(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-525620
(P2004-525620A)
(43)公表日　平成16年8月26日(2004.8.26)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A61K 38/16	A61P	3/10		4B064
A61P 3/10	A61P	5/14		4B065
A61P 5/14	A61P	21/04		4C084
A61P 21/04	A61P	25/00		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 187 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-557417(P2002-557417)
(86)(22)出願日　平成14年1月17日(2002.1.17)
(85)翻訳文提出日　平成15年7月16日(2003.7.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/001487
(87)国際公開番号　WO2002/056910
(87)国際公開日　平成14年7月25日(2002.7.25)
(31)優先権主張番号　09/765,208
(32)優先日　平成13年1月17日(2001.1.17)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　503256494
トルビオン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
ＴＲＵＢＩＯＮ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国９８１２１ワシントン州シアトル、フォース・アベニュー２４０１番、スウィート１０５０
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100067035
弁理士　岩崎　光隆
(74)代理人　100064610
弁理士　中嶋　正二

最終頁に続く

(54)【発明の名称】結合ドメイン－免疫グロブリン融合タンパク質

(57)【要約】
本発明は、抗原、カウンターレセプターなどのコグネイト構造の結合ドメイン、システイン残基を有さない、または1個有するヒンジ領域ポリペプチド、および免疫グロブリンCH2およびCH3ドメインを特徴とし、主として単量体タンパク質として存在しながらADCCおよび／またはCDC能を有する新規な結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質に関する。これらの融合タンパク質は高い発現レベルで組換え発現し得る。また、関連の組成物および免疫療法適用をはじめとする方法も提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
(a)免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドと融合した結合ドメインポリペプチド、なおこのヒンジ領域ポリペプチドは(i)システイン残基を含まず、かつ、1以上のシステイン残基を有する野生型免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに由来する変異型ヒンジ領域ポリペプチド、(ii)1つのシステイン残基を含み、かつ、2以上のシステイン残基を有する野生型免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに由来する変異型ヒンジ領域ポリペプチド、(iii)野生型ヒトIgAヒンジ領域ポリペプチド、(iv)システイン残基を含まず、かつ、野生型ヒトIgA領域ポリペプチドに由来する変異型ヒトIgAヒンジ領域ポリペプチド、および(v)1つのシステイン残基を含み、かつ、野生型ヒトIgA領域ポリペプチドに由来する変異型ヒトIgAヒンジ領域ポリペプチドからなる群から選択される;
(b)ヒンジ領域ポリペプチドと融合した免疫グロブリン重鎖CH2不変領域ポリペプチド;および
(c)CH2不変領域ポリペプチドと融合した免疫グロブリン重鎖CH3不変領域ポリペプチド
を含み、
(1)結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質が抗体依存細胞媒介性細胞傷害作用および補体結合からなる群から選択される少なくとも1つの免疫活性能を持ち、かつ、
(2)結合ドメインポリペプチドが抗体に対して特異的結合能を持つ、
結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質。
【請求項２】
免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドが変異型ヒンジ領域ポリペプチドであり、かつ、野生型ヒト免疫グロブリンGヒンジ領域ポリペプチドに比べて低い二量体形成能を示す、請求項１に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質。
【請求項３】
結合ドメインポリペプチドが、免疫グロブリン軽鎖可変領域ポリペプチドおよび免疫グロブリン重鎖可変領域ポリペプチドからなる群から選択される少なくとも1つの免疫グロブリン可変領域ポリペプチドを含む、請求項１に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質。
【請求項４】
免疫グロブリン可変領域ポリペプチドがヒト免疫グロブリンに由来する、請求項３に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質。
【請求項５】
結合ドメインポリペプチドが、
(a)少なくとも1つの免疫グロブリン軽鎖可変領域ポリペプチド;
(b)少なくとも1つの免疫グロブリン重鎖可変領域ポリペプチド;および
(c)(a)のポリペプチドかつ(b)のポリペプチドと融合している少なくとも1つのリンカーペプチド
を含む、請求項１に記載の結合ドメインFv-免疫グロブリン融合タンパク質。
【請求項６】
免疫グロブリン軽鎖可変領域および重鎖可変領域ポリペプチドがヒト免疫グロブリンに由来する、請求項５に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質。
【請求項７】
免疫グロブリン重鎖CH2不変領域ポリペプチドおよび免疫グロブリン重鎖CH3不変領域ポリペプチドの少なくとも1つがヒト免疫グロブリン重鎖に由来する、請求項１に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質。
【請求項８】
免疫グロブリン重鎖不変領域CH2およびCH3ポリペプチドがヒトIgGおよびヒトIgAからなる群から選択されるイソタイプのものである、請求項１に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質。
【請求項９】

抗原がCD19、CD20、CD37、CD40およびL6からなる群から選択される、請求項１に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質。
【請求項１０】
リンカーポリペプチドがGly-Gly-Gly-Gly-Ser[配列番号21]のアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチドを含む、請求項５に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質。
【請求項１１】
リンカーポリペプチドがGly-Gly-Gly-Gly-Ser[配列番号21]のアミノ酸配列を有するポリペプチドの少なくとも3つのリピートを含む、請求項５に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質。
【請求項１２】
免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドがヒトIgAヒンジ領域ポリペプチドを含む、請求項１に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質。
【請求項１３】
結合ドメインポリペプチドがCD154細胞外ドメインを含む、請求項１に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質。
【請求項１４】
結合ドメインポリペプチドがCD154細胞外ドメインおよび少なくとも1つの免疫グロブリン可変領域ポリペプチドを含む、請求項１に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質。
【請求項１５】
(a)免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドと融合した結合ドメインポリペプチド、なおこのヒンジ領域ポリペプチドは(i)システイン残基を含まず、かつ、1以上のシステイン残基を有する野生型免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに由来する変異型ヒンジ領域ポリペプチド、(ii)1つのシステイン残基を含み、かつ、2以上のシステイン残基を有する野生型免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに由来する変異型ヒンジ領域ポリペプチド、(iii)野生型ヒトIgAヒンジ領域ポリペプチド、(iv)システイン残基を含まず、かつ、野生型ヒトIgA領域ポリペプチドに由来する変異型ヒトIgAヒンジ領域ポリペプチド、および(v)1つのシステイン残基を含み、かつ、野生型ヒトIgA領域ポリペプチドに由来する変異型ヒトIgAヒンジ領域ポリペプチドからなる群から選択される;
(b)ヒンジ領域ポリペプチドと融合した免疫グロブリン重鎖CH2不変領域ポリペプチド;および
(c)CH2不変領域ポリペプチドと融合した免疫グロブリン重鎖CH3不変領域ポリペプチド
を含み、
(1)結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質が抗体依存細胞媒介性細胞傷害作用および補体結合からなる群から選択される少なくとも1つの免疫活性能を持ち、かつ、
(2)結合ドメインポリペプチドが抗体に対して特異的結合能を持つ、
結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチド。
【請求項１６】
作動可能なようにプロモーターに連結されている請求項１５に記載のポリヌクレオチドを含む、組換え発現構築物。
【請求項１７】
請求項１６に記載の組換え発現構築物で形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。
【請求項１８】
結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質の作製方法であって、
(a)請求項１７に記載の宿主細胞を結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質の発現を可能とする条件下で培養し；さらに
(b)その宿主細胞培養物から結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質を単離する
ステップを含む、方法。

【請求項１９】
請求項１に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質を生理学上許容される担体とともに含む、医薬組成物。
【請求項２０】
悪性症状またはB細胞疾患を有する、または有することが疑われる被験体を治療する方法であって、治療上有効量の請求項１に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質を患者に投与することを含む、方法。
【請求項２１】
悪性症状またはB細胞疾患がB細胞リンパ腫および自己抗体の産生を特徴とする疾病からなる群から選択される、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
悪性症状またはB細胞疾患が慢性関節リウマチ、重症性筋無力症、グレーブス病、I型糖尿病、多発性硬化症および自己免疫疾患からなる群から選択される、請求項２０に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
本発明は一般に、免疫活性のある組換え結合タンパク質、詳しくは一本鎖Fv-免疫グロブリン融合タンパク質を含む、分子的に操作された結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質に関する。本発明はまた、自己抗体の産生を特徴とする疾病をはじめとする悪性症状およびB細胞疾患を治療する組成物および方法に関する。
【０００２】
免疫グロブリン分子は、鎖間ジスルフィド結合によって結合して高分子となる2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖からなる。鎖内ジスルフィド結合は同じポリペプチド鎖の異なる領域を連結し、その結果、隣接するアミノ酸を伴って免疫グロブリンドメインを構成するループが形成される。各軽鎖および各重鎖は抗体ごとに著しいアミノ酸組成のバリエーションを示す単一の可変領域を有する。軽鎖可変領域V_Lは重鎖可変領域V_Hと会合して免疫グロブリンの抗原結合部位Fvを形成する。軽鎖は1つの不変領域ドメインを有し、重鎖は数個の不変領域ドメインを有する。クラスIgG、IgA、およびIgEはCH1、CH2、およびCH3と呼ばれる3つの不変領域ドメインを有し、クラスIgMおよびIgEは4つの不変領域を有する。
【０００３】
免疫グロブリンの重鎖は、Fd、ヒンジおよびFcの3つの機能的領域に分けることができる。Fd領域はV_HおよびCH1ドメインを含み、軽鎖との組合せでFabを形成する。Fcフラグメントは一般に補体結合およびFcレセプターとの結合といった免疫グロブリンのエフェクター機能をつかさどると考えられている。ヒンジ領域はIgG、IgA、およびIgDクラスで見られ、柔軟なスペーサーとして働き、Fab部分がスペース内を自由に移動できるようにする。不変領域とは対照的に、このヒンジドメインは構造的に多様であり、免疫グロブリンのクラスおよびサブクラス間で配列、長さとも様々である。例えば、3つのヒトIgGサブクラスIgG1、IgG2、およびIgG4は12～15個のアミノ酸のヒンジ領域を有するが、IgG3は21個のプロリン残基と11個のシステイン残基を含むおよそ62個のアミノ酸を含む。結晶学的研究によれば、ヒンジはさらに機能上、上方ヒンジ、コア、そして下方ヒンジの3つの領域に細分することができる(Shin et al., Immunological Reviews 130:87 (1992))。上方ヒンジはCH1のカルボキシル末端から、動きを制限するヒンジの最初の残基、通常は2つの重鎖間で鎖間ジスルフィド結合を形成する最初のシステイン残基までのアミノ酸を含む。上方ヒンジ領域の長さは抗体のセグメントの柔軟性と相関している。コアヒンジ領域は重鎖内ジスルフィド架橋を含み、下方ヒンジ領域はCH2ドメインのアミノ末端を連結し、CH2の残基を含む(同上)。ヒトIgG1のコアヒンジ領域はCys-Pro-Pro-Cysの配列を含むが、これはジスルフィド結合が形成された際に旋回軸として働くと考えられる環状オクタペプチドが生じ、これにより柔軟性が付与される。ヒンジ領域はまた炭水化物結合部位を含み得る。例えば、IgA1はヒンジ領域の17個のアミノ酸セグメント内に5つの炭水化物部位を含み、分

泌免疫グロブリンに有利な特性であると考えられるヒンジの腸管プロテアーゼ耐性を排除する。

【０００４】

ヒンジ領域の構造と柔軟性に許容されるコンホメーション変化はその抗体のFc部分のエフェクター機能に影響を及ぼし得る。Fc領域に関連するエフェクター機能の3つの一般的なカテゴリーとしては、(1)従来の補体カスケードの活性化、(2)エフェクター細胞との相互作用、および(3)免疫グロブリンのコンパートメント化が挙げられる。異なるヒトIgGサブクラスは補体カスケードのステップを活性化および増幅させる相対活性が異なる。一般に、IgG1およびIgG3が最も効果的に補体と結合し、IgG2はその効果が低く、IgG4は補体を活性化しない。補体の活性化は抗原-抗体複合体に、カスケードの最初の補体C1のサブユニットであるC1qが結合することで開始される。C1qの結合部位が抗体のCH2ドメインに位置するとしても、ヒンジ領域は抗体がカスケードを活性化させる能力に影響を与える。例えば、ヒンジ領域を欠く組換え免疫グロブリンは補体を活性化させることができない(同上)。ヒンジ領域によって柔軟性が付与されなければ、抗原に結合した抗体のFab部分はC1qのCH2への結合を可能とするのに必要なコンホメーションを採用できない可能性がある(同上参照)。研究ではヒンジの長さとセグメントの柔軟性が補体の活性化に相関していることが示されているが、この相関は絶対的なものではない。IgG4と同じほど硬質の変化したヒンジ領域を有するヒトIgG3分子はなおこのカスケードを効果的に活性化する。

【０００５】

またヒンジ領域の欠損も、ヒトIgG免疫グロブリンが免疫エフェクター細胞のFcレセプターに結合する能力に影響を与える。免疫グロブリンとFcレセプターとの結合は、腫瘍細胞の排除に重要な手段であると考えられる抗体依存細胞傷害作用(ADCC)を助長する。ヒトIgG Fcレセプターファミリーは、IgGと高い親和性で結合し得るFcγRI(CD64)、いずれも親和性の低いレセプターであるFcγRII(CD32)、およびFcγRIII(CD16)の3つの群に分類される。これらの3種の各レセプターと免疫グロブリンの間の分子的相互作用はまだ厳密には定義されていないが、実験では、CH2ドメインのヒンジ隣接領域の残基が抗体とFcレセプターの間の相互作用の特異性に重要であることが示されている。さらにまた、ヒンジ領域を欠いたIgG1メラノーマタンパク質および組換えIgG3キメラ抗体は、おそらくCH2への接近が低下しているためにFcγRIと結合できない(Shin et al., Intern. Rev. Immunol. 10:177, 178-79 (1993))。

【０００６】

モノクローナル抗体技術および遺伝子操作法はヒト疾病の診断および治療用の免疫グロブリン分子の迅速な開発をもたらした。コグネイト抗原に対する抗体の親和性を向上させるため、免疫原性に関する問題をなくすため、また、抗体のエフェクター機能を変化させるためにタンパク質工学が適用されてきた。免疫グロブリンのドメイン構造は、抗原結合ドメインおよびエフェクター機能を付与するドメインが免疫グロブリンクラスおよびサブクラス間で交換可能であるという点で操作しやすいものである。

【０００７】

さらにまた、全免疫グロブリン療法に付随する問題を克服するために小免疫グロブリン分子が構築されている。一本鎖Fv(scFv)は短いリンカーペプチドを介して軽鎖可変ドメインと連結した重鎖可変ドメインを含む(Huston et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-83, 1988)。scFv分子が小さいので、それらは全免疫グロブリンよりも極めて迅速な血漿および組織からのクリアランスとより有効な組織浸透を示す。抗腫瘍scFvは対応するキメラ抗体よりも迅速な腫瘍浸透およびより均一な腫瘍分布を示した(Yokota et al., Cancer Res. 52, 3402-08 (1992))。scFvと、毒素などの別の分子との融合は標的組織へ毒素を送達するため、scFvの特異的な抗原結合活性と小型であることを利用するものである(Chaudary et al., Nature 339:394 (1989); Batra et al., Mol. Cell. Biol. 11:2200 (1991))。

【０００８】

scFv分子は血清療法を実現するという利点にもかかわらず、この治療アプローチにはいく

つかの欠点がある。scFvの迅速なクリアランスが正常細胞における有毒作用を軽減するものの、このように迅速なクリアランスは標的組織への最小有効用量の送達を妨げてしまうことがある。scFvの発現および単離が困難で生産量に悪影響を及ぼすことから、患者への投与に十分量のscFvを製造する試みが続いている。発現中、scFv分子は安定性を欠き、別の分子の様々な領域が対合することで凝集することが多い。さらに、哺乳類発現系におけるscFv分子の産生レベルは低く、治療向けのscFv分子の効率的な製造の可能性を制限している(Davis et al, J. Biol. Chem. 265:10410-18 (1990); Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655-59 (1991))。可変領域に対するグリコシル化部位の付加をはじめ、生産を向上させる戦略が探求されている(Jost, C. R. 米国特許第5,888,773号, Jost et al, J. Biol. Chem. 269: 26267-73 (1994))。

【０００９】

scFVに対する毒素の結合または融合により極めて有効な分子が得られるが、毒素分子からの毒性によって投与は制限される。有毒作用としては、肝臓酵素の上昇および血管漏出症候群が挙げられる。さらに、免疫毒素は高い免疫原性を持ち、毒素に対して生じた宿主抗体はその反復治療の可能性を制限する。

【００１０】

治療にscFvを用いるさらなる利点としては、エフェクター機能がないことである。免疫グロブリンの不変領域に関連する細胞溶解機能、ADCCおよび補体依存細胞傷害作用(CDC)のないscFvは疾病の治療に有効ではないものと思われる。scFv技術の開発が12年前に始まっているにもかかわらず、現在に至ってまだ治療が認可されているscFvはない。

【００１１】

疾病の治療に対する抗体不変領域に関連するエフェクター機能のため、非免疫グロブリン配列が抗体可変領域に置換されている融合タンパク質の開発が促された。例えば、HIVにより認識されるT細胞表面タンパク質であるCD4が免疫グロブリンFcエフェクタードメインと組換え融合された(Sensel et al., Chem. Immunol. 65:129-158 (1997)参照)。このような分子の生物活性は選択された不変領域のクラスまたはサブクラスに部分的に依存するであろう。IL-2-IgG1融合タンパク質は補体により媒介されるIL-2レセプター保有細胞の溶解をもたらした(同上参照)。これら、またその他の融合タンパク質の構築を目的とした免疫グロブリン不変領域の使用はまた、薬物動態特性の向上をもたらし得る。

【００１２】

数種の免疫グロブリン療法に従うものと思われる疾病および疾患としては、癌および免疫系疾患が挙げられる。癌は世界で約4人に1人が罹患する広範な疾患である。急速で制御されない悪性細胞の増殖が血液の悪性症状をはじめ多種の癌の特徴である。血液の悪性症状を有する患者は過去20年間の癌治療の進展から最も恩恵を受けてきた(Multani et al., J. Clin. Oncology 16: 3691-3710, 1998)。緩解率は高まってきているが、大部分の患者がなお再発し、その疾病に屈している。細胞傷害薬による治癒の障壁としては腫瘍細胞の耐性、および多くの患者で最適な投与の妨げとなる化学療法の高い毒性が挙げられる。モノクローナル抗体(mAb)をはじめ、悪性細胞と特異的に結合する分子を用いたターゲッティングに基づく新しい治療は毒性を高めることなく効果を向上させることができる。

【００１３】

1975年に初めてmAbが記載されて以来(Kohler et al., Nature 256:495-97 (1975))、多くの患者が腫瘍細胞で発現した抗原に対するmAbを用いて治療されてきた。これらの研究は治療に適した標的抗原の選択に関する重要な教訓となっている。第一に最も重要なこととしては、標的抗原は重要な正常組織によっては発現されてはならない。幸いにも、血液の悪性細胞は幹細胞その他の必須細胞では発現しない多くの抗原を発現する。血液起源の正常および悪性細胞の双方を枯渇させる血液の悪性症状の治療は、治療が終わった後に始原細胞から正常細胞の再生が起こるので許容されてきた。第二に、標的抗原は腫瘍細胞の全てのクローン原性集団で発現しなければならず、かつ、発現は免疫グロブリン療法の選択圧によらず持続しなければならない。このようにB細胞悪性症状の治療のための表面イディオタイプの選択は、その抗原が高い腫瘍選択性を示したとしても、表面イディオタイプ

の発現の変化を伴う腫瘍細胞変異体の派生物によって制限されたものとなっている(Meeker et al., N. Engl. J. Med. 312:1658-65 (1985))。第三に、選択された抗原は、免疫グロブリンがそれと結合した後に適宜移動しなければならない。免疫グロブリンが標的抗原と結合した後のその抗原の放出またはインターナリゼーションは腫瘍細胞を破壊から逃れさせる可能性があり、従って、血清療法の有効性を制限する。第四に、活性化シグナルを伝達する、免疫グロブリンと標的抗原との結合は増殖の停止とアポトーシスをもたらす腫瘍細胞の機能的応答の向上をもたらし得る。これらの特性は全て重要であるが、免疫グロブリンが抗原と結合した後のアポトーシスの誘発は血清療法の成功を達成する上で重要な因子であり得る。

【００１４】

BおよびT細胞悪性症状の血清療法の標的として試験された抗原としては、Igイディオタイプ(Brown et al., Blood 73:651-61 (1989))、CD19(Hekman et al., Cancer Immunol. Immunother. 32:364-72 (1991); Vlasveld et al., Cancer Immunol. Immunother. 40: 37-47 (1995))、CD20(Press et al., Blood 69: 584-91 (1987); Maloney et al., J. Clin. Oncol. 15:3266-74, (1997)) CD21 (Scheinberg et. al., J. Clin. Oncol. 8:792-803, (1990))、CD5(Dillman et. al., J. Biol. Respn. Mod. 5:394-410 (1986))、およびCD52(CAMPATH)(Pawson et al., J. Clin. Oncol. 15:2667-72, (1997))が挙げられる。これらのうち、B細胞リンパ腫の治療標的としてCD20を用いる場合で最も成功が得られている。その他の標的は各々抗原の生物特性によって制限されている。例えば、表面イディオタイプは体細胞突然変異によって変更される可能性があり、腫瘍細胞を逃れさせることがある。CD5、CD21、およびCD19は、もしmAbが毒素分子と結合していなければ、mAbと結合した後に速やかにインターナライズされて腫瘍細胞を破壊から逃れさせてしまう。CD22はB細胞リンパ腫のサブセットでしか発現しないが、CD52はT細胞およびB細胞の双方で発現し、T細胞の枯渇から免疫抑制を生じる。

【００１５】

CD20はB細胞悪性症状の治療に適当な標的抗原の選択に関して上記した基本的な基準を満たす。キメラCD20 mAbを用いた低悪性度または濾胞性B細胞リンパ腫を有する患者の治療は多くの患者で部分的または完全応答を誘導する(McLaughlin et al, Blood 88:90a (abstract, suppl. 1)(1996); Maloney et al, Blood 90: 2188-95 (1997))。しかし、一般に6ヶ月から1年以内に腫瘍の再発が起こる。従って、低悪性度B細胞リンパ腫においてより持続的な応答を誘導し、高悪性度リンパ腫その他のB細胞疾患の効果的な治療を可能とするには血清療法にさらなる改善が必要である。

【００１６】

CD20血清療法を改善する一つの試みはCD20に特異的なmAbを用いてB細胞リンパ腫に放射性同位元素をターゲッティングすることであった。治療の有効性は高まっているものの、放射性抗体のin vivo半減期が長いことに関連する毒性も高まり、患者が幹細胞救助を受ける必要が生じることもある(Press et al., N. Eng. J. Med. 329: 1219-1224, 1993; Kaminski et al., N. Eng.J. Med. 329:459-65 (1993))。CD20に対するMAbは放射性同位元素の結合前にプロテアーゼにより切断されて$F(ab')_2$ またはFabフラグメントを生じる。これは放射性同位元素コンジュゲートの腫瘍への浸透を高め、in vivo半減期を短縮することで正常組織への毒性を軽減する。しかし、補体結合およびADCCをはじめ、CD20 mAbのFc領域によって供されるエフェクター機能の利点は失われている。従って、放射性同位元素の送達の向上のためには、Fc依存性のエフェクター機能を保持するが大きさが小さいCD20 mAb誘導体を作出し、それにより腫瘍への浸透を高め、かつ、mAbの半減期を短縮する戦略が必要である。

【００１７】

CD20はモノクローナル抗体によって認識される最初のヒトB細胞系特異的表面分子であったが、B細胞の生物学におけるCD20の機能はまだ完全には理解されていない。CD20は細胞質内にアミノおよびカルボキシ両末端を有する35kDaの非グルコシル化疎水性リンタンパク質である(Einfeld et al, EMBO J. 7:711-17 (1988))。CD20の天然リガンドはまだ同定

されていない。CD20は全ての正常な成熟B細胞により発現されるが、B細胞前駆体によっては発現されない。

【００１８】

CD20 mAbsは正常B細胞へ生存力および成長に影響を及ぼすシグナルを伝達する(Clark et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4494-98 (1986))。最近のデータでは、CD20の大規模な架橋がBリンパ腫細胞系のアポトーシスを誘導し得ることが示されている(Shan et al., Blood 91:1644-52 (1998))。チロシン残基における細胞基質のリン酸化を測定することで検出されたことであるが、細胞表面におけるCD20の架橋はシグナル変換の大きさおよび速度を高める(Deans et al., J. Immunol. 146:846-53 (1993))。重要なこととしては、RamosBリンパ腫細胞のアポトーシスはFcレセプター陽性細胞の付加によるCD20 mAbの架橋によっても誘導された(Shan et al., Blood 91: 1644-52 (1998))。従って、補体およびADCC機構による細胞溷渇に加え、in vivoにおけるCD20 mAbによるFcレセプター結合もCD20の架橋による悪性B細胞のアポトーシスを促進することが可能であった。この理論はSCIDマウスモデルにおけるヒトリンパ腫のCD20療法の有効性がCD20 mAbによるFcレセプター結合に依存していたことを示す実験と一致する(Funakoshi et al., J. Immunotherapy 19:93-101 (1996))。

【００１９】

CD20ポリペプチドは4つのトランスメンブランドメインを含む(Einfeld et al., EMBO J. 7: 711-17, (1988); Stamenkovic et al., J .Exp. Med. 167:1975-80 (1988); Tedder et. al., J. Immunol. 141:4388-4394 (1988))。この複数の膜貫通ドメインは抗体結合後のCD20のインターナリゼーションを妨げる。このCD20の特性は、B細胞リンパ腫を有する患者にネズミCD20 mAbである1F5を注射した際に悪性細胞の著しい溷渇と部分的な臨床応答をもたらす、細胞悪性症状の効果的な療法にとっての重要な特徴と認識された(Press et al., Blood 69: 584-91 (1987))。

【００２０】

正常な成熟B細胞もまたCD20を発現することから、CD20抗体療法中には正常なB細胞も溷渇される(Reff, M.E. et al, Blood 83: 435-445, 1994)。しかし、治療が完了した後にCD20陰性B細胞前駆体から正常なB細胞が再生するので、抗CD20療法で処置した患者は顕著な免疫抑制を受けることはない。正常なB細胞の溷渇は、自己抗体の不適切な産生を含む疾病またはB細胞が役割を果たすと考えられるその他の疾病に有用であり得る。ヒトIgG1重鎖およびヒトκ軽鎖不変領域と融合したマウス起源の重鎖および軽鎖可変領域からなるCD20特異的キメラmAbはCD20との結合およびADCCを媒介して補体と結合する能力を保持していた(Liu et al., J. Immunol. 139:3521-26 (1987); Robinson et al., 米国特許第5,500,362号)。この研究は、現在米国食品医薬品局によりB細胞リンパ腫療法として認可されているキメラCD20 mAbであるRituximab(商標)の開発をもたらした。Rituximabによる治療後には多くの場合で臨床応答が見られるが、6～12ヶ月後に再発する患者が多い。

【００２１】

Rituximab(商標)は、この分子がおよそ150kDaという大きなものであって、多数の腫瘍細胞が存在しているリンパ組織中では拡散が制限されることから、静脈注射のためには高用量が必要となる。Rituximab(商標)の抗腫瘍活性のメカニズムはADCC、補体の結合およびアポトーシスを誘導する悪性B細胞におけるシグナルの引き金を含む、いくつかの活性の組合せであると考えられる。サイズの大きなRituximab(商標)は悪性B細胞を含むリンパ組織へのこの分子の最適な拡散の妨げとなり、それによりこれらの抗腫瘍活性も制限される。上記で論じたように、プロテアーゼによるCD20 mAbのFabまたは$F(ab')_2$フラグメントへの切断により、それらはより小さくなり、リンパ組織へ浸透しやすくなるが、抗腫瘍活性にとって重要なエフェクター機能が失われる。CD20 mAbフラグメントは放射性同位元素の送達のためには完全抗体よりも有効であり得るが、Fc部分のエフェクター機能を保持しているが、大きさが小さく、良好な腫瘍浸透を促進し、かつ、半減期がより短くなるCD20 mAb誘導体を構築することが望ましい。

【００２２】

CD20はB細胞リンパ腫および慢性リンパ性白血病(CLL)をはじめとするB細胞起源の悪性細胞によって発現される。CD20は急性リンパ芽球性白血病などの悪性のB細胞前駆体によっては発現されない。従って、CD20はB細胞リンパ腫、CLLおよびその他、B細胞が疾病の活動に関わる疾病の治療によい標的となる。その他のB細胞疾患としては、B細胞の形質細胞への分化中に自己抗体が産生される自己免疫疾患が挙げられる。B細胞疾患の例としては、グレーブス病および橋本病をはじめとする自己免疫性甲状腺疾患、慢性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡(SLE)、シェーグレン症候群、免疫血小板減少性紫斑病(ITP)、多発性硬化症(MS)、重症性筋無力症(MG)、乾癬、強皮症、ならびにクローン病および潰瘍性大腸炎をはじめとする炎症性腸疾患が挙げられる。

【００２３】

以上から悪性症状およびB細胞疾患を治療する組成物および方法の改良には明確な必要性が明らかである。本発明の組成物および方法は、免疫グロブリン重鎖CH3不変領域ポリペプチドと融合した免疫グロブリン重鎖CH2不変領域ポリペプチドと融合した免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドと融合した結合ドメインポリペプチドを含む結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質を提供することで先行技術の制限を克服するものであり、ここでは結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質がADCCまたは補体結合を媒介し得る。さらに、これらの組成物および方法はその他の関連の利点も示す。

【００２４】

(本発明の要約)

本発明の1つの態様は、(a)免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドと融合した結合ドメインポリペプチド、なおこのヒンジ領域ポリペプチドは(i)システイン残基を含まず、かつ、1以上のシステイン残基を有する野生型免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに由来する変異型ヒンジ領域ポリペプチド、(ii)1つのシステイン残基を含み、かつ、2以上のシステイン残基を有する野生型免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに由来する変異型ヒンジ領域ポリペプチド、(iii)野生型ヒトIgAヒンジ領域ポリペプチド、(iv)システイン残基を含まず、かつ、野生型ヒトIgA領域ポリペプチドに由来する変異型ヒトIgAヒンジ領域ポリペプチド、および(v)1つのシステイン残基を含み、かつ、野生型ヒトIgA領域ポリペプチドに由来する変異型ヒトIgAヒンジ領域ポリペプチドからなる群から選択される;(b)ヒンジ領域ポリペプチドと融合した免疫グロブリン重鎖CH2不変領域ポリペプチド;および(c)CH2不変領域ポリペプチドと融合した免疫グロブリン重鎖CH3不変領域ポリペプチドを含み、(1)結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質が抗体依存細胞媒介性細胞傷害作用および補体結合からなる群から選択される少なくとも1つの免疫活性能を持ち、かつ、(2)結合ドメインポリペプチドが抗原に対して特異的結合能を持つ、結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質を提供することである。ある実施形態では、この免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドは変異型ヒンジ領域ポリペプチドであり、かつ、野生型ヒト免疫グロブリンGヒンジ領域ポリペプチドに比べて低い二量体形成能を示す。もう1つの実施形態では、この結合ドメインポリペプチドは、免疫グロブリン軽鎖可変領域ポリペプチドまたは免疫グロブリン重鎖可変領域ポリペプチドである少なくとも1つの免疫グロブリン可変領域ポリペプチドを含む。さらなる実施形態では、この免疫グロブリン可変領域ポリペプチドはヒト免疫グロブリンに由来する。

【００２５】

もう1つの実施形態では、結合ドメインFv-免疫グロブリン融合タンパク質結合ドメインポリペプチドは、(a)少なくとも1つの免疫グロブリン軽鎖可変領域ポリペプチド;(b)少なくとも1つの免疫グロブリン重鎖可変領域ポリペプチド;および(c)(a)のポリペプチドかつ(b)のポリペプチドと融合している少なくとも1つのリンカーペプチドを含む。さらなる実施形態では、この免疫グロブリン軽鎖可変領域および重鎖可変領域ポリペプチドはヒト免疫グロブリンに由来する。

【００２６】

もう1つの実施形態では、免疫グロブリン重鎖CH2不変領域ポリペプチドおよび免疫グロブリン重鎖CH3不変領域ポリペプチドの少なくとも1つがヒト免疫グロブリン重鎖に由来する

。もう1つの実施形態では、免疫グロブリン重鎖不変領域CH2およびCH3ポリペプチドはヒトIgGおよびヒトIgAから選択されるイソタイプのものである。もう1つの実施形態では、抗原はCD19、CD20、CD37、CD40およびL6からなる群から選択される。上記の融合タンパク質のさらなる特定の実施形態では、このリンカーポリペプチドはGly-Gly-Gly-Gly-Ser[配列番号21]のアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチドを含み、その他の特定の実施形態では、このリンカーポリペプチドはGly-Gly-Gly-Gly-Ser[配列番号21]のアミノ酸配列を有するポリペプチドの少なくとも3つのリピートを含む。特定の実施形態では、この免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドはヒトIgAヒンジ領域ポリペプチドを含む。特定の実施形態では、この結合ドメインポリペプチドはCD154細胞外ドメインを含む。特定の実施形態では、この結合ドメインポリペプチドはCD154細胞外ドメインおよび少なくとも1つの免疫グロブリン可変領域ポリペプチドを含む。

【００２７】

他の実施形態では、本発明は、上記のいずれかの結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチドを提供し、関連の実施形態では、本発明は、かかるポリヌクレオチドを含む組換え発現構築物を提供し、さらなる特定の実施形態では、本発明は、かかる組換え発現構築物で形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。もう1つの実施形態では、本発明は、結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質の作製方法であって、(a)上記の宿主細胞を結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質の発現を可能とする条件下で培養し；さらに(b)その宿主細胞培養物から結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質を単離するステップを含む方法を提供する。

【００２８】

本発明はまた、特定の実施形態において上記の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質を生理学上許容される担体とともに含む医薬組成物を提供する。もう1つの実施形態では、治療上有効量の上記結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質を患者に投与することを含む、悪性症状またはB細胞疾患を有する、または有することが疑われる被験体を治療する方法を提供する。さらなる特定の実施形態では、この悪性症状またはB細胞疾患はB細胞リンパ腫または自己抗体の産生を特徴とする疾病であり、他の特定の実施形態では、この悪性症状またはB細胞疾患は慢性関節リウマチ、重症性筋無力症、グレーブス病、I型糖尿病、多発性硬化症または自己免疫疾患である。

【００２９】

本発明のこれら、およびその他の態様は以下の詳細な説明および添付の図面を参照すれば明らかとなる。本明細書に開示されている参照文献は全て出典明示によりその全内容があたかも個々に組み入れられているように本明細書の一部とする。

【図面の簡単な説明】

【００３０】

【図１Ａ】CD20と特異的に結合し得る結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質である2H7 scFv-IgのDNAおよび推定アミノ酸配列[配列番号__]を示す。

【図１Ｂ】CD20と特異的に結合し得る結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質である2H7 scFv-IgのDNAおよび推定アミノ酸配列[配列番号__]を示す。

【図２】トランスフェクトされた安定なCHO系統による2H7 scFv-Igの産生レベルおよび精製2H7 scFv-IgとCD20発現CHO細胞との結合による標準曲線の作製を示す。

【図３】単離2H7scFv-Igタンパク質の複数の調製物のSDS-PAGE解析を示す。

【図４Ａ】2H7scFv-Igによる補体結合(図4A)および抗体依存性細胞傷害作用(ADCC、図4B))を示す。

【図４Ｂ】2H7scFv-Igによる補体結合(図4A)および抗体依存性細胞傷害作用(ADCC、図4B))を示す。

【図５】正常B細胞の増殖に対するCD20およびCD40の同時連結の作用を示す。

【図６】Bリンパ芽球細胞系統におけるCD95の発現およびアポトーシスの誘導に対するCD20およびCD40の同時連結の作用を示す。

【図７Ａ】CD20およびCD40と特異的に結合し得る結合ドメイン-免疫グロブリン融合タン

パク質2H7scFv-CD154 L2(図7A、配列番号__)および2H7scFv-CD154 S4(図7B、配列番号__)のDNAおよび推定アミノ酸配列[配列番号__]を示す。
【図７Ｂ】CD20およびCD40と特異的に結合し得る結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質2H7scFv-CD154 L2(図7A、配列番号__)および2H7scFv-CD154 S4(図7B、配列番号__)のDNAおよび推定アミノ酸配列[配列番号__]を示す。
【図７Ｃ】CD20およびCD40と特異的に結合し得る結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質2H7scFv-CD154 L2(図7A、配列番号__)および2H7scFv-CD154 S4(図7B、配列番号__)のDNAおよび推定アミノ酸配列[配列番号__]を示す。
【図７Ｄ】CD20およびCD40と特異的に結合し得る結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質2H7scFv-CD154 L2(図7A、配列番号__)および2H7scFv-CD154 S4(図7B、配列番号__)のDNAおよび推定アミノ酸配列[配列番号__]を示す。
【図８】フローイムノサイトフルオリメトリーによる2H7scFv-CD154結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質とCD20+CHO細胞との結合を示す。
【図９】2H7scFv-CD154結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質と細胞との結合後のアネキシンVとB細胞系統Ramos、BJABおよびT51との結合を示す。
【図１０】2H7scFv-CD154結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質の結合後のB細胞系統T51の増殖に対する作用を示す。
【図１１】CytoxBまたはCytoxB誘導体:CytoxB-MHWTG1C(2H7 ScFv、変異型ヒンジ、野生型ヒトIgG1 Fcドメイン)、CytoxB-MHMG1C(2H7 ScFv、変異型ヒンジ、変異型ヒトIgG1 Fcドメイン)およびCytoxB-IgAHWTHG1C(2H7 ScFv、ヒトIgA由来ヒンジ[配列番号__]、野生型ヒトIgG1 Fcドメイン)と呼ばれる2H7ScFv-Ig融合タンパク質[配列番号__]の構造の模式図を示す。矢印はFcR結合およびADCC活性(濃い矢印)、および補体結合(薄い矢印)に関与すると考えられるアミノ酸残基の位置番号を示す。鎖間ジスルフィド結合が存在しないことに着目。
【図１２】単離CytoxBおよび2H7scFv-CD154結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質のSDS-PAGE解析を示す。
【図１３】CytoxB誘導体の抗体依存細胞媒介性細胞傷害作用(ADCC)活性を示す。
【図１４】CytoxB誘導体の補体依存細胞傷害作用(CDC)を示す。
【図１５】マカク血液サンプルにおけるCytoxB-MHWTG1Cの血清半減期の測定を示す。
【図１６】マカク血液サンプルにおける循環CD40+B細胞のレベルに対するCytoxB-MHWTG1の作用を示す。
【図１７】トランスフェクト哺乳類細胞系統によるHD37(CD19特異的)ScFv-Igの産生レベルおよび精製HD37 ScFv-IgとCD19発現細胞との結合による標準曲線の作製を示す。
【図１８】トランスフェクトされた安定なCHO系統によるL6(癌腫抗原)ScFv-Igの産生レベルおよび精製L6 ScFv-IgとL6抗原発現細胞との結合による標準曲線の作製を示す。
【図１９】結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質2H7 ScFv-Ig、HD37 ScFv-IgおよびG28-1(CD37特異的)ScFv-IgのADCC活性を示す。
【図２０】L6 ScFv-Ig融合タンパク質のADCC活性を示す。
【図２１】L6 ScFv-Igおよび2H7 ScFv-Ig融合タンパク質のSDS-PAGE解析を示す。
【図２２】G28-1 ScFv-IgおよびHD37 ScFv-Ig融合タンパク質のSDS-PAGE解析を示す。
【００３１】
(本発明の詳細な説明)
本発明は、免疫治療および免疫診断用途に有用であって、先行技術の抗原特異的ポリペプチドに優る特定の利点を供する結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質、ならびに関連の組成物および方法を目的とする。本発明の融合タンパク質は好ましくは適切な部分として以下の融合ドメイン：結合ドメインポリペプチド、免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチド、免疫グロブリン重鎖CH2不変領域ポリペプチド、および免疫グロブリン重鎖CH3不変領域ポリペプチドを含むポリペプチド一本鎖である。特に好ましい実施形態では、その結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質のポリペプチドドメインはヒト遺伝子配列の産物であるポリペプチドを含むか、またはそれに由来するものであるが、本発明はこ

れに限定される必要はなく、実際には、本明細書に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質に関する遺伝子操作ポリペプチドおよび／または変異型ポリペプチドをはじめ、いずれの天然源または人工源に由来するものであってもよい。

【００３２】

本発明は1つには、本明細書に記載の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質が免疫活性能を有するという驚くべき知見に関する。より詳しくは、これらのタンパク質は、そのようなエフェクター活性を促進し得るとは予測されない構造を有するにもかかわらず、抗体依存細胞媒介性細胞傷害作用(ADCC、例えば適当な条件下で、細胞表面への抗原の結合に続いて起こる、FcRγIIIを有するナチュラルキラー(NK)細胞など、適当なFcレセプターを有する細胞傷害性エフェクター細胞の会合および誘導)および／または補体依存細胞傷害作用(CDC、例えば細胞表面への抗原の結合に続いて起こる、血液補体カスケードの成分である細胞溶解タンパク質の動員および活性化)の補体結合をはじめとする周知の免疫エフェクター活性に関与する能力を保持する。以下にさらに詳細に記載するが、ADCCおよびCDCは対象となる融合タンパク質に対して選択された構造、特に、鎖間ホモ二量体ジスルフィド結合を形成し得るそれらの能力に妥当なヒンジ領域ポリペプチドの選択に好ましい免疫グロブリン重鎖領域を含む単量体タンパク質にとっては予測できない作用である。

【００３３】

本発明によって与えられるもう1つの利点は先行技術の一本鎖抗体構築物で通常得られるものより典型的に多い実質的量で産生することができる結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドである。好ましい実施形態では、本発明の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質は哺乳類発現系で組換え発現され、in vivoで(例えば、生理条件下で)安定なポリペプチドを提供するという利点を供する。特定の理論に限定されるものではないが、このような安定性は1つには融合タンパク質の翻訳後修飾、具体的にはグリコシル化によるものであり得る。組換え哺乳類発現を通じた本発明の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質の産生は静置細胞培養物において培養上清1リットル当たり50mgを超えるレベルで得られており、通常、このような培養物では10～50mg/lで認められ、従って、静置培養条件下では少なくとも10～50mg/lが産生されることが好ましく、また、「フェッドバッチ(fed batch)」(すなわち、非静置)産生などの当技術分野で受け入れられているスケールアップ法を用いて融合タンパク質の産生向上も考えられ、これによればタンパク質産物にもよるが、少なくとも5-500mg/l、場合によっては少なくとも0.5～1gm/lの収率が得られる。

【００３４】

本発明によれば結合ドメインポリペプチドはコグネイト生体分子、あるいは1を超える分子の複合体、または安定的なものであれ一時的なものであれ、このような分子の集合体または凝集体を特異的に認識して結合する能力を有するいずれのポリペプチドであってもよく、このような分子としてはタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、アミノ酸、またはその誘導体；脂質、脂肪酸など、またはその誘導体；炭水化物、糖など、またはその誘導体；核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、プリン、ピリミジンもしくは関連の分子、またはその誘導体など；あるいは例えば糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、リポタンパク質、タンパク脂質などのそのいずれかの組合せ；あるいは生体サンプルに存在し得る他のいずれかの生体分子が挙げられる。生体サンプルは血液サンプル、生検標本、組織外植片、器官培養物、体液またはその他被験体もしくは生物源のいずれかの組織もしくは細胞調製物を採取することで得られる。被験体または生物源はヒトもしくは非ヒト動物、一次細胞培養物、限定されるものではないが、染色体に組み込まれているかエピソーム組換えされた核酸配列を含み得る遺伝子操作細胞系統、不死化された、もしくは不死化可能な細胞系統、体細胞雑種細胞系統、分化した、もしくは分化可能な細胞系統、形質転換された細胞系統などをはじめとする培養に適合した細胞系統であり得る。本発明の特定の好ましい実施形態では、被験体または生物源は上記で示した悪性症状またはB細胞疾患を有することが疑われる、またはそのリスクがあるものであり、さらなる特定の好ましい実施形態では自己免疫疾患であり、本発明のその他の特定の好ましい実施形態では、この被験体または

生物源はかかる疾病のリスクがない、またはかかる疾病が存在しないことが分かっているものであり得る。

【００３５】

従って結合ドメインポリペプチドは目的の標的構造をとる、本明細書で示されたコグネイト生体分子(本明細書では「抗原」と呼ぶ)の天然に存在する、または組換え産生された結合相手であってもよいが、本開示によれば本発明の融合タンパク質が特異的に結合することが望ましい、いずれの標的生体分子も包含するものとする。結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質は「免疫特異的」である、すなわちそれらが結合するならば、本明細書で示される抗原などの所望の標的分子と、約10^4M^{-1}以上、好ましくは約10^5M^{-1}以上、より好ましくは約10^6M^{-1}以上、いっそう好ましくは約10^7M^{-1}のK_aで特異的に結合し得るものと定義される。本発明の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質の親和性は常法、例えばScatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660 (1949)に記載の方法を用いて容易に測定することができる。このような目的の標的抗原と結合する融合タンパク質の決定はもまた、他のタンパク質またはポリペプチドと特異的に相互作用するタンパク質を同定および獲得する多くの公知の方法のいずれか、例えば米国特許第5,283,173号および同第5,468,614号に記載のものなどの酵母ツーハイブリッドスクリーニング系を用いて行うことができる。

【００３６】

本発明の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質の好ましい実施形態は、本明細書に記載の抗原またはその他目的の標的構造と特異的に結合する限り、重鎖または軽鎖V領域の全てまたは一部またはフラグメントなど、少なくとも1つの免疫グロブリン可変領域ポリペプチドを含む結合ドメインを含む。他の好ましい実施形態では、結合ドメインは、少なくとも1つの免疫グロブリン軽鎖V領域の全てまたは一部および少なくとも1つの免疫グロブリン重鎖V領域の全てまたは一部を含んでもよく、それらのV領域と融合したリンカーをさらに含む、一本鎖免疫グロブリン由来Fv産物を含み、このような構築物の調製および試験は本明細書にさらに詳細に記載され、また当技術分野でも周知のものである。その他の結合ドメインポリペプチドは、非免疫グロブリンをはじめ、本明細書で示される抗原と特異的に結合する能力を保持するいずれかのタンパク質またはその一部を含み得る。従って本発明では、ホルモン、サイトカイン、ケモカインなどのようなポリペプチドリガンド；このようなポリペプチドリガンドの細胞表面または可溶性レセプター；レクチン；特異的白血球インテグリン、セレクチン、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーメンバー、細胞間接着分子(ICAM-1、-2、-3)などのような細胞間接着レセプター；組織適合性抗原などに由来する結合ドメインポリペプチドを含む融合タンパク質を意図する。

【００３７】

結合ドメインポリペプチドを提供し、かつ、本発明の結合ドメイン-Ig融合タンパク質が望ましく結合する標的分子または抗原としても選択され得る細胞表面レセプターの例としては次のものなどが挙げられる：HER1(例えば、GenBank受託番号U48722、SEG_HEGFREXS, KO3193)、HER2(Yoshino et al., 1994 J. Immunol. 152:2393; Disis et al., 1994 Canc. Res. 54:16;また例えば、GenBank受託番号X03363、M17730、SEG_HUMHER20も参照)、HER3(例えば、GenBank受託番号U29339、M34309)、HER4(Plowman et al., 1993 Nature 366:473;また例えば、GenBank受託番号L07868、T64105も参照)、上皮成長因子レセプター(EGFR)(例えば、GenBank受託番号U48722、SEG_HEGFREXS、KO3193)、血管内皮細胞成長因子(例えば、GenBank受託番号M32977)、血管内皮細胞成長因子レセプター(例えば、GenBank受託番号AF022375、1680143、U48801、X62568)、インスリン様成長因子-I(例えば、GenBank受託番号X00173、X56774、X56773、X06043、また、欧州特許第GB2241703号も参照)、インスリン様成長因子-II(例えば、GenBank受託番号X03562、X00910、SEG_HUMGFIA、SEG_HUMGFI2、M17863、M17862)、トランスフェリンレセプター(Trowbridge and Omary, 1981 Proc. Nat. Acad. USA 78:3039;また例えば、GenBank受託番号X01060、M11507も参照)、エストロゲンレセプター(例えば、GenBank受託番号M38651、X03635、X99101、U47678、M12674)、プロゲステロンレセプター(例えば、GenBank受託番号X51730、X69068、M15716)、卵胞

刺激ホルモンレセプター(FSH-R)(例えば、GenBank受託番号Z34260、M65085)、レチノイン酸レセプター(例えば、GenBank受託番号L12060、M60909、X77664、X57280、X07282、X06538)、MUC-1(Barnes et al., 1989 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:7159;また例えば、GenBank受託番号SEG_MUSMUCIO、M65132、M64928も参照)、NY-ESO-1(例えば、GenBank受託番号AJ003149、U87459)、NA 17-A(例えば、欧州特許第WO96/40039号)、Melan-A/MART-1(Kawakami et al., 1994 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3515;また例えば、GenBank受託番号U06654、U06452も参照)、チロシナーゼ(Topalian et al., 1994 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:9461;また例えば、GenBank受託番号M26729、SEG_HUMTYR0も参照、またWeber et al., J. Clin. Invest (1998) 102:1258も参照)、Gp-100(Kawakami et al., 1994 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3515;また例えば、GenBank受託番号S73003も参照、また欧州特許第EP668350; Adema et al., 1994 J. Biol. Chem. 269:20126も参照)、MAGE(van den Bruggen et al., 1991 Science 254:1643;また例えば、GenBank受託番号U93163、AF064589、U66083、D32077、D32076、D32075、U10694、U10693、U10691、U10690、U10689、U10688、U10687、U10686、U10685、L18877、U10340、U10339、L18920、U03735、M77481)、BAGE(例えば、GenBank受託番号U19180、また米国特許第5,683,886号および同第5,571,711号も参照)、GAGE(例えば、GenBank受託番号AF055475、AF055474、AF055473、U19147、U19146、U19145、U19144、U19143、U19142)、特にSSX2遺伝子によってコードされるHOM-MEL-40抗原を含むCTAクラスのレセプターのいずれか(例えば、GenBank受託番号X86175、U90842、U90841、X86174)、癌胎児抗原(CEA, Gold and Freedman, 1985 J. Exp. Med. 121:439;また例えば、GenBank受託番号SEG_HUMCEA、M59710、M59255、M29540も参照)、およびPyLT(例えば、GenBank受託番号J02289、J02038)。

【００３８】

結合ドメインポリペプチドの供給源であり得るか、またはコグネイト抗原であり得るさらなる細胞表面レセプターとしては次のものなどが挙げられる：CD2(例えば、GenBank受託番号Y00023、SEG_HUMCD2、M16336、M16445、SEG_MUSCD2、M14362)、4-1BB(CDw137, Kwon et al., 1989 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:1963)、4-1BBリガンド(Goodwin et al., 1993 Eur. J. Immunol. 23:2361; Melero et al., 1998 Eur. J. Immunol. 3:116)、CD5(例えば、GenBank受託番号X78985、X89405)、CD10(例えば、GenBank受託番号M81591、X76732)、CD27(例えば、GenBank受託番号M63928、L24495、L08096)、CD28(June et al., 1990 Immunol. Today 11:211;また例えば、GenBank受託番号J02988、SEG_HUMCD28、M34563も参照)、CTLA-4(例えば、GenBank受託番号L15006、X05719、SEG_HUMIGCTL)、CD40(例えば、GenBank受託番号M83312、SEG_MUSC040A0、Y10507、X67878、X96710、U15637、L07414)、インターフェロン-γ(IFN-γ;また例えば、Farrar et al. 1993 Ann. Rev. Immunol. 11:571およびそこに挙げられている参照文献, Gray et al. 1982 Nature 295:503, Rinderknecht et al. 1984 J. Biol. Chem. 259:6790, DeGrado et al. 1982 Nature 300:379も参照)、インターロイキン-4(IL-4;また例えば、53rd Forum in Immunology, 1993 Research in Immunol. 144:553-643; Banchereau et al., 1994 in The Cytokine Handbook, 2nd ed., A. Thomson, ed., Academic Press, NY, p. 99; Keegan et al., 1994 J Leukocyt. Biol.. 55:272およびそこに挙げられている参照文献参照)、インターロイキン-17(IL-17)(例えば、GenBank受託番号U32659、U43088)およびインターロイキン-17レセプター(IL-17R)(例えば、GenBank受託番号U31993、U58917)。以上にもかかわらず、本発明は米国特許第5,807,734号および同第5,807,734号に開示されるいずれの免疫グロブリン融合タンパク質も明らかに含まない。

【００３９】

結合ドメインポリペプチドの供給源であり得るか、またはコグネイト抗原であり得るさらなる細胞表面レセプターとしては次のものなどが挙げられる：CD59(例えば、GenBank受託番号SEG_HUMCD590、M95708、M34671)、CD48(例えば、GenBank受託番号M59904)、CD58/LFA-3(例えば、GenBank受託番号A25933、Y00636、E12817;また日本国特許JP1997075090-Aも参照)、CD72(例えば、GenBank受託番号AA311036、S40777、L35772)、CD70(例えば、GenBank受託番号Y13636、S69339)、CD80/B7.1(Freeman et al., 1989 J. Immunol. 43:2714; F

reeman et al., 1991 J. Exp. Med. 174:625;また例えば、GenBank受託番号U33208、I683379)、CD86/B7.2(Freeman et al., 1993 J. Exp. Med. 178:2185, Boriello et al., 1995 J. Immunol. 155:5490;また例えば、GenBank受託番号AF099105、SEG_MMB72G、U39466、U04343、SEG_HSB725、L25606、L25259)、CD40リガンド(例えば、GenBank受託番号SEG_HUMCD40L、X67878、X65453、L07414)、IL-17(例えば、GenBank受託番号U32659、U43088)、CD43(例えば、GenBank受託番号X52075、J04536)およびVLA-4($\alpha_4\beta_7$)(例えば、GenBank受託番号L12002、X16983、L20788、U97031、L24913、M68892、M95632)。次の細胞表面レセプターは典型的にB細胞と会合する：CD19(例えば、GenBank受託番号SEG_HUMCD19W0、M84371、SEG_MUSCD19W、M62542)、CD20(例えば、GenBank受託番号SEG_HUMCD20、M62541)、CD22(例えば、GenBank受託番号I680629、Y10210、X59350、U62631、X52782、L16928)、CD30リガンド(例えば、GenBank受託番号L09753、M83554)、CD37(例えば、GenBank受託番号SEG_MMCD37X、X14046、X53517)、CD106(VCAM-1)(例えば、GenBank受託番号X53051、X67783、SEG_MMVCAM1C、また米国特許第5,596,090号も参照)、CD54(ICAM-1)(例えば、GenBank受託番号X84737、S82847、X06990、J03132、SEG_MUSICAM0)、インターロイキン-12(例えば、Reiter et al, 1993 Crit. Rev. Immunol. 13:1およびそこに挙げられている参照文献参照)。また、補助細胞剤としては、典型的に樹状細胞と会合する次の細胞表面レセプターのいずれかが挙げられる：CD83(例えば、GenBank受託番号AF001036、AL021918)、DEC-205(例えば、GenBank受託番号AF011333、U19271)。

【００４０】

上記で論じた免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドとしては、天然に存在する、または人工ペプチドとしての、もしくは遺伝子操作の結果としてのものであって、CH1およびCH2領域における鎖内免疫グロブリン-ドメインジスルフィド結合の形成に関与するアミノ酸残基間の免疫グロブリン重鎖ポリペプチドに位置するいずれのヒンジペプチドまたはポリペプチドも含み、本発明で用いるヒンジ領域ポリペプチドとしてはまた、変異型ヒンジ領域ポリペプチドも含み得る。従って、免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドは上記のように、従来ヒンジ機能を有するものとされている免疫グロブリンポリペプチド鎖領域に由来するものであってもよいし、あるいはその一部またはフラグメント(すなわち、ペプチド結合の1以上のアミノ酸、典型的には5～65のアミノ酸、好ましくは10～50、より好ましくは15～35、いっそう好ましくは18～32、いっそう好ましくは20～30、いっそう好ましくは21、22、23、24、25、26、27、28または29のアミノ酸)であってもよい。しかしながら、本発明で用いるヒンジ領域ポリペプチドはこのように限定する必要はなく、CH1ドメインまたはCH2ドメインなどの隣接する免疫グロブリンドメイン、または人為的に操作した特定の免疫グロブリン構築物の場合には免疫グロブリン可変領域ドメインに位置するアミノ酸を含み得る(当技術分野で知られているように、様々であり得る特定のドメインに対して特定の残基を割り付ける構造基準に従う)。

【００４１】

野生型免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドとしては、免疫グロブリンの不変領域ドメインCH1およびCH2の間に位置する天然型のヒンジ領域のいずれもを含む。野生型免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドは好ましくはヒトIgG免疫グロブリン由来のヒンジ領域、より好ましくはヒトIgG1イソ型由来のヒンジ領域ポリペプチドを含むヒト免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドであることが好ましい。当技術分野で公知のように、免疫グロブリンアミノ酸配列が全体として著しく多様であるにもかかわらず、免疫グロブリンの一次構造は、免疫グロブリンポリペプチド鎖の特定の部分において、顕著にはそれらのメルカプト基によって、利用可能な他のメルカプト基とのジスルフィド結合の形成の可能性を与えるシステイン残基の存在に関して高い程度の配列保存を示す。従って、本発明の内容では、野生型免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドは1以上の高度に保存された(例えば統計学的に有意な割合で優勢である)システイン残基を特徴とするものであると考えられ、特定の好ましい実施形態では、変異型ヒンジ領域ポリペプチドはシステイン残基を含まないか、または1つ含み、かつ、 かかる野生型ヒンジ領域に由来するものが選択され得る。

【００４２】

変異型免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドはCH2およびCH3ドメインのものとは異なる種、免疫グロブリンイソ型もしくはクラス、または免疫グロブリンサブクラスの免疫グロブリンにその起源を有するヒンジ領域を含み得る。例えば、本発明の特定の実施形態では、結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質は、本明細書に記載のようにシステイン残基を含まないか、または1個のみ含む野生型ヒトIgAヒンジ領域ポリペプチドまたは変異型ヒトIgAヒンジ領域ポリペプチドを含む免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドと融合した結合ドメインポリペプチドを含み得る。このようなヒンジ領域ポリペプチドは別のIgイソ型またはクラス、例えばIgGサブクラス(特定の好ましい実施形態ではIgG1サブクラスである)由来の免疫グロブリン重鎖CH2領域ポリペプチドと融合されていてもよい。

【００４３】

例えば、以下にさらに詳細に記載するが、本発明の特定の実施形態では、免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドは天然型として3つのシステインを含む野生型ヒトIgAヒンジ領域に由来しするものから選択され、ここでその選択されたヒンジ領域ポリペプチドは1個のシステイン残基のみが残るように、完全ヒンジ領域に対して末端切断されている(例えば、配列番号35～36)。同様に、本発明の他の特定の実施形態では、結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質は、アミノ酸置換または欠失によりシステイン残基の数が減っている変異型ヒンジ領域ポリペプチドを含む免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドと融合した結合ドメインポリペプチドを含む。このように変異型ヒンジ領域ポリペプチドは1以上のシステイン残基を含む野生型免疫グロブリンヒンジ領域に由来するものであってもよい。特定の実施形態では、変異型ヒンジ領域ポリペプチドはシステイン残基を含まないか、または1個のみ含んでよく、この変異型ヒンジ領域ポリペプチドはそれぞれ1以上または2以上のシステイン残基を含む野生型免疫グロブリンヒンジ領域に由来するものである。この変異型ヒンジ領域ポリペプチドにおいては、野生型免疫グロブリンヒンジ領域のシステイン残基はジスルフィド結合を形成できないアミノ酸で置換されていることが好ましい。本発明のある実施形態では、変異型ヒンジ領域ポリペプチドは、4つのヒトIgGイソ型サブクラスIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のいずれかを含んでなり得るヒトIgG野生型ヒンジ領域ポリペプチドに由来する。特定の好ましい実施形態では、変異型ヒンジ領域ポリペプチドはヒトIgG1野生型ヒンジ領域ポリペプチドに由来する。例としては、ヒトIgG1野生型ヒンジ領域ポリペプチド由来の変異型ヒンジ領域ポリペプチドは野生型免疫グロブリンヒンジ領域の3つのシステイン残基のうち2つにおける突然変異、または3つのシステイン残基全てにおける突然変異を含み得る。

【００４４】

野生型免疫グロブリンヒンジ領域に存在し、かつ、本発明の特に好ましい実施形態の突然変異誘発によって除去されるシステイン残基としては、鎖間ジスルフィド結合を形成する、または形成し得るシステイン残基が挙げられる。理論に拘束されるものではないが、本発明は鎖間ジスルフィド架橋の形成に関与すると考えられているかかるヒンジ領域システイン残基の突然変異が、驚くことに、その融合タンパク質が抗体依存細胞媒介性細胞傷害作用(ADCC)を促進する、または補体と結合する能力をなくすことなく、鎖間ジスルフィド結合の形成を介して本発明の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質の二量体(またはより高次のオリゴマー)形成能を低下させることを意図する。特に、ADCC(例えば、FcRIII、CD16)を媒介するFcレセプター(FcR)は免疫グロブリンFcドメインに対して低い親和性を示すが、このことはFcとFcRとの機能的結合には通常の抗体の重鎖の二量体構造によるFc-FcR複合体のアビディティの安定化、および／または通常のAb Fc構造によるFcRの凝集および架橋を必要とする(Sonderman et al., 2000 Nature 406:267; Radaev et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:16469; Radaev et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:16478; Koolwijk et al., 1989 J. Immunol. 143:1656; Kato et al., 2000 Immunol. Today 21:310)。よって、本発明の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質は一本鎖免疫グロブリン融合タンパク質に付随した利点を提供しながら、予期されないことに免疫活性を保持している。同様に、補体と結合する能力もFcを含むものなどの重鎖不変領域に関して二量体である免疫グロブリンに不随しているのが典型であり、それと同時に本発明の結合ドメイン

-免疫グロブリン融合タンパク質は予期されない補体結合能を示す。

【００４５】

上記で示したように、結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質は、限定されない理論によれば、それらの二量体形成能に妥当なものであると考えられ、さらに理論によれば、この特性は融合タンパク質の構築に含めることを目的に選択された免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに存在するシステイン残基の数が減る結果である。ポリペプチドの相対的二量体形成能の決定は十分関連技術の知識の範囲内であり、確立されているいくつかの方法論のうちのいずれかを適用してタンパク質の二量体形成を検出することができる(例えば、Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, 1987 Springer-Verlag, New York参照)。例えば、分子サイズをもとにタンパク質を分離する生化学的分離技術(例えば、ゲル電気泳動、ゲル濾過クロマトグラフィー、分析的超遠心分離など)、および／またはメルカプト活性剤(例えば、ヨードアセトアミド、N-エチルマレイミド)またはジスルフィド還元剤(例えば、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール)導入前後のタンパク質の物理化学的特性の比較、またはその他同等の方法論は全てポリペプチドの二量体形成またはオリゴマー形成の程度の測定、およびこのような、とり得る第四級構造に対するジスルフィド結合の可能性のある関与の判断のために用いることができる。特定の実施形態では、本発明は、本明細書で示されるように野生型ヒト免疫グロブリンGヒンジ領域ポリペプチドに比べて低い(すなわち、適当なIgG由来対照に対して統計学的に有意に)二量体形成能を示す結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質に関する。従って、当業者ならば特定の融合タンパク質がこのような低い二量体形成能を示すかどうかを容易に決定することができる。

【００４６】

免疫グロブリン融合タンパク質の調製のための組成物および方法は例えば単一コードポリヌクレオチドの産物であるが、本発明の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質ではない組換え抗体を開示する米国特許第5,892,019号に記載されているものなど、当業者で周知である。

【００４７】

ヒトでの使用を意図した本発明の免疫グロブリン融合タンパク質では、可能性のある抗ヒト免疫応答を最小にし、適当なエフェクター機能を提供するためにこれらの不変領域は典型的にはヒト配列起源のものとなる。抗体不変領域をコードする配列の操作は、Morrison and OiのPCT公報WO89/07142に記載されている。特に好ましい実施形態では、CH1ドメインは欠失され、結合ドメインのカルボキシ末端、または結合ドメインが2つの免疫グロブリン可変領域ポリペプチドを含む場合には第2の(すなわち、C末端により近い)可変領域はヒンジ領域を介してCH2のアミノ酸末端に連結される。二例の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質の構造を示した模式図が図11に示されているが、ここで、特に好ましい実施形態では鎖間ジスルフィド結合は存在せず、他の実施形態では、野生型ヒンジ領域ポリペプチドが代わりに存在した場合に存在する結合の数に比べて限定された数の鎖間ジスルフィド結合しか存在せず、また、他の実施形態では、融合タンパク質は野生型ヒトIgGヒンジ領域ポリペプチドに比べて低い二量体形成能を示す変異型ヒンジ領域ポリペプチドを含むことを注記しておかねばならない。このように、この単離ポリヌクレオチド分子は、選択された抗原に対して特異的結合親和性を提供する結合ドメインを有する一本鎖免疫グロブリン融合タンパク質をコードする。

【００４８】

上記に示したように、特定の実施形態では、結合タンパク質-免疫グロブリン融合タンパク質は軽鎖または重鎖変領域ポリペプチドであり得る少なくとも1つの免疫グロブリン可変領域ポリペプチドを含み、また特定の実施形態では、融合タンパク質は少なくとも1つのかかる軽鎖V領域と1つのかかる重鎖V領域およびこれらV領域の各々と融合した少なくとも1つのリンカーペプチドを含む。このような結合ドメイン、例えば一本鎖Fvドメインの構築は当技術分野で周知のものであり、以下の実施例にもさらに詳細に記載され、また、例えば米国特許第5,892,019号およびそこに挙げられている参照文献にも記載されており

、一本鎖可変領域、ならびに重鎖由来および軽鎖由来V領域の各々と融合させ得るリンカーポリペプチドの選択および構築(例えば、一本鎖Fvポリペプチドを含む結合ドメインを作出するため)も当技術分野で公知であり、本明細書にも記載され、また、例えば米国特許第5,869,620号、同第4,704,692号および同第4,946,778号にも記載されている。特定の実施形態では、非ヒト源に由来する免疫グロブリン配列の全てまたは一部はヒト化抗体、すなわちヒト免疫系がこのようなタンパク質を外来のものとして認識する程度を引き下げるためにヒトIg配列が導入される免疫グロブリン配列の作出を目的に認知されている手法に従って「ヒト化」してもよい(例えば、米国特許第5,693,762号、同第5,585,089号、同第4,816,567号、同第5,225,539号、同第5,530,101号およびそこに挙げられている参照文献参照)。

【００４９】

本明細書で示したような結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質がひと度デザインされれば、そのポリペプチドをコードするDNAを、例えばSinha et al., Nucleic Acids Res., 12, 4539-4557 (1984)に記載のようなオリゴヌクレオチド合成によって合成し、例えばInnis, Ed., PCR Protocols, Academic Press (1990)、またBetter et al. J. Biol. Chem. 267, 16712-16118 (1992)に記載のようなPCRによって構築し、例えばAusubel et al., Eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York (1989)、またRobinson et al., Hum. Antibod. Hybridomas, 2, 84-93 (1991)に記載のような標準的手法によってクローニングおよび発現させ、さらに例えばHarlow et al., Eds., Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988)およびMunson et al., Anal. Biochem., 107, 220-239 (1980)に記載のように特異的抗原結合活性について試験することができる。

【００５０】

Fv領域の単一ポリペプチド鎖結合分子、すなわち一本鎖Fv分子の調製は出典明示により本明細書に組み入れる米国特許第4,946,778号に記載されている。本発明では、一本鎖Fv様分子は重鎖または軽鎖の第1の可変領域をコードし、それぞれ対応する軽鎖または重鎖の可変領域に対する1以上のリンカー続けることで合成される。2つの可変領域間の適当なリンカーの選択については米国特許第4,946,778号に記載されている。本明細書に記載されるリンカー例は$(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_3$である。このリンカーを用いて、自然凝集しているが化学的に分離する重鎖および軽鎖を単一ポリペプチド鎖のアミノ末端抗原結合部分へと変換するが、この抗原結合部分は2つのポリペプチド鎖からなる元の構造と同様の構造へと折りたたむことから、目的抗原との結合能を保持する。リンカーをコードする配列によって連結される重鎖および軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は抗体不変領域をコードするヌクレオチド配列と連結される。これらの不変領域は結果として得られたポリペプチドに鎖間ジスルフィド結合を形成させて二量体を形成させ、抗体依存細胞傷害作用(ADCC)を媒介する能力など所望のエフェクター機能を含むものである。ヒトでの使用を意図した本発明の免疫グロブリン様分子としては、これらの不変領域は可能性のある抗ヒト免疫応答を最小にし、かつ、エフェクター機能に妥当性を与えるために実質的にヒトであることが典型である。抗体不変領域をコードする配列の操作は、出典明示により本明細書に組み入れるMorrison and OiのPCT公報WO89/07142に記載されている。好ましい実施形態では、CH1ドメインは欠失され、第2の可変領域のカルボキシ末端はヒンジ領域を介してCH2のアミノ酸末端に連結されている。軽鎖の対応するCysとジスルフィド結合を形成して天然抗体分子の重鎖および軽鎖を折りたたむヒンジのCys残基は欠失させてもよいし、あるいは好ましくは例えばPro残基などで置換する。

【００５１】

上記のように、本発明は本明細書で示す結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質の発現を命令し得る組換え発現構築物を提供する。本明細書に言及される種々のアミノ酸配列に見られるアミノ酸は公知の三文字または一文字略号に従って示されている。本明細書で言及される種々のDNA配列またはその断片に見られるヌクレオチドは当技術分野で通常用いられる標準的な一文字表記で示されている。記載のアミノ酸配列は例えば例示であっ

て限定されるものではないが、共有結合化学修飾、挿入、欠失および置換など微細な変化のみを有する同等のアミノ酸配列も包含してもよく、さらに保存的置換も含み得る。互いによく似たアミノ酸配列は実質的な配列相同領域を共有し得る。同様に、ヌクレオチド配列も、例えば例示であって限定されるものではないが、共有結合化学修飾、挿入、欠失および置換など微細な変化のみを有する実質的に同等のヌクレオチド配列も包含し、さらに遺伝コードの縮重によるサイレント変異も含み得る。互いによく似たヌクレオチド配列は実質的な配列相同領域を共有し得る。

【００５２】

被験体における悪性症状の存在とは、例えば新生物、腫瘍、非接触阻害または発癌転換細胞などをはじめとする被験体における異形成、癌化および／または悪性転換細胞の存在をさす。本発明が意図する好ましい実施形態では、例えばかかる癌細胞は、リンパ系の悪性転換細胞、特にB細胞リンパ腫などの悪性造血系細胞であり、特定の好ましい実施形態では、癌細胞は癌腫細胞などの上皮細胞であってもよい。本発明はまたB細胞疾患も包含し、B細胞を侵す特定の悪性症状(例えば、B細胞リンパ腫)を含み得るが、これに限定されるものではなく、自己免疫疾患、特に自己抗体の産生を特徴とする疾病、疾患および症状も含む。

【００５３】

自己抗体とは自己抗原と反応する抗体である。自己抗体はいくつかの自己免疫疾患(すなわち、宿主免疫系が不適切な抗「自己」免疫反応を生じる疾病、疾患または症状)で検出され、そこではそれらが疾病の活動に関与している。これら自己免疫疾患の現行の治療薬は継続投与を要し、特異性を欠き、重い副作用を引き起こす免疫抑制剤である。最小の毒性で自己抗体の産生をなくし得る新しいアプローチは、多くの人々を侵す疾病範囲に必要なまだ見ぬ医療に取り組むものである。本発明の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質はリンパ組織への浸透を高めるようデザインされている。Bリンパ球の涸渇は自己抗体の産生サイクルを妨げ、骨髄の前駆体から新しいBリンパ球が産生される際に免疫系がリセットさせる。

【００５４】

限定されるものではないがある理論によれば、B細胞涸渇療法から有益な効果が得られるものと確信されるいくつかの疾病が確認されており、以下、これらの疾病のいくつかの例を簡単に説明する。

【００５５】

自己免疫甲状腺疾患としてはグレーブス病および橋本甲状腺炎が挙げられる。米国だけでも数形態の自己免疫甲状腺疾患を有する患者が約2千万人存在する。自己免疫甲状腺疾患は甲状腺を刺激して甲状腺機能亢進を引き起こす(グレーブス病)か、または甲状腺を破壊して甲状腺機能低下を引き起こす(橋本甲状腺炎)自己抗体の産生によるものである。甲状腺刺激は甲状腺刺激ホルモン(TSH)レセプターと結合してこれを活性化する自己抗体によって引き起こされる。甲状腺の破壊は他の甲状腺抗原と反応する自己抗体によって引き起こされる。

【００５６】

グレーブス病の現行の治療法としては、外科術、放射性ヨウ素、または抗甲状腺薬療法が挙げられる。抗甲状腺投薬は重い副作用を有し、疾病の再発率も高いことから放射性ヨウ素が広く用いられている。外科術は大きな甲状腺腫を有する患者、または極めて速やかな甲状腺機能の正常化が必要な場合に限られる。TSHレセプターの刺激に関与する自己抗体の産生をターゲッティングする治療法はない。橋本甲状腺炎の現行の治療法はレボチロキシンナトリウムであり、緩解の可能性は低いので、この治療法は通常延命措置である。抑制療法は橋本甲状腺炎において甲状腺腫を退縮させることが示されているが、自己抗体の産生を減らしてこの疾病メカニズムをターゲッティングする治療法は知られていない。

【００５７】

慢性関節リウマチ(RA)は腫脹、痛み、および機能欠損をきたす間接の炎症を特徴とする慢性疾患である。米国ではRAは推定250万人に達している。RAは初期感染または傷害、異常

な免疫応答、および遺伝的因子をはじめとする事柄の組合せによって引き起こされる。RAでは自己反応性T細胞およびB細胞が存在するが、RAの診断には関節に集まり、リウマチ因子と呼ばれる高レベルの抗体の検出が用いられる。RAの現行の治療法としては、痛みを管理し疾病の進行を遅らせる多くの投薬法が挙げられる。この疾病を治癒できる治療法はまだ見つかっていない。投薬法には非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDS)および疾病改善抗リウマチ薬(DMARDS)が挙げられる。NSAIDSは良性疾患には効果的であるが、重度のRAにおける関節の破壊および弱化への進行を防ぐことはできない。NSAIDSにもDMARDSにも重い副作用が伴う。唯一新しいDMARDであるレフルノミドだけが10年間にわたって認可され続けている。レフルノミドは自己抗体の産生を遮断し、炎症を軽減し、RAの進行を遅らせる。しかし、この薬剤も悪心、下痢、脱毛、発疹および肝傷害をはじめとする重い副作用を引き起こす。

【００５８】

全身性紅斑性狼瘡(SLE)は腎臓、皮膚および関節をはじめとする多臓器の血管への頻発傷害によって引き起こされる自己免疫疾患である。米国ではSLEは50万人を超えるに達している。SLE患者では、T細胞とB細胞の間の不完全な相互作用が細胞核を攻撃する自己抗体の産生をもたらす。これらには抗二本鎖DNAおよび抗Sm抗体が含まれる。また、SLE患者の約半数ではリン脂質と結合する自己抗体も見られ、血管損傷および低血球数の原因となっている。免疫複合体はSLE患者の腎臓、血管、および関節に集積し、そこでこれらは炎症および組織損傷を引き起こす。この疾病を治癒させるSLE治療は見つかっていない。この疾病の重篤度によってNSAIDSおよびDMARDSが治療法として用いられている。血漿交換によって自己抗体を除去する血漿瀉血はSLE患者における一時的改善をもたらすことができる。自己抗体がSLEの原因であることは一般に合意されているので、B細胞系を涸渇させ、前駆体から新たなB細胞が生じた際に免疫系をリセットさせる新しい療法はSLE患者に長期的利益の期待を与えるものである。

【００５９】

シェーグレン症候群は体の水分産生腺の破壊を特徴とする自己免疫疾患である。シェーグレン症候群は最も罹患率の高い自己免疫疾患の1つであり、米国では400万人に達するまでになっている。シューグレン症候群の約半数は慢性関節リウマチなどの結合組織の疾患も有するが、他方の半数は他の併発自己免疫疾患を伴わない原発性のシューグレン症候群を有する。シューグレン症候群患者には抗核抗体、リウマチ因子、抗フォドリン、および抗ムスカリンレセプターをはじめとする自己抗体がしばしば存在する。従来の治療法としてはコルチコステロイドがある。

【００６０】

免疫血小板減少性紫斑病(ITP)は血小板と結合してそれらの破壊を引き起こす自己抗体によって引き起こされる。ITPの症例には薬物によって引き起こされるものもあれば、感染、妊娠またはSLEなどの自己免疫疾患に関連するものもある。全症例の約半数が、その原因が不明であることを意味する「特発性」として分類されている。ITPの治療は徴候の重篤度によって決定される。いくつかの症例では治療は必要ない。大多数の症例では、T細胞を涸渇させるためコルチコステロイドまたは免疫グロブリンの静脈点滴をはじめとする免疫抑制薬を用いる。通常血小板数の増加をもたらすもう1つの治療法として抗体によってコートされた血小板を破壊する臓器である脾臓の摘出がある。重篤な症例を有する患者には、シクロスポリン、シクロホスファミドまたはアザチオプリンをはじめとするより効力のある免疫抑制薬を用いる。重篤な疾病を有する患者では第2の治療法として患者の血漿をAタンパク質カラムに通すことによる自己抗体の除去が用いられる。

【００６１】

多発性硬化症(MS)は中枢神経系の炎症、ならびに脳、脊髄および身体の神経細胞繊維を絶縁するミエリンの破壊を特徴とする自己免疫疾患である。MSの原因は分かっていないが、自己免疫T細胞がこの疾病の病因の主たる一因であると広く考えられている。しかし、MS患者の脳脊髄液には高レベルの抗体が存在し、抗体産生をもたらすB細胞の応答がこの疾病の媒介に重要であると推定する説もある。MS患者ではB細胞涸渇療法は研究されたこと

はない。MSに確かな治療法はない。現行の治療法としてはコルチコステロイドがあり、これは発作の持続時間および重さを軽減することができるが、時間が経つにつれMSの経過に作用しなくなる。最近になってMSに対する新しいバイオテクノロジーインターフェロン(IFN)療法が認可された。

【００６２】

重症性筋無力症(MG)は随意筋群の虚弱を特徴とする慢性自己免疫性神経筋疾患である。MGは米国で約40,000人に達している。MGは神経筋接合部で発現するアセチルコリンレセプターと結合する自己抗体によって引き起こされる。これらの自己抗体はアセチルコリンレセプターを減少させるか、または遮断して神経から筋肉へのシグナル伝達を妨げる。MGに知られている治療法はない。一般的な処置としてはコルチコステロイド、シクロスポリン、シクロホスファミド、またはアザチオプリンによる免疫抑制が挙げられる。自己免疫応答を弱めるために胸腺の外科摘出がしばしば用いられる。MGには血液中の自己抗体レベルを引き下げるために用いる血漿瀉血が効果的であるが、自己抗体の産生は継続するので一時的なものである。血漿瀉血は通常、外科術に先立ち重度の筋肉虚弱の場合に限られる。

【００６３】

乾癬はおよそ500万人に達している。皮膚の自己免疫性炎症。30%が関節炎を伴う乾癬(乾癬性関節炎)。ステロイド、紫外線レチノイド、ビタミンD誘導体、シクロスポリン、メトトレキサートをはじめとする多くの治療法がある。

【００６４】

強皮症は全身性硬化症としても知られる結合組織の慢性自己免疫疾患である。強皮症はコラーゲンの過剰生産を特徴とし、皮膚の肥厚をきたす。米国ではおよそ300,000人が強皮症である。

【００６５】

クローン病および潰瘍性大腸炎をはじめとする炎症性腸疾患は消化器系の自己免疫疾患である。

【００６６】

本発明はさらに、結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質をコードする構築物、特に例えばかかるポリペプチドの断片、類似体および誘導体として発現し得るタンパク質をコードする組換え構築物を投与する方法に関する。結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドまたは融合タンパク質についていう場合の「断片」、「誘導体」および「類似体」とは、いずれの結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドまたはかかるポリペプチドと実質的に同じ生物作用もしくは活性を保持する融合タンパク質をもさす。従って類似体は、活性型の結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドの生成を目的としたプロタンパク質部分の切断によって活性化され得るプロタンパク質を含む。

【００６７】

本明細書で言及されるcDNAによりコードされる結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドまたは融合タンパク質をはじめとする、結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドまたは融合タンパク質の断片、誘導体または類似体は、(i)1以上のアミノ酸残基が保存的または非保存的アミノ酸残基(好ましくは保存的アミノ酸残基)で置換されているもの(このような置換アミノ酸残基は遺伝コードによってコードされるものであってもなくともよい)、あるいは(ii)1以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの、あるいは(iii)結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドまたはプロタンパク質配列の検出または特定の機能変更に用いられるアミノ酸をはじめ、さらなるアミノ酸が結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドに融合しているものであってもよい。本明細書における教示からこのような断片、誘導体および類似体も当業者の範囲内であると考えられる。

【００６８】

本発明のポリペプチドとしては、結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチド、および当技術分野で公知の配列と同一または同等の結合ドメインポリペプチドアミノ酸配列を有する融合タンパク質、あるいはその断片または一部が挙げられる。例えば例示であって、限定されるものではないが、ヒトCD154分子細胞外ドメインは、報告されているポリペ

プチドおよびそのようなポリペプチドの一部と少なくとも70%の類似性(好ましくは70%の同一性)、より好ましくは90%の類似性(より好ましくは90%の同一性)、いっそう好ましくは95%の類似性(いっそう好ましくは95%の同一性)を有するポリペプチドである場合は本発明の使用に意図され、ここでこのような結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドの一部とは一般に少なくとも30のアミノ酸、より好ましくは少なくとも50のアミノ酸を含む。

【００６９】

当技術分野で知られているように、2つのポリペプチド間の「類似性」は、あるポリペプチドのアミノ酸配列およびそれに対する保存的アミノ酸置換を他方のポリペプチドの配列と比較することで調べる。本発明のポリペプチドをコードする核酸の断片または一部を用いて本発明の全長核酸を合成してもよい。本明細書において「同一性%」とは、2以上のポリペプチドのアライメントを行い、それらの配列を、the National Institutes of Health/ NCBI database (Bethesda, MD;www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast参照)により提供される初期加重値に従って配列ギャップおよび配列ミスマッチを負荷するギャップBLASTアルゴリズム(例えば、Altschul et al., 1997 Nucl. Ac. Res. 25:3389)を用いて分析した場合の、対応するアミノ酸残基位置に位置する同一のアミノ酸のパーセンテージをいう。

【００７０】

「単離」とは、その材料がその元の環境(例えば、それが天然に存在するならばその天然環境)から取り出されていることを意味する。例えば、天然に存在する核酸または動物生体に存在するポリペプチドは単離されてはいないが、天然系で共存しているいくつか、または全てのものから分離された同じ核酸またはポリペプチドは単離されている。このような核酸はベクターの一部であってもよいし、かつ／またはこのような核酸またはポリペプチドは組成物の一部であってもよく、このようなベクターまたは組成物はその天然環境の一部ではないという点でやはり単離されている。

【００７１】

「遺伝子」とは、ポリペプチド鎖の産生に関与するDNAのセグメントを意味し、コード領域「リーダーおよびトレーラー」前後に領域を、ならびに個々のコードセグメント(エクソン)間に介在配列(イントロン)を含む。

【００７２】

本明細書に記載のように、本発明は、例えば例示であって限定されるものではないが、融合タンパク質の欠失、機能変更、単離および／または精製を可能とする付加的な機能的ポリペプチド配列と融合した結合ドメインポリペプチド配列の発現のために供する付加的な免疫グロブリンドメインコード配列とフレーム内融合した結合ドメインコード配列を有する核酸によってコードされる結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質を提供する。このような融合タンパク質は、例えば(上記のように)ジスルフィド結合の形成に関与するメルカプト基の利用能を引き下げることにより、また、ADCCおよび／またはCDCを増強する能力を付与することによって融合産物の挙動に影響を及ぼす付加的な免疫グロブリン由来ポリペプチド配列を含めることで、結合ドメインの機能変更を可能とする。

【００７３】

ポリペプチドの修飾は当業者に公知のいずれの手段によって達成してもよい。本明細書において好ましい方法は融合タンパク質をコードするDNAの修飾および修飾されたDNAの発現に頼るものである。上記の結合ドメイン-免疫グロブリン融合物の1つをコードするDNAは以下に記載されるものをはじめ標準的な方法論を用いて突然変異誘発できる。例えば、そうでなければ多量体形成を促進する、または特定の分子コンホメーションを促すシステイン残基をポリペプチドから欠失させるか、または例えば凝集塊の形成に関与するシステイン残基を置換することができる。必要であれば、凝集塊の形成に寄与するシステイン残基の識別は、システイン残基を欠失および／または置換して生じたタンパク質が生理学上許容されるバッファーおよび塩を含有する溶液中で凝集するかどうかを確認することにより経験的に行うことができる。さらに、結合ドメイン-免疫グロブリン融合物の断片を構築

して使用してもよい。上記で示したように、当業者が即製の発現構築物のコード産物に含めるのに適当なポリペプチドドメインを容易に選択できるよう、多くの候補結合ドメイン-免疫グロブリン融合物のカウンターレセプター／リガンド結合ドメインを描写した。

【００７４】

保存的アミノ酸置換は周知のものであり、一般に、得られる結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質分子の生物活性を変更することなく行える。例えば、このような置換は一般に、極性残基群、電荷残基群、疎水性残基群、小残基群などの中で相互交換することで行う。必要であれば、このような置換は実験的に、単にin vitro生物アッセイにおいて適当な細胞表面レセプターと結合する能力、または適当な抗原もしくは所望の標的分子と結合する能力に関して得られた修飾タンパク質を試験することで確認することができる。

【００７５】

本発明はさらに本明細書で示される結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質コードポリヌクレオチド配列とハイブリダイズする核酸、または配列間に少なくとも70%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の同一性があれば、当業者に容易に明らかとなるそれらの相補物に関する。本発明は特に本明細書で言及される結合ドメイン-免疫グロブリン融合物コード核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸に関する。本明細書において「ストリンジェントな条件」とは、配列間に少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%の同一性がある場合に限ってハイブリダイゼーションが起こることを意味する。本明細書で言及される結合ドメイン-免疫グロブリン融合物コード核酸とハイブリダイズする核酸は、好ましい実施形態では、本明細書に挙げられている参照文献のcDNAによってコードされる結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドと実質的に同等の生物作用または活性を保持するポリペプチドをコードする。

【００７６】

本発明で用いる場合、特定のストリンジェンシーの条件下で「ハイブリダイズする」とは、2つの二本鎖核酸分子間で生じたハイブリッドの安定性を表すのに用いる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーはこのようなハイブリッドがアニーリングおよび洗浄されるイオン強度および温度条件で表すのが典型である。典型的には「高」、「中」および「低」ストリンジェンシーは次の条件またはそれと同等の条件を含む：高ストリンジェンシー：0.1xSSPEまたはSSC、0.1% SDS、65℃；中ストリンジェンシー：0.2xSSPEまたはSSC、0.1% SDS、50℃；および低ストリンジェンシー：1.0xSSPEまたはSSC、0.1% SDS、50℃。当業者に知られているように、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーのバリエーションは回数、温度および／またはプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程に用いる溶液の濃度を変更することで達成でき、好適な条件は1つには用いるプローブの特定のヌクレオチド配列、およびブロットされた発端の核酸サンプルのヌクレオチド配列によっても異なる。従って、プローブの所望の選択性を確認する過度な実験を行わなくとも、1以上のある発端とはハイブリダイズし得るが、他の特定の発端配列とはハイブリダイズしないことをもとに、好適なストリンジェント条件を容易に選択することができると考えられる。

【００７７】

本発明の核酸は、本明細書ではポリヌクレオチドとも呼ばれ、RNAの形態であってもDNAの形態であってもよく、DNAとしてはcDNA、ゲノムDNAおよび合成DNAが含まれる。DNAは一本鎖であっても二本鎖であってもよく、一本鎖であればコード鎖であっても非コード鎖(アンチセンス鎖)であってもよい。本発明に従って用いられる結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードするコード配列はあるいずれかの結合ドメイン-免疫グロブリン融合物として当技術分野で公知のコード配列に等しいものであってもよいし、あるいは遺伝コードの重複または縮重の結果として同じ結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードする異なるコード配列であってもよい。

【００７８】

本発明に従って用いられる結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードする核酸としては、限定されるものではないが、結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプ

チドのコード配列のみ；結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドのコード配列および付加的なコード配列；結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチド(および所望により付加的なコード配列)、およびイントロン、または結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドのコード配列の5'および／または3'側の非コード配列のような非コード配列(これはさらに例えば、限定されるものではないが、調節または調節可能なプロモーター、エンハンサー、その他の転写調節配列、レプレッサー結合配列、翻訳調節配列またはその他いずれかの調節核酸配列であり得る1以上の調節核酸配列を含んでもよい)が挙げられる。従って、結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質を「コードする核酸」または「コードするポリヌクレオチド」とは、結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドのコード配列のみ、ならびに付加的なコード配列および／または非コード配列を含む核酸を含む核酸を包含する。

【００７９】

本明細書に記載の使用のための核酸およびオリゴヌクレオチドは当業者に公知のいずれかの方法によって合成することができる(例えば、WO93/01286、米国出願第07/723,454号、米国特許第5,218,088号、同第5,175,269号、同第5,109,124号参照)。本発明で用いるオリゴヌクレオチドおよび核酸配列の同定には当技術分野で周知の方法が含まれる。例えば、有用なオリゴヌクレオチドの望ましい特性、長さおよびその他の特徴は周知のものである。特定の実施形態では、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、スルホン、スルフェート、ケチル、ホスホロジチオエート、ホスホロアミデート、リン酸エステルなどの結合、その他アンチセンス適用に有用であることが分かっている結合を含めることで、内在する宿主細胞の核分解酵素による分解に耐性のある合成オリゴヌクレオチドおよび核酸配列をデザインすることができる(例えば、Agrwal et al., Tetrehedron Lett. 28:3539-3542 (1987); Miller et al., J. Am. Chem. Soc. 93:6657-6665 (1971); Stec et al., Tetrehedron Lett. 26:2191-2194 (1985); Moody et al., Nucl. Acids Res. 12:4769-4782 (1989); Uznanski et al., Nucl. Acids Res. (1989); Letsinger et al., Tetrahedron 40:137-143 (1984); Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 54:367-402 (1985); Eckstein, Trends Biol. Sci. 14:97-100 (1989); Stein In: Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression, Cohen, Ed, Macmillan Press, London, pp. 97-117 (1989); Jager et al., Biochemistry 27:7237-7246 (1988)参照)。

【００８０】

ある実施形態では、本発明は、結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質に用いる末端切断型成分(例えば、結合ドメインポリペプチド、ヒンジ領域ポリペプチド、リンカーなど)を提供し、もう1つの実施形態では、本発明は、このような末端切断型成分を有する結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質をコードする核酸を提供する。末端切断型分子はその分子の全長型よりも短いいずれの分子であってもよい。本発明によって提供される末端切断型分子は末端切断型生体ポリマーを含んでもよく、好ましい実施形態では、このような末端切断型分子は末端切断型核酸分子または末端切断型ポリペプチドであってもよい。末端切断型核酸分子は公知の、または記載されている核酸分子の全長ヌクレオチド配列より短く、このような公知の、または記載されている核酸分子は当業者がそれを全長分子とみなす限りは天然に存在する核酸分子であっても、合成核酸分子であっても、組換え核酸分子であってもよい。このように例えば、遺伝子配列に相当する末端切断型核酸分子は全長遺伝子よりも短く、この遺伝子はコード配列および非コード配列、プロモーター、エンハンサーその他の調節配列、フランキング配列など、ならびにその他その遺伝子の一部と認識されている機能的および非機能的配列を含む。もう1つの例では、mRNA配列に相当する末端切断型核酸分子は全長mRNA転写物より短く、種々の翻訳領域および非翻訳領域ならびにその他機能的および非機能的配列を含み得る。

【００８１】

その他の好ましい実施形態では、末端切断型分子は特定のタンパク質またはポリペプチド成分の全長アミノ酸より短い。本明細書において「欠失」とは、当業者に理解されている一般的な意味を有し、例えば、本明細書で提供される末端切断型分子の場合と同様、対応

する全長分子に対して末端または非末端領域のいずれかに由来する1以上の配列部分を欠いた分子をさし得る。核酸分子またはポリペプチドなどの直鎖生体ポリマーである末端切断型分子は分子の末端に由来するか分子の非末端領域に由来するかのいずれかの1以上の欠失を有する場合があり、このような欠失は1～1500の連続するヌクレオチドまたはアミノ酸残基、好ましくは1～500の連続するヌクレオチドまたはアミノ酸残基、より好ましくは1～300の連続するヌクレオチドまたはアミノ酸残基の欠失であり得る。ある特定の好ましい実施形態では、末端切断型核酸分子は270～330の連続するヌクレオチドの欠失を有し得る。他のある特定の実施形態では、末端切断型ポリペプチド分子は80～140の連続するアミノ酸残基の欠失を有し得る。

【００８２】

本発明はさらに結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドの断片、類似体および／または誘導体をコードする本明細書に記載の核酸の変異体に関する。結合ドメイン-免疫グロブリン融合物をコードする核酸の変異体は核酸の天然に存在する対立遺伝子変異体であっても、あるいは天然には存在しない変異体であってもよい。当技術分野で知られているように、対立遺伝子変異体は1以上のヌクレオチドの置換、欠失または付加を少なくとも1以上有し得る核酸配列の変異型であり、それはいずれもコードされる結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドの機能を実質的に変更しない。

【００８３】

結合ドメイン-免疫グロブリン融合物の変異体または誘導体は結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の突然変異によって得られる。天然型アミノ酸配列の変更はいくつかの常法のうちのいずれかによって達成できる。天然配列の断片との連結を可能とする制限部位によってフランキングされた変異配列を含むオリゴヌクレオチドを合成することにより特定の遺伝子座に突然変異を導入することができる。連結後、得られた再構成配列は所望のアミノ酸挿入、置換または欠失を有する類似体をコードする。

【００８４】

あるいは、オリゴヌクレオチドによって指定される位置特異的突然変異誘発法を用いて所定のコドンが置換、欠失または挿入によって変更され得る変異遺伝子を得ることができる。このような変更をなす方法例がWalder et al. (Gene 42:133, 1986); Bauer et al. (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); Kunkel (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985); Kunkel et al. (Methods in Enzymol. 154:367, 1987);および米国特許第4,518,584および同第4,737,462号に開示されている。

【００８５】

一例として、DNAの修飾は、プライマーを用いたDNA増幅法を併用して、そのタンパク質をコードするDNAの位置指定突然変異誘発を行ってオーバーラップエクステンションによるPCRスプライシング(SOE)など、DNA鋳型に変異を導入、増幅することによって行える。位置指定突然変異誘発は典型的には 周知であって市販されているM13ファージベクターなどの一本鎖および二本鎖型のファージベクターを用いて行う。一本鎖ファージ複製起点を含む他の好適なベクターも使用できる(例えば、Veira et al., Meth. Enzymol. 15:3, 1987参照)。一般に、位置指定突然変異誘発は目的タンパク質(例えば、ある結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質の全てまたは成分)をコードする一本鎖ベクターを製造することによって行う。一本鎖ベクターのDNAと相同な領域内に所望の突然変異を含むオリゴヌクレオチドプライマーをベクターにアニーリングした後、二本鎖領域をプライマーとして用いて、一方の鎖が変異配列をコードし、他方の鎖がオリジナル配列をコードするヘテロ二重らせんを形成する大腸菌(E. coli)DNAポリメラーゼI(クレノウフラグメント)などのDNAポリメラーゼIを添加する。このヘテロ二重らせんを適当な細菌細胞に導入し、所望の突然変異を含むクローンを選択する。得られた変異型DNA分子は適当な宿主細胞で組換え

発現させて修飾タンパク質を産生させることができる。

【００８６】

生物活性に必要でない種々のアミノ酸残基もしくは配列の付加または置換、あるいは末端または内部残基または配列の欠失をコードする同等のDNA構築物も本発明に包含される。例えば、上記で論じたように、生物活性に望まれない、または必須でないCys残基をコードする配列をCys残基を欠失させるか、あるいは他のアミノ酸で置換して変化させ、復元時に不適切な分子間ジスルフィド架橋の形成を妨げることができる。

【００８７】

宿主生物としては、in vitroおよびin vivo発現を含め、細菌(例えば、大腸菌)、酵母(例えば、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)およびピチア・パストリス(Pichia pastoris))、昆虫細胞および哺乳類細胞など、本発明の組換え構築物によってコードされる結合ドメイン-免疫グロブリン融合産物の組換え生産が起こり得る生物が挙げられる。従って宿主生物には本明細書で提供されるワクチン生産における構築、増殖、発現またはその他の工程のための生物が含まれ、宿主としてはまた上記のように免疫応答が生じる対象が含まれる。現在のところ好ましい宿主生物としては大腸菌株、ネズミ近交系およびネズミ細胞株、ならびにヒト細胞、被験体および細胞株がある。

【００８８】

所望の結合ドメイン-免疫グロブリン融合物をコードするDNA構築物は適当な宿主での発現のためのプラスミドに導入する。好ましい実施形態では、この宿主は細菌宿主である。リガンドまたは核酸結合ドメインをコードする配列は特定の宿主での発現のためにコドンを至適化するのが好ましい。従って例えば、ヒト結合ドメイン-免疫グロブリン融合物を細菌で発現させる場合にはコドンを細菌向けに至適化する。短いコード領域では、遺伝子は単一のオリゴヌクレオチドとして合成され得る。大きなタンパク質では、複数のオリゴヌクレオチドのスプライシング、突然変異誘発またはその他当業者に公知の技術を用いてもよい。プロモーターおよびオペレーターなどの調節領域であるプラスミド中のヌクレオチド配列は転写のために互いに作動可能なように連結する。結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列はまた分泌シグナルををコードするDNAを含んでもよく、それにより生じたペプチドはタンパク質前駆体となる。生じたプロセッシングタンパク質は周辺質空間または発酵培地から回収できる。

【００８９】

好ましい実施形態では、DNAプラスミドはまた転写ターミネーター配列も含む。本明細書において「転写ターミネーター領域」とは、転写終結のシグナル伝達を行う配列である。完全な転写ターミネーターは、挿入された結合ドメイン-免疫グロブリン融合物コード遺伝子またはプロモーター供給源と同一であっても異なっていてもよいタンパク質コード遺伝子から得られる。転写ターミネーターは本明細書の発現系の任意の成分であるが、好ましい実施形態では用いられる。

【００９０】

本明細書で用いるプラスミドは目的のタンパク質またはポリペプチドをコードするDNAと作動可能なように連結したプロモーターであり、所望のプラスミドの用途(例えば、結合ドメイン-免疫グロブリン融合物コード配列を含むワクチンの投与)によって上記のような好適な宿主(例えば、細菌、ネズミ、またはヒト)でのタンパク質の発現向けにデザインされたものである。本明細書のタンパク質およびポリペプチドの発現に好適なプロモーターは広く入手可能であって、当技術分野で周知のものである。調節領域と連結した誘導プロモーターまたは構成プロモーターが好ましい。かかるプロモーターとしては、限定されるものではないが、T7ファージプロモーター、ならびにT3、T5およびSP6プロモーターなどのその他のT7様ファージプロモーター、大腸菌由来のtrp、lpp、およびlacプロモーター(lacUV5など)、バキュロウイルス／昆虫細胞発現系のP10またはポリヘドリン遺伝子プロモーター(例えば、米国特許第5,243,041号、同第5,242,687号、同第5,266,317号、同第4,745,051号および同第5,169,784号参照)および他の真核生物発現系由来の誘導プロモーターが挙げられる。タンパク質発現のためにはこのようなプロモーターはlacオペロンなどの

対照領域をプラスミド中に作動可能なように連結して挿入する。

【００９１】

好ましいプロモーター領域としては大腸菌で誘導可能かつ機能的なものである。好適な誘導プロモーターおよびプロモーター領域の例としては、限定されるものではないが、イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG;Nakamura et al., Cell 18:1109-1117, 1979参照)応答性の大腸菌lacオペレーター；重金属(例えば亜鉛)誘導応答性のメタロチオネインプロモーター金属調節エレメント(例えば、Evans et al.の米国特許第4,870,009号参照);IPTG応答性のファージT7lacプロモーター(例えば、米国特許第4,952,496号;およびStudier et al., Meth. Enzymol. 185:60-89, 1990参照)およびTACプロモーターが挙げられる。

【００９２】

これらのプラスミドは所望により宿主内で機能的な選択マーカー遺伝子を含んでよい。選択マーカー遺伝子は形質転換細菌細胞の同定および多数の非形質転換細胞からの選択的増殖を可能とする表現型を細菌に付与するいずれの遺伝子も含む。細菌宿主に好適な選択マーカー遺伝子としては例えばアンピシリン耐性遺伝子(Amp^r)、テトラサイクリン耐性遺伝子(Tc^r)およびカナマイシン耐性遺伝子(Kan^r)が挙げられる。現在のところカナマイシン耐性遺伝子が好ましい。

【００９３】

これらのプラスミドはまた、作動可能なように連結されたタンパク質の分泌のためのシグナルをコードするDNAを含んでもよい。使用に好適な分泌シグナルは広く入手可能であって、当技術分野で周知のものである。大腸菌で機能的な原核生物および真核生物分泌シグナルを用いてもよい。現在のところ好ましい分泌シグナルとしては、限定されるものではないが、以下の大腸菌遺伝子：ompA、ompT、ompF、ompC、β-ラクタマーゼ、アルカリ性ホスファターゼなどによってコードされるものが挙げられる(von Heijne, J. Mol. Biol. 184:99-105, 1985)。さらにまた、細菌pelB遺伝子分泌シグナル(Lei et al., J. Bacteriol. 169:4379, 1987)、phoA分泌シグナルおよび昆虫細胞で機能的なcek2を用いてもよい。最も好ましい分泌シグナルは大腸菌ompA分泌シグナルである。当業者に公知のその他の原核生物および真核生物分泌シグナルを利用してもよい(例えば、von Heijne, J. Mol. Biol. 184:99-105, 1985参照)。当業者ならば本明細書に記載の方法を用いて酵母、昆虫または哺乳類細胞のいずれかでこれらの細胞からのタンパク質の分泌に機能的な分泌シグナルを代用することができる。

【００９４】

大腸菌の形質転換に好ましいプラスミドとしてはpET発現ベクター(例えば、pET-11a、pET-12a-c、pET-15b;米国特許第4,952,496号;Novagen, Madison, WI.から入手可能)が挙げられる。他の好ましいプラスミドとしては、pKKプラスミド、特にtacプロモーターを含むpKK 223-3(Brosius et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6929, 1984; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology;米国特許第5,122,463号、同第5,173,403号、同第5,187,153号、同第5,204,254号、同第5,212,058号、同第5,212,286号、同第5,215,907号、同第5,220,013号、同第5,223,483号、および同第5,229,279号参照)が挙げられる。プラスミドpKKはアンピシリン耐性遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子に置き換えることで改変されたものである(Pharmaciaから入手可能;pUC4Kから獲得、例えば、Vieira et al. (Gene 19:259-268, 1982;および米国特許第4,719,179号参照)。また、昆虫細胞におけるポリペプチドの発現のためにはpBlueBac(pJVETLおよびその誘導体とも呼ばれる)、特にpBlueBac III(例えば、米国特許第5,278,050号、同第5,244,805号、同第5,243,041号、同第5,242,687号、同第5,266,317号、同第4,745,051号、および同第5,169,784号参照;Invitrogen, San Diegoから入手可能)などのバキュロウイルスベクターを使用してもよい。その他のプラスミドとしてはpIN-IIIompA2などのpIN-IIIompAプラスミド(米国特許第4,575,013号参照;また、Duffaud et al., Meth. Enz. 153:492-507, 1987も参照)が挙げられる。

【００９５】

このDNA分子は細菌細胞、好ましくは大腸菌で複製することが好ましい。好ましいDNA分子

としてはまた、細菌の世代間でのDNA分子の維持を確保する細菌複製起点も挙げられる。このような場合、細菌の複製によって大量のDNA分子が生産できる。好ましい細菌複製起点としては、限定されるものではないが、f1-oriおよびcol E1複製起点が挙げられる。好ましい宿主は、lacUVプロモーターなどの誘導プロモーターと作動可能なように連結されたT7 RNAポリメラーゼをコードするDNAの染色体コピーを含む(米国特許第4,952,496号参照)。このような宿主としては、限定されるものではないが、溶原大腸菌HMS174(DE3)pLysS株、BL21(DE3)pLysS株、HMS174(DE3)株およびBL21(DE3)株が挙げられる。BL21(DE3)株が好ましい。pLys株は低レベルの、T7 RNAポリメラーゼ阻害剤T7ライソザイムを提供する。

【００９６】

提供されるDNA分子はまたレプレッサータンパク質をコードする遺伝子を含んでもよい。レプレッサータンパク質はレプレッサータンパク質が結合するヌクレオチドの配列を含むプロモーターの転写を抑制し得る。このプロモーターは細胞の生理条件を変更することによって脱抑制し得る。例えばこの変更は、オペレーターと、または調節タンパク質もしくはその他のDNA領域と相互作用する能力を阻害する分子を増殖培地に加えることにより、あるいは増殖培地の温度を変更することにより達成することができる。好ましいレプレッサータンパク質としては、限定されるものではないが、IPTG誘導反応性の大腸菌lacIレプレッサー、温度感受性λcI857レプレッサーなどが挙げられる。大腸菌lacIレプレッサーが好ましい。

【００９７】

一般に、本発明の組換え構築物はまた、転写および翻訳に必要なエレメントを含む。特にこのようなエレメントは結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質をコードする核酸配列を含む組換え発現構築物が宿主細胞または生物での発現のために意図される場合に好ましい。本発明の特定の実施形態では、細胞結合ドメイン-免疫グロブリン融合物コード遺伝子の細胞種選択的または細胞種特異的発現はその遺伝子をプロモーターの制御下に置くことで達成し得る。プロモーターの選択肢は形質転換する細胞種および望まれる制御の程度またはタイプによって異なる。プロモーターは構成型でも活性型のものでもよく、さらに細胞種特異的、組織特異的、個々の細胞特異的、事象特異的、時間特異的または誘導型のものでもよい。細胞種特異的プロモーターまたは事象種特異的プロモーターが好ましい。構成的または非特異的プロモーターの例としてはSV40初期プロモーター(米国特許第5,118,627号)、SV40後期プロモーター(米国特許第5,118,627号)、CMV初期遺伝子プロモーター(米国特許第5,168,062号)、およびアデノウイルスプロモーターが挙げられる。ウイルスプロモーターの他、細胞プロモーターも本発明の内容に従う。特にいわゆるハウスキーピング遺伝子の細胞プロモーターが有用である。ウイルスプロモーターは一般に細胞プロモーターよりも強力なプロモーターであるので好ましい。プロモーター領域は高等真核生物を含む多くの真核生物の遺伝子で同定されているので、当業者ならば個々の宿主で用いるのに好適なプロモーターを容易に選択することができる。

【００９８】

また、誘導プロモーターを使用してもよい。これらのプロモーターとしてはデキサメタゾンにより誘導可能なMMTV LTR(PCT WO91/13160)、重金属により誘導可能なメタロチオネインプロモーター、およびcAMPにより誘導可能なcAMP応答エレメントを有するプロモーターが挙げられる。誘導プロモーターを用いることで、結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質をコードする核酸配列を本発明の発現構築物により細胞へ送達し、インデューサーを添加するまで停止させておくことができる。これはさらに遺伝子産物の産生のタイミングにおいて制御可能である。

【００９９】

事象種特異的プロモーターは腫瘍形成またはウイルス感染などの事象が起こったときにのみ活性化またはアップレギュレートされる。HIV LTRは事象特異的プロモーターの周知の例である。このプロモーターはウイルス感染時に生じるtat遺伝子産物が存在しない限り不活性である。いくつかの事象種プロモーターは組織特異的でもある。

【０１００】

さらにまた、特定の細胞遺伝子で協調調節されるプロモーターを用いてもよい。例えば特定の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質コード遺伝子の発現が1以上の付加的内在性または外から導入された遺伝子の発現と協調して望まれる場合に協調発現される遺伝子のプロモーターを用い得る。この種のプロモーターは免疫系の特定の組織における免疫応答の誘導に関する遺伝子発現パターンを知る際に特に有用であり、これによりその組織内の特異的免疫担当細胞が活性化されるか、そうでなければ免疫応答に参加するべく動員される。

【０１０１】

例えば宿主が治療戦略の一環として一時的に免疫無防備にする場合などの特定の状況では、プロモーターの他、レプレッサー配列、ネガティブレギュレーター、または組織特異的サイレンサーを挿入して結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質コード遺伝子の非特異的発現を低下させてもよい。プロモーター領域には複数のレプレッサーエレメントを挿入し得る。転写抑制はレプレッサーエレメントの配向やプロモーターからの距離には依存しない。ある種のレプレッサー配列は絶縁配列である。このような配列は転写を阻害し(Dunaway et al., Mol Cell Biol 17: 182-9, 1997; Gdula et al., Proc Natl Acad Sci USA 93:9378-83, 1996, Chan et al., J Virol 70: 5312-28, 1996; Scott and Geyer, EMBO J 14:6258-67, 1995; Kalos and Fournier, Mol Cell Biol 15:198-207, 1995; Chung et al., Cell 74: 505-14, 1993)、バックグラウンド転写をサイレンシングする。

【０１０２】

またレプレッサーエレメントはII型(軟骨)コラーゲン、コリンアセチルトランスフェラーゼ、アルブミン(Hu et al., J. Cell Growth Differ. 3(9):577-588, 1992)、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK-2)(Misuno et al., Gene 119(2):293-297, 1992)遺伝子のプロモーター領域で、また6-ホスホフルクト-2-キナーゼ／フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ遺伝子(Lemaigre et al., Mol. Cell Biol. 11(2):1099-1106)でも同定されている。さらにいくつかの肝特異的遺伝子では負の調節エレメントTse-1が同定され、肝細胞におけるcAMP応答エレメント-(CRE)によって媒介される遺伝子活性化誘導を遮断することが示されている(Boshart et al., Cell 61(5):905-916, 1990)。

【０１０３】

好ましい実施形態では、所望の産物の発現を増強するエレメントを構築物に組み込む。このようなエレメントとしては内部リボソーム結合部位(IRES; Wang and Siddiqui, Curr. Top. Microbiol. Immunol 203:99, 1995; Ehrenfeld and Semler, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 203:65, 1995; Rees et al., Biotechniques 20:102, 1996; Sugimoto et al., Biotechnology 12:694, 1994)が挙げられる。IRESは翻訳効率を高める。同様に他の配列も発現を高め得る。いくつかの遺伝子では特に5'末端の配列が転写および／または翻訳を阻害する。これらの配列は通常パリンドロームとなっていてヘアピン構造を形成することがある。送達すべき核酸中にこのような配列があれば一般に欠失させる。転写または翻訳産物の発現レベルをどの配列が発現を左右するかを確認または突き止めるべくアッセイする。転写レベルはノーザンブロットハイブリダイゼーション、RNアーゼプローブ保護などをはじめとするいずれの公知の方法によってアッセイしてもよい。タンパク質レベルはELISA、ウエスタンブロット、免疫組織化学またはその他の周知の技術をはじめ、いずれの公知の方法によってアッセイしてもよい。

【０１０４】

本発明の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質コード構築物にその他のエレメントを組み込んでもよい。好ましい実施形態では、構築物はポリアデニル化配列、スプライス供与部位および受容部位、ならびにエンハンサーをはじめとする転写ターミネーター配列を含む。哺乳類細胞またはその他の真核細胞での構築物の発現および維持に有用なその他エレメントも組み込んでよい(例えば、複製起点)。これらの構築物は細菌細胞で便宜に産生されるので、細菌中での増殖に必要な、または細菌での増殖を増強するエレメントを組み込む。このようなエレメントとしては複製起点、選択マーカーなどがある。

【０１０５】

本明細書で示されるように、本発明の構築物を用いて細胞へ送達された結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質をコードする核酸の発現のさらなるレベルの制御は2以上の示差的に調節される核酸構築物を同時に送達することによって得られる。このような複数の核酸構築アプローチを用いることで、例えば細胞種および／または別の発現コード成分の存在に依存する時間的空間的協調といった免疫応答の協調調節が可能となる。当業者ならば複数の調節遺伝子発現レベルも同様に、限定されるものではないが、プロモーター、エンハンサー、およびその他周知の遺伝子調節エレメントをはじめとする好適な調節配列の選択によって達成できることが分かるであろう。

【０１０６】

本発明はまた、ベクター、および本発明の核酸を含む公知のベクターから製造した構築物、特に上記で示したような本発明の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質およびポリペプチドをコードする核酸のいずれかを含む「組換え発現構築物」、本発明のベクターおよび／または構築物で遺伝子操作した宿主細胞、ならびに組換え技術による、本発明のかかる結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドおよび融合タンパク質をコードする核酸配列、またはその断片もしくは変異体を含む発現構築物を投与する方法に関する。結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質は構築物の性質(例えば、上記のようにプロモーターの種類)および所望の宿主細胞の性質(例えば、有糸分裂後の分化終期か活発な分裂期か；例えば、発現構築物が宿主細胞においてエピソームとして存在するか宿主細胞ゲノムに組み込まれるか)によって、適当なプロモーターの制御下、実質的にいずれの宿主細胞でも発現し得る。原核生物および真核生物宿主とともに用いるのに適当なクローニングおよび発現ベクターは上記で示したようにSambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, (1989)に記載されており、本発明の特に好ましい実施形態では、組換え発現は本発明の組換え発現構築物でトランスフェクトまたは形質転換した哺乳類細胞で行う。

【０１０７】

典型的には、これらの構築物はプラスミドベクターに由来する。好ましい構築物としては、アンピシリン耐性遺伝子、ポリアデニル化シグナルおよびT7プロモーター部位をコードする核酸配列を有する改変型pNASSベクター(Clontech, Palo Alto, CA)がある。他の好適な哺乳類発現ベクターも周知である(例えば、Ausubel et al., 1995; Sambrook et al., 上記参照;また、例えば、Invitrogen, San Diego, CA; Novagen, Madison, WI; Pharmacia, Piscataway, NJその他のカタログも参照)。現在のところ、結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質の高産生レベルをもたらすため、好適な調節制御下にジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)コード配列を含む好ましい構築物が製造し得るが、このレベルは適当な選択剤(例えば、メトトレキサート)の適用後の遺伝子増幅によるものである。

【０１０８】

一般に組換え発現ベクターは宿主細胞の形質転換を可能とする複製起点および選択マーカー、ならびに上記のように下流構造配列の転写を命令するため、高レベルで発現する遺伝子に由来するプロモーターを含む。この異種構造配列は翻訳開始および終結配列に対して適当な位相に組み込む。従って例えば、本明細書で提供される結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質コード核酸は、宿主細胞で結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドを発現させるための組換え発現構築物として、種々の発現ベクター構築物のいずれか1つに含めればよい。特定の好ましい実施形態では、これらの構築物はin vivoに投与される製剤中に含める。このようなベクターおよび構築物としては染色体配列、非染色体配列および合成DNA配列、例えばSV40の誘導体；細菌プラスミド；ファージDNA；酵母プラスミド；プラスミドとファージDNA、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルスおよび仮性狂犬病ウイルス、または以下に記載する複製欠陥レトロウイルスなどのウイルスDNAとの組合せに由来するベクターが挙げられる。しかしながら、組換え発現構築物の製造のためにその他のベクターを用いてもよく、好ましい実施形態では、このようなベクターは宿主中で複製可能で生存力を持つものである。

【０１０９】

これら適当なDNA配列は種々の手法によりベクターへ挿入できる。一般に、このDNA配列は当技術分野で公知の手法によって適当な制限エンドヌクレアーゼ部位へ挿入する。DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼなどの酵素反応のためのクローニング、DNA単離、増幅および精製の標準的な技術ならびに種々の分離技術は当業者に公知であり、一般に用いられているものである。標準的な技術のいくつかが、例えばAusubel et al. (1993 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA); Sambrook et al. (1989 Molecular Cloning, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis et al. (1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Glover (Ed.) (1985 DNA Cloning Vol. I and II, IRL Press, Oxford, UK); Hames and Higgins (Eds.), (1985 Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, UK)その他に記載されている。

【０１１０】

発現ベクター中のDNA配列は、mRNA合成を命令すべく少なくとも1つの好適な発現制御配列(例えば、構成プロモーターまたは調節プロモーター)に作動可能なように連結されている。このような発現制御配列の代表例としては上記のような真核細胞またはそれらのウイルスのプロモーターが挙げられる。プロモーター領域はCAT(クロラムフェニコールトランスフェラーゼ)ベクターまたはその他のベクターを選択マーカーとともに用いていずれの所望の遺伝子からでも選択できる。真核プロモーターとしてはCMV前初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来のLTR、およびマウスメタロチオネイン-Iが挙げられる。適当なベクターおよびプロモーターの選択は十分当業者のレベルの範囲内にあり、本明細書では結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドをコードする核酸と作動可能なように連結された少なくとも1つのプロモーターまたは調節プロモーターを含む特定の特に好ましい組換え発現構築物の製造を記載する。

【０１１１】

高等真核生物による本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写はベクターにエンハンサー配列を挿入することによって増強することができる。エンハンサーとは、プロモーターに作用してその転写を増強する通常約10～300bpの、DNAのcis作用エレメントである。例としては複製起点の後期部位bp100～bp270のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期部位のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。

【０１１２】

本明細書で示されるように、特定の実施形態では、このベクターはレトロウイルスベクターなどのウイルスベクターであってもよい(Miller et al., 1989 BioTechniques 7:980; Coffin and Varmus, 1996 Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.)。例えばレトロウイルスプラスミドベクターを誘導し得るレトロウイルスとしては、限定されるものではないが、モロニーネズミ白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、レトロウイルス(ラウス肉腫ウイルス、ハーヴィー肉腫ウイルス、鳥類白血症ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アデノウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスなど)が挙げられる。

【０１１３】

レトロウイルスは複製し、DNA中間体を通じて宿主細胞のゲノムに組み込まれ得るRNAウイルスである。このDNA中間体、すなわちプロウイルスは宿主細胞のDNAへ安定して組み込まれる。本発明の特定の実施形態によれば、ワクチンは、通常のレトロウイルスRNAの代わりに外来タンパク質をコードする外来遺伝子が組み込まれているレトロウイルスを含み得る。レトロウイルスRNAが感染と同時に宿主細胞に入る際、この外来遺伝子も細胞に導入され、その後、それがレトロウイルスゲノムの一部であったかのように宿主細胞DNAへ組み込まれる。宿主内でこの外来遺伝子が発現すると、外来タンパク質が発現することになる。

【０１１４】

遺伝子治療向けに開発されたほとんどのレトロウイルスベクター系はネズミレトロウイルスを基にしたものである。このようなレトロウイルスはビリオンと呼ばれる遊離型のウイルス粒子として、または宿主細胞DNAへ組み込まれたプロウイルスとしての2形態で存在する。ビリオン形態のウイルスはレトロウイルスの構造タンパク質および酵素タンパク質(逆転写酵素を含む)、ウイルスゲノムの2つのRNAコピー、およびウイルスエンベロープ糖タンパク質を含有するソース細胞の原形質膜部分を含む。このレトロウイルスゲノムは4つの主要領域、すなわち転写の開始と終結に必要なcis作用エレメントを含み、コード遺伝子の5'および3'双方に位置する長い末端反復配列(LTR)、ならびに3つのコード遺伝子gag、pol、およびenvへと組織される。これらの3つの遺伝子gag、pol、およびenvはそれぞれ内部ウイルス構造、酵素タンパク質(インテグラーゼなど)、およびウイルスの感染力と宿主域特異性を付与するエンベロープ糖タンパク質(gp70およびp15eと呼ばれる)、ならびにまだ機能の同定されていない「R」ペプチドをコードする。

【０１１５】

本発明により提供されるワクチンにおけるそれらの使用をはじめ、レトロウイルスの使用に関する安全的懸念のため、個別のパッケージング細胞系統およびベクター産生細胞系統が開発されている。要するに、この方法論ではレトロウイルスベクターとパッケージング細胞系統(PCL)の二成分の使用を採用する。レトロウイルスベクターは長い末端反復配列(LTR)、導入する外来DNAおよびパッケージング配列(y)を含む。このレトロウイルスベクターは構造タンパク質およびエンベロープタンパク質をコードする遺伝子をベクターゲノム内に含まないのでそれ自体は再生しない。PCLはgag、pol、およびenvタンパク質をコードする遺伝子を含むが、パッケージングシグナル「y」を含まない。従って、PCLそれ自体によっては空のビリオン粒子しか形成することができない。この一般法の中では、レトロウイルスベクターをPCLに導入し、それによりベクター産生細胞系統(VCL)を作り出す。このVCLはレトロウイルスベクターの(外来の)ゲノムのみを含むビリオン粒子を作り、従って、これまでのところ治療用として安全なレトロウイルスベクターであると考えられている。

【０１１６】

「レトロウイルスベクター構築物」とは、本発明の好ましい実施形態では、結合ドメイン-免疫グロブリン融合物コード核酸配列などの目的配列または目的遺伝子の発現を命令し得る集合体をさす。要するに、このレトロウイルスベクター構築物は5' LTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、第二鎖DNA合成の起点および3' LTRを含んでいなければならない。例えば、タンパク質(例えば、細胞傷害性タンパク質、疾病関連抗原、免疫補助分子、または置換遺伝子)をコードする配列、または分子それ自体として有用なもの(例えば、リボザイムまたはアンチセンス配列)をはじめ、ベクター構築物には多様な異種配列を含め得る。

【０１１７】

本発明のレトロウイルスベクター構築物は、例えばB、CおよびD型レトロウイルス、ならびにスプマウイルスおよびレンチウイルスをはじめとする多様なレトロウイルスから容易に構築することができる(例えば、RNA Tumor Viruses, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985参照)。このようなレトロウイルスはAmerican Type Culture Collection ("ATCC"; Rockville, Maryland)などの寄託先またはコレクションから容易に得られるか、または一般に利用可能な技術を用いて既知起源から単離することができる。上記のレトロウイルスはいずれも、本明細書の開示および標準的な組換え技術(例えば、Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Kunkle, PNAS 82:488, 1985)に示される本発明のレトロウイルスベクター構築物、パッケージング細胞、または産生細胞を組立てまたは構築すべく容易に使用できる。

【０１１８】

一般にウイルスベクターで用いるのに好適なプロモーターとしては、限定されるものではないが、レトロウイルスLTR；SV40プロモーター；およびMiller, et al., Biotechniques

7:980-990 (1989)に記載のヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、またはその他いずれかのプロモーター(例えば、限定されるものではないが、ヒストン、pol III、およびβ-アクチンプロモーターをはじめとする真核細胞プロモーターなどの細胞プロモーター)が挙げられる。用い得るその他のプロモーターとしては、限定されるものではないが、アデノウイルスプロモーター、チミジンキナーゼ(TK)プロモーター、およびB19パルボウイルスプロモーターが挙げられる。好適なプロモーターの選択は、当業者には本明細書に含まれている教示から明らかであり、上記のような調節プロモーターまたはプロモーターのいずれかから選択すればよい。

【０１１９】

上記のように、パッケージング細胞系統に形質導入して産生細胞系統を形成するにはレトロウイルスプラスミドベクターを用いる。トランスフェクトし得るパッケージング細胞の例としては、限定されるものではないが、PE501、PA317、Ψ-2、Ψ-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、ΨCRE、ΨCRIP、GP+E-86、GP+envAm12、およびMiller, Human Gene Therapy, 1:5-14 (1990)に記載のDNA細胞系統が挙げられる。このベクターは当技術分野で公知のいずれかの手段によってパッケージング細胞に形質導入し得る。このような手段としては、限定されるものではないが、エレクトロポレーション、リポソームの使用、および$CaPO_4$沈殿法が挙げられる。1つの選択肢としては、レトロウイルスプラスミドベクターをリポソームに封入するか脂質と結合させた後、宿主に投与してもよい。

【０１２０】

産生細胞系統は結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸配列を含む感染力のあるレトロウイルスベクター粒子を生じる。次に、このようなレトロウイルスベクター粒子を用いてin vitroまたはin vivoのいずれかで真核細胞に形質導入すればよい。形質導入された真核細胞は結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸配列を発現する。形質導入し得る真核細胞としては、限定されるものではないが、胚幹細胞ならびに造血系幹細胞、肝細胞、繊維芽細胞、循環末梢血単球および骨髄単球をはじめとする多形核細胞、リンパ球、筋芽細胞、組織マクロファージ、樹状細胞、クップファー細胞、リンパ節および脾臓のリンパ様細胞および網内皮細胞、ケラチノサイト、内皮細胞および気管支上皮細胞が挙げられる。

【０１２１】

ウイルスベクターを用いて組換え結合ドメイン-免疫グロブリン融合発現構築物を製造する本発明の実施形態のもう1つの例として、ある好ましい実施形態では、結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドまたは融合タンパク質の発現を命令する組換えウイルス構築物によって形質導入された宿主細胞は、ウイルスの出芽の際、ウイルス粒子により組み込まれた宿主細胞膜の部分に由来する発現結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドまたは融合タンパク質を含有するウイルス粒子を生じ得る。

【０１２２】

もう1つの態様では、本発明は、上記の組換え結合ドメイン-免疫グロブリン融合発現構築物を含む宿主細胞に関する。宿主細胞は、本発明のベクターおよび／または発現構築物（例えばクローニングベクター、シャトルベクターまたは発現構築物であってもよい)で遺伝子操作(形質導入、形質転換またはトランスフェクト)される。このベクターまたは構築物は例えばプラスミド、ウイルス粒子、ファージなどの形態であってもよい。これら操作された宿主細胞は、プロモーターの活性化、形質転換体の選択、または結合ドメイン-免疫グロブリン融合ポリペプチドまたは結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質をコードする遺伝子などの特定の遺伝子の増幅に適当なように改変した 従来の栄養培地で培養することができる。温度、pHなど、発現のために選択された個々の宿主の培養条件は当業者ならば容易に明らかとなる。

【０１２３】

宿主細胞は哺乳類細胞などの高等真核細胞または酵母細胞などの下等真核細胞であってもよく、あるいは宿主細胞は細菌細胞などの原核細胞であってもよい。本発明の適当な宿主

細胞の代表例としては、限定されるものではないが、大腸菌、放線菌(Streptomyces)、ネズミチフス菌(Salmonella tyvphimurium)などの細菌細胞；酵母などの真菌細胞；ドロソフィラ(Drosophila)S2およびスポドプテラ(Spodoptera)Sf9などの昆虫細胞；CHO、COSまたは293細胞などの動物細胞；アデノウイルス；植物細胞、あるいはin vitro増殖にすでに適合されているか、またはそのようにde novoで確立された好適ないずれかの細胞が挙げられる。適当な宿主の選択は本明細書の教示から当業者の範囲内にあるものと思われる。

【０１２４】

種々の哺乳類細胞培養系を用いて組換えタンパク質を発現させることができる。哺乳類発現系の例としては、Gluzman, Cell 23:175 (1981)に記載されているサル腎繊維芽細胞のCOS-7系統、ならびに例えばC127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞系統などの適合ベクターを発現し得る他の細胞系統が挙げられる。哺乳類発現ベクターは複製起点、好適なプロモーターおよびエンハンサーを含み、また、例えば結合ドメイン-免疫グロブリン融合発現構築物の製造に関して本明細書に記載されているものなど、必要があればリボゾーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与部位および受容部位、転写終結配列、および5'フランキング非転写配列を含む。SV40スプライス部位およびポリアデニル化部位に由来するDNA配列を用いて必要な非転写遺伝エレメントを提供してもよい。宿主細胞へのこの構築物の導入は、限定されるものではないが、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、またはエレクトロポレーション(Davis et al., 1986 Basic Methods in Molecular Biology)をはじめとする当業者に公知の種々の方法によって達成することができる。

【０１２５】

本発明の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質は周知の方法による投与向けの医薬組成物へと調剤できる。医薬組成物は一般に1以上の組換え発現構築物、および／またはそのような構築物の発現産物を、医薬上許容される担体、賦形剤または希釈剤と組み合わせて含む。このような担体は用いる用量および濃度でレシピエントに無毒なものである。核酸を基にした製剤、または本発明の組換え構築物の発現産物を含む製剤としては、約0.01μg/kg～約100mg/体重kgを典型的には皮内、皮下、筋肉内または静脈経路、あるいはその他の経路によって投与する。好ましい用量は約1μg/kg～約1mg/kgであり、約5μg/kg～約200μg/kgが特に好ましい。当業者ならば投与の回数および頻度が宿主の応答によって異なることが明らかであろう。治療用途の「医薬上許容される担体」は製薬分野で周知のものであり、例えばRemingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985)に記載されている。例えば、滅菌生理食塩水およびリン酸緩衝生理食塩水を生理学的pHで用いればよい。この医薬組成物には保存剤、安定剤、染料および香味剤も供してよい。例えば安息香酸ナトリウム、ソルビン酸およびp-ヒドロキシ安息香酸エステルを保存剤として添加してもよい(同上、1449)。さらに抗酸化剤および沈殿防止剤を用いてもよい(同上)。

【０１２６】

「医薬上許容される塩」とは、このような化合物および有機もしくは無機酸(酸付加塩)または有機もしくは無機塩基(塩基付加塩)の組合せから誘導される本発明の化合物の塩をさす。本発明のこれらの化合物は遊離塩基または塩形態のいずれで用いてもよく、両形体とも本発明の範囲内にあるとみなされる。

【０１２７】

1以上の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質コード構築物(またはそれらの発現産物)を含む医薬組成物は、その組成物の患者への投与を可能とするいずれの形態であってもよい。例えば、この組成物は固体、液体または気体(エアゾール)の形態であってもよい。典型的な投与経路としては、限定されるものではないが、経口、局所、非経口(舌下または口内)、舌下、直腸、膣および鼻内が挙げられる。本明細書において非経口とは、皮下注射、静脈内、筋肉内、胸骨内、海綿内、くも膜下内、道内、尿道内注射または点滴法が挙げられる。この医薬組成物は、組成物を患者に投与した際にそこに含まれる有効成

分がバイオアベラブルとなるように調剤する。患者へ投与する組成物は1以上の投与単位の形態をとり、例えば錠剤は単一の投与単位であり、エアゾール形態の本発明の1以上の化合物の容器は複数投与単位であり得る。

【０１２８】

経口投与としては、賦形剤および／または結合剤が存在してもよい。例としてスクロース、カオリン、グリセリン、デンプンデキストリン、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、およびエチルセルロースが挙げられる。着色剤および／または香味剤が存在してもよい。コーティング剤皮を用いてもよい。

【０１２９】

組成物は例えばエリキシル、シロップ、溶液、エマルションまたは懸濁液などの液体形態であってもよい。液体は二例として経口投与用または注射送達用であり得る。経口投与を意図する場合、好ましい組成物は1以上の結合ドメイン-免疫グロブリン融合構築物または発現産物の他、1以上の甘味剤、保存剤、染料／着色剤および香味強化剤を含む。注射投与を意図する組成物では、1以上の界面活性剤、保存剤、湿潤剤、分散剤、沈殿防止剤、バッファー剤、安定剤、および等張剤を含んでもよい。

【０１３０】

本明細書において液体医薬組成物は、溶液であれ懸濁液であれ、その他も同様の形態であっても、以下の1以上のアジュバントを含んでよい：注射水、塩水、好ましくは生理食塩水、リンゲル液、等張塩化ナトリウム、溶媒または懸濁媒として用いられる合成モノもしくはジグリセリドなどの固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたはその他の溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸、クエン酸またはリン酸などのバッファー、および塩化ナトリウムもしくはデキストロースなどの張力調節剤。

【０１３１】

非経口製剤はガラスまたはプラスチック製のアンプル、ディスポーザブルシリンジ、または多用量バイアルに封入することができる。生理食塩水が好ましいアジュバントである。注射用医薬組成物は滅菌することが好ましい。

【０１３２】

また製剤中には、限定されるものではないが、アルミニウム塩、油中水エマルション、生分解性オイルビヒクル、水中油エマルション、生分解性マイクロカプセル、およびリポソームをはじめとする送達ビヒクルなどの他の成分を含むことも望まれる。このようなビヒクルにおいて用いられる免疫刺激物質(アジュバント)の例としては、N-アセチルムラミル-L-アラニン-D-イソグルタミン(MDP)、リポポリ多糖類(LPS)、グルカン、IL-12、GM-CSF、γインターフェロンおよびIL-15が挙げられる。

【０１３３】

本発明の医薬組成物には当業者に公知の好適な担体はいずれも用い得るが、担体の種類は投与様式および徐放性が求められるかどうかによって異なる。皮下注射などの非経口投与では、担体は好ましくは水、塩水、アルコール、油脂、ワックスまたはバッファーを含む。経口投与では上記担体またはマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、タルク、セルロース、グルコース、スクロースおよび炭酸マグネシウムなどの固形担体はいずれも用い得る。生分解性ミクロスフェア(例えば、ポリ乳酸ガラクチド)も本発明の医薬組成物の担体として用い得る。好適な生分解性ミクロスフェアは例えば米国特許第4,897,268号および同第5,075,109号に開示されている。これに関しては、ミクロスフェアがおよそ25μより大きいことが望ましい。

【０１３４】

医薬組成物はまた、バッファーなどの希釈剤、アスコルビン酸などの抗酸化剤；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；タンパク質；アミノ酸；グルコース、スクロースまたはデキストリンをはじめとする炭水化物；EDTAなどのキレート剤、グルタチオン、ならびにその他の安定剤および賦形剤を含んでもよい。中性緩衝塩水または非特異的血清アルブミン

と混合した塩水は適当な希釈剤の例である。好ましくは製剤は希釈剤として適当な賦形剤溶液(例えば、スクロース)を用いて凍結乾燥物として調剤する。

【０１３５】

上記のように、本発明は結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質をコードする核酸分子を送達し得る組成物を含む。このような組成物としては組換えウイルスベクター(例えば、レトロウイルス(WO90/07936、WO91/02805、WO93/25234、WO93/25698、およびWO94/03622参照)、アデノウイルス(Berkner, Biotechniques 6:616-627, 1988; Li et al., Hum. Gene Ther. 4:403-409, 1993; Vincent et al., Nat. Genet. 5:130-134, 1993;およびKolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219, 1994参照)、ポックスウイルス(米国特許第4,769,330号、同第5,017,487号、およびWO89/01973参照)、ポリ陽イオン分子と複合化した組換え発現構築物核酸分子(WO93/03709参照)、およびリポソームと会合した核酸(Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7851, 1987参照)が挙げられる。特定の実施形態では、このDNAは死滅または不活性化アデノウイルスと結合させてもよい(Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147-154, 1992; Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6094, 1992参照)。他の好適な組成物としてはDNA-リガンド(Wu et al., J. Biol. Chem. 264:16985-16987, 1989参照)および脂質-DNAの組合せ(Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, 1989参照)が挙げられる。

【０１３６】

直接in vivo法の他、宿主細胞から細胞を取り出し、改変して、同じまたは別の宿主動物に入れるex vivo法を用いてもよい。ex vivoに関して結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質または結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質コード核酸分子を組織細胞へ導入するのに、上記で示したいずれの組成物を用いてもよいことは明らかである。ウイルス的、生理的および化学的取り込み法のプロトコールは当技術分野で周知のものである。

【０１３７】

よって、本発明はB細胞疾患または悪性症状を有する患者の治療、あるいはこのような患者に由来する細胞培養物の処置に有用である。本明細書において「患者」とは、温血動物、好ましくはヒトをさす。患者はB細胞リンパ腫などの癌に罹患していても正常(すなわち、検出可能な疾病および感染がない)であってもよい。「細胞培養物」とは、ex vivo処理に従ういずれかの調製物であり、例えば免疫担当細胞または免疫系の単離細胞(限定されるものではないが、T細胞、マクロファージ、単球、B細胞および樹状細胞を含む)を含む調製物がある。このような細胞は当業者に周知の種々の技術のいずれによって単離してもよい(例えば、フィコール-ハイパーク密度勾配遠心分離)。細胞は(必ずしもその必要はないが)B細胞疾患または悪性症状に罹患した患者から単離されたものであって、処置後に患者に再導入されるものであってもよい。

【０１３８】

非経口または経口投与のいずれかを意図した液体組成物は好適な用量が得られるような量の結合ドメイン-免疫グロブリン融合タンパク質コード構築物または発現産物を含んでいなければならない。典型的には、この量は組成物中、結合ドメイン-免疫グロブリン融合物構築物または発現産物の少なくとも0.01重量％である。経口投与を意図する場合、この量は組成物重量の0.1から約70％の間で異なる。好ましい経口組成物は約4％から約50％の間の結合ドメイン-免疫グロブリン融合構築物または発現産物を含有する。好ましい組成物および製剤としては、非経口投与単位が有効化合物0.01から1重量％となるように調製する。

【０１３９】

この医薬組成物は、担体が溶液、エマルション、軟膏またはジェル基剤を適宜含み得る場合には局所投与も意図し得る。例えば基剤は以下のものの1以上を含み得る：ワセリン、ラノリン、ポリエチレングリコール、蜜蝋、鉱油、水およびアルコールなどの希釈剤、ならびに乳化剤および安定剤。局所投与用医薬組成物中には増粘剤が存在してもよい。経皮投与を意図する場合には、組成物は経皮パッチまたはイオン導入装置を含んでもよい。局

所製剤は約0.1から約10% w/v(単位容量当たりの重量)の濃度の結合ドメイン-免疫グロブリン融合構築物または発現産物を含めばよい。

【０１４０】

この組成物は例えば直腸内で融解して薬剤を放出する坐剤の形態で直腸投与を意図してもよい。直腸投与用の組成物は好適な無刺激性賦形剤として油性基剤を含み得る。このような基剤としては、限定されるものではないが、ラノリン、カカオ脂、およびポリエチレングリコールが挙げられる。

【０１４１】

本発明の方法では、結合ドメイン-免疫グロブリン融合物コード構築物または発現産物はインサート、ビーズ、徐放性製剤、パッチ、または速放性製剤の使用によって投与してもよい。

【０１４２】

以下の実施例は例示のために示すものであって、これに限定されない。

【実施例１】

【０１４３】

2H7可変領域のクローニングと2H7scFV-Igの構築および配列決定

本実施例はモノクローナル抗体2H7の重鎖および軽鎖可変領域をコードするcDNA分子のクローニングについて示す。本実施例はまた2H7scFv-Igの構築、配列決定および発現についても示す。

【０１４４】

CD20と特異的に結合する2H7モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞はワシントン州立大学(Seattle, WA)のEd Clarkにより提供されたものである。採取に先立ち、ハイブリドーマ細胞はグルタミン、ピルビン酸、DMEM非必須アミノ酸、およびペニシリン-ストレプトマイシンを添加したRPMI 1640培地(Life Technologies, Gaithersburg, MD)中で数日間、対数増殖期で維持した。細胞を遠心分離により培地からペレット化し、2×10^7細胞を用いてRNAを調製した。Pharmingen (San Diego, CA)全RNA単離キット(カタログ番号45520K)を用いキットに付随する製造業者の説明書に従って2H7産生ハイブリドーマ細胞からRNAを単離した。1□gの全RNAを鋳型として用い、逆転写によりcDNAを調製した。RNAおよび300ngのランダムプライマーを合わせ、酵素の添加前に72℃で10分間変性させた。酵素を添加した5X第二鎖バッファーおよび0.1M DTTの存在下、Superscript II逆転写酵素(Life Technologies)をRNAとプライマー混合物へ総量25□lで添加した。逆転写反応を42℃で1時間進行させた。

【０１４５】

ランダムプライム逆転写酵素反応で生成した2H7 cDNAおよびV領域特異的プライマーを用い、PCRにより2H7抗体の軽鎖および重鎖可変領域を増幅した。このV領域特異的プライマーは公開されている配列(Genbank受託番号はV_LがM17954、V_HがM17953)を指標として用いてデザインした。この2つの可変鎖を適合末端配列を用い、増幅および制限酵素消化の後にこの2つのV領域を連結することによってscFvが構築できるようにデザインした。

【０１４６】

この2つのV領域の間に挿入される$(gly_4ser)_3$ ペプチドリンカーを、2H7のV_Lのアンチセンスプライマーに付加的なヌクレオチドを加えることで組み込んだ。またSac I制限部位もこの2つのV領域の間の接合部に導入した。HindIII制限部位と軽鎖リーダーペプチドを含み、2H7 V_Lの増幅に用いたセンスプライマーは、5'-gtc aag ctt gcc gcc atg gat ttt caa gtg cag att ttt cag c-3'(配列番号__)であった。アンチセンスプライマーは、5'-gtc gtc gag ctc cca cct cct cca gat cca cca ccg ccc gag cca ccg cca cct ttc agc tcc agc ttg gtc cc-3'(配列番号__)であった。V領域のリーディングフレームは太字の下線のコドンで示し、HindIIIおよびSacI部位は斜体下線の配列で示す。

【０１４７】

V_Hドメインはリーダーペプチドを用いずに増幅したが、V_Lとの融合のための5' SacI制限部位、ならびにヒトIgG1 Fcドメインおよび末端切断型CD40リガンドであるCD154をはじめ

とする種々のテールとの融合のための3'末端にBclI制限部位を含んだ。センスプライマーは、5'-gct gct gag ctc tca ggc tta tct aca gca agt ctg g-3'(配列番号__)であった。SacI部位は斜体下線フォントで示し、V_Hドメインの最初のアミノ酸コドンのリーディングフレームは太字下線で示す。アンチセンスプライマーは5'-gtt gtc tga tca gag acg g tg acc gtg gtc cc-3'(配列番号__)であった。BclI部位は斜体下線で示し、V_Hドメイン配列の最後のセリンは太字下線で示す。

【０１４８】

2H7 scFv HindIII-BclI断片をヒトIgG1ヒンジ、CH2、およびCH3領域を含み、制限酵素HindIIIおよびBclIで消化したpUC19へ挿入することでscFv-Igを構築した。連結後、連結産物をDH5α菌へ形質転換した。診断部位として2H7のV_L-V_H接合部にあるSacI部位を用い、適切に断片が挿入されたかどうかで陽性クローンをスクリーニングした。この2H7scFv-Ig cDNAに対して、PE 9700サーモサイクラーにて96℃10秒の変性、50℃30秒のアニーリング、および72℃4分の伸張による25サイクルのプログラムを用い、サイクルシーケンシングを行った。シーケンシングプライマーはpUCフォワードおよびリバースプライマーならびにIgG不変領域部分においてヒトCH2ドメインとアニーリングされた内部プライマーとした。シーケンシング反応はBig Dye Terminator Ready Sequencing Mix (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA)を製造業者の説明書に従って用いて行った。次に、Centrisepカラム(カタログ番号CS-901, Princeton Separations, Adelphia, N.J.)を用いてサンプルを精製し、Savant真空乾燥機で溶出物を乾燥させ、Template Suppression Reagent (PE-ABI)で変性し、ABI 310 Genetic Analyzer (PE-Applied Biosystems)で解析した。配列を編集、翻訳し、Vector Ntiバージョン6.0 (Informax, North Bethesda, MD)を用いて解析した。図1は2H7scFv-Ig構築物のcDNAおよび推定アミノ酸配列を示す。

【実施例２】

【０１４９】

安定なCHO細胞系統における2H7scFV-Igの発現

本実施例は真核細胞系統における2H7scFv-Igの発現、ならびにSDS-PAGEによる、また、ADCCおよび補体結合を含む機能的アッセイによる発現2H7scFv-Igの特性決定について示す。

【０１５０】

正確な配列の2H7scFv-Ig HindIII-XbaI(～1.6kb)断片を哺乳類発現ベクターpD18へ挿入し、陽性クローン由来のDNAをQIAGENプラスミド調製キット(QIAGEN, Valencia, CA)を用いて増幅した。次に、組換えプラスミドDNA(100□g)をAscI消化により非必須領域で線状化し、フェノール抽出により精製し、組織培養培地Excell 302(カタログ番号14312-79P, JRH Biosciences, Lenexa, KS)に再懸濁させた。トランスフェクション用の細胞CHO DG44細胞は対数増殖期で維持し、各トランスフェクション反応につき10^7細胞を採取した。エレクトロポレーションのため、線状DNAをこのCHO細胞に総量0.8mlで加えた。

【０１５１】

2H7 scFv-Ig融合タンパク質(配列番号10)の安定生産は、CMVプロモーターの制御下に2H7 scFv-Ig cDNAを含む選択的増幅プラスミドpD18の、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞へのエレクトロポレーションによって達成した。2H7発現カセットを～1.6kb HindIII-XbaI断片としてベクター多重クローニング部位のCMVプロモーターの下流にサブクローニングした。このpD18ベクターはプラスミドの選択圧を高めるべく弱化したプロモーターとともにDHFR選択マーカーをコードするpcDNA3である。Qiagen maxiprepキットを用いてプラスミドDNAを調製し、精製したプラスミドを固有AscI部位で線状化した後、フェノール抽出およびエタノール沈降を行った。サケ精子DNA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を担体DNAとして加え、各100□gのプラスミドおよび担体DNAを用いてエレクトロポレーションにより10^7 CHO DG44細胞をトランスフェクトした。細胞をグルタミン(4mM)、ピルビン酸、組換えインスリン、ペニシリン-ストレプトマイシン、および2X DMEM非必須アミノ酸(全てLife Technologies, Gaithersburg, Marylandより)を含有するExcell 302培地(JRH Biosciences)(以下、「Excell 302完全」培地と呼ぶ)で対数増殖期まで増殖させた。非トランスフェクト細胞用の培地にはHT(ヒポキサンチンおよびチミジンの100X溶液から希釈)(L

ife Technologies)も含んだ。選択下のトランスフェクション用培地には選択剤として50nM～5□Mの範囲の種々のレベルのメトトレキサート(Sigma-Aldrich)を含んだ。エレクトロポレーションは275ボルト、950□Fで行った。トランスフェクト細胞を非選択培地で一晩回復させた後、96ウェル平底プレート(Costar)に125細胞/ウェル～2000細胞/ウェルの範囲の種々の希釈シリーズで選択平板培養した。細胞のクローニング用の培地は100nMのメトトレキサートを含有するExcell 302完全培地とした。クローン増殖が十分となったところでマスターウェルからの培養上清の希釈シリーズについてCD20-CHOトランスフェクト細胞と結合するかどうかスクリーニングする。融合タンパク質の産生の最も高いクローンをT25次いでT75フラスコと拡張し、冷凍および2H7scFvIgのスケールアップ生産に十分な数の細胞を得た。さらに、メトトレキサート含有培地で連続的に増幅することで3つのクローン由来の培養物の産生レベルを高めた。細胞の各連続継代培養では、Excell 302完全培地には増加濃度のメトトレキサートを含み、DHFRプラスミドを増幅した細胞だけが生き残るようにした。

【０１５２】

2H7scFv-Igを発現するCHO細胞から上清を回収し、0.2□mのPES発現フィルター(Nalgene, Rochester, NY)で濾過し、Aタンパク質-アガロース(IPA 300架橋アガロース)カラム(Repligen, Needham, MA)に通した。このカラムをPBSで洗浄した後、結合したタンパク質を0.1Mクエン酸バッファーpH3.0で溶出した。画分を回収し、溶出タンパク質を1M Tris, pH 8.0で中和した後、PBS中で一晩透析した。精製した2H7scFv-Ig(配列番号__)の濃度は280nmの吸光度で測定した。Vector Ntiバージョン6.0ソフトウエアパッケージ(Informax, North Bethesda, MD)を用い、吸光率1.77が測定された。このプログラムはアミノ酸組成を用いて吸光率を算出するものである。

【０１５３】

トランスフェクトされた安定なCHO細胞による2H7scFv-Igの産生レベルはフローサイトメトリーで分析した。精製したCHO細胞に対する2H7scFv-IgをCD20を発現したCHO細胞(CD20 CHO)に結合させ、フルオレセイン結合抗ヒトIgG セカンドステップリージェント(カタログ番号H10101およびH10501, CalTag, Burlingame, CA)を用い、フローサイトメトリーにより分析した。図2(上)はCD20 CHOに結合している2H7scFv-Igを滴定することで作製した標準曲線を示す。各濃度の2H7scFv-Igに対し、フルオレセインシグナルの平均明度が直線上に示されている。次に、2H7scFv-Igを発現する安定なCHO細胞クローンを含むTフラスコから回収した上清をCD20 CHOと結合させ、その結合をフローサイトメトリーによって分析した。上清に含まれていた2H7scFv-Igによって生じたフルオレセインシグナルを測定し、上清中の2H7scFv-Ig濃度を標準曲線から算出した(図2、下)。

【０１５４】

精製した2H7scFv-Ig(配列番号__)をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。それぞれAタンパク質アガロースカラムに流すことにより精製した2H7scFv-Igサンプルをジスルフィド結合を還元しないSDSサンプルバッファー中で煮沸し、SDS 10% Tris-BISゲル(カタログ番号NP0301, Novex, Carlsbad, CA)に適用した。各精製バッチ20μgをゲルにロードした。電気泳動後、クーマシーブルー染色(Pierce Gel Code Blue Stain Reagent, カタログ番号24590, Pierce, Rockford, IL)によりタンパク質を可視化し、蒸留水中で脱色した。同じゲルに分子量マーカーも含めた(Kaleidoscope Prestained Standards, カタログ番号161-0324, Bio-Rad, Hercules, CA)。結果は図3に示す。レーンの上の数字は各々の精製バッチを示す。図の左側に分子量マーカーの分子量kDaを示す。別のサンプル調製条件を用いたさらなる実験では、DTTまたは2-メルカプトエタノールを含有するSDSサンプルバッファー中でタンパク質を煮沸することでジスルフィド結合を還元すると2H7scFv-Igの凝集が生じることが示された。

【０１５５】

当技術分野で周知の通常のアッセイを用い、他のいくつかの免疫学的パラメーターをモニタリングしてもよい。これらには例えば抗体依存細胞媒介性細胞傷害作用(ADCC)アッセイ、in vitro二次抗体応答、十分確立されたマーカー抗原系を用いる種々の抹消血またはリ

ンパ系単核細胞部分集団のフロー免疫細胞蛍光測定解析、免疫組織化学またはその他関連のアッセイが含まれる。これらおよびその他のアッセイは例えばRose et al. (Eds.), Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5th Ed., 1997 American Society of Microbiology, Washington, DCに見出せる。

【０１５６】

補体の存在下で2H7scFv-IgがCD20陽性細胞を死滅させる能力はB細胞系統RamosおよびBjabを用いて試験した。このアッセイにはウサギ補体(Pel-Freez, Rogers, AK)を1/10の最終濃度で用いた。精製2H7scFv-IgをB細胞および補体とともに37℃で45分間インキュベートした後、トリパンブルー排除により生細胞と死細胞を計数した。図4Aの結果はウサギ補体の存在下で2H7scFv-IgがCD20を発現するB細胞を溶解したことを示す。

【０１５７】

末梢血単核細胞(PBMC)の存在下、2H7scFv-IgがCD20陽性細胞を死滅させる能力は、100:1比のPBMCおよびBjabを用い、4時間のアッセイ中、標識Bjab細胞からの^{51}Crの放出を測定することにより試験した。図4Bに示される結果は、PBMCおよび2H7scFv-Igの双方の存在下ではPBMCまたは2H7scFv-Igいずれか単独の存在下よりも^{51}Crの放出が高いことから、2H7scFv-Igが抗体依存細胞傷害作用(ADCC)を媒介し得ることが示された。

【実施例３】

【０１５８】

正常B細胞の増殖およびCD95の発現に対するCD20およびCD40の同時連結の作用、ならびにアポトーシスの誘導

本実施例は細胞増殖に対する細胞表面で発現したCD20およびCD40の架橋の作用について示す。

【０１５９】

稠密な休止B細胞をヒト扁桃からパーコール密度勾配によって単離し、Eロゼット形成試験によりT細胞を取り出した。休止中の稠密な扁桃B細胞の増殖は4日間の実験のうち最後の12時間の^{3}[H]-チミジン取り込みによって測定した。示されたように、増殖は4回の培養における平均値±標準誤差として測定した。ネズミ抗ヒトCD20 mAb 1F5は単独で用いるか(抗CD20)、または抗ネズミκmAb 187.1と架橋した(抗CD20XL)。CD40の活性化はネズミCD8と融合した可溶性ヒトCD154(CD154)(Hollenbaugh et al., EMBO J. 11: 4212-21 (1992))を用いて行い、CD40の架橋は抗ネズミCD8 mAb 53-6 (CD154XL)を用いて行った。この手順により細胞表面におけるCD20およびCD40の同時架橋が可能であった。結果は図5に示す。

【０１６０】

Bリンパ腫細胞系統であるRamos細胞に対するCD20およびCD40架橋の作用を調べた。CD20(1F5)およびCD40(G28-5)と特異的に結合するネズミmAbを用いた処理(ヤギ抗マウスIgG(GAM)は含まない)および／または架橋(+GAM)8時間後のRamos細胞のCD95(Fas)発現およびアポトーシス％を分析した。対照はCD3に特異的な非結合イソ型対照(64.1)で処理した。

【０１６１】

処理したRamos細胞を回収し、FITC-抗CD95とともにインキュベートし、フローサイトメトリーによる分析で、CD20またはCD40架橋後の細胞表面のFasの相対的発現レベルを求めた。データは示された刺激による処理後の細胞の平均蛍光としてプロットしたものである(図6A)。

【０１６２】

同じ実験の、処理したRamos細胞を採取し、アネキシンVの結合を測定して処理した培養物におけるアポトーシス％を示した。アポトーシスは、1F5およびG28-5を用いてCD20およびCD40を架橋してから18時間後にアネキシンVを結合させ、その後、GAMと架橋させることで測定した。アネキシンVの結合はFITC-アネキシンVキット(カタログ番号PN-IM2376, Immunotech, Marseille, France)を用いて測定した。アネキシンVの結合は細胞がアポトーシスへと進む初期段階であることが知られている。アポトーシス、すなわちプログラムされた細胞死は自殺による細胞死をもたらす異化反応のカスケードを特徴とするプロセスである。アポトーシスの初期段階において、細胞が形態変化してDNAを加水分解するまでは細胞

膜の完全性は維持されるが、細胞は膜のリン脂質の非対称性を失い、細胞表面にホスファチジルセリンなどの負電荷リン脂質が露出する。カルシウムおよびリン脂質結合タンパク質であるアネキシンVは優先的かつ高い親和性でホスファチジルセリンと結合する。FASレセプター(CD95)の発現に対するCD20およびCD40両者の架橋の作用を示す結果が図6Bに示されている。細胞へのアネキシンVの結合に対するCD20およびCD40両者の架橋の作用は図6Bに示されている。

【実施例４】

【０１６３】

2H7 scFV-CD154融合タンパク質の構築および特性決定

CD20およびCD40の両者と結合し得る分子を構築するため、2H7 scFvをコードするcDNAをCD40リガンドであるCD154をコードするcDNAと融合させた。この2H7 scFvIg構築物から、HindIII-BclI断片にコードされている2H7 scFv cDNAを取り出し、ヒトCD154の細胞外ドメインをコードするBamHI-XbaI cDNA断片とともにpD18ベクターに挿入した。この細胞外ドメインは他のII型膜タンパク質と同様、CD154のカルボキシ末端にコードされている。

【０１６４】

このヒトCD154の細胞外ドメインを、ランダムプライマーおよびPHA(フィトヘマグルチニン)で活性化したヒトTリンパ球由来RNAを用いて作製したcDNAを用いてPCR増幅した。これらのプライマー対は2つの異なる5'またはセンスプライマーを含んでおり、CD154の細胞外ドメイン内の2つの異なる位置に融合接合部を作り出した。2つの異なる融合接合部をデザインし、これらはCD154の細胞外ドメインのアミノ酸108(Glu)-261(Leu)+(Glu)を含む短鎖または末端切断型(S4型)とアミノ酸48(Arg)-261(Leu)+(Glu)を含む長鎖または完全型(L2型)を生じ、両者ともBamHI-XbaI断片として構築されたものである。2つの異なる末端切断型細胞外ドメインと2H7scFvを融合させるセンスプライマーはクローニングのためのBamHI部位を含む。CD154 cDNAのS4型に対するセンスプライマーは配列番号11またはCD154BAM108で示され、以下の配列：5'-gtt gtc gga tcc aga aaa cag ctt tga aat gca a-3'を有する34マーをコードし、一方、アンチセンスプライマーは配列番号12またはCD154XBAで示され、以下の配列：5'-gtt gtt tct aga tta tca ctc gag ttt gag taa gcc aaa gga cg-3'を有する44マーをコードする。

【０１６５】

アミノ酸48(Arg)-261(Leu)+(Glu)をコードするCD154細胞外ドメインの長鎖型(L2)の増幅に用いるオリゴヌクレオチドプライマーは以下の通りである。センスプライマーはCD154BAM48(配列番号13)で示され、以下の配列：5'-gtt gtc gga tcc aag aag gtt gga caa gat aga ag-3'を有する35マーをコードする。アンチセンスプライマーはCD154XBA(配列番号__)で示され、5'-gtt gtt tct aga tta tca ctc gag ttt gag taa gcc aaa gga cg-3'の44マーをコードする。その他のPCR反応条件は2H7 scFvの増幅に用いたものと同じとした(実施例1参照)。PCRクイックキット(QIAGEN, San Diego, CA)によりPCR断片を精製し、30□l ddH_2Oで溶出し、反応量40□l、37℃にて3時間、BamHIおよびXbaI(Roche)制限エンドヌクレアーゼで消化した。断片をゲル精製し、QIAEXキットを製造業者(QIAGEN)の説明書に従って用いて精製し、HindIII+XbaIで消化したpD18発現ベクター中へ2H7 HindIII-BclI断片とともに連結した。連結反応物をDH5-α化学適合菌へ形質転換し、100□g/mlアンピシリンを含有するLBプレートで平板培養した。形質転換体を37℃で一晩培養し、単離したコロニーを用い、100□g/mlアンピシリンを含有するLuria Broth中3mlの液体培養物へ接種した。ミニプラスミドプレパレーション(QIAGEN)の後、2H7 scFvおよびCD154両者の細胞外ドメイン断片が挿入されているかどうかでクローンをスクリーニングした。

【０１６６】

2H7scFv-CD154構築物cDNAに対して、PE 9700サーモサイクラーにて96℃10秒の変性、50℃5秒のアニーリングおよび60℃4分の伸張を含む25サイクルを用いてサイクルシーケンシグを行った。用いたシーケンシグプライマーはpD18フォワード(配列番号__: 5'-gtctatataagcagagctctggc-3')およびpD18リバース(配列番号__: 5'-cgaggctgatcagcgagctctagca-3')プライマーであった。さらにヒトCD154配列(配列番号__: 5'-ccgcaatttgaggattctgatcacc

-3')と相同性を有する内部プライマーを用いた。シーケンシング反応には3.2pmolのプライマー、およそ200ngのDNA鋳型、および8□lのシーケンシング混合物を含んだ。シーケンシング反応はBig Dye Terminator Ready Sequencing Mix (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA)を製造業者の説明書に従って用いて行った。次に、Centrisepカラム(Princeton Separations, Adelphia, NJ)を用いてサンプルを精製した。溶出物をSavant急速真空乾燥機で乾燥させ、20□lのTemplate Suppression Reagent (ABI)中、95°Cで2分間変性させ、ABI 310 Genetic Analyzer (PE-Applied Biosystems)で解析した。配列を編集、翻訳し、Vector Ntiバージョン6.0 (Informax, North Bethesda, MD)を用いて解析した。2H7scFv-CD154 L2のcDNA配列および推定アミノ酸は図7Aに示され、2H7scFv-CD154 S4のcDNA配および推定アミノ酸配列は図7Bに示されている。

【０１６７】

2H7 scFv-CD154融合タンパク質(配列番号: __および__)のCD20およびCD40に対する結合活性はフローサイトメトリーによって同時に測定した。このアッセイではCD20を発現するCHO細胞標的を用いた。2H7 scFv-CD154発現プラスミドでトランスフェクトした細胞からの上清とともにCD20 CHO細胞を45分間インキュベートした後、CD20 CHO細胞を2回洗浄し、PBS/2% FBS中、ビオチン結合CD40-Ig融合タンパク質とともにインキュベートした。45分後、細胞を2回洗浄し、PBS/2% FBS中、1:100で、ヒコエリスリン(PE)標識ストレプトアビジン(Molecular Probes, Eugene OR)とともにインキュベートした。さらに30分間インキュベートした後、細胞を2回洗浄し、フローサイトメトリーにより分析した。結果は2H7 scFv-CD154分子が細胞表面でCD20と結合し、ビオチン結合CD40を溶液から取り込むことができたことを示す(図8)。

【０１６８】

Bリンパ腫およびリンパ芽球様細胞系統の増殖および生存力に対する2H7scFv-CD154の作用を調べるため、細胞を12時間、2H7scFv-CD154 L2(配列番号__)とともにインキュベートした後、アネキシンVの結合に関して調べた。アネキシンVの結合はFITC-アネキシンVキット(Immunotech, Marseille, France, カタログ番号PN-IM2376)を用いて測定した。B細胞系統を、分泌型の2H7scFv-CD154融合タンパク質を発現する細胞からの上清を濃縮、透析したものの希釈物とともに1ml培養物中でインキュベートした。結果は図9に示す。

【０１６９】

2H7scFv-CD154の存在下のRamos Bリンパ腫細胞系統の増殖速度を、24時間の培養のうち少なくとも6時間の間の^{3}H-チミジン取り込みによって調べた。細胞増殖に対する2H7scFv-CD154の作用は図10に示されている。

【実施例５】

【０１７０】

CytoxB抗体誘導体の構築および特性決定

CytoxB抗体は2H7 scFv-IgGポリペプチド由来のものであった。2H7 scFv(実施例1参照)を改変型ヒンジドメイン(実施例11参照)を介してヒトIgG1 Fcドメインと連結した。ヒンジ領域中のシステイン残基を位置指定突然変異誘発およびその他当技術分野で公知の方法によってセリン残基に置換した。この変異型ヒンジを野生型FcドメインとCytoB-MHWTG1Cと呼ばれる構築物を作出するか、あるいはCH2ドメインにさらなる突然変異を導入した変異型Fcドメイン(CytoxB-MHMG1C)と融合した。エフェクター機能に関連するCH2のアミノ酸残基は図11に示されている。これらの残基の1以上の突然変異はFcR結合およびエフェクター機能の媒介を低下させ得る。本実施例では、2H7 scFv融合タンパク質において、当技術分野でFcレセプター結合に重要であることが分かっているロイシン残基234を変異させた(CytoxB-[MG1H/MG1C])。また別の構築物では、ヒトIgG1ヒンジ領域を、野生型ヒトFcドメインと融合したヒトIgAヒンジ部分に置換した(CytoxB-IgAHWTHG1C)(図11参照)。この変異型ヒンジ領域はヒトIgG1 CH2およびCH3ドメインの機能特性を保持する単量体および二量体分子の混合物を発現させる。これらの分子の合成組換えcDNA発現カセットを構築し、実施例2に記載の方法に従ってポリペプチドをCHODG44細胞で発現させた。

【０１７１】

CytoxB-scFvIg分子の精製した融合タンパク質誘導体を実施例2に記載の方法に従いSDS-PAGEによって解析した。ポリアクリルアミドゲルの泳動は非還元および還元条件下で行った。2つの異なる分子量マーカーセット、BioRadプレステインマーカー(BioRad, Hercules, CA)およびNovex Multimark分子量マーカーを各ゲルにロードした。種々の構築物およびRituximab(商標)の移動パターンを図12に示す。

【０１７２】

CytoxB-scFvIg分子の種々の誘導体がADCCを媒介する能力は、標的としてBjab Bリンパ腫細胞を、エフェクター細胞として新たに調製したヒトPBMCを用いて測定した(実施例2参照)。エフェクターと標的の比率は70:1、35:1、および18:1と変え、ウェル当たりのBjab細胞数は一定としてPBMCの数を変えた。Bjab細胞は^{51}Crで2時間標識し、平底96ウェルプレートの各ウェルに5x10^{4}細胞/ウェルの細胞密度で分注した。精製した融合タンパク質またはrituximabを種々の希釈率のPBMCに10mg/mlの濃度で加えた。PBMCまたは融合タンパク質を添加せずに自然放出を測定し、適当なウェルに洗剤(1% NP-40)を加えることで最大放出を測定した。反応物を4時間インキュベートし、培養上清100μlをLumaplate (Packard Instruments)に採取し、一晩乾燥させた後、放出されたcpmを測定した。結果は図13に示す。

【０１７３】

CytoxB誘導体の補体依存細胞傷害(CDC)活性も測定した。反応は実質的に実施例2に記載した通りに行った。結果は、各濃度の融合タンパク質について全細胞に対する死細胞のパーセンテージとして図14に示す。

【実施例６】

【０１７４】

マカクにおけるin vivo研究

CytoxB誘導体の最初のin vivo研究はヒトでない霊長類で行った。図15はサルにおけるCytoxBの血漿半減期を特徴付けるデータを示す。測定は、矢印で示した日に各サルに6mg/kgの用量を投与した後、2個体の異なるマカク(J99231およびK99334)から得た血漿サンプルで行った。各サンプルについて存在する2H7scFvIgのレベルを精製CytoxB-(MHWTG1C)-Ig融合タンパク質とCD20 CHO細胞との結合によって作製した標準曲線に当てはめて推定した(実施例2参照)。データは図15の下のパネルの表で示す。

【０１７５】

マカクの循環CD40+細胞のレベルに対するCytoxB-(MHWTG1C)Ig融合タンパク質の作用を調べた。図16で示した日にそれぞれ完全な血球を計数した。さらに細胞集団の中からB細胞を検出するCD40特異的フルオレセイン結合抗体を用い、末梢血リンパ球に対してFACS(蛍光活性化細胞選別)アッセイを行った。次に陽性細胞のパーセンテージを用いて元のサンプルのB細胞数を算出した。データは注射後の示された日に測定した血液のマイクロタイター当たりのB細胞1000個としてグラフで示す(図16)。

【実施例７】

【０１７６】

抗CD19 scFV-Ig融合タンパク質の構築および発現

抗CD19 scFv-Ig融合タンパク質を構築し、真核細胞へトランスフェクトし、実施例1、2および5に記載の方法および当技術分野の標準に従って発現させた。CD19と特異的に結合する抗体HD37を産生するハイブリドーマ細胞から単離したRNAから可変重鎖領域および可変軽鎖領域をクローニングした。HD37scFv-IgAHWTG1CおよびHD37scFv-IgMHWTG1Cの発現レベルを測定し、精製HD37 scFvIgを用いて作製した標準曲線に当てはめた。結果は図17に示す。

【実施例８】

【０１７７】

抗L6 scFV-IG融合タンパク質の構築および発現

scFv-Ig融合タンパク質を抗癌腫mAb、L6に由来する可変領域を用いて構築した。この融合タンパク質を構築し、真核細胞へトランスフェクトし、実施例1、2および5に記載の方法

および当技術分野の標準に従って発現させた。L6scFv-IgAHWTG1CおよびL6scFv-IgMHWTG1Cの発現レベルを測定し、精製HD37 scFvIgを用いて作製した標準曲線に当てはめた。結果は図18に示す。

【実施例９】

【０１７８】

種々のscFV-Ig融合タンパク質の特性決定

すでに記載したscFv-Ig融合タンパク質の他、G28-1(抗CD37)scFv-Ig融合タンパク質を実質的に実施例1および5に記載のようにして調製した。重鎖および軽鎖可変領域を当技術分野で公知の方法に従ってクローニングした。2H7-MHWTG1C、2H7-IgAHWTG1C、G28-1-MHWTG1C、G28-1 IgAHWTG1C、HD37-MHWTG1C、およびHD37-IgAHWTG1CのADCC活性を上記の方法(実施例2参照)に従って測定した。結果は図19に示す。L6scFv-IgAHWTG1CおよびL6scFv-IgMHWTG1CのADCC活性は2981ヒト肺癌細胞系統を用いて測定した。結果は図20に示す。ネズミL6モノクローナル抗体はADCC活性を阻害しないことが分かっている。

【０１７９】

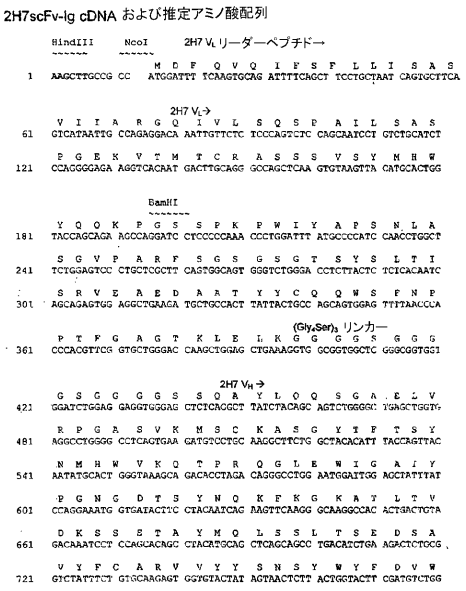
精製したタンパク質を還元および非還元条件下でSDS-PAGEにより解析した。実質的に実施例2および5に記載のようにしてサンプルを調製し、ゲル泳動を行った。L6および2H7 scFv-Ig融合タンパク質に関する結果は図21に示し、G28-1およびHD37 scFv-Ig融合タンパク質に関する結果は図22に示す。

【０１８０】

例示を目的に本発明の特定の実施形態を本明細書に記載してきたが、以上から、本発明の精神および範囲を逸脱することなく様々な改変を行えることが分かるであろう。よって、本発明は添付のクレーム以外のものに限定されない。

【図１Ａ】

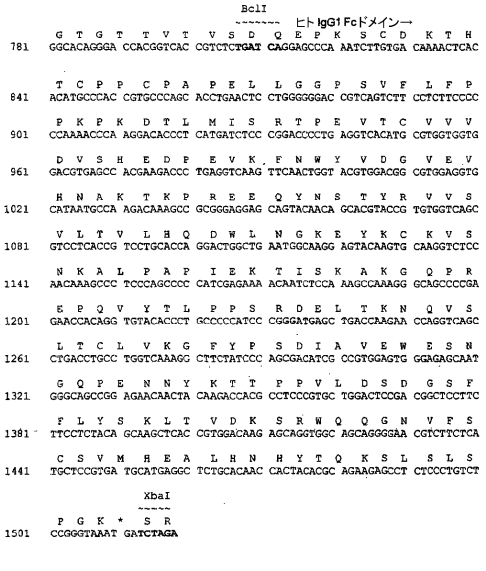
Figure 1A



1/26

【図１Ｂ】

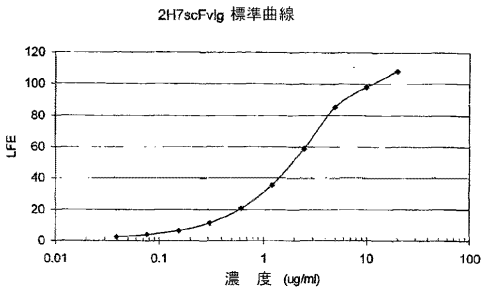
Figure 1B



2/26

【図２】

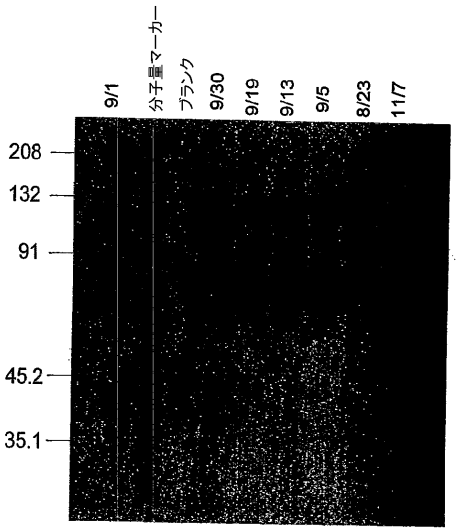
Figure 2.



クローン	LFE @ 1:50	推定濃度 (μg/ml)
D2	26.1	56
IIIC6	25.7	55
IVA3	28.6	61
消費量	29.6	64

【図３】

Figure 3.



【図４Ａ】

Figure 4A.

CD20 ターゲッティング 2H7 誘導体の結合後の補体により媒介される B 細胞の死滅

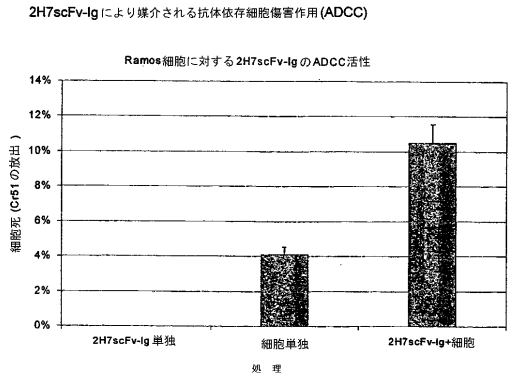
2H7scFv-Ig 濃度	RAMOS	BJAB
20 μg/ml + 補体	0.16	0.07
5 μg/ml + 補体	0.2	N.D.
1.25 μg/ml + 補体	0.32	0.1
補体単独	0.98	0.94

＊生存力はトリパンブルー排除により求め、計数した全細胞数に対する生存力のある細胞の分数として作表した。

**N.D.（推定されず）

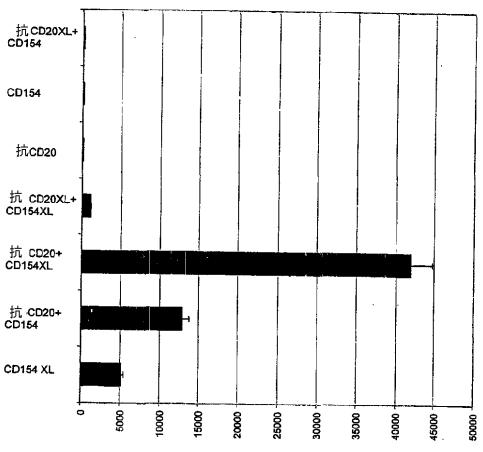
【図４Ｂ】

Figure 4B.



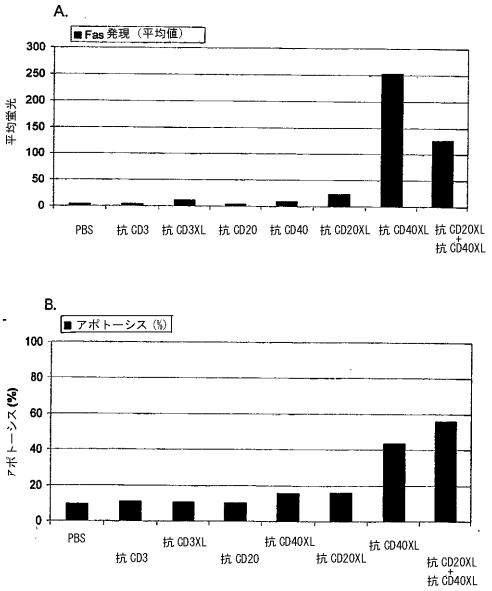
【図５】

Figure 5.



【図６】

Figure 6A and B.



【図７Ａ】

Figure 7A.

2H7-CD154 L2 cDNA および推定アミノ酸配列

```
      HindIII      NcoI  2H7 VL リーダーペプチド→
      ~~~~~~       ~~~~~~
                          M  D  F  Q  V  Q  I  F  S  F  L  L  I  S  A  S
   1  AAGCTTGCCG CC   ATGGATTT TCAAGTGCAG ATTTTCAGCT TCCTGCTAAT CAGTGCTTCA

                                2H7 VL →
                       V  I  L  A  R  G  Q  I  V  L  S  Q  S  P  A  I  L  S  A  S
  61  GTCATAATTG CCAGAGGACA AATTGTTCTC TCCCAGTCTC CAGCAATCCT GTCTGCATCT

                       P  G  E  K  V  T  M  T  C  R  A  S  S  S  V  S  Y  M  H  W
 121  CCAGGGGAGA AGGTCACAAT GACTTGCAGG GCCAGCTCAA GTGTAAGTTA CATGCACTGG

                             BamHI
                             ~~~~~~
                       Y  Q  Q  K  P  G  S  S  P  K  P  W  I  Y  A  P  S  N  L  A
 181  TACCAGCAGA AGCCAGGATC CTCCCCCAAA CCCTGGATTT ATGCCCCATC CAACCTGGCT

                       S  G  V  P  A  R  F  S  G  S  G  S  G  T  S  Y  S  L  T  I
 241  TCTGGAGTCC CTGCTCGCTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CCTCTTACTC TCTCACAATC

                       S  R  V  E  A  E  D  A  A  T  Y  Y  C  Q  Q  W  S  F  N  P
 301  AGCAGAGTGG AGGCTGAAGA TGCTGCCACT TATTACTGCC AGCAGTGGAG TTTTAACCCA

                                                    (Gly4Ser)3 リンカー→
                       P  T  F  G  A  G  T  K  L  E  L  K  G  G  G  G  S  G  G  G
 361  CCCACGTTCG GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAAGGTG GCGGTGGCTC GGGCGGTGGT

                                2H7 VH →
                       G  S  G  G  G  G  S  S  Q  A  Y  L  Q  Q  S  G  A  E  L  V
 421  GGATCTGGAG GAGGTGGGAG CTCTCAGGCT TATCTACAGC AGTCTGGGGC TGAGCTGGTG

                       R  P  G  A  S  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y
 481  AGGCCTGGGG CCTCAGTGAA GATGTCCTGC AAGGCTTCTG GCTACACATT TACCAGTTAC

                       N  M  H  W  V  K  Q  T  P  R  Q  G  L  E  W  I  G  A  I  Y
 541  AATATGCACT GGGTAAAGCA GACACCTAGA CAGGGCCTGG AATGGATTGG AGCTATTTAT

                       P  G  N  G  D  T  S  Y  N  Q  K  F  K  G  K  A  T  L  T  V
 601  CCAGGAAATG GTGATACTTC CTACAATCAG AAGTTCAAGG GCAAGGCCAC ACTGACTGTA

                       D  K  S  S  S  T  A  Y  M  Q  L  S  S  L  T  S  E  D  S  A
 661  GACAAATCCT CCAGCACAGC CTACATGCAG CTCAGCAGCC TGACATCTGA AGACTCTGCG

                       V  Y  F  C  A  R  V  V  Y  Y  S  N  S  Y  W  Y  F  D  V  W
 721  GTCTATTTCT GTGCAAGAGT GGTGTACTAT AGTAACTCTT ACTGGTACTT CGATGTCTGG
```


【図７Ｂ】

Figure 7B

```
                                ヒトCD154/アミノ酸48→
                                Bcl/Bam ハイブリッド部位
      G  T  G  T  T  V  T  V  S  D  P  R  R  L  D  K  I  E  D  E
 781  GGCACAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGAT CCAAGAAGGT TGGACAAGAT AGAAGATGAA

      R  N  L  H  E  D  F  V  F  M  K  T  I  Q  R  C  N  T  G  E
 841  AGGAATCTTC ATGAAGATTT TGTATTCATG AAAACGATAC AGAGATGCAA CACAGGAGAA

      R  S  L  S  L  L  N  C  E  E  I  K  S  Q  F  E  G  F  V  K
 901  AGATCCTTAT CCTACTGAA CTGTGAGGAG ATTAAAAGCC AGTTTGAAGG CTTTGTGAAG

                                                              BclI
      D  I  M  L  N  K  E  E  T  K  K  E  N  S  F  E  M  Q  K  G
 961  GATATAATGT TAAACAAAGA GGAGACGAAG AAAGAAAACA GCTTTGAAAT GCAAAAAGGT

      BclI
      ~~~~~
      D  Q  N  P  Q  I  A  A  H  V  I  S  E  A  S  S  K  T  T  S
1021  GATCAGAATC CTCAAATTGC GGCACATGTC ATAAGTGAGG CCAGCAGTAA AACAACATCT

      V  L  Q  W  A  E  K  G  Y  Y  T  M  S  N  N  L  V  T  L  E
1081  GTGTTACAGT GGGCTGAAAA AGGATACTAC ACCATGAGCA ACAACTTGGT AACCCTGGAA

      N  G  K  Q  L  T  V  K  R  Q  G  L  Y  Y  I  Y  A  Q  V  T
1141  AATGGGAAAC AGCTGACCGT TAAAAGACAA GGACTCTATT ATATCTATGC CCAAGTCACC

                  HindIII
                  ~~~~~~~
      F  C  S  N  R  E  A  S  S  Q  A  P  F  I  A  S  L  C  L  K
1201  TTCTGTTCCA ATCGGGAAGC TTCGAGTCAA GCTCCATTTA TAGCCAGCCT CTGCCTAAAG

      S  P  G  R  F  E  R  I  L  L  R  A  A  N  T  H  S  S  A  K
1261  TCCCCCGGTA GATTCGAGAG AATCTTACTC AGAGCTGCAA ATACCCACAG TTCCGCCAAA

      P  C  G  Q  Q  S  I  H  L  G  G  V  F  E  L  Q  P  G  A  S
1321  CCTTGCGGGC AACAATCCAT TCACTTGGGA GGAGTATTTG AATTGCAACC AGGTGCTTCG

                                                  NcoI
                                                  ~~~~~~
      V  F  V  N  V  T  D  P  S  Q  V  S  H  G  T  G  F  T  S  F
1381  GTGTTTGTCA ATGTGACTGA TCCAAGCCAA GTGAGCCATG GCACTGGCTT CACGTCCTTT

                  XhoI        XbaI
                  ~~~~~~      ~~~~
      G  L  L  K  L  E  *  *  S  R
1441  GGCTTACTCA AACTCGAGTG ATAATCTAGA
```


【図７Ｃ】

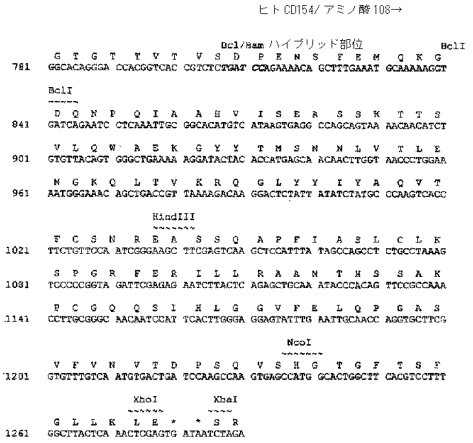
Figure 7C

2H7scFv-CD154 S4 cDNAおよび推定アミノ酸配列

```
      HindIII      NcoI
      ~~~~~~       ~~~~~~2H7 VL リーダーペプチド→
                          M  D  F  Q  V  Q  I  F  S  F  L  L  I  S  A  S
   1  AAGCTTGCCG CC   ATGGATTT TCAAGTGCAG ATTTTCAGCT TCCTGCTAAT CAGTGCTTCA

                                2H7 VL →
                       V  I  L  A  R  G  Q  I  V  L  S  Q  S  P  A  I  L  S  A  S
  61  GTCATAATTG CCAGAGGACA AATTGTTCTC TCCCAGTCTC CAGCAATCCT GTCTGCATCT

                       P  G  E  K  V  T  M  T  C  R  A  S  S  S  V  S  Y  M  H  W
 121  CCAGGGGAGA AGGTCACAAT GACTTGCAGG GCCAGCTCAA GTGTAAGTTA CATGCACTGG

                             BamHI
                             ~~~~~~
                       Y  Q  Q  K  P  G  S  S  P  K  P  W  I  Y  A  P  S  N  L  A
 181  TACCAGCAGA AGCCAGGATC CTCCCCCAAA CCCTGGATTT ATGCCCCATC CAACCTGGCT

                       S  G  V  P  A  R  F  S  G  S  G  S  G  T  S  Y  S  L  T  I
 241  TCTGGAGTCC CTGCTCGCTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CCTCTTACTC TCTCACAATC

                       S  R  V  E  A  E  D  A  A  T  Y  Y  C  Q  Q  W  S  F  N  P
 301  AGCAGAGTGG AGGCTGAAGA TGCTGCCACT TATTACTGCC AGCAGTGGAG TTTTAACCCA

                                                    (Gly4Ser)3 リンカー→
                       P  T  F  G  A  G  T  K  L  E  L  K  G  G  G  G  S  G  G  G
 361  CCCACGTTCG GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAAGGTG GCGGTGGCTC GGGCGGTGGT

                                2H7 VH →
                       G  S  G  G  G  G  S  S  Q  A  Y  L  Q  Q  S  G  A  E  L  V
 421  GGATCTGGAG GAGGTGGGAG CTCTCAGGCT TATCTACAGC AGTCTGGGGC TGAGCTGGTG

                       R  P  G  A  S  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y
 481  AGGCCTGGGG CCTCAGTGAA GATGTCCTGC AAGGCTTCTG GCTACACATT TACCAGTTAC

                       N  M  H  W  V  K  Q  T  P  R  Q  G  L  E  W  I  G  A  I  Y
 541  AATATGCACT GGGTAAAGCA GACACCTAGA CAGGGCCTGG AATGGATTGG AGCTATTTAT

                       P  G  N  G  D  T  S  Y  N  Q  K  F  K  G  K  A  T  L  T  V
 601  CCAGGAAATG GTGATACTTC CTACAATCAG AAGTTCAAGG GCAAGGCCAC ACTGACTGTA

                       D  K  S  S  S  T  A  Y  M  Q  L  S  S  L  T  S  E  D  S  A
 661  GACAAATCCT CCAGCACAGC CTACATGCAG CTCAGCAGCC TGACATCTGA AGACTCTGCG

                       V  Y  F  C  A  R  V  V  Y  Y  S  N  S  Y  W  Y  F  D  V  W
 721  GTCTATTTCT GTGCAAGAGT GGTGTACTAT AGTAACTCTT ACTGGTACTT CGATGTCTGG
```

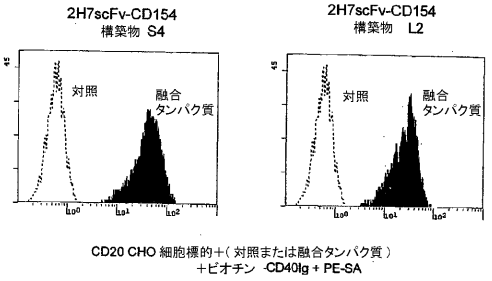
【図７Ｄ】

Figure 7D.



【図８】

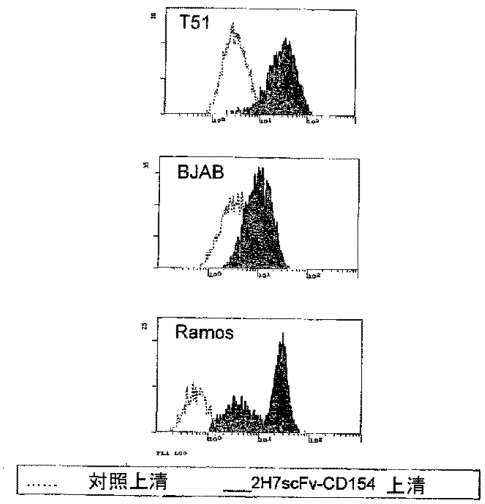
Figure 8.



CD20 CHO 細胞標的+（対照または融合タンパク質）
+ビオチン -CD40lg + PE-SA

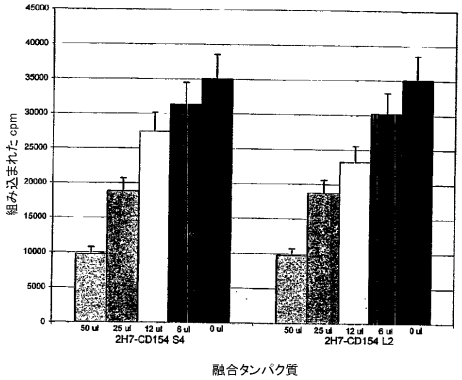
【図９】

Figure 9.



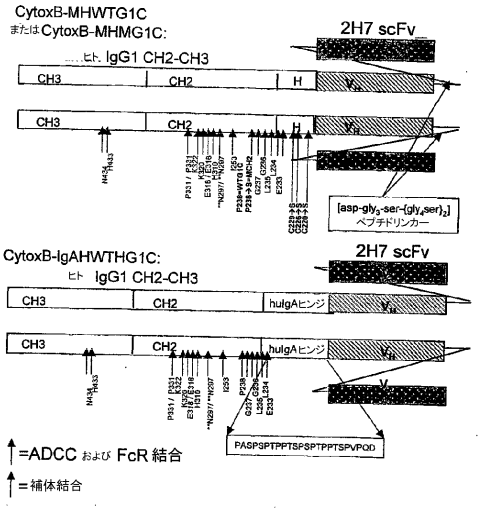
【図１０】

Figure 10.



【図１１】

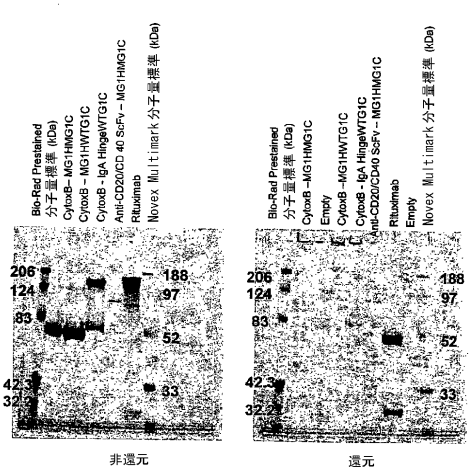
FIGURE 11



15/26

【図１２】

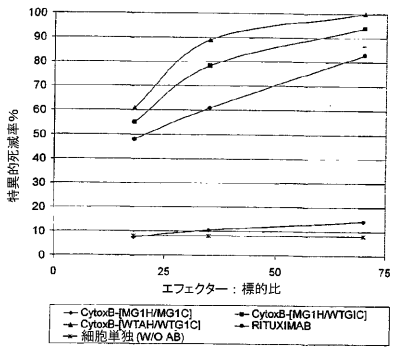
FIGURE 12



16/26

【図１３】

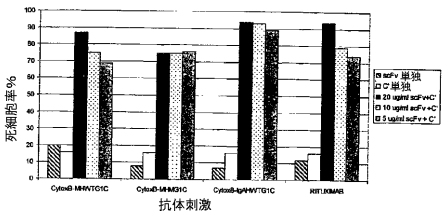
FIGURE 13



17/26

【図１４】

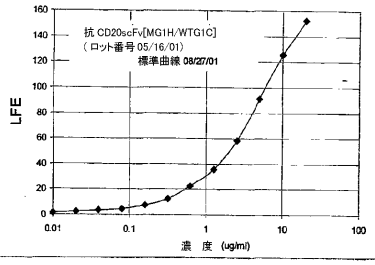
FIGURE 14



18/26

【図１５】

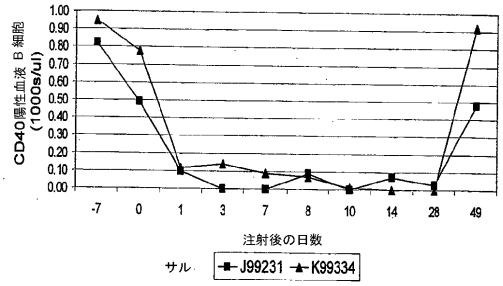
FIGURE 15



日	サル J99231 LFE(1:40)	濃 度 (μg/mL)	サル K99334 LFE(1:40)	濃 度 (μg/mL)
注射→ -7	2.41	<0.6μg/mL	1.51	<0.4μg/mL
0	2.22	<0.6μg/mL	1.63	<0.4μg/mL
注射→ 1	73.8	220μg/mL	44.4	100μg/mL
3	20.0	28μg/mL	40.2	80μg/mL
7	15.6	24μg/mL	15.7	24μg/mL
8	39.1	80μg/mL	42.6	92μg/mL
10	11.5	18μg/mL	2.74	1.2μg/mL
14	2.05	0.6mg/mL	1.96	0.6μg/mL

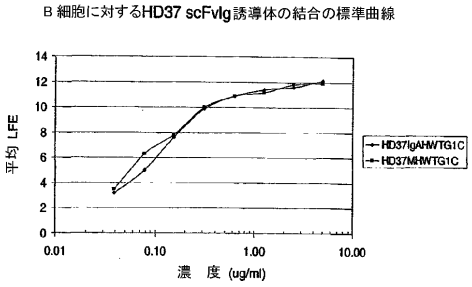
【図１６】

Figure 16



【図１７】

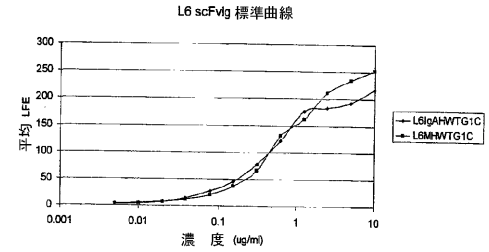
FIGURE 17



クローン／単離物	1:100 における平均 LFE	推定濃度
Bulk IgAHWTG1C	11.2	> 60 ug/ml
1B2	10.4	>50 ug/ml
6C5	10.5	>50 ug/ml
4B1	8.6	>40 ug/ml
Bulk MHWTG1C	10.9	> 50 ug/ml
2G8	10.6	> 50 ug/ml
3F3	8.3	>40 ug/ml
3D9	11.1	> 60 ug/ml

【図１８】

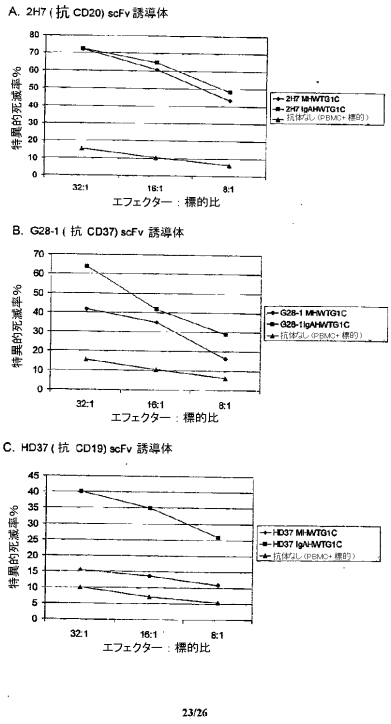
FIGURE 18



構築物	1:20 における平均 LFE	推定濃度
L6IgAHWTG1C 非増幅 CHO 上清	51.1	6.25 ug/ml
L6IgGMHWTG1C 非増幅 CHO 上清	23.0	3.2 ug/ml

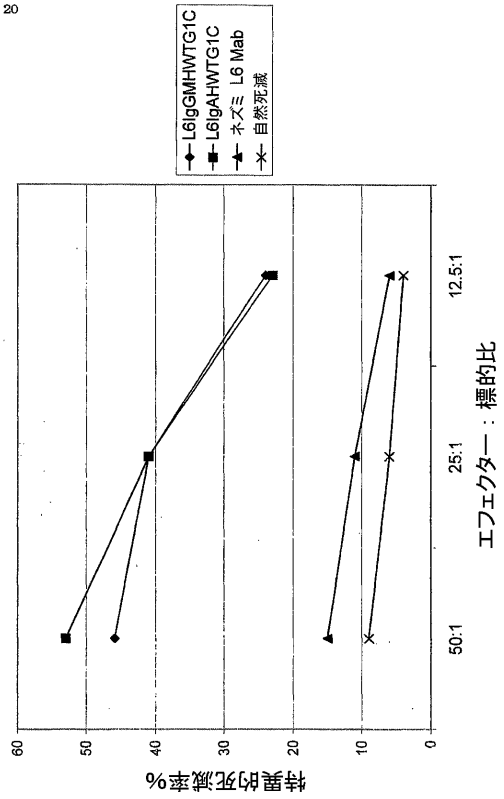
【図１９】

FIGURE 19



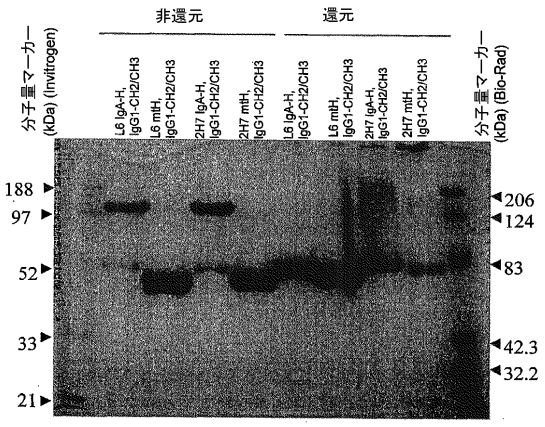
【図２０】

FIGURE 20



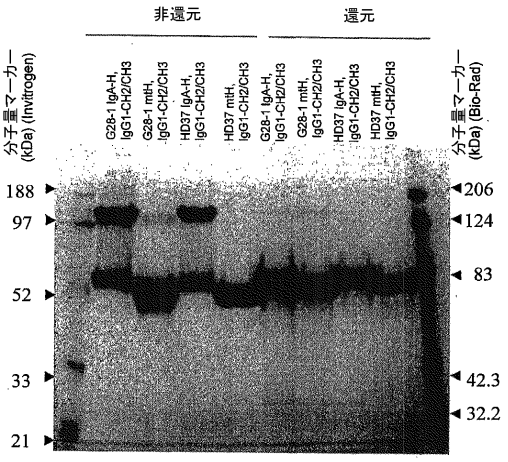
【図２１】

Figure 21



【図２２】

Figure 22



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/056910 A1

(51) International Patent Classification⁷: A61K 39/395, C07H 21/04, C07K 16/44, C12N 15/13, 5/10, 15/00

(21) International Application Number: PCT/US02/01487

(22) International Filing Date: 17 January 2002 (17.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/765,208 17 January 2001 (17.01.2001) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **GENECRAFT, INC.** [US/US]; 18798 Ridgefield Road N.W., Shoreline, WA 98177 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **LEDBETTER, Jeffrey, A.** [US/US]; 18798 Ridgefield Road N.W., Shoreline, WA 98177 (US). **HAYDEN-LEDBETTER, Martha** [US/US]; 18798 Ridgefield Road N.W., Shoreline, WA 98177 (US).

(74) Agents: **ROSENMAN, Stephen, J.** et al.; Seed Intellectual Property Law Group PLLC, Suite 6300, 701 Fifth Avenue, Seattle, WA 98104-7092 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/056910 A1

(54) Title: BINDING DOMAIN-IMMUNOGLOBULIN FUSION PROTEINS

(57) Abstract: The invention relates to novel binding domain-immunoglobulin fusion proteins that feature a binding domain for a cognate structure such as an antigen, a counterreceptor or the like, a hinge region polypeptide having either zero or one cysteine residue, and immunoglobulin CH2 and CH3 domains, and that are capable of ADCC and/or CDC while occurring predominantly as monomeric polypeptides. The fusion proteins can be recombinantly produced at high expression levels. Also provided are related compositions and methods, including immunotherapeutic applications.

BINDING DOMAIN-IMMUNOGLOBULIN FUSION PROTEINS

BACKGROUND OF THE INVENTION

The present invention relates generally to immunologically active, recombinant binding proteins, and in particular, to molecularly engineered binding domain-immunoglobulin fusion proteins, including single chain Fv-immunoglobulin fusion proteins. The present invention also relates to compositions and methods for treating malignant conditions and B-cell disorders, including diseases characterized by autoantibody production.

An immunoglobulin molecule is composed of two identical light chains and two identical heavy chains that are joined into a macromolecular complex by interchain disulfide bonds. Intrachain disulfide bonds join different areas of the same polypeptide chain, which results in the formation of loops that along with adjacent amino acids constitute the immunoglobulin domains. Each light chain and each heavy chain has a single variable region that shows considerable variation in amino acid composition from one antibody to another. The light chain variable region, V_L, associates with the variable region of a heavy chain, V_H, to form the antigen binding site of the immunoglobulin, Fv. Light chains have a single constant region domain and heavy chains have several constant region domains. Classes IgG, IgA, and IgE have three constant region domains, which are designated CH1, CH2, and CH3, and the IgM and IgE classes have four constant region domains.

The heavy chains of immunoglobulins can be divided into three functional regions: Fd, hinge, and Fc. The Fd region comprises the V_H and CH1 domains and in combination with the light chain forms Fab. The Fc fragment is generally considered responsible for the effector functions of an immunoglobulin, such as, complement fixation and binding to Fc receptors. The hinge region, found in IgG, IgA, and IgD classes, acts as a flexible spacer, allowing the Fab portion to move freely in space. In contrast to the constant regions, the hinge domains are structurally diverse, varying in both sequence and length among immunoglobulin classes and subclasses.

For example, three human IgG subclasses, IgG1, IgG2, and IgG4, have hinge regions of 12-15 amino acids while IgG3 comprises approximately 62 amino acids, including 21 proline residues and 11 cysteine residues. According to crystallographic studies, the hinge can be further subdivided functionally into three regions: the upper hinge, the core, and the lower hinge (Shin et al., *Immunological Reviews* 130:87 (1992)). The upper hinge includes amino acids from the carboxyl end of CH1 to the first residue in the hinge that restricts motion, generally the first cysteine residue that forms an interchain disulfide bond between the two heavy chains. The length of the upper hinge region correlates with the segmental flexibility of the antibody. The core hinge region contains the inter-heavy chain disulfide bridges, and the lower hinge region joins the amino terminal end of the CH2 domain and includes residues in CH2. (*Id.*) The core hinge region of human IgG1 contains the sequence, Cys-Pro-Pro-Cys, which when disulfide bonds are formed results in a cyclic octa-peptide believed to act as a pivot, thus conferring flexibility. The hinge region may also contain carbohydrate attachment sites. For example, IgA1 contains five carbohydrate sites within a 17 amino acid segment of the hinge region, conferring exception resistance of the hinge to intestinal proteases, considered an advantageous property for a secretory immunoglobulin.

Conformational changes permitted by the structure and flexibility of the hinge region may affect the effector functions of the Fc portion of the antibody. Three general categories of effector functions associated with the Fc region include (1) activation of the classical complement cascade, (2) interaction with effector cells, and (3) compartmentalization of immunoglobulins. The different human IgG subclasses vary in their relative efficacy to activate and amplify the steps of the complement cascade. In general, IgG1 and IgG3 most effectively fix complement, IgG2 is less effective, and IgG4 does not activate complement. Complement activation is initiated by binding of C1q, a subunit of the first component C1 in the cascade, to an antigen-antibody complex. Even though the binding site for C1q is located in the CH2 domain of the antibody, the hinge region influences the ability of the antibody to activate the cascade. For example, recombinant immunoglobulins lacking a hinge region are unable to activate complement. (*Id.*) Without the flexibility conferred by the hinge region, the

Fab portion of the antibody bound to the antigen may not be able to adopt the conformation required to permit C1q to bind to CH2. (*See id.*) Studies have indicated that hinge length and segmental flexibility correlate with complement activation; however, the correlation is not absolute. Human IgG3 molecules with altered hinge regions that are as rigid as IgG4 still effectively activate the cascade.

Lack of the hinge region also affects the ability of human IgG immunoglobulins to bind Fc receptors on immune effector cells. Binding of an immunoglobulin to an Fc receptor facilitates antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), which is presumed to be an important means to eliminate tumor cells. The human IgG Fc receptor family is divided into three groups, FcγRI (CD64), which is capable of binding IgG with high affinity, FcγRII (CD32), and FcγRIII (CD16), both of which are low affinity receptors. The molecular interaction between each of the three receptors and an immunoglobulin has not been defined precisely, but experiments indicate that residues in the hinge proximal region of the CH2 domain are important to the specificity of the interaction between the antibody and the Fc receptor. In addition, IgG1 myeloma proteins and recombinant IgG3 chimeric antibodies that lack a hinge region are unable to bind FcγRI, likely because accessibility to CH2 is decreased. (Shin et al., *Intern. Rev. Immunol.* 10:177, 178-79 (1993)).

Monoclonal antibody technology and genetic engineering methods have led to rapid development of immunoglobulin molecules for diagnosis and treatment of human diseases. Protein engineering has been applied to improve the affinity of an antibody for its cognate antigen, to diminish problems related to immunogenicity, and to alter an antibody's effector functions. The domain structure of immunoglobulins is amenable to engineering, in that the antigen binding domains and the domains conferring effector functions may be exchanged between immunoglobulin classes and subclasses.

In addition, smaller immunoglobulin molecules have been constructed to overcome problems associated with whole immunoglobulin therapy. Single chain Fv (scFv) comprise the heavy chain variable domain joined via a short linker peptide to the light chain variable domain (Huston et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-83,

1988). Because of the small size of scFv molecules, they exhibit very rapid clearance from plasma and tissues and more effective penetration into tissues than whole immunoglobulin. An anti-tumor scFv showed more rapid tumor penetration and more even distribution through the tumor mass than the corresponding chimeric antibody (Yokota et al., *Cancer Res.* 52, 3402-08 (1992)). Fusion of an scFv to another molecule, such as a toxin, takes advantage of the specific antigen-binding activity and the small size of an scFv to deliver the toxin to a target tissue. (Chaudary et al., *Nature* 339:394 (1989); Batra et al., *Mol. Cell. Biol.* 11:2200 (1991)).

Despite the advantages that scFv molecules bring to serotherapy, several drawbacks to this therapeutic approach exist. While rapid clearance of scFv may reduce toxic effects in normal cells, such rapid clearance may prevent delivery of a minimum effective dose to the target tissue. Manufacturing adequate amounts of scFv for administration to patients has been challenging due to difficulties in expression and isolation of scFv that adversely affect the yield. During expression, scFv molecules lack stability and often aggregate due to pairing of variable regions from different molecules. Furthermore, production levels of scFv molecules in mammalian expression systems are low, limiting the potential for efficient manufacturing of scFv molecules for therapy (Davis et al, *J. Biol. Chem.* 265:10410-18 (1990); Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655-59 (1991)). Strategies for improving production have been explored, including addition of glycosylation sites to the variable regions (Jost, C. R. US Patent # 5,888,773, Jost et al, *J. Biol. Chem.* 269: 26267-73 (1994)).

Conjugation or fusion of toxins to scFV provides a very potent molecule, but dosing is limited by toxicity from the toxin molecule. Toxic effects include elevation of liver enzymes and vascular leak syndrome. In addition, immunotoxins are highly immunogenic, and host antibodies generated against the toxin limit its potential for repeated treatment.

An additional disadvantage to using scFv for therapy is the lack of effector function. An scFv without the cytolytic functions, ADCC and complement dependent-cytotoxicity (CDC), associated with the constant region of an immunoglobulin may be ineffective for treating disease. Even though development of

scFv technology began over 12 years ago, currently no scFv products are approved for therapy.

The benefit of antibody constant region-associated effector functions to treatment of a disease has prompted development of fusion proteins in which nonimmunoglobulin sequences are substituted for the antibody variable region. For example, CD4, the T cell surface protein recognized by HIV, was recombinantly fused to an immunoglobulin Fc effector domain. (*See* Sensel et al., *Chem. Immunol.* 65:129-158 (1997)). The biological activity of such a molecule will depend in part on the class or subclass of the constant region chosen. An IL-2-IgG1 fusion protein effected complement-mediated lysis of IL-2 receptor-bearing cells. (*See id.*). Use of immunoglobulin constant regions to construct these and other fusion proteins may also confer improved pharmacokinetic properties.

Diseases and disorders thought to be amenable to some type of immunoglobulin therapy include cancer and immune system disorders. Cancer includes a broad range of diseases, affecting approximately one in four individuals worldwide. Rapid and unregulated proliferation of malignant cells is a hallmark of many types of cancer, including hematological malignancies. Patients with a hematologic malignant condition have benefited most from advances in cancer therapy in the past two decades (Multani et al., *J. Clin. Oncology* 16: 3691-3710, 1998). Although remission rates have increased, most patients still relapse and succumb to their disease. Barriers to cure with cytotoxic drugs include tumor cell resistance and the high toxicity of chemotherapy, which prevents optimal dosing in many patients. New treatments based on targeting with molecules that specifically bind to a malignant cell, including monoclonal antibodies (mAbs), can improve effectiveness without increasing toxicity.

Since mAbs were first described in 1975 (Kohler et al., *Nature* 256:495-97 (1975)), many patients have been treated with mAbs to antigens expressed on tumor cells. These studies have yielded important lessons regarding the selection of target antigens suitable for therapy. First and most importantly, the target antigen should not be expressed by crucial normal tissues. Fortunately, hematologic malignant cells express many antigens that are not expressed on stem cells or other essential cells.

Treatment of a hematologic malignant condition that depletes both normal and malignant cells of hematological origin has been acceptable because regeneration of normal cells from progenitors occurs after therapy has ended. Second, the target antigen should be expressed on all clonogenic populations of tumor cells, and expression should persist despite the selective pressure from immunoglobulin therapy. Thus, the choice of surface idiotype for therapy of B cell malignancy has been limited by the outgrowth of tumor cell variants with altered surface idiotype expression even though the antigen exhibits a high degree of tumor selectivity (Meeker et al., *N. Engl. J. Med.* 312:1658-65 (1985)). Third, the selected antigen must traffic properly after an immunoglobulin binds to it. Shedding or internalization of a target antigen after an immunoglobulin binds to the antigen may allow tumor cells to escape destruction, thus limiting the effectiveness of serotherapy. Fourth, binding of an immunoglobulin to target antigens that transmit activation signals may result in improved functional responses in tumor cells that lead to growth arrest and apoptosis. While all of these properties are important, the triggering of apoptosis after an immunoglobulin binds to the antigen may be a critical factor in achieving successful serotherapy.

Antigens that have been tested as targets for serotherapy of B and T cell malignancies include Ig idiotype (Brown et al., *Blood* 73:651-61 (1989)), CD19 (Hekman et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 32:364-72 (1991); Vlasveld et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 40: 37-47 (1995)), CD20 (Press et al., *Blood* 69: 584-91 (1987); Maloney et al., *J. Clin. Oncol.* 15:3266-74, (1997)) CD21 (Scheinberg et. al., *J. Clin. Oncol.* 8:792-803, (1990)), CD5 (Dillman et. al., *J. Biol. Respn. Mod.* 5:394-410 (1986)), and CD52 (CAMPATH) (Pawson et al., *J. Clin. Oncol.* 15:2667-72, (1997)). Of these, the most success has been obtained using CD20 as a target for therapy of B cell lymphomas. Each of the other targets has been limited by the biological properties of the antigen. For example, surface idiotype can be altered through somatic mutation, allowing tumor cell escape. CD5, CD21, and CD19 are rapidly internalized after mAb binding, allowing tumor cells to escape destruction unless mAbs are conjugated with toxin molecules. CD22 is expressed on only a subset of B cell lymphomas, while CD52

is expressed on both T cells and B cells and generates immunosuppression from T cell depletion.

CD20 fulfills the basic criteria described above for selection of an appropriate target antigen for therapy of a B cell malignant condition. Treatment of patients with low grade or follicular B cell lymphoma using chimeric CD20 mAb induces partial or complete responses in many patients (McLaughlin et al, *Blood* 88:90a (abstract, suppl. 1) (1996); Maloney et al, *Blood* 90: 2188-95 (1997)). However, tumor relapse commonly occurs within six months to one year. Therefore, further improvements in serotherapy are needed to induce more durable responses in low grade B cell lymphoma, and to allow effective treatment of high grade lymphoma and other B cell diseases.

One approach to improving CD20 serotherapy has been to target radioisotopes to B cell lymphomas using mAbs specific for CD20. While the effectiveness of therapy is increased, associated toxicity from the long *in vivo* half-life of the radioactive antibody increased also, sometimes requiring that the patient undergo stem cell rescue (Press et al., *N. Eng. J. Med.* 329: 1219-1224, 1993; Kaminski et al., *N. Eng.J. Med.* 329:459-65 (1993)). MAbs to CD20 have been cleaved with proteases to yield $F(ab')_2$ or Fab fragments prior to attachment of the radioisotope. This improves penetration of the radioisotope conjugate into the tumor, and shortens the *in vivo* half-life, thus reducing the toxicity to normal tissues. However, the advantages of effector functions, including complement fixation and ADCC, that are provided by the Fc region of the CD20 mAb are lost. Therefore, for improved delivery of radioisotopes, a strategy is needed to make a CD20 mAb derivative that retains Fc-dependent effector functions but is smaller in size, thereby increasing tumor penetration and shortening mAb half-life.

CD20 was the first human B cell lineage-specific surface molecule identified by a monoclonal antibody, but the function of CD20 in B cell biology is still incompletely understood. CD20 is a non-glycosylated, hydrophobic 35 kDa phosphoprotein that has both amino and carboxy ends in the cytoplasm (Einfeld et al,

EMBO J. 7:711-17 (1988)). Natural ligands for CD20 have not been identified. CD20 is expressed by all normal mature B cells, but is not expressed by precursor B cells.

CD20 mAbs deliver signals to normal B cells that affect viability and growth (Clark et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4494-98 (1986)). Recent data has shown that extensive cross-linking of CD20 can induce apoptosis of B lymphoma cell lines (Shan et al., *Blood* 91:1644-52 (1998)). Cross-linking of CD20 on the cell surface increases the magnitude and kinetics of signal transduction, which was detected by measuring phosphorylation of cellular substrates on tyrosine residues (Deans et al., *J. Immunol.* 146:846-53 (1993)). Importantly, apoptosis of Ramos B lymphoma cells was also be induced by cross-linking of CD20 mAbs by addition of Fc-receptor positive cells (Shan et al., *Blood* 91: 1644-52 (1998)). Therefore, in addition to cellular depletion by complement and ADCC mechanisms, Fc-receptor binding by CD20 mAbs *in vivo* could promote apoptosis of malignant B cells by CD20 cross-linking. This theory is consistent with experiments showing that effectiveness of CD20 therapy of human lymphoma in a SCID mouse model was dependent upon Fc-receptor binding by the CD20 mAb (Funakoshi et al., *J. Immunotherapy* 19:93-101 (1996)).

The CD20 polypeptide contains four transmembrane domains (Einfeld et al., *EMBO J.* 7: 711-17, (1988); Stamenkovic et al., *J. Exp. Med.* 167:1975-80 (1988); Tedder et. al., *J. Immunol.* 141:4388-4394 (1988)). The multiple membrane spanning domains prevent CD20 internalization after antibody binding. This property of CD20 was recognized as an important feature for effective therapy of B cell malignancies when a murine CD20 mAb, 1F5, was injected into patients with B cell lymphoma, resulting in significant depletion of malignant cells and partial clinical responses (Press et al., *Blood* 69: 584-91 (1987)).

Because normal mature B cells also express CD20, normal B cells are depleted during CD20 antibody therapy (Reff, M.E. et al, Blood 83: 435-445, 1994). However, after treatment is completed, normal B cells are regenerated from CD20 negative B cell precursors; therefore, patients treated with anti-CD20 therapy do not experience significant immunosuppression. Depletion of normal B cells may be beneficial in diseases that involve inappropriate production of autoantibodies or other

diseases where B cells may play a role. A chimeric mAb specific for CD20, consisting of heavy and light chain variable regions of mouse origin fused to human IgG1 heavy chain and human kappa light chain constant regions, retained binding to CD20 and the ability to mediate ADCC and to fix complement (Liu et al., *J. Immunol.* 139:3521-26 (1987); Robinson et al., U.S. Patent No. 5,500,362). This work led to development of a chimeric CD20 mAb, Rituximab™, currently approved by the U.S. Food and Drug Administration for approval for therapy of B cell lymphomas. While clinical responses are frequently observed after treatment with Rituximab, patients often relapse after about 6-12 months.

High doses of Rituximab™ are required for intravenous injection because the molecule is large, approximately 150 kDa, and diffusion is limited into the lymphoid tissues where many tumor cells reside. The mechanism of anti-tumor activity of Rituximab™ is thought to be a combination of several activities, including ADCC, fixation of complement, and triggering of signals in malignant B cells that promote apoptosis. The large size of Rituximab™ prevents optimal diffusion of the molecule into lymphoid tissues that contain malignant B cells, thereby limiting these anti-tumor activities. As discussed above, cleavage of CD20 mAbs with proteases into Fab or $F(ab')_2$ fragments makes them smaller and allows better penetration into lymphoid tissues, but the effector functions important for anti-tumor activity are lost. While CD20 mAb fragments may be more effective than intact antibody for delivery of radioisotopes, it would be desirable to construct a CD20 mAb derivative that retains the effector functions of the Fc portion, but is smaller in size, facilitating better tumor penetration and resulting in a shorter half-life.

CD20 is expressed by malignant cells of B cell origin, including B cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia (CLL). CD20 is not expressed by malignancies of pre-B cells, such as acute lymphoblastic leukemia. CD20 is therefore a good target for therapy of B cell lymphoma, CLL, and other diseases in which B cells are involved in the disease activity. Other B cell disorders include autoimmune diseases in which autoantibodies are produced during the differentiation of B cells into plasma cells. Examples of B cell disorders include autoimmune thyroid disease,

including Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE), Sjogrens syndrome, immune thrombocytopenic purpura (ITP), multiple sclerosis (MS), myasthenia gravis (MG), psoriasis, scleroderma, and inflammatory bowel disease, including Crohn's disease and ulcerative colitis.

From the foregoing, a clear need is apparent for improved compositions and methods to treat malignant conditions and B cell disorders. The compositions and methods of the present invention overcome the limitations of the prior art by providing a binding domain-immunoglobulin fusion protein comprising a binding domain polypeptide that is fused to an immunoglobulin hinge region polypeptide, which is fused to an immunoglobulin heavy chain CH2 constant region polypeptide fused to an immunoglobulin heavy chain CH3 constant region polypeptide, wherein the binding domain-immunoglobulin fusion protein is capable of mediating ADCC or complement fixation. Furthermore, the compositions and methods offer other related advantages.

SUMMARY OF THE INVENTION

It is an aspect of the present invention to provide a binding domain-immunoglobulin fusion protein, comprising (a) a binding domain polypeptide that is fused to an immunoglobulin hinge region polypeptide, wherein said hinge region polypeptide is selected from the group consisting of (i) a mutated hinge region polypeptide that contains no cysteine residues and that is derived from a wild-type immunoglobulin hinge region polypeptide having one or more cysteine residues, (ii) a mutated hinge region polypeptide that contains one cysteine residue and that is derived from a wild-type immunoglobulin hinge region polypeptide having two or more cysteine residues, (iii) a wild-type human IgA hinge region polypeptide, (iv) a mutated human IgA hinge region polypeptide that contains no cysteine residues and that is derived from a wild-type human IgA region polypeptide, and (v) a mutated human IgA hinge region polypeptide that contains one cysteine residue and that is derived from a wild-type human IgA region polypeptide; (b) an immunoglobulin heavy chain CH2 constant region polypeptide that is fused to the hinge region polypeptide; and (c) an

immunoglobulin heavy chain CH3 constant region polypeptide that is fused to the CH2 constant region polypeptide, wherein: (1) the binding domain-immunoglobulin fusion protein is capable of at least one immunological activity selected from the group consisting of antibody dependent cell-mediated cytotoxicity and complement fixation, and (2) the binding domain polypeptide is capable of specifically binding to an antigen. In one embodiment the immunoglobulin hinge region polypeptide is a mutated hinge region polypeptide and exhibits a reduced ability to dimerize, relative to a wild-type human immunoglobulin G hinge region polypeptide. In another embodiment the binding domain polypeptide comprises at least one immunoglobulin variable region polypeptide that is an immunoglobulin light chain variable region polypeptide or an immunoglobulin heavy chain variable region polypeptide. In a further embodiment the immunoglobulin variable region polypeptide is derived from a human immunoglobulin.

In another embodiment the binding domain Fv-immunoglobulin fusion protein binding domain polypeptide comprises (a) at least one immunoglobulin light chain variable region polypeptide; (b) at least one immunoglobulin heavy chain variable region polypeptide; and (c) at least one linker peptide that is fused to the polypeptide of (a) and to the polypeptide of (b). In a further embodiment the immunoglobulin light chain variable region and heavy chain variable region polypeptides are derived from human immunoglobulins.

In another embodiment at least one of the immunoglobulin heavy chain CH2 constant region polypeptide and the immunoglobulin heavy chain CH3 constant region polypeptide is derived from a human immunoglobulin heavy chain. In another embodiment the immunoglobulin heavy chain constant region CH2 and CH3 polypeptides are of an isotype selected from human IgG and human IgA. In another embodiment the antigen is selected from the group consisting of CD19, CD20, CD37, CD40 and L6. In certain further embodiments of the above described fusion protein, the linker polypeptide comprises at least one polypeptide having as an amino acid sequence Gly-Gly-Gly-Gly-Ser [SEQ ID NO:21], and in certain other embodiments the linker polypeptide comprises at least three repeats of a polypeptide having as an amino acid sequence Gly-Gly-Gly-Gly-Ser [SEQ ID NO:21]. In certain embodiments the

immunoglobulin hinge region polypeptide comprises a human IgA hinge region polypeptide. In certain embodiments the binding domain polypeptide comprises a CD154 extracellular domain. In certain embodiments the binding domain polypeptide comprises a CD154 extracellular domain and at least one immunoglobulin variable region polypeptide.

In other embodiments the invention provides an isolated polynucleotide encoding any of the above described binding domain-immunoglobulin fusion proteins, and in related embodiments the invention provides a recombinant expression construct comprising such a polynucleotide, and in certain further embodiments the invention provides a host cell transformed or transfected with suc a recombinant expression construct. In another embodiment the invention provides a method of producing a binding domain-immunoglobulin fusion protein, comprising the steps of (a) culturing the host cell as just described, under conditions that permit expression of the binding domain-immunoglobulin fusion protein; and (b) isolating the binding domain-immunoglobulin fusion protein from the host cell culture.

The present invention also provides in certain embodiments a pharmaceutical composition comprising a binding domain-immunoglobulin fusion protein as described above, in combination with a physiologically acceptable carrier. In another embodiment there is provided a method of treating a subject having or suspected of having a malignant condition or a B-cell disorder, comprising administering to a patient a therapeutically effective amount of an above described binding domain-immunoglobulin fusion protein. In certain further embodiments the malignant condition or B-cell disorder is a B-cell lymphoma or a disease characterized by autoantibody production, and in certain other further embodiments the malignant condition or B-cell disorder is rheumatoid arthritis, myasthenia gravis, Grave's disease, type I diabetes mellitus, multiple sclerosis or an autoimmune disease.

These and other aspects of the present invention will become apparent upon reference to the following detailed description and attached drawings. All

references disclosed herein are hereby incorporated by reference in their entirety as if each was incorporated individually.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows DNA and deduced amino acid sequences [SEQ ID NOS:__] of 2H7scFv-Ig, a binding domain-immunoglobulin fusion protein capable of specifically binding CD20.

Figure 2 shows production levels of 2H7 scFv-Ig by transfected, stable CHO lines and generation of a standard curve by binding of purified 2H7 scFv-Ig to CHO cells expressing CD20.

Figure 3 shows SDS-PAGE analysis of multiple preparations of isolated 2H7scFv-Ig protein.

Figure 4 shows complement fixation (Fig. 4A) and mediation of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC, Fig. 4B)) by 2H7scFv-Ig.

Figure 5 shows the effect of simultaneous ligation of CD20 and CD40 on growth of normal B cells.

Figure 6 shows the effect of simultaneous ligation of CD20 and CD40 on CD95 expression and induction of apoptosis in a B lymphoblastoid cell line.

Figure 7 shows DNA and deduced amino acid sequences [SEQ ID NOS:__] of 2H7scFv-CD154 L2 (Fig. 7A, SEQ ID NOS:__) and 2H7scFv-CD154 S4 (Fig. 7B, SEQ ID NOS:__) binding domain-immunoglobulin fusion proteins capable of specifically binding CD20 and CD40.

Figure 8 shows binding of 2H7scFv-CD154 binding domain-immunoglobulin fusion proteins to CD20+ CHO cells by flow immunocytofluorimetry.

Figure 9 shows binding of Annexin V to B cell lines Ramos, BJAB, and T51 after binding of 2H7scFv-CD154 binding domain-immunoglobulin fusion protein to cells.

Figure 10 shows effects on proliferation of B cell line T51 following binding of 2H7scFv-CD154 binding domain-immunoglobulin fusion protein.

Figure 11 depicts schematic representations of the structures of 2H7ScFv-Ig fusion proteins [SEQ ID NOS:__] referred to as CytoxB or CytoxB derivatives: CytoxB-MHWTG1C (2H7 ScFv, mutant hinge, wild-type human IgG1 Fc domain), CytoxB-MHMG1C (2H7 ScFv, mutant hinge, mutated human IgG1 Fc domain) and CytoxB-IgAHWTHG1C (2H7 ScFv, human IgA-derived hinge [SEQ ID NO:__], wild-type human IgG1 Fc domain). Arrows indicate position numbers of amino acid residues believed to contribute to FcR binding and ADCC activity (heavy arrows), and to complement fixation (light arrows). Note absence of interchain disulfide bonds.

Figure 12 shows SDS-PAGE analysis of isolated CytoxB and 2H7scFv-CD154 binding domain-immunoglobulin fusion proteins.

Figure 13 shows antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) activity of CytoxB derivatives.

Figure 14 shows complement dependent cytotoxicity (CDC) of CytoxB derivatives.

Figure 15 shows serum half-life determinations of CytoxB-MHWTG1C in macaque blood samples.

Figure 16 shows effects of CytoxB-MHWTG1C on levels of circulating CD40+ B cells in macaque blood samples.

Figure 17 shows production levels of HD37 (CD19-specific) ScFv-Ig by transfected mammalian cell lines and generation of a standard curve by binding of purified HD37 ScFv-Ig to cells expressing CD19.

Figure 18 shows production levels of L6 (carcinoma antigen) ScFv-Ig by transfected, stable CHO lines and generation of a standard curve by binding of purified L6 ScFv-Ig to cells expressing L6 antigen.

Figure 19 shows ADCC activity of binding domain-immunoglobulin fusion proteins 2H7 ScFv-Ig, HD37 ScFv-Ig and G28-1 (CD37-specific) ScFv-Ig.

Figure 20 shows ADCC activity of L6 ScFv-Ig fusion proteins.

Figure 21 shows SDS-PAGE analysis of L6 ScFv-Ig and 2H7 ScFv-Ig fusion proteins.

Figure 22 shows SDS-PAGE analysis of G28-1 ScFv-Ig and HD37 ScFv-Ig fusion proteins.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is directed to binding domain-immunoglobulin fusion proteins and to related compositions and methods, which will be useful in immunotherapeutic and immunodiagnostic applications, and which offer certain advantages over antigen-specific polypeptides of the prior art. The fusion proteins of the present invention are preferably single polypeptide chains that comprise, in pertinent part, the following fused domains: a binding domain polypeptide, an immunoglobulin hinge region polypeptide, an immunoglobulin heavy chain CH2 constant region polypeptide, and an immunoglobulin heavy chain CH3 constant region polypeptide. In particularly preferred embodiments, the polypeptide domains of which the binding domain-immunoglobulin fusion protein is comprised are, or are derived from, polypeptides that are the products of human gene sequences, but the invention need not be so limited and may in fact relate to binding domain-immunoglobulin fusion proteins as provided herein that are derived from any natural or artificial source, including genetically engineered and/or mutated polypeptides.

The present invention relates in part to the surprising observation that the binding domain-immunoglobulin fusion proteins described herein are capable of immunological activity. More specifically, these proteins retain the ability to participate in well known immunological effector activities including antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC, *e.g.*, subsequent to antigen binding on a cell surface, engagement and induction of cytotoxic effector cells bearing appropriate Fc receptors, such as natural killer (NK) cells bearing FcRγIII, under appropriate conditions) and/or complement fixation in complement dependent cytotoxicity (CDC, *e.g.*, subsequent to antigen binding on a cell surface, recruitment and activation of cytolytic proteins that are components of the blood complement cascade), despite having structures that would not be expected to be capable of promoting such effector activities. As described in greater detail below, ADCC and CDC are unexpected functions for monomeric proteins comprising immunoglobulin heavy chain regions, which are favored by the structures selected for the subject fusion proteins, and

particularly by the selection of hinge region polypeptides that are compromised in their ability to form interchain, homodimeric disulfide bonds.

Another advantage afforded by the present invention is a binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide that can be produced in substantial quantities that are typically greater than those routinely attained with single-chain antibody constructs of the prior art. In preferred embodiments, the binding domain-immunoglobulin fusion polypeptides of the present invention are recombinantly expressed in mammalian expression systems, which offer the advantage of providing polypeptides that are stable *in vivo* (*e.g.*, under physiological conditions). According to non-limiting theory, such stability may derive in part from posttranslational modifications, and specifically glycosylation, of the fusion proteins. Production of the present binding domain-immunoglobulin fusion proteins via recombinant mammalian expression has been attained in static cell cultures at a level of greater than 50 mg protein per liter culture supernatant and has been routinely observed in such cultures at 10-50 mg/l, such that preferably at least 10-50 mg/l may be produced under static culture conditions; also contemplated are enhanced production of the fusion proteins using art-accepted scale-up methodologies such as "fed batch" (*i.e.*, non-static) production, where yields of at least 5-500 mg/l, and in some instances at least 0.5-1 gm/l, depending on the particular protein product, are obtained.

A binding domain polypeptide according to the present invention may be any polypeptide that possesses the ability to specifically recognize and bind to a cognate biological molecule or complex of more than one molecule or assembly or aggregate, whether stable or transient, of such a molecule, which includes a protein, polypeptide, peptide, amino acid, or derivative thereof; a lipid, fatty acid or the like, or derivative thereof; a carbohydrate, saccharide or the like or derivative thereof, a nucleic acid, nucleotide, nucleoside, purine, pyrimidine or related molecule, or derivative thereof, or the like; or any combination thereof such as, for example, a glycoprotein, a glycopeptide, a glycolipid, a lipoprotein, a proteolipid; or any other biological molecule that may be present in a biological sample. Biological samples may be provided by obtaining a blood sample, biopsy specimen, tissue explant, organ culture, biological

fluid or any other tissue or cell preparation from a subject or a biological source. The subject or biological source may be a human or non-human animal, a primary cell culture or culture adapted cell line including but not limited to genetically engineered cell lines that may contain chromosomally integrated or episomal recombinant nucleic acid sequences, immortalized or immortalizable cell lines, somatic cell hybrid cell lines, differentiated or differentiatable cell lines, transformed cell lines and the like. In certain preferred embodiments of the invention, the subject or biological source may be suspected of having or being at risk for having a malignant condition or a B-cell disorder as provided herein, which in certain further preferred embodiments may be an autoimmune disease, and in certain other preferred embodiments of the invention the subject or biological source may be known to be free of a risk or presence of such disease.

A binding domain polypeptide may therefore be any naturally occurring or recombinantly produced binding partner for a cognate biological molecule as provided herein that is a target structure of interest, herein referred to as an "antigen" but intended according to the present disclosure to encompass any target biological molecule to which it is desirable to have the subject invention fusion protein specifically bind. Binding domain-immunoglobulin fusion proteins are defined to be "immunospecific" or capable of specifically binding if they bind a desired target molecule such as an antigen as provided herein, with a K_a of greater than or equal to about 10^4 M^{-1}, preferably of greater than or equal to about 10^5 M^{-1}, more preferably of greater than or equal to about 10^6 M^{-1} and still more preferably of greater than or equal to about 10^7 M^{-1}. Affinities of binding domain-immunoglobulin fusion proteins according to the present invention can be readily determined using conventional techniques, for example those described by Scatchard et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci. 51*:660 (1949). Such determination of fusion protein binding to target antigens of interest can also be performed using any of a number of known methods for identifying and obtaining proteins that specifically interact with other proteins or polypeptides, for example, a yeast two-hybrid screening system such as that described in U.S. Patent No. 5,283,173 and U.S. Patent No. 5,468,614, or the equivalent.

Preferred embodiments of the subject invention binding domain-immunoglobulin fusion protein comprise binding domains that include at least one immunoglobulin variable region polypeptide, such as all or a portion or fragment of a heavy chain or a light chain V-region, provided it is capable of specifically binding an antigen or other desired target structure of interest as described herein. In other preferred embodiments the binding domain comprises a single chain immunoglobulin-derived Fv product, which may include all or a portion of at least one immunoglobulin light chain V-region and all or a portion of at least one immunoglobulin heavy chain V-region, and which further comprises a linker fused to the V-regions; preparation and testing such constructs are described in greater detail herein and are well known in the art. Other binding domain polypeptides may comprise any protein or portion thereof that retains the ability to specifically bind an antigen as provided herein, including non-immunoglobulins. Accordingly the invention contemplates fusion proteins comprising binding domain polypeptides that are derived from polypeptide ligands such as hormones, cytokines, chemokines, and the like; cell surface or soluble receptors for such polypeptide ligands; lectins; intercellular adhesion receptors such as specific leukocyte integrins, selectins, immunoglobulin gene superfamily members, intercellular adhesion molecules (ICAM-1, -2, -3) and the like; histocompatibility antigens; etc.

Examples of cell surface receptors that may provide a binding domain polypeptide, and that may also be selected as the target molecule or antigen to which a binding domain-Ig fusion protein of the present invention desirably binds, include the following, or the like: HER1 (*e.g.*, GenBank Accession Nos. U48722, SEG_HEGFREXS, KO3193), HER2 (Yoshino et al., 1994 *J. Immunol.* 152:2393; Disis et al., 1994 *Canc. Res.* 54:16; see also, *e.g.*, GenBank Acc. Nos. X03363, M17730, SEG_HUMHER20), HER3 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. U29339, M34309), HER4 (Plowman et al., 1993 *Nature* 366:473; see also *e.g.*, GenBank Acc. Nos. L07868, T64105), epidermal growth factor receptor (EGFR) (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. U48722, SEG_HEGFREXS, KO3193), vascular endothelial cell growth factor(*e.g.*, GenBank No. M32977), vascular endothelial cell growth factor receptor (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. AF022375, 1680143, U48801, X62568), insulin-like growth factor-I (*e.g.*,

GenBank Acc. Nos. X00173, X56774, X56773, X06043, *see also* European Patent No. GB 2241703), insulin-like growth factor-II (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. X03562, X00910, SEG_HUMGFIA, SEG_HUMGFI2, M17863, M17862), transferrin receptor (Trowbridge and Omary, 1981 *Proc. Nat. Acad. USA* 78:3039; see also *e.g.*, GenBank Acc. Nos. X01060, M11507), estrogen receptor (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. M38651, X03635, X99101, U47678, M12674), progesterone receptor (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. X51730, X69068, M15716), follicle stimulating hormone receptor (FSH-R) (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. Z34260, M65085), retinoic acid receptor (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. L12060, M60909, X77664, X57280, X07282, X06538), MUC-1 (Barnes et al., 1989 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:7159; see also *e.g.*, GenBank Acc. Nos. SEG_MUSMUCIO, M65132, M64928) NY-ESO-1 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. AJ003149, U87459), NA 17-A (*e.g.*, European Patent No. WO 96/40039), Melan-A/MART-1 (Kawakami et al., 1994 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3515; see also *e.g.*, GenBank Acc. Nos. U06654, U06452), tyrosinase (Topalian et al., 1994 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:9461; see also *e.g.*, GenBank Acc. Nos. M26729, SEG_HUMTYR0, *see also* Weber et al., *J. Clin. Invest* (1998) *102*:1258), Gp-100 (Kawakami et al., 1994 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3515; see also *e.g.*, GenBank Acc. No. S73003, *see also* European Patent No. EP 668350; Adema et al., 1994 *J. Biol. Chem.* 269:20126), MAGE (van den Bruggen et al., 1991 *Science* 254:1643; see also *e.g*, GenBank Acc. Nos. U93163, AF064589, U66083, D32077, D32076, D32075, U10694, U10693, U10691, U10690, U10689, U10688, U10687, U10686, U10685, L18877, U10340, U10339, L18920, U03735, M77481), BAGE (*e.g.*, GenBank Acc. No. U19180, *see also* U.S. Patent Nos. 5,683,886 and 5,571,711), GAGE (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. AF055475, AF055474, AF055473, U19147, U19146, U19145, U19144, U19143, U19142), any of the CTA class of receptors including in particular HOM-MEL-40 antigen encoded by the SSX2 gene (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. X86175, U90842, U90841, X86174), carcinoembyonic antigen (CEA, Gold and Freedman, 1985 *J. Exp. Med.* 121:439; see also *e.g.*, GenBank Acc. Nos. SEG_HUMCEA, M59710, M59255, M29540), and PyLT (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. J02289, J02038).

Additional cell surface receptors that may be sources of binding domain polypeptides or that may be cognate antigens include the following, or the like: CD2 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. Y00023, SEG_HUMCD2, M16336, M16445, SEG_MUSCD2, M14362), 4-1BB (CDw137, Kwon et al., 1989 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:1963, 4-1BB ligand (Goodwin et al., 1993 *Eur. J. Immunol.* 23:2361; Melero et al., 1998 *Eur. J. Immunol.* 3:116), CD5 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. X78985, X89405), CD10 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. M81591, X76732) CD27 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. M63928, L24495, L08096), CD28 (June et al., 1990 *Immunol. Today* 11:211; see also, *e.g.*, GenBank Acc. Nos. J02988, SEG_HUMCD28, M34563), CTLA-4 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. L15006, X05719, SEG_HUMIGCTL), CD40 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. M83312, SEG_MUSC040A0, Y10507, X67878, X96710, U15637, L07414), interferon-γ (IFN-γ; see, *e.g.*, Farrar et al. 1993 *Ann. Rev. Immunol.* 11:571 and references cited therein, Gray et al. 1982 *Nature* 295:503, Rinderknecht et al. 1984 *J. Biol. Chem.* 259:6790, DeGrado et al. 1982 *Nature* 300:379), interleukin-4 (IL-4; see, e.g., *53rd Forum in Immunology*, 1993 *Research in Immunol.* 144:553-643; Banchereau et al., 1994 in *The Cytokine Handbook*, 2nd ed., A. Thomson, ed., Academic Press, NY, p. 99; Keegan et al., 1994 *J Leukocyt. Biol.*. 55:272, and references cited therein), interleukin-17 (IL-17) (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. U32659, U43088) and interleukin-17 receptor (IL-17R) (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. U31993, U58917). Notwithstanding the foregoing, the present invention expressly does not encompass any immunoglobulin fusion protein that is disclosed in U.S. 5,807,734, U.S. 5,795,572 or U.S. 5,807,734.

Additional cell surface receptors that may be sources of binding domain polypeptides or that may be cognate antigens include the following, or the like: CD59 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. SEG_HUMCD590, M95708, M34671), CD48 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. M59904), CD58/LFA-3 (*e.g.*, GenBank Acc. No. A25933, Y00636, E12817; see also JP 1997075090-A) , CD72 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. AA311036, S40777, L35772), CD70 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. Y13636, S69339), CD80/B7.1 (Freeman et al., 1989 *J. Immunol.* 43:2714; Freeman et al., 1991 *J. Exp. Med.* 174:625; see also *e.g.*, GenBank Acc. Nos. U33208, I683379), CD86/B7.2 (Freeman et al., 1993 *J. Exp. Med.* 178:2185, Boriello et al., 1995 *J. Immunol.*

155:5490; see also, *e.g.*, GenBank Acc. Nos. AF099105, SEG_MMB72G, U39466, U04343, SEG_HSB725, L25606, L25259), CD40 ligand (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. SEG_HUMCD40L, X67878, X65453, L07414), IL-17 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. U32659, U43088), CD43 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. X52075, J04536) and VLA-4 ($\alpha_4\beta_7$) (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. L12002, X16983, L20788, U97031, L24913, M68892, M95632). The following cell surface receptors are typically associated with B cells: CD19 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. SEG_HUMCD19W0, M84371, SEG_MUSCD19W, M62542), CD20 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. SEG_HUMCD20, M62541), CD22 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. I680629, Y10210, X59350, U62631, X52782, L16928), CD30 ligand (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. L09753, M83554), CD37 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. SEG_MMCD37X, X14046, X53517), CD106 (VCAM-1) (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. X53051, X67783, SEG_MMVCAM1C, *see also* U.S. Patent No. 5,596,090), CD54 (ICAM-1) (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. X84737, S82847, X06990, J03132, SEG_MUSICAM0), interleukin-12 (see, *e.g.*, Reiter et al, 1993 *Crit. Rev. Immunol.* 13:1, and references cited therein). Accessory cell agents may also include any of the following cell surface receptors typically associated with dendritic cells: CD83 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. AF001036, AL021918), DEC-205 (*e.g.*, GenBank Acc. Nos. AF011333, U19271).

An immunoglobulin hinge region polypeptide, as discussed above, includes any hinge peptide or polypeptide that occurs naturally, as an artificial peptide or as the result of genetic engineering and that is situated in an immunoglobulin heavy chain polypeptide between the amino acid residues responsible for forming intrachain immunoglobulin-domain disulfide bonds in CH1 and CH2 regions; hinge region polypeptides for use in the present invention may also include a mutated hinge region polypeptide. Accordingly, an immunoglobulin hinge region polypeptide may be derived from, or may be a portion or fragment of (*i.e.*, one or more amino acids in peptide linkage, typically 5-65 amino acids, preferably 10-50, more preferably 15-35, still more preferably 18-32, still more preferably 20-30, still more preferably 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 or 29 amino acids) an immunoglobulin polypeptide chain region classically regarded as having hinge function, as described above, but a hinge region

polypeptide for use in the instant invention need not be so restricted and may include amino acids situated (according to structural criteria for assigning a particular residue to a particular domain that may vary, as known in the art) in an adjoining immunoglobulin domain such as a CH1 domain or a CH2 domain, or in the case of certain artificially engineered immunoglobulin constructs, an immunoglobulin variable region domain.

Wild-type immunoglobulin hinge region polypeptides include any naturally occurring hinge region that is located between the constant region domains, CH1 and CH2, of an immunoglobulin. The wild-type immunoglobulin hinge region polypeptide is preferably a human immunoglobulin hinge region polypeptide, preferably comprising a hinge region from a human IgG immunoglobulin, and more preferably, a hinge region polypeptide from a human IgG1 isotype. As is known to the art, despite the tremendous overall diversity in immunoglobulin amino acid sequences, immunoglobulin primary structure exhibits a high degree of sequence conservation in particular portions of immunoglobulin polypeptide chains, notably with regard to the occurrence of cysteine residues which, by virtue of their sulfyhydryl groups, offer the potential for disulfide bond formation with other available sulfydryl groups. Accordingly, in the context of the present invention wild-type immunoglobulin hinge region polypeptides may be regarded as those that feature one or more highly conserved (*e.g.*, prevalent in a population in a statistically significant manner) cysteine residues, and in certain preferred embodiments a mutated hinge region polypeptide may be selected that contains zero or one cysteine residue and that is derived from such a wild-type hinge region.

A mutated immunoglobulin hinge region polypeptide may comprise a hinge region that has its origin in an immunoglobulin of a species, of an immunoglobulin isotype or class, or of an immunoglobulin subclass that is different from that of the CH2 and CH3 domains. For instance, in certain embodiments of the invention, the binding domain-immunoglobulin fusion protein may comprise a binding domain polypeptide that is fused to an immunoglobulin hinge region polypeptide comprising a wild-type human IgA hinge region polypeptide, or a mutated human IgA hinge region polypeptide that contains zero or only one cysteine residues, as described

herein. Such a hinge region polypeptide may be fused to an immunoglobulin heavy chain CH2 region polypeptide from a different Ig isotype or class, for example an IgG subclass, which in certain preferred embodiments will be the IgG1 subclass.

For example, and as described in greater detail below, in certain embodiments of the present invention an immunoglobulin hinge region polypeptide is selected which is derived from a wild-type human IgA hinge region that naturally comprises three cysteines, where the selected hinge region polypeptide is truncated relative to the complete hinge region such that only one of the cysteine residues remains (*e.g.*, SEQ ID NOS:35-36). Similarly, in certain other embodiments of the invention, the binding domain-immunoglobulin fusion protein comprises a binding domain polypeptide that is fused to an immunoglobulin hinge region polypeptide comprising a mutated hinge region polypeptide in which the number of cysteine residues is reduced by amino acid substitution or deletion. A mutated hinge region polypeptide may thus be derived from a wild-type immunoglobulin hinge region that contains one or more cysteine residues. In certain embodiments, a mutated hinge region polypeptide may contain zero or only one cysteine residue, wherein the mutated hinge region polypeptide is derived from a wild type immunoglobulin hinge region that contains, respectively, one or more or two or more cysteine residues. In the mutated hinge region polypeptide, the cysteine residues of the wild-type immunoglobulin hinge region are preferably substituted with amino acids that are incapable of forming a disulfide bond. In one embodiment of the invention, the mutated hinge region polypeptide is derived from a human IgG wild-type hinge region polypeptide, which may include any of the four human IgG isotype subclasses, IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4. In certain preferred embodiments, the mutated hinge region polypeptide is derived from a human IgG1 wild-type hinge region polypeptide. By way of example, a mutated hinge region polypeptide derived from a human IgG1 wild-type hinge region polypeptide may comprise mutations at two of the three cysteine residues in the wild-type immunoglobulin hinge region, or mutations at all three cysteine residues.

The cysteine residues that are present in a wild-type immunoglobulin hinge region and that are removed by mutagenesis according to particularly preferred

embodiments of the present invention include cysteine residues that form, or that are capable of forming, interchain disulfide bonds. Without wishing to be bound by theory, the present invention contemplates that mutation of such hinge region cysteine residues, which are believed to be involved in formation of interchain disulfide bridges, reduces the ability of the subject invention binding domain-immunoglobulin fusion protein to dimerize (or form higher oligomers) via interchain disulfide bond formation, while surprisingly not ablating the ability of the fusion protein to promote antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) or to fix complement. In particular, the Fc receptors (FcR) which mediate ADCC (*e.g.*, FcRIII, CD16) exhibit low affinity for immunoglobulin Fc domains, suggesting that functional binding of Fc to FcR requires avidity stabilization of the Fc-FcR complex by virtue of the dimeric structure of heavy chains in a conventional antibody, and/or FcR aggregation and cross-linking by a conventional Ab Fc structure. (Sonderman et al., 2000 *Nature* 406:267; Radaev et al., 2001 *J. Biol. Chem.* 276:16469; Radaev et al., 2001 *J. Biol. Chem.* 276:16478; Koolwijk et al., 1989 *J. Immunol.* 143:1656; Kato et al., 2000 *Immunol. Today* 21:310.) Hence, the binding domain-immunoglobulin fusion proteins of the present invention provide the advantages associated with single-chain immunoglobulin fusion proteins while also unexpectedly retaining immunological activity. Similarly, the ability to fix complement is typically associated with immunoglobulins that are dimeric with respect to heavy chain constant regions such as those that comprise Fc, while the binding domain-immunoglobulin fusion proteins of the present invention exhibit the unexpected ability to fix complement.

As noted above, binding domain-immunoglobulin fusion proteins are believed, according to non-limiting theory, to be compromised in their ability to dimerize, and further according to theory, this property is a consequence of a reduction in the number of cysteine residues that are present in the immunoglobulin hinge region polypeptide selected for inclusion in the construction of the fusion protein. Determination of the relative ability of a polypeptide to dimerize is well within the knowledge of the relevant art, where any of a number of established methodologies may be applied to detect protein dimerization (see, *e.g.,* Scopes, *Protein Purification:*

Principles and Practice, 1987 Springer-Verlag, New York). For example, biochemical separation techniques for resolving proteins on the basis of molecular size (*e.g.*, gel electrophoresis, gel filtration chromatography, analytical ultracentrifugation, etc.), and/or comparison of protein physicochemical properties before and after introduction of sulfhydryl-active (*e.g.*, iodoacetamide, N-ethylmaleimide) or disulfide-reducing (*e.g.*, 2-mercaptoethanol, dithiothreitol) agents, or other equivalent methodologies, may all be employed for determining a degree of polypeptide dimerization or oligomerization, and for determining possible contribution of disulfide bonds to such potential quarternary structure. In certain embodiments, the invention relates to a binding domain-immunoglobulin fusion protein that exhibits a reduced (*i.e.*, in a statistically significant manner relative to an appropriate IgG-derived control) ability to dimerize, relative to a wild-type human immunoglobulin G hinge region polypeptide as provided herein. Accordingly, those familiar with the art will be able readily to determine whether a particular fusion protein displays such reduced ability to dimerize.

Compositions and methods for preparation of immunoglobulin fusion proteins are well known in the art, as described for example, in U.S. Patent No. 5,892,019, which discloses recombinant antibodies that are the products of a single encoding polynucleotide but which are not binding domain-immunoglobulin fusion proteins according to the present invention.

For an immunoglobulin fusion protein of the invention which is intended for use in humans, the constant regions will typically be of human sequence origin, to minimize a potential anti-human immune response and to provide appropriate effector functions. Manipulation of sequences encoding antibody constant regions is described in the PCT publication of Morrison and Oi, WO 89/07142. In particularly preferred embodiments, the CH1 domain is deleted and the carboxyl end of the binding domain, or where the binding domain comprises two immunoglobulin variable region polypeptides, the second (*i.e.*, more proximal to the C-terminus) variable region is joined to the amino terminus of CH2 through the hinge region. A schematic diagram depicting the structures of two exemplary binding domain-immunoglobulin fusion proteins is shown in FIG. 11, where it should be noted that in particularly preferred

embodiments no interchain disulfide bonds are present, and in other embodiments a restricted number of interchain disulfide bonds may be present relative to the number of such bonds that would be present if wild-type hinge region polypeptides were instead present, and that in other embodiments the fusion protein comprises a mutated hinge region polypeptide that exhibits a reduced ability to dimerize, relative to a wild-type human IgG hinge region polypeptide. Thus, the isolated polynucleotide molecule codes for a single chain immunoglobulin fusion protein having a binding domain that provides specific binding affinity for a selected antigen.

As noted above, in certain embodiments the binding protein-immunoglobulin fusion protein comprises at least one immunoglobulin variable region polypeptide, which may be a light chain or a heavy chain variable region polypeptide, and in certain embodiments the fusion protein comprises at least one such light chain V-region and one such heavy chain V-region and at least one linker peptide that is fused to each of the V-regions. Construction of such binding domains, for example single chain Fv domains, is well known in the art and is described in greater detail in the Examples below, and has been described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,892,019 and references cited therein; selection and assembly of single-chain variable regions and of linker polypeptides that may be fused to each of a heavy chain-derived and a light chain-derived V region (*e.g.*, to generate a binding domain that comprises a single-chain Fv polypeptide) is also known to the art and described herein and, for example, in U.S. Patent Nos. 5,869,620, U.S. 4,704,692 and U.S. 4,946,778. In certain embodiments all or a portion of an immunoglobulin sequence that is derived from a non-human source may be "humanized" according to recognized procedures for generating humanized antibodies, *i.e.*, immunoglobulin sequences into which human Ig sequences are introduced to reduce the degree to which a human immune system would perceive such proteins as foreign (see, *e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,693,762; 5,585,089; 4,816,567; 5,225,539; 5,530,101; and references cited therein)

Once a binding domain-immunoglobulin fusion protein as provided herein has been designed, DNAs encoding the polypeptide may be synthesized via oligonucleotide synthesis as described, for example, in Sinha et al., *Nucleic Acids Res.*,

12, 4539-4557 (1984); assembled via PCR as described, for example in Innis, Ed., *PCR Protocols*, Academic Press (1990) and also in Better et al. *J. Biol. Chem.* 267, 16712-16118 (1992); cloned and expressed via standard procedures as described, for example, in Ausubel et al., Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1989) and also in Robinson et al., *Hum. Antibod. Hybridomas*, 2, 84-93 (1991); and tested for specific antigen binding activity, as described, for example, in Harlow et al., Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988) and Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107, 220-239 (1980).

The preparation of single polypeptide chain binding molecules of the Fv region, single-chain Fv molecules, is described in U.S. Pat. No. 4,946,778, which is incorporated herein by reference. In the present invention, single-chain Fv-like molecules are synthesized by encoding a first variable region of the heavy or light chain, followed by one or more linkers to the variable region of the corresponding light or heavy chain, respectively. The selection of appropriate linker(s) between the two variable regions is described in U.S. Pat. No. 4,946,778. An exemplary linker described herein is $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_3$. The linker is used to convert the naturally aggregated but chemically separate heavy and light chains into the amino terminal antigen binding portion of a single polypeptide chain, wherein this antigen binding portion will fold into a structure similar to the original structure made of two polypeptide chains and thus retain the ability to bind to the antigen of interest. The nucleotide sequences encoding the variable regions of the heavy and light chains, joined by a sequence encoding a linker, are joined to a nucleotide sequence encoding antibody constant regions. The constant regions are those which permit the resulting polypeptide to form interchain disulfide bonds to form a dimer, and which contain desired effector functions, such as the ability to mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). For an immunoglobulin-like molecule of the invention which is intended for use in humans, the constant regions will typically be substantially human to minimize a potential anti-human immune response and to provide approbate effector functions. Manipulation of sequences encoding antibody constant regions is described in the PCT

publication of Morrison and Oi, WO 89/07142, which is incorporated herein by reference. In preferred embodiments, the CH1 domain is deleted and the carboxyl end of the second variable region is joined to the amino terminus of CH2 through the hinge region. The Cys residue of the hinge which makes a disulfide bond with a corresponding Cys of the light chain, to hold the heavy and light chains of the native antibody molecule, can be deleted or, preferably, is substituted with, *e.g.*, a Pro residue or the like.

As described above, the present invention provides recombinant expression constructs capable of directing the expression of binding domain-immunoglobulin fusion proteins as provided herein. The amino acids, which occur in the various amino acid sequences referred to herein, are identified according to their well known three letter or one letter abbreviations. The nucleotides, which occur in the various DNA sequences or fragments thereof referred herein, are designated with the standard single letter designations used routinely in the art. A given amino acid sequence may also encompass similar amino acid sequences having only minor changes, for example by way of illustration and not limitation, covalent chemical modifications, insertions, deletions and substitutions, which may further include conservative substitutions. Amino acid sequences that are similar to one another may share substantial regions of sequence homology. In like fashion, nucleotide sequences may encompass substantially similar nucleotide sequences having only minor changes, for example by way of illustration and not limitation, covalent chemical modifications, insertions, deletions and substitutions, which may further include silent mutations owing to degeneracy of the genetic code. Nucleotide sequences that are similar to one another may share substantial regions of sequence homology.

The presence of a malignant condition in a subject refers to the presence of dysplastic, cancerous and/or transformed cells in the subject, including, for example neoplastic, tumor, non-contact inhibited or oncogenically transformed cells, or the like. In preferred embodiments contemplated by the present invention, for example, such cancer cells are malignant hematopoietic cells, such as transformed cells of lymphoid lineage and in particular, B-cell lymphomas and the like; cancer cells may in certain

preferred embodiments also be epithelial cells such as carcinoma cells. The invention also contemplates B-cell disorders, which may include certain malignant conditions that affect B-cells (*e.g.*, B-cell lymphoma) but which is not intended to be so limited, and which is also intended to encompass autoimmune diseases and in particular, diseases, disorders and conditions that are characterized by autoantibody production.

Autoantibodies are antibodies that react with self antigens. Autoantibodies are detected in several autoimmune diseases (*i.e.*, a disease, disorder or condition wherein a host immune system generates an inappropriate anti-"self" immune reaction) where they are involved in disease activity. The current treatments for these autoimmune diseases are immunosuppressive drugs that require continuing administration, lack specificity, and cause significant side effects. New approaches that can eliminate autoantibody production with minimal toxicity will address an unmet medical need for a spectrum of diseases that affect many people. The subject invention binding domain-immunoglobulin fusion protein is designed for improved penetration into lymphoid tissues. Depletion of B lymphocytes interrupts the autoantibody production cycle, and allows the immune system to reset as new B lymphocytes are produced from precursors in the bone marrow.

A number of diseases have been identified for which beneficial effects are believed, according to non-limiting theory, to result from B cell depletion therapy; a brief description of several exemplars of these diseases follows.

Autoimmune thyroid disease includes Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. In the United States alone, there are about 20 million people who have some form of autoimmune thyroid disease. Autoimmune thyroid disease results from the production of autoantibodies that either stimulate the thyroid to cause hyperthyroidism (Graves' disease) or destroy the thyroid to cause hypothyroidism (Hashimoto's thyroiditis). Stimulation of the thyroid is caused by autoantibodies that bind and activate the thyroid stimulating hormone (TSH) receptor. Destruction of the thyroid is caused by autoantibodies that react with other thyroid antigens.

Current therapy for Graves' disease includes surgery, radioactive iodine, or antithyroid drug therapy. Radioactive iodine is widely used, since antithyroid

medications have significant side effects and disease recurrence is high. Surgery is reserved for patients with large goiters or where there is a need for very rapid normalization of thyroid function. There are no therapies that target the production of autoantibodies responsible for stimulating the TSH receptor. Current therapy for Hashimoto's thyroiditis is levothyroxine sodium, and therapy is usually lifelong because of the low likelihood of remission. Suppressive therapy has been shown to shrink goiters in Hashimoto's thryoiditis, but no therapies that reduce autoantibody production to target the disease mechanism are known.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic disease characterized by inflamation of the joints, leading to swelling, pain, and loss of function. RA effects an estimated 2.5 million people in the United States. RA is caused by a combination of events including an initial infection or injury, an abnormal immune response, and genetic factors. While autoreactive T cells and B cells are present in RA, the detection of high levels of antibodies that collect in the joints, called rheumatoid factor, is used in the diagnosis of RA. Current therapy for RA includes many medications for managing pain and slowing the progression of the disease. No therapy has been found that can cure the disease. Medications include nonsteroidal antiinflamatory drugs (NSAIDS), and disease modifying antirheumatic drugs (DMARDS). NSAIDS are effective in benign disease, but fail to prevent the progression to joint destruction and debility in severe RA. Both NSAIDS and DMARDS are associated with signficant side effects. Only one new DMARD, Leflunomide, has been approved in over 10 years. Leflunomide blocks production of autoantibodies, reduces inflamation, and slows progression of RA. However, this drug also causes severe side effects including nausea, diarrhea, hair loss, rash, and liver injury.

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease caused by recurrent injuries to blood vessels in multiple organs, including the kidney, skin, and joints. SLE effects over 500,000 people in the United States. In patients with SLE, a faulty interaction between T cells and B cells results in the production of autoantibodies that attack the cell nucleus. These include anti-double stranded DNA and anti-Sm antibodies. Autoantibodies that bind phospholipids are also found in about half of SLE

patients, and are responsible for blood vessel damage and low blood counts. Immune complexes accumulate the kidneys, blood vessels, and joints of SLE patients, where they cause inflamation and tissue damage. No treatment for SLE has been found to cure the disease. NSAIDS and DMARDS are used for therapy depending upon the severity of the disease. Plasmapheresis with plasma exchange to remove autoantibodies can cause temporary improvement in SLE patients. There is general agreement that autoantibodies are responsible for SLE, so new therapies that deplete the B cell lineage, allowing the immune system to reset as new B cells are generated from precursors, offer hope for long lasting benefit in SLE patients.

Sjogrens syndrome is an autoimmune disease characterized by destruction of the body's moisture producing glands. Sjogrens syndrome is one of the most prevelant autoimmune disorders, striking up to 4 million people in the United States. About half of people with Sjogren's also have a connective tissue disease, such as rheumatoid arthritis, while the other half have primary Sjogren's with no other concurrent autoimmune disease. Autoantibodies, including anti-nuclear antibodies, rheumatoid factor, anti-fodrin, and anti-muscarinic receptor are often present in patients with Sjogrens syndrome. Conventional therapy includes corticosteroids.

Immune Thrombocytopenic purpura (ITP) is caused by autoantibodies that bind to blood platelets and cause their destruction. Some cases of ITP are caused by drugs, and others are associated with infection, pregnancy, or autoimmune disease such as SLE. About half of all cases are classified as "idiopathic", meaning the cause is unknown. The treatment of ITP is determined by the severity of the symptoms. In some cases, no therapy is needed. In most cases, immunosuppressive drugs, including corticosteroids or intravenous infusions of immune globulin to deplete T cells. Another treatment that usually results in an increased number of platelets is removal of the spleen, the organ that destroys antibody-coated platelets. More potent immunosuppressive drugs, including cyclosporine, cyclophosphamide, or azathioprine are used for patients with severe cases. Removal of autoantibodies by passage of patients' plasma over a Protein A column is used as a second line treatment in patients with severe disease.

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune disease characterized by inflamation of the central nervous system and destruction of myelin, which insulates nerve cell fibers in the brain, spinal cord, and body. Although the cause of MS is unknown, it is widely believed that autoimmune T cells are primary contributors to the pathogenesis of the disease. However, high levels of antibodies are present in the cerebral spinal fluid of patients with MS, and some theories predict that the B cell response leading to antibody production is important for mediating the disease. No B cell depletion therapies have been studies in patients with MS. There is no cure for MS. Current therapy is corticosteroids, which can reduce the duration and severity of attacks, but do not affect the course of MS over time. New biotechnology interferon (IFN) therapies for MS have recently been approved.

Myasthenia Gravis (MG) is a chronic autoimmune neuromuscular disorder that is characterized by weakness of the voluntary muscle groups. MG effects about 40,000 people in the United States. MG is caused by autoantibodies that bind to acetylcholine receptors expressed at neuromuscular junctions. The autoantibodies reduce or block acetylcholine receptors, preventing the transmission of signals from nerves to muscles. There is no known cure for MG. Common treatments include immunosuppression with corticosteroids, cyclosporine, cyclophosphamide, or azathioprine. Surgical removal of the thymus is often used to blunt the autoimmune response. Plasmapheresis, used to reduce autoantibody levels in the blood, is effective in MG, but is short-lived because the production of autoantibodies continues. Plasmapheresis is usually reserved for severe muscle weakness prior to surgery.

Psoriasis effects approximately five million people. Autoimmune inflamation in the skin. Psoriasis associated with arthritis in 30% (psoriatic arthritis). Many treatments, including steroids, UV light retenoids, vitamin D derivatives, cyclosporine, methotrexate.

Scleroderma is a chronic autoimmune disease of the connective tissue that is also known as systemic sclerosis. Scleroderma is characterized by an overproduction of collagen, resulting in a thickening of the skin. Approxiamtely 300,000 people in the United States have scleroderma.

Inflamatory Bowel Disease including Crohn's disease and Ulcerative colitis, are autoimmune diseases of the digestive system.

The present invention further relates to constructs encoding binding domain-immunoglobulin fusion proteins, and in particular to methods for administering recombinant constructs encoding such proteins that may be expressed, for example, as fragments, analogs and derivatives of such polypeptides. The terms "fragment," "derivative" and "analog" when referring to binding domain-immunoglobulin fusion polypeptides or fusion proteins, refers to any binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide or fusion protein that retains essentially the same biological function or activity as such polypeptide. Thus, an analog includes a proprotein which can be activated by cleavage of the proprotein portion to produce an active binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide.

A fragment, derivative or analog of an binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide or fusion protein, including binding domain-immunoglobulin fusion polypeptides or fusion proteins encoded by the cDNAs referred to herein, may be (i) one in which one or more of the amino acid residues are substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably a conserved amino acid residue) and such substituted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code, or (ii) one in which one or more of the amino acid residues includes a substituent group, or (iii) one in which additional amino acids are fused to the binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide, including amino acids that are employed for detection or specific functional alteration of the binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide or a proprotein sequence. Such fragments, derivatives and analogs are deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

The polypeptides of the present invention include binding domain-immunoglobulin fusion polypeptides and fusion proteins having binding domain polypeptide amino acid sequences that are identical or similar to sequences known in the art, or fragments or portions thereof. For example by way of illustration and not limitation, the human CD154 molecule extracellular domain is contemplated for use

according to the instant invention, as are polypeptides having at least 70% similarity (preferably a 70% identity) and more preferably 90% similarity (more preferably a 90% identity) to the reported polypeptide and still more preferably a 95% similarity (still more preferably a 95% identity) to the reported polypeptides and to portions of such polypeptides, wherein such portions of a binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide generally contain at least 30 amino acids and more preferably at least 50 amino acids.

As known in the art "similarity" between two polypeptides is determined by comparing the amino acid sequence and conserved amino acid substitutes thereto of the polypeptide to the sequence of a second polypeptide. Fragments or portions of the nucleic acids encoding polypeptides of the present invention may be used to synthesize full-length nucleic acids of the present invention. As used herein, "% identity" refers to the percentage of identical amino acids situated at corresponding amino acid residue positions when two or more polypeptide are aligned and their sequences analyzed using a gapped BLAST algorithm (*e.g.,* Altschul et al., 1997 *Nucl. Ac. Res.* 25:3389) which weights sequence gaps and sequence mismatches according to the default weightings provided by the National Institutes of Health/ NCBI database (Bethesda, MD; *see* www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast).

The term "isolated" means that the material is removed from its original environment (*e.g.*, the natural environment if it is naturally occurring). For example, a naturally occurring nucleic acid or polypeptide present in a living animal is not isolated, but the same nucleic acid or polypeptide, separated from some or all of the co-existing materials in the natural system, is isolated. Such nucleic acids could be part of a vector and/or such nucleic acids or polypeptides could be part of a composition, and still be isolated in that such vector or composition is not part of its natural environment.

The term "gene" means the segment of DNA involved in producing a polypeptide chain; it includes regions preceding and following the coding region "leader and trailer" as well as intervening sequences (introns) between individual coding segments (exons).

As described herein, the invention provides binding domain-immunoglobulin fusion proteins encoded by nucleic acids that have the binding domain coding sequence fused in frame to an additional immunoglobulin domain encoding sequence to provide for expression of a binding domain polypeptide sequence fused to an additional functional polypeptide sequence that permits, for example by way of illustration and not limitation, detection, functional alteration, isolation and/or purification of the fusion protein. Such fusion proteins may permit functional alteration of a binding domain by containing additional immunoglobulin-derived polypeptide sequences that influence behavior of the fusion product, for example (and as described above) by reducing the availability of sufhydryl groups for participation in disulfide bond formation, and by conferring the ability to potentiate ADCC and/or CDC.

Modification of the polypeptide may be effected by any means known to those of skill in this art. The preferred methods herein rely on modification of DNA encoding the fusion protein and expression of the modified DNA. DNA encoding one of the binding domain-immunoglobulin fusions discussed above may be mutagenized using standard methodologies, including those described below. For example, cysteine residues that may otherwise facilitate multimer formation or promote particular molecular conformations can be deleted from a polypeptide or replaced, *e.g.*, cysteine residues that are responsible for aggregate formation. If necessary, the identity of cysteine residues that contribute to aggregate formation may be determined empirically, by deleting and/or replacing a cysteine residue and ascertaining whether the resulting protein aggregates in solutions containing physiologically acceptable buffers and salts. In addition, fragments of binding domain-immunoglobulin fusions may be constructed and used. As noted above, the counterreceptor/ ligand binding domains for many candidate binding domain-immunoglobulin fusion have been delineated, such that one having ordinary skill in the art may readily select appropriate polypeptide domains for inclusion in the encoded products of the instant expression constructs.

Conservative substitutions of amino acids are well-known and may be made generally without altering the biological activity of the resulting binding domain-immunoglobulin fusion protein molecule. For example, such substitutions are generally

made by interchanging within the groups of polar residues, charged residues, hydrophobic residues, small residues, and the like. If necessary, such substitutions may be determined empirically merely by testing the resulting modified protein for the ability to bind to the appropriate cell surface receptors in *in vitro* biological assays, or to bind to appropriate antigens or desired target molecules.

The present invention further relates to nucleic acids which hybridize to binding domain-immunoglobulin fusion protein encoding polynucleotide sequences as provided herein, or their complements, as will be readily apparent to those familiar with the art, if there is at least 70%, preferably at least 90%, and more preferably at least 95% identity between the sequences. The present invention particularly relates to nucleic acids which hybridize under stringent conditions to the binding domain-immunoglobulin fusion encoding nucleic acids referred to herein. As used herein, the term "stringent conditions" means hybridization will occur only if there is at least 95% and preferably at least 97% identity between the sequences. The nucleic acids which hybridize to binding domain-immunoglobulin fusion encoding nucleic acids referred to herein, in preferred embodiments, encode polypeptides which retain substantially the same biological function or activity as the binding domain-immunoglobulin fusion polypeptides encoded by the cDNAs of the references cited herein.

As used herein, to "hybridize" under conditions of a specified stringency is used to describe the stability of hybrids formed between two single-stranded nucleic acid molecules. Stringency of hybridization is typically expressed in conditions of ionic strength and temperature at which such hybrids are annealed and washed. Typically "high", "medium" and "low" stringency encompass the following conditions or equivalent conditions thereto: high stringency: 0.1 x SSPE or SSC, 0.1% SDS, 65° C; medium stringency: 0.2 x SSPE or SSC, 0.1% SDS, 50°C; and low stringency: 1.0 x SSPE or SSC, 0.1% SDS, 50°C. As known to those having ordinary skill in the art, variations in stringency of hybridization conditions may be achieved by altering the time, temperature and/or concentration of the solutions used for prehybridization, hybridization and wash steps, and suitable conditions may also depend in part on the particular nucleotide sequences of the probe used, and of the blotted, proband nucleic

acid sample. Accordingly, it will be appreciated that suitably stringent conditions can be readily selected without undue experimentation where a desired selectivity of the probe is identified, based on its ability to hybridize to one or more certain proband sequences while not hybridizing to certain other proband sequences.

The nucleic acids of the present invention, also referred to herein as polynucleotides, may be in the form of RNA or in the form of DNA, which DNA includes cDNA, genomic DNA, and synthetic DNA. The DNA may be double-stranded or single-stranded, and if single stranded may be the coding strand or non-coding (anti-sense) strand. A coding sequence which encodes an binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide for use according to the invention may be identical to the coding sequence known in the art for any given binding domain-immunoglobulin fusion, or may be a different coding sequence, which, as a result of the redundancy or degeneracy of the genetic code, encodes the same binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide.

The nucleic acids which encode binding domain-immunoglobulin fusion polypeptides for use according to the invention may include, but are not limited to: only the coding sequence for the binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide; the coding sequence for the binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide and additional coding sequence; the coding sequence for the binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide (and optionally additional coding sequence) and non-coding sequence, such as introns or non-coding sequences 5' and/or 3' of the coding sequence for the binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide, which for example may further include but need not be limited to one or more regulatory nucleic acid sequences that may be a regulated or regulatable promoter, enhancer, other transcription regulatory sequence, repressor binding sequence, translation regulatory sequence or any other regulatory nucleic acid sequence. Thus, the term "nucleic acid encoding" or "polynucleotide encoding" a binding domain-immunoglobulin fusion protein encompasses a nucleic acid which includes only coding sequence for a binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide as well as a nucleic acid which includes additional coding and/or non-coding sequence(s).

Nucleic acids and oligonucleotides for use as described herein can be synthesized by any method known to those of skill in this art (*see, e.g.*, WO 93/01286, U.S. Application Serial No. 07/723,454; U.S. Patent No. 5,218,088; U.S. Patent No. 5,175,269; U.S. Patent No. 5,109,124). Identification of oligonucleotides and nucleic acid sequences for use in the present invention involves methods well known in the art. For example, the desirable properties, lengths and other characteristics of useful oligonucleotides are well known. In certain embodiments, synthetic oligonucleotides and nucleic acid sequences may be designed that resist degradation by endogenous host cell nucleolytic enzymes by containing such linkages as: phosphorothioate, methylphosphonate, sulfone, sulfate, ketyl, phosphorodithioate, phosphoramidate, phosphate esters, and other such linkages that have proven useful in antisense applications (*see, e.g.*, Agrwal et al., *Tetrehedron Lett. 28*:3539-3542 (1987); Miller et al., *J. Am. Chem. Soc. 93*:6657-6665 (1971); Stec et al., *Tetrehedron Lett. 26*:2191-2194 (1985); Moody et al., *Nucl. Acids Res. 12*:4769-4782 (1989); Uznanski et al., *Nucl. Acids Res.* (1989); Letsinger et al., *Tetrahedron 40*:137-143 (1984); Eckstein, *Annu. Rev. Biochem. 54*:367-402 (1985); Eckstein, *Trends Biol. Sci. 14*:97-100 (1989); Stein In: *Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression*, Cohen, Ed, Macmillan Press, London, pp. 97-117 (1989); Jager et al., *Biochemistry 27*:7237-7246 (1988)).

In one embodiment, the present invention provides truncated components (*e.g.*, binding domain polypeptide, hinge region polypeptide, linker, etc.) for use in a binding domain-immunoglobulin fusion protein, and in another embodiment the invention provides nucleic acids encoding a binding domain-immunoglobulin fusion protein having such truncated components. A truncated molecule may be any molecule that comprises less than a full length version of the molecule. Truncated molecules provided by the present invention may include truncated biological polymers, and in preferred embodiments of the invention such truncated molecules may be truncated nucleic acid molecules or truncated polypeptides. Truncated nucleic acid molecules have less than the full length nucleotide sequence of a known or described nucleic acid molecule, where such a known or described nucleic acid molecule may be a naturally

occurring, a synthetic or a recombinant nucleic acid molecule, so long as one skilled in the art would regard it as a full length molecule. Thus, for example, truncated nucleic acid molecules that correspond to a gene sequence contain less than the full length gene where the gene comprises coding and non-coding sequences, promoters, enhancers and other regulatory sequences, flanking sequences and the like, and other functional and non-functional sequences that are recognized as part of the gene. In another example, truncated nucleic acid molecules that correspond to a mRNA sequence contain less than the full length mRNA transcript, which may include various translated and non-translated regions as well as other functional and non-functional sequences.

In other preferred embodiments, truncated molecules are polypeptides that comprise less than the full length amino acid sequence of a particular protein or polypeptide component. As used herein "deletion" has its common meaning as understood by those familiar with the art, and may refer to molecules that lack one or more of a portion of a sequence from either terminus or from a non-terminal region, relative to a corresponding full length molecule, for example, as in the case of truncated molecules provided herein. Truncated molecules that are linear biological polymers such as nucleic acid molecules or polypeptides may have one or more of a deletion from either terminus of the molecule or a deletion from a non-terminal region of the molecule, where such deletions may be deletions of 1-1500 contiguous nucleotide or amino acid residues, preferably 1-500 contiguous nucleotide or amino acid residues and more preferably 1-300 contiguous nucleotide or amino acid residues. In certain particularly preferred embodiments truncated nucleic acid molecules may have a deletion of 270-330 contiguous nucleotides. In certain other particularly preferred embodiments truncated polypeptide molecules may have a deletion of 80-140 contiguous amino acids.

The present invention further relates to variants of the herein referenced nucleic acids which encode fragments, analogs and/or derivatives of a binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide. The variants of the nucleic acids encoding binding domain-immunoglobulin fusion may be naturally occurring allelic variants of the nucleic acids or non-naturally occurring variants. As is known in the art, an allelic

variant is an alternate form of a nucleic acid sequence which may have at least one of a substitution, a deletion or an addition of one or more nucleotides, any of which does not substantially alter the function of the encoded binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide.

Variants and derivatives of binding domain-immunoglobulin fusion may be obtained by mutations of nucleotide sequences encoding binding domain-immunoglobulin fusion polypeptides. Alterations of the native amino acid sequence may be accomplished by any of a number of conventional methods. Mutations can be introduced at particular loci by synthesizing oligonucleotides containing a mutant sequence, flanked by restriction sites enabling ligation to fragments of the native sequence. Following ligation, the resulting reconstructed sequence encodes an analog having the desired amino acid insertion, substitution, or deletion.

Alternatively, oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis procedures can be employed to provide an altered gene wherein predetermined codons can be altered by substitution, deletion or insertion. Exemplary methods of making such alterations are disclosed by Walder et al. (*Gene 42*:133, 1986); Bauer et al. (*Gene 37*:73, 1985); Craik (*BioTechniques*, January 1985, 12-19); Smith et al. (*Genetic Engineering: Principles and Methods BioTechniques*, January 1985, 12-19); Smith et al. (*Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press, 1981); Kunkel (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82*:488, 1985); Kunkel et al. (*Methods in Enzymol. 154*:367, 1987); and U.S. Patent Nos. 4,518,584 and 4,737,462.

As an example, modification of DNA may be performed by site-directed mutagenesis of DNA encoding the protein combined with the use of DNA amplification methods using primers to introduce and amplify alterations in the DNA template, such as PCR splicing by overlap extension (SOE). Site-directed mutagenesis is typically effected using a phage vector that has single- and double-stranded forms, such as M13 phage vectors, which are well-known and commercially available. Other suitable vectors that contain a single-stranded phage origin of replication may be used (*see, e.g.*, Veira et al., *Meth. Enzymol. 15*:3, 1987). In general, site-directed mutagenesis is performed by preparing a single-stranded vector that encodes the protein of interest

(*e.g.*, all or a component portion of a given binding domain-immunoglobulin fusion protein). An oligonucleotide primer that contains the desired mutation within a region of homology to the DNA in the single-stranded vector is annealed to the vector followed by addition of a DNA polymerase, such as *E. coli* DNA polymerase I (Klenow fragment), which uses the double stranded region as a primer to produce a heteroduplex in which one strand encodes the altered sequence and the other the original sequence. The heteroduplex is introduced into appropriate bacterial cells and clones that include the desired mutation are selected. The resulting altered DNA molecules may be expressed recombinantly in appropriate host cells to produce the modified protein.

Equivalent DNA constructs that encode various additions or substitutions of amino acid residues or sequences, or deletions of terminal or internal residues or sequences not needed for biological activity are also encompassed by the invention. For example, and as discussed above, sequences encoding Cys residues that are not desirable or essential for biological activity can be altered to cause the Cys residues to be deleted or replaced with other amino acids, preventing formation of incorrect intramolecular disulfide bridges upon renaturation.

Host organisms include those organisms in which recombinant production of binding domain-immunoglobulin fusion products encoded by the recombinant constructs of the present invention may occur, such as bacteria (for example, *E. coli*), yeast (for example, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*), insect cells and mammals, including *in vitro* and *in vivo* expression. Host organisms thus may include organisms for the construction, propagation, expression or other steps in the production of the vaccines provided herein; hosts also include subjects in which immune responses take place, as described above. Presently preferred host organisms are *E. coli* bacterial strains, inbred murine strains and murine cell lines, and human cells, subjects and cell lines.

The DNA construct encoding the desired binding domain-immunoglobulin fusion is introduced into a plasmid for expression in an appropriate host. In preferred embodiments, the host is a bacterial host. The sequence encoding the ligand or nucleic acid binding domain is preferably codon-optimized for expression in

the particular host. Thus, for example, if a human binding domain-immunoglobulin fusion is expressed in bacteria, the codons would be optimized for bacterial usage. For small coding regions, the gene can be synthesized as a single oligonucleotide. For larger proteins, splicing of multiple oligonucleotides, mutagenesis, or other techniques known to those in the art may be used. The sequences of nucleotides in the plasmids that are regulatory regions, such as promoters and operators, are operationally associated with one another for transcription. The sequence of nucleotides encoding a binding domain-immunoglobulin fusion protein may also include DNA encoding a secretion signal, whereby the resulting peptide is a precursor protein. The resulting processed protein may be recovered from the periplasmic space or the fermentation medium.

In preferred embodiments, the DNA plasmids also include a transcription terminator sequence. As used herein, a "transcription terminator region" is a sequence that signals transcription termination. The entire transcription terminator may be obtained from a protein-encoding gene, which may be the same or different from the inserted binding domain-immunoglobulin fusion encoding gene or the source of the promoter. Transcription terminators are optional components of the expression systems herein, but are employed in preferred embodiments.

The plasmids used herein include a promoter in operative association with the DNA encoding the protein or polypeptide of interest and are designed for expression of proteins in a suitable host as described above (*e.g.*, bacterial, murine or human) depending upon the desired use of the plasmid (*e.g.*, administration of a vaccine containing binding domain-immunoglobulin fusion encoding sequences. Suitable promoters for expression of proteins and polypeptides herein are widely available and are well known in the art. Inducible promoters or constitutive promoters that are linked to regulatory regions are preferred. Such promoters include, but are not limited to, the T7 phage promoter and other T7-like phage promoters, such as the T3, T5 and SP6 promoters, the trp, lpp, and lac promoters, such as the lacUV5, from *E. coli*; the P10 or polyhedrin gene promoter of baculovirus/insect cell expression systems (*see, e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,243,041, 5,242,687, 5,266,317, 4,745,051, and 5,169,784) and inducible

promoters from other eukaryotic expression systems. For expression of the proteins such promoters are inserted in a plasmid in operative linkage with a control region such as the lac operon.

Preferred promoter regions are those that are inducible and functional in *E. coli*. Examples of suitable inducible promoters and promoter regions include, but are not limited to: the *E. coli* lac operator responsive to isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG; *see* Nakamura et al., *Cell 18*:1109-1117, 1979); the metallothionein promoter metal-regulatory-elements responsive to heavy-metal (*e.g.*, zinc) induction (*see, e.g.*, U.S. Patent No. 4,870,009 to Evans et al.); the phage T7lac promoter responsive to IPTG (*see, e.g.*, U.S. Patent No. 4,952,496; and Studier et al., *Meth. Enzymol. 185*:60-89, 1990) and the TAC promoter.

The plasmids may optionally include a selectable marker gene or genes that are functional in the host. A selectable marker gene includes any gene that confers a phenotype on bacteria that allows transformed bacterial cells to be identified and selectively grown from among a vast majority of untransformed cells. Suitable selectable marker genes for bacterial hosts, for example, include the ampicillin resistance gene (Amp^r), tetracycline resistance gene (Tc^r) and the kanamycin resistance gene (Kan^r). The kanamycin resistance gene is presently preferred.

The plasmids may also include DNA encoding a signal for secretion of the operably linked protein. Secretion signals suitable for use are widely available and are well known in the art. Prokaryotic and eukaryotic secretion signals functional in *E. coli* may be employed. The presently preferred secretion signals include, but are not limited to, those encoded by the following *E. coli* genes: ompA, ompT, ompF, ompC, beta-lactamase, and alkaline phosphatase, and the like (von Heijne, *J. Mol. Biol. 184*:99-105, 1985). In addition, the bacterial pelB gene secretion signal (Lei et al., *J. Bacteriol. 169*:4379, 1987), the phoA secretion signal, and the cek2 functional in insect cell may be employed. The most preferred secretion signal is the *E. coli* ompA secretion signal. Other prokaryotic and eukaryotic secretion signals known to those of skill in the art may also be employed (*see, e.g.*, von Heijne, *J. Mol. Biol. 184*:99-105, 1985). Using the methods described herein, one of skill in the art can substitute

secretion signals that are functional in either yeast, insect or mammalian cells to secrete proteins from those cells.

Preferred plasmids for transformation of *E. coli* cells include the pET expression vectors (*e.g.*, pET-11a, pET-12a-c, pET-15b; *see* U.S. Patent No. 4,952,496; available from Novagen, Madison, WI.). Other preferred plasmids include the pKK plasmids, particularly pKK 223-3, which contains the tac promoter (Brosius et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. 81*:6929, 1984; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*; U.S. Patent Nos. 5,122,463, 5,173,403, 5,187,153, 5,204,254, 5,212,058, 5,212,286, 5,215,907, 5,220,013, 5,223,483, and 5,229,279). Plasmid pKK has been modified by replacement of the ampicillin resistance gene with a kanamycin resistance gene. (Available from Pharmacia; obtained from pUC4K, *see, e.g.*, Vieira et al. (*Gene 19*:259-268, 1982; and U.S. Patent No. 4,719,179.) Baculovirus vectors, such as pBlueBac (also called pJVETL and derivatives thereof), particularly pBlueBac III (*see, e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,278,050, 5,244,805, 5,243,041, 5,242,687, 5,266,317, 4,745,051, and 5,169,784; available from Invitrogen, San Diego) may also be used for expression of the polypeptides in insect cells. Other plasmids include the pIN-IIIompA plasmids (*see* U.S. Patent No. 4,575,013; *see also* Duffaud et al., *Meth. Enz. 153*:492-507, 1987), such as pIN-IIIompA2.

Preferably, the DNA molecule is replicated in bacterial cells, preferably in *E. coli*. The preferred DNA molecule also includes a bacterial origin of replication, to ensure the maintenance of the DNA molecule from generation to generation of the bacteria. In this way, large quantities of the DNA molecule can be produced by replication in bacteria. Preferred bacterial origins of replication include, but are not limited to, the f1-ori and col E1 origins of replication. Preferred hosts contain chromosomal copies of DNA encoding T7 RNA polymerase operably linked to an inducible promoter, such as the lacUV promoter (*see* U.S. Patent No. 4,952,496). Such hosts include, but are not limited to, lysogens *E. coli* strains HMS174(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysS, HMS174(DE3) and BL21(DE3). Strain BL21(DE3) is preferred. The pLys strains provide low levels of T7 lysozyme, a natural inhibitor of T7 RNA polymerase.

The DNA molecules provided may also contain a gene coding for a repressor protein. The repressor protein is capable of repressing the transcription of a promoter that contains sequences of nucleotides to which the repressor protein binds. The promoter can be derepressed by altering the physiological conditions of the cell. For example, the alteration can be accomplished by adding to the growth medium a molecule that inhibits the ability to interact with the operator or with regulatory proteins or other regions of the DNA or by altering the temperature of the growth media. Preferred repressor proteins include, but are not limited to the *E. coli* lacI repressor responsive to IPTG induction, the temperature sensitive λ cI857 repressor, and the like. The *E. coli* lacI repressor is preferred.

In general, recombinant constructs of the subject invention will also contain elements necessary for transcription and translation. In particular, such elements are preferred where the recombinant expression construct containing nucleic acid sequences encoding binding domain-immunoglobulin fusion proteins is intended for expression in a host cell or organism. In certain embodiments of the present invention, cell type preferred or cell type specific expression of a cell binding domain-immunoglobulin fusion encoding gene may be achieved by placing the gene under regulation of a promoter. The choice of the promoter will depend upon the cell type to be transformed and the degree or type of control desired. Promoters can be constitutive or active and may further be cell type specific, tissue specific, individual cell specific, event specific, temporally specific or inducible. Cell-type specific promoters and event type specific promoters are preferred. Examples of constitutive or nonspecific promoters include the SV40 early promoter (U.S. Patent No. 5,118,627), the SV40 late promoter (U.S. Patent No. 5,118,627), CMV early gene promoter (U.S. Patent No. 5,168,062), and adenovirus promoter. In addition to viral promoters, cellular promoters are also amenable within the context of this invention. In particular, cellular promoters for the so-called housekeeping genes are useful. Viral promoters are preferred, because generally they are stronger promoters than cellular promoters. Promoter regions have been identified in the genes of many eukaryotes including higher eukaryotes, such that

suitable promoters for use in a particular host can be readily selected by those skilled in the art.

Inducible promoters may also be used. These promoters include MMTV LTR (PCT WO 91/13160), inducible by dexamethasone; metallothionein promoter, inducible by heavy metals; and promoters with cAMP response elements, inducible by cAMP. By using an inducible promoter, the nucleic acid sequence encoding a binding domain-immunoglobulin fusion protein may be delivered to a cell by the subject invention expression construct and will remain quiescent until the addition of the inducer. This allows further control on the timing of production of the gene product.

Event-type specific promoters are active or up-regulated only upon the occurrence of an event, such as tumorigenicity or viral infection. The HIV LTR is a well known example of an event-specific promoter. The promoter is inactive unless the *tat* gene product is present, which occurs upon viral infection. Some event-type promoters are also tissue-specific.

Additionally, promoters that are coordinately regulated with a particular cellular gene may be used. For example, promoters of genes that are coordinately expressed may be used when expression of a particular binding domain-immunoglobulin fusion protein-encoding gene is desired in concert with expression of one or more additional endogenous or exogenously introduced genes. This type of promoter is especially useful when one knows the pattern of gene expression relevant to induction of an immune response in a particular tissue of the immune system, so that specific immunocompetent cells within that tissue may be activated or otherwise recruited to participate in the immune response.

In addition to the promoter, repressor sequences, negative regulators, or tissue-specific silencers may be inserted to reduce non-specific expression of binding domain-immunoglobulin fusion protein encoding genes in certain situations, such as, for example, a host that is transiently immunocompromised as part of a therapeutic strategy. Multiple repressor elements may be inserted in the promoter region. Repression of transcription is independent on the orientation of repressor elements or distance from the promoter. One type of repressor sequence is an insulator sequence.

Such sequences inhibit transcription (Dunaway et al., *Mol Cell Biol 17*: 182-9, 1997; Gdula et al., *Proc Natl Acad Sci USA 93*:9378-83, 1996, Chan et al., *J Virol 70*: 5312-28, 1996; Scott and Geyer, *EMBO J 14*:6258-67, 1995; Kalos and Fournier, *Mol Cell Biol 15*:198-207, 1995; Chung et al., *Cell 74*: 505-14, 1993) and will silence background transcription.

Repressor elements have also been identified in the promoter regions of the genes for type II (cartilage) collagen, choline acetyltransferase, albumin (Hu et al., *J. Cell Growth Differ. 3*(9):577-588, 1992), phosphoglycerate kinase (PGK-2) (Misuno et al., *Gene 119*(2):293-297, 1992), and in the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase gene. (Lemaigre et al., *Mol. Cell Biol. 11*(2):1099-1106.) Furthermore, the negative regulatory element Tse-1 has been identified in a number of liver specific genes, and has been shown to block cAMP response element- (CRE) mediated induction of gene activation in hepatocytes. (Boshart et al., *Cell* 61(5):905-916, 1990).

In preferred embodiments, elements that increase the expression of the desired product are incorporated into the construct. Such elements include internal ribosome binding sites (IRES; Wang and Siddiqui, *Curr. Top. Microbiol. Immunol 203*:99, 1995; Ehrenfeld and Semler, *Curr. Top. Microbiol. Immunol. 203*:65, 1995; Rees et al., *Biotechniques 20*:102, 1996; Sugimoto et al., *Biotechnology 12*:694, 1994). IRES increase translation efficiency. As well, other sequences may enhance expression. For some genes, sequences especially at the 5′ end inhibit transcription and/or translation. These sequences are usually palindromes that can form hairpin structures. Any such sequences in the nucleic acid to be delivered are generally deleted. Expression levels of the transcript or translated product are assayed to confirm or ascertain which sequences affect expression. Transcript levels may be assayed by any known method, including Northern blot hybridization, RNase probe protection and the like. Protein levels may be assayed by any known method, including ELISA, western blot, immunocytochemistry or other well known techniques.

Other elements may be incorporated into the binding domain-immunoglobulin fusion protein encoding constructs of the present invention. In preferred embodiments, the construct includes a transcription terminator sequence,

including a polyadenylation sequence, splice donor and acceptor sites, and an enhancer. Other elements useful for expression and maintenance of the construct in mammalian cells or other eukaryotic cells may also be incorporated (*e.g.*, origin of replication). Because the constructs are conveniently produced in bacterial cells, elements that are necessary for, or that enhance, propagation in bacteria are incorporated. Such elements include an origin of replication, a selectable marker and the like.

As provided herein, an additional level of controlling the expression of nucleic acids encoding binding domain-immunoglobulin fusion proteins delivered to cells using the constructs of the invention may be provided by simultaneously delivering two or more differentially regulated nucleic acid constructs. The use of such a multiple nucleic acid construct approach may permit coordinated regulation of an immune response such as, for example, spatiotemporal coordination that depends on the cell type and/or presence of another expressed encoded component. Those familiar with the art will appreciate that multiple levels of regulated gene expression may be achieved in a similar manner by selection of suitable regulatory sequences, including but not limited to promoters, enhancers and other well known gene regulatory elements.

The present invention also relates to vectors, and to constructs prepared from known vectors that include nucleic acids of the present invention, and in particular to "recombinant expression constructs" that include any nucleic acids encoding binding domain-immunoglobulin fusion proteins and polypeptides according to the invention as provided above; to host cells which are genetically engineered with vectors and/or constructs of the invention and to methods of administering expression constructs comprising nucleic acid sequences encoding such binding domain-immunoglobulin fusion polypeptides and fusion proteins of the invention, or fragments or variants thereof, by recombinant techniques. Binding domain-immunoglobulin fusion proteins can be expressed in virtually any host cell under the control of appropriate promoters, depending on the nature of the construct (*e.g.*, type of promoter, as described above), and on the nature of the desired host cell (*e.g.*, whether postmitotic terminally differentiated or actively dividing; *e.g.*, whether the expression construct occurs in host cell as an episome or is integrated into host cell genome). Appropriate cloning and

expression vectors for use with prokaryotic and eukaryotic hosts are described by Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, (1989); as noted above, in particularly preferred embodiments of the invention, recombinant expression is conducted in mammalian cells that have been transfected or transformed with the subject invention recombinant expression construct.

Typically, the constructs are derived from plasmid vectors. A preferred construct is a modified pNASS vector (Clontech, Palo Alto, CA), which has nucleic acid sequences encoding an ampicillin resistance gene, a polyadenylation signal and a T7 promoter site. Other suitable mammalian expression vectors are well known (*see, e.g.*, Ausubel et al., 1995; Sambrook et al., *supra*; *see also, e.g.,* catalogues from Invitrogen, San Diego, CA; Novagen, Madison, WI; Pharmacia, Piscataway, NJ; and others). Presently preferred constructs may be prepared that include a dihydrofolate reductase (DHFR) encoding sequence under suitable regulatory control, for promoting enhanced production levels of the binding domain-immunoglobulin fusion protei, which levels result from gene amplification following application of an appropriate selection agent (*e.g.*, methetrexate).

Generally, recombinant expression vectors will include origins of replication and selectable markers permitting transformation of the host cell, and a promoter derived from a highly-expressed gene to direct transcription of a downstream structural sequence, as described above. The heterologous structural sequence is assembled in appropriate phase with translation initiation and termination sequences. Thus, for example, the binding domain-immunoglobulin fusion protein encoding nucleic acids as provided herein may be included in any one of a variety of expression vector constructs as a recombinant expression construct for expressing a binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide in a host cell. In certain preferred embodiments the constructs are included in formulations that are administered in vivo. Such vectors and constructs include chromosomal, nonchromosomal and synthetic DNA sequences, *e.g.*, derivatives of SV40; bacterial plasmids; phage DNA; yeast plasmids; vectors derived from combinations of plasmids and phage DNA, viral DNA, such as vaccinia, adenovirus, fowl pox virus, and pseudorabies, or replication deficient

retroviruses as described below. However, any other vector may be used for preparation of a recombinant expression construct, and in preferred embodiments such a vector will be replicable and viable in the host.

The appropriate DNA sequence(s) may be inserted into the vector by a variety of procedures. In general, the DNA sequence is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) by procedures known in the art. Standard techniques for cloning, DNA isolation, amplification and purification, for enzymatic reactions involving DNA ligase, DNA polymerase, restriction endonucleases and the like, and various separation techniques are those known and commonly employed by those skilled in the art. A number of standard techniques are described, for example, in Ausubel et al. (1993 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA); Sambrook et al. (1989 *Molecular Cloning*, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis et al. (1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Glover (Ed.) (1985 *DNA Cloning Vol. I and II*, IRL Press, Oxford, UK); Hames and Higgins (Eds.), (1985 *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, UK); and elsewhere.

The DNA sequence in the expression vector is operatively linked to at least one appropriate expression control sequences (*e.g.*, a constitutive promoter or a regulated promoter) to direct mRNA synthesis. Representative examples of such expression control sequences include promoters of eukaryotic cells or their viruses, as described above. Promoter regions can be selected from any desired gene using CAT (chloramphenicol transferase) vectors or other vectors with selectable markers. Eukaryotic promoters include CMV immediate early, HSV thymidine kinase, early and late SV40, LTRs from retrovirus, and mouse metallothionein-I. Selection of the appropriate vector and promoter is well within the level of ordinary skill in the art, and preparation of certain particularly preferred recombinant expression constructs comprising at least one promoter or regulated promoter operably linked to a nucleic acid encoding an binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide is described herein.

Transcription of the DNA encoding the polypeptides of the present invention by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are *cis*-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp that act on a promoter to increase its transcription. Examples including the SV40 enhancer on the late side of the replication origin bp 100 to 270, a cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers.

As provided herein, in certain embodiments the vector may be a viral vector such as a retroviral vector. (Miller et al., 1989 *BioTechniques* 7:980; Coffin and Varmus, 1996 Retroviruses, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, NY.) For example, retroviruses from which the retroviral plasmid vectors may be derived include, but are not limited to, Moloney Murine Leukemia Virus, spleen necrosis virus, retroviruses such as Rous Sarcoma Virus, Harvey Sarcoma virus, avian leukosis virus, gibbon ape leukemia virus, human immunodeficiency virus, adenovirus, Myeloproliferative Sarcoma Virus, and mammary tumor virus.

Retroviruses are RNA viruses which can replicate and integrate into the genome of a host cell via a DNA intermediate. This DNA intermediate, or provirus, may be stably integrated into the host cell DNA. According to certain embodiments of the present invention, a vaccine may comprise a retrovirus into which a foreign gene that encodes a foreign protein is incorporated in place of normal retroviral RNA. When retroviral RNA enters a host cell coincident with infection, the foreign gene is also introduced into the cell, and may then be integrated into host cell DNA as if it were part of the retroviral genome. Expression of this foreign gene within the host results in expression of the foreign protein.

Most retroviral vector systems which have been developed for gene therapy are based on murine retroviruses. Such retroviruses exist in two forms, as free viral particles referred to as virions, or as proviruses integrated into host cell DNA. The virion form of the virus contains the structural and enzymatic proteins of the retrovirus (including the enzyme reverse transcriptase), two RNA copies of the viral genome, and portions of the source cell plasma membrane containing viral envelope glycoprotein.

The retroviral genome is organized into four main regions: the Long Terminal Repeat (LTR), which contains *cis*-acting elements necessary for the initiation and termination of transcription and is situated both 5' and 3' of the coding genes, and the three coding genes *gag, pol,* and *env*. These three genes *gag, pol,* and *env* encode, respectively, internal viral structures, enzymatic proteins (such as integrase), and the envelope glycoprotein (designated gp70 and p15e) which confers infectivity and host range specificity of the virus, as well as the "R" peptide of undetermined function.

Separate packaging cell lines and vector producing cell lines have been developed because of safety concerns regarding the uses of retroviruses, including their use in vaccines as provided by the present invention. Briefly, this methodology employs the use of two components, a retroviral vector and a packaging cell line (PCL). The retroviral vector contains long terminal repeats (LTRs), the foreign DNA to be transferred and a packaging sequence (y). This retroviral vector will not reproduce by itself because the genes which encode structural and envelope proteins are not included within the vector genome. The PCL contains genes encoding the *gag, pol,* and *env* proteins, but does not contain the packaging signal "y". Thus, a PCL can only form empty virion particles by itself. Within this general method, the retroviral vector is introduced into the PCL, thereby creating a vector-producing cell line (VCL). This VCL manufactures virion particles containing only the retroviral vector's (foreign) genome, and therefore has previously been considered to be a safe retrovirus vector for therapeutic use.

"Retroviral vector construct" refers to an assembly which is, within preferred embodiments of the invention, capable of directing the expression of a sequence(s) or gene(s) of interest, such as binding domain-immunoglobulin fusion encoding nucleic acid sequences. Briefly, the retroviral vector construct must include a 5' LTR, a tRNA binding site, a packaging signal, an origin of second strand DNA synthesis and a 3' LTR. A wide variety of heterologous sequences may be included within the vector construct, including for example, sequences which encode a protein (*e.g.,* cytotoxic protein, disease-associated antigen, immune accessory molecule, or

replacement gene), or which are useful as a molecule itself (*e.g.*, as a ribozyme or antisense sequence).

Retroviral vector constructs of the present invention may be readily constructed from a wide variety of retroviruses, including for example, B, C, and D type retroviruses as well as spumaviruses and lentiviruses (*see, e.g.*, RNA Tumor Viruses, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985). Such retroviruses may be readily obtained from depositories or collections such as the American Type Culture Collection ("ATCC"; Rockville, Maryland), or isolated from known sources using commonly available techniques. Any of the above retroviruses may be readily utilized in order to assemble or construct retroviral vector constructs, packaging cells, or producer cells of the present invention given the disclosure provided herein, and standard recombinant techniques (*e.g.*, Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Kunkle, *PNAS 82*:488, 1985).

Suitable promoters for use in viral vectors generally may include, but are not limited to, the retroviral LTR; the SV40 promoter; and the human cytomegalovirus (CMV) promoter described in Miller, et al., *Biotechniques* 7:980-990 (1989), or any other promoter (*e.g.*, cellular promoters such as eukaryotic cellular promoters including, but not limited to, the histone, pol III, and β-actin promoters). Other viral promoters which may be employed include, but are not limited to, adenovirus promoters, thymidine kinase (TK) promoters, and B19 parvovirus promoters. The selection of a suitable promoter will be apparent to those skilled in the art from the teachings contained herein, and may be from among either regulated promoters or promoters as described above.

As described above, the retroviral plasmid vector is employed to transduce packaging cell lines to form producer cell lines. Examples of packaging cells which may be transfected include, but are not limited to, the PE501, PA317, ψ-2, ψ-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψCRE, ψCRIP, GP+E-86, GP+envAm12, and DAN cell lines as described in Miller, *Human Gene Therapy*, *1*:5-14 (1990). The vector may transduce the packaging cells through any means known in the art. Such

means include, but are not limited to, electroporation, the use of liposomes, and $CaPO_4$ precipitation. In one alternative, the retroviral plasmid vector may be encapsulated into a liposome, or coupled to a lipid, and then administered to a host.

The producer cell line generates infectious retroviral vector particles which include the nucleic acid sequence(s) encoding the binding domain-immunoglobulin fusion polypeptides or fusion proteins. Such retroviral vector particles then may be employed, to transduce eukaryotic cells, either *in vitro* or *in vivo*. The transduced eukaryotic cells will express the nucleic acid sequence(s) encoding the binding domain-immunoglobulin fusion polypeptide or fusion protein. Eukaryotic cells which may be transduced include, but are not limited to, embryonic stem cells, as well as hematopoietic stem cells, hepatocytes, fibroblasts, circulating peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells including myelomonocytic cells, lymphocytes, myoblasts, tissue macrophages, dendritic cells, Kupffer cells, lymphoid and reticuloendothelia cells of the lymph nodes and spleen, keratinocytes, endothelial cells, and bronchial epithelial cells.

As another example of an embodiment of the invention in which a viral vector is used to prepare the recombinant binding domain-immunoglobulin fusion expression construct, in one preferred embodiment, host cells transduced by a recombinant viral construct directing the expression of binding domain-immunoglobulin fusion polypeptides or fusion proteins may produce viral particles containing expressed binding domain-immunoglobulin fusion polypeptides or fusion proteins that are derived from portions of a host cell membrane incorporated by the viral particles during viral budding.

In another aspect, the present invention relates to host cells containing the above described recombinant binding domain-immunoglobulin fusion expression constructs. Host cells are genetically engineered (transduced, transformed or transfected) with the vectors and/or expression constructs of this invention which may be, for example, a cloning vector, a shuttle vector or an expression construct. The vector or construct may be, for example, in the form of a plasmid, a viral particle, a phage, etc. The engineered host cells can be cultured in conventional nutrient media

modified as appropriate for activating promoters, selecting transformants or amplifying particular genes such as genes encoding binding domain-immunoglobulin fusion polypeptides or binding domain-immunoglobulin fusion fusion proteins. The culture conditions for particular host cells selected for expression, such as temperature, pH and the like, will be readily apparent to the ordinarily skilled artisan.

The host cell can be a higher eukaryotic cell, such as a mammalian cell, or a lower eukaryotic cell, such as a yeast cell, or the host cell can be a prokaryotic cell, such as a bacterial cell. Representative examples of appropriate host cells according to the present invention include, but need not be limited to, bacterial cells, such as *E. coli, Streptomyces, Salmonella typhimurium*; fungal cells, such as yeast; insect cells, such as *Drosophila S2* and *Spodoptera Sf9*; animal cells, such as CHO, COS or 293 cells; adenoviruses; plant cells, or any suitable cell already adapted to *in vitro* propagation or so established *de novo*. The selection of an appropriate host is deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

Various mammalian cell culture systems can also be employed to express recombinant protein. Examples of mammalian expression systems include the COS-7 lines of monkey kidney fibroblasts, described by Gluzman, *Cell 23*:175 (1981), and other cell lines capable of expressing a compatible vector, for example, the C127, 3T3, CHO, HeLa and BHK cell lines. Mammalian expression vectors will comprise an origin of replication, a suitable promoter and enhancer, and also any necessary ribosome binding sites, polyadenylation site, splice donor and acceptor sites, transcriptional termination sequences, and 5′ flanking nontranscribed sequences, for example as described herein regarding the preparation of binding domain-immunoglobulin fusion expression constructs. DNA sequences derived from the SV40 splice, and polyadenylation sites may be used to provide the required nontranscribed genetic elements. Introduction of the construct into the host cell can be effected by a variety of methods with which those skilled in the art will be familiar, including but not limited to, for example, calcium phosphate transfection, DEAE-Dextran mediated transfection, or electroporation (Davis et al., 1986 *Basic Methods in Molecular Biology*).

The present invention binding domain-immunoglobulin fusion proteins may be formulated into pharmaceutical compositions for administration according to well known methodologies. Pharmaceutical compositions generally comprise one or more recombinant expression constructs, and/or expression products of such constructs, in combination with a pharmaceutically acceptable carrier, excipient or diluent. Such carriers will be nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed. For nucleic acid-based formulations, or for formulations comprising expression products of the subject invention recombinant constructs, about 0.01 μg/kg to about 100 mg/kg body weight will be adminstered, typically by the intradermal, subcutaneous, intramuscular or intravenous route, or by other routes. A preferred dosage is about 1 μg/kg to about 1 mg/kg, with about 5 μg/kg to about 200 μg/kg particularly preferred. It will be evident to those skilled in the art that the number and frequency of administration will be dependent upon the response of the host. "Pharmaceutically acceptable carriers" for therapeutic use are well known in the pharmaceutical art, and are described, for example, in Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). For example, sterile saline and phosphate-buffered saline at physiological pH may be used. Preservatives, stabilizers, dyes and even flavoring agents may be provided in the pharmaceutical composition. For example, sodium benzoate, sorbic acid and esters of *p*-hydroxybenzoic acid may be added as preservatives. Id. at 1449. In addition, antioxidants and suspending agents may be used. Id.

"Pharmaceutically acceptable salt" refers to salts of the compounds of the present invention derived from the combination of such compounds and an organic or inorganic acid (acid addition salts) or an organic or inorganic base (base addition salts). The compounds of the present invention may be used in either the free base or salt forms, with both forms being considered as being within the scope of the present invention.

The pharmaceutical compositions that contain one or more binding domain-immunoglobulin fusion protein encoding constructs (or their expressed products) may be in any form which allows for the composition to be administered to a

patient. For example, the composition may be in the form of a solid, liquid or gas (aerosol). Typical routes of administration include, without limitation, oral, topical, parenteral (*e.g.*, sublingually or buccally), sublingual, rectal, vaginal, and intranasal. The term parenteral as used herein includes subcutaneous injections, intravenous, intramuscular, intrasternal, intracavernous, intrathecal, intrameatal, intraurethral injection or infusion techniques. The pharmaceutical composition is formulated so as to allow the active ingredients contained therein to be bioavailable upon administration of the composition to a patient. Compositions that will be administered to a patient take the form of one or more dosage units, where for example, a tablet may be a single dosage unit, and a container of one or more compounds of the invention in aerosol form may hold a plurality of dosage units.

For oral administration, an excipient and/or binder may be present. Examples are sucrose, kaolin, glycerin, starch dextrins, sodium alginate, carboxymethylcellulose and ethyl cellulose. Coloring and/or flavoring agents may be present. A coating shell may be employed.

The composition may be in the form of a liquid, *e.g.*, an elixir, syrup, solution, emulsion or suspension. The liquid may be for oral administration or for delivery by injection, as two examples. When intended for oral administration, preferred compositions contain, in addition to one or more binding domain-immunoglobulin fusion construct or expressed product, one or more of a sweetening agent, preservatives, dye/colorant and flavor enhancer. In a composition intended to be administered by injection, one or more of a surfactant, preservative, wetting agent, dispersing agent, suspending agent, buffer, stabilizer and isotonic agent may be included.

A liquid pharmaceutical composition as used herein, whether in the form of a solution, suspension or other like form, may include one or more of the following adjuvants: sterile diluents such as water for injection, saline solution, preferably physiological saline, Ringer's solution, isotonic sodium chloride, fixed oils such as synthetic mono or digylcerides which may serve as the solvent or suspending medium, polyethylene glycols, glycerin, propylene glycol or other solvents; antibacterial agents

such as benzyl alcohol or methyl paraben; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic. Physiological saline is a preferred adjuvant. An injectable pharmaceutical composition is preferably sterile.

It may also be desirable to include other components in the preparation, such as delivery vehicles including but not limited to aluminum salts, water-in-oil emulsions, biodegradable oil vehicles, oil-in-water emulsions, biodegradable microcapsules, and liposomes. Examples of immunostimulatory substances (adjuvants) for use in such vehicles include N-acetylmuramyl-L-alanine-D-isoglutamine (MDP), lipopoly-saccharides (LPS), glucan, IL-12, GM-CSF, gamma interferon and IL-15.

While any suitable carrier known to those of ordinary skill in the art may be employed in the pharmaceutical compositions of this invention, the type of carrier will vary depending on the mode of administration and whether a sustained release is desired. For parenteral administration, such as subcutaneous injection, the carrier preferably comprises water, saline, alcohol, a fat, a wax or a buffer. For oral administration, any of the above carriers or a solid carrier, such as mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, talcum, cellulose, glucose, sucrose, and magnesium carbonate, may be employed. Biodegradable microspheres (*e.g.*, polylactic galactide) may also be employed as carriers for the pharmaceutical compositions of this invention. Suitable biodegradable microspheres are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 4,897,268 and 5,075,109. In this regard, it is preferable that the microsphere be larger than approximately 25 microns.

Pharmaceutical compositions may also contain diluents such as buffers, antioxidants such as ascorbic acid, low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides, proteins, amino acids, carbohydrates including glucose, sucrose or dextrins, chelating agents such as EDTA, glutathione and other stabilizers and excipients. Neutral buffered saline or saline mixed with nonspecific serum albumin are

exemplary appropriate diluents. Preferably, product is formulated as a lyophilizate using appropriate excipient solutions (*e.g.*, sucrose) as diluents.

As described above, the subject invention includes compositions capable of delivering nucleic acid molecules encoding binding domain-immunoglobulin fusion proteins. Such compositions include recombinant viral vectors (*e.g.,* retroviruses (*see* WO 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698, and WO 94/03622), adenovirus (*see* Berkner, *Biotechniques 6*:616-627, 1988; Li et al., *Hum. Gene Ther. 4*:403-409, 1993; Vincent et al., *Nat. Genet. 5*:130-134, 1993; and Kolls et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91*:215-219, 1994), pox virus (*see* U.S. Patent No. 4,769,330; U.S. Patent No. 5,017,487; and WO 89/01973)), recombinant expression construct nucleic acid molecules complexed to a polycationic molecule (*see* WO 93/03709), and nucleic acids associated with liposomes (*see* Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84*:7851, 1987). In certain embodiments, the DNA may be linked to killed or inactivated adenovirus (*see* Curiel et al., *Hum. Gene Ther. 3*:147-154, 1992; Cotton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89*:6094, 1992). Other suitable compositions include DNA-ligand (*see* Wu et al., *J. Biol. Chem. 264*:16985-16987, 1989) and lipid-DNA combinations (*see* Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84*:7413-7417, 1989).

In addition to direct *in vivo* procedures, *ex vivo* procedures may be used in which cells are removed from a host, modified, and placed into the same or another host animal. It will be evident that one can utilize any of the compositions noted above for introduction of binding domain-immunoglobulin fusion proteins or of binding domain-immunoglobulin fusion protein encoding nucleic acid molecules into tissue cells in an *ex vivo* context. Protocols for viral, physical and chemical methods of uptake are well known in the art.

Accordingly, the present invention is useful for treating a patient having a B-cell disorder or a malignant condition, or for treating a cell culture derived from such a patient. As used herein, the term "patient" refers to any warm-blooded animal, preferably a human. A patient may be afflicted with cancer, such as B-cell lymphoma, or may be normal (*i.e.,* free of detectable disease and infection). A "cell culture" is any preparation amenable to *ex vivo* treatment, for example a preparation containing

immunocompetent cells or isolated cells of the immune system (including, but not limited to, T cells, macrophages, monocytes, B cells and dendritic cells). Such cells may be isolated by any of a variety of techniques well known to those of ordinary skill in the art (*e.g.*, Ficoll-hypaque density centrifugation). The cells may (but need not) have been isolated from a patient afflicted with a B-cell disorder or a malignancy, and may be reintroduced into a patient after treatment.

A liquid composition intended for either parenteral or oral administration should contain an amount of binding domain-immunoglobulin fusion protein encoding construct or expressed product such that a suitable dosage will be obtained. Typically, this amount is at least 0.01 wt% of a binding domain-immunoglobulin fusion construct or expressed product in the composition. When intended for oral administration, this amount may be varied to be between 0.1 and about 70% of the weight of the composition. Preferred oral compositions contain between about 4% and about 50% of binding domain-immunoglobulin fusion construct or expressed product(s). Preferred compositions and preparations are prepared so that a parenteral dosage unit contains between 0.01 to 1% by weight of active compound.

The pharmaceutical composition may be intended for topical administration, in which case the carrier may suitably comprise a solution, emulsion, ointment or gel base. The base, for example, may comprise one or more of the following: petrolatum, lanolin, polyethylene glycols, beeswax, mineral oil, diluents such as water and alcohol, and emulsifiers and stabilizers. Thickening agents may be present in a pharmaceutical composition for topical administration. If intended for transdermal administration, the composition may include a transdermal patch or iontophoresis device. Topical formulations may contain a concentration of the binding domain-immunoglobulin fusion construct or expressed product of from about 0.1 to about 10% w/v (weight per unit volume).

The composition may be intended for rectal administration, in the form, *e.g.*, of a suppository which will melt in the rectum and release the drug. The composition for rectal administration may contain an oleaginous base as a suitable

nonirritating excipient. Such bases include, without limitation, lanolin, cocoa butter and polyethylene glycol.

In the methods of the invention, the binding domain-immunoglobulin fusion encoding constructs or expressed product(s) may be administered through use of insert(s), bead(s), timed-release formulation(s), patch(es) or fast-release formulation(s).

The following Examples are offered by way of illustration and not by way of limitation.

EXAMPLES

EXAMPLE 1

CLONING OF THE 2H7 VARIABLE REGIONS AND CONSTRUCTION AND SEQUENCING OF 2H7SCFV-IG

This Example illustrates the cloning of cDNA molecules that encode the heavy chain and light chain variable regions of the monoclonal antibody 2H7. This Example also demonstrates the construction, sequencing, and expression of 2H7scFv-Ig.

Hybridoma cells expressing 2H7 monoclonal antibody that specifically bound to CD20 were provided by Ed Clark at the University of Washington, Seattle, WA. Prior to harvesting, hybridoma cells were kept in log phase growth for several days in RPMI 1640 media (Life Technologies, Gaithersburg, MD) supplemented with glutamine, pyruvate, DMEM non-essential amino acids, and penicillin-streptomycin. Cells were pelleted by centrifugation from the culture medium, and 2 x 10^7 cells were used to prepare RNA. RNA was isolated from the 2H7-producing hybridoma cells using the Pharmingen (San Diego, CA) total RNA isolation kit (Catalog # 45520K) according to the manufacturer's instructions accompanying the kit. One microgram (1 □g) of total RNA was used as template to prepare cDNA by reverse transcription. The RNA and 300 ng random primers were combined and denatured at 72 °C for 10 minutes

prior to addition of enzyme. Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies) was added to the RNA plus primer mixture in a total volume of 25 □l in the presence of 5X second strand buffer and 0.1 M DTT provided with the enzyme. The reverse transcription reaction was allowed to proceed at 42°C for one hour.

The 2H7 cDNA generated in the randomly primed reverse transcriptase reaction and V region specific primers were used to amplify by PCR the variable regions for the light and heavy chain of the 2H7 antibody. The V region specific primers were designed using the published sequence (Genbank accession numbers M17954 for V_L and M17953 for V_H) as a guide. The two variable chains were designed with compatible end sequences so that an scFv could be assembled by ligation of the two V regions after amplification and restriction enzyme digestion.

A $(gly_4ser)_3$ peptide linker to be inserted between the two V regions was incorporated by adding the extra nucleotides to the antisense primer for the V_L of 2H7. A Sac I restriction site was also introduced at the junction between the two V regions. The sense primer used to amplify the 2H7 V_L, that included a HindIII restriction site and the light chain leader peptide was 5'-gtc *aag ctt* gcc gcc atg gat ttt caa gtg cag att ttt cag c-3' (SEQ ID NO:__). The antisense primer was 5'-gtc gtc *gag ctc* cca cct cct cca gat cca cca ccg ccc gag cca ccg cca cct ttc agc tcc agc ttg gtc cc-3' (SEQ ID NO:__). The reading frame of the V region is indicated as a bold, underlined codon. The Hind III and SacI sites are indicated by underlined italicized sequences.

The V_H domain was amplified without a leader peptide, but included a 5' SacI restriction site for fusion to the V_L and a BclI restriction site at the 3' end for fusion to various tails, including the human IgG1 Fc domain and the truncated forms of CD40 ligand, CD154. The sense primer was 5'-gct gct *gag ctc* tca ggc tta tct aca gca agt ctg g-3' (SEQ ID NO:__). The SacI site is indicated in italicized and underlined font, and the reading frame of the codon for the first amino acid of the V_H domain is indicated in bold, underlined type. The antisense primer was 5'-gtt gtc *tga tca* gag acg gtg acc gtg gtc cc-3' (SEQ ID NO:__). The BclI site is indicated in italicized, underlined type, and the last serine of the V_H domain sequence is indicated in bold, underlined type.

The scFv-Ig was assembled by inserting the 2H7 scFv HindIII-BclI fragment into pUC19 containing the human IgG1 hinge, CH2, and CH3 regions, which was digested with restriction enzymes, HindIII and BclI. After ligation, the ligation products were transformed into DH5α bacteria. Positive clones were screened for the properly inserted fragments using the SacI site at the V_L-V_H junction of 2H7 as a diagnostic site. The 2H7scFv-Ig cDNA was subjected to cycle sequencing on a PE 9700 thermocycler using a 25-cycle program by denaturing at 96 °C for 10 seconds, annealing at 50 °C for 30 seconds, and extending at 72°C for 4 minutes. The sequencing primers were pUC forward and reverse primers and an internal primer that annealed to the CH2 domain human in the IgG constant region portion. Sequencing reactions were performed using the Big Dye Terminator Ready Sequencing Mix (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. Samples were subsequently purified using Centrisep columns (Catalog # CS-901, Princeton Separations, Adelphia, N.J.), the eluates dried in a Savant vacuum dryer, denatured in Template Suppression Reagent (PE-ABI), and analyzed on an ABI 310 Genetic Analyzer (PE-Applied Biosystems). The sequence was edited, translated, and analyzed using Vector Nti version 6.0 (Informax, North Bethesda, MD) . Figure 1 shows the cDNA and predicted amino acid sequence of the 2H7scFv-Ig construct.

EXAMPLE 2

EXPRESSION OF 2H7 SCFV-IG IN STABLE CHO CELL LINES

This Example illustrates expression of 2H7scFv-Ig in a eukaryotic cell line and characterization of the expressed 2H7scFv-Ig by SDS-PAGE and by functional assays, including ADCC and complement fixation.

The 2H7scFv-Ig HindIII-XbaI (~1.6 kb) fragment with correct sequence was inserted into the mammalian expression vector pD18, and DNA from positive clones was amplified using QIAGEN plasmid preparation kits (QIAGEN, Valencia, CA). The recombinant plasmid DNA (100 □g) was then linearized in a nonessential region by digestion with AscI, purified by phenol extraction, and resuspended in tissue

culture media, Excell 302 (Catalog # 14312-79P, JRH Biosciences, Lenexa, KS). Cells for transfection, CHO DG44 cells, were kept in logarithmic growth, and 10^7 cells harvested for each transfection reaction. Linearized DNA was added to the CHO cells in a total volume of 0.8 ml for electroporation.

Stable production of the 2H7 scFv-Ig fusion protein (SEQ. ID NO:10) was achieved by electroporation of a selectable, amplifiable plasmid, pD18, containing the 2H7 scFv-Ig cDNA under the control of the CMV promoter, into Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. The 2H7 expression cassette was subcloned downstream of the CMV promoter into the vector multiple cloning site as a ~1.6 kb HindIII-XbaI fragment. The pD18 vector is a modified version of pcDNA3 encoding the DHFR selectable marker with an attenuated promoter to increase selection pressure for the plasmid. Plasmid DNA was prepared using Qiagen maxiprep kits, and purified plasmid was linearized at a unique AscI site prior to phenol extraction and ethanol precipitation. Salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was added as carrier DNA, and 100 □g each of plasmid and carrier DNA was used to transfect 10^7 CHO DG44 cells by electroporation. Cells were grown to logarithmic phase in Excell 302 media (JRH Biosciences) containing glutamine (4mM), pyruvate, recombinant insulin, penicillin-streptomycin, and 2X DMEM nonessential amino acids (all from Life Technologies, Gaithersburg, Maryland), hereafter referred to as "Excell 302 complete" media. Media for untransfected cells also contained HT (diluted from a 100X solution of hypoxanthine and thymidine) (Life Technologies). Media for transfections under selection contained varying levels of methotrexate (Sigma-Aldrich) as selective agent, ranging from 50 nM to 5 □M. Electroporations were performed at 275 volts, 950 □F. Transfected cells were allowed to recover overnight in non-selective media prior to selective plating in 96 well flat bottom plates (Costar) at varying serial dilutions ranging from 125 cells/well to 2000 cells/well. Culture media for cell cloning was Excell 302 complete, containing 100 nM methotrexate. Once clonal outgrowth was sufficient, serial dilutions of culture supernatants from master wells were screened for binding to CD20-CHO transfected cells. The clones with the highest production of the fusion protein were expanded into T25 and then T75 flasks to provide adequate numbers of

cells for freezing and for scaling up production of the 2H7scFvIg. Production levels were further increased in cultures from three clones by progressive amplification in methotrexate containing culture media. At each successive passage of cells, the Excell 302 complete media contained an increased concentration of methotrexate, such that only the cells that amplified the DHFR plasmid could survive.

Supernatants were collected from CHO cells expressing the 2H7scFv-Ig, filtered through 0.2 □m PES express filters (Nalgene, Rochester, NY) and were passed over a Protein A-agarose (IPA 300 crosslinked agarose) column (Repligen, Needham, MA). The column was washed with PBS, and then bound protein was eluted using 0.1 M citrate buffer, pH 3.0. Fractions were collected and eluted protein was neutralized using 1M Tris, pH 8.0, prior to dialysis overnight in PBS. Concentration of the purified 2H7scFv-Ig (SEQ ID NO:__) was determined by absorption at 280 nm. An extinction coefficient of 1.77 was determined using the protein analysis tools in the Vector Nti Version 6.0 Software package (Informax, North Bethesda, MD). This program uses the amino acid composition data to calculate extinction coefficients.

Production levels of 2H7scFv-Ig by transfected, stable CHO cells were analyzed by flow cytometry. Purified 2H7scFv-Ig to CHO cells was allowed to bind to CHO cells that expressed CD20 (CD20 CHO) and analyzed by flow cytometry using a fluorescein-conjugated anti-human IgG second step reagent (Catalog Numbers H10101 and H10501, CalTag, Burlingame, CA). Figure 2 (top) shows a standard curve generated by titration of 2H7scFv-Ig binding to CD20 CHO. At each concentration of 2H7scFv-Ig, the mean brightness of the fluorescein signal in linear units is shown. Supernatants collected from T flasks containing stable CHO cell clones expressing 2H7scFv-Ig were then allowed to bind to CD20 CHO and the binding was analyzed by flow cytometry. The fluorescein signal generated by 2H7scFv-Ig contained in the supernatants was measured and the 2H7scFv-Ig concentration in the supernatants was calculated from the standard curve (Figure 2, bottom).

Purified 2H7scFv-Ig (SEQ ID NO:__) was analyzed by electrophoresis on SDS-Polyacrylamide gels. Samples of 2H7scFv-Ig, purified by independent Protein A Agarose column runs, were boiled in SDS sample buffer without reduction of

disulfide bonds and applied to SDS 10% Tris-BIS gels (Catalog # NP0301, Novex, Carlsbad, CA). Twenty micrograms of each purified batch was loaded on the gels. The proteins were visualized after electrophoresis by Coomassie Blue staining (Pierce Gel Code Blue Stain Reagent, Catalog #24590, Pierce, Rockford, IL), and destaining in distilled water. Molecular weight markers were included on the same gel (Kaleidoscope Prestained Standards, Catalog # 161-0324, Bio-Rad, Hercules, CA). The results are presented in Figure 3. The numbers above the lanes designate independent purification batches. The molecular weights in kilodaltons of the size markers are indicated on the left side of the figure. Further experiments with alternative sample preparation conditions indicated that reduction of disulfide bonds by boiling the protein in SDS sample buffer containing DTT or 2-mercaptoethanol caused the 2H7scFv-Ig to aggregate.

Any number of other immunological parameters may be monitored using routine assays that are well known in the art. These may include, for example, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) assays, secondary *in vitro* antibody responses, flow immunocytofluorimetric analysis of various peripheral blood or lymphoid mononuclear cell subpopulations using well established marker antigen systems, immunohistochemistry or other relevant assays. These and other assays may be found, for example, in Rose et al. (Eds.), *Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5th Ed.*, 1997 American Society of Microbiology, Washington, DC.

The ability of 2H7scFv-Ig to kill CD20 positive cells in the presence of complement was tested using B cell lines Ramos and Bjab. Rabbit complement (Pel-Freez, Rogers, AK) was used in the assay at a final dilution of 1/10. Purified 2H7scFv-Ig was incubated with B cells and complement for 45 minutes at 37 °C, followed by counting of live and dead cells by trypan blue exclusion. The results in Figure 4A show that in the presence of rabbit complement, 2H7scFv-Ig lysed B cells expressing CD20.

The ability of 2H7scFv-Ig to kill CD20 positive cells in the presence of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was tested by measuring the release of ^{51}Cr from labeled Bjab cells in a 4-hour assay using a 100:1 ratio of PBMC to Bjab cells. The results shown in Figure 4B indicated that 2H7scFv-Ig can mediate antibody

dependent cellular cytotoxicity (ADCC) because the release of ^{51}Cr was higher in the presence of both PBMC and 2H7scFv-Ig than in the presence of either PBMC or 2H7scFv-Ig alone.

EXAMPLE 3

EFFECT OF SIMULTANEOUS LIGATION OF CD20 AND CD40 ON GROWTH OF NORMAL B CELLS, AND ON CD95 EXPRESSION, AND INDUCTION OF APOPTOSIS

This example illustrates the effect of cross-linking of CD20 and CD40 expressed on the cell surface on cell proliferation.

Dense resting B cells were isolated from human tonsil by a Percoll step gradient and T cells were removed by E-rosetting. Proliferation of resting, dense tonsillar B cells was measured by uptake of ^{3}[H]-thymidine during the last 12 hours of a 4-day experiment. Proliferation was measured in quadruplicate cultures with means and standard deviations as shown. Murine anti-human CD20 mAb 1F5 (anti-CD20) was used alone or was cross-linked with anti-murine κ mAb 187.1 (anti-CD20XL). CD40 activation was accomplished using soluble human CD154 fused with murine CD8 (CD154) (Hollenbaugh et al., *EMBO J.* 11: 4212-21 (1992)), and CD40 cross-linking was accomplished using anti-murine CD8 mAb 53-6 (CD154XL). This procedure allowed simultaneous cross-linking of CD20 and CD40 on the cell surface. The results are presented in Figure 5.

The effect of CD20 and CD40 cross-linking on Ramos cells, a B lymphoma cell line, was examined. Ramos cells were analyzed for CD95 (Fas) expression and percent apoptosis eighteen hours after treatment (no goat anti-mouse IgG (GAM)) and/or cross-linking (+GAM) using murine mAbs that specifically bind CD20 (1F5) and CD40 (G28-5). Control cells were treated with a non-binding isotype control (64.1) specific for CD3.

Treated Ramos cells were harvested, incubated with FITC-anti-CD95, and analyzed by flow cytometry to determine the relative expression level of Fas on the

cell surface after CD20 or CD40 cross-linking. Data is plotted as mean fluorescence of cells after treatment with the stimuli indicated (Figure 6A).

Treated Ramos cells from the same experiment were harvested and binding of annexin V was measured to indicate the percentage apoptosis in the treated cultures. Apoptosis was measured by binding of Annexin V 18 hours after cross-linking of CD20 and CD40 using 1F5 and G28-5 followed by cross-linking with GAM. Binding of Annexin V was measured using a FITC-Annexin V kit (Catalog # PN-IM2376, Immunotech, Marseille, France,). Annexin V binding is known to be an early event in progression of cells into apoptosis. Apoptosis, or programmed cell death, is a process characterized by a cascade of catabolic reactions leading to cell death by suicide. In the early phase of apoptosis, before cells change morphology and hydrolyze DNA, the integrity of the cell membrane is maintained but cells lose the asymmetry of their membrane phospholipids, exposing negatively charged phospholipids, such as phosphatidylserine, at the cell surface. Annexin V, a calcium and phopholipid binding protein, binds preferentially and with high affinity to phosphatidylserine. Results demonstrating the effect of cross-linking both CD20 and CD40 on expression of the FAS receptor (CD95) are presented in Figure 6B. The effect of cross-linking of both CD20 and CD40 on Annexin V binding to cells is shown in Figure 6B.

EXAMPLE 4

CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF 2H7 SCFV-CD154 FUSION PROTEINS

To construct a molecule capable of binding to both CD20 and CD40, cDNA encoding the 2H7 scFv was fused with cDNA encoding CD154, the CD40 ligand. The 2H7 scFv cDNA encoded on the HindIII-BclI fragment was removed from the 2H7 scFvIg construct, and inserted into a pD18 vector along with a BamHI-XbaI cDNA fragment encoding the extracellular domain of human CD154. The extracellular domain is encoded at the carboxy terminus of CD154, similar to other type II membrane proteins.

The extracellular domain of human CD154 was PCR amplified using cDNA generated with random primers and RNA from human T lymphocytes activated with PHA (phytohemagglutinin). The primer sets included two different 5' or sense primers that created fusion junctions at two different positions within the extracellular domain of CD154. Two different fusion junctions were designed that resulted in a short or truncated form (form S4) including amino acids 108 (Glu)-261 (Leu) + (Glu), and a long or complete form (form L2) including amino acids 48 (Arg) -261 (Leu) + (Glu), of the extracellular domain of CD154, both constructed as BamHI-XbaI fragments. The sense primer which fuses the two different truncated extracellular domains to the 2H7scFv includes a BamHI site for cloning. The sense primer for the S4 form of the CD154 cDNA is designated SEQUENCE ID NO: 11 or CD154BAM108 and encodes a 34 mer with the following sequence : 5'-gtt gtc gga tcc aga aaa cag ctt tga aat gca a-3' , while the antisense primer is designated SEQUENCE ID NO: 12 or CD154XBA and encodes a 44 mer with the following sequence: 5'-gtt gtt tct aga tta tca ctc gag ttt gag taa gcc aaa gga cg-3'.

The oligonucleotide primers used in amplifying the long form (L2) of the CD154 extracellular domain encoding amino acids 48 (Arg)-261 (Leu) + (Glu), were as follows: The sense primer designated CD154 BAM48 (SEQUENCE ID NO:13) encoded a 35-mer with the following sequence: 5'-gtt gtc gga tcc aag aag gtt gga caa gat aga ag-3'. The antisense primer designated or CD154XBA (SEQUENCE ID NO:__) encoded the 44-mer: 5'-gtt gtt tct aga tta tca ctc gag ttt gag taa gcc aaa gga cg-3'. Other PCR reaction conditions were identical to those used for amplifying the 2H7 scFv (see Example 1). PCR fragments were purified by PCR quick kits (QIAGEN, San Diego, CA), eluted in 30 □l ddH_2O, and digested with BamHI and XbaI (Roche) restriction endonucleases in a 40 □l reaction volume at 37 °C for 3 hours. Fragments were gel purified, purified using QIAEX kits according to the manufacturer's instructions (QIAGEN), and ligated along with the 2H7 HindIII-BclI fragment into the pD18 expression vector digested with HindIII+XbaI. Ligation reactions were transformed into DH5-alpha chemically competent bacteria and plated onto LB plates containing 100 □g/ml ampicillin. Transformants were grown overnight at 37 °C, and

isolated colonies used to inoculate 3 ml liquid cultures in Luria Broth containing 100 □g/ml ampicillin. Clones were screened after mini-plasmid preparations (QIAGEN) for insertion of both the 2H7 scFv and the CD154 extracellular domain fragments.

The 2H7scFv-CD154 construct cDNAs were subjected to cycle sequencing on a PE 9700 thermocycler using a 25-cycle program that included denaturating at 96 °C, 10 seconds, annealing at 50 °C for 5 seconds, and extension at 60°C, for 4 minutes. The sequencing primers used were pD18 forward (SEQ ID NO:__: 5'-gtctatataagcagagctctggc-3') and pD18 reverse (SEQ ID NO:__: 5'-cgaggctgatcagcgagctctagca-3') primers. In addition, an internal primer was used that had homology to the human CD154 sequence (SEQ ID NO:__: 5'-ccgcaatttgaggattctgatcacc-3'). Sequencing reactions included primers at 3.2 pmol, approximately 200 ng DNA template, and 8 □l sequencing mix. Sequencing reactions were performed using the Big Dye Terminator Ready Sequencing Mix (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. Samples were subsequently purified using Centrisep columns (Princeton Separations, Adelphia, NJ). The eluates were dried in a Savant speed-vacuum dryer, denatured in 20 □l template Suppression Reagent (ABI) at 95°C for 2 minutes, and analyzed on an ABI 310 Genetic Analyzer (PE-Applied Biosystems). The sequence was edited, translated, and analyzed using Vector Nti version 6.0 (Informax, North Bethesda, MD). The 2H7scFv-CD154 L2 cDNA sequence and predicted amino acid sequence is presented in Figure 7A, and 2H7scFv-CD154 S4 cDNA sequence and predicted amino acid sequence is presented in Figure 7B.

The binding activity of the 2H7 scFv-CD154 fusion proteins (SEQ. ID NO: __ and __) to CD20 and CD40 simultaneously was determined by flow cytometry. The assay used CHO cell targets that express CD20. After a 45-minute incubation of CD20 CHO cells with supernatants from cells transfected with the 2H7 scFv-CD154 expression plasmid, the CD20 CHO cells were washed twice and incubated with biotin-conjugated CD40-Ig fusion protein in PBS/2% FBS. After 45 min, cells were washed twice and incubated with phycoerythrin (PE)-labeled strepavidin at 1:100 in PBS/2% FBS (Molecular Probes, Eugene OR). After an additional 30 min incubation, cells were

washed 2X and were analyzed by flow cytometry. The results show that the 2H7 scFv-CD154 molecule was able to bind to CD20 on the cell surface and to capture biotin-conjugated CD40 from solution (Figure 8).

To determine the effect of the 2H7scFv-CD154 on growth and viability of B lymphoma and lymphoblastoid cell lines, cells were incubated with 2H7scFv-CD154 L2 (SEQ. ID NO: __) for 12 hours and then examined for binding of Annexin V. Binding of Annexin V was measured using a FITC-Annexin V kit (Immunotech, Marseille, France, Catalog # PN-IM2376). B cell lines were incubated in 1 ml cultures with dilutions of concentrated, dialyzed supernatants from cells expressing secreted forms of the 2H7scFv-CD154 fusion proteins. The results are presented in Figure 9.

The growth rate of the Ramos B lymphoma cell line in the presence of 2H7scFv-CD154 was examined by uptake of ^{3}H-thymidine for the last 6 hours of a 24-hour culture. The effect of 2H7scFv-CD154 on cell proliferation is shown in Figure 10.

EXAMPLE 5

CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF CYTOXB ANTIBODY DERIVATIVES

CytoxB antibodies were derived from the 2H7 scFv-IgG polypeptide. The 2H7 scFv (see Example 1) was linked to the human IgG1 Fc domain via an altered hinge domain (see Figure 11). Cysteine residues in the hinge region were substituted with serine residues by site-directed mutagenesis and other methods known in the art. The mutant hinge was fused either to a wild-type Fc domain to create one construct, designated CytoB-MHWTG1C, or was fused to a mutated Fc domain (CytoxB-MHMG1C) that had additional mutations introduced into the CH2 domain. Amino acid residues in CH2 that are implicated in effector function are illustrated in Figure 11. Mutations of one or more of these residues may reduce FcR binding and mediation of effector functions. In this example, the leucine residue 234 known in the art to be important to Fc receptor binding, was mutated in the 2H7 scFv fusion protein, CytoxB-[MG1H/MG1C]. In another construct, the human IgG1 hinge region was substituted

with a portion of the human IgA hinge, which was fused to wild-type human Fc domain (CytoxB-IgAHWTHG1C). (See Figure 11). This mutated hinge region allows expression of a mixture of monomeric and dimeric molecules that retain functional properties of the human IgG1 CH2 and CH3 domains. Synthetic, recombinant cDNA expression cassettes for these molecules were constructed and polypeptides were expressed in CHODG44 cells according to methods described in Example 2.

Purified fusion protein derivatives of CytoxB-scFvIg molecules were analyzed by SDS-PAGE according to the methods described in Example 2. Polyacrylamide gels were run under non-reducing and reducing conditions. Two different molecule weight marker sets, BioRad prestained markers, (BioRad, Hercules, CA) and Novex Multimark molecular weight markers were loaded onto each gel. The migration patterns of the different constructs and of Rituximab™ are presented in Figure 12.

The ability of the different derivatives of CytoxB-scFvIg molecules to mediated ADCC was measured using the Bjab B lymphoma cells as the target and freshly prepared human PBMCs as effector cells. (See Example 2). Effector to target ratios were varied as follows: 70:1, 35:1, and 18:1, with the number of Bjab cells per well remaining constant but the number of PBMCs were varied. Bjab cells were labeled for 2 hours with ^{51}Cr and aliquoted at a cell density of 5×10^4 cells/well to each well of flat-bottom 96 well plates. Purified fusion proteins or rituximab were added at a concentration of 10 mg/ml to the various dilutions of PBMCs. Spontaneous release was measured without addition of PBMC or fusion protein, and maximal release was measured by the addition of detergent (1% NP-40) to the appropriate wells. Reactions were incubated for 4 hours, and 100 ul of culture supernatant was harvested to a Lumaplate (Packard Instruments) and allowed to dry overnight prior to counting cpm released. The results are presented in Figure 13.

Complement dependent cytotoxicity (CDC) activity of the CytoxB derivatives was also measured. Reactions were performed essentially as described in Example 2. The results are presented in Figure 14 as percent of dead cells to total cells for each concentration of fusion protein.

EXAMPLE 6

IN VIVO STUDIES IN MACAQUES

Initial *in vivo* studies with CytoxB derivatives have been performed in nonhuman primates. Figure 15 shows data characterizing the serum half-life of CytoxB in monkeys. Measurements were performed on serum samples obtained from two different macaques (J99231 and K99334) after doses of 6 mg/kg were administered to each monkey on the days indicated by arrows. For each sample, the level of 2H7scFvIg present was estimated by comparison to a standard curve generated by binding of purified CytoxB-(MHWTG1C)-Ig fusion protein to CD20 CHO cells (see Example 2). The data are tabulated in the bottom panel of the Figure 15.

The effect of CytoxB-(MHWTG1C)Ig fusion protein on levels of circulating CD40+ cells in macaques was investigated. Complete blood counts were performed at each of the days indicated in Figure 16. In addition, FACS (fluorescence activated cell sorter) assays were performed on peripheral blood lymphocytes using a CD40-specific fluorescein conjugated antibody to detect B cells among the cell population. The percentage of positive cells was then used to calculate the number of B cells in the original samples. The data are graphed as thousands of B cells per microliter of blood measured at the days indicated after injection (Figure 16).

EXAMPLE 7

CONSTRUCTION AND EXPRESSION OF AN ANTI-CD19 SCFV-IG FUSION PROTEIN

An anti-CD19 scFv-Ig fusion protein was constructed, transfected into eukaryotic cells, and expressed according to methods presented in Examples 1, 2, and 5 and standard in the art. The variable heavy chain regions and variable light chain regions were cloned from RNA isolated from hybridoma cells producing antibody HD37, which specifically binds to CD19. Expression levels of a HD37scFv-IgAHWTG1C and a HD37scFv-IgMHWTG1C were measured and compared to a

standard curve generated using purified HD37 scFvIg. The results are presented in Figure 17.

EXAMPLE 8

CONSTRUCTION AND EXPRESSION OF AN ANTI-L6 SCFV-IG FUSION PROTEIN

An scFv-Ig fusion protein was constructed using variable regions derived from an anti-carcinoma mAb, L6. The fusion protein was constructed, transfected into eukaryotic cells, and expressed according to methods presented in Examples 1, 2, and 5 and standard in the art. Expression levels of L6scFv-IgAHWTG1C and L6scFv-IgMHWTG1C were measured and compared to a standard curve generated using purified HD37 scFvIg. The results are presented in Figure 18.

EXAMPLE 9

CHARACTERIZATION OF VARIOUS SCFV-IG FUSION PROTEINS

In addition to the scFv-Ig fusion protein already described, G28-1 (anti-CD37) scFv-Ig fusion proteins were prepared essentially as described in Examples 1 and 5. The variable regions of the heavy and light chains were cloned according to methods known in the art. ADCC activity of 2H7-MHWTG1C, 2H7-IgAHWTG1C, G28-1- MHWTG1C, G28-1 IgAHWTG1C, HD37- MHWTG1C, and HD37-IgAHWTG1C was determined according to methods described above (see Example 2). Results are presented in Figure 19. ADCC activity of L6scFv-IgAHWTG1C and L6scFv-IgMHWTG1C was measured using the 2981 human lung carcinoma cell line. The results are presented in Figure 20. The murine L6 monoclonal antibody is known not to exhibit ADCC activity.

The purified proteins were analyzed by SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions. Samples were prepared and gels run essentially as described in Examples 2 and 5. The results for the L6 and 2H7 scFv-Ig fusion proteins are

presented in Figure 21 and the results for the G28-1 and HD37 scFv-Ig fusion proteins are presented in Figure 22.

From the foregoing, it will be appreciated that, although specific embodiments of the invention have been described herein for the purpose of illustration, various modifications may be made without deviating from the spirit and scope of the invention. Accordingly, the present invention is not limited except as by the appended claims.

CLAIMS

What is claimed is:

1. A binding domain-immunoglobulin fusion protein, comprising:

(a) a binding domain polypeptide that is fused to an immunoglobulin hinge region polypeptide, wherein said hinge region polypeptide is selected from the group consisting of (i) a mutated hinge region polypeptide that contains no cysteine residues and that is derived from a wild-type immunoglobulin hinge region polypeptide having one or more cysteine residues, (ii) a mutated hinge region polypeptide that contains one cysteine residue and that is derived from a wild-type immunoglobulin hinge region polypeptide having two or more cysteine residues, (iii) a wild-type human IgA hinge region polypeptide, (iv) a mutated human IgA hinge region polypeptide that contains no cysteine residues and that is derived from a wild-type human IgA region polypeptide, and (v) a mutated human IgA hinge region polypeptide that contains one cysteine residue and that is derived from a wild-type human IgA region polypeptide;

(b) an immunoglobulin heavy chain CH2 constant region polypeptide that is fused to the hinge region polypeptide; and

(c) an immunoglobulin heavy chain CH3 constant region polypeptide that is fused to the CH2 constant region polypeptide,

wherein:

(1) the binding domain-immunoglobulin fusion protein is capable of at least one immunological activity selected from the group consisting of antibody dependent cell-mediated cytotoxicity and complement fixation, and

(2) the binding domain polypeptide is capable of specifically binding to an antigen.

2. The binding domain-immunoglobulin fusion protein of claim 1 wherein the immunoglobulin hinge region polypeptide is a mutated hinge region

polypeptide and exhibits a reduced ability to dimerize, relative to a wild-type human immunoglobulin G hinge region polypeptide.

3. The binding domain-immunoglobulin fusion protein of claim 1 wherein the binding domain polypeptide comprises at least one immunoglobulin variable region polypeptide that is selected from the group consisting of an immunoglobulin light chain variable region polypeptide and an immunoglobulin heavy chain variable region polypeptide.

4. The binding domain -immunoglobulin fusion protein of claim 3 wherein the immunoglobulin variable region polypeptide is derived from a human immunoglobulin.

5. The binding domain Fv-immunoglobulin fusion protein of claim 1 wherein the binding domain polypeptide comprises:

(a) at least one immunoglobulin light chain variable region polypeptide;

(b) at least one immunoglobulin heavy chain variable region polypeptide; and

(c) at least one linker peptide that is fused to the polypeptide of (a) and to the polypeptide of (b).

6. The binding domain-immunoglobulin fusion protein of claim 5 wherein the immunoglobulin light chain variable region and heavy chain variable region polypeptides are derived from human immunoglobulins.

7. The binding domain-immunoglobulin fusion protein of claim 1 wherein at least one of the immunoglobulin heavy chain CH2 constant region polypeptide and the immunoglobulin heavy chain CH3 constant region polypeptide is derived from a human immunoglobulin heavy chain.

8. The binding domain-immunoglobulin fusion protein of claim 1 wherein the immunoglobulin heavy chain constant region CH2 and CH3 polypeptides are of an isotype selected from the group consisting of human IgG and human IgA.

9. The binding domain-immunoglobulin fusion protein of claim 1 wherein the antigen is selected from the group consisting of CD19, CD20, CD37, CD40 and L6.

10. The binding domain-immunoglobulin fusion protein of claim 5 wherein the linker polypeptide comprises at least one polypeptide having as an amino acid sequence Gly-Gly-Gly-Gly-Ser [SEQ ID NO:21].

11. The binding domain-immunoglobulin fusion protein of claim 5 wherein the linker polypeptide comprises at least three repeats of a polypeptide having as an amino acid sequence Gly-Gly-Gly-Gly-Ser [SEQ ID NO:21].

12. The binding domain-immunoglobulin fusion protein of claim 1 wherein the immunoglobulin hinge region polypeptide comprises a human IgA hinge region polypeptide.

13. The binding domain-immunoglobulin fusion protein of claim 1 wherein the binding domain polypeptide comprises a CD154 extracellular domain.

14. The binding domain-immunoglobulin fusion protein of claim 1 wherein the binding domain polypeptide comprises a CD154 extracellular domain and at least one immunoglobulin variable region polypeptide.

15. An isolated polynucleotide encoding a binding domain-immunoglobulin fusion protein, said protein comprising:

(a) a binding domain polypeptide that is fused to an immunoglobulin hinge region polypeptide, wherein said hinge region polypeptide is selected from the group consisting of (i) a mutated hinge region polypeptide that contains no cysteine residues and that is derived from a wild-type immunoglobulin hinge region polypeptide having one or more cysteine residues, (ii) a mutated hinge region polypeptide that contains one cysteine residue and that is derived from a wild-type immunoglobulin hinge region polypeptide having two or more cysteine residues, (iii) a wild-type human IgA hinge region polypeptide, (iv) a mutated human IgA hinge region polypeptide that contains no cysteine residues and that is derived from a wild-type human IgA region polypeptide, and (v) a mutated human IgA hinge region polypeptide that contains one cysteine residue and that is derived from a wild-type human IgA region polypeptide;

(b) an immunoglobulin heavy chain CH2 constant region polypeptide that is fused to the hinge region polypeptide; and

(c) an immunoglobulin heavy chain CH3 constant region polypeptide that is fused to the CH2 constant region polypeptide,

wherein:

(1) the binding domain-immunoglobulin fusion protein is capable of at least one immunological activity selected from the group consisting of antibody dependent cell-mediated cytotoxicity and complement fixation, and

(2) the binding domain polypeptide is capable of specifically binding to an antigen.

16. A recombinant expression construct comprising a polynucleotide according to claim 15 that is operably linked to a promoter.

17. A host cell transformed or transfected with a recombinant expression construct according to claim 16.

18. A method of producing a binding domain-immunoglobulin fusion protein, comprising the steps of:

(a) culturing a host cell according to claim 17 under conditions that permit expression of the binding domain-immunoglobulin fusion protein; and

(b) isolating the binding domain-immunoglobulin fusion protein from the host cell culture.

19. A pharmaceutical composition comprising a binding domain-immunoglobulin fusion protein according to claim 1 in combination with a physiologically acceptable carrier.

20. A method of treating a subject having or suspected of having a malignant condition or a B-cell disorder, comprising administering to a patient a therapeutically effective amount of a binding domain-immunoglobulin fusion protein according to claim 1.

21. The method of claim 20 wherein the malignant condition or B-cell disorder is selected from the group consisting of a B-cell lymphoma and a disease characterized by autoantibody production.

22. The method of claim 20 wherein the malignant condition or B-cell disorder is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, myasthenia gravis, Grave's disease, type I diabetes mellitus, multiple sclerosis and an autoimmune disease.

Figure 1A

2H7scFv-Ig cDNA and predicted amino acid sequence:

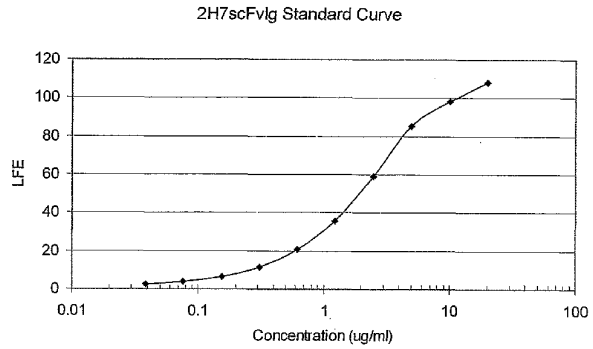
HindIII NcoI 2H7 V_L Leader Peptide→

```
                        M  D  F  Q  V  Q  I  F  S  F  L  L  I  S  A  S
  1 AAGCTTGCCG CC   ATGGATTT TCAAGTGCAG ATTTTCAGCT TCCTGCTAAT CAGTGCTTCA

                  2H7 VL→
     V  I  I  A  R  G  Q  I  V  L  S  Q  S  P  A  I  L  S  A  S
 61 GTCATAATTG CCAGAGGACA AATTGTTCTC TCCCAGTCTC CAGCAATCCT GTCTGCATCT

     P  G  E  K  V  T  M  T  C  R  A  S  S  S  V  S  Y  M  H  W
121 CCAGGGGAGA AGGTCACAAT GACTTGCAGG GCCAGCTCAA GTGTAAGTTA CATGCACTGG

                  BamHI
                  ~~~~~~~
     Y  Q  Q  K  P  G  S  S  P  K  P  W  I  Y  A  P  S  N  L  A
181 TACCAGCAGA AGCCAGGATC CTCCCCCAAA CCCTGGATTT ATGCCCCATC CAACCTGGCT

     S  G  V  P  A  R  F  S  G  S  G  S  G  T  S  Y  S  L  T  I
241 TCTGGAGTCC CTGCTCGCTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CCTCTTACTC TCTCACAATC

     S  R  V  E  A  E  D  A  A  T  Y  Y  C  Q  Q  W  S  F  N  P
301 AGCAGAGTGG AGGCTGAAGA TGCTGCCACT TATTACTGCC AGCAGTGGAG TTTTAACCCA

                                          (Gly4Ser)3 Linker
     P  T  F  G  A  G  T  K  L  E  L  K  G  G  G  G  S  G  G  G
361 CCCACGTTCG GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAAGGTG GCGGTGGCTC GGGCGGTGGT

                                    2H7 VH →
     G  S  G  G  G  G  S  S  Q  A  Y  L  Q  Q  S  G  A  E  L  V
421 GGATCTGGAG GAGGTGGGAG CTCTCAGGCT TATCTACAGC AGTCTGGGGC TGAGCTGGTG

     R  P  G  A  S  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y
481 AGGCCTGGGG CCTCAGTGAA GATGTCCTGC AAGGCTTCTG GCTACACATT TACCAGTTAC

     N  M  H  W  V  K  Q  T  P  R  Q  G  L  E  W  I  G  A  I  Y
541 AATATGCACT GGGTAAAGCA GACACCTAGA CAGGGCCTGG AATGGATTGG AGCTATTTAT

     P  G  N  G  D  T  S  Y  N  Q  K  F  K  G  K  A  T  L  T  V
601 CCAGGAAATG GTGATACTTC CTACAATCAG AAGTTCAAGG GCAAGGCCAC ACTGACTGTA

     D  K  S  S  S  T  A  Y  M  Q  L  S  S  L  T  S  E  D  S  A
661 GACAAATCCT CCAGCACAGC CTACATGCAG CTCAGCAGCC TGACATCTGA AGACTCTGCG

     V  Y  F  C  A  R  V  V  Y  Y  S  N  S  Y  W  Y  F  D  V  W
721 GTCTATTTCT GTGCAAGAGT GGTGTACTAT AGTAACTCTT ACTGGTACTT CGATGTCTGG
```

Figure 1 B

```
                                  BclI
                                ~~~~~~~human IgG1 Fc domain →
      G  T  G  T   T  V  T   V  S  D   Q  E  P  K   S  C  D   K  T  H
 781  GGCACAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGAT CAGGAGCCCA AATCTTGTGA CAAAACTCAC

      T  C  P  P   C  P  A   P  E  L   L  G  G  P   S  V  F   L  F  P
 841  ACATGCCCAC CGTGCCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC

      P  K  P  K   D  T  L   M  I  S   R  T  P  E   V  T  C   V  V  V
 901  CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG

      D  V  S  H   E  D  P   E  V  K   F  N  W  Y   V  D  G   V  E  V
 961  GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG

      H  N  A  K   T  K  P   R  E  E   Q  Y  N  S   T  Y  R   V  V  S
1021  CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC

      V  L  T  V   L  H  Q   D  W  L   N  G  K  E   Y  K  C   K  V  S
1081  GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC

      N  K  A  L   P  A  P   I  E  K   T  I  S  K   A  K  G   Q  P  R
1141  AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACAATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA

      E  P  Q  V   Y  T  L   P  P  S   R  D  E  L   T  K  N   Q  V  S
1201  GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCCATCC CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTCAGC

      L  T  C  L   V  K  G   F  Y  P   S  D  I  A   V  E  W   E  S  N
1261  CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT

      G  Q  P  E   N  N  Y   K  T  T   P  P  V  L   D  S  D   G  S  F
1321  GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC

      F  L  Y  S   K  L  T   V  D  K   S  R  W  Q   Q  G  N   V  F  S
1381  TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA

      C  S  V  M   H  E  A   L  H  N   H  Y  T  Q   K  S  L   S  L  S
1441  TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT

                    XbaI
                   ~~~~~
      P  G  K  *   S  R
1501  CCGGGTAAAT GATCTAGA
```

Figure 2.



Clone	LFE @ 1:50	Estimated Concentration (μg/ml)
D2	26.1	56
IIIC6	25.7	55
IVA3	28.6	61
Spent bulk	29.6	64

Figure 3.

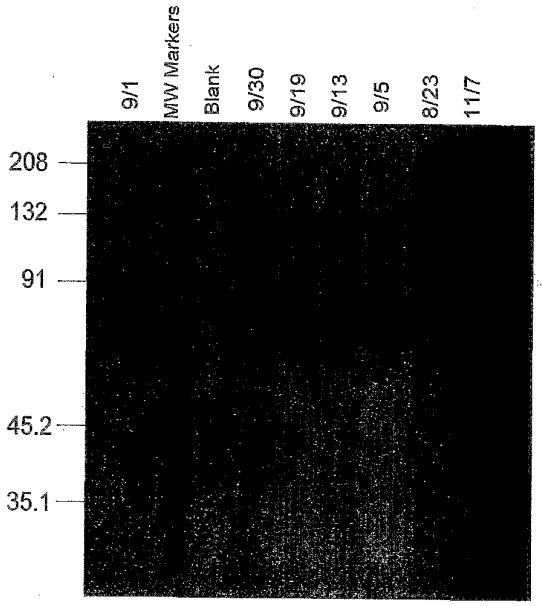


Figure 4A.

Complement Mediated B Cell Killing After Binding of CD20-targeted 2H7 Derivatives:

2H7scFv-Ig Concentration	RAMOS	BJAB
20 μg/ml + complement	0.16	0.07
5 μg/ml + complement	0.2	N.D.
1.25 μg/ml + complement	0.32	0.1
Complement alone	0.98	0.94

*Viability was determined by trypan blue exclusion and is tabulated as the fraction of viable cells out of the total number of cells counted.

**N.D. (not determined).

Figure 4B.

Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mediated by 2H7scFv-Ig:

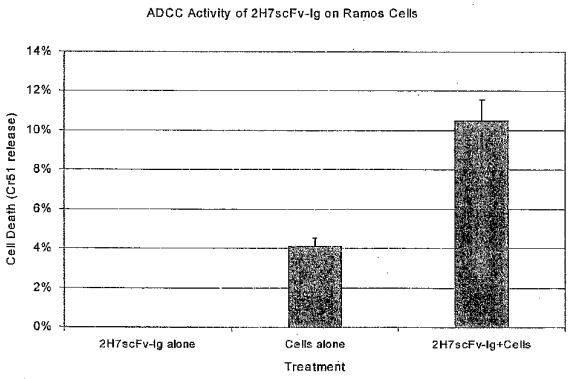


Figure 5.

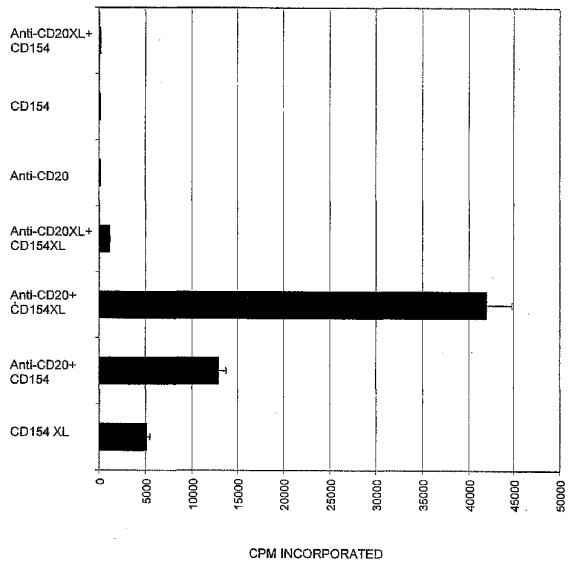

Anti-CD20XL+ CD154
CD154
Anti-CD20
Anti-CD20XL+ CD154XL
Anti-CD20+ CD154XL
Anti-CD20+ CD154
CD154 XL
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
40000
45000
50000
CPM INCORPORATED

Figure 6A and B.

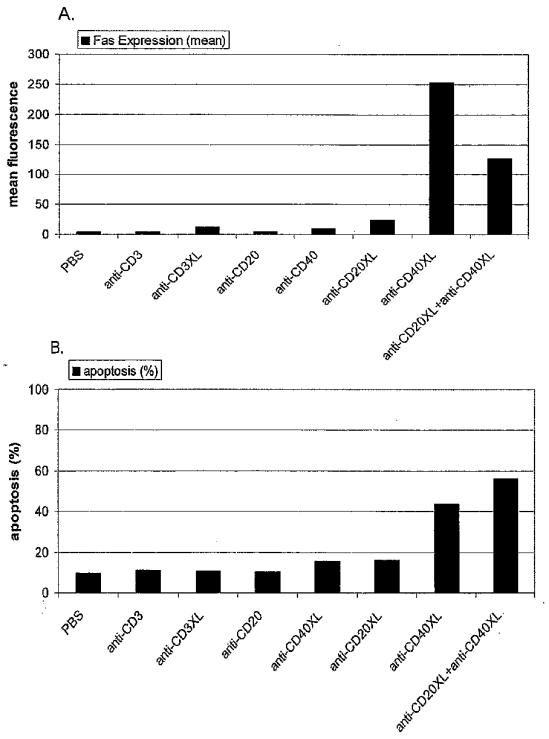


Figure 7A.

2H7-CD154 L2 cDNA and predicted amino acid sequence:

HindIII NcoI 2H7 V_L Leader Peptide →

```
                    M  D  F  Q  V  Q  I  F  S  F  L  L  I  S  A  S
1   AAGCTTGCCG CC   ATGGATTT TCAAGTGCAG ATTTTCAGCT TCCTGCTAAT CAGTGCTTCA

                2H7 VL →
     V  I  I  A  R  G  Q  I  V  L  S  Q  S  P  A  I  L  S  A  S
61  GTCATAATTG CCAGAGGACA AATTGTTCTC TCCCAGTCTC CAGCAATCCT GTCTGCATCT

     P  G  E  K  V  T  M  T  C  R  A  S  S  S  V  S  Y  M  H  W
121 CCAGGGGAGA AGGTCACAAT GACTTGCAGG GCCAGCTCAA GTGTAAGTTA CATGCACTGG

                BamHI
                ~~~~~~~
     Y  Q  Q  K  P  G  S  S  P  K  P  W  I  Y  A  P  S  N  L  A
181 TACCAGCAGA AGCCAGGATC CTCCCCCAAA CCCTGGATTT ATGCCCCATC CAACCTGGCT

     S  G  V  P  A  R  F  S  G  S  G  S  G  T  S  Y  S  L  T  I
241 TCTGGAGTCC CTGCTCGCTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CCTCTTACTC TCTCACAATC

     S  R  V  E  A  E  D  A  A  T  Y  Y  C  Q  Q  W  S  F  N  P
301 AGCAGAGTGG AGGCTGAAGA TGCTGCCACT TATTACTGCC AGCAGTGGAG TTTTAACCCA

                                        (Gly4Ser)3 Linker →
     P  T  F  G  A  G  T  K  L  E  L  K  G  G  G  G  S  G  G  G
361 CCCACGTTCG GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAAGGTG GCGGTGGCTC GGGCGGTGGT

                          2H7 VH →
     G  S  G  G  G  G  S  S  Q  A  Y  L  Q  Q  S  G  A  E  L  V
421 GGATCTGGAG GAGGTGGGAG CTCTCAGGCT TATCTACAGC AGTCTGGGGC TGAGCTGGTG

     R  P  G  A  S  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y
481 AGGCCTGGGG CCTCAGTGAA GATGTCCTGC AAGGCTTCTG GCTACACATT TACCAGTTAC

     N  M  H  W  V  K  Q  T  P  R  Q  G  L  E  W  I  G  A  I  Y
541 AATATGCACT GGGTAAAGCA GACACCTAGA CAGGGCCTGG AATGGATTGG AGCTATTTAT

     P  G  N  G  D  T  S  Y  N  Q  K  F  K  G  K  A  T  L  T  V
601 CCAGGAAATG GTGATACTTC CTACAATCAG AAGTTCAAGG GCAAGGCCAC ACTGACTGTA

     D  K  S  S  S  T  A  Y  M  Q  L  S  S  L  T  S  E  D  S  A
661 GACAAATCCT CCAGCACAGC CTACATGCAG CTCAGCAGCC TGACATCTGA AGACTCTGCG

     V  Y  F  C  A  R  V  V  Y  Y  S  N  S  Y  W  Y  F  D  V  W
721 GTCTATTTCT GTGCAAGAGT GGTGTACTAT AGTAACTCTT ACTGGTACTT CGATGTCTGG
```

Figure 7B

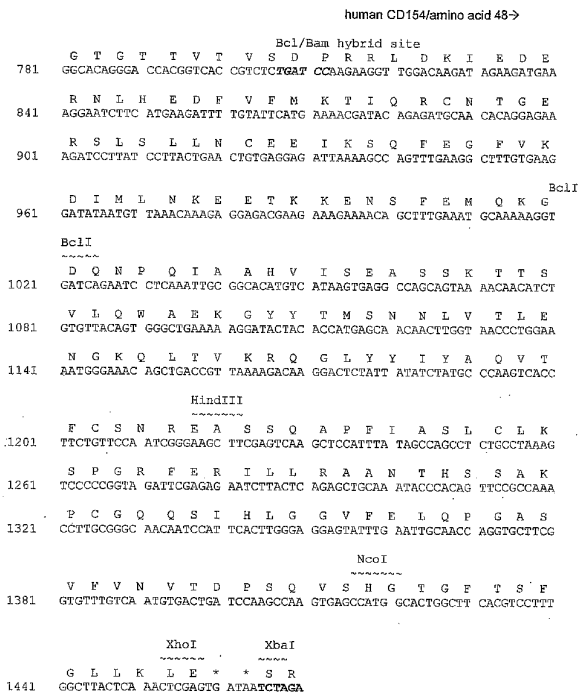

human CD154/amino acid 48→
Bcl/Bam hybrid site
G T G T T V T V S D P R R L D K I E D E
781 GGCACAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGAT CCAAGAAGGT TGGACAAGAT AGAAGATGAA
R N L H E D F V F M K T I Q R C N T G E
841 AGGAATCTTC ATGAAGATTT TGTATTCATG AAAACGATAC AGAGATGCAA CACAGGAGAA
R S L S L L N C E E I K S Q F E G F V K
901 AGATCCTTAT CCTTACTGAA CTGTGAGGAG ATTAAAAGCC AGTTTGAAGG CTTTGTGAAG
BclI
D I M L N K E E T K K E N S F E M Q K G
961 GATATAATGT TAAACAAAGA GGAGACGAAG AAAGAAAACA GCTTTGAAAT GCAAAAAGGT
BclI
D Q N P Q I A A H V I S E A S S K T T S
1021 GATCAGAATC CTCAAATTGC GGCACATGTC ATAAGTGAGG CCAGCAGTAA AACAACATCT
V L Q W A E K G Y Y T M S N N L V T L E
1081 GTGTTACAGT GGGCTGAAAA AGGATACTAC ACCATGAGCA ACAACTTGGT AACCCTGGAA
N G K Q L T V K R Q G L Y Y I Y A Q V T
1141 AATGGGAAAC AGCTGACCGT TAAAAGACAA GGACTCTATT ATATCTATGC CCAAGTCACC
HindIII
F C S N R E A S S Q A P F I A S L C L K
1201 TTCTGTTCCA ATCGGGAAGC TTCGAGTCAA GCTCCATTTA TAGCCAGCCT CTGCCTAAAG
S P G R F E R I L L R A A N T H S S A K
1261 TCCCCCGGTA GATTCGAGAG AATCTTACTC AGAGCTGCAA ATACCCACAG TTCCGCCAAA
P C G Q Q S I H L G G V F E L Q P G A S
1321 CCTTGCGGGC AACAATCCAT TCACTTGGGA GGAGTATTTG AATTGCAACC AGGTGCTTCG
NcoI
V F V N V T D P S Q V S H G T G F T S F
1381 GTGTTTGTCA ATGTGACTGA TCCAAGCCAA GTGAGCCATG GCACTGGCTT CACGTCCTTT
XhoI XbaI
G L L K L E * * S R
1441 GGCTTACTCA AACTCGAGTG ATAATCTAGA

Figure 7C

2H7scFv-CD154 S4 cDNA and predicted amino acid sequence:

```
      HindIII      NcoI
      ~~~~~~       ~~~~~~2H7 VL Leader Peptide→
                         M  D  F  Q  V  Q  I  F  S  F  L  L  I  S  A  S
    1 AAGCTTGCCG CC   ATGGATTT TCAAGTGCAG ATTTTCAGCT TCCTGCTAAT CAGTGCTTCA

                              2H7 VL →
      V  I  I  A  R  G  Q  I  V  L  S  Q  S  P  A  I  L  S  A  S
   61 GTCATAATTG CCAGAGGACA AATTGTTCTC TCCCAGTCTC CAGCAATCCT GTCTGCATCT

      P  G  E  K  V  T  M  T  C  R  A  S  S  S  V  S  Y  M  H  W
  121 CCAGGGGAGA AGGTCACAAT GACTTGCAGG GCCAGCTCAA GTGTAAGTTA CATGCACTGG

                        BamHI
                        ~~~~~~~
      Y  Q  Q  K  P  G  S  S  P  K  P  W  I  Y  A  P  S  N  L  A
  181 TACCAGCAGA AGCCAGGATC CTCCCCCAAA CCCTGGATTT ATGCCCCATC CAACCTGGCT

      S  G  V  P  A  R  F  S  G  S  G  S  G  T  S  Y  S  L  T  I
  241 TCTGGAGTCC CTGCTCGCTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CCTCTTACTC TCTCACAATC

      S  R  V  E  A  E  D  A  A  T  Y  Y  C  Q  Q  W  S  F  N  P
  301 AGCAGAGTGG AGGCTGAAGA TGCTGCCACT TATTACTGCC AGCAGTGGAG TTTTAACCCA

                                                  (Gly4Ser)3 Linker →
      P  T  F  G  A  G  T  K  L  E  L  K  G  G  G  G  S  G  G  G
  361 CCCACGTTCG GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAAGGTG GCGGTGGCTC GGGCGGTGGT

                                 2H7 VH →
      G  S  G  G  G  G  S  S  Q  A  Y  L  Q  Q  S  G  A  E  L  V
  421 GGATCTGGAG GAGGTGGGAG CTCTCAGGCT TATCTACAGC AGTCTGGGGC TGAGCTGGTG

      R  P  G  A  S  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y
  481 AGGCCTGGGG CCTCAGTGAA GATGTCCTGC AAGGCTTCTG GCTACACATT TACCAGTTAC

      N  M  H  W  V  K  Q  T  P  R  Q  G  L  E  W  I  G  A  I  Y
  541 AATATGCACT GGGTAAAGCA GACACCTAGA CAGGGCCTGG AATGGATTGG AGCTATTTAT

      P  G  N  G  D  T  S  Y  N  Q  K  F  K  G  K  A  T  L  T  V
  601 CCAGGAAATG GTGATACTTC CTACAATCAG AAGTTCAAGG GCAAGGCCAC ACTGACTGTA

      D  K  S  S  S  T  A  Y  M  Q  L  S  S  L  T  S  E  D  S  A
  661 GACAAATCCT CCAGCACAGC CTACATGCAG CTCAGCAGCC TGACATCTGA AGACTCTGCG

      V  Y  F  C  A  R  V  V  Y  Y  S  N  S  Y  W  Y  F  D  V  W
  721 GTCTATTTCT GTGCAAGAGT GGTGTACTAT AGTAACTCTT ACTGGTACTT CGATGTCTGG
```

Figure 7D.

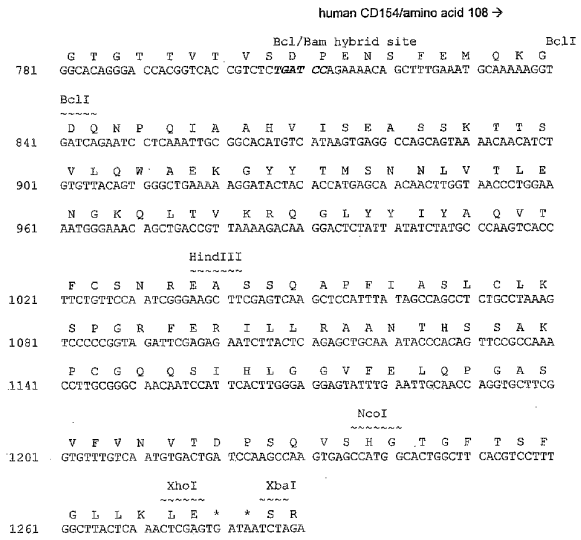
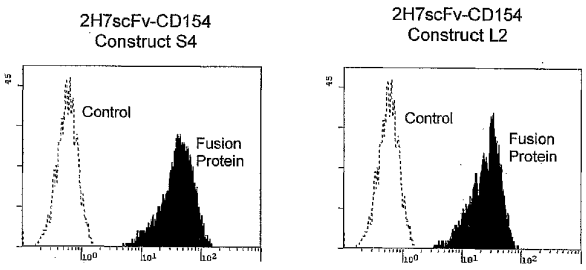

human CD154/amino acid 108 →
Bcl/Bam hybrid site
BclI
BclI
HindIII
NcoI
XhoI
XbaI

Figure 8.



CD20 CHO cell targets + (control or fusion protein)
+ Biotin-CD40Ig + PE-SA

Figure 9.

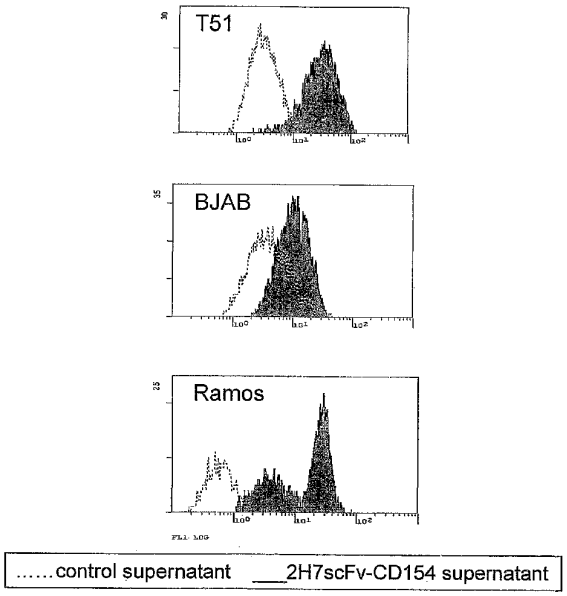

T51
BJAB
Ramos
.....control supernatant ___2H7scFv-CD154 supernatant

Figure 10.

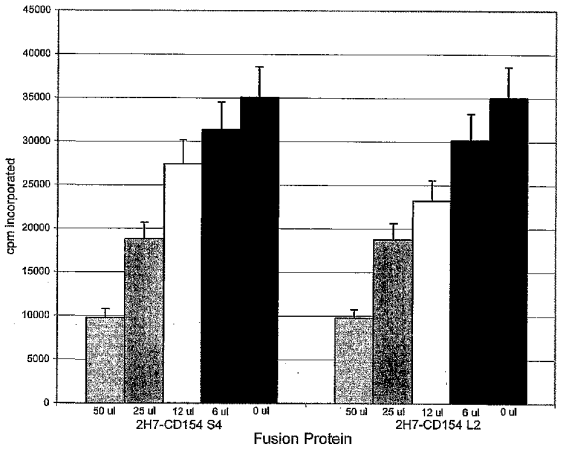

45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
cpm incorporated
50 ul
25 ul
12 ul
6 ul
0 ul
2H7-CD154 S4
50 ul
25 ul
12 ul
6 ul
0 ul
2H7-CD154 L2
Fusion Protein

FIGURE 11

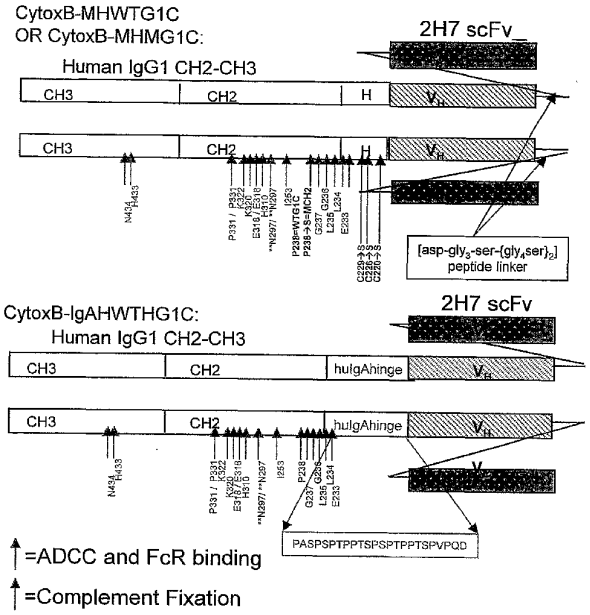

CytoxB-MHWTG1C
OR CytoxB-MHMG1C:
2H7 scFv
Human IgG1 CH2-CH3
CH3
CH2
H
[asp-gly3-ser-(gly4ser)2]
peptide linker
CytoxB-IgAHWTHG1C:
2H7 scFv
Human IgG1 CH2-CH3
CH3
CH2
hulgAhinge
PASPSPTPPTSPSPTPPTSPVPQD
=ADCC and FcR binding
=Complement Fixation

FIGURE 12

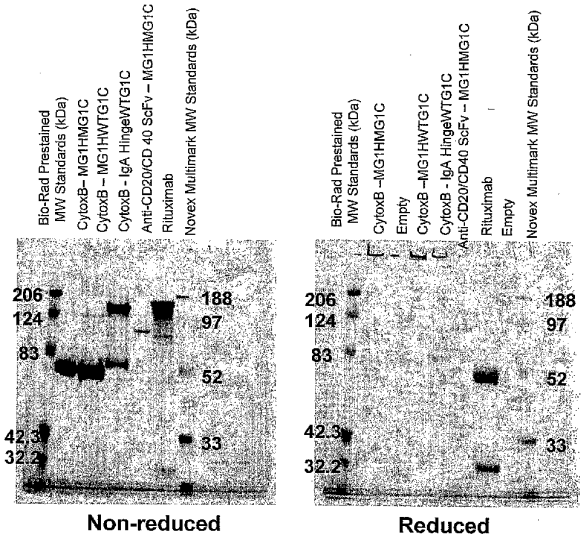

Bio-Rad Prestained MW Standards (kDa)
CytoxB– MG1HMG1C
CytoxB – MG1HWTG1C
CytoxB - IgA HingeWTG1C
Anti-CD20/CD 40 ScFv – MG1HMG1C
Rituximab
Novex Multimark MW Standards (kDa)
206
124
83
42.3
32.2
188
97
52
33
Non-reduced
Bio-Rad Prestained MW Standards (kDa)
CytoxB –MG1HMG1C
Empty
CytoxB –MG1HWTG1C
CytoxB - IgA HingeWTG1C
Anti-CD20/CD40 ScFv – MG1HMG1C
Rituxmab
Empty
Novex Multimark MW Standards (kDa)
206
124
83
42.3
32.2
188
97
52
33
Reduced

FIGURE 13

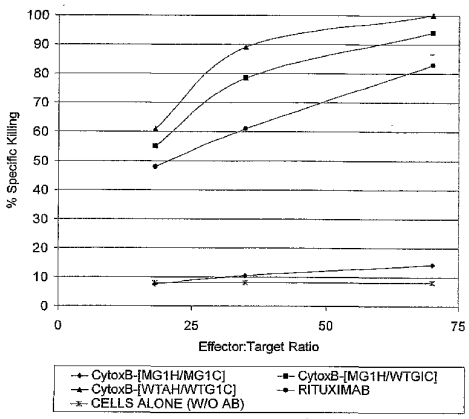

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Specific Killing
0
25
50
75
Effector:Target Ratio
CytoxB-[MG1H/MG1C]
CytoxB-[MG1H/WTGIC]
CytoxB-[WTAH/WTG1C]
RITUXIMAB
CELLS ALONE (W/O AB)

FIGURE 14

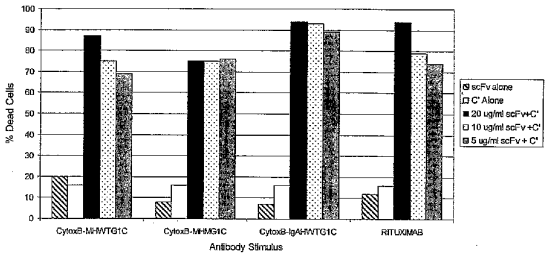
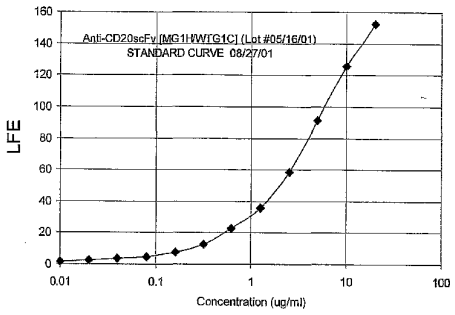

% Dead Cells
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CytoxB-MHWTG1C
CytoxB-MHMG1C
CytoxB-IgAHWTG1C
RITUXIMAB
Antibody Stimulus
scFv alone
C' Alone
20 ug/ml scFv+C'
10 ug/ml scFv +C'
5 ug/ml scFv + C'

FIGURE 15



	Day	Monkey J99231 LFE(1:40)	Monkey J99231 Concentration (µg/mL)	Monkey K99334 LFE(1:40)	Monkey K99334 Concentration (µg/mL)
Injection ▶	-7	2.41	<0.6µg/mL	1.51	<0.4µg/mL
	0	2.22	<0.6µg/mL	1.63	<0.4µg/mL
Injection ▶	1	73.8	220µg/mL	44.4	100µg/mL
	3	20.0	28µg/mL	40.2	80µg/mL
	7	15.6	24µg/mL	15.7	24µg/mL
	8	39.1	80µg/mL	42.6	92µg/mL
	10	11.5	18µg/mL	2.74	1.2µg/mL
	14	2.05	0.6mg/mL	1.96	0.6µg/mL

Figure 16

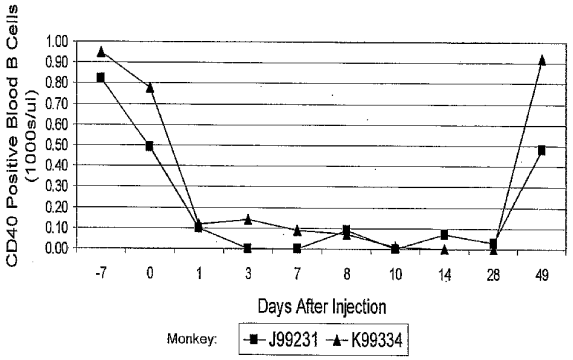
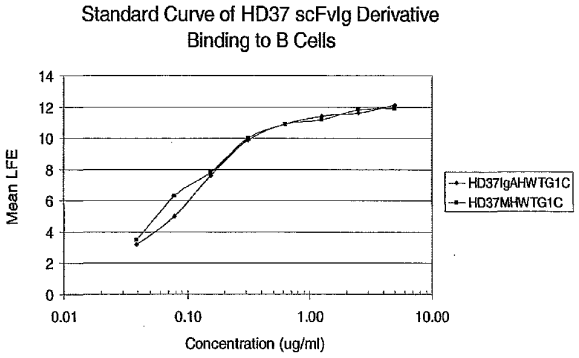
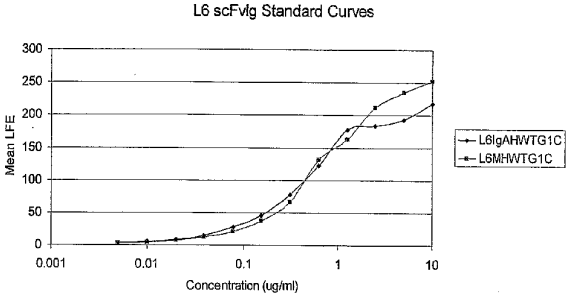

CD40 Positive Blood B Cells (1000s/ul)
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
-7
0
1
3
7
8
10
14
28
49
Days After Injection
Monkey:
J99231
K99334

FIGURE 17



Clone/Isolate	Mean LFE at 1:100	Estimated Concentration
Bulk IgAHWTG1C	11.2	> 60 ug/ml
1B2	10.4	>50 ug/ml
6C5	10.5	>50 ug/ml
4B1	8.6	>40 ug/ml
Bulk MHWTG1C	10.9	> 50 ug/ml
2G8	10.6	> 50 ug/ml
3F3	8.3	>40 ug/ml
3D9	11.1	> 60 ug/ml

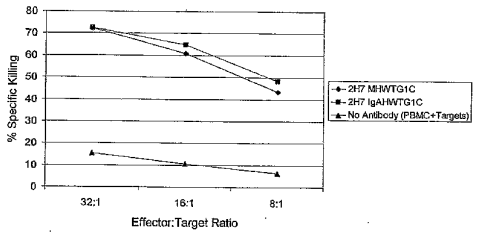
FIGURE 18



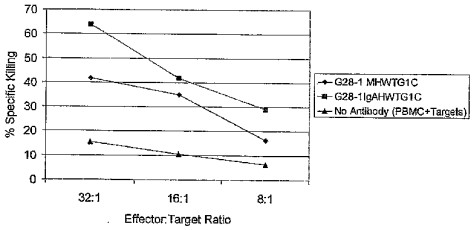
Construct	Mean LFE 1:20	Estimated Concentration
L6IgAHWTG1C unamplified CHO sup	51.1	6.25 ug/ml
L6IgGMHWTG1C unamplified CHO sup	23.0	3.2 ug/ml

FIGURE 19

A. 2H7 (anti-CD20) scFv Derivatives



B. G28-1 (anti-CD37) scFv Derivatives



C. HD37 (anti-CD19) scFv Derivatives

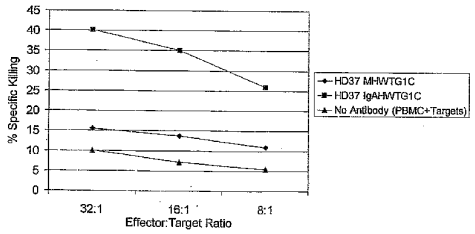


FIGURE 20

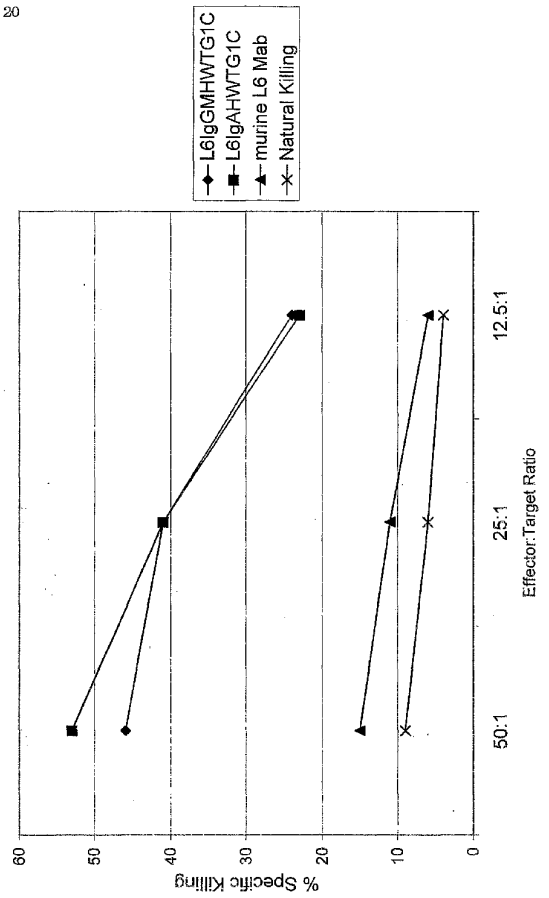

L6IgGMHWTG1C
L6IgAHWTG1C
murine L6 Mab
Natural Killing
% Specific Killing
0
10
20
30
40
50
60
50:1
25:1
12.5:1
Effector:Target Ratio

Figure 21

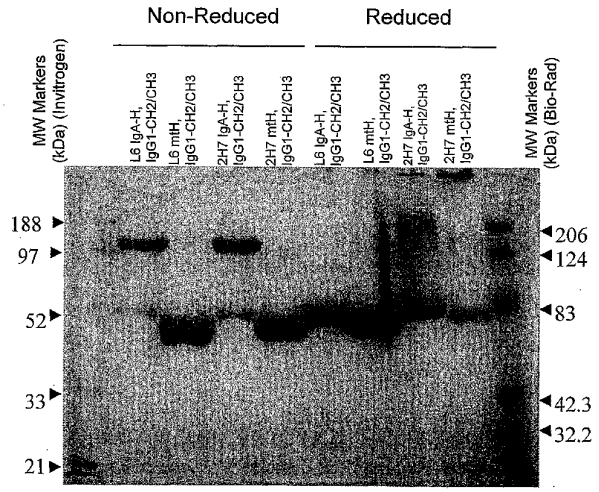
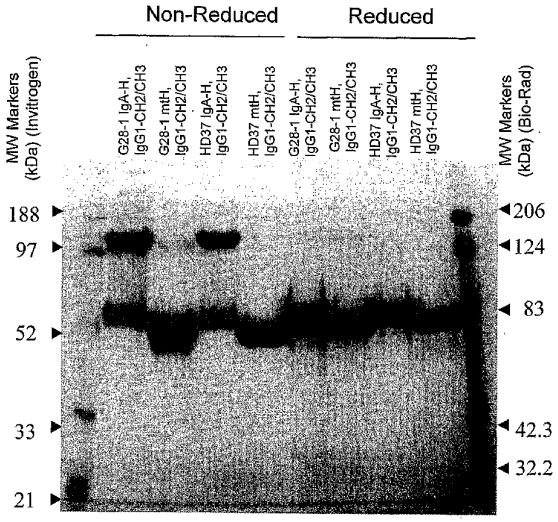

Non-Reduced
Reduced
MW Markers (kDa) (Invitrogen)
L6 IgA-H, IgG1-CH2/CH3
L6 mtH, IgG1-CH2/CH3
2H7 IgA-H, IgG1-CH2/CH3
2H7 mtH, IgG1-CH2/CH3
L6 IgA-H, IgG1-CH2/CH3
L6 mtH, IgG1-CH2/CH3
2H7 IgA-H, IgG1-CH2/CH3
2H7 mtH, IgG1-CH2/CH3
MW Markers (kDa) (Bio-Rad)
188
97
52
33
21
206
124
83
42.3
32.2

Figure 22


Non-Reduced
Reduced
MW Markers (kDa) (Invitrogen)
G28-1 IgA-H, IgG1-CH2/CH3
G28-1 mtH, IgG1-CH2/CH3
HD37 IgA-H, IgG1-CH2/CH3
HD37 mtH, IgG1-CH2/CH3
G28-1 IgA-H, IgG1-CH2/CH3
G28-1 mtH, IgG1-CH2/CH3
HD37 IgA-H, IgG1-CH2/CH3
HD37 mtH, IgG1-CH2/CH3
MW Markers (kDa) (Bio-Rad)
188
97
52
33
21
206
124
83
42.3
32.2

SEQUENCE LISTING

<110> Genecraft, Inc.
Ledbetter, Jeffrey
Hayden-Ledbetter, Martha

<120> Binding Domain-Immunoglobulin Fusion Proteins

<130> 390069.401PC

<140> PCT
<141> 2002-01-17

<160> 38

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
<211> 812
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC MOUSE SCFV FUSION GENE

<220>
<221> sig_peptide
<222> (13)..(78)

<220>
<221> V_region
<222> (79)..(396)
<223> light chain variable region for anti-CD20 scFv

<220>
<221> misc_feature
<222> (397)..(444)
<223> asp-gly3ser(gly4ser)2-ser peptide linker

<220>
<221> V_region
<222> (445)..(808)
<223> heavy chain variable region for anti-CD20 scFv

<400> 1
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60
gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
taccagcaga agccaggatc ctccccaaaa cctggattt atgccccatc caacctggct 240
tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300
agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggtg gcggtggctc gggcggtggt 420
ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgaggctggtg 480
aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720
gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat ca 812

<210> 2
<211> 1518
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC MOUSE HUMAN CHIMERIC FUSION GENE

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(807)
<223> MURINE ANTI-HUMAN CD20 scFv

<220>
<221> C_region
<222> (808)..(1513)
<223> HUMAN IgG1 Fc TAIL, WILD TYPE HINGE, CH2 AND CH3

<400> 2
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60
gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
ccagggagaa aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
taccagcaga agccaggatc ctccccaaa ccctggattt atgcccatc caacctggct 240
tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300
agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420
ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgaggtggtg 480
aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
aatatgcaat gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720
gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttgtga caaaactcac 840
acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
ccgggtaaat gatctaga 1518

<210> 3
<211> 1518
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC MOUSE-HUMAN CHIMERIC FUSION GENE

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(807)<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV

<220>
<221> C_region
<222> (808)..(1513)
<223> HINGE CYSTEINES (826-829; 844-847; 853-856) MUTATED TO SERINES
PROLINE TO SERINE MUTATION (880-883) IN CH2 DISRUPTS EFFECTOR FUN
CTION

<400> 3
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60
gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
taccagcaga agccaggatc ctccccaaaa ccctggattt atgcccatc caacctggct 240
tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300
agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420
ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagctggtg 480
aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gttacacatt taccagttac 540
aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720
gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840
acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 900
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020
cataatgcca agacaaagcc gcggggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
ccgggtaaat gatctaga 1518

<210> 4
<211> 1518
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC MOUSE-HUMAN CHIMERIC FUSION GENE

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(807)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV

<220>
<221> C_region
<222> (808)..(1513)
<223> HINGE CYSTEINES MUTATED TO SERINES (826-829; 844-847; 853-856)
WILD TYPE CH2 AND CH3 DOMAINS MEDIATE EFFECTOR FUNCTIONS

<400> 4
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60
gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
taccagcaga agccaggatc ctccccaaaa ccctggattt atgcccatc caacctggct 240
tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300
agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360

cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420
ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagctggtg 480
aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720
gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgttctgg 780
ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840
acatcccccac cgtccccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
ccgggtaaat gatctaga 1518

<210> 5
<211> 1524
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC MOUSE HUMAN CHIMERIC FUSION GENE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(796)
<223> MOUSE ANTI HUMAN CD20 SCFV

<220>
<221> N_region
<222> (797)..(864)
<223> HUMAN IGA HINGE REGION

<220>
<221> C_region
<222> (865)..(1518)
<223> HUMAN IGG1 CH2 AND CH3 WILD TYPE FC DOMAIN

<400> 5
atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaatca gtgcttcagt cataattgcc 60
agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 120
gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaagttaca tgcactggta ccagcagaag 180
ccaggatcct ccccaaacc ctggatttat gccccatcca acctggcttc tggagtccct 240
gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag 300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagtt ttaacccacc cacgttcggt 360
gctgggacca agctggagct gaaagatggc ggtggctcgg gcggtggtgg atctggagga 420
ggtgggagct ctcaggctta tctacagcag tctggggctg agctggtgag gcctggggcc 480
tcagtgaaga tgtcctgcaa ggcttctggc tacacattta ccagttacaa tatgcactgg 540
gtaaagcaga cacctagaca gggcctggaa tggattggag ctatttatcc aggaaatggt 600
gatacttcct acaatcagaa gttcaagggc aaggccacac tgactgtaga caaatcctcc 660
agcacagcct acatgcagct cagcagcctg acatctgaag actctgcggt ctatttctgt 720
gcaagagtgg tgtactatag taactcttac tggtacttcg atgttctgggg cacagggacc 780
acggtcaccg tctctgatca gccagttccc tcaactccac ctaccccatc tccctcaact 840
ccacctaccc catctccctc atgcgcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 900
ttccccccaa aacccaagga cacctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 960

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 1020
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 1080
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1140
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacaa tctccaaagc caaagggcag 1200
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1260
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1320
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1380
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1440
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1500
ctgtctccgg gtaaatgatc taga 1524

<210> 6
<211> 711
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC HUMAN PARTIAL FUSION GENE

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(705)
<223> HINGE CYSTEINES MUTATED TO SERINES (19-21; 37-39; 46-48)

<400> 6
gatcaggagc ccaaatcttc tgacaaaact cacacatccc caccgtcccc agcacctgaa 60
ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 120
tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 180
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 240
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 300
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 360
aaaacaatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 420
tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 480
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 540
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 600
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 660
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgatctag a 711

<210> 7
<211> 729
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC HUMAN PARTIAL FUSION GENE

<220>
<221> N_region
<222> (1)..(69)
<223> HUMAN IGA HINGE

<220>
<221> C_region
<222> (70)..(723)
<223> HUMAN WILD TYPE IGG1 CH2 AND CH3, FC

<400> 7
gatcagccag ttccctcaac tccacctacc ccatctccct caactccacc taccccatct 60
cctcatgcg cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 120
aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 180
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 240

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 300
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 360
ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 420
gtgtacaccc tgccccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 480
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 540
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt ctcctctac 600
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 660
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 720
tgatctaga 729

<210> 8
<211> 825
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC MOUSE SCFV FUSION GENE

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(72)
<223> LIGHT CHAIN LEADER PEPTIDE

<220>
<221> V_region
<222> (73)..(405)
<223> LIGHT CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD19: HD37

<220>
<221> misc_feature
<222> (406)..(450)
<223> SYNTHETIC (GLY4SER)3 LINKER PEPTIDE

<220>
<221> V_region
<222> (454)..(825)
<223> HEAVY CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD19: HD37

<400> 8
aagcttgccg ccatggagac agacacactc ctgctatggg tgctgctgct ctgggttcca 60
ggctccactg gtgacattgt gctgacccaa tctccagctt ctttggctgt gtctctaggg 120
cagagggcca ccatctcctg caaggccagc caaagtgttg attatgatgg tgatagttat 180
ttgaactggt accaacagat tccaggacag ccacccaaac tcctcatcta tgatgcatcc 240
aatctagttt ctgggatccc acccaggttt agtggcagtg ggtctgggac agacttcacc 300
ctcaacatcc atcctgtgga gaaggtggat gctgcaacct atcactgtca gcaaagtact 360
gaggatccgt ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaaggtgg cggtggctcg 420
ggcggtggtg ggtcgggtgg cggcggatcg tcacaggttc agctgcagca gtctggggct 480
gagctggtga ggcctgggtc ctcagtgaag atttcctgca aggcttctgg ctatgcattc 540
agtagctact ggatgaactg ggtgaagcag aggcctggac agggtcttga gtggattgga 600
cagatttggc ctggagatgg tgatactaac tacaatggaa agttcaaggg taaagccact 660
ctgactgcag acgaatcctc cagcacagcc tacatgcaac tcagcagcct agcatctgag 720
gactctgcgg tctatttctg tgcaagacgg gagactacga cggtaggccg ttattactat 780
gctatggact actggggtca aggaacctca gtcaccgtct cctca 825

<210> 9
<211> 795
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHETIC MOUSE SCFV FUSION GENE

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(72)
<223> LIGHT CHAIN LEADER PEPTIDE SEQUENCE

<220>
<221> V_region
<222> (73)..(393)
<223> LIGHT CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD37: G28-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (394)..(441)
<223> SYNTHETIC LINKER PEPTIDE ENCODED (GLY4SER)3

<220>
<221> V_region
<222> (442)..(795)
<223> HEAVY CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD37: G28-1

<400> 9
aagcttgccg ccatggtatc cacagctcag ttccttgggt tgctgctgct gtggcttaca 60
ggtggcagat gtgacatcca gatgactcag tctccagcct ccctatctgc atctgtggga 120
gagactgtca ccatcacatg tcgaacaagt gaaaatgttt acagttattt ggcttggtat 180
cagcagaaac agggaaaatc tcctcagctc ctggtctctt ttgcaaaaac cttagcagaa 240
ggtgtgccat caaggttcag tggcagtgga tcaggcacac agttttctct gaagatcagc 300
agcctgcagc ctgaagattc tggaagttat ttctgtcaac atcattccga taatccgtgg 360
acgttcggtg gaggcaccga actggagatc aaaggtggcg gtggctcggg cggtggtggg 420
tcgggtggcg gcggatcgtc agcggtccag ctgcagcagt ctggacctga gctggaaaag 480
cctggcgctt cagtgaagat ttcctgcaag gcttctggtt actcattcac tggctacaat 540
atgaactggg tgaagcagaa taatggaaag agccttgagt ggattggaaa tattgatcct 600
tattatggtg gtactaccta caaccggaag ttcaagggca aggccacatt gactgtagac 660
aaatcctcca gcacagccta catgcagctc aagagtctga catctgagga ctctgcagtc 720
tattactgtg caagatcggt cggccctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 780
gtctcttctg atcag 795

<210> 10
<211> 824
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHETIC MOUSE FUSION GENE

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(61)
<223> native light chain leader peptide

<220>
<221> V_region
<222> (62)..(397)
<223> LIGHT CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD22: G28-7

<220>
<221> misc_feature
<222> (398)..(445)
<223> (gly4ser)3 linker peptide

<220>
<221> V_region
<222> (445)..(818)
<223> HEAVY CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD22: G28-7

<220>
<221> misc_feature
<222> (819)..(824)
<223> BclI restriction site

<400> 10
atggagtcac attcccaggt ctttctctcc ctgctgtctt gggtatctgg tacctgtggg 60
aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt cagcaggaga aaaggtcact 120
atgaactgta agtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaggaa ttatttggcc 180
tggtatcagc agaaaccagg gcagtctccc aaattgctga tctactgggc atctactagg 240
gaatctggtg tccctgatcg cttcacaggc agtggatccg ggacagactt tactcttacc 300
atcagcagtg tacatactga agacctggca gtttattact gtcatcaatt cctctttcg 360
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaaggcg gtggtggttc gggtggtggt 420
ggttcgggtg gcggcggatc ttctcaggtc caactgcagc agcctggggc tgaactggtg 480
aagcctgggg cttcagtgaa gctgtcctgc aaggcttctg gctacacctt caccaactac 540
tggatggtct gggtgaagca gacgcctgga gaaggccttg agtggattgg agaaattatt 600
cctagcaacg gtcgtactaa atacaatgag aagttcaaga gcaaggccac actgactgca 660
gacaaatcct ccgcacagc ctacatgcaa ctcagcagcc tgacatctga ggactctgcg 720
gtctattatt gtgcaagaga gatgttccatt attactacgg tactgactcc cggtttgctt 780
actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgcagcctg atca 824

<210> 11
<211> 266
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> INIT_MET
<222> (1)..(1)

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)..(22)

<220>
<221> DOMAIN
<222> (23)..(128)
<223> LIGHT CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD20

<220>
<221> SITE
<222> (129)..(144)
<223> ASP-(GLY3SER)-(GLY4SER)2-SER LINKER PEPTIDE

<220>
<221> DOMAIN
<222> (145)..(266)
<223> HEAVY CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD20

<400> 11
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

```
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
    50                  55                  60
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65                  70                  75                  80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
                85                  90                  95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
            100                 105                 110
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
        115                 120                 125
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
    130                 135                 140
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
145                 150                 155                 160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
                165                 170                 175
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
            180                 185                 190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
        195                 200                 205
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
    210                 215                 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225                 230                 235                 240
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
                245                 250                 255
Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp
            260                 265

<210>  12
<211>  271
<212>  PRT
<213>  Mus musculus

<220>
<221>  SITE
<222>  (1)..(271)
<223>  MOUSE ANTI-HUMAN CD19 SCFV

<400>  12
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1                   5                   10                  15
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
            20                  25                  30
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45
Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro
    50                  55                  60
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser
65                  70                  75                  80
Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys
            100                 105                 110
Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
        115                 120                 125
Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140
Gly Ser Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
145                 150                 155                 160
Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
                165                 170                 175
```

Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
180 185 190
Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn
195 200 205
Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser
210 215 220
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val
225 230 235 240
Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr
245 250 255
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
260 265 270

<210> 13
<211> 259
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(259)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD37 SCFV

<400> 13
Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15
Gly Gly Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
20 25 30
Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn
35 40 45
Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
50 55 60
Gln Leu Leu Val Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser
100 105 110
Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ala
130 135 140
Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala Ser
145 150 155 160
Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
165 170 175
Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
180 185 190
Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
195 200 205
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
210 215 220
Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
225 230 235 240
Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
245 250 255
Val Ser Ser

<210> 14
<211> 272
<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(272)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD22 SCFV

<400> 14
Met Glu Ser His Ser Gln Val Phe Leu Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15
Gly Thr Cys Gly Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30
Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45
Val Phe Tyr Ser Ser Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val His Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys His Gln Phe Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val
145 150 155 160
Lys Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
165 170 175
Phe Thr Asn Tyr Trp Met Val Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Glu Gly
180 185 190
Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Ile Pro Ser Asn Gly Arg Thr Lys Tyr
195 200 205
Asn Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
210 215 220
Arg Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala
225 230 235 240
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Met Ser Ile Ile Thr Thr Val Leu Thr
245 250 255
Pro Gly Leu Leu Thr Gly Ala Lys Gly Leu Trp Ser Leu Ser Leu Gln
260 265 270

<210> 15
<211> 499
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MOUSE-HUMAN HYBRID FUSION PROTEIN

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(265)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV: 2H7

<220>
<221> DOMAIN
<222> (266)..(499)
<223> HUMAN IGG1 WILD TYPE HINGE, CH2, CH3 FC

<400> 15

```
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1               5                  10                  15
Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
            20                  25                  30
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
        35                  40                  45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
    50                  55                  60
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65                  70                  75                  80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
                85                  90                  95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
            100                 105                 110
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
        115                 120                 125
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
    130                 135                 140
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
145                 150                 155                 160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
                165                 170                 175
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
            180                 185                 190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
        195                 200                 205
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
    210                 215                 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225                 230                 235                 240
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
                245                 250                 255
Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Cys
            260                 265                 270
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
        275                 280                 285
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
    290                 295                 300
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305                 310                 315                 320
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
                325                 330                 335
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
            340                 345                 350
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
        355                 360                 365
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
    370                 375                 380
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385                 390                 395                 400
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
                405                 410                 415
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
            420                 425                 430
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
        435                 440                 445
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
    450                 455                 460
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465                 470                 475                 480
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
                485                 490                 495
```

Pro Gly Lys

<210> 16
<211> 499
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MOUSE-HUMAN HYBRID FUSION PROTEIN

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(265)
<223> 2H7 SCFV TARGETED TO HUMAN CD20

<220>
<221> DOMAIN
<222> (265)..(499)
<223> HINGE CYSTEINES MUTATED TO SERINES (AMINO ACIDS 272, 278, 281)
PROLINE IN CH2 MUTATED TO SERINE (AMINO ACID 290)

<400> 16

Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser
1				5					10					15	
Val	Ile	Ile	Ala	Arg	Gly	Gln	Ile	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile
			20					25					30		
Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser
		35					40					45			
Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser
	50					55					60				
Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
65					70					75					80
Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile
				85					90					95	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
			100					105					110		
Ser	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys
		115					120					125			
Asp	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser
	130					135					140				
Gln	Ala	Tyr	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala
145					150					155					160
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
				165					170					175	
Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Arg	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			180					185					190		
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
		195					200					205			
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
	210					215					220				
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
225					230					235					240
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp
				245					250					255	
Gly	Thr	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Asp	Gln	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser
			260					265					270		
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
		275					280					285			
Gly	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
	290					295					300				
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His

305 310 315 320
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495
Pro Gly Lys

<210> 17
<211> 499
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MOUSE-HUMAN HYBRID FUSION PROTEIN

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(265)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV: 2H7

<220>
<221> DOMAIN
<222> (266)..(499)
<223> HINGE CYSTEINES MUTATED TO SERINES (AMINO ACIDS 272, 278, 281)
CH2 AND CH3 DOMAINS ARE WILD TYPE IN SEQUENCE

<400> 17
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

```
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
    130                 135                 140
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
145                 150                 155                 160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
                165                 170                 175
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
            180                 185                 190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
        195                 200                 205
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
    210                 215                 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225                 230                 235                 240
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
                245                 250                 255
Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser
            260                 265                 270
Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
        275                 280                 285
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
    290                 295                 300
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305                 310                 315                 320
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
                325                 330                 335
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
            340                 345                 350
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
        355                 360                 365
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
    370                 375                 380
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385                 390                 395                 400
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
                405                 410                 415
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
            420                 425                 430
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
        435                 440                 445
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
    450                 455                 460
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465                 470                 475                 480
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
                485                 490                 495
Pro Gly Lys
```

<210> 18
<211> 505
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MOUSE-HUMAN FUSION PROTEIN

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(265)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV: 2H7

<220>
<221> DOMAIN
<222> (266)..(288)
<223> WILD TYPE IGA HINGE

<220>
<221> DOMAIN
<222> (289)..(505)
<223> HUMAN IGG1 CH2 AND CH3 DOMAINS, WILD TYPE SEQUENCE

<400> 18

```
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1               5                  10                  15
Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
            20                  25                  30
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
        35                  40                  45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
    50                  55                  60
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65                  70                  75                  80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
                85                  90                  95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
            100                 105                 110
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
        115                 120                 125
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
    130                 135                 140
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
145                 150                 155                 160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
                165                 170                 175
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
            180                 185                 190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
        195                 200                 205
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
    210                 215                 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225                 230                 235                 240
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
                245                 250                 255
Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Pro Val Pro Ser Thr
            260                 265                 270
Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys
        275                 280                 285
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
    290                 295                 300
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
305                 310                 315                 320
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
                325                 330                 335
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
            340                 345                 350
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
        355                 360                 365
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
    370                 375                 380
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
385                 390                 395                 400
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
```

405 410 415
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
420 425 430
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
435 440 445
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
450 455 460
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
465 470 475 480
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
485 490 495
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

<210> 19
<211> 234
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(234)
<223> MUTANT IGG1 HINGE (AMINO ACIDS 7, 13, 16)
WILD TYPE CH2 AND CH3 DOMAINS
ALTERNATIVE CARBOXY TERMINUS OF SCFVIG FUSION PROTEINS

<400> 19
Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser
1 5 10 15
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
20 25 30
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
35 40 45
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
50 55 60
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
65 70 75 80
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
85 90 95
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
100 105 110
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
115 120 125
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
130 135 140
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
145 150 155 160
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
165 170 175
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
180 185 190
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
195 200 205
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
210 215 220
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 20
<211> 240
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(23)
<223> ALTERNATIVE CARBOXY TERMINUS OF SCFVIG FUSION PROTEINS

<220>
<221> DOMAIN
<222> (24)..(240)
<223> HUMAN IGG1 WILD TYPE CH2 AND CH3 FC

<400> 20
Asp Gln Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro
1 5 10 15
Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
20 25 30
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
35 40 45
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
50 55 60
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
65 70 75 80
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
85 90 95
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
100 105 110
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
115 120 125
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
130 135 140
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
145 150 155 160
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
165 170 175
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
180 185 190
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
195 200 205
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
210 215 220
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230 235 240

<210> 21
<211> 1470
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MOUSE-HUMAN HYBRID

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(808)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV

<220>
<221> misc_feature
<222> (814)..(1455)
<223> HUMAN EXTRACELLULAR DOMAIN LONG FORM, CD154

<400> 21
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60
gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
ccagggagaa aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
taccagcaga agccaggatc ctccccaaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240
tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300
agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420
ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagctggtg 480
aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720
gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat ccaagaaaca gctttgaaat gcaaaaaggt 840
aggaatcttc atgaagattt tgtattcatg aaaacgatac agagatgcaa cacaggagaa 900
agatccttat ccttactgaa ctgtgaggag attaaaagcc agtttgaagg ctttgtgaag 960
gatataatgt taaacaaaga ggagacgaag aaagaaaaca gctttgaaat gcaaaaaggt 1020
gatcagaatc ctcaaattgc ggcacatgtc ataagtgagg ccagcagtaa aacaacatct 1080
gtgttacagt gggctgaaaa aggatactac accatgagca acaacttggt aaccctggaa 1140
aatgggaaac agctgaccgt taaaagacaa ggactctatt atatctatgc ccaagtcacc 1200
ttctgttcca atcgggaagc ttcgagtcaa gctccattta tagccagcct ctgcctaaag 1260
tccccggta gattcgagag aatcttactc agagctgcaa atacccacag ttccgccaaa 1320
ccttgcgggc aacaatccat tcacttggga ggagtatttg aattgcaacc aggtgcttcg 1380
gtgtttgtca atgtgactga tccaagccaa gtgagccatg gcactggctt cacgtccttt 1440
ggcttactca aactcgagtg ataatctaga 1470

<210> 22
<211> 1290
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MOUSE-HUMAN HYBRID

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(808)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV

<220>

<221> misc_feature
<222> (814)..(1275)
<223> HUMAN EXTRACELLULAR DOMAIN, SHORT FORM, CD154

<400> 22
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60
gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
ccagggagaa aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
taccagcaga agccaggatc ctccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240
tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300
agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420
ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagctggtg 480
aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720
gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat ccagaaaaca gctttgaaat gcaaaaaggt 840

gatcagaatc ctcaaattgc ggcacatgtc ataagtgagg ccagcagtaa aacaacatct 900
gtgttacagt gggctgaaaa aggatactac accatgagca acaacttggt aaccctggaa 960
aatgggaaac agctgaccgt taaaagacaa ggactctatt atatctatgc ccaagtcacc 1020
ttctgttcca atcgggaagc ttcgagtcaa gctccatttta tagccagcct ctgcctaaag 1080
tccccgggta gattcgagag aatcttactc agagctgcaa atacccacag ttccgccaaa 1140
ccttgcgggc aacaatccat tcacttggga ggagtatttg aattgcaacc aggtgcttcg 1200
gtgtttgtca atgtgactga tccaagccaa gtgagccatg gcactggctt cacgtccttt 1260
ggcttactca aactcgagtg ataatctaga 1290

<210> 23
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 23
gtcaagcttg ccgccatgga ttttcaagtg cagatttttc agc 43

<210> 24
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 24
gtcgtcgagc tcccacctcc tccagatcca ccaccgccag agccaccgcc acctttcagc 60
tccagcttgg tccc 74

<210> 25
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 25
gctgctgagc tctcaggctt atctacagca agtctgg 37

<210> 26
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 26
gttgtctgat cagagacggt gaccgtggtc cc 32

<210> 27
<211> 34

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 27
gttgtcggat ccagaaaaca gctttgaaat gcaa 34

<210> 28
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 28
gttgtttcta gattatcact cgagtttgag taagccaaag gacg 44

<210> 29
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 29
gttgtcggat ccaagaaggt tggacaagat agaag 35

<210> 30
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 30
gtctatataa gcagagctct ggc 23

<210> 31
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 31
cgaggctgat cagcgagctc tagca 25

<210> 32
<211> 25
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 32
ccgcaatttg aggattctga tcacc 25

<210> 33
<211> 482
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MOUSE-HUMAN HYBRID FUSION PROTEIN

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(266)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV

<220>
<221> DOMAIN
<222> (268)..(481)
<223> EXTRACELLULAR DOMAIN, LONG FORM, HUMAN CD154

<400> 33
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
130 135 140
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
145 150 155 160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
180 185 190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
195 200 205
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
210 215 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225 230 235 240
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255
Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Pro Arg Arg Leu Asp Lys
260 265 270

```
Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val Phe Met Lys Thr
        275                 280                 285
Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser Leu Leu Asn Cys
    290                 295                 300
Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys Asp Ile Met Leu
305                 310                 315                 320
Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu Met Gln Lys Gly
                325                 330                 335
Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser
            340                 345                 350
Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met
        355                 360                 365
Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys
    370                 375                 380
Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn
385                 390                 395                 400
Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys
                405                 410                 415
Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His
            420                 425                 430
Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val
        435                 440                 445
Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro
    450                 455                 460
Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys
465                 470                 475                 480
Leu Glu
```

<210> 34
<211> 422
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MOUSE-HUMAN HYBRID FUSION PROTEIN

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(266)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN SCFV

<220>
<221> DOMAIN
<222> (268)..(421)
<223> EXTRACELLULAR DOMAIN, SHORT FORM, HUMAN CD154

<400> 34

```
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1               5                   10                  15
Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
            20                  25                  30
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
        35                  40                  45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
    50                  55                  60
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65                  70                  75                  80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
                85                  90                  95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
            100                 105                 110
```

```
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
        115                 120                 125
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
    130                 135                 140
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
145                 150                 155                 160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
                165                 170                 175
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
            180                 185                 190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
        195                 200                 205
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
    210                 215                 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
225                 230                 235                 240
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
                245                 250                 255
Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Pro Glu Asn Ser Phe Glu
            260                 265                 270
Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
        275                 280                 285
Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
    290                 295                 300
Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
305                 310                 315                 320
Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
                325                 330                 335
Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
            340                 345                 350
Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
        355                 360                 365
Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
    370                 375                 380
Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
385                 390                 395                 400
Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
                405                 410                 415
Gly Leu Leu Lys Leu Glu
            420
```

<210> 35
<211> 63
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> N_region
<222> (1)..(63)
<223> PORTION OF HUMAN IGA HINGE DOMAIN CONTAINING ONLY 1 CYSTEINE

<400> 35
ccagttccct caactccacc taccccatct ccctcaactc cacctacccc atctccctca 60
tgc 63

<210> 36
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr
1 5 10 15
Pro Ser Pro Ser Cys
20

<210> 37
<211> 763
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(6)
<223> BCLI SITE FOR FUSION TO AMIN TERMINAL SCFVS

<220>
<221> N_region
<222> (8)..(752)
<223> WILD TYPE IGA HINGE, CH2, CH3 DOMAINS
TRUNCATED TO REMOVE SECRETORY COMPONENT ATTACHMENT

<400> 37
tgatcagcca gttccctcaa ctccacctac cccatctccc tcaactccac ctaccccatc 60
tccctcatgc tgccaccccc gactgtcact gcaccgaccg gccctcgagg acctgctctt 120
aggttcagaa gcgatcctca cgtgcacact gaccggcctg agagatgcct caggtgtcac 180
cttcacctgg acgccctcaa gtgggaagag cgctgttcaa ggaccacctg accgtgacct 240
ctgtggctgc tacagcgtgt ccagtgtcct gccgggctgt gccgagccat ggaaccatgg 300
gaagaccttc acttgcactg ctgcctaccc cgagtccaag acccccgctaa ccgccaccct 360
ctcaaaatcc ggaaacacat tccggcccga ggtccacctg ctgccgccgc cgtcggagga 420
gctggccctg aacgagctgg tgacgctgac gtgcctggca cgtggcttca gccccaagga 480
tgtgctggtt cgctggctgc aggggtcaca ggagctgccc cgcgagaagt acctgacttg 540
ggcatcccgg caggagccca gccagggcac caccaccttc gctgtgacca gcatactgcg 600
cgtggcagcc gaggactgga agaaggggga caccttctcc tgcatggtgg gccacgaggc 660
cctgccgctg gccttcacac agaagaccat cgaccgcttg gcgggtaaac ccacccatgt 720
caatgtgtct gttgtcatgg cggaggtgga ctgataatct aga 763

<210> 38
<211> 250
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> DOMAIN
<222> (3)..(250)
<223> TRUNCATED FORM, REMOVAL OF LAST THREE AMINO ACIDS THAT MEDIATE AT
TACHMENT TO SECRETORY COMPONEN

<400> 38
Asp Gln Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro
1 5 10 15
Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg
20 25 30
Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Ile Leu Thr Cys
35 40 45
Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr
50 55 60
Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Asp Arg Asp Leu
65 70 75 80
Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro
85 90 95

```
Trp Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser
            100                 105                 110
Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg
        115                 120                 125
Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn
    130                 135                 140
Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp
145                 150                 155                 160
Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys
                165                 170                 175
Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr
            180                 185                 190
Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys
        195                 200                 205
Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala
    210                 215                 220
Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His Val
225                 230                 235                 240
Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp
                245                 250
```

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/01487

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 39/395; C07H 21/04; C07K 16/44; C12N 15/13, 5/10, 15/00
US CL :Please See Extra Sheet.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 536/23.53, 23.5; 530/387.3, 867; 435/320.1, 325, 69.6; 424/133.1, 135.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WEST 2.0, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS, search terms: inventor names, hinge region, mutat?, mutant?, cys, cysteine, immunoglobulin, ig

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,876,950 A (SIADAK et al.) 02 March 1999, see entire document.	1-22
Y	US 5,807,734 A (DIEGEL et al.) 15 September 1998, see entire document.	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 APRIL 2002	09 MAY 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231	Authorized officer RON SCHWADRON
Facsimile No. (703) 305-3230	Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)★

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/01487

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

536/23.53, 23.5; 530/387.3, 867; 435/320.1, 325, 69.6; 424/133.1, 155.1

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1998)★

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 25/00	Ａ６１Ｐ 29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ 29/00	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 37/06		
Ａ６１Ｐ 37/06	Ｃ０７Ｋ 16/42		
Ｃ０７Ｋ 16/42	Ｃ０７Ｋ 19/00		
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ	
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ａ６１Ｋ 37/04		
Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ｂ	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100072730
弁理士 小島 一晃
(72)発明者 ジェフリー・エイ・レッドベター
アメリカ合衆国９８１７７ワシントン州ショアライン、リッジフィールド・ロード・ノース・ウエスト１８７９８番
(72)発明者 マーサ・ヘイデン－レッドベター
アメリカ合衆国９８１７７ワシントン州ショアライン、リッジフィールド・ロード・ノース・ウエスト１８７９８番

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA61 BA80 CA04 CA07 CA11 DA02 EA04 GA14 HA01 HA03 HA14
4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01
4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 BA03 CA24 CA44
4C084 AA02 AA07 BA03 BA44 DA39 ZA02 ZA94 ZA96 ZB02 ZB15 ZB26 ZC06 ZC35
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA13 BA41 CA40 DA76 EA22 EA28 FA74 GA15 GA26