

(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2013-507968

(P2013-507968A)

(43) 公表日 平成25年3月7日(2013.3.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 H O 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 187 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-535402 (P2012-535402)	(71) 出願人	500287639
(86) (22) 出願日	平成22年10月22日 (2010.10.22)		ミレニアム ファーマシューティカルズ、 インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成24年3月30日 (2012.3.30)		MILLENNIUM PHARMACE UTICALS, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/053686		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 1 3 9, ケンブリッジ, ランズタウン ストリート 40
(87) 国際公開番号	W02011/050242	(71) 出願人	512061940
(87) 国際公開日	平成23年4月28日 (2011.4.28)		アムジェン ブリティッシュ コロンビア カナダ国 ブイ5エー 1ブイ7 ブリテ イッシュ コロンビア, バーナビー, エンタープライズ ストリート 7990
(31) 優先権主張番号	61/254,474	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成21年10月23日 (2009.10.23)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗GCC分子と関連組成物および方法

(57) 【要約】

GCCに結合する抗体およびGCCに結合する抗体の抗原結合断片が開示される。この抗体は、GCCの細胞外ドメインに結合し、内部移行され得る。いくつかの実施形態では、この抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはヒト抗体である。この抗体またはその部分をコードする核酸およびベクター、この核酸を含有する組換え細胞、ならびにこの抗体または抗原結合断片を含む組成物も開示される。本発明はまた、本明細書において提供される抗体および抗原結合断片を利用する治療方法および診断方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗 G C C 抗体分子であって、該抗 G C C 抗体分子の軽鎖可変領域および重鎖可変領域が、以下の抗体：

5 F 9、

A b 2 2 9、または

3 G 1

のいずれか 1 つについて表 2 に開示される軽鎖配列および重鎖配列から選択される、抗 G C C 抗体分子。

【請求項 2】

I g G 1 抗体である、請求項 1 に記載の抗 G C C 抗体分子。

【請求項 3】

治療剤と結合体化させていない、請求項 1 に記載の抗 G C C 抗体分子。

【請求項 4】

治療剤と結合体化させている、請求項 1 に記載の抗 G C C 抗体分子。

【請求項 5】

検出可能な標識と結合体化させている、請求項 1 に記載の抗 G C C 抗体分子。

【請求項 6】

以下の抗体：

5 F 9、

A b 2 2 9、または

3 G 1

のいずれか 1 つについて表 5 に開示される、軽鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 ならびに重鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む抗 G C C 抗体分子。

【請求項 7】

ヒトの軽鎖可変領域フレームワークおよび重鎖可変領域フレームワークまたはヒト由来の軽鎖可変領域フレームワークおよび重鎖可変領域フレームワークをさらに含む、請求項 6 に記載の抗 G C C 抗体分子。

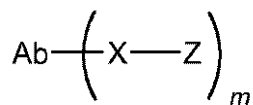
【請求項 8】

I g G 1 抗体である、請求項 7 に記載の抗 G C C 抗体分子。

【請求項 9】

式 (I) の免疫結合体：

【化 6 7】



(I)

またはその薬学的に許容される塩

(式中、

A b は、請求項 1 に記載の抗 G C C 抗体分子であり、

X は、A b と Z を接続するリンカー成分であり、

Z は、治療剤または標識であり、

m は、1 ~ 1 5 の整数である) 。

【請求項 1 0】

Z は、検出可能な標識である、請求項 9 に記載の免疫結合体。

【請求項 1 1】

- Z は、メイタンシンまたはアウリスタチンである、請求項 9 に記載の免疫結合体。

【請求項 1 2】

- Z は、D M 1 または D M 4 である、請求項 9 に記載の免疫結合体。

【請求項 1 3】

10

20

30

40

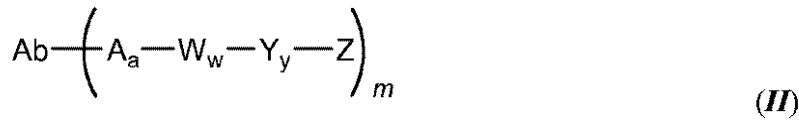
50

- Z は、MMAE または MMAF である、請求項 9 に記載の免疫結合体。

【請求項 14】

前記リンカー - X - は式 - A_a - W_w - Y_y - を有し、前記免疫結合体は式 (II) に
よって特徴付けられる、請求項 9 に記載の免疫結合体

【化 68】



またはその薬学的に許容される塩

10

(式中、

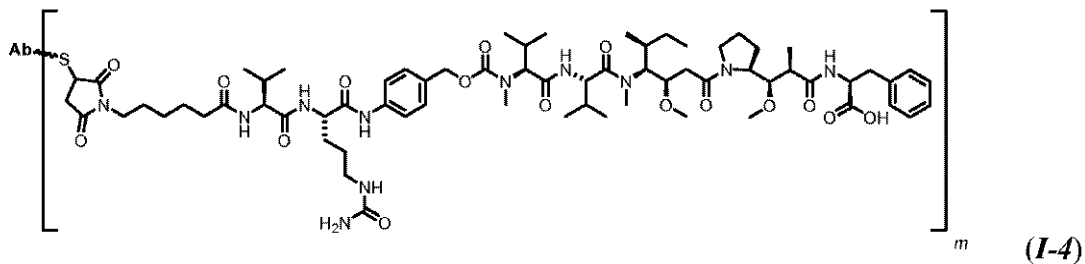
- A - は、ストレッチャー単位であり、
a は、0 または 1 であり、
- W - は、それぞれ独立して、アミノ酸単位であり、
w は、0 ~ 12 の範囲の整数であり、
- Y - は、自壊的スペーサー単位であり、
y は、0、1、または 2 であり、
Z は、治療剤または標識であり、
m は、約 1 ~ 約 15 の範囲にある)。

【請求項 15】

20

式 (I-4) の免疫結合体

【化 69】



30

またはその薬学的に許容される塩

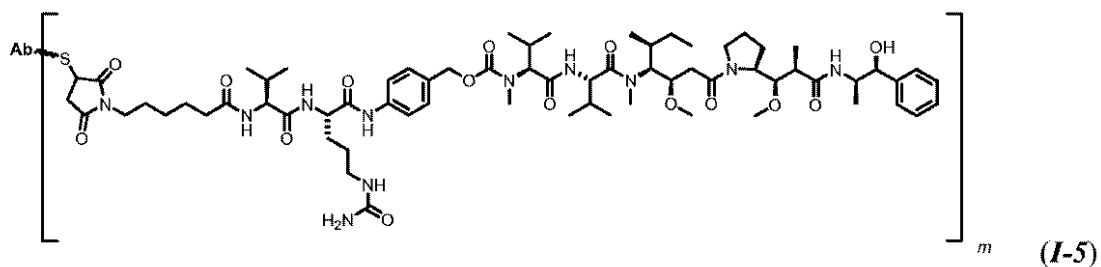
(式中、

A b は、5 F 9 であり、
m は、1 ~ 8 の整数である)。

【請求項 16】

式 (I-5) の免疫結合体

【化 70】



40

またはその薬学的に許容される塩

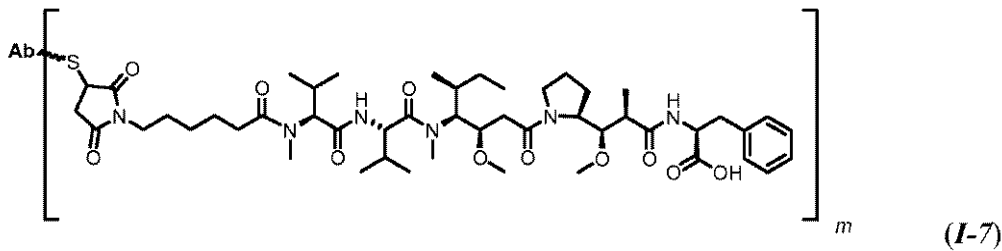
(式中、

A b は、5 F 9 であり、
m は、1 ~ 8 の整数である)。

【請求項 17】

50

式 (I - 7) に記載の免疫結合体
【化 7 1】



またはその薬学的に許容される塩

(式中、

A b は、5 F 9 であり、

m は、1 ~ 8 の整数である)。

【請求項 1 8】

m は 1 ~ 3 である、請求項 1 5 に記載の免疫結合体。

【請求項 1 9】

m は 3 ~ 5 である、請求項 1 5 に記載の免疫結合体。

【請求項 2 0】

m は 3 ~ 5 である、請求項 1 6 に記載の免疫結合体。

【請求項 2 1】

m は 3 ~ 5 である、請求項 1 8 に記載の免疫結合体。

【請求項 2 2】

被験体の結腸がんを処置する方法であって、請求項 1 または 6 に記載の抗体分子の治療有効量を該被験体に投与し、それによって該被験体を処置する工程を含む方法。

【請求項 2 3】

被験体の結腸がんを処置する方法であって、請求項 9 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の免疫結合体の治療有効量を該被験体に投与する工程を含む方法。

【請求項 2 4】

請求項 1 または 6 に記載の抗体分子をコードする単離核酸配列。

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載の単離核酸配列を含む細胞。

【請求項 2 6】

請求項 1 または 6 に記載の抗体分子を産生する方法であって、抗体分子の産生を可能にする条件下で請求項 2 5 に記載の細胞を培養し、それによって請求項 1 または 6 に記載の抗体分子を産生する工程を含む方法。

【請求項 2 7】

請求項 1 または 6 に記載の抗体分子の軽鎖および重鎖の一方または両方を含むベクター。

【請求項 2 8】

G C C 分子を検出する方法であって、該分子を請求項 1 または 6 に記載の抗体分子と接触させる工程と、該抗体分子が該 G C C 分子に結合するかどうかを決定する工程とを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願への相互参照

本願は、2009年10月23日に提出された米国仮特許出願第61/254,474号の利益を主張する。米国仮特許出願第61/254,474号の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。

【0 0 0 2】

10

20

30

40

50

発明の分野

本発明は、GCCに結合する抗体分子ならびに関連する分子、たとえば、そのような抗体分子をコードする核酸、組成物、ならびに関連する方法、たとえば治療方法および診断方法に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

グアニリルシクラーゼC (GCC) は、腸液の維持、電解質の恒常性、および細胞増殖において機能する膜貫通細胞表面受容体であり、たとえばCarrithersら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100巻：3018～3020頁(2003年)を参照されたい。GCCは、小腸、大腸、および直腸を裏打ちする粘膜細胞で発現される(Carrithersら、Dis Colon Rectum 39巻：171～181頁(1996年))。GCCの発現は、すべての原発性および転移性結腸直腸腫瘍における発現と同様に、腸上皮細胞の新生物性形質転換に際して維持される(非特許文献1；非特許文献2；非特許文献3)。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Carrithersら、Dis Colon Rectum 39巻：171～181頁(1996年)

20

【非特許文献2】Bucら Eur J Cancer 41巻：1618～1627頁(2005年)

【非特許文献3】Carrithersら、Gastroenterology 107巻：1653～1661頁(1994年)。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、ヒト抗体およびマウス抗体の両方を含む多数の抗GCC抗体を発見した。したがって、一態様では、本発明は、本明細書において開示されるように、抗GCC抗体分子を特徴とする。抗GCC抗体分子は、裸の抗体分子(naked antibody molecule)としても、免疫結合体(immun conjugate)の構成要素としても有用である。したがって、他の態様では、本発明は、抗GCC抗体分子と、治療剤または標識とを含む免疫結合体を特徴とする。本発明はまた、本明細書に記載の抗GCC抗体分子および免疫結合体を含む薬学的組成物を特徴とする。本発明はまた、GCCおよびGCCを発現する細胞または組織の検出；GCC媒介性の疾患の診断、予後、画像診断、または病期分類；GCCタンパク質の活性または機能の調整；ならびに本明細書に記載のGCC媒介性の疾患の処置のための、本明細書に記載の抗GCC抗体分子および免疫結合体を使用する方法を特徴とする。他の態様では、本発明はまた、抗GCC抗体分子アミノ酸配列をコードする単離および/または組換え核酸、ならびにそのような核酸を含むベクターおよび宿主細胞、ならびに抗GCC抗体分子を産生するための方法を特徴とする。

30

40

【0006】

本明細書に記載の刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献はすべて、それらの全体が参照によって組み込まれる。

【0007】

本明細書において開示される本発明(複数可)の他の特徴、目的、および利点は、本明細書および図面からならびに本特許請求の範囲から明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、5F9vc-MMAF、5F9vc-DM1、および5F9vc-DM

50

4を用いてq14dスケジュールで処置した、293-GCC#2担持SCIDマウスにおける腫瘍の成長を示す。

【図2】図2は、接種後(p.i.)41日目に、0.9%NaCl;40mg/kgの209抗体;または10mg/kgまたは40mg/kgの5F9抗体を用いて処置したマウスの肺の重量を示す。

【図3】図3は、5F9抗体で処置した、CT26-hGCC腫瘍担持マウスの生存曲線を示す。

【図4】図4は、GCCオルソログの抗体交差反応性を試験するためのELISA結合アッセイを示す。

【発明を実施するための形態】

【0009】

グアニリルシクラーゼC

グアニリルシクラーゼC(GCC)(STAR、ST受容体、GUC2C、およびGUCY2Cとしても公知)は、腸液の維持、電解質の恒常性、および細胞増殖において機能する膜貫通細胞表面受容体である(それぞれが参照によって本明細書において組み込まれるCarrithersら、Proc Natl Acad Sci USA 100巻:3018~3020頁(2003年);Mannら、Biochem Biophys Res Commun 239巻:463~466頁(1997年);Pitarisら、Proc Natl Acad Sci USA 100巻:2695~2699頁(2003年));GenBank受託番号NM_004963)。この機能は、グアニリンの結合を通して媒介される(Wiegandら、FEBS Lett. 311巻:150~154頁(1992年))。GCCはまた、E.coliおよび他の感染性生物によって産生されるペプチドである耐熱性エンテロトキシン(たとえば、NTFYCCELCCNPACAGCY、配列番号316のアミノ酸配列を有するST)に対する受容体でもある(Rao, M.C. Ciba Found. Symp. 112巻:74~93頁(1985年);Knoop F.C.およびOwens, M.J. Pharmacol. Toxicol. Methods 28巻:67~72頁(1992年))。GCCへのSTの結合は、腸疾患、たとえば下痢をもたらすシグナルカスケードを活性化する。

【0010】

ヒトGCCについてのヌクレオチド配列(GenBank受託番号NM_004963):

【0011】

10

20

30

【化 1】

1 atgaagacgt tgctgttggga ctggccttg tggcactgc tctccagcc cgggtggctg
61 tccttagtt cccaggtgag tcagaactgc cacaatggca gctatgaaat cagcgtcctg
121 atgatgggca actcagcctt tgcagagccc ctgaaaaact tggagatgc ggtgaatgag
181 gggctggaaa tagtgagagg acgtctgcaa aatgctggcc taaatgtgac tgtgaacgct
241 acttcatgt atcggatgg tctgattcat aactcaggcg actgccggag tagcacctgt
301 gaaggcctcg acctactcag gaaaattca aatgcacaac ggatgggctg tgcctcata
361 gggccctcat gtacatactc caccttcag atgtacctg acacagaatt gagctacccc
421 atgatctcag ctggaagttt tggattgca tgtgactata aagaaacctt aaccaggctg
481 atgtctccag ctagaaagtt gatgtacttc ttggtaact tttggaaaac caacgatctg
541 ccctcaaaa cttattcctg gagcacttcg tatgtttaca agaatggtac agaaactgag
601 gactgtttct ggtacctaa tgctctggag gctagcgttt cctatttctc ccacgaactc
661 ggctttaaagg tgggtftaag acaagataag gagtttcagg atatcttaat ggaccacaac

10

20

【 0 0 1 2 】

【化 2】

721 aggaaaagca atgtgattat tatgtgtggt ggtccagagt tctctacaa gctgaagggt
 781 gaccgagcag tggctgaaga cattgtcatt attctagtgg atctttcaa tgaccagtac
 841 tttgaggaca atgtcacagc cctgactat atgaaaaatg tccftgtct gacgctgtct
 901 cctgggaatt ccttctaaa tagctcttc tccaggaatc taccaccaac aaaacgagac
 961 tttgctcttg cctatttgaa tggaatcctg ctctttggac atatgctgaa gatattctt 10
 1021 gaaaatggag aaaatattac cacccccaaa tttgctcatg ctctcaggaa tctcactttt
 1081 gaagggtatg acgggtccagt gaccttggat gactgggggg atgttgacag taccatgggtg
 1141 ctctgtata cctctgtgga caccaagaaa tacaagggtc tttgaceta tgataccac
 1201 gtaaataaga cctatcctgt ggatatgagc cccacattca ctggaagaa ctctaaactt
 1261 cctaatgata ttacaggccg gggccctcag atcctgatga ttgcagtctt caccctact
 1321 ggagctgtgg tctgtctct gctgtctgct ctctgatgc tcagaaaata tagaaaagat 20
 1381 tatgaactc gtcagaaaa atggfccac attcctctg aaaatatctt tctctggag
 1441 accaatgaga ccaatcatgt tagcctcaag atcgatgatg acaaaagacg agatacaatc
 1501 cagagactac gacagtgcaa atacgacaaa aagcgagtga ttctcaaaga tctcaagcac
 1561 aatgatgga atttactga aaaacagaag atagaattga acaagttgct tcagattgac
 1621 tattacaacc tgaccaagtt ctacggcaca gtgaaacttg ataccatgat ctctgggggtg
 1681 atagaatact gtgagagagg atccctccgg gaagttftaa atgacacaat ttctaccct 30
 1741 gatggacat tcatggattg ggagttaag atctctgtct tgtatgacat tgctaaggga
 1801 atgtcatatc tgcactccag taagacagaa gtccatggtc gtctgaaatc taccaactgc
 1861 gtagtggaca gtagaatggt ggtgaagatc actgattttg gctgcaatc cattttacct
 1921 ccaaaaaagg acctgtggac agctccagag cacctccgcc aagccaacat ctctcagaaa
 1981 ggagatgtgt acagctatgg gatcatcgca caggagatca tctgctggaa agaaacctc
 2041 tacacttga gctgtcggga ccggaatgag aagatttca gactggaaaa ttccaatgga 40
 2101 atgaaacct tccgccaga ttattcttg gaaacagcag aggaaaaaga gctagaagtg
 2161 tactacttg taaaaactg ttggaggaa gatccagaaa agagaccaga ttcaaaaaa
 2221 attgagacta cactfgccaa gatatttga ctfttcatg accaaaaaaa tgaagctat

【 0 0 1 3 】

【化3】

2281 atggatacct tgatccgacg tctacagcta tattctcgaa acctggaaca tctggtagag
 2341 gaaaggacac agctgfataa ggcagagagg gacagggtg acagacttaa cttatgttg
 2401 ctccaaggc tagtggtaaa gtctctgaag gagaaaggct ttgtggagcc ggaactatat
 2461 gaggaagta caatctactt cagtgcatt gtaggttca ctactatctg caatacagc
 2521 accccatgg aagtgggga catgcttaat gacatctata agagtttga ccacattgt
 2581 gatcatcatg atgtctaaa ggtggaaacc atcggtgatg cgtacatggt ggctagtgg
 2641 ttgctaaga gaaatggcaa tcggcatgca atagacattg ccaagatggc cttggaaatc
 2701 etcagctca tggggacctt tgagctggag catcttctg gcctccaat atggatcgc
 2761 attggagttc actctgtcc ctgtctgtg ggagttgtg gaatcaagat gcctcgttat
 2821 tgtctattg gagatacgg caacacagcc tctaggatgg aatccactgg cctcccttg
 2881 agaattcag tgagtggctc caccatagcc atcctgaaga gaactgagtg ccagttcct
 2941 tatgaagtga gaggagaaac atactaaag ggaagaggaa atgagactac ctactggctg
 3001 actgggatga aggaccagaa attcaacctg ccaaccctc ctactgtgga gaatcaacag
 3061 cgtttgcaag cagaatttc agacatgatt gccactctt tacagaaaag acagcgagca
 3121 gggataagaa gccaaaaacc cagacgggta gccagctata aaaaaggcac tctggaatac
 3181 ttgcagctga ataccacaga caaggagagc acctatttt aa

10

20

(配列番号 :227)

30

ヒトGCCについてのアミノ酸配列 (GenPept 受託番号 NP__004954) :

【0014】

【化4】

1 mktllldlal wslfqpgwl sfssqvsqnc hngsy eisvl mmgnsafaep lknledavne
 61 gleivrglrq naglnvtvna tfmysdglh nsgdcrsstc egldllrkis naqrmgevli
 121 gpstystfq myldtelsyp misagsfgls cdyketltrl msparklmyf lvnfwktn dl
 181 pfkty swsts vvykngtete dcfwylnale asvsyfshel gfkvvlrqdk efqdlmdhn
 241 rksnviimeg gpeflyklkg dravaedivi ilvdlfindqy fednvtapdy mknvlvltls
 301 pgnslnssf smlsptkrd falaylngil lfghmlkifl engenittpk fahafnltf

40

【0015】

【化5】

361 egydgpvtld dwgdvdstmv llytsvdtkk ykvlltydth vnktypvdms ptftwknskl
 421 pnditgrgpq ilmiavftlt gavvllllva llmlrkyrkd yelrqkkwsh ippenifple
 481 tnetnhvslk idddkrrdti qrlrqckydk krvilkdikh ndgnftekqk ielnkllqid
 541 yynltkfygt vkldtmifgv ieycergslr evlndtisyp dgtfmdwefk isvlydiakg
 601 msylhsskte vhgrikstnc vvdsrmvcki tdfgensilp pkkdlwtape hlrqanisqk
 661 gdvysygiia qeillrketf ytlscrdne kifrvensng mkpfrpdlfl etaeekelev
 721 yllvknewee dpekrpdfkk iettlakifg lfhdqknesy mdtlirrlql ysrnlehlve
 781 ertqlykaer dradrlnfml lprlvvkslk ekgfvepely eevtiyfsdi vgfttickys
 841 tpmevvdmln diyksfdhiv dhhdvykvet igdaymvasg lprkngnrha idiakmalei
 901 lsfmgftele hlpplpiwir igvhsgpcaa gvgikmpy clfgdtvnta srmestglpl
 961 rihvsgstia ilkrtecqfl yevrgetylk grgnettywl tgmkdqkfnl ptpptvenqq
 1021 rlqaefsdmi anslqkrqaa girsqkprv asykkgtley lqlnttdkes tyf

10

20

(配列番号 :228)

GCCタンパク質は、それぞれがGCC分子に分離可能な機能を提供する、いくつかの一般に認められたドメインを有する。GCCの部分は、配列番号228のアミノ酸残基1～残基約23または残基1～残基約21のシグナル配列（細胞表面にタンパク質を誘導するための）（成熟のために切り取られて、配列番号228のアミノ酸残基約22または24～1073の機能的成熟タンパク質を産出する）、配列番号228のアミノ酸残基約24～残基約420または残基約54～残基約384に結合するリガンド、たとえばグアニリンまたはSTに対する細胞外ドメイン、配列番号228のアミノ酸残基約431～残基約454または残基約436～残基約452の膜貫通ドメイン、配列番号228のアミノ酸残基約489～残基約749または残基約508～残基約745の、チロシンキナーゼ活性を有することが予測されるキナーゼ相同性ドメイン、および配列番号228の残基約750～残基約1007または残基約816～残基約1002のグアニリルシクラーゼ触媒ドメインを含む。

30

【0016】

正常なヒト組織において、GCCは、小腸、大腸、および直腸を裏打ちする粘膜細胞で、たとえば、先端の刷子縁膜で発現される（Carrithersら、Dis Colon Rectum 39巻：171～181頁（1996年））。GCCの発現は、すべての原発性および転移性結腸直腸腫瘍における発現と同様に、腸上皮細胞の新生物性形質転換に際して維持される（Carrithersら、Dis Colon Rectum 39巻：171～181頁（1996年）；Bucら Eur J Cancer 41巻：1618～1627頁（2005年）；Carrithersら、Gastroenterology 107巻：1653～1661頁（1994年））。胃、食道、および胃食道接合部由来の新生物性細胞もまた、GCCを発現する（たとえば米国特許第6,767,704号；Debruyneら Gastroenterology 130巻：1191～1206頁（2006年）を参照されたい）。その組織特異的発現およびがん、たとえば胃腸起源のがん（たとえば結腸がん、胃がん、または食道がん）との関連は、この疾患についての診断マーカーとしてのGCCの使用のために活用することができる（Carrithersら、Dis Colon Rectum 39巻：171～1

40

50

81頁(1996年); Bucra Eur J Cancer 41巻:1618~1627頁(2005年)。

【0017】

細胞表面タンパク質として、GCCはまた、抗体またはリガンドなどの受容体結合タンパク質についての治療用標的として役立つことができる。正常な腸組織において、GCCは、管腔環境および血管区画の間の不透過性障壁を形成する上皮細胞密着結合の先端側で発現される(Almenoffら、Mol Microbiol 8巻:865~873頁); Guarinoら、Dig Dis Sci 32巻:1017~1026頁(1987年)。そのため、GCC結合タンパク質治療薬の全身静脈内投与により、それは侵襲性または転移性結腸がん細胞、腸管外または転移性結腸腫瘍、食道腫瘍または胃腫瘍、胃食道接合部の腺癌を含む胃腸系の新生物性細胞に到達するが、腸GCC受容体に最小限の影響しか有していない。さらに、GCCは、リガンド結合に際して、受容体媒介性のエンドサイトーシスを通して内部移行する(Bucra Eur J Cancer 41巻:1618~1627頁(2005年); Urbanskiら、Biochem Biophys Acta 1245巻:29~36頁(1995年))。

10

【0018】

GCCの細胞外ドメインに対して産生されたポリクローナル抗体(Nandira Protein Expr. Purif. 8巻:151~159頁(1996年))は、ヒトおよびラットGCCに結合するSTペプチドを阻害し、かつヒトGCCによるST媒介性のcGMP産生を阻害することができた。

20

【0019】

GCCは、結腸がんを含むがんに関与するタンパク質として特徴付けられている。Carrithersら、Dis Colon Rectum 39巻:171~181頁(1996年); Bucra Eur J Cancer 41巻:1618~1627頁(2005年); Carrithersら、Gastroenterology 107巻:1653~1661頁(1994年); Urbanskiら、Biochem Biophys Acta 1245巻:29~36頁(1995年)も参照されたい。GCCに対する抗体分子治療薬は、非結合体形態で単独で使用して、それによってGCC発現がん性細胞を阻害することができる。本発明の抗GCC抗体分子は、ヒトGCCに結合することができる。いくつかの実施形態では、本発明の抗GCC抗体分子は、リガンド、たとえばグアニリンまたは耐熱性エンテロトキシンのGCCへの結合を阻害することができる。他の実施形態では、本発明の抗GCC抗体分子は、リガンド、たとえばグアニリンまたは耐熱性エンテロトキシンのGCCへの結合を阻害しない。

30

【0020】

GCCに特異的なモノクローナル抗体は、GCC:B10(Nandira, J. Cell. Biochem. 66巻:500~511頁(1997年))、GCC:4D7(Vijayachandraら Biochemistry 39巻:16075~16083頁(2000年))、およびGCC:C8(Bakreら Eur. J. Biochem. 267巻:179~187頁(2000年))を含む。GCC:B10は、カッパ軽鎖およびIgG2aアイソタイプを有し、かつラット、ブタ、およびサルGCCに交差反応する。GCC:B10は、GCCの細胞内ドメイン、特に配列番号228の残基470~480の最初の63のアミノ酸に結合する(Nandira Protein Sci. 7巻:2175~2183頁(1998年))。GCC:4D7は、GCCの残基491~568内のキナーゼ相同性ドメインに結合する(Bhandariら Biochemistry 40巻:9196~9206頁(2001年))。GCC:C8は、GCCの細胞質部分におけるプロテインキナーゼ様ドメインに結合する。

40

定義および方法

本明細書において他に定義されない限り、本発明に関連して使用される科学用語および専門用語は、当業者によって共通して理解される意味を有する。一般に、本明細書に記載の細胞培養および組織培養、分子生物学、ならびにタンパク質およびオリゴヌクレオチド

50

またはポリヌクレオチドの化学およびハイブリダイゼーションに関連して利用される命名法ならびにそれらの技術は、当技術分野において公知であるものである。GenBank受託番号またはGenPept受託番号ならびに有用な核酸配列およびペプチド配列は、National Center for Biotechnological Information、Bethesda MDによって維持されるウェブサイトで見出すことができる。標準的な技術は、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、および組織培養、ならびに形質転換およびトランスフェクション（たとえばエレクトロポレーション、リポフェクション）に使用される。酵素反応および精製技術は、製造業者の説明書に従ってまたは当技術分野において共通して行われるようにまたは本明細書に記載のとおり実行される。前述の技術および手順は、たとえば、本明細書の全体にわたって記載され、議論される様々な、一般的なおよびより特定の参考文献に記載のとおり、当技術分野において公知の方法に従って一般に実行される。たとえばSambrookら Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.（2000年））を参照されたい、または一般に、Harlow, E.およびLane, D.（1988年）Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NYを参照されたい。本明細書に記載の分析化学、有機合成化学、ならびに医薬品化学および薬化学に関連して利用される命名法ならびにその検査法および技術は、当技術分野において公知である。標準的な技術は、化学合成、化学分析、医薬品の調製、処方、および送達、ならびに患者の処置に使用される。さらに、文脈によって他に定めがない限り、単数形の用語は、複数形を含むものとし、複数形の用語は、単数形を含むものとする。

10

20

30

40

50

【0021】

本明細書において使用されるように、用語「抗体分子」は、抗体、抗体ペプチド（複数可）、もしくは免疫グロブリンまたは前述のもの、たとえば抗体のいずれかの抗原結合断片を指す。抗体分子は、単鎖抗体分子、たとえばscFv（たとえばBirdら（1988年）Science 242巻：423～426頁およびHoustonら（1988年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85巻：5879～5883頁）を参照されたい）、ならびに単ドメイン抗体分子（たとえばWO9404678を参照されたい）を含む。用語「抗体分子」の範囲内にはないが、本発明はまた、「抗体アナログ（複数可）」、他の非抗体分子タンパク質ベースのスクフォールド、たとえば、特異的な抗原結合を提供するためにCDRを使用する融合タンパク質および/または免疫結合体をも含む。

【0022】

「抗GCC抗体分子」は、GCC、たとえばヒトGCCと相互作用し、またはそれを認識する、たとえばそれに結合する（たとえば特異的に結合する）抗体分子（つまり抗体、抗体の抗原結合断片、または抗体アナログ）を指す。例示的な抗GCC抗体分子は、表1および表2に要約されるものなどである。

【0023】

本明細書において使用されるように、用語「抗体」、「抗体ペプチド（複数可）」、または「免疫グロブリン」は、単鎖、二本鎖、および複数鎖タンパク質および糖タンパク質を指す。抗体という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、およびヒト抗体またはヒト化抗体を含み、これらはすべて、本明細書における他のところでより詳細に議論される。ラクダ科の動物の抗体（たとえばUS2005/0037421を参照されたい）、およびナノボディ、たとえばIgNAR（サメ抗体）（たとえばWO03/014161を参照されたい）もまた、用語の範囲内に含まれる。用語「抗体」はまた、合成改変体および遺伝子操作された改変体をも含む。

【0024】

本明細書において使用されるように、用語「抗体断片」または抗体の「抗原結合断片」

は、たとえば Fab、Fab'、F(ab')₂、および Fv 断片、単鎖抗体、機能的重鎖抗体（ナノボディ）ならびに特異的な結合について完全な抗体と競合する、少なくとも 1 つの所望のエピトープに対して特異性を有する抗体の任意の部分（たとえば、エピトープに特異的に結合するのに十分な CDR 配列を有し、かつ十分なフレームワーク配列を有する断片）を指す。たとえば、抗原結合断片は、その断片が誘導される抗体に結合するエピトープへの結合について競合することができる。誘導されるとは、このおよび同様の文脈において使用されるように、誘導の任意の特定の手法またはプロセスを意味しないが、単に配列類似性を指し得る。抗原結合断片は、組換え技術によってまたは完全な抗体の酵素的切断もしくは化学的切断によって、産生することができる。抗原結合断片という用語は、単鎖、たとえば軽鎖および重鎖を有する抗体のうちの重鎖と共に使用される場合、鎖の断片が、他方の鎖、たとえば軽鎖の完全可変領域と対になる場合に、それが、重鎖および軽鎖可変領域全体で見られるものの少なくとも 25、50、75、85、または 90% の結合を可能にするのに十分であることを意味する。

10

【0025】

用語「CDR の抗原結合集合体」または「結合を可能にするのに十分な多くの CDR」（および同様の言葉）は、本明細書において使用されるように、フレームワークに配置され、かつ他方の鎖の完全可変領域とまたは同様の長さで、同数の CDR を有する他方の鎖の可変領域、たとえば軽鎖の一部と対になる場合に、重鎖および軽鎖可変領域全体で見られるもののたとえば少なくとも 25、50、75、85、または 90% の結合を可能にするのに十分な鎖、たとえば重鎖の CDR を指す。

20

【0026】

本明細書において使用されるように、用語「ヒト抗体」は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウス（たとえば XENOMOUSE（商標）遺伝子操作マウス（Abgenix、Fremont、CA））、ヒトファージディスプレイライブラリー、ヒトミエローム細胞、またはヒト B 細胞から誘導される抗体などの、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列から誘導される配列を有する抗体を含む。

【0027】

本明細書において使用されるように、用語「ヒト化抗体」は、親抗体の抗原結合特性を保持する、または実質的に保持するが、ヒトにおいてそれほど免疫原性ではない非ヒト抗体、たとえばげっ歯動物（たとえばマウス）から誘導される抗体を指す。本明細書において使用されるヒト化は、脱免疫抗体（deimmunized antibody）を含むように意図される。典型的に、ヒト化抗体は、非ヒト CDR、ヒトまたはヒト誘導のフレームワーク領域およびヒトまたはヒト誘導の定常領域を含む。

30

【0028】

本明細書において使用される用語「改変」抗体は、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現される抗体、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離される抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックな動物（たとえばマウス、ヒツジ、もしくはヤギ）から単離される抗体、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他の DNA 配列へのスプライシングを伴う任意の他の手段によって調製される、発現される、生成される、もしくは単離される抗体などの、組換え手段によって調製される、発現される、生成される、または単離される抗体を指す。そのような改変抗体は、ヒト化抗体、CDR 移植抗体（たとえば、第 1 の抗体由来の CDR および異なる供給源、たとえば第 2 の抗体またはコンセンサスフレームワーク由来のフレームワーク領域を有する抗体）、キメラ抗体、in vitro 生成（たとえばファージディスプレイによって）抗体を含み、必要に応じて、代替の免疫グロブリン配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを伴う任意の手段によって調製される、発現される、生成される、または単離される、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列またはヒト免疫グロブリン遺伝子もしくは抗体から誘導される可変領域または定常領域を含んでいてもよい。実施形態では、改変抗体分子は、参照抗体からの配列の変化を有する抗体分子を含む。

40

【0029】

50

用語「単一特異性抗体」は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性および結合親和性を示す抗体または抗体調製物を指す。この用語は、「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」を含む。

【0030】

用語「二重特異性抗体」または「二機能性抗体」は、2つのエピトープに対して二重の結合特異性を示す抗体を指し、それぞれの結合部位は異なり、異なるエピトープを認識する。

【0031】

用語「非結合体化抗体」および「裸の抗体」は、非抗体成分、たとえば治療剤または標識と結合体化させていない抗体分子を指すように区別なく使用される。

10

【0032】

用語「免疫結合体」、「抗体結合体」、「抗体薬物結合体」、および「ADC」は、区別なく使用され、非抗体成分、たとえば治療剤または標識と結合体化させている抗体を指す。

【0033】

用語「作用物質」は、化合物、化合物の混合物、生体高分子、または生物学的材料から作製される抽出物を示すために本明細書において使用される。用語「治療剤」は、生物学的活性を有する作用物質を指す。

【0034】

用語「抗がん剤」または「化学療法剤」は、ヒトにおける新生物、特に、癌腫、肉腫、リンパ腫、または白血病などの悪性（がん性）病変の発症または進行を阻害する機能的な特性を有する作用物質を指すために本明細書において使用される。転移または新脈管形成の阻害は、抗がん剤または化学療法剤の特性であることが多い。化学療法剤は、細胞傷害剤または細胞増殖抑制剤であってもよい。用語「細胞増殖抑制剤」は、細胞成長および/または細胞の増殖を阻害または抑制する作用物質を指す。

20

【0035】

「細胞傷害剤」は、アルキル化剤、腫瘍壊死因子阻害剤、干渉物質、微小管阻害剤、キナーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、およびトポイソメラーゼ阻害剤を含むが、これらに限定されない、主として、細胞の機能に直接干渉することによって細胞死を引き起こす化合物を指す。本明細書において使用される「毒素負荷量」は、細胞に送達される場合に、細胞死をもたらす、十分な量の細胞傷害剤を指す。毒素負荷量の送達は、本発明の抗体または抗原結合断片および細胞傷害剤を含む、十分な量の免疫結合体の投与によって行われてもよい。毒素負荷量の送達はまた、細胞傷害剤を含む、十分な量の免疫結合体の投与によって行われてもよく、免疫結合体は、本発明の抗体または抗原結合断片を認識し、かつ結合する第2の抗体またはその抗原結合断片を含む。

30

【0036】

本明細書において使用されるように、語句「から誘導される」または「指定される配列に対して特異的な」配列は、たとえば、指定される配列の隣接領域に対応する、つまり同一であるまたは相補的である、おおよそ、少なくとも6個のヌクレオチドもしくは少なくとも2個のアミノ酸、少なくとも約9個のヌクレオチドもしくは少なくとも3個のアミノ酸、少なくとも約10~12個のヌクレオチドもしくは4個のアミノ酸、または少なくとも約15~21個のヌクレオチドもしくは5~7個のアミノ酸の隣接配列を含む配列を指す。ある実施形態では、配列は、指定されるヌクレオチド配列またはアミノ酸配列をすべて含む。配列は、当技術分野における公知の技術によって決定される、特定の配列に特有である配列領域に相補的であってもよい（ポリヌクレオチド配列の場合には）または同一であってもよい。配列が誘導されてもよい領域は、特異的なエピトープをコードする領域、CDRをコードする領域、フレームワーク配列をコードする領域、定常ドメイン領域をコードする領域、可変ドメイン領域をコードする領域、ならびに非翻訳および/または非転写領域を含むが、これらに限定されない。誘導配列は、必ずしも、研究中の、対象の配列から物理的に誘導されないが、ポリヌクレオチドが誘導される領域（複数可）中の塩基

40

50

の配列によって提供される情報に基づき、化学合成、複製、逆転写、または転写を含むが、これらに限定されない、任意の方法において生成されてもよい。そのため、それは、元のポリヌクレオチドのセンスまたはアンチセンス配向のいずれかを表わしてもよい。さらに、指定される配列の領域に対応する領域の組み合わせは、意図される使用と一致するように、当技術分野において公知の方法において改変されても組み合わせられてもよい。たとえば、配列は、それぞれ、指定される配列の一部を含み、かつ指定される配列と同一でない領域により中断される2つ以上の隣接配列を含んでいてもよいが、指定される配列から誘導される配列を表わすように意図される。抗体分子に関して、「それから誘導される」は、比較抗体に機能的にまたは構造的に関連する抗体分子を含む、たとえば、「それから誘導される」は、類似するか、または実質的に同じ配列または構造物を有する、たとえば、同じまたは類似するCDR、フレームワーク領域または可変領域を有する抗体分子を含む。抗体についての「それから誘導される」はまた、隣接していても隣接していなくてもよいが、番号付け方式または一般的な抗体構造に対する相同性または三次元の近似に従って明確化または同定される、つまり、比較配列のCDRまたはフレームワーク領域内の残基、たとえば1つ以上の、たとえば2、3、4、5、または6以上の残基をも含む。用語「それから誘導される」は、それから物理的に誘導されることに限定されないが、任意の方法による、たとえば他の抗体を設計するための、比較抗体由来の配列情報の使用による生成を含む。

10

【0037】

本明細書において使用されるように、語句「によってコードされる」は、ポリペプチド配列をコードする核酸配列を指し、そのポリペプチド配列またはその部分は、その核酸配列によってコードされるポリペプチド由来の少なくとも3～5個のアミノ酸、少なくとも8～10個のアミノ酸、または少なくとも15～20個のアミノ酸のアミノ酸配列を含む。

20

【0038】

2つの配列の間の「相同性」の計算は、以下のとおり実行することができる。配列は、最適な比較目的のためにアライメントされる（たとえば、ギャップは、最適なアライメントのために、第1のおよび第2のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方に導入することができる、非相同配列は、比較目的のために無視することができる）。比較目的のためにアライメントされる参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、40%、または50%、少なくとも60%、または少なくとも70%、80%、90%、95%、100%である。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドは、比較される。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められる場合、分子は、その位置で同一となる（本明細書において使用されるように、アミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸「相同性」と等価である）。2つの配列の間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアライメントのために導入される必要があるギャップの数およびそれぞれのギャップの長さを考慮に入れた、配列によって共有される同一の位置の数の関数である。

30

【0039】

配列の比較および2つの配列の間の相同性パーセントの決定は、数学的なアルゴリズムを使用して行うことができる。2つのアミノ酸配列の間の相同性パーセントは、当技術分野において公知の任意の方法を使用して決定することができる。たとえば、NeedlemanおよびWunsch (J. Mol. Biol. 48巻: 444～453頁 (1970年)) アルゴリズムは、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれかおよび16、14、12、10、8、6、または4のギャップウェイト (gap weight) および1、2、3、4、5、または6の長さウェイト (length weight) を使用するGCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムに組み込んでいる。2つのヌクレオチド配列の間の相同性パーセントはまた、NWSgapdna.CMPマトリックスおよび40、50、60、70、または80のギャップウ

40

50

ェイトおよび1、2、3、4、5、または6の長さウェイトを使用するGCGソフトウェアパッケージ(Accelrys, Inc. San Diego, CA)中のGAPプログラムを使用して決定することもできる。相同性の決定のためのパラメータの例示的なセットは、12のギャップペナルティー、4のギャップ伸長ペナルティー、および5のフレームシフトギャップペナルティーを用いるBlossum 62スコアリングマトリックスである。

【0040】

本明細書において使用されるように、用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせる」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての条件を説明する。ハイブリダイゼーション反応を実行するための手引きは、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989年)、6.3.1-6.3.6において見出すことができる。水性および非水性の方法は、その参考文献において記載されており、どちらでも使用することができる。本明細書において言及される特異的なハイブリダイゼーション条件は、以下のとおりである：1)少なくとも50での0.2×SSC、0.1%SDS中での2回の洗浄が後続する、約45での、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中での低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件(洗浄の温度は、低ストリンジェンシー条件については55まで上昇させることができる)；2)60での0.2×SSC、0.1%SDS中での1回以上の洗浄が後続する、約45での、6×SSC中での中ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件；3)65での0.2×SSC、0.1%SDS中での1回以上の洗浄が後続する、約45での、6×SSC中での高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件；および4)超高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、65での0.5Mリン酸ナトリウム、7%SDSであり、65での、0.2×SSC、1%SDSでの1回以上の洗浄が後続する。超高ストリンジェンシー条件(4)は、多くの場合、好ましい条件であり、別段の定めがない限り使用されるべきものである。

【0041】

本発明の抗体およびその抗原結合断片は、ポリペプチドの機能に実質的な影響を有していないさらなる保存的置換または非必須アミノ酸置換を有していてもよいことが理解される。特定の置換が許容されるかどうかは、つまり、結合活性などの所望の生物学的特性に有害な影響を及ぼさないかどうかは、Bowie, J Ura Science 247巻：1306~1310頁(1990年)またはPadlanら FASEB J. 9巻：133~139頁(1995年)に記載のとおり決定することができる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似する側鎖を有するアミノ酸残基と置き換えられる置換である。類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖(たとえばリシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(たとえばアスパラギン酸、グルタミン酸)、無電荷極性側鎖(たとえばアスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(たとえばグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ分枝側鎖(たとえばトレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖(たとえばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸を含む。

【0042】

「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を消失させることなくまたは生物学的活性を実質的に改変することなく、結合剤、たとえば抗体の野生型配列から改変することができる残基であるのに対して、「必須」アミノ酸残基は、そのような変化をもたらす。抗体において、必須アミノ酸残基は、特異性決定残基(SDR)とすることができる。

【0043】

本明細書において使用されるように、用語「単離された」は、その元の環境(たとえば、それが天然に存在する場合、天然の環境)から取り出される物質を指す。たとえば、生

10

20

30

40

50

きている動物に存在する、天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されていないが、天然の系において共存する物質のうちいくつかまたはすべてから分離されたその同じポリヌクレオチドまたはDNAまたはポリペプチドは、単離されている。そのようなポリヌクレオチドは、ベクターの一部とすることができそして/またはそのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、組成物（たとえば混合物、溶液、または懸濁物）またはポリヌクレオチドもしくはポリペプチドを含む単離細胞もしくは培養細胞を含む組成物の一部とすることができ、ベクターまたは組成物がその天然の環境の一部ではないという点でなお単離されているものとすることができる。

【0044】

本明細書において使用されるように、用語「レプリコン」は、細胞内でポリヌクレオチド複製の自律的な単位として振る舞う、プラスミド、染色体、またはウイルスなどの任意の遺伝因子を指す。

10

【0045】

本明細書において使用されるように、用語「作動可能に連結された」は、記載される構成要素が、それらの意図される方法においてそれらが機能するのを可能にする関係にある状況を指す。したがって、たとえば、コード配列に「作動可能に連結された」制御配列は、コード配列の発現が、制御配列と適合性の条件下で達成される方法でライゲーションされる。

【0046】

本明細書において使用されるように、用語「ベクター」は、連結されたセグメントの複製および/または発現を引き起こすためなどの、他のポリヌクレオチドセグメントが連結されるレプリコンを指す。

20

【0047】

本明細書において使用されるように、用語「制御配列」は、それがライゲーションされるコード配列の発現を達成するのに必要なポリヌクレオチド配列を指す。そのような制御配列の性質は、宿主生物に依存して異なる。原核生物において、そのような制御配列は、一般に、プロモーター、リボソーム結合部位、およびターミネーターならびにいくつかの場合においてエンハンサーを含む。したがって、用語「制御配列」は、最低でも、その存在が発現に必要である構成要素をすべて含むように意図され、また、その存在が有利であるさらなる構成要素、たとえばリーダー配列を含んでいてもよい。

30

【0048】

本明細書において使用されるように、用語「精製産物」は、産物が通常関連している細胞構成成分からおよび/または対象の試料に存在し得る他のタイプの細胞から単離された、産物の調製物を指す。

【0049】

本明細書において使用されるように、用語「エピトープ」は、抗体に特異的に結合することができるタンパク質の決定因子 (d e t e r m i n a t e) を指す。エピトープ決定因子は、普通、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的活性表面の群から成り、普通、特異的な三次元構造の特徴ならびに特異的な電荷の特徴を有する。いくつかのエピトープは、線状エピトープであるが、他のものは、高次構造エピトープである。線状エピトープは、隣接アミノ酸一次配列が、認識されるエピトープを含むエピトープである。線状エピトープは、典型的に、少なくとも3個、より普通には、少なくとも5個、たとえば約8~約10個の隣接アミノ酸を含む。高次構造的なエピトープは、a) たとえばリガンド結合に依存するもしくはシグナル伝達分子による修飾（たとえばリン酸化）に依存するあるタンパク質高次構造においてのみ抗体結合に曝露される線状配列；またはb) タンパク質の1つを超える部分由来の、もしくは多サブユニットタンパク質における1つを超えるサブユニット由来の、構造の特徴（その特徴は、結合に参加するのに、3次元空間において十分に極めて接近している）の組み合わせなどの少なくとも2つの状況に起因し得る。

40

【0050】

本明細書において使用されるように、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によっ

50

てコードされる抗体クラス（たとえば I g M または I g G 1 ）を指す。

【 0 0 5 1 】

本明細書において使用されるように、用語「検出可能な作用物質」、「標識」、または「標識された」は、ポリペプチドまたは糖タンパク質上の検出可能なマーカの組み込みを指すために使用される。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法は、当技術分野において公知であり、それらが使用されてもよい。ポリペプチドについての標識の例は、以下を含むが、これらに限定されない：放射性同位体または放射性核種（たとえばインジウム（ ^{111}In ）、ヨウ素（ ^{131}I もしくは ^{125}I ）、イットリウム（ ^{90}Y ）、ルテチウム（ ^{177}Lu ）、アクチニウム（ ^{225}Ac ）、ビスマス（ ^{212}Bi もしくは ^{213}Bi ）、硫黄（ ^{35}S ）、炭素（ ^{14}C ）、トリチウム（ ^3H ）、ロジウム（ ^{188}Rh ）、テクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、プラセオジウム、またはリン（*phosphorous*）（ ^{32}P ）または陽電子放出放射性核種、たとえば炭素 11（ ^{11}C ）、カリウム 40（ ^{40}K ）、窒素 13（ ^{13}N ）、酸素 15（ ^{15}O ）、フッ素 18（ ^{18}F ）、およびヨウ素 121（ ^{121}I ）、蛍光標識（たとえば FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素標識（たとえば西洋ワサビペルオキシダーゼ、ベータガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光、ビオチニル基（マークされたアビジン、たとえば、ストレプトアビジン成分および光学的な方法または熱量測定法によって検出することができる蛍光マーカまたは酵素活性を含有する分子によって検出することができる）、ならびに第 2 のレポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（たとえばロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）。いくつかの実施形態では、標識は、潜在的な立体障害を低下させるために様々な長さのスペーサーアームが付加される。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

本明細書において使用されるように、「特異的な結合」、「特異的に結合する」、または「結合特異性」は、抗 G C C 抗体分子については、抗体分子が、非 G C C タンパク質、たとえば B S A に結合するよりも大きな親和性で G C C、たとえばヒト G C C タンパク質に結合することを意味する。典型的に、抗 G C C 分子は、G C C、たとえばヒト G C C タンパク質に対するその K_d の、2 倍を超える、10 倍を超える、100 倍を超える、1,000 倍を超える、 10^4 倍を超える、 10^5 倍を超える、または 10^6 倍を超える、非 G C C タンパク質、たとえば B S A に対する K_d を有する。 K_d の決定において、G C C および非 G C C タンパク質、たとえば B S A に対する K_d は、同じ条件下で行われるべきである。

【 0 0 5 3 】

本明細書において使用されるように、用語「処置する」または「処置」は、被験体、たとえば患者への抗 G C C 抗体分子の投与またはたとえば、被験体に戻される、被験体由来の単離組織もしくは単離細胞への塗布による投与として定義される。抗 G C C 抗体分子は、単独でまたは第 2 の作用物質と組み合わせる投与することができる。処置は、障害、障害の症状、または障害に対する素因、たとえばがんを治癒する、治す、軽減する、緩和する、改変する、いやす、回復させる、和らげる、改善する、またはそれに影響を及ぼすことであり得る。理論によって拘束されることを望むものではないが、処置は、*in vitro* もしくは *in vivo* において細胞の障害、消失、もしくは死滅または別の方法では、細胞、たとえば異常な細胞が、障害、たとえば本明細書に記載の障害（たとえばがん）を媒介する能力の低下を引き起こすと考えられる。

【 0 0 5 4 】

本明細書において使用されるように、用語「被験体」は、哺乳動物、霊長類、ヒト、および非ヒト動物を含むように意図される。たとえば、被験体は、がん、たとえば胃腸起源のがん（たとえば結腸がん）、がん、たとえば細胞のうちの少なくとも一部が G C C を発現する胃腸起源のがん（たとえば結腸がん）の症状、またはがん、たとえば細胞のうちの少なくとも一部が G C C を発現する胃腸起源のがん（たとえば結腸がん）に対する素因を有する患者（たとえばヒト患者または家畜患者）とすることができる。本発明の「非ヒト

動物」という用語は、特に断りのない限り、全ての非ヒト脊椎動物、たとえば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、八虫類などの、非ヒト哺乳動物および非哺乳動物を含む。一実施形態では、被験体は、マウス、ラット、ウサギ、またはヤギの1つ以上のまたはすべてを除外する。

【0055】

本明細書において使用されるように、障害を処置するのに「有効な」もしくは「十分な」抗GCC抗体分子の量または「治療有効量」もしくは「治療的に十分な量」は、細胞、たとえばがん細胞（たとえばGCC発現腫瘍細胞）を処置するのに、またはそのような処置が存在しない場合に予想されるものを上回って、本明細書に記載の障害を有する被験体の治癒、軽減、緩和、もしくは改善を長くするのに、被験体へ1回または複数回の用量を投与することで有効である、抗体分子の量を指す。本明細書において使用されるように、腫瘍またはがんの「成長の阻害」は、その成長および/または転移を遅らせる、中断する、阻止する、または停止させることを指し、腫瘍成長の完全な排除を必ずしも示すものではない。

10

【0056】

本明細書において使用されるように、「STAR」、「GUC2C」、「GUCY2C」、または「ST受容体」タンパク質としても公知である「GCC」は、哺乳動物のGCC、好ましくはヒトGCCタンパク質を指す。ヒトGCCは、配列番号228において示されるタンパク質およびその天然に存在する対立遺伝子タンパク質改変体を指す。配列番号228における対立遺伝子は、配列番号227において示されるGCCの核酸配列によってコードすることができる。他の改変体は、当技術分野において公知である。たとえば残基281にロイシンを有する受託番号Ensp0000261170、Ensembl Database、European Bioinformatics InstituteおよびWellcome Trust Sanger Institute；米国特許出願公開第20060035852号の配列番号14；またはGenBank受託番号AAB19934を参照されたい。典型的に、天然に存在する対立遺伝子改変体は、配列番号228のGCCの配列と少なくとも95%、97%、または99%同一であるアミノ酸配列を有する。転写物は、1073のアミノ酸のタンパク質産物をコードし、GenBank受託番号NM_004963において記載される。GCCタンパク質は、膜貫通細胞表面受容体タンパク質として特徴付けられ、腸液、電解質の恒常性、および細胞増殖の維持に重要な役割を果たすと考えられる。

20

30

【0057】

特に断りのない限り、用語「アルキル」は、約1～約20個の炭素原子（ならびにその中の炭素原子の範囲および特定の数のすべての組み合わせおよび副組み合わせ）を有する飽和直鎖状または分枝炭化水素を指し、約1～約8個の炭素原子が好ましい。アルキル基の例は、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、iso-ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、2-ペンチル、3-ペンチル、2-メチル-2-ブチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチル、n-ノニル、n-デシル、3-メチル-2-ブチル、3-メチル-1-ブチル、2-メチル-1-ブチル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、2-メチル-2-ペンチル、3-メチル-2-ペンチル、4-メチル-2-ペンチル、3-メチル-3-ペンチル、2-メチル-3-ペンチル、2,3-ジメチル-2-ブチル、および3,3-ジメチル-2-ブチルである。

40

【0058】

アルキル基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、「置換」されたものとして言及されてもよい。置換アルキル基は、-Hロゲン、-O-(C₁～C₈アルキル)、-O-(C₂～C₈アルケニル)、-O-(C₂～C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N₃、-NH₂、-NH

50

(R')、-N(R')₂、および-CNを含むが、これらに限定されない1つ以上の基、好ましくは1~3つの基(およびハロゲンから選択される任意のさらなる置換基)で置換されたアルキル基であり、R'は、それぞれ、-H、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、または-アリールから独立して選択され、当該-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、および-C₂~C₈アルキニル基は、必要に応じて、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、-ハロゲン、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH₂、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')₂、-NHC(O)R''、-SR''、-SO₃R''、-S(O)₂R''、-S(O)R''、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R'')、-N(R'')₂、および-CNを含むが、これらに限定されない1つ以上の基でさらに置換することができ、R''は、それぞれ、-H、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、または-アリールから独立して選択される。

【0059】

特に断りのない限り、用語「アルケニル」および「アルキニル」は、約2~約20(ならびにその中の炭素原子の範囲および特定の数のすべての組み合わせおよび副組み合わせ)個の炭素原子を有する直鎖状および分枝炭素鎖を指し、約2~約8個の炭素原子が好ましい。アルケニル鎖は、鎖に少なくとも1つの二重結合を有し、アルキニル鎖は、鎖に少なくとも1つの三重結合を有する。アルケニル基の例は、エチレンまたはビニル、アリル、-1-ブテニル、-2-ブテニル、-イソブチレニル、-1-ペンテニル、-2-ペンテニル、-3-メチル-1-ブテニル、-2-メチル-2-ブテニル、および-2,3-ジメチル-2-ブテニルを含むが、これらに限定されない。アルキニル基の例は、アセチレン、プロパルギル、アセチレニル、プロピニル、-1-ブチニル、-2-ブチニル、-1-ペンチニル、-2-ペンチニル、および-3-メチル-1-ブチニルを含むが、これらに限定されない。

【0060】

アルキル基と同様に、アルケニル基およびアルキニル基は置換され得る。「置換」アルケニル基またはアルキニル基は、-ハロゲン、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH₂、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')₂、-NHC(O)R''、-SR''、-SO₃R''、-S(O)₂R''、-S(O)R''、-OH、=O、-N₃、-NH₂、-NH(R'')、-N(R'')₂、および-CNを含むが、これらに限定されない1つ以上の基、好ましくは1~3つの基(およびハロゲンから選択される任意のさらなる置換基)で置換された基であり、R'は、それぞれ、-H、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル(alky en l)、-C₂~C₈アルキニル、または-アリールから独立して選択され、当該-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、および-C₂~C₈アルキニル基は、必要に応じて、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、-ハロゲン、-O-(C₁~C₈アルキル)、-O-(C₂~C₈アルケニル)、-O-(C₂~C₈アルキニル)、-アリール、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH₂、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')₂、-NHC(O)R''、-SR''、-SO₃R''、-S(O)₂R''、-S(O)R''、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R'')、-N(R'')₂、および-CNを含むが、これらに限定されない1つ以上の置換基でさらに置換することができ、R''は、それぞれ、-H、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、または-アリールから独立して選択される。

【0061】

特に断りのない限り、用語「アルキレン」は、約1～約8個の炭素原子が好ましいが、約1～約20（ならびにその中の炭素原子の範囲および特定の数のすべての組み合わせおよび副組み合わせ）個の炭素原子を有し、かつ親アルカンの同じまたは2つの異なる炭素原子からの2つの水素原子の除去によって得られる2つの一価ラジカル中心を有する飽和分枝ラジカルまたは直鎖炭化水素ラジカルを指す。典型的なアルキレンは、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン（octylene）、ノニレン、デカレン、1,4-シクロヘキシレン、およびその他同種のものを含むが、これらに限定されない。アルキレン基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、-ハロゲン、-O-（C₁～C₈アルキル）、-O-（C₂～C₈アルケニル）、-O-（C₂～C₈アルキニル）、-アリール、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂、および-CNを含むが、これらに限定されない1つ以上の基、好ましくは1～3つの基（およびハロゲンから選択される任意のさらなる置換基）で必要に応じて置換することができ、R'は、それぞれ、-H、-C₁～C₈アルキル、-C₂～C₈アルケニル、-C₂～C₈アルキニル、または-アリールから独立して選択され、当該-O-（C₁～C₈アルキル）、-O-（C₂～C₈アルケニル）、-O-（C₂～C₈アルキニル）、-アリール、-C₁～C₈アルキル、-C₂～C₈アルケニル、および-C₂～C₈アルキニル基は、必要に応じて、-C₁～C₈アルキル、-C₂～C₈アルケニル、-C₂～C₈アルキニル、-ハロゲン、-O-（C₁～C₈アルキル）、-O-（C₂～C₈アルケニル）、-O-（C₂～C₈アルキニル）、-アリール、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH₂、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')₂、-NHC(O)R''、-SR''、-SO₃R''、-S(O)₂R''、-S(O)R''、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R'')、-N(R'')₂、および-CNを含むが、これらに限定されない1つ以上の置換基でさらに置換することができ、R''は、それぞれ、-H、-C₁～C₈アルキル、-C₂～C₈アルケニル、-C₂～C₈アルキニル、または-アリールから独立して選択される。

10

20

30

【0062】

特に断りのない限り、用語「アルケニレン」は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含有する、必要に応じて置換されるアルキレン基を指す。例示的なアルケニレン基は、たとえばエテニレン（-CH=CH-）およびプロペニレン（-CH=CHCH₂-）を含む。

【0063】

特に断りのない限り、用語「アルキニレン」は、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含有する、必要に応じて置換されるアルキレン基を指す。例示的なアルキニレン基は、たとえばアセチレン（-C≡C-）、プロパルギル（-CH₂C≡C-）、および4-ペンチニル（-CH₂CH₂CH₂C≡CH-）を含む。

40

【0064】

特に断りのない限り、用語「アリール」は、親芳香環系の単一の炭素原子からの1個の水素原子の除去によって得られる、6～20（ならびにその中の炭素原子の範囲および特定の数のすべての組み合わせおよび副組み合わせ）個の炭素原子の一価芳香族炭化水素ラジカルを指す。いくつかのアリール基は、例示的な構造において「Ar」として表される。典型的なアリール基は、ベンゼン、置換ベンゼン、フェニル、ナフタレン、アントラセン、ピフェニル、およびその他同種のものから誘導されるラジカルを含むが、これらに限定されない。

【0065】

アリール基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、-ハロゲン、-C₁～C₈アルキル、-C₂～C₈アルケニル、-C₂～C₈アルキニル、-O-

50

($C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-$ ($C_2 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-$ ($C_2 \sim C_8$ アルキニル)、 $-$ アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')$ ₂、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')$ ₂、および $-CN$ を含むが、これらに限定されない1つ以上の、好ましくは1~5つの、またはさらに好ましくは1~2つの基で必要に応じて置換することができ、 R' は、それぞれ、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、または $-$ アリールから独立して選択され、当該 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、 $O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、および $-$ アリール基は、必要に応じて、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、 $-$ ハロゲン、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、 $-$ アリール、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')$ ₂、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')$ ₂、および $-CN$ を含むが、これらに限定されない1つ以上の置換基でさらに置換することができ、 R'' は、それぞれ、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、または $-$ アリールから独立して選択される。

10

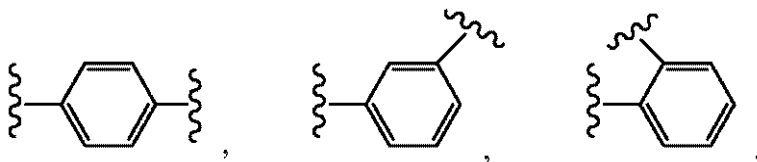
20

【0066】

特に断りのない限り、用語「アリーレン」は、二価の(つまり、親芳香環系の同じまたは2つの異なる炭素原子からの2つの水素原子の除去によって得られる)、必要に応じて置換されたアリール基を指し、例示的なアリール基としてフェニルを有する以下の構造において示されるようにオルト、メタ、またはパラ配置をとり得る。

【0067】

【化6】



30

典型的な「 $-(C_1 \sim C_8$ アルキレン)アリール」基、「 $-(C_2 \sim C_8$ アルケニレン)アリール」基、および「 $-(C_2 \sim C_8$ アルキニレン)アリール」基は、ベンジル、2-フェニルエタン-1-イル、2-フェニルエテン-1-イル、ナフチルメチル、2-ナフチルエタン-1-イル、2-ナフチルエテン-1-イル、ナフトベンジル、2-ナフトフェニルエタン-1-イル、およびその他同種のものを含むが、これらに限定されない。

【0068】

特に断りのない限り、用語「ヘテロ環」は、3~14個の環原子を有する(環メンバーとも呼ばれる)単環式、二環式、または多環式環系を指し、少なくとも1つの環の少なくとも1つの環原子は、 N 、 O 、 P 、または S から選択されるヘテロ原子(ならびにその中の炭素原子およびヘテロ原子の範囲および特定の数のすべての組み合わせおよび副組み合わせ)である。ヘテロ環は、 N 、 O 、 P 、または S から独立して選択される1~4個の環ヘテロ原子を有することができる。ヘテロ環における1つ以上の N 、 C 、または S 原子は、酸化されてもよい。単環式(monocyclic)ヘテロ環は、好ましくは、3~7個の環メンバー(たとえば、2~6個の炭素原子、および N 、 O 、 P 、または S から独立して選択される1~3個のヘテロ原子)を有し、二環式ヘテロ環は、好ましくは、5~10個の環メンバー(たとえば、4~9個の炭素原子、および N 、 O 、 P 、または S から独立して選択される1~3個のヘテロ原子)を有する。ヘテロ原子を含む環は、芳香族または非芳香族であり得る。特に断りのない限り、ヘテロ環は、安定した構造をもたらす任意の

40

50

ヘテロ原子または炭素原子においてそのペンダント基に結合する。

【0069】

ヘテロ環は、Paquette、「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」(W. A. Benjamin, New York, 1968年)、特に1、3、4、6、7、および9章；「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」(John Wiley & Sons, New York, 1950年から現在まで)、特に13、14、16、19、および28巻；ならびにJ. Am. Chem. Soc. 82巻：5566頁(1960年)において記載されている。

10

【0070】

特に断りのない限り、用語「ヘテロシクロ」は、二価の(つまり、親ヘテロ環式環系の同じまたは2つの異なる炭素原子からの2つの水素原子の除去によって得られる)、上記に定義される必要に応じて置換されるヘテロ環基を指す。

【0071】

「ヘテロ環」基の例は、限定ではなく例として、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル(ピペリジル)、チアゾリル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンゾイミダゾリル、ピペリジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス-テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス-テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾシニル、トリアジニル、6H-1,2,5-チアジアジニル、2H,6H-1,5,2-ジチアジニル、チエニル、チアントレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサントニル、フェノキサチニル、2H-ピロリル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、1H-インダゾリル、プリニル、4H-キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、プテリジニル、4H-カルバゾリル、カルバゾリル、 β -カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾイソオキサゾリル、オキシンドリル、ベンゾオキサゾリニル、およびイサチノイルを含む。好ましい「ヘテロ環」基は、ベンゾフラニル、ベンゾチオフエニル、インドリル、ベンゾピラゾリル、クマリニル、イソキノリニル、ピロリル、チオフエニル、フラニル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、キノリニル、ピリミジニル、ピリジニル、ピリドニル、ピラジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、およびテトラゾリルを含むが、これらに限定されない。

20

30

【0072】

ヘテロ環基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、 $-$ ハロゲン、 $-O-$ ($C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-$ ($C_2 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-$ ($C_2 \sim C_8$ アルキニル)、 $-$ アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、および $-CN$ を含むが、これらに限定されない1つ以上の基、好ましくは1~2つの基で必要に応じて置換することができ、 R' は、それぞれ、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、または $-$ アリールから独立して選択され、当該 $-O-$ ($C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-$ (C_2

40

50

~ C₈アルケニル)、 - O - (C₂ ~ C₈アルキニル)、 - C₁ ~ C₈アルキル、 - C₂ ~ C₈アルケニル、 - C₂ ~ C₈アルキニル、および - アリール基は、必要に応じて、 - C₁ ~ C₈アルキル、 - C₂ ~ C₈アルケニル、 - C₂ ~ C₈アルキニル、 - ハロゲン、 - O - (C₁ ~ C₈アルキル)、 - O - (C₂ ~ C₈アルケニル)、 - O - (C₂ ~ C₈アルキニル)、 - アリール、 - C (O) R ' '、 - O C (O) R ' '、 - C (O) O R ' '、 - C (O) N H₂、 - C (O) N H R ' '、 - C (O) N (R ' ')₂、 - N H C (O) R ' '、 - S R ' '、 - S O₃ R ' '、 - S (O)₂ R ' '、 - S (O) R ' '、 - O H、 - N₃、 - N H₂、 - N H (R ' ')、 - N (R ' ')₂、および - C Nを含むが、これらに限定されない1つ以上の置換基でさらに置換することができ、R ' 'は、それぞれ、 - H、 - C₁ ~ C₈アルキル、 - C₂ ~ C₈アルケニル、 - C₂ ~ C₈アルキニル、またはアリールから独立して選択される。

10

【 0 0 7 3 】

限定ではなく例として、炭素結合ヘテロ環は、以下の位置で結合することができる：ピリジンの2、3、4、5、もしくは6位；ピリダジンの3、4、5、もしくは6位；ピリミジンの2、4、5、もしくは6位；ピラジンの2、3、5、もしくは6位；フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフエン、ピロール、もしくはテトラヒドロピロールの2、3、4、もしくは5位；オキサゾール、イミダゾール、もしくはチアゾールの2、4、もしくは5位；イソオキサゾール、ピラゾール、もしくはイソチアゾールの3、4、もしくは5位；アジリジンの2もしくは3位；アゼチジンの2、3、もしくは4位；キノリンの2、3、4、5、6、7、もしくは8位；またはイソキノリンの1、3、4、5、6、7、もしくは8位。さらにより典型的に、炭素結合ヘテロ環は、2 - ピリジル、3 - ピリジル、4 - ピリジル、5 - ピリジル、6 - ピリジル、3 - ピリダジニル、4 - ピリダジニル、5 - ピリダジニル、6 - ピリダジニル、2 - ピリミジニル、4 - ピリミジニル、5 - ピリミジニル、6 - ピリミジニル、2 - ピラジニル、3 - ピラジニル、5 - ピラジニル、6 - ピラジニル、2 - チアゾリル、4 - チアゾリル、または5 - チアゾリルを含む。

20

【 0 0 7 4 】

限定ではなく例として、窒素結合ヘテロ環は、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、2 - ピロリン、3 - ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、2 - イミダゾリン、3 - イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、2 - ピラゾリン、3 - ピラゾリン、ペペリジン、ペペラジン、インドール、インドリン、または1 H - イндаゾールの1位；イソインドールまたはイソインドリンの2位；モルホリンの4位；およびカルバゾールまたは - カルボリンの9位で結合することができる。さらにより典型的に、窒素結合ヘテロ環は、1 - アジリジル、1 - アゼテジル、1 - ピロリル、1 - イミダゾリル、1 - ピラゾリル、および1 - ペペリジニルを含む。

30

【 0 0 7 5 】

特に断りのない限り、用語「炭素環」は、3 ~ 14（ならびにその中の炭素原子の範囲および特定の数のすべての組み合わせおよび副組み合わせ）個の環原子を有する飽和または不飽和非芳香族単環式、二環式、または多環式環系を指し、環原子はすべて、炭素原子である。単環式炭素環は、好ましくは3 ~ 6個の環原子、さらにより好ましくは5または6個の環原子を有する。二環式炭素環は、たとえば、ビシクロ [4 , 5]、 [5 , 5]、 [5 , 6]、もしくは [6 , 6]系として配置される好ましくは7 ~ 12個の環原子またはビシクロ [5 , 6]もしくは [6 , 6]系として配置される9もしくは10個の環原子を有する。用語「炭素環」は、たとえば、アリール環と縮合した単環式炭素環（たとえば、ベンゼン環と縮合した単環式炭素環）を含む。炭素環は、好ましくは、3 ~ 8個の炭素環原子を有する。

40

【 0 0 7 6 】

炭素環基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、たとえば、 - ハロゲン、 - C₁ ~ C₈アルキル、 - C₂ ~ C₈アルケニル、 - C₂ ~ C₈アルキニル、 - O - (C₁ ~ C₈アルキル)、 - O - (C₂ ~ C₈アルケニル)、 - O - (C₂ ~ C₈アルキニル)、 - アリール、 - C (O) R '、 - O C (O) R '、 - C (O) O R '、

50

- C (O) N H ₂、 - C (O) N H R '、 - C (O) N (R ') ₂、 - N H C (O) R '、
 - S R '、 - S O ₃ R '、 - S (O) ₂ R '、 - S (O) R '、 - O H、 = O、 - N ₃、
 - N H ₂、 - N H (R ')、 - N (R ') ₂、および - C Nを含むが、これらに限定され
 ない1つ以上の基、好ましくは、1または2個の基（およびハロゲンから選択される任
 意のさらなる置換基）で必要に応じて置換することができ、R'は、それぞれ、- H、
 - C ₁ ~ C ₈ アルキル、 - C ₂ ~ C ₈ アルケニル、 - C ₂ ~ C ₈ アルキニル、または - アリ
 ールから独立して選択され、当該 - C ₁ ~ C ₈ アルキル、 - C ₂ ~ C ₈ アルケニル、 - C
₂ ~ C ₈ アルキニル、 - O - (C ₁ ~ C ₈ アルキル)、 - O - (C ₂ ~ C ₈ アルケニル)
 、 - O - (C ₂ ~ C ₈ アルキニル)、および - アリール基は、必要に応じて、 - C ₁ ~ C
₈ アルキル、 - C ₂ ~ C ₈ アルケニル、 - C ₂ ~ C ₈ アルキニル、 - ハロゲン、 - O - (10
 C ₁ ~ C ₈ アルキル)、 - O - (C ₂ ~ C ₈ アルケニル)、 - O - (C ₂ ~ C ₈ アルキニ
 ル)、 - アリール、 - C (O) R ' '、 - O C (O) R ' '、 - C (O) O R ' '、 - C
 (O) N H ₂、 - C (O) N H R ' '、 - C (O) N (R ' ') ₂、 - N H C (O) R ' '、
 - S R ' '、 - S O ₃ R ' '、 - S (O) ₂ R ' '、 - S (O) R ' '、 - O H、 -
 N ₃、 - N H ₂、 - N H (R ' ')、 - N (R ' ') ₂、および - C Nを含むが、これら
 に限定されない1つ以上の置換基でさらに置換することができ、R''は、それぞれ、 -
 H、 - C ₁ ~ C ₈ アルキル、 - C ₂ ~ C ₈ アルケニル、 - C ₂ ~ C ₈ アルキニル、または
 - アリールから独立して選択される。

【0077】

単環式炭素環置換基の例は、 - シクロプロピル、 - シクロブチル、 - シクロペンチル、
 - 1 - シクロペンタ - 1 - エニル、 - 1 - シクロペンタ - 2 - エニル、 - 1 - シクロペン
 タ - 3 - エニル、シクロヘキシル、 - 1 - シクロヘキサ - 1 - エニル、 - 1 - シクロヘキ
 サ - 2 - エニル、 - 1 - シクロヘキサ - 3 - エニル、 - シクロヘブチル、 - シクロオクチ
 ル、 - 1, 3 - シクロヘキサジエニル、 - 1, 4 - シクロヘキサジエニル、 - 1, 3 - シ
 クロヘプタジエニル、 - 1, 3, 5 - シクロヘプタトリエニル、および - シクロオクタジ
 エニルを含む。

【0078】

「カルボシクロ」は、単独でまたは他の基の一部として使用されるかどうかに関わらず
 、二価の（つまり、親炭素環系の同じまたは2つの異なる炭素原子からの2つの水素原子
 の除去によって得られる）、上記に定義される必要に応じて置換される炭素環基を指す。

【0079】

文脈によって他に示されない限り、ハイフン (-) は、ペンダント分子への結合の場所
 を示す。したがって、用語「 - (C ₁ ~ C ₈ アルキレン) アリール」または「 - C ₁ ~ C
₈ アルキレン (アリール)」は、本明細書において定義される C ₁ ~ C ₈ アルキレンラジ
 カルを指し、アルキレンラジカルは、アルキレンラジカルの炭素原子のいずれかのペンダ
 ント分子に結合し、アルキレンラジカルの炭素原子に結合した水素原子のうちの1つは、
 本明細書において定義されるアリールラジカルと置き換えられる。

【0080】

特定の基が「置換される」場合、その基は、置換基のリストから独立して選択される1
 つ以上の置換基、好ましくは1~5個の置換基、より好ましくは1~3個の置換基、最も
 好ましくは1~2個の置換基を有していてもよい。しかしながら、基は、一般に、ハロゲ
 ンから選択される任意の数の置換基を有することができる。置換される基は、そのよう
 に示される。

【0081】

分子における特定の位置の任意の置換基または変数の定義は、その分子において、その
 他の場所では、その定義と無関係であることが意図される。本発明の化合物上の置換基お
 よび置換パターンは、化学的に安定しており、当技術分野において公知の技術および本明
 細書に記載の方法によって容易に合成することができる化合物を提供するように当業者に
 よって選択することができることが理解される。

【0082】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される保護基は、多官能化合物における一反応部位を一時的にまたは永久に選択的にブロックする基を指す。本発明における使用に適したヒドロキシ保護基は、薬学的に許容されるものであり、化合物が活性となるように、被験体への投与の後に親化合物から切断される必要があってもまたはなくてもよい。切断は、体内での正常な代謝プロセスを通してのものである。ヒドロキシ保護基は、当技術分野において周知であり、その全体がすべての目的のために参照によって本明細書において組み込まれる T. W. Greene および P. G. M. Wuts による PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (John Wiley & Sons、第3版)を参照されたい。また、これは、たとえば、エーテル(たとえば、アルキルエーテルおよびシリルエーテル(たとえばジアルキルシリルエーテル、トリアルキルシリルエーテル、ジアルキルアルコキシシリルエーテルを含む))、エステル、カーボネート、カルバメート、スルホネート、ならびにホスフェート保護基を含む。ヒドロキシ保護基の例は、メチルエーテル;メトキシメチルエーテル、メチルチオメチルエーテル、(フェニルジメチルシリル)メトキシメチルエーテル、ベンジルオキシメチルエーテル、p-メトキシベンジルオキシメチルエーテル、p-ニトロベンジルオキシメチルエーテル、o-ニトロベンジルオキシメチルエーテル、(4-メトキシフェノキシ)メチルエーテル、グアイアコールメチルエーテル、t-ブトキシメチルエーテル、4-ペンテニルオキシメチルエーテル、シロキシメチルエーテル、2-メトキシエトキシメチルエーテル、2,2,2-トリクロロエトキシメチルエーテル、ビス(2-クロロエトキシ)メチルエーテル、2-(トリメチルシリル)エトキシメチルエーテル、メントキシメチルエーテル、テトラヒドロピラニルエーテル、1-メトキシシクロヘキシルエーテル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルエーテル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルエーテル S, S-ジオキシド、1-[(2-クロロ-4-メチル)フェニル] - 4-メトキシピペリジン - 4-イルエーテル、1-(2-フルオロフェニル) - 4-メトキシピペリジン - 4-イルエーテル、1,4-ジオキサソ - 2-イルエーテル、テトラヒドロフラニルエーテル、テトラヒドロチオフラニルエーテル;置換エチルエーテル(例えば、1-エトキシエチルエーテル、1-(2-クロロエトキシ)エチルエーテル、1-[2-(トリメチルシリル)エトキシ]エチルエーテル、1-メチル-1-メトキシエチルエーテル、1-メチル-1-ベンジルオキシエチルエーテル、1-メチル-1-ベンジルオキシ-2-フルオロエチルエーテル、1-メチル-1-フェノキシエチルエーテルなど)、2-トリメチルシリルエーテル、t-ブチルエーテル、アリルエーテル、プロパルギルエーテル、p-クロロフェニルエーテル、p-メトキシフェニルエーテル、ベンジルエーテル、p-メトキシベンジルエーテル、3,4-ジメトキシベンジルエーテル、トリメチルシリルエーテル、トリエチルシリルエーテル、トリプロピルシリルエーテル、ジメチルイソプロピルシリルエーテル、ジエチルイソプロピルシリルエーテル、ジメチルヘキシルシリルエーテル、t-ブチルジメチルシリルエーテル、ジフェニルメチルシリルエーテル、ベンゾイルホルマートエステル、アセタートエステル、クロロアセタートエステル、ジクロロアセタートエステル、トリクロロアセタートエステル、トリフルオロアセタートエステル、メトキシアセタートエステル、トリフェニルメトキシアセタートエステル、フェニルアセタートエステル、ベンゾアートエステル、アルキルメチルカルボネート、アルキル9-フルオレニルメチルカルボネート、アルキルエチルカルボネート、アルキル2,2,2-トリクロロエチルカルボネート、1,1,1-ジメチル-2,2,2-トリクロロエチルカルボネート、アルキルスルホネート、メタンスルホネート、ベンジルスルホネート、トシレート、メチレンアセタール、エチリデンアセタール、およびt-ブチルメチリデンケタールを含むが、これらに限定されない。好ましい保護基は、式 - R、- Si(R)(R)(R)、- C(O)R、- C(O)OR、- C(O)NH(R)、- S(O)₂R、- S(O)₂OH、P(O)(OH)₂、および - P(O)(OH)OR によって表され、Rは、C₁ ~ C₂₀ アルキル、C₂ ~ C₂₀ アルケニル、C₂ ~ C₂₀ アルキニル、- C₁ ~ C₂₀ アルキレン(炭素環)、- C₂ ~ C₂₀ アルケニレン(炭素環)、- C₂ ~ C₂₀ アルキニレン(炭素環)、- C₆ ~ C₁₀ アリール、- C₁ ~ C₂₀ アルキレン(アリール)、- C₂ ~ C₂₀

10

20

30

40

50

アルケニレン（アリール）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン（アリール）、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン（ヘテロ環）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン（ヘテロ環）、または $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン（ヘテロ環）であり、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、およびヘテロ環ラジカルは、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず必要に応じて置換される。

【0083】

略語「AFP」は、ジメチルパリン - パリン - ドライソロイイン - ドラプロイイン - フェニルアラニン - p - フェニレンジアミンを指す（下記式（XVII）を参照されたい）。

【0084】

略語「MAE」は、モノメチルアウリスタチンEを指す（下記式（XII）を参照されたい）。

【0085】

略語「AEB」は、アウリスタチンEをパラアセチル安息香酸と反応させることによって生成されるエステルを指す（下記式（XXI）を参照されたい）。

【0086】

略語「AEB」は、アウリスタチンEをベンゾイル吉草酸と反応させることによって生成されるエステルを指す（下記式（XXII）を参照されたい）。

【0087】

略語「MAF」は、モノメチルアウリスタチンFを指す（下記式（XXI）を参照されたい）。

抗体

特定の態様では、本発明は、表1および表2に要約されるものなどの特徴を有する抗GCC抗体分子に関する。他の態様では、本発明は、表3、4、5、および/または6に要約されるものなどの特徴を有する抗GCC抗体分子に関する。

【0088】

一実施形態では、抗GCC抗体分子は、ヒトハイブリドーマ抗体であり、抗体5F9、5H3、6H8、8C2、10C10、10D3、および1D3のうちの一つである。一実施形態では、抗GCC抗体分子は、抗体5F9、5H3、6H8、8C2、10C10、10D3、または1D3から誘導される。一実施形態では、抗GCC抗体分子は、ハイブリドーマ5F9（PTA-8132）によって産生される。

【0089】

一実施形態では、抗GCC抗体分子は、選択されたリンパ球抗体であり、抗体Abx-12、Abx-020、Abx-106、Abx-198、Abx-221、Abx-229、Abx-338、およびAbx-393のうちの一つである。一実施形態では、抗GCC抗体分子は、抗体Abx-12、Abx-020、Abx-106、Abx-198、Abx-221、Abx-229、Abx-338、およびAbx-393から誘導される。

【0090】

一実施形態では、抗GCC抗体分子は、マウス抗体であり、抗体mAb 3G1、mAb 8E12、mAb 10B8、およびmAb 8F1のうちの一つである。一実施形態では、抗GCC抗体分子は、抗体mAb 3G1、mAb 8E12、およびmAb 8F1から誘導される。

【0091】

一実施形態では、抗GCC抗体分子は、たとえば、本明細書に記載の範囲において、直接結合アッセイまたは競合結合アッセイによって測定されるような、GCCへの親和性を有する。一実施形態では、抗GCC抗体分子は、 1×10^{-6} M未満、 1×10^{-7} M未満、 1×10^{-8} M未満、 1×10^{-9} M未満、 1×10^{-10} M未満、 1×10^{-11} M未満、 1×10^{-12} M未満、または 1×10^{-13} M未満の K_d を有する。一実施形態では、抗体分子は、IgGまたはその抗原結合断片であり、 1×10^{-6} M未満、 $1 \times$

10

20

30

40

50

10^{-7} M未満、 1×10^{-8} M未満、または 1×10^{-9} M未満の K_d を有する。一実施形態では、抗GCC抗体分子、たとえば5F9抗体またはそれから誘導される抗体は、約80~約200 pM、好ましくは約100~約150 pMまたは約120 pMの K_d を有する。一実施形態では、抗GCC抗体分子、たとえば5F9抗体またはそれから誘導される抗体は、約0.9~約 1.25×10^5 M⁻¹ s⁻¹、好ましくは約 1.1×10^5 M⁻¹ s⁻¹の k_a を有する。一実施形態では、抗体分子は、ScFvであり、 1×10^{-6} M未満、 1×10^{-7} M未満、 1×10^{-8} M未満、 1×10^{-9} M未満、 1×10^{-10} M未満、 1×10^{-11} M未満、 1×10^{-12} M未満、または 1×10^{-13} M未満の K_d を有する。

【0092】

実施形態では、抗体分子は、免疫結合体ではない、つまり、「裸の」抗体分子であり、実施形態において、GCCへの結合に際して細胞反応を引き起こす。関連する実施形態では、細胞反応は、抗体が結合するGCC発現細胞によって実行される。そのような細胞反応は、たとえば、抗体分子がGCCのアゴニストである場合、GCCによって媒介されるシグナル伝達とすることができる（たとえば米国特許出願公開US 20040258687を参照されたい。他の実施形態では、細胞反応は、第1の細胞上のGCCに結合した抗体分子を認識する第2の細胞、たとえば免疫エフェクター細胞（たとえばナチュラルキラー細胞）によって実行される。いくつかの実施形態では、監視分子、たとえば補体分子は、細胞反応に先立って、GCCに結合した抗体分子と接触する。これらの実施形態における細胞反応は、GCC発現細胞の死を引き起こすことができる。

【0093】

さらなる実施形態では、免疫結合体である抗体分子は、GCCへの結合に際して細胞反応を引き起こすこともでき、内部移行して、それが結合するGCC発現細胞に作用物質を送達することもできる。

【0094】

いくつかの実施形態では、本発明の抗GCC抗体分子は、GCCへのリガンド結合をブロックすることができる。

【0095】

一実施形態では、抗GCC抗体分子は、ラットGCCおよびマウスGCCの一方または両方と実質的な交差反応を示さない。

【0096】

一実施形態では、抗体分子は、GCC:B10でも、GCC:4D7でも、GCC:C8でもない。他の実施形態では、抗GCC抗体分子は、GCCの細胞内ドメイン、配列番号228のアミノ酸残基約455~1073に結合しない。たとえば、この実施形態では、抗GCC抗体分子は、GCCのキナーゼ相同性ドメインまたはグアニリルシクラーゼドメインに結合しない。

【0097】

天然に存在する哺乳動物の抗体構造単位は、四量体によって典型的に表される。それぞれの四量体は、2対のポリペプチド鎖から構成され、それぞれの対は、1つの「軽」鎖（約25 kDa）および1つの「重」鎖（約50~70 kDa）を有する。それぞれの鎖のアミノ末端部分は、主として抗原認識を担う約100~110以上のアミノ酸の可変領域を含む。それぞれの鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能を主として担う定常領域を定める。ヒト軽鎖は、カッパおよびラムダ軽鎖として分類することができる。重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、またはイプシロンとして分類することができ、それぞれ、IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEとして抗体のアイソタイプを定める。軽鎖および重鎖内で、可変および定常領域は、約12以上のアミノ酸の「J」領域によってつながれ、重鎖はまた、約10以上のアミノ酸の「D」領域をも含む。一般に、Fundamental Immunology 7章（Paul, W. 編、第2版 Raven Press, N.Y. (1989年)）を参照されたい。それぞれの軽/重鎖対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。抗GCC抗体分子についての好ましいアイ

10

20

30

40

50

ソタイプは、異なるガンマ重鎖を有する、4つのサブクラス、I g G 1、I g G 2、I g G 3、およびI g G 4に分類することができるI g G免疫グロブリンである。ほとんどの治療用抗体は、I g G 1タイプのヒト抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体である。特定の実施形態では、抗G C C抗体分子は、I g G 1アイソタイプを有する。

【0098】

それぞれの重鎖および軽鎖対の可変領域は、抗原結合部位を形成する。したがって、完全なI g G抗体は、同じである2つの結合部位を有する。しかしながら、二機能性または二重特異性抗体は、2つの異なる重ノ軽鎖対を有し、2つの異なる結合部位をもたらす人工ハイブリッド構築物である。

【0099】

鎖はすべて、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によってつながれた比較的保存されたフレームワーク領域(FR)の同じ一般的な構造物を示す。それぞれの対の2つの鎖由来のCDRは、フレームワーク領域に関して一列に並び、それにより特定のエピトープへの結合が可能となる。N末端からC末端に、軽鎖および重鎖の両方は、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4を含む。それぞれのドメインへのアミノ酸の割り当ては、KabatのSequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987年および1991年))またはChothia & Lesk J. Mol. Biol. 196巻:901~917頁(1987年); Chothiaら Nature 342巻:878~883頁(1989年)の定義に従う。本明細書において使用されるように、CDRは、重(HCDR1、HCDR2、HCDR3)鎖および軽(LCDR1、LCDR2、LCDR3)鎖のそれぞれについて言及される。

【0100】

抗G C C抗体分子は、上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの1つの重鎖および軽鎖の一方または両方のCDRのすべてまたは抗原結合サブセットを含むことができる。可変領域およびCDRを含むヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、およびマウス抗体部分のアミノ酸配列は、表3および表5に見出すことができる。

【0101】

したがって、一実施形態では、抗体分子は、
 (a) 上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの1つの、1、2、3、または抗原結合数の軽鎖CDR(LCDR1、LCDR2、および/またはLCDR3)。実施形態では、このCDR(複数可)は、以下のとおり、LCDR1~3の1個以上のまたはすべてのアミノ酸配列を含んでいてもよい:LCDR1または1~7個のアミノ酸が保存的に置換された改変LCDR1)、LCDR2または1もしくは2個のアミノ酸が保存的に置換された改変LCDR2);またはLCDR3または1もしくは2個のアミノ酸が保存的に置換された改変LCDR3;ならびに
 (b) 上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの1つの、1、2、3、または抗原結合数の重鎖CDR(HCDR1、HCDR2、および/またはHCDR3)。実施形態では、このCDR(複数可)は、以下のとおり、HCDR1~3の1個以上のまたはすべてのアミノ酸配列を含んでいてもよい:HCDR1または1もしくは2個のアミノ酸が保存的に置換された改変HCDR1;HCDR2または1~4個のアミノ酸が保存的に置換された改変HCDR2;またはHCDR3または1もしくは2個のアミノ酸が保存的に置換された改変HCDR3
 の一方または両方を含む。

【0102】

抗G C C抗体の産生に有用な免疫原は、G C C、たとえばヒトG C C発現細胞(たとえば腫瘍細胞系、たとえばT84細胞または新鮮なもしくは凍結させた結腸腫瘍細胞、G C Cを発現する組換え細胞); G C C発現細胞の膜画分(たとえば結腸腫瘍細胞系、たとえ

10

20

30

40

50

ば T 8 4 細胞または新鮮なもしくは凍結させた結腸腫瘍細胞、G C C を発現する組換え細胞、たとえば、完全長 G C C またはその部分を発現する H T - 2 9 - G C C # 2 細胞、たとえば、G C C の細胞外ドメイン、たとえば配列番号 3 1 8 を含む部分を発現する C H O G C C # 2 7 細胞) ; 単離または精製 G C C 、たとえばヒト G C C タンパク質 (たとえば、たとえば、G C C を発現する胃腸腫瘍細胞または組換え細胞あるいはその改変体から単離された、生化学的に単離された G C C)、またはその部分 (たとえば G C C の細胞外ドメイン、G C C のキナーゼ相同性ドメイン、または G C C のグアニリルシクラーゼ触媒ドメインまたはたとえば、配列番号 2 2 8 の少なくとも約 8、1 0、1 2、1 4、1 6、2 0、2 4、2 8、もしくは 3 2 のアミノ酸残基を含むその部分に対応するペプチド) ; または配列番号 2 2 9 を含むもしくはそのシグナル配列がない (つまり、配列番号 2 2 9 のアミノ酸残基 1 ~ 約 2 1 もしくは 2 3 がいない) その成熟部分を含む免疫原、たとえば成熟 T O K 1 0 7 - h I g G タンパク質、配列番号 3 1 7 を含む。

10

【 0 1 0 3 】

免疫原は、生化学的操作、精製、免疫、または抗体価測定を促進するために異種の配列に融合することができる。そのような免疫原は、G C C の一部、たとえば細胞外ドメインおよび非 G C C ポリペプチドを含む部分を含むことができる。精製を容易にするまたは固体支持体、たとえばアフィニティーカラム、マイクロタイタープレート、もしくは他の適したアッセイ基材 / チップ上への固定を容易にするために、多くの選択肢が、融合タンパク質の構築に関して存在する。たとえば、融合成分は、ドメイン、たとえば、グルタチオンに結合することができるグルタチオン - S - トランスフェラーゼ / キナーゼ (G S T) ; プロテイン A もしくはプロテイン G に結合することができる免疫グロブリンの F c 領域 ; アフィニティーカラム上のニッケルもしくはコバルトに結合することができるアミノ酸残基、たとえば 2、3、4、5、好ましくは 6 つのヒスチジン残基 ; エピトープタグ、たとえば、タグ特異的抗体に結合することができる c - m y c がん遺伝子 (m y c - タグ)、F L A G タグ (米国特許第 4, 7 0 3, 0 0 4 号)、赤血球凝集素 (H A) タグ、T 7 遺伝子 1 0 タグ、V 5 タグ、H S V タグ、もしくは V S V - G タグの一部 ; または補因子、たとえば、ストレプトアビジンに結合することができるビオチンを追加することができる。

20

【 0 1 0 4 】

免疫グロブリンの F c 部分を含む免疫原は、効率的な抗体生成のために宿主免疫監視構成要素によって G C C のエピトープへの構造的な到達を可能にする配置で、溶解した状態でまたは細胞に付加された状態で、G C C を保持することができる。F c 領域を含む免疫グロブリン重鎖が、会合して、鎖間ジスルフィド結合を通して二量体になるので、F c 領域を有する融合物に起因する免疫原は、二量体となる。融合タンパク質の価 (v a l e n c y) は、F c 領域を提供する免疫グロブリンのタイプを反映することができる。たとえば、I g G タンパク質を有する融合物は、二量体であり得、I g A 融合物は、四量体の免疫原を作製することができ、I g M 融合物は、十量体の免疫原を作製することができ、後者の 2 つは、J 鎖の同時トランスフェクションにより促進される。F c 融合タンパク質についての例示的な免疫グロブリンは、I g G 1 である。典型的に使用される部分は、単一のエクソンによってコードされる I g G 1 ヒンジ、C H 2、および C H 3 ドメインを有する。このエクソンはまた、軽鎖由来のシステインとのジスルフィド結合に適応したシステインを有する、C H 1 領域の一部をも有するので、有用な改変は、対でないシステインが融合タンパク質にないことを確実にするために、C H 1 システインをたとえばセリンに変異させることである。そのような変異はまた、ヒンジの可撓性を増加させもする。

30

40

【 0 1 0 5 】

宿主種、たとえばマウス、ラット、ウサギ、ヤギにおける免疫のために免疫原に融合させるための、非宿主種から誘導される F c 部分、たとえばヒト I g F c 領域は、アジュバントとして作用する。このアジュバント機能は、F c エピトープおよび G C C エピトープの両方に対して特異的な抗体を誘発することができる。F c 反応性の抗体は、スクリーニングの間に同定し、廃棄することができる。F c 部分は、野生型配列またはエフェクタ

50

一機能を改変するために変異させる配列を有することができる。たとえば、変異させた定常領域（改変体）は、Fc受容体への結合および/または補体を固定するための能力を最小限にするために、融合タンパク質に組み込むことができる（たとえばWinterら、GB 2, 209, 757 B; Morrisonら、WO 89/07142; Morganら、WO 94/29351を参照されたい）。好ましい実施例では、Fc領域の基準に従って番号付けされたリシン235およびグリシン237は、たとえばアラニンに変異させる。Fc変異IgGを有する免疫原/融合タンパク質は、宿主においてFc受容体との相互作用を低下させることができる。好ましい可溶性免疫原融合タンパク質（シグナルペプチドを切断するための成熟および分泌の後の）は、TOK-107-hIgG（代替の名称hGCC-ECD/hIgG1 Fc）であり、これは、変異ヒトIgG1免疫グロブリンFc（配列番号317）に融合された配列番号228のアミノ酸残基24～430から成る。

【0106】

細胞発現免疫原を調製するために、免疫グロブリン部分は、B細胞受容体の免疫グロブリン部分を模倣するように構築することができる。たとえば、免疫グロブリンFc領域は、Fc受容体、Fc受容体、Fc/μ受容体、またはFc受容体などの免疫受容体由来の膜貫通領域を含むポリペプチドにさらに融合することができる。そのようなFc受容体細胞結合免疫原の適切な配向は、細胞表面上の適切な露出と共に、免疫原融合タンパク質を発現する細胞が抗原受容体複合体、たとえばB細胞IgM受容体またはIgD受容体のさらなる構成要素をさらに含む場合、改善され得る。複合体の適した構成要素は、ヘテロ二量体を形成する、MB-1およびB29などの免疫グロブリン（Ig）シースタンパク質（sheath protein）を含む（IgM受容体についてはCD79AおよびCD79B; Hombachら Eur. J. Immunol. 20巻: 2795～2799頁（1990年））。Igシースタンパク質は、たとえば、B細胞リンパ腫細胞系をトランスフェクトする場合、トランスフェクト細胞によって；またはたとえば別個のベクターもしくは同じベクターにおけるシースタンパク質との免疫原の同時トランスフェクションによって、内因的に提供することができる。マウスにおける免疫のための好ましいIgGシースタンパク質は、マウスCD79aおよびCD79b（それぞれGenBank受託番号NM_007655およびNM_008339）である。好ましい細胞結合免疫原融合タンパク質（シグナルペプチドを切断するための成熟および細胞表面への移行の後の）は、マウスIgG2a（たとえばGenPept受託番号AAB59661）膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン（配列番号318）に融合されたTOK-107-hIgG（hGCC-ECD/hIgG1 Fc）から成るTOK111産物である。

【0107】

抗GCC抗体分子、たとえば本明細書に記載のモノクローナル抗体、ヒト抗体、またはヒト化抗体が結合することができる有用なエピトープ、たとえばGCC分子由来の参照エピトープは、GCCの細胞外部分に見出すことができる。そのようなGCCのエピトープは、細胞の表面上で、たとえば細胞外部で、抗体分子に結合することができる。

【0108】

たとえば、抗GCC抗体分子に対するエピトープは、配列番号228の残基1～50または本発明の抗GCC抗体分子に結合するその断片、たとえばその5F9結合断片由来の残基（複数可）内に存在するか、またはそれを含むことができる。そのような断片は、配列番号228の残基1～25、5～30、10～35、15～40、20～45、25～50、5～45、10～40、15～35、20～30、または33～50を含むことができる。いくつかの実施形態では、抗GCC抗体分子、たとえば5F9抗体についてのエピトープは、残基50以降のGCCアミノ酸配列における、つまり、配列番号228の残基約50～1073から選択される、1つ以上のさらなるアミノ酸残基をさらに含む高次構造エピトープである。

【0109】

他の実施例では、抗GCC抗体分子についてのエピトープは、配列番号225または配

列番号 228 の残基 271 ~ 300 または本発明の抗 G C C 抗体分子に結合するその断片、たとえばその A B X - 198 - 結合断片、3 G 1 - 結合断片、8 F 1 - 結合断片、または 10 B 8 結合断片由来の残基（複数可）内に存在するまたはそれを含むことができる。そのような断片は、配列番号 228 の残基 281 ~ 290 もしくは配列番号 228 の残基 281 ~ 290（ここで、残基 281 はロイシンである）または配列番号 228 の残基 281 ~ 300 もしくは残基 271 ~ 290 を含むことができる。いくつかの実施形態では、抗 G C C 抗体分子、たとえば A B X - 198 - 抗体、3 G 1 - 抗体、8 F 1 - 抗体、または 10 B 8 抗体についてのエピトープは、1 つ以上のさらなるアミノ酸残基、つまり、たとえば、配列番号 228 の残基約 1 ~ 270 および / または約 301 ~ 1073 から選択される、G C C アミノ酸配列における、配列番号 225 でない残基をさらに含む高次構造エピトープである。

10

【0110】

他の実施例では、抗 G C C 抗体分子についてのエピトープは、配列番号 226 または配列番号 228 の残基 351 ~ 375 または本発明の抗 G C C 抗体分子に結合するその断片、たとえばその A B X - 012 - 結合断片、A B X - 338 - 結合断片、または A B X - 106 結合断片由来の残基（複数可）内に存在するまたはそれを含むことができる。そのような断片は、配列番号 228 の 356 ~ 370 または配列番号 228 の残基 351 ~ 370 または配列番号 228 の残基 356 ~ 375 を含むことができる。いくつかの実施形態では、抗 G C C 抗体分子、たとえば A B X - 012 - 抗体、A B X - 338 - 抗体、または A B X - 106 抗体についてのエピトープは、1 つ以上のさらなるアミノ酸残基、つまり、たとえば、配列番号 228 の残基約 1 ~ 350 および / または約 376 ~ 1073 から選択される、G C C アミノ酸配列における、配列番号 226 でない残基をさらに含む高次構造エピトープである。

20

【0111】

そのようなエピトープまたは細胞外ドメイン、たとえば、配列番号 228 のアミノ酸残基 24 ~ 420 またはその参照部分、たとえば G C C の残基 24 ~ 75、75 ~ 150、150 ~ 225、225 ~ 300、300 ~ 375、もしくは 375 ~ 420 由来の残基（複数可）内に存在するもしくはそれを含むエピトープに対して産生される抗体、またはそれから誘導される抗体分子は、本明細書に記載のとおり、治療用抗体または診断用抗体として有用であり得る。

30

【0112】

一実施形態では、抗 G C C 抗体分子は、1 つ以上の以下の特性を有する：

a) それは、結合について、たとえば、細胞表面 G C C または精製 G C C への結合について、表 1 および表 2 に要約される上記に参照される抗 G C C 抗体分子のうちの 1 つ、たとえばヒトハイブリドーマ抗体（たとえば 5 F 9）、選択されたリンパ球抗体（たとえば A b x - 229）、またはマウス抗体（たとえば 3 G 1）と競合する；

b) それは、表 1 および表 2 に要約される上記に参照される抗 G C C 抗体分子のうちの 1 つとして、たとえばヒトハイブリドーマ抗体（たとえば 5 F 9）、選択されたリンパ球抗体（たとえば A b x - 229）、またはマウス抗体（たとえば 3 G 1）として、同じまたは実質的に同じ、G C C のエピトープに結合する。一実施形態では、抗体は同じエピトープに結合するが、それは 1 つ以上のペプチドアレイアッセイによって決定されたとおりであるかまたはたとえば、細胞表面上に発現される切断変異体、キメラ、もしくは点変異体または膜調製物への結合によって決定されたとおりであり、それらのアッセイは本明細書に記載のとおりである；

40

c) それは、表 1 および表 2 に要約される上記に参照される抗 G C C 抗体分子のうちの 1 つ、たとえばヒトハイブリドーマ抗体（たとえば 5 F 9）、選択されたリンパ球抗体（たとえば A b x - 229）、またはマウス抗体（たとえば 3 G 1）のエピトープと共通の、少なくとも 1、2、3、4、5、8、10、15、または 20 の隣接アミノ酸残基を有するエピトープに結合する；

d) それは、本発明の抗 G C C 抗体が結合するヒト G C C の領域に結合し、その領域、た

50

例えば細胞外領域または細胞質領域は、長さが10～15、10～20、20～30、または20～40の残基であり、その結合は、たとえば、切断変異体への結合によって決定される。一実施形態では、抗GCC抗体分子は、ヒトGCCの細胞外領域に結合する。一実施形態では、抗GCC抗体分子は、配列番号228のアミノ酸残基24～420によって定められる細胞外ドメインのヒトGCCの部分に結合することができる。一実施形態では、抗GCC抗体分子は、配列番号228のアミノ酸残基931～954のグアニル酸シクラーゼ識別特性部位 (signature site) に結合することができる；または

e) それは、本明細書に記載の参照エピトープに結合する。

【0113】

一実施形態では、抗GCC抗体分子は、GCC配列ILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLLVLTLS (配列番号225) に結合する。

【0114】

一実施形態では、抗GCC抗体分子は、GCC配列FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV (配列番号226) に結合する。

【0115】

一実施形態では、抗体分子は、高次構造エピトープに結合する。他の実施形態では、抗体分子は、線状エピトープに結合する。

【0116】

抗GCC抗体分子は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単一特異性抗体、キメラ抗体 (米国特許第6,020,153号を参照されたい)、またはヒト抗体もしくはヒト化抗体、またはその抗体断片もしくは誘導体とすることができる。前述のものはいずれかの合成改変体または遺伝子操作された改変体 (米国特許第6,331,415号を参照されたい) もまた、本発明によって企図される。モノクローナル抗体は、従来のマウスモノクローナル抗体の方法論、たとえば、KohlerおよびMilstein、Nature 256巻:495頁(1975年)の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む様々な技術によって産生することができる。一般にHarlow, E. およびLane, D. (1988年) Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NYを参照されたい。

【0117】

タンパク質、たとえばGCCまたは可溶性部分またはGCCの一部を含む融合タンパク質 (たとえばTOK107-hIg)、または細胞もしくはそれ由来の膜画分、たとえば、表面露出GCCもしくはその部分 (たとえばpLKTOK4産物もしくはpLKTOK111産物) を発現する細胞を用いる免疫は、応答を誘導する方法において、たとえば、アジュバント、たとえばフロイント完全アジュバントと共に、注射のために調製された免疫原を用いて実行することができる。他の適したアジュバントは、TITERMAX GOLD (登録商標) アジュバント (CYTRX Corporation、Los Angeles、CA) およびミョウバンを含む。低分子ペプチド免疫原は、キーホールリンペットヘモシニアンなどのより大きな分子に連結することができる。マウスは、多くの部位に、たとえば腹膜 (i.p.)、尾のつけ根、もしくは足蹠、または部位の組み合わせ、たとえばiPおよび尾のつけ根 (BIP) に、多くの方法で、たとえば皮下、静脈内、または筋肉内に、注射することができる。ブースター注射は、同じまたは異なる免疫原を含むことができ、アジュバント、たとえばフロイント不完全アジュバントをさらに含むことができる。DNA、たとえば、GCCまたはその部分もしくはGCCまたはその部分を含む融合タンパク質をコードする (たとえばTOK107-hIgをコードする) DNAを用いる免疫は、遺伝子銃技術を使用して注射することができる。たとえば、DNAは、微視的金粒子上に負荷され、短い期間にわたって、頻繁な間隔でマウスに注射される。

【0118】

一般に、モノクローナル抗体が所望される場合、ハイブリドーマは、不死細胞系由来の

10

20

30

40

50

適した細胞（たとえばSP2/0、P3X63Ag8.653、またはヘテロミエロームなどのミエローム細胞系）を抗体産生細胞と融合することによって産生される。抗体産生細胞は、ヒトの末梢血または好ましくは脾臓もしくはリンパ節、ヒト抗体トランスジェニック動物、または対象の抗原を用いて免疫された他の適した動物から得ることができる。ヒト起源の抗体（たとえばヒト抗体）を産生する細胞は、適した方法、たとえば、ヒト抗体産生細胞およびヘテロミエロームもしくはトリオーム（*triooma*）の融合またはエプスタイン-バーウイルスによる感染を介しての活性化ヒトB細胞の不死化を使用して産生することができる（たとえば米国特許第6,197,582号（*Trakht*）；*Niedbala*ら、*Hybridoma*, 17巻：299~304頁（1998年）；*Zanella*ら、*J Immunol Methods*, 156巻：205~215頁（1992年）；*Gustafsson*ら、*Hum Antibodies Hybridomas*, 2巻：26~32頁（1991年）を参照されたい）。融合または不死化抗体産生細胞（ハイブリドーム）は、選択的培養条件を使用して単離し、限界希釈法によってクローニングすることができる。所望の特異性を有する抗体を産生する細胞は、適したアッセイを使用して同定することができる（たとえばELISA（たとえばマイクロタイターウェル上に固定された免疫原、たとえばTOK107-hIgGを用いる）またはGCCもしくはその部分を発現する細胞、たとえばpLKTOK111産物を発現する細胞に対するFACSによって）。たとえば、GCC免疫原が親和性試薬である融合成分を含む場合、この成分は、GCCを含む融合タンパク質またはその部分がマトリックス、たとえばプロテインGコート、ストレプトアビジンコート、グルタチオン誘導体化、または抗体コートマイクロタイタープレートまたはアッセイチップに結合するのを可能にすることができ、これは、次いで、免疫血清またはハイブリドームもしくは抗体発現組換え細胞由来の順化培地と組み合わせられ、その混合物は、複合体形成を促す条件下で（たとえば塩およびpHについての生理学的条件で）培養される。インキュベーションに続いて、マイクロタイタープレートウェルまたはチップの細胞は、あらゆる非結合構成要素を除去するために洗浄され、抗GCC抗体による結合が測定される。

10

20

【0119】

実施形態では、治療上の適用については、本発明の抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。ヒト抗体またはヒト化抗体の利点は、それらが、宿主レシピエントにおける抗体の免疫原性を潜在的に減少させまたは排除し、生物学的利用能の増加および有害な免疫反応の可能性の低下を可能にし、したがって、潜在的に、複数回の抗体投与を可能にすることである。

30

【0120】

改変抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはCDR移植抗体を含む。ヒト抗マウス抗体（HAMMA）応答により、キメラ抗体または別の方法でヒト化抗体の開発に至った。キメラ抗体は、ヒト定常領域およびマウス可変領域を有するが、特に、抗体の慢性的なまたは多用量の利用において、ある種のヒト抗キメラ抗体（HACA）応答が観察されるといふことが予想される。そのようなマウスまたはラット誘導タンパク質の存在は、抗体の急速な排除をもたらし得るか、あるいは患者による抗体に対する免疫応答の生成をもたらし得る。マウスまたはラット誘導抗体の利用を回避するために、配列が抗体配列に導入され、その抗体配列をヒト抗体配列により近いものにしたヒト化抗体またはげっ歯動物へヒト抗体機能を導入することによって生成される完全ヒト抗体が開発され、それによりげっ歯動物が完全ヒト配列を有する抗体を産生するようになった。ヒト抗体は、マウス、ウサギ、またはラットの可変領域および/または定常領域を有する抗体と関連するいくつかの問題を回避する。

40

ヒト抗体

完全ヒト抗体分子は、マウスmAbまたはマウス誘導体化mAbに固有の免疫原性応答およびアレルギー性応答を最小限にし、したがって、投与される抗体の効力および安全性を増加させることができる。完全ヒト抗体分子の使用は、繰り返しの抗体投与を必要とする、炎症、自己免疫、およびがんなどの、慢性的なおよび再発性のヒト疾患の処置におい

50

て実質的な利点を提供することができる。さらに、ヒト抗体分子は、動物の抗体遺伝子発現が抑制され、ヒト抗体分子遺伝子発現と機能的に置き換えられた動物の遺伝子操作された株を使用して産生することができる。

【0121】

ヒト抗体を作製するための方法は、当技術分野において公知である。ヒト抗体を作製するための1つの方法は、トランスジェニックマウスなどのトランスジェニック動物の利点を利用する。これらのトランスジェニック動物は、自身のゲノムに挿入された、ヒト抗体産生ゲノムの実質的な部分、たとえば、機能的な再構成を受け得るヒト免疫グロブリン座を含有し、動物自体の内因性の抗体産生は、抗体の産生において欠損させる。そのようなトランスジェニック動物を作製するための方法は、当技術分野において公知である。そのようなトランスジェニック動物は、XENOMOUSE（商標）技術を使用してまたは「ミニローカス（minilocus）」アプローチを使用して作製することができる。XENOMIC（商標）を作製するための方法は、参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第6,162,963号、第6,150,584号、第6,114,598号、および第6,075,181号において記載されている。「ミニローカス」アプローチを使用して、トランスジェニック動物を作製するための方法は、米国特許第5,545,807号、第5,545,806号、および第5,625,825号において記載されており、国際特許出願公開WO93/12227もまた参照されたい。これらはそれぞれ参照によって本明細書において組み込まれる。他のトランスジェニックヒト抗体産生マウスは、HUMAB-MOUSE（登録商標）、KIRIN TC MOUSE（商標）トランスクロモソームマウス、KM-MOUSE（登録商標）（MEDAREX、Princeton、NJ）を含む。

10

20

【0122】

ヒト抗体トランスジェニック動物技術、たとえばXENOMOUSE（商標）技術を使用して、ヒト抗体は、対象の抗原を用いて、XENOMOUSE（商標）マウス（Abgenix、Fremont、Calif.）を免疫することによって得ることができる。リンパ細胞（B細胞など）は、抗体を発現するマウスから回収される（たとえば、脾臓組織から単離される）。これらの回収された細胞は、標準的な方法論を使用して、不死ハイブリドーマ細胞系を調製するために骨髓型の細胞系と融合することができる。これらのハイブリドーマ細胞系は、対象の抗原に特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞系を同定するためにスクリーニングし、かつ選択することができる。

30

【0123】

ヒト抗体トランスジェニック動物は、特異性および親和性などの所望の特性を有する抗体をコードする核酸が富化され得る核酸の供給源を提供する。たとえば、抗体または抗体可変領域をコードする核酸は、GCCタンパク質またはその改変体もしくは部分を用いて免疫されたヒト抗体トランスジェニックマウスから単離されてもよい。単離核酸またはその部分（たとえば、可変領域、CDR、フレームワーク領域をコードする部分）は、GCCタンパク質に結合する抗体または抗原結合断片に対して富化された抗体または抗体の抗原結合断片（たとえば単鎖抗原結合断片、二重鎖抗原結合断片）のライブラリーを産生するために、任意の適した方法（たとえばファージディスプレイ）を使用して発現することができる。そのようなライブラリーは、免疫されたヒト抗体トランスジェニック動物において産生される抗体のレパートリーに比べて、増強された多様性（たとえば重鎖可変領域および軽鎖可変領域の対形成を通してのコンビナトリアル多様性）を示すことができる。そのライブラリーは、所望の特性（たとえば特異性、親和性）を有する抗体または抗原結合断片を同定するために任意の適したアッセイ（たとえばGCCタンパク質結合アッセイ）を使用してスクリーニングすることができる。所望の特性を有する抗体または抗原結合断片をコードする核酸は、任意の適した方法を使用して回収することができる（たとえば米国特許第5,871,907号（Winterら）および米国特許第6,057,098号（Buechlerら）を参照されたい）。

40

【0124】

50

その代わりに、抗体は、ハイブリドーマ細胞系以外の細胞系において発現することができる。より具体的には、特定の抗体をコードする配列は、抗体を産生する細胞からクローニングし、適した哺乳動物の宿主細胞の形質転換に使用することができる。好ましい方法において、免疫マウス由来の脾臓および/またはリンパ節のリンパ球は、マウスから単離され、参照によって本明細書において組み込まれる Babcookら、Proc Natl Acad Sci U S A、93巻：7843～8頁(1996年)において以前に記載されるように、ブランクアッセイにおいて培養される。手短に言えば、細胞は、GCC抗原を用いてコートされた、ヒツジ赤血球を有する寒天で培養され、GCC抗原に対してmAbを分泌する細胞は、補体を固定し、mAb産生細胞の周囲の赤血球を直ちに溶解する。澄清化したブランク内の細胞は、免疫グロブリン配列の配列決定および発現ベクター内へのサブクローニングのために採取される。GCC特異的なmAbを含有する一時的にトランスフェクトされた細胞由来の上清は、続いて、ELISAによっておよびフローサイトメトリーによって細胞への結合についてスクリーニングされる。特定のエピトープに結合するCDRを含む産生ヒト抗体の可変配列またはその部分は、改変抗体の産生のために利用されてもよい。たとえば、産生抗体の可変領域は、構築物の移入、構築物の発現の増加、および/または完全長抗体を発現することができるベクターへの構築物の組み込みを容易にするために、発現カセットの中にスプライシングされてもよい。たとえばUS20060147445を参照されたい。特定の実施形態では、発現カセットは、IgG1アイソタイプの重鎖定常領域を含む。

10

【0125】

20

Selected Lymphocyte Antibody Method (SLAM、米国特許第5,627,052号、Babcookら Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93巻：7843～7848頁(1996年)を参照されたい)もまた、対象の抗体を提供することができる細胞を同定するために使用することができる。SLAMでは、B細胞が直接培養され、したがって、典型的には、マウスによってもともと生成されるわずかな割合の抗体しか捕捉しないハイブリドーマ技術が回避される。マイクロプレートベースのアッセイを使用して、B細胞は、数日の期間にわたって速やかにアッセイされる。典型的に、何千もの抗原反応性細胞クローンが同定され、それは、何千もの個々の抗原特異的、たとえばGCC特異的モノクローナル抗体を表わす。単一の実験において同定される異なる抗原反応性モノクローナル抗体の数は、典型的に、何倍にも増加する。親和性および機能によって抗体を測定し、ランク付けるためのさらなる迅速なマイクロプレートベースのアッセイを適用した後に、非常に高品質の抗体を産生する個々のB細胞クローンを選択することができる。さらに、ハイブリドーマ生成ステップを回避することによって、産出物を、組換え生産細胞系中に速やかに移動することができる。本技術を使用して選択された個々のB細胞は、単離され、その抗体遺伝子は、生産細胞系に直接導入することができる。次いで、結果として生じる細胞系は、ハイブリドーマ細胞系開発のために必要とされるものと本質的に同じ時間軸(time line)にわたって臨床試験のために発達させることができる。

30

【0126】

ヒトmAb 5F9 (IgG2、カッパ)は、ハイブリドーマ46.5F9.8.2とも呼ばれるハイブリドーマ5F9によって産生することができ、これは、受託番号PTA-8132の下で、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 20110、U.S.A.に、Millennium Pharmaceuticals Inc.、40 Landsdowne Street、Cambridge、MA、02139、USAを代表して2007年1月10日に寄託された(その寄託は、Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedureに従って成され、その要求を満たす)。本発明は、ハイブリドーマ5F9、それが産

40

50

生する抗体、その抗原結合断片、ならびに抗体およびその部分（たとえば重鎖、重鎖可変領域、軽鎖、軽鎖可変領域、CDR）をコードする核酸に関する。本明細書に記載のとおり、ハイブリドーマ5F9は、IgG2（カッパ抗体）を産生する。

【0127】

ヒト化およびディスプレイ技術および抗体に対する改変

上記に議論されるように、免疫原性が低下した抗体を産生することは有利である。これは、ヒト化の技術および適切なライブラリーを使用したディスプレイ技術に関連して行うことができる。マウス抗体または他の種由来の抗体は、当技術分野において公知の技術を使用して、ヒト化または霊長類化する（*primatize*）ことができることが十分に理解される。たとえばWinterおよびHarris *Immunol Today* 14巻：43～46頁（1993年）およびWrightら *Crit. Reviews in Immunol.* 12125～168頁（1992年）を参照されたい。対象の抗体は、CH1、CH2、CH3、ヒンジドメイン、および/またはフレームワークドメインを対応するヒト配列と置換するための組換えDNA技術によって操作されてもよい（WO92/02190ならびに米国特許第5,530,101号、第5,585,089号、第5,693,761号、第5,693,792号、第5,714,350号、および第5,777,085号を参照されたい）。さらに、キメラ免疫グロブリン遺伝子の構築のためのIg cDNAの使用は、当技術分野において公知である（Liuら *Proc Natl Acad Sci USA*, 84巻：3439（1987年）およびJ. *Immunol.* 139巻：3521頁（1987年））。mRNAは、抗体を産生するハイブリドーマまたは他の細胞から単離され、cDNAを生成するために使用される：対象のcDNAは、特異的なプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応によって増幅されてもよい（米国特許第4,683,195号および第4,683,202号）。

【0128】

その代わりに、ファージディスプレイ技術（たとえばMcCaffertyら、*Nature*, 348巻：552～553頁（1990年）を参照されたい）は、免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子から、たとえば、非免疫ドナー由来のレパトリーから *in vitro*においてヒト抗体および抗体断片を産生するために使用することができる。この技術に従って、抗体Vドメイン遺伝子は、M13またはfdなどの、糸状バクテリオファージの主要なまたは微量のコートタンパク質遺伝子にインフレームでクローニングされ、ファージ粒子の表面に機能的な抗体断片として示される。糸状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含有するので、抗体の機能的な特性に基づく選択はまた、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択をももたらす。したがって、ファージは、B細胞の特性のうちのいくつかを模倣する。ファージディスプレイは、様々な方式において実行することができる；それらの総説については、たとえばJohnsonおよびChiswell、*Current Opinion in Structural Biology*, 3巻：564～571頁（1993年）を参照されたい。V遺伝子セグメントのいくつかの供給源は、ファージディスプレイに使用することができる。Clacksonら、*Nature*, 352巻：624～628頁（1991年）は、免疫マウスの脾臓から誘導されたV遺伝子の小さなランダムコンビナトリアルライブラリーから抗オキサゾロン抗体の多様な配列を単離した。非免疫ヒトドナー由来のV遺伝子のレパトリーを構築することができる、Marksら、*J. Mol. Biol.*, 222巻：581～597頁（1991年）またはGriffithら、*EMBO J.*, 12巻：725～734頁（1993年）によって記載される技術に本質的に従って、多様な一群の抗原（自己抗原を含む）に対する抗体を単離することができる。米国特許第5,565,332号および第5,573,905号もまた参照されたい。ディスプレイライブラリーは、人工アミノ酸配列を含有する抗体または抗体の抗原結合断片を含有することができる。たとえば、そのライブラリーは、人工CDR（たとえばランダムアミノ酸配列）およびヒトフレームワーク領域を含有するFab断片を含有することができる（たとえば米国特許第6,300,064号（Knappikら）を参照されたい）。

10

20

30

40

50

【0129】

ヒト抗体はまた、*in vitro* 活性化B細胞によって生成されてもよい（米国特許第5,567,610号および第5,229,275号を参照されたい）。

【0130】

ヒト定常領域遺伝子の配列は、Kabataら（1991年）*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, N. I. H. publication no. 91-3242において見出してもよい。ヒトC領域遺伝子は、公知のクローンから容易に入手可能である。アイソタイプの選択は、補体固定または抗体依存性細胞傷害における活性などの所望のエフェクター機能によって導かれる。アイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4とすることができる。特定の実施形態では、本発明の抗体分子は、IgG1およびIgG2である。ヒト軽鎖定常領域（カッパまたはラムダ）のどちらでも使用されてもよい。次いで、キメラ抗体、ヒト化抗体は、従来の方法によって発現される。

10

【0131】

いくつかの実施形態では、本発明の抗GCC抗体分子は、GCCを発現する細胞（たとえば腫瘍細胞）に対して抗体依存性細胞傷害（ADCC）をも引き出すことができる。IgG1およびIgG3アイソタイプを有する抗体は、Fc受容体に結合するそれらの能力により、抗体依存性の細胞傷害性能力においてエフェクター機能を誘発するのに有用である。IgG2およびIgG4アイソタイプを有する抗体は、Fc受容体に結合する能力が低いために、ADCC応答を最小限にするのに有用である。関連する実施形態では、たとえば改変真核生物細胞系における成長による、Fc領域における置換または抗体のグリコシル化組成における変化は、抗GCC抗体が結合する細胞を認識する、その細胞に結合する、および/またはその細胞に対する細胞傷害性を媒介する、Fc受容体の能力を増強するために成すことができる（たとえば米国特許第7,317,091号、第5,624,821号、およびWO00/42072、Shieldsら *J. Biol. Chem.* 276巻：6591~6604頁（2001年）、Lazarus *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103巻：4005~4010頁（2006年）、Satoら *Expert Opin Biol. Ther.* 6巻：1161~1173頁（2006年）を含む刊行物を参照されたい）。ある実施形態では、抗体または抗原結合断片（たとえばヒト起源の抗体、ヒト抗体）は、機能（たとえばエフェクター機能）を改変するまたは調整するアミノ酸置換または交換を含むことができる。たとえば、ヒト起源の定常領域（たとえば1定常領域、2定常領域）は、補体活性化および/またはFc受容体結合を低下させるように設計することができる（たとえば、これらの全教示が参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第5,648,260号（Winterら）、第5,624,821号（Winterら）、および第5,834,597号（Tsoら）を参照されたい）。好ましくは、そのようなアミノ酸置換または交換を含有するヒト起源の定常領域のアミノ酸配列は、ヒト起源の非改変定常領域のアミノ酸配列に対して完全長にわたって少なくとも約95%同一である、より好ましくは、ヒト起源の非改変定常領域のアミノ酸配列に対して完全長にわたって少なくとも約99%同一である。

20

30

40

【0132】

他のさらなる実施形態では、エフェクター機能はまた、抗体のグリコシル化パターンを調整することによって改変することができる。改変とは、抗体において認められる1つ以上の炭水化物成分の欠失および/または抗体に存在しない1つ以上のグリコシル化部位の追加を意味する。たとえば、抗体のFc領域に結合するフコースを欠く成熟炭水化物構造物を有する増強されたADCC活性を有する抗体は、米国特許出願公開第2003/0157108号（Presta）において記載されている。米国特許出願公開第2004/0093621号（Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd）もまた参照されたい。Glycofiもまた、抗体の特定のグリコフォームを産生することができる酵母細胞系を開発した。

50

【0133】

さらにまたはその代わりに、フコシル残基の量が低下した低フコシル化(hypofucosylated)抗体または2つに枝分かれした(bisecting)GlcNac構造物が増加した抗体などの改変されたタイプのグリコシル化を有する抗体を作製することができる。そのような改変されたグリコシル化パターンは、抗体のADCC能力を増加させることが実証されている。そのような炭水化物改変物は、たとえば、改変されたグリコシル化機構を有する宿主細胞において抗体を発現させることによって行うことができる。改変されたグリコシル化機構を有する細胞は、当技術分野において記載されており、本発明の組換え抗体を発現するように操作される宿主細胞として使用し、それによって、グリコシル化が改変された抗体を産生することができる。たとえば、HangらによるEP 1,176,195は、そのような細胞系において発現される抗体が低フコシル化(hypofucosylation)を示すように、フコシルトランスフェラーゼをコードする、機能的に破壊されたFUT8遺伝子を有する細胞系を記載する。PrestaによるPCT公開WO03/035835は、アスパラギン(297)連結炭水化物にフコースを付加する能力が低下した改変体CHO細胞系、Lec13細胞を記載し、これもまた、その宿主細胞において発現される抗体の低フコシル化をもたらす(たとえばShields, R.L.ら、2002年 J. Biol. Chem. 277巻:26733~26740頁を参照されたい)。UmañaらによるPCT公開WO99/54342は、操作された細胞系において発現される抗体が、抗体のADCC活性の増加をもたらす、2つに枝分かれしたGlcNac構造物の増加を示すように、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ(たとえばベータ(1,4)-NアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII))を発現するように操作された細胞系を記載する(Umañaら、1999年 Nat. Biotech. 17巻:176~180頁もまた、参照されたい)。

10

20

【0134】

ヒト化抗体はまた、CDR移植アプローチを使用して作製することもできる。そのようなヒト化抗体の生成の技術は、当技術分野において公知である。一般に、ヒト化抗体は、GCCに結合する抗体の可変重配列および可変軽配列をコードする核酸配列を得、可変重配列および可変軽配列における相補性決定領域または「CDR」を同定し、かつヒトフレームワーク核酸配列にCDR核酸配列を移植することによって産生される(たとえば米国特許第4,816,567号および第5,225,539号を参照されたい)。CDRおよびフレームワーク残基の位置は、決定することができる(Kabat, E.A.ら(1991年) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242およびChothia, C.ら J. Mol. Biol. 196巻:901~917頁(1987年)を参照されたい)。本明細書に記載の抗GCC抗体分子は、表5および表6に列挙されるCDRをコードするCDRアミノ酸配列およびCDR核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、表5および表6由来の配列は、本明細書に記載の治療方法または診断方法における使用のためにGCCを認識する分子に組み込むことができる。選択されるヒトフレームワークは、in vivo投与に適したものであり、それが免疫原性を示さないことを意味する。たとえば、そのような決定は、そのような抗体のin vivoにおける使用を伴う先の知見およびアミノ酸類似性に関する研究によって成すことができる。適したフレームワーク領域は、ドナー抗体、たとえば抗GCC抗体分子(たとえば3G1)の等価な部分(たとえばフレームワーク領域)のアミノ酸配列内のフレームワーク領域の全長にわたって、少なくとも約65%のアミノ酸配列同一性、好ましくは、少なくとも約70%、80%、90%、または95%のアミノ酸配列同一性を有するヒト起源の抗体から選択することができる。アミノ酸配列同一性は、デフォルトパラメータを使用して、CLUSTAL Wなどの適したアミノ酸配列アライメントアルゴリズムを使用して決定することができる(Thompson J.D.ら、Nucle

30

40

50

ic Acids Res. 22巻: 4673~4680頁(1994年)。

【0135】

ヒト化されることとなるクローニング抗体のCDRおよびFRが一度同定されたら、CDRをコードするアミノ酸配列が、同定され、対応する核酸配列が、選択されるヒトFR上に移植される。これは、公知のプライマーおよびリンカーを使用して行うことができ、これらの選択は、当技術分野において公知である。特定のヒト抗体のCDRはすべて、非ヒトCDRの少なくとも1つの部分と置き換えられてもよいし、またはCDRのうちのごく一部が非ヒトCDRで置き換えられてもよい。所定の抗原へのヒト化抗体の結合に必要とされるCDRの数を置き換えることのみが必要である。CDRが選択されたヒトFR上に移植された後に、結果として生じる「ヒト化」可変重配列および可変軽配列は、GCCに結合するヒト化Fvまたはヒト化抗体を産生するように発現される。好ましくは、CDR移植(たとえばヒト化)抗体は、ドナー抗体に類似する、実質的にドナー抗体と同じ、またはドナー抗体の親和性より好適な親和性で、GCCタンパク質に結合する。典型的に、ヒト化可変重配列および軽配列は、GCCに結合する完全な抗体が得られるように、ヒト定常ドメイン配列を有する融合タンパク質として発現される。しかしながら、定常配列を含有しないヒト化Fv抗体を産生することができる。

10

【0136】

特定のアミノ酸が置換された、欠失した、または付加されたヒト化抗体もまた、本発明の範囲内である。特に、ヒト化抗体は、抗原への結合を改善するように、フレームワーク領域におけるアミノ酸置換を有することができる。たとえば、ヒト化免疫グロブリン鎖の、選択される少数のアクセプターフレームワーク残基は、対応するドナーアミノ酸によって置き換えることができる。置換の位置は、CDRに近接するまたはCDRと相互作用することができるアミノ酸残基を含む(たとえば米国特許第5,585,089号または第5,859,205号を参照されたい)。アクセプターフレームワークは、成熟ヒト抗体フレームワーク配列またはコンセンサス配列とすることができる。本明細書において使用されるように、用語「コンセンサス配列」は、最も頻繁に認められるまたは関連するファミリーメンバーの間で領域内の配列におけるそれぞれの位置で最も共通する残基から考えられる配列を指す。ヒト可変領域の異なるサブグループについてのコンセンサス配列を含む、多くのヒト抗体コンセンサス配列が、入手可能である(Kabat, E.A.ら、*Sequences of Proteins of Immunological Interest*、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、U.S. Government Printing Office(1991年)を参照されたい)。Kabatデータベースおよびそのアプリケーションは、たとえば、National Center for Biotechnology Information、Bethesda、MDのIgBLASTを介してオンラインで自由に入手可能である(Johnson, G.およびWu, T.T.、*Nucleic Acids Research* 29巻: 205~206頁(2001年)もまた参照されたい)。

20

30

【0137】

抗体をヒト化するための他の技術は、1992年12月23日に公開されたPadlanらEP 519596 A1において記載されている。

40

【0138】

抗GCC抗体分子は、ヒトT細胞エピトープの特異的な欠失またはこれらの内容が参照によって本明細書において組み込まれるPCT公開WO98/52976およびWO00/34317において開示される方法による「脱免疫」によって改変されてもよい他のヒト化抗体を含む。手短かに言えば、抗GCC抗体のマウス重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、MHCクラスIIに結合するペプチドについて分析することができる;これらのペプチドは、潜在的なT細胞エピトープを表す。潜在的なT細胞エピトープの検出については、「ペプチドスレッディング(peptide threading)」と称されるコンピュータモデリングアプローチを適用することができ、さらに、ヒトMHCクラスII

50

結合ペプチドのデータベースは、PCT公開WO98/52976およびWO00/34317に記載のとおりマウスVHおよびVL配列に存在するモチーフについて検索することができる。これらのモチーフは、18の主要なMHCクラスII DRアロタイプのいずれかに結合し、したがって潜在的なT細胞エピトープを構築する。検出された潜在的なT細胞エピトープは、可変領域における少数のアミノ酸残基の置換によってまたは好ましくは単一アミノ酸置換によって排除することができる。可能な限り、保存的置換は、排他的ではないが多くの場合に行なわれ、ヒト生殖細胞系列抗体配列におけるその位置で、共通のアミノ酸が使用されてもよい。ヒト生殖細胞系列配列は、Tomlinson, I. A.ら、J. Mol. Biol. 227巻: 776~798頁(1992年); Cook, G. P.ら、Immunol. Today 16巻(5号): 237~242頁(1995年); Chothia, D.ら、J. Mol. Bio. 227巻: 799~817頁(1992年)において開示されている。VBASEディレクトリーは、ヒト免疫グロブリン可変領域配列の包括的なディレクトリーを提供する(Tomlinson, I. A.ら MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UKによって編集)。抗GCC抗体の脱免疫VHおよびVLをマウスVHおよびVL遺伝子の変異誘発によって構築した後に、その変異誘発された可変配列は、必要に応じて、ヒト定常領域、たとえばヒトIgG1定常領域または定常領域に融合することができる。

【0139】

他の実施形態では、CDR移植抗体による免疫原性応答の低下は、CDR中のアミノ酸残基の変化、たとえば欠失、置換によって達成することができる(Kashmiriら Methods 36巻: 25~34頁(2005年)、米国特許第6,818,749号、Tanら J. Immunol. 169巻: 1119~1125頁(2006年))。たとえば、抗原との接触に關与する位置の残基は、好ましくは、変化されない。典型的に、そのような残基、SDRは、抗体の間で高レベルの可変性を示す位置にある。たとえば、抗GCC抗体分子から、たとえば、本明細書に記載の抗体から、Clustal法(Higgins D. G.ら、Meth. Enzymol. 266巻: 383~402頁(1996年))によって誘導されるコンセンサス配列(たとえば配列番号302~307、表5)は、SDRを同定するのを促進する。本明細書に記載のヒト抗GCC抗体分子において、SDRは、以下の、重鎖CDR1の少なくとも最初の残基またはいくつかの実施形態では、最初の4つの残基; 重鎖CDR2の少なくともN末端部分、たとえば最初の7個、10個、または13個の残基; 重鎖CDR3のほぼすべて; 軽鎖CDR1のC末端部分、たとえば、残基6、8、または9の後; 軽鎖CDR2のほぼ最初の、中央の、および/または最後の残基; ならびに軽鎖CDR3の大部分または少なくとも、残基2もしくは3の後、である。したがって、抗GCC抗体分子のヒト化または改変の後にGCCタンパク質への結合を維持するために、抗GCC抗体分子のCDRのそのようなSDR残基は、CDRの他の残基またはフレームワーク領域の残基よりも、変化を、たとえば、マウス残基からヒトコンセンサス残基への変化を受けにくい。反対に、非ヒト、たとえばマウスCDR中の残基を、ヒトCDR、たとえば本明細書に記載の抗GCC抗体分子のCDR(たとえば表5に列挙される配列)中のコンセンサスとして同定される残基に変化させることは有益であり得る。たとえば、セリンは、重鎖CDR1のC末端についてのヒト残基を表わし得る、および/またはチロシンは、重鎖CDR1の第2のおよび/もしくは第3の残基についてのヒト残基を表わし得る; 重鎖CDR2は、S-(L/V)-K-(S/G)(配列番号312)で終わり、ヒトCDRを表わし得る; ヒトCDR3を表わすように、重鎖CDR3における4~6個の残基および/またはアスパルテート6~9個の残基の後にグリシンであり得る; 軽鎖CDR1は、(K/R)-(A/S)-SQS-(V/L)-(S/L)(配列番号313)で始まり、ヒトCDRを表わし得る; 軽鎖CDR2は、第3の残基にセリンおよび/もしくは第5の残基にアルギニンを有し、ヒトCDRを表わし得る; ならびに/または軽鎖CDR3は、第2の残基にグルタミンおよび/または第3の残基にチロシンもしくはセリンを有し、ヒトCDRを表わし得る。

10

20

30

40

50

【0140】

完全な抗体でない抗GCC抗体もまた、本発明に有用である。そのような抗体は、上に記載される抗体のいずれかからも誘導されてもよい。このタイプの有用な抗体分子は、(i) Fab断片、VL、VH、CL、およびCH1ドメインから成る一価断片；(ii) F(ab')₂断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片；(iii) VHおよびCH1ドメインから成るFd断片；(iv) 抗体の単一のアームのVLおよびVHドメインから成るFv断片、(v) VHドメインから成るdAb断片(Wardら、Nature 341巻：544～546頁(1989年))；(vi) VHHドメイン(ナノボディとして公知)から成る単一ドメイン機能的重鎖抗体、たとえばCortez-Retamozoら、Cancer Res. 64巻：2853～2857頁(2004年)およびその中に引用される参考文献を参照されたい；ならびに(vii)単離CDR、たとえば、抗原結合断片を提供するのに十分なフレームワークと一緒に1つ以上の単離CDRを含む。さらに、Fv断片の2つのドメイン、VLおよびVHは、別個の遺伝子によってコードされるが、それらは合成リンカーによって組換え法を使用して連結することができる。その合成リンカーにより、上記VLおよびVHは、そのVLおよびVH領域が対になって一価分子(単鎖Fv(scFv)として公知)を形成する単一タンパク質鎖として作製することが可能となる；たとえばBirdら Science 242巻：423～426頁(1988年)；およびHoustonら Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85巻：5879～5883頁(1988年)を参照されたい。そのような単鎖抗体もまた、抗体の用語「抗原結合断片」の範囲内に包含されるように意図される。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技術を使用して得られ、その断片は、完全な抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。Fv、F(ab')₂、およびFabなどの抗体断片は、完全なタンパク質の切断によって、たとえば、プロテアーゼによるまたは化学的な切断によって調製されてもよい。

10

20

【0141】

実施形態では、重鎖および軽鎖の一方または両方のCDR配列のうちの一部またはすべては、他の抗体分子に、たとえばCDR移植、ヒト化、またはキメラ抗体分子に使用することができる。

【0142】

実施形態は、細胞表面GCCへの結合を可能にするために、上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの一つ由来の十分なCDR、たとえば6つのCDRすべてを含む抗体分子を含む。

30

【0143】

一実施形態では、CDR、たとえばHCDRのすべてまたはLCDRのすべてまたは6つすべては、ヒトまたはヒト誘導フレームワーク領域(複数可)に埋め込まれる。ヒトフレームワーク領域の例は、ヒト生殖細胞系列フレームワーク配列、親和性成熟したヒト生殖細胞系列配列(in vivoもしくはin vitroのいずれかにおいて)、または合成ヒト配列、たとえばコンセンサス配列を含む。一実施形態では、重鎖フレームワークは、IgG1またはIgG2フレームワークである。一実施形態では、軽鎖フレームワークは、カッパフレームワークである。

40

【0144】

一実施形態では、抗GCC抗体分子、たとえばCDR移植抗体分子またはヒト化抗体分子は、GCCへの結合を可能にするように、十分なCDR、たとえば、本明細書に記載の抗体、たとえば表5に列挙される配列のうちの一つ由来の6つのCDRすべてを含む(表5に列挙されるCDRアミノ酸配列をコードすることができる例示的な核酸配列は、本明細書において表6に提供される)。特定の実施形態では、抗GCC抗体分子は、5F9またはAbx-229由来のCDRを含むことができる。

【0145】

in vivoにおける治療用または診断用の使用のための抗体断片は、それらの血清

50

半減期を改善する改変から利益を得ることができる。抗体の *in vivo* 血清半減期を増加させるように意図される適した有機成分は、親水性のポリマー基（たとえば線状または分枝ポリマー（たとえばポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、およびその他同種のものなどのポリアルカングリコール）、炭水化物（たとえばデキストラン、セルロース、多糖、およびその他同種のもの）、親水性アミノ酸のポリマー（たとえばポリリシン、ポリアスパルテート、およびその他同種のもの）、ポリアルカンオキシド、ならびにポリビニルピロリドン）、脂肪酸基（たとえばモノカルボン酸もしくはジカルボン酸）、脂肪酸エステル基、脂質基（たとえばジアシルグリセロール基、スフィンゴリピド基（たとえばセラミジル））、またはリン脂質基（たとえばホスファチジルエタノールアミン基）から選択される 1 または 2 以上の線状成分または分枝成分を含むことができる。好ましくは、有機成分は、所定の部位に結合され、その有機成分は、非結合体化抗体成分と比較して、得られる免疫結合体の機能を損なわない（たとえば、抗原結合親和性を減少させない）。その有機成分は、約 500 Da ~ 約 50,000 Da、好ましくは約 2000、5000、10,000、または 20,000 Da の分子量を有することができる。有機成分を用いてポリペプチド、たとえば抗体を改変するための例および方法は、たとえば、米国特許第 4,179,337 号および第 5,612,460 号、PCT 公開 WO 95/06058 および WO 00/26256、ならびに米国特許出願公開第 20030026805 号に見出すことができる。

10

【0146】

抗 G C C 抗体分子は、上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの 1 つの重鎖および軽鎖の一方または両方の可変領域のすべてまたはその抗原結合断片を含むことができる。

20

【0147】

一実施形態では、(a) の軽鎖アミノ酸配列は、1、2、3、4、5、10、または 15 もの数の残基に対して (a) (i ~ ii) において言及される参照アミノ酸配列（複数可）のうちの 1 つと異なり得る。実施形態では、その差異は、保存的置換である。実施形態では、その差異は、フレームワーク領域にある。一実施形態では、(b) の重鎖アミノ酸配列は、1、2、3、4、5、10、または 15 もの数の残基に対して (b) (i ~ ii) において言及される参照アミノ酸配列（複数可）のうちの 1 つと異なり得る。実施形態では、その差異は、保存的置換である。実施形態では、その差異は、フレームワーク領域にある。

30

【0148】

一実施形態では、抗 G C C 抗体分子は、以下：

(a) (i) 表 3 由来の軽鎖可変領域アミノ酸配列、たとえば配列番号 20 または (ii) 表 4 由来のヌクレオチド配列によってコードされる軽鎖可変領域アミノ酸、たとえば配列番号 19 のいずれかの、すべての軽鎖アミノ酸配列または上記いずれかの抗原結合断片；および

(b) (i) 表 3 由来の重鎖可変領域アミノ酸配列、たとえば配列番号 18 または (ii) 表 4 由来のヌクレオチド配列によってコードされる重鎖アミノ酸配列、たとえば配列番号 17 のいずれかの、すべての重鎖アミノ酸配列または上記いずれかの抗原結合断片、の一方または両方を含む。

40

【0149】

一実施形態では、抗 G C C 抗体分子は、以下：

a) 本発明の抗 G C C 抗体分子、たとえば上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの 1 つの軽鎖可変領域と少なくとも 85、90、95、97、または 99 % の相同性を有する軽鎖可変領域またはその抗原結合断片；および

b) 本発明の抗 G C C 抗体分子、たとえば上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、またはマウス抗体のうちの 1 つの重鎖可変領域と少なくとも 85、90、95、97、または 99 % の相同性を有する重鎖可変領域またはその抗原結合断片、の

50

方または両方を含む。

【0150】

ヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、およびマウス抗体の可変領域のアミノ酸配列は、表3に見出すことができる。

【0151】

一実施形態では、抗GCC抗体分子は、5F9抗体分子であり、a)配列番号231由来の重鎖定常領域のすべてまたは上記領域の断片；およびb)配列番号233由来の軽鎖定常領域のすべてまたは上記領域の断片の一方または両方を含む。

【0152】

他の実施形態では、抗GCC抗体分子は、Abx-229抗体分子であり、a)配列番号46由来の重鎖可変領域のすべてまたは上記領域のGCC結合断片；およびb)配列番号48由来の軽鎖可変領域のすべてまたは上記領域のGCC結合断片の一方または両方を含む。

10

【0153】

1つのアプローチにおいて、重鎖J領域および軽鎖J領域をコードするコンセンサス配列は、ヒトC領域セグメントへのV領域セグメントのその後の連結のためにJ領域に有用な制限酵素認識部位を導入するためのプライマーとして使用するオリゴヌクレオチドを設計するのに使用してもよい。C領域cDNAは、ヒト配列における類似の位置に制限酵素認識部位を配置するために部位特異的変異誘発によって変更することができる。

【0154】

発現ベクターは、プラスミド、レトロウイルス、コスミド、YAC、EBV由来のエピソーム、およびその他同種のものを含む。好都合なベクターは、任意のVHまたはVLの配列が容易に挿入され、発現することができるように操作された、適切な制限酵素認識部位を有する、機能的に完全なヒトCH免疫グロブリン配列またはCL免疫グロブリン配列をコードするベクターである。そのようなベクターにおいて、スプライシングは、普通、挿入されたJ領域におけるスプライドナー部位とヒトC領域に先行するスプライスアクセプター部位の間で生じ、またヒトCHエクソン内に生じるスプライス領域でも生じる。適した発現ベクターは、多くの構成要素、たとえば複製起点、選択マーカー遺伝子、転写制御エレメント（たとえばプロモーター、エンハンサー、ターミネーター）などの1つ以上の発現制御エレメントおよび/または1つ以上の翻訳シグナル、シグナル配列またはリーダー配列、ならびにその他同種のものを含むことができる。ポリアデニル化および転写終結は、コード領域の下流の天然の染色体部位で生じる。結果として生じるキメラ抗体は、任意の強力なプロモーターにつながれてもよい。使用することができる適したベクターの例は、シミアンウイルス40(SV40)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、アデノウイルス2、ウシ乳頭腫ウイルス(BPV)、パポウイルスBK変異体(BKV)、またはマウスおよびヒトサイトメガロウイルス(CMV)、ならびにモロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)、天然のIgプロモーターなどの、哺乳動物の宿主に適しており、ウイルス複製系をベースとするベクターを含む。単一のコピーもしくは複数のコピーで維持されるかまたはたとえば、LTRを介してもしくは複数の組込み部位を用いて操作された人工染色体を介して宿主細胞染色体に組込まれるようになるベクターを含む様々な適したベクターが、当技術分野において公知である(Lindenbaumら Nucleic Acids Res. 32巻: e172(2004年)、Kennardら Biotechnol. Bioeng. Online 2009年5月20日)。適したベクターのさらなる例は、後の部において列挙される。

20

30

40

【0155】

したがって、本発明は、抗体、抗体の抗原結合断片（たとえば、前述のものの中のいずれかのヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、もしくは前述のものの中の抗原結合断片）、抗体鎖（たとえば重鎖、軽鎖）、またはGCCタンパク質に結合する抗体鎖のうちの抗原結合部分をコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。

【0156】

50

真核生物の宿主細胞における発現は、そのような細胞が、適切に折り畳まれ、免疫学的に活性のある抗体を構築し、分泌する可能性が原核生物細胞よりも高いので、有用である。しかしながら、不適切な折り畳みにより不活性な、産生されたいかなる抗体も、公知の方法に従って復元することができる (KimおよびBaldwin、「Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding」、Ann. Rev. Biochem. 51巻、459~89頁(1982年))。宿主細胞が、軽鎖二量体または重鎖二量体などの、完全な抗体の一部を産生することは可能であり、これらもまた、本発明によれば抗体相同体である。

10

【0157】

さらに、本明細書において別記されるように、ヒト抗体または他の種由来の抗体は、当技術分野において周知の技術を使用する、ファージディスプレイ、レトロウイルスディスプレイ、リボソームディスプレイ、および他の技術を含むがそれに限定されないディスプレイ型の技術を通して生成することができ、結果として生じる分子は、そのような技術が当技術分野において公知のように、親和性成熟などのさらなる成熟にかけることができる。WinterおよびHarris Immunol Today 14巻：43~46頁(1993年)およびWrightら Crit. Reviews in Immunol. 12125~168頁(1992年)、HanesおよびPlucthau PNAS USA 94巻：4937~4942頁(1997年)(リボソームディスプレイ)、ParmleyおよびSmith Gene 73巻：305~318頁(1988年)(ファージディスプレイ)、Scott TIBS 17巻：241~245頁(1992年)、Cwirllaら Proc Natl Acad Sci USA 87巻：6378~6382頁(1990年)、Russellら Nucl. Acids Research 21巻：1081~1085頁(1993年)、Hoganboomら Immunol. Reviews 130巻：43~68頁(1992年)、ChiswellおよびMcCafferty TIBTECH 10巻：80~84頁(1992年)、および米国特許第5,733,743号。ディスプレイ技術がヒトでない抗体を産生するために利用される場合、そのような抗体は、上に記載されるようにヒト化することができる。

20

30

【0158】

生成される抗体は、特定の所望のアイソタイプを最初に有する必要はなく、むしろ、生成される場合、その抗体は、任意のアイソタイプを有することができることが十分に理解される。たとえば、5F9ハイブリドーマ(ATCC寄託番号PTA-8132)によって産生される抗体は、IgG2アイソタイプを有する。その抗体のアイソタイプは、当技術分野において公知の従来の技術を使用して、その抗体が細胞上のGCCに結合する場合に、ADCC反応を誘発するために、その後、たとえばIgG1またはIgG3に切り替えることができる。そのような技術は、とりわけ、直接組換え技術(たとえば米国特許第4,816,397号を参照されたい)、細胞間融合技術(たとえば米国特許第5,916,771号を参照されたい)の使用を含む。細胞間融合技術において、任意の所望のアイソタイプを有する重鎖を有するミエローマ細胞系または他の細胞系が調製され、軽鎖を有する他のミエローマ細胞系または他の細胞系が調製される。そのような細胞は、その後、融合することができ、完全な抗体を発現する細胞系を単離することができる。

40

【0159】

ある実施形態では、GCC抗体分子は、ヒト抗GCC IgG1抗体である。そのような抗体が、GCC分子への所望の結合を有するので、そのような抗体のうちの任意の1つは、たとえば、なお同じ可変領域(これは、ある程度まで、抗体の特異性および親和性を決定する)を有しながら、容易にアイソタイプを切り替え、ヒトIgG4アイソタイプを生成することができる。したがって、上記に議論される所望の「構造的な」属性を満たす抗体候補が、生成されるので、それらに、一般に、アイソタイプ切り替えを通して、所望

50

される少なくともある種のさらなる「機能的な」属性を提供することができる。

【0160】

一実施形態では、可変領域またはその抗原結合断片は、それが共に生成される定常領域以外の定常領域（もしくはその断片）たとえば、他の抗体由来の定常領域（もしくはその断片）にまたは合成定常領域（もしくはその断片）に結合することができる。実施形態では、その定常領域は、IgG1またはIgG2の定常領域（またはその断片）である。配列変化は、抗体分子のエフェクター活性を改変するために可変領域または定常領域において成すことができる。

他の治療薬の設計および生成

GCCに関して本明細書において産生され、特徴付けられる抗体は、他の抗体、他のアンタゴニスト、または抗体以外の化学的な成分を含む他の治療様式の設計を提供し、それによりその設計が促進される。そのような様式は、限定を伴うことなく、類似する結合活性または機能性を有する抗体、二重特異性抗体、免疫結合体、および放射標識治療薬などの高度な抗体治療薬、ペプチド治療薬、特にイントラボディの生成、ならびに小分子を含む。さらに、上記に議論されるように、本発明の抗体のエフェクター機能は、様々な治療用の使用について、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA1、IgA2、IgE、またはIgMにアイソタイプを切り替えることによって変化させてもよい。

10

【0161】

二重特異性抗体に関連して、(i) 2つの抗体、一方はGCCに対する特異性を有し、他方は一緒に結合体化させる第2の分子に対する特異性を有する、(ii) GCCに特異的な1つの鎖および第2の分子に特異的な第2の鎖を有する単一抗体、または(iii) GCCおよび他の分子に対する特異性を有する単鎖抗体を含む二重特異性抗体を生成することができる。そのような二重特異性抗体は、公知の技術を使用して生成することができる。たとえば、二重特異性抗体は、2つ以上の抗体（同じタイプまたは異なるタイプの）を架橋することによって産生されてもよい。適した架橋剤は、適切なスペーサーによって分離された2つの別個に反応性の基を有するヘテロ二官能性のもの（たとえばm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）またはホモ二官能性のもの（たとえばジスクシンイミジルスベレート）を含む。そのようなリンカーは、Pierce Chemical Company、Rockford、ILから入手可能である。たとえばFangerら Immunomethods 4巻：72～81頁（1994年）ならびにWinterおよびHarris Immunol Today 14巻：43～46頁（1993年）ならびにWrightら Crit. Reviews in Immunol. 12 125～168頁（1992年）ならびに(iii)に関連して、たとえばTraunckerら Int. J. Cancer（増刊）7巻：51～52頁（1992年）、Songsivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79巻：315～321頁（1990年）、Kostelnyら J. Immunol. 148巻：1547～1553頁（1992年）もまた、参照されたい。

20

30

【0162】

さらに「カッパボディ(Kappabody)」(Ill.ら「Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions」Protein Eng 10巻：949～57頁（1997年）、「ミニボディ(Minibody)」(Martinら EMBO J 13巻：5303～9頁（1994年）、米国特許第5,837,821号)、「ダイアボディ」(Holligerら Proc Natl Acad Sci USA 90巻：6444～6448頁（1993年）)、または「Janusin」(Traunckerら EMBO J 10巻：3655～3659頁（1991年）)およびTraunckerら Int J Cancer 増

40

50

刊7巻：51～52頁（1992年）もまた、調製されてもよい。

核酸およびポリペプチド

他の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の抗体分子をコードするまたはそれを表わすポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列に関する。そのようなポリヌクレオチドは、重鎖および軽鎖のそれぞれの可変領域および定常領域の両方をコードするが、他の組み合わせが、本明細書に記載の組成物に従って本発明によって企図される。本発明はまた、開示されるポリヌクレオチドおよびこれらのポリヌクレオチドに相補的な核酸配列から誘導されるオリゴヌクレオチド断片を企図する。

【0163】

ポリヌクレオチドは、RNA形態またはDNA形態とすることができる。DNA、cDNA、ゲノムDNA、核酸アナログ、および合成DNAの形態をしているポリヌクレオチドは、本発明の範囲内である。DNAは、二本鎖であっても一本鎖であってもよく、一本鎖である場合、コード（センス）鎖であっても非コード（アンチセンス）鎖であってもよい。ポリペプチドをコードするコード配列は、本明細書において提供されるコード配列と同一であってもよいまたはコード配列が、遺伝子コードの重複性または縮重の結果として、本明細書において提供されるDNAと同じポリペプチドをコードする、異なるコード配列であってもよい。

【0164】

提供される実施形態では、ポリヌクレオチドは、たとえば表4に要約されるように、本発明の少なくとも1つの重鎖可変領域および少なくとも1つの軽鎖可変領域をコードする。

【0165】

本発明はまた、ポリヌクレオチドの欠失、置換、または付加などの改変を含有する改変ポリヌクレオチドおよび改変ポリヌクレオチド配列に起因する任意のポリペプチド改変を含む。本発明のポリヌクレオチドはまた、本明細書において提供されるコード配列の改変体であるコード配列を有していてもよい。たとえば、改変ポリヌクレオチドは、表4に列挙されるポリヌクレオチドと、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または97%の同一性を有することができる。実施形態では、改変ポリヌクレオチドは、抗GCC抗体分子をコードする。

【0166】

本発明は、さらに、本発明の抗体を表わすポリペプチドならびにそのようなポリペプチドの断片、アナログ、および誘導体に関する。本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然に産生されるポリペプチド、または合成ポリペプチドであってもよい。本発明のポリペプチドの断片、誘導体、またはアナログは、1つ以上のアミノ酸残基が、保存または非保存アミノ酸残基（好ましくは保存アミノ酸残基）と置換されるもの、およびそのような置換されたアミノ酸残基は、遺伝子コードによってコードされるアミノ酸残基であってもなくてもよい；またはそれは、1つ以上のアミノ酸残基が置換基を含むものであってもよい；またはそれは、ポリペプチドが、ポリペプチドの半減期を増加させるための化合物（たとえばポリエチレングリコール）などの他の化合物と融合されるもの；またはそれは、さらなるアミノ酸が、リーダー配列もしくは分泌配列またはポリペプチド配列もしくはプロタンパク質配列の精製に利用される配列などのポリペプチドに融合されるものであってもよい。そのような断片、誘導体、およびアナログは、本発明の範囲内である。様々な態様では、本発明のポリペプチドは、部分的に精製されてもよいまたは精製産物であってもよい。

【0167】

本発明のポリペプチドは、たとえば表2もしくは表3に要約される本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列または1つ以上のアミノ酸置換に起因するわずかな変化により異なるアミノ酸配列を有することができる。変化は、典型的に、約1～5個のアミノ酸の範囲での「保存的变化」であってもよく、置換されたアミノ酸は、類似する構造的または化学的特性を有する、たとえば、ロイシンのイソロイシンとのまたはト

10

20

30

40

50

レオニンのセリンとの交換；リシンのアルギニンまたはヒスチジンとの交換。対照的に、変化は、非保存的变化、たとえばグリシンのトリプトファンとの交換を含んでもよい。類似するわずかな変化はまた、アミノ酸の欠失または挿入もしくはその両方を含んでもよい。生物学的または免疫学的活性を変化させることなくどのまたはどれだけのアミノ酸残基を置換、挿入、または欠失させてもよいかを決定する際の手引きは、当技術分野において公知のコンピュータプログラム、たとえばDNA STARソフトウェア（DNA STAR, Inc., Madison, Wis.）を使用して見出してもよい。

【0168】

他の態様では、本発明は、抗GCC抗体分子をコードする単離核酸および/または組換え核酸を特徴とする。実施形態では、その核酸は、1つ以上の抗体分子、重鎖、軽鎖、軽鎖可変領域、重鎖可変領域、本明細書に記載の抗体分子の重鎖および軽鎖の一部（たとえば完全長重鎖可変領域と対になった場合に、抗原結合性となる軽鎖可変領域断片または完全長軽鎖可変領域と対になった場合に、抗原結合性となる重鎖可変領域断片）、ならびにCDRをコードする。実施形態は、ベクター（たとえば発現ベクター）に配置されたそのような核酸を含む。特定の実施形態では、本発明は、プラスミドpTOK58D-5F9LCおよびpTOK58D-5F9HCを含む。さらに、本発明は、たとえば、プラスミドpTOK58D-5F9LCおよびpTOK58D-5F9HCによってコードされる抗体分子を発現する宿主細胞によって産生される抗体分子を包含する。

10

【0169】

一実施形態では、

20

軽鎖可変領域をコードする配列、たとえば表4に列挙される配列、その抗原結合断片、または本明細書に記載の、たとえば表6に記載の軽鎖由来の1、2、もしくは3個のCDR（および必要に応じてフレームワーク領域）；ならびに

重鎖可変領域をコードする配列、たとえば表4に列挙される配列、その抗原結合断片、または本明細書に記載の、たとえば表6に記載の重鎖由来の1、2、もしくは3個のCDR（および必要に応じてフレームワーク領域）の一方または両方を含む、ベクター、たとえば発現ベクターが提供される。

【0170】

提供される実施形態では、ポリヌクレオチドは、本発明の抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域または少なくとも1つの軽鎖可変領域をコードする。提供される実施形態では、ポリペプチドは、本発明の抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域および1つの軽鎖可変領域をコードすることができる。

30

【0171】

一実施形態では、抗GCC抗体分子は、以下：

(a) (i) 本明細書に記載の、たとえば表4に記載の抗GCC抗体分子コード核酸配列の相補体または(ii) 本発明の抗GCC抗体分子、たとえば、表1および表2に要約される上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、もしくはマウス抗体のうち1つの軽鎖をコードする任意の核酸配列と、選択されるストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされる軽鎖可変領域またはその抗原結合断片；ならびに

40

(b) (i) 本明細書に記載の、たとえば表4に記載の抗GCC抗体分子コード核酸配列の相補体または(ii) 本発明の抗GCC抗体分子、たとえば、表1および表2に要約される上記に参照されるヒトハイブリドーマ、選択されたリンパ球、もしくはマウス抗体のうち1つの重鎖をコードする任意の核酸配列と、選択されるストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされる重鎖可変領域またはその抗原結合断片の一方または両方を含む。

【0172】

一実施形態では、選択されるストリンジェンシー条件は、たとえば、それらの条件が本明細書に記載のとおり、高ストリンジェンシー条件または超高ストリンジェンシー条件である。

50

【0173】

さらなる態様では、上記抗体または上記抗原結合断片は、ATCC受託番号PTA-8132を有するDNAによってコードされる抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列のアミノ酸配列を含む。他のさらなる態様では、上記抗体または上記抗原結合断片は、ATCC受託番号PTA-8132を有するDNAによってコードされる抗体の重鎖可変領域配列のアミノ酸配列を含む。

【0174】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターを用いて遺伝子操作される宿主細胞、および組換え技術による本発明の抗体の産生をも提供する。

【0175】

適切なDNA配列は、様々な手順によってベクターに挿入されてもよい。一般に、上記DNA配列は、当技術分野において公知の手順によって適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。発現ベクター中のポリヌクレオチド配列は、mRNAの合成を指示するために適切な発現制御配列（つまりプロモーター）に作用的に連結される。そのようなプロモーターの例は、ラウス肉腫ウイルスLTRまたは初期もしくは後期SV40プロモーター、E. coli lacもしくはtrp、ファージラムダP_Lプロモーター、および原核生物（たとえばE. coliについてのtac、T3、T7プロモーター）細胞もしくは真核生物（たとえばサイトメガロウイルスプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、EF-1αプロモーター）細胞またはそれらのウイルスにおいて遺伝子の発現を制御することが公知の他のプロモーターを含むが、これらに限定されない。上記発現ベクターはまた、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写ターミネーターを含有する。ベクターはまた、発現を増幅するための適切な配列を含んでいてもよい。たとえば、ベクターは、エンハンサーを含有することができ、これは、SV40などのシミアンウイルス、ポリオーマウイルス、サイトメガロウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、またはモロニー肉腫ウイルスから誘導されたものなどのウイルス起源またはゲノム起源の転写刺激DNA配列である。ベクターはまた、好ましくは、複製起点をも含有する。ベクターは、外因性の複製起点を含有するように構築することができるかまたはそのような複製起点は、SV40もしくは他のウイルス供給源から誘導することができるかまたは宿主細胞の染色体複製メカニズムによるものとすることができる。

【0176】

さらに、上記ベクターは、様々な宿主においてメトトレキセートを用いる選択を可能にするためのジヒドロ葉酸レダクターゼマーカージン遺伝子、またはラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン抵抗性）、原核生物細胞において使用されるTet遺伝子（テトラサイクリン抵抗性のための）もしくはネオマイシン、GA418（ジェネテシン、ネオマイシン誘導体）、gpt（ミコフェノール酸）、アンピシリン、またはヒグロマイシン抵抗性遺伝子などの抗生物質抵抗性遺伝子、またはチミジンキナーゼ、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼなどの不在などの、宿主細胞の遺伝子傷害を補完する遺伝子などの、トランスフェクトした宿主細胞の選択のためのマーカージン遺伝子を必要に応じて含有する。宿主の栄養要求性マーカージン遺伝子産物をコードする遺伝子（たとえばLEU2、URA3、HIS3）は、多くの場合、酵母における選択マーカージンとして使用される。

【0177】

本発明の抗体を得るために、本発明の抗体の軽鎖および重鎖可変領域ならびに軽鎖および重鎖定常領域をコードする1つ以上のポリヌクレオチド配列が、ベクターに組み込まれるべきである。本発明の抗体の軽鎖および重鎖をコードするポリヌクレオチド配列は、1つまたは複数のベクターに組み込むことができ、次いで、宿主細胞に組み込まれる。

【0178】

哺乳動物の細胞における発現に適した発現ベクターは、たとえば、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、pEF-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)、pCMV-

10

20

30

40

50

SCRIPT、pFB、pSG5、pXT1 (Stratagene、La Jolla、CA)、pCDEF3 (Goldman, L.A.、Biotechniques、21巻:1013~1015頁(1996年))、pSVSPORT (GIBCO division of Invitrogen Life Technologies、Carlsbad、CA)、pEF-Bos (Mizushima, S.、Nucleic Acids Res.、18巻:5322頁(1990年))、Bicistronic GPEX (登録商標) Retrovector (Gala Biotech、Middleton、WI)、およびその他同種のものを含む。原核生物細胞 (E. coli)、昆虫細胞 (Drosophila Schneider S2細胞、Sf9)、および酵母 (P. methanolica、P. pastoris、S. cerevisiae) などの様々な発現宿主において使用するのに適した発現ベクターもまた、入手可能である。例示的なベクターは、pLKTOK58 (野生型IgG1 Fc配列) および pLKTOK59 (変異IgG1 Fc配列) である (米国特許出願公開第20060147445号を参照されたい)。

10

20

30

40

50

【0179】

十分に理解されるように、本発明に従う抗体は、ハイブリドーマ細胞系以外の細胞系において発現することができる。特定の抗体についてのcDNAまたはゲノムクローンをコードする配列は、適した哺乳動物または非哺乳動物の宿主細胞に使用することができる。形質転換は、たとえば、ウイルスに(またはウイルスベクターに)ポリヌクレオチドをパッケージすることおよびウイルス(もしくはベクター)を用いてまたは哺乳動物細胞に異種のポリヌクレオチドを導入するための当技術分野において公知のトランスフェクション手順によって、たとえばデキストラン媒介性のトランスフェクション、リン酸カルシウム沈澱、ポリブレン媒介性のトランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソームへのポリヌクレオチド(複数可)のカプセル化、およびDNA分子の直接的なマイクロインジェクションによって、宿主細胞を形質導入することを含む、宿主細胞にポリヌクレオチドを導入する任意の公知の方法によるものとして行うことができる。使用される形質転換手順は、形質転換されることとなる宿主に依存する。哺乳動物の細胞への異種のポリヌクレオチドの導入のための方法は、当技術分野において公知であり、デキストラン媒介性のトランスフェクション、リン酸カルシウム沈澱、ポリブレン媒介性のトランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、微粒子銃、リポソームへのポリヌクレオチド(複数可)のカプセル化、ペプチド結合体、デンドリマー、および核へのDNAの直接マイクロインジェクションを含むが、これらに限定されない。

【0180】

他の態様では、本発明は、本明細書に記載の核酸を含む宿主細胞を特徴とする。実施形態では、上記細胞は、本明細書に記載の抗体分子またはその構成要素を発現する。なおさらなる実施形態は、抗体分子、たとえば本明細書に記載の抗GCC抗体分子、たとえばヒトまたはヒト化抗体分子を産生する方法であって、発現に適切な条件下で宿主細胞を維持する工程を含み、それによって、免疫グロブリン鎖(複数可)は、発現され、抗体分子が産生される、方法を提供する。さらなる実施形態は、重鎖および軽鎖抗体配列をコードする前述の発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。上記宿主細胞は、真核生物細胞、たとえば哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、または原核生物細胞、たとえばE. coliとすることができる。たとえば、哺乳動物細胞は、培養細胞または細胞系とすることができる。例示的な哺乳動物細胞は、リンパ球細胞系(たとえばNS0)、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、COS細胞を含む。特定の実施形態では、培養宿主細胞は、5F9抗体分子をコードする核酸配列を含むCOS細胞である。他の実施形態では、上記宿主細胞は、ハイブリドーマ5F9(PTA-8132)である。さらに、細胞は、卵母細胞およびトランスジェニック動物由来の細胞、たとえば乳腺上皮細胞を含む。たとえば、本明細書に記載の抗体分子をコードする核酸は、トランスジェニック非ヒト動物において発現することができる。

【0181】

発現のために宿主として利用可能な哺乳動物細胞系は、当技術分野において公知であり、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、NSO細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、サル腎臓細胞（COS）、ヒト肝細胞癌細胞（たとえばHepG2）、および多くの他の細胞系を含むが、これらに限定されない、American Type Culture Collection（ATCC）から入手可能である多くの不死化細胞系を含む。細菌、酵母、昆虫、および植物を含むが、これらに限定されない非哺乳動物細胞もまた、組換え抗体を発現するために使用することができる。グリコシル化を排除するための抗体CH2ドメインの部位特異的変異誘発は、非ヒトグリコシル化に起因する免疫原性、薬物動態、および/またはエフェクター機能における変化を防止するのに好ましい場合がある。発現方法は、どの系が最も高い発現レベルを生じさせ、構成的GCC結合特性を有する抗体を産生するかを決定することによって選択される。

【0182】

なおさらなる実施形態は、抗GCC抗体分子、たとえばヒトまたはヒト化抗体分子を産生する方法であって、免疫グロブリンの発現に適切な条件下で、本明細書に記載の核酸、たとえば表4または表6に列挙される1つ以上の核酸配列を含む宿主細胞を維持する工程を含み、それによって、免疫グロブリン鎖が発現され、抗体分子、たとえばGCCに結合するヒト抗体分子もしくはヒト化抗体分子またはその断片もしくは改変体が産生される、方法を提供する。たとえば、抗体分子の発現の方法は、宿主細胞の使用を含み、ここで、抗体分子、たとえばヒト抗体軽鎖またはヒト化抗体軽鎖をコードする第1の組換え核酸分子および抗体分子、たとえばヒトまたはヒト化抗体重鎖をコードする第2の組換え核酸分子は、単一の発現ベクターに含まれる。他の実施形態では、それらは、別個のベクターに存在する。所望の場合、上記方法は、抗体、抗体の抗原結合断片、抗体鎖、または抗体鎖の抗原結合断片を単離するまたは回収するステップをさらに含むことができる。

【0183】

たとえば、GCCタンパク質に結合するヒト抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸分子（つまり1つ以上の核酸分子）またはそのような核酸分子（複数可）を含む発現構築物（つまり1つ以上の構築物）は、選択される宿主細胞に適切な任意の方法を使用して（たとえば形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、感染）、組換え宿主細胞を生成するために、適した宿主細胞に導入することができ、その結果、上記核酸分子（複数可）は、1つ以上の発現制御エレメントに作動可能に連結される（たとえばベクターにおいて、上記細胞におけるプロセスによって生成される構築物において、宿主細胞ゲノムに組み込まれる）。結果として生じる組換え宿主細胞は、発現に適した条件下で維持することができ（たとえば、誘発因子の存在下において、適した非ヒト動物において、適切な塩、増殖因子、抗生物質、栄養サプリメントなどを補充した適した培地において、など）、それによってコードされたポリペプチド（複数可）が、産生される。所望の場合、コードされたタンパク質は、単離するまたは回収することができる（たとえば動物、宿主細胞、培地、ミルクから）。このプロセスは、トランスジェニック非ヒト動物（たとえば、WO92/03918、GenPharm Internationalを参照されたい）または植物の宿主細胞における発現を包含する。

【0184】

さらに、産生細胞系由来の本発明の抗体（またはそれ由来の他の成分）の発現は、多くの公知の技術を使用して増強することができる。たとえば、グルタミンシンテターゼおよびDHFR遺伝子発現系は、ある特定の条件下での発現を増強するための共通のアプローチである。高発現細胞クローンは、限界希釈法クローニング（limited dilution cloning）、Microdrop技術、または当技術分野において公知の任意の他の方法などの従来技術を使用して同定することができる。GS系は、欧州特許第0216846号、第0256055号、および第0323997号ならびに欧州特許出願第89303964.4号に関連して、全体的または部分的に議論される。

【0185】

本発明の改変抗体またはその抗原結合部分の組換え発現のための例示的な系において、抗体重鎖および抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターは、リン酸カルシウム媒介性のトランスフェクションによって、*d h f r - CHO*細胞に導入される。組換え発現ベクター内で、抗体重鎖および軽鎖の遺伝子は、それぞれ、遺伝子の高レベルの転写を駆動するために、エンハンサー/プロモーター調節エレメント（たとえば、*CMV*エンハンサー/*AdMLP*プロモーター調節エレメントまたは*SV40*エンハンサー/*AdMLP*プロモーター調節エレメントなどの、*SV40*、*CMV*、アデノウイルス、およびその他同種のものに由来する）に作用的に連結される。組換え発現ベクターはまた、*DHFR*遺伝子を担持し、これは、メトトレキセート選択/増幅を使用するベクターによってトランスフェクトされた*CHO*細胞の選択を可能にする。選択された形質転換体宿主細胞は、抗体重鎖および軽鎖の発現を可能にするために培養され、完全な抗体が培地から回収される。標準的な分子生物学技術は、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、かつ培地から抗体を回収するために使用される。

10

20

30

40

50

【0186】

本発明の抗体はまた、対象の免疫グロブリン重鎖配列および軽鎖配列についてトランスジェニックである哺乳動物または植物の生成によってならびにそれから回収可能な形態をしている抗体の産生によってトランスジェニックに (*transgenically*) 産生することもできる。哺乳動物におけるトランスジェニック産生に関連して、抗体は、ヤギ、ウシ、または他の哺乳動物のミルク中に産生し、それから回収することができる。たとえば、米国特許第5,827,690号、第5,756,687号、第5,750,172号、および第5,741,957号を参照されたい。

【0187】

本明細書に記載の抗体、その抗原結合断片、抗体鎖、および抗原結合部分はまた、適した *in vitro* 発現系において、化学合成によって、または任意の他の適した方法によって産生することができる。

融合タンパク質および免疫結合体

本明細書に記載の抗*GCC*抗体は、1つ以上の非抗体分子実体に、任意の適した方法（たとえば化学的結合、遺伝子融合、非共有結合、または別の方法）によって機能的に連結することができる。

【0188】

本明細書に記載の抗*GCC*抗体分子および非抗体成分が、単一の連続的なポリペプチド鎖の構成要素である融合タンパク質を産生することができる。非抗体成分は、抗体成分に関して、*N*-末端に、*C*-末端に、または内部に配置することができる。たとえば、いくつかの実施形態は、*pET*ベクター（たとえば *pET-15b*、*Novagen*）、ファージベクター（たとえば *pCNATAB 5E*、*Pharmacia*）、または他のベクター、たとえば *pRIT2T*プロテインA融合ベクター、*Pharmacia*）などの適した発現ベクターへの、免疫グロブリン配列をコードする核酸の挿入によって産生することができる。結果として生じる構築物は、非抗体成分（たとえばヒスチジンタグ、*E*タグ、またはプロテインAの *IgG* 結合ドメイン）を含む抗体鎖を産生するために発現させることができる。融合タンパク質は、適した親和性マトリックスを使用するクロマトグラフィーなどの任意の適した技術を使用して、単離するまたは回収することができる（たとえば *Current Protocols in Molecular Biology* (*Ausubel, F.M*ら編、2巻、増刊26、16.4.1~16.7.8頁(1991年)を参照されたい)。

【0189】

本発明は、細胞に向けられ、実施形態では、細胞に内部移行される抗*GCC*抗体分子を提供する。それらは*GCC*を発現する細胞にまたはその細胞中に治療剤または検出可能な作用物質を送達することができるが、標的が発現していない細胞にまたはその細胞中に送達することができない。したがって、本発明はまた、治療剤または検出可能な作用物質と

結合体化させている、本明細書に記載の抗GCC抗体分子を含む抗GCC免疫結合体を提供する。実施形態では、抗GCC免疫結合体のGCCに対する親和性は、結合体化させていない抗体の親和性の少なくとも10、25、50、75、80、90、または95%である。これは、細胞表面GCCまたは単離GCCを使用して、決定することができる。一実施形態では、抗GCC抗体分子、たとえば免疫結合体は、1,000、500、250、100、または50pM未満の、本明細書に記載のアッセイによって決定されるLD50を有する。

【0190】

抗GCC抗体分子は、当技術分野において公知の技術を利用して、免疫結合体として作用するように改変することができる。たとえばVitetta Immunol Today 14巻：252頁（1993年）を参照されたい。米国特許第5,194,594号もまた参照されたい。放射標識抗体の調製物もまた、当技術分野において公知の技術を利用して容易に調製することができる。たとえばJunghansら Cancer Chemotherapy and Biotherapy中の655~686頁（第2版、ChafnerおよびLongo編、Lippincott Raven（1996年））を参照されたい。米国特許第4,681,581号、第4,735,210号、第5,101,827号、第5,102,990号（米国再発行特許第35,500号）、第5,648,471号、および第5,697,902号もまた参照されたい。

10

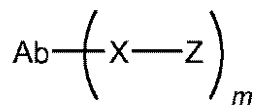
【0191】

いくつかの実施形態では、抗体分子および非抗体成分は、リンカーの手段によってつながれる。そのような実施形態では、免疫結合体は、式(I)によって表され、

20

【0192】

【化7】



(I)

ここで、Abは、本明細書に記載の抗GCC抗体分子であり、

Xは、AbとZを接続する成分、たとえば、AbおよびZの一方または両方への共有結合の後の、本明細書に記載のリンカーの残基であり、

30

Zは、治療剤または標識であり、

mは、約1~約15の範囲にある。

【0193】

変数mは、式(I)の免疫結合体における抗体分子当たりの-X-Z成分の数を表す。様々な実施形態では、mは、1~15、1~10、1~9、1~8、1~7、1~6、1~5、1~4、1~3、または1~2の範囲にある。いくつかの実施形態では、mは、2~10、2~9、2~8、2~7、2~6、2~5、2~4、または2~3の範囲にある。他の実施形態では、mは、1、2、3、4、5、または6である。式(I)の複数の免疫結合体を含む組成物において、mは、平均薬剤負荷量とも呼ばれる、Ab当たりの-X-Z成分の平均数である。平均薬剤負荷量は、Ab当たり1~約15の-X-Z成分の範囲にあってよい。いくつかの実施形態では、mが平均薬剤負荷量を表す場合、mは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、または約8である。例示的な実施形態では、mは、約2~約8である。一実施形態では、mは、約8である。他の実施形態では、mは、約4である。他の実施形態では、mは、約2である。

40

【0194】

Ab当たりの-X-Z成分の平均数は、質量分析、ELISAアッセイ、およびHPLCなどの従来的手段によって特徴付けられてもよい。mに関しての免疫結合体の量的分布もまた、決定されてもよい。いくつかの場合において、mが、他の薬剤負荷を有する免疫結合体と区別されるように、一定の値をしている場合の、均質な免疫結合体の分離、精製

50

、および特徴付けは、逆相 H P L C または電気泳動などの手段によって達成されてもよい。

【 0 1 9 5 】

式 (I) の免疫結合体は、混合物として存在してもよく、その混合物のそれぞれの構成要素は、異なる m 値を有する。たとえば、式 (I) の免疫結合体は、2 つの別個の免疫結合体構成要素の混合物として存在してもよく、一方の免疫結合体構成要素は、m が 7 であり、他方の免疫結合体構成要素は、m が 8 である。

【 0 1 9 6 】

一実施形態では、式 (I) の免疫結合体は、3 つの別個の免疫結合体の混合物として存在し、ここでその 3 つの別個の免疫結合体についての m は、それぞれ、1、2、および 3 である。

10

【 0 1 9 7 】

一実施形態では、式 (I) の免疫結合体は、3 つの別個の免疫結合体の混合物として存在し、ここでその 3 つの別個の免疫結合体についての m は、それぞれ、3、4、および 5 である。

【 0 1 9 8 】

一実施形態では、式 (I) の免疫結合体は、3 つの別個の免疫結合体の混合物として存在し、ここでその 3 つの別個の免疫結合体についての m は、それぞれ、5、6、および 7 である。

【 0 1 9 9 】

一実施形態では、式 (I) の免疫結合体は、3 つの別個の免疫結合体の混合物として存在し、ここでその 3 つの別個の免疫結合体についての m は、それぞれ、7、8、および 9 である。

20

【 0 2 0 0 】

一実施形態では、式 (I) の免疫結合体は、3 つの別個の免疫結合体の混合物として存在し、ここでその 3 つの別個の免疫結合体についての m は、それぞれ、9、10、および 11 である。

【 0 2 0 1 】

一実施形態では、式 (I) の免疫結合体は、3 つの別個の免疫結合体の混合物として存在し、ここでその 3 つの別個の免疫結合体についての m は、それぞれ、11、12、および 13 である。

30

【 0 2 0 2 】

一実施形態では、式 (I) の免疫結合体は、3 つの別個の免疫結合体の混合物として存在し、ここでその 3 つの別個の免疫結合体についての m は、それぞれ、13、14、および 15 である。

【 0 2 0 3 】

免疫結合体を調製するのに適した様々なリンカー（たとえば治療剤または標識に抗体分子を接続するためのヘテロ二官能性試薬）および方法は、当技術分野において公知である（たとえば Charisら、Cancer Research 52 巻：127～131 頁（1992 年）を参照されたい）。上記リンカーは、リンカーの切断により、細胞内環境中に薬剤（治療剤または標識）が放出されるように、たとえば生理学的条件下で、たとえば細胞内条件下で、切断可能とすることができる。他の実施形態では、上記リンカーは、切断可能ではなく、上記薬剤は、たとえば抗体分解によって放出される。

40

【 0 2 0 4 】

上記リンカーは、抗体成分上の化学的反応基に、たとえば、遊離アミノ基、遊離イミノ基、遊離ヒドロキシル基、遊離チオール基、または遊離カルボキシル基に（たとえば N 末端もしくは C 末端に、1 つ以上のリシン残基のイプシロンアミノ基に、1 つ以上のグルタミン酸もしくはアスパラギン酸残基の遊離カルボン酸基に、または 1 つ以上のシステイン残基のスルフヒドリル基に）結合することができる。上記リンカーが結合する部位は、抗体成分のアミノ酸配列における天然の残基とすることができるかまたはそれは、たとえ

50

ばDNA組換え技術によって（たとえばアミノ酸配列にシステインもしくはプロテアーゼ切断部位を導入することによって）またはタンパク質生化学（たとえば還元、pH調整、もしくはタンパク質分解）によって抗体成分に導入することができる。

【0205】

共有結合の最も共通して使用される非特異的な方法のうちの1つは、化合物のカルボキシ（またはアミノ）基を抗体分子のアミノ（またはカルボキシ）基に連結するためのカルボジイミド反応である。さらに、ジアルデヒドまたはイミドエステルなどの二機官能性作用物質は、化合物のアミノ基を抗体分子のアミノ基に連結するために使用されてきた。シッフ塩基反応もまた、抗体分子への薬剤の付加に利用可能である。この方法は、グリコールまたはヒドロキシ基を含有する薬剤の過ヨウ素酸酸化を伴い、したがって、抗体分子と次に反応するアルデヒドを形成する。付加は、抗体分子のアミノ基とのシッフ塩基の形成を介して生じる。イソチオシアネートもまた、抗体分子に薬剤を共有結合させるための結合剤として使用することができる。他の技術は、当業者に公知であり、本発明の範囲内である。

10

【0206】

ある実施形態では、リンカー（X）の前駆体である中間体は、適切な条件下で薬剤（Z）と反応する。ある実施形態では、反応基は、薬剤および/または中間体上で使用される。薬剤および中間体の間の反応の産物または誘導された薬剤は、続いて、適切な条件下で抗体分子と反応させる。

【0207】

免疫結合体は、当業者に周知の方法論、たとえばカラムクロマトグラフィー（たとえばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、疎水性相互作用クロマトグラフィー）、透析、ダイアフィルトレーション、または沈澱を利用することによって、反応物から精製することができる。免疫結合体は、当業者に周知の方法論、たとえばSDS-PAGE、質量分析、またはキャピラリー電気泳動を利用することによって評価することができる。

20

【0208】

いくつかの実施形態では、上記リンカーは、細胞内環境において（たとえばリソソームまたはエンドソームまたはカベオラ（caveola）内に）存在する切断剤によって切断可能である。上記リンカーは、たとえば、リソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼを含むが、これらに限定されない細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素によって切断されるペプチジルリンカーとすることができる。いくつかの実施形態では、ペプチジルリンカーは、少なくとも2アミノ酸長または少なくとも3アミノ酸長である。切断剤は、カテプシンBおよびDならびにプラスミンを含むことができ、これらはすべて、ジペプチド薬剤誘導体を加水分解し、標的細胞の内部で活性薬剤の放出をもたらすことが公知である（たとえばDubowchikおよびWalker、1999年、Pharm. Therapeutics 83巻：67～123頁を参照されたい）。非常に典型的なものは、GCC発現細胞に存在する酵素によって切断可能なペプチジルリンカーである。たとえば、癌性組織において高度に発現されるチオール依存性プロテアーゼのカテプシンBによって切断可能なペプチジルリンカーを使用することができる（たとえばPhe-LeuリンカーまたはGly-Phe-Leu-Glyリンカー（配列番号319））。そのようなリンカーの他の例は、たとえば、その全体においておよびすべての目的のために参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第6,214,345号において記載されている。特定の実施形態では、細胞内プロテアーゼによって切断可能なペプチジルリンカーは、Val-CitリンカーまたはPhe-Lysリンカーである（たとえば、val-citリンカーを有するドキシソルピシンの合成を記載する米国特許第6,214,345号を参照されたい）。治療剤の細胞内のタンパク分解性の放出を使用するという1つの利点は、その治療剤が、結合体化させた場合、典型的に弱毒化され、その結合体の血清安定性が典型的に高いということである。

30

40

【0209】

50

他の実施形態では、切断可能なリンカーは、pH感受性である、つまり、ある特定のpH値で加水分解に感受性である。典型的に、pH感受性のリンカーは、酸性条件下で加水分解可能である。たとえば、リソソームにおいて加水分解可能な酸不安定なリンカー（たとえばヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、シスアコニット酸アミド、オルトエステル、アセタール、ケタールなど）を使用することができる（たとえば米国特許第5,122,368号；第5,824,805号；第5,622,929号；DubowchikおよびWalker、1999年、Pharm. Therapeutics 83巻：67～123頁；Nevilleら、1989年、Biol. Chem. 264巻：14653～14661頁を参照されたい）。そのようなリンカーは、血液中におけるものなどの中性のpH条件下で比較的安定しているが、リソソームのおよそのpHであるpH5.5または5.0より下では不安定となる。ある実施形態では、加水分解可能なリンカーは、チオエーテルリンカーである（たとえば、アシルヒドラゾン結合を介して治療剤に付加されるチオエーテルなど（たとえば米国特許第5,622,929号を参照されたい））。

10

【0210】

さらにまた他の実施形態では、上記リンカーは、還元条件下で切断可能である（たとえばジスルフィドリンカー）。たとえば、SATA（N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセタート）、SPDP（N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート）、SPDB（N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）ブチレート）およびSMPT（N-スクシンイミジル-オキシカルボニル-アルファ-メチル-アルファ-（2-ピリジル-ジチオ）トルエン）、SPDBおよびSMPTを使用して形成することができるものを含む、様々なジスルフィドリンカーは、当技術分野において公知である（たとえばThorpeら、1987年、Cancer Res. 47巻：5924～5931頁；Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer（C.W. Vogel編、Oxford U. Press、1987年中のWawrzynczakら）を参照されたい。米国特許第4,880,935号もまた参照されたい）。

20

【0211】

さらにまた他の特定の実施形態では、上記リンカーは、マロネートリンカー（Johnsonら、1995年、Anticancer Res. 15巻：1387～93頁）、マレイミドベンゾイルリンカー（Laurら、1995年、Bioorg Med Chem. 3巻（10号）：1299～1304頁）、または3'-N-アミドアナログ（Laurら、1995年、Bioorg-Med-Chem. 3巻（10号）：1305～12頁）である。

30

【0212】

さらにまた他の実施形態では、上記リンカー単位は、切断可能ではなく、上記薬剤は、抗体分解によって放出される（たとえば、その全体においておよびすべての目的のために参照によって本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20050238649号を参照されたい）。

40

【0213】

典型的に、上記リンカーは、細胞外環境に実質的に感受性ではない。本明細書において使用されるように、リンカーの文脈における「細胞外環境に実質的に感受性ではない」は、免疫結合体が細胞外環境に（たとえば血漿中に）存在する場合に、その免疫結合体の試料中のリンカーの約20%以下、典型的には約15%以下、より典型的には約10%以下、そしてさらに典型的には約5%以下、約3%以下、または約1%以下しか切断されないことを意味する。リンカーが細胞外環境に実質的に感受性ではないかどうかは、たとえば、所定の期間（たとえば2、4、8、16、または24時間）、免疫結合体を血漿とインキュベートし、次いで、血漿中に存在する遊離薬剤の量を定量することによって決定することができる。

50

【0214】

他の相互に排他的でない実施形態では、上記リンカーは、細胞の内部移行を促進する。ある実施形態では、上記リンカーは、治療剤または標識（Z）と結合体化させた場合、細胞の内部移行を促進する。さらにまた他の実施形態では、上記リンカーは、Z成分および抗GCC抗体分子の両方と結合体化させた場合、細胞の内部移行を促進する。

【0215】

本発明の組成物および方法と共に使用することができる、様々な例示的なリンカーは、WO2004-010957、米国特許出願公開第20060074008号、米国特許出願公開第20050238649号、および米国特許出願公開第20060024317号において記載されている（これらのそれぞれは、その全体がすべての目的のために参照によって本明細書において組み込まれる）。

10

【0216】

治療剤または標識に抗体分子を結合するのに使用することができるリンカーの例は、たとえばマレイミドカプロイル（mc）；マレイミドカプロイル-p-アミノベンジルカルバメート；マレイミドカプロイル-ペプチド-アミノベンジルカルバメートリンカー、たとえばマレイミドカプロイル-L-フェニルアラニン-L-リシン-p-アミノベンジルカルバメートおよびマレイミドカプロイル-L-バリン-L-シトルリン-p-アミノベンジルカルバメート（vc）；N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピリオネート（N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエートまたはSPPとしても公知である）；4-スクシンイミジル-オキシカルボニル-2-メチル-2-(2-ピリジルジチオ)-トルエン（SMP T）；N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート（SPDP）；N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ブチレート（SPDB）；2-イミノチオラン；S-アセチルコハク酸無水物；ジスルフィドベンジルカルバメート；カルボネート；ヒドラゾンリンカー；N-(マレイミドアセトキシ)スクシンイミドエステル；N-[4-(p-アジドサリチルアミド)ブチル]-3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド（AMAS）；N-[マレイミドプロピルオキシ]スクシンイミドエステル（BMPS）；[N-マレイミドカプロイルオキシ]スクシンイミドエステル（EMCS）；N-[マレイミドブチリルオキシ]スクシンイミドエステル（GMBS）；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-[6-アミドカプロエート]（LC-SMCC）；スクシンイミジル6-(3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオンアミド)ヘキサノエート（LC-SPDP）；m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）；N-スクシンイミジル[4-ヨードアセチル]アミノベンゾエート（SIAB）；スクシンイミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）；N-スクシンイミジル3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオンアミド（SPDP）；[N-マレイミドカプロイルオキシ]スルホスクシンイミドエステル（スルホ-EMCS）；N-[マレイミドブチリルオキシ]スルホスクシンイミドエステル（スルホ-GMBS）；4-スルホスクシンイミジル-6-メチル-(2-ピリジルジチオ)トルアミド]ヘキサノエート（スルホ-LC-SMPT）；スルホスクシンイミジル6-(3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオンアミド)ヘキサノエート（スルホ-LC-SPDP）；m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル（スルホ-MBS）；N-スルホスクシンイミジル[4-ヨードアセチル]アミノベンゾエート（スルホ-SIAB）；スルホスクシンイミジル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（スルホ-SMCC）；スルホスクシンイミジル4-[p-マレイミドフェニル]ブチレート（スルホ-SMPB）；エチレングリコール-ビス(コハク酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)（EGS）；酒石酸ジスクシンイミジル（DST）；1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸（DOTA）；ジエチレントリアミン-五酢酸（DTPA）；およびチオ尿素リンカーを含む。

20

30

40

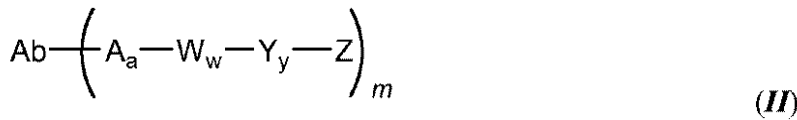
【0217】

50

いくつかの実施形態では、リンカー - X - は、式 - A_a - W_w - Y_y - を有し、式 (I) の免疫結合体は、式 (I I) によって特徴付けられ、

【 0 2 1 8 】

【 化 8 】



A b は、本明細書に記載の抗 G C C 抗体分子であり、

- A - は、ストレッチャー単位であり、

a は、0 または 1 であり、

- W - は、それぞれ、独立して、アミノ酸単位であり、

w は、0 ~ 1 2 の範囲の整数であり、

- Y - は、自壊的 (s e l f - i m m o l a t i v e) スペーサー単位であり、

y は、0、1、または 2 であり、

Z は、治療剤または標識であり、

m は、約 1 ~ 約 1 5 の範囲にある。

【 0 2 1 9 】

ストレッチャー単位 (A) が存在する場合、ストレッチャー単位 (A) は A b 単位を、存在する場合にはアミノ酸単位 (- W -) に、存在する場合にはスペーサー単位 (- Y -) に、または治療剤もしくは標識 (Z) に連結することができる。天然にまたは化学的な操作を介して抗 G C C 抗体分子上に存在し得る有用な官能基は、スルフヒドリル、アミノ、ヒドロキシル、炭水化物のアノマー位ヒドロキシル基、およびカルボキシルを含むが、これらに限定されない。適した官能基は、スルフヒドリルおよびアミノである。一つの例において、スルフヒドリル基は、抗 G C C 抗体分子の分子内ジスルフィド結合の還元によって生成することができる。他の実施形態では、スルフヒドリル基は、2 - イミノチオラン (T r a u t 試薬) または他のスルフヒドリル生成試薬との、抗 G C C 抗体分子のリシン成分のアミノ基の反応によって生成することができる。ある実施形態では、抗 G C C 抗体分子は、組換え抗体であり、1 つ以上のリシンを運ぶように操作される。ある他の実施形態では、組換え抗 G C C 抗体分子は、さらなるスルフヒドリル基、たとえばさらなるシステインを運ぶように操作される。

【 0 2 2 0 】

一実施形態では、ストレッチャー単位は、A b 単位の硫黄原子と結合を形成する。硫黄原子は、A b のスルフヒドリル基から誘導することができる。この実施形態の代表的なストレッチャー単位は、式 (I I I a) および (I I I b) の角括弧内に表され、A b - 、 - W - 、 - Y - 、 - Z 、 w 、および y は、上記に定義されるとおりであり、R^a は、- C₁ ~ C₁₀ アルキレン - 、 - C₂ ~ C₁₀ アルケニレン - 、 - C₂ ~ C₁₀ アルキニレン - 、 - カルボシクロ - 、 - O - (C₁ ~ C₈ アルキレン) - 、 O - (C₂ ~ C₈ アルケニレン) - 、 - O - (C₂ ~ C₈ アルキニレン) - 、 - アリーレン - 、 - C₁ ~ C₁₀ アルキレン - アリーレン - 、 - C₂ ~ C₁₀ アルケニレン - アリーレン - 、 - C₂ ~ C₁₀ アルキニレン - アリーレン - 、 - アリーレン - C₁ ~ C₁₀ アルキレン - 、 - アリーレン - C₂ ~ C₁₀ アルケニレン - 、 - アリーレン - C₂ ~ C₁₀ アルキニレン - 、 - C₁ ~ C₁₀ アルキレン - (カルボシクロ) - 、 - C₂ ~ C₁₀ アルケニレン - (カルボシクロ) - 、 - C₂ ~ C₁₀ アルキニレン - (カルボシクロ) - 、 - (カルボシクロ) - C₁ ~ C₁₀ アルキレン - 、 - (カルボシクロ) - C₂ ~ C₁₀ アルケニレン - 、 - (カルボシクロ) - C₂ ~ C₁₀ アルキニレン - 、ヘテロシクロ - 、 - C₁ ~ C₁₀ アルキレン - (ヘテロシクロ) - 、 - C₂ ~ C₁₀ アルケニレン - (ヘテロシクロ) - 、 - C₂ ~ C₁₀ アルキニレン - (ヘテロシクロ) - 、 - (ヘテロシクロ) - C₁ ~ C₁₀ アルキレン - 、 - (ヘテロシクロ) - C₂ ~ C₁₀ アルケニレン - 、 - (ヘテロシクロ) - C₂ ~ C₁₀ アルキニレン - 、 - (C H₂ C H₂ O)_r - 、または - (C H₂ C H₂ O)_r - C H₂ - から選択

10

20

30

40

50

され、 r は、 $1 \sim 10$ の範囲にある整数であり、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、カルボシクロ、ヘテロシクロ、およびアリーレンラジカルは、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換される。いくつかの実施形態では、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、カルボシクロ、ヘテロシクロおよびアリーレンラジカルは、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、置換されていない。いくつかの実施形態では、 R^a は、 $-C_{1 \sim 10}$ アルキレン-、 $-$ カルボシクロ-、 $-O-$ ($C_{1 \sim 8}$ アルキレン)-、 $-$ アリーレン-、 $-C_{1 \sim 10}$ アルキレン-アリーレン-、 $-$ アリーレン $C_{1 \sim 10}$ アルキレン-、 $-C_{1 \sim 10}$ アルキレン-(カルボシクロ)-、 $-$ (カルボシクロ)- $C_{1 \sim 10}$ アルキレン-、 $-C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ-、 $-C_{1 \sim 10}$ アルキレン-(ヘテロシクロ)-、 $-$ (ヘテロシクロ)- $C_{1 \sim 10}$ アルキレン-、 $-$ (CH_2CH_2O) $_r$ -、および $-$ (CH_2CH_2O) $_r$ - CH_2- から選択され、 r は、 $1 \sim 10$ の範囲にある整数であり、当該アルキレン基は、置換されておらず、残りの基は、必要に応じて置換される。

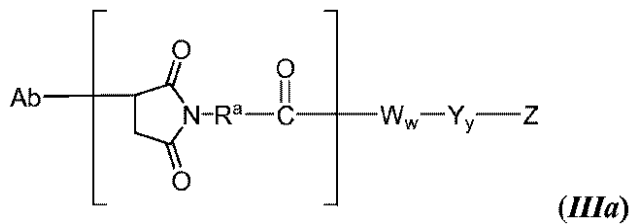
10

【0221】

明らかに示されない場合でさえ、 $1 \sim 15$ の薬剤成分を、 Ab に連結することができることをすべての例示的な実施形態から理解される ($m = 1 \sim 15$)。

【0222】

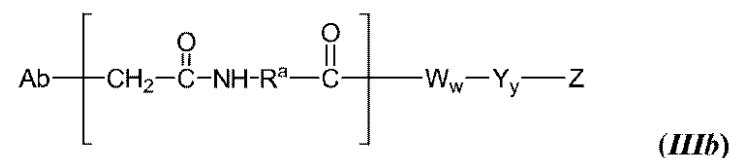
【化9】



20

【0223】

【化10】

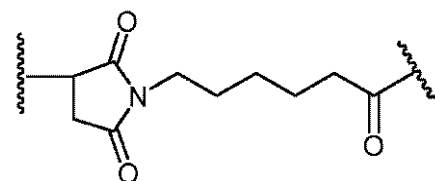


30

例示のストレッチャー単位は、式 (IIIa) のものであり、 R^a は、 $-(CH_2)_5-$ である。

【0224】

【化11】

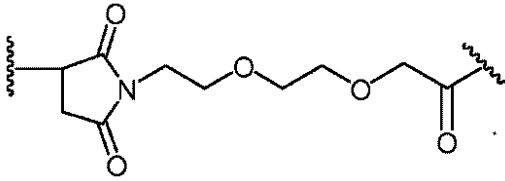


40

他の例示のストレッチャー単位は、式 (IIIa) のものであり、 R^a は、 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ であり、 r は、 2 である。

【0225】

【化 1 2】



他の例示のストレッチャー単位は、式 (I I I a) のものであり、 R^a は、- アリーレンまたはアリーレン - C_{10} アルキレン - である。いくつかの実施形態では、アール基は、置換されていないフェニル基である。

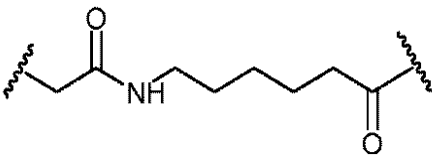
10

【 0 2 2 6】

他の例示のストレッチャー単位は、式 (I I I b) のものであり、 R^a は、- (CH_2)₅ - である。

【 0 2 2 7】

【化 1 3】

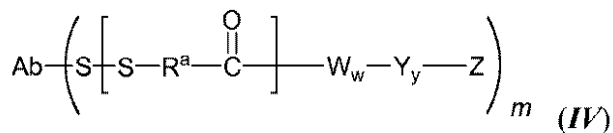


20

ある実施形態では、ストレッチャー単位は、 $A b$ 単位の硫黄原子およびストレッチャー単位の硫黄原子の間のジスルフィド結合を介して $A b$ 単位に連結される。この実施形態の代表的なストレッチャー単位は、式 (I V) の角括弧内に表され、 R^a 、 $A b$ -、- W -、- Y -、- Z 、 w 、および y は、上記に定義されるとおりである。

【 0 2 2 8】

【化 1 4】

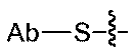


30

本出願の全体にわたって、下記の式中の S 成分は、文脈によって他に示されない限り、 $A b$ 単位の硫黄原子を指すことに注意されたい。

【 0 2 2 9】

【化 1 5】

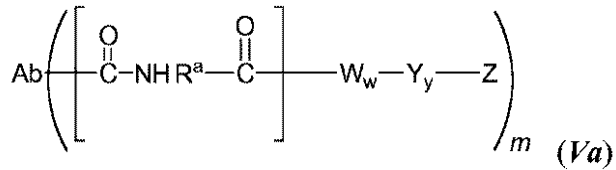


他の実施形態では、ストレッチャーは、 $A b$ への結合前に、 $A b$ の第一級または第二級アミノ基と結合を形成することができる反応部位を含有する。これらの反応部位の例は、スクシンイミドエステル、4ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、酸無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアネート、およびイソチオシアネートなどの活性化エステルを含むが、これらに限定されない。この実施形態の代表的なストレッチャー単位は、式 (V a) および (V b) の角括弧内に表され、- R^a -、 $A b$ -、- W -、- Y -、- Z 、 w 、および y は、上記に定義されるとおりである。

40

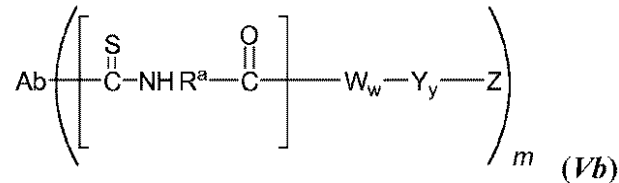
【 0 2 3 0】

【化 1 6】



【 0 2 3 1】

【化 1 7】



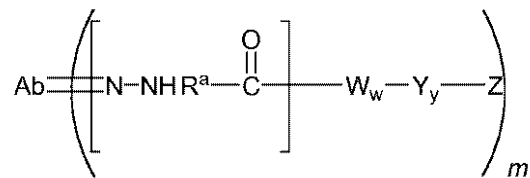
10

いくつかの実施形態では、ストレッチャーは、Ab上に存在し得る修飾炭水化物の(-CHO)基に対し反応性である反応部位を含有する。たとえば、炭水化物は、過ヨウ素酸ナトリウムなどの試薬を使用して穏やかに酸化することができ、酸化された炭水化物の結果として生じる(-CHO)単位は、Kanekoら、1991年、Bioconjugate Chem. 2巻: 133~41頁に記載されるものなどのヒドラジド、オキシム、第一級または第二級アミン、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジドなどの官能基を含有するストレッチャーと縮合することができる。この実施形態の代表的なストレッチャー単位は、式(VIa)、(VIb)、および(VIc)の角括弧内に表され、-R^a-、Ab-、-W-、-Y-、-Z、w、およびyは、上記に定義されるとおりである。

20

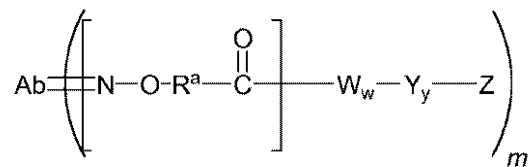
【 0 2 3 2】

【化 1 8】

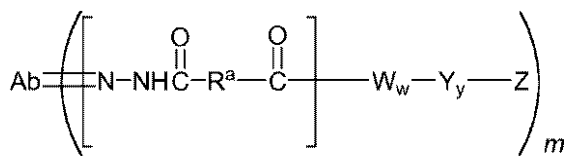


(VIa)

30



(VIb)



(VIc)

40

アミノ酸単位(-W-)が存在する場合、アミノ酸単位(-W-)はストレッチャー単位を、スペーサー単位が存在する場合にはスペーサー単位に連結し、スペーサー単位が不在である場合にはストレッチャー単位を薬剤成分に連結し、ストレッチャー単位およびスペーサー単位が不在である場合にはAb単位を治療剤または標識成分に連結する。

【 0 2 3 3】

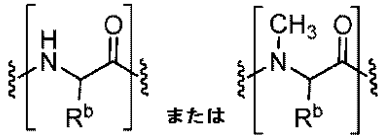
W_w-は、たとえばモノペプチド、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペン

50

タペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチド、またはドデカペプチド単位とすることができる。それぞれの - W - 単位は、角括弧において下記に示される式を独立して有し、w は、0 ~ 12 の範囲の整数であり、

【0234】

【化19】

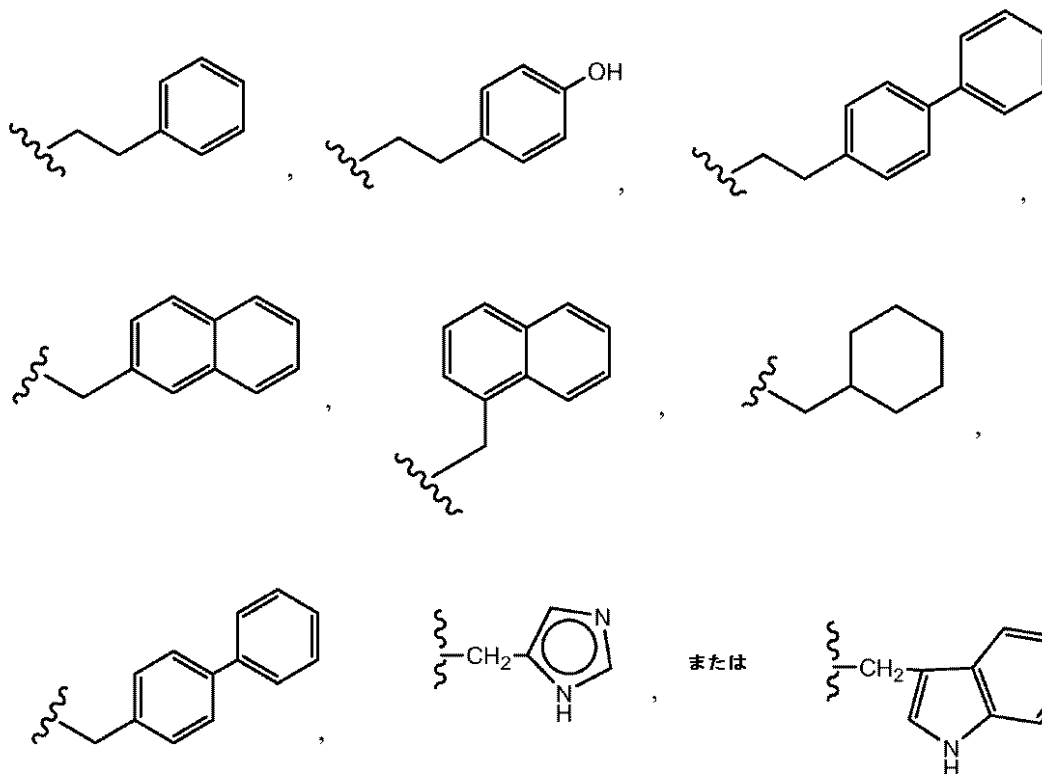


10

R^b は、水素、メチル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、ベンジル、p-ヒドロキシベンジル、-CH₂OH、-CH(OH)CH₃、-CH₂CH₂SCH₃、-CH₂CONH₂、-CH₂COOH、-CH₂CH₂CONH₂、-CH₂CH₂COOH、-(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₃NH₂、-(CH₂)₃NHCOCH₃、-(CH₂)₃NHCHO、-(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₄NH₂、-(CH₂)₄NHCOCH₃、-(CH₂)₄NHCHO、-(CH₂)₃NHCONH₂、-(CH₂)₄NHCONH₂、-CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂、2-ピリジルメチル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル、フェニル、シクロヘキシル、

【0235】

【化20】



30

40

である。

【0236】

いくつかの実施形態では、アミノ酸単位は、癌または腫瘍関連のプロテアーゼを含む1つ以上の酵素によって酵素的に切断することができ、治療剤または標識成分(-Z)を遊離し、これは、放出に際してin vivoにおいて一実施形態においてプロトン化され、治療剤または標識(Z)を提供する。

【0237】

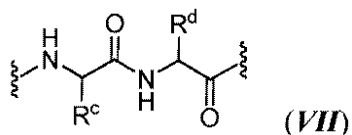
ある実施形態では、アミノ酸単位は、天然アミノ酸を含むことができる。他の実施形態

50

では、アミノ酸単位は、非天然アミノ酸を含むことができる。例示の W_w 単位は、式 (VI) ~ (IX) によって表される。

【0238】

【化21】



式中の R^c および R^d は、以下のとおりである。

【0239】

【化22】

R^c	R^d
ベンジル	$(CH_2)_4NH_2$;
メチル	$(CH_2)_4NH_2$;
イソプロピル	$(CH_2)_4NH_2$;
イソプロピル	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
ベンジル	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
イソブチル	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
<i>sec</i> -ブチル	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
ベンジル	メチル ;
ベンジル	$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

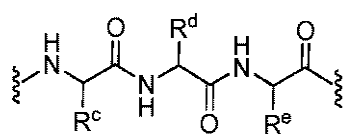
10

20

30

【0240】

【化23】



式中の R^c 、 R^d 、および R^e は、以下のとおりである。

【0241】

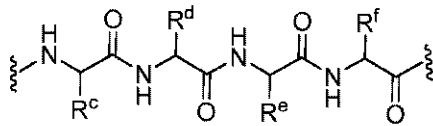
【化24】

R^c	R^d	R^e
ベンジル	ベンジル	$(CH_2)_4NH_2$;
イソプロピル	ベンジル	$(CH_2)_4NH_2$; および
H	ベンジル	$(CH_2)_4NH_2$;

40

【0242】

【化 2 5】



(IX)

式中の R^c 、 R^d 、 R^e 、および R^f は、以下のとおりである。

【0 2 4 3】

【化 2 6】

R^c	R^d	R^e	R^f
H	ベンジル	イソブチル	H; および
メチル	イソブチル	メチル	イソブチル

10

例示的なアミノ酸単位は、 R^c はベンジルでありかつ R^d は $-(CH_2)_4NH_2$ である場合、 R^c はイソプロピルでありかつ R^d は、 $-(CH_2)_4NH_2$ である場合、または R^c はイソプロピルでありかつ R^d は $-(CH_2)_3NHCONH_2$ である場合の式 (VII) の単位を含むが、これに限定されない。他の例示的なアミノ酸単位は、式 (VIII) の単位であり、 R^c は、ベンジルであり、 R^d は、ベンジルであり、 R^e は、 $-(CH_2)_4NH_2$ である。

20

【0 2 4 4】

有用な $-W_w-$ 単位は、特定の酵素、たとえば腫瘍関連のプロテアーゼによる酵素的切断でのそれらの選択性について設計し、最適化することができる。一実施形態では、 $-W_w-$ 単位は、その切断がカテプシン B、C、および D または プラスミンプロテアーゼによって触媒されるものである。

【0 2 4 5】

一実施形態では、 $-W_w-$ は、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、またはペントペプチドである。 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 、または R^f が水素以外である場合、 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 、または R^f が結合する炭素原子は、キラルである。

30

【0 2 4 6】

R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 、または R^f が結合する炭素原子はそれぞれ、独立して (S) または (R) 配置である。

【0 2 4 7】

アミノ酸単位の一態様では、アミノ酸単位は、バリン - シトルリン (vc または val-cit) である。他の態様では、アミノ酸単位は、フェニルアラニン - リシン (つまり fk) である。アミノ酸単位の他の態様では、アミノ酸単位は、N - メチルバリン - シトルリンである。他の態様では、アミノ酸単位は、5 - アミノ吉草酸、ホモフェニルアラニンリシン、テトライソキノリンカルボキシレートリシン、シクロヘキシルアラニンリシン、イソニペコチン酸 (isonopecotinic acid) リシン、ベータ - アラニンリシン、グリシンセリンパリングルタミン、およびイソニペコチン酸である。

40

【0 2 4 8】

スペーサー単位 ($-Y-$) は、存在する場合、アミノ酸単位が存在する場合、アミノ酸単位を治療剤または標識成分 ($-Z-$) に連結する。あるいは、スペーサー単位は、アミノ酸単位が不在である場合、ストレッチャー単位を治療剤または標識成分に連結する。スペーサー単位はまた、アミノ酸単位およびストレッチャー単位の両方が不在である場合、治療剤または標識成分を A b 単位に連結する。

【0 2 4 9】

スペーサー単位は、2 つの一般的なタイプ、非自壊的単位、自壊的単位がある。非自壊的スペーサー単位は、スペーサー単位の一部またはすべてが、抗体 - 医薬結合体からのア

50

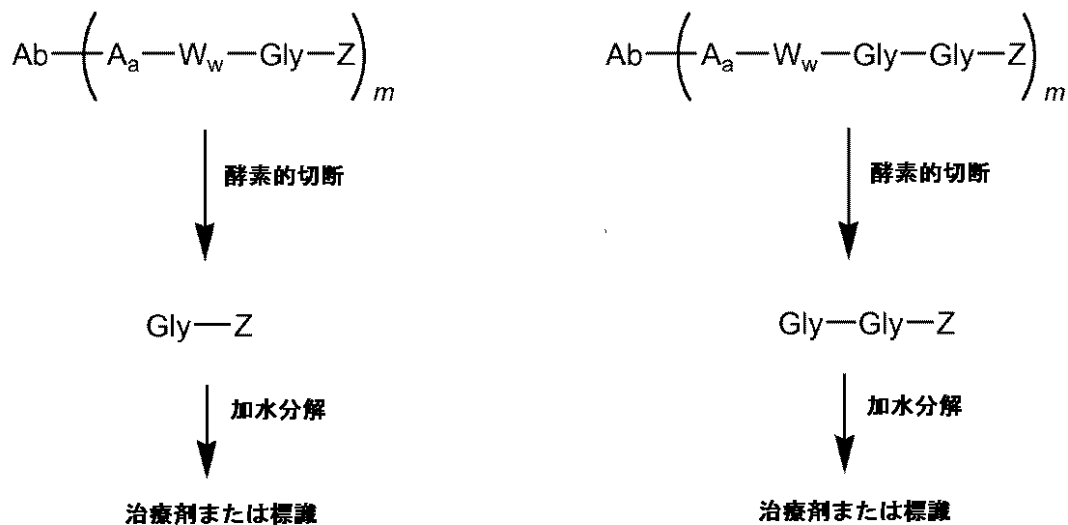
ミノ酸単位の切断（特に酵素的切断）の後に、治療剤または標識成分に結合したままであるものである。非自壊的スペーサー単位の例は、（グリシン-グリシン）スペーサー単位およびグリシンスペーサー単位（共にスキーム1に表される）（下記）を含むが、これらに限定されない。グリシン-グリシンスペーサー単位またはグリシンスペーサー単位を含有する結合体が、酵素（たとえば腫瘍細胞関連プロテアーゼ、癌細胞関連プロテアーゼ、またはリンパ球関連プロテアーゼ）を介して酵素的切断を受ける場合、グリシン-グリシン-Z成分またはグリシン-Z成分は、A_b-A_a-W_w-から切断される。一実施形態では、独立した加水分解反応が、標的細胞内で起こり、グリシン-Z成分結合を切断し、治療剤または標識を遊離させる。

【0250】

10

【化27】

スキーム1



20

いくつかの実施形態では、非自壊的スペーサー単位（-Y-）は、-Gly-である。いくつかの実施形態では、非自壊的スペーサー単位（-Y-）は、-Gly-Gly-である。

30

【0251】

一実施形態では、本発明は、スペーサー単位が不在（y=0）である、式（II）の免疫結合体またはその薬学的に許容される塩を提供する。

【0252】

あるいは、自壊的スペーサー単位を含有する結合体は、-Zを放出することができる。本明細書において使用されるように、用語「自壊的スペーサー」は、間を置いて配置された2つの化学成分を一緒に共有結合で連結し、安定した三連の分子にすることができる二官能性化学成分を指す。第1の成分へのその結合が切断される場合、それは、自発的に、第2の化学成分から分離する。

40

【0253】

いくつかの実施形態では、-Y_y-は、フェニレン部分がQ_nで置換されるp-アミノベンジルアルコール（PAB）単位であり（スキーム2および3を参照されたい）、Qは、-C₁~C₈アルキル、-C₂~C₈アルケニル、-C₂~C₈アルキニル、-O-（C₁~C₈アルキル）、-O-（C₂~C₈アルケニル）、-O-（C₂~C₈アルキニル）、-ハロゲン、-ニトロ、または-シアノであり、nは、0~4の範囲の整数である。アルキル、アルケニル、およびアルキニル基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換され得る。

【0254】

いくつかの実施形態では、-Y-は、PAB基のアミノ窒素原子を介して-W_w-に連

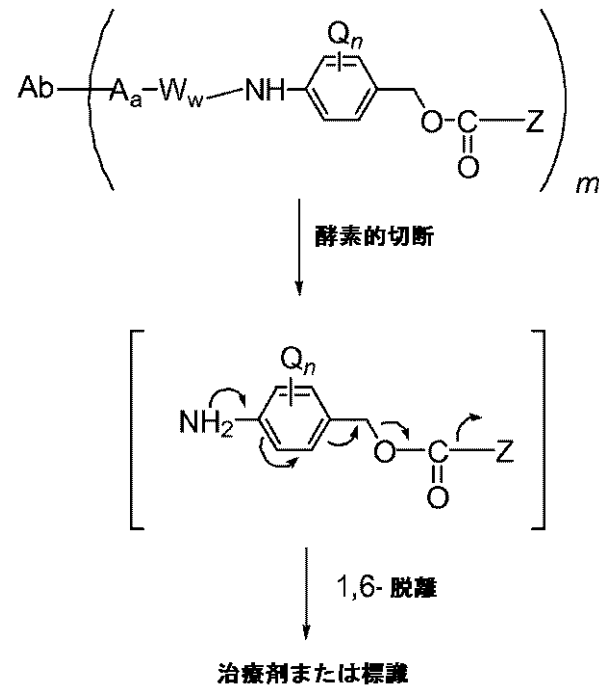
50

結され、カーボネート、カルバメート、またはエーテル基を介して - Z に直接つながれる P A B 基である。あらゆる特定の理論またはメカニズムによって拘束されることなく、スキーム 2 は、Tokira、2002 年、J. Org. Chem. 67 巻：1866 ~ 1872 頁に記載されるように、カルバメートまたはカーボネート基を介して - Z に直接結合している P A B 基からの治療剤または標識 (- Z) の放出の、可能性のあるメカニズムを表す。

【0255】

【化28】

スキーム 2



スキーム 2 では、Q は、- C₁ ~ C₈ アルキル、- C₂ ~ C₈ アルケニル、- C₂ ~ C₈ アルキニル、- O - (C₁ ~ C₈ アルキル)、- O - (C₂ ~ C₈ アルケニル)、- O - (C₂ ~ C₈ アルキニル)、- ハロゲン、- ニトロ、または - シアノであり、m は、0 ~ 4 の範囲の整数であり、m は、1 ~ 約 20 の範囲にある。アルキル、アルケニル、およびアルキニル基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換され得る。

30

【0256】

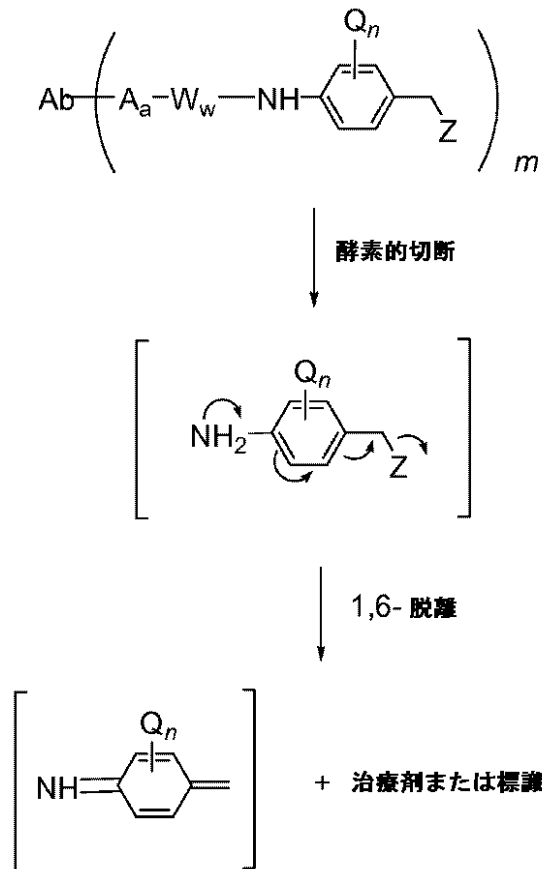
あらゆる特定の理論またはメカニズムによって拘束されることなく、スキーム 3 は、エーテル結合またはアミン結合を介して - Z に直接結合している P A B 基からの治療剤または標識成分 (- Z) の放出の、可能性のあるメカニズムを表し、- Z は、治療剤または標識成分の一部である酸素または窒素基を含む。

40

【0257】

【化 2 9】

スキーム 3



10

20

スキーム 3 では、Q は、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルケニル)、 $-O-(C_2 \sim C_8$ アルキニル)、 $-$ ハロゲン、 $-$ ニトロ、または $-$ シアノであり、n は、0 ~ 4 の範囲の整数であり、m は、1 ~ 約 20 の範囲にある。アルキル、アルケニル、およびアルキニル基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換され得る。

30

【0258】

自壊的スパーサーの他の例は、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体 (Hayashi ら、1999 年、Bioorg. Med. Chem. Lett. 9 巻: 2237 頁) およびオルトまたはパラ-アミノベンジルアセタールなどの PAB 基に電子的に類似する芳香族化合物を含むが、これらに限定されない。置換および非置換 4-アミノ酪酸アミド (Rodrigues ら、1995 年、Chemistry Biology 2 巻: 223 頁)、適切に置換されたピシクロ [2.2.1] およびピシクロ [2.2.2] 環系 (Storm ら、1972 年、J. Amer. Chem. Soc. 94 巻: 5815 頁)、ならびに 2-アミノフェニルプロピオン酸アミド (Amsberry ら、1990 年、J. Org. Chem. 55 巻: 5867 頁) などのアミド結合加水分解に際して環化を経るスパーサーを使用することができる。グリシンの 位で置換されるアミン含有薬剤の脱離 (Kingsbury ら、1984 年、J. Med. Chem. 27 巻: 1447 頁) もまた、自壊的スパーサーの例である。

40

【0259】

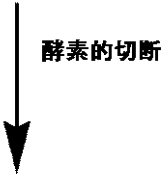
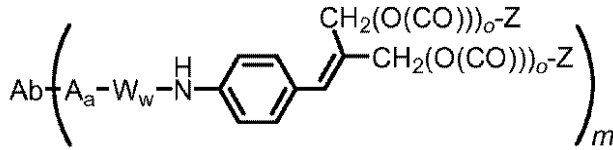
一実施形態では、スパーサー単位は、スキーム 4 に表される分枝ビス(ヒドロキシメチル)スチレン (BHMS) 単位であり、これは、多数の薬剤を組み込み、放出するために使用することができる。

50

【 0 2 6 0 】

【 化 3 0 】

スキーム 4



(2 x m) 治療剤または標識

スキーム 4 では、Q は、 $-\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、 $-\text{C}_2 \sim \text{C}_8$ アルケニル、 $-\text{C}_2 \sim \text{C}_8$ アルキニル、 $-\text{O} - (\text{C}_1 \sim \text{C}_8 \text{ アルキル})$ 、 $-\text{O} - (\text{C}_2 \sim \text{C}_8 \text{ アルケニル})$ 、 $-\text{O} - (\text{C}_2 \sim \text{C}_8 \text{ アルキニル})$ 、 $-\text{ハロゲン}$ 、 $-\text{ニトロ}$ 、または $-\text{シアノ}$ であり、 n は、 $0 \sim 4$ の範囲の整数であり、 o は、 0 または 1 であり、 m は、 $1 \sim \text{約} 20$ の整数である。アルキル、アルケニル、およびアルキニル基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換され得る。

【 0 2 6 1 】

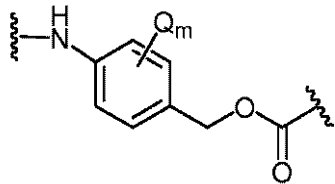
いくつかの実施形態では、 $-\text{Z}$ 成分は、同じである。他の実施形態では、 $-\text{Z}$ 成分は、異なる。

【 0 2 6 2 】

一態様では、スペーサー単位 ($-\text{Y}_y -$) は、式 (X) ~ (XII) によって表され、

【 0 2 6 3 】

【 化 3 1 】

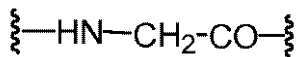


(X)

Q は、 $-\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、 $-\text{C}_2 \sim \text{C}_8$ アルケニル、 $-\text{C}_2 \sim \text{C}_8$ アルキニル、 $-\text{O} - (\text{C}_1 \sim \text{C}_8 \text{ アルキル})$ 、 $-\text{O} - (\text{C}_2 \sim \text{C}_8 \text{ アルケニル})$ 、 $-\text{O} - (\text{C}_2 \sim \text{C}_8 \text{ アルキニル})$ 、 $-\text{ハロゲン}$ 、 $-\text{ニトロ}$ 、または $-\text{シアノ}$ であり、 m は、 $0 \sim 4$ の範囲にある整数である。アルキル、アルケニル、およびアルキニル基は、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換され得る。

【 0 2 6 4 】

【 化 3 2 】

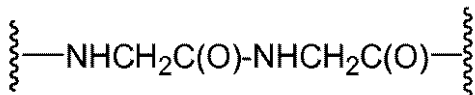


(XI)

および

【 0 2 6 5 】

【 化 3 3 】



(XII)

10

20

30

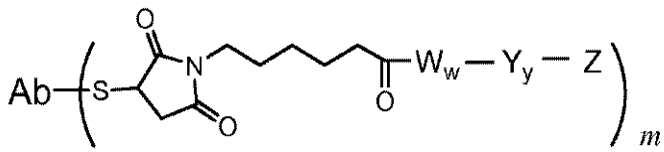
40

50

選択される実施形態の群では、式 (I) および (I I) の結合体は、以下のものであり、

【 0 2 6 6 】

【 化 3 4 】

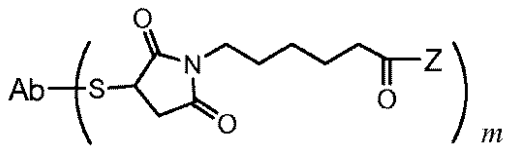


式中の w および y は、それぞれ、0、1、または2であり、

10

【 0 2 6 7 】

【 化 3 5 】

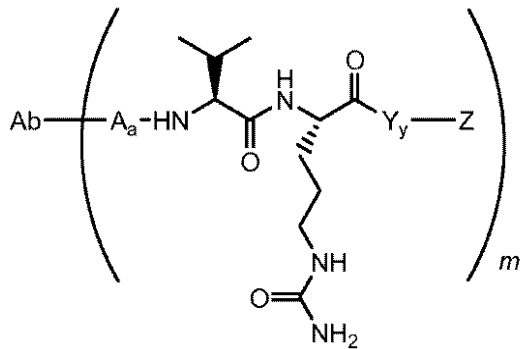


式中の w および y は、それぞれ、0であり、

【 0 2 6 8 】

【 化 3 6 】

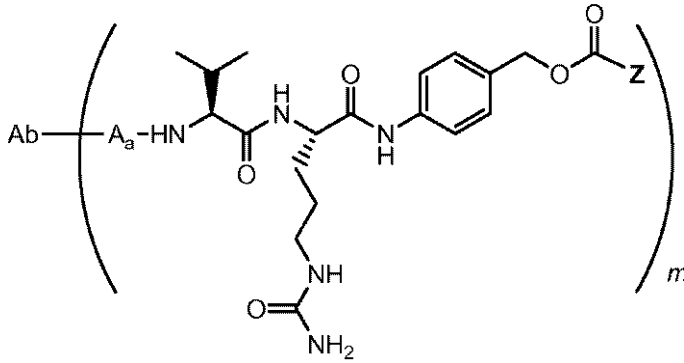
20



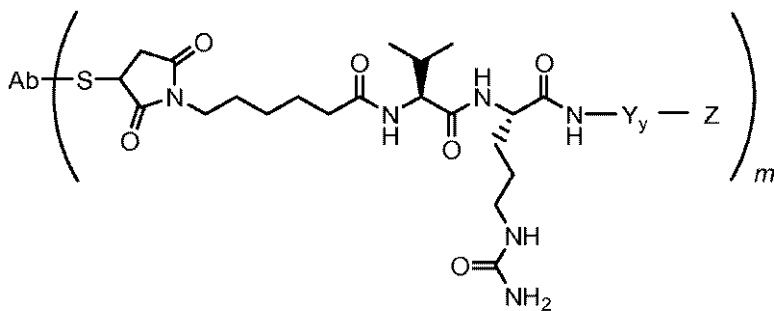
【 0 2 6 9 】

30

【化 3 7】

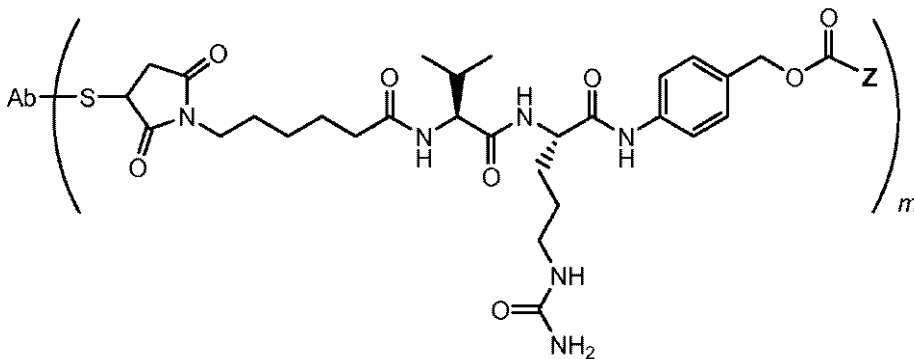


10



20

, および



30

式中の A_a 、 W_w 、 Y_y 、 Z 、および A_b は、上記にて提供された意味を有する。

【0270】

式 (I) における可変部 Z は、治療剤または標識である。上記治療剤は、所望の生物学的効果を及ぼすことができる任意の作用物質とすることができる。いくつかの実施形態では、上記治療剤は、第 2 の治療様式、たとえば化学療法剤、放射線療法、免疫療法への細胞の感受性を高める。

40

【0271】

いくつかの実施形態では、治療剤は、細胞増殖抑制剤または細胞傷害剤である。例として、限定を伴うことなく、代謝拮抗薬（たとえばアザチオプリン、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、フルダラビン、ペントスタチン、クラドリビン、5 - フルオロウラシル (5FU)、フロクスウリジン (FUDR)、シトシンアラビノシド (シタラビン)、メトトレキサート、トリメトプリム、ピリメタミン、ペメトレキサド)；アルキル化剤（たとえばシクロホスファミド、メクロレタミン、ウラムスチン、メルファラン、クロラムブシル、チオテパ/クロラムブシル、イホスファミド、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ブスルファン、ジプロモマンニトール、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン、サトラプラチン、トリプラチンテトラニトレート、

50

プロカルバジン、アルトレタミン、ダカルバジン、ミトゾロミド、テモゾロミド)；アントラサイクリン(たとえばダウノルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、バルルビシン)；抗生物質(たとえばダクチノマイシン、プレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン、ストレプトゾトシン、グラミシジンD、マイトマイシン類(たとえばマイトマイシンC)、デュオカルマイシン類(たとえばCC-1065)、カリケアマイシン類)；有糸分裂阻害剤(メイタンシノイド類、アウリスタチン(auristatin)類、ドラスタチン類、クリプトフィシン類、ピンカアルカロイド(たとえばピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン、ピノレルピン)、タキサン類(たとえばパクリタキセル、ドセタキセル、または新規なタキサン(たとえば、2001年5月31日に公開された国際特許出願公開WO01/38318を参照されたい)、およびコルヒチン類)；トポイソメラーゼ阻害剤(たとえばイリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド、テニポシド、ミザントロン)；およびプロテアソーム阻害剤(たとえばペプチジルボロン酸)を含む。

メイタンシノイド免疫結合体

いくつかの実施形態では、上記治療剤は、メイタンシノイドである。たとえば、メイタンシノイド化合物および抗体へのそれらの結合体化のための方法は、Charira、Cancer Res., 52巻:127~131頁(1992年)；Widdisonら、J. Med. Chem. 49巻:4392~4408頁(2006年)；ならびに米国特許第5,208,020号および第6,333,410号において記載されている。メイタンシノイドの例は、修飾芳香環を有するメイタンシノイド類似体(たとえばC-19-デクロロ、C-20-デメトキシ、C-20-アシルオキシ)および他の位置に修飾を有するもの(たとえばC-9-CH、C-14-アルコキシメチル、C-14-ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル、C-15-ヒドロキシ/アシルオキシ、C-15-メトキシ、C-18-N-デメチル、4,5-デオキシ)を含む。ある実施形態では、上記メイタンシノイドは、 $N^{2'}$ -デアセチル- $N^{2'}$ -(4-メルカプト-1-オキソペンチル)メイタンシン(DM3)、 $N^{2'}$ -デアセチル- $N^{2'}$ -(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン(DM1)、または $N^{2'}$ -デアセチル- $N^{2'}$ -(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)メイタンシン(DM4)である。

【0272】

スルフヒドリル基を含むメイタンシノイド化合物は、チオエーテルまたはジスルフィド結合によってメイタンシノイド化合物につながるヘテロ二官能性リンカーを使用して、抗体に結合することができる。いくつかのそのような実施形態では、上記リンカーは、抗体上のアミノ基(たとえば末端アミノ基またはリシン残基のイプシロンアミノ基)に結合される。いくつかの実施形態では、メイタンシノイド化合物を抗体に結合するために使用されるヘテロ二官能性リンカーは、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエート、もしくはSPP)、4-スクシンイミジル-オキシカルボニル-2-メチル-2-(2-ピリジルジチオ)-トルエン(SMPT)、N-スクシンイミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)；N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ブチレート(SPDB)、2-イミノチオラン、またはS-アセチルコハク酸無水物である。

【0273】

ある実施形態では、式(I)の免疫結合体は、式Ab-(SMCC-DM1)_m(式(I-1)；Ab-(SPP-DM1)_m(式(I-2)；またはAb-(SPDB-DM4)_m(式(I-3)によって特徴付けられ、ここで、Abは本明細書に記載の抗GCC抗体分子であり、mは、式(I)について上に記載される値および好ましい値を有する。

【0274】

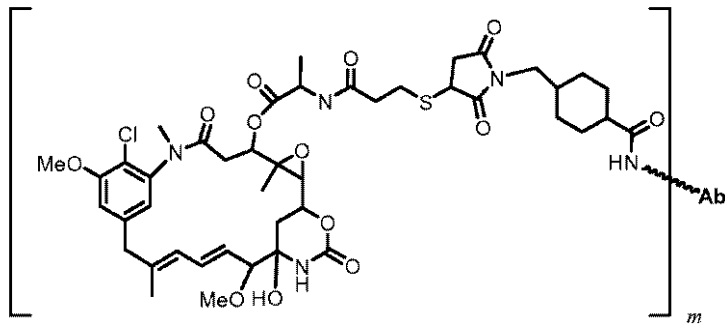
10

20

30

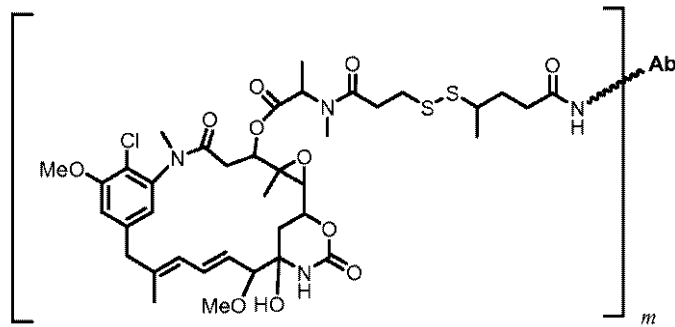
40

【化 3 8】



(I-1)

10

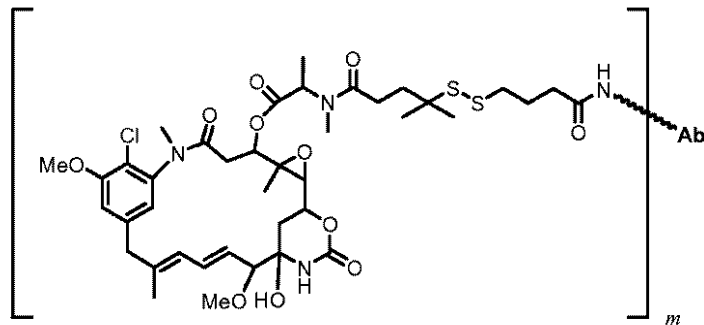


(I-2)

20

【 0 2 7 5】

【化 3 9】



(I-3)

30

いくつかの実施形態では、式 (I - 1)、(I - 2)、または (I - 3) における可変部 A b は、表 1 ~ 6 において要約される特徴を有する抗体分子である。ある実施形態では、可変部 A b は、5 F 9 抗体分子または A b x - 2 2 9 抗体分子である。

【 0 2 7 6】

いくつかの実施形態では、式 (I - 1)、(I - 2)、または (I - 3) における変数 m は、約 1 ~ 約 1 0、約 3 ~ 約 7、または約 3 ~ 約 5 の範囲にある。

【 0 2 7 7】

ある特定の実施形態では、本発明は、式 (I - 1)、(I - 2)、または (I - 3) の免疫結合体に関しており、ここで A b は、5 F 9 抗体分子であり、m は、約 4 である。

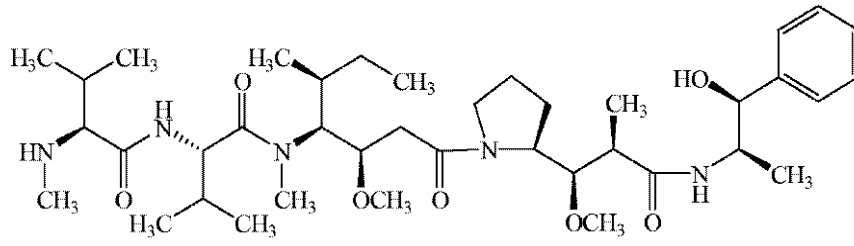
ドラスタチンおよびアウリスタチン免疫結合体

いくつかの他の実施形態では、上記治療剤は、ドラスタチンである。いくつかの実施形態では、上記治療剤は、アウリスタチン E (ドラスタチン - 1 0 の誘導体としても当技術分野において公知) などのアウリスタチンまたはその誘導体である。いくつかの実施形態では、上記治療剤は、式 (X I I I) ~ (X X I I I) の化合物から選択される化合物またはその薬学的に許容される塩形態である。

【 0 2 7 8】

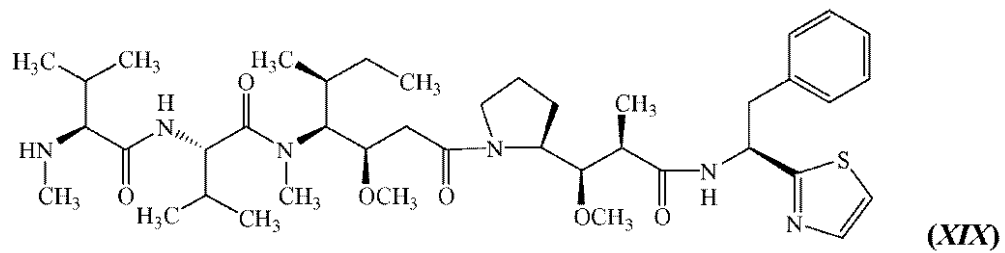
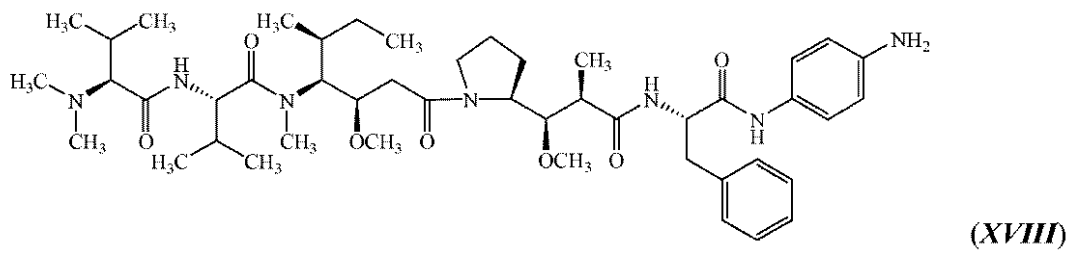
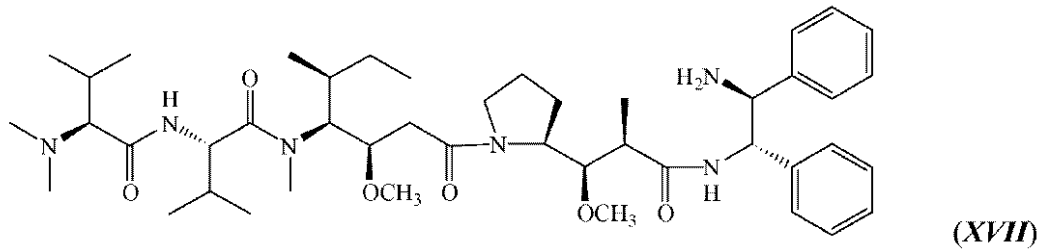
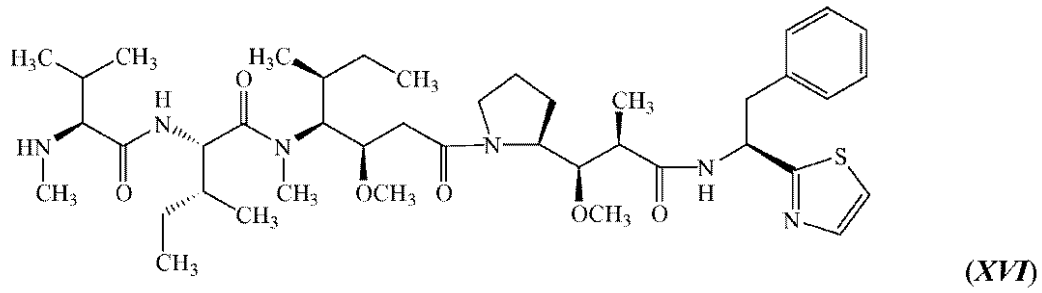
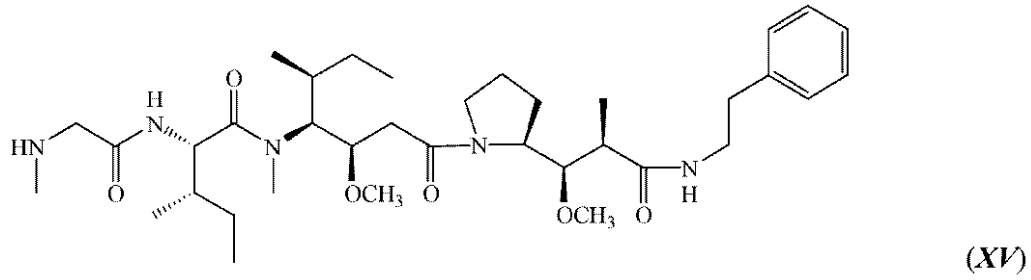
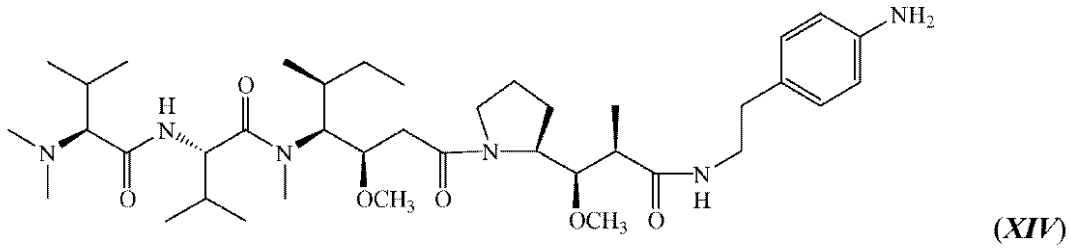
40

【化 4 0】

**(XIII)**

【 0 2 7 9 】

【化 4 1】



【 0 2 8 0 】

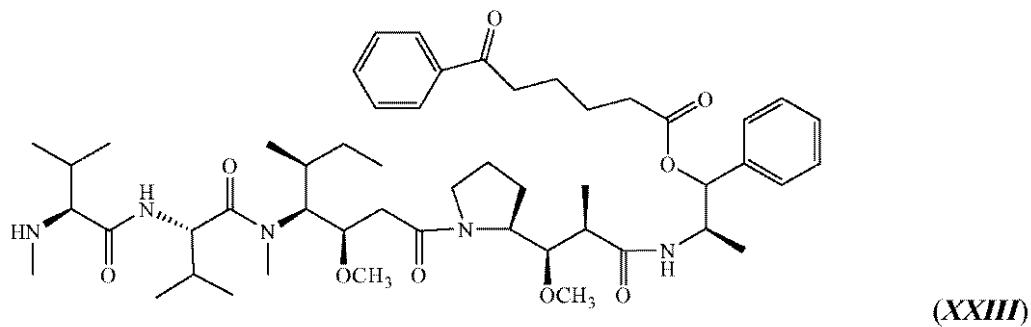
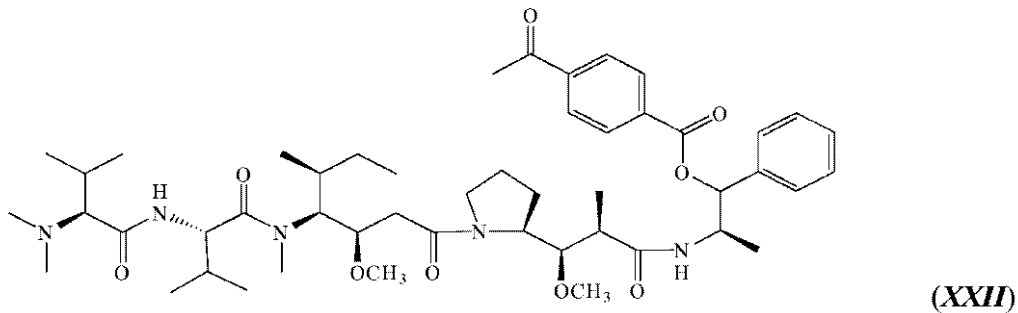
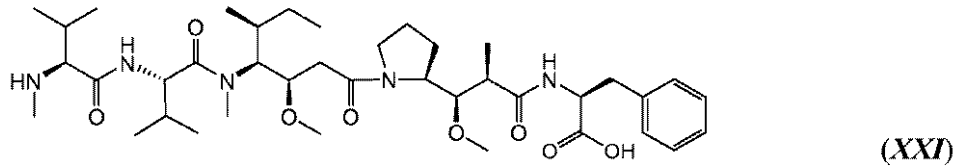
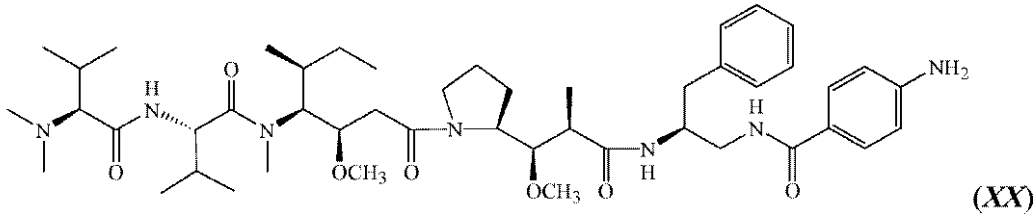
10

20

30

40

【化 4 2】



10

20

30

40

50

アウリスタチン化合物および抗体へのそれらの結合体形成のための方法は、たとえば、Doroninaら、Nature Biotech., 21巻:778~784頁(2003年); Hamblettら、Clin. Cancer Res., 10巻:7063~7070頁(2004年); CarterおよびSenter、Cancer J., 14巻:154~169頁(2008年); 米国特許第7,498,298号、第7,091,186号、第6,884,869号; 第6,323,315号; 第6,239,104号; 第6,034,065号; 第5,780,588号; 第5,665,860号; 第5,663,149号; 第5,635,483号; 第5,599,902号; 第5,554,725号; 第5,530,097号; 第5,521,284号; 第5,504,191号; 第5,410,024号; 第5,138,036号; 第5,076,973号; 第4,986,988号; 第4,978,744号; 第4,879,278号; 第4,816,444号; および第4,486,414号; 米国特許出願公開第20090010945号、第20060074008号、第20080300192号、第20050009751号、第20050238649号、および第20030083236号; ならびに国際特許出願公開第WO04/010957およびWO02/088172において記載されており、これらのそれぞれは、その全体においておよびすべての目的のため

めに参照によって本明細書に組み込まれる。

【0281】

上記アウリスタチンは、たとえばアウリスタチンEおよびケト酸の間で形成されるエステルであり得る。たとえば、アウリスタチンEは、それぞれ、AEBおよびAEVBを生産するためにパラアセチル安息香酸またはベンゾイル吉草酸と反応させることができる。他の典型的なアウリスタチンは、アウリスタチンフェニルアラニンフェニレンジアミン(AFP; (XVIIII))、モノメチルアウリスタチンE(MMAE; (XIIII))、およびモノメチルアウリスタチンF(MMAF; (XXI))を含む。

【0282】

アウリスタチンは、微小管動態ならびに核分裂および細胞分裂に干渉することが示されており、このものは抗がん活性を有する。本発明における使用のためのアウリスタチンは、チューブリンに結合し、GCC発現細胞系に細胞傷害性または細胞増殖抑制性効果を及ぼすことができる。化合物がチューブリンに結合するかどうかを決定するための方法は、当技術分野において公知である。たとえば、Mullerら、Anal. Chem 2006年、78巻、4390~4397頁; Hamelら、Molecular Pharmacology, 1995年 47巻: 965~976頁; およびHamelら、The Journal of Biological Chemistry, 1990年 265巻: 28号、17141~17149頁を参照されたい。本発明の目的のために、チューブリンへの化合物の相対的な親和性を決定することができる。本発明のいくつかの好ましいアウリスタチン類は、チューブリンへのMMAEの結合親和性よりも10倍低い(より弱い親和性)~チューブリンへのMMAEの結合親和性よりも10倍、20倍、またはさらに100倍高い(より高い親和性)範囲の親和性でチューブリンに結合する。

10

20

【0283】

アウリスタチンまたは結果として生ずる免疫結合体が所望の細胞系に対して細胞増殖抑制性効果または細胞傷害性効果を及ぼすかどうかを決定するために使用することができる、当技術分野において公知の多くの異なるアッセイが存在する。たとえば、免疫結合体の細胞傷害性活性または細胞増殖抑制性活性は、細胞培養基に免疫結合体の標的タンパク質を発現する哺乳動物細胞を曝露する工程、約6時間~約5日間の期間、細胞を培養する工程、および細胞生存率を測定する工程によって測定することができる。細胞ベースのin vitroアッセイは、免疫結合体に関して、生存率(増殖)、細胞傷害性、およびアポトーシス(カスパーゼ活性化)の誘導を測定するために使用することができる。

30

【0284】

免疫結合体が細胞増殖抑制性効果を及ぼすかどうかを決定するために、チミジン取り込みアッセイが使用されてもよい。たとえば、96ウェルプレートの1ウェルあたり5,000細胞の密度で、標的抗原を発現するがん細胞は、72時間の期間、培養し、72時間の期間の最終の8時間の間に0.5 μ Ciの³H-チミジンに曝露することができる。培養物の細胞中への³H-チミジンの組み込みは、免疫結合体の存在および不在下において測定される。

【0285】

細胞傷害性を決定するために、ネクローシスまたはアポトーシス(プログラム細胞死)を測定することができる。ネクローシスには、典型的に、形質膜の透過性の増加; 細胞の膨張、および形質膜の破裂が伴う。アポトーシスは、典型的に、膜のプレビング、細胞質の凝縮、および内因性エンドヌクレアーゼの活性化によって特徴付けられる。がん細胞に対するこれらの効果のいずれかの決定は、免疫結合体ががんの処置において有用であることを示す。

40

【0286】

細胞生存率は、ニュートラルレッド、トリパンブルー、またはALAMAR(商標)ブルーなどの色素の取り込みを細胞において決定することによって測定することができる(たとえばPageら、1993年、Intl. J. Oncology 3巻: 473~4

50

76頁を参照されたい)。そのようなアッセイでは、上記細胞は、色素を含有する培地中で培養され、上記細胞は、洗浄され、上記色素の細胞の取り込みを反映する、残留する色素は、分光測光法で測定される。タンパク質結合色素のスルホローダミンB (SRB) もまた、細胞傷害性を測定するために使用することができる (Skehanら、1990年、J. Natl. Cancer Inst. 82巻: 1107~12頁)。

【0287】

その代わりに、MTTまたはWSTなどのテトラゾリウム塩は、死細胞ではなく生きている細胞を検出することによる、哺乳動物の細胞生存および増殖についての定量比色アッセイに使用される (たとえばMosmann、1983年、J. Immunol. Methods 65巻: 55~63頁を参照されたい)。

10

【0288】

アポトーシスは、たとえばDNA断片化を測定することによって定量することができる。DNA断片化の*in vitro*定量測定のための市販の測光法が入手可能である。TUNEL (断片化DNAにおける標識ヌクレオチドの組み込みを検出する) およびELISAベースのアッセイを含むそのようなアッセイの例は、Biochemica、1999年、第2、34~37頁 (Roche Molecular Biochemicals) において記載されている。

【0289】

アポトーシスはまた、細胞における形態学的変化を測定することによって決定することができる。たとえば、ネクローシスでのように、形質膜完全性の喪失は、ある種の色素 (たとえば、たとえばアクリジンオレンジまたは臭化エチジウムなどの蛍光色素) の取り込みを測定することによって決定することができる。アポトーシス細胞の数を測定するための方法は、DukeおよびCohen、Current Protocols in Immunology (Coliganら編、1992年、3.17.1~3.17.16頁) によって記載されている。細胞はまた、DNA色素 (たとえばアクリジンオレンジ、臭化エチジウム、またはヨウ化プロピジウム) で標識することができ、そして上記細胞は、クロマチン凝縮および内部核膜に沿った縁への移動 (margination) について観察される。アポトーシスを決定するために測定することができる他の形態学的変化は、たとえば細胞質凝縮、膜のプレビング増加、および細胞の収縮を含む。

20

【0290】

アポトーシス細胞の存在は、培養物の付着画分および「浮遊」画分の両方において測定することができる。たとえば、両方の画分は、上清を除去し、付着細胞をトリプシン処理し、遠心分離洗浄ステップ (たとえば2000rpmで10分間) に続いて調製物を組み合わせ、アポトーシスを検出することによって (たとえばDNA断片化を測定することによって) 収集することができる (たとえばPiazzaら、1995年、Cancer Research 55巻: 3110~16頁を参照されたい)。

30

【0291】

免疫結合体の効果は、動物モデルにおいて試験するまたは検証することができる。がんの多くの確立された動物モデルが、当業者に公知であり、これらのいずれも、免疫結合体の効力をアッセイするために使用することができる。そのようなモデルの非限定的な例は、下記に記載される。さらに、免疫結合体の*in vivo*における効力を検査するための小動物モデルは、適切な免疫不全げっ歯動物系統、たとえば無胸腺ヌードマウスまたはSCIDマウスにヒト腫瘍細胞系を移植することによって作製することができる。

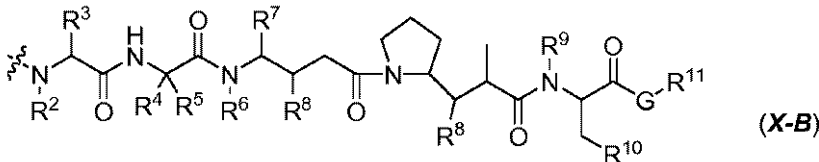
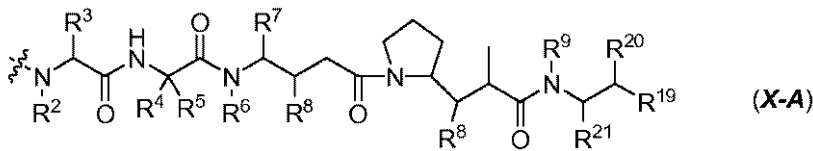
40

【0292】

いくつかの実施形態では、式(I)における可変部-Zは、式(X-A)または式(X-B)のアウリスタチン成分であり、

【0293】

【化 4 3】



10

20

30

40

50

それぞれの位置で独立して、

波線は、結合を示し、

R^2 は、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、または $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、

R^3 は、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン（炭素環）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン（炭素環）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン（炭素環）、 $-$ アリアル、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン（アリアル）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン（アリアル）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン（アリアル）、 $-$ ヘテロ環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン（ヘテロ環）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン（ヘテロ環）、または $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン（ヘテロ環）であり、

R^4 は、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン（炭素環）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン（炭素環）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン（炭素環）、 $-$ アリアル、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン（アリアル）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン（アリアル）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン（アリアル）、 $-$ ヘテロ環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン（ヘテロ環）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン（ヘテロ環）、もしくは $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン（ヘテロ環）であり、

R^5 は、 $-H$ もしくは $-C_1 \sim C_8$ アルキルであるか、

または R^4 および R^5 は、共同で環状炭素を形成し、式 $-(CR^aR^b)_s-$ を有し、 R^a および R^b は、独立して、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、もしくは $-$ 炭素環であり、 s は、2、3、4、5、もしくは 6 であり、

R^6 は、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、または $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、

R^7 は、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $-$ 炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン（炭素環）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン（炭素環）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン（炭素環）、 $-$ アリアル、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン（アリアル）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン（アリアル）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン（アリアル）、ヘテロ環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン（ヘテロ環）、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン（ヘテロ環）、または $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン（ヘテロ環）であり、

R^8 は、それぞれ、独立して、 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $-O-(C_1 \sim C_{20}$ アルキル)、 $-O-(C_2 \sim C_{20}$ アルケニル)、 $-O-(C_1 \sim C_{20}$ アルキニル)、または $-$ 炭素環であり、

R^9 は、 $-H$ 、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、または $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、

R^{19} は、 - アリール、 - ヘテロ環、または - 炭素環であり、
 R^{20} は、 - H、 - $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 - 炭素環、 - O - ($C_1 \sim C_{20}$ アルキル)、 - O - ($C_2 \sim C_{20}$ アルケニル)、 - O - ($C_2 \sim C_{20}$ アルキニル)、または OR^{18} であり、 R^{18} は、 - H、ヒドロキシル保護基、または直接的結合であり、 OR^{18} は、 = O を表し、
 R^{21} は、 - H、 - $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、もしくは - $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 - アリール、 - ヘテロ環、または - 炭素環であり、
 R^{10} は、 - アリールまたは - ヘテロ環であり、
G は、 - O - 、 - S - 、 - NH - 、または - NR¹² - であり、 R^{12} は、 - $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、
 R^{11} は、 - H、 - $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 - アリール、 - ヘテロ環、 - ($R^{13}O$)_s - R^{14} 、または - ($R^{13}O$)_s - CH(R^{15})₂ であり、
s は、 0 ~ 1000 の範囲の整数であり、
 R^{13} は、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルキレン、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン、または - $C_2 \sim C_{20}$ アルキニレンであり、
 R^{14} は、 - H、 - $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、または - $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、
各 R^{15} は独立して、 - H、 - COOH、 - (CH₂)_t - N(R^{16})₂、 - (CH₂)_t - SO₃H、 - (CH₂)_t - SO₃ - $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 - (CH₂)_t - SO₃ - $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、または - (CH₂)_t - SO₃ - $C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、
各 R^{16} は独立して、 - H、 - $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、または - (CH₂)_t - COOH であり、
t は、 0 ~ 6 の範囲の整数であり、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン (alkynylene)、アリール、炭素環、およびヘテロ環ラジカルは、単独であるかまたは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換される。

10

20

30

40

50

【0294】

式 (X - A) のアウリスタチンは、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、およびヘテロ環ラジカルが置換されていないものを含む。

【0295】

式 (X - A) のアウリスタチンは、本明細書に記載のとおり、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、および R^9 の基は置換されず、 R^{19} 、 R^{20} 、および R^{21} の基は必要に応じて置換されるものを含む。

【0296】

式 (X - A) のアウリスタチンは、

R^2 は、 - $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、

R^3 、 R^4 、および R^7 は、 - H、 - $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環、 - $C_1 \sim C_{20}$ アルキレン (単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン (単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン (単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 - $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 - $C_1 \sim C_{20}$ アルキレン ($C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン ($C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン ($C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 - ヘテロ環、 - $C_1 \sim C_{20}$ アルキレン (ヘテロ環)、 - $C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン (ヘテロ環)、もしくは - $C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン (ヘテロ環) から独立して選択され、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、炭素環、アリールおよびヘテロ環ラジカルは、必要に応じて置換され、

R^5 は、 - 水素であり、

R⁶ は、-C₁ ~ C₈ アルキルであり、

R⁸ はそれぞれ、-OH、-O-(C₁ ~ C₂₀ アルキル)、-O-(C₂ ~ C₂₀ アルケニル)、もしくは -O-(C₂ ~ C₂₀ アルキニル) から独立して選択され、当該アルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは、必要に応じて置換され、

R⁹ は、-水素もしくは -C₁ ~ C₈ アルキルであり、

R¹⁹ は、必要に応じて置換されるフェニルであり、

R²⁰ は、OR¹⁸ であり、R¹⁸ は、H、ヒドロキシル保護基、もしくは直接的結合であり、OR¹⁸ は、=Oを表し、

R²¹ は、-H、-C₁ ~ C₂₀ アルキル、-C₂ ~ C₂₀ アルケニル、-C₂ ~ C₂₀ アルキニル、もしくは -炭素環から選択され、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、および炭素環ラジカルは、必要に応じて置換されるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。

10

【0297】

式(X-A)のアウリスタチンは、

R² は、メチルであり、

R³ は、-H、-C₁ ~ C₈ アルキル、-C₂ ~ C₈ アルケニル、もしくは -C₂ ~ C₈ アルキニルであり、当該アルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは、必要に応じて置換され、

R⁴ は、-H、C₁ ~ C₈ アルキル、-C₂ ~ C₈ アルケニル、-C₂ ~ C₈ アルキニル、単環式C₃ ~ C₆ 炭素環、-C₆ ~ C₁₀ アリール、-C₁ ~ C₈ アルキレン(C₆ ~ C₁₀ アリール)、-C₂ ~ C₈ アルケニレン(C₆ ~ C₁₀ アリール)、-C₂ ~ C₈ アルキニレン(C₆ ~ C₁₀ アリール)、-C₁ ~ C₈ アルキレン(単環式C₃ ~ C₆ 炭素環)、-C₂ ~ C₈ アルケニレン(単環式C₃ ~ C₆ 炭素環)、-C₂ ~ C₈ アルキニレン(単環式C₃ ~ C₆ 炭素環)であり、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、および炭素環ラジカルは、単独であるかもしくは他の基の一部であるかどうかに関わらず、必要に応じて置換され、

20

R⁵ は、Hであり、

R⁶ は、メチルであり、

R⁷ は、-C₁ ~ C₈ アルキル、-C₂ ~ C₈ アルケニル、もしくは -C₂ ~ C₈ アルキニルであり、

30

R⁸ はそれぞれ、メトキシであり、

R⁹ は、-水素もしくは -C₁ ~ C₈ アルキルであり、

R¹⁹ は、フェニルであり、

R²⁰ は、OR¹⁸ であり、R¹⁸ は、-H、ヒドロキシル保護基、もしくは直接的結合であり、OR¹⁸ は、=Oを表し、

R²¹ は、メチルであるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。

【0298】

式(X-A)のアウリスタチンは、

R² は、メチルであり、R³ は、HもしくはC₁ ~ C₃ アルキルであり、R⁴ は、C₁ ~ C₅ アルキルであり、R⁵ は、Hであり、R⁶ は、メチルであり、R⁷ は、イソプロピルもしくはsec-ブチルであり、R⁸ は、メトキシであり、R⁹ は、水素もしくはC₁ ~ C₈ アルキルであり、R¹⁹ は、フェニルであり、R²⁰ は、OR¹⁸ であり、R¹⁸ は、H、ヒドロキシル保護基、もしくは直接的結合であり、OR¹⁸ は、=Oを表し、R²¹ は、メチルであるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。

40

【0299】

式(X-A)のアウリスタチンは、

R² は、メチルもしくはC₁ ~ C₃ アルキルであり、R³ は、HもしくはC₁ ~ C₃ アルキルであり、R⁴ は、C₁ ~ C₅ アルキルであり、R⁵ は、Hであり、R⁶ は、C₁ ~ C₃ アルキルであり、R⁷ は、C₁ ~ C₅ アルキルであり、R⁸ は、C₁ ~ C₃ アルコキシであり、R⁹ は、水素もしくはC₁ ~ C₈ アルキルであり、R¹⁹ は、フェニルであり、

50

R^{20} は、 OR^{18} であり、 R^{18} は、H、ヒドロキシル保護基、もしくは直接的結合であり、 OR^{18} は、=Oを表し、 R^{21} は、 $C_1 \sim C_3$ アルキルであるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。

【0300】

式(X-B)のアウリスタチンは、

R^2 は、メチルであり、

R^3 、 R^4 、および R^7 は、-H、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(単環式 $C_3 \sim C_6$ 炭素環)、 $-C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン($C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン($C_6 \sim C_{10}$ アリール)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン($C_6 \sim C_{10}$ アリール)、ヘテロ環、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキレン(ヘテロ環)、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン(ヘテロ環)、もしくは $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレン(ヘテロ環)から独立して選択され、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、炭素環、アリール、およびヘテロ環式ラジカルは、単独であるかもしくは他の基の一部であるかどうかに関わらず必要に応じて置換され、

R^5 は、-Hであり、

R^6 は、メチルであり、

R^8 はそれぞれ、メトキシであり、

R^9 は、-H、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、もしくは $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、当該アルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは、必要に応じて置換され、

R^{10} は、必要に応じて置換されるアリールもしくは必要に応じて置換されるヘテロ環であり、

Gは、-O-、-S-、-NH-、もしくは $-NR^{12}$ -であり、 R^{12} は、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、もしくは $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、これらのそれぞれは、必要に応じて置換され、

R^{11} は、-H、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、-アリール、-ヘテロ環、 $-(R^{13}O)_s$ 、 R^{14} 、もしくは $-(R^{13}O)_s$ 、 $-CH(R^{15})_2$ であり、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、およびヘテロ環ラジカルは、必要に応じて置換され、

sは、0~1000の範囲の整数であり、

R^{13} は、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキレン、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニレン、もしくは $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニレンであり、これらのそれぞれは、必要に応じて置換され、

R^{14} は、-H、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、もしくは $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、当該アルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは、必要に応じて置換され、

各 R^{15} は独立して、-H、-COOH、 $-(CH_2)_t$ 、 $-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_t$ 、 $-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_t$ 、 $-SO_3$ 、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-(CH_2)_t$ 、 $-SO_3$ 、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、もしくは $-(CH_2)_t$ 、 $-SO_3$ 、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニルであり、当該アルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは、必要に応じて置換され、

各 R^{16} は独立して、-H、 $-C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、もしくは $-(CH_2)_t$ 、 $-COOH$ であり、当該アルキル、アルケニル、およびアルキニルラジカルは、必要に応じて置換され、

tは、0~6の範囲の整数であるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。

【0301】

これらのうちの特定の実施形態では、 R^{10} は、必要に応じて置換されるフェニルである。

10

20

30

40

50

【0302】

式(X-B)のアウリスタチンは、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、および R^9 の基は置換されず、かつ R^{10} および R^{11} の基は本明細書に記載のとおりであるものを含む。

【0303】

式(X-B)のアウリスタチンは、当該アルキル、アルケニル、アルキニル、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリール、炭素環、およびヘテロ環ラジカルが置換されていないものを含む。

【0304】

式(X-B)のアウリスタチンは、
 R^2 は、 $C_1 \sim C_3$ アルキルであり、 R^3 は、Hもしくは $C_1 \sim C_3$ アルキルであり、 R^4 は、 $C_1 \sim C_5$ アルキルであり、 R^5 は、Hであり、 R^6 は、 $C_1 \sim C_3$ アルキルであり、 R^7 は、 $C_1 \sim C_5$ アルキルであり、 R^8 は、 $C_1 \sim C_3$ アルコキシであり、 R^9 は、水素もしくは $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、 R^{10} は、必要に応じて置換されるフェニルであり、Gは、O、S、もしくはNHであり、 R^{11} は、本明細書において定義されるとおりであるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。

10

【0305】

式(X-B)のアウリスタチンは、
 R^2 は、メチルであり、 R^3 は、Hもしくは $C_1 \sim C_3$ アルキルであり、 R^4 は、 $C_1 \sim C_5$ アルキルであり、 R^5 は、Hであり、 R^6 は、メチルであり、 R^7 は、イソプロピルもしくはsec-ブチルであり、 R^8 は、メトキシであり、 R^9 は、水素もしくは $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、 R^{10} は、必要に応じて置換されるフェニルであり、Gは、O、S、もしくはNHであり、 R^{11} は、本明細書において定義されるとおりであるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。

20

【0306】

式(X-B)のアウリスタチンは、
 R^2 は、メチルであり、 R^3 は、Hもしくは $C_1 \sim C_3$ アルキルであり、 R^4 は、 $C_1 \sim C_5$ アルキルであり、 R^5 は、Hであり、 R^6 は、メチルであり、 R^7 は、イソプロピルもしくはsec-ブチルであり、 R^8 は、メトキシであり、 R^9 は、水素もしくは $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、 R^{10} は、フェニルであり、Gは、OもしくはNHであり、 R^{11} は、本明細書において定義されるとおりであり、好ましくは水素であるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。

30

【0307】

式(X-B)のアウリスタチンは、
 R^2 は、 $C_1 \sim C_3$ アルキルであり、 R^3 は、Hもしくは $C_1 \sim C_3$ アルキルであり、 R^4 は、 $C_1 \sim C_5$ アルキルであり、 R^5 は、Hであり、 R^6 は、 $C_1 \sim C_3$ アルキルであり、 R^7 は、 $C_1 \sim C_5$ アルキルであり、 R^8 は、 $C_1 \sim C_3$ アルコキシであり、 R^9 は、水素もしくは $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、 R^{10} は、フェニルであり、Gは、OもしくはNHであり、 R^{11} は、本明細書において定義されるとおりであり、好ましくは水素であるもの、またはその薬学的に許容される塩形態を含む。

40

【0308】

式(X-A)または(X-B)のアウリスタチンは、 R^3 、 R^4 、および R^7 は、独立して、イソプロピルまたはsec-ブチルであり、 R^5 は、-Hであるものを含む。例示的な実施形態では、 R^3 および R^4 はそれぞれ、イソプロピルであり、 R^5 は、Hであり、 R^7 は、sec-ブチルである。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。

【0309】

式(X-A)または(X-B)のアウリスタチンは、 R^2 および R^6 はそれぞれ、メチルであり、 R^9 は、Hであるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。

50

【0310】

式(X-A)または(X-B)のアウリスタチンは、各 R^8 は $-OCH_3$ であるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。

【0311】

式(X-A)または(X-B)のアウリスタチンは、 R^3 および R^4 は、それぞれ、イソプロピルであり、 R^2 および R^6 は、それぞれ、メチルであり、 R^5 は、Hであり、 R^7 は、sec-ブチルであり、各 R^8 は $-OCH_3$ であり、 R^9 は、Hであるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。

【0312】

式(X-B)のアウリスタチンは、Gは、 $-O-$ または $-NH-$ であるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。 10

【0313】

式(X-B)のアウリスタチンは、 R^{10} は、アリールであるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。

【0314】

式(X-B)のアウリスタチンは、 R^{10} は、 $-フェニル$ であるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。

【0315】

式(X-B)のアウリスタチンは、Gは、 $-O-$ であり、 R^{11} は、H、メチル、またはt-ブチルであるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。 20

【0316】

式(X-B)のアウリスタチンは、Gが $-NH$ である場合、 R^{11} は、 $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$ であり、 R^{15} は、 $-(CH_2)_t-N(R^{16})_2$ であり、 R^{16} は、 $-C_1 \sim C_8$ アルキルまたは $-(CH_2)_t-COOH$ であるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。

【0317】

式(X-B)のアウリスタチンは、Gが $-NH$ である場合、 R^{11} は、 $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$ であり、 R^{15} は、Hまたは $-(CH_2)_t-SO_3H$ であるものを含む。残りの置換基は、本明細書において定義されるとおりである。 30

【0318】

式(II)の免疫結合体の好ましい実施形態では、Zが式(X-A)のアウリスタチン分子である場合、wは1~12、好ましくは2~12の範囲の整数であり、yは、1または2であり、aは、好ましくは1である。

【0319】

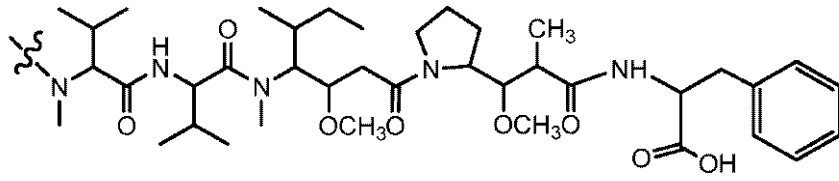
式(II)の免疫結合体のいくつかの実施形態では、Zが式(X-B)のアウリスタチン分子である場合、aは、1であり、wおよびyは、0である。

【0320】

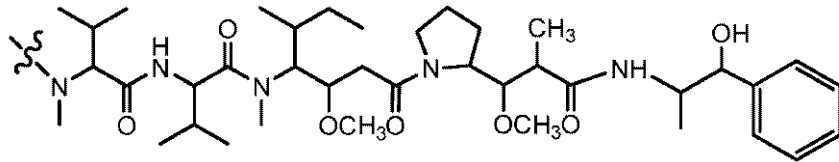
例示の治療剤(-Z)は、以下の構造を有するものを含む。

【0321】

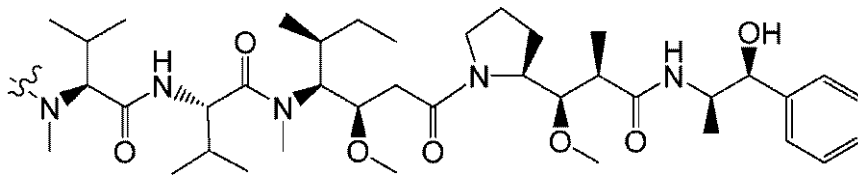
【化 4 4】



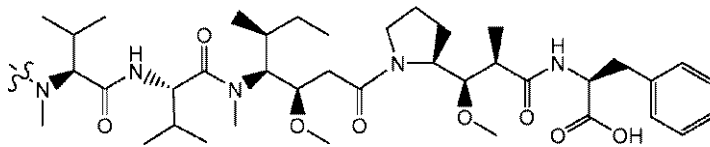
10



20

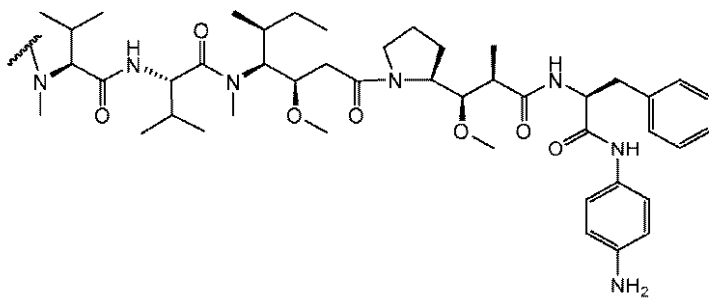
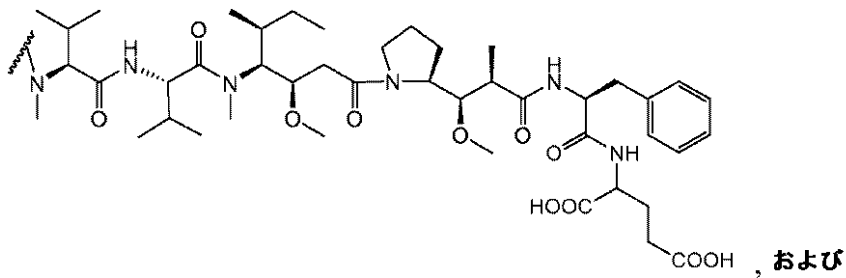
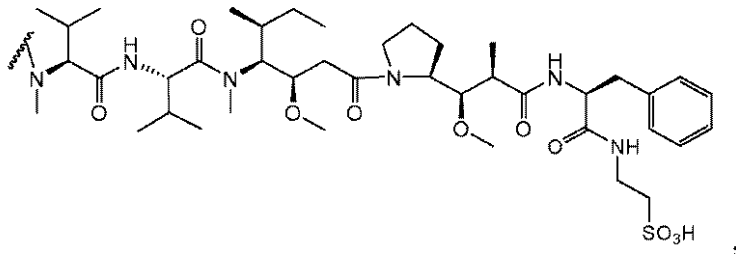
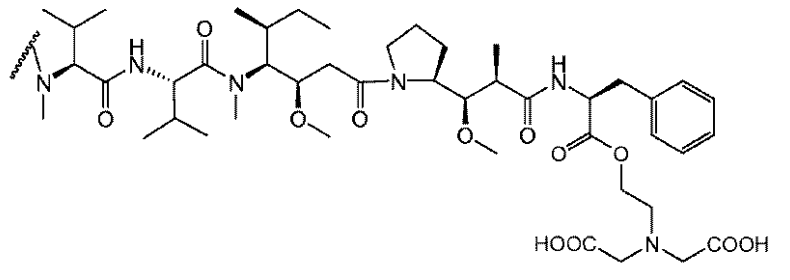


30



【 0 3 2 2 】

【化 4 6】



一態様では、限定されるものではないが、トリエチレングリコールエステル（TEG）などの親水基は、 R^{11} で、式（X-B）のアウリスタチン分子に結合することができる。理論によって拘束されることなく、親水基は、治療剤の内部移行および非凝集を助ける。

40

【0324】

いくつかの実施形態では、治療剤は、TZT-1027ではない。いくつかの実施形態では、治療剤は、アウリスタチンEでも、ドラスタチン10でも、アウリスタチンPEでもない。

【0325】

いくつかの実施形態では、アウリスタチン分子は、マレイミド成分、たとえばマレイミドカプロイル成分を含むリンカーを介して抗体分子上のシステイン成分に連結される。

【0326】

50

ntia阻害剤、クルシン、クロチン、マイトジリン、レストリクトシン、フェノマイシン、およびエノマイシンなどの毒素およびその構成要素；腫瘍壊死因子、インターフェロン、神経増殖因子、血小板由来増殖因子、および組織プラスミノゲン活性化因子などの腫瘍での免疫系に従事するかまたは腫瘍でのエフェクター機能を誘発するタンパク質；ならびにたとえばサイトカインおよびリンホカイン（たとえばインターロイキン1（「IL-1」）、インターロイキン2（「IL-2」）、インターロイキン6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージ（macrophage）コロニー刺激因子（「GM-CSF」）、および顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」））ならびに他の増殖因子、成長因子などの生物学的応答調節剤を含む。

【0335】

本発明の抗体はまた、ウイルス粒子上に存在するウイルス表面タンパク質と結合体化させるかまたは融合することができる。たとえば、本発明の単鎖抗GCC抗体は、ウイルス表面タンパク質に融合することができる（たとえば融合タンパク質を形成するために）。あるいは、本発明の全抗GCC抗体またはその断片は、ウイルス表面タンパク質と化学的に結合体化させることができる（たとえば化学的なリンカーを介して）。好ましくは、ウイルスは、ウイルスが抗GCC抗体と共に内部移行され、それによって、GCC発現細胞に感染するように、エンドサイトーシス膜と融合するもの、たとえばインフルエンザウイルスである。ウイルスは、細胞毒素として遺伝子操作され得る。たとえば、ウイルスは、細胞に対して毒性の遺伝子、たとえば細胞死を促進する遺伝子を発現させるまたはその発現を誘発することができる。好ましくは、そのようなウイルスは、ウイルス複製ができない。

【0336】

本明細書に記載の抗GCC抗体分子はまた、プロドラッグまたはプロドラッグ活性化因子と結合体化させることができる。腫瘍細胞を死滅させるまたは抑制するための方法において、本発明の第1の抗GCC抗体分子は、プロドラッグ活性化因子と極めて接近している場合にのみ活性化されるプロドラッグと結合体化させる。プロドラッグ活性化因子は、第2の抗体分子、好ましくはGCC分子上の非競合部位に結合するものと結合体化させる。2つの抗体が競合または非競合結合部位に結合するかどうかは、従来の競合結合アッセイによって決定されてもよい。本発明の実施における使用に適した薬剤 プロドラッグ対は、Blakelyら、「ZD2767, an Improved System for Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy That Results in Tumor Regressions in Colorectal Tumor Xenografts」（1996年）Cancer Research, 56巻：3287～3292頁に記載されている。

【0337】

治療上活性な放射性同位体もまた、抗GCC抗体、その抗原結合断片、または誘導体に結合することができる。放射性同位体は、診断上または治療上の適用において使用することができる。抗GCC抗体に結合することができる放射性同位体は、 ^{67}Ga 、 ^{111}In 、もしくは ^{125}I 放射体または ^{125}I および ^{131}I 放射体を含むが、これらに限定されない。たとえばS.E. Order、「Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy」Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy、R.W. Baldwinら（編）、303～316頁（Academic Press 1985年を参照されたい。そのような放射性同位体は、銅（ ^{64}Cu ）、ヨウ素（ ^{131}I もしくは ^{125}I ）、イットリウム（ ^{90}Y ）、ルテチウム（ ^{177}Lu ）、アクチニウム（ ^{225}Ac ）、プラセオジウム、アスタチン（ ^{211}At ）、レニウム（ ^{186}Re ）、ビスマス（ ^{212}Bi もしくは ^{213}Bi ）、インジウム（ ^{111}In ）、テクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、リン（ ^{32}P ）、ロジウム（ ^{188}Rh ）、硫黄（ ^{35}S ）、炭素（ ^{14}C ）、トリチウム（ ^3H ）、クロム（ ^{51}Cr ）

10

20

30

40

50

、塩素 (^{36}Cl)、コバルト (^{57}Co もしくは ^{58}Co)、鉄 (^{59}Fe)、セレン (^{75}Se)、またはガリウム (^{67}Ga)を含むが、これらに限定されない。治療剤として有用な放射性同位体は、イットリウム (^{90}Y)、ルテチウム (^{177}Lu)、アクチニウム (^{225}Ac)、プラセオジウム、アスタチン (^{211}At)、レニウム (^{186}Re)、ビスマス (^{212}Bi または ^{213}Bi)、およびロジウム (^{188}Rh)を含む。たとえば診断において使用するのに、標識として有用な放射性同位体は、ヨウ素 (^{131}I もしくは ^{125}I)、インジウム (^{111}In)、テクネチウム ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、リン (^{32}P)、炭素 (^{14}C)、およびトリチウム (^3H)または上記に列挙される1つ以上の治療用アイソトープを含む。

【0338】

^{131}I 、 ^{90}Y 、および ^{177}Lu で標識される抗体を使用する放射免疫療法 (RIT) は、懸命な臨床試験下にある。これらの3つの核種の物理的特性において有意差があり、その結果として、放射性核種の選択は、腫瘍に最大の放射線量を送達するのに重要であり得る。 ^{90}Y のより高いベータエネルギー粒子は、大きな腫瘍に好適であるかもしれないが、それは、小さな腫瘍、特に骨転移に必要なではない場合がある。 ^{131}I の比較的低いエネルギーのベータ粒子は、理想的であるが、放射性ヨウ素標識分子の *in vivo* 脱ハロゲン化は、抗体を内部移行するのに主要な不利益となる。対照的に、 ^{177}Lu は、わずか0.2~0.3mmの範囲での低エネルギーのベータ粒子を有し、 ^{90}Y と比較して、骨髄に、はるかに低い放射線量を送達する。さらに、より長い物理的半減期 (^{90}Y と比較して) により、腫瘍滞留時間はより長い。その結果として、より高い活性 (より高いmCi量) の ^{177}Lu 標識作用物質を、比較的より少ない放射線量で骨髄に投与することができる。いくつかの臨床研究が、様々な癌の処置において ^{177}Lu 標識抗体の使用を調査している (Mulligan *Tr Clin Cancer Res*, 1巻: 1447~1454頁 (1995年); Meredith *RF J Nucl Med* 37巻: 1491~1496頁 (1996年); Alvarez *RD Gynecologic Oncology* 65巻: 94~101頁 (1997年))。

【0339】

有用な検出可能な作用物質 (この作用物質を用いて、本発明の抗体または抗体部分が誘導されてもよい (または標識されてもよい)) は、蛍光化合物、様々な酵素、補欠分子族、発光物質、生物発光物質、蛍光放射金属原子、たとえばユーロピウム (Eu)、および他のランタノイド (anthanide) ならびに放射性物質 (上に記載される) を含む。例示的な蛍光検出可能な作用物質は、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリトリン、およびその他同種のものを含む。抗体はまた、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコースオキシダーゼ、およびその他同種のものなどの検出可能な酵素を用いて誘導されてもよい。抗体が検出可能な酵素を用いて誘導される場合、それは、検出可能な生成物を産生するために酵素が使用するさらなる試薬の追加によって検出される。たとえば、検出可能な作用物質西洋ワサビペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加は、有色反応生成物をもたらす、この有色反応生成物は、検出可能である。抗体はまた、補欠分子族 (たとえばストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチン) を用いて誘導されてもよい。たとえば、抗体は、ビオチンを用いて誘導され、アビジン結合またはストレプトアビジン結合の間接的な測定を通して検出されてもよい。適した蛍光物質の例は、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンを含み、発光物質の例は、ルミノールを含み、生物発光物質の例は、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンを含む。

【0340】

薬学的組成物

別の態様では、本発明は、組成物、例えば、薬学的に許容される組成物を特徴とし、こ

10

20

30

40

50

の組成物は薬学的に許容される担体と一緒に製剤化される、本明細書に記載の抗GCC抗体分子またはその免疫結合体を含む。実施形態において、抗GCC抗体分子は、表1および表2に要約されている例示的な特徴を持つ抗体分子である。

【0341】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、任意のかつ全ての生理的に適合性の溶媒、分散媒、等張化剤(isotonic agent)および吸収遅延剤などを包含する。担体は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、非経口投与、直腸投与、脊髄投与または上皮投与(例えば、注射または注入による)に適している。薬学的組成物は、1種以上の追加的な賦形剤、例えば、塩、緩衝剤、張性調節剤、分散保護剤(Lyoprotectant)、非イオン性界面活性剤、表面活性剤、および保存料を含んでよい。

10

【0342】

組成物は、種々の形態であってよい。これらとしては、例えば、液体状溶液(例えば、注射用溶液および注入用溶液)、分散物または懸濁物、リポソームおよび坐剤などの液体剤形、半固体剤形および固体剤形が挙げられる。好ましい形態は、意図される投与形式および治療への適用次第である。いくつかの典型的な組成物は、非経口投与(例えば、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与)することが意図された注射用溶液または注入用溶液の形態である。一部の実施形態では、抗体は、静脈内注入または静脈内注射によって投与される。他の実施形態では、抗体は、筋肉内注射または皮下注射によって投与される。

20

【0343】

句「非経口投与」および「非経口的に投与する」は、本明細書で使用される場合、経腸および局所投与以外の投与形式、通常、注射による投与形式を意味し、それらとしては、これらに限定することなく、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内の注射および注入が挙げられる。

【0344】

一部の実施形態では、薬学的組成物は、製造および貯蔵の条件下で滅菌状態であり、かつ安定である。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散物、リポソーム、ミクロスフェア、または高い抗体濃度に適した他の規則構造として製剤化することができる。滅菌注射用溶液は、必要量の活性化化合物(すなわち、抗体または抗体部分)を、上に列挙した成分の1つ、または成分の組み合わせと共に適切な溶媒に組み込み、必要に応じて、その後、例えば濾過によって滅菌することによって調製することができる。一般に、分散物は、活性化化合物を、基本的な分散媒および上に列挙した中からの必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製する。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合では、提供される調製方法は、予め滅菌濾過した活性成分と任意の追加的な所望の成分の溶液から、活性成分の粉末と任意の追加的な所望の成分をもたらず真空乾燥および凍結乾燥である。溶液の妥当な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散物の場合では必要な粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持することができる。注射用組成物の持続的吸収は、組成物に、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを含めることによってもたらすことができる。

30

40

【0345】

本発明の抗体および抗原結合性断片は、当技術分野で公知の種々の方法によって投与することができるが、多くの治療に適用するための投与の経路/形式は、静脈内への注射または注入である。当業者には理解されるように、投与の経路および/または形式は、所望の結果に応じて変わる。ある実施形態では、活性化化合物は、化合物を、急速に放出することから保護する担体、例えば、移植片、経皮パッチ剤、およびマイクロカプセル化した送達系を含めた制御放出製剤などと一緒に調製することができる。エチレンビニルアセテート、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳

50

酸などの生分解性かつ生体適合性のポリマーを使用することができる。そのような製剤を調製するための多くの方法は、特許が与えられているか、または当業者に一般に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems、J. R. Robinson 編、Marcel Dekker、Inc.、New York、1978年を参照されたい。

【0346】

ある実施形態では、本明細書に記載の抗GCC抗体分子または免疫結合体は、例えば、不活性な希釈剤または吸収できる食用担体と一緒に経口投与することができる。化合物（および、望ましい場合には他の成分）は、ハードシェルゼラチンカプセルまたはソフトシェルゼラチンカプセルに封入し、圧縮して錠剤、パッカ錠、トローチ剤、カプセル、エリキシル剤、懸濁物、シロップ剤、ウェーハなどにもすることもできる。本発明の抗体または抗体断片を非経口投与以外で投与するために、化合物が不活性化することを予防する材料で化合物をコーティングする、または化合物をそれと共投与することが必要であり得る。

10

【0347】

治療用組成物は、当技術分野で公知の医学的なデバイスを用いて投与することができる。例えば、薬学的調製物を、1以上の用量を含有するデバイス、例えば気密容器または液密容器内に入れることができる。送達デバイスの例としては、限定することなく、バイアル、カニューレ、針、点滴袋、およびラインが挙げられる。本発明は、本明細書に記載の抗体分子または免疫結合体を、そのようなデバイスに配置する方法も提供する。

20

【0348】

一部の実施形態では、本発明は、リポソーム組成物中に配合される本明細書に記載の抗GCC抗体分子または免疫結合体を提供する。一部の実施形態では、リポソームを抗体分子でコーティングする。いくつかのそのような実施形態では、リポソームを治療剤で満たす。リポソームによる送達により、抗体に連結されていない作用物質、例えば治療剤の送達を可能にすることができる。この手法は、隔離されるべき、または非標的細胞と接触することを最小限にするべきである抗体分子または作用物質、例えば治療剤への架橋を受ける可能性がない作用物質、例えば治療剤を送達するために使用することができる。特定の実施形態では、リポソームを細胞増殖抑制剤または細胞傷害性薬で満たす。いくつかの特定の実施形態では、治療剤は、メイタンシノイド、アウリスタチン、ドラスタチン、デュオカルマイシン、クリプトフィシン、タキサン、DNAアルキル化剤であるカリチアマイシン、および前述のものの誘導体からなる群から選択される。他の実施形態では、リポソームを、GCC発現細胞において、GCCの発現または別の遺伝子、例えばがん遺伝子の発現を減らすことができるRNA干渉分子、例えば、アンチセンス分子、siRNA分子、hsRNA分子またはmiRNA分子を含む核酸配列で満たす。いくつかの他の実施形態では、リポソームを、抗GCC抗体分子および治療剤または標識を含む免疫結合体でコーティングするか、またはそれで満たす。

30

【0349】

投薬レジメンを調整して、最適な所望の応答（例えば、治療反応）をもたらす。例えば、単回のボラスを投与すること、ある期間にわたっていくつかの分割用量を投与すること、または、治療状況の緊急性によって指示される通りに用量を比例的に低下または増加させることができる。非経口用組成物は、投与を容易にし、かつ投与量を均一にするために、単位剤形に製剤化することが特に有利である。用語「単位剤形」は、本明細書で 사용되는場合、処置される被験体に対する単位投与量として適した物理的に別個の単位を指し；各単位は、必要な薬学的担体と関連して所望の治療効果をもたらすように算出された所定の量の活性化化合物を含有する。本発明の単位剤形の仕様は、(a) 活性化化合物の独特の特性および実現されるべき特定の治療効果、および(b) 個体における感受性を処置するためにそのような活性化化合物を配合する技術分野に固有の限界によって規定され、それに直接左右される。

40

【0350】

50

例示的な、治療的または予防的に有効な量の本発明の抗体または抗原結合性断片についての非限定的範囲は、0.1 ~ 20 mg/kg、または1 ~ 10 mg/kgである。投与量の値は、緩和されるべき状態の種類および重症度に伴って変わってよいことに留意すべきである。任意の特定の被験体に対して、特定の投薬レジメンを個々の必要性、および組成物の投与を管理または監督する人の専門的な判断に従って、ある期間にわたって調整すべきであること、および本明細書に記載の投与量の範囲は単なる例示であり、特許請求された組成物の範囲または実施を制限するものではないことがさらに理解されるべきである。

【0351】

本発明の薬学的組成物は、「治療的に有効な」量の本発明の抗体または抗原結合性断片を含んでよい。「治療的に有効な」量は、所望の治療結果を実現するために、必要な投薬量かつ期間に、有効な量を指す。改変された抗体または抗体断片の治療有効量は、個体の病態、年齢、性別、および体重、および抗体または抗体部分の、個体における所望の応答を引き出す能力などの因子に応じて変わり得る。治療有効量は、改変された抗体または抗体断片の任意の毒性の影響または有害な影響より治療的に有益な影響がまさる量でもある。「治療的に有効な投与量」により、処置された被験体における測定可能なパラメータ（例えば、腫瘍の成長速度）が、無処置の被験体と比較して少なくとも約20%、少なくとも約40%、少なくとも約60%、および一部の実施形態では少なくとも約80%阻害されることが好ましい。化合物の、測定可能なパラメータ、例えば、がんを阻害する能力は、ヒト腫瘍における有効性について予測する動物モデル系において評価することができる。あるいは、組成物のこの性質は、化合物の、*in vitro*における阻害などの阻害する能力を、当業者に公知のアッセイによって検査することによって評価することができる。

10

20

【0352】

本明細書に記載の抗GCC抗体分子または免疫結合体を含むキットも本発明の範囲内である。抗GCC抗体分子または免疫結合体を含むリボソーム組成物を含むキットもさらに包含される。キットは、使用説明書；他の試薬、例えば、標識、治療剤、またはキレート化、またはそうでなければカップリングに有用な作用物質、標識または治療剤に対する抗体、または放射線防護組成物；投与用抗体を調製するためのデバイスまたは他の材料；薬学的に許容される担体；および被験体に投与するためのデバイスまたは他の材料を含めた1つ以上の他の要素を含んでよい。使用説明書は、抗GCC抗体分子または免疫結合体を*in vitro*で、例えば、試料中、例えば、がんを有する患者からの生検材料もしくは細胞におけるGCCを検出するため、または、*in vivo*でGCCを検出するための診断に適用するための説明書を含んでよい。説明書は、例えば、がん（例えば胃腸起源のがん、例えば、結腸がん、胃がん、食道がんなど）の患者における推奨される投与量および/または投与形式を含めた、治療に適用するための手引きを含んでよい。他の説明書は、抗体をキレート化剤、標識または治療剤にカップリングすることについて、または、結合体化させた抗体を、例えば、未反応の結合体形成の構成成分から精製するための説明を含んでよい。上記の通り、キットは、標識、例えば本明細書に記載の任意の標識を含んでよい。上記の通り、キットは、治療剤、例えば本明細書に記載の治療剤を含んでよい。いくつかの適用では、抗体は、他の構成成分、例えば、キレート化剤または標識または治療剤、例えば、放射性同位元素、例えば、イットリウムまたはルテチウムと反応する。そのような場合では、キットは、反応を行うための反応容器、または最終生成物を出発材料または反応中間体から分離するために使用する分離デバイス、例えば、クロマトグラフィーカラムの1つ以上を含んでよい。

30

40

【0353】

キットは、必要に応じて1つ以上の別々の薬学的調製物中に配合される、診断用薬または治療剤、例えば、本明細書に記載の診断用薬または治療剤などの少なくとも1種の追加的な試薬、および/または、1種以上の追加的な抗GCC抗体分子または免疫結合体をさらに含んでよい。

50

【0354】

キットは、放射線防護剤をさらに含有してよい。同位元素、例えば、 ^{90}Y （ ^{90}Y ）の、放射線によって分解される性質は公知である。この放射線分解を克服するために、放射線防護剤を、そのような放射線防護剤が良性である、つまりそれらが、例えば、 ^{90}Y などの同位元素を抗体に標識する反応を阻害しない、またはそうでなければ、その反応に悪影響を及ぼさない限りは、例えば、反応緩衝剤に含めることができる。本発明の製剤緩衝液は、イットリウムまたは他の強力な放射性核種が原因の放射線分解を最小限にする、ヒト血清アルブミン（HSA）またはアスコルビン酸などの放射線防護剤を含んでよい。他の放射線防護剤、すなわち、ラジカルスカベンジャー（フェノール、亜硫酸塩、グルタチオン、システイン、ゲンチジン酸、ニコチン酸、パルミチン酸アスコルビル、HOP（:O）H₂Iグリセロール、ホルムアルデヒドスルホキシル酸ナトリウム、Na₂S₂O₄、Na₂S₂O₃、およびSO₂など）が当技術分野で公知であり、同様に、本発明の製剤緩衝剤に使用することができる。

10

【0355】

提供されるキットは、キレート化剤と結合体化させたタンパク質またはペプチドを、患者に投与するための治療用放射性同位元素で放射線標識するのに有用なキットである。キットは、(i)キレート化剤と結合体化させた抗体を含むバイアル、(ii)放射線標識した抗体を安定化し、患者に投与するための製剤緩衝剤を含むバイアル、および(iii)放射線標識の手順を実施するための説明書を含む。キットは、キレート化剤と結合体化させた抗体を放射性同位元素またはその塩に、十分な時間、穏やかな条件下で、例えば、説明書において推奨されている通りに曝露することを提供する。十分な純度であり、特異的活性および結合特異性を有する放射線標識した抗体を作製する。放射線標識した抗体は、例えば、製剤緩衝剤で適切な濃度に希釈することができ、さらなる精製を伴って、または伴わずに患者に直接投与することができる。キレート化剤と結合体化させた抗体は、凍結乾燥した形態で供給することができる。

20

【0356】

使用

本明細書に記載の抗GCC抗体分子は、*in vitro*および*in vivo*における診断上の有用性、予後判定上の有用性、画像診断上の有用性、治療上の有用性および予防における有用性を有する。例えば、これらの抗体分子は、種々の障害を処置する、予防する、かつ/または診断するために、培養中の細胞に、例えば、*in vitro*もしくは*ex vivo*で投与することができるか、または被験体に、例えば、*in vivo*で投与することができる。

30

【0357】

使用することができる本明細書に記載の抗体分子、免疫結合体、および融合タンパク質により、GCCタンパク質の活性または機能、例えば、リガンド結合性（例えば、STまたはグアニリンの結合性）、GCCに媒介されるシグナル伝達、腸液の維持、電解質の恒常性、細胞内のカルシウムの放出（カルシウム流）、細胞分化、細胞増殖、または細胞活性化などを調節することができる。

40

【0358】

一態様では、本発明は、GCC発現細胞を死滅させる、その成長を阻害もしくは調節する、またはその代謝に干渉する方法を特徴とする。一実施形態では、本発明は、GCCに媒介される細胞シグナル伝達を阻害する方法または細胞を死滅させる方法を提供する。方法は、がん性細胞（例えば、胃腸系のがん、例えば、結腸、胃、または食道、または膵臓細胞のがん由来の細胞）、または転移性の病変などのGCCを発現する任意の細胞または組織と一緒に使用することができる。GCC発現細胞の非限定的な例としては、T84ヒト結腸腺癌細胞、新鮮な結腸腫瘍細胞または凍結された結腸腫瘍細胞、およびGCCまたはその部分をコードする組換え型の核酸を含む細胞が挙げられる。

【0359】

本発明の方法は、有効量、すなわち、GCCに媒介される細胞シグナル伝達を阻害する

50

のに十分な量または細胞を死滅させるのに十分な量の本明細書に記載の抗G C C抗体分子またはその免疫結合体と細胞を接触させるステップを含む。この方法は、培養中の細胞に対して、例えば、*in vitro*、*in vivo*、*ex vivo*、または*in situ*で使用することができる。例えば、G C Cを発現する細胞（例えば、腫瘍または転移性の病変の生検によって採取された細胞；樹立がん細胞系由来の細胞；または組換え細胞）を*in vitro*において培地中で培養することができ、培地に抗G C C抗体分子または免疫結合体を加えることによって接触させるステップに影響を及ぼすことができる。細胞を死滅させる方法において、方法は、裸の抗G C C抗体分子、または、抗G C C抗体分子および細胞傷害性薬を含む免疫結合体を使用するステップを含む。この方法により、特にG C C発現腫瘍細胞（例えば、結腸腫瘍細胞）を含めた、G C C発現細胞を死滅させる。

10

【0360】

表7を参照することは、さまざまな方法に使用するために（1種以上の）抗体を選択するための手引きとして役に立ち得る。例えば、表7は、どの抗体がG C Cに結合した後に内部移行することが確認されたかを示す。そのような抗体は、細胞傷害性成分または細胞を画像処理するための成分と連結させたときに有用だと思われる。内部移行しない抗体は、抗体依存性細胞により媒介される細胞傷害性反応を引き出すように設計された裸の抗体を使用する診断的な目的または治療方法、または、おそらくリポソーム送達法に使用することができる。

20

【0361】

本発明の抗G C C抗体分子は、抗原発現細胞において、G C Cの細胞外ドメインまたはその部分に結合する。結果として、がん性細胞を死滅させるため、抑制するため、または検出するために本発明の方法を実施した場合、抗体または抗原結合性断片は、固定された細胞、または細胞内の抗原性ドメインがその他の方法で細胞外の環境に曝露される細胞だけではなく、そのような細胞の全てに結合する。したがって、抗体または抗原結合性断片の結合は、これらの細胞が固定されているか固定されていないか、生存可能であるか壊死性であるかに関係なく、G C C発現細胞が存在する領域に集中する。それに加えて、またはその代わりに、抗G C C抗体分子は、抗原発現細胞に結合すると、G C Cに結合し、内部移行する。

30

【0362】

方法は、被験体内に存在する細胞に対して、*in vivo*プロトコールの一部として実施することもできる。一実施形態では、被験体はヒト被験体である。あるいは、被験体は、本明細書に開示されている抗G C C抗体分子と交差反応するG C C抗原を発現している哺乳動物であってよい。抗G C C抗体分子またはその免疫結合体は、ヒト被験体に治療目的で投与することができる。抗G C C抗体分子または免疫結合体は、抗体と交差反応するG C C様抗原を発現している非ヒト哺乳動物（例えば、霊長類、ブタまたはマウス）にも、獣医科用に、またはヒト疾患の動物モデルとして投与することができる。動物モデルは、本発明の抗体の治療効果を評価する（例えば、投与量および投与の時間経過を試験する）のに有用であり得る。*in vivo*の実施形態では、接触させるステップは、被験体において実施し、抗G C C抗体分子またはその免疫結合体を、細胞で発現されたG C Cの細胞外ドメインに抗体分子が結合すること、および細胞を処理することの両方を可能にするために有効な条件下で、被験体に投与することを含む。

40

【0363】

一実施形態では、本発明は、抗G C C抗体分子、または抗G C C抗体分子および細胞傷害性薬を含む免疫結合体を、そのような処置を必要とする患者に投与することによってがんを治療する方法を提供する。この方法は、G C C抗原を発現する少なくともいくつかの細胞を含む任意のがん性障害を処置するために使用することができる。本明細書で使用される場合、用語「がん」は、その組織病理学的な種類または侵襲性の段階に関係なく、全種類のがん性成長または発がん性プロセス、転移性組織または悪性に形質転換した細胞、組織または器官を含むことが意図される。用語「がん」および「腫瘍」は、互換的に使用

50

することができる（例えば、治療方法と関連して使用する場合、「がんを処置すること」および「腫瘍を処置すること」は、同じ意味を有する）。

【0364】

実施形態において、治療は、被験体の腫瘍の成長を低下させる、もしくは阻害する、転移性の病変の数もしくはサイズを低下させる、腫瘍の負荷を低下させる、原発腫瘍の負荷を低下させる、侵襲性を低下させる、生存時間を延長する、または生活の質を維持もしくは改善するのに十分である。

【0365】

がん性障害の例としては、これらに限定されないが、固形腫瘍、軟組織腫瘍、および転移性の病変が挙げられる。固形腫瘍の例としては、結腸および膀胱に影響を及ぼす腫瘍などの、種々の器官系の悪性腫瘍、例えば、肉腫、腺癌、および癌腫が挙げられる。腺癌としては、肺の非小細胞癌などの悪性腫瘍が挙げられる。上述のがんの転移性の病変も、本発明の方法および組成物を使用して処置または予防することができる。一部の実施形態では、処置されるがんは、胃腸系のがん（例えば、結腸直腸がん、食道がん、または胃がん）である。一部の実施形態では、膀胱がんである。

10

【0366】

一実施形態では、がんは、結腸直腸がん、例えば、結腸直腸腺がん、結腸直腸平滑筋肉腫、結腸直腸リンパ腫、結腸直腸黒色腫、または結腸直腸神経内分泌腫瘍である。特定の実施形態では、がんは、転移性結腸がんである。別の実施形態では、がんは胃がん（例えば、胃腺がん、胃リンパ腫、または胃肉腫）、またはそれらの転移である。別の実施形態では、がんは食道がん（例えば、食道扁平上皮細胞癌または食道腺癌）である。

20

【0367】

方法は、任意の病期または細分類の関連性のある障害を処置することにおいて有用であり得る。例えば、方法は、早期または後期の結腸がん、または、第0期、第I期、第IIA期、第IIB期、第IIIA期、第IIIB期、第IIIC期、および第IV期のいずれかの結腸がんを処置するために使用することができる。

【0368】

一部の実施形態では、がん（例えば、結腸直腸がん、食道がんまたは胃がん）を処置するための方法は、そのような処置を必要とする患者に、本明細書に記載の裸の抗GCC抗体分子を投与するステップを含む。他の実施形態では、方法は、本明細書に記載の抗GCC抗体分子および細胞傷害性薬を含む免疫結合体を投与するステップを含む。いくつかのそのような実施形態では、免疫結合体は、本明細書に記載の式(I)を特徴とする。ある実施形態では、免疫結合体は、本明細書に記載の式(I-1)、(I-2)、(I-3)、(I-4)、(I-5)、(I-6)、または(I-7)を特徴とする。特定の実施形態では、免疫結合体は、式(I)、(I-1)、(I-2)、(I-3)、(I-4)、(I-5)、(I-6)、または(I-7)を特徴とし、ここで可変部Abは、表1~6に要約されている特徴を持つ抗体分子である。ある実施形態では、可変部Abは、5F9抗体分子またはAbx-229抗体分子である。いくつかの特定の実施形態では、免疫結合体は、式(I-5)または(I-7)を特徴とし、ここで可変部Abは5F9抗体分子である。

30

40

【0369】

抗体分子および免疫結合体を投与する方法は、上記されている。使用する分子の適切な投与量は、被験体の年齢および体重ならびに使用する特定の化合物に依存する。

【0370】

一部の実施形態では、抗GCC抗体分子または免疫結合体は、処置サイクルで投与する。「処置サイクル」は、上記の通り抗GCC抗体分子または免疫結合体を投与する処置期間と、その後の抗GCC抗体分子または免疫結合体を投与しない休止期間とからなる。処置サイクルは、所望の効果を実現するために必要に応じて繰り返すことができる。

【0371】

本明細書に記載の抗GCC抗体（例えば、裸の抗GCC抗体分子または抗GCC抗体分

50

子および治療剤を含む免疫結合体)は、他の療法と組み合わせて使用することができる。例えば、併用療法は、1種以上の追加的な治療剤、例えば、1種以上の抗がん剤、例えば、細胞傷害性薬または細胞増殖抑制剤、ホルモン治療、ワクチン、および/または他の免疫療法と共に製剤化し、かつ/または共投与する、本発明の組成物を含んでよい。他の実施形態では、抗GCC抗体は、外科手術、放射線照射、冷凍外科療法、および/または温熱療法を含めた他の治療的な処置モダリティと組み合わせて投与する。そのような併用療法は、投与される治療剤を低投与量で有利に利用し、したがって、種々の単独療法に伴う、可能性のある毒性または合併症を回避することができる。

【0372】

「組み合わせて」投与することは、本明細書で使用される場合、障害がある被験体の苦痛の過程の間、2つの(またはそれ以上の)異なる処置を被験体に送達すること、例えば、2つ以上の処置を、被験体が障害と診断された後、および障害が治癒する、または排除される前に送達することを意味する。一部の実施形態では、1種の処置の送達が、第2の送達が始まる際にまだ起こっている、したがって、重複している。このことは、時には、本明細書で「同時に起こる」または「同時発生的な送達」と言及される。他の実施形態では、1種の処置の送達は、他の処置の送達が始まる前に終わる。いずれかの事例の一部の実施形態では、処置は、組み合わせて投与したゆえに、より有効である。例えば、第2の処置は、より有効である、例えば、第1の処置なしに第2の処置を投与した場合に見られると思われるよりも少ない第2の処置で、相当する効果が見られるか、または第2の治療により症状が大きく低下する、または同様の状況が第1の治療で見られる。一部の実施形態では、送達は、症状、または障害に関連する他のパラメータの低下が、他の処置なしに1種の処置を送達すると観察されと思われる低下を超えるものである。2種の処置の効果は、部分的に相加的、完全に相加的、または相加的を超えるものであってよい。送達は、送達された第1の処置の効果が、第2の処置が送達されるときに検出可能なものであってよい。

【0373】

一部の実施形態では、抗GCC抗体分子またはその免疫結合体は、化学療法剤と組み合わせて使用する。DNA損傷性化学療法剤の非限定的な例としては、トポイソメラーゼI阻害剤(例えば、イリノテカン、トポテカン、カンプトテシンおよびそれらの類似体または代謝産物、およびドキシソルピシン);トポイソメラーゼII阻害剤(例えば、エトポシド、テニポシド、およびダウノルビシン);アルキル化剤(例えば、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、チオテパ、イホスファミド、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、デカルバジン、メトトレキサート、マイトマイシンC、およびシクロホスファミド);DNAインターカレーター(例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチン);プレオマイシンなどのDNAインターカレーターおよびラジカル発生剤;ならびにヌクレオシド模倣物(例えば、5-フルオロウラシル、カペシタピン(capicitabine)、ゲムシタピン、フルダラピン、シタラピン、メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン、およびヒドロキシウレア)が挙げられる。

【0374】

細胞の複製を攪乱する化学療法剤としては、パクリタキセル、ドセタキセル、および関連する類似体;ピンクリスチン、ピンプラスチン、および関連する類似体;サリドマイド、レナリドマイド、および関連する類似体(例えば、CC-5013およびCC-4047);タンパク質チロシンキナーゼ阻害剤(例えば、メシル酸イマチニブおよびゲフィチニブ);プロテアソーム阻害剤(例えば、ボルテゾミブ);I Bキナーゼの阻害剤を含めたNF- B阻害剤;がんにおいて過剰発現されているタンパク質に結合し、それによって細胞の複製を下方制御する抗体(例えば、トラスツズマブ、リツキシマブ、セツキシマブ、およびベパシズマブ);ならびに、がんにおいて上方制御、過剰発現、または活性化され、それを阻害することによって細胞の複製が下方制御されることが公知である他のタンパク質または酵素の阻害剤が挙げられる。

【0375】

本発明の抗GCC抗体分子または免疫結合体と組み合わせる（1つ以上の）治療剤または処置モダリティの選択は、処置される障害に依存する。（1つ以上の）追加的な作用物質または処置モダリティは、例えば、処置されている適応症に対する標準の認可された療法を含んでよい。例えば、抗GCC抗体分子またはその免疫結合体を、結腸がんを処置するために使用する場合、それは、例えば、外科手術；放射線療法；5-フルオロウラシル（fluorouracil）（5-FU）、カペシタビン、ロイコボリン、イリノテカン、オキサリプラチン、ベパシズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、またはそれらの組み合わせ（例えば、オキサリプラチン/カペシタビン（XELOX）、5-フルオロウラシル/ロイコボリン/オキサリプラチン（FOLFOX）、5-フルオロウラシル/ロイコボリン/イリノテカン（FOLFIRI）、FOLFOX+ベパシズマブ、またはFOLFIRI+ベパシズマブ）と組み合わせて使用することができる。

10

【0376】

別の態様では、本発明は、医薬品の製造における本明細書に記載の抗GCC抗体分子または免疫結合体の使用を特徴とする。一実施形態では、医薬品は、がん、例えば、胃腸がんを処置するためのものである。一部の実施形態では、医薬品は、表1～6に要約されている特徴を有する抗GCC抗体分子を含む。一部の実施形態では、医薬品は、5F9抗体分子またはAbx-229抗体分子を含む。

【0377】

本明細書に記載の抗GCC抗体および免疫結合体は、GCCの存在を検出するため、例えば、生物学的試料におけるGCCの存在を検出するため、または被験体におけるGCCの存在または分布を検出するために使用することができる。用語「検出すること」は、本明細書で使用される場合、定量的検出または定性的検出を包含する。GCCまたはGCCタンパク質を検出することは、本明細書で使用される場合、インタクトなGCCタンパク質を検出すること、または、抗GCC抗体分子が結合するエピトープを含むGCCタンパク質の一部を検出することを意味する。

20

【0378】

したがって、別の態様では、本発明は、GCCタンパク質を検出する、例えば、GCC発現細胞または組織、例えば、腫瘍細胞、またはGCC発現細胞を有する腫瘍を検出する方法を特徴とする。方法は、材料、例えば細胞または組織、例えばGCCを発現する腫瘍の試料を、抗GCC抗体分子、例えば本明細書に記載の抗GCC抗体分子と、抗GCC抗体分子とGCCタンパク質との間の複合体の形成が可能になる条件下で接触させるステップと；抗体分子とGCCタンパク質との間の複合体の形成を検出し、それによってGCCタンパク質の存在を検出する、例えば、GCC発現細胞または腫瘍を検出するステップとを含む。

30

【0379】

一実施形態では、抗GCC抗体分子は、検出可能な標識を含む免疫結合体である。

【0380】

ある実施形態では、組織は、他の組織、例えばB細胞および/またはB細胞関連組織などの他の組織と比較して高いレベルでGCCを発現する正常組織および/またはがん性の組織を含む。

40

【0381】

本明細書に記載の検出方法は、*in vitro*または*in vivo*のいずれにせよ、被験体を評価するために使用することができる。一実施形態では、方法は、*in vivo*で実施し、例えば、患者を画像診断、病期分類、評価または診断するために使用することができる。ある実施形態では、障害は、がんまたは腫瘍、例えば、結腸がんなどの細胞増殖性障害である。

【0382】

したがって、別の態様では、本発明は、GCCタンパク質の存在を、*in vitro*（例えば、被験体からの生物学的試料、例えば、腫瘍組織からの組織生検材料など）また

50

は *in vivo* (例えば、被験体における *in vivo* 画像診断によって) 検出するための方法を提供する。方法は、(i) 試料を、抗 G C C 抗体分子またはその免疫結合体と接触させるか、または被験体に、抗 G C C 抗体分子またはその免疫結合体を投与するステップと；(ii) 抗 G C C 抗体分子と G C C タンパク質との間の複合体の形成を検出するステップとを含む。複合体の形成により、G C C の存在またはレベルが示される。

【0383】

実施形態において、試料または被験体において検出された複合体のレベルを、参照値、例えば、G C C の複合体の形成またはレベルについての値と比較する。一実施形態では、参照値を超える G C C のレベルにより、G C C 媒介性障害が示される。

【0384】

一実施形態では、方法は、参照試料、例えば、対照試料(例えば、対照の生物学的試料、例えば血漿、組織、生検材料など)または対照の被験体を、抗 G C C 抗体分子またはその免疫結合体と接触させるステップ、および試料または被験体において検出されたレベルとそこで検出された複合体のレベルを比較するステップを含む。

【0385】

ある実施形態では、試験細胞または試験組織は、G C C の発現の増加に関連する障害を有する疑いがある個体から得る。

【0386】

一実施形態では、被験体からの試料中、または被験体における G C C のレベルを、参照レベル、例えば対照材料、例えば被験体の細胞と同じ組織起源の正常細胞または正常細胞に匹敵するレベルの G C C を有する細胞の G C C のレベルと比較する。方法は、例えば、検出された G C C のレベルに応じて、診断、予後判定、処置の効力の評価、または障害の病期分類をもたらすことを含んでよい。試料中、または被験体における G C C のレベルが対照材料と比較して高いことにより、G C C の発現の増加に関連する障害の存在が示される。試料中、または被験体における G C C のレベルが対照材料と比較して高いことにより、処置の効力の相対的な不足、予後比較的不良、または疾患が後期であることも示され得る。G C C のレベルは、将来の処置、例えば、多少攻撃的な処置の必要性、またはある処置レジメンから別の治療レジメンに切り換える必要性を評価または選択するためにも使用することができる。

【0387】

G C C のレベルは、患者を選択または評価するためにも使用することができる。例えば、実施形態において、表面に多量の G C C を発現している腫瘍細胞を有する患者は、毒素と結合体化させた抗 G C C 抗体分子を用いて処置するための良い候補だと考えられる。実施形態において、表面に少量の G C C を発現している腫瘍細胞を有する患者は、この良い候補にはならないと思われ、抗 G C C 抗体分子を追加的な治療方法と組み合わせることの候補、または裸の抗体療法の候補であり得る。別の例では、毒素と結合体化させた抗 G C C 抗体分子の投与量は、腫瘍細胞の表面で発現されている G C C 分子の数を反映するように調整することができる。腫瘍細胞の表面に多数の G C C 分子を有する患者は、少数の G C C 分子を有する患者よりも低い投与量で治療することができる。G C C を発現している腫瘍細胞の存在を *in vivo* で検出することにより、組織(この組織へ、主要な G C C を発現している腫瘍が転移した)の同定を可能にすることができる。どの組織が転移を有するかの知見により、腫瘍の療法の標的化適用をもたらすことができる。

【0388】

上記の通り、本明細書に記載の抗体分子により、正常組織を対照とした新生物組織の G C C タンパク質の存在を評価することができ、それにより、疾患の存在または重症度、疾患の進行および/または療法の効力を評価することができる。例えば、療法をモニターし、効力を評価することができる。一実施例では、炎症性疾患を有する被験体から得た第1の試料における G C C タンパク質を検出および/または測定することができ、療法を開始することができる。後で、第2の試料を、被験体から得ることができ、試料中の G C C タンパク質を検出および/または測定することができる。第2の試料において検出または測

10

20

30

40

50

定された G C C タンパク質の数量の減少により、治療効果が示され得る。

【 0 3 8 9 】

本明細書に開示されている抗体を使用して評価、例えば診断することができる例示的な細胞増殖性障害としては、これらに限定されないが、結腸がん、胃がん、食道がんを含めた増殖性障害が挙げられる。

【 0 3 9 0 】

ある実施形態では、例えば上記のものなどの方法は、抗 G C C 抗体の、細胞の表面で、またはその表面に G C C を発現する細胞から得た膜調製物において発現されている G C C への結合を検出するステップを含む。ある実施形態では、方法は、抗 G C C 抗体が G C C に結合することが許容される条件下で、細胞を抗 G C C 抗体と接触させるステップと、細胞表面で抗 G C C 抗体と G C C との間で複合体が形成されたかどうかを検出するステップとを含む。抗 G C C 抗体の、細胞の表面で発現された G C C への結合を検出するための例示的なアッセイは、「 F A C S 」アッセイである。

10

【 0 3 9 1 】

本明細書に記載の方法のための例示的な試料は、炎症性滲出液、血液、血清、腸液、便試料、または生検材料などの組織または体液を含む。一実施例では、個体から試料（例えば、組織および/または体液）を得ることができ、適切な免疫学的方法を使用して G C C タンパク質の発現を検出および/または測定することができる。G C C タンパク質の発現を検出または測定するための適切な免疫学的方法としては、酵素結合免疫吸着検定法（ E L I S A ）、放射免疫測定法、免疫組織学、フローサイトメトリーなどが挙げられる。

20

【 0 3 9 2 】

本明細書に記載の方法、例えば、 *in vivo* 検出および *in vitro* 検出、例えば、診断方法、病期分類方法、または画像診断方法において使用する抗 G C C 抗体分子は、結合した、または結合していない結合剤の検出を容易にするために、検出可能な物質を使用して直接的に、または間接的に標識することができる。適切な検出可能な物質としては、種々の生物学的に活性な酵素、リガンド、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、化学発光材料、生物発光材料、発色団材料、高電子密度材料、常磁性の（例えば、核磁気共鳴活性な）材料、および放射性材料が挙げられる。一部の実施形態では、抗 G C C 抗体分子は、放射性イオン、例えば、インジウム（ ^{111}In ）、ヨウ素（ ^{131}I または ^{125}I ）、イットリウム（ ^{90}Y ）、ルテチウム（ ^{177}Lu ）、アクチニウム（ ^{225}Ac ）、ビスマス（ ^{212}Bi または ^{213}Bi ）、硫黄（ ^{35}S ）、炭素（ ^{14}C ）、トリチウム（ ^3H ）、ロジウム（ ^{188}Rh ）、テクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、プラセオジウム、またはリン（ ^{32}P ）；または陽電子放出放射性核種、例えば、炭素 11（ ^{11}C ）、カリウム 40（ ^{40}K ）、窒素 13（ ^{13}N ）、酸素 15（ ^{15}O ）、フッ素 18（ ^{18}F ）、およびヨウ素 121（ ^{121}I ）につながっている。

30

【 0 3 9 3 】

例示的な標識としては、希土類キレートまたはフルオレセインなどのフルオロフォアおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ（米国特許第 4, 737, 456 号）、ルシフェリン、および 2, 3 - ジヒドロフタラジンジオンが挙げられる。他の例示的な標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ H R P ）、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖類オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、複素環オキシダーゼ（例えば、過酸化水素を使用して色素前駆体を酸化する酵素（例えば、 H R P 、 ラクトペルオキシダーゼ、またはミクロペルオキシダーゼなど）と共役した、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼなど）、ビオチン / アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定な遊離基などが挙げられる。

40

【 0 3 9 4 】

フルオロフォアおよび発色団で標識した抗体分子は、当技術分野で公知の標準成分から調製することができる。抗体および他のタンパク質は約 310 nm までの波長を有する光

50

を吸収するので、蛍光成分は、310 nmを上回る波長、好ましくは400 nmを上回る波長において相当な吸収を有するように選択するべきである。種々の適切な蛍光化合物および発色団は、Stryer Science、162巻：526頁(1968年)およびBrand、L.ら、Annual Review of Biochemistry、41巻：843~868頁(1972年)に記載されている。抗体は、蛍光発色団のグループを用いて、米国特許第3,940,475号、同第4,289,747号、および同第4,376,110号に開示されているものなどの従来の手順によって標識することができる。

【0395】

いくつもの上記の望ましい特性を有する蛍光剤の1つのグループはキサンテン色素であり、それらとしては、3,6-ジヒドロキシ-9-フェニルキサンチンヒドロール(henylxanthinhydrool)から誘導されるフルオレセイン、および3,6-ジアミノ-9-フェニルキサンチンヒドロールから誘導されるローダミンおよびレサミン、およびリッサミンローダミンBが挙げられる。9-o-カルボキシフェニルキサンチンヒドロールのローダミン誘導体およびフルオレセイン誘導体は、9-o-カルボキシフェニル基を有する。アミノ基およびイソチオシアネート基などの反応性カップリング基を有するフルオレセイン化合物、例えばフルオレセインイソチオシアネートおよびフルオレスカミンなどが容易に入手可能である。蛍光化合物の別のグループは、 α 位または β 位にアミノ基を有するナフチルアミンである。

10

【0396】

標識した抗体分子は、例えば、(i)アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降などの標準の技法によって所定の抗原を単離すること；(ii)所定の抗原(例えば、細胞溶解物中または細胞の上清中の)を、タンパク質の存在量および発現パターンを評価するために検出すること；(iii)臨床的試験手順の一部として、例えば、所与の処置レジメンの効力を決定するために、組織におけるタンパク質レベルをモニターすることを含めた、いくつもの状況において、診断上および/または実験的に使用することができる。

20

【0397】

ある他の方法を使用して、抗GCC抗体のGCCへの結合を検出することができる。そのような方法としては、これらに限定されないが、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素連結免疫吸着検定法)、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫沈降アッセイ、蛍光免疫測定法、プロテインA免疫測定法、および免疫組織化学検査(IHC)などの、当技術分野で公知の抗原結合アッセイが挙げられる。

30

【0398】

抗GCC抗体分子とGCCとの間の複合体の形成は、GCC抗原に結合した抗体(または抗体断片)または結合していない抗体分子のいずれかを測定または視覚化することによって検出することができる。従来は検出アッセイ、例えば、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素連結免疫吸着検定法)、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫沈降アッセイ、蛍光免疫測定法、プロテインA免疫測定法、および免疫組織化学検査(IHC)または放射免疫測定法(RIA)を使用することができる。

40

【0399】

抗GCC抗体分子を標識する代わりに、検出可能な物質で標識した標準物質および標識していない抗GCC抗体分子を利用する競合免疫測定法によって試料中のGCCの存在をアッセイすることができる。このアッセイでは、生物学的試料、標識した標準物質およびGCC結合剤を組み合わせ、標識していない抗体に結合した標識した標準物質の量を決定する。試料中のGCCの量は、GCC結合剤に結合した標識した標準物質の量に反比例する。

【0400】

構成成分(GCCまたは抗体分子)のいずれをもさらに操作または標識化することなく、例えば、蛍光エネルギー転移(FET、例えば、Lakowiczら、米国特許第5、

50

631, 169号; Stavriopoulosら、米国特許第4,868,103号を参照されたい)の技法を利用することによって、抗GCC抗体分子複合体の形成に対してGCCを直接検出することも可能である。第1の「供与体」分子上のフルオロフォア標識は、適切な波長の入射光で励起されると、その放出蛍光エネルギーが第2の「受容体」分子上の蛍光標識に吸収され、それが今度は吸収されたエネルギーによって蛍光を発することができるように選択する。あるいは、「供与体」タンパク質分子は、単にトリプトファン残基の天然の蛍光エネルギーを利用することができる。標識は、異なる波長の光を放出するように選択し、したがって、「受容体」分子の標識は、「供与体」の標識と区別することができる。標識間のエネルギー転移の効率は分子を隔てている距離に関連するので、分子間の空間的な関連性を評価することができる。分子間で結合が起こる状況では、アッセイにおける「受容体」分子の標識の蛍光放出が最大になるはずである。FET結合事象は、当技術分野で周知の標準物質の蛍光定量的な検出手段(例えば、蛍光光度計を使用すること)によって好都合に測定することができる。

10

20

30

40

50

【0401】

別の例では、抗体分子の、GCCを認識する能力の決定は、アッセイの構成成分(GCCまたは抗体分子)のいずれをも標識化せずに、リアルタイム生体分子相互作用分析(BIA)などの技術を利用することによって実現することができる(例えば、Sjlander、Sand Urbaniczky、C.、1991年、Anal. Chem. 63巻:2338~2345頁およびSzaboら、1995年、Curr. Opin. Struct. Biol. 5巻:699~705頁を参照されたい)。本明細書で使用される場合、「BIA」または「表面プラズモン共鳴」は、生体特異的な相互作用を、リアルタイムで、相互作用体のいずれをも標識化せずに試験するための技術である(例えば、BIACORE(商標))。結合表面における質量の変化(結合事象を示す)により、表面近くの光の屈折率が変化し(表面プラズモン共鳴(SPR)の光学現象)、その結果、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として使用することができる検出可能なシグナルがもたらされる。

【0402】

さらに別の実施形態では、本発明は、GCCを発現している腫瘍組織の存在を*in vivo*で検出するための方法を提供する。方法は、(i)被験体(例えば、がんを有する患者)に、検出可能な標識またはマーカーと結合体化させた抗GCC抗体またはその抗原結合性断片、好ましくは、抗体またはその抗原結合性断片を投与するステップと;(ii)被験体を、GCCを発現している組織または細胞に対する前記検出可能な標識またはマーカーを検出するための手段に曝露させるステップとを含む。

【0403】

本発明による診断的な画像診断に有用な標識の例は、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{68}Ga 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、および ^{188}Rh などの放射性標識、フルオレセインおよびローダミンなどの蛍光標識、核磁気共鳴活性な標識、単一光子放出型コンピュータ断層撮影法(「SPECT」)検出器または陽電子放出断層撮影法(「PET」)スキャナーによって検出可能な陽電子放出同位元素、ルシフェリンなどの化学発光体、ならびにペルオキシダーゼまたはホスファターゼなどの酵素マーカーである。短距離の放射線放射体、例えば、経直腸プローブなどの、短距離の検出プローブによって検出可能な同位元素なども使用することができる。抗体は、そのような試薬を用いて、当技術分野で公知の技法を使用して標識することができる。抗体を放射標識することに関する技法については、例えば、WenselおよびMeares(1983年)Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy、Elsevier、New Yorkを参照されたい。D. Colcherら、Meth. Enzymol. 121巻:802~816頁(1986年)も参照されたい。

【0404】

放射標識した抗体の場合では、患者に投与された抗体は、抗体が反応する腫瘍担持抗原に局在化し、それを、例えば、ガンマカメラを使用する放射性核種スキャンまたは放出断

層撮影法またはコンピュータ断層撮影法などの公知の技法を使用して *in vivo* で検出または「画像化」する。例えば、A. R. Bradwellら、「Developments in Antibody Imaging」、Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy、R. W. Baldwinら、(編)、65~85頁(Academic Press 1985年)を参照されたい。あるいは、放射性標識が陽電子を放出する場合(例えば、 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 、および ^{13}N)、Brookhaven National Laboratoryに設置されているPet VIと称される陽電子放出横断断層撮影スキャナーを使用することができる。

【0405】

他の実施形態では、本発明は、被験体、例えば、ヒト被験体に、放射性同位元素と結合させた抗GCC抗体分子を投与する場合に、種々の組織に曝露する用量、例えば、放射線量を決定するための方法を提供する。方法は、(i)本明細書に記載の抗GCC抗体分子、例えば、放射性同位元素で標識した抗GCC抗体分子を被験体に投与するステップと；(ii)種々の組織、例えば、腫瘍、または血液に位置する放射性同位元素の量を、放射性同位元素の一部または全部が被験体の体から排除されるまで、さまざまな時点で測定するステップと；(iii)分析された各組織が受けた放射線の総線量を算出するステップとを含む。測定値は、指定した時点、例えば、放射標識した抗GCC抗体分子を被験体に投与した(0日目)後、1日目、2日目、3日目、5日目、7日目、および12日目に取得してよい。ある期間にわたって積分し、放射性同位元素特異的活性を掛けた所与の組織内に存在する放射性同位元素の濃度を使用して、所与の組織が受ける線量を算出することができる。1種の放射性同位元素、例えば、ガンマ放射体、例えば ^{111}In で標識した抗GCC抗体分子を使用して生成した薬理的な情報を使用して、同じ組織が、容易に測定することができない異なる放射性同位元素、例えば、ベータ放射体、例えば ^{90}Y から受けるとされる予測線量を算出することができる。

【0406】

抗GCC抗体の配列

抗GCC抗体を、いくつかの方法によって、実施例に詳細に記載されている通り生成した。簡単に述べると、マウスモノクローナル抗体である3G1-8F1および10B8を、通常マウスにおいて、従来免疫技術によって生成した。ヒトモノクローナル抗体である1D2、5F9、5H3、6H8、8C2、および10C10を、完全ヒトIgG2抗体を生成するトランスジェニックマウスを使用し、Abgenix XENOMOUSEトランスジェニック技術を利用して生成し、ハイブリドーマ技術を使用して単離した。ヒトmAb Abx-012、mAb Abx-020、mAb Abx-106、mAb Abx-198、mAb Abx-221、mAb Abx-229、mAb Abx-338およびmAb Abx-393を、完全ヒトIgG2抗体を生成するトランスジェニックマウスを使用して生成した。単一の抗体を、Abgenix SLAM技術を使用して単離した。これらを使用して、完全ヒトIgG1抗体を作製した。GCCに対する抗体の特異性を、ELISAおよびフローサイトメトリー(FCM)によって試験した。生成した抗体のサブセットを、さらなる特徴付けのために選択した。

【0407】

以下の表1に、いくつかの抗GCC抗体について、抗体の名称、抗体を生成するために使用した免疫原、使用した動物、供給源、種およびアイソタイプ単離体が要約されている。

【0408】

10

20

30

40

【表 1】

抗体	免疫原	動物	供給源	種	アイソタイプ
3G1	TOK107-hlg	C57 通常マウス	ハイブリドーマ	マウス	IgG1,k
8F1	TOK107-hlg	C57 通常マウス	ハイブリドーマ	マウス	IgG1,k
10B8	TOK107-hlg	C57 通常マウス	ハイブリドーマ	マウス	IgG1,k
1D3	TOK107-hlg	C57 通常マウス	ハイブリドーマ	マウス	IgG1,k
8E12	TOK107-hlg	C57 通常マウス	ハイブリドーマ	マウス	IgG1,k
5F9	TOK107-hlg	XenoMouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2,k
1D2	TOK107-hlg	XenoMouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2,k
5H3	CHO-GC-C#27 細胞	XenoMouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2,k
6H8	CHO-GC-C#27 細胞	XenoMouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2,k
8C2	CHO-GC-C#27 細胞	XenoMouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2,k
10C10	CHO-GC-C#27 細胞	XenoMouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2,k
10D3	CHO-GC-C#27 細胞	XenoMouse	ハイブリドーマ	ヒト	IgG2,k
1C9	CHO-GC-C#27 細胞	XenoMouse		ヒト	IgG2,k
229	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k
012	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k
221	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k
020	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k
338	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k
106	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k
198	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k
393	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	ヒト	IgG1,k

軽鎖可変領域および重鎖可変領域の配列を決定した。以下の表 2 は、いくつかの抗体の可変領域についての配列番号の概要である。マウス抗 G C C 抗体およびヒト抗 G C C 抗体についての重鎖および軽鎖のそれぞれの可変領域のアミノ酸配列および核酸配列が、それぞれ表 3 および表 4 に示されている。

【 0 4 0 9 】

抗 G C C 抗体についての重鎖および軽鎖の C D R のそれぞれのアミノ酸配列および核酸配列が、それぞれ表 5 および表 6 に示されている。

【 0 4 1 0 】

例えば、表 3 の 9 行目は、m A b 5 F 9 の成熟重鎖可変領域の、コードされているアミノ酸配列（配列番号 1 8 ）の例示であり；m A b 5 F 9 の成熟重鎖可変領域をコード

10

20

30

40

50

する核酸配列（配列番号17）が、表4の9行目に示されている。mAb 5F9重鎖CDR（CDR）1（配列番号106）、CDR2（配列番号108）およびCDR3（配列番号110）の、コードされているアミノ酸配列が、それぞれ表5の25～27行目に示されており；mAb 5F9重鎖CDR1（配列番号105）、CDR2（配列番号107）およびCDR3（配列番号109）の核酸配列が、それぞれ表6の25～27行に示されている。

【0411】

表3の10行目は、mAb 5F9の成熟軽鎖可変領域のコードされているアミノ酸配列（配列番号20）の例示であり；mAb 5F9の成熟カップ軽鎖可変領域をコードする核酸配列（配列番号19）が、表4の10行目に示されている。mAb 5F9軽鎖CDR（CDR）1（配列番号112）、CDR2（配列番号114）およびCDR3（配列番号116）の、コードされているアミノ酸配列が、それぞれ表5の28～30行目に示されており；mAb 5F9軽鎖CDR1（配列番号111）、CDR2（配列番号113）およびCDR3（配列番号115）の核酸配列が、それぞれ表6の28～30行目に示されている。

10

【0412】

CDRを配列決定することにより、毒素結合体形成部位としての役割を果たし得る残基の存在量を決定することが可能になった。抗原結合領域の不对の遊離のシステインは、アウリスタチンとの結合体化のための部位であり得、リジンはメイタンシンが結合体形成するための部位であり得る。CDRのアミノ酸に毒素を結合体化させることにより、抗体のGCCに対する結合親和性を変化させる懸念が生じる。したがって、実施形態において、CDRは治療剤と結合体化させ得るアミノ酸を欠く。

20

【0413】

表2．モノクローナル抗体の可変領域の配列番号の概要

【0414】

【表 2 - 1】

モノクローナル抗体	IgG 鎖	核酸配列番号	アミノ酸配列番号
3G1	重鎖	1	2
	軽鎖	3	4
8E12	重鎖	5	6
	軽鎖	7	8
8F1	重鎖	9	10
	軽鎖	11	12
1D3	重鎖	13	14
	軽鎖	15	16
5F9	重鎖	17	18
	軽鎖	19	20
5H3	重鎖	21	22
	軽鎖	23	24
6H8	重鎖	25	26
	軽鎖	27	28
8C2	重鎖	29	30
	軽鎖	31	32
10C10	重鎖	33	34
	軽鎖	35	36
10D3	重鎖	286	287
	軽鎖	288	289
Abx-012	重鎖	238	239

10

20

30

40

【 0 4 1 5 】

【表 2 - 2】

	軽鎖	240	241
Abx-020	重鎖	37	38
	軽鎖	39	40
Abx-106	重鎖	242	243
	軽鎖	244	245
Abx-198	重鎖	41	42
	軽鎖	43	44
Abx-221	重鎖	246	247
	軽鎖	248	249
Abx-229	重鎖	45	46
	軽鎖	47	48
Abx-338	重鎖	49	50
	軽鎖	51	52
Abx-393	重鎖	53	54
	軽鎖	55	56

10

20

30

表 3 . モノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列
【 0 4 1 6 】

【表 3 - 1】

	モノクローナル抗体	IgG鎖	配列番号	アミノ酸配列	
1	3G1	重鎖	2	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLR <u>NAIS</u> WVRQP PGKGLEWLGVIWTGGGTNYNSALKSRLSIRKENSKSQVF LKMNSLQTEDTARYFCARSGYDGF <u>DY</u> WGQGLTVTSA	10
2	3G1	軽鎖	4	QIVLTQSPA IMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMHWYQK SGTSPKRWIYDTSKLA SGVPARFSGSGSGTSYSLTITSME AEDAATYYCQQWSGNPYTFGGGTKLEIK	
3	8E12	重鎖	6	QVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVK QRPGQGLEWIGKIGPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYFCARWDAYWGQGLTVTVS	20
4	8E12	軽鎖	8	DVVM TQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLN WLQQRPGQAPKHLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTL KISRVEAEDLGVYYC <u>LQGT</u> YYPYTFGGGTKLEIK	
5	8F1	重鎖	10	QVQLQQPGAELVKPGASVQMSCKASGYIFTGYWMYWV KQRPGQGLEWIGRIHPSDSNTNYNQKFKGKATLTVDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYCTHALAYWGQGLTVTVS	30
6	8F1	軽鎖	12	DVVL TQTPLTSLITIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLSWL LQRPGQSPKRLIYLVSQLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVYYC <u>VQGT</u> HLFTFGSGTKLEIK	
7	1D3	重鎖	14	QVQLKQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYINWV KQRPGQGLEWIGKIGPRSGSTYYNEKFKGKATLTADKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYFCARWDAYWGQGLTVTSA	40

【 0 4 1 7 】

【表 3 - 2】

8	1D3	軽鎖	16	DVVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLN WLQQRPGQAPKHLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTL KISRVEAEDLGVYYCLQGTYYPYTFGGGKLEIK	
9	5F9	重鎖	18	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSRTISVDTSKNQF ALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGNFDHWGQGTLV TVSS	10
10	5F9	軽鎖	20	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQS EDFAVYYCQQYKTWPRTFGQGTNVEIK	
11	5H3	重鎖	22	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDCYMSWIR QSPGKGLEWVSYITTSGNTIYYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGWFGMDVWGQGT TVTSS	20
12	5H3	軽鎖	24	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHNDGKTYLY WYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVPDRFSSSGSXTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCMQSIQLPRTFGQGTKVEIK	
13	6H8	重鎖	26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAIWDGSKNYADSVKGRFTISRDNANK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSSYFDYWGQGT LTVSS	30
14	6H8	軽鎖	28	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKTSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKI SRVGAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEIK	
15	8C2	重鎖	30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVGAIWDGSKNYAASVKGRFTISRDNANK NTLYLQMNSLRAEDTAVFYCARGRSSSYFDYWGQGT LTVSS	40

【 0 4 1 8 】

【表 3 - 3】

16	8C2	軽鎖	32	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKTSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKI SRVGAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEIK	
17	10C10	重鎖	34	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVA AIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSSYFDYWGQGT LTVSS	10
18	10C10	軽鎖	36	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASFSCRSSQSLVHSDGNTYLS WLQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEIK	
35	10D3	重鎖	287	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC AVFGGSFSGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSR VTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYG NFDHWGQGT LTVSS	20
36	10D3	軽鎖	289	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSRYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGTPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYFCQYERSFTFGPGTKVD	
19	Abx-012	重鎖	239	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGASISHYYWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYISGRTSYNPSLKSRVTVSVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARDRLTGYFDYWGQGT LTVSS	30
20	Abx-012	軽鎖	241	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRAAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQY GSSSLTFGGGKVEIK	
21	Abx-020	重鎖	38	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIR QAPGKGLEWISYITSSGSTIYY SASVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARD FSGWFGVHFDYWGQGT LTVSS	40

【表 3 - 4】

22	Abx-020	軽鎖	40	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYW YLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVPNRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQSIQLTWTFGQGTKVEIK
23	Abx-106	重鎖	243	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYISGRTSYNPSLKSRTVTVSVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARDRLTGYFDYWGQGLVTVSS
24	Abx-106	軽鎖	245	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSPMCSFGQGTKLEIK
25	Abx-198	重鎖	42	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLDWVSDISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMHSLSAEDTAIYYCAKRRWQGYFDLWGRGTLV TVSS
26	Abx-198	軽鎖	44	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRARQRVDSRYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGKTKVEIK
27	Abx-221	重鎖	247	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSRYAMNWVR QAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRDFWSPFDYWGQGT LTVSS
28	Abx-221	軽鎖	249	EIVMTPSSATLSVSPGERATLSCRASQSVSRSLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQS EDVAVYYCQQYNNWMCSFGQGTKLEIK
29	Abx-229	重鎖	46	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSRYAMNWVR QAPGKGLEWVSGISGSGGRYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRDFWSPFDYWGQGT LTVSS
30	Abx-229	軽鎖	48	EIVMTPSSATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYCHQYSNWMCSFGQGTKLEIK

10

20

30

40

【表 3 - 5】

31	Abx-338	重鎖	50	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRSYYSWIRQP AGKGLEWIGRIYISGRITTFNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYFCARDRYYG YLDYWGQGLTVTVSS
32	Abx-338	軽鎖	52	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRSYLA WYQQ KPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDEAVYYCQQYGSSPSTFGQGTRLEIK
33	Abx-393	重鎖	54	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRHYYWSWIRQ PPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNLSLKSRTISRDTSKNQVS LKLSSVTAADTAVYYCAAGMGFDYWGQGLTVTVSS
34	Abx-393	軽鎖	56	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQAIRNDLGWYQLKP GKAPKRLIYSASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPE DSATYYCLQHNSFPPTFGQGTKVEIK

10

20

表 4 . モノクローナル抗体可変領域の核酸配列

【 0 4 2 1 】

【表 4 - 1】

	モノクローナル抗体	IgG鎖	配列番号	核酸配列
1	3G1	重鎖	1	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTG GCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACTGTC TCTGGGTTCTCATTAAGCAGAAATGCTATAAGCTGG GTTCGCCAGCCACCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTT GGAGTAATATGGACTGGTGGAGGCACAAATTATAAT TCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCCGCAAAGAG AACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGT CTACAAACTGAAGACACAGCCAGGTACTIONTCTGTGCC AGAAGTGGTTACGACGGGTTTGATTACTGGGGCCAA GGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
2	3G1	軽鎖	3	CAGATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTG CATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTG CCAGCTCAAGTGTAATTACATGCACTGGTACCAGC AGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATG ACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAC AATCACCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTA TTACTIONTCTGCGAGTGGAGTGGTAACCCGTACACGTT CGGAGGGGGGACCACAACTGGAAATAAAA

10

20

30

【 0 4 2 2 】

【表 4 - 2】

3	8E12	重鎖	5	<p>CAGGTCCAGTTGAAGCAGTCTGGAGCTGAACTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACTACTATATAAACTGGG TGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTG GAAAGATTGGTCCTCGAAGTGGTAATACTTACTACA ATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCA GACAAATCGTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGC AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTG CAAGATGGGATGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGG TCACTGTCTCT</p>	10
4	8E12	軽鎖	7	<p>GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTGTCTTTGTCGG TTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTC AAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAGACATA TTTGAATTGGTTACAACAGAGGCCTGGCCAGGCTCC AAAGCACCTAATGTATCAGGTGTCCAACTGGACCC TGGCATCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGA AACAGATTTTACACTTAAAATCAGCAGAGTGGAGGC TGAAGATTTGGGAGTTTATTACTGCTTGCAAGGTAC ATATTATCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCT GGAAATAAAG</p>	20
5	8F1	重鎖	9	<p>CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGCAGATGTCCTGTAAGGCT TCTGGCTATATTTTACCCGGCTACTGGATGTAAGGG TGAAGCAGAGGCCTGGCCAAGGCCTTGAGTGGATTG GAAGGATTCATCCTTCTGATAGTAATACTAATACTACA ATCAAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAG ACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCA GCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTAC CCATGCCCTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT CACTGTCTCT</p>	30
					40

【 0 4 2 3 】

【表 4 - 3】

6	8F1	軽鎖	11	<p>GATGTTGTGTTGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGA TTACCATTTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTC AAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAAACCTA TTTGAGTTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCC AAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTCAACTGGACTCT GGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGA ACAGATTTTACACTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT GAGGATTTGGGAGTGTATTACTGCGTGCAAGGTACA CATTTATTCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAA ATAAAA</p>	10
7	1D3	重鎖	13	<p>CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACAGACTACTATATAAACTGG GTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATT GGAAAGATTGGTCCTAGAAGTGGTAGTACTTACTAC AATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGC AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAG CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGT GCAAGATGGGATGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTG GTCACTGTCTCTGCA</p>	20 30
8	1D3	軽鎖	15	<p>GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTGTCTTTGTCGG TTACCATTTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTC AAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAGACATA TTTGAATTGGTTACAACAGAGGCCTGGCCAGGCTCC AAAGCACCTAATGTATCAGGTGTCCAACTGGACCC TGGCATCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGA AACAGATTTTACACTTAAAATCAGCAGAGTGGAGGC TGAAGATTTGGGAGTTTATTACTGCTTGCAAGGTAC ATATTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCT GGAAATAAAA</p>	40

【表 4 - 5】

12	5H3	軽鎖	23	<p>GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCG TCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAGT CTAGTCAGAGCCTCCTGCATAATGATGGAAAGACCT ATTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTC CACAACCTCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGTTCTC TGGAGTGCCAGATAGGTTTCAGTAGCAGCGGGTCNNG GACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGC TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTAT ACAGCTTCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGT GGAAATCAA</p>	10
13	6H8	重鎖	25	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG GCAGCTATATGGTATGATGGAAGTAATAATACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTATTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA</p>	20
14	6H8	軽鎖	27	<p>GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACCTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAATTTATAAGACTTCTAACCGCTTCTCT GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGG GACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGGAGC TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTAC GCAATTTCCAACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGA GATTAAA</p>	30

【表 4 - 6】

15	8C2	重鎖	29	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggTCCCT GAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTCACCTTCAGT AGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGC AAGGGGCTGGAGTGGGTGGGAGCTATATGGTATGAT GGAAGTAATAAATACTATGCAGCCTCCGTGAAGGGC CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCTGTATTTACTGTGCGAGAGGGAGGAGCAGC TCGTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA	10
16	8C2	軽鎖	31	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACCTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAATTTATAAGACTTCTAACCGTTCTCT GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGG GACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGGAGC TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTAC GCAATTTCCAACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGA GATTA	20
17	10C10	重鎖	33	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG GCAGCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA GACAATTTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTATTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	30
					40

【 0 4 2 7 】

【表 4 - 7】

18	10C10	軽鎖	35	<p>GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCTTCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACGTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCT GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGG GACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGAAAGC TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTAC ACAATTTCCAACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGA GATTA</p>
35	10D3	重鎖	286	<p>CAGGTGCA GCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTC GGAGACCCTGTCCC TCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCCTTCAGTGGTTA CTACTGGAGCTGG ATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATT GGGGAAATCAATCA TCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCCTCAAGAG TCGAGTCACCATAT CAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGC TGAGTTCTGTGACC GCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAA CGTGGATACACCTA TGGTAACTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT CACCGTCTCCTCA</p>

10

20

30

40

【 0 4 2 8 】

【表 4 - 1 0】

22	Abx-020	軽鎖	39	<p>GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCG TCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGTAAGTC TAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATGGAAAGACCTA TTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCC ACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGTTCTCT GGAGTGCCAAATAGGTTTCAGTGGCAGCGGGTCAGG GACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGC TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTAT ACAACCTACGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGT GGAAATCAA</p>	10
23	Abx-106	重鎖	242	<p>CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGTGC CTCCATCAGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCA GCCCCCGGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGCGTAT CTATATCA GTGGGAGGACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGTC GAGTCACCGTGTGAGTAGACACGTCCAAGAACCAGT TCTCCCTG AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGAGATCGGCTAACTGGGTACTTT GACTACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGC</p>	20
					30

【 0 4 3 1 】

【表 4 - 1 2】

26	Abx- 198	軽鎖	43	<p>GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG CCAGGCAGCGTGTGACAGCAGGTACTIONTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG ACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTG CAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGC TCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA</p>	10
27	Abx- 221	重鎖	246	<p>GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATT</p> <p>CACCTTTAGCCGCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTAT TAGTGGTA</p> <p>GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG GCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACA CGCTGTAT</p> <p>CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGC CGTATATTACTGTGCGAAAGATCGCGATTTTTGGAG TGGTCCATT</p> <p>TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC CTCAGC</p>	20
					30

【 0 4 3 3 】

【表 4 - 1 4】

30	Abx- 229	軽鎖	47	GAAATAGTGATGACGCCGTCTTCAGCCACCCTGTCT GTGTCTCCAGGGGAGAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAAACTTAGCCTGGTAC CAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCC AGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAATTCCT CTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCACCAGTATAGTAACTGGATGTGCA GTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA	10
31	Abx- 338	重鎖	49	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGTGGCTCCATCAGAAGTTACTACTGGAGCTGGA TCCGGCAGCCC GCCGGAAGGGACTGGAGTGGATTG GACGTATTTATATCAGTGGGAGGACCACCTTCAACC CCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTGGACA CGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG TGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGA GAGATAGATATTATGGCTACCTTGACTACTGGGGCC AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	20
32	Abx- 338	軽鎖	51	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCCGCAGTACTTAGCCTGGT ACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGATGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG ACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTG CAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGTTCACCGA GCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA	30
					40

【表 4 - 1 5】

33	Abx- 393	重鎖	53	<p>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGCGGCTCCATCCGTCATTACTACTGGAGCTGGA TCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTG GGTATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACC TCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAAGAGACA CGTCCAAGAATCAGGTCTCCCTG</p> <p>AAGCTGAGTTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTG TATTATTGTGCGGCGGGTATGGGCTTTGACTACTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA</p>
34	Abx- 393	軽鎖	55	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTCCCTGTCTG CATCTATAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG CAAGTCAGGCCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATC AGCTGAAACCGGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCT ATTCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAA GGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTC TCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTCTGCAA CTTATTACTGTCTACAGCATAATAGTTTCCCTCCGAC GTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA</p>

10

20

30

表 5 : C D R の ア ミ ノ 酸 配 列

【 0 4 3 6 】

【表 5 - 1】

	モノクロー ナル 抗体	IgG 鎖	配列番号	アミノ酸配列
1	3G1	VH CDR1	58	RNAIS
2	3G1	VH CDR2	60	VIWTGGGTYNSALKS
3	3G1	VH CDR3	62	SGYDGFYD
4	3G1	VL CDR1	64	SASSSVNYMH
5	3G1	VL CDR2	66	DTSKLAS
6	3G1	VL CDR3	68	QQWSGNPYT
7	8E12	VH CDR1	70	DYYIN
8	8E12	VH CDR2	72	KIGPRSGNTYYNEKFKG
9	8E12	VH CDR3	74	WDAY
10	8E12	VL CDR1	76	KSSQSLLYSNGKTYLN

10

20

30

40

【 0 4 3 7 】

【表 5 - 2】

11	8E12	VL CDR2	78	QVSKLDP	
12	8E12	VL CDR3	80	LQGTYYPYT	
13	8F1	VH CDR1	82	GYWMY	10
14	8F1	VH CDR2	84	RIHPSDSNTNYNQKFKG	
15	8F1	VH CDR3	86	ALAY	
16	8F1	VL CDR1	88	KSSQSLLYSNGKTYLS	20
17	8F1	VL CDR2	90	LVSQLDS	
18	8F1	VL CDR3	92	VQGTHLFT	30
19	1D3	VH CDR1	94	DYYIN	
20	1D3	VH CDR2	96	KIGPRSGSTYYNEKFKG	
21	1D3	VH CDR3	98	WDAY	40
22	1D3	VL CDR1	100	KSSQSLLYSNGKTYL	

【 0 4 3 8 】

【表 5 - 3】

23	1D3	VL CDR2	102	QVSKLDP	
24	1D3	VL CDR3	104	LQGTYYPYT	
25	5F9	VH CDR1	106	GYYS	10
26	5F9	VH CDR2	108	EINHRGNTNDNPSLKS	
27	5F9	VH CDR3	110	ERGYTYGNFDH	20
28	5F9	VL CDR1	112	RASQSVSRNLA	
29	5F9	VL CDR2	114	GASTRAT	
30	5F9	VL CDR3	116	QQYKTWPRT	30
31	5H3	VH CDR1	118	DCYMS	
32	5H3	VH CDR2	120	YITTSNGNTIYYADSVKG	
33	5H3	VH CDR3	122	DWGWFYGMVD	40
34	5H3	VL CDR1	124	KSSQSLHNDGKTYLY	

【 0 4 3 9 】

【表 5 - 4】

35	5H3	VL CDR2	126	EVSNRFS	
36	5H3	VL CDR3	128	MQSIQLPRT	
37	6H8	VH CDR1	130	SYGMH	10
38	6H8	VH CDR2	132	AIWYDGSNKYYADSVKG	
39	6H8	VH CDR3	134	GRSSSYFDY	
40	6H8	VL CDR1	136	RSSQSLVHSDGNTYLS	20
41	6H8	VL CDR2	138	KTSNRFS	
42	6H8	VL CDR3	140	MQATQFPT	30
43	8C2	VH CDR1	142	SYGMH	
44	8C2	VH CDR2	144	AIWYDGSNKYYAASVKG	
45	8C2	VH CDR3	146	GRSSSYFDY	40
46	8C2	VL CDR1	148	RSSQSLVHSDGNTYLS	

【 0 4 4 0 】

【表 5 - 5】

47	8C2	VL CDR2	150	KTSNRFS	
48	8C2	VL CDR3	152	MQATQFPT	
49	10C10	VH CDR1	154	SYGMH	10
50	10C10	VH CDR2	156	AIWYDGSNKYYADSVKG	
51	10C10	VH CDR3	158	GRSSSYFDY	
52	10C10	VL CDR1	160	RSSQSLVHSDGNTYLS	20
53	10C10	VL CDR2	162	KISNRFS	
54	10C10	VL CDR3	164	MQATQFPT	
103	10D3	VH CDR1	291	GYYS	
104	10D3	VH CDR2	293	EINHRGNTNDNPSLKS	30
105	10D3	VH CDR3	295	ERGYTYGNFDH	
106	10D3	VL CDR1	297	RASQSVSSRYLA	40

【 0 4 4 1 】

【表 5 - 6】

107	10D3	VL CDR2	299	GASSRAT	
108	10D3	VL CDR3	301	QQYERSFT	
55	Abx-012	VH CDR1	251	HYYWS	10
56	Abx-012	VH CDR2	253	RIYISGRTSYNPSLKS	
57	Abx-012	VH CDR3	255	DRLTGYFDY	
58	Abx-012	VL CDR1	257	RASQSVSSSYLA	20
59	Abx-012	VL CDR2	259	GASSRAA	
60	Abx-012	VL CDR3	261	QQYGSSLT	30
61	Abx-020	VH CDR1	166	DYYMS	
62	Abx-020	VH CDR2	168	YITSSGSTIYYSASVKG	
63	Abx-020	VH CDR3	170	DFSGWFGVHFDY	40
64	Abx-020	VL CDR1	172	KSSQSLHSDGKTYLY	

【 0 4 4 2 】

【表 5 - 7】

65	Abx-020	VL CDR2	174	EVSNRFS	
66	Abx-020	VL CDR3	176	MQSIQLTWT	
67	Abx-0106	VH CDR1	263	HYYWS	10
68	Abx-106	VH CDR2	265	RIYISGRTSYNPSLKS	
69	Abx-106	VH CDR3	267	DRLTGYFDY	
70	Abx-106	VL CDR1	269	RASQSVSSSYLA	20
71	Abx-106	VL CDR2	271	GTSSRAT	
72	Abx-106	VL CDR3	273	QQYGSSPMCS	30
73	Abx-198	VH CDR1	178	SYAMS	
74	Abx-198	VH CDR2	180	DISGSGGSTYYADSVKG	
75	Abx-198	VH CDR3	182	RRWQGYFDL	40
76	Abx-198	VL CDR1	184	RARQRVDSRYLA	

【 0 4 4 3 】

【表 5 - 8】

77	Abx-198	VL CDR2	186	GASSRAT	
78	Abx-198	VL CDR3	188	QQYGSSPLT	
79	Abx-221	VH CDR1	275	RYAMN	10
80	Abx-221	VH CDR2	277	GISGSGGSTYYADSVKG	
81	Abx-221	VH CDR3	279	DRDFWSGPFDY	
82	Abx-221	VL CDR1	281	RASQSVSRSLA	20
83	Abx-221	VL CDR2	283	GASTRAT	
84	Abx-221	VL CDR3	285	QQYNNWMCS	30
85	Abx-229	VH CDR1	190	RYAMN	
86	Abx-229	VH CDR2	192	GISGSGGRTYYADSVKG	
87	Abx-229	VH CDR3	194	DRDFWSGPFDY	40
88	Abx-229	VL CDR1	196	RASQSVSRNLA	

【 0 4 4 4 】

【表 5 - 9】

89	Abx-229	VL CDR2	198	GASTRAT	
90	Abx-229	VL CDR3	200	HQYSNWMCS	
91	Abx-338	VH CDR1	202	SYYS	10
92	Abx-338	VH CDR2	204	RIYISGRITTFNPSLKS	
93	Abx-338	VH CDR3	206	DRYYGYLDY	
94	Abx-338	VL CDR1	208	RASQSVRSYLA	20
95	Abx-338	VL CDR2	210	DASSRAT	
96	Abx-338	VL CDR3	212	QQYGSSPST	30
97	Abx-393	VH CDR1	214	HYYWS	
98	Abx-393	VH CDR2	216	YIYYSGSTNYNLSLKS	
99	Abx-393	VH CDR3	218	GMGFDY	40
100	Abx-393	VL CDR1	220	RASQAIRNDLG	

【 0 4 4 5 】

【表 5 - 10】

101	Abx-393	VL CDR2	222	SASSLQS
102	Abx-393	VL CDR3	224	LQHNSFPPT
109	コンセンサス	VH CDR1	302	x-x/Y-x/Y-M/W-S/N
110	コンセンサス	VH CDR2	303	x-I-x-x-SG-[xまたはなし]-x-T/I-[y/T/S]-x-x-L/V-K-s/G
111	コンセンサス	VH CDR3	304	[4-6x]-G-[2-3x]-D-Y
112	コンセンサス	VL CDR1	305	R/K-A/S-SQS-V/L-S/L-[5-9x]
113	コンセンサス	VL CDR2	306	x-x-S-x-R-x-x
114	コンセンサス	VL CDR3	307	Q/H/M-Q-Y/S-[5-7x]

10

20

30

表 6 . C D R の 核 酸 配 列

【 0 4 4 6 】

【 表 6 - 1 】

	モノクロー ナル抗体	IgG 鎖	配列番号	核酸配列
1	3G1	VH CDR1	57	AGAAATGCTATAAGC

40

【 0 4 4 7 】

【表 6 - 2】

2	3G1	VH CDR2	59	GTAATATGGACTGGTGGAGGCACAAATTAT AATTCAGCTCTCAAATCC	
3	3G1	VH CDR3	61	AGTGGTTACGACGGGTTTGATTAC	
4	3G1	VL CDR1	63	AGTGCCAGCTCAAGTGTAATTACATGCAC	10
5	3G1	VL CDR2	65	GACACATCCAACTGGCTTCT	
6	3G1	VL CDR3	67	<u>CAGCAGTGGAGTGGTAACCCGTACACG</u>	20
7	8E12	VH CDR1	69	GACTACTATATAAAC	
8	8E12	VH CDR2	71	AAGATTGGTCCTCGAAGTGGTAATACTTACT ACAATGAGAAGTTCAAGGGC	
9	8E12	VH CDR3	73	TGGGATGCTTAC	30
10	8E12	VL CDR1	75	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAGACATATTTGAAT	
11	8E12	VL CDR2	77	CAGGTGTCCAACTGGACCCT	
12	8E12	VL CDR3	79	TTGCAAGGTACATATTATCCGTACACG	40
13	8F1	VH CDR1	81	<u>GGCTACTGGATGTAC</u>	

【 0 4 4 8 】

【表 6 - 3】

14	8F1	VH CDR2	83	<u>AGGATTCATCCTTCTGATAGTAATACTAACT</u> <u>ACAATCAAAAGTTCAAGGGC</u>	
15	8F1	VH CDR3	85	<u>GCCCTTGCTTAC</u>	
16	8F1	VL CDR1	87	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAAACCTATTTGAGT	10
17	8F1	VL CDR2	89	CTGGTGTCTCAACTGGACTCT	
18	8F1	VL CDR3	91	GTGCAAGGTACACATTTATTCACG	
19	1D3	VH CDR1	93	GACTACTATATAAAC	20
20	1D3	VH CDR2	95	AAGATTGGTCCTAGAAGTGGTAGTACTTACT ACAATGAGAAGTTCAAGGGC	
21	1D3	VH CDR3	97	TGGGATGCTTAC	30
22	1D3	VL CDR1	99	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAGACATATTTGAAT	
23	1D3	VL CDR2	101	CAGGTGTCCAAACTGGACCCT	
24	1D3	VL CDR3	103	TTGCAAGGTACATATTATCCGTACACG	40
25	5F9	VH CDR1	105	GGTTACTACTGGAGC	

【表 6 - 4】

26	5F9	VH CDR2	107	GAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGAC AACCCGTCCTCAAG	
27	5F9	VH CDR3	109	GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACC AC	
28	5F9	VL CDR1	111	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTA GCC	10
29	5F9	VL CDR2	113	GGTGCATCCACCAGGGCCACT	
30	5F9	VL CDR3	115	CAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACG	20
31	5H3	VH CDR1	117	GACTGCTACATGAGC	
32	5H3	VH CDR2	119	TACATTACTACTAGTGGTAATACCATTTACT ACGCAGACTCTGTGAAGGGC	
33	5H3	VH CDR3	121	GACTGGGGATGGTTCTACGGTATGGACGTC	30
34	5H3	VL CDR1	123	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAATGATG GAAAGACCTATTTG	
35	5H3	VL CDR2	125	GAAGTTTCCAACCGGTTCTCT	
36	5H3	VL CDR3	127	ATGCAAAGTATACAGCTTCCTCGGACG	40
37	6H8	VH CDR1	129	AGCTATGGCATGCAC	

【 0 4 5 0 】

【表 6 - 5】

38	6H8	VH CDR2	131	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGC	
39	6H8	VH CDR3	133	GGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTAT	
40	6H8	VL CDR1	135	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACCTACTTGAGT	10
41	6H8	VL CDR2	137	AAGACTTCTAACCGCTTCTCT	
42	6H8	VL CDR3	139	ATGCAAGCTACGCAATTTCCAACC	
43	8C2	VH CDR1	141	AGCTATGGCATGCAC	20
44	8C2	VH CDR2	143	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGCCTCCGTGAAGGGC	
45	8C2	VH CDR3	145	GGGAGGAGCAGCTCGTATTTTGACTAC	30
46	8C2	VL CDR1	147	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACCTACTTGAGT	
47	8C2	VL CDR2	149	AAGACTTCTAACCGCTTCTCT	
48	8C2	VL CDR3	151	ATGCAAGCTACGCAATTTCCA	40
49	10C10	VH CDR1	153	AGCTATGGCATGCAC	

【 0 4 5 1 】

【表 6 - 6】

50	10C10	VH CDR2	155	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGC	
51	10C10	VH CDR3	157	GGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTAT	
52	10C10	VL CDR1	159	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACGTACTIONTGGAGT	10
53	10C10	VL CDR2	161	AAGATTTCTAACCGGTTCTCT	
54	10C10	VL CDR3	163	ATGCAAGCTACACAATTTCCAACC	
103	10D3	VH CDR1	290	GGTACTACTGGAGC	20
104	10D3	VH CDR2	292	GAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGAC AACCCGTCCCTCAAG	
105	10D3	VH CDR3	294	GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACC AC	
106	10D3	VL CDR1	296	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGGTAC TTAGCCT	30
107	10D3	VL CDR2	298	GGTGCATCCAGCAGGGCCACTG	
108	10D3	VL CDR3	300	CAGCAGTATGAAAGGTCATTCACTT	
55	Abx-012	VH CDR1	250	CATTACTACTGGAGC	40
56	Abx-012	VH CDR2	252	CGTATCTATATCAGTGGGAGGACCAGCTACA ACCCCTCCCTCAAGAGT	

【表 6 - 7】

57	Abx-012	VH CDR3	254	GATCGGCTAACTGGGTACTTTGACTAC	
58	Abx-012	VL CDR1	256	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTAC TTAGCC	
59	Abx-012	VL CDR2	258	GGTGCATCCAGCAGGGCCGCT	10
60	Abx-012	VL CDR3	260	CAGCAGTATGGTAGCTCCCTCACT	
61	Abx-020	VH CDR1	165	GACTACTACATGAGC	
62	Abx-020	VH CDR2	167	TACATTACTAGTAGTGGTAGTACCATATACT ACTCAGCCTCTGTGAAGGGC	20
63	Abx-020	VH CDR3	169	GATTTCACTGGCTGGTTCGGAGTCCACTTTG ACTAC	
64	Abx-020	VL CDR1	171	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATG GAAAGACCTATTTGTAT	30
65	Abx-020	VL CDR2	173	GAAGTTTCCAACCGGTTCTCT	
66	Abx-020	VL CDR3	175	ATGCAAAGTATACAACCTACGTGGACG	
67	Abx-106	VH CDR1	262	CATTACTACTGGAGC	40
68	Abx-106	VH CDR2	264	CGTATCTATATCAGTGGGAGGACCAGCTACA ACCCCTCCCTCAAGAGT	

【 0 4 5 3 】

【表 6 - 8】

69	Abx-106	VH CDR3	266	GATCGGCTAACTGGGTACTTTGACTAC	
70	Abx-106	VL CDR1	268	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTAC TTAGCC	
71	Abx-106	VL CDR2	270	GGTACATCCAGCAGGGCCACT	10
72	Abx-106	VL CDR3	272	CAGCAGTATGGTAGCTCACCCATGTGCAGT	
73	Abx-198	VH CDR1	177	AGCTATGCCATGAGC	
74	Abx-198	VH CDR2	179	GATATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGC	20
75	Abx-198	VH CDR3	181	CGGCGGTGGCAGGGGTACTTCGATCTC	
76	Abx-198	VL CDR1	183	AGGGCCAGGCAGCGTGTTGACAGCAGGTAC TTAGCC	30
77	Abx-198	VL CDR2	185	GGTGCATCCAGCAGGGCCACT	
78	Abx-198	VL CDR3	187	CAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACT	
79	Abx-221	VH CDR1	274	CGCTATGCCATGAAC	40
80	Abx-221	VH CDR2	276	GGTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGC	

【 0 4 5 4 】

【表 6 - 9】

81	Abx-221	VH CDR3	278	GATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTTGACT AC	
82	Abx-221	VL CDR1	280	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAAGCTTA GCC	
83	Abx-221	VL CDR2	282	GGTGCATCCACCAGGGCCACT	10
84	Abx-221	VL CDR3	284	CAGCAGTATAATAACTGGATGTGCAGT	
85	Abx-229	VH CDR1	189	CGCTATGCCATGAAC	
86	Abx-229	VH CDR2	191	GGTATTAGTGGGAGTGGTGGTAGGACATAC TACGCAGACTCCGTGAAGGGC	20
87	Abx-229	VH CDR3	193	GATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTTGACT AC	
88	Abx-229	VL CDR1	195	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAACTTA GCC	30
89	Abx-229	VL CDR2	197	GGTGCATCCACCAGGGCCACT	
90	Abx-229	VL CDR3	199	CACCAGTATAGTAACTGGATGTGCAGT	
91	Abx-338	VH CDR1	201	AGTTACTACTGGAGC	40
92	Abx-338	VH CDR2	203	CGTATTTATATCAGTGGGAGGACCACCTTCA ACCCCTCCCTCAAGAGT	

【 0 4 5 5 】

【表 6 - 1 0】

93	Abx-338	VH CDR3	205	GATAGATATTATGGCTACCTTGACTAC
94	Abx-338	VL CDR1	207	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCAGTTACT TAGCC
95	Abx-338	VL CDR2	209	GATGCATCCAGCAGGGCCACT
96	Abx-338	VL CDR3	211	CAGCAGTATGGTAGTTCACCGAGCACC
97	Abx-393	VH CDR1	213	CATTACTACTGGAGC
98	Abx-393	VH CDR2	215	TATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACA ACCTCTCCCTCAAGAGT
99	Abx-393	VH CDR3	217	GGTATGGGCTTTGACTAC
100	Abx-393	VL CDR1	219	CGGGCAAGTCAGGCCATTAGAAATGATTTA GGC
101	Abx-393	VL CDR2	221	TCTGCATCCAGTTTGCAAAGT
102	Abx-393	VL CDR3	223	CTACAGCATAATAGTTTCCCTCCGACG

10

20

30

40

50

mAb 5F9およびAbx-229のそれぞれの重鎖および軽鎖の両方のコード配列を含有する発現ベクターを上記の通り創製した。

【0456】

本発明を以下の実施例によって例示するが、これはさらなる限定と解釈されるべきではない。

【実施例】

【0457】

(実施例1)

抗GCC抗体の生成および特徴づけ

免疫およびスクリーニングするためのGCCタンパク質の生成を以下の通り実施した。GCC抗原を、以下のGCC配列(シグナル配列および細胞外ドメイン)を含む配列をコードするGCC遺伝子の部分を発現ベクターにサブクローニングすることによって調製し

た。

【 0 4 5 8 】

【 化 4 9 】

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEPLKNLEDAVNEGLEIVR
 GRLQNAGLNVTVNATFMYS DGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMY
 LDELSYPMISAGSFGLS CDYKETLTRLMS PARKLMYFLVNFWKTN DL PFKTYSWSTS YVYKNGTE
 TEDCFWYLNAL EASVS YFSHELGFKVVL RQDKEFQDILMDHNRKSNV IIMCGGPEFLYK LKGDRAV
 AEDIV IILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLT LSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAYLNGILLF
 GHMLKIFLENGENITPKFAHAFRNLT FEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVL LTY
 DTHVNKTYPVDMSPFTWKN SKL (配列番号 :229)

10

発現ベクター (p L K T O K 1 0 7) により、 G C C 配列と融合するための C 末端 I g G 1 F c 領域がもたらされた。このベクターは、 I g G 1 ヒンジ、 C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインを有するエクソンを含み、変異させてエクソン内の C H 1 断片から不对のシステインを除去した。さらに、この I g G 1 F c 領域のリジン 2 3 5 およびグリシン 2 3 7 をアラニンに変異させた。その構築物を、 S V 4 0 T - 抗原の遺伝子でトランスフェクトしたヒト胎児由来腎臓 (H E K) 2 9 3 細胞において、組換えによって、 C 末端ヒト I g G 1 F c と融合した分泌型 G C C 配列 (配列番号 2 2 8 のアミノ酸残基 2 4 ~ 4 3 0) として発現させた。 T O K 1 0 7 - h I g と称されるタンパク質 (別の名称、 h G C C - E C D / h I g G 1 F c 、 配列番号 3 1 7) を、プロテイン A クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。

20

【 0 4 5 9 】

上記の融合タンパク質を、 C 末端上のマウス I g G 2 a 膜貫通領域の融合を可能にする p L K T O K 1 1 1 などの発現ベクターにサブクローニングすることによって G C C 抗原も調製した。この構築物を、組換えによって C H O 細胞において発現させると、 G C C の細胞外ドメインが細胞表面で検出される。 G C C - I g 融合タンパク質 (配列番号 3 1 8) の細胞表面での高発現は、 p L K T O K 1 1 1 ベクターを、マウスの C D 7 9 a (M B - 1) および C D 7 9 b (B 2 9) を含む p L K T O K 1 2 3 と同時トランスフェクトする場合に実現される。このトランスフェクション (C H O - G C C # 2 7) からのクローン # 2 7 を免疫原として使用した。 H T 2 9 - G C C # 2 細胞も免疫原として使用した。

30

【 0 4 6 0 】

ハイブリドーマの上清および精製された m A b を E L I S A によってスクリーニングするために、 G C C 融合構築物をコードする核酸を p C M V 1 発現ベクター (S i g m a) にクローニングした。精製タグ : F L A G タグ (N 末端における) および H i s タグ (C 末端における) を、同様にその構築物にクローニングした。上記融合タンパク質構築物を 2 9 3 細胞にトランスフェクトし、発現させ、抗 F L A G (登録商標) M 2 - アガロースアフィニティーカラム (S i g m a) を通して組換えタンパク質を精製した。

【 0 4 6 1 】

試薬および細胞系。 H E K 2 9 3 細胞、 C H O 細胞、および T 8 4 ヒト結腸がん細胞を A T C C から得、 A T C C のプロトコールに従って維持した。

40

【 0 4 6 2 】

マウス : マウスハイブリドーマを生成するために、雌の C 5 7 B L / 6 マウス、 4 ~ 6 週齢を T a c o n i c F a r m s 、 I n c . (G e r m a n t o w n 、 N Y) から購入した。ヒトハイブリドーマを生成するために、 4 ~ 6 週齢まで社内 (i n - h o u s e) で飼育された、ヒト I g G 2 抗体を産生する X e n o m o u c e (複数) を A b g e n i x 、 I n c . (F r e m o n t 、 C A) から得た。全ての動物を、 I n s t i t u t i o n a l A n i m a l C a r e a n d U s e C o m m i t t e e o f M i l l e n n i u m P h a r m a c e u t i c a l s 、 I n c のガイドラインに従って取得し、維持した。

50

【0463】

細胞系：機能アッセイのために使用した細胞系は、GCCをトランスフェクトした細胞およびベクター対照のHEK293細胞またはHT29細胞の細胞対であった。HT29細胞を、EF-1プロモーターまたは空ベクター（pLTKOK4）の制御下で、全長GCCでトランスフェクトし、G418中で選択した。これらの細胞におけるGCCは、STペプチド（1～18または5～18）と接触させた場合にcGMP応答を有することが確認された。HEK293細胞を、CMVプロモーターまたは空ベクター（pN8mycSV40）の制御下で、全長GCCでトランスフェクトし、プラスチジン中で選択した。これらの細胞におけるGCCはmycタグを有する。最も高いGCCの発現について選択されたクローンは、293-GCC#2、HT29-GCC#2およびHT29-GCC#5であった。HT29-GCC#2も、抗GCC抗体分子を生成するための免疫原として使用した。追加的なGCC発現細胞はCT26細胞である。GCCを発現しているCT26細胞系を開発するために、pTOK58Dベクターを使用した。全長GCCを、重鎖をクローニングするために通常使用される部位にクローニングし、ルシフェラーゼを、軽鎖をクローニングするために通常使用される部位にクローニングした。CT26細胞にトランスフェクションした後、GCCおよびルシフェラーゼの両方の独立した発現を確認した。GCCの表面発現を、5F9抗体を使用したフローサイトメトリーによって確認した。クローン#32を、さらに試験するために選択した。

10

【0464】

T84結腸がん細胞系は、GCCを内因的に発現する。広範な細胞系パネルにおけるGCCのTaqman分析により、T84が、GCCのmRNAを発現する唯一の細胞系であることが明らかになった。T84細胞の細胞ペレットのGCCをGCC選択的なmAbで染色することにより、顕著なGCCタンパク質の発現が示された。

20

【0465】

GCC受容体レベルを放射標識したリガンド（ST毒素）で定量することにより、293-GCC#2細胞が、T84細胞よりも多くのGCCを発現し、一方HT29-GCC#2またはHT29-GCC#5が細胞当たり最も少ないGCC分子を発現することが示唆された。

細胞系 細胞全体の結合アッセイ（受容体/細胞）

HT29-GCC#2/#5 100,000
 T84の内因性GCC 300,000
 293-GCC 600,000

30

タンパク質を免疫することによるマウスmAbの生成：ヒトGCCの細胞外ドメイン/ヒトIg融合タンパク質（TOK107-hIg、50μg）を、ダルベッコリン酸塩緩衝食塩水（PBS；GIBCO、Grand Island、NY）に懸濁させ、等体積のフロイント完全アジュバント（Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO）を用いて乳化した。C57BL/6マウスを、エマルジョンを皮下部位3か所および腹腔内（i.p.）部位1か所に注射することによって免疫した。最初の免疫の2週間後、上記マウスに、フロイント不完全アジュバント中25μgのTOK107-hIgを用いてi.p.追加免疫を与えた。1週間後、少量の血液を尾静脈から採取し、TOK107-Igに対する血清の結合活性をELISAによって滴定した。マウスを、それらの力価が、ELISAで1：24,300を超えた場合、またはFACSで1：500を超えた場合に、融合のために選択した。選択されたマウスを、PBS中25μgのTOK107-hIgを注射することによって追加免疫した。4日後、P3細胞と融合させるために、1匹のマウスを安楽死させ、そして脾臓細胞懸濁物を調製し、PBSで洗浄した。1か月後、P3細胞と融合させるために、別のマウスからの脾臓細胞を調製した。GCCに特異的に結合する抗体の産生についてその融合細胞を試験したが、それは、TOK107-hIgへの結合について、非GCC抗原への結合またはIgGのFc領域への結合と比較して、ELISAによって試験する、ならびに、T84細胞への結合またはCaco-2細胞への結合またはHT-29クローン#2細胞への結合について、ベクター対

40

50

照への結合と比較して、およびGCCを発現していないMCF-7細胞への結合と比較して、FACSによって試験するというものであった。アイソタイプを、ISOSTRIP（登録商標）マウスモノクローナル抗体アイソタイプングキット（Roche Diagnostics Mannheim Germany）を使用して決定した。これらの免疫スキームおよびハイブリドーマ融合により、マウス抗GCC抗体分子である1D3、8E12、3G1および10B8が産生された。

【0466】

ヒトmAbの生成。ヒトモノクローナル抗体を作製するために、遺伝子操作されたマウスであるXENOMOUSE（Abgenix, Fremont, CA）（8～10週齢）を免疫した。Mendezら、Nature Genetics 15巻：146～156頁（1997年）、GreenおよびJakobovits J. Exp. Med. 188巻：483～495頁（1998年）を参照されたい。いくつかの免疫スキームを使用した。1つのスキームでは、ヒトGC-C細胞外ドメイン/ヒトIg融合タンパク質（TOK107-hIg）100マイクログラムを、ダルベッコリン酸塩緩衝食塩水（PBS；GIBCO, Grand Island, NY）に懸濁させ、等体積のフロイント完全アジュバント（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）を用いて乳化した。XENOMOUSE（商標）を、尾の基部の皮下部位3か所、および腹腔内（i.p.）部位1か所にエマルジョンを注射することによって免疫した。最初の免疫の14日後、マウスに、フロイント不完全アジュバント中50μgのTOK107-hIgを用いて追加免疫を与えた。血清試験により不十分な力価が示されたので、数週間休止した後、50μgのヒトTOK107-hIgの第2の追加免疫を与えた。2週間後、少量の血液を尾静脈から採取し、TOK107-Igに対する血清の活性をELISAによって、およびHT29-GCC#2細胞に対する血清の活性をFACSによって滴定した。マウスを、それらの力価が、ELISAで1：24，300を超えた場合、またはFACSで1：500を超えた場合に、融合のために選択した。その追加免疫のほぼ3か月後に、マウスを、フロイント不完全アジュバント中10⁷個のHT-29#2細胞を用いて追加免疫し、次の日にフロイント不完全アジュバント中50μgのTOK107-hIgを用いて追加免疫した。このスキームを用いて免疫したマウスは、ヒト抗GCC抗体分子である5F9および1D2を産生した。このスキームを用いて免疫したマウスは、ヒト抗GCC抗体分子である5F9および1D2を産生した。4日後、融合のために、上記マウスを安楽死させ、そして脾臓細胞懸濁物を調製し、PBSで洗浄した。GCCに特異的に結合する抗体の産生についてその融合細胞を試験したが、それは、TOK107-hIgへの結合について、非GCC抗原への結合またはIgGのFc領域への結合と比較して、ELISAによって試験する、ならびに、T84細胞への結合またはHT-29クローン#2細胞への結合について、ベクター対照への結合と比較して、およびGCCを発現していないMCF-7細胞への結合と比較して、FACSによって試験するというものであった。アイソタイプを、ELISAを使用して、またはFACSによってIgG特異的二次抗体またはIgM特異的二次抗体を使用して決定した。このスキームを用いて免疫したマウスは、ヒト抗GCC抗体分子である5F9および1D2を産生した。

【0467】

別のスキームでは、pkTOK111ベクターを含み、その表面にGCCの細胞外ドメインを発現しているCHO-GCC#27細胞（5×10⁶）を、BIP（尾の基部+腹腔内）免疫の間に、2週間で2回免疫原として使用した。血液をサンプリングした後、TOK107-hIgに対する抗GCC反応性をELISAによって同定するために、マウスを、HT29-GCC#2細胞を用いて追加免疫した（前の追加免疫以後3週間、または2か月超のいずれか）。最後の追加免疫の4日後に、細胞融合のために、それぞれの脾臓を回収した。GCCに特異的に結合する抗体の産生についてその融合細胞を試験したが、それは、TOK107-hIgへの結合について、非GCC抗原への結合またはIgGのFc領域への結合と比較して、ELISAによって試験する、ならびに、HT-29クローン#2細胞への結合について、ベクター対照への結合、T84細胞への結合、または

10

20

30

40

50

GCCを発現していないMCF-7細胞への結合と比較して、FACSによって試験するというものであった。アイソタイプを、ELISAを使用して決定した。これらの免疫スキームおよびハイブリドーマ融合により、ヒト抗GCC抗体分子である5H3、6H8、8C2、10C10、10D3および1C9が産生した。

【0468】

ヒトmAbを産生するハイブリドーマ：脾臓細胞を計数し、重鎖免疫グロブリン鎖または軽鎖免疫グロブリン鎖のいずれかを分泌することができないSP2/0骨髓腫細胞(ATCC番号CRL8-006、Rockville、MD)と、脾臓：骨髓腫の比率2：1で混合した。細胞を、12個の96ウェル組織培養プレート中のHAT選択培地中で、標準の手順に従ってポリエチレングリコール1450(ATCC)と融合した。融合の10～21日後、ハイブリドーマのコロニーが確認できるようになったので、培養物の上清を回収し、次いでELISAおよびFACSによってスクリーニングした。

10

【0469】

SLAM技術に基づく抗体生成：モノクローナル抗体もAbgenixのSLAM技術(Babcockら、PNAS 93巻：7843～7848頁(1996年))によって単離した。この方法の最初のステップは、XENOMOUSEマウスを免疫することであり、それは上記マウスを以下に記載されるスキームの中からのスキームによってGCC抗原で免疫するというものであった。次に、SLAM(選択リンパ球抗体法)ステップは、まず、リンパ細胞の大集団のうちで、所望の特異性または機能を有する抗体を産生している単一のリンパ球を同定するステップと、次いで、そのリンパ球から、その抗体の特異性をコードする遺伝情報を救出するステップとを含む。そのようなリンパ球(最初にIgG2抗体またはIgG4抗体を産生する)の可変領域を増幅し、IgG1アイソタイプを担持するベクターに移入する。

20

【0470】

SLAM抗体(例えば、Abx-229、Abx-012、Abx-221、Abx-020、Abx-338、Abx-106、Abx-198またはAbx-393)に対する免疫スキームは、キーホールリンペットヘモシアニンと結合体化させたTOK-hIgまたはTOK-hIgを使用することを含んだ。免疫は、足蹠または尾の基部と腹腔内の組み合わせのいずれかを介した。免疫原10μgの最初の免疫は、TITERMAX(登録商標)goldアジュバントまたはフロイント完全アジュバントのいずれかを含んだ。免疫原5μgの追加免疫を、Alum、TITERMAX(登録商標)goldアジュバントまたはフロイント不完全アジュバントのいずれかを使用して6～8回実施した。TITERMAX goldが最初のアジュバントであった場合、ミョウバン(alum)が追加免疫アジュバントであり、追加免疫は3～4日間隔で実施した。最初の免疫および追加免疫に、フロイント完全アジュバント、次いでフロイント不完全アジュバントを使用した場合、追加免疫は約2週間おきの間隔で実施した。4回目～6回目の追加免疫の際の力価の血清検査の後に、時にはさらに追加免疫した。4日後に回収する前の最終の追加免疫には、PBS中免疫原を使用した。

30

【0471】

ELISAによるmAbの分析。高タンパク質結合性96ウェルEIAプレート(Costar/Corning、Inc. Corning、NY)を、1ウェル当たり50μlのTOK107-hIgの2μg/ml溶液(1ウェル当たり0.1μg)でコーティングし、4で一晚インキュベートした。過剰な溶液を吸引し、そのプレートをPBS/0.05%Tween-20で洗浄し(3回)、次いで、非特異的な結合を阻害するために、1%ウシ血清アルブミン(BSA、フラクションV、Sigma Chemical Co.、MO)を用いて室温(RT)で1時間ブロッキングした。BSA溶液を除去し、各融合物プレートのウェルからのハイブリドーマの上清1ウェル当たり50μlを加えた。次いで、プレートを37で45分間インキュベートし、PBS/0.05%Tween-20で3回洗浄した。1%BSA/PBS中1：4000に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合体化ヤギ抗マウスIgG F(ab)2(H&L)または

40

50

1% BSA / PBS 中 1 : 4000 に希釈した抗ヒト IgG F (a b) 2 (H & L) (Jackson Research Laboratories, Inc., West Grove, PA) を各ウェルに加え、次いでプレートを 37 °C で 45 分間インキュベートした。洗浄した後、1 ウェル当たり 50 μ l の A B T S 溶液 (Z y m e d, S o u t h S a n F r a n c i s c o, C A) を加えた。陽性ウェルの 405 nm における緑色の強度を、Vmax マイクロタイタープレートリーダー (M o l e c u l a r D e v i c e s C o r p., S u n n y v a l e, C A) において評価した。次いで、陽性反応を示した全てのハイブリドーマウェルを 24 ウェルの培養に拡大し、限界希釈法によってサブクロニングし、E L I S A および F A C S によって分析した。最も良好に産生するサブクローン 3 つをさらに拡大した。

10

【0472】

フローサイトメトリーによる m A b の分析。E L I S A スクリーニングと並行して、融合物プレートの上清全てに対してフローサイトメトリー (F A C S) スクリーニングを行った。HT - 29 クローン # 2 またはトランスフェクトしていない HT - 29 細胞を、T 225 フラスコ (C o s t a r / C o r n i n g, I n c., C o r n i n g, N Y) 中の、10% ウシ胎仔血清 (G I B C O) を補充した D M E M (G I B C O) 中で成長させた。細胞を、V e r s e n e (G I B C O) を使用してフラスコ表面から引き離し、採取し、D M E M で 2 回、次いで 1% B S A / P B S 溶液で 1 回洗浄した。上記細胞を 1% B S A / P B S に再懸濁させ、 2×10^6 個の細胞を V 底 96 ウェルプレート (C o s t a r) の各ウェルに加え、2500 R P M で 5 分間、遠心分離した (洗浄) 。洗浄溶液を廃棄し、各融合物プレートウェルの洗浄物からの上清 1 ウェル当たり 50 μ l を加えた。プレートシーラー (L i n b r o / M P B i o m e d i c a l s, L L C, S o l o n, O H) を適用し、次いでプレートを穏やかにボルテックスして再懸濁させ、細胞と上清を混合し、4 °C (氷上) で 30 分間インキュベートした。次いでプレートを冷 1% B S A / P B S で洗浄し (3 回) 、1 : 50 希釈した、F I T C 結合体化ロバ抗マウス IgG F (A b) 2 (H & L) または F I T C 結合体化ヤギ抗ヒト IgG F (A b) 2 (H & L) (J a c k s o n) を 1 ウェル当たり 50 μ l を、4 °C で (暗所中、氷上で) 30 分間各ウェルに加えた。プレートを再度、冷 1% B S A / P B S 中で 3 回洗浄し、冷 1% パラホルムアルデヒド (S i g m a) / P B S に固定した。細胞をクラスターチューブ (C o s t a r) に移し、F A C S c a l i b u r フローサイトメーター (B e c t o n D i c k e n s o n, S a n J o s e, C A) で分析した。次いで、正のシフトを示したいずれのハイブリドーマウェルも 24 ウェルの培養に拡大し、限界希釈法によってサブクロニングした。

20

30

【0473】

内部移行アッセイ。抗 G C C 抗体分子の内部移行を、G C C 発現細胞およびベクター対照細胞の両方において、免疫蛍光顕微鏡検査を使用して試験した。細胞をカバーガラス上で成長させ、10 分間氷上に置いた後、冷培地中 10 μ g / m l の抗体と共に、氷上で 20 分間インキュベートした。内部移行については、抗体含有培地を新鮮な培地と交換し、上記細胞を 2 ~ 3 時間にわたって 37 °C にシフトさせるか、または氷上で維持した。P B S 中ですすぎ、室温で 4% パラホルムアルデヒドに短時間固定した後、細胞を 0 / 5% の T R I T O N X - 100 中で 15 分間透過処理した。試験抗体の局在性を、蛍光標識抗 IgG 抗体を使用して、レーザー走査型共焦点顕微鏡検査によって決定した。細胞を氷上においた場合、抗体分子は G C C 発現細胞の細胞表面に局在した。37 °C でインキュベーションすると、5 F 9 は、内部移行を示す、細胞膜内の強調染色を示した。ベクター細胞では内部移行は検出されなかった。

40

【0474】

抗 G C C 抗体分子の性質の概要。本明細書で生成する抗体の大部分を、一群の上記のアッセイにおいて試験した。表 7 に、それぞれの *i n v i t r o* における性質が要約されている。(T 84 = ヒト結腸腫瘍細胞、M C F 7 = ヒト乳房腫瘍細胞、W B = ウェスタンブロット、I P = 免疫沈降、I H C = 免疫組織化学検査 ; 内部移行では、M C F - 7 細胞

50

と比較してT84細胞が使用される)

表7. 抗GCC抗体分子の性質

【0475】

【表7-1】

抗体	ELISA		FACS							
	TOK1 07-hIg	TOK8 2-hIg	HT- 29#2	HT- 29	T84	MCF7	WB	IP	IHC	内部移行
8F1	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+		+	
3G1	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
10B8	+	-	+	-	+	-	-	+	+	
5H3	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
6H8	+	-	+	-	+	-	-	+		+
8C2	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
10C10	-	-	+	-	+	-	-	+		
10D3	+	-	+	-	+	-	+	+		
1D2	+	-	+	-	+	-	-	+		
4A12	+	-	+	-	+	-	-	+		
5F9	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
1C9	+	-	+	-	+	-	-	+		
Abx-012	+		+				-	+	+	+
Abx-015	+		-				+	+		
Abx-020	+		+				-	+		+
Abx-106	+		+					+		-
Abx-198	+		+					+		+
Abx-221	+		+					+		+

10

20

30

40

【0476】

【表 7 - 2】

Abx-229	+		+					+		+
Abx-252	+		+					+		+
Abx-338	+		+					+		+
Abx-393	+		+					-		+

さらに、一部の抗体を、GCC発現細胞においてSTペプチド誘導性のカルシウムイオンフラックスを阻害するそれらの能力について試験した。HT29-GCC#18細胞において、50nMのSTの存在下、抗GCC抗体分子の存在下または非存在下でcGMPアッセイを実施した。5F9によるカルシウムイオンフラックスが用量依存的に阻害された。他の抗体、5H3およびAbx-338も、STによって誘導されるカルシウムイオンフラックスを阻害した。

10

【0477】

抗GCC抗体分子の相対的な親和性の推定値。一部の抗GCC抗体分子の相対的親和性(EC50;最大半量の結合のための抗体濃度)を、TOK107-hlgに対するELISA測定値から、および、GCC発現細胞を用いたFACS測定値によって推定した。以下の表に一部の結果が示されている。

20

【0478】

表8. 抗GCC抗体分子のEC50

【0479】

【表8】

抗体	EC50, TOK107-hlg, M	EC50, 細胞, M
5F9	3.65×10^{-8}	1.24×10^{-9}
5H3	4.16×10^{-9}	4.7×10^{-7}
Abx-338	4.9×10^{-12}	9.0×10^{-8}
3G1	2.28×10^{-8}	5.8×10^{-10}
Abx-229	2.95×10^{-8}	
Abx-221	6.55×10^{-9}	
Abx-020	4.58×10^{-9}	
Abx-012	5.55×10^{-10}	
Abx-198	4.77×10^{-8}	

30

抗GCC抗体分子の親和性の測定。BIACORE(商標)T100システム(GE Healthcare, Piscataway, NJ)を使用して、22における抗GCC 5F9抗体の親和性を測定した。

40

【0480】

ステップ1: MA b 5F9(Prep A)を、pH4.0の10mM 酢酸ナトリウム中で20μg/mLに希釈し、参照5F9 MA b(Prep B)をpH4.0の10mM 酢酸ナトリウム中で10μg/mLに希釈した。各mAbを、数個のCM4

50

B I A C O R Eチップに、標準アミンカップリングを使用して共有結合的に固定化した。調製した各CM4チップについて、Prep A 5F9を2つのフローセルにわたって約75~100RUで固定し、一方、Prep B 5F9は1つのフローセルに約70~80RUで固定化した。各CM4チップの残りの第4のフローセルを参照フローセルとして使用した。

【0481】

ステップ2: GCC-ECD-Fc (TOK107-hIg)のストック濃度を、Protein Science、4巻: 2411頁(1995年)中でPaceら、およびCurrent Protocols in Protein Science、3.1.1~3.1.9(2003年)中でPaceおよびGrimsleyによって詳説されている方法を使用して決定した。

10

【0482】

ステップ3: ステップ1に記載の調製したCM4チップのそれぞれについて、GCC-ECD-Fcを2分間にわたって202nM~1.6nMの濃度範囲(2x段階希釈)で注入し、その後、7分間解離させた。試料を、ダブルリファレンスのために、いくつかの緩衝液注入サイクルを分散させて用いて3連で無作為に注入した。より顕著な解離速度(off-rate)の減衰データを得るために、3回の追加的な101nMのGCC-ECD-Fcの注入および3回の追加的な緩衝液の注入を、2分間の注入および4時間の解離時間を用いて実施した。全ての実験に対して100μL/分の流速を使用し、全ての表面を、10mMのグリシン-HCl(pH2.0)の20秒のパルスで再生させた。全ての試料を、100μg/mLのBSAを添加したHepes緩衝食塩水、0.005%のポリソルベート20、pH7.4(HBS-P)であるランニングバッファー中で調製した。

20

【0483】

ステップ4: 全てのセンサーグラム(時間に対する表面プラズモン共鳴のプロット)データを、Scrubber 2.0ソフトウェア(BioLogic Software、Campbell、Australia)を用いて加工し、マストラנסポート係数 k_m についての項を含めた1:1相互作用モデルに、CLAMP(商標)ソフトウェア(MyškaおよびMorton Trends Biochem. Sci. 23巻: 149~150頁(1998年))を使用してグローバルフィットを行なった。

30

【0484】

mAb固定化のレベルが低く保たれ、したがって各表面についてセンサーグラムデータの全体的な解析に起因する R_{max} が少なくとも12RUを下回る限りは、1:1モデルによってデータに対する非常に良好なフィッティングがもたらされた。ほとんどの場合、2つのPrep A 5F9表面のうちの1つが、信頼できるカイネティクス測定のためには低すぎる R_{max} (2RU未満)を有した。しかし、できる限り、同じCM4チップ由来のPrep A 5F9に結合しているGCC-ECD-Fcの2つのフローセルからのデータを同時にフィッティングした。高い R_{max} (>12RU)をもたらすmAb表面が調製された場合、センサーグラムは複合体カイネティクス(complex kinetics)を明確に示し、したがって1:1モデルはデータに十分にフィットしない。GCC-ECD-Fcが二価の構築物であり、固定化したmAbの表面密度が高いとGCC-ECD-Fcが表面に非常に強く結合する確率が最も増加する可能性があるという事実から、これは驚くべきことではない。この試験について報告された反復試験は、1:1相互作用モデルに良好にフィッティングするデータのみを含む。Prep A 5F9およびPrep B参照mAbについての全ての反復試験から得られた K_D および速度定数が、それぞれ表9および表10に列挙されている。

40

【0485】

表9: 固定化したPrep A 5F9モノクローナル抗体へのGCC-Fcの結合

【0486】

【表 9】

反復試験	R _{max} (RU)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	K _D (pM)
A	11	1.06 X 10 ⁵	1.19 X 10 ⁻⁵	112
B	8	1.20 X 10 ⁵	1.10 X 10 ⁻⁵	91.7
C	5	1.07 X 10 ⁵	2.15 X 10 ⁻⁵	201
D	9	1.22 X 10 ⁵	1.11 X 10 ⁻⁵	91.0
E	6,4	9.64 X 10 ⁴	1.77 X 10 ⁻⁵	184
平均 (95%信頼区間)		1.10 (0.13) X 10 ⁵	1.46 (0.59) X 10 ⁻⁵	136 (65)

10

表 10 : 固定化した P r e p B 5 F 9 モノクローナル抗体への G C C - F c の結合
【 0 4 8 7 】

【表 10】

20

反復試験	R _{max} (RU)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	K _D (pM)
F	9	9.68 X 10 ⁴	7.64 X 10 ⁻⁶	78.9
G	8	1.20 X 10 ⁵	1.24 X 10 ⁻⁵	103
H	7	9.09 X 10 ⁴	9.57 X 10 ⁻⁶	105
I	12	1.21 X 10 ⁵	1.54 X 10 ⁻⁵	127
平均 (95% 信頼区間)		1.07 (0.25) X 10 ⁵	1.13 (0.54) X 10 ⁻⁵	103 (31)

30

抗体への毒素の結合体形成

メイタンシン。マウス抗ヒト (M A H) - I g G - D M 1 および抗 G C C - D M 1 を、米国特許第 6 , 4 4 1 , 1 6 3 号に記載のメイタンシノイドの細胞傷害性結合体を産生するための 1 ステッププロセスに従って生成した。

【 0 4 8 8 】

簡単に述べると、公開された手順を使用してメイタンシノイドを抗体と結合体化させた。DM 1 を、S M C C ヘテロ二官能性架橋剤 (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 - カルボキシラートを使用して抗体と結合体化させた ; C h a r i ń、C a n c e r R e s e a r c h 5 2 巻 : 1 2 7 ~ 1 3 1 頁 (1 9 9 2 年) 。 D M 4 を、S P D B ヘテロ二官能性架橋剤を使用して抗体と結合体化させた (W i d d i s o n ら、J . M e d . C h e m . 4 9 巻 : 4 3 9 2 ~ 4 4 0 8 頁 (2 0 0 6 年)) 。結合体化させた抗体を、未反応の反応副生成物から、S E P H A D E X (商標) G - 2 5 カラムを使用したゲル濾過クロマトグラフィーによって分離する。

40

【 0 4 8 9 】

アウリスタチン。アウリスタチンでの結合体形成は、公開された手順を使用して実施することができる (例えば、D o r o n i n a ら、N a t u r e B i o t e c h .、2 1

50

巻：778～784頁（2003年）。一般に、アウリスタチンは、抗体鎖のシステインに連結する。システインへの連結は、まず抗体分子内のジスルフィド結合を還元することによって実現される。還元プロセスを調節することにより、全部である必要はないが、一部の鎖間のジスルフィド結合に還元を限定しようとする。したがって、アウリスタチンは、遊離のシステインに結合することができる。結合体形成反応をクエンチした後に、反応副生成物を除去し、緩衝液を交換して所望の処方物にする。

【0490】

簡単に述べると、7.6 mg/mLの抗GCC抗体分子を37 で予め平衡化し、次いで15%体積の500 mM ホウ酸ナトリウム、pH 8.0を加えてpHを7.5～8.0に上昇させる。溶液は、1 mMのDTPAも含有する。抗体を、抗GCC抗体分子1モル当たり2.6当量のトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）を加えることによって部分的に還元し、37 で攪拌する。28分後、還元された抗GCC抗体分子の溶液を氷上に置き、次いで直ちに4.8～4.9モル当量（抗GCC抗体分子に対して）の、DMSO中20.5 mM溶液としての薬物リンカー（例えば、mc-vc-MMAFまたはmc-vc-MMAEまたはmc-MMAF）で処理する。追加的なDMSOを導入して、混合物を体積で10% DMSOにする。反応混合物を約90分間氷上で攪拌した後、5倍モル過剰のN-アセチルシステイン（mc-vc-MMAFに対して）で処理する。その結合体をタンジェンシャルフロー濾過によって単離し、まず約10 mg/mLに濃縮し、次いで約10ダイアフィльтраーション容積（diavolume）のPBSを用いてダイアフィльтраーションした。得られた抗体薬物結合体は、抗体当たり約4つの薬物-リンカー単位の平均薬物の負荷量を有した。便宜上、以下の実施例および添付の図面では、アウリスタチン免疫結合体は、薬物の負荷量に関係なく以下の省略形式で言及される：「Ab-vc-MMAF」は、mc-vc-MMAFと結合体化させた抗GCC抗体分子を指し；「Ab-vc-MMAE」は、mc-vc-MMAEと結合体化させた抗GCC抗体分子を指し；「Ab-mc-MMAF」は、mc-MMAFと結合体化させた抗GCC抗体分子を指す。特異的な抗GCC抗体分子を含む免疫結合体は同じ形式で言及される：例えば、5F9-vc-MMAF、5F9-vc-MMAE、および5F9-mc-MMAF。

10

20

【0491】

抗体当たり約2つの薬物-リンカー単位の平均薬物負荷を有する抗体薬物結合体を調製するために、プロトコール（上記）を、TCEPの量を50%減らすことによって変更する。薬物リンカーの量も50%減らす。対応する抗体薬物結合体をAb-vc-MMAF（2）と略す。

30

【0492】

5F9 vcMMAEの調製

上記の一般的な方法と同様の方法を使用して、5F9 mAbをMMAE（式（XII））と称されるアウリスタチン誘導体と、本明細書に記載のvc（Val-Cit）リンカーを使用して結合体化させ、5F9 vcMMAEと称される免疫結合体を創製した。vcリンカーのMMAE（Seattle Genetics, Inc., Bothell, WA）への結合体形成を以前に記載されている通り完了した（例えば、US 2006/0074008を参照されたい）。

40

【0493】

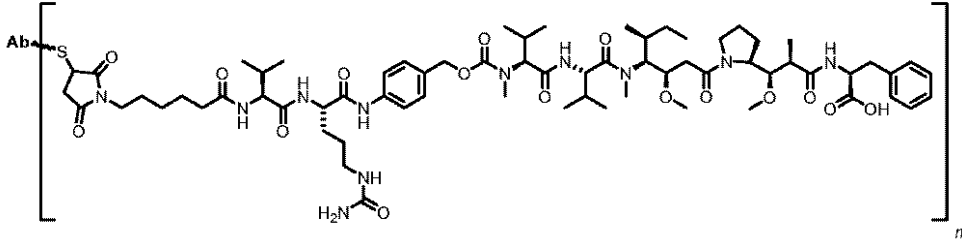
簡単に述べると、pH 5.8の100 mMの酢酸塩中の17.8 mg/mLの5F9 mAb溶液を、0.3 Mのリン酸二ナトリウムを用いてpH 8に調整し、最終のmAb濃度11.3 mg/mLを得た。次いで、最終濃度を1 mMにするために反応混合物にDTPAを加えた。次いでmAbを、2.28モル当量のTCEP（mAbのモルに対して）を加えることによって部分的に還元し、次いで37 で1.5時間攪拌した。次いで、部分的に還元されたmAb溶液を4 まで冷却し、4.4モル当量のvcMMAE（抗体のモルに対して）をDMSO中20.3 mM溶液として加えた。混合物を22 で30分間攪拌し、次いで5モル当量のN-アセチルシステイン（vcMMAEのモルに対して）を

50

加えた後さらに15分間撹拌した。過剰なクエンチされたv c M M A Eおよびその他の反応構成成分を、10ダイアフィルトレーション容積のP B S、p H 7 . 4を用いる免疫結合体の限外濾過/ダイアフィルタレーションによって除去した。生じた免疫結合体を5 F 9 v c M M A Eと名付け、それは次式を有する：

【0494】

【化50】



10

式中、A bは5 F 9 m A bであり、mは1～8である。平均薬物の負荷量(m)は約3.6であった。

【0495】

細胞傷害性アッセイ。各抗体の、標的発現細胞に結合し、内部移行し、それを死滅させる能力を測定するために、細胞傷害性アッセイを実施した。このアッセイでは、細胞を、さまざまな濃度の結合体化させていない一次抗G C C抗体および固定された無毒性濃度のD M 1と結合体化させた抗ヒトF c二次抗体と一緒に(間接的細胞傷害性)、またはさまざまな濃度の毒素と結合体化させた抗G C C m A bと一緒に(直接的細胞傷害性)インキュベートした。インキュベーションの4日後に細胞の生存率をW S Tアッセイによって測定した。ヒト抗G C C抗体の、293-G C C # 2細胞に対する相対的な効力が表8に示されており、これは、D M 1と結合体化させたマウス抗ヒトI g G m A bを使用して決定した(M A H - I g GをクローンH P 6 0 7 (C R L 1 7 5 3、A T C Cから精製した)。5 F 9および229が最も強力な抗G C C m A bであり、そのL D 5 0は26 p Mおよび78 p Mである。本明細書では示されていないが、誤差は、反復数の範囲で測定したところ一般にこれらの平均の20%以内である、または標準偏差は2反復数超である。

20

30

【0496】

表11.293-G C C # 2細胞に対する抗G C C抗体の細胞傷害性アッセイの結果

【0497】

【表 1 1】

抗 GCC 抗体	LD50 (pM)
5F9	26
229	78
106	166
221	207
338	267
12	279
20	569
5H3	722
10D3	1596
8C2	2038
10C10	2443
1D2	>3055
6H8	>4818
393	>5400
198	>5400

10

20

30

細胞表面の結合。結合体化させていない5F9またはアウリスタチンと結合体化させた5F9の結合を、フローサイトメトリーを使用した間接免疫蛍光法アッセイによって評価した。1ウェル当たり細胞 1×10^6 個を、V底96ウェルプレートに播種し、 $1 \sim 0.001 \mu\text{g/ml}$ の抗体の段階希釈物を用いて氷上で1時間インキュベートした。細胞を氷冷のPBS中3%FBSで2回洗浄し、1:200マウス抗ヒトPE IgG (Southern Biotech 2043-09)と一緒に氷上で1時間インキュベートした。細胞を再度洗浄し、BD FACS Canto IIフローサイトメーターにおいてフローサイトメトリーによって分析した。データを、FACS Canto IIシステムソフトウェアを使用して解析し、平均蛍光強度を決定した。

40

【0498】

エピトープマッピング。エピトープを同定するために複数の戦略を開始した。ペプチドアレイ。15アミノ酸のオーバーラップを有する20-マー(mer)のペプチドを生成し、細胞外ドメイン(ECD)をGCCの膜貫通ドメイン(アミノ酸1~440)中に包含した。ペプチドを合成し、アレイとして提供し、ガラススライド上に固定化した。直鎖状ペプチドが結合するために十分であるかを決定するために、アレイを抗GCC抗体のそれぞれとハイブリダイズさせた。Abx-198はペプチド55および56に結合したが、3G1抗体、8F1抗体および10B8抗体は、ペプチド55、56および57に結合した。これらのペプチドは配列

【0499】

50

【化5 1】

ILVDLFDNQYLEDNVTAPDYMKNVVLVLTLS (配列番号:225)

にまたがっている。ペプチド間のオーバーラップ領域は

【0500】

【化5 2】

LEDNVTAPDY (配列番号:314).

である。Abx - 012、Abx - 338およびAbx - 106は、ペプチド71および72に結合した。

【0501】

【化5 3】

FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV (配列番号:226),

、および配列

【0502】

【化5 4】

RNLTFEGYDGPVTLDD (配列番号:315)

は2つのペプチドにオーバーラップしている。

【0503】

GCC切断変異体への細胞表面の結合。GCC ECDの切断変異体を、およそ50アミノ酸の欠失増大を表すFLAGタグをつけた構築物(pFLAG-CMV-3)として生成した(FL成熟ペプチドおよび8つの切断物(1~32、1~49、1~94、1~128、1~177、1~226、1~279、1~229および1~379))。構築物を293細胞において発現させ、その後、抗GCC抗体分子によって免疫沈降させ、GCC ECD変異体でトランスフェクトした293細胞の溶解物中のFLAGエピトープについてウェスタンブロットを行った。抗体5F9は1~32変異を有する細胞に結合するが、1~49変異を有する細胞には結合しない。5F9のGCCへの結合は、そのタンパク質がアミノ酸33~50の間で切断されている場合に失われ、これは、この領域が5F9による、GCC上のその結合性エピトープの認識に關与することを示唆している。しかし、ラットおよびマウスのGCC配列は、この領域においてヒトGCCと同一であり、5F9はマウスまたはラットのGCCに結合しないので、5F9抗体は、ヒトGCCのアミノ酸33~50が存在することによって形成される高次構造エピトープに結合する可能性がある。

【0504】

(実施例2)

毒素リンカーの選択/ADCの特徴づけ

抗体薬物結合体(ADC)戦略では、非常に強力な毒素を抗体と結合体化させること、毒素の細胞傷害性は、標的的特異的に腫瘍を対象とすることができ、正常組織の抗原陰性細胞に影響を及ぼすことなく、抗原を発現している腫瘍細胞に毒素が送達され、したがって全身性の毒性を低下させることができる。アウリスタチン(ドラスタチン10の類似体)およびメイタンシンクラスの毒素を、抗GCC mAbとのADCとして評価した。これらの毒素は全て微小管重合の阻害剤であり、抗有糸分裂薬として作用する。遊離の毒素と接触させた細胞における試験により、遊離の毒素の細胞傷害性は、GCC発現細胞とGCCを有さない対照細胞を区別しないことが示された。これらの遊離の毒素は、表9に示されているように、HT29-ベクター対HT29-GCC#5細胞において、293-ベクター、293-GCC#2細胞に対して強力であった。

【0505】

表12. 遊離毒素の細胞傷害性

10

20

30

40

50

【 0 5 0 6 】

【表 1 2】

細胞系	MMAE		MMAF		DM1		DM4	
	LD50	SD	LD50	SD	LD50	SD	LD50	SD
293 ベクター	0.07	6	3.37	2.34	2.83	2.00	0.79	0.79
293 GCC#2	4	3	2.07	1.48	2.96	2.23	0.83	1.03
HT29	4	1	5.21	1.91	2.69	1.09	0.57	0.27
HT29 GCC#5	7	4	7.65	3.32	1.00	0.14	0.40	0.17

10

種々の毒素を抗体に結合体化させる化学反応は異なっており、それはリンカーの安定性に影響を及ぼす。リンカーの安定性は、血液中または標的でない組織中での薬物放出に対する腫瘍での薬物放出に影響することによって治療域に影響を及ぼす。理想的なADCリンカーは、血液中では高い安定性を有するが、標的媒介性細胞侵入に際して効率的に遊離する。

【 0 5 0 7 】

20

アウリスタチン

3つのアウリスタチン-リンカー対を評価した。まず、これらの結合体を *in vitro* で評価し、次に大規模 *in vivo* 試験のための毒素-リンカーを決定するために、5F9をvcMMAE、vcMMAFおよびmcMMAFと結合体化させた（結合体当たり20mg）。

【 0 5 0 8 】

アウリスタチンは、天然産物であるドラスタチン10に関連する合成毒素である。MMAEとMMAFはわずかに異なり、MMAF型はR2位にカルボン酸基を有し、それにより遊離の毒素としての細胞浸透性および効力が低下している。MMAEはPgp薬物ポンプの基剤であるが、MMAFはそうではない。

30

【 0 5 0 9 】

アウリスタチンを、部分的に抗体を還元するプロセス、マレイミド薬物誘導体との反応、過剰なシステインでのクエンチング、濃縮および緩衝液のPBSへの交換によって鎖間システインと結合体化させる。アウリスタチンは、細胞内に取り込まれると切断されるカテプシンB感受性ジペプチドリinker、または切断不可能なリンカーに結合させることができる。

【 0 5 1 0 】

vcモノメチルアウリスタチン(vcMonoMethylAuristatin)リンカーでは、パリンシトルリンジペプチド結合が、p-アミノベンジルカルバメート(PAB)基によって薬物に結合し、マレイジミド(maleimidido)カプロイル結合体形成基によって抗体に結合している。内部移行すると、ジペプチドリinkerはリソソームのプロテアーゼであるカテプシンBによって切断され、PAB基は自己破壊し、遊離の毒素が放出される。このリンカーは、血清の安定性を維持しながらカテプシンBによる細胞内の薬物放出を最大にするように設計された。

40

【 0 5 1 1 】

アウリスタチンは、ペプチダーゼ感受性リンカーを用いずに、マレイミド結合体形成基に直接結合したMMAFなどの切断不可能なリンカーによって抗体に連結することもできる。MC結合体化ADCも標的媒介性細胞死(target mediated cell kill)において有効である。

【 0 5 1 2 】

50

切断不可能なアウリスタチン結合体についての薬物放出の機構は、リソソームにおける一般的な抗体分解によるものと考えられる。LC/M5試験により、Ab-mcMMAF結合体が単一のシステイン付加物の形態で毒素を放出することが報告されている。

【0513】

抗体薬物結合体の結合

5F9抗体薬物結合体の全てが、293-GCC#2細胞に同等に良好に結合した。表10に、293-GCC#2細胞の濃度を増加させたときの5F9結合体の平均蛍光強度が示されている。他の試験により、5F9-SPDB-DM4結合体は293-GCC#2細胞に濃度依存的に結合したが、209-SPDB-DM4抗体は結合しなかったことが決定された。

【0514】

表13. 293GCC#2細胞における5F9および5F9結合体の結合アッセイからのMFIのチャート：

【0515】

【表13】

	5F9 または 5F9 結合体の $\mu\text{g/ml}$					
	0.001	0.004	0.016	0.063	0.25	1
5F9	500	937	2465	6615	7816	8026
vcMMAE	445	696	1787	4854	7296	7416
vcMMAF	440	707	1502	4830	7563	7779
mcMMAF	483	776	2106	5353	7398	7585

5F9-アウリスタチン毒素結合体を、GCC核酸でトランスフェクトし、GCCの発現について選択した種々の細胞の直接的な細胞傷害性アッセイにおいて試験した。GCCの表面発現のレベルを調査することにより、293GCC#2細胞は高量のGCCを発現し；HT29#2およびCT26#2.5細胞はGCCを中～低レベルで発現し；CT26#32細胞はGCCを高レベルで発現し；HT29GCC#5およびHT29GCC#18は低量のGCCを発現することが見いだされた。表11に、標的発現細胞における、または野生型細胞またはベクター対照細胞における、3種のアウリスタチン結合体の細胞傷害性データをもたらす複数の試験を編集したものが示されている。標的増強性死滅(target enhanced killing)が、293GCC#2細胞に対する5F9と結合体化させた毒素の全ての事例において観察され、ここではMMAF対MMAEを使用した場合に治療域がはるかに増加する。MMAFの切断可能な形態および切断不可能な形態の両方も同様に強力であった。陰性対照として、無関係の標的に対して得られるヒトIgG1モノクローナル抗体であり、GCCに対する反応性がないsc209抗体を用いた抗体薬物結合体も作製した。209ADC対5F9vcMMAFADCを用いた直接的な細胞傷害性アッセイにより、293細胞モデルおよびHT29細胞モデルにおいて、標的増強性細胞死滅(target enhanced cell kill)が示された。細胞系の中で5F9と結合体化させた毒素の活性を比較することにより、細胞傷害性のレベルが、その細胞が発現しているGCCの量といくらかの相関を有することが示される。これらのデータは、最大量のGCCを発現する細胞系の少なくとも一部が、少量のGCCを発現する細胞よりも上記結合体の細胞傷害性活性を受けやすかったことを示唆している。細胞当たりの相対的なGCC数については実施例1を参照されたい。細胞傷害性レベルの差における別の因子は、野生型の細胞系の中で変動し得る上記結合体の内部移行または細胞内プロセッシングにおける差であり得る。

10

20

30

40

50

【 0 5 1 6 】

表 1 4 . 抗 G C C アウリスタチン A D C の細胞傷害性。

【 0 5 1 7 】

【 表 1 4 - 1 】

細胞系	5F9 結合体の LD 50 (nM)			209 結合体の LD50 (nM)
	vcMMAE	vcMMAF	mcMMAF	
293 ベクター	128	> 10	> 10	
293 GCC # 2	0.37	0.001	0.002	
293 ベクター	1.8	>10	>10	
293 GCC # 2	0.13	0.005	0.007	

10

【 0 5 1 8 】

20

【 表 1 4 - 2 】

293 ベクター		>10		>10
293 GCC # 2		0.0004		>10
HT 29 WT	84	> 10	> 10	
HT 29 GCC #2	24.1	0.127	3.1	
CT 26 WT	> 500	> 10	> 10	
CT 26 GCC #2.5	> 500	> 10	> 10	
CT 26 GCC #32	267	0.004	0.064	
HT 29 ベクター	520.6	> 10,000	> 10,000	
HT 29 GCC #5	653.5	563.2	> 10,000	
HT 29 GCC #18	554.6	> 10,000	> 10,000	
HT29	0.93	>10	>10	
HT29 GCC#5	0.59	0.32	>10	
HT29		>10		>10
HT29 GCC#5		0.035		≧10

30

40

これらの効力が *i n v i v o* に移された場合、*m c* と *v c M M A F* の間の同等の効力

50

で、m c M M A Fについて予測されるM T Dが高くなり、この結合体についてより大きな治療域が示唆される。

【0519】

メイタンシン

5 F 9 - メイタンシン A D C は、2 9 3 - G C C # 2 細胞において強力な標的増強性死滅を示した(表12)。興味深いことに、5 F 9 - メイタンシン結合体がどちらも、2 9 3 モデルにおいて標的増強性死滅を示したが、H T 2 9 モデルでは標的増強性死滅は観察されず、メイタンシン結合体を *i n v i v o* で評価するためのこのモデルの有用性に対する懸念が生じた。さらに、この差の根拠は、容易に説明することはできないが、細胞内の結合体の内部移行またはプロセッシングにおける種々の受容体の密度および/または差に起因する可能性がある。陰性対照として、無関係の標的に対するヒト I g G 1 モノクローナル抗体であり、G C C に対して反応性を有さない s c 2 0 9 抗体を用いた抗体薬物結合体も作製した。2 0 9 A D C 対 5 F 9 A D C を用いた直接的な細胞傷害性アッセイにより、全ての 5 F 9 結合体に関して 2 9 3 細胞モデルにおける標的増強性細胞死滅が示される。H T 2 9 細胞モデルでは、5 F 9 - D M x 結合体および 2 0 9 - D M x 結合体はこれらの細胞を同等に良好に死滅させ、これは、これらの細胞における非標的的特異的な死滅機構を示している。

10

【0520】

表15 抗G C C メイタンシン A D C の細胞傷害性

【0521】

20

【表15】

細胞系	LD50 (nM)			
	5F9-SMCC-DM1	209-SMCC-DM1	5F9-SPDB-DM4	209-SPDB-DM4
293 ベクター	25.3		10.4	
293 GCC#2	<0.004		<0.004	
293 ベクター	32	11	13	7.4
293 GCC#2	<0.000004	6.7	<0.000004	4.8
HT29	22.4		7.7	
HT29 GCC#5	20.8		9.1	
HT29	22	12	4.8	2.1
HT29 GCC#5	30	22	5.8	4.2

30

40

(実施例3)

i n v i v o 評価

腫瘍モデル:

5 F 9 A D C の *i n v i v o* 細胞傷害性を、マウス異種移植片モデルにおいて評価した。最初の *i n v i v o* での研究は、H T 2 9 - G C C # 5 細胞系および H T 2 9 - G C C # 1 8 細胞系を用いて行った。2 9 3 - G C C # 2 細胞系も、*i n v i v o* における成長について試験し、段階的に移植可能なトロカールモデルとして開発した。

【0522】

50

異種移植片モデルにおけるGCCの発現レベルが、転移性結腸がんの患者におけるGCCの発現レベルと関連性があるかどうかという疑問に取り組むために、GCCの発現レベルを異種移植片組織、ヒトの原発性結腸腫瘍および転移をIHC分析することによって比較した。新鮮な凍結させた細胞系および組織のパネルを、GCC 3G1に対するマウスmAbを用いたrIHCによるGCCの定量に利用した。IHC定量のために、スコア化を、半定量的0～3スコア化システムを使用して行った。腫瘍モデルのGCCレベル 臨床のGCCレベルである場合、モデリングは、正確である、または臨床で必要とされる曝露が過大評価される可能性がある。腫瘍モデルのGCCレベル>臨床のGCCレベルである場合、モデリングは、臨床で必要とされる曝露を過小評価し得る。

【0523】

転移性の試料におけるGCCの発現にいくらかの変動性があったが、HT29-GCC#5細胞およびHT29-GCC#18細胞による発現は、転移性の試料の多くの範囲内であった。IHCから、HT29-GCC#5細胞およびHT29-GCC#18細胞のGCCの染色は転移性細胞のGCCの染色と等量またはそれより低かった。このデータは、本発明者らの腫瘍モデルが、metCRCの臨床試料に見られるレベルに匹敵するレベルでGCCを発現することを示唆している。

【0524】

表16に、192時間の時点で回収したさまざまな組織についてのシンチレーション計数が、示した3匹の動物の平均で示されている。5F9は、HT29-GCC#5腫瘍対HT29-ベクター腫瘍に優先的に集積したが、209はあまり特質的な集積を示さなかった。この結果により、5F9抗体薬物結合体が、GCCを発現している腫瘍に集積することを予測し得ることが支持された。評価した全ての他の組織では、5F9対mAb 209抗体の集積のレベルにはほとんど差がなかった。

【0525】

HT29-GCC#5腫瘍担持マウスおよびHT29-ベクター腫瘍担持マウスにおける放射標識した5F9の*in vivo*分布

腫瘍担持マウスにおいて、抗GCC抗体5F9と陰性対照抗体sc209（無関係の細胞表面標的をターゲティングするヒトIgG1モノクローナル抗体）の腫瘍ターゲティングおよび*in vivo*生体分布を評価するために放射性イメージング試験を実施した。抗体を、DTPAを二官能性キレート化剤として使用して¹¹¹Inで放射標識した。腫瘍ターゲティングおよび正常組織における経時的な生体分布を含めた*in vivo*における挙動を、GCC(-)およびGCC(+)腫瘍の両方を有するマウス二重腫瘍モデルを用いて調査した。*in vivo*画像(SPECT/CT)を獲得し、空間分解を補うために、組織放射能計数法を使用した。

【0526】

ヌードマウスにおいて、右側にHT29-ベクター腫瘍、左側にHT29-GCC#5腫瘍を用いて皮下腫瘍を成長させた。動物当たり0.3mCi = 15μgの抗体を投薬した。1群当たり動物は3匹であり、群から1h、24h、48h、72h、120hおよび192hにおいて収集した。

【0527】

192hにおける群の動物からの組織の調査により、5F9および209がどちらも同程度に大部分の正常組織（例えば、血液、心臓、胃、小腸、大腸、筋肉および皮膚）およびHT29-ベクター対照腫瘍に集積することが示された。Ab209は肝臓に5F9よりもわずかに高いレベルで集積し、5F9は肺、脾臓および腎臓に209よりもわずかに高いレベルで集積した。HT29-GCC#5腫瘍では、5F9が209のレベルよりも2倍超高いレベルで優先的に集積した。この結果により、5F9抗体薬物結合体がGCC発現腫瘍に集積することを予測できることが支持された。

【0528】

腫瘍への抗体集積のカイネティクスを理解するために、試験全体を通して全ての時点について各抗体についての腫瘍データを得た。5F9抗体の集積を示した唯一の組織はGC

10

20

30

40

50

C 発現腫瘍である。他の全ての組織における放射能レベルは比較的平らなままであり、5 F 9 のレベルと 2 0 9 のレベルとの間に殆ど差はなかった。5 F 9 は H T 2 9 - G C C # 5 腫瘍に優先的に集積したが、2 0 9 は少しも集積を示さなかった。この結果により、5 F 9 抗体薬物結合体が G C C を発現している腫瘍に集積することを予測し得ることが支持された。

【 0 5 2 9 】

表 1 6 . G C C を発現している腫瘍に ^{111}In 標識した G C C 特異的モノクローナル抗体は集積するが対照モノクローナル抗体は集積しない。

【 0 5 3 0 】

【 表 1 6 】

	平均 % ID 5F9	平均 % ID 対照 IgG
1時間	2.816+/-0.133	2.494+/-0.167
24時間	3.057+/-0.107	3.010+/-0.630
72時間	4.485+/-1.029	3.564+/-0.152
120時間	5.162+/-1.012	3.412+/-0.048
192時間	6.550+/-1.015	2.782+/-0.085

10

20

G C C を発現している腫瘍における 7 日間にわたる放射標識した 5 F 9 の集積により、週 1 回の投薬スケジュールが支持された。

【 0 5 3 1 】

H T 2 9 - G C C # 5 s . c . 腫瘍における試験的な効力試験

有効な結合体および投薬レジメンを決定するために、H T 2 9 - G C C # 5 腫瘍担持マウスにおいて試験を実施した。マウスに、単回用量または複数回の用量を投薬した。これらの試験により、高レベルの毒素結合体（例えば、q 3 d x 5 スケジュールにおいて 1 5 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ の 5 F 9 v c M M A F ）であまりに高頻度に投薬すると毒性があることが判明した。別の試験により、q 1 4 d x 5 スケジュールは、このモデルにおいては余りにも頻度が少ないため、いくつかの毒素結合体が対照と比較して有意な効力を示すことができないことが判明した。さらに、このモデルにおけるメイタンシノイド - 抗体結合体を用いた P D 試験により、用量依存的なホスホヒストン (p h o s p h o h i s t o n e) 集積が D M 4 毒素のみに伴い、D M 1 毒素には伴わないことが実証された。このモデルにおける別の試験により、いくつかの腫瘍の成長が非特異的な 2 0 9 - 毒素結合体によって阻害されることが示された。これらの結果により、他の i n v i v o モデルを評価することが必要であることが示唆された。

30

【 0 5 3 2 】

2 9 3 - G C C # 2 腫瘍担持マウスにおける 5 F 9 A D C を用いた P K / P D 試験。

【 0 5 3 3 】

代替の腫瘍モデルでは 2 9 3 - G C C # 2 細胞を使用した。2 9 3 - G C C # 2 腫瘍担持マウスにおける 5 F 9 A D C についての P D 試験を実施した。マウスに、単回用量の 5 F 9 v c M M A F を 7 5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ または 1 5 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ で投薬し、毒素の、腫瘍細胞に対する抗有糸分裂効果を試験するために、ホスホヒストン H 3 を P D 解析するための血清を 1 時間 ~ 4 日間の時点で取得した。ホスホヒストン H 3 を腫瘍のパラフィン包埋切片の抗体 (U p s t a t e B i o t e c h n o l o g y , n o w M i l l i p o r e , B i l l e r i c a , M A) 染色によって検出した。表 1 7 のデータにより、A D C のそれぞれが、腫瘍における p H 3 陽性細胞集団において有意な増加を引き起こしたことが示され、このことは、A D C のそれぞれが 7 5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 毒素投与量相当量および 1 5 0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 毒素投与量相当量のどちらでも腫瘍に到達することができ、そしてそれらが腫

40

50

瘍細胞に対して所望の抗有糸分裂効果を有していることを示している。

【 0 5 3 4 】

表 1 7 . 5 F 9 A D C の単回 i v 投与後の有糸分裂における細胞の停止によって評価した P D 反応 (p H 3 陽性腫瘍細胞の %) 。

【 0 5 3 5 】

【表 1 7 - 1 】

	pH3 陽性腫瘍 細胞の平均 %	SD
ビヒクル対照	2.556801	2.37707
5F9-vcMMAE 75 µg/kg 1 時間	4.525187	0.178882
4 時間	2.551616	1.688255
8 時間	4.243988	0.352938
24 時間	9.8199	4.82057
48 時間	8.692061	4.756786
96 時間	8.628345	1.065456
5F9-vcMMAE 150 µg/kg 1 時間	3.334943	1.351667
4 時間	2.78543	1.690216
8 時間	4.575611	1.130484
24 時間	13.78776	3.343155

10

20

30

40

【 0 5 3 6 】

【表 1 7 - 2】

48 時間	14.26067	5.448921	
96 時間	14.67942	1.827724	
5F9-vcMMAF 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 1 時間	4.235245	0.617585	
4 時間	4.18364	0.846752	10
8 時間	4.930098	0.54746	
24 時間	20.22484	2.453935	
48 時間	9.920771	3.788795	
96 時間	10.38187	1.896461	20
5F9-vcMMAF 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 1 時間	3.465674	1.341187	
4 時間	4.416646	0.807636	
8 時間	8.594385	4.005021	
24 時間	21.53718	7.25212	30
48 時間	15.15814	4.28407	
96 時間	11.12288	2.150476	
5F9-mcMMAF 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 1 時間	5.365582	1.14198	
4 時間	4.044478	0.992449	40
8 時間	8.228597	3.098222	
24 時間	14.10734	1.611093	

【 0 5 3 7 】

【表 17 - 3】

48時間	19.37223	8.146504
96時間	7.749388	1.180759
5F9-mcMMAF 150 µg/kg 1時間	3.212482	0.509604
4時間	4.722554	1.577531
8時間	9.105349	5.963128
24時間	27.51416	10.96057
48時間	13.34043	3.414961
96時間	15.60917	3.386154

10

20

同様の試験により、5F9vcMMAF、5F9-SPDB-DM4および5F9-SMCC-DM1で処置した、293-GCC#2腫瘍担持マウスにおけるホスホヒストンレベルを測定した。マウスに、150 µg/kgの単回用量を投薬し、全抗体および毒素と結合体化させた抗体の両方をPK解析するために、血清を1時間～21日間の時点で取得した。293-GCC#2腫瘍におけるホスホヒストンH3陽性細胞の百分率は3種のADC：5F9vcMMAF、5F9-SMCC-DM1および5F9-SPDB-DM4の全てに应答して増加した。最大のホスホヒストンH3レベルは、ベースラインよりも3～5倍増加し、ピークは注射の24時間後であった。

30

【0538】

5F9vcMMAFおよび5F9-DMxを用いた293-GCC#2s.c.腫瘍における効力試験

5F9-SPDB-DM4、5F9-SMCC-DM1および5F9vcMMAFを、293-GCC#2腫瘍モデルにおける効力について、q14d×5スケジュールにおいて2つの投与量(75 µg/kgおよび150 µg/kgの毒素)で試験した。具体的には、この試験には、ピヒクルで処置した対照、Sc209-DM1(150 µg/kgのDM1相当量)、Sc209-DM4(150 µg/kgのDM4相当量)、Sc209-vcMMAF(150 µg/kgのMMAF相当量)、5F9-DM1(150 µg/kgのDM1相当量)、5F9-DM4(150 µg/kgのDM4相当量)、5F9-DM4(75 µg/kgのDM4相当量)、5F9-vcMMAF(150 µg/kgのMMAF相当量)、および5F9-vcMMAF(75 µg/kgのMMAF相当量)を含めた。293-GCC#2細胞を担持する雌のタクニック(Taconic)マウス(1群当たり10匹のマウス)を使用した。

40

【0539】

図1は、5F9vc-MMAF、5F9vc-DM1、および5F9vc-DM4を用いてq14dスケジュールで処置した、293-GCC#2を担持するSCIDマウスに

50

おける腫瘍の成長を示す。293-GCC#2モデルにおいて5F9-SPDB-DM4で用量依存的な効力が観察されたのに対して、209-SPDB-DM4対照には影響がなかった。5F9-SMCC-DM1も効果的であったが、150 μ g/kgの5F9-SPDB-DM4ほどではなかった。5F9vcMMAF(75 μ g/kgおよび150 μ g/kg)が最も効果的であったが、209vcMMAFもいくらかの活性を有した。したがって、これらの投与量およびスケジュールにおいて、5F9-SPDB-DM4がその対照結合体から最大の効果の差を有した。

【0540】

5F9vcMMAFおよび5F9-DMxを用いた293-GCC#2s.c.腫瘍における効力試験

5F9-SPDB-DM4および5F9-SMCC-DM1を、293-GCC#2腫瘍モデルにおける効力について、q7d \times 5スケジュールにおいて2つの投与量(75 μ g/kgおよび150 μ g/kgの毒素)で試験した。具体的には、この試験には、ビヒクルで処置した対照、5F9単独(15mg/kg)、DM1(300 μ g/kg)、DM4(300 μ g/kg)、Sc209-DM1(150 μ g/kgのDM1相当量)、Sc209-DM4(150 μ g/kgのDM4相当量)、Sc209-vcMMAF(150 μ g/kgのMMAF相当量)、5F9-DM1(150 μ g/kgのDM1相当量)、5F9-DM1(75 μ g/kgのDM1相当量)、5F9-DM4(150 μ g/kgのDM4相当量)、および5F9-DM4(75 μ g/kgのDM4相当量)を含めた。293-GCC#2細胞を担持する雌のタコニックマウス(1群当たり10匹のマウス)を使用した。

10

20

【0541】

アウリスタチン結合体を用いた293GCC#2腫瘍における効力試験

5F9のvcMMAEとの、vcMMAFとの、またはmcMMAFとの結合体を用い、これらの毒素の209との結合体との比較において、または遊離の毒素またはビヒクル対照との比較において、3種の投与量で293GCC#2腫瘍担持SCIDマウスを処置した。投与量をq7d \times 4スケジュールにおいてivで投与した。3日目、7日目、10日目、13日目および17日目に腫瘍を収集した。対照試薬で処置したマウスにおける腫瘍により、連続的な体積の増加が実証された。5F9アウリスタチン結合体で処置した腫瘍は、この腫瘍の成長の用量および時間依存性の阻害を示した。表18に結果の概要を提供する(TGI=腫瘍の成長阻害、T/C=処置/対照、TGD=腫瘍の成長の遅延、CR/PR=完全奏効/部分奏効;p値=統計的有意を判定するための尺度、NS=有意でない)。

30

表18. 293GCC#2腫瘍担持マウスにおけるアウリスタチンADCの分析。

【0542】

【表 1 8】

群	TGI	T/C	TGD	CR/PR	P 値
209-vcMMAE 300 µg/kg	24.5	0.76	0.9	0	0.38>0.05 NS
209-vcMMAF 150 µg/kg	29.4	0.71	1.4	0	0.27>0.05 NS
209-mcMMAE 150 µg/kg	36.5	0.63	1.4	0	0.15>0.05 NS
遊離 MMAE 300 µg/kg	35.6	0.64	2	0	0.18>0.05 NS
遊離 ncMMAF 150 µg/kg	-3.4	1.03	-1.3	0	0.73>0.05 NS
5F9-vcMMAE 300 µg/kg	96.9	0.03		9/10 PR	<0.001
5F9-vcMMAE 150 µg/kg	83.5	0.17		2/10 PR	<0.01
5F9-vcMMAF 150 µg/kg	97	0.03		9/10 PR	<0.001
5F9-mcMMAF 150 µg/kg	97	0.03		9/10 PR	<0.001
5F9-vcMMAE 75 µg/kg	54.5	0.45	4.4		0.01<p<0.05
5F9-vcMMAF 75 µg/kg	88.5	0.12		6/10 PR	<0.001
5F9-mcMMAF 75 µg/kg	87.5	0.13		7/10 PR	=0.001
5F9-vcMMAF 37.5 µg/kg	65.2	0.35	7.1		=0.01
5F9-mcMMAF 37.5 µg/kg	63.6	0.36	5.8		=0.01

10

20

30

これらのADC 3種全てが293GCC#2モデルにおいてq7dスケジュールで有効であった。5F9-vcMMAFおよび5F9-mcMMAFは5F9-vcMMAEよりも強力であり、*in vivo* PD (pHisH3) および *in vitro* 細胞傷害性データと相関する。

【0543】

5F9vcMMAFおよび5F9-DMxを用いたT84 s.c.腫瘍における効力試験

5F9-SPDB-DM4および5F9-SMCC-DM1を、T84腫瘍モデルにおける効力について、q7d×5スケジュールにおいて2つの投与量(75µg/kgおよび150µg/kgの毒素)で試験した。具体的には、この試験には、ビヒクルで処置した対照、5F9単独(15mg/kg)、DM1(300µg/kg)、DM4(300µg/kg)、Sc209-DM1(150µg/kgのDM1相当量)、Sc209-DM4(150µg/kgのDM4相当量)、Sc209-vcMMAF(150µg/kgのMMAF相当量)、5F9-DM1(150µg/kgのDM1相当量)、5F9-DM1(75µg/kgのDM1相当量)、5F9-DM4(150µg/kgのDM4相当量)、および5F9-DM4(75µg/kgのDM4相当量)を含めた。T84細胞を担持する雌のタコニックマウス(1群当たり10匹のマウス)を使用した。

40

【0544】

免疫組織化学検査

50

生検材料および異種移植片などの組織におけるGCCの相対的な量の検出および測定を免疫組織化学検査によって実施することができる。凍結させた組織切片をアセトンとメタノールの1:1溶液に室温で20分間に固定する。スライドを1×PBS中で5分間洗浄する。スライドを、Ventana Discovery XT自動染色器(Ventana Medical Systems、Tucson、AZ)などの自動染色デバイスで、製造者が推奨している反応緩衝液を使用して処理する。抗GCC抗体を5%ヤギ血清中で5 μ g/mlに希釈する。ヒト抗GCC抗体、例えば、5F9について、検出二次抗体は、ヤギ抗ヒトビオチン化抗体のDako Protein blok(Dako、Carpinteria、CA)中1:500溶液である。自動染色器処理による抗体反応の後、スライドを自動染色器から取り出し、反応緩衝液中ですすぎ、キシレンまでの標準系列によって脱水し、カバーガラスにキシレンベースの封入剤処理をほどこす。

10

【0545】

一次性腫瘍モデルにおけるADCの効力試験

原発性の結腸直腸癌および胃がんのモデルをマウスにおける皮下腫瘍として成長させる。5F9-vcMMAE ADCおよび5F9-mcMMAF ADCをPHTX-11c一次性腫瘍担持マウスにおいて試験する。投与量をq7d×4スケジュールにおいてivで投与する。毒素と209の結合体を対照マウスに投与する。

【0546】

一次性腫瘍モデルにおけるADCの抗腫瘍活性

PHTX-9c原発性ヒト結腸腫瘍異種移植マウスにおける、さまざまな投与量および投薬スケジュールでの5F9-vcMMAEのin vivo抗腫瘍活性を決定するため、ならびに5F9-vcMMAEの遊離毒素MMAEに対する抗腫瘍活性および非免疫vcMMAE抗体毒素結合体(209-vcMMAE)に対する抗腫瘍活性を比較するため、ならびに処置後の再成長のカイネティクスを決定するために、2つの同様の試験を行った。雌のCB-17 SCIDマウス(8週齢)の側腹部にPHTX-9c腫瘍断片(2mm×2mm)を皮下(SC)接種した。腫瘍の成長を、週2回ノギスを使用してモニターし、平均腫瘍体積を、式(0.5×[長さ×幅²])を使用して算出した。平均腫瘍体積がおよそ150mm³(試験A)または160mm³(試験B)に到達したとき、動物を処置群に無作為に分けた(試験Aについてはn=群当たり10匹、試験Bについてはn=群当たり9匹)。

20

30

【0547】

マウスを0.938mg/kg、1.875mg/kg、3.75mg/kg、もしくは7.5mg/kgの5F9-vcMMAEを用いて週1回の(QW)投薬スケジュール(3投与量)で静脈内に(IV)20日間、またはビヒクル(0.9%食塩水)、0.075mg/kgもしくは0.15mg/kgのMMAE IVを含む対照を用いてQWスケジュールで、または1.875mg/kgもしくは3.75mg/kgの209-vcMMAE IVを用いてQW投薬スケジュールで20日間処置した(試験A)。第2の試験(試験B)では、マウスを、0.938mg/kg、1.875mg/kg、3.75mg/kg、7.5mg/kg、もしくは10.0mg/kgの5F9-vcMMAE IVを用いてQWスケジュール(3投与量)で、または3.75mg/kgのIVを週2回の(BIW)スケジュール(6投与量)で、またはビヒクル、7.5mg/kgもしくは10mg/kgの209-vcMMAEを含む対照で、または0.135mg/kgもしくは0.18mg/kgのMMAEのQWスケジュールでのIV投与で、20日間処置した。投与量(複数)は、QWスケジュールについては1日目、8日目、および15日目に、ならびにBIWスケジュールについては1日目、4日目、8日目、11日目、15日目、および18日目に投与した。免疫結合体の用量におけるMMAEの量を釣り合わせるために、以下の理論的根拠によって遊離のMMAEの用量を算出した: MMAEの相当する用量は、MLN0264用量の1.8%である。相当する用量のリンカー+MMAEは5F9-vcMMAEの用量の4%である。これらの算出は、抗体当たり平均3.9のMMAE分子および遊離の抗体の分子量150kDに基づく。実際抗体の分子量は、グリコ

40

50

シル化の程度によってわずかに変わる。

【0548】

腫瘍体積および体重を週2回測定し、腫瘍の成長の遅延(TGD)によって証明されるように再成長のカイネティクスを測定するために処置期間を超えて継続した。腫瘍体積の測定を腫瘍体積が処置群内の単一のマウスにおいて体重の10%に到達するまで継続し、その時点でその群については終了した。腫瘍の成長阻害(TGI)の百分率([対照群の平均腫瘍体積 - 処置群の平均腫瘍体積] / 対照群の平均腫瘍体積; T/C比)を20日目に決定した。処置群すべてにわたるT/C比を、ウエルチの両側t検定を使用して対照群のT/C比と比較した。1つの腫瘍がサイズの限度に到達した(およそ1000mm³)場合に全部の群について終了したので、平均再成長が遅かった群についてはTGDを算出することができなかった。

10

【0549】

処置群の対間の経時的な腫瘍の成長の傾向における差を、線形混合効果回帰モデルを使用して評価した。これらのモデルから、各動物を複数の時点で測定したという事実が明らかとなる。各々の比較のために別個のモデルをフィッティングさせ、各処置群についての曲線下面積(AUC)を、モデルからの予測値を使用して算出した。次いで、参照群と比較したAUCにおけるパーセント減少(dAUC)を算出した。統計的に有意なP値(<0.05)は、2つの処置群についての経時的な傾向が異なったことを示唆している。結果が以下の表19および20に要約されている。

20

【0550】

どちらの試験においても5F9 - vcMMAE - 処置群の全てで抗腫瘍活性が観察され、その効果が用量依存的事実であることが示された。2つの試験の結果は同程度であった。QWスケジュールにおいて0.938mg/kgの5F9 - vcMMAEを用いてIVで処置したマウスでは、ビヒクル群での処置と比較してTGIは20.7~21.4%であり、P値は<0.05であった。QWスケジュールにおいて1.875mg/kgをIV投与した処置群では、TGIは41.3~44.7%であり、P値は<0.001であった。3.75mg/kgをQWスケジュールでIV投与した処置群では、ビヒクル群での処置と比較してTGIは65.3~65.7%(p<0.001)であった。7.5mg/kgをIV QWで投与した5F9 - vcMMAEでは、84.1~84.3%のTGIがもたらされ(p<0.001)、10mg/kgのIV QW(試験Bのみ)では、91.2%のTGIがもたらされた(p<0.001)。3.75mg/kgをBIWスケジュール(S)でIV投与した場合、有意な阻害が観察され、TGIは84.9%であった(p<0.001)。

30

【0551】

7.5mg/kgおよび10.0mg/kgの高投与量の209 - vcMMAEにおいて、それぞれ35.7%および45.4%のTGI(p<0.001)を伴って中程度の抗腫瘍活性が観察されたが、低投与量の209 - vcMMAE(1.875mg/kgおよび3.75mg/kg)では阻害を示さなかった(p>0.05)。高い209 - vcMMAEによって観察された抗腫瘍活性は、おそらく免疫結合体のMMAE部分による非特異的な活性に起因する。

40

【0552】

遊離の毒素MMAEを投与することにより、混合した結果がもたらされた: 0.075mg/kg、0.135mg/kg、および0.15mg/kgのIV QW投与では腫瘍の成長阻害はもたらされなかったが(p>0.05)、0.18mg/kgのIV QW投与により、50.4%のTGIがもたらされた(p<0.001)。

【0553】

治療期間に観察された最大の体重損失は、試験Bの、遊離の毒素0.18mg/kgのMMAE群の7日目の2.3%および同じ試験の0.938mg/kgの5F9 - vcMMAE群であった。これは、薬物が良好に耐容されたことを示す。

【0554】

50

腫瘍体積の測定は、治療期間を超えて、腫瘍体積が処置群内の単一のマウスで体重の10%に到達するまで継続し、そこでその処置群については終了した。これらの試験では、腫瘍の再成長が用量依存的であることが明らかになった。

表19. SCIDマウスにおける一次性ヒト結腸腫瘍異種移植片の処置に関する試験Aの結果。

【0555】

【表19】

処置	投与量 (mg/kg)	投与方法/頻度	TGI	体重の変化 (平均最大 パーセント)	TGD (日数)/ (または 最初の 腫瘍が1000mm ³ を超えるまでの 日数)
ピヒクル	0	IV QW × 3 用量	N/A	-0.2	0
209-vcMMAE	1.875	IV QW × 3 用量	-2.0 (p>0.05)	8.3	0.6
209-vcMMAE	3.75	IV QW × 3 用量	4.5 (p>0.05)	6.9	0.4
MMAE	0.075	IV QW × 3 用量	5.0 (p>0.05)	8.3	1.0
MMAE	0.15	IV QW × 3 用量	11.1 (p>0.05)	10.8	2.0
5F9-vcMMAE	0.938	IV QW × 3 用量	21.4 (p>0.05)	9.0	3.3
5F9-vcMMAE	1.875	IV QW × 3 用量	44.7 (p>0.001)	10.6	8.2
5F9-vcMMAE	3.75	IV QW × 3 用量	65.3 (p>0.001)	9.0	17.8
5F9-vcMMAE	7.5	IV QW × 3 用量	84.1 (p>0.001)	7.5	(最初の腫瘍 から58日間超)

表20. SCIDマウスにおける一次性ヒト結腸腫瘍異種移植片の処置に関する試験Bの結果。

【0556】

10

20

30

【表 20】

処置	投与量 (mg/kg)	投与方法/頻度	TGI	体重の変化 (平均最大 パーセント)	TGD (日数)/ (または 最初の 腫瘍が1000mm ³ を超えるまでの 日数)
ピヒクル	0	IV QW × 3 用量	N/A	-1.8	0
209-vcMMAE	7.5	IV QW × 3 用量	35.7 (p>0.001)	4.2	4.2
209-vcMMAE	10.0	IV QW × 3 用量	45.4 (p>0.001)	2.6	11.3
MMAE	0.135	IV QW × 3 用量	2.2 (p>0.05)	9.3	0.2
MMAE	0.18	IV QW × 3 用量	50.4 (p>0.001)	-2.3	8.6
5F9-vcMMAE	0.938	IV QW × 3 用量	20.7 (p>0.001)	-2.3	3.8
5F9-vcMMAE	1.875	IV QW × 3 用量	41.3 (p>0.001)	5.6	6.6
5F9-vcMMAE	3.75	IV QW × 3 用量	65.7 (p>0.001)	-2.2	16
5F9-vcMMAE	3.75	IV BIW × 6 用量	84.9 (p>0.001)	-1.8	31.9
5F9-vcMMAE	7.5	IV QW × 3 用量	84.3 (p>0.001)	6.5	(最初の腫瘍 から47日間超)
5F9-vcMMAE	10.0	IV QW × 3 用量	91.2 (p>0.001)	7.2	(最初の腫瘍 から56日間超)

10

20

30

40

50

裸の5F9抗hGCC抗体を用いたCT26 hGCC/luc#32播種性モデル (balb/cマウス)における効力に関するパイロット試験

このモデルでは裸の抗体の、循環中のGCCを発現している腫瘍細胞に結合する能力および新しい腫瘍の確立を妨げる能力を試験する。雌のbalb/cマウスに、CT26 hGCC/luc#32細胞をマウス当たり 1×10^5 個およびマウス当たり 5×10^5 個でi.v.によって接種した。ピヒクルである0.9%のNaClおよび非特異的な抗体(裸の209)を、裸の5F9の投与と比較するために対照群に投与した。どちらの抗体も、IgG1アイソタイプを有するように操作され(pLKTOK58ベクターに)、したがってそれらのFc領域は、細胞表面抗原(すなわち、5F9についてはGCC、および209については無関係の標的)に結合した後、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性反応を誘発することができた。接種する前日にi.v.で投薬を開始し、投薬スケジュールは週1回i.v.×4(q7d×4)であった。腫瘍の成長を、Xenogen画像処理システムによって週2回モニターした。体重および生存を同様に週2回モニターした。肺の重量およびMRI画像を含めた画像をこの試験の終わりに取得した。

【0557】

図2に示されている通り、どちらの5F9群(40mg/kgおよび10mg/kg; マウス当たり 1×10^5 個)も、効力を示す(接種後(p.i)34日目: T/C(処置/対照)は0.04~0.05である)。p.i34日目における5F9群についてのT/Cは209群と比較して0.18~0.14である。209の40mg/kg群についてのT/Cは、0.9%のNaCl(ノーマルセーライン)群と比較して0.64である。5F9の 5×10^5 群では利益は認められなかった。

【0558】

この試験の終わりにおける各群の肺の重量を図3に示した。T検定：ビヒクル対209 40 mg/kg、 $P = 0.4$ ；ビヒクル対5F9 40 mg/kg、 $P < 0.05$ ；ビヒクル対5F9 10 mg/kg、 $P < 0.01$ であった。肺の目視検査により、5F9 - 処置群における腫瘍小結節がビヒクルまたは209 - 処置群におけるものよりも少ないことが確認された。上記マウスのin vivoにおけるMRIにより、ビヒクルで処置したマウスにおいて大量の肺腫瘍が周囲の組織への滲出(exfiltration)および心臓変位(heart displacement)が示された。40 mg/kgの5F9で処置したマウスでは、腫瘍の証拠はなく正常な肺の症状が認められた。

【0559】

生存曲線が図4に示されている。5F9処置群(1×10^5)で生存における有意な増加が観察され、5F9の10 mg/kg群と40 mg/kg群との間に差はなかった。

【0560】

(実施例4)

抗体産生細胞系の生成

生産性が > 600 mg/Lである、5F9を発現する安定なCHO細胞系のクローンを生成するために、5F9のための発現ベクターを、軽鎖可変領域(配列番号19)および重鎖可変領域(配列番号17)を、WTヒトIgG1 Fcおよびネオマイシン耐性遺伝子を含むpLKTK58発現ベクターにサブクローニングすることによって生成した。5F9可変領域-IgG1融合生成物の発現はEF-1aプロモーターの制御下である。

【0561】

抗GCCヒトモノクローナル抗体5F9可変領域のクローニングおよび配列決定

ヒトハイブリドーマ46.5F9サブクローン8.2から全RNAを単離した(QiagenのRNeasyキット)。このハイブリドーマは、「標準の」公開されたカップの軽鎖定常領域(GenBank受託番号AW383625、またはBM918539)および「標準の」の公開されたIgG2の重鎖定常領域(GenBank受託番号BX640623、またはAJ294731)を有する。5' race-readyのポリG尾部をもつcDNAを従来の方法によって合成した(Nature Methods 2巻、629~630頁(2005年))。軽鎖可変領域を、5' raceによって、ポリCアンカーオリゴをカップ定常領域に特異的なリバースプライマーと組み合わせて使用してcDNAからPCR増幅した。重鎖可変領域を、IgG2定常領域に特異的なリバースプライマーを公知の重鎖リーダー配列に特異的なフォワードプライマーと複数の組み合わせで用いて増幅した。PCR産物をTOPO(登録商標)クローニングし(Invitrogen(商標)、Life Technologies, Inc.)、M13FプライマーおよびM13Rプライマーを用いて配列決定した。

【0562】

抗GCCヒトモノクローナル抗体5F9を担持する哺乳動物の発現ベクターの構築

5F9の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を担持する哺乳動物の発現ベクターを構築して産生CHO細胞系を生成した。ネイティブな構築物については、5F9の軽鎖および重鎖の可変領域をpLKTK58Dにサブクローニングした(米国特許出願第20040033561号)。このベクターは、2種の哺乳動物の選択マーカー：ネオマイシン耐性およびDHFR/メトトレキサート(増幅のために)を有する。ベクターにより、それぞれベクターのリーダー-カップ定常領域およびリーダー-IgG1(野生型Fc)定常領域の上流に位置するタンデムなEF1アルファプロモーターから軽鎖および重鎖の両方が同時発現することが可能になる。サブクローニングするために、軽鎖および重鎖の可変領域を、配列が確認されたTOPOクローンから、ベクターのそれぞれのリーダー-カップ領域およびリーダー-IgG1領域の接合部に方向性クローニングのための独特の制限酵素認識部位を含む遺伝子特異的プライマーを用いてPCR増幅した。プライマーの配列は、以下の通りである(5F9可変領域特異的配列は太字である)：

10

20

30

40

50

ネイティブな 5 F 9 軽鎖リーダー - 可変プライマー :

フォワード N o t I

【 0 5 6 3 】

【 化 5 5 】

5'ataagaatGCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACA
GCTACAGGTGTCCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTG-3'

(配列番号 : 234)

リバーズ B s i W I

【 0 5 6 4 】

【 化 5 6 】

5'-GCCACCGTACGTTTGATTTCACGTTGGTCCCTTGGCCGAACGTC-3' (配列番号
:235)

10

ネイティブな 5 F 9 重鎖リーダー - 可変プライマー

フォワード E c o R I

【 0 5 6 5 】

【 化 5 7 】

5'ccgGAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCT
ACAGGTGTCCACTCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGAC-3' (配列番号

:236)

20

リバーズ B l p l

【 0 5 6 6 】

【 化 5 8 】

5'-GGAGGCTGAGCTGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAGTGGTC-3' (配列番号
: 237)

30

クローンを、その軽鎖および重鎖の両方を二本鎖 DNA 配列決定することによって確認した。

【 0 5 6 7 】

2つのトランスフェクション方法：従来の M P I プロセスおよび C r u c e l l プロセスを使用して、構築物を C H O 細胞に導入した。C H O 細胞のトランスフェクションを、ネイティブな 5 F 9 構築物を用いて、従来の M P I プロセスを使用して開始した。電気穿孔または L i p o p f e c t a m i n e 2 0 0 0 C D トランスフェクションのいずれかとともに、線状化 DNA および非線状化 DNA を使用した。およそ 30 の安定なプールを、G 4 1 8、ヌクレオシドを含まない培地および 5 n M のメトトレキサート中で選択することによって生成した。抗体産生レベルについての F M A T 解析に基づいて、3つの安定なプールを、クローニングするために選択した。産生量が最も多いプールは抗体を 1 2 . 2 μ g / m l で分泌した。これらの3つのプールを十分に凍結させた。

40

【 0 5 6 8 】

C r u c e l l S T A R 要素を評価して、S T A R 要素を含有する 5 F 9 発現ベクターを作製することができる。

5 F 9 / h I g G 1 重鎖ヌクレオチド配列は :

【 0 5 6 9 】

【化 5 9】

GAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCC
 ACTCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
 CACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCTTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAG
 GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCC
 TCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGCTGAGTTC
 TGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAACGTGGATACACCTATGGTAAC
 TTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG
 TCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT
 CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT
 GCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
 CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC
 AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA
 GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCA
 TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG
 TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
 AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA
 TGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
 CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA
 GCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
 TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
 CCCTGTCTCCGGTAAATAATAGGGATAACAGGGTAATACTAGAG

10

20

(配列番号:230)

である。

5 F 9 / h I g G 1 重鎖タンパク質配列は；

【 0 5 7 0 】

【化 6 0】

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVFGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE
 WIGEINHRGNTNDNPSLKSRTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGNFDHWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGK

40

(配列番号:231)

である。

5 F 9 / h K a p p a 軽鎖ヌクレオチド配列は；

【 0 5 7 1 】

【化 6 1】

GCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGT
 CCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
 ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTG
 GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGAATCCCAGCCAGGTT
 CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACCTCACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTT
 GCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAACGTGG
 AAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
 ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
 TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC
 AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
 AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC
 AGGGGAGAGTGTTAGTCTAGA

10

(配列番号 :232)

である。

5 F 9 / h K a p p a 軽鎖タンパク質配列は :

【 0 5 7 2 】

【化 6 2】

MGWSCILFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKPGQAPRLLI
 YGASTRATGIPARFSGSGSTEFTLTIGSLQSEDFAVYYCQYKTPRTFGQGTNVEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTSK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

(配列番号 :233)

である。

【 0 5 7 3 】

以下に列挙されている 5 F 9 の重鎖および軽鎖の核酸配列を p T O K 5 8 D ベクターに挿入した :

30

【 0 5 7 4 】

【化 6 3】

atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgaaatagtgatgacgcagctccagccacctgtctgt
 ctccagg

ggaaagagccacctctctgcagggccagtcagagtgtagcagaaacttagcctggtatcagcagaaacctggccagg

ctcccaggctctcatctatggtgatccaccagggccactggaatccagccaggttcagtggtggtctgggaca

40

gagttcactctcaccatcggcagcctgcagctgaagatttgcagtttattactgtcagcagataaaacctggcctcg

gacgttcggccaagggaacacgtggaatcaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatctcccgccatctgatg

agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaag

gtggataacgcctccaatcggttaactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcag

cagcaccctgacctgagcaaacgagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagct

cgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgtag (配列番号 :308)

50

【 0 5 7 5 】

【 化 6 4 】

atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagct

acagggtgccactcccagggtgcagctacagcagtgggggcgcaggactgtgaagcctcggagaccctgtccctcacctg

cgctgtctttgggtgggtcttccagtgggtactactggagctggatccgccagccccaggaaggggctggagtggattg

gggaaatcaatcatcgtggaaacaccaacgacaaccgctccctcaagagtcgagtcacatcatcagtagacacgtccaag

aaccagttcgcctgaagctgagttctgtgaccgccgggacacggctgtttactgtgcgagagaacgtggafacac 10

ctatggtaactttgaccactggggccagggaaccctggtcaccgtcagctcagcctccaccaagggcccatcggctcttc

ccctggcaccctctccaagagcacctctgggggcacagcggcctgggctgctggtaaggactactccccgaaccg

gtgacgggtgctgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacagtcctcaggactcta

ctccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccca

gcaacaccaaggtggacaagaaagtgagcccaaatctgtgacaaaactcacatgccaccgtgccagcacctgaa

ctctggggggaccgtcagttctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcac 20

atgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtagcgtggacggcgtggaggtgcataatg

ccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgg

ctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctcaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaa

agggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct

gcctggtaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacc 30

acgcctcccgtgctggactccgacggctcttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggg

gaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggta

aataa (配列番号 :309)

以下の A b x - 2 2 9 の重鎖および軽鎖の配列をコードする配列を p T O K 5 8 D ベクターに挿入した :

【 0 5 7 6 】

【化 6 5】

atggagtttgggctgagctggctttttcttggctatt

ttaaaggtgtccagtgtgaggtgcagctgttgagctctgggggaggcttggtagcctgggggtccctgagactctc

ctgtgcagcctctggattcaccttagccgctatgccatgaactgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtggg

tctcaggtattagtgaggagtggtgtaggacatactacgcagactccgtgaagggcgggtcaccatctccagagacaat

tccaagaacacactatatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgaaagatcgca

ttttggagtggccatttgactactggggccagggaaacctggtcaccgtcagctcagcctccaccaagggcccatcgg

tctccccctggcaccctcctcaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactactcccc

gaaccggtgacgggtgctgtggaactcagggccctgaccagcggcgtgcacacctcccggtgtcctacagtctcagg

actctactccctcagcagcgtggtgacctgcccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcaca

agcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagca

cctgaactctggggggaccgtcagctcttcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccgaccctga

ggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc

ataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag

gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcaa

agccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcc

tgacctgcctggtcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactac

aagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggca

gcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc

cggtaaataa (配列番号 :310)

10

20

30

【 0 5 7 7 】

【化 6 6】

atgaggctcctgctcagcttctc
 ttctctgctactctggtcccagataccactggagaaatagtgatgacgccgttccagccaccctgtctgtgtctcc
 aggggagagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgtagtagaaacttagcctggtaccagcagaacctggcc
 aggtcccaggctctctatgtggtgatccaccagggccactggatcccagccagggtcagtgaggcagtggtctggg
 acagaattcactcaccatcagcagcctgcagctgaagatfttcagcttattactgtcaccagtatagtaactggat
 gtgcagtttggccaggggaccaagctggagatcaaactgacgggtggctgcaccatctgtcttcttcccgccatctg
 atgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtg
 aagggtgataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcct
 cagcagcacctgacctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggcctga
 gctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgtag (配列番号 :311)

10

本発明は、その実施形態を提供するために参考文献とともに示され、記載されているが、その形態および詳細において、添付の特許請求の範囲に包含される本発明の範囲から逸脱することなく、さまざまな変更を行ってよいことが当業者には理解されよう。

20

【 図 1 】

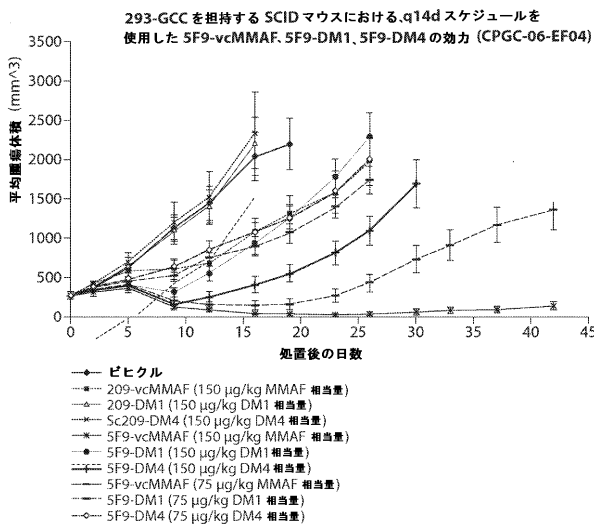


Fig. 1

【 図 2 】

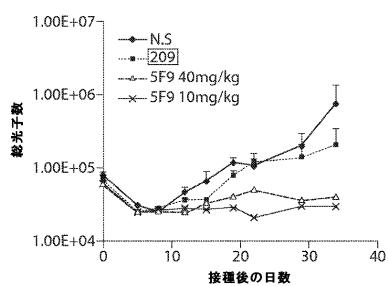


Fig. 2

【 図 3 】

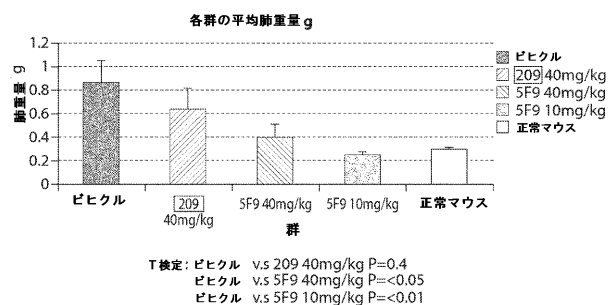


Fig. 3

【 図 4 】

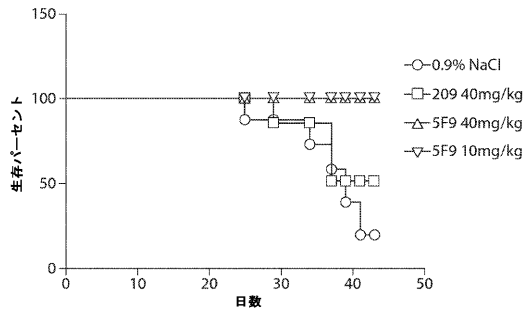


Fig. 4

【 配 列 表 】

2013507968000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 10/53686
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395 (2010.01) USPC - 424/143.1; 424/133.1; 530/387.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 424/143.1; 424/133.1; 530/387.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC 424/143.1; 424/133.1; 530/387.1; 424/134.1, 424/146.1 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PubWEST (USPT, EPAB, PGPB, JPAB); Google Scholar; GenCore Sequence Search (AA) Search terms: Guanylyl Cyclase C (GCC; GUC2C; GUCY2C; STAR, ST Receptor); anti-GCC, immunocjugata, auristatin, antibody 5F8, Ab 229, antibody 3G1, colon cancer; SEQ ID NOs: 2,4,18,20,46,48		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2006/0246071 A1 (GREEN et al.) 2 November 2006 (02.11.2006). Especially SEQ ID NO: 567	1-5, 9-28
A	US 2003/0147809 A1 (GUDDAS) 7 August 2003 (07.08.2003). Especially SEQ ID NO: 6	1-5, 9-28
A	US 2003/0165496 A1 (BASI et al.) 4 September 2003 (04.09.2003). Especially SEQ ID NO: 9	1-5, 9-28
A	US 2009/0041717 A1 (MACDONALD et al.) 12 February 2009 (12.02.2009). Especially SEQ ID NO: 354	1-5, 9-28
A	US 2003/0099656 A1 (PATTI et al.) 29 May 2003 (29.05.2003). Especially SEQ ID NO: 12	1-5, 9-28
A	US 2009/0005257 A1 (JESPEERS et al.) 1 January 2009 (01.01.2009). Esp. SEQ ID NO: 10	1-5, 9-28
A	US 2006/024297 A1 (WOOD et al.) 2 February 2006 (02.02.2006). Especially SEQ ID NO: 664	6-8, 22 and 24-28
A	US 2008/0124345 A1 (ROTHE et al.) 29 May 2008 (29.05.2008). Especially SEQ ID NO: 289	6-8, 22 and 24-28
A	US 2004/0031072 A1 (LA ROSA et al.) 12 February 2004 (12.02.2004). Especially SEQ ID NO: 271497	6-8, 22 and 24-28
A	US 2004/0110933 A1 (RONDON et al.) 10 June 2004 (10.06.2004). Especially SEQ ID NO: 15.	6-8, 22 and 24-28
A	US 2004/0081651 A1 (KARPUSAS) 29 April 2004 (29.04.2004). Especially SEQ ID NO: 1	6-8, 22 and 24-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 application or patent 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 16 February 2011 (16.02.2011)		Date of mailing of the international search report 10 MAR 2011
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lea W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/53686

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- on paper
 in electronic form

b. (time)

- in the international application as filed
 together with the international application in electronic form
 subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore ver 6.3 SEQ ID NOs: 2,4,18,20,46,48,58,60,62,64,66,68,106,108,110,112,114,116,190,192,194,196,198,200

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/53686

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:

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:
Group I: Claims 1-14 and 22-28, drawn to an anti-GCC antibody; an immunoconjugate, cell or vector comprising said anti-GCC antibody; and methods of using said anti-GCC antibody.
Group II: Claims 15-21 and 23, drawn to immunoconjugates.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the invention listed as Group I is a anti-GCC antibody. While the immunoconjugates set forth in Group II can comprise an anti-GCC antibody of Group I, it is readily apparent that the immunoconjugates of Group II can be conjugated to a variety of antibodies not limited by any special feature to the anti-GCC antibody of Group I. Unity of invention exists only when the same or corresponding technical feature is shared by the claimed inventions. With out a shared special technical feature, the inventions of Groups I and II lack unity of invention.
---please see exta sheet---

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying 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

International application No.

PCT/US 10/53686

Continuation of:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Further, while both Group I and Group II share a 5F9 antibody, this special technical feature fails to provide a contribution over the prior art, as evidenced by the article entitled "Characterization of monoclonal antibodies to heat-labile enterotoxin encoded by a plasmid from a clinical isolate of *Escherichia coli*" by Belisle et al. (*Infect Immun.* 1984 March; 43(3): 1027-1032). Belisle teaches the 5F9 antibody (p 1028, right col, para 7). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 A 6 1 P 35/00
 G 0 1 N 33/53 D

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

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ナム, サミュエル エス.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 3 2, ハーバリル, ブライスデル ストリート
 9 2

(72)発明者 グリーンフィールド, エドワード エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ, ストートン, ポスカス ストリート 1 6 0

(72)発明者 バブクック, ジョン

カナダ国 ブイ6アール 2アール2 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバ, ウエスト
 1 2ティーエイチ アベニュー 4 4 8 0

(72)発明者 オキーフ, セレッサ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 3, ウォーザン, リッチグレイン アベニュー
 2 0

(72)発明者 チン, シーチン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, タフト アベニュー 1 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA01 CA09 CA10 CA11 CA20 DA03 EA04 GA01

GA11 HA01 HA11

4C085 AA13 AA14 AA16 AA26 AA33 BB36 CC22 CC23

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 EA20 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2013507968A5	公开(公告)日	2013-11-28
申请号	JP2012535402	申请日	2010-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	米伦纽姆医药公司 Amgen的不列颠哥伦比亚省		
申请(专利权)人(译)	千年制药公司 Amgen的不列颠哥伦比亚省		
[标]发明人	ナムサミュエルエス グリーンフィールドエドワードエー バブクックジョン オキーフセレッサ チンシーチン		
发明人	ナム, サミュエル エス. グリーンフィールド, エドワード エー. バブクック, ジョン オキーフ, セレッサ チン, シーチン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/00 A61K47/6871 C07K16/30 C07K16/40 C07K2317/21 C07K2317/34 C07K2317/77 C07K2317/92 A61K38/17 A61K38/18 A61K39/395 A61K47/42 A61K49/14 A61K49/16 C07K14/435 C07K14/475 C07K16/18 C07K16/22 A61K39/39558 C07K2317/76 G01N33/573		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.Y A61P35/00 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024 /DA03 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA26 4C085/AA33 4C085/BB36 4C085/CC22 4C085/CC23 4H045/AA11 4H045 /AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/254474 2009-10-23 US		
其他公开文献	JP2013507968A JP5925684B2		

摘要(译)

公开了与GCC结合的抗体和与GCC结合的抗体的抗原结合片段。该抗体与GCC的细胞外结构域结合，可以内化。在一些实施方案中，抗体是人源化抗体，嵌合抗体或人抗体。还公开了编码抗体或其部分的核酸和载体，含有核酸的重组细胞，以及包含抗体或抗原结合片段的组合物。本发明还提供了利用本文提供的抗体和抗原结合片段的治疗和诊断方法。

