

(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2007-501011

(P2007-501011A)

(43) 公表日 平成19年1月25日(2007.1.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 B O 6 4
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 104 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-522603 (P2006-522603)
 (86) (22) 出願日 平成16年7月28日 (2004.7.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年4月3日 (2006.4.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/024218
 (87) 国際公開番号 W02005/012531
 (87) 国際公開日 平成17年2月10日 (2005.2.10)
 (31) 優先権主張番号 60/491,877
 (32) 優先日 平成15年8月1日 (2003.8.1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

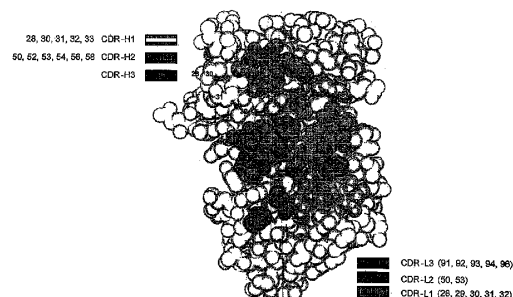
(71) 出願人 596168317
 ジェネンテック・インコーポレーテッド
 GENENTECH, INC.
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
 0-4990・サウス・サン・フランシス
 コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義敦
 (72) 発明者 フェローズ, フレデリック エー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 941
 10, サン フランシスコ, 23番 スト
 リート 3648

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 制限多様性配列を有する結合型ポリペプチド

(57) 【要約】

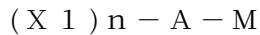
本発明は、非常に制限されたアミノ酸配列多様性を含む変異型CDRを提供する。前記ポリペプチドは新規の抗原結合型ポリペプチドを同定するための母集団として用いることができる柔軟性のある単純な配列多様性の母集団を提供する。また、本発明は少なくともファージやウイルスコートタンパク質の一部などの異種性ポリペプチドとの融合ポリペプチドとして前記ポリペプチドを提供する。複数の前記ポリペプチドを含むライブラリもまた提供する。加えて、前記ポリペプチド及びライブラリを生成する及び使用するための方法と組成物を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列：



を有する変異型CDRH3領域を含んでなるポリペプチドであり、X1は10又は10以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、 $n = 3 \sim 20$ であるポリペプチド。

【請求項 2】

X1がコドンセットTMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT又はこれらの組み合わせによってコード化される、請求項1に記載のポリペプチド。 10

【請求項 3】

X1がコドンセットTMT及び／又はKMTによってコード化される、請求項2に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

アミノ酸配列が $(X1)n - A - M - D - Y$ である、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

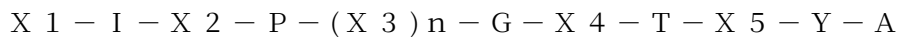
$n = 7 \sim 20$ である、請求項2に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

X1が抗体4D5のCDRH3のアミノ酸位置95に一致する、請求項1に記載のポリペプチド。 20

【請求項 7】

アミノ酸配列：



を有する変異型CDRH2を含んでなるポリペプチドであり、X1、X2、X3、X4及び／又はX5は10又は10以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化され、 $n = 1 \sim 2$ であるポリペプチド。

【請求項 8】

制限コドンセットがTMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT又はこれらの組み合わせである、請求項7に記載のポリペプチド。 30

【請求項 9】

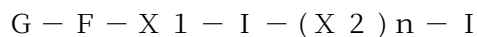
コドンセットがTMT及び／又はKMTである、請求項8に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

$n = 2$ である、請求項8に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

アミノ酸配列：



を有する変異型CDRH1を含んでなるポリペプチドであり、X1及び／又はX2が10又は10以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化され、 $n = 2 \sim 4$ であるポリペプチド。 40

【請求項 12】

コドンセットがTMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT又はこれらの組み合わせである、請求項11に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

コドンセットがTMT及び／又はKMTである、請求項12に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

$n = 4$ である、請求項12に記載のポリペプチド。

【請求項 15】

アミノ酸配列：

$Q-X1-(X2)_n-P-X3-T-F$

を有する変異型CDRL3を含んでなるポリペプチドであり、X1がQであるか又は欠損しており、X2及び／又はX3は10又は10以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化され、 $n=2\sim4$ であるポリペプチド。

【請求項16】

制限コドンセットがTMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT又はこれらの組み合わせである、請求項15に記載のポリペプチド。

【請求項17】

コドンセットがTMT及び／又はKMTである、請求項16に記載のポリペプチド。

【請求項18】

$n=4$ である、請求項16に記載のポリペプチド。

【請求項19】

アミノ酸配列：

$Y-X1-A-S-X2-L$

を有する変異型CDRL2を含んでなるポリペプチドであり、X1及び／又はX2は10又は10以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化されるポリペプチド。

【請求項20】

制限コドンセットがTMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT又はこれらの組み合わせである、請求項19に記載のポリペプチド。

【請求項21】

コドンセットがTMT及び／又はKMTである、請求項20に記載のポリペプチド。

【請求項22】

アミノ酸配列：

$S-Q-(X1)_n-V$

を有する変異型CDRL1を含んでなるポリペプチドであり、X1が10又は10以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化され、 $n=3\sim5$ であるポリペプチド。

【請求項23】

制限コドンセットがTMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT又はこれらの組み合わせである、請求項22に記載のポリペプチド。

【請求項24】

コドンセットがTMT及び／又はKMTである、請求項23に記載のポリペプチド。

【請求項25】

$n=5$ である、請求項23に記載のポリペプチド。

【請求項26】

変異型CDRH1、H2、H3、L1、L2及び／又はL3を含んでなるポリペプチドであり、該変異型CDRが溶媒と接触しうる非常に多様な少なくとも一のアミノ酸位置に変異型アミノ酸を有し、該変異型アミノ酸が10又は10以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化されるポリペプチド。

【請求項27】

ポリペプチドが、カバットシステムに従って番号付けした位置95、96、97、98、99、100及び100aの少なくとも一的位置に変異型アミノ酸を有する変異型CDRH3を含んでなる、請求項1ないし6及び26の何れかに記載のポリペプチド。

【請求項28】

ポリペプチドが、位置95、96、97、98、99、100及び100とC末端配列

10

20

30

40

50

A M D Yの間の位置の少なくとも一の位置に変異型アミノ酸を有する変異型C D R H 3を含んでなる、請求項1ないし6及び26の何れかーに記載のポリペプチド。

【請求項29】

変異型C D R H 3が一以上の位置への挿入を含み、該一以上の位置が制限コドンセットによりコードされるアミノ酸を含む、請求項1ないし6及び26の何れかーに記載のポリペプチド。

【請求項30】

ポリペプチドが、カバットシステムに従って番号付けした位置50、52、53、54、56及び58の少なくとも一の位置に変異型アミノ酸を有する変異型C D R H 2を含んでなる、請求項7ないし10及び26の何れかーに記載のポリペプチド。

10

【請求項31】

ポリペプチドが、カバットシステムに従って番号付けした位置28、30、31、32及び33の少なくとも一の位置に変異型アミノ酸を有する変異型C D R H 1を含んでなる、請求項11ないし14及び26の何れかーに記載のポリペプチド。

【請求項32】

ポリペプチドが、カバットシステムに従って番号付けした位置92、93、94、95及び97の少なくとも一の位置に変異型アミノ酸を有する変異型C D R L 3を含んでなる、請求項15ないし18及び26の何れかーに記載のポリペプチド。

【請求項33】

ポリペプチドが、カバットシステムに従って番号付けした位置51及び54の少なくとも一の位置に変異型アミノ酸を有する変異型C D R L 2を含んでなる、請求項19ないし21及び26の何れかーに記載のポリペプチド。

20

【請求項34】

ポリペプチドが、カバットシステムに従って番号付けした位置29、30、31、32及び33の少なくとも一の位置に変異型アミノ酸を有する変異型C D R L 1を含んでなる、請求項22ないし25及び26の何れかーに記載のポリペプチド。

【請求項35】

制限コドンセットがT M T、W M T、R M C、R M G、R R C、R S A、M K C、Y M T、R S T、K M T、S R C、M R T、W M T又はこれらの組み合わせである、請求項1ないし34の何れかーに記載のポリペプチド。

30

【請求項36】

コドンセットがT M T及び／又はK M Tである、請求項1ないし35の何れかーに記載のポリペプチド。

【請求項37】

請求項1ないし36の何れかーに記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を含んでなる核酸。

【請求項38】

請求項37に記載の核酸を含んでなるベクター。

【請求項39】

複製可能な発現ベクターである、請求項38に記載のベクター。

40

【請求項40】

ベクターが、l a c Zプロモータ系、アルカリホスファターゼp h o Aプロモータ（A p）、バクテリオファージl p_Lプロモータ（温度感受性プロモータ）、t a cプロモータ、トリプトファンプロモータおよびバクテリオファージT7プロモータからなる群から選択されるポリペプチドに連結したプロモータ領域を有する、請求項39に記載のベクター。

【請求項41】

ウイルス表面上に表出される請求項1ないし36の何れかーに記載のポリペプチドを含んでなるウイルス。

【請求項42】

50

複数の少なくとも 1×10^4 の請求項 1 ないし 36 の何れかーに記載の異なるポリペプチド配列を含んでなるライブラリ。

【請求項 43】

請求項 39 又は 40 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 44】

さらに、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 又は CDRL3 からなる群から選択される少なくとも 1、2、3、4 又は 5 の付加的な変異体 CDR を含み、少なくとも一の CDR が溶媒と接触しうる非常に多様な少なくとも一のアミノ酸位置に変異型アミノ酸を有し、該変異型アミノ酸が 10 又は 10 以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化される、請求項 1 ないし 25 の何れかーに記載のポリペプチド。 10

【請求項 45】

制限コドンセットが TMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT 又はこれらの組み合わせである、請求項 44 に記載のポリペプチド。

【請求項 46】

制限コドンセットが 4 又は 4 以下のアミノ酸をコードする、請求項 45 に記載のポリペプチド。

【請求項 47】

制限コドンセットが 2 のアミノ酸のみをコードする、請求項 44 ないし 46 の何れかーに記載のポリペプチド。 20

【請求項 48】

2 のアミノ酸が Y 及び S である、請求項 47 に記載のポリペプチド。

【請求項 49】

変異型 CDRH3 を含み、付加的な CDR が CDRH1 及び／又は CDRH2 である、請求項 44 ないし 48 の何れかーに記載のポリペプチド。

【請求項 50】

さらに、変異型軽鎖 CDR を含む、請求項 49 に記載のポリペプチド。

【請求項 51】

変異型軽鎖 CDR が CDRL3 である、請求項 50 に記載のポリペプチド。 30

【請求項 52】

さらに、変異型 CDRL1 及び／又は CDRL2 を含む、請求項 51 に記載のポリペプチド。

【請求項 53】

ポリペプチドが重鎖抗体可変ドメインである、請求項 1 ないし 36 及び 44 ないし 52 の何れかーに記載のポリペプチド。

【請求項 54】

(a) 請求項 1 ないし 14 の何れかーに記載のポリペプチドを含む重鎖抗体可変ドメイン；と

(b) 請求項 15 ないし 25 の何れかーに記載のポリペプチドを含む軽鎖抗体可変ドメイン； 40

を有する少なくとも二つの抗体可変ドメインを含んでなるポリペプチド。

【請求項 55】

さらに、重鎖抗体可変ドメインの C 末端領域に連結した二量体化ドメインを含む、請求項 1 ないし 36 及び 44 ないし 54 の何れかーに記載のポリペプチド。

【請求項 56】

二量体化ドメインがロイシンジッパードメイン又は少なくとも一のシステイン残基を含む配列を含む、請求項 55 に記載のポリペプチド。

【請求項 57】

二量体化ドメインが抗体からのヒンジ領域及びロイシンジッパーを含む、請求項 56 に 50

記載のポリペプチド。

【請求項 58】

二量体化ドメインが単一システインである、請求項 55 に記載のポリペプチド。

【請求項 59】

請求項 1 ないし 36 及び 44 ないし 54 の何れかーに記載のポリペプチドを含んでなる融合ポリペプチドであり、該ポリペプチドを有する抗体可変ドメインが少なくとも一のウイルスコートタンパク質の一部と融合している融合ポリペプチド。

【請求項 60】

ウイルスコートタンパク質がタンパク質 p I I I、主要コートタンパク質 p V I I I、S o c、H o c、g p D、p v l およびそれらの変異体からなる群から選択されたものである、請求項 59 に記載の融合ポリペプチド。

10

【請求項 61】

さらに、可変ドメインとウイルスコートタンパク質との間に二量体化ドメインを含む、請求項 59 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 62】

可変ドメインが重鎖のものである、請求項 61 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 63】

さらに、ペプチドタグに融合した可変ドメインを含む、請求項 59 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 64】

可変ドメインが軽鎖のものである、請求項 63 に記載の融合ポリペプチド。

20

【請求項 65】

ペプチドタグが g D、c -m y c、ポリ-h i s、蛍光タンパク質および B -ガラクトシダーゼからなる群から選択されたものである、請求項 63 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 66】

さらに、単一抗体鑄型から得られた F R 配列である、変異型 C D R に一致する抗体可変ドメインの F R 1、F R 2、F R 3 及び／又は F R 4 を含む、請求項 1 ないし 31 及び 44 ないし 54 の何れかーに記載のポリペプチド。

【請求項 67】

各々の F R が抗体 4 D 5 の配列（配列番号 1）を有する、請求項 66 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 68】

請求項 44 ないし 67 の何れかーに記載のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド分子を含む核酸。

【請求項 69】

請求項 68 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 70】

複製可能な発現ベクターである、請求項 69 に記載のベクター。

【請求項 71】

複製可能な発現ベクターが、M 1 3、f 1、f d、P f 3 ファージ又はその誘導体、又は λ 様ファージ、例えば λ、2 1、p h i 8 0、p h i 8 1、8 2、4 2 4、4 3 4 など又はその誘導体である、請求項 70 に記載のベクター。

40

【請求項 72】

ウイルス表面上に表出される請求項 1 ないし 31 及び 44 ないし 54 の何れかーに記載のポリペプチドを含んでなるウイルス。

【請求項 73】

複数の請求項 1 ないし 31 及び 44 ないし 54 の何れかーに記載のポリペプチドを含んでなり、少なくとも 1×10^4 の異なる抗体可変ドメイン配列を有するライブラリ。

【請求項 74】

請求項 70 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

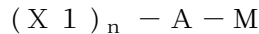
50

【請求項 75】

複数のポリペプチドを有する組成物を生成する方法であり、

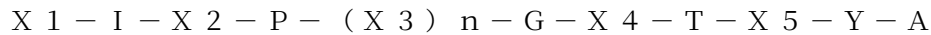
(a) CDRH1又はCDRH2又はCDRH3の変異型CDRの少なくとも一又はそれらの混合を含んでなるポリペプチド

(i) 変異型CDRH3を含んでなるポリペプチドが、アミノ酸配列：



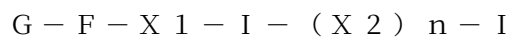
を有し、X1が10又は10以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、 $n = 3 \sim 20$ であるポリペプチド；

(ii) 変異型CDRH2を含んでなるポリペプチドが、アミノ酸配列：



を有し、X1、X2、X3、X4及び／又はX5が10又は10以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、 $n = 1 \sim 2$ であるポリペプチド；と

(iii) 変異型CDRH1を含んでなるポリペプチドが、アミノ酸配列：



を有し、X1及び／又はX2が10又は10以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、 $n = 2 \sim 4$ であるポリペプチドを複数生成することを含む方法。

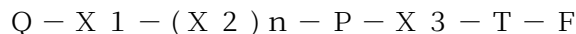
【請求項 76】

(i) 変異型CDRL1、CDRL2又はCDRL3又はそれらの混合を含み、該変異型CDRが溶媒と接触しうる非常に多様な少なくとも一のアミノ酸位置に変異を有し、該変異型アミノ酸が10又は10以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化される複数のポリペプチドを生成することをさらに含む請求項75に記載の方法。

【請求項 77】

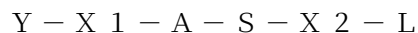
CDRL1又はCDRL2又はCDRL3の変異型CDRの少なくとも一又はそれらの混合を含んでなるポリペプチド

(i) 変異型CDRL3を含んでなるポリペプチドが、アミノ酸配列：



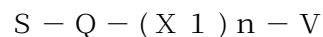
を有し、X1がQであるか又は欠損しており、X2及び／又はX3は10又は10以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化され、 $n = 2 \sim 4$ であるポリペプチド；

(ii) 変異型CDRL2を含んでなるポリペプチドが、アミノ酸配列：



を有し、X1及び／又はX2は10又は10以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化されるポリペプチド；と

(iii) 変異型CDRL1を含んでなるポリペプチドが、アミノ酸配列：



を有し、X1が10又は10以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化され、 $n = 3 \sim 5$ であるポリペプチドを複数生成することを含む、請求項75または76の方法。

【請求項 78】

(a) 請求項1ないし31及び44ないし54の何れか一に記載のポリペプチドの複数を有する組成物を生成し；

(b) 前記組成物から標的抗原に結合するポリペプチド結合体を選別し；

(c) 非結合体からポリペプチド結合体を単離し；

(d) 単離したポリペプチド結合体から所望の親和性を有する結合体を同定することを含む、標的抗原へ結合するポリペプチドの選別方法。

【請求項 79】

(a) 請求項73に記載の抗体可変ドメインのライブラリに標的抗原を接触させ；

10

20

30

40

50

(b) 非結合体から結合体を分離して、標的抗原の結合体を溶出して、そして約 $0.1 \text{ nM} \sim 1000 \text{ nM}$ の濃度の減少した量の標的抗原を含む溶液中で結合体をインキュベートし；

(c) 最も低い濃度の標的抗原に結合することができる、約 $0.1 \text{ nM} \sim 200 \text{ nM}$ の親和性を有する結合体を選別する

ことを含む、抗体可変ドメインのライブラリから標的抗原に結合する抗原結合可変ドメインを選別する方法。

【請求項 80】

標的抗原が、VEGF、IGF-1、ニュートラビジン、マルトース結合タンパク質、アポトシスタンパク質、エルビンGST、インスリン又はIgGである、請求項79に記載の方法。 10

【請求項 81】

標的抗原の濃度が約 $100 \sim 250 \text{ nM}$ である、請求項79に記載の方法。

【請求項 82】

標的抗原の濃度が約 $25 \sim 100 \text{ nM}$ である、請求項79に記載の方法。

【請求項 83】

(a) 請求項1ないし36及び44ないし54の何れか一に記載のポリペプチドを複数含むライブラリに固定した標的抗原を結合に適した条件下で接触させることによって標的抗原へのポリペプチド結合体を単離し；

(b) 非結合体からライブラリ中のポリペプチド結合体を分離して、標的抗原から結合体を溶出して結合体豊富なサブ集団を得て； 20

(c) 場合によっては、すでに選別して得られた結合体のサブ集団を用いて(a)－(b)の工程を少なくとも二度繰り返す

ことを含む、ポリペプチドのライブラリから標的抗原に結合するポリペプチドを選別する方法。

【請求項 84】

(f) 結合体が混合物を形成するのに適した条件下で $0.1 \text{ nM} \sim 1000 \text{ nM}$ の範囲の濃縮した標識した標的抗原とともにポリペプチド結合体のサブ集団をインキュベートし；

(g) 標的抗原上の標識に結合する固定した作用剤を前記混合物に接触させ； 30

(h) 標識した標的抗原に結合したポリペプチド結合体を検出して、標識した標的抗原からポリペプチド結合体を溶出し；

(i) 場合によっては、すでに選別して得られた結合体のサブ集団と前回の選別より低い濃度の標識標的抗原を用いて、(f)～(i)の工程を少なくとも二度繰り返す

ことをさらに含む、請求項83に記載の選別方法。

【請求項 85】

さらに、過剰量の非標識標的抗原を混合物に添加して、十分な時間インキュベートして標識標的抗原から親和性の低い結合体を溶出することを含む、請求項84に記載の方法。

【請求項 86】

(a) 請求項1ないし36及び44ないし54の何れか一に記載のポリペプチドを複数含むライブラリに少なくとも約 $0.1 \text{ nM} \sim 1000 \text{ nM}$ 濃度の標的抗原を接触させて、標的抗原へのポリペプチド結合体を単離し； 40

(b) 標的抗原からポリペプチド結合体を分離して、ポリペプチド結合体豊富なサブ集団を得て；

(c) 場合によっては、すでに選別して得られた結合体のサブ集団と前回の選別より低い濃度の標的抗原を用いて(a)－(b)の工程を少なくとも二度繰り返して、もっとも低い濃度の標的抗原に結合するポリペプチド結合体を単離する

ことを含む、標的抗原への高い親和性を有する結合体を単離する方法。

【請求項 87】

(a) 結合に適した条件下にてライブラリに $0.1 \text{ nM} \sim 1000 \text{ nM}$ の範囲の濃度の 50

標識した標的抗原を接触させて、ポリペプチド結合体と標識した標的抗原との複合体を形成させ；

(b) 複合体を単離して、標識した標的抗原からポリペプチド結合体を分離して、結合体豊富なサブ集団を得て；

(c) 場合によっては、すでに選別して得られた結合体のサブ集団と前回の選別より低い濃度の標的抗原を用いて (a) - (b) の工程を少なくとも二度繰り返すことを含む、請求項 1 ないし 3 6 及び 4 4 ないし 5 4 の何れか一に記載のポリペプチドを複数含むライブラリからポリペプチド結合体を選別する方法。

【請求項 8 8】

さらに、ポリペプチド結合体と標的抗原の複合体に過剰な非標識標的抗原を加えることを含む、請求項 8 7 に記載の方法。 10

【請求項 8 9】

工程を二度繰り返し、第一回目の選別の標的の濃度が約 1 0 0 n M ~ 2 5 0 n M であり、第二回目の選別では約 2 5 n M ~ 1 0 0 n M であり、第三回目の選別では約 0 . 1 n M ~ 2 5 n M である、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 0】

(a) ポリペプチドと標的抗原との結合に適した条件下にて、ライブラリの第一試料を濃縮した標的抗原とともにインキュベートし；

(b) 標的抗原なしでライブラリの第二試料をインキュベートし；

(c) ポリペプチドと固定した標的抗原との結合に適した条件下にて、第一及び第二試料のそれぞれと固定した標的抗原とを接触させ； 20

(d) 各々の試料について固定した標的抗原に結合したポリペプチドを検出し；

(e) 第二試料からの結合ポリペプチドの量に対する第一試料の結合ポリペプチドの量の割合を算出することによって、標的抗原に対するポリペプチドの親和性を測定することを含む、請求項 1 ないし 3 6 及び 4 4 ないし 5 4 の何れか一に記載のポリペプチドを複数含むライブラリのスクリーニング方法。

【請求項 9 1】

(a) C D R L 1、L 2、L 3、H 1、H 2 及び H 3 からなる群から選択した起源抗体の少なくとも 1、2、3、4、5 又はすべての C D R を含む起源抗体のうちの軽鎖可変ドメイン、重鎖可変ドメイン、又はその両方をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターを構築し； 30

(b) 1 0 又は 1 0 以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットを用いて、溶媒と接触しうる非常に多様な少なくとも一のアミノ酸位置に起源抗体の少なくとも 1、2、3、4、5 又はすべての C D R を変異させることを含む方法。

【請求項 9 2】

変異型 C D R H 3 が、アミノ酸配列：

(X 1) n - A - M

を含み、X 1 は 1 0 又は 1 0 以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、n = 3 ~ 2 0 である、請求項 9 1 に記載の方法。 40

【請求項 9 3】

変異型 C D R H 2 が、アミノ酸配列：

X 1 - I - X 2 - P - (X 3) n - G - X 4 - T - X 5 - Y - A

を含み、X 1、X 2、X 3、X 4 及び / 又は X 5 は 1 0 又は 1 0 以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化され、n = 1 ~ 2 である、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 4】

変異型 C D R H 1 が、アミノ酸配列：

G - F - X 1 - I - (X 2) n - I

を含み、X 1 及び / 又は X 2 が 1 0 又は 1 0 以下のアミノ酸をコードする制限コドンセッ 50

トによりコード化され、 $n = 2 \sim 4$ である、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 5】

変異型 C D R L 3 が、アミノ酸配列：

$Q - X 1 - (X 2) n - P - X 3 - T - F$

を含み、X 1 が Q であるか又は欠損しており、X 2 及び／又は X 3 は 1 0 又は 1 0 以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化され、 $n = 2 \sim 4$ である、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 6】

変異型 C D R L 2 が、アミノ酸配列：

$Y - X 1 - A - S - X 2 - L$

を含み、X 1 及び／又は X 2 は 1 0 又は 1 0 以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化される、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 7】

変異型 C D R L 1 が、アミノ酸配列：

$S - Q - (X 1) n - V$

を含み、X 1 が 1 0 又は 1 0 以下のアミノ酸をコードする制限コドンセットによりコード化され、 $n = 3 \sim 5$ である、請求項 9 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0 0 0 1】

(出願について)

この出願は、米国特許法規則 1. 5 3 (b) (1) に基づき出願した非仮出願であり、米国特許法 1 1 9 (e) に基づき、2 0 0 3 年 8 月 1 日に出願の仮出願第 6 0 / 4 9 1 8 7 7 号の優先権を主張し、参照によりここにその内容全体が組み込まれるものである。

【0 0 0 2】

(発明の分野)

本発明は、一般的に非常に制限されたアミノ酸レパートリーを用いて多様化した変異型 C D R、及びそのような配列を複数含むライブラリに関する。また、本発明はこれら変異型 C D R を含む融合ポリペプチドに関する。また、本発明は治療に又は試薬として用いることができる新規の結合型ポリペプチドを同定するために有用な方法及び組成物に関する。

【0 0 0 3】

(発明の背景)

ファージディスプレイ技術は抗原などのリガンドに結合する新規のタンパク質を生成し、選別するための強力なツールである。ファージディスプレイ技術の使用により、高い親和性で標的抗原に結合する配列について迅速に分類することができるタンパク質変異体の大きなライブラリを作製することができる。変異体ポリペプチドをコードしている核酸をウイルスコートタンパク質、例えば遺伝子 I I I タンパク質又は遺伝子 V I I I タンパク質をコードしている核酸配列に融合する。タンパク質ないしポリペプチドをコードしている核酸配列を遺伝子 I I I タンパク質の一部をコードする核酸配列に融合した一価ファージディスプレイ系が開発された。(Bass, S., Proteins, 8:309 (1990); Lowman and Wells, Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 3:205 (1991))。一価ファージディスプレイ系では、遺伝子融合が低レベルで発現し、野生型遺伝子 I I I タンパク質も粒子の感染性が維持されるように発現している。ペプチドライブラリを作製してそのライブラリをスクリーニングする方法は多くの特許で開示されている(例として、米国特許第 5,723,286 号、米国特許第 5,432,018 号、米国特許第 5,580,717 号、米国特許第 5,427,908 号および米国特許第 5,498,530 号)。

糸状ファージの表面上のペプチドの発現と大腸菌周辺質での機能的抗体断片の発現を証明することは、抗体ファージディスプレイライブラリの開発に重要であった(Smithら, Science (1985), 228:1315; Skerra及びPluckthun, Science (1988), 240:1038)。抗体又は

10

20

30

40

50

抗原結合ポリペプチドのライブラリは、ランダムなDNA配列を挿入したり、関連遺伝子のファミリーをクローニングして単一遺伝子を変更することを含むいくつかの方法で調製していた。ファージディスプレイを用いた抗体又は抗原結合断片を表出させる方法は、米国特許第5,750,373号、同第5,733,743号、同第5,837,242号、同第5,969,108号、同第6,172,197号、同第5,580,717号、及び同第5,658,727号に記載されている。ついで、ライブラリは所望の特性を有する抗体又は抗原結合タンパク質の発現についてスクリーニングする。

【0004】

ファージディスプレイ技術は、所望の特徴を有する抗体を調製する従来のハイブリドーマおよび組換え方法に勝るいくつかの効果がある。この技術により、より少ない時間で動物を用いることなく多様な配列を有する抗体の大きなライブラリを作製することができる。ハイブリドーマの調製又はヒト化抗体の調製は、きっと数か月で可能である。加えて、免疫化が必要ないので、ファージ抗体ライブラリは毒性のある抗原又は抗原性が低い抗原について作製することができる(Hogenboom, Immunotechniques (1988), 4:1-20)。また、ファージ抗体ライブラリは、新規なヒト抗体を生成して同定するために用いることができる。

抗体は、多種多様な場で治療的作用剤として非常に有効になってきている。例えば、腫瘍抗原であるHER-2に対するヒト化抗体は、癌の診断および治療に有効である。抗INF- γ 抗体などの他の抗体は、クローン病などの炎症性状態を治療する際に有効である。ファージディスプレイライブラリは、免疫化されたヒト、免疫化されていないヒト、生殖細胞系配列又は未処理のB細胞Igレパートリーからヒト抗体を生成するために用いられた(Barbas & Burton, Trends Biotech (1996), 14:230; Griffithsら, EMBO J. (1994), 13:3245; Vaughanら, Nat. Biotech. (1996), 14:309; Winter EP 0368 684 B1)。未処理、または免疫化されていない、抗原結合ライブラリは種々のリンパ系組織を用いて作製されている。Cambridge Antibody Technology及びMorphosysにより開発されたものなど、いくつかのライブラリが市販されている (Vaughanら, Nature Biotech 14:309 (1996); Knappikら, J. Mol. Biol. 296:57 (1999))。しかしながら、これらのライブラリの多くは、多様性が制限されている。

【0005】

高親和性抗体をファージディスプレイライブラリから同定して、単離できることは、治療的用途のための新規なヒト抗体を単離するために重要である。ライブラリからの高親和性抗体の単離は、以前から、ライブラリのサイズ、細菌細胞の産生の効率およびライブラリの多様性に少なくともある程度依存していると思われる。例えば、Knappikら, J. Mol. Biol. (1999), 296:57を参照。ライブラリのサイズは、抗体又は抗原結合タンパク質の不適当な折畳み（ホールディング）および終止コドンの存在による効率的でない産生によって減少する。抗体又は抗原結合ドメインが適切に折り畳まれない場合、細菌細胞での発現は阻害されうる。発現は、可変／定常の境界面の表層、または、選択されたCDR残基で順に残基を変異させることによって改良することができる。(Dengら, J. Biol. Chem. (1994), 269:9533, Ulrichら, PNAS (1995), 92:11907-11911; Forsbergら, J. Biol. Chem. (1997), 272:12430)。抗体ファージライブラリを細菌細胞において作製するとき、フレームワーク領域の配列は適当な折畳みを提供する因子である。

また、抗体又は抗原結合タンパク質の多様なライブラリを作製することは、高親和性抗体の単離に重要である。限定したCDRに多様化を有するライブラリは種々の方法を用いて作製されている。例えば、Tomlinson, Nature Biotech. (2000), 18:989-994を参照。抗原結合に関与することが明らかなことが多いので、CDR3領域にいくらか関心がある。重鎖上のCDR3領域は、サイズ、配列および構造的立体配座が非常に変化する。

【0006】

また、各可変重鎖及び可変軽鎖位置の全20アミノ酸を用いて可変重鎖および可変軽鎖のCDR領域をランダム化することによって、多様性を生成したものもある。全20アミノ酸を用いることで変異型抗体の配列に大きな多様性をもたらし、新規な抗体を同定する

10

20

30

40

50

可能性を増やすと思われた。(Barbas, PNAS 91:3809 (1994); Yelton, DE, J. Immunology, 155:1994 (1995); Jackson, J.R., J. Immunology, 154:3310 (1995)及びHawkins, RE, J. Mol. Biology, 226:889 (1992))。

また、天然に生じる抗体のアミノ酸分布を反映させるためにいくつかのCDRのアミノ酸置換の群を制限することによって多様性をつくる試みがあった。Garrard & Henner, Gene (1993), 128:103; Knappikら, J. Mol. Biol. (1999), 296:57を参照。これらの試みは様々な成功があったが、系統的で定量的方法に適用されなかった。CDR領域の多様性をつくる一方で、アミノ酸変異の数を最小にすることに取り組んでいる。さらに、例えば、第一ライブラリが一つの基準に従って作製されると、第一ライブラリの多様性をさらに強化することが望まれるであろう。しかしながら、実質的に収率などの実用的限界を超えることなく更なる多様化が可能になるように、この第一ライブラリは十分な多様性がありなおかつ十分にサイズを小さく保つことが必要とされる。

10

【0007】

いくつかの研究グループは、タンパク質を生成するために必要な最小数のアミノ酸蓄積の理論上及び実験上の分析を報告している。しかしながら、一般的にこれらの分析は範囲及び性質に限りがあり、制限した一連のアミノ酸タイプを用いて複合的機能を有するポリペプチドを生成することの実施可能性に関してかなりの懐疑的疑問が残る。例として、Riddleら, Nat. Struct. Biol. (1997), 4(10):805-809; Shangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994), 91:8373-8377; Heinzら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992), 89:3751-3755; Regan & Degrado, Science (1988), 241:976-978; Kamtekerら, Science (1993), 262:1680-1685; Wang & Wang, Nat. Struct. Biol. (1999), 6(11):1033-1038; Xiongら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995), 92:6349-6353; Heinzら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992), 89:3751-3755; Cannataら, Bioinformatics (2002), 18(8):1102-1108; Davidsonら, Nat. Struct. Biol. (1995), 2(10):856-863; Murphyら, Prot. Eng. (2000), 13(3):149-152; Brown & Sauer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96:1983-1988; Akanumaら, Proc. Natl. Acad. Sci. (2002), 99(21):13549-13553; Chan, Nat. Struct. Biol. (1999), 6(11):994-996を参照。

20

ゆえに、十分な程度の配列多様性を有する機能的ポリペプチドを含み、さらに更なる多様化、高率な発現などを目的とした操作に反応しやすいライブラリを作製する方法を改良する必要がある。本明細書中に記載する発明は、この必要性に応じたものであり、他の有益性も提供するものである。

30

【0008】

(本発明の開示)

本発明は、制限された多様性を有する配列を含むが、抗原結合能を維持している変異型CDRを含むポリペプチドを生成する簡素化した利便性の高い方法を提供する。特定のCDR又はすべてのCDRを多様化した場合にのみ標的結合体の十分な多様性が生じるという定理に基づいた従来の方法や、多様な範囲のアミノ酸置換（一般的に20アミノ酸すべて又はそのほとんどを置換することによる）に依存して十分な多様性を得るという従来の概念と異なり、本発明は、参照ポリペプチド又は由来する抗原の特定のCDRや特定数のCDRを多様化することに頼る必要がない高質の標的結合体を生成することができる方法を提供する。本発明は、標的抗原に結合することができる機能的ポリペプチドを含む高質の非常に多様なライブラリが非常に制限された数のアミノ酸残基がある最小限の数のアミノ酸位置を多様化することによって生成することができるという驚くべきかつ不測の発見に少なくともある程度は基づいている。本発明の方法は、迅速、利便性が高く、順応性があり、少ない数のアミノ酸をコードする制限したコドンセットの使用に基づく。配列の多様性を制限しているので、本発明の方法によって生成したポリペプチドの集団（例えば、ライブラリ）は一般的により小さいので、必要又は希望に応じてこれら集団の更なる多様化が可能となる。これは一般的に従来法では得られなかった有益性である。本発明によって生成される候補結合体ポリペプチドは質の高い標的結合特性を有しており、細胞培養物中の生成物の回収率が高い構造的特性を有する。本発明は、これら結合体ポリペプチド生

40

50

成方法、これらポリペプチドの使用法、及びこれらを含む組成物を提供する。

【0009】

一態様では、本発明は、所望の標的に対する候補結合体となる特異で別々の複数のポリペプチド及び単一のポリペプチドとして異種ポリペプチド配列（好ましくはウイルスポリペプチドの少なくとも一部の配列）及び、多様化したCDRを含む融合ポリペプチドを提供する。そのようなポリペプチドを含む組成物（ライブラリなど）は、例えば所望の標的に結合する候補免疫グロブリンポリペプチド（例えば、抗体及び抗体断片）のプールとして様々な用途に使用される。また、本ポリペプチドは非免疫グロブリンの足場（例えば、ヒト成長ホルモンなどのタンパク質）を用いて生成することができるであろう。本発明は、本発明の方法によって生成したポリヌクレオチド及びポリペプチドを含む様々な態様、本発明の方法を実施するためのシステム、キット及び製造品、及び／又は本発明のポリヌクレオチド／ポリペプチド及び／又は本発明の組成物の使用法も包含する。

10

一態様では、本発明はH1、H2、H3、L1、L2又はL3からなる群から選択される少なくとも1、2、3、4又は5の変異型CDRを有するポリペプチドであり、所望の標的抗原に結合することができるポリペプチドを生成する方法を提供し、該方法は、変異型CDRに対応する参照CDR中の少なくとも一の（又はすべての数までの任意の数の）溶媒と接触しうる非常に多様なアミノ酸位置を多様化すること；（ii）制限したコドンセット（以下の「制限コドンセット」の定義を参照）を用いてCDRの変異型コピーを生成することによって溶媒と接触しうる非常に多様なアミノ酸位置を変異させることを含む。

20

【0010】

本発明の方法の多様な態様や実施態様は、本発明の複数のポリペプチドを含むプールを生成する及び／又は使用するため、特に所望の標的抗原への候補結合体を選択して同定するために有用である。例えば、本発明は複数のポリペプチドを含んでなる組成物を生成する方法を提供するものであり、各ポリペプチドはH1、H2、H3、L1、L2又はL3からなる群から選択される少なくとも1、2、3、4又は5の変異型CDRを有し、該ポリペプチドが所望の標的抗原に結合することができ、該方法が、変異型CDRに対応する参照CDR中の少なくとも一の（又はすべての数までの任意の数の）溶媒と接触しうる非常に多様なアミノ酸位置を多様化すること；（ii）制限したコドンセットを用いてCDRの変異型コピーを生成することによって溶媒と接触しうる非常に多様なアミノ酸位置を変異させることを含み；複数のポリペプチドは、変異型アミノ酸をコードする配列中に含まれる非常に制限されたオリゴヌクレオチド縮重のある鋳型ポリヌクレオチドを増幅することによって生成され、該制限された縮重が制限コドンセットの限定した数のコドン配列を反映する。

30

他の例では、本発明は、CDRL1、L2、L3、H1、H2及びH3からなる群から選択される少なくとも1、2、3、4、5又はすべてのCDRを含む起源抗原の軽鎖、重鎖又は軽鎖及び重鎖両方の可変ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを構築し；少なくとも一の（又はすべての数までの任意の数の）溶媒と接触しうる非常に多様なアミノ酸位置の少なくとも1、2、3、4、5又はすべての起源抗体のCDRを制限コドンセットを用いて変異させることを含む方法を提供する。

40

【0011】

他の例では、本発明は、本発明の複数のポリペプチドを表出するファージ又はファジミド粒子のライブラリを構築し；粒子と標的抗原との結合に適した条件下にて粒子のライブラリに標的抗原を接触させて；標的抗原に結合しないものと結合した粒子とを分離することを含む方法を提供する。

本明細書中に記載の何れかの本発明の方法において、溶解性があり利用しやすく及び／又は非常に多様なアミノ酸位置は本明細書に記載の定義に当てはまる任意のもの、特に本明細書に記載の位置の組み合わせ、例えば本発明のポリペプチドについて記載した位置の任意の組み合わせ（ここでより詳細に記載する）であり得る。好適な変異型アミノ酸は、本明細書に記載の定義に当てはまる任意のもの、例えば、以下のより詳細に記載した本発

50

明のポリペプチドの中の変異型アミノ酸であり得る。

C D Rの多様化の設定には、C D Rの長さ及び／又は配列を多様化することを伴うであろう。例えば、C D R H 3は、制限コドンセットによってコードされるアミノ酸を有する非常に多様な及び／又は溶媒と接触しうる位置を変異させることによって、例えば7～19アミノ酸の長さやその配列を多様化されるかもしれない。いくつかの実施態様では、C D R H 3の一部は5～22、7～20、9～15又は11～13アミノ酸の範囲の長さであり、限られた数のアミノ酸をコードする制限コドンセット、例として10、8、6、4又は2以下のアミノ酸をコードするコドンセットによってコードされる一以上の位置に変異型アミノ酸を有する。ある実施態様では、C末端にアミノ酸配列A M又はA M D Yを有する。

10

【0012】

ある実施態様では、本発明のポリペプチドは、ポリペプチドに標的結合する機能がある限り多様な型であってよい。ある実施態様では、本発明のポリペプチドは融合ポリペプチドである（すなわち、異種ポリペプチド由来の2又はそれ以上の配列の融合）。本発明に従って多様化したC D Rを有するポリペプチドは、例えばファージディスプレイの使用のために、ウイルスコートタンパク質の少なくとも一部との融合ポリペプチドとして調製することができる。本発明のポリペプチドの表出のために使用することができるウイルスコートタンパク質には、タンパク質p I I I、主要コートタンパク質p V I I I、S o c（T 4ファージ）、H o c（T 4ファージ）、g p D（λファージ）、p V I又はそれらの変異体又はそれらの断片が含まれる。ある実施態様では、融合ポリペプチドは、p I I I、p V I I I、S o c、H o c、g p D、p V Iおよびそれらの変異体又はそれらの断片からなる群から選択されるウイルスコートタンパク質などのウイルスコートタンパク質の少なくとも一部と融合している。

20

ある実施態様では、多様化されたC D Rを有するポリペプチドは一以上の抗体可変ドメインであり、抗体可変ドメインはS c F v、F a b、S c F v₂、F (a b')₂及びF (a b)₂を含む多様な型でウイルス表面上に表出されうる。二価のポリペプチドの表出には、融合ポリペプチドは好ましくは二量体化ドメインを包含する。二量体化ドメインは、二量体化配列及び／又は一以上のシステイン残基を有する配列を含みうる。二量体化ドメインは好ましくは、重鎖の可変又は定常ドメイン（C H 1など）のC末端に直接的にまたは間接的に連結している。二量体化ドメインの構造は、抗体可変ドメインが（二量体化ドメインの後にアンバー停止コドンを含まないで）ウイルスコートタンパク質成分を有する融合タンパク質成分として産生されるか、抗体可変ドメインが（二量体化ドメインの後にアンバー停止コドンを含んで）主にウイルスコートタンパク質成分なしで産生されるかによって変わりうる。抗体可変ドメインが主にウイルスコートタンパク質成分を有する融合タンパク質として産生される場合、一以上のジスルフィド結合及び／又は単一二量体化配列により二価表出される。ウイルスコートタンパク質成分に融合せずに主に産生される抗体可変ドメイン（アンバー停止あり）には、システイン残基と二量体化配列の両方を含む二量体化ドメインを有することが好ましい。

30

【0013】

加えて、場合によっては、融合ポリペプチドは精製、検出及び／又はスクリーニングに有用なタグ、例としてF L A G、ポリ-h i s、g Dタグ、c -m y c、蛍光タンパク質又はB -ガラクトシダーゼを含みうる。一実施態様では、融合ポリペプチドはポリペプチドタグに融合した軽鎖可変又は定常ドメインを含む。

40

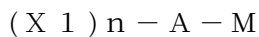
本発明の他の態様では、抗体可変ドメインなどのポリペプチドは単一起源又は鑄型分子から得たものである。起源又は鑄型分子は、原核細胞又は真核細胞の培養で産生される場合に効率よく安定しているなどの特性について選択又は設定する、及び／又は長さの違うC D R H 3領域に適応するように選択又は設定するのが好ましい。ファージコートタンパク質成分を有する融合タンパク質としてある場合、鑄型分子の配列は可変ドメインのホールディング及び／又は表出を改善するように変更することができる。例えば、起源抗体はヒト化抗体4 D 5の可変ドメイン（軽鎖可変ドメイン（図15；配列番号1））；（重鎖

50

可変ドメイン（図15；配列番号2））のアミノ酸配列を含んでもよい。例えば、重鎖又は軽鎖の抗体可変ドメイン中のフレームワーク領域残基を起源又は鋳型分子から修飾又は変更して、抗体可変ドメインのホールディング、効率、表出又は親和性を改良することができる。ある実施態様では、起源分子のフレームワーク位置にあるアミノ酸が天然に生じる抗体又はサブグループの一致配列内の位置に共通してみられる単一又は複数のアミノ酸と異なる場合、フレームワーク残基を選択して起源又は鋳型分子から修飾する。この位置にあるアミノ酸を天然に生じる抗体又はサブグループの一致配列内にもっとも共通してみられるアミノ酸に変更することができる。一実施態様では、重鎖のフレームワーク残基71はR、V又はAであるかもしれない。他の例では、重鎖のフレームワーク残基93はS又はAであるかもしれない。更なる他の例では、フレームワーク残基94はR、K又はTであるか、MRTによりコードされるかもしれない。更なる他の例では、重鎖のフレームワーク残基49はアラニン又はグリシンであるかもしれない。また、軽鎖のフレームワーク残基は変更しうる。例えば、位置66のアミノ酸はアルギニン又はグリシンであるかもしれない。

【0014】

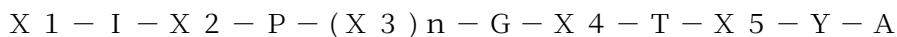
本発明の方法は、多様な組み合わせのCDR配列を含む多種多様なポリペプチドを生成することができる。例えば、一実施態様では、本発明は、アミノ酸配列：



を有する変異型CDRH3領域を含んでなるポリペプチドであり、X1は制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、nはCDRの機能的活性を維持するのに適する数であるポリペプチドを提供する。例えば、nは3～20、5～20、7～20、5～18又は7～18であり得る。一実施態様では、n=7～20である。ある実施態様では、X1がコドンセットTMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT又はこれらの組み合わせによってコード化される。一実施態様では、X1がコドンセットTMT及び／又はKMTによってコード化される。一実施態様では、アミノ酸配列が(X1)n-A-M-D-Yである。ある実施態様では、CDRH3内のアミノ酸位置95、例えば抗体4D5のCDRH3の位置95第一X1の抗体4D5のCDRH3のアミノ酸位置95に一致する。ある実施態様では、第一X1の位置は、CDRH2の末端後の位置33残基、及びシステイン残基後の2残基に一致する。ある実施態様では、第一X1の位置は、Cys-Xaa-Xaaに続く位置に一致し、ある実施態様では、それはCys-Ala-Arg又はCys-Ser-Argである。

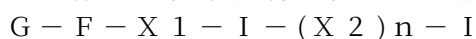
【0015】

一態様では、本発明は、アミノ酸配列：



を有する変異型CDRH2を含んでなるポリペプチドであり、X1、X2、X3、X4及び／又はX5は制限コドンセットによりコード化され、nはCDRの機能的活性を維持するのに適する数であるポリペプチドを提供する。例えば、nは1～5、1～3又は1～2であり得る。一実施態様では、n=2である。ある実施態様では、制限コドンセットがTMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT又はこれらの組み合わせである。ある実施態様では、制限コドンセットがTMT及び／又はKMTである。

他の態様では、本発明は、アミノ酸配列：

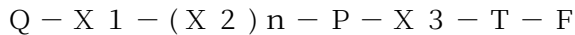


を有する変異型CDRH1を含んでなるポリペプチドであり、X1及び／又はX2が制限コドンセットによりコード化され、nはCDRの機能的活性を維持するのに適する数であるポリペプチドを提供する。例えば、nは1～4、2～4又は3～4であり得る。一実施態様では、n=4である。ある実施態様では、コドンセットがTMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT又はこれらの組み合わせである。ある実施態様では、コドンセットがTMT及び／又はKM

Tである。

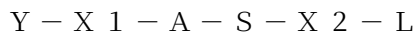
【0016】

他の態様では、本発明は、アミノ酸配列：



を有する変異型CDRL3を含んでなるポリペプチドであり、X1がQであるか又は欠損しており、X2及び／又はX3は制限コドンセットによりコード化され、nはCDRの機能的活性を維持するのに適する数であるポリペプチドを提供する。例えば、nは1～4、2～4又は3～4であり得る。一実施態様では、n=4である。ある実施態様では、制限コドンセットがTMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT又はこれらの組み合わせである。ある実施態様では、コドンセットがTMT及び／又はKMTである。 10

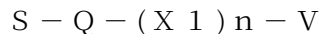
他の態様では、本発明は、アミノ酸配列：



を有する変異型CDRL2を含んでなるポリペプチドであり、X1及び／又はX2は制限コドンセットによりコード化されるポリペプチドを提供する。ある実施態様では、制限コドンセットがTMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT又はこれらの組み合わせである。ある実施態様では、コドンセットがTMT及び／又はKMTである。

【0017】

他の態様では、本発明は、アミノ酸配列：



を有する変異型CDRL1を含んでなるポリペプチドであり、X1が制限コドンセットによりコード化され、nはCDRの機能的活性を維持するのに適する数であるポリペプチドを提供する。例えば、nは1～5、2～5、3～5又は4～5であり得る。一実施態様では、n=5である。ある実施態様では、制限コドンセットがTMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT又はこれらの組み合わせである。ある実施態様では、コドンセットがTMT及び／又はKMTである。 20

明確にするために、本明細書に記載のCDR配列中でnが1より大きい場合、単一変異型のCDR内のアミノ酸Xは特定の制限コドンセットによってコード化される何れかのアミノ酸であり得る。例えば、変異型CDRH3配列内の、X1はKMTによってコード化され、n=4であり、変異型CDRH3内の4つのX1アミノ酸は、例えばAADY、AAAY、DSYA、SAYY、AAAA、SAAY、AAAY、AYDS又は制限コドンセットによってコードされる4アミノ酸の一以上の何れかの組み合わせであり得る。 30

【0018】

本発明の一実施態様では、制限コドンセットは、2～10のアミノ酸、2～8のアミノ酸、2～6のアミノ酸、2～4のアミノ酸、又は2アミノ酸のみをコードする。ある実施態様では、制限コドンセットは少なくとも2多くとも10、多くとも8、多くとも6、多くとも4のアミノ酸をコードする。一実施態様では、制限コドンセットは4単位(tetranomial)コドンセットである。他の実施態様では、制限コドンセットは二価のコドンセットである。 40

更なる他の態様では、本発明は、変異型CDRH1、H2、H3、L1、L2及び／又はL3を含んでなるポリペプチドであり、該変異型CDRが溶媒と接触しうる非常に多様な少なくとも一のアミノ酸位置に変異型アミノ酸を有し、該変異型アミノ酸が制限コドンセットによりコード化されるポリペプチドを提供する。ある実施態様では、制限コドンセットがTMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT又はこれらの組み合わせである。ある実施態様では、コドンセットがTMT及び／又はKMTである。ある実施態様では、変異型CDRは前述のアミノ酸配列を含む。

【0019】

一態様では、本発明は、カバットシステムに従って番号付けした位置 95、96、97、98、99、100 及び 100a の少なくとも一（又はすべての数までの任意の数）の位置に変異型アミノ酸を有する変異型 CDRH3 を含んでなるポリペプチドを提供する。典型的に、CDRH3 の C 末端残基は AMDY として一定に保たれている（しかし所望のポリペプチドの性質（標的抗原結合など）が実質的に維持される限り、いくつか変異させることができる）。ある実施態様では、ある実施態様では、100 と AMDY 領域の A の間のすべての位置に変異型アミノ酸を含む。ある実施態様では、100 と AMDY 領域の A の間の少なくとも一の位置に変異型アミノ酸を含む。ある実施態様では、ポリペプチドは位置 95、96、97、98、99、100 及び 100 と C 末端配列 AMDY との間の少なくとも一の位置に変異型アミノ酸を有する変異型 CDRH3 を含む。これらのポリペプチドのある実施態様では、変異型 CDRH3 は一以上の残基／位置の挿入を含み、該一以上の位置は制限コドンセットによってコード化されるアミノ酸を含む。ある実施態様では、該挿入は 1～15、3～13、5～11 又は 7～9 の残基／位置を含む。ある実施態様では、該挿入は少なくとも 1、少なくとも 3、少なくとも 5、少なくとも 7、少なくとも 9、少なくとも 11、少なくとも 13 の残基／位置を含む。ある実施態様では、該挿入は 15 以下、13 以下、11 以下、9 以下、7 以下、5 以下の残基／位置を含む。

【0020】

一態様では、本発明は、カバットシステムに従って番号付けした位置 50、52、53、54、56 及び 58 の少なくとも一（又はすべての数までの任意の数）の位置に変異型アミノ酸を有する変異型 CDRH2 を含んでなるポリペプチドを提供する。

一態様では、本発明は、カバットシステムに従って番号付けした位置 28、30、31、32 及び 33 の少なくとも一（又はすべての数までの任意の数）の位置に変異型アミノ酸を有する変異型 CDRH1 を含んでなるポリペプチドを提供する。

一態様では、本発明は、カバットシステムに従って番号付けした位置 91、92、93、94 及び 96 の少なくとも一（又はすべての数までの任意の数）の位置に変異型アミノ酸を有する変異型 CDR L3 を含んでなるポリペプチドを提供する。

一態様では、本発明は、カバットシステムに従って番号付けした位置 50 及び 53 の少なくとも一又はその両方の位置に変異型アミノ酸を有する変異型 CDR L2 を含んでなるポリペプチドを提供する。

一態様では、本発明は、カバットシステムに従って番号付けした位置 28、29、30、31 及び 32 の少なくとも一（又はすべての数までの任意の数）の位置に変異型アミノ酸を有する変異型 CDR L1 を含んでなるポリペプチドを提供する。

【0021】

一態様では、本発明は、前述の変異型 CDR を含むポリペプチドであり、該ポリペプチドは CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDR L1、CDR L2 又は CDR L3 からなる群から選択される少なくとも 1、2、3、4 又は 5 の付加的な変異体 CDR をさらに含み、変異型アミノ酸は制限コドンセットによってコード化されるポリペプチドを提供する。ある実施態様では、制限コドンセットが TMT、WMT、RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT、WMT 又はこれらの組み合わせである。ある実施態様では、制限コドンセットは少なくとも Y 及び／又は S をコード化する。一実施態様では、制限コドンセットはアラニンを含み、一実施態様では、制限コドンセットは 4 又は 4 以下のアミノ酸をコードする。一実施態様では、制限コドンセットは 2 のアミノ酸のみをコードし、一実施態様では Y 及び S である。本発明の実施態様では、制限コドンセットは 2～10 のアミノ酸、2～8 のアミノ酸、2～6 のアミノ酸、2～4 のアミノ酸、又は 2 のアミノ酸のみをコードする。ある実施態様では、制限コドンセットは少なくとも 2 多くとも 10、多くとも 8、多くとも 6、多くとも 4 のアミノ酸をコードする。一実施態様では、制限コドンセットは 4 単位(tetranomial)コドンセットである。他の実施態様では、制限コドンセットは 2 単位(binomial)コドンセットである。一例では、本発明のポリペプチドは変異型 CDRH3、及び CDRH1 及び／又は CDRH2 である少なくとも一の付加的な変異型 CDR を含む。ある実施態様では、ポリペ

チドはさらに少なくとも一の変異型軽鎖CDRを含む。一実施態様では、変異型軽鎖CDRはCDRL3である。ある実施態様では、本発明のポリペプチドはさらに変異型CDRL1及び／又はCDRL2を（例えば、変異型CDRL3と組み合わせて）含む。

【0022】

一態様では、本発明のポリペプチドは、重鎖及び軽鎖の抗体可変ドメインの少なくとも一又はその両方を含み、抗体可変ドメインは本明細書中に記載の（例えば前述に記載のような）1、2又は3の変異型CDRを含む。

ある実施態様では、本発明のポリペプチド（特に抗体可変ドメインを含むもの）は、さらに、抗体フレームワーク配列、例えば変異型CDRに一致する単一抗体鋳型由来のFR配列である抗体可変ドメインのFR1、FR2、FR3及び／又はFR4を含む。一実施態様では、FR配列はヒト抗体由来である。一実施態様では、FR配列はヒトコンセンサス配列（例えばサブグループIIIコンセンサス配列）由来である。一実施態様では、フレームワーク配列は本明細書中に記載の修飾したコンセンサス配列を含む（例えば重鎖の位置49、71、93及び／又は94、及び／又は軽鎖の位置66の修飾を含む）。一実施態様では、各FRは抗体4D5の配列（配列番号1）を有する。

【0023】

一態様では、本発明は、本発明のポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドを含む組成物を生成する方法を提供する。したがって、一態様では、本発明は、複数のポリペプチドを有する組成物を生成する方法であり、

(a) CDRH1又はCDRH2又はCDRH3の変異型CDRの少なくとも一又はそれらの混合を含んでなるポリペプチド

(i) アミノ酸配列：

(X1)n-A-M

を有する変異型CDRH3を含んでなるポリペプチドであり、X1が制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、nはCDRの機能的活性を維持しうる適当な数である（例えば3～20、5～20、7～20、5～18、7～18）ポリペプチド；

(ii) アミノ酸配列：

X1-I-X2-P-(X3)n-G-X4-T-X5-Y-A

を有する変異型CDRH2を含んでなるポリペプチドであり、X1、X2、X3、X4及び／又はX5が制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、nはCDRの機能的活性を維持しうる適当な数である（例えば1～5、1～3、1～2）ポリペプチド；と

(iii) アミノ酸配列：

G-F-X1-I-(X2)n-I

を有する変異型CDRH1を含んでなるポリペプチドであり、X1及び／又はX2が制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、nはCDRの機能的活性を維持しうる適当な数である（例えば1～4、2～4、3～4）ポリペプチドを複数生成することを含む方法を提供する。

【0024】

ある実施態様では、また、本発明の方法は、変異型CDRL1又はCDRL2又はCDRL3又はそれらの混合を含んでなる複数のポリペプチドを生成することを含み、該変異型CDRは溶媒と接触しうる非常に多様な少なくとも一のアミノ酸位置を有し；該変異型アミノ酸は制限コドンセットによりコード化される。一実施態様では、変異型CDRL3を含んでなるポリペプチドは、アミノ酸配列：

Q-X1-(X2)n-P-X3-T-F

を有し、X1がQであるか又は欠損しており、X2及び／又はX3は制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、nはCDRの機能的活性を維持しうる適当な数である（例えば1～4、2～4、3～4）。一実施態様では、変異型CDRL2を含んでなるポリペプチドは、アミノ酸配列：

10

20

30

40

50

$Y-X1-A-S-X2-L$

を有し、X1は制限コドンセットによりコード化される。一実施態様では、変異型CDRL1を含んでなるポリペプチドは、アミノ酸配列：

$S-Q-(X1)_n-V$

を有し、X1は制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、nはCDRの機能的活性を維持しうる適当な数である（例えば1～5、2～5、3～5、4～5）。

【0025】

ある態様では、本発明は、CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2及びCDRH3からなる群から選択される少なくとも1、2、3、4、5又はすべての変異型CDRを含むポリペプチドであり、該変異型CDRが前述に記載のものであるポリペプチドを提供する。

ある実施態様では、本発明のポリペプチドは、軽鎖及び重鎖の抗体可変ドメインを含み、該軽鎖可変ドメインはCDRL1、L2及びL3からなる群から選択される少なくとも1、2又は3の変異型CDRを含み、重鎖可変ドメインはCDRH1、H2及びH3からなる群から選択される少なくとも1、2又は3の変異型CDRを含むものである。

ある実施態様では、本発明のポリペプチドはScFvである。ある実施態様では、Fab断片である。ある実施態様では、F(ab)₂又はF(ab')₂である。したがって、ある実施態様では、本発明のポリペプチドはさらに二量体化ドメインを含む。ある実施態様では、二量体化ドメインは抗体重鎖又は軽鎖の可変ドメインとウイルスコートタンパク質の少なくとも一部の間に位置する。二量体化ドメインは二量体化配列及び／又は一以上のシステイン残基を含む配列を含みうる。二量体化ドメインは好ましくは重鎖可変ドメイン又は定常ドメインのC末端に直接又は間接的に連結する。二量体化ドメインの構造は、抗体可変ドメインが（二量体化ドメインの後にアンバー停止コドンを含まないで）ウイルスコートタンパク質成分を有する融合タンパク質成分として産生されるか、抗体可変ドメインが（二量体化ドメインの後にアンバー停止コドンを含んで）主にウイルスコートタンパク質成分なしで産生されるかによって変わりうる。抗体可変ドメインが主にウイルスコートタンパク質成分を有する融合タンパク質として産生される場合、一以上のジスルフィド結合及び／又は単一二量体化配列により二価表出される。ウイルスコートタンパク質成分への融合なしで主に産生される抗体可変ドメイン（アンバー停止あり）には、たとえ必要でなくとも、システイン残基と二量体化配列の両方を含む二量体化ドメインを有することが好ましい。ある実施態様では、F(ab)₂の重鎖はヒンジ領域を含まない二量体化ドメインで二量体化する。二量体化ドメインはロイシンジッパー配列を含みうる（例えばGRMKQL EDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGERG（配列番号3）などのGCN4配列）。

【0026】

ある実施態様では、本発明のポリペプチドはさらに、軽鎖可変ドメインに融合した軽鎖定常ドメインを含み、ある実施態様では、少なくとも1、2又は3の変異型CDRを含む。本発明のポリペプチドのある実施態様では、ポリペプチドはさらに、重鎖可変ドメインに融合した重鎖定常ドメインを含み、ある実施態様では、少なくとも1、2又は3の変異型CDRを含む。

ある場合では、参照ポリペプチド又は起源抗体に関して変異型となるようにフレームワーク残基を変異させることが好ましい。例えば、重鎖のフレームワーク残基71はアミノ酸R、V又はAであってよい。他の例では、重鎖のフレームワーク残基93はアミノ酸S又はAであってよい。更なる他の例では、重鎖のフレームワーク残基94はアミノ酸R、K又はT又はであるか、MRTによってコードされてよい。更なる他の例では、重鎖のフレームワーク残基49はアミノ酸A又はGであってよい。また、軽鎖のフレームワーク残基は変異されうる。例えば、軽鎖のフレームワーク残基66はアミノ酸R又はGであってよい。

【0027】

本明細書に記載のように、変異型CDRは単一参照ポリペプチド／起源抗体の一致する

10

20

30

40

50

C D Rと比較して配列が変異しているC D Rを指す。したがって、本発明の単一ポリペプチドのC D Rは好ましくは、単一参照ポリペプチド又は起源抗体の一組のC D Rに一致する。本発明のポリペプチドは変異型C D Rの何れか一又は組み合わせを含みうる。例えば、本発明のポリペプチドは変異型C D R H 1及びC D R H 2を含みうる。本発明のポリペプチドは変異型C D R H 1、変異型C D R H 2及び変異型C D R H 3を含みうる。他の例では、本発明のポリペプチドは変異型C D R H 1、変異型C D R H 2、変異型C D R H 3及びC D R L 3を含む。他の例では、本発明のポリペプチドは変異体C D R L 1、変異体C D R L 2及び変異体C D R L 3を含む。本発明の何れかのポリペプチドはさらに、変異体C D R L 3を含んでもよい。本発明の何れかのポリペプチドはさらに、変異体C D R H 3を含んでもよい。

10

一実施態様では、本発明のポリペプチドは図5に示す変異型C D R配列の一以上を含む。

本発明のポリペプチドは、互いに複合体であり得る。例えば、本発明は2のポリペプチドを含んでいるポリペプチド複合体を提供するものであり、各々のポリペプチドは本発明のポリペプチドであり、該ポリペプチドのうちの一は少なくとも1、2又はすべての変異体C D R H 1、H 2およびH 3を含み、他のポリペプチドは変異体軽鎖C D R（例えばC D R L 3）を含む。ポリペプチド複合体は第1および第2のポリペプチド（第1および第2のポリペプチドは本発明のポリペプチドである）を含んでもよく、第一のポリペプチドは少なくとも1、2又は3の変異体軽鎖C D Rを含み、第2のポリペプチドは少なくとも1、2又は3の変異体重鎖C D Rを含む。また、本発明は、同じ変異体C D R配列を含むポリペプチドの複合体を提供する。複合体形成は、ここで記載されているような二量体化／多量体化ドメインでの二量体化／多量体化又は共有結合的相互作用（例えばジスルフィド結合を介して）を含む任意の適切な技術によって可能である（この文脈において、二量体化ドメインの一部、例えば二量体化ドメインが、ロイシンジッパー配列およびシステインを含むものでよい）。

20

別の態様においては、本発明は、本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドを含んでなる組成物を提供する。例えば、本発明は、本明細書中に記載の本発明の何れかのポリペプチドを複数含んでなる組成物を提供する。該複数は変異体アミノ酸をコード化している配列の縮重を含んでなる一組のオリゴヌクレオチドを用いて生成した複数のポリヌクレオチドによってコード化されるポリペプチドを含んでもよく、該縮重は変異型ア

30

【0028】

一態様では、本発明は、ここで記載されているような本発明のポリペプチドをコード化しているポリヌクレオチドを提供する。他の態様において、本発明は、本発明のポリペプチドをコードしている配列を含んでなるベクターを提供する。ベクターは、例えば、複製発現ベクターであり得る（例えば、複製発現ベクターは、M13、f1、fd、Pf3ファージ又はその誘導體、又はλ様ファージ、例えばλ、21、phi80、phi81、82、424、434など又はその誘導體でもよい）。ベクターは、本発明のポリペプチドをコードしている配列に連結されたプロモーター領域を含みうる。プロモータは、ポリペプチドの発現に好適な任意のもの、例えばlacZプロモータ系、アルカリホスファターゼphoAプロモータ（Ap）、バクテリオファージl_{pL}プロモータ（温度感受性プロモータ）、tacプロモータ、トリプトファンプロモータおよびバクテリオファージT7プロモータであり得る。したがって、本発明も、前述のプロモータ系からなる群から選択したプロモータを含んでなるベクターを提供する。

40

本発明のポリペプチドは、専門家の必要および要求に従って任意の好適な形で表出される。例えば、本発明のポリペプチドは、ウイルス表層、例えばファージ又はファジミドウイルス粒子上に表出される。したがって、本発明は、本発明のポリペプチド及び／又は本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むウイルス粒子を提供する。

50

【0029】

一態様では、本発明は、複数の本発明のポリペプチド又はポリヌクレオチドを含む母集団を提供するものであり、ポリペプチド又はポリヌクレオチドの各々のタイプはここで記載されているような本発明のポリペプチド又はポリヌクレオチドである。

いくつかの実施態様において、ポリペプチド及び／又はポリヌクレオチドはライブラリとして提供され、例えば、ライブラリは複数の少なくとも約 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 の異なる本発明のポリペプチド及び／又はポリヌクレオチド配列を含む。他の態様において、また本発明は、複数の本発明のウイルス又はウイルス粒子、本発明のポリペプチドを表出する各々のウイルス又はウイルス粒子を含むライブラリを提供する。本発明のライブラリは、いくらかの異なるポリペプチド、例えば少なくとも約 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 の異なるポリペプチド（配列）を表出するウイルス又はウイルス粒子を含んでよい。

10

他の態様では、本発明は、本発明のポリペプチドをコードする配列を有するポリヌクレオチド又はベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0030】

他の態様では、本発明は、特定の標的抗原、例として成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、インスリン様成長因子、n-メチオニルヒト成長ホルモンを含むヒト成長ホルモン、パラトルモン、チロキシン、インスリン、プロインシュリン、アミリン、アポトーシスタンパク質、リラキシン、プロリラキシン、卵胞刺激ホルモン（FSH）などの糖タンパクホルモン、黄体形成ホルモン（LH）、造血性成長因子、線維芽細胞成長因子、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、腫瘍壊死因子、肝細胞増殖因子、肝細胞成長因子レセプタ（c-met）、ミューラー管阻害物質（mullerian inhibiting substance）、マウスゴナドトロピン関連のポリペプチド、インヒビン、アクチビン、脈管内皮成長因子、インテグリン、NGF- β などの神経成長因子、インスリン様成長因子-I および II、エリスロポイエチン、骨誘導因子、インターフェロン、コロニー刺激因子、インターロイキン、骨形成タンパク質、LIF、SCF、ニュートラビジン、マルトース結合タンパク質、エルビンGST、インスリン、IgG、FLT-3リガンド及びkitリガンドに高い親和性のある結合体を選別する方法を提供する。

20

本発明の方法は、一以上の多様化したCDR領域を有するポリペプチド（例えばポリペプチド（抗体可変ドメインなど）ライブラリ）の母集団を提供する。これらのライブラリを分類（選別）して及び／又はスクリーニングして、標的抗原に対して親和性の高い結合体を同定する。一態様では、ライブラリからのポリペプチド結合体は、標的抗原に対する結合及び親和性について選択する。ポリペプチド結合体は、この選別方法の一以上を用いて選択して、それから、親和性及び／又は特異性（非標的抗原でなく標的抗原に対してのみの結合）についてスクリーニングしてもよい。

30

【0031】

一態様では、本発明の方法は、一以上の多様化されたCDR領域を有する複数のポリペプチドを生成し、結合に好適な条件下で標的抗原を有する複数のポリペプチドと接触させることによって標的抗原に対する結合体について複数のポリペプチドを分類する；結合しないものから標的抗原との結合体を分離し；結合体を単離し；高親和性結合体（または、所望の結合親和性を有する任意の結合体）を同定することを含む。標的抗原と結合する結合体の親和性は、例えば、当分野に公知の種々の技術、例えば本明細書中に記載の競合的ELISAなどを用いて測定することができる。場合によって、ポリペプチドは、標的抗原についての分類と組み合わせて結合体の分類に用いることができるポリペプチドタグ、例えばgD、ポリhis又はFLAGに融合させることができる。

40

他の実施態様では、抗体可変ドメインのライブラリから標的抗原に結合する抗体可変ドメインを単離又は選別する方法であり、（a）本発明のポリペプチドを複数含む母集団に、固定した標的抗原を結合に適した条件下で接触させて、標的抗原ポリペプチド結合体を単離し；（b）非結合体からポリペプチド結合体を分離して、標的抗原から結合体を溶出し；（c）場合によっては、（a）－（b）の工程を少なくとも一度（ある実施態様では

50

少なくとも二度) 繰り返すことを含む方法を提供する。

ある実施態様では、前記方法はさらに、(d) 結合体が混合物を形成するのに適した条件下で $0.1 \text{ nM} \sim 1000 \text{ nM}$ の範囲の濃度の標識した標的抗原とともにポリペプチド結合体をインキュベートし；(e) 標的抗原上の標識に結合する固定した作用剤を前記混合物に接触させ；(f) 標識した標的抗原からポリペプチド結合体を溶出し；(g) 場合によっては、前回の選別より連続的に低い濃度の標識標的抗原を用いて、(d) ～ (f) の工程を少なくとも一度（ある実施態様では少なくとも二度）繰り返す。場合によっては、前記方法は混合物に過剰な量の非標識の標的抗原を加えて、十分な時間インキュベートして標識した標的抗原から低親和性の結合体を溶出することを含むかもしれない。

【0032】

本発明の他の態様は、標的抗原に対して高親和性の結合体（又は所望の結合親和性を有する結合体）を単離又は選別する方法を提供する。一実施態様では、前記方法は、(a) 本発明のポリペプチドを複数含む母集団に標的抗原を接触させて、標的抗原ポリペプチド結合体を単離し（ここで用いる抗原は約 $0.1 \text{ nM} \sim 1000 \text{ nM}$ の範囲の濃度である）；(b) 標的抗原からポリペプチド結合体を分離し；(c) 場合によっては、(a) – (b) の工程を少なくとも一度（ある実施態様では少なくとも二度）、各回とももっとも低濃度の標的抗原に結合するポリペプチド結合体を単離するために連続的により低濃度の標的抗原を用いて繰り返し；(d) 様々に異なる濃度の標的抗原とともにポリペプチド結合体をインキュベートすることによって高い親和性（又は所望の親和性）で最も低濃度の標的抗原に結合するポリペプチド結合体を選別し、ポリペプチド結合体の IC_{50} を測定し；(e) 標的抗原に対して所望の親和性を有するポリペプチド結合体を同定することを含む。前記の親和性は、例えば約 $0.1 \text{ nM} \sim 200 \text{ nM}$ 、 $0.5 \text{ nM} \sim 150 \text{ nM}$ 、 $1 \text{ nM} \sim 100 \text{ nM}$ 、 $25 \text{ nM} \sim 75 \text{ nM}$ であり得る。

【0033】

他の実施態様では、ポリペプチド結合体を単離又は選別するためのアッセイであり、(a) ポリペプチド結合体と標識した標的抗原との複合体が形成するための結合に適する条件下にて、本発明のポリペプチドを複数含む母集団に標識した標的抗原を接触させて、(ここで用いる標識した標的抗原は約 $0.1 \text{ nM} \sim 1000 \text{ nM}$ の範囲の濃度である)；(b) 複合体を単離して、標識標的抗原からポリペプチド結合体を分離し；(c) 場合によっては、(a) – (b) の工程を少なくとも一度、各回ともより低濃度の標的抗原を用いて繰り返すことを含むアッセイを提供する。場合によっては、前記方法はさらに、ポリペプチド結合体と標的抗原との複合体を過剰な量の非標識標的抗原と接触させることを含んでもよい。一実施態様において、該方法の工程が二回繰り返され、第1回目の選別に用いる標的の濃度は約 $100 \text{ nM} \sim 250 \text{ nM}$ の範囲であり、第2回目の選別（行われるならば）では約 $25 \text{ nM} \sim 100 \text{ nM}$ の範囲であり、第3回目の選別（行われるならば）では約 $0.1 \text{ nM} \sim 25 \text{ nM}$ の範囲である。

また、本発明は、複数の本発明のポリペプチドを含む母集団をスクリーニングする方法であり、(a) ポリペプチドと標的抗原との結合に適した条件下にて、ポリペプチド母集団の第一試料を標的抗原とともにインキュベートし；(b) 標的抗原なしでポリペプチド母集団の第二試料を同様にインキュベートし；(c) ポリペプチドと固定した標的抗原との結合に適した条件下にて、第一及び第二試料のそれぞれと固定した標的抗原とを接触させ；(d) 各々の試料について固定した標的抗原に結合したポリペプチドの量を検出し；(e) 第二試料で結合した特定のポリペプチドの量に対する第一試料で結合した特定のポリペプチドの量の割合を算出することによって標的抗原に対する特定のポリペプチドの親和性を測定することを含むスクリーニング方法を提供する。

【0034】

また、本明細書中に記載のように作製したライブラリを特定の標的への結合と非標的抗原への結合の欠損についてスクリーニングしてもよい。一態様では、本発明は、抗体可変ドメインのライブラリから特定の標的抗原に結合する本発明の抗体可変ドメインなどのポリペプチドについてのスクリーニング方法であり、(a) 複数の本発明のポリペプチドを

10

20

30

40

50

含む母集団を作製し；（b）結合に適する条件下で、標的抗原をポリペプチド母集団と接触させ；（c）ライブラリ中の結合ポリペプチドを非結合ポリペプチドから分離し；（d）結合ポリペプチドが非標的抗原と結合するかどうかを決定することによって、標的抗原特異的結合ポリペプチドを同定し；（e）標的抗原特異的結合ポリペプチドを単離することを含む方法を提供する。ある実施態様では、工程（e）に標的抗原から結合ポリペプチドを溶出して、前記結合ポリペプチドをコードする複製発現ベクターを増幅することを含む。

【0035】

前述の分類／選別の何れかの方法の組み合わせをスクリーニング方法と組み合わせてもよい。例えば、一実施態様では、ポリペプチド結合体は、固定された標的抗原への結合について第一に選択する。ついで、固定された標的抗原と結合するポリペプチド結合体は、標的抗原に結合して非標的抗原に結合しないものをスクリーニングすることができる。標的抗原に特異的に結合するポリペプチド結合体は、必要に応じて増幅することができる。これらポリペプチド結合体は、複合体を形成するように濃縮した標識標的抗原と接触させることによって親和性の高いものを選別することができ、該標識標的抗原の濃度範囲は、約0.1 nM～約1000 nMであり、該複合体は標的抗原上の標識に結合する作用剤と接触させることによって単離する。ついで、ポリペプチド結合体は標識した標的抗原から溶出させることができ、場合によっては選別の回数を繰り返し、各回にはより低濃度の標識標的抗原を用いる。この選別方法を用いて単離した結合ポリペプチドは、例えば実施例8に記載のような溶液ファージELISAアッセイや当分野に公知の他の従来法を用いて親和性の高いものをスクリーニングすることができる。本発明の方法に用いた本発明のポリペプチドの母集団は、選別／スクリーニングの工程に適する任意の型で提供される。例えば、ポリペプチドは遊離可溶型、基質吸着型、又はファージやファジミド粒子などのウイルス粒子の表面上に存在する形でもよい。本発明の方法のある実施態様では、複数のポリペプチドはライブラリの型で提供される複数の複製ベクターによってコードされる。本明細書中に記載の選別／スクリーニング方法では、結合ポリペプチドをコードするベクターはさらに、選別／スクリーニングの反復工程（上記のように本発明の方法で選択的に行われる）に用いる十分量のポリペプチドを提供するために増幅してもよい。

【0036】

一実施態様では、本発明は、標的抗原に結合するポリペプチドの選別方法であり、
（a）本明細書中に記載の本発明のポリペプチドの複数を有する組成物を生成し；
（b）前記組成物から標的抗原に結合するポリペプチド結合体を選別し；
（c）非結合体からポリペプチド結合体を単離し；
（d）単離したポリペプチド結合体から所望の親和性を有する結合体を同定することを含む方法を提供する。

他の実施態様では、本発明は、抗体可変ドメインのライブラリから標的抗原に結合する抗原結合可変ドメインの選別方法であり、

（a）本発明の（本明細書中に記載のような）抗体可変ドメインのライブラリに標的抗原を接触させ；
（b）非結合体から結合体を分離して、標的抗原から結合体を溶出して、そして約0.1 nM～1000 nMの濃度の減少した量の標的抗原を含む溶液中で結合体をインキュベートし；
（c）最も低濃度の標的抗原に結合することができる、約0.1 nM～200 nMの親和性を有する結合体を選別することを含む方法を提供する。

一実施態様では、標的抗原の濃度は約100～250 nM、又は約25～100 nMである。

【0037】

一実施態様では、本発明は、ポリペプチドライブラリから標的抗原に結合するポリペプチドの選別方法であり、

(a) 本発明の（本明細書中に記載の）ポリペプチドを複数含むライブラリに固定した標的抗原を結合に適した条件下で接触させることによって標的抗原へのポリペプチド結合体を単離し；

(b) 非結合体からライブラリ中のポリペプチド結合体を分離して、標的抗原から結合体を溶出して結合体豊富なサブ集団を得て；

(c) 場合によっては、すでに選別して得られた結合体のサブ集団を用いて（a）－（b）の工程を少なくとも一度（ある実施態様では少なくとも二度）繰り返すことを含む方法を提供する。

ある実施態様では、本発明の方法はさらに、

(d) 結合体が混合物を形成するのに適した条件下で $0.1 \text{ nM} \sim 1000 \text{ nM}$ の範囲の濃度の標識した標的抗原とともにポリペプチド結合体のサブ集団をインキュベートし； 10

(e) 標的抗原上の標識に結合する固定した作用剤を前記混合物に接触させ；

(f) 標識した標的抗原に結合したポリペプチド結合体を検出して、標識した標的抗原からポリペプチド結合体を溶出し；

(g) 場合によっては、すでに選別して得られた結合体のサブ集団と前回の選別より低い濃度の標識標的抗原を用いて、（d）～（f）の工程を少なくとも一度（ある実施態様では少なくとも二度）繰り返すことを含む方法を提供する。

ある実施態様では、前記方法はさらに、過剰量の非標識標的抗原を混合物に添加して、十分な時間インキュベートして標識標的抗原から親和性の低い結合体を溶出することを含む。 20

【0038】

他の実施態様では、本発明は、標的抗原に対して親和性の高い結合体の単離方法であり、

(a) 本発明の（本明細書中に記載の）ポリペプチドを複数含むライブラリに少なくとも約 $0.1 \text{ nM} \sim 1000 \text{ nM}$ の濃度の標的抗原を接触させて、標的抗原へのポリペプチド結合体を単離し；

(b) 標的抗原からポリペプチド結合体を分離して、ポリペプチド結合体豊富なサブ集団を得て；

(c) 場合によっては、すでに選別して得られた結合体のサブ集団と前回の選別より低い濃度の標的抗原を用いて（a）－（b）の工程を少なくとも一度（ある実施態様では少なくとも二度）繰り返して、もっとも低い濃度の標的抗原に結合するポリペプチド結合体を単離することを含む方法を提供する。 30

一態様では、本発明は、本発明の（本明細書中に記載の）複数のポリペプチドを含むライブラリからポリペプチド結合体を選別するアッセイであり、

(a) 結合に適した条件下にてライブラリに $0.1 \text{ nM} \sim 1000 \text{ nM}$ の範囲の濃度の標識した標的抗原を接触させて、ポリペプチド結合体と標識した標的抗原との複合体を形成させ；

(b) 複合体を単離して、標識した標的抗原からポリペプチド結合体を分離して、結合体豊富なサブ集団を得て； 40

(c) 場合によっては、すでに選別して得られた結合体のサブ集団と前回の選別より低い濃度の標的抗原を用いて（a）－（b）の工程を少なくとも一度（ある実施態様では少なくとも二度）繰り返すことを含むアッセイを提供する。

【0039】

ある実施態様では、前記方法はさらに、ポリペプチド結合体と標的抗原の複合体に過剰な非標識標的抗原を加えることを含む。ある実施態様では、前述の工程は少なくとも一度（ある実施態様では少なくとも二度）繰り返し、選別の第一回目の標的濃度は約 $100 \text{ nM} \sim 250 \text{ nM}$ 、選別の第二回目では約 $25 \text{ nM} \sim 100 \text{ nM}$ 、選別の第三回目では約 0 50

． 1 n M ～ 2 5 n M である。

他の態様では、本発明は、本発明のポリペプチドを複数含むライブラリのスクリーニング方法であり、

(a) ポリペプチドと標的抗原との結合に適した条件下にて、ライブラリの第一試料を濃縮した標的抗原とともにインキュベートし；

(b) 標的抗原なしでライブラリの第二試料をインキュベートし；

(c) ポリペプチドと固定した標的抗原との結合に適した条件下にて、第一及び第二試料のそれぞれと固定した標的抗原とを接触させ；

(d) 各々の試料について固定した標的抗原に結合したポリペプチドを検出し；

(e) 第二試料からの結合ポリペプチドの量に対する第一試料の結合ポリペプチドの量の割合を算出することによって、標的抗原に対するポリペプチドの親和性を測定することを含む方法を提供する。 10

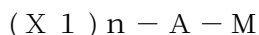
【0040】

一実施態様では、本発明は、

(a) C D R L 1、L 2、L 3、H 1、H 2 及び H 3 からなる群から選択した起源抗体の少なくとも 1、2、3、4、5 又はすべての C D R を含む起源抗体のうちの軽鎖可変ドメイン、重鎖可変ドメイン、又はその両方をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターを構築し；

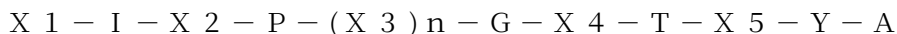
(b) 制限コドンセットを用いて、溶媒と接触しうる非常に多様な少なくとも一のアミノ酸位置に起源抗体の少なくとも 1、2、3、4、5 又はすべての C D R を変異させることを含む方法を提供する。 20

一実施態様では、本発明の方法に用いる母集団中のポリペプチドは、X 1 が制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、n が C D R の機能的活性を保持しうる好適な数である、アミノ酸配列：



を有する変異型 C D R H 3 を含む。

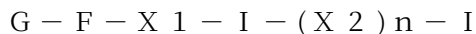
一実施態様では、本発明の方法に用いる母集団中のポリペプチドは、X 1、X 2、X 3、X 4 及び／又は X 5 が制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、n が C D R の機能的活性を保持しうる好適な数である、アミノ酸配列：



を有する変異型 C D R H 2 を含む。 30

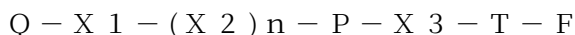
【0041】

一実施態様では、本発明の方法に用いる母集団中のポリペプチドは、X 1 及び／又は X 2 が制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、n が C D R の機能的活性を保持しうる好適な数である、アミノ酸配列：



を有する変異型 C D R H 1 を含む。

一実施態様では、本発明の方法に用いる母集団中のポリペプチドは、X 1 が Q であるか又は欠損しており、X 2 及び／又は X 3 が制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、n が C D R の機能的活性を保持しうる好適な数である、アミノ酸配列： 40



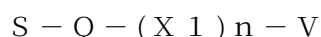
を有する変異型 C D R L 3 を含む。

更なる他の実施態様では、本発明の方法に用いる母集団中のポリペプチドは、X 1 及び／又は X 2 が制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸である、アミノ酸配列：



を有する変異型 C D R L 2 を含む。

更なる他の実施態様では、本発明の方法に用いる母集団中のポリペプチドは、X 1 が制限コドンセットによりコード化されるアミノ酸であり、n が C D R の機能的活性を保持しうる好適な数である、アミノ酸配列：



を有する変異型 C D R L 1 を含む。

【0042】

本発明の結合ポリペプチドの診断的及び治療的使用を包含する。ある診断的用途では、本発明は、対象とするタンパク質の存在を検出する方法であり、該タンパク質を含むことが予測される試料を本発明の結合ポリペプチドにさらし、試料への結合ポリペプチドの結合を検出することを含む方法を提供する。この使用には、本発明は、結合ポリペプチドと、タンパク質を検出するための結合ポリペプチドの使用についての指示書とを含むキットを提供する。

さらに本発明は、結合ポリペプチドをコードする単離した核酸；核酸、場合によってはベクターを形質移入した宿主細胞によって認識されるコントロール配列に操作可能に連結している核酸を含むベクター；ベクターを形質移入した宿主細胞；核酸が発現されるように該宿主細胞を培養して、場合によっては宿主細胞培養物（例えば宿主細胞培養液）から結合ポリペプチドを回収することを含む結合ポリペプチドの産生過程を提供する。

また、本発明は、本発明の結合ポリペプチドと担体（薬学的に受容可能な担体）又は希釈剤を含む組成物を提供する。治療的使用のための組成物は滅菌され、凍結乾燥されていてもよい。また、本明細書中に記載の適応症を治療するための医薬の製造における本発明の結合ポリペプチドの使用も包含する。さらに組成物は化学療法剤、細胞障害性剤又は抗血管形成剤などの第二治療剤を含みうる。

【0043】

本発明はさらに、哺乳動物の治療方法であり、哺乳動物に本発明の結合ポリペプチドの有効量を投与することを含む方法を提供する。前記方法で治療する哺乳動物は非ヒト哺乳動物、例えばギャザリング臨床前データに好適な霊長類又は齧歯動物（例えばマウス又はネズミ又はウサギ）でもよい。非ヒト哺乳動物は健康体（例えば毒物学研究において）、又は対象とする結合ポリペプチドで治療する疾患に罹患していてもよい。一実施態様では、哺乳動物は異常血管形成症（例えば病理学的血管形成症）に罹患しているか、その発症リスクがある。ある特定の実施態様では、疾患は、結腸直腸癌、腎臓細胞上皮癌、卵巣癌、肺癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、気管支肺胞上皮癌および膀胱癌からなる群から選択した癌である。他の実施態様では、疾患は、眼血管新生、例えば糖尿病性盲目、網膜症、原発性糖尿病性網膜症、年齢によって誘発された黄斑変性およびルベオオーシスに起因する疾病である。他の実施態様では、治療する哺乳動物は、浮腫（例えば脳腫瘍と関連している浮腫、脳卒中と関連している浮腫又は大脳浮腫）に罹患しているか、そのリスクがある。他の実施態様では、哺乳動物は、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、抵抗性腹水、乾癬、サルコイドーシス、動脈の動脈硬化症、敗血症、熱傷および膀胱炎からなる群から選択される疾患又は疾病に罹患しているか、そのリスクがある。他の実施態様によると、哺乳動物は、多嚢胞性卵巣疾患（POD）、子宮内膜症および子宮頸線維腫からなる群から選択される尿生殖器性疾病に罹患しているか、そのリスクがある。一実施態様では、疾患は、限定するものではないが、癌、免疫系の疾患、神経系の疾患および維管束系の疾患を含む細胞生存の調節不全（例えば細胞死の異常な量）に起因する疾病である。投与する本発明の結合ポリペプチドの量は、疾患を治療するために治療的に有効な量であろう。用量段階的増大研究では、様々な用量の結合ポリペプチドを哺乳動物に投与するであろう。他の実施態様では、治療的有效量の結合ポリペプチドをヒト患者の疾患を治療するために患者に投与する。一実施態様では、本明細書中に記載の炎症性疾患又は免疫疾患を治療するのに有用な本発明の結合ポリペプチドは F a b 又は s c F v 抗体である。したがって、このような結合ポリペプチドは炎症性疾患や免疫疾患の治療のための医薬の製造において用いることができる。本明細書中に記載の疾患又は疾病に罹患しているか、その発症リスクがある哺乳動物を、本発明のポリペプチド（例えば抗体）と第二治療薬と同時、連続して、又は組み合わせて投与することによって治療することができる。第二治療薬に加えて他の治療薬は哺乳動物に投与できる、又は所望の適応症の医薬の製造において用いることができることが理解されるであろう。

【0044】

本ポリペプチドは、例えばヒトの腫瘍を移植したモデルマウスにおいて移植された非宿主腫瘍の成長への宿主間質性細胞の協調の役割を理解するために用いることができる。本ポリペプチドは、本発明のポリペプチドで治療した後の齧歯動物又はウサギに移植した腫瘍の成長を観察又はモニタリングすることによって、治療的処置を回避したヒト腫瘍を同定する方法に用いることができる。また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドと他の治療薬との併用療法を研究し、評価するために用いることができる。本発明のポリペプチドは、疾患又は類似の疾患に罹患した動物に該ポリペプチドを投与して該疾患の一以上の症状が寛解するかどうかを決定することによって他の疾患における対象とする標的分子の役割を研究するために用いることができる。

明確にするために、本明細書中に記載のすべてのアミノ酸番号付けは、特に又は文中で示さない限り、Kabatら（以下の「定義」の詳述を参照）に従った。 10

【0045】

（本発明の実施形態）

本発明は、CDR配列（抗体可変ドメイン配列を含む）を多様化するための新規の、非慣習的な、非常に簡略化された順応性のある方法及び、多数、一般的には非常に多くの多様化されたCDR（抗体可変ドメイン配列を含む）を含むライブラリを提供する。そのようなライブラリは、例えば結合親和性や結合力などの所望の活性を有する合成抗体クローンを選別する及び／又はスクリーニングするのに有用な組み合わせライブラリを提供する。このようなライブラリは、多種多様な任意の標的抗原と相互作用することができる免疫グロブリンポリペプチド配列を同定するために有用である。例えば、本発明のファージディスプレイとして発現される多様化した免疫グロブリンポリペプチドを含むライブラリは所望の抗原結合分子を選択したり、又はスクリーニングするために特に有用であり、そのためのハイスループットで効率が高く、自動化したシステムを提供する。本発明の方法は、起源又は鑄型分子の変異を最小限にして標的抗原への親和性の高い結合体を提供するため、及び抗体又は抗原結合断片が細胞培養物で産生される場合に産生効率が良いように設定するものである。 20

本発明の方法及び組成物は多くの付加的な利便性をもたらす。例えば、相対的に簡便なCDR配列を、十分に多様化した特定の標的結合配列を保持しつつ、制限した数のアミノ酸をコードするコドンセットを用いて生成することができる（対照的に従来の方法は最大限の数のアミノ酸をコードするコドンセットを用いる）。本発明に従って生成した配列母集団の性質が単純化されている（一般的に相対的にサイズが小さい）ので、母集団又はそのサブ集団が所望の特性を有するように一度同定したものの更なる多様化が可能である。 30

【0046】

本発明の方法によって得られた標的抗原結合体の配列を単純化すると、所望の結果を得るために個別化した更なる配列修飾の余地が著しく広がる。例えば、配列修飾は、親和性成熟化、ヒト化などにおいて通常行われる。限定した数のアミノ酸しかコードしていない制限コドンセットの多様化に基づくことによって、異なる制限コドンセットを用いて異なるエピトープを標的とすることができ、それ故に最大限数のアミノ酸に基づくランダム化と比較して、実施者が多様化の方法を大きくコントロールすることができるであろう。制限コドンセットを用いることはさらに、望ましくないアミノ酸、例えばメチオニンや停止コドンがこの過程から排除し、それによってライブラリの全体の質や生産性を改善することができるという利便性がある。さらに、場合によっては、潜在的結合体の構造的多様性を限定することが望ましいであろう。本発明の方法及び組成物は、この目的を達成するための順応性がある。例えば、あるアミノ酸、例えばチロシンが配列中に存在すると、旋回配位がより少なくなる。本発明の一実施態様では本明細書中に示すように、チロシン残基優勢な配列を含む変異型CDR及びその変異型CDRを含む結合体を生成することができる。 40

【0047】

定義

アミノ酸は本明細書中において、一文字表記又は三文字表記又はその両方で表す。 50

用語「親和性精製」は、化学物質または結合パートナーへ分子が特異的に誘引または結合され、その結果パートナーに結合または誘引されたままの状態での分子が不純物から分離されるような組合せまたは複合体の形成に基づく分子の精製を意味する。

用語「抗体」は最も広義で使われており、具体的には、それらが所望の生物学的活性を示す限り、単一のモノクローナル抗体（アゴニストおよびアンタゴニスト抗体を含む）、多エピトープ特異性を有する抗体組成物、親和性成熟抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体ならびに抗原結合断片（例えば、F a b、F（a b'）₂、s c F vおよびF v）をカバーする。一実施態様では、「抗体」なる用語はヒト抗体も包含する。

本明細書で使われるように、「抗体可変ドメイン」は相補性決定領域（C D R；すなわち、C D R 1、C D R 2およびC D R 3）ならびにフレームワーク領域（F R）のアミノ酸配列を含む、抗体分子の軽鎖および重鎖の部分を目指す。V_Hは重鎖の可変ドメインを目指す。V_Lは軽鎖の可変ドメインを目指す。本発明で使用する組成物及び方法によると、C D RとF Rに割り当てられるアミノ酸位置はカバットに従って規定される(Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987及び1991))。抗体または抗原結合断片のアミノ酸のナンバリングも、カバットのそれに準じる。

10

【0048】

本明細書で使われるように、用語「相補性決定領域（C D R；すなわち、C D R 1、C D R 2およびC D R 3）は、抗原結合のために存在している必要がある抗体可変ドメインのアミノ酸残基を目指す。各可変ドメインは、一般的にC D R 1、C D R 2およびC D R 3と同一とされる3つのC D R領域を持つ。各相補性決定領域はカバットが記載しているような「相補性決定領域」からのアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメインの残基約24～34（L1）、50～56（L2）、および89～97（L3）ならびに重鎖可変ドメインの31～35（H1）、50～65（H2）および95～102（H3）；Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD.(1991))、および／または「超可変ループ」からの残基（すなわち、軽鎖可変ドメインの残基約26～32（L1）、50～52（L2）および91～96（L3）ならびに重鎖可変ドメインの26～32（H1）、53～55（H2）および96～101（H3）；Chothia及びLesk, J.Mol.Biol.196:901-917頁(1987))を含んでもよい。いくつかの場合には、相補性決定領域はカバットの記載により定義されているC D R領域および超可変ループの両方からのアミノ酸を含むことができる。例えば、抗体4D5の重鎖のC D R H 1は、アミノ酸26～35を含む。

20

30

「フレームワーク領域」（以下F Rと称す）は、C D R残基以外の可変ドメイン残基である。各可変ドメインは、一般的にF R 1、F R 2、F R 3およびF R 4と同一とされる4つのF Rを持つ。C D Rがカバットの定義に従うならば、軽鎖F R残基は残基約1～23（L C F R 1）、35～49（L C F R 2）、57～88（L C F R 3）および98～107（L C F R 4）に位置し、重鎖F R残基は重鎖残基の残基約1～30（H C F R 1）、36～49（H C F R 2）、66～94（H C F R 3）および103～113（H C F R 4）に位置する。C D Rが超可変ループからのアミノ酸残基を含むならば、軽鎖F R残基は軽鎖の残基約1～25（L C F R 1）、33～49（L C F R 2）、53～90（L C F R 3）および97～107（L C F R 4）に位置し、重鎖F R残基は重鎖残基の残基約1～25（H C F R 1）、33～52（H C F R 2）、56～95（H C F R 3）および102～113（H C F R 4）に位置する。いくつかの場合には、C D Rがカバットの定義によるC D Rと超可変ループのその両方からのアミノ酸を含む場合、F R残基はそれに応じて調節される。例えば、C D R H 1がアミノ酸H 26-H 35を含むとき、重鎖F R 1残基は位置1～25にあり、F R 2残基は位置36～49にある。

40

【0049】

本明細書で使われるように、「コドンセット」は所望の変異体アミノ酸をコードするのに用いられる、一組の異なるヌクレオチドトリプレット配列を目指す。一組のオリゴヌクレオチドは、コドンセットによって提供されるヌクレオチドトリプレットの可能な組合せの

50

すべてを表す配列であって所望のアミノ酸群をコードする配列を含み、例えば固相法によって合成することができる。標準的なコドン指定形式はIUBコードのそれであり、このコードは当技術分野で公知であり本明細書に記載されている。コドンセットは、一般的に3つのイタリック大文字、例えばNNK、NNS、XYZ、DVKなどで表される。ある位置の選択されたヌクレオチド「縮重」を有するオリゴヌクレオチドの合成は当技術分野で公知であり、例えば、TRIM手法が知られている(Knappek他、J. Mol. Biol. (1999)、296:57~86頁); GarrardおよびHenner, Gene(1993), 128:103頁)。そのようなある種のコドンセットを有しているオリゴヌクレオチドのセットは、市販の核酸シンセサイザー(Applied Biosystems, Foster City, CAなどから入手可能)を使って合成することができ、または市販品を入手することができる(例えば、Life Technologies, Rockville, MDから)。したがって、特定のコドンセットを有する合成オリゴヌクレオチドセットは、一般的に異なる配列の複数のオリゴヌクレオチドを含み、この相違は配列全体の中のコドンセットによるものである。本発明で使用されるように、オリゴヌクレオチドは可変ドメイン核酸テンプレートへのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し、また、必ずしもそうではないが、例えばクローニングに役立つ制限酵素部位を含むこともできる。

【0050】

「制限コドンセット(制限されたコドンセット)」なる用語とその変異型は、本明細書中において、配列多様性を生じさせる当分野の方法で典型的に有用なコドンセットより非常に制限された数のアミノ酸をコードしているコドンセットを意味する。本明細書の一態様では、配列多様化に用いる制限コドンセットは2~10、2~8、2~6、2~4又は2のみのアミノ酸をコードしている。ある実施態様では、配列多様化に用いる制限コドンセットは、少なくとも2であるが10以下、8以下、6以下、4以下のアミノ酸をコードしている。典型的な例では、4単位のコドンセットを用いる。4単位のコドンセットの例を図6に挙げる(RMC、RMG、RRC、RSA、MKC、YMT、RST、KMT、SRC、MRT及びWMT)。他の典型例では、2単位コドンセットが用いられる。2単位のコドンセットの例にはTMT、KAT、YAC、WAC、TWC、TYT、YTC、WTC、KTT、YCT、MCG、SCG、MGC、SGT、GRT、GKT及びGYTが含まれる。好適な制限コドンの決定、及び特定の制限コドンセットによってコードされる特定のアミノ酸の同定は公知であり、当業者に明らかであろう。CDR配列の多様化に用いられる好適なアミノ酸の決定は、当分野で公知の基準によって経験的に及び／又は導かれうる(例えば、疎水性及び親水性のアミノ酸型などの組み合わせを含む)。

【0051】

「Fv」断片は、完全な抗原認識および結合部位を含む抗体断片である。この領域は、堅く結合した重鎖可変ドメイン1つと軽鎖可変ドメイン1つの二量体から成り、その結合は自然界では例えばscFvにおけるように共有結合である。各可変ドメインの3つのCDRが相互作用して $V_H - V_L$ 二量体の表面の抗原結合部位を確定するのはこの構成である。この6つのCDRまたはそのサブセットは、共同して抗体に抗原結合特異性を賦与する。しかし、単一の可変ドメイン(または抗原に特異的なCDRを3つしか含んでいないFvの半分)でさえ、通常は結合部位全体より親和性は低いものの、抗原を認識して結合する能力を有する。

「Fab」断片は、軽鎖の可変および定常ドメインと重鎖の可変ドメインおよび第1の定常ドメイン(CH1)を含む。 $F(ab')_2$ 抗体断片は一对のFab断片を含み、通常これらはその間にあるヒンジシステインによってそのカルボキシ末端の近くで共有結合により連結される。抗体断片の他の化学的結合も当技術分野で公知である。

「単鎖Fv」または「scFv」抗体断片は抗体の V_H および V_L ドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。通常、Fvポリペプチドは V_H および V_L ドメインの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、このリンカーはscFvが抗原結合にとって望ましい構造を形成するのを可能にする。scFvのレビューに関しては、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol.113, Rosenbergおよび

Moore編, Springer-Verlag, New York, 269-315頁(1994)を参照。

【0052】

用語「ダイアボディ(diabody)」は、抗原結合部位を2つ備える小さな抗体断片を指し、この抗体断片は同じポリペプチド鎖(V_H および V_L) 内で軽鎖可変ドメイン(V_L) に連結した重鎖可変ドメイン(V_H) を含む。同じ鎖の上の2つのドメインの間で対合させるにはあまりに短いリンカーを用いて、このドメインを他の鎖の相補性ドメインと強制的に対合させ、2つの抗原結合部位をつくる。ダイアボディについては、例えば欧州特許第404097号; WO93/11161号; およびHollinger他, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90:6444-6448頁(1993)でさらに詳しく記載されている。

表現「線状抗体」はZapata他, Protein Eng., 8(10):1057-1062頁(1995)に記載されている抗体を指す。つまり、これらの抗体は相補性の軽鎖ポリペプチドと共に一对の抗原結合領域を形成する、一对のタンデムFdセグメント($V_H - C_H 1 - V_H - C_H 1$) を含む。線状抗体は二重特異性または単一特異性であり得る。

【0053】

「細胞」、「細胞系」および「細胞培養」は本明細書では同義で使われ、そのような呼称は細胞または細胞系のすべての後代を含む。このように、例えば、「形質転換体」および「形質転換細胞」のような用語は、継代数に関係なくそれらに由来する一次対象細胞および培養物を含む。また、故意または偶発的な突然変異により、すべての後代においてDNAの内容が正確に同一であるというわけではないことが理解される。当初の形質転換細胞でスクリーニングされたような、同じ機能または生物学的活性を有する変異体後代が含まれる。異なった呼称を意図する場合は、前後関係から明白となろう。

発現に言及する場合の「制御(コントロール)配列」は、特定の宿主生物で作用可能に連結したコード配列の発現のために必要なDNA塩基配列を意味する。例えば原核生物に好適な制御配列は、プロモーター、場合によってはオペレーター配列、リボソーム結合部位、および恐らくはまだよく理解されていない他の配列を含む。真核細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することが公知である。

【0054】

用語「コートタンパク質」はタンパク質を意味し、少なくともその一部はウイルス粒子の表面に存在する。機能上の観点からは、コートタンパク質は宿主細胞でのウイルスの構築過程でウイルス粒子と結合する任意のタンパク質であり、ウイルスが他の宿主細胞に感染するまでそれと結合したままである。コートタンパク質は、主要なコートタンパク質であってもよいし、マイナーなコートタンパク質であってもよい。「主要な」コートタンパク質は、通常ウイルスの外殻に存在するコートタンパク質であり、好ましくは少なくとも約5個、より好ましくは少なくとも約7個、より好ましくは少なくとも約10個かそれ以上のタンパク質コピーが存在する。主要なコートタンパク質は、1ビリオンにつき数十、数百または数千のコピーが存在しうる。主要なコートタンパク質の例は、繊維状ファージのp8タンパク質である。

特定の検定におけるある化学物体の「検出限界」は、その検定でバックグラウンドレベルより高く検出されるその物体の最小限の濃度である。例えば、ファージELISAでは、特定の抗原結合断片を提示している特定のファージの「検出限界」は、その抗原結合断片を提示していない対照ファージによって生じたものよりも多くのELISAシグナルを特定のファージが生産するファージ濃度である。

【0055】

「融合タンパク質」および「融合ポリペプチド」は、共有結合で互いに結合した2つの部分を持つポリペプチドを指し、各部分は異なる特性を有するポリペプチドである。この特性は、例えばインビトロまたはインビボ活性などの生物学的性質でよい。この特性はまた、単一の化学的または物理的性質、例えば対象抗原との結合、反応の触媒などかもしれない。この2つの部分は単一のペプチド結合によって直接、または1つまたは複数のアミノ酸残基を含んでいるペプチドリinkerを通して結合していてもよい。通常、この2つの部分とリンカーは同じ読み枠に存在する。好ましくは、ポリペプチドの2つの部分は異種

または異なるポリペプチドから得られる。

「異種DNA」は宿主細胞に導入される任意のDNAである。DNAは、ゲノムDNA、cDNA、合成DNAおよびこれらの融合または組合せを含む様々なソースに由来してもよい。DNAは、宿主または受容細胞と同じ細胞または細胞型からのDNA、あるいは異なる細胞型、例えば哺乳類または植物からのDNAを含むことができる。DNAは任意選択にマーカーまたは選択遺伝子、例えば抗生物質耐性遺伝子、耐熱性遺伝子、その他を含むことができる。

【0056】

本明細書で使われるように、「非常に多様な位置」は、公知のかつ／または天然抗体または抗原結合断片のアミノ酸配列を比較した場合に、その位置で提示されるいくつかの異なるアミノ酸を持つ軽鎖および重鎖可変領域上のアミノ酸位置を指す。非常に多様な位置は一般的にCDR領域にある。一態様では、公知のかつ／または天然抗体の非常に多様な位置を決定する際には、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987年および1991年)が提供しているデータが有効である。インターネット上のデータベース(<http://immuno/bme/nwu/edu>)は収集された多数のヒト軽鎖および重鎖の配列とその配置を提供し、これらの配列の非常に多様な位置の決定に役立つ。本発明によると、アミノ酸がある位置で好ましくは約2から約11、好ましくは約4から約9、好ましくは約5から約7個の可能な異なるアミノ酸残基変異を有する場合は、その位置は非常に多様と言える。いくつかの実施形態では、あるアミノ酸位置は、好ましくは少なくとも約2、好ましくは少なくとも約4、好ましくは少なくとも約6、好ましくは少なくとも約8つの可能な異なるアミノ酸残基変異を有するならば非常に多様である。

10

20

本明細書で使われるように、「ライブラリー」は複数の抗体もしくは抗体断片配列（例えば本発明のポリペプチド）またはこれらの配列をコードする核酸を指し、これらの配列は、本発明の方法によってこれらの配列に導入される変異体アミノ酸の組合せにおいて異なる。

【0057】

「ライゲーション（連結）」は、2つの核酸断片の間でリン酸ジエステル結合を形成する方法である。この2つの断片のライゲーションのために、断片の末端は互いに適合していなければならない。場合によっては、この末端はエンドヌクレアーゼ消化の後に直ちに適合性を持つようになる。しかし、ライゲーションに適合させるためには、まずエンドヌクレアーゼ消化の後に一般的に形成される付着末端を平滑末端に変える必要がある。平滑末端にするためには、DNAを適当な緩衝液中で15℃で少なくとも15分間、4つのデオキシリボヌクレオチド三リン酸の存在下でDNAポリメラーゼIまたはT4DNAポリメラーゼのクレノー断片の約10単位で処理する。次にDNAをフェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿、またはシリカ精製によって精製する。連結すべきDNA断片を溶液に等モル量入れる。この溶液は、ATP、リガーゼ緩衝およびT4DNAリガーゼのようなりガーゼも、DNA 0.5 μgにつき約10単位含む。DNAをベクターに連結する場合は、ベクターは適当な制限エンドヌクレアーゼによる消化作用によってまず線状にする。線状にされた断片は、次に細菌のアルカリホスファターゼまたは仔ウシ腸管のホスファターゼで処理して、ライゲーションのステップの間のセルフライゲーションを予防する。

30

40

「突然変異」は、参照ヌクレオチド配列、例えば野生型配列と比較してのヌクレオチドの欠失、挿入または置換である。

【0058】

本明細書で使われるように、「天然（自然）」または「天然に生じる」抗体は、非合成源、例えば生体外で得られる分化抗原特異的B細胞、またはその対応するハイブリドーマ細胞系、あるいは動物の血清から得られる抗体から特定された抗体を指す。これらの抗体には、天然のものであれ誘発されたものであれいかなる種類の免疫応答で生じた抗体も含まれる。天然抗体には、これらの抗体を構成するかコードするアミノ酸配列およびヌクレオチド配列、例えばカバットデータベースで特定されているようなものが含まれる。本明

50

細書で使われるように、天然抗体は、ソース配列または鋳型配列を、例えばある位置で起源抗体配列と異なる抗体配列を提供する異なるアミノ酸を用いて1つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失または追加により変更した抗体配列を指す「合成抗体」とは異なる。

核酸に関して「作用可能に連結した」は、その核酸が他の核酸配列と機能的な関係にあることを意味する。例えば、プレシーケンス(presequence)または分泌リーダーのDNAは、あるポリペプチドの分泌に関わっている前駆体タンパク質として発現する場合は、そのポリペプチドのDNAと作動可能的に結合している。プロモーターまたはエンハンサーは、それがあるコード配列の転写に影響する場合はその配列と作用可能に連結している。または、リボソーム結合部は、それが翻訳を容易にする位置にある場合は作用可能にコード配列と連結している。通常、「作用可能に連結した」は、結合したDNA配列が連続しており、分泌リーダーの場合は連続して読み枠内にあることを意味する。しかし、エンハンサーは連続する必要はない。連結は都合のよい制限部位でライゲーションによって達成される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来の慣行に従って使用される。

10

【0059】

「ファージディスプレイ」は、変異体ポリペプチドをファージ、例えば繊維状ファージの粒子表面でコートタンパク質の少なくとも一部と融合したタンパク質として提示する方法である。ファージディスプレイの有用さは、ランダム化タンパク質変異体の大きなライブラリーから対象抗原と高親和性で結合する配列を迅速に、効率的に選別できることにある。ファージ上のペプチドおよびタンパク質ライブラリーの提示は、何百万ものポリペプチドを特異的結合特性に関してスクリーニングするために利用されてきた。多価ファージディスプレイ方法は、繊維状ファージの遺伝子IIIまたは遺伝子VIIの融合を通して小さなランダムペプチドおよび小タンパク質を提示するために利用されてきた。WellsおよびLowman, Curr.Opin.Struct.Biol., 3:355-362頁(1992)とその中の引用文献。一価のファージディスプレイでは、タンパク質またはペプチドのライブラリーが遺伝子IIIまたはその一部に融合され、ファージ粒子が融合タンパク質の1個または0個のコピーを提示するように野生型遺伝子IIIタンパク質の存在下で低レベルで発現される。アビディティ効果は多価のファージと比較して低下しているので、選別は内在性のリガンド親和性に基づいておりファジミドベクターが使われるが、このベクターはDNA操作を単純化する。LowmanおよびWells, Methods:A Companion to Methods in Enzymology, 3:205-216頁(1991)。

20

30

【0060】

「ファジミド」は、細菌の複製起点、例えばColE1およびバクテリオファージの遺伝子間領域のコピーを有するプラスミドベクターである。ファジミドはいかなる公知のバクテリオファージ、例えば繊維状バクテリオファージおよびラムドイドバクテリオファージでも使用できる。プラスミドは、通常、抗生物質耐性の選択マーカーも含む。これらのベクターにクロニングされたDNAセグメントは、プラスミドとして増殖することができる。これらのベクターを備える細胞がファージ粒子の生産のために必要なすべての遺伝子を備えているとき、プラスミドの複製様式はローリングサークル複製に変化し、プラスミドDNAの1つの鎖のコピーとパッケージファージ粒子を生成する。ファジミドは感染性または非感染性ファージ粒子を形成することができる。この用語は、異種ポリペプチドがファージ粒子の表面で提示されるように遺伝子融合としてこの異種ポリペプチドの遺伝子と結合したファージコートタンパク質遺伝子、またはその断片を含むファジミドを含む。

40

用語「ファージベクター」は、異種遺伝子を含んでいて複製ができるバクテリオファージの二本鎖複製型を意味する。ファージベクターは、ファージ複製およびファージ粒子形成を可能にするファージ複製起点を有する。ファージは好ましくは繊維状バクテリオファージ、例えばM13、f1、fd、Pf3ファージもしくはその誘導体、またはλ様ファージ、例えばλ、21、phi80、phi81、82、424、434、その他もしくはその誘導体である。

50

【0061】

「オリゴヌクレオチド」は、公知の方法（例えば、固相手法、例えば欧州特許第266032号、1988年5月4日公布、に記載されている手法を利用したリン酸トリエステル、亜リン酸塩、またはホスホラミダイト化学、またはFroeshler他、Nucl.Acids.Res., 14:5399-5407頁(1986)に記載されているデオキシヌクレオチドH-ホスホン酸塩中間体を通した方法）によって化学的に合成される短い、一本鎖または二本鎖のポリデオキシヌクレオチドである。他の方法には、以下に記載のポリメラーゼ連鎖反応および他のオートプライマー法、および固体担体上のオリゴヌクレオチド合成が含まれる。これらの方法のすべては、Engels他、Agnew.Chem.Int.Ed.Engl., 28:716-734頁(1989)に記載されている。遺伝子のすべての核酸配列が公知ならば、またはコード鎖と相補的な核酸の配列が利用できるならばこれらの方法が使われる。あるいは、対象アミノ酸配列が公知ならば、各アミノ酸残基の公知で好ましいコード残基を使って可能な核酸配列を推測できよう。オリゴヌクレオチドは、ポリアクリルアミドゲルもしくは分子サイジングカラムで、または沈殿法によって精製することができる。

DNAが「精製される」のは、DNAが非核酸不純物から分離されるときである。不純物は極性、無極性、イオン性、その他である。

本明細書で使われるように、「起源抗体」は、その抗原結合配列が本明細書に記載される基準に従う多様化が実行される鋳型配列としての役目をする抗体、または抗原結合断片を指す。抗原結合配列は、通常、抗体可変部、好ましくは少なくとも1つの好ましくはフレームワーク領域を含むCDRを含む。

【0062】

本明細書で使われる「溶媒と接触しうる(solventaccessible)位置」は起源抗体または抗原結合断片の重鎖および軽鎖の可変部のアミノ酸残基の位置を指し、それは、この抗体または抗原結合断片の構造、構造アンサンブルおよび／またはモデル化された構造に基づき、溶媒露出が可能かつ／または抗体特異性抗原などの分子との接触が可能と判断されるものである。これらの位置は一般的にはCDRで、またタンパク質の外側に見られる。本明細書で定められるように、抗体または抗原結合断片の溶媒と接触しうる位置は、当技術分野で公知のいくつかのアルゴリズムのいずれかを使って決定できる。好ましくは、溶媒と接触しうる位置は抗体（又は抗体の一部、例えば抗体可変ドメインやCDRセグメント）の三次元モデルからの座標を使い、好ましくはInsight IIプログラム(Accelrys, San Diego, CA)のようなコンピュータプログラムを使って決定される。溶媒と接触しうる位置は、当技術分野で公知のアルゴリズム（例えば、LeeおよびRichards, J.Mol.Biol.55, 379(1971)、および、Connolly, J.Appl.Cryst.16, 548(1983)）を使用しても決定することができる。溶媒と接触しうる位置の決定は、タンパク質モデリングに適したソフトウェアおよび抗体（又はその一部）から得られる三次元構造情報を使って行うことができる。このような目的のために利用できるソフトウェアには、SYBYL生体高分子モジュールソフトウェア(Tripes Associates)が含まれる。一般に、また好ましくは、アルゴリズム（プログラム）がユーザーの入力サイズパラメータを必要とする場合は、計算において使われるプローブの「サイズ」は半径約1.4オングストローム以下に設定される。さらに、パーソナルコンピュータ用のソフトウェアを使用した溶媒と接触しうる領域の決定法が、Pacios, (1994)「ARVOMOL/CONTOUR:molecular surface areas and volumes on Personal Computers」Comput.Chem.18(4):377-386頁；および同(1995)「Variations of Surface Areas and Volumes in Distinct Molecular Surfaces of Biomolecules」J.Mol.Model.1:46-53頁に記載されている。

【0063】

「転写調節因子」は、以下の構成成分の1つまたは複数を含む：エンハンサー要素、プロモーター、オペレーター配列、リプレッサー遺伝子および転写終結配列。このような構成成分は当技術分野において公知である。米国特許第5,667,780号。

「形質転換体」は、そのDNAと関連する表現型（例えば、そのDNAによってコードされるタンパク質によって付与された抗生物質耐性）の発現によって証明されるような、

DNAを取り込み、維持している細胞である。

「形質転換」は、細胞がDNAを取り込んで「形質転換体」になる過程を意味する。DNA取込みは永久的、または一過性である。

【0064】

「ヒト抗体」は、ヒトにより生成される抗体のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基を有するもの、及び／又は本明細書中に開示したヒト抗体をつくるためのいずれかの技術を使用して、つくられたものである。この定義におけるヒト抗体は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特別に除く。

「親和性成熟」抗体は、その1つ以上のCDRに1つ以上の変更を有する抗体であって、そのような変更を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性を向上させる。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル単位の、さらにはピコモル単位の親和性を有する。親和成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産できる。Marks他、Bio/Technology, 10:779-783(1992年)において、VHドメインとVLドメインのシャフリングによる親和成熟を開示している。CDRおよび／またはフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas他、Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994); Schier他、Gene, 169:147-155 (1995); Yelton他、J. Immunol., 155:1994-2004 (1995); Jackson他、J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995); およびHawkins他、J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)に開示されている。

【0065】

「遮断（ブロック）」抗体又は「アンタゴニスト」抗体は、結合する抗原の生物学的活性を阻害又は減退させるものである。遮断抗体又はアンタゴニスト抗体は抗原の生物学的活性を実質的に又は完全に阻害する。

ここで用いる「アゴニスト抗体」は対象とするポリペプチドの少なくとも一の機能的活性を模倣する抗体である。

本発明のアミノ酸配列を含む抗体又はポリペプチドの半減期を増大させるために、例えば米国特許第5739277号に記載のように、抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープ接着させることができる。例えば、サルベージレセプター結合エピトープをコードする核酸分子は、操作した核酸分子によって発現される融合タンパク質が本発明のポリペプチド配列とサルベージレセプター結合エピトープを含むように、本発明のポリペプチド配列をコードする核酸のフレーム内に連結させることができる。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄)のFc領域のエピトープを意味する(例えば、Ghetie, Vら., (2000) An. Rev. Immunol. 18:739-766, 表1)。Fc領域内に置換を有する抗体及び血清半減期が増大した抗体については、W000/42072 (Presta, L.)、W0 02/060919; Shields, R.L., ら., (2001) JBC 276(9):6591-6604; Hinton, P.R., (2004) JBC 279(8):6213-6216)にも記載されている。他の実施態様では、例えば他のポリペプチド配列に接着させることによって血清半減期が増大しうる。例えば、血清アルブミンが抗体又はポリペプチドに結合するように、本発明の抗体又は本発明のアミノ酸配列を含む他のポリペプチドをFcRnレセプター又は血清アルブミン結合ペプチドに結合する血清アルブミン又は血清アルブミンの一部に接着させることができ、例としてこのようなポリペプチド配列はWO 01/45746に開示されている。一実施態様では、接着した血清アルブミンペプチドはアミノ酸配列DICLPRWGCLWを含む。他の実施態様では、本発明によるFabの半減期はこれらの方法によって増大する。血清アルブミン結合ペプチド配列については、Dennis, M.S., ら., (2002) JBC 277(38):35035-35043も参照のこと。

【0066】

「疾患」は、本発明の物質／分子又は方法を用いて治療することによって利益を得る任意の症状である。これには、哺乳動物の問題とする疾患の素因となる病的状態を含む慢性及び急性の疾患又は疾病を包含する。限定するものでなく、ここで治療する疾患の例には、悪性及び良性の腫瘍；非白血病およびリンパ系の悪性腫瘍；神経系、神経膠系、星状膠

系、視床下部性及び他の腺性、マクロファージ系、上皮性、間質性、胞胚腔系の疾患；及び、炎症性、免疫系、他の脈管形成関連の疾患が包含される。

「細胞増殖性疾患」及び「増殖性疾患」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖を伴う疾患を意味する。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。

ここで用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍形成細胞成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。「癌」、「癌性」、「細胞増殖性疾患」、「増殖性疾患」及び「腫瘍」なる用語はここに示すように互いに独占的なものではない。

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平細胞癌(squamous cell cancer)、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平癌腫(squamous carcinoma)、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸管癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝臓性癌、並びに頭部及び頸部の癌が含まれる。

10

【0067】

血管形成調節不全により、本発明の組成物及び方法によって治療される多くの疾患が引き起こされうる。これらの疾患には、非腫瘍性又は腫瘍性症状の両方が含まれる。腫瘍性のものは上記に記載のものに限らない。非腫瘍性疾患には、限定するものではないが、望ましくない又は異常な肥大、関節炎、慢性関節リウマチ(RA)、乾癬、乾癬の斑、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化、アテローム動脈硬化性斑、未熟児の網膜症を含む糖尿病性及び他の増殖性の網膜症、水晶体後繊維増殖、血管新生緑内障、年齢関連性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜／脈絡叢血管新生、虹彩(angle)(ルベオーシス)の血管新生、眼性新生血管疾患、脈管再狭窄、動静脈奇形(AVM)、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺の過形成(グレーブズ病を含む)、角膜及び他の組織移植、慢性炎症、肺炎症、急性肺損傷／ARDS、敗血症、原発性肺高血圧症、悪性の肺滲出、大脳浮腫(例えば、急性脳卒中／非開放性頭部損傷／外傷と関連している)、滑液炎症、RAのパンヌス形成、筋炎骨化、高親和性骨形成、骨関節炎(OA)、抵抗性腹水、多嚢胞性卵巣の疾患、子宮内膜症、液体性疾患の第3の間隔(3rd spacing)(膵炎、コンパートメント症候群、熱傷、腸疾患)、子宮類線維腫、早産、慢性炎症、例えばIBD(クローン病および潰瘍性大腸炎)、腎臓同種異系移植片拒絶反応、炎症性腸疾患、ネフローゼ症候群、望ましくない又は異常な組織塊成長(癌以外)、血友病関節、肥大した癍痕、体毛成長の抑制、Osler-Weber症候群、化膿性肉芽腫水晶体後繊維増殖、強皮症、トラコーマ、脈管粘着力、関節滑膜炎、皮膚炎、子癇前症、腹水、心嚢貯留液(例えば心外膜炎と関連しているもの)および胸水が含まれる。

20

30

【0068】

ここで使用されるところの「治療」は、治療されている個体又は細胞の天然の過程を改変するための臨床的介入を意味し、予防のため又は臨床的病理の過程中に実施することができる。治療の望ましい効果には、疾病の発生又は再発の防止、症状の寛解、疾病の任意の直接的又は間接的病理的結果の低減、転移の防止、疾病の進行速度の低減、疾病状態の回復又は緩和、及び寛解又は改善された予後が含まれる。ある実施態様では、本発明の抗体は疾患又は疾病の進行を遅らせるために用いられる。

40

「有効量」とは所望の治療又は予防結果を達成するために必要な用量及び時間での効果的な量を意味する。

本発明の物質／分子の「治療的有效量」は、例えば個体の疾病ステージ、年齢、性別、及び体重、並びに個体に所望の応答を誘発する物質／分子、アゴニスト又はアンタゴニストの能力のような因子に従って変わりうる。また、治療的有效量は物質／分子、アゴニスト又はアンタゴニストの任意の毒性又は有害な効果よりも治療的に恩恵のある効果が上回

50

るものである。「予防的有効量」とは所望の予防結果を達成するために必要な用量及び時間での効果的な量を意味する。典型的には、予防的量は疾患の初期ステージ又はその前の患者に用いるので、予防的有効量は治療的有効量よりも少ないであろう。

【0069】

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

【0070】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びシクロホスファミド(CYTOXAN(商品名))のようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramidate)及びトリメチロロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン（特にプラタシン及びプラタシノン）；デルター9-テトラヒドロカナビノール（ドロナビノール、MARINOL（登録商標））； β ラパチョーネ；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン（合成アナログトポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT-11（イリノテカン、CAMPTOSAR（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン(scopolectin)及び9-アミノカンプトテシンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；テニポシド；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8）；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン（合成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む）；エロイテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロランブシル、クロロナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネスチリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；抗生物質、例えばエネジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシン γ 1I及びカリケアマイシン ω 1I（例えばAgnew C hem Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994)参照））；ダイネマイシン(dynemicin)Aを含むダイネマイシン；エスペラマイシン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorbicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキソルビシン（モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシン及びデオキシドキソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシンCのようなマイトマ

イシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルビシン(zorubicin)；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸アナログ、例えばデノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセート(trimetrexate)；プリンアナログ、例えばフルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えばアンシタビン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)；アンドロゲン類、例えばカルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸リプレニッシャー(replenisher)、例えばフロリン酸(frolinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ビスアントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium)；エポチロン(epothilone)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；メイタンシノイド(maytansinoid)類、例えばメイタンシン(maytansine)及びアンサミトシン(ansamitocine)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamol)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルビシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K(登録商標)多糖複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニューアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquone)；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類(特にT-2毒素、ベラクリン(verracurin)A、ロリジン(roridine)A及びアングイジン(anguidine))；ウレタン；ビンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標))；ダカーバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピボプロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「Ara-C」)；チオテパ；タキソイド類、例えばTAXOL(登録商標)パクリタキセル(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、ABRAXANETMパクリタキセルのクレモフォー無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、及びTAXOTERE(登録商標)ドキセタキセル(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；ゲムシタビン(gemcitabine)(GEMZAR(登録商標))；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；プラチナアナログ、例えばシスプラチン及びカルボプラチン；ビンブラスチン(VELBAN(登録商標))；プラチナ；エトポシド(VP-16)；イホスファミド；マイトキサントロン；ピンクリスチン(ONCOVIN(登録商標))；オキサリプラチン；ロイコボビン(leucovovin)；ビノレルビン(NAVELBINE(登録商標))；ノバントロン(novantrone)；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロナート(ibandronate)；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチロールニチン(DMFO)；レチノイン酸のようなレチノイド；カペシタビン(capecitabine)(XELODA(登録商標))；上述したもののいずれかの薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体；並びに上記のうち2以上の組み合わせ、例えば、シクロホスファミド、ドキシソルビシン、ピンクリスチン、及びブレドニソロン併用療法の略称であるCHOP、及び5-FU及びロイコボビン(leucovovin)とオキサリプラチン(ELOXATINTM)を組み合わせた治療法の略称であるFOLFOXが含まれる。

またこの定義に含まれるものには、癌の成長を助けるホルモンの作用を調節、低減、遮断又は阻害するように働き、多くの場合全身処置の形態で使用される抗ホルモン剤がある。それらはそれ自体がホルモンであってもよい。それらは例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体調節物質 (SERM) を含み、例えば、タモキシフェン (NOLVADEX (登録商標) タモキシフェンを含む)、EVISTA (登録商標) ラロキシフェン (raloxifene)、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン (trioxifene)、ケオキシフェン (keoxifene)、LY 117018、オナプリストーン (onapristone)、及び FARESTON (登録商標) トレミフェン；抗プロゲステロン；エストロゲンレセプター下方調節剤 (ERD)；卵巣を抑制又は停止させる機能がある作用剤、例えば LUPRON (登録商標) 及び ELIGARD (登録商標) 酢酸ロイプロリド等の黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) アゴニスト、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン及びトリプテレリン (tripterelin)；その他抗アンドロゲン、例えばフルタミド (flutamide)、ニルタミド (nilutamide)、ビカルタミド；並びに副腎のエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば 4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE (登録商標) 酢酸メゲストロール、AROMASIN (登録商標) エキセメスタン、フォルメスタニー (formestane)、ファドロゾール、RIVISOR (登録商標) ボロゾール、FEMARA (登録商標) レトロゾール、及び ARIMIDEX (登録商標) アナストロゾールである。加えて、このような化学療法剤の定義には、クロドロネート (例えば BONEFOS (登録商標)) 又は OSTAC (登録商標))、DIDROCAL (登録商標) エチドロロン酸、NE-58095、ZOMETA (登録商標) ゴレドロロン酸／ゴレドロネート、FOSAMAX (登録商標) アレンドロネート、ARE 20 DIA (登録商標) パミドロロン酸、SKELID (登録商標) チルドロン酸、又は ACTONEL (登録商標) リセドロロン酸、並びにトロキサシタビン (troxacitabine) (1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に接着細胞の増殖に結びつくシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えば PKC- α 、Raf、及び H-Ras、及び上皮成長因子レセプター (EGF-R)；THERATOPE (登録商標) ワクチン及び遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えば ALLOVECTIN (登録商標) ワクチン、LEUVECTIN (登録商標) ワクチン、及び VAXID (登録商標) ワクチン；LURTOTECAN (登録商標) トポイソメラーゼ I 阻害剤；ABARELIX (登録商標) rmRH；ラパチニブ (lapatinib ditosylate) (GW572016 としても知られる ErbB-2 及び EGFR 二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤) 及び上記のもののいずれかの製薬的に許容 30 される塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0072】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、対象とする標的分子の活性に依存して成長する細胞の成長をインビトロ又はインビボの何れかで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、成長阻害剤は、S 期で標的分子依存性細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を (S 期以外の位置で) 阻害する薬剤、例えば G1 停止又は M 期停止を誘発する薬剤を含む。古典的な M 期ブロッカーは、ビンカス (ビンクリスチン及びビンブラスチン)、タキサン類、及びトポイソメラーゼ II 阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。また G1 停止させるこれらの薬剤は、S 期停止にも波及し、例えば、DNA アルキル 40 化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びアラ-C である。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn 及び Israel, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami 等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に 13 頁に見出すことができる。タキサン類 (パクリタキセル及びドセタキセル) は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル (TAXOTERE (登録商標)、ローン・プーラン ローラー) は、パクリタキセル (TAXOL (登録商標)、ブリストル-マイヤー スクウィブ) の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。 50

「ドキシソルビシン」はアントラサイクリン抗生物質である。ドキシソルビシンの完全な化学名は、(8S-シス)-10-[(3-アミノ-2, 3, 6-トリデオキシ- α -L-リキソ-ヘキサピラノシル)オキシ]-7, 8, 9, 10-テトラヒドロ-6, 8, 11-トリヒドロキシ-8-(ヒドロキシアセチル)-1-メトキシ-5, 12-ナフタセンジオンである。

【0073】

出発ポリペプチドまたは参照ポリペプチド（例えば、起源抗体またはその可変ドメイン／CDR）の「変異体」または「突然変異体」、例えば融合タンパク質（ポリペプチド）または異種ポリペプチド（ファージに対して異種性）は、1）出発ポリペプチドまたは参照ポリペプチドのそれとは異なるアミノ酸配列を有し、また2）自然または人為の（人工）突然変異を通して出発ポリペプチドまたは参照ポリペプチドから導かれたポリペプチドである。そのような変異体は、例えば対象とするポリペプチドのアミノ酸配列内の残基の欠失、および／またはそれへの挿入、および／またはその置換を含む。例えば、変異体アミノ酸（起源抗体／抗原結合断片の対応する位置で見られるアミノ酸と比較して）を有する配列をコードする制限したコドンセットを含んでいるオリゴヌクレオチドを使って作製した本発明の融合ポリペプチドは、起源抗体及び／又は抗原結合断片及び／又はCDRと比較して変異体ポリペプチドとなる。このように、変異体CDRは、出発ポリペプチドまたは参照ポリペプチド配列に対する変異体配列（例えば、起源抗体及び／又は抗原結合断片及び／又はCDRのそれ）を含んでいるCDRを指す。この意味合いでは、変異体アミノ酸は出発ポリペプチドまたは参照ポリペプチド配列の対応する位置のアミノ酸（例えば、起源抗体及び／又は抗原結合断片及び／又はCDRのそれ）とは異なるアミノ酸を指す。最終的な変異体または突然変異体構築物に到達するには欠失、挿入および置換をいかように組み合わせてもよいが、最終的な構築物は所望の機能的特性を有するものとする。本明細書中に記載の実施例の中には、結合体配列は欠損や付加などの点突然変異を含む。例えば、YADSライブラリから得たVEGFクローンはCDRL3中のQの欠損を示すが、これはベクターコンストラクトの結果ではない。他の例では、4D5 CDR L3の位置89のQはベクターコンストラクトにおいて意図的に欠損している。アミノ酸変化はポリペプチドの翻訳後プロセス、例えばグリコシル化部位の数または位置を変えることもできる。ポリペプチドのアミノ酸配列変異体を作製する方法は、本明細書で参照により取り込まれた米国特許第5, 534, 615号に記載されている。

【0074】

「野生型」または「参照」配列、あるいは、「野生型」または「参照」タンパク質／ポリペプチド、例えばコートタンパク質または起源抗体のCDRまたは可変ドメインの配列は、突然変異の導入を通してそこから変異体ポリペプチドが導かれる参照配列かもしれない。一般的に、所与のタンパク質の「野生型」配列は、自然界で最も一般的な配列である。同様に、「野生型」遺伝子配列は、その遺伝子の自然界で最も一般的に見られる配列である。突然変異は、自然過程を通してまたは人為的手段を通して「野生型」遺伝子（したがってそれがコードするタンパク質）に導入することができる。そのようなプロセスの産物は、原「野生型」タンパク質または遺伝子の「変異体」または「突然変異体」形態である。

本明細書で使われるように、「複数」の物質、例えば本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、通常、その物質の2つ以上の種類の集合を指す。ある物質の2つ以上が特定の形質に関して互いと異なるならば、その物質には2種類以上が存在し、例としては特定のアミノ酸位置で見られる変異体アミノ酸がある。例えば、変異体CDRの配列以外、または特定の溶媒と接触しうる非常に多様なアミノ酸位置の変異体アミノ酸以外は実質的に同じ、好ましくは同一の配列である本発明の2つ以上のポリペプチドがあるならば、本発明のポリペプチドには複数個存在する。他の実施例では、変異体CDRをコードする配列以外、または特定の溶媒と接触しうる非常に多様なアミノ酸位置の変異体アミノ酸をコードする配列以外は実質的に同じ、好ましくは同一の配列である本発明の2つ以上のポリヌクレオチドがあるならば、本発明のポリヌクレオチドには複数個存在する。

【0075】

本発明は、選択した抗原に対して高親和性を有する新規の標的抗原結合ポリペプチド、例として抗体または抗原結合断片を作製し、単離する方法を提供する。制限したコドンセットを用いて元となる抗体（起源抗体）の軽鎖可変ドメイン及び／又は重鎖可変ドメイン中の一以上の選択したアミノ酸位置を突然変異させる（多様化する）ことによって複数の異なる結合体ポリペプチドを調製して、少なくとも一のCDR配列に変異型アミノ酸を有するライブラリを作製するものであり、このときの変異型アミノ酸の数は最小にする（すなわち、10以下、8以下、6以下、4以下、又は2のみ、しかし一般的には少なくとも2）。このようなアミノ酸位置は溶媒と接触しうる位置であり、それは例えば起源抗体の構造を分析することで決定され、かつ／または公知のかつ／または天然に生じる免疫グロブリンポリペプチドの中で高い多様性を有する位置である。さらに本発明の多様化の限定的性質によって、非常に多様化した及び／又は溶媒と接触しうるアミノ酸位置以外の付加的なアミノ酸位置も実施者の必要や希望に応じて多様化することができるという利便性が生じる；この実施態様の例を本明細書中に記載する。

【0076】

溶媒と接触しうる非常に多様であるアミノ酸位置は、CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2、CDRH3およびその混合物からなる群から選択した抗体可変ドメインのCDR領域にあるものであることが好ましい。限定した数のアミノ酸（各位置で共通して生じるアミノ酸に一般的に依存しないアミノ酸を選択する）をコードする制限コドンセットを用いてアミノ酸位置をそれぞれ突然変異させる。いくつかの実施形態では、CDR領域中の溶媒と接触しうる非常に多様な位置を突然変異させる場合は、好ましくは2～10、好ましくは2～8、好ましくは2～6、好ましくは2～4、好ましくはたった2つのアミノ酸をコードするコドンセットを選択する。いくつかの実施形態では、CDR領域中の溶媒と接触しうる非常に多様な位置を突然変異させる場合は、好ましくは2～10、3～9、4～8、5～7アミノ酸をコードするコドンセットを選択する。いくつかの実施形態では、少なくとも2、しかし10以下、8以下、6以下、4以下のアミノ酸をコードするコドンセットを選択する。例えばCDRH3に関しては、長さを変えることによってCDR配列を多様化することができ、制限コドンセットを用いて、選択した位置の長さが異なる及び／又は選択した位置がランダム化している変異型CDRH3領域を生成することができる。

【0077】

変異型CDRを含むポリペプチドのライブラリーの多様性は、限られた数のアミノ酸のみをコードするコドンセットを用いて設定するので、最小であるが十分に多様性のある配列を有するCDRとなる。CDR内の変異した位置の数は最小であり、各位置の変異型アミノ酸は限定した数のアミノ酸を包含するように設定してあり、公知の及び／又は天然に生じるCDR内の同じ位置に共通して生じると思われるアミノ酸とは無関係である。好ましくは、少なくとも一のCDRを含む単一抗体は起源抗体（ソース抗体、元となる抗体）として用いる。驚くべきことに、配列と大きさが多様な抗体可変ドメインのライブラリは単一の起源抗体を鋳型として用いて作製し、従来にはない限定した数のアミノ酸置換によって特定の位置に多様性を持たせることができる。

【0078】

抗体可変ドメインの多様性の設定（デザイン）

本発明の一態様では、抗体可変ドメインの高品質のライブラリが作製される。このライブラリは、限定した多様性のあるCDR配列の異なる配列、例えば多様性のある抗体可変ドメインを有する。このライブラリは一以上の抗原、例えば、ニュートラビジン、アポトーシスタンパク質（AP）、マルトース結合タンパク質2（MBP2）、エルビン-GST、インスリン、マウス及びヒトのVEGFなどに対して高い親和性を有する結合抗体可変ドメインを含む。このライブラリーの多様性は、単一の起源抗体内の溶媒と接触しうる非常に多様であるアミノ酸位置を選択し、制限コドンセットを使って少なくとも1つのCDR内のそれらの位置を突然変異させることによって設定する。制限コドンセットは、好ましくは10、8、6、4アミノ酸をコードする、又は2アミノ酸のみをコードす

る。

【0079】

起源抗体の一つはヒト化抗体4D5であるが、多様性の設計方法は配列が公知の他の起源抗体にも適用することができる。起源抗体は、天然抗体、合成抗体、組換え抗体、ヒト化抗体、生殖細胞系派生抗体、キメラ抗体、親和性成熟抗体またはそれらの抗原結合断片でよい。抗体は、ヒト、マウスおよびラットを含む様々な種類の哺乳類から得ることができる。いくつかの実施形態では、起源抗体は最初の1回または複数回の親和性スクリーニングの後で、親和性成熟段階の前に得られる抗体である。細胞培養において高収率で安定した生産を可能にするために、起源抗体を選択または修飾することができる。

抗体4D5は、Her-2 (erbB2) として知られている癌関連の抗原に特異的なヒト化抗体である。この抗体は、コンセンサスフレームワーク領域を有する可変領域を含む。ヒト化抗体の親和性を高める過程で、2、3の位置がマウス配列に戻されている。ヒト化抗体4D5の配列と結晶構造は、米国特許第6,054,297号、Carter他, PNAS 89:4285頁(1992)に記載され、結晶構造はJ.Mol.Biol.229:969頁(1993)およびインターネットサイト www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/mmdb (MMDB # s - 990 - 992) で示されている。

【0080】

抗体可変ドメインで多様性を生み出す基準は、溶媒と接触しうる（上で定義される）位置で残基に突然変異を起こさせることである。これらの位置は一般的にはCDRで、またタンパク質の外側に見られる。好ましくは、溶媒と接触しうる位置は、Insight I I プログラム (Accelrys, San Diego, CA) のようなコンピュータプログラムを用いて、抗体の3次元モデルからの座標を使って決定される。溶媒と接触しうる位置は、当技術分野で公知のアルゴリズム（例えば、LeeおよびRichards, J.Mol.Biol.55, 379(1971)、および、Connolly, J.Appl.Cryst.16, 548(1983)）を使用しても決定することができる。溶媒と接触しうる位置の決定は、タンパク質モデリングに適したソフトウェアおよび抗体から得られる三次元構造情報を使って行うことができる。このような目的のために利用できるソフトウェアには、SYBYL生体高分子モジュールソフトウェア (Tripos Associates) が含まれる。一般に、また好ましくは、アルゴリズム（プログラム）がユーザーの入力サイズパラメータを必要とする場合は、計算において使われるプローブの「サイズ」は半径約1.4オングストローム以下に設定される。さらに、パーソナルコンピュータ用のソフトウェアを使用した溶媒露出領域およびエリア決定法が、Pacios, (1994) 「ARVOMOL/CONT OUR:molecular surface areas and volumes on Personal Computers」Comput.Chem.18(4):377-386頁；および同、「Variations of Surface Areas and Volumes in Distinct Molecular Surfaces of Biomolecules」J.Mol.Model.(1995), 1:46-53頁に記載されている。

【0081】

いくつかの場合には、溶媒と接触しうる残基の選択は、協同で最小限の連続するパッチを形成する溶媒と接触しうる残基を選ぶことによってさらに洗練され、例えば参照ポリペプチドまたは起源抗体がその三次元折り畳み構造の場合がそうである。例えば、図21で示すように、コンパクト（最小）な連続したパッチは、ヒト化4D5のCDRH1/H2/H3/L1/L2/L3に対して選択された残基によって形成される。コンパクト（最小）な連続したパッチは、CDRの全域の1つのサブセット（例えば2～5個のCDR）、例えばCDRH1/H2/H3/L3だけを含むことができる。そのようなパッチの形成に貢献しない溶媒と接触しうる残基は、任意選択に多様化から排除してもよい。この基準による選択の洗練化により、実務者は、希望により多様化する残基数を最小化することができる。例えば、H1の残基28はパッチの端にあるので、多様化において任意選択で排除することができる。しかし、この選択基準は、希望により、必ずしも溶媒に露出しているとは考えられない多様化のための残基を選ぶためにも用いることができる。例えば、溶媒に露出していると考えられなくても、溶媒に露出していると考えられる他の残基と共に三次元折り畳み構造で連続するパッチを形成する残基は、多様化の対象に選んでもよい。この例はCDRL1-29である。そのような残基の選択は当業者には明らかとなるもので

、その適切さも経験的に、また熟練実務者のニーズと希望に応じて決定することができる。

【0082】

ヒト化抗体4D5の結晶構造から特定された、各CDRの溶媒と接触しうる位置は次の通りである（残基の位置はカバットに従う）：

CDRL1：28、30、31、32

CDRL2：50、53

CDRL3：91、92、93、94、96

CDRH1：28、30、31、32、33

CDRH2：50、52、52A、53、54、55、56、57、58。

10

さらにまた、ある実施態様ではCDRL1の残基29は、他の溶媒と接触しうる残基を含んでいる連続するパッチに含まれているかどうかに基づいて選択してよい。前述の溶媒と接触しうる位置のすべて又はサブセットは本発明の方法及び組成物で多様化してもよい。例えば、ある実施態様では、CDRH2内の位置50、52、53、54、56及び58のみを多様化する。

【0083】

突然変異させる位置を選択するための他の基準は、公知のかつ／または天然抗体の配列と比較したときにアミノ酸配列に変異を示す位置である。非常に多様な位置は、公知のかつ／または天然抗体／抗原結合断片のアミノ酸配列を比較した場合に、その位置で提示されるいくつかの異なるアミノ酸を持つ軽鎖または重鎖可変領域上のアミノ酸位置を指す。非常に多様な位置は好ましくはCDR領域にある。CDRH3の位置はすべて非常に多様であると考えられている。本発明によると、アミノ酸がその位置で好ましくは約2から約11個（本明細書に記載されているようにこの数字には幅があるが）の可能な異なるアミノ酸残基変異を有する場合は、そのアミノ酸残基は非常に多様と言える。

20

一態様では、公知のかつ／または天然抗体の非常に多様な位置を同定する際には、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987年および1991年)が提供しているデータが有効である。インターネット上のデータベース(<http://immuno/bme/nwu/edu>)は収集された多数のヒト軽鎖および重鎖の配列とその配置を提供し、これらの配列の非常に多様な位置の決定に役立つ。公知のかつ／または天然の軽鎖および重鎖のヒト化抗体4D5の溶媒露出位置における多様性を、図22および23に示す。

30

【0084】

本発明の一態様では、CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2およびその混合物からなる群から選ばれた少なくとも1つのCDRの非常に多様化した溶媒と接触しうる残基を突然変異させる（すなわち、本明細書で記載されている制限コドンセットを用いてランダム化する）。例えば、制限コドンを用いて、CDRL3およびCDRH3の溶媒と接触しうるかつ／または非常に多様な少なくとも一の残基を多様化させることによってポリペプチド母集団を作製してもよい。したがって、本発明は起源抗体の可変ドメインの少なくとも一のCDRの溶媒と接触しうる非常に多様化した少なくとも一の位置を制限コドンによってコードされる変異型アミノ酸で置換することによって形成する大きな数の新規の抗体配列を提供する。例えば、変異型CDR又は抗体可変ドメインは、CDRH1の位置28、30、31、32及び／又は33のうちの一以上のアミノ酸位置；及び／又はCDRH2の位置50、52、53、54、56及び／又は58のうちの一以上のアミノ酸位置；CDRL1の位置28、29、30及び／又は31のうちの一以上のアミノ酸位置；CDRL2の位置50及び／又は53のうちの一以上のアミノ酸位置；及び／又はCDRL3の位置91、92、93、94及び／又は96のうちの一以上のアミノ酸位置に変異型アミノ酸を含みうる。これらの位置の変異型アミノ酸は、本明細書中に記載のように制限コドンセットによってコードされる。

40

【0085】

上で示したように、変異体アミノ酸は制限コドンセットによってコードされる。コドン

50

セットとは、所望のアミノ酸群をコードするのに用いられる一組のオリゴヌクレオチドを形成するのに用いることができる一組の異なるヌクレオチドトリプレット配列である。一組のオリゴヌクレオチドは、コドンセットによって提供されるヌクレオチドトリプレットの可能な組合せのすべてを表す配列であって所望のアミノ酸群をコードする配列を含み、例えば固相法によって合成することができる。ある位置での選ばれたヌクレオチド「縮重」を有するオリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で公知である。そのようなある種のコドンセットを有しているヌクレオチドのセットは、市販の核酸合成機（Applied Biosystems, Foster City, CAなどから入手可能）を使って合成することができ、または市販品を入手することができる（例えば、Life Technologies, Rockville, MDから）。したがって、特定のコードセットを有する合成オリゴヌクレオチドセットは、一般的に異なる配列の複数のオリゴヌクレオチドを含み、この相違は配列全体の中のコドンセットによるものである。本発明で使用するオリゴヌクレオチドは可変ドメイン核酸テンプレートへのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し、また、クローニングに役立つ制限酵素部位を含むこともできる。

10

【0086】

一態様では、ヒト化抗体4D5のCDR内の溶媒と接触しうる非常に多様化した位置の一以上を占めるように意図したアミノ酸の制限したレパートリーを決定する（実施者の希望に基づいて、希望する特定の位置の特定のアミノ酸、特定の位置が欠損するような特定のアミノ酸、希望するライブラリの大きさ、分類する抗原結合体の特徴などを含めた任意の数の基準に基づいてよい）。

20

公知の抗体の重鎖CDR3（CDRH3）は多様な配列、高次構造および長さを持つ。CDRH3は抗原結合ポケットの中央でしばしば見られ、抗原接触にしばしば関与する。このようにCDRH3の設定は好ましくは他のCDRのそれとは別に構築されるが、それはCDRH3の高次構造を予測することが難しく、またこの領域のアミノ酸の多様性は公知の抗体で特に多様なためである。本発明に従って、CDRH3はCDRH3内の特定の位置（例えば位置95、96、97、98、99、100及び100a（例として4D5内のカバット番号付けに従う））で多様化されるように設定される。ある実施態様では、制限コードセットを用いてCDRH3の長さを変えることによって多様化する。長さの多様性は、抗原結合タンパク質を十分な割合で含むポリペプチドの母集団を作製するのに適するように経験的に範囲を決定することができる。例えば、配列：(X1) n -A-M、X1は制限コードセットによりコード化されるアミノ酸であり、 n は様々な長さ、例えば $n=3\sim20$ 、 $5\sim20$ 、 $7\sim20$ 、 $5\sim18$ 又は $7\sim18$ である配列を有する変異型CDRH3を含むポリペプチドを生成することができる。 n の値としてあり得る他の例は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19及び20である。CDRH3配列の長さを変えるために有用であり得るオリゴヌクレオチドの例示的实施態様は、図2及び図9に示すものを含む。

30

【0087】

特定のCDR、例えばCDRH3内の変異体アミノ酸の導入によってつくられるライブラリーの配列多様性は、抗体の他の領域、特に軽鎖または重鎖何れかの可変配列の他のCDR内に変異を含む他のCDRを変異型CDRと組み合わせることによって高めることができる。このセットの構成メンバーをコードする核酸配列は、コードセットを通して、軽鎖または重鎖の配列のCDRにおける他の変異体アミノ酸の導入によってさらに多様化できると考える。このように、例えば、一実施形態では、対象抗原と結合する融合ポリペプチドからのCDRH3配列は、多様化されたCDRL3、CDRH1またはCDRH2配列、あるいは多様化されたCDRのいかなる組合せとも組み合わせることができる。

40

いくつかの例では、例えばコンセンサス配列を反映させるため、または安定性を向上させるため、または提示するために、フレームワーク残基を起源抗体または抗原結合断片の配列に対して変化させることができる点に留意する必要がある。例えば、重鎖のフレームワーク残基49、93、94または71は変化させることができる。重鎖フレームワーク

50

残基 93 は、セリンまたはアラニン（その位置のヒトコンセンサス配列アミノ酸）でもよい。重鎖フレームワーク残基 94 は、フレームワークコンセンサス配列を反映するためにトレオニンからアルギニンまたはリジンに変更してもよい。変えることができるフレームワーク残基の他の例は重鎖フレームワーク残基 71 であり、カバットデータベースで見られるようにそれは約 1970 のポリペプチドでは R、約 627 のポリペプチドでは V、約 527 のポリペプチドでは A である。重鎖のフレームワーク残基 49 は、アラニンまたはグリシンでよい。さらに、任意選択に、H鎖可変ドメインの 3 つの N 末端アミノ酸は取り除くことができる。軽鎖では、任意選択に、アミノ酸位置 66 のアルギニンはグリシンに変更することができる。

【0088】

一態様では、本発明は潜在的なリガンドに顕著な親和性で結合する融合ポリペプチドを生成するためのベクター構築物を提供する。これらの構築物は、融合ポリペプチドに存在するとき重鎖が二量体化して Fab または Fab' の抗体断片／部分の二量体を形成する傾向を強める二量体化可能なドメインを含む。これらの二量体化ドメインは、例えば、融合ポリペプチドに存在してもよい重鎖ヒンジ配列（例えば、TCPPCPAPELLG（配列番号 120）を含む配列）を含むことができる。融合ファージポリペプチドの二量体化ドメインは 2 組の融合ポリペプチド（LC／HC－ファージタンパク質／断片（例えば pIII））で構成され、こうして 2 組の融合ポリペプチド間で適当な結合（例えば重鎖間ジスルフィド架橋）の形成を可能にする。そのような二量体化ドメインを含んでいるベクター構築物を用いて、ファージ上で抗体可変ドメイン、例えば、本明細書で記載される多様化された融合タンパク質の二価提示を達成することができる。好ましくは、各単量体抗体断片（融合ポリペプチド）の内在性親和性は、二量体化ドメインとの融合によって著しく変更されることはない。好ましくは、二量体化は、著しく低下した解離速度でファージ結合のアビディティを高める二価ファージディスプレイをもたらし、このことは当技術分野で公知の方法により、また本明細書で記載されているように測定することができる。本発明の二量体化ドメイン含有ベクターは、二量体化ドメインの後ろにアンバー終止コドンを含んでもよいし含まなくてもよい。

【0089】

異なる提示特性を達成するために二量体化を変更することができる。二量体化ドメインは、システイン残基、完全長抗体からのヒンジ領域、ロイシンジッパー配列もしくは GCN4 ジッパー配列のような二量体化配列またはその混合物を含んでいる配列を含むことができる。二量体化配列は当技術分野で公知であり、例えば、GCN4 ジッパー配列（GRMKQLLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGERG）（配列番号 3）などが含まれる。この二量体化ドメインは、好ましくは重鎖可変ドメインまたは定常ドメインの配列の C 末端、および／あるいは重鎖可変ドメインまたは定常ドメインの配列とウイルスコートタンパク質成分の配列との間に位置する。アンバー終止コドンも、二量体化ドメインの C 末端またはその後存在してもよい。アンバー終止コドンが存在する一実施形態では、二量体化ドメインは少なくとも 1 つのシステインおよびロイシンジッパーなどの二量体化配列をコードする。アンバー終止コドンが存在しない他の実施形態では、二量体化ドメインは単一のシステイン残基を含むかもしれない。

本発明のポリペプチドは、変異体ポリペプチドの提示のために、または前記ポリペプチドの精製、スクリーニングもしくは選別および検出のために他の種類のポリペプチドと融合することもできる。ファージディスプレイを含む実施形態に関しては、本発明のポリペプチドはウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部と融合される。ウイルスコートタンパク質の例としては、タンパク質 pIII、主コートタンパク質、pVII、Soc、Hoc、gpD、pVI およびその変異体が含まれる。さらに、本発明の方法によって生成される変異体ポリペプチドは、ポリペプチドマーカースまたはタグ、例えば FLAG、ポリヒスチジン、gD、c-myc、 β -ガラクトシダーゼなどと任意選択に融合することができる。

【0090】

ランダム化可変ドメインライブラリー作製法

鋳型核酸に選択されたアミノ酸を置換する方法は当技術分野で確立されており、その幾つかは本明細書に記載されている。例えば、キュンケル方法を使用し、少なくとも1つのCDR領域の溶媒に露出しかつ／または非常に多様な位置を対象に変異体アミノ酸でアミノ酸を置換することによってライブラリーを作製することができる。例えば、Kunkel他, Methods Enzymol. (1987), 154:367-382頁を参照。ランダム化された配列の生成は、下の実施例でも後述する。

オリゴヌクレオチド配列は、異なる長さのCDRH3のためにまたはCDRの溶媒に露出し非常に多様な位置のために設定された制限コドンセットの1つまたは複数を含む。コドンセットは所望の変異体アミノ酸をコードするのに用いられる、一組の異なるヌクレオチドトリプレット配列である。コドンセットは、IUBコードによって下で示すように、特定のヌクレオチドまたはヌクレオチドの等モル混合物を示すために符号を使って表される。コドンセットは、一般的に3つの大文字、例えばKMT、TMTなどで表される。

10

【0091】

IUBコード

G グアニン

A アデニン

T チミン

C シトシン

R (AまたはG)

Y (CまたはT)

M (AまたはC)

K (GまたはT)

S (CまたはG)

W (AまたはT)

H (AまたはCまたはT)

B (CまたはGまたはT)

V (AまたはCまたはG)

D (AまたはGまたはT)

N (AまたはCまたはGまたはT)

20

30

【0092】

例えば、コドンセットTMTでは、Tはヌクレオチドチミンであり、MはAまたはCでありうる。このコドンセットは複数のコドンが存在し、限定した数のアミノ酸のみ、すなわちチロシン及びセリンをコードしうる。

オリゴヌクレオチドまたはプライマーのセットは、標準の方法を使って合成できる。一組のオリゴヌクレオチドは、例えば、制限コドンセットによって提供されるヌクレオチドトリプレットの可能な組合せのすべてを代表し、所望の制限されたアミノ酸群をコードする配列を含む固相法によって合成することができる。ある位置での選ばれたヌクレオチド「縮重」を有するオリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で公知である。そのようなある種のコドンセットを有しているオリゴヌクレオチドのセットは、市販の核酸シンセサイザー (Applied Biosystems, Foster City, CAなどから入手可能) を使って合成することができ、または市販品を入手することができる (例えば、Life Technologies, Rockville, MDから)。したがって、特定のコドンセットを有する合成オリゴヌクレオチドセットは、一般的に異なる配列の複数のオリゴヌクレオチドを含み、この相違は配列全体の中のコドンセットによるものである。本発明で利用されるように、オリゴヌクレオチドは可変ドメインCDR (例えば可変ドメイン内に含まれるもの) の核酸鋳型へのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し、また、クローニングに役立つ制限酵素部位を含むこともできる。

40

【0093】

1つの方法では、変異体アミノ酸をコードしている核酸配列は、4D5の抗体可変ドメ

50

インなどのソースまたは鋳型ポリペプチドをコードしている核酸配列のオリゴヌクレオチドを媒介した突然変異生成によって作製することができる。この手法はZoller他, *Nucleic Acids Res.*10:6487-6504頁(1987)が記載しているように、当技術分野で公知である。つまり、変異体アミノ酸をコードしている核酸配列は所望の制限コドンセットをコードしているオリゴヌクレオチドセットをDNA鋳型とハイブリダイズすることによって作製され、前記鋳型は可変部核酸鋳型配列を含むプラスミドの一本鎖型である。ハイブリダイゼーションの後、DNAポリメラーゼを用いて鋳型の二次相補鎖すべてを合成し、この相補鎖はオリゴヌクレオチドプライマーを取り込み、前記オリゴヌクレオチドセットによって提供される制限コドンセットを含むようになる。他のソースまたは鋳型分子をコードしている核酸は公知であるか、または容易に決定することができる。

10

通常、長さが少なくとも25ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドが使われる。最適オリゴヌクレオチドは、突然変異体をコードするヌクレオチドの両側が鋳型と完全に相補性である少なくとも12から15個のヌクレオチドを持つ。これにより、オリゴヌクレオチドが正しく一本鎖DNA鋳型分子にハイブリダイズするようになる。オリゴヌクレオチドは、当技術分野で公知の手法、例えばCrea他, *Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA*, 75:5765頁(1978)に記載の手法を使って容易に合成される。

【0094】

DNA鋳型はバクテリオファージM13ベクター（市販のM13mp18およびM13mp19ベクターが適当）に由来するベクター、またはViera他, *Meth.Enzymol.*153:3頁(1987)に記載されている一本鎖ファージ複製起点を含むベクターによって生成される。このように、突然変異させるべきDNAは、一本鎖鋳型を生成するためにこれらのベクターの1つに挿入することができる。一本鎖鋳型の生産は、前記Sambrook他のセクション4.21~4.41で記載されている。

20

未変性のDNA配列を変えるために、オリゴヌクレオチドが適当なハイブリダイゼーション条件の下で一本鎖鋳型にハイブリダイズされる。DNA重合酵素、通常、T7DNAポリメラーゼまたはDNAポリメラーゼIのクレノー断片を次に加え、合成のためのプライマーとしてオリゴヌクレオチドを使って鋳型の相補鎖を合成する。こうしてDNAの1つの鎖は遺伝子1の突然変異した形態をコードし、他の鎖（元の鋳型）は遺伝子1の未変性、未変更の配列をコードするようにヘテロ二本鎖分子が形成される。このヘテロ二本鎖分子は、次に適当な宿主細胞、通常大腸菌JM101のような原核生物に形質転換される。細胞を増殖させた後にアガロースプレートの上へプレートし、突然変異したDNAを含む細菌コロニーを同定するために32リン酸塩で放射性標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを使ってスクリーニングする。

30

【0095】

この上で記載されている方法は、プラスミドの両方の鎖が突然変異を含むホモ二本鎖分子が作製されるように修正することができる。この修正は以下の通りである。一本鎖オリゴヌクレオチドを先に述べたように一本鎖鋳型にアニールする。3つのデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボアデノシン(dATP)、デオキシリボグアノシン(dGTP)およびデオキシリボチミジン(dTT)の混合物を、dCTP- (a S)と呼ばれる修飾されたデオキシリボシトシン(Amershamから入手できる)と合わせる。この混合物を鋳型-オリゴヌクレオチド複合体に加える。DNAポリメラーゼをこの混合物へ追加すると、突然変異した塩基以外は鋳型と同一のDNA鎖が生成する。さらに、この新しいDNA鎖はdCTPの代わりにdCTP- (a S)を含み、これはDNA鎖を制限酵素による消化作用から保護するのに役立つ。二本鎖ヘテロ二本鎖の鋳型鎖に適当な制限酵素でニックを入れた後、突然変異を起こさせる部位を含む領域の後方で鋳型鎖はExo I I Iヌクレアーゼまたは適当な他のヌクレアーゼで消化することができる。反応を終了すると、部分的にだけ一本鎖の分子が残る。次に、完全な二本鎖DNAホモ二本鎖が、4つのデオキシリボヌクレオチド三リン酸のすべて、ATPおよびDNAリガーゼの存在下でDNAポリメラーゼを使って形成される。このホモ二本鎖分子は、次に適当な宿主細胞に形質転換することができる。

40

50

【0096】

前に示したように、オリゴヌクレオチドセットの配列の長さは鋳型核酸にハイブリダイズするために十分な長さであり、また、必須ではないが制限部位を含むこともできる。DNA鋳型はバクテリオファージM13ベクターに由来するベクター、またはViera他((1987), Meth.Enzymol.153:3頁)に記載されている一本鎖ファージ複製起点を含むベクターによって生成される。このように、突然変異させるべきDNAは、一本鎖鋳型を生成するためにこれらのベクターの1つに挿入する必要がある。一本鎖鋳型の生産は、前記Sambrook他のセクション4.21~4.41で記載されている。

他の方法によると、ライブラリーは上流および下流のオリゴヌクレオチドセットを提供することによって生成することができ、各セットは、オリゴヌクレオチドの配列内で提供されたコドンセットによって確立された異なる配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを持つ。上流および下流のオリゴヌクレオチドセットは、可変ドメイン鋳型核酸配列と共に、PCR産物の「ライブラリー」を作製するためにPCR法で使うことができる。PCR産物は確立された分子生物学的手法を使って他の関連した、または無関係な核酸配列、例えばウイルスのコートタンパク質構成成分および二量体化ドメインと融合することができるので、「核酸カセット」と呼ぶこともある。

【0097】

PCRプライマー配列は、CDR領域の溶媒に露出し非常に多様な位置のために設計されたコドンセットの1つまたは複数を含む。前記したように、コドンセットは所望の変異体アミノ酸をコードするのに用いられる、一組の異なるヌクレオチドトリプレット配列である。

オリゴヌクレオチドセットは、核酸カセットを作製するための鋳型として可変部核酸鋳型配列を使ってPCR法で使うことができる。可変部核酸鋳型配列は、対象核酸配列（すなわち、置換の対象となるアミノ酸をコードしている核酸配列）を含む免疫グロブリンの軽鎖または重鎖のいかなる部分でもよい。可変部核酸鋳型配列は、第1の核酸鎖および相補性の第2の核酸鎖を有する二本鎖DNA分子の一部である。可変部核酸鋳型配列は、少なくとも可変ドメインの一部を含み、また少なくとも1つのCDRを持つ。場合によっては、可変部核酸鋳型配列は複数のCDRを含む。可変部核酸鋳型配列の上流部および下流部は、上流域のオリゴヌクレオチドセットおよび下流域のオリゴヌクレオチドセットの構成メンバーによるハイブリダイゼーションの対象とすることができる。

【0098】

上流のプライマーセットの第1のオリゴヌクレオチドは第1の核酸鎖にハイブリダイズすることができ、下流のプライマーセットの第2のオリゴヌクレオチドは第2の核酸鎖にハイブリダイズすることができる。オリゴヌクレオチドプライマーは1つまたは複数のコドンセットを含むことができ、可変部核酸鋳型配列の一部にハイブリダイズするように設計することができる。これらのオリゴヌクレオチドの使用により、PCR後に2つ以上のコドンセットをPCR産物（すなわち核酸カセット）に導入することができる。抗体可変ドメインをコードしている核酸配列の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーは、アミノ酸置換の対象となるCDR残基をコードする部分を含む。

上流域および下流域のオリゴヌクレオチドセットは、オリゴヌクレオチド配列内に制限部位を含むように合成することもできる。これらの制限部位は、さらなる抗体配列を有している発現ベクターへの核酸カセット（すなわちPCR反応生成物）の挿入を容易にする。好ましくは、制限部位は外来の核酸配列を導入することなく、または元のCDRまたはフレームワーク核酸配列を取り除くことなく核酸カセットのクローニングを容易にするようになっている。

【0099】

核酸カセットは、作製した対象アミノ酸置換を含む軽鎖または重鎖の配列の一部またはすべての発現のために、いかなる適当なベクターにもクローニングすることができる。本発明で詳述される方法によると、核酸カセットはウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部と融合した軽鎖または重鎖配列の一部またはすべて（すなわち、融合タンパク質を

10

20

30

40

50

形成)の生産を可能にしているベクターにクローニングされるか、あるいは、粒子または細胞の表面で提示される。数種類のベクターが入手でき、それらは本発明の実施に用いることができるが、ファジミドベクターが本明細書での使用には好ましいベクターであり、その訳はそれらが相対的に容易に構築し、また容易に増幅することができるからである。当業者に公知のように、ファジミドベクターは、通常、プロモーター、シグナル配列、表現型選択遺伝子、複製起点部位および他の必要な構成成分を含む様々な構成成分を含む。

特定の変異体アミノ酸の組合せが発現される他の実施形態では、核酸カセットは、重鎖または軽鎖の変異ドメインのすべてまたは一部をコードすることができ、また変異体アミノ酸の組合せをコードすることができる配列を含む。ライブラリーの場合のようにこれらの変異体アミノ酸または変異体アミノ酸の組合せを含んでいる抗体の作製のために、核酸カセットは、さらなる抗体配列、例えば軽鎖および重鎖可変部の可変または定常ドメインのすべてまたは一部を含んでいる発現ベクターに挿入することができる。これらのさらなる抗体配列は他の核酸配列、例えばウイルスコートタンパク質構成成分をコードしている配列と融合することができ、したがって融合タンパク質の生産を可能にする。

10

20

30

40

50

【0100】

ベクター

本発明の1つの態様は遺伝子融合をコードしている核酸配列を含んでいる複製可能な発現ベクターを含み、前記遺伝子融合は、ウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部と融合した、1つのCDR含有ポリペプチド(抗体可変ドメインなど)、または1つの抗体可変ドメインと1つの定常ドメインを含む融合タンパク質をコードする。先に述べたように多様な配列で生成された複数の融合ポリペプチドを含む複数の異なる融合タンパク質をコードする複数の遺伝子融合を含む、多様で複製可能な発現ベクターのライブラリーも含まれる。ベクターは様々な構成成分を含んでいてもよく、好ましくは異なるベクターの間で抗体可変ドメインが移動できるように、かつ/または異なるフォーマットで融合タンパク質が提示されるように構築される。

ベクターの例としてはファージベクター及びファジミドベクター(ここでは広範囲に例示されるものであり、上記により詳細に記載される)が含まれる。ファージベクターは一般的に、ファージ複製およびファージ粒子形成を可能にするファージ複製起点を有する。ファージは一般に繊維状バクテリオファージ、例えばM13、f1、fd、Pf3ファージもしくはその誘導体、またはラムドイドファージ、例えばラムダ、21、phi80、phi81、82、424、434、その他、もしくはその誘導体である。

【0101】

ウイルスコートタンパク質の例には、感染性タンパク質PIII(ときにp3とも称される)、主要コートタンパク質PVIII、Soc(T4)、Hoc(T4)、gpD(バクテリオファージλ)、マイナーバクテリオファージコートタンパク質6(pVI)(繊維状ファージ; J Immunol Methods.1999年12月10日;231(1-2):39-51頁)、M13バクテリオファージ主コートタンパク質変異体(P8)(Protein Sci 2000年4月;9(4):647-54頁)が含まれる。融合タンパク質はファージの表面で提示されるが、適当なファージ系にはM13KO7ヘルパーファージ、M13R408、M13-VCSおよびPhiX174、pJufファージ系(J Virol.2001年8月;75(15):7107-13頁.v)、ハイパーファージ(Nat Biotechnol.2001年1月;19(1):75-8頁)が含まれる。好ましいヘルパーファージはM13KO7であり、好ましいコートタンパク質はM13ファージ遺伝子IIIコートタンパク質である。好ましい宿主は大腸菌、および大腸菌のプロテアーゼ欠損株である。ベクター、例えばfth1ベクター(Nucleic Acids Res.2001年5月15日;29(10):E50-0)は、融合タンパク質の発現に役立つことがある。

発現ベクターは、CDR含有融合ポリペプチド(例えば抗体の各サブユニットまたはその断片)をコードしているDNAと融合した分泌シグナル配列も持つことができる。この配列は典型的には融合タンパク質をコードしている遺伝子の直ぐ5'側に位置し、したがって融合タンパク質のアミノ末端で転写される。しかし、あるケースでは、シグナル配列は分泌されるべきタンパク質をコードしている遺伝子の5'以外の位置にあることが証明

された。この配列は、それが細菌細胞の内膜を横切って結合するタンパク質を対象とする。シグナル配列をコードしているDNAは、シグナル配列を持つタンパク質をコードしている遺伝子のいずれかから、制限エンドヌクレアーゼ断片として得られる。原核生物の適当なシグナル配列は、例えば、LamBまたはOmpF(Wong他, Gene, 68:1931頁(1983))、MalE、PhoAをコードしている遺伝子および他の遺伝子から得られるかもしれない。一実施態様では、本発明の実施のための好ましい原核生物シグナル配列は、Chang他, Gene 55:189頁(1987)、に記載されている大腸菌耐熱性エンテロトキシンII(STII)シグナル配列及び／又はmalEである。

【0102】

上述のように、ベクターは、一般的に、融合ポリペプチドの発現を促進するためにプロモーターを含む。原核生物ベクターで最も一般的に使われるプロモーターには、lacZプロモーター系、アルカリホスファターゼphoAプロモーター(Ap)、バクテリオファージl_PLプロモーター(温度感受性プロモーター)、tacプロモーター(lacリプレッサーによって制御されるハイブリッドtrp-lacプロモーター)、トリプトファンプロモーターおよびバクテリオファージT7プロモーターが含まれる。プロモーターの総説に関しては、前出Sambrook他のセクション17を参照。これらが最も一般的に使用されるプロモーターであるが、他の適当な微生物プロモーターも同様に使うことができる。

ベクターは、また、他の核酸配列、例えば、gDタグ、c-Mycエピトープ、ポリヒスチジンタグ、蛍光タンパク質(例えば、GFP)またはファージまたは細胞の表面で発現する融合タンパク質の検出または精製に役立つβ-ガラクトシダーゼタンパク質をコードしている配列を含むことができる。例えばgDタグをコードしている核酸配列は、また、融合タンパク質を発現する細胞またはウイルスの正または負の選択を可能にする。いくつかの実施形態では、gDタグは好ましくはウイルスコートタンパク質構成成分に融合していない抗体可変ドメインと融合する。例えば、ポリヒスチジン標識をコードしている核酸配列は、免疫組織化学手法を使って特異的抗原と結合する抗体可変ドメインを含む融合タンパク質を同定するために役立つ。抗原結合の検出に役立つタグは、ウイルスコートタンパク質構成成分に融合していない抗体可変ドメイン、またはウイルスコートタンパク質構成成分に融合した抗体可変ドメインに融合することができる。

【0103】

本発明を実践するのに用いられるベクターの他の有用構成成分は、表現型選択遺伝子である。典型的表現型選択遺伝子は、宿主細胞に抗生物質耐性を与えるタンパク質をコードしている遺伝子である。実例として、アンピシリン耐性遺伝子(amp^r)およびテトラサイクリン耐性遺伝子(tet^r)はこの目的のために容易に使用される。

ベクターは、独特の制限部位および抑制性終止コドンを含んでいる核酸配列も含むことができる。独特の制限部位は異なるベクターおよび発現系の間で抗体可変ドメインを移動させるために役立ち、特に細胞培養による完全長抗体または抗原結合断片の生産に役立つ。抑制性終止コドンは融合タンパク質の発現レベルを調節するのに役立ち、可溶性抗体断片の精製を容易にする。例えば、アンバー終止コドンはファージディスプレイを可能にするsupE宿主ではGlnと解釈することができるが、非supE宿主ではそれはファージコートタンパク質と融合していない可溶性抗体断片を産生する終止コドンと解釈される。これらの合成配列は、ベクター内の1つまたは複数の抗体可変ドメインと融合させることができる。

【0104】

対象とする抗体配列、例えば変異体アミノ酸を有するCDRをコードしている核酸がベクター系から容易に取り出されて他のベクター系に入れられるようにするベクター系を使うことがときに有用である。例えば、変異体アミノ酸を有する抗体または抗体可変ドメインをコードしている核酸配列の取り出しを容易にするために、適当な制限部位をベクター系に組み込むことができる。制限配列は、通常、効率的な切出しおよび新しいベクターへのライゲーションを容易にするために、ベクター内でユニークなものが選ばれる。抗体ま

たは抗体可変ドメインは、その後外来の融合配列、例えばウイルスコートタンパク質または他の配列タグなしでベクターから発現され得る。

抗体可変ドメインまたは定常ドメインをコードしている核酸（遺伝子1）とウイルスのコートタンパク質構成成分（遺伝子2）との間に、終結または終止コドンにコードしているDNAを挿入することができ、そのような終結コドンにはUAG（アンバー）、UAA（オーカー）およびUGA（オベル）が含まれる。（Microbiology, Davis他, Harper & Row, New York, 1980年, 237頁, 245-47頁および374頁）。野生型宿主細胞で発現する終結または終止コドンは、遺伝子2タンパク質が結合しない遺伝子1タンパク質産物の合成をもたらす。しかし、抑制宿主細胞での増殖は検出可能な量の融合タンパク質の合成をもたらす。そのような抑制宿主細胞は公知であり、大腸菌抑制遺伝子株(Bullock他, Bio Techniques 5:376-379頁(1987))などが記載されている。そのような終結コドンを融合ポリペプチドをコードしているmRNAに入れるために、許容できるいかなる方法でも用いることができる。

【0105】

抑制性コドンは、抗体可変または定常ドメインをコードしている第1の遺伝子とファージコートタンパク質の少なくとも一部をコードしている第2の遺伝子との間に挿入することができる。あるいは、抑制性終結コドンは、抗体可変ドメインの最後のアミノ酸トリプレットまたはファージコートタンパク質の最初のアミノ酸を置換することによって融合部位に隣接して挿入することができる。抑制性終結コドンは、二量体化ドメインのC末端またはその後に位置してもよい。抑制性コドンを含んでいるプラスミドがサプレッサー宿主細胞で増殖された場合、ポリペプチドおよびコートタンパク質を含んでいる融合ポリペプチドの検出可能な量が生産される。プラスミドが非サプレッサー宿主細胞で増殖された場合、抗体可変ドメインは挿入された抑制性トリプレットUAG、UAAまたはUGAにおける終結のために、実質的にファージコートタンパク質と融合せずに合成される。非サプレッサー細胞では、抗体可変ドメインはそれを宿主メンブランに固定する融合ファージコートタンパク質が存在しないために、合成された後に宿主細胞から分泌される。

いくつかの実施形態では、多様化される（ランダム化される）CDRは、鋳型配列（本明細書では「終止鋳型」と呼ぶ）に組み込まれた終止コドンを持つことができる。この特徴は、関心の変異体アミノ酸の配列を含むオリゴヌクレオチドの取り込みのために、鋳型配列における終止コドンの修復の成功に基づき、多様化が成功した配列の検出と選択を可能にする。この特徴は、下記の実施例でさらに例示される。

【0106】

軽鎖および／または重鎖抗体可変または定常ドメインはさらなるペプチド配列に融合することもでき、このさらなるペプチド配列はウイルス粒子または細胞の表面での1つまたは複数の融合ポリペプチドの相互作用を可能にする。これらのペプチド配列は、本明細書では「二量体化ドメイン」と称す。二量体化ドメインは、少なくとも1つまたは複数の二量体化配列、またはシステイン残基を含んでいる配列を少なくとも1つ、あるいはこの両方共含むことができる。適当な二量体化配列には、疎水残基が一定の間隔をあけて存在し、各タンパク質の疎水残基の相互作用による二量体の形成を可能にする両親媒性の α ヘリックスを有するタンパク質のそれらが含まれる。そのようなタンパク質およびタンパク質部分には、例えばロイシンジッパー領域が含まれる。二量体化ドメインは、また、1つまたは複数のシステイン残基を含むことができる（例えば、二量体化ドメイン内に抗体ヒンジ配列を含むことにより提供される）。システイン残基は、1つまたは複数のジスルフィド結合の形成による二量体化を可能にする。終止コドンが二量体化ドメインの後方に存在する一実施形態では、二量体化ドメインは少なくとも1つのシステイン残基を含む。二量体化ドメインは、好ましくは抗体可変または定常ドメインとウイルスコートタンパク質構成成分との間に位置する。

【0107】

場合によっては、ベクターは、例えばコートタンパク質に融合した重鎖および軽鎖可変部を含んでいる単鎖形態の単一の抗体ファージポリペプチドをコードする。これらのケー

スでは、ベクターは、ある種のプロモーターの制御下で1つの転写産物を発現する「一シストロン性」と考えられる。例えばベクターは、V LおよびV Hドメインの間にリンカーペプチドを有し、V LおよびV Hドメインをコードしている一シストロン性配列の発現を促進するためにプロモーター（例えばアルカリホスファターゼ（A P）またはT a cプロモーター）を利用してもよい。このシストロン配列は、5'末端でシグナル配列（例えば大腸菌のm a l Eまたは耐熱性エンテロトキシンI I（S T I I）シグナル配列）に連結し、3'末端でウイルスコートタンパク質（例えばバクテリオファージp I I Iタンパク質）のすべてまたは一部に連結する。本実施態様のベクターによってコードされる融合ポリペプチドは、本明細書では「S c F v-p I I I」と称す。いくつかの実施形態では、ベクターは第2の可変ドメイン配列（例えばV H）とウイルスコートタンパク質配列との間のその3'末端に、二量体化ドメイン（例えばロイシンジッパー）をコードしている配列をさらに含むことができる。この二量体化ドメインを含んでいる融合ポリペプチドは、二量体化により2つのs c F vポリペプチドの複合体（本明細書では「（S c F v）2-p I I I」と称す）を形成することができる。

10

20

30

40

50

【0108】

その他の場合、重鎖および軽鎖の可変部は別々のポリペプチドとして発現され、このようにベクターは「二シストロン性」であり、別々の転写産物の発現を可能にする。これらのベクターでは、適当なプロモーター、例えばP t a cまたはP h o Aプロモーターは二シストロン性メッセージの発現を促すために利用する。例えば軽鎖可変および定常ドメインをコードしている第1のシストロンは、5'末端でシグナル配列、例えば大腸菌のm a l Eまたは耐熱性エンテロトキシンI I（S T I I）シグナル配列に連結し、3'末端でタグ配列、例えばg Dタグをコードしている核酸配列に連結している。例えば重鎖可変および定常ドメインC H 1をコードしている第2のシストロンは、5'末端でシグナル配列、例として大腸菌のm a l Eまたは耐熱性エンテロトキシンI I（S T I I）シグナル配列に連結し、3'末端でウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部に連結している。

二シストロン性メッセージ及びF(a b')₂-p I I Iを表出するための好適なプロモーター、例えばP t a cまたはP h o A（A P）プロモーターを提供するベクターの一実施態様では、5'末端でシグナル配列、例えば大腸菌m a l Eまたは耐熱性エンテロトキシンI I（S T I I）シグナル配列と作用可能に連結し、3'末端でタグ配列、例えばg Dタグをコードしている核酸配列と連結した軽鎖可変および定常ドメインをコードしている第1のシストロンの発現を促進する。第2のシストロンは、例えば5'末端でシグナル配列、例えば大腸菌のm a l Eまたは耐熱性エンテロトキシンI I（S T I I）シグナル配列と作用可能に連結した重鎖可変および定常ドメインをコードし、3'末端にはI g Gヒンジ配列およびロイシンジッパー配列、さらにその後方に少なくとも一部のウイルスコートタンパク質を含む二量体化ドメインを持つ。

【0109】

融合ポリペプチドの表出（提示、ディスプレイ）

C D R含有ポリペプチド（例として抗体可変ドメイン）の融合ポリペプチドは、細胞、ウイルスまたはファジミド粒子の表面で様々な形式で提示することができる。これらの形式には、単鎖F v断片（s c F v）、F(a b)断片およびこれらの断片の多価の形態が含まれる。例えば、多価の形態は、S c F v、F a bまたはF(a b')の二量体を含み、これらは本明細書では（S c F v）₂、F(a b)₂およびF(a b')₂とそれぞれ称す。多価の形態の提示は、それらが、通常低親和性クローンの同定をもたらし、また選択過程で稀なクローンのより効率的な選別を可能にする複数の抗原結合部位を有することにおいて有益である。

バクテリオファージの表面で抗体断片を含んでいる融合ポリペプチドを提示する方法は当技術分野で公知であり、例えばW O 9 2 / 0 1 0 4 7号および本明細書に記載されている。他の公開特許公報W O 9 2 / 2 0 7 9 1号；W O 9 3 / 0 6 2 1 3号；W O 9 3 / 1 1 2 3 6号および国際出願第9 3 / 1 9 1 7 2号は関連した方法を記載しており、参照によりすべて本明細書に組み込まれている。他の刊行物は、ファージ表面で提示された様々

な抗原に対する、人工的に再配置されたV遺伝子レパートリーによる抗体の同定を示した（例えば、H.R.Hoogenboom & G.Winter J.Mol.Biol.227, 381-388頁, 1992年；またWO 93/06213号およびWO 93/11236号で開示されている）。

【0110】

ベクターがs c F v形式での提示のために構築される場合、このベクターは抗体可変軽鎖ドメインおよび抗体可変重鎖可変ドメインをコードしている核酸配列を含む。一般的には、抗体重鎖可変ドメインをコードする核酸配列は、ウイルスコートタンパク質構成成分に融合する。抗体可変ドメインの一方または両方は、少なくとも1つのCDR領域に変異体アミノ酸を持つことができる。抗体可変軽鎖をコードしている核酸配列は、ペプチドリンカーをコードしている核酸配列によって抗体可変重鎖ドメインに連結される。ペプチドリンカーは、一般的に約5から15個のアミノ酸を含む。任意選択に、例えば精製または検出に役立つ標識をコードしている他の配列を、抗体可変軽鎖もしくは抗体可変重鎖ドメインのいずれかまたは両方をコードしている核酸配列の3'末端に融合することができる。

ベクターがF(ab)提示のために構築される場合、このベクターは抗体可変ドメインおよび抗体定常ドメインをコードしている核酸配列を含む。軽鎖可変ドメインをコードする核酸は、軽鎖定常ドメインをコードする核酸配列に融合される。抗体重鎖可変ドメインをコードする核酸配列は、重鎖定常CH1ドメインをコードする核酸配列に融合される。一般的には、重鎖可変および定常ドメインをコードしている核酸配列は、ウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部をコードしている核酸配列に融合される。抗体軽鎖または重鎖の可変ドメインの一方または両方は、少なくとも1つのCDR領域に変異体アミノ酸を持つことができる。ある実施態様では、重鎖可変および定常ドメインは好ましくはウイルスコートタンパク質の少なくとも一部との融合体として発現され、軽鎖可変および定常ドメインは重鎖ウイルスコート融合タンパク質とは別々に発現される。重鎖および軽鎖は互いと結合し、その結合は共有結合でも非共有結合でもよい。任意選択に、例えば精製または検出に役立つポリペプチド標識をコードしている他の配列を、抗体軽鎖定常ドメインもしくは抗体重鎖定常ドメインのいずれかまたは両方をコードしている核酸配列の3'末端に融合することができる。

【0111】

ある実施態様では、好ましくは、二価の成分、例えばF(ab)₂二量体またはF(ab')₂二量体が、粒子表面で変異体アミノ酸置換を有する抗体断片を提示するために使用される。F(ab')₂二量体は一般的に溶相抗原結合検定でF(ab)二量体と同じ親和性を持つことが分かっているが、F(ab')₂の解離速度は高アビディティーのため低下している。したがって、二価の形態（例えばF(ab')₂）は低親和性クローンの同定を可能にし、また選択過程で稀なクローンのより効率的な選別を可能にするので、特に有用な形態である。

【0112】

宿主細胞へのベクターの導入

本発明に従って記載されているように構築されたベクターは、増幅および／または発現のために宿主細胞に導入される。ベクターは、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿などを含む標準の形質転換法を使って、宿主細胞に導入することができる。ベクターがウイルスのような感染性の粒子であるならば、ベクター自体が宿主細胞に侵入する。遺伝子融合をコードする複製可能な発現ベクターを含んでいる宿主細胞のトランスフェクションおよび標準手法によるファージ粒子の生産は、融合タンパク質がファージ粒子の表面で提示されるファージ粒子を提供する。

複製可能な発現ベクターは、様々な方法を使用して宿主細胞に導入される。一実施形態では、ベクターはWO 00/106717号で記載されているようにエレクトロポレーション法を使って細胞に導入することができる。細胞は標準の培養液中で任意に約6～48時間（またはOD₆₀₀=0.6～0.8になるまで）、37℃で培養し、次にブロースを遠心分離して上清を取り出す（例えばデカンテーションにより）。初期の精製では、好

ましくは緩衝液（例えば1.0 mMのHEPES pH 7.4）の中に細胞ペレットを再懸濁し、次に再遠心分離を行い、上清を取り出す。得られた細胞ペレットを希釈したグリセリン（例えば5～20% v/v）の中に再懸濁し、再度再遠心分離をして細胞ペレットを形成し、上清を取り除く。最終的な菌体濃度は、所望の濃度に細胞ペレットを水または希釈したグリセリンの中に再懸濁することによって得られる。

【0113】

特に好ましい受容細胞は本発明のエレクトロポレーション応答能のある大腸菌株SS320である(Sidhu他, Methods Enzymol.(2000), 328:333-363頁)。大腸菌株SS320は、稔性エピソーム(F'プラスミド)またはXL1-BLUEをMC1061細胞に移転するのに十分な条件の下で、MC1061細胞をXL1-BLUE細胞と交接させて調製した。大腸菌株SS320は、1998年6月18日、アメリカ基準株保存機構(ATCC)、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia USAに寄託され、寄託番号98795が割り当てられた。この菌株でのファージ複製を可能にするいかなるF'エピソームでも、本発明で用いることができる。適当なエピソームはATCCに預けられている株から入手可能であるし、または市販品を入手できる(CJ236、CSH18、DHF'、JM101、JM103、JM105、JM107、JM109、JM110、KS1000、XL1-BLUE、71-18、その他)。

エレクトロポレーションでより高いDNA濃度(約10倍)を使用すると、形質転換率が向上し、宿主細胞に形質転換されるDNAの量が増加する。高い菌体濃度の使用も効率を高める(約10倍)。移転されたDNA量の増加により、より大きな多様性を有し、複 20
合ライブラリーのより多くの独特なメンバーを示すより大きなライブラリーが生じる。形質転換細胞は、通常、抗生物質を含む培地上の増殖によって選択される。

【0114】

選択した対象への結合体の選択(選別)とスクリーニング

方法論に様々な置換および変更を加えた、対象抗原結合体を同定するためのファージディスプレイの使用は、当技術分野で確立されている。一手法では、融合ポリペプチドをコードしている遺伝子融合体と作用可能に連結した転写調節要素を含む複製可能な変異体ベクターのファミリーを構築し、適当な宿主細胞に形質転換し、この形質転換細胞を培養して前記融合ポリペプチドをファージ粒子表面で提示するファージ粒子を形成し、その後選択の過程で結合しない粒子と比較して結合する粒子のサブセットを増加させる目的で、少 30
なくとも粒子集団の一部が対象と結合するように組換え体ファージ粒子を対象抗原と接触させることによる選択または選別を伴うプロセスを行う。選択されたプールは、異なるかまたは同じストリンジェンシーで同じ対象をさらに1回選別するために、宿主細胞、例えば新鮮なXL1-BLUE細胞を感染させて増幅することができる。得られた変異体のプールは、次に新規高親和性結合タンパク質を同定するために、対象抗原に対してスクリーニングされる。これらの新規高親和性結合タンパク質は、アンタゴニストまたはアゴニストなどの治療薬として、かつ/または診断薬および研究試薬として有用であり得る。

【0115】

変異体アミノ酸を含んでいる抗体可変ドメインのような融合ポリペプチドは、ファージ、ファジミド粒子または細胞の表面で発現され、次に融合ポリペプチド群の構成メンバー 40
の、一般的に関心の抗原である対象抗原に結合する能力について選択および/またはスクリーニングをすることができる。対象結合体についての選択の方法は、タンパク質Lまたはファージ上で提示される抗体もしくは抗体断片と結合する標識特異抗体のような抗体可変ドメインと親和性を有する一般的なタンパク質上での選別も含み、これは正しくフォールドされた抗体断片(融合ポリペプチド)を提示するライブラリーメンバーを豊富にするために使うことができる。

標的(対象)タンパク質、例えば受容体は、天然源から単離することができ、または当技術分野で公知の手法による組換え方法により調製することができる。対象抗原としては、治療上関心の多くの分子が含まれる。

親和性のための選択(選別)のために様々な方策を使うことができる。ある方策は固体 50

担体方法またはプレート選別または固定化対象選別である。他の方策は、溶液－結合法である。

【0116】

固体担体方法については、対象タンパク質は当技術分野で公知である適当な固体または半固体マトリックス、例えばアガロースビーズ、アクリルアミドビーズ、ガラスビーズ、セルロース、様々なアクリルコポリマー、メタクリル酸ヒドロキシアルキルゲル、ポリアクリルおよびポリメタクリルコポリマー、ナイロン、中性およびイオン性担体などに結合してもよい。マトリックスへの対象タンパク質の結合は、Methods in Enzymology, 44(1976)に記載されている方法、または当技術分野で公知の他の手段で達成することができる。

マトリックスへの対象抗原の結合の後、固定化された対象をファージ粒子集団の少なくとも1サブセットと固定化対象抗原との結合に適した条件下で、融合ポリペプチドを発現しているライブラリーと接触させる。通常、pH、イオン強度、温度などを含む条件は、生理学的条件を模倣する。前記固定化対象と結合する粒子（「結合体」）は、水洗により対象と結合しない粒子から分離する。洗浄条件は、高親和性結合体以外のすべてが取り除かれるように調節することができる。結合体は様々な方法によって固定化された対象から解離させることができる。これらの方法には野生型リガンド（例えば過剰な対象抗原）を使う競合的解離、pHおよび／またはイオン強度の変更、ならびに当技術分野で公知の方法が含まれる。結合体の選択は、一般的に0.1MのHClなどの酸またはリガンドのような、適当な溶出材料によるアフィニティーマトリックスからの溶出を含む。リガンドの濃度を上昇させて溶出すると、提示されたより親和性の高い結合分子を溶出させることができた。

【0117】

結合体は単離してから細胞を結合体であるウイルス粒子（および、例えばウイルス粒子がファジミド粒子である場合は必要に応じてヘルパーファージ）に感染させることによって、適当な宿主細胞で増幅させることができ、この宿主細胞は所望の融合ポリペプチドを提示する粒子の増幅に適した条件下で培養される。次にファージ粒子を採取し、対象抗原の結合体がいづらか豊富になるまで選択工程を1回または複数回繰り返し、選択または選別は何回でも利用できる。選択または選別方法の1つは、タンパク質Lまたは提示されるポリペプチドに存在するポリペプチドタグに対する抗体、例えばgDタンパク質またはポリヒスチジンタグに対する抗体のような一般の親和性タンパク質と結合する結合体を単離することを含むこともできる。

【0118】

本発明の1つの態様は、「溶液－結合方法」と呼ばれる新規選択法を用いた本発明のライブラリーの選別を伴う。本発明は、従来の溶液選別方法よりも効率が非常に改善された溶相選別を可能にする。ランダムなライブラリーから元の結合体を見つけるため、あるいは特定の結合クローンまたはクローン群の親和性を改善することを目的としたライブラリーから改善された結合体を見つけるために溶液結合方法を用いてもよい。この方法は、複数のポリペプチド、例えばファージまたはファジミド粒子（ライブラリー）上で提示されるポリペプチドを、タグ分子で標識されたか融合された対象抗原と接触させることを含む。タグはビオチンまたは他の特異的結合体が入手できる部分でよい。溶相のストリンジエンシーは、第1の溶液結合相で濃度を段階的に低くした標識された対象抗原を用いて変化させることができる。さらにストリンジエンシーを高めるために、第1の溶液結合相の後に、第1の溶相での最初の標識された対象との結合の後に高濃度の標識されていない対象抗原を有する第2の溶相が続いてもよい。通常、標識対象の100から1000倍の非標識対象が第2相で使われる（含まれるならば）。第1の溶相のインキュベーション時間は、平衡に達するまで2、3分から1、2時間またはそれ以上の範囲である。結合速度の速い結合体には、この第1相において結合時間を短くする傾向がある、または短くすることが選択されうる。第2相のインキュベーションの時間および温度は、ストリンジエンシーを高めるために変化させることができる。これにより、対象から離れる速度（解離速度）が

遅い結合体に対する選択の偏りが生じる。複数のポリペプチド（ファージ／ファジミド粒子上で提示された）を対象抗原と接触させた後に、標識対象と結合したファージまたはファジミド粒子を結合しないファージから分離する。結合の溶相からの粒子－対象混合物は、それを標識対象分子成分と接触させて短時間（例えば2～5分間）標識対象分子と結合する分子との結合を可能にすることによって単離する。標識対象抗原の初期濃度の範囲は、約0.1 nMから約1000 nMまでである。結合粒子を溶出して、次の選別のために増殖させることができる。各回低い濃度の標識対象抗原を用いて選別を複数回繰り返すのが好ましい。

【0119】

例えば、約100から250 nMの標識対象抗原を使った最初の選別または選択は広範囲の親和性を捕えるのに十分なはずであるが、この因子は経験的にかつ／または実践者の希望に沿うように決定することができる。2回目の選択では、約25から100 nMの標識対象抗原を使える。3回目の選択では、約0.1から25 nMの標識対象抗原を使える。例えば、100 nMの結合体の親和性を改善するためには、20 nMの標識対象から始めて5および1 nMへと進め、次にさらに低い濃度、例えば約0.1 nMの標識対象抗原へ進めるのが望ましい。

従来の溶液選別法ではストレプトアビジンをコーティングしたビーズのようなビーズを使用するが、これは使用するのが非常に厄介であり、またファージ結合体の回収の効率が非常に低いことが多い。ビーズによる従来の溶液選別法は2～5分よりもかなり長い時間を要し、高スループットの自動操作に適応させるのが上述の本発明より困難である。

本明細書で記載されているように、固体担体と溶液選別方法の組合せは、所望の特性を有している結合体を単離するために有利に使うことができる。対象抗原に対して2、3回選択／選別を繰り返した後、所望の性質／特性を有する特異的結合体を同定するために選択されたプールからの個々のクローンのスクリーニングを通常実行する。好ましくは、スクリーニングのプロセスは、ライブラリー候補物質の高スループットスクリーニングを可能にする自動化システムによって実行される。

【0120】

2つの主なスクリーニング方法を以下で記載する。しかし、当技術分野で公知の他の方法も本発明の方法で用いることができる。第1のスクリーニング法は固定化された対象抗原によるファージELISA検定を含み、この方法は非結合クローンからの特異的結合クローンの同定を可能にする。特異性は、対象でコーティングされたウェルおよびBSA、または他の非対象タンパク質でコーティングしたウェル上のクローンの同時検定で測定することができる。この検定は高スループットスクリーニングが自動化可能である。

一実施形態は、抗体可変ドメインのライブラリーから特異的対象抗原に結合する抗体可変ドメインを選択する方法を提供し、この方法は複数のポリペプチドを含む複製可能な発現ベクターのライブラリーを作製するステップと、前記ライブラリーを、結合に適した条件下で対象抗原および少なくとも1つの非対象抗原と接触させるステップと、前記ライブラリーのポリペプチド結合体を非結合体から分離するステップと、前記対象抗原と結合し、前記非対象抗原とは結合しない結合体を同定するステップと、この結合体を前記対象抗原から溶出するステップと、特異的抗原に結合する前記ポリペプチド結合体を含んでいる複製可能な発現ベクターを増幅するステップとを含む。

【0121】

第2のスクリーニング検定は低親和性クローンからの高親和性クローンのハイスループット選別を可能にする親和性スクリーニング検定法である。この検定では、各クローンはまずある濃度の対象抗原とある時間（例えば30～60分）インキュベートするかまたはしないで、その後対象でコーティングしたウェルへ短時間（例えば5～15分）塗布する。次に結合したファージを通常のファージELISA法、例えば抗M13 HRPコンジュゲートを用いて測定する。1つは対象でプリインキュベーションされ他のウェルは対象抗原でプリインキュベーションされていないが、この2つのウェルの結合シグナルの比率は親和性の指標である。第1のインキュベーションのための対象濃度の選択は、関心の親

10

20

30

40

50

和性の範囲に依存する。例えば、10 nMを超える親和性の結合体が所望であるならば、第1のインキュベーションでは100 nMの対象がしばしば使われる。一旦結合体が特定の回の選別（選択）で検出されると、より高い親和性の結合体を同定するためにこれらのクローンは親和性スクリーニング検定でスクリーニングすることができる。

【0122】

前記選別／選択法のいずれの組合せもこのスクリーニング法と組み合わせることができる。例えば、一実施形態ではポリペプチド結合体は、まず固定化対象抗原への結合に関して選択される。前記固定化対象抗原と結合するポリペプチド結合体は、次に増幅して、この対象抗原との結合および非対象抗原への非結合に関してスクリーニングすることができる。特異的に対象抗原と結合するポリペプチド結合体を増幅する。これらのポリペプチド結合体は、次に複合体を形成するためにある濃度の標識された対象抗原と接触させることにより、より高い親和性に関して選択でき、この標識された対象抗原の濃度域は約0.1 nMから約1000 nMであり、この複合体は対象抗原上の標識と結合する因子との接触によって単離される。このポリペプチド結合体は、次に標識された対象抗原から溶出され、また各回より低い濃度の標識された対象抗原を用いて選択を繰り返すこともできる。この選択方法を使用して単離された高親和性ポリペプチド結合体は、次に、本明細書中に記載のいくつか、当分野で公知の様々な方法を用いて高親和性に関してスクリーニングすることができる。

10

【0123】

これらの方法は、多数のクローンに対する長く、複雑な競合親和性検定を必要としないで、高親和性のクローンの検出を容易にする。多くのクローンに対して複雑な検定を行うことは手間が掛かり、選択による最良のクローンの検出に対してしばしば著しい障害となる。この方法は、類似した親和性の複数の結合体が選択プロセスから回収される場合の親和性の改善に特に役立つ。異なるクローンは、ファージまたはファジミド粒子上の発現／提示の効率が非常に異なることがある。より多く発現するクローンは、回収される可能性が高い。つまり、選択は変異体の提示または発現の量によって一方に偏らせることができる。本発明の溶液－結合選別方法は、高親和性結合体を見つけるための選択プロセスを改善することができる。この方法は、最良の結合体を迅速かつ容易にスクリーニングする際に著しく有利な親和性スクリーニング検定法である。

20

結合体が対象抗原への結合により同定された後、核酸を抽出することができる。抽出されたDNAは次に大腸菌宿主細胞を形質転換するのに直接用いることができ、あるいは、コード配列を例えばPCRで適当なプライマーを使って増幅し、典型的シーケンシング方法によって配列決定をすることができる。結合体の可変ドメインDNAは制限酵素で消化し、次にタンパク質発現のためにベクターに挿入することができる。

30

【0124】

本発明の方法に従って生成した多様性のある制限配列を有するCDRを持つポリペプチドを含む母集団を、図3、4、5、8に挙げるものを含む様々な標的に対する結合体を単離するために使用することができる。これらの結合体には制限コドンを用いて生成した多様化配列を含む一以上の変異型CDRが含まれるであろう。ある実施態様では、変異型CDRは、長さの異なるCDRH3から生じる制限コドンセットへのアミノ酸置換及び／又はアミノ酸挿入によって生じた配列多様性を含むCDRH3である。本発明の融合ポリペプチドを生成するために有用な例示的オリゴヌクレオチドには図2、9、14に挙げるものが含まれる。一以上の変異型CDRを組み合わせてもよい。ある実施態様では、CDRH3のみが多様化される。他の実施態様では、CDRH3を含む二以上の重鎖CDRが変異型である。他の実施態様では、CDRH3を除く一以上の重鎖CDRが変異型である。ある実施態様では、少なくとも一の重鎖及び少なくとも一の軽鎖CDRが変異型である。ある実施態様では、少なくとも1、2、3、4、5又はすべてのCDR H1、H2、H3、L1、L2及びL3が変異型である。

40

【0125】

場合によって、一以上の多様化した軽鎖CDRを一以上の多様化した重鎖CDRを含む

50

ポリペプチドの母集団から単離した新規の結合体と組み合わせることが有益であり得る。この過程は2工程プロセスを指す。2工程プロセスの実施例では、まず1つまたは複数のCDRをランダム化することによって作製された1つまたは複数のライブラリー内の結合体（通常、低親和性結合体）を確定するが、各ライブラリーでランダム化されるCDRは異なるか、あるいは、同じCDRがランダム化される場合はこのCDRがランダム化されて異なる配列を生成する。重鎖ライブラリーからの結合体は、次に例えばキュンケルなどの突然変異生成技術により、または新しい軽鎖ライブラリーを定常軽鎖だけを有する既存の重鎖結合体にクローニングすることによって（カットアンドペースト（例えば、異なるCDR配列をライゲーションすることによって））、軽鎖CDRにおけるCDR多様性でCDRをランダム化することができる。プールは次に親和性の向上した結合体を同定するために、対象に対してさらに選別することができる。例えば、H1/H2/H3ライブラリーの選別から得られた結合体（例えば低親和性結合体）は、L1/L2/L3多様性のライブラリーと融合させて元の固定したL1/L2/L3と置き換えることができ、この新しいライブラリーは次に他の結合体セット（例えば高親和性結合体）を得るために対象とする標的に対してさらに選別される。様々な標的抗原の何れかに対してより高い結合親和性を示す新規の抗体配列を同定することができる。

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドを含んでいるライブラリーは複数回選別され、各選別では前回の選別から得られた結合体を前回の対象抗原とは別の対象抗原と接触させる。望ましくは、しかし必ずしもそうとは限らないが、対象抗原は配列が相同的であり、例えば関連するが異なるポリペプチドのファミリーのメンバーであり、例えばそれには限定されないがサイトカイン（例えばαインターフェロン亜型）が含まれる。

【0126】

変異型CDR含有ポリペプチドを含むライブラリーの作製

抗体可変ドメインの少なくとも1つのCDR内の溶媒と接触しうるかつ／または非常に多様な位置を突然変異させて、変異型CDRポリペプチドのライブラリーを作製することができる。いくつかまたはすべてのCDRは、本発明の方法を使用して突然変異させることができる。いくつかの実施形態では、CDRH1、CDRH2およびCDRH3の位置を突然変異させて単一のライブラリーを形成することにより、またはCDRL3およびCDRH3の位置を突然変異させて単一のライブラリーを形成することにより、またはCDRL3、CDRH1、CDRH2およびCDRH3の位置を突然変異させて単一のライブラリーを形成することにより多様な抗体ライブラリーを作製することが好ましいかもしれない。

例えばCDRH1、CDRH2およびCDRH3の溶媒に露出しかつ／または非常に多様な位置に突然変異を有する、抗体可変ドメインのライブラリーを作製することができる。CDRL1、CDRL2およびCDRL3で突然変異を有する他のライブラリーを作製することができる。所望の親和性の結合体を作製するために、これらのライブラリーを互いに一緒に使うこともできる。例えば、対象抗原への結合により重鎖ライブラリーを1回または複数回選択した後、軽鎖ライブラリーは結合体の親和性を増やすために、さらなる選択のために重鎖結合体の集団に戻すことができる。

【0127】

一実施形態では、重鎖配列の可変領域のCDRH3領域において、元のアミノ酸を限定した一組の変異型アミノ酸で置換することによってライブラリーは作製される。本発明によると、このライブラリーは複数の抗体配列を含むことができ、その配列多様性は主に重鎖配列のCDRH3領域にある。

一態様では、このライブラリーはヒト化抗体4D5配列またはヒト化抗体4D5配列のフレームワークアミノ酸配列に関連して作製される。好ましくは、このライブラリーは少なくとも重鎖の残基95～100aをTMT、KMT又はWMTコドンセットによってコードされるアミノ酸で置換することによって作製され、該TMT、KMT又はWMTコドンセットはこれらの位置のあらゆる位置に対して限定した一組の変異体アミノ酸をコードするために用いられる。適当なオリゴヌクレオチド配列の例には、限定するものではない

が、図 2 および図 9 に挙げるものが含まれ、本明細書で記載される基準に従って当業者が決定することができる。

【0128】

他の実施形態では、異なる C D R H 3 デザインを利用して高親和性結合体を単離し、また様々なエピトープに対する結合体を単離する。C D R H 3 の多様化のために、長さの異なる H 3 を用いて別々に構築し、混合して、標的抗原に対する結合体を選択することができる。このライブラリーで生成される C D R H 3 の長さの範囲は 3 ~ 20、5 ~ 20、7 ~ 20、5 ~ 18 又は 7 ~ 18 個のアミノ酸であるが、これとは異なる長さの生成も可能である。また、前述のように C D R H 1 及び C D R H 2 内を多様化させることもできる。ライブラリーの一実施態様では、図 2 及び図 9 に例示するオリゴヌクレオチドを用いて H 1 及び H 2 内を多様化する。配列が異なる他のオリゴヌクレオチドも用いることができる。実施者の実用的必要性及び希望に応じてオリゴヌクレオチドを単独に用いる、又は様々な組み合わせの何れかで用いることができる。ある実施態様では、重鎖 C D R 内のランダム化した位置には図 1 に挙げるものが含まれる。

10

【0129】

本明細書中に記載のように、複数のライブラリーをプールして、固体担体選択および溶液選別方法を使用して選別することができる。複数の選別方策を使用してもよい。例えば、1 つの変更は固体に結合した対象に対する選別、続いて融合ポリペプチド（例えば、抗 g D タグ）上に存在しているかもしれないタグに対する選別、続いて固体に結合した対象に対する他の選別を含む。別法として、ライブラリーをまず固体表面に結合した対象上で選別し、次に溶相結合法を濃度を段階的に下げた対象抗原を用いて行うことにより溶出した結合体を選別する。異なる選別方法を組み合わせて利用すると、高発現の配列だけが選択されるのを極小化して、いくつかの異なる高親和性クローンの選択を可能にする。

20

【0130】

前述のようなプールしたライブラリーから単離した結合体の中から、ある場合では軽鎖内の多様性を限定することによってさらに親和性が改善しうることが明らかとなった。軽鎖の多様性は、必要でなくても以下のような実施態様で生成されうる：多様化する C D R L 1 内の位置にはアミノ酸位置 28、29、30、31、32 が含まれる；多様化する C D R L 2 内の位置にはアミノ酸位置 50、51、53、54、55 が含まれる；多様化する C D R L 3 内の位置には 91、92、93、94、95、97 が含まれる。一実施態様では、ランダム化した位置は図 13 に挙げるものである。

30

この実施態様のライブラリーから単離した親和性の高い結合体は、細菌及び真核生物の細胞培養において効率よく容易に生成される。g D タグ、ウイルスコートタンパク質成分配列などの配列を容易に除去したり、又は定常領域配列内に付加するようにベクターを設定して、完全長抗体又は抗原結合断片を効率よく生成することができる。

本発明の方法に従ってコドンセットと C D R の任意の組み合わせを多様化することができる。様々な C D R の組み合わせ内の好適なコドンの例を図 2、6、9、13 に挙げる。

【0131】

（ベクター、宿主細胞及び組換え方法）

本発明の抗体ポリペプチドの組み換え生成のために、コードする核酸を単離して、更なるクローニング（D N A の増幅）又は発現のために複製ベクターに挿入する。抗体をコードする D N A は従来の手順で簡単に単離し、配列決定される（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて）。多くのベクターが利用可能である。用いる宿主細胞にある程度依存してベクターを選択する。一般的に、好適な宿主細胞は原核生物又は真核生物（一般的に哺乳動物）由来の細胞である。

40

【0132】

（原核生物の宿主細胞を用いた抗体生成）

ベクターの構築

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードしているポリヌクレオチド配列は標準的な組

50

換え技術を使用して得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列はハイブリドーマ細胞のような抗体産生細胞から単離し配列決定することができる。あるいは、ポリヌクレオチドはヌクレオチド合成機又はPCR法を使用して合成することができる。ひとたび得られると、ポリペプチドをコードしている配列は原核生物宿主中で異種ポリヌクレオチドを複製し、発現することが可能な組換えベクター中に挿入される。当該分野において入手でき知られている多くのベクターを本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、主として、ベクターに挿入される核酸のサイズとベクターで形質転換される特定の宿主に依存する。各ベクターは、機能（異種性ポリヌクレオチドの増幅又は発現ないしその両方）及び属する特定の宿主細胞への適合性に応じて、様々な成分を含む。一般的に、限定するものではないが、ベクター成分には複製起源、選択マーカー遺伝子、プロモータ、リボゾーム結合部位（RBS）、シグナル配列、異種性核酸挿入及び転写終末配列が含まれる。 10

一般には、レプリコン及び宿主細胞と適合性のある種に由来するコントロール配列を含んでいるプラスミドベクターが、宿主細胞と関連して使用される。そのベクターは、通常、複製開始点並びに形質転換細胞において表現型の選択を提供可能なマーキング配列を有する。例えば、一般的に大腸菌は、大腸菌種由来のプラスミドであるpBR322を用いて形質転換する。pBR322はアンピシリン（Amp）及びテトラサイクリン（Tet）耐性のコード遺伝子を含んでいるため、形質転換細胞を容易に同定することができる。pBR322、その誘導体又は他の微生物プラスミド又はバクテリオファージも外来性タンパク質を発現する微生物によって使用可能なプロモータを含むか、含むように変更される。特定の抗体の発現に使用されるpBR322誘導体の例はCarter等の米国特許第5648237号に詳細に記載されている。 20

【0133】

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

本発明の発現ベクターは各ポリペプチド成分をコードする2又はそれ以上のプロモーターシストロン（翻訳単位）対を含みうる。プロモーターはその発現を調節するシストロンの上流（5'）に位置している非翻訳配列である。原核生物のプロモーターは典型的には誘導性と構成的との二つのクラスのものがある。誘導性プロモーターは、例えば栄養分の有無又は温度の変化のような、培養条件の変化に応答してその調節下でシストロンの転写レベルを増大させるように誘導するプロモーターである。 30

様々な潜在的宿主細胞によって認識されるプロモータが非常にたくさん公知となっている。選択したプロモーターを、制限酵素消化によって供給源DNAからプロモータを除去し、本発明のベクター内に単離したプロモータを挿入することによって軽鎖又は重鎖をコードするシストロンDNAに作用可能に連結することができる。天然プロモーター配列と多くの異種プロモーターの双方を、標的遺伝子の増幅及び／又は発現を生じさせるために使用することができる。ある実施態様では、天然の標的ポリペプチドプロモーターと比較して、一般的に発現する標的遺伝子をより多く転写させ、効率をよくするので、異種プロモーターが有用である。 40

【0134】

原核生物宿主での使用に好適なプロモーターには、PhoAプロモーター、βガラクターマーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン(trp)プロモーター系及びハイブリッドプロモーター、例えばtac又はtrcプロモーターが含まれる。しかし、細菌中で機能性である他のプロモーター（例えば他の既知の細菌又はファージプロモーター）も好適である。そのヌクレオチド配列は発表されており、よって当業者は、任意の必要とされる制限部位を供給するリンカー又はアダプターを使用して標的軽鎖及び重鎖をコードするシストロンにそれらを作用可能に結合させることができる（Siebenlist等（1980）Ce 50

11 20:269)。

【0135】

本発明の一態様では、組換えベクター内の各シストロンは、膜を貫通して発現されるポリペプチドの転写を誘導する分泌シグナル配列成分を含む。一般に、シグナル配列はベクターの成分でありうるか、ベクター中に挿入される標的ポリペプチドDNAの一部でありうる。この発明の目的のために選択されるシグナル配列は宿主細胞によって認識されプロセッシングされる（つまりシグナルペプチダーゼにより切断される）ものでなければならない。異種ポリペプチドに天然のシグナル配列を認識せずプロセッシングする原核生物宿主細胞に対しては、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、I p pあるいは熱安定性エンテロトキシンII (STII) リーダー、L a m B、P h o E、P e l B、O m p A及びM B Pからなる群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。一実施態様では、発現系の双方のシストロンに使用されるシグナル配列はS T I Iシグナル配列又はその変異体である。

10

【0136】

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

20

本発明は、発現されるポリペプチド成分の量的割合を本発明の抗体の分泌及び好適な集積効率が最大となるように調節することができる発現系を提供する。ポリペプチド成分の翻訳強度を同時に調節することによって少なくともある程度その調節が達成される。

【0137】

翻訳強度を調節する方法の一つの方法は、Simmons等の米国特許第5840523号に開示されている。このアプローチはシストロン内の翻訳開始領域(TIR)の変異体を利用する。与えられたTIRに対して、ある範囲の翻訳強さを持つ一群のアミノ酸又は核酸配列変異体をつくり出すことができ、それによって、所望の発現レベルの特異的鎖に対してこの因子を調節するための簡便な手段を提供する。TIR変異体はアミノ酸配列を改変することができるコドン変化を生じる一般的な突然変異誘発法によって産生することができるが、ヌクレオチド配列のサイレント変化が好ましい。TIRの変異には、例えばシグナル配列の変更と共に、シャイン-ダルガーノ配列の数又は間隔の変更が含まれうる。変異体シグナル配列を作成するためのある方法はシグナル配列のアミノ酸配列を変化させない（つまり変化がサイレントである）コード配列の最初での「コドンバンク」の産生である。これは、各コドンの第三のヌクレオチド位置を変化させることによって、達成できる；加えて、幾つかのアミノ酸、例えばロイシン、セリン、及びアルギニンはバンクの作製に複雑さを付加し得る複数の第一及び第二の位置を有している。この突然変異誘発の方法はYansura等(1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158に詳細に記載されている。

30

好ましくは、その各シストロンに対してある範囲のTIR強さを有する一群のベクターが産生される。この制限された群は各鎖の発現レベルと様々なTIR強さの組合せ下で所望の抗体産物の収量の比較をもたらす。TIR強さはSimmons等の米国特許第5840523号に記載されているレポーター遺伝子の発現レベルを定量することによって決定することができる。翻訳強度を比較することによって、所望の個々のTIRsが選択されて、本発明の発現ベクターコンストラクト中で組み合わされる。

40

【0138】

本発明の抗体を発現するのに適した原核生物宿主細胞には、古細菌及び真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物が含まれる。有用な細菌の例には、エシェリキア属（例えば大腸菌）、バシラス属（例えば枯草菌）、エンテロバクター属、シュードモナス種（例えば緑膿菌）、ネズミチフス菌、霊菌(Serratia marcescans)、クレブシエラ属、プロ

50

テウス属、赤痢菌、根粒菌、ビトレオシラ(Vitreoscilla)又はパラコッカス(Paracoccus)が含まれる。一実施態様では、グラム陰性菌が使用される。一実施態様では、大腸菌細胞が本発明の宿主として使用される。大腸菌株の例として、遺伝子型 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kan^R を有する 33D3 株(米国特許第5,639,635号)を含む W3110 株 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 1190-1219頁; ATCC 寄託番号 27,325) 及びその誘導体が含まれる。また、大腸菌 294 (ATCC 31,446), 大腸菌 B, 大腸菌 λ 1776 (ATCC 31,537) 及び大腸菌 RV308 (ATCC 31,608) など、他の株及びその誘導体も好適である。この例は限定的なものでなく例示的なものである。定義した遺伝子型を有する上記の何れかの細菌の誘導体の構築方法は当業者に公知であり、例として、Bassら., Proteins, 8:309-314 (1990) に記載されている。一般的に、細菌細胞中でのレプリコンの複製能を考慮して適した細菌を選択することが必要である。pBR322、pBR325、pACYC177、又は pKN410 のようなよく知られたプラスミドを使用してレプリコンを供給する場合、例えば、大腸菌、セラシア属、又はサルモネラ種を宿主として好適に用いることができる。典型的に、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌しなければならず、望ましくは更なるプロテアーゼインヒビターを細胞培養中に導入することができる。

【0139】

抗体産生

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

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

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

【0140】

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

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

本発明の発現ベクターに誘導性プロモータが用いられる場合、プロモータの活性に適する条件下でタンパク質発現を誘導する。本発明の一態様では、ポリペプチドの転写制御のために Ph o A プロモータが用いられる。したがって、形質転換した宿主細胞を誘導のためにリン酸限定培地で培養する。好ましくは、リン酸限定培地は C. R. A. P 培地である (例として、Simmonsら., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147 を参照)。様々

な他の誘導因子は用いるベクターコンストラクトに応じて当業者に知りうるように用いてよい。

【0141】

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

10

【0142】

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

20

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

【0143】

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

30

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

40

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

50

【0144】

抗体精製

ある実施態様では、本明細書に記載の生成した抗体タンパク質をさらに精製して、更なるアッセイ及び使用のために実質的に均一な調製物を得る。当分野で公知の標準的なタンパク質精製方法を用いることができる。以下の方法は好適な精製手順の例である：免疫親和性又はイオン交換カラムによる分画化、エタノール沈降法、逆相HPLC、シリカ又はDEAEなどの陽性交換樹脂によるクロマトグラフィ、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈降法及び、例えばSephadex G-75を用いたゲル濾過法。

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

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

【0145】

真核生物の宿主細胞を用いた抗体の生成

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

(i) シグナル配列成分

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

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

【0146】

(ii) 複製開始点

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

(iii) 選択遺伝子成分

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

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

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

10

20

30

40

50

例えば、D H F R 選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、D H F R の競合的アンタゴニストであるメトトリキセート (M t x) を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型 D H F R を用いた場合の好適な宿主細胞は、D H F R 活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 株化細胞である (例として、A T C C C R L - 9 0 9 6) 。

あるいは、抗体をコードする D N A 配列、野生型 D H F R タンパク質、及びアミノグリコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼ (A P H) のような他の選択可能マーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞 (特に、内在性 D H F R を含む野生型宿主) は、カナマイシン、ネオマイシンあるいは G 4 1 8 のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。米国特許第 4 9 6 5 1 9 9 号を参照のこと。 10

【0147】

(i v) プロモーター成分

発現及びクローニングベクターは通常は宿主生物体によって認識され抗体ポリペプチド核酸に作用可能に結合しているプロモーターを含む。真核生物に対してもプロモーター配列が知られている。実質的に全ての真核生物の遺伝子が、転写開始部位からおよそ 2 5 ないし 3 0 塩基上流に見出される A T リッチ領域を有している。多数の遺伝子の転写開始位置から 7 0 ないし 8 0 塩基上流に見出される他の配列は、N が任意のヌクレオチドである C N C A A T 領域である。大部分の真核生物遺伝子の 3' 末端には、コード配列の 3' 末端へのポリ A 尾部の付加に対するシグナルである A A T A A A 配列がある。これらの配列は 20 全て真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗体ポリペプチドの転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス、アデノウィルス (例えばアデノウィルス 2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B 型肝炎ウィルス及びサルウィルス 4 0 (S V 4 0) のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節される。

S V 4 0 ウィルスの初期及び後期プロモーターは、S V 4 0 ウィルスの複製起点を更に含む S V 4 0 制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウィルスの最初期プロモーターは、H i n d I I I E 制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウィルスを用いて哺乳動物宿主中で D N A を発現させる系が、米国特許第 4 4 1 9 4 4 6 号に開示されている。この系の変形例は米国特許第 4 6 0 1 9 7 8 号に開示されている。また、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの調節下でのマウス細胞中でのヒト β インターフェロン c D N A の発現について、Reyes 等, Nature, 297: 598-601 (1982) を参照のこと。あるいは、ラウス肉腫ウィルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。 30

【0148】

(v) エンハンサーエレメント成分

より高等の真核生物によるこの発明の抗体ポリペプチドをコードしている D N A の転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増強される。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている (グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側の S V 4 0 エンハンサー (1 0 0 - 2 7 0 塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。真核生物プロモーターの活性化のための増強要素については、Yaniv, Nature, 297: 17-18 (1982) もまた参照のこと。エンハンサーは、抗体ポリペプチドコード配列の 5' 又は 3' 位でベクター中にスプライシングされうるが、好ましくはプロモーターから 5' 位に位置している。 40

【0149】

(v i) 転写終結成分

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

【0150】

(v i i) 宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクター中のDNAをクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、脊椎動物の宿主細胞を含む本明細書中に記載の高等真核生物細胞を含む。培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651);ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977));ハムスター乳児腎細胞(BHK, ATCC CCL 10);チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHF R(CHO, Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980));マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980));サルの腎臓細胞(CV1 ATCC CCL 70);アフリカミドリザルの腎臓細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);ヒト子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2);イヌ腎臓細胞(MDCK, ATCC CCL 34);バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75);ヒト肝臓細胞(Hep G2, HB 8065);マウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL 51);TRI細胞(Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982));MRC 5細胞;FS 4細胞;及びヒト肝臓株(Hep G2)である。

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

【0151】

(v i i i) 宿主細胞の培養

本発明の抗体を産生するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)のF10(シグマ)、最小必須培地((MEM), (シグマ)、RPMI-1640(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM), (シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第4767704号;同4657866号;同4927762号;同4560655号;又は同5122469号;国際公開第90/03430号;国際公開第87/00195号;又は米国再発行特許第30985号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファ(例えばHEPES)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCINTM薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【0152】

(ix) 抗体の精製

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

【0153】

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、
10 ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティーリガンドとしての
プロテインAの適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、又は $\gamma 4$ 重鎖に基づく抗体の精製に用
いることができる(Lindmark等, J. immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテインG
は、全てのマウスアイソタイプ及びヒト $\gamma 3$ に推奨されている(Guss等, EMBO J. 5: 165
71575 (1986))。アフィニティーリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであるこ
20 ことが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び
短い処理時間を可能にする。抗体が $C_H 3$ ドメインを含む場合、Bakerbond A
BXTM樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラム
での分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンで
のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂上でのSEPHAROSETMク
ロマトグラフィー(ポリアスパラギン酸カラム)、クロマトフォーカシング、SDS-P
A GE、及び硫酸アンモニウム沈殿法も、回収される多価抗体に応じて利用可能である。

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

【0154】

活性のアッセイ

本発明の抗体は当該分野で知られている様々なアッセイによってその物理的／化学的性質及び生物学的機能について特徴付けることができる。

精製された免疫グロブリンは、限定されるものではないが、N末端シーケンシング、アミノ酸解析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィー及びパパイン消化を含む一連のアッセイによって更に特徴付けることができる。

本発明の特定の実施態様では、ここで生産された免疫グロブリンはその生物学的活性について分析される。ある実施態様では、本発明の免疫グロブリンはその抗原結合活性について試験される。当該分野で知られ、ここで使用することができる抗原結合アッセイには、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、エライザ(酵素結合免疫吸着検定法)、
40 「サンドウィッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、及びプロテインAイムノアッセイのような技術を使用する任意の直接的又は競合的結合アッセイが制限なく含まれる。

【0155】

一実施態様では、本発明はすべてではなくいくつかのエフェクター機能を有する変更した抗体を考慮し、このことによって抗体のインビボ半減期が重要なある種のエフェクター機能(補体又はADCCなど)が不要で有害である多くの手法の所望する候補となる。特定の実施態様では、生成した免疫グロブリンのFc活性を測定して、所望の特性が維持されていることを確認する。インビボ及び／又はインビトロ細胞障害アッセイを行って、CD
50 DC及び／又はADCC活性の減少／枯渇を確認することができる。例えば、Fcレセプ

ター (F c R) 結合アッセイを行って、抗体が F c γ R 結合を欠損している (すなわち A D C C 活性をほとんど欠損している) が、F c R n 結合能は維持していることを確認することができる。A D C C に関与している第一細胞である N K 細胞は F c γ R I I I のみを発現しており、その一方で単核細胞は F c γ R I、F c γ R I I 及び F c γ R I I I を発現している。造血系細胞での F c R 発現については、Ravetch 及び Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991) の 464 頁の表 3 に要約されている。対象とする分子の A D C C 活性を評価するためのインビトロアッセイの例は、米国特許第 5,500,362 号又は同第 5,821,337 号に記載されている。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞 (P B M C) 及びナチュラルキラー (N K) 細胞が含まれる。あるいは、又は加えて、対象とする分子の A D C C 活性は、例えば Clynes ら, PNAS (USA) 95:652-656 (1998) に開示されているような動物モデル内でインビボに評価することができる。また、C 1 q 結合アッセイを行って、抗体が C 1 q に結合できない、つまり C D C 活性を欠損していることを確認してもよい。補体活性化を評価するために、例えば Gazzano-Santoro ら, J. Immunol. Methods 202:163 (1996) に記載のように、C D C アッセイを行ってもよい。また、F c R n 結合及びインビボクリアランス/半減期測定を、当分野で公知の方法、例えば実施例の項目で示す方法を用いて行うことができる。

10

【0156】

ヒト化抗体

本発明は、ヒト抗体を包含する。非ヒト抗体をヒト化する様々な方法は当分野でよく知られている。例えば、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と呼ばれる。ヒト化は、本質的にはヒト抗体の該当する高頻度可変領域配列を置換することによりウィンターと共同研究者の方法 (Jones ほか, Nature, 321:522-525 (1986)、Riechmann ほか, Nature, 332:323-327 (1988)、Verhoeyen ほか, Science, 239:1534-1536 (1988)) を使用して実施することができる。よって、このような「ヒト化」抗体は、完全なヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の該当する配列で置換されたキメラ抗体 (米国特許第 4,816,567 号) である。実際には、ヒト化抗体は、典型的にはいくらかの高頻度可変領域残基及び場合によってはいくらかの F R 残基が齧歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

20

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方の可変ドメインの選択が非常に重要である。「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒト配列をヒト化抗体のヒトフレームワークとして受け入れる (Sims ほか, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia ら, J. Mol. Biol., 196:901 (1987))。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる (Carter ほか, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta ほか, J. Immunol., 151:2623 (1993))。

30

【0157】

更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、一方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、F R 残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接的かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

40

50

【0158】

抗体変異体

一態様では、本発明は、Fc領域を含むFcポリペプチドの作用面内に修飾を有する抗体断片を提供するものであり、ここでいう修飾によって異種性二量体化を容易にする及び／又は促進される。この修飾は、第一Fcポリペプチド内への隆起と第二Fcポリペプチド内への腔の導入を含むものであり、ここでいう隆起は第一Fcポリペプチドと第二Fcポリペプチドの複合体化を促進するために腔内に位置する。これらの修飾を有する抗体の生成方法は当分野で公知であり、例えば米国特許第5,731,168号に記載されている。

ある実施態様では、本明細書中に記載の抗体のアミノ酸配列の修飾を考える。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善することが望まれうる。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体核酸中に適当なヌクレオチド変化を導入することにより、又はペプチド合成により調製される。そのような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失及び／又は挿入及び／又は置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせをその最終コンストラクトに達するまでなされることによって最終コンストラクトが所望の特徴を有する。配列を作製すると同時に目的の抗体アミノ酸配列にアミノ酸修飾を導入するのがよい。

10

【0159】

突然変異誘発の好ましい位置である抗体の所定の残基又は領域の特定のために有用な方法は、Cunningham及びWells, Science 244: 1081-1085 (1989)に記載されているように「アラニンスキャンニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的残基の残基又は基が同定され（例えば、arg, asp, his, lys,及びglu等の荷電残基）、中性又は負荷電アミノ酸（最も好ましくはアラニン又はポリアラニン）に置換され、アミノ酸と抗原との相互作用に影響を及ぼす。ついで置換に対する機能的感受性を示すこれらのアミノ酸の位置は、置換部位において又はそれに対して更なる又は他の変異体を導入することにより精製される。しかして、アミノ酸配列変異を導入する部位は予め決定されるが、変異自体の性質は予め決める必要はない。例えば、与えられた部位における変異の性能を分析するために、alaスキャンニング又はランダム突然変異誘発を標的コドン又は領域で実施し、発現された免疫グロブリンを所望の活性についてスクリーニングする。

20

アミノ酸配列挿入は、1残基から100以上の残基を含むポリペプチドの長さの範囲のアミノ-及び／又はカルボキシル末端融合物、並びに一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入物を含む。末端挿入物の例には、N末端メチオニル残基を持つ抗体ないし細胞障害性ポリペプチドに融合した抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を向上させる酵素（例えばADEPT）又はポリペプチドへの、抗体のN又はC末端への融合物を含む。

30

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、抗体分子において少なくとも一つのアミノ酸残基が異なる残基で置換されている。置換突然変異に対して最も興味深い部位は高頻度可変領域を含むが、FR変化も考えられる。保存的置換は、「好ましい置換」と題して表2に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、以下の表に「例示的置換」と名前を付け、又はアミノ酸の分類に関して以下に更に記載するような、より実質的な変化を導入し、生成物をスクリーニングしてもよい。

40

【0160】

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

【0161】

抗体の生物学的性質における実質的な修飾は、(a) 置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b) 標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c) 側鎖の嵩を維持するそれらの効果において実質的に異なる置換を選択することにより達成される。アミノ酸は共通の側鎖特性に基づいて群に分けることができる：

40

- (1) 非極性：Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) 荷電のない極性：Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) 酸性：Asp (D), Glu (E)
- (4) 塩基性：Lys (K), Arg (R), His (H)

あるいは、天然に生じる残基は共通の側鎖性質に基づくグループに分けられる：

- (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;

50

- (4) 塩基性：His, Lys, Arg；
(5) 鎖配向に影響する残基：Gly, Pro；
(6) 芳香族：Trp, Tyr, Phe。

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、保存的置換部位又はより好ましくは残りの（非保存的）部位内に置換された残基を導入してもよい。

【0162】

ある型の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体）の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、さらなる発展のために選択され、得られた変異体は、それらが作製された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を作製する簡便な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性突然変異を含む。簡潔に言えば、幾つかの高頻度可変領域部位（例えば6-7部位）を突然変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された多価抗体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13の遺伝子III産物への融合物としてディスプレイされる。ファージディスプレイ変異体は、ついで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。修飾のための候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体と抗原の接点を特定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここに述べた技術に従う置換の候補である。そのような変異体が生成されると、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択する。

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、この分野で知られた種々の方法によって調製される。これらの方法は、限定するものではないが、天然源からの単離（天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合）又は初期に調製された抗体の変異体又は非変異体のオリゴヌクレオチド媒介（又は部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製を含む。

【0163】

本発明の免疫グロブリンポリペプチドのFc領域内に一以上のアミノ酸修飾を導入してFc領域変異型を生成することが望ましい。Fc領域変異体は、ヒンジシステイン修飾を含む、一以上のアミノ酸位置でのアミノ酸修飾（例えば、置換）を有するヒトFc領域配列（例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4 Fc領域）を含みうる。

当分野での記載や教示に従って、ある実施態様では、本発明の方法を用いた抗体が野生型の対応抗体と比較して例えばFc領域内に一以上の変異を有することを考慮する。にもかかわらず、この抗体はその野生型対応物と比較して治療的有用性を示す実質的に同じ特徴を維持している。例えば、WO99/51642などに記載のようにC1q結合及び/又は補体依存性細胞障害（CDC）を変更する（すなわち改良又は減少する）結果となるFc領域内に特定の変異を生じさせることが考えられる。また、Fc領域変異型の他の例に関するDuncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)；米国特許第5,648,260号；米国特許第5,624,821号；及びW094/29351を参照。

【0164】

免疫コンジュゲート

また、本発明は、化学療法剤、薬剤、成長阻害剤、毒素（例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片）、又は放射性同位体（すなわち放射性コンジュゲート）などの細胞毒性剤にコンジュゲートした抗体を含む免疫コンジュゲート又は抗体-薬剤コンジュゲート（ADC）に関する。

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、すなわち癌治療における腫瘍細胞を殺す又は阻害するための薬剤の局所運搬に抗体-薬剤コンジュゲートを用いると(Syrigos及びEpenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Ad

10

20

30

40

50

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

10

20

【0165】

ゼバリン(ZEVALIN)(登録商標)(イブリツモマブチウキセタン(ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idec)は正常及び悪性のBリンパ球の細胞表面上にみられるCD20抗原に対するマウスIgG1κモノクローナル抗体と¹¹¹In又は⁹⁰Y放射性同位体とがチオウレアリンカーキレート剤にて結合した抗体-放射性同位体コンジュゲートである(Wisemanら (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wisemanら (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzigら (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzigら (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。ゼバリンはB細胞非ホジキン性リンパ球(NHL)に対して活性を有するが、投与によってほとんどの患者に重症で長期の血球減少を引き起こす。カリケアマイシンに連結したhuCD33抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるマイロターゲット(MYL0TARG)(登録商標)(ゲムツズマブオゾガミシン(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals)は、急性骨髄性白血病の治療用注射剤として2000年に認可された(Drugs of the Future (2000) 25(7):686; 米国特許第4970198号; 同第5079233号; 同第5585089号; 同第5606040号; 同第5693762号; 同第5739116号; 同第5767285号; 同第5773001号)。ジスルフィドリンカーSPPを介してメイタンシノイド薬剤分子DM1と連結しているhuC242抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるカンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)は、CAnAgを発現する癌、例として大腸、膵臓、胃などの治療用に第I相試験へと進んでいる。メイタンシノイド薬剤分子DM1と連結している抗前立腺特異的膜抗原(PSMA)モノクローナル抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるMLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)は、前立腺癌の潜在的治療の開発段階にある。アウリスタチン(auristatin)ペプチド、アウリスタチンE(AE)及びモノメチルアウリスタチン(MMAE)、ドラスタチン(dolastatin)の合成類似体は、キメラモノクローナル抗体cBR96(癌細胞上のルイスYに特異的)及びcAC10(血液系悪性腫瘍上のCD30に特異的)(Doroninaら (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)にコンジュゲートしており、治療的開発段階にある。

30

40

【0166】

このような免疫複合体(免疫コンジュゲート)の生成に有用な化学治療薬を上に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデク

50

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

抗体のコンジュゲートと一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、トリコセン(trichothene)及びCC1065、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。

【0167】

メイタンシン及びメイタンシノイド

一実施態様では、本発明の抗体(完全長又は断片)は一又は複数のメイタンシノイド分子と結合している。

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4137230号；同4248870号；同4256746号；同4260608号；同4265814号；同4294757号；同4307016号；同4308268号；同4308269号；同4309428号；同4313946号；同4315929号；同4317821号；同4322348号；同4331598号；同4361650号；同4364866号；同4424219号；同4450254号；同4362663号；及び同4371533号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。

【0168】

メイタンシノイド-抗体コンジュゲート

治療指標を改善する試みにおいて、メイタンシン及びメイタンシノイドは、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体と結合している。メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5,208,020号、同5,416,064号、欧州特許第0425235B1号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。Liu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に結合するDM1と命名されたメイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞障害性を有することが見出されており、インビボ

腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体A7、又はHER-2/neuオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体TA.1に結合している免疫コンジュゲートが記載されている。TA.1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞障害性はヒト乳癌株化細胞SK-BR-3におけるインビトロで試験され、細胞当たり 3×10^5 HER-2表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。A7-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞障害性を示した。

10

【0169】

抗体-メイタンシノイドコンジュゲート(免疫コンジュゲート)

抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合させることにより調製される。1分子の毒素/抗体は、裸抗体の使用において細胞障害性を高めることが予期されているが、抗体分子当たり、平均3-4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5208020号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

20

例えば、米国特許第5208020号又は欧州特許第0425235B1号、及びChari等, Cancer Research, 52:127-131(1992)に開示されているもの等を含む、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。

【0170】

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

30

40

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

【0171】

50

カリケアマイシン

対象の他の免疫コンジュゲートには、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、 γ_1^1 、 α_2^1 、 α_3^1 、N-アセチル- γ_1^1 、PSAG及び θ_1^1 (Hinman等, Cancer Research, 53:3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58:2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

【0172】

他の細胞障害剤

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

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

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

【0173】

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

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

【0174】

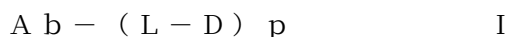
抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサレンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミ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

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

【0175】

抗体薬剤コンジュゲートの調製

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



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

【0176】

また、本発明の抗体薬剤コンジュゲートは、抗体を修飾して求電子性の部分を導入する(リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基を用いて反応させることができる)ことによって

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

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

【0177】

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

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

【0178】

抗体誘導体

本発明の抗体は当該分野において知られ直ぐに利用できる更なる非タンパク質性部分を含むように更に修飾することができる。好ましくは、抗体の誘導体化に適した部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されるものではないが、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-ジオキソラン、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(ホモポリマーかランダムコポリマー)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール、及びそれらの混合物が含まれる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは水中におけるその安定性のために製造の際に有利であろう。ポリマーは任意の分子量であってよく、分枝状でも非分枝状でもよい。抗体に結合するポリマーの数は変化してもよく、一を超えるポリマーが結合する場合、それらは同じでも異なった分子でもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/又はタイプは、限定されるものではないが、その抗体誘導体が定まった条件下での治療に使用されるかどうか、改善される抗体の特定の性質又は機能を含む考慮事項に基づいて決定することができる。

【0179】

医薬製剤

本発明の抗体を含んでなる治療用製剤は、所望の純度を持つ抗体と、場合によっては生

理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより (Remington's Pharmaceutical Sciences 16版, Osol, A. 編 (1980))、水溶液、凍結乾燥又は他の乾燥製剤の形態に調製されて保存される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトレート、ヒスチジン及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；及び／又はTWEENTM、PLURONICSTM又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0180】

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

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリー系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）に、あるいはマクロエマルジョンに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16版, Osol, A. 編 (1980)に開示されている。

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

【0181】

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

【0182】

使用

例えば、本発明の抗体は、インビトロ、エクスビボ及びインビボの治療法で用いてもよい。本発明の抗体は、インビトロ、エクスビボ及び／又はインビボで特異的抗原活性を部分的に又は完全にブロック（遮断）するアンタゴニストとして用いることができる。さらに、本発明の少なくともいくつかの抗体は、他の種から抗原活性を中和することができる。したがって、本発明の抗体は、例えば、抗原を含んでいる細胞培養物中、患者、又は、本発明の抗体が交差反応する抗原を有する他の哺乳類対象動物（例えばチンパンジ、ヒヒ、マーモセット、カニクイザルおよび赤毛猿、ブタ又はマウス）の特異的抗原活性を阻害するために用いることができる。一実施態様において、本発明の抗体は、抗原活性が阻害されるように抗原と抗体とを接触させることによって抗原活性を阻害するために用いることができる。抗原はヒトタンパク質分子であることが好ましい。

10

一実施態様において、本発明の抗体を抗原活性が有害である疾患に罹患している対象体の抗原を阻害する方法に用いることができ、その方法は対象体の抗原活性が阻害されるように本発明の抗体を対象体に投与することを含む。好ましくは、抗原はヒトタンパク質分子であり、対象体は患者である。あるいは、対象体は、本発明の抗体が結合する抗原を発現する哺乳動物でありうる。また更に、対象体は、抗原が導入された哺乳動物でありえる（例えば、抗原の投与や、抗原導入遺伝子の発現による）。本発明の抗体は、治療的目的のために患者に投与することができる。さらに、本発明の抗体は、免疫グロブリンが獣医学の分野で、又はヒト疾患の動物モデルとして交差反応する抗原を発現する人間以外の哺乳動物（例えば霊長類、ブタ又はマウス）に投与することができる。後者に関して、このような動物モデルは、本発明の抗体の治療有効性（例えば用量のテストおよび投与の時間経過）を評価するために有効であるかもしれない。治療的に有効である本発明の遮断抗体には、例えば、限定するものではなく、抗HER2、抗VEGF、抗IgE、抗CD11、抗インターフェロン、抗インターフェロンレセプタ、抗肝細胞成長因子（HGF）、抗c-metおよび抗組織因子抗体が含まれる。本発明の抗体は一以上の抗原分子の異常発現及び／又は活性が関与する疾患、疾病又は症状、の治療、阻害、経過を遅延、再発を予防／遅延、寛解、又は予防に用いることができる。この疾患、疾病又は症状には、限定するものではないが、悪性及び良性の腫瘍；非白血病及びリンパ系の悪性腫瘍；神経系、神経膠、星状膠、視床下部、他の腺性、マクロファージ性、上皮性、間質性、胞腔性の疾患；及び炎症性、血管形成性、免疫系の疾患が含まれる。

20

【0183】

30

一態様では、本発明の遮断抗体はリガンド抗原に特異的で、リガンド抗原を伴うリガンド-レセプタ相互作用をブロックするかまたは妨げることによって、対応するシグナル経路および他の分子又は細胞性の現象を阻害することによって抗原活性を阻害する。また、本発明は必ずしもリガンド結合を阻害するというわけではなくて、レセプター活性化を妨ぐレセプター特異的な抗体を特徴とし、それによって通常リガンド結合によって開始する任意の応答を阻害する。また、本発明は、好ましくは又は排他的にリガンド-レセプター複合体と結合する抗体を包含する。また、本発明の抗体は、特定の抗原レセプターのアゴニストとして作用し、それによって、リガンド媒介性のレセプター活性の活性化を完全に又は部分的に潜在化、亢進又は活性化する。

ある実施態様では、細胞障害性剤とコンジュゲートした抗体を含んでなる免疫コンジュゲートを患者に投与する。ある実施態様では、免疫コンジュゲート及び／又はそれが結合する抗原が細胞に内在化されていると、結合する標的細胞を殺す際の免疫コンジュゲートの治療効果が増す。一実施態様において、細胞障害性剤は標的細胞内の核酸を標的とするか又は妨げる。このような細胞障害性剤の例には、本明細書に記載の何れかの化学療法剤（例えばメイタンシノイド又はカリケアマイシン）、放射性同位元素、又はRNA分解酵素ないしDNAエンドヌクレアーゼが含まれる。

40

【0184】

本発明の抗体は、単独で、または、他の組成物と組み合わせて治療に用いることができる。例えば、本発明の抗体は、他の抗体、化学療法剤（一又は複数）（化学療法剤の混合を含む）、他の細胞障害性剤（一又は複数）、抗血管形成剤（一又は複数）、サイトカイ

50

ンおよび／または増殖阻害性剤（一又は複数）と同時に投与してもよい。本発明の抗体が腫瘍成長を阻害する場合、腫瘍成長を阻害する一つ以上の他の治療薬と組み合わせることが特に望ましい。例えば、本発明の抗体は、処置、例えば結腸直腸癌、転移性乳癌および腎臓癌を含む本明細書中に記載の何れかの疾患の治療に、抗V E G F抗体（例えばアバスタチン）及び／又は抗E r b B抗体（例えばハーセプチン（登録商標）抗H E R 2抗体）を組み合わせてもよい。あるいは又は加えて、放射線療法（例えば、外部光線照射、又は放射性標識した抗体などの作用剤を用いた治療）を患者に併用してもよい。上記の併用治療には、併用投与（2以上の作用剤が同じか又は別の製剤に包含される）及び別々の投与、別々の場合には、本発明の抗体は補助治療（一又は複数）の前及び／又はその後に投与することができる。

10

本発明の抗体（及び補助治療薬）は、非経口的、皮下、腹膜内、肺内、鼻腔内、そして、必要に応じて局所の治療のために、病巣内投与を含む任意の好適な手段によって投与する。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、又は皮下的な投与を含む。加えて、抗体を、特に抗体の用量を減少して、パルス注入によって好適に投与する。投与が短期のものであるか長期のものであるかにある程度依存して、例えば、静脈内又は皮下注射などの注射によって、好適な任意の方法投与することができる。

【0185】

本発明の抗体組成物は、医学的実用性に合わせた様式で調製し、1回分に分けて、投与する。ここで考慮する要因は、治療する特定の疾患、治療する特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の運搬部位、投与の方法、投与の日程計画、および医師が知る他の因子を含む。必要ではないが場合によっては、問題の疾患を予防するかまたは治療するために一般に用いられる一つ以上の作用剤と抗体とを調製する。そのような他の作用剤の有効量は、製剤中の本発明の抗体の量、疾患の型又は治療、及び上記の他の因子に依存する。一般的に、以前用いたのと同じ用量及び投与経路で、又は前回用いた用量の1～99%で用いる。

20

疾患の予防又は治療のために、本発明の抗体の好適な用量は（単独で用いる場合、又は化学療法剤などの他の作用剤と組み合わせる場合）、治療する疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体を予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及び抗体への応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。抗体は一時的又は一連の治療にわたって好適に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ～ $10\text{mg}/\text{kg}$ ）の抗体が、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初期候補用量である。ある典型的な1日量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であろう。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。抗体の用量の例は、約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であろう。ゆえに、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 又は $10\text{mg}/\text{kg}$ の一以上の用量を（又はそれらを組み合わせる）患者に投与してもよい。このような用量は、間欠的に、例えば週ごと又は3週ごとに投与してもよい（例えば患者に約2～約20、例えば約6用量の抗体が投与される）。初期のより高い負荷投与量の後、一以上のより低い用量を投与してもよい。例示的用量療法は、約 $4\text{mg}/\text{kg}$ の初期負荷投与量の後、約 $2\text{mg}/\text{kg}$ の毎週の維持用量抗体を投与することを含む。しかしながら、他の投与計画が有効かもしれない。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニターすることができる。

30

40

【0186】

製造品

本発明の他の態様では、上記の疾患の治療、予防及び／又は診断に有用な物質を含む製造品が提供される。該製造品は容器と該容器の又は該容器に付随するラベル又はパッケージ挿入物を具備する。好適な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等々が含まれる。容器は、様々な材料、例えばガラス又はプラスチックから形成されうる。容器は、それのみによって又は他の組成物と組み合わせることで症状を治療、予防及び／又は診断するのに

50

有効な組成物を収容し、滅菌アクセスポートを有しうる（例えば、容器は皮下注射針が貫通可能なストッパーを有するバイアル又は静脈内投与溶液バッグでありうる）。組成物中の少なくとも一つの活性剤は本発明の抗体である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が癌のような選択した症状の治療に使用されることを示す。更に、製造品は、（a）組成物を中に収容し、その組成物が本発明の抗体を含む第一の容器と；（b）組成物を中に収容し、その組成物が更なる細胞毒性剤を含む第二の容器とを含みうる。本発明のこの実施態様における製造品は、第一及び第二抗体組成物を特定の症状、例えば癌の治療に使用することができることを示しているパッケージ挿入物を更に含む。あるいは、もしくはは付加的に、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用の静菌水（B W F I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を含む第二の（又は第三の）容器を更に具備してもよい。更に、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジを含む、商業上及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

10

【0187】

一般的に本発明を記載したものであって、同様に、限定を意図するのではなく例としてあげる以下の実施例を参照することによって容易に理解しうるであろう。

【実施例】

【0188】

実施例1 Ty r又はSe rのみでランダム化したCDR残基を有するファージディスプレイFabライブラリの構築

Fab重鎖及び遺伝子3微量コートタンパク質（P3C）のC末端ドメイン間に挿入したロイシンジッパードメインによって二量体化した二価のFab分子を表出するファジミドベクターを用いて、ファージディスプレイFabライブラリを構築した。このベクターは図18に示す配列（配列番号14）を含む。前記ベクター（図19に概略的に示す）はIPTG誘導性Ptacプロモータ制御下にヒト化抗体4D5可変ドメインを有する。ヒト化抗体4D5は、主に重鎖及び軽鎖中のヒトコンセンサス配列フレームワーク領域と、Her-2に特異的なマウスモノクローナル抗体のCDR領域を有する抗体である。抗Her-2抗体の作製方法及び可変ドメイン配列の同定は、米国特許第5821337号及び同第6054297号に示される。

20

【0189】

2つのライブラリを構築した。ライブラリYS-Aは3つすべての重鎖CDRにランダム化した残基を有するように、一方ライブラリYS-Bは3つすべての重鎖CDRと軽鎖CDR3にランダム化した残基を有するように構築した。ランダム化した特定の残基を図1に示す。

30

ランダム化した各々の位置の野生型コドンと、等モル比のTy r及びSe rをコードする縮重TMTコドン（等モル比のM=A/C）に置換した。加えて、CDRH3の長さを位置101～107の7野生型コドンを異なる数のTMTコドン（ライブラリYS-Aは7～20、ライブラリYS-Bは7～15）で置換したオリゴヌクレオチドを用いて長さを変えた。加えて、ライブラリYS-BのCDRL3をランダム化して、50%のライブラリメンバーが位置91を欠損し、残りの50%は位置91に野生型のGln残基を含むようにした。

40

【0190】

既に記載の方法(Sidhu, S. S., Lowman, H. B., Cunningham, B. C. & Wells, J. A., Methods Enzymol. (2000), 328, 333-363)とKunkel法(Kunkel, T. A., Roberts, J. D. & Zakour, R. A., Methods Enzymol. (1987), 154, 367-382)を用いてライブラリを構築した。Fabディスプレイベクターの特定の型である「停止鑄型」を用いて、ライブラリYS-A及びYS-Bの両方を作製した。重鎖の位置30、33、52、54、56、57、60、102、103、104、107、108にTAA停止コドンを入れたpV0350-4と称するファジミド鑄型（図24に記載の配列、配列番号5を含むファジミドベクター）を用いた。軽鎖CDR3には停止コドンを導入しなかった。多様化させる位置を縮重TMTコドンで突然変異させたオリゴヌクレオチドを用いて、CDR多様化の導入

50

と停止コドンの修復を同時に行った。オリゴヌクレオチド配列を図2に示す。両方のライブラリとも、オリゴヌクレオチドH1及びH2それぞれを用いてCDR-H1とCDR-H2に多様化を導入した。ライブラリYS-Aは、オリゴヌクレオチドH3-7、H3-8、H3-9、H3-10、H3-11、H3-12、H3-13、H3-14、H3-15、H3-16、H3-17、H3-18、H3-19及びH3-20の等モル混合物を用いてCDR-H3を多様化した。ライブラリYS-Bは、オリゴヌクレオチドH3-7、H3-8、H3-9、H3-10、H3-11、H3-12、H3-13、H3-14及びH3-15の等モル混合物を用いてCDR-H3を多様化した。ライブラリYS-Bは、オリゴヌクレオチドL3a及びL3bの等モル混合物を用いてCDR-L3を多様化した。ランダム化するすべてのCDRの突然変異オリゴヌクレオチドを単一の突然変異誘発反応に同時に入れて、すべての突然変異オリゴヌクレオチドの同時移入により各々の位置を所望のように多様化すると同時にすべてのTAA停止コドンを修復させ、ホモ二量体化したロイシンジッパーとP3Cに融合したFabライブラリメンバーをコードするオープンリーディングフレームを生成した。

突然変異誘発反応物を大腸菌SS320内に電気穿孔法にて導入し(Sidhuら., 上掲)、形質転換細胞をM13-KO7ヘルパーファージ(New England Biolabs, Beverly, MA)の存在下にて一晚培養して、前記ファジミドDNAを包含し、その細胞表面上にFabフラグメントを表出したファージ粒子を生成した。各ライブラリは 5×10^9 の一致しないメンバーを含有する。

【0191】

実施例2 ナイブライブラリYS-A及びYS-Bからの特異的抗体の選別

ライブラリYS-A又はYS-B(実施例1)のファージについて結合選別操作を繰り返して、対象とする標的に結合するクローンを濃縮した。各ライブラリの8つの標的タンパク質：ヒトVEGF、マウスのVEGF、ニュートラビジン、アポトシスタンパク質(AP)、マルトース結合タンパク質、エルビン-GST融合及びインスリンについて別々に解析した。この結合選別は既に記載の方法(Sidhuら、上記)に従って行った。

捕獲標的($5 \mu\text{g}/\text{mL}$)にてNUNC96ウェルMaxisorpイムノプレートに4℃で一晩コートし、Superblock TBS(トリス緩衝生理食塩水)(Pierce)で2時間ブロックした。既に記載したように(Sidhuら、上記)、ファージを一晩37℃で培養した後、PEG/NaClで沈殿させて濃縮し、Superblock TBS、0.05% Tween 20(Sigma)に再懸濁した。上記コートしたイムノプレートにファージ溶液(10^{12} ファージ/ mL)を加えた。2時間インキュベートしてファージを結合させた後、PBS、0.05% Tween 20でプレートを10回洗浄した。0.1M HClにて結合したファージを10分間溶出し、1.0M トリス塩基で溶出物を中和した。溶出したファージを大腸菌XL1ブルーで増幅し、さらなる選別操作のために使用した。

ライブラリーを各標的タンパク質に対して5回選別操作を行い、各回、Superblock TBSにてコートした標的タンパク質又は空のウェルの何れかに結合するファージの力価を測定した。空のウェルに結合したファージの力価で割った標的コートウェルに結合したファージの力価を、標的タンパク質に特異的に結合するファージプールを定量化するために用いた濃縮率として定義した；大きな濃縮率は特異性が高い結合であることを表す。第3、4又は5回目の選別で得られた濃縮率を図3に示す。

【0192】

各回の選別から得た個々のクローンをカルベニシリン及びM13-VCSを添加した500 μL の2YT培養液を含む96ウェルフォーマットにて培養し、培養液上清をファージELISA(Sidhuら., 上掲)に直接用いて、標的タンパク質でコートしたプレートには結合するがBSAでコートしたプレートには結合しないファージディスプレイFabを検出した。BSAコートプレートと比較して標的コートプレート上で少なくとも15倍より大きなELISAシグナルを呈するファージクローンを特異的結合体として定義した。個々のクローンを、ヒトVEGFに対する結合について2回選別した後、又は、他の標的タンパク質への結合について5回選別した後にスクリーニングした。これらのデータを用い

て特異的な結合体の割合を算出した。各々の標的タンパク質に対する各々のライブラリの結果を図4に示す；MBP2に関するYS-Aライブラリを除いて、各々のライブラリが各々の標的タンパク質に対して結合体を生産したことが分かる。

特異的な結合体を表している個々のクローンについてDNA配列分析を行い、いくつかの標的についてランダム化したCDR位置の配列を図5に示す。各々の標的タンパク質について、ランダム化した位置にTyr又はSerだけを含んだ特異的な結合体を選択することが可能であったことがわかる（しかしながら、おそらくオリゴヌクレオチド内の不純物のためにライブラリ構築中に生じたと思われる設定していない突然変異がいくつかみられた）。さらに、特異的な結合体の配列は、選択された標的タンパク質に特有のものであった。

10

【0193】

2つの抗VEGF結合体は、hVEGFおよびmVEGFに対する親和性について試験した。BIAcoreデータを、Chenら., J Mol Biol. (1999), 293(4): 865-81に従って得た。簡潔にいうと、hVEGFおよびmVEGFに対するhVEGF結合体の結合親和性は、BIAcoreTM-2000表面プラスモン共鳴系(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いて測定した結合定数及び解離速度定数から算出した。バイオセンサチップは、供給元(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)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-ヒドロキシスクシニミド(NHS)を用いてVEGFの共有結合的結合を活性化した。hVEGF又はmVEGFは、10mMの酢酸ナトリウムpH4.8にバッファー交換して、およそ30mg/mlまで希釈した。等量のVEGFを、結合したタンパク質のおよそ200~300の応答単位(RU)に達成するように、2μL/分の流速で、注入した。遮断剤として、1Mエタノールアミンの溶液を注入した。動態学的な測定のために、2倍の階段希釈をしたFabを25℃で10μL/分の流速でPBS/ツイーン緩衝液に注入した(0.05%のTween20を含むリン酸緩衝食塩水)。平衡解離定数、表面プラスモン共鳴測定値からのKd値をk_{off}/k_{on}として算出した。BIAcoreTMデータは図23に要約した。

20

上述のように(Sidhuら., 上掲)、選択した抗APクロンのIC50値をファージELISAによって測定した。その値を図11に示す。

【0194】

30

実施例3 4のアミノ酸コード化の4単位(tetranomial)コドンでランダム化したCDR残基を有するファージディスプレイFabライブラリ(F0505)の構築

Fab重鎖及び遺伝子3微量コートタンパク質(P3C)のC末端ドメイン間に挿入したロイシンジッパードメインによって二量体化した二価のFab分子を表出するように設定した前述のファジミドを用いて、実施例1に記載のようにファージディスプレイライブラリを構築した(実施例1に記載のように)。ランダム化した重鎖のCDR位置を図1に示す。4つのアミノ酸のみをコードする4単位のコドンでCDR位置をランダム化するように設定したそれぞれの突然変異誘発反応によって、11の別々の突然変異誘発反応を行った。各突然変異誘発反応では、複数のCDR位置をただ一つのタイプの4単位コドンで同時に置き換えた。11の突然変異反応に用いた11個の4単位コドンとそれらがコードするアミノ酸を図6に示す。それぞれの突然変異誘発のために、3つのうちの1つの重鎖CDRを多様化させるようにそれぞれ設定して3つの変異原性オリゴヌクレオチドを用いた。オリゴヌクレオチドの配列を以下に示す：

40

【0195】

CDR-H1: GCA GCT TCT GGC TTC XXX ATT XXX X
XX XXX XXX ATA CAC TGG GTG CGT (配列番号8)

CDR-H2: CTG GAA TGG GTT GCA XXX ATT XXX C
CA XXX XXX GGT XXX ACT XXX TAT GCC GAT A
GC GTC (配列番号9)

CDR-H3: GTC TAT TAT TGT AGC CGC XXX XXX X

50

X X X X X X X X X X X X A T G G A C T A C T G G (配列番号 10)

各オリゴヌクレオチドの「X X X」は野生型のコドンが図 6 に示す 4 単位コドンの一つに置き換わった縮重コドンを示す。

11 の突然変異誘発反応物をプールして、大腸菌 S S 3 2 0 内に電気穿孔法にて導入し (Sidhu ら., 上掲)、形質転換細胞を M 1 3 -K O 7 ヘルパーファージ (New England Biolabs, Beverly, MA) の存在下にて一晚培養して、前記ファジミド DNA を包含し、その細胞表面上に F a b フラグメントを表出したファージ粒子を生成した。各ライブラリは 2.6×10^{10} の一致しないメンバーを含有する。これをライブラリ F 0 5 0 5 とした。

【0196】

実施例 4 4 単位ナイーブラライブラリ F 0 5 0 5 からの特異的抗体の選別

ライブラリ F 0 5 0 5 (実施例 3) のファージについて結合選別操作を繰り返して、異なる 4 つの標的; I G F、h -V E G F、抗 h G H、h G H 結合タンパク質に結合するクローンを濃縮した。この結合選別は既に記載の方法 (Sidhu ら、上記) に従って行った。

捕獲標的 ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) にて N U N C 9 6 ウェルMaxisorpイムノプレートに 4°C で一晚コートし、B S A (Sigma) で 2 時間ブロックした。既に記載したように (Sidhu ら、上記)、ファージを一晚 37°C で培養した後、P E G / N a C l で沈殿させて濃縮し、0.5 % B S A、0.05 % T w e e n 2 0 (Sigma) に再懸濁した。上記のコートしたイムノプレートにファージ溶液 ($\sim 10^{12}$ ファージ/ mL) を加えた。2 時間インキュベートしてファージを結合させた後、P B S、0.05 % T w e e n 2 0 でプレートを 10 回洗浄した。0.1 M H C l にて結合したファージを 10 分間溶出し、1.0 M トリス塩基で溶出物を中和した。溶出したファージを大腸菌 X L 1 ブルーで増幅し、さらなる選別操作のために使用した。

ライブラリーを各標的タンパク質に対して 4 回選別操作を行った。第 2 及び第 3 回目の選別から得た個々のクローンをカルベニシリン及び M 1 3 -V C S を添加した $500 \mu\text{L}$ の 2 Y T 培養液を含む 9 6 ウェルフォーマットにて培養し、培養液上清をファージ E L I S A (Sidhu ら., 上掲) に直接用いて、標的タンパク質でコートしたプレートには結合するが B S A でコートしたプレートには結合しないファージディスプレイ F a b を検出した。B S A コートプレート上のシグナルと比較して標的コートプレート上で少なくとも 10 倍より大きな E L I S A シグナルを呈する場合にクローンを特異的結合体とした。各々の選別と個々の標的についての特異的な結合体の数を図 7 に表で示す。

特異的なクローンについて DNA 配列分析を行った。それぞれの異なる配列のライブラリ起源を決定して、図 8 に示した。

【0197】

実施例 5 ファージディスプレイ F a b ライブラリ Y A D S - A 及び Y A D S - B の構築 F a b 重鎖及び遺伝子 3 微量コートタンパク質 (P 3 C) の C 末端ドメイン間に挿入したロイシンジッパードメインによって二量体化した二価の F a b 分子を表出するように設定した前述のファジミドを用いて、実施例 1 に記載のように 2 つのファージディスプレイライブラリ (Y A D S - A 及び Y A D S - B) を構築した (実施例 1 に記載のように)。ランダム化した重鎖の C D R 位置を図 1 に示す。オリゴヌクレオチド配列を図 9 に示す。

ライブラリ Y A D S - A について、2 つの別々の突然変異誘発反応を行った。はじめの反応では、オリゴヌクレオチド Y A D S - H 1、Y A D S - H 2 及び Y A D S - H 3 - 7 を用いてそれぞれ C D R - H 1、C D R - H 2 及び C D R - H 3 を多様化した。これによって、4 つのアミノ酸チロシン、アラニン、アスパラギン酸及びセリンをコードする縮重コドンを導入した。第二の反応では、オリゴヌクレオチド Y T N S - H 1、Y T N S - H 2 及び Y T N S - H 3 - 7 を用いてそれぞれ C D R - H 1、C D R - H 2 及び C D R - H 3 を多様化した。これによって、4 つのアミノ酸チロシン、スレオニン、アスパラギン及びセリンをコードする縮重コドンを導入した。2 つの反応をプールした。

【0198】

ライブラリ Y A D S - B について、13 の別々の突然変異誘発反応を行った。その反応

10

20

30

40

50

によって4つのアミノ酸チロシン、アラニン、アスパラギン酸及びセリンをコードする縮重コドンを導入した。それぞれの反応で、オリゴヌクレオチドYADS-H1及びYADS-H2を用いてCDR-H1及びCDR-H2を多様化した。各反応について、以下のオリゴヌクレオチドの一つを用いて、CDR-H3を多様化した：YADS-H3-3、YADS-H3-4、YADS-H3-5、YADS-H3-6、YADS-H3-7、YADS-H3-8、YADS-H3-9、YADS-H3-10、YADS-H3-11、YADS-H3-12、YADS-H3-13、YADS-H3-14又はYADS-H3-15。13の反応をプールした。

2つのライブラリについて、蓄積した突然変異誘発反応物を、大腸菌SS320内に電気穿孔法にて導入した(Sidhuら., 上掲)。形質転換細胞をM13-KO7ヘルパーファージ(New England Biolabs, Beverly, MA)の存在下にて一晚培養して、前記のファジミドDNAを包含し、その細胞表面上にFabフラグメントを表出したファージ粒子を生成した。各ライブラリYADS-A及びYADS-Bのサイズはともに 7×10^9 である。

【0199】

実施例6 YADS-A及びYADS-Bナイーブラライブラリからの抗hVEGF特異的抗体の選別

ライブラリYADS-A及びYADS-B(実施例5)のファージについて結合選別操作を繰り返して、h-VEGFに結合するクローンを濃縮した。この結合選別は既に記載の方法(Sidhuら、上記)に従って行った。

捕獲標的($5 \mu\text{g}/\text{mL}$)にてNUNC96ウェルMaxisorpイムノプレートに4℃で一晩コートし、BSA(Sigma)で2時間ブロックした。既に記載したように(Sidhuら、上記)、ファージを一晩37℃で培養した後、PEG/NaClで沈殿させて濃縮し、PBS、0.5%BSA、0.05%Tween20(Sigma)に再懸濁した。上記のコートしたイムノプレートにファージ溶液($\sim 10^{12}$ ファージ/mL)を加えた。2時間インキュベートしてファージを結合させた後、PBS、0.05%Tween20でプレートを10回洗浄した。0.1M HClにて結合したファージを10分間溶出し、1.0M トリス塩基で溶出物を中和した。溶出したファージを大腸菌XL1ブルーで増幅し、さらなる選別操作のために使用した。

ライブラリーを各標的タンパク質に対して4回選別操作を行った。個々の選別から得た個々のクローンをカルベニシリン及びM13-VCSを添加した500 μL の2YT培養液を含む96ウェルフォーマットにて培養し、培養物上清をファージELISA(Sidhuら., 上掲)に直接用いて、標的タンパク質でコートしたプレートには結合するがBSAでコートしたプレートには結合しないファージディスプレイFabを検出した。BSAコートプレート上のシグナルと比較して標的コートプレート上で少なくとも20倍より大きなELISAシグナルを呈する場合にクローンを特異的結合体とした。結果を図10の表に示す。特異的な結合体の複数の異なる配列を得た(データは示さない)。

【0200】

実施例7 ライブラリYADS-A及びYADS-Bから単離したVEGF結合クローンの親和性成熟についてのライブラリYADS-IIの構築

ライブラリYADS-A及びYADS-B(実施例5及び6)から選択したVEGF結合クローンの配列決定により、ランダム化した重鎖CDR位置にチロシン、アラニン、アスパラギン酸又はセリンのみを含む24の異なるクローンが明らかとなった。我々は、チロシン、アラニン、アスパラギン酸又はセリンのみをコードする縮重コドンを用いて軽鎖CDRを多様化することによって16のクローンの親和性を向上させることを試みた。

部位特異的突然変異誘発のKunkel法(Kunkelら、上掲)を用いて、この実施例で用いる16の「停止鋳型」のファジミドを構築した。軽鎖CDRのコドン(位置29、32、51、54、55、93、94及び97)をTAA停止コドンに置換した。停止コドンの修復と同時にチロシン、アラニン、アスパラギン酸又はセリンをコードする縮重コドンを導入するように設定した3つのオリゴヌクレオチドを用いて、16の別々の突然変異誘発反応(各鋳型につき1つ)を行った。変異原性オリゴヌクレオチドYADS-L1、YADS-L2及びYADS-L3を用いてそれぞれCDR-L1、CDR-L2及びCDR-

L 3 を多様化した。オリゴヌクレオチド配列を図 1 3 に示し、ランダム化した軽鎖 C D R 部位を図 1 2 に示した。

1 6 の突然変異誘発反応を蓄積して、大腸菌 S S 3 2 0 内に電気穿孔法にて導入した (S idhu ら., 上掲)。形質転換細胞を M 1 3 -K O 7 ヘルパーファージ (New England Biolabs, Beverly, MA) の存在下にて一晚培養して、前記のファージミド D N A を包含し、その細胞表面上に F a b フラグメントを表出したファージ粒子を生成した。ライブラリは 6.5×10^9 の異なるメンバーを含有し、ライブラリ Y A D S - I I とした。

【0201】

実施例 8 Y A D S - I I ライブラリからの抗 h V E G F 特異的抗体の選別

ライブラリ Y A D S - I I (実施例 7) のファージについて結合選別操作を繰り返して、h - V E G F に結合するクローンを濃縮した。この結合選別は以下に行った。

ライブラリ Y A D S - I I は固体支持体上で選別した後、溶液中で 2 回選別した。第一の選別では、捕獲 h - V E G F ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) にて N U N C 9 6 ウェルMaxisorpイムノプレートを 4°C で一晚コートし、B S A (Sigma) で 2 時間ブロックした。既に記載したように (S idhu ら., 上記)、ファージを一晩 37°C で培養した後、P E G / N a C l で沈殿させて濃縮し、P B S、0.5% B S A、0.05% T w e e n 2 0 (Sigma) に再懸濁した。上記のコートしたイムノプレートにファージ溶液 ($\sim 10^{12}$ ファージ / mL) を加えた。2 時間インキュベートしてファージを結合させた後、P B S、0.05% T w e e n 2 0 でプレートを 10 回洗浄した。0.1 M H C l にて結合したファージを 10 分間溶出し、1.0 M トリス塩基で溶出物を中和した。溶出したファージを大腸菌 X L 1 ブルーで増幅し、さらなる選別操作のために使用した。

【0202】

以下の 2 回の選別は溶液中で行った。既に記載したように、ファージを一晩 37°C で培養した後、P E G / N a C l で沈殿させて濃縮し、Superblock 1% T B S (Pierce)、0.05% T w e e n 2 0 (Sigma) に再懸濁した。25 nM の濃度のビオチン化 h - V E G F とともにファージ溶液 (10^{12} ファージ / mL に近い濃度、200 μL) をインキュベートした。優しく攪拌しながら室温で 2 時間インキュベートした後、800 μL の Superblock+0.05% T w e e n 2 0 を加えた。800 μL のこの希釈液を 5 n g / μL のニュートラビジン (Pierce) でコートした 8 つのウェルでインキュベートして、Superblock 溶液にて飽和させた。優しく攪拌しながら室温で 5 分間インキュベートした後、P B S、0.05% T w e e n 2 0 でプレートを 10 回洗浄した。1 ウェル当たり 100 μL の 100 mM H C l にてファージを溶出し、1 M トリス塩基で溶出物を中和した。溶出したファージを大腸菌 X L 1 ブルーで増幅した。

【0203】

各回の選別から得た 200 個のクローンをカルベニシリン及び M 1 3 - V C S を添加した 500 μL の 2 Y T 培養液を含む 96 ウェルフォーマットにて培養し、培養液上清をファージ E L I S A (S idhu ら., 上掲) に直接用いて、標的タンパク質でコートしたプレートには結合するが B S A でコートしたプレートには結合しないファージディスプレイ F a b を検出した。B S A コートプレート上のシグナルと比較して標的コートプレート上で少なくとも 20 倍より大きな E L I S A シグナルを呈するクローンを特異的結合体とした。結果を図 1 4 の表に示す。

100 nM の h V E G F による結合阻害の量に基づいて、さらに 3 つの結合体を分析した。他のタンパク質 (図 1 6) 上の結合をこれら 3 つの結合体について測定した。これら結合体は、大腸菌の F a b タンパク質として発現されており、その h V E G F 及び m V E G F への結合親和性を実施例 2 に記載のように測定した。データを図 7 に示す。

【0204】

本明細書中で挙げたすべての文献 (特許及び特許出願を含む) は出典明記によりその全体が個々に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0205】

【図 1】 Y 及び S のみをコードする 2 単位(binomial)コドンセットに基づくライブラリ内で多様化された C D R の位置を示す。示した C D R の位置はカバット命名法に従って番号を付けた。

【図 2】 Y 及び S のみをコードする 2 単位コドンセットに基づく 2 つの例示的ライブラリの構築に用いた変異原性オリゴヌクレオチドを示す。このライブラリを Y S - A 及び Y S - B とする。等モルの D N A 縮重をコドンセットに示す ($M = A / C$)。コドンセットは I U B コードで表す。

【図 3】 様々な標的抗原に対して 5 回の選別を行った後のライブラリ Y A D S - A 及び Y A D S - B の濃縮率を示す。

【図 4】 Y S - A 及び Y S - B ライブラリの分類の結果を示す。得られた特異的結合の数 10
を示す。数は X / Y として示し、X は特異的クローンの数を表し（すなわち、ウシ血清アルブミン (B S A) の結合よりも少なくとも 10 倍高く標的抗原に結合するもの (450 nm での E L I S A 信号に基づく)）、Y は与えられたライブラリ、選別回数 (ラウンド) 及び標的抗原についてスクリーニングしたクローンの数を表す。

【図 5】 ライブラリ Y S - A 及び Y S - B の選別より得られた結合体の配列を示す。注記：* は通常鋳型配列の対応する位置にみられるアミノ酸の欠如を表す。

【図 6】 制限されたコドンセットの例示的セットを示す。示したコドンセットは 4 単位 (t
etranomial)、各はすなわち 4 アミノ酸しかコードしていない。

【図 7】 ファージ E L I S A によって評価した特異的な結合体の数 20
を示す。数は X / Y として示し、X は特異的な結合体の数、Y はスクリーニングしたクローンの数である。

【図 8】 各標的抗原について異なる制限多様性ライブラリより得たれた特定のクローンの数 30
を示す。

【図 9】 4 アミノ酸のみをコードする 4 単位(tetranomial)コドンセットに基づいたライ
ブラリ Y A D S - A 及び Y A D S - B の構築に用いた変異原性オリゴヌクレオチドを示す。等モル D N A 縮重をコドンセットで表す ($W = T / G$ 、 $K = T / A$ 、 $M = A / C$)。W M T は S、Y、T 及び N をコードする。K M T は Y、A、D 及び S をコードする。コドン
セットは I U B コードで示す。

【図 10】 ライブラリ Y A D S - A 及び Y A D S - B のファージ E L I S A によって評価
した特異的な結合体の数 30
を示す。数は X / Y として示し、X は特異的な結合体の数、Y はスクリーニングしたクローンの数である。

【図 11】 対応するヒト標的抗原及びカニクイザル標的抗原について競合的ファージ E L
I S A によって測定したクローン Y S 1 - A P、Y S 2 - A P 及び Y S 3 - A P の I C 5
0 値を示す。

【図 12】 4 のコドンセット (Y A D S) に基づいたライブラリにおいて多様化された軽
鎖 C D R の位置を示す。ライブラリは Y A D S - I I ライブラリを指す。C D R の位置は
カバット命名法に従って番号を付けた。

【図 13】 ライブラリ Y A D S - I I の構築に用いた変異原性オリゴヌクレオチドを示す。
等モル D N A 縮重をコドンセットで表す ($W = T / G$ 、 $M = A / C$)。K M T は Y、A
、D 及び S をコードする。コドンセットは I U B コードで示す。

【図 14】 Y A D S - I I h V E G F 選択物のスクリーニングの結果を示す。図は、ク
ロンの数、B S A 結合体 (ファージ E L I S A による測定 - 0.200 以下の数はバック
グラウンド以下と判断し太字で示す)、及び 100 nM のヒト V E G F により阻害され
る結合の割合 (75% 以上の阻害を示す数を太字で示す)。

【図 15】 4 D 5 軽鎖及び重鎖の可変ドメインの配列を示す (それぞれ配列番号 1 及び 2
)。

【図 16】 異なる標的抗原でコートしたプレートにて Y A D S ライブラリから得た 3 結合
体 (ファージ量の増加を示す) のファージ E L I S A の結果をグラフに示す。

【図 17】 ヒト V E G F 及びマウス V E G F の 3 結合体の結合値 (K a)、解離率 (k d
) 及び親和性値 (K d) を示す。

【図 18 A】 F a b - z i p (配列番号 4) の表出に用いた P t a c プロモータ作動性カ 50

セットのDNA配列を示す。2つのオープンリーディングフレームを示す。第一のオープンリーディングフレームはmalE分泌シグナル、ヒト化4D5軽鎖可変及び定常ドメインをコードする。第二のオープンリーディングフレームはstII分泌シグナル、ヒト化4D5重鎖可変ドメイン、ヒト化4D5重鎖第一定常ドメイン(CH1)、ジッパー配列及びp3のC末端(cP3)をコードする。

【図18B】Fab-zip(配列番号4)の表出に用いたPtacプロモータ作動性カセットのDNA配列を示す。2つのオープンリーディングフレームを示す。第一のオープンリーディングフレームはmalE分泌シグナル、ヒト化4D5軽鎖可変及び定常ドメインをコードする。第二のオープンリーディングフレームはstII分泌シグナル、ヒト化4D5重鎖可変ドメイン、ヒト化4D5重鎖第一定常ドメイン(CH1)、ジッパー配列及びp3のC末端(cP3)をコードする。 10

【図19】F(ab)₂の表出のために離れた転写部位の発現を促すバイシストロン性のベクターを図示する。好適なプロモータは第一及び第二のシストロンの発現を作動させる。第一シストロンは分泌シグナル配列(malE又はstII)、軽鎖可変及び定常ドメインと、gDタグをコードする。第二シストロンは分泌シグナル、重鎖可変ドメイン及び定常ドメイン1(CH1)をコードする配列と、ウイルスコートタンパク質の二量体化ドメイン及び少なくともその一部をコードする。

【図20】隣接するパッチを形成するCDR残基を示すヒト化4D5の3-Dモデル構造を示す。隣接するパッチはCDRL1のアミノ酸残基28、29、30、31及び32；CDRL2のアミノ酸残基50及び53；CDRL3のアミノ酸残基91、92、93、94及び96；CDRH1の28、30、31、32、33；及びCDRH2の50、52、53、54、56及び58によって形成される。 20

【図21】カバットデータベースからのヒト抗体軽鎖CDR配列におけるアミノ酸(一文字コードで表示)の頻度を示す。特定のアミノ酸位置にある各アミノ酸の頻度を、左にもっとも頻度が高いアミノ酸を置き、右にもっとも頻度が低いアミノ酸を続けて示す。アミノ酸の下に数字はその位置にそのアミノ酸を有するカバットデータベース中の天然に生じるアミノ酸の数を表す。

【図22】カバットデータベースからのヒト抗体重鎖CDR配列におけるアミノ酸(一文字コードで表示)の頻度を示す。特定のアミノ酸位置にある各アミノ酸の頻度を、左にもっとも頻度が高いアミノ酸を置き、右にもっとも頻度が低いアミノ酸を続けて示す。アミノ酸の下に数字はその位置にそのアミノ酸を有するカバットデータベース中の天然に生じるアミノ酸の数を表す。また、フレームワークアミノ酸位置71、93及び94を示す。 30

【図23】ヒトVEGF及びマウスVEGFのYSライブラリ(実施例2に示す)から得た2つの抗VEGF結合体の結合値(K_a)、解離率(k_d)及び親和性値(K_d)を示す。

【図24A】重鎖定常CH1ドメインとp3配列との間に二量体化ドメインを含むベクターpV-0350-4のDNA配列(配列番号5)及びアミノ酸配列(軽鎖及び重鎖それぞれ配列番号6及び7)を示す。

【図24B】重鎖定常CH1ドメインとp3配列との間に二量体化ドメインを含むベクターpV-0350-4のDNA配列(配列番号5)及びアミノ酸配列(軽鎖及び重鎖それぞれ配列番号6及び7)を示す。 40

【図24C】重鎖定常CH1ドメインとp3配列との間に二量体化ドメインを含むベクターpV-0350-4のDNA配列(配列番号5)及びアミノ酸配列(軽鎖及び重鎖それぞれ配列番号6及び7)を示す。

【図24D】重鎖定常CH1ドメインとp3配列との間に二量体化ドメインを含むベクターpV-0350-4のDNA配列(配列番号5)及びアミノ酸配列(軽鎖及び重鎖それぞれ配列番号6及び7)を示す。

【図24E】重鎖定常CH1ドメインとp3配列との間に二量体化ドメインを含むベクターpV-0350-4のDNA配列(配列番号5)及びアミノ酸配列(軽鎖及び重鎖それぞれ配列番号6及び7)を示す。

【図 2 4 F】重鎖定常 C H 1 ドメインと p 3 配列との間に二量体化ドメインを含むベクター p V - 0 3 5 0 - 4 の D N A 配列（配列番号 5）及びアミノ酸配列（軽鎖及び重鎖それぞれ配列番号 6 及び 7）を示す。

【図 1】

FIG. 1

Library	Randomized Positions			
	CDRL3	CDRH1	CDRH2	CDRH3
YS-A		28, 30, 31, 32, 33	50, 52, 53, 54, 56, 58	95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a
YS-B	91-94, 96	28, 30, 31, 32, 33	50, 52, 53, 54, 56, 58	95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a

【図 2】

FIG. 2

Name	Sequence
H1	GCA GCT TCT GGC TTC TMT ATT TMT TMT TMT TMT ATA CAC TGG GTG CGT
H2	CTG GAA TGG GTT GCA TMT ATT TMT CCA TMT TMT GOT TMT ACT TMT TAT GCC GAT AGC GTC
H3-7	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (TMT) ₃ GCT ATG GAC TAC TGG
H3-8	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (TMT) ₃ GCT ATG GAC TAC TGG
H3-9	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (TMT) ₃ GCT ATG GAC TAC TGG
H3-10	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (TMT) ₃ GCT ATG GAC TAC TGG
H3-11	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (TMT) ₃ GCT ATG GAC TAC TGG
H3-12	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (TMT) ₃ GCT ATG GAC TAC TGG
H3-13	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (TMT) ₃ GCT ATG GAC TAC TGG
H3-14	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (TMT) ₃ GCT ATG GAC TAC TGG
H3-15	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (TMT) ₃ GCT ATG GAC TAC TGG
H3-16	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (TMT) ₃ GCT ATG GAC TAC TGG
H3-17	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (TMT) ₃ GCT ATG GAC TAC TGG
H3-18	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (TMT) ₃ GCT ATG GAC TAC TGG
H3-19	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (TMT) ₃ GCT ATG GAC TAC TGG
H3-20	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (TMT) ₃ GCT ATG GAC TAC TGG
L3a	GCA ACT TAT TAC TGT CAG TMT TMT TMT TMT CCA TMT ACG TTC GGA CAG GGT ACC
L3b	ACT TAT TAC TGT CAG CAA TMT TMT TMT TMT CCA TMT ACG TTC GGA CAG GGT ACC

【図 3】

FIG. 3

Library	Round	Target Protein							
		neutravidin	MBP2	ERBIN-GST	insulin	AP version 1	AP version 2	mVEGF	hVEGF
YS-A	3	3	0	1	1	0	0	29	2
	4	2	1	1	1	1	1	1	12.5
	5	2	5	346	13	6	5	34	
YS-B	3	44	2	229	1	1	0	250	55
	4	1	1	5	2	1	1	2	300
	5	1	0	800	100	129	167	367	

【図 4】

FIG. 4

Library	Library type							
	YS-A				YS-B			
Round number / Target	Round #2	Round #3	Round #4	Round #5	Round #2	Round #3	Round #4	Round #5
h-VEGF	1 / 24	11 / 24	24 / 24		7 / 24	19 / 24	24 / 24	
neutravidin		0 / 24	3 / 24	23 / 24		0 / 24	0	21 / 24
maltese binding protein		0 / 24	0 / 24	0 / 24		0 / 24	0	7 / 24
Erbin GST		1 / 48	33 / 48	24 / 24		17 / 48	24 / 48	24 / 24
insulin		0 / 24	1 / 24	5 / 24		0 / 24	0 / 24	12 / 24
AP version 1		0 / 24	2 / 24	3 / 24		0 / 24	0 / 24	23 / 24
AP version 2		0 / 24	0 / 24	1 / 24		0 / 24	0 / 24	24 / 24
mVEGF		15 / 48	25 / 48	24 / 24		10 / 48	15 / 48	24 / 24
murine IgG		2 / 24	2 / 24	21 / 24		0 / 24	0 / 24	5 / 24

【図 5】

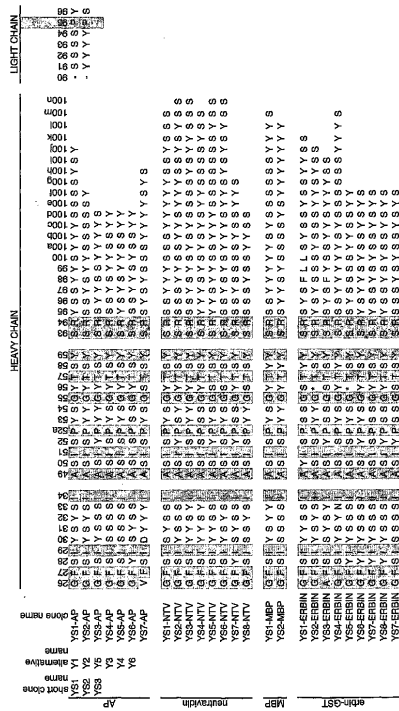


FIG. 5

【図 6】

FIG. 6

codon	composition in base	amino acids encoded
RMG	(AC)(AC)(C)	TNDA
RMG	(AG)(AC)(G)	TKEA
RRC	(AG)(AG)(C)	NSDG
RSA	(AG)(CG)(A)	TRAG
MKG	(AC)(TG)(C)	LRES
YMT	(TC)(CA)(T)	SYTH
RST	(AG)(CG)(T)	GAST
KMT	(TG)(CA)(T)	YADS
SRC	(CG)(AG)(C)	HRDG
MKT	(AC)(AG)(T)	HNES
WMT	(TA)(CA)(T)	SYTN

【図 7】

FIG. 7

Round	Target Antigen			
	IGF	h-VBGP	Anti-hGH	hGH bp
2	2 / 24	0 / 24	0 / 24	0 / 24
3	6 / 24	34 / 216	13 / 96	4 / 24
4	3 / 24	1 / 24	8 / 24	11 / 48

【図 8】

FIG. 8

Target	Library of origin for each binder						total
	TRAG	GAST	HRDG	SYTN	SYTH	YADS	
IGF	2		1		2		5
h-VBGP					3	27	30
anti-hGH	5	5	4			1	15
hGH bp				6			6

【図 9】

FIG. 9

Name	Sequence
YADS-H1	GCA GCT TCT GGC TTC WMT ATT WMT WMT WMT WMT ATA CAC TGG GTG CGT
YADS-H2	CTG GAA TGG GTT GCA WMT ATT WMT CCA WMT WMT GGT WMT ACT WMT TAT
YADS-H3-1	GCC GAT AGC GTC
YADS-H3-2	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (WMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG
YADS-H3-3	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (WMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG
YADS-H3-4	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (WMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG
YADS-H3-5	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (WMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG
YADS-H3-6	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (WMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG
YADS-H3-7	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (WMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG
YADS-H3-8	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (WMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG
YADS-H3-9	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (WMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG
YADS-H3-10	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (WMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG
YADS-H3-11	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (WMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG
YADS-H3-12	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (WMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG
YADS-H3-13	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (WMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG
YADS-H3-14	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (WMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG
YADS-H3-15	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (WMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG
YINS-H1	GCA GCT TCT GGC TTC KMT ATT KMT KMT KMT KMT ATA CAC TGG GTG CGT
YINS-H2	CTG GAA TGG GTT GCA KMT ATT KMT CCA KMT KMT GGT KMT ACT KMT TAT
YINS-H3-1	GCC GAT AGC GTC
YINS-H3-2	GTC TAT TAT TGT AGC CGC (KMT) ₂ GCT ATG GAC TAC TGG

【図 10】

FIG. 10

Round	Library	
	YADS-A	YADS-B
2	3 / 224	0 / 24
3	2 / 32	34 / 408
4	49 / 128	5 / 24
5		2 / 24

【図 11】

FIG. 11

short clone name	clone name	human AP (nM)	cyno AP (nM)
YS1	YS1-AP	7.9	32
YS2	YS2-AP	15.8	> 1000
YS3	YS3-AP	348	> 1000

【図 12】

FIG. 12

Randomized Positions		
CDR L1	CDR L2	CDR L3
28, 29, 30, 31, 32	50, 53	91-94, 96

【 図 1 4 】

[illegible]

【図 18 A】

Figure 1 consists of three line graphs showing the effect of various compounds on the growth of YAD-1, YAD-2, and YAD-3. The y-axis for all graphs is OD 450 nm, ranging from 0 to 4. The x-axis is concentration on a log scale, ranging from 0.000001 to 1. The legend for all graphs is: mVEGF (solid line with circles), NGH (dashed line with squares), BP (dotted line with triangles), NaCl (solid line with diamonds), mVEGF (solid line with circles), and BSA (solid line with triangles).

- 力価 YAD-1:** The graph shows that mVEGF, NGH, and BP significantly inhibit growth, with OD values remaining near zero across all concentrations. NaCl and BSA show no effect, with OD values increasing from approximately 0.2 to 3.5 as concentration increases.
- 力価 YAD-2:** The graph shows that mVEGF, NGH, and BP significantly inhibit growth, with OD values remaining near zero across all concentrations. NaCl and BSA show no effect, with OD values increasing from approximately 0.2 to 3.5 as concentration increases.
- 力価 YAD-3:** The graph shows that mVEGF, NGH, and BP significantly inhibit growth, with OD values remaining near zero across all concentrations. NaCl and BSA show no effect, with OD values increasing from approximately 0.2 to 3.5 as concentration increases.

	h-VEGF コートチップ			m-VEGF コートチップ		
クローン名	k_a	k_d	K_d	k_a	k_d	K_d
YADS-1	3×10^5	5×10^{-4}	$2.0 \pm 0.6 \text{ nM}$	ND	ND	ND
YADS-2	1×10^6	1×10^{-2}	$10 \pm 4 \text{ nM}$	8×10^5	4×10^{-3}	$5 \pm 1 \text{ nM}$
YADS-3	1×10^6	3×10^{-3}	$3 \pm 1 \text{ nM}$	2×10^6	5×10^{-3}	$2.5 \pm 1 \text{ nM}$

[illegible]

【 図 2 2 】

HC 編號	T	S	X	D	G	X	E	A	S	N	I	X
28	1922	1297	337									
29	1923	1300	340									
30	2451	653	154	82	70	67	128					
31	S	N	G									
32	1815	432	365	339	324	40	32	190				
33	2231	332	269	138	124	120	316					
34	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
35	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
36	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
37	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
38	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
39	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
40	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
41	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
42	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
43	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
44	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
45	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
46	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
47	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
48	785	713	605	501	431	117	98	90	71	208		
49	G	S	A									
50	2337	814	706									
51	50	633	361	354	K	1	316	305	234	233	219	155
52	51	988	940	637	259	203	127	123	100	332		
53	S	D	Y	S	G	H	N	I	T	W	X	
54	915	755	295	374	3300	314	182	109	77	316		
55	G	S	D	N	K	F	134	170				
56	1400	971	433	249	224	187	134	170				
57	1986	832	248	186	1155	390						
58	S	T	N	D	Y	E	A	X	X			
59	1039	601	549	394	381	201	175	83	344			
60	2130	552	284	266	236	369						
61	1228	941	445	283	166	155	120	94	351			
62	1228	941	445	283	166	155	120	94	351			
63	1228	941	445	283	166	155	120	94	351			
64	1228	941	445	283	166	155	120	94	351			
65	1228	941	445	283	166	155	120	94	351			

【図 2 4 A】

[illegible]

【 図 2 3 】

クローン #3	hVEGF コートチップ	mVEGF コートチップ
k_a ($M^{-1} \cdot s^{-1}$) (on-rate)	1.6×10^6	検出不可
k_d (s^{-1}) (off-rate)	7×10^{-2}	検出不可
Kd	$46 \pm 17 nM$	検出不可 ($> 1 \mu M$)

クローン #18	hVEGF コートチップ	mVEGF コートチップ
k_a ($M^{-1} \cdot s^{-1}$) (on-rate)	1×10^5	4×10^4
k_d (s^{-1}) (off-rate)	8×10^{-3}	2×10^{-2}
Kd	64 +/- 7nM	600 +/- 200nM

【図 2 4 D】

[illegible]

【図 2 4 F】

[illegible]

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US2004/024218
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/00 C12N15/62 C12N15/13 C07K16/22		
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) IPC 7 C07K C12N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, Sequence Search, BIOSIS, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KLEIN D ET AL: "I.29 lymphoma cells express a nonmutated VH gene before and after H chain switch." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 MAR 1988, vol. 140, no. 5, 1 March 1988 (1988-03-01), pages 1676-1684, XP002338100 ISSN: 0022-1767 the whole document	1-5, 37-39, 41-43, 59,62, 63, 68-75, 78,83
X	DATABASE NCBI 31 January 1994 (1994-01-31), SCHLUTER-C ET AL.: "CAA46520" XP002338103 abstract -/-	1,2,5
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "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) "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 "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 "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 "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. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 August 2005		Date of mailing of the international search report 13/09/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lechner, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 In
 of Application No
 PCT/US2004/024218

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	-& SCHLÖTER C ET AL: "The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins." THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY. NOV 1993, vol. 123, no. 3, November 1993 (1993-11), pages 513-522, XP002338950 ISSN: 0021-9525 abstract	1,2,5
X	WO 01/27612 A (CONNEX GESELLSCHAFT ZUR OPTIMIERUNG VON FORSCHUNG; REITER, CHRISTIAN;) 19 April 2001 (2001-04-19) the whole document	15,16, 18-20, 22,23, 37-39, 43,78,83
X	DATABASE REGISTRY RN 148222-13-3 22 June 1993 (1993-06-22), "Anti-human thyroid peroxidase antibody Fab heavy chain (human 1-3)" XP002338104 abstract	7,8
X	-& WO 93/05072 A 18 March 1993 (1993-03-18) abstract; figure 32a	15,16, 18-21, 37-39, 41-43, 59,72, 73,78, 83,91, 95,96
X	WO 03/055979 A (HUMAN GENOME SCIENCES, INC; RUBEN, STEVEN, M; BARASH, STEVEN, C; CHOI,) 10 July 2003 (2003-07-10) sequence 918	15,16, 18-20
X	US 2003/091995 A1 (BUECHLER JOE ET AL) 15 May 2003 (2003-05-15) the whole document	11,12, 14, 37-43, 59, 61-65, 68-76, 78-87
X	US 6 190 908 B1 (KANG ANGRAY S) 20 February 2001 (2001-02-20) the whole document	59-65
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/US2004/024218
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 03/089614 A (GENENCOR INTERNATIONAL, INC; POWER, SCOTT, D; WANG, HUAMING; WARD, MIC) 30 October 2003 (2003-10-30) the whole document	1-5,15, 16,18, 37,39, 41, 43-45, 49-51, 53,54, 68,69, 72,74, 78,83
A	HAWKINS R E ET AL: "SELECTION OF PHAGE ANTIBODIES BY BINDING AFFINITY MIMICKING AFFINITY MATURATION" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 226, no. 3, 1992, pages 889-896, XP000940994 ISSN: 0022-2836 the whole document	78-90
A	WINTER G ET AL: "MAKING ANTIBODIES BY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY" ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY, ANNUAL REVIEWS INC, US, vol. 12, 1994, pages 433-455, XP000564245 ISSN: 0732-0582 the whole document	1-97
A	DESHAYES KURT ET AL: "Rapid identification of small binding motifs with high-throughput phage display: Discovery of peptidic antagonists of IGF-1 function" CHEMISTRY AND BIOLOGY (LONDON), vol. 9, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 495-505, XP002338407 ISSN: 1074-5521 abstract paragraphs 'MONOVALENT!', 'LIBRARY!', 'DESIGN!', 'OAND!', 'SELECTION!'	1-97
A	CHEN Y ET AL: "Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured fab in complex with antigen" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 293, no. 4, 5 November 1999 (1999-11-05), pages 865-881, XP004461879 ISSN: 0022-2836 the whole document	1-97
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 In International Application No
 PCT/US2004/024218

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ADAMS G P ET AL: "Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 231, no. 1-2, 10 December 1999 (1999-12-10), pages 249-260, XP004187649 ISSN: 0022-1759 abstract	86-89
A	SCHIER R ET AL: "ISOLATION OF HIGH-AFFINITY MONOMERIC HUMAN ANTI-C-ERBB-2 SINGLE CHAIN FV USING AFFINITY-DRIVEN SELECTION" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 255, 1996, pages 28-43, XP000921474 ISSN: 0022-2836 abstract paragraphs 'SELECTION! - '000F!	86-89
A	WO 01/44463 A (GENENTECH, INC) 21 June 2001 (2001-06-21) the whole document	91-97
A	VAJDOS F F ET AL: "Comprehensive Functional Maps of the Antigen-binding Site of an Anti-ErbB2 Antibody Obtained with Shotgun Scanning Mutagenesis" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 320, no. 2, 5 July 2002 (2002-07-05), pages 415-428, XP004449739 ISSN: 0022-2836 the whole document	1-97
A	SIDHU SACHDEV S ET AL: "Exploring protein-protein interactions with phage display." CHEMBIOCHEM : A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY. 3 JAN 2003, vol. 4, no. 1, 3 January 2003 (2003-01-03), pages 14-25, XP002338908 ISSN: 1439-4227 the whole document	1-97
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/US2004/024218

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MCCAFFERTY JOHN: "Phage display: Factors affecting panning efficiency" PHAGE DISPLAY OF PEPTIDES AND PROTEINS: A LABORATORY MANUAL ACADEMIC PRESS, INC., 1250 SIXTH AVE., SAN DIEGO, CALIFORNIA 92101, USA; ACADEMIC PRESS LTD., 14 BELGRAVE SQUARE, 24-28 OVAL ROAD, LONDON NW1 70X, ENGLAND, UK, 1996, pages 261-276, XPO09051515 ISSN: 0-12-402380-0 the whole document	1-97
A	ADEY NILS B ET AL: "Preparation of second-generation phage libraries" PHAGE DISPLAY OF PEPTIDES AND PROTEINS: A LABORATORY MANUAL ACADEMIC PRESS, INC., 1250 SIXTH AVE., SAN DIEGO, CALIFORNIA 92101, USA; ACADEMIC PRESS LTD., 14 BELGRAVE SQUARE, 24-28 OVAL ROAD, LONDON NW1 70X, ENGLAND, UK, 1996, pages 277-291, XPO09051516 ISSN: 0-12-402380-0 the whole document	1-97
A	SIDHU S S ET AL: "PHAGE DISPLAY FOR SELECTION OF NOVEL BINDING PEPTIDES" METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC, SAN DIEGO, CA, US, vol. 328, 2000, pages 333-363, XP000984091 ISSN: 0076-6879 the whole document	1-97
A	KONTHUR Z ET AL: "Automation of phage display for high-throughput antibody development" TARGETS, ELSEVIER, vol. 1, no. 1, 1 July 2002 (2002-07-01), pages 30-36, XP004886584 ISSN: 1477-3627 the whole document	1-97

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.

PCT/US2004/024218

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☒ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ in written format
- ☒ in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- ☐ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in computer readable form
- ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

International Application No. PCT/US2004/024218

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 37-43, 54-65, 68-74, 79-90 (all only in part), 26-36, 44-53, 66, 67 (not searched at all)11)

Present claims 26-36, 44-53 and claims referring to said claims relate to completely undefined variants. In fact, the claims contain so many variables that a lack of clarity (and conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible; Consequently, no search has been carried out for said claims. Moreover, the "variant" is completely undefined since the referenced sequence(s), of which the claimed should be a variant, is not defined.

Claims 37-43, 54-65, 68-74, 79-90 were searched as far as not relating to claims 26-36, 44-53.

Claims 60, 71 do not meet the requirements of Article 6, PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The claims relate to completely undefined variants and derivatives. In the present case, the claims lack clarity. Consequently, the examination of novelty and inventive step has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear and supported, namely those parts relating to the specifically identified peptide sequences and formulas given in claims 1-5, 7-25 and the specific viral-coat proteins given in claim 60, peptide-tags given in claim 65, and the specific expression vectors listed in claim 71 (without derivatives).

The wording of claims 6, 66 is unclear in itself (Art. 6, PCT) not allowing a meaningful search. Moreover, claim 6 relates to an Ab designated by an in-house designation, i.e. 4D5 which is also unclear in the sense of Art. 6, PCT.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/024218

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US2004/024218

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0127612	A	19-04-2001	AT 236398 T 15-04-2003
			AU 1137301 A 23-04-2001
			AU 7787100 A 23-04-2001
			BR 0014734 A 18-06-2002
			CA 2387473 A1 19-04-2001
			CN 1382259 A 27-11-2002
			DE 50001665 D1 08-05-2003
			DK 1232392 T3 28-07-2003
			WO 0127612 A2 19-04-2001
			WO 0127613 A2 19-04-2001
			EP 1232392 A1 21-08-2002
			EP 1221045 A2 10-07-2002
			EP 1336850 A1 20-08-2003
			ES 2194782 T3 01-12-2003
			JP 2003511697 T 25-03-2003
			JP 2003511698 T 25-03-2003
			PT 1232392 T 29-08-2003
			SI 1232392 T1 31-10-2003
			TR 200201006 T2 21-11-2002
WO 9305072	A	18-03-1993	AU 2555792 A 05-04-1993
			CA 2116453 A1 18-03-1993
			EP 0604453 A1 06-07-1994
			FI 940391 A 28-03-1994
			FI 940732 A 28-04-1994
			JP 7503604 T 20-04-1995
			JP 7506960 T 03-08-1995
			NO 940298 A 27-01-1994
			NO 940668 A 29-04-1994
			WO 9305072 A1 18-03-1993
WO 03055979	A	10-07-2003	EP 0668918 A1 30-08-1995
			AU 2002364954 A1 15-07-2003
			CA 2467521 A1 10-07-2003
			EP 1456347 A2 15-09-2004
			WO 03055979 A2 10-07-2003
US 2003091995	A1	15-05-2003	US 2003223996 A1 04-12-2003
			AU 7849600 A 10-05-2001
			CA 2385709 A1 12-04-2001
			EP 1222314 A1 17-07-2002
			JP 2003527832 T 24-09-2003
US 6190908	B1	20-02-2001	WO 0125492 A1 12-04-2001
			AU 766253 B2 09-10-2003
			AU 5554399 A 06-03-2000
			CA 2336541 A1 24-02-2000
			EP 1127142 A1 29-08-2001
			JP 2002522084 T 23-07-2002
			WO 0009715 A1 24-02-2000
			US 6323004 B1 27-11-2001
			US 2002146827 A1 10-10-2002
WO 03089614	A	30-10-2003	AU 2003222664 A1 03-11-2003
			EP 1495055 A2 12-01-2005
			US 2005158825 A1 21-07-2005
			WO 03089614 A2 30-10-2003
			US 2004018573 A1 29-01-2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

 International Application No
 PCT/US2004/024218

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03089614 A		US 2004115785 A1	17-06-2004
		AU 2003272454 A1	08-04-2004
		WO 2004026891 A2	01-04-2004
WO 0144463 A	21-06-2001	AU 2272201 A	25-06-2001
		CA 2393869 A1	21-06-2001
		EP 1240319 A1	18-09-2002
		JP 2003516755 T	20-05-2003
		WO 0144463 A1	21-06-2001
		US 2003180714 A1	25-09-2003

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 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 14/005 (2006.01)	C 0 7 K 14/005	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P 15/08	
A 6 1 P 13/02 (2006.01)	A 6 1 P 13/02	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
C 4 0 B 30/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 4 0 B 30/04	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GO, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 シドゥ, サチデヴ エス.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94107, サン フランシスコ, フリーロン ストリート
150

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 CA09 CA11 CA20 DA01 DA02 DA05
DA11 EA04 GA11 HA01
4B064 AG26 CA02 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 BA03 CA53 DC50 NA14 ZA332 ZA362 ZA452
ZA592 ZA662 ZA682 ZA812 ZA892 ZA962 ZB072 ZB112 ZB152 ZB212
ZB262 ZB272 ZB352 ZC062 ZC352
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA01 CA40 DA75 EA20
EA50 FA74