(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2016-185944
(P2016-185944A)
(43)公開日　平成28年10月27日(2016.10.27)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00	ZNA	4B064
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4B065
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C085
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4H045
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		

審査請求 有　請求項の数 31　ＯＬ　外国語出願　（全 162 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-63159 (P2016-63159)
(22)出願日　平成28年3月28日 (2016.3.28)
(62)分割の表示　特願2013-530332 (P2013-530332)の分割
原出願日　平成23年9月22日 (2011.9.22)
(31)優先権主張番号　61/385,460
(32)優先日　平成22年9月22日 (2010.9.22)
(33)優先権主張国　米国 (US)

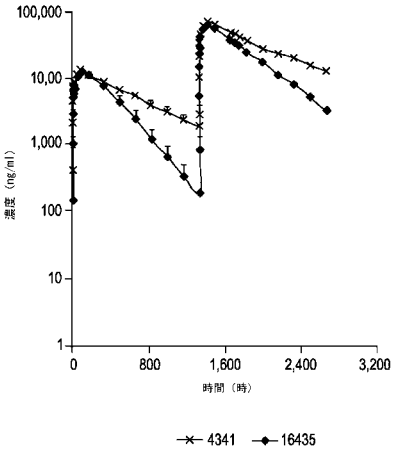
(71)出願人　500049716
アムジエン・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国　シーエー　９１３２０，サウザンド　オークス，ワン　アムジエン　センター　ドライブ
(74)代理人　110001173
特許業務法人川口國際特許事務所
(72)発明者　ケネス・ダブリユ・ウオーカー
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９１３２０、ニユーベリー・パーク、メサ・アベニユー・１７５
(72)発明者　タルナ・アローラ
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９１３２０、サウザンド・オークス、ビア・ピサ・５３８０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】担体としての免疫グロブリンおよびその使用

(57)【要約】　（修正有）
【課題】可溶性ヒトＴＲ２と結合しない免疫グロブリン及び担体としての使用を開示。
【解決手段】可溶性ヒトＴＲ２と結合しない免疫グロブリンの単離。また、免疫グロブリンを含む医薬組成物および薬剤、該免疫グロブリンを製造する方法において有用な、該免疫グロブリンをコードする単離された核酸、ベクター、宿主細胞が開示される。免疫グロブリンは、薬理活性を有するポリペプチド等の、１～２４個の薬理活性を有する化学的部分を結合して含む。
【選択図】図４４

図４４



【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む単離された免疫グロブリンであって、
（ａ）　該重鎖可変領域が配列番号３２３のアミノ酸配列を含み、該軽鎖可変領域が配列番号１８８もしくは配列番号１９０のアミノ酸配列を含む；または
（ｂ）　該重鎖可変領域が配列番号３２１のアミノ酸配列を含み、該軽鎖可変領域が配列番号１８８もしくは配列番号１９０のアミノ酸配列を含む；または
（ｃ）　該重鎖可変領域が配列番号３２５のアミノ酸配列を含み、該軽鎖可変領域が配列番号１８２、配列番号１８８、もしくは配列番号１９０のアミノ酸配列を含む、上記免疫グロブリン。
【請求項２】
以下の免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む単離された免疫グロブリンであって、
（ａ）　該軽鎖可変領域が配列番号１９６のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３３５、配列番号３４９、配列番号３５１、配列番号３５３、配列番号３５５、もしくは配列番号３５９のアミノ酸配列を含む；または
（ｂ）　該軽鎖可変領域が配列番号２０４のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３４９もしくは配列番号３５５のアミノ酸配列を含む；または
（ｃ）　該軽鎖可変領域が配列番号２０２のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３４９のアミノ酸配列を含む；または
（ｄ）　該軽鎖可変領域が配列番号１９２のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３５７、配列番号３５９、もしくは配列番号３６９のアミノ酸配列を含む；または
（ｅ）　該軽鎖可変領域が配列番号１９４のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３３５、配列番号３４９、もしくは配列番号３５１のアミノ酸配列を含む、上記免疫グロブリン。
【請求項３】
重鎖可変領域が配列番号３２３のアミノ酸配列を含み；軽鎖可変領域が配列番号１８８のアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の単離された免疫グロブリン。
【請求項４】
軽鎖可変領域が配列番号１９６のアミノ酸配列を含み；重鎖可変領域が配列番号３５３のアミノ酸配列を含む、請求項２に記載の単離された免疫グロブリン。
【請求項５】
軽鎖可変領域が配列番号２０２のアミノ酸配列を含み；重鎖可変領域が配列番号３４９のアミノ酸配列を含む、請求項２に記載の単離された免疫グロブリン。
【請求項６】
重鎖可変領域が配列番号３２５のアミノ酸配列を含み；軽鎖可変領域が配列番号１９０のアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の単離された免疫グロブリン。
【請求項７】
単離された免疫グロブリンが抗体または抗体フラグメントを含む、請求項１または請求項２に記載の単離された免疫グロブリン。
【請求項８】
ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４を含む、請求項７に記載の単離された免疫グロブリン。
【請求項９】
モノクローナル抗体を含む、請求項７に記載の単離された免疫グロブリン。
【請求項１０】
ヒト抗体を含む、請求項９に記載の単離された免疫グロブリン。
【請求項１１】
（ａ）　配列番号１１３のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個の

アミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号１１０のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または
（ｂ）　配列番号１２５のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号１２２のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または
（ｃ）　配列番号１０１のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号９８のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または
（ｄ）　配列番号１１９のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号１１６のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖
、を含む請求項１０記載の単離された免疫グロブリン。

【請求項１２】
１から２４個の薬理活性を有する化学的部分を、結合してさらに含む、請求項１～６または８～１１のいずれか一項に記載の単離された免疫グロブリン。

【請求項１３】
薬理活性を有する化学的部分が薬理活性を有するポリペプチドである、請求項１２に記載の単離された免疫グロブリン。

【請求項１４】
免疫グロブリンが組換え技術によって産生される、請求項１３に記載の単離された免疫グロブリン。

【請求項１５】
免疫グロブリンが少なくとも１個の免疫グロブリン重鎖および少なくとも１個の免疫グロブリン軽鎖を含み、薬理活性を有するポリペプチドが免疫グロブリン重鎖のＦｃドメインの内部ループ内の、免疫グロブリン重鎖の一次アミノ酸配列に挿入された、請求項１４に記載の単離された免疫グロブリン。

【請求項１６】
免疫グロブリンが少なくとも１個の免疫グロブリン重鎖および少なくとも１個の免疫グロブリン軽鎖を含み、薬理活性を有するポリペプチドが免疫グロブリン重鎖のＮ末端またはＣ末端に結合した、請求項１３に記載の単離された免疫グロブリン。

【請求項１７】
免疫グロブリンが少なくとも１個の免疫グロブリン重鎖および少なくとも１個の免疫グロブリン軽鎖を含み、薬理活性を有するポリペプチドが免疫グロブリン軽鎖のＮ末端またはＣ末端に結合した、請求項１３に記載の単離された免疫グロブリン。

【請求項１８】
薬理活性を有するポリペプチドが、トキシンペプチド、ＩＬ－６結合ペプチド、ＣＧＲＰペプチド拮抗薬、ブラジキニンＢ１受容体ペプチド拮抗薬、ＰＴＨ作動薬ペプチド、ＰＴＨ拮抗薬ペプチド、ａｎｇ－１結合ペプチド、ａｎｇ－２結合ペプチド、ミオスタチン結合ペプチド、ＥＰＯ－模倣体ペプチド、ＦＧＦ２１ペプチド、ＴＰＯ－模倣体ペプチド、ＮＧＦ結合ペプチド、ＢＡＦＦ拮抗薬ペプチド、ＧＬＰ－１もしくはそのペプチド模倣薬、またはＧＬＰ－２もしくはそのペプチド模倣薬である、請求項１３に記載の単離された免疫グロブリン。

【請求項１９】
トキシンペプチドがＳｈＫまたはＳｈＫペプチド類似体である、請求項１８に記載の単離された免疫グロブリン。
【請求項２０】
請求項１～１９のいずれかに記載の免疫グロブリン；および薬剤的に許容できる希釈剤、賦形剤または担体を含む、医薬組成物。
【請求項２１】
請求項１～１１のいずれかに記載の免疫グロブリンをコードする、単離された核酸。
【請求項２２】
請求項３に記載の免疫グロブリンをコードする、単離された核酸。
【請求項２３】
請求項４に記載の免疫グロブリンをコードする、単離された核酸。
【請求項２４】
請求項５に記載の免疫グロブリンをコードする、単離された核酸。
【請求項２５】
請求項６に記載の免疫グロブリンをコードする、単離された核酸。
【請求項２６】
請求項１１に記載の免疫グロブリンをコードする、単離された核酸。
【請求項２７】
請求項１３～１９のいずれかに記載の免疫グロブリンをコードする、単離された核酸。
【請求項２８】
請求項２１に記載の単離された核酸を含むベクター。
【請求項２９】
請求項２２～２６のいずれかに記載の単離された核酸を含むベクター。
【請求項３０】
請求項２７に記載の単離された核酸を含むベクター。
【請求項３１】
発現ベクターを含む、請求項２８に記載のベクター。
【請求項３２】
発現ベクターを含む、請求項２９に記載のベクター。
【請求項３３】
発現ベクターを含む、請求項３０に記載のベクター。
【請求項３４】
請求項３１～３３のいずれかに記載の発現ベクターを含む、単離された宿主細胞。
【請求項３５】
（ａ）　発現ベクターにコードされた免疫グロブリンの発現を可能にする条件下、請求項３４に記載の宿主細胞を培地中で培養すること；および
（ｂ）　培地から免疫グロブリンを回収すること、を含む方法。
【請求項３６】
表面プラズモン共鳴結合アッセイで測定した場合に、生理条件下でインキュベートされた水溶液中で、３０マイクロモル濃度の免疫グロブリンが、３０ナノモル濃度の可溶性ヒトＩＬ－１７Ｒ（配列番号８９）と有意には結合しない、請求項１に記載の免疫グロブリン。
【請求項３７】
表面プラズモン共鳴結合アッセイで測定した場合に、生理条件下でインキュベートされた水溶液中で、１０マイクロモル濃度の免疫グロブリンが、１０ナノモル濃度の可溶性ヒトＴＲ２（配列番号８２）と有意には結合しない、請求項２に記載の免疫グロブリン。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】

本出願は、２０１０年９月２２日に出願された米国仮特許出願第６１／３８５，４６０号の利益を主張するものであり、その全体が参照によって本明細書に組み込まれるものとする。

【０００２】

本願は、２０１１年９月２２日にＥＦＳ－ＷＥＢを介して提出されたＡＳＣＩＩ「ｔｘｔ」対応の配列表を含み、該配列表は、米国特許法施行規則§§１．８２１（ｃ）および１．８２１（ｅ）に規定される、コンピューターで読み取り可能な形態（ＣＲＦ）およびハードコピーの両方となり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。２０１１年９月２２日に作製された「ｔｘｔ」ファイルの名称は、Ａ－１５３６－ＷＯ－ＰＣＴＳｅｑＬｉｓｔ０９２２１１＿ＳＴ２５．ｔｘｔであり、サイズは５０１ｋｂである。

【０００３】

本願全体を通して、様々な公報が括弧または角括弧内に参照される。これら公報の全体の開示は、本発明が属する技術分野の現状をより十分に説明するために、本願における参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【０００４】

１.技術分野

【０００５】

本発明は、薬物動態特性の向上のために一つまたは複数の薬理活性を有する化学的部分が結合可能である、免疫グロブリンに関する。

【０００６】

２．関連技術の考察

【０００７】

「担体」部分とは、薬理活性を有する化学的部分、例えば、非ペプチド性有機質部分（すなわち、「小分子」）またはポリペプチド作用物質（例えば、本発明の免疫グロブリン）が共有結合によって結合または融合することのできる、薬理学的に不活性な分子を表す。

タンパク質分解による薬理活性を有する部分のｉｎ　ｖｉｖｏ分解、もしくは薬理活性を有する化学的部分のｉｎ　ｖｉｖｏにおける活性を減じる他の化学修飾の防止もしくは軽減、または腎クリアランスの低減、治療薬のｉｎ　ｖｉｖｏにおける半減期もしくは他の薬物動態学的特性の強化、例えば吸収速度の増加、毒性もしくは免疫原性の低減、溶解性の向上、および／もしくは製造性もしくは貯蔵安定性の増加等に、非結合型の薬理活性を有する部分と比較して、有効である担体が求められてきた。

【０００８】

医薬産業で使用されいるそのような担体部分の例としては、ポリエチレングリコール（例えば、Burg et al., Erythropoietin conjugates with polyethylene glycol, 国際公開第０１／０２０１７号を参照）、免疫グロブリンのＦｃドメイン（例えば、Feige et al., Modified peptides as therapeutic agents、米国特許第６，６６０，８４３号を参照）、ヒト血清アルブミン（例えば、Rosen et al., Albumin fusion proteins、米国特許第６，９２６，８９８号および米国特許出願公開第２００５／００５４０５１号；Bridon et al., Protection of endogenous therapeutic peptides from peptidase activity through conjugation to blood components、米国特許出願公開第６，８８７，４７０号を参照）、トランスサイレチン（例えば、Walker et al., Use of transthyretin peptide/protein fusions to increase the serum half-life of pharmacologically active peptides/proteins、米国特許出願公開第２００３／０１９５１５４Ａ１号；２００３／０１９１０５６Ａ１を参照）、もしくはサイロキシン結合性グロブリン、または、例えばSullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２００７／０２２８３１号（国際公開第２００８／０８８４２２号として公開）に記載されているような免疫グロブリン（軽鎖＋重鎖）およびＦｃドメイン等の組み合わせ（ヘテロ三量体の組み合わせ、いわゆる「ヘ

ミボディ（hemibody）」）が挙げられる。薬理活性を有する部分は、長い半減期を有する血清タンパク質に対して親和性を有するペプチドまたは小分子にも結合されている（例えば、Blaney et al., Method and compositions for increasing the serum half-life of pharmacologically active agents by binding to transthyretin-selective ligands、米国特許第５，７１４，１４２号；Sato et al., Serum albumin binding moieties、米国特許出願公開第２００３／００６９３９５Ａ１号；Jones et al., Pharmaceutical active conjugates、米国特許第６，３４２，２２５号を参照）。

【０００９】

Ｆｉｓｃｈｅｒらによって、免疫グロブリンが２本の重鎖または２本の重鎖および２本の軽鎖から成り、その免疫グロブリンが機能的な免疫グロブリンではない、ペプチド－免疫グロブリン複合体についての記載がなされた（Fischer et al., A peptide-immunoglobulin conjugate、国際公開第２００７／０４５４６３Ａ１号）。

【００１０】

本発明は、非常に優れた、組換え発現の均一性および効率、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおける安定性および非凝集性、光分解および酸化への耐性、ヒト抗原との非交差反応性、並びに良好な薬物動態特性をもたらす免疫グロブリンを提供する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１１】

【特許文献１】国際公開第２００１／００２０１７号
【特許文献２】米国特許第６，６６０，８４３号明細書
【特許文献３】米国特許第６，９２６，８９８号明細書
【特許文献４】米国特許出願公開第２００５／００５４０５１号明細書
【特許文献５】米国特許第６，８８７，４７０号明細書
【特許文献６】米国特許出願公開第２００３／０１９５１５４号明細書
【特許文献７】米国特許出願公開第２００３／０１９１０５６号明細書
【特許文献８】国際公開第２００８／０８８４２２号
【特許文献９】米国特許第５，７１４，１４２号明細書
【特許文献１０】米国特許出願公開第２００３／００６９３９５号明細書
【特許文献１１】米国特許第６，３４２，２２５号明細書
【特許文献１２】国際公開第２００７／０４５４６３号

【発明の概要】

【００１２】

本発明は、担体部分として有用な免疫グロブリンに関する。抗体および抗体フラグメントを含むこれらの免疫グロブリンは、信頼性のある発現および精製の特性を示すことで、安定で比較的均一な産物をもたらし、ラットおよびカニクイザルにおいては顕著な薬物動態（ＰＫ）特性を示す。本発明の免疫グロブリンは、ヒトのタンパク質、細胞または組織に結合することは検出されていない。これらの免疫グロブリンは多くの目的に、例えば、限定はされないが、抗体医薬のための品質管理または分析用標準、および生物学的に関連したアイソタイプ一致抗体の対照として、使用することができる。

【００１３】

本発明のある実施形態は、免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を有する単離された免疫グロブリンを含み、その中で、

該重鎖可変領域は配列番号３２３［ＶＨ１０］のアミノ酸配列を含み、該軽鎖可変領域は配列番号１８８［ＶＬ４］もしくは配列番号１９０［ＶＬ５］のアミノ酸配列を含むか；または

該重鎖可変領域は配列番号３２１［ＶＨ９］のアミノ酸配列を含み、該軽鎖可変領域は配列番号１８８［ＶＬ４］もしくは配列番号１９０［ＶＬ５］のアミノ酸配列を含むか；または

該重鎖可変領域は配列番号３２５［ＶＨ１１］のアミノ酸配列を含み、該軽鎖可変領域は配列番号１８２［ＶＬ１］、配列番号１８８［ＶＬ４］、もしくは配列番号１９０［ＶＬ５］のアミノ酸配列を含む。
例としては、表２Ｃに開示される１６４３５番、１６４３６番、１６４３８番、１６４３９番、１６４４０番、１６４４１番、および１６４４４番の抗体が挙げられる。例えば、本明細書に記載されるように、表面プラズモン共鳴結合アッセイによって測定された場合、通常、３０マイクロモル濃度の本発明の免疫グロブリンは、生理条件下でインキュベートされた水溶液中で３０ナノモル濃度の可溶性ヒトＩＬ－１７Ｒ（配列番号８９）と有意には結合しない。

【００１４】

本発明の他の実施形態は、免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を有する単離された免疫グロブリンを含み、その中で、
該軽鎖可変領域は配列番号１９６［ＶＬ８］のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域は配列番号３３５［ＶＨ１６］、配列番号３４９［ＶＨ２３］、配列番号３５１［ＶＨ２４］、配列番号３５３［ＶＨ２５］、配列番号３５５［ＶＨ２６］、もしくは配列番号３５９［ＶＨ２８］のアミノ酸配列を含むか；または
該軽鎖可変領域は配列番号２０４［ＶＬ１２］のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域は配列番号３４９［ＶＨ２３］もしくは配列番号３５５［ＶＨ２６］のアミノ酸配列を含むか；または
該軽鎖可変領域は配列番号２０２［ＶＬ１１］のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域は配列番号３４９［ＶＨ２３］のアミノ酸配列を含むか；または
該軽鎖可変領域は配列番号１９２［ＶＬ６］のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域は配列番号３５７［ＶＨ２７］、配列番号３５９［ＶＨ２８］、もしくは配列番号３６９［ＶＨ３３］のアミノ酸配列を含むか；または
該軽鎖可変領域は配列番号１９４［ＶＬ７］のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域は配列番号３３５［ＶＨ１６］、配列番号３４９［ＶＨ２３］、もしくは配列番号３５１［ＶＨ２４］のアミノ酸配列を含む。
例としては、表２Ｃに開示される１９６１番、１９６２番、１９６３番、１９６４番、１９６５番、１９６６番、２３２３番、２３２４番　２３３０番、４２４１番、４３４１番、１０１８２番、１０１８３番、１０１８４番、および１０１８８の抗体が挙げられる。例えば、本明細書に記載されるように、表面プラズモン共鳴結合アッセイによって測定された場合、通常、１０マイクロモル濃度の本発明の免疫グロブリンは、生理条件下でインキュベートされた水溶液中で、１０ナノモル濃度の可溶性ヒトＴＲ２（配列番号８２）と有意には結合しない。

【００１５】

いくつかの実施形態では、本発明の免疫グロブリンは、薬理活性を有する化学的部分、例えば、小分子、ペプチド、および／またはタンパク質の担体として使用され、それらのＰＫ特性を強化する。薬理活性を有する部分は、化学結合反応によって本発明の免疫グロブリンに結合、すなわち共有結合することができ、または組換え遺伝子発現によって、薬理活性を有する部分は免疫グロブリンに融合することができる。

【００１６】

また、本発明は、そのような本発明の免疫グロブリンを生成するための材料および方法を提供し、例えば、それらをコードする単離された核酸、ベクターおよび単離された宿主細胞を含む。また、免疫グロブリンの重鎖および／もしくは軽鎖の配列並びに／またはＶＨおよび／もしくはＶＬの配列のうちのいずれかをコードする単離された核酸が提供される。関連する実施形態では、前記核酸のいずれかを含む発現ベクターが提供される。さらに別の実施形態では、前記核酸または発現ベクターのうちいずれかを含む宿主細胞が提供される。

【００１７】

本発明の免疫グロブリンは、医薬組成物または薬剤の製造に使用することができる。本

発明の医薬組成物または薬剤は、薬理活性物質と結合した免疫グロブリン、および薬剤的に許容できる希釈剤、担体または賦形剤を含む。

【００１８】

本発明では、数多くの方法が企図される。例えば、コードされた免疫グロブリンが発現されるように、本発明の発現ベクターを含む前記宿主細胞を培養することを含む方法が提供される。そのような方法には、宿主細胞培養から前記免疫グロブリンを回収する工程も含まれ得る。関連する実施形態では、前記方法によって産生された単離された免疫グロブリンが提供される。

【００１９】

前述の概要は本発明のあらゆる態様を定義することを意図しているわけではなく、追加の態様が、発明を実施するための形態等の他の部分に記載される。本文書全体は統合された開示として関連するよう意図されており、たとえ特徴の組み合わせが本文書の同じ文章、または段落、または節中に一緒に記載されていなくても、本明細書に記載の全ての特徴の組み合わせが企図されることは理解されるべきである。

【００２０】

上記に加え、本発明は、追加の態様として、上記の特定の段落によって定義される変更形態より多少なりとも範囲が狭い、本発明の実施形態全てを含む。例えば、ある属として記載される本発明のある態様、およびある属の全構成要素は、個々に、本発明の一態様であることは理解されるべきである。また、ある属として記載される、またはある属の一構成要素を選択している態様が、前記属の２つ以上の構成要素の組み合わせを包含することは理解されるべきである。出願人は本明細書に記載される本発明の全範囲を発明したが、出願人は他者の先行技術に記載される発明の主題を請求することは意図していない。従って、特許庁または他の実体または個人によって、特許請求の範囲内の法的先行技術が出願人に知らされた場合、出願人は適用可能な特許法の下で補正の権利を行使して、かかる特許請求の範囲の発明の主題を再定義し、それにより、かかる特許請求の範囲から、かかる法的先行技術または法的先行技術の明らかな変更形態を具体的に除外する権利を有する。そのような補正された特許請求の範囲によって定義される本発明の変更形態も、本発明の態様と見なされる。

【図面の簡単な説明】

【００２１】

図１Ａ～Ｎは、本明細書に記載のＬ５またはＬ１０のような任意のペプチジルリンカー部を介して免疫グロブリンの１つ以上のドメインと融合した薬理学的に活性な毒素ペプチド類似体（短い不規則な曲線）の単位を１つ以上含む、本発明の組成物のいくつかの実施形態の概略構造を示す図である。これらの概略図はより典型的なＩｇＧ１を示すが、これらは、ヒンジ内の４つのジスルフィド結合および重鎖と軽鎖を連結するジスルフィド結合の異なった配置を有するＩｇＧ２、ならびにＩｇＧ３、ならびにＩｇＧ４にも適用されることを意図している。

【図１Ａ】毒素ペプチド類似体が一方の免疫グロブリンＦｃドメイン単量体のＣ末端と融合した、一価ヘテロ二量体のＦｃ－毒素ペプチド類似体融合物を表す。

【図１Ｂ】毒素ペプチド類似体が両方の免疫グロブリンＦｃドメイン単量体のＣ末端と融合した、二価ホモ二量体のＦｃ－毒素ペプチド類似体融合物を表す。

【図１Ｃ】毒素ペプチド類似体が一方の免疫グロブリンＦｃドメイン単量体のＮ末端と融合した、一価ヘテロ二量体の毒素ペプチド類似体－Ｆｃ融合物を表す。

【図１Ｄ】毒素ペプチド類似体が両方の免疫グロブリンＦｃドメイン単量体のＮ末端と融合した、二価ホモ二量体の毒素ペプチド類似体－Ｆｃ融合物を表す。

【図１Ｅ】免疫グロブリン重鎖（ＨＣ）と、免疫グロブリン軽鎖（ＬＣ）と、毒素ペプチド類似体がそのＣ末端と融合した免疫グロブリンＦｃ単量体とを含む、一価ヘテロ三量体のＦｃ－毒素ペプチド類似体／Ａｂを表す。

【図１Ｆ】毒素ペプチド類似体が一方のＨＣ単量体のＣ末端と融合した、一価ヘテロ四量体（ＨＴ）の抗体ＨＣ－毒素ペプチド類似体融合物を表す。

【図１Ｇ】両方のＨＣ単量体のＣ末端上に毒素ペプチド類似体を有する、二価ＨＴの抗体Ａｂ　ＨＣ－毒素ペプチド類似体融合物を表す。
【図１Ｈ】毒素ペプチド類似体が一方のＬＣ単量体のＮ末端と融合した、一価ＨＴの毒素ペプチド類似体－ＬＣ　Ａｂを表す。
【図１Ｉ】毒素ペプチド類似体が一方のＨＣ単量体のＮ末端と融合した、一価ＨＴの毒素ペプチド類似体－ＨＣ　Ａｂを表す。
【図１Ｊ】毒素ペプチド類似体が一方のＬＣ単量体のＣ末端と融合した、一価ＨＴのＡｂ　ＬＣ－毒素ペプチド類似体融合物（すなわち、ＬＣ－毒素ペプチド類似体融合物＋ＬＣ＋２（ＨＣ））を表す。
【図１Ｋ】毒素ペプチド類似体が両方のＬＣ単量体のＣ末端と融合した、二価ＨＴのＡｂ　ＬＣ－毒素ペプチド類似体融合物（すなわち、２（ＬＣ－毒素ペプチド類似体融合物）＋２（ＨＣ））を表す。
【図１Ｌ】毒素ペプチド類似体が両方のＬＣ単量体および一方のＨＣ単量体のＣ末端と融合した、三価ＨＴのＡｂ　ＬＣ－毒素ペプチド類似体／ＨＣ－毒素ペプチド類似体（すなわち、２（ＬＣ－毒素ペプチド類似体融合物）＋ＨＣ－毒素ペプチド類似体融合物＋ＨＣ）を表す。
【図１Ｍ】毒素ペプチド類似体部分が各ＨＣ単量体の免疫グロブリンＦｃドメインの内部ループ内に挿入された二価抗体を表す。
【図１Ｎ】毒素ペプチド類似体部分が一方のＨＣ単量体の免疫グロブリンＦｃドメインの内部ループ内に挿入された一価抗体を表す。二量体または三量体は、単一の鎖をコードするデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）構築物の発現時に、ある特定の宿主細胞内において自然に形成される。他の宿主細胞では、細胞を二量体／三量体の形成に好適な条件下に置くか、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏで二量体／三量体を形成し得る。２つ以上のＨＣ単量体、ＬＣ単量体、または免疫グロブリンＦｃドメイン単量体が単一の実施形態の一部である場合、各単量体は必要に応じて、同一であっても互いに異なっていてもよい。
【図２Ａ】本発明の抗体の実施形態がＩＬ１７Ｒと結合しないことを示す。
【図２Ｂ】同上。　抗体１６４２９をＣＭ５センサーチップに固定化し、抗体の存在しない１０ｎＭのＩＬ－１７Ｒを用いて、溶液中に抗体結合のないＩＬ－１７の１００％結合シグナルを確立した。図２Ａでは、表示されている１０ｎＭ、１００ｎＭ、および１０００ｎＭの抗体試料を１０ｎＭのＩＬ－１７Ｒと共にインキュベートして、溶液中の抗体結合を測定した。図２Ｂでは、３０，０００ｎＭの抗体試料を３０ｎＭのＩＬ－１７Ｒと共にインキュベートして、溶液中の抗体結合を測定した。図２Ａ～Ｂにおいて、抗体のインキュベーション後にＩＬ－１７Ｒの結合シグナルが減少しているのは、溶液中で抗体がＩＬ－１７Ｒに結合したことを示す。
【図３】５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１７と、表示されている０．１μＭ、１μＭ、および１０μＭの抗体試料と共にインキュベートしたヒト包皮線維芽細胞から産生されたＧＲＯ－αの相対量を示す。ＧＲＯ－αサンドイッチＥＬＩＳＡを使用して馴化細胞培地のＧＲＯ－αレベルを評価した。
【図４Ａ】抗体（パネルの上から下の順に）：１６４３５、１６４３６、１６４３９、１６４４０、１６４４１、および１６４４４に対して、１００ｍＭリン酸ナトリウム、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．８、流速０．５ｍＬ／分の移動相を用いて、連続した２つのサイズ排除カラム（ＴＳＫ－ＧＥＬ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ、粒子径５ｍｍ、７．８×３００ｍｍ、東ソーバイオサイエンス、０８５４１）から得た代表的溶出を示す。
【図４Ｂ】上の図４Ａの抗体（パネルの上から下の順に）：１６４３５、１６４３６、１６４３９、１６４４０、１６４４１、および１６４４４に対するサイズ排除分析の拡大分析結果を示す。
【図５】２μｇの抗体１６４３５、１６４３６、１６４３７、１６４３８、１６４３９、１６４４０、１６４２９、１６４３０、１６４３３、１６４３４、１６４４１、および１６４４４に対して、非還元ローディングバッファーおよびＱｕｉｃｋＢｌｕｅ（ボストンバイオロジカルズ）による染色を用いて、２２０Ｖで展開した１．０ｍｍトリス－グリシ

ン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）上で行った非還元分析を示す。分子量マーカーは、Ｎｏｖｅｘ　ＳｅｅＢｌｕｅ（登録商標）の染色済み標準である。
【図６】２μｇの抗体１６４３５、１６４３６、１６４３７、１６４３８、１６４３９、１６４４０、１６４２９、１６４３０、１６４３３、１６４３４、１６４４１、および１６４４４に対して、非還元ローディングバッファーおよびＱｕｉｃｋＢｌｕｅ（ボストンバイオロジカルズ）による染色を用いて、２２０Ｖで展開した１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）上で行った還元分析を示す。分子量マーカーは、Ｎｏｖｅｘ　ＳｅｅＢｌｕｅ（登録商標）の染色済み標準である。
【図７Ａ】抗体１６４３５と１６４４４のそれぞれの力価を示す。
【図７Ｂ】同上。　ＣＨＯ　ＤＨＦＲ（－）宿主細胞を、対応するＨＣおよびＬＣ発現プラスミドでトランスフェクトすることにより、発現プールを作成した。ＣＤ６－Ｄアッセイ培地中の６日間の前倒し（front-loaded）プロセスを用いて小規模（５ｍＬ；図７Ａ）な発現試験を行い、他方、ペプトン培地を用いた１１日間の流加培養プロセスを使用して大規模（３Ｌ；図７Ｂ）な試験を完了させた。力価レベルの測定は、プロテインＡ　ＨＰＬＣベースのアッセイを用いて行った。
【図８Ａ】２０カラム体積の、５０％勾配までの７℃のＳ-緩衝液Ｂ（２０ｍＭ酢酸、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ５．０）を用いてＳＰ－ＨＰセファロースカラム（ＧＥライフサイエンス）から溶出した抗体１６４３５に対する、３００ｎｍでの吸光度を測定したクロマトグラムを示す。
【図８Ｂ】２０カラム体積の、５０％勾配までの７℃のＳ-緩衝液Ｂ（２０ｍＭ酢酸、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ５．０）を用いてＳＰ－ＨＰセファロースカラム（ＧＥライフサイエンス）から溶出した抗体１６４４４に対する、３００ｎｍでの吸光度を測定したクロマトグラムを示す。
【図９Ａ】ＱｕｉｃｋＢｌｕｅ（ボストンバイオロジカルズ）による染色を用いて、２２０Ｖで展開した１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）上で行った抗体１６４３５の分析を示す。
【図９Ｂ】ＱｕｉｃｋＢｌｕｅ（ボストンバイオロジカルズ）による染色を用いて、２２０Ｖで展開した１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）上で行った抗体１６４４４の分析を示す。　「非還元」と表示されているレーンは非還元試料バッファーを含み、「還元」と表示されているレーンは還元試料バッファーを含む。
【図１０】抗体１６４３５および１６４４４に対して、１００ｍＭリン酸ナトリウム、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．８、流速０．５ｍＬ／分の移動相を用いて、連続した２つのサイズ排除カラム（ＴＳＫ－ＧＥＬ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ、粒子径５ｍｍ、７．８×３００ｍｍ、東ソーバイオサイエンス、０８５４１）を使用して行ったサイズ排除分析の拡大図を示す。
【図１１】抗体：ＩｇＧ２モノクローナル抗体コンパレーター、１６４４４、および１６４３５に対して、ＭｉｃｒｏＣａｌ　ＶＰ－ＤＳＣを用いて１分に１℃の割合で試料を２０℃から９５℃に加熱するＤＳＣにより行った分析を示す。タンパク質濃度は、１０ｍＭ酢酸ナトリウム、９％スクロース、ｐＨ５．０中０．５ｍｇ／ｍｌであった。
【図１２Ａ】抗体１６４３５に対して、還元ＣＥ－ＳＤＳを用いて２２０ｎｍでの吸光度を検出した分析を示す。
【図１２Ｂ】抗体１６４３５に対して、非還元ＣＥ－ＳＤＳを用いて２２０ｎｍでの吸光度を検出した分析を示す。
【図１２Ｃ】抗体１６４４４に対して、還元ＣＥ－ＳＤＳを用いて２２０ｎｍでの吸光度を検出した分析を示す。
【図１２Ｄ】抗体１６４４４に対して、非還元ＣＥ－ＳＤＳを用いて２２０ｎｍでの吸光度を検出した分析を示す。　露出した石英ガラスキャピラリー５０μｍ×３０．２ｃｍを使用して、分離分析を行った。
【図１３】抗体１６４３５および１６４４４に対して、室温で３日間、アルミホイルで覆う（「暗」）か蛍光灯に当てた（「明」）後、１００ｍＭリン酸ナトリウム、２５０ｍＭ

ＮａＣｌ、ｐＨ６．８、流速０．５ｍＬ／分の移動相を用いて、連続した２つのサイズ排除カラム（ＴＳＫ－ＧＥＬ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ、粒子径５ｍｍ、７．８×３００ｍｍ、東ソーバイオサイエンス、０８５４１）を使用して行ったサイズ排除分析を示す。

【図１４Ａ】抗体１６４３５に対して、室温で３日間、アルミホイルで覆った後（「暗」）、１Ｍ硫酸アンモニウム、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．０の移動相Ａと、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、５％アセトニトリル、ｐＨ５．０の移動相Ｂを用いて、連続した２つのＤｉｏｎｅｘ　ＰｒｏＰａｃ　ＨＩＣ－１０カラムを使用して行ったＨＩＣ分析を示す。

【図１４Ｂ】抗体１６４４４に対して、室温で３日間、アルミホイルで覆った後（「暗」）、１Ｍ硫酸アンモニウム、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．０の移動相Ａと、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、５％アセトニトリル、ｐＨ５．０の移動相Ｂを用いて、連続した２つのＤｉｏｎｅｘ　ＰｒｏＰａｃ　ＨＩＣ－１０カラムを使用して行ったＨＩＣ分析を示す。

【図１４Ｃ】抗体１６４３５に対して、室温で３日間、蛍光灯に当てた後（「明」）、１Ｍ硫酸アンモニウム、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．０の移動相Ａと、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、５％アセトニトリル、ｐＨ５．０の移動相Ｂを用いて、連続した２つのＤｉｏｎｅｘ　ＰｒｏＰａｃ　ＨＩＣ－１０カラムを使用して行ったＨＩＣ分析を示す。

【図１４Ｄ】抗体１６４４４に対して、室温で３日間、蛍光灯に当てた後（「明」）、１Ｍ硫酸アンモニウム、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．０の移動相Ａと、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、５％アセトニトリル、ｐＨ５．０の移動相Ｂを用いて、連続した２つのＤｉｏｎｅｘ　ＰｒｏＰａｃ　ＨＩＣ－１０カラムを使用して行ったＨＩＣ分析を示す。　５０分間で０～１００％の直線勾配を用いて０．８ｍｌ／分の割合で試料を溶出し、２２０ｎｍでの吸光度を測定した。

【図１５】抗体がＴＲＡＩＬ（ｈｕＴＲ２）に結合することを示す。抗体１６４４９をＣＭ５センサーチップに固定化し、抗体の存在しない１ｎＭのＴＲＡＩＬを用いて、溶液中に抗体結合のないＴＲＡＩＬの１００％結合シグナルを確立した。溶液中の抗体結合を測定するため、７ｐＭ～１０ｎＭの抗体試料を１ｎＭのＴＲＡＩＬと共にインキュベートした。抗体のインキュベーション後にＴＲＡＩＬの結合シグナルが減少しているのは、溶液中で抗体がＴＲＡＩＬに結合したことを示す。

【図１６】本発明の抗体の実施形態がＴＲＡＩＬ（ｈｕＴＲ２）と結合しないことを示す。抗体１６４４９をＣＭ５センサーチップに固定化し、抗体の存在しない１０ｎＭのＴＲＡＩＬを用いて、溶液中に抗体結合のないＴＲＡＩＬの１００％結合シグナルを確立した。溶液中の抗体結合を測定するため、５０ｎＭと１０００ｎＭの抗体試料を１０ｎＭのＴＲＡＩＬと共にインキュベートした。抗体のインキュベーション後にＴＲＡＩＬの結合シグナルが減少しているのは、溶液中で抗体がＴＲＡＩＬに結合したことを示す。

【図１７】本発明の抗体の実施形態がＴＲＡＩＬ（ｈｕＴＲ２）と結合しないことを示す。抗体１６４４９をＣＭ５センサーチップに固定化し、抗体の存在しない１０ｎＭのＴＲＡＩＬを用いて、溶液中に抗体結合のないＴＲＡＩＬの１００％結合シグナルを確立した。溶液中の抗体結合を測定するため、１０００ｎＭの抗体試料を１０ｎＭのＴＲＡＩＬと共にインキュベートした。抗体のインキュベーション後にＴＲＡＩＬの結合シグナルが減少しているのは、溶液中で抗体がＴＲＡＩＬに結合したことを示す。

【図１８】ｙ軸に列記された本発明の抗体の実施形態がＴＲＡＩＬ（ｈｕＴＲ２）と結合しないことを示す。抗体１６４４９をＣＭ５センサーチップに固定化し、抗体の存在しない１０ｎＭのＴＲＡＩＬを用いて、溶液中に抗体結合のないＴＲＡＩＬの１００％結合シグナルを確立した。溶液中の抗体結合を測定するため、１０００ｎＭと１００００ｎＭの抗体試料を１０ｎＭのＴＲＡＩＬと共にインキュベートした。抗体のインキュベーション後にＴＲＡＩＬの結合シグナルが減少しているのは、溶液中で抗体がＴＲＡＩＬに結合したことを示す。

【図１９】ｘ軸に列記された本発明の抗体の実施形態がＴＲＡＩＬ（ｈｕＴＲ２）と結合しないことを示す。抗体１６４４９をＣＭ５センサーチップに固定化し、抗体の存在しな

い１０ｎＭのＴＲＡＩＬを用いて、溶液中に抗体結合のないＴＲＡＩＬの１００％結合シグナルを確立した。溶液中の抗体結合を測定するため、５００００ｎＭの抗体試料を１０ｎＭのＴＲＡＩＬと共にインキュベートした。抗体のインキュベーション後にＴＲＡＩＬの結合シグナルが減少しているのは、溶液中で抗体がＴＲＡＩＬに結合したことを示す。

【図２０Ａ】ｘ軸に列記された本発明の抗体の実施形態がＴＲＡＩＬ（ｈｕＴＲ２）と結合しないことを示す。

【図２０Ｂ】同上。　抗体１６４４９をＣＭ５センサーチップに固定化し、抗体の存在しない１０ｎＭのＴＲＡＩＬを用いて、溶液中に抗体結合のないＴＲＡＩＬの１００％結合シグナルを確立した。溶液中の抗体結合を測定するため、１０００ｎＭ、１００００ｎＭ、５００００ｎＭの抗体試料を１０ｎＭのＴＲＡＩＬと共にインキュベートした。抗体のインキュベーション後にＴＲＡＩＬの結合シグナルが減少しているのは、溶液中で抗体がＴＲＡＩＬに結合したことを示す。

【図２０Ｃ】ｉｎ　ｖｉｔｒｏの細胞ベースのＴＲＡＩＬ活性アッセイの結果を示す。抗体４２４１、４３４１の試料を陽性対照ＩｇＧ１抗ＴＲ２　ｍＡｂ　１６４４９と比較した。調製した抗体試料を、ＴＲＡＩＬ感受性のヒト腹水結腸直腸腺癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５に加えた。相対発光量の増加を測定することによるＴＲＡＩＬ介在性のカスパーゼ３活性化の検出を、アポトーシスの陽性マーカーとして用いた。陽性対照抗体１６４４９と異なり、抗体４２４１、４３４１はカスパーゼ３を活性化しなかった。

【図２１Ａ】２μｇの抗体１８７０［別名１６４５１］、１６４４９、１６４５０、１０１８５、１０１８４、４３４１、１０１８３、および１０１８２に対して、非還元ローディングバッファーおよびＱｕｉｃｋＢｌｕｅ（ボストンバイオロジカルズ）による染色を用いて、２２０Ｖで展開した１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）上で行った非還元分析を示す。分子量マーカーは、Ｎｏｖｅｘ　ＳｅｅＢｌｕｅの染色済み標準である。分子量マーカーは、Ｎｏｖｅｘ　ＳｅｅＢｌｕｅ（登録商標）の染色済み標準である。

【図２１Ｂ】２μｇの抗体１８７０［別名１６４５１］、１６４４９、１６４５０、１０１８５、１０１８４、４３４１、１０１８３、および１０１８２に対して、非還元ローディングバッファーおよびＱｕｉｃｋＢｌｕｅ（ボストンバイオロジカルズ）による染色を用いて、２２０Ｖで展開した１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）上で行った還元分析を示す。分子量マーカーは、Ｎｏｖｅｘ　ＳｅｅＢｌｕｅ（登録商標）の染色済み標準である。

【図２２Ａ】５０μｇの抗体４２４１を５０ｍＭ　NaH_2PO_4、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．９、１ｍＬ／分のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ－３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）に注入し、２８０ｎｍでの吸光度を測定することにより行ったサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図２２Ｂ】５０μｇの抗体４３４１を５０ｍＭ　NaH_2PO_4、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．９、１ｍＬ／分のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ－３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）に注入し、２８０ｎｍでの吸光度を測定することにより行ったサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図２２Ｃ】５０μｇの抗体１０１８２を５０ｍＭ　NaH_2PO_4、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．９、１ｍＬ／分のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ－３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）に注入し、２８０ｎｍでの吸光度を測定することにより行ったサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図２２Ｄ】５０μｇの抗体１０１８３を５０ｍＭ　NaH_2PO_4、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．９、１ｍＬ／分のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ－３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）に注入し、２８０ｎｍでの吸光度を測定することにより行ったサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図２２Ｅ】５０μｇの抗体１０１８４を５０ｍＭ　NaH_2PO_4、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．９、１ｍＬ／分のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ－３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）に注入し、２８０ｎｍでの吸光度を測定することにより

行ったサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図２２Ｆ】５０μｇの抗体１０１８５を５０ｍＭ　NaH_2PO_4、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．９、１ｍＬ／分のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ－３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）に注入し、２８０ｎｍでの吸光度を測定することにより行ったサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図２３Ａ】抗体４２４１と４３４１のそれぞれの力価を示す。
【図２３Ｂ】同上。　ＣＨＯ　ＤＨＦＲ（－）宿主細胞を、対応するＨＣおよびＬＣ発現プラスミドでトランスフェクトすることにより、発現プールを作成した。ＣＤ　６－Ｄアッセイ培地中の６日間の前倒し（front-loaded）プロセスを用いて小規模（５ｍＬ；図２３Ａ）な発現試験を行い、他方、ペプトン培地を用いた１１日間の流加培養プロセスを使用して大規模（３Ｌ；図２３Ｂ）な試験を完了させた。力価レベルの測定は、プロテインＡ　ＨＰＬＣベースのアッセイを用いて行った。
【図２４Ａ】抗体４２４１の処理中試料に対して、非還元ローディングバッファーおよびＱｕｉｃｋＢｌｕｅ（ボストンバイオロジカルズ）による染色を用いて、２２０Ｖで展開した１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）上で行った還元分析を示す。
【図２４Ｂ】抗体４３４１の処理中試料に対して、非還元ローディングバッファーおよびＱｕｉｃｋＢｌｕｅ（ボストンバイオロジカルズ）による染色を用いて、２２０Ｖで展開した１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）上で行った還元分析を示す。
【図２５】２０カラム体積の、５０％勾配までの７℃のＳ-緩衝液Ｂ（２０ｍＭ酢酸、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ５．０）を用いてＳＰ－ＨＰセファロースカラム（ＧＥライフサイエンス）から溶出した抗体４３４１、４２４１に対して、３００ｎｍでの吸光度を測定したクロマトグラムを重ねた図を示す。
【図２６Ａ】ＱｕｉｃｋＢｌｕｅ（ボストンバイオロジカルズ）による染色を用いて、２２０Ｖで展開した１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）上で行った抗体４２４１の分析を示す。
【図２６Ｂ】ＱｕｉｃｋＢｌｕｅ（ボストンバイオロジカルズ）による染色を用いて、２２０Ｖで展開した１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）上で行った抗体４３４１の分析を示す。　「非還元」と表示されているレーンは非還元試料バッファーを含み、「還元」と表示されているレーンは還元試料バッファーを含む。
【図２７Ａ】抗体：４２４１（上のパネル）および４３４１（下のパネル）に対して、１００ｍＭリン酸ナトリウム、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．８、流速０．５ｍＬ／分の移動相を用いて、連続した２つのサイズ排除カラム（ＴＳＫ－ＧＥＬ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ、粒子径５ｍｍ、７．８×３００ｍｍ、東ソーバイオサイエンス、０８５４１）を使用して行った分析の原寸図を示す。
【図２７Ｂ】抗体：４２４１（上のパネル）および４３４１（下のパネル）に対して、１００ｍＭリン酸ナトリウム、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．８、流速０．５ｍＬ／分の移動相を用いて、連続した２つのサイズ排除カラム（ＴＳＫ－ＧＥＬ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ、粒子径５ｍｍ、７．８×３００ｍｍ、東ソーバイオサイエンス、０８５４１）を使用して行った分析の拡大図を示す。
【図２８】抗体４３４１、４２４１に対して、ＭｉｃｒｏＣａｌ　ＶＰ－ＤＳＣを用いて１分に１℃の割合で試料を２０℃から９５℃に加熱するＤＳＣにより行った分析を示す。タンパク質濃度は、１０ｍＭ酢酸ナトリウム、９％スクロース、ｐＨ５．０中０．５ｍｇ／ｍｌであった。
【図２９Ａ】抗体４２４１に対して、還元ＣＥ－ＳＤＳを用いて２２０ｎｍの吸光度を検出した分析を示す。
【図２９Ｂ】抗体４２４１に対して、非還元ＣＥ－ＳＤＳを用いて２２０ｎｍの吸光度を検出した分析を示す。
【図２９Ｃ】抗体４３４１に対して、還元ＣＥ－ＳＤＳを用いて２２０ｎｍの吸光度を検

出した分析を示す。
【図２９Ｄ】抗体４３４１に対して、非還元ＣＥ－ＳＤＳを用いて２２０ｎｍの吸光度を検出した分析を示す。　露出した石英ガラスキャピラリー５０μｍ×３０．２ｃｍを使用して、分離分析を行った。
【図３０】抗体４２４１（上のパネル）、４３４１（下のパネル）に対して、イオン交換ＨＰＬＣ（ＳＰ－５ＰＷ、粒径１０μｍ、内径７．５ｍｍ×７．５ｃｍ、東ソーバイオサイエンス、０８５４１）を使用し、緩衝液Ａとして２０ｍＭ酢酸、ｐＨ５．０、緩衝液Ｂとして２０ｍＭ酢酸、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ５．０を用いて、緩衝液Ｂの０～４０％の直線勾配で８０分間、流速１ｍＬ／分で流すことにより行った分析を示す。
【図３１Ａ】抗体４２４１に対して、光に当てる前と後、１Ｍ硫酸アンモニウム、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．０の移動相Ａと、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、５％アセトニトリル、ｐＨ５．０の移動相Ｂを用いて、連続した２つのＤｉｏｎｅｘ　ＰｒｏＰａｃ　ＨＩＣ－１０カラムを使用して行ったＨＩＣ分析を示す。
【図３１Ｂ】抗体４３４１に対して、光に当てる前と後、１Ｍ硫酸アンモニウム、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．０の移動相Ａと、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、５％アセトニトリル、ｐＨ５．０の移動相Ｂを用いて、連続した２つのＤｉｏｎｅｘ　ＰｒｏＰａｃ　ＨＩＣ－１０カラムを使用して行ったＨＩＣ分析を示す。　５０分間で０～１００％の直線勾配を用いて０．８ｍｌ／分の割合で試料を溶出し、２２０ｎｍでの吸光度を観察した。
【図３２】成体Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（８～１２週齢）に５ｍｇ／ｋｇを皮下注射し、投与から０、０．２５、１、４、２４、４８、７２、９６、１６８、３３６、５０４、６７２、８４０、および１００８時間後に側尾静脈から血液を採取することにより特定した、抗体１６４３５、１６４４４、４２４１、および４３４１の代表的薬物動態プロファイルを示す。次いで、抗ヒトＦｃベースのＥＬＩＳＡを用いて血清中濃度を測定した。
【図３３】雄のカニクイザルに１ｍｇ／ｋｇまたは１０ｍｇ／ｋｇを単回静脈内投与することにより特定した、抗体１６４３５の代表的薬物動態プロファイルを示す。投与前と、投与から０．２５、０．５、１、４、８、１２、２４、４８、７２、９６、１２０、１４４、１６８、１９２、２１６、２４０、２６４、２８８、３１２、３６０、４０８、４５６、５０４、５５２、６００、６４８、および６７２時間後に血清試料を採取した。抗ＩｇＧサンドイッチＥＬＩＳＡを用いて、試料の１６４３５抗体レベルを評価した。
【図３４】任意のペプチジルリンカー部を介して１つの免疫グロブリンと融合した薬理学的に活性な毒素ペプチド類似体（短い不規則な曲線）を１単位含む、本発明の組成物の一実施形態の概略構造を示す。
【図３５】最終的な一価１６４３５　ＩｇＧ２－Ｌ１０－Ｓｈｋ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］産物をクーマシーブリリアントブルーで染色したトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。産物は４種類の発現プールから単離した。レーン１～１０に次のように設置した：Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２広範タンパク質スタンダード（１０μｌ）、２μｇのプール１非還元産物、２μｇのプール２非還元産物、２μｇのプール３非還元産物、２μｇのプール４非還元産物、Ｎｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ１２広範タンパク質スタンダード（１０μｌ）、２μｇのプール１還元産物、２μｇのプール２還元産物、２μｇのプール３還元産物、２μｇのプール４還元産物。
【図３６Ａ】３７４２産物の３０μｇの最終プール１、２、３、および４を、５０ｍＭ　ＮａＨ２ＰＯ４、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．９、流速１ｍｌ／分に平衡化したＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ－３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）に注入し、２８０ｎｍでの吸光度を測定したサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図３６Ｂ】同上。
【図３６Ｃ】同上。
【図３６Ｄ】同上。
【図３７Ａ】最終的な３７４２試料の還元状態の軽鎖のＬＣ－ＭＳ分析を示す。
【図３７Ｂ】同上。

【図３７Ｃ】同上。
【図３７Ｄ】同上。　Ｗａｔｅｒｓ　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣシステムを使用して、産物をＷａｔｅｒｓ　ＭａｓｓＰＲＥＰマイクロ脱塩カラムに通してクロマトグラフィーを行った。カラムは８０℃に設定し、０．１％ギ酸中、直線勾配で増加させたアセトニトリル濃度を用いてタンパク質を溶出した。カラム溶出物を、質量分析用にＷａｔｅｒｓ　ＬＣＴ　Ｐｒｅｍｉｅｒ　ＥＳＩ－ＴＯＦ質量分析器に回した。機器はポジティブＶモードで作動させた。キャピラリー電圧を３，２００Ｖ、コーン電圧を８０Ｖに設定した。８００～３０００ｍ／ｚの質量スペクトルを得て、機器製造業者により提供されたＭａｘＥｎｔ１ソフトウェアを用いてデコンボリュートした。
【図３８Ａ】最終的な３７４２試料の還元状態の重鎖のＬＣ－ＭＳ分析を示す。
【図３８Ｂ】同上。
【図３８Ｃ】同上。
【図３８Ｄ】同上。　Ｗａｔｅｒｓ　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣシステムを使用して、産物をＷａｔｅｒｓ　ＭａｓｓＰＲＥＰマイクロ脱塩カラムに通してクロマトグラフィーを行った。カラムは８０℃に設定し、０．１％ギ酸中、直線勾配で増加させたアセトニトリル濃度を用いてタンパク質を溶出した。カラム溶出物を、質量分析用にＷａｔｅｒｓ　ＬＣＴ　Ｐｒｅｍｉｅｒ　ＥＳＩ－ＴＯＦ質量分析器に回した。機器はポジティブＶモードで作動させた。キャピラリー電圧を３，２００Ｖ、コーン電圧を８０Ｖに設定した。８００～３０００ｍ／ｚの質量スペクトルを得て、機器製造業者により提供されたＭａｘＥｎｔ１ソフトウェアを用いてデコンボリュートした。
【図３９Ａ】抗体融合物１０１６２、１０１６３、１０１６４の馴化培地および偽のトランスフェクションから得た馴化培地に対して、非還元ローディングバッファーおよびＱｕｉｃｋＢｌｕｅ（ボストンバイオロジカルズ）による染色を用いて、２２０Ｖで展開した１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）上で行った非還元分析を示す。分子量マーカーはｋＤａ単位で表示している。
【図３９Ｂ】最終的な産物１０１６２、１０１６３、および１０１６４をクーマシーブリリアントブルーで染色したトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。レーン１と５にはＮｏｖｅｘ　Ｍａｒｋ　１２標準を載せた。レーン２～４（非還元）とレーン６～８（還元）には２μｇの産物を載せた。
【図４０Ａ】５０μｇの融合抗体１０１６２を５０ｍＭ　NaH_2PO_4、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．９、１ｍＬ／分のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ－３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）に注入し、２８０ｎｍでの吸光度を測定したサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図４０Ｂ】５０μｇの融合抗体１０１６３を５０ｍＭ　NaH_2PO_4、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．９、１ｍＬ／分のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ－３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）に注入し、２８０ｎｍでの吸光度を測定したサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図４０Ｃ】５０μｇの融合抗体１０１６４を５０ｍＭ　NaH_2PO_4、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．９、１ｍＬ／分のＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ－３０００カラム（７．８×３００ｍｍ）に注入し、２８０ｎｍでの吸光度を測定したサイズ排除クロマトグラフィーを示す。
【図４１Ａ】最終的な４３４１－ＳｈＫ（１－３５、Ｑ１６Ｋ）の還元状態の軽鎖のＬＣ－ＭＳ分析を示す。
【図４１Ｂ】最終的な４３４１－ＦＧＦ２１の還元状態の軽鎖のＬＣ－ＭＳ分析を示す。
【図４１Ｃ】最終的な１６４３５－ＦＧＦ２１の還元状態の軽鎖のＬＣ－ＭＳ分析を示す。　Ｗａｔｅｒｓ　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣシステムを使用して、産物をＷａｔｅｒｓ　ＭａｓｓＰＲＥＰマイクロ脱塩カラムに通してクロマトグラフィーを行った。カラムは８０℃に設定し、０．１％ギ酸中、直線勾配で増加させたアセトニトリル濃度を用いてタンパク質を溶出した。カラム溶出物を、質量分析用にＷａｔｅｒｓ　ＬＣＴ　Ｐｒｅｍｉｅｒ　ＥＳＩ－ＴＯＦ質量分析器に回した。機器はポジティブＶモードで作動させた。キ

ャピラリー電圧を３，２００Ｖ、コーン電圧を８０Ｖに設定した。８００～３０００ｍ／ｚの質量スペクトルを得て、機器製造業者により提供されたＭａｘＥｎｔ１ソフトウェアを用いてデコンボリュートした。
【図４２Ａ】最終的な４３４１－ＳｈＫ（１－３５、Ｑ１６Ｋ）の還元状態の重鎖のＬＣ－ＭＳ分析を示す。
【図４２Ｂ】最終的な４３４１－ＦＧＦ２１の還元状態の重鎖のＬＣ－ＭＳ分析を示す。
【図４２Ｃ】最終的な１６４３５－ＦＧＦ２１の還元状態の重鎖のＬＣ－ＭＳ分析を示す。　Ｗａｔｅｒｓ　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣシステムを使用して、産物をＷａｔｅｒｓ　ＭａｓｓＰＲＥＰマイクロ脱塩カラムに通してクロマトグラフィーを行った。カラムは８０℃に設定し、０．１％ギ酸中、直線勾配で増加させたアセトニトリル濃度を用いてタンパク質を溶出した。カラム溶出物を、質量分析用にＷａｔｅｒｓ　ＬＣＴ　Ｐｒｅｍｉｅｒ　ＥＳＩ－ＴＯＦ質量分析器に回した。機器はポジティブＶモードで作動させた。キャピラリー電圧を３，２００Ｖ、コーン電圧を８０Ｖに設定した。８００～３０００ｍ／ｚの質量スペクトルを得て、機器製造業者により提供されたＭａｘＥｎｔ１ソフトウェアを用いてデコンボリュートした。
【図４３】ＳＤラットにおける抗体１６４３５および４３４１（両方とも投与量は５ｍｇ／ｋｇ）の代表的ＰＫプロファイルを示す。
【図４４】カニクイザルにおける抗体１６４３５、４３４１の逐次投与（５ｍｇ／ｋｇ）の代表的ＰＫプロファイルを示す。
【発明を実施するための形態】
【００２２】
本明細書で使用される節の表題は、構成上の目的のためのみであり、記載された発明の主題を限定するものであるとは見なされるべきではない。
【００２３】
定義
【００２４】
本明細書に別段の定めがない限り、本出願に関連して使用される科学用語および技術用語は、当業者によって共通に理解される意味を持つものとする。さらに、文脈上別段の必要がなければ、単数形の用語は複数を含むものとし、複数形の用語は単数を含むものとする。従って、本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、別段の明確な指示がない限り、単数形の「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は複数の指示対象を含む。例えば、「タンパク質（ａ　ｐｒｏｔｅｉｎ）」への言及には、複数のタンパク質も含まれ；「細胞（ａ　ｃｅｌｌ）」への言及には複数の細胞集団も含まれる。
【００２５】
「ポリペプチド」および「タンパク質」は、本明細書では同義的に用いられ、ペプチド結合を介して共有結合的に連結した２つ以上のアミノ酸から成る分子鎖を含む。前記用語は生成物の具体的な長さについては言及していない。従って、「ペプチド」、および「オリゴペプチド」は、ポリペプチドの定義内に含まれる。これらの用語は、ポリペプチドの翻訳後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化等を含む。さらに、タンパク質断片、類似体、変異（ｍｕｔａｔｅｄ　ｏｒ　ｖａｒｉａｎｔ）タンパク質、融合タンパク質等が、ポリペプチドの意味の中に含まれる。これらの用語は、既知のタンパク質操作技法を用い、組換え発現できるように、一つまたは複数のアミノ酸類似体または非標準もしくは非天然のアミノ酸が含まれる分子も含む。さらに融合タンパク質は、本明細書に記載されるように、公知の有機化学的技法によって誘導体化可能である。
【００２６】
言及される「単離されたタンパク質」という用語は、対象タンパク質が、（１）天然において通常は共に存在するであろう少なくともいくつかの他のタンパク質を含んでいないこと、（２）同一の供給源由来、例えば、同一種由来の他のタンパク質を本質的に含まないこと、（３）異なる種もしくは種類の細胞によって、組換え発現されること、（４）天然では結合しているポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、もしくは他の物質のうちの少な

くとも約５０％から分離されていること、（５）天然では結合しないポリペプチドと、（共有結合または非共有結合的な相互作用によって）機能的に結合していること、および／または（６）天然には存在しないこと、を意味する。通常、「単離されたタンパク質」は、所与の試料の少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２５％、または少なくとも約５０％を構成する。ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡもしくは合成起源の他のＲＮＡ、またはそれらのいかなる組み合せも、そのような単離されたタンパク質をコードすることができる。単離されたタンパク質は、その治療用途、診断用途、予防用途、研究用途または他の使用を妨げるであろう、その天然環境に存在するタンパク質もしくはポリペプチドまたは他の混入物を、実質的に含まないことが好ましい。

【００２７】

ポリペプチド（例えば、免疫グロブリン、または抗体）の「変異体」は、別のポリペプチド配列と比較して、アミノ酸配列において一つまたは複数のアミノ酸残基が挿入、欠失および／または置換されたアミノ酸配列を含む。変異体には融合タンパク質が含まれる。

【００２８】

「融合タンパク質」という用語は、タンパク質が、２つ以上の親タンパク質または親ポリペプチドに由来するポリペプチド成分を含んでいることを表す。通常、融合タンパク質は、あるタンパク質由来のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列が、異なるタンパク質由来のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列と、インフレームで付加され、所望によりリンカーによって隔てらた、融合遺伝子から発現される。次いで、融合遺伝子は組換え宿主細胞によって、単一のタンパク質として発現され得る。

【００２９】

「分泌」タンパク質とは、分泌シグナルペプチド配列によって、ＥＲ、分泌小胞、または細胞外間隙へと方向付け可能なタンパク質、並びに、必ずしもシグナル配列の含有を必要とせずに、細胞外間隙に放出されるタンパク質を表す。分泌タンパク質が細胞外間隙に放出されると、該分泌タンパク質は、細胞外プロセシングを受けることで、「成熟」タンパク質を生成することができる。細胞外間隙への放出は、エキソサイトーシスおよびタンパク質切断を含む多くの機序によって引き起こされ得る。本発明の組成物の他のいくつかの実施形態では、トキシンペプチド類似体が分泌タンパク質として宿主細胞によって合成される場合があり、それをその後、細胞外間隙および／または培地からさらに精製することができる。

【００３０】

本明細書で使用される場合、宿主細胞中で組換えＤＮＡ技術により産生されたタンパク質に関連する場合の「可溶性」とは、水溶液中に存在するタンパク質であり；タンパク質が双アルギニン（twin-arginine）シグナルアミノ酸配列を含む場合、可溶性タンパク質はグラム陰性細菌宿主の細胞膜周辺腔へと輸送されるか、または、分泌ができる真核生物宿主細胞によって、もしくは適切な遺伝子（例えば、kil遺伝子）を保有する細菌の宿主によって、培地中に分泌される。従って、可溶性タンパク質は、宿主細胞内の封入体には存在しないタンパク質である。あるいは、文脈によっては、可溶性タンパク質は、細胞膜への組み込みが見られないタンパク質であり；対照的に、不溶性タンパク質は、宿主細胞の細胞質顆粒（封入体と称される）内に修飾型で存在するタンパク質であるか、あるいはまた、文脈によっては、不溶性タンパク質は、限定はされないが例えば、細胞膜、ミトコンドリア膜、葉緑体膜、小胞体膜等の細胞膜中に存在するタンパク質である。

【００３１】

「可溶性ヒトＩＬ－１７Ｒ」とは、以下のアミノ酸配列を有するポリペプチド（ｈｕＩＬ－１７Ｒ－ＦｐＨ）である：LRLLDHRALVCSQPGLNCTVKNSTCLDDSWIHPRNLTPSSPKDLQIQLHFAHTQQGDLFPVAHIEWTLQTDASILYLEGAELSVLQLNTNERLCVRFEFLSKLRHHHRRWRFTFSHFVVDPDQEYEVTVHHLPKPIPDGDPNHQSKNFLVPDCEHARMKVTTPCMSSGSLWDPNITVETLEAHQLRVSFTLWNESTHYQILLTSFPHMENHSCFEHMHHIPAPRPEEFHQRSNVTLTLRNLKGCCRHQVQIQPFFSSCLNDCLRHSATVSCPEMPDTPEPIPDYMPLWEPRSGSSDYKDDDDKGSSHHHHHH／／配列番号８９。

【００３２】

「可溶性ヒトＴＲ２」とは、単量体型または二量体型の、以下のアミノ酸配列を有する融合ポリペプチド（ｈｕＴＲ２　ｌｏｎｇ－ｈｕＦｃ（ＩｇＧ１）である：MEQRGQNAPAAS GARKRHGPGPREARGARPGPRVPKTLVLVVAAVLLLVSAESALITQQDLAPQQRAAPQQKRSSPSEGLCPPGHHISEDGR DCISCKYGQDYSTHWNDLLFCLRCTRCDSGEVELSPCTTTRNTVCQCEEGTFREEDSPEMCRKCRTGCPRGMVKVGDCTP WSDIECVHKESGTKHSGEAPAVEETVTSSPGTPASPCSLSGVDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK／／配列番号８２。

【００３３】

緩衝液および免疫グロブリン、または他の結合アッセイ試薬をインキュベートすることに関する「生理的条件下」とは、非共有結合反応等の生化学反応が起こることを可能にする温度、ｐＨ、およびイオン強度の条件下でのインキュベーションを意味する。典型的には、温度は、最大約３７℃の室温または周囲温度、ｐＨ６．５～７．５である。

【００３４】

「組換え型」という用語は、その物質（例えば、核酸またはポリペプチド）が人の介在により人為的にまたは合成的に（すなわち、自然にではなく）改変されたことを表す。改変は、物質に対し、その天然の環境または状態の中で、またはそこから離れて、行われ得る。例えば、「組換え核酸」とは、例えば、クローニング、ＤＮＡシャフリングまたは他の公知の分子生物学的手法の実施中に、核酸を組換えることによって生成されるものである。そのような分子生物学的手法の例は、Maniatis et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y(1982)に見出される。「組換えＤＮＡ分子」とは、そのような分子生物学的手法を用いることによって連結されたＤＮＡのセグメントから成る。「組換えタンパク質」または「組換えポリペプチド」という用語は、本明細書で使用される場合、組換えＤＮＡ分子を用いて発現されるタンパク質分子を表す。「組換え宿主細胞」とは、組換え核酸を含有および／または発現する細胞である。

【００３５】

「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、２つ以上のヌクレオチド残基を含有する一本鎖および二本鎖のヌクレオチド重合体の両方を含む。ポリヌクレオチドを構成するヌクレオチド残基は、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドまたはいずれかのヌクレオチド型の修飾型であり得る。前記修飾は、ブロモウリジンおよびイノシン誘導体等の塩基修飾、２’，３’－ジデオキシリボース等のリボース修飾、並びにホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニラデートおよびホスホロアミデート等のヌクレオチド間架橋修飾を含む。

【００３６】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、２００個以下のヌクレオチド残基から構成されるポリヌクレオチドを意味する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは１０～６０の塩基長である。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０～４０のヌクレオチド長である。オリゴヌクレオチドは、例えば、突然変異遺伝子の作製における使用のために、一本鎖または二本鎖であってよい。オリゴヌクレオチドは、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドであってよい。オリゴヌクレオチドは、検出アッセイ用の放射標識、蛍光標識、ハプテンまたは抗原性標識を含む標識を含み得る。オリゴヌクレオチドは、例えば、ＰＣＲのプライマー、クローニングのプライマーまたはハイブリダイゼーションのプローブとして使用することができる。

【００３７】

「ポリヌクレオチド配列」または「ヌクレオチド配列」または「核酸配列」とは、本明細書で同義的に用いられる場合、ポリヌクレオチドにおけるヌクレオチド残基の一次配列であり、例えば、文脈にも依るが、核酸であるオリゴヌクレオチド、ＤＮＡおよびＲＮＡ

の一次配列、またはヌクレオチド残基の一次配列を表す文字列が含まれる。いかなる特定のポリヌクレオチド配列からも、所与の核酸配列または相補的ポリヌクレオチド配列のいずれかを決定することができる。一本鎖でも二本鎖でもよく、センス鎖またはアンチセンス鎖を表す、ゲノム起源または合成起源のＤＮＡまたはＲＮＡも含まれる。特に指定がない限り、本明細書で論じられる一本鎖ポリヌクレオチド配列の左端は全て、５’末端であり；二本鎖ポリヌクレオチド配列の左手方向は５’方向と称される。新生ＲＮＡ転写物の５’から３’への付加の方向は、転写方向と称され；ＲＮＡ転写物の５’から５’末端であるＲＮＡ転写物と同一の配列を有するＤＮＡ鎖上の配列領域は、「上流配列」と称され；ＲＮＡ転写物の３’から３’末端であるＲＮＡ転写物と同一の配列を有するＤＮＡ鎖上の配列領域は、「下流配列」と称される。

【００３８】

本明細書で使用される場合、「単離された核酸分子」または「単離された核酸配列」とは、（１）特定され、該核酸の天然源において通常付随する少なくとも１つの混入核酸分子から分離された核酸分子、または（２）クローン化された、増幅された、標識された、あるいは、目的の核酸の配列を決定できるようにバックグラウンドの核酸と区別された核酸分子である。単離された核酸分子は、それが天然で見出される形態または設定とは異なる。しかし、単離された核酸分子には、免疫グロブリン（例えば、抗体）を通常発現する細胞に含有される核酸分子が含まれ、その場合、例えば、核酸分子は天然の細胞のとは異なる染色体上の位置に存在する。

【００３９】

本明細書で使用される場合、「～をコードする核酸分子」、「～をコードするＤＮＡ配列」、および「～をコードするＤＮＡ」という用語は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順番または配列を表す。これらのデオキシリボヌクレオチドの順番は、ｍＲＮＡ鎖に沿ったリボヌクレオチドの順番を決定し、また、ポリペプチド（タンパク質）鎖に沿ったアミノ酸の順番も決定する。従って、ＤＮＡ配列はＲＮＡ配列およびアミノ酸配列をコードする。

【００４０】

「遺伝子」という用語は、生物学的機能に関わるあらゆる核酸について言及するのに広く使用される。遺伝子は通常、そのようなコード配列の発現に必要なコード配列および／または制御配列を含む。「遺伝子」という用語は、特定のゲノム配列または組換え配列、並びにその配列にコードされるｃＤＮＡまたはｍＲＮＡに適用される。「融合遺伝子」は、トキシンペプチド類似体をコードするコード領域を含有する。遺伝子はまた、例えば、他のタンパク質に対する認識配列を形成する非発現核酸セグメントを含む。転写因子等の調節タンパク質が結合し、それによって隣接または近傍配列の転写が起こる、転写制御因子を含む非発現調節配列。

【００４１】

「遺伝子の発現」または「核酸の発現」とは、ＲＮＡへのＤＮＡの転写（所望によりＲＮＡの修飾、例えば、スプライシングを含む）、ポリペプチドへのＲＮＡの翻訳（それに続くポリペプチドの翻訳後修飾も含まれ得る）、または文脈によって示される場合、転写および翻訳の両方を意味する。

【００４２】

本明細書で使用される場合、「コード領域」または「コード配列」という用語は、構造遺伝子との関連で使用される場合、ｍＲＮＡ分子の翻訳の結果として、新生ポリペプチド中に存在するアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を表す。コード領域は、真核生物では、５’側は開始メチオニンをコードするヌクレオチドトリプレット「ＡＴＧ」と境を接しており、３’側は終止コドン（すなわち、ＴＡＡ、ＴＡＧ、ＴＧＡ）を指定する３つのトリプレットのうちの１つと境を接している。

【００４３】

「制御配列」または「制御シグナル」という用語は、特定の宿主細胞において、連結しているコード配列の発現およびプロセシングに影響を及ぼすことができるポリヌクレオチ

ド配列を表す。そのような制御配列の性質は宿主生物に依存し得る。特定の実施形態では、原核生物の制御配列は、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列を含み得る。真核生物の制御配列は、１つまたは複数の転写因子認識部位を含むプロモーター、転写エンハンサー配列または要素、ポリアデニル化部位、および転写終結配列を含み得る。制御配列はリーダー配列および／または融合パートナー配列（fusion partner sequence）を含み得る。プロモーターおよびエンハンサーは、転写に関わる細胞タンパク質と特異的に相互作用する短いＤＮＡ配列から成る（Maniatis, et al., Science 236:1237 (1987)）。プロモーターおよびエンハンサーエレメントは、酵母、昆虫および哺乳類細胞およびウイルスの遺伝子を含む、様々な真核生物源から単離されている（類似の調節領域、すなわち、プロモーターは、原核生物にも存在する）。特定のプロモーターおよびエンハンサーの選択は、目的のタンパク質を発現するために使用されるべき細胞型が何かに依存する。真核生物のプロモーターおよびエンハンサーのいくつかは幅広い宿主範囲を有するが、一方他の種類は、限られた一部の細胞型でのみ機能する（概説として、Voss, et al., Trends Biochem. Sci., 11:287 (1986) and Maniatis, et al., Science 236:1237 (1987)を参照）。

【００４４】

「ベクター」という用語は、情報をコードするタンパク質を宿主細胞に導入するのに用いる、いかなる分子または独立体（例えば、核酸、プラスミド、バクテリオファージまたはウイルス）をも意味する。

【００４５】

「発現ベクター」または「発現コンストラクト」という用語は、本明細書で使用される場合、所望のコード配列および、特定の宿主細胞中で機能的に連結したコード配列の発現に必要な適切な核酸制御配列を含有する組換えＤＮＡ分子を表す。発現ベクターは、転写、翻訳に影響または制御を及ぼし、イントロンが存在する場合、機能的に連結したコード領域のＲＮＡスプライシングに影響を及ぼす配列を含むが、これらに限定はされない。原核生物での発現に必要な核酸配列は、プロモーター、所望によりオペレーター配列、リボソーム結合部位を含み、他の配列を含む可能性もある。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー、並びに終結シグナルおよびポリアデニル化シグナルを利用することが知られている。所望により、分泌シグナルペプチド配列が、目的のコード配列に機能的に連結して、発現ベクターにコードされていてもよく、それによって、発現されたポリペプチドは、所望であれば、目的のポリペプチドの細胞からのより容易な単離のために、組換え宿主細胞によって分泌され得る。そのような技術は、当該技術分野において周知である(例えば、Goodey, Andrew R.; et al., Peptide and DNA sequences, 米国特許第５，３０２，６９７号;Weiner et al., Compositions and methods for protein secretion, 米国特許第６，０２２，９５２号および米国特許第６，３３５，１７８号; Uemura et al., Protein expression vector and utilization thereof, 米国特許第７，０２９，９０９号; Ruben et al., 27 human secreted proteins, 米国特許出願公開第２００３／０１０４４００Ａ１号)。

【００４６】

「機能的な組み合せで」、「機能的な順序で」および「機能的に連結した」という用語は、本明細書で使用される場合、所与の遺伝子の転写および／または所望のタンパク質分子の合成を指示することができる核酸分子が産生されるような、核酸配列の連結を表す。この用語は、機能的なタンパク質が産生されるような、アミノ酸配列の連結も表す。例えば、タンパク質コード配列に「機能的に連結した」ベクター中の制御配列は、制御配列の転写活性に適合する条件下でタンパク質コード配列の発現が達成されるために、タンパク質コード配列に連結される。

【００４７】

「宿主細胞」という用語は、核酸によって形質転換された、または形質転換可能であることで、目的の遺伝子を発現可能な細胞を意味する。この用語は、目的の遺伝子が存在する限り、親細胞の子孫細胞も含み、該子孫細胞が元の親細胞に対し、形態において、また

は遺伝子構造において同一であるか否かは関係しない。多数の利用可能な、公知の宿主細胞のいずれも、本発明を実施する際に使用することができる。特定の宿主の選択は、当該技術分野で認められているいくつかの要素に依存する。これらには、例えば、選択された発現ベクターとの適合性、ＤＮＡ分子にコードされるペプチドの毒性、形質転換率、ペプチド回収の容易さ、発現特性、バイオセイフティおよび費用が含まれる。全ての宿主が特定のＤＮＡ配列の発現に対して等しく効果的であり得るわけではないことを理解して、これらの因子の釣り合いを決定しなければならない。これらの一般的な指針の中で、培養液中で有用な微生物宿主細胞には、細菌（大腸菌種等）、酵母（サッカロマイセス種等）および他の真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、哺乳類（例えばヒト）細胞、例えば、ＣＨＯ細胞およびＨＥＫ－２９３細胞が含まれる。変更はＤＮＡレベルでも同様になされ得る。ペプチドをコードするＤＮＡ配列は、選択された宿主細胞により適合するコドンに変化させてもよい。大腸菌（E. coli）の場合、最適化されたコドンが当該技術分野において周知である。制限酵素認識部位を除去するために、または、選択された宿主細胞におけるＤＮＡのプロセシングで役立ち得るサイレント制限酵素認識部位を含むために、コドンを置換することができる。次に、形質転換された宿主は培養および精製される。所望の化合物が発現されるために、宿主細胞を従来の発酵条件下で培養してもよい。そのような発酵条件は、当該技術分野において周知である。

【００４８】

「トランスフェクション」という用語は、細胞による外来（foreign or exogenous）ＤＮＡの取り込みを意味し、外来性ＤＮＡが細胞膜の内側に導入されている場合、細胞は「トランスフェクトされ」ている。いくつかのトランスフェクション技術が当該技術分野において周知であり、本明細書で開示される。例えば、Graham et al., 1973, Virology 52:456; Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, supra; Davis et al., 1986, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier; Chu et al., 1981, Gene 13:197を参照されたい。そのような技術を、一つまたは複数の外来性ＤＮＡ部分を適切な宿主細胞に導入するのに使用することができる。

【００４９】

「形質転換」という用語は、細胞の遺伝的特徴における変化を表し、細胞が新規のＤＮＡまたはＲＮＡを含有するように改変されている場合、細胞は形質転換されている。例えば、トランスフェクション、形質導入、または他の技術を介して新規の遺伝物質を導入することによって、その天然状態から遺伝子改変された場合に、細胞は形質転換される。トランスフェクションまたは形質導入後、形質転換ＤＮＡは、細胞の染色体への物理的な組み込みによって細胞のＤＮＡと再結合する場合もあり、エピソームエレメントとして、複製されることなく一時維持される場合もあり、プラスミドとして独立に複製する場合もある。形質転換ＤＮＡが細胞の分裂と共に複製される場合、細胞は「安定に形質転換され」たとみなされる。

【００５０】

組成物の「生理学的に許容される塩」、例えば抗体等の免疫グロブリンの塩が意味するものは、薬剤的に許容できることが、知られているまたは、後に発見される、あらゆる塩である。薬剤的に許容できる塩のいくつかの非限定例は、酢酸塩；トリフルオロ酢酸塩；塩酸塩および臭化水素酸塩等のハロゲン酸塩；硫酸塩；クエン酸塩；マレイン酸塩；酒石酸塩；グリコール酸塩；グルコン酸塩；コハク酸塩；メシル酸塩；ベシル酸塩；ペンタガロイルグルコース（ＰＧＧ）および没食子酸エピガロカテキン（ＥＧＣＧ）等の没食子酸エステルの塩（没食子酸は、３，４，５トリヒドロキシ安息香酸としても知られている）、コレステロール硫酸の塩、パモ酸塩、タンニン酸塩およびシュウ酸塩である。

【００５１】

タンパク質の「ドメイン」または「領域」（本明細書では同義的に用いられる）は、タンパク質全体のあらゆる部分であり、最大では完全タンパク質をも含むが、典型的には、完全タンパク質に満たないものが含まれる。ドメインは、タンパク質鎖の残りとは独立し

て折り重なることも可能であるが、そうである必要はなく、および／または、特定の生物学的、生化学的、または構造的な機能または部位（例えば、リガンド結合ドメイン、または細胞質ドメイン、膜貫通ドメインまたは細胞外ドメイン）と関連付けられ得る。

【００５２】

「処置」または「処置すること」とは、ある疾患の、発生を予防する、または病状を変化させるという意図を持って行われる、介入である。従って、「処置」とは、治療的な処置および予防的な（prophylactic or preventative）措置の両方を表す。処置を必要としているものには、障害を既に抱えているもの、および障害が予防されるべきものが含まれる。「処置」は、寛解；軽快；症状の縮小、または該損傷、病状もしくは状態を患者がより許容できるものにすること；変性または衰弱速度の緩徐化；変性の終結点をより消耗性の低いものにすること；患者の身体的または精神的な健全性を向上させること等、あらゆる客観的または主観的パラメータを含む、損傷、病状または状態の改善における、いかなる成功の兆候をも含む。症状の処置または改善は、理学的検査、患者による自己報告、神経精神医学的検査、および／または精神医学的評価の結果を含む、客観的または主観的パラメータに依存し得る。

【００５３】

「有効量」とは、一般的には、重症度および／もしくは症状の頻度を低減させ、症状および／もしくは根本原因を取り除き、症状および／もしくはその根本原因の発生を予防し、並びに／または片頭痛の結果生じる、もしくは片頭痛に付随する障害を改善もしくは修復するのに十分な量である。一部の実施形態では、有効量は治療有効量または予防有効量である。「治療有効量」とは、病状（例えば、移植拒絶反応もしくはＧＶＨＤ、炎症、多発性硬化症、がん、糖尿病、神経障害、疼痛）または症状、具体的には、病態に伴う状態または症状を治療、または、病態もしくは、疾患に多少であっても関連している他のあらゆる望ましくない症状の進行を防ぐ、妨げる、遅延させるまたは逆行させるのに十分な（すなわち「治療効果」を与える）量である。「予防有効量」とは、対象に投与された場合に、意図された予防効果を有する、例えば、片頭痛もしくは多発性硬化症の発生（または再発）を予防もしくは遅延し、または片頭痛、片頭痛症、もしくは多発性硬化症の発生率（または再発率）を低減する、医薬組成物の量である。完全な治療または予防の効果は、必ずしも１回用量の投与によって発生するわけではなく、一連の用量の投与後にのみ発生する場合がある。従って、治療有効量または予防有効量は、一回または複数回の投与において投与され得る。

【００５４】

処置を行うための「哺乳類」とは、哺乳動物に分類されるいかなる動物をも表し、例えば、ヒト、飼育動物および家畜、およびイヌ、ウマ、ネコ、雌ウシ、ラット、マウス、サル等の動物園の動物、競技用動物、または愛がん動物が挙げられる。哺乳動物はヒトであることが好ましい。

【００５５】

「天然の」という用語は、ポリペプチド、核酸、宿主細胞等の生物由来物質に関連して本明細書の全体を通じて使用されるが、これは、天然に存在する物質を指す。

【００５６】

「抗体」、または同義の「Ａｂ」という用語は、最も幅広い意味で使用され、該用語には、所望の生物活性を提示する限り、上記の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む、完全構築抗体、モノクローナル抗体（ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多特異的抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗原と結合可能な抗体フラグメント（例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、一本鎖抗体、二重特異性抗体（diabody））が含まれる。化学的に誘導体化された抗体を含む、インタクトな分子および／またはフラグメントの多量体または凝集体が企図される。ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、およびＩｇＥ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２、またはあらゆるアロタイプを含む、あらゆるアイソタイプクラスまたはサブクラスの抗体が企図される。異なるアイソタイプは異なるエフェクター機能を有し；例え

ば、ＩｇＧ１およびＩｇＧ３アイソタイプは抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性を有する。

【００５７】

「抗原結合性タンパク質」（ＡＢＰ）という用語は、目的の標的抗原と特異的に結合するような所望の抗原－結合特性を有するＣＤＲ由来の配列を含有する、上記で定義されるような抗体または抗体フラグメント、および組換えペプチドまたは他の化合物を含む。

【００５８】

一般的に、抗原結合性タンパク質、例えば、抗体または抗体フラグメントは、その抗原に対して、同様の結合アッセイ条件下の他の無関係のタンパク質に対するその親和性と比較して、有意により高い結合親和性を有し、それによりその抗原を識別することができる場合に、目的の抗原（例えば、ＩＬ－１７ＲまたはＴＲ２）に「特異的に結合する」。通常、抗原結合性タンパク質は、解離定数（K_D）が10^{-8}Ｍ以下である場合に、その標的抗原と「特異的に結合する」と言われる。抗体は、K_Dが≦5×10^{-9}Ｍ以下である場合は「高い親和性」で、K_Dが5×10^{-10}Ｍ以下である場合は「非常に高い親和性」で、抗原と特異的に結合する。一実施形態では、抗体は、約10^{-8}Ｍ～10^{-10}ＭのK_Dで、目的の抗原に結合し、さらに別の実施形態では、抗体は5×10^{-9}以下のK_Dで結合する。

【００５９】

「抗原結合領域」または「抗原結合部位」とは、特定の抗原、例えば、ＩＬ－１７ＲまたはＴＲ２と特異的に結合する、タンパク質の一部分を意味する。例えば、抗原と相互作用し、抗原に対するその特異性および親和性を抗原結合性タンパク質に与えるアミノ酸残基を含有する抗原結合性タンパク質のその部分は、「抗原結合領域」と称される。抗原結合領域は通常、一つまたは複数の「相補性決定領域（complementary binding region）」（「ＣＤＲ」）を含む。ある抗原結合領域はまた、一つまたは複数の「フレームワーク」領域（「ＦＲ」）を含む。「ＣＤＲ」は、抗原結合特異性および親和性に寄与するアミノ酸配列である。「フレームワーク」領域は、ＣＤＲの適切な高次構造の維持を助けることで、抗原結合領域と抗原の間の結合を促進することができる。従来の抗体においては、ＣＤＲは重鎖および軽鎖の可変領域のフレームワーク内に埋め込まれており、そこでＣＤＲは抗原結合および抗原認識に関与する領域を構成する。免疫グロブリン抗原結合性タンパク質の可変領域は、フレームワーク領域内に（所定のフレームワーク領域１～４、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、およびＦＲ４、Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD；またChothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917も参照）、少なくとも３つの重鎖ＣＤＲまたは軽鎖ＣＤＲを含む（上記参照）（上記Kabat et al., 1991；また上記Chothia and Lesk, 1987；Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883も参照）。

【００６０】

「単離された」免疫グロブリン、例えば、抗体または抗体フラグメントは、特定され、その天然環境の、または、産生細胞によってそれが分泌された培地の、一つまたは複数の成分から分離されたものである。その天然環境または培地の「混入」成分は、抗体の診断用途または治療用途を妨げるであろう物質であり、例えば、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質を挙げることができる。いくつかの実施形態では、抗体は、所望により染色、例えば、クーマシーブルーまたは銀染色を用いて、還元または非還元条件下、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、（１）抗体含有量９５重量％超、最も好ましくは９９重量％超まで、または（２）均一となるまで、精製される。単離された天然抗体は、抗体の天然環境の少なくとも1つの成分が存在しないために、組換え細胞内の原位置の抗体を含む。しかし、通常は、単離された抗体は少なくとも１回の精製工程で製造される。

【００６１】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、実質的に均一な抗

体の集団から得られる抗体、すなわち、少量存在し得る自然に生じる可能性がある変異以外は同一である集団を含む個々の抗体を表す。抗原結合性タンパク質であるモノクローナル抗体は、異なるエピトープを対象とする異なる抗体を通常含むポリクローナル抗体製剤とは対照的に、個々の抗原部位またはエピトープを対象としている、非常に特異的な結合剤である。モノクローナル抗体の非限定的な例としては、マウス抗体、ウサギ抗体、ラット抗体、ニワトリ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体、完全構築抗体、多特異的抗体（二重特異性抗体を含む）、抗原と結合できる抗体フラグメント（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、一本鎖抗体、ヘミボディを含む）、マキシボディ（maxibody）、ナノボディ（nanobody）、および所望の生物活性を提示する限り上記のＣＤＲを含む組換えペプチド、またはその変異体または誘導体が挙げられる。

【００６２】

「モノクローナル」という修飾語句は、実質的に均一な抗体集団から得られるという抗体の特性を表し、何らかの特定の方法による抗体産生を要すると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 [1975]に最初の記載があるハイブリドーマ法で製造することができ、あるいは、組換えＤＮＡ法で製造することもできる（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号を参照）。「モノクローナル抗体」は、例えばClackson et al., Nature,352:624-628 [1991] and Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)に記載される技術を用いて、ファージ抗体ライブラリからも単離することができる。

【００６３】

「多特異的な」結合剤または抗原結合性タンパク質もしくは抗体は、２つ以上の抗原またはエピトープを標的とするものである。

【００６４】

「二重特異性」（“bispecific,” “dual-specific”）、または「二機能性」の結合剤または抗原結合性タンパク質または抗体とは、２つの異なる抗原結合部位を有するハイブリッドである。二重抗原結合性タンパク質、抗原結合性タンパク質および抗体は、複数抗原結合性タンパク質、抗原結合性タンパク質または多特異的な抗体の一種であり、ハイブリドーマの融合またはＦａｂ’フラグメントの連結を含むがこれらに限定されない種々の方法で製造することができる。例えば、Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553を参照されたい。二重特異的抗原結合性タンパク質または抗体の２つの結合部位は、同一または異なるタンパク質標的に存在し得る２つの異なるエピトープに結合する。

【００６５】

「免疫グロブリン」という用語は、それぞれ軽鎖（ＬＣ）に共有結合的に連結される２つの二量化した重鎖（ＨＣ）を含む完全抗体；単独の二量化していない免疫グロブリン重鎖および共有結合的に連結された軽鎖（ＨＣ＋ＬＣ）、またはキメラ免疫グロブリン（軽鎖＋重鎖）－Ｆｃのヘテロ三量体（いわゆる「ヘミボディ」）を包含する。「免疫グロブリン」は、タンパク質ではあるが、必ずしも抗原結合性タンパク質であるわけではない。

【００６６】

「抗体」においては、それぞれの四量体は、各対が約２２０個のアミノ酸（約２５ｋＤａ）から成る１つの「軽」鎖および約４４０個のアミノ酸（約５０～７０ｋＤａ）から成る１つの「重」鎖を有する、２つの同一のポリペプチド鎖対から成る。各鎖のアミノ末端部は、抗原認識に主に関わる約１００～１１０以上のアミノ酸から成る「可変」（「Ｖ」）領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部は、エフェクター機能に主に関与する定常領域を規定する。可変領域は異なる抗体間で異なる。定常領域は異なる抗体間で同一である。抗原結合性タンパク質である抗体の場合、各重鎖または軽鎖の可変領域内には、抗体の抗原に対する特異性の決定を助ける３つの超可変性小領域が存在する。しかし、本発明の範囲内で、免疫グロブリン、例えば抗体の実施形態は、抗原結合性タンパク質である必要も、抗原に特異的に結合することが既知である必要もない。超可変領域間の可変領域残基は、フレームワーク残基と称されており、通常、異なる抗体の間で多少類似している。その重

鎖の定常領域のアミノ酸配列によって、免疫グロブリンを異なるクラスに割り当てることができる。ヒト軽鎖は、カッパ（κ）およびラムダ（λ）軽鎖として分類される。軽鎖および重鎖内では、可変領域および定常領域は、約１２個以上のアミノ酸から成る「Ｊ」領域で連結されており、また、重鎖は約１０個のさらなるアミノ酸からなる「Ｄ」領域も含んでいる。Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))を参照されたい。本発明の範囲内では、「抗体」は、組換えによって生成された抗体、およびグリコシル化された、またはグリコシル化を欠いた抗体も包含する。

【００６７】

「軽鎖」または「免疫グロブリン軽鎖」という用語は、結合特異性を与えるのに十分な可変領域配列を有する完全長の軽鎖およびそのフラグメントを含む。完全長の軽鎖は、可変領域ドメインであるV_L、および定常領域ドメインであるC_Lを含む。軽鎖の可変領域ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端に存在する。軽鎖には、κ鎖およびλ鎖が含まれる。

【００６８】

「重鎖」または「免疫グロブリン重鎖」という用語は、完全長の重鎖、および結合特異性を与えるのに十分な可変領域配列を有するそのフラグメントを含む。完全長の重鎖は、可変領域ドメインであるV_H、および３つの定常領域ドメインであるC_H1、C_H2、およびC_H3を含む。V_Hドメインはポリペプチドのアミノ末端に存在し、C_Hドメインはカルボキシル末端に存在し、そこではC_H3がポリペプチドのカルボキシ末端に最も近く位置している。重鎖は、ミュー（μ）、デルタ（Δ）、ガンマ（γ）、アルファ（α）、およびイプシロン（ε）として分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、およびＩｇＥと定義する。本発明の別々の実施形態において、重鎖は、ＩｇＧ（例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４サブタイプ）、ＩｇＡ（例えばＩｇＡ１およびＩｇＡ２サブタイプ）、ＩｇＭおよびＩｇＥを含む、いかなるアイソタイプであってもよい。これらのうちのいくつかは、サブクラスまたはアイソタイプ、例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２等にさらに分類することができる。異なるＩｇＧアイソタイプは、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）等の、異なるエフェクター機能（Ｆｃ領域を介する）を有する場合がある。ＡＤＣＣでは、抗体のＦｃ領域は、ナチュラルキラーおよびマクロファージ等の免疫エフェクター細胞の表面に存在するＦｃ受容体（ＦｃγＲ）に結合し、それによってファゴサイトーシスまたは標的細胞の溶解を引き起こす。ＣＤＣでは、抗体は、細胞表面で補体カスケードを始動させることによって、標的細胞を死滅させる。

【００６９】

「Ｆｃ領域」、または本明細書で同義的に用いられる、「Ｆｃドメイン」もしくは「免疫グロブリンＦｃドメイン」は、２つの重鎖フラグメントを含有し、それらは完全抗体において、抗体のC_H1ドメインおよびC_H2ドメインを含む。２つの重鎖フラグメントは、２つ以上のジスルフィド結合およびC_H3ドメインの疎水性相互作用によって、結合している。

【００７０】

「サルベージ受容体結合エピトープ（salvage receptor binding epitope）」という用語は、ＩｇＧ分子のｉｎ ｖｉｖｏでの血清半減期の増加に関わるＩｇＧ分子（例えば、IgG_1、IgG_2、IgG_3、またはIgG_4）のＦｃ領域のエピトープを表す。

【００７１】

「アロタイプ」は、免疫原となり得、ヒトの特定の対立遺伝子によってコードされる、抗体の配列における、しばしば定常領域における変動である。アロタイプは、ヒトＩＧＨＣ遺伝子である、ＩＧＨＧ１、ＩＧＨＧ２、ＩＧＨＧ３、ＩＧＨＡ２およびＩＧＨＥ遺伝子の５つに対して確認されており、それぞれは、Ｇ１ｍ、Ｇ２ｍ、Ｇ３ｍ、Ａ２ｍ、およびＥｍアロタイプと称される。少なくとも１８種のＧｍアロタイプ：ｎＧ１ｍ（１）、ｎＧ１ｍ（２）、Ｇ１ｍ（１、２、３、１７）もしくはＧ１ｍ（ａ、ｘ、ｆ、ｚ）、Ｇ２ｍ

（２３）もしくはＧ２ｍ（ｎ）、Ｇ３ｍ（５、６、１０、１１、１３、１４、１５、１６、２１、２４、２６、２７、２８）もしくはＧ３ｍ（ｂ１、ｃ３、ｂ５、ｂ０、ｂ３、ｂ４、ｓ、ｔ、ｇ１、ｃ５、ｕ、ｖ、ｇ５）が知られている。２種のＡ２ｍアロタイプ、Ａ２ｍ（１）およびＡ２ｍ（２）が存在する。

【００７２】

抗体の構造および発生の詳細な記述については、Roth, D.B., and Craig, N.L., Cell, 94:411-414 (1998)（参照によってその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。簡潔に説明すると、重鎖および軽鎖の免疫グロブリン配列をコードするＤＮＡを生成するプロセスは、発生途中のＢ細胞で主に起こる。種々の免疫グロブリン遺伝子セグメントの再編成および連結の前は、Ｖ、Ｄ、Ｊおよび定常（Ｃ）遺伝子セグメントは通常、単一の染色体上で比較的かなり近位に存在している。Ｂ細胞分化の間、Ｖ、Ｄ、Ｊ（または、軽鎖遺伝子の場合はＶおよびＪのみ）遺伝子セグメントのそれぞれの適切なファミリーメンバーのうちの１つが、組み換えられて、機能的に再編成された重鎖および軽鎖の免疫グロブリン遺伝子の可変領域を形成する。この遺伝子セグメントの再編成プロセスは順次的であるように思われる。最初に、重鎖Ｄ－Ｊ連結がつくられ、続いて重鎖Ｖ－ＤＪ連結および軽鎖Ｖ－Ｊ連結がつくられる。Ｖ、ＤおよびＪセグメントの再編成に加えて、軽鎖のＶおよびＪセグメントが連結し、且つ重鎖のＤおよびＪセグメントが連結する部位での、可変部の組換えによって、免疫グロブリン重鎖および軽鎖の初期レパートリーにさらなる多様性が生み出される。そのような軽鎖における変動は、通常、Ｖ遺伝子セグメントの最後のコドンおよびＪセグメントの最初のコドンの中で生じる。連結の際の同様の不明確性がＤセグメントとＪ$_{H}$セグメントの間の重鎖染色体上で生じ、１０ヌクレオチドにもわたる場合がある。さらに、ゲノムＤＮＡにはコードされていない、いくつかのヌクレオチドが、ＤとＪ$_{H}$遺伝子セグメントの間、およびＶ$_{H}$とＤ遺伝子セグメントの間に挿入され得る。これらのヌクレオチドの追加は、Ｎ領域の多様性として知られている。そのような可変領域遺伝子セグメントにおける再編成、およびそのような連結の間に生じ得る可変組換えの正味の影響は、一次抗体レパートリーの生成である。

【００７３】

「超可変」領域という用語は、抗原結合性に関わる抗体のアミノ酸残基を表す。超可変領域は、相補性決定領域またはＣＤＲ由来のアミノ酸残基を含む［すなわち、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)に記載される、軽鎖可変領域の残基２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）および８９～９７（Ｌ３）、並びに重鎖可変領域の３１～３５（Ｈ１）、５０～６５（Ｈ２）および９５～１０２（Ｈ３）］。全てのＣＤＲを含有する全体の抗原結合部位よりも親和性は低くなるが、単独のＣＤＲであっても、抗原を認識し、結合することができる。

【００７４】

超可変性「ループ」由来の残基の別の定義は、Chothia et al., J. Mol.Biol. 196: 901-917 (1987)に、軽鎖可変領域における残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）および９１～９６（Ｌ３）、並びに重鎖可変領域における２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）および９６～１０１（Ｈ３）であると記載されている。

【００７５】

「フレームワーク」または「ＦＲ」残基とは、超可変領域残基以外の可変領域残基である。

【００７６】

「抗体フラグメント」は、インタクトな完全長抗体の一部、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_{2}$、およびＦｖフラグメント；ダイアボディ；線状抗体（Zapata et al., Protein Eng.,8(10):1057-1062 (1995)）；一本鎖抗体分子；並びに抗体フラグメントから形成される多特異的抗体が挙げられる。

【００７７】

抗体のパパイン消化によって、「Ｆａｂ」フラグメントと称される２つの同一の抗原結合性フラグメントが生成され、それぞれは単一の抗原結合部位、および定常領域を含有する残留「Ｆｃ」フラグメントを有する。Ｆａｂフラグメントは、全可変領域、並びに軽鎖の定常領域および重鎖の第一の定常領域（ＣＨ１）を含有する。Ｆｃフラグメントは炭水化物を提示しており、あるクラスの抗体を別のクラスの抗体と区別する多くの抗体エフェクター機能（結合性補体（binding complement）および細胞受容体等）に関わる。

【００７８】

ペプシン処置によって、抗体のＶＨドメインおよびＶＬドメインを含有し、これらのドメインが単一のポリペプチド鎖に存在する、２つの「一本鎖Ｆｖ」すなわち「ｓｃＦｖ」抗体フラグメントを有するＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントが生じる。Ｆａｂフラグメントは、重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端における、抗体ヒンジ領域由来の一つまたは複数のシステインを含む少数の追加残基の含有によって、Ｆａｂ’フラグメントと異なる。Ｆｖポリペプチドは、Ｆｖが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にするＶＨドメインとＶＬドメインの間のポリペプチドリンカーをさらに含むことが好ましい。ｓｃＦｖの概説としては、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. l 13, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照されたい。

【００７９】

「Ｆａｂフラグメント」は、１本の軽鎖、並びに１本の重鎖のC_H１および可変領域から成る。Ｆａｂ分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することができない。

【００８０】

「Ｆａｂ’フラグメント」は、鎖間ジスルフィド結合が２つのＦａｂ’フラグメントの２本の重鎖の間に形成されて、Ｆ（ａｂ’）$_2$分子を形成することができるように、１本の軽鎖および１本の重鎖のV_HドメインおよびC_H１ドメイン、さらにC_H１ドメインとC_H２ドメインの間の領域を含む部分を含有する。

【００８１】

「Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント」は、２本の重鎖間で鎖間ジスルフィド結合が形成されるように、２本の軽鎖、並びにC_H１とC_H２ドメインの間の定常領域の一部分を含む２本の重鎖を含有する。従って、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントは、２本の重鎖間のジスルフィド結合で結合している２つのＦａｂ’フラグメントから成る。

【００８２】

「Ｆｖ」は、完全な抗原認識および結合部位を含有する最小の抗体フラグメントである。この領域は、堅固な非共有結合で会合した状態の、１つの重鎖可変領域および１つの軽鎖可変領域の二量体から成る。各可変領域の３つのＣＤＲが相互作用することで、ＶＨとＶＬの二量体の表面上に抗原結合部位が示されるのは、この立体配置においてである。単一の可変領域（またはある抗原に特異的な３つのＣＤＲのみから成るＦｖの半分）は、全体の結合部位よりも低い親和性でだが、抗原を認識し、結合する能力を有する。

【００８３】

「一本鎖抗体」とは、Ｆｖ分子であって、それにおいて、重鎖および軽鎖の可変領域は可動性リンカーによって連結され、一本のポリペプチド鎖を形成し、そしてそれが抗原結合性領域を形成している。一本鎖抗体については、国際公開第８８／０１６４９号および米国特許第４，９４６，７７８号および第５，２６０，２０３号で詳細に論じられており、その開示の全体が参照によって組み込まれる。

【００８４】

「一本鎖Ｆｖ」すなわち「ｓｃＦｖ」抗体フラグメントは、抗体のV_HドメインおよびV_Lドメインを含有し、そこではこれらのドメインは一本のポリペプチド鎖の状態で存在し、所望によりV_HドメインおよびV_Lドメインの間に、Ｆｖが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にするポリペプチドリンカーを含んでいる（Bird et al., Science 242:423-426, 1988, and Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 85:5879-5883, 1988）。「Ｆｄ」フラグメントは、V_HおよびC_H1ドメインから成る。

【００８５】

「二重特異性抗体」という用語は、２つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントを表し、そのフラグメントは同一のポリペプチド鎖（ＶＨＶＬ）に、軽鎖可変領域（ＶＬ）に連結された重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。同一鎖上の２つのドメイン間の対合を可能にするには短過ぎるリンカーを用いることで、ドメインは別の鎖の相補性ドメインとの対合を余儀なくされ、２つの抗原結合部位が生じる。二重特異性抗体については、例えば、EP 404,097; 国際公開第９３／１１１６１号; and Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)に、より十分な記載がある。

【００８６】

「ドメイン抗体（domain antibody）」は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含有する免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントである。場合によっては、２つ以上のV_H領域がペプチドリンカーで共有結合的に連結されて、二価ドメイン抗体を生成する。二価ドメイン抗体の２つのV_H領域は、同じ抗原または異なる抗原を標的とし得る。

【００８７】

「競合する」という用語は、同一のエピトープに対し競合する抗原結合性タンパク質（例えば、中和抗原結合性タンパク質または中和抗体）との関連で用いられる場合、抗原結合性タンパク質間の競合がアッセイによって決定され、該アッセイにおいて、試験用の抗原結合性タンパク質（例えば、抗体または免疫学的に機能的なそのフラグメント）が、参照の抗原結合性タンパク質（例えば、リガンド、または参照抗体）の、共通の抗原（例えば、ＩＬ－１７Ｒもしくはそのフラグメント、またはＴＲ２もしくはそのフラグメント）への特異的結合を阻止または阻害することを意味する。多くの種類の競合的結合アッセイが使用可能であり、例えば：固相直接または間接ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、固相直接または間接酵素免疫測定法（ＥＩＡ）、サンドイッチ競合アッセイ（例えば、Stahli et al., 1983, Methods in Enzymology 9:242-253を参照）；固相直接ビオチン－アビジンＥＩＡ（例えば、Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137:3614-3619を参照） 固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ（例えば、Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Pressを参照）；Ｉ－１２５標識を用いる固相直接標識ＲＩＡ（例えば、Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25:7-15を参照）；固相直接ビオチン－アビジンＥＩＡ（例えば、Cheung, et al., 1990, Virology 176:546-552を参照）；直接標識ＲＩＡ（Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82）；および表面プラズモン共鳴（ＢＩＡｃｏｒｅ（商標登録）；例えば、Fischer et al., A peptide-immunoglobulin-conjugate、国際公開第２００７／０４５４６３Ａ１号、実施例１０、これらはその全体が参照によって本明細書に組み込まれる）、またはＫｉｎＥｘＡ等が挙げられる。通常、そのようなアッセイは、固体表面に結合した精製された抗原またはこれらのいずれかを担持する細胞、未標識の試験免疫グロブリンまたは抗原結合性タンパク質、および標識された参照抗原結合性タンパク質使用が含まれる。競合的阻害は、試験抗原結合性タンパク質の存在下で固体表面または細胞に結合した標識量を決定することにより測定される。通常、試験免疫グロブリンまたは抗原結合性タンパク質は過剰量で存在する。競合アッセイによって特定された抗原結合タンパク質（競合的抗原結合性タンパク質）は、参照抗原結合性タンパク質と同一のエピトープに結合する抗原結合性タンパク質、および参照抗原結合性タンパク質が結合したエピトープに、立体障害が生じる程近位に存在する、隣接エピトープに結合する抗原結合性タンパク質を含む。競合的結合を測定するための方法に関するさらなる詳細は、本明細書の実施例にて提供される。通常、競合性抗原結合性タンパク質が過剰量で存在する場合、参照抗原結合性タンパク質の、共通の抗原への特異的結合が、少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％または７５％阻害される。場合によっては、結合は、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５

％、または９７％またはそれ以上、阻害される。

【００８８】

免疫グロブリン（例えば、抗体または抗体フラグメント）が抗原と「有意には結合しない」場合、それは、過剰量の特定の免疫グロブリンが、参照抗原結合性タンパク質と、例えば、正の対照抗体と競合せずに、標的抗原へのその結合を、３９％超、または３０％超、または２０％超、または１０％超だけ阻害することがないことを意味する。可溶性ヒトＩＬ－１７Ｒへの特異的結合について、正の対照抗体は、本明細書に記載の抗体１６４２９である。可溶性ヒトＴＲ２への特異的結合について、正の対照抗体は、本明細書に記載の抗体１６４４９である。

【００８９】

抗体抗原相互作用は、$M^{-1}s^{-1}$単位の会合速度定数（k_a）、またはs^{-1}単位の解離速度定数（k_d）、あるいはM単位の解離平衡定数（K_D）によって特徴付けることができる。会合速度定数、解離速度定数、または解離平衡定数は、表面プラズモン共鳴（ＢＩＡｃｏｒｅ（商標登録）；例えば、Fischer et al., A peptide-immunoglobulin-conjugate、国際公開第２００７／０４５４６３Ａ１号、実施例１０、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）、または製造業者によって概説される一般的な手順もしくは当該技術分野において周知の他の方法を用いるＫｉｎＥｘＡ等の動態解析技術を用いて容易に決定することができる。ＢＩＡｃｏｒｅ（商標登録）またはＫｉｎＥｘＡで得られた速度論データは、製造業者により記述された方法によって分析することができる。

【００９０】

試験免疫グロブリンが「有意に結合しない」かどうかを決定することに関して「表面プラズモン共鳴結合アッセイで測定される」とは、表面プラズモン共鳴に基づく免疫グロブリンの結合活性を評価するために、本明細書に記載の溶解平衡結合アッセイで測定されることを意味する。参照抗原結合性タンパク質（例えば、ヒトＩＬ－１７Ｒに対する抗体１６４２９またはヒトＴＲ２に対する抗体１６４４９）は、製造業者の取扱説明書（BIACore, Inc.、ニュージャージー州ピスカタウェイ）に従って、ＢＩＡＣｏｒｅ（商標登録）２０００、研究用グレードセンサーチップＣＭ５表面に固定化される。センサーチップ表面のカルボキシル基は、０．２Ｍ　Ｎ－エチル－Ｎ’－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣ）および０．０５Ｍ　Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）を含有する６０μＬの混合物を注入することで活性化される。参照抗原結合性タンパク質は、ｐＨ４．０の１０ｍＭ　酢酸ナトリウム中に希釈され、活性化されたチップ表面全体に３０μＬ／分で６分間注がれる。表面上の過剰な反応性基は、６０μＬの１Ｍ　エタノールアミンを注ぐことで不活性化される。最終的な固定化レベルは通常、およそ６６００共鳴単位（resonance unit, RU）である。可溶性抗原結合性タンパク質（例えば、抗体）の非存在下の可溶性標的抗原（例えば、１０ｎＭの可溶性ヒトＩＬ－１７Ｒまたは３０ｎＭの可溶性ヒトＴＲ２）は、固定された参照抗原結合性タンパク質（例えば、正の対照抗体）に対する１００％の結合シグナルを確立するために用いられる。試験免疫グロブリンのインキュベーション後における標的抗原の結合シグナルの減少は、溶液中の標的抗原に対するその結合レベルを示す。

【００９１】

「抗原」という用語は、抗原結合性タンパク質（例えば、抗体またはその免疫学的に機能するフラグメントを含む）等の選択的結合剤と結合でき、そしてさらに、抗体を動物に使用して、その抗原に結合できる抗体を生産可能な分子または分子の一部分を表す。抗原は、異なる抗原結合性タンパク質、例えば抗体と相互作用可能な一つまたは複数のエピトープを有し得る。

【００９２】

「エピトープ」という用語は、抗原結合性タンパク質（例えば、抗体）が結合する分子の部分である。この用語は、抗体等の抗原結合性タンパク質またはＴ細胞受容体に特異的に結合可能な、いかなる決定基をも含む。エピトープは、隣接していても隣接していなくてもよい（例えば、一本鎖ポリペプチドにおいて、ポリペプチド配列中で互いに隣接して

いないが、その分子上で、抗原結合性タンパク質が結合するアミノ酸残基）。ある実施形態では、エピトープは、それらが抗原結合性タンパク質を生成するのに用いられるエピトープと類似した三次元構造を含むが、抗原結合性タンパク質を生成するのに用いられるそのエピトープ中に存在するアミノ酸残基を全くまたはほとんど含まないという点で、模倣剤になり得る。エピトープはほとんどの場合タンパク質に存在するが、いくつかの例では、核酸等の他の種類の分子に存在する場合もある。エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニル基等の、分子の化学活性を有する表面基群（surface grouping）を含む場合があり、特定の三次元構造特性、および／または特定の電荷特性を有する場合がある。通常、特定の標的抗原に特異的な抗体は、タンパク質および／または高分子の混合物中で、標的抗原上のエピトープを選択的に認識する。

【００９３】

「同一性」という用語は、配列を整列および比較することで決定される、２つ以上のポリペプチド分子または２つ以上の核酸分子から成る配列間の関係を表す。「相同性パーセント」とは、比較された分子におけるアミノ酸間またはヌクレオチド間の同一残基のパーセントを意味し、比較されている分子の中で最も小さな分子のサイズに基づいて計算される。これらの計算のためには、整列におけるギャップを（仮にあれば）、特定の数学モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって対処しなければならない。整列された核酸またはポリペプチドの同一性を計算するために使用することができる方法としては、Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; and Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073に記載される方法が挙げられる。例えば、配列同一性は、２つのポリペプチドのアミノ酸の位置における類似性を比較するために一般的に使用される、標準的な方法で決定することができる。ＢＬＡＳＴまたはＦＡＳＴＡ等のコンピュータプログラムを用いて、２つのポリペプチドまたは２つのポリヌクレオチド配列が、（一方もしくは両方の配列の全長に沿って、または一方もしくは両方の配列の所定の部分に沿って）それらの各残基が最適にマッチングするように、整列される。それらのプログラムは、初期設定の開始ペナルティおよび初期設定のギャップペナルティを提供し、ＰＡＭ２５０（標準的なスコアリングマトリックス（scoring matrix);Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp. 3 (1978)を参照）等のスコアリングマトリックスを、それらのコンピュータプログラムと組み合わせて使用することができる。例えば、相同性は、そこで次のように計算できる。完全一致の総数に１００を乗じ、次に、一致した範囲内の長い方の配列の長さと、２つの配列を整列させるために長い方の方の配列に導入されたギャップの数の合計で除算される。相同性パーセントを計算する際、比較される配列は、配列間に最大の一致を与えるように整列される。

【００９４】

ＧＣＧプログラムパッケージは、相同性パーセントの決定に使用することができるコンピュータプログラムであり、このパッケージはＧＡＰを含む（Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group、ウィスコンシン大学、ウィスコンシン州マディソン）。コンピューターアルゴリズムＧＡＰは、配列相同性パーセントが決定されるべき２つのポリペプチドまたは２つのポリヌクレオチドを整列するのに使用される。配列は、それらの各アミノ酸またはヌクレオチドが最適マッチングするように、整列される（アルゴリズムによって決定される「一致範囲」）。ギャップ開始ペナルティ（３×平均対角（average diagonal）として算出され、ここで「平均対角」は、使用されている比較マトリックスの対角の平均である；「対角（diagonal）」は、特定の比

較マトリックスによって各々の完全アミノ酸一致に割り当てられるスコアまたは数値である）およびギャップ伸長ペナルティー（通常、０．１×ギャップ開始ペナルティーである）、ならびにＰＡＭ２５０またはＢＬＯＳＵＭ６２などの比較マトリックスが、前記アルゴリズムと組み合わせて用いられる。ある実施形態では、標準的な比較マトリックス（PAM 250比較マトリックスについてはDayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352;BLOSUM 62比較マトリックスについては、Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919を参照）がまた、このアルゴリズムによって用いられる。

【００９５】

ＧＡＰプログラムを用いてポリペプチドまたはヌクレオチド配列の相同性パーセントを決定するための推奨パラメータには、以下が含まれる。

【００９６】

アルゴリズム：Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453；

【００９７】

比較マトリックス：上記Henikoff et al., 1992からのBLOSUM 62；

【００９８】

ギャップペナルティ：１２（ただし末端ギャップにはペナルティ無し）

【００９９】

ギャップ長ペナルティ：４

【０１００】

類似性の閾値：０

【０１０１】

２つのアミノ酸配列を整列するためのある整列スキームによって、２つの配列の短い領域だけの一致を得られる場合があり、２つの完全長配列の間に有意な関連性がないにしても、この短いアライメントされた領域は、非常に高い配列同一性を有し得る。従って、選択されたアラインメント法（ＧＡＰプログラム）は、標的ポリペプチドの少なくとも５０の隣接アミノ酸に渡るアラインメントが得られるように、所望であれば、調整することができる。

【０１０２】

「修飾」という用語は、本発明の、抗体および抗体フラグメントを含む免疫グロブリンとの関連で使用される場合、一つまたは複数のアミノ酸変化（置換、挿入または欠失を含む）；化学修飾；治療薬または診断用薬への結合による共有結合修飾；標識（例えば、放射性核種または種々の酵素による）；ＰＥＧ化等の共有結合性ポリマー結合（ポリエチレングリコールによる誘導体化）および化学合成による非天然アミノ酸の挿入または置換を含むが、これらに限定はされない。本発明の修飾免疫グロブリンは、本発明の無修飾の分子の結合（または非結合）特性を保持する。

【０１０３】

「誘導体」という用語は、本発明の免疫グロブリン（抗体および抗体フラグメントを含む）との関連で使用される場合、治療薬または診断用薬への結合、標識（例えば、放射性核種または種々の酵素による）、ＰＥＧ化等の共有結合性ポリマー結合（ポリエチレングリコールによる誘導体化）および化学合成による非天然アミノ酸の挿入または置換によって共有結合的に修飾された免疫グロブリンを表す。本発明の誘導体は、本発明の誘導体化されていない分子の結合特性を保持する。

【０１０４】

免疫グロブリンの実施形態

【０１０５】

完全長の免疫グロブリン軽鎖および重鎖では、可変領域および定常領域は約１２個またはそれ以上のアミノ酸から成る「Ｊ」領域によって連結されており、重鎖には約１０個またはそれ以上のアミノ酸から成る「Ｄ」領域も含まれる。例えば、Fundamental Immunology, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press（あ

らゆる目的で、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）を参照。各軽鎖／重鎖対の可変領域は、通常は抗原結合部位を形成する。

【０１０６】

ヒトＩｇＧ２重鎖（ＨＣ）定常領域の一例は、以下のアミノ酸配列を有する：

【０１０７】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGT
QTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK／／配列番号８６。

【０１０８】

ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４免疫グロブリンアイソタイプを所望であれば有する本発明の免疫グロブリンの組換え体を作成するための、他のＩｇＧアイソタイプの定常領域配列が、当該技術分野において周知である。一般的に、ヒトＩｇＧ２はエフェクター機能が所望されない標的に用いることができ、ヒトＩｇＧ１は、そのようなエフェクター機能（例えば、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ））が所望される状況で用いることができる。ヒトＩｇＧ３は比較的短い半減期を有し、ヒトＩｇＧ４は抗体「半分子（half-molecule）」を形成する。ヒトＩｇＧ１は、４種のアロタイプが知られている。好ましいアロタイプは「ｈＩｇＧ１ｚ」と称され、「ＫＥＥＭ」アロタイプとしても知られている。ヒトＩｇＧ１アロタイプ「ｈＩｇＧ１ｚａ」（ＫＤＥＬ）、「ｈＩｇＧ１ｆ」（ＲＥＥＭ）、および「ｈＩｇＧ１ｆａ」も有用であり；その全てがＡＤＣＣエフェクター機能を有すると思われる。

【０１０９】

ヒトｈＩｇＧ１ｚ重鎖（ＨＣ）定常領域は、以下のアミノ酸配列を有する：

【０１１０】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK／／配列番号８７。

【０１１１】

ヒトｈＩｇＧ１ｚａ重鎖（ＨＣ）定常領域は、以下のアミノ酸配列を有する：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK／／配列番号８８。

【０１１２】

ヒトｈＩｇＧ１ｆ重鎖（ＨＣ）定常領域は、以下のアミノ酸配列を有する：

【０１１３】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK//配列番号１２７。

【０１１４】

ヒトｈＩｇＧ１ｆａ重鎖（ＨＣ）定常領域は、以下のアミノ酸配列を有する：

【０１１５】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK//配列番号９０。

【０１１６】

ヒト免疫グロブリン軽鎖（ＬＣ）定常領域の配列の一例は、以下のものである（「ＣＬ－１」と命名）：

【０１１７】

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ
WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS//配列番号９１。

【０１１８】

ＣＬ－１は抗体のｐＩを増加させるのに有用であり、好都合である。「ＣＬ－２」、「ＣＬ－３」および「ＣＬ－７」と命名された、３種のヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域が他に存在し、それらも本発明の範囲内で使用することができる。ＣＬ－２およびＣＬ－３は、ヒト個体群により多くみられる。

【０１１９】

ＣＬ－２ヒト軽鎖（ＬＣ）定常領域は、以下のアミノ酸配列を有する：
Gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvclisdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylsltpeqwk
shrsyscqvthegstvektvaptecs／／配列番号９２。

【０１２０】

ＣＬ－３ヒトＬＣ定常領域は、以下のアミノ酸配列を有する：
gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvclisdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylsltpeqwk
shksyscqvthegstvektvaptecs／／配列番号９３。

【０１２１】

ＣＬ－７ヒトＬＣ定常領域は、以下のアミノ酸配列を有する：

【０１２２】

Gqpkaapsvtlfppsseelqankatlvclvsdfypgavtvawkadgspvkvgvettkpskqsnnkyaassylsltpeq
wkshrsyscrvthegstvektvapaecs／／配列番号９４。

【０１２３】

ヒトＬＣκ定常領域は、以下のアミノ酸配列を有する：

【０１２４】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC／／配列番号１２９。

【０１２５】

免疫グロブリン鎖の可変領域は、通常、同じ全体構造を示し、３つの超可変領域によって連結された比較的保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）を含み、これらの超可変領域は、「相補性決定領域」またはＣＤＲと称されることがより多い。上述の各重鎖／軽鎖対の２本の鎖のＣＤＲは、通常、フレームワーク領域によって整列されて、標的（例えば、ヒトＩＬ－１７ＲまたはヒトＴＲ２）の特定のエピトープまたはドメインと特異的に結合する構造を形成するが、本発明の範囲内において、元のＣＤＲ配列は、ヒトＩＬ－１７ＲまたはＴＲ２標的に有意に結合しないように、意図的に修飾されている。Ｎ末端からＣ末端まで、天然の軽鎖および重鎖可変領域は両方、典型的には、以下のエレメントの順序に従う：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３およびＦＲ４。これらの各ドメインの位置を占めるアミノ酸に番号を割り当てるために、付番方式が考案された。この付番方式は、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest（１９８７年および１９９１年、ＮＩＨ、メリーランド州ベセスダ）、またはChothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342:878-883で規定されている。

【０１２６】

提供される抗体のいくつかの完全長軽鎖および重鎖並びにそれらの対応するアミノ酸配列の具体例が、以下の表１Ａおよび表１Ｂで要約されている。表１Ａは例示的な軽鎖配列

を示す。表１Ｂは例示的な重鎖配列を示し、そのいくつかは定常領域ヒトＩｇＧ２（配列番号８６）を含み、そのいくつかは定常領域ヒトＩｇＧ１ｆ（配列番号１２７）を含む。しかし、本発明に包含されるのは、表１Ａおよび／または表１Ｂ（例えばＩｇＧ４対ＩｇＧ２、ＣＬ２対ＣＬ１）に列挙されるもののうち、定常領域またはフレームワーク領域に配列変化がある免疫グロブリンである。また、表１Ａおよび表１Ｂ中の全配列のシグナルペプチド（ＳＰ）配列には、例えば、以下が含まれる：VK-1　SPシグナルペプチド:MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC（配列番号１０３）、MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG（配列番号１０４）、MEWTWRVLFLVAAATGAHS（配列番号１０５）、METPAQLLFLLLLWLPDTTG（配列番号１０６）、

【０１２７】

MKHLWFFLLLVAAPRWVLS（配列番号１０７）、しかし、他のいかなる好適なシグナルペプチド配列も、本発明の範囲内で使用することができる。有用なシグナルペプチド配列の別の例は、VH21　SP　MEWSWVFLFFLSVTTGVHS（配列番号９５）である。他の例示的なシグナルペプチド配列は、表１Ａ～Ｂに示される。

【０１２８】

【表１】

表１Ａ.　免疫グロブリン軽鎖配列

シグナルペプチド配列は下線によって示される。

配列番号	名称	配列
１０９	16435 (LC: P66L、D90E)	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWFQQKPGQ APRLLIYDASTRATGVPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDNWPLTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
１１０	16435 (LC: P66L、D90E)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWFQQKPGQAPRLLIYDASTRATGVPARF SGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDNWPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
１２１	16444 (LC: P66L、D90E、W114A)	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWFQQKPGQ APRLLIYDASTRATGVPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDNAPLTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
１２２	16444 (LC: P66L、D90E、W114A)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWFQQKPGQAPRLLIYDASTRATGVPARF SGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDNAPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
９７	4241 (LC:Y53A)	METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSALAWYQQKPG QAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
９８	4241 (LC:Y53A)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSALAWYQQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
１１５	4341 (LC:Y53E)	METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSELAWYQQKPG QAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
１１６	4341 (LC:Y53E)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSELAWYQQKPGQAPSLLIYGASSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０１２９】

【表２】

表１Ｂ．　免疫グロブリン重鎖配列
シグナルペプチド配列は下線で示される。

配列番号	名称	配列
１１２	16435 (HC:R118A)	MEWTWRVLFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYGISWVRQAPG QGLEWMGWISTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARAQLYF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPC PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
１１３	16435 (HC:R118A)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYSGNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARAQLYFDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
１２４	16444 (HC:　R118A、　L120Q)	MEWTWRVLFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYGISWVRQAPG QGLEWMGWISTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARAQQYF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPC PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
１２５	16444 (HC:　R118A、　L120Q)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYSGNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARAQQYFDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
１００	4241 (HC:	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWIRQL PGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGG

	Y125E)	DYEYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
１０１	4241 (HC:Y125E)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWIRQLPGKGLEWIGHIIINSGTTYY NPSLKSRVTISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYEYGMDVWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
１１８	4341 (HC:Y125A)	MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWIRQL PGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGG DYAYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
１１９	4341 (HC:Y125A)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWIRQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYY NPSLKSRVTISVDTSKKQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYAYGMDVWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０１３０】

抗体または抗体フラグメントを含む、単離された免疫グロブリンのいくつかの有用な実施形態は、以下を含む：

【０１３１】

（ａ）配列番号１１３のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号１１０のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または

【０１３２】

（ｂ）配列番号１２５のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号１２２のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または

【０１３３】

（ｃ）配列番号１０１のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個の

アミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号９８のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または

【０１３４】

（ｄ）配列番号１１９のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号１１６のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖。

【０１３５】

いくつかの場合、そのような抗体は少なくとも１つの重鎖および１つの軽鎖を含むが、他の場合では、変異型は２つの同一の軽鎖および２つの同一の重鎖を含有する。重鎖および／または軽鎖が、例えば、翻訳後修飾によって、表１Ａおよび表１Ｂに記載された重鎖および軽鎖のうちのいずれか１つに対して、Ｎ末端またはＣ末端またはその両方から、１，２，３，４または５個のアミノ酸残基が欠失されていてもよいことは、本発明の範囲内である。例えば、ＣＨＯ細胞は通常、Ｃ末端のリジンを切断除去（cleave off）する。本明細書に記載されるような、薬理活性を有するポリペプチド等の一つまたは複数の薬理活性を有する化学的部分との結合を含む特定の実施形態は、図１Ｆ～１Ｎ（表２Ｄも参照）に模式的に示されるような、一価のヘテロ二量体、ヘテロ三量体、またはヘテロ四量体等のヘテロ多量体を含み得る。

【０１３６】

免疫グロブリン、例えば、抗体の可変ドメイン

【０１３７】

本明細書で提供される種々の重鎖および軽鎖可変領域は、表２Ａ～Ｂに示される。これらの可変領域はそれぞれ、上記重鎖および軽鎖定常領域に結合して、それぞれ完全な抗体重鎖および抗体軽鎖を形成することができる。さらに、そのように生成された重鎖および軽鎖配列のそれぞれは、組み合わされて、完全な抗体構造を形成する。本明細書で提供される重鎖および軽鎖可変領域が、上記の例示的な配列と異なる配列を有する他の定常領域にも結合できることは理解されるべきである。

【０１３８】

下記の表２Ａに示されるような、V_L2、V_L3、V_L4、およびV_L5から選択される少なくとも１つの免疫グロブリン軽鎖可変領域、並びに下記の表２Ｂに示されるような、V_H2、V_H3、V_H4、V_H5、V_H6、V_H7、V_H8、V_H9、V_H10、およびV_H11から選択される少なくとも１つの免疫グロブリン重鎖可変領域を含有する、もしくは含む、抗体または抗体フラグメントを含む免疫グロブリン、並びにこれらの軽鎖および重鎖可変領域の免疫学的に機能的なフラグメント、誘導体、変異タンパク質および変異体も提供される。そのような実施形態の例は、下記の表２Ｃおよび表２Ｄに記載される。

【０１３９】

下記の表２Ａに示されるような、V_L7、V_L8、V_L9、V_L10、V_L11、V_L12、V_L13、V_L14、V_L15およびV_L16から選択される少なくとも１つの免疫グロブリン軽鎖可変領域、並びに下記の表２Ｂに示されるような、V_H13、V_H14、V_H15、V_H16、V_H17、V_H18、V_H19、V_H20、V_H21、V_H22、V_H23、V_H24、V_H25、V_H26、V_H27、V_H28、V_H29、V_H30、V_H31、V_H32、V_H33、V_H34、V_H35およびV_H36から選択される少なくとも１つの免疫グロブリン重鎖可変領域を含有する、もしくは含む、抗体または抗体フラグメントを含む免疫グロブリン、並びにこれらの軽鎖および重鎖可変領域の免疫学的に機能的なフラグメント、誘導体、変異タンパク質および変異体も提供される。そのような実施形態の例は、下記の表２Ｃおよび表２Ｄに記載される。

【０１４０】
本発明の免疫グロブリンの実施形態例としては、以下のようなものが挙げられる：
【０１４１】
該重鎖可変領域が配列番号３２３［ＶＨ１０］のアミノ酸配列を含み；該軽鎖可変領域が配列番号１８８［ＶＬ４］のアミノ酸配列を含む；または
【０１４２】
該軽鎖可変領域が配列番号１９６［ＶＬ８］のアミノ酸配列を含み；該重鎖可変領域が配列番号３５３［ＶＨ２５］のアミノ酸配列を含む；または
【０１４３】
該軽鎖可変領域が配列番号２０２［ＶＬ１１］のアミノ酸配列を含み；該重鎖可変領域が配列番号３４９［ＶＨ２３］のアミノ酸配列を含む；または
【０１４４】
該重鎖可変領域が配列番号３２５［ＶＨ１１］のアミノ酸配列を含み；該軽鎖可変領域が配列番号１９０［ＶＬ５］のアミノ酸配列を含む、免疫グロブリン。
【０１４５】
このタイプの免疫グロブリンは、一般的に式「V_Hｘ／V_Lｙ」によって命名することができ、式中、「ｘ」は免疫グロブリンに含まれる重鎖可変領域の数に該当し、「ｙ」は免疫グロブリンに含まれる軽鎖可変領域の数に該当する（一般的に、ｘおよびｙはそれぞれ１または２である）。
【０１４６】

【表３】

表２Ａ．　V_L鎖の例
任意のＮ末端のシグナル配列については示されていないが、V_Lの任意の「種類（description）」に反映されている場合がある。

名称	種類（Description）	配列番号	アミノ酸配列
VL１	抗IL-１７R 野生型　(WT)	１８２	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWFQQK PGQAPRPLIYDASTRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQ SEDFAVYYCQQYDNWPLTFGGGTKVEIK
VL２	Ｗ１１４Ａ	１８４	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWFQQK PGQAPRPLIYDASTRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQ SEDFAVYYCQQYDNAPLTFGGGTKVEIK
VL３	Ｙ１１１Ａ	１８６	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWFQQK PGQAPRPLIYDASTRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQ SEDFAVYYCQQADNWPLTFGGGTKVEIK
VL４	Ｐ６６Ｌ、　Ｄ９０Ｅ	１８８	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWFQQK PGQAPRLLIYDASTRATGVPARFSGSGSGTEFTLTISSLQ SEDFAVYYCQQYDNWPLTFGGGTKVEIK
VL５	Ｐ６６Ｌ、　Ｄ９０Ｅ、　Ｗ１１４Ａ	１９０	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWFQQK PGQAPRLLIYDASTRATGVPARFSGSGSGTEFTLTISSLQ SEDFAVYYCQQYDNAPLTFGGGTKVEIK
VL６	抗huTR２　野生型　(WT)	１９２	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQ KPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIK
VL７	Ｆ１１２Ａ	１９４	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQ KPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQAGSSPWTFGQGTKVEIK
VL８	Ｙ５３Ａ	１９６	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSALAWYQQ KPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIK
VL９	Ｗ１１７Ａ	１９８	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQ KPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQFGSSPATFGQGTKVEIK
VL１０	Ｆ１１２Ｙ	２００	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQ KPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
VL１１	Ｙ５３Ｅ	２０２	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSELAWYQQ KPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIK
VL１２	Ｙ５３Ｒ	２０４	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSRLAWYQQ KPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIK
VL１３	Ｆ１１２Ｅ	２０６	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQ KPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQEGSSPWTFGQGTKVEIK

VL14	F112R	208	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSYLAWYQQ KPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQRGSSPWTFGQGTKVEIK
VL15	Y53A、 F112A	210	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGISRSALAWYQQ KPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQAGSSPWTFGQGTKVEIK
VL16	G48S、 I49V、 R51S	212	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPSLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQQFGSSPWTFGQGTKVEIK

【0147】

【表４】

表２Ｂ．　V_H鎖の例
任意のＮ末端のシグナル配列については示されていないが、V_Hの任意の「種類」に反映されている場合がある。

名称	種類	配列番号	アミノ酸配列
VH１	抗IL-１７R野生型　（WT）	３０５	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRQLYFDYWGQGTLVTVSS
VH２	Ｙ１２４Ａ	３０７	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRQLYFDAWGQGTLVTVSS
VH３	Ｆ１２２Ａ	３０９	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRQLYADYWGQGTLVTVSS
VH４	Ｙ１２１Ａ	３１１	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRQLAFDYWGQGTLVTVSS
VH５	Ｙ７９Ａ	３１３	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYSGNTNAAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRQLYFDYWGQGTLVTVSS
VH６	Ｙ７３Ａ	３１５	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTASGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRQLYFDYWGQGTLVTVSS
VH７	Ｗ６９Ａ	３１７	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYGISWVRQAPGQGLEWMGAISTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRQLYFDYWGQGTLVTVSS
VH８	Ｙ５１Ａ	３１９	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRAGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRQLYFDYWGQGTLVTVSS
VII９	Ｌ１２０Ｑ	３２１	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRQQYFDYWGQGTLVTVSS
VH１０	Ｒ１１８Ａ	３２３	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARAQLYFDYWGQGTLVTVSS
VH１１	Ｒ１１８Ａ、Ｌ１２０Ｑ	３２５	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARAQQYFDYWGQGTLVTVSS

VH１２	抗huTR２　野生型　(WT)	３２７	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
VH１３	D１２３A	３２９	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGAYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
VII１４	Y１２４A	３３１	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDAYYGMDVWGQ GTTVTVSS
VH１５	Y５３A	３３３	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDAFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
VH１６	F５４A	３３５	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYAWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
VH１７	F５４E	３３７	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYEWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
VH１８	F５４Y	３３９	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
VH１９	F５４R	３４１	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYRWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
VH２０	W５５A	３４３	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFASWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
VH２１	Y７９A	３４５	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTAYNPSLKSRVTISVDTSKK QFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQG TTVTVSS
VH２２	Y８０A	３４７	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYANPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
VH２３	Y１２５A	３４９	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYAYGMDVWGQ GTTVTVSS

VH２４	Ｙ１２６Ａ	３５１	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYAGMDVWGQ GTTVTVSS
VH２５	Ｙ１２５Ｅ	３５３	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYEYGMDVWGQ GTTVTVSS
VH２６	Ｙ１２５Ｒ	３５５	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYRYGMDVWGQ GTTVTVSS
VH２７	Ｆ５４Ａ、Ｙ１２５Ａ	３５７	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYAWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYAYGMDVWGQ GTTVTVSS
VH２８	Ｆ５４Ａ、Ｙ１２６Ａ	３５９	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYAWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYAGMDVWGQ GTTVTVSS
VH２９	Ｙ１２６Ｅ	３６１	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYEGMDVWGQ GTTVTVSS
VH３０	Ｙ１２６Ｒ	３６３	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYRGMDVWGQ GTTVTVSS
VH３１	Ｆ５４Ａ、Ｙ１２５Ａ、Ｙ１２６Ａ	３６５	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYAWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYAAGMDVWGQ GTTVTVSS
VII３２	Ｄ１２３Ａ、Ｙ１２４Ａ	３６７	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGAAYYGMDVWGQ GTTVTVSS
VH３３	Ｙ１２５Ａ、Ｙ１２６Ａ	３６９	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYAAGMDVWGQ GTTVTVSS
VH３４	Ｙ１２４Ａ、Ｙ１２５Ａ、Ｙ１２６Ａ	３７１	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDAAAGMDVWGQ GTTVTVSS
VH３５	Ｈ７１Ｙ、Ｈ７３Ｙ、Ｎ７４Ｙ、Ｔ７７Ｓ	３７３	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGYIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKK QFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYYYGMDVWGQG TTVTVSS

VH３６	Ｒ１２０Ｙ、Ｇ１２２Ｄ、Ｄ１２５Ｙ	３７５	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSK KQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDYGDYYYYYYGMDVW GQGTTVTVSS

【０１４８】
【表５】

表２Ｃ．　上記表２Ａおよび２Ｂに開示される、表示のV_LおよびV_{II}を含有する免疫グロブリン（またはその多量体）の実施形態。
ここに加えて列挙される、抗体１６４２９および１６４４９は、それぞれヒトＩＬ－１７ＲおよびＴＲ２に対する正の対照抗体である。

抗体　＃	V_L	V_H
１８６９	VL６	VII１３
１８７０	VL６	VH１４
１９１０	VL７	VH１２
１９１１	VL９	VH１２
１９１２	VL６	VH１５
１９１３	VL６	VH１６
１９１４	VL６	VH２０
１９１５	VL６	VH２１
１９１６	VL６	VH２２
１９１９	VL６	VH２３
１９２０	VL６	VH２４
１９２１	VL６	VH３２
１９２２	VL６	VH３４
１９６１	VL８	VH１６
１９６２	VL８	VH２３
１９６３	VL８	VH２４
１９６４	VL７	VH２４
１９６５	VL７	VH２３
１９６６	VL７	VH１６
２２８１	VL１６	VH１２
２３０１	VL１０	VH１２
２３０２	VL１５	VH１２
２３０３	VL１１	VH１２
２３０４	VL１２	VH１２
２３０５	VL１３	VH１２
２３０６	VL１４	VH１２
２３０７	VL６	VH１８
２３２１	VL６	VH３５
２３２２	VL６	VH３６
２３２３	VL６	VH２７
２３２４	VL６	VH２８
２３２５	VL６	VH１９
２３２６	VL６	VH２５
２３２７	VL６	VH２６
２３２８	VL６	VH２９
２３２９	VL６	VH３０
２３３０	VL６	VH３３
２３３１	VL６	VH３１
２３３２	VL６	VH１７
４２４１	VL８	VH２５

４３４１	VL１１	VH２３
１０１８２	VL８	VH２６
１０１８３	VL１２	VH２３
１０１８４	VL１２	VH２６
１０１８５	VL１１	VH２５
１０１８６	VL７	VH２８
１０１８７	VL７	VH２７
１０１８８	VL８	VH２８
１０１８９	VL８	VH２７
１０１９０	VL１５	VH２４
１０１９１	VL１５	VH２３
１０１９２	VL１５	VH１６
１６４２９	VL１	VH１
１６４３０	VL４	VH１
１６４３３	VL５	VH１
１６４３４	VL１	VH１０
１６４３５	VL４	VH１０
１６４３６	VL５	VH１０
１６４３７	VL１	VH９
１６４３８	VL４	VH９
１６４３９	VL５	VH９
１６４４０	VL１	VH１１
１６４４１	VL４	VH１１
１６４４４	VL５	VH１１
１６４４９	VL６	VH１２
１６６１３	VL８	VH１２
１６６２９	VL３	VH１
１６６３０	VL２	VH１
１６６３１	VL１	VH８
１６６３２	VL１	VH７
１６６３３	VL１	VH６
１６６３４	VL１	VH５
１６６３５	VL１	VH４
１６６３６	VL１	VH３
１６６３７	VL１	VH２

【０１４９】

【表６】

表２D.　上記の表２Ａおよび２Ｂに開示されるような、表示のV_LおよびV_Hを含有するキャリアー抗体（carrier　antibody）（またはその多量体）、並びに本明細書の実施例５～６により詳細に記載される融合パートナーの実施形態。

抗体　#	V_L	V_H	融合パートナー
３７４２	VL１	VH１	ShK（1-３５、　Q１６K）
１０１６２	VL４	VH１０	FGF２１
１０１６３	VL１１	VH２３	FGF２１
１０１６４	VL１１	VH２３	ShK（1-３５、　Q１６K）

【０１５０】

一部の実施形態では、免疫グロブリン（抗体および抗体フラグメントを含む）は、単独であっても他の治療薬との併用であっても、所望の効果を達成するために使用することができる治療用分子として、有用であり得る。そのような実施形態では、本発明の免疫グロ

ブリン（抗体および抗体フラグメントを含む）は、小分子であってもポリペプチドであってもよい、１～２４個の、１～１６個の、１～８個の、または１～４個の、薬理活性を有する化学的部分を結合してさらに含む。薬理活性を有する小分子またはポリペプチドである化学的部分は、免疫グロブリン単量体（例えば、ＬＣまたはＨＣ単量体）のＮ末端もしくはＣ末端の残基において、当該技術分野において周知であり本明細書にさらに記載されている化学反応で、またはそれらを介して、結合することができる。あるいは、本発明の免疫グロブリンの主鎖内に含まれるアミノ酸残基の一つまたは複数の側鎖上の官能基における、またはそれを介した、薬理活性を有する化学的一部分、または複数部分の結合が、本発明に包含される。有用な方法および免疫グロブリン鎖内の内部結合部位（例えば、特定のシステイン残基）は、当該技術分野において周知である（例えば、Gegg et al., Modified Fc Molecules、国際公開第２００７／０２２０７０号および米国特許出願公開第２００７０２６９３６９号で公開、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）。

【０１５１】

薬理活性を有する化学的部分がポリペプチドである本発明の他の実施形態では、組換え融合タンパク質は、薬理活性を有するポリペプチドが、Ｎ末端および／またはＣ末端にではなく、免疫グロブリン重鎖のＦｃドメインの内部ループ内で、免疫グロブリン重鎖の一次アミノ酸配列に挿入されることで生成することができ、本明細書の実施例および当該技術分野（例えば、Gegg et al.、米国特許第７，４４２，７７８号；米国特許第７，６５５，７６５号；米国特許第７，６５５，７６４号；米国特許第７，６６２，９３１号；米国特許第７，６４５，８６１号；米国特許出願公開第２００９／０２８１２８６号；および第２００９／０２８６９６４号、これらはそれぞれ、それらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる）においてさらに記載される。

【０１５２】

「結合した」とは、少なくとも２つの化学的部分が、直接的に、または所望により、自身が該部分の両方に共有結合的に連結するペプチジルもしくは非ペプチジルリンカー部分を介して、互いに共有結合的に連結、または結合していることを意味する。例えば、共有結合は、ペプチドまたはタンパク質のアミノ酸残基を介したもの、例えば、αアミノ基、αカルボキシル基を介したもの、または側鎖を介したものであり得る。共有結合が達成される方法、例えば、「結合」が化学合成的な手段によるもの、または融合タンパク質において融合された（すなわち、結合した）パートナーの組換え発現によるもののどちらであるかは、重要ではない。

【０１５３】

上述のように、本発明のいくつかの実施形態の組成物は、薬理学的に不活性な本発明の免疫グロブリンに結合した少なくとも１つの薬理活性を有するポリペプチド部分を含み、例えば、薬理学的に不活性な本発明の免疫グロブリンに結合した薬理活性を有するポリペプチド部分の組換え融合タンパク質を構成している。「薬理活性を有する」という用語は、そのように記載されている物質が、あるとすれば物質の単なる免疫原性は除いて、医学的パラメータ（例えば、血圧、血液細胞数、コレステロールレベル、痛覚）または病状（例えば、がん、自己免疫障害、慢性疼痛）に影響を及ぼす活性を有することが判定されていることを意味する。反対に、「薬理学的に不活性な」という用語は、仮にあったとしても物質の単なる免疫原性は除いて、医学的パラメータまたは病状に影響を及ぼす活性が、その物質について判定できないことを意味する。従って、薬理活性を有するペプチドまたはタンパク質は、以下に定義されるような作動薬または摸倣薬および拮抗薬として働くペプチドを含む。本発明は、約５～約８０のアミノ酸残基長に渡るアミノ酸配列を有し、組換え発現に適している、いかなる薬理活性を有するタンパク質の使用をも包含する。本発明のいくつかの有用な実施形態では、薬理活性を有するタンパク質は、必須の生物活性が維持される限り、アミノ酸の付加もしくは挿入、アミノ酸欠失、ペプチド切断、アミノ酸置換、またはアミノ酸残基の化学誘導体化（既知の化学的手法によって達成される）を含む一つまたは複数の方法で、目的の天然配列に対して、修飾される。

【０１５４】
「－模倣体ペプチド」、「ペプチド模倣薬」、および「－作動薬ペプチド」という用語は、目的の天然タンパク質、例えば、限定はされないが、トキシンペプチド分子、例えば、ＳｈＫもしくはＯＳＫ１トキシンペプチド、またはそのペプチド類似体と同等の生物活性を有するペプチドまたはタンパク質を表す。これらの用語には、天然分子の効果を高める等により、天然ペプチド分子の活性を間接的に模倣するペプチドがさらに含まれる。
【０１５５】
「－拮抗薬ペプチド」、「ペプチド拮抗薬」、および「阻害剤ペプチド」という用語は、目的の受容体の生物活性を遮断する、もしくは何らかの方法で干渉する、または、目的の受容体（限定はされないが、イオンチャネルまたはＧタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）等）の既知の拮抗薬もしくは阻害剤と同等の生物活性を有するペプチドを表す。
【０１５６】
本発明内で使用することができる薬理活性を有するタンパク質の例としては、トキシンペプチド（例えば、ＯＳＫ１またはＯＳＫ１ペプチド類似体；ＳｈＫまたはＳｈＫペプチド類似体）、ＩＬ－６結合ペプチド、ＣＧＲＰペプチド拮抗薬、ブラジキニンＢ１受容体ペプチド拮抗薬、副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）作動薬ペプチド、副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）拮抗薬ペプチド、ａｎｇ－１結合ペプチド、ａｎｇ－２結合ペプチド、ミオスタチン結合ペプチド、エリスロポエチン摸倣体（ＥＰＯ摸倣体）ペプチド、ＦＧＦ２１ペプチド、トロンボポエチン摸倣体（ＴＰＯ摸倣体）ペプチド（例えば、ＡＭＰ２またはＡＭＰ５）、神経成長因子（ＮＧＦ）結合ペプチド、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）結合ペプチド、グルカゴン様ペプチド（ＧＬＰ）－１もしくはそのペプチド模倣薬またはＧＬＰ－２もしくはそのペプチド模倣薬が挙げられるが、これらに限定はされない。グルカゴン様ペプチド１（ＧＬＰ－１）および関連ペプチドグルカゴンは、プログルカゴンの異なるプロセシングを介して生成され、対立する生物活性を有する。プログルカゴンそれ自体は、膵臓のα細胞において、および主に末端小腸および結腸に位置する腸内分泌Ｌ細胞において、産生される。膵臓において、グルカゴンはプログルカゴンから選択的に開裂される。腸においては、対照的に、プログルカゴンはプロセシングを受けてＧＬＰ－１およびグルカゴン様ペプチド２（ＧＬＰ－２）を形成し、それぞれはプログルカゴンのアミノ酸残基の７８～１０７番目および１２６～１５８番目に対応している（例えば、Irwin and Wong, 1995, Mol. Endocrinol. 9:267-277およびBell et al., 1983, Nature 304:368-371を参照）。慣例により、ＧＬＰ－１のアミノ酸の番号付けは、プログルカゴンの開裂から生成されたＧＬＰ－１（１～３７）に基づくものとなる。生物活性を有する形態は、このペプチドのさらなるプロセシングから生成され、これにより、ある番号付けの慣例で、ＧＬＰ－１（７～３７）－ＯＨおよびＧＬＰ－１（７～３６）－NH_2がもたらされる。ＧＬＰ－１（７～３７）－ＯＨ（または単にＧＬＰ－１（７～３７））およびＧＬＰ－１（７～３６）－NH_2の両方は、同じ活性を有している。便宜上、「ＧＬＰ－１」という用語は、これらの形態の両方を表すのに用いられる。これらのプロセシングを受けたペプチドの最初のアミノ酸は、この番号付け慣例では、Ｈｉｓ７である。しかし、当該技術分野において認められている別の番号付け慣例では、プロセシングを受けたペプチドの番号付けが、位置７としてのＨｉｓからではなく、位置１としてのＨｉｓから開始されると仮定される。従って、この番号付けスキームでは、ＧＬＰ－１（１～３１）はＧＬＰ－１（７～３７）と同一であり、ＧＬＰ－１（１～３０）はＧＬＰ－１（７～３６）と同一である。ＧＬＰ－１模倣体のポリペプチド配列の例としては、以下が含まれる：
HGEGTFTSDQSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG//（配列番号２９０）；
HGEGTFTSDQSSYLEGQAAKEFIAWLQKGRG//（配列番号２９１）；
HGEGTFTSDVSSYQEGQAAKEFIAWLVKGRG//（配列番号２９２）；
HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAQLVKGRG//（配列番号２９３）；
HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAQLQKGRG//（配列番号２９４）；
HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLQKGRG//（配列番号２９５）；
HNETTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG//（配列番号２９６）

HGEGTFTSDVSSYLENQTAKEFIAWLVKGRG//（配列番号２９７）；
HGEGTFTSDVSSYLEGNATKEFIAWLVKGRG//（配列番号２９８）；
HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVNGTG//（配列番号２９９）；
HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKNRT//（配列番号３００）；
HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRNGT//（配列番号３０１）；
HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGGTGNGT//（配列番号３０２）；および
【０１５７】
HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGGSGNGT//（配列番号３０３）。
【０１５８】
ヒトＧＬＰ－２およびＧＬＰ－２模倣類似体（mimetic analog）も、当該技術分野において周知である（例えば、Prasad et al., Glucagonlike peptide-2 analogue enhances intestinal mucosal mass after ischemia and reperfusion, J. Pediatr. Surg. 2000 Feb;35(2):357-59 (2000); Yusta et al., Glucagon-like peptide-2 receptor activation engages bad and glycogen synthase kinase-3 in a protein kinase A-dependent manner and prevents apoptosis following inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase, J. Biol. Chem. 277(28):24896-906 (2002)を参照）。
【０１５９】
「トキシンペプチド」には、毒液から単離することが可能な天然の薬理活性を有するペプチドまたはポリペプチドの、同一アミノ酸配列を有するペプチドおよびポリペプチドが含まれ、また、そのような天然分子の修飾ペプチド類似体も含まれる（例えば、Kalman et al., ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide, J. Biol. Chem. 273(49):32697-707 (1998); Kem et al.、米国特許第６，０７７，６８０号;Mouhat et al., OsK1 derivatives、国際公開第２００６／００２８５０Ａ２号; Chandy et al., Analogs of SHK toxin and their uses in selective inhibition of Kv1.3 potassium channels、国際公開第２００６／０４２１５１号; Sullivan et al., Toxin Peptide therapeutic agents、国際公開第２００６／１１６１５６Ａ２号を参照；これら全ては、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）。ヘビ、サソリ、クモ、ミツバチ、カタツムリおよびイソギンチャクは、強力且つ選択的にイオンチャネルおよび受容体を標的とする小分子生理活性トキシンペプチドまたは「トキシン」の豊富な源としての役割を果たす、毒液生産生物の数少ない例である。トキシンペプチドの一例は、Orthochirus scrobiculosusサソリ毒液から単離されたトキシンペプチドである、ＯＳＫ１（ＯｓＫ１としても知られている）である（例えば、Mouhat et al., K+ channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from Orthochirus scrobiculosus scorpion venom, Biochem. J. 385:95-104 (2005); Mouhat et al., Pharmacological profiling of Orthochirus scrobiculosus toxin 1 analogs with a trimmed N-terminal domain, Molec. Pharmacol. 69:354- 62 (2006); Mouhat et al., OsK1 derivatives、国際公開第２００６／００２８５０Ａ２号）。別の例は、イソギンチャクであるStichodactyla helianthusの毒液から単離されたＳｈＫである（例えば、Tudor et al., Ionisation behaviour and solution properties of the potassium-channel blocker ShK toxin, Eur. J. Biochem. 251(1-2):133-41(1998); Pennington et al., Role of disulfide bonds in the structure and potassium channel blocking activity of ShK toxin, Biochem. 38(44): 14549-58 (1999); Kem et al., ShK toxin compositions and methods of use、米国特許第６，０７７，６８０号;Lebrun et al., Neuropeptides originating in scorpion、米国特許第６，６８９，７４９号;Beeton et al., Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channnels for therapy of autoimmune diseases, Molec. Pharmacol. 67(4):1369-81 (2005)）。
【０１６０】

トキシンペプチドは、通常約２０～約８０のアミノ酸長であり、２～５個のジスルフィド結合を含有し、非常にコンパクトな構造を形成する。トキシンペプチド（例えば、サソリ、イソギンチャクおよびイモガイの毒液由来）が単離され、イオンチャネルに対するそれらの影響について特徴付けられている。そのようなペプチドは、作用強度および安定性という重大な問題に対処するのにとりわけよく適している、比較的少数の構造骨組（structural framework）から進化してきたように思われる。サソリおよびイモガイのトキシンペプチドの大多数は、例えば、１０～４０個のアミノ酸および最大５個のジスルフィド結合を含有しており、しばしばタンパク質分解に耐性を示す、極めてコンパクトで拘束された構造（ミクロタンパク質）を形成する。コノトキシンおよびサソリトキシンペプチドは、それらのジスルフィド結合およびペプチド折り畳みに基づいて、いくつかのスーパーファミリーに分類することができる。これらの多くの溶液構造が、ＮＭＲ分光分析法によって決定されており、それらのコンパクトな構造が明らかにされ、それらの系統的な折り畳みの保存が確かめられている（例えば、Tudor et al., Ionisation behaviour and solution properties of the potassium-channel blocker ShK toxin, Eur. J. Biochem. 251(1-2):133-41(1998); Pennington et al., Role of disulfide bonds in the structure and potassium channel blocking activity of ShK toxin, Biochem. 38(44): 14549-58 (1999); Jaravine et al., Three-dimensional structure of toxin OSK1 from Orthochirus scrobiculosus scorpion venom, Biochem. 36(6):1223-32 (1997); del Rio-Portillo et al.; NMR solution structure of Cn12, a novel peptide from the Mexican scorpion Centruroides noxius with a typical beta-toxin sequence but with alpha-like physiological activity, Eur. J. Biochem. 271(12): 2504-16 (2004); Prochnicka-Chalufour et al., Solution structure of discrepin, a new K+-channel blocking peptide from the alpha-KTx15 subfamily, Biochem. 45(6):1795-1804 (2006)）。本発明の実施が有用であり得る薬理活性を有するトキシンペプチドの例としては、ＳｈＫ、ＯＳＫ１、カリブドトキシン（ＣｈＴｘ）、カリオトキシン１（kaliotoxin 1, ＫＴＸ１）、もしくはマウロトキシン（maurotoxin）、または一つまたは複数のアミノ酸残基で天然配列から修飾された、それらいずれかのトキシンペプチド類似体が挙げられるが、これらに限定はされない。他の例は、当該技術分野において周知であるか、以下：Sullivan et al、国際公開第０６１１６１５６Ａ２号または米国特許公開第１１／４０６，４５４号（題名：Toxin Peptide Therapeutic Agents、ＵＳ２００７／００７１７６４として公開）；Mouhat et al., OsK1 derivatives、国際公開第２００６／００２８５０Ａ２号；Sullivan et al.、米国特許公開第１１／９７８，０７６号（題名：Conjugated Toxin Peptide Therapeutic Agents、２００７年１０月２５日出願、米国特許出願公開第２００９０２９１８８５号として２００９年１１月２６日公開）、Sullivan et al.、国際公開第２００８／０８８４２２号;Lebrun et al.、米国特許第６，６８９，７４９号、およびSullivan et al.、Selective and Potent Peptide Inhibitors of Kv1.3、２００９年３月２０日出願の米国仮特許出願第６１／２１０，５９４号に見出すことができ、それぞれは、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０１６１】

「ペプチド類似体」という用語は、少なくとも１つのアミノ酸残基の置換、少なくとも１つのアミノ酸の内部付加もしくは内部欠失、および／またはアミノ末端もしくはカルボキシ末端の切断、もしくは付加によって、天然に存在するペプチド配列と異なる配列を有するペプチドを表す。「内部欠失」とは、天然ではＮまたはＣ末端以外の位置に存在するアミノ酸が、配列に存在しないことを表す。同様に、「内部付加」とは、天然ではＮまたはＣ末端以外の位置に存在するアミノ酸が、配列中に存在することを表す。「トキシンペプチド類似体」とは、例えば、限定はされないが、ＯＳＫ１ペプチド類似体、ＳｈＫペプチド類似体、またはＣｈＴｘペプチド類似体等であり、目的の未変性トキシンペプチド配列に対する、目的の未変性トキシンペプチド配列の修飾（例えば、アミノ酸残基置換、内

部付加もしくは挿入、内部欠失、および／またはアミノ末端もしくはカルボキシ末端の切断、または上記のような付加）を含んでいる。

【０１６２】

「ＣＧＲＰペプチド拮抗薬」とは、ＣＧＲＰペプチド類似体等が挙げられるがこれらに限定はされないＣＧＲＰ$_1$受容体と選択的に結合し、生理条件の温度、ｐＨ、およびイオン強度の下で、完全長の未変性ヒトαＣＧＲＰまたはβＣＧＲＰによるＣＧＲＰ$_1$受容体の活性化を拮抗、遮断、減少、低減、妨害、または阻害する、ペプチドである。ＣＧＲＰペプチド拮抗薬には、完全拮抗薬および部分的拮抗薬が含まれる。そのような拮抗薬の活性は、既知のｉｎ ｖｉｔｒｏにおける方法またはｉｎ ｖｉｖｏにおける機能分析法によって検出することができる（例えば、Smith et al., Modifications to the N-terminus but not the C-terminus of calcitonin gene-related peptide(8-37) produce antagonists with increased affinity, J. Med. Chem., 46:2427-2435 (2003)を参照）。有用なＣＧＲＰペプチド拮抗薬の例は、Gegg et al., CGRP peptide antagonists and conjugates、国際公開第２００７／０４８０２６Ａ２号および米国仮特許出願第（U.S. Serial No.）１１／５８４，１７７号（２００６年１０月１９日出願、米国特許出願公開第ＵＳ２００８／００２０９７８Ａ１号として公開）に開示されており、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０１６３】

「副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）作動薬」および「ＰＴＨ作動薬」という用語は、完全長未変性ヒト副甲状腺ホルモンと同様に、ＰＴＨ－１またはＰＴＨ－２受容体に結合して、一つまたは複数のＰＴＨ活性アッセイパラメータを増加もしくは減少させる分子を表す。有用なＰＴＨ作動薬ペプチドの例は、Modulators of receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related proteinという表題の米国特許第６，７５６，４８０号の表１に開示されており、その全体は参照によって本明細書に組み込まれる。例示的なＰＴＨ活性アッセイは、米国特許第６，７５６，４８０号の実施例１に開示されている。

【０１６４】

「副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）拮抗薬」という用語は、ＰＴＨ－１またはＰＴＨ－２受容体に結合し、完全長未変性ヒト副甲状腺ホルモンによるこれらのパラメータに対する正常効果を遮断または防止する分子を表す。有用なＰＴＨ拮抗薬ペプチドの例は、米国特許第６，７５６，４８０号の表２に開示されており、その全体は参照によって本明細書に組み込まれる。例示的なＰＴＨ活性アッセイは、米国特許第６，７５６，４８０号の実施例２に記載されている。

【０１６５】

「ブラジキニンＢ１受容体拮抗薬ペプチド」および「ブラジキニンＢ１受容体ペプチド拮抗薬」という用語は、ヒトブラジキニンＢ１受容体（ｈＢ１）に対して拮抗薬活性を有するペプチドを意味する。有用なブラジキニンＢ１受容体拮抗薬ペプチドは、Ng et al., Antagonist of the bradykinin B1 receptor、米国特許出願公開第２００５／０２１５４７０Ａ１号（２００５年９月２９日に公開、米国特許第７，６０５，１２０号；米国特許第５，８３４，４３１号または第５，８４９，８６３号として発行）に記載されるように、同定または誘導することができる。例示的なＢ１受容体活性アッセイは、米国特許出願公開第２００５／０２１５４７０Ａ１号の実施例６～８に記載される。

【０１６６】

「トロンボポエチン（ＴＰＯ）模倣体ペプチド」および「ＴＰＯ模倣体ペプチド」という用語は、Cwirla et al. (1997), Science 276: 1696-9、米国特許第５，８６９，４５１号および第５，９３２，９４６号（全体が参照により組み込まれる）；２００３年９月１８日に公開された米国特許出願第２００３／０１７６３５２号（全体が参照により組み込まれる）；２００３年４月１７日に公開された国際公開第０３／０３１５８９号；２０００年５月４日に公開された国際公開第００／２４７７０号に記載されるように、特定または誘導することができるペプチド；並びに、米国特許出願公開第２００６／０１

４０９３４号（２００５年９月２３日に出願された米国仮特許出願第（U.S. Serial No.）１１／２３４，７３１号、表題Modified Fc Molecules、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）の表５に現れるあらゆるペプチドを表す。当業者であれば、これらの各参照により、異なるペプチドライブラリを用い、開示された手順に従うことによって、実際に開示されたものとは異なるペプチドを選択することが可能となることに気づくだろう。

【０１６７】

「ＥＰＯ模倣体ペプチド」および「エリスロポエチン模倣体ペプチド」という用語は、Wrighton et al. (1996), Science 273: 458-63およびNaranda et al. (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7569-74（これらは共に、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されるように、特定または誘導することができるペプチドを表す。有用なＥＰＯ模倣体ペプチドとしては、米国特許公開出願第２００７／０２６９３６９Ａ１号の表５および米国特許第６，６６０，８４３号（これらは共に、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）に列挙されたＥＰＯ模倣体ペプチドが挙げられる。

【０１６８】

「ａｎｇ－２結合ペプチド」という用語には、２００３年１２月１１日に公開された米国特許出願第２００３／０２２９０２３号；２００３年７月１７日に公開された国際公開第０３／０５７１３４号；２００３年１２月２５日に公開された米国特許出願公開第２００３／０２３６１９３号（それぞれ、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）に記載のように、特定または誘導できるペプチド；並びに、米国特許出願公開第２００６／０１４０９３４号（２００５年９月２３日に出願された米国仮特許出願第（U.S. Serial No.）１１／２３４，７３１号、表題Modified Fc Molecules、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）の表６に現れるあらゆるペプチドが含まれる。当業者であれば、これらの各参照により、異なるペプチドライブラリを用い、開示された手順に従うことによって、実際に開示されたものとは異なるペプチドを選択することが可能となることに気づくだろう。

【０１６９】

「神経成長因子（ＮＧＦ）結合ペプチド」および「ＮＧＦ結合ペプチド」という用語には、２００４年４月１日に公開された国際公開第０４／０２６３２９号に記載のように同定または誘導できるペプチド、並びに米国特許出願公開第２００６／０１４０９３４号（２００５年９月２３日に出願された米国仮特許出願第（U.S. Serial No.）１１／２３４，７３１号、表題Modified Fc Molecules、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）の表７に現れるあらゆるペプチドが含まれる。当業者であれば、これらの各参照により、異なるペプチドライブラリを用い、開示された手順に従うことによって、実際に開示されたものとは異なるペプチドを選択することが可能となることに気づくだろう。

【０１７０】

「ミオスタチン結合ペプチド」という用語には、２００３年１２月１９日に出願された米国仮特許出願第（U.S. Serial No.）１０／７４２，３７９号（その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されるように特定または誘導できるペプチド、並びに米国特許出願公開第２００６／０１４０９３４号（２００５年９月２３日に出願された米国仮特許出願第（U.S. Serial No.）１１／２３４，７３１号、表題Modified Fc Molecules、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）の表８に現れるあらゆるペプチドが含まれる。当業者であれば、これらの各参照により、異なるペプチドライブラリを用い、開示された手順に従うことによって、実際に開示されたものとは異なるペプチドを選択することが可能となることに気づくだろう。

【０１７１】

「ＢＡＦＦ拮抗薬ペプチド」および「ＢＡＦＦ結合ペプチド」という用語には、米国特許出願公開第２００３／０１９５１５６Ａ１号（その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）に記載されるように特定または誘導できるペプチド、並びに米国特許出願公開

第２００６／０１４０９３４号（２００５年９月２３日に出願された米国仮特許出願第（U.S. Serial No.）１１／２３４，７３１号、表題Modified Fc Molecules、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）の表９に現れるペプチドが含まれる。当業者であれば、上記参照により、異なるペプチドライブラリを用い、開示された手順に従うことによって、実際に開示されたものとは異なるペプチドを選択することが可能となることに気づくだろう。

【０１７２】

上記は、本発明の免疫グロブリン（抗体および抗体フラグメントを含む）に有用に結合または融合可能な薬理活性を有するポリペプチドの単なる非限定的な例として意図されるものである。薬理活性を有するポリペプチド部分を含むものはすべて、本発明の範囲内で使用可能であり、例えば、いわゆるアビマー（avimer）構造を有するポリペプチドが挙げられる（例えば、Kolkman et al., Novel Proteins with Targeted Binding、米国特許出願公開第２００５／００８９９３２号；Baker et al., IL-6 Binding Proteins、米国特許出願公開第２００８／０２８１０７６号;Stemmer et al., Protein Scaffolds and Uses Thereof、米国特許出願公開第２００６／０２２３１１４号および米国特許出願公開第２００６／０２３４２９９号を参照）。

【０１７３】

有用な前臨床の動物モデルが、目的の治療指標における薬の妥当性検証用に、当該技術分野では周知である（例えば、an adoptive-transfer model of periodontal disease by Valverde et al., J. Bone Mineral Res. 19:155 (2004); an ultrasonic perivascular Doppler flow meter-based animal model of arterial thrombosis in Gruner et al., Blood 105:1492-99 (2005); pulmonary thromboembolism model, aorta occlusion model, and murine stroke model in Braun et al.、国際公開第２００９／１１５６０９Ａ１号）。例えば、多発性硬化症の養子移入実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＡＴ－ＥＡＥ）モデルは、多発性硬化症等の免疫疾患に関する研究のために、説明がなされている（Beeton et al., J. Immunol. 166:936 (2001); Beeton et al., PNAS 98:13942 (2001); Sullivan et al.、国際公開第２００８／０８８４２２Ａ２号の実施例４５、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。ＡＴ－ＥＡＥモデルにおいて、有効量の本発明の医薬組成物による処置がなされた動物には、疾患重症度の有意な低減および生存増加が期待されるが、一方、無処置動物は深刻な疾患および／または死亡に至ることが予期される。ＡＴ－ＥＡＥモデルを運用するために、ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）に特異的な、脳骨髄性（myelogenic）ＣＤ４＋ラットＴ細胞株、ＰＡＳが、Ｅｖｅｌｙｎｅ Ｂｅｒａｕｄ博士により考案された。これらの細胞のｉｎ ｖｉｔｒｏにおいての維持およびＡＴ－ＥＡＥモデルにおいてのそれらの使用は、以前に記載がなされている（Beeton et al. (2001) PNAS 98, 13942）。ＰＡＳ Ｔ細胞は、ＭＢＰおよび照射を受けた胸腺細胞（２日目）による交互の一連の抗原刺激または活性化、およびＴ細胞増殖因子（５日目）による増殖によって、ｉｎ ｖｉｔｒｏで維持される。ＰＡＳ Ｔ細胞（３×１０^{5}／ｍｌ）の活性化は、細胞を、１０μｇ／ｍｌのＭＢＰおよび１５×１０^{6}／ｍｌの同系の被照射（３５００ｒａｄ）胸腺細胞と共に、２日間インキュベートすることを必要とする。ｉｎ ｖｉｔｒｏでの活性化から２日後、１０～１５×１０^{6}個の生存ＰＡＳ Ｔ細胞を、６～１２週齢の雌Ｌｅｗｉｓラット（チャールズ・リバー社（Charles River Laboratories））に、尾静脈内注射によって注入する。ビヒクル（ＰＢＳ中２％Ｌｅｗｉｓラット血清）または試験医薬組成物の皮下注射を毎日、－１～３日目に与え、ここで－１日目とは、ＰＡＳ Ｔ細胞（０日目）の注射の１日前を表す。ビヒクル処置ラットでは、ＰＡＳ Ｔ細胞注入後４～５日目に、急性ＥＡＥが発生することが予期される。通常は、阻害剤のレベルの分析用に、血清を、４日目に尾静脈出血により、および８日目（試験の終わり）に心穿刺により、採血する。通常、ラットは－１、４、６、および８日目に体重測定する。動物は、細胞移入（０日目）の日から３日目までは１日１回、そして４日目から８日目までは１日２回、盲検方式でスコア化してもよい。臨床兆候は、各肢および尾の不全麻痺の程度の総得点

として評価する。臨床スコアリング：０＝兆候なし、０．５＝遠位尾の引きずり、１．０＝尾のひきずり、２．０＝中等度の不全対麻痺、運動失調、３．０＝中等度の不全対麻痺、３．５＝後肢一本の麻痺、４．０＝後肢の完全麻痺、５．０＝後肢完全麻痺および失調症、５．５＝四肢麻痺、６．０＝瀕死状態または死亡。スコアが５．０に達したラットは、通常は安楽死させる。

【０１７４】

免疫グロブリンの抗体実施形態の産生

【０１７５】

ポリクローナル抗体.

ポリクローナル抗体は、関連する抗原およびアジュバントの複数回の皮下（ｓｃ）または腹腔内（ｉｐ）注射によって、動物において産生されるのが好ましい。あるいは、抗原は動物のリンパ節に直接注射してもよい（Kilpatrick et al., Hybridoma, 16:381-389, 1997を参照）。二機能性物質または誘導体化剤、例えば、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した結合）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基を介する）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸または当該技術分野において周知の他の物質を用いて、免疫される種において免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、または大豆トリプシンインヒビターに関連抗原を結合することによって、抗体応答の向上を得ることができる。

【０１７６】

例えば、１００μｇのタンパク質または複合体（マウス用）と３倍量のフロイント完全アジュバントとを混合し、その溶液を複数の部位に皮内注射することによって、動物を抗原、免疫原性複合体、または誘導体に対し免疫化する。１ヶ月後、複数の部位への皮下注射による、最初の量の１／５～１／１０倍量のフロイント完全アジュバント中ペプチドまたは複合体で、動物を追加免疫する。追加抗原注射の７～１４日後に、動物を出血させ、血清を抗体価につきアッセイする。力価がプラトーとなるまで動物を追加免疫する。動物は、異なるタンパク質に対しおよび／または異なる架橋剤を介して結合している以外は同一の抗原の複合体で、追加免疫されることが好ましい。複合体は、タンパク質融合として組換え細胞培養で作成することもできる。また、ミョウバン等の凝集剤は、免疫応答の増強に用いるのに適している。

【０１７７】

モノクローナル抗体.

提供される本発明の免疫グロブリンにはモノクローナル抗体が含まれる。モノクローナル抗体は、当該技術分野において周知のいかなる技術をも用いて生産され得、例えば、免疫スケジュール完了後の遺伝子導入動物から採取した脾臓細胞の不死化によって生産することができる。脾臓細胞は、当該技術分野において周知のいかなる技術をも用いて不死化することができ、例えば、それらを骨髄腫細胞と融合させてハイブリドーマを作成することによって行うことができる。例えば、モノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５）で最初に記述されたハイブリドーマ法を用いて作成することができ、または、本発明において有用であるような、所定配列の組換えＤＮＡ法によって作成することができ（例えば、Cabilly et al., Methods of producing immunoglobulins, vectors and transformed host cells for use therein、米国特許第６，３３１，４１５号）、例えば、抗体をグリコシル化することができる哺乳類細胞株（例えば、ＣＨＯ細胞）を所望により用いて、通常は等モルの軽鎖および重鎖の産生を促進する、「スプリットＤＨＦＲ（ｓｐｌｉｔ ＤＨＦＲ）」法等の方法が挙げられる（例えば、Page, Antibody production、EP0481790A2および米国特許第５，５４５，４０３号を参照）。

【０１７８】

ハイブリドーマ法は、本発明の免疫グロブリン生成においては有用でないが、抗原結合性タンパク質の生成においては有用であり、通常この方法において、マウス、またはラッ

ト、ハムスターもしくはマカクサル等の他の適切な宿主哺乳動物が、本明細書に記載のように免疫化されて、免疫化に用いられるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生する、または産生可能であるリンパ球を誘導する。あるいは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでリンパ球を免疫化してもよい。その後、ポリエチレングリコール等の適切な細胞融合剤（fusing agent）を用いてリンパ球を骨髄腫細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成させる（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)）。

【０１７９】

いくつかの場合では、ヒト免疫グロブリン配列を有する遺伝子導入動物を免疫原で免疫化すること；該免疫動物から脾臓細胞を採取すること；採取された脾臓細胞を骨髄腫細胞株に融合させて、ハイブリドーマ細胞を生じさせること；ハイブリドーマ細胞からハイブリドーマ細胞株を確立し、目的の抗原に結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を特定すること、によってハイブリドーマ細胞株を作製する。そのようなハイブリドーマ細胞株、およびそれらにより産生されるモノクローナル抗体は、本発明の態様である。

【０１８０】

ハイブリドーマ細胞を、作製したらすぐに、未融合の親骨髄腫細胞の成長または生存を阻害する一つまたは複数の物質を好ましくは含有する適切な培地中に播種して増殖させる。例えば、親骨髄腫細胞が酵素であるヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴまたはＨＰＲＴ）を欠乏している場合、ハイブリドーマ用培地には典型的に、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン（ＨＡＴ培地）が含まれ、それらの物質によってＨＧＰＲＴ欠乏細胞の成長が妨害される。

【０１８１】

好ましい骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による安定的に高いレベルの抗体産生を支援し、培地に対する感受性が高いものである。ヒト骨髄腫およびマウス－ヒトヘテロ骨髄腫細胞株は、ヒトモノクローナル抗体の産生についても記述されている（Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)）。ハイブリドーマ作製融合法用の骨髄腫細胞は、好ましくは、抗体を産生しないものであり、高い融合効率、および所望の融合細胞（ハイブリドーマ）のみの成長を支援するある種の選択培地においてそれらが成長できないようにする酵素欠損を有する。マウス細胞融合（mouse fusion）用に適切な細胞株の例としては、Ｓｐ－２０、Ｐ３－Ｘ６３／Ａｇ８、Ｐ３－Ｘ６３－Ａｇ８．６５３、ＮＳ１／１．Ａｇ４　１、Ｓｐ２１０－Ａｇ１４、ＦＯ、ＮＳＯ／Ｕ、ＭＰＣ－１１、ＭＰＣ１１－Ｘ４５－ＧＴＧ１．７およびＳ１９４／５ＸＸＯ　Ｂｕｌが挙げられ；ラット細胞融合（rat fusion）で用いられる細胞株の例としては、Ｒ２１０．ＲＣＹ３、Ｙ３－Ａｇ　１．２．３、ＩＲ９８３Ｆおよび４Ｂ２１０が含まれる。細胞融合に有用な他の細胞株は、Ｕ－２６６、ＧＭ１５００－ＧＲＧ２、ＬＩＣＲ－ＬＯＮ－ＨＭｙ２およびＵＣ７２９－６である。

【０１８２】

ハイブリドーマ細胞が成長中の培養液を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって、またはラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）もしくは酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）等のｉｎ　ｖｉｔｒｏ結合アッセイによって、決定されることが好ましい。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標登録）またはスキャチャード解析によって決定することができる（Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980); Fischer et al., A peptide-immunoglobulin-conjugate、国際公開第２００７／０４５６３Ａ１号、実施例１０、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）。

【０１８３】

所望の特異性、親和性、および／または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を特

定した後、クローンを限界希釈法によりサブクローン化し、標準方法で増殖させてもよい（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)）。この目的に適切な培地としては、例えば、Ｄ－ＭＥＭまたはＲＰＭＩ－１６４０培地が挙げられる。さらに、ハイブリドーマ細胞は動物においては腹水腫瘍としてｉｎ　ｖｉｖｏで増殖させることができる。

【０１８４】

ハイブリドーマまたはｍＡｂを、さらにスクリーニングして、Ｋｖ１．ｘチャネルを介したＫ$^{1+}$流動を阻害する能力等の特定の特性を有するｍＡｂを特定することができる。そのようなスクリーニングの例は下記の実施例で提供される。サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、タンパク質Ａ－セファロース、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、アフィニティークロマトグラフィー、または当該技術分野において周知の他のあらゆる適切な精製技術等の、従来の免疫グロブリン精製法によって培地、腹水、または血清から適切に分離される。

【０１８５】

抗体の組換え体生産

本発明は、宿主細胞により認識される制御配列に所望により機能的に連結した抗体（ポリクローナルおよびモノクローナル）（本明細書に記載の本発明の抗体フラグメントを含む）のいずれかをコードする単離された核酸、該核酸を含むベクターおよび宿主細胞、並びに、該核酸が発現するように宿主細胞を培養すること、および、所望により、宿主細胞培養または培地から抗体を回収することを含み得る抗体を生産するための組み換え技術を提供する。同様の物質および方法は、ポリペプチドをベースとした免疫グロブリンの産生にも適合する。

【０１８６】

目的の免疫グロブリンまたはポリペプチドからの関連アミノ酸配列は、直接的なタンパク質構造解析によって決定することができ、適切なコードヌクレオチド配列を一般的なコドン表に従って設計することができる。あるいは、モノクローナル抗体をコードするゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡは、そのような抗体を産生する細胞から、従来の方法を用いて（例えば、該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可能なオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）、単離および配列決定することができる。

【０１８７】

ＤＮＡのクローニングは、標準的な技術を用いて実行される（例えば、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Pressを参照、参照により本明細書に組み込まれる）。例えば、ｃＤＮＡライブラリは、ポリＡ＋ｍＲＮＡ、好ましくは膜結合性ｍＲＮＡ、およびヒト免疫グロブリンポリペプチド遺伝子配列に特異的なプローブを用いてスクリーニングしたライブラリの逆転写によって、構築することができる。しかしながら一実施形態では、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）が、目的の免疫グロブリン遺伝子セグメント（例えば、軽鎖または重鎖可変セグメント）をコードするｃＤＮＡ（または完全長ｃＤＮＡの部分）の増幅に用いられる。増幅された配列は、あらゆる適切なベクター、例えば、発現ベクター、ミニ遺伝子ベクター、またはファージディスプレイベクターに、容易にクローン化することができる。目的の免疫グロブリンポリペプチドのいくつかの部分の配列を決定することができるのであれば、使用されるクローニングの具体的な方法は重要でないことが理解されよう。

【０１８８】

抗体核酸の一つの供給源は、目的の抗原で免疫した動物からＢ細胞を得て、それを不死細胞に融合させることにより作製されるハイブリドーマである。あるいは、核酸は免疫動物のＢ細胞（または脾臓全体）から単離することができる。抗体をコードする核酸のさらに別の供給源は、例えば、ファージディスプレイ技術によって生成されたそのような核酸のライブラリである。目的のペプチド、例えば、所望の結合特性を有する可変領域ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、パニング等の標準的な技術によって特定することが

できる。

【０１８９】

免疫グロブリンポリペプチドの可変領域全体をコードする配列を決定してもよいが、可変領域の一部分のみ、例えば、ＣＤＲコード部分を配列決定することで、場合によっては十分である。配列決定は標準的な技術を用いて行われる（例えば、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, and Sanger, F. et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467を参照、参照によって本明細書に組み込まれる）。クローン化された核酸配列と、ヒト免疫グロブリン遺伝子およびｃＤＮＡの発表された配列とを比較することによって、配列決定された領域に応じて、当業者は容易に、（ｉ）ハイブリドーマ免疫グロブリンポリペプチド（重鎖のアイソタイプを含む）の生殖系セグメントの使用、並びに（ｉｉ）Ｎ領域付加および体細胞突然変異の過程からもたらされる配列を含む、重鎖および軽鎖可変領域の配列を決定することができる。免疫グロブリン遺伝子配列情報の１つの供給源は、国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）、国立医療図書館（National Library of Medicine）、国立衛生研究所（National Institutes of Health）（メリーランド州ベセスダ）である。

【０１９０】

単離されたＤＮＡは、制御配列に機能的に連結されるか、または発現ベクター中に配置され、それが次に他の形では免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞に形質移入して、組換え宿主細胞中にモノクローナル抗体の合成を指示することができる。抗体の組換え体産生は当該技術分野において周知である。

【０１９１】

核酸が別の核酸配列と機能的な関係に置かれるとき、核酸は、機能的に連結される。例えば、ポリペプチドの分泌に関与するタンパク質前駆体として発現される場合は、プレ配列または分泌リーダー（secretory leader）のＤＮＡがポリペプチドのＤＮＡに機能的に連結され；配列の転写に影響を及ぼす場合は、プロモーターまたはエンハンサーがコード配列に機能的に連結され；あるいは、翻訳を促進するために位置付けられる場合は、リボソーム結合部位がコード配列に機能的に連結される。一般に、機能的に連結されることは、連結されるＤＮＡ配列が隣接していることを意味し、また、分泌リーダーの場合は、連結されるＤＮＡ配列が隣接し、リーディング・フェーズ（reading phase）内であることを意味する。しかしながら、エンハンサーは隣接することを必要としない。連結は、都合が良い制限酵素認識部位でのライゲーションによって達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、慣習に従って使用される。

【０１９２】

多くのベクターが当該技術分野において周知である。ベクター構成要素には、以下のうちの一つまたは複数が含まれ得る：シグナル配列（例えば、抗体の分泌を指示し得る；例えば、ＶＫ－１シグナルペプチド配列ＭＤＭＲＶＰＡＱＬＬＧＬＬＬＬＷＬＲＧＡＲＣ／／配列番号１０３をコードする、ＡＴＧＧＡＣＡＴＧＡＧＧＧＴＧＣＣＣＧＣＴＣＡＧＣＴＣＣＴＧＧＧＧＣＴＣＣＴＧＣＴＧＣＴＧＴＧＧＣＴＧＡＧＡＧＧＴＧＣＧＣＧＣＴＧＴ／／配列番号１０２）、複製開始点、一つまたは複数の選択的なマーカー遺伝子（例えば、抗生物質耐性または他の薬剤耐性を与える、栄養要求性欠乏を補完する、または培地中で獲られない不可欠な栄養物を供給することができる）、エンハンサー要素、プロモーター、および転写終結配列で、これらのすべては当該技術分野において周知である。

【０１９３】

細胞、細胞株、および細胞培養は、しばしば同義的に使用され、本明細書における全てのそのような名称には子孫細胞が含まれる。形質転換体および形質転換細胞には、形質転換の数を問わず、初代対象細胞およびそれ由来の培養物が含まれる。意図的または偶然の変異によって、全ての子孫細胞が、ＤＮＡ内容において正確には同一でない場合もあることも理解される。元の形質転換細胞においてスクリーニングされたのと同一の機能または

生物活性を有する変異子孫細胞が含まれる。

【０１９４】

例示的な宿主細胞には、原核生物、酵母、または高等真核生物細胞が含まれる。原核宿主細胞には、グラム陰性菌またはグラム陽性菌等の真正細菌、例えば、大腸菌類（Escherichia）、例えば、大腸菌（E. coli）、エンテロバクター属（Enterobacter）、エルウィニア属（Erwinia）、クレブシエラ属（Klebsiella）、プロテウス属（Proteus）、サルモネラ属（Salmonella）、例えば、ネズミチフス菌（Salmonella typhimurium）、セラチア属（Serratia）、例えば、霊菌属（Serratia marcescans）、および赤痢菌属（Shigella）等の腸内細菌科（Enterobacteriaceae）、並びに枯草菌（B. subtilis）およびリケニホルミス菌（B. licheniformis）等の炭疽菌（Bacillus）、シュードモナス属（Pseudomonas）、並びにストレプトマイセス属（Streptomyces）が含まれる。糸状菌または酵母等の真核微生物は、組換えポリペプチドまたは組換え抗体の適切なクローニングまたは発現用宿主である。出芽酵母（saccharomyces cerevisiae）、または通常のパン酵母が、下等な真核生物宿主微生物の中でもっとも一般的に使用される。しかし、ピキア属（Pichia）、例えばピキア・パストリス（P. pastoris）、分裂酵母（Schizosaccharomyces pombe）；クリベロマイセス属（Kluyveromyces）、ヤロウイア属（Yarrowia）；カンジダ属（Candida）；トリコデルマ・リーシア（Trichoderma reesia）；ニューロスポラ・クラッサ（Neurospora crassa）；スクワニオミセス・オクシデンタリス（Schwanniomyces occidentalis）等のスクワニオミセス属（Schwanniomyces）；並びに、例えば、ニューロスポラ属（Neurospora）、ペニシリウム属（Penicillium）、トリポクラミジウム属（Tolypocladium）、並びにＡ．ニデュランス（A.nidulans）およびＡ．ニガー（A.niger）等のアスペルギルス属（Aspergillus）宿主等の糸状菌等の、いくつかの他の属、種、および株は、一般に入手可能で且つ本明細書において有用である。

【０１９５】

抗体を含む、グリコシル化された免疫グロブリンの発現のための宿主細胞は、多細胞生物に由来し得る。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞および昆虫細胞が挙げられる。多数のバキュロウイルス株および変異体並びにスポドプテラ・フルギペルダ（Spodoptera frugiperda）（イモムシ）、アエデス・アエギプティ（Aedes aegypti）（蚊）、アエデス・アルボピクタス（Aedes albopictus）（蚊）、ドロソフィラ・メラノガスタ（Drosophila melanogaster）（ショウジョウバエ）およびボンビクス・モリ（Bombyx mori）等の宿主由来の対応する許容昆虫宿主細胞が同定されている。トランスフェクションのための様々なウイルス株、例えば、オートグラファ・カリフォルニア（Autographa californica）ＮＰＶのＬ－１変異体およびボンビクス・モリ(Bombyx mori)ＮＰＶのＢｍ－５菌株が公的に利用できる。

【０１９６】

脊椎動物宿主細胞もまた適切な宿主であり、そのような細胞からの抗原結合性タンパク質（抗体を含む）の組換え体生産は、通常の方法となっている。有用な哺乳類宿主細胞株の例としは、チャイニーズハムスター卵巣細胞、例えば、ＣＨＯＫ１細胞（ＡＴＣＣ ＣＣＬ６１）、ＤＸＢ－１１、ＤＧ－４４、およびチャイニーズハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯ、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)）；ＳＶ４０によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１系統（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５１）；ヒト胚腎臓系統（浮遊培養での増殖のためにサブクローニングされた２９３または２９３細胞（Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)）；ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ ＣＣＬ１０）；マウスセルトリ細胞（ＴＭ４、Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)）；サル腎細胞（ＣＶ１ ＡＴＣＣ ＣＣＬ７０）；アフリカミドリザル腎細胞（ＶＥＲＯ－７６、ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１５８７）；ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ、ＡＴＣＣ ＣＣＬ ２）；イヌ腎細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ ＣＣＬ ３４）；バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ ３Ａ、ＡＴＣＣ ＣＲＬ １４４２）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７５）；ヒト肝細胞腫細胞（Ｈｅｐ Ｇ２、ＨＢ８０６５）；マウス乳腺腫瘍（ＭＭＴ ０６０５６２、

ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１）；ＴＲＩ　細胞（Mather et al., Annals N.Y Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)）；ＭＲＣ５細胞もしくはＦＳ４細胞；または哺乳類骨髄腫細胞が挙げられる。

【０１９７】

宿主細胞は、免疫グロブリン産生用の前述の核酸またはベクターで形質転換または形質導入され、プロモーター誘導、形質転換体選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために、必要に応じて改変された従来の栄養培地中で培養される。さらに、選択的マーカーによって分離された転写単位の複数コピーを有する新規ベクターおよび形質導入細胞株は、免疫グロブリンの発現に特に有用である。

【０１９８】

本発明の免疫グロブリンを生産するのに用いられる宿主細胞は、様々な培地で培養することができる。ハムＦ１０（シグマ社）、最小必須培地（（ＭＥＭ），（シグマ社）、ＲＰＭＩ－１６４０（シグマ社）、およびダルベッコー修飾イーグル培地（（ＤＭＥＭ）、シグマ社）等の市販の培地が、宿主細胞を培養するのに適している。さらに、Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980)、米国特許第４，７６７，７０４号；第４，６５７，８６６号；第４，９２７，７６２号；第４，５６０，６５５号；もしくは第５，１２２，４６９号；国際公開第９０１０３４３０号；国際公開第８７／００１９５号；または米国再発行特許第３０，９８５号に記載される培地のいずれも、宿主細胞の培地として使用され得る。これらの培地のうちいずれも、必要に応じて、ホルモンおよび／または他の増殖因子（インスリン、トランスフェリン、または上皮増殖因子等）、塩（塩化ナトリウム、カルシウム塩（calcium）、マグネシウム塩（magnesium）、およびリン酸塩等）、緩衝液（ＨＥＰＥＳ等）、ヌクレオチド（アデノシンおよびチミジン等）、抗菌剤（Gentamycin（商標）薬等）、微量元素（マイクロモル範囲の最終濃度に通常は存在する無機化合物として定義される）、およびグルコースまたは同等のエネルギー源を補充されていてもよい。いかなる他の必要な補助剤も、当業者には知られているであろう適切な濃度で、含まれ得る。温度、ｐＨ等の培養条件は、発現用に選択された宿主細胞に以前に使用されたものであり、当業者には明らかである。

【０１９９】

宿主細胞を培養すると、免疫グロブリンは、細胞膜周辺腔で細胞内に産生され得、または直接的に培地に分泌され得る。免疫グロブリンが最初のステップとして細胞内で産生される場合、粒状の残骸、宿主細胞または溶解したフラグメントは、　例えば、遠心分離または限外濾過によって除去される。

【０２００】

免疫グロブリン（例えば、抗体または抗体フラグメント）は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、陽イオンもしくは陰イオン交換クロマトグラフィー、または、好ましくはアフィニティークロマトグラフィーを用い、親和性リガンドとして目的の抗原またはタンパク質Ａもしくはタンパク質Ｇを用いて、精製することができる。タンパク質Ａは、ヒトγ１、γ２、またはγ４重鎖に基づくポリペプチドを含むタンパク質を精製するのに使用することができる（Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)）。タンパク質Ｇは、全てのマウスアイソタイプおよびヒトγ３に推奨される（Guss et al., EMBO J. 5: 15671575 (1986)）。親和性リガンドが結合する基質は、ほとんどの場合アガロースであるが、他の基質が利用可能である。制御多孔質ガラス（controlled pore glass）またはポリ（スチレンジビニル）ベンゼン等の機械的に安定な基質は、アガロースで達成することができる流速とプロセシング時間よりも速い流速と短いプロセシング時間を可能にする。タンパク質がC_H3ドメインを含む場合、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ　ＡＢＸ（商標）樹脂（Ｊ．Ｔ．ベーカー社（J.T.Baker）、ニュージャージー州フィリップスバーグ）が精製に有用である。エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、等電点電気泳動、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、および硫安塩析等のタンパク質精製の他の技術も、回収されるべき抗体によって使用される可能性がある。

【０２０１】

キメラ、ヒト化およびヒト改変（商標）モノクローナル抗体.

げっ歯類モノクローナル抗体の可変Ｉｇドメインがヒト定常Ｉｇドメインに融合されるキメラモノクローナル抗体は、当該技術分野において周知の標準的な手順を用いて生成することができる（Morrison, S. L., et al. (1984) Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855; and, Boulianne, G. L., et al, Nature 312, 643-646. (1984)を参照）。いくつかの技術が、抗体配列をよりヒトに類似するようにヒト化または改変することについて記載しており、例えば、（１）非ヒト相補性決定領域（ＣＤＲ）をヒトフレームワークおよび定常領域に移植（当該技術分野で「ＣＤＲグラフティング」によるヒト化と称される方法）することによって、または（２）非ヒト可変領域全体を移植するが、それらを表面残基の置き換えによりヒト様の表面で「覆い隠す」こと（当該技術分野で「化粧張り（veneering）」と称される方法）によって、または（３）各残基の、抗原結合性または抗体構造への関与の見込み、およびその免疫原性の見込みに基づいて、選択された非ヒトアミノ酸残基をよりヒトへと改変することによる。例えば、Jones et al., Nature 321:522 525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851 6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65 92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239:1534 1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489 498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169 217 (1994); and Kettleborough, C.A. et al., Protein Eng. 4(7):773 83 (1991); Co, M. S., et al. (1994), J. Immunol. 152, 2968-2976); Studnicka et al. Protein Engineering 7: 805-814 (1994)を参照；これらの各々はその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０２０２】

いくつかの技術が、抗体配列をよりヒトに類似するようにヒト化または改変することについて記載しており、例えば、（１）非ヒト相補性決定領域（ＣＤＲ）をヒトフレームワークおよび定常領域に移植（当該技術分野で「ＣＤＲグラフティング」によるヒト化と称される方法）することによって、または（２）非ヒト可変領域全体を移植するが、それらを表面残基の置き換えによりヒト様の表面で「覆い隠す」こと（当該技術分野で「化粧張り（veneering）」と称される方法）によって、または（３）各残基の、抗原結合性または抗体構造への関与の見込み、およびその免疫原性の見込みに基づいて、選択された非ヒトアミノ酸残基をよりヒトへと改変することによる。 例えば、Jones et al., Nature 321:522 525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851 6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65 92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239:1534 1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489 498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169 217 (1994); and Kettleborough, C.A. et al., Protein Eng. 4(7):773 83 (1991); Co, M. S., et al. (1994), J. Immunol. 152, 2968-2976); Studnicka et al. Protein Engineering 7: 805-814 (1994)を参照；これらの各々はその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０２０３】

本発明の一つの態様では、本明細書で提供される抗体の軽鎖および重鎖可変領域（表２Ａ～Ｂを参照）は、同一、または異なる、系統発生的種（phylogenetic species）由来の抗体から得られたフレームワーク領域（ＦＲ）に移植される。コンセンサスヒトＦＲを作製するために、いくつかのヒト重鎖または軽鎖のアミノ酸配列から得られたＦＲを整列させて、コンセンサスアミノ酸配列を特定することができる。他の実施形態では、本明細書で開示される重鎖または軽鎖のＦＲは、異なる重鎖または軽鎖から得られたＦＲと置き換えられる。一つの態様では、抗体の重鎖および軽鎖のＦＲにおける希アミノ酸は置換されないが、残りのＦＲアミノ酸は置換される。「希アミノ酸」は、この特定のアミノ酸がＦＲにおいて通常は存在しない位置に存在する、特定のアミノ酸である。あるいは、１つ

の重鎖または軽鎖から得られた移植可変領域は、本明細書に記載されるようなその特定の重鎖または軽鎖の定常領域とは異なる定常領域と共に使用され得る。他の実施形態では、移植可変領域は一本鎖Ｆｖ抗体の部分である。

【０２０４】

抗体は、内因性の免疫グロブリンを産生せず、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含有するように操作された遺伝子導入動物を用いて生成することもできる。例えば、国際公開第９８／２４８９３号は、ヒトＩｇ遺伝子座を有する遺伝子導入動物を開示しており、その動物は、内因性の重鎖および軽鎖遺伝子座の不活性化により機能的な内因性免疫グロブリンを産生しない。また、国際公開第９１／１０７４１号は、免疫原に対して免疫応答を開始することができる遺伝子導入した非霊長類哺乳類宿主を開示しており、それにおいては、抗体は霊長類の定常領域および／または可変領域を有しており、遺伝子座をコードする内因性免疫グロブリンは置換されているか、不活性化されている。国際公開第９６／３０４９８号は、定常領域または可変領域の全てまたは一部分を置換して改変された抗体分子を形成させるため等に、哺乳動物における免疫グロブリン遺伝子座を改変するためのＣｒｅ／Ｌｏｘ系の使用を開示している。国際公開第９４／０２６０２号は、不活性化された内因性Ｉｇ遺伝子座および機能的なヒトＩｇ遺伝子座を有する非ヒト哺乳類宿主を開示している。米国特許第５，９３９，５９８号は、遺伝子導入マウスを作製するための方法を開示しており、その方法において、該マウスは内因性重鎖が欠損しており、一つまたは複数の異種定常領域を含む外因性の免疫グロブリン遺伝子座を発現する。

【０２０５】

上記の遺伝子導入動物を用いることで、選択された抗原性分子に対して免疫応答を発生させることが可能であり、抗体産生細胞は、動物から採取可能で、ヒト由来モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作製するのに用いることができる。免疫方法、アジュバント等は、当該技術分野において周知であり、例えば、国際公開第９６／３３７３５号に記載されるような、遺伝子導入マウスの免疫化に用いられる。モノクローナル抗体を、対応するタンパク質の生物活性または生理作用を阻害または中和する能力について、試験することができる。Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); Mendez et al., Nat. Genet. 15:146-156 (1997)；および米国特許第５,５９１,６６９号、米国特許第５,５８９,３６９号、米国特許第５,５４５,８０７号；および米国特許出願第２００２０１９９２１３号も参照されたい。米国特許出願第２００３００９２１２５号は、所望のエピトープに対する動物の免疫応答を偏向させる方法について記載している。ヒト抗体は、ｉｎ ｖｉｔｒｏ活性化Ｂ細胞によっても産生され得る（米国特許第５，５６７，６１０号および第５，２２９，２７５号を参照）。

【０２０６】

ファージディスプレイ技術による抗体生産

【０２０７】

組換え型ヒト抗体遺伝子のレパートリーを作製するための技術の発達、およびコードされた抗体フラグメントの糸状バクテリオファージ表面への提示は、ヒト由来抗体を生成するための別の手段を提供している。ファージディスプレイは、例えば、Dower et al.、国際公開第９１／１７２７１号、McCafferty et al.、国際公開第９２／０１０４７号、およびCaton and Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-6454 (1990)に記載され、これらの各々はその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。ファージ技術によって生成される抗体は、通常、抗原結合性フラグメント、例えばＦｖまたはＦａｂフラグメントとして細菌中で産生され、そのためにエフェクター機能が欠損している。２つの方法のうちの１つによって、エフェクター機能を導入することができる。フラグメントは、哺乳類細胞中で発現されるために完全抗体中に、またはエフェクター機能を誘起可能な第二の結合部位を有する二重特異性抗体フラグメント中のいずれかに操作、導入することができる。

【０２０８】
通常、抗体のＦｄフラグメント（V_H-C_H1）および軽鎖（V_L-C_L）は、ＰＣＲによって別々にクローン化され、コンビナトリアルファージディスプレイライブラリにおいて無作為に組み換えられた後に、特定の抗原への結合に選択され得る。抗体フラグメントはファージ表面に発現され、ＦｖまたはＦａｂ（従って、ファージは抗体フラグメントをコードするＤＮＡを含有する）の抗原結合による選別は、数回にわたる抗原結合および再増幅（パニングと名付けられた手順）を通じて達成される。抗原に特異的な抗体フラグメントは、濃縮され、最後に単離される。
【０２０９】
ファージディスプレイ技術は、げっ歯類モノクローナル抗体のヒト化へのアプローチにも使用することができ、「誘導選別（guided selection）」と呼ばれる（Jespers, L. S., et al., Bio/Technology 12, 899-903 (1994)を参照）。このために、マウスモノクローナル抗体のＦｄフラグメントを、ヒト軽鎖ライブラリと組み合わせて提示することができ、その後抗原を用いて、得られたハイブリッドＦａｂライブラリを選別することができる。従ってマウスＦｄフラグメントは、選別を誘導するためのテンプレートを提供するものである。次に、選択されたヒト軽鎖をヒトＦｄフラグメントライブラリと組み合わせる。得られたライブラリを選別することによって完全なヒトＦａｂが得られる。
【０２１０】
ファージディスプレイライブラリからのヒト抗体の誘導について、様々な手順が記載されている（例えば、Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991)；米国特許第５，５６５，３３２号および第５，５７３，９０５号；Clackson, T., and Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994)を参照）。特に、ｉｎ ｖｉｔｒｏでの選別およびファージディスプレイライブラリから誘導される抗体の進化は、強力な手段となっている（Burton, D. R., and Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); and, Winter, G., et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994)；米国特許出願第２００２０００４２１５号および国際公開第９２／０１０４７号；２００３年１０月９日に公開された米国特許出願第２００３０１９０３１７号および米国特許第６，０５４，２８７号；米国特許第５，８７７，２９３号を参照されたい。
【０２１１】
Watkins, “Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift,” Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178: 187-193および２００３年３月６日に公開された米国特許出願公開第２００３００４４７７２号は、ファージ発現抗体ライブラリまたは他の結合分子を捕捉リフト（capture lift）によってスクリーニングする方法について記載しており、方法には候補結合分子の固体基板への固定化が含まれる。
【０２１２】
免疫グロブリンの他の実施形態：抗体フラグメント
【０２１３】
上で言及したように、抗体フラグメントは、インタクトな完全長抗体の一部分、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域を含み、抗体フラグメントから形成される線状抗体および多特異的抗体を含む。抗体フラグメントの非制限的な例としては、抗体が所望の生物活性を保持していればよく、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、Ｆｄ、ドメイン抗体（ｄＡｂ）、相補性決定領域（ＣＤＲ）フラグメント、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、一本鎖抗体フラグメント、マキシボディ（maxibody）、二重特異性抗体、トリアボディ（triabody）、テトラボディ（tetrabody）、ミニボディ（minibody）、線状抗体、キレート化組換え抗体、トリボディ（tribody）もしくはバイボディ（bibody）、細胞内抗体、ナノボディ（nanobody）、小モジュラー免疫医薬（small modular immunopharmaceutical、ＳＭＩＰ）、抗原結合性ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化（camelized）抗体、ＶＨＨ含有抗体、またはそれらの変異タンパク質もしくは誘

導体、並びに、ＣＤＲ配列等の、ポリペプチドへの特異的抗原結合性を与えるのに十分なだけの免疫グロブリンの少なくとも一部を含有するポリペプチドが挙げられる。そのような抗原フラグメントは、抗体全体の改変によって生成することができ、あるいは組換えＤＮＡ技術またはペプチド合成によって新規に合成することができる。

【０２１４】

さらなる抗体フラグメントとしては、V_Hドメインを含有するドメイン抗体（ｄＡｂ）フラグメント（Ward et al., Nature 341:544-546, 1989）が挙げられる。

【０２１５】

「線状抗体（linear antibody）」は、１対の抗原結合領域を形成する１対のタンデムＦｄセグメント（$V_H-C_H1-V_H-C_H1$）を含む。線状抗体は二重特異性であっても単一特異性であってもよい（Zapata et al. Protein Eng. 8:1057-62 (1995)）。

【０２１６】

ペプチドリンカーを介して（ヒンジなし）、またはＩｇＧヒンジを介してＣＨ３に融合したｓｃＦｖから成る「ミニボディ（minibody）」については、Olafsen, et al., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr;17(4):315-23に記載がなされている。

【０２１７】

「マキシボディ（maxibody）」という用語は、免疫グロブリンのＦｃ領域に共有結合した二価のｓｃＦｖを表し、例えば、Fredericks et al, Protein Engineering, Design & Selection, 17:95-106 (2004)およびPowers et al., Journal of Immunological Methods, 251:123-135 (2001)を参照されたい。

【０２１８】

軽鎖がない機能的な重鎖抗体は、コモリザメ（nurse shark）、テンジクザメ（wobbegong shark）、並びにラクダ科（Camelidae）、例えばラクダ、ヒトコブラクダ、アルパカおよびラマ等の、ある種の動物において天然に存在する。これらの動物において、抗原結合部位は、VH_Hドメインである単一ドメインに減少されている。これらの抗体は、重鎖可変領域のみを使用して抗原結合領域を形成する。すなわち、これらの機能的抗体は、構造H_2L_2のみを有する重鎖のホモ二量体である（「重鎖抗体」または「ＨＣＡｂ」と呼ばれる）。ラクダ化V_{HH}は、報告によれば、ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３ドメインを含有し、ＣＨ１ドメインを欠くＩｇＧ２定常領域およびＩｇＧ３定常領域で組み換えられる。古典的なV_Hのみのフラグメントは、可溶型で作製するのが困難であるが、フレームワーク残基が、よりVH_H様に改変された場合、溶解性および特異的結合の向上がもたらされ得る（例えば、Reichman, etal., J Immunol Methods 1999, 231:25-38を参照）。ラクダ化V_{HH}ドメインは、高親和性で抗原に結合することが見出されており（Desmyter et al., J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001）、溶液中での安定性が高い（Ewert et al., Biochemistry 41:3628-36, 2002）。ラクダ化重鎖を有する抗体を作製するための方法は、例えば、米国特許公報第２００５／０１３６０４９号および第２００５／００３７４２１号に記載されている。別の足場を、サメのＶ－ＮＡＲ足場とより近く一致するヒト可変様ドメインから作製することが可能であり、長貫通型ループ構造のためのフレームワークを提供し得る。

【０２１９】

重鎖抗体の可変領域は、分子量がたった１５ｋＤａの、完全な機能を有する最小の抗原結合フラグメントであるため、この独立体はナノボディと呼ばれている（Cortez-Retamozo et al., Cancer Research 64:2853-57, 2004）。ナノボディライブラリは、Conrath et al.(Antimicrob Agents Chemother 45: 2807-12, 2001)に記載されているような、免疫化ヒトコブラクダから作製することができる。

【０２２０】

細胞内抗体（intrabody）は、細胞内発現を示し、細胞内タンパク質の機能を操作することができる一本鎖抗体である（Biocca, et al., EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 101:17616-21, 2004）。細胞内領

域に抗体構築物を保持するという細胞シグナル配列を含むイントラボディは、Mhashilkar et al (EMBO J 14:1542-51, 1995)およびWheeler et al. (FASEB J. 17:1733-5. 2003)に記載されているように作製することができる。トランスボディ（transbody）は、タンパク質形質導入ドメイン（ＰＴＤ）が一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）抗体と融合されている細胞透過性抗体である（Heng et al., Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005）。

【０２２１】

標的タンパク質に特異的なＳＭＩＰまたは結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質である抗体が本発明によりさらに包含される。これらの構築物は、抗体エフェクター機能を発揮するのに必要な免疫グロブリン領域に融合された抗原結合領域を含む一本鎖ポリペプチドである。例えば、国際公開第０３／０４１６００号、米国特許公報第２００３０１３３９３９号および米国特許公報第２００３０１１８５９２号を参照されたい。

【０２２２】

抗体フラグメント作製のための様々な技術が開発されている。これらのフラグメントは、慣例ではインタクトな抗体のタンパク質消化を介して誘導されたが、組換え宿主細胞によって直接的に産生可能でもある。例えば、Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988); Skerra et al. Science 240: 1038-1041 (1988); Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)を参照されたい。

【０２２３】

免疫グロブリンの他の実施形態：多価抗体

【０２２４】

一部の実施形態では、多価モノクローナル抗体または多重特異性（例えば、二重特異性、三重特異性等）のモノクローナル抗体を作製することが望ましい場合がある。そのような抗体は、標的抗原の少なくとも２つの異なるエピトープに対して結合特異性を有し得るか、あるいは、２つの異なる分子、例えば、標的抗原および細胞表面タンパク質または受容体に結合し得る。例えば、二重特異性抗体は、標的発現細胞に細胞防御機構を集中させるために、標的に結合する腕、並びにＴ細胞受容体分子等の白血球上のトリガー分子（例えば、ＣＤ２またはＣＤ３）またはＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）およびＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６））等の、ＩｇＧに対するＦｃ受容体（ＦｃγＲ）に結合する別の腕を含み得る。別の例として、二重特異性抗体は、標的抗原を発現する細胞に細胞傷害性薬剤を局在化させるために使用され得る。これらの抗体は、標的に結合する腕および細胞傷害性薬剤（例えば、サポリン、抗インターフェロン-６０、ビンカアルカロイド、リシンＡ鎖、メトトレキサートまたは放射性同位体ハプテン）に結合する腕を有する。多重特異性抗体は、完全長抗体または抗体フラグメントとして作製することができる。

【０２２５】

さらに、本発明の免疫グロブリン（例えば、抗体および抗体フラグメント）および複合体は、多価形態に折り畳まれるよう構築することも可能であり、これにより、血液中の半減期を向上させ得る。多価形態は、当該技術分野において周知の技術により作製することができる。

【０２２６】

二重特異性抗体または多特異的抗体は、架橋結合した、または「ヘテロ複合体」の抗体を含む。例えば、ヘテロ複合体における抗体の一方は、アビジンに結合され得、他方は、ビオチンに結合され得る。ヘテロ複合体抗体は、任意の簡便な架橋法を使用して作製することができる。適切な架橋剤は当該技術分野において周知であり、いくつかの架橋手法とともに米国特許第４，６７６，９８０号に開示されている。ｓｃＦｖのＣ末端にストレプトアビジンコード配列を付加することにより四量体を作製するための別の方法が設計される。ストレプトアビジンは４個のサブユニットから成るため、ｓｃＦｖ－ストレプトアビジンが折り畳まれるとき、４個のサブユニットが結合して四量体を形成する（Kipriyanov et al., Hum Antibodies Hybridomas 6(3): 93-101 (1995)：この開示は、全体

が参照によって本明細書に組み込まれる）。

【０２２７】

二重特異性抗体を作製するための別のアプローチに従って、１対の抗体分子間の接触部分は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の割合を最大化するよう操作することができる。１つの接触部分は、抗体定常領域のC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第一抗体分子の接触部分からの一つまたは複数の小型アミノ酸側鎖は、大型側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）と置換される。大型側鎖と同一または同様の大きさの代償性「空洞（cavity）」が、大型アミノ酸側鎖をより小さなアミノ酸側鎖（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二の抗体分子の接触部分に作製される。これは、ホモ二量体等の他の望まれない最終産物よりも多くヘテロ二量体の生産量を増加させるための機構を提供する。１９９６年９月６日に公開された国際公開第９６／２７０１１号を参照されたい。

【０２２８】

抗体フラグメントから二重特異性抗体または多特異的抗体を作製する技術は、文献にも記載されている。例えば、二重特異性抗体または三重特異性抗体は、化学結合を用いて作製することができる。Brennan et al., Science 229:81 (1985)には、インタクトな抗体をタンパク質分解によって切断してF（ａｂ’）$_2$フラグメントを生成する手順が記載されている。これらのフラグメントを、ジチオール錯化剤の亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元し、隣接するジチオールを安定化させ、分子間のジスルフィド形成を妨害する。次に、生成されたＦａｂ’フラグメントをチオニトロベンゾエート（ＴＮＢ）誘導体に変換する。次に、Ｆａｂ’－ＴＮＢ誘導体の１つを、メルカプトエチルアミンで還元することによってＦａｂ’－チオールに再変換し、等モル量のもう一方のＦａｂ’－ＴＮＢ誘導体と混合して、二重特異性抗体を形成させる。生成された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための作用物質として使用可能である。Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988)には、細菌由来の機能的抗体フラグメントの分泌が開示されている（例えば、Better et al., Skerra et al. Science 240: 1038-1041 (1988)を参照）。例えば、Ｆａｂ’－ＳＨフラグメントは、大腸菌から直接回収し、化学的に結合させて二重特異性抗体を形成させることができる（Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992); Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)）。

【０２２９】

Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)には、完全ヒト化二重特異性抗体F（ａｂ’）$_2$分子の生成が記載されている。各Ｆａｂ’フラグメントは、大腸菌（E.coli）から別々に分泌され、指示されたｉｎ ｖｉｔｒｏでの化学的結合を受けることで、重特異性抗体を形成した。

【０２３０】

二重特異性抗体または多特異的抗体フラグメントを組換え細胞培養物から直接作製および単離するための様々な技術も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパー、例えばＧＣＮ４を用いて生産されている（一般には、Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)を参照）。ＦｏｓおよびＪｕｎタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって２つの異なる抗体のＦａｂ’部分に連結された。抗体ホモ二量体はヒンジ領域で還元されることにより、単量体を形成し、その後再酸化されて抗体ヘテロ二量体を形成する。この方法は、抗体ホモ二量体の生成にも利用できる。

【０２３１】

上記のダイアボディは、二重特異性抗体の一例である。例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照されたい。二価の二重特異性抗体はジスルフィド結合によって安定化することができる。

【０２３２】

安定な単一特異性または二重特異性のＦｖ四量体は、（ｓｃＦｖ$_2$）$_2$立体配置の非共有結合性会合によって、つまりビス－テトラボディとして、生成することもできる。ある

いは、２つの異なるｓｃＦｖは、縦一列に連結されて、ビス－ｓｃＦｖを形成し得る。

【０２３３】

一本鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）二量体の使用により二重特異性抗体フラグメントを作製する別の方法も報告されている。Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994)を参照されたい。１つのアプローチは、２つのｓｃＦｖ抗体をリンカーまたはジスルフィド結合で連結することであった（Mallender and Voss, J. Biol. Chem. 269:199-2061994、国際公開第９４／１３８０６号、および米国特許第５，９８９，８３０号、これらの開示はその全体が参照によって本明細書に組み込まれる）。

【０２３４】

あるいは、二重特異性抗体は、Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)に記載されるように生成された「線状抗体」であってもよい。簡潔に説明すると、これらの抗体は、一対の抗原結合領域を形成する一対の直列Ｆｄセグメント（$V_H-C_H1-V_H-C_H1$）を含む。線状抗体は、二重特異性または単一特異性であり得る。

【０２３５】

３つ以上の価を有する抗体も企図される。例えば、三重特異性抗体を作製することができる（Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)）。

【０２３６】

「キレート化組換え抗体」は、標的抗原の隣接する非オーバーラップエピトープを認識する二重特異性抗体であり、両方のエピトープに同時に結合するのに十分なだけの融通性を有する（Neri et al., J Mol Biol. 246:367-73, 1995）。

【０２３７】

二重特異性Ｆａｂ－ｓｃＦｖ（「バイボディ（bibody）」）および三重特異性Ｆａｂ－（ｓｃＦｖ）（２）（「トリボディ（tribody）」）の作製については、Schoonjans et al. (J Immunol. 165:7050-57, 2000)およびWillems et al. (J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003)に記載がなされている。バイボディまたはトリボディについて、ｓｃＦｖ分子は、ＶＬ-ＣＬ（Ｌ）およびＶＨ-ＣＨ１（Ｆｄ）鎖の一方または両方に融合される。例えば、トリボディを作製するために、２つのｓｃＦｖをＦａｂのＣ末端に融合し、バイボディでは、一方のｓｃＦｖをＦａｂのＣ末端に融合する。

【０２３８】

さらに別の方法では、遊離システインが親タンパク質に導入された後に、二量体、三量体、および四量体が作製される。変動する数（２～４個）のマレイミド基を有するペプチドベースの架橋剤が、目的のタンパク質を遊離システインに架橋するのに使用された（Cochran et al., Immunity 12(3): 241-50 (2000)、この開示はその全体が本明細書に組み込まれる）。

【０２３９】

免疫グロブリンの他の実施形態

【０２４０】

本発明の免疫グロブリンには、ペプチボディ（peptibody）も含まれる。「ペプチボディ」という用語は、少なくとも１個のペプチドに結合した抗体Ｆｃドメインを含む分子を表す。ペプチボディの作製は、２０００年５月４日に公開されたＰＣＴ公報ＷＯ００／２４７８２に一般的に記述される。これらのペプチドのいずれも、リンカーを用いても用いなくても、直列に（すなわち、連続的に）連結することができる。システイニル残基を含有するペプチドは、別のＣｙｓ含有ペプチドと架橋結合することができ、その一方または両方がビヒクルに連結され得る。２つ以上のＣｙｓ残基を有するペプチドはいずれも、ペプチド内ジスルフィド結合も形成し得る。これらのペプチドのいずれもが、誘導体化され得る。例えばカルボキシル末端はアミノ基でキャッピングされ得、システインはキャップ（cappe）であり得、またはアミノ酸残基はアミノ酸残基以外の部分によって置換され得る（例えば、Bhatnagar et al., J. Med. Chem. 39: 3814-9 (1996)およびCuthbertson et al., J. Med. Chem. 40: 2876-82 (1997)を参照（これらはその全体

が参照によって本明細書に組み込まれる））。抗体に対する親和性成熟と同様に、ペプチド配列は最適化されるか、あるいはアラニンスキャニングまたはランダムもしくは定方向突然変異誘発によって改変され、その後最良の結合剤を特定するためにスクリーニングが行われ得る。Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26: 401-24 (1997)。免疫グロブリンの所望の活性を保持しつつ、種々の分子を、免疫グロブリン構造、例えば、ペプチド部分それ自体の内部またはペプチドと免疫グロブリンのビヒクル部分の間に挿入することができる。例えば、Ｆｃドメインもしくはそのフラグメント等の分子、ポリエチレングリコールまたはデキストラン、脂肪酸、脂質、コレステロール基、小分子炭水化物、ペプチド、本明細書に記載のような検出可能部分（蛍光剤、放射性同位元素等の放射標識を含む）、オリゴ糖、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、干渉（または他の）ＲＮＡ、酵素、ホルモン等の他の関連分子は、容易に挿入され得る。この様式での挿入に適切な他の分子は、当業者には明らかであり、本発明の範囲内に包含される。これには、例えば、所望により適切なリンカーで連結された２つの連続したアミノ酸の間にある所望の分子の挿入が含まれる。

【０２４１】

リンカー

「リンカー」または「リンカー部分」とは、本明細書で同義的に使用される場合、本発明の組成物に含有されるポリペプチド鎖（例えば、免疫グロブリンＨＣまたは免疫グロブリンＬＣまたは免疫グロブリンＦｃドメイン）のアミノ酸残基に共有結合する、生物学的に許容できるペプチジルまたは非ペプチジル有機基を表し、リンカー部分は、ポリペプチド鎖を、分子中の別のペプチドもしくはポリペプチド鎖に、または生物活性を有する小分子もしくはオリゴペプチド等の治療的部分に、または半減期延長部分に、共有結合的に連結または結合する。例えば、Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、ＵＳ２００７／００７１７６４; Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２００７／０２２８３１号（国際公開第２００８／０８８４２２号として公開）；および２００９年３月２０日に出願された米国仮特許出願第６１／２１０，５９４、を参照されたい（これらは全てその全体が参照によって本明細書に組み込まれる）。

【０２４２】

本発明の免疫グロブリンにおけるいかなるリンカー部分の存在も、任意のである。リンカーは、存在する場合、本発明の免疫グロブリンの分子の一つまたは複数の他の機能的部分に対し、１つの機能性部分の提示または位置を、配置する、連結する、接続する、または最適化するためのスペーサーとして主に機能するため、リンカーの化学構造は重要ではない。リンカー部分の存在は、本発明の免疫グロブリン（抗体および抗体フラグメントを含む）のいくつかの実施形態の薬理活性（pharamcologial activity）を最適化する際に有用であり得る。リンカーは、ペプチド結合によって結合しているアミノ酸で構成されることが好ましい。リンカー部分は、存在する場合、本発明の免疫グロブリンに存在し得るあらゆる他の一つまたは複数のリンカーと、独立に同じであっても異なっていてもよい。

【０２４３】

上述のように、リンカー部分は、もし存在する場合（免疫グロブリンの一次アミノ酸配列内にあっても、または治療的部分または半減期延長部分を本発明の免疫グロブリンに結合させるためのリンカーとしてであっても）、「ペプチジル」の性質を有し（すなわち、ペプチド結合によって連結されているアミノ酸から構成される）、好ましくは、１から最大約４０アミノ酸残基長、より好ましくは、１から最大約２０アミノ酸残基長、最も好ましくは１から約１０アミノ酸残基長で構成され得る。リンカー中のアミノ酸残基は、２０個の標準（canonical）アミノ酸、より好ましくは、システイン、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、および／またはセリンの中から選択されるのが好ましいが、必ずしもそうである必要はない。さらにより好ましくは、ペプチジルリンカーは、ペプチド結合で連結したグリシン、セリン、およびアラニン等の立体的に障害にならないアミノ酸の過半数から構成される。また、ペプチジルリンカーは、もし存在する場合

、ｉｎ　ｖｉｖｏ循環における急速なタンパク分解による代謝回転を回避するよう選択されることが望ましい。当業者には十分に理解されるように、これらのアミノ酸のいくつかは、グリコシル化される場合がある。例えば、シアリル化部位を構成する有用なリンカー配列は、$X_1X_2NX_4X_5$Ｇ（配列番号１４８）であり、ここでX_1、X_2、X_4およびX_5はそれぞれ独立して任意のアミノ酸残基である。

【０２４４】

他の実施形態では、ペプチジルリンカー部分の１～４０個のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、およびリジンから選択される。リンカーは、グリシンおよびアラニン等の立体的に障害にならないアミノ酸の過半数から構成されることが好ましい。従って、好ましいリンカーには、ポリグリシン、ポリセリン、およびポリアラニン、またはこれらのうちいずれかの組み合わせが含まれる。いくつかの例示的なペプチジルリンカーは、ポリ（Ｇｌｙ）$_{1-8}$、特に（Ｇｌｙ）$_3$、（Ｇｌｙ）$_4$（配列番号１４９）、（Ｇｌｙ）$_5$（配列番号１５０）および（Ｇｌｙ）$_7$（配列番号１５１）、並びに、ポリ（Ｇｌｙ）$_4$Ｓｅｒ（配列番号１５２）、ポリ（Ｇｌｙ－Ａｌａ）$_{2-4}$およびポリ（Ａｌａ）$_{1-8}$である。他のペプチジルリンカーの具体例としては、（Ｇｌｙ）$_5$ＬｙｓＧｌｙ（配列番号１５４）、および（Ｇｌｙ）$_5$ＬｙｓＡｒｇ（配列番号１５５）が挙げられる。有用なペプチジルリンカーの他の例は：有用なペプチジルリンカーの他の例は以下のとおりである：

【０２４５】

（Ｇｌｙ）$_3$ＬｙｓＧｌｙ）$_4$（配列番号１５９）；

【０２４６】

（Ｇｌｙ）$_3$ＡｓｎＧｌｙＳｅｒ（Ｇｌｙ）$_2$（配列番号１５６）；

【０２４７】

（Ｇｌｙ）$_3$ＣｙｓＧｌｙ）$_4$（配列番号１５７）；および

【０２４８】

ＧｌｙＰｒｏＡｓｎＧｌｙＧｌｙ（配列番号１５８）。

【０２４９】

上記命名法を説明すると、例えば、（Ｇｌｙ）$_3$ＬｙｓＧｌｙ）$_4$は、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｌｙｓ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ（配列番号１５９）を意味する。ＧｌｙおよびＡｌａの他の組み合わせも有用である。

【０２５０】

一般に使用されるリンカーは、本明細書において「Ｌ５」（ＧＧＧＧＳ；または「G_4S」；配列番号１５２）、「Ｌ１０」（ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ；配列番号１５３）、「Ｌ２５」（ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ；配列番号１４６）と特定され得るリンカー、および本明細書中下記の実施例で使用されるあらゆるリンカーを含む。

【０２５１】

ペプチドリンカー部分を含む本発明の組成物の一部の実施形態では、酸性残基、例えば、グルタミン酸残基またはアスパラギン酸残基が、リンカー部分のアミノ酸配列に配置される。例としては、以下のペプチドリンカー配列が含まれる：

【０２５２】

ＧＧＥＧＧＧ（配列番号１６０）；

【０２５３】

ＧＧＥＥＥＧＧＧ（配列番号１６１）；

【０２５４】

ＧＥＥＥＧ（配列番号１６２）；

【０２５５】

ＧＥＥＥ（配列番号１６３）；

【０２５６】

ＧＧＤＧＧＧ（配列番号１６４）；

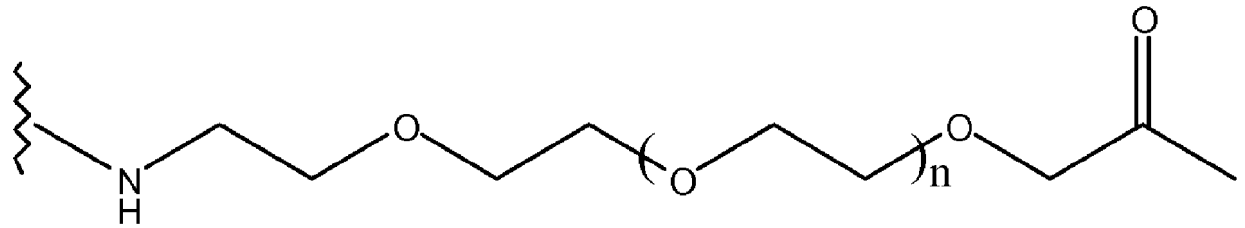
【０２５７】
ＧＧＤＤＤＧＧ（配列番号１６５）；
【０２５８】
ＧＤＤＤＧ（配列番号１６６）；
【０２５９】
ＧＤＤＤ（配列番号１６７）；
【０２６０】
ＧＧＧＧＳＤＤＳＤＥＧＳＤＧＥＤＧＧＧＧＳ（配列番号１６８）；
【０２６１】
ＷＥＷＥＷ（配列番号１６９）；
【０２６２】
ＦＥＦＥＦ（配列番号１７０）；
【０２６３】
ＥＥＥＷＷＷ（配列番号１７１）；
【０２６４】
ＥＥＥＦＦＦ（配列番号１７２）；
【０２６５】
ＷＷＥＥＥＷＷ（配列番号１７３）；または
【０２６６】
ＦＦＥＥＥＦＦ（配列番号１７４）。
【０２６７】
他の実施形態では、リンカーはリン酸化部位、例えば、$X_1X_2YX_4X_5G$（配列番号１７５）（ここで、X_1、X_2、X_4、およびX_5はそれぞれ独立して任意のアミノ酸残基である）；$X_1X_2SX_4X_5G$（配列番号１７６）（ここで、X_1、X_2、X_4およびX_5はそれぞれ独立して任意のアミノ酸残基である）；または$X_1X_2TX_4X_5G$（配列番号１７７）（ここで、X_1、X_2、X_4およびX_5はそれぞれ独立して任意のアミノ酸残基である）を構成する。
【０２６８】
本明細書に示されるリンカーは例示的なものであり；本発明の範囲内のペプチジルリンカーはさらにより長い場合もあり、他の残基を含む場合もある。ペプチジルリンカーは、半減期を延長させる部分と結合させるための、例えば、システイン、別のチオール、または求核試薬を含有し得る。別の実施形態では、リンカーは、官能性の半減期延長部分であるマレイミド、ヨードアセトアミドまたはチオエステルへの結合のための、システインもしくはホモシステイン残基、または他の２－アミノ－エタンチオールもしくは３－アミノ－プロパンチオール部分を含有する。
【０２６９】
別の有用なペプチジルリンカーは、無作為のＧｌｙ／Ｓｅｒ／Ｔｈｒ配列、例えば：ＧＳＧＳＡＴＧＧＳＧＳＴＡＳＳＧＳＧＳＡＴＨ（配列番号１７８）またはＨＧＳＧＳＡＴＧＧＳＧＳＴＡＳＳＧＳＧＳＡＴ（配列番号１７９）を含む、大型の可動性リンカーであり、約１ｋＤａのサイズのＰＥＧ分子であると推定される。あるいは、有用なペプチジルリンカーは、当該技術分野において周知のアミノ酸配列から構成されて、強固な螺旋構造（例えば、リジットリンカー：－ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＧ－）（配列番号１８０）を形成し得る。さらに、ペプチジルリンカーは、式$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$の六炭素脂肪族分子等の非ペプチジルセグメントを含んでいてもよい。ペプチジルリンカーは、改変されて本明細書に記載のような誘導体を形成してもよい。
【０２７０】
所望により、非ペプチジルリンカー部分は、半減期延長部分結合トキシンペプチド類似体のペプチド部分に、半減期延長部分を結合させるのにも有用である。例えば、$-NH-(CH_2)_s-C(O)-$（式中、ｓ＝２～２０）等のアルキルリンカーを使用すること

ができる。これらのアルキルリンカーは、低級アルキル（例えば、C_1～C_6）、低級アシル、ハロゲン（例えば、Ｃｌ、Ｂｒ）、ＣＮ、NH_2、フェニル等の、任意の非立体的な障害基（hindering group）でさらに置換されてもよい。例示的な非ペプチジルリンカーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカー（例えば、以下に示される）：

【０２７１】

（Ｉ）

【化１】



［０００２］　式中、ｎはリンカーが約１００～約５０００ダルトン（Ｄａ）、好ましくは約１００～約５００Ｄａの分子量を有するようなものである。

【０２７２】

一実施形態では、非ペプチジルリンカーはアリールである。リンカーは、当該技術分野において記述されているのと同じ方法で、改変されて誘導体を形成してもよく、例えば、Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents, US2007/0071764; Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２００７／０２２８３１号（国際公開第２００８／０８８４２２号として公開）；および２００９年3月２０日に出願された米国仮特許出願第６１／２１０，５９４号に記述されており、これらは全てその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０２７３】

さらに、ＰＥＧ部分は、ＰＥＧアルデヒドを用いての還元的アルキル化またはヒドロキシスクシンイミドもしくはＰＥＧの炭酸エステルを用いてのアシル化によって、またはチオール結合によって、Ｎ末端のアミンまたは選択された側鎖アミンに結合され得る。

【０２７４】

「アリール」は、フェニルまたは飽和、部分飽和、または不飽和の、３、４、または５員の炭素架橋と近傍融合したフェニルであり、該フェニルまたは架橋はC_{1-8}アルキル、C_{1-4}ハロアルキルまたはハロから選択される０、１、２または３個の置換基によって置換されている。

【０２７５】

「ヘテロアリール」は、不飽和の５、６もしくは７員の単環式環、または部分飽和もしくは不飽和の６、７、８、９、１０もしくは１１員の二環式環であり、ここで、少なくとも１個の環は不飽和であり、該単環式および該二環式環はＮ、ＯおよびＳから選択される１、２、３または４個の原子を含有し、該環はC_{1-8}アルキル、C_{1-4}ハロアルキルおよびハロから選択される０、１、２または３個の置換基によって置換されている。

【０２７６】

非ペプチジルリンカーまたは非ペプチド半減期延長部分等の本発明の組成物の非ペプチド部分は、従来の有機化学反応によって合成することができる。

【０２７７】

以上は単に説明のためのものであり、本発明に従って所望により使用され得るリンカーの種類を包括的に扱うものではない。

【０２７８】

免疫グロブリン変異体の生成

上で言及したように、組換えＤＮＡ介在性および／もしくはＲＮＡ介在性のタンパク質発現およびタンパク質工学技術、またはペプチド作製のいかなる他の方法も、本発明の組成物の作製に適用可能である。例えば、ポリペプチドは、形質転換された宿主細胞において作製することができる。簡潔に説明すると、ペプチドをコードする組換えＤＮＡ分子、

すなわちコンストラクトが作製される。そのようなＤＮＡ分子を作製するための方法は、当該技術分野において周知である。例えば、ペプチドをコードする配列を、適切な制限酵素を用いてＤＮＡから切除することができる。多くの入手可能で周知の宿主細胞はいずれも、本発明の実施に使用することができる。具体的な宿主の選択は、当該技術分野で認められるいくつかの因子に依存する。これらには、例えば、選択された発現ベクターとの適合性、ＤＮＡ分子にコードされるペプチドの毒性、形質転換率、ペプチド回収の容易さ、発現特性、バイオセイフティおよび費用が含まれる。全ての宿主が特定のＤＮＡ配列の発現に対して等しく効果的であり得るわけではないことを理解して、これらの因子の釣り合いを決定しなければならない。これらの一般的な指針の中で、培養液中で有用な微生物宿主細胞には、細菌（大腸菌（Escherichia coli）種等）、酵母（サッカロマイセス（Saccharomyces）種等）および他の真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、哺乳類（例えばヒト）細胞、例えば、ＣＨＯ細胞およびＨＥＫ－２９３細胞、並びに本明細書に記載された、または当該技術分野において周知の他の種類が含まれる。変更はＤＮＡレベルでも同様になされ得る。ペプチドをコードするＤＮＡ配列は、選択された宿主細胞により適合するコドンに変化させてもよい。大腸菌（E. coli）の場合、最適化されたコドンが当該技術分野において周知である。制限酵素認識部位を除去するために、または、選択された宿主細胞におけるＤＮＡのプロセシングで役立ち得るサイレント制限酵素認識部位を含むために、コドンを置換することができる。次に、形質転換された宿主は培養および精製される。所望の化合物が発現されるために、宿主細胞を従来の発酵条件下で培養してもよい。そのような発酵条件は、当該技術分野において周知である。さらに、ＤＮＡは所望により、５’から融合タンパク質のコード領域まで、発現された免疫グロブリンに機能的に連結したシグナルペプチド配列（例えば、分泌シグナルペプチド）をさらにコードする。適切な組換え法のさらなる例、および哺乳類細胞による本発明の組成物の組換え発現に有用な例示的ＤＮＡコンストラクト、例えば本発明の特異的結合剤に結合した二量体Ｆｃ融合タンパク質（「ペプチボディ（peptibody）」）またはキメラ免疫グロブリン（軽鎖＋重鎖）－Ｆｃヘテロ三量体（「ヘミボディ（hemibody）」）については、例えば、Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、ＵＳ２００７／００７１７６４; Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２００７／０２２８３１号（国際公開第２００８／０８８４２２号として公開）；および２００９年３月２０日に出願された米国仮特許出願第６１／２１０，５９４号を参照されたい（これらは全てその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０２７９】

所望の免疫グロブリンのアミノ酸配列変異体は、適切なヌクレオチド変化をコードＤＮＡに導入することにより、またはペプチド合成により、作製することができる。そのような変異体には、例えば、免疫グロブリンまたは抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失および／または挿入および／または置換が含まれる。欠失、挿入、および置換のいかなる組み合わせも、最終構築物が所望の特徴を持つことを条件として、最終構築物に到達する。アミノ酸変化は、グリコシル化部位の数または位置を変化させる等の、免疫グロブリンの翻訳後プロセシングも変化させ得る。ある場合においては、免疫グロブリン変異体は、エピトープ結合に直接関わるアミノ酸残基を改変する目的で作製される。他の実施形態では、エピトープ結合に直接には関わらない残基、またはエピトープ結合に何ら関わりもない残基の改変は、本明細書で論じられる目的には望ましい。ＣＤＲ領域および／またはフレームワーク領域のいずれかの内部における変異誘発が企図される。抗体または抗体フラグメントを含む免疫グロブリンのアミノ酸配列における有用な改変を設計するために、当業者は共分散分析技術を使用することができる。(例えば、Choulier, et al., Covariance Analysis of Protein Families: The Case of the Variable Domains of Antibodies, Proteins: Structure, Function, and Genetics 41:475-484 (2000); Demarest et al., Optimization of the Antibody C_H3 Domain by Residue Frequency Analysis of IgG Sequences, J. Mol. Biol. 335:41-48 (2004); Hugo et al., VL position 34 is a key determinant for the engineering

of stable antibodies with fast dissociation rates, Protein Engineering 16(5):381-86 (2003); Aurora et al., Sequence covariance networks, methods and uses thereof, US 2008/0318207 A1; Glaser et al., Stabilized polypeptide compositions, 米国特許出願公開第２００９／００４８１２２　Ａ１号; Urech et al., Sequence based engineering and optimization of single chain antibodies、国際公開第２００８／１１０３４８Ａ１号; Borras et al., Methods of modifying antibodies, and modified antibodies with improved functional properties、国際公開第２００９／０００００９９Ａ２号）。共分散分析により決定されたそのような改変は、免疫グロブリンの作用強度、薬物動態学的特徴、薬力学的特徴、および／または製造性の特徴を向上させることができる。

【０２８０】

免疫グロブリンまたは抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当該技術分野において周知の種々の方法によって作製される。そのような方法には、免疫グロブリンの以前に作製された変異体または非変異体バージョンの、オリゴヌクレオチドを介した（または部位特異的な）変異誘発、ＰＣＲ変異誘発、およびカセット変異導入が含まれる。

【０２８１】

超可変領域すなわちＣＤＲ領域またはフレームワーク領域のいずれか内部における置換変異誘発が企図される。変異誘発にとって好ましい位置にある、免疫グロブリンの特定の残基または領域を特定するための有用な方法は、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれており、Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989)に記載されるようなものである。本明細書において、残基または標的残基の群が特定され（例えば、Ａｒｇ、Ａｓｐ、Ｈｉｓ、ＬｙｓおよびＧｌｕなどの電荷を有する残基）、アミノ酸の抗原との相互作用に影響を及ぼすよう、中性または負の電荷を有するアミノ酸（最も好ましくは、アラニンまたはポリアラニン）で置換される。次いで、置換に対し機能感受性を示すアミノ酸部位を、置換部位にまたはその代わりに、さらなる変異体またはその他の変異体を導入することによって改良する。従って、アミノ酸配列変化を導入する部位は予め決定されているが、変異の性質自体は、予め決定されている必要はない。例えば、所与の部位での変異の動向を分析するために、Ａｌａスキャニングまたはランダム変異誘発を、標的コドンまたは領域で実施し、発現された改変体を、所望の活性についてスクリーニングする。

【０２８２】

本発明の免疫グロブリンのいくつかの実施形態は、合成法によっても作製可能である。固相合成は、小分子ペプチドを調製するのに最も対費用効果の高い方法であるため、それぞれのペプチドを調製するのに好ましい技術である。例えば、周知の固相合成技術には、保護基、リンカー、および固相担体の使用、並びに、特定の保護および脱保護の反応条件、リンカーの切断条件、スカベンジャーの使用、並びに固相ペプチド合成の他の態様が含まれる。適切な技術は当該技術分野において周知である（例えば、Merrifield (1973), Chem. Polypeptides, pp. 335-61 (Katsoyannis and Panayotis eds.); Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85: 2149; Davis et al. (1985), Biochem. Intl. 10: 394-414; Stewart and Young (1969), Solid Phase Peptide Synthesis;米国特許第３，９４１，７６３号;Finn et al. (1976), The Proteins (3rd ed.) 2: 105-253; and Erickson et al. (1976), The Proteins (3rd ed.) 2: 257-527; "Protecting Groups in Organic Synthesis," 3rd Edition, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, Eds., John Wiley & Sons, Inc., 1999; NovaBiochem Catalog, 2000; "Synthetic Peptides, A User's Guide," G. A. Grant, Ed., W.H. Freeman & Company, New York, N.Y., 1992; "Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Organic Chemistry," W. D. Bennet, J. W. Christensen, L. K. Hamaker, M. L. Peterson, M. R. Rhodes, and H. H. Saneii, Eds., Advanced Chemtech, 1998; "Principles of Peptide Synthesis, 2nd ed.," M. Bodanszky, Ed., Springer-Verla

g, 1993; "The Practice of Peptide Synthesis, 2nd ed.," M. Bodanszky and A. Bodanszky, Eds., Springer-Verlag, 1994; "Protecting Groups," P. J. Kocienski, Ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1994; "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach," W. C. Chan and P. D. White, Eds., Oxford Press, 2000, G. B. Fields et al., Synthetic Peptides: A User's Guide, 1990, 77-183)。本発明の組成物の作製に適用可能な、当該技術分野において周知の合成方法および精製方法のさらなる例としては、例えば、Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、ＵＳ２００７／００７１７６４およびSullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２００７／０２２８３１号（国際公開第２００８／０８８４２２Ａ２号として公開）を参照されたい（これらの両方はその全体が参照によって本明細書に組み込まれる）。

【０２８３】

本明細書における免疫グロブリンのいずれか、並びに変異体をさらに説明する際、天然ペプチドおよびタンパク質（表３）に一般に組み入れられる２０個の「標準（canonical）」アミノ酸残基の種類を表すために、一文字略号方式がしばしば適用される。このような一文字略号は、意味の上で、三文字略号または省略されていないアミノ酸名と完全に同義である。本明細書に使用されている一文字略号方式において、大文字はＬアミノ酸を示し、小文字はＤアミノ酸を示す。例えば、略号「Ｒ」はＬ－アルギニンを表し、略号「ｒ」はＤ－アルギニンを表す。

【０２８４】

【表７】

表３．標準アミノ酸の一文字略号
括弧内に三文字略号を記す。

アラニン（Ala）	A
グルタミン（Gln）	Q
ロイシン（Leu）	L
セリン（Ser）	S
アルギニン（Arg）	R
グルタミン酸（Glu）	E
リジン（Lys）	K
トレオニン（Thr）	T
アスパラギン（Asn）	N
グリシン（Gly）	G
メチオニン（Met）	M
トリプトファン（Trp）	W
アスパラギン酸（Asp）	D
ヒスチジン（His）	H
フェニルアラニン（Phe）	F
チロシン（Tyr）	Y
システイン（Cys）	C
イソロイシン（Ile）	I
プロリン（Pro）	P
バリン（Val）	V

【０２８５】

本明細書において、アミノ酸配列中のアミノ酸置換は、特定の位置におけるアミノ酸残基に対する一文字略号に続き、元の目的配列に対する数字のアミノ酸位置、次いで、これ

に続く、置換されたアミノ酸残基に対する一文字記号によって典型的に表される。例えば、「Ｔ３０Ｄ」は、元の目的配列に対して、アミノ酸位置３０におけるアスパラギン酸残基によるトレオニン残基の置換を表す。別の例として、「Ｗ１０１Ｆ」は、元の目的配列に対して、アミノ酸位置１０１におけるフェニルアラニン残基によるトリプトファン残基の置換を表す。

【０２８６】

非標準アミノ酸残基は、組換え的に発現している細胞を使用するタンパク質工学の公知の技術を使用することにより、本発明の範囲内でポリペプチドに組み込むことができる。（例えば、Link et al., Non-canonical amino acids in protein engineering, Current Opinion in Biotechnology, 14(6):603-609 (2003)を参照）。「非標準アミノ酸残基」という用語は、天然タンパク質中に一般的に取り込まれる２０個の標準アミノ酸に属さないＤ又はＬ型のアミノ酸残基、例えば、β－アミノ酸、ホモアミノ酸、環状アミノ酸及び誘導体化された側鎖を有するアミノ酸を表す。例としては、（Ｌ型またはＤ型の）β－アラニン、β－アミノプロピオン酸、ピペリジン酸、アミノカプリオ酸、アミノヘプタン酸、アミノピメリン酸、デスモシン、ジアミノピメリン酸、Ｎ$^{\alpha}$－エチルグリシン、Ｎ$^{\alpha}$－エチルアスパラギン、ヒドロキシリジン、アロ－ヒドロキシリジン、イソデスモシン、アロ－イソロイシン、ω－メチルアルギニン、Ｎ$^{\alpha}$－メチルグリシン、Ｎ$^{\alpha}$－メチルイソロイシン、Ｎ$^{\alpha}$－メチルバリン、γ－カルボキシグルタミン酸、ε－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルリジン、ε－Ｎ－アセチルリジン、Ｏ－ホスホセリン、Ｎ$^{\alpha}$－アセチルセリン、Ｎ$^{\alpha}$－ホルミルメチオニン、３－メチルヒスチジン、５－ヒドロキシリジン、および他の同様なアミノ酸、並びに下記表４に列挙されるもの、並びに本明細書に記載のこれらのうちいずれかの誘導体化型が挙げられる。表４は、本発明に基づく有用ないくつかの例示的な非標準アミノ酸残基、および本明細書で通常使用される関連略号を含むが、異なる略号および命名法が同じ物質に適用可能であり、本明細書に同義的に現れることは熟練した実施者ならば理解するであろう。

【０２８７】

【表８】

表４．　本発明に基づく、ペプチド配列へのアミノ酸の付加、挿入、または置換に有用な非標準アミノ酸
表４に列挙される略号が、本明細書の別の場所で開示される同一の物質に対する別の略号と異なる場合、両方の略号が適用可能であると理解される。表４に列挙されるアミノ酸は、Ｌ型であってもＤ型であってもよい。

アミノ酸	略号
アセトアミドメチル	Acm
アセチルアルギニン	acetylarg
α-アミノアジピン酸	Aad
アミノ酪酸	Abu
６-アミノヘキサン酸	Ahx；　εAhx
３-アミノ-６-ヒドロキシ-２-ピペリドン	Ahp
２-アミノインダン-２-カルボン酸	Aic
α-アミノ-イソ酪酸	Aib
３-アミノ-２-ナフトエ酸	Anc
２-アミノテトラリン-２-カルボン酸	Atc
アミノフェニルアラニン	Aminophe；　Amino-Phe
４-アミノ-フェニルアラニン	４AmP
４-アミジノ-フェニルアラニン	４AmPhe
２-アミノ-２-（１-カルバムイミドイルピペリジン-４-イル）酢酸	４AmPig
Arg　φ　(CH_2NH)　-還元アミド結合	rArg
β-ホモアルギニン	bhArg
β-ホモリジン	bhomoK
β-ホモTic	BhTic
β-ホモフェニルアラニン	BhPhe
β-ホモプロリン	BhPro
β-ホモトリプトファン	BhTrp
４,４’-ビフェニルアラニン	Bip
β、β-ジフェニル-アラニン	BiPhA
β-フェニルアラニン	BPhe
p-カルボキシル-フェニルアラニン	Cpa
シトルリン	Cit
シクロヘキシルアラニン	Cha
シクロヘキシルグリシン	Chg
シクロペンチルグリシン	Cpg
２-アミノ-３-グアニジノプロパン酸	３G-Dpr
α，γ-ジアミノ酪酸	Dab
２,４-ジアミノ酪酸	Dbu
ジアミノプロピオン酸	Dap

α，β-ジアミノプロピオン酸（または２，３-ジアミノプロピオン酸	Dpr
３，３-ジフェニルアラニン	Dip
４-グアニジノフェニルアラニン	Guf
４-グアニジノプロリン	４GuaPr
ホモアルギニン	hArg；　hR
ホモシトルリン	hCit
ホモグルタミン	hQ
ホモリジン	hLys；　hK；　homoLys
ホモフェニルアラニン	hPhe；　homoPhe
４-ヒドロキシプロリン（またはヒドロキシプロリン）	Hyp
２-インダニルグリシン（またはインダニルグリシン）	IgI
インドリン-２-カルボン酸	Idc
ヨードチロシン	I-Tyr
Lys　ϕ（CH_2NH）-還元アミド結合	rLys
酸化メチニン	Met[O]
メチオニン　スルホン	$Met[O]_2$
N^{α}-メチルアルギニン	NMeR
Nα-[（CH_2）$_3$NHCH（NH）NH_2]置換グリシン	N-Arg
N^{α}-メチルシトルリン	NMeCit
N^{α}-メチルグルタミン	NMeQ
N^{α}-メチルホモシトルリン	N^{α}-MeHoCit
N^{α}-メチルホモリジン	NMeHoK
N^{α}-メチルロイシン	N^{α}-MeL；　NMeL；　NMeLeu；　NMe-Leu
N^{α}-メチルリジン	NMe-Lys
N^{ε}-メチル-リジン	N-eMe-K
N^{ε}-エチル-リジン	N-eEt-K
N^{ε}-イソプロピル-リジン	N-eIPr-K
N^{α}-メチルノルロイシン	NMeNle；　NMe-Nle
N^{α}-メチルオルニチン	N^{α}-MeOrn；　NMeOrn
N^{α}-メチルフェニルアラニン	NMe-Phe
４-メチル-フェニルアラニン	MePhe
α-メチルフェニルアラニン	AMeF
N^{α}-メチルトレオニン	NMe-Thr；　NMeThr
N^{α}-メチルバリン	NMeVal；　NMe-Val
N^{ε}-（O-（アミノエチル）-O’-（２-プロパノイル）-ウンデカエチレングリコール）-リジン	K（NPeg１１）
N^{ε}-（O-（アミノエチル）-O’-（２-プロパノイル）-（エチレングリコール）２７-リジン	K（NPeg２７）
３-（１-ナフチル）アラニン	１-Nal；　１Nal

3-（2-ナフチル）アラニン	2-Nal； 2Nal
ニペコ酸	Nip
ニトロフェニルアラニン	nitrophe
ノルロイシン	Nle
ノルバリン	NvaまたはNvl
O-メチルチロシン	Ome-Tyr
オクタヒドロインドール-2-カルボン酸	Oic
オルニチン	Orn
Orn ψ（CH2NH）-還元アミド結合	rOrn
4-ピペリジニルアラニン	4PipA
4-ピリジニルアラニン	4Pal
3-ピリジニルアラニン	3Pal
2-ピリジニルアラニン	2Pal
パラ-アミノフェニルアラニン	4AmP；4-Amino-Phe
パラ-ヨードフェニルアラニン（または4-ヨードフェニルアラニン）	pI-Phe
フェニルグリシン	Phg
4-フェニル-フェニルアラニン（またはビフェニルアラニン）	4Bip
4,4’-ビフェニルアラニン	Bip
ピペコリン酸	Pip
4-アミノ-1-ピペリジン-4-カルボン酸	4Pip
サルコシン	Sar
1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン	Tic
1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-1-カルボン酸	Tiq
1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-7-ヒドロキシ-3-カルボン酸	Hydroxyl-Tic
1,2,3,4-テトラヒドロノルハルマン-3-カルボン酸	Tpi
チアゾリジン-4-カルボン酸	Thz
3-チエニルアラニン	Thi

【０２８８】

ＵＰＡＣ－ＩＵＢ生物化学の命名法に関する合同委員会（ＪＣＢＮ）によるアミノ酸及びペプチドに対する命名法及び記号表記は、以下の文書に公表されている：Biochem. J., 1984, 219, 345-373; Eur. J. Biochem., 1984, 138, 9-37; 1985, 152, 1; 1993, 213, 2; Internat. J. Pept. Prot. Res., 1984, 24, p 84に従う; J. Biol. Chem., 1985, 260, 14-42; Pure Appl. Chem., 1984, 56, 595-624; Amino Acids and Peptides, 1985, 16, 387-410; Biochemical Nomenclature and Related Documents, 2nd edition, Portland Press, 1992, pages 39-69。

【０２８９】

本発明の免疫グロブリンのペプチドドメインに対する一つまたは複数の有用な改変には、既知の化学的手法によって達成される、アミノ酸の付加もしくは挿入、アミノ酸欠失、ペプチド切断、アミノ酸置換、および／またはアミノ酸残基の化学誘導体化が含まれ得る。例えば、このように改変されたアミノ酸配列には、目的の天然配列のアミノ酸配列に対

して、そこに挿入または置換された少なくとも１つのアミノ酸残基が含まれ、その中で該挿入または置換されたアミノ酸残基は求核性または求電子性の反応性官能基を含む側鎖を有し、それによってペプチドはリンカーおよび／または半減期延長部分に結合する。本発明によると、そのような求核性または求電子性の反応性官能基の有用な例としては、チオール、一級アミン、セレノ、ヒドラジド、アルデヒド、カルボン酸、ケトン、アミノオキシ、マスクされた（保護）アルデヒド、またはマスクされた（保護）ケト官能基が挙げられるが、これらに限定はされない。求核性の反応性官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基の例としては、リジン残基、ホモリジン、α，β－ジアミノプロピオン酸残基、α，γ－ジアミノ酪酸残基、オルニチン残基、システイン、ホモシステイン、グルタミン酸残基、アスパラギン酸残基、またはセレノシステイン残基が挙げられるが、これらに限定はされない。

【０２９０】

アミノ酸残基は一般に、異なる化学的特徴および／または物理的特徴に従って分類される。「酸性アミノ酸残基」という用語は、酸性基を含む側鎖を有するＤ型またはＬ型のアミノ酸残基を表す。例示的な酸性残基としては、アスパラギン酸（aspartatic acid）およびグルタミン酸（glutamatic acid）残基が挙げられる。「アルキルアミノ酸残基」という用語は、直鎖、分岐鎖、または環状であってよいC_{1-6}アルキル側鎖を有するＤ型またはＬ型のアミノ酸残基を表し、例えば、プロリン等中におけるアミノ酸アミンを表し、ここでC_{1-6}アルキルは、C_{1-4}ハロアルキル、ハロ、シアノ、ニトロ、－Ｃ（＝Ｏ）R^b、－Ｃ（＝Ｏ）OR^a、－Ｃ（＝Ｏ）NR^aR^a、－Ｃ（＝NR^a）NR^aR^a、－NR^aC（＝NR^a）NR^aR^a、－OR^a、－ＯＣ（＝Ｏ）R^b、－ＯＣ（＝Ｏ）NR^aR^a、－OC_{2-6}アルキルNR^aR^a、－OC_{2-6}アルキルOR^a、－SR^a、－Ｓ（＝Ｏ）R^b、－$S(=O)_2R^b$、－$S(=O)_2NR^aR^a$、－NR^aR^a、－Ｎ（R^a）Ｃ（＝Ｏ）R^b、－Ｎ（R^a）Ｃ（＝Ｏ）OR^b、－Ｎ（R^a）Ｃ（＝Ｏ）NR^aR^a、－Ｎ（R^a）Ｃ（＝NR^a）NR^aR^a、－Ｎ（R^a）$S(=O)_2R^b$、－Ｎ（R^a）$S(=O)_2NR^aR^a$、－NR^aC_{2-6}アルキルNR^aR^aおよび－NR^aC_{2-6}アルキルOR^aから選択される０、１、２または３個の置換基により置換されており；ここでR^aは独立して、それぞれの場合において、ＨまたはR^bであり；R^bは独立して、それぞれの場合において、ハロ、C_{1-4}アルキル、C_{1-3}ハロアルキル、－OC_{1-4}アルキル、－NH_2、－NHC_{1-4}アルキル、および－Ｎ（C_{1-4}アルキル）C_{1-4}アルキルから選択される０、１、２または３個の置換基によって置換されたC_{1-6}アルキルであり；あるいは、あらゆるそのプロトン化形態、例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、セリン、トレオニン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、システイン、メチオニン、ヒドロキシプロリンを表すが、その残基にはアリールも芳香族基も含有されない。「芳香族アミノ酸残基」という用語は、芳香族基を含む側鎖を有するＤ型またはＬ型のアミノ酸残基を表す。例示的な芳香族残基としては、トリプトファン、チロシン、３－（１－ナフチル）アラニン、またはフェニルアラニン残基が挙げられる。「塩基性アミノ酸残基」という用語は、塩基性基を含む側鎖を有するＤ型またはＬ型のアミノ酸残基を表す。例示的な塩基性アミノ酸残基としては、ヒスチジン、リジン、ホモリジン、オルニチン、アルギニン、Ｎ－メチル－アルギニン、ω－アミノアルギニン、ω－メチル－アルギニン、１－メチル－ヒスチジン、３－メチル－ヒスチジン、およびホモアルギニン（ｈＲ）残基が挙げられる。「親水性アミノ酸残基」という用語は、極性基を含む側鎖を有するＤ型またはＬ型のアミノ酸残基を表す。例示的な親水性残基としては、システイン、セリン、トレオニン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、およびシトルリン（Cit）残基が含まれる。「親油性アミノ酸残基」という用語は、無電荷の、脂肪族または芳香族の基を含む側鎖を有するＤ型またはＬ型のアミノ酸残基を表す。例示的な親油性側鎖としては、フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、バリン、トリプトファン、およびチロシンが挙げられる。アラニン（Ａ）は両親媒性であり、親水性残基としてまたは親油性残基として作用可能である。

従って、アラニンは、「親油性残基」および「親水性残基」の両方の定義内に含まれる。「非機能性アミノ酸残基」という用語は、酸性基、塩基性基、または芳香族基を欠いている側鎖を有するＤ型またはＬ型のアミノ酸残基を表す。例示的な中性アミノ酸残基としては、メチオニン、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、およびノルロイシン（Ｎｌｅ）残基が挙げられる。

【０２９１】

さらなる有用な実施形態は、本明細書で開示されるポリペプチドのアミノ酸配列の保存的な改変からもたらされ得る。保存的改変は、そのような改変がなされる結合される（例えば、ＰＥＧ結合）ペプチドと同様の機能的、物理的、および化学的特徴を有する半減期延長部分結合ペプチドを生成する。本明細書で開示される結合ポリペプチドのそのような保存的改変型もまた、本発明の実施形態であることが企図される。

【０２９２】

対照的に、ペプチドの機能的特徴および／または化学的特徴における実質的な改変は、（ａ）例えば、αらせん高次構造等の、置換の領域中の分子の主鎖構造、（ｂ）標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または（ｃ）分子の大きさの維持に対するそれらの影響という点で大きく異なる、アミノ酸配列における置換を選択することで達成できる。

【０２９３】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、元の（native）アミノ酸残基を、その位置におけるアミノ酸残基の極性または電荷に対する影響がほとんどない別の（nonnative）残基で置換することを含み得る。さらに、ポリペプチド中のあらゆる天然残基は、「アラニンスキャニング変異誘発」について以前に記載されたように、アラニンで置換することもできる（例えば、アラニンスキャニング変異誘発について論じている、MacLennan et al., Acta Physiol. Scand. Suppl., 643:55-67 (1998); Sasaki et al., 1998, Adv. Biophys. 35:1-24 (1998)を参照）。

【０２９４】

所望のアミノ酸置換（保存的であるか非保存的であるかに関わらず）は、そのような置換が所望された時に、当業者によって決定され得る。例えば、ペプチド配列の重要な残基を特定するために、または本明細書に記載のペプチドもしくはビヒクル結合ペプチド分子の親和性を増加もしくは減少させるために、アミノ酸置換を利用することができる。

【０２９５】

天然残基は共通の側鎖性質に基づいて分類できる：

１）　疎水性：ノルロイシン（ＮｏｒまたはＮｌｅ）、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ；

２）　中性且つ親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ；

３）　酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ；

４）　塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ；

５）　鎖配向に影響を及ぼす残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ；および

６）　芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ。

【０２９６】

保存的アミノ酸置換は、これらのクラスのうち１つの構成要素を、同じクラスの別の構成要素で置換することを含み得る。保存的アミノ酸置換は、非天然アミノ酸残基を含んでもよく、これらは通常、生物系での合成によってではなく、化学的なペプチド合成によって組み込まれる。これらにはペプチド模倣薬、およびアミノ酸部分を逆転または反転させた他の形態も含まれる。

【０２９７】

非保存的置換は、これら種類の１つのうちのあるメンバーを、別の種類からのあるメンバーに置換することを含み得る。そのような置換された残基は、トキシンペプチド類似体の領域に導入することができる。

【０２９８】

そのような変更を行う際、ある特定の実施形態によれば、アミノ酸のハイドロパシー指

標が考慮され得る。各アミノ酸には、その疎水性および電荷特性に基づくハイドロパシー指標が割り当てられている。それらは、イソロイシン（＋４．５）；バリン（＋４．２）；ロイシン（＋３．８）；フェニルアラニン（＋２．８）；システイン／シスチン（＋２．５）；メチオニン（＋１．９）；アラニン（＋１．８）；グリシン（－０．４）；トレオニン（－０．７）；セリン（－０．８）；トリプトファン（－０．９）；チロシン（－１．３）；プロリン（－１．６）；ヒスチジン（－３．２）；グルタミン酸（－３．５）；グルタミン（－３．５）；アスパラギン酸（－３．５）；アスパラギン（－３．５）；リジン（－３．９）；およびアルギニン（－４．５）である。

【０２９９】

タンパク質に相互作用的な生物学的機能を与える上でのハイドロパシーアミノ酸指標の重要性は、当該技術分野では理解されていることである（例えば、Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131を参照）。あるアミノ酸が同様のハイドロパシー指標またはスコアを有する他のアミノ酸に置換されて、なお同様の生物活性を保持する場合があることが知られている。ハイドロパシー指標に基づいて変更を行う際、ある実施形態では、ハイドロパシー指標が±２以内であるアミノ酸の置換も含まれる。いくつかの実施形態では、±１以内であるものが含まれ、別の実施形態では、±０．５以内のものが含まれる。

【０３００】

また、類似アミノ酸の置換が親水性に基づいて効率的に行われ得ることは、特に、本明細書に記載されるように、それによって生成された生物学的な機能を持つタンパク質またはペプチドが免疫学的な実施形態での使用を意図したものである場合、当該技術分野において理解されていることである。ある実施形態では、隣接するアミノ酸の親水性によって規定される、あるタンパク質の最大の局所平均親水性は、その免疫原性および抗原性、すなわち該タンパク質の生物学的特性と相関関係を持つ。

【０３０１】

以下の親水性値がこれらのアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（+３．０）；リジン（+３．０）；アスパラギン酸（+３．０±１）；グルタミン酸（+３．０±１）；セリン（+０．３）；アスパラギン（+０．２）；グルタミン（+０．２）；グリシン（０）；トレオニン（-０．４）；プロリン（-０．５±１）；アラニン（-０．５）；ヒスチジン（-０．５）；システイン（-１．０）；メチオニン（-１．３）；バリン（-１．５）；ロイシン（－１．８）；イソロイシン（-１．８）；チロシン（-２．３）；フェニルアラニン（-２．５）およびトリプトファン（-３．４）。同様の親水性値に基づき変更を行う際、ある実施形態では、親水性値が±２以内であるアミノ酸の置換が含まれ、ある実施形態では、±１以内のものが含まれ、ある実施形態では、±０．５以内のものが含まれる。親水性に基づいて一次アミノ酸配列からエピトープを同定することもできる。これらの領域は「エピトープコア領域」とも称される。

【０３０２】

保存的置換の例としては、イソロイシン、バリン、ロイシン　ノルロイシン、アラニン、もしくはメチオニン等の１つの無極性（疎水性）アミノ酸残基の、別のものへの置換、例えばアルギニンとリジン、グルタミンとアスパラギン、グリシンとセリン等の１つの極性（親水性）アミノ酸残基の別のものへの置換、リジン、アルギニンもしくはヒスチジン等の１つの塩基性アミノ酸残基の別のものへの置換、またはアスパラギン酸もしくはグルタミン酸等の１つの酸性残基の別のものへの置換が挙げられる。「保存的アミノ酸置換」という表現には、誘導体化されていない残基に代わって、化学的に誘導体化された残基を使用することも含まれるが、ただしそのようなポリペプチドが必須の生物活性を示すという条件がある。本発明に従い、有用であり得る他の例示的なアミノ酸置換を以下の表５に記載する。

【０３０３】

【表９】

表５．　いくつかの有用なアミノ酸置換

元の残基	例示的な置換基
Ala	Val、 Leu、 Ile
Arg	Lys、 Gln、 Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser、 Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro、 Ala
His	Asn、 Gln、 Lys、 Arg
Ile	Leu、 Val、 Met、 Ala、 Phe、 ノルロイシン
Leu	ノルロイシン、 Ile、 Val、 Met、 Ala、 Phe
Lys	Arg、 １,４-ジアミノ-ブタン酸、Gln、 Asn
Met	Leu、 Phe、 Ile
Phe	Leu、 Val、 Ile、 Ala、 Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr、 Ala、 Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr、 Phe
Tyr	Trp、 Phe、 Thr、 Ser
Val	Ile、 Met、 Leu、 Phe、 Ala、 ノルロイシン

【０３０４】

通常、免疫グロブリンのアミノ酸配列変異体は、元の免疫グロブリンまたは重鎖もしくは軽鎖の可変領域の抗体アミノ酸配列と、少なくとも６０％のアミノ酸配列同一性、または少なくとも６５％、または少なくとも７０％、または少なくとも７５％または少なくとも８０％同一性、より好ましくは少なくとも８５％同一性、さらにより好ましくは少なくとも９０％同一性、最も好ましくは、例えば、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、および１００％を含む、少なくとも９５％同一性を有するアミノ酸配列を有する。この配列に対する同一性または相同性は、本明細書では、配列を整列させ、必要ならばギャップを導入して、最大の配列同一性を達成した後、いかなる保存的置換も配列同一性の部分と見なさなかった場合の、元の配列と同一である、候補配列中のアミノ酸残基の割合（％）として定義される。免疫グロブリンまたは抗体の配列中への、Ｎ末端、Ｃ末端、または内部の、伸長、欠失、または挿入はいずれも、配列同一性または相同性に影響を及ぼさないと解釈されるものとする。

【０３０５】

アミノ酸配列挿入には、長さが１残基から１００個以上の残基を含有するポリペプチドまで及ぶ、アミノ末端および／またはカルボキシル末端の融合、並びに単一または複数のアミノ酸残基の内部配列挿入も含まれる。末端挿入の例としては、Ｎ末端にメチオニル残基を有する免疫グロブリン、またはエピトープ標識もしくはサルベージ受容体結合エピト

ープと融合された免疫グロブリン（抗体または抗体フラグメントを含む）が挙げられる。免疫グロブリンまたは抗体分子の他の挿入による変異体には、免疫グロブリンの血清半減期を増加させる、例えばＮ末端またはＣ末端における、ポリペプチドへの融合が含まれる。

【０３０６】

エピトープ標識の例としては、ｆｌｕ　ＨＡ標識ポリペプチドおよびその抗体１２ＣＡ５（Field et al., Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)）；ｃ－ｍｙｃ標識並びにその抗体である８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７および９Ｅ１０（Evan et al., Mol. Cell. Biol. 5(12): 3610-3616 (1985)）；並びに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）標識およびその抗体（Paborsky et al., Protein Engineering 3(6): 547-553 (1990)）が挙げられる。他の例示的な標識は、ニッケルキレート化を用いてそのように標識された化合物の単離を可能にする、通常は約６個のヒスチジン残基のポリヒスチジン配列である。ＦＬＡＧ（商標登録）標識（イーストマン・コダック社、ニューヨーク州ロチェスター）等の他のラベルおよびタグは、当該技術分野において周知であり慣例で使用されるものである。

【０３０７】

抗体および抗体フラグメントを含む本発明の免疫グロブリンのアミノ酸置換変異体の、いくつかの具体的で非限定的な実施形態を、以下に例示する。

【０３０８】

免疫グロブリンの適切な高次構造の維持に関わらないシステイン残基はいずれも、通常はセリンと置換されることで、分子の酸化安定性を向上させ、異常な架橋を防ぐことができる。逆に、システイン結合が免疫グロブリンに追加されることで、その安定性を向上させることが可能である（特に、免疫グロブリンがＦｖフラグメント等の抗体フラグメントである場合）。

【０３０９】

ある場合において、免疫グロブリン変異体は、開始配列においてエピトープ結合に直接関わっているアミノ酸残基を改変する目的で、作製される。他の実施形態では、エピトープ結合には直接関わらない残基、またはエピトープ結合に全く関わっていない残基の改変は、本明細書で論じられる目的には望ましい。ＣＤＲ領域および／またはフレームワーク領域のいずれかの内部での変異誘発が企図される。

【０３１０】

どの抗原結合性タンパク質アミノ酸残基がエピトープの認識および結合に重要であるかを決定するために、アラニンスキャニング変異誘発を行って置換変異体を生成してもよい。例えば、Cunningham et al., Science, 244:1081-1085 (1989)を参照されたい（この開示は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる）。この方法では、個々のアミノ酸残基が１つずつアラニン残基と置換され、得られた抗体は、非改変ポリペプチドと比較して、その特異的エピトープとのその結合能についてスクリーニングされる。結合能が減少した改変抗原結合性タンパク質は、配列決定されて、どの残基が変化したかが決定され、それによって、結合または生物学的特性におけるその重要性が示される。

【０３１１】

抗原結合性タンパク質の置換変異体は、ランダムなアミノ酸変化が親ポリペプチド配列に導入される親和性成熟によって、作製することができる。例えば、Ouwehand et al., Vox Sang 74 (Suppl 2):223-232, 1998; Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8910-8915, 1998; Dall'Acqua et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 8:443-450, 1998を参照されたい（これらの開示はその全体が参照によって本明細書に組み込まれる）。親和性成熟には、抗原結合性タンパク質、またはその変異体の作製およびスクリーニング、並びに得られた変異体からの、親抗原結合性タンパク質と比較して結合親和性の増加等の改変された生物学的特性を有するものの、選択が含まれる。置換変異体を生成するための都合の良い方法は、ファージディスプレイを用いる親和性成熟である。簡潔に説明すると、いくつかの超可変領域部位が変異導入されて、各部位にお

ける全ての可能なアミノ置換が生成される。そのように生成された変異体は、各粒子内に封入されたＭ１３の遺伝子ＩＩＩ産物への融合体として、繊維状ファージ粒子の表面上に一価の様式で発現される。次に、ファージにより提示された変異体は、それらの生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。例えば、国際公開第９２／０１０４７号、国際公開第９３／１１２３６６号、国際公開第９５／１５３８８号および国際公開第９３／１９１７２号を参照されたい。

【０３１２】

現在の抗体親和性成熟方法は、２つの変異誘発カテゴリー、すなわち、確率論的および非確率論的なものに分けられる。誤りがちなＰＣＲ（error prone PCR）、変異誘発菌種（Low et al., J. Mol. Biol. 260, 359-68, 1996）、および飽和変異誘発（Nishimiya et al., J. Biol. Chem. 275:12813-20, 2000; Chowdhury, P. S. Methods Mol. Biol. 178, 269-85, 2002）は、確率論的な変異誘発法の典型例である（Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 102:8466-71, 2005）。非確率論的技術では、特定の変異タンパク質の限定された収集物を生成するために、しばしばアラニンスキャニングまたは部位特異的突然変異誘発が用いられる。いくつかの方法を以下に詳細に記載する。

【０３１３】

パニング法による親和性成熟

組換え抗体の親和性成熟は一般的には、漸減量の抗原の存在下における、候補抗体の数回に渡るパニングを通して行われる。１回当たりの漸減量の抗原によって抗原に最も高い親和性を有する抗体が選択され、それにより、出発物質の大きなプールから高親和性の抗体が得られる。パニングによる親和性成熟は当該技術分野において周知であり、例えば、Huls et al. (Cancer Immunol Immunother. 50:163-71, 2001)に記載がなされている。ファージディスプレイ技術を用いた親和性成熟の方法は、本明細書の別の部分に記載されており、当該技術分野において周知である（例えば、Daugherty et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 97:2029-34, 2000を参照）。

【０３１４】

ルックスルー変異誘発（look-through mutagenesis）

ルックスルー変異誘発（ＬＴＭ）（Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 102:8466-71, 2005）は、抗体結合部位を迅速にマッピングするための方法を提供する。ＬＴＭのために、２０個の天然アミノ酸により提供される主要な側鎖化学の代表である９個のアミノ酸が選択され、抗体の全６個のＣＤＲにおける全ての位置での、機能的側鎖の結合への関与が分析される。ＬＴＭは、ＣＤＲ内に、位置的に連続した（a positional series of）単一突然変異を生み出し、そこでは、それぞれの「野生型」残基は９個の選択されたアミノ酸のうちの１つにより意図的に置換される。変異したＣＤＲは組み合わされて、全ての変異タンパク質の定量的表示に対し阻害的にならずに、複雑性およびサイズが増加していく一本鎖可変領域フラグメント（ｓｃＦｖ）のコンビナトリアルライブラリが作製される。ポジティブ選択の後、向上した結合能を有するクローンが配列決定され、有益な変異がマッピングされる。

【０３１５】

誤りがちのＰＣＲ

誤りがちのＰＣＲには、異なる選択ラウンド間における核酸の無作為化が含まれる。無作為化は、使用されるポリメラーゼの内因的エラー率でもって低速で行われるが、転写中に高い内因的エラー率を有するポリメラーゼを使用する（Hawkins et al., J Mol Biol. 226:889-96, 1992）、誤りがちのＰＣＲ（Zaccolo et al., J. Mol. Biol. 285:775-783, 1999）によって促進され得る。変異サイクルの後、抗原に対して向上した親和性を有するクローンが、当該技術分野における通例の方法により選択される。

【０３１６】

遺伝子シャフリングおよび指向性進化を利用する技術が、所望の活性を目的として抗原結合性タンパク質、またはその変異体を作製およびスクリーニングするのに使用されても

よい。例えば、Jermutus et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 98(1):75-80 (2001)では、リボソーム提示法に基づく、場合に応じたｉｎ ｖｉｔｒｏでの選択戦略が、ＤＮＡシャフリングによるｉｎ ｖｉｔｒｏでの多様化と組み合わされることで、ｓｃＦｖのオフ速度（off-rate）または熱力学的安定性のいずれかが進化したことが示され；Fermer et al., Tumour Biol. 2004 Jan-Apr;25(1-2):7-13では、ＤＮＡシャフリングと組み合わされたファージディスプレイの使用により、親和性がおよそ３桁上昇したことが報告された。Dougherty et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Feb. 29; 97(5):2029-2034では、（ｉ）機能的なクローンが超変異ライブラリにおいて、予想外に高頻度で発生すること、（ｉｉ）機能獲得型変異体がそのようなライブラリにかなり存在すること、および（ｉｉｉ）より高い親和性に至るｓｃＦｖ変異体の過半数が、結合部位から遠い残基に対するものであることが報告された。

【０３１７】

あるいは、または、さらに、抗原抗体複合体の結晶構造を解析して抗体と抗原の接触点を特定すること、またはコンピュータソフトウェアを使用してそのような接触点のモデルを作ることが有益な場合がある。本明細書で詳しく述べられる技術によれば、そのような接触残基および隣接残基は置換の候補である。そのような変異体が生成されると、それらは本明細書に記載されるようなスクリーニングを受け、一つまたは複数の関連するアッセイにおいて優れた特性を有する抗体が、さらなる開発のために選択され得る。

【０３１８】

修飾された炭水化物を有する免疫グロブリン

【０３１９】

例えば、免疫グロブリンに結合した炭水化物部分のうちの一つもしくは複数を付加もしくは除去して、および／または免疫グロブリン中の一つまたは複数のグリコシル化部位を付加もしくは除去して、親ポリペプチドに対して、修飾されたグリコシル化パターンを有する免疫グロブリン変異体を作製することもできる。

【０３２０】

抗体を含むポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、Ｎ結合型またはＯ結合型のいずれかである。Ｎ結合型とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を表す。アスパラギン－Ｘ－セリンおよびアスパラギン－Ｘ－トレオニンというトリペプチド配列（ここでＸは、プロリン以外の任意のアミノ酸である）が、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的な結合に対する認識配列である。ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在することにより、潜在的なグリコシル化部位が形成される。従って、Ｎ結合型グリコシル化部位は、これらのトリペプチド配列の１つまたは複数を含有するようにアミノ酸配列を変化させることによって免疫グロブリンに付加することができる。Ｏ結合型グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も多いのはセリンまたはトレオニンへの、糖Ｎ－アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうち１つの結合を表すが、５-ヒドロキシプロリンまたは５-ヒドロキシリジンもまた、使用することができる。Ｏ結合型グリコシル化部位は、１つまたは複数のセリン残基またはトレオニン残基を元の免疫グロブリンまたは抗体の配列に挿入するか、または置換することによって、免疫グロブリンに付加することができる。

【０３２１】

変更されたエフェクター機能

【０３２２】

抗体またはＦｃ含有ポリペプチドのＦｃ領域において、システイン残基を除去または導入して、それにより、この領域での鎖間ジスルフィド結合形成を排除または増加することができる。このようにして作製されたホモ二量体免疫グロブリンは、向上した内部移行能力ならびに／または増加した補体媒介性細胞殺傷および抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を有し得る。Caron et al., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) and Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)を参照されたい。ホモ二量体の免疫グロブリンまたは抗体は、Wolff et al., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に

記載されているように、ヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製することもできる。あるいは、二重Ｆｃ領域を有する免疫グロブリンが操作され得、それによって、増強された補体溶解能力およびＡＤＣＣ能力を有し得る。Stevenson et al., Anti-CancerDrug Design 3: 219-230 (1989)を参照されたい。

【０３２３】

重鎖または軽鎖のＮ末端の２０個のアミノ酸残基（例えば、シグナル配列）のうちの一つまたは複数が除去されることも企図される。

【０３２４】

血清半減期を延長させるための修飾も望ましく、例えば、サルベージ受容体結合エピトープの組み込みまたは付加による修飾（例えば、適切な領域の変異による、または、エピトープをペプチド標識に組み込み、その後いずれかの末端または中間で該免疫グロブリンに融合することによる修飾、例えば、ＤＮＡ合成またはペプチド合成による修飾）（例えば、国際公開第９６／３２４７８号を参照）、またはＰＥＧ等の分子、もしくは多糖類ポリマーを含む他の水溶性ポリマーを付加することによる修飾が挙げられる。

【０３２５】

サルベージ受容体結合エピトープは、任意の一つまたは複数のアミノ酸残基が、Ｆｃドメインの１つまたは２つのループから、免疫グロブリンまたはフラグメントの類似の位置に移される、領域を構成することが好ましい。さらにより好ましくは、Ｆｃドメインの１つまたは２つのループから３つ以上の残基が移される。さらにより好ましくは、エピトープは、Ｆｃ領域（例えば、ＩｇＧの）のＣＨ２ドメインから取り出され、免疫グロブリンまたは抗体の、ＣＨ１、ＣＨ３、もしくはＶＨ領域、または２つ以上のそのような領域に移される。あるいは、エピトープはＦｃ領域のＣＨ２ドメインから取り出され、免疫グロブリンフラグメントのC_L領域もしくはV_L領域、または両方に移される。Ｆｃ変異体およびそれらのサルベージ受容体との相互作用について記述している、国際出願第９７／３４６３１号および第９６／３２４７８号も参照のこと。

【０３２６】

Ｃ１ｑ結合部位等の、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、および／または抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）に関与する定常領域の他の部位およびアミノ酸残基が特定されている（例えば、特定の位置における変異の影響について記載している、Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992); Shields et al., J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604 (2001); Lazar et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 103(11): 4005 (2006)を参照されたい（それぞれはその全体が参照によって本明細書に組み込まれる））。Ｆｃ受容体結合部位内の残基の変異は、Ｆｃ受容体に対する変更された親和性、変更されたＡＤＣＣ活性もしくはＣＤＣ活性、または変更された半減期等の変更された（すなわち増加または減少した）エフェクター機能をもたらし得る。上記のように、起こり得る変異としては、一つまたは複数の残基の挿入、欠失または置換が挙げられ、例えば、アラニンとの置換、保存的置換、非保存的置換、または異なるサブクラスの同じ位置にある対応するアミノ酸残基との置換（例えばＩｇＧ１残基の、その位置にある対応するＩｇＧ２残基との置換）が含まれる。

【０３２７】

本発明はまた、変更された炭水化物構造を有し、その結果として変更されたエフェクター活性を有する、抗体および抗体フラグメントを含む免疫グロブリン分子の作製も包含し、例えば、向上したＡＤＣＣ活性を示す、フコシル化が欠けているまたは減少している抗体分子が挙げられる。これを達成するための様々な方法が当該技術分野において周知である。例えば、ＡＤＣＣエフェクター活性は、抗体分子のＦｃγＲＩＩＩ受容体への結合によって仲介され、それは、ＣＨ２ドメインのＡｓｎ－２９７におけるＮ結合型グリコシル化の炭水化物構造に依存することが示されている。非フコシル化抗体は、増加した親和性でもってこの受容体と結合し、ＦｃγＲＩＩＩ介在性エフェクター機能を、未変性のフコシル化抗体よりもより効率的に誘起する。例えば、α－１，６－フコシル基転移酵素がノックアウトされているＣＨＯ細胞中での非フコシル化抗体の組換え産生は、１００倍増加

したＡＤＣＣ活性を有する抗体をもたらす（Yamane-Ohnuki et al., Biotechnol Bioeng. 2004 Sep 5;87(5):614-22）。同様の効果は、フコシル化経路におけるこの酵素または他の酵素の活性の減少を通して、例えば、該酵素をノックアウトするよう細胞株を操作し、または選択的グリコシル化阻害剤と一緒に培養する、ｓｉＲＮＡまたはアンチセンスＲＮＡ処理を通して、達成され得る（Rothman et al., Mol Immunol. 1989 Dec;26(12):1113-23）。いくつかの宿主細胞株、例えばＬｅｃ１３またはラットハイブリドーマＹＢ２／０細胞株は、より低いフコシル化レベルを有する抗体を天然に産生する。Shields et al., J Biol Chem. 2002 Jul 26;277(30):26733-40; Shinkawa et al., J Biol Chem. 2003 Jan 31;278(5):3466-73。例えばＧｎＴＩＩＩ酵素を過剰発現する細胞での抗体の組換え産生による、二分された（bisected）炭水化物のレベルの増加は、ＡＤＣＣ活性も増加させることが測定されている。Umana et al., Nat Biotechnol. 1999 Feb;17(2):176-80。２つのフコース残基のうち１つのみの欠如が、ＡＤＣＣ活性を増加させるのに十分であり得ることが予想されている（Ferrara et al., J Biol Chem. 2005 Dec 5）。

【０３２８】

免疫グロブリンの他の共有結合的修飾

【０３２９】

免疫グロブリンの他の特定の共有結合修飾も、本発明の範囲内に含まれる。それらは、適用可能な場合、化学合成によって、または免疫グロブリンもしくは抗体の酵素的もしくは化学的切断によってなされ得る。他のタイプの共有結合修飾は、標的アミノ酸残基を、選択された側鎖またはＮもしくはＣ末端の残基と反応可能な有機誘導体化剤と反応させることによって導入することができる。

【０３３０】

システイニル残基は、最も一般的には、クロロ酢酸またはクロロアセトアミド等のα－ハロ酢酸塩（および対応するアミン）と反応して、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を与える。システイニル残基は、ブロモトリフルオロアセトン、α－ブロモ－β－（５－イミドゾイル）プロピオン酸、リン酸クロロアセチル、Ｎ－アルキルマレイミド、３－ニトロ－２－ピリジルジスルフィド、メチル２－ピリジルジスルフィド、ｐ‐クロロ第二水銀安息香酸塩、２－クロロメルクリ－４－ニトロフェノール、または２－クロロ－７－ニトロベンゾ－２－オキサ－１，３－ジアゾールとの反応によっても誘導体化される。

【０３３１】

ヒスチジル残基は、ｐＨ５．５～７．０でのジエチルピロカルボネートとの反応によって誘導体化されるが、それは、この試薬がヒスチジル側鎖に比較的特異的であるためである。パラ－ブロモフェナシルブロミドもまた有用であり；ｐＨ６．０の０．１Ｍ カコジル酸ナトリウム中にて反応が行われることが好ましい。

【０３３２】

リジニル（lysinyl）およびアミノ末端残基は、コハク酸または他のカルボン酸無水物と反応する。これらの試薬による誘導体化は、リジニル残基の電位を逆転させる効果を有する。α－アミノ含有残基の誘導体化に適切な他の試薬としては、メチルピコリンイミダート、リン酸ピリドキサール、ピリドキサール、クロロホウ化水素、トリニトロベンゼンスルホン酸、Ｏ－メチルイソ尿素、２，４－ペンタンジオン等のイミドエステル、およびアミノ基転移酵素により触媒されるグリオキシレートとの反応が挙げられる。

【０３３３】

アルギニル残基は、１または数種類の従来試薬、中でも、フェニルグリオキサール、２，３－ブタンジオン、１，２－シクロヘキサンジオン、およびニンヒドリンとの反応により修飾される。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基のpK_aが高いことから、アルカリ性条件で反応が行われることを必要とする。さらに、これらの試薬はリジン基、およびアルギニンのε－アミノ基と反応し得る。

【０３３４】

チロシル残基の特定の修飾は、スペクトルラベル（spectral label）をチロシル残基に導入するという特別な関心のもと、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応により達成され得る。最も一般的には、Ｎ－アセチルイミジゾールおよびテトラニトロメタンが用いられて、それぞれＯ－アセチルチロシル種および３－ニトロ誘導体を形成する。チロシル残基は、ラジオイムノアッセイ用の標識化タンパク質の調製のために、^{125}Ｉまたは^{131}Ｉによってヨウ素化される。

【０３３５】

カルボキシル側鎖（アスパルチルまたはグルタミル）は、カルボジイミド（Ｒ－Ｎ＝Ｃ＝Ｎ－Ｒ’）（式中、ＲおよびＲ’は、１－シクロヘキシル－３－（２－モルホリニル－４－エチル）カルボジイミドまたは１－エチル－３－（４－アゾニア－４，４－ジメチルペンチル）カルボジイミド等の異なるアルキル基である）との反応によって選択的に修飾される。さらに、アスパルチルおよびグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によって、アスパラギニル残基およびグルタミニル残基に変換される。

【０３３６】

グルタミニル残基およびアスパラギニル残基は、それぞれ対応するグルタミル残基およびアスパルチル残基に、しばしば脱アミドされる。これらの残基は、中性または塩基性条件下で脱アミド化される。これらの残基の脱アミド化形態は本発明の範囲内である。

【０３３７】

他の修飾としては、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖のαアミノ基のメチル化（T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)）、Ｎ末端アミンのアセチル化、並びにあらゆるＣ末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【０３３８】

共有結合修飾の別の種類には、化学的または酵素的に、グリコシドを免疫グロブリン（例えば、抗体または抗体フラグメント）にカップリングすることが含まれる。これらの手順は、ＮまたはＯ結合型グリコシル化のためのグリコシル化能を有する宿主細胞での免疫グロブリンの産生を必要としないという点で都合が良い。使用されるカップリング様式に応じて、糖は、（ａ）アルギニンおよびヒスチジン、（ｂ）遊離カルボキシル基、（ｃ）システイン等における遊離スルフヒドリル基、（ｄ）セリン、トレオニン、もしくはヒドロキシプロリン等における遊離ヒドロキシル基、（ｅ）フェニルアラニン、チロシン、もしくはトリプトファン等における芳香族残基、または（ｆ）グルタミンのアミド基に結合し得る。これらの方法については、１９８７年９月１１日に公開された国際公開第８７／０５３３０号、およびAplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

【０３３９】

免疫グロブリンに存在するいかなる炭水化物部分の除去も、化学的に、または酵素的に達成することができる。化学的な糖鎖除去は、免疫グロブリンの、トリフルオロメタンスルホン酸化合物、または同等の化合物への暴露を必要とする。この処理は、免疫グロブリンをインタクトのままにしつつ、連結している糖（Ｎ－アセチルグルコサミンまたはＮ－アセチルガラクトサミン）以外の大部分または全ての糖類の切断をもたらす。化学的な糖鎖除去については、Hakimuddin, et al. Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987)およびEdge et al. Anal. Biochem., 118: 131 (1981)に記載がなされている。免疫グロブリン上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al. Meth. Enzymol. 138: 350 (1987)に記載されているように、種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼを使用することで達成することができる。

【０３４０】

本発明の免疫グロブリン（抗体および抗体フラグメントを含む）の、別の種類の共有結合修飾には、免疫グロブリンを種々の非タンパク質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリオキシエチ

ル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グルコース、ポリオキシエチル化グリセロール、ポリオキシアルキレン、またはデキストラン等の多糖類ポリマーのうちの１つへの連結が含まれる。そのような方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、米国特許第４，６４０，８３５号；第４，４９６，６８９号；第４，３０１，１４４号；第４，６７０，４１７号；第４，７９１，１９２号、第４，１７９，３３７号、第４，７６６，１０６号、第４，１７９，３３７号、第４，４９５，２８５号、第４，６０９，５４６号またはＥＰ３１５４５６を参照されたい。

【０３４１】

単離された核酸

【０３４２】

本発明の別の態様は、本発明の免疫グロブリンをコードする単離された核酸であり、例えば、本発明の抗体または抗体フラグメントをコードする単離された核酸等が挙げられるが、これに限定はされない。そのような核酸は、当該技術分野において周知の、および／または本明細書で開示される組み換え技術により、作製される。

【０３４３】

他の実施形態では、単離された核酸は、以下の免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む免疫グロブリンをコードする：

【０３４４】

（ａ）該重鎖可変領域が配列番号３２３のアミノ酸配列を含み、該軽鎖可変領域が配列番号１８８もしくは配列番号１９０のアミノ酸配列を含む；または

【０３４５】

（ｂ）該重鎖可変領域が配列番号３２１のアミノ酸配列を含み、該軽鎖可変領域が配列番号１８８もしくは配列番号１９０のアミノ酸配列を含む；または

【０３４６】

（ｃ）該重鎖可変領域が配列番号３２５のアミノ酸配列を含み、該軽鎖可変領域が配列番号１８２、配列番号１８８、もしくは配列番号１９０のアミノ酸配列を含む、免疫グロブリン。

【０３４７】

また、いくつかの実施形態では、単離された核酸は、以下の免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む免疫グロブリンをコードする：

【０３４８】

（ａ）該軽鎖可変領域が配列番号１９６のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３３５、配列番号３４９、配列番号３５１、配列番号３５３、配列番号３５５、もしくは配列番号３５９のアミノ酸配列を含む；または

【０３４９】

（ｂ）該軽鎖可変領域が配列番号２０４のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３４９もしくは配列番号３５５のアミノ酸配列を含む；または

【０３５０】

（ｃ）該軽鎖可変領域が配列番号２０２のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３４９のアミノ酸配列を含む；または

【０３５１】

（ｄ）該軽鎖可変領域が配列番号１９２のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３５７、配列番号３５９、もしくは配列番号３６９のアミノ酸配列を含む；または

【０３５２】

（ｅ）該軽鎖可変領域が配列番号１９４のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３３５、配列番号３４９、もしくは配列番号３５１のアミノ酸配列を含む、免疫グロブリン。

【０３５３】

他の例では、単離された核酸は、以下の免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含む免疫グロブリンをコードする：

【０３５４】
（ａ）該重鎖可変領域が配列番号３２３のアミノ酸配列を含み；該軽鎖可変領域が配列番号１８８のアミノ酸配列を含む；または
【０３５５】
（ｂ）該軽鎖可変領域が配列番号１９６のアミノ酸配列を含み；該重鎖可変領域が配列番号３５３のアミノ酸配列を含む；または
【０３５６】
（ｃ）該軽鎖可変領域が配列番号２０２のアミノ酸配列を含み；該重鎖可変領域が配列番号３４９のアミノ酸配列を含む；または
【０３５７】
（ｄ）該重鎖可変領域が配列番号３２５のアミノ酸配列を含み；該軽鎖可変領域が配列番号１９０のアミノ酸配列を含む、免疫グロブリン。
【０３５８】
または、一部の実施形態では、単離された核酸は、以下を含む免疫グロブリンをコードする：
【０３５９】
配列番号１１３のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号１１０のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または
【０３６０】
配列番号１２５のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号１２２のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または
【０３６１】
配列番号１０１のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号９８のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または
【０３６２】
配列番号１１９のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号１１６のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖。
【０３６３】
本発明は、ベクター、例えば、本発明の任意の単離された核酸を含む発現ベクターも対象としている。該技術分野において周知の、および／または本明細書で開示される分子生物学的手法によって作製される、発現ベクターを含む単離された宿主細胞も、本発明に包含される。
【０３６４】
本発明は、
【０３６５】
発現ベクターにコードされる免疫グロブリンの発現を可能にする条件下で、宿主細胞を培地中で培養すること；および
【０３６６】

免疫グロブリンを培地から回収すること、を含む方法も対象とする。免疫グロブリンの回収は、限定はされないが、本明細書の実施例１および別の場所で開示される抗体精製技術等の、抗体精製の既知の方法により達成される。

【０３６７】

遺伝子治療

【０３６８】

適切な細胞への治療的免疫グロブリンの送達は、当該技術分野において周知の任意の適切なアプローチを用いることで、ｅｘ　ｖｉｖｏ、ｉｎ　ｓｉｔｕ、またはｉｎ　ｖｉｖｏでの遺伝子治療を介して達成することができる。例えば、ｉｎ　ｖｉｖｏ治療の場合、所望の免疫グロブリンまたは抗体をコードする核酸は、単独で、またはベクター、リポソーム、もしくは沈殿物と併せて、対象に直接注射される場合があり、一部の実施形態では、免疫グロブリン化合物の発現が所望される部位に注射される場合もある。ｅｘ　ｖｉｖｏ治療の場合、対象の細胞が採取され、核酸がこれらの細胞に導入され、その改変された細胞が直接的に対象に戻されるか、または、例えば、多孔質膜内に封入されて患者に埋め込まれる。例えば、米国特許第４，８９２，５３８号および第５，２８３，１８７号を参照されたい。

【０３６９】

核酸を生細胞に導入するのに利用可能な様々な技術が存在する。核酸が培養細胞に導入されるのがｉｎ　ｖｉｔｒｏであるか目的の宿主の細胞中のｉｎ　ｖｉｖｏであるかに応じて、技術は異なる。ｉｎ　ｖｉｔｒｏで哺乳類細胞中に核酸を導入するのに適切な技術には、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、化学的処置、ＤＥＡＥ－デキストラン、およびリン酸カルシウム沈殿の使用が含まれる。他のｉｎ　ｖｉｖｏにおける核酸導入技術としては、ウイルスベクター（アデノウイルス、単純ヘルペスＩウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはレトロウイルス等）および脂質ベースの系を用いたトランスフェクションが挙げられる。核酸およびトランスフェクション試薬は所望により微小粒子と結合される。例示的なトランスフェクション試薬としては、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共沈、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、四級アンモニウム両親媒性物質ＤＯＴＭＡ（ＧＩＢＣＯ－ＢＲＬによりリポフェクチンとして商品化されている臭化（ジオレオイルオキシプロピル）トリメチルアンモニウム）（Felgner et al, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417; Malone et al. (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86 6077-6081）；トリメチルアンモニウムのペンダントヘッドを有する親油性グルタミン酸ジエステル（Ito et al. (1990) Biochem. Biophys. Acta 1023, 124-132）；陽イオン脂質ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン（ＤＯＧＳ、Ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍ、プロメガ社）およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミルスペルミン（ＤＰＰＥＳ）などの代謝可能な親脂質（J. P. Behr (1986) Tetrahedron Lett. 27, 5861-5864; J. P. Behr et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6986）；代謝可能な第四級アンモニウム塩（ＤＯＴＢ、メチル硫酸Ｎ－（１－［２，３－ジオレオイルオキシ］プロピル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウム（ＤＯＴＡＰ）（ベーリンガー・マンハイム社）、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、ジオレオイルエステル、ＣｈｏＴＢ、ＣｈｏＳＣ、ＤＯＳＣ）（Leventis et al. (1990) Biochim. Inter. 22, 235-241）；３β［Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノエタン）－カルバモイル］コレステロール（ＤＣ－Ｃｈｏｌ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）／３β［Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノエタン）－カルバモイル］コレステロールＤＣ－Ｃｈｏｌの１対１の混合物（Gao et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 1065, 8-14）、スペルミン、スペルミジン、リポポリアミン（Behr et al., Bioconjugate Chem, 1994, 5: 382-389）、親油性ポリリシン（ＬＰＬＬ）（Zhou et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18）、過剰ホスファチジルコリン／コレステロールを伴う水酸化［［（１，１，３，３－テトラメチルブチル）クレゾキシ］エトキシ］エチル］ジメチルベンジルアンモニウム（水酸化ＤＥＢＤＡ）（Ballas et

al., (1988) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18）、臭化セチルトリメチルアンモニウム（ＣＴＡＢ）／ＤＯＰＥ混合物（Pinnaduwage et al, (1989) Biochim. Biophys. Acta 985, 33-37）、ＤＯＰＥ、ＣＴＡＢ、ＤＥＢＤＡ、臭化ジドデシルアンモニウム（ＤＤＡＢ）とグルタミン酸との親油性ジエステル（ＴＭＡＧ）、およびホスファチジルエタノールアミンと混合されたステアリルアミン（Rose et al., (1991) Biotechnique 10, 520-525）、ＤＤＡＢ／ＤＯＰＥ（ＴｒａｎｓｆｅｃｔＡＣＥ、ギブコ社（GIBCO BRL））、ならびにオリゴガラクトース担持脂質が挙げられる。導入効率を増加させる例示的なトランスフェクションエンハンサー試薬としては、例えば、ＤＥＡＥ－デキストラン、ポリブレン、リソソーム崩壊ペプチド（Ohmori N I et al, Biochem Biophys Res Commun Jun. 27, 1997;235(3):726-9）、コンドロイタン（chondroitan）ベースのプロテオグリカン、硫化プロテオグリカン、ポリエチレンイミン、ポリリシン（Pollard H et al. J Biol Chem, 1998 273 (13):7507-11）、インテグリン結合ペプチドＣＹＧＧＲＧＤＴＰ（配列番号２３５）、線状デキストランノナサッカリド（nonasaccharide）、グリセロール、オリゴヌクレオチドの３’末端ヌクレオシド間結合に係留したコレステリル基（Letsinger, R. L. 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86: (17):6553-6）、リソホスファチド、リソホスファチジルコリン、リソホスファチジルエタノールアミン、および１－オレオイルリソホスファチジルコリンが挙げられる。

【０３７０】

場合によっては、核酸含有ベクターを標的細胞に方向付ける薬剤と共に核酸を送達することが望ましい場合がある。そのような「標的化」分子としては、標的細胞上の細胞表面の膜タンパク質に特異的な抗原結合性タンパク質、または標的細胞上の受容体に対するリガンドが挙げられる。リポソームが使用される場合、エンドサイトーシスに関わる細胞表面の膜タンパク質に結合するタンパク質が、標的化および／または取り込み促進のために使用される場合がある。そのようなタンパク質の例としては、特定の細胞型指向性のカプシドタンパク質およびそのフラグメント、循環中に内部移行を起こすタンパク質に対する抗原結合性タンパク質、並びに細胞内局在を標的とし、細胞内半減期を延長するタンパク質が挙げられる。他の実施形態では、受容体介在性のエンドサイトーシスが利用され得る。そのような方法は、例えば、Wu et al., 1987またはWagner et al., 1990に記載がなされている。現在知られている遺伝子マーキングおよび遺伝子治療プロトコルの概説としては、Anderson 1992を参照されたい。また、国際公開第９３／２５６７３号およびそれに記載される参照も参照されたい。遺伝子治療技術の追加の概説としては、Friedmann, Science, 244: 1275-1281 (1989); Anderson, Nature, supplement to vol. 392, no 6679, pp. 25-30 (1998); Verma, Scientific American: 68-84 (1990);およびMiller, Nature, 357: 455460 (1992)を参照されたい。

【０３７１】

治療製剤の投与および調製

【０３７２】

本発明の方法の実施において使用される免疫グロブリンまたは抗体は、所望の送達方法に適切な担体を含む医薬組成物および薬剤に製剤化されてもよい。適切な担体には、免疫グロブリンまたは抗体と組み合わされる場合はあらゆる物質が含まれ、対象の免疫系と反応性を持たない。例としては、無菌リン酸緩衝食塩溶液、静菌水等のいくつかの標準的な医薬担体のいずれかが含まれるが、これらに限定はされない。様々な水性担体、例えば、水、緩衝化水、０．４％食塩水、０．３％グリシン等が使用されてよく、軽度の化学修飾等を受けたアルブミン、リポ蛋白、グロブリン等の安定性増強のための他のタンパク質も含まれてもよい。

【０３７３】

製剤中の例示的な免疫グロブリン濃度は、約０．１ｍｇ／ｍｌ～約１８０ｍｇ／ｍｌもしくは約０．１ｍｇ／ｍＬ～約５０ｍｇ／ｍＬ、もしくは約０．５ｍｇ／ｍＬ～約２５ｍｇ／ｍＬ、もしくは約２ｍｇ／ｍＬ～約１０ｍｇ／ｍＬの範囲であってよい。免疫グロブリンの水性製剤は、例えば、ｐＨが約４．５～約６．５、または約４．８～約５．５の範

囲の、または約５．０のｐＨ緩衝液中で、調製することができる。この範囲内のｐＨに適切な緩衝液の例としては、酢酸塩（例えば酢酸ナトリウム）、コハク酸塩（コハク酸ナトリウム等）、グルコン酸塩、ヒスチジン、クエン酸塩および他の有機酸緩衝液が挙げられる。緩衝液の濃度は、例えば、緩衝液および所望の製剤の等張性に依存して、約１ｍＭ～約２００ｍＭ、または約１０ｍＭ～約６０ｍＭであってよい。

【０３７４】

免疫グロブリンを安定化することもできる等張化剤が製剤中に含まれてもよい。例示的な等張化剤としては、マンニトール、スクロースまたはトレハロース等のポリオールが挙げられる。水性製剤は等張であることが好ましいが、高張液または低張液が適切である場合もある。製剤中のポリオールの例示的な濃度は、約１％～約１５％ｗ／ｖの範囲であり得る。

【０３７５】

界面活性剤を、配合された免疫グロブリンの凝集の低減および／または製剤中での微粒子形成の最小化および／または吸着低減のために、免疫グロブリン製剤に添加してもよい。例示的な界面活性剤としては、ポリソルベート（例えばポリソルベート２０、またはポリソルベート８０）またはポロキサマー（例えばポロキサマー１８８）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。例示的な界面活性剤の濃度は、約０．００１％～約０．５％、または約０．００５％～約０．２％、または約０．００４％～約０．０１％ｗ／ｖの範囲であり得る。

【０３７６】

一実施形態では、製剤は、上で特定した薬剤（すなわち、免疫グロブリン、緩衝液、ポリオールおよび界面活性剤）を含有し、ベンジルアルコール、フェノール、ｍ‐クレゾール、クロロブタノールおよび塩化ベンゼトニウム等の一つまたは複数の保存剤を本質的に含まない。別の実施形態では、保存剤は、例えば、約０．１％～約２％、または約０．５％～約１％の範囲の濃度で、製剤中に含まれる場合がある。製剤の所望の特性に悪影響を及ぼさないという条件で、Remington’s Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に記載されるもの等の、１つまたは複数の他の薬剤的に許容できる担体、賦形剤または安定剤が、製剤中に含まれる場合がある。許容できる担体、賦形剤または安定剤は、使用される投与量および濃度で受容者に対し毒性を持たず、追加の緩衝剤；助溶剤；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；ＥＤＴＡ等のキレート化剤；金属錯体（例えばＺｎ－タンパク質複合体）；ポリエステル等の生分解性ポリマー；および／またはナトリウム等の塩形成対イオンを含む。

【０３７７】

免疫グロブリンの治療的製剤は、所望の純度を有する免疫グロブリンを、所望の生理学的に許容される担体、賦形剤または安定剤（Remington’s Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）と混合することによって、凍結乾燥した製剤または水溶液の形態で、保存用に調製される。許容できる担体、賦形剤、または安定剤は、使用される投与量および濃度で受容者に対して毒性を持たないものであり、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸等の緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール；メチルパラベンもしくはプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；およびｍ‐クレゾール等）；低分子の（約１０残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジン等のアミノ酸；単糖類、二糖類、および他の炭水化物、例えばグルコース、マンノース、マルトース、もしくはデキストリン；ＥＤＴＡ等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトール等の糖類；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ－タンパク質複合体）；および／またはＴＷＥＥＮ（商標）、ＰＬＵＲ

ＯＮＩＣＳ（商標）もしくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性剤を含むものである。

【０３７８】

一実施形態では、請求の範囲に記載されている発明の適切な製剤は、ポリオール、ソルビトール、スクロースまたは塩化ナトリウム等の、等張化および安定化をする等張化剤と組み合わせて、リン酸塩、酢酸塩、またはトリス緩衝液等の等張緩衝液を含有する。そのような等張化剤の一例は、５％ソルビトールまたはスクロースである。さらに、製剤は、凝集を防ぐため、および安定化等のために、０．０１～０．０２％ｗｔ／ｖｏｌで、所望により界面活性剤を含む場合がある。製剤のｐＨは、４．５～６．５または４．５～５．５の範囲であってよい。抗体用医薬製剤の他の例示的な記述は、米国特許出願公開第２００３／０１１３３１６号および米国特許第６，１７１，５８６号に見出すことができ、それぞれはその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０３７９】

本明細書の製剤は、必要に応じて、治療される特定の兆候に対する、２つ以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼし合わない相補的な活性を有するものを含有してもよい。例えば、免疫抑制剤をさらに提供することが望ましい場合がある。そのような分子は、本来の目的に効果的な量で組み合わされて、存在することが適切である。

【０３８０】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術によって、または界面重合、例えば、ヒロドキシメチルセルロースまたはゼラチン－マイクロカプセルおよびポリ－（メチルメタシラート）マイクロカプセルによって、それぞれ、コロイド性薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子およびナノカプセル剤）において、またはマクロエマルションにおいて、調製されたマイクロカプセル中に封入されてもよい。そのような技術は、Remington’s Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)で開示されている。

【０３８１】

免疫グロブリンの懸濁剤および結晶形も企図される。懸濁剤および結晶形を作製するための方法は、当業者に知られている。

【０３８２】

ｉｎ ｖｉｖｏでの投与に使用されるべき製剤は無菌でなければならない。本発明の組成物は、従来の、周知の滅菌法によって滅菌することができる。例えば滅菌は、無菌濾過膜を通す濾過によって、容易に達成される。得られた溶液は、使用用にパッケージ化、または無菌状態下で濾過および凍結乾燥されてもよく、凍結乾燥した調製物は投与前に無菌液と混合される。

【０３８３】

凍結乾燥の工程は、特にポリペプチドが液体組成物では比較的不安定な場合に、長期保存のためにポリペプチドを安定化させるのにしばしば採用される。凍結乾燥サイクルは通常３つの工程、すなわち凍結、一次乾燥、および二次乾燥から成る（Williams and Polli, Journal of Parenteral Science and Technology, Volume 38, Number 2, pages 48-59 (1984)）。凍結工程では、溶液は十分に凍結するまで冷却される。溶液中のバルク水がこの段階で氷を形成する。氷は一次乾燥段階で昇華するが、それは、真空によってチャンバ圧を氷の蒸気圧未満に減少させることで行われる。最終的に、吸着水または結合水が、減圧したチャンバ圧および上昇した棚温度下で、第二乾燥段階で除去される。前記工程によって、凍結乾燥ケーキとして知られている物質が生成される。その後、前記ケーキは使用前に再構成される。

【０３８４】

凍結乾燥物質に対する標準的な再構成の実行は、ある量の純水（典型的には凍結乾燥の間に除去された体積と等量）を加え戻すことであるが、時として、抗菌剤の希釈溶液が非経口投与用の医薬品の生産時に用いられる（Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, Volume 18, Numbers 11 and 12, pages 1311-1354 (1992)）。

【０３８５】
賦形剤が、ある場合では、凍結乾燥製品の安定剤として働くことが述べられている；Carpenter et al., Developments in Biological Standardization, Volume 74, pages 225-239 (1991)。例えば、既知の賦形剤としては、ポリオール（マンニトール、ソルビトールおよびグリセロールを含む）；糖類（グルコースおよびスクロースを含む）；およびアミノ酸（アラニン、グリシンおよびグルタミン酸）が挙げられる。
【０３８６】
さらに、ポリオールおよび糖類はまた、ポリペプチドを凍結および乾燥によって生じる損傷から保護し、乾燥状態において保存中の安定性を増強させるためにもしばしば使用される。一般に、糖類、具体的には二糖類は、凍結乾燥工程中および保存中の両方で効果的である。単糖類および二糖類並びにＰＶＰ等のポリマーを含む他のクラスの分子も、凍結乾燥製品の安定剤として報告されている。
【０３８７】
注射用に、医薬製剤および／または薬剤は上記のような適切な溶液を用いた再構成に適した粉末であってよい。これらの例としては、凍結乾燥粉末、回転乾燥（rotary dried）粉末または噴霧乾燥粉末、非晶質粉末、粒剤、沈殿物、または微粒子が挙げられるが、これらに限定はされない。注射用に、製剤は所望により、安定剤、ｐＨ調節剤、界面活性剤、生物学的利用能調節剤およびそれらの組み合わせを含有してよい。
【０３８８】
徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の適切な例としては、免疫グロブリンを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは成形品の形態、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態にある。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸およびｙ　エチル－Ｌ－グルタミン酸のコポリマー、分解不可性エチレン酢酸ビニル、Ｌｕｐｒｏｎ　Ｄｅｐｏｔ（商標）（乳酸グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから成る注射用ミクロスフェア）等の分解性乳酸グリコール酸コポリマー、並びにポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン酢酸ビニルおよび乳酸グリコール酸等のポリマーは１００日間以上の分子の放出を可能にするが、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短期間で放出する。カプセルに入れられたポリペプチドが長期間体内に留まると、それらは３７℃の水分への暴露の結果として変性または凝集し、その結果、生物活性の喪失および免疫原性の変化の可能性をもたらし得る。関与する機序に応じ、合理的な戦術を安定化のために工夫が講じられ得る。例えば、凝集の機序が、チオール-ジスルフィド相互交換（thio-disulfide interchange）による分子間のＳＳ結合形成であることが発見された場合、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液の凍結乾燥、水分量の制御、適切な添加剤の使用、および特定のポリマーマトリックス組成物の開発により、安定化を達成してもよい。
【０３８９】
本発明の製剤は、本明細書に記載のように、短時間作用性、即時放出性（fast-releasing）、長時間作用性、または徐放性となるように設計してもよい。従って、医薬製剤は、制御放出用または持続放出用に製剤化してもよい。
【０３９０】
具体的な投与量は、対象の疾患の状態、年齢、体重、全体的な健康状態、性別、および食事、薬剤の投与間隔、投与経路、排出速度、並びに組み合わせによって調節されてよい。有効量を含有する上記剤形のいずれも、通例の実験法の十分に範囲内であり、従って、十分に本発明の範囲内である。
【０３９１】
免疫グロブリンは、非経口投与、皮下投与、腹腔内投与、肺内投与、および鼻腔内投与、並びに、所望であれば局所療法、病巣内投与を含む、任意の適切な方法で投与される。非経口注入としては、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、皮内投与また

は皮下投与が挙げられる。さらに、免疫グロブリンは、パルス注入によって、具体的には免疫グロブリンまたは抗体の投与量を減少させつつ、適切に投与される。投与は、投与が短期間であるか長期間であるかに部分的に依存して、注射によって、最も好ましくは　静脈内注射または皮下注射によってなされることが好ましい。局所的投与、具体的には経皮投与、経粘膜的投与、直腸投与、経口的投与、または例えば所望の部位の近位に配置されたカテーテルを介した局所投与を含む、他の投与方法が企図される。最も好ましくは、本発明の免疫グロブリンは、生理溶液中で静脈内に、０．０１ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇの範囲の投与量で、毎日から毎週、毎月までの範囲（例えば、毎日、１日おき、２日おき、または１週間に２、３、４、５、もしくは６回）の頻度で、好ましくは０．１～４５ｍｇ／ｋｇ、０．１～１５ｍｇ／ｋｇまたは０．１～１０ｍｇ／ｋｇの範囲の投与量で、１週間に２もしくは３回の頻度で、または最大４５ｍｇ／ｋｇの投与量で、１ヶ月に１回の頻度で、投与される。

【０３９２】

本発明の実施形態または態様には、限定はされないが、以下が含まれ得る：

【０３９３】

１．

以下の免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む単離された免疫グロブリンであって、

【０３９４】

（ａ）　該重鎖可変領域が配列番号３２３のアミノ酸配列を含み、該軽鎖可変領域が配列番号１８８もしくは配列番号１９０のアミノ酸配列を含む；または

【０３９５】

（ｂ）　該重鎖可変領域が配列番号３２１のアミノ酸配列を含み、該軽鎖可変領域が配列番号１８８もしくは配列番号１９０のアミノ酸配列を含む；または

【０３９６】

（ｃ）　該重鎖可変領域が配列番号３２５のアミノ酸配列を含み、該軽鎖可変領域が配列番号１８２、配列番号１８８、もしくは配列番号１９０のアミノ酸配列を含む、

免疫グロブリン。

【０３９７】

２．　以下の免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む単離された免疫グロブリンであって、

【０３９８】

（ａ）　該軽鎖可変領域が配列番号１９６のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３３５、配列番号３４９、配列番号３５１、配列番号３５３、配列番号３５５、もしくは配列番号３５９のアミノ酸配列を含む；または

【０３９９】

（ｂ）　該軽鎖可変領域が配列番号２０４のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３４９もしくは配列番号３５５のアミノ酸配列を含む；または

【０４００】

（ｃ）　該軽鎖可変領域が配列番号２０２のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３４９のアミノ酸配列を含む；または

【０４０１】

（ｄ）　該軽鎖可変領域が配列番号１９２のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３５７、配列番号３５９、もしくは配列番号３６９のアミノ酸配列を含む；または

【０４０２】

（ｅ）　該軽鎖可変領域が配列番号１９４のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３３５、配列番号３４９、もしくは配列番号３５１のアミノ酸配列を含む、

免疫グロブリン。

【０４０３】

３．　該重鎖可変領域が配列番号３２３のアミノ酸配列を含み；該軽鎖可変領域が配列

番号１８８のアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４０４】
４．　該軽鎖可変領域が配列番号１９６のアミノ酸配列を含み；該重鎖可変領域が配列番号３５３のアミノ酸配列を含む、請求項２に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４０５】
５．　該軽鎖可変領域が配列番号２０２のアミノ酸配列を含み；該重鎖可変領域が配列番号３４９のアミノ酸配列を含む、請求項２に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４０６】
６．　該重鎖可変領域が配列番号３２５のアミノ酸配列を含み；該軽鎖可変領域が配列番号１９０のアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４０７】
７．　単離された免疫グロブリンが抗体または抗体フラグメントを含む、請求項１または請求項２に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４０８】
８．　ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４０９】
９．　モノクローナル抗体を含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４１０】
１０．　ヒト抗体を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４１１】
１１．　以下を含む、請求項１０に記載の単離された免疫グロブリン：
【０４１２】
（ａ）配列番号１１３のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号１１０のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または
【０４１３】
（ｂ）配列番号１２５のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号１２２のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または
【０４１４】
（ｃ）配列番号１０１のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号９８のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または
【０４１５】
（ｄ）配列番号１１９のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号１１６のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している上記配列を含む免疫グロブリン軽鎖。
【０４１６】
１２．　１～２４個の薬理活性を有する化学的部分を結合によってさらに含む、請求項

１～１１のいずれか一項に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４１７】
１３．　薬理活性を有する化学的部分が薬理活性を有するポリペプチドである、請求項１～１２のいずれか一項に記載の、単離された免疫グロブリン。
【０４１８】
１４．　免疫グロブリンが組換え技術によって産生される、請求項１～１３のいずれか一項に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４１９】
１５．　免疫グロブリンが少なくとも１個の免疫グロブリン重鎖および少なくとも１個の免疫グロブリン軽鎖を含み、薬理活性を有するポリペプチドが、免疫グロブリン重鎖のＦｃドメインの内部ループ内の、免疫グロブリン重鎖の一次アミノ酸配列に挿入された、請求項１４に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４２０】
１６．　免疫グロブリンが少なくとも１個の免疫グロブリン重鎖および少なくとも１個の免疫グロブリン軽鎖を含み、薬理活性を有するポリペプチドが免疫グロブリン重鎖のＮ末端またはＣ末端に結合されている、請求項１３または１４に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４２１】
１７．　免疫グロブリンが少なくとも１個の免疫グロブリン重鎖および少なくとも１個の免疫グロブリン軽鎖を含み、薬理活性を有するポリペプチドが免疫グロブリン軽鎖のＮ末端またはＣ末端に結合された、請求項１３または１４に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４２２】
１８．　薬理活性を有するポリペプチドが、トキシンペプチド、ＩＬ－６結合ペプチド、ＣＧＲＰペプチド拮抗薬、ブラジキニンＢ１受容体ペプチド拮抗薬、ＰＴＨ作動薬ペプチド、ＰＴＨ拮抗薬ペプチド、ａｎｇ－１結合ペプチド、ａｎｇ－２結合ペプチド、ミオスタチン結合ペプチド、ＥＰＯ－模倣体ペプチド、ＦＧＦ２１ペプチド、ＴＰＯ－模倣体ペプチド、ＮＧＦ結合ペプチド、ＢＡＦＦ拮抗薬ペプチド、ＧＬＰ－１もしくはそのペプチド模倣薬、またはＧＬＰ－２もしくはそのペプチド模倣薬である、請求項１３または１４に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４２３】
１９．　トキシンペプチドがＳｈＫまたはＳｈＫペプチド類似体である、請求項１８に記載の単離された免疫グロブリン。
【０４２４】
２０．　請求項１～１９のいずれか一項に記載の免疫グロブリン；および薬剤的に許容できる希釈剤、賦形剤または担体を含む医薬組成物。
【０４２５】
２１．　請求項１～１１のいずれか一項に記載の免疫グロブリンをコードする、単離された核酸。
【０４２６】
２２．　請求項３に記載の免疫グロブリンをコードする、単離された核酸。
【０４２７】
２３．　請求項４に記載の免疫グロブリンをコードする、単離された核酸。
【０４２８】
２４．　請求項５に記載の免疫グロブリンをコードする、単離された核酸。
【０４２９】
２５．　請求項６に記載の免疫グロブリンをコードする、単離された核酸。
【０４３０】
２６．　請求項１１に記載の免疫グロブリンをコードする、単離された核酸。
【０４３１】

２７．　請求項１３～１９のいずれか一項に記載の免疫グロブリンをコードする、単離された核酸。
【０４３２】
２８．　請求項２１に記載の単離された核酸を含むベクター。
【０４３３】
２９．請求項２２～２６のいずれか一項に記載の単離された核酸を含むベクター。
【０４３４】
３０．　請求項２７に記載の単離された核酸を含むベクター。
【０４３５】
３１．　発現ベクターを含む、請求項２８に記載のベクター。
【０４３６】
３２．　発現ベクターを含む、請求項２９に記載のベクター。
【０４３７】
３３．　発現ベクターを含む、請求項３０に記載のベクター。
【０４３８】
３４．　請求項３１～３３のいずれか一項に記載の発現ベクターを含む単離された宿主細胞。
【０４３９】
３５．以下を含む方法：
【０４４０】
（ａ）発現ベクターにコードされた免疫グロブリンの発現を可能にする条件下、培地中で請求項３４に記載の宿主細胞を培養すること；および
【０４４１】
（ｂ）培地から免疫グロブリンを回収すること。
【０４４２】
３６．　表面プラズモン共鳴結合アッセイで測定した場合に、生理条件下でインキュベートされた水溶液中で、３０マイクロモル濃度の免疫グロブリンが、３０ナノモル濃度の可溶性ヒトＩＬ－１７Ｒ（配列番号８９）と有意には結合しない、請求項１に記載の免疫グロブリン。
【０４４３】
３７．　表面プラズモン共鳴結合アッセイで測定した場合に、生理条件下でインキュベートされた水溶液中で、１０マイクロモル濃度の免疫グロブリンが、１０ナノモル濃度の可溶性ヒトＴＲ２（配列番号８２）と有意には結合しない、請求項２に記載の免疫グロブリン。
【０４４４】
本発明は、以下のさらなる例によって説明されるが、それらは決して、限定を意図するものではない。
【実施例】
【０４４５】
実施例１
ヒトＩＬ－１７Ｒに対する抗体の生成およびスクリーニング
クローニングおよび操作。ｈｕＩＬ－１７Ｒに対する抗体の免疫グロブリン重鎖（ＶＨ１を含む）サブユニットと軽鎖（ＶＬ１を含む）サブユニットをコードする抗体１６４２９のＤＮＡ配列を、Tockerら（国際公開第２００８／０５４６０３Ａ２号）から取得して、標準の組換え技術を用いてクローニングした。これらの抗体の結合能を排除するため、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅を用いて、一連の部位特異的変異誘発クローンを生成した。相補性決定領域（ＣＤＲ）内の位置、生殖系配列からの変化、推定される溶媒露出、および芳香族と電荷の性質に基づき、変更すべきアミノ酸を選定した。初期の変異体群は、生殖系でアラニン置換の変異体であった。続いて突然変異を組み合わせた。いくつかの場合では、アラニン置換変異体を変異させ、アラニンをグルタミン酸に置換すること

により負電荷を導入し、あるいはアラニンをアルギニンに置換することにより正電荷を導入した。

【０４４６】

ＰＣＲ部位特異的変異手順の代表例は、抗ＩＬ１７軽鎖のＣＤＲ３におけるトリプトファンに代えてアラニンを導入することである。

【０４４７】

ＰＣＲ増幅は、変異を導入するための５’ＰＣＲと３’ＰＣＲ、および変異後の抗ＩＬ１７Ｒ軽鎖の両端を連結する最終オーバーラップＰＣＲ、の３段階のプロセスとして行った。５’ＰＣＲには、順方向プライマー５’－ＡＡＧ　ＣＴＣ　ＧＡＧ　ＧＴＣ　ＧＡＣ　ＴＡＧ　ＡＣＣ　ＡＣＣ　ＡＴＧ　ＧＡＡ　ＧＣＣ　ＣＣＡ　ＧＣＧ　ＣＡＧ－３’（配列番号３１）と、逆方向プライマー５’－ＧＡＡ　ＡＧＴ　ＧＡＧ　ＣＧＧ　ＡＧＣ　ＧＴＴ　ＡＴＣ　ＡＴＡ　ＣＴＧ　ＣＴＧ　ＡＣＡ　－３’（配列番号３２）を使用する。３’ＰＣＲには、順方向プライマー５’－ＴＧＴ　ＣＡＧ　ＣＡＧ　ＴＡＴ　ＧＡＴ　ＡＡＣ　ＧＣＴ　ＣＣＧ　ＣＴＣ　ＡＣＴ　ＴＴＣ－３’（配列番号３３）と、逆方向プライマー５’－ＡＡＣ　ＣＧＴ　ＴＴＡ　ＡＡＣ　ＧＣＧ　ＧＣＣ　ＧＣＴ　ＣＡＡ　ＣＡＣ　ＴＣＴ　ＣＣＣ　ＣＴＧ　ＴＴＧ　ＡＡ－３’（配列番号３４）を使用する。オーバーラップＰＣＲには、順方向プライマー５’－ＡＡＧ　ＣＴＣ　ＧＡＧ　ＧＴＣ　ＧＡＣ　ＴＡＧ　ＡＣＣ　ＡＣＣ　ＡＴＧ　ＧＡＡ　ＧＣＣ　ＣＣＡ　ＧＣＧ　ＣＡＧ　－３’（配列番号３１）と、逆方向プライマー５’－ＡＡＣ　ＣＧＴ　ＴＴＡ　ＡＡＣ　ＧＣＧ　ＧＣＣ　ＧＣＴ　ＣＡＡ　ＣＡＣ　ＴＣＴ　ＣＣＣ　ＣＴＧ　ＴＴＧ　ＡＡ－３’（配列番号３４）を使用する。

【０４４８】

ＰＣＲは、Ｐｈｕｓｉｏｎ　ＨＦ　ＤＮＡポリメラーゼ（フィンザイム）を用いて行った。５’ＰＣＲと３’ＰＣＲのＰＣＲ反応サイクルは、抗ＩＬ－１７Ｒ軽鎖ＤＮＡの変性を９４℃で２０秒間、次いで、各サイクル９４℃、２０秒間からなる増幅を３サイクル；５５℃、３０秒間；７２℃、３０秒間、加えて９４℃、２０秒間のサイクルを２７サイクル；６０℃、３０秒間；および７２℃、３０秒間で構成した。次いで、最終ＰＣＲサイクルに続いて７２℃で反応物を７分間インキュベートして、完全に伸長させた。オーバーラップＰＣＲのＰＣＲ反応サイクルは、５’ＰＣＲ　ＤＮＡと３’ＰＣＲ　ＤＮＡの変性を９４℃で２０秒間、次いで、各サイクル９４℃、２０秒間の増幅を３サイクル；５５℃、６０秒間；７２℃、４０秒間、加えて９４℃、２０秒間のサイクルを２７サイクル；６０℃、３０秒間；および７２℃、４０秒間で構成した。次いで、最終ＰＣＲサイクルに続いて７２℃で反応物を７分間インキュベートして、完全に伸長させた。オーバーラップＰＣＲ産物をｐＴＴ５発現ベクター（ＮＲＣＣ）へとクローニングして、その配列をＡＢＩ　ＤＮＡシークエンシング機器（パーキンエルマー）を用いて決定した。構築物の形成に関するさらなる詳細は、本明細書の実施例５と実施例６に記述する。表６（下記）は、本段落に記載のＰＣＲサイクルと同一の条件に基づき、本発明の免疫グロブリンおよび抱合体の種々の実施形態の構成サブユニットをクローニングする際に用いたプライマーと鋳型の詳細を含む。

【０４４９】

組換えモノクローナル抗体作製のための一過性発現

ＨＥＫ２９３-６Ｅ細胞において、一過性トランスフェクションを以下のように行った。エプスタイン・バーウイルス核抗原-１を安定的に発現するヒト胎児腎２９３細胞系を国家研究会議（National Research Council）（カナダ、モントリオール）から入手した。６ｍＭ　Ｌ-グルタミン（インビトロジェン、カリフォルニア州カールズバッド）、１．１％Ｆ-６８プルロニック（インビトロジェン、カリフォルニア州カールズバッド）、および２５０μｇ／μｌジェネテシン（インビトロジェン、カリフォルニア州カールズバッド）を添加したＦ１７培地（インビトロジェン、カリフォルニア州カールズバッド）を用いて、細胞を無血清懸濁培養物として維持した。この懸濁細胞培養物を、エルレンマイヤー振とうフラスコ培養物内に維持した。この培養フラスコを、加湿した５％CO_2雰

囲気中、３７℃、６５ｒｐｍで振とうした。２５-ｋＤａの直線状ＰＥＩ（ポリサイエンス、ペンシルベニア州ウォリントン）のストック溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を水中で調製し、溶解するまでＨＣｌでｐＨ２．０に酸性化し、次いで、ＮａＯＨで中和し、ろ過（０．２μｍ）により滅菌し、分注して、使用するまで－２０℃で保管した。トリプトンＮ１をオルガノテクニーＳ．Ａ．（テクニサイエンス、カナダケベック州）から入手した。ストック溶液（２０％、ｗ／ｖ）をＦｒｅｅｓｔｙｌｅ培地（インビトロジェン、カリフォルニア州カールズバッド）中で調製し、０．２μｍフィルターによるろ過で滅菌し、使用するまで４℃で保管した。通常、トランスフェクションは１Ｌのスケールで行った。細胞（２９３-６Ｅ）を１．１×１０^{6}の生細胞密度まで増殖させ、次いで、トランスフェクション複合体を最終培養体積の１／１０の体積で調製した。１Ｌのトランスフェクション培養物用に、トランスフェクション複合体を１００ｍｌのＦ１７基本培地中で調製し、５００μｇのプラスミドＤＮＡ（重鎖および軽鎖ＤＮＡ、１：１の比）を最初に１００ｍｌのＦ１７培地中に希釈した。５分間の室温でのインキュベーション後、１．５ｍｌのＰＥＩ溶液を加えた。複合体を穏やかにボルテックスし、次いで、室温で１５分間インキュベートした。振とうフラスコ培養液中の細胞にトランスフェクション複合混合物を加えることにより、細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの２４時間後に、トリプトンＮ１を、トランスフェクトされた培養物に０．５％の最終濃度になるまで加え、トランスフェクトされた培養物を、加湿した５％CO_2の雰囲気中、３７℃、６５ｒｐｍの振とう器上でさらに５日間維持した後、それらを回収した。馴化培地を４０００ｒｐｍでの遠心分離により回収し、次いで、０．２μｍフィルター（コーニング社）によるろ過で滅菌した。

【０４５０】

抗体の精製。一過性に発現した抗体を、組換えプロテインＡセファロース（ＧＥヘルスケア）を使用し、馴化培地を直接、５ｍｌ／分、７℃のカラムに装填することにより精製した。次いで、二価陽イオンを含まない１０カラム体積のダルベッコＰＢＳでカラムを洗浄してから、１００ｍＭ、ｐＨ３．５の酢酸で溶出した。溶出した抗体をクロマトグラフプロファイルに基づきプールし、２Ｍのトリス塩基を用いてｐＨを５．０に調整した。次に、このプールを０．８／０．２２μｍのシリンジフィルターでろ過し、次いで１０ｍＭ酢酸、９％スクロース、ｐＨ５．０に対して透析した。次に、緩衝液交換された抗体をＶｉｖａｓｐｉｎ　３０ｋＤａ遠心濃縮（ザルトリウス）を用いて濃縮し、濃縮した産物を０．２２μｍの酢酸セルロースフィルターでろ過した。

【０４５１】

ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）結合アッセイ。ＢＩＡｃｏｒｅ分析により、ＩＬ－１７Ｒ細胞外ドメインとの結合の欠如を測定し、これを基にリード候補を選定した。抗体１６４２９は、ｈｕＩＬ－１７Ｒと特異的に結合するヒト抗体である。ｈｕＩＬ－１７Ｒに対する抗体群の結合活性を評価するための溶解平衡結合アッセイを開発した。製造者（ＢＩＡＣｏｒｅ社、ニュージャージー州ピスカタウェイ）の指示に従って、抗体１６４２９を、ＢＩＡＣｏｒｅ（登録商標）２０００リサーチグレードセンサーチップＣＭ５の表面に固定化した。手短に述べると、０．２Ｍ　Ｎ－エチル－Ｎ’－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣ）と０．０５Ｍ　Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）を含有する６０μＬの混合物を注入することにより、センサーチップ上のカルボキシル基を活性化した。抗体１６４２９をｐＨ４．０、１０ｍＭの酢酸ナトリウム中で希釈し、活性化したチップ表面上に６分かけて３０μＬ／分の速度で注入した。チップ表面の過剰反応基は、６０μＬの１Ｍエタノールアミンを注入することにより不活性化した。最終の固定化レベルは、約６６００レゾナンスユニット（ＲＵ）であった。図２Ａに示すように、可溶性抗体の存在しない１０ｎＭのＩＬ－１７Ｒを使用して、固定化した１６４２９抗体に対するＩＬ－１７Ｒの１００％結合シグナルを確立した。溶液中の抗体結合を測定するため、１０ｎＭ、１００ｎＭ、１０００ｎＭの抗体試料を１０ｎＭのＩＬ－１７Ｒと共にインキュベートした。抗体のインキュベーション後にＩＬ－１７Ｒの結合シグナルが減少しているのは、溶液中で抗体がＩＬ－１７Ｒに結合していることを示す。このアッセイに基づ

き、抗体１６４３５、１６４３８、１６４３９、１６４４０、１６４４１、および１６４４４は、ＩＬ－１７Ｒ結合能の実質的減少を示した。図２Ｂに示すように、３０ｎＭのＩＬ－１７Ｒと３０μＭの抗体試料を使用して、選択されたこれらの抗体がＩＬ－１７Ｒ結合活性を失ったことをさらに実証した。このアッセイでは、試験した６つの抗体すべて（１６４３５、１６４３８、１６４３９、１６４４０、１６４４１、および１６４４４）が、最大３０μＭの抗体でＩＬ－１７Ｒとの有意な結合活性をまったく示さなかった。

【０４５２】

細胞ベース活性アッセイ。ＩＬ－１７が細胞表面のＩＬ－１７Ｒと相互作用すると、細胞から様々な因子（増殖関連癌遺伝子アルファ（ＧＲＯ－α）を含む）の産生が誘発される。サンドイッチＥＬＩＳＡを用いて放出ＧＲＯ－αを測定するため、細胞ベースの特徴付けアッセイを開発した。このＥＬＩＳＡにおいて、ＧＲＯ－α捕捉抗体を利用してＧＲＯ－αと結合させ、次いでビオチン標識したＧＲＯ－α検出抗体を使用して、捕捉されたタンパク質を検出した。次に、西洋わさびペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）を抱合したストレプトアビジンを加えて、ビオチン標識され結合したＧＲＯ－α検出抗体の量を検出した。結合ＨＲＰの量の測定は、４５０ｎｍでの吸光度を評価することにより行った。４５０ｎｍでの吸光度の上昇は、産生ＧＲＯ－αの量の増加を表す。このアッセイにおいて、ヒト包皮線維芽細胞（ＨＦＦ）を５ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１７、および０．１μＭ、１μＭ、１０μＭの抗体試料と共にインキュベートする。次いで、馴化細胞培地を回収し、ＧＲＯ－αサンドイッチＥＬＩＳＡを用いたＧＲＯ－αレベルの評価のための処理をする。６つの実験用担体抗体（１６４３５、１６４３８、１６４３９、１６４４０、１６４４１、１６４４４）のいずれも、最大１０μＭ抗体での本アッセイでは、有意なブロッキング活性をまったく示さなかった（図３）。

【０４５３】

均一性の分析。一過性発現により産生された抗体に対して、１００ｍＭリン酸ナトリウム、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．８、流速０．５ｍＬ／分の移動相を用いた、連続した２つサイズ排除カラム（ＴＳＫ－ＧＥＬ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ、粒子径５ｍｍ、７．８×３００ｍｍ、東ソーバイオサイエンス、０８５４１）により均一性を分析した（図４Ａ～Ｂ）。すべての抗体が比較的低レベルの高分子種を示したが、１６４３９と１６４３５は最も低く、１６４４０は最も高かった。これらのリード抗体に対して、さらに、還元ローディングバッファー（図６）と非還元ローディングバッファー（図５）を用いた１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）上で産物品質を分析した。非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥの両方とも、すべての候補がかなり類似しているようであったが、還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で、１６４３３がいくらか追加的な高分子量物質を示した。ＳＥＣ動作、ＳＤＳ－ＰＡＧＥの均一性、ＢＩＡｃｏｒｅ結合分析、細胞ベースアッセイの結果、および発現レベルに基づき、リード候補をさらに絞り込んだ。これらの基準に基づき、さらなる評価対象として１６４３５と１６４４４を選定した。

【０４５４】

抗体の安定発現。ＣＨＯ　ＤＨＦＲ（－）宿主細胞を、標準的なエレクトロポレーション手順を用いて、対応するＨＣおよびＬＣ発現プラスミドセットでトランスフェクトすることにより、抗体１６４３５および１６４４４の発現プールを作出した。各抗体分子当たり、３～４つの異なるトランスフェクションを行い、複数のプールを作製した。トランスフェクション後に、細胞を無血清（－）ＧＨＴ選択増殖培地中のプールとして増殖させ、プラスミド含有細胞の選択および回収を可能にした。（-）ＧＨＴ選択培地で増殖させた細胞プールを、それらが８５％を超える生存率に達するまで培養した。選択された細胞プールを１５０ｎｍのＭＴＸで増幅した。ＭＴＸ増幅プールの生存率が８５％を超える生存率に達したとき、補強した産生培地で、簡略化した６日間のバッチ産生アッセイを用いてプールをスクリーニングし、発現を評価した。６日間のアッセイ力価および正確な質量確認に基づき、最良のプールを選択した。続いて、１１日間の流加培養プロセスを用いたスケールアップ産生を実施して抗体を産生した後、回収し精製した。

【０４５５】
Ｐｏｒｏｓ Ａカラム、２０μｍ、２．１×３０ｍｍ（アプライドバイオシステムズ、部品番号１－５０２４－１２）を用いたＨＰＬＣアッセイにより、力価を測定した（図７Ａ～Ｂ）。手短に述べると、ＨＰＬＣによる分析の前に、馴化培地中の抗体をＳｐｉｎ－Ｘカラム（コーニング、部品番号８１６０）でろ過し、試験抗体の注入前と各分析実行の後に１×ＰＢＳ（インビトロジェン、部品番号１４１９０－１４４）のブランクを注入した。加えて、分析前に、抗体を含まない馴化培地を注入してカラムをコンディショニングし、新規のカラムは１００μｇの対照抗体を３回注入して調整した。ＰＢＳを用いて０．６ｍｌ／分で９分間洗浄した後、ＩｍｍｕｎｏＰｕｒｅ ＩｇＧ Ｅｌｕｔｉｏｎ Ｂｕｆｆｅｒ（ピアス、部品番号２１００９）で抗体を溶出させ、２８０ｎｍでの吸光度を観察した。対照抗体の濃度とピーク領域の標準プロット図に照らして、抗体の力価を定量化した。対照抗体ストックを４ｍｇ／ｍｌ濃度で調製し、抗体対照ストックを一定量のＰＢＳ中に希釈することにより５つの標準抗体濃度を調製した（０．１μｇ／μｌ～１．６μｇ／μｌ）。検量線を伸ばした結果、抗体の下側の検出限界は０．０２μｇ／μｌ、定量化の上側限界は４μｇ／μｌである。試験抗体が対照と同様の吸光度特性を持つと仮定したが、試験抗体の消衰係数に対する対照抗体の消衰係数の比率を力価に乗算することにより、力価を調節することができる。力価アッセイの結果は、流加培養プロセスにスケールアップした後、１６４３５抗体の方が１６４４４担体抗体よりわずかに良好な発現を示した。

【０４５６】
安定発現した抗体の精製。安定的に発現した抗体を、洗浄緩衝液として二価陽イオンを含まない８カラム体積のダルベッコＰＢＳ、溶出緩衝液として１００ｍＭ、ｐＨ３．５の酢酸を７℃で使用して、Ｍａｂ Ｓｅｌｅｃｔ Ｓｕｒｅクロマトグラフィー（ＧＥライフサイエンス）により精製した。溶出ピークをクロマトグラムに基づきプールし、２Ｍのトリス塩基を用いてｐＨを約５．０に上昇させた。次に、このプールを少なくとも３倍量の水で希釈し、０．２２μｍの酢酸セルロースフィルターでろ過してから、ＳＰ－ＨＰセファロースカラム（ＧＥライフサイエンス）に充填し、１０カラム体積のＳ-緩衝液Ａ（２０ｍＭ酢酸、ｐＨ５．０）で洗浄し、次いで、２０カラム体積の５０％までの勾配のＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭ酢酸、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ５．０）を用いて７℃で溶出した。クロマトグラムおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析に基づきプールを作製し、次いで、材料を約６倍に濃縮し、３０ｋＤａ膜を有するＶｉｖａＦｌｏｗ ＴＦＦカセットを用いて、約５倍体積の１０ｍＭ酢酸、９％スクロース、ｐＨ５．０に対して透析ろ過した。次いで、透析した材料を０．８／０．２μｍ酢酸セルロースフィルターによりろ過し、２８０ｎｍでの吸光度により濃度を測定した。１６４３５、１６４４４の各変異体のイオン交換クロマトグラフィープロファイルを比較したところ、有意差を示していなかった（図８Ａ～Ｂ）。

【０４５７】
安定発現した抗体の分析。これらの変異体に対する、還元ローディングバッファーと非還元ローディングバッファーを用いた１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）による分析でも、変異体間の有意差を示していなかった（図９Ａ～Ｂ）。しかし、１００ｍＭリン酸ナトリウム、２５０ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ６．８、流速０．５ｍＬ／分の移動相を用いた、連続した２つのサイズ排除カラム（ＴＳＫ－ＧＥＬ Ｇ３０００ＳＷＸＬ、粒子径５ｍｍ、７．８×３００ｍｍ、東ソーバイオサイエンス、０８５４１）を使用した分析では、１６４４４の方が高い高分子種を示し、１６４３５の方がプレピークが顕著であった（図１０）。

【０４５８】
また、ＭｉｃｒｏＣａｌ ＶＰ－ＤＳＣを用いて試料を毎分１℃の割合で２０℃から９５℃に加熱するＤＳＣにより、抗体の熱耐性も分析した。ＤＳＣは、温度の上昇および低下の制御時に生体分子に生じる熱変化を直接測定することにより、物質を天然状態において試験することを可能にする。

【０４５９】

ＤＳＣでは、熱変性によるアンフォールディングのエンタルピー（ΔＨ）を測定する。溶液中の生体分子は、天然の（折り畳まれた）高次構造と変性した（折り畳みがほどけた）状態の間で平衡状態にある。生体分子の５０％の折り畳みがほどける熱遷移中間点（Ｔｍ）が高いほど、分子の安定性が高い。ＤＳＣは、変性の熱容量（ΔＣｐ）の変化の測定にも使われる（図１１参照）。対象のタンパク質を、１０ｍＭ酢酸ナトリウム、９％スクロース、ｐＨ５．０中の０．５ｍｇ／ｍｌでインキュベートした（図１１）。１６４３５抗体の方が二次遷移温度が高く、最も望ましい融解プロファイルを示した。

【０４６０】

還元ＣＥ－ＳＤＳと非還元ＣＥ－ＳＤＳにより、抗体を分析した（図１２Ａ～Ｄ）。どのＣＥ　ＳＤＳ実験も、ＵＶダイオード検出器付きＢｅｃｋｍａｎ　ＰＡ８００　ＣＥシステム（カリフォルニア州フラートン）を使用し、波長２２１ｎｍと２２０ｎｍを用いて行った。露出した石英ガラスキャピラリー５０μｍ×３０．２ｃｍを使用して、分離分析を行った。ベックマン・コールターのＩｇＧ　Ｐｕｒｉｔｙ／Ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｉｔｙマニュアルの記載に従って、バッファーバイアルを調製、充填し、キャピラリーカートリッジを設置した。還元ＣＥ－ＳＤＳと非還元ＣＥ－ＳＤＳの動作条件は、ベックマン・コールターのＩｇＧ　Ｐｕｒｉｔｙ／Ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｉｔｙマニュアルの記載と同様であったが、いくつか修正を加えた。以下、この修正について簡単に説明する。非還元条件については、抗体試料（１５０μｇ）を２０μｌのＳＤＳ反応緩衝液および５μｌの７０ｍＭ　Ｎ－エチルマレイミドに加えた。次に、水を加えて最終容量を３５μｌにし、タンパク質濃度を４．３ｍｇ／ｍｌにした。ＳＤＳ反応緩衝液は、４％ＳＤＳ、０．０１Ｍリン酸クエン酸緩衝液（シグマ）、および０．０３６Ｍリン酸二ナトリウムで作製した。調製物を十分にボルテックスし、４５℃で５分間加熱した。次に、調製物を追加の１１５μｌの４％ＳＤＳと合わせた。ボルテックスし、遠心分離した後、調製物を２００μＬのＰＣＲバイアルに入れ、ＰＡ８００機器に装填した。３０秒間の－１０ｋＶを用いた逆極性により試料をアノードに注入し、キャピラリーの両端に２０ｐｓｉ圧力の－１５ｋＶをかけて、３５分の分離中に分離させた。還元条件については、純H_2Oを加えて抗体試料を２．１ｍｇ／ｍｌに希釈し、９５μｌの抗体を、５．６％β－メルカプトエタノールを有する１０５μＬのＳＤＳ試料緩衝液（ベックマン）に加えた。次に、調製物を十分にボルテックスしてから、７０℃で１０分間加熱した。遠心分離の後、上清を２００μｌのＰＣＲバイアルに入れ、ＰＡ８００機器に装填した。２０秒間の－５ｋＶを用いた逆極性により試料をアノードに注入し、キャピラリーの両端に２０ｐｓｉ圧力の－１５ｋＶをかけて、３０分の分離中に分離させた。還元ＣＥ－ＳＤＳと非還元ＣＥ－ＳＤＳの両方とも、抗体１６４３５、１６４４４は非常によく似たプロファイルを示した（図１２Ａ～Ｄ）。

【０４６１】

抗体の光感受性を測定するため、抗体を実験室の周囲蛍光灯に当てるかアルミホイルで覆って、室温で3日間インキュベートした。光に当てた抗体および遮光状態に管理した抗体に対して、１００ｍＭリン酸ナトリウム、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．８、流速０．５ｍＬ／分の移動相を用いた、連続した2つのサイズ排除カラム（ＴＳＫ－ＧＥＬ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ、粒子径５ｍｍ、７．８×３００ｍｍ、東ソーバイオサイエンス、０８５４１）により分析した。ＳＥＣクロマトグラムに基づき、１６４４４は１６４３５より有意に大きい光感受性を示した（図１３）。次に、これらの抗体に対し、移動相Ａとして１Ｍ硫酸アンモニウム、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．０、移動相Ｂとして２０ｍＭ酢酸ナトリウム、５％アセトニトリル、ｐＨ５．０を用いた、連続した2つのＤｉｏｎｅｘ　ＰｒｏＰａｃ　ＨＩＣ－１０カラムを使用して、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）による分析を行った。５０分間で０～１００％の直線勾配を用いて０．８ｍｌ／分の割合で試料を溶出し、２２０ｎｍでの吸光度を観察した。ＨＩＣクロマトグラムに基づき、１６４３５の方がメインピークが狭く、産物の均一性がより高いことが判明した（図１４）。光感受性が低く、精製収率が高く（１２１９ｍｇ／Ｌ対１００８ｍｇ／Ｌ）、ＤＳＣプロファイルが良好で、ＳＥＣプロファイルが良好で、親抗体からの変異が少な

いことから、この抗体ファミリーの第一リードとして、１６４３５を選定した。
【０４６２】

【表１０】

表６．　表示産物のクローニングに使用したＰＣＲプライマーセットおよび鋳型

プライマーセット 配列番号	使用鋳型 配列番号	産物＋ プライマーセット 配列番号	最終産物 配列番号
ラウンド１クローニング			
(31,32)(33,34)	187	(31,34)	189
(35,37)(38,36)	304	(35,36)	322
(35,39)(40,36)	304	(35,36)	320
(35,41)(42,36)	304	(35,36)	324
(278,43)(44,36)	326	(278,36)	328
(278,45)(46,36)	326	(278,36)	330
ラウンド２クローニング			
(31,213)(214,34)	181	(31,34)	185
(31,215)(216,34)	181	(31,34)	183
(35,217)(218,36)	304	(35,36)	318
(35,219)(220,36)	304	(35,36)	316
(35,221)(222,36)	304	(35,36)	314
(35,223)(224,36)	304	(35,36)	312
(35,225)(226,36)	304	(35,36)	310
(35,227)(228,36)	304	(35,36)	308
(35,229)(230,36)	304	(35,36)	306
(231,232)(233,34)	191	(231,34)	195
(231,234)(235,34)	191	(231,34)	193
(231,236)(237,34)	191	(231,34)	197
(278,238)(239,36)	326	(278,36)	332
(278,240)(241,36)	326	(278,36)	334
(278,242)(243,36)	326	(278,36)	342
(278,244)(245,36)	326	(278,36)	344
(278,246)(247,36)	326	(278,36)	346
(278,248)(249,36)	326	(278,36)	328
(278,250)(251,36)	326	(278,36)	330
(278,252)(253,36)	326	(278,36)	348
(278,254)(255,36)	326	(278,36)	350
(278,256)(257,36)	326	(278,36)	366
(278,258)(259,36)	326	(278,36)	370
ラウンド３クローニング（二重変異体＆生殖系列）			
(231,　132)(133,　34)	191	(231,34)	211
(231,　134)(135,　34)	191	(231,34)	199
(278,　136)(137,　36)	326	(278,36)	338
(278,　138)(139,　36)	326	(278,36)	372
(278,　140)(141,　36)	326	(278,36)	374
(231,234)(235,34)	195	(231,34)	209
(278,240)(241,36)	348	(278,36)	356
(278,240)(241,36)	350	(278,36)	358
ラウンド４クローニング（電荷			

変異体［A～EまたはR］および三重変異体)			
(231,142)(143,34)	191	(231,34)	201
(231,144)(145,34)	191	(231,34)	203
(231,260)(261,34)	191	(231,34)	205
(231,262)(263,34)	191	(231,34)	207
(278,264)(265,36)	326	(278,36)	336
(278,266)(267,36)	326	(278,36)	340
(278,268)(269,36)	326	(278,36)	352
(278,270)(271,36)	326	(278,36)	354
(278,272)(273,36)	326	(278,36)	360
(278,274)(275,36)	326	(278,36)	362
(278,276)(277,36)	326	(278,36)	368
(278,276)(277,36)	334	(278,36)	364

【０４６３】

実施例２

ヒトＴＲＡＩＬ　Ｒ２に対する抗体の生成およびスクリーニング

クローニングおよび操作。抗ｈｕＴＲ２抗体の免疫グロブリン重鎖（ＶＨ１２を含む）サブユニットと軽鎖（ＶＬ６を含む）サブユニットをコードする抗体１６４４９のＤＮＡ配列をGliniakら（米国特許第７，５２１，０４８号）から取得して、標準の組換え技術を用いてクローニングした。これらの抗体の結合能を排除するため、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅を用いて、一連の部位特異的変異誘発クローンを生成した。相補性決定領域（ＣＤＲ）内の位置、生殖系配列からの変化、推定される溶媒露出、および芳香族と電荷の性質に基づき、変更すべきアミノ酸を選定した。初期の変異体群は、生殖系でアラニン置換の変異体であった。続いて突然変異を組み合わせた。いくつかの場合では、アラニン置換変異体を変異させ、アラニンをグルタミン酸に置換することにより負電荷を導入し、あるいはアラニンをアルギニンに置換することにより正電荷を導入した。構築物の形成に関するさらなる詳細は、本明細書の実施例５と表６に記述する。

【０４６４】

組換えモノクローナル抗体作製のための一過性発現。

ＨＥＫ２９３-６Ｅ細胞において、一過性トランスフェクションを以下のように行った。エプスタイン・バーウイルス核抗原-１（２９３-６Ｅ細胞）を安定的に発現するヒト胎児腎２９３細胞系を国家研究会議（National Research Council）（カナダ、モントリオール）から入手した。６ｍＭ　Ｌ-グルタミン（インビトロジェン、カリフォルニア州カールズバッド）、１．１％Ｆ-６８プルロニック（インビトロジェン、カリフォルニア州カールズバッド）、および２５０μｇ／μｌジェネテシン（インビトロジェン、カリフォルニア州カールズバッド）を添加したＦ１７培地（インビトロジェン、カリフォルニア州カールズバッド）を用いて、細胞を無血清懸濁培養物として維持した。この懸濁細胞培養物を、エルレンマイヤー振とうフラスコ培養物内に維持した。この培養フラスコを、加湿した５％CO_2雰囲気中、３７℃、６５ｒｐｍで振とうした。２５-ｋＤａの直線状ＰＥＩ（ポリサイエンス、ペンシルベニア州ウォリントン）のストック溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を水中で調製し、溶解するまでＨＣｌでｐＨ２．０に酸性化し、次いで、ＮａＯＨで中和し、ろ過（０．２μｍ）により滅菌し、分注して、使用するまで－２０℃で保管した。トリプトンＮ１をオルガノテクニーＳ．Ａ．（テクニサイエンス、カナダケベック州）から入手した。ストック溶液（２０％、ｗ／ｖ）をＦｒｅｅｓｔｙｌｅ培地（インビトロジェン、カリフォルニア州カールズバッド）中で調製し、０．２μｍフィルターによるろ過で滅菌し、使用するまで４℃で保管した。通常、トランスフェクションは１Ｌのスケールで行った。細胞（２９３-６Ｅ）を１．１×10^6の生細胞密度まで増殖させ、次いで、トランスフェクション複合体を最終培養体積の１／１０の体積で調製した。１Ｌのトラン

スフェクション培養物用に、トランスフェクション複合体を１００ｍｌのＦ１７基本培地中で調製し、５００μｇのプラスミドＤＮＡ（重鎖および軽鎖ＤＮＡ、１：１の比）を最初に１００ｍｌのＦ１７培地中に希釈した。５分間の室温でのインキュベーション後、１．５ｍｌのＰＥＩ溶液を加えた。複合体を穏やかにボルテックスし、次いで、室温で１５分間インキュベートした。振とうフラスコ培養液中の細胞にトランスフェクション複合混合物を加えることにより、細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの２４時間後に、トリプトンＮ１を、トランスフェクトされた培養物に０．５％の最終濃度になるまで加え、トランスフェクトされた培養物を、加湿した５％CO_2の雰囲気中、３７℃、６５ｒｐｍの振とう器上でさらに5日間維持した後、それらを回収した。馴化培地を４０００ｒｐｍでの遠心分離により回収し、次いで、０．２μｍフィルター（コーニング社）によるろ過で滅菌した。

【０４６５】

抗体の精製。一過性に発現した抗体を、組換えプロテインＡセファロース（ＧＥヘルスケア）を使用し、馴化培地を直接、５ｍｌ／分、７℃のカラムに装填することにより精製した。次いで、二価陽イオンを含まない１０カラム体積のダルベッコＰＢＳでカラムを洗浄してから、１００ｍＭ、ｐＨ３．５の酢酸で溶出した。溶出した抗体をクロマトグラフプロファイルに基づきプールし、２Ｍのトリス塩基を用いてｐＨを５．０に調整した。次に、このプールを０．８／０．２２μｍのシリンジフィルターでろ過し、次いで１０ｍＭ酢酸、９％スクロース、ｐＨ５．０に対して透析した。次に、緩衝液交換された抗体をＶｉｖａｓｐｉｎ　３０ｋＤａ遠心濃縮器（ザルトリウス）を用いて濃縮し、濃縮した産物を０．２２μｍの酢酸セルロースフィルターでろ過した。

【０４６６】

ＢＩＡｃｏｒｅ結合アッセイ。抗体１６４４９は、Ｔｒａｉｌ受容体２（ＴＲ２）と特異的に結合するヒト抗体である。ＴＲ２に対する抗体群の結合活性を評価するための溶解平衡結合アッセイを開発した。上記実施例１に記載のように、抗体を１６４４９をＣＭ５センサーチップ面に固定化した。最終の固定化レベルは、約８０００レゾナンスユニット（ＲＵ）であった。抗体の存在しないＴＲ２（１ｎＭ）を使用して、溶液中に抗体結合がないＴＲ２の１００％結合シグナルを確立した。溶液中の抗体結合を測定するため、７ｐＭ～１０ｎＭの範囲で段階的に希釈した抗体試料を１ｎＭのＴＲ２と共にインキュベートした。抗体のインキュベーション後にＴＲ２の結合シグナルが減少しているのは、溶液中で抗体がＴＲ２に結合していることを示す。図１５に示す結果は、新しい３つの抗体構築物（１６４４９、１８６９、１８７０）のすべてが、元の構築物と同様のＴＲ２結合活性を保持していることを表している。

【０４６７】

他の実験において、１０ｎＭのＴＲ２を、本アッセイの５０ｎＭおよび１μＭの抗体試料と共に上記のようにインキュベートした。１０ｎＭのＴＲ２を、１００％結合シグナルを定義するために使用した。５０ｎＭでは、いくつかの抗体が結合の有意な欠如を示したが（１６６１３、１９１９、１９１３、１９１０、１９２０、および１９２２）、１０００ｎＭでは、完全な結合欠如を示したものはなかった（結果を図１６に示す）。追加の点突然変異により、ＴＲ２親和性の低い抗体が得られた（図１７）。２つの部位（重鎖Ｙ１２５と軽鎖Ｙ５３）、特に位置Ｙ１２５に荷電置換を有する部位が、変異誘発に対して特に大きな感受性を示した。二重アラニン置換により、ＴＲ２結合親和性がさらに低い変異体が産生された（図１８）。アラニン変異体と荷電変異体を対にするか、またはそれより大きいオーダーで組み合わせた結果、１０μＭ抗体でもＴＲ２との有意な結合を示さない分子がいくつか産生された（図１９）。これらのデータから、５つの最良の変異体（１０１８６、１０１８４、４３４１、１０１８３、および４２４１）を、５０μＭ抗体での結合実験に進ませた（図２０Ａ～Ｂ）。１０１８６以外は、５０μＭでもＴＲ２との有意な結合を示さなかった。

【０４６８】

細胞ベース活性アッセイ。Ｃｏｌｏ２０５は、ＴＲＡＩＬの存在に感受性を有するヒト

結腸癌細胞株である。Ｃｏｌｏ２０５の表面にあるＴＲ２に陽性対照であるＩｇＧ１抗ＴＲ２ｍＡｂ分子（抗体１６４４９）が結合すると、細胞アポトーシスが生じる。抗体の細胞死滅効力を検証するため、Ｃｏｌｏ２０５をベースにした細胞アッセイを開発した。抗体１６４４９（抗ＴＲＡＩＬ－Ｒ２抗体）のｉｎ ｖｉｔｒｏ生物活性を、ヒト腹水結腸直腸腺癌細胞株Ｃｏｌｏ２０５においてアポトーシスを誘発するその能力により分析する。カスパーゼ３活性化の検出を、アポトーシスの陽性マーカーとして用い、製造者の指示に従って、Ａｐｏ－Ｏｎｅ（商標）Ｈｏｍｏｇｅｎｅｏｕｓ ｃａｓｐａｓｅ（商標）－３／７アッセイキット（プロメガ社、ウィスコンシン州マディソン）を使用する（Niles et al., The Apo-One（商標）.Homogeneous Caspase（商標）-3/7 assay: a simplified "solution" for apoptosis detection, Cell Notes 2:2-3 (2001)を参照）。この方法では、Ｃｏｌｏ２０５細胞において抗ＴＲＡＩＬ－Ｒ２に誘発されたカスパーゼ活性化を、発光カスパーゼ３／７試薬が敏感かつ強力にモニタリングする。発光量は、存在するカスパーゼ活性の量に比例する。各試料の発光量を、プレートごと読み取るルミノメーターで測定する。試験試料の応答を標準試料の応答と比較することにより、試験試料の生物活性を決定する。試料を標準の対照抗体と比較するため、２００ｎＭおよび１０μＭの抗体試料を、１μｇ／ｍｌまたは１００μｇ／ｍｌのプロテインＧと共にプレインキュベートした。次に、この混合物をＣｏｌｏ２０５培養液に加えた。図２０Ｃは、対照の抗ＴＲ２ ｍＡｂ分子と異なり、抗体試料は非常に高濃度（例えば３０μｇ／ｍＬの抗体）でも殺細胞能力を持たないことを示している。

【０４６９】

均一性の分析。これらのリード抗体に対して、還元ローディングバッファー（図２１Ｂ）と非還元ローディングバッファー（図２１Ａ）を用いた１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）上で産物品質を分析した。非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥの両方とも、すべての候補がかなり類似しているようであった。さらに、５０ｍＭリン酸ナトリウム、２５０ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ６．８、流速１．０ ｍＬ／分の移動相を用いた１つのサイズ排除カラム（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ ＳＥＣ３０００、７．８×３００ｍｍ）を使用して、抗体の均一性を分析した（代表的結果を図２２に示す）。すべての抗体が比較的低レベルの高分子種を示したが、１０１８５と１０１８４は、わずかに高い高分子量物質を示した。ＳＥＣ動作、ＢＩＡｃｏｒｅ結合分析、細胞ベースアッセイの結果、推定されるタンパク質分解脆弱性、および計算値等電点の移動の低さに基づき、リード候補を選定した。これらの基準に基づき、さらなる評価の対象として４２４１と４３４１を選定した。

【０４７０】

安定発現のための構築物の形成。ＣＨＯ ＤＨＦＲ（－）宿主細胞を、標準的なエレクトロポレーション手順を使用して、対応するＨＣおよびＬＣ発現プラスミドセットでトランスフェクトすることにより、安定発現抗体４２４１、４３４１のプールを作出した。各抗体分子当たり、３～４つの異なるトランスフェクションを行い、複数のプールを作製した。トランスフェクション後に、細胞を無血清（－）ＧＨＴ選択増殖培地中のプールとして増殖させ、プラスミド含有細胞の選択および回収を可能にした。（-）ＧＨＴ選択培地で増殖させた細胞プールを、それらが８５％を超える生存率に達するまで培養した。選択された細胞プールを１５０ｎｍのＭＴＸで増幅した。ＭＴＸ増幅プールの生存率が８５％を超える生存率に達したとき、補強した産生培地で、簡略化した６日間のバッチ産生アッセイを用いてプールをスクリーニングし、発現を評価した。６日間のアッセイ力価および正確な質量確認に基づき、最良のプールを選択した。続いて、１１日間の流加培養プロセスを用いたスケールアップ産生を実施して抗体を産生した後、回収し精製した。

【０４７１】

Ｐｏｒｏｓ Ａカラム、２０μｍ、２．１×３０ｍｍ（アプライドバイオシステムズ、部品番号１－５０２４－１２）を用いたＨＰＬＣアッセイにより、力価を測定した。手短に述べると、ＨＰＬＣによる分析の前に、馴化培地中の抗体をＳｐｉｎ－Ｘカラム（コーニング、部品番号８１６０）でろ過し、試験抗体の注入前と各分析実行の後に１×ＰＢＳ

（インビトロジェン、部品番号１４１９０－１４４）のブランクを注入した。加えて、分析前に、抗体を含まない馴化培地を注入してカラムを調整し、新規のカラムは１００μｇの対照抗体を３回注入して調整した。ＰＢＳを用いて０．６ｍｌ／分で９分間洗浄した後、ＩｍｍｕｎｏＰｕｒｅ ＩｇＧ Ｅｌｕｔｉｏｎ Ｂｕｆｆｅｒ（ピアス、部品番号２１００９）で抗体を溶出させ、２８０ｎｍでの吸光度を測定した。

【０４７２】

対照抗体の濃度とピーク領域の標準プロット図に照らして、抗体の力価を定量化した。対照抗体ストックを４ｍｇ／ｍｌ濃度で調製し、抗体対照ストックを一定量のＰＢＳ中に希釈することにより５つの標準抗体濃度を調製した（０．１μｇ／μｌ～１．６μｇ／μｌ）。検量線を伸ばした結果、抗体の下側の検出限界は０．０２μｇ／μｌ、定量化の上側限界は４μｇ／μｌである。試験抗体は対照と同様の吸光度特性を持つと仮定されるが、試験抗体の消衰係数に対する対照抗体の消衰係数の比率を力価に乗算することにより、力価を調整することができる。力価アッセイの結果は、流加培養プロセスにスケールアップした後、４２４１抗体の方が４３４１抗体よりわずかに良好な発現を示した（図２３Ａ～Ｂ）。

【０４７３】

安定発現した抗体の精製。安定的に発現した抗体を、洗浄緩衝液として二価陽イオンを含まない８カラム体積のダルベッコＰＢＳ、溶出緩衝液として１００ｍＭ、ｐＨ３．５の酢酸を７℃で使用して、Ｍａｂ Ｓｅｌｅｃｔ Ｓｕｒｅクロマトグラフィー（ＧＥライフサイエンス）により精製した。溶出ピークをクロマトグラムに基づきプールし、２Ｍのトリス塩基を用いてｐＨを約５．０に上昇させた。次に、このプールを少なくとも３倍量の水で希釈し、０．２２μｍの酢酸セルロースでろ過してから、ＳＰ－ＨＰセファロースカラム（ＧＥライフサイエンス）に充填し、１０カラム体積のＳ－緩衝液Ａ（２０ｍＭ酢酸、ｐＨ５．０）で洗浄し、次いで、２０カラム体積の５０％までの勾配のＳ－緩衝液Ｂ（２０ｍＭ酢酸、１Ｍ ＮａＣｌ、ｐＨ５．０）を用いて７℃で溶出した。クロマトグラムおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析に基づきプールを作製し、次いで、材料を約６倍に濃縮し、３０ｋＤａ膜を有するＶｉｖａＦｌｏｗ ＴＦＦカセットを用いて、約５倍体積の１０ｍＭ酢酸、９％スクロース、ｐＨ５．０に対して透析ろ過した。次いで、透析した材料を０．８／０．２μｍ酢酸セルロースフィルターによりろ過し、２８０ｎｍでの吸光度により濃度を測定した。精製処理した試料を、１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）還元ローディングバッファーを使用して分析した（図２４Ａ～Ｂ）。これらのデータは、抗体４２４１、４３４１の両方とも、予想外の試料損失を生じる段階なしに同様の精製特性を有することを示した。

【０４７４】

安定発現した抗体の分析。４２４１、４３４１の各変異体のイオン交換クロマトグラフィープロファイルを比較したところ（図２５）、４３４１の方がメインピークが狭く、４２４１より不均一性が低いことを示した。これらの変異体に対する、還元ローディングバッファーと非還元ローディングバッファーを用いた１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）による分析では、両者の間に有意差はなかった（図２６Ａ～Ｂ）。１００ｍＭリン酸ナトリウム、２５０ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ６．８、流速０．５ｍＬ／分の移動相を用いた、連続した２つのサイズ排除カラム（ＴＳＫ－ＧＥＬ Ｇ３０００ＳＷＸＬ、粒子径５ｍｍ、７．８×３００ｍｍ、東ソーバイオサイエンス、０８５４１）による分析でも、変異体４２４１と４３４１の間に有意差はなかった（図２７Ａ～Ｂ）。ＭｉｃｒｏＣａｌ ＶＰ－ＤＳＣを用いて試料を毎分１℃の割合で２０℃から９５℃に加熱するＤＳＣにより、抗体の熱耐性を分析した。タンパク質の濃度は、１０ｍＭ酢酸ナトリウム、９％スクロース、ｐＨ５．０中０．５ｍｇ／ｍｌであった（図２８）。抗体４３４１と比較して、４２４１抗体の方が二次遷移温度が高く、最も望ましい融解プロファイルを示した。

【０４７５】

還元ＣＥ－ＳＤＳと非還元ＣＥ－ＳＤＳにより、抗体４２４１と４３４１を分析した（

図２９Ａ～Ｄ）。どのＣＥ　ＳＤＳ実験も、ＵＶダイオード検出器付きＢｅｃｋｍａｎ　ＰＡ８００　ＣＥシステム（カリフォルニア州フラートン）を使用し、波長２２１ｎｍと２２０ｎｍを用いて行った。露出した石英ガラスキャピラリー５０μｍ×３０．２ｃｍを使用して、分離分析を行った。ベックマン・コールターのＩｇＧ　Ｐｕｒｉｔｙ／Ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｉｔｙマニュアルの記載に従って、バッファーバイアルを調製、充填し、キャピラリーカートリッジを設置した。還元ＣＥ－ＳＤＳと非還元ＣＥ－ＳＤＳの動作条件は、ベックマン・コールターのＩｇＧ　Ｐｕｒｉｔｙ／Ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｉｔｙマニュアルの記載と同様であったが、いくつか修正を加えた。以下、この修正について簡単に説明する。非還元条件については、抗体試料（１５０μｇ）を２０μｌのＳＤＳ反応緩衝液および５μｌの７０ｍＭ　Ｎ－エチルマレイミドに加えた。次に、水を加えて最終容量を３５μｌにし、タンパク質濃度を４．３ｍｇ／ｍｌにした。ＳＤＳ反応緩衝液は、４％ＳＤＳ、０．０１Ｍリン酸クエン酸緩衝液（シグマ）、および０．０３６Ｍリン酸二ナトリウムで作製した。調製物を十分にボルテックスし、４５℃で５分間加熱した。次に、調製物を追加の１１５μｌの４％ＳＤＳと合わせた。ボルテックスし、遠心分離した後、調製物を２００μｌのＰＣＲバイアルに入れ、ＰＡ８００機器に装填した。３０秒間の－１０ｋＶを用いた逆極性により試料をアノードに注入し、キャピラリーの両端に２０ｐｓｉ圧力の－１５ｋＶをかけて、３５分の分離中に分離させた。還元条件については、純H_2Oを加えて抗体試料を２．１ｍｇ／ｍｌに希釈し、９５μｌの抗体を、５．６％β－メルカプトエタノールを有する１０５μＬのＳＤＳ試料緩衝液（ベックマン）に加えた。次に、調製物を十分にボルテックスしてから、７０℃で１０分間加熱した。遠心分離の後、上清を２００μｌのＰＣＲバイアルに入れ、ＰＡ８００機器に装填した。２０秒間の－５ｋＶを用いた逆極性により試料をアノードに注入し、キャピラリーの両端に２０ｐｓｉ圧力の－１５ｋＶをかけて、３０分の分離中に分離させた。ＣＥ－ＳＤＳ分析では、どちらの抗体も有意差を示さなかった（図２９Ａ～Ｄ）。

【０４７６】

高速イオン交換クロマトグラフィー（ＳＰ－５ＰＷ、粒径１０μｍ、内径７．５ｍｍ×７．５ｃｍ、東ソーバイオサイエンス、０８５４１）を使用し、緩衝液Ａとして２０ｍＭ酢酸、ｐＨ５．０、緩衝液Ｂとして２０ｍＭ酢酸、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ５．０を用いて、緩衝液Ｂの０～４０％の直線勾配で８０分間、流速１ｍＬ／分で流すことにより、抗体の均一性も分析した。この方法による高速イオン交換プロファイルでは、精製された抗体４２４１、４３４１のどちらも有意差を示さなかった（図３０）。抗体の光感受性を測定するため、抗体を実験室の周囲蛍光灯に当てるかアルミホイルで覆って、室温で３日間インキュベートした。次に、これらの抗体に対し、１Ｍ硫酸アンモニウム、２０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．０の移動相Ａ、および２０ｍＭ酢酸ナトリウム、５％アセトニトリル、ｐＨ５．０の移動相Ｂを用いて、連続した２つのＤｉｏｎｅｘ　ＰｒｏＰａｃ　ＨＩＣ－１０カラムを使用した疎水性相互作用クロマトグラフィーによる分析を行った。５０分間で０～１００％の直線勾配を用いて０．８ｍｌ／分の割合で試料を溶出し、２２０ｎｍでの吸光度を観察した。ＨＩＣクロマトグラムでは、露光の有無によらず、どちらの抗体も有意差を示さなかった（図３１Ａ～Ｂ）。精製時のイオン交換クロマトグラフィーのピークがより均一であったことを主な根拠として、この抗体ファミリーの第一リードとして４３４１を選定した。

【０４７７】

実施例３

ヒト組織交差反応性の評価

Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administraton, Center for Biologics Evaluation and Research (1997))に記載されているガイダンスに概ね従って、予備的な非ＧＬＰ試験を実施して、本発明の抗体と各種ヒト組織との交差反応性を測定した。薬剤開発を目的とした抗体の場合は、ＧＬＰ条件下のより広範な試験が必要である。Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏ

ｒ　４８８で標識した形態の試験物質を使用して、選択されたヒト組織の凍結切片に対する抗体１６４３５、４３４１の組織交差反応性を評価した（チャールズリバーラボラトリーズ、プリンシパルサービス、ネバダ州リノ）。Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｄｉｓｅａｓｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｔｅｒｃｈａｎｇｅ（ＮＤＲＩ、ペンシルベニア州フィラデルフィア）、キュアライン社（カリフォルニア州バーリンゲーム）、Ｃｙｂｒｄｉ（メリーランド州ロックビル）、ロッキー・マウンテン・ライオンズ・アイバンク（コロラド州オーロラ）のいずれかが２名の個人から収集した正常ヒト組織（別段の指定がある場合を除く）を、Ｓｐｅｃｉａｌ　Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ　Ｈｕｍａｎ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｂａｎｋから入手した。試験組織には、ヒトの小脳、肺、大脳皮質、卵巣（成熟女性由来）、眼、胎盤、胃腸管（小腸）、皮膚（１名）、心臓、脾臓、腎臓（１名）、甲状腺、肝臓、精巣が含まれていた。新しい凍結ヒト組織切片および対照ビーズブロック（ヒト血清アルブミン［ＨＳＡ］ビーズ）を低温保持装置上で切断し、キャピラリーギャップスライド上に載せて解凍した。組織および対照ビーズのスライドを、低温アセトン中－１０℃～－２５℃で約１０分固定した。固定したスライドを少なくとも１時間（～一晩）かけて乾燥させた。凍結保存した場合は、固定したスライドを実験の前の日にフリーザーから取り出し、使用前に一晩かけて解凍した。別段の指定がない限り、以下の手順はすべて室温で実施した。スライドを１×Ｍｏｒｐｈｏｓａｖｅ（商標）と共に約１５分インキュベートして組織形態を保全した後、１×リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）で２回、それぞれ約５分間洗浄した。内因性ペルオキシダーゼをブロックするため、スライドをグルコースオキシダーゼ溶液中で約１時間、３７℃でインキュベートした。スライドを１×ＰＢＳで２回、それぞれ約５分間洗浄した。アジビンおよびビオチン溶液中での逐次的インキュベーション（それぞれ約１５分）により、内因性ビオチンをブロックした。ビオチン中のインキュベーションの後、組織切片をブロック抗体溶液で約２５分間ブロックした。Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８－Ａｂ　１６４３５およびＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８　ａｎｔｉ－Ａｂ　４３４１を、約２５分間、最適濃度（２．０μｇ／ｍＬ）または最適濃度の５倍（１０．０μｇ／ｍＬ）で切片に適用した。スライドを洗浄緩衝液で３回洗浄してから、二次抗体（ウサギ抗Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８）と共に約２５分間インキュベートした。二次抗体とのインキュベーションの後、スライドを洗浄緩衝液で４回洗浄し、次いで、三次抗体（西洋わさびペルオキシダーゼを抱合したヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体）と共に約２５分インキュベートし、ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）色素原基質で結合を可視化した。ＨＳＡビーズを陰性対照として使用した。組織は、ＣＤ３１すなわち血小板内皮細胞接着分子（ＰＥＣＡＭ－１）に対する抗体（抗ＣＤ３１）での染色により、免疫組織化学検査に適していると認められた。濃度２．０μｇ／ｍＬと１０．０μｇ／ｍＬのいずれの試験抗体も、検査したヒト組織において具体的な染色はまったくなかった。

【０４７８】

実施例４

ラットおよびカニクイザルにおける本発明の抗体実施形態の薬物動態（ＰＫ）試験

成体Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（８～１２週齢）に５ｍｇ／ｋｇを皮下注射し、投与から０、０．２５、１、４、２４、４８、７２、９６、１６８、３３６、５０４、６７２、８４０、および１００８時間後に側尾静脈から血液約２５０μＬをＭｉｃｒｏｔａｉｎｅｒ（登録商標）血清分離チューブに回収することにより、担体抗体１６４３５、１６４４４、４２４１、および４３４１の薬物動態プロファイルを特定した。回収後、各試料を室温に維持し、３０～４０分の凝固時間の後、較正済みのＥｐｐｅｎｄｏｒｆ　５４１７Ｒ遠心分離システム（ブリンクマンインスツルメンツ社、ニューヨーク州ウエストベリー）を用いて２～８℃、１１，５００ｒｐｍで約１０分間、遠心分離した。次に、（各ラットに対して）事前にラベル表示した極低温保存チューブに回収済み血清を移し、その後の分析用に－６０℃～－８０℃で保存した。ＰＫ試験試料から血清試料濃度を測定するため、以下の方法を用いた：半面積黒色プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ３６９４）を、２μｇ／ｍｌの抗ｈｕ　Ｆｃ抗体１．３５．１のＰＢＳ溶液でコーティングして、４℃で一晩インキュベートした。次に、プレートを洗浄し、Ｉ－Ｂｌｏｃｋ（商標）（アプライド

バイオシステムズ）を用いて４℃で一晩ブロッキングした。試料を希釈する必要がある場合は、ラットＳＤ対照血清で希釈した。標準試料と試料をＩ－Ｂｌｏｃｋ（商標）＋５％ＢＳＡで１：２０に希釈して、３８０μｌの希釈緩衝液にした。プレートを洗浄した後、前処置した５０μＬの標準試料および試料を、抗体１．３５．１をコーティングしたプレートに移し、室温で１．５時間インキュベートした。プレートを洗浄してから、Ｉ－Ｂｌｏｃｋ（商標）＋５％ＢＳＡ中の１００ｎｇ／ｍｌの抗ｈｕ　Ｆｃ抗体２１．１－ＨＲＰ抱合体５０μｌを加えて、１．５時間インキュベートした。プレートを洗浄してから、５０μｌのＰｉｃｏ基質を加えて、プレートを直ちにルミノメーターで分析した。４つの抗体のいずれも、薬物動態プロファイルに有意差はなく（図３２）、抗体１６４３５、１６４４４、４２４１、４３４１のAUC_{0-t}±標準偏差は、それぞれ１８，４９２±２，１０４、２１，０２１±２，８３２、２４，０４５±２，４８０、２４，５１３±９７２μｇ／ｈ／ｍＬであった。

【０４７９】

カニクイザル（Macaca fascicularis）における抗体１６４３５の薬物動態プロファイルを決定することにより、ｉｎ　ｖｉｖｏのパラメーターを評価した。手短に述べると、１ｍｇ／ｋｇまたは１０ｍｇ／ｋｇの１６４３５を、成熟した雄のカニクイザル（ｎ＝２／グループ）に単回で静脈内にボーラス投与した。抗体の投与前、ならびに投与から０．２５、０．５、１、４、８、１２、２４、４８、７２、９６、１２０、１４４、１６８、１９２、２１６、２４０、２６４、２８８、３１２、３６０、４０８、４５６、５０４、５５２、６００、６４８、および６７２時間後の時点に血清試料を採取した。抗ＩｇＧサンドイッチＥＬＩＳＡを用いて、試料の１６４３５抗体レベルを評価した。ＷｉｎＮｏｎＬｉｎ（登録商標）（Ｅｎｔｅｒｐｒｉｓｅ　ｖｅｒｓｉｏｎ　５．１．１，２００６、Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ（登録商標）社、カリフォルニア州マウンテンビュー）を用いた非区画化方法により、時間濃度データを分析した。得られた薬物動態プロファイルは、有意な異常をまったく示していなかった（図３３）。

【０４８０】

実施例５

抗体１６４３５－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］融合物のクローニング、精製、および分析

クローニングおよび発現。一価１６４３５－ＳｈＫ融合物（抗体３７４２）の構成要素には、以下のものが含まれる：

（ａ）１６４３５κＬＣ（配列番号１０９）；

（ｂ）１６４３５ＩｇＧ２　ＨＣ（配列番号１１２）；および

（ｃ）１６４３５ＩｇＧ２－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］（配列番号３７７）：

ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＲＹＧＩＳＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＷＩＳＴＹＳＧＮＴＮＹＡＱＫＬＱＧＲＶＴＭＴＴＤＴＳＴＳＴＡＹＭＥＬＲＳＬＲＳＤＤＴＡＶＹＹＣＡＲＡＱＬＹＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＥＳＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＮＦＧＴＱＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＴＶＥＲＫＣＣＶＥＣＰＰＣＰＡＰＰＶＡＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＦＲＶＶＳＶＬＴＶＶＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＧＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＴＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＭＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＲＳＣＩＤＴＩＰＫＳＲＣＴＡＦＫＣＫＨＳＭＫＹＲＬＳＦＣＲＫＴＣＧＴＣ／／配列番号３７７。

【０４８１】

所望の産物である抗体融合物（３７４２）は、１つの重鎖のＣ末端と融合したＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］ペプチド（配列番号７６）を有する完全抗体であった（図３４の概

略図を参照）。２つの異なる重鎖が１種類の軽鎖を共有しているため、重鎖：軽鎖：重鎖-ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］の比は１：２：１であった。予想される発現産物は、１６４３５ＩｇＧ２、一価１６４３５ＩｇＧ２－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］、および二価１６４３５ＩｇＧ２－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］である。本明細書に記載のように、陽イオン交換イオンクロマトグラフィーを使用して、混合物から一価１６４３５ＩｇＧ２－Ｓｈｋ融合タンパク質を単離した。

【０４８２】

鋳型として（配列番号３８９）をコードする構築物ｐＴＴ５－ａＫＬＨ１２０．６－ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］を使用してＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］断片を生成し、ＳｔｕＩとＮｏｔＩで消化し、ＰＣＲ精製キット（キアジェン）で精製した。同時に、ｐＤＣ３２４（配列番号１１１）をＳｔｕＩとＮｏｔＩで消化し、仔ウシ腸ホスファターゼ（ＣＩＰ）で処理して、１％アガロースゲル上で泳動した。大きい方の断片を切り出し、キアジェンのゲル精製キットでゲル精製した。精製したＳｈｋ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］を大ベクター断片と連結し、ＯｎｅＳｈｏｔ　Ｔｏｐ１０細菌中に形質転換した。形質転換した細菌コロニーからＤＮＡを単離して、配列決定に供した。いくつかのクローン配列の解析で上記配列と１００％マッチが得られたが、大規模なプラスミド精製には１クローンのみを選択した。最終的なｐＤＣ３２４－１６４３５－ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］構築物は、ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］融合ポリペプチド（配列番号３７７）をコードした。

【０４８３】

精製。プロテインＡセファロース（ＧＥヘルスケア）を用いた親和性ＦＰＬＣでのＦｃ領域の捕捉により、３７４２馴化培地の最初の精製を行った後、二価陽イオンを含まないダルベッコＰＢＳ（インビトロジェン）でのカラム洗浄および１００ｍＭ酢酸、ｐＨ３．５による段階的溶出を行った。タンパク質含有画分をプールし、１０Ｎ　ＮａＯＨを用いてｐＨを５．０に中和し、水で５倍体積に希釈した。この材料を０．４５μｍ酢酸セルロースフィルター（コーニング）によりろ過し、陽イオン交換ＦＰＬＣ（ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｈｉｇｈ　Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ；ＧＥヘルスケア）によりさらに精製した。１００％緩衝液Ａ（５０ｍＭ酢酸、ｐＨ５．０）で平衡化したカラム上に試料を充填し、０～８００ｍＭ　ＮａＣｌの勾配を用いた３０カラム体積で溶出した。一価種を含有するピークをプールし、１０ｍＭ酢酸ナトリウム、９％スクロース、ｐＨ５．０中に調合した。

【０４８４】

分析。３７４２プールに対して、２μｇのタンパク質と４～１２％トリス－グリシンゲル（インビトロジェン）を使用し、ＱｕｉｃｋＢｌｕｅ（ボストンバイオロジカルズ）で染色することにより、還元および非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を行った。このＳＤＳ－ＰＡＧＥによれば、プール間の有意差はまったくなかった（図３５）。移動相として５０ｍＭリン酸ナトリウム、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．９を使用した定組成溶出により、Ｂｉｏｓｅｐ　ＳＥＣ－Ｓ３０００カラム（フェノメネックス）を使用して、流速１ｍｌ／分で分析用ＳＥＣを行った（図３６Ａ～Ｄ）。ＳＥＣデータでは、４つのプールすべてが比較的低レベルの凝集を示したが、プール１は、他のプールと比べて多少高いレベルを示した。

【０４８５】

還元状態の重鎖（図３８Ａ～Ｄ）および軽鎖（図３７Ａ～Ｄ）のＬＣ－ＭＳ分析により、最終的な３７４２試料を特徴付けした。Ｗａｔｅｒｓ　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣシステムを使用して、産物をＷａｔｅｒｓ　ＭａｓｓＰＲＥＰマイクロ脱塩カラムに通してクロマトグラフィーを行った。カラムは８０℃に設定し、０．１％ギ酸中、直線勾配で増加させたアセトニトリル濃度を用いてタンパク質を溶出した。カラム溶出物を、質量分析用にＷａｔｅｒｓ　ＬＣＴ　Ｐｒｅｍｉｅｒ　ＥＳＩ－ＴＯＦ質量分析器に回した。機器はポジティブＶモードで作動させた。キャピラリー電圧を３，２００Ｖ、コーン電圧を８０Ｖに設定した。８００～３０００ｍ／ｚの質量スペクトルを得て、機器製造業者により提

供されたＭａｘＥｎｔ１ソフトウェアを用いてデコンボリュートした。４つのプールのすべてが機器の誤差の範囲内の予想質量を示し、全プールが予想産物を産生していることを示した（図３７Ａ～Ｄ、図３８Ａ～Ｄ）。

【０４８６】

全血分析。ｅｘ　ｖｉｖｏのアッセイを用いて、毒素ペプチド類似体Ｋｖ１．３阻害剤がＩＬ－２およびＩＦＮ－γの分泌に及ぼす影響を調べた。以前に説明されているｅｘ　ｖｉｖｏのアッセイ（国際公開第２００８／０８８４２２Ａ２号の実施例４６を参照。この文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を用いて、ヒト全血中でのＴ細胞の炎症のブロックにおけるＳｈＫ類似体および結合体の効力を試験した。手短に言えば、５０％ヒト全血をタプシガルギンで刺激して、貯蔵枯渇、カルシウム動員、およびサイトカイン分泌を誘発させた。Ｔ細胞サイトカイン分泌のブロックにおける分子の効力を評価するため、タプシガルギン刺激を加える前に、様々な濃度のＫｖ１．３ブロッキングペプチドおよびペプチド結合体を、ヒト全血試料と共に３０～６０分間プレインキュベートした。３７℃、５％CO_2で４８時間経過した後、馴化培地を回収し、メソスケールディスカバリーの提供する４スポット電気化学発光イムノアッセイを用いてサイトカイン分泌レベルを測定した。タプシガルギン刺激を用いて、複数の供与者から分離した血液からサイトカインＩＬ-２およびＩＦＮ-ｇを強力に分泌させた。タプシガルギン刺激の後にヒト全血中で産生させたＩＬ-２およびＩＦＮ-ｇは、細胞内サイトカイン染色および蛍光標示式細胞分取（ＦＡＣＳ）分析から明らかなように、Ｔ細胞から産生された。Ｋｖ１．３は、Ｔ細胞上に存在する主要な電位依存性カリウムチャネルである。K^+を流出させることにより、Ｋｖ１．３は、効率的なＴ細胞活性化およびサイトカイン分泌に必要な細胞内カルシウムの持続的な上昇に必要とされる、継続的なCa^{2+}流入の駆動力を供給する。Ｋｖ１．３阻害剤が、ＴＣＲ連結反応によりこのカルシウム流動を抑制することが以前に示されている（G.C. Koo et al., 1999, Cell. Immunol. 197, 99-107）。タプシガルギン誘導性の貯蔵枯渇およびＴＣＲ連結反応は、単離Ｔ細胞において同様のパターンのCa^{2+}動員を誘発する（E. Donnadieu et al., 1991, J. Biol. Chem. 267, 25864-25872）が、本発明者らは、タプシガルギンが全血においてより強力な応答を引き起こすことを見出した。したがって、本発明者らは、ヒト全血中においてタプシガルギンにより誘導されるＴ細胞からのサイトカイン分泌をブロックするＫｖ１．３阻害剤の能力を調べることによりその生物活性を評価するための、バイオアッセイを利用した。全血は高濃度のタンパク質を含有する複雑な流体であるため、この全血アッセイにおけるペプチドおよびペプチド結合体の活性は、生体関連流体中での４８時間にわたる分子の安定性の評価においてさらなる利点を有する。電気生理学（ｅＰｈｙｓ）アッセイは一般に持続時間が短く（＜１～２時間）、タンパク質を含有しない生理的食塩水を使用するため、ｅＰｈｙｓにより判定されたＫｖ１．３の分子効力の重要な確認が全血アッセイで得られる。全血アッセイの持続時間が長いほど、持続時間が短いｅＰｈｙｓ実験に比べて、平衡結合速度のより有効な判定が可能となり得る。表７Ａ（下記）から分かるように、３７４２－ＳｈＫ（１－３５，Ｑ１６Ｋ）の４つのプールすべてがヒト全血アッセイで良好な効力を示した。このことは、単離された分子が適切な三次構造を獲得し、４８時間中、血清内で適度に安定していることを表している。表７Ｂ（下記）は、この効力が他のＳｈＫ結合分子に匹敵することを示す。

【０４８７】

【表１１】

表７Ａ　本明細書の実施例５に記載のとおり、ＩＬ－２およびインターフェロン－γ（「ＩＦＮγ」）の３７４２の４つのプール（配列番号：３７７、１０９、１１２、１０９）のヒト全血（「ＷＢ」）アッセイを行った。

プール	IC_{50}　IFNγ（pM）	IC_{50}　IL-2（pM）
1	708	2220
2	599	2461
3	598	1649
4	412	909

【０４８８】

【表１２】

表７Ｂ　全血アッセイにおける様々な［Ｌｙｓ１６］ＳｈＫ結合体の効力を示すデータ。毒素ペプチドおよび毒素ペプチド類似体を、本明細書の実施例９に記載のようにＰＥＧ化した。免疫グロブリンを含有する化合物を、実施例８に記載のように組換えにより発現させ、精製した。本明細書の実施例５に記載のとおり、ＩＬ－２およびインターフェロン－γ（「ＩＦＮｇ」）のヒト全血（「ＷＢ」）アッセイを行った。

配列番号または引用	結合体タイプ	名称	WB（IL-2）IC50（nM）	WB（IFNg）IC50（nM）	ShK(WB,IL2)を基準にした相対効力
378	なし	ShK(1-35)	0.067	0.078	1.00
76	なし	[Lys16]ShK	0.110	0.158	1.64
379	なし	[Lys16]ShK-Ala	0.138	0.266	2.06
380	PEG	20kDa-PEG-ShK	0.380	0.840	5.67
381	PEG	20kDa-PEG-[Lys16]ShK	0.092	0.160	1.37
382	PEG	20kDa-PEG-[Lys16]ShK-Ala	0.754	1.187	11.25
377;109; 112;109	IgG2	一価抗体 #3742-ShK(1-35, Q16K)、プール４	0.412	0.909	6.15
国際公開第2008/088422A2号、実施例１	IgG1	二価 Fc-L10-ShK[1-35] ホモ二量体	0.386	0.320	5.76
国際公開第2008/088422A2号、実施例2	IgG1	二価 Fc-L10-ShK[2-35] ホモ二量体	0.585	2.285	8.73
国際公開第2008/088422A2号、実施例2	IgG1	一価 Fc/Fc-L10-ShK[2-35] ヘテロ二量体	2.149	5.199	32.07
1;26	IgG2	一価 Fc/Fc-ShK(1-35 Q16K) ヘテロ二量体	0.160	0.499	2.39
26;26	IgG2	二価Fc-ShK (1-35,Q16K) ホモ二量体	1.850	3.140	27.61

【０４８９】

実施例６

Ａｂ４３４１－ＳｈＫ（１－３５，Ｑ１６Ｋ）、４３４１－ＦＧＦ２１、１６４３５－ＦＧＦ２１融合構築物の生成

抗体１６４３５－ｈｕＦＧＦ２１融合物（Ａｂ１０１６２）。１６４３５－ｈｕＦＧＦ２１融合物の構成要素には、以下のものが含まれる：

（ａ）１６４３５κＬＣ（配列番号１０９）；

（ｂ）１６４３５ＨＣ（Ｒ１１８Ａ；配列番号１１２）；および

（ｃ）１６４３５ＩｇＧ２－ＨＣ－ｈｕＦＧＦ２１［１－１８１］（配列番号３８４）：

ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＲＹＧＩＳＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＷＩＳＴＹＳＧＮＴＮＹＡＱＫＬＱＧＲＶＴＭＴＴＤＴＳＴＳＴＡＹＭＥＬＲＳＬＲＳＤＤＴＡＶＹＹＣＡＲＡＱＬＹＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴ

KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTC
NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGGGGGGSGGGSGGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVRQRYLYT
DDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVI
QILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRELLLEDG
YNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLP
PAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS／／
配列番号３８４。

【０４９０】

鋳型として構築物ｐＴＴ５－ａＫＬＨ１２０．６－ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１５－ｈｕＦＧＦ２１［１－１８１］（配列番号１３０）を用いて、１６４３５　ｈｕＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１５－ｈｕＦＧＦ２１［１－１８１］断片を生成し、ＢｓｍＢＩとＮｏｔＩで消化し、キアジェンのゲル精製キットで精製した。同時に、ｐＴＴ５－１６４３５ＩｇＧ２ＨＣをＢｓｍＢＩとＮｏｔＩで消化し、１％アガロースゲル上で泳動した。１６４３５の重鎖可変領域を含むベクター断片を切り出し、キアジェンのゲル精製キットでゲル精製した。精製したｈｕＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１５－ｈｕＦＧＦ２１［１－１８１］断片を、１６４３５の重鎖可変領域を含むベクター断片と連結し、ＤＨ１０ｂ細菌中に形質転換した。形質転換した細菌コロニーからＤＮＡを単離して、配列決定に供した。いくつかのクローン配列の解析で上記配列と１００％マッチが得られたが、大規模なプラスミド精製には１クローンのみを選択した。最終的なｐＴＴ５－１６４３５－ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１５－ｈｕＦＧＦ２１［１－１８１］構築物は、ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１５－ｈｕＦＧＦ２１［１－１８１］融合ポリペプチド（配列番号３８４）をコードした。

【０４９１】

抗体４３４１－ｈｕＦＧＦ２１融合物（Ａｂ　１０１６３）。４３４１－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］融合物（Ａｂ１０１６３）の構成要素には、以下のものが含まれる：

（ａ）４３４１κＬＣ（配列番号１１５）；

（ｂ）４３４１ＨＣ（Ｙ１２５Ａ；配列番号１１８）；および

（ｃ）４３４１ＩｇＧ２－ＨＣ－ｈｕＦＧＦ２１［１－１８１］（配列番号３８６）：

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYFWSWI
RQLPGKGLEWIGHIHNSGTTYYNPSLKSRVTISVDTSKKQ
FSLRLSSVTAADTAVYYCARDRGGDYAYGMDVWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFG
TQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKE
YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPML
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGGGGGGGSGGGGSGGGGGSHPIPDSSPLLQFGGQVR
QRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKA
LKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDGALYGSLHFDPEACSFRE
LLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPARFL
PLPGLPPAPPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSP

ＳＹＡＳ／／配列番号３８６。

【０４９２】

鋳型として構築物ｐＴＴ５－ａＫＬＨ１２０．６－ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１５－ｈｕＦＧＦ２１［１－１８１］を用いて、ｈｕＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１５－ｈｕＦＧＦ２１［１－１８１］断片を生成し、ＢｓｍＢＩとＮｏｔＩで消化し、キアジェンのゲル精製キットで精製した。同時に、ｐＴＴ５－４３４１ＩｇＧ２　ＨＣをＢｓｍＢＩとＮｏｔＩで消化し、１％アガロースゲル上で泳動した。４３４１の重鎖可変領域を含む大きい方の断片を切り出し、キアジェンのゲル精製キットでゲル精製した。精製したｈｕＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１５－ｈｕＦＧＦ２１［１－１８１］断片を、４３４１の重鎖可変領域を含む大ベクター断片と連結し、ＤＨ１０ｂ細菌中に形質転換した。形質転換した細菌コロニーからＤＮＡを単離して、配列決定に供した。いくつかのクローン配列の解析で上記配列と１００％マッチが得られたが、大規模なプラスミド精製には１クローンのみを選択した。最終的なｐＴＴ５－４３４１－ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１５－ｈｕＦＧＦ２１［１－１８１］構築物は、ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１５－ｈｕＦＧＦ２１［１－１８１］融合ポリペプチド（配列番号３８６）をコードした。

【０４９３】

４３４１－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］融合物（抗体１０１６４）。４３４１－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］融合物（Ａｂ１０１６４）の構成要素には、以下のものが含まれる：

（ａ）４３４１κＬＣ（配列番号１１５）；

（ｂ）４３４１ＨＣ（Ｙ１２５Ａ；配列番号１１８）；および

（ｃ）４３４１ＩｇＧ２－ＨＣ－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］（配列番号３８８）：

ＱＶＱＬＱＥＳＧＰＧＬＶＫＰＳＱＴＬＳＬＴＣＴＶＳＧＧＳＩＳＳＧＤＹＦＷＳＷＩＲＱＬＰＧＫＧＬＥＷＩＧＨＩＨＮＳＧＴＴＹＹＮＰＳＬＫＳＲＶＴＩＳＶＤＴＳＫＫＱＦＳＬＲＬＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＹＣＡＲＤＲＧＧＤＹＡＹＧＭＤＶＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＥＳＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＮＦＧＴＱＴＹＴＣＮＶＤＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＴＶＥＲＫＣＣＶＥＣＰＰＣＰＡＰＰＶＡＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＦＲＶＶＳＶＬＴＶＶＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＧＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＴＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＭＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＲＳＣＩＤＴＩＰＫＳＲＣＴＡＦＫＣＫＨＳＭＫＹＲＬＳＦＣＲＫＴＣＧＴＣ／／配列番号３８８。

【０４９４】

鋳型として構築物ｐＤＣ３２４－１６４３５－ＨＣ－Ｌ１０－ＩｇＧ２－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］（配列番号３７６）を用いて、ｈｕＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］断片を生成し、ＢｓｍＢＩとＮｏｔＩで消化し、キアジェンのゲル精製キットで精製した。同時に、ｐＴＴ５－４３４１ＩｇＧ２ＨＣをＢｓｍＢＩとＮｏｔＩで消化し、１％アガロースゲル上で泳動した。４３４１の重鎖可変領域を含む大きい方の断片を切り出し、キアジェンのゲル精製キットでゲル精製した。精製したｈｕＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］断片を、４３４１の重鎖可変領域を含む大ベクター断片と連結し、ＤＨ１０ｂ細菌中に形質転換した。形質転換した細菌コロニーからＤＮＡを単離して、配列決定に供した。いくつかのクローン配列の解析で上記配列と１００％マッチが得られたが、大規模なプラスミド精製には１クローンのみを選択した。最終的なｐＴＴ５－４３４１－ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ　［１－３５，Ｑ１６Ｋ］構築物は、ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ　［１－３５，Ｑ１６Ｋ］融合ポリペプチド（配列番号３８８）をコードした。

【０４９５】

実施例７

Ａｂ４３４１－ＳｈＫ、４３４１－ＦＧＦ２１、および１６４３５－ＦＧＦ２１融合物の発現、精製、および分析

ＨＥＫ２９３－６Ｅ細胞において、一過性トランスフェクションを以下のように行った。エプスタイン・バーウイルス核抗原-１（２９３－６Ｅ細胞）を安定的に発現するヒト胎児腎２９３細胞系を国家研究会議（National Research Council）（カナダ、モントリオール）から入手した。６ｍＭ Ｌ-グルタミン（インビトロジェン、カリフォルニア州カールズバッド）、１．１％Ｆ-６８プルロニック（インビトロジェン、カリフォルニア州カールズバッド）、および２５０μｇ／μｌジェネテシン（インビトロジェン、カリフォルニア州カールズバッド）を添加したＦ１７培地（インビトロジェン、カリフォルニア州カールズバッド）を用いて、細胞を無血清懸濁培養物として維持した。この懸濁細胞培養物を、エルレンマイヤー振とうフラスコ培養物内に維持した。この培養フラスコを、加湿した５％CO_2雰囲気中、３７℃、６５ｒｐｍで振とうした。２５-ｋＤａの直線状ＰＥＩ（ポリサイエンス、ペンシルベニア州ウォリントン）のストック溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を水中で調製し、溶解するまでＨＣｌでｐＨ２．０に酸性化し、次いで、ＮａＯＨで中和し、ろ過（０．２μｍ）により滅菌し、分注して、使用するまで－２０℃で保管した。トリプトンＮ１をオルガノテクニーＳ．Ａ．（テクニサイエンス、カナダケベック州）から入手した。ストック溶液（２０％、ｗ／ｖ）をＦ１７培地中で調製し、０．２μｍフィルターによるろ過で滅菌し、使用するまで４℃で保管した。通常、トランスフェクションは１Ｌのスケールで行った。細胞（２９３-６Ｅ）を１．１×10^6の生細胞密度まで増殖させ、次いで、トランスフェクション複合体を最終培養体積の１／１０の体積で調製した。１Ｌのトランスフェクション培養物用に、トランスフェクション複合体を１００ｍｌのＦ１７基本培地中で調製し、５００μｇのプラスミドＤＮＡ（重鎖および軽鎖ＤＮＡ、１：１の比）を最初に１００ｍｌのＦ１７培地中に希釈した。５分間の室温でのインキュベーション後、１．５ｍｌのＰＥＩ溶液を加えた。複合体を穏やかにボルテックスし、次いで、室温で１５分間インキュベートした。振とうフラスコ培養液中の細胞にトランスフェクション複合混合物を添加することにより、細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの２４時間後に、トリプトンＮ１を、トランスフェクトされた培養物に０．５％の最終濃度になるまで加え、トランスフェクトされた培養物を、加湿した５％CO_2の雰囲気中、３７℃、６５ｒｐｍの振とう器上でさらに５日間維持した後、それらを回収した。馴化培地を４０００ｒｐｍでの遠心分離により回収し、次いで、０．２μｍフィルター（コーニング社）によるろ過で滅菌した。

【０４９６】

一過性に発現した抗体を、組換えプロテインＡセファロース（ＧＥヘルスケア）を使用し、馴化培地を直接、５ｍｌ／分、７℃のカラムに装填することにより精製した。次いで、二価陽イオンを含まない１０カラム体積のダルベッコＰＢＳでカラムを洗浄してから、１００ｍＭ、ｐＨ３．５の酢酸で溶出した。溶出した抗体をクロマトグラフプロファイルに基づきプールし、２Ｍのトリス塩基を用いてｐＨを５．０に調整した。次いで、プールを０．８／０．２２μｍのシリンジフィルターでろ過してから、１０ｍＭ酢酸、９％スクロース、ｐＨ５．０に対して透析した。次いで、緩衝液交換された抗体をＶｉｖａｓｐｉｎ ３０ｋＤａ遠心濃縮（ザルトリウス社）を用いて濃縮し、濃縮した産物を０．２２μｍの酢酸セルロースフィルターでろ過した。偽トランスフェクションを含むすべての馴化培地を、１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用し、１０μｌの馴化培地を載せて、３５ｍＡ／１０００Ｖ／２５０Ｗで５５分間泳動して分析した（図３９Ａ）。偽トランスフェクション試料には観察されない２５０分子量マーカーより上のバンドが、発現産物であると予想される。３つの実験用トランスフェクションすべてが、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で有意な量の予想産物を示した。

【０４９７】

抗体融合物に対して、還元ローディングバッファーと非還元ローディングバッファーを用いた１．０ｍｍトリス－グリシン４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｎｏｖｅｘ）上で産物

品質を分析した（図３９Ｂ）。非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥのどちらも、すべての候補が予想通りに電気泳動したが、１０１６２と１０１６３は予想バンドより多少遅く移動した。このことはおそらく、部分的グリコシル化を示す。さらに、５０ｍＭリン酸ナトリウム、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．８、流速１．０ｍＬ／分の移動相を用いた１つのサイズ排除カラム（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＳＥＣ３０００、７．８×３００ｍｍ）を使用して、抗体の均一性を分析した（図４０）。１０１６２融合物と１０１６３融合物は予想通りに溶出し、比較的低レベルの高分子種を示したが、１０１６４融合物は予想より早く溶出した。このことはおそらく、凝集を示している。

【０４９８】

最終的な試料４３４１－ＳｈＫ、４３４１－ＦＧＦ２１、および１６４３５－ＦＧＦ２１の還元状態の軽鎖（図４１Ａ～Ｃ）、重鎖（図４２Ａ～Ｃ）に対し、それぞれＬＣ－ＭＳ分析を行った。ＦＧＦ２１融合物試料を、還元の前に、製造者（ＱＡバイオＬＬＣ、カリフォルニア州パームデザート）の説明に従いＰＮＧａｓｅＦ手法を用いて脱グリコシル化した。ただし、基質対酵素の比率は基質１０μｇに対して酵素１μＬとした。アジレントの１１００キャピラリーＨＰＬＣシステムを使用し、産物をＺｏｒｂａｘ　ＳＢ３００　Ｃ８　５０×１ｍｍ　３ミクロンカラムに通してクロマトグラフィーを行った。カラムは７５°Ｃに設定し、０．１％トリフルオロ酢酸中、ｎ－プロパノール濃度の勾配を増加させてタンパク質を溶出した。カラム流出物を、質量分析用にアジレントのＴＯＦ質量分析器に回した。キャピラリー電圧を３，２００Ｖ、フラグメンター電圧を２２５Ｖに設定した。８００～３０００ｍ／ｚの質量スペクトルを得て、機器製造業者により提供されたＭａｓｓＨｕｎｔｅｒソフトウェアを用いてデコンボリュートした。すべての試料が機器の誤差の範囲内の予想質量を有し、全プールが予想産物を含むことを示した。

【０４９９】

実施例８

一価または多価の免疫グロブリン－および／またはＦｃドメイン－毒素ペプチド類似体融合物の発現および精製

実施例５の表７Ｂに示す本発明の代表的実施形態を含む、一価構造、二価構造、および三価構造の組み合わせを発現させ、比較のため精製した。この中には抗体ＩｇＧ２－またはＩｇＧ１－ＳｈＫ融合変異体が含まれた（図１Ｆ～Ｌを参照）。例えば、二価のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］、一価の免疫グロブリン重鎖－［Ｌｙｓ１６］ＳｈＫ融合抗体（図１Ｆ参照）である。ＩｇＧ２Ｆｃ／Ｆｃ－ＳｈＫ変異体（図１Ａ参照）、二価のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］、一価のＦｃ／Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］も、比較のため、Sullivanら、国際公開第２００８／０８８４２２Ａ２号、特にその実施例１、２、および５６（この文献は、参照により全体が本明細書に組み込まれる）に記載の、または本明細書で修正される組換え方法により作製した。

【０５００】

毒素ペプチド類似体-Ｆｃ融合物（「ペプチボディ」）または他の免疫グロブリン融合物の実施形態を作製するために使用する一過性発現系。ＨＥＫ２９３-６Ｅ細胞を、３Ｌのフェルンバッハエルレンマイヤーフラスコ内で、Ｌ-グルタミン（６ｍＭ）およびジェネテシン（２５μｇ／ｍｌ）を添加したＦ１７培地中、３７℃、５％CO_2で２ｅ５～１．２ｅ６細胞／ｍｌの間で維持し、６５ＲＰＭで振とうした。トランスフェクション時に、最終培養体積の９０％の上記Ｆ１７培地中、細胞を１．１×10^6細胞／ｍＬまで希釈した。ＤＮＡ複合体を、最終培養体積の１０％でＦｒｅｅｓｔｙｌｅ２９３培地中で調製した。ＤＮＡ複合体には、培養物１リットル当たり５００μｇの総ＤＮＡおよび培養物１リットル当たり１．５ｍｌのＰＥＩｍａｘが含まれる。成分を加えたら、ＤＮＡ複合体を短時間振とうし、室温で１０～２０分間インキュベートした後、細胞培養物に添加して、恒温器内に戻す。トランスフェクションの翌日、トリプトンＮ１（５ｇ／Ｌ）を液体２０％ストックから培養物に添加した。トランスフェクションの６日後、培養物を４，０００ＲＰＭで４０分間遠心分離して細胞をペレット化し、その培養培地を０．４５μｍフィルターを通して回収した。

【０５０１】
ＤＮＡ複合体調製の際、プラスミドの比は、目的の生成物を生成するのに必要なペプチドの所望のモル比に比例していた。ＩｇＧ２Ｆｃ／Ｆｃ-ＳｈＫの構成要素として、ＩｇＧ２ＦｃとＩｇＧ２Ｆｃ-ＳｈＫが１：１の比で含まれる。発現の間に、これらが会合してＩｇＧ２Ｆｃホモ二量体、ＩｇＧ２Ｆｃ／Ｆｃ-ＳｈＫヘテロ二量体、およびＩｇＧ２Ｆｃ-ＳｈＫホモ二量体となる。陽イオン交換クロマトグラフィーを用いた精製の間に、ＩｇＧ２Ｆｃ／Ｆｃ-ＳｈＫヘテロ二量体（一価型）が単離された。
【０５０２】
ＩｇＧ２Ｆｃ－ＳｈＫ［２－３５］；ＩｇＧ２Ｆｃ　Ｓｈｋ［２－３５，Ｑ１６Ｋ］；ＩｇＧ２Ｆｃ－Ｓｈｋ［１－３５］；ＩｇＧ２Ｆｃ－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］の哺乳動物での発現。Ｋｖ１．３阻害ペプチドＳｈＫ［２-３５］または変異ＳｈＫ［２-３５，Ｑ１６Ｋ］の単量体とインフレームで融合されたヒトＩｇＧ２の免疫グロブリンＦｃドメイン：
ＭＥＷＳＷＶＦＬＦＦＬＳＶＴＴＧＶＨＳＥＲＫＶＥＣＰＰＣＰＡＰＰＶＡＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＦＲＶＶＳＶＬＴＶＶＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＧＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＴＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＭＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ／／配列番号１
をコードするＤＮＡ配列を、標準的なＰＣＲ技術を用いて構築した。分子のＳｈＫ［２-３５］またはＳｈＫ［２-３５，Ｑ１６Ｋ］および１０アミノ酸リンカー部分を、鋳型としてｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ中の原型Ｆｃ-２ｘＬ-ＳｈＫ［２-３５］を用いてＰＣＲ反応において生成した（Sullivanら、国際公開第２００８／０８８４２２Ａ２号、実施例２、図１５Ａ～１５Ｂを参照）。ＳｈＫ［１-３５］を、鋳型としてｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ中の原型Ｆｃ-２ｘＬ-ＳｈＫ［１-３５］を用いてＰＣＲ反応において生成した（Sullivanら、国際公開第２００８／０８８４２２Ａ２号、実施例１、図１４Ａ～１４Ｂ）。これらのＳｈＫ構築物は、以下のオリゴ：
５’－ＣＡＴ　ＧＡＡ　ＴＴＣ　ＣＣＣ　ＡＣＣ　ＡＴＧ　ＧＡＡ　ＴＧＧ　ＡＧＣ　ＴＧＧ－３’（配列番号３）；および
５’－ＣＡ　ＣＧＧ　ＴＧＧ　ＧＣＡ　ＣＴＣ　ＧＡＣ　ＴＴＴ　ＧＣＧ　ＣＴＣ　ＧＧＡ　ＧＴＧ　ＧＡＣ　ＡＣＣ－３’（配列番号４）
を有するｐＳｅｌｅｘｉｓ-Ｖｈ２１-ｈＩｇＧ２-Ｆｃ鋳型から生成された、以下の改変ＶＨ２１シグナルペプチドアミノ酸配列：ＭＥＷＳＷＶＦＬＦＦＬＳＶＴＴＧＶＨＳ／／配列番号２を有する。
【０５０３】
Ｎ末端リンカー伸長を有する野生型ＳｈＫ［２-３５］（アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＳＣＩＤＴＩＰＫＳＲＣＴＡＦＱＣＫＨＳＭＫＹＲＬＳＦＣＲＫＴＣＧＴＣ／／配列番号６）は、以下のＤＮＡ配列：
ＧＧＡＧＧＡＧＧＡＧＧＡＴＣＣＧＧＡＧＧＡＧＧＡＧＧＡＡＧＣＡＧＣＴＧＣＡＴＣＧＡＣＡＣＣＡＴＣＣＣＣＡＡＧＡＧＣＣＧＣＴＧＣＡＣＣＧＣＣＴＴＣＣＡＧＴＧＣＡＡＧＣＡＣＡＧＣＡＴＧＡＡＧＴＡＣＣＧＣＣＴＧＡＧＣＴＴＣＴＧＣＣＧＣＡＡＧＡＣＣＴＧＣＧＧＧＣＡＣＣＴＧＣ／／（配列番号５）
によりコードされた。このコード配列（配列番号５）を含む断片を、下のオリゴ（配列番号７および配列番号８）ならびに鋳型としてｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ中の原型Ｆｃ-Ｌ１０-ＳｈＫ［２-３５］を用いて生成した（Sullivanら、国際公開第２００８／０８８４２２Ａ２号、実施例２、図１５Ａ～１５Ｂ。この文献は参照により組み込まれる）：
５’－ＧＴＣ　ＣＡＣ　ＴＣＣ　ＧＡＧ　ＣＧＣ　ＡＡＡ　ＧＴＣ　ＧＡＧ　ＴＧＣ　ＣＣＡ　ＣＣＧ　ＴＧＣ　Ｃ－３’（配列番号７）；および

５’－ＴＣＣ ＴＣＣ ＴＣＣ ＴＴＴ ＡＣＣ ＣＧＧ ＡＧＡ ＣＡＧ ＧＧＡ ＧＡＧ －３’／／（配列番号８）。

【０５０４】

ストラタジーン社のＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ Ｍｕｌｔｉ ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓキット（カタログ番号２００５３１）で部位特異的突然変異誘発を製造者の説明書に従い使用して、変異体ＳｈＫ［2-３５，Ｑ１６Ｋ］を生成した。突然変異誘発を生じさせるために使用したオリゴは：

５’－ＧＣＴ ＧＣＡ ＣＣＧ ＣＣＴ ＴＣＡ ＡＧＴ ＧＣＡ ＡＧＣ ＡＣＡ ＧＣ ３’（配列番号９）；および

５’－ＧＣＴ ＧＴＧ ＣＴＴ ＧＣＡ ＣＴＴ ＧＡＡ ＧＧＣ ＧＧＴ ＧＣＡ ＧＣ －３’（配列番号１０）；

であり、鋳型としてｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ中の原型Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］を用いて（Sullivanら、国際公開第２００８／０８８４２２Ａ２号、実施例２、図１５Ａ～１５Ｂ）、Ｎ末端リンカー伸長を有するＳｈｋ（２－３５，Ｋ１６）アミノ酸配列：

ｇｇｇｇｓｇｇｇｇｓｓｃｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆｋｃｋｈｓｍｋｙｒｌｓｆｃｒｋｔｃｇｔｃ／／（配列番号１２）

をコードするＤＮＡコード配列：

Ｇｇａｇｇａｇｇａｇｇａｔｃｃｇｇａｇｇａｇｇａｇｇａａｇｃａｇｃｔｇｃａｔｃｇａｃａｃｃａｔｃｃｃｃａａｇａｇｃｃｇｃｔｇｃａｃｃｇｃｃｔｔｃａａｇｔｇｃａａｇｃａｃａｇｃａｔｇａａｇｔａｃｃｇｃｃｔｇａｇｃｔｔｃｔｇｃｃｇｃａａｇａｃｃｔｇｃｇｇｃａｃｃｔｇｃ／／（配列番号１１）

を得た。

【０５０５】

ＳｈＫ［１－３５］ＷＴ断片を、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ中の原型Ｆｃ－２ｘＬ－ＳｈＫ［１－３５］（Sullivanら、国際公開第２００８／０８８４２２Ａ２号、実施例１、図１４Ａ～１４Ｂ）を鋳型として、ならびに以下のオリゴ：

５’－ＧＴＣ ＣＡＣ ＴＣＣ ＧＡＧ ＣＧＣ ＡＡＡ ＧＴＣ ＧＡＧ ＴＧＣ ＣＣＡ ＣＣＧ ＴＧＣ Ｃ－３’（配列番号７）；および

５’－ ＴＣＣ ＴＣＣ ＴＣＣ ＴＴＴ ＡＣＣ ＣＧＧ ＡＧＡ ＣＡＧ ＧＧＡ ＧＡＧ－３’（配列番号８）

を用いて生成した。

【０５０６】

ＩｇＧ２Ｆｃ領域を以下のオリゴ：

５’－ＣＣＧ ＧＧＴ ＡＡＡ ＧＧＡ ＧＧＡ ＧＧＡ ＧＧＡ ＴＣＣ ＧＧＡ Ｇ－３’（配列番号１３）；および

５’－ ＣＡＴ ＧＣＧ ＧＣＣ ＧＣＴ ＣＡＴ ＴＡＧ ＣＡＧ ＧＴＧ －３’（配列番号１４）

ならびにアミノ酸配列：

ａｐｐｖａｇｐｓｖｆｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｑｆｎｗｙｖｄｇｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｆｎｓｔｆｒｖｖｓｖｌｔｖｖｈｑｄｗｌｎｇｋｅｙｋｃｋｖｓｎｋｇｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋｔｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒｅｅｍｔｋｎｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐｍｌｄｓｄｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈｙｔｑｋｓｌｓｌｓｐｇｋ（配列番号１６）

をコードする以下のＤＮＡコード配列：

ｇｃａｃｃａｃｃｔｇｔｇｇｃａｇｇａｃｃｇｔｃａｇｔｃｔｔｃｃｔｃｔｔｃｃｃｃｃｃａａａａｃｃｃａａｇｇａｃａｃｃｃｔｃａｔｇａｔｃｔｃｃｃｇｇａｃｃｃｃｔｇａｇｇｔｃａｃｇｔｇｃｇｔｇｇｔｇｇｔｇｇａｃｇｔｇａｇｃｃａｃｇａａｇａｃｃｃｃｇａｇｇｔｃｃａｇｔｔｃａａｃｔｇｇｔａｃｇｔｇｇａｃｇｇｃｇｔｇｇａｇｇｔｇ

ｃａｔａａｔｇｃｃａａｇａｃａａａｇｃｃａｃｇｇｇａｇｇａｇｃａｇｔｔｃａａｃａ
ｇｃａｃｇｔｔｃｃｇｔｇｔｇｇｔｃａｇｃｇｔｃｃｔｃａｃｃｇｔｔｇｔｇｃａｃｃａ
ｇｇａｃｔｇｇｃｔｇａａｃｇｇｃａａｇｇａｇｔａｃａａｇｔｇｃａａｇｇｔｃｔｃｃ
ａａｃａａａｇｇｃｃｔｃｃｃａｇｃｃｃｃｃａｔｃｇａｇａａａａａｃｃａｔｃｔｃｃａ
ａａａｃｃａａａｇｇｇｃａｇｃｃｃｃｇａｇａａｃｃａｃａｇｇｔｇｔａｃａｃｃｃｔ
ｇｃｃｃｃｃａｔｃｃｃｇｇｇａｇｇａｇａｔｇａｃｃａａｇａａｃｃａｇｇｔｃａｇｃ
ｃｔｇａｃｃｔｇｃｃｔｇｇｔｃａａａｇｇｃｔｔｃｔａｃｃｃｃａｇｃｇａｃａｔｃｇ
ｃｃｇｔｇｇａｇｔｇｇｇａｇａｇｃａａｔｇｇｇｃａｇｃｃｇｇａｇａａｃａａｃｔａ
ｃａａｇａｃｃａｃａｃｃｔｃｃｃａｔｇｃｔｇｇａｃｔｃｃｇａｃｇｇｃｔｃｃｔｔｃ
ｔｔｃｃｔｃｔａｃａｇｃａａｇｃｔｃａｃｃｇｔｇｇａｃａａｇａｇｃａｇｇｔｇｇｃ
ａｇｃａｇｇｇｇａａｃｇｔｃｔｔｃｔｃａｔｇｃｔｃｃｇｔｇａｔｇｃａｔｇａｇｇｃ
ｔｃｔｇｃａｃａａｃｃａｃｔａｃａｃｇｃａｇａａｇａｇｃｃｔｃｔｃｃｃｔｇｔｃｔ
ｃｃｇｇｇｔａａａ／／配列番号１５

を含む断片を生じるｐＳｅｌｅｘｉｓ　Ｖｈ２１－ｈＩｇＧ２－Ｆｃ鋳型を用いて生成した。

【０５０７】

ＰＣＲ断片を生成し、産物をゲル上で泳動させた。ゲル精製の後、ＤＮＡ断片をＰＣＲチューブにまとめて入れ、外側プライマー：

５’－ＣＡＴ　ＧＡＡ　ＴＴＣ　ＣＣＣ　ＡＣＣ　ＡＴＧ　ＧＡＡ　ＴＧＧ　ＡＧＣ　ＴＧＧ　－３’（配列番号３）；および

５’－ＣＡＴ　ＧＣＧ　ＧＣＣ　ＧＣＴ　ＣＡＴ　ＴＡＧ　ＣＡＧ　ＧＴＧ　－３’（配列番号１４）

で繋ぎ合わせた。

【０５０８】

ＰＣＲ産物をＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩ（ロシュ）制限酵素で消化し、ゲル精製キットによりアガロースゲル精製した。同時に、ｐＴＴ１４ベクター（ＣＭＶプロモーター、ポリＡテールおよびピューロマイシン耐性遺伝子を含むアムジェン社のベクター）をＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩ制限酵素で消化し、大断片をゲル精製キットにより精製した。各精製ＰＣＲ産物を大断片に連結し、ＯｎｅＳｈｏｔ　Ｔｏｐ１０細菌中に形質転換した。形質転換細菌コロニー由来のＤＮＡを単離して、ＥｃｏＲＩおよびＮｏｔＩ制限酵素消化を施し、１パーセントのアガロースゲル上で分離した。期待されたパターンを生じたＤＮＡを、配列決定に供した。いくつかのクローン配列の解析で上記配列と１００％のマッチが得られたが、大規模なプラスミド精製には各構築物の１クローンのみを選択した。最終的なｐＴＴ１４－ＶＨ１ＳＰ－ＩｇＧ２－Ｆｃ構築物は、以下の配列：

Ｍｅｗｓｗｖｆｌｆｆｌｓｖｔｔｇｖｈｓｅｒｋｖｅｃｐｐｃｐａｐｐｖａｇｐｓｖｆ
ｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｑｆｎｗｙｖｄｇ
ｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｆｎｓｔｆｒｖｖｓｖｌｔｖｖｈｑｄｗｌｎｇｋｅｙｋｃ
ｋｖｓｎｋｇｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋｔｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒｅｅｍｔｋｎ
ｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐｍｌｄｓｄ
ｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈｙｔｑｋｓｌ
ｓｌｓｐｇｋｇｇｇｇｓｇｇｇｇｇｓｓｃｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆｑｃｋｈｓｍｋｙｒｌ
ｓｆｃｒｋｔｃｇｔｃ／／（配列番号１７）

を有するＩｇＧ２－Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）融合ポリペプチドをコードした。

【０５０９】

ｐＴＴ１４－ＶＨ２１ＳＰ－ＩｇＧ２－Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５，Ｑ１６Ｋ）構築物は、ＩｇＧ２－Ｆｃ　Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５，Ｑ１６Ｋ）融合ポリペプチド配列：

Ｍｅｗｓｗｖｆｌｆｆｌｓｖｔｔｇｖｈｓｅｒｋｖｅｃｐｐｃｐａｐｐｖａｇｐｓｖｆ
ｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｑｆｎｗｙｖｄｇ

ｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｆｎｓｔｆｒｖｖｓｖｌｔｖｖｈｑｄｗｌｎｇｋｅｙｋｃ
ｋｖｓｎｋｇｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋｔｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒｅｅｍｔｋｎ
ｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐｍｌｄｓｄ
ｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈｙｔｑｋｓｌ
ｓｌｓｐｇｋｇｇｇｇｓｇｇｇｇｇｓｓｃｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆＫｃｋｈｓｍｋｙｒｌ
ｓｆｃｒｋｔｃｇｔｃ／／配列番号１８

をコードし；

ｐＴＴ１４－ＶＨ２１ＳＰ－ＩｇＧ２－Ｆｃ　ＳｈＫ１－３５構築物は、以下の配列：

ｍｅｗｓｗｖｆｌｆｆｌｓｖｔｔｇｖｈｓｅｒｋｖｅｃｐｐｃｐａｐｐｖａｇｐｓｖｆ
ｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｑｆｎｗｙｖｄｇ
ｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｆｎｓｔｆｒｖｖｓｖｌｔｖｖｈｑｄｗｌｎｇｋｅｙｋｃ
ｋｖｓｎｋｇｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋｔｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒｅｅｍｔｋｎ
ｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐｍｌｄｓｄ
ｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈｙｔｑｋｓｌ
ｓｌｓｐｇｋｇｇｇｇｓｇｇｇｇｇｓｒｓｃｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆｑｃｋｈｓｍｋｙｒ
ｌｓｆｃｒｋｔｃｇｔｃ／／（配列番号１９）

を有するＩｇＧ２　Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（１－３５）融合ポリペプチドのコード配列を含んでいた。

【０５１０】

ｐＹＤ１６（ＣＭＶプロモーター、ポリＡテールおよびヒグロマイシン耐性遺伝子を含むアムジェン社のベクター）中でのＶＨ２１ＳＰ－ＩｇＧ２－Ｆｃのみの構築物生成は、以下のように行った：ＶＨ２１シグナルペプチドを以下のオリゴ：

５’－ＣＡＴ　ＡＡＧ　ＣＴＴ　ＣＣＣ　ＡＣＣ　ＡＴＧ　ＧＡＡ　ＴＧＧ　ＡＧＣ　ＴＧＧ－３’（配列番号２０）；および

５’－　ＣＡ　ＣＧＧ　ＴＧＧ　ＧＣＡ　ＣＴＣ　ＧＡＣ　ＴＴＴ　ＧＣＧ　ＣＴＣ　ＧＧＡ　ＧＴＧ　ＧＡＣ　ＡＣＣ　－３’（配列番号４）

を用いて、ならびに上記のｐＳｅｌｅｘｉｓ鋳型を用いて生成した。

【０５１１】

Ｆｃ領域を、上記のｐＳｅｌｅｘｉｓ鋳型ならびに以下のオリゴ：

５’－ＧＴＣ　ＣＡＣ　ＴＣＣ　ＧＡＧ　ＣＧＣ　ＡＡＡ　ＧＴＣ　ＧＡＧ　ＴＧＣ　ＣＣＡ　ＣＣＧ　ＴＧＣ　Ｃ－３’（配列番号７）；および

５’－　ＣＡＴ　ＧＧＡ　ＴＣＣ　ＴＣＡ　ＴＴＴ　ＡＣＣ　ＣＧＧ　ＡＧＡ　ＣＡＧ　ＧＧＡ　Ｇ　－３’（配列番号２１）

を用いて生成した。

【０５１２】

ＰＣＲ断片をゲル精製し、外側プライマーＧＧＴ　ＴＧＡ　ＧＡＧ　ＧＴＧ　ＣＣＡ　ＧＡＴ　ＧＴＣ　ＡＧＧ　ＧＣＴ　ＧＣＡ　ＧＣＡ　ＧＣＧ　ＧＣ／／配列番号３９１およびＣＡＧ　ＣＴＧ　ＣＡＣ　ＣＴＧ　ＡＣＣ　ＡＣＣ　ＡＣＣ　ＴＣＣ　ＡＣＣ　ＧＣＴ　ＡＴＧ　ＣＴＧ　ＡＧＣ　ＧＣＧ／／配列番号３９２を用いた１回のＰＣＲ反応で繋ぎ合わせた。得られたＰＣＲ断片をゲル精製し、ＨｉｎｄＩＩＩおよびＢａｍＨＩにより消化した。同時に、ｐＹＤ１６ベクター（ＣＭＶプロモーター、ポリＡテールおよびヒグロマイシン耐性遺伝子を含むアムジェン社のベクター）もＨｉｎｄＩＩＩおよびＢａｍＨＩにより切断し、大ベクター断片をキアジェン社のゲル精製キットにより精製した。精製ＰＣＲ産物を大断片に連結し、ＯｎｅＳｈｏｔ　Ｔｏｐ１０細菌中に形質転換した。形質転換細菌コロニー由来のＤＮＡを単離して、ＨｉｎｄＩＩＩおよびＢａｍＨＩ制限酵素消化を施し、１パーセントのアガロースゲル上で分離した。期待されたパターンを生じたＤＮＡを、配列決定に供した。いくつかのクローン配列の解析で上記配列と１００％マッチが得られたが、大規模なプラスミド精製には１クローンのみを選択した。最終的なｐＹＤ１６－ＶＨ２１ＳＰ－ＩｇＧ２－Ｆｃ構築物は、ヒトＩｇＧ２－Ｆｃ（上記配列番号１）をコードした。

【０５１３】

ＩｇＧ２－Ｆｃ　ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］の哺乳動物での発現。ＤＮＡ　ｐＴＴ５－ａＫＬＨ１２０．６－ＶＫ１ＳＰ－ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］構築物を用いて、ＤＮＡコード配列：

ｇｇａｔｃｃｇｇａｇｇａｇｇａｇｇａａｇｃｃｇｃａｇｃｔｇｃａｔｃｇａｃａｃｃａｔｃｃｃｃａａｇａｇｃｃｇｃｔｇｃａｃｃｇｃｃｔｔｃａａｇｔｇｃａａｇｃａｃａｇｃａｔｇａａｇｔａｃｃｇｃｃｔｇａｇｃｔｔｃｔｇｃｃｇｃａａｇａｃｃｔｇｃｇｇｃａｃｃｔｇｃｔａａｔｇａｇｃｇｇｃｃｇｃｔｃｇａｇｇｃｃｇｇｃａａｇｇｃｃｇｇａｔｃｃ／／（配列番号２２）

を含む断片を、ＢａｍＨＩ／ＢａｍＨＩを用いて切断した。このコード配列（配列番号２３）は、Ｎ末端リンカー配列：

ＧＳＧＧＧＧＳＲＳＣＩＤＴＩＰＫＳＲＣＴＡＦＫＣＫＨＳＭＫＹＲＬＳＦＣＲＫＴＣＧＴＣ／／（配列番号２３）

を有するＳｈＫ（１－３５，Ｑ１６Ｋ）をコードする。

【０５１４】

同時に、ｐＴＴ１４－ｈＩｇＧ２－Ｆｃ－ＳｈＫ［１－３５］ＷＴ構築物もＢａｍＨＩ／ＢａｍＨＩで消化することにより、Ｓｈｋ［１－３５］コード領域を除去し、アミノ酸配列：

ｍｅｗｓｗｖｆｌｆｆｌｓｖｔｔｇｖｈｓｅｒｋｖｅｃｐｐｃｐａｐｐｖａｇｐｓｖｆｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｑｆｎｗｙｖｄｇｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｆｎｓｔｆｒｖｖｓｖｌｔｖｖｈｑｄｗｌｎｇｋｅｙｋｃｋｖｓｎｋｇｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋｔｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒｅｅｍｔｋｎｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐｍｌｄｓｄｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈｙｔｑｋｓｌｓｌｓｐｇｋｇｇｇ／／（配列番号２５）

をコードするコード配列：

Ａｔｇｇａａｔｇｇａｇｃｔｇｇｇｔｃｔｔｔｃｔｃｔｔｃｔｔｃｃｔｇｔｃａｇｔａａｃｇａｃｔｇｇｔｇｔｃｃａｃｔｃｃｇａｇｃｇｃａａａｇｔｃｇａｇｔｇｃｃｃａｃｃｇｔｇｃｃｃａｇｃａｃｃａｃｃｔｇｔｇｇｃａｇｇａｃｃｇｔｃａｇｔｃｔｔｃｃｔｃｔｔｃｃｃｃｃｃａａａａｃｃｃａａｇｇａｃａｃｃｃｔｃａｔｇａｔｃｔｃｃｃｇｇａｃｃｃｃｔｇａｇｇｔｃａｃｇｔｇｃｇｔｇｇｔｇｇｔｇｇａｃｇｔｇａｇｃｃａｃｇａａｇａｃｃｃｃｇａｇｇｔｃｃａｇｔｔｃａａｃｔｇｇｔａｃｇｔｇｇａｃｇｇｃｇｔｇｇａｇｇｔｇｃａｔａａｔｇｃｃａａｇａｃａａａｇｃｃａｃｇｇｇｇａｇｇａｇｃａｇｔｔｃａａｃａｇｃａｃｇｔｔｃｃｇｔｇｔｇｇｔｃａｇｃｇｔｃｃｔｃａｃｃｇｔｔｇｔｇｃａｃｃａｇｇａｃｔｇｇｃｔｇａａｃｇｇｃａａｇｇｇａｇｔａｃａａｇｔｇｃａａｇｇｔｃｔｃｃａａｃａａａｇｇｃｃｔｃｃｃａｇｃｃｃｃｃａｔｃｇａｇａａａａａｃｃａｔｃｔｃｃａａａａｃｃａａａｇｇｇｃａｇｃｃｃｃｇａｇａａｃｃａｃａｇｇｔｇｔａｃａｃｃｃｔｇｃｃｃｃｃａｔｃｃｃｇｇｇａｇｇａｇａｔｇａｃｃａａｇａａｃｃａｇｇｔｃａｇｃｃｔｇａｃｃｔｇｃｃｔｇｇｔｃａａａｇｇｃｔｔｃｔａｃｃｃｃａｇｃｇａｃａｔｃｇｃｃｇｔｇｇａｇｔｇｇｇａｇａｇｃａａｔｇｇｇｃａｇｃｃｇｇａｇａａｃａａｃｔａｃａａｇａｃｃａｃａｃｃｔｃｃｃａｔｇｃｔｇｇａｃｔｃｃｇａｃｇｇｃｔｃｃｔｔｃｔｔｃｃｔｃｔａｃａｇｃａａｇｃｔｃａｃｃｇｔｇｇａｃａａｇａｇｃａｇｇｔｇｇｃａｇｃａｇｇｇｇａａｃｇｔｃｔｔｃｔｃａｔｇｃｔｃｃｇｔｇａｔｇｃａｔｇａｇｇｃｔｃｔｇｃａｃａａｃｃａｃｔａｃａｃｇｃａｇａａｇａｇｃｃｔｃｔｃｃｃｔｇｔｃｔｃｃｇｇｇｔａａａｇｇａｇｇａｇｇａ　／／（配列番号２４）

を得た。

【０５１５】

ＳｈＫを除去したｐＴＴ１４－ｈＩｇＧ２－Ｆｃベクターを、仔ウシ腸ホスファターゼ（ＣＩＰ）で処理して５’リン酸基を除去し、フェノール／クロロホルム抽出を行って、ベクターのそれ自体との再連結を防止した。挿入ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］断片をそ

のベクターからゲル精製により取り出し、キアジェン社のゲル精製キットでクリーンアップした。精製挿入物を大ベクター断片に連結し、ＯｎｅＳｈｏｔ　Ｔｏｐ１０細菌中に形質転換した。形質転換細菌コロニー由来のＤＮＡを単離して、ＢａｍＨＩ制限酵素消化を施し、１パーセントのアガロースゲル上で分離した。期待されたパターンを生じたＤＮＡを、配列決定に供した。いくつかのクローン配列の解析で上記配列と１００％マッチが得られたが、大規模なプラスミド精製には１クローンのみを選択した。最終的なｐＴＴ１４－ＩｇＧ２－Ｆｃ－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］構築物は、以下のＩｇＧ２　Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（１－３５，Ｑ１６Ｋ）融合タンパク質配列：

ｍｅｗｓｗｖｆｌｆｆｌｓｖｔｔｇｖｈｓｅｒｋｖｅｃｐｐｃｐａｐｐｖａｇｐｓｖｆｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｑｆｎｗｙｖｄｇｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｆｎｓｔｆｒｖｖｓｖｌｔｖｖｈｑｄｗｌｎｇｋｅｙｋｃｋｖｓｎｋｇｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋｔｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒｅｅｍｔｋｎｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐｍｌｄｓｄｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈｙｔｑｋｓｌｓｌｓｐｇｋｇｇｇｇｓｇｇｇｇｇｓｒｓｃｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆｋｃｋｈｓｍｋｙｒｌｓｆｃｒｋｔｃｇｔｃ／／（配列番号２６）

をコードした。

【０５１６】

ＩｇＧ２　Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（１－３５）のアミノ酸配列は、次のとおりである。

ｍｅｗｓｗｖｆｌｆｆｌｓｖｔｔｇｖｈｓｅｒｋｖｅｃｐｐｃｐａｐｐｖａｇｐｓｖｆｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｑｆｎｗｙｖｄｇｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｆｎｓｔｆｒｖｖｓｖｌｔｖｖｈｑｄｗｌｎｇｋｅｙｋｃｋｖｓｎｋｇｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋｔｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒｅｅｍｔｋｎｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐｍｌｄｓｄｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈｙｔｑｋｓｌｓｌｓｐｇｋｇｇｇｇｓｇｇｇｇｇｓｒｓｃｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆｑｃｋｈｓｍｋｙｒｌｓｆｃｒｋｔｃｇｔＣ／／（配列番号３０）

【０５１７】

所望のａＫＬＨ　ＩｇＧ２／Ｆｃ－ＳｈＫ産物は、図１Ｅにおいて構成されるように、すぐ上の各構成要素（ａ）～（ｃ）の１コピーを含んでいた。このため、その比は１：１：１であった。この産物は、Ｆｃドメインで結合された半抗体と半Ｆｃの融合物（「ヘミボディ（ｈｅｍｉｂｏｄｙ）」）と表現することができる。培養物から除去する必要のあるさらなるペプチド集合体は、ａＫＬＨ　ＡｂおよびＦｃ－ＳｈＫホモ二量体であった。

【０５１８】

ＳｈＫ［１－３５］ＷＴ断片を、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ中の原型Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］を鋳型として（Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、国際出願ＰＣＴ／米国特許出願公開第２００７／０２２８３１号（国際公開第２００８／０８８４２２号として公開）の実施例１、図１４Ａ～１４Ｂに記載。この文献は、参照により全体が本明細書に組み込まれる）、ならびに以下のオリゴ：

５’－ＴＣＣ　ＣＴＧ　ＴＣＴ　ＣＣＧ　ＧＧＴ　ＧＧＡ　ＧＧＡ　ＧＧＡ　ＧＧＡ　ＴＣＣ　ＧＧＡ　Ｇ－３’（配列番号４７）；および

５’－ＣＡＴ　ＧＣＧ　ＧＣＣ　ＧＣＴ　ＣＡＴ　ＴＡＧ　ＣＡＧ　ＧＴＧ－３’（配列番号１４）

を用いて生成した。

【０５１９】

ＰＣＲ産物を１％アガロースゲル上で泳動した。バンドをアガロースプラグ用に切り取り、このプラグを新たなＰＣＲ反応チューブに入れた。次いで、配列番号３５７および配列番号３３０の外側プライマーを用いて、ＰＣＲによりアガロースプラグを増幅した。次いで、ＰＣＲ産物を、ＸｂａＩおよびＮｏｔＩにより消化し、ＰＣＲクリーンアップキット（キアジェン）で精製した。同時に、ｐＴＴ５ベクター（ＣＭＶプロモーターおよびポ

リＡテールを含むアムジェン社のベクター）をＸｂａＩおよびＮｏｔＩにより切断した。ｐＴＴ５ベクターを１％アガロースゲル上で泳動し、大きい方の断片を切り出して、キアジェン社のゲル精製キットでゲル精製した。精製ＰＣＲ産物を大ベクター断片と連結し、ＯｎｅＳｈｏｔ　Ｔｏｐ１０細菌中に形質転換した。形質転換細菌コロニー由来のＤＮＡを単離して、ＸｂａＩおよびＮｏｔＩ制限酵素消化を施し、１パーセントのアガロースゲル上で分離した。期待されたパターンを生じたＤＮＡを、配列決定に供した。いくつかのクローン配列の解析で上記配列と１００％マッチが得られたが、大規模なプラスミド精製には１クローンのみを選択した。最終的なｐＴＴ５－ａＫＬＨ　１２０．６－ＶＫ１ＳＰ－ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］構築物は、アミノ酸配列：

Ｍｄｍｒｖｐａｑｌｌｇｌｌｌｌｗｌｒｇａｒｃｑｖｑｌｖｑｓｇａｅｖｋｋｐｇａｓ
ｖｋｖｓｃｋａｓｇｙｔｆｔｇｙｈｍｈｗｖｒｑａｐｇｑｇｌｅｗｍｇｗｉｎｐｎｓｇｇ
ｔｎｙａｑｋｆｑｇｒｖｔｍｔｒｄｔｓｉｓｔａｙｍｅｌｓｒｌｒｓｄｄｔａｖｙｙｃａ
ｒｄｒｇｓｙｙｗｆｄｐｗｇｑｇｔｌｖｔｖｓｓａｓｔｋｇｐｓｖｆｐｌａｐｃｓｒｓｔ
ｓｅｓｔａａｌｇｃｌｖｋｄｙｆｐｅｐｖｔｖｓｗｎｓｇａｌｔｓｇｖｈｔｆｐａｖｌｑ
ｓｓｇｌｙｓｌｓｓｖｖｔｖｐｓｓｎｆｇｔｑｔｙｔｃｎｖｄｈｋｐｓｎｔｋｖｄｋｔｖ
ｅｒｋｃｃｖｅｃｐｐｃｐａｐｐｖａｇｐｓｖｆｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖ
ｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｑｆｎｗｙｖｄｇｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｆｎｓｔ
ｆｒｖｖｓｖｌｔｖｖｈｑｄｗｌｎｇｋｅｙｋｃｋｖｓｎｋｇｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋｔ
ｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒｅｅｍｔｋｎｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖ
ｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐｍｌｄｓｄｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑ
ｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈｙｔｑｋｓｌｓｌｓｐｇｇｇｇｇｓｇｇｇｇｓｒｓｃ
ｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆｑｃｋｈｓｍｋｙｒｌｓｆｃｒｋｔｃｇｔｃ／／（配列番号４８）

を有するＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］融合ポリペプチドをコードした。

【０５２０】

この構築物のＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］変異体型を生成するために、ストラタジーン社のＱｕｉｋｃｈａｎｇｅ　Ｍｕｌｔｉ　ｓｉｔｅ　Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓキット（カタログ番号２００５３１）を製造者の説明書に従って、ならびにオリゴ：

５’－ＧＣＴ　ＧＣＡ　ＣＣＧ　ＣＣＴ　ＴＣＡ　ＡＧＴ　ＧＣＡ　ＡＧＣ　ＡＣＡ　ＧＣ　３’（配列番号９）；および

５’－　ＧＣＴ　ＧＴＧ　ＣＴＴ　ＧＣＡ　ＣＴＴ　ＧＡＡ　ＧＧＣ　ＧＧＴ　ＧＣＡ　ＧＣ　－３’（配列番号１０）

を用いて、部位特異的変異誘発を行った。最終的な構築物ｐＴＴ５－ａＫＬＨ１２０．６－ＶＫ１ＳＰ－ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］は、以下のアミノ酸配列：

Ｍｄｍｒｖｐａｑｌｌｇｌｌｌｌｗｌｒｇａｒｃｑｖｑｌｖｑｓｇａｅｖｋｋｐｇａｓ
ｖｋｖｓｃｋａｓｇｙｔｆｔｇｙｈｍｈｗｖｒｑａｐｇｑｇｌｅｗｍｇｗｉｎｐｎｓｇｇ
ｔｎｙａｑｋｆｑｇｒｖｔｍｔｒｄｔｓｉｓｔａｙｍｅｌｓｒｌｒｓｄｄｔａｖｙｙｃａ
ｒｄｒｇｓｙｙｗｆｄｐｗｇｑｇｔｌｖｔｖｓｓａｓｔｋｇｐｓｖｆｐｌａｐｃｓｒｓｔ
ｓｅｓｔａａｌｇｃｌｖｋｄｙｆｐｅｐｖｔｖｓｗｎｓｇａｌｔｓｇｖｈｔｆｐａｖｌｑ
ｓｓｇｌｙｓｌｓｓｖｖｔｖｐｓｓｎｆｇｔｑｔｙｔｃｎｖｄｈｋｐｓｎｔｋｖｄｋｔｖ
ｅｒｋｃｃｖｅｃｐｐｃｐａｐｐｖａｇｐｓｖｆｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖ
ｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｑｆｎｗｙｖｄｇｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｆｎｓｔ
ｆｒｖｖｓｖｌｔｖｖｈｑｄｗｌｎｇｋｅｙｋｃｋｖｓｎｋｇｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋｔ
ｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒｅｅｍｔｋｎｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖ
ｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐｍｌｄｓｄｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑ
ｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈｙｔｑｋｓｌｓｌｓｐｇｇｇｇｇｓｇｇｇｇｓｒｓｃ
ｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆｋｃｋｈｓｍｋｙｒｌｓｆｃｒｋｔｃｇｔｃ／／（配列番号４

９）
を有するＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］融合ポリペプチドをコードした。
【０５２１】
ａＫＬＨ－ＩｇＧ２重鎖－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５，Ｑ１６Ｋ］の哺乳動物での発現。ＤＮＡ構築物ｐＴＴ５－ａＫＬＨ　１２０．６－ＶＫ１ＳＰ－ＩｇＧ２－ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］をベクターとして使用し、ＳｈＫ［１－３５］をＢａｍＨＩ／ＢａｍＨＩを用いて切り出した。ＳｈＫ［１－３５］を含まないｐＴＴ５－ａＫＬＨ　１２０．６－ＶＫ１ＳＰ－ＩｇＧ２－ＨＣ由来のベクター断片は、アミノ酸配列：
ｍｄｍｒｖｐａｑｌｌｇｌｌｌｌｗｌｒｇａｒｃｑｖｑｌｖｑｓｇａｅｖｋｋｐｇａｓ
ｖｋｖｓｃｋａｓｇｙｔｆｔｇｙｈｍｈｗｖｒｑａｐｇｑｇｌｅｗｍｇｗｉｎｐｎｓｇｇ
ｔｎｙａｑｋｆｑｇｒｖｔｍｔｒｄｔｓｉｓｔａｙｍｅｌｓｒｌｒｓｄｄｔａｖｙｙｃａ
ｒｄｒｇｓｙｙｗｆｄｐｗｇｑｇｔｌｖｔｖｓｓａｓｔｋｇｐｓｖｆｐｌａｐｃｓｒｓｔ
ｓｅｓｔａａｌｇｃｌｖｋｄｙｆｐｅｐｖｔｖｓｗｎｓｇａｌｔｓｇｖｈｔｆｐａｖｌｑ
ｓｓｇｌｙｓｌｓｓｖｖｔｖｐｓｓｎｆｇｔｑｔｙｔｃｎｖｄｈｋｐｓｎｔｋｖｄｋｔｖ
ｅｒｋｃｃｖｅｃｐｐｃｐａｐｐｖａｇｐｓｖｆｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖ
ｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｑｆｎｗｙｖｄｇｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｆｎｓｔ
ｆｒｖｖｓｖｌｔｖｖｈｑｄｗｌｎｇｋｅｙｋｃｋｖｓｎｋｇｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋｔ
ｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒｅｅｍｔｋｎｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖ
ｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐｍｌｄｓｄｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑ
ｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈｙｔｑｋｓｌｓｌｓｐｇｇｇｇｇ／／（配列番号５１）
をコードするコード配列：
ａｔｇｇａｃａｔｇａｇｇｇｔｇｃｃｃｇｃｔｃａｇｃｔｃｃｔｇｇｇｇｃｔｃｃｔｇ
ｃｔｇｃｔｇｔｇｇｃｔｇａｇａｇｇｔｇｃｃａｇａｔｇｔｃａｇｇｔｇｃａｇｃｔｇｇ
ｔｇｃａｇｔｃｔｇｇｇｇｃｔｇａｇｇｔｇａａｇａａｇｃｃｔｇｇｇｇｃｃｔｃａｇｔ
ｇａａｇｇｔｃｔｃｃｔｇｃａａｇｇｃｔｔｃｔｇｇａｔａｃａｃｃｔｔｃａｃｃｇｇｃ
ｔａｃｃａｃａｔｇｃａｃｔｇｇｇｇｔｇｃｇａｃａｇｇｃｃｃｃｔｇｇａｃａａｇｇｇｃ
ｔｔｇａｇｔｇｇａｔｇｇｇａｔｇｇａｔｃａａｃｃｃｔａａｃａｇｔｇｇｔｇｇｃａｃ
ａａａｃｔａｔｇｃａｃａｇａａｇｔｔｔｃａｇｇｇｃａｇｇｇｔｃａｃｃａｔｇａｃｃ
ａｇｇｇａｃａｃｇｔｃｃａｔｃａｇｃａｃａｇｃｃｔａｃａｔｇｇａｇｃｔｇａｇｃａ
ｇｇｃｔｇａｇａｔｃｔｇａｃｇａｃａｃｇｇｃｃｇｔｇｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃｇａｇ
ａｇａｔｃｇｔｇｇｇａｇｃｔａｃｔａｃｔｇｇｔｔｃｇａｃｃｃｃｔｇｇｇｇｃｃａｇ
ｇｇａａｃｃｃｔｇｇｔｃａｃｃｇｔｃｔｃｃｔｃａｇｃｃｔｃｃａｃｃａａｇｇｇｃｃ
ｃａｔｃｇｇｔｃｔｔｃｃｃｃｃｔｇｇｃｇｃｃｃｔｇｃｔｃｃａｇｇａｇｃａｃｃｔｃ
ｃｇａｇａｇｃａｃａｇｃｇｇｃｃｃｔｇｇｇｇｃｔｇｃｃｔｇｇｔｃａａｇｇａｃｔａｃ
ｔｔｃｃｃｃｇａａｃｃｇｇｔｇａｃｇｇｔｇｔｃｇｔｇｇａａｃｔｃａｇｇｃｇｃｔｃ
ｔｇａｃｃａｇｃｇｇｃｇｔｇｃａｃａｃｃｔｔｃｃｃａｇｃｔｇｔｃｃｔａｃａｇｔｃ
ｃｔｃａｇｇａｃｔｃｔａｃｔｃｃｃｔｃａｇｃａｇｃｇｔｇｇｔｇａｃｃｇｔｇｃｃｃ
ｔｃｃａｇｃａａｃｔｔｃｇｇｃａｃｃｃａｇａｃｃｔａｃａｃｃｔｇｃａａｃｇｔａｇ
ａｔｃａｃａａｇｃｃｃａｇｃａａｃａｃｃａａａｇｇｔｇｇａｃａａｇａｃａｇｔｔｇａ
ｇｃｇｃａａａｔｇｔｔｇｔｇｔｃｇａｇｔｇｃｃｃａｃｃｇｔｇｃｃｃａｇｃａｃｃａ
ｃｃｔｇｔｇｇｃａｇｇａｃｃｇｔｃａｇｔｃｔｔｃｃｔｃｔｔｃｃｃｃｃｃａａａａｃ
ｃｃａａｇｇａｃａｃｃｃｔｃａｔｇａｔｃｔｃｃｃｇｇａｃｃｃｃｔｇａｇｇｔｃａｃ
ｇｔｇｃｇｔｇｇｔｇｇｔｇｇａｃｇｔｇａｇｃｃａｃｇａａｇａｃｃｃｃｇａｇｇｔｃ
ｃａｇｔｔｃａａｃｔｇｇｔａｃｇｔｇｇａｃｇｇｃｇｔｇｇａｇｇｔｇｃａｔａａｔｇ
ｃｃａａｇａｃａａａｇｃｃａｃｇｇｇａｇｇａｇｃａｇｔｔｃａａｃａｇｃａｃｇｔｔ
ｃｃｇｔｇｔｇｇｔｃａｇｃｇｔｃｃｔｃａｃｃｇｔｔｇｔｇｃａｃｃａｇｇａｃｔｇｇ
ｃｔｇａａｃｇｇｃａａｇｇａｇｔａｃａａｇｔｇｃａａｇｇｔｃｔｃｃａａａｃａａａｇ
ｇｃｃｔｃｃｃａｇｃｃｃｃｃａｔｃｇａｇａａａａｃｃａｔｃｔｃｃａａａａａｃｃａａ
ａｇｇｇｃａｇｃｃｃｃｇａｇａａｃｃａｃａｇｇｔｇｔａｃａｃｃｃｔｇｃｃｃｃｃａ

ｔｃｃｃｇｇｇａｇｇａｇａｔｇａｃｃａａｇａａｃｃａｇｇｔｃａｇｃｃｔｇａｃｃｔ
ｇｃｃｔｇｇｔｃａａａｇｇｃｔｔｃｔａｃｃｃｃａｇｃｇａｃａｔｃｇｃｃｇｔｇｇａ
ｇｔｇｇｇａｇａｇｃａａｔｇｇｇｃａｇｃｃｇｇａｇａａｃａａｃｔａｃａａｇａｃｃ
ａｃａｃｃｔｃｃｃａｔｇｃｔｇｇａｃｔｃｃｇａｃｇｇｃｔｃｃｔｔｃｔｔｃｃｔｃｔ
ａｃａｇｃａａｇｃｔｃａｃｃｇｔｇｇａｃａａｇａｇｃａｇｇｔｇｇｃａｇｃａｇｇｇ
ｇａａｃｇｔｃｔｔｃｔｃａｔｇｃｔｃｃｇｔｇａｔｇｃａｔｇａｇｇｃｔｃｔｇｃａｃ
ａａｃｃａｃｔａｃａｃｇｃａｇａａｇａｇｃｃｔｃｔｃｃｃｔｇｔｃｔｃｃｇｇｇｔｇ
ｇａｇｇａｇｇａ／／（配列番号５０）
を含んだ。

【０５２２】

次いで、ベクター断片を、仔ウシ腸ホスファターゼ（ＣＩＰ）で処理して５’リン酸基を除去し、フェノール／クロロホルム抽出を行って、ベクターのそれ自体との再連結を防止した。挿入物は、ＩｇＧ２　Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５，Ｑ１６Ｋ）：

ｍｅｗｓｗｖｆｌｆｆｌｓｖｔｔｇｖｈｓｅｒｋｖｅｃｐｐｃｐａｐｐｖａｇｐｓｖｆ
ｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｑｆｎｗｙｖｄｇ
ｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｆｎｓｔｆｒｖｖｓｖｌｔｖｖｈｑｄｗｌｎｇｋｅｙｋｃ
ｋｖｓｎｋｇｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋｔｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒｅｅｍｔｋｎ
ｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐｍｌｄｓｄ
ｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈｙｔｑｋｓｌ
ｓｌｓｐｇｋｇｇｇｇｓｇｇｇｇｓｓｃｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆｋｃｋｈｓｍｋｙｒｌ
ｓｆｃｒｋｔｃｇｔｃ／／（配列番号１８）

をコードするｐＴＴ１４－ＶＨ２１ＳＰ－ＩｇＧ２－Ｆｃ－ＳｈＫ［２－３５，Ｑ１６Ｋ］由来であり、この挿入物もＢａｍＨＩ／ＢａｍＨＩを用いて消化した。挿入ＳｈＫ［２－３５，Ｑ１６Ｋ］断片をそのベクターからゲル精製により取り出し、キアジェン社のゲル精製キットでクリーンアップした。アミノ酸配列：

ｇｓｇｇｇｇｓｓｃｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆｋｃｋｈｓｍｋｙｒｌｓｆｃｒｋｔｃｇ
ｔｃ（配列番号５３）

をコードするコード配列：

ｇｇａ　ｔｃｃ　ｇｇａ　ｇｇａ　ｇｇａ　ｇｇａ　ａｇｃ　ａｇｃ　ｔｇｃ　ａｔｃ
ｇａｃ　ａｃｃ　ａｔｃ　ｃｃｃ　ａａｇ　ａｇｃ　ｃｇｃ　ｔｇｃ　ａｃｃ　ｇｃｃ
ｔｔｃ　ａａｇ　ｔｇｃ　ａａｇ　ｃａｃ　ａｇｃ　ａｔｇ　ａａｇ　ｔａｃ　ｃｇｃ
ｃｔｇ　ａｇｃ　ｔｔｃ　ｔｇｃ　ｃｇｃ　ａａｇ　ａｃｃ　ｔｇｃ　ｇｇｃ　ａｃｃ
ｔｇｃ　ｔａａ　ｔｇａ／／（配列番号５２）

を含む精製ＤＮＡ挿入物を大ベクター断片と連結し、ＯｎｅＳｈｏｔ　Ｔｏｐ１０細菌中に形質転換した。形質転換細菌コロニー由来のＤＮＡを単離して、ＢａｍＨＩ制限酵素消化を施し、１パーセントのアガロースゲル上で分離した。期待されたパターンを生じたＤＮＡを、配列決定に供した。いくつかのクローン配列の解析で上記配列と１００％マッチが得られたが、大規模なプラスミド精製には１クローンのみを選択した。最終的な構築物ｐＴＴ５－ａＫＬＨ－ＩｇＧ２　ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５，Ｑ１６Ｋ］は、ＩｇＧ２　ＨＣ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５，Ｑ１６Ｋ］融合ポリペプチド：

Ｍｄｍｒｖｐａｑｌｌｇｌｌｌｌｗｌｒｇａｒｃｑｖｑｌｖｑｓｇａｅｖｋｋｐｇａｓ
ｖｋｖｓｃｋａｓｇｙｔｆｔｇｙｈｍｈｗｖｒｑａｐｇｑｇｌｅｗｍｇｗｉｎｐｎｓｇｇ
ｔｎｙａｑｋｆｑｇｒｖｔｍｔｒｄｔｓｉｓｔａｙｍｅｌｓｒｌｒｓｄｄｔａｖｙｙｙｃａ
ｒｄｒｇｓｙｙｗｆｄｐｗｇｑｇｔｌｖｔｖｓｓａｓｔｋｇｐｓｖｆｐｌａｐｃｓｒｓｔ
ｓｅｓｔａａｌｇｃｌｖｋｄｙｆｐｅｐｖｔｖｓｗｎｓｇａｌｔｓｇｖｈｔｆｐａｖｌｑ
ｓｓｇｌｙｓｌｓｓｖｖｔｖｐｓｓｎｆｇｔｑｔｙｔｃｎｖｄｈｋｐｓｎｔｋｖｄｋｔｖ
ｅｒｋｃｃｖｅｃｐｐｃｐａｐｐｖａｇｐｓｖｆｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖ
ｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｑｆｎｗｙｖｄｇｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｆｎｓｔ
ｆｒｖｖｓｖｌｔｖｖｈｑｄｗｌｎｇｋｅｙｋｃｋｖｓｎｋｇｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋｔ
ｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒｅｅｍｔｋｎｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖ

ｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐｍｌｄｓｄｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈｙｔｑｋｓｌｓｌｓｐｇｇｇｇｇｇｓｇｇｇｇｇｓｓｃｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆｋｃｋｈｓｍｋｙｒｌｓｆｃｒｋｔｃｇｔｃ／／（配列番号５４）

をコードした。

【０５２３】

ＶＨ２１ＳＰ－Ｎ末端ＳｈＫ［１－３５］野生型-ＩｇＧ１－Ｆｃの哺乳動物での発現

。ヒトＩｇＧ１のＮ末端Ｆｃ領域とインフレームで融合したＫｖ１．３阻害ペプチドＳｈＫ［1-３５］の単量体をコードするＤＮＡ配列を、以下に記載のように構築した。

【０５２４】

ＶＨ２１　ＳＰ－ＳｈＫ（１－３５）－Ｌ１０－ＩｇＧ１　Ｆｃ発現ベクター構築のために、ＰＣＲ法を用いて、ＨｉｎｄＩＩＩおよびＢａｍＨＩ制限部位に隣接する４グリシンおよび１セリンアミノ酸と連結したＶＨ２１シグナルペプチドＳｈＫ（１－３５）遺伝子を生成し、ＢａｍＨＩおよびＮｏｔＩ制限部位に隣接するＩｇＧ１　Ｆｃ断片と連結した４グリシンおよび１セリンアミノ酸を、ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ中のＦｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１を鋳型として用いたＰＣＲ反応（Sullivanら、国際公開第２００８／０８８４２２Ａ２号の実施例４１および図４２Ａ～４２Ｂに記載。この文献は参照により組み込まれる）で生成した。

【０５２５】

ＶＨ２１　ＳＰ－ＳｈＫ（１－３５）－$Ｇ_4$Ｓを生成するために、ＰｆｕＴｕｒｂｏ　ＨｏｔＳｔａｒｔ　ＤＮＡポリメラーゼ（ストラタジーン）を用いた、９５℃－３０秒、５５℃－３０秒、７５℃－４５秒で３５サイクルのＰＣＲ反応において、下に示す配列の２つのオリゴを使用した；ＨｉｎｄＩＩＩ（ａａｇｃｔｔ）およびＢａｍＨＩ（ｇｇａｔｃｃ）制限部位には下線を付す：

順方向プライマー：

ｔｇｃａｇａａｇｃｔｔｃｔａｇａｃｃａｃｃａｔｇｇａａｔｇｇａｇｃｔｇｇｇｔｃｔｔｔｃｔｃｔｔｃｔｔｃｃｔｇｔｃａｇｔａａｃｇａｃｔｇｇｔｇｔｃｃａｃｔｃｃｃｇｃａｇｃｔｇｃａｔｃｇａｃａｃｃａｔｃｃｃｃａａｇａｇｃｃｇｃｔｇｃａｃｃｇｃｃｔｔｃｃａｇｔ／／（配列番号５５）；および

逆方向プライマー：

Ｃｔｃｃｇｇａｔｃｃｔｃｃｔｃｃｔｃｃｇｃａｇｇｔｇｃｃｇｃａｇｇｔｃｔｔｇｃｇｇｃａｇａａｇｃｔｃａｇｇｃｇｇｔａｃｔｔｃａｔｇｃｔｇｔｇｃｔｔｇｃａｃｔｇｇａａｇｇｃｇｇｔｇｃａｇｃｇｇｃｔｃｔｔｇｇｇｇａｔｇｇｔｇｔｃｇａｔ／／（配列番号５６）。

【０５２６】

得られたＰＣＲ産物は、２パーセントのアガロースゲル上で２０２ｂｐのバンドとして分離された。２０２ｂｐのＰＣＲ産物を、ＰＣＲ精製キット（キアジェン）を用いて精製し、次いで、ＨｉｎｄＩＩＩおよびＢａｍＨＩ（ロシュ）制限酵素で消化し、アガロースゲルをゲル抽出キット（キアジェン）で精製した。

【０５２７】

$Ｇ_4$Ｓ－ＩｇＧ１　Ｆｃを生成するために、ＰｆｕＴｕｒｂｏ　ＨｏｔＳｔａｒｔ　ＤＮＡポリメラーゼ（ストラタジーン）を用いた、９５℃－３０秒、５５℃－３０秒、７５℃－１分で３０サイクルのＰＣＲ反応において、下に示す配列の２つのオリゴを使用した；ＢａｍＨＩ（ｇｇａｔｃｃ）およびＮｏｔＩ（ｇｃｇｇｃｃｇｃ）制限部位に下線を付す：

順方向プライマー：

ｇｔａｇｇａｔｃｃｇｇａｇｇａｇｇａｇｇａａｇｃｇａｃａａａａｃｔｃａｃａｃ／／（配列番号５７）；および

逆方向プライマー：

Ｃｇａｇｃｇｇｃｃｇｃｔｔａｃｔａｔｔｔａｃｃｃｇｇａｇａｃａｇｇｇａ／／（配

列番号５８）。

【０５２８】

得られたＰＣＲ産物は、１パーセントのアガロースゲル上で７２１ｂｐのバンドとして分離された。７２１ｂｐのＰＣＲ産物を、ＰＣＲ精製キット（キアジェン）を用いて精製し、次いで、ＢａｍＨＩおよびＮｏｔＩ（ロシュ）制限酵素で消化し、アガロースゲルをゲル抽出キット（キアジェン）で精製した。

【０５２９】

ｐｃＤＮＡ３．１（＋）ＣＭＶｉ－Ｆｃ－Ｌ１０－ＯＳＫ１ベクターをＢａｍＨＩおよびＮｏｔＩ制限酵素で消化し、大断片をゲル抽出キットにより精製した。ゲル精製した４ＧＳ－ＩｇＧ１　Ｆｃ断片を精製大断片と連結し、Ｏｎｅ　Ｓｈｏｔ（登録商標）Ｔｏｐ１０（インビトロジェン）中に形質転換して、ｐＣＭＶｉ－Ｆｃ－Ｌ１０－ＩｇＧ１　Ｆｃベクターを作出した。次いで、ｐＣＭＶｉ－Ｆｃ－Ｌ１０－ＩｇＧ１　ＦｃベクターをＨｉｎｄＩＩＩおよびＢａｍＨＩ制限酵素で消化し、大断片をゲル抽出キットにより精製した。ゲル精製したＶＨ２１　ＳＰ－ＳｈＫ（１－３５）－４ＧＳ断片を精製大断片に連結し、Ｏｎｅ　Ｓｈｏｔ（登録商標）Ｔｏｐ１０（インビトロジェン）中に形質転換して、ｐＣＭＶｉ－ＶＨ２１　ＳＰ－ＳｈＫ（１－３５）－Ｌ１０－ＩｇＧ１　Ｆｃ構築物を得た。形質転換細菌コロニー由来のＤＮＡを単離して、ＢａｍＨＩおよびＮｏｔＩ制限酵素で消化し、１パーセントのアガロースゲル上で分離した。期待されたパターンを生じたＤＮＡを、配列決定に供した。いくつかのクローン配列の解析で上記配列と１００％のマッチが得られたが、大規模なプラスミド精製には各遺伝子由来の１クローンのみを選択した。ｐＣＭＶｉベクター中のＶＨ２１　ＳＰ－ＳｈＫ（１－３５）－Ｌ１０－ＩｇＧ１　Ｆｃ由来のＤＮＡを再配列決定してＦｃおよびリンカー領域を確認し、配列は上記配列と１００％一致していた。断片Ｈ２１　ＳＰ－ＳｈＫ（１－３５）－Ｌ１０－ＩｇＧ１　Ｆｃは、ＶＨ２１　ＳＰ－ＳｈＫ（１－３５）－Ｌ１０－ＩｇＧ１　Ｆｃのアミノ酸配列：

ｍｅｗｓｗｖｆｌｆｆｌｓｖｔｔｇｖｈｓｒｓｃｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆｑｃｋｈｓ
ｍｋｙｒｌｓｆｃｒｋｔｃｇｔｃｇｇｇｇｓｇｇｇｇｓｄｋｔｈｔｃｐｐｃｐａｐｅｌｌ
ｇｇｐｓｖｆｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｋｆ
ｎｗｙｖｄｇｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｙｎｓｔｙｒｖｖｓｖｌｔｖｌｈｑｄｗｌｎ
ｇｋｅｙｋｃｋｖｓｎｋａｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋａｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒ
ｄｅｌｔｋｎｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐ
ｐｖｌｄｓｄｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈ
ｙｔｑｋｓｌｓｌｓｐｇｋ／／（配列番号６０）

をコードするコード配列：

ａｔｇｇａａｔｇｇａｇｃｔｇｇｇｔｃｔｔｔｃｔｃｔｔｃｔｔｃｃｔｇｔｃａｇｔａ
ａｃｇａｃｔｇｇｔｇｔｃｃａｃｔｃｃｃｇｃａｇｃｔｇｃａｔｃｇａｃａｃｃａｔｃｃ
ｃｃａａｇａｇｃｃｇｃｔｇｃａｃｃｇｃｃｔｔｃｃａｇｔｇｃａａｇｃａｃａｇｃａｔ
ｇａａｇｔａｃｃｇｃｃｔｇａｇｃｔｔｃｔｇｃｃｇｃａａｇａｃｃｔｇｃｇｇｃａｃｃ
ｔｇｃｇｇａｇｇａｇｇａｇｇａｔｃｃｇｇａｇｇａｇｇａｇｇａａｇｃｇａｃａａａａ
ｃｔｃａｃａｃａｔｇｃｃｃａｃｃｇｔｇｃｃｃａｇｃａｃｃｔｇａａｃｔｃｃｔｇｇｇ
ｇｇｇａｃｃｇｔｃａｇｔｃｔｔｃｃｔｃｔｔｃｃｃｃｃｃａａａａｃｃｃａａｇｇａｃ
ａｃｃｃｔｃａｔｇａｔｃｔｃｃｃｇｇａｃｃｃｃｔｇａｇｇｔｃａｃａｔｇｃｇｔｇｇ
ｔｇｇｔｇｇａｃｇｔｇａｇｃｃａｃｇａａｇａｃｃｃｔｇａｇｇｔｃａａｇｔｔｃａａ
ｃｔｇｇｔａｃｇｔｇｇａｃｇｇｃｇｔｇｇａｇｇｔｇｃａｔａａｔｇｃｃａａｇａｃａ
ａａｇｃｃｇｃｇｇｇａｇｇａｇｃａｇｔａｃａａｃａｇｃａｃｇｔａｃｃｇｔｇｔｇｇ
ｔｃａｇｃｇｔｃｃｔｃａｃｃｇｔｃｃｔｇｃａｃｃａｇｇａｃｔｇｇｃｔｇａａｔｇｇ
ｃａａｇｇａｇｔａｃａａｇｔｇｃａａｇｇｔｃｔｃｃａａａｃａａａｇｃｃｃｔｃｃｃａ
ｇｃｃｃｃｃａｔｃｇａｇａａａａｃｃａｔｃｔｃｃａａａｇｃｃａａａｇｇｇｃａｇｃ
ｃｃｃｇａｇａａｃｃａｃａｇｇｔｇｔａｃａｃｃｃｔｇｃｃｃｃｃａｔｃｃｃｇｇｇａ
ｔｇａｇｃｔｇａｃｃａａｇａａｃｃａｇｇｔｃａｇｃｃｔｇａｃｃｔｇｃｃｔｇｇｔｃ
ａａａｇｇｃｔｔｃｔａｔｃｃｃａｇｃｇａｃａｔｃｇｃｃｇｔｇｇａｇｔｇｇｇａｇａ

ｇｃａａｔｇｇｇｃａｇｃｃｇｇａｇａａｃａａｃｔａｃａａｇａｃｃａｃｇｃｃｔｃｃ
ｃｇｔｇｃｔｇｇａｃｔｃｃｇａｃｇｇｃｔｃｃｔｔｃｔｔｃｃｔｃｔａｃａｇｃａａｇ
ｃｔｃａｃｃｇｔｇｇａｃａａｇａｇｃａｇｇｔｇｇｃａｇｃａｇｇｇｇａａｃｇｔｃｔ
ｔｃｔｃａｔｇｃｔｃｃｇｔｇａｔｇｃａｔｇａｇｇｃｔｃｔｇｃａｃａａｃｃａｃｔａ
ｃａｃｇｃａｇａａｇａｇｃｃｔｃｔｃｃｃｔｇｔｃｔｃｃｇｇｇｔａａａｔａｇｔａａ
／／（配列番号５９）
を含んだ。

【０５３０】

Ｎ末端ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］－ａＫＬＨ　ＨＣ；およびＮ末端ＳｈＫ［１－３５Ｑ１６Ｋ］－ａＫＬＨ　ＬＣの哺乳動物での発現。Ｎ末端ＳｈＫ［１－３５］野生型-Ｌ１０－ＩｇＧ１－Ｆｃをコードする構築物を用いて、以下のオリゴ：

５’－ＧＣＴ　ＧＣＡ　ＣＣＧ　ＣＣＴ　ＴＣＡ　ＡＧＴ　ＧＣＡ　ＡＧＣ　ＡＣＡ　ＧＣ－３’／／（配列番号９）；および

５’－ＧＣＴ　ＧＴＧ　ＣＴＴ　ＧＣＡ　ＣＴＴ　ＧＡＡ　ＧＧＣ　ＧＧＴ　ＧＣＡ　ＧＣ　－３’（配列番号１０）

を使用して部位特異的変異誘発を行い、ＳｈＫ領域におけるＱ１６Ｋ変異を生じさせた。

【０５３１】

ストラタジーン社のＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ　Ｍｕｌｔｉ　Ｓｉｔｅ　Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓキットを製造者の説明書に従って使用した。ｐＣＭＶｉ-Ｎ末端-ＳｈＫ［１－３５Ｑ１６Ｋ］－Ｌ１０－ＩｇＧ１－Ｆｃの最終構築物は、以下のシグナルペプチド（ＶＨ２１　ＳＰ）－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］－Ｌ１０－ＩｇＧ１－Ｆｃ融合ポリペプチド：

Ｍｅｗｓｗｖｆｌｆｆｌｓｖｔｔｇｖｈｓｒｓｃｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆｋｃｋｈｓ
ｍｋｙｒｌｓｆｃｒｋｔｃｇｔｃｇｇｇｇｓｇｇｇｇｓｄｋｔｈｔｃｐｐｃｐａｐｅｌｌ
ｇｇｐｓｖｆｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｋｆ
ｎｗｙｖｄｇｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｙｎｓｔｙｒｖｖｓｖｌｔｖｌｈｑｄｗｌｎ
ｇｋｅｙｋｃｋｖｓｎｋａｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋａｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒ
ｄｅｌｔｋｎｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐ
ｐｖｌｄｓｄｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈ
ｙｔｑｋｓｌｓｌｓｐｇｋ／／（配列番号６１）
をコードした。

【０５３２】

Ｎ末端ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］－ａＫＬＨ　ＨＣ構築物を生成するために、シグナルペプチド-ＳｈＫ［１－３５Ｑ１６Ｋ］－Ｌ１０リンカーを含むＰＣＲ産物を、以下のオリゴ：

５’－ＣＡＴ　ＴＣＴ　ＡＧＡ　ＣＣＡ　ＣＣＡ　ＴＧＧ　ＡＡＴ　ＧＧ－３’（配列番号６２）；

５’－ＣＡＧ　ＣＴＧ　ＣＡＣ　ＣＴＧ　ＧＣＴ　ＴＣＣ　ＴＣＣ　ＴＣＣ　ＴＣＣ　ＧＧ－３’（配列番号６３）；および

鋳型ｐＣＭＶｉ－Ｎ末端-ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］－Ｌ１０－ＩｇＧ１－Ｆｃを用いて作製し、

ＶＨ２１　ＳＰ－ＳｈＫ（１－３５，Ｑ１６Ｋ）－Ｌ１０のアミノ酸配列：

ＭＥＷＳＷＶＦＬＦＦＬＳＶＴＴＧＶＨＳＲＳＣＩＤＴＩＰＫＳＲＣＴＡＦＫＣＫＨＳＭＫＹＲＬＳＦＣＲＫＴＣＧＴＣＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ／／（配列番号６５）
をコードするコード配列：

ａｔｇｇａａｔｇｇａｇｃｔｇｇｇｔｃｔｔｔｃｔｃｔｔｃｔｔｃｃｔｇｔｃａｇｔａ
ａｃｇａｃｔｇｇｔｇｔｃｃａｃｔｃｃｃｇｃａｇｃｔｇｃａｔｃｇａｃａｃｃａｔｃｃ
ｃｃａａｇａｇｃｃｇｃｔｇｃａｃｃｇｃｃｔｔｃａａｇｔｇｃａａｇｃａｃａｇｃａｔ
ｇａａｇｔａｃｃｇｃｃｔｇａｇｃｔｔｃｔｇｃｃｇｃａａｇａｃｃｔｇｃｇｇｃａｃｃ

ｔｇｃｇｇａｇｇａｇｇａｇｇａｔｃｃｇｇａｇｇａｇｇａｇｇａａｇｃ／／（配列番号６４）
を含む断片を得た。
【０５３３】
ａＫＬＨ－ＨＣ断片を生成するために、オリゴ：
５’－ＧＧＡ　ＧＧＡ　ＧＧＡ　ＡＧＣ　ＣＡＧ　ＧＴＧ　ＣＡＧ　ＣＴＧ　ＧＴＧ　ＣＡＧ－３’（配列番号６６）；
５’－ＣＡＴ　ＧＣＧ　ＧＣＣ　ＧＣＴ　ＣＡＴ　ＴＴＡ　ＣＣＣ－３’（配列番号６７）；および
鋳型ｐＴＴ５－ａＫＬＨ　１２０．６－ＨＣを用いてＰＣＲ産物を作出し、アミノ酸配列：
ｑｖｑｌｖｑｓｇａｅｖｋｋｐｇａｓｖｋｖｓｃｋａｓｇｙｔｆｔｇｙｈｍｈｗｖｒｑ
ａｐｇｑｇｌｅｗｍｇｗｉｎｐｎｓｇｇｔｎｙａｑｋｆｑｇｒｖｔｍｔｒｄｔｓｉｓｔａ
ｙｍｅｌｓｒｌｒｓｄｄｔａｖｙｙｃａｒｄｒｇｓｙｙｗｆｄｐｗｇｑｇｔｌｖｔｖｓｓ
ａｓｔｋｇｐｓｖｆｐｌａｐｃｓｒｓｔｓｅｓｔａａｌｇｃｌｖｋｄｙｆｐｅｐｖｔｖｓ
ｗｎｓｇａｌｔｓｇｖｈｔｆｐａｖｌｑｓｓｇｌｙｓｌｓｓｖｖｔｖｐｓｓｎｆｇｔｑｔ
ｙｔｃｎｖｄｈｋｐｓｎｔｋｖｄｋｔｖｅｒｋｃｃｖｅｃｐｐｃｐａｐｐｖａｇｐｓｖｆ
ｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐｅｖｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｑｆｎｗｙｖｄｇ
ｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｆｎｓｔｆｒｖｖｓｖｌｔｖｖｈｑｄｗｌｎｇｋｅｙｋｃ
ｋｖｓｎｋｇｌｐａｐｉｅｋｔｉｓｋｔｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒｅｅｍｔｋｎ
ｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉａｖｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐｍｌｄｓｄ
ｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗｑｑｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈｙｔｑｋｓｌ
ｓｌｓｐｇｋ／／（配列番号６９）
をコードするコード配列：
ｃａｇｇｔｇｃａｇｃｔｇｇｔｇｃａｇｔｃｔｇｇｇｇｃｔｇａｇｇｔｇａａｇａａｇ
ｃｃｔｇｇｇｇｃｃｔｃａｇｔｇａａｇｇｔｃｔｃｃｔｇｃａａｇｇｃｔｔｃｔｇｇａｔ
ａｃａｃｃｔｔｃａｃｃｇｇｃｔａｃｃａｃａｔｇｃａｃｔｇｇｇｔｇｃｇａｃａｇｇｃ
ｃｃｃｔｇｇａｃａａｇｇｇｃｔｔｇａｇｔｇｇａｔｇｇｇａｔｇｇａｔｃａａｃｃｃｔ
ａａｃａｇｔｇｇｔｇｇｃａｃａａａｃｔａｔｇｃａｃａｇａａｇｔｔｔｃａｇｇｇｃａ
ｇｇｇｔｃａｃｃａｔｇａｃｃａｇｇｇａｃａｃｇｔｃｃａｔｃａｇｃａｃａｇｃｃｔａ
ｃａｔｇｇａｇｃｔｇａｇｃａｇｇｃｔｇａｇａｔｃｔｇａｃｇａｃａｃｇｇｃｃｇｔｇ
ｔａｔｔａｃｔｇｔｇｃｇａｇａｇａｔｃｇｔｇｇｇａｇｃｔａｃｔａｃｔｇｇｔｔｃｇ
ａｃｃｃｃｔｇｇｇｇｃｃａｇｇｇａａｃｃｃｔｇｇｔｃａｃｃｇｔｃｔｃｃｔｃａｇｃ
ｃｔｃｃａｃｃａａｇｇｇｃｃｃａｔｃｇｇｔｃｔｔｃｃｃｃｃｔｇｇｃｇｃｃｃｔｇｃ
ｔｃｃａｇｇａｇｃａｃｃｔｃｃｇａｇａｇｃａｃａｇｃｇｇｃｃｃｔｇｇｇｃｔｇｃｃ
ｔｇｇｔｃａａｇｇａｃｔａｃｔｔｃｃｃｃｇａａｃｃｇｇｔｇａｃｇｇｔｇｔｃｇｔｇ
ｇａａｃｔｃａｇｇｃｇｃｔｃｔｇａｃｃａｇｃｇｇｃｇｔｇｃａｃａｃｃｔｔｃｃｃａ
ｇｃｔｇｔｃｃｔａｃａｇｔｃｃｔｃａｇｇａｃｔｃｔａｃｔｃｃｃｔｃａｇｃａｇｃｇ
ｔｇｇｔｇａｃｃｇｔｇｃｃｃｔｃｃａｇｃａａｃｔｔｃｇｇｃａｃｃｃａｇａｃｃｔａ
ｃａｃｃｔｇｃａａｃｇｔａｇａｔｃａｃａａｇｃｃｃａｇｃａａｃａｃｃａａａｇｇｔｇ
ｇａｃａａｇａｃａｇｔｔｇａｇｃｇｃａａａｔｇｔｔｇｔｇｔｃｇａｇｔｇｃｃｃａｃ
ｃｇｔｇｃｃｃａｇｃａｃｃａｃｃｔｇｔｇｇｃａｇｇａｃｃｇｔｃａｇｔｃｔｔｃｃｔ
ｃｔｔｃｃｃｃｃｃａａａａｃｃｃａａｇｇａｃａｃｃｃｔｃａｔｇａｔｃｔｃｃｃｇｇ
ａｃｃｃｃｔｇａｇｇｔｃａｃｇｔｇｃｇｔｇｇｔｇｇｔｇｇａｃｇｔｇａｇｃｃａｃｇ
ａａｇａｃｃｃｃｇａｇｇｔｃｃａｇｔｔｃａａｃｔｇｇｔａｃｇｔｇｇａｃｇｇｃｇｔ
ｇｇａｇｇｔｇｃａｔａａｔｇｃｃａａｇａｃａａａｇｃｃａｃｇｇｇｇａｇｇａｇｃａｇ
ｔｔｃａａｃａｇｃａｃｇｔｔｃｃｇｔｇｔｇｇｔｃａｇｃｇｔｃｃｔｃａｃｃｇｔｔｇ
ｔｇｃａｃｃａｇｇａｃｔｇｇｃｔｇａａｃｇｇｃａａｇｇａｇｔａｃａａｇｔｇｃａａ
ｇｇｔｃｔｃｃａａｃａａａｇｇｃｃｔｃｃｃａｇｃｃｃｃｃａｔｃｇａｇａａａａａｃｃ
ａｔｃｔｃｃａａａａｃｃａａａｇｇｇｃａｇｃｃｃｃｇａｇａａｃｃａｃａｇｇｔｇｔ

ａｃａｃｃｃｔｇｃｃｃｃｃａｔｃｃｃｇｇｇａｇｇａｇａｔｇａｃｃａａｇａａｃｃａ
ｇｇｔｃａｇｃｃｔｇａｃｃｔｇｃｃｔｇｇｔｃａａａｇｇｃｔｔｃｔａｃｃｃｃａｇｃ
ｇａｃａｔｃｇｃｃｇｔｇｇａｇｔｇｇｇａｇａｇｃａａｔｇｇｇｃａｇｃｃｇｇａｇａ
ａｃａａｃｔａｃａａｇａｃｃａｃａｃｃｔｃｃｃａｔｇｃｔｇｇａｃｔｃｃｇａｃｇｇ
ｃｔｃｃｔｔｃｔｔｃｃｔｃｔａｃａｇｃａａｇｃｔｃａｃｃｇｔｇｇａｃａａｇａｇｃ
ａｇｇｔｇｇｃａｇｃａｇｇｇｇａａｃｇｔｃｔｔｃｔｃａｔｇｃｔｃｃｇｔｇａｔｇｃ
ａｔｇａｇｇｃｔｃｔｇｃａｃａａｃｃａｃｔａｃａｃｇｃａｇａａｇａｇｃｃｔｃｔｃ
ｃｃｔｇｔｃｔｃｃｇｇｇｔａａａｔｇａ／／（配列番号６８）

を含むＤＮＡ断片を得た。

【０５３４】

２つのＰＣＲ産物をゲル上で泳動し、適当なサイズのバンドをアガロースプラグ用に切り取った。アガロースプラグを新たな単一のＰＣＲ反応に供し、最外プライマー（配列番号６２）および（配列番号６７）を用いて断片を繋ぎ合わせた。ＸｂａＩおよびＮｏｔＩを用いてＰＣＲ断片を切断し、キアジェン社のＰＣＲクリーンアップキットでクリーニングした。同時に、ｐＴＴ５ベクターもＸｂａＩおよびＮｏｔＩにより切断し、ゲル精製した。精製挿入物を、大ベクター断片に連結し、ＯｎｅＳｈｏｔ　Ｔｏｐ１０細菌中に形質転換した。形質転換細菌コロニー由来のＤＮＡを単離して、ＸｂａＩおよびＮｏｔＩ制限酵素消化を施し、１パーセントのアガロースゲル上で分離した。期待されたパターンを生じたＤＮＡを、配列決定に供した。いくつかのクローン配列の解析で上記配列と１００％マッチが得られたが、大規模なプラスミド精製には１クローンのみを選択した。最終構築物のｐＴＴ５-Ｎ末端ＳｈＫ［１－３５Ｑ１６Ｋ］－Ｌ１０－ａＫＬＨ１２０．６－ＨＣは、ＶＨ２１　ＳＰ－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］－Ｌ１０－ａＫＬＨ１２０．６－ＨＣ融合ポリペプチド：

Ｍｅｗｓｗｖｆｌｆｆｌｓｖｔｔｇｖｈｓｒｓｃｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆｋｃｋｈｓ
ｍｋｙｒｌｓｆｃｒｋｔｃｇｔｃｇｇｇｇｓｇｇｇｇｓｑｖｑｌｖｑｓｇａｅｖｋｋｐｇ
ａｓｖｋｖｓｃｋａｓｇｙｔｆｔｇｙｈｍｈｗｖｒｑａｐｇｑｇｌｅｗｍｇｗｉｎｐｎｓ
ｇｇｔｎｙａｑｋｆｑｇｒｖｔｍｔｒｄｔｓｉｓｔａｙｍｅｌｓｒｌｒｓｄｄｔａｖｙｙ
ｃａｒｄｒｇｓｙｙｗｆｄｐｗｇｑｇｔｌｖｔｖｓｓａｓｔｋｇｐｓｖｆｐｌａｐｃｓｒ
ｓｔｓｅｓｔａａｌｇｃｌｖｋｄｙｆｐｅｐｖｔｖｓｗｎｓｇａｌｔｓｇｖｈｔｆｐａｖ
ｌｑｓｓｇｌｙｓｌｓｓｖｖｔｖｐｓｓｎｆｇｔｑｔｙｔｃｎｖｄｈｋｐｓｎｔｋｖｄｋ
ｔｖｅｒｋｃｃｖｅｃｐｐｃｐａｐｐｖａｇｐｓｖｆｌｆｐｐｋｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔｐ
ｅｖｔｃｖｖｖｄｖｓｈｅｄｐｅｖｑｆｎｗｙｖｄｇｖｅｖｈｎａｋｔｋｐｒｅｅｑｆｎ
ｓｔｆｒｖｖｓｖｌｔｖｖｈｑｄｗｌｎｇｋｅｙｋｃｋｖｓｎｋｇｌｐａｐｉｅｋｔｉｓ
ｋｔｋｇｑｐｒｅｐｑｖｙｔｌｐｐｓｒｅｅｍｔｋｎｑｖｓｌｔｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄｉ
ａｖｅｗｅｓｎｇｑｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐｍｌｄｓｄｇｓｆｆｌｙｓｋｌｔｖｄｋｓｒｗ
ｑｑｇｎｖｆｓｃｓｖｍｈｅａｌｈｎｈｙｔｑｋｓｌｓｌｓｐｇｋ／／（配列番号７０）

をコードした。

【０５３５】

最後に、Ｎ末端-ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］－Ｌ１０－ａＫＬＨ１２０．６軽鎖（ＬＣ）を上と同じ方法で生成した。シグナルペプチド-ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］－Ｌ１０を含むＰＣＲ産物を、オリゴ：

５’－ＣＡＴ　ＴＣＴ　ＡＧＡ　ＣＣＡ　ＣＣＡ　ＴＧＧ　ＡＡＴ　ＧＧ－３’（配列番号６２）；および

５’－ＣＡＴ　ＣＴＧ　ＧＡＴ　ＧＴＣ　ＧＣＴ　ＴＣＣ　ＴＣＣ　ＴＣＣ　ＴＣＣ　ＧＧ－３’（配列番号７１）；

ならびに鋳型ｐＣＭＶｉ－Ｎ末端-ＳｈＫ［１－３５Ｑ１６Ｋ］－Ｌ１０－ＩｇＧ１－Ｆｃを用いて作出し、シグナルペプチド（ＶＨ２１　ＳＰ）－ＳｈＫ（１－３５，Ｑ１６Ｋ）－Ｌ１０リンカーのアミノ酸配列：

ｍｅｗｓｗｖｆｌｆｆｌｓｖｔｔｇｖｈｓｒｓｃｉｄｔｉｐｋｓｒｃｔａｆｋｃｋｈｓ
ｍｋｙｒｌｓｆｃｒｋｔｃｇｔｃｇｇｇｇｓｇｇｇｇｓ／／（配列番号６５）

をコードするコード配列：

atggaatggagctgggtctttctcttcttcctgtcagta
acgactggtgtccactcccgcagctgcatcgacaccatcc
ccaagagccgctgcaccgccttcaagtgcaagcacagcat
gaagtaccgcctgagcttctgccgcaagacctgcgggcacc
tgcgggagggaggaggatccggagggaggaggaggaagc／／（配列番号
６４）

を含むＤＮＡ断片を得た。

【０５３６】

鋳型およびオリゴ：

５’－ＧＧＡ　ＧＧＡ　ＧＧＡ　ＡＧＣ　ＧＡＣ　ＡＴＣ　ＣＡＧ　ＡＴＧ　ＡＣＣ
ＣＡＧ　ＴＣ－３’（配列番号７２）；および

５’－ＣＡＴ　ＣＴＣ　ＧＡＧ　ＣＧＧ　ＣＣＧ　ＣＴＣ　ＡＡＣ－３’（配列番号７
３）

の使用。

【０５３７】

得られたクローンＰＣＲ断片は、Ｎ末端シグナルペプチドを有するＮ末端-ＶＨ２１
ＳＰ－ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］－Ｌ１０－ａＫＬＨ１２０．６軽鎖（ＬＣ）のアミ
ノ酸配列：

mewswvflffflsvttgvhsrscidtipksrctafkckhs
mkyrlsfcrktcgtcggggsggggsdiqmtqspsslsasv
gdrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapkrliyaasslq
sgvpsrfsgsgsgteftltisslqpedfatyyclqhnsyp
ltfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcl
lnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstysl
sstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec／
／（配列番号７５）

をコードするコード配列：

atggaatggagctgggtctttctcttcttcctgtcagta
acgactggtgtccactcccgcagctgcatcgacaccatcc
ccaagagccgctgcaccgccttcaagtgcaagcacagcat
gaagtaccgcctgagcttctgccgcaagacctgcgggcacc
tgcgggagggaggaggatccggagggaggaggaggaagcgacatcc
agatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtagg
agacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagggcatt
agaaatgatttaggctggtatcagcagaaaccagggaaaag
ccctaaacgcctgatctatgctgcatccagtttgcaaag
tggggtcccatcaaggttcagcggcagtggatctgggaca
gaattcactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagatt
ttgcaacttattactgtctacagcataatagttacccgct
cactttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacgaact
gtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatg
agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgct
gaataacttctatcccagaggccaaagtacagtggaag
gtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtg
tcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcag
cagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacac
aaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagct
cgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttga／／
（配列番号７４）

を含んだ。

【０５３８】

両方のＰＣＲ断片（配列番号６４のコード配列を含むＤＮＡ断片および配列番号７４のコード配列を含むａＫＬＨ　１２０．６軽鎖ＬＣ断片）をゲル上で泳動し、適当なサイズのバンドをアガロースプラグ用に切り取った。アガロースプラグを新たな単一のＰＣＲ反応に供し、最外プライマー（配列番号６２）および（配列番号７３）を用いて断片を繋ぎ合わせた。得られたＰＣＲ断片をＸｂａＩおよびＮｏｔＩを用いて切断し、キアジェン社のＰＣＲクリーンアップキットでクリーニングした。

【０５３９】

同時に、ｐＴＴ１４ベクター（ＣＭＶプロモーター、ポリＡテールおよびピューロマイシン耐性遺伝子を含むアムジェン社のベクター）もＸｂａＩおよびＮｏｔＩで切断し、ゲル精製した。精製挿入物を、大ベクター断片に連結し、ＯｎｅＳｈｏｔ　Ｔｏｐ１０細菌中に形質転換した。形質転換細菌コロニー由来のＤＮＡを単離して、ＸｂａＩおよびＮｏｔＩ制限酵素消化を施し、１パーセントのアガロースゲル上で分離した。期待されたパターンを生じたＤＮＡを、配列決定に供した。シグナルペプチド-ＳｈＫ［１－３５，Ｑ１６Ｋ］－Ｌ１０－ａＫＬＨ１２０．６－ＬＣ融合ポリペプチド配列（すなわち、配列番号７５）をコードする最終構築物ｐＴＴ１４－Ｎ末端ＳｈＫ［１－３５Ｑ１６Ｋ］－Ｌ１０－ａＫＬＨ１２０．６－ＬＣ。

【０５４０】

実施例９

コンパレーター分子の精製および評価：一価Ｆｃ／Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］ヘテロ二量体、一価または二価Ｆｃ／Ｆｃ－ＳｈＫ（１－３５　Ｑ１６Ｋ）（ＩｇＧ２）ヘテロ二量体、その他のポリペプチド分子

一価または二価のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［２－３５］、一価または二価のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ［１－３５］、一価または二価のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（１－３５，Ｑ１６Ｋ）、および、表７Ｂ（本明細書の実施例５）に列記されているその他のＳｈＫ関連ポリペプチド分子を、本明細書に記載の方法で発現し、単離し、精製した。表７Ｂに記載のＰＥＧ化および未ＰＥＧ化毒素ペプチドコンパレーターを、以下のとおり合成により調製した。

【０５４１】

ペプチド合成。Ｎ$^{\alpha}$-Ｆｍｏｃ側鎖保護アミノ酸およびＨ-Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）-２Ｃｌ-Ｔｒｔレジンを、ノバビオケム社、バーケム社、またはシグマアルドリッチ社から購入した。以下の側鎖保護ストラテジーを用いた：Ａｓｐ（ＯｔＢｕ）、Ａｒｇ（Ｐｂｆ）、Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）、Ｇｌｕ（ＯｔＢｕ）、Ｈｉｓ（Ｔｒｔ）、Ｌｙｓ（Ｎ$^{\varepsilon}$－Ｂｏｃ）、Ｓｅｒ（ＯｔＢｕ）、Ｔｈｒ（ＯｔＢｕ）、およびＴｙｒ（ＯｔＢｕ）。ＳｈＫ（ＲＳＣＩＤＴＩＰＫＳＲＣＴＡＦＱＣＫＨＳＭＫＹＲＬＳＦＣＲＫＴＣＧＴＣ／／（配列番号３７８）、［Ｌｙｓ１６］ＳｈＫ（ＲＳＣＩＤＴＩＰＫＳＲＣＴＡＦＫＣＫＨＳＭＫＹＲＬＳＦＣＲＫＴＣＧＴＣ／／（配列番号７６）または他の毒素ペプチド類似体アミノ酸配列を、Ｈ－Ｃｙｓ（Ｔｒｔ）－２Ｃｌ－Ｔｒｔレジン（０．２ｍｍｏｌ、０．３２ｍｍｏｌ／ｇ負荷）を用いた０．２ｍｍｏｌ当量基準のＤＩＣ／ＨＯＢｔカップリング化学を用いたＳＰＰＳにより、ＣＳ　Ｂｉｏペプチド合成装置で段階的に合成した。各カップリングサイクルに対して、１ｍｍｏｌ　Ｎ$^{\alpha}$－Ｆｍｏｃ－アミノ酸をＮ，Ｎ-ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中、２．５ｍＬの０．４Ｍ　１-ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）に溶解させた。この溶液に、ＤＭＦ中１．０ｍＬの１．０Ｍ　Ｎ，Ｎ'－ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）を加えた。溶液を窒素バブリングにより１５分間撹拌して予備活性化を行い、次いで、レジンに加えた。混合物を２時間振とうした。レジンをろ過し、ＤＭＦで３回、ジクロロメタン（ＤＣＭ）で２回、およびＤＭＦで３回洗浄した。ＤＭＦ中２０％ピペリジンによる処理（５ｍＬ、２×１５分）によりＦｍｏｃ脱保護を行った。最初の２３残基を、上記Ｆｍｏｃ-アミノ酸カップリングおよびＦｍｏｃ除去ステップを繰り返して単一カップリングした。残りの残基を、Ｆｍｏｃ除去を進める前にカップリングステップを２回行うことにより二重カップリングした。

【０５４２】
合成に続いて、レジンを排出し、ＤＣＭ、ＤＭＦ、ＤＣＭで順次洗浄し、次いで減圧下で乾燥させた。ペプチド－レジンを２５０ｍＬのプラスチック丸底フラスコに移した。トリイソプロピルシラン（１．５ｍＬ）、３，６－ジオキサ－１，８－オクタン-ジチオール（ＤＯＤＴ、１．５ｍＬ）、水（１．５ｍＬ）、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ、２０ｍＬ）、および撹拌子での処理により、ペプチドを脱保護してレジンから切り離し、混合物を３時間撹拌した。混合物を１５０ｍＬの焼結ガラス漏斗を通して２５０ｍＬのプラスチック丸底フラスコ内にろ過した。混合物を１５０ｍＬの焼結ガラス漏斗を通して２５０ｍＬのプラスチック丸底フラスコ内にろ過し、ろ液を減圧下で濃縮した。粗ペプチドを冷ジエチルエーテルの添加により沈殿させ、遠心分離により回収し、減圧下で乾燥させた。

【０５４３】
ペプチドのフォールディング。乾燥粗直鎖状ペプチド（約６００ｍｇ）、例えば［Ｌｙｓ１６］ＳｈＫペプチド（配列番号７６）または［Ｌｙｓ１６］ＳｈＫ－Ａｌａ（［Ｌｙｓ１６，Ａｌａ３６］－ＳｈＫとしても知られる；配列番号３７９）ペプチドを、１６ｍＬの酢酸、６４ｍＬの水および４０ｍＬのアセトニトリル中に溶解した。混合物を１５分間急速に撹拌して完全に溶解させた。ペプチド溶液を、１７００ｍＬの水および大型の撹拌子の入った２Ｌのプラスティックボトルに加えた。こうして希釈した溶液に、２０ｍＬの濃縮水酸化アンモニウムを加えて溶液のｐＨを９．５に上げた。必要に応じて、少量の酢酸またはNH_4OHでｐＨを調節した。溶液を８０ｒｐｍで一晩撹拌し、ＬＣ-ＭＳによりモニターした。通常、２４～４８時間でフォールディング完了と判断し、酢酸とＴＦＡ（ｐＨ＝２．５）を添加して溶液をクエンチした。水溶液をろ過した（０．４５μｍセルロース膜）。

【０５４４】
逆相ＨＰＬＣ精製。逆相高速液体クロマトグラフィーを、分析（Ｃ１８、５μｍ、０．４６ｃｍ×２５ｃｍ）または分取（Ｃ１８、１０μｍ、２．２ｃｍ×２５ｃｍ）カラムで行った。クロマトグラフィーによる分離は、Ａ中の緩衝液Ｂ（Ａ＝０．１％ＴＦＡ水溶液；Ｂ＝０．０９％ＴＦＡを含む９０％ＡＣＮ水溶液）の直線勾配を用いて行い、通常、解析的分析では５～９５％で、流速１ｍＬ／分で３５分にわたり、分取の分離では、５～６５％で、流速２０ｍＬ／分で９０分にわたり行った。分析および分取ＨＰＬＣ画分をＥＳＭＳおよびフォトダイオードアレイ（ＰＤＡ）ＨＰＬＣにより特徴付けし、一緒にして凍結乾燥させた。

【０５４５】
質量分析。イオンスプレー大気圧イオン化源を装備した単一四重極質量分析器で質量スペクトルを得た。試料（２５μＬ）を、石英ガラスキャピラリー接続部分（内径５０μｍ）を介して直接イオン化源と接続した移動溶媒（１０μＬ／分；０．０５％ＴＦＡを含む３０：５０：２０ＡＣＮ／ＭｅＯＨ）内に注入した。試料の液滴を５ｋＶの正電位でイオン化し、境界プレート、次いで開口部（直径１００～１２０μｍ）を通して、６０Ｖの電位で分析器に入れた。０．１Ｄａのスキャンステップサイズで質量範囲４００～２２００Ｄａにわたりフルスキャン質量スペクトルを得た。観察されたｍ／ｚ値から分子量を導き出した。

【０５４６】
ＰＥＧ化、精製、および解析。ペプチド、例えば［Ｌｙｓ１６］ＳｈＫ（配列番号７６）または［Ｌｙｓ１６］ＳｈＫ－Ａｌａ（配列番号３７９）を、活性化された直鎖状または分岐ＰＥＧを用いて、そのＮ末端で還元的アルキル化により選択的にＰＥＧ化した。２０ｍＭシアノ水素化ホウ素ナトリウムおよび２モルの過剰２０ｋＤａモノメトキシ－ＰＥＧ－アルデヒド（ＮＯＦ、日本）を含有する５０ｍＭ NaH_2PO_4、ｐＨ４．５の反応緩衝液中、２ｍｇ／ｍｌで結合を行った。結合反応物を約５時間、室温で撹拌し、その進行をＲＰ－ＨＰＬＣによりモニターした。完了した反応物を、２０ｍＭ ＮａＯＡｃ（ｐＨ４）による４倍希釈によりクエンチし、４℃まで冷却した。次いで、ＰＥＧ-ペプチドを４０℃でクロマトグラフィーにより精製したが、ここではＳＰセファロースＨＰカラ

ム（ＧＥヘルスケア、ニュージャージー州ピスカタウェイ）を使用し、２０ｍＭ　ＮａＯＡｃ（ｐＨ４．０）中０～１Ｍ　ＮａＣｌの直線勾配で溶出した。溶出したピーク画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＲＰ－ＨＰＬＣにより解析し、プーリングを純度＞９７％で決定した。観察された主要な夾雑物はジ－ＰＥＧ化毒素ペプチド類似体であった。選択されたプールを３ｋＤａ　ＭＷＣＯ膜に対する遠心ろ過により２～５ｍｇ／ｍｌまで濃縮し、５％ソルビトールを含む１０ｍＭ　ＮａＯＡｃ（ｐＨ４）中に透析した。次いで、透析したプールを０．２ミクロンのフィルターにより無菌ろ過し、ＳＤＳ-ＰＡＧＥ（データ非表示）により純度が＞９７％であることを判定した。アジレント１１００モデルＨＰＬＣで、０．１％ＴＦＡ／H_2O中、１ｍｌ／分でＺｏｒｂａｘ（登録商標）５μｍ　３００ＳＢ－Ｃ８　４．６×５０ｍｍカラム（アジレント）に流し、カラム温度を４０℃に維持して、逆相ＨＰＬＣを行った。ＰＥＧ－ペプチド（２０μｇ）試料を注入し、波長２１５ｎｍをモニターしながら、６～６０％の直線勾配で溶出した。

【０５４７】

融合タンパク質。概して、図１Ａと図２Ｂはそれぞれ、一価と二価のＦｃ毒素ペプチド（または毒素ペプチド類似体）融合タンパク質（すなわち「ペプチボディ」）の概略図を示す。二価のＦｃ-ＳｈＫ分子は、２本のＦｃ-ＳｈＫ鎖を含むホモ二量体である。一価のＦｃ-ＳｈＫ毒素ペプチド（または毒素ペプチド類似体）分子は、１本のＦｃ鎖と１本のＦｃ-ＳｈＫ（または類似体）鎖を含むヘテロ二量体である。一価のＦｃ-ＳｈＫ分子は、二量体につき単一のＳｈＫペプチドのみを含むため、一価とみなされる。Ｆｃ-（毒素ペプチド類似体）と称される構築物または鎖は、Ｎ末端Ｆｃ領域を含み、かつ任意で、毒素ペプチドまたは毒素ペプチド類似体と共有結合する可動性リンカー配列（例えば、Ｌ１０ペプチジルリンカーＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ；配列番号１５３）を含み、これにより、Ｎ末端からＣ末端の配向がＦｃ－リンカー－毒素ペプチドまたは毒素ペプチド類似体となる。

【０５４８】

Sullivanら、国際公開第２００８／０８８４２２Ａ２号の実施例１および２には、哺乳類細胞から発現した二価のＦｃ－ＳｈＫペプチボディ、Ｆｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（１－３５）、およびＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（２－３５）の活性について記載されている。国際公開第２００８／０８８４２２Ａ２号の実施例１には、発現中に少量の最終生成物として形成される一価のＦｃ－Ｌ１０－ＳｈＫ（１－３５）分子の単離についても記載されている。一価抗体＃３７４２－ＳｈＫ（１－３５，Ｑ１６Ｋ）結合体は、ヒト全血のＴ細胞サイトカイン分泌を強力に遮断した（本明細書の実施例５の表７Ａ～Ｂを参照）。

【０５４９】

実施例１０

ラットおよびカニクイザルにおける薬物動態（ＰＫ）試験

ラットのＰＫ。成体Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ（ＳＤ）ラット（ｎ＝３／グループ）に抗体５ｍｇ／ｋｇを皮下注射し、投与から０、０．２５、１、４、２４、４８、７２、１６８、３３６、５０４、６７２、８４０、および１００８時間後に側尾静脈から血液約２５０μＬをＭｉｃｒｏｔａｉｎｅｒ（登録商標）血清分離チューブを回収することにより、抗体１６４３５および４３４１の薬物動態プロファイルを測定した。回収後、各試料を室温に維持し、３０～４０分の凝固時間の後、較正済みのＥｐｐｅｎｄｏｒｆ　５４１７Ｒ遠心分離システム（ブリンクマンインスツルメンツ社、ニューヨーク州ウエストベリー）を用いて２～８℃、１１，５００ｒｐｍで約１０分間、遠心分離した。次に、（各ラットに対して）事前にラベル表示した極低温保存チューブに回収済み血清を移し、その後の分析用に－６０℃～－８０℃で保存した。ＰＫ実験試料で得た血清試料濃度を測定するため、以下の方法を用いた：半面積黒色プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ３６９４）を、２μｇ／ｍｌの抗ｈｕ　Ｆｃ抗体１．３５．１のＰＢＳ溶液でコーティングして、４℃で一晩インキュベートした。次に、プレートを洗浄し、Ｉ－Ｂｌｏｃｋ（商標）（アプライドバイオシステムズ）を用いて４℃で一晩ブロッキングした。試料を希釈する必要がある場合は、ラットＳＤ血清で希釈した。次に、標準試料および試料を、１×ＰＢＳ＋１Ｍ　ＮａＣｌ＋０．５％Ｔｗｅｅｎ２０および１％ＢＳＡ緩衝液（５％血清）で１：２０に希釈し

た。プレートを洗浄してから、希釈した標準試料および試料の５０μｌ試料を、抗体１．３５．１をコーティングしたプレートに移し、室温で１．５時間インキュベートした。プレートを洗浄してから、Ｉ－Ｂｌｏｃｋ（商標）＋５％ＢＳＡ中の１００ｎｇ／ｍｌの抗ｈｕ　Ｆｃ抗体２１．１－ＨＲＰ抱合体５０μｌを加えて、１．５時間インキュベートした。プレートを洗浄してから、５０μｌのＰｉｃｏ基質を加えて、プレートを直ちにルミノメーターで分析した。ＷｉｎＮｏｎＬｉｎ（登録商標）（Ｅｎｔｅｒｐｒｉｓｅ　ｖｅｒｓｉｏｎ５．１．１，２００６、Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ（登録商標）社、カリフォルニア州マウンテンビュー）を用いた非区画化方法により、時間濃度データを分析した（図３４．０）。Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける、この２つの抗体の薬物動態プロファイルを図４３に示す。ＳＤラットにおける１６４３５と４３４１のＰＫパラメーターの一覧を、表８（下記）に示す。どちらの分子も良好なＰＫプロファイルを示し、半減期は１０日を超えていた。

【０５５０】

【表１３】

表８　ＳＤラットにおける抗体１６４３５、４３４１のＰＫパラメーター

化合物	SC投与量 (mg/kg)	$T_{1/2}$ (h)	Tmax (h)	Cmax (ng/mL)	MRT (h)	CL/F (mL/h/kg)	AUC_{0-t} (ng h/mL)	AUC_{0-inf} (ng h/ml)
16435	5	226	104	44,080	395	0.368	16,038,601	20,048,353
4341	5	365	136	38,963	580	0.190	22,280,335	26,661,802

【０５５１】

カニクイザルのＰＫ。カニクイザル（ｎ＝２／グループ）に対しても、０日目に１ｍｇ／ｋｇ、５７日目に５ｍｇ／ｋｇの用量を続けて２回皮下注射することにより、抗体１６４３５と４３４１の薬物動態プロファイルを測定した。投与前、１ｍｇ／ｋｇの１回目投与から０．５、２、４、８、１２、２４、４８、９６、１６８、３３６、５０４、６７２、８４０、１００８、１１７６、１３４４時間後（２回目の投与前）、および５ｍｇ／ｋｇの２回目投与から０．５、２、４、８、１２、２４、４８、９６、１６８、３３６、３６０、３８４、４３２、５０４、６７２、８４０、１００８、１１７６、１３４４時間後に血清試料を採取した。上記の抗ＩｇＧサンドイッチＥＬＩＳＡを用いて、試料の１６４３５および４３４１抗体レベルを測定した。時間濃度データの解析は、ＷｉｎＮｏｎＬｉｎ（登録商標）を用いた非区画的方法により行った。カニクイザルにおける、この２つの抗体の薬物動態プロファイルを図４４に示す。カニクイザルにおける１６４３５と４３４１のＰＫパラメーターの一覧を、表９（下記）に示す。どちらの分子も、カニクイザルにおいて良好なＰＫプロファイルを示し、半減期は１６４３５が約１２日、４３４１が約２１日であった。４３４１抗体の方が１６４３５より良好なＰＫ特性を有し、ＦｃＲｎの結合および標的媒介性の薬物動態（target mediated drug disposition）（ＴＭＤＤ）クリアランス機構の不存在に基づき、４３４１抗体はサルにおける正常なｈｕ　ＩｇＧクリアランスを示した。加えて、図４４の結果から、カニクイザルに複数回投与した場合でも、抗体１６４３５と４３４１のいずれも、カニクイザルの免疫応答に媒介されるクリアランスの有意な変化をまったく示していないことが分かる。仮に、異常な抗体クリアランスを引き起こす有意な免疫応答が存在していたとすれば、１回目の投与による免疫系初回刺激により、２回目の投与後にそうした免疫応答が予期されていたであろうと推定される。

【０５５２】

【表１４】

表９　カニクイザルにおける抗体１６４３５、４３４１のＰＫパラメーター

化合物	SC投与量 (mg/kg)	$T_{1/2}$ (h)	Tmax (h)	Cmax (ng/mL)	MRT (h)	CL/F (mL/h/kg)	AUC_{0-t} (ng h/mL)	AUC_{0-inf} (ng h/ml)
16435	5	285	96	58,682	450	0.161	29,924,604	31,230,285
4341	5	502	96	68,166	740	0.096	43,578,088	51,909,826

略号

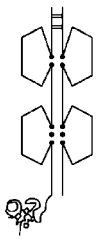
本明細書の全体を通じて使用される略号は、特定の状況で定義されている場合を除き以下に定義される通りである。

Ａｃ	アセチル（アセチル化残基を指すのに用いられる）
ＡｃＢｐａ	アセチル化ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン
ＡＣＮ	アセトニトリル
ＡｃＯＨ	酢酸
ＡＤＣＣ	抗体依存性細胞傷害
Ａｉｂ	アミノイソ酪酸
ｂＡ	β－アラニン
Ｂｐａ	ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン
ＢｒＡｃ	ブロモアセチル（$BrCH_2C(O)$
ＢＳＡ	ウシ血清アルブミン
Ｂｚｌ	ベンジル
Ｃａｐ	カプロン酸
ＣＢＣ	全血球計算値
ＣＯＰＤ	慢性閉塞性肺疾患
ＣＴＬ	細胞傷害性Ｔリンパ球
ＤＣＣ	ジシクロヘキシルカルボジイミド
Ｄｄｅ	１－（４，４－ジメチル－２，６－ジオキソ－シクロヘキシリデン）エチル
ＤＮＰ	２，４－ジニトロフェノール
ＤＯＰＣ	１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン
ＤＯＰＥ	１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン
ＤＰＰＣ	１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン
ＤＳＰＣ	１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン
ＤＴＴ	ジチオスレイトール
ＥＡＥ	実験的自己免疫性脳脊髄炎
ＥＣＬ	増強化学発光
ＥＳＩ－ＭＳ	エレクトロスプレーイオン化質量分析
ＦＡＣＳ	蛍光標識細胞分取
Ｆｍｏｃ	フルオレニルメトキシカルボニル
ＧＨＴ	グリシン、ヒポキサンチン、チミジン
ＨＯＢｔ	１－ヒドロキシベンゾトリアゾール
ＨＰＬＣ	高速液体クロマトグラフィー
ＨＳＬ	ホモセリンラクトン

ＩＢ	封入体
ＫＣａ	カルシウム活性化カリウムチャネル（ＩＫＣａ、ＢＫＣａ、ＳＫＣａ等）
ＫＬＨ	キーホールリンペットヘモシニアン
Ｋｖ	電位開口型カリウムチャネル
Ｌａｕ	ラウリン酸
ＬＰＳ	リポ多糖類
ＬＹＭＰＨ	リンパ球
ＭＡＬＤＩ－ＭＳ	マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析
Ｍｅ	メチル
ＭｅＯ	メトキシ
ＭｅＯＨ	メタノール
ＭＨＣ	主要組織適合遺伝子複合体
ＭＭＰ	マトリックスメタロプロテアーゼ
ＭＷ	分子量
ＭＷＣＯ	分画分子量
１－Ｎａｐ	１－ナフチルアラニン
ＮＥＵＴ	好中球
Ｎｌｅ	ノルロイシン
ＮＭＰ	Ｎ－メチル－２－ピロリジノン
ＯＡｃ	酢酸塩
ＰＡＧＥ	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
ＰＢＭＣ	末梢血単核球
ＰＢＳ	リン酸緩衝食塩水
Ｐｂｆ	２，２，４，６，７－ペンタメチルジヒドロベンゾフラン－５－スルホニル
ＰＣＲ	ポリメラーゼ連鎖反応
ＰＤ	薬力学的
Ｐｅｃ	ピペコリン酸
ＰＥＧ	ポリ（エチレングリコール）
ｐＧｌｕ	ピログルタミン酸
Ｐｉｃ	ピコリン酸
ＰＫ	薬物動態学的な
ｐＹ	ホスホチロシン
ＲＢＳ	リボソーム結合部位
ＲＴ	室温（約２５℃）
Ｓａｒ	サルコシン
ＳＤＳ	ドデシル硫酸ナトリウム
ＳＴＫ	セリン－トレオニンキナーゼ
ｔ－Ｂｏｃ	ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル
ｔＢｕ	ｔｅｒｔ－ブチル
ＴＣＲ	Ｔ細胞受容体
ＴＦＡ	トリフルオロ酢酸
ＴＨＦ	胸腺液性因子
Ｔｒｔ	トリチル

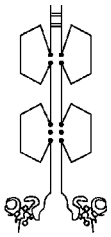
【図１Ａ】

図１Ａ



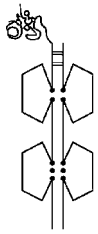
【図１Ｂ】

図１Ｂ



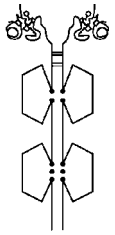
【図１Ｃ】

図１Ｃ



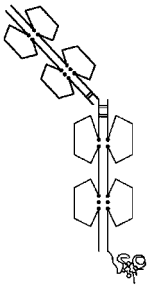
【図１Ｄ】

図１Ｄ



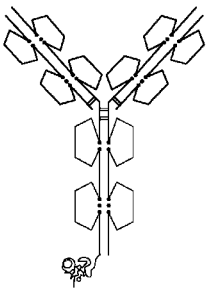
【図１Ｅ】

図１Ｅ



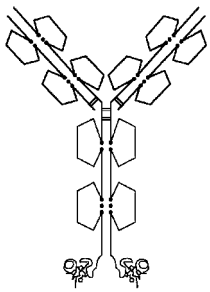
【図１Ｆ】

図１Ｆ



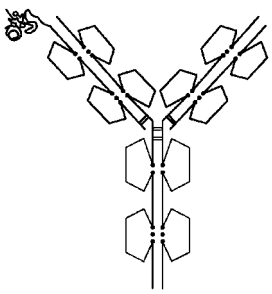
【図１Ｇ】

図１Ｇ



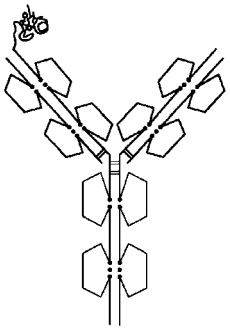
【図１Ｈ】

図１Ｈ



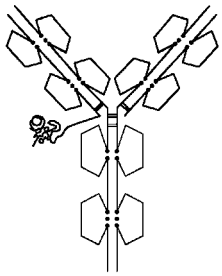
【図１Ｉ】

図１Ｉ



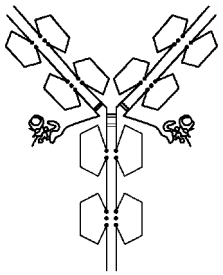
【図１Ｊ】

図１Ｊ



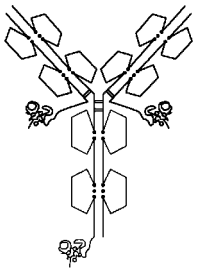
【図１Ｋ】

図１Ｋ



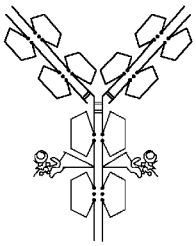
【図１Ｌ】

図１Ｌ



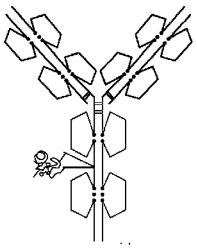
【図１Ｍ】

図１Ｍ

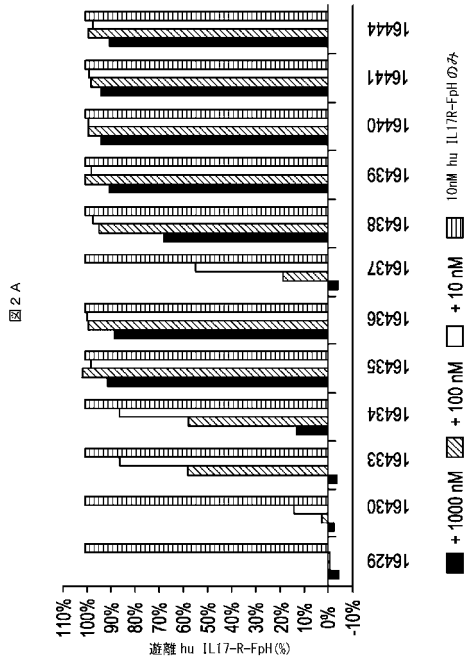


【図１Ｎ】

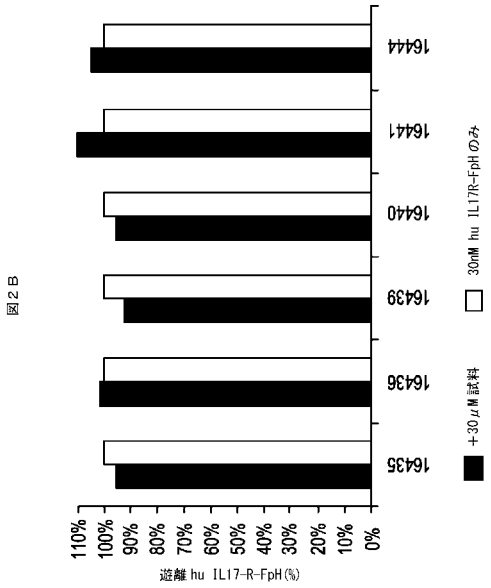
図１Ｎ



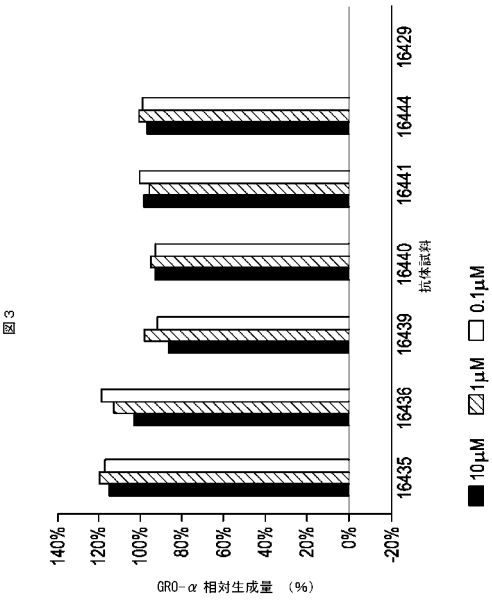
【図２Ａ】



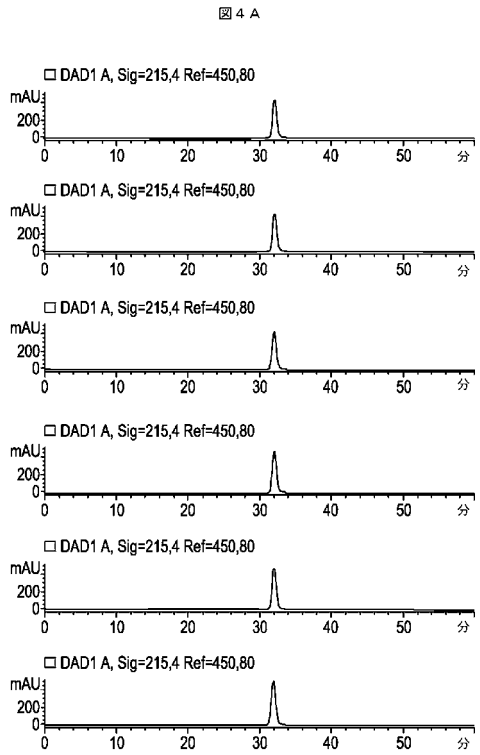
【図２Ｂ】



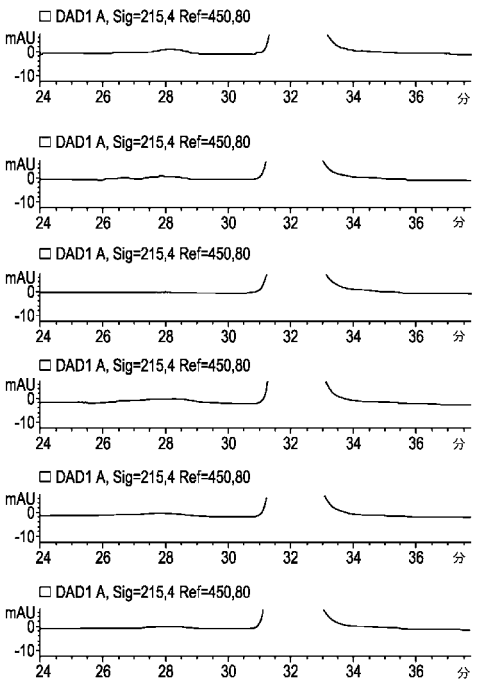
【図３】



【図４Ａ】

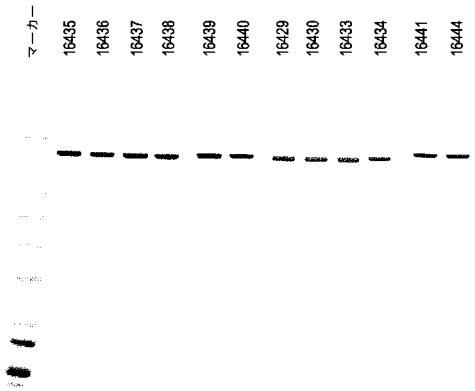


【図４Ｂ】



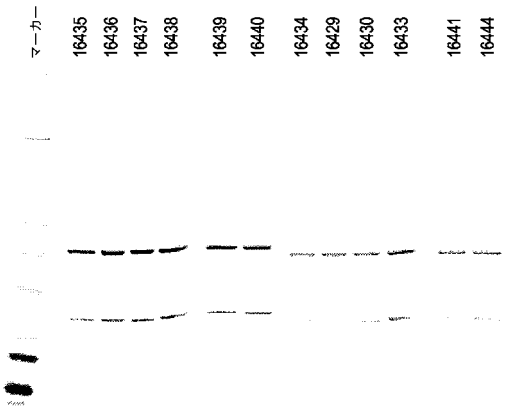
【図５】

図５



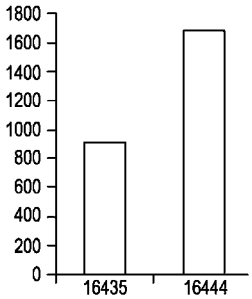
【図６】

図６



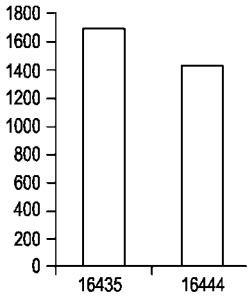
【図７Ａ】

図７Ａ



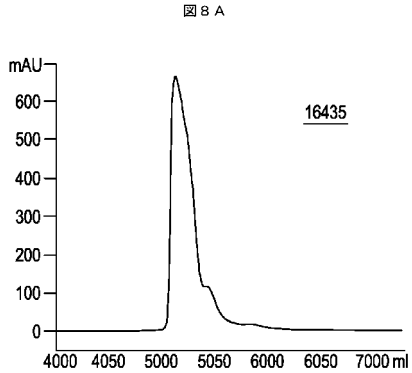
【図７Ｂ】

図７Ｂ



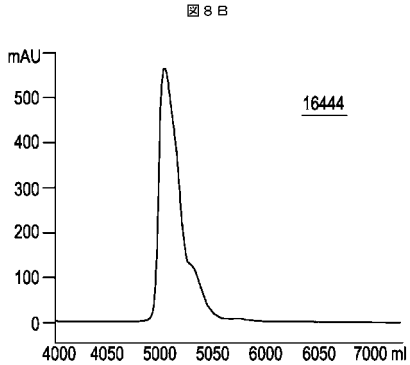
【図８Ａ】

図８Ａ

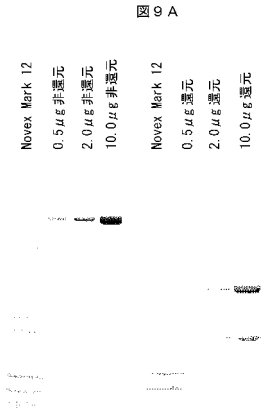


【図８Ｂ】

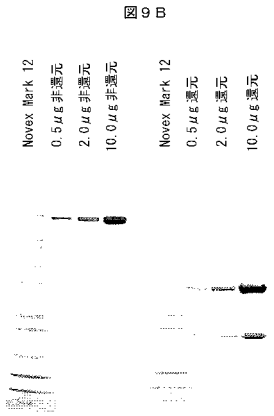
図８Ｂ



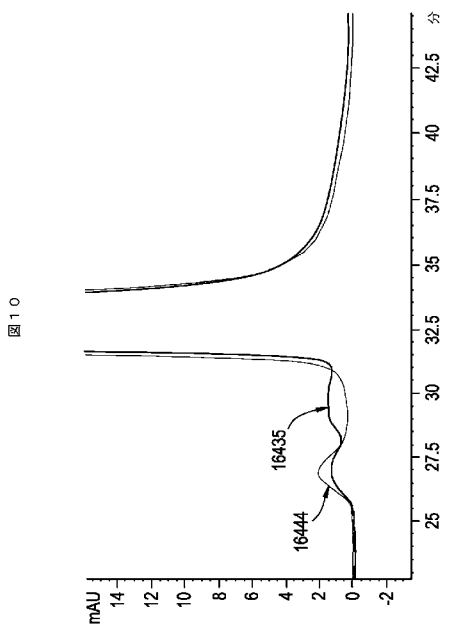
【図９Ａ】



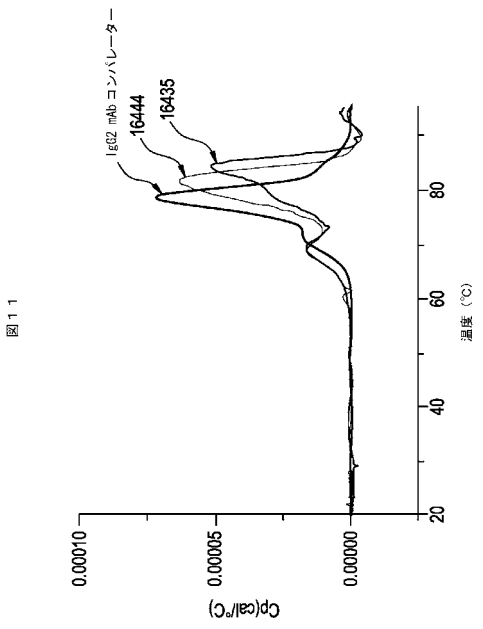
【図９Ｂ】



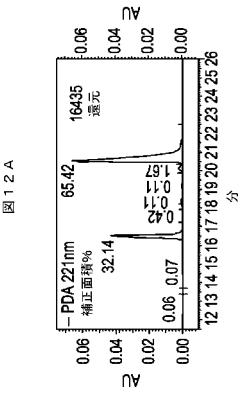
【図１０】



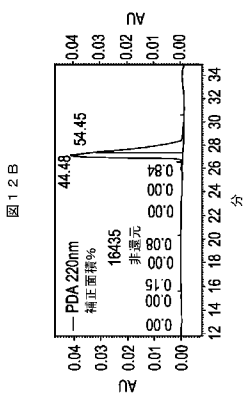
【図１１】



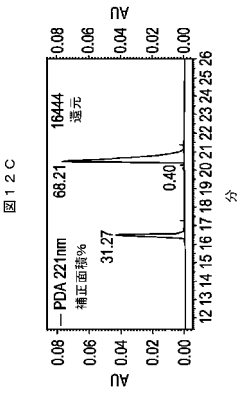
【図１２Ａ】



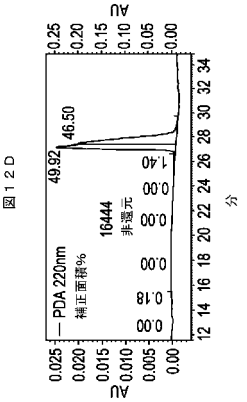
【図１２Ｂ】



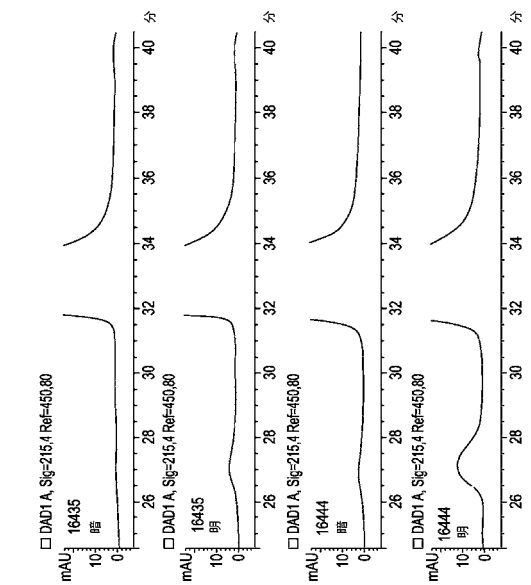
【図１２Ｃ】



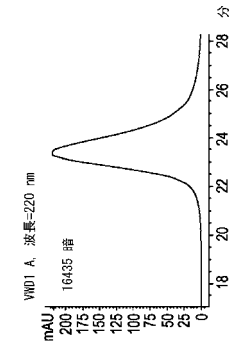
【図１２Ｄ】



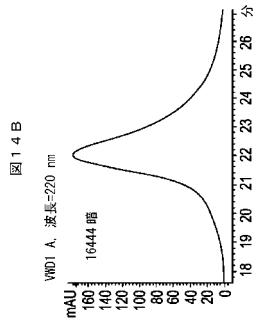
【図１３】



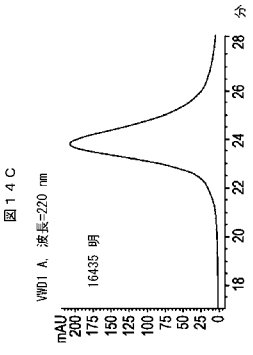
【図１４Ａ】



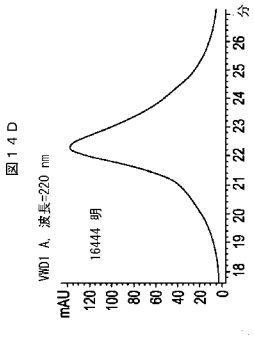
【図１４Ｂ】



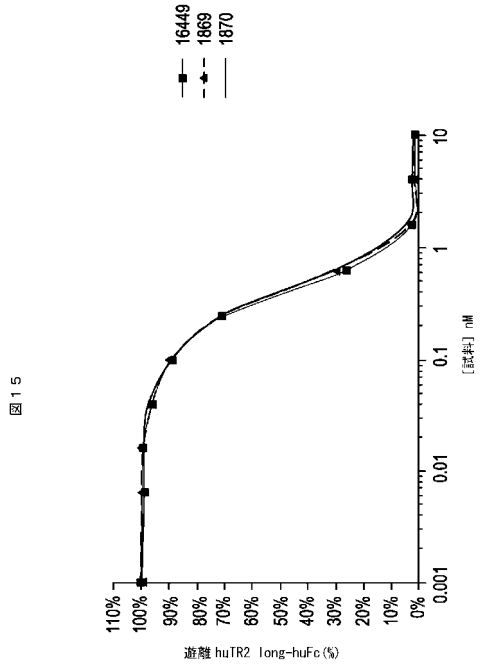
【図１４Ｃ】



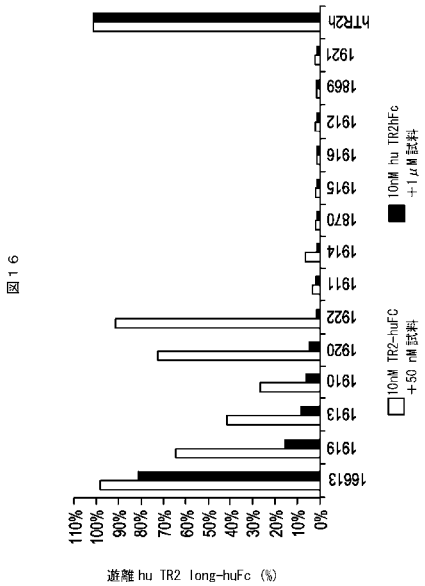
【図１４Ｄ】



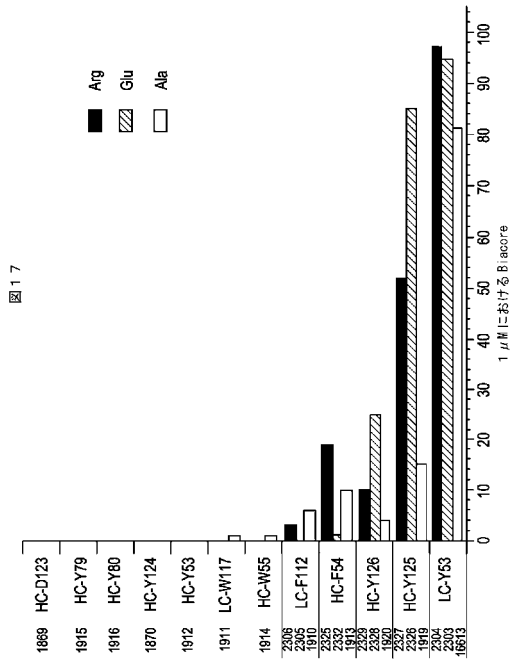
【図１５】



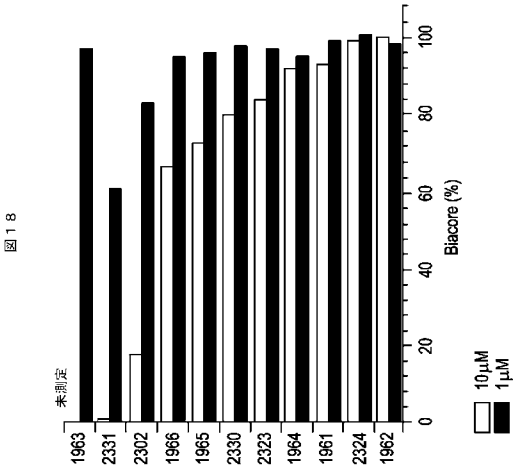
【図１６】



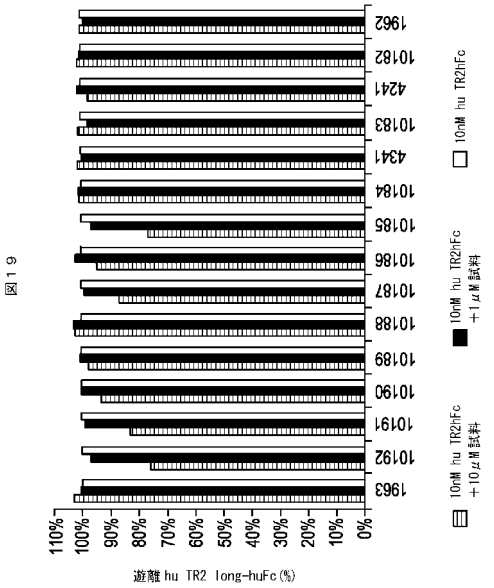
【図１７】



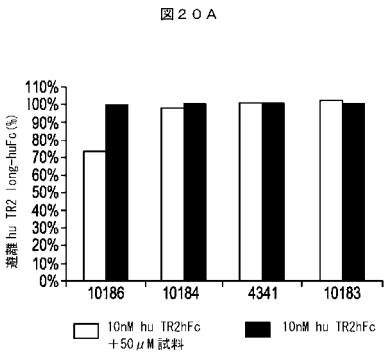
【図１８】



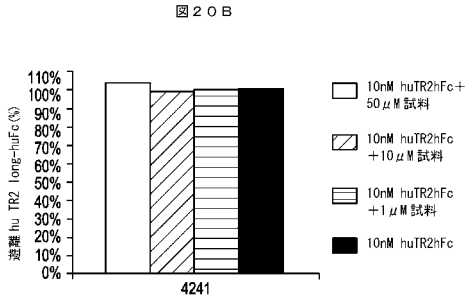
【図１９】



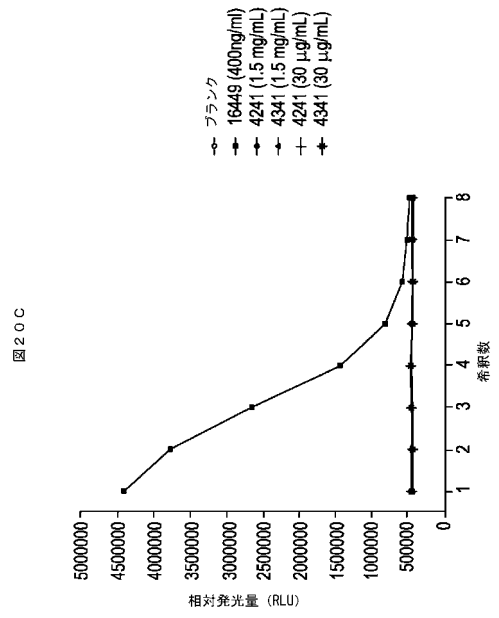
【図２０Ａ】



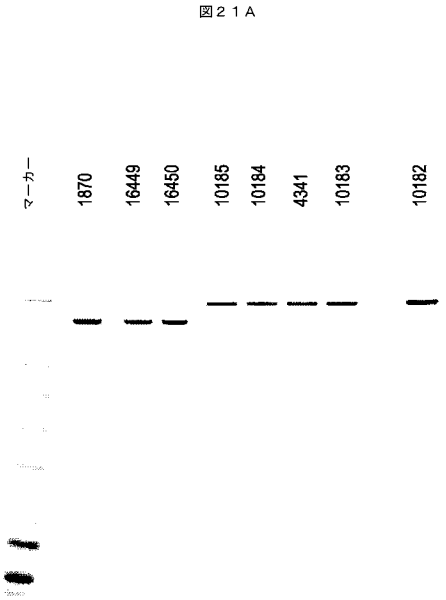
【図２０Ｂ】



【図２０Ｃ】



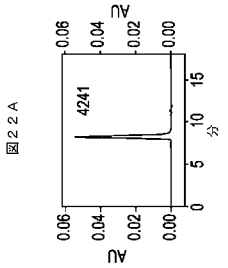
【図２１Ａ】



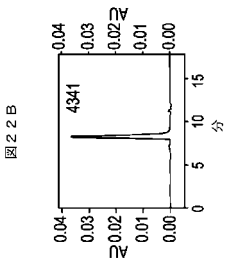
【図２１Ｂ】



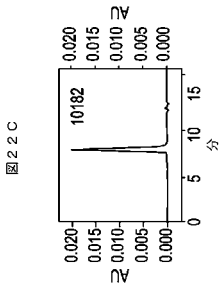
【図２２Ａ】



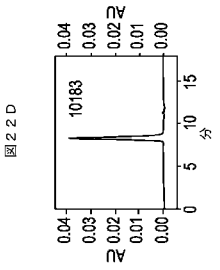
【図２２Ｂ】



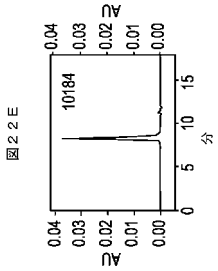
【図２２Ｃ】



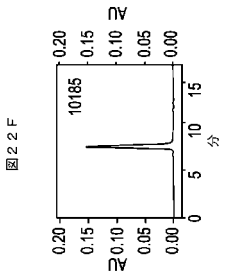
【図２２Ｄ】



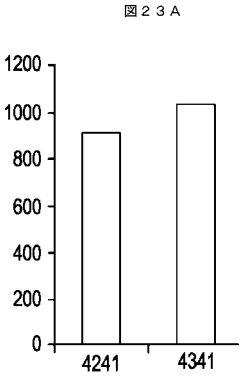
【図２２Ｅ】



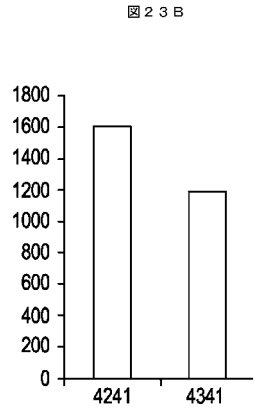
【図２２Ｆ】



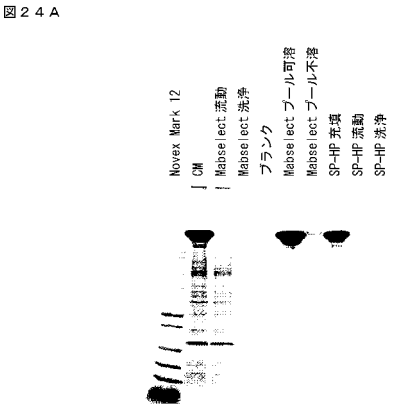
【図２３Ａ】



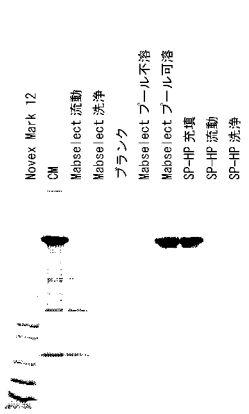
【図２３Ｂ】



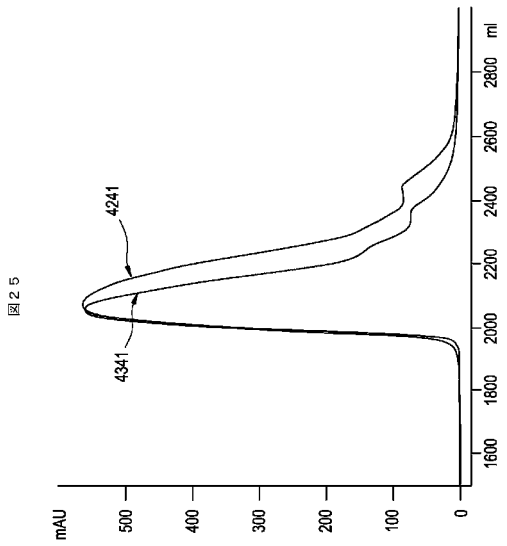
【図２４Ａ】



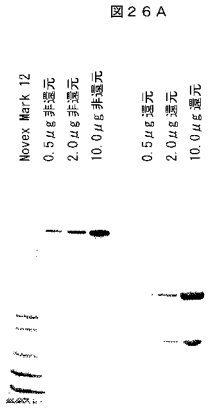
【図２４Ｂ】



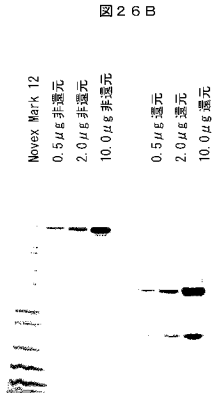
【図２５】



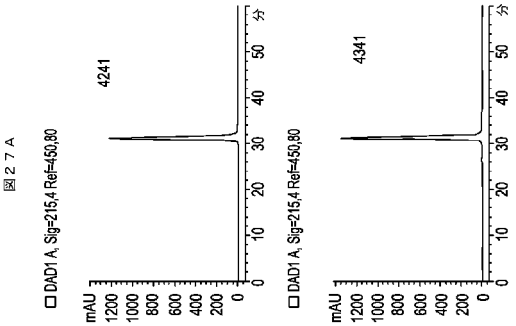
【図２６Ａ】



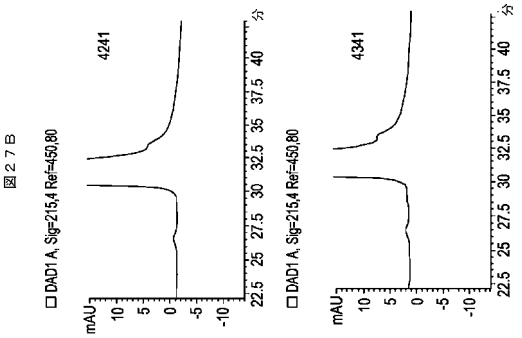
【図２６Ｂ】



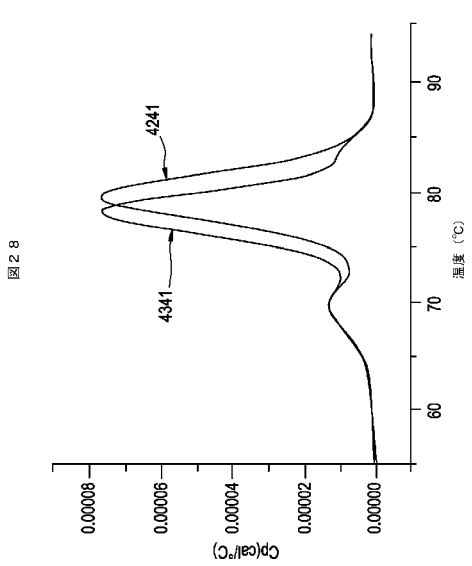
【図２７Ａ】



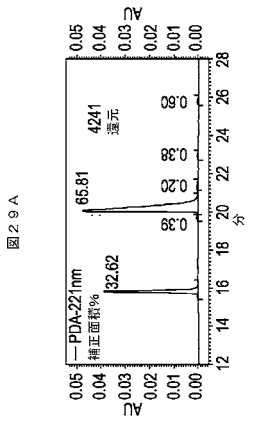
【図２７Ｂ】



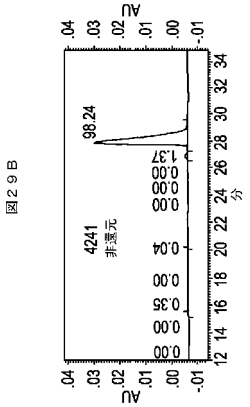
【図２８】



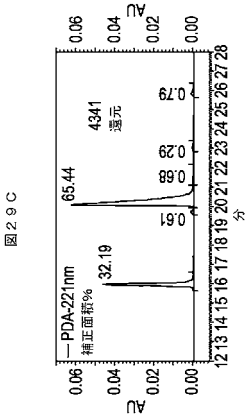
【図２９Ａ】



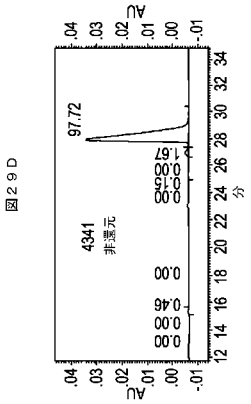
【図２９Ｂ】



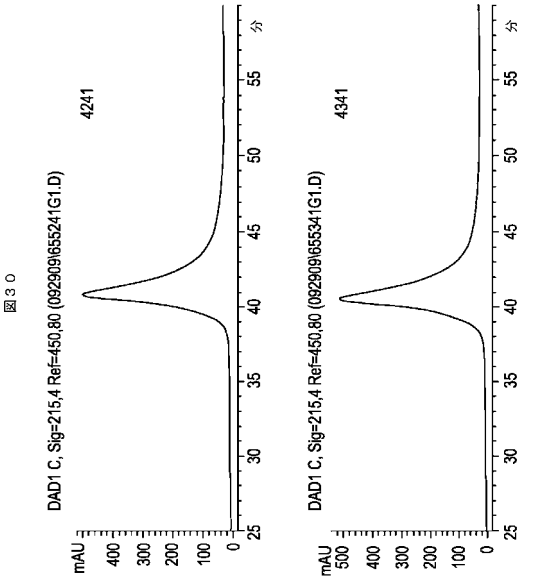
【図２９Ｃ】



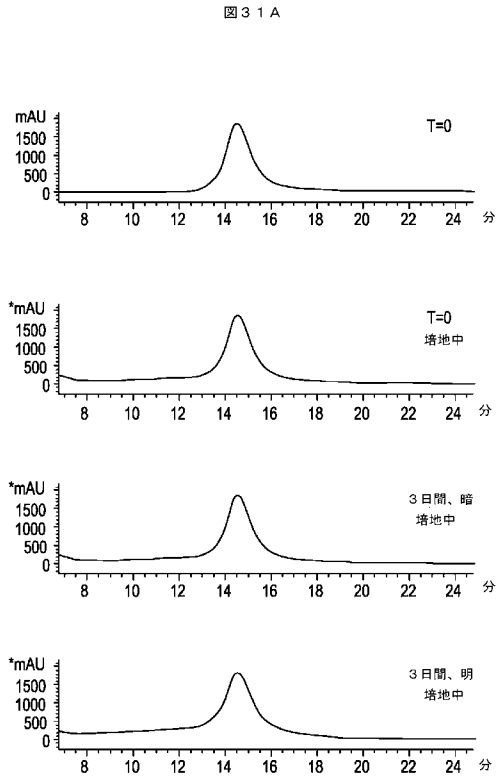
【図２９Ｄ】



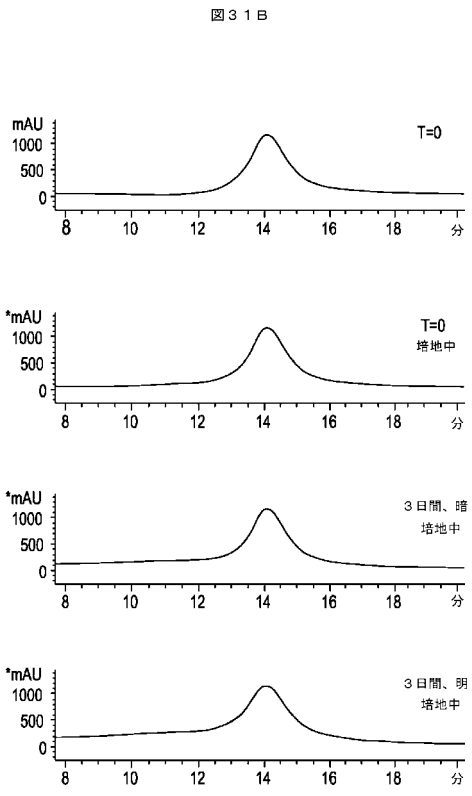
【図３０】



【図３１Ａ】



【図３１Ｂ】



【図３２】

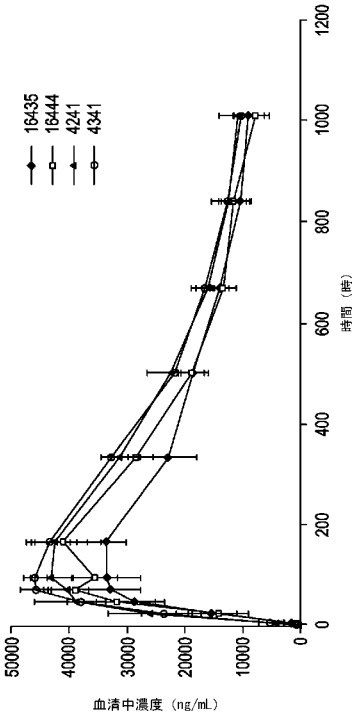


図３２

【図３３】

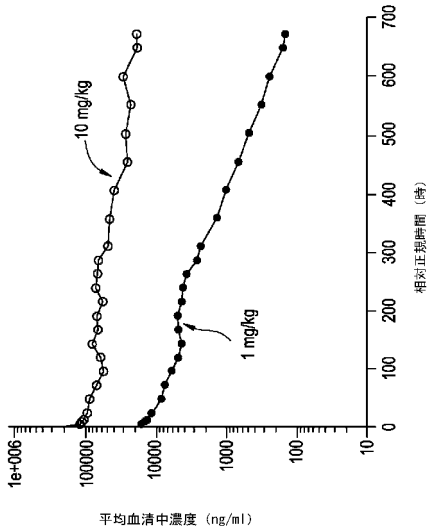
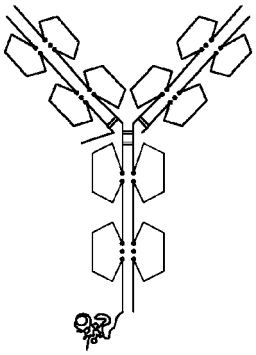


図３３

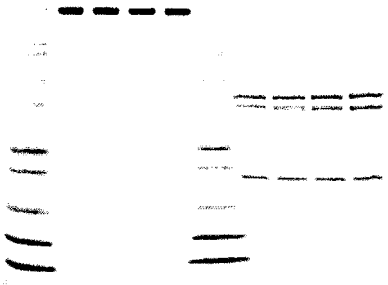
【図３４】

図３４

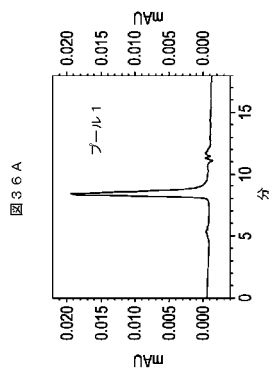


【図３５】

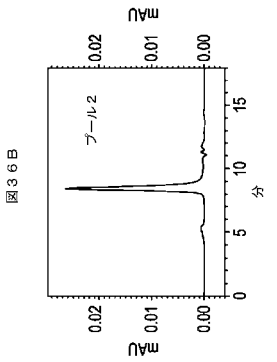
図３５



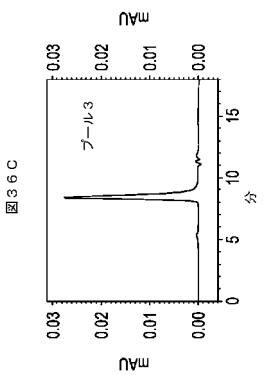
【図３６Ａ】



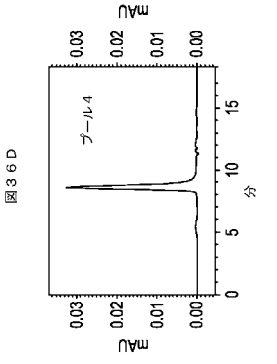
【図３６Ｂ】



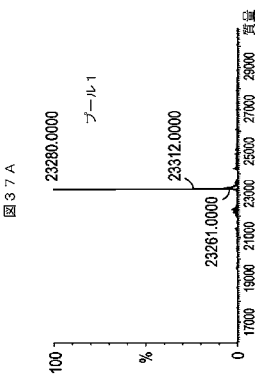
【図３６Ｃ】



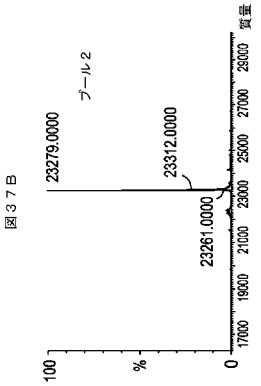
【図３６Ｄ】



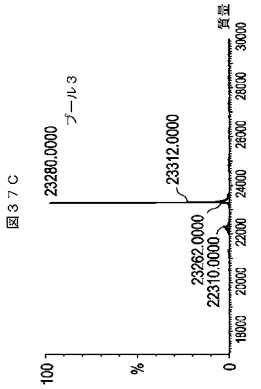
【図３７Ａ】



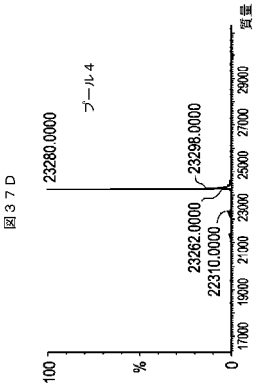
【図３７Ｂ】



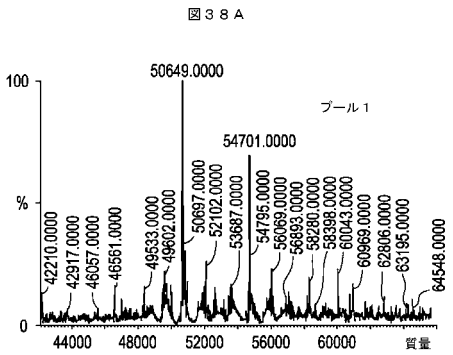
【図３７Ｃ】



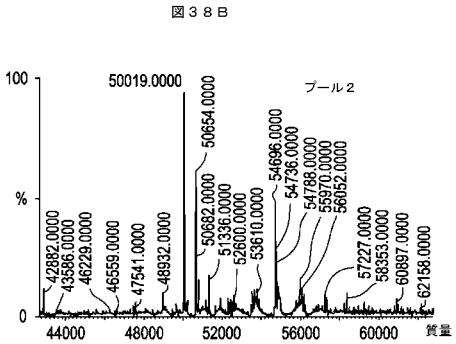
【図３７Ｄ】



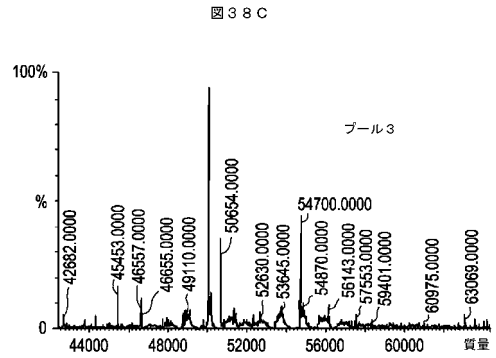
【図３８Ａ】



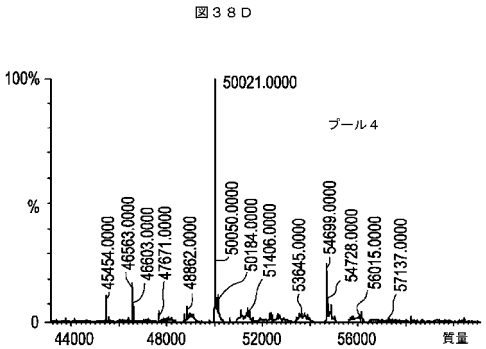
【図３８Ｂ】



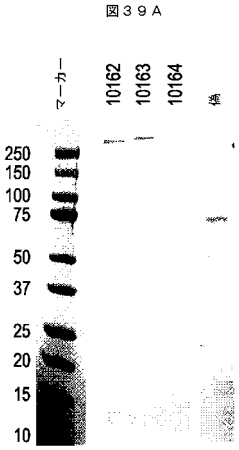
【図３８Ｃ】



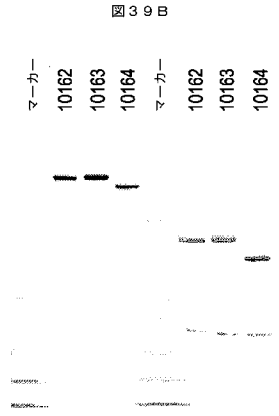
【図３８Ｄ】



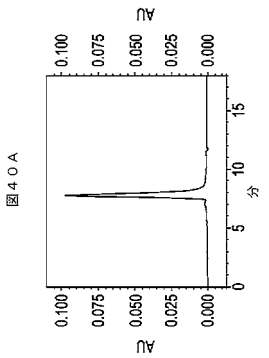
【図３９Ａ】



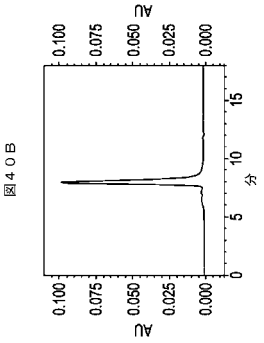
【図３９Ｂ】



【図４０Ａ】



【図４０Ｂ】



【図４０Ｃ】

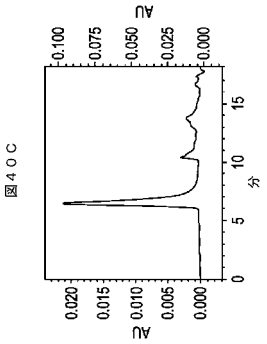
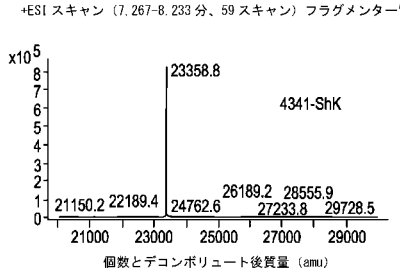


図４０Ｃ

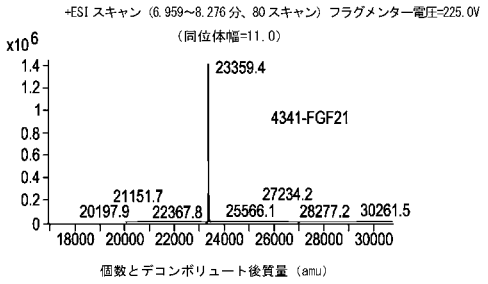
【図４１Ａ】

図４１Ａ



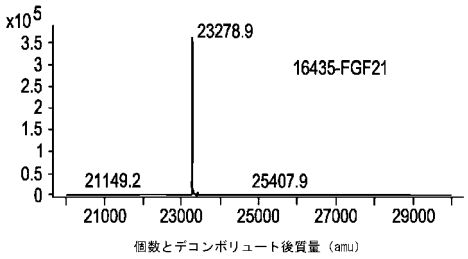
【図４１Ｂ】

図４１Ｂ



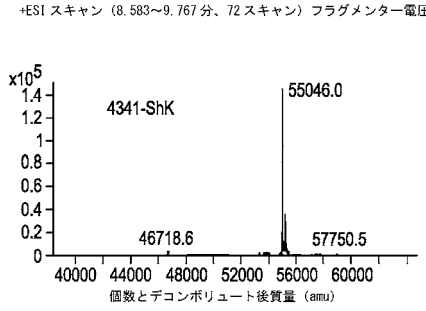
【図４１Ｃ】

図４１Ｃ



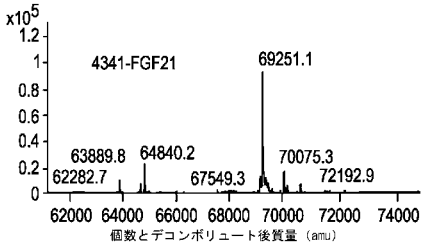
【図４２Ａ】

図４２Ａ



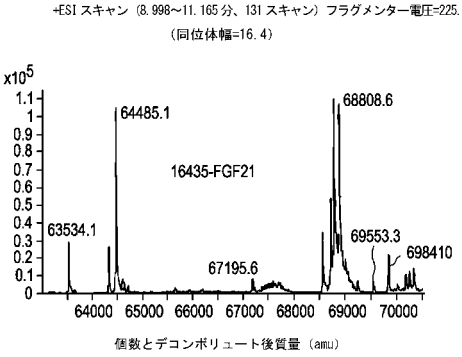
【図４２Ｂ】

図４２Ｂ



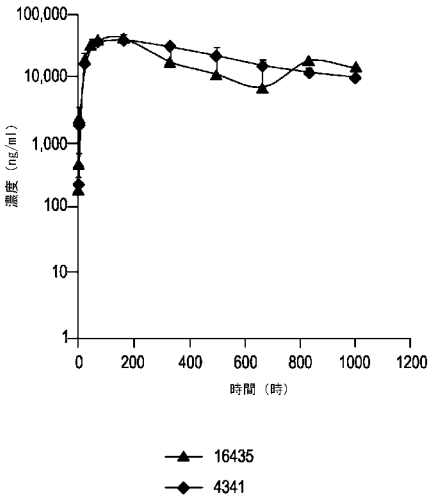
【図４２Ｃ】

図４２Ｃ



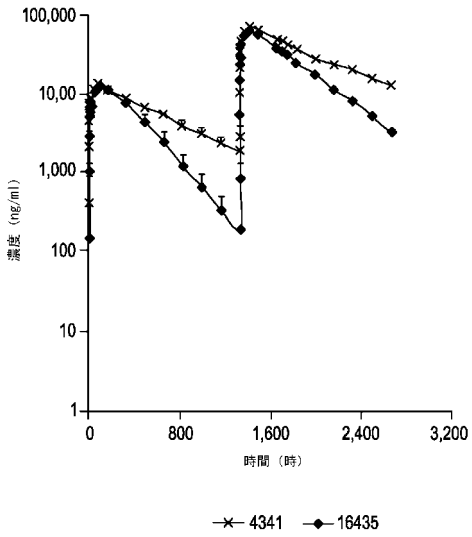
【図４３】

図４３



【図４４】

図４４



【配列表】

2016185944000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年4月27日(2016.4.27)

【手続補正１】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項１】

以下の免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む単離された抗体であって、

（ａ）　該軽鎖可変領域が配列番号１９６のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３３５、配列番号３４９、配列番号３５１、配列番号３５３、配列番号３５５、もしくは配列番号３５９のアミノ酸配列を含む；または

（ｂ）　該軽鎖可変領域が配列番号２０４のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３４９もしくは配列番号３５５のアミノ酸配列を含む；または

（ｃ）　該軽鎖可変領域が配列番号２０２のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３４９のアミノ酸配列を含む；または

（ｄ）　該軽鎖可変領域が配列番号１９２のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３５７、配列番号３５９、もしくは配列番号３６９のアミノ酸配列を含む；または

（ｅ）　該軽鎖可変領域が配列番号１９４のアミノ酸配列を含み、該重鎖可変領域が配列番号３３５、配列番号３４９、もしくは配列番号３５１のアミノ酸配列を含み、

表面プラズモン共鳴結合アッセイで測定した場合に、生理条件下でインキュベートされ

た水溶液中で、１０マイクロモル濃度の前記抗体が、１０ナノモル濃度の配列番号８２からなる可溶性ヒトＴＲ２と結合しない、前記抗体。
【請求項２】
軽鎖可変領域が配列番号１９６のアミノ酸配列を含み；重鎖可変領域が配列番号３５３のアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の単離された抗体。
【請求項３】
軽鎖可変領域が配列番号２０２のアミノ酸配列を含み；重鎖可変領域が配列番号３４９のアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の単離された抗体。
【請求項４】
ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４抗体を含む、請求項１に記載の単離された抗体。
【請求項５】
モノクローナル抗体である、請求項１に記載の単離された抗体。
【請求項６】
モノクローナル抗体がヒト抗体である、請求項５に記載の単離された抗体。
【請求項７】
（ａ）　配列番号１０１のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している前記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号９８のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している前記配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または
（ｂ）　配列番号１１９のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している前記配列を含む免疫グロブリン重鎖；および配列番号１１６のアミノ酸配列を含むか、または１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸残基がＮ末端もしくはＣ末端、もしくは両方から欠如している前記配列を含む免疫グロブリン軽鎖、を含む、単離された抗体。
【請求項８】
少なくとも１つの薬理活性を有する化学的部分が結合している、請求項１～７のいずれか一項に記載の単離された抗体。
【請求項９】
薬理活性を有する化学的部分が薬理活性を有するポリペプチドである、請求項８に記載の単離された抗体。
【請求項１０】
抗体が組換え技術によって産生される、請求項９に記載の単離された抗体。
【請求項１１】
抗体が少なくとも１個の免疫グロブリン重鎖および少なくとも１個の免疫グロブリン軽鎖を含み、薬理活性を有するポリペプチドが、免疫グロブリン重鎖のＦｃドメインの内部ループ内の、免疫グロブリン重鎖の一次アミノ酸配列に挿入された、請求項１０に記載の単離された抗体。
【請求項１２】
抗体が少なくとも１個の免疫グロブリン重鎖および少なくとも１個の免疫グロブリン軽鎖を含み、薬理活性を有するポリペプチドが免疫グロブリン重鎖のＮ末端またはＣ末端で結合している、請求項９に記載の単離された抗体。
【請求項１３】
抗体が少なくとも１個の免疫グロブリン重鎖および少なくとも１個の免疫グロブリン軽鎖を含み、薬理活性を有するポリペプチドが免疫グロブリン軽鎖のＮ末端またはＣ末端で結合している、請求項９に記載の単離された抗体。
【請求項１４】
薬理活性を有するポリペプチドが、抗体の一次配列内のアミノ酸残基の側鎖上の官能基を介して前記抗体に結合している、請求項９に記載の単離された抗体。

【請求項１５】
薬理活性を有する化学的部分または薬理活性を有するポリペプチドが、非ペプチジルリンカーまたはペプチジルリンカーを介して抗体に結合している、請求項８～１０または１２～１４のいずれか一項に記載の単離された抗体。
【請求項１６】
ペプチジルリンカーがグリシン、セリン、アラニン又はその組合せを含む、請求項１５に記載の単離された抗体。
【請求項１７】
非ペプチジルリンカーがポリエチレングリコールリンカーである、請求項１５に記載の単離された抗体。
【請求項１８】
薬理活性を有するポリペプチドが、トキシンペプチドまたはトキシンペプチド類似体、ＩＬ－６結合ペプチド、ＣＧＲＰペプチド拮抗薬、ブラジキニンＢ１受容体ペプチド拮抗薬、ＰＴＨ作動薬ペプチド、ＰＴＨ拮抗薬ペプチド、ａｎｇ－１結合ペプチド、ａｎｇ－２結合ペプチド、ミオスタチン結合ペプチド、ＥＰＯ－模倣体ペプチド、ＦＧＦ２１ペプチド、ＴＰＯ－模倣体ペプチド、ＮＧＦ結合ペプチド、ＢＡＦＦ拮抗薬ペプチド、ＧＬＰ－１もしくはそのペプチド模倣薬、またはＧＬＰ－２もしくはそのペプチド模倣薬である、請求項９～１７のいずれか一項に記載の単離された抗体。
【請求項１９】
薬理活性を有するポリペプチドがトキシンペプチドまたはトキシンペプチド類似体である、請求項１８に記載の単離された抗体。
【請求項２０】
トキシンペプチドがＳｈＫまたはＳｈＫペプチド類似体である、請求項１９に記載の単離された抗体。
【請求項２１】
請求項１～２０のいずれか一項に記載の免疫グロブリン；および薬剤的に許容できる希釈剤、賦形剤または担体を含む医薬組成物。
【請求項２２】
請求項１～７のいずれか一項に記載の抗体をコードする、単離された核酸。
【請求項２３】
請求項２に記載の抗体をコードする、単離された核酸。
【請求項２４】
請求項３に記載の抗体をコードする、単離された核酸。
【請求項２５】
請求項７に記載の抗体をコードする、単離された核酸。
【請求項２６】
請求項９～１３のいずれか一項に記載の抗体をコードする、単離された核酸。
【請求項２７】
請求項２２に記載の単離された核酸を含むベクター。
【請求項２８】
請求項２６に記載の単離された核酸を含むベクター。
【請求項２９】
ベクターが発現ベクターである、請求項２７または２８に記載のベクター。
【請求項３０】
請求項２９に記載の発現ベクターを含む、単離された宿主細胞。
【請求項３１】
（ａ）　発現ベクターにコードされた抗体の発現を可能にする条件下、請求項３０に記載の宿主細胞を培地中で培養すること；および
（ｂ）　培地から抗体を回収すること、を含む方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	***5/10***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ１２Ｐ	***21/08***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｐ	21/08		
Ｃ１２Ｎ	***15/09***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	
Ａ６１Ｋ	***39/395***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	

(72)発明者　フレデリツク・ダブリユ・ジエイコブセン
アメリカ合衆国、カリフオルニア・９１３２０、ニユーベリー・パーク、ホームステイク・プレイス・１１６８

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA90X AA93Y AB01 BA01 CA25 CA44
4C085 AA14 AA25 AA27 BB36 CC23 DD62 EE01
4H045 AA11 AA30 BA40 BA41 DA76 EA20 FA74

【外国語明細書】
2016185944000001.pdf