

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5796831号

(P5796831)

(45) 発行日 平成27年10月21日(2015.10.21)

(24) 登録日 平成27年8月28日(2015.8.28)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28
C 0 7 K 16/22 (2006.01)	C 0 7 K 16/22
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
請求項の数 14 (全 127 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2011-526137 (P2011-526137)	(73) 特許権者	509012625
(86) (22) 出願日	平成21年9月1日(2009.9.1)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2012-501648 (P2012-501648A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(43) 公表日	平成24年1月26日(2012.1.26)		ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/055625		ウェイ 1
(87) 国際公開番号	W02010/027981	(74) 代理人	110002077
(87) 国際公開日	平成22年3月11日(2010.3.11)		園田・小林特許業務法人
審査請求日	平成24年9月3日(2012.9.3)	(72) 発明者	ボストロム, ジェニー, エム.
(31) 優先権主張番号	61/190,856		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(32) 優先日	平成20年9月3日(2008.9.3)		38, モス ビーチ, ステットソン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ストリート 802
前置審査		(72) 発明者	フー, ジャーメイン
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
			44, パシフィカ, アマポーラ アベ
			ニュー 149
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多重特異性抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

6つの高頻度可変領域(HVR)配列:(i) 配列NIAKTISGY(配列番号: 1)を含むHVR-L1、(ii) 配列WGSFLY(配列番号: 2)を含むHVR-L2、及び(iii) 配列HYSSPP(配列番号: 3)を含むHVR-L3、及び

更に、

(iv) 配列NISGTY(配列番号: 7)を含むHVR-H1、(v) 配列RIYPSEGYTR(配列番号: 8)を含むHVR-H2、及び(vi) 配列WVGVGIFYAMD(配列番号: 9)を含むHVR-H3、

を含むHVR配列を含んでなり、ヒト上皮性増殖因子レセプター2(HER2)およびヒト血管内皮性増殖因子(VEGF)を特異的に結合する、単離された抗体であって、

ヒトのVEGFとの結合親和性が3 nMのKd又はそれ以上に強く、ヒトのHER2との結合親和性が0.2 nMのKd又はそれ以上に強く、コントロールと比較して、VEGF誘導性の細胞増殖とHER2発現細胞の増殖を阻害する抗体。

【請求項 2】

6つの高頻度可変領域(HVR)配列:(i) 配列NIAKTISGY(配列番号: 1)を含むHVR-L1、(ii) 配列WGSFLY(配列番号: 2)を含むHVR-L2、及び(iii) 配列HYSSPP(配列番号: 3)を含むHVR-L3、及び

10

20

更に、

(iv) 配列NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1、

(v) 配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2、及び

(vi) 配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3、

を含むHVR配列を含んでなり、ヒト上皮性増殖因子レセプター2(HER2)およびヒト血管内皮性増殖因子(VEGF)を特異的に結合する、単離された抗体であって、

ヒトのVEGFとの結合親和性が3 nMのKd又はそれ以上に強く、ヒトのHER2との結合親和性が0.2 nMのKd又はそれ以上に強い抗体。

【請求項3】

請求項2に記載の抗体の抗原結合断片。

10

【請求項4】

Fab断片である、請求項3に記載の抗原結合断片。

【請求項5】

前記抗体がモノクローナル抗体であるか、又はIgG抗体である、請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項6】

HER2およびVEGFを特異的に結合し、

Fab断片又は単鎖可変断片(scFv)である、

請求項1又は2に記載の抗体の抗原結合断片。

【請求項7】

20

フレームワーク配列の少なくとも一部が、ヒトコンセンサスフレームワーク配列である、請求項1-6の何れか一項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項8】

ヒト患者における

(a) 腫瘍、又は、

(b) HER2の異常な活性化を伴う非悪性疾患

を治療するために用いる医薬の調製における、請求項1-7の何れか一項に記載の抗体ないし抗原結合断片の使用であって、このとき抗体ないし抗原結合断片が被検体の腫瘍、又は非悪性疾患を治療又は予防するために十分な時間と量で投与される、使用。

【請求項9】

30

前記腫瘍が結腸直腸腫瘍、乳癌、肺癌、腎臓細胞癌腫、膠腫、神経膠芽腫又は卵巣癌である、請求項8に記載の使用。

【請求項10】

前記医薬が他の抗癌療法と共に投与される、請求項9に記載の使用。

【請求項11】

前記他の抗癌療法が、第2の抗体ないし抗原結合断片、化学療法剤、細胞障害性薬剤、抗血管形成剤、免疫抑制剤、プロドラッグ、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、細胞障害性放射線療法、副腎皮質ステロイド、制吐剤、癌ワクチン、鎮痛剤又は増殖阻害性剤を含み、前記第2の抗体ないし抗原結合断片が、請求項1-7の何れか一項に記載の抗体ないし抗原結合断片と異なる、請求項10に記載の使用。

40

【請求項12】

前記他の抗癌療法が、請求項1-7の何れか一項に記載の抗体ないし抗原結合断片の投与の前又は後に、あるいは、請求項1-7の何れか一項に記載の抗体ないし抗原結合断片と同時に、投与される、請求項11に記載の使用。

【請求項13】

ヒト患者における

(a) 腫瘍、又は、

(b) HER2の異常な活性化を伴う非悪性疾患

を治療するために用いる、請求項1-7の何れか一項に記載の抗体ないし抗原結合断片であって、このとき抗体ないし抗原結合断片が被検体の腫瘍、又は非悪性疾患を治療又は予

50

防するために十分な時間と量で投与される、抗体ないし抗原結合断片。

【請求項 14】

ヒト患者における

(a) 腫瘍、又は、

(b) HER2 の異常な活性化を伴う非悪性疾患

を治療する際に有用な組成物中に、活性成分として用いる請求項 1-7 の何れか一項に記載の抗体ないし抗原結合断片であって、このとき抗体ないし抗原結合断片が被検体の腫瘍、又は非悪性疾患を治療又は予防するために十分な時間と量で投与される、抗体ないし抗原結合断片。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、多重特異性抗体と、該抗体の製造方法及び使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体は、外来タンパク質、糖タンパク質、細胞又は他の抗原性外来物質による抗原刺激に応答して脊椎動物の免疫系によって生産される特定の免疫グロブリンポリペプチドである。この過程の重要なところは、特定の外来物質に特異的に結合する抗体の生成である。特定の抗原に対するこのようなポリペプチドの結合特異性は非常に正確であり、個々の脊椎動物によって生成されることが可能な特異性の多くはその複雑性および多様性が著しい。何千もの抗原は応答を誘発することが可能であり、各々は誘発した特定の抗原に対してほぼ排他的に偏向している。

20

特異的な抗原認識は、適応性の免疫応答の機能に対する抗体に必須である。重鎖(HC)および軽鎖(LC)のコンビナトリアルな会合は、抗体レパートリの生成においてすべての脊椎動物に保存されている。しかしながら、2つの鎖には非対称の多様性がある。HC(VH)の可変ドメインは、非常に高い配列多様性を含有し、LC(VL)の可変ドメインよりも多くの抗原認識の決定基に寄与することが多い。抗原特異性を決定する際のLCの役割は、レセプター編集と呼ばれる過程によって示される。B細胞レセプターを編集するためのVL遺伝子の継続的な組換えは、自己反応性の抗体前駆体を修正するための主要なメカニズムであり、最初のレパートリの有意な部分(75%程度)を構成するようである。軽鎖の変更により、不必要な結合特異性又は多重特異性が無効になることが示されている。

30

一又は複数の特定の抗原に対する抗体および抗体断片の特異性は、抗体を所望の治療薬にする。抗体および抗体断片を用いて、特定の組織、例えば腫瘍を標的化し、それによって非特異的標的の起こりうる副作用を最小限にすることができる。このように、癌および他の増殖性疾患の治療において有用な、治療的抗体、特に抗体、断片およびその誘導体を識別し、特徴化するために現在及び継続的な必要性がある。

【発明の概要】

【0003】

本発明は、配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含む高頻度可変領域(HVR) L1配列を含む単離された抗体であって、ヒト上皮性増殖因子レセプター2(HER2)および血管内皮性増殖因子(VEGF)を特異的に結合する抗体を提供する。一実施態様では、抗体は、配列WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2および／または配列HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3をさらに含んでなる。他の実施態様では、抗体は、(i) 配列NIKDTY(配列番号：4)を含むHVR-H1、(ii) 配列RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含むHVR-H2、及び、(iii) 配列WGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むHVR-H3から選択される1つ、2つ又は3つのHVR配列を含む。他の実施態様では、抗体は、(i) 配列NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1、(ii) 配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2、及び(iii) 配列WVGVGfyAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3から選択される1つ、2つ又は3つのHVR配列を更に含む。

40

50

【0004】

他の態様では、本発明は、配列 $X_1 I X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 Y$ (配列番号：83)を含むHVR-L1配列を含む単離された抗体であって、 X_1 がアスパラギン酸以外の任意のアミノ酸であり、 X_3 がプロリン以外の任意のアミノ酸であり、 X_4 がアルギニン以外の任意のアミノ酸であり、 X_5 がセリン以外の任意のアミノ酸であり、HER2およびVEGFを特異的に結合する抗体を特色とする。一実施態様では、配列 $X_1 I X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 Y$ (配列番号：83)を含む抗体は、 X_1 にアスパラギン、 X_3 にアラニン、 X_4 にリジン、 X_5 にスレオニン、 X_7 にセリンおよび／または X_8 にグリシン、又はこれら何れかの組合せを有する。本発明のこの態様の様々な実施態様では、1、5又は10を超えるF値を有することが図57に示されるHVR-L1の何れかの残基は、bH1-44又はbH1-81のHVR-L1(配列番号：1)の同じ位置に見られるのと同じ残基として維持されるのが好ましい残基である。更なる実施態様では、1より大きい $\Delta\Delta G$ 値を有することが表14に示されるHVR-L1の何れかの残基は、bH1-44又はbH1-81のHVR-L1(配列番号：1)の同じ位置に見られるのと同じ残基として維持されるのが好ましい残基である。一実施態様では、抗体は、配列 $R X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 R$ (配列番号：84)を含むHVR-H2配列を含む。一実施態様では、抗体は、配列WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2および／または配列HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3を更に含む。他の実施態様では、抗体は、(i) 配列NIKDTY(配列番号：4)を含むHVR-H1、(ii) 配列RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含むHVR-H2、及び(iii) 配列WGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むHVR-H3から選択される1つ、2つ又は3つのHVR配列を更に含む。他の実施態様では、抗体は、(i) 配列NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1、(ii) 配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2、及び(iii) 配列WVGVGfyAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3から選択される1つ、2つ又は3つのHVR配列を更に含む。

【0005】

他の態様では、本発明は、配列 $R X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 R$ (配列番号：85)を含むHVR-H2配列を含む単離された抗体であって、 X_5 がスレオニン以外の任意のアミノ酸であり、 X_6 がアスパラギン以外の任意のアミノ酸であり、HER2およびVEGFを特異的に結合する抗体を特色とする。他の実施態様では、配列 $R X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 R$ (配列番号：84)を含む抗体は、 X_8 にチロシンを有する。一実施態様では、配列 $R X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 R$ (配列番号：84)を含む抗体は、 X_5 にセリンおよび／または X_6 にグルタミン酸を有する。この態様の他の実施態様では、抗体は、配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1、配列WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2、および／または配列HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3の群から選択される1つ、2つ又は3つのHVR配列を更に含む。本明細書に記述される何れかの実施態様では、抗体は、(i) 配列NIKDTY(配列番号：4)を含むHVR-H1、及び(ii) 配列WGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むHVR-H3から選択される1つ又は2つのHVR配列を更に含む。更なる実施態様では、抗体は、(i) 配列NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1、及び(ii) 配列WVGVGfyAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3から選択される1つ又は2つのHVR配列を更に含む。

【0006】

本発明のこの態様の様々な実施態様では、1、5又は10を超えるF値を有することが図57に示されるHVR-H2の何れかの残基は、bH1-44又はbH1-81のHVR-H2(それぞれ配列番号：8および5)の同じ位置に見られるのと同じ残基として維持されるのが好ましい残基である。更なる実施態様では、1より大きい $\Delta\Delta G$ 値を有することが表14に示されるHVR-H2の何れかの残基は、bH1-44又はbH1-81のHVR-H2(それぞれ配列番号：8および5)の同じ位置に見られるのと同じ残基として維持されるのが好ましい残基である。

特定の実施態様では、抗体は、NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列、WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2配列、HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3配列

10

20

30

40

50

、NIKDTY(配列番号：4)を含むHVR-H1配列、RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含むHVR-H2配列、及びWGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むHVR-H3配列を含むか、あるいは、NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列、WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2配列、HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3配列、NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1配列、RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2配列、および／またはWVGFGFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3配列を含む。

さらに具体的な実施態様では、単離された抗体は、HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3を含み、それぞれ順に、配列NIAKTISGY(配列番号：1)、WGSFLY(配列番号：2)、HYSSPP(配列番号：3)、NIKDTY(配列番号：4)、RIYPTNGYTR(配列番号：5)、及びWGGDGFYAMD(配列番号：6)を含み、HER2およびVEGFを特異的に結合する。他の特定の実施態様では、抗体は、HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3を含み、それぞれ順に、配列NIAKTISGY(配列番号：1)、WGSFLY(配列番号：2)、HYSSPP(配列番号：3)、NISGTY(配列番号：7)、RIYPSEGYTR(配列番号：8)、及びWVGFGFYAMD(配列番号：9)を含み、HER2およびVEGFを特異的に結合する。

【0007】

ここに記載の何れかの態様の様々な実施態様では、抗体は、150 nM以上の強さのKdでヒト及びマウスのVEGFを、そして7 nM以上の強さのKdでHER2を結合する。更なる実施態様では、抗体は、コントロールと比較して、VEGFが誘導する細胞増殖およびHER2発現細胞の増殖を阻害する。特定の実施態様では、抗体は、36 nM以上の強さのKdでヒト及びマウスのVEGFを、そして1 nM以上の強さのKdでHER2を結合する。更なる実施態様では、抗体は、VEGFR2へのVEGF結合を阻害する。

他の態様では、本発明は、150 nM以上の強さのKdでヒト及びマウスのVEGFを、そして7 nM以上の強さのKdでHER2を結合する単離された抗体であって、コントロールと比較して、VEGFが誘導する細胞増殖およびHER2発現細胞の増殖を阻害する抗体を特色とする。一実施態様では、抗体は、36 nM以上の強さのKdでヒト及びマウスのVEGFを、そして1 nM以上の強さのKdでHER2を結合する。

さらに他の態様では、本発明は、58 nM以上の強さのKdでヒトVEGFを、そして6 nM以上の強さのKdでHER2を結合し、及び／又は、コントロールと比較して、VEGFが誘導する細胞増殖およびHER2発現細胞の増殖を阻害する単離された抗体断片を提供する。特定の実施態様では、抗体断片は、33 nM以上の強さのKdでヒト及びマウスのVEGFを、そして0.7 nM以上の強さのKdでHER2を結合する。他の具体的な実施態様では、断片は、Fab断片又は単鎖可変断片(scFv)である。

上記何れかの態様では、抗体はモノクローナル抗体であってよい。上記すべての態様の他の実施態様では、抗体はIgG抗体であってよい。上記すべての態様の更なる実施態様では、抗体のフレームワーク配列の少なくとも一部は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列であってよい。

【0008】

他の態様では、本発明は、ここに記載の何れかの抗体の断片を特色とする。抗体断片の一実施態様は、HER2及びVEGFを特異的に結合する、配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列を含む断片である。他の実施態様では、抗体断片は、(i) 配列WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2、及び(ii) 配列HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3から選択される1つ又は2つのHVR配列を更に含む。他の実施態様では、抗体断片は、(i) 配列NIKDTY(配列番号：4)を含むHVR-H1、(ii) 配列RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含むHVR-H2、及び(iii) 配列WGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むHVR-H3から選択される1つ、2つ又は3つのHVR配列を更に含む。更なる実施態様では、抗体断片は、(i) 配列NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1、(ii) 配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2、及び(iii) 配列WVGFGFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3から選択される1つ、2つ又は3つのHVR配列を更に含む。具体的な実施態様では、抗体断片は、NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列、WGSFLY(配列番号

： 2) を含む H V R - L 2 配列、HYSSPP(配列番号： 3) を含む H V R - L 3 配列、NIKDTY(配列番号： 4) を含む H V R - H 1 配列、RIYPTNGYTR(配列番号： 5) を含む H V R - H 2 配列、及び WGGDGFYAMD(配列番号： 6) を含む H V R - H 3 配列を含むか、又は、NIAKTISGY(配列番号： 1) を含む H V R - L 1 配列、WGSFLY(配列番号： 2) を含む H V R - L 2 配列、HYS SPP(配列番号： 3) を含む H V R - L 3 配列、NISGTY(配列番号： 7) を含む H V R - H 1 配列、RIYPSEGYTR(配列番号： 8) を含む H V R - H 2 配列、及び WVGVGIFYAMD(配列番号： 9) を含む H V R - H 3 配列を含む。一実施態様では、断片は、F a b 断片又は単鎖可変断片(s c F v) である。上記すべての態様の更なる実施態様では、抗体のフレームワーク配列の少なくとも一部は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列であってよい。

【 0 0 0 9 】

更なる態様では、本発明は、ここに記載の何れかの抗体又は抗体断片をコードするポリヌクレオチド、並びに該ポリヌクレオチドを含むベクターを特色とする。具体的な実施態様では、コードされた抗体は、NIAKTISGY(配列番号： 1) を含む H V R - L 1 配列を含む。場合によって又はさらに、ポリヌクレオチドは、WGSFLY(配列番号： 2) を含む H V R - L 2 配列、および／またはHYSSPP(配列番号： 3) を含む H V R - L 3 配列、又はこれら何れかの組合せも含む抗体をコードする。更なる態様では、ポリヌクレオチドは、NIKDTY(配列番号： 4) を含む H V R - H 1 配列、RIYPTNGYTR(配列番号： 5) を含む H V R - H 2 配列、及び WGGDGFYAMD(配列番号： 6) を含む H V R - H 3 配列のうちの 1 つ、2 つ又は 3 つを含む抗体、または、NISGTY(配列番号： 7) を含む H V R - H 1、RIYPSEGYTR(配列番号： 8) を含む H V R - H 2、および／または WVGVGIFYAMD(配列番号： 9) を含む H V R - H 3 配列のうちの 1 つ、2 つ又は 3 つを含む抗体を更にコードしてよい。

本発明の更なる態様では、ポリヌクレオチドは、NISGTY(配列番号： 7) の配列を含む H V R - H 1 配列、RIYPSEGYTR(配列番号： 8) の配列を含む H V R - H 2、又は WVGVGIFYAMD(配列番号： 9) の配列を含む H V R - H 3、又はこれら何れかの組合せをコードする。

【 0 0 1 0 】

他の態様では、本発明は、配列 NIAKTISGY(配列番号： 1) を含む H V R - L 1 配列をコードする単離されたポリヌクレオチドを特色とし、場合によって、ポリヌクレオチドは、(i) 配列 NIKDTY(配列番号： 4) を含む H V R - H 1、(ii) 配列 RIYPTNGYTR(配列番号： 5) を含む H V R - H 2、及び (iii) 配列 WGGDGFYAMD(配列番号： 6) を含む H V R - H 3 から選択される 1 つ、2 つ又は 3 つの H V R 配列を更にコードする。更なる態様では、本発明は、配列 NIAKTISGY(配列番号： 1) を含む H V R - L 1 配列、及び (i) 配列 WGSFLY(配列番号： 2) を含む H V R - L 2 配列、又は (ii) 配列 HYSSPP(配列番号： 3) を含む H V R - L 3 配列、又はこの両方をコードする単離されたポリヌクレオチドを特色とし、場合によって、該ポリヌクレオチドは、(i) 配列 NIKDTY(配列番号： 4) を含む H V R - H 1、(ii) 配列 RIYPTNGYTR(配列番号： 5) を含む H V R - H 2、及び (iii) 配列 WGGDGFYAMD(配列番号： 6) を含む H V R - H 3 から選択される 1 つ、2 つ又は 3 つの H V R 配列を更にコードする。

更なる態様では、本発明は、配列 NIAKTISGY(配列番号： 1) を含む H V R - L 1 配列、配列 NISGTY(配列番号： 7) を含む H V R - H 1、配列 RIYPSEGYTR(配列番号： 8) を含む H V R - H 2、及び配列 WVGVGIFYAMD(配列番号： 9) を含む H V R - H 3 をコードする単離されたポリヌクレオチドを特色とする。さらに他の態様では、本発明は、配列 NIAKTISGY(配列番号： 1) を含む H V R - L 1 配列、配列 WGSFLY(配列番号： 2) を含む H V R - L 2 配列、配列 HYSSPP(配列番号： 3) を含む H V R - L 3 配列、配列 NISGTY(配列番号： 7) を含む H V R - H 1、配列 RIYPSEGYTR(配列番号： 8) を含む H V R - H 2、及び配列 WVGVGIFYAMD(配列番号： 9) を含む H V R - H 3 をコードする単離されたポリヌクレオチドを特色とする。

【 0 0 1 1 】

他の態様では、本発明は、配列 NISGTY(配列番号： 7) を含む H V R - H 1 配列をコードする単離されたポリヌクレオチド、配列 RIYPSEGYTR(配列番号： 8) を含む H V R - H 2 配列をコードする単離されたポリヌクレオチド、及び、配列 WVGVGIFYAMD(配列番号： 9) を含む H V R - H 3 配列をコードする単離されたポリヌクレオチドを特色とする。他の態様では、本発明は、配列 NISGTY(配列番号： 7) を含む H V R - H 1 配列、配列 RIYPSEGYTR(配列

番号：8)を含むHVR-H2配列、及び配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを特色とする。

本発明の更なる実施態様では、単離されたポリヌクレオチドは、配列 X_1 I X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 Y(配列番号：83)を含むHVR-L1配列をコードし、このとき、 X_1 はアスパラギン酸以外の任意のアミノ酸であり、 X_3 はプロリン以外の任意のアミノ酸であり、 X_4 はアルギニン以外の任意のアミノ酸であり、そして X_5 はセリン以外の任意のアミノ酸である。本発明の他の実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列 X_1 I X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 Y(配列番号：83)を含むHVR-L1配列であって、このとき、 X_1 はAsp以外の任意のアミノ酸であり、 X_3 はプロリン以外の任意のアミノ酸であり、 X_4 はアルギニン以外の任意のアミノ酸であり、そして X_5 はセリン以外の任意のアミノ酸であるHVR-L1配列、及び配列WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2配列および／または配列HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3配列をコードする。本発明のこの態様の更なる実施態様では、ポリヌクレオチドは、 X_1 にアスパラギン、 X_3 にアラニン、 X_4 にリジン、 X_5 にスレオニン、 X_7 にセリンおよび／または X_8 にグリシン、又はこの何れかの組合せを有する配列 X_1 I X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 Y(配列番号：83)を含む抗体をコードする。本発明のこの態様の様々な実施態様では、1、5又は10を超えるF値を有することが図57に示されるHVR-L1の何れかの残基が、bH1-44又はbH1-81のHVR-L1(配列番号：1)の同じ位置に見られるのと同じ残基として維持されることが好ましい残基である。更なる実施態様では、1より大きな $\Delta\Delta G$ 値を有することが表14に示されるHVR-L1の何れかの残基が、bH1-44又はbH1-81のHVR-L1(配列番号：1)の同じ位置に見られるのと同じ残基として維持されることが好ましい残基である。

【0012】

本発明の更なる実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列 RX_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 R(配列番号：85)を含むHVR-H2配列をコードし、このとき X_5 はスレオニン以外の任意のアミノ酸であり、 X_6 はアスパラギン以外の任意のアミノ酸である。他の態様では、本発明は、配列NISGT(配列番号：7)を含むHVR-H1配列； X_5 がスレオニン以外の任意のアミノ酸であり、 X_6 がアスパラギン以外の任意のアミノ酸である、配列 RX_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 R(配列番号：85)を含むHVR-H2配列；及び配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3配列をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明の更なる実施態様では、ポリヌクレオチドは、 X_5 にセリン、 X_6 にグルタミン酸および／または X_8 にチロシン、又はこれら何れかの組合せを有する配列 RX_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 R(配列番号：84)を含むHVR-H2配列をコードする。本発明のこの態様の様々な実施態様では、1、5又は10を超えるF値を有することが図57に示されるHVR-H2の何れかの残基が、bH1-44又はbH1-81のHVR-H2(それぞれ配列番号：8および5)の同じ位置に見られるのと同じ残基として維持されることが好ましい残基である。更なる実施態様では、1より大きな $\Delta\Delta G$ 値を有することが表14に示されるHVR-H2の何れかの残基が、bH1-44又はbH1-81のHVR-H2(それぞれ配列番号：8および5)の同じ位置に見られるのと同じ残基として維持されることが好ましい残基である。

【0013】

更なる態様では、本発明は、配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列を含む単離されたポリペプチド又は配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列を含む単離されたポリペプチド；配列WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2配列；および／または配列HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3配列を含む単離されたポリペプチドを特色とする。他の態様では、本発明は、配列 X_1 I X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 Y(配列番号：83)を含むHVR-L1配列を含むポリペプチドであって、このとき X_1 はアスパラギン酸以外の任意のアミノ酸であり、 X_3 はプロリン以外の任意のアミノ酸であり、 X_4 はアルギニン以外の任意のアミノ酸であり、 X_5 はセリン以外の任意のアミノ酸である、ポリペプチドを提供する。この態様の他の実施態様では、ポリペプチドは、HV

10

20

30

40

50

R-L 1 配列 X_1 I X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 Y (配列番号：83) を含み、このとき X_1 はアスパラギン酸以外の任意のアミノ酸であり、 X_3 はプロリン以外の任意のアミノ酸であり、 X_4 はアルギニン以外の任意のアミノ酸であり、 X_5 はセリン以外の任意のアミノ酸である。場合によって、ポリペプチドは、配列 WGSFLY (配列番号：2) を含む HVR-L 2 配列および／または配列 HYSSPP (配列番号：3) を含む HVR-L 3 配列を更に含む。配列 X_1 I X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 Y (配列番号：83) を含むポリペプチドを含む上記何れかの態様の特定の実施態様では、 X_1 にアスパラギン、 X_3 にアラニン、 X_4 にリジン、 X_5 にスレオニン、 X_7 にセリンおよび／または X_8 にグリシン、又はこの何れかの組合せがある。本発明のこの態様の様々な実施態様では、1、5 又は 10 を超える F 値を有することが図 57 に示される HVR-L 1 の何れかの残基は、bH1-44 又は bH1-81 の HVR-L 1 (配列番号：1) の同じ位置に見られるのと同じ残基として維持されるのが好ましい残基である。更なる実施態様では、1 より大きな $\Delta\Delta G$ 値を有することが表 14 に示される HVR-L 1 の何れかの残基は、bH1-44 又は bH1-81 の HVR-L 1 (配列番号：1) の同じ位置に見られるのと同じ残基として維持されるのが好ましい残基である。

10

【0014】

また、本発明は、配列 $RX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9R$ (配列番号：85) を含む HVR-H 2 配列を含むポリペプチドであって、このとき X_5 がスレオニン以外の任意のアミノ酸であり、 X_6 がアスパラギン以外の任意のアミノ酸である、ポリペプチドを提供する。本発明の他の態様では、ポリペプチドは、 X_5 がスレオニン以外の任意のアミノ酸であり、 X_6 がアスパラギン以外の任意のアミノ酸である HVR-H 2 配列 $RX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9R$ (配列番号：85) と、配列 NISGTY (配列番号：7) を含む HVR-H 1 配列と、配列 WVGGFYAMD (配列番号：9) を含む HVR-H 3 配列とを含む。上記の態様の異なる実施態様では、配列 $RX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9R$ (配列番号：84) を含む HVR-H 2 配列を含むポリペプチドは、 X_5 にセリン、 X_6 にグルタミン酸および／または X_8 にチロシン、又はこれら何れかの組合せを有する。本発明の本態様の様々な実施態様では、1、5 又は 10 を超える F 値を有することが図 57 に示される HVR-H 2 の何れかの残基は、bH1-44 又は bH1-81 の HVR-H 2 (それぞれ配列番号：8 および 5) の同じ位置に見られるのと同じ残基として維持されるのが好ましい残基である。更なる実施態様では、1 より大きな $\Delta\Delta G$ 値を有することが表 14 に示される HVR-H 2 の何れかの残基は、bH1-44 又は bH1-81 の HVR-H 2 (それぞれ配列番号：8 および 5) の同じ位置に見られるのと同じ残基として維持されるのが好ましい残基である。

20

30

【0015】

また、本発明は、配列 NISGTY (配列番号：7) を含む HVR-H 1 配列、配列 RIYPSEGYTR (配列番号：8) を含む HVR-H 2 配列、および／または配列 WVGGFYAMD (配列番号：9) を含む HVR-H 3 配列、又はこれらの何れかの組合せの 1 つ、2 つまたは 3 つを含むポリペプチドを提供する。

上記何れかの態様では、単離されたポリペプチドは、配列 NIAKTISGY (配列番号：1) を含む HVR-L 1 配列、配列 NIKDTY (配列番号：4) を含む HVR-H 1、配列 RIYPTNGYTR (配列番号：5) を含む HVR-H 2、および／または配列 WGGDFYAMD (配列番号：6) を含む HVR-H 3、又はこれら何れかの組合せの 1 つ、2 つまたは 3 つを更に含んでよい。

40

上記何れかの態様では、単離されたポリペプチドは、配列 NIAKTISGY (配列番号：1) を含む HVR-L 1 配列、配列 WGSFLY (配列番号：2) を含む HVR-L 2 配列、および／または配列 HYSSPP (配列番号：3) を含む HVR-L 3 配列、又はこれら何れかの組合せの 1 つ、2 つまたは 3 つを更に含んでよい。

上記何れかの態様では、単離されたポリペプチドは、配列 NIKDTY (配列番号：4) を含む HVR-H 1、配列 RIYPTNGYTR (配列番号：5) を含む HVR-H 2、および／または配列 WGGDFYAMD (配列番号：6) を含む HVR-H 3、又はこれら何れかの組合せを更に含んでよい。

50

上記何れかの態様では、単離されたポリペプチドは、配列NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1、配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2配列、および／または配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3、又はこれら何れかの組合せから選択される1つ、2つまたは3つのHVR配列を更に含んでよい。

【0016】

更なる態様では、本発明は、配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列、及び(i)配列WGSFLYを含む(配列番号：2)を含むHVR-L2配列又は(ii)配列HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3配列、又はこの両方；及び、(i)配列NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1、(ii)配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2、および／または、(iii)配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3、又はこれら何れかの組合せの1つ、2つまたは3つ、を含む単離されたポリペプチドを特色とする。

10

更なる態様では、本発明は、配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列、及び(i)配列WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2配列又は(ii)配列HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3配列、又はこの両方；及び、(i)配列NIKDTY(配列番号：4)を含むHVR-H1、(ii)配列RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含むHVR-H2、および／または、(iii)配列WGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むHVR-H3、又はこれら何れかの組合せを含む単離されたポリペプチドを特色とする。

更なる態様では、本発明は、配列NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1配列を含む単離されたポリペプチド、配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2配列を含む単離されたポリペプチド、そして、配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3配列を含む単離されたポリペプチドを特色とする。より更なる態様では、本発明は、配列NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1配列、配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2配列、そして、配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3配列を含む単離されたポリペプチドを特色とする。

20

【0017】

一実施態様では、本発明は、本発明の上記何れかのポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。他の態様では、本発明は、本発明の何れかのベクターを含む宿主細胞を特色とする。一実施態様では、宿主細胞は原核生物のものである。他の実施態様では、宿主細胞は、真核生物の、例えば哺乳類の細胞である。

他の態様では、本発明は、上記何れかの抗体又は抗体断片の製造方法を特色とする。この方法は、抗体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む宿主細胞を培養し、抗体を回収することを含む。ある実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列をコードし、場合によって、ポリヌクレオチドは、さらに、配列NIKDTY(配列番号：4)を含むHVR-H1、配列RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含むHVR-H2、及び配列WGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むHVR-H3をコードする。他の実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列、配列WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2配列、及び配列HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3配列をコードし、場合によって、ポリヌクレオチドは、さらに、配列NIKDTY(配列番号：4)を含むHVR-H1、配列RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含むHVR-H2、及び配列WGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むHVR-H3をコードする。他の実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列、配列NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1、配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2、及び配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3をコードする。さらに他の実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列、配列WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2配列、配列HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3配列、配列NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1、配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2、及び配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3をコードする。

30

40

【0018】

更なる実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-

50

H 1 配列、配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むH V R-H 2 配列、又は配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むH V R-H 3 配列をコードする。また更なる実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列NISGTY(配列番号：7)を含むH V R-H 1 配列、配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むH V R-H 2 配列、及び配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むH V R-H 3 配列を含むポリペプチドをコードする。

一実施態様では、宿主細胞は原核生物のものであり、他の実施態様では、宿主細胞は哺乳類の細胞といった真核生物のものである。

【0019】

更なる態様では、本発明は、被検体の腫瘍の治療方法を特色とする。この方法は、本明細書中に記載の抗体ないし抗体断片を被検体に投与することを含み、この投与は被検体の腫瘍を治療又は予防するために十分な量と時間である。一実施態様では、腫瘍は、結腸直腸腫瘍、乳癌、肺癌、腎臓細胞癌腫、膠腫、神経膠芽腫又は卵巣癌である。他の実施態様では、抗体は、配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含むH V R-L 1 配列を含み、H E R 2 およびV E G F を特異的に結合する。一実施態様によると、抗体は、(i) 配列WGSFLY(配列番号：2)を含むH V R-L 2、及び(ii) 配列HYSSPP(配列番号：3)を含むH V R-L 3 から選択される1つ又は2つのH V Rを更に含む。他の実施態様では、抗体は、(i) 配列NIKDTY(配列番号：4)を含むH V R-H 1、(ii) 配列RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含むH V R-H 2、及び(iii) 配列WGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むH V R-H 3 から選択される1つ、2つ又は3つのH V R配列を含む。更なる実施態様では、抗体は、(i) 配列NISGTY(配列番号：7)を含むH V R-H 1、(ii) 配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むH V R-H 2、及び(iii) 配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むH V R-H 3 から選択される1つ、2つ又は3つのH V R配列を含む。具体的な実施態様では、抗体は、NIAKTISGY(配列番号：1)を含むH V R-L 1 配列、WGSFLY(配列番号：2)を含むH V R-L 2 配列、HYSSPP(配列番号：3)を含むH V R-L 3 配列、NIKDTY(配列番号：4)を含むH V R-H 1 配列、RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含むH V R-H 2 配列、及びWGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むH V R-H 3 配列を含み、H E R 2 およびV E G F を特異的に結合する。他の実施態様では、抗体は、NIAKTISGY(配列番号：1)を含むH V R-L 1 配列、WGSFLY(配列番号：2)を含むH V R-L 2 配列、HYSSPP(配列番号：3)を含むH V R-L 3 配列、NISGTY(配列番号：7)を含むH V R-H 1 配列、RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むH V R-H 2 配列、及びWVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むH V R-H 3 配列を含み、H E R 2 およびV E G F を特異的に結合する。

【0020】

実施態様では、前記方法は、被検体に他の抗癌療法を投与することを更に含む。他の実施態様では、他の抗癌療法は、他の抗体、化学療法剤、細胞障害性剤、抗血管形成剤、免疫抑制剤、プロドラッグ、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、細胞障害性放射線療法、副腎皮質ステロイド、制吐剤、癌ワクチン、鎮痛剤又は増殖阻害性剤を含む。

更なる実施態様では、他の抗癌療法は、抗体の投与の前又は後に投与される。更なる実施態様では、他の抗癌療法は、抗体と同時に投与される。

【0021】

更なる態様では、本発明は、被検体の自己免疫性疾患の治療方法を特色とする。この方法は、本明細書中に記載の抗体ないし抗体断片を被検体に投与することを含み、この投与は被検体の自己免疫性疾患を治療又は予防するために十分な量と時間である。一実施態様では、抗体は、配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含むH V R-L 1 配列を含み、H E R 2 およびV E G F を特異的に結合する。一実施態様によると、抗体は、(i) 配列WGSFLY(配列番号：2)を含むH V R-L 2、及び(ii) 配列HYSSPP(配列番号：3)を含むH V R-L 3 から選択される1つ又は2つのH V R配列を含む。他の実施態様では、抗体は、(i) 配列NIKDTY(配列番号：4)を含むH V R-H 1、(ii) 配列RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含むH V R-H 2、及び(iii) 配列WGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むH V R-H 3 から選択される1つ、2つ又は3つのH V R配列を含む。更なる実施態様では、抗体が、(i) 配列NISGTY(配列番号：7)を含むH V R-H 1、(ii) 配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むH V R-H

2、及び(iii) 配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3から選択される1つ、2つ又は3つのHVR配列を含む。特定の実施態様では、抗体は、NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列、WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2配列、HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3配列、NIKDTY(配列番号：4)を含むHVR-H1配列、RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含むHVR-H2配列、及びWGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むHVR-H3配列を含み、HER2及びVEGFを特異的に結合し、又は、この抗体は、NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列、WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2配列、HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3配列、NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1配列、RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2配列、及びWVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3配列を含み、HER2およびVEGFを特異的に結合する。

10

【0022】

さらに他の態様では、本発明は、被検体のHER2の異常な活性化を伴う非悪性疾患の治療方法を特色とする。この方法は、本明細書中に記載の抗体ないし抗体断片を被検体に投与することを含み、この投与は被検体の非悪性疾患を治療又は予防するために十分な量と時間である。一実施態様では、抗体は、配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列を含み、HER2およびVEGFを特異的に結合する。一実施態様によると、抗体は、(i) 配列WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2、及び配列HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3から選択される1つ又は2つのHVR配列を含む。他の実施態様では、抗体は、(i) 配列NIKDTY(配列番号：4)を含むHVR-H1、(ii) 配列RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含むHVR-H2、及び(iii) 配列WGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むHVR-H3から選択される1つ、2つ又は3つのHVR配列を含む。更なる実施態様では、抗体は、(i) 配列NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1、(ii) 配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2、及び(iii) 配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3から選択される1つ、2つ又は3つのHVR配列を含む。特定の実施態様では、抗体は、NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列、WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2配列、HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3配列、NIKDTY(配列番号：4)を含むHVR-H1配列、RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含むHVR-H2配列、及びWGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むHVR-H3配列を含み、HER2及びVEGFを特異的に結合するか、又はこの抗体は、NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列、WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2配列、HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3配列、NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1配列、RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2配列、及びWVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3配列を含み、HER2およびVEGFを特異的に結合する。

20

30

【0023】

本発明の他の態様は、被検体においてHER2の異常活性化を伴う腫瘍、自己免疫性疾患又は非悪性疾患の治療における抗体ないし抗体断片の使用、並びに被検体においてHER2の異常活性化を伴う腫瘍、自己免疫性疾患又は非悪性疾患の治療のための医薬の製造における使用を特色とする。これらの使用の一実施態様では、抗体は、配列NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列を含み、HER2およびVEGFを特異的に結合する。一実施態様によると、抗体は、(i) 配列WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2、及び(ii) 配列HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3から選択される1つ又は2つのHVR配列を更に含む。他の実施態様では、抗体は、(i) 配列NIKDTY(配列番号：4)を含むHVR-H1、(ii) 配列RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含むHVR-H2、及び(iii) 配列WGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むHVR-H3から選択される1つ、2つ又は3つのHVR配列を含む。更なる実施態様では、抗体は、(i) 配列NISGTY(配列番号：7)を含むHVR-H1、(ii) 配列RIYPSEGYTR(配列番号：8)を含むHVR-H2、及び(iii) 配列WVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むHVR-H3から選択される1つ、2つ又は3つのHVR配列を含む。特定の実施態様では、抗体は、NIAKTISGY(配列番号：1)を含むHVR-L1配列、WGSFLY(配列番号：2)を含むHVR-L2配列、HYSSPP(配列番号：3)を含むHVR-L3配列、NIKDTY(配列番号：4)を含むHVR-H1配列、RIYPTNGYTR(配列番号：5)を含む

40

50

H V R - H 2 配列、及びWGGDGFYAMD(配列番号：6)を含むH V R - H 3 配列を含み、H E R 2 及びV E G F を特異的に結合するか、又はこの抗体は、NIAKTISGY(配列番号：1)を含むH V R - L 1 配列、WGSFLY(配列番号：2)を含むH V R - L 2 配列、HYSSPP(配列番号：3)を含むH V R - L 3 配列、NISGTY(配列番号：7)を含むH V R - H 1 配列、RInYPSEGYTR(配列番号：8)を含むH V R - H 2 配列、及びWVGVGIFYAMD(配列番号：9)を含むH V R - H 3 配列を含み、H E R 2 およびV E G F を特異的に結合する。

【0024】

本明細書中に記載のH E R 2 の異常な活性化を伴う腫瘍、自己免疫性疾患又は非悪性疾患の治療方法の実施態様では、被検体はヒトである。

また、本明細書中に記載の抗体及び抗体断片を含む、キット、組成物および製造品も考慮する。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】様々なL C ライブラリの設計された多様性を示す。

【図2】他の標的と結合するように抗V E G F 抗体又は抗H e r 2 抗体を変更するために用いた4つの軽鎖ライブラリの概要を示す。イタリック体のN N K およびX Y Z はコドンセットを指す。Y s、D s、T s およびS s はそれぞれ、チロシン、アスパラギン酸、スレオニンおよびセリンをほぼ50%の確率で、そして20アミノ酸のうちのいずれか一つを50%の確率で有することによる穏やかな(ソフト)ランダム化を指す。D / D およびT / T s はそれぞれ、D 又はT を75%の確率で、そして20アミノ酸のうちのいずれか一つを25%の確率で有する穏やかな(ソフト)ランダム化を指す。

【図3】軽鎖鋳型のH C、L C C D R 残基の配列を示す。

【図4】軽鎖C D R の天然及び設計された多様性を示す。各々の位置の、ハーセプチン(登録商標)抗体配列を括弧で示す。「*」は、ハーセプチン(登録商標)抗体に存在しない挿入を意味する。

【図5A-B】軽鎖(L C)ライブラリから単離した特定の抗原結合性クローンの配列を示す。図5Aは、V E G F、D R 5 およびF c に結合する単一特異性ファージクローンのL C C D R 配列を示す。図5Bは、V E G F / H E R 2、D R 5 / H E R 2 およびF c / H E R 2 に結合する二重特異性F a b を示す。軽鎖フレームワークおよび重鎖配列は、L C フレームワーク置換R 6 6 G を除いてハーセプチン(登録商標)抗体のものに対応する。

【図6】L C ライブラリ由来の抗体の結合特異性を示すグラフである。抗体b H 1、b H 3、3-1、b D 1、b D 2、4-1 および4-5の結果を示す。結合したI g G 抗体は分光光度法で検出した(450nmの光学濃度、y軸)。アッセイに含まれるタンパク質は、(各抗体について左から右の順に)ヒト血管内皮性増殖因子A(h V E G F - A)、h V E G F - C、h V E G F - D、h H E R 2 細胞外ドメイン(E C D)、上皮性増殖因子レセプター細胞外ドメイン(h E G F R)、ヒトデスレセプター5(h D R 5)、ウシ血清アルブミン(B S A)、カゼイン、ウシ胎児血清(F B S)、W I L 2 細胞溶解物およびN R 6 細胞溶解物とした。

【図7】ライブラリCおよびDの分類条件および濃縮を示す。

【図8】V E G F 結合体を示す。残基28、30、30 a、31、92、93 および93 a は十分に多様であった。残基32、50、53、91 および94 は限定的であった。残基29、33 および51 は制限された(<3)。

【図9】ヒトV E G F 結合体、併用プレートおよび溶液選別を示す。

【図10A-B】V E G F およびH E R 2 の両方を結合するクローンを示す。

【図11】V E G F のみを結合し、H E R 2 との結合活性を失っているクローンを示す。

【図12】V E G F に結合するクローンを示す。

【図13A-B】V E G F R 1 - D 2 又はD 1 へのV E G F 結合を遮断するクローンを示す。

【図14A-B】ライブラリL 1 / L 2 / L 3 - C, D からのV E G F 結合体とV E G F 結合体の親和性を示す。

10

20

30

40

50

【図15】hVEGFおよびHER2を結合しうるクローンを示す。

【図16】scFv'2形成に使用し、ファージ上に表出されたLCライブラリ結合体を示す。

【図17】Fab又はhIgG型での様々なクローンの発現を示す。

【図18A-B】hVEGF165に結合するhIgG型のクローンのELISAを示す。

【図19】固定されたタンパク質標的に結合するhIgG型のクローンのELISAを示す。

【図20】Her2およびVEGF又はDR5の存在下における、hIgG型のクローンの競合的ELISAを示す。

【図21】VEGF又はHER2への結合のBiacore分析を示す。

【図22A-B】異なる結合クローンから得られた軽鎖を有するIgG又はFabを有するHER2-ECD又はhVEGFへの結合を示す。

【図23A-B】VEGFR1 D1-3およびKDR D1-7とのVEGF相互作用を遮断する抗VEGF抗体を示す。

【図24】B20-4. 1およびVEGF結合を遮断する抗体を示す。

【図25】アバスタチン(登録商標)抗体とVEGF結合を遮断する抗体を示す。

【図26】HER2又はVEGFに結合した二重特異性bH1 Fabの結晶構造を示す。

【図27】抗VEGF抗体がVEGFレセプター2(VEGFR2)へのhVEGF結合を遮断することを示すグラフである。

【図28】HER2又はVEGFに結合した二重特異性bH1 Fabの結晶構造を示す。

【図29】bH1の構造的パルトープに対する個々のCDR貢献を示す一連の円グラフである。VEGFのパルトープサイズは $730 \text{ \AA}^2$ であり、HER2は $690 \text{ \AA}^2$ である。重鎖CDRを灰色で示し、軽鎖CDRを白色で示す。

【図30】図28と同じ方向の、VEGF/HER2結合bH1又はHER2結合ハーセプチン(登録商標)抗体のCDRループの重ね合わせを示す。

【図31】HER2又はVEGFに結合した二重特異性bH1 Fabの結晶構造を示す。2つのbH1複合体のCDR-L1は同じ方向で示す。

【図32】VEGFおよびHER2結合のためのbH1のエネルギー的に重要な結合部位を示す。

【図33】ショットガンスクランを行ったbH1のコドンを示す。

【図34】ライブラリ構築を示す。

【図35】VEGFへの結合によりスクリーニングされたショットガンスクラン突然変異を有する抗体クローンを示す。

【図36】HER2への結合によりスクリーニングされたショットガンスクラン突然変異を有する抗体クローンを示す。

【図37A-D】アラニンスキャン結果を示す。図37A-Bは、VEGF結合(図37A)又はHER2結合(図37B)についてのbH1のアラニンスキャンの結果と、VEGF結合(図37C)又はHER2結合(図37D)についてのbH1のホモログスキャンの結果を示す。

【図38】bH1又はハーセプチン(登録商標)抗体変異体のアラニンスキャン結果を示す。

【図39A-B】VEGFおよびHER2への結合についてのbH1 Fabのショットガンアラニン-およびホモログスキャンを示す。

【図40A-B】VEGFおよびHER2結合についてのbH1のエネルギー的に重要な結合部位を示す。

【図41】bH1 VEGF-親和性成熟したクローン配列と、VEGF又はHER2に対する結合親和性を示す。

10

20

30

40

50

【図４２】抗VEGF抗体によるVEGF誘導性HUVEC細胞増殖の阻害を示す。

【図４３Ａ－Ｄ】NR6細胞に発現されるHER2への二重特異性抗体の結合を示す。

【図４４】VEGF又はHER2へのbH1についての競合的結合実験の結果を示す。

【図４５Ａ－Ｂ】bH1及び親和性改善した変異体bH1-44およびbH1-81のIgGがインビトロでHER2およびVEGFが媒介する細胞増殖を阻害することを示す。

【図４６】LCライブラリ由来の二重特異性抗体の結合特異性を示す。

【図４７Ａ－Ｂ】抗VEGF抗体がVEGFR2レセプターへのVEGF結合を遮断することを示す。図４７ＡはヒトVEGF結合を示し、図４７ＢはマウスVEGF結合を示す。

【図４８Ａ－Ｂ】VEGFおよびHER2が溶液中のbH1-44二重特異性IgGへの結合について競合することを示す。

【図４９Ａ－Ｂ】二重特異性抗体bH1およびbH1-44が、HER2発現マウス線維芽細胞(NR6；図４９Ｂ)に結合するが、HER2陰性NR6細胞(図４９Ａ)には結合しないことを示す。

【図５０】二重特異性bH1抗体が、マウス線維芽細胞(NR6)溶解物からVEGF又はHER2を特異的に免疫沈降するが、他のタンパク質は免疫沈降しないことを示す。

【図５１Ａ－Ｂ】免疫欠損マウスのColo205及びBT474M1異種移植片におけるbH1-44の腫瘍阻害を示す。

【図５２Ａ－Ｂ】以下のように配列識別子を有する本発明を実施するために使用される、例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を示す。可変重鎖(VH)コンセンサスフレームワーク(図５２ＡおよびＢ)。ヒトVHサブグループIコンセンサスフレームワーク領域FR1、FR2、FR3及びFR4からカバットCDRを除く(IA：それぞれ配列番号：42-45)。ヒトVHサブグループIコンセンサスフレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4から伸展した高頻度可変領域を除く(IB：それぞれ配列番号：46、47、44および45；IC：それぞれ配列番号：46-48および45；ID：それぞれ配列番号：42、47、49および45)。ヒトVHサブグループIIコンセンサスフレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4からカバットCDRを除く(IIA：それぞれ配列番号：50-52および45)。ヒトVHサブグループIIコンセンサスフレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4から伸展した高頻度可変領域を除く(IIIB：それぞれ配列番号：53、54、52および45；IIC：それぞれ配列番号：53-55および45；IID：それぞれ配列番号：53、54、56および45)。ヒトVHサブグループIIIコンセンサスフレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4からカバットCDRを除く(IIIA：それぞれ配列番号：57-59および45)。ヒトVHサブグループIIIコンセンサスフレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4から伸展した高頻度可変領域を除く(IIIB：それぞれ配列番号：60、61、59および45；IIIC：それぞれ配列番号：60-62および45；IIID：それぞれ配列番号：60、61、63および45)。ヒトVHアクセプターフレームワーク領域FR1、FR2、FR3及びFR4からカバットCDRを除く(アクセプターA：それぞれ配列番号：64、58、65及び45)。ヒトVHアクセプターフレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4から伸展した高頻度可変領域を除く(アクセプターB：それぞれ配列番号：60、61、65および45；アクセプターC：それぞれ配列番号：60、61、66および45)。ヒトVHアクセプター2フレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4からカバットCDRを除く(第二アクセプターA：それぞれ配列番号：64、58、67および45)。ヒトVHアクセプター2フレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4から伸展した高頻度可変領域を除く(第二アクセプターB：それぞれ配列番号：60、61、67および45；第二アクセプターC：それぞれ配列番号：60、61、68および45；第二アクセプターD：それぞれ配列番号：60、61、69および45)。

【図５３】以下のように配列識別子を有する本発明を実施するために使用される、例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を示す。可変軽鎖(VL)コンセンサ

10

20

30

40

50

スフレームワーク(図53)。ヒトV L κサブグループI コンセンサスフレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4(k v 1:それぞれ配列番号:70-73)。ヒトV L κサブグループI I コンセンサスフレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4(k v 2:それぞれ配列番号:74-76および73)。ヒトV L κサブグループI I I コンセンサスフレームワーク領域FR1、FR2およびFR3(k v 3:それぞれ配列番号:77-79および73)。ヒトV L κサブグループI V コンセンサスフレームワーク領域FR1、FR2およびFR3(k v 4:それぞれ配列番号:80-82および73)。

【図54】HER2、VEGF又はその両方と構造的に接触するか又はエネルギー的に相互作用する残基を示す。構造的に接触するか(>25%埋没)、又はHER2(淡い灰色)、VEGF(灰色)又はその両方(共通、黒色)とエネルギー的に相互作用する($\Delta\Delta G > 10\%$ 総結合エネルギー)残基を、HER2結合bH1の表面にマップする。

【図55】bH1/VEGFおよびbH1/HER2結合界面を示す。bH1/VEGF(A)およびbH1/HER2(B)結合界面の拡大図は、抗体結合の領域におけるVEGFとHER2との間の構造的相違を示す。VEGF(C)およびHER2-ECD(D)の境界の表示はbH1 Fabと比較して同じ方向で示す。bH1 Fab(4.5 Åより近い)と接触する残基を強調して示す。化学組成又は位相幾何学に関して、bH1の2つのエピートープ間で見かけの類似点はない。

【図56】bH1およびbH1-44抗体がVEGFR1へのヒトVEGF結合を遮断することを示す。ビオチン化ヒトVEGF165は、漸増濃度のIgG(x軸)とインキュベートし、次いで固定したヒトVEGFR1-Fcに捕捉させ、基質を加えた西洋ワサibelオキシダーゼコンジュゲートストレプトアビジンにて検出した(基準化した%OD450、y軸)。

【図57】bH1およびbH1-44変異体のアラニンスキャンニング結果を示す。アラニンスキャンニング突然変異誘発は、VEGFおよび/またはHER2結合のために機能的に重要な残基を同定した。F値は、各々スキャンした残基の抗原結合に対する相対的な寄与を表す。F値は、VEGFおよびHER2へのbH1-44結合について決定し(黒色バー)、bH1のF値(白色バー)と比較した。括弧のアミノ酸は、bH1と異なるbH1-44残基を意味する。このグラフは図56から応用した。

【図58】VEGFおよびHER2に対するbH1-44 I29A Y32A bH1-44およびR50A R58A bH1-44の抗体の結合を示す。ELISA結合アッセイは、bH1-44 IgGおよび2つの二重突然変異体の、ビオチン化VEGF109(左)又はHER2-ECD(右)へ結合し、固定した抗VEGF抗体又はハーセプチンとそれぞれ競争する能力を示す。I29A/Y32A LC変異体はVEGFの結合を失っていたのに対して、HER2に対する親和性の維持はbH1-44と同程度であった。R50A/R58A HC変異体は、HER2に対する親和性を失っていたが、VEGF結合を保持する。

【図59A-F】抗原結合と関係しているエンタルピー変化の熱量測定値を示す。図59A-Fはそれぞれ、VEGFへのbH1結合、HER2へのbH1結合、VEGFへのbH1-44結合、HER2へのbH1-44結合、VEGFへのbH1-44 HC-R50A+R58A結合、HER2へのbH1-44 LC-I29A+Y32A結合についてのデータを示す。図は、個々の熱パルス(上図)と反応の熱(下図)を示す。これらは、注入終了時の抗原に対する抗体比の関数としてプロットした各パルスの座標により算出した。エンタルピー変化の小さいものは相対的に高いタンパク質濃度を必要とした。これは、親和性が高い場合のKDの正確な評価を除く。図59A-Dは、10-20 μMの濃度のHER2-ECDのVEGF109の溶液は、100から200 μMの濃度のbH1又はbH1-44 Fabを15回注入して滴定した。図59E-Fは、10-20 μMの濃度のVEGF109又はHER2-ECDの溶液は、150および250 μMの濃度のbH1-44 LC-I29A+Y32A Fab又はbH1-44 HC-R50A+R58A Fabを20回注入して滴定した。図59Eの滴定ナンバー1および13は、計測器ノイズのた

10

20

30

40

50

め分析から除いた。

【図60】bH1変異体およびハーセプチン(登録商標)抗体の熱力学の性質を示す。各々の二重特異性変異体(bH1、bH1-81およびbH1-44)は、VEGFおよびHER2結合について好適なエンタルピーおよびエントロピーによって特徴付けされる熱力学の性質を有する。それぞれHER2又はVEGFに対する親和性を失っていた変異体HC-R50A+R58AおよびLC-129A+Y32Aは、bH1-44と同様な熱力学の性質を表す。bH1-44/HER2相互作用の熱力学の性質は、ハーセプチン/HER2と異なっている。

【図61】アラニンスキャニング突然変異誘発データに基づいた、HER2結合についてのbH1、bH1-44およびハーセプチン(登録商標)抗体ホットスポットの比較を示す。ホットスポット残基は、ハーセプチン(登録商標)(ハーセプチン)構造又はbH1 Fab構造(bH1、bH1-44)にマップし、灰色で強調した。ホットスポットは、全結合自由エネルギー(ΔG)の10%以上の $\Delta \Delta G$ として定義する。構造上の接触部位(構造において抗原の4.5 Å内)は、明るい点線で外形を表す。HCおよびLCは、黒色の点線で分かれる。下線を付した残基は、配列がハーセプチン(登録商標)と異なる。

【図62】VEGF又はHER2と結合するbH1-44 Fab結合と関係する推定の熱容量変化を示す。 ΔC_p は、20から37°Cの間の ΔH の温度依存の傾斜から決定した。この範囲を超えると、 ΔC_p は、 ΔH とTの直線関係に基づく、Tから独立しているように見える(bH1-44/HER2については $R=0.991$ 、bH1-44/VEGFのための $R=0.9989$)。ハーセプチン(登録商標)/HER2の ΔC_p は、Kelley et al. (Biochemistry, 1992)によって予め決定した。

【図63A-B】BIACoreによって測定したbH1-44変異体の結合動態を示す。図は、固定した(A) VEGF109又は(B) HER2-ECDと、0.5 μM溶液のbH1-44 Fab(AおよびB：上)、bH1-44-LC-Y32(A：下から2番目；B：上から2番目)、bH1-44-LC-I29A+Y32A(A：下；B：下から2番目)、およびbH1-44-HC-R50A+R58A(A：上から2番目；B：下)との間の結合相互作用についての代表的な時間に対する反応のプロットのオーバーレイを示す。トレースは、同じ固定したCM5チップへの結合を表す。このチップは各Fab実行の後に再生した。VEGFへのbH1-44-LC-I29A+Y32Aについて、または、0.5 μMのHER2へのbH1-44-HC-R50A+R58Aについて、結合は検出されなかった。変異体bH1-44-Y32Aは、野生型bH1-44と比較してVEGFへの結合の有意な減弱を表した。

【図64A-D】bH1の結晶構造上のbH1-44の特異性を決定している残基のマッピングを示す。VEGF結合に重要な残基(LC-I29およびLC-Y32：AおよびB)、及びHER2結合に重要な残基(HC-R50およびHC-R58；CおよびD)を、bH1/VEGF(AおよびC、2.6 Å分解能)又はbH1/HER2(BおよびD、2.9 Å分解能)結晶構造上に棒状の濃い灰色で示す。残基I29およびY32は、VEGF-結合に必要なCDR-L1ループ立体構造を維持するように働く鎖内相互作用に伴うようである。I29は、HER2構造において溶媒に露出される。Y32は、HER2に対してパックするが、生産的な抗原接触には係わらない。R50およびR58は、HER2上のD560およびE558に対してパックし、電荷-電荷相互作用に係わるようである。R50およびR58は、VEGF溶媒構造において溶媒に露出する溶媒である。

【図65】ハーセプチン(登録商標)変異体Fab(R50A、R58AおよびR50A/R58A)の発現を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

(本発明の詳細な説明)

本発明は、多重特異性抗体および抗体断片の製造方法、並びにこれら方法を用いて同定した抗体及びその方法を提供する。通常、本発明の方法は、ライブラリにおいて安定して発現されうる変異体を生成するために、抗体の軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインを

10

20

30

40

50

多様化することを伴う。次いで、2つのエピトープを特異的に結合することができる多様化された抗体をこのライブラリから選択し、さらに特徴付けする。

【0027】

本発明の方法を用いて同定された例示的な抗体には、HER2(ヒト上皮性増殖因子レセプター2)及びVEGF(血管内皮性増殖因子)の両方を結合する抗体が含まれる。特に、本明細書中、例えば以下の実施例に記載のデータは、HER2抗体の軽鎖相補性決定領域(CDR)内の突然変異がHER2だけでなく関係のないタンパク質抗原についての二重結合能を与えることを示す。ある二重特異性高親和性HER2/VEGF抗体は、広く特徴付けされる。更に、HER2及びVEGFと複合体化したこの二重特異性Fabの結晶構造を示し、突然変異誘発によるFab残基のエネルギー的な貢献を評価する。2つの抗原のための結合部位は広く重なっており、HER2と接触するCDR残基の大部分はVEGFを係合する。しかしながら、エネルギー的に、重鎖の残基はHER2特性に影響するのに対して、軽鎖はVEGF特異性に影響する。

10

HER2/VEGF二重特異性抗体は、インビトロ及びインビボで、HER2およびVEGFの両方が媒介する細胞増殖を阻害する。これらの結果は、抗体の軽鎖可変ドメインの配列を変更することにより、二重特異性及び機能を有する抗体を生成することができることを示す。例えば、bH1-44およびbH1-81は、HER2が媒介する腫瘍細胞増殖とVEGFが媒介する腫瘍血管形成といった、腫瘍発達の2つのメカニズムをターゲットとする可能性がある。単一の抗体によって2つの抗原を同時に標的とすることは、併用療法の変形例である。

20

【0028】

I. 定義

「多重特異性抗体」なる用語は最も広義に用いられ、重鎖可変ドメイン(VH)および軽鎖可変ドメイン(VL)を含む抗体を特別に包含する。このVHVLユニットはポリエピトープ性特異性を有する(すなわち、1つの生体分子上の2つの異なるエピトープ又は異なる生体分子上の各エピトープに結合することが可能である)。このような多重特異性抗体には、完全長抗体、2以上のVLおよびVHドメインを有する抗体、Fab、Fv、dsFv、scFv、ダイアボディ、二重特異性ダイアボディおよびトリアボディのような抗体断片、共有結合又は非共有結合して連結されている抗体断片を含むが、これらに限定されない。「ポリエピトープ性特異性」は、同じ又は異なる標的(一又は複数)上の2以上の異なるエピトープに特異的に結合する能力を指す。「単一特異性」は、1つのエピトープにのみ結合する能力を指す。ある実施態様によると、多重特異性抗体は、5 µMから0.001 pM、3 µMから0.001 pM、1 µMから0.001 pM、0.5 µMから0.001 pM、又は0.1 µMから0.001 pMの親和性で、各々のエピトープに結合するIgG1型である。

30

【0029】

基本的な4-鎖抗体ユニットは2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体の糖タンパクである(IgM抗体は、基本的なヘテロ四量体ユニットとそれに付随するJ鎖と称される付加的なポリペプチドの5つからなり、よって10の抗原結合部位を有するが、分泌されたIgA抗体は重合して、基本的4-鎖ユニットとそれ付随するJ鎖のうち2-5つを含む多価集合を形成可能である)。IgGの場合、4-鎖ユニットは一般的に約150000ダルトンである。それぞれのL鎖は1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に結合するが、2つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により互いに結合している。それぞれのH及びL鎖はまた規則的な間隔を持った鎖内ジスルフィド結合を持つ。それぞれのH鎖は、α及びγ鎖の各々に対しては3つの定常ドメイン(C_H)が、μ及びεアイソタイプに対しては4つのC_Hドメインが続く可変ドメイン(V_H)をN末端に有する。それぞれのL鎖は、その他端に定常ドメイン(C_L)が続く可変ドメイン(V_L)をN末端に有する。V_LはV_Hと整列し、C_Lは重鎖の第一定常ドメイン(C_{H1})と整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。V_LとV_Hは共同して対になって、単一

40

50

の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性は、例えばBasic and Clinical Immunology, 8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁及び6章を参照のこと。

任意の脊椎動物種からのL鎖には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる2つの明確に区別される型の一つを割り当てることができる。また、その重鎖の定常ドメイン(C_H)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンには異なったクラス又はアイソタイプを割り当てることができる。IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMという免疫グロブリンの5つの主要なクラスがあり、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ と呼ばれる重鎖を有する。さらに γ 及び α のクラスは、 C_H 配列及び機能等の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えば、ヒトにおいては次のサブクラス：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2が発現する。

【0030】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部分が抗体の間で配列が広範囲に異なることを意味する。Vドメインは抗原結合性を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定める。しかし、可変性は可変ドメインの110-アミノ酸スパンを通して均等には分布されていない。代わりに、V領域は、それぞれ9-12アミノ酸長である「高頻度可変領域」と称される極度の可変性を有するより短い領域によって分離された15-30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不变の伸展からなる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメイン各々は、大きな β -シート配置をとり、3つの高頻度可変領域により接続された4つのFR領域を含み、それはループ状の接続を形成し、 β -シート構造の一部を形成することもある。各鎖の高頻度可変領域はFRにより他の鎖からの高頻度可変領域とともに極近傍に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ED. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接は関係ないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害(ADCC)における抗体の寄与を示す。

ここで使用される「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。高頻度可変領域は、一般に、「相補性決定領域」又は「CDR」由来のアミノ酸残基(例えば、VLの概ね残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)周辺と、VHの概ね31-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3); Kabatら、Sequences of Protein of Immunological Interest, 第5版、Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))、及び／又は「高頻度可変ループ」由来のそれらの残基(例えば、VLの残基26-32(L1)、50-51(L2)及び91-96(L3)と、VHの26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3); Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))とを含む。

【0031】

「フレームワーク領域」(FR)は、CDR残基以外の可変ドメイン残基である。各可変ドメインは、一般的にFR1、FR2、FR3およびFR4と同定される4つのFRを持つ。CDRがカバットの定義に従うならば、軽鎖FR残基は残基およそ1-23(LCFR1)、35-49(LCFR2)、57-88(LCFR3)および98-107(LCFR4)に位置し、重鎖FR残基は重鎖残基の残基1-30(HCFR1)、36-49(HCFR2)、66-94(HCFR3)および103-113(HCFR4)に位置する。CDRが高頻度可変ループからのアミノ酸残基を含むならば、軽鎖FR残基は軽鎖の残基1-25(LCFR1)、33-49(LCFR2)、53-90(LCFR3)および97-107(LCFR4)に位置し、重鎖FR残基は重鎖残基の残基1-25(HCFR1)、33-52(HCFR2)、56-95(HCFR3)および102-113(HCFR4)に位置する。場合によって、CDRがカバットの定義によるCDRと高頻度可変ループのものの両方からのアミノ酸を含む場合、FR残基はそれに応じて調節されるであろう。例えば、CDRH1がアミノ酸H26-H35を含む場合、重鎖F

R 1 残基は位置 1 - 2 5 にあり、F R 2 残基は位置 3 6 - 4 9 にある。

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリン V L 又は V H フレームワーク配列の選別において最も共通して生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリン V L 又は V H 配列の選別は、可変ドメイン配列のサブグループから行う。一般に、配列のサブグループはカバットによるサブグループである。一実施態様では、V L について、サブグループはカバットによるサブグループ κ I である。一実施態様では、V H について、サブグループはカバットによるサブグループ I I I である。

【0032】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、一般に少量で存在する突然変異等の、モノクローナル抗体の産生の間に生じる可能性のある突然変異を除いて、実質的に同一であり、同じエピトープ(一又は複数)に結合する。このようなモノクローナル抗体は、一般に、標的を結合する可変領域を含む抗体を包含しており、この抗体は、複数の抗体からの抗体の選択を含むプロセスによって得られたものである。例えば、この選択プロセスは、複数のクローン、例えばハイブリドーマクローン、ファージクローン又は組換え DNA クローンのプールからの、特定のクローンの選択であり得る。選択された抗体を更に変更することにより、例えば標的に対する親和性を向上させる、抗体をヒト化する、細胞培養液中でのその産生を向上させる、インビボでのその免疫原性を低減する、多重特異性抗体を作製する等が可能であること、並びに、変更した可変領域配列を含む抗体も本発明のモノクローナル抗体であることを理解されたい。その特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、通常他の免疫グロブリンと混同していない点で有利である。

「モノクローナル」との修飾詞は、ほぼ均一な抗体の集団から得られるという抗体の特徴を示し、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は様々な技術によって作ることができ、それらの技術には例えばハイブリドーマ法(例えば、Kohler等、Nature, 256:495 (1975); Harlow等、Antibodies: A laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版 1988); Hammerling等: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981))、組換え DNA 法(例えば、米国特許第4816567号参照)、ファージディスプレイ法(例えば、Clarkson等、Nature, 352:624-628 (1991); Marks等、J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Sidhu等、J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee等、J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); 及びLee等、J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)参照)、及びヒト免疫グロブリン座位又はヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の一部又は全部を有する動物からのヒト又はヒト様抗体を産生する技術(例えば、WO1998/24893; WO1996/34096; WO1996/33735; WO1991/10741; Jakobovits等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits等、Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann等、Year in Immuno., 7:33 (1993); 米国特許第5545806号; 同第5569825号; 同第5591669号(全てGenPharm); 同第5545807号; WO1997/17852; 米国特許第5545807号; 同第5545806号; 同第5569825号; 同第5625126号; 同第5633425号; 及び同第5661016号; 及びMarks等、Bio/Technology, 10:779-783 (1992); Longerg等、Nature, 368:856-859 (1994); Morrison, Nature, 368:812-813 (1994); Fishwild等、Nature Biotechnology, 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14:826 (1996); 及びLongerg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995))が含まれる。

【0033】

「インタクト」の抗体は、抗原-結合部位、並びに C_L 及び少なくとも重鎖定常ドメイン、C_H 1、C_H 2 及び C_H 3 を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそれらのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、無傷の抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、F a b、F a b'、F(a b')₂、及び F v 断片; ダイアボディ(

10

20

30

40

50

diabodies)；直鎖状抗体（米国特許第5641870号、実施例2；Zapata等，Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]）；単鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

「線形抗体」という表現は、Zapata等，Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)に記載された抗体を意味する。簡単に言えば、これら抗体は、相補的な軽鎖ポリペプチドと共に抗原結合領域の対を形成する一对の直列のFdセグメント(VH-CH1-VH-CH1)を含む。直鎖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。

【0034】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して命名された残りの「Fc」断片を産生する。Fab断片は全長L鎖とH鎖の可変領域ドメイン(V_H)、及び一つの重鎖の第一定常ドメイン(C_H1)からなる。抗体のペプシン処理により、単一の大きなF(ab')₂断片が生じ、これは2価の抗原結合部位を持つ2つのジスルフィド結合されたFab断片にほぼ対応し、抗原を交差結合させることができるものである。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含むC_H1ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりFab断片と相違する。Fab'-SHは、ここでは定常ドメインのシステイン残基(類)が遊離のチオール基を持つFab'を表す。F(ab')₂抗体断片は、通常はFab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

Fc断片はジスルフィドにより一緒に保持されている双方のH鎖のカルボキシ末端部位を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc領域の配列により決定され、その領域は、所定の型の細胞に見出されるFcレセプター(FcR)によって認識される部位である。

【0035】

「Fv」は、完全な抗原-認識及び-結合部位を含む最小の抗体断片である。この断片は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。これら2つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する6つの高頻度可変ループ(H及びL鎖から、それぞれ3つのループ)が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなるFvの半分)でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

「sFv」又は「scFv」とも略称される「単鎖Fv」は、単一のポリペプチド鎖内に結合したV_H及びV_L抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、sFvポリペプチドはV_H及びV_Lドメイン間にポリペプチドリンカーをさらに含み、それはsFvが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。sFvの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)；Borrebaeck 1995, 以下を参照のこと。

「ダイアボディ(diabodies)」という用語は、鎖間ではなく鎖内でVドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち2つの抗原-結合部位を有する断片が得られるように、V_HとV_Lドメインとの間に、短いリンカー(約5-10残基)を持つsFv断片(前の段落を参照)を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは2つの「交差」sFv断片のヘテロダイマーであり、そこでは2つの抗体のV_H及びV_Lドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号；国際公開93/11161号；及びHollinger等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により十分に記載されている。

【0036】

非ヒト(例えば齧歯類)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト抗体から得られた最小配列を含むキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類のような所望の抗体特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免

疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのFRがヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、状況に応じて免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525(1986); Riechmann等, Nature 332, 323-329(1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照のこと。

10

【0037】

本明細書で使われるように、「コドンセット」は所望の変異体アミノ酸をコードするのに用いられる、一組の異なるヌクレオチドトリプレット配列を指す。一組のオリゴヌクレオチドは、コドンセットによって提供されるヌクレオチドトリプレットの可能な組合せのすべてを表す配列であって所望のアミノ酸群をコードする配列を含み、例えば固相法によって合成することができる。標準的なコドン指定形式はIUBコードのものであり、このコードは当技術分野で公知であり本明細書で記載されている。コドンセットは、一般的に、イタリック体の3文字、例えばNNK、NNS、XYZ、DVKなどで表される(例えば、NNKコドンは、コドンの位置1及び位置2ではN=A/T/G/Cであり、位置3ではK=G/T(等モル比)であることを示し、20すべての天然のアミノ酸をコードする)。ゆえに、本明細書中で用いられる「非ランダムコドンセット」とは、ここに記載のアミノ酸選別の基準を部分的、好ましくは完全に満たす選択アミノ酸をコードするコドンセットを指す。ある位置の選択されたヌクレオチド「縮重」によるオリゴヌクレオチドの合成は当技術分野で公知であり、例えば、TRIM手法が知られている(Knappek et al., J. Mol. Biol. 296:57-86, 1999); Garrard and Henner, Gene 128:103, 1993)。そのようなある種のコドンセットを有するオリゴヌクレオチドのセットは、市販の核酸シンセサイザー(Applied Biosystems, Foster City, CAなどから入手可能)を使って合成することができ、または市販品を入手することができる(例えば、Life Technologies, Rockville, MDから)。したがって、特定のコドンセットを有する合成オリゴヌクレオチドセットは、一般的に異なる配列の複数のオリゴヌクレオチドを含み、この相違は配列全体の中の

20

30

【0038】

対象の抗原を「結合する」本発明の抗体は、抗体が抗原を発現するタンパク質、細胞ないし組織を標的とした治療薬及び/又は診断剤として有用となるように十分な親和性を有して抗原を結合するものである。このような実施態様では、「非標的」タンパク質に対する抗体の結合範囲は、蛍光活性化細胞分類(FACS)分析又は放射性免疫沈降法(RIA)又はELISAにより決定した場合、その特定の標的タンパク質に対する抗体の結合の約10%未満である。標的分子への抗体の結合に関して、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープに対する「特異的結合」又は「に特異的に結合する」又は「に特異的な」といった用語は、非特異的な相互作用とは測定可能な差異を有する結合を意味する(例えば、bH1-44又はbH1-81では、非特異的な相互作用は、ウシ血清アルブミン、カゼイン、ウシ胎児血清又はニューロアビジンへの結合である)。特異的結合は、例えば、コントロール分子の結合と比較して分子の結合を決定することにより測定することができる。例えば、特異的結合は、標的、例えば標識していない過剰な量の標的に類似したコントロール分子との競合により決定することができる。この場合、プローブに対する標識した標的の結合が、標識していない過剰な量の標的により競合的に阻害された場合、特異的結合が示される。ここで用いる特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープに対する「特異的結合」又は「に特異的に結合する」又は「に特異

40

50

的である」といった用語は、例えば、少なくともおよそ200 nM、あるいは少なくともおよそ150 nM、あるいは少なくともおよそ100 nM、あるいは少なくともおよそ60 nM、あるいは少なくともおよそ50 nM、あるいは少なくともおよそ40 nM、あるいは少なくともおよそ30 nM、あるいは少なくともおよそ20 nM、あるいは少なくともおよそ10 nM、あるいは少なくともおよそ8 nM、あるいは少なくともおよそ6 nM、あるいは少なくともおよそ4 nM、あるいは少なくともおよそ2 nM、あるいは少なくともおよそ1 nM又はそれ以上の対標的Kdを有する分子によって提示されうる。一実施態様では、「特異的な結合」なる用語は、分子が他のいかなるポリペプチド又はポリペプチドエピトープに実質的に結合しないで特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープに結合する結合を指す。

10

【0039】

一般的に「結合親和性」は、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)との間の非共有結合的な相互作用の総合的な強度を意味する。特に明記しない限り、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば抗体と抗原)間の1:1相互作用を反映する内因性結合親和性を意味する。一般的に、分子XのそのパートナーYに対する親和性は、解離定数(Kd)として表される。望ましくは、Kdは、200 nM、150 nM、100 nM、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、8 nM、6 nM、4 nM、2 nM、1 nM又はそれ以上の強さである。およそ親和性は、本明細書中に記載のものを含む当業者に公知の共通した方法によって測定することができる。低親和性抗体は抗原にゆっくり結合して素早く解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は抗原により密接により長く結合したままとなる。結合親和性の様々な測定方法が当分野で公知であり、それらの何れかを本発明のために用いることができる。

20

【0040】

一実施態様では、本発明の「Kd」又は「Kd値」は、およそ10反応単位(RU)の固定した抗原CM5チップを用いて25℃のBIAcore™-2000又はBIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)にて表面プラズモン共鳴アッセイを行ってKd又はKd値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシニミド(NHS)で活性化した。抗原を10 mM 酢酸ナトリウム(pH 4.8)で5 µg/ml(〜0.2 µM)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(RU)がおよそ10になるように5 µl/分の流速で注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために1 Mのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2倍の段階希釈したFab(0.78 nMから500 nM)を25℃、およそ25 µl/分の流速で0.05% Tween 20(PBST)を含むPBSに注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度(K_{on})と解離速度(K_{off})を算出した。平衡解離定数(Kd)を K_{off}/K_{on} 比として算出した。例として、Chen, Y.,ら, (1999) J. Mol Biol 293:865-881を参照。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 M^{-1} S^{-1}$ を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBS(pH 7.2)、25℃の、20 nMの抗抗原抗体(Fab型)の蛍光放出強度(励起=295 nm; 放出=340 nm、帯域通過=16 nm)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

30

40

【0041】

また、本発明の「結合速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「 k_{on} 」は、〜10反応単位(RU)の固定した抗原CM5チップを用いて25℃のBIAcore™-2000又はBIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いた前述と同じ表面プラズモン共鳴アッセイにて測定される。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセン

50

サーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシニミド(NHS)で活性化した。抗原を10 mM 酢酸ナトリウム(pH 4.8)で5 µg/ml(およそ0.2 µM)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(RU)がおよそ10になるように5 µl/分の流速で注入した。その後、反応しない群をブロックするために1 Mのエタノールアミンを注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために1 Mのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2倍の段階希釈したFab(0.78 nMから500 nM)を25℃、およそ25 µl/分の流速で0.05% Tween 20(PBS T)を含むPBSに注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度(K_{on})と解離速度(K_{off})を算出した。平衡解離定数(K_d)を K_{off}/K_{on} 比として算出した。例として、Chen, Y., ら, (1999) J. Mol Biol 293:865-881を参照。しかし、上記の表面プラスモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 M^{-1} S^{-1}$ を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBS(pH 7.2)、25℃の、20 nMの抗抗原抗体(Fab型)の蛍光放出強度(励起=295 nm; 放出=340 nm、帯域通過=16 nm)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定するのが好ましい。

10

20

【0042】

本発明のポリペプチドに関して「生物学的に活性な」および「生物学的活性」および「生物学的特徴」は、特段の記載がない限り、生物各的な分子に結合する能力を有することを意味する。

「生物学的分子」は、核酸、タンパク質、糖質、脂質およびこれらの組合せを指す。一実施態様では、生物学的分子は天然に存在する。

【0043】

「単離された」とは、ここで開示された種々の抗体を記述するために使用するときには、発現した細胞又は細胞培養物から同定され分離され及び/又は回収された抗体を意味する。その自然環境の混入成分とは、ポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、(1)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、N末端あるいは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性が得られるように十分なほど精製される。ポリペプチドの自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも1つの精製工程により調製される。

30

【0044】

「コントロール配列」なる用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

40

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列或いは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合しているか、プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合しているか、又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合

50

している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接して読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプター或いはリンカーが使用される。

【0045】

ここで同定されるポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、比較するポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作成され、ソースコードは米国著作権庁、Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、South San Francisco, Californiaを通して公的に入手可能である。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0046】

ここに記載するアミノ酸配列は、特に明記しない限り隣接するアミノ酸配列である。

本発明による「構造的に非類似の」生物学的分子は、同じクラス内にない生物学的分子(タンパク質、核酸、脂質、糖質など)を指すか、例えば、タンパク質を指す場合、互いに比較して60%未満のアミノ酸同一性、50%未満のアミノ酸同一性、40%未満のアミノ酸同一性、30%未満のアミノ酸同一性、20%未満のアミノ酸同一性又は10%未満のアミノ酸同一性を有する。

【0047】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングに必要な温度が高くなり、プローブが短くなるとそれに必要な温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補鎖がその融点より低い環境に存在する場合に、変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション配列の間で所望される同一性の程度が高くなればなるほど、用いることができる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をよりストリンジェントにすることになり、低い温度はストリンジェントを低下させることになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーの更なる詳細及び説明については、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biology(Wiley Interscience Publishers, 2003)を参照のこと。

【0048】

ここで定義される「ストリンジェントな条件」又は「高度なストリンジェンシー条件」は、(1)洗浄に低イオン強度及び高温度を用いる、例えば、50℃で、0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウム；(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤を用いる、例えば、42℃で、50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー

、及び750 mMの塩化ナトリウム、75 mMクエン酸ナトリウム；又は(3)42℃で、50%ホルムアミド、5×SSC(0.75 MのNaCl、0.075 Mのクエン酸ナトリウム)、50 mMのリン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハード液、超音波処理サケ精子DNA(50 µg/ml)、0.1%SDS、及び10%の硫酸デキストラン溶液を用いた溶液中で終夜ハイブリダイズさせ、42℃の0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)にて10回洗浄し、ついで55℃で、EDTAを含む0.1×SSCからなる高ストリンジェンシー洗浄を10回行うものによって同定される。

「中程度のストリンジェント条件」は、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989)に記載されているように同定され、上記のものよりも低いストリンジェントの洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件を使用する。中程度のストリンジェント条件の例は、20%ホルムアミド、5×SSC(150 mMのNaCl、15 mMのクエン酸三ナトリウム)、50 mMリン酸ナトリウム(pH 7.6)、5×デンハード液、10%硫酸デキストラン、及び20 mg/mlの変性切断サケ精子DNAを含む溶液中にて37℃で終夜インキュベーションし、次いで1×SSC中にて約37-50℃でフィルターを洗浄することを含む。当業者であれば、プローブ長などの因子に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかは理解されるであろう。

【0049】

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域(天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域)に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞障害；Fcレセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)；貪食作用；細胞表面レセプター(例えば、B細胞レセプター)のダウンレギュレーション；及びB細胞活性化が含まれる。

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「ADCC」とは、ある種の細胞障害細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球及びマクロファージ)上に存在するFcレセプター(FcRs)と結合した分泌Igにより、これらの細胞障害エフェクター細胞が抗原-担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞障害性の形態を意味する。抗体は細胞障害細胞を「備えて」おり、これはこのような死滅には絶対に必要なものである。ADCCを媒介する主要な細胞NK細胞はFcγRIIIのみを発現するのに対し、単球はFcγRI、FcγRII及びFcγRIIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5500362号又は同第5821337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー細胞(NK細胞)が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、対象の分子のADCC活性は、例えば、Clynes等、PNAS (USA) 95:652-656 (1998)において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

【0050】

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記載するものである。好適なFcRは天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、IgG抗体(ガンマレセプター)と結合するもので、FcγRI、FcγRII及びFcγRIIIサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。FcγRIIIレセプターには、FcγRIIIA(「活性型レセプター」)及びFcγRIIIB(「阻害型レセプター」)が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターFcγRIIIAは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)を含んでいる。阻害型レセプターFcγRIIIBは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性

10

20

30

40

50

モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif ; I T I M)を含んでいる(Daeron, Annu. Rev. immunol. 15:203-234 (1997)を参照)。FcRsに関しては、Ravetch and Kinet, Annu.Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, J.Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995) に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のFcRsはここでの「FcR」という言葉によって包含される。また、該用語には、母性IgGの胎児への移送を担い(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim等, J. Immunol.24:249 (1994))、免疫グロブリンのホメオスタシスを調節する新生児性レセプターFcRnも含まれる。

【0051】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数のFcRsを発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。その細胞が少なくともFcγRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行することが望ましい。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞障害性T細胞及び好中球が含まれるが、PBMCとNK細胞が好適である。エフェクター細胞は天然源、例えば血液から単離してもよい。

10

「補体依存性細胞障害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系(C1q)の第1補体が、同族抗原と結合した(適切なサブクラスの)抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。

20

【0052】

「治療の有効量」なる用語は、対象の疾患又は疾病を治療するための抗体または抗体断片の量を指す。腫瘍(例えば癌性腫瘍)の場合は、治療の有効量の抗体ないし抗体断片(例えばHER2及びVEGFを特異的に結合する多重特異性抗体ないし抗体断片)は、癌細胞の数を減少させる、腫瘍の大きさを小さくする、癌細胞の周辺器官への浸潤を阻害する(すなわち、ある程度に遅く、好ましくは止める)、腫瘍の転移を阻害する(すなわち、ある程度遅く、好ましくは止める)、腫瘍の成長をある程度阻害する、及び／又は疾患に関連する一又は複数の症状をある程度和らげうる。ある程度、抗体ないし抗体断片は、成長を妨げ及び／又は現存の癌細胞を殺し得、細胞分裂停止性及び／又は細胞障害性である。癌治療に対しては、インビボにおける効力は、例えば生存期間、病状の進行時間(TTP)

30

、応答速度(RR)、応答期間、及び／又は生活の質の測定により測定される。

「低減する又は阻害する」とは、概して好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、最も好ましくは75%、85%、90%、95%又はそれ以上の減少を引き起こす能力を指す。低減する又は阻害するとは、治療する疾患の症状、転移の存在又は大きさ、原発腫瘍のサイズ、又は血管形成性疾患の血管の大きさ又は数を指しうる。

【0053】

「癌」及び「癌性」なる用語は、典型的には調節されない細胞の成長／増殖を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。良性及び悪性の癌は、この定義に含まれる。癌の例には、これらに限定するものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病が含まれる。このような癌のより具体的な例には、扁平細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞性癌、胃腸癌を含む胃(gastric及びstomach)癌、膵癌、神経膠芽腫、膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝腫瘍、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮癌腫、唾液腺癌腫、腎臓癌(例えば、腎臓細胞癌腫)、肝癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門部の癌腫、陰茎癌腫、メラノーマ、及び様々な種類の頭頸部癌が含まれる。

40

「初期段階の癌」は、浸潤性でも転移性でもなく、又はステージ0、I又はIIの癌として分類される癌を意味する。

「前癌性」なる用語は、典型的に癌に進行する又は癌に発達する症状ないし成長を指す。

「非転移性」とは、良性である癌、又は原発部位に止まり、リンパ管や血管系ないしは

50

原発部位以外の組織に浸透しない癌を意味する。一般的に、非転移性癌は、ステージ 0、I 又は II の癌、場合によってステージ III の癌のいずれかの癌である。

【0054】

「HER2 の異常な活性化を伴う非悪性疾患又は障害」は、疾患ないし障害を有するか又はその素因がある被検体の細胞又は組織において HER2 の異常な活性化が生じている癌を伴っていない症状である。このような疾患又は障害の例には、自己免疫性疾患(例えば乾癬)(下記の定義を参照)；子宮内膜症；強皮症；再狭窄；大腸ポリープ、鼻ポリープ又は胃腸ポリープといったポリープ；線維腺腫；呼吸器疾患(例として、慢性気管支炎、急性の喘息およびアレルギー性喘息を含む喘息、嚢胞性線維症、気管支拡張症、アレルギー性又は他の鼻炎又は副鼻腔炎、 $\alpha 1$ -抗トリプシン欠乏症、咳、肺気腫、肺線維症又は過剰反応性の気道、慢性閉塞性肺性疾患、及び慢性閉塞性肺疾患)；胆嚢炎；神経線維腫症；多発性嚢胞腎；炎症性疾患；乾癬および皮膚炎を含む皮膚疾患；血管系疾患；血管性上皮細胞の異常な増殖を伴う状態；胃腸潰瘍；メネトリエ病、分泌腺腫又はタンパク質喪失症候群；腎臓疾患；血管形成性疾患；眼性疾患、例えば加齢性黄斑変性症、推定眼ヒストプラスマ症候群、増殖性糖尿病性網膜症由来の網膜血管新生、網膜脈管形成、糖尿病性網膜症又は加齢性黄斑変性；骨関連症、例えば骨関節炎、くる病および骨粗鬆症；大脳虚血発症後の損傷；線維性又は浮腫性疾患、例えば熱傷、外傷、放射線、脳卒中、低酸素又は乏血後の肝硬変、肺線維症、サルコイドーシス、甲状腺炎、全身過粘稠度症候群、オスラー・ランデュ・ウェーバー病、慢性閉塞性肺疾患又は浮腫；皮膚の過敏性反応；糖尿病性網膜症および糖尿病性ネフロパシ；ギラン・バレー症候群；移植片対宿主病又は移植拒絶反応；パジェット病；骨又は関節の炎症；光老化(例えば、ヒトの皮膚の UV 照射によって生じる)；良性前立腺肥大；アデノウイルス、ハンタウイルス、ボレリア・ブルグドルフェリ、エルシニア菌種およびボルデテラペルツシスから選択される微生物病原体を含む特定の微生物感染；血小板凝集によって生じる血栓；生殖系状態、例えば子宮内膜症、卵巣の過刺激症候群、子癇前症、機能障害性子宮出血又は機能性子宮出血；関節滑膜炎；アテローム；急性及び慢性のネフロパシ(増殖性糸球体腎炎および糖尿病性腎疾患を含む)；湿疹；肥大型癬痕形成；エンドトキシンショックおよび真菌感染；家族性腺腫性ポリープ症；神経変性疾患(例えばアルツハイマー病、AIDS 関連痴呆、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎、脊髄筋萎縮および小脳変性)；骨髄形成異常症候群；無形成性貧血；虚血性傷害；肺、腎臓又は肝臓の線維形成；T 細胞が媒介する過敏性症候群；乳幼児肥大型先天性幽門閉塞；泌尿器閉塞性症候群；乾癬の関節炎；及び橋本甲状腺炎が含まれる。

【0055】

本明細書中の「自己免疫疾患」は、個体の自己組織又は同時分離又はその徴候又は結果として生じるその症状に対する及びそれらから生じる疾患又は症状である。自己免疫疾患又は症状の例として、限定するものではないが、関節炎(関節リウマチ(例えば急性の関節炎、慢性の関節リウマチ、痛風性関節炎、急性の痛風性関節炎、慢性炎症性関節炎、変形性関節症、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬の関節炎、椎骨関節炎及び若年性発症関節リウマチ、骨関節炎、関節炎慢性化、関節炎変形、関節炎慢性原発、反応性関節炎、及び強直性脊椎炎)、炎症性過剰増殖性皮膚病、乾癬、例えばプラーク乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬及び爪乾癬)、皮膚炎、例として接触皮膚炎、慢性接触皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、ヘルペス状の皮膚炎、貨幣状皮膚炎、脂漏性皮膚炎、非特異的皮膚炎、一次刺激物接触皮膚炎及び過敏性皮膚炎、X 連鎖性過剰 IgM 症候群、蕁麻疹、例えば慢性アレルギー性蕁麻疹及び慢性特発性蕁麻疹、例として慢性自己免疫蕁麻疹、多発性筋炎／皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性上皮性表皮壊死症、強皮症(全身強皮症を含む)、硬化症、例えば全身性硬化症、多発性硬化症(MS)、例えば脊椎-眼(spino-optical) MS)、一次進行性 MS (PPMS) 及び再発性寛解 MS (RRMS)、進行性全身性硬化症、アテローム性動脈硬化、動脈硬化症、硬化症汎発、失調性硬化症、炎症性腸疾患 (IBD) (例えばクローン病、自己免疫性胃腸疾患、大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎、大腸性潰瘍、微細な大腸炎、膠原性大腸炎、大腸ポリープ、壊死性全腸炎及び

経壁の大腸炎、及び自己免疫炎症性腸疾患)、膿皮症壊疽、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、上強膜炎、呼吸窮迫症候群、例として成人性又は急性の呼吸窮迫症候群(A R D S)、髄膜炎、葡萄膜の全部又は一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫血液疾患、リウマチ様脊椎炎、リウマチ様関節滑膜炎、突発性聴力障害、I g E媒介性疾患、例えばアナフィラキシー及びアレルギー性鼻炎及びアトピー性鼻炎、脳炎、例えばラスマッセンの脳炎及び辺縁及び／又は脳幹脳炎、ブドウ膜炎、例として、前部ブドウ膜炎、急性前ブドウ膜炎、肉芽腫ブドウ膜炎、非顆粒性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎又は自己免疫ブドウ膜炎、ネフローゼ症候群を有する又は有さない糸球体腎炎(G N)、例として、慢性又は急性の糸球体腎炎、例として原発性G N、免疫性G N、膜性G N(膜性ネフロパシ)、特発性膜性G N又は特発性膜性ネフロパシ、膜又は膜性増殖性G N(M P G N)(タイプI及びタイプI Iを含む)、急速進行性G N、アレルギー性症状、アレルギー性反応、湿疹、例としてアレルギー性又はアトピー性湿疹、喘息、例えば喘息気管支炎、気管支喘息及び自己免疫喘息、T細胞の浸潤を伴う症状及び慢性炎症反応、慢性肺炎症性疾患、自己免疫心筋炎、白血球粘着力欠損、全身性エリテマトーデス(S L E)又は全身性ループスエリテマトーデス、例えば皮膚S L E、亜急性の皮膚S L E、新生児期ループス症候群(N L E)、紅斑性狼瘡汎発、ループス(例としてループス腎炎、ループス脳炎、小児ループス、非腎性ループス、腎外ループス、円板状ループス、脱毛症ループス)、若年性開始型(I型)真正糖尿病、例として小児インシュリン依存性真正糖尿病(I D D M)、成人発症型真正糖尿病(I I型糖尿病)、自己免疫性糖尿病、特発性の尿崩症、サイトカイン及びTリンパ球によって媒介される急性及び遅発性過敏症と関係する免疫応答、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、例としてリンパ腫肉芽腫症、ヴェゲナーの肉芽腫症、無顆粒球症、脈管炎、例として血管炎、大血管性血管炎(例えば大脈管脈管炎(リウマチ性多発性筋痛及び巨細胞(高安)動脈炎を含む)、中脈管脈管炎(川崎病及び結節性多発動脈炎を含む)、微小多発動脈炎、C N S脈管炎、壊死性血管炎、皮膚性血管炎又は過敏性血管炎、全身性壊死性血管炎、及びA N C A関連の脈管炎、例としてチャージ-ストラウス脈管炎又は症候群(C S S))、側頭動脈炎、無形成性貧血、自己免疫無形成性貧血、クームズ陽性貧血症、ダイヤモンドブラックファン貧血症、溶血性貧血又は免疫溶血性貧血、例として自己免疫溶血性貧血(A I H A)、悪性貧血(貧血症悪性熱)、アジソン病、純粋な赤血球貧血症又は形成不全(P R C A)、第VIII因子欠損症、血友病A、自己免疫好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球血管外遊出を伴う疾患、C N S炎症性疾患、多器官損傷症候群、例えば敗血症、外傷又は出血の二次症状、抗原-抗体複合体関連疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット又はベーチェット病、カールスマン症候群、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンスジョンソン症候群、類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡及び類天疱瘡皮膚、天疱瘡(尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、ペンフィグス粘液膜類天疱瘡及び天疱瘡エリテマトーデスを含む)、自己免疫多腺性内分泌障害、ライター病又は症候群、免疫複合体腎炎、抗体媒介性腎炎、視神経脊髄炎、多発性神経炎、慢性神経障害、例えばI g M多発性神経炎又はI g M媒介性神経障害、血小板減少(例えば心筋梗塞患者によるもの)、例えば血栓性血小板減少性紫斑病(T T P)、及び自己免疫性又は免疫媒介性血小板減少、例えば慢性及び急性のI T Pを含む特発性血小板減少性紫斑病(I T P)、自己免疫性精巣炎及び卵巣炎を含む精巣及び卵巣の自己免疫性疾患、一次甲状腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、自己免疫内分泌性疾患、例えば甲状腺炎、例えば自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)又は亜急性の甲状腺炎、自己免疫甲状腺性疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブ病、自己免疫多腺性症候群、例として多腺性症候群(又は、多腺性内分泌障害症候群)、腫瘍随伴症候群、例として神経系新生物関連症候群、例えばランバート-イートン筋無力症候群又はイートン-ランバート症候群、スティッフマン又はスティッフマン症候群、脳脊髄炎、例として、アレルギー性脳脊髄炎又は脳脊髄炎性アレルギー及び実験的アレルギー性脳脊髄炎(E A E)、重症筋無力症、例えば胸腺腫関連の重症筋無力症、小脳性退化、神経ミオトニ、眼球クローヌス又は眼球クローヌス筋硬直症候群(O M S)及び感覚系神経障害、多病巣性運動神経障害、シーハン症候群、自己

10

20

30

40

50

免疫肝炎、慢性肝炎、類狼瘡肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動性肝炎又は自己免疫慢性活動性肝炎、リンパ系間隙間質性肺炎(L I P)、閉塞性細気管支炎(非移植)対N S I P、ギラン・バレー症候群、ベルガー病(I g Aネフロパシ)、特発性I g Aネフロパシ、線状I g A皮膚病、原発性胆管萎縮症、肺線維症、自己免疫腸疾患症候群、セリアック病、コエリアック病、脂肪便症(グルテン腸疾患)、抵抗性スプルー、特発性スプルー、クリオグロブリン血症、アミロトロフィック側索硬化症(A L S ; 筋萎縮性側索硬化症(Lou Gehrig's disease))、冠状動脈疾患、自己免疫性耳疾患、例として、自己免疫内耳疾患(A I E D)、自己免疫聴力障害、眼球クロース筋硬直徴候(O M S)、多発性軟骨炎、例として、抵抗性又は再発性多発性軟骨炎、肺胞状蛋白症、アミロイドーシス、強膜炎、非癌性リンパ球増多症、一次リンパ球増多症、これにはモノクローナルB細胞リンパ球増多症(例えば良性モノクローナル免疫グロブリン症及び未同定の有意なモノクローナル免疫グロブリン血症(monoclonal gammopathy of undetermined significance)、M G U S)が含まれる、末梢性神経障害、腫瘍随伴症候群、チャネル病、例として、癲癇、片頭痛、不整脈、筋疾患、難聴、盲目、周期性麻痺及びC N Sのチャネル病、自閉症、炎症性ミオパシ、局所性分節性糸球体硬化症(F S G S)、内分泌性眼障害、ブドウ膜網膜炎、脈絡網膜炎、自己免疫性肝臓病、線維症、多内分泌性不全、シュミット症候群、副腎炎、胃萎縮、初老期痴呆、脱髄性疾患、例として自己免疫脱髄性病、糖尿病性ネフロパシ、ドレスラー症候群、円形脱毛症、C R E S T症候群(石灰沈着、レイノー現象、食道運動障害、強指症及び毛細管拡張症)、雌雄自己免疫性不妊性、混合性結合組織病、シャーガス病、リウマチ熱、再発性中絶、農夫肺、多形性紅斑、心切開術後症候群、クッシング症候群、愛鳥家肺、アレルギー性肉芽腫性脈管炎、良性リンパ球血管炎、アルポート症候群、肺炎、例えばアレルギー性肺炎及び繊維化肺炎、間隙肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、リーシュマニア症、キパノソミアシス(kypanosomiasis)、住血吸虫症、蛔虫症、アスペルギルス症、サンプター症候群、カプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維形成、広汎性間質性肺線維形成、間質性肺線維形成、特発性の肺線維形成、嚢胞性線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、胎児赤芽球症、好酸性筋膜炎(eosinophilic faciitis)、シャルマン症候群、フェルティエー症候群、フィラリア(flariasis)、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、ヘテロ慢性毛様体炎、虹彩毛様体炎、又はF u c hの毛様体炎)、ヘーノホ-シェーライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス(H I V)感染、エコーウィルス感染、心筋症、アルツハイマー病、パルボウィルス感染、風疹ウィルス感染、種痘後症候群、先天性風疹感染、エプスタインバーウィルス感染、耳下腺炎、エヴァンの症候群、自己免疫性腺機能不全、シドナム舞踏病、連鎖球菌感染後腎炎、閉塞性血栓性血管炎(thromboangitis obliterans)、甲状腺中毒症、脊髄癆、脈絡膜炎、巨細胞多発性筋痛、内分泌性眼障害、慢性過敏性肺炎、乾性角結膜炎、流行性角結膜炎、特発性腎臓症候群、微小変化ネフロパシ、良性家族性及び乏血-再灌流障害、網膜自己免疫、関節炎症、気管支炎、慢性閉塞性気道疾患、珪肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化症疾患、アスペルミオジェネーシス(aspermio-genese)、自己免疫性溶血、ベック病、クリオグロブリン血症、デュピュイトラン拘縮、水晶体過敏性眼内炎、腸炎アレルギー、結節性紅斑、leprosum、特発性顔麻痺、慢性疲労症候群、リウマチ性熱、ハンマンリッチ病、感覚器性(sensoneural)聴力障害、血色素尿症発作(haemoglobinuria paroxysmatica)、性機能低下、回腸炎領域、白血球減少症、単核細胞増加症感染、横移動脊髄炎、一次特発性の粘液水腫、ネフローゼ、眼炎symphatica、精巢炎肉芽腫症、睪炎、多発性神経根炎急性、膿皮症壊疽、Q u e r v a i n甲状腺炎、後天性脾臓萎縮、抗精子抗体による不妊性、非悪性胸腺腫、白斑、S C I D及びエプスタインバーウィルス関連疾患、後天性免疫不全症候群(エイズ)、寄生虫病、例えばLesihmania、毒性ショック症候群、食中毒、T細胞の浸潤を伴う症状、白血球-粘着力欠損、サイトカイン及びTリンパ球に媒介される急性及び遅発性過敏症関連免疫応答、白血球血管外遊を伴う疾患、多器官損傷症候群、抗原-抗体複合体媒介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、アレルギー性神経炎、自己免疫多腺性内分泌障害、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫萎縮性胃炎、交感性眼炎、リウマチ性疾患、混合性結合組織病、ネフローゼ症候群、睪島炎、多内分泌性不全、末梢性神経障害、自己免疫多腺性症候群I型、成人発症型特発性副甲

10

20

30

40

50

状腺機能低下症(A O I H)、完全脱毛症、拡張型心筋症、後天性表皮水疱症(E B A)、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性又は非化膿性副鼻腔炎、急性又は慢性副鼻腔炎、篩骨、正面、上顎骨又は蝶形骨副鼻腔炎、好酸球性関連疾患、例えば好酸球増加症、肺浸潤好酸球増加症、好酸球増加症-筋肉痛症候群、レフラー症候群、慢性好酸性肺炎、熱帯肺好酸球増加症、気管支肺炎アスペルギルス症、アスペルギローム又は好酸球性を含有する肉芽腫、アナフィラキシー、血清陰性脊椎関節炎、多内分泌性自己免疫性疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性皮膚粘膜カンジダ症、ブラットン症候群、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、ウィスコット-アルドリッチ症候群、毛細血管拡張性運動失調症候群、膠原病と関係する自己免疫疾患、リウマチ、神経病学的疾患、虚血性再灌流障害、血圧応答の減退、血管機能不全、antgiectasis、組織損傷、心血管乏血、痛覚過敏、脳虚血、及び脈管化を伴う疾患、アレルギー性過敏症疾患、糸球体腎炎、再灌流障害、心

10

筋又は他の組織の再灌流損傷、急性炎症性成分を有する皮膚病、急性化膿性髄膜炎又は他の中枢神経系炎症性疾患、眼性及び眼窩の炎症性疾患、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘発性毒性、急性重症炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、肺線維症、糖尿病性網膜症、糖尿病性大動脈疾患、動脈内過形成、消化性潰瘍、弁膜炎、及び子宮内膜症などがある。

【0056】

「抗血管新生剤」又は「血管新生(血管形成)インヒビター」は、直接的又は間接的に、血管新生、脈管形成又は望ましくない血管透過を阻害する、小分子量の物質、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、単離したタンパク質、組換えタンパク質、抗体、又はそれらのコンジュゲートないしは融合タンパク質を指す。例えば、抗血管新生剤は、上記に定義したように血管新生剤に対する抗体又は他のアンタゴニスト、例えば、VEGFに対する抗体(例えば、ベバシズマブ(アバスタチン(登録商標))、bH1、bH1-44、bH1-81)、VEGFレセプターに対する抗体、VEGFレセプターシグナル伝達を遮断する小分子(例えば、PTK787/ZK2284、SU6668、SUTENT/SU11248(スニチニブマレート)、AMG706)である。また、抗血管新生剤には、天然の血管新生インヒビター、例えばアンジオスタチン、エンドスタチンなどが含まれる。例として、Klagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003)(例えば表3は悪性メラノーマにおける抗血管形成療法を列挙している); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12): 1359-1364 (1999); Tonin i et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003)(例えば、表2は抗血管形成因子を列挙している); 及び、Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)(例えば、表1は臨床試験に使用される抗血管形成剤を列挙している)を参照のこと。脈管形成の調節不全は、本発明の組成物および方法によって治療されうる多くの疾患を引き起こしうる。これらの疾患は非腫瘍性及び腫瘍性の両方の状態を含む。

20

30

ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体(例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 Ra^{223} 、 P^{32} 及びLuの放射性同位体)、化学治療薬、例としてメトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド(ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロランブシル、ダウノルビシン又は他の挿入剤、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び/又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、そしてここに開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞障害性薬が下記に記載されている。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

40

【0057】

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

50

パ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)の
 ようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエ
 チレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramide)
 及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラ
 メラミン類；アセトゲニン(acetogenins) (特にブラタシン(bullatacin)及びブラタシノ
 ン(bullatacinone))； δ -9-テトラヒドロカンナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登
 録商標))； β -ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン(合成類
 似体トポテカン(topotecan)(HYCANTIN(登録商標))、C P T - 1 1 (イリノテカン、CAMPTOS
 AR(登録商標))、アセチルカンプトテシン(acetylcamptothecin)、スコポレクチン(scopol
 ectin)、及び9-アミノカンプトテシン(9-aminocamptothecin)を含む)；ブリオスタチン
 ；カリスタチン(callystatin)；C C - 1 0 6 5 (そのアドゼレシン(adozelesin)、カルゼ
 レシン(carzelesin)及びバイゼレシン(bizelesin)合成類似体を含む)；ポドフィリン；ポ
 ドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン(cryptophycin)(特にクリプトフィシン1
 及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン(dolastatin)；デュオカルマイシン(duocarmy
 cin) (合成類似体、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エレトロビン(eleutherobin)；パ
 ンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコディクチン(sarcodictyin)；スポンジスタ
 チン(spongistatin)；クロランブシル、クロルナファジン(chlornaphazine)、チョロホ
 スファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、
 メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、
 フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミ
 ド(trofوسفamide)、ウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード；ニトロスレアス
 (nitrosureas)、例えばカルムスチン(carmustine)、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フ
 ォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン(lomustine)、ニムスチン、ラニムスチン；エネ
 ジイン(enediynes) 抗生物質等の抗生物質 (例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、
 特にカリケアマイシガンマ1 I、例えば、Agnew Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186
 (1994)を参照のこと；ダイネミシンA(dynemicinA)を含むダイネミシン(dynemicin)；
 エスペラマイシン(esperamicin)；同様にネオカルチノスタチン発光団及び関連色素蛋白
 エネジイン(enediynes) 抗生物質発光団)、アクラシノマイシン(aclacinomysins)、アク
 チノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン(bleomyci
 ns)、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン(car
 minomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、
 ダウノルビシン、デトルビシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン
 、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキシルビシン (モルフォリノードキシルビシン、シアノモルフ
 オリノ-ドキシルビシン、2-ピロリノ-ドキシルビシン及びデオキシドキシルビシンを含
 む)、エピルビシン、エソルビシン(esorubicin)、イダルビシン、マセロマイシン(marc
 ellomycin)、マイトマイシンCなどのマイトマイシン(mitomycins)、マイコフェノール
 酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)
 、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイ
 シン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシ
 ン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルビシン
 (zorubicin)；メトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)などの抗-代謝産物
 ；デノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリ
 メトトレキセート(trimetrexate)のような葉酸類似体；フルダラビン(fludarabine)、6-メ
 ルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリン類似体；アンシタビン、ア
 ザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラビン、
 ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(enocitabine)、フロキシウリジ
 ン(floxuridine)のようなピリミジン類似体；カルステロン(calusterone)、プロピオン酸
 ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolacton
 e)のようなアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副
 腎剤；フロリン酸(frolinic acid)のような葉酸リプレニッシャー(replenisher)；アセグ

10

20

30

40

50

ラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル(eniluraci
 l)；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ビスアントレン(bisantren
 e)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demec
 olcine)；ジアジコン(diaziqune)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニ
 ウム(elliptinium acetate)；エポチロン(epothilone)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸
 ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン(lonidainine)；メイタンシン(ma
 ytansine)及びアンサマイトシン(ansamitocin)のようなメイタンシノイド(maytansinoid)
 ；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダンモール(mopidanmol)；ニト
 ラエリン(nitraerine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルビシン；ロソ
 キサントロン(losoxantrone)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K(登録商標
)多糖類複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシ
 ン(rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニューアゾン酸(t
 enuazonic acid)；トリアジコン(triaziqune)；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミ
 ン；トリコテセン(trichothecenes)(特に、T-2トキシシン、ベラキュリンA(verracurin
 A)、ロリデンA(roridin A)及びアングイデン(anguidine))；ウレタン；ビンデシン(ELD
 ISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標))；ダカルバジン；マンノムスチン(mannomustine)
 ；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシト
 シン(gacytosine)；アラビノシド(「Ara-C」)；チオテパ；タキソイド、例えばタキシ
 ール(登録商標)パクリタキセル、(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、
 ABRAXANETM クレモフォール(Cremophor)を含まない、アルブミン設計のナノ粒子形状のパ
 クリタキセル(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)及びタキシ
 テア(登録商標)ドキシタキセル、(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロラン
 ブシル；GEMZAR(登録商標)ゲンシタビン(gemcitabine)；6-チオグアニン；メルカプトブ
 リン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンのようなプラチナ類似体；ビ
 ンブラスチン(VELBAN(登録商標))；プラチナ；エトポシド(V P-16)；イホスファミド
 ；ミトキサントロン；ピンクリスチン(ONCOVIN(登録商標))；オキサリプラチン；ロイコ
 ボリン；NAVELBINE(登録商標)ビノレルビン；ノバントロン(novantrone)；エダトレキセ
 ート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロナート(ibandronate)；トポイソメ
 ラーゼインヒビターR F S 2 0 0 0；ジフルオロメチロールニチン(D M F O)；レチノイ
 ン酸などのレチノイド類；カペシタビン(capecitabine)(XELODA(登録商標))；上述したも
 のの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体；並びに、上記のうちの2以上の組合せ、
 例えば、シクロホスファミド、ドキシソルビシン、ピンクリスチン及びブレドニソロンの併
 用治療の略記号であるCHOP、及び5-FUとロイコボリン(leucovovin)と組み合わせられる
 オキサリプラチン(ELOXATINTM)による治療投薬計画の略記号であるFOLFOXが含まれる。

【0058】

また、癌の成長を促進しうるホルモンの影響を調節、低減、阻止(ブロック)又は阻害す
 るように作用し、たびたび全身性、又は全身治療の形態にある抗ホルモン剤もこの定義に
 含まれる。これらはホルモン類自体でもよい。例として、抗卵胞ホルモン類及び、選択的
 なエストロゲンレセプターモジュレータ類(S E R M)、例えば、タモキシフェン(NOLVADE
 X(登録商標)タモキシフェン)、EVISTA(登録商標)ラロキシフェン、ドロロキシフェン(dro
 loxifene)、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフ
 ェン(keoxifene)、LY117018、オナプリストン及びFARESTON(登録商標)トレミフェン、抗
 プロゲステロン類、エストロゲンレセプター下方制御因子(E R D)、卵巣を抑制するか又
 は一時停止させるように機能する薬剤、例えば、黄体形成ホルモン放出ホルモン(L H R
 H)アゴニスト、例えば、LUPRON(登録商標)及びELIGARD(登録商標)酢酸ロイプロリド、ゴ
 セレリンアセテート、ブセレリンアセテート及びトリプトレリン(tripterelin)、他の抗
 アンドロゲン類、例えばフルタミド、ニルタミド及びピカルタミド、及び、副腎のエスト
 ロゲン産生を制御する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害薬、例として、例え
 ば4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE(登録商標)メゲストロールアセテ
 ート、AROMASIN(登録商標)エキセメスタン、ホルメスタン、ファドロゾール、RIVISOR(

10

20

30

40

50

登録商標) ボロゾール、FEMARA(登録商標) レトロゾール及びARIMIDEX(登録商標) アナストロゾールなどがある。加えて、化学療法剤のこのような定義には、ビスホスホネート、例えばクロドロロン酸(例えば、BONEFOS(登録商標)又はOSTAC(登録商標))、DIDROCAL(登録商標)エチドロロン酸、NE-58095、ZOMETA(登録商標) ズレドロロン酸／ズレドロネート、FOSAMAX(登録商標)アレンドロネート、AREDIA(登録商標)パミドロロン酸、SKELID(登録商標) チルドロン酸又はACTONEL(登録商標)、リセドロロン酸、並びにトロキサチタビン(troxacitabine)(1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に異常な細胞増殖に関係するシグナル伝達経路の遺伝子の発現を阻害するもの、例として、例えばPKC- α 、Raf、H-Ras及び上皮性成長因子レセプター(EGFR)、ワクチン、例えばTHERATOPE(登録商標)ワクチン及び遺伝子治療ワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチン及びVAXID(登録商標)ワクチン、LURTOTECAN(登録商標)トポイソメラーゼ1インヒビター、ABARELIX(登録商標) rmRH、ラパチニブジトシラート(ErbB-2及びEGFR二重チロシンキナーゼ小分子インヒビター、GW572016とも称される)、及び、上記の何れかの薬学的に受容可能な塩類、酸又は誘導体が含まれる。

【0059】

ここで用いられる際の「増殖阻害剤」は、細胞の増殖をインビトロ又はインビボの何れかで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、増殖阻害剤は、S期でHip発現細胞の割合を有意に減少させるものである。増殖阻害剤の例は、細胞周期の進行を(S期以外の位置で)阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ビンカス(例えばビンクリスチン及びビンブラスチン)、タキサン類、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、及びアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。タキサン類(パクリタキセル及びドセタキセル)は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、ローン・プーラン ローラー)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、ブリストル・マイヤー スクウィブ)の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

【0060】

「ここで用いる「抗癌療法」は、被検体の癌を低減するか又は阻害する処置を指す。抗癌療法の例には、細胞障害性放射線療法、並びに細胞障害性剤、化学療法剤、増殖阻害性剤、癌ワクチン、脈管形成インヒビター、プロドラッグ、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、副腎皮質ステロイド、免疫抑制因子、制吐剤、抗体ないし抗体断片又は鎮痛剤の治療上の有効量の被検体への投与が含まれる。

この出願で用いられる用語「プロドラッグ」なる用語は、親薬剤と比較して腫瘍細胞に対する細胞障害性が低く、酵素的に活性化又はより活性な親形態に変換されうる薬学的に活性な物質の前駆体又は誘導体の形態を指す。例として、Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)およびStella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Human a Press (1985)を参照のこと。プロドラッグには、限定するものではないが、ホスファート含有プロドラッグ、チオホスファート含有プロドラッグ、スルファート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、 β -ラクタム含有プロドラッグ、任意に置換されたフェノキシアセトアミド含有ブ

10

20

30

40

50

ロドラッグ、又は任意に置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、より活性のある細胞毒のない薬剤に転換可能な5-フルオロシトシン及び他の5-フルオロウリジンプロドラッグを含む。限定はしないが、本発明で使用するプロドラッグ形態に誘導体化可能な細胞障害性剤の例には、前記の化学療法剤が含まれる。

【0061】

「サイトカイン」なる用語は、一つの細胞集団から放出され、他の細胞に細胞間メディエータとして作用するタンパク質の一般用語である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるのは、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン（HGH）、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インシュリン；プロインシュリン；レラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば濾胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、及び黄体化ホルモン（LH）；上皮性増殖因子（EGF）；肝臓成長因子；線維芽成長因子（FGF）；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子- α 及び- β ；ミューラー阻害因子；マウス生殖腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF- β 等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF- α 及びTGF- β 等のトランスフォーミング成長因子（TGFs）；インシュリン様成長因子-I及びII；エリスロポエチン（EPO）；骨誘発因子；インターフェロン- α 、- β 、及び- γ 等のインターフェロン；コロニー刺激因子（CSFs）、例えばマクロファージ-CSF（M-CSF）；顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）；及び顆粒球-CSF（G-CSF）；インターロイキン（ILs）、例えばIL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12；腫瘍壊死因子、例えばTNF- α 及びTNF- β ；及びLIF及びキットリガンド（KL）を含む他のポリペプチド因子である。ここで用いられる際、用語サイトカインには、天然供給源から、又は組換え細胞培養からのタンパク質、及び天然配列サイトカインの生物学的に活性な等価物が含まれる。

【0062】

「サイトカインアンタゴニスト」とは、少なくとも一のサイトカインの生物学的活性を一部又は完全に遮断、阻害、又は中和する分子を意味する。例えば、サイトカインアンタゴニストは、サイトカイン発現および／または分泌を阻害することによって、または、サイトカイン又はサイトカインレセプターに結合することによってサイトカイン活性を阻害してよい。サイトカインアンタゴニストには、抗体、合成又は天然の配列ペプチド、イムノアドヘシン、及びサイトカイン又はサイトカインレセプターに結合する小分子アンタゴニストが含まれる。サイトカインアンタゴニストは場合によって、細胞障害性剤とコンジュゲートされるか又は融合される。例示的なTNFアンタゴニストは、エタネルセプト（ENBREL（登録商標））、インフリキシマブ（REMICADE（登録商標））およびアダリムマブ（HUMIRATM）である。

【0063】

本明細書中で用いる「免疫抑制剤」なる用語は、治療される被検体の免疫系を抑制するか又は隠すために作用する物質を指す。これには、サイトカイン産生を抑制する物質、自己抗原発現を下方制御又は抑制する物質、又は、MHC抗原をマスキングする物質が含まれる。免疫抑制剤の例には、2-アミノ-6-アリル-5-置換ピリミジン（米国特許第4665077号を参照）；ミコフェノール酸モフェチル、例えばCELLCEPT（登録商標）；アザチオプリン（IMURAN（登録商標））、AZASAN（登録商標）／6-メルカプトプリン；プロモクリプチン；ダナゾール；ダブソン；グルタルアルデヒド（米国特許第4120649号に記載のように、MHC抗原をマスキングするもの）；MHC抗原およびMHC断片のための抗イデオタイプ抗体；サイクロスポリンA；副腎皮質ステロイドおよび糖質コルチコイドといったステロイド、例えばプレドニゾン、プレドニソロン、例えばPEDIAPRED（登録商標）（プレドニソロンリン酸ナトリウム）又はORAPRED（登録商標）（プレドニソロンリン酸ナトリウム経口溶液）、メチルプレドニゾンおよび

デキサメサゾン；メトトレキセート(経口又は皮下)(RHEUMATREX(登録商標)、TREXALLTM)；ヒドロキシクロロキン／クロロキン；スルファサラジン；レフルノミド；サイトカイン又はサイトカインレセプターアンタゴニスト、例として抗インターフェロン- γ 、- β 、又は- α 抗体、抗腫瘍壊死因子- α 抗体(インフリキシマブ又はアダリムマブ)、抗TNF α イムノアドヘシン(ENBREL(登録商標)、エタネルセプト)、抗腫瘍壊死因子- β 抗体、抗インターロイキン2抗体、及び抗IL-2レセプター抗体；抗CD11aおよび抗CD18抗体を含む抗LFA-1抗体；抗L3T4抗体；異種性抗リンパ球グロブリン；ポリクローナル又はパンT抗体、又はモノクローナル抗CD3又は抗CD4／CD4a抗体；LFA-3結合ドメインを含む可溶性ペプチド(1990年7月26日公開の国際公開1990／08187)；ストレプトキナーゼ；TGF- β ；ストレプトドルナーゼ；宿主のRNA又はDNA；FK506；RS-61443；デオキシスベルグアリン；ラパマイシン；T細胞レセプター(Cohen et al.、米国特許第5114721号)；T細胞レセプター断片(Offner et al. Science, 251: 430-432 (1991)；国際公開1990／11294；laneway, Nature, 341: 482 (1989)；及び国際公開1991／01133)；T10B9といったT細胞レセプター抗体(欧州特許第340109号)；シクロホスファミド(CYTOXAN(登録商標))；ダブソン；ペニシラミン(CUPRIMINE(登録商標))；血漿交換；または、静脈免疫グロブリン(IVIg)が含まれる。これらは単独で用いられても、互いに、特にステロイド及び他の免疫抑制剤との組合せ、又はこの組合せの後にステロイドの必要性を低減するために維持用量の非ステロイド剤を組み合わせて用いられてもよい。

【0064】

「鎮痛剤」は、被検体の痛みを阻害するかまたは抑制するために作用する薬剤を指す。例示的な鎮痛剤には、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、例えばイブプロフェン(MOTRIN(登録商標))、ナプロキセン(NAPROSYN(登録商標))、アセチルサリチル酸、インドメタシン、スリンダクおよびトルメチン、これらの塩類及び誘導体、並びに、生じる鋭い痛みを低減するために用いられる様々な他の医薬、例えば抗痙攣剤(ガバペンチン、phenytoin、カルバマゼピン)又は三環系抗鬱薬が含まれる。具体例には、アセトアミノフェン、アスピリン、アミトリプチリン(ELAVIL(登録商標))、カルバマゼピン(TEGRETOL(登録商標))、phenytoin(DILANTIN(登録商標))、ガバペンチン(NEURONTIN(登録商標))、(E)-N-バニルル-8-メチル-6-ノネアミド(CAPSICIN(登録商標))又は神経遮断薬が含まれる。

「副腎皮質ステロイド」は、天然に生じる副腎皮質ステロイドの効果を模倣するかあるいは増大するステロイドの一般的な化学構造を有するいくつかの合成又は天然に生じる物質の何れか一つを指す。合成副腎皮質ステロイドの例として、プレドニゾン、プレドニロン(メチルプレドニゾロンを含む)、デキサメサゾン、トリアムシノロン及びベタメサゾンが含まれる。

【0065】

ここで用いる「癌ワクチン」は、癌に対して被検体において免疫応答を刺激する組成物である。癌ワクチンは典型的に、抗原に対して免疫応答を更に刺激してブーストする他の構成成分(例えばアジュバント)とともに、被検体に対して自己由来性(自己から)又は同種異系性(他から)である癌関連の物質又は細胞(抗原)の供与源からなる。癌ワクチンにより望ましくは、被検体の免疫系が刺激され、1又はいくつかの特異的抗原に対して抗体が産生され、および／またはそれらの抗原を有する癌細胞を攻撃するためにキラーT細胞が産生される。

ここで用いる「細胞障害性放射線療法」は、細胞の機能を阻害又は予防し、および／または細胞の破壊を引き起こす放射線療法を指す。放射線療法には、例えば、外的光線照射又は抗体などの放射性標識した薬剤による療法が含まれる。この用語は、放射性同位体(例えばAt²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、Ra²²³、P³²およびLuの放射性同位体)の使用を含むことを目的とする。

【0066】

「制吐剤」は、被検体における嘔気を軽減又は予防する化合物である。制吐化合物には、例えば、ニューロキニン-1レセプターアンタゴニスト、5HT₃レセプターアンタゴニスト(例えばオンダンセトロン、グラニセトロン、トロピセトロンおよびザチセトロン)、GABABレセプターアゴニスト、例としてバクロフェン、デキサメサゾン、KENALOG(登録商標)、ARISTOCORT(登録商標)又はNASALIDE(登録商標)のような副腎皮質ステロイド、抗ドーパミン作動剤、フェノサイアジン(例えばプロクロルペラジン、フルフェナジン、チオリダジンおよびメソリダジン)、ドロナビノール、metroclopramide、ドンペリドン、ハロペリドール、シクリジン、ロラゼパム、プロクロルペラジンおよびレボメプロマジンが含まれる。

10

「被検体」は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物には、家畜(例えばウシ)、スポーツ用動物、愛玩動物(例えばネコ、イヌおよびウマ)、霊長類、マウスおよびラットが含まれるが、これらに限定されない。

【0067】

実施例において示す市販の試薬は、特に明記しない限り製造業者の指示に従って使用した。以下の実施例及び明細書全体にわたってATCC受託番号によって識別される細胞の供与源は、American Type Culture Collection, Manassas, VAである。特に明記しない限り、本発明は、組換えDNA技術の標準的な手順を用いる。これらは本明細書中及び以下のテキストに記載される。上掲のSambrook et al.; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989); Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc.: N.Y., 1990); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988); Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press: Oxford, 1984); Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 1991。

20

本明細書及び特許請求の範囲全体を通して、「含む」なる語彙、又は「含む」ないし「含んでいる」の変形型は、定めた完全体又は完全体の群を包含するもので、任意の他の完全体又は完全体の群を除外するものではない。

【0068】

II. ベクター、宿主細胞及び組換え方法

30

本発明の抗体の組み換え生成のために、コードする核酸を単離して、更なるクローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製ベクターに挿入する。抗体をコードするDNAは従来の手順で簡単に単離し、配列決定される(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて)。多くのベクターが利用可能である。用いる宿主細胞にある程度依存してベクターを選択する。一般的に、好適な宿主細胞は原核生物又は真核生物(一般的に哺乳動物)由来の細胞である。IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE定常領域を含め、任意のアイソタイプの定常領域がこの目的のために使われてもよく、このような定常領域はヒト又は動物種の何れから得られうることは理解されるであろう。

【0069】

40

a. 原核生物の宿主細胞を用いた抗体生成

i. ベクターの構築

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードしているポリヌクレオチド配列は標準的な組換え技術を使用して得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列はハイブリドーマ細胞のような抗体産生細胞から単離し配列決定することができる。あるいは、ポリヌクレオチドはヌクレオチド合成機又はPCR法を使用して合成することができる。ひとたび得られると、ポリペプチドをコードしている配列は原核生物宿主中で異種ポリヌクレオチドを複製し、発現することが可能な組換えベクター中に挿入される。当該分野において入手でき知られている多くのベクターを本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、主として、ベクターに挿入される核酸のサイズとベクターで形質転換さ

50

れる特定の宿主に依存する。各ベクターは、機能(異種性ポリヌクレオチドの増幅又は発現ないしその両方)及び属する特定の宿主細胞への適合性に応じて、様々な成分を含む。一般的に、限定するものではないが、ベクター成分には複製起源、選択マーカー遺伝子、プロモータ、リボゾーム結合部位(RBS)、シグナル配列、異種性核酸挿入及び転写終末配列が含まれる。

【0070】

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

10

【0071】

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

20

【0072】

本発明の発現ベクターは各ポリペプチド成分をコードする2又はそれ以上のプロモーターシストロン(翻訳単位)対を含みうる。プロモーターはその発現を調節するシストロンの上流(5')に位置している非翻訳配列である。原核生物のプロモーターは典型的には誘導性と構成的との二つのクラスのものがある。誘導性プロモーターは、例えば栄養分の有無又は温度の変化のような、培養条件の変化に応答してその調節下でシストロンの転写レベルを増大させるように誘導するプロモーターである。

【0073】

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

30

【0074】

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

40

【0075】

本発明の一態様では、組換えベクター内の各シストロンは、膜を貫通して発現されるポリペプチドの転写を誘導する分泌シグナル配列成分を含む。一般に、シグナル配列はベクターの成分でありうるか、ベクター中に挿入される標的ポリペプチドDNAの一部であり

50

うる。この発明の目的のために選択されるシグナル配列は宿主細胞によって認識されプロセシングされる(つまりシグナルペプチダーゼにより切断される)ものでなければならない。異種ポリペプチドに天然のシグナル配列を認識せずプロセシングする原核生物宿主細胞に対しては、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、I p pあるいは熱安定性エンテロトキシン I I (S T I I) リーダー、L a m B、P h o E、P e l B、O m p A及びM B Pからなる群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。一実施態様では、発現系の双方のシストロンに使用されるシグナル配列はS T I Iシグナル配列又はその変異体である。

【0076】

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

【0077】

本発明の抗体を発現するのに適した原核生物宿主細胞には、古細菌及び真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物が含まれる。有用な細菌の例には、エシェリキア属(例えば大腸菌)、バシラス属(例えば枯草菌)、エンテロバクター属、シュードモナス種(例えば緑膿菌)、ネズミチフス菌、霊菌(*Serratia marcescans*)、クレブシエラ属、プロテウス属、赤痢菌、根粒菌、ビトレオシラ(*Vitreoscilla*)又はパラコッカス(*Paracoccus*)が含まれる。一実施態様では、グラム陰性菌が使用される。一実施態様では、大腸菌細胞が本発明の宿主として使用される。大腸菌株の例として、遺伝子型W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac I q lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kan^R を有する 3 3 D 3 株(米国特許第5,639,635号)を含むW3110株 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 1190-1219頁; ATCC寄託番号27,325)及びその誘導体が含まれる。また、大腸菌294 (ATCC 31,446), 大腸菌B, 大腸菌 λ 1776 (ATCC 31,537)及び大腸菌RV308(ATCC 31,608) など、他の株及びその誘導体も好適である。この例は限定的なものでなく例示的なものである。定義した遺伝子型を有する上記の何れかの細菌の誘導体の構築方法は当業者に公知であり、例として、Bass等, Proteins, 8:309-314 (1990)に記載されている。一般的に、細菌細胞中でのレプリコンの複製能を考慮して適した細菌を選択することが必要である。p B R 3 2 2、p B R 3 2 5、p A C Y C 1 7 7、又はp K N 4 1 0のようなよく知られたプラスミドを使用してレプリコンを供給する場合、例えば、大腸菌、セラシア属、又はサルモネラ種を宿主として好適に用いることができる。典型的に、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌しなければならない、望ましくは更なるプロテアーゼインヒビターを細胞培養中に導入することができる。

【0078】

ii. 抗体産生

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

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

【0079】

本発明のポリペプチドを生産するために使用される原核生物細胞は当該分野で知られ、

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

【0080】

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

10

【0081】

原核生物宿主細胞は適切な温度で培養される。例えば、大腸菌の増殖に対しては、好適な温度は約20℃から約39℃、より好ましくは約25℃から約37℃の範囲、更により好ましくは約30℃である。培地のpHは、主として宿主生物に応じて、約5から約9の範囲の任意のpHでありうる。大腸菌に対しては、pHは好ましくは約6.8から約7.4、より好ましくは約7.0である。

【0082】

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

20

【0083】

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

30

【0084】

本発明の一側面では、抗体産生は発酵法によって多量に受け継がれる。組換えタンパク質の生産には様々な大規模流加発酵法を利用することができる。大規模発酵は少なくとも1000リットルの容量、好ましくは約1000から100000リットルの容量である。これらの発酵槽は、酸素と栄養分、特にグルコース(好ましい炭素/エネルギー源)を分散させる攪拌翼を使用する。小規模発酵とは一般におよそ100リットル以下の容積で、約1リットルから約100リットルの範囲でありうる発酵槽での発酵を意味する。

40

【0085】

発酵法では、タンパク質の発現の誘導は、典型的には、細胞が適切な条件下にて、初期定常期に細胞があるステージで、所望の密度、例えば約180-220のOD₅₅₀まで増殖したところで開始される。当該分野で知られ上述されているように、用いられるベクターコンストラクトに応じて、様々なインデューサーを用いることができる。細胞を誘導前の短い時間の間、増殖させてもよい。細胞は通常約12-50時間の間、誘導されるが、更に長い又は短い誘導時間としてもよい。

50

【0086】

本発明のポリペプチドの生産収量と品質を改善するために、様々な発酵条件を変更することができる。例えば、分泌される抗体ポリペプチドの正しい組み立てとフォールディングを改善するために、例えばD s bタンパク質(D s b A、D s b B、D s b C、D s b D及び／又はD s b G)又はF k p A(シャペロン活性を持つペプチジルプロピルシス、トランス-イソメラーゼ)のようなシャペロンタンパク質を過剰発現する更なるベクターを用いて宿主原核細胞を同時形質転換させることができる。シャペロンタンパク質は細菌宿主細胞中で生産される異種性タンパク質の適切な折り畳みと溶解性を容易にすることが実証されている。Chen等(1999) J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou等, 米国特許第6083715号; Georgiou等, 米国特許第6027888号; Bothmann及びPluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm及びPluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie等(2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。

10

【0087】

発現された異種タンパク質(特にタンパク分解を受けやすいもの)のタンパク質分解を最小にするために、タンパク質分解酵素を欠くある種の宿主株を本発明に用いることができる。例えば、原核生物宿主細胞株を改変して、プロテアーゼI I I、O m p T、D e g P、T s p、プロテアーゼI、プロテアーゼM i、プロテアーゼV、プロテアーゼV I及びその組合せのような既知の細菌プロテアーゼをコードしている遺伝子に遺伝子突然変異を生じさせることができる。幾つかの大腸菌プロテアーゼ欠損株が利用でき、例えば、上掲のJoly等(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2773-2777; Georgiou等, 米国特許第5264365号; Georgiou等, 米国特許第5508192号; Hara等(1996) Microbial Drug Resistance 2:63-72に記載されている。

20

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

【0088】

iii. 抗体精製

当分野で公知の標準的なタンパク質精製方法を用いることができる。以下の方法は好適な精製手順の例である：免疫親和性又はイオン交換カラムによる分画化、エタノール沈降法、逆相H P L C、シリカ又はD E A Eなどの陽性交換樹脂によるクロマトグラフィ、クロマトフォーカシング、S D S - P A G E、硫酸アンモニウム沈降法及び、例えばSephadex G-75を用いたゲル濾過法。

30

【0089】

一態様では、固形層に固定したプロテインAを本発明の完全長抗体産物の免疫親和性精製法に用いる。プロテインAは抗体のF c領域に高い親和性で結合する黄色ブドウ球菌から単離した41 k Dの細胞壁タンパク質である。Lindmark等(1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。プロテインAを固定した固形層は、ガラス又はシリカ表面、より好ましくは孔を調節したガラスカラム又はケイ酸カラムを含むカラムが好ましい。ある方法では、カラムは非特異的な混入物の接着を防ぐためにグリセロールなどの試薬でコートされている。

40

【0090】

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

【0091】

b. 真核生物の宿主細胞を用いた抗体の生成

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

【0092】

(i) シグナル配列成分

50

真核生物の宿主細胞に用いるベクターは、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいは対象とするポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドを含んでもよい。好ましく選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものである。哺乳動物細胞での発現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペスgDシグナルが利用できる。

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

【0093】

(ii) 複製開始点

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

【0094】

(iii) 選択遺伝子成分

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

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

【0095】

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

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

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

【0096】

(iv) プロモーター成分

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

【0097】

10

20

30

40

50

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗体ポリペプチドの転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス、アデノウィルス(例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びサルウィルス40(SV40)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節される。

SV40ウィルスの初期及び後期プロモーターは、SV40ウィルスの複製起点を更に含むSV40制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウィルスの最初期プロモーターは、HindIII制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウィルスを用いて哺乳動物宿主中でDNAを発現させる系が、米国特許第4419446号に開示されている。この系の変形例は米国特許第4601978号に開示されている。あるいは、ラウス肉腫ウィルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。

【0098】

(v) エンハンサーエレメント成分

より高等の真核生物によるこの発明の抗体ポリペプチドをコードしているDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増強される。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。真核生物プロモーターの活性化のための増強要素については、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)もまた参照のこと。エンハンサーは、抗体ポリペプチドコード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされうるが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

【0099】

(vi) 転写終末成分

また、真核生物宿主細胞に用いられる発現ベクターは、典型的には、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列を含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの5'、時には3'の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、抗体をコードしているmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第94/11026号とそこに開示された発現ベクターを参照のこと。

【0100】

(vii) 宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクター中のDNAをクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、脊椎動物の宿主細胞を含む本明細書中に記載の高等真核生物細胞を含む。培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); ハムスター乳児腎細胞(BHK, ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巣細胞/DHFR(CHO, Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); サルの腎細胞(CV1 ATCC CCL 70); アフリカミドリザルの腎細胞(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細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 806

5) ; マウス乳房腫瘍細胞 (MMT 0 6 0 5 6 2 , A T C C C C L 5 1) ; T R I 細胞(Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)) ; M R C 5 細胞; F S 4 細胞; 及びヒト肝癌株(H e p G 2)である。

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

【0101】

(viii) 宿主細胞の培養

本発明の抗体を産生するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(H a m)の F 1 0 (シグマ)、最小必須培地((M E M), (シグマ)、R P M I - 1 6 4 0 (シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((D M E M), (シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第 4 7 6 7 7 0 4 号; 同 4 6 5 7 8 6 6 号; 同 4 9 2 7 7 6 2 号; 同 4 5 6 0 6 5 5 号; 又は同 5 1 2 2 4 6 9 号; 国際公開第 9 0 / 0 3 4 3 0 号; 国際公開第 8 7 / 0 0 1 9 5 号; 又は米国再発行特許第 3 0 9 8 5 号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばH E P E S)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCINTM薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、p H等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【0102】

(ix) 抗体の精製

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

【0103】

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリンF c領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト γ 1、 γ 2、又は γ 4重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark等, J. immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト γ 3に推奨されている(Guss等, EMBO J. 5: 165715 75 (1986))。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_H 3ドメインを含む場合、Bakerbond ABXTM樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相H P L C、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂上でのS E P H A R O S ETMクロマトグラフィー(ポリアスパラギン酸カラム)、クロマトフォーカシング、S D S - P A G E、及び硫酸アンモニウム沈殿法も、回収される多価抗体に応じて利用可能である。

予備的精製工程に続いて、目的の抗体及び混入物を含む混合液をpH約2.5-4.5、好ましくは低塩濃度(例として、約0-0.25M塩)の溶出緩衝液を用いて低pH疎水性作用クロマトグラフィを行う。

【0104】

イムノコンジュゲート

また、本発明は、化学療法剤、薬剤、成長阻害剤、毒素(例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性性毒素、又はその断片)、又は放射性同位体(すなわち放射性コンジュゲート)などの細胞毒性剤にコンジュゲートした本明細書中に記載の何れかの抗N o t c h 1 N R R抗体を含む、イムノコンジュゲート(「抗体-薬剤コンジュゲート」又は「ADC」と交換可能に称される)を提供する。

10

【0105】

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、すなわち癌治療における腫瘍細胞を殺す又は阻害するための薬剤の局所運搬に抗体-薬剤コンジュゲートを用いると(Syrigos及びEpenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172; 米国特許第4,975,278号)、腫瘍への薬剤成分の標的とする運搬とそこでの細胞内集積が可能となるものであり、この非コンジュゲート薬物作用剤の全身性投与により正常細胞並びに除去しようとする腫瘍細胞への毒性が容認できないレベルとなりうる(Baldwin等, (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,」 in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pincheraら. (ed. s), pp. 475-506)。これによって、最小限の毒性で最大限の効果を求める。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はこの方策に有用であるとして報告されている(Rowland等, (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)。この方法に用いる薬物には、ダウノマイシン、ドキソルビジン、メトトレキサート及びビンデジンが含まれる(Rowland等, (1986)、上掲)。抗体-毒素コンジュゲートに用いる毒素には、ジフテリア毒素などの細菌性毒素、ゲルダナマイシン(Mandlerら(2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandlerら(2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandlerら(2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、メイタンシノイド(EP 1391213; Liu等, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン(Lode等, (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman等, (1993) Cancer Res. 53:3336-3342)などのリシン、小分子毒素などの植物毒が含まれる。該毒素は、チューブリン結合、DNA結合又はトポイソメラーゼ阻害を含む機能によりその細胞障害性及び細胞分裂停止性の効果に影響しうる。ある種の細胞障害性剤は、大きな抗体又はタンパク質レセプターリガンドにコンジュゲートした場合に、不活性又は活性が低減する傾向がある。

20

30

【0106】

ゼバリン(ZEVALIN)(登録商標)(イブリツモマブチウキセタン(ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idec)は正常及び悪性のBリンパ球の細胞表面上にみられるCD20抗原に対するマウスIgG1κモノクローナル抗体と¹¹¹In又は⁹⁰Y放射性同位体とがチオウレアリンカーキレート剤にて結合した抗体-放射性同位体コンジュゲートである(Wiseman等, (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman等, (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig等, (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig等, (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。ゼバリンはB細胞非ホジキン性リンパ球(NHL)に対して活性を有するが、投与によってほとんどの患者に重症で長期の血球減少を引き起こす。カリケアマイシンに連結したhuCD33抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるマイロターゲット(MYLOTARG)(登録商標)(ゲムツズマブオゾガミシン(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals)は、急性骨髄性白血病の治療用注射剤として2000年に認可された(Drugs of the Future (2000) 25(7):686; 米国特許第4970198号; 同第5079233号; 同第5585089号; 同第5606040号; 同第5693762号; 同第5739116号; 同第5767285号; 同第5773001号)。ジスルフィドリンカーSPPを介してメイタンシノイド薬剤分子DM1と連結しているhuCD242抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるカンツズマブメルタンシン(Cantuzumab me

40

50

rtansine)(Immunogen, Inc.)は、C a n A gを発現する癌、例として大腸、膵臓、胃などの治療用に第 I I 相試験へと進んでいる。メイタンシノイド薬剤分子DM 1と連結している抗前立腺特異的膜抗原(P S M A)モノクローナル抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるML N-2 7 0 4(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)は、前立腺癌の潜在的治療の開発段階にある。アウリスタチン(auristatin)ペプチド、アウリスタチンE(A E)及びモノメチルアウリスタチン(MM A E)、ドラスタチン(dolastatin)の合成類似体は、キメラモノクローナル抗体c B R 9 6(癌細胞上のルイスYに特異的)及びc A C 1 0(血液系悪性腫瘍上のC D 3 0に特異的)(Doronina等, (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)にコンジュゲートしており、治療の開発段階にある。

【0107】

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

抗体のコンジュゲートと一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコセン(trichothene)及びC C 1 0 6 5、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。

【0108】

i. メイタンシン及びメイタンシノイド

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは一又は複数のメイタンシノイド分子と結合している本発明の抗体(完全長又は断片)を含んでなる。

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第3 8 9 6 1 1 1号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4 1 5 1 0 4 2号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4,137,230号;同4,248,870号;同4,256,746号;同4,260,608号;同4,265,814号;同4,294,757号;同4,307,016号;同4,308,268号;同4,308,269号;同4,309,428号;同4,313,946号;同4,315,929号;同4,317,821号;同4,322,348号;同4,331,598号;同4,361,650号;同4,364,866号;同4,424,219号;同4,450,254号;同4,362,663号;及び同4,37

1,533号に開示されている。

メイタンシノイド薬剤成分は、(i) 発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために相対的に利用可能である(ii) 抗体に対する非ジスルフィドリンカーによる共役上好適な官能基による誘導体化に従う、(iii) 血漿中で安定、そして(iv) 様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体薬剤コンジュゲートの魅力的な薬剤成分である。

【0109】

メイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲート、その作製方法及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5,208,020号、同5,416,064号、欧州特許第0425235 B1号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。Liu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C 2 4 2に結合するDM 1と命名されたメイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞障害性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等, Cancer Research, 52: 127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体A 7、又はHER-2/neuオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体TA. 1に結合しているイムノコンジュゲートが記載されている。TA. 1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞障害性はヒト乳癌株化細胞SK-BR-3におけるインビトロで試験され、細胞当たり 3×10^5 HER-2表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。A 7-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞障害性を示した。

【0110】

抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合させることにより調製される。例えば、米国特許第5,208,020号(この開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)を参照。1分子の毒素/抗体は、裸抗体の使用において細胞障害性を高めることが予想されているが、抗体分子当たり、平均3-4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5,208,020号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

【0111】

例えば、米国特許第5,208,020号又は欧州特許第0425235 B1号、Chari等, Cancer Research, 52: 127-131(1992)、及び2004年10月8日に出願の米国特許出願番号10/960,602(これらの開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)に開示されているもの等を含め、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。リンカー成分SMCCを含んでなる抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、2004年10月8日に出願の米国特許出願番号10/960,602に開示されるように調製されうる。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。更なる結合基を本願明細書中に記載し、例示する。

【0112】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SM

CC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。特に好ましいカップリング剤には、ジスルフィド結合により提供されるN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート(SPP)及びN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPPD)(Carlsson等, Biochem. J. 173: 723-737[1978])が含まれる。

10

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

【0113】

ii. アウリスタチン類及びドラスタチン類

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

20

例示的なアウリスタチンの実施態様は、N末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤成分DE及びDFを含み、"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US Ser. No. 10/983,340, filed Nov. 5, 2004に開示される。この開示内容は出典明記によってその全体が特別に組み込まれる。

30

【0114】

一般的に、ペプチドベースの薬剤成分は、2以上のアミノ酸及び／又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知の液相合成方法に従って調製することができる(E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照)。アウリスタチン／ドラスタチン薬剤成分は、米国特許第5635483号;同第5780588号;Pettit等(1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465;Pettit等(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277;Pettit, G.R., 等 Synthesis, 1996, 719-725;及びPettit等(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863の方法に従って調製されうる。また、Doronina(2003) Nat Biotechnol 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", 2005年10月27日に公開の米国公開特許20050238649も参照のこと。これらは出典明記によってその全体が本願明細書中に組み込まれる(例えば、リンカー及びモノメチルバリン化合物、例えばMMAE及びリンカーにコンジュゲートしたMMAFの調整方法を開示している)。

40

【0115】

iii. カリケアマイシン

他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した本発明の抗体を含んでなる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコ

50

ンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、 γ_1^1 、 α_2^1 、 α_3^1 、N-アセチル- γ_1^1 、PSAG及び θ_1^1 (Hinman等, Cancer Research, 53:3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58:2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

10

【0116】

iv. 他の細胞障害剤

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

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

20

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

【0117】

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

30

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

40

【0118】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、

50

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

10

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

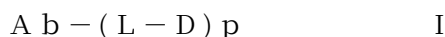
20

【0119】

v. 抗体薬剤コンジュゲートの調製

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

30



リンカーは、一つ以上のリンカー成分から成ってもよい。例示的なリンカー成分は、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボンイル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SPP」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(「SMCC」)、及びN-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「SIAB」)を含む。更なるリンカー成分は当分野で公知であり、そのいくつかは本願明細書において、記述される。また、"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", 2004年11月5日に出願した米出願番号10/983,340を参照。その内容は出典明記により本願明細書に組み込まれる。

40

【0120】

いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸残基を含みうる。例示的なアミノ酸リンカー成分には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドなどがある。例示的なジペプチドは、バリン-シトルリン(vc又はval-cit)、アラニン-フェニルアラニン(af又はala-phe)を含む。例示的なトリペプチドは、グリシン-バリン-シトルリン(gly-val-cit)及びグリシン-グリシン-グリシン(gly-gly-gly)を含む。アミノ酸リンカー成分を含んでなるアミノ酸残基は、天然に生じるもの、並びに微量のアミノ酸及び非天然に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンを含む。アミノ酸リンカー成分は設定され、特に酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C及びD又はプラスミンプロテ

50

アーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。

【0121】

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

10

【0122】

また、本発明の抗体薬剤コンジュゲートは、抗体を修飾して求電子性の部分を導入する(リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応させることができる)ことによって生成してもよい。グリコシル化された抗体の糖質を、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬剤部分のアミン基と反応するアルデヒド又はケトン基を形成させてもよい。生じたイミンシッフ塩基群が安定結合を形成するか、又は例えば安定アミン結合を形成させるホウ化水素試薬によって、還元してもよい。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の何れかによるグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により、薬剤(Hermanson, Bioconjugate Techniques)上の適当な基と反応することができるタンパク質のカルボニル(アルデヒド及びケトン)基が生じうる。他の実施態様では、N末端セリン又はスレオニン残基を含んでいるタンパク質はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩と反応して、第一のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成する(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; 米国特許第5362852号)。このようなアルデヒドは、薬剤部分又はリンカー求核基と反応することができる。

20

30

【0123】

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

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

40

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

【0124】

薬剤的製剤

50

本発明の抗体を含んでなる治療用製剤は、所望の純度を持つ抗体と、場合によっては生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより(Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000))、水溶液、凍結乾燥又は他の乾燥製剤の形態に調製されて保存される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトレート、ヒスチジン及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料(例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール)；低分子量(約10残基未満)のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質複合体)；及び／又はTWEENTM、PLURON ICSTM又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。

10

【0125】

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

20

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリー系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ-粒子及びナノカプセル)に、あるいはマクロエマルジョンに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000)に開示されている。

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

30

【0126】

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

40

【0127】

III. 治療上の使用

50

HER2及びVEGFの両方を結合する抗体および抗体断片(例えばbH1-44又はbH1-88又はその断片)は、前癌性、非転移性及び癌性の腫瘍(例えば初期の癌)を含む腫瘍の治療のため、自己免疫性疾患の治療のため、脈管形成性疾患の治療のため、HER2の異常な活性化を伴う疾患の治療のため、または、癌(例えば乳癌、結腸直腸癌、肺癌、腎臓細胞癌腫、膠腫又は卵巣癌)、脈管形成性疾患、自己免疫性疾患又はHER2の異常な活性化を伴う疾患を発症するリスクにある被検体の治療のために用いられうる。

癌なる用語は、前癌性の増殖、良性腫瘍及び悪性腫瘍を含むがこれに限らず、一まとまりの増殖性疾患を包含する。良性腫瘍は、起源の部位に限局化されたままであり、遠部位に浸潤、侵入又は転移する能力を有していない。悪性腫瘍は、周辺の他の組織に侵入して、障害を与える。また、それらは、起源の部位から切り離れる能力を獲得し、通常はリンパ節が配置されるリンパ系や血流を介して身体他の部位に拡がりうる(転移する)。原発性腫瘍は、それらが生じる組織の種類によって分類され、転移性腫瘍は、癌細胞が由来する組織の種類によって分類される。時間とともに、悪性腫瘍の細胞は、より異常になり、正常細胞のようではなくなる。癌細胞にみられるこの変化は、腫瘍グレードと呼ばれており、癌細胞は、十分に分化されている、中程度に分化されている、ほとんど分化されていない、又は、未分化であると表される。十分に分化した細胞はで全く正常な見かけであり、起源の正常細胞のようである。未分化な細胞は、細胞の起源を決定することがもはや不可能であるほど異常となっている細胞である。

【0128】

腫瘍は固形腫瘍であるか、或いは非固形腫瘍又は軟組織腫瘍でありうる。軟組織腫瘍の例には、白血病(例えば、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、成人急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、成熟B細胞急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、前リンパ球性白血病、又はヘアリーセル白血病)、或いはリンパ腫(例えば、非ホジキンリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、又はホジキン病)が含まれる。固形腫瘍には、血液、骨髄、又はリンパ系以外の身体組織のあらゆる癌が含まれる。固形腫瘍は更に、上皮細胞を起源とするものと、非上皮細胞を起源とするものとに分けられる。上皮細胞固形腫瘍の例には、胃腸管、結腸、胸部、前立腺、肺、腎臓、肝臓、脾臓、卵巣、頭頸部、口腔、胃、十二指腸、小腸、大腸、肛門、胆嚢、下唇、鼻いん頭、皮膚、子宮、男性生殖器、泌尿器、膀胱、及び皮膚の腫瘍が含まれる。非上皮起源の固形腫瘍には、肉腫、脳腫瘍、及び骨腫瘍が含まれる。

上皮性癌は一般に、良性腫瘍から侵襲前段階(例えばインサイツでの癌腫)、基底膜を透過して、上皮下間質に侵入した悪性癌に発達する。

【0129】

VEGFおよびHER2の両方を結合する多重特異性抗体(例えば、bH1-44又はbH1-88又はこれらの断片)は、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、腎臓細胞癌腫、膠腫又は卵巣癌を治療するために用いられるのが望ましい。

脈管形成が様々な疾患の発病に関係することは、現在明らかとなっている。これらには、固形腫瘍および転移、アテローム性動脈硬化、水晶体後繊維増殖、血管腫、慢性炎症、増殖性網膜症のような眼内新生血管疾患、例えば糖尿病性網膜症、年齢関連性黄斑変性(AMD)、血管新生緑内障、移植された角膜組織および他の組織の免疫拒絶反応、関節リウマチおよび乾癬が含まれる。Folkman et al., J. Biol. Chem., 267:10931-10934 (1992); Klagsbrun et al., Annu. Rev. Physiol. 53:217-239 (1991); 及び、Garner A., "Vascular diseases", In: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710。

【0130】

ある罹患した状態において新しい血管が過度に、不十分に又は不適當に成長したとき、異常な血管形成が生じるか(例えば医学的観点から位置、時期又は発生が望ましくない血管形成)、又はそれによって罹患した状態となる。癌、特に血管化の固形腫瘍および転移性腫瘍(大腸、肺癌(特に小細胞肺癌)又は前立腺癌を含む)、眼血管新生、特に糖尿病性盲目、網膜症、主に糖尿病性網膜症又は年齢関連性黄斑変性(AMD)、糖尿病性黄斑浮腫、

大脳浮腫(例えば、急性の脳卒中／非開放性頭部損傷／外傷と関係する)、滑液炎症、関節リウマチのパンヌス形成、骨化性筋炎、肥大性骨形成、抵抗性腹水、多嚢胞性卵巣の疾患、第3区画の体液疾患(脾炎、区画症候群、熱傷、腸疾患)、子宮頸線維腫、早産、アングル(ルベオースの血管新生、悪性の肺浸出、血管性再狭窄、血管腫といった血管芽細胞腫；炎症性腎疾患、例として糸球体腎炎、特にメサングウム増殖性糸球体腎炎、溶血性尿毒症候群、糖尿病性ネフロパシ又は高血圧患者腎硬化症、様々な炎症性疾患、例として関節炎、特に関節リウマチ、炎症性腸疾患、乾癬、乾癬の関節炎、乾癬のプラーク、サルコイドーシス、動脈性動脈硬化症および移植後に生じる疾患、腎臓同種異系移植片拒絶反応、子宮内膜症又は慢性喘息、および70以上の他の状態によって生じる疾患においてなど、罹患した状態を悪化させるかまたは罹患した状態の原因となる新たな血管の発達がある場合に、過剰な、不適切な又は制御できない血管形成が起こる。新しい血管は疾患組織に養分を与え、正常な組織を破壊する。癌の場合、新しい血管によって腫瘍細胞は他の器官の窪み(lodge)及び循環に逃げ得る(腫瘍転移)。病的状態、例えば、冠状動脈疾患、脳卒中および遅発性創傷治癒などの病気で悪化に関与する不適切な血管成長がある場合、不十分な血管新生が生じる。さらに、潰瘍、脳卒中および心臓発作は、天然の治癒に通常必要な血管新生が欠損することから生じうる。本発明は、VEGFおよびHER2を特異的に結合する抗体(例えばbH1-81又はbH1-44抗体)使用して、上記の疾病を有するか又は発症するリスクにある患者を治療することを考慮する。

10

【0131】

本発明の組成物が投与される候補にある他の患者は、血管結合組織の異常増殖、赤瘡、後天性免疫不全症候群、動脈閉塞、アトピー性角膜炎、細菌性潰瘍、ベーチェット疾患、血液が媒介する腫瘍、頸動脈閉塞性疾患、脈絡叢血管新生、慢性炎症、慢性網膜剥離、慢性ブドウ膜炎、慢性硝子体炎、コンタクトレンズ疲労、角膜移植片拒絶、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、クローン病、イールズ病、流行性角結膜炎、真菌潰瘍、単純ヘルペス感染、帯状ヘルペス感染、過粘稠度症候群、カポシ肉腫、白血病、脂質変性、ライム病、周縁表皮剥離、モーレン潰瘍、ハンセン病以外のマイコバクテリア感染、近視、眼性新生血管疾患、視神経窩、オスラー-ウェーバー症候群(オスラー-ウェーバー-ランデュ)、骨関節炎、パジェット病、毛様体扁平部炎、類天疱瘡、phlyctenulosis、多発動脈炎、レーザー後合併症、原生動物の感染、弾性線維性偽性黄色腫、翼状片角膜炎乾燥、放射状角膜切開、網膜血管新生、未熟児の網膜症、水晶体後繊維増殖、類肉腫、強膜炎、鎌状赤血球貧血、シェーグレン症候群、固形腫瘍、シュタルガルト病、スティーブンジョンソン病、上辺縁角膜炎、梅毒、全身狼瘡、テリアン周縁変性、トキソプラズマ症、ユーイング肉腫の腫瘍、神経芽細胞腫の腫瘍、骨肉腫の腫瘍、網膜芽細胞腫の腫瘍、横紋筋肉腫の腫瘍、潰瘍性大腸炎、静脈閉塞、ビタミンA欠乏、ヴェゲナー肉芽腫、糖尿病と関係している望ましくない脈管形成、寄生虫病、異常な創傷治癒、手術、損傷又は外傷後の肥大(例えば急性の肺損傷／ARDS)、体毛成長の阻害、排卵および黄体形成の阻害、移植の阻害および子宮における胚発達の阻害を有するか、又は発症するリスクにある。

20

30

【0132】

抗血管新生治療は、移植片拒絶、肺炎症、原発性肺高血圧、ネフローゼ症候群、子癇前症、及び胸水貯留、望ましくない血管透過によって特徴づけられる疾患及び疾患、例えば、脳腫瘍と関連している浮腫、悪性腫瘍と関連している腹水、メイグス症候群、肺炎症、ネフローゼ症候群、心嚢液貯留(心膜炎と関係するもの)、心血管疾患と関連している透過性、例えば心筋梗塞および脳卒中などの後の症状、及び敗血症の一般的な処置に有用である。

40

本発明の他の血管新生依存性疾患には、血管線維腫(出血傾向がある異常な血管)、血管新生緑内障(目の血管成長)、動静脈奇形(AVM；動脈および静脈間の異常な連通)、結合しない骨折(治癒しない骨折)、アテローム動脈硬化性斑(動脈の硬化)、化膿肉芽腫(血管から成る一般的な皮膚病変)、強皮症(結合組織病の形)、血管腫(血管から成る腫瘍)、髄膜種、甲状腺過形成(グレーブス病)、トラコーマ(発展途上国の盲目の主要な原因)、血友病関節、滑膜炎、皮膚炎、血管接着、および肥大した瘢痕(異常な瘢痕形成)が含まれる。

50

【0133】

I V. 用量および製剤

抗体(例えばbH1-44 bH1-81)又は抗体断片の組成物は、良好な医療行為に一致した形で処方され、投与量が決められ、投与される。この場合に考慮される因子には、治療されている特定の疾患、治療されている特定の哺乳動物、個々の被検体の臨床症状、疾患の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び医師に知られている他のファクターが含まれる。投与される抗体又は抗体断片の「治療上有効量」は、このような考慮によって調整され、癌又は自己免疫性疾患を予防するか、改善するかまたは治療するために必要な最小限量である。抗体又は抗体断片は、必ずしもそうする必要はないが、場合によっては、癌又は自己免疫性疾患あるいは癌又は自己免疫性疾患のリスクの予防又は治療のために現在使用されている一又は複数の薬剤と共に処方される。かかる他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体又は抗体断片の量、疾患又は治療のタイプ、及び上で検討した他の因子に依存する。これらは、一般に、これまで使用されたものと同じ用量及び投与経路で、あるいはこれまで用いられた投薬量の約1から99%で使用される。一般に、癌の寛解又は治療は、癌と関係する一又は複数の症状又は医学的な問題を少なくすることを伴う。治療上有効な量の薬剤によって、以下の何れか又はいくつかが達成される。癌細胞数の(少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%以上の)減少；腫瘍サイズ又は腫瘍負担の低減又は阻害；周辺臓器への癌細胞の浸潤の阻害(すなわちある程度の減少及び／又は停止)；腺腫の場合のホルモン分泌の低減；血管密度の低減；腫瘍転移の阻害；腫瘍増殖の低減又は阻害；及び／又は、癌関連の一又は複数の症状のある程度の軽減。ある実施態様では、抗体又は抗体断片を用いて、被検体の癌又は自己免疫性疾患の発症又は再発を防ぐ。

10

20

【0134】

一実施態様では、本発明は、癌又は自己免疫性疾患に罹りやすいか又はそうと診断されたヒト患者の生存期間を増すために用いられうる。生存期間は、薬剤の最初の投与から死亡の時と定める。また、生存期間は治療中の患者の死亡のリスクを表す、コントロール群に対する治療群の危険率(HR)を層別化することによって測定することもできる。

更に他の実施態様では、本発明の治療法は、様々な抗癌療法にて治療される癌であると疑われるか診断された一群のヒト患者において奏効率を有意に増加させる。奏効率は治療に反応した治療された患者の割合と定義される。一態様では、抗体ないし抗体断片と、手術、放射線療法又は一又は複数の化学療法剤を使用する本発明の併用治療法は、手術、放射線療法又は化学療法単独で治療された群と比較して治療患者群において奏効率を有意に増大させ、該奏効率は0.005未満の χ^2 乗p値を有する。

30

【0135】

癌の治療の治療的有効性の更なる測定値は、米国特許出願公開番号20050186208において記述される。

治療用製剤は、所望の純度を有する活性成分を、任意の生理的に許容される担体、賦形剤又は安定剤と混合することによって、当分野で公知の標準的な方法を用いて調製される(Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)。許容可能な担体には、生理食塩水、又はリン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸などのバッファ；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量(およそ10未満の残基)のポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン、アミノ酸、例として、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン；単糖、二糖および他の炭水化物、例としてグルコース、マンノース又はデキストリン；キレート剤、例えばEDTA；糖アルコール、例えばマンニトール又はソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；および／又は非イオン性界面活性剤、例えばTWEENTM、PLURONICSTM又はPEGが含まれる。

40

場合によって、しかし、好ましくは、製剤は、薬学的に許容可能な塩、好ましくは塩化ナトリウムを、好ましくは生理的濃度で含有する。場合によって、本発明の製剤は、薬学

50

的に許容可能な防腐剤を含有してもよい。いくつかの実施態様では、保存の濃度は、0.1から2.0%、一般的にv/vの範囲である。好適な防腐剤には製薬の分野で知られているものが含まれる。ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、メチルパラベンおよびプロピルパラベンは、好適な防腐剤である。場合によって、本発明の製剤は、0.005~0.02%の濃度で、薬学的に許容可能な界面活性剤を含んでもよい。

【0136】

また、本明細書中の製剤は、治療される特定の徴候の必要に応じて、一よりも多い活性な化合物、好ましくは互いに悪影響を与えない相補的活性を有するものを含有してもよい。このような分子は、意図する目的のために有効である量で組み合わせられて適切に存在する。

活性成分はまた、コロイド性薬物デリバリーシステム(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロカプセル、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセルなど)又はマクロエマルジョン中、例えば、それぞれ、コアセルベーション法又は界面重合法によって製造された、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタシラート)(poly-(methylmethacrylate) マイクロカプセルに取込むことができる。このような技術は、上掲のRemington's Pharmaceutical Sciencesにおいて開示される。

徐放性製剤も調製できる。徐放性製剤の適切な例には、抗体を含有する固形疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが含まれ、このマトリックスはフィルムやマイクロカプセル等の成形品の形である。徐放性マトリックスの例として、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール))、ポリアクチド(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸とγ-エチル-L-グルタマートの共重合体、非-分解性エチレン-ビニルアセテート、LUPRON DEPOTTM(乳酸-グリコール酸共重合体および酢酸ロイプロリド(leuprolide acetate)から構成される注射用ミクロスフェア)のような分解性乳酸-グリコール酸共重合体、およびポリ-D-(+)-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-ビニルアセテートおよび乳酸-グリコール酸のようなポリマーは分子を100日間にわたって放出することができるが、ある種のヒドロゲルはタンパクをより短時間の間放出する。被包された抗体が体内に長時間維持された場合、37℃で水分に暴露されて変性するか凝集し、結果として生物学的活性を失い免疫原性が変化するかもしれない。関与する機構に応じて安定化のための合理的な戦略を考案することができる。例えば、凝集機構がチオージスルフィド交換を介する分子間S-S結合の形成であることが分かれば、安定化は、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含量のコントロール、適当な添加物の使用、および特異的なポリマーマトリックス組成物の使用によって達成することができる。

【0137】

ここに記載の抗体ないし抗体断片(例えばbH1-44又はbH1-84又はこれらの断片)は、ボラスとして又はある期間の連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液内、包膜内、経口、局所などの投与経路又は吸入経路などの既知の方法でヒト患者に投与される。広範囲な副作用又は毒性がVEGF及び/又はHER2拮抗作用と関係している場合、局所投与が特に望ましい。また、エクスピボ方策が医療適用のために用いられてもよい。エクスピボ方策は、抗体ないし抗体断片をコードするポリヌクレオチドを被検体から得られる細胞に形質移入させるか又は形質導入させることを伴う。形質移入させるか又は形質導入させた細胞は、次いで被検体に戻される。細胞は、造血性細胞(例えば骨髓細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、T細胞又はB細胞)、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、ケラチン合成細胞又は筋細胞を含むが、これらに限定されるものではない様々な範囲のいずれかでありうる。

一例では、抗体(例えばbH1-44又はbH1-81)あるいは抗体断片は、疾患又は腫瘍の位置が許す限り、例えば直接注射によって局所的に投与され、この注射は周期的に繰り返されうる。また、抗体ないし抗体断片は、局所の再発又は転移を予防するかまたは低減するために、被検体に全身的に、又は腫瘍細胞、例えば腫瘍の外科的切除後の腫瘍又

10

20

30

40

50

は腫瘍巣に直接、送達されてよい。

【0138】

V. 製造品及びキット

本発明の他の実施態様は、自己免疫性疾患及び癌の治療に有用な材料を具備する製造品である。製造品は、容器と容器上ないしは容器に付随するラベルないしはパッケージ挿入物を具備する。適切な容器には、例えば瓶、バイアル、注射器などが含まれる。容器は、ガラス又はプラスチックのような様々な材料から形成されてよい。容器は、症状の治療に有効である組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る(例えば、容器は皮下注射針により貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい)。組成物中の少なくとも一つの活性薬剤は本発明の多重特異性抗体ないしその抗体断片である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が特定の疾患の治療に用いられることを示す。ラベル又はパッケージ挿入物は更に、抗体組成物を患者に投与するための指示を含む。また、本明細書中に記載の併用治療を含む製造品及びキットも考慮される。

10

パッケージ挿入物は、慣習的に治療用製品の市販パッケージに含まれる指示書を指し、効能、使用、用量、投与、禁忌及び／又はこのような治療用製品の使用に関する警告についての情報を含むものである。他の実施態様では、パッケージ挿入物は、組成物が、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、腎臓細胞癌腫、膠腫又は卵巣癌の治療のために用いられることを示す。

さらに、製造品は、製薬的に許容可能なバッファー、例えば注射用の静菌水(BWF I)、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を含む第2の容器を具備してもよい。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

20

【0139】

また、様々な目的、例えばVEGF又はHER2を細胞から精製する又は免疫沈降するために有用なキットが提供される。VEGF又はHER2の単離又は精製のために、キットは、ビーズ(例えばセファロースビーズ)に結合したVEGF／HER2抗体(例えばbH1-44又はbH1-81)を含みうる。例えば、ELISA又はウェスタンブロットにおいて、VEGF又はHER2をインビトロで検出及び定量するための抗体を具備するキットが提供されうる。製造品と同様に、キットは、容器と容器上ないしは容器に付随するラベルないしはパッケージ挿入物を具備する。容器は、本発明の少なくとも一の多重特異性抗体ないし抗体断片を含む組成物を収容する。例えば希釈剤及びバッファ又はコントロール抗体を具備する他の容器が具備されてよい。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物の説明並びにインビトロでの使用又は診断上の使用についての指示を提供してよい。

30

【0140】

前述の記載は当業者が本発明を実施するために十分であるとみなされる。以下の実施例は、事例のためだけであって、本発明の権利範囲が制限されるものでは決してない。事実、本明細書に示したものと記載内容に本発明の様々な変更が加わることは、前述の記載から当業者に明らかであり、添付の特許請求の範囲内のものである。

【実施例】

【0141】

40

実施例1. ライブラリーの設計および構築

抗体の抗原結合部位は、抗原を認識するための3つのCDRループをそれぞれ含有する重鎖(HC)および軽鎖(LC)の可変ドメイン(V_H 、 V_L)を結合させることによって形成される。多くの場合、これら2つの可変ドメインのうちの1つ、しばしば V_H が、抗原の特異性を決定する。トランスジェニックなHCを有するが、未変化のLCレパートリーも有するマウスから、中和抗体価が生じる(Sennら、Eur. J. Immunol. 33:950~961、2003)。本発明者らは、抗体の二重特異性が発生し得る機序、ならびに V_H ドメインおよび V_L ドメインの異なる活用によって、二重の抗原結合特異性が可能となり得るかどうかの調査に着手した。

半経験的アプローチをとり、アミノ酸組成および抗体軽鎖のCDRの長さを多様化する

50

ための設計、ならびにタンパク質抗原に特異的に結合する抗体を選択することができる、機能性ファージ表出抗体ライブラリーの生成を可能にするライブラリー鑄型を見出した。K a b a t データベースに示されているおよそ1500個のヒトカッパ軽鎖配列のCDR領域の配列および長さの多様性は、ライブラリーの設計プロセスを導くのに役立った。溶媒に露出する残基を標的にして、ランダム化を行った。サブセットのランダム化した位置は、これらの部位における天然レパートリーの一部をなすアミノ酸となるように合わせ、一方、残りの部位は、20種の天然に存在するアミノ酸すべてを含むようにランダム化した。

【0142】

特に、以下に記載する軽鎖鑄型（可変ドメイン）を、本明細書の記載に従って改変した（下線を引いた残基がランダム化した残基である）（配列番号10）。 10

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQD²⁸VNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS⁵⁰ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQ⁹¹HTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

4つのセットのライブラリーを、3つのヒトF a bおよびs c F vの鑄型に基づいて生成し、明確に異なるセットの位置を標的にして、ランダム化を行った（図1）。

ライブラリーのすべてにおいて、重鎖は一定に保ち、その配列はライブラリー鑄型によって定義された。重鎖鑄型（可変ドメイン）の配列を、以下に記載する（配列番号11）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDQTYIHWRVQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY 20
LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

【0143】

ライブラリーの設計を、図1および図2に要約する。すべてのライブラリー鑄型が、CDRL1中に組み込まれた終止コドン（S i d h u ら、2004）を含有して、ファージ表出抗体ライブラリーのメンバーの間に鑄型軽鎖が存在するのを阻止した。鑄型のCDR配列を、図3に要約する。

一例では、本発明者らは、元々の結合特異性を保持する一方で、異なるタンパク質抗原に結合することができる変異体を同定するために、HER2に特異的な抗体のLC可変ドメイン中に突然変異を導入した。本発明者らは、安定に発現することができる変異体を生成するために、保存的アプローチをとって、LC CDRをランダム化した。溶媒に露出する12箇所のLC CDR位置、すなわち、CDR1中の5箇所（28、29、30、31、32）、CDR2中の3箇所（50、51、53）、およびCDR3中の4箇所（91、92、93、94）を選択して、ランダム化を行った。さらに、選ばれた部位におけるアミノ酸の多様性の設計を導くために、およそ1500のヒトカッパLC CDR配列を解析することによって、これらの位置の天然の多様性も調べた（J o h n s o n およびW u、N u c l e i c A c i d s R e s . 28:214、2000；C h o t h i a およびL e s k、J . M o l . B i o l . 196:901、1987）（図4）。比較的大きな天然の多様性を有するいくつかの位置（30、31、50、92、93）は完全にランダム化し、一方、その他の位置では、わずか2つのアミノ酸の種類に限定して天然の抗体を模倣した。また、天然のLCのCDR1およびCDR3の長さの変化も、ライブラリーに反映させた（図4）。図4中、Xは、表示した低い頻度で設計したアミノ酸の種類を意味する。長さの多様性は、1～5つの残基を、残基30と残基31との間および残基93と残基94との間に挿入することによって構築する。 40

【0144】

このLCライブラリーは、生産的なナイーブレパートリーである（表1）。95個のランダムクローンをスクリーニングした、4回の選別の終了時の結果を列挙する。特に、新たな結合特異性についての選別を、記載に従って、固定化した標的（VEGF、DR5およびヒトFc）に対して実施した（S i d h u ら、J . M o l . B i o l . 338:299、2004）。4回の選別後、標的HER2および非標的タンパク質BSAに対する結 50

合性についてE L I S Aを使用して、95個のファージクローンをアッセイして、特異的結合性を確かめた。H E R 2結合性を維持する、標的に結合するクローンを濃縮するために、H E R 2に対する最終回の選別を実施した。陽性クローンについて配列決定した。最も高い親和性の結合体を同定するために、抗原結合性についてのI C₅₀を、競合E L I S Aによって決定した(S i d h uら、J. M o l. B i o l. 338:299、2004)。特有のクローンの数を、配列解析により決定し、H E R 2結合性を維持する特有のクローンの数(二重特異性クローン)を示す。これらのクローンは、B S A等の不適切な抗原に対しては最小のバックグラウンド結合シグナルを示す。

【表1】

表1. 軽鎖ライブラリーの選別の概要

	陽性%	特有の配列	H E R 2 陽性
ヒトFc融合体	63	61個中31個	1
hVEGF	77	74個中41個	41個中30個
DR5、長	85	82個中5個	5個中2個*

*=弱い結合シグナル

標的	二重特異性、スクリーニング	二重特異性、選別
ヒトFc融合体	31個中1個	未決定
hVEGF	41個中30個	94個中94個
DR5、長	5個中2個*	7個**中2個

*=弱い結合シグナル、H e r 2

**=弱い結合シグナル、D R 5

【0145】

3つのタンパク質抗原、すなわち、ヒト血管内皮増殖因子(h V E G F)、デスレセプター5(D R 5)、およびI g Gの補体結合断片(F c)に対する選別によって、多くの結合性クローンを生成した(図5A)。クローンの中には、H E R 2に対する結合親和性を喪失したものもあれば、H E R 2結合性を維持し、したがって、二重特異性であったものもあった。新たな結合特異性を有する131個の特有のH e r c e p t i n(登録商標)抗体変異体の配列解析によって、H e r c e p t i n(登録商標)抗体(図5B)と比較したアミノ酸の置換および挿入が同定された。

突然変異の数は、3~17個の範囲に及んだ。H E R 2結合性を保持したクローン(二重特異性クローン)は平均して、H E R 2結合性を喪失したクローンよりも少ない突然変異を含有した。H e r c e p t i n(登録商標)抗体のC D R-L3配列を保持することが好まれたが、それだけではH E R 2結合性を保存するには十分ではなかった。このことは、H e r c e p t i n(登録商標)抗体のC D R-L3が、H E R 2結合性についての最も重要なL C C D Rであるという報告と一致する(K e l l e yおよびO' C o n n e l l、B i o c h e m i s t r y 32:6828、1993)。代表的なV E G F結合性クローンを、F a bタンパク質およびI g Gタンパク質として発現させた(表2)

。

【表 2】

表 2. ハーセプチン（登録商標）抗体の軽鎖ライブラリーから単離した代表的な抗体（配列番号：1 2～2 3）。

	CDR-L1										CDR-L2					CDR-L3							特異性	K _D (nM)
	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	5	5	5	5	9	9	9	9	9	9				
	8	9	0	0	0	0	0	1	2	3	0	1	2	3	1	2	3	3	3	4				
				a	b	c	d											a	b					
ハーセプチン (登録商標)	D	V	N	-	-	-	-	T	A	V	S	A	S	F	H	Y	T			T	HER2	0.1		
3-1 ^a	N	V	W					D	W	V	P	A	S	S	G	W	Y	I		A	VEGF	15		
bH1	D	I	P	R	S	I	S	G	Y	V	W	G	S	Y	H	Y	T			T	VEGF/HER2	300/26		
bH3	D	I	G	L				G	S	V	W	A	S	Y	H	Y	T			T		19,000/8		
bH4	D	I	R	S				G	S	V	W	G	S	Y	H	Y	T			T		3,500/11		

^a ハーセプチン（登録商標）抗体との違いを太字で示す。

【0 1 4 6】

本発明者らは、これらの抗体が、それらの同族抗原（c o g n a t e a n t i g e n）に特異的に結合し、その他のタンパク質とは非特異的に相互作用しないことを実証するために、1 パネルの哺乳動物細胞溶解物および非抗原性タンパク質に対しては、検出可能な結合性がないことを示した。このアッセイにより、精製した I g G または F a b の単一特異性および二重特異性が確認された（図 6）。

L C ライブラリー由来の単一特異性抗体の平衡結合親和性（K_D）は、1 5 ～1 5 0 n M の範囲に及んだ。二重特異性抗体は、新たな抗原（すなわち、V E G F）には、高 n M から低 μ M までの親和性で結合し、H E R 2 には、低 n M の親和性で結合した（表 2）。表 2 に示す抗体のうち、抗体 b H 1 が、2 つの異なるタンパク質抗原、すなわち、V E G F（K_D = 3 0 0 n M）および H E R 2（K_D = 2 6 n M）に対して最も高い二重特異性の親和性を表出した。

【0 1 4 7】

材料

酵素および M 1 3 - K O 7 ヘルパーファージは、New England Biolabs から入手した。E. coli XL1-Blue は、Stratagene から入手した。ウシ血清アルブミン（BSA）、卵白アルブミンおよび ツイーン 2 0 は、Sigma から入手した。ニュートラアビジン、カゼインおよび Superblock は、Pierce から入手した。固定化されているプロテイン G および抗 M 1 3 コンジュゲート化西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）は、GE Healthcare（Piscataway, NJ）から入手した。Maxisorp イムノプレートは、NUNC（Roskilde、デンマーク）から入手した。テトラメチルベンジジン（TMB）基質は、Kirkegaard and Perry Laboratories（Gaithersburg, MD）から入手した。すべてのタンパク質抗原は、Genentech, Inc. の研究グループが生成した。DNA の縮重は、IUB コードを使用して示し、別段の記載がない限り、等モルの混合物を示す：N = A / C / G / T、D = A / G / T、V = A / C / G、B = C / G / T、H = A / C / T、K = G / T、M = A / C、R = A / G、S = G / C、W = A / T、Y = C / T。

例えば、特定のランダム化した位置において、野生型のコドン、を、全 2 0 種の天然アミ

ノ酸をコードする縮重NNKコドン（等モル比のN=A/T/G/C、K=G/T）で置き換えた。XYZコドンは、コドンのトリプレットのそれぞれの位置のヌクレオチドの比が等しくないコドンを指す。Xは、38%のG、19%のA、26%のTおよび17%のCを含有し；Yは、31%のG、34%のA、17%のTおよび18%のCを含有し；Zは、24%のGおよび76%のCを含有した。

【0148】

ライブラリー構築のためのファージミドベクター

標準的な分子生物学の技法を使用して、ベクターを構築した。3つの鋳型を、ライブラリーを生成するために構築した。すべての鋳型は、改変ヒト化4D5（8版）（Leeら、2004a）に基づいた重鎖ライブラリーにおいて使用したプラスミドpV0354の誘導体である。

Fabの軽鎖および重鎖の両方について、アルカリホスファターゼプロモーター（Lowmanら、1991）およびstII分泌シグナルを含有するpV0354-Fab-Cベクターに2C4重鎖可変ドメインをクローニングすることによって、2C4Fab-C鋳型ファージミドpJB0290を構築した。これを、以前の記載（Leeら、2004b）に従って、単一のシステインを重鎖可変ドメイン1のC末端において含有するように工学的に操作して、2C4Fabの二価のM13ファージ表出を可能にした。2C4軽鎖CDRを、Fab-Cベクターに、Kunkelらの方法（Kunkelら、1987）を使用する部位特異的変異誘発によって組み込んだ。記載（Sidhuら、2004）に従って、エピトープタグ（gDタグ）（LaskyおよびDowbenko、1984）を、軽鎖のC末端に付加して、表出レベルの決定を可能にした。高表出の重鎖可変ドメインをpV0354-Fab-Cにクローニングすることによって、Fab12-Gライブラリー鋳型pV1283を創出し、軽鎖可変ドメインをFab-12（ヒト化A4.6.1、抗VEGF抗体）のCDR-L3を含有するように改変した。高表出のV_Hは、G6Fabの重鎖CDR残基をショットガンアラニンスキャニング変異誘発（Liangら、2006；Vajdosら、2002）を使用してランダム化し、CDR-L3がFab-12に転換している（Y₉₁STVPW₉₆；配列番号24）Fabライブラリーから、固定化抗gD抗体上でのパニングによって選択した。M13ファージ粒子の表面上で4d5（LC-R66G）scFvを二価性に表出するファージミドpV1384の設計および構築を、以前に記載されている（Sidhuら、2004）鋳型pS2018から改変した。scFv断片は、軽鎖と重鎖との間のリンカー領域中にgDエピトープタグを含有した。LCフレームワークの残基Arg66を、95%超の天然のカップ軽鎖中のこの位置の優勢な残基であるGly66に突然変異させた。KelleyおよびConnellの記載（Biochemistry 32:6828, 1993）によれば、このR66Gの突然変異によって、HER2に対するHerceptin（登録商標）抗体の結合親和性はわずかに低下するに過ぎない（<2倍）。ライブラリー鋳型のCDR配列を、図3に要約する。

【0149】

ライブラリーの構築

ファージ表出ライブラリーを、記載（Sidhuら、2004）に従って、オリゴヌクレオチド指定変異誘発を使用して創出した。このライブラリー鋳型ベクターは、CDR-L1中に組み込まれた終止コドン（TAA）を含有し、これは、変異誘発反応の間に、CDR-L1、CDR-L3（すべてのライブラリー）、CDR-L2（L1/L2/L3-A、-B、-C、+L4-D）、ならびに軽鎖フレームワーク3（L1/L4およびL1/L2/L3+L4-D）をコードする配列上にアニールする縮重オリゴヌクレオチドを使用して修復された。ライブラリーの変異誘発反応は、Kunkelらの方法（Kunkelら、1987）に従って実施した。ライブラリーのための軽鎖CDRの設計を、図1に記載する。図1には、異なるライブラリーのために各位置で使用した縮重コドンが要約されている。ランダム化の標的となる各位置において所望の頻度のアミノ酸の種類をコードするように、各CDRについて、3つまたは4つのオリゴヌクレオチドを特定の比で

ミックスした（図4）。オリゴヌクレオチドを異なる比で組み合わせて、選択した位置においては、天然の軽鎖カッパ配列中のアミノ酸頻度を反映するように多様性を微調整した。CDR1の場合、91～94位のコドンを含む3つのオリゴヌクレオチド、すなわち、CAT NNK NNK RST（配列番号25）、KMT XYZ XYZ RST（配列番号26）またはDGG XYZ XYZ RST（配列番号27）を、1：3：1の比でミックスした。XYZは、脂肪族の疎水性アミノ酸の範囲を低下させるために、各部位について等しい比率のA/G/T/Cを有するNNKの変化形態である（Leeら、J. Mol. Biol. 340：1073、2004）。CDR2の場合、50～53位のコドンを含む4つのオリゴヌクレオチド、すなわち、NNK GST TCC NNK（配列番号28）、TGG GST TCC NNK（配列番号29）、KGG GST TCC TMT（配列番号30）またはNNK GST TCC TMT（配列番号31）を、1：1：2：10の比でミックスした。CDR3の場合、それぞれの長さは、28～33位のコドンを含む3つのオリゴヌクレオチド、すなわち、G₇₀A₇₀C₇₀ RTT NNK NNK TAC STA（配列番号32）、G₇₀A₇₀C₇₀ RTT NNK NNK DGG STA（配列番号33）またはG₇₀A₇₀C₇₀ RTT NNK NNK NMT STA（配列番号34）の1：1：2の比の混合物であった。G₇₀A₇₀C₇₀は、「ソフト」コドンであり、指定したヌクレオチドを70%有し、その他の3つヌクレオチドをそれぞれ10%有し、約50%のGluおよび約50%のその他のアミノ酸をコードする。

カッパLCを有するいくつかの代表的な抗体の構造解析から、CDR1が最も広い範囲の立体構造を有し、このことは、ループの長さが変動すること（24位と34位との間で11～17残基）の結果である可能性が高いことが示されている。したがって、異なるCDR-L1の長さ（11～16残基長）を、ライブラリーに含めた。また、天然のCDR-L3も長さが変動し（89位と96位との間で7～10残基長）、これも、ライブラリーの設計によって反映されている（8～10残基長；図4）。

【0150】

図1に、軽鎖の天然の多様性と実際のライブラリーの設計との比較を示す。変異誘発産物を、1つのライブラリー当たり1つの反応にプールし、KO7ヘルパーファージを補った大腸菌SS320細胞中に電気穿孔し、30℃で一晩増殖した（Leeら、J. Mol. Biol. 340：1073、2004）。約 10^{11} 個の細胞および約5～10μgのDNAを、各エレクトロポレーション反応において使用した。ライブラリーファージを精製した（Sidhuら、J. Mol. Biol. 338：299、2004）。形質転換体の数は、 10^9 ～ 10^{10} 個の範囲に及んだ。ファージ表面上の未変化のFabまたはscFvの表出レベルを、ELISA結合アッセイにおいて決定し、この場合、各ライブラリーから無作為に選択した96個のクローンを、抗gD抗体と結合するそれらの能力について試験した。この表出レベルは、5～25%の範囲に及んだ（図2）。抗体を表出するクローンのうちの25%が、HER2結合性を保持した。およそ150個の表出クローンを配列決定して、設計の多様性と比較した実際のライブラリーの多様性を調べた。機能を表出したライブラリーメンバーのうちの一部（約30%）が、Herceptin（登録商標）抗体のCDR-L2配列および／またはCDR-L3配列を保持し、これは、不完全な変異誘発に起因した（scFvの発現においては、CDR-L中の鋳型の終止コドンによって、このCDRの100%の突然変異が保証された）。これらは、実際のライブラリーの多様性の配列解析から除外した。大半のランダム化した位置において、ファージ表出ライブラリーの表出クローンの多様性は、設計した多様性から有意には逸脱しなかった（ $p > 0.05$ 、オッズ比検定）。例外は、Ileと比較して若干過剰出現する（ $p = 0.005$ ）ことが見出されたCDR-L1の29位、ならびにGlyおよびSerがそれぞれ、AlaおよびTyrよりも優勢である（ $p < 0.01$ ）CDR-L2の51位および53位であった。

【0151】

実施例2．ライブラリーの性能の評価

10

20

30

40

50

ライブラリーの分類およびスクリーニング

種々のタンパク質抗原に特異的に結合する抗体を、4～5回の分類後に単離することができる場合に、ライブラリーが機能を有するとみなした。多くのタンパク質標的は、機能性に固定化してライブラリーのパニングを行うことが可能であることが知られており、妥当性が確認されたファージ表出ライブラリーから特異的な抗体が生成されている（Fellouseら、2005）（Leeら、2004a）。本発明者らは、各セットのライブラリーを評価するために、これらの標的のサブセットを選んで、選別を行った（図2）。これらのライブラリーに対して、抗gD抗体またはプロテインLを捕捉標的として用いて結合性の選別の初回を行って、Fab/scFv遺伝子が欠失しているクローンを排除し、それに続いて、4～5回の抗原の選別を行った。あるいは、それらのライブラリーに対して、抗gDまたはプロテインLを用いる前選別なしで、標的結合性の直接的な選別も行った。NUNC製96ウェルMaxisorpプレートを、抗原（5μg/ml）を用いて一晚コートし、遮断剤を交互に用いて1時間遮断した（図7）。最初の選別サイクルでは、 $10^{1.3}$ ファージ/mlのファージ溶液を、コートしたイムノプレートに添加した。ファージ濃度は、選別の回が進むにつれて減少させた。イムノプレート上のファージ溶液をインキュベートして、固定化抗原に結合させた後、プレートを、PBS、0.5% Tween 20を用いて繰り返し洗浄した。ストリンジェンシーを増加させるために、選別の回が進むにつれて、インキュベーション時間を短縮し（1回目4時間、2回目3時間、3回目3時間、4回目2時間、5回目1.75時間）、洗浄回数を増加させた（図7）。結合しているファージを、0.1M HClを用いて30分間溶出し、溶出液を、1.0M Tris塩基を用いて中和した。抗原でコートしたイムノプレートウェル1つ当たりのファージの回収率を計算し、抗原でコートされていないが遮断されているウェルの回収率と比較して、標的抗原に特異的に結合する、FabまたはscFvを表出するファージクローンの濃縮を調べた（図7）。溶出したファージを、大腸菌中で増幅し、その後の選別のために使用した。ランダムクローンを4回目および5回目から選択して、ファージELISAを使用してスクリーニングおよびアッセイを行い、ここでは、標的および抗gDに対する結合性を関連のないタンパク質（BSA）に対する結合性と比較して、非特異的な結合を調べた。抗gD抗体および標的に結合するが、非特異的なタンパク質には結合しないクローンを、特異的陽性とみなした。ライブラリーL1/L3、L1/L4、L1/L2/L3-A、L1/L2/L3-B__1およびL1/L2/L3-B__2は、いずれの特異的陽性のクローンも産生しなかったが、ライブラリーL1/L2/L3-CおよびL1/L2/L3+L4-Dからは、標的抗原に対して特異的な抗体を単離することができた。

【0152】

例えば、4回目から得られたランダムクローンを、ファージELISAを使用してアッセイし、ここでは、個々に増幅したクローンの、標的およびHER2に対する結合性を、非標的タンパク質（BSA）に対する結合性と比較して、結合特異性を試験した。HER2結合性を維持するファージクローンを濃縮するために、VEGFまたはDR5による選別の3回目および4回目から溶出したファージを増殖し、それに対して、HER2でコートしたウェル上でさらに1回選別を行った。陽性クローンのV_L領域およびV_H領域を、PCRにより増幅し、配列決定した。

hFC、hVEGFおよびhDR5-1fのヒット率はそれぞれ、63%、77%および85%であった。陽性クローンのV_L領域を、記載（Sidhuら、2004）に従ってPCRにより増幅し、配列決定した。陽性の特異的な結合体のDNA配列解析から、特有のクローンのパーセントが、51%（hFC）、55%（hVEGF）および6.1%（hDR5-1f）であることが明らかになった。特有のhVEGF結合性クローンの配列を、図8に要約する。

【0153】

hVEGF結合性クローンのプレート選別と溶液選別との組合せ

4回の分類の後のhVEGF結合性クローンに大きな多様性が観察された。高い親和性のhVEGF結合性クローンを同定するために、4回目のプレートに基づいた分類に続く

て、溶液に基づいた選別のアプローチをとった。50 nMビオチン化hVEGFを、固定化抗原上での4回目の選別から得て繁殖させたファージと共にインキュベートした。攪拌しながら室温で2時間インキュベートした後、hVEGFに結合しているファージを、ニュートラアビジンでコートし遮断したイムノプレート上に捕捉し、それに続いて、繰り返し洗浄した。ファージクローンを、先の記載に従って、溶出、スクリーニングおよび配列決定した。この最後の溶液選別ステップから得られたhVEGF結合性クローンの配列を、図9に示す。

【0154】

ライブラリーL1/L2/L3-CおよびライブラリーL1/L2/L3+L4-Dからの二重特異性クローンの単離

ライブラリーL1/L2/L3-CおよびライブラリーL1/L2/L3+L4-Dのライブラリー鑄型は、Her2に高い親和性で結合する、hu4D5抗体から改変したscFv断片であった。hu4D5-5のHer2結合性についての機能性パラトープを、CDR領域のアラニンスキャニング変異誘発によって位置付けると、重鎖の残基が、大半の結合の自由エネルギーに寄与し、一方、個々の軽鎖の残基が寄与する程度はそれより少ないことが示された(KelleyおよびO'Connell、1993)。ヒトHer2-ECDと複合したHerceptin(登録商標)抗体のFabの原子構造の解析から、軽鎖は、抗原との接触を起こすことに関与し、一方、重鎖は、抗原との構造的な界面の大部分をもたらすことが実証されている(Chouら、Nature 421:756、2003)。本発明者らは、Herceptin(登録商標)抗体の鑄型上に構築した機能性の軽鎖ライブラリーのいくつかのメンバーが、Her2への結合能を保持することを観察した。Her2にも第2の抗原にも結合することができる機能性ライブラリーであるL1/L2/L3-CおよびL1/L2/L3+L4-Dから、二重特異性scFv断片を単離する試みにおいて、2つの戦略を適用した。1つのアプローチでは、先に記載した標的抗原の選別から得られた陽性のクローンを、ELISAにより、Her2結合性を保持するものについてスクリーニングした。Her2に結合することができる特異的陽性のクローンのパーセントは、第2の抗原の特異性に依存して変化した。61個の特有のhFcに特異的陽性のクローンのうちわずか1個のクローンが依然としてHer2に結合するに過ぎず(1.6%)、41個の特有のhVEGF結合性クローンのうち30個が依然としてHer2に結合し(73%)、5つの特有のhDR5結合体のうち2つが依然としてHer2に結合した(40%)。さらに、選別に基づくアプローチもとして、二重特異性抗体を、hVEGF結合性抗体およびhDR5結合性抗体のプールからHer2結合体を選択することによって単離した。標的抗原の分類の4回目から得られた溶出液に対して、 2×10^{13} 個のファージ/mlを、Her2(5 $\mu\text{g/ml}$)でコートしBSAで遮断したMaxisorpイムノプレート上で1時間インキュベートすることによってさらに1回選別を行った。これらのプレートを、先の記載に従って、PBS、0.5%ツイーン20を用いて15回洗浄し、結合しているファージを溶出した。ランダムクローンを、Her2、抗gDおよび標的に対する結合性について選択およびアッセイし、非関連のタンパク質(BSA)への非特異的な結合と比較した。試験した192個のクローンすべてが特異的陽性であると同定され、これらを先の記載に従って配列決定した。配列決定から、94個の特有の配列が明らかになった。要約すると、この方法により、試験した94個の特有のクローンから、94個のHer2/hVEGF二重特異性クローンを生成した(100%)(図8)。両方の単離戦略から単離した特有のhVEGF/Her2二重特異性抗体すべての配列を、図10Aおよび10Bに要約する。Her2に対する検出可能な結合性すべてを喪失した単離クローンの配列を、図11に示す。二重の特異性を有するクローンのうち、ほとんどすべてがHerceptin(登録商標)抗体のCDR-L3を保持し、このことは、CDR-L3の維持がHER2結合性を維持するために重要である可能性を高めている。hDR5の場合には、7個の特有のHer2結合性クローンのうち2個が、二重特異性であった(29%、12個のクローンを配列決定した)。これらの二重特異性のクローンのうちの1個が、CDR-L3中にいくつかの相同的な変化を有した。

10

20

30

40

50

【0155】

hVEGF結合性クローンの高スループットによる特徴付け

96ウェルフォーマット中での高スループットのシングルスロット競合ELISA (Sidhura, 2004) を使用して、hVEGFに対する高い親和性のクローンについてスクリーニングし、VEGFR1遮断プロファイルの研究した。手短に述べると、Maxisorp Immunoplateを、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ hVEGF₁₀₉を用いて4℃で一晩コートし、1% (w/v) BSAを用いて1時間遮断した。大腸菌XL1-Blue中のファージミドクローンを、カルベニシリンおよびM13-KO7ヘルパーファージを補った150 μl の2YTブロス中で増殖した。96ウェルフォーマット中で、培養物を攪拌しながら37℃で一晩増殖した。親和性スクリーニングのために、ファージを含有する培養上清を、PBST (0.05% ツイーン20および0.5% (w/v) BSAを有するPBS) 中で100 nM hVEGF₁₀₉を添加した状態または添加しない状態で5倍に希釈した。レセプター遮断スクリーニングのためには、hVEGFでコートしたウェルをVEGFR1ドメイン1~3 (D1~3) およびVEGFR1ドメイン2 (D2) がある状態またはない状態でインキュベートしてから、5倍に希釈したファージ上清を添加した (Liangら, 2006; Wiesmannら, 1997)。室温 (RT) で1時間インキュベートした後、混合物を、hVEGF₁₀₉を用いてコートしたプレートに移し、10分間インキュベートした。プレートを、PBT (0.05% ツイーン20を有するPBS) を用いて洗浄し、PBST中で5000倍に希釈して1 nMとなした抗M13抗体の西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートと共に30分間インキュベートした。プレートを洗浄し、TMB基質を加えておよそ5分間展開し、1.0 M H₃PO₄を用いて消光し、450 nmにおける分光光度を読んだ。シングルスロット親和性アッセイでは、溶液相hVEGF₁₀₉の存在下における吸光度の、溶液相hVEGF₁₀₉の非存在下における吸光度に対する比を、親和性の指標として使用した。低い比は、最初のインキュベーションの段階で大部分のFab-ファージが溶液相hVEGF₁₀₉に結合し、したがって、固定化hVEGF₁₀₉により捕捉されるものがなかったことを示すことになる。最初の41個の特有のクローンの高スループット親和性アッセイの結果を、図12に要約する。同様に、遮断アッセイの場合も、低い比は、クローンのhVEGF₁₀₉に対する結合がhVEGF₁₀₉とVEGFR1との相互作用によって遮断されることを示し、このことは、いくつかのクローンが、VEGF上に、それぞれのVEGFレセプター断片と重複する結合部位 (エピトープ) を有し (図13Aおよび13B)、これらのクローンは、遮断性の抗体を表出している可能性が高いことを示した。

【0156】

二重特異性hVEGF/Her2クローンの高スループットによる特徴付け

先のセクションで記載したのと同じ原理を適用して、さらなる特徴付けのために、hVEGFおよびHer2に対して高い親和性を有するクローンを単離することができた (図14A)。高スループットのシングルスロット競合ELISAを使用して、hVEGFおよびHer2に対する高い親和性クローンについて、Maxisorp Immunoplateを $2\mu\text{g}/\text{ml}$ のhVEGF₁₀₉およびHer2-ECDを用いて4℃で一晩コートし、それに続いて、1% (w/v) BSAを用いて1時間遮断することによってスクリーニングした。先のシングルスロットELISAスクリーニングにおいて二重特異性であると同定されたファージクローンを、先の記載に従って増殖し、20 nM Her2-ECDおよび50 nM hVEGFを添加した状態ならびに添加しない状態でインキュベートした。室温で1時間インキュベートした後、溶液を、先のセクションの記載に従って、コートしたイムノプレートに適用し、結合シグナルを記録および解析した。hVEGFおよびHer2の両方について低い比を有するクローンを選択して、さらなる特徴付けを行った。シングルスロット競合ELISAにおいて最も低いシグナル比を発生させたhVEGF特異的ファージクローンおよびhVEGF/Her2二重特異性ファージクローンを選択して、競合ELISAによる親和性の測定を行った。同様に、最初のシングルスロットELISAスクリーニングから得られたDR5結合性ファージクローンおよびDR

5 / H e r 2 二重特異性ファージクローン、ならびにプレート選別と溶液選別との組合せから得られた V E G F 結合性クローンについても測定を行った。単一コロニーから得られたファージクローンを、カルベニシリンおよび K O 7 ヘルパーファージを補った 25 ml の 2 Y T 培地中、30℃で一晩増殖することによって繁殖させた。P E G / N a C l 中で沈殿させることによって精製したファージを最初に、P B S T 中で段階的に希釈し、抗原でコートしたプレートに対する結合について試験した。50～70%の飽和シグナルを発生させる希釈度を、溶液結合アッセイにおいて使用し、この場合、ファージを、最初に、漸増濃度の抗原と共に1～2時間インキュベートし、次いで、抗原でコートしたプレートに移し、10～15分かけて未結合のファージを捕捉した。I C₅₀を、50%のファージが固定化抗原に結合するのを阻害する溶液-結合段階の抗原濃度として計算した (L e e 10
e ら、2004a)。図14Bは、プレートによる分類戦略から得て、解析した h V E G F 結合性クローンについて I C₅₀を計算した曲線を示す。この I C₅₀値は、22 nM ~ > 1 μM の範囲に及んだ (図14B)。プレートに基づいた選別と溶液に基づいた選別との組合せによって単離した h V E G F 結合体についての I C₅₀値は、41 nM ~ 226 nM の範囲に及んだ (図9)。D R 5 結合性クローンの I C₅₀値は、20 nM ~ > 1 μM の範囲に及んだ。h V E G F / H e r 2 二重特異性クローンについての I C₅₀値を、図15に要約する。

【0157】

実施例3. 軽鎖ライブラリーから得られた抗体の特徴付け
s c F v の F a b への変換

ファージ上に表出した F v ' 2 の F a b への変換が、ライブラリーから得られた結合性クローンの親和性に影響を及ぼすかどうかを試験するために、2つのクローン (3-7 抗 h V E G F および 4-1 抗 h D R 5) を、F a b への変換のために選び、ファージ上に表出させた。選択した h V E G F の s c F v 断片および D R 5 の s c F v 断片についてのファージミド DNA の V_L 領域を、制限酵素を用いて消化し、これらの酵素によって、C D R - L 1 をコードする領域の DNA の上流 (E c o R V)、および C D R - L 3 をコードする領域の下流 (K p n I) が切断された。この消化した DNA 断片を、同様に消化した、F a b h u 4 D 5 のファージ表出のために設計されているベクター (p A P 2 0 0 9) に、M 1 3 遺伝子-3 マイナーコートタンパク質の C 末端ドメインに融合することによってライゲーションした (L e e 30
e ら、2004b)。得られたバイシストロニックなファージミドは、アルカリホスファターゼプロモーターの制御下にある、C 末端においてエピトープ (g D) タグに融合した軽鎖と、C 末端において M 1 3 マイナーコートタンパク質 (p 3) 遺伝子に融合した重鎖 (V_H および C_H 1) とを含有する。第1のオープンリーディングフレームは、s t I I 分泌シグナル、それに続く、C D R が 3-7 抗 h V E G F の s c F v ' 2 および 4-1 抗 h D R 5 の s c F v ' 2 の C D R で置換されている F a b 4 D 5 軽鎖、ならびにそれに続く、g D タグエピトープからなるポリペプチドをコードした。第2のオープンリーディングフレームは、以下からなる融合ポリペプチドをコードした：s t I I 分泌シグナル、F a b 4 D 5 重鎖、アンバー (T A G) 終止コドン、G l y / S e r リンカー配列、および g 3 タンパク質の c 末端ドメイン (c P 3)。M 1 3 - K O 7 を同時感染させた大腸菌 X L - 1 B l u e 中における発現により、3-7 s c F v ' 2 および 4-1 s c F v ' 2 の F a b 変異形を表出する M 1 3 バクテリオファージを40
産生した。ファージ競合 E L I S A を使用して、h V E G F および h D R 5 に対する、ファージが表出した s c F v および F a b の親和性を、I C₅₀ 値として推定した。これら2つの異なるフォーマットから得られたデータは十分に一致した (データ示さず)。

【0158】

M 1 3 バクテリオファージ表面上における b H 1 F a b の表出を可能にするために、プラスミド p A P 2 0 0 9 を、b H 1 F a b をコードするように改変した。b H 1 F a b の変異形を、L C ライブラリーおよび H C ライブラリーのそれぞれのために、3つの L C C D R または 3つの H C C D R の中に終止コドン (T A A) を含有するライブラリー鑄型として使用した。別個の重鎖および軽鎖のアラニンスキャニングライブラリーお50

よびホモログスキャニングライブラリーを、以前の記載 (Vajdosら、J. Mol. Biol. 320:415, 2002) に従って構築した。縮重度は、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ の範囲に及び、実際のライブラリーのサイズは、 $6 \times 10^9 \sim 4 \times 10^{10}$ の範囲に及んだ。ライブラリーは、上記に従って構築した。2～3回の選別を、固定化標的 (VEGF、HER2-ECF、プロテインLまたは抗gD mIgG) 上で実施した (Vajdosら、J. Mol. Biol. 320:415, 2002)。標的結合性クローンを、ファージELISAによって標的への結合についてスクリーニングし、それに続いて、DNA配列決定および配列アライメントを行って、各位置における野生型/突然変異の比を計算した。 F_{wt}/m_{ut} 値を求めるために、VEGF結合性クローンおよびHER2結合性クローンのおよそ100個の特有の配列の配列解析から得られた比を、表出およびタンパク質の折畳みの作用について、100個超の抗gD結合性クローンの配列から計算した比で割ることによって補正した。Fab重鎖のみが、ファージのコートに融合することから、軽鎖に融合するgDタグのファージ表出が、適切な折畳みおよび軽鎖と重鎖との結合の指標となる。また、一貫して、Fabの軽鎖上の非直鎖状エピトープに結合するプロテインLからも、gDタグにより選別した場合、類似の野生型/突然変異の比が得られた。 F_{wt}/m_{ut} 値を、Vajdosらの記載 (J. Mol. Biol. 320:415, 2002) に従って、式 $\Delta\Delta G = RT \ln(K_{a, wt}/K_{a, mut}) = RT \ln(F_{wt}/m_{ut})$ を使用して $\Delta\Delta G$ に変換した。

【0159】

ライブラリー結合体の、遊離のヒトのFabおよびIgGとしての発現

これらの抗体の親和性、特異性およびその他の特性を正確に決定するために、競合ELISA実験において最も高い親和性を示す、それぞれの特異性の群から得られた代表的なクローンを選択して、遊離のFabおよびhIgGとして発現させた (図16)。軽鎖および重鎖の可変ドメインを、大腸菌中でのFabの発現または哺乳動物細胞中での一過性のヒトIgG発現のために以前に設計されているベクター (Leeら、2004a) にクローニングした。Fabタンパク質を、記載 (Prestaら、1997) に従って、形質転換34B8大腸菌細胞を完全C. R. A. P. 培地中、30℃で26時間増殖することによって生成した。hIgGsを、293細胞の一過性のトランスフェクションによって発現させ、それを、プロテインA親和性クロマトグラフィーを用いて精製した (Fuhら、J. Biol. Chem. 273:11197, 1998)。1Lの大腸菌培養物を、プロテインG親和性クロマトグラフィーを用いて精製した。カラムを、PBSを用いて洗浄し、Fabタンパク質を、100mM酢酸を用いて溶出し、PBSに対して透析した。4Lの大腸菌培養物を、以前の記載 (Mullerら、1998) に従って、プロテインA親和性カラム上で精製し、それに続いて、カチオン交換クロマトグラフィーを行った。タンパク質濃度を、分光光学的に決定した。Fabの最終的な収率は典型的には、小規模な振とうフラスコによる増殖物から精製した場合、0.8～15mg/lであった。IgG産物の収率は、小規模な培養の場合、6.7～60mg/lの中～高の程度であった (図17)。精製したタンパク質を最初に、分子ふるいクロマトグラフィーおよび光散乱を使用して特徴付けて、これらのタンパク質が顕著なレベルのタンパク質凝集を示さない (<5%) ことを保証した。

【0160】

手短に述べると、発現させたFabおよびhIgGを、ELISAにより、それらのそれぞれの抗原 (複数可) への結合についてスクリーニングした。1つの変異体を除きすべてが、それらの同族抗原 (複数可) に結合することが見出された。クローン4-6は、FabおよびhIgGへ転換した場合、hDR5への結合能を喪失した。より短い形態であるhVEGF₁₀₉に対して産生させ、選択した抗VEGFクローンを、hVEGF₁₆₅に対する結合性について、標準的なELISA (H3 hIgG、H4__N hIgG、H4__D hIgG) および競合ELISA (bH1 hIgG、3-1 hIgG、3-6 hIgG、3-7 hIgG) を使用して試験した。G6 hIgG (Fuhら、2006) を、陽性コントロールとして使用した (図18Aおよび18B)。予想した

ように、すべてのクローンがhVEGF₁₆₅に結合した。

【0161】

タンパク質凝集の程度を研究するために、選択したクローンを、精製したFabおよびIgGとして、分子ふるいクロマトグラフィー（SEC）により解析し、それに続いて、光散乱（LS）解析を行った。これらの試料を、PBS中で、0.5mg/ml（hIgG）および1mg/ml（Fab）の濃度でアッセイした。最大5%の凝集が、これらの指定した濃度で、すべての試料について観察され（図17）、この値は、本発明者らが、その他のファージ表出由来抗体について以前に観察したことがある値の範囲に属する。クローン3-6および3-7は、予想した時点では出現せず、このことから、これらの再フォーマットしたIgGおよびFabは、凝集および／または樹脂との非特異的な相互作用を示すことが示唆された（データ示さず）。これらのクローンは、その後の解析を行うクローンのセットから外した。

10

【0162】

本発明者らは、交差反応性および非特異的結合を排除するために、標準的なELISAアッセイにおいて、全細胞溶解物、同族抗原および相同体を含めた、1パネルの固定化タンパク質標的に対する、高い濃度（100nM）の選択したhIgGの結合性を研究した。本発明者らは、抗原に加えて、hVEGFのマウス変異形も固定化して、抗hVEGFクローンの異種間の反応性を試験した。具体的には、この1パネルのタンパク質を、Maxisorpプレート上に固定化し、PBS中の1%BSAを用いて1時間遮断した。hIgG（またはFab）を、PBST中で100nMまたは500nMの濃度に希釈し、コートしたプレートに移した。1時間のインキュベーションの後、プレートを洗浄し、HRPコンジュゲート化プロテインAと共にインキュベートした。結合シグナルを、TMB基質の添加によりおよそ5分間発色させ、1M H₃PO₄を用いて消光し、A₄₅₀における分光光度を読んだ。試験したhIgGは、それらの抗原（複数可）に特異的に結合した。クローンbH1およびクローン3-1は、マウスVEGF（mVEGF）に対して交差反応性を示した（図19）。

20

二重特異性抗体であるbH1、H3（抗hVEGF/Her2）、およびD1（抗hDR5/Her2）が、それらの同族抗原に同時に結合することができるかどうか、またはこれらの抗原が、抗体の結合について競合するかどうかを試験するために、hVEGFおよびhDR5を、2μg/mlの濃度で固定化した。一定の濃度のhIgGを、段階希釈したHer2-ECDと共にインキュベートし、それに続いて、これらの固定化抗原上のhIgGの捕捉を行った。いずれの場合も、Her2-ECDに対する結合が、その他の抗原に対する結合と競合することが見出された（図20）。

30

【0163】

本発明者らは、IgGおよびFab（すなわち、ライブラリーから単離した抗hVEGF Fabおよび抗hVEGF/Her2 Fab、ならびにIgG）の親和性を正確に決定するため、さらに、結合プロファイルをリアルタイムで研究するために、BIAcore（商標）-3000（BIAcore、Uppsala、スウェーデン）装置上での表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイを使用し、研究する分析対象に応じて40~300の応答単位（RU）でhVEGF、mVEGF、DR5およびHer2-ECDを固定化したCM5センサーチップを用いた。固定化は記載（Chenら、1999）に従って実施した。二価のIgG分析対象のアビディティ作用を最小限に留めるために、これらの場合には、センサーチップ上のより低い密度のリガンドを標的とした。（競合ELISA実験に基づいて）推定されたK_Dのおよそ10倍未満から10倍超までの濃度の範囲に及ぶ漸増濃度の試料を、22~30μl/分で注入し、結合応答を、参照フローセルからのRUを減じることによって補正した。さらに、これらの応答を、二重参照して、装置のドリフトについて、サンプルバッファー（0.05%ツイーン20を有するPBS）を注入した、リガンドをコンジュゲートさせたフローセルからのRUを減じることによって正規化した。Fabの動態解析のために、1:1のラングミュア結合モデルを使用して、k_{on}およびk_{off}を計算した。（高い分析対象濃度においては）必要に応じて、物質

40

50

移動限界がある1:1のラングミュア結合モデルを適用した。IgG分析対象の場合、物質移動限界があるまたはない二価の分析対象の結合モデルを使用した(BIAcore Evaluation Software 3.2)。H3-hIgG、H4-N Fab、およびH4-D-hIgGの場合、動態結合モデルへの応答の適合は、満足なものではなかった。したがって、平衡応答を分析対象濃度に対してプロットする定常状態の結合解析を適用した。 K_D を、 EC_{50} として推定した。BIAcore結合解析の概要を、図21に見出すことができる。hVEGF結合性抗体の3-1、3-6および3-7の親和性が、ナノモルの範囲にあることが見出された。解析した二重特異性抗体(bH1、H3、H4-N、H4-D)は、hVEGFに対して、低マイクロモルからマイクロモルの親和性を示した。対照的に、Her2に対する親和性は、8~59 nMの範囲に及んだ(Fab)。

10

抗hVEGF結合体であるbH1、H3およびH4-Nの軽鎖が、関連の重鎖の配列に依存せずに、hVEGFに結合することができるかどうかを決定するために、軽鎖可変ドメインを2C4 Fab発現ベクターpJB0524にクローニングし、したがって、2C4軽鎖可変ドメインを置換することによって、軽鎖可変ドメインを抗Her2-2C4 Fab上にグラフトした。これらのFabを、先の記載に従って発現させた。bH1/2C4キメラFabおよびH3/2C4キメラFabは、検出可能なレベルでは発現しなかった。H4-N/2C4キメラFabタンパク質を、単離し、hVEGF(bH1の元々の特異性)およびHer2(bH1、2C4の元々の特異性)に対する結合性について試験した。hVEGFおよびHer2に対する結合性は、標準的なELISA結合アッセイによっては検出されなかった(図22)。これらの結果から、bH1の重鎖は、抗原結合性に必要であることが示唆される。

20

【0164】

抗hVEGFエピトープの比較

hVEGF上の、抗hVEGF抗体のエピトープを大まかに位置付ける試みとして、本発明者らは、これらの新たに単離した抗VEGF抗体が、その他のhVEGF結合性抗体および既知の結合部位を有するVEGFレセプターと競合する能力を研究した(Fuhrら、2006; Mullerら、1998; Wiesmannら、1997)。これらのアッセイは、競合ELISAフォーマットにおいて行い、この場合、VEGFR1(Flt)ドメイン1~3、および抗hVEGFである抗体Avastin(登録商標)(IgG) 30、B20-4.1(IgG)、G6(Fab)、およびKDRドメイン1~7のFc融合タンパク質を、Maxisorpイムノプレート上に、2 µg/mlで固定化した。この溶液競合結合アッセイは、段階希釈した精製IgGタンパク質を用いて平衡化したビオチン化VEGFを使用し、未結合のビオチン-VEGFを、Maxisorbプレート上にコートした固定化されているFabまたはIgGを用いて捕捉し、ストレプトアビジンコンジュゲート化HRPを用いて検出した(Leaら、J. Mol. Biol. 340: 1073、2004)。hVEGFが、その他のhVEGF結合性抗体またはhVEGFレセプターに結合するのを遮断する抗体は、重複するエピトープを共有する可能性が高い。高濃度(µM)の二重特異性hVEGF/Her2結合性抗体であるbH1によって、hVEGFの、そのレセプターであるVEGFR1およびVEGFR2に対する結合を完 40全に遮断することができ、このことから、bH1のエピトープは、VEGFR1(図23)およびVEGFR2(図23)と十分に重複することが示唆される。さらに、bH1は、hVEGFのB20-4.1に対する結合も遮断する(図24)。また、H3、H4-NおよびH4-Dも、両方のレセプターに対するhVEGFの結合を遮断し、このことは、bH1と類似するエピトープがあることを指している(図23)。不完全な遮断プロファイルは、hVEGFに対するそれらの親和性が比較的低いことの結果である可能性が高い(図21)。対照的に、3-1は、hVEGFがVEGFR1に結合するのを最も高い濃度(0.5 µM)においてさえ遮断しない(図23)。さらに、本発明者らは、3-1-hIgGがAvastin(登録商標)抗体を遮断するのを検出することができなかつ 50た(図25)。しかし、3-1-hIgGは、VEGFR2(KDR)(図23)および

B20-4. 1 (図24) に対する hVEGF の結合を遮断する。これらの結果から、3-1 は、その他の抗体と比較して、特有のエピトープを有することが示されている。

【0165】

実施例4. bH1、抗hVEGF/Her2二重特異性抗体の構造-機能研究

bH1とその2つの抗原、VEGFおよびHER2との相互作用の性質を解明するために、構造的および機能的研究を行った。Herceptin (登録商標) 抗体とbH1とは、CDR-L1 ($V^{29}NTA^{32}$ 対 $I^{29}PRSIGY^{32}$ 、配列番号35および36) ならびにCDR-L2 ($S^{50}ASF^{53}$ 対 $W^{50}GSY^{53}$ 、配列番号37および38) が異なる。bH1抗VEGF/Her2を、VEGFおよびHer2に対するその二重特異性性質およびその比較的高い親和性に基づく構造的特徴付けの代表的として選択した。VEGFおよびHer2上の機能的および構造的エピトープを研究するために、VEGF₁₀₉と複合体形成したbH1 FabおよびhHer2の細胞外ドメインを結晶化し、2つの複合体の構造をX線結晶構造解析によって解析した。さらに、記載のようにコンビナトリアルファージ表出ライブラリーを用いたアラニンおよびホモログのショットガンスクニング分析を行った (Vajdosら、2002)。

【0166】

bH1 Fabの発現、精製、結晶化およびデータ収集

以前に記載のように、残基8~109からなるヒトVEGFのレセプター結合部分を発現させ、再折畳みを行い、精製した (Christingerら、1996)。以前に記載のようにHer2の細胞外ドメインの残基1~624を発現させ、精製した (Franklinら、2004、HudziakおよびUllrich、1991)。

大スケールのbH1 Fabの調製には、全細胞ペレットを10リットルの大腸菌発酵から得た。220グラムの細胞ペーストを1LのPBS、25mMのEDTA、1mMのPMSF中で解凍した。混合物をホモジナイズし、その後、マイクロ流動化装置に2回通した。その後、懸濁液を250mlのアリコートで90分間、12kで遠心分離した。その後、タンパク質をPBSで平衡化したプロテインGカラム (25ml) 上に5ml/分間で載せた。カラムを平衡化バッファーで洗浄し、その後、0.58%の酢酸で溶出させた。画分をSDS PAGEによってアッセイした (データ示さず)。bH1 Fabを含有する画分をプールし、その後、20mMのMES、pH5.5で平衡化した50mlの陽イオン交換SPセファロースカラム (Pharmacia) 上に載せた。Fabを平衡化バッファー中の塩化ナトリウムの勾配で溶出させた。勾配は0.5MのNaCl、20mMのMES、pH5.5まで直線的であった。Fabを含有する画分をSDS-PAGEによって同定し (データ示さず)、プールした。bH1 Fabは約0.5MのNaCl濃度で溶出させた。Fab濃度はA₂₈₀を測定することによって決定した。bH1 Fabの最終収率は、1lの発酵槽増殖物あたり67mgであった。

【0167】

複合体は、精製したbH1 FabおよびVEGFまたはHer2 ECDを2:1のモル比で混合し、VEGF-Fab複合体には25mMのトリス-HCl、pH7.5および0.3Mの塩化ナトリウム、Her2 ECD-Fab複合体には25mMのトリス-HCl、pH8および0.15Mの塩化ナトリウム中でのサイズ排除クロマトグラフィー (SP-200、Pharmacia) によって精製することによって得た。生じた複合体の組成はSDS PAGEによって検証した (データ示さず)。タンパク質複合体を濃縮し、結晶化の試行で使用した。19℃の蒸気拡散方法を用いた初期の懸滴実験の結果、bH1-VEGF複合体の場合では1週間以内に14通りの異なる条件から小さな同形結晶が生じた。bH1-Her2複合体の結晶は4つの条件で1週間以内に出現した。それぞれの場合について、1つの条件からの結晶をさらなる最適化のために選択した。

bH1 Fab-VEGF (8~109) の結晶化には、等体積のタンパク質複合体溶液 (10.6mg/mlのタンパク質、300mMのNaCl、25mMのトリス-HCl、pH7.5) および0.15MのD,Lリンゴ酸、pH7.0、20%のPEG₃₃₅₀を含有する結晶化バッファーを19℃で混合し、平衡化した。24時間後に、a=1

00.6、 $b=198.0$ 、 $c=77.7$ のセル寸法を有する空間群 $C222_1$ に属する大きな結晶が出現した。結晶形は不斉ユニット中に1個のFabおよび1個のVEGF単量体を含有していた。人工母液中に5%、10%、および15%のグリセロールを含有する液滴間を移送させ、続いて液体窒素中でフラッシュ凍結することによって、データ収集前に結晶を凍結保護した。データはAdvanced Light Source (Berkeley)のビームライン5.0.1で $2.6\text{ \AA}$ まで収集した。

bH1 Fab-Her2 (1~624)の結晶は、タンパク質溶液(11mg/ml、25mMのトリス、pH8および150mMの塩化ナトリウム)を、25%w/vのPEG₂₀₀₀、0.1MのMES、pH6.5を含有する結晶化バッファーと混合することによって得た。12時間後に、 $a=62.3$ 、 $b=115.1$ 、 $c=208.2$ のセル寸法を有する空間群 $P2_12_12_1$ に属する結晶が出現した。不斉ユニット中に1個のHer2-Fab複合体が含有されていた。データ収集の前に、20%のエチレングリコールを凍結保護剤として用いて結晶を液体窒素中でフラッシュ凍結した。データはAdvanced Light Source (Berkeley)のビームライン5.0.1で $2.9\text{ \AA}$ まで収集した。

【0168】

データ処理、構造決定、および洗練

データはDenzoおよびScalepackを用いて処理した(Otwinowski、1997)。bH1 Fab複合体の構造はPhaserによって解析した(L. C. Storoni、2004、Read、2001)。bH1-Fab-VEGF (8~109)複合体は、以前に記載されているVEGF-Fab複合体(2FJG)からのVEGFおよびHerceptin (登録商標)抗体Fab-Her2複合体(1N8Z)の可変ドメイン V_L/V_H または定常ドメイン C_{H1}/C_L のいずれかを含有するFab断片の座標を用いて解析した。Her2の断片およびHer2-Fab複合体1N8ZからのHerceptin (登録商標)抗体Fabの可変ドメインを、bH1-Her2構造を解析する際の検索モデルとして使用した。bH1 Fabの定常ドメインは、Herceptin (登録商標)抗体Fab定常部分を検索モデルとして使用した場合に見つけることができず(1N8Z)、Herceptin (登録商標)抗体Fab-Her2複合体構造によって導いて手動でドッキングしなければならなかった。モデルの構築および洗練は、それぞれプログラムRefmac (Collaborative Computational Project、1994)およびCoot (EmsleyおよびCowtan、2004)を用いて行った。立体化学的なパラメータはMolProbityを用いて分析した(Lovellら、Proteins、50:437 (2003))。構造は、Fab-VEGF複合体には $R_{\text{value}}=0.22$ および $R_{\text{free}}=0.27$ まで、Fab-Her2複合体には $R_{\text{value}}=0.25$ および $R_{\text{free}}=0.31$ まで洗練させた。VEGFおよびHer2-ECDとの複合体中のbH1 Fabの結晶構造をモデリングした。一部のbH1 Fab残基は抗原の4.5、4.0、および3.5 Å以内にあった。同じ抗体上の2つの抗原の2つのパラトープ(抗原との接触を行う抗体上の領域)は顕著に重複し、軽鎖および重鎖の両方からの残基が、両方の抗原との結合に関与している。bH1は、Avastin (登録商標)抗体と同様のVEGF上のエピトープと結合し、また、bH1は、Herceptin (登録商標)抗体と本質的に同一のエピトープ上のHer2と結合する。

【0169】

HER2の細胞外ドメイン(ECD)(残基1~624)およびVEGFレセプター結合ドメイン(残基8~109)と結合したbH1 Fabの結晶構造を、それぞれ $2.9\text{ \AA}$ および $2.6\text{ \AA}$ の分解能で決定した(図26および表3)。図26は、Herceptin (登録商標)抗体/HER2複合体と重ね合わせたbH1 Fab/HER2の結晶構造、およびbH1 Fab/VEGF複合体の結晶構造を示す。

bH1/HER2複合体では、FabはHerceptin (登録商標)抗体と同様の様式でHER2のドメインIVと結合する(Choら、Nature、421:756、

10

20

30

40

50

2003)。2つの複合体は2.3 ÅのC α 位置の標準偏差(r. m. s. d.)と重なる。VEGF複合体中では、bH1は、VEGFレセプターVEGFR1およびVEGFR2ならびに他のVEGF抗体の結合部位と重複するエピトープを認識する(Wiesmannら、Cell、91:695、1997、Mullerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94:7192、1997)。一貫して、VEGFとそのレセプターとの結合のbH1遮断が観察された(図27)。図27に示すデータでは、ビオチン標識したヒトVEGF₁₆₅を漸増濃度のIgG(x軸)で平衡化した。結合していないhVEGF₁₆₅を固定化したVEGFR2-ECDFc融合体上に捕捉し、分光光度によって検出した(450nmの光学密度、y軸)。

【0170】

10

図28に示すように、bH1上のVEGFおよびHER2の結合部位は広範に重複する。HER2と結合する14個の残基のうちの12個はVEGFとも接触する。どちらの結合部位にもHCおよびLCからのCDR残基が含まれる。HER2複合体中では、LCおよびHC CDRは、ほぼ等しい抗原接触面積に貢献する(それぞれ53%および47%)一方で、VEGF複合体中では、LC CDRは埋没した表面のほぼ70%を構成する(図29)。Herceptin(登録商標)抗体およびbH1上のHER2結合部位は類似しており、Herceptin(登録商標)抗体配列がbH1中で保存されていないCDR-L1および-L2領域中のみが異なる(図28)。図28では、bH1またはHerceptin(登録商標)抗体のFab表面上の残基は、VEGFまたはHER2によって埋没された程度に従って陰影をつけた(濃い色および白文字、>75%埋没した、中間の色および白文字、50~75%埋没した、薄い色および黒文字、25~49%埋没した)。下線を引いた残基はbH1およびHerceptin(登録商標)抗体の間で異なる。白い点線は軽鎖および重鎖の境界線を示す。

20

【0171】

【表 3】

表3. 結晶学的研究

	bH1 Fab/hVEGF複合体	bH1 Fab/HER2-ECD複合体
データ収集の統計		
空間群	C222 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
単位格子 (Å)	a=100.6, b=198.0, c=77.7	a=62.3, b=115.1, c=208.2
ビームライン、波長	ALS 5.0.1	ALS 5.0.1
分解能 (Å)	50.0-2.6	50.0-2.9
R _{sym} ^a	0.090 (0.66)	0.095 (0.66)
観測の回数	151689	192951
ユニークな反射	24705	34149
完全性 (%) [*]	99.8 (100)	100 (100)
1/σ (I) [*]	16.0 (3.0)	18.5 (2.6)
洗練の統計		
非対称単位の内容物	1/2個のVEGF二量体、1個のFab	1個のHer2-ECD単量体、1個のFab
分解能 (Å)	30.0-2.6	30.0-2.9
使用した反射	22977	32277
R因子 ^b 、R _{free}	0.19, 0.25	0.22, 0.28
結合の標準偏差 (Å)	0.011	0.010
角度の標準偏差 (°)	1.3	1.3
ラマチャンドランの統計		
好まれる領域 (%)	96.5%	89.9%
許容される領域 (%)	99.4%	97.9%
異常値 (%)	0.6%	2.1%
残基の数	528	1017
水の数	49	0
糖の数	0	2
リガンド/イオンの数	1 (グリセロール)	1 (MES)

$R_{sym}^a = \sum I - \langle I \rangle / \sum I$. $\langle I \rangle$ は、ユニークな反射の対称性関連の観測の平均強度である。

R因子^b = $\sum FO - Fc / \sum I$. Fc は、反射の 5% をすべての洗練から排除する以外は、R と同様に計算する。

括弧内の*値は、最も高い分解能シェルの値を示す。

【0172】

HER2 との複合体中の bH1 Fab のコンホメーションは、VEGF と結合した Fab (標準偏差 = 0.7 Å, Cα) のそれと顕著に類似している。両方の bH1 Fab 構造の CDR は互いに良好に重なり合い、親 Herceptin (登録商標) 抗体 Fv および bH1 Fv (HER2) は標準偏差 = 0.6 Å であり、Herceptin (登録商標) 抗体 Fv および bH1 Fv (VEGF) は標準偏差 = 1.2 Å である。CDR-L1 は例外であり、2 つの複合体の構造が顕著に異なり、偏差は 4.6 Å である (残基 27 ~ 32 の Cα)。図 30 は、CDR-L1 を例外として、VEGF と結合した bH1 Fab の CDR コンホメーションが、HER2 と結合した bH1 および Herceptin (登録商標) 抗体と顕著に類似していることを示す。図 30 は、VEGF と結合した bH1 (濃い色)、HER2 と結合した bH1 (白) および HER2 と結合した Herceptin (登録商標) 抗体 (薄い色) のチューブとしての CDR ループの重ね合わせである。CDR-L1 ループは、2 つの bH1 構造において顕著に異なるコンホメーションを示す (bH1 残基 27 ~ 32 の標準偏差 Cα = 4.6) (図 31)。HER2 複合体中では、CDR-L1 は抗原相互作用に最小限しか関与しておらず、ループの一部 (残基 28 ~ 30 b) は柔軟に見える。VEGF 結合には、ループ全体が良好に構成されており、VEGF によって埋没された表面積の 26% に貢献する。

【0173】

CDR-L1中の2個の残基、Ile30cおよびTyr32は異なるコンホメーションを有し、bH1とHER2またはVEGFとの結合において異なる役割を果たす。HER2複合体中では、Ile30cの側鎖は、CDR-L1およびCDR-L3残基によって形成される疎水性コア中に埋没している。VEGF複合体中では、この側鎖はVEGFと疎水性接触を形成する。Tyr32のCαは2つの構造中で同じ位置にあるが、その側鎖は約130度回転している。HER2複合体中では、Tyr32はレセプターに対してパッキングしているが、VEGF複合体中では、側鎖はIle29と一緒にあって疎水性コアを形成し、CDR-L1およびCDR-L3のコンホメーションを支持する。CDR-L1コンホメーションは、Tyr32とLCフレームワーク残基Gly72との間の水素結合によってさらに安定化される。構造解析により、アラニンまたはフェニルアラニンのどちらへの突然変異も許容されないため、Tyr32がVEGF結合に重要であることが確認される。VEGF結合とは反対に、Tyr32からアラニンへの突然変異(Herceptin(登録商標)抗体の残基に戻る)はHER2結合に好ましい。2つの複合体の重ね合わせにより、VEGFは、そのHER2と結合した状態のCDR-L1のTyr32と衝突することが明らかとなる(図31)。図31では、残基Tyr32、Ile30c、Ile29、およびGly72の側鎖を棒として示す。平均よりも高い温度要因を有する残基を濃い色で示す(残基28~30b)。Tyr32とGly72との間の水素結合を点線によって例示する。

10

上記結果は、CDR-L1を再編成する能力がbH1の二重特異性に必要であることを示している。CDR-L1の同様のコンホメーション柔軟性が、天然抗体の抗原認識において役割を果たすことが示されている(Jimenezら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、100:92、2003、Mylvaganamら、J. Mol. Biol.、281:301、1998)。図26、28、30、31、および32は、PYMOL(DeLano Scientific、San Carlos, CA)を用いて結晶構造の座標から作成した(PDBコード、3BDY、3BE1、1N8Z)。

20

【0174】

bH1ショットガンスクランニング

bH1Fabの抗原結合部位を研究するために、ファージ表出Fabライブラリーを用いたショットガンスクランニングコンビナトリアル突然変異誘発を行った(Vajdosら、J. Mol. Biol.、320:415、2002、Weissら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97:8950、2000)。機能的クローンを単離するために抗原(hVEGFおよびHer2-ECD)に対する結合選別、続いてDNA配列決定を行うことで、それぞれの変化させた位置での野生型/突然変異体の比の計算が可能となった(Vajdosら、2002)。その後、これらの比を使用して、VEGFおよびHer2の結合に対するそれぞれのスクランニングした側鎖の貢献を決定する。結果により、VEGFおよびHer2を結合することに関する機能的パトープのマッピングが可能となった。

30

【0175】

bH1ショットガンライブラリーの設計

CDR中の溶媒に曝露された残基を、野生型残基をアラニンもしくは野生型(アラニンスクランニング)またはホモログ残基もしくは野生型(ホモログスクランニング)のどちらかとして変動させたファージ表出ライブラリーを用いてスクランニングした。遺伝暗号の性質により、Wt/アラニンまたはWt/ホモログ(Homolog)残基に加えて何らかの他の置換をライブラリー中に含めることが必要であった(図33)。別々の重鎖および軽鎖のアラニンおよびホモログスクランニングライブラリーを構築した。ライブラリーは図34に記載する。縮重は $1.3 \times 10^5 \sim 1.3 \times 10^8$ 個の範囲であり、実際のライブラリーの大きさは $6 \times 10^9 \sim 4 \times 10^{10}$ 個であった。

40

【0176】

ショットガンスクランニングライブラリーの構築

50

上述のように、M13バクテリオファージの表面上にbH1 Fabの表出を可能にするため、M13遺伝子-3マイナーコートタンパク質のC末端ドメインと融合させたファージ上でhu4D5 Fabを表出するように設計された以前に記載したプラスミドAP2009を、標準の分子生物学技法を用いて、bH1 Fabをコードするように改変した。軽鎖のC末端はエピトープ(gD)タグを含有していた。bH1 Fabの「ストップ鑄型」バージョンをライブラリーの鑄型として使用した(Sidhuら、2004)。軽鎖のアラニンおよびホモログスキャンングライブラリーはCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3中にストップコドンを含しており、重鎖のアラニンおよびホモログライブラリーはそれぞれの重鎖CDR中にストップコドンを含っていた。ライブラリーは、以前に記載されている方法によって(Sidhuら、2004)、対応するストップ鑄型にKunkel突然変異誘発を用いて(Kunkelら、1987)、構築した。

10

【0177】

ライブラリーの選別

NUNCの96ウェルMaxisorp免疫プレートに5 µg/mlの捕捉標的(hVEGF₁₀₉、Her2-ECDまたは抗gD mIgG)でコートし、PBS中の1%のBSA(w/v)で遮断した。記載のように上述のライブラリーからのファージをKO7ヘルパーファージ(NEB)と共に繁殖させた(Leeら、2004a)。ライブラリーファージ溶液をコートしたプレートに10¹³個のファージ粒子/mlの濃度で加え、1~2時間室温でインキュベートした。プレートをPBSTで8回洗浄し、続いて、結合したファージを0.1MのHClで30分間溶出させた。各回の選別後の濃縮は既に記載のように決定した。2回の標的選別後、5~10倍の濃縮を示したhVEGF上で分類したLC-AlaおよびLC-Hom以外のすべてのライブラリーで、50~1000倍の濃縮が観察された。50~1000倍の濃縮を示すそれぞれのライブラリーからのいくつかのランダムクローンを、記載のように配列決定のために選別した(Sidhuら、2004)。ライブラリーLC-AlaをファージELISAにおいてhVEGF結合についてスクリーニングした(Sidhuら、2000)。BSAでコートしたコントロールプレート上のシグナルよりも少なくとも2倍高いhVEGF ELISAシグナルを示したクローンを、配列決定のために選別した。LC-Homライブラリーは、hVEGF上でのさらに1回の選別、続いてファージELISAスクリーニングおよびVEGF結合クローンの配列決定に供した。

20

30

【0178】

DNAの配列解析

様々な標的選別からのそれぞれのライブラリーからの高品質配列を翻訳およびアラインメントした(データ示さず)。分析に供したそれぞれのライブラリーからの配列の数を以下の表4に要約する。

【表 4】

表 4. 分析した配列の数

ライブラリー	合計配列
LCA-V2b	51
LCH-V3	79
LCA-H2	97
LCH-H2	50
LCA-gD	112
LCH-gD	120
LCA-pL	60
LCH-pL	65
HCA-V2	100
HCH-V2	96
HCA-H2	81
HCH-H2	96
HCA-gD	105
HCH-gD	105
HCA-pl	102
HCH-pl	99

【0179】

変化させた位置での $W_t / M_u t$ 比を計算することで（図 35 および図 36）、記載した F_{w_t} / m_{u_t} 値の計算が可能となり（図 35 および図 36）、これらは、記載のように標的選別からの比を表出選別からの比で除算することによって、表出について補正されている（Vajdosら、2002）。1 より高い F_{w_t} / m_{u_t} 値は、 W_t がこの位置で好ましいことを示し、1 より低い F_{w_t} / m_{u_t} は、突然変異が好ましいことを示す。 $F_{w_t} / m_{u_t} > 5$ は、抗原結合におけるその重要な役割を示している。それぞれのスキニングした CDR 残基の重要性を図 37A～37D に例示する。結果により、重鎖および軽鎖のどちらからの残基も、どちらの抗原（Her2 および hVEGF）の結合にエネルギー的に貢献することを実証している。Her2 結合に対する bH1 軽鎖および重鎖残基の影響を、その親抗体 hu4D5 と比較した（Kelley および O'Connell、1993）（図 38）。

図 39A および図 39B は、VEGF および HER2 との結合における、bH1 Fab のショットガンアラニンおよびホモログスキニングを示す。アラニンの突然変異（m1）、もしくはさらなる突然変異（m2、m3、ショットガンアラニンコドンの制限に

10

20

30

40

50

よる)、または相同的アミノ酸への突然変異(m4)の効果、ヒトVEGF(図39A)またはHER2(図39B)と結合するクローンの中の野生型および突然変異体の発生率の比(wt/mut)として計算する。野生型残基のみが出現した場合は、比は野生型計数よりも大きい「>」として示す。アミノ酸置換(m1~m4)が何であるかは、F値の上付き文字として示す。野生型残基がアラニンである場合は、これをグリシンによって置換した(m1)。「*」は、VEGFまたはHER2複合体の形成の際に埋没されるbH1残基の程度を示す(*25~49%の接近可能な面積が埋没している、**50~75%の接近可能な面積が埋没している、***75%以上の接近可能な面積が埋没している)。

【0180】

エネルギー的相互作用に顕著に貢献する残基が機能的パラトープを構成し、これは構造的結合部位の部分組を構成する。抗原接触部位間の広範な重複とは対照的に、2つの機能的パラトープは限定的な重複を示す(図32および40)。具体的には、ショットガンスクリーニング突然変異誘発に基づいて、VEGF(図40A)またはHER2(図40B)結合について、 $\Delta\Delta G$ 値(y軸、kcal/mol)をそれぞれのアラニン(黒バー)または相同的アミノ酸(白バー)への突然変異についてプロットする。「†」は、この位置では突然変異が観察されなかったため、下限を表す。「*」は、VEGFまたはHER2複合体の形成の際に埋没されるbH1残基表面積の程度を示す>(*25~49%が埋没した、**50~75%、***>75%)。VEGF結合相互作用は、コアホットスポットとしてCDR-L1のTyr32およびCDR-L3のHis91を有するLC CDRによって主に媒介されている($\Delta\Delta G_{wt/ala} > 1.5 \text{ kcal/mol}$)。HER2結合は主にHC CDRによって貢献されている。図32は、bH1およびHerceptin(登録商標)抗体の残基をその機能的な重要性に基づいてFab表面上に陰影をつけた、結晶構造を示す(濃い色および白文字、 $\Delta\Delta G \geq 1.5 \text{ kcal/mol}$ 、中間の色および黒文字、 $1 \leq \Delta\Delta G < 1.5 \text{ kcal/mol}$ 、薄い色および黒文字、 $0.5 \leq \Delta\Delta G < 1 \text{ kcal/mol}$ のアラニン突然変異)。黒い点線は図28と同様に接触面積の輪郭を示す。白い点線は軽鎖および重鎖の境界線を示す。

VEGF結合およびHER2結合では、機能的パラトープ残基はHCおよびLCにわたって分布されており、2本の鎖の相乗作用を示している。CDR-H3のTrp95が2つの相互作用の唯一の共通のホットスポット残基である($\Delta\Delta G_{wt/ala} > 1.5 \text{ kcal/mol}$)。上述のように、VEGF結合相互作用は主にLC CDRによって媒介される一方で、HER2結合はHC CDRによって支配される。Herceptin(登録商標)抗体と比較して、より弱いHER2結合親和性を有するbH1(300倍)はHER2結合に対して同じコアホットスポット残基を維持し(Arg50、Trp95、およびTyr100a)、他方で、周辺残基の重要性は再分布されている(図32)。前提的に、hu4D5/Her2結合に貢献する重鎖中の重要な側鎖のほとんどは、bH1/Her2結合にも重要である($\Delta\Delta G > 1.5 \text{ kcal/mol}$)。一部の变化は存在する。軽鎖残基は貢献により多くのシャフリングを有し、一部の残基は重要性が減り、一部は重要性が増す。全体的に、機能的部位はbH1-VEGFおよびbH1-Her2複合体の結晶構造からの構造的界面の一部である。

【0181】

手短に言うと、bH1と2つの構造的に非関連の大きなタンパク質との相互作用は、それぞれの抗原とエネルギー的に相互作用しているbH1残基の明確な組の結合によって特徴付けられている。2つの異なる抗原の2つの広範に重複する結合部位のほとんどは単一のコンホメーションを示すが、1つのCDRループ(L1)の柔軟性により、HER2およびVEGFの両方の収容が容易となる。この機構は、非関連の小ハプテンまたはペプチドと結合する多重特異的性抗体で観察される分子万能性によく似ている。以前の研究が、単一の抗体コンホメーションの空間的に明確に異なる領域での小リガンドの示差的な配置(Sethiら、Immunity、24:429、2006)、または抗原結合部位の複数の既存のコンホメーション(Jamesら、Science、299:1362、2

10

20

30

40

50

003) のどちらかによって媒介される、多重特異性を説明している。限定的LC突然変異によって2つの非関連のタンパク質抗原と結合する抗体を産生させる方法によって、抗原認識における抗体分子の万能性をさらに強調する。

【0182】

bH1親和性成熟

構造的および機能的な結果が利用可能になる前に軽鎖配列の最適化によってbH1のVEGF結合親和性を増加させることができるかどうかを調査する試みとして、bH1 Fabに非常に似ていると予想されるh4D5⁴² Fabの結晶構造に基づいて高度に溶媒接近可能な位置にあるCDR残基を多様化したライブラリーを構築した(Eigenbrotら、2001)。標的残基を野生型または数個の相同的残基のいずれかとして変動させた(図34)。ライブラリーは、「ショットガンスクリーニングライブラリーの構築」のセクションで記載のように構築した。溶液に基づく選別方法を用いて、記載のようにより高い親和性VEGF結合体を選別した。2回の溶液に基づく選別を行った。ビオチン標識したVEGFの濃度を、1回目の50nMから2回目の20nMまで減少させることによって、各選別の回でストリンジェンシーを増加させた。最終回の選別で138個のクローンを配列決定した。ほとんどのクローンはユニークであることが判明した。固定化したVEGF(8~109)、抗gD抗体、およびHer2-ECDを用いた高スループットELISAアッセイを使用して、VEGF、Her2-ECD、および抗gD mIgGと結合したがBSAと結合しなかったクローンを同定した。VEGF-ELISA結合シグナルを抗gD ELISAシグナルによって正規化して、VEGF結合クローンの相対的親和性を推定した。高いVEGF/抗gD比を有するクローンを、さらなる特徴付けのために選別した。選別したクローンのVEGFおよびHer2に対する親和性は、競合ELISAによって以前に記載したファージ表出Fabとして推定した。bH1変異体は、親bH1クローンと比較して改善されたVEGF結合親和性を示す。興味深いことに、Her2の親和性に基づく選別を行わなかったにもかかわらず、一部のクローンはHer2結合に対してわずかに改善されたIC₅₀値を有する。Her2結合に能力を顕著な影響を与えずに、VEGF結合についてbH1クローンを親和性成熟させることが可能なことを示している。親bH1クローンと比較してHer2結合親和性が低下した、VEGFの親和性が改善されたクローンが一部存在する。この結果は、bH1-Her2複合体構造およびショットガンアラニンスクリーニング分析に基づいて重鎖が結合エネルギーへの主な貢献者であることにもかかわらず、軽鎖がbH1とHer2との結合能力に能動的に貢献することを示している。特徴付けたクローンの配列およびIC₅₀値を図41に要約する。ほとんどの配列がユニークであるという発見は、これらの変異体の軽鎖配列はVEGF結合に対して未だ完全に最適化されておらず、さらなる回数の選別によってbH1クローンの親和性をさらに改善させることが可能であることを示唆している。

表5に示すように、単一のFabの2つの抗原に対する顕著な親和性改善が達成可能であり、一般的に適用可能である。例えば、ヒトVEGFのK_Dは250(bH1、IgG)から41(bH1-81、IgG)または16nM(bH1-44、IgG)に増加し、HER2のK_Dは21(bH1、IgG)から7(bH1-81、IgG)または1nM(bH1-44、IgG)まで増加した。

【0183】

親和性は、bH1のHCおよびLC CDR中に突然変異を導入することによって改善させた。位置は、本明細書中に記載のVEGFおよびHER2の機能的パラトープに関する情報に基づいて選別した。bH1変異体は、2つのステップで、本明細書中に記載のファージ表出ライブラリーの選別およびスクリーニング(screening)によって単離した。改善されたクローンbh1-81は、記載した軽鎖ホモログショットガンスクリーニングライブラリーの親和性に基づく選別によって単離した。第2のステップでは、bh1-81の残基をランダム化することによって、最高の親和性のクローン(bh1-44)をライブラリーから単離した。具体的には、bh1-81のHCおよびLC中の部位をランダム化されたオリゴヌクレオチドを設計して(表5)、それぞれの位置で約50%の野

生型および50%のすべての他の19種のアミノ酸をコードさせた (Gallopら、Journal of Medicinal Chemistry、37:1233、1994)。

【0184】

bH1親和性改善変異体の K_D (表5)を、Fab断片およびIgG抗体について測定した。本明細書中に記載のように、Fab断片およびIgG抗体をそれぞれ大腸菌および293細胞中で発現させ、精製した。Leeら (J. Mol. Biol.、340:1073、2004)に記載のように、BIAcore 3000を用いた表面プラズモン共鳴 (SPR)の測定値を使用して、Fab断片およびIgG抗体の結合親和性を決定した。一価Fab断片としての抗体の親和性を研究するために、抗原 (hVEGF₁₀₉、マウスVEGF₁₀₂、およびHER2 ECD)を低密度でBIAcore CM5チップ上において固定化した。Fab断片の段階希釈液を固定化した抗原と接触させ、結合応答をSPRによって測定した。1:1のラングミュア結合モデルを使用して k_{on} 、 k_{off} 、および K_D を計算した。IgG抗体の K_D を決定するために、固定化した抗Fc抗体によってIgGをBIAcore CM5チップ上に捕捉し、hVEGF₁₀₉、マウスVEGF₁₀₂、およびHER2-ECDの段階希釈液に曝露させた。HER2では、単純な1:1のラングミュア結合モデルを用いて K_D を決定し、一方で、VEGFは二価分析物モデルを要した。すべての実験は30℃で行った。

【0185】

表5には、ランダム化された位置を太字で示し、bH1、bH1-81、およびbH1-44のCDR配列 (配列番号1~9および39~41)ならびにその親和性 (表面プラズモン共鳴によって決定)を要約する。

【表5】

表5. 改善された二重親和性を有するbH1の変異体

抗体	輕鎖																		Kd (nM)						
																			hVEGF	mVEGF	HER2				
	CDR-L1									CDR-L2						CDR-L3									
	28	29	30	30a	30b	30c	30d	31	32	50	51	52	53	54	55	91	92	93				94	95	96	
bH1	D	I	P	R	S	I	S	G	Y	W	G	S	Y	L	Y	H	Y	T	T	P	P	300	>1000	26	
bH1-81	N		A	K	T								F				S	S			250	>1000	21		
bH-44	N		A	K	T								F				S	S			58	41	ND	6	7
																					9	16	150		0.7
																						33	36		1

抗体	重鎖																									
	CDR-H1						CDR-H2										CDR-H3									
	28	29	31	32	33	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102	
bH1	N	I	K	D	T	Y	R	I	Y	P	T	N	G	Y	T	R	W	G	G	D	G	F	Y	A	M	D
bH1-81																										
bH-44			S	G						S	E						V		V							

ND=未検出。

【0186】

ヒトVEGF₁₀₉、マウスVEGF₁₀₂、およびHER2 ECDに対する抗体の

一価親和性をB I A c o r eによって測定した。表5は、それぞれの結合相互作用の代表的な解離定数 (K_d) を示す。b H 1 変異体は溶液競合実験において完全長タンパク質 (V E G F₁₆₅) およびV E G F₁₀₉と同様の親和性で結合するため(データ示さず)、V E G F (V E G F₁₀₉) のレセプター結合断片をB I A c o r e実験で使用した。様々なアッセイ様式および評価モデルを用いて本明細書中に記載のF a b断片/I g G抗体 K_d を計算した。様々なアッセイ/評価様式により、個々の相互作用について一貫した解離定数が得られた。

【0187】

実施例5. 細胞アッセイにおけるI g G活性の分析

b H 1 および3-1抗体がh V E G F₁₆₅に誘導されるヒト臍静脈内皮(H U V E C)細胞の増殖を阻害できるかどうかを決定するために、これらを増殖アッセイで試験した。ヒト臍静脈内皮細胞(H U V E C)(C a m b r e x, E a s t R u t h e r f o r d, N J)を成長させ、記載のようにアッセイした(F u h ら, J. B i o l. C h e m., 273:11197, 1998)。約4000個のH U V E Cを96ウェル細胞培養プレートのそれぞれのウェル中にプレートし、1.0%(v/v)のウシ胎児血清を添加したダルベッコ変法イーグル/F-12培地(1:1)(アッセイ培地)中で18時間インキュベートした。その後、準最大DNA合成を刺激することができるV E G Fのレベルとして最初に滴定した固定量のV E G F(0.2nMの最終濃度)を含む新鮮なアッセイ培地、および漸増濃度の抗V E G F抗体(例えばb H 1)を細胞に加えた。37℃で18時間インキュベートした後、細胞を0.5μCi/ウェルの[³H]チミジンで24時間パルスし、収集してT o p C o u n t マイクロプレートシンチレーションカウンターで計数した。結果は、3-1およびb H 1はどちらも、h V E G Fに誘導されるシグナルおよび続く増殖を妨げることによって、V E G Fに誘導されるH U V E C細胞の成長を阻害できることを実証している。A v a s t i n (登録商標)抗体(抗V E G F)を陽性コントロールとして使用し、H e r c e p t i n (登録商標)抗体を陰性コントロールとして使用した(図42)。

二重特異性抗H e r 2/V E G F抗体と哺乳動物細胞上で発現されるH e r 2との結合を研究するために、b H 1およびb H 3抗体とH e r 2を過剰発現するN R 6線維芽細胞(N R 6-H e r 2)との結合をフローサイトメトリーによって研究した。100万個のN R 6-H e r 2細胞を100μg/mlのF a bおよびI g Gと共に1時間インキュベートし、続いて、A l e x a 488とコンジュゲートさせたマウス抗ヒトI g G抗体と共に1時間インキュベートした。陰性コントロールとして、非発現N R 6細胞と結合するF a bおよびI g Gを研究した。図43に実証するように、b H 1およびb H 3はN R 6細胞上のH e r 2とF a bとしておよびI g Gとして特異的に結合する。

【0188】

図44は、b H 1とV E G FまたはH E R 2との競合的結合実験の結果を示す。b H 1は、V E G Fに誘導されるヒト臍静脈内皮細胞(H U V E C)の増殖を200nMのI C₅₀で阻害し、これは300nMというその親和性、および、その減少した親和性が原因でH e r c e p t i n (登録商標)抗体よりも低い効率ではあるが、5日間のインキュベーション後のH E R 2を発現する乳癌細胞系B T 474の増殖と一貫している(図45)。H e r c e p t i n (登録商標)I g G抗体およびベバシズマブ(抗V E G F)がコントロールとして役割を果たした。図45に示すように、b H 1-81およびb H 1-44抗体は、V E G Fに誘導されるH U V E C細胞の増殖およびB T 474細胞の成長をb H 1よりも高い程度で阻害する。b H 1変異体の増加した力価は、その相対的な親和性と関連している。最も高い親和性の変異体b H 1-44は、それぞれベバシズマブまたはH e r c e p t i n (登録商標)抗体に同様の力価でH U V E CおよびB T 474細胞の成長を阻害する。

これらの実験を実施するために、V E G Fで刺激したH U V E Cを漸増濃度のヒトI g Gで処置し、2日間のインキュベーション後の増殖阻害をL i a n g ら(J. B i o l. C h e m., 281:951, 2006)に記載のように測定した。乳癌細胞B T 474

は10%のFBSを添加したRPMI培地中で培養した。アッセイでは、96ウェルプレート中に1個のウェルあたり 10^4 個の細胞をプレートし、終夜(18時間)、37℃でインキュベートした。漸増濃度のヒトIgGを細胞に加えた。その後、細胞を37℃で5日間インキュベートし、続いて10%のAlamarBlue(Biosource International、Camarillo, CA)を製造者の指示に従って加えた。HER2発現細胞の増殖の抗体依存性阻害は、6時間後の蛍光シグナルを測定することによって決定した。

【0189】

実施例6. 結合特異性の分析

LCライブラリーに由来する抗体の結合特異性を決定した。IgGと同族抗原を含めた様々な固定化した精製したタンパク質または細胞溶解物との結合をELISAによってアッセイした。抗原を固定化し、 $15\mu\text{g/mL}$ の濃度のhIgGと共に1時間インキュベートした。結合したIgGを分光光度によって検出した(450nmの光学密度、y軸、図46)。アッセイに含めたタンパク質は(図46中の左から右)、血管内皮増殖因子A(VEGF)、マウス血管内皮増殖因子(マウスVEGF)、血管内皮増殖因子C、(hVEGF-C)、血管内皮増殖因子D、(hVEGF-D)、HER2細胞外ドメイン(HER2 ECD)、表皮増殖因子レセプター細胞外ドメイン(hEGFR)、ErbB3/HER3細胞外ドメイン(HER3 ECD)、ヒトデスレセプター5(hDR5)、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、ウシ胎児血清(FBS)、Neutravidin、5%の乳、マウス線維芽細胞溶解物、およびhVEGF-AまたはHER2 ECDを入れたマウス線維芽細胞溶解物であった。図46では、誤差バーは2つ組の標準誤差(SEM)を表す。抗体bH3、3-1、bD1、bD2、4-1、および4-5は、マウスVEGF、HER3 ECD、Neutravidin、5%の乳、hVEGF-Aを入れた細胞溶解物、およびHER2 ECDを入れた細胞溶解物との結合について試験しなかった。

様々な抗体(Avastin(登録商標)抗体、Herceptin(登録商標)抗体、bH1、bH3、bH4、bH1-81、およびbH1-44)がVEGFとVEGFレセプターとの結合を遮断する能力も決定した(図47)。ビオチン標識したヒトVEGF₁₆₅(図47A)またはマウスVEGF₁₆₄(図47B)を漸増濃度のIgGで平衡化した(x軸)。結合していないVEGFを固定化したヒトVEGFR2-ECD Fc融合タンパク質上に捕捉し、分光光度によって検出した(450nmの光学密度、y軸)。同様の阻害がVEGFR1でも観察された。抗VEGF抗体は、VEGFとVEGFレセプターとの結合を遮断する。

【0190】

抗原VEGFおよびHER2は、溶液中のbH1-44二重特異性IgG抗体との結合を競合することが示されている(図48)。0.1nMの濃度のヒトbH1-44 IgG抗体を、0.1nMのビオチン標識したヒトVEGF₁₆₅と共に、漸増濃度のHER2 ECDの存在下でインキュベートした。bH1-44を固定化した抗ヒトFcによって捕捉し、bH1-44と結合したビオチン-VEGFをstreptavidin-HRPで検出した。捕捉されたbH1-44と結合したHER2 ECDは、HER2上の非重複エピトープと結合するマウス抗HER2抗体、続いてHRPとコンジュゲートさせたヤギ抗マウスIgGを用いて検出した(図48A)。0.2nMの濃度のヒトbH1-44 IgGを、0.6nMのビオチン標識したHER2と共に、漸増濃度のヒトVEGF₁₆₅の存在下でインキュベートした。bH1-44を固定化した抗ヒトFcによって捕捉し、bH1-44と結合したビオチン-HER2をstreptavidin-HRPで検出した(図48B)。

また、bH1およびbH1-44と細胞との特異的結合を、FACSを用いて検出した(蛍光活性化細胞分類、図49)。二重特異性抗体(bH1およびbH1-44)はHER2を発現するマウス線維芽細胞(NR6)と結合するが(図49B)、HER2陰性のNR6細胞とは結合しない(図49A)。50~100万個の細胞を $15\mu\text{g/mL}$ のh

I g Gと共に氷上で1時間インキュベートした。細胞と結合した一次抗体は、二次の蛍光P Eとコンジュゲートさせたヤギ抗ヒトI g Gを用いて検出した。細胞はF A C S C a l i b u r フローサイトメーターを用いて分析した。ラットn e u (H E R 2のラット相同分子種)でトランスフェクトしたマウス線維芽細胞に対する結合は検出されなかったため、b H 1およびb H 1-4 4はH E R 2のラット相同分子種と交差反応しなかった。

【0191】

b H 1抗体変異体b H 1-8 1およびb H 1-4 4の特異性をさらに特徴付けるため、免疫沈降実験を実施し、b H 1抗体変異体は、V E G FまたはH E R 2をマウス線維芽細胞(N R 6)溶解物から特異的に免疫沈降させるが、他のタンパク質はさせないことが示された(図50)。N R 6細胞を非特異的にビオチン標識し、溶解し、細胞膜タンパク質を洗剤で溶かした。500~1000万個の細胞/mLのN R 6細胞に対応する細胞溶解物、0.1 μ g/mLのビオチン標識したV E G F₁₆₅を入れたN R 6細胞、またはN R 6細胞を過剰発現するH E R 2を、15 μ g/mLの抗体と共にインキュベートした。抗体を、プロテインAでコートしたセファロースビーズを用いて捕捉し、結合したタンパク質を溶出させた。溶出させたタンパク質をS D S-P A G Eによって分離した。約25~50,000個の細胞に対応する細胞溶解物および約12~25万個の細胞からの免疫沈降物をゲルに載せた。捕捉されたビオチン標識したタンパク質は、ストレプトアビジン-H R Pを用いたウエスタンブロッティングによって検出した。

【0192】

実施例7. *in vivo*アッセイにおけるI g G活性の分析

*in vitro*のこれらの抗体の二重活性が*in vivo*の対応する活性に変換されるかどうかを評価するために、抗V E G F抗体(C o l o 2 0 5、結腸直腸癌細胞系)またはH e r c e p t i n (登録商標)抗体(B T 4 7 4 M 1、乳癌細胞系)による処置に応答性であることが知られているマウス異種移植腫瘍モデルを用いた。具体的には、C o l o 2 0 5異種移植体をn u / n uマウスで使用し、B T 4 7 4 M 1異種移植体をベージュヌードX I Dマウスを使用した。すべての動物研究は米国実験動物管理認定協会(A m e r i c a n A s s o c i a t i o n f o r A c c r e d i t a t i o n o f L a b o r a t o r y A n i m a l C a r e)およびG e n e n t e c h施設内動物実験委員会(I n s t i t u t i o n a l A n i m a l C a r e a n d U s e C o m m i t t e e)の指針に従っていた。

具体的には、B T 4 7 4 M 1 (インハウス)およびC o l o 2 0 5 (A T C C、M a n a s s a s, V A)細胞をR P M I培地/10%のウシ胎児血清中で培養した。5 $\times$ 10⁶個のB T 4 7 4 M 1細胞をハックス緩衝塩溶液(H B S S)に懸濁させ、マトリゲル(1:1)混合物を、エストラジオールペレットを皮下移植したH a r l a n ベージュヌードX I Dマウス(I n d i a n a p o l i s, I N)の乳腺脂肪体内に注射した。C o l o 2 0 5異種移植体では、H B S S中の5 $\times$ 10⁶個のC o l o 2 0 5細胞をC h a r l e s R i v e r n u / n uマウス(H o l l i s t e r, C A)内に皮下注射した。平均の腫瘍の大きさが約200mm³に達した後、マウスを8匹のマウス(B T 4 7 4 M 1)または10匹のマウス(C o l o 2 0 5)の7つの群へとランダムに群分けした。抗体は1週間に1回腹腔内投与した。腫瘍の大きさを1週間に2回測定した。体積は $V = 0.5ab^2$ (aは腫瘍の最長の寸法であり、bはaに垂直である)として計算した。統計的評価では一方向分析、続いて両側スチューデントt検定を使用した。多重比較(ボンフェローニ)によるアルファレベルの調節では、本発明者らの結論の有意性は変更されなかった。部分的応答(P R)とは、V 0と比較して腫瘍体積が50~99%低下した応答として定義した。血清試料は最初および3回目の処置の後の7日目に収集した。ヒト抗体の濃度はE L I S Aを用いて決定した。ロバ抗ヒトI g G F cを免疫プレート上に固定化した。血清および標準抗体の希釈液をプレート上で2時間インキュベートした。結合した抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートさせたヤギ抗ヒトI g G F c、続いてT M B基質/1Mのリン酸によって検出した。プレートは450/620nmで読み取った。試料の濃度は4-パラメータのアルゴリズムを用いて決定した。

bH1-44で処置した群を、抗VEGF（B20-4.1）（Liangら、J. Biol. Chem.、281:951、2006）、Herceptin（登録商標）抗体、または組合せ（Herceptin（登録商標）抗体＋抗VEGF）で処置した群と比較して、bH1-44抗体がVEGFおよびHER2に媒介される腫瘍成長を阻害できることをさらに確立させた。すべての群で、抗体は、処置の開始後の7日目にColo205異種移植体からの血清中に高レベルで存在しており（ELISAによって推定）、これは正常な薬物動態を示している（表6）。

【0193】

【表6】

表6. 抗体血清レベル

群	抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	平均	SD
コントロール IgG、 $10\text{mg}/\text{kg}$	65	14
ハーセプチン（登録商標）、 $10\text{mg}/\text{kg}$	83	47
抗VEGF、 $10\text{mg}/\text{kg}$	20	8
抗VEGF＋ハーセプチン（登録商標）、 $10+10\text{mg}/\text{kg}$	41	25
bH1-44 $10\text{mg}/\text{kg}$	30	12
bH1-44 $20\text{mg}/\text{kg}$	37	9

それぞれの群で $n=5$ 、SD＝標準偏差

$10\text{mg}/\text{kg}$ で1週間に1回投与したbH1-44は、コントロール抗体と比較してColo205の腫瘍成長を阻害し（ $p<0.0001$ 、 $n=10$ ）、抗VEGF（ $10\text{mg}/\text{kg}/\text{週}$ ）としても同様の有効性を有している一方で、Herceptin（登録商標）抗体はColo205の成長に影響を与えなかった（ $p=0.12$ 、 $n=10$ ）。予測どおり、組合せ処置では抗VEGF単独と同様の有効性が示された。 10 および $20\text{mg}/\text{kg}/\text{週}$ で投与したbH1-44抗体では用量依存性の応答が得られた。BT474M1モデルでは、bH1-44抗体で処置したマウスの群において有意な腫瘍成長の阻害が観察された（ $10\text{mg}/\text{kg}/\text{週}$ 、 $p=0.0005$ 、 $n=8$ および $20\text{mg}/\text{kg}/\text{週}$ 、 $p=0.0001$ 、 $n=7$ ）。Herceptin（登録商標）抗体またはHerceptin（登録商標）／抗VEGFの組合せを投与した群と同様、bH1-44抗体で処置した腫瘍の半数より多くが、初期体積から50%を超える回帰を示した（すなわち、部分的応答、図51）。他方で、抗VEGF単独では、コントロールと比較してBT474M1に対して中程度の成長阻害効果しか示されず（ $p=0.06$ 、 $n=7$ ）、部分的応答を示さなかった。したがって、二重特異性bH1-44抗体はin vivoでの腫瘍成長に重要な2つの明確に異なる機構を阻害することが示された。

上記結果は、in vivoの腫瘍成長に重要な2つの機構を阻害する、bH1抗体の親和性が改善された変異体（例えばbH1-44およびbH1-81）の潜在性を示している。

【0194】

実施例8. VEGFおよびHER2とbH1およびbH1-44との結合界面の特徴付け
bH1およびbH1-44の構造的特徴をさらに比較するために、VEGFおよびHE

R 2 とこれらの抗体との結合界面を同定した。表 7 に記載した構造的接触を、結晶構造座標 3 B D Y (b H 1 / V E G F) および 3 B E 1 (b H 1 / H E R 2) に基づいて同定した。結合界面はプログラム X S A E を用いて計算した。このプログラムにより、界面が極性、疎水性、および混合として定義された。表 7 には、全表面積の $> 25\%$ が H E R 2 または V E G F の結合の際に埋没した b H 1 残基を記載する。また、表 7 には、b H 1 残基の $4.5 \text{ \AA}$ 以内の V E G F および H E R 2 残基も記載する。複合体形成の際に埋没されるそれぞれの残基の表面積を、I M O L を用いて、結晶構造の座標 3 B D Y、3 B E 1、および 1 N 8 Z (P D B) に基づいて計算した。表 1 1 に報告する極性および疎水性界面の領域は、極性界面領域および混合の半分を反映している。報告されている疎水性界面領域は、疎水性領域および混合の半分からなる。

10

結晶構造およびアラニンスキャニングにより、b H 1 が H e r c e p t i n (登録商標) 抗体と同じ H E R 2 上の結合エピトープを保持することが示された (B o s t r o m ら、2009)。H E R 2 との複合体中の H e r c e p t i n (登録商標) F a b の結晶構造は、b H 1 / H E R 2 複合体上に良好に重ね合わされる (標準偏差 $0.8 \text{ \AA}$) (B o s t r o m ら、2009、C h o ら、2003)。さらに、アラニンスキャニング突然変異誘発に基づいて全結合エネルギーの 10% よりも多くに貢献する H e r c e p t i n (登録商標) 抗体残基は保存されており、その多くは b H 1 および b H 1 - 4 4 の結合ホットスポットの一部でもある (B o s t r o m ら、2009、K e l l e y および O ' C o n n e l l、1993) (表 1 4、図 6 2)。b H 1 / V E G F と b H 1 / H E R 2 との間の界面はそれぞれ $1506 \text{ \AA}^2$ および $1579 \text{ \AA}^2$ を埋没し、主に疎水性である (それぞれ 60% および 63%)。H e r c e p t i n (登録商標) / H E R 2 結合界面は b H 1 / H E R 2 界面と同様の大きさおよび組成を有しており ($1524 \text{ \AA}^2$ 、 60% の疎水性、表 1 1)、高い形状相補性によっても特徴付けられている (表 8) (B o s t r o m ら、2009)。

20

【0195】

【表 7】

表 7. b H 1 / F a b / H E R 2 / E C D および b H 1 / F a b / V E G F₁₀₉ の複合体の構造的接触のリスト。この表には、H E R 2 および V E G F の結合の際に埋没される全表面積の > 25 % を有する残基を記載する。b H 1 残基の 4.5 Å 以内にある V E G F および H E R 2 の残基を記載する。複合体形成の際に埋没されるそれぞれの残基の表面積を、I M O L を用いて、結晶構造の座標 3 B D Y、3 B E 1、および 1 N 8 Z (P D B) に基づいて計算した。

	b H 1 残基	H E R 2 に よって埋没 された領域 (%)		V E G F に よって埋没 された領域 (%)	
		b H 1 と接触する H E R 2 残基		b H 1 と接触する V E G F 残基	
重鎖	Y33	48	E558 F573	87	H86
	R50	97	E558 D560 F573	35	H86
	Y52			30	H86
	Y56	42	P557 E558		
	R58	50	E558 Q561		
	W95	100	P572 F573	61	H86 Q87
	G99	93	D570 P579 K593	75	K48 I83 Q89
	Y100a	80	D570 P571 P572 F573	88	I83 K84 P85 H86 Q87 G88 Q89
軽鎖	S28			59	I91 G92 E93
	I29			77	R82 H90 I91 G92
	S30			69	H90 I91
	G31			85	G88 Q89 H90 I91
	Y32	97	D570 P571 A600 C601 Q602	89	Q89 H90
	W50	62	K593 P603	59	F17 M81 Q89
	Y53	44	P603 C604 P605	74	F17 M18 I91
	H91	90	P571 P572	81	G88 Q89
	Y92	55	K569 P571 P572	76	Y45 K84 G88 Q89 H90
	T93			61	K84 Q87 G88
	T94	68	D560 P572	55	H86 Q87

【0196】

抗体と抗原との間の形状相補性（表 8 中で S c として表す）を記載のように決定した（Lawrence ら、1993）。Herceptin（登録商標）抗体および H E R 2 の間の相補性に類似した、b H 1 / V E G F および b H 1 / H E R 2 複合体の高い形状相補性は、報告された抗体－抗原複合体の範囲内にある（S c 約 0.64～0.68、Lawrence ら、1993）。H E R 2 と V E G F と結合したコンホメーションの b H 1 との重ね合わせ、または V E G F と H E R 2 と結合した形態の b H 1 との重ね合わせにより、抗体を非関連の抗原と並置した際にわずかな形状相補性しか観察されないことが明らかとなる。（S c 約 0.35、Lawrence ら、1993）。この結果は、b H 1 が再編成されて 2 つの異なる抗原を収容する程度を実証している。

【表 8】

表 8. HER2 および VEGF との結合における、
bH1 の様々な表面コンホメーション。

抗体／抗原複合体の形状相補性		
抗体	抗原	Sc*
Herceptin	HER2	0.75
bH1	HER2	0.72
bH1	VEGF	0.68
bH1 (VEGF と結合したコンホメーション)	HER2	0.40
bH1 (HER2 と結合したコンホメーション)	VEGF	0.44

* Sc = 形状相補性の統計の中央値

10

【0197】

高親和性変異体 bH1-44 を bH1 のファージ表出抗体ライブラリーから選別することによって、bH1 の親和性を改善させた。ショットガンアラニンスキャニング突然変異原により、bH1-44 が bH1 の抗原結合のホットスポットを保存していたことが実証された（表 9 A ~ B、10、および 14）。bH1-44 のショットガンアラニンスキャニング突然変異原は、bH1 のショットガンアラニンスキャニング突然変異誘発について上述した技法を用いて行った。

20

表 9 A ~ B では、アラニンへの突然変異 (m1)、もしくはさらなる突然変異 (m2、m3、ショットガンコドンの制限による)、または相位的アミノ酸への突然変異 (m4) の効果を、VEGF (表 9 A) または HER2 (表 9 B) 結合クロンの野生型 (wt) の発生率の比または wt / mut の発生率の比として計算する。wt がアラニンである場合は、これをグリシンによって置換した (m1)。wt / mut 比は、表出選別からの wt / mut 比で除算して F 値をうることによって、タンパク質の折畳み／発現の効果について補正されている。表出の選別は、抗体軽鎖の非直鎖エピトープと結合するタンパク質 L と結合するクロンを選別することによって、独立して行った。Fab 重鎖のみをファージコートタンパク質 (p3) と融合させるため、タンパク質 L の結合は、適切な折畳みならびに軽鎖および重鎖の会合を示す。

30

表 10 では、結晶構造中で VEGF および／または HER2 と接触する bH1 および bH1-44 の抗体残基を記載する。結合のエネルギー的ホットスポットは、相互作用の全結合エネルギーの約 10% よりも高い $\Delta \Delta G_{wt/ala}$ をもたらす抗体残基によって定義される。

表 11 中のデータは、結合界面の極性および大きさが bH1 / VEGF、bH1 / HER2、および Herceptin (登録商標) / HER2 の複合体で類似していることを示す。XSAE を用いてそれぞれの界面の極性を分析した。表 11 に示すすべての数字は、別段に指定しない限りは $\text{\AA}^2$ での面積を表す。

【0198】

【表 9 A】

表 9 A. VEGF との結合における b H 1 - 4 4 F a b の
ショットガンアラニンおよびホモログスキニング。

	抗原選別 (VEGF)				表出選別 (タンパク質 L)				F w t / m u t 値				$\Delta \Delta G_{wt/mut}$ (kcal/mol)			
	wt/m1	wt/m2	wt/m3	wt/m4	wt/m1	wt/m2	wt/m3	wt/m4	Fwt/m1	Fwt/m2	Fwt/m3	Fwt/m4	$\Delta \Delta G_{wt/m1}$	$\Delta \Delta G_{wt/m2}$	$\Delta \Delta G_{wt/m3}$	$\Delta \Delta G_{wt/m4}$
CDR-L1																
Q27	0.3	1.0	9.0	1.2	0.8	0.9	0.4	2.8	0.4	1.1	20.3	0.5	-0.6	0.04	1.8	-0.5
N28	1.8	0.6	3.5	1.2	0.6	0.9	1.0	8.4	2.8	0.7	3.5	0.1	0.6	-0.2	0.7	-1.1
I29	39.0	39.0	3.9	36.0	0.8	0.7	0.4	0.8	46.8	59.8	8.8	42.7	2.3	2.4	1.3	2.2
A30	2.8	NA	NA	1.7	0.4	NA	NA	0.2	6.5			9.9	1.1			1.4
K30a	3.0	2.7	9.0	1.6	1.4	3.1	1.1	0.2	2.1	0.9	7.8	8.7	0.4	-0.1	1.2	1.3
T30b	7.0	NA	NA	1.4	0.9	NA	NA	0.5	7.7			2.7	1.2			0.6
I30c	16.0	5.3	0.5	0.9	2.3	2.1	0.7	1.0	7.1	2.6	0.7	0.9	1.2	0.6	-0.2	-0.1
S30d	15.7	NA	NA	74.0	1.7	NA	NA	0.5	9.1			150.4	1.3			3.0
G31	24.0	NA	NA	74.0	2.6	NA	NA	3.0	9.4			24.3	1.3			1.9
Y32	46.0	23.0	46.0	74.0	0.5	1.9	0.3	1.6	99.1	12.4	152.2	45.9	2.7	1.5	3.0	2.3
CDR-L2																
W50	46.0	15.3	46.0	74.0	2.3	1.5	2.4	1.1	20.4	10.2	19.2	65.1	1.8	1.4	1.7	2.5
G51	24.0	NA	NA	74.0	7.3	NA	NA	7.5	3.3			9.8	0.7			1.4
S52	15.7	NA	NA	36.0	4.1	NA	NA	7.5	3.9			4.8	0.8			0.9
F53	22.0	44.0	14.7	5.7	1.9	2.4	1.4	0.4	11.6	18.1	10.8	13.5	1.5	1.7	1.4	1.5
CDR-L3																
H91	7.3	44.0	44.0	73.0	0.0	0.1	0.3	2.6	150.3	880.0	154.0	27.9	3.0	4.0	3.0	2.0
Y92	48.0	48.0	48.0	13.8	3.8	6.3	1.0	2.8	12.6	7.6	46.7	5.0	1.5	1.2	2.3	1.0
S93	1.0	NA	NA	1.7	3.0	NA	NA	2.5	0.4			0.7	-0.6			-0.2
S94	15.7	NA	NA	3.4	1.0	NA	NA	0.9	15.3			3.7	1.6			0.8

10

20

30

40

CDR-H1

S30	1.2	NA	NA	1.7	1.2	NA	NA	1.3	1.0			1.3	0.0		0.2	
G31	2.4	NA	NA	5.6	1.2	NA	NA	5.0	2.0			1.1	0.4		0.1	
T32	0.5	NA	NA	0.5	0.9	NA	NA	0.6	0.5			0.9	-0.4		-0.1	
Y33	10.2	1.0	2.2	12.5	1.4	2.0	0.8	2.3	7.1	0.5	2.6	5.5	1.2	-0.4	0.6	1.0

CDR-H2

R50	0.6	0.9	20.5	0.4	2.1	1.3	70.0	1.3	0.3	0.7	0.3	0.3	-0.7	-0.2	-0.7	-0.8
Y52	1.8	30.0	7.5	1.4	2.0	2.5	1.8	2.7	0.9	11.9	4.3	0.5	-0.1	1.5	0.9	-0.4
S53	1.4	NA	NA	1.0	1.2	NA	NA	1.1	1.2			0.9	0.1			0.0
E54	1.2	NA	NA	0.7	0.4	NA	NA	1.0	3.4			0.7	0.7			-0.3
Y56	9.2	6.5	6.9	0.7	1.6	2.3	1.3	1.2	5.8	2.8	5.3	0.6	1.0	0.6	1.0	-0.3
R58	1.5	1.8	8.1	1.3	2.1	2.3	4.9	2.7	0.7	0.8	1.6	0.5	-0.2	-0.2	0.3	-0.4

CDR-H3

W95	139.0	139.0	8.7	243.0	0.8	0.2	0.3	4.5	185.3	685.7	27.2	53.7	3.1	3.9	2.0	2.4
V96	0.5	NA	NA	1.4	2.1	NA	NA	1.5	0.2			1.0	-0.9			0.0
G97	0.8	NA	NA	2.9	0.9	NA	NA	5.7	0.9			0.5	-0.1			-0.4
V98	2.3	NA	NA	1.2	1.5	NA	NA	0.8	1.6			1.4	0.3			0.2
G99	2.1	NA	NA	3.0	1.2	NA	NA	1.8	1.7			1.7	0.3			0.3
F100	6.2	9.5	5.0	2.2	2.0	2.0	0.9	1.8	3.0	4.7	5.4	1.2	0.7	0.9	1.0	0.1
Y100a	27.2	27.2	15.1	2.2	1.5	1.5	0.6	0.9	17.9	18.6	26.6	2.5	1.7	1.7	1.9	0.5

NA = 突然変異は含まれない。

10

20

30

【表 9 B】

表 9 B. H E R 2 との結合における b H 1 - 4 4 F a b の
ショットガンアラニンおよびホモログスキャニング。

	抗原選別 (H E R 2)				表出選別 (タンパク質 L)				F w t / m u t 値				$\Delta \Delta G_{wt/mut}$ (k c a l / m o l)				
	wt/m1	wt/m2	wt/m3	wt/m4	wt/m1	wt/m2	wt/m3	wt/m4	Fwt/m1	Fwt/m2	Fwt/m3	Fwt/m4	$\Delta \Delta G_{wt/m1}$	$\Delta \Delta G_{wt/m2}$	$\Delta \Delta G_{wt/m3}$	$\Delta \Delta G_{wt/m4}$	
CDR-L1																	
Q27	0.9	1.0	0.6	1.4	0.8	0.9	0.4	2.8	1.2	1.0	1.3	0.5	0.1	0.0	0.1	-0.4	
N28	1.3	0.9	1.2	1.1	0.6	0.9	1.0	8.4	2.0	1.0	1.2	0.1	0.4	0.0	0.1	-1.2	
I29	1.5	1.9	0.8	0.8	0.8	0.7	0.4	0.8	1.8	3.0	1.7	1.0	0.3	0.6	0.3	0.0	
A30	0.3	NA	NA	1.1	0.4	NA	NA	0.2	0.8			6.5	-0.2			1.1	
K30a	1.5	2.6	1.8	1.1	1.4	3.1	1.1	0.2	1.1	0.8	1.6	6.0	0.0	-0.1	0.3	1.1	
T30b	1.0	NA	NA	0.3	0.9	NA	NA	0.5	1.1			0.6	0.1			-0.3	
I30c	4.4	5.3	1.8	1.5	2.3	2.1	0.7	1.0	1.9	2.6	2.6	1.6	0.4	0.6	0.6	0.3	
S30d	0.9	NA	NA	1.0	1.7	NA	NA	0.5	0.5			2.1	-0.4			0.4	
G31	2.0	NA	NA	2.2	2.6	NA	NA	3.0	0.8			0.7	-0.1			-0.2	
Y32	0.0	1.0	0.02	1.9	0.5	1.9	0.3	1.6	0.1	0.5	0.1	1.2	-1.8	-0.4	-1.6	0.1	
CDR-L2																	
W50	8.1	24.3	8.1	91.0	2.3	1.5	2.4	1.1	3.6	16.2	3.4	80.1	0.8	1.7	0.7	2.6	
G51	8.4	NA	NA	44.5	7.3	NA	NA	7.5	1.2			5.9	0.1			1.1	
S52	8.4	NA	NA	6.6	4.1	NA	NA	7.5	2.1			0.9	0.4			-0.1	
F53	3.1	9.8	2.0	0.4	1.9	2.4	1.4	0.4	1.6	4.0	1.5	1.0	0.3	0.8	0.2	0.0	
CDR-L3																	
H91	1.7	58.0	58.0	5.5	0.05	0.1	0.3	2.6	34.0	1160.0	203.0	2.1	2.1	4.2	3.1	0.4	
Y92	22.5	90.0	90.0	4.1	3.8	6.3	1.0	2.8	5.9	14.2	87.6	1.5	1.1	1.6	2.7	0.2	
S93	1.5	NA	NA	2.8	3.0	NA	NA	2.5	0.5			1.1	-0.4			0.1	
S94	30.3	NA	NA	7.3	1.0	NA	NA	0.9	29.7			8.1	2.0			1.2	
CDR-H1																	
S30	1.3	NA	NA	1.0	1.2	NA	NA	1.3	1.0			0.8	0.0			-0.1	
G31	1.5	NA	NA	3.3	1.2	NA	NA	5.0	1.3			0.7	0.1			-0.2	
T32	0.6	NA	NA	1.5	0.9	NA	NA	0.6	0.7			2.6	-0.2			0.6	
Y33	150.0	150.0	150.0	5.7	1.4	2.0	0.8	2.3	104.3	75.0	179.3	2.5	2.8	2.6	3.1	0.5	

10

20

30

40

CDR-H2																	
R50	150.0	150.0	150.0	134.0	2.1	1.3	70.0	1.3	70.7	113.6	2.1	100.5	2.5	2.8	0.5	2.7	
Y52	1.0	1.5	0.9	1.2	2.0	2.5	1.8	2.7	0.5	0.6	0.5	0.4	-0.4	-0.3	-0.4	-0.5	
S53	1.0	NA	NA	1.1	1.2	NA	NA	1.1	0.9			1.0	-0.1			0.0	
E54	1.2	NA	NA	2.2	0.4	NA	NA	1.0	3.4			2.2	0.7			0.5	
Y56	49.0	147.0	147.0	0.9	1.6	2.3	1.3	1.2	31.2	64.1	112.3	0.7	2.0	2.5	2.8	-0.2	
R58	23.7	142.0	142.0	66.0	2.1	2.3	4.9	2.7	11.2	61.4	28.8	24.8	1.4	2.4	2.0	1.9	
CDR-H3																	
W95	150.0	150.0	150.0	134.0	0.8	0.2	0.3	4.5	200.0	740.0	470.0	29.6	3.1	3.9	3.6	2.0	
V96	0.9	NA	NA	1.2	2.1	NA	NA	1.5	0.4			0.8	-0.5			-0.1	
G97	1.8	NA	NA	6.9	0.9	NA	NA	5.7	2.0			1.2	0.4			0.1	
V98	0.6	NA	NA	1.5	1.5	NA	NA	0.8	0.4			1.8	-0.5			0.3	
G99	6.5	NA	NA	21.3	1.2	NA	NA	1.8	5.2			12.0	1.0			1.5	
F100	145.0	145.0	29.0	133.0	2.0	2.0	0.9	1.8	71.1	71.1	31.3	73.0	2.5	2.5	2.0	2.5	
Y100a	149.0	149.0	149.0	6.9	1.5	1.5	0.6	0.9	98.0	101.9	262.7	7.8	2.7	2.7	3.3	1.2	

NA = 突然変異は含まれない。

10

20

【表 10】

表 10. VEGF および HER 2 の構造的および機能的パラトープ。

	VEGF のみ	HER 2 のみ	共通
構造的接触 (bH1)	LC-S30b	HC-Y56	LC-Y32
	LC-I30c	HC-R58	LC-W50
	LC-S30d		LC-Y53
	LC-G31		LC-H91
	LC-T93		LC-Y92
			LC-T94
			HC-Y33
			HC-R50
			HC-W95
			HC-G99
			HC-Y100a
ホットスポット残基 (bH1)		LC-T94	LC-W50
	LC-I29		
	LC-S30b	HC-Y33	HC-W95
	LC-S30d	HC-R50	
	LC-G31	HC-Y56	
	LC-Y32	HC-R58	
	LC-G51	HC-G99	
	LC-H91	HC-F100	
	LC-Y92	HC-Y100a	
ホットスポット残基 (bH1-44)	LC-I29	HC-Y33	LC-H91
	LC-T30b	HC-R50	LC-S94
	LC-S30d	HC-Y56	HC-W95
	LC-G31	HC-R58	
	LC-Y32	HC-F100	
	LC-W50	HC-Y100a	
	LC-F53		
	LC-Y92		
	HC-Y100a		

10

20

30

40

【表 1 1】

表 1 1. bH1／VEGF、bH1／HER2、およびハーセプチン（登録商標）／HER2 の複合体の結合界面の極性および大きさ。

	bH1 Fab／VEGFの結合界面				bH1 Fab／HER2の結合界面				ハーセプチン Fab／HER2の結合界面			
	bH1	VEGF	組合せ	パーセント(%)	bH1	HER2	組合せ	パーセント(%)	Herceptin	HER2	組合せ	パーセント(%)
極性	311	295	607	40%	308	282	591	37%	307	308	614	40%
疎水性	438	462	900	60%	470	518	988	63%	441	469	910	60%
合計	749	757	1506		779	800	1579		747	777	1524	

10

【0199】

HER2／VEGF 二重特異性 bH1－44 抗体は Herceptin（登録商標）抗体の HER2 結合動態を維持する

bH1 およびその Fab 変異体と固定化した VEGF または HER2 との結合動態を研究するために、表面プラズモン共鳴を行った（表 1 2）。SPR に基づくアッセイは、BIAcore 3000 を用いて行った。VEGF₁₀₉ および HER2 細胞外ドメインを、50～150 RU の範囲の R_{max} を許容する密度で CM5 チップ上に固定化した。0.05% の Tween 20 を含む PBS 中の Fab の段階希釈液を 30 μl / 分で注入した。結合応答は、ブランクのフローセルからの応答を減算することによって、およびバッファー効果を正規化することによって補正した。1：1 のラングミュア当てはめモデルを用いて k_a （会合速度）および k_d （解離速度）を推定した。 K_D 値は k_a および k_d の比から決定した。

20

bH1 Fab／VEGF の相互作用は、比較的高い会合速度（ $k_{on} = 3.7 \times 10^4$ ）および速い解離速度（ $k_{off} = 0.013$ ）によって特徴付けられており、これは 300 nM という中等度 K_D をもたらす。bH1／HER2 相互作用の親和性（ $K_D = 26$ nM、 $k_{on} = 9.6 \times 10^4$ 、 $k_{off} = 2.4 \times 10^{-3}$ ）は、より遅い会合速度および速い解離速度を有する Herceptin（登録商標）／HER2 相互作用（ $K_D = 0.5$ nM、 $k_{on} = 7.1 \times 10^5$ 、 $k_{off} = 3.5 \times 10^{-4}$ ）よりも 52 倍低い。親和性が改善された bH1 変異体である bH1－81 および bH1－44 は、VEGF および HER2 の相互作用の会合速度および解離速度のどちらの改善も表出した。高親和性クローン bH1－44 は、Herceptin（登録商標）と同様の親和性で HER2 と結合する（ $K_D = 0.2$ nM、表 1 2）。

30

【0200】

表 1 2 は、BIAcore を 30℃ で用いた表面プラズモン共鳴の測定によって決定した、bH1 変異体および Herceptin（登録商標）抗体の動態プロファイルを示す。これらの実験では、Fab を固定化した VEGF または HER2 と結合させ、1：1 のラングミュア結合当てはめモデルを用いて会合速度（ k_a ）、解離速度（ k_d ）、および解離定数（ K_D ）を決定した。bH1－44 抗体は、Herceptin（登録商標）抗体と同様の HER2 に対する動態プロファイルおよび親和性を有する。VEGF または HER2 との結合を失った 2 つの二重突然変異体（bH1－44 I29A＋Y32A および bH1－44 R50A＋R58A）は、他方の抗原に対する動態プロファイルおよび親和性を保っていた。

40

【表 1 2】

表 1 2. b H 1 変異体およびハーセプチン（登録商標）抗体の動態プロファイル。

	VEGF ₁₀₉			HER2 ECD		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (nM)
ハーセプチン（登録商標）F a b	-	-	NB	7.1E+05	3.5E-04	0.5 +/- 0.06
ハーセプチン（登録商標）（R 5 0 A）F a b	-	-	NB	2.7E+04	2.0E-03	74
ハーセプチン（登録商標）（R 5 8 A）F a b	-	-	NB	5.9E+04	7.3E-04	12
ハーセプチン（登録商標）（R 5 0 A + R 5 8 A）F a b	-	-	NB	-	-	NB
bH1 Fab	3.7E+04	0.013	300 +/- 87	9.6E+04	2.4E-03	26 +/- 28
bH1-81	1.2E+05	0.007	58 +/- 12	2.2E+05	1.4E-03	6 +/- 0.6
BH1-44 Fab	4.0E+05	0.001	3 +/- 0.3	3.7E+05	8.0E-05	0.2 +/- 0.07
bH1-44 (Y32A) Fab	-	-	weak	6.2E+05	3.5E-05	0.1
bH1-44 (I29A+Y32A) Fab	-	-	NB	4.2E+05	8.3E-05	0.2 +/- 0.07
bH1-44 (R50A+R58A) Fab	3.5E+05	0.001	3 +/- 0.7	-	-	NB

NB＝検出可能な結合なし。

【0 2 0 1】

二重特異性抗体はH E R 2 およびV E G F と同様の熱力学的特性で相互作用する

b H 1 F a b 変異体と2つの抗原、V E G F（V E G F のレセプター結合ドメイン、V E G F_{8 ~ 1 0 9}）およびH E R 2 細胞外ドメイン（E C D）との間の相互作用のエンタルピー（ΔH）およびエントロピー（ΔS）変化も、等温滴定熱量測定（I T C）を用いて決定した（図 5 9 A ~ F、図 6 0、表 1 3）。

F a b とヒト V E G F_{1 0 9} および H E R 2 の細胞外ドメインとの間の相互作用のマイクロ熱量測定を、V P - I T C 滴定熱量計（M i c r o c a l I n c.）で記載のように行った（S t a r o v a s n i k ら、1 9 9 9）。タンパク質溶液を広範にリン酸緩衝生理食塩水中へと透析した。バッファの組成の違いによる混合熱効果を最小限にするために、抗原および F a b は同じ容器中で透析した。1 0 0 ~ 2 2 0 μ M の濃度の F a b を 1 0 ~ 2 2 μ M の濃度の抗原溶液（H E R 2 - E C D または V E G F_{1 0 9}）中へ滴定した。この抗原濃度は正確なエンタルピー測定に必要であったが、結合親和性が高い場合は

K_D の決定が妨げられる。15または20回の注入を行って2倍過剰の抗体を得た。反応の熱を決定し、Fab希釈の熱を減算し、 ΔH を計算した。

表面プラズモン共鳴によって決定した解離定数(K_D) (表12)を用いて、

$$\Delta G = RT \ln(K_D)$$

に従って結合自由エネルギー(ΔG)を計算した。会合の際のエントロピー変化(ΔS)は、

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T \text{ [式中、} T \text{は温度(K)である]}$$

に従って計算した。

ΔCp を決定するために、20～37℃の範囲の様々な温度でマイクロ熱量測定を上述のように行った。 ΔCp は、 ΔH を温度の関数としてプロットすることによって、直線回帰によって決定した(図62)。

10

二重特異性抗体bH1とその2つの抗原VEGFおよびHER2のどちらかとの相互作用を、最初に特徴付けた。bH1とVEGFおよびHER2との結合は同様の熱力学的特性を示した(表13)。30℃でpH7.4のPBS中で測定したどちらの相互作用も発熱性(VEGFおよびHER2でそれぞれ $\Delta H = -2.4$ および -2.4 kcal/mol 、表13、図60)であり、結合エネルギーに貢献する非常に好ましいエントロピー変化を有する(VEGFおよびHER2でそれぞれ $-T\Delta S = -6.6$ および -7.9 kcal/mol 、表13、図60)。

【0202】

表13は、 ΔG (結合自由エネルギー)、 ΔS (エントロピー変化)、および ΔH (エンタルピー変化)を kcal/mol で示す。示した親和性は、BIAcore、30℃による動態分析を用いた少なくとも2つの独立した実験で測定した。 ΔH はITCを用いて測定し、2回または3回の独立した測定の平均、続いて標準偏差を表す。 ΔG および ΔS は上述のように計算した。

20

高親和性変異体bH1-81およびbH1-44は、bH1と同様の熱力学的プロファイルを表出した。また、VEGFおよびHER2とのその相互作用も、好ましいエンタルピーおよびエントロピーから特徴付けた(表13、図60)。VEGF相互作用では、親和性の改善は、顕著により好ましいエンタルピー変化(bH1-44では $\Delta H = -7.1$ 対bH1では -2.4 kcal/mol 、30℃)およびわずかにより少ない正のエントロピー変化(bH1-44では $-T\Delta S = -6.6$ 対bH1では -4.7 、30℃、表13、図60)に関連していた。HER2に対する改善された親和性も、より好ましいエンタルピー変化に関連していた($\Delta H = -5.3$ 対 -2.4 kcal/mol 、30℃、表13、図60)。

30

【表 1 3】

表 1 3. b H 1 変異体およびハーセプチン（登録商標）抗体の
抗原結合親和性および熱力学。

	VEGF ₁₀₉				HER2-ECD			
	K _D (nM)	ΔG	ΔH	-TΔS	K _D (nM)	ΔG	ΔH	-TΔS
ハーセプチン (登録商標)	-	-	-	-	0.5	-12.9 +/- 0.06	-13.6 +/- 0.2	-0.3 +/- 0.2
bH1	300	-9.0 +/- 0.2	-2.4 +/- 0.7	-6.6 +/- 0.7	26	-10.5 +/- 0.4	-2.4 +/- 0.5	-7.9 +/- 0.6
bH1-81	58	-10 +/- 0.1	-6.2 +/- 0.1	-3.8 +/- 0.2	6	-11.4 +/- 0.05	-3.8	-7.6
bH1-44	3	-11.8 +/- 0.07	-7.1 +/- 0.3	-4.7 +/- 0.3	0.2	-13.5 +/- 0.3	-5.3 +/- 0.4	-8.1 +/- 0.5
bH1-44 (LC-I29A/Y32A)	-	-	-	-	0.2	-13.5 +/- 0.3	-6.4 +/- 0.5	-7.6 +/- 0.6
bH1-44 (HCR50A/R58A)	4	-11.6 +/- 0.1	-7.7	-3.9	-	-	-	-

【0 2 0 3】

b H 1 - 4 4 および H e r c e p t i n（登録商標）は明確に異なる熱力学で H E R 2
と相互作用する

二重特異性抗体とは対照的に、H E R 2 / H e r c e p t i n（登録商標）相互作用は、
顕著なエントロピー変化を全く伴わない（ $-T\Delta S = -0.3 \text{ kcal/mol}$ 、図 6
0、表 1 3）大きな好ましいエンタルピー変化（ $\Delta H = -13.6 \text{ kcal/mol}$ ）に
よって特徴付けられている（K e l l e y ら、1 9 9 2）。b H 1 - 4 4 は H e r c e p
t i n（登録商標）と同様の親和性で H E R 2 と相互作用するが、結合自由エネルギーは
より大きなエントロピーコンポーネント（ $-T\Delta S = -8.1 \text{ kcal/mol}$ 、3 0 °C
）およびより小さなエンタルピーコンポーネント（ $\Delta H = -5.3 \text{ kcal/mol}$ 、3
0 °C）からなる。明確に異なる熱力学的特性は、親和性、動態、およびエネルギー的ホッ
トスポットの残基の多くを含めた、H e r c e p t i n（登録商標）と b H 1 - 4 4 との
間の H E R 2 結合特徴の多くの類似性と対照的である。H E R 2 において全結合エネルギーの 1 0 % よりも多く貢献する H e r c e p t i n（登録商標）のホットスポット残基は
b H 1 および b H 1 - 4 4 のそれに類似しているが、明らかな差異が存在する。

表 1 4 は、アラニンスキャニング突然変異誘発によって決定した H E R 2 結合における
b H 1、b H 1 - 4 4、および H e r c e p t i n（登録商標）抗体ホットスポットを示
す。突然変異誘発は K e l l e y ら、1 9 9 3 に記載のように行った。表 1 4 中の数字は
、残基をアラニンへと突然変異させた場合の結合自由エネルギーの変化（ $\Delta\Delta G_{wt-mut}$ ）を表す。表 1 4 中のホットスポット残基に陰影をつけ、全結合自由エネルギー（ Δ
G）の 1 0 % 以上の $\Delta\Delta G$ として定義する。

残基 L C - T h r 9 4、H C - T y r 3 3、H C - A s p 9 8 は b H 1 中の配列中で保
存されているが、H E R 2 結合において異なる機能を有する（表 1 4、図 6 1）。したが
って、V E G F 結合を補充した H e r c e p t i n（登録商標）の抗原結合部位中の突然
変異は、H E R 2 との相互作用に影響を与える抗原結合部位に何らかの基礎的な変化を行
ったと考えられる。二重特異性抗体は、H E R 2 に対して H e r c e p t i n（登録商標）
と同等に高い親和性をもたらす、異なる H E R 2 認識戦略を利用することによって、導
入された突然変異を収容する。b H 1 - 4 4 の L C - S e r 9 4 以外は、H E R 2 に対す
る親和性を b H 1 と比較して 1 0 0 倍より高く改善させた突然変異は、結合ホットスポ
ットの一部ではなく、既存の相互作用を最適化すると考えられることは、興味深い注記点で

ある。

【0204】

二重特異性相互作用における大きな負の熱容量

二重特異性相互作用を駆動する共通のエネルギーおよびそれらがどのように単一特異性親 *Herceptin* (登録商標) のそれと区別されるかをさらに理解するために、一連の実験を行って、bH1-44とVEGFまたはHER2、および *Herceptin* (登録商標) とHER2の3つのFab/抗原の相互作用を研究した。二重特異性相互作用の熱容量は、結合のエンタルピー (ΔH) を $20^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$ の範囲の複数の温度 ($\Delta T = 17^{\circ}\text{C}$ 、図62、表15) で決定することによって測定した。熱容量 (ΔC_p) は ΔH および温度 (T) の関数であり、方程式：

$$\Delta C_p = \delta(\Delta H) / \delta T$$

によって説明することができる。

ΔC_p は ΔH の温度依存性の勾配から直線回帰によって推定した (図62、表15)。bH1-44の ΔC_p は、VEGFとの相互作用では -400 cal/mol K 、およびHER2との相互作用では -440 cal/mol K であると決定された。大きな負の熱容量は、以前に記載のように疎水性効果の重要性を示しており (Kauzmann、1959)、これは、2つの複合体の構造的界面の疎水性性質と一貫している (表11)。以前に同様の温度間隔で -370 cal/mol K であると決定された *Herceptin* (登録商標) /HER2の ΔC_p は (Kelleyら、1992)、bH1-44/HER2の ΔC_p よりも小さいが、それでもHER2結合の疎水性効果の重要な役割を示す。

【0205】

結合自由エネルギーの全エントロピー変化 (ΔS) は、3つの供給源 (Murphyら、1994)、すなわち、結合表面の脱溶媒和に関連するエントロピー変化 (ΔS_{SOLV})、回転および並進の自由度の損失からのエントロピー変化 (ΔS_{RT})、ならびに相互作用分子の立体配置およびコンホメーションの力学の変化によるエントロピー変化 (ΔS_{CONF}) からのエントロピー変化の和である。

$$(1) \Delta S_{\text{TOT}} = \Delta S_{\text{SOLV}} + \Delta S_{\text{RT}} + \Delta S_{\text{CONF}}$$

典型的には、 ΔS_{SOLV} のみが正であり、 ΔS_{RT} および ΔS_{CONF} はどちらも負である。2つの分子の会合のクラティック (cratic) なエントロピー用語 ΔS_{RT} は、記載のように -8 cal/Kmol であると推定することができる (Murphyら、1994)。 ΔS_{SOLV} は、無極性表面積の埋込みによる疎水性効果によって支配されると予測することができ、 ΔC_p の関数として説明することができる。

$$(2) \Delta S_{\text{SOLV}} = \Delta C_p \ln(T/T^*), T^* = 385 \text{ K}$$

したがって、 ΔS_{CONF} は、

$$(3) \Delta S_{\text{CONF}} = \Delta S_{\text{TOT}} - \Delta S_{\text{RT}} - \Delta S_{\text{SOLV}}$$

として推定することができる。

方程式 (3) によれば、 ΔS_{SOLV} は、bH1-44/VEGFでは $96 \text{ cal/mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ 、bH1-44/HER2では $105 \text{ cal/mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ 、および *Herceptin* (登録商標) /HER2では $89 \text{ cal/mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ であると推定される (表15)。これは、bH1-44/VEGFでは $-72 \text{ cal/mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ 、bH1-44/HER2では $-70 \text{ cal/mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ 、および *Herceptin* (登録商標) /HER2では $-80 \text{ cal/mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ の ΔS_{CONF} へと変換される (表15)。

その親 *Herceptin* (登録商標) と比較した二重特異性Fabの全体的な構造的安定性を検査するために、示差スキャニング熱量 (DSC) を用いた熱変性実験を行った。熱変性実験はMicrocal Inc. の示差スキャニング熱量計で行った。Fabを 10 mM の酢酸ナトリウム、 $\text{pH } 5$ 、 150 mM の塩化ナトリウムに対して透析した。溶液を 0.5 mg/ml の濃度に調節し、 1°C/分 の速度で 95°C まで加熱した。融解プロファイルをベースライン補正し、正規化した。融解温度 (T_M) は製造者によって供給されたソフトウェアを用いて決定した。予測どおり、どのFabも可逆的な熱変性プロフ

ファイルを表出しなかった (Kelleyら、1992) (データ示さず)。二重特異性変異体の T_M (bH1、bH1-81、およびbH1-44でそれぞれ77.2°C、75.6°C、74.3°C、表16) は、Herceptin (登録商標) (82.5°C) よりもわずかに低かったが、高いものであり、他の治療的抗体で報告されているものの範囲内であった (GarberおよびDemarest、2007)。

【0206】

VEGFまたはHER2のみに対して高い親和性を有するbH1変異体の結合動態および熱力学

興味深いことに、二重特異性抗体は、その結合エネルギーの大部分を共有のVEGF/HER2結合部位の完全に異なる領域から引き出す。これらのデータは、残りの結合特異性に影響を与えずに二重特異性抗体のVEGFまたはHER2結合機能を選択的に破壊することができることを示している。構造的な研究により、VEGFおよびHER2のbH1上の構造的パラトープは顕著に重複することが示されたが、bH1およびbH1-44のショットガンアラニン突然変異誘発により、VEGFおよびHER2の相互作用はわずかな重複しか有さない2つのユニークなCDR残基の組によって媒介されることが実証された (図54および57、表9A、9B、および10)。bH1およびbH1-44のショットガンアラニンスキニングにより、VEGF結合に重要なLC-Ile29、LC-Tyr32、およびHER2結合のHC-Arg50、HC-Arg58を含めた (図54および57、表9および10)、一部のCDR残基がVEGFまたはHER2のどちらかの結合に排他的に重要であることが示された (図54および57、表9A、9B、および10)。それぞれの相互作用におけるこれらの残基の側鎖のユニークな重要性を確認するために、それぞれの残基を、bH1-44 (LC-Ile29、LC-Tyr32、HC-Arg50、HC-Arg58) またはHerceptin (登録商標) (HC-Arg50、HC-Arg58) の足場中で、個別にまたは組み合わせて、アラニンへと突然変異させ、突然変異体をFabおよびIgGとして発現させた。

重鎖を介して遺伝子IIIのN末端と融合したbH1-44またはHerceptin (登録商標) Fabをコードしているベクターを、Kunkel突然変異誘発の鋳型として使用した (Kunkelら、1987)。所望のアラニン突然変異を選別した位置に導入されるようにオリゴヌクレオチドを設計した。Fabアラニン突然変異体をファージとして発現させ、結合を競合ELISAによって確認した (図58)。その後、記載のように、重鎖および軽鎖可変ドメインをFabおよびIgG発現ベクター内にクローニングし、FabおよびIgGを発現させ、精製した (Bostromら、2009)。SDS-PAGEにより正しいタンパク質の大きさが確認された (図65)。サイズ排除クロマトグラフィーにより5%未満の凝集レベルが示された。

【0207】

2つの抗原との結合を競合ELISAおよび/またはBIAcoreによって検査した。bH1-44足場中のすべての単一アラニン突然変異が、結合を様々な度合で損なわせた (データ示さず)。最も著しい単一突然変異はLC-Y32Aであり、VEGF結合を顕著に破壊した一方で、HER2結合の親和性および動態が維持された (表12、図58、および図63)。二重突然変異I29A+Y32A (LC) またはR50A+R58A (HC) は、それぞれVEGFまたはHER2との結合をほぼ完全に破壊した一方で、他の抗原に対する結合の親和性および動態が維持された (表12、図58、および図63)。Herceptin (登録商標) 足場中のアラニン突然変異HC-R50A、HC-R58AもHER2との結合を様々な程度まで破壊した一方で、二重突然変異体HC-R50A+R58Aは検出可能なHER2結合を示さなかった (表12)。

次に、二重突然変異体の熱力学的パラメータを分析し、bH1-44の値と比較した。bH1-44突然変異体LC-I29A+Y32AおよびHC-R50A+R58AとそれぞれHER2またはVEGFとの結合自由エネルギーは、エンタルピーおよびエントロピーの好ましい貢献から生じ (VEGFでは $\Delta H = -7.7$ および $-T\Delta S = -3.9$ 、HER2では $\Delta H = -6.4$ および $-T\Delta S = -7.6$ 、表13、図60)、これは30

℃で測定したbH1-44とほぼ同等である（表13、図60）。したがって、二重突然変異体はbH1-44と同じ熱力学および動態のプロファイルを表出した。

【0208】

特異性を変更させる残基の機能の構造的基礎

次に、それぞれの抗原複合体中の結合決定要因の特異的相互作用を明らかにするために、VEGFまたはHER2との複合体中のbH1の結晶構造を分析した（Bostromら、2009）（図64）。生じた分析により、2つの特異性決定残基の突然変異が、どのように他方の親和性、動態、および結合熱力学に影響を与えずに一方の抗原の結合能力を破壊するかが説明された。bH1のCDR-L1はHerceptin（登録商標）からの配列の変化の大多数を含有し、VEGF結合に重要である。bH1のCDR-L1のコンホメーションは2つの複合体の構造で顕著に異なり、平均の偏差は4.6 Åである（残基27～32のC_α）。対照的に、VEGFとの複合体中のbH1 Fabの全体的なコンホメーションは、HER2と結合したFabのそれと顕著に類似している（標準偏差=0.7 Å、398個の主鎖原子、C_α）。CDR-L1ループはVEGFによって埋没された表面積の26%を構成する一方で、このループはHER2パラトープの周辺に位置し、HER2との接触に最小限しか関与していない。

10

2つの複合体の重ね合わせにより、VEGFは、HER2と結合したコンホメーションでCDR-L1のTyr32および隣接残基と衝突することが示された。Tyr32の主鎖C_α原子は2つの構造において同じ位置に存在するが、その側鎖は約130°回転している。VEGF複合体中では、Tyr32およびIle29は、VEGF結合に必要なCDR-L1のコンホメーションを可能にすることにおいて構造的な役割を果たすと考えられる。Tyr32からAlaまたはPheのどちらかへの突然変異は、VEGF結合には許容されない（Bostromら、2009）。Tyr32の側鎖はHER2に向けられているが、生産的な抗原接触に関与していると考えられていない。Ile29はHER2から遠く離れており、その側鎖は溶媒に曝露されており、また、Ile29およびTyr32からAlaへの突然変異はHER2結合に良好に許容される。

20

【0209】

【表 1 4】

表 1 4. アラニンスキャニング突然変異誘発によって決定したHER2結合のbH1、bH1-44、およびハーセプチン（登録商標）ホットスポットの比較

		$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)				
残基		bH1/VEGF	bH1-44/VEGF	bH1/HER2	bH1-44/HER2	ハーセプチン
軽鎖	27		-0.6		0.1	
	28	0.05	0.6	0.03	0.4 ^a	-0.3
	29	1.1	2.3	-0.2 ^a	0.3 ^a	
	30	0.2	1.1	0.1 ^a	-0.2 ^a	1.1
	30a	-0.2	0.4	-0.2 ^a	0.04 ^a	-
	30b	1 ^c	1.2	0.3 ^a	0.05 ^a	-
	30c	0.8 ^c	1.1	0.9 ^a	0.4 ^a	-
	30d	1.3 ^c	1.3	-0.2 ^a	-0.4 ^a	-
	31	1.2 ^c	1.3	0.3 ^a	-0.1 ^a	0.8
	32	1.7 ^c	2.7	-0.8 ^{ac}	-1.8 ^a	
	50	1.3 ^c	1.8	1.4 ^{ac}	0.8 ^a	-0.1
	51	1	0.7	-0.3 ^a	0.09 ^a	
	52	0.1	0.8	0.3	0.4	-0.3
	53	0.7 ^c	1.5	0.9 ^{ac}	0.3	
重鎖	91	2 ^c	3.0	0.9 ^c	2.1	3.2
	92	1.4 ^c	1.5	0.5 ^c	1.1	1.4
	93	-0.3 ^c	-0.6	-0.4	-0.4 ^a	0.8
	94	0.05 ^c	1.6	1.4 ^c	2.0 ^a	-0.1
	30	0.2	0.0	-0.3	0.01 ^a	0.6
	31	0.2	0.4	0.4	0.1 ^a	0.2
	32	-0.4	-0.4	-0.4	-0.2	0.4
	33	0.3 ^c	1.2	2.4 ^c	2.8	-0.1
	50	-0.3 ^c	-0.7	2.5 ^c	2.5	3.3
	52	0.4	-0.1	-0.8	-0.4	0.2
	53	-0.5	0.1	0.06	-0.07 ^a	0.1
	54	-0.2	0.7	-0.8	0.7 ^a	-0.1
	56	0.2	1.0	1.8 ^c	2.0	0.9
	58	-0.2	-0.2	2.5 ^c	1.4	1.9
	95	2 ^c	3.1	1.8 ^c	3.1	5.8
	96	0.2	-0.9	0.08	-0.5 ^a	
	97	-0.1	-0.1	0.3	0.4	
	98	0	0.3	-0.1	-0.5 ^a	1.2
	100	0.7	0.7	1.9	2.5	1.2
	100a	0.5 ^c	1.7	2.2 ^c	2.7	5.6

^aハーセプチン（登録商標）抗体と異なるbH1／bH1-44の残基。^cbH1／VEGFまたはbH1／HER2複合体構造中の接触残基を示す。（－）ハーセプチン（登録商標）抗体がこの位置で残基を持たないことを示す。

【表 1 5】

表 1 5. VEGFおよびHER2の相互作用の熱力学的パラメータ。

	ΔC_p (cal/Kmol)	ΔS_{tot} (cal/Kmol)	ΔS_{conf} (cal/Kmol)	ΔS_{desolv} (cal/Kmol)	ΔS_{rt} (cal/Kmol)
bH1-44/VEGF	-400	16	-72	96	-8
bH1-44/HER2	-440	27	-70	105	-8
ハーセプチン (登録商標) ／HER2	-370	0.8	-80	89	-8

Murphyら、Proteins、1994に記載のように、 $\Delta S_{CONF} = \Delta S_{TOT} - \Delta S_{SOLV} - \Delta S_{RT}$ である。 ΔS_{RT} は、単純な結合反応で -8 cal/mol と推定された。 $\Delta S_{SOLV} = \Delta S^* + \Delta C_p \ln(T/T_s^*)$ であり、 $T = 303.15$ であり、 $T_s^* = 385.15$ であり、 ΔS^* は約0である。

【表 1 6】

表 1 6. 二重特異性Fabおよびハーセプチン（登録商標）抗体の融解温度（ T_M ）

Fab	T_M (°C)
Herceptin	82.5
bH1	77.2
bH1-81	75.6
bH1-44	74.3

【0 2 1 0】

bH1／HER2複合体中のHER2結合にユニークに重要な残基の構造も検査した。Arg50およびArg58の側鎖は、bH1－HER2構造中のHER2上の酸性残基（Glu558およびAsp560）に対してパッキングしている（図64）。LysおよびAlaへの突然変異は破壊的であるため、相互作用は側鎖に高度に特異的であると考えられる（Bostromら、2009）。しかし、VEGF構造中では、Arg50およびArg58は溶媒に曝露されており、VEGFから遠く離れており、AlaまたはLysへの突然変異は良好に許容される（Bostromら、2009）。

【0 2 1 1】

引用文献：

- Baselga, J., L. Norton, J. Albanell, et al., 1998, Cancer Res. V. 58, p. 2825.
- Bostrom, J., S. F. Yu, D. Kan, B. A. Appleton, C. V. Lee, K. Billeci, W. Man, F. Peale, S. Ross, C. Wiesmann, and G. Fuh, 2009, Science, v. 323, p. 1610-4.
- Chen Y., C. Wiesmann, G. Fuh, B. Li, H. W. Christinger, P. McKay, A. M. de Vos, and H. B. Lowman, 1999, J Mol Biol, v. 293, p. 865-81.
- Cho, H. S., K. Mason, K. X. Ramyar, A. M. Stanley, S. B. Gabelli, D. W. Denney, Jr., and D. J. Leahy, 2003, Nature, v. 421, p. 756-60.
- Chothia, C., A. M. Lesk, 1987, J. Mol. Biol., v. 196, p. 901.
- Christinger, H. W., Y. A. Muller, L. T. Berleau, B. A. Keyt, B. C. Cunningham, N. Ferrara, and A. M. de Vos, 1996, Proteins, v. 26, p. 353-7.
- Collaborative Computational Project, N., 1994: Acta Crystallogr. Section D. Bi

ol. Crystallogr., v. 50, p. 760-763.

Dall'Acqua, W., E. R. Goldman, E. Eisenstein, et al., 1996, *Biochemistry*, v. 35, p. 1967.

Emsley, P., and K. Cowtan, 2004, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, v. 60, p. 2126-32.

Fellouse, F. A., B. Li, D. M. Compaan, A. A. Peden, S. G. Hymowitz, and S. S. Sidhu, 2005, *J Mol Biol*, v. 348, p. 1153-62.

Fields, B. A., F. A. Goldbaum, X. Ysern, et al., 1995, *Nature*, v. 374, p. 739.

Franklin, M. C., K. D. Carey, F. F. Vajdos, D. J. Leahy, A. M. de Vos, and M. X. Sliwowski, 2004, *Cancer Cell*, v. 5, p. 317-28. 10

Fuh, G., B. Li, C. Crowley, B. Cunningham, and J. A. Wells, 1998, *J Biol Chem*, v. 273, p. 11197-204.

Fuh, G., P. Wu, W. C. Liang, M. Ultsch, C. V. Lee, B. Moffat, and C. Wiesmann, 2006, *J Biol Chem*, v. 281, p. 6625-31.

Gallop, M. A., R. W. Barrett, W. J. Dower, et al., 1994, *Journal of Medicinal Chemistry*, V. 37, p. 1233.

Garber, E., and S. J. Demarest, 2007, *Biochem Biophys Res Commun*, v. 355, p. 751-7.

Hudziak, R. M., and A. Ullrich, 1991, *J Biol Chem*, v. 266, p. 24109-15.

James, L. C., Roversi, P., Tawfik, D. S., 2003, *Science*, v. 299, p. 1362. 20

Jimenez, R., G. Salazar, K. K. Baldrige, et al., 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 100, p. 92.

Johnson, G., T. T. Wu, 2000, *Nucleic Acids Res.*, v. 28, p. 214.

Kauzmann, W., 1959, *Adv Protein Chem*, v. 14, p. 1-63.

Kelley, R. F., and M. P. O'Connell, 1993, v. 32, p. 6828-35.

Kelley, R. F., M. P. O'Connell, P. Carter, L. Presta, C. Eigenbrot, M. Covarrubias, B. Snedecor, J. H. Bourell, and D. Vetterlein, 1992, *Biochemistry*, v. 31, p. 5434-41.

Kunkel, T. A., J. D. Roberts, and R. A. Zakour, 1987, *Methods Enzymol*, v. 154, p. 367-82. 30

L. C. Storoni, A. J. M. a. R. J. R., 2004, *Acta Cryst.*, p. 432-438.

Lasky, L. A., and D. J. Dowbenko, 1984, *DNA*, v. 3, p. 23-9.

Lawrence, M.C., Colman, P.M. et al., 1993, *J Mol Biol*, v. 234, pp. 946-950.

Lee, C. V., W. C. Liang, M. S. Dennis, C. Eigenbrot, S. S. Sidhu, and G. Fuh, 2004a, *J Mol Biol*, v. 340, p. 1073-93.

Lee, C. V., S. S. Sidhu, and G. Fuh, 2004b, *J Immunol Methods*, v. 284, p. 119-32.

Lee, C. V., S. G. Hymowitz, H.J. Wallweber, et al.

Liang, W. C., X. Wu, F. V. Peale, C. V. Lee, Y. G. Meng, J. Gutierrez, L. Fu, A. K. Malik, H. P. Gerber, N. Ferrara, and G. Fuh, 2006, *J Biol Chem*, v. 281, p. 951-61. 40

Lovell, S. C., I. W. Davis, W. B. Arendall, et al., 2003, *Proteins*, v. 50, p. 437.

Lowman, H. B., S. H. Bass, N. Simpson, and J. A. Wells, 1991, *Biochemistry*, v. 30, p. 10832-8.

McCoy, Y. A. J., R. J. Read, and L. C. Storoni, 2004, *Acta Cryst.*, 432.

Muller, Y. A., Y. Chen, H. W. Christinger, B. Li, B. C. Cunningham, H. B. Lowman, and A. M. de Vos, 1998, *Structure*, v. 6, p. 1153-67.

Muller, B., H. Li, W. Christinger, et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, v. 94, p. 7192. 50

Murphy, K. P., D. Xie, K. S. Thompson, L. M. Amzel, and E. Freire, 1994, *Proteins*, v. 18, p. 63-7.

Mylvaganam, S. E., Y. Paterson, and E. D. Getzoff, 1998, *J. Mol. Biol.*, v. 281, p. 301.

Nemazee, D., 2006, *Nat. Rev. Immunol.*, v. 6, p. 728.

Otwinowski, Z., and Minor, W., 1997, *Methods Enzymol.*, v. 276, p. 307-326.

Pauling, L., 1940, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 62, p. 2643.

Presta, L. G., H. Chen, S. J. O'Connor, V. Chisholm, Y. G. Meng, L. Krummen, M. Winkler, and N. Ferrara, 1997, *Cancer Res.*, v. 57, p. 4593-9.

Read, R. J., 2001, *Acta Cryst.*, v. D57, p. 1373-1382.

Reichert, J. M., Rosenzweig, C. J., Faden, L. B., et al., 2005, *Nat. Biotechnol.*, v. 23, p. 1703.

Senn, B. M., Lopez-Macias, C., Kalinke, U., et al., 2006, *Eur. J. Immunol.*, v. 33, p. 950.

Sethi, D. K., Agarwal, A., Manivel, V., et al., 2006, *Immunity*, v. 24, p. 429.

Sidhu, S. S., B. Li, Y. Chen, F. A. Fellouse, C. Eigenbrot, and G. Fuh, 2004, *J Mol Biol*, v. 338, p. 299-310.

Sidhu, S. S., H. B. Lowman, B. C. Cunningham, and J. A. Wells, 2000, *Methods Enzymol*, v. 328, p. 333-63.

Starovasnik, M. A., M. P. O'Connell, W. J. Fairbrother, and R. F. Kelley, 1999, *Protein Sci*, v. 8, p. 1423-31.

Vajdos, F. F., C. W. Adams, T. N. Breece, L. G. Presta, A. M. de Vos, and S. S. Sidhu, 2002, *J Mol Biol*, v. 320, p. 415-28.

Weiss, G. A., C. K. Watanabe, A. Zhong, et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA*, v. 97, p. 8950.

Wiesmann, C., G. Fuh, H. W. Christinger, C. Eigenbrot, J. A. Wells, and A. M. de Vos, 1997, *Cell*, v. 91, p. 695-704.

Winn, M. D., M. N. Isupov, and G. N. Murshudov, 2001, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, v. 57, p. 122.

【 0 2 1 2 】

本明細書中で引用又は参照した特許、特許出願、特許出願公報及び他の出版物のすべては、特許、特許出願、特許出願公報又は他の出版物の各々が出典明記によって援用されるために具体的及び個々に示されるのと同程度に、出典明記によって本明細書中に援用される。

【図 1 A】

FIG. 1A

[illegible]

【図 1 B】

FIG. 1B

[illegible]

【図 2】

FIG. 2

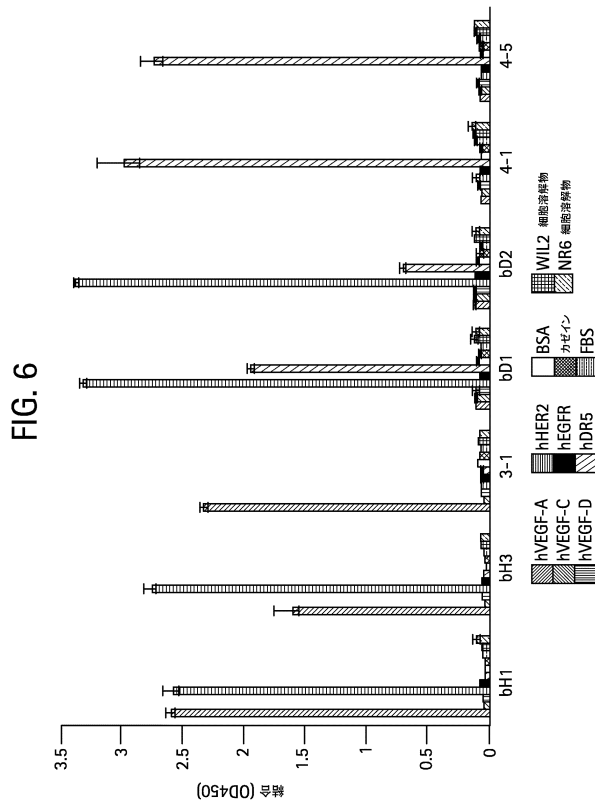
ライブラリ	L1/L3	L1/L4	L1/L2/L3-A	L1/L2/L3-B	L1/L2/L3-C, L4-LD
構造 型型 マート 終止	2C4 Fab-C L1	2C4 Fab-C L1	2C4 Fab-C L1	1 4D5 6G-Av ScFv L1	4D5 ScFv L1
28		Ss	Ss	NNK	Ds
29		NNK	VL	NNK	NNK
30a-e	NNK	NNK	NNK	NNK	NNK
31	NNK/O-4	NNK/O-5	(XXZ)5	NNK	NNK/O-5
32	NNK	NNK	P	NNK	NNK
33	Ys	Ys	Y	NNK	NNK
				NNK	YIWRG/YSYHSTDA
L1					
L2			NNK/IN GAS S	NNK/IN GAS S	NNK/IN/WRG GA
			NNK	NNK	YS/NNK
L4					NNK
					Ss
					T/Ts
					D/Ds
L3			XXZ XXZ (XXZ)O-2	NNK NNK NNK	YADSH/WRG XXZ XXZ (XXZ)O-2 ATSG
					ATSG
表出	5-7%	5-7%	5-7%	~15-25%	~17%
構的	VEGF DRS アルブミン	VEGF DRS	VEGF DRH5	VEGF	VEGF DR5 IgG-Fc-融合タンパク質

【図 3】

FIG. 3

	CDR-L1					CDR-L2					FR3(CDR-L4)					CDR-L3										
	28	29	30	30a-f	31	32	33	50	51	52	53	66	67	68	69	70	91	92	93	93a-e	94	95	96			
hu4D5	D	V	S		T	A	V	S	A	S	F	G	S	G	T	D	H	Y	T		T	P	P			
2C4	D	V	S		I	G	V	S	A	S	Y	G	S	G	T	D	Y	Y	I		Y	P	Y			
ab12-G	D	V	S		T	A	V	S	A	S	F	G	S	G	T	D	Y	S	T		Y	P	W			
	CDR-H1					CDR-H2										CDR-H3										
	29	30	31	32	33	34	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	94	95	96	97	98	99	100	100a
hu4D5	I	K	D	T	Y	I	A	R	I	Y	P	T	N	G	Y	T	R	Y	R	W	G	G	D	G	F	Y
2C4	F	T	D	Y	T	M	A	D	V	N	P	S	G	G	S	T	Y	Y	R	N	L	G	P	S	F	F
ab12-G	I	S	D	S	G	I	A	A	I	P	G	A	G	S	T	Y	Y	Y	R	F	V	S	A	P	P	S

【図 6】



【图 7】

FIG. 7

分類 ラウンド	結合条件	タンパク質	タイター	濃縮	OD/mL
1	結合4時間	ヒト Fc 融合	1.8×10^6		21
	洗浄4回	hVEGF	1.5×10^6		18.3
	BSA	hDR5 – long	8×10^5		20.9
		L – 3 (short L1's)	4.8×10^6		
		L – 4 (long L1's)	1×10^6		
2	結合3時間	ヒト Fc 融合	5.2×10^5	1.86	26.6
	洗浄5回	hVEGF	3.6×10^6	1.33	18.2
	BSA/ 卵白アルブミン	hDR5 – long	4.2×10^5	1.05	15.4
3	結合3時間	ヒト Fc 融合	9×10^3	1.5	16.2
	洗浄10回	hVEGF	8×10^3	0.75	8.17
	BSA/ 乳	hDR5 – long	1.4×10^4	2.8	17.3
4	結合2時間	ヒト Fc 融合	5.5×10^5	22.9	25.3
	洗浄12回	hVEGF	7.4×10^6	96.1	14.8
	カゼイン	hDR5 – long	4.5×10^7	818.2	9.7
5	結合1.75時間	ヒト Fc 融合	1.4×10^6	14	
	洗浄12回	hVEGF	2.2×10^7	110	
	BSA	hDR5 – long	6.5×10^7	325	

【图 8】

FIG. 8

28	29	30	30a					31	32	33		50	51	52	53		91	92	93
Dsoft	I/V	M/W						M/W		L/V			G/A						X/Y
D	I	R	S					G	S	V		W	G	S	Y		H	Y	T
D	I	R	T					G	S	V		W	G	S	F		H	Y	T
D	I	R	V					G	S	V		W	G	S	F		H	Y	T
D	I	A	G					G	S	V		W	A	S	Y		H	Y	T
D	I	R	F					G	S	V		W	G	S	F		H	Y	T
D	I	K	S					G	S	V		W	G	S	Y		H	Y	T
D	I	A	R					G	S	V		W	G	S	Y		H	Y	T
W	V	P	S					H	T	V		L	G	S	Y		S	D	Y
D	I	N	G					G	S	V		W	A	S	F		H	Y	T
D	I	L	Q					G	S	V		W	G	S	Y		H	Y	T
D	V	R	M					G	S	V		W	G	S	Y		H	Y	T
D	I	R	T					G	S	V		W	G	S	S		H	Y	T
D	I	K	H					G	S	V		W	G	S	F		H	Y	T
D	I	A	S					G	S	V		W	A	S	F		H	Y	T
D	I	K	S					G	S	L		W	G	S	Y		H	Y	T
N	V	W						D	W	V		P	A	S	S		G	W	Y
D	I	K	H					G	S	V		W	G	S	S		H	Y	T
D	I	R	M					G	S	V		W	G	S	V		H	Y	T
Q	I	W						R	H	L		T	G	S	S		S	Y	W
D	I	S	H					G	S	V		W	G	S	F		H	Y	T
N	I	A	M					G	S	V		W	G	S	Y		H	Y	T
E	V	Y						S	Y	V		P	A	S	S		G	F	W
V	I	R	K	A	F	G		Q	P	L		G	A	S	Y		Y	R	A
D	I	K	K					G	S	V		W	G	S	S		H	Y	T
N	I	F						S	H	V		P	G	S	Y		A	F	W
D	I	R	T					G	S	V		W	G	S	Y		H	Y	T
D	I	L	F					G	S	V		W	G	S	F		H	Y	T
D	I	W						R	W	L		A	G	S	S		H	D	Q
D	I	Y	M					G	S	V		W	G	S	Y		H	Y	T
D	I	S	M					G	S	V		W	G	S	Y		H	Y	T
N	I	A	Q					G	S	V		W	A	S	F		H	Y	T

【图 9】

FIG. 9

hVEGF 結合体併用プレートと溶液選別

L1										L2				L3				Frag-3		[C50(nM)]
28	29	30	30a	30b	30c	31	32	33	50	51	52	53	91	92	93	93a	94	hVEGF	HER2	
4D5	D	V	S			T	A	V	G	S	A	S	F	S	W	A	G	87	ND	
H6	Y	I	W			N	Y	V	G	S	G	S	F	W	W	A	G	60	ND	
H7	N	V	W			D	W	V	P	A	S	S	G	W	Y	I	A	226	ND	
H8	E	I	F		P	Y	Y	V	L	G	S	G	W	D	Y	G	G	41	ND	
H9	Y	V	F			Q	Y	V	H	A	A	S	G	Y	W	V	A	170	ND	
H10	D	V	F			T	S	V	D	A	S	S	G	Y	I	W	A	170	ND	
H11																				
H12																				
H13																				
H14																				
H15																				
H16																				
H17																				
H18																				
H19																				
H20																				
H21																				
H22																				
H23																				
H24																				
H25																				
H26																				
H27																				
H28																				
H29																				
H30																				
H31																				
H32																				
H33																				
H34																				
H35																				
H36																				
H37																				
H38																				
H39																				
H40																				
H41																				
H42																				
H43																				
H44																				
H45																				
H46																				
H47																				
H48																				
H49																				
H50																				

【図10A-1】

FIG. 10A-1

クローン	緩和性スクリーニングアッセイ										L1			L2			L3					
	SSC+/− 50nM Veqf	SSC+/− 20nM HER2	SSC+/− 50nM Veqf	SSC+/− 20nM HER2	SSC+/− 50nM Veqf	SSC+/− 20nM HER2	SSC+/− 50nM Veqf	SSC+/− 20nM HER2	SSC+/− 50nM Veqf	SSC+/− 20nM HER2	28	30	32	33								
H11	59	2.28	2.06	90.5	2.79	0.12	4.4	D	I	M	L	G	S	V	W	G	S	F	Y	T	T	
	92	2.57	1.72	67.0	1.96	0.11	5.8	D	I	K	V	R	Q	G	S	W	A	S	F	H	Y	T
	1	2.38	2.90	96.9	2.69	0.10	6.6	D	I	R	G	L	G	S	V	W	A	S	F	H	Y	T
	64	2.91	2.92	100.3	3.29	0.23	7.1	D	I	A	K	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	38	2.15	2.00	96.7	2.77	0.20	7.2	D	I	L	A	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	67	2.36	2.35	99.5	2.50	0.19	7.6	D	I	A	K	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
H3	56	2.67	2.61	97.7	2.95	0.24	8.0	D	I	S	R	A	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T
	60	2.02	2.00	99.0	2.78	0.23	8.2	N	I	Y	A	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	71	2.44	2.34	95.9	2.82	0.24	8.4	D	I	A	F	G	S	L	W	G	S	F	H	Y	T	T
	56	2.43	2.46	101.3	3.38	0.22	9.3	D	I	K	A	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	25	2.98	2.88	96.7	3.31	0.31	9.4	N	I	A	M	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	14	2.54	2.40	94.4	2.83	0.27	9.5	D	I	L	K	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	90	2.71	2.57	94.7	2.93	0.28	9.6	D	I	L	I	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	72	2.25	2.15	95.7	2.78	0.27	9.7	D	I	V	S	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	21	2.59	2.44	94.1	2.80	0.30	10.6	D	I	K	H	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	76	3.35	3.25	97.1	3.34	0.36	10.6	D	I	R	G	G	S	V	W	A	S	Y	H	Y	T	T
H4	53	2.45	2.37	96.8	2.41	0.26	10.8	D	I	R	Q	G	S	V	W	A	S	Y	H	Y	T	T
	37	2.29	2.21	96.4	2.73	0.30	10.9	D	I	R	Q	G	S	V	W	A	S	Y	H	Y	T	T
	76	2.65	2.49	94.0	2.83	0.31	11.1	D	I	S	M	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	86	2.49	2.41	96.6	2.78	0.31	11.1	D	I	K	V	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	36	3.08	3.11	101.2	3.36	0.38	11.2	D	I	R	E	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	89	2.92	2.68	91.9	2.86	0.32	11.2	D	I	R	E	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	17	2.82	2.67	94.7	2.85	0.32	11.3	D	I	L	T	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	2	3.02	3.09	102.3	3.32	0.39	11.8	D	I	R	V	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
	42	2.61	2.26	86.8	2.87	0.35	12.1	N	I	R	T	G	S	V	W	G	S	Y	H	Y	T	T
	16	2.56	2.57	100.5	3.07	0.38	12.3	D	I	S	R	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
23	3.11	2.95	94.8	3.31	0.42	12.8	D	I	Y	M	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	
17	3.07	2.96	96.2	3.29	0.43	13.1	D	I	S	S	G	S	V	W	G	S	Y	H	Y	T	T	

FIG. 10A-2

クローン	緩和性スクリーニングアッセイ										L1				L2				L3			
	SSC-H+ 50nM Veqf	SSC-H+ 20nM HER2	SSC-H+ 50nM Veqf	SSC-H+ 20nM HER2	SSC-H+ 50nM Veqf	SSC-H+ 20nM HER2	SSC-H+ 50nM Veqf	SSC-H+ 20nM HER2	SSC-H+ 50nM Veqf	SSC-H+ 20nM HER2	28	29	30	31	32	33	50	51		52	53	
53	2.56	2.71	105.8	2.87	0.38	13.1	D	I	S	V	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	
85	2.13	2.00	94.0	2.67	0.35	13.1	D	I	V	R	Q	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T
9	3.21	3.14	98.0	3.30	0.43	13.1	D	I	Q	S	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
2	2.38	2.33	97.9	2.84	0.37	13.1	D	I	V	S	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
95	2.77	2.46	88.8	2.87	0.38	13.2	D	I	R	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T	T
48	2.77	2.70	97.5	2.86	0.39	13.6	D	I	K	S	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
75	2.18	2.16	98.7	2.14	0.30	14.0	D	I	M	S	G	S	V	W	A	S	F	H	Y	T	T	T
85	2.62	2.47	94.3	2.95	0.42	14.3	D	I	L	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T	T
40	2.36	2.31	97.8	2.69	0.40	15.0	D	I	L	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T	T
5	3.01	2.97	98.5	2.96	0.46	15.4	D	I	R	L	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
47	2.61	2.55	97.6	2.89	0.45	15.6	D	I	R	F	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
94	2.77	2.64	95.2	2.87	0.45	15.7	D	I	R	F	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
32	2.65	2.60	98.1	2.87	0.45	15.7	D	I	G	A	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
95	2.55	2.26	88.8	2.67	0.43	16.1	D	I	A	T	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
44	2.73	2.79	102.0	3.28	0.54	16.4	D	I	A	T	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
74	2.18	2.19	100.6	2.89	0.48	16.6	D	I	A	T	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
38	2.66	2.60	100.7	2.84	0.48	16.8	D	I	R	F	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
25	2.73	2.59	94.9	3.03	0.51	16.8	D	I	L	S	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
63	3.27	3.20	97.8	3.32	0.58	17.4	G	I	R	T	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
69	1.49	1.51	101.5	2.74	0.48	17.6	G	I	R	T	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
58	2.90	2.09	92.7	2.93	0.52	17.7	D	I	A	M	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
87	2.49	2.40	100.2	2.73	0.49	18.0	D	I	L	K	G	S	V	W	A	S	F	H	Y	T	T	T
40	2.52	2.30	91.2	2.86	0.52	18.2	D	I	K	L	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
87	3.33	3.19	95.7	3.33	0.61	18.3	D	I	A	G	G	S	V	W	A	S	F	H	Y	T	T	T
4	2.87	2.84	99.0	3.10	0.57	18.4	N	I	Y	S	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
88	3.06	2.94	95.9	3.05	0.57	18.6	D	I	R	M	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T
94	2.59	2.63	101.7	2.95	0.55	18.8	D	I	R	M	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T

【図10B-1】

FIG. 10B-1

クローン	緩和性スクリーニングアッセイ										L1				L2				L3				
	SSC+/− 50nM Veqf	SSC+/− 20nM HER2	SSC+/− 50nM Veqf	SSC+/− 20nM HER2	SSC+/− 50nM Veqf	SSC+/− 20nM HER2	SSC+/− 50nM Veqf	SSC+/− 20nM HER2	SSC+/− 50nM Veqf	SSC+/− 20nM HER2	28	29	30	32	33								
9	3.12	2.96	94.8	3.01	0.59	19.5	D	I	R	A	G	S	V	W	A	S	F	H	Y	T	T		
13	3.02	2.84	94.1	2.94	0.59	20.0	D	I	K	V	R	Q	G	S	V	W	A	S	F	H	Y	T	T
78	2.37	2.35	98.8	2.88	0.58	20.2	D	I	A	A	G	S	V	W	A	S	F	H	Y	T	T		
43	2.23	2.20	99.0	2.70	0.56	20.7	D	I	A	R	G	S	V	W	A	S	F	H	Y	T	T		
79	2.83	2.81	99.4	2.98	0.62	20.7	D	I	Q	T	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T		
36	2.95	2.92	99.0	3.02	0.63	21.0	D	I	Q	S	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T		
57	2.59	2.53	97.7	2.98	0.63	21.2	D	I	R	V	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T		
21	2.86	2.74	95.7	2.97	0.64	21.6	D	I	T	M	G	S	V	W	A	S	F	H	Y	T	T		
33	2.50	2.45	97.9	2.84	0.61	21.6	D	I	G	M	G	S	V	W	A	S	F	H	Y	T	T		
69	2.66	2.63	99.0	2.98	0.65	21.7	D	I	R	G	S	V	W	G	S	T	Y	H	Y	T	T		
54	2.49	2.41	96.7	2.18	0.51	23.4	D	I	K	S	G	S	V	W	G	S	T	H	Y	T	T		
82	2.59	2.44	94.4	2.87	0.67	23.4	N	I	A	M	G	S	V	W	G	S	Y	H	Y	T	T		
24	2.75	2.51	91.2	2.88	0.67	23.4	D	I	Q	R	G	S	V	W	G	S	C	H	Y	T	T		
82	2.87	2.74	95.5	2.84	0.69	24.4	D	I	R	S	G	S	V	W	G	S	Y	H	Y	T	T		
57	2.45	2.32	94.5	2.56	0.63	24.6	D	I	R	S	G	S	V	W	G	S	T	H	Y	T	T		
7	3.05	2.90	95.1	3.02	0.77	25.5	D	I	G	S	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T		
17	3.00	2.42	104.9	2.79	0.71	25.6	D	I	K	F	G	S	V	W	G	S	S	H	Y	T	T		
57	3.00	2.88	96.1	2.93	0.75	25.6	D	I	A	S	G	S	V	W	G	S	L	H	Y	T	T		
66	2.70	2.98	110.4	2.99	0.78	25.9	D	I	R	R	G	S	V	W	G	S	Y	H	Y	T	T		
92	2.91	2.93	100.7	2.98	0.78	26.1	D	I	R	I	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T		
25	2.66	2.57	96.6	2.85	0.75	26.3	D	I	A	G	S	V	W	G	S	F	F	H	Y	T	T		
31	2.13	1.98	92.9	2.90	0.82	28.5	D	I	A	S	G	S	V	W	G	S	S	H	Y	T	T		
26	2.84	2.97	104.6	3.07	0.90	29.4	D	I	A	X	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T		

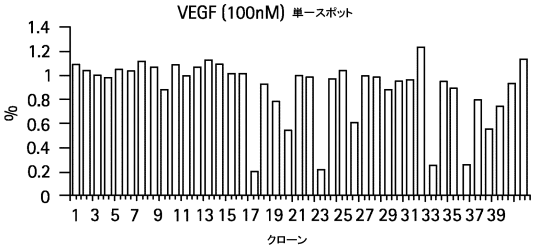
【図 1 1】

FIG. 11

ELISA 親和性スクリーニング		SSC +/- 50 x10 ³ 100nM VEGF		SSC +/- 20nM HER2		L1		L2		L3	
6	212	1.81	85.6	0.04	0.04	103.3	28	50	53	91	92
8	248	1.88	76.1	0.05	0.06	126.5	29	P	A	G	Y
12	223	1.81	81.3	0.04	0.04	97.9	30	I	G	S	W
18	288	2.56	88.8	0.04	0.04	96.7	31	W	G	W	A
20	246	2.21	90.9	0.05	0.04	91.5	32	P	S	T	G
43	1.96	1.76	89.5	0.04	0.04	96.1	33	L	S	Y	Y
5	2.47	0.41	16.6	0.04	0.04	99.7	R	T	S	H	Y
26	2.68	2.11	78.5	0.04	0.04	110.8	H	W	A	G	A
27	2.82	2.70	95.7	0.04	0.04	98.5	N	P	S	F	W
28	2.58	1.83	71.2	0.09	0.04	47.3	I	G	S	A	S
38	3.09	0.69	22.2	0.04	0.04	105.5	Y	L	S	G	W
45	3.08	2.72	88.2	0.05	0.04	93.6	Y	H	S	W	V
67	2.08	1.02	49.0	0.04	0.04	103.1	D	W	S	Y	T
75	2.90	2.47	85.1	0.07	0.07	102.3	I	A	S	I	W
86	3.25	2.57	79.0	0.06	0.07	104.6	P	G	S	Y	A
19	2.13	1.86	87.6	0.05			N	G	S	R	Y
37	1.36	0.26	18.8	0.05			W	L	S	L	W
41	1.36	0.72	53.3	0.05			N	P	S	S	Y
46	1.22	0.24	20.1	0.05			W	A	S	G	W
51	1.05	0.59	58.5	0.05			E	S	S	Y	W
67	1.05	0.90	85.8	0.05			N	P	S	F	I
70	1.84	0.43	23.3	0.05			S	G	S	Y	A
84	1.37	0.33	23.9	0.05			D	A	S	H	D
88	2.00	1.56	77.8	0.05			Y	H	S	Q	A
90	1.30	0.68	52.3	0.05			W	A	S	G	Y
92	1.39	1.02	72.3	0.05			N	W	S	S	Y

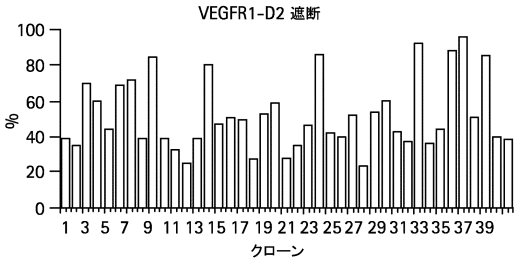
【図 1 2】

FIG. 12



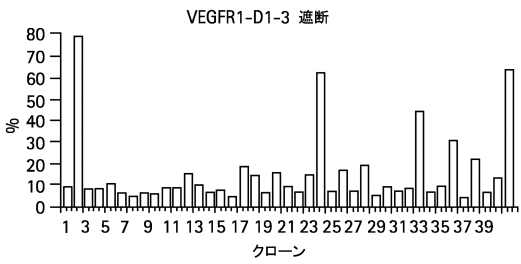
【図 1 3 A】

FIG. 13A



【図 1 3 B】

FIG. 13B



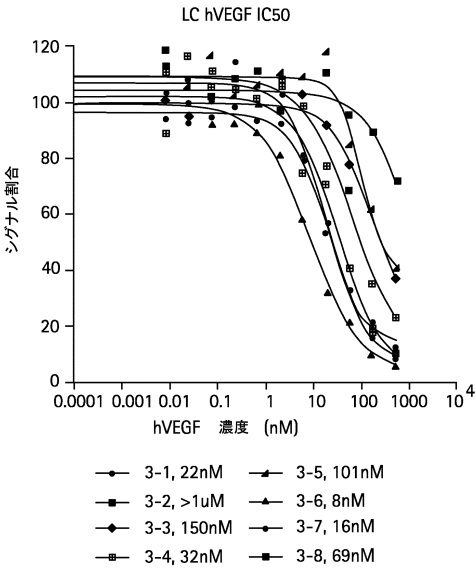
【図 1 4 A】

FIG. 14A

hVEGF 結合		L1		L2		L3		Phage IC50 (nM)	
28	29	30	30a	30b	30c	30d	31	32	33
4D5	D	V	S	T	A	V	S	A	S
3-1	N	V	W	D	W	V	P	A	S
3-2	I	R	M	G	S	V	W	G	S
3-3	Q	I	W	H	L	T	G	S	S
3-4	E	V	Y	S	Y	V	P	A	S
3-5	N	I	F	S	H	V	P	G	S
3-6	Y	V	W	Q	Y	V	H	A	S
3-7	Y	I	W	R	Y	V	W	G	S
3-8	N	V	W	S	H	V	G	S	S

【図 1 4 B】

FIG. 14B



【図 1 5】

FIG. 15
HER2にて直接プレート分類したhVEGF結合体

	L1										L2										L3										フアージ[C50(nM)]	
	28	29	30	30a	30b	30c	30d	31	32	33	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
4D5	D	V	S	S	S	S	S	T	A	V	S	A	S	F	H	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H1	D	I	P	R	S	I	S	G	Y	V	W	G	S	Y	H	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H3	D	I	G	L	L	L	L	G	S	V	W	A	S	Y	H	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H4	N	I	R	T	T	T	T	G	S	V	W	G	S	Y	H	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H5	D	I	R	M	M	M	M	G	S	V	W	G	S	F	H	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

【図 1 6】

FIG. 16

	L1										L2										L3										フアージ[C50(nM)]	
	28	29	30	30a	30b	30c	30d	31	32	33	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
4D5	D	V	S	S	S	S	S	T	A	V	S	A	S	F	H	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
3-1	N	V	W	W	W	W	W	D	W	V	P	A	S	S	G	W	Y	I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3-6	Y	V	W	W	W	W	W	Q	Y	V	H	A	S	S	G	Y	W	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3-7	Y	I	W	W	W	W	W	R	Y	V	W	G	S	S	G	L	W	Y	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
H1	D	I	P	R	S	I	S	G	Y	V	W	G	S	Y	H	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H3	D	I	G	L	L	L	L	G	S	V	W	A	S	Y	H	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H4_N	N	I	R	T	T	T	T	G	S	V	W	A	S	Y	H	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H4_D	D	I	R	S	S	S	S	G	S	V	W	G	S	Y	H	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
4-1	D	I	W	N	R	R	R	R	A	L	E	G	S	S	G	G	S	Y	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4-5	N	V	G	G	G	G	G	R	P	V	G	G	S	S	Y	G	S	F	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
4-6	S	V	S	S	S	S	S	S	A	V	S	A	S	S	Y	S	S	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D1	N	V	S	S	S	S	S	K	H	V	W	G	S	Y	S	Y	S	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
D2	N	I	R	N	G	G	G	G	L	S	A	S	F	H	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

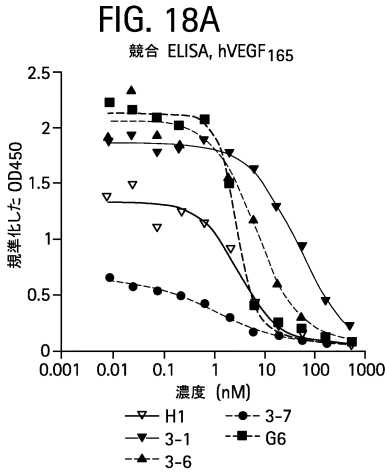
【図 1 7】

FIG. 17

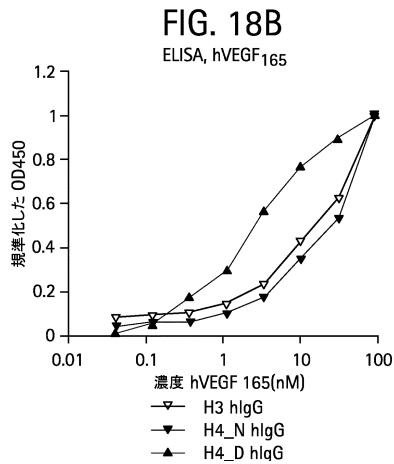
クローン	特性性	収率		凝集 (%)
		Fab/L. E. Coli 小規模	hlgG/L 293	
3_1	hVEGF	8.5 mg **	60 mg	3
H1	hVEGF/Her2	0.8 mg *	40 mg	4
H3	hVEGF/Her2	9.2 mg **	40 mg	4
H4_N	hVEGF/Her2	0.8 mg *	37 mg	4
H4_D	hVEGF/Her2	/	43 mg	4
4_1	DR5	15.2 mg **	10 mg	4
4_5	DR5	ND	6.7 mg	4
D1	DR5/Her2	ND	10 mg	4
D2	DR5/Her2	ND	6.7 mg	4

* 1L培養物に基づく
** 4L培養物に基づく
/ 未検
ND=溶解分画におけるFab未検

【図 1 8 A】

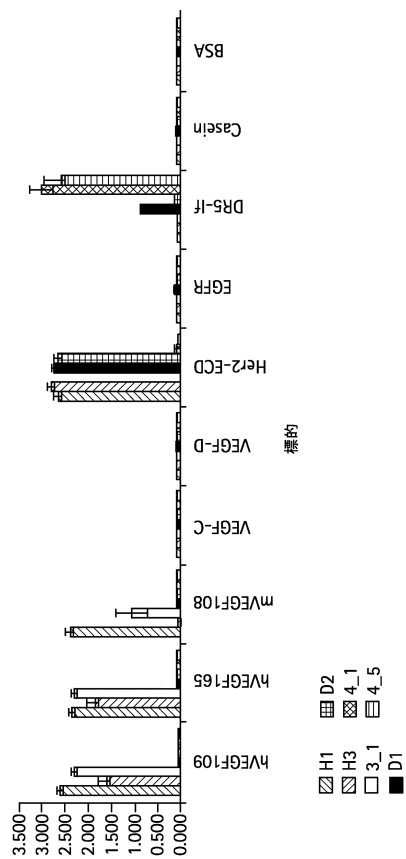


【図 18 B】

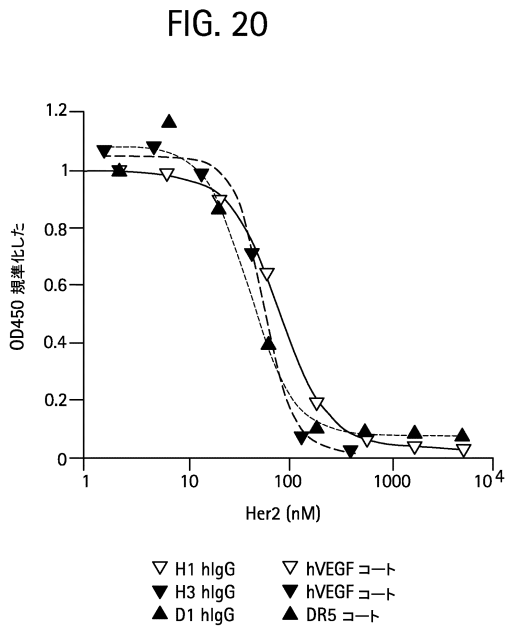


【図 19】

FIG. 19



【図 20】



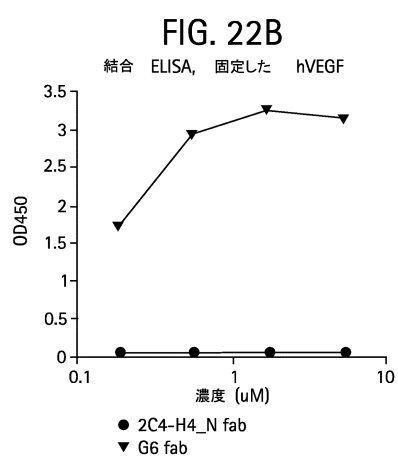
【図 21】

FIG. 21

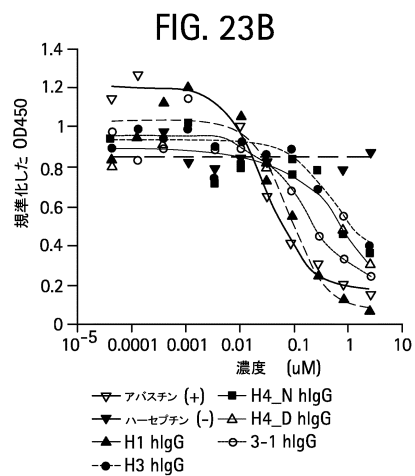
クローン	フォーマット	特異性	Her2-ECD	hVEGF ₁₀₉	mVEGF ₁₀₈
			k_{on} (1/Ms) k_{off} (1/s) K_D (nM)	k_{on} (1/Ms) k_{off} (1/s) K_D (nM)	k_{on} (1/Ms) k_{off} (1/s) K_D (nM)
3_1	Fab IgG	hVEGF	NB NB	1.4E+05 2.2E-03 15 8.0E+04 9.6E-04 12	3.5E+04 3.6E-03 105 3.6E+05 1.6E-02 44
3_6	Fab IgG	hVEGF	NB NB	4.5E+05 1.1E-03 3 2.0E+05 9.7E-04 5	8.3E+04 4.5E-03 54 1.8E+05 1.4E-02 78
3_7	Fab IgG	hVEGF	NB NB	8.0E+05 2.5E-03 3 5.8E+05 4.2E-03 7	7.2E+04 5.6E-03 78 5.0E+05 1.5E-02 30
H1	Fab IgG	hVEGF/Her2	59.1 170000 0.0017 9.8	2.7E+04 9.3E-03 350 3.4E+05 4.6E-03 140	/
H3	Fab IgG	hVEGF/Her2	8 1.0E+05 2.1E-03 20	1.5E+03 5.9E-03 3930	NB NB
H4_N	Fab IgG	hVEGF/Her2	140000 0.0013 9.87	* * * 550	NB
H4_D	Fab IgG	hVEGF/Her2	230000 0.0013 6	* * * **	NB
			1.0E+05 1.2E-03 11	* * *	NB

正確な動態分析が不可能であり、定常状態結合分析を用いる
** SS結合分析を行なったための濃度分析物による区別実験
NB= 結合は検出されない

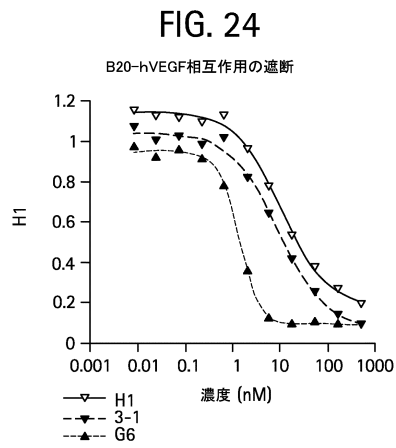
【図 2 2 B】



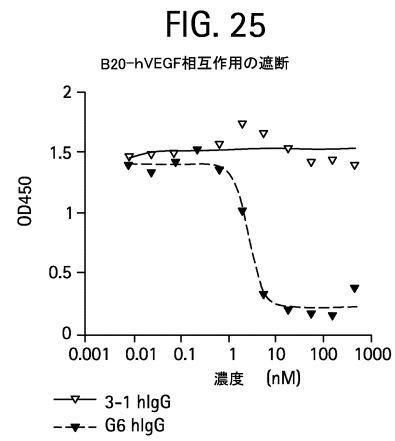
【図 2 3 B】



【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】

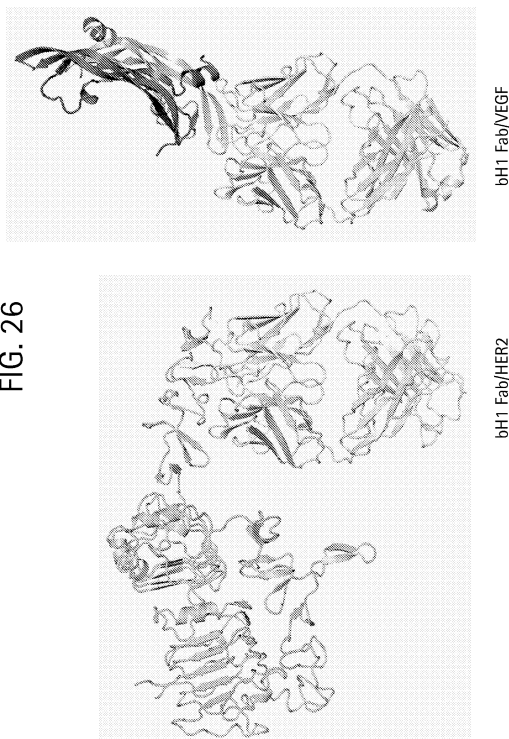
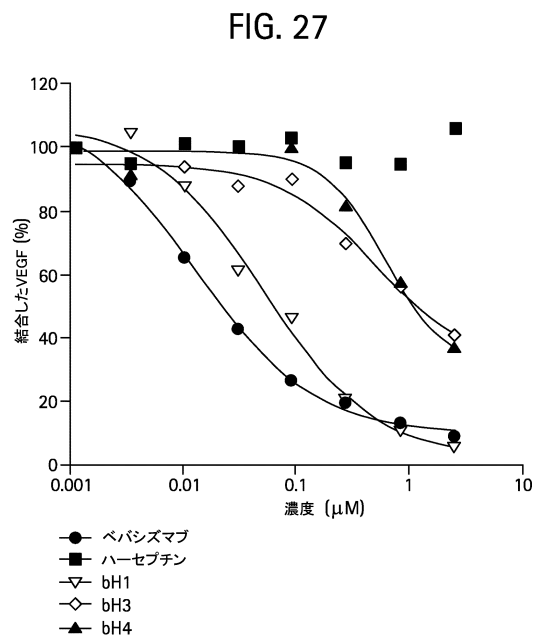
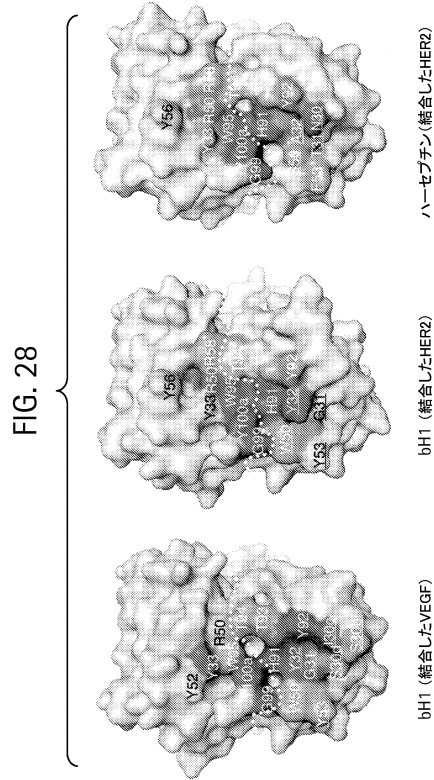


FIG. 26

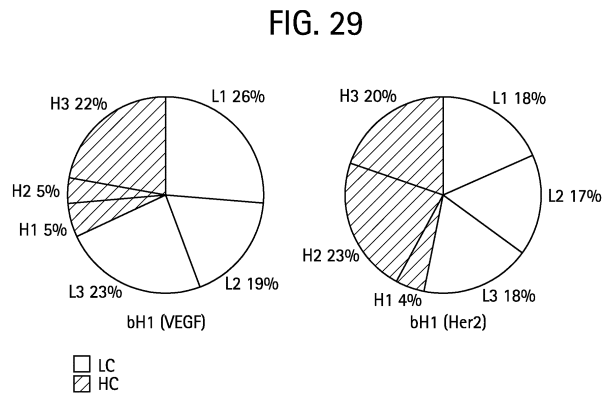
【図 2 7】



【図 28】

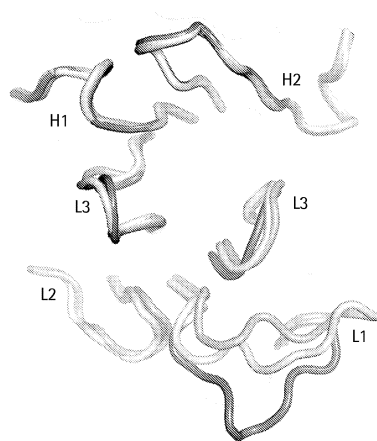


【図 29】



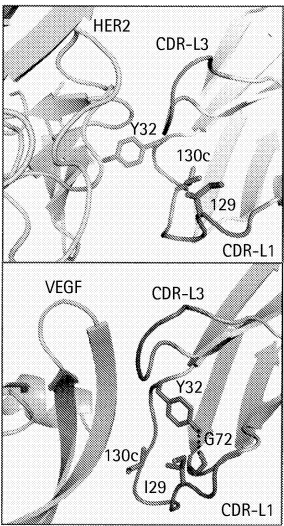
【図 30】

FIG. 30

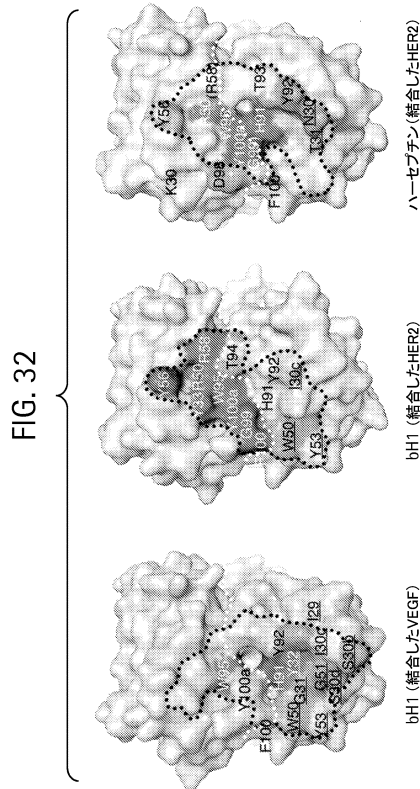


【図 31】

FIG. 31



【図 3 2】



【図 3 3】

FIG. 33

CDR	野生型	アミノ酸	CDR	野生型	アミノ酸	CDR	野生型	アミノ酸	CDR	野生型	アミノ酸
CDR-L1	D28	GMT	CDR-L1	Q27	SAA	CDR-L2	Y32	THY	CDR-L3	H91	HWI
CDR-L2	I29	RYT	CDR-L2	D28	RAM	CDR-L3	Y92	HWI	CDR-H1	D31	ARG
CDR-L3	P30	SCA	CDR-L3	I29	VIT	CDR-H1	T93	ASC	CDR-H2	R50	ARG
CDR-H1	R30a	SST	CDR-H1	P30	SCA	CDR-H2	T93	ASC	CDR-H3	Y56	SST
CDR-H2	S30b	RYT	CDR-H2	R30a	SST	CDR-H3	Y56	SST			
CDR-H3	S30c	KCC	CDR-H3	S30b	RYT						
	G31	GST		S30c	KCC						
	Y32	KMT		G31	GST						
	W50	KSG		Y32	KMT						
	G51	GST		W50	KSG						
	S52	KCC		G51	GST						
	H91	SMT		S52	KCC						
	T93	RCT		H91	SMT						
	R94	RCA		T93	RCT						
	D31	GMT		R94	RCA						
	T32	RCT		D31	GMT						
	Y33	KMT		T32	RCT						
	R50	SST		Y33	KMT						
	T53	RCT		R50	SST						
	N54	RVC		T53	RCT						
	Y56	SST		N54	RVC						
	W56	SST		Y56	SST						
	G96	GST		W56	SST						
	D98	GMT		G96	GST						
	G99	GST		D98	GMT						
	F100	KMT		G99	GST						
	Y100a	KMT		F100	KMT						

【図 3 4】

FIG. 34

ライブラリ構成

ライブラリ	CDRs	残基	ショットガン コドン	オリゴヌクレオチド	理論上の 多様性
LC-Ala	L1	D28, I29, P30, R30a, S30b, I30c, S30d, G31, Y32	アラニン	L1-ALA	3.3 e7
	L2	W50, G51, S52, Y53		L2-ALA	
	L3	H91, Y92, T93, T94		L3-ALA	
LC-Hom	L1	Q27, D28, I29, P30, R30a, S30b, I30c, S30d, G31, Y32	ホモログ	L1-HOM	1.4 e7
	L2	W50, G51, S52, Y53		L2-HOM	
	L3	H91, Y92, T93, T94		L3-HOM	
HC-Ala	H1	K30, D31, T32, Y33	アラニン	H1-ALA	1.3 e8
	H2	R50, Y52, T53, N54, Y56, R58		H2-ALA	
	H3	W95, G96, G97, D98, G99, F100, Y100a		H3-ALA	
HC-Hom	H1	K30, D31, T32, Y33	ホモログ	H1-HOM	1.3 e5
	H2	R50, Y52, T53, N54, Y56, R58		H2-HOM	
	H3	W95, G96, G97, D98, G99, F100, Y100a		H3-HOM	

【図 3 5】

FIG. 35

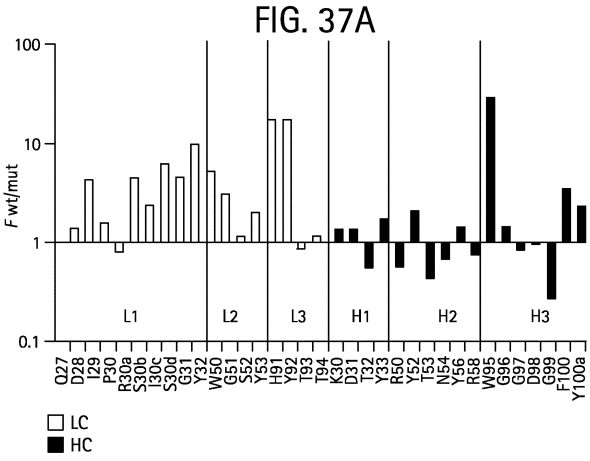
	抗原選別 (VEGF)				ディスプレイ選別 (抗eD)				Fwt/mt 値			
	wt/m1	wt/m2	wt/m3	wt/m4	wt/m1	wt/m2	wt/m3	wt/m4	Fwt/ m1	Fwt/ m2	Fwt/ m3	Fwt/ m4
CDR-L1	Q27			1.39				0.97				1.44
	D28	2.38		(6.0) ^E	1.73			(1.29) ^E	D28	1.38		(4.65) ^F
	I29	8.33	8.33	(0.94) ^B	1.95	3.00	0.98	(1.15) ^L	I29	4.27	2.78	1.35
	P30	1.83		4.27	1.18			1.33	P30	1.56		3.22
	R30a	1.91	3.50	2.63	0.90	2.38	0.91	0.94	R30a	0.80	3.84	2.79
	S30b	4.75		(0.85) ^F	1.06			(1.1) ^J	S30b	4.49		(0.89) ^I
	I30c	7.67	7.67	1.05	48.00	3.23	2.80	1.00	I30c	2.37	2.74	1.05
CDR-L2	S30d	8.80		(12.2) ^T	1.44			(1.3) ^T	S30d	6.09		(46.8) ^H
	G31	9.20		(38.5) ^A	2.00			(2.90) ^A	G31	4.60		(13.3) ^A
	Y32	14.00	42.00	(38.5) ^F	1.44	1.89	1.13	(0.82) ^F	Y32	9.72	22.17	12.44
	W50	22.0	14.7	46.0	78.0	4.20	1.20	1.68	W50	5.24	12.22	27.38
	G51	9.2		78.0	3.00			2.00	G51	3.07		39.00
	S52	1.8		7.8	1.60			1.61	S52	1.14		4.83
	Y53	5.3	32.0	5.3	0.1	2.67	2.00	1.08	Y53	2.00	16.00	4.93
CDR-L3	H91	46.0	46.0	23.0	(>79) ^N	2.67	2.09	2.09	H91	17.25	22.04	11.02
	Y92	41.0	8.2	41.0	1.2	2.36	1.74	0.72	Y92	17.39	4.72	57.15
	T93	0.9		1.1	1.02			1.50	T93	0.86		0.74
	R94	0.8		(0.58) ^S	0.65			(1.28) ^S	R94	1.16		(0.45) ^S
CDR-H1	K30	4.36	1.92	3.00	1.50	3.31	1.65	1.87	K30	1.32	1.16	1.60
	D31	2.19		0.63	1.63			0.93	D31	1.35		0.68
	T32	0.82		2.10	1.50			0.64	T32	0.55		3.27
	Y33	2.50	0.26	0.21	5.86	1.48	1.31	1.55	Y33	1.69	0.20	0.14
CDR-H2	R50	0.63	0.55	11.00	1.57	1.13	0.53	9.00	R50	0.56	1.04	1.22
	Y52	4.35	74.00	9.25	1.18	2.17	1.63	1.63	Y52	2.01	45.54	5.69
	T53	0.39		0.68	0.93			0.58	T53	0.42		1.19
	N54	0.65	0.20	0.61	0.68	0.97	1.07	1.88	N54	0.67	0.19	0.33
	Y56	5.33	6.40	4.92	0.83	3.85	3.13	1.92	Y56	1.39	2.05	2.56
	R58	0.83	0.55	24.00	1.19	1.12	0.76	2.42	R58	0.74	0.71	9.93
CDR-H3	W95	>102	>102	1.56	>96	3.63	1.12	0.69	W95	>28.1	>91.4	2.27
	G96	1.86		5.27	1.33			1.39	G96	1.39		3.80
	D98	1.38		4.88	1.69			1.23	D98	0.82		3.95
	G99	0.96		1.64	1.00			0.94	G99	0.96		1.74
	F100	0.30		0.52	1.17			1.89	F100	0.26		0.28
	Y100a	11.50	23.00	0.96	8.60	3.38	2.20	1.63	Y100a	3.40	10.45	0.59
		4.75	57.00	1.90	0.27	2.11	2.35	1.43		2.26	24.23	1.33

【図 3 6】

FIG. 36

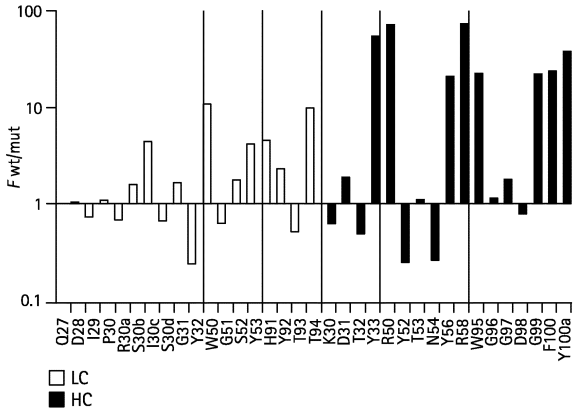
	抗原選別 (Her2)				ディスプレイ選別 (抗aD)				Fwt/mut 値			
	wt/m1	wt/m2	wt/m3	wt/m4	wt/m1	wt/m2	wt/m3	wt/m4	Fwt/ m1	Fwt/ m2	Fwt/ m3	Fwt/ m4
CDR-L1	Q27			2.85				0.97	Q27			2.94
	D28	1.82		(2.0) ^E	1.73			(1.29) ^E	D28	1.05		(1.55) ^E
	I29	1.47	2.00	(1.13) ^L	1.95	3.00	0.98	(1.15) ^L	I29	0.76	0.67	(0.98) ^L
	P30	1.31		1.22	1.18			1.33	P30	1.11		0.92
	R30a	1.67	1.75	1.67	2.31	2.38	0.91	0.94	R30a	0.70	1.92	1.77
	S30b	1.74		(4.25) ^J	1.06			(1.1) ^J	S30b	1.64		(3.86) ^J
	I30c	14.75	11.80	2.03	(1.41) ^L	3.23	2.80	1.00	I30c	4.57	4.21	2.03
	S30d	1.00		(1.0) ^J	1.44			(1.3) ^J	S30d	0.69		(0.768) ^J
	G31	3.36		(4.17) ^A	2.00			(2.9) ^A	G31	1.68		(1.43) ^A
	Y32	0.36	12.00	0.24	(1.8) ^F	1.44	1.89	1.13	Y32	0.25	6.33	0.21
CDR-L2	W50	45.50	22.75	>98	16.00	4.20	1.20	1.68	W50	10.83	18.96	>58.3
	G51			2.57	3.00			2.00	G51	0.65		1.29
	S52	2.88		4.67	1.60			1.61	S52	1.79		2.90
	Y53	11.29	39.50	8.78	0.65	2.67	2.00	1.08	Y53	4.23	19.75	8.12
CDR-L3	H91	12.43	0.98	>98	(3.0) ^N	2.67	2.09	2.09	H91	4.66	0.47	>47.0
	Y92	5.50	38.50	81.00	1.83	2.36	1.74	0.72	Y92	2.33	22.17	112.91
	T93	0.54		31.00	1.02			1.50	T93	0.53		20.67
	T94	6.46		(4.3) ^S	0.65			(1.28) ^S	T94	9.99		(3.36) ^S
CDR-H1	K30	2.13	1.68	2.13	1.13	3.31	1.65	1.87	K30	0.64	1.02	1.14
	D31	3.05			0.66	1.63		0.93	D31	1.88		0.71
	T32	0.76			0.75	1.50		0.64	T32	0.51		1.16
	Y33	>81	>81	>81	47.00	1.48	1.31	1.55	Y33	>54.8	>61.9	>52.4
CDR-H2	R50	>81	>81	>81	95.00	1.13	0.53	9.00	R50	>72	>153	>8.0
	Y52	0.55	2.67	0.53	0.60	2.17	1.63	1.63	Y52	0.25	1.64	0.33
	T53	1.03			0.70	0.93		0.58	T53	1.11		1.22
	N54	0.26	0.50	0.45	1.04	0.97	1.07	1.88	N54	0.27	0.47	0.24
	Y56	>81	>81	>81	1.21	3.85	3.13	1.92	Y56	>21.1	>25.9	>42.1
	R58	>81	80.00	>81	>96	1.12	0.76	2.42	R58	>72.6	104.83	>33.5
CDR-H3	W95	>81	>81	>81	>96	3.63	1.12	0.69	W95	>22.3	>72.6	>117
	G96	1.53			0.61	1.33		1.39	G96	1.15		0.44
	G97	3.05			3.75	1.69		1.23	G97	1.80		3.04
	D98	0.80			0.40	1.00		0.94	D98	0.80		0.42
	G99	26.00			18.00	1.17		1.89	G99	22.29		9.53
	F100	>81	>81	39.50	95.00	3.38	2.20	1.63	F100	>23.9	>36.8	24.24
	Y100a	80.00	>81	>81	6.31	2.11	2.35	1.43	Y100a	38.00	>34.4	>56.7

【図 3 7 A】



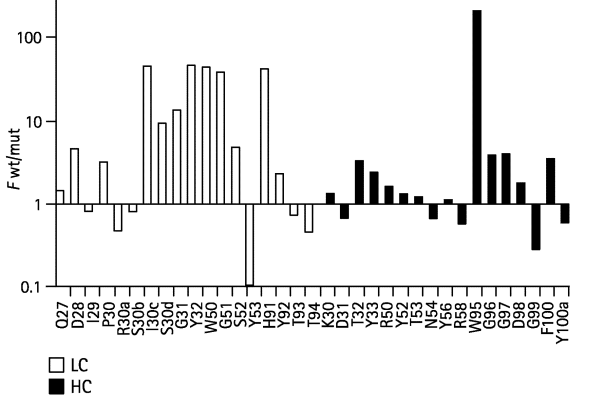
【図 3 7 B】

FIG. 37B

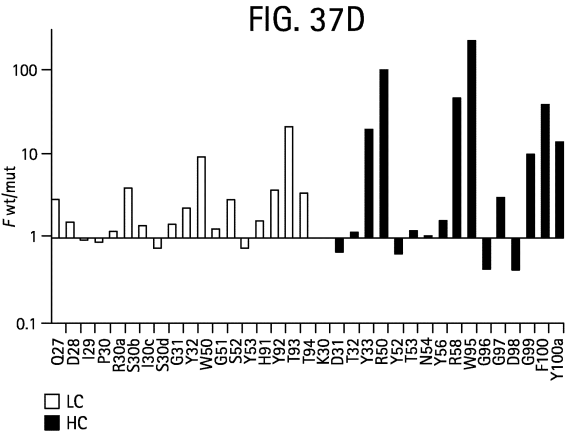


【図 3 7 C】

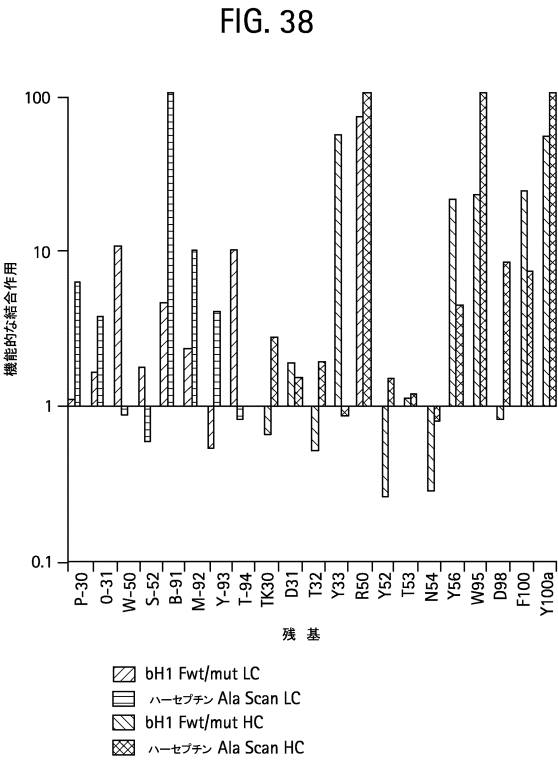
FIG. 37C



【図 3 7 D】



【図 3 8】



【図 3 9 A - 1】

FIG. 39A-1

抗原選別 (VEGF)				ディスプレイ選別 (抗pD)				F _{wt/mut} 値				ΔΔG _{wt/mut} (kcal/mol)			
wt/m1	wt/m2	wt/m3	wt/m4	wt/m1	wt/m2	wt/m3	wt/m4	F _{wt/m1}	F _{wt/m2}	F _{wt/m3}	F _{wt/m4}	ΔΔG _{wt/m1}	ΔΔG _{wt/m2}	ΔΔG _{wt/m3}	ΔΔG _{wt/m4}
Q27			1.4			1.0					1.4 ^E		0.2 ^E		
D28	1.8		3.5	1.7	1.3			1.1 ^A			2.7 ^E	0 ^A		0.6 ^E	
I29	12.8	17.0	1.9	1.4	2.0	3.0	1.0	6.5 ^A	5.7 ^T	1.9 ^V	1.2 ^L	1.1 ^A	1.0 ^T	0.4 ^V	0.1 ^L
P30	1.7		3.8	1.2	1.3			1.5 ^A			2.9 ^A	0.2 ^A		0.6 ^A	
R30a	1.9	4.1	1.9	0.8	2.4	0.9	0.9	0.8 ^A	4.5 ^G	2.1 ^P	0.4 ^K	-0.2 ^A	0.9 ^G	0.4 ^P	-0.5 ^K
S30b**	5.5		0.7	1.1		1.1		5.2 ^A			0.6 ^T	1.0 ^A		-0.3 ^T	
S30c***	12.7	7.6	1.0	23.8	3.2	2.8	1.0	3.9 ^A	2.7 ^T	1.0 ^V	23.2 ^L	0.8 ^A	0.6 ^T	0 ^V	1.9 ^L
S30d**	13.2		16.9	1.4	1.3			9.1 ^A			13.0 ^T	1.3 ^A		1.5 ^T	
G31***	16.0		35.5	2.0		2.9		8.0 ^A			12.2 ^A	1.2 ^A		1.5 ^A	
Y32***	26.0	78.0	16.0	23.0	1.4	1.9	1.1	0.8	18.1 ^A	41.2 ^D	23.1 ^S	>28 ^F	1.7 ^A	2.2 ^D	>2.0 ^F
W50**	39.0	26.0		20.4	4.2	1.2	1.7	1.8	9.3 ^A	21.7 ^G	23.2 ^S	11.6 ^L	1.3 ^A	1.9 ^S	1.5 ^L
G51	16.0		20.4	3.0		2.0		5.3 ^A			10.2 ^A	1.0 ^A		1.4 ^A	
S52	2.0		6.5	1.6		1.6		1.3 ^A			4.0 ^A	0.1 ^A		0.8 ^A	
Y53**	9.0	63.0	4.5	0.1	2.7	2.0	1.1	0.8	3.4 ^A	31.5 ^D	4.2 ^S	0.1 ^F	2.0 ^D	0.8 ^S	-1.4 ^F

【図 3 9 A - 2】

FIG. 39A-2

抗原選別 (VEGF)				ディスプレイ選別 (抗pD)				F _{wt/mut} 値				ΔΔG _{wt/mut} (kcal/mol)				
wt/m1	wt/m2	wt/m3	wt/m4	wt/m1	wt/m2	wt/m3	wt/m4	F _{wt/m1}	F _{wt/m2}	F _{wt/m3}	F _{wt/m4}	ΔΔG _{wt/m1}	ΔΔG _{wt/m2}	ΔΔG _{wt/m3}	ΔΔG _{wt/m4}	
H91 ^{***}	80.0	40.0	>150	2.7	2.1	2.1	1.9	30 ^A	19.2 ^D	19.2 ^P	>80 ^N	2.0 ^A	1.7 ^D	1.7 ^P	>2.6 ^N	
Y92 ^{***}	25.0	12.5	75.0	1.0	2.4	1.7	0.5	10.6 ^A	7.2 ^D	104.5 ^S	2.0 ^F	1.4 ^A	1.2 ^D	2.8 ^S	0.4 ^F	
G93 ^{**}	0.7	0.9	0.9	1.0	1.0	1.5	0.7	0.7 ^A	0.6 ^S	0.6 ^S	0.6 ^S	-0.3 ^A	-0.3 ^A	-0.3 ^S	-0.3 ^S	
T94 ^{**}	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	1.3	1.1	1.1 ^A	0.4 ^S	0.4 ^S	0.4 ^S	0 ^A	0 ^A	-0.5 ^S	-0.5 ^S	
K30	4.4	1.9	3.0	1.5	3.3	1.7	1.9	1.1 ^A	1.3 ^A	1.2 ^E	1.6 ^T	1.3 ^R	0.2 ^A	0.1 ^E	0.3 ^T	
E031	2.2	0.6	0.6	1.6	1.6	0.9	0.9	1.3 ^A	0.7 ^E	0.7 ^E	0.7 ^E	0.2 ^A	-0.2 ^E	-0.2 ^E	-0.2 ^E	
T32	0.8	2.1	1.5	1.5	1.5	0.6	0.6	0.5 ^A	3.3 ^S	0.4 ^A	3.3 ^S	-0.4 ^A	-0.4 ^A	0.7 ^S	0.7 ^S	
Y33 ^{***}	2.5	0.3	0.2	5.9	1.5	1.3	1.5	2.5	1.7 ^A	0.2 ^D	0.1 ^S	2.4 ^F	0.3 ^A	-1.0 ^D	-1.2 ^S	0.5 ^F

【図 39A - 3】

FIG. 39A-3

抗原選別 (VEGF)				ディスプレイ選別 (抗αD)				F _{wt} /mut 値				ΔΔG _{wt} /mut (kcal/mol)			
wt/m1		wt/m2		wt/m3		wt/m4		F _{wt} /m1		F _{wt} /m2		F _{wt} /m3		F _{wt} /m4	
wt/m1		wt/m2		wt/m3		wt/m4		wt/m1		wt/m2		wt/m3		wt/m4	
R50*	0.6	0.6	11.0	1.6	1.1	0.5	9.0	1.0	0.6 ^A	1.0 ^G	1.2 ^P	1.6 ^K	0.3 ^A	0 ^G	0.1 ^P
Y52*	4.4	74.0	9.3	1.2	2.2	1.6	1.6	0.9	2.0 ^A	45.5 ^D	5.7 ^S	1.3 ^F	0.4 ^A	2.3 ^D	1.0 ^S
ΔH T53	0.4			0.7	0.9			0.6	0.4 ^A			1.2 ^S	-0.5 ^A		0.1 ^S
ΔH N54	0.6	0.2	0.6	0.7	1.0	1.1	1.9	1.0	0.7 ^A	0.2 ^D	0.3 ^J	0.7 ^D	-0.2 ^A	-1.0 ^D	-0.2 ^D
ΔH Y56	5.3	6.4	4.9	0.8	3.8	3.1	1.9	0.8	1.4 ^A	2.0 ^D	2.6 ^S	1.1 ^F	0.4 ^A	0.2 ^A	0.6 ^S
R58	0.8	0.5	24.0	1.2	1.1	0.8	2.4	2.1	0.7 ^A	0.7 ^G	9.9 ^P	0.6 ^K	-0.2 ^A	-0.2 ^G	1.4 ^P
W95**	>102	>102	1.6	>96	3.6	1.1	0.7	0.5	>28 ^A	>91 ^G	2.3 ^S	>209 ^L	>2.0 ^A	>2.7 ^G	0.5 ^S
G96	1.9			5.3	1.3			1.4	1.4 ^A			3.8 ^A	0.2 ^A		0.8 ^A
G97	1.4			4.9	1.7			1.2	0.8 ^A			4.0 ^A	-0.1 ^A		0.8 ^A
ΔH D98	1.0			1.6	1.0			0.9	1.0 ^A			1.7 ^E	0 ^A		0.3 ^E
G99***	0.3			0.5	1.2			1.9	0.3 ^A			0.3 ^A	-0.8 ^A		-0.8 ^A
F100	11.5	23.0	1.0	8.6	3.4	2.2	1.6	2.5	3.4 ^A	10.5 ^S	0.6 ^V	3.4 ^Y	0.7 ^A	1.4 ^S	-0.3 ^V
Y100a***	4.8	57.0	1.9	0.3	2.1	2.4	1.4	0.5	2.3 ^A	24.2 ^D	1.3 ^S	0.6 ^F	0.5 ^A	1.9 ^D	0.2 ^S

【図 39B - 2】

FIG. 39B-2

抗原選別 (Her2)				ディスプレイ選別 (抗αD)				F _{wt} /mut 値				ΔΔG _{wt} /mut (kcal/mol)			
wt/m1		wt/m2		wt/m3		wt/m4		F _{wt} /m1		F _{wt} /m2		F _{wt} /m3		F _{wt} /m4	
wt/m1		wt/m2		wt/m3		wt/m4		wt/m1		wt/m2		wt/m3		wt/m4	
H91***	12.4	1.0	>98	2.8	2.7	2.1	1.9	1.1	0.6 ^A	1.0 ^E	1.1 ^T	1.0 ^R	-0.3 ^A	0 ^E	0.1 ^T
ΔH Y92**	5.5	38.5	81.0	1.8	2.4	1.7	0.7	0.5	2.3 ^A	22.2 ^D	112.9 ^S	3.5 ^F	0.5 ^A	1.8 ^D	2.8 ^S
ΔH T93	0.5			0.7	1.0			1.5	0.5 ^A			0.5 ^S	-0.4 ^A		-0.4 ^S
ΔH T94**	6.5			1.4	0.6			1.3	10 ^A			1.1 ^S	1.4 ^A		0.1 ^S
K30	2.1	1.7	2.1	1.1	3.3	1.7	1.9	1.1	0.6 ^A	1.0 ^E	1.1 ^T	1.0 ^R	-0.3 ^A	0 ^E	0.1 ^T
D31	3.1			0.7	1.6			0.9	1.9 ^A			0.7 ^E	0.4 ^A		-0.2 ^E
T32	0.8			0.7	1.5			0.6	0.5 ^A			1.2 ^S	-0.4 ^A		0.1 ^S
ΔH Y33*	>81	>81	>81	47.0	1.5	1.3	1.5	2.5	>55 ^A	>62 ^D	>52 ^S	19.1 ^F	>2.4 ^A	>2.4 ^D	>2.3 ^S

【図 39B - 1】

FIG. 39B-1

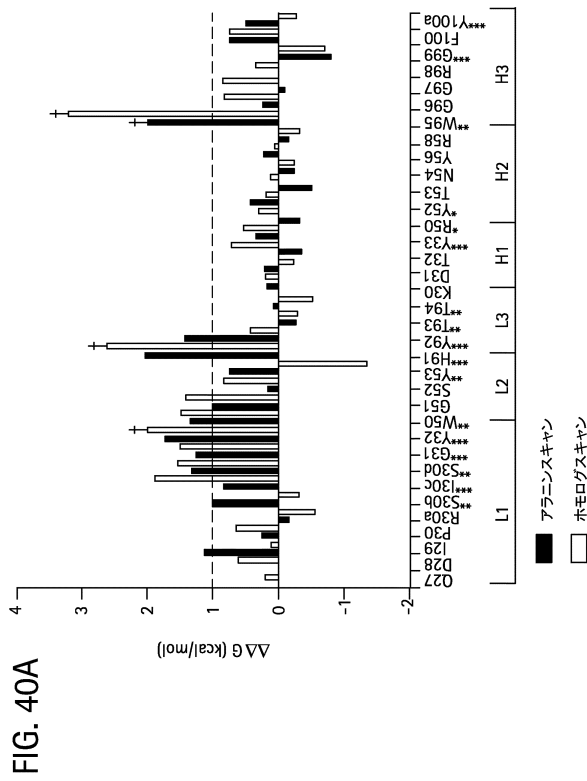
抗原選別 (Her2)				ディスプレイ選別 (抗αD)				F _{wt} /mut 値				ΔΔG _{wt} /mut (kcal/mol)			
wt/m1		wt/m2		wt/m3		wt/m4		F _{wt} /m1		F _{wt} /m2		F _{wt} /m3		F _{wt} /m4	
wt/m1		wt/m2		wt/m3		wt/m4		wt/m1		wt/m2		wt/m3		wt/m4	
Q27															
D28	1.8							1.0							
I29	1.5	2.0	0.8	1.3	2.0	3.0	1.0	1.2	0.8 ^A	0.7 ^T	0.8 ^V	1.1 ^L	-0.2 ^A	-0.2 ^T	0.2 ^E
P30	1.3							1.3	1.1 ^A			0.6 ^A	0.1 ^A		0.1 ^L
ΔH R30a	1.7	1.8	1.7	1.4	2.4	0.9	0.9	1.9	0.7 ^A	1.9 ^G	1.8 ^P	0.7 ^K	-0.2 ^A	0.4 ^G	-0.3 ^A
ΔH D30	1.7							1.1	1.6 ^A			1.6 ^T	0.3 ^A		0.3 ^T
I30c	14.8	11.8	2.0	1.3	3.2	2.8	1.0	1.0	4.6 ^A	4.2 ^T	2.0 ^V	1.2 ^L	0.9 ^A	0.9 ^T	0.1 ^L
S30d	1.0							1.3	0.7 ^A			1.7 ^T	-0.2 ^A		0.3 ^T
G31*	3.4							2.9	1.7 ^A			1.8 ^A	0.3 ^A		0.3 ^A
Y32***	0.4	12.0	0.2	1.8	1.4	1.9	1.1	0.8	0.3 ^A	6.3 ^D	0.2 ^S	2.1 ^F	-0.8 ^A	1.1 ^D	-1.0 ^S
W50**	45.5	22.8	>98	17.0	4.2	1.2	1.7	1.8	10.8 ^A	19 ^G	>58 ^S	9.6 ^L	1.4 ^A	1.7 ^G	>2.4 ^S
ΔH G51	1.9			1.7	3.0			2.0	0.6 ^A			0.9 ^A	-0.3 ^A		-0.1 ^A
ΔH S52	2.9			3.0	1.6			1.6	1.8 ^A			1.9 ^A	0.3 ^A		0.4 ^A
ΔH Y53*	11.3	39.5	8.8	0.6	2.7	2.0	1.1	0.8	4.2 ^A	19.8 ^D	8.1 ^S	0.8 ^F	0.9 ^A	1.8 ^D	1.2 ^S

【図 39B - 3】

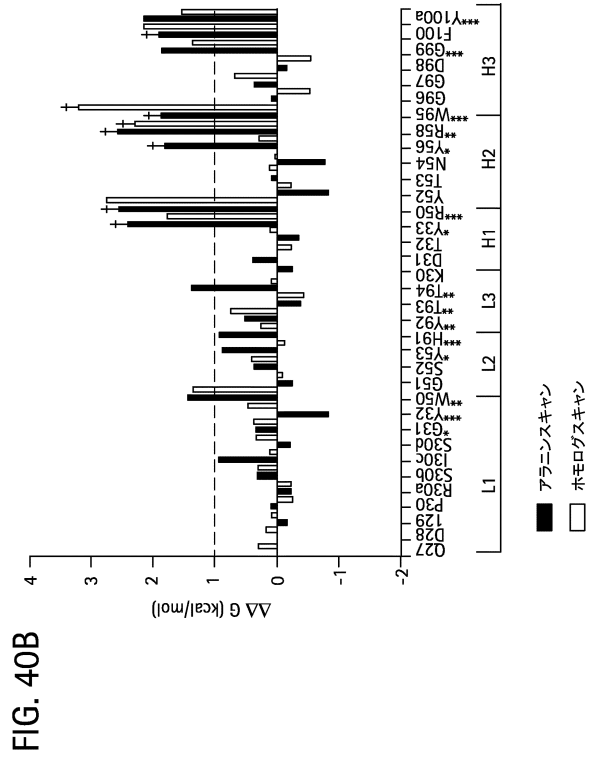
FIG. 39B-3

抗原選別 (HER2)				ディスプレイ選別 (抗αD)				F _{wt} /mut 値				ΔΔG _{wt} /mut (kcal/mol)			
wt/m1		wt/m2		wt/m3		wt/m4		F _{wt} /m1		F _{wt} /m2		F _{wt} /m3		F _{wt} /m4	
wt/m1		wt/m2		wt/m3		wt/m4		wt/m1		wt/m2		wt/m3		wt/m4	
R50***	>81	>81	>81	95.0	1.1	0.5	9.0	1.0	>72 ^A	>153 ^G	>9 ^P	98.6 ^K	>3.0 ^G	>1.3 ^P	2.7 ^K
Y52	0.6	2.7	0.5	0.6	2.2	1.6	1.6	0.9	0.3 ^A	1.6 ^D	0.3 ^S	0.7 ^F	-0.8 ^A	0.3 ^D	-0.2 ^F
ΔH T53	1.0			0.7	0.9			0.6	1.1 ^A			1.5 ^S	0.1 ^A		0.1 ^S
ΔH N54	0.3	0.5	0.5	1.0	1.0	1.1	1.9	1.0	0.3 ^A	0.5 ^D	0.2 ^T	1.0 ^D	-0.8 ^A	-0.5 ^D	0 ^D
Y56*	>81	>81	1.2	3.8	3.1	1.9	0.8	>21 ^A	>26 ^D	>42 ^S	1.6 ^F	>1.9 ^D	>1.8 ^A	>1.9 ^D	>2.2 ^S
R58**	>81	80.0	>81	>96	1.1	0.8	2.4	2.1	>73 ^A	104.8 ^G	>33 ^P	>46 ^K	>2.5 ^A	2.8 ^G	>2.1 ^P
W95***	>81	>81	>81	>96	3.6	1.1	0.7	0.5	>22 ^A	>73 ^G	>117 ^S	>209 ^L	>1.8 ^A	>2.5 ^G	>3.2 ^L
G96	1.5			0.6	1.3			1.4	1.1 ^A			0.4 ^A	0.1 ^A		-0.5 ^A
G97	3.1			3.8	1.7			1.2	1.8 ^A			3.0 ^A	0.3 ^A		0.7 ^A
D98	0.8			0.4	1.0			0.9	0.8 ^A			0.4 ^E	-0.1 ^A		-0.5 ^E
G99***	26.0			18.0	1.2			1.9	22.3 ^A			9.5 ^A	1.8 ^A		1.3 ^A
F100	>81	>81	39.5	95.0	3.4	2.2	1.6	2.5	>24 ^A	>37 ^S	24.2 ^V	38.0 ^Y	>1.9 ^A	>2.1 ^S	1.9 ^V
Y100a***	80.0	>81	>81	6.3	2.1	2.4	1.4	0.5	38 ^A	>34 ^D	>56.7 ^S	13.8 ^F	2.2 ^A	>2.1 ^D	>2.4 ^S

【図 40A】



【図 40B】

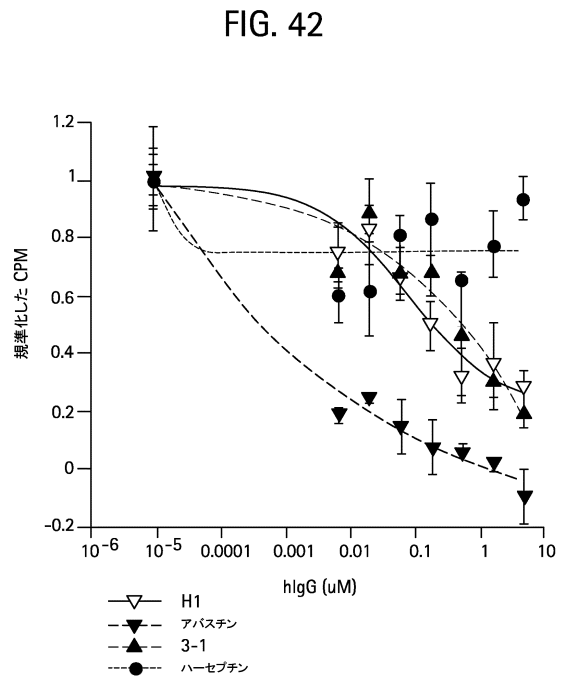


【図 41】

FIG. 41

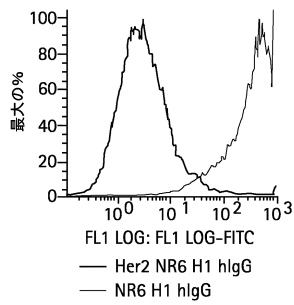
クローン	IC50 (nM)	IC50 (nM)	変異の数	CDR-L1	CDR-2	CDR-3
INEP109	HER2-EC0			24 25 26 27 28 29 30 30a 30b 30c 30d 31 32	52 52a 53 54	91 92 93 94 95 96 97
H1	35.74	4.0	2.1	C R A S Q D I P R S I S G Y V A	W G S Y	H Y T T P P T
	35.28	7.0	0.6	C R A I Q D I P K T I T G Y V A	W G S	F H F N S P P K
	35.56	9.0	1.7	C R A I Q N I A K T I T G Y V A	W G S	F H F N S P P K
	35.2	10.0	3.5	C R A I Q D L P K T V S G Y V A	W G S	F H Y T I P P K
	35.25	11.0	0.4	C R A I Q K V P R T I T G Y V A	W G S	F H Y T S P P T
	20.49	12.0	2.6	C R A S V D L P K S V S G Y V A	W G S	F H F T S P P T
	35.45	12.0	1.1	C R A S E D I P K T V S G Y V A	W G S	F H F S S P P T
	20.52	15.0	3.1	C R A I E W L P K T I S G Y V A	W G S	F H F S S P P T
	20.74	17.0	0.4	C R A S Q K I A R I I S G Y V A	W G S	F H Y S S P P T
	20.80	17.0	2.2	C R A S E D I P K S I S G Y V A	W G S	F H F S S P P T
	35.21	18.0	1.4	C R A S Q D L P K S I S G Y V A	W G S	F H F S S P P T
	35.61	19.0	7.1	C R A I E N L P K S I T G Y V A	W G S	F H Y S T P P K
	35.95	19.0	4.3	C R A I E N L P K S V S G Y V A	W G S	F H Y T S P P T
	20.93	20.0	3.8	C R A V E D S P K T I T G Y V A	W G S	F H F T I P P K
	20.57	22.0	試験せず	C R A S Q E T A K T I S G Y V A	W G S	F H F S S P P T
	35.87	34.0	2.2	C R A S O N I P K S V S G Y V A	W G S	F H F N S P P T
	20.38	52.0	試験せず	C R A S E D L P K S V S G Y V A	W G S	F H Y S S P P T
	20.38	200.0	試験せず	C R A S E N I P R T V S G Y V A	W G S	F H E T S P P T

【図 42】



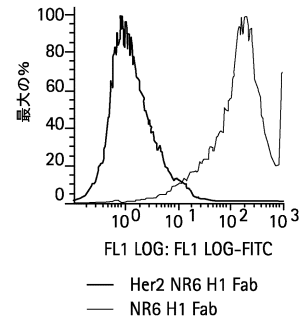
【図 4 3 A】

FIG. 43A



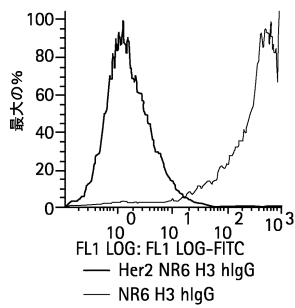
【図 4 3 C】

FIG. 43C



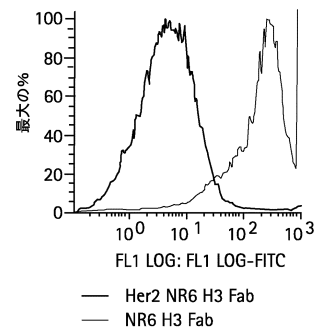
【図 4 3 B】

FIG. 43B



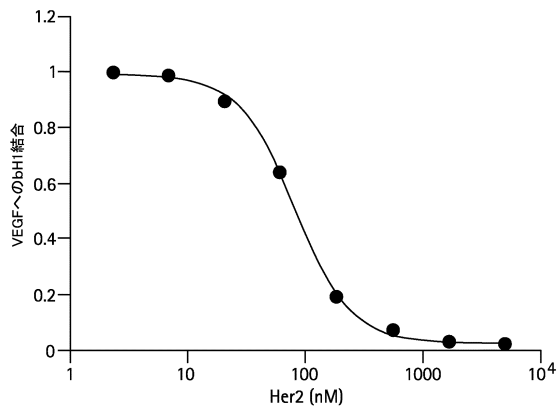
【図 4 3 D】

FIG. 43D



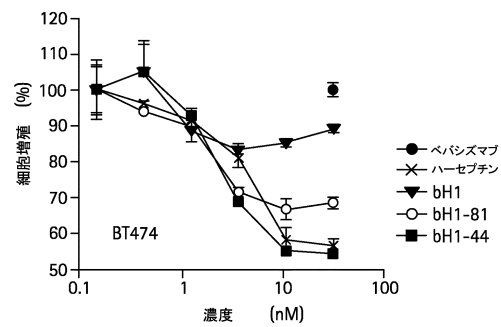
【図 4 4】

FIG. 44



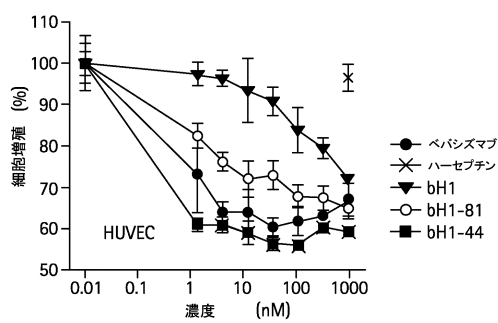
【図 4 5 B】

FIG. 45B

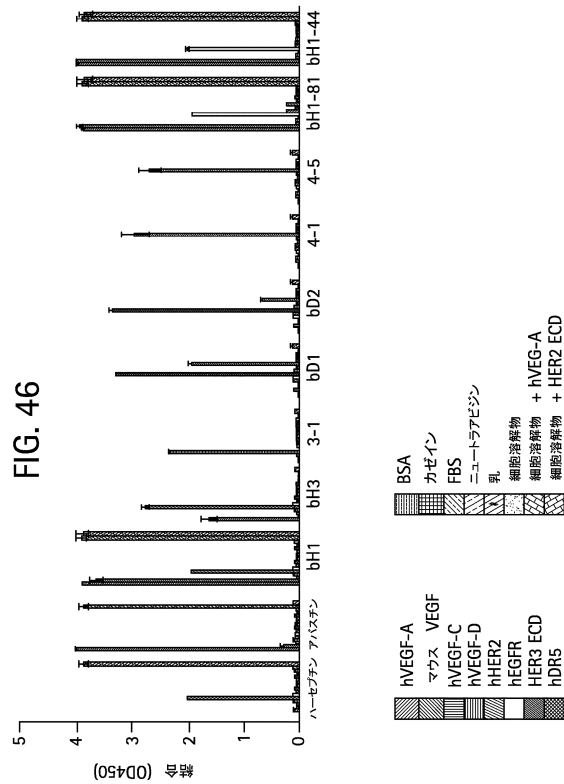


【図 4 5 A】

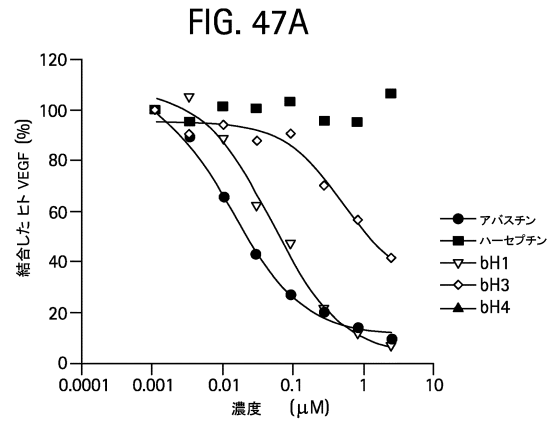
FIG. 45A



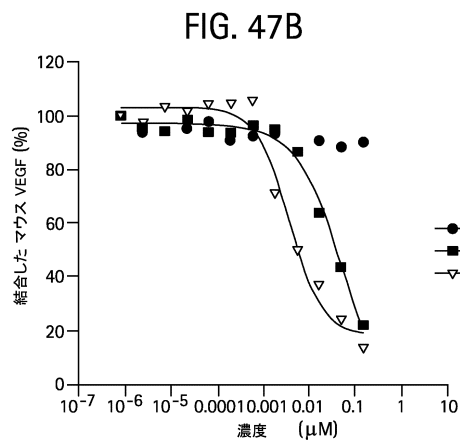
【図 4 6】



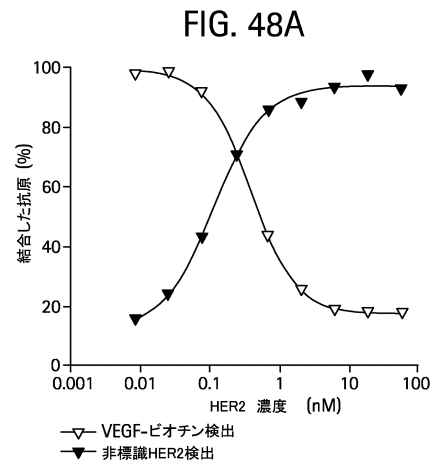
【図 4 7 A】



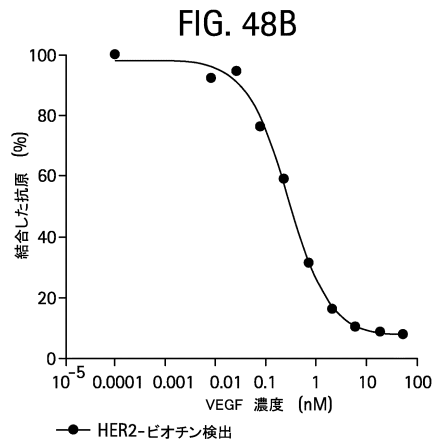
【図 4 7 B】



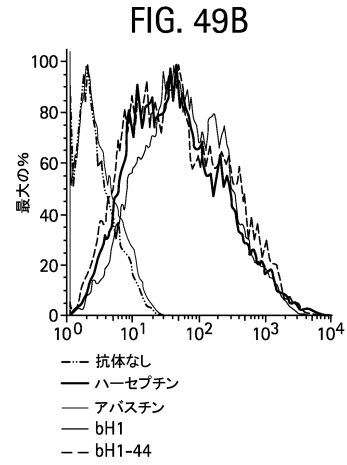
【図 4 8 A】



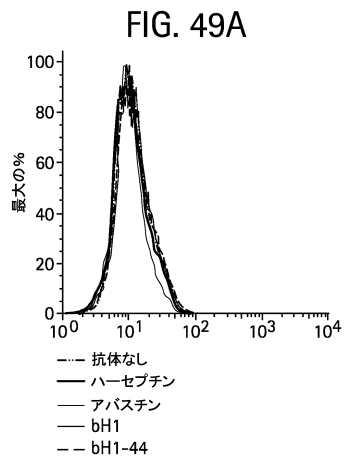
【図 48B】



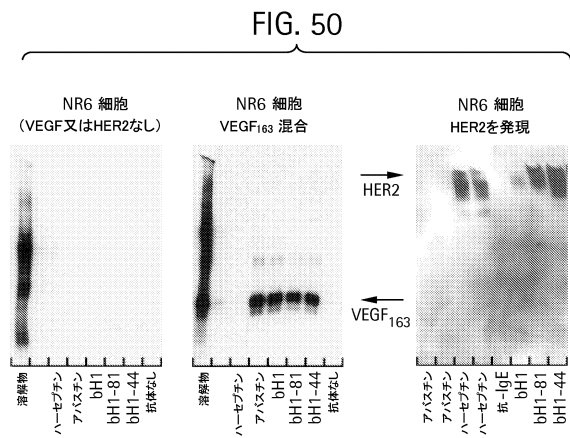
【図 49】



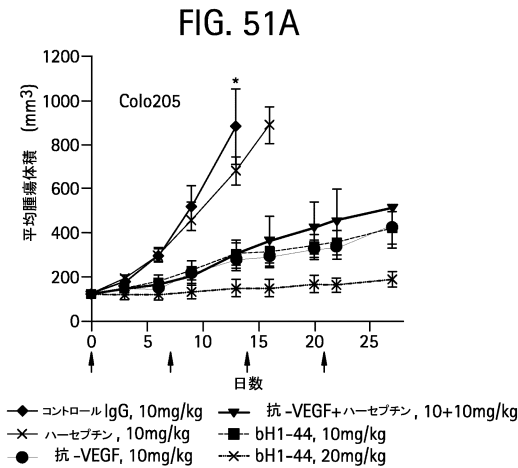
【図 49A】



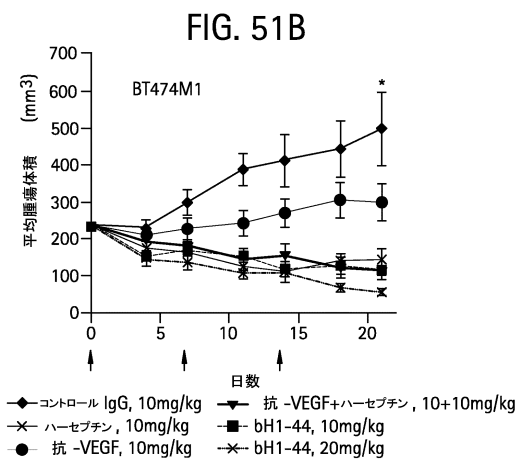
【図 50】



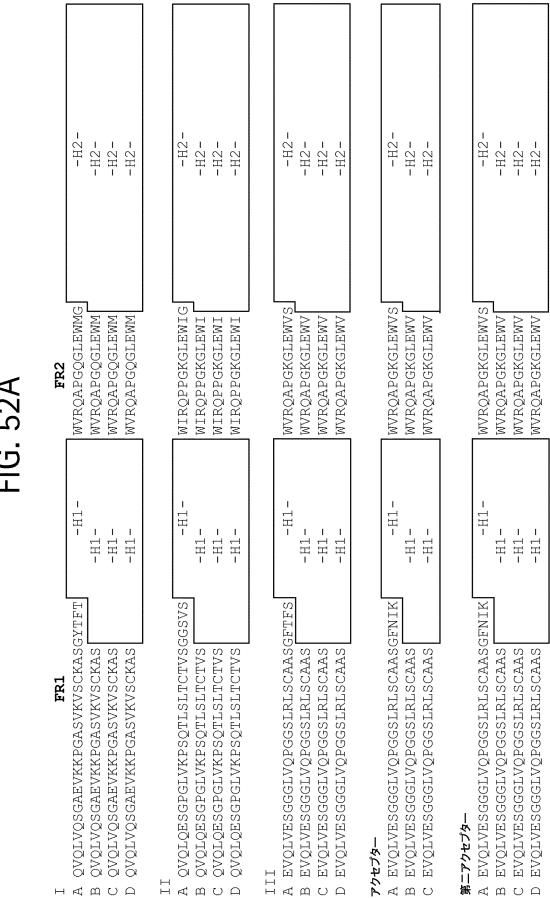
【図 5 1 A】



【図 5 1 B】

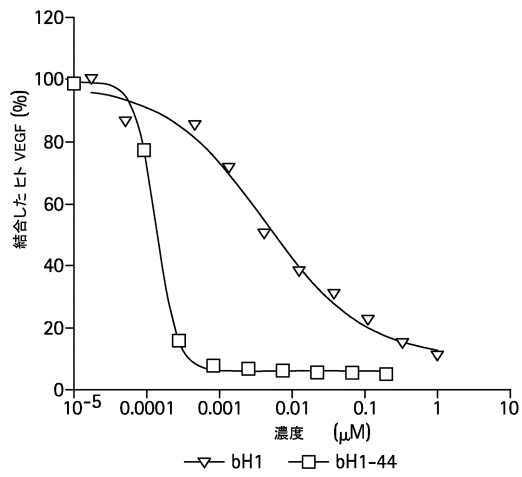


【図 5 2 A】



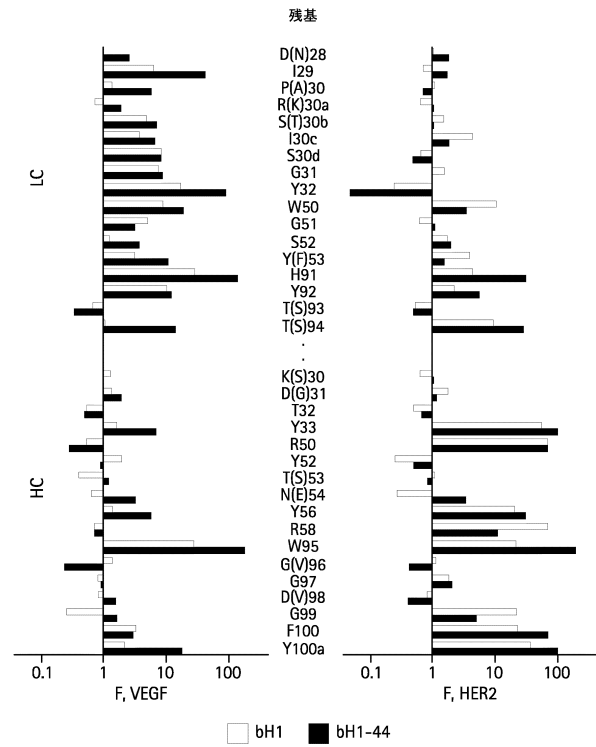
【図 5 6】

FIG. 56



【図 5 7】

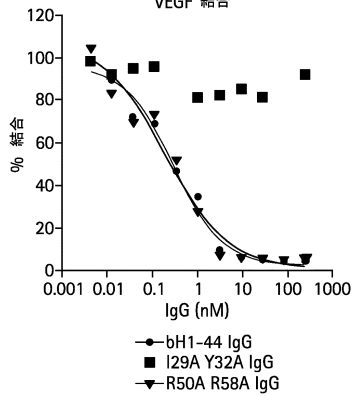
FIG. 57



【図 5 8 A】

FIG. 58A

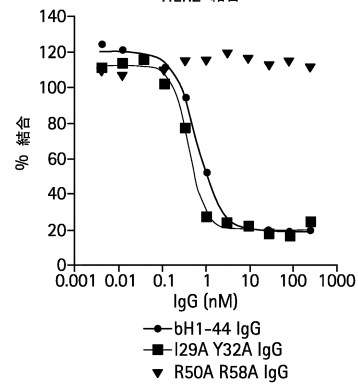
VEGF 結合



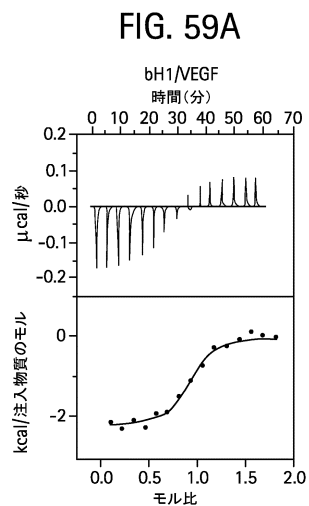
【図 5 8 B】

FIG. 58B

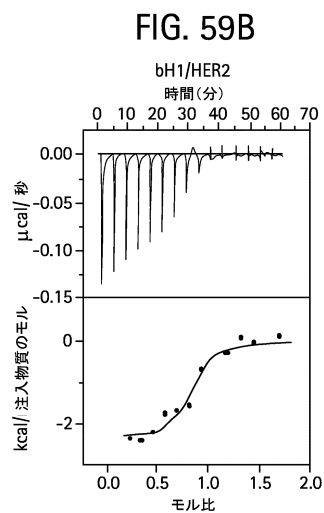
HER2 結合



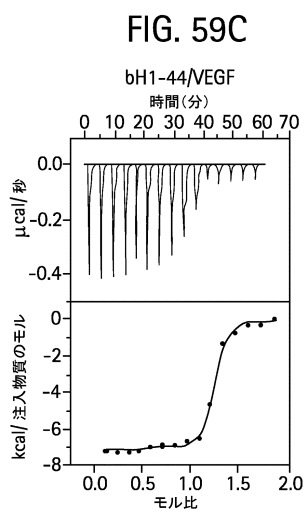
【図 5 9 A】



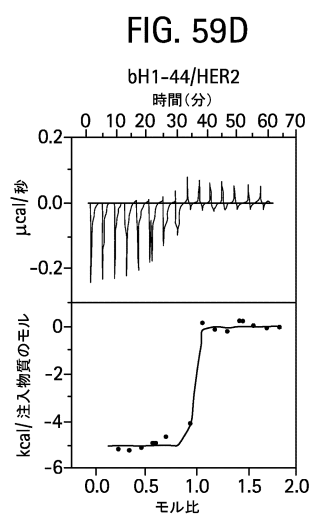
【図 5 9 B】



【図 5 9 C】

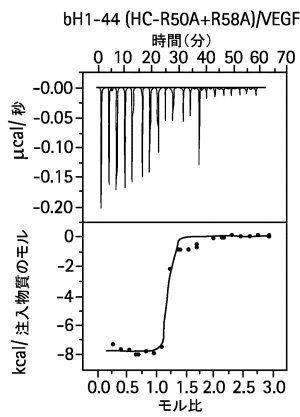


【図 5 9 D】



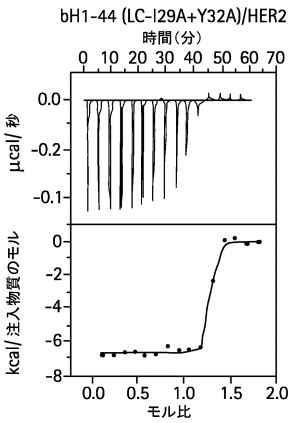
【図 5 9 E】

FIG. 59E



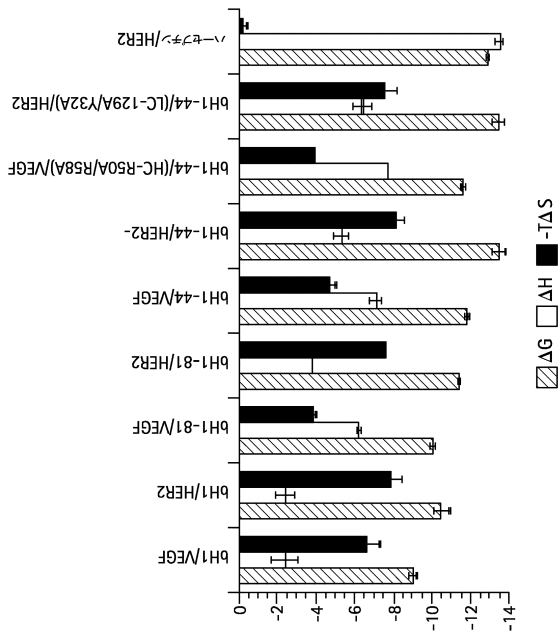
【図 5 9 F】

FIG. 59F



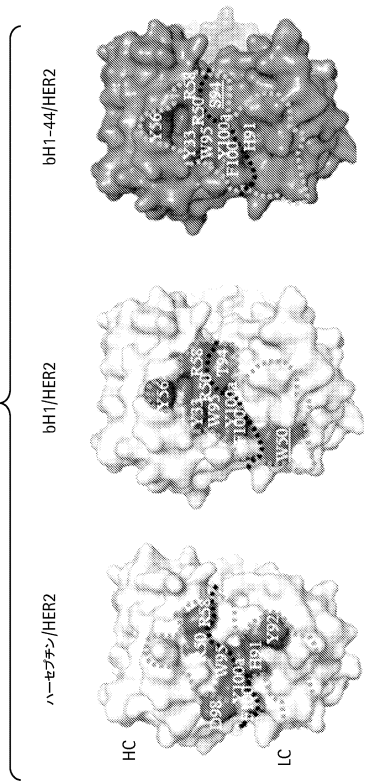
【図 6 0】

FIG. 60

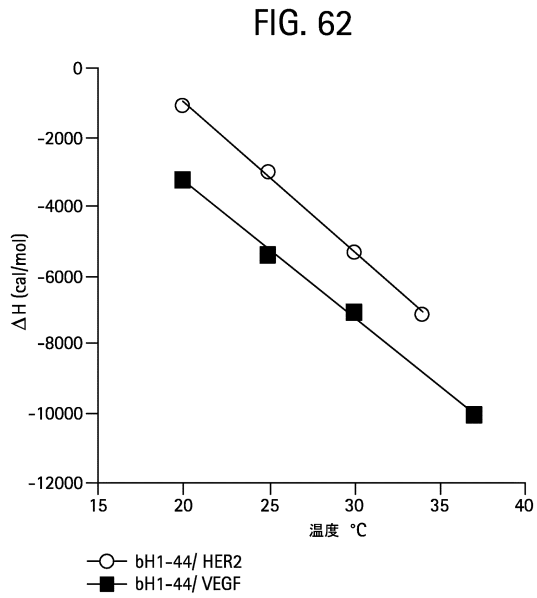


【図 6 1】

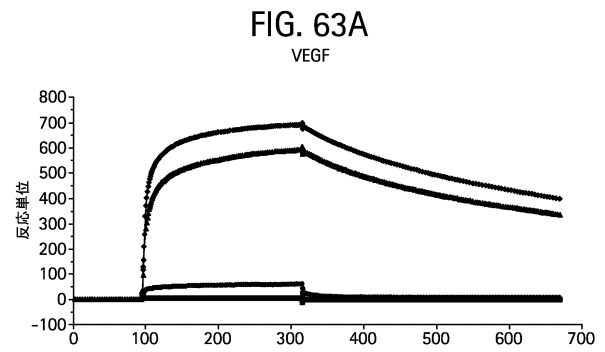
FIG. 61



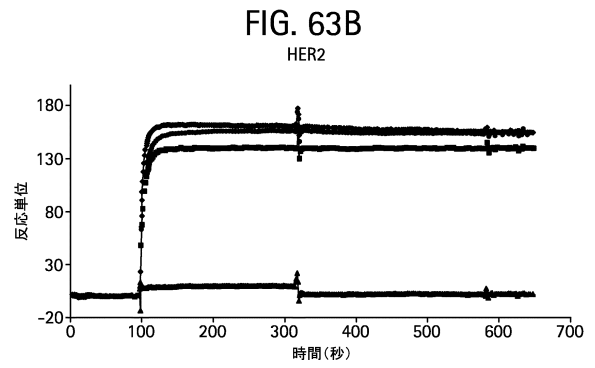
【図 6 2】



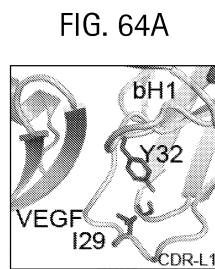
【図 6 3 A】



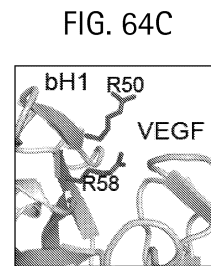
【図 6 3 B】



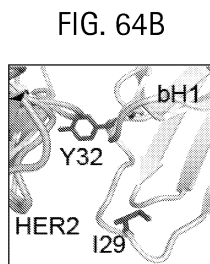
【図 6 4 A】



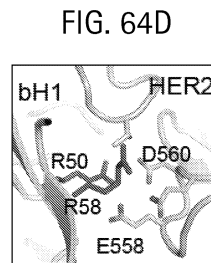
【図 6 4 C】



【図 6 4 B】

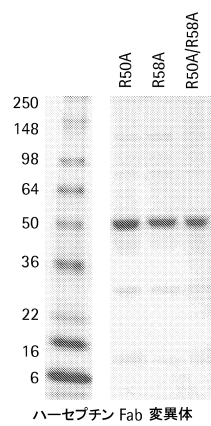


【図 6 4 D】



【図 6 5】

FIG. 65



【配列表】

0005796831000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00 1 1 1

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 特開2002-355074 (JP, A)
国際公開第2008/027236 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S
/ W P I X (S T N)