(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2007-181458
(P2007-181458A)
(43)公開日　平成19年7月19日(2007.7.19)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00		4B064
C07K 14/705	(2006.01)	C07K	14/705		4B065
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18		4C085
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4H045

審査請求 有　請求項の数 35　ＯＬ　外国語出願　（全 26 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-338520 (P2006-338520)
(22)出願日　平成18年12月15日 (2006.12.15)
(31)優先権主張番号　60/750,746
(32)優先日　平成17年12月15日 (2005.12.15)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　390023582
財団法人工業技術研究院
ＩＮＤＵＳＴＲＩＡＬ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ　ＲＥＳＥＡＲＣＨ　ＩＮＳＴＩＴＵＴＥ
台湾新竹縣竹東鎮中興路四段１９５號
１９５　Ｃｈｕｎｇ　Ｈｓｉｎｇ　Ｒｄ．，Ｓｅｃ．４，Ｃｈｕｔｕｎｇ，Ｈｓｉｎ－Ｃｈｕ，Ｔａｉｗａｎ　Ｒ．Ｏ．Ｃ
(74)代理人　100065226
弁理士　朝日奈　宗太
(72)発明者　周　民元
台湾台北縣新店市柴▲ちぇん▼里３鄰安民街６５巷１５号８樓之１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】組み換え三重足場ベースポリペプチド

(57)【要約】　（修正有）
【課題】高い親和性、低い細胞分裂促進作用、および高いインビボ安定性を備えるタンパク質複合体ベースの結合試薬の提供。
【解決手段】　足場ドメインおよび異種ドメインをそれぞれ有する融合ポリペプチド鎖を形成する三重らせんコイルを含むタンパク質複合体。また、関連する単離融合ポリペプチド、核酸、ベクター、宿主細胞、および融合ポリペプチドの製造方法宿主細胞の培養、タンパク質複合体の精製方法。該試薬は多価（multi-valent）あるいは多重特異性（multi-specific）にもなり得る。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
第１の足場ドメインおよび該第１の足場ドメインの１つの末端に融合する第１の異種ドメインを含む第１の融合ポリペプチド鎖と、
第２の足場ドメインを含む第２の融合ポリペプチド鎖と、
第３の足場ドメインを含む第３の融合ポリペプチド鎖と、を含み、
該第１、第２および第３の足場ドメインが、三重らせんコイルを形成するよう並んでいる組み換えタンパク質複合体。
【請求項２】
前記異種ドメインが結合ドメインを含む請求項１記載のタンパク質複合体。
【請求項３】
前記結合ドメインが、リガンド結合ドメイン、リガンド、レセプター、親和性タグ、またはプロテオグリカンを含む請求項２記載のタンパク質複合体。
【請求項４】
前記結合ドメインが、免疫グロブリンの１つまたはそれ以上の相補決定領域を含む請求項２記載のタンパク質複合体。
【請求項５】
前記結合ドメインが、抗原結合フラグメントの配列を含む請求項４記載のタンパク質複合体。
【請求項６】
前記抗原結合フラグメントがＣＤ３またはＥＧＦＲに特異的に結合する請求項５記載のタンパク質複合体。
【請求項７】
前記抗原結合フラグメントが、一本鎖抗体の配列を含む請求項５記載のタンパク質複合体。
【請求項８】
前記第１の融合ポリペプチド鎖が、前記第１の足場ドメインのもう１つの末端に融合する第２の異種ドメインをさらに含む請求項１記載のタンパク質複合体。
【請求項９】
前記第１の異種ドメインが、ＣＤ３に特異的に結合する第１の一本鎖抗体の配列を含む請求項８記載のタンパク質複合体。
【請求項１０】
前記第２の異種ドメインが、ＥＧＦＲに特異的に結合する第２の一本鎖抗体の配列を含む請求項８記載のタンパク質複合体。
【請求項１１】
前記第２の融合ポリペプチド鎖が、前記第２の足場ドメインの１つの末端に融合する第３の異種ドメインを含む請求項８記載のタンパク質複合体。
【請求項１２】
前記第２の融合ポリペプチド鎖が、前記第２の足場ドメインのもう１つの末端に融合する第４の異種ドメインをさらに含む請求項１１記載のタンパク質複合体。
【請求項１３】
前記第３の融合ポリペプチド鎖が、前記第３の足場ドメインの１つの末端に融合する第５の異種ドメインを含む請求項１２記載のタンパク質複合体。
【請求項１４】
前記第３の融合ポリペプチド鎖が、前記第３の足場ドメインのもう１つの末端に融合する第６の異種ドメインを含む請求項１３記載のタンパク質複合体。
【請求項１５】
前記第１、第２または第３の足場ドメインが、１またはそれ以上の三重らせんリピートを含み、各リピートは次の式：（Ｘ１－Ｘ２－Ｘ３）ｎの配列を含んでおり、式中、Ｘ１はＧｌｙ残基、Ｘ２またはＸ３は任意のアミノ酸残基であり、かつｎは５またはこれより大

きい数である請求項１記載のタンパク質複合体。
【請求項１６】
前記第１、第２または第３の足場ドメインが、１つまたはそれ以上のＣ１ｑ、コレクチン、またはコラーゲンポリペプチド鎖の三重らせんリピートを含む請求項１５記載のタンパク質複合体。
【請求項１７】
Ｘ３がプロリンまたはヒドロキシプロリン残基である請求項１５記載のタンパク質複合体。
【請求項１８】
各リピートが（ＧＰＰ）$_{10}$の配列を含んでいる請求項１５記載のタンパク質複合体。
【請求項１９】
前記異種ドメインが酵素ドメインまたは蛍光タンパク質の配列を含む請求項１記載のタンパク質複合体。
【請求項２０】
前記第１、第２および第３の融合ポリペプチドが実質的に同一である請求項１記載のタンパク質複合体。
【請求項２１】
三重らせんコイルを形成するための足場ドメインと、該足場ドメインの１つの末端に融合する第１の異種ドメインとを含む組み換え融合ポリペプチド。
【請求項２２】
前記足場ドメインが、１またはそれ以上の三重らせんリピートを含み、各リピートが次の式：（Ｘ１－Ｘ２－Ｘ３）ｎの配列を含んでおり、式中、Ｘ１はＧｌｙ残基、Ｘ２またはＸ３は任意のアミノ酸残基であり、かつｎは５またはこれより大きい数である請求項２１記載の融合ポリペプチド。
【請求項２３】
Ｘ３がプロリンまたはヒドロキシプロリン残基である請求項２２記載の融合ポリペプチド。
【請求項２４】
前記足場ドメインのもう１つの末端に融合する第２の異種ドメインをさらに含む請求項２１記載の融合ポリペプチド。
【請求項２５】
前記足場ドメインが、Ｃ１ｑ、コレクチン、またはコラーゲンポリペプチド鎖の、１つまたはそれ以上の三重らせんリピートを含む請求項２１記載の融合ポリペプチド。
【請求項２６】
前記異種ドメインが、リガンド結合ドメイン、リガンド、レセプターまたは多糖類を含む請求項２１記載の融合ポリペプチド。
【請求項２７】
前記異種ドメインがファージディスプレイスクリーニングによって得られる請求項２６記載の融合ポリペプチド。
【請求項２８】
請求項２１記載の融合ポリペプチドをコードする配列またはその補体を含む単離核酸。
【請求項２９】
請求項２８記載の核酸を含む宿主細胞。
【請求項３０】
前記細胞が哺乳類または昆虫の細胞である請求項２９記載の宿主細胞。
【請求項３１】
前記哺乳類の細胞がマウス骨髄腫ＮＳ０細胞である請求項３０記載の宿主細胞。
【請求項３２】
請求項２８記載の核酸を含む発現ベクター。
【請求項３３】

請求項２９記載の宿主細胞を、前記核酸によりコードされるポリペプチドの発現を可能とする条件下、培地中で培養する工程と、前記培養された細胞または前記細胞の前記培地から前記ポリペプチドを精製する工程とを含む融合ポリペプチドの製造方法。
【請求項３４】
請求項１記載のタンパク質複合体の製造方法であって、
第１の足場ドメインおよび該第１の足場ドメインの１つの末端に融合する第１の異種ドメインを含む第１の融合ポリペプチド鎖をコードする第１の核酸と、第２の足場ドメインを含む第２の融合ポリペプチド鎖をコードする第２の核酸と、第３の足場ドメインを含む第３の融合ポリペプチド鎖をコードする第３の核酸とを含有する宿主細胞を、該３つの核酸にコードされるポリペプチドの発現およびそれらの間における三重らせんコイルの形成を可能とする条件下、培地で培養する工程、ならびに
培養された細胞または細胞の培地からタンパク質複合体を精製する工程
を含む方法。
【請求項３５】
前記宿主細胞が、プロリン残基をヒドロキシル化する酵素活性を含む真核細胞である請求項３４記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、２００５年１２月１５日に出願された米国特許出願番号６０／７５０，７４６の優先権を主張するものであり、その内容はここに参照することにより組み込まれる。
【０００２】
本発明は、高い親和性、低い細胞分裂促進作用、および高いインビボ安定性を備えるタンパク質複合体ベースの結合試薬に関する。該試薬は多価（multi-valent）あるいは多重特異性（multi-specific）にもなり得る。
【背景技術】
【０００３】
タンパク質ベースの結合試薬は治療または診断の適用において様々な用途がある。抗体がこのような試薬の優れたパラダイムであることは証明されている。実際、多くのモノクローナル抗体（ｍＡｂ）が、癌、感染病、および炎症性疾患の治療のために首尾よく使用されている（Adamsら、Nat. Biotechnol.2005 Sep;23（9）:1147-57）。
【０００４】
マウスｍＡｂの有効性および安全性はいずれもキメラ化およびヒト化などの組み換えＤＮＡ技術によって高められた。しかし、ＣＤＲ（相補決定領域）グラフティングを用いたマウスｍＡｂのヒト化は、マウス対応物よりも結合親和性が低くなることが多い。抗体親和性は、治療薬としての抗体の成功の鍵となる要因である。高親和性を有する抗体は、標的レセプターに対し天然リガンドと有効に競合できるものとなり、投与量、毒性、およびコストを低減させる。親和性はまた、抗体の薬物動態、例えばその標的組織および宿主の血液循環内における分布と排出にも影響する。インビボで有効なモノクローナル抗体に要求されるのは、無関係のタンパク質に非特異的に結合することのない、標的抗原に対する強い親和性である。抗原結合部位の多量体化は、抗体親和性（機能的親和性（functional affinity））として定義される、抗原への抗体の全体的な結合の強さを向上させる効果的な手段と見られている（Millerら、J Immunol 170:4854-4861、2003; Rheinneckerら、J Immunol 157:2989-2997、1996; Shopes、J Immunol 148:2918-2922、1992; Shufordら、Science 252:724-727、1991; Wolffら、J Immunol 148:2469-2474、1992））。それらはインビボにおける抗腫瘍活性を向上させる（Liu ら、Int Immunopharmacol 6:791-799、2006; Wolffら、Cancer Res 53:2560-2565、1993）。免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）の二価の性質により、従来および人工のＩｇＧは、２つを超える異なった抗原に同時に結合させるために用いることはできない。よって、多価または多重特異性のタンパク質ベース結合

試薬が必要とされる。

【０００５】

場合によって、Ｆｃ領域を操作することを通し、例えば抗体依存性細胞介在性障害（ＡＤＣＣ）および補体依存性細胞障害（ＣＤＣ）のようなエフェクター作用を回避することは、細胞分裂促進性の副作用を低減するために必要である。例として、マウスの抗ヒトＣＤ３ ｍＡｂ（オルソクローンＯＫＴ３、ムロモナブ－ＣＤ３）は、ヒトＴ細胞上のＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）／ＣＤ３複合体を標的にする強力な免疫抑制剤である。過去２０年の間、それは同種移植の拒否反応を防ぐまたは治療するために用いられてきた（Cosimiら、N Engl J Med 305:308-314、1981; Group、N Engl J Med 313:337-342、1985; Kungら、Science 206:347-349、1979）。しかし、この治療を用いることの主な欠点の１つは、インフルエンザに似た症状、呼吸困難、神経学的症状および急性尿細管壊死を含む一連の有害な細胞分裂促進作用をもたらすＴＮＦ-α、ＩＬ-２およびＩＦＮ-γのようなサイトカインの全身的な放出である（Abramowiczら、Transplantation 47:606-608、1989; Chatenoudら、N Engl J Med 320:1420-1421、1989; Goldmanら、Transplantation 50:158-159、1990; Toussaintら、Transplantation 48:524-526、1989）。ＯＫＴ３およびその他の抗ＣＤ３ ｍＡｂの細胞分裂促進活性は、ＦｃＲ陽性細胞（例えば単球）への結合を介しての広範なＴＣＲ／ＣＤ３架橋によるため、最近は、ＦｃＲへの結合を修正することによる非細胞分裂促進型の抗ＣＤ３抗体の開発に努力が注がれている。したがって、高い親和性、低い細胞分裂促進作用、および高いインビボ安定性を備えるタンパク質ベースの結合試薬が必要とされる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

本発明の目的は、高い親和性、低い細胞分裂促進作用、および高いインビボ安定性を備えるタンパク質複合体ベースの結合試薬を提供することにある。該試薬は多価あるいは多重特異性とすることもできる。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

したがって、本発明の１態様は、第１の足場ドメイン（scaffold domain）および第１の足場ドメインの１つの末端にインフレームで（in-frame）融合する第１の異種ドメイン（heterologous domain）を含む第１の融合ポリペプチド鎖と、第２の足場ドメインを含む第２の融合ポリペプチド鎖と、第３の足場ドメインを含む第３の融合ポリペプチド鎖とを含んでいる単離組み換えタンパク質複合体に特徴を有する。第１、第２および第３の足場ドメインは、三重らせんコイル（triple helix coil）を形成するように並ぶ。第１の足場ドメインおよび第１の異種ドメインはインフレームで融合し、かつ同一のペプチド鎖に存する。

【０００８】

異種ドメインには酵素ドメインまたは蛍光タンパク質の配列が含まれ得る。蛍光タンパク質の例としては、ＧＦＰおよびｄｓＲｅｄ、さらにそれらの変異体などがある。酵素ドメインの例には、グルタチオンＳ-トランスフェラーゼ、ルシフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、およびβ-ラクタマーゼのドメインが含まれる。

【０００９】

異種ドメインには、結合パートナーと結合する結合ドメイン（例えばリガンド結合ドメイン、リガンド、レセプター、またはプロテオグリカン）が含まれ得る。「結合パートナー」とは、目的とする所望の化合物（例えばタンパク質）の部分に対して特異的、共有結合的または非共有結合的な親和性を備える任意の分子を意味する。結合パートナーの例としては、抗原／抗体のペア、タンパク質／阻害剤のペア、レセプター／リガンドのペア（例えば細胞表面または核レセプター／リガンドのペア）、酵素／基質のペア（例えばキナーゼ／基質のペア）、レクチン／炭水化物のペア、オリゴマーまたはヘテロオリゴマータンパク質のペア、ＤＮＡ結合タンパク質／ＤＮＡ結合部位のペア、およびＲＮＡ／タンパ

ク質のペアがある。また、結合ドメインの例には、例えばヒスチジンタグ、ｍｙｃタグ、またはヘマグルチン（hemagglutin）タグのような親和性タグの配列も含まれる。

【００１０】

上述した第１の異種ドメインには、免疫グロブリンの１つまたはそれ以上の相補決定領域（ＣＤＲ）が含まれてもよい。よって、異種ドメインには、例えばV_HドメインおよびＦａｂのような抗体の抗原結合部位が含まれ得る。１つの実施形態において、第１の異種ドメインには、抗原結合性フラグメントまたは一本鎖抗体、例えば分化抗原３（ＣＤ３）または上皮増殖因子レセプター（ＥＧＦＲ）に特異なものの配列が含まれる。第１のポリペプチド鎖はさらに、第１の足場ドメインのもう１つの末端にインフレームで融合する第２の異種ドメインを含んでいてもよい。第１の異種ドメインのように、第２の異種ドメインにも、結合パートナーと結合するドメインが含まれ得る。第１および第２の異種ドメインは互いに同一であってもまたは異なっていてもよい。これらは、同一の結合パートナーまたは２つの異なる結合パートナーに結合することができる。例えば、第１の異種ドメインおよび第２の異種ドメインには、ＣＤ３およびＥＧＦＲにそれぞれ特異的に結合する第１の一本鎖抗体および第２の一本鎖抗体の配列が各々含まれていてもよい。

【００１１】

上述したタンパク質複合体において、第２の融合ポリペプチド鎖は、第２の足場ドメインの１つの末端にインフレームで融合する第３の異種ドメイン、第２の足場ドメインのもう１つの末端にインフレームで融合する第４の異種ドメイン、または２つの末端にインフレームで融合する両方のドメインを含んでいてもよい。同様に、第３の融合ポリペプチド鎖は、第３の足場ドメインの１つの末端にインフレームで融合する第５の異種ドメイン、または、第３の足場ドメインのもう１つの末端にインフレームで融合する第６の異種ドメイン、または、両方を含んでいてもよい。上述した第１および第２の異種ドメインのように、これら４つの異種ドメインの各々には、結合パートナーと結合する結合ドメインも含まれ得る。６つ全ての異種ドメインは互いに同一であってもよくまたは異なってもよい。よってこれらは、１、２、３、４、５または６つの結合パートナーと結合できる。言い換えると、当該タンパク質複合体は、一、二、三、四、五、または六価であり得る。

【００１２】

第１、第２、および第３の足場ドメインが三重らせんコイルを形成するよう、３つの足場ドメインのそれぞれは１つまたはそれ以上の三重らせんリピートを含んでおり、各リピートは次の式：（Ｘ１－Ｘ２－Ｘ３）ｎの配列を含み、式中、Ｘ１はＧｌｙ残基であり、Ｘ２およびＸ３は任意のアミノ酸残基、好ましくはイミノ酸のプロリンまたはヒドロキシプロリンであり、かつ、ｎは５またはこれより大きい数である。例えば、第１、第２、および第３の足場ドメインは、$(GPP)_{10}$、または、１つもしくはそれ以上のヒト補体Ｃ１ｑ、コレクチン、もしくはコラーゲンポリペプチド鎖の三重らせんリピートを含むことができる。

【００１３】

１つの実施形態において、上述した第１、第２および第３の融合ポリペプチドは実質的に同じであり、互いに少なくとも７５％（例えば７５％から１００％の間の任意の数を含む）の配列同一性を有している。３つの同じ融合ポリペプチドから形成される複合体はホモ三量体である。これら３つの融合ポリペプチドは機能的に等価であり得る。「機能的に等価」とは、例えば、１もしくはそれ以上の点変異、挿入、欠失、切断を有するタンパク質、融合タンパク質、またはそれらの組み合わせなど共通のポリペプチドのポリペプチド誘導体が、三重らせんコイルを形成する能力と、例えばリガンドに結合するといった異種ドメインの活性を実質的に保持していることをいう。

【００１４】

異種ポリペプチド、核酸、または遺伝子は異種から由来するもの、または、同種からのものである場合はその原形に実質的に修飾が加えられたものである。２つの融合ドメインまたは配列は、それらが天然のタンパク質または核酸中で互いに隣り合っていない場合は、互いに異種である。例えば、天然のヒトミニコラーゲン（ＸＸＩ型）、コレクチンファ

ミリータンパク質、または補体１ｑ（Ｃ１ｑ）の一部でないポリペプチド配列は、ヒトタンパク質におけるドメインに対して異種である。

【００１５】

本発明はまた、（ｉ）三重らせんコイルを形成するのに用いられる足場ドメイン、および（ii）足場ドメインの１つの末端にインフレームで融合する第１の異種ドメイン、または足場ドメインのもう１つの末端にインフレームで融合する第２の異種ドメインを含む単離組み換え融合ポリペプチド（例えば上述した３つの各融合ポリペプチド）にも特徴を有する。足場ドメインは、１つまたはそれ以上の上述した三重らせんリピート、例えばヒトＣ１ｑまたはコラーゲンポリペプチド鎖のそれを含み得る。異種ドメインは、上述した結合ドメインの１つを含んでいてもよく、かつ、ファージディスプレイスクリーニングのような当該分野で知られるさまざまな方法によって得ることができる。

【００１６】

単離ポリペプチドまたはタンパク質複合体とは、天然の関連分子を実質的に含まないポリペプチドまたはタンパク質複合体のことをいい、つまり、それは乾燥重量で少なくとも純度７５％（すなわち７５％および１００％の間の任意の数を含む）である。純度は任意の適した標準的方法、例えばカラムクロマトグラフィ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはＨＰＬＣ分析によって測定することができる。本発明の単離ポリペプチドまたはタンパク質複合体は、天然資源から精製でき、また組み換えＤＮＡ技術で作製することができる。

【００１７】

本発明は、先ほど述べた融合ポリペプチドをコードする配列またはその配列の補体を含む単離核酸にも特徴を有する。核酸とはＤＮＡ分子（例えばｃＤＮＡもしくはゲノムＤＮＡ）、ＲＮＡ分子（例えばｍＲＮＡ）、またはＤＮＡもしくはＲＮＡアナログのことをいう。ＤＮＡまたはＲＮＡアナログはヌクレオチドアナログから合成されたものであってよい。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であってもよいが、好ましいのは二本鎖ＤＮＡである。「単離核酸」とは、その構造が、どの天然に存在する核酸の構造とも、またはどの天然に存在するゲノム核酸のフラグメントの構造とも同一でない核酸である。よってこの用語は、例えば（ａ）天然に存在するゲノムＤＮＡ分子の一部の配列を有するが、生物に天然に存在するゲノムにおいてその分子の一部の側方に位置する２つのコーディング配列の隣にはないＤＮＡ、（ｂ）得られる分子がいかなる天然に存在するベクターまたはゲノムＤＮＡとも同一にならないような方式で、ベクターまたは原核生物もしくは真核生物のゲノムＤＮＡに組み込まれる核酸、（ｃ）例えばｃＤＮＡ、ゲノムフラグメント、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により作製されたフラグメントまたは制限フラグメントのような分離された分子、および（ｄ）ハイブリッド遺伝子、つまり融合タンパク質をコードする遺伝子の一部である組み換えヌクレオチド配列、を包含する。上述した核酸は本発明のポリペプチドを発現するのに用いることができる。この目的のために、核酸を適した調節配列へ動作可能に連結させて発現ベクターを生成することができる。

【００１８】

ベクターとは、それに連結された別の核酸を運ぶ能力のある核酸分子のことをいう。ベクターは自己複製または宿主ＤＮＡと統一化することが可能である。ベクターの例としては、プラスミド、コスミド、またはウィルスベクターなどがある。本発明のベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適したかたちで核酸を含む。ベクターが、発現させようとする核酸配列に操作により連結した１つまたはそれ以上の調節配列を含んでいると好ましい。「調節配列」には、プロモーター、エンハンサー、またはその他の発現制御要素（例えばポリアデニル化信号）が含まれる。調節配列には、組織特異的な調節および／または誘導（inducible）配列だけでなく、ヌクレオチド配列を直接構成的発現させるものも含まれる。発現ベクターの設計は、形質転換させるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどといった要素に応じて行うことができる。発現ベクターを宿主細胞に導入することにより本発明のポリペプチドが生産される。上述した核酸を含む宿主細胞もまた本発明の範囲内に含まれる。例として、Ｅ．Ｃｏｌｉ細胞、昆虫細胞（例えばショウジ

ョウバエＳ２またはバキュロウイルス細胞を使用）、酵母細胞、または哺乳動物の細胞（例えばマウス骨髄腫ＮＳ０細胞）などがある。例えば、Goeddel、（1990）Gene Expression Technology:Method in Enzymology 185、Academic Press、San Diego、CAを参照されたい。

【００１９】

本発明の融合ポリペプチドを作製するには、本発明の核酸によってコードされるポリペプチドの発現を可能とする条件下、培地中で宿主細胞を培養し、培養された細胞または細胞の培地からポリペプチドを精製することができる。あるいは、本発明の核酸は、例えばＴ７プロモーター調節配列およびＴ７ポリメラーゼを用いてインビトロの複写および翻訳がされてもよい。

【００２０】

本発明のタンパク質複合体を作製するには、上述した第１、第２および第３の融合ポリペプチドをそれぞれコードする第１、第２および第３の核酸を含む宿主細胞を、これら３つの核酸によりコードされるポリペプチドの発現、および、発現されたポリペプチド間における三重らせんコイルの形成を可能とさせる条件下、培地中で培養し、培養された細胞または細胞の培地からタンパク質複合体を精製することができる。宿主細胞が、プロリン残基をヒドロキシル化する酵素活性を含む真核細胞であると好ましい。

【００２１】

本発明の１つまたはそれ以上の実施形態の詳細を、添付の図面および以下の記載において説明する。本発明のその他の特徴、目的および特長は、当該記載および図面から、そして特許請求の範囲から明らかとなるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２２】

本発明は、ヒト三重らせんコイルの足場ドメインにインフレームで融合する異種タンパク質結合ドメインが結合活性を保持する、および得られる融合ポリペプチドが三重らせんコイルを形成する、という予期せぬ発見に、少なくとも一部基づいている。図１に示されているのは、本発明のタンパク質複合体の１例である。この図に示されているように、三重らせんコイルタンパク質複合体の６つの末端は、６つの異種タンパク質結合ドメイン、すなわち一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）のＦｖフラグメントにインフレームで融合する。

【００２３】

本発明のタンパク質複合体は従来の抗体よりも優れている。また、６つのドメインのうち２つまたはそれ以上が互いに同一である場合、該タンパク質複合体は１つの結合パートナー（例えば抗原）に特異な２～６つの結合ドメインを備えることができ、これに比べて従来の抗体はそのようなドメインを２つしか備えない。言い換えると、抗原に対し二価でしかない従来の抗体とは異なり、当該タンパク質複合体は二、三、四、五または六価となり得る。その結果として、従来の抗体よりも高い各種親和性を持つようにすることができる。その高い親和性のために、従来の抗体よりも、必要とされるタンパク質複合体の量は少なく、かつインキュベーション期間は短くなり、望ましいゴールが達成される。例えば治療上の効果としては、これにより治療コストが低くなり、かつ副作用（例えば望ましくない免疫反応）が最小限に抑えられる。一方、６つのドメインのうち２つまたはそれ以上が互いに異なる場合、本発明のタンパク質複合体は、２～６つの異なる結合パートナーに特異である２～６つの結合ドメインを備えることができる。特異性の異なる多数の結合パートナー部位を１ユニットに統合することによって、多数の結合パートナーをまとめる能力が備わるため、治療、組織再生、および活性タンパク質機械（active protein machinery）（例えばマルチサブユニット酵素）の組立において、ナノメーターレベルでの望ましい使用が可能となる。

【００２４】

ヒトのインビボでの使用において、本発明のタンパク質複合体はヒト由来であることが好ましい。例えば、それには、ヒトＣ１ｑ、コレクチンファミリータンパク質、またはコラーゲンポリペプチド鎖のようなヒト由来のらせんコイル足場にインフレームで融合する

ヒト化一本鎖抗体配列などが含まれる。ヒトＣ１ｑおよびコラーゲンはいずれも血中で極めて安定であるので、当該タンパク質複合体は従来の抗体に比べてより安定である。

【００２５】

コラーゲンは哺乳動物に存在する最も豊富なタンパク質である。それは、リピートトリプレット配列Ｇｌｙ－Ｘ１－Ｘ２を含むと共に、かかるトリプレットの存在が３本のコラーゲンのポリペプチド鎖（α鎖）を三重らせん構造に折り畳ませ得る細胞外基質タンパク質である。トリプレット配列Ｇｌｙ－Ｘ１－Ｘ２におけるＸ２の位置のアミノ酸はプロリンであることが多く、それはコラーゲンの三重らせん構造を安定にするためコラーゲンポリペプチド鎖の翻訳後修飾によってしばしば４－ヒドロキシル化される。プロリンのヒドロキシル化なしには、コラーゲンの主要な三重らせん構造が生理的温度以下で熱的に不安定になる（BergおよびProckop、Biochem Biophys Res Commun 52:115-120、1973；Rosenbloomら、Arch Biochem Biophys 158:478-484、1973）。ヒトの血清中には多くのコラーゲン様ドメインを有するコラーゲン様タンパク質が存在しており、感染性生物からの防御において先天性免疫システムの役目を果たす。これらには、補体タンパク質Ｃ１ｑ、コレクチンファミリータンパク質－マンノース結合レクチン（ＭＢＬ）、サーファクタントタンパク質ＡおよびＤ（ＳＰ－ＡおよびＳＰ－Ｄ）が含まれる。これらコラーゲン様タンパク質間で共通な構造的特徴は、これらがいずれも、そのコラーゲン様ドメインの三重らせんが集合した後、三量体分子が堆積または鎖間ジスルフィド架橋することにより、多量体タンパク質ユニットの形をとることにある。したがって、これら「防御コラーゲン」分子の結合ドメインの機能的親和性（functional affinity）は、多量体化を通して大いに向上する。

【００２６】

本発明のタンパク質複合体またはポリペプチドは組み換え技術により得ることができる。該複合体のポリペプチドをコードする適当な宿主細胞の核酸に導入してから、該核酸にコードされたポリペプチドの発現と該ポリペプチド間における三重らせんコイルの形成とを可能とする条件下でポリペプチドを発現させることができる。三重らせんコイル足場の形成を促進するために、コラーゲン生合成の鍵酵素である宿主細胞のプロリル４－ヒドロキシラーゼ（Ｐ４ＨＡ）で同時発現させることが可能である。

【００２７】

異種タンパク質ドメインには抗体またはそのフラグメント（例えばその抗原結合フラグメント）が含まれ得る。ここで用いられる「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子またはその免疫学的に活性である部位、すなわち抗原結合部位のことをいう。それは、少なくとも１つ、そして好ましくは２つの重（Ｈ）鎖可変領域（V_H）と、少なくとも１つ、そして好ましくは２つの軽（Ｌ）鎖可変領域（V_L）とを含むタンパク質のことをいう。V_HおよびV_L領域はさらに、「フレームワーク領域」（ＦＲ）と呼ばれるより保存性の高い領域の間に位置する、「相補決定領域（「ＣＤＲ」）」と呼ばれる超可変の領域に細分されていてもよい。フレームワーク領域およびＣＤＲの範囲ははっきりと定義がされている（参照することにより本明細書に組み込まれるKabatら（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interes、Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242、およびChothiaら（1987）J. Mol. Biol. 196:901-917を参照）。各V_HおよびV_Lはアミノ末端からカルボキシ末端まで次の順序：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４、で並ぶ３つのＣＤＲおよび４つのＦＲよりなっている。抗体はさらに、重および軽鎖定常領域を含み、これにより重および軽免疫グロブリン鎖がそれぞれ形成されるようになっていてもよい。重鎖定常領域は３つのドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３からなる。軽鎖定常領域は１つのドメイン、ＣＬからなる。重および軽鎖の可変領域は、抗原と作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は通常、免疫システムの各種細胞（例えばエフェクター細胞）および古典的補体系の第１成分（Ｃ１ｑ）を含む宿主組織または因子への抗体の結合を仲介する。

【００２８】

本明細書で「免疫グロブリン」という用語は、実質的に免疫グロブリン遺伝子によって

コードされる１つまたはそれ以上のポリペプチドからなるタンパク質のことをいう。存在が認められているヒト免疫グロブリン遺伝子には、カッパ、ラムダ、アルファ（ＩｇＡ１およびＩｇＡ２）、ガンマ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２，ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）、デルタ、エプシロンならびにミュー定常領域遺伝子、そしてさらに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子がある。完全長の免疫グロブリン「軽鎖」（約２５ＫＤａまたは２１４のアミノ酸）は、ＮＨ２-末端（約１１０のアミノ酸）の可変領域遺伝子と、ＣＯＯＨ-末端のカッパまたはラムダ定常領域遺伝子とによってコードされる。同じように、完全長の免疫グロブリン「重鎖」（約５０ＫＤａまたは４４６のアミノ酸）は、可変領域遺伝子（約１１６のアミノ酸）と、他の上記定常領域遺伝子のうちの１つ、例えばガンマ（約３３０のアミノ酸をコードする）とによってコードされる。

【００２９】

抗体の「抗原結合フラグメント」（または「抗体部分（antibody portion）」、または「フラグメント」）は、本明細書においては、例えばＥＧＦＲまたはＣＤ３ポリペプチドあるいはそのフラグメントである抗原に特異的に結合する能力を保持する１つまたはそれ以上の完全長の抗体のフラグメントのことをいう。抗体の抗原結合フラグメントの例としては、限定はされないが、（ｉ）Ｆａｂフラグメント、V_L、V_H、C_LおよびC_{H1}ドメインからなる一価フラグメント、（ii）Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、ヒンジ領域にてジスルフィドブリッジにより連結される２つのＦａｂフラグメントを含む二価フラグメント、（iii）V_HおよびC_{H1}ドメインからなるＦｄフラグメント、（iv）抗体の１本のアームのV_LおよびV_HドメインからなるＦｖフラグメント、（v）V_HドメインからなるｄＡｂ領域（Wardら、（1987） Nature 341：544-546）、（vi）単離相補決定領域（ＣＤＲ）、ならびに（vii）V_LまたはV_Hドメインが含まれる。さらに、Ｆｖフラグメントの２つのドメイン、V_LおよびV_Hは、別々の遺伝子によりコードされるが、これらは組み換え法を用い、合成リンカーにより結合させることができ、この合成リンカーはこれらを、V_LおよびV_H領域が組になって一価分子を形成する一本のタンパク質鎖とさせることができる（一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として知られる。例えばBirdら （1988） Science 242：423-426、およびHustonら （1988）PROC. Natl. Acad. Sci USA 85：5879-5883参照）。このような一本鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合フラグメント」という用語に包含される。これらの抗体フラグメントは当業者に知られる従来の手法により得ることができ、かつ、当該フラグメントは実用に供することのできるよう、インタクト抗体と同じ方式で選別される。

【００３０】

適した抗体にはモノクローナル抗体がある。別の実施形態において、抗体は、組み換え技術、例えばファージディスプレイまたはコンビナトリアル手法により作製したものであってもよい。抗体を作製するためのファージディスプレイおよびコンビナトリアル手法は当該技術分野において周知である（例えば、Ladnerら、米国特許第５，２２３，４０９号明細書；Kangら、国際公開第９２／１８６１９号パンフレット；Dowerら、国際公開第９１／１７２７１号パンフレット；Winterら、国際公開第Ｏ９２／２０７９１号パンフレット；Marklandら、国際公開第９２／１５６７９号パンフレット；Breitlingら、国際公開第９３／０１２８８号パンフレット；McCaffertyら、国際公開第９２／０１０４７号パンフレット；Garrardら、国際公開第９２／０９６９０号パンフレット；Ladnerら、国際公開第９０／０２８０９号パンフレット；Fuchsら、（1991）Bio/Technology 9:1370-1372；Hayら、(1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85；Huseら、（1989）Science 246:1275-1281；Griffthsら、（1993）EMBO J 12:725-734；Hawkinsら、（1992）J Mol Biol 226:889-896；Clacksonら、（1991）Nature 352:624-628；Gramら、（1992） PNAS 89:3576-3580；Garradら、（1991）Bio/Technology 9:1373-1377；Hoogenboomら、（1991）Nuc Acid Res 19:4133-4137、およびBarbasら、（1991）PNAS 88:7978-7982を参照、これらすべての内容は参照することにより本明細書に組み込まれる）。

【００３１】

１つの実施形態において、抗体は、完全ヒト抗体（例えば、ヒト免疫グロブリン配列からの抗体を産出するよう遺伝子操作を受けたマウスで作られた抗体）、または非ヒト抗体

、例えば齧歯動物（マウスまたはラット）、ヤギ、霊長類の動物（例えばサル）、ラクダの抗体である。非ヒト抗体は齧歯動物（マウスまたはラット抗体）とするのが好ましい。齧歯動物抗体を作製する方法は当該技術分野において周知である。

【００３２】

ヒトモノクローナル抗体は、マウスの系ではなく、ヒト免疫グロブリン遺伝子を持つトランスジェニックマウスを用いて生成することができる。目的の抗原で免疫されたこれらトランスジェニックマウスからの脾細胞は、ヒトタンパク質のエピトープに対し特異的親和性があるヒトｍＡｂを分泌するハイブリドーマを作出するのに用いられる（例えば、Woodら、国際公開第９１／００９０６号パンフレット；Kucherlapatiら、国際公開第９１／１０７４１号パンフレット；Lonbergら、国際公開第９２／０３９１８号パンフレット；Kayら、国際公開第９２／０３９１７号パンフレット；Lonberg, Nら、1994 Nature 368:856-859、Green,L.Lら、1994 Nature Genet. 7:13-21；Morrisonら、１９９４ Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855；Bruggemanら、1993 Year Immunol 7:33-40；Tuaillonら、1993 PNAS 90:3720-3724；Bruggemanら、1991 Eur J Immuno 21:1323-1326を参照。）。

【００３３】

抗体は、可変領域または例えばＣＤＲなどその一部が、非ヒト生物、例えばラットまたはマウスにおいて産出されたものであってよい。キメラ、ＣＤＲ－グラフト、およびヒト化抗体が使用可能である。例えばラットまたはマウスのような非ヒト生物で産出されてから、ヒトにおける抗原性を低減するために例えば可変フレームワークまたは定常領域において修飾がなされた抗体は、本発明の範囲に含まれる。

【００３４】

キメラ抗体は、当該技術分野において周知である組み換えＤＮＡ技術によって作製することができる。例として、マウス（またはその他の種の）モノクローナル抗体分子のＦｃ定常領域をコードする遺伝子を制限酵素により消化して、マウスＦｃをコードする領域を除去してから、ヒトＦｃ定常領域をコードする遺伝子の相当部位で置換する（Robinsonら、国際特許出願ＰＣＴ／ＵＳ８６／０２２６９号；Akiraら、欧州特許出願第１８４，１８７号明細書；Taniguchi,M、欧州特許出願第１７１，４９６号明細書；Morrisonら、欧州特許出願第１７３，４９４号明細書；Neubergerら、国際公開第８６／０１５３３号パンフレット；Cabillyら、米国特許第４，８１６，５６７号明細書；Cabillyら 欧州特許出願第１２５，０２３号明細書；Betterら、（1998 Science 240:1041-1043）；Liuら、（1987） PNAS 84:3439-3443；Liuら、1987,J.Immunol 139:3521-3526；Sunら、（1987） PNAS 84:214-218；Nishimuraら、1987,Canc.Res. 47:999-1005；Woodら、（1985） Nature 314:446-449；およびShawら、1998, J. Natl Cancer Inst. 89:1553-1559を参照）。

【００３５】

ヒト化またはＣＤＲグラフト抗体は、少なくとも１つまたは２つ、ただし通常は３つすべてのレシピエントの（重およびまたは軽免疫グロブリン鎖の）ＣＤＲが、ドナーＣＤＲで置き換えられる。抗体が非ヒトＣＤＲの少なくとも１部で置き換えられても、あるいは、ＣＤＲのいくつかだけが非ヒトＣＤＲで置き換えられてもよい。ヒト化抗体またはそのフラグメントの結合に要されるＣＤＲの数だけ置き換えればよいのである。ドナーが齧歯動物の抗体、例えばラットまたはマウス抗体であり、かつレシピエントがヒトフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークであると好ましい。一般に、ＣＤＲを提供する免疫グロブリンは「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供する免疫グロブリンは「アクセプター」と呼ばれる。１つの実施形態において、ドナー免疫グロブリンはヒト以外（例えば齧歯動物）である。アクセプターのフレームワークは、天然（例えばヒト）フレームワークまたはコンセンサスフレームワーク、または、約８５％またはこれ以上、好ましくは９０％、９５％、９９％またはこれ以上がそれと同一な配列である。本明細書で「コンセンサス配列」とは、関連配列のファミリー中にて最も頻繁に出現するアミノ酸（またはヌクレオチド）から形成される配列のことをいう（例えば、Winnaker、From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987) 参照）。タンパク質のファ

ミリーにおいて、コンセンサス配列中の各位置は、該ファミリーにおけるその位置に最も頻繁に出現するアミノ酸によって占められる。２つのアミノ酸が同等に頻繁に出現する場合は、どちらかがコンセンサス配列に含まれ得る。「コンセンサスフレームワーク」とは、コンセンサス免疫グロブリン配列中のフレームワーク領域のことをいう。

【００３６】

抗体は当該技術分野において周知の方法でヒト化することができる。ヒト化抗体は、抗原の結合に直接かかわりのないＦｖ可変領域の配列を、ヒトＦｖ可変領域からの相当する配列で置き換えることによって生成することができる。ヒト化抗体を生成する一般的な方法は、Morrison,S.L、1985,Science 229:1202-1207、Oiら、1986,BioTechniques 4:214、ならびにQueenら、米国特許第５，５８５，０８９号明細書、米国特許第５，６９３，７６１号明細書および米国特許第５，６９３，７６２号明細書により提示されており、これらのすべての内容は参照することにより本明細書に組み込まれる。それらの方法は、少なくとも１つの重または軽鎖からの免疫グロブリンＦｖ可変領域のすべてまたは一部をコードする核酸配列を単離する工程、操作する工程、および発現させる工程を含む。かかる核酸のソースは当業者にはよく知られており、例えば、目的のポリペプチドまたはそのフラグメントに対する抗体を産出するハイブリドーマから得ることができる。よって、ヒト化抗体またはそのフラグメントをコードする組み換えＤＮＡを、適当な発現ベクターにクローニングすることができる。

【００３７】

特定のアミノ酸が置換、欠失または追加されたヒト化抗体は足場に融合することもできる。好ましいヒト化抗体は、例えば抗原への結合を改善する目的で、フレームワーク領域にアミノ酸置換基を有する。例えば、ヒト化抗体は、ドナーのフレームワークの残基またはレシピエントのフレームワーク残基以外の別なアミノ酸と同一であるフレームワークの残基を備える。このような抗体を生成するため、選択された、少数のヒト化免疫グロブリン鎖のアクセプターフレームワーク残基を、対応するドナーアミノ酸で置き換えることができる。好ましい置換基の配置としては、アミノ酸残基をＣＤＲに隣接させる、またはＣＤＲと作用することのできる配置などがある。ドナーからアミノ酸を選ぶ基準は、ＵＳ５，５８５，０８９号に記載されており、その内容は本明細書では参照することにより組み込まれる。ヒト化抗体のその他の技術は、Padlanら、欧州特許出願公開第５１９５９６号明細書に記載されている。

【００３８】

本発明は、本発明のタンパク質複合体を形成する融合ポリペプチドをコードする核酸をも含む。核酸は、ファージディスプレイライブラリーから選別された、または上記の適した抗体または抗体の誘導体を発現する細胞株から（ＲＴ－ＰＣＲによって）単離されたものとすることができる。核酸は発現ベクターに機能的にライゲートされてもよい。核酸またはベクターで形質転換された細胞を、本発明の融合ポリペプチドまたはタンパク質複合体を作製するのに用いることができる。抗体を作製するのに有用な細胞としては、昆虫細胞および哺乳動物の細胞（例えばＣＨＯまたはリンパ細胞）などがある。

【００３９】

本発明のタンパク質複合体は、細胞毒素のような治療成分（therapeutic moiety）、治療薬または放射性イオンにコンジュゲートすることができる。細胞毒素または細胞毒性薬には、細胞に有害なあらゆる薬剤が含まれる。例としては、タクソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド（tenoposide）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、メイタンシノイド（maytansinoids）、例えばメイタンシノール（maytansinol）（米国特許第５，２０８，０２０号明細書参照）、ＣＣ－１０６５（米国特許第５，４７５，０９２号明細書、米国特許第５，５８５，４９９号明細書、米国特許第５，８４６，５４５号明細書参照

）およびそのアナログまたはホモログがある。治療薬には、限定はされないが、代謝拮抗物質（例えばメトトレキサート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えばメクロレタミン、チオエパクロラムブシル（thioepa chlorambucil）、ＣＣ－１０６５、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）およびロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロトスファミド（cyclothosphamide）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、およびシスジクロロジアミン白金（II）（ＤＤＰ）（シスプラチン）、アントラサイクリン（例えばダウノルビシン（旧ダウノマイシン）およびドクソルビシン）、抗生物質（例えばダクチノマイシン、（旧アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（ＡＭＣ））、ならびに抗分裂剤（例えばビンクリスチン、ビンブラスチン、タクソールおよびメイタンシノイド）が含まれる。放射性イオンには、限定はされないが、ヨード、イットリウムおよびプラセオジムが含まれる。

【００４０】

コンジュゲートは所定の生物学的反応を修飾するのに用いることができ、薬物成分（drug moiety）は古典的な化学治療薬に限定されると解されるべきではない。例えば、薬物成分は、所望の生物学的活性を備えたタンパク質またはポリペプチドであり得る。かかるタンパク質には、例として、アブリン、リシンＡ、緑膿菌外毒素もしくはジフテリア毒素のような毒素、腫瘍壊死因子、α－インターフェロン、β－インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノーゲンアクチベータのようなタンパク質、または、例えばリンフォカイン、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コロニー刺激因子（「ＧＭ－ＣＳＦ」）、 顆粒球コロニー刺激因子（「G-ＣＳＦ」）もしくはその他の成長因子のような生物学的反応修飾物質が含まれる。

【００４１】

異種結合ドメインの特異性をベースとしている上述のタンパク質複合体およびコンジュゲートは、ガン、炎症疾患、代謝疾患、繊維化疾患、および心臓血管疾患を含むさまざまな疾患を治療するために用いることができる。よって本発明は、例えば、それを必要とする対象に本発明のタンパク質複合体を有効量投与することによって、このような疾患を治療する方法に特徴を有する。治療を受けるべき対象は、疾患に特徴付けられる状態を持つまたは獲得する危険があるものとして確認することができる。この方法は、単独で、またはその他の薬物もしくは治療法と併用して行うことが可能である。

【００４２】

その多重特異性という特徴により、本発明のタンパク質複合体は、本来は互いにつながっていない分子または細胞を架橋するのに用いられ得る。この特徴は細胞ベースの治療に対しとりわけ有用である。一例において、タンパク質複合体における１つの異種ドメインは、細胞障害性細胞上のエフェクター抗原に特異的に結合することによって細胞傷害性細胞（例えば細胞傷害性Ｔ細胞）を活性化させることができ、同時に他の異種ドメインは、破壊するべき病原細胞または悪性細胞上の標的抗原に特異的に結合する。このようにして、タンパク質複合体は病原または悪性細胞によって引き起こされる疾病を治療することができるのである。

【００４３】

細胞傷害性Ｔ細胞の活性化は、本発明のタンパク質複合体による、細胞障害性Ｔ細胞表面のエフェクター抗原としてのＣＤ３抗原の結合を通して起こり得る。その他のリンパ球様細胞結合型（lymphoid cell-associated）エフェクター抗原には、ヒトＣＤ１６抗原、ＮＫＧ２Ｄ抗原、ＮＫｐ４６抗原、ＣＤ２抗原、ＣＤ２８抗原、ＣＤ２５抗原、ＣＤ６４抗原、およびＣＤ８９抗原などがある。これらエフェクター抗原に結合することによって、単球、好中性顆粒球および樹枝状細胞のようなエフェクター細胞の活性化がもたらされる。よって、これら活性化された細胞は、標的細胞に対し細胞傷害またはアポトーシス効果を発揮する。

【００４４】

標的抗原は、病気の状態に付随する標的細胞上にユニークに発現（uniquely express）する抗原であるが、健康な状態では発現しない、低レベルで発現する、あるいはアクセスできない（non-accessible）ものである。悪性細胞に関連するかかる標的抗原の例には、ＥｐＣＡＭ、ＣＣＲ５、ＣＤ１９、ＨＥＲ－２ｎｅｕ、ＨＥＲ－３、ＨＥＲ－４、ＥＧＦＲ、ＰＳＭＡ、ＣＥＡ、ＭＵＣ－１（ムチン）、ＭＵＣ２、ＭＵＣ３、ＭＵＣ４、ＭＵＣ５．ｓｕｂ．ＡＣ、ＭＵＣ５．ｓｕｂ．Ｂ、ＭＵＣ７、ベータ．ｈＣＧ、ルイス－Ｙ、ＣＤ２０、ＣＤ３３、ＣＤ３０、ガングリオシドＧＤ３、９－Ｏ－アセチル－ＧＤ３、ＧＭ２、Ｇｌｏｂｏ Ｈ、フコシル ＧＭ１、ポリＳＡ、ＧＤ２、カルボアンヒドラーゼ（Carboanhydrase）ＩＸ（ＭＮ／ＣＡ ＩＸ)、Ｄ４４ｖ６、ソニックヘッジホッグ(Ｓｈｈ)、Ｗｕｅ－１、形質細胞抗原、（膜結合性）ＩｇＥ、メラノーマコンドロイチンサルフェートプロテオグリカン（ＭＣＳＰ)、ＣＣＲ８、ＴＮＦ－アルファ前駆体、ＳＴＥＡＰ、メソテリン（mesothelin）、Ａ３３抗原、前立腺幹細胞抗原(ＰＳＣＡ)、Ｌｙ－６；デスモグレイン４、Ｅ－カドヘリンネオエピトープ、胎児アセチルコリンレセプター、ＣＤ２５、ＣＡ１９－９マーカー、ＣＡ－１２５マーカーおよびミュラー管抑制物質（ＭＩＳ）レセプタータイプII、ｓＴｎ（シリル化Ｔｎ抗原;ＴＡＧ－７２)、ＦＡＰ(線維芽細胞活性化抗原)、エンドシアリン（endosialin）、ＥＧＦＲｖIII、ＬＧ、ＳＡＳならびにＣＤ６３などがある。

【００４５】

「治療する（treating）」という用語は、病気、病気の症状、病気による二次的な病状、または病気にかかり易い素因を治す（cure）、緩和する（alleviate）、軽減する（relieve）、修復する（remedy）、予防する（prevent）、または改善する（ameliorate）ことを目的とし、対象に組成物を投与することとして定義される。「有効量」とは、治療を受ける対象において例えば上述したような医学的に望ましい結果を生じさせることのできる組成物の量のことである。

【００４６】

１つのインビボアプローチでは、治療組成物（例えば本発明のタンパク質複合体を含む組成物）を対象に投与する。通常、該複合体は医薬的に許容される担体（例えば生理食塩水）に懸濁されており、経口でもしくは静脈内注射により投与される、または皮下、筋肉、鞘内、腹腔内、直腸内、膣内、鼻腔内、胃内、気管内もしくは肺内に注射もしくは注入される。

【００４７】

必要な投与量は、投与経路の選択、剤形の性質、対象の疾病の性質、対象の大きさ、体重、表面積、年齢および性別、投与されている他の薬物、ならびに主治医の判断によって決まる。適切な投与量は０．０１～１００．０ｍｇ／ｋｇの範囲である。必要とされる投与量の増減は、利用可能な組成物の種類、および各種投与経路の異なる効率を考慮して予測される。例えば、経口投与は静脈注射による投与よりも高い投与量を要するであろうことが予想できる。これら投与量の増減の程度は、当該技術分野においてよく理解されているような、標準的な経験的ルーチンによって調整し至適化することができる。適した運搬媒体（例えば高分子微粒子または埋め込み型装置）に組成物をカプセル封入すれば、特に経口デリバリーにおいて、運搬の効率を向上させることができる。

【００４８】

医薬的に許容される担体および有効量の本発明のタンパク質複合体を含む医薬組成物も、本発明の範囲内に含まれる。医薬組成物は上記した疾患を処置するのに用いることができる。医薬的に許容される担体には、溶剤、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、ならびに等張および吸収遅延剤が含まれる。医薬組成物は、従来の方法を用い、それぞれ異なる投与経路に合った剤形に形成することができる。

【００４９】

本発明の組成物の有効性はインビトロとインビボの両方において評価できる。インビボ試験では、組成物を動物（例えばマウスモデル）に注射してから、その治療上の効果を調べることができる。その結果に基づいて、適切な投与量の範囲と投与経路が決められる。

【００５０】
以下の具体例は、説明にすぎず、いかなる方式においてもこの開示以外のものを限定するものではないと解されるべきである。詳述はしなくとも、当業者は、本明細書の記載に基づいて、本発明を最大限利用できると考えられる。本明細書に引用されるすべての刊行物は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。
【実施例】
【００５１】
実施例１
Ｍ１３ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングして、ＥＧＦＲに特異的に結合するヒト一本鎖可変フラグメント(ｓｃＦｖ)を同定した。多数のクローンを同定した。ウェスタンブロッティングおよびＥＬＩＳＡによる確認ののち、さらなる実験のために１つのクローン、ｅｒｂ_ｓｃＦｖを選んだ。標準方法により、ｅｒｂ_ｓｃＦｖをコードするｃＤＮＡを得てから、発現ベクターにライゲートした。以下に示すのは、ｅｒｂ_ｓｃＦｖのポリペプチド配列（配列番号１）とそれをコードするヌクレオチド配列（配列番号２）である。
【００５２】
配列番号１
MetAlaGluValGlnLeuLeuGluSerGlyGlyGlyLeuValGlnProGlyGlySerLeuArgLeuSerCysAlaAlaSerGlyPheThrPheSerSerTyrAlaMetSerTrpValArgGlnAlaProGlyLysGlyLeuGluTrpValSerAspIleGlyAlaSerGlySerAlaThrSerTyrAlaAspSerValLysGlyArgPheThrIleSerArgAspAsnSerLysAsnThrLeuTyrLeuGlnMetAsnSerLeuArgAlaGluAspThrAlaValTyrTyrCysAlaLysSerThrThrThrPheAspTyrTrpGlyGlnGlyThrLeuValThrValSerSerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerThrAspIleGlnMetThrGlnSerProSerSerLeuSerAlaSerValGlyAspArgValThrIleThrCysArgAlaSerGlnSerIleSerSerTyrLeuAsnTrpTyrGlnGlnLysProGlyLysAlaProLysLeuLeuIleTyrAspAlaSerAlaLeuGlnSerGlyValProSerArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerSerLeuGlnProGluAspPheAlaThrTyrTyrCysGlnGlnTyrAlaAspTyrProThrThrPheGlyGlnGlyThrLysValGluIleLysArg
【００５３】
配列番号２
ATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGATATTGGTGCTTCTGGTTCTGCTACATCTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCTACTACTACTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCATCCGCTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGTATGCTGATTATCCTACTACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG
【００５４】
次いで、発現ベクターを昆虫細胞株ショウジョウバエＳ２中で発現させた。抗ＥＧＦＲ ｅｒｂ_ｓｃＦｖを精製し、ウェスタンブロット分析およびＥＬＩＳＡにかけて、そのＥＧＦＲに対する特異性を確認した。
【００５５】
ＲＴ－ＰＣＲを行って、抗ＣＤ３モノクローナル抗体ＯＫＴ３の重鎖可変領域（V_H)および軽鎖可変領域（V_L）をコードするｃＤＮＡをハイブリドーマ細胞株から得た。続いて、２つのｃＤＮＡをライゲートして、ＯＫＴ３のV_H－V_Lの融合タンパク質をコードする融合配列を作製した。以下に示すのは、この融合タンパク質のポリペプチド配列（配列番号３）とそれをコードするｃＤＮＡの配列（配列番号４）である。
【００５６】

配列番号３
ValGlnLeuGlnGlnSerGlyAlaGluLeuAlaArgProGlyAlaSerValLysMetSerCysLysAlaSerGlyTyrTh
rPheThrArgTyrThrMetHisTrpValLysGlnArgProGlyGlnGlyLeuGluTrpIleGlyTyrIleAsnProSerA
rgGlyTyrThrAsnTyrAsnGlnLysPheLysAspLysAlaThrLeuThrThrAspLysSerSerSerThrAlaTyrMet
GlnLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyrCysAlaArgTyrTyrAspAspHisTyrCysLeuAspTy
rTrpGlyGlnGlyThrThrValThrValSerSerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerA
spIleValLeuThrGlnSerProAlaIleMetSerAlaSerProGlyGluLysValThrMetThrCysSerAlaSerSer
SerValSerTyrMetAsnTrpTyrGlnGlnLysSerGlyThrSerProLysArgTrpIleTyrAspThrSerLysLeuAl
aSerGlyValProAlaHisPheArgGlySerGlySerGlyThrSerTyrSerLeuThrIleSerGlyMetGluAlaGluA
spAlaAlaThrTyrTyrCysGlnGlnTrpSerSerAsnProPheThrPheGlySerGlyThrLysLeuGluLeuLysArg

【００５７】
配列番号４
GTCCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAC
CTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCC
GTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
CAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTA
CTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGG
ACATTGTGCTAACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCA
AGTGTAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGC
TTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAG
ATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGA

【００５８】
同じ手順を行って、抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体５２８のV_HおよびV_LをコードするｃＤＮＡ、ならびに抗ＥＧＦＲ５２８のV_H－V_Lの融合タンパク質をコードする融合配列を得た。５２８モノクローナル抗体は、細胞膜、例えばヒト類表皮癌Ａ４３１細胞などの細胞膜上のＥＧＦＲに結合する。この５２８一本鎖抗体のポリペプチド配列（配列番号５）およびそれをコードするｃＤＮＡの配列（配列番号６）を以下に示す。

【００５９】
配列番号５
ValLysLeuGlnGluSerGlySerGluMetAlaArgProGlyAlaSerValLysLeuProCysLysAlaSerGlyAspTh
rPheThrSerTyrTrpMetHisTrpValLysGlnArgHisGlyHisGlyProGluTrpIleGlyAsnIleTyrProGlyS
erGlyGlyThrAsnTyrAlaGluLysPheLysAsnLysValThrLeuThrValAspArgSerSerArgThrValTyrMet
HisLeuSerArgLeuThrSerGluAspPheAlaValTyrTyrCysThrArgSerGlyGlyProTyrPhePheAspTyrTr
pGlyGlnGlyThrThrValThrValSerSerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerMetT
hrGlnThrProLeuSerLeuProValSerLeuGlyAspGlnAlaSerIleSerCysArgSerSerGlnAsnIleValHis
AsnAsnGlyIleThrTyrLeuGluTrpTyrLeuGlnArgProGlyGlnSerProLysLeuLeuIleTyrLysValSerAs
pArgPheSerGlyValProAspArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuLysIleSerArgValGluA
laGluAspLeuGlyIleTyrTyrCysPheGlnGlySerHisHisProProThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGlu

【００６０】
配列番号６
GTCAAGCTGCAGGAGTCAGGGTCTGAGATGGCGAGGCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGCCCTGCAAGGCTTCTGGCGACAC
ATTCACCAGTTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCATGGACATGGCCCTGAGTGGATCGGAAATATTTATCCAGGTA
GTGGTGGTACTAACTACGCTGAGAAGTTCAAGAACAAGGTCACTCTGACTGTAGACAGGTCCTCCCGCACAGTCTACATG
CACCTCAGCAGGCTGACATCTGAGGACTTTGCGGTCTATTATTGTACAAGATCGGGGGGTCCCTACTTCTTTGACTACTG
GGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGATGA
CCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTGTACAT
AATAATGGAATCACCTATTTAGAATGGTACCTGCAAAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCGA
CCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTAGAGG
CTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATCATCCTCCCACGTTCGGCGGGGGGACCAAGCTGGAA

【００６１】

上述の抗ＥＧＦＲ ｓｃＦｖ０３、ＯＫＴ３V_H－V_L、および抗ＥＧＦＲ ５２８V_H－V_LをコードするｃＤＮＡを、５’末端の短いヒンジ配列、および３’末端のヒスチジンタグ配列を含むＸＸＩ型ヒトミニコラーゲンのｃＤＮＡにそれぞれインフレームで融合した。以下に示すのは、ＸＸＩ型ヒトミニコラーゲンのポリペプチドおよびｃＤＮＡの配列（それぞれ配列番号７および８）である。

【００６２】

配列番号７

GlyGlyArgGluProLysSerCysAspLysThrHisThrCysProProCysProArgSerIleProGlyProProGlyProIleGlyProGluGlyProArgGlyLeuProGlyLeuProGlyArgAspGlyValProGlyLeuValGlyValProGlyArgProGlyValArgGlyLeuLysGlyLeuProGlyArgAsnGlyGluLysGlySerGlnGlyPheGlyTyrProGlyGluGlnGlyProProGlyProProGlyProGluGlyProProGlyIleSerLysGluGlyProProGlyAspProGlyLeuProGlyLysAspGlyAspHisGlyLysProGlyIleGlnGlyGlnProGlyProProGlyIleCysAspProSerLeuCysPheSerValIleAlaArgArgAspProPheArgLysGlyProAsnTyrSerLeuAspAspSerSerHisHisHisHisHisHisSerSerGly

（注：Proはプロリンまたはヒドロキシプロリンである）

【００６３】

配列番号８

GGCGGCCGCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAAGATCTATTCCTGGGCCACCTGGTCCGATAGGCCCAGAGGGTCCCAGAGGATTACCTGGTTTGCCAGGAAGAGATGGTGTTCCTGGATTAGTGGGTGTCCCTGGACGTCCAGGTGTCAGAGGATTAAAAGGCCTACCAGGAAGAAATGGGGAAAAAGGGAGCCAAGGGTTTGGGTATCCTGGAGAACAAGGTCCTCCTGGTCCCCCAGGTCCAGAGGGCCCTCCTGGAATAAGCAAAGAAGGTCCTCCAGGAGACCCAGGTCTCCCTGGCAAAGATGGAGACCATGGAAAACCTGGAATCCAAGGGCAACCAGGCCCCCCAGGCATCTGCGACCCATCACTATGTTTTAGTGTAATTGCCAGAAGAGATCCGTTCAGAAAAGGACCAAACTATAGTCTAGACGACAGCAGCCATCATCACCATCACCATAGCAGCGGC

【００６４】

得られた３つの発現ベクターを、ショウジョウバエS2細胞に同時トランスフェクト（co-transfect）した。その細胞をブラストサイジン存在下で培養し、ブラストサイジンに耐性を持つ細胞を選別した。細胞培養上清を回収してから、ＥＧＦＲおよびＣＤ３に対する抗体活性に対して、ウェスタンブロットとＥＬＩＳＡでスクリーニングした。一部のクローンの細胞が三重らせん状の複合体（triple helix complex）を安定に発現していることが発見された。ＸＸＩ型ヒトミニコラーゲンに似たこれら三重らせん状の複合体は、熱およびペプシンに耐性を示した。より重要なのは、これらがＥＧＦＲとＣＤ３の両方に特異的に結合したということである。

【００６５】

実施例２

この実施例では、３つの融合ポリペプチド、ＯＫＴ３_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌ、ｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌ、およびｅｒｂ_ＮＳＰＤ－ｓｃＦｖを作製した。

【００６６】

ファージライブラリーの選択

上皮細成長因子レセプター細胞外ドメイン（ＥＧＦＲ－ＥＣＤ）結合可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を含むｅｒｂファージミドを、ヒトシングルフォールドｓｃＦｖファージディスプレイライブラリー（Tomlinson I + J；I. M. Tomlinson and G. Winterより親切に提供された、ＭＲＣラボラトリー オブ モレキュラーバイオロジー、ケンブリッジ、英国）をスクリーニングすることにより単離した。精製したＥＧＦレセプターの組み換え細胞外ドメイン（ＥＧＦＲ-ＥＣＤ；リサーチ ダイアグノスティック社（Research Diagnostics, Inc.））１０μｇを塗布したイムノチューブ（Maxisorp；ヌン（Nunc）、 ロスキレ、デンマーク）を用いて選別を行った。メーカーのプロトコールにしたがって、ブロッキング、パンニング（panning）、洗浄、溶出および溶出ファージの再増幅を行った。

【００６７】

組み換えプラスミドの構築

ｅｒｂのｓｃＦｖをコードするｃＤＮＡをＰＣＲによりｅｒｂファージミドから増幅した。ＯＫＴ３ハイブリドーマ（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ-８００１）の逆転写産物により、ムリンＩｇＧ２ａ抗ＣＤ３ ｍＡｂ ＯＫＴ３（オルト ファーマシューティカル コーポレーション）をコードする配列を得た。公開されたヌクレオチド配列を基に、ＲＴ－ＰＣＲによってＯＫＴ３ ｍＡｂのV_LおよびV_HのｃＤＮＡを得た。グリシンリンカー（ＧＧＧＳ）$_3$でV_LおよびV_H鎖をつなぐことにより、ｅｒｂおよびＯＫＴ３のｓｃＦｖ ＰＣＲの融合を発生させた。

【００６８】

ｓｃＦｖ-Ｃｏｌを生成するよう、ｓｃＦｖ-Ｃｏｌのコーディング領域には、Ｎ末端のｓｃＦｖヌクレオチド配列と、ヒトＩｇＧのヒンジ領域、コラーゲン様ドメイン（下線部）およびＸＸＩ型コラーゲンのＮＣ１ドメインを含む、ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＲＳＩＰ（ＧＰＰ）$_{10}$ＧＩＣＤＰＳＬＣＦＳＶＩＡ-ＲＲＤＰＦＲＫＧＰＮＹのペプチド配列をコードするＣ末端合成コラーゲン足場遺伝子とが含まれる。以下に示すのは、合成コラーゲン足場ポリペプチドおよびｃＤＮＡの配列（それぞれ配列番号９および１０）である。

【００６９】

配列番号９

SEQ ID NO: 9:

GluProLysSerCysAspLysThrHisThrCysProProCysProArgSerIleProGlyProProGlyProProGlyPro
oProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyIleCysAspP
roSerLeuCysPheSerValIleAlaArgArgAspProPheArgLysGlyProAsnTyr

【００７０】

配列番号１０

GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAAGATCTATTCCTGGGCCACCTGGTCCCCCAGGTCC
TCCAGGACCCCCAGGGCCCCCAGGCCCCCCCGGGCCGCCTGGACCCCCAGGGCCACCAGGCCCCCCAGGCATCTGCGACC
CATCACTATGTTTTAGTGTAATTGCCAGAAGAGATCCGTTCAGAAAAGGACCAAACTAT

【００７１】

この合成配列（配列番号１０）をオーバーラップＰＣＲにより作製し、ＮｏｔＩおよびＸｈｏＩ部位の隣に位置する（flanking）ＰＣＲ産物を、同部位の発現ベクターｐＳｅｃＴａｇ２／Ｈｙｇｒｏ(インビトロジェン)にクローニングした。続いて、ｅｒｂおよびＯＫＴ３のｓｃＦｖを、ＡｓｃＩおよびＮｏｔＩ部位で上述したＣ末端コラーゲン足場含有構成体にインフレームでクローニングして、ｅｒｂ_ｓｃＦｖ－ＣｏｌおよびＯＫＴ３_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌの発現構成体をそれぞれ作った。

【００７２】

次に、ｅｒｂ_ＮＳＰＤ－ｓｃＦｖを作製した。ＮＳＰＤ－ｓｃＦｖのコーディング領域には、ヒトサーファクタントタンパク質Ｄ（ＳＰＤ）のＮ末端の２５４のアミノ酸、コレクチンファミリーのメンバー、およびＣ末端のｓｃＦｖが含まれていた。以下に示すのは、ヒトサーファクタントタンパク質ＤのポリペプチドのＮ末端２５４アミノ酸およびそのｃＤＮＡの配列である（それぞれ配列番号１１および１２）。

【００７３】

配列番号１１

MetLeuLeuPheLeuLeuSerAlaLeuValLeuLeuThrGlnProLeuGlyTyrLeuGluAlaGluMetLysThrTyrSe
rHisArgThrMetProSerAlaCysThrLeuValMetCysSerSerValGluSerGlyLeuProGlyArgAspGlyArgA
spGlyArgGluGlyProArgGlyGluLysGlyAspProGlyLeuProGlyAlaAlaGlyGlnAlaGlyMetProGlyGln
AlaGlyProValGlyProLysGlyAspAsnGlySerValGlyGluProGlyProLysGlyAspThrGlyProSerGlyPr
oProGlyProProGlyValProGlyProAlaGlyArgGluGlyProLeuGlyLysGlnGlyAsnIleGlyProGlnGlyL
ysProGlyProLysGlyGluAlaGlyProLysGlyGluValGlyAlaProGlyMetGlnGlySerAlaGlyAlaArgGly
LeuAlaGlyProLysGlyGluArgGlyValProGlyGluArgGlyValProGlyAsnThrGlyAlaAlaGlySerAlaGl
yAlaMetGlyProGlnGlySerProGlyAlaArgGlyProProGlyLeuLysGlyAspLysGlyIleProGlyAspLysG
lyAlaLysGlyGluSerGlyLeuProAspValAlaSerLeuArgGlnGlnValGluAlaLeuGlnGlyGlnValGlnHis

LeuGlnAlaAlaPheSerGlnTyrLysLysValGluLeuPhe

【００７４】

配列番号１２

ATGCTGCTCTTCCTCCTCTCTGCACTGGTCCTGCTCACACAGCCCCTGGGCTACCTGGAAGCAGAAATGAAGACCTACTC
CCACAGAACAATGCCCAGTGCTTGCACCCTGGTCATGTGTAGCTCAGTGGAGAGTGGCCTGCCTGGTCGCGATGGACGGG
ATGGGAGAGAGGGCCCTCGGGGCGAGAAGGGGGACCCAGGTTTGCCAGGAGCTGCAGGGCAAGCAGGGATGCCTGGACAA
GCTGGCCCAGTTGGGCCCAAAGGGGACAATGGCTCTGTTGGAGAACCTGGACCAAAGGGAGACACTGGGCCAAGTGGACC
TCCAGGACCTCCCGGTGTGCCTGGTCCAGCTGGAAGAGAAGGTCCCCTGGGGAAGCAGGGGAACATAGGACCTCAGGGCA
AGCCAGGCCCAAAAGGAGAAGCTGGGCCCAAAGGAGAAGTAGGTGCCCCAGGCATGCAGGGCTCGGCAGGGGCAAGAGGC
CTCGCAGGCCCTAAGGGAGAGCGAGGTGTCCCTGGTGAGCGTGGAGTCCCTGGAAACACAGGGGCAGCAGGGTCTGCTGG
AGCCATGGGTCCCCAGGGAAGTCCAGGTGCCAGGGGACCCCCGGGATTGAAGGGGGACAAAGGCATTCCTGGAGACAAAG
GAGCAAAGGGAGAAAGTGGGCTTCCAGATGTTGCTTCTCTGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTACAGCAC
CTCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAGAAAGTTGAGCTCTTC

【００７５】

Ｎ末端ＳＰＤ ｃＤＮＡを、発現ベクター、ｐＳｅｃＴａｇ２／Ｈｙｇｒｏ（インビトロジェン）にＮｈｅＩおよびＡｓｃＩ部位でクローニングした。続いて、ｅｒｂのｓｃＦｖを、ＡｓｃＩおよびＸｈｏＩ部位で上述したＮ末端ＳＰＤ含有構成体にインフレームでクローニングして、ｅｒｂ_ＮＳＰＤ－ｓｃＦｖの発現構成体を作った。

【００７６】

ｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌ、ｅｒｂ_ＮＳＰＤ－ｓｃＦｖおよびＯＫＴ３_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌの各読み取り枠（open reading frame）には、Ｎ末端リーダー配列と、分泌、検出および精製に利用されるＣ末端ｍｙｃエピトープ／ポリヒスチジンタグとをコードする配列が含まれていた。下表にまとめたのは、上述の発現構成体によりコードされる各種組み換えタンパク質／抗体である。

【００７７】

【表１】

表１　本試験に用いた各種抗体分子の概観

抗体	標的	タイプ	Ａｂの起源
ｅｒｂ－ｓｃＦｖ－Ｃｏｌ	ＥＧＦＲ－ＥＣＤ	ＣＳＡ[1]	ヒト
ｅｒｂ－ｓｃＦｖ－Ｆｃ	ＥＧＦＲ－ＥＣＤ	ｓｃＦｖ－Ｆｃ	ヒト
ｅｒｂ－ｓｃＦｖ	ＥＧＦＲ－ＥＣＤ	ｓｃＦｖ	ヒト
ｅｒｂ－ＮＳＰＤ－ｓｃＦｖ	ＥＧＦＲ－ＥＣＤ	ＣＳＡ	ヒト
ＯＫＴ３_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌ	ＣＤ３	ＣＳＡ	マウス
ＯＫＴ３	ＣＤ３	ＩｇＧ	マウス

[1]コラーゲン足場抗体

【００７８】

抗体の発現および精製

組み換えタンパク質複合体／抗体を作製するため、Ｅｆｆｅｃｔｅｎｅ（Qiagen）を用い、メーカーの取扱説明書にしたがって上述の構成体をマウス骨髄腫ＮＳ０細胞に導入した。ハイグロマイシン（４００μｇ／ｍｌ）で４週間選別したのち、各安定クローンを、振盪フラスコ中の２％のウシ胎仔血清を含む既知組成培地ＨｙＱＣＤＭ４ＮＳ０（ハイクローン（Hyclone））にて、初播種密度２×１０^{5}細胞／ｍｌとして培養した。該培養は３７℃で５日間、１５０ｒｐｍに保って行った。それら細胞が、上述の抗体ドメインと、コラーゲン足場ドメインつまりコラーゲン足場抗体（ＣＳＡ）と、を含むタンパク質をコードする発現構成体を保持できるように、培地にアスコルビン酸ナトリウム（８０μｇ／ｍｌ）を毎日加えた。

【００７９】

ｅｒｂ_ｓｃＦｖ、ｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｆｃ、ｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌ、またはＯＫＴ

３_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌタンパク質あるいはタンパク質複合体を精製するべく、ろ過した各培地約２Ｌを、流速６０ｍｌ／時間で、ｐＨ８．０の５０ｍＭトリスＨＣｌバッファーで平衡化したＴゲルカラム（１．５×８ｃｍ、Pierce）にかけた。同バッファーで洗浄したのち、その組み換えタンパク質またはタンパク質複合体をｐＨ４．０の５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファーで溶出した。それらのＵＶ吸収度を２８０ｎｍで測定し、そのピーク画分を、流速６０ｍｌ／時間で、ｐＨ８．０の０．５Ｍ ＮａＣｌ含有５０ｍＭトリスＨＣｌバッファーにより平衡化した$ZnSO_4$チャージキレーティングセファロースハイトラップカラム（$ZnSO_4$-charged chelating Sepharose HighTrap column）（ベッドボリューム１－ｍｌ、ＧＥ ヘルスケア)にかけた。そのカラムを先ず２０ｍＭのイミダゾールで洗浄してから、結合タンパク質またはタンパク質複合体を同バッファー中にて０．２５Ｍのイミダゾールで溶出した。最終的な調製液をｐＨ７．０の５０ｍＭ Ｈｅｐｅｓバッファーに透析した。

【００８０】

次に、ＭＯＰＳを用いる１０％ＮｕＰＡＧＥビス－トリスポリアクリルアミドゲルか、酢酸ナトリウムをランニングバッファー（インビトロジェン）に用いる７％ＳＤＳ／トリスアセテートポリアクリルアミドゲルのいずれかにより、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを実行した。続いてクマシーブリリアントブルーＲ－２５０でタンパク質を染色した。ＣｈｅｍｉＩｍａｇｅｒ５５００（アルファ イノテック（Alpha Innotech）、サンリアンドロ、カリフォルニア）とソフトウェアＡｌｐｈａ ＥａｓｅＦＣ（ｖ.４．０；アルファ イノテック）を用い濃度測定を行うことによってタンパク質バンドの濃度を定量化した。

【００８１】

三重らせんの性質を調べるため、精製されたｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌ（１ｍｇ／ｍｌ）を１０ｍＭ ＤＴＴの非存在または存在下、３７℃で１時間インキュベートした。ＤＤＴ処理サンプルのアリコートをさらに常温で５０ｍＭ Ｎ－エチル－マレイミド（ＮＥＭ）と３０分間反応させて、遊離スルフヒドリル基および三量体の再編成を完全にブロックした。各サンプルからの等量のタンパク質を、酢酸ナトリウムをランニングバッファーとする７％ ＳＤＳ／トリスアセテートポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。そのゲルをクマシーブルーで染色した。精製されたＣＳＡは、ホモ三量体、または、マイルドな還元条件下で２つの三量体に解離可能な鎖間ジスルフィド結合六量体であることが発見された。

【００８２】

ｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌの三量体構造の熱安定性を調べた。２Ｍ尿素含有５０ｍＭトリス－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）中の精製されたｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌを１０ｍＭトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）の非存在または存在下常温で処理した。次いで、還元されたサンプルを常温下５０ｍＭ ＮＥＭでアルキル化した。ＳＤＳローディングバッファーを混合する前に、等量のタンパク質を含む各サンプルを３５、４５、５５、６５、７５および８５℃で１０分間加熱した。そのサンプルを、非還元条件下、ＭＯＰＳバッファーを用い１０％ＳＤＳ／ビス－トリスポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。そのゲルをクマシーブルーで染色した。その結果、ｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌ三量体が高い熱安定性を有することが示された。実際には、６５℃で１０分間処理したのち、５０％を超える三量体が残っていた。また、ｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌのコラーゲン様ドメインの三量体構造は、プロリルのヒドロキシル化がなされていることもわかった。

【００８３】

結合試験

各種の型のｅｒｂ抗体のＥＧＦＲ－ＥＣＤに対する結合動態（binding kinetics）を、ランニングバッファーＨＢＳ-ＥＰ（ｐＨ７．４の１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、３ｍＭ ＥＤＴＡ、０．００５％界面活性剤Ｐ２０）中で、ＢＩＡｃｏｒｅ Ｘバイオセンサー（ビアコア社（BIACORE, Inc.）、ウプサラ、スウェーデン）を用いて測定した。簡単に言うと、ＥＧＦＲ－ＥＣＤをアミンカップリングにより、レスポンス単位（ＲＵ）が１７００程度となるまで、Ｃｌセンサーチップ上に固定化し、各種濃度で精製し

た抗体を流速１０μｌ／分で注入した。ｐＨ ３．５の１０ｍＭグリシン－ＨＣｌを５μｌ注入することによってその表面を再生した。各濃度におけるセンサーグラムを得ると共に、プログラム、ＢＩＡ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ３．２を用いて評価した。結合データを１：１ラングミュア結合モデルでフィッティングし、解離速度（k_{diss}）／会合速度（k_{ass}）の比として定義される親和定数K_Dを計算した。その結果を以下の表２に示す。

【００８４】

【表２】

表２　各種形態のｅｒｂ抗体の固定ＥＧＦＲ－ＥＣＤへの結合動態

抗体	$k_{ass}／10^5$	$K_{diss}／10^{-4}$	K_D
	$M^{-1}s^{-1}$	s^{-1}	nM
erb_scFv_Col	１．７２	８．２２	４．７８
erb_scFv-Fc	０．９０９	９４．４	１０４
erb_scFv	０．１５	７４１	４９６０

【００８５】

表２に示されるように、ＥＧＦＲ－ＥＣＤに対するｅｒｂ_ｓｃＦｖ_Ｃｏｌの結合親和性は、二価（ｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｆｃ)および一価（ｅｒｂ_ｓｃＦｖ）ｍＡｂカウンターパートよりもそれぞれ約２０倍および１０００倍強かった。

【００８６】

安定性および薬物動態アッセイ

血清安定性アッセイでは、各種形態のｅｒｂ抗体、ｅｒｂ_ｓｃＦｖ_Ｃｏｌ、ｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｆｃまたはｅｒｂ_ｓｃＦｖの安定性を３７℃にてヒト血清でインキュベートすることにより測定した。各インキュベーション期間経過後に残った活性抗ＥＧＦＲの量を定量的ＥＬＩＳＡにより測定した。ＥＬＩＳＡは、（捕捉試薬としての）組み換えＥＧＦＲ－ＥＣＤと抗ｃ-ｍｙｃ ｍＡｂ（９Ｅ１０、シグマケミカル社）、続いて、ＨＲＰコンジュゲートアフィニティ精製ポリクローナルヤギ抗マウスＩｇＧと化学発光基質（ピアース バイオテクノロジー社（Pierce Biotechnology, Inc.））を用いて行った。薬物動態アッセイでは、３匹のＢＡＬＢ／ｃヌードマウスを用いてｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌのクリアランスを分析した。簡単に言うと、事前の採血（pre-bleed）を行ってから、各マウスに２５μｇ(２ｍｇ／体重キログラム)のｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌを皮下注射（ｓ．ｃ．）した。続く７０時間の間に、定期的に血液サンプルを回収し、ＥＬＩＳＡによってそれらのｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌの含有量を評価した。タンパク質はきわめて安定しているということがわかった。

【００８７】

Ｔ細胞増殖アッセイおよび混合リンパ球反応（ＭＬＲ）

５－ブロモ-２'－デオキシウリジン(ＢｒｄＵ)細胞増殖アッセイを行った。簡単に言うと、ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を３７℃で６６時間、１０倍段階希釈したＯＫＴ３（イーバイオサイエンス社（eBioscience, Inc.））またはＯＬＴ３_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌの存在下、ブラック９６ウェル平底組織培養プレート中に２×１０^5細胞／ウェルとなるように加えた１０％ＦＢＳ含有１００μｌ ＲＰＭＩ－１６４０培地にプレートした。次いでその細胞を１０μＭのＢｒｄＵにより５時間パルス処理した。培地を除去したのち、ＦｉｘＤｅｎａｔによりワンステップで細胞の固定とＤＮＡの変性を行った。その後、その細胞をペルオキシダーゼ標識抗ＢｒｄＵ抗体（抗ＢｒｄＵ ＰＯＤ、Ｆａｇフラグメント）で１．５時間室温にてインキュベートした。マイクロプレートルミノメーター（Hidex, CHAMELEON detection platform、フィンランド）を用いて化学発光検出および定量化を行った。

【００８８】

一方向性混合リンパ球反応におけるＴ細胞増殖および免疫抑制を以下のようにして評価

した。ヒトＰＢＭＣを２人の健康なドナーから採取した（刺激および応答）。刺激または応答細胞を、３７℃、５％のＣＯ２を含んだ加湿空気中、完全培地（１０％ヒトＡＢ血清、２ｍＭグルタミン、５０ｎＭ ２－メルカプトエタノール、ならびにそれぞれ１００単位／ｍｌのペニシリンおよびストレプトマイシンを加えたＲＰＭＩ １６４０）にて２５μｇ／ｍｌのマイトマイシンＣ（シグマ－アルドリッチ）で３０分間処理してから、ＲＰＭＩ １６４０培地中で3回洗浄した。応答細胞を単独で、またはマイトマイシンＣ処理した刺激細胞もしくはマイトマイシンＣ応答細胞と１：１で混合し、2×10^5細胞／ウェルとして２００μｌの完全培地で培養した。応答細胞をプレートしたのち、精製したＯＫＴ３_ｓｃＦｖ－ＣｏｌまたはＯＫＴ３を異なる濃度で培養物に速やかに加えた。５日後、培養細胞を１０μＭのＢｒｄＵでパルス処理し、２４時間後に回収した。次いで、細胞増殖アッセイを上述の手法で行った。

【００８９】

ＯＫＴ３_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌは、Ｔ細胞増殖の免疫抑制においてより効果が高く、かつ、Ｔ細胞増殖の刺激においては無視できる程度の細胞分裂促進活性を示すことが見出された。

【００９０】

サイトカイン測定

ヒトＰＢＭＣを、３７℃、１０倍段階希釈したＯＫＴ３またはＯＫＴ３_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌの存在下、2×10^5細胞／ウェルとなるように、１０％ＦＢＳ含有０．１ｍｌ ＲＰＭＩ－１６４０培地にプレートした。その上清を各時点で回収し、ヒトサイトカインイムノアッセイキット（イーバイオサイエンス社）を用いて多数のサイトカインを測定した。その結果、ＯＫＴ３_ｓｃＦｖ_Ｃｏｌの投与は、マウスＯＫＴ３ｍＡｂに比較して、無視できる程度のサイトカイン放出しか生じさせないことが示された。

【００９１】

抗体変位（Antibody Displacement）アッセイ

下記する全ての手順は４℃下で行った。ヒトＴ細胞を1×10^6細胞／ｍｌの密度でＦＣＭバッファー（２％ＦＢＳおよび０．１％アジ化ナトリウム含有リン酸緩衝食塩水）に懸濁させた。その細胞をマウス総ＩｇＧ（２μｇ／ｍｌ、ジャクソン イムノリサーチラボラトリーズ）で３０分処理してから、段階希釈したＯＫＴ３_ｓｃＦｖ－ＣｏｌまたはＯＫＴ３抗体で1時間インキュベートした。固定した、飽和量（フローサイトメトリーにより判断）のＦＩＴＣコンジュゲートＯＫＴ３（０．２５μｇ／ｍｌ、イーバイオサイエンス社より購入）を直接加えた。1時間のインキュベーション後、その細胞をＦＣＭバッファーで洗浄し、ＦＡＣＳｃａｎ（ベクトンデッキンソン、サンジョゼ、カリフォルニア)を用いフローサイトメトリー法により免疫発光解析を行った。そのデータを、遮断抗体の非存在下ＯＫＴ３－ＦＩＴＣでＴ細胞を染色することにより得た平均蛍光強度として定義される最大蛍光強度の抑制率(percent inhibition)として表した。

【００９２】

その結果、ＯＫＴ３_ｓｃＦｖ_Ｃｏｌが、天然マウスＯＫＴ３ ｍＡｂよりも、強力にヒトＣＤ３+Ｔ細胞に結合することがわかった。

【００９３】

ヒトＩｇＧを標準として、Ｂｒａｄｆｏｒｄアッセイ（ピアース バイオテクノロジー社製、クーマシープラス試薬（Coomassie plus reagent）)によりタンパク質濃度を測定した。アミノ酸分析については、精製したｅｒｂ_ｓｃＦｖ－Ｃｏｌを５０ｍＭ酢酸に透析し、１１０℃で２４時間、６ＮのＨＣｌ中で加水分解し、Ｗａｔｅｒｓ ＰｉｃｏＴａｇ（登録商標）システムでアミノ酸分析を行った。

【００９４】

これら結果によって、コラーゲン足場抗体が、抗腫瘍および免疫調節いずれの用途においても治療抗体設計に理想的な構造であるということが示される。

【００９５】

本明細書に開示されたすべての特徴は、どのような組合せにも組み合わせることができ

る。本明細書に開示された各特徴は、同一、均等、または類似の目的を果たす他の特徴で置き換えられてもよい。したがって、特に明示する場合を除いては、開示された各特徴は、単に、包括的な一連の均等または同様の特徴の例に過ぎない。

【００９６】

上述の記載から、当業者は、本発明の主要な特徴を容易に確認することができると共に、その精神と範囲を逸脱することなく、各種使用および条件に適合するように本発明をさまざまに変更および修飾することができる。よって、その他の実施形態もまた、以下の特許請求の範囲の範囲内に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【００９７】

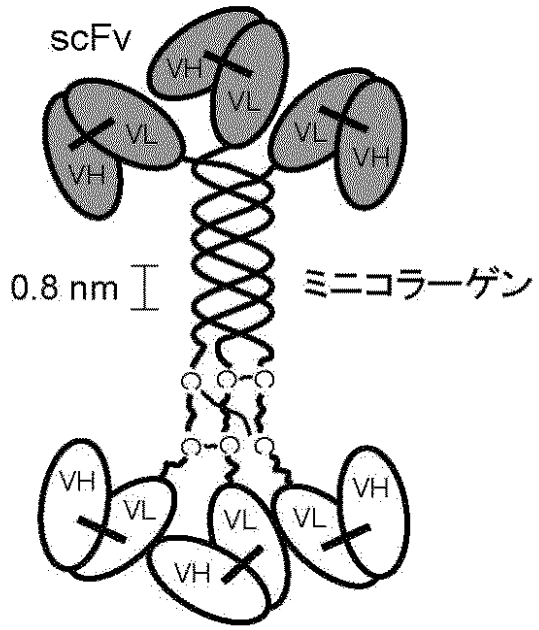
【図１】ヒトＸＸＩ型コラーゲン由来のミニコラーゲン三重らせんコイル足場を有するタンパク質複合体を示す図である。三重らせんコイルの６つの末端は、一本鎖抗体のV_LおよびV_Hドメインを有する６つのＦｖフラグメント（ｓｃＦｖ）にそれぞれインフレームで融合している。

【図２】それぞれ、（Ａ）その３つのＮ末端が３つの一本鎖抗体ＯＫＴ３（抗ＣＤ３）、５２８（抗ＥＧＦＲ）、およびｅｒｂ_ｓｃＦｖ（抗ＥＧＦＲ）にそれぞれインフレームで融合する三重らせんコイル足場を有するタンパク質複合体を示す図、（Ｂ）該タンパク質複合体のウェスタンブロットの結果を示す写真である。安定にトランスフェクトされたショウジョウバエＳ２細胞由来の培地を、非還元条件下ＳＤＳ－ＰＡＧＥで電気泳動してから、ＸＸＩ型コラーゲン、３Ｅ２のＣ末端に対するモノクローナル抗体で免疫ブロットした。Ｔは鎖間でジスルフィド結合した三量体であり、Ｍｔは鎖間でジスルフィド結合した三量体を含む単量体である。

【図３】三重らせんコイル足場を有するタンパク質複合体を示す図である。三重らせんコイルの３つのＮ末端は３つのＯＫＴ３一本鎖抗体にインフレームで融合し、三重らせんコイルの３つのＣ末端は３つの５２８一本鎖抗体にインフレームで融合している。

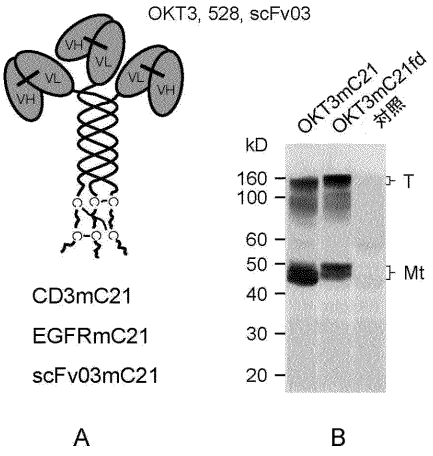
【図４】それぞれ異なる形式の抗体を説明するものである。（Ａ）コラーゲン足場抗体：アミノ末端ｓｃＦｖ、ヒトＩｇＧのヒンジ領域、コラーゲン様ドメイン$(GPP)_{10}$、およびＸＸＩ型コラーゲンのカルボキシル末端ＮＣ１ドメインを含むｓｃＦｖ－Ｃｏｌ（左パネル）、サーファクタントタンパク質Ｄ（ＳＰＤ）コレクチンのアミノ末端部およびカルボキシル末端のｓｃＦｖを含むＮＳＰＤ－ｓｃＦｖ（右パネル）。（Ｂ）左から右に:免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）、キメラ（ｓｃＦｖ－Ｆｃ）、および一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）と、これらのおおよその分子量。グレーのエリアはV_HおよびV_Lフラグメントを表す。点線：鎖間ジスルフィド結合。

【図１】

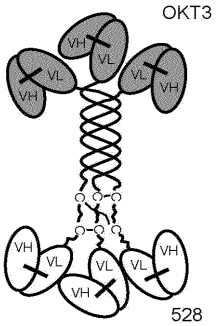


コラーゲン足場抗体

【図２】

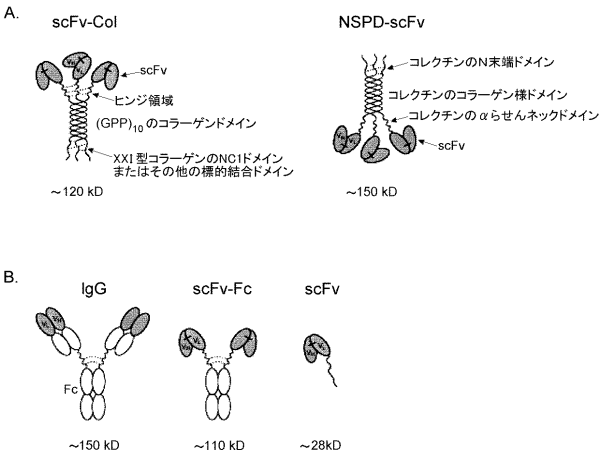


【図３】



CD3mC21 x EGFR
二重特異性 T細胞エンゲージャ（engager）

【図４】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C07K	***14/78***	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｋ	14/78		
C07K	***14/44***	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｋ	14/44		
C12N	***1/15***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	1/15		
C12N	***1/19***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	1/19		
C12N	***1/21***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	1/21		
C12N	***5/10***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	5/00	Ａ	
C12P	***21/02***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ	
Ａ６１Ｐ	*37/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｚ	

(72)発明者　范　佳玉
台湾新竹市東区軍功里２５鄰建新路１９号
(72)発明者　黄　娟娟
台湾台北縣新莊市中美里１１鄰復興路１段２１８巷７－２号３Ｆ
(72)発明者　李　秀娟
台湾新竹縣寶山郷里寶斗村６鄰寶新路４４６号

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA61 BA63 BA80 CA01 CA07 DA01 DA02 DA03 DA05 DA11 EA04 GA11 HA08
4B064 AG01 AG20 AG26 CA02 CA05 CA10 CA11 CA12 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA44
4C085 AA11 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 BA40 BA41 CA40 DA50 DA75 DA89 EA20 FA74

【外国語明細書】
2007181458000001.pdf
2007181458000002.pdf
2007181458000003.pdf
2007181458000004.pdf