

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-112318

(P2009-112318A)

(43) 公開日 平成21年5月28日(2009.5.28)

(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 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 4
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00	4 B O 6 5
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 H O 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-51399 (P2009-51399)	(71) 出願人	596168317
(22) 出願日	平成21年3月4日 (2009.3.4)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願2000-553467 (P2000-553467) の分割		GENENTECH, INC.
原出願日	平成11年6月10日 (1999.6.10)		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408 0-4990・サウス・サン・フランシス コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(31) 優先権主張番号	09/096,637	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成10年6月12日 (1998.6.12)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体、交叉反応性抗体およびそれを生成する方法

(57) 【要約】

【課題】混合型抗原免疫プロトコールに従ってモノクローナル抗体を生成する方法を提供すること。

【解決手段】さらに、この方法により得られる抗体が開示され、この抗体は、A p o - 2 リガンド (A p o - 2 L) が結合し得る2つ以上の異なる異なるレセプターと特異的に交叉反応する。驚くことに、異なる抗原の混合物で免疫された動物由来の血清力価は、単一抗原で免疫された動物において達成されるものと同様であることが、本発明で発見された。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、概してモノクローナル抗体を生成する方法に関する。本発明は、この方法によって入手可能な抗体にさらに関し、この抗体は、Apo-2リガンド(Apo-2L)が結合し得る2つ以上の異なるレセプターと特異的に交叉反応する。

10

【背景技術】

【0002】

(関連分野の説明)

ネイティブの抗体は、主に、「血漿細胞」と呼ばれる特殊化したリンパ球により合成される。宿主動物における強力な抗体応答の生成は、B細胞がこれらの血漿細胞へと分化するのを誘導することおよび調節することによって制御される。この分化とは、未刺激のB細胞(これは、細胞表面抗原レセプターとして改変された抗体を有し、そして抗体を分泌しない)が活性化B細胞(これは、両方とも抗体を分泌し、そして細胞表面抗体を有する)、次いで血漿細胞(これは、表面抗原レセプターを有さない、非常に特異化した抗体工場である)になることを含む。この分化プロセスは、抗原の存在によって、そしてB細胞とヘルパーT細胞との間の細胞の情報伝達によって影響される。

20

【0003】

抗体が目的の抗原に選択的に結合する能力が原因で、抗体は、研究適用、診断適用および治療適用のために広範に使用されている。抗体の潜在的用途は、モノクローナル抗体の開発によって拡大された。ポリクローナル抗血清(これは、異なるエピトープに対する抗体の混合物を含む)とは対照的に、モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基またはエピトープに対し、そして均一である。さらに、モノクローナル抗体は、無制限の量で生成され得る。

【0004】

KohlerおよびMilsteinによる根本的研究は、モノクローナル抗体を生成し得るハイブリドーマを得る最初の方法を記載した[KohlerおよびMilstein、Nature 256:495(1975)]。この方法において、抗体分泌免疫細胞(免疫されたマウスから単離された)は、骨髓腫細胞(B細胞腫瘍の1つの型)と融合される。生じたハイブリッド細胞(すなわち、ハイブリドーマ)は、インビトロで維持され得、そして規定された特異性を有する抗体を分泌し続け得る。

30

【0005】

マウスモノクローナル抗体はマウスに由来するので、ヒトにおける治療薬剤としてのその抗体の使用は制限される。なぜなら、患者に対するこのマウス抗体の投与に際してヒト抗マウス応答が生じるからである。従って、研究者らは、非ヒト抗体を操作して、これらがよりヒト抗体らしくなるようにしている。このような操作された抗体は「キメラ」抗体と呼ばれる；この抗体では、非ヒト抗原結合ドメインはヒト定常ドメインに結合されている[Cabilllyら、米国特許第4,816,567号]。このヒト定常ドメインのアイソタイプは、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)および補体依存性細胞傷害への関与について、このキメラ抗体を調整するように選択され得る。抗体の抗原結合機能を解明することおよびヒト抗体における異種配列の使用を最小にすることのためのさらなる努力において、Winterおよび共同研究者[Jonesら、Nature 321:522~525(1986)；Riechmannら、Nature 332:323~327(1988)；Verhoeyenら、Science 239:1534~1536(1988)]は、ヒト抗体の対応するセグメントに代えて齧歯類相補性決定領域(CD

40

50

R) 残基で置換してヒト化抗体を生成した。

【0006】

本明細書中で使用される場合、用語「ヒト化」抗体とは、インタクトなヒト可変ドメインよりも実質的に少ないヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応する配列によって置換されているキメラ抗体の態様である。実際は、ヒト化抗体は代表的には、CDR残基およびおそらくいくつかのフレームワーク領域(FR)残基が齧歯類抗体中のアナログ部位由来の残基によって置換されているヒト抗体である。

【0007】

他のグループが、完全に「ヒト」モノクローナル抗体を生成する方法を開発している。このような抗体は、特異的抗体を分泌するヒト細胞をエプスタイン-バーウイルス(EBV)を使用して不死化することによって[Steinitzら、Nature 269:420~422(1977)]か；またはそのモノクローナル抗体を分泌するヒト-ヒトハイブリドーマを調製することによって[Olsonら、PNAS(USA)77:5429~5431(1980)]生成され得る。ヒト抗体はまた、ファージ提示ライブラリーから誘導され得る[Hoogenboomら、J.Mol.Biol.、227:381(1991)；Marksら、J.Mol.Biol.、222:581~597(1992)；Vaughanら、Nature Biotech 14:309(1996)]。

10

【0008】

あるいは、ヒト抗体は、トランスジェニック実験動物中で生成されている。この動物においては、ヒト免疫グロブリン遺伝子座がこの動物に導入され、そして内因性免疫グロブリン遺伝子が、部分的にかまたは完全に、不活化されている[Fishwildら、Nature Biotech. 14:845~851(1996)；およびMendezら、Nature Genetics 15:146~156(1997)]。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

(発明の要旨)

本発明は、1つの局面において、モノクローナル抗体を生成する方法を提供し、この方法においては、動物が2つ以上の異なる抗原で免疫され、そして各抗原に結合するモノクローナル抗体が生成および同定される。驚くことに、異なる抗原の混合物で免疫された動物由来の血清力価は、単一抗原で免疫された動物において達成されるものと同様であることが、本明細書中で発見された。

30

【0010】

この方法は、異なる抗原結合特異性を有する2つ以上のモノクローナル抗体を生成するために免疫されそして屠殺される必要がある動物の数を減少させるのに有用であると考えられる。

【0011】

さらに、この方法が、2つ以上の異なる抗原と交叉反応性である抗体を生成するのに有用であることが発見された。例えば、2つ以上の異なるApo-2Lレセプターと特異的に交叉反応性である抗体が生成された。

40

【0012】

従って、本発明は、抗体を生成する方法を提供し、この方法は以下の工程を包含する：

(a) 2つ以上の異なる抗原で動物を免疫し、この動物において各抗原に対するポリクローナル抗体を生成する工程；

(b) モノクローナル抗体を調製する工程であって、このポリクローナル抗体を生成するこの免疫された動物の免疫細胞を使用する、工程；および

(c) このモノクローナル抗体をスクリーニングして、各抗原に結合する1つ以上のモノクローナル抗体を同定する工程。このスクリーニング工程において、少なくとも2つの異なる抗原に対する少なくとも1つのモノクローナル抗体が見出される。好ましくは、少

50

なくとも1つのモノクローナル抗体が、この動物を免疫した各抗原について見出される。

【0013】

好ましくは、この動物は、2つ以上の異なる抗原の混合物を含む組成物で免疫され、そして工程(b)は、この免疫された動物由来の免疫細胞を骨髄腫細胞と融合させて、モノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞株を生成することを包含する。1つの実施態様において、この方法は、2つ以上の異なる抗原と交叉反応性である1つ以上のモノクローナル抗体を同定する工程をさらに包含する。

【0014】

本発明は、上記の方法に従って生成されたモノクローナル抗体(例えば、構造的にかまたは機能的に関連する2つ以上の抗原と交叉反応性である抗体)をさらに提供する。

10

【0015】

本発明はまた、2つ以上の異なるApo-2レセプターと特異的に交叉反応する抗体(例えば、Apo-2ポリペプチドに特異的に結合し、そしてさらに別のApo-2レセプターと特異的に交叉反応する)に関する。

【0016】

本願はさらに、3H1.18.10、3H3.14.5および3D5.1.10からなる群より選択されるモノクローナル抗体の生物学的特徴を有するモノクローナル抗体を供給する。

【0017】

さらに、本発明は、本明細書中に開示されるモノクローナル抗体のいずれかを生成するハイブリドーマ細胞株を提供する。

20

【0018】

本発明はまた、以下に関する：本明細書中に開示されるような抗体をコードするDNAを含む、単離された核酸；この核酸を含むベクター；このベクターを含む宿主細胞；このDNAが発現される条件下で宿主細胞を培養する工程を含み、必要に応じてこの宿主細胞培養物からこの抗体を回収する工程をさらに含む、抗体を生成する方法。

【0019】

本発明は、本明細書中に記載されるような抗体およびキャリアを含む組成物をさらに提供する。

【0020】

さらに、哺乳動物ガン細胞においてアポトーシスを誘導する方法が提供される。この方法は、哺乳動物ガン細胞を、本明細書中に開示されるような、有効量の交叉反応性アゴニスト抗Apo-2レセプター抗体に曝露する工程を包含する。

30

【0021】

本発明はさらに、容器およびこの容器中に含まれる組成物を含む製品に関し、ここでこの組成物は、本明細書中に記載されるような抗体を含む。したがって、本発明はまた、以下をも提供する。

(1) 抗体を生成する方法であって、以下の工程：

(a) 2つ以上の異なる抗原で動物を免疫し、該動物において各抗原に対するポリクローナル抗体を生成する工程；

40

(b) モノクローナル抗体を調製する工程であって、該ポリクローナル抗体を生成する該免疫された動物の免疫細胞を使用する、工程；および

(c) 該モノクローナル抗体をスクリーニングして、各抗原に結合する1つ以上のモノクローナル抗体を同定する工程を包含する、方法。

(2) 項目1に記載の方法であって、工程(a)の抗原がタンパク質である、方法。

(3) 項目1に記載の方法であって、前記2つ以上の異なる抗原の混合物を含む組成物で前記動物を免疫する工程を包含する、方法。

(4) 項目3に記載の方法であって、前記組成物中の前記2つ以上の異なる抗原が精製された抗原である、方法。

50

(5) 項目1に記載の方法であって、工程(b)が、前記免疫された動物由来の免疫細胞を骨髄腫細胞と融合して、前記モノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞株を生成することを包含する、方法。

(6) 項目1に記載の方法であって、工程(c)が、免疫アッセイにおいて前記モノクローナル抗体をスクリーニングすることを包含する、方法。

(7) 項目1に記載の方法であって、前記動物が約2～約10の異なる抗原で免疫される、方法。

(8) 項目1に記載の方法であって、前記動物が約3～約4の異なる抗原で免疫される、方法。

(9) 項目1に記載の方法であって、前記動物が齧歯類である、方法。

(10) 項目9に記載の方法であって、前記動物がマウスである、方法。

(11) 項目9に記載の方法であって、前記動物がヒト抗体を発現するマウスである、方法。

(12) 項目1に記載の方法であって、前記異なる抗原のうちの2つ以上と交叉反応する1つ以上のモノクローナル抗体を同定する工程をさらに包含する、方法。

(13) 項目1に記載の方法であって、工程(a)における抗原が構造的に関連しているか、または機能的に関連している、方法。

(14) 項目13に記載の方法であって、工程(a)における抗原がそのレセプターまたはフラグメントを含み、ここで、該レセプターがそれぞれ同じリガンドに結合されている、方法。

(15) 項目1に記載の方法であって、工程(c)において選択されたモノクローナル抗体をコードする核酸を単離する工程、および該モノクローナル抗体またはその改変体をコードする核酸で形質転換された宿主細胞において、該モノクローナル抗体またはその改変体を生成する工程をさらに包含する、方法。

(16) 項目1に記載の方法であって、工程(c)において選択されたモノクローナル抗体をヒト化する工程をさらに包含する、方法。

(17) 項目1に記載の方法であって、工程(c)において選択されたモノクローナル抗体から抗体フラグメントを形成する工程をさらに包含する、方法。

(18) 項目1に記載の方法であって、工程(c)において選択されたモノクローナル抗体を異種分子と結合体化する工程をさらに包含する、方法。

(19) 項目18に記載の方法であって、前記異種分子がポリエチレングリコール、標識薬剤または細胞傷害性薬剤である、方法。

(20) 項目1に記載の方法に従って生成された、モノクローナル抗体。

(21) 項目20に記載のモノクローナル抗体であって、構造的に関連する抗原または機能的に関連する抗原の2つ以上と交叉反応する、モノクローナル抗体。

(22) 2つ以上の異なるApo-2レセプターと特異的に交叉反応する、抗体。

(23) 項目22に記載の抗体であって、モノクローナル抗体を含む、抗体。

(24) 項目22に記載の抗体であって、Apo-2ポリペプチドに特異的に結合し、そしてさらに別のApo-2レセプターと特異的に交叉反応する、抗体。

(25) 項目22に記載の抗体であって、Apo-2ポリペプチドと特異的に結合し、そしてさらにDR4と特異的に交叉反応する、抗体。

(26) 項目22に記載の抗体であって、アゴニスト性抗体である、抗体。

(27) 項目22に記載の抗体であって、遮断抗体である、抗体。

(28) 項目22に記載の抗体であって、抗体フラグメントである、抗体。

(29) 項目22に記載の抗体であって、非ヒト超可変領域残基およびヒトフレームワーク領域残基を含む、抗体。

(30) ヒト抗体である、項目22に記載の抗体。

(31) 3H1.18.10、3H3.14.5および3D5.1.10からなる群より選択されるモノクローナル抗体の生物学的特徴を有する、抗体。

(32) 項目31に記載の抗体であって、3H1.18.10、3H3.14.5および

10

20

30

40

50

3 D 5 . 1 . 1 0 からなる群より選択されるモノクローナル抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する、抗体。

(3 3) 項目 3 1 に記載のモノクローナル抗体であって、3 H 1 . 1 8 . 1 0、3 H 3 . 1 4 . 5 および 3 D 5 . 1 . 1 0 からなる群より選択されるモノクローナル抗体の超可変領域残基を有する、抗体。

(3 4) 3 H 1 . 1 8 . 1 0、3 H 3 . 1 4 . 5 および 3 D 5 . 1 . 1 0 からなる群より選択されるモノクローナル抗体を生成する、ハイブリドーマ細胞株。

(3 5) 項目 2 2 に記載の抗体をコードする DNA を含む、単離された核酸。

(3 6) 項目 3 5 に記載の核酸を含む、ベクター。

(3 7) 項目 3 6 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

(3 8) 抗体を生成する方法であって、前記 DNA が発現される条件下で項目 3 7 に記載の宿主細胞を培養する工程を包含する、方法。

(3 9) 項目 3 8 に記載の方法であって、前記宿主細胞培養物から前記抗体を回収する工程をさらに包含する、方法。

(4 0) 項目 2 2 に記載の抗体および薬学的に受容可能なキャリアを含む、組成物。

(4 1) 哺乳動物ガン細胞中でアポトーシスを誘導する方法であって、有効量の項目 2 6 に記載のアゴニスト性抗体に対して哺乳動物ガン細胞を曝露する工程を包含する、方法。

(4 2) 容器および該容器中に含まれた組成物を含む製品であって、ここで該組成物は項目 2 2 に記載の抗体を含む、製品。

(4 3) 項目 4 2 に記載の製品であって、インビボかまたはエキソビボで前記抗体を使用するための説明書をさらに含む、製品。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、以下の免疫原についての例示的混合抗原免疫スキームを示す：Apo-2-IgG、DR4-IgG、DcR1-IgGおよびDcR2-IgG。

【図2】図2は、以下の抗原についての例示的単一抗原免疫スキームを示す：Apo-2-IgG、DR4-IgG、およびDcR2-IgG。

【図3】図3は、DR4-IgG、Apo-2-IgGまたはDcR2-IgGで個々に免疫されたマウスの抗原特異的血清力価を示す。MPL-TDM中1μgの各免疫粘着素(immunoadhesin)分子で足の指頭球(foot pad)(F.P.)に10回免疫したBalb/cマウス(5マウス/群)から、血清を収集した。ヒトIgG Fc部分に対する活性を、100mlの血清(PBS中1:500希釈)を3mg/50mlのCD4-IgGとともに1時間室温(RT)でインキュベートすることによって、事前吸着させた。次に、この事前吸着した血清の連続希釈物を、PBSで調製した。この事前吸着した血清の抗原特異的活性を、特異的抗原で被覆したマイクロタイターウェルを使用する捕獲ELISAで決定した。

【図4】図4は、DR4-IgG、Apo-2-IgG、DcR1-IgGおよびDcR2-IgGで一緒に免疫したマウスの抗原特異的血清力価を示す。マウスを、DR4-IgG、Apo-2-IgG、DcR1-IgGおよびDcR2-IgGの混合物で足指頭球に免疫した(マウスを、14回免疫した；DcR2-IgGを、最後の6回の免疫用の混合物中に含めた)。各免疫原の注射1回あたり1μgを使用した。この血清におけるヒトIgG Fcの活性を、上記のようにCD4-IgGとともにインキュベートすることによって吸着させた。この事前吸着させた各抗原に特異的な血清の活性を、特異的抗原で被覆したマイクロタイターウェルを使用する捕獲ELISAで決定した。

【図5A】図5Aは、ネイティブ配列ヒトApo-2 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号1)およびその誘導されるアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図5B】図5Bは、ネイティブ配列ヒトApo-2 cDNAのヌクレオチド配列(配列番号1)およびその誘導されるアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図6A】図6Aは、ELISAによって決定された、以下のApo2-Lレセプターに対する抗体結合を示す：DR4、Apo-2、DcR1およびDcR2。抗体は、3H3

10

20

30

40

50

． 1 4 ． 5 である。

【図 6 B】図 6 B は、E L I S A によって決定された、以下の A p o 2 - L レセプターに対する抗体結合を示す：D R 4、A p o - 2、D c R 1 および D c R 2。抗体は、3 H 1 ． 1 8 ． 1 0 である。

【図 6 C】図 6 C は、E L I S A によって決定された、以下の A p o 2 - L レセプターに対する抗体結合を示す：D R 4、A p o - 2、D c R 1 および D c R 2。抗体は、3 D 5 ． 1 ． 1 0 である。

【図 7 A】図 7 A は、I g G コントロール [点線] と比較した場合の抗体 3 H 1 ． 1 8 ． 1 0 [太線により示される] についての F A C S 分析を示す。抗体は、ヒト 9 D 細胞において発現された A p o - 2 を認識した。

【図 7 B】図 7 B は、I g G コントロール [点線] と比較した場合の抗体 3 H 3 ． 1 4 ． 5 [太線により示される] についての F A C S 分析を示す。抗体は、ヒト 9 D 細胞において発現された A p o - 2 を認識した。

【図 7 C】図 7 C は、I g G コントロール [点線] と比較した場合の抗体 3 D 5 ． 1 ． 1 0 [太線により示される] についての F A C S 分析を示す。抗体は、ヒト 9 D 細胞において発現された A p o - 2 を認識した。

【図 8】図 8 は、抗体 3 H 1 ． 1 8 ． 1 0 (3 H 1)、3 H 3 ． 1 4 ． 5 (3 H 3) および 3 D 5 ． 1 ． 1 0 (3 D 5)、アイソタイプを適合させたコントロール (I g G)、および A p o - 2 L により誘導されたアポトーシスを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 3 】

(好ましい実施態様の詳細な説明)

(I . 定義)

用語「抗体」とは、最も広い意味で使用され、そして詳細には、モノクローナル抗体 (アゴニスト、アンタゴニスト、および遮断抗体または中和抗体を含む) およびポリエピトープ特異性を有する抗体組成物を包含する。

【 0 0 2 4 】

用語「モノクローナル抗体」とは、本明細中で使用される場合、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体をいう。すなわち、この集団を構成する個々の抗体は、少量存在し得る潜在的な天然に存在する変異を除いて、同一である。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、単一の抗原性部位に指向されている。さらに、従来の (ポリクローナル) 抗体調製物 (これは、代表的には、異なる決定基 (エピトープ) に対する異なる抗体を含む) とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に指向される。

【 0 0 2 5 】

本明細書中でモノクローナル抗体は、ハイブリッド抗体および組換え抗体を含み、これらの抗体は、抗体の可変 (超可変を含む) ドメインを定常ドメインと接合させるか、または軽鎖を重鎖と接合させるか、または 1 つの種由来の鎖を別の種由来の鎖と接合させることによるか、あるいは異種タンパク質 (起源の種または免疫グロブリンクラスもしくはサブクラスの名称に関わらない) ならびに抗体フラグメント (例えば、F a b、F a b '、F (a b ')₂、および F v) との融合物によって、そのモノクローナル抗体が所望の生物学的活性を示す限り、生成される。例えば、米国特許第 4, 8 1 6, 5 6 7 号および M a g e ら、M o n o c l o n a l A n t i b o d y P r o d u c t i o n T e c h n i q u e s a n d A p p l i c a t i o n s、7 9 ~ 9 7 頁 (M a r c e l D e k k e r, I n c. : N e w Y o r k, 1 9 8 7)。

【 0 0 2 6 】

従って、修飾語「モノクローナル」とは、抗体の実質的に均一な集団から得られるような抗体の特徴を示し、そしてこれは、いかなる特定の方法による抗体の生成を必要とするとしても解釈されるべきではない。例えば、本発明のモノクローナル抗体は、最初に K o h l e r および M i l s t e i n、N a t u r e、2 5 6 : 4 9 5 (1 9 7 5) により記載されたハイブリドーマ法によって生成されてもよいし、あるいは米国特許第 4, 8 1 6

10

20

30

40

50

、567号に記載されるような組換えDNA法によって生成されてもよい。「モノクローナル抗体」とはまた、例えば、McCaffertyら、Nature、348:552~554(1990)に記載された技術を使用して生成されたファージライブラリーからも単離され得る。

【0027】

「単鎖Fv」抗体フラグメントすなわち「scFv」抗体フラグメントとしては、抗体のV_HドメインおよびV_Lドメインが挙げられ、ここでこれらのドメインは、単鎖ポリペプチド鎖で存在する。一般に、Fvポリペプチドは、scFvが、抗原結合のために望ましい構造を形成するのを可能にするポリペプチドリンカーをV_HドメインとV_Lドメインとの間にさらに含む。scFvの総説については、例えば、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113巻, RosenbergおよびMoore編 Springer-Verlag, New York, 269-315頁(1994)を参照のこと。

10

【0028】

「ヒト化」形態の非ヒト(例えば、マウス)抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含む、特異的キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはそれらのフラグメント(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合部分配列)である。大抵は、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)(例えば、マウス、ラット、またはウサギ)の超可変領域由来の残基によって置換されている、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)の残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、このヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体のいずれにも見出されない残基を含み得る。これらの改変は、抗体の性能をさらに改善および最適化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、そして代表的には2つの、可変ドメインの実質的に全てを含み、ここで、超可変領域の全てまたは実質的に全ては、非ヒト免疫グロブリンの超可変領域に対応し、そしてFR領域の全てまたは実質的に全ては、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域である。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域またはドメイン(Fc)の少なくとも一部、代表的にはヒト免疫グロブリンの定常領域またはドメイン(Fc)の少なくとも一部を含む。

20

30

【0029】

本明細書中で用いられる場合、用語「超可変領域」とは、抗原結合を担う、抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は、「相補性決定領域」すなわち「CDR」(すなわち、軽鎖可変ドメイン中の残基24~34(L1)、残基50~56(L2)、および残基89~97(L3)、ならびに重鎖可変ドメイン中の残基31~35(H1)、残基50~65(H2)、および残基95~102(H3); Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))由来のアミノ酸残基、ならびに/または「超可変ループ」(すなわち、軽鎖可変ドメイン中の残基26~32(L1)、残基50~52(L2)、および残基91~96(L3)、ならびに重鎖可変ドメイン中の残基26~32(H1)、残基53~55(H2)、および残基96~101(H3); ChothiaおよびLesk J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))由来の残基を含む。「フレームワーク」すなわち「FR」残基は、本明細書中に定義された通りの超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

40

【0030】

用語「Apo-2リガンド」すなわち「Apo-2L」とは、1997年7月17日に公開され、そして本明細書中で参考として明示的に援用される、WO97/25428に開示されるApo-2Lポリペプチドをいう。本願の目的のために、これらの用語はまた、1997年1月16日に公開されたWO97/01633に開示され、そして本明細書

50

中に参考として明示的に援用されるポリペプチドをいう。

【0031】

「Apo-2レセプター」は、Apo-2L（本明細書中で定義される通り）が特異的に結合し得るポリペプチドである。用語「Apo-2レセプター」は、本明細書中で用いる場合、ネイティブ配列Apo-2レセプターおよびそれらの改変体（これはさらに本明細書中で定義される）を含む。これらの用語は、ヒトを含む種々の哺乳動物由来のApo-2レセプターを含む。このApo-2レセプターは、種々の供給源から、例えば、ヒト組織型からもしくは別の供給源から単離され得るか、または組換え方法もしくは合成方法によって調製され得る。「ネイティブ配列」Apo-2レセプターの例としては、Apo-2ポリペプチド（本明細書中で以下に記載される通り）、Panら Science 276:111-113 (1997)に記載される通りのネイティブ配列「DR4」; Sheridanら, Science 277:818-821 (1997)においてのようなネイティブ配列「おとりレセプター1」すなわち「DcR1」; ならびにMarstersら, Curr. Biol. 7:1003-1006 (1997)においてのようなネイティブ配列「おとりレセプター2」すなわち「DcR2」、およびネイティブ配列オステオプロテゲリン (osteoprotegerin) [Simonetら Cell 89:309-319 (1997)ならびにEmeryら, J. Interferon and Cytokine Research 18(5):A47 Abstract 2.17 (1998)を参照のこと]が挙げられる。

10

20

【0032】

本明細書中で用いられる場合、用語「Apo-2ポリペプチド」および「Apo-2」は、ネイティブ配列Apo-2およびApo-2改変体（これは、本明細書中でさらに定義される）を含む。これらの用語は、ヒトを含む種々の哺乳動物由来のApo-2を含む。このApo-2は、種々の供給源から、例えば、ヒト組織型由来もしくは別の供給源から単離され得るか、または組換え方法もしくは合成方法によって調製され得る。

【0033】

「ネイティブ配列」ポリペプチド（例えば、「ネイティブ配列Apo-2」）は、天然に由来するポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。従って、ネイティブ配列ポリペプチドは、任意の哺乳動物由来の、天然に存在するポリペプチドのアミノ酸配列を有し得る。このようなネイティブ配列ポリペプチドは、天然から単離され得るか、または組換え手段もしくは合成手段によって生成され得る。用語「ネイティブ配列」ポリペプチドは、天然に存在する短縮形態または分泌形態のポリペプチド（例えば、細胞外ドメイン配列）、このポリペプチドの天然に存在する改変体形態（例えば、選択的にスプライシングされた形態）および天然に存在する対立遺伝子改変体の特異的に含む。

30

【0034】

天然に存在する改変体形態のApo-2としては、図5（配列番号2）に示されるアミノ酸配列において残基410にアミノ酸置換を有するApo-2が挙げられる。このような天然に存在する改変体形態の1つの実施態様では、410位のロイシン残基は、メチオニン残基によって置換される。図5（配列番号2）では、410位のアミノ酸残基は、このアミノ酸が、必要に応じてロイシンまたはメチオニンのいずれかであり得ることを示すために「Xaa」と同定される。図10（配列番号2）では、1367位のヌクレオチドは、このヌクレオチドが、アデニン（A）またはチミン（T）またはウラシル（U）のいずれかであり得ることを示すために、「W」と同定される。本発明の1つの実施態様では、このネイティブ配列Apo-2は、図5（配列番号2）のアミノ酸1~411を含む、成熟または全長のネイティブ配列Apo-2である。必要に応じて、このApo-2は、ATCC 209021として寄託されるベクターのcDNA挿入物によってコードされるポリペプチドを発現することによって入手されるかまたは入手可能である。

40

【0035】

「細胞外ドメイン」または「ECD」（例えば、「Apo-2細胞外ドメイン」または「Apo-2 ECD」）とは、レセプターの膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを本

50

質的に含まないレセプターポリペプチドの形態をいう。通常、ECDは、このような膜貫通ドメインおよび/または細胞質ドメインの1%未満を有し、好ましくは、このようなドメインの0.5%未満を有する。必要に応じて、Apo-2 ECDは、図5(配列番号2)のアミノ酸残基54~182、または図5(配列番号2)のアミノ酸残基1~182を含む。必要に応じて、Apo-2 ECDは、1つ以上のシステインに富むドメインを含み、好ましくは、Sheridanら、Science 277:818-821(1997)に示された配列について同定されたシステインに富むドメインの1つまたは両方を含む。Apo-2ポリペプチドについて本明細書において同定された膜貫通ドメインが、疎水性ドメインの型を同定するために当該分野において慣用的に使用される基準に従って同定されることは、当業者によって理解される。膜貫通ドメインの正確な境界は変化し得るが、本明細書において特に言及されたドメインのいずれかの末端のせいぜい約5アミノ酸までのようである。

10

【0036】

ポリペプチド「改変体」(例えば、「Apo-2改変体」)は、ネイティブ配列のポリペプチド(例えば、全長ネイティブ配列ヒトApo-2の図5(配列番号2)に示される推定アミノ酸配列、または本明細書において同定されたApo-2 ECDもしくはデスドメイン(death domain)の配列を有するApo-2)と、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する生物学的に活性なポリペプチドを意味する。このような改変体としては、例えば、ポリペプチドのN末端またはC末端で1つ以上のアミノ酸残基が付加されているか、または欠失されているポリペプチドが挙げられる(例えば、図5の配列(配列番号2)または本明細書において同定されたApo-2もしくはデスドメインの配列におけるApo-2の場合)。

20

【0037】

「抗体改変体」の例としては、非ヒト抗体のヒト化改変体、「アフィニティー成熟した」抗体(例えば、Hawkinsら、J. Mol. Biol. 254:889-896(1992)およびLowmanら、Biochemistry 30(45):10832-10837(1991)を参照のこと)、および変化したエフェクター機能(単数または複数)を有する抗体変異体(例えば、1997年7月15日に発行された米国特許第5,648,260号(これは参考として本明細書においてはっきりと援用される)を参照のこと)が挙げられる。

30

【0038】

通常、改変体は、ネイティブ配列(例えば、Apo-2については、図5(配列番号2)のアミノ酸配列、または本明細書において同定されたApo-2 ECDもしくはデスドメインの配列)と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、およびさらにより好ましくは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0039】

「アミノ酸配列同一性割合(%)」は、必要であるならば、最大の配列同一性割合を達成するために、配列を整列させそしてギャップを導入した後での、ネイティブ配列のアミノ酸残基と同一である候補配列のアミノ酸残基の割合として定義され、任意の保存的置換を配列同一性の部分として考慮しない。アミノ酸配列同一性割合を決定する目的のための整列は、例えば、公に利用可能であるコンピューターソフトウェア(例えば、ALIGNTMまたはMegalign(DNA STAR)ソフトウェア)を使用して、当業者の技術範囲内である種々の方法において達成され得る。当業者は、整列を測定するための適切なパラメーターを決定し得、これらには、比較される配列の全長にわたって最大整列を達成するために必要とされる任意のアルゴリズムが含まれる。

40

【0040】

用語「エピトープタグ化」とは、本明細書で使用される場合、「タグポリペプチド」に融合されたポリペプチドもしくはそのドメイン配列をいう。タグポリペプチドは、抗体を作製し得るエピトープを提供するに十分な残基を有し、さらにこれは十分に短く、そのポ

50

リペプチドの活性を妨げない。好ましくは、タグポリペプチドはまた、抗体が他のエピトープと実質的に交叉反応しないように、かなり独特である。一般的に、適切なタグポリペプチドは、少なくとも6アミノ酸残基、および通常約8～約50アミノ酸残基（好ましくは、約10～約20残基）を有する。

【0041】

Apo-2レセプターに関して「生物学的に活性」および「所望の生物学的活性」とは、本明細書の目的のために、(1)少なくとも1つの型の哺乳動物細胞において、アポトーシスをインビボまたはエキソビボで調節する能力を有すること（アゴニスト様式もしくは刺激様式、またはアンタゴニスト様式もしくはブロック様式のいずれか）；(2) Apo-2リガンドを結合する能力を有すること；または(3) Apo-2リガンドシグナリングおよび Apo-2リガンド活性を調節する能力を有することを意味する。

10

【0042】

用語「アポトーシス」および「アポトーシス活性」は、広範な意味に使用され、そして哺乳動物における細胞死の秩序立ったもしくは制御された形態をいい、代表的には、1つ以上の特徴的な細胞の変化（細胞質の凝縮、形質膜微絨毛の消失、核の断片化、染色体DNAの分解、またはミトコンドリア機能の消失を含む）を付随する。この活性は、例えば、細胞生存アッセイ、FACS分析、またはDNA電気泳動により決定および測定され得、これらは全て当該分野において公知である。

【0043】

用語「処置する」、「処置」、および「治療」は、本明細書で使用される場合、治効ある治療、予防的な（prophylactic）治療、および予防的（preventative）治療をいう。

20

【0044】

用語「癌」および「癌性」とは、代表的に、無秩序な細胞増殖により特徴付けられる、哺乳動物における生理学的状態をいうかまたは記載する。癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられるがこれらに限定されない。そのような癌のさらに特定の例としては、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、芽細胞腫、胃腸癌、腎臓（renal）癌、脾臓癌、神経膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、頸部癌、卵巣癌、肝臓癌、胃癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌腫、唾液腺癌腫、腎臓（kidney）癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝性癌腫、ならび

30

【0045】

用語「哺乳動物」とは、本明細書で使用される場合、哺乳動物として分類される任意の動物をいい、これらには、ヒト、ウシ、ウマ、イヌおよびネコが挙げられる。

【0046】

用語「抗原」および「免疫原」は、本明細書において交換可能に使用され、分子または物質で免疫された動物において、免疫応答（好ましくは抗体応答）を誘導する分子または物質をいう（すなわち、抗原は動物において「免疫原性」である）。抗原は、タンパク質、ペプチド、炭水化物、核酸、脂質、ハプテン、または他の天然に存在する化合物もしくは合成化合物であり得る。好ましくは、抗原は、約4kDより大きい分子量を有する「タンパク質」である。このタンパク質は、例えば、細胞性タンパク質、細菌タンパク質またはウイルスタンパク質であり得る。

40

【0047】

「異なる抗原」とは、構造的に異なる抗原；例えば、ペプチドまたはタンパク質の場合、異なるアミノ酸配列を有する抗原、を意味する。

【0048】

「構造的または機能的に関連する抗原」という表現は、類似の構造および/または類似の機能を有する抗原をいう。例えば、抗原は、必要に応じて異種アミノ酸配列に融合されており、同じリガンドにより結合されそして/または活性化されるレセプター（またはそのフラグメント）（例えば、本明細書に記載される Apo-2レセプター）を含み得る

50

。構造的および機能的に関連するレセプターの他の例としては、EGFレセプター、HER2レセプター、HER3レセプターおよびHER4レセプターのような、ErbB2レセプターファミリーのメンバー；ならびにRse、Ax1およびMerレセプターファミリーのメンバーが挙げられる。構造的または機能的に関連するリガンドの例としては、ニューレグリン(neuregulin)、インスリン様増殖因子(IGF)などが挙げられる。

【0049】

目的のタンパク質抗原は、「レセプター」[すなわち、細胞表面上または細胞の細胞質内に天然で存在し、そして1つ以上のリガンド(単数または複数)に結合し得るタンパク質分子]であり得る。別の例示的な抗原は、タンパク質「リガンド」[すなわち、1つ以上のレセプター(単数または複数)に結合し得、そして必要に応じてそれを活性化し得る分子；例えば、増殖因子]である。抗原は、本明細書において、例えば、レセプターまたはリガンドのフラグメントを包含し、これは、必要に応じて、1つ以上の異種アミノ酸配列に融合される(例えば、抗原は免疫付着因子(immunoadhesion)であり得る)。

10

【0050】

本明細書で使用される場合、用語「免疫付着因子(immunoadhesion)」は、異種「付着因子(adhesion)」タンパク質(例えば、レセプター、リガンドまたは酵素)の「結合ドメイン」を、免疫グロブリン定常ドメインと結合させた抗体様分子を意味する。構造的に、免疫付着因子は、所望の結合特異性を有する付着アミノ酸配列(抗体の抗原認識および結合部位(抗原結合部位)以外(すなわち、異種性))と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。例えば、米国特許第5,565,335号および米国特許第5,116,964号を参照のこと(これらは明確に参考として本明細書中に援用される)。

20

【0051】

用語「リガンド結合ドメイン」は、本明細書で使用される場合、任意の天然の細胞表面レセプターまたはそれらの任意の領域もしくは誘導体(対応する天然のレセプターの少なくとも質的なリガンド結合能力を保持する)をいう。特定の実施態様において、レセプターは、免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーに相同の細胞外ドメインを有する細胞表面ポリペプチドに由来する。免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーではないが、それにもかかわらず、この定義により具体的に包括される他のレセプターは、サイトカインのレセプター、そして特に、チロシンキナーゼ活性を有するレセプター(レセプターチロシンキナーゼ)、ヘマトポイエチンおよび神経成長因子レセプタースーパーファミリーのメンバー、ならびに細胞接着分子(例えば、(E-、L-およびP-)セレクチン)である。

30

【0052】

用語「レセプター結合ドメイン」は、レセプターの任意の天然のリガンドを称するために使用され得、これらには、細胞接着分子、またはそのような天然のリガンドの任意の領域もしくは誘導体(対応する天然のリガンドの少なくとも質的なレセプター結合能力を保持する)が挙げられる。この定義には、とりわけ、上記に言及したレセプターのリガンドに由来する結合配列が特に含まれる。

40

【0053】

「抗体-免疫付着因子キメラ」は、抗体の少なくとも1つの結合ドメイン(本明細書において定義されるような)を、少なくとも1つの免疫付着因子(本出願において定義されるような)と結合させた分子を含む。例示的な抗体-免疫付着因子キメラは、Bergら、PNAS(USA)88:4723-4727(1991)およびChamowら、J.Immunol.153:4268(1994)に記載される、二重特異性のCD4-IgGキメラである。

【0054】

「単離された(した)」ポリペプチドは、その天然の環境の成分から同定されそして分

50

離されそして/または回収されたポリペプチドである。その天然の環境の混入成分は、ポリペプチドの診断的使用または治療的使用を妨げる物質であり、これらには、酵素、ホルモン、および他の蛋白様溶質または非蛋白様溶質が挙げられる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、(1) Lowry法で決定した場合には、ポリペプチドの95重量%より多くまで、そして最も好ましくは99重量%より多くまで、(2) N末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を、スピニングカップシークエネーター (spinning cup sequencer) を使用して得るために十分な程度にまで、または(3) 還元条件下もしくは非還元条件下で、クマシーブルーもしくは好ましくは銀染色を使用する SDS-PAGE によって均質になるまで、に精製される。

【0055】

「精製された(した)」抗原は、1つ以上の精製手順に供された抗原である。精製された抗原は均質であり得、これは、本明細書において、組成物の全重量に基づいて、少なくとも約70重量%~約100重量%の目的の抗原、好ましくは少なくとも約80重量%~約100重量%の目的の抗原を含む組成物をいうために使用される。

【0056】

用語「免疫する(免疫化する)」とは、動物において抗体が生じ得るように、1つ以上の抗原を動物に投与する工程(単数または複数)をいう。一般的に、免疫は、抗原(単数または複数)を動物に注射する工程を包含する。免疫は、抗原(単数または複数)を1回以上投与することを含む。

【0057】

免疫される「動物」は、本明細書において、好ましくは齧歯類である。本明細書において免疫され得る他の動物としては、非ヒト霊長類(例えば、旧世界(Old World)サル(例えば、ヒヒまたはマカーク(アカゲザルおよびカニクイザルを含む);米国特許第5,658,570号を参照のこと);鳥類(例えば、ニワトリ);ウサギ;ヤギ;ヒツジ;ウシ;ウマ;ブタ;ロバ;イヌなどが挙げられる。「齧歯類」は、胎盤哺乳動物の齧歯類目に属する動物である。例示的な齧歯類としては、マウス、ラット、モルモット、リス、ハムスター、フェレットなどが挙げられ、本明細書における方法に従う免疫にはマウスが好ましい齧歯類である。

【0058】

「ポリクローナル抗体」または「ポリクローナル抗血清」とは、1つ(一価もしくは特異的抗血清)またはそれより多い(多価抗血清)抗原に特異的な抗体の混合物を含む免疫血清をいい、これは、抗原(単数または複数)で免疫された動物の血液から調製され得る。

【0059】

用語「免疫細胞」とは、抗体を産生し得る細胞をいう。本明細書において特に興味深い免疫細胞は、例えば、脾臓、末梢血リンパ球(PBL)、リンパ節、峯径節、パイアー斑、扁桃、骨髄、臍帯血、胸水および腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)に由来するリンパ系細胞である。

【0060】

「固相」とは、目的の分子が特異的にまたは非特異的に付着し得る非水溶性マトリクス(例えば、アッセイプレート)を意味する。

【0061】

「アジュバント」は、免疫応答の非特異的な刺激因子である。アジュバントは、以下の成分のいずれかまたは両方を含む組成物の形態であり得る:(a) 抗原を迅速な異化から保護する沈着物を形成するように設計された物質(例えば、鉱油、ミョウバン、水酸化アルミニウム、リポソームまたは界面活性剤[例えば、多価ポリオール(pluronic polyol)])、および(b) 免疫される宿主動物の免疫応答を非特異的に刺激する物質(例えば、それらにおけるリンホカインレベルを増大することによって)。リンホカインレベルを増大するための例示的な分子としては、リポポリサッカライド(LPS)またはそのリピドA部分; Bordetella pertussis; 百日咳毒素; M

10

20

30

40

50

ycobacterium tuberculosis; およびムラムルジペプチド (MDP) が挙げられる。アジュバントの例としては、フロイントアジュバント (必要に応じて、殺傷した *M. tuberculosis* を含む; 完全フロイントアジュバント); 水酸化アルミニウムアジュバント; およびモノホスホリルリピド A - 合成トレハホースジコリノミルコレート (*dicorynomylcolate*) (MPL-TDM) が挙げられる。

【0062】

「スクリーニング」とは、1つ以上のモノクローナル抗体 (例えば、精製抗体および/または抗体を含むハイブリドーマ培養上清) を、目的の抗原に結合する抗体の能力を質的および/または量的に決定する1つ以上のアッセイに供することを意味する。

10

【0063】

「イムノアッセイ」とは、抗体の抗原への結合を決定するアッセイを意味し、ここで、抗体もしくは抗原のいずれか、または両方が、アッセイのいくつかの段階において、必要に応じて固相上に付着される (すなわち、「免疫吸着因子」アッセイ)。例示的なそのようなアッセイとしては、ELISA、ラジオイムノアッセイ (RIA)、および FACS アッセイが挙げられる。

【0064】

2つ以上の異なる抗原と「交叉反応する」抗体は、異なる抗原の各々に結合し得、例えば、以下の実施例に記載されるように、ELISA または FACS により決定される。

【0065】

2つ以上の異なる抗原と「特異的に交叉反応する」抗体は、第一の抗原と結合しそして第二の異なる抗原にさらに結合する抗体であり、ここで、約 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体濃度での第二抗原に対する抗体の結合能力 (例えば、OD 450/620; 図 6A~C) は、以下の実施例のように捕獲 ELISA において決定された場合、第一抗原の結合活性の約 50% ~ 約 100% (好ましくは、約 75% ~ 約 100%) である。例えば、抗体は、Apo-2 (「第一抗原」) に特異的に結合し得、そして別の Apo-2 レセプター (例えば、DR4 (「第二抗原」)) と特異的に交叉反応し得る。ここにおいて、約 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体の DR4 への結合の程度は、本明細書中の捕獲 ELISA において、Apo-2 に対する抗体の結合能力の約 50% ~ 約 100% である。

20

【0066】

用語「標識」とは、本明細書で使用される場合、検出可能な化合物または組成物をいい、これらは、目的の分子に直接的にかまたは間接的に結合され得、そしてそれ自体が検出され得る (例えば、ラジオアイソトープ標識または蛍光標識) か、あるいは酵素標識の場合、それらは、検出可能な基質化合物または組成物の化学的变化を触媒し得る。

30

【0067】

「単離された」核酸分子は、通常、ポリペプチド核酸の天然の供給源に関連する少なくとも1つの混入核酸分子から同定および単離された核酸分子である。単離された核酸分子は、天然において見出される形態またはセッティング以外のものである。従って、単離された核酸分子は、天然の細胞に存在する場合のその核酸分子と区別される。しかし、単離された核酸分子は、通常ポリペプチドを発現する細胞 (ここでは、例えば、核酸分子は、天然の細胞の染色体位置とは異なる位置に存在する) 中に含まれる核酸分子を含む。

40

【0068】

発現「制御配列」とは、特に宿主生物において作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な DNA 配列をいう。原核生物に適切な制御配列は、例えば、プロモーター、必要に応じてオペレーター配列、およびリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用することが公知である。

【0069】

核酸が別の核酸配列と機能的な関係で配置される場合、この核酸は、「作動可能に連結」される。例えば、プレ配列もしくは分泌リーダーの DNA がポリペプチドの分泌に係するプレタンパク質として発現される場合、そのプレ配列もしくは分泌リーダーの DNA

50

はそのポリペプチドのDNAに作動可能に連結される；プロモーターもしくはエンハンサーがコード配列の転写に作用する場合、プロモーターもしくはエンハンサーはそのコード配列に作動可能に連結される；またはリボソーム結合部位が翻訳を容易にするように配置される場合、リボソーム結合部位はコード配列に作動可能に連結される。一般的に、「作動可能に連結される」は、連結されているDNA配列は隣接し、そして分泌リーダーの場合、それは隣接しかつリーディングフレーム内にあることを意味する。しかし、エンハンサーは、隣接する必要はない。連結は、都合の良い制限部位で連結することによって達成される。このような部位が存在しない場合、従来の慣行に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが使用される。

【0070】

本明細書で使用される場合、発現「細胞」、「細胞株」、および「細胞培養」は交換可能に使用され、そしてこのような指定の全ては子孫を含む。従って、単語「形質転換体」および「形質転換細胞」は、初代細胞およびそれに由来する転移回数に関わらない培養物を含む。全ての子孫が、意図的な変異または偶然の変異に起因して、DNA含有量において正確に同一であり得ないことも理解され得る。本来の形質転換細胞についてスクリーニングされた場合、同様の機能または生物学的活性を有する変異子孫が含まれる。異なる指定が意図されることが、本文脈から明らかである。

【0071】

用語「細胞傷害性因子」とは、本明細書で使用される場合、細胞の機能を阻害もしくは妨げる物質、および/または細胞の破壊を引き起こす物質をいう。この用語は、放射活性同位元素（例えば、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} および Re^{186} ）、化学療法剤、および毒素（例えば、細菌、真菌、植物もしくは動物起源の酵素学的に活性な酵素、またはそれらの改変体および/もしくはフラグメント）を含むことが意図される。

【0072】

「化学療法剤」は、癌の処置に有用な化合物である。化学療法剤の例としては以下が挙げられる：アドリマイシン、ドキソルビシン、エビルピシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ara-C」）、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン、タキソイド（taxoids）（例えば、パクリタキセル（TAXOL™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ））、およびドクサタキセル（doxetaxel）（Taxotera, Rhone-Poulenc

Rorer, Antony, Rnace）、トキシテレ（toxotere）、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、プレオマイシン、エトポシド、イホスファミド、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ビノレルビン（vinorelbine）、カルボプラチン、テニポシド（teniposide）、ダウノマイシン、カルミノマイシン（carminomycin）、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラミシン（esperamicins）（米国特許第4,675,187号を参照のこと）、メルファランおよび他の関連するナイトロジェンマスタード。この定義には、腫瘍に対するホルモン作用を制御または阻害するように作用するホルモン因子（タモキシフェンおよびオナプリストン（onapristone））もまた含まれる。

【0073】

用語「プロドラッグ」とは、本出願において使用される場合、薬学的に活性な物質の前駆体または誘導体形態をいう。これは、親薬物と比較して腫瘍細胞に対してより細胞傷害性が少なく、そして酵素学的に活性化され得るか、またはより活性な親形態に変換され得る。例えば、Wilman、「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」Biochemical Society Transactions、14、375~382頁、615th

Meeting Belfast (1986)およびStellaら、「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug

10

20

30

40

50

Delivery, Directed Drug Delivery, Borchardtら編、247~267頁、Humana Press(1985)。本発明のプロドラッグとしては、より活性な細胞傷害性遊離薬物に変換され得るリン酸含有プロドラッグ、チオリン酸含有プロドラッグ、硫酸含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸改変プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、 β -ラクタム含有プロドラッグ、必要に応じて置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグまたは必要に応じて置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5-フルオロシトシンプロドラッグおよび他の5-フルオロリジンプロドラッグが挙げられる。本発明の使用のためのプロドラッグ形態に誘導体化され得る細胞傷害性薬物の例としては、上記される化学療法剤が挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0074】

(本発明を実行するための様式)

(A. 混合抗原免疫プロトコル)

1つの局面において、本発明は、モノクローナル抗体を作製するための方法を提供する。ここにおいて、動物は、動物が免疫された2つ以上の抗原に対するポリクローナル抗体、および好ましくはモノクローナル抗体を産生するように、2つ以上の異なる抗原で免疫される。この方法は、以下の節においてより詳細に記載される。

【0075】

(i) 抗原の選別および調製

本明細書における方法は、1つ以上の異なる抗原に対して指向される抗体の調製を包含する。好ましくは、少なくとも抗原の1つ(および好ましくは、全ての抗原)は、生物学的に重要な分子であり、そして疾患もしくは障害に罹患している哺乳動物へのそれらに対する抗体の投与により、その哺乳動物において治療的利益が生じ得る。本発明の好ましい実施態様において、抗原はタンパク質である。しかし、他の非ポリペプチド抗原(例えば、腫瘍関連糖脂質; 米国特許第5,091,178号を参照のこと)が使用され得る。

20

【0076】

例示的なタンパク質抗原としては、以下が挙げられる: レニンのような分子; 成長ホルモン(ヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモンを含む); 成長ホルモン放出因子; 副甲状腺ホルモン; 甲状腺刺激ホルモン; リポタンパク質; β -1-アンチトリプシン; インスリンA-鎖; インスリンB-鎖; プロインスリン; 卵胞刺激ホルモン; カルシトニン; 黄体形成ホルモン; グルカゴン; 凝固因子(例えば、第VIIIC因子、第IX因子、組織因子、およびフォン・ビルブラント因子); ならびに抗凝固因子(例えば、プロテインC); 心房性ナトリウム利尿因子; 肺サーファクタント; プラスミノゲンアクチベーター(例えば、ウロキナーゼまたはヒト尿もしくは組織型プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)); ボンベシン; トロンピン; 造血成長因子; 腫瘍壊死因子 - および - ; エンケファリナーゼ; RANTES(正常なT細胞の活性化に際して制御されて発現されそして分泌される); ヒトマクロファージ炎症性タンパク質(MIP-1-); 血清アルブミン(例えば、ヒト血清アルブミン); Muellerian阻害物質; リラキシンA-鎖; リラキシンB-鎖; プロリラキシン; マウスゴナドトロピン関連ペプチド; 微生物タンパク質(例えば、 β -ラクタマーゼ); DNase; IgE; 細胞傷害性Tリンパ球関連抗原(CTLA)(例えば、CTLA-4); インヒビン; アクチビン; 血管上皮増殖因子(VEGF); ホルモンまたは増殖因子のレセプター; プロテインAまたはD; リウマチ因子; ニューロトロフィン因子(例えば、骨由来ニューロトロフィン因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、ニューロトロフィン-5、もしくはニューロトロフィン-6(NT-3、NT-4、NT-5、もしくはNT-6)、または神経成長因子(例えば、NGF-); 血小板由来増殖因子(PDGF); 線維芽細胞増殖因子(例えば、aFGFおよびbFGF); 上皮成長因子(EGF); トランスフォーミング増殖因子(TGF)(例えば、TGF- およびTGF-)(TGF- 1、TGF- 2、TGF- 3、TGF- 4、またはTGF- 5を含む); インスリン様増殖因子-Iおよび-II(IGF-IおよびIGF-II); des(1

30

40

50

- 3) - I G F - I (脳 I G F - I)、インスリン様増殖因子結合タンパク質；C D タンパク質 (例えば、C D 3、C D 4、C D 8、C D 19 および C D 20)；エリトロポエチン；骨誘導性因子；イムノトキシン；骨形態形成タンパク質 (B M P)；インターフェロン (例えば、インターフェロン - 、 - 、および -)；コロニー刺激因子 (C S F) (例えば、M - C S F、G M - C S F、および G - C S F)；インターロイキン (I L) (例えば、I L - 1 ~ I L - 10)；スーパーオキシドジスムターゼ；T 細胞レセプター；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；ウイルス抗原 (例えば、A I D S エンベロープ部分のような)；輸送タンパク質；ホーミングレセプター；アドレシン (a d d r e s s i n)；調節タンパク質；インテグリン (例えば、C D 11 a、C D 11 b、C D 11 c、C D 18、I C A M、V L A - 4 および V C A M)；腫瘍関連抗原 (例えば、H E R 2、H E R 3 または H E R 4 レセプター)；ならびに上記に列挙したポリペプチドのいずれかの改変体および / またはフラグメント。

10

【0077】

本発明に含まれる抗体の好ましい分子標的には、以下が挙げられる：C D タンパク質 (例えば、C D 3、C D 4、C D 8、C D 19、C D 20 および C D 34)；E r b B レセプターファミリーのメンバー (例えば、E G F レセプター、H E R 2 レセプター、H E R 3 レセプターまたは H E R 4 レセプター)；細胞接着分子 (例えば、L F A - 1、M a c 1、p 150 . 95、V L A - 4、I C A M - 1、V C A M および v / 3 インテグリン (その サブユニットまたは サブユニット (例えば、抗 C D 11 a 抗体、抗 C D 18 抗体または抗 C D 11 b 抗体のいずれかを含む))；増殖因子 (例えば、V E G F)；I g E；血液型抗原；f l k 2 / f l t 3 レセプター；肥満 (O B) レセプター；m p l レセプター；C T L A - 4；プロテイン C；アポ 2 L レセプター (例えば、A p o - 2、D R 4、D c R 1 および D c R 2)；ならびに以上に同定された分子の改変体および / またはフラグメントなど。

20

【0078】

この方法において使用されるべき各抗原は、好ましくは当該分野において利用可能な精製技術を使用して、抗原の本質的に均質な調製物を形成するように精製される。使用され得る精製手順の例には、以下が挙げられる：疎水性相互作用クロマトグラフィー (例えば、フェニルセファロース)での分画、エタノール沈降法、等電点電気泳動、逆相 H P L C、シリカでのクロマトグラフィー、H E P A R I N S E P H A R O S E TMでのクロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、S D S - P A G E、硫酸アンモニウム沈降法、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、アフィニティークロマトグラフィー (例えば、捕獲試薬として、プロテイン A、プロテイン G、抗体、特異的基質、リガンドまたは抗原を使用する)、またはこれらの方法のうち2つ以上の組合せ。

30

【0079】

タンパク質抗原の場合において、免疫付着因子 (i m m u n o a d h e s i o n) は、そのタンパク質 (または、そのフラグメント) を免疫グロブリン F c 領域に融合し、そしてプロテイン A クロマトグラフィーまたはプロテイン G クロマトグラフィーによって得られた免疫付着因子を精製することによって調製され得る。

40

【0080】

可溶性抗原またはそのフラグメント (必要に応じて、1つ以上の他の分子に結合されている) は、抗体を生成するための免疫原として使用され得る。レセプターのような膜貫通分子について、これらのフラグメント (例えば、レセプターの細胞外ドメイン) は、免疫原として使用され得る。必要に応じて、目的のタンパク質またはそのフラグメントを、異種分子と融合して、例えば以下の実施例中のような免疫付着因子を形成する。

【0081】

低分子量の抗原 (例えば、ハプテンおよび合成ペプチド) および他の抗原について、その抗原を、以下のような「キャリア分子」と結合することが望ましくあり得る：血清アルブミン (例えば、ウシ血清アルブミン (B S A))、オボアルブミン、キーホールリンペ

50

ットヘモシアニン (keyhole limpet hemacyanin) (KLH)、ウシサイログロブリン、ダイズトリブシンインヒビターまたはツベルクリンの精製されたタンパク質誘導体 (PPD)。そのようなキャリア分子は、免疫されるべき動物において免疫原性であり得る (すなわち、それらの分子は、クラス II - T 細胞レセプター結合部位を提供し得る)。カップリングは、以下のような二官能性カップリング剤を使用して達成され得る：マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル (システイン残基を介する結合)、N - ヒドロキシスクシンイミド (リジン残基を介する)、カルボジイミド、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、 SOCl_2 または $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ 、ここで R および R^1 は、異なるアルキル基である。あるいは、またはさらに、この抗原およびキャリア分子は、融合タンパク質として生成され得る。一般に、50 アミノ酸のキャリア分子あたり約 1 モルのハプテンが、合理的なカップリング比である。

【0082】

抗原は、以下によって、より抗原性にされ得る：大きなマトリクス (例えば、アガロースビーズ) にカップリングすること；細胞 (例えば、赤血球) に化学カップリングすること；自己重合 (例えば、ジニトロフェノールまたはアルシニル (arsynyl) のような化学架橋剤を用いて、または部分的変性によって) によって、抗原をより大きな化合物に変換すること；免疫複合体を調製すること；抗原をニトロセルロースに結合させること；および/または抗原を「キャリア」タンパク質 (上記を参照のこと) に結合させること。

【0083】

別の実施態様において、抗原は、細胞、細菌またはウイルス中またはそれら上に存在し、そして宿主動物は、その細胞、細菌またはウイルスで免疫される。そのような抗原は、その細胞、細菌もしくはウイルスに対してネイティブであり得るか、または合成によって (例えば、組換え技術、化学カップリングなどによって) 導入されており得る。しかし、好ましくは、動物が免疫された抗原の各々は、少なくとも 1 つの精製工程によって精製されている。

【0084】

(ii) 免疫

抗原で免疫されるべき動物または宿主を選択する。好ましい実施態様において、動物は、げっ歯類 (例えば、マウス) である。

【0085】

免疫されるべきマウスは、例えば米国特許第 5,721,122 号 (本明細書中に参考として明確に援用される) に記載されるような「抗原を含まない」マウスであり得る。

【0086】

1 つの実施態様において、宿主は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座が導入されているトランスジェニック動物である。例えば、このトランスジェニック動物は、導入されたヒト免疫グロブリン遺伝子を含むマウス、および内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活化されているマウスであり得る。チャレンジの際に、そのようなトランスジェニック宿主においてヒト抗体産生が観察される。これは、すべての点 (遺伝子再配置、アセンブリおよび抗体レパートリーを含む) において、ヒトにおいて見られるものと非常に類似する。このアプローチは、例えば、以下に記載されている：米国特許第 5,545,807 号；同第 5,545,806 号；同第 5,569,825 号；同第 5,625,126 号；同第 5,633,425 号；同第 5,661,016 号；ならびに以下の科学刊行物：Marks ら、Bio/Technology 10:779~783 (1992)；Lonberg ら、Nature 368:856~859 (1994)；Morrison, Nature 368:812~13 (1994)；Fishwild ら、Nature Biotechnology 14:845~51 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996)；Lonberg および Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65~93 (1995)。

10

20

30

40

50

【0087】

宿主動物に投与される各抗原の量は、例えば約0.01 μg ~ 約250 μg、好ましくは約0.1 μg ~ 約100 μgの範囲に及び得る。本発明は、宿主動物を2つ以上の異なる抗原（例えば、約2 ~ 約10の異なる抗原、好ましくは約3 ~ 約4の異なる抗原）で免疫することを含む。本発明の好ましい実施態様において、宿主動物は、2つ以上の異なる抗原の混合物、および必要に応じて生理学的に受容可能な希釈剤（例えば、PBSまたは他の緩衝液）を含む組成物で免疫される。あるいは、動物は、別々に抗原で免疫され得る。組成物を調製するために使用される抗原は、好ましくは少なくとも1つの精製工程によって精製されている。

【0088】

宿主動物は、種々の異なる方法で、抗原で免疫され得る。例えば、皮下注射、筋肉内注射、皮内注射、静脈内注射および/または腹腔内注射による。さらに、リンパ系器官、膝窩リンパ節および/またはフットパッドへの注射が可能である。別々および/または同時に、2つ以上の異なる投与経路の組合せを用いて、動物を免疫することが望ましくあり得る。

【0089】

一次応答が弱い場合、抗体力価が増加または一定状態になるまで、一定間隔で動物を追加免疫することが望ましくあり得る。免疫の後に、血清サンプル（試験採血）を取り、特定の抗体の産生をチェックし得る。好ましくは、宿主動物は、宿主動物からの免疫細胞の単離の約3 ~ 5日前に最後の追加免疫をされる。

【0090】

(iii) モノクローナル抗体産生

モノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature, 256:495(1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製され得る。ハイブリドーマ法において、ポリクローナル抗体を産生するかまたは産生し得る「免疫細胞」を、上記のように免疫した動物から得る。種々の免疫細胞は、上記の通りであり、リンパ節または脾臓は、モノクローナル抗体を作製するための好ましい免疫細胞供給源である。次いで、そのような細胞は、適切な「融合剤」（例えば、ポリエチレングリコールまたはSendaiウイルス）を用いて骨髓腫細胞と融合され、ハイブリドーマ細胞を形成し得る（Goding、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59~103頁(Academic Press, 1986)）。

【0091】

このように調製されたハイブリドーマ細胞を、好ましくは、融合されていない親骨髓腫細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含む適切な培養培地中に播きそして増殖させる。例えば、親骨髓腫細胞が、酵素ヒポキサンチンゲアニンホスホチボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPRT)を欠く場合、ハイブリドーマのための培養培地は、代表的には、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン(HAT培地)を含み、これらの物質は、HGPRT欠損細胞の増殖を妨げる。

【0092】

好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞によって抗体の安定な高レベル産生を支持し、そして培地（例えば、HAT培地）に感受性である細胞である。これらのうち、好ましい骨髓腫細胞株は、マウス骨髓腫株、例えば、Salk Institute Cell Distribution

Center, San Diego, California USAから入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍から誘導される株、ならびにアメリカンタイプカルチャーコレクション、Manassas, VA, USAから入手可能なP3X63AgU.1、SP-2またはX63-Ag8-653細胞である。210-RCY3.Ag1.2.3ラット骨髓腫細胞株もまた利用可能である。ヒト骨髓腫細胞株およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984); Brode

10

20

30

40

50

urら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、51～63頁(Marcel Dekker、Inc.、New York、1987)。

【0093】

あるいは、ハイブリドーマ細胞株は、他の方法で、例えば、目的のモノクローナル抗体を産生する不死化された細胞株を産生するために、免疫細胞をウイルス(例えば、エプスタインバーウイルス)またはオンコジーンで不死化することによって、免疫された動物の免疫細胞から調製され得る。Babcockら、PNAS(USA)、93:7843～7848(1996)もまた参照のこと。これは、免疫された動物の免疫細胞を使用してモノクローナル抗体を調製するためのなお別のストラテジーのために、特定の抗体を産生する単一の細胞から免疫グロブリンcDNAをクローニングすることによる、モノクローナル抗体の産生に関する。

10

【0094】

(iv)スクリーニング

各抗原に結合し得る1つ以上のモノクローナル抗体を同定するために、スクリーニングを行う。一般に、動物が免疫された各抗原に結合する抗体についてのスクリーニングが行われる。そのようなスクリーニングは、融合から生じる各ハイブリドーマの培養上清からの培養上清および/または精製された抗体に対して行われ得る。あるいは、またはさらに、スクリーニングは、クローニングされたハイブリドーマ細胞からの培養上清および/または精製された抗体を用いて行われ得る(下記を参照のこと)。さらに、交叉反応性抗体が目的である場合、モノクローナル抗体の、2つ以上の異なる抗原と交叉反応する能力が決定され得る。さらに、特定の機能的特徴(例えば、アゴニスト活性、ブロック活性など)を有する抗体についてスクリーニングすることが望ましくあり得る。

20

【0095】

ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、例えば、イムノアッセイにおいて(例えば、免疫沈降法によって)、または他のインビトロ結合アッセイ(例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)または固相酵素免疫検定法(ELISA))において決定され得る。

【0096】

使用され得るスクリーニング方法には、以下の3つの一般的なクラスが存在する:(a)抗体捕獲アッセイ;(b)抗原捕獲アッセイ;および(c)機能性スクリーニング。

30

【0097】

抗体捕獲アッセイにおいて、抗原を固相に結合し得、試験されるべきモノクローナル抗体を抗原に結合させ、結合していない抗体を洗浄によって除去し、次いで結合した抗体を、例えば二次試薬(例えば、抗体を特異的に認識する標識した抗体)によって検出する。

【0098】

抗原捕獲アッセイのために、抗原は、直接的に標識され得る(種々の標識は、本明細書中に記載される)。1つの実施態様において、試験されるべきモノクローナル抗体を固相に結合し、次いで必要に応じて標識された抗原と反応させ得る。あるいは、抗体-抗原複合体を、試験されるべきモノクローナル抗体を固相に結合する前に、免疫沈降法によって形成させ得る。一旦、抗体-抗原複合体が固相に結合されると、結合していない抗原を洗浄によって除去し得、そしてポジティブのものを、抗原を検出することによって同定し得る。

40

【0099】

所望の活性を有するモノクローナル抗体を同定するための種々の機能性スクリーニングが存在する。例には、以下の例のアゴニスト活性アッセイおよびブロックアッセイが挙げられる:ケラチノサイト単層接着アッセイおよび混合リンパ球応答(MLR)アッセイ(Wertherら、J. Immunol. 157:4986～4995(1996));腫瘍増殖因子阻害アッセイ(例えば、WO89/06692に記載されるアッセイ);抗体依存性細胞性細胞傷害性(ADCC)アッセイおよび補体媒介細胞傷害性(CDC

50

) アッセイ (米国特許第 5, 500, 362 号); ならびに造血アッセイ (WO 95/27062 を参照のこと)。抗体のクラス/サブクラスは、例えば二重拡散アッセイ; 抗原コートプレート上での抗体捕獲; および/または抗 IgG 抗体での抗体捕獲によって決定され得る。

【0100】

目的の抗原上の特定のエピトープに結合する抗体 (例えば、本明細書中に開示される抗体のいずれかの、Apo-2L レセプターへの結合をブロックする抗体) についてスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow および David Lane 編 (1988) に記載されるアッセイのような、慣用的な交叉ブロッキングアッセイが、行われ得る。あるいは、エピトープマッピング (例えば、Champeら、J. Biol. Chem. 270: 1388~1394 (1995) において記載されるような) は、抗体が目的のエピトープを結合するか否かを決定するために行われ得る。

10

【0101】

所望の特性、親和性および/または活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後、単一細胞クローンが、限界希釈手順 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59~103 頁 (Academic Press, 1986)); 拾い上げ (pick) による単一細胞クローニング; または軟らかいアガー中での増殖によるクローニング (Harlow および Lane, Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988); 224~227 頁) によってサブクローニングされ得る。

20

【0102】

ハイブリドーマクローンは、標準的な方法によって増殖され得る。この目的のための適切な培養培地は、例えば DMEM または RPMI-1640 培地を含む。さらに、ハイブリドーマ細胞は、動物における腹水腫瘍としてインビボで増殖され得る (Harlow および Lane, Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988); 第 7 章)。

30

【0103】

サブクローン体によって分泌されたモノクローナル抗体は、例えば以下のような従来の免疫グロブリン精製手順によって、培養培地、腹水液または血清から適切に分離される: プロテイン G または A-Sepharose、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティークロマトグラフィー。

【0104】

(v) クローニングおよび MA b のさらなる改変

モノクローナル抗体をコードする DNA を、従来の手順を用いて (例えば、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)、容易に単離および配列決定し得る。ハイブリドーマ細胞は、そのような DNA の好ましい供給源として作用する。一旦単離すると、この DNA を、発現ベクター中に置き得、次いで宿主細胞 (例えば、E. coli 細胞、サル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、または他の様式で免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髄腫細胞) にトランスフェクトし、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を得る。抗体の組換え産生を、以下により詳細に記載する。

40

【0105】

また、この DNA を、例えば同種マウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインについてのコード配列で置換することによって (米国特許第 4, 816, 567 号; Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984))、または免疫グロブリンコード配列に、非免疫グロブリンポリペプチドのコ

50

ード配列のすべてまたは部分を共有結合させることによって改変し得る。

【0106】

代表的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドを、抗体の定常ドメインの代わりに置換するか、またはそれらを、抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインの代わりに置換し、抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位、および異なる抗原に対する特異性を有する別の抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を作製する。

【0107】

1つの実施態様において、モノクローナル抗体はヒト化される。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、または抗体の他の抗原結合部分配列）である。ヒト化抗体は、非ヒトである供給源由来の抗体に導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、頻繁に「インポート(import)」残基と呼ばれ、これは、代表的には「インポート」可変ドメインから取り出される。ヒト化は、本質的に、Winterおよび共同研究者らの方法(Jonesら、Nature, 321:522~525(1986); Reichmannら、Nature, 332:323~327(1988); Verhoeyenら、Science, 239:1534~1536(1988))に従って、ヒト抗体の対応する配列の代わりにげっ歯類のCDRまたはCDR配列で置換することによって行われ得る。従って、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体であり（米国特許第4,816,567号）、ここで、インタクトなヒト可変ドメインよりも実質的により少ないドメインが、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は、代表的には、いくつかの超可変領域の残基およびおそらくいくつかのFR残基が、げっ歯類抗体における類似の部位由来の残基によって置換されているヒト抗体である。

【0108】

ヒト化抗体を作製する際に使用されるヒト可変ドメイン（重鎖および軽鎖の両方）の選択は、抗原性を低減するために非常に重要である。いわゆる「ベストフィット」方法に従って、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列を、公知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングする。次いで、そのげっ歯類の配列に最も近いヒト配列を、ヒト化抗体についてのヒトフレームワーク(FR)として受け入れる(Simsら、J. Immunol., 151:2296(1993); Chothiaら、J. Mol. Biol., 196:901(1987))。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークは、いくつかの種々のヒト化抗体のために使用され得る(Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992); Prestaら、J. Immunol., 151:2623(1993))。

【0109】

抗体は、抗原に対する高い親和性および他の好ましい生物学的特性を保持してヒト化されることがさらに重要である。この目的を達成するために、好ましい方法に従って、ヒト化抗体を、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列および種々の概念的なヒト化産物の分析のプロセスによって調製する。三次元免疫グロブリンモデルは、一般に入手可能であり、そして当業者に精通されている。選択された候補免疫グロブリン配列の可能性のある三次元立体構造を例示し、そして表示するコンピュータープログラムは入手可能である。これらのディスプレイの検査によって、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの、その抗原を結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。この方法で、所望の抗体の特徴（例えば、標的抗原に対する増加した親和性）が達成されるように、FR残基は、レシピエント配列およびインポート配列から選択され、そして組合せられ得る。一般に、超可変領域の残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに、直接的そしてほぼ実質的に関与する。

【0110】

10

20

30

40

50

本発明の抗体はまた、一価抗体として調製され得る。一価抗体を調製するための方法は、当該分野において周知である。例えば、1つの方法は、免疫グロブリンの軽鎖および改変された重鎖の組換え発現を含む。一般に、重鎖の架橋を妨げるように、重鎖を、Fc領域中のいずれかの点で短縮する。あるいは、架橋を妨げるように、関連するシステイン残基を、別のアミノ酸残基で置換するか、または欠失させる。

【0111】

インビトロ方法もまた、一価抗体を調製するために適切である。抗体の、そのフラグメント（特に、Fabフラグメント）を生成するための消化は、当該分野において公知の慣用的な技術を用いて達成され得る。例えば、消化は、パピンを用いて行われ得る。パピン消化の例は、WO94/29348（1994年12月22日公開）および米国特許第4,342,556号において記載されている。抗体のパピン消化は、代表的には、Fabフラグメントと呼ばれる2つの同一の抗原結合フラグメント（各々、単一の抗原結合部位を有する）、および残りのFcフラグメントを生じる。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有し、そしてなお抗原を架橋し得るF(ab')₂フラグメントを生じる。

【0112】

抗体消化において生成されるFabフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1定常ドメイン(CH₁)を含む。Fab'フラグメントは、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む、重鎖CH₁ドメインのカルボキシ末端でのいくつかの残基の付加によって、Fabフラグメントとは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を有しているFab'についての、本明細書中の命名である。F(ab')₂抗体フラグメントは、元々、ヒンジシステインを互いの間に有するFab'フラグメントの対として産生された。抗体フラグメントの他の化学カップリングもまた公知である。

【0113】

モノクローナル抗体を含む多重特異性(multispecific)抗体を生成することが望ましくあり得る。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有する。そのような分子は、通常、2つの抗原のみを結合する（すなわち、二重特異性抗体、BsAb）が、三重特異性抗体のようなさらなる特異性を有する抗体が、本明細書中で使用される場合にこの表現に含まれる。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体フラグメント（例えば、F(ab')₂二重特異性抗体）として調製され得る。

【0114】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当該分野において公知である。全長の二重特異性抗体の伝統的な生成は、2つの免疫グロブリンの重鎖-軽鎖対の同時発現（ここで、2つの鎖は、異なる特異性を有する）に基づく(Millsteinら、Nature, 305:537~539(1983))。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな分類に起因して、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10の異なる抗体分子の可能性のある混合物を生成し、そのうちのわずか1つのみが、正確な二重特異性構造を有する。正確な分子の精製（これは、通常、アフィニティークロマトグラフィー工程によってなされる）は、むしろ煩雑であり、そして産物の収率は低い。類似の手順が、WO93/08829、およびTraunckerら、EMBO J., 10:3655~3659(1991)に開示されている。

【0115】

異なるアプローチに従って、所望の結合特異性（抗体-抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインは、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合されている。この融合は、好ましくは免疫グロブリン重鎖定常ドメインとであり、少なくともヒンジ領域、CH₂領域およびCH₃領域の部分を含む。融合物の少なくとも1つに存在する軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域(CH₁)を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物、および所望される場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを、別々の発現ベクターに挿入し、そして適切な宿主生物に同時トランスフェクトする。このことは、この構築において使用される等しくない比の3つのポリペプチド鎖が至適な収率を提供する実施態

10

20

30

40

50

様において、3つのポリペプチドフラグメントの相互の比を調整することにおいて大きな柔軟性を提供する。しかし、等しい比の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高い収率を生じる場合、または比が特に有意ではない場合に、1つの発現ベクターに、2つまたは3つすべてのポリペプチド鎖のコード配列を挿入することが可能である。

【0116】

このアプローチの好ましい実施態様において、二重特異性抗体は、1つのアームにおける第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他方のアームにハイブリッド免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対（第2の結合特異性を提供する）から構成される。二重特異性分子の一方の半分のみにおける免疫グロブリン軽鎖の存在が、分離の容易な方法を提供するので、この対称構造は、望ましくない免疫グロブリン鎖の組合せから所望の二重特異性化合物を分離することを容易にすることが見出された。このアプローチは、WO94/04690に開示されている。二重特異性抗体を生成することのさらなる詳細については、例えば、Sureshら、Methods in Enzymology、121:210(1986)を参照のこと。

10

【0117】

WO96/27011に記載される別のアプローチに従って、抗体分子の対の間の界面は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体のパーセンテージを最大にするように操作され得る。好ましい界面は、少なくとも、抗体定常ドメインの C_H3 ドメインの一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の界面からの1つ以上の小さなアミノ酸側鎖は、より大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置換される。大きな側鎖と同じまたは類似のサイズの補償的な「空洞」が、大きなアミノ酸側鎖をより小さな側鎖（例えば、アラニンまたはトレオニン）で置換することによって第2の抗体分子の界面上に作製される。このことは、ホモ二量体のような他の所望されない最終生成物を超えて、ヘテロ二量体の収率を増加させるための機構を提供する。

20

【0118】

二重特異性抗体としては、架橋または「ヘテロ結合体化」された抗体が挙げられる。例えば、ヘテロ結合体中の抗体のうち的一方はアビジンに結合し、そして他方はビオチンに結合し得る。そのような抗体は、例えば、所望されない細胞へと免疫系の細胞を標的化させるため（米国特許第4,676,980号）、およびHIV感染の処置のために提案されてきた（WO91/00360、WO92/200373、およびEP03089）。ヘテロ結合体抗体は、任意の従来 of 架橋方法を使用して、作製され得る。適切な架橋剤は、当該分野において周知であり、そして多数の架橋技術と共に米国特許第4,676,980号において開示される。

30

【0119】

2つより多い原子価を有する抗体が意図される。例えば、三重特異的抗体が調製され得る。Tuttlら、J. Immunol. 147:60(1991)。

【0120】

本発明はまた、細胞傷害性薬剤（例えば、化学療法剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素学的に活性な毒素、またはそのフラグメント）、または放射性同位元素（すなわち、放射性結合体）と結合体化された、本明細書中に記載の抗体を含む免疫結合体に関する。

40

【0121】

そのような免疫結合体の生成に有用な化学療法剤は上記されている。使用され得る酵素学的に活性な毒素およびそれらのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、体外毒素A鎖（Pseudomonas aeruginosa由来）、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシン（modeccin）A鎖、サルシン（sarcin）、Aleurites

fordiitanパク質、ジアンチン（dianthin）タンパク質、Phytolacca americanaタンパク質（PARI、PAPII、およびPAP-S）、モモルディカカラシア（momordica charantia）インヒビター、

50

クルシン (curc in)、クロチン (cro tin)、サパオナリア (sapa ona ria) 薬用インヒビター、ジェロニン (gelo nin)、ミトジェリン (mito gell in)、レストリクトシン (restr ictoc in)、フェノマイシン (ph enomy cin)、エノマイシン (enomy cin)、およびトリコテセン (tri cothec ene) が挙げられる。種々の放射性核種が、放射性結合抗体の産生のために利用可能である。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、および ^{186}Re が挙げられる。

【0122】

抗体および細胞傷害性薬剤の結合体は、以下のような種々の二官能性タンパク質結合剤を使用して作製され得る：N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオール) プロピオネート (SPDP)、イミノチオラン (iminothiolane) (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (例えば、ジメチルアジピミデート (adipimide) HCL)、活性エステル (例えば、ジスクシンイミジルスベレート)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド (glutaredhyde))、ビスアジド化合物 (例えば、ビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサジアミン)、ビスジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、トリエン (tolylene) 2, 6 - ジイソシアネート)、およびビス活性フッ素化合物 (例えば、1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン)。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら、Science 238: 1098 (1987) に記載のように調製され得る。炭素 - 14 標識された 1 - イソチオシアネートベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸 (MX-DTPA) は、抗体への放射性ヌクレオチドの結合のための例示的なキレート剤である。WO94/11026を参照のこと。

10

20

【0123】

別の実施態様において、抗体は、腫瘍前標的化 (pretargeting) における利用のための「レセプター」 (例えば、ストレプトアビジン) に結合体化され得る。ここで、抗体 - レセプター結合体は患者に投与され、次いで、キレート剤を使用して循環から未結合の結合体を除去し、次いで、細胞傷害性薬剤 (例えば、放射性ヌクレオチド) に結合体化された「リガンド」 (例えば、アビジン) を投与する。

30

【0124】

抗体を含む免疫リポソームもまた調製され得る。抗体を含むリポソームは、以下に記載されるような当該分野において公知の方法によって調製される；Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985)；Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980)；ならびに米国特許第4, 485, 045号および同第4, 544, 545号。循環時間を増加したリポソームは、米国特許第5, 013, 556号に開示される。

【0125】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導化ホスファチジルエタノールアミン (PEG-PE) を含有する脂質組成物を用いて逆相エバポレーション法によって生成され得る。リポソームは、規定された孔の大きさのフィルターを通して押し出されて、所望の直径を有するリポソームを産生する。本発明の抗体のFab'フラグメントは、ジスルフィド交換反応を介して、Martinら、J. Biol. Chem. 257: 286 - 288 (1982) に記載のようにリポソームに結合体化され得る。化学療法剤 (例えば、ドキソルビシン) は、必要に応じてリポソーム内に含まれる。Gabizonら、J. National Cancer Inst. 81 (19): 1484 (1989) を参照のこと。

40

【0126】

本発明の抗体はまた、プロドラッグ (例えば、ペプチジル化学療法剤 (WO81/01145を参照のこと)) を活性化抗腫瘍薬物へと変換するプロドラッグ活性化酵素に抗体を

50

結合体化することによって、A D E P T 中で使用され得る。例えば、W O 8 8 / 0 7 3 7 8 および米国特許第 4 , 9 7 5 , 2 7 8 号を参照のこと。

【 0 1 2 7 】

A D E P T に有用な免疫結合体の酵素成分としては、プロドラッグをより活性（細胞傷害性）な形態へと変換するような様式で、プロドラッグに作用し得る任意の酵素が挙げられる。

【 0 1 2 8 】

本発明の方法において有用な酵素としては以下が挙げられるが、これらに限定されない：アルカリホスファターゼ（リン酸塩含有プロドラッグを遊離型薬物に変換するために有用）；アリアルスルファターゼ（硫酸塩含有プロドラッグを遊離型薬物に変換するために有用）；シトシンデアミナーゼ（非毒性 5 - フルオロシトシンを抗癌薬物である 5 - フルオロウラシルに変換するために有用）；プロテアーゼ（例えば、セラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼおよびカテプシン（例えば、カテプシン B およびカテプシン L））（ペプチド含有プロドラッグを遊離型薬物に変換するために有用）；D - アラニルカルボキシペプチダーゼ（D - アミノ酸置換基を含有するプロドラッグを変換するために有用）；炭水化物切断酵素（例えば、 α - ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ）（グリコシル化プロドラッグを遊離型薬物に変換するために有用）； β - ラクタマーゼ（ β - ラクタムで誘導体化された薬物を遊離型薬物に変換するために有用）；およびペニシリンアミダーゼ（例えば、ペニシリン V アミダーゼまたはペニシリン G アミダーゼ）（それぞれ、それらのアミン窒素にてフェノキシアセチル基またはフェニルアセチル基で誘導体化された薬物を、誘導体化されていない薬物に変換するために有用）。あるいは、酵素活性を有する抗体（当該分野において、「アブザイム」としてもまた公知）を使用して、本発明のプロドラッグを活性な遊離型薬物に変換し得る [例 えば、M a s s e y、N a t u r e 3 2 8 : 4 5 7 - 4 5 8 (1 9 8 7) を参照のこと]。抗体 - アブザイム結合体は、腫瘍細胞増殖へのアブザイムの送達のために、本明細書中に記載されるように調製され得る。

【 0 1 2 9 】

本発明の酵素は、当該分野において周知の技術（例えば、上記で議論されたヘテロ二官能性架橋試薬の使用）によって、抗体に共有結合され得る。あるいは、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部分に結合された、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を含む融合タンパク質は、当該分野で周知の組換え D N A 技術を用いて構築され得る [例 えば、N e u b e r g e r ら、N a t u r e 3 1 2 : 6 0 4 - 6 0 8 (1 9 8 4) を参照のこと]。

【 0 1 3 0 】

本発明の特定の実施態様において、例えば、腫瘍穿通を増加させるために、インタクテナ抗体ではなく抗体フラグメントを使用することが所望され得る。この場合、その血清半減期を増加させるために、抗体フラグメントを改変することが所望され得る。これは、例えば、この抗体フラグメント内にサルベージレセプター結合エピトープを組み込むことによって（例えば、抗体フラグメント中の適切な領域を変異させることによって、またはエピトープタグ中にエピトープを組み込み、次いでこれを、いずれかの末端もしくはその中間で抗体フラグメントに融合させることによって（例えば、D N A またはペプチド合成によって））達成され得る。

【 0 1 3 1 】

サルベージレセプター結合エピトープは、好ましくは領域を構成する。ここで、F c ドメインの 1 つまたは 2 つのループ由来の 1 つ以上の任意のアミノ酸残基は、抗体フラグメントの類似の位置に転移される。なおより好ましくは、F c ドメインの 1 つまたは 2 つのループ由来の 3 つ以上の残基が転移される。さらにより好ましくは、エピトープは（例えば、I g G の）F c 領域の C H 2 ドメインから採取され、そして抗体の C H 1、C H 3、もしくは V_H 領域、または 1 つより多いそのような領域に転移される。あるいは、エピトープは、F c 領域の C H 2 ドメインから採取され、そして抗体フラグメントの C_L 領域も

10

20

30

40

50

しくはV_L領域、またはその両方に転移される。例えば、米国特許第5,747,035号(特に本明細書中で参考として援用される)を参考のこと。

【0132】

抗体の共有結合修飾は、本発明の範囲内である。これらは、化学合成によって、または、適用可能であれば抗体の酵素的もしくは化学的切断によって作製され得る。抗体の共有結合修飾の他の型は、抗体の標的化されたアミノ酸残基を、選択された側鎖またはN末端残基もしくはC末端残基で反応し得る有機誘導体化剤と反応させることによって、分子中に導入される。

【0133】

抗体は、必要に応じて、1つ以上の化学基に共有結合的に連結され得るか、または結合体化され得る。例えば、ポリオルは、WO93/00109に開示されるように、リジン残基を含む1つ以上のアミノ酸残基で抗体分子に結合体化され得る。必要に応じて、ポリオルは、ポリ(アルケレングルコール)(例えば、ポリ(エチレングリコール)(PEG))である。しかし、当業者は、他のポリオル(例えば、ポリ(プロピレングリコール)およびポリエチレン-ポリプロピレングルコールコポリマーのような)が、ポリペプチドにPEGを結合体化させるための技術を用いて使用され得ることを認識する。ポリペプチドをペグ化(pegylation)するための種々の方法が記載されている。例えば、米国特許第4,179,337号(これは、低減された免疫原性を有する生理学的に活性な組成物を産生するための、PEGおよびポリプロピレングリコールへの多数のホルモンおよび酵素の結合体化を開示する)を参照のこと。

10

20

【0134】

抗体はまた、別の異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列(例えば、エピトープタグ)に融合または結合され得る。

【0135】

(B.抗Apo-2Lレセプター抗体)

本発明はまた、2つ以上の異なるApo-2Lレセプターと交叉反応し得る抗体を提供する。これらの交叉反応性抗体は、上記の混合抗原免疫化方法に従って(または、単一抗原(例えば、Apo-2または別のApo-2Lレセプター)で動物を免疫化することによって)調製され得るか、または以下に詳述されるような他の技術によって作製され得る。

30

【0136】

以下の実施例に記載のように、抗Apo-2モノクローナル抗体が調製された。これらの抗体のうち3つ(3H1.18.10、3H3.14.5、および3D5.1.10)が、ATCCに寄託されている。1つの実施態様において、本発明のモノクローナル抗体は、抗体3H1.18.10、3H3.14.5、または3D5.1.10を産生するATCCに寄託された3つのハイブリドーマ細胞株によって分泌される1つ以上のモノクローナル抗体と同じような生物学的特性を有する。用語「生物学的特性」は、モノクローナル抗体のインビトロおよび/またはインビボでの活性または特性(例えば、Apo-2および/または別のApo-2Lレセプターに特異的に結合する能力、あるいはApo-2Lレセプター活性化を実質的にブロック、誘導、または増強する能力)をいう。必要に応じて、モノクローナル抗体は、本明細書中に開示される1つ以上の3H1.18.10、3H3.14.5、または3D5.1.10抗体と同じエピトープに結合する。モノクローナル抗体は、好ましくは、前述の抗体のうち1つ以上の超可変領域を有する(例えば、これは、ヒト化改変体を含み得る)。

40

【0137】

抗体を得るための上記の方法(1つ以上の抗原で宿主を免疫化することによる)のほか、他の技術が、抗Apo-2Lレセプター抗体を産生するために利用可能である。例えば、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーにおいて生成され得る[HoogenboomおよびWinter、J.Mol.Biol.227:381(1992); Marksら、J.Mol.Biol.222:581(1991)]。Coleら、お

50

よび Boernerらの技術もまた、ヒトモノクローナル抗体の調製のために利用可能である [Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、第77頁(1985)、および Boernerら、J. Immunol. 147(1)86-95(1991)]。ファージライブラリーを調製するために適切な方法は、Winterら、Annu. Rev. Immunol. 12:433-55(1994); Soderlindら、Immunological Reviews、130:109-123(1992); Hoogenboom、Tibtech February 1997、第15巻; Neriら、Cell Biophysics 27:47-61(1995)に概説および記載されている。単鎖抗体のライブラリーはまた、WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO95/01438、およびWO95/15388に記載の方法によって調製され得る。抗体ライブラリーはまた、例えば、Cambridge Antibody Technologies(C. A. T.)、Cambridge、UKから市販される。

【0138】

(C. 組換え抗体)

本発明はまた、本明細書中に開示される抗体(例えば、混合抗原免疫化によって得られるような抗体および/または抗Apo-2Lレセプター抗体)をコードする単離された核酸、この核酸を含むベクターおよび宿主細胞、ならびにこのような抗体を産生するための組換え技術を提供する。

【0139】

抗体の組換え産生について、抗体をコードする核酸が単離され、そしてさらなるクローニング(DNAの増幅)または発現のために、複製可能なベクター中に挿入される。モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順(例えば、この抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に対して、特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることによる)を使用して、容易に単離および配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクター成分は、一般的に、以下のうちの1つ以上を含むが、これらに限定されない:シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終結配列。このような発現系成分の例は、米国特許第5,739,277号(1998年4月14日発行)(特に本明細書中で参考して援用される)に開示される。

【0140】

本明細書中において、ベクター中のDNAをクローニングまたは発現させるために適切な宿主細胞は、原核生物細胞、酵母細胞、または高等真核細胞である(例えば、米国特許第5,739,277号(特に本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。

【0141】

宿主細胞は、抗体の産生のために、上記の発現ベクターまたはクローニングベクターで形質転換される。そしてこれは、プロモーターを誘導するか、形質転換体を選択するか、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切に改変された従来の栄養培地中で培養される。

【0142】

本発明の抗体を産生するために使用される宿主細胞は、種々の培地中で培養され得る。任意の必須サプリメントもまた、当業者に公知の適切な濃度で含有され得る。培養条件(例えば、温度、pHなど)は、発現のために選択された宿主細胞で以前に使用された条件であり、そしてこれは当業者に明らかである。

【0143】

組換え技術を使用する場合、抗体は、ペリプラズム空間において細胞内で産生され得るか、または培地中に直接的に分泌され得る。抗体が細胞内で産生される場合、第1の工程として、粒子状細片(宿主細胞または溶解されたフラグメント)が、例えば、遠心分離または限外濾過によって除去される。抗体が培地中に分泌される場合、そのような発現系が

らの上清は、一般的にまず、市販のタンパク質濃縮フィルター（例えば、AmiconまたはMillipore Pelliconの限外濾過ユニット）を用いて濃縮される。PMSFのようなプロテアーゼインヒビターを、前述の工程のいずれかに含ませることによってタンパク質分解を阻害し得、そして抗生物質を含ませることによって外因性の夾雑物の増殖を阻害し得る。

【0144】

この細胞から調製される抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、およびアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製され得る。ここで、アフィニティークロマトグラフィーは、好ましい精製技術である。親和性リガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する、任意の免疫グロブリンFcドメインの種およびアイソタイプに依存する。プロテインAは、抗体を精製するために用いられ得、これはヒト¹、²、または⁴重鎖に基づく（Lindmarkら、J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)）。プロテインGは、すべてのマウスのアイソタイプおよびヒト³について推奨される（Gussら、EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)）。親和性リガンドが結合されるマトリクスは、最も頻繁にはアガロースであるが、他のマトリクスは利用可能である。機械的に安定なマトリクス（例えば、制御された細孔性のガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼン）は、アガロースを用いて達成され得るよりも、早い流速およびより短い処理時間を可能にする。抗体がC_H3ドメインを含む場合、Bakerbond ABXTM樹脂（J. T. Baker, Phillipsburg, NJ）が、精製のために有用である。タンパク質精製のための他の技術（例えば、イオン交換カラムでの分画、エタノール沈降、逆相HPLC、シリカ上でのクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSETM上でのクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂（例えば、ポリアスパラギン酸カラム）上でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈殿）はまた、回収されるべき抗体に依存して利用可能である。

10

20

【0145】

（D. 抗体についての治療的使用）

本明細書中に記載の抗体は、治療的有用性を有する。例えば、アゴニストのApo-2レセプター抗体は、癌細胞におけるアポトーシスを活性化または刺激するために使用され得る。従って、本発明は、抗体（例えば、交叉反応性Apo-2レセプター抗体）を用いて癌を処置するための方法を提供する。本発明の方法が、外科手術のようなさらに他の治療的技術と組み合わせて使用され得ることは、当然意図される。

30

【0146】

抗体は、好ましくは、キャリア中で哺乳動物に投与される。適切なキャリアおよびそれらの処方物は、Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、1980、Mack Publishing Co.、Osloら編、に記載される。代表的には、適切な量の薬学的に受容可能な塩が処方物で使用されて、処方物を等張性にする。薬学的に受容可能なキャリアの例としては、生理食塩水、リンゲル溶液、およびデキストロース溶液が挙げられる。溶液のpHは、好ましくは約5～約8、そしてより好ましくは約7～約7.5である。さらなるキャリアは、例えば、抗体を含有する固形疎水性ポリマーの半透性マトリクス（このマトリクスは、成形物の形態（例えば、フィルム、リポソーム、または微粒子）にある）のような徐放調製物を含む。特定のキャリアが、例えば、投与の経路および投与される抗体の濃度に依存して、より好ましいものであり得ることは、当業者に明らかである。

40

【0147】

抗体は、注射（例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内）によって、または有効な形態での血流への送達を保障する注入のような他の方法によって、哺乳動物に投与され得る。抗体はまた、局所的ならびに全身的治療効果を及ぼすように、腫瘍内、腫瘍周囲、病変内、または病変周囲経路によって投与され得る。局所的注射または静脈内注射が好ましい。

【0148】

50

抗体の投与について有効な投薬量およびスケジュールは、経験的に決定され得、そしてそのような決定をなすことは、当該技術の範囲内である。当業者は、投与されねばならない抗体の投薬量が、例えば、抗体を受容する哺乳動物、投与の経路、使用される抗体の特定の型、およびその哺乳動物に投与される他の薬物に依存して変動することを理解する。抗体の適切な用量を選択する際の指針は、抗体の治療的使用に関する文献（例えば、Handbook of Monoclonal Antibodies、Ferroneら編、Noges Publications、Park Ridge, N. J. (1985)、第22章、および第303~357頁；Smithら、Antibodies in Human Diagnosis and Therapy、Haberら編、Raven Press、New York (1977)第365~389頁)において見出される。単独で使用される抗体の代表的な1日用量は、上記に言及した因子に依存して、1日あたり約1 μ g/kg体重から100mg/kg体重以上までの範囲であり得る。

10

【0149】

抗体はまた、有効量の1つ以上の他の治療剤との組み合わせにおいて、または放射線治療と組み合わせて、哺乳動物に投与され得る。意図される治療剤としては、化学療法剤ならびに免疫アジュバントおよびサイトカインが挙げられる。抗体は、1つ以上の他の治療剤と連続的に、または同時に投与され得る。抗体および治療剤の量は、例えば、どのような型の薬物が使用されるか、処置される癌、および投与のスケジュールおよび経路に依存する。しかし、これは一般的に、各々が個々に用いられる場合よりも少ない。

20

【0150】

哺乳動物への抗体の投与後に、この哺乳動物の癌および生理学的状態が、熟練した開業医に周知の種々の様式でモニターされ得る。例えば、腫瘍塊は、物理的に、または標準的なX線画像技術によって観察され得る。

【0151】

本発明のApo-2レセプター抗体はまた、例えば、ADCCの補体結合を通して、Apo-2レセプターを発現する細胞において免疫媒介性細胞死を増強する際に有用であり得る。あるいは、拮抗性の抗Apo-2レセプター抗体が、過剰なアポトーシス（例えば、神経変性疾患における）をブロックするために、またはNF- κ B活性化から生じるApo-2の潜在的な自己免疫/炎症性効果をブロックするために使用され得る。そのような拮抗性の抗体は、上記の治療方法および治療技術に従って、利用され得る。

30

【0152】

(E. 抗体についての非治療的使用)

抗体はさらに、それらの抗原についての診断的アッセイ（例えば、特定の細胞、組織、または血清におけるその発現を検出すること）において、使用され得る。当該分野において公知の種々の診断アッセイ技術（例えば、競合的結合アッセイ、直接的または間接的サンドウィッチアッセイ、および異種相または同種相のいずれかにおいて実施される免疫沈降アッセイ）が、使用され得る[Zola、Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques、CRC Press, Inc. (1987)第147-158頁]。診断的アッセイにおいて使用される抗体は、検出可能な部分で標識され得る。検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで検出可能なシグナルを生成し得るはずである。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、または ^{125}I ）、蛍光化合物もしくは化学発光化合物（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、またはルシフェリン）、または酵素（例えば、アルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、または西洋わさびペルオキシダーゼ）であり得る。検出可能な部分に抗体を結合体化させるための当該分野で公知の任意の方法が使用され得、これには、Hunterら、Nature 144:945 (1962)；Davidら、Biochemistry 13:1014 (1974)；Painら、J. Immunol. Meth. 40:219 (1981)；ならびにNygren、J. Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982)に記載の方法が挙げられる。

40

50

【0153】

抗体はまた、組換え細胞培養物または天然の供給源由来の抗原のアフィニティー精製のために有用である。このプロセスにおいて、抗体は、当該分野において周知の方法を使用して、適切な支持体（例えば、Sephadex樹脂または濾紙）に固定化される。次いで、固定化された抗体は、精製されるべき抗原を含有するサンプルと接触され、その後、支持体が、固定化された抗体に結合されるこの抗原を除いたサンプル中の実質的にすべての物質を取り除く適切な溶媒を用いて洗浄される。最終的に、この支持体は、抗体から抗原を放出する別の適切な溶媒を用いて洗浄される。

【0154】

（F．抗体を含むキット）

本発明のさらなる実施態様では、例えば、上記の治療的または非治療的適用に使用され得る抗体を含む、製品およびキットが提供される。製品は、ラベルを有する容器を備える。適切な容器としては、例えば、瓶、バイアル、および試験管が挙げられる。この容器は、ガラスまたはプラスチックのような種々の材料から形成され得る。この容器は、上記のような、治療的または非治療的適用のために有用である活性薬剤を含む組成物を収容する。この組成物中のこの活性薬剤は、抗体（例えば、Apo-2Lレセプター抗体）である。容器のラベルは、この組成物が、特定の治療的または非治療的適用のために使用されることを示し、そしてまた、上記のような、インビボまたはインビトロのいずれかでの使用についての指示を示し得る。

【0155】

本発明のキットは、代表的に、上記の容器、および商業的観点および使用者の観点から望ましい材料（緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および使用のための指示を有するパッケージインサートを含む）を含む1以上の他の容器を備える。

【実施例】

【0156】

以下の実施例は、例示の目的のためにのみ提供され、そしていかなる様式においても本発明の範囲を限定することは決して意図しない。

【0157】

本明細書中に引用される全ての特許および文献の参考文献は、その全体が本明細書中で参考として援用される。

【0158】

（実施例1：免疫原の調製）

以下の実施例2および実施例3のレセプター抗原は全て、Apo-2リガンドについてのレセプターである[Pittiri, J. Biol. Chem., 271:12687-12690 (1996); およびW097/25428]。Apo-2Lレセプターは、以下であった：DR4 [Panら, Science, 276:1111-1113 (1997)]; Apo-2 [Sheridanら, Science 277:818-821 (1997) において「DR5」と呼ばれる]; DcR1 [Sheridanら, Science 277:818-821 (1997)]; およびDcR2 [Marstersら, Curr. Biol., 7:1003-1006 (1997)]。

【0159】

レセプター免疫付着因子 (immunoadhesins) (「DR4-IgG」、「Apo-2-IgG」、「DcR1-IgG」、および「DcR2-IgG」と称される) を、各レセプターの細胞外ドメイン配列を、以前[Ashkenaziら, Proc. Natl. Acad. Sci., 88:10535-10539 (1991)]に記載されたようにpRK5中の、ヒト免疫グロブリンG₁重鎖のヒンジ領域およびFc領域に融合することにより調製した。免疫付着因子タンパク質は、ヒト293細胞への一過性トランスフェクションによって発現され、そしてAshkenaziら(前出)によって記載されるように、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって細胞上清から精製された。精製された免疫付着因子を、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中に懸濁した

10

20

30

40

50

。

【0160】

(実施例2:混合抗原免疫)

本実施例における動物を、上記の実施例の4つのレセプター免疫付着因子で免疫した。用いた混合抗原免疫スキームを、図1に示す。

【0161】

Balb/cマウス(Charles River Laboratoriesから入手した)を、1:1の免疫付着因子:アジュバント比でモノホスホリルリピドA+トレハロースジコリノミコレートアジュバント(MPL-TDM;Ribi Immunochem. Research Inc., Hamilton, MT)中に懸濁したDR4-IgG、Apo-2-IgG、DcR1-IgGおよびDcR2-IgGの混合物(各1μg)を用いて各後肢パッドに3~4日間の間隔で14回免疫した(DcR2-IgGは、6回目の最後の免疫のための混合物にのみ含まれていた)。

10

【0162】

最後のブーストの3日後、膝窩リンパ節細胞節をこれらのマウスから取り出し、そして単一細胞懸濁物を、1%ペニシリン-ストレプトマイシンを補充したDMEM培地(BioWhittaker Corp.から入手した)中に調製した。リンパ節細胞を、35%ポリエチレングリコールを用いてマウス骨髄腫細胞P3X63AgU.1(ATCC CRL 1597)に融合し、そして96ウェル培養プレート中で培養した。

20

【0163】

ハイブリドーマを、100μMヒポキサンチン、0.4μMアミノプテリン、および16μMチミジン(1xHAT、Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を含有するスーパーDMEM[DMEM+10%ウシ胎仔血清(FCS)、10%NCTC-109(BioWhittaker, Walkersville, MD)、100mMピルベート、100U/mlインスリン、100mMオキサロ酢酸、2mMグルタミン、1%非必須アミノ酸(GIBCO)、100U/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシン]中で選択した。

【0164】

融合10日後、180μlの各ハイブリドーマ培養上清を、3つの異なる抗原に対する抗体(すなわち、DR4-IgG、Apo-2-IgGおよびCD4-IgGコントロール)の存在について捕獲ELISAにおいてスクリーニングした。ハイブリドーマ細胞に、10%FCSおよび抗生物質を含む200μlのスーパーDMEMを再度供給した。2日後、180μlの培養上清を収集し、そして別の2つの異なる抗原に対する抗体(すなわち、DcR1-IgGおよびDcR2-IgG)の存在について捕獲ELISAにおいてスクリーニングした。ELISAの結果を慎重に調べた後に、各抗原に対するモノクローナル抗体を分泌する潜在的にポジティブなハイブリドーマを、限界希釈法を用いて2回クローン化した。これらのクローンから得た培養上清を、特定の抗原に結合するが他の抗原(CD4-IgGを含む)には結合しない能力について、捕獲ELISAにおいて再度試験した。抗体のアイソタイプもまた決定した。

30

【0165】

選択されたクローンもまた、(a)細胞膜上に発現されるApo-2Lレセプターを認識する能力についてフローサイトメトリー(FACS)によって;(b)リガンド-レセプター相互作用をブロックする能力について、および(c)アゴニスト活性について試験した。

40

【0166】

(実施例3:単一抗原免疫)

単一抗原免疫スキームを、図2に示す。一般的な方法は、単一抗原のみを免疫原として用い、そしてハイブリドーマのスクリーニングの間に、特定の抗原およびコントロールのCD4-IgGに対するポジティブなモノクローナル抗体の存在についてスクリーニングするために上清(180μl)を1回しか収集しなかったこと以外は、上記の実施例2に

50

おける混合抗原免疫プロトコルとほぼ同じであった。

【0167】

Balb/cマウス(Charles River Laboratoriesから入手した)を、 $0.5 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ の免疫接着因子タンパク質(Ribi Immunochemical Research Inc., Hamilton, MTから購入したMPL-TDMアジュバント中に希釈した)を各後肢のパッドに3~4日間の間隔で10回注射することによって免疫した。最後のブーストの3日後、膝窩リンパ節をマウスから取り出し、そして単一細胞懸濁物を、1%ペニシリン-ストレプトマイシンを補充したDMEM培地(Biowhitaker Corp.から入手した)中に調製した。次いで、リンパ節細胞を、35%ポリエチレングリコールを用いてマウス骨髄腫細胞P3X63AgU.1(ATCC CRL 1597)に融合し、そして96ウェル培養プレート中で培養した。融合物から得られるハイブリドーマを、実施例2においてと同様にHAT培地中で選択した。融合の10日後、ハイブリドーマ培養上清($180 \mu\text{l}$)を、ELISAにおいてスクリーニングして、免疫接着因子タンパク質に結合しているモノクローナル抗体の存在について試験した。

10

【0168】

(実施例4:捕獲ELISA)

捕獲ELISAのために、96ウェルマイクロタイタープレート(Maxisorb; Nunc, Kamstrup, Denmark)を、PBS中の $50 \mu\text{l}$ の $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ヤギ抗ヒトIgG Fc(Cappel Laboratoriesから購入した)を各ウェルに添加し、そして4に overnight インキュベートすることによりコーティングした。次いで、このプレートを、洗浄緩衝液(0.05% TWEEN 20™を含むPBS)を用いて3回洗浄した。次いで、マイクロタイタープレート中のウェルを、PBS中の $50 \mu\text{l}$ の2.0%ウシ血清アルブミン(BSA)を用いてブロックし、そして室温にて1時間インキュベートした。次いで、このプレートを、洗浄緩衝液を用いてさらに3回洗浄した。

20

【0169】

洗浄工程の後、アッセイ緩衝液(PBS+0.5% BSA)中の $50 \mu\text{l}$ の $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の免疫付着因子タンパク質(上記の通り)を各ウェルに添加した。このプレートを、シェーカー装置上で室温にて1時間インキュベートし、その後、洗浄緩衝液を用いて3回洗浄した。

30

【0170】

洗浄工程後、 $100 \mu\text{l}$ のハイブリドーマ上清または精製された抗体(プロテインG-sepharoseカラムを用いる)($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)を、指定されたウェルに添加した。 $100 \mu\text{l}$ のP3X63AgU.1骨髄腫細胞馴化培地を、他の指定されたウェルにコントロールとして添加した。このプレートを、シェーカー装置上で室温にて1時間インキュベートし、次いで洗浄緩衝液を用いて3回洗浄した。

【0171】

次いで、アッセイ緩衝液(PBS中の0.5%ウシ血清アルブミン、0.05% TWEEN 20™、0.01% Thimersol)中に1:1000に希釈した $50 \mu\text{l}$ のHRP結合体化ヤギ抗マウスIgG Fc(Cappel

40

Laboratoriesから購入される)を、各ウェルに添加し、そしてこのプレートを、シェーカー装置上で室温にて1時間インキュベートした。このプレートを、洗浄緩衝液を用いて3回洗浄し、続いて $50 \mu\text{l}$ の基質(TMBマイクロウェルペルオキシダーゼ基質, Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD)を各ウェルに添加し、そして室温にて10分間インキュベートした。この反応を、 $50 \mu\text{l}$ のTMB 1成分停止溶液(ジエチルグリコール, Kirkegaard & Perry)を各ウェルに添加することによって停止させ、そして450nmでの吸光度を自動マイクロタイタープレートリーダーにおいて読み取った。

【0172】

50

(実施例5：抗体のアイソタイプ分類)

抗体のアイソタイプを、アイソタイプ特異的ヤギ抗マウスIg (Fisher Biotech, Pittsburgh, PA)を用いてマイクロタイタープレートに4にて一晚コーティングすることにより決定した。次いで、このプレートを、洗浄緩衝液で洗浄した。次いで、マイクロタイタープレート中のウェルを、200 μ lの2%ウシ血清アルブミンを用いてブロックし、そして室温にて1時間インキュベートした。このプレートを、洗浄緩衝液を用いてさらに3回洗浄した。次に、100 μ lのハイブリドーマ培養上清または5 μ g/mlの精製抗体を、指定のウェルに添加した。このプレートを、室温にて30分間インキュベートし、次いで50 μ lのHRP結合体化ヤギ抗マウスIgG (上記の通り)を各ウェルに添加した。このプレートを、室温にて30分間インキュベートした。このプレートに結合したHRPのレベルを、上記の通りにHRP基質を用いて検出した。

10

【0173】

(実施例6：フローサイトメトリー)

FACS分析を、9D細胞(Apo-2およびDR4を発現するヒトBリンパ球細胞株; Genentech, Inc.)またはDcR1およびDcR2を発現するヒト微小血管内皮(HUMEC)細胞(Cell Systems, Inc.)を用いて行った。セルソーター緩衝液(1% FCSおよび0.02% NaN₃を含むPBS)中の25 μ lの細胞懸濁物(4 \times 10⁶細胞/ml)を、U底型マイクロタイターウェルに添加し、セルソーター緩衝液(CSB)中の100 μ lの培養上清または精製モノクローナル抗体(プロテイン-G sepharoseカラム上に精製される)(10 μ g/ml)と混合し、そして氷上で30分間インキュベートした。洗浄後、細胞を、100 μ lのFITC結合体化ヤギ抗マウスIgGとともに4にて30分間インキュベートした。細胞をCSB中で2回洗浄し、そして150 μ lのCSB中に再懸濁し、そしてFACSscan(Becton Dickinson, Mountain View, CA)によって分析した。

20

【0174】

(実施例7：Apo-2L誘導性アポトーシスをブロックする抗体の能力についてのアッセイ)

ハイブリドーマ上清および精製抗体を、Apo-2リガンド誘導性9D細胞アポトーシスをブロックする能力について試験した。ヒト9D細胞(5 \times 10⁵細胞)を、Falcon 2052チューブ中の50 μ lの完全RPMI培地(RPMI+10% FCS、グルタミン、非必須アミノ酸、ペニシリンおよびストレプトマイシン、ならびにビルビン酸ナトリウム)中に懸濁した。200 μ lの培地中の10 μ gの抗体+10 μ gのDR4抗体を細胞に添加し、そして細胞を氷上で15分間インキュベートした。250 μ lの完全RPMI中の0.5 μ gのApo-2L(WO 97/25428に記載される通りに調製される可溶性Hisタグ化Apo-2L; Pittiら、前出もまた参照のこと)を、細胞に添加した。9D細胞を、7%CO₂の存在下にて37にて一晚インキュベートした。細胞を回収し、そしてPBS中で1回洗浄した。次いで、細胞の生存率を、製造業者(Clontech)の推奨に従い、ホスファチジルセリンに結合しているFITC-Annexin Vの染色によって決定した。手短には、PBS中で洗浄した細胞を、200 μ lの結合緩衝液中に再懸濁した。10 μ lのAnnexin V-FITC(1 μ g/ml)および10 μ lのヨウ化プロピジウム(propidium iodide)を、細胞に添加した。暗所での15分間のインキュベーションの後、細胞をFACSscanによって分析した。

30

40

【0175】

(実施例8：抗マウスIgとの架橋後のモノクローナル抗体によるアポトーシス)

50 μ lの完全RPMI培地(RPMI+10% FCS、グルタミン、非必須アミノ酸、ペニシリンおよびストレプトマイシン、ならびにビルビン酸ナトリウム)中のヒト9D細胞(2.5 \times 10⁵細胞)を、Falcon 2052チューブに添加した。次いで

50

、細胞を、100 μlの完全RPMI培地中の1 μgのモノクローナル抗体とともに氷上で15分間インキュベートした。次いで、細胞を、350 μlの完全RPMI培地中の10 μgのヤギ抗マウスIgG Fcとともに37 にて一晩インキュベートした。PBSでの1回の洗浄後、細胞を、0.5% BSAを含む200 μlのPBS中に再懸濁し、そして10 μlのFITC - Annexinおよび10 μlのヨウ化プロピジウムとともに暗所で15分間インキュベートした。次いで、死んだ細胞を、上記の通りにFACSscanによって検出した。

【0176】

(結果および考察)

図3および図4は、混合抗原で免疫したマウス(図4)に対する、単一抗体で免疫したマウス(図3)からの抗原特異的血清力価の比較を提供する。

10

【0177】

各々の抗原で免疫したマウスからの血清力価(EC50)は、各々の特異的抗原について約10,000であった。混合抗原で免疫したマウスの抗原特異的血清力価(EC50)は、DR4-IgG、Apo-2-IgG、DcR1-IgGについて約10,000であり、そしてDcR2-IgGについて約5,000であった。従って、この抗原特異的抗体力価は、マウスを個々の抗原で免疫したか、または4つの異なる抗原の混合物で免疫したかによらず、極めて同等であった。4つの異なる抗原で免疫したマウスのDcR2-IgG特異的力価(約1:4,000)は、DcR2-IgG単独で免疫したマウスのDcR2-IgG特異的力価(約1:10,000)よりもわずかに低かった。しかし、これは、混合抗原で免疫したマウスは、DcR2-IgGを6回しか受けなかったが、DcR2-IgG単独で免疫されたマウスは、10回の注射を受けたという事実に起因し得る。

20

【0178】

【表1】

表 1.
単一抗原免疫と混合抗原免疫との間の比較

	DR4		Apo-2		DcR2	
	単一抗原	混合抗原	単一抗原	混合抗原	単一抗原	混合抗原
ELISA ポジティブ	13.30%	6.50%	4.50%	2.10%	1.20%	2.30%
FACS ポジティブ	48%	17%	36%	46%	20%	0
選択された 最終モノクローナル 抗体	5	3	4	5	1	0
特異性	3/5	1/3	1/4	1/5		
交叉反応性*	0/5	1/3	0/4	1/5		

30

40

* DR4およびApo-2の両方と特異的に交叉反応する。

表1は、混合抗原で免疫したマウスに対して、単一抗原で免疫したマウスを用いてのDR4、Apo-2、およびDcR2に対するモノクローナル抗体の作製の有効性を比較する。両方の方法を用いてモノクローナル抗体を作製し得る。しかし、混合抗原免疫スキ-

50

△は、異なるレセプターと交叉反応する（すなわち、2つのタンパク質間で共有されるエピトープを認識する；表1を参照のこと）、より多くの抗体の生成および単離をもたらした。詳細には、混合抗原免疫プロトコルを用いて、異なるApo-2Lレセプターと交叉反応する抗体を同定した。捕獲ELISAによって決定した場合の交叉反応性を、表2に示す。

【0179】

【表2】

表 2.
Apo-2Lレセプターとの抗体交叉反応性

10

	アノグロ	交叉反応性			
		DR4	Apo-2	DcR1	DcR2
3H1.18.10	G1	+/-	+++	+/-	+/-
3H3.14.5	G1	+/-	+++	+/-	+/-
3D5.1.10	G1	++	+++	-	+/-

++ ≥ 75% 結合 (Apo-2 結合と比較して)
 + -50-74% 結合
 +/- -25-49% 結合
 - ≤ 24% 結合

20

図6Cおよび表2に示すように、3D5.1.10抗体は、Apo-2に特異的に結合し、そしてDR4と特異的に交叉反応した。抗体3H1.18.10および3H3.14.5は、Apo-2を特異的に結合し、そして試験した他のApo-2Lレセプターとのいくつかの交叉反応性を提示した（表2ならびに図6Aおよび図6B）。表2からの抗体の他の生物学的活性を、実施例6（細胞表面レセプターに対する抗体結合）；実施例7（ブロック能力または中和能力）；および実施例8（アポトーシス活性）に記載される方法に従って評価した。結果を以下の表3に示す。

30

【0180】

【表3】

表 3.
抗Apo-2Lレセプター抗体の他の活性

	9D細胞の FACS	“ブロック”能力	アポトーシス活性.
3H1.18.10	+	-	-
3H3.14.5	+	+	+
3D5.1.10	+	-	-

40

3つの抗体全ては、9D細胞の表面上に発現されたApo-2を結合し得た。3H3.14.5抗体はまた、Apo-2LとApo-2との間の相互作用を介して誘導されるアポトーシスを阻害し得た。この抗体はさらに、抗体を架橋する抗Fc抗体の存在下で9D細胞のアポトーシスを誘導し得た。

【0181】

（材料の寄託）

以下の材料を、American Type Culture Collection

50

, 12301 Parklawn Drive, Manassas, VA, USA (ATCC) に寄託した:

【0182】

【表4】

<u>材料</u>	<u>ATCC 寄託番号</u>	<u>寄託日</u>
pRK5-Apo-2	209021	1997年5月8日
3F11.39.7	HB-12456	1998年1月13日
3H1.18.10	HB-12535	1998年6月2日
3H3.14.5	HB-12534	1998年6月2日
3D5.1.10	HB-12536	1998年6月2日

10

この寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項およびそれに基づく規則（ブダペスト条約）に拠って行われた。このことは、寄託日から30年間の寄託物の生存可能な培養物の維持を保証する。この寄託は、ブダペスト条約の条項に基づいてATCCによって利用可能にされ、そしてGenentech, Inc.とATCCとの間の合意を受けなければならず、この合意は、関連する米国特許の発行によって、またはいずれかの米国もしくは外国特許出願の公共への公開のいずれか速い方によって、寄託培養物の子孫の公共への永続的かつ制限されない利用可能性を保証し、そして米国特許法122条およびそれに従う長官の規則（886 O G 638を特に参照して、米国特許法施行規則1.14を含む）に基づいて権利を与えられる米国特許商標庁長官によって決定されたものへのこの子孫の利用可能性を保証する。

20

【0183】

本特許出願の譲受人は、適切な条件下で培養した場合に寄託材料の培養物が、死滅するか、失われるか、または破壊された場合、この材料が、通知により、同一材料の別のもの迅速に置き換えられることに合意した。この寄託材料の利用可能性は、いずれかの政府機関の下でその特許法に従って与えられる権利に違反して本発明を実施することのライセンスであるとは解釈されない。

【0184】

上記の詳細な説明は、当業者が本発明を実施するのを可能にするに充分であると考えられる。本発明は、寄託された構築物による範囲に限定されない。なぜなら、寄託された実施態様は、本発明の特定の局面の1つの例示として意図され、そして機能的に等価である任意の構築物が本発明の範囲内にあるからである。本明細書中の寄託材料は、本明細書中に含まれる詳細な説明が本発明のいずれかの局面（本発明の最良の形態を含む）の実施を可能にするのに不適切であることについての承認を構成せず、かつ寄託材料が示す特定の例示へと特許請求の範囲の範囲を限定するとも解釈されない。実際、本明細書中に示され、かつ記載されたものに加えて、本発明の種々の改変は、上記の説明から当業者に明らかになり、そして添付の特許請求の範囲の範囲内にある。

30

【 5 A 】

1 CCCAGCCGTC GCGATAAATC ACGACAGCCG CCGAGAACCC GCGAAATCTC GCGCTCACCA AATACACCGA CCGTCCCGCA TCGACTCTTA GCGCTCGAAC
 GCGTCCCGAG CCGTAAATTA TCGTCCCGCC GCGCTCTTGG CCGTATAGAA CCGCGATGTT TTAGTGTGCT GCTACAGGCT AGATAAATC CCGCATTTG
 101 CCGCGGCTAT GAGACACTTC AAGACCCGTC CCGACCGCCA TGGACAGACG GCGACACACG CCGCCCGCCG CCGTCCCGCC CCGGAAAGCG GACGCGCCG
 GCGCCCGCA CTTCTCGATA TTTCTCGAG GCGAGGCGCT ACCCTGTC CCGTCTTGG CAGCCCGC GAGCCCGC GCGCTCTTC TCGCGGCT
 201 GAGCCAGGTA GCGCCCGGGA GCGAGGCTTC GCGTCCCGCT CCGCAGAC CCGTCCCGCC TTTGTCGCG GCGTCCCGTC TTTGTCGCG TCGAGTCTCG
 CCGGCTGCTT CCGCGCCCTT CCGTCCCGAC CCGAGCGCCA GCGGTCTGCG GACACAGCG CACGCGCGCG CCGAGACGTC GACTCAGCG GACTCAGCG
 22 Prollygl uAlaLyslyl AlaLysPreg LyuLyslyl AlaLyslyl Prollylsh LyuLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 301 TCGTCCCGCC GCGCCAGGCG TACGTCGCG GCGCCCGCG CCGCCCGCG CCGCCCGCG CCGCCCGCG CCGCCCGCG CCGCCCGCG CCGCCCGCG
 55 LeuLyslyl GluLyslyl eAlaLysPreg LyuLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 401 TCGAGAGCG GTCAGAGTCC GTCAGAGTCC GTCAGAGTCC GTCAGAGTCC GTCAGAGTCC GTCAGAGTCC GTCAGAGTCC GTCAGAGTCC GTCAGAGTCC
 88 Ser-GluLyslyl AlaLysPreg LyuLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 501 GAGCCAGGTA GCGCCCGGGA GCGAGGCTTC GCGTCCCGCT CCGCAGAC CCGTCCCGCC TTTGTCGCG GCGTCCCGTC TTTGTCGCG
 601 GAGCCAGGTA GCGCCCGGGA GCGAGGCTTC GCGTCCCGCT CCGCAGAC CCGTCCCGCC TTTGTCGCG GCGTCCCGTC TTTGTCGCG
 155 LyuLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 701 GAGCCAGGTA GCGCCCGGGA GCGAGGCTTC GCGTCCCGCT CCGCAGAC CCGTCCCGCC TTTGTCGCG GCGTCCCGTC TTTGTCGCG
 188 GlyLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 801 GTCCTCTGAG CAGCAAAATG AAGTCCGCG CCGACAGGTC TCGACATGCT GTCCTCCCGG CCGTCCCGCC GCGTCCCGCG TCGTCCCGCG
 CCGAGACTC GTCCTCTTAC TCGACATGCT GTCCTCCCGG CCGTCCCGCC GCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG
 255 ValPreglu GluLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 1001 CCGAAGGCT CCGAGAGGTC GAGCCAGGTA AATACAGGTA AATACAGGTA AATACAGGTA AATACAGGTA AATACAGGTA AATACAGGTA
 CCGACTTCCA GACTCTTCC CCGCAGAC CCGAGGCTTC GACTCTTCC GACTCTTCC GACTCTTCC GACTCTTCC GACTCTTCC GACTCTTCC
 288 AlaLyslyl SerGluLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 1101 CTTTTCAGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC
 GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC
 322 PheLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 1201 GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC
 GTCAGAGGTC TATTCAGGTC TATTCAGGTC TATTCAGGTC TATTCAGGTC TATTCAGGTC TATTCAGGTC TATTCAGGTC TATTCAGGTC
 355 ThrMetLeu IleLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 1301 AGATATGCG ACCACTTCTT GAGCTCTTGA AGTCTCTTCT AGTCTCTTCT AGTCTCTTCT AGTCTCTTCT AGTCTCTTCT AGTCTCTTCT
 TCTTACTTCT TCGTCCCGCG CCGAGACTTC TCGACTTCCA TCGACTTCCA TCGACTTCCA TCGACTTCCA TCGACTTCCA TCGACTTCCA
 388 LyuLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC
 1401 CTTTTCAGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC
 1501 CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG
 GCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG
 1601 GTCAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC
 GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC
 1701 TCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG
 ACCCGACTTC TCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG

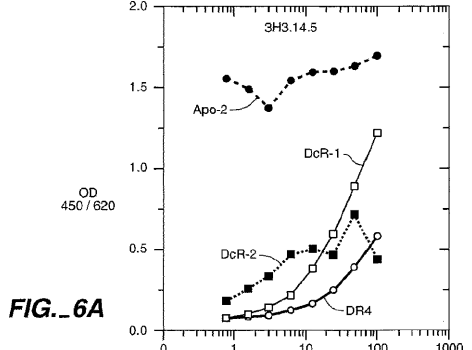
FIG.-5A

【 5 B 】

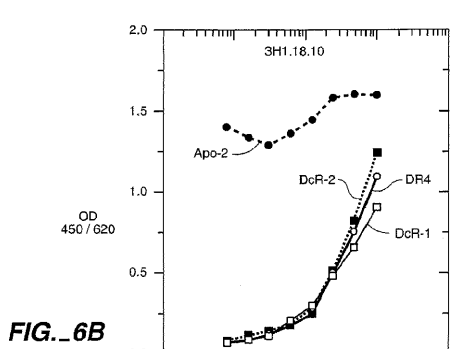
901 GTCCTCTGAG CAGCAAAATG AAGTCCGCG CCGACAGGTC TCGACATGCT GTCCTCCCGG CCGTCCCGCC GCGTCCCGCG TCGTCCCGCG
 CCGAGACTC GTCCTCTTAC TCGACATGCT GTCCTCCCGG CCGTCCCGCC GCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG
 255 ValPreglu GluLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 1001 CCGAAGGCT CCGAGAGGTC GAGCCAGGTA AATACAGGTA AATACAGGTA AATACAGGTA AATACAGGTA AATACAGGTA AATACAGGTA
 CCGACTTCCA GACTCTTCC CCGCAGAC CCGAGGCTTC GACTCTTCC GACTCTTCC GACTCTTCC GACTCTTCC GACTCTTCC GACTCTTCC
 288 AlaLyslyl SerGluLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 1101 CTTTTCAGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC
 GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC
 322 PheLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 1201 GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC
 GTCAGAGGTC TATTCAGGTC TATTCAGGTC TATTCAGGTC TATTCAGGTC TATTCAGGTC TATTCAGGTC TATTCAGGTC TATTCAGGTC
 355 ThrMetLeu IleLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 1301 AGATATGCG ACCACTTCTT GAGCTCTTGA AGTCTCTTCT AGTCTCTTCT AGTCTCTTCT AGTCTCTTCT AGTCTCTTCT AGTCTCTTCT
 TCTTACTTCT TCGTCCCGCG CCGAGACTTC TCGACTTCCA TCGACTTCCA TCGACTTCCA TCGACTTCCA TCGACTTCCA TCGACTTCCA
 388 LyuLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl AlaLyslyl
 GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC
 1401 CTTTTCAGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC CCGAGAGGTC
 1501 CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG
 GCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG
 1601 GTCAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC
 GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC GAGAGGTC
 1701 TCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG
 ACCCGACTTC TCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG CCGTCCCGCG

FIG.-5B

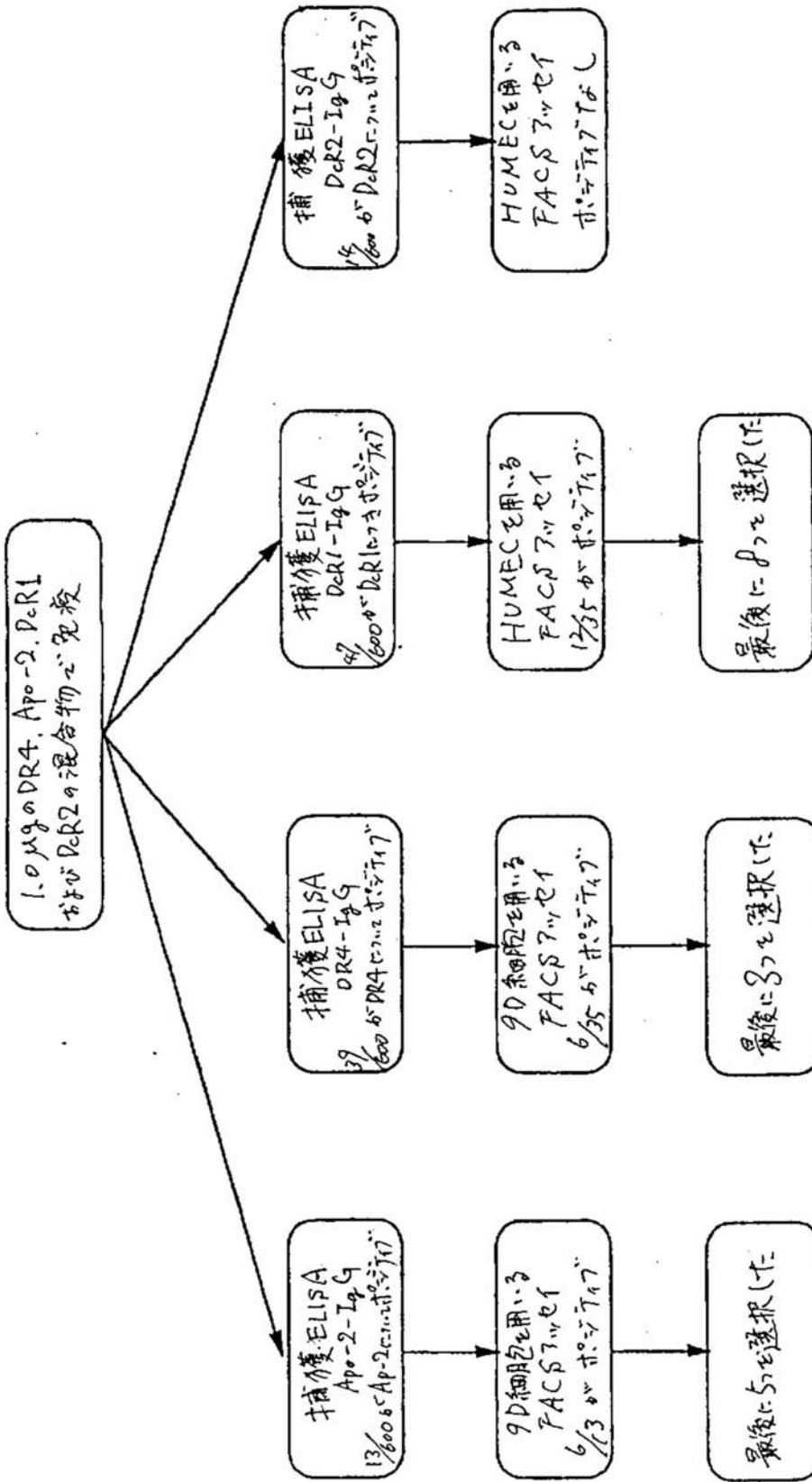
【 6 A 】



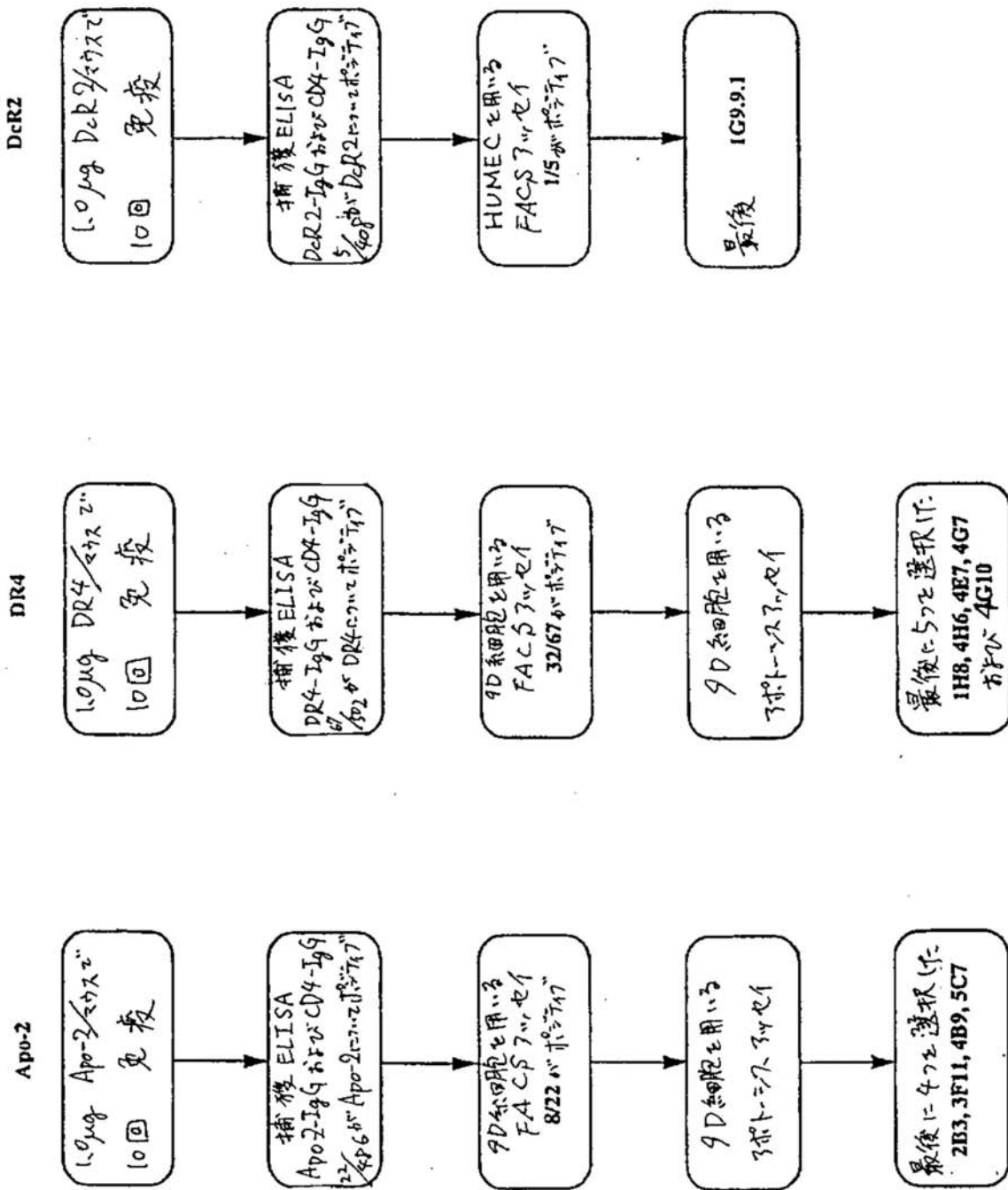
【 6 B 】



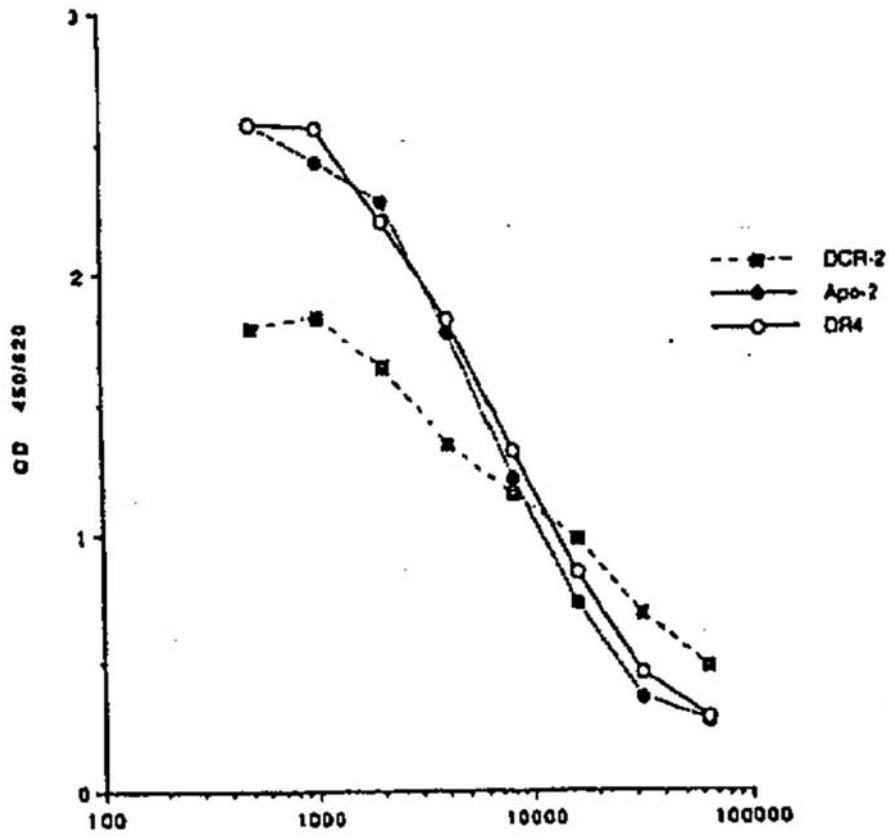
【図1】



【 図 2 】

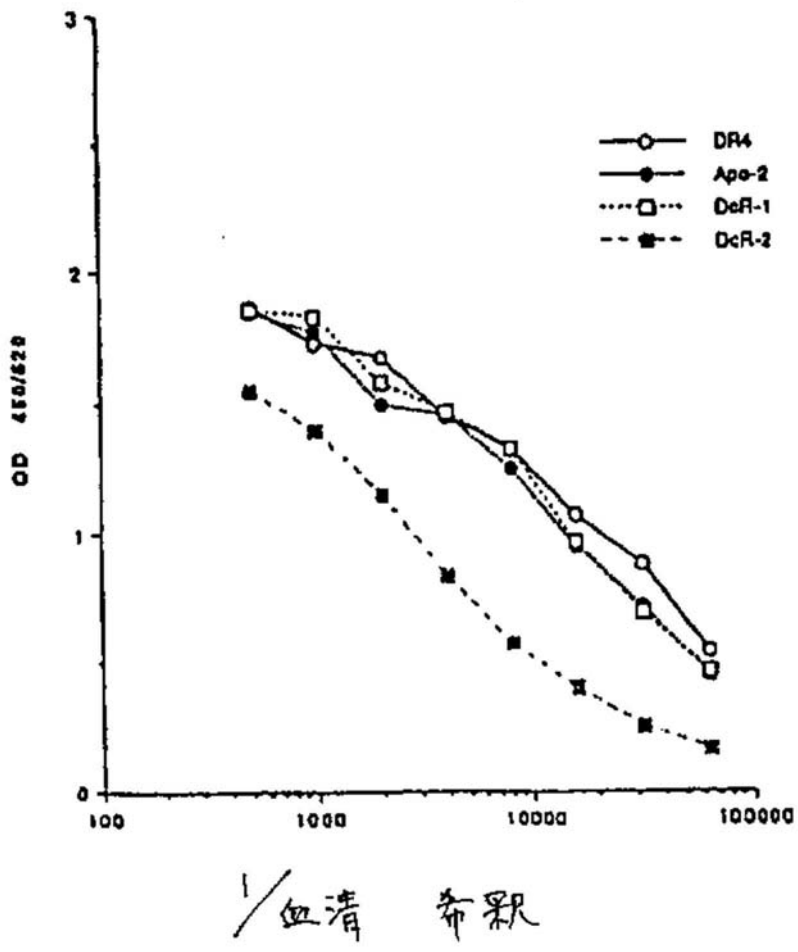


【 図 3 】

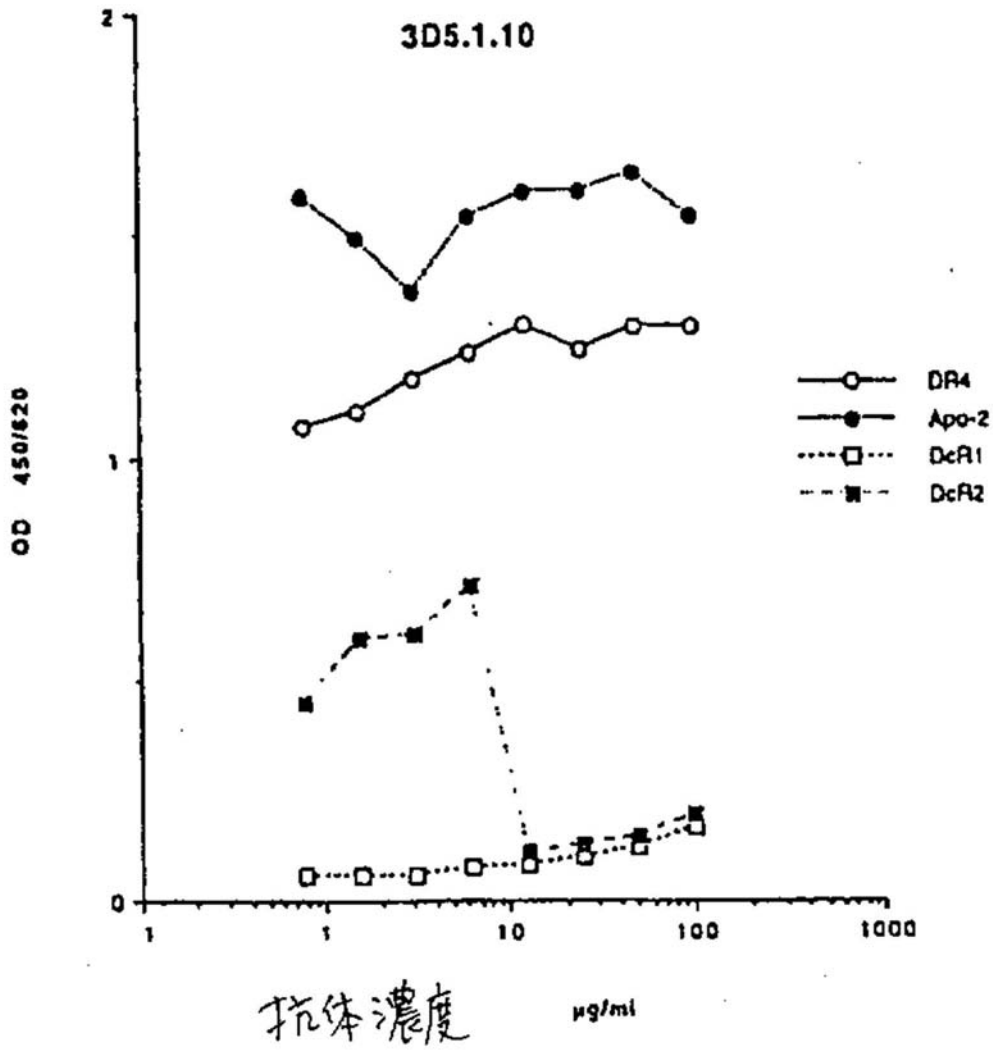


1/血清希釈

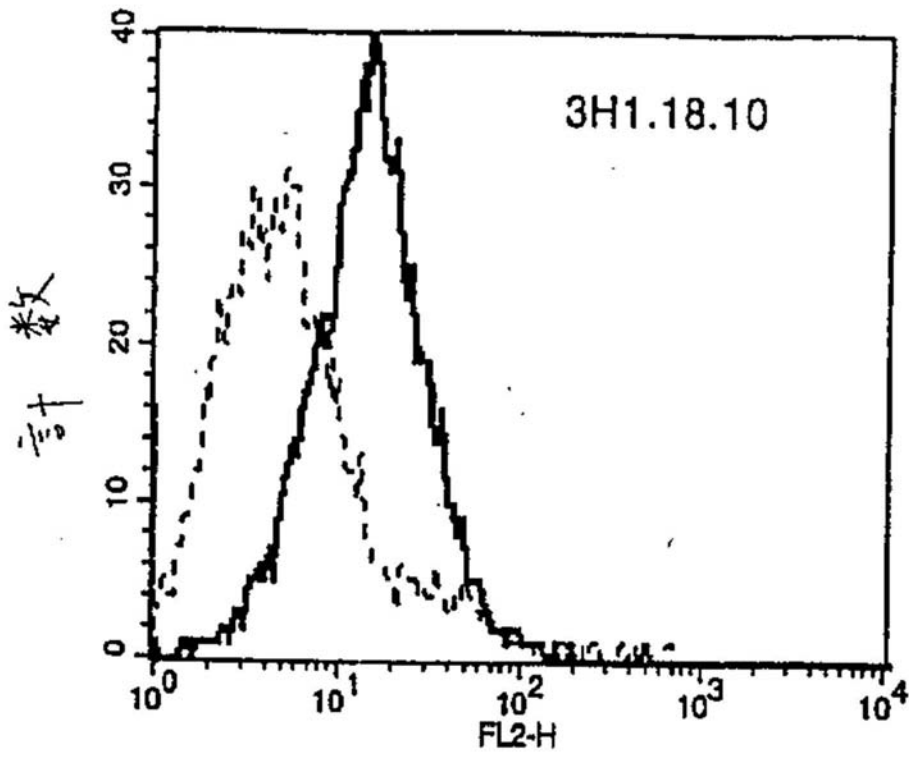
【 図 4 】



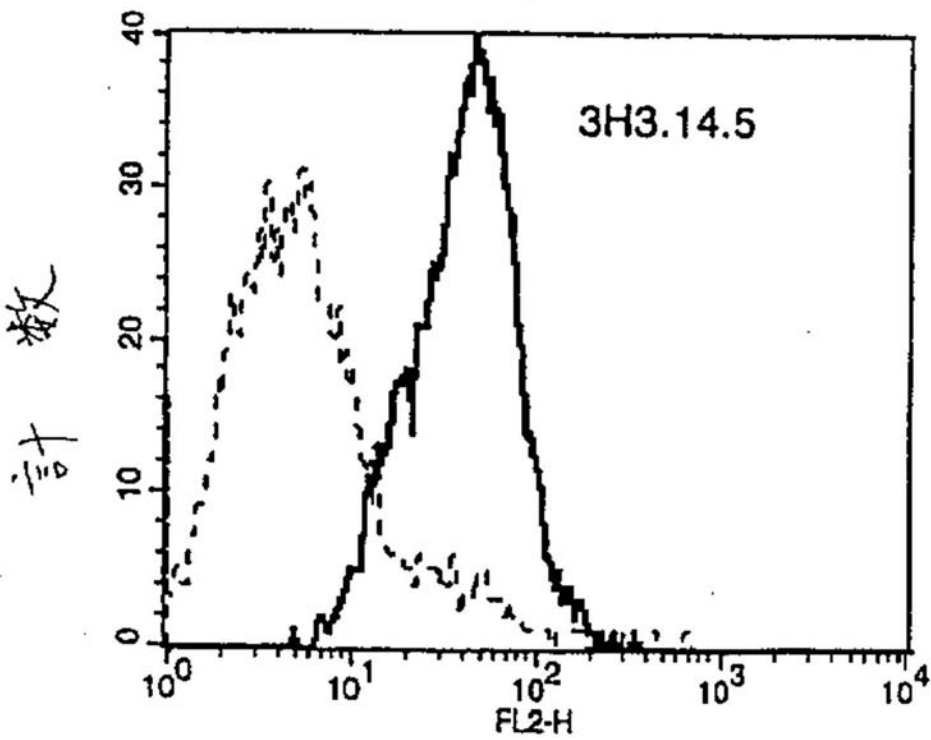
【 図 6 C 】



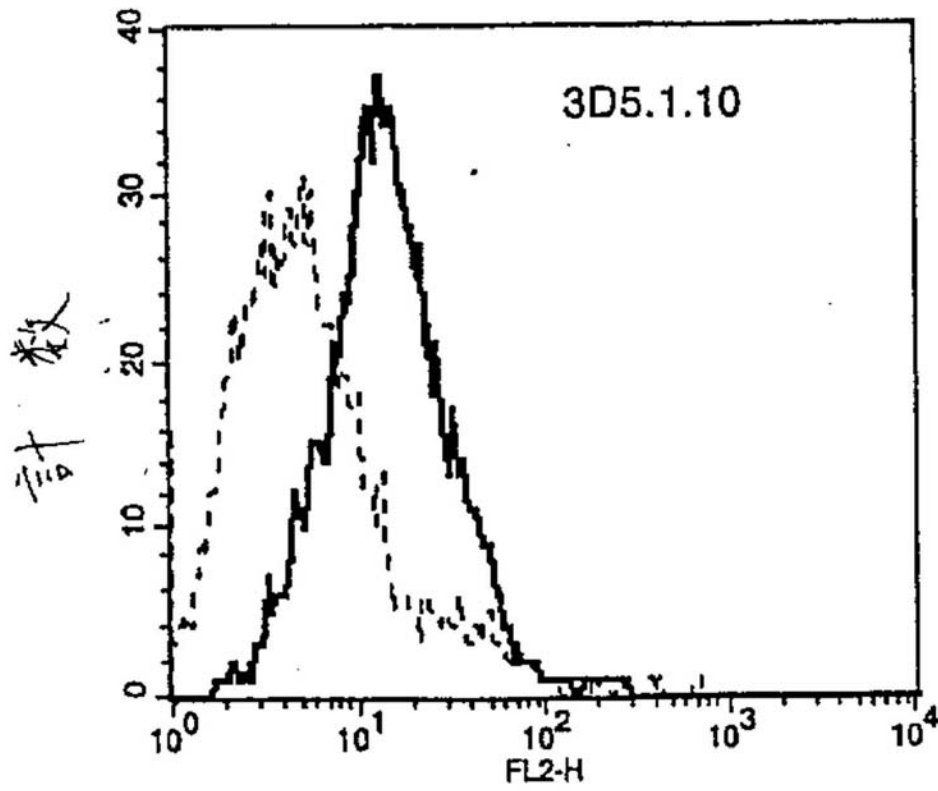
【 図 7 A 】



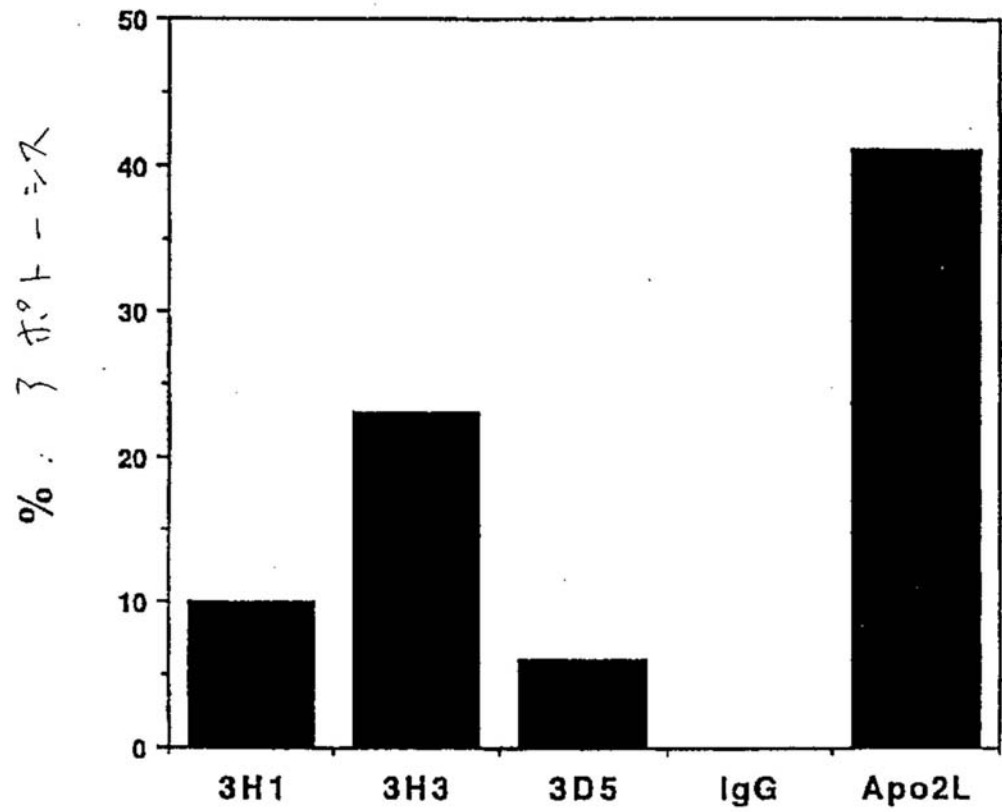
【 図 7 B 】



【図7C】



【図8】



【配列表】

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
			C 1 2 N	5/00	B

(72)発明者 アビ ジェイ . アシュケナジ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 2 , サン マテオ , タリータウン ストリート
 1 4 5 6

(72)発明者 アナン チュンザラパイ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 5 , コルマ , エリス ドライブ 8 2 6

(72)発明者 ケイ . ジン キム
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 4 , ロス アルトス , ベネベニュー アベニュー
 8 2 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 CA10 DA02 EA04
 FA02 FA07 FA10 GA05 GA11 GA18 GA27 HA03 HA08 HA09
 HA12 HA14 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01
 4B065 AA91X AA92X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA24 BA25 CA25
 CA44
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA28
 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	单克隆抗体，交叉反应抗体及其制备方法		
公开(公告)号	JP2009112318A	公开(公告)日	2009-05-28
申请号	JP2009051399	申请日	2009-03-04
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	アビジェイアシュケナジ アナンチュンザラパイ ケイジンキム		
发明人	アビ ジェイ. アシュケナジ アナン チュンザラパイ ケイ. ジン キム		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/02 C07K16/00 C07K16/28 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/531 A61K38/00 A61K39/395 A61P35/00 C07K14/705 C12R1/91		
CPC分类号	C07K14/70578 A61K38/00 C07K16/2878 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2319/00 C07K2319/30		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.C C07K16/00 C07K16/28 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12N5/00.B C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/FA10 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA27 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA09 4B024/HA12 4B024/HA14 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/BA25 4B065/CA25 4B065/CA44 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA28 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	09/096637 1998-06-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供根据混合抗原免疫方案生产单克隆抗体的方法。解决方案：此外，公开了通过该方法可获得的抗体，并且抗体与Apo-2配体（Apo-2L）可结合的两种或更多种不同受体特异性交叉反应。在本发明中发现，源自用不同抗原的混合物免疫的动物的血清滴度令人惊讶地类似于用单一抗原免疫的动物中获得的血清滴度。Z

	DR4		Apo-2		DcR2	
	单抗原	混合抗原	单抗原	混合抗原	单抗原	混合抗原
ELISA ポジティブ	13.30%	6.50%	4.50%	2.10%	1.20%	2.30%
FACS ポジティブ	48%	17%	36%	46%	20%	0
選択された 最終E170+IV 抗体	5	3	4	5	1	0
特異性	3/5	1/3	1/4	1/5		
交叉反応性*	0/5	1/3	0/4	1/5		