

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-90567
(P2018-90567A)

(43) 公開日 平成30年6月14日(2018.6.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/44 (2006.01)	C07K 16/44 ZNA	4B064
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B065
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 N	4C085
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4H045
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	

審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-220802 (P2017-220802)
 (22) 出願日 平成29年11月16日 (2017.11.16)
 (62) 分割の表示 特願2015-519221 (P2015-519221) の分割
 原出願日 平成25年7月4日 (2013.7.4)
 (31) 優先権主張番号 12174957.6
 (32) 優先日 平成24年7月4日 (2012.7.4)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラッセ124
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

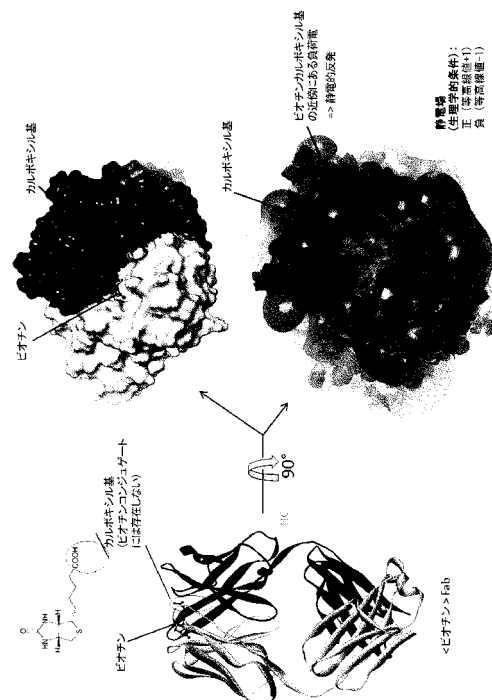
(54) 【発明の名称】 抗ビオチン抗体および使用方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 抗体が診断剤および/または治療剤としてビオチンのターゲティングに役立つように、十分な親和性でビオチンと結合する能力を有する、抗ビオチン抗体および抗ビオチン誘導体抗体の提供。

【解決手段】 特定のアミノ酸の配列を含む重鎖または軽鎖の超可変領域 (HVR) を含む、ヒト化抗ビオチン抗体、該抗体のモノクローナル抗体またはビオチンと結合する抗体フラグメント、該抗体と薬学的に許容される担体とを含む薬学的製剤、および該抗体の使用方法。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(b) SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むHVR-L3、および(c) SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む、ヒト化抗ビオチン抗体。

【請求項 2】

(a) SEQ ID NO:09のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c) SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

(a) SEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b) SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c) SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 4】

Kabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの24位にアミノ酸残基セリンを含み、かつ/またはKabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの73位にアミノ酸残基スレオニンを含むことを特徴とする、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

Kabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの60位にアミノ酸残基アラニンを含み、かつKabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの61位にアミノ酸残基グルタミンを含むことを特徴とする、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

(a) SEQ ID NO:12のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVH配列、

(b) SEQ ID NO:16のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVL配列、または

(c) (a)のVH配列および(b)のVL配列を含む抗体であって、Kabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの24位のアミノ酸残基がセリンであり、かつ/またはKabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの73位のアミノ酸残基がスレオニンである、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

SEQ ID NO:12のVH配列を含む、請求項4に記載の抗体。

【請求項 8】

SEQ ID NO:16のVL配列を含む、請求項4または7のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 9】

SEQ ID NO:12のVH配列およびSEQ ID NO:16のVL配列を含む、抗体。

【請求項 10】

完全長IgG1抗体または完全長IgG4抗体である、請求項1に記載の抗体。

【請求項 11】

モノクローナル抗体である、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 12】

ビオチンと結合する抗体フラグメントである、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 13】

前記請求項のいずれか一項に記載の抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的製剤。

【請求項 14】

医薬として使用するための、請求項1~12のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 15】

医薬の製造における請求項1~12のいずれか一項に記載の抗体の使用。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は抗ビオチン抗体および抗ビオチン誘導体抗体ならびにそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

ハプテン結合性抗体は、治療的応用および診断的応用に、捕捉モジュールとして応用することができる。例えば、フルオロフォア、キレート試薬、ペプチド、核酸、タンパク質、脂質、ナノ粒子、および他の多くの作用物質などのハプテン結合実体は、ハプテン結合性の抗体および抗体誘導体と反応することができる。これにより、そのような「ペイロード (payload)」の効果的検出、ならびに捕捉、所望の場所における蓄積、架橋および他の抗体媒介効果が可能になる。ハプテンの特徴および組成はハプテン結合実体の組成および「挙動」(サイズ、溶解度、活性、生物物理学的特性、PK、生物学的効果その他を含む)に影響を及ぼしうるので、多種多様なハプテン結合性実体を開発することが、極めて望ましい。それにより、選択したハプテンを所与のペイロードと対応させて、最適化されたハプテンコンジュゲートを生成することが可能になる。次に、最適なハプテン結合性実体を、該コンジュゲートと組み合わせ、最適な抗体-ハプテン-ペイロード複合体を生成することができる。ヒト化された抗体誘導体などのハプテン結合性実体があることは、さらに望ましい。これにより、治療的応用における免疫原性などといった干渉のリスクを著しく低減した応用が可能になる。本明細書に記載する抗体はビオチン誘導体と結合する(しかし、無修飾ビオチンとは結合しない)。これらの抗体をこの文書では「ビオチン結合性」または「抗ビオチン」抗体と呼ぶ。

10

20

【0003】

WO 00/50088 (特許文献1)にはビオチン化ケモカイン抗体複合体が報告されている。

【0004】

Kohen, F., et al., (Methods Enzymol. 279 (1997) 451-463) (非特許文献1)は、抗ビオチン抗体の調製および特性を報告している。Bagci, H., et al., (FEBS Lett. 322 (1993) 47-50) (非特許文献2)は、モノクローナル抗ビオチン抗体がビオチンの認識においてアビジンをまねることを報告している。Cao, Y., et al., (J. Immunol. Meth. 220 (1998) 85-91) (非特許文献3)は、ビオチン化高分子を検出するための汎用イムノプローブ (immunoprobe) としての二重特異性モノクローナル抗体の開発を報告している。

30

【0005】

WO 01/34651 (特許文献2)には、非天然エナンチオマー (L-ビオチン) と結合する抗体と、ターゲティング剤としてのそれらの使用が報告されている。

【0006】

Dakshinamurti et al. (Biochem. J. 237 (1986) 477-482) (非特許文献4)は、ビオチンに対するモノクローナル抗体の作製と特徴付けを報告している。抗ビオチンモノクローナル抗体およびストレプトアビジンに対するビオチンおよびビオチン化高分子リガンドの結合の比較が、Vincent, P., et al., (J. Immunol. Meth. 165 (1993) 177-182) (非特許文献5)によって報告されている。Berger, M., et al. (Biochem. 14 (1975) 2338-2342) (非特許文献6)は、ビオチンと結合しビオチン含有酵素を阻害する抗体の作製を報告している。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】WO 00/50088

【特許文献2】WO 01/34651

50

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Kohen, F., et al., (Methods Enzymol. 279 (1997) 451-463)

【非特許文献2】Bagci, H., et al., (FEBS Lett. 322 (1993) 47-50)

【非特許文献3】Cao, Y., et al., (J. Immunol. Meth. 220 (1998) 85-91)

【非特許文献4】Dakshinamurti et al. (Biochem. J. 237 (1986) 477-482)

【非特許文献5】Vincent, P., et al., (J. Immunol. Meth. 165 (1993) 177-182)

【非特許文献6】Berger, M., et al. (Biochem. 14 (1975) 2338-2342)

【発明の概要】

【0009】

10

概要

本発明は、抗ビオチン抗体および抗ビオチン誘導体抗体ならびにそれらを使用する方法を提供する。

【0010】

本明細書において報告する一局面は、(a) SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(b) SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むHVR-L3、および(c) SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含むヒト化抗ビオチン抗体である。この抗体はビオチンに特異的に結合する。

【0011】

一態様では、抗体がさらに、(a) SEQ ID NO:09のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c) SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

20

【0012】

一態様では、抗体がさらに、(a) SEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b) SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c) SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0013】

一態様では、抗体が、Kabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの24位にアミノ酸残基セリンを含み、かつ/またはKabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの73位にアミノ酸残基スレオニンを含む。

30

【0014】

一態様では、抗体が、Kabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの60位にアミノ酸残基アラニンを含み、かつKabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの61位にアミノ酸残基グルタミンを含む。

【0015】

一態様では、抗体が、(1) Kabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの24位にアミノ酸残基セリンを含み、かつ/またはKabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの73位にアミノ酸残基スレオニンを含み、(2) Kabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの60位にアミノ酸残基アラニンを含み、かつ(3) Kabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの61位にアミノ酸残基グルタミンを含む。

40

【0016】

一態様では、抗体が、(a) SEQ ID NO:12のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVH配列、(b) SEQ ID NO:16のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVL配列、または(c) (a)のVH配列および(b)のVL配列を含み、Kabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの24位のアミノ酸残基がセリンであり、かつ/またはKabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの73位のアミノ酸残基がスレオニンであり、かつKabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの60位のアミノ酸残基がアラニンであり、かつKabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの61位のアミノ酸残基がグルタミンである。

【0017】

50

一態様では、抗体がSEQ ID NO:12のVH配列を含む。

【0018】

一態様では、抗体がSEQ ID NO:16のVL配列を含む。

【0019】

本明細書において報告する一局面は、SEQ ID NO:12のVH配列およびSEQ ID NO:16のVL配列を含む抗体である。

【0020】

一態様では、抗体が完全長IgG1抗体または完全長IgG4抗体である。

【0021】

一態様では、抗体がモノクローナル抗体である。

10

【0022】

一態様では、抗体がビオチンと結合する抗体フラグメントである。

【0023】

本明細書において報告する一局面は、本明細書において報告する抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的製剤である。

【0024】

本明細書において報告する一局面は、医薬として使用するための、本明細書において報告する抗体である。

【0025】

本明細書において報告する一局面は、医薬の製造における、本明細書において報告する抗体の使用である。

20

[本発明1001]

(a) SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(b) SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むHVR-L3、および(c) SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む、ヒト化抗ビオチン抗体。

[本発明1002]

(a) SEQ ID NO:09のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c) SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、本発明1001の抗体。

[本発明1003]

(a) SEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b) SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c) SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、前記本発明のいずれかの抗体。

30

[本発明1004]

Kabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの24位にアミノ酸残基セリンを含み、かつ/またはKabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの73位にアミノ酸残基スレオニンを含むことを特徴とする、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1005]

Kabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの60位にアミノ酸残基アラニンを含み、かつKabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの61位にアミノ酸残基グルタミンを含むことを特徴とする、前記本発明のいずれかの抗体。

40

[本発明1006]

(a) SEQ ID NO:12のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVH配列、

(b) SEQ ID NO:16のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVL配列、または

(c) (a)のVH配列および(b)のVL配列

を含む抗体であって、Kabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの24位のアミノ酸残基がセリンであり、かつ/またはKabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの73位のアミノ酸残基がスレオニンである、前記本発明のいずれかの抗体。

50

[本発明1007]

SEQ ID NO:12のVH配列を含む、本発明1004の抗体。

[本発明1008]

SEQ ID NO:16のVL配列を含む、本発明1004または1007のいずれかの抗体。

[本発明1009]

SEQ ID NO:12のVH配列およびSEQ ID NO:16のVL配列を含む、抗体。

[本発明1010]

完全長IgG1抗体または完全長IgG4抗体である、本発明1001の抗体。

[本発明1011]

モノクローナル抗体である、前記本発明のいずれかの抗体。

10

[本発明1012]

ビオチンと結合する抗体フラグメントである、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1013]

前記本発明のいずれかの抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的製剤。

[本発明1014]

医薬として使用するための、本発明1001～1012のいずれかの抗体。

[本発明1015]

医薬の製造における本発明1001～1012のいずれかの抗体の使用。

【図面の簡単な説明】

【0026】

20

【図1】共有結合的ペイロードカップリングのためのcys変異を有する、およびcys変異を有しない、ビオチンおよびビオチン誘導体と結合するヒト化抗体の発現。還元および非還元SDS PAGEが、プロテインAおよびSECによる精製後のヒト化抗体の組成および均一性を示している。どちらの抗体誘導体のSEC精製画分にも、抗体のH鎖（50kにある上側のバンド）およびL鎖（25kにある下側のバンド）をユニークバンドとして検出することができ、目に見える量の他のタンパク質夾雑物は存在しない。

【図2】ビオシチンアミド（biocytinamid）との複合体を形成しているマウス抗ビオチン抗体Fabフラグメントのタンパク質構造を決定した。複合体を形成したハプテンは、負に荷電したアミノ酸のクラスターに近接している。ビオチンは、ハプテンとしてペイロードカップリングのためにそのカルボキシル基で誘導体化されており、これは、（COOH基を欠くので）その位置における電荷反発がないことから、効率よく結合する。これに対し、遊離の（普通の）ビオチンは、そのカルボキシル基がこの負電荷クラスターに近接することで反発が起きることから、抗体に効率よく結合することができない。

30

【発明を実施するための形態】

【0027】

発明の態様の詳細な説明

I. 定義

本明細書に関して「アクセプターヒトフレームワーク」とは、以下に定義するヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する軽鎖可変ドメイン（VL）フレームワークまたは重鎖可変ドメイン（VH）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、それと同じアミノ酸配列を含むか、またはアミノ酸配列変化を含有しうる。いくつかの態様では、アミノ酸変化の数が10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、または2以下である。いくつかの態様では、VLアクセプターヒトフレームワークの配列が、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と同一である。

40

【0028】

「親和性」は、ある分子（例えば抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば抗原）との間の非共有結合的相互作用の総和の強さを指す。別段の表示がある場合を除き

50

、本明細書でいう「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば抗体と抗原）間の1:1相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Xのその結合パートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数（Kd）によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載するものを含む、当技術分野において公知の一般的方法によって測定することができる。結合親和性の測定に関して、説明的かつ例示的な具体的態様を、以下に記載する。

【0029】

「親和性成熟」抗体は、該当する改変を持たない親抗体と比較して、1つまたは複数の超可変領域（HVR）に1つまたは複数の改変を有する抗体であって、当該改変が抗原に対する抗体の親和性の改良をもたらしているものを指す。

【0030】

用語「抗ビオチン抗体」および「ビオチンに結合する抗体」は、抗体が診断剤および/または治療剤としてビオチンのターゲティングに役立つように、十分な親和性でビオチンと結合する能力を有する抗体を指す。一態様では、無関係な非ビオチンタンパク質に対する抗ビオチン抗体の結合の程度が、例えばラジオイムノアッセイ（RIA）で測定した場合に、ビオチンへの抗体の結合の約10%未満である。一定の態様では、ビオチンに結合する抗体が、1 μ M、100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM、または0.001nM（例えば10⁻⁸M以下、例えば10⁻⁸M~10⁻¹³M、例えば10⁻⁹M~10⁻¹³M）の解離定数（Kd）を有する。

【0031】

本明細書において用語「抗体」は最も広い意味で使用され、さまざまな抗体構造、例えば限定するわけではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、および抗体フラグメントなどを、それらが所望の抗原結合活性を呈する限り包含する。

【0032】

「抗体フラグメント」は、無傷の抗体のうち、無傷の抗体が結合する抗原と結合する部分を含む、無傷の抗体以外の分子を指す。抗体フラグメントの例には、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ダイアボディ；線状抗体；単鎖抗体分子（例えばscFv）；および抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体などがあるが、それらに限定されるわけではない。

【0033】

参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」とは、競合アッセイにおいて参照抗体がその抗原に結合するのを50%以上阻止する抗体を指し、逆に参照抗体は競合アッセイにおいて抗体がその抗原に結合するのを50%以上阻止する。例示的な競合アッセイは本明細書に掲載する。

【0034】

用語「キメラ」抗体は、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の供給源または種に由来し、同時に重鎖および/または軽鎖の残りの部分が異なる供給源または種に由来する抗体を指す。

【0035】

抗体の「クラス」は、その重鎖が持つ定常ドメインまたは定常領域のタイプを指す。抗体の主要クラスには、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMの5つがあり、これらのうちのいくつかは、さらにサブクラス（アイソタイプ）に、例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、およびIgA₂に分けることができる。異なる免疫グロブリンクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 、 、 、 および μ と呼ばれる。

【0036】

本明細書において使用する用語「細胞毒性作用物質」は、細胞の機能を阻害もしくは防止し、かつ/または細胞死もしくは細胞破壊を引き起こす物質を指す。細胞毒性作用物質には、放射性同位体（例えばAt²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²およびLuの放射性同位体）；化学療法剤または化学療法薬（例えばメトトレキサート、アドリアマイシン（adriamycin）、ピンカアルカロイド（ピンクリスチン、ピンブ

10

20

30

40

50

ラスチン、エトポシド)、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピシンまたは他の挿入剤);成長阻害剤;酵素およびそのフラグメント、例えば核酸分解酵素;抗生物質;毒素、例えば低分子毒素または細菌、真菌、植物もしくは動物由来の酵素的に活性な毒素(そのフラグメントおよび/または変種を含む);および以下に開示するさまざまな抗腫瘍または抗がん剤などがあるが、それらに限定されるわけではない。

【0037】

「エフェクター機能」は、抗体のFc領域に帰することができる生物学的活性を指し、それは抗体クラスによって異なる。抗体エフェクター機能の例には、C1q結合および補体依存性細胞傷害(CDC);Fc受容体結合;抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC);貪食;細胞表面受容体(例えばB細胞受容体)のダウンレギュレーション;およびB細胞活性化などがある。

10

【0038】

薬剤、例えば薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療的または予防的結果を達成するのに有効な量、それを達成するのに必要な投薬量および期間を指す。

【0039】

本明細書において「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部分を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を規定するために使用される。この用語にはネイティブ配列Fc領域および変種Fc領域が含まれる。一態様では、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226またはPro230から重鎖のカルボキシル末端に及ぶ。ただし、Fc領域のC末端リジン(Lys447)は存在しても存在しなくてもよい。本明細書において別段の明示がある場合を除き、Fc領域または定常領域におけるアミノ酸残基のナンバリングは、Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242に記載されているEUナンバリングシステム(EUインデックスとも呼ばれる)に従う。

20

【0040】

「フレームワーク」または「FR」とは、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般的には、4つのFRドメイン、すなわちFR1、FR2、FR3、およびFR4からなる。したがって、HVR配列およびFR配列は、一般的には、VH(またはVL)中に、次の順序で見いだされる:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

30

【0041】

用語「完全長抗体」、「無傷の抗体」、および「全抗体」は、本明細書では、ネイティブ抗体の構造に実質的に類似する構造を有するか、または本明細書に定義するFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指すために、可換的に使用される。

【0042】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」および「宿主細胞培養」は可換的に使用され、外因性核酸が導入されている細胞を指し、そのような細胞の子孫も含まれる。宿主細胞には「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれ、これらには初代形質転換細胞とそこから派生する子孫とが継代数を問わずに含まれる。子孫は、核酸内容物が親細胞と完全には同一でなくて、変異を含有するかもしれない。最初に形質転換された細胞において選別または選択されたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫は、ここに含まれる。

40

【0043】

「ヒト抗体」は、ヒトまたはヒト細胞によって生産される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列、またはヒト抗体レパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を利用した非ヒト供給源に由来する抗体に対応するアミノ酸配列を持つものである。ヒト抗体のこの定義からは、非ヒト抗原結合性残基を含むヒト化抗体は特に除外される。

【0044】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVLまたはVHフレームワーク配列の選択に際して最もよく見いだされるアミノ酸残基に相当するフレームワークであ

50

る。一般に、ヒト免疫グロブリンVLまたはVH配列の選択は可変ドメイン配列のサブグループからなされる。一般に、配列のサブグループはKabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols.1-3に記載のサブグループである。一態様において、VLについては、サブグループが前記Kabat et alに記載のサブグループ・カップIである。一態様において、VHについては、サブグループが前記Kabat et alに記載のサブグループIIIである。

【0045】

「ヒト化」抗体とは、非ヒトHVRからのアミノ酸残基とヒトFRからのアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を指す。一定の態様においては、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、そのHVR（例えばCDR）の全てまたは実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、FRの全てまたは実質的に全てがヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含みうる。抗体（例えば非ヒト抗体）の「ヒト化型」とは、ヒト化を受けた抗体を指す。

10

【0046】

本明細書において使用する用語「超可変領域」または「HVR」は、配列が超可変的であり、かつ/または構造上明確なループ（「超可変ループ」）を形成する抗体可変ドメインの領域のそれぞれを指す。一般に、ネイティブな四本鎖抗体は6つのHVRを含み、3つはVH（H1、H2、H3）中にあり、3つはVL（L1、L2、L3）中にある。HVRは、一般に、超可変ループおよび/または「相補性決定領域」（CDR）からのアミノ酸残基を含み、後者は最も高い配列可変性を有し、かつ/または抗原認識に関与する。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基26～32（L1）、50～52（L2）、91～96（L3）、26～32（H1）、53～55（H2）、および96～101（H3）に見いだされる（Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917）。例示的なCDR（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3）は、L1のアミノ酸残基24～34、L2の50～56、L3の89～97、H1の31～35B、H2の50～65、およびH3の95～102に見いだされる（Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242）。VH中のCDR1を除けば、CDRは、一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRは、抗原と接触する残基である「特異性決定残基」または「SDR」も含む。SDRは、短縮CDR（abbreviated-CDR）またはa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に含有される。例示的なa-CDR（a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、およびa-CDR-H3）は、L1のアミノ酸残基31～34、L2の50～55、L3の89～96、H1の31～35B、H2の50～58、およびH3の95～102に見いだされる（Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633参照）。別段の表示がある場合を除き、HVR残基および可変ドメイン中の他の残基（例えばFR残基）は、本明細書では、前記Kabat et al.に従ってナンバリングされる。

20

30

【0047】

「イムノコンジュゲート」は、例えば限定するわけではないが細胞毒性作用物質などの1つまたは複数の異種分子にコンジュゲートされた抗体である。

40

【0048】

「個体」または「対象」は哺乳動物である。哺乳動物には、家畜（例えばウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ）、霊長類（例えばヒトおよびサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、および齧歯類（例えばマウスおよびラット）が含まれるが、それらに限定されるわけではない。一定の態様では、個体または対象がヒトである。

【0049】

「単離された」抗体とは、その自然環境の構成要素から分離されたものである。いくつかの態様では、抗体が、例えば電気泳動（例えばSDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフィー（例えばイオン交換または逆相HPLC）などによる決定で、95%または99%を上回る純度まで精製される。抗体純度の評価方法を概

50

観するには、例えばFlatman, S., et al., J. Chrom. B 848 (2007) 79-87を参照されたい。

【0050】

「単離された」核酸とは、その自然環境の構成要素から分離された核酸分子を指す。単離された核酸には、通常その核酸分子を含有するが、当該核酸分子が染色体外またはその自然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在している細胞に含有される核酸分子も含まれる。

【0051】

「抗ビオチン抗体をコードする単離された核酸」とは、抗体重鎖および軽鎖（またはそのフラグメント）をコードする1つまたは複数の核酸分子を指し、これには、単一のベクターまたは別々のベクター中のそのような核酸分子、および宿主細胞中の1つまたは複数の場所に存在するそのような核酸分子が含まれる。

10

【0052】

本明細書において使用する用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す。すなわち、この集団を構成する個々の抗体は、考えうる変種抗体、例えば天然の変異を含有するもの、またはモノクローナル抗体調製物の生産中に生じるもの（そのような変種は一般に微量に存在する）を除いて、同一であり、かつ/または同じエピトープと結合する。典型的には異なる決定基（エピトープ）を指向する異なる抗体が含まれるポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基を指向する。したがって「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体集団から得られるという抗体の特徴を示しているものであって、何らかの特定の方法による抗体の生産を要求していると解釈すべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、例えば限定するわけではないがハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン座位の全部または一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法など、さまざまな技法によって作製することができ、本明細書にはモノクローナル抗体を作製するためのそのような方法および他の例示的方法を記載する。

20

【0053】

「裸の抗体」とは、異種成分（例えば細胞毒性部分）または放射性標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。裸の抗体は薬学的製剤中に存在しうる。

30

【0054】

「ネイティブ抗体」とは、さまざまな構造を有する天然免疫グロブリン分子を指す。例えばネイティブIgG抗体は、ジスルフィド結合した2つの同一軽鎖および2つの同一重鎖から構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各重鎖は、N末端からC末端に向かって、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）と、それに続く3つの定常ドメイン（CH1、CH2、およびCH3）を有する。同様に、各軽鎖は、N末端からC末端に向かって、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）と、それに続く定常軽鎖（CL）ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ κ ）およびラムダ（ λ ）と呼ばれる2つのタイプの1つに割り当てることができる。

40

【0055】

「添付文書」という用語は、治療用製品の市販用梱包物に通例含まれていて、適応症、用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌および/または当該治療用製品の使用上の注意に関する情報が掲載されている、説明書を指すために使用される。

【0056】

参照ポリペプチド配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」は、最大の配列同一性パーセントが得られるように、また保存的置換を配列同一性の一部と見なさずに、配列を整列し、必要であればギャップを導入した後に、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の百分率と定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するための整列は、当技術分野の技能の範囲内にあるさまざまな方

50

法で、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign (DNASTAR) ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使って、達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大の整列を達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含めて、配列を整列するための適当なパラメータを決定することができる。ただし、本明細書における目的には、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使って、アミノ酸配列同一性%値を生成させる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはGenentech, Inc.によって作成されたものであり、米国著作権局 (Washington D.C., 20559) に利用者向け文書と共に登録申請され、米国著作権登録番号TXU510087として登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc. (カリフォルニア州サウスサンフランシスコ) から公的に入手することができるか、またはソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2プログラムはUNIXオペレーティングシステム、好ましくはdigital UNIX V4.0D上で使用するためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータはALIGN-2プログラムによって設定され、変動しない。

10

【 0 0 5 7 】

アミノ酸配列比較にALIGN-2を使用する場合、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bへの、所与のアミノ酸配列Bとの、または所与のアミノ酸配列Bに対するアミノ酸配列同一性% (これは、所与のアミノ酸配列Bに、所与のアミノ酸配列Bと、または所与のアミノ酸配列Bに対して、一定のアミノ酸配列同一性%を有する、または含む、所与のアミノ酸配列Aと、言い換えることもできる) は、次のように計算される。

分率 $X/Y \times 100$

20

ここで、Xは、配列整列プログラムALIGN-2が、そのプログラムによるAとBとの整列において、完全一致 (identical match) と記録したアミノ酸残基の数であり、YはB中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合に、Aの、Bとのアミノ酸配列同一性%が、Bの、Aとのアミノ酸配列同一性%と等しくなくなることは、理解されるであろう。別段の明言がある場合を除き、本明細書において使用するアミノ酸配列同一性%値は全て、すぐ上の段落で説明したように、ALIGN-2コンピュータプログラムを使って得られる。

【 0 0 5 8 】

「薬学的製剤」という用語は、そこに含有される活性成分の生物学的活性が有効でありうるような形態にあって、その製剤が投与されるであろう対象にとって許容できないほど毒性な追加構成要素を含有しない調製物を指す。

30

【 0 0 5 9 】

「薬学的に許容される担体」とは、対象にとって無毒性な、活性成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体には、緩衝液、賦形剤、安定剤、または保存剤などがあるが、それらに限定されるわけではない。

【 0 0 6 0 】

本明細書において使用する用語「ビオチン」は、5-[(3aS,4S,6aR)-2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル]ペンタン酸を表す。ビオチンはビタミンHまたはコエンザイムRとも呼ばれている。

【 0 0 6 1 】

40

本明細書でいう「処置」(およびその文法上の異形、例えば「処置する」または「処置すること」)は、処置される個体の自然経過を改変しようとする臨床的介入を指し、予防のために行うことも、臨床病理の過程において行うこともできる。処置の望ましい効果には、疾患の出現または再発を防止すること、症状の軽減、疾患の直接的または間接的な病理学的帰結の減縮、転移を防止すること、疾患進行の速度を減じること、疾患状態からの回復または疾患状態の緩和、および寛解、または予後の改善などがあるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様では、本発明の抗体が、疾患の発生を遅延させ、または疾患の進行を遅らせるために使用される。

【 0 0 6 2 】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗原への抗体の結合に関与する抗

50

体重鎖または軽鎖のドメインを指す。ネイティブ抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれVHおよびVL）は一般に類似する構造を有し、各ドメインは4つの保存されたフレームワーク領域（FR）と3つの超可変領域（HVR）とを含む（例えばKindt, T.J., et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), 91ページ参照）。抗原結合特異性を付与するには、単一のVHまたはVLドメインで十分でありうる。さらにまた、特定の抗原と結合する抗体は、その抗原と結合する抗体からのVHまたはVLドメインを使って、それぞれ相補的VLまたはVHドメインのライブラリーをスクリーニングすることによって、単離することができる。例えばPortolano, S., et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887, Clackson, T., et al., Nature 352 (1991) 624-628を参照されたい。

【0063】

10

本明細書において使用する用語「ベクター」は、そこに連結された別の核酸を増殖させる能力を有する核酸分子を指す。この用語には、自己複製する核酸構造としてのベクターも、それが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターも含まれる。一定のベクターは、それらが作動的に連結されている核酸の発現を指示する能力を有する。そのようなベクターを本明細書では「発現ベクター」という。

【0064】

「ハプテン」という用語は、タンパク質などの大きな担体に取り付けられた場合にのみ免疫応答を引き出しすることができる小分子を表す。例示的なハプテンは、アニリン、o-、m-、およびp-アミノ安息香酸、キノン、ヒドララジン、ハロタン、フルオレセイン、ピオチン、ジゴキシゲニン、テオフィリンおよびジニトロフェノールである。一態様では、ハプテンがピオチンまたはジゴキシゲニンまたはテオフィリンまたはカルボランである。

20

【0065】

「にコンジュゲートされたハプテン」または「ハプテン化合物」という用語は、ポリペプチドまたは標識などといった、さらなる部分に共有結合で連結されたハプテンを表す。そのようなコンジュゲートの形成には、活性化ハプテン誘導体が発発材料として使用されることが多い。一態様では、ハプテンがジゴキシゲニンであり、リンカーを介して前記部分に（一態様ではその3-ヒドロキシ基を介して）コンジュゲートされる。一態様では、リンカーが、a) 1つまたは複数（一態様では3~6個）のメチレン-カルボキシ-メチル基（ $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ ）、および/またはb) 1~10個（一態様では1~5個）のアミノ酸残基（一態様では、グリシン、セリン、グルタミン酸、 $-\text{アラニン}$ 、 $-\text{アミノ酪酸}$ 、 $-\text{アミノカプロン酸}$ またはリジンから選択される）、および/またはc) 1つまたは複数（一態様では1つまたは2つ）の、構造式 $\text{NH}_2-[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_x\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ （式中、nは2または3であり、xは1~10、一態様では1~7である）を有する化合物を含む。最後の要素は、式 $-\text{NH}-[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_x\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ のリンカー（部分）を（少なくとも部分的に）もたらず。そのような化合物の一例は、例えば12-アミノ-4,7,10-トリオキサドデカン酸（これはTEG（トリエチレングリコール）リンカーをもたらず）である。一態様では、リンカーがさらにマレイミド基を含む。リンカーは、電荷を含有しかつ/または水素橋を形成することができるので、安定化および可溶化効果を有する。加えて、リンカーは、ハプテンコンジュゲートへの抗ハプテン抗体の結合を立体的に容易にすることができる。一態様では、リンカーがポリペプチドのアミノ酸の側鎖に置かれる（例えばリジン側鎖またはシステイン側鎖にアミノ基またはチオール基を介してコンジュゲートされる）。一態様では、リンカーが、ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端に置かれる。ポリペプチド上のリンカーの位置は、典型的には、ポリペプチドの生物学的活性が影響を受けない領域に選択される。したがって、リンカーの取り付け位置は、生物学的活性を担うポリペプチドおよび関連構造要素の性質に依存する。ハプテンを取り付けたポリペプチドの生物学的活性は、インビトロアッセイで試験することができる。

30

40

【0066】

「共有結合的複合体形成」という用語は、例えば抗テオフィリン抗体とテオフィリンの間の非共有結合的複合体の形成後に、複合体の2つのパートナー間に共有結合が形成されることを表す。共有結合の形成は他に反応物を加えなくても起こる。

50

【 0 0 6 7 】

II. 組成物および方法

一局面において本発明は、ビオチンに結合する抗体に基づく。これらの抗体は本明細書において規定される。本発明の抗体は、例えばビオチン化 (biotinylated) 化合物と結合するための単一特異性抗体として役立ち、また、ビオチン化合物への結合特異性をその抗体の汎用ペイロード化特徴 (universal payloading characteristic) として使用することにより、あらゆる種類の疾患を診断または処置するための多重特異性抗体としても役立つ。

【 0 0 6 8 】

A. 例示的抗ビオチン抗体

一局面において、本発明は、ビオチンに結合する単離された抗体を提供する。一定の態様では、抗ビオチン抗体がヒト化抗ビオチン抗体である。一定の態様では、本明細書において報告する抗ビオチン抗体が、ビオチンにコンジュゲートされかつビオチン残基を介して抗体に特異的に結合される化合物の生物学的活性に干渉することなく、ビオチン化合物に結合する。したがってこれらの抗体は、その抗体が単一特異性抗体である場合は、ビオチンにコンジュゲートされた化合物 (ビオチン化合物) の薬物動態特性を改良するために使用することができる。また、抗体が二重特異性または多重特異性抗体である場合、1つの結合特異性はビオチンを指向して、汎用ペイロード化特異性 (universal payloading specificity) として使用することができ、一方、第2の結合特異性は、例えば細胞表面分子に特異的に結合して、二重特異性または多重特異性抗体のターゲティング特徴/構成要素となるので、これらの抗体はビオチン化合物の標的送達のために使用することもできる。

【 0 0 6 9 】

一局面において本発明は、(a) SEQ ID NO:01のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) SEQ ID NO:02のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c) SEQ ID NO:03のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d) SEQ ID NO:05のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e) SEQ ID NO:06のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(f) SEQ ID NO:07のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのHVRを含む抗ビオチン抗体を提供する。

【 0 0 7 0 】

一局面において、本発明は、(a) SEQ ID NO:01のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) SEQ ID NO:02のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c) SEQ ID NO:03のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVH HVR配列を含む抗ビオチン抗体を提供する。一態様では、抗体が、SEQ ID NO:03のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。別の態様では、抗体が、SEQ ID NO:03のアミノ酸配列を含むHVR-H3およびSEQ ID NO:07のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。さらなる態様では、抗体が、SEQ ID NO:03のアミノ酸配列を含むHVR-H3、SEQ ID NO:07のアミノ酸配列を含むHVR-L3、およびSEQ ID NO:02のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。さらなる態様では、抗体が、(a) SEQ ID NO:01のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) SEQ ID NO:02のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c) SEQ ID NO:03のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【 0 0 7 1 】

別の局面において、本発明は、(a) SEQ ID NO:05のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b) SEQ ID NO:06のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c) SEQ ID NO:07のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVL HVR配列を含む抗ビオチン抗体を提供する。一態様では、抗体が、(a) SEQ ID NO:05のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b) SEQ ID NO:06のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c) SEQ ID NO:07のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【 0 0 7 2 】

別の局面において、本発明の抗ビオチン抗体は、(a) (i) SEQ ID NO:01のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii) SEQ ID NO:02のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(iii) SEQ ID NO:03のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、ま

10

20

30

40

50

たは3つ全てのVH HVR配列を含むVHドメインと、(b)(i)SEQ ID NO:05のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)SEQ ID NO:06のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c)SEQ ID NO:07のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインとを含む。

【0073】

別の局面において、本発明は、(a)SEQ ID NO:01のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)SEQ ID NO:02のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)SEQ ID NO:03のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)SEQ ID NO:05のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)SEQ ID NO:06のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(f)SEQ ID NO:07から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗ビオチン抗体を提供する。

10

【0074】

一態様では、抗ビオチン抗体がヒト化されている。

【0075】

一局面において、本発明は、(a)SEQ ID NO:09のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)SEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(f)SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのHVRを含むヒト化抗ビオチン抗体を提供する。

【0076】

一局面において、本発明は、(a)SEQ ID NO:09のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c)SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVH HVR配列を含むヒト化抗ビオチン抗体を提供する。一態様では、抗体が、SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。別の態様では、抗体が、SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3およびSEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。さらなる態様では、抗体が、SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3、SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むHVR-L3、およびSEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。さらなる態様では、抗体が、(a)SEQ ID NO:09のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c)SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

20

30

【0077】

別の局面において、本発明は、(a)SEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c)SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVL HVR配列を含むヒト化抗ビオチン抗体を提供する。一態様では、抗体が、(a)SEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c)SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0078】

別の局面において、本発明の抗体は、(a)(i)SEQ ID NO:09のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(iii)SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVH HVR配列を含むVHドメインと、(b)(i)SEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c)SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインとを含む。

40

【0079】

別の局面において、本発明は、(a)SEQ ID NO:09のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)SEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(f)SEQ ID NO:15から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を

50

含むヒト化抗ビオチン抗体を提供する。

【0080】

別の局面において、本発明は、(a) SEQ ID NO:01のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) SEQ ID NO:02のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c) SEQ ID NO:03のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d) SEQ ID NO:05のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e) SEQ ID NO:06のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(f) SEQ ID NO:07から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含み、HVR-H2中の60位のアミノ酸残基がAであり、HVR-H2中の61位のアミノ酸残基がQである、ヒト化抗ビオチン抗体を提供する。

【0081】

ヒト化抗ビオチン抗体はKabatの60位にAを含み、かつKabatの61位にQを含む。これらの変化(正変異)はヒト化抗ビオチン抗体の結合親和性を増加させるために導入した。

10

【0082】

一態様では、ヒト化抗ビオチン抗体が、上記の態様のいずれかのHVRを含み、さらにアクセプターヒトフレームワーク、例えばヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークを含む。一態様では、ヒト化抗ビオチン抗体が、上記の態様のいずれかのHVR-Hを含むVHを含み、さらに

・24位にS、および/または

・73位にT

のうちの1つまたは複数を含む。

【0083】

Kabatの24位はSEQ ID NO:04、12、および20の残基番号24に対応する。

20

【0084】

Kabatの60位はSEQ ID NO:04、12、および20の残基番号61に対応する。

【0085】

Kabatの61位はSEQ ID NO:04、12、および20の残基番号62に対応する。

【0086】

Kabatの71位はSEQ ID NO:04、12、および20の残基番号72に対応する。

【0087】

これらの変化(正変異)はヒト化抗ビオチン抗体の結合親和性を増加させるために導入した。

30

【0088】

別の局面では、抗ビオチン抗体が、SEQ ID NO:04のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。一定の態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するVH配列が、参照配列と比較して置換(例えば保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ビオチン抗体はビオチンに結合する能力を保持している。一定の態様では、SEQ ID NO:04において全部で1~10個のアミノ酸が、置換、挿入、および/または削除されている。一定の態様では、置換、挿入、または欠失がHVR外の領域(すなわちFR中)に存在する。任意で、抗ビオチン抗体は、SEQ ID NO:04中のVH配列(その配列の翻訳後修飾を含む)を含む。ある特定態様では、VHが、(a) SEQ ID NO:01のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) SEQ ID NO:02のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c) SEQ ID NO:03のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される1つ、2つまたは3つのHVRを含む。

40

【0089】

別の局面では、SEQ ID NO:08のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を含む抗ビオチン抗体が提供される。一定の態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するVL配列が、参照配列と比較して置換(例えば保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ビオチン抗体はビオチンに結合する能力を保持している。一定の態様では、

50

SEQ ID NO:08において全部で1~10個のアミノ酸が、置換、挿入、および/または削除されている。一定の態様では、置換、挿入、または欠失がHVR外の領域(すなわちFR中)に存在する。任意で、抗ビオチン抗体は、SEQ ID NO:08中のVL配列(その配列の翻訳後修飾を含む)を含む。ある特定態様では、VLが、(a) SEQ ID NO:05のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b) SEQ ID NO:06のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c) SEQ ID NO:07のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される1つ、2つまたは3つのHVRを含む。

【0090】

別の局面では、上に掲載した態様のいずれかのVHと、上に掲載した態様のいずれかのVLとを含む抗ビオチン抗体が提供される。一態様では、抗体が、それぞれSEQ ID NO:04およびSEQ ID NO:08中のVH配列およびVL配列(それらの配列の翻訳後修飾を含む)を含む。

10

【0091】

別の局面では、ヒト化抗ビオチン抗体が、SEQ ID NO:12のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。一定の態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するVH配列が、参照配列と比較して置換(例えば保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ビオチン抗体はビオチンに結合する能力を保持している。一定の態様では、SEQ ID NO:12において全部で1~10個のアミノ酸が、置換、挿入、および/または削除されている。一定の態様では、置換、挿入、または欠失が、HVR外の領域(すなわちFR中)に存在する。任意で、抗ビオチン抗体は、SEQ ID NO:12中のVH配列(その配列の翻訳後修飾を含む)を含む。ある特定態様では、VHが、(a) SEQ ID NO:09のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c) SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される1つ、2つまたは3つのHVRを含む。

20

【0092】

別の局面では、SEQ ID NO:16のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を含むヒト化抗ビオチン抗体が提供される。一定の態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するVL配列が、参照配列と比較して置換(例えば保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗ビオチン抗体はビオチンに結合する能力を保持している。一定の態様では、SEQ ID NO:16において全部で1~10個のアミノ酸が、置換、挿入、および/または削除されている。一定の態様では、置換、挿入、または欠失がHVR外の領域(すなわちFR中)に存在する。任意で、抗ビオチン抗体は、SEQ ID NO:16中のVL配列(その配列の翻訳後修飾を含む)を含む。ある特定態様では、VLが、(a) SEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b) SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c) SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される1つ、2つまたは3つのHVRを含む。

30

【0093】

別の局面では、上に掲載した態様のいずれかのVHと上に掲載した態様のいずれかのVLとを含むヒト化抗ビオチン抗体が提供される。一態様では、抗体が、それぞれSEQ ID NO:12およびSEQ ID NO:16中のVH配列およびVL配列(それらの配列の翻訳後修飾を含む)を含む。

40

【0094】

本発明のさらなる局面において、上記の態様のいずれかによる抗ビオチン抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。一態様では、抗ビオチン抗体が抗体フラグメント、例えばFv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、またはF(ab')₂フラグメントである。別の態様では、抗体が完全長抗体、例えば無傷のIgG1もしくはIgG4抗体、または本明細書において定義する他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

【0095】

さらなる局面では、上記の態様のいずれかによる抗ビオチン抗体が、以下の1~5項に記

50

載する特徴のいずれかを、一つずつまたは組み合わせて組み入れることができる。

【0096】

1. 抗体親和性

一定の態様では、本明細書に規定する抗体が、 $1\mu\text{M}$ 、 100nM 、 10nM 、 1nM 、 0.1nM 、 0.01nM 、または 0.001nM （例えば 10^{-8}M 以下、例えば $10^{-8}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$ 、例えば $10^{-9}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$ ）の解離定数（Kd）を有する。

【0097】

一態様では、Kdが、以下のアッセイで説明するように、関心対象の抗体のFab型とその抗原とを使って行われる放射標識抗原結合アッセイ（RIA）によって測定される。抗原に対するFABの溶液結合親和性（solution binding affinity）は、非標識抗原のタイトレーション系列（titration series）の存在下でFabを最小濃度の（ ^{125}I ）-標識抗原と平衡させ、次に結合した抗原を抗Fab抗体被覆プレートで捕捉することによって測定される（例えばChen, Y., et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881参照）。アッセイのための条件を確立するために、MICROTITER（登録商標）マルチウェルプレート（Thermo Scientific）を、 50mM 炭酸ナトリウム（ $\text{pH}9.6$ ）中、 $5\mu\text{g/ml}$ の捕捉用抗Fab抗体（Cappel Labs）で終夜コーティングし、次に室温（約 23°C ）で2~5時間、PBS中の2%（w/v）ウシ血清アルブミンでブロックする。非吸着性プレート（Nunc #269620）において、 100pM または 26pM [^{125}I]-抗原を、関心対象のFabの段階希釈液と混合する（例えばPresta, L.G., et al., Cancer Res. 57 (1997) 4593-4599における抗VEGF抗体Fab-12の評価に準じる）。次に、関心対象のFabを終夜インキュベートするが、このインキュベーションは、平衡に達することを保証するために、さらに長い期間（例えば約65時間）継続してもよい。その後、混合物を捕捉プレートに移して、室温で（例えば1時間）インキュベートする。次に、溶液を取り除き、PBS中の0.1%ポリソルベート20（TWEEN-20（登録商標））でプレートを8回洗浄する。プレートが乾燥したら、 $150\mu\text{l}$ /ウェルのシンチラント（MICROSCINT-20（商標）；Packard）を加え、TOPCOUNT（商標）ガンマ線計数器（Packard）でプレートを10分間カウントする。最大結合の20%以下を与える各Fabの濃度を、競合結合アッセイにおいて使用するために選択する。

【0098】

別の態様では、約10応答単位（response unit）（RU）の固定化抗原CM5チップを使用し、25 $^\circ\text{C}$ で、BIACORE（登録商標）-2000またはBIACORE（登録商標）-3000（BIAcore, Inc.、ニュージャージー州ピスカタウェイ）を用いる表面プラズモン共鳴アッセイを使って、Kdが測定される。簡単に述べると、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIACORE, Inc.）を、供給者の指示に従って、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（EDC）およびN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化する。抗原を 10mM 酢酸ナトリウム（ $\text{pH}4.8$ ）で $5\mu\text{g/ml}$ （約 $0.2\mu\text{M}$ ）に希釈してから、 $5\mu\text{l}$ /分の流速で注入することにより、およそ10応答単位（RU）のタンパク質をカップリングさせる。抗原の注入に続いて、未反応基を保護するために1Mエタノールアミンを注入する。速度論的測定のために、Fabの2倍段階希釈液（ $0.78\text{nM} \sim 500\text{nM}$ ）を、0.05%ポリソルベート20（TWEEN-20（商標））界面活性剤を含むPBS（PBST）中、25 $^\circ\text{C}$ 、およそ $25\mu\text{l}$ /分の流速で注入する。単純な1対1ラングミュア結合モデル（BIACORE（登録商標）評価ソフトウェア・バージョン3.2）を使用し、会合と解離のセンサーグラムを同時にフィッティングすることによって、会合速度（ k_{on} ）および解離速度（ k_{off} ）を計算する。平衡解離定数（Kd）は比 k_{off}/k_{on} として計算される。例えばChen, Y., et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881参照。上記の表面プラズモン共鳴アッセイでオン速度が $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ を上回る場合は、抗原の濃度を増加させつつ、ストップフロー付き分光測光器（Aviv Instruments）または攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-AMINCO（商標）分光測光器（ThermoSpectronic）などの分光計で測定される、PBS（ $\text{pH}7.2$ ）中、 20nM の抗抗原抗体（Fab型）の、25 $^\circ\text{C}$ における蛍光発光強度（励起 = 295nm ；放出 = 340nm 、帯域幅 16nm ）の増減を測定する蛍光消光技法を使って、オン速度を決定することができる。

【0099】

10

20

30

40

50

2. 抗体フラグメント

一定の態様では、本明細書に規定する抗体が、抗体フラグメントである。抗体フラグメントには、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、およびscFvフラグメント、ならびに以下に述べる他のフラグメントがあるが、それらに限定されるわけではない。一定の抗体フラグメントを概観するには、Hudson, P.J., et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134を参照されたい。scFvフラグメントを概観するには、例えばPlueckthun, A., In; The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp.269-315を参照されたい。また、WO 93/16185およびUS 5,571,894およびUS 5,587,458も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、増加したインビボ半減期を有するFabおよびF(ab')₂フラグメントに関する解説については、US 5,869,046を参照されたい。

10

【0100】

ダイアポディは、二価または二重特異性であることができる2つの抗原結合部位を有する抗体フラグメントである。例えばEP 0 404 097、WO 1993/01161、Hudson, P.J., et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134、およびHolliger, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448を参照されたい。トリアポディおよびテトラポディも、Hudson, P.J., et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134に記載されている。

【0101】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全部もしくは一部または軽鎖可変ドメインの全部または一部を含む抗体フラグメントである。一定の態様では、単ドメイン抗体が、ヒト単ドメイン抗体である (Domantis, Inc.、マサチューセッツ州ウォルサム; 例えばUS 6,248,516 B1参照)。

20

【0102】

抗体フラグメントは、さまざまな技法によって、例えば限定するわけではないが、本明細書に記載するように、無傷の抗体のタンパク質分解消化や、組換え宿主細胞 (例えば大腸菌 (E. coli) またはファージ) による生産などによって作製することができる。

【0103】

3. キメラ抗体およびヒト化抗体

一定の態様では、本明細書に規定する抗体が、キメラ抗体である。例えばUS 4,816,567、およびMorrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855には、一定のキメラ抗体が記載されている。一例では、キメラ抗体が、非ヒト可変領域 (例えばマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルなどの非ヒト霊長類に由来する可変領域) とヒト定常領域とを含む。さらなる例では、キメラ抗体が、クラスまたはサブクラスが親抗体のものから変化している「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体にはその抗原結合性フラグメントが含まれる。

30

【0104】

一定の態様では、キメラ抗体がヒト化抗体である。非ヒト抗体は、典型的には、親非ヒト抗体の特異性および親和性を保ったまま、ヒトに対する免疫原性を低減するために、ヒト化される。一般にヒト化抗体は、HVR、例えばCDR (またはその一部分) が非ヒト抗体に由来し、FR (またはその一部分) がヒト抗体配列に由来する、1つまたは複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、任意で、ヒト定常領域の少なくとも一部分も含む。いくつかの態様では、ヒト化抗体中のいくつかのFR残基が、例えば抗体の特異性または親和性を復活させるかまたは改良するために、非ヒト抗体 (例えばHVR残基が由来する抗体) からの対応する残基で置換される。

40

【0105】

ヒト化抗体およびそれらを作製する方法については、例えばAlmagro, J.C. and Franss on, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633に総説があり、例えばRiechmann, I., et al., Nature 332 (1988) 323-329、Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033、US 5,821,337、US 7,527,791、US 6,982,321、およびUS 7,087,409、Kashmiri, S.V., et al., Methods 36 (2005) 25-34 (SDR (a-CDR) 移植についての記

50

載がある)、Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (「リサーフェイシング (resurfacing)」についての記載がある)、Dall'Acqua, W.F., et al., *Methods* 36 (2005) 43-60 (「FRシャフリング」についての記載がある)、ならびにOsborn, J., et al., *Methods* 36 (2005) 61-68およびKlimka, A., et al., *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (FRシャフリングのための「誘導選択 (guided selection)」アプローチについての記載がある)に、さらに詳しく説明されている。

【0106】

ヒト化に使用することができるヒトフレームワーク領域には、次に挙げるものがあるが、それらに限定されるわけではない: 「ベストフィット (best-fit)」法を使って選択されたフレームワーク領域 (例えばSims, M.J., et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308参照); 軽鎖または重鎖可変領域の特定サブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域 (例えばCarter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289、およびPresta, L.G., et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632参照); ヒト成熟 (体細胞性変異型) フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系フレームワーク領域 (例えばAlmagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633参照); およびスクリーニングFRライブラリーに由来するフレームワーク領域 (例えばBaca, M., et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684およびRosok, M.J., et al., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618参照)。

【0107】

4. 多重特異性抗体

一定の態様では、本明細書に規定する抗体が多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。一定の態様では、結合特異性の一方がビオチンに対するものであり、他方が他の任意の抗原に対するものである。一定の態様では、二重特異性抗体が、ビオチンの2つの異なるエピトープに結合しうる。二重特異性抗体は、ビオチンを発現する細胞に細胞毒性作用物質を局在化するためにも使用することができる。二重特異性抗体は完全長抗体または抗体フラグメントとして調製することができる。

【0108】

多重特異性抗体を作製するための技法には、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組換え同時発現 (Milstein, C. and Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540、WO 93/08829、およびTraunecker, A., et al., *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659参照)、および「ノブ・イン・ホール (knob-in-hole)」工学 (例えばUS 5,731,168参照) などがあるが、それらに限定されるわけではない。多重特異性抗体は、抗体Fc-ヘテロ二量体分子を作製するために静電的ステアリング効果 (electrostatic steering effect) を工学的に操作すること (WO 2009/089004); 2つ以上の抗体またはフラグメントを架橋すること (例えばUS 4,676,980、およびBrennan, M., et al., *Science* 229 (1985) 81-83参照); ロイシンジッパーを使って二重特異性抗体を生産すること (例えばKostelny, S.A., et al., *J. Immunol.* 148 (1992) 1547-1553参照); 二重特異性抗体フラグメントを作製するために「ダイアボディ」技術を使用すること (例えばHolliger, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448参照); および単鎖Fv (sFv) 二量体を使用すること (例えばGruber, M et al., *J. Immunol.* 152 (1994) 5368-5374参照); および例えばTutt, A., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 60-69に記載されているように、三重特異性抗体を調製することによって作製することもできる。

【0109】

3つまたはそれ以上の機能的抗原結合部位を有する改変抗体 (engineered antibody) も、「オクトパス抗体 (Octopus antibody)」を含めて、ここに含まれる (例えばUS 2006/0025576参照)。

【0110】

本明細書における抗体またはフラグメントには、ビオチンともう一つの異なる抗原とに結合する抗原結合部位を含む「二重作用性Fab (Dual Acting Fab)」または「DAF」も含

10

20

30

40

50

まれる（例えばUS 2008/0069820参照）。

【0111】

本明細書における抗体またはフラグメントには、WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792、およびWO 2010/145793に記載の多重特異性抗体も含まれる。

【0112】

5. 抗体変種

一定の態様では、本明細書に規定する抗体のアミノ酸配列変種が考えられる。例えば抗体の結合親和性および/または他の生物学的特性を改良することが望ましい場合がありうる。抗体のアミノ酸配列変種は、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な修飾を導入するか、またはペプチド合成によって、調製することができる。そのような修飾には、例えば抗体のアミノ酸配列からの欠失、および/または抗体のアミノ酸配列への挿入、および/または抗体のアミノ酸配列内での残基の置換が含まれる。最終構築物が所望の特徴、例えば抗原結合性を持つ限り、欠失、挿入および置換を任意に組み合わせて、最終構築物に到達することができる。

10

【0113】

a) 置換、挿入、および欠失変種

一定の態様では、1つまたは複数のアミノ酸置換を有する抗体変種が提供される。置換変異導入のための関心対象の部位には、HVRおよびFRが含まれる。表1では保存的置換を「好ましい置換」という見出しの下に示す。より実質的な変化は、表1では「例示的置換」という見出しの下に掲載されており、アミノ酸側鎖クラスに関連して以下にさらに詳しく説明するとおりである。アミノ酸置換を関心対象の抗体に導入し、生成物を所望の活性について、例えば保持/改良された抗原結合、減少した免疫原性、または改良されたADCCもしくはCDCなどについてスクリーニングすることができる。

20

【0114】

（表1）

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

10

20

30

【 0 1 1 5 】

アミノ酸は共通する側鎖特性に従って分類することができる。

- (1) 疎水性: ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- (2) 中性親水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- (3) 酸性: Asp、Glu;
- (4) 塩基性: His、Lys、Arg;
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基: Gly、Pro;
- (6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

40

【 0 1 1 6 】

非保存的置換は、これらのクラスの一つのメンバーを別のクラスと交換することを必然的に伴う。

【 0 1 1 7 】

置換変種のタイプは、親抗体（例えばヒト化またはヒト抗体）の1つまたは複数の超可変領域残基を置換することを伴う。一般に、その結果生じてさらなる研究のために選択される変種は、親抗体との比較で一定の生物学的特性に修飾（例えば改良）（例えば増加した親和性、低減した免疫原性）を有し、かつ/または親抗体の一定の生物学的特性を実質的に保持している。例示的な置換変種は親和性成熟抗体であり、これは、例えば本明細書に記載するようなファージディスプレイに基づく親和性成熟技法を使って、従来の方法

50

で生成することができる。簡単に述べると、1つまたは複数のHVR残基を変異させ、変種抗体をファージ上にディスプレイし、特定の生物学的活性（例えば結合親和性）についてスクリーニングする。

【0118】

改変（例えば置換）は、例えば抗体親和性を改良するために、HVRに施すことができる。そのような改変は、HVR「ホットスポット」、すなわち体細胞での成熟過程で高頻度に変異を起こすコドンによってコードされる残基（例えばChowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196）および/またはSDR（a-CDR）に施すことができ、その結果生じた変種VHまたはVLは結合親和性について試験される。二次ライブラリーを構築し、そこから選択することによる親和性成熟は、例えばHoogenboom, H.R. らが、*Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37に記載している。親和性成熟のいくつかの態様では、さまざまな方法（例えばエラーブローンPCR、鎖シャフリング、またはオリゴヌクレオチド指定変異導入）のいずれかによって、成熟のために選択された可変遺伝子に多様性が導入される。次に二次ライブラリーを作成する。次に、所望の親和性を有する任意の抗体変種を同定するために、ライブラリーをスクリーニングする。多様性を導入するための別の方法は、数個のHVR残基（例えば一度に4~6残基）をランダム化するHVR指向的アプローチを伴う。抗原結合に關与するHVR残基は、例えばアラニンスキャニング変異導入法やモデリングなどを使って、特異的に同定することができる。特にCDR-H3およびCDR-L3は標的とされることが多い。

10

【0119】

一定の態様では、その改変が抗原と結合する抗体の能力を実質的に低減しない限り、置換、挿入、または欠失が、1つまたは複数のHVR内に存在してもよい。例えば、結合親和性を実質的に低減しない保存的改変（例えば保存的置換は本明細書に規定するとおりである）をHVRに施すことができる。そのような改変はHVR「ホットスポット」外またはSDR外でありうる。上掲の変種VHおよびVL配列の一定の態様では、各HVRは無改変であるか、1つ、2つまたは3つ以下のアミノ酸置換を含有する。

20

【0120】

変異導入の標的とすることができる抗体の残基または領域を同定するための有用な一方法は、Cunningham, B.C. and Wells, J.A., *Science* 244 (1989) 1081-1085に記載されているように、「アラニンスキャニング変異導入法」と呼ばれる。この方法では、残基または標的残基群（例えばarg、asp、his、lys、およびgluなどの荷電残基）を同定し、それを中性アミノ酸または負荷電アミノ酸（例えばアラニンまたはポリアラニン）で置き換えて、抗体の、抗原との相互作用が影響を受けるかどうかを決定する。最初の置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸位置に、さらなる置換を導入することもできる。これに代えて、またはこれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造は、抗体と抗原の間の接触点を同定する。そのような接触残基および近隣残基は、置換の候補として標的にするか、または除外することができる。変種をスクリーニングして、それらが所望の特性をもっているかどうかを決定することができる。

30

【0121】

アミノ酸配列挿入には、1残基から、100残基またはそれ以上を含有するポリペプチドまでわたる長さのアミノ末端および/またはカルボキシル末端融合も、単一アミノ酸残基および複数アミノ酸残基の配列内挿入も含まれる。末端挿入の例には、N末端メチオニル残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変種には、抗体のN末端またはC末端の、酵素（例えばADEPTの場合）または抗体の血清中半減期を増加させるポリペプチドへの融合が含まれる。

40

【0122】

好ましい一変種は、重鎖可変ドメイン中のKabatによる53位のアミノ酸残基がシステインである、単一システイン変種である。

【0123】

b) グリコシル化変種

50

一定の態様では、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少させるために、本明細書に規定する抗体が改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つまたは複数のグリコシル化部位が作出または除去されるようにアミノ酸配列を改変することによって、都合よく達成することができる。

【0124】

抗体がFc領域を含む場合は、そこに取り付けられる糖質を改変することができる。哺乳動物細胞によって生産されるネイティブ抗体は、典型的には、分岐したパイアンテナ型オリゴ糖を含み、これは一般的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN結合によって取り付けられる。例えばWright, A. and Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32参照。オリゴ糖は、さまざまな糖質、例えばマンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、およびシアル酸、ならびにパイアンテナ型オリゴ糖構造の「ステム」中のGlcNAcに取り付けられたフコースを含みうる。いくつかの態様では、一定の改良された特性を有する抗体変種を作出するために、本発明の抗体中のオリゴ糖の修飾を行うことができる。

10

【0125】

一態様では、Fc領域に（直接または間接的に）取り付けられたフコースを欠く糖質構造を有する抗体変種が提供される。例えばそのような抗体におけるフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%または20%~40%でありうる。フコースの量は、例えばWO 2008/077546に記載されているようにMALDI-TOF質量分析によって測定されるAsn297における糖鎖内のフコースの平均量を、Asn297に取り付けられた全ての糖構造（例えば複合型、混成型および高マンノース型構造）の和と比較して算出することによって決定される。Asn297とはFc領域の297位（Fc領域残基のEUナンバリング）付近に位置するアスパラギン酸残基を指すが、抗体における軽微な配列変動ゆえに、Asn297は、297位の上流側または下流側約±3アミノ酸付近、すなわち294位と300位の間に位置する場合もありうる。そのようなフコシル化変種は改良されたADCC機能を有しうる。例えばUS 2003/0157108、US 2004/093621参照。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体変種に関する刊行物の例には、US 2003/0157108、WO 2000/61739、WO 2001/29246、US 2003/0115614、US 2002/0164328、US 2004/0093621、US 2004/0132140、US 2004/0110704、US 2004/0110282、US 2004/109865、WO 2003/085119、WO 2003/084570、WO 2005/035586、WO 2005/035778、WO 2005/053742、WO 2002/031140、Okazaki, A., et al., J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249、Yamane-Ohnuki, N., et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622などがある。脱フコシル化抗体を生産する能力を有する細胞株の例には、タンパク質フコシル化欠損性のLe c13 CHO細胞 (Ripka, J., et al., Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; US 2003/0157108; およびWO 2004/056312、特に実施例11)、および-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8ノックアウトCHO細胞などのノックアウト細胞株（例えばYamane-Ohnuki, N., et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622、Kanda, Y., et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688、およびWO 2003/085107参照）などがある。

20

30

【0126】

例えば抗体のFc領域に取り付けられたパイアンテナ型オリゴ糖がGlcNAcによってバイセクト (bisect) されているバイセクト型 (bisected) オリゴ糖を有する抗体変種が、さらに提供される。そのような抗体変種は、低減したフコシル化および/または改良されたADC C機能を有しうる。そのような抗体変種の例は、例えばWO 2003/011878、US 6,602,684、およびUS 2005/0123546に記載されている。Fc領域に取り付けられたオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体変種も提供される。そのような抗体変種は改良されたCDC機能を有しうる。そのような抗体変種は、例えばWO 1997/30087、WO 1998/58964、およびWO 1999/22764に記載されている。

40

【0127】

c) Fc領域変種

一定の態様では、本明細書に規定する抗体のFc領域に1つまたは複数のアミノ酸修飾を導入することにより、Fc領域変種を生成することができる。Fc領域変種は、1つまたは複

50

数のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば置換）を含むヒトFc領域配列（例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4 Fc領域）を含みうる。

【0128】

一定の態様において、本発明では、全部ではなく一部のエフェクター機能を持つ抗体変種が考えられる。これは、その抗体変種を、インビボでの抗体の半減期は重要であるが、一定のエフェクター機能（例えば補体およびADCC）は不必要または有害であるような応用の望ましい候補にする。CDCおよび/またはADCC活性の低減/欠乏を確認するために、インビトロおよび/またはインビボ細胞毒性アッセイを行うことができる。例えば、抗体がFcR結合を欠く（それゆえにおそらくADCC活性を欠く）が、FcRn結合能は保持していることを保証するために、Fc受容体（FcR）結合アッセイを行うことができる。ADCCを媒介するための主要細胞であるNK細胞がFc(R)IIIだけを発現するのに対し、単球はFcRI、FcRIIおよびFcRIIIを発現する。造血細胞におけるFcR発現は、Ravetch, J.V. and Kinetic, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492の464ページの表3に要約されている。関心対象の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、US 5,500,362（例えばHellstrom, I., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 7059-7063、およびHellstrom, I., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1499-1502参照）、US 5,821,337（Bruggemann, M., et al., *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361参照）に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ方法を使用してもよい（例えば、フローサイトメトリー用のACT1（商標）非放射性細胞毒性アッセイ（CellTechnology, Inc.、カリフォルニア州マウンテンビュー）、およびCytoTox 96（登録商標）非放射性細胞毒性アッセイ（Promega、ウィスコンシン州マディソン）参照）。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核球（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞がある。これに代えて、またはこれに加えて、関心対象の分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 652-656に開示されているような動物モデルで、評価することもできる。抗体がC1qに結合することができず、したがってCDC活性を欠くことを確認するために、C1q結合アッセイを行うこともできる。例えばWO 2006/029879およびWO 2005/100402のC1qおよびC3c結合ELISA参照。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行うことができる（例えばGazzano-Santorio, H., et al., *J. Immunol. Methods* 202 (1996) 163-171、Cragg, M.S., et al., *Blood* 101 (2003) 1045-1052、およびCragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103 (2004) 2738-2743参照）。FcRn結合およびインビボクリアランス/半減期決定も、当技術分野において公知の方法を使って行うことができる（例えばPetkova, S.B., et al., *Int. Immunol.* 18 (2006) 1759-1769参照）。

【0129】

エフェクター機能が低減している抗体には、Fc領域残基238、265、269、270、297、327および329の1つまたは複数の置換を有するものが含まれる（US 6,737,056）。そのようなFc変異体には、265位、269位、270位、297位および327位のアミノ酸の2つまたはそれ以上に置換を有するFc変異体（残基265および297のアラニンへの置換を有するいわゆる「DANA」Fc変異体（US 7,332,581）を含む）が含まれる。

【0130】

FcRへの結合が改良または減縮されている一定の抗体変種は記載されている（例えばUS 6,737,056、WO 2004/056312、およびShields, R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604参照）。

【0131】

一定の態様では、抗体変種が、ADCCを改良する1つまたは複数のアミノ酸置換、例えばFc領域の298位、333位、および/または334位（残基のEUナンバリング）における置換を有するFc領域を含む。

【0132】

いくつかの態様では、例えばUS 6,194,551、WO 99/51642、およびIdusogie, E.E., et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184に記載されているような、C1q結合および/また

10

20

30

40

50

は補体依存性細胞傷害（CDC）の改変（すなわち改良または減縮）をもたらす改変が、Fc領域に施される。

【 0 1 3 3 】

半減期が増加し、胎児への母体免疫グロブリン（IgG）の移行の原因となる新生児型Fc受容体（FcRn）（Guyer, R.L., et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593、およびKim, J.K., et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434）への結合が改良されている抗体は、US 2005/0014934に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改良する1つまたは複数の置換がそこに含まれているFc領域を含む。そのようなFc変種には、Fc領域残基:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424または434の1つまたは複数に置換を有するもの、例えばFc領域残基434の置換を有するものが含まれる（US 7,371,826）。

10

【 0 1 3 4 】

Fc領域変種の他の例に関して、Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740、US 5,648,260、US 5,624,821、およびWO 94/29351も参照されたい。

【 0 1 3 5 】

d) システイン改変抗体変種

一定の態様では、システイン改変抗体（cysteine engineered antibody）、例えば抗体の1つまたは複数の残基がシステイン残基で置換されている「チオMAb（thioMAb）」を作出することが望ましいかもしれない。特定の態様では、置換残基が抗体の接近可能部位に見いだされる。それらの残基をシステインで置換することによって抗体の接近可能部位に活性チオール基が置かれることになり、本明細書においてさらに説明するように、それを使って、抗体を他の部分、例えば薬物部分またはリンカー-薬物部分にコンジュゲートすることで、イムノコンジュゲートを作成することができる。一定の態様では、次に挙げる残基の任意の1つまたは複数にシステインで置換することができる：軽鎖のV205（Kabatナンバリング）、重鎖のA118（EUナンバリング）、および重鎖Fc領域のS400（EUナンバリング）。システイン改変抗体は、例えばUS 7,521,541に記載されているように生成することができる。

20

【 0 1 3 6 】

e) 抗体誘導体

一定の態様では、当技術分野において公知であり容易に入手することができる追加の非タンパク質部分を含有するように、本明細書に規定する抗体をさらに修飾することができる。抗体の誘導体化に適した部分には水溶性ポリマーがあるが、それらに限定されるわけではない。水溶性ポリマーの非限定的な例には、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキサラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダムコポリマー）、およびデキストランまたはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール（propylene glycol）ホモポリマー、ポリプロピレンオキシド（polypropylene oxide）/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えばグリセロール）、ポリビニルアルコール、およびそれらの混合物などがあるが、それらに限定されるわけではない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性ゆえに、製造時に有利でありうる。ポリマーは任意の分子量であってよく、分岐型であっても非分岐型であってもよい。抗体に取り付けられるポリマーの数はさまざまであってよく、2つ以上のポリマーが取り付けられる場合、それらは同じ分子または異なる分子であることができる。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数および/またはタイプは、例えば限定するわけではないが、改良しようとする抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が所定の条件下で治療に使用されるかどうかなどといった、考慮事項に基づいて決定することができる。

30

40

【 0 1 3 7 】

別の態様では、抗体と、放射線への曝露によって選択的に加熱することができる非タン

50

パク質部分とのコンジュゲートが提供される。一態様では、非タンパク質部分がカーボンナノチューブである (Kam, N.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605)。放射線は任意の波長であってよく、例えば限定するわけではないが、通常の細胞を傷つけることはないが、非タンパク質部分を、抗体-非タンパク質部分に近接する細胞が死滅する温度まで加熱する波長が含まれる。

【0138】

B. 組換え法および組換え組成物

抗体は、例えばUS 4,816,567に記載されているような組換え法および組換え組成物を使って生産することができる。一態様では、本明細書に記載の抗ビオチン抗体をコードする単離された核酸が提供される。そのような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列および/または抗体のVHを含むアミノ酸配列 (例えば抗体の軽鎖および/または重鎖) をコードしうる。さらなる態様では、そのような核酸を含む1つまたは複数のベクター (例えば発現ベクター) が提供される。さらなる態様では、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。そのような態様の一つでは、宿主細胞が、(1) 抗体のVLを含むアミノ酸配列と抗体のVHを含むアミノ酸配列とをコードする核酸を含むベクターを含むか、または(2) 抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1ベクターと抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2ベクターを含む (例えば、前記ベクターで形質転換されている)。一態様では、宿主細胞が真核生物、例えばチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞またはリンパ球系細胞 (例えばY0、NS0、Sp20細胞) である。一態様では、抗ビオチン抗体を作成する方法であって、上に規定した抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を抗体の発現に適した条件下で培養すること、および任意で、宿主細胞 (または宿主細胞培養培地) から抗体を回収することを含む方法が提供される。

【0139】

抗ビオチン抗体の組換え生産のために、抗体をコードする核酸、例えば上述のものを単離し、宿主細胞におけるさらなるクローニングおよび/または発現のために1つまたは複数のベクターに挿入する。そのような核酸は、従来手法を使って (例えば抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合する能力を有するオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)、容易に単離し、配列決定することができる。

【0140】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に適切な宿主細胞には、本明細書に記載の原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、特にグリコシル化およびFcエフェクター機能が必要な場合は、抗体を細菌中で生産することができる。細菌における抗体フラグメントおよびポリペプチドの発現については、例えばUS 5,648,237、US 5,789,199、およびUS 5,840,523を参照されたい (大腸菌における抗体フラグメントの発現を記載しているCharlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp.245-254も参照されたい)。発現後に、抗体を細菌細胞ペーストから可溶性画分中に単離して、さらに精製することができる。

【0141】

原核生物だけでなく、糸状菌や酵母などの真核微生物も、グリコシル化経路が「ヒト化」されていて部分的または完全にヒトのグリコシル化パターンを有する抗体の生産をもたらす真菌株および酵母株を含めて、抗体をコードするベクターのための適切なクローニング宿主または発現宿主である。Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414、およびLi, H., et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215参照。

【0142】

グリコシル化抗体発現用の適切な宿主細胞は、多細胞生物 (無脊椎生物および脊椎動物) にも由来する。無脊椎生物細胞の例には、植物細胞および昆虫細胞が含まれる。昆虫細胞と一緒に使用することができる、特にスポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) 細胞のトランスフェクションに使用することができる、数多くのバキュロウイルス株が同定されている。

【0143】

10

20

30

40

50

植物細胞培養を宿主として利用することもできる。例えばUS 5,959,177、US 6,040,498、US 6,420,548、US 7,125,978、およびUS 6,417,429（トランスジェニック植物中で抗体を生産するためのPLANTIBODIES（商標）技術が記載されている）。

【0144】

脊椎動物細胞も宿主として使用することができる。例えば、懸濁培養に適応した哺乳動物細胞株は役立つ。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7）、ヒト胎児腎臓株（Graham, F.L., et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74に記載の293または293細胞）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）、マウスセルトリ細胞（Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252に記載のTM4細胞）、サル腎臓細胞（CV1）、アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）、ヒト子宮頸癌細胞（HE LA）、イヌ腎臓細胞（MDCK）、パッファローラット肝臓細胞（BRL3A）、ヒト肺細胞（W138）、ヒト肝臓細胞（Hep G2）、マウス乳房腫瘍（MMT 060562）、例えばMather, J.P., et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68に記載のTRI細胞、MRC5細胞、およびFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、DHFR⁻ CHO細胞（Urlaub, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220）を含むチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ならびにY0、NS0、およびSp2/0などの骨髓腫細胞株などがある。抗体生産に適した一定の哺乳動物宿主細胞株を概観するには、例えばYazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268を参照されたい。

10

【0145】

20

C.アッセイ

本明細書に規定する抗ビオチン抗体は、当技術分野において公知のさまざまなアッセイにより、それらの物理的/化学的特性および/または生物学的活性について、同定し、スクリーニングし、または特徴づけることができる。

【0146】

結合アッセイおよび他のアッセイ

一局面において、本発明の抗体は、例えばELISA、ウェスタンブロットなどの公知の方法によって、その抗原結合活性が試験される。

【0147】

別の局面では、ビオチンへの結合に関して本明細書において報告する抗体と競合する抗体を同定するために、競合アッセイを使用することができる。

30

【0148】

例示的な競合アッセイでは、ビオチンに結合する第1標識抗体と、ビオチンへの結合に関して第1抗体と競合するその能力について試験しようとする第2の無標識抗体とを含む溶液中で、固定化ビオチンがインキュベートされる。第2抗体はハイブリドーマ上清中に存在しうる。対照として、第1標識抗体を含むが、第2の無標識抗体を含まない溶液中で、固定化ビオチンをインキュベートする。ビオチンへの第1抗体の結合を挙用する条件下でのインキュベーション後に、過剰な未結合抗体を取り除き、固定化ビオチンと会合している標識の量を測定する。対照試料と比較して試験試料中で、固定化ビオチンと会合している標識の量が実質的に低減していれば、それは、第2抗体がビオチンへの結合に関して第1抗体と競合していることを示す。Harlow, E. and Lane, D., Antibody: A Laboratory Manual, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988) 参照。

40

【0149】

D.イムノコンジュゲート

本発明は、1つまたは複数の細胞毒性作用物質、例えば化学療法剤または薬物、成長阻害剤、毒素（例えばタンパク質毒素、細菌、真菌、植物、もしくは動物由来の酵素的に活性な毒素、またはそのフラグメント）、または放射性同位体にコンジュゲートされた、本明細書における抗ビオチン抗体を含むイムノコンジュゲートも提供する。

【0150】

50

一態様において、イムノコンジュゲートは、抗体が1つまたは複数の薬物、例えば限定するわけではないが、次に挙げるものにコンジュゲートされている、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)である:メイタンシノイド(US 5,208,020、US 5,416,064およびEP 0 425 235 B1参照);オーリスタチン、例えばモノメチルオーリスタチン薬物部分DEおよびDF(MMAEおよびMMAF)(US 5,635,483、US 5,780,588、およびUS 7,498,298参照);ドラスタチン;カリケアマイシンまたはその誘導体(US 5,712,374、US 5,714,586、US 5,739,116、US 5,767,285、US 5,770,701、US 5,770,710、US 5,773,001、およびUS 5,877,296、Hinman, L.M., et al., *Cancer Res.* 53 (1993) 3336-3342、ならびにLode, H.N., et al., *Cancer Res.* 58 (1998) 2925-2928参照);アントラサイクリン、例えばダウノマイシンまたはドキソルピシン(Kratz, F., et al., *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 477-523、Jeffrey, S.C., et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 358-362、Torgov, M.Y., et al., *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 717-721、Nagy, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97 (2000) 829-834、Dubowchik, G.M., et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12 (2002) 1529-1532、King, H.D., et al., *J. Med. Chem.* 45 (2002) 4336-4343、およびUS 6,630,579参照);メトトレキサート;ビンデシン;タキサン、例えばドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、およびオルタタキセル;トリコテセシン;およびCC1065。

10

【0151】

別の態様において、イムノコンジュゲートは、酵素的に活性な毒素またはそのフラグメント、例えば限定するわけではないが、次に挙げるものにコンジュゲートされた、本明細書に記載の抗体を含む:ジフテリア毒素A鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性フラグメント、エキソトキシンA鎖(緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由来)、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ(*Phytolacca americana*)タンパク質(PAPI、PAP II、およびPAP-S)、ニガウリ(*Momordica charantia*)インヒビター、クルシン、クロチン、サボウソウ(*Saponaaria officinalis*)インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)、およびトリコテセン(tricothecenes)。

20

【0152】

別の態様では、イムノコンジュゲートが、放射性コンジュゲートが形成されるように放射性原子にコンジュゲートされた本明細書に記載の抗体を含む。放射性コンジュゲートの生産にはさまざまな放射性同位体を利用することができる。その例には、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} およびLuの放射性同位体などがある。放射性コンジュゲートを検出に使用する場合、それは、シンチグラフィ-研究用の放射性原子、例えば Tc^{99m} または I^{123} を含むか、核磁気共鳴(NMR)イメージング(磁気共鳴イメージングMRIとも呼ばれている)用のスピン標識、例えば、ここでもヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガンまたは鉄を含みうる。

30

【0153】

抗体と細胞毒性作用物質のコンジュゲートは、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(例えばジメチルアジブイミデートHCl)、活性エステル(例えばジスクシンイミジルスベレート)、アルデヒド(例えばグルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えばビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えばトルエン2,6-ジイソシアネート)、およびビス活性フッ素化合物(例えば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)など、さまざまな二官能性タンパク質カップリング剤を使って作製することができる。例えばリシン免疫毒素は、Vitetta, E.S., et al., *Science* 238 (1987) 1098-1104に記載されているように調製することができる。炭素14標識1-イソチオシアナトベンジ

40

50

ル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、抗体に放射性核種をコンジュゲートするための例示的キレート剤である。WO 94/11026参照。リンカーは、細胞における細胞毒性薬の放出を容易にする「切断可能リンカー」であることができる。例えば酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー (Chari, R.V., et al., Cancer Res. 52 (1992) 127-131、US 5,208,020) を使用することができる。

【 0 1 5 4 】

本明細書におけるイムノコンジュゲートまたはADCは、架橋試薬、(例えばPierce Biotechnology, Inc. (米国イリノイ州ロックフォード) から) 市販されているBMPS、EMCS、G MBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、およびスルホ-SMP B、およびSVSB (スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾエート) などを使って調製された上述のコンジュゲートを、特に想定しているが、それらに限定されるわけではない。

10

【 0 1 5 5 】

E. 診断および検出のための方法および組成物

本明細書において使用する用語「検出する」は、定量的検出または定性的検出を包含する。

【 0 1 5 6 】

一態様では、診断または検出の方法に使用するための抗ビオチン抗体が提供される。そのような方法はインビトロ法またはインビボ法でありうる。

20

【 0 1 5 7 】

一定の態様では、標識抗ビオチン抗体が提供される。標識には、直接検出される標識または部分 (例えば蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、および放射性標識)、ならびに例えば酵素反応または分子相互作用などによって間接的に検出される部分、例えば酵素またはリガンドが含まれるが、それらに限定されるわけではない。例示的な標識には、放射性同位体³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、および¹³¹I、フルオロフォア、例えば希土類キレートまたはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ (luciferases)、例えばホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ (US 4,737,456)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖類オキシダーゼ (例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、過酸化水素を使って色素前駆体を酸化する酵素 (例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、またはマイクロペルオキシダーゼ) と共役させた複素環オキシダーゼ (例えばウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ)、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定フリーラジカルなどがあるが、それらに限定されるわけではない。

30

【 0 1 5 8 】

F. 薬学的製剤

本明細書に記載の抗ビオチン抗体の薬学的製剤は、望ましい純度を有するそのような抗体を1つまたは複数の随意的薬学的に許容される担体 (Osol, A. (ed.) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, (1980)) と混合することにより、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で調製される。薬学的に許容される担体は、使用される投薬量および濃度において受容者にとって一般に無毒性であり、これには、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝剤; アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤; 保存剤 (例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド; 塩化ヘキサメトニウム; 塩化ベンザルコニウム; 塩化ベンゼトニウム; フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール; アルキルパラベン、例えばメチルパラベンまたはプロピルパラベン; カテコール; レゾルシノール; シクロヘキサノール; 3-ペンタノール; およびm-クレゾール); 低分子量 (約10残基未満) のポリペプチド; タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グ

40

50

ロブリン;親水性ポリマー、例えばポリ(ビニルピロリドン);アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン;単糖、二糖、および他の糖質、例えばグルコース、マンノース、またはデキストリン;キレート剤、例えばEDTA;糖類、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール;塩形成対イオン、例えばナトリウム;金属錯体(例えばZn-タンパク質複合体);および/または非イオン界面活性剤、例えばポリエチレングリコール(PEG)などがあるが、それらに限定されるわけではない。本明細書における、例示的な薬学的に許容される担体には、さらに、間質薬物分散剤、例えば可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質(sHASEGP)、例えばヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えばrhuPH20(HYLENEX(登録商標)、Baxter International, Inc.)が含まれる。rhuPH20を含む一定の例示的sHASEGPおよび使用方法は、US 2005/0260186ならびにUS 2006/0104968に記載されている。一局面では、sHASEGPが、1つまたは複数の追加グリコサミノグリカナーゼ、例えばコンドロイチナーゼと併用される。

【0159】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、US 6,267,958に記載されている。水性抗体製剤には、US 6,171,586およびWO 2006/044908に記載されているものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン-酢酸緩衝液を含む。

【0160】

本明細書における製剤は、処置される特定適応症の必要に応じて、2つ以上の活性成分、好ましくは互いに有害な影響を及ぼさない相補的活性を有するものも含有しうる。例えば、さらに[[抗ビオチン抗体との組合せが考えられる薬物を列挙]]を提供することが望ましい。そのような活性成分は、適宜、意図した目的に有効な量で組み合わせられて存在する。

【0161】

活性成分は、例えばコアセルベーション技法または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルに封入するか、コロイド薬物送達系(例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子およびナノカプセル)に封入するか、またはマクロエマルションに封入することができる。そのような技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)に開示されている。

【0162】

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の適切な例には、抗体を含有する固形疎水性ポリマーの半透過性マトリックスであって、マトリックスがフィルムまたはマイクロカプセルなどの造形品の形態にあるものなどがある。

【0163】

インピボ投与に使用される製剤は一般に滅菌状態にある。滅菌性は例えば滅菌濾過膜による濾過などによって容易に達成することができる。

【0164】

G. 治療方法および治療組成物

本明細書に規定する抗ビオチン抗体はいずれも治療方法に使用することができる。

【0165】

一局面では、医薬として使用するための抗ビオチン抗体が提供される。一定の態様では、処置方法において使用するための抗ビオチン抗体が提供される。

【0166】

さらなる局面において、本発明は、医薬の製造または調製における抗ビオチン抗体の使用を提供する。

【0167】

さらなる局面において、本発明は、本明細書に規定する抗ビオチン抗体のいずれかを含む薬学的製剤を提供する。一態様では、薬学的製剤が、本明細書に規定する抗ビオチン抗

10

20

30

40

50

体のいずれかと薬学的に許容される担体とを含む。

【0168】

本発明の抗体は、単独で、または他の作用物質と組み合わせて、治療に使用することができる。例えば本発明の抗体は、少なくとも1つの追加治療剤と同時投与することができる。

【0169】

上述の併用治療には、併用投与（この場合は2つ以上の治療剤が同じ製剤または別々の製剤に含まれる）、および個別投与（この場合は、本発明の抗体の投与を、追加治療剤および/またはアジュバントの投与の前に、同時に、および/または後に、行うことができる）が包含される。本発明の抗体は放射線療法と併用することもできる。

10

【0170】

本発明の抗体（および任意の追加治療剤）は、非経口投与、肺内投与、および鼻腔内投与、そして局所処置にとって望ましい場合は、病巣内投与を含む、任意の適切な手段によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。投薬は、投与が短期間であるか慢性的であるかにも一部依存して、任意の適切な経路、例えば静脈内注射または皮下注射などの注射によることができる。限定するわけではないが、単回投与、またはさまざまな時点にわたる複数投与、ボラス投与、およびパルス注入を含む、さまざまな投薬日程が、本明細書では考えられる。

【0171】

本発明の抗体は、適正医療基準（good medical practice）に合致する方法で、製剤化され、調合され、投与される。この文脈において考慮すべき因子には、処置される特定障害、処置される特定哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与の方法、投与の日程計画、および医療従事者に公知の他の因子が含まれる。抗体は、問題の障害を防止または処置するために現在使用されている1つまたは複数の作用物質と共に製剤化する必要はないが、任意でそのようにしてもよい。そのような他の作用物質の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害または処置のタイプ、および上で述べた他の因子に依存する。これらは、一般に、上述したものと同一投薬量および投与経路で使用されるか、または本明細書に記載の投薬量の約1~99%、もしくはは任意の投薬量で、実験的/臨床的に適当であると決定された任意の経路によって使用される。

20

【0172】

疾患の防止または処置に関して、本発明の抗体の適当な投薬量（単独で使用する場合、または1つもしくは複数の他の追加治療剤と併用する場合）は、処置すべき疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重症度および経過、抗体を防止のために投与するか治療のために投与するか、治療歴、患者の病歴および抗体に対する応答、ならびに担当医の裁量に依存する。抗体は、患者に1回で、または一連の処置で、適切に投与される。疾患のタイプおよび重症度に依存して、例えば1回または複数回の独立した投与によるか、持続注入によるかを問わず、約1 μ g/kg~15mg/kg（例えば0.5mg/kg~10mg/kg）の抗体を、患者への投与のための初回候補投薬量とすることができる。典型的な1日量は、上述の因子に依存して約1 μ g/kgから100mg/kgまでまたはそれ以上に及びうる。数日またはそれ以上にわたる反復投与の場合、状態に依存して、処置は一般に、疾患症状の所望の抑制が起こるまで、維持される。抗体の例示的投薬量の一つは約0.05mg/kg~約10mg/kgの範囲にある。したがって約0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kgまたは10mg/kg（またはそれらの任意の組み合わせ）の1つまたは複数の用量を患者に投与することができる。そのような用量は、（例えば、患者が抗体の投与を約2回から約20回、例えば約6回受けるように）間欠的に、例えば毎週または3週間ごとに投与することができる。最初に高用量の初回負荷量を投与した後、1つまたは複数の低用量を投与することができる。この治療法の進行は、従来の技法およびアッセイで容易にモニターされる。

30

40

【0173】

上記の製剤または治療方法はいずれも、抗ビオチン抗体の代わりに、または抗ビオチン抗体に加えて、本発明のイムノコンジュゲートを使って行うことができると理解される。

50

【0174】

III. 製造品

本発明の別の局面では、上述の障害の処置、防止および/または診断に有用な材料が入っている製造品が提供される。製造品は、容器、および容器上のまたは容器に付随するラベルまたは添付文書を含む。適切な容器には、例えば瓶、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグなどがある。容器は、ガラスまたはプラスチックなど、さまざまな素材で形成される。容器は、組成物を単独で、またはその状態を処置、防止および/または診断するのに有効な別の組成物と組み合わせて保持し、滅菌アクセスポートを有しうる（例えば容器は静脈内溶液バッグであるか、皮下注射針で突き刺すことができる栓を有するバイアルであることができる）。組成物中の少なくとも1つの活性作用物質は本発明の抗体である。ラベルまたは添付文書は、その組成物が選択された状態の処置に使用されることを示す。さらにまた、製造品は、(a)本発明の抗体を含む組成物が入っている第1容器と、(b)さらなる細胞毒性作用物質または他の治療剤を含む組成物が入っている第2容器とを含みうる。本発明のこの態様の製造品は、さらに、特定の状態を処置するためにその組成物を使用できることを示す添付文書を含みうる。これに代えて、またはこれに加えて、製造品はさらに、薬学的に許容される緩衝液、例えば静菌性注射用水(BWFI)、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液およびデキストロス溶液を含む第2(または第3)の容器を含みうる。商業的観点および使用者の観点から望ましい他の材料、例えば緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、およびシリンジを、さらにも含む。

10

【0175】

上記の製造品はいずれも、抗ビオチン抗体の代わりに、または抗ビオチン抗体に加えて、本発明のイムノコンジュゲートを含みうる。

20

【実施例】

【0176】

IV. 実施例

以下は本発明の方法および組成物の実施例である。一般論は上に述べたので、他にもさまざまな態様を実施することができるものと理解される。

【0177】

実施例1

カッパ軽鎖を有するIgG1クラスのマウス抗ビオチン抗体のVHおよびVLドメインをコードするcDNAのマウスハイブリドーマからの単離および特徴付け

30

マウスハプテン-ビオチン抗体のVHおよびVLドメインのタンパク質および(DNA)配列情報は、ハイブリドーマクローンから直接、取得した。次に行った実験工程は、(i)抗体産生ハイブリドーマ細胞からのRNAの単離、(ii)このRNAのcDNAへの変換、VHおよびVL保有PCRフラグメントへのトランスファー、ならびに(iii)これらのPCRフラグメントの、大腸菌における増殖およびそれらのDNA(および推定タンパク質)配列決定のための、プラスミドベクターへの組み込みであった。

【0178】

ハイブリドーマ細胞からのRNA調製:

RNeasy-Kit(Qiagen)を応用して 5×10^6 個の抗体発現ハイブリドーマ細胞からRNAを調製した。簡単に述べると沈降させた細胞をPBS中で1回洗浄し、沈降させた後、溶解のために500 μ lのRLT緩衝液(+ME)に再懸濁した。細胞をQiashredder(Qiagen)に通すことによって完全に溶解した後、製造者のマニュアルに記載のマトリックスによる精製手法(ETOH、RNeasyカラム)に付した。最後の洗浄段階後に、RNAをカラムから50 μ lのRNAseフリー水に回収した。1:20希釈試料のA260とA280を定量することにより、回収されたRNAの濃度を決定した。単離されたRNA試料の完全性(品質、分解度)を、ホルムアミド-アガロースゲルでの変性RNAゲル電気泳動によって分析した(Maniatis Manual参照)。無傷の18sおよび28sリボソームRNAに相当する不連続なバンドが得られ、これらのバンドが無傷であること(およびおよそ2:1の強度比)から、RNA調製物の良好な品質が示された。ハイブリドーマからの単離RNAを凍結し、小分けして-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

40

50

【 0 1 7 9 】

RACE PCRによるVHおよびVLをコードするDNAフラグメントの生成、これらのDNAフラグメントのプラスミドへのクローニング、およびそれらのDNA配列およびアミノ酸配列の決定:

国際特許出願PCT/EP2011/074273に記載の技術を応用することにより、後続の(RACE-)PCR反応のためのcDNAをRNA調製物から調製した。次に、VHおよびVLをコードするPCRフラグメントを、標準的な分子生物学技法により、アガロースゲル抽出とそれに続く精製とによって単離した。pCR bluntII topoキット(Invitrogen)を製造者の説明書に厳密に従って適用することにより、PWOで生成した精製PCRフラグメントを、ベクターpCR bluntII topoに挿入した。Topoライゲーション反応を大腸菌Topo10-one-shotコンピテント細胞に形質転換した。その後、VL含有インサートまたはVH含有インサートのいずれかを有するベクターを含有する大腸菌クローンを、LB-カナマイシン寒天プレート上のコロニーとして同定した。これらのコロニーからプラスミドを調製し、ベクター中の所望のインサートの存在を、EcoRIによる制限消化で確認した。ベクターバックボーンはインサートのそれぞれの側に隣接するEcoRI制限認識部位を含有するので、インサートを保有するプラスミドは、EcoRIで放出されるおよそ800bp(VLの場合)または600bp(VHの場合)のインサートを有することによって特定された。VLおよびVHのDNA配列および推定タンパク質配列を、VHおよびVLに関する複数クローンでの自動DNA配列決定によって決定した。

10

【 0 1 8 0 】

抗ビオチン抗体のマウスVL配列をSEQ ID NO:08に示す。抗ビオチン抗体のマウスVH配列をSEQ ID NO:04に示す。

20

【 0 1 8 1 】

実施例2マウス抗ビオチン抗体のVHおよびVLドメインのヒト化

マウスビオチン結合性抗体muM33を次のようにヒト化した。マウスハイブリドーマからのカッパ軽鎖を有するIgG1クラスのマウス抗ビオチン抗体のVHドメインおよびVLドメインを含むコード配列およびアミノ酸配列の生成および特徴付けは、WO 2011/003557およびWO 2011/003780に記載されている。この情報に基づいて、ヒト生殖細胞系フレームワークIGHV1-69-02とIGKV1-27-01との組み合わせに基づく対応ヒト化抗ビオチン抗体(huM33)を生成した。VLについては、ヒトIGKV1-27-01のフレームワークとIGKJ2-01生殖細胞系のヒトJ要素に何らかの復帰変異を組み込む必要はなかった。ヒト化VHはヒトIGHV1-69-02生殖細胞系とIGHJ4-01-3生殖細胞系のヒトJ要素とに基づく。フレームワーク領域1中の24位(A24S)とフレームワーク領域3中の73位(K73T)に2つの復帰変異を導入した。ヒト化VHのアミノ酸配列をSEQ ID NO:12に表し、ヒト化VLのアミノ酸配列をSEQ ID NO:16に示す。

30

【 0 1 8 2 】

実施例3ビオチン存在下でのマウス抗ビオチンFv領域の結合領域の結晶化およびX線構造決定

マウス抗ビオチン抗体の構造を決定した。そのために、周知である最新の方法(パイン消化)を応用して、精製IgGのプロテアーゼ消化でFabフラグメントを生成し、次にそれを精製した。

【 0 1 8 3 】

結晶化のために、20mM His-HCl、140mM NaCl、pH6.0中のアポFabフラグメント(精製Fab)を13mg/mlまで濃縮した。蒸気拡散シッティングドロップ実験において0.2μlのタンパク質溶液を0.2μlのリザーバー溶液と混合することにより、21で、結晶化液滴を設定した。0.1Mトリス(pH8.5)、0.01M塩化コバルト、20%ポリビニルピロリドンK15から、5日以内に結晶が現れ、8日以内に0.3mm×0.06mm×0.03mmの最終サイズまで成長した。

40

【 0 1 8 4 】

凍結保護物質として15%グリセロールを使って結晶を採取し、次に液体N2中で瞬間凍結した。回折像は、Swiss Light SourceのビームラインX10SAにおいて、100Kの温度で、Pilatus 6M検出器を使って収集し、プログラムXDS[Kabsch, W., J. Appl. Cryst. 26 (1993) 795-800]で処理し、SCALA[BRUKER AXSから入手]でスケーリングすることで、2.22

50

分解能までのデータを得た。このFabフラグメント結晶は単斜晶系空間群P21に属し、格子定数は $a = 90.23$ 、 $b = 118.45$ 、 $c = 96.79$ および $\beta = 117.53^\circ$ で、結晶学的非対称単位あたり4つのFab分子を含有する（表2参照）。

【 0 1 8 5 】

CCP4ソフトウェアスイートからの標準的結晶学プログラムを使って、PDBエントリ3PQPを探索モデルとする分子置換法で構造を解き、電子密度を計算し、X線構造を精密化した [CCP4 (Collaborative Computational Project, N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallogr. D (1994) 760-763]。COOTを使って構造モデルを電子密度に合わせた (Emsley, P., et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 60 (2010) 486-501)。REFMAC5 (Murshudov, G.N., et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 53 (1997) 240-255) およびautoBUSTER (Global Phasing Ltd.) で座標を精密化した。

【 0 1 8 6 】

（表2）単斜晶系 μ M33 Fabフラグメントアポ結晶に関するデータ収集および構造精密化の統計値

データ収集	
波長 (Å)	1.0
分解能 ¹ (Å)	2.22 (2.34-2.22)
独立な反射 ¹	77716 (11301)
完全性 (%) ¹	98.0 (100)
$R_{\text{merge}} (\%)^{1,2}$	6.4 (44.4)
$\langle I/\sigma \rangle^1$	8.3 (1.7)
単位格子 (空間群C2)	$a=90.23\text{Å}$ $b=118.45\text{Å}$ $c=96.73\text{Å}$ および $\beta=117.53^\circ$
精密化	
分解能 (Å)	2.2 (2.28-2.22)
$R_{\text{cryst}}^{1,3}$	20.66 (21.84)
$R_{\text{free}}^{1,4}$	25.23 (26.47)
精密化における原子の数	13314
理想的な結合距離 (Å)/結合角 (°) からのr.m.s.偏差	0.01 / 1.21
主鎖二面角 (%) 優 (most favored)/良 (allowed)/ 可 (generous)/不可 (disallowed) ⁵	90.4 / 9.1 / 0.3 / 0.2

¹ 括弧内は最外殻分解能の値 (highest resolution bin) を示す。

² $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_i |I_i - \langle I \rangle|}{\sum_i I_i}$ (式中、 I は強度である)。

³ $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_i |F_{0i} - \langle F_c \rangle|}{\sum_i F_{0i}}$ (式中、 F_{0i} は構造因子振幅観測値であり、 F_c は構造因子振幅計算値である)。

⁴ R_{free} は精密化に際して省略した総データの5%に基づいて計算した。

⁵ PROCHECK [Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structure. J. Appl. Crystallogr. 26, 283-291 (1993)] で計算した。

【 0 1 8 7 】

ピオチン誘導体との複合体を形成しているFabフラグメントの結晶化については、浸漬 (soaking) 実験に使用するFabフラグメントのアポ結晶が、スクリーニング後、3日以内に、0.8Mコハク酸から析出し、それが5日以内に0.25mm x 0.04mm x 0.04mmの最終サイズまで成長した。ピオシチンアミドを100mMの濃度で水に溶解した。次に、その化合物を結晶化溶液に10mMの作業濃度まで希釈し、結晶化液滴中の結晶に適用した。

【 0 1 8 8 】

結晶を2 μ lの10mM化合物溶液で3回洗浄し、最後にピオシチンアミドと共に21 で16時間インキュベートした。

【 0 1 8 9 】

凍結保護物質として15%グリセロールを使って結晶を採取し、次に液体N₂中で瞬間凍結した。回折像は、Swiss Light SourceのビームラインX10SAにおいて、100Kの温度で、Pilatus 6M検出器を使って収集し、プログラムXDS [Kabsch, W., J. Appl. Cryst. 26 (1993) 795-800] で処理し、SCALA [BRUKER AXSから入手] でスケーリングすることで、2.35分解能までのデータを得た。このFabフラグメント結晶は単斜晶系空間群P21に属し、格子定数はa = 89.09 、 b = 119.62 、 c = 96.18 および $\beta = 117.15^\circ$ で、結晶学的非対称単位あたり4つのFab分子を含有する (表3参照)。

10

【 0 1 9 0 】

CCP4ソフトウェアスイートからの標準的結晶学プログラムを使って、アポFabフラグメントの座標を探索モデルとする分子置換法で構造を解き、電子密度を計算し、X線構造を2.5 の分解能まで精密化した [CCP4 (Collaborative Computational Project)]。COOTを使って構造モデルを電子密度に合わせた (Emsley, P., et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 60 (2010) 486-501)。REFMAC5 (Murshudov, G.N., et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 53 (1997) 240-255) およびautoBUSTER (Global Phasing Ltd.) で座標を精密化した。

20

【 0 1 9 1 】

(表3) 単斜晶系muM33 Fabフラグメントピオシチンアミド複合体結晶に関するデータ収集および構造精密化の統計値

データ収集	
波長(Å)	1.0
分解能 ¹ (Å)	2.35 (2.45-2.35)
独立な反射 ¹	74645 (8714)
完全性 (%) ¹	99.9 (99.9)
R _{merge} (%) ^{1,2}	6.30 (65.00)
$\langle I/\sigma \rangle$ ¹	10.29 (1.18)
単位格子 (空間群C2)	a=89.09Å b=119.62Å c=96.18Å および $\beta=117.15^\circ$
精密化	
分解能(Å)	2.5 (2.565-2.500)
R _{cryst} ^{1,3}	20.92 (36.86)
R _{free} ^{1,4}	27.56 (47.5)
精密化における原子の数	13656
理想的な結合距離(Å)/結合角(°)からのr.m.s.偏差	0.009 / 1.43
主鎖二面角 (%) 優/良/可/不可 ⁵	87.5 / 12.0 / 0.2 / 0.3

30

40

¹ 括弧内は最外殻分解能の値を示す。

² $R_{merge} = \frac{\sum |I - \langle I \rangle|}{\sum I}$ (式中、Iは強度である)。

³ $R_{cryst} = \frac{\sum |F_o - \langle F_c \rangle|}{\sum F_o}$ (式中、F_oは構造因子振幅観測値であり、F_cは構造因子振幅計算値である)。

⁴ R_{free}は精密化に際して省略した総データの5%に基づいて計算した。

⁵ PROCHECK [Laskowski, R.A., et al., J. Appl. Crystallogr. 26, 283-291 (1993)] で計算した。

【 0 1 9 2 】

50

複合体の結晶形は、非対称単位中に4つの独立したビオシチンアミド:抗ビオチンFab複合体を含有しており、ビオシチンアミドは全てのFab分子によって同じように結合されていた。ビオシチンアミド (biocytidinamide) は、重鎖のCDR1および3ならびに3つ全ての軽鎖CDRによって形成されるポケットに結合している。リガンドの結合ポケットは、重鎖からの残基ASN29、ASP31、THR32、PHE33、GLN35、TRP99およびTRP106ならびに軽鎖からのASN31、TYR32、LEU33、SER34、TYR49、SER50、PHE91およびTYR96によって画定されている。ビオチンヘッド基は、ポケットの一端にあるCDR2およびCDR1の残基と水素結合を形成する。すなわち、ビオシチンアミドのN3はSer50のヒドロキシル酸素と相互作用し、一方、O22は、同じ残基のバックボーンアミド窒素と接触している。加えて、ビオシチンアミドのO22は、Ser34のヒドロキシル酸素に水素結合もしている。これに加えて、ビオシチンアミドと、結合ポケットを裏打ちしている芳香族側鎖との間に、疎水性相互作用が観察される。ビオチンの(CH₂)₄脂肪族テールの端にあるアミド結合は、重鎖CDR1のPHE33にスタッキングし、PHE33のバックボーンアミド窒素およびAsp31へのさらなる水素結合によって安定化されている。これは、活性実体への連結部位であるアミド窒素を、窒素に続く原子が結合ポケットを離れて溶媒の方向に向くように配置する。

【0193】

2.5 の分解能での結合領域の実験的決定の結果により、組換えビオチン結合モジュールのタンパク質工学による詳細なモデリングとさらなる改良にとっての必要条件であるリガンドとその抗体との結合様式の特徴付けが可能になる。

【0194】

実施例4

組換え抗ビオチン抗体の組成、発現および精製

マウスおよびヒト化抗ビオチン抗体可変領域をヒト起源の定常領域と組み合わせて、単一特異性または二重特異性キメラまたはヒト化抗体を形成させた。

【0195】

単一特異性ヒト化抗ビオチン抗体、およびビオチンに加えて非ビオチン標的 (例えば受容体チロシンキナーゼまたはIGF-1R) とも特異的に結合する二重特異性ヒト化抗ビオチン抗体の生成には、(i) そのような分子のアミノおよびヌクレオチド配列の設計と定義、(ii) トランスフェクト培養哺乳動物細胞におけるこれらの分子の発現、および (iii) トランスフェクト細胞の上清からのこれらの分子の精製が必要であった。これらの段階は、以前にPCT/EP2011/074273に記載したように行った。

【0196】

一般的には、(元の)マウス抗ビオチン抗体の結合特異性を有するIgGクラスのヒト化抗体を生成するために、サブクラスIgG1のヒトFc領域のCH1-ヒンジ-CH2-CH3のN末端にヒト化VH配列をインフレームに融合した。同様に、ヒトCLカッパ定常領域のN末端にヒト化VL配列をインフレームに融合した。

【0197】

ビオチン結合特異性と他の標的への特異性とを併せもつ二重特異性抗体誘導体を生成するために、以前に記載された重鎖のC末端に、抗ビオチン抗体、scFvまたはFabフラグメントをインフレームに融合した。多くの場合、適用した抗ハプテンscFvは、以前に記載されたVH44-VL100ジスルフィド結合の導入によって、さらに安定化された (例えばReiter, Y., et al., Nature biotechnology 14 (1996) 1239-1245)。

【0198】

発現プラスミド:

重鎖および軽鎖を発現させるための発現カセットを含む発現プラスミドは、哺乳動物細胞発現ベクター中で別々に組み立てられた。これにより、個々の要素をコードする遺伝子セグメントは、上に概説したように接続された。

【0199】

コドン使用頻度を推定することができるヒト軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列に関する一般情報は、Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Intere

10

20

30

40

50

st, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication No 91-3242に与えられている。

【0200】

軽鎖の転写単位は次の要素から構成される：

- ・ヒトサイトメガロウイルス (hCMV) からの前初期エンハンサーおよびプロモーター、
- ・コザック配列を含む合成5'-UT、
- ・シグナル配列イントロンを含むマウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- ・5'端にユニークBsmI制限部位を配し、3'端にスプライス供与部位およびユニークNotI制限部位を配した、クローン化可変軽鎖cDNA、
- ・イントロン2マウスIg- エンハンサーを含むゲノムヒト 遺伝子定常領域 (Picard, D., and Schaffner, W. Nature 307 (1984) 80-82)、および
- ・ヒト免疫グロブリン -ポリアデニル化 (「ポリA」) シグナル配列。

10

【0201】

1重鎖の転写単位は次の要素から構成される：

- ・ヒトサイトメガロウイルス (hCMV) からの前初期エンハンサーおよびプロモーター、
- ・コザック配列を含む合成5'-UT、
- ・シグナル配列イントロンを含む修飾マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- ・5'端にユニークBsmI制限部位を配し、3'端にスプライス供与部位およびユニークNotI制限部位を配した、クローン化単一特異性可変重鎖cDNAまたはクローン化二重特異性融合sc Fv可変重鎖cDNA、
- ・マウスIg μ -エンハンサーを含む、ゲノムヒト 1重鎖遺伝子定常領域 (Neuberger, M.S., EMBO J. 2 (1983) 1373-1378)、および
- ・ヒト 1-免疫グロブリンポリアデニル化 (「ポリA」) シグナル配列。

20

【0202】

軽鎖または 1-重鎖発現カセットの他に、これらのプラスミドは

- ・ハイグロマイシン耐性遺伝子、
 - ・エプスタイン・バー・ウイルス (EBV) の複製起点oriP、
 - ・大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクター-pUC18からの複製起点、
 - ・大腸菌におけるアンピシリン耐性を付与する -ラクタマーゼ遺伝子
- を含有する。

30

【0203】

組換えDNA技法：

クローニングは、Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載の標準的クローニング技法を使って行った。分子生物学用試薬は (別段の表示がない場合) 全て市販されており、製造者の説明書に従って使用した。

【0204】

コード配列、変異またはさらなる遺伝子要素を含有するDNAは、Genart AG (レーゲンズブルク) によって合成された。

【0205】

DNA配列は、SequiServe (SequiServe GmbH、ドイツ) で行われた両鎖配列決定によって決定された。

40

【0206】

DNA配列およびタンパク質配列の解析ならびに配列データ管理：

配列の作成、マッピング、解析、アノテーション、および図解には、Vector NTI Advanceスイート・バージョン9.0を使用した。

【0207】

抗ビオチン抗体および誘導体の発現：

懸濁状態のヒト胎児腎臓293 (HEK293) 細胞の一過性トランスフェクションによって、抗ビオチン抗体を発現させた。そのために、対応する単一特異性または二重特異性抗体の

50

軽鎖および重鎖を、上に概説したように、原核生物選択マーカ―および真核生物選択マーカ―を保有する発現ベクター中に構築した。これらのプラスミドを大腸菌中で増幅し、精製した後、一過性トランスフェクションに応用した。細胞の取り扱いには、Current Protocols in Cell Biology (2000)、Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.に記載されているように、標準的細胞培養技法を使用した。

【0208】

細胞を、適当な発現培地中、37 /8%CO₂で培養した。トランスフェクションの当日に、細胞を、新鮮な培地に、1~2×10⁶個の生細胞/mlの密度で播種した。250mlの最終トランスフェクション体積用に250 μgの重鎖および軽鎖プラスミドDNAを1:1のモル比で含むOpti-MEM I培地 (Invitrogen、米国) 中に、トランスフェクション試薬とのDNA複合体を調製した。トランスフェクションの7日後に、14,000gで30分間の遠心分離と、滅菌フィルタ (0.22 μm) での濾過によって、単一特異性または二重特異性抗体を含有する細胞培養上清を清澄化した。上清を精製まで-20 で保存した。

【0209】

細胞培養上清中の抗体および誘導体の濃度を決定するために、アフィニティHPLCクロマトグラフィーを適用した。そのために、プロテインAに結合する単一特異性もしくは二重特異性抗体またはその誘導体を含有する細胞培養上清を、200mM KH₂PO₄、100mMクエン酸ナトリウムを含むpH7.4の溶液中のApplied Biosystems Poros A/20カラムに適用した。このクロマトグラフィー材料からの溶出は、200mM NaCl、100mMクエン酸を含むpH2.5の溶液を適用することによって行った。UltiMate 3000 HPLCシステム (Dionex) を使用した。溶出したタンパク質をUV吸光度とピーク面積の積分によって定量した。精製IgG1抗体を標準とした。

【0210】

抗ビオチン抗体の精製:

トランスフェクションの7日後にHEK293細胞上清を採取した。そこに含有される組換え抗体を、プロテインA-Sepharose (商標) アフィニティクロマトグラフィー (GE Healthcare、スウェーデン) を使ったアフィニティクロマトグラフィーと、Superdex200サイズ排除クロマトグラフィーとにより、2段階で上清から精製した。簡単に述べると、抗体を含有する清澄化培養上清を、PBS緩衝液 (10mM Na₂HPO₄、1mM KH₂PO₄、137mM NaClおよび2.7 mM KCl、pH7.4) で平衡化したMabSelect SuReプロテインA (5~50ml) カラムに適用した。結合していないタンパク質を平衡化緩衝液で洗い流した。抗体 (または抗体誘導体) を50mMクエン酸緩衝液 (pH3.2) で溶出させた。タンパク質含有画分を0.1mlの2Mトリス (pH9.0) で中和した。次に、溶出したタンパク質画分をプールし、Amicon Ultra遠心分離フィルタデバイス (MWCO:30K、Millipore) で濃縮し、20mMヒスチジン、140mM NaCl (pH6.0) で平衡化したSuperdex200 HiLoad26/60ゲル濾過カラム (GE Healthcare、スウェーデン) にのせた。精製された抗体および誘導体のタンパク質濃度は、Pace, et al., Protein Science 4 (1995) 2411-2423に従いアミノ酸配列に基づいて算出されたモル吸光計数を使用し、280nmにおける光学密度 (OD) を、バックラウンド補正としての320nmにおけるODと共に決定することによって決定した。単量体型の抗体画分をプールし、瞬間凍結し、-80 で保存した。試料の一部を後続のタンパク質分析および特徴付けに供した。

【0211】

抗体の均一性は、還元剤 (5mM 1,4-ジチオスレイトール (dithiothreitol)) の存在下および非存在下でSDS-PAGEを行い、クーマシーブリリアントブルーで染色することによって確認した。NuPAGE (登録商標) Pre-Castゲルシステム (Invitrogen、米国) を、製造者の説明書に従って使用した (4-20%トリス-グリシンゲル)。

【0212】

還元条件下で、IgGに関係するポリペプチド鎖は、SDS-PAGE上で、計算上の分子量に類似する見掛けの分子サイズに現れた。全ての構築物の発現レベルをプロテインAによって分析した。平均タンパク質収量は、上述の非最適化一過性発現実験では、細胞培養上清1

10

20

30

40

50

リットルあたり精製タンパク質6mg～35mgであった。

【0213】

図1は、ビオチンおよびビオチン誘導体と結合するヒト化抗体の発現および精製の結果を示している。還元および非還元SDS PAGEが、Kabatの53位にシステインを有するヒト化抗体およびKabatの53位にシステインを有しないヒト化抗体の、プロテインA (MabSelect) およびSECによる精製後の組成および均一性を示している。分子量マーカーは無印のレーンにある。還元条件下では、抗体のH鎖 (50kにある上側のバンド) およびL鎖 (25kにある下側のバンド) を、目に見える量の余分なタンパク質夾雑物が存在しないユニークバンドとして検出することができる。

【0214】

実施例5

ビオチン標識化合物 (ビオチン化合物) への組換えヒト化抗ビオチン抗体の結合

バイオレイヤー干渉法 (BLI) 技術により、Octet QK計器 (Fortebio Inc.) を使って、組換えキメラ抗ビオチン抗体および組換えヒト化抗ビオチン抗体ならびにKabatのナンバリングでHVR-H2中の53位にシステインを有するそれらの変種の結合特性を解析した。これは分子相互作用を研究するための確立されたシステムである。BLI技術は、バイオセンサーチップの表面と内部リファレンスとから反射される白色光の干渉パターンの測定に基づく。バイオセンサーチップへの分子の結合は、測定することができる干渉パターンのシフトをもたらす。上述のヒト化手法が抗ビオチン抗体のビオチンへの結合能を減少させたかどうかを解析するために、キメラ型およびヒト型の抗体の特性を、そのビオチン化タンパク質への結合能について、直接比較した。結合研究は、抗hulgG Fc抗体捕捉 (anti-hulgG Fc antibody Capture) (AHC) バイオセンサー (Fortebio Inc.) 上で抗ビオチン抗体を捕捉することによって行った。まず、20mMヒスチジン、140mM NaCl、pH6.0中、濃度が0.5 mg/mlの抗体溶液において、バイオセンサーを1分間インキュベートした。その後、安定なベースラインに到達するように、バイオセンサーを1×PBS (pH7.4) 中で1分間インキュベートした。20mMヒスチジン、140mM NaCl、pH6.0中にビオチン化タンパク質を0.06mg/mlの濃度で含有する溶液において、抗体被覆バイオセンサーを5分間インキュベートすることによって、結合を測定した。解離は1×PBS (pH7.4) 中で5分間モニターした。その結果得られたキメラ抗ビオチン化抗体とヒト化抗ビオチン抗体に関する結合曲線を直接比較した。

【0215】

ヒト化型の抗体は、キメラ抗体に等しいか、またはキメラ抗体より良好な、ビオチン化抗原の結合を示した。Kabat位置VH53にCys変異を有するヒト化抗体にも同じことが言える。ビオチン化タンパク質はバイオセンサーへの残存非特異的結合を示し、それは、ビオチンと結合しないハーセプチンでバイオセンサーを被覆すると低減した。したがって、抗ビオチン抗体の機能性は、そのヒト化変種 (SEQ ID NO:12および16、SEQ ID NO:20および24に表す配列によって定義されるもの) でも保たれていた。

【0216】

表面プラズモン共鳴:

表面プラズモン共鳴測定は、BIAcore (登録商標) T200計器 (GE Healthcare Biosciences AB、スウェーデン) で、25 において行った。4300レゾナンスユニット (RU) の捕捉系 (ヒト抗体捕捉キット (Human Antibody Capture Kit) BR-1008-39 (GE Healthcare Biosciences AB、スウェーデン) の10 µg/ml抗ヒト捕捉 (Anti-human Capture) (IgG Fc) を、GE Healthcareが供給している標準的なアミンカップリングキット (BR-1000-50) を使って、CM3チップ (GE Healthcare、BR-1005-36) にpH5.0でカップリングした。アミンカップリングのためのランニング緩衝液はHBS-N (10mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、GE Healthcare、BR-1006-70) とした。続く結合研究用のランニングおよび希釈緩衝液は、PBS-T (0.05% Tween 20を含む10mMリン酸緩衝食塩水) pH7.4とした。ヒト化抗ビオチン抗体の捕捉は、2nM溶液を5 µl/分の流速で60秒間注入することによって行った。ビオチン化 siRNAをPBS-Tで0.14～100nM (1:3希釈系列) の濃度に希釈した。各濃度を30 µl/分の流速

10

20

30

40

50

で180秒間注入することによって結合を測定した（解離時間600秒）。流速 $5 \mu\text{l}/\text{分}$ の 3M MgCl_2 溶液による30秒間の洗浄で、表面を再生した。BIAevaluationソフトウェア（GE Healthcare Biosciences AB、スウェーデン）を使ってデータを評価した。抗ヒトIgG Fc表面から得られた応答を差し引くことによってバルク屈折率の差を補正した。ブランク注入も差し引いた（=二重参照）。KDおよび速度論的パラメータの計算にはラングミュア1:1モデルを使用した。

【0217】

ヒト化抗ビオチン抗体SEQ ID NO:12および16ならびにヒト化抗ビオチン抗体VH53C SEQ ID NO:20および24について、表面プラズモン共鳴（SPR）による速度論的結合解析を行った。濃度が 2nM の抗ビオチン抗体を、CM3センサーチップに結合している抗ヒトIgG Fc抗体によって捕捉した。ビオチン化siRNA（Mw:13868Da）の結合を、 0.41 、 1.23 、 3.7 、 11.1 、 33.3 、 100 および 300nM の濃度で記録した。測定は二重に行った。計算された K_D は、ヒト化抗ビオチン抗体およびヒト化抗ビオチン抗体VH53Cについて、それぞれ 0.633nM および 0.654nM であった。

【0218】

実施例6

ビオチン化合物と抗ビオチン抗体との非共有結合的複合体の生成

一般的方法：

抗ビオチン抗体とビオチン化合物（=ペイロードにコンジュゲートされたビオチン）との複合体の生成は、明確な複合体をもたらすべきであり、これらの複合体中の化合物（=ペイロード）はその活性を保っていることが保証されるべきである。ビオチン化合物と抗ビオチン抗体との複合体を生成するために、ビオチン化合物を最終濃度が $1\text{mg}/\text{ml}$ になるように H_2O に溶解した。抗体は、 20mM ヒスチジン緩衝液、 140mM NaCl、 $\text{pH}=6.0$ 中で、 $1\text{mg}/\text{ml}$ （ $4.85 \mu\text{M}$ ）の最終濃度まで濃縮した。ビオチン化ペイロードと抗体を、モル比が $2:1$ （化合物対抗体）になるように、上下にピペッティングすることによって混合し、室温で15分間インキュベートした。

【0219】

あるいは、ビオチン化合物を最終濃度が $10\text{mg}/\text{ml}$ になるように 100% DMFに溶解した。抗体は、 50mM トリス-HCl、 1mM EDTA、 $\text{pH}=8.2$ 中で、 $10\text{mg}/\text{ml}$ の最終濃度まで濃縮した。ビオチン化合物と抗体を、モル比が $2.5:1$ （化合物対抗体）になるように、上下にピペッティングすることによって混合し、室温および 350rpm で、60分間インキュベートした。

【0220】

ビオチン化蛍光色素と抗ビオチン抗体との複合体 - ビオチン-Cy5/キメラ抗ビオチン抗体（ヒトIgGサブクラス）複合体 - を形成させるための例示的方法：

システニル化リンカーを含有するビオチン誘導体Cy5（ビオチン-Cys-Cy5）の複合体を生成するために、 0.16mg のビオチン-Cys-Cy5を、濃度が $10\text{mg}/\text{ml}$ になるように 100% DMFに溶解した。 1mg の抗体を、 50mM トリス-HCl、 1mM EDTA、 $\text{pH}8.2$ から構成される緩衝液中、 $10.1\text{mg}/\text{ml}$ （約 $69 \mu\text{M}$ ）の濃度で使用した。ビオチン-Cys-Cy5と抗体を $2.5:1$ のモル比（ビオチン-Cys-Cy5対抗体）で混合し、 350rpm で振とうしながら室温で60分間インキュベートした。その結果得られたコンジュゲートを、実施例7で述べるようにSDS-PAGEで分析した。蛍光の検出は実施例7で述べるように行った。

【0221】

ビオチン化蛍光色素と抗ビオチン抗体との複合体 - ビオチン-Cys-Cy5/ヒト化抗ビオチン抗体 - を形成させるための例示的方法：

システニル化リンカーを含有するビオチン誘導体Cy5（ビオチン-Cys-Cy5）の複合体を生成するために、 0.16mg のビオチン-Cys-Cy5を、濃度が $10\text{mg}/\text{ml}$ になるように 100% DMFに溶解した。 1mg の抗体を、 50mM トリス-HCl、 1mM EDTA、 $\text{pH}8.2$ から構成される緩衝液中、 $5.5\text{mg}/\text{ml}$ （約 $38 \mu\text{M}$ ）の濃度で使用した。ビオチン-Cys-Cy5と抗体を $2.5:1$ のモル比（ビオチン-Cys-Cy5対抗体）で混合し、 350rpm で振とうしながら室温で60分間インキュベートした。その結果得られたコンジュゲートを、実施例7で述べるようにSDS-PAGEで分析した

。蛍光の検出は実施例7で述べるように行った。

【0222】

ビオチン化ポリペプチドと抗ビオチン抗体との複合体 - Ac-PYY-PEG3-Cys- -Ala- ビオチン/キメラ抗ビオチン抗体複合体 - を形成させるための例示的方法:

システイニル化リンカーを含有するビオチン化-PYY-ポリペプチドの非共有結合的複合体を生成するために、0.19mgのAc-PYY-PEG3-Cys- -Ala- ビオチンを、濃度が10mg/mlになるように100%DMFに溶解した。抗体は、50mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH8.2から構成される緩衝液中、10.7mg/ml (約73 μM) の濃度で使用した。Ac-PYY-PEG3-Cys- -Ala- ビオチンと抗体を2.5:1のモル比 (Ac-PYY-PEG3-Cys- -Ala- ビオチン対抗体) で混合し、室温、350rpmで、60分間インキュベートした。その結果得られた複合体は、サイズ排除クロマトグラフィーにおいて単一ピークが存在することから、単量体型のIgG様分子 (95%モノマー) であることが明らかになった。得られた複合体を、SDS-PAGEとそれに続くウェスタンブロット解析によって、さらに分析した。10 μgの複合体を4×LDS試料緩衝液 (Invitrogen) と混合し、95 で5分間インキュベートした。試料を4-12%ビス-トリスポリアクリルアミドゲル (NuPAGE、Invitrogen) にのせ、それを200Vおよび120mAで35分間泳動した。ポリアクリルアミドゲル中で分離した分子をPVDFメンブレン (孔径0.2 μm、Invitrogen) に25Vおよび160mAで40分間転写した。メンブレンを、1×PBST (1×PBS + 0.1% Tween20) 中、1% (w/v) 脱脂乳により、室温で1時間ブロッキングした。メンブレンを1×PBST中で5分間ずつ3回洗浄した後、ストレプトアビジン-PODコンジュゲート (2900U/ml、Roche) (1:2000希釈で使用) と共にインキュベートした。メンブレン上のビオチンに結合したストレプトアビジン-PODの検出は、Lumi-Lightウェスタンブロットティング基質 (Roche) を使って行った。

【0223】

ビオチン化ポリペプチドと抗ビオチン抗体との複合体 - Ac-PYY-PEG3-Cys-PEG2- ビオチン/キメラ抗ビオチン抗体複合体 - を形成させるための例示的方法:

システイニル化リンカーを含有するビオチン化-PYY-ポリペプチドの非共有結合的複合体を生成するために、0.16mgのAc-PYY-PEG3-Cys-PEG2- ビオチンを、濃度が10mg/mlになるように100%DMFに溶解した。抗体は、50mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH8.2から構成される緩衝液中、10.7mg/ml (約73 μM) の濃度で使用した。Ac-PYY-PEG3-Cys-PEG2- ビオチンと抗体を2.5:1のモル比 (Ac-PYY-PEG3-Cys-PEG2- ビオチン対抗体) で混合し、室温、350rpmで、60分間インキュベートした。その結果得られた複合体は、サイズ排除クロマトグラフィーにより、63%が単量体型IgG様分子であり、37%が二量体型可溶性凝集体であることが明らかになった。得られた複合体を、SDS-PAGEとそれに続くウェスタンブロット解析によって、さらに分析した。10 μgの複合体を4×LDS試料緩衝液 (Invitrogen) と混合し、95 で5分間インキュベートした。試料を4-12%ビス-トリスポリアクリルアミドゲル (NuPAGE、Invitrogen) にのせ、それを200Vおよび120mAで35分間泳動した。ポリアクリルアミドゲル中で分離した分子をPVDFメンブレン (孔径0.2 μm、Invitrogen) に25Vおよび160mAで40分間転写した。メンブレンを、1×PBST (1×PBS + 0.1% Tween20) 中、1% (w/v) 脱脂乳により、室温で1時間ブロッキングした。メンブレンを1×PBST中で5分間ずつ3回洗浄した後、ストレプトアビジン-PODコンジュゲート (2900U/ml、Roche) (1:2000希釈で使用) と共にインキュベートした。メンブレン上のビオチンに結合したストレプトアビジン-PODの検出は、Lumi-Lightウェスタンブロットティング基質 (Roche) を使って行った。

【0224】

酸化還元剤の非存在下でのハプテン化色素およびポリペプチドと抗ハプテン抗体VH53Cとの明確な共有結合的コンジュゲートの生成

共有結合的抗ビオチン抗体/ビオチン化ポリペプチドまたはビオチン化色素ジスルフィド連結コンジュゲートを生成するには、(i) ポリペプチドを抗体表面上に露出させることでその活性を保つことを可能にする適切な反応性基 (例えばシステイン、マレイミドなど) 含有リンカーを介して、ビオチンをポリペプチドまたは色素にカップリングすること、および(ii) ポリペプチドの生物学的活性が保たれている、ビオチン化ポリペプチドと

システイン変異を有する抗ビオチン抗体 (= 抗体VH52bC/VH53C) との部位特異的共有結合コンジュゲートを生成すること、および (iii) 抗体鎖間ジスルフィド橋の還元を避けるために、還元剤の非存在下で反応を行うことが必要である。

【0225】

一般的方法:

抗ビオチン抗体とビオチン化合物とのコンジュゲートの生成は、明確な化学量論でコンジュゲートをもたらすべきであり、これらのコンジュゲート中の化合物はその活性を保っていることが保証されるべきである。ビオチン化合物と抗ビオチン抗体とのコンジュゲートを生成するために、ビオチン化合物を最終濃度が10mg/mlになるように100%DMFに溶解した。抗ビオチン抗体VH52bC/VH53Cを、50mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH=8.2中、10 mg/mlの濃度にした。ビオチン化合物と抗ビオチン抗体VH52bC/VH53Cを、モル比が2.5:1 (化合物対抗体) になるように、上下にピペティングすることによって混合し、室温および350rpmで、60分間インキュベートした。

10

【0226】

システイン含有リンカーを介してビオチンにコンジュゲートされたポリペプチドを、以下、ビオチン-Cys-ポリペプチドまたはポリペプチド-Cys-ビオチンと呼ぶ。ポリペプチドは遊離のN末端を有してもよいし、例えばアセチル基 (Ac-ポリペプチド-Cys-ビオチン) またはPEG残基 (PEG-ポリペプチド-Cys-ビオチン) でキャッピングされたN末端を有してもよい。

20

【0227】

以下、システイン含有リンカーを介してビオチンにコンジュゲートされた蛍光色素を色素-Cys-ビオチンまたはビオチン-Cys-色素と呼ぶ。

20

【0228】

ビオチン化蛍光色素と抗ビオチン抗体とのコンジュゲート - ビオチン-Ser-Cy5/ヒト化抗ビオチン抗体 - を形成させるための例示的方法:

リンカー内にセリン残基を含有するビオチン誘導体Cy5 (ビオチン-Ser-Cy5) の複合体を生成するために、0.61mgのビオチン-Ser-Cy5を、10mg/mlの濃度になるように、20mMヒスチジン、140mM NaCl、pH6.0に溶解した。18.5mgのヒト化抗ビオチン抗体を、50mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH8.2から構成される緩衝液中、10mg/ml (約69 μM) の濃度で使用した。ビオチン-Ser-Cy5と抗体を2.5:1のモル比 (ビオチン-Ser-Cy5対抗体) で混合し、350rpmで振とうしながら室温で60分間インキュベートした。次に、20mMヒスチジン、140mM NaCl、pH6.0を移動相とし、1.5ml/分の流速で、Superdex 200 16/60高負荷分取用 (high load prep) カラム (GE Healthcare) を用いるサイズ排除クロマトグラフィーに、試料を付した。ピーク画分を収集し、SDS-PAGEで純度を分析した。色素対抗体比は、(1) 280 nm (タンパク質) および650nm (Cy5) で試料の吸光度を測定し、(2) 式: 標識されたタンパク質の $A_{650} / (Cy5) \times \text{タンパク質濃度 (M)} = \text{タンパク質1モルあたりの色素のモル数}$ (ここで、 $(Cy5) = 250000 M^{-1} cm^{-1}$ 、複合体の $A_{650} = 47.0$ 、およびタンパク質濃度は86.67 μMである) を使用することによって計算した。その結果得られた色素対抗体分子の比は2.17であった。これは、全ての抗体パラトープがビオチン-Cy5分子で飽和していることを示唆している。

30

40

【0229】

ビオチン化蛍光色素と抗ビオチン抗体とのコンジュゲート - ビオチン-Cys-Cy5/キメラ抗ビオチン抗体VH53C - を形成させるための例示的方法:

システニル化リンカーを含有するビオチン誘導体Cy5のコンジュゲートを生成するために、0.16mgのビオチン-Cys-Cy5を、濃度が10mg/mlになるように100%DMFに溶解した。1mgの抗ビオチン抗体VH53Cを、50mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH8.2から構成される緩衝液中、9.7mg/ml (約68 μM) の濃度で使用した。ビオチン-Cys-Cy5と抗体を2.5:1のモル比 (Ac-ビオチン-Cys-Cy5対抗体) で混合し、350rpmで振とうしながら室温で60分間インキュベートした。その結果得られたコンジュゲートを、実施例7で述べるようにSDS-PAGEで分析した。蛍光の検出は実施例7で述べるように行った。

50

【0230】

ビオチン化蛍光色素と抗ビオチン抗体とのコンジュゲート - ビオチン-Cys-Cy5/ヒト化抗ビオチン抗体VH53C - を形成させるための例示的方法:

システニル化リンカーを含有するビオチン誘導体化Cy5のコンジュゲートを生成するために、0.16mgのビオチン-Cys-Cy5を、濃度が10mg/mlになるように100%DMFに溶解した。1mgのヒト化抗ビオチン抗体VH53Cを、50mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH8.2から構成される緩衝液中、7.4mg/ml (約51 μM)の濃度で使用した。ビオチン-Cys-Cy5と抗体を2.5:1のモル比 (Ac-ビオチン-Cys-Cy5対抗体) で混合し、350rpmで振とうしながら室温で60分間インキュベートした。その結果得られたコンジュゲートを、実施例7で述べるようにSDS-PAGEで分析した。蛍光の検出は実施例7で述べるように行った。

10

【0231】

ビオチン化ポリペプチドと抗ビオチン抗体とのコンジュゲート - Ac-PYY(PEG3-Cys- Ala-ビオチン)/キメラ抗ビオチン抗体VH53C - を形成させるための例示的方法:

システニル化リンカーを含有するビオチン誘導体化PYY-ポリペプチドのコンジュゲートを生成するために、0.19mgのAc-PYY(PEG3-Cys- Ala-ビオチン)を、濃度が10mg/mlになるように100%DMFに溶解した。1mgのキメラ抗ビオチン抗体VH53Cを、50mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH8.2から構成される緩衝液中、9.7mg/ml (約67 μM)の濃度で使用した。Ac-PYY(PEG3-Cys- Ala-ビオチン)と抗体を2.5:1のモル比 (Ac-PYY(PEG3-Cys- Ala-ビオチン)対抗体) で混合し、350rpmで振とうしながら室温で60分間インキュベートした。その結果得られたコンジュゲートを質量分析によって分析した。検出された分子種の87.7%は、2つのペプチド分子にカップリングされた抗体と同定され、12.3%は1つのペプチド分子にカップリングされた抗体と同定された。

20

【0232】

ビオチン化ポリペプチドと抗ビオチン抗体とのコンジュゲート - Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-ビオチン)/キメラ抗ビオチン抗体VH53C - を形成させるための例示的方法:

システニル化リンカーを含有するビオチン誘導体化PYY-ポリペプチドのコンジュゲートを生成するために、0.16mgのAc-PYY(PEG3-Cys-PEG2-ビオチン)を、濃度が10mg/mlになるように100%DMFに溶解した。1mgのキメラ抗ビオチン抗体VH53Cを、50mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH8.2から構成される緩衝液中、9.9mg/ml (約68 μM)の濃度で使用した。Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-ビオチン)と抗体を2.5:1のモル比 (Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-ビオチン)対抗体) で混合し、350rpmで振とうしながら室温で60分間インキュベートした。その結果得られたコンジュゲートを質量分析によって分析した。検出された分子種の100%が2つのペプチド分子にカップリングされた抗体と同定された。

30

【0233】

ビオチン化ポリペプチドと抗ビオチン抗体とのコンジュゲート - Ac-PYY(PEG3-Cys- Ala-ビオチン)/ヒト化抗ビオチン抗体VH53C - を形成させるための例示的方法:

システニル化リンカーを含有するビオチン誘導体化PYY-ポリペプチドのコンジュゲートを生成するために、0.06mgのAc-PYY(PEG3-Cys- Ala-ビオチン)を、濃度が10mg/mlになるように100%DMFに溶解した。0.8mgのヒト化抗ビオチン抗体VH53Cを、50mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH8.2から構成される緩衝液中、9mg/ml (約62 μM)の濃度で使用した。Ac-PYY(PEG3-Cys- Ala-ビオチン)と抗体を2.5:1のモル比 (Ac-PYY(PEG3-Cys- Ala-ビオチン)対抗体) で混合し、350rpmで振とうしながら室温で60分間インキュベートした。その結果得られたコンジュゲートを質量分析によって分析した。検出された分子種の62.2%は2つのペプチド分子にカップリングされた抗体と同定され、33.9%は1つのペプチド分子にカップリングされた抗体と同定され、3.9%はカップリングされていない抗体と同定された。

40

【0234】

ビオチン化ポリペプチドと抗ビオチン抗体とのコンジュゲート - Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-ビオチン)/ヒト化抗ビオチン抗体VH53C - を形成させるための例示的方法:

システニル化リンカーを含有するビオチン誘導体化PYY-ポリペプチドのコンジュゲ

50

トを生成するために、0.08mgのAc-PYY(PEG3-Cys-PEG2-ビオチン)を、濃度が10mg/mlになるように100%DMFに溶解した。0.8mgのヒト化抗ビオチン抗体VH53Cを、50mMトリス-HCl、1mM EDTA、pH8.2から構成される緩衝液中、9mg/ml(約62 μ M)の濃度で使用した。Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-ビオチン)と抗体を2.5:1のモル比(Ac-PYY(PEG3-Cys-PEG2-ビオチン)対抗体)で混合し、350rpmで振とうしながら室温で60分間インキュベートした。その結果得られたコンジュゲートを質量分析によって分析した。検出された分子種の71.4%が2つのペプチド分子にカップリングされた抗体と同定され、26%が1つのペプチド分子にカップリングされた抗体と同定され、2.5%がカップリングされていない抗体と同定された。

【0235】

実施例7

検出方法

SDSゲル電気泳動:

SDSゲル電気泳動のために、4 \times LDS試料緩衝液(Invitrogen)を試料に加えた。各試料について、10 \times NuPAGE試料還元剤(Invitrogen)を加えることによって、還元型試料も調製した。全ての試料を70 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートしてから、1 \times MOPS緩衝液(Invitrogen)を使って4-12%ビス-トリスポリアクリルアミドゲル(NuPAGE、Invitrogen)での電気泳動を行った。

【0236】

蛍光検出:

ゲル中のCy5関連蛍光は、LumiImager F1デバイス(Roche)を使って、645nmの励起波長で検出した。蛍光の検出後に、ゲルをSimplyBlue SafeStain(Invitrogen)で染色した。

【0237】

実施例8

血清安定性

ビオチン化Cy5とヒト化抗ビオチン抗体VH53Cとの共有結合的コンジュゲートと比較した、ビオチン化Cy5とヒト化抗ビオチン抗体との複合体の血清安定性

ここに記載するペプチド修飾技術の目的は、ペプチドの治療上の利用可能性を改良することである。治療上の利用にとって主たる障害は、現在のところ制限があるインビボ安定性および/または短い血清中半減期と迅速なクリアランスである。フルオロフォアの抗体コンジュゲートのPKパラメータをインビボで決定した。それを非共有結合的抗体-フルオロフォア複合体のPKと比較する。そこで、(i)抗ビオチン抗体VH53Cをビオチン化フルオロフォアBiot-Cys-Cy5に共有結合でコンジュゲートし、(ii)抗ビオチン抗体とビオチン化フルオロフォアBiot-Cy5との非共有結合的複合体を生成し、(iii)共有結合的にコンジュゲートされた化合物と、非共有結合的に複合体化された化合物とを動物に適用し、(iv)これらの動物における化合物の血清中濃度を経時的に分析した。

【0238】

実験手法:

小さな蛍光性基質が抗体複合体化のPKパラメータに及ぼす影響を解析するために、20mMヒスチジン/140mM NaCl、pH6.0中の13nmolのCy5-ビオチン/ヒト化抗ビオチン抗体ジスルフィド連結コンジュゲートまたは対応する抗体非共有結合的複合体化合物を、各物質について6匹の雌マウス(NRMI系統)に適用する。次に挙げる時点後に、約0.1mlの血液試料を収集する:マウス1および2では0.08時間、8時間および48時間、マウス3および4では0.08時間、24時間および48時間、ならびにマウス5および6では0.08時間、36時間および48時間。室温で1時間後に遠心分離(9,300 \times g、3分、4 $^{\circ}$ C)によって少なくとも40 μ lの血清試料を得る。血清試料を-80 $^{\circ}$ Cで保存する。

【0239】

所与の時点における血清中の化合物の量を決定するためにCy5の蛍光特性を使用する。すなわち、Cary Eclipse蛍光分光測光器(Varian)を使って、血清試料中のCy5関連蛍光を、120 μ l石英キュベット中、室温で測定する。励起波長は649nmであり、発光は670nmで測定される。適当な発光強度範囲になるように血清試料を1 \times PBSで希釈する。それぞれの

10

20

30

40

50

試料と同じ希釈度にした1×PBS中の無処置マウスの血清を、ブランクプローブとして使用する。

【0240】

以上の発明は、明快に理解されるように、説明と例示のためにいくらか詳しく説明したが、これらの説明および実施例が本発明の範囲を限定するとみなしてはならない。本明細書において言及した全ての特許および科学文献の開示は、特に、参照により、そのまま本明細書に組み込まれる。

【0241】

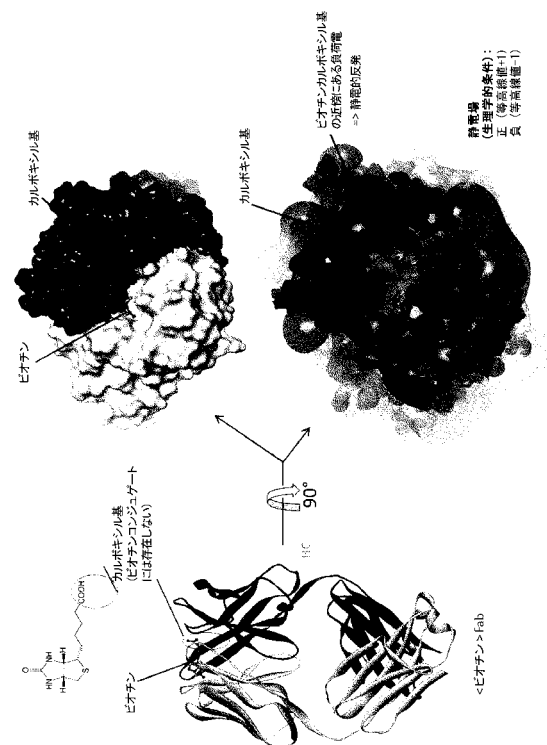
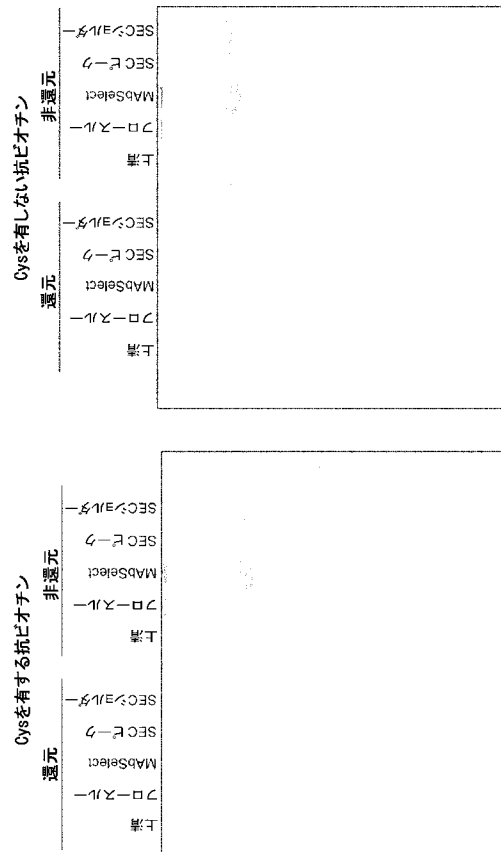
実施例9

ビオチンアミドとの複合体を形成しているマウス抗ビオチン抗体FabフラグメントのX線構造決定

ビオチンアミドとの複合体を形成しているマウス抗ビオチン抗体Fabフラグメントのタンパク質構造を決定した。そのために、Fabフラグメントの結晶を、0.8Mコハク酸中で成長させ、次に、抗体結晶にビオチンアミドを装填した（結晶化溶液で10mMの作業濃度に希釈し、結晶化液滴中の結晶に適用した）。結晶を2μlの10mMビオチンアミド溶液で3回洗浄し、最後にビオチンアミドと共に21℃で16時間インキュベートし、凍結保護物質として15%グリセロールを使って採取し、液体窒素中で瞬間凍結した。処理した回折像は、2.5 Åの分解能でタンパク質構造を与えた。ビオチン結合性可変領域の構造および電荷組成を図2に示す。ビオチンは、CDR領域からのアミノ酸で構成される荷電領域に挟まれた表面ポケット中に結合する。複合体を形成したハプテンは、負に荷電したアミノ酸のクラスターに近接している。ビオチンは、ハプテンとしてペイロードカップリングのためにそのカルボキシル基で誘導体化されており、これは、(COOH基を欠くので)その位置における電荷反発がないことから、効率よく結合する。これに対し、遊離の(普通の)ビオチンは、そのカルボキシル基がこの負電荷クラスターに近接することで反発が起きることから、抗体に効率よく結合することができない。

【図1】

【図2】



10

20

【配列表】

2018090567000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年11月30日(2017.11.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) SEQ ID NO:19のアミノ酸配列を含むHVR-H3、

(b) SEQ ID NO:18のアミノ酸配列を含むHVR-H2、

(c) SEQ ID NO:17のアミノ酸配列を含むHVR-H1、

(d) SEQ ID NO:23のアミノ酸配列を含むHVR-L3、

(e) SEQ ID NO:22のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および

(f) SEQ ID NO:21のアミノ酸配列を含むHVR-L1

を含む、ヒト化抗ビオチン抗体またはビオチンと結合するそのフラグメント。

【請求項2】

Kabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの24位にアミノ酸残基セリンを含み、かつ/またはKabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの73位にアミノ酸残基スレオニンを含むことを特徴とする、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

(a) SEQ ID NO:20のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVH配列、

(b) SEQ ID NO:24のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVL配列、または

(c) (a)のVH配列および(b)のVL配列

を含む抗体であって、Kabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの24位のアミノ酸残基がセリンであり、かつ/またはKabatによるナンバリングで重鎖可変ドメインの73位のアミノ酸残基がスレオニンである、請求項1に記載の抗体。

【請求項4】

SEQ ID NO:20のVH配列を含む、請求項2に記載の抗体。

【請求項5】

SEQ ID NO:24のVL配列を含む、請求項2または4に記載の抗体。

【請求項6】

SEQ ID NO:20のVH配列およびSEQ ID NO:24のVL配列を含む、ヒト化抗ビオチン抗体またはビオチンと結合するそのフラグメント。

【請求項7】

完全長IgG1抗体または完全長IgG4抗体である、請求項1に記載の抗体。

【請求項8】

モノクローナル抗体である、請求項1または6に記載の抗体。

【請求項9】

ビオチンと結合する抗体フラグメントである、請求項1または6に記載の抗体。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/18 (2006.01)	C 1 2 N 5/18	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ブリンクマン ウルリッヒ
ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム ファイヒトルシュトラッセ 1 2

(72)発明者 ゲオルゲス ガイ
ドイツ連邦共和国 ハーバツハ アム ベルクグラーベン 1 1

(72)発明者 グローテ ミヒャエル
ドイツ連邦共和国 ペンツベルク ザエルヴァイアーシュトラッセ 1 5

(72)発明者 ホフマン アイケ
ドイツ連邦共和国 ヘルシング アム アマーゼー キエンバツハシュトラッセ 1 ビー

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC06 CC24 CE12 DA01
4B065 AA91Y AA92X AA93X AB01 AB05 BA02 BC03 BD15 BD18 CA25
CA44
4C085 AA14 BB36 EE01
4H045 AA11 AA30 BA09 BA10 BA41 CA50 DA76 EA20 FA72 FA74
GA15 GA26