

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6413127号
(P6413127)

(45) 発行日 平成30年10月31日(2018.10.31)

(24) 登録日 平成30年10月12日(2018.10.12)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/00 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C O 7 K 16/00 Z N A
 C 1 2 N 15/13
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21

請求項の数 21 (全 237 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-551703 (P2014-551703)
 (86) (22) 出願日 平成25年1月7日(2013.1.7)
 (65) 公表番号 特表2015-504893 (P2015-504893A)
 (43) 公表日 平成27年2月16日(2015.2.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/050131
 (87) 国際公開番号 W02013/105013
 (87) 国際公開日 平成25年7月18日(2013.7.18)
 審査請求日 平成27年12月24日(2015.12.24)
 (31) 優先権主張番号 61/584,675
 (32) 優先日 平成24年1月9日(2012.1.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-13394
 微生物の受託番号 ATCC PTA-13395

(73) 特許権者 509129244
 コヴェックス・テクノロジーズ・アイルラ
 ンド・リミテッド
 アイルランド国 カウンティ・コーク リ
 ンガスキディー オペレーションズ・サポ
 ート・グループ
 (74) 代理人 100133927
 弁理士 四本 能尚
 (74) 代理人 100137040
 弁理士 宮澤 純子
 (74) 代理人 100147186
 弁理士 佐藤 真紀
 (74) 代理人 100174447
 弁理士 龍田 美幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異抗体およびそのコンジュゲーション

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類の抗体定常軽鎖（C L）ドメインを含むポリペプチドであって、前記抗体定常軽鎖ドメインは、配列番号 6 の配列とアラインさせた場合に、残基 K および H を、配列番号 6 の 8 0 および 8 1 位に対応する位置に含む抗体定常軽鎖ドメインを含み、かつ、A、G、I、V、L、R、S、T、Q、P、N、M、H、W からなる群から選択される残基を、配列番号 6 の 7 7 位に対応する位置にさらに含むことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリペプチドであって、配列番号 6 の残基 7 7 に対応する位置の残基が、

- (i) A、G、I、L、R、S、T、P、N、および M からなる群；
 - (ii) A、G、I、L、S、T、P、および M からなる群；または
 - (iii) A、G、S、T、P、または M からなる群
- から選択される、ポリペプチド。

【請求項 3】

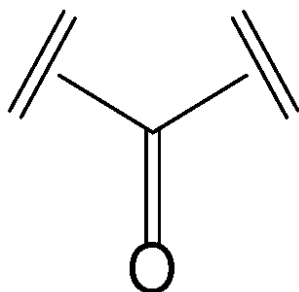
請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドであって、哺乳類の抗体定常軽鎖ドメインが抗体可変領域に接続されている、ポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のポリペプチドであって、哺乳類の抗体定常軽鎖ドメインがヒト化ドメインまたはヒトドメインである、ポリペプチド。

【請求項 5】

配列番号 6 の残基 80 に対応する位置に位置する K の側鎖の ϵ -アミノ基が、リンカーに共有結合されている、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のポリペプチドであって、リンカーが式 $X^1 - Y^1 - Z^1$ 、 $X^1 - \Phi - Y^1 - Z^1$ 、および $X^1 - Y^1 - \Phi - Z^1$ からなる群から選択される式を含み、ここで、 Φ は切断可能な基であり、 X^1 は、少なくとも 1 個のエフェクター部分に共有結合的に接続可能な基であり、 Y^1 は、直鎖または分枝の接続鎖であって、いずれかの分子が、C、H、N、O、P、S、F、Cl、Br、および I から成る群から選択され、Z は、下式：



10

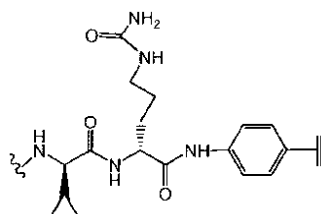
の構造を有し、かつ配列番号 6 の残基 80 に対応する位置に位置する K の側鎖の ϵ -アミノ基に共有結合的に接続される基であり、前記エフェクター部分は、治療薬、タンパク質、ペプチド、核酸、アプタマー、低分子、タンパク質アゴニスト、タンパク質アンタゴニスト、代謝調節物質、ホルモン、毒素、成長因子、または診断薬である、ポリペプチド。

20

【請求項 6】

切断可能な基 Φ が存在し、下式：

【化 1】



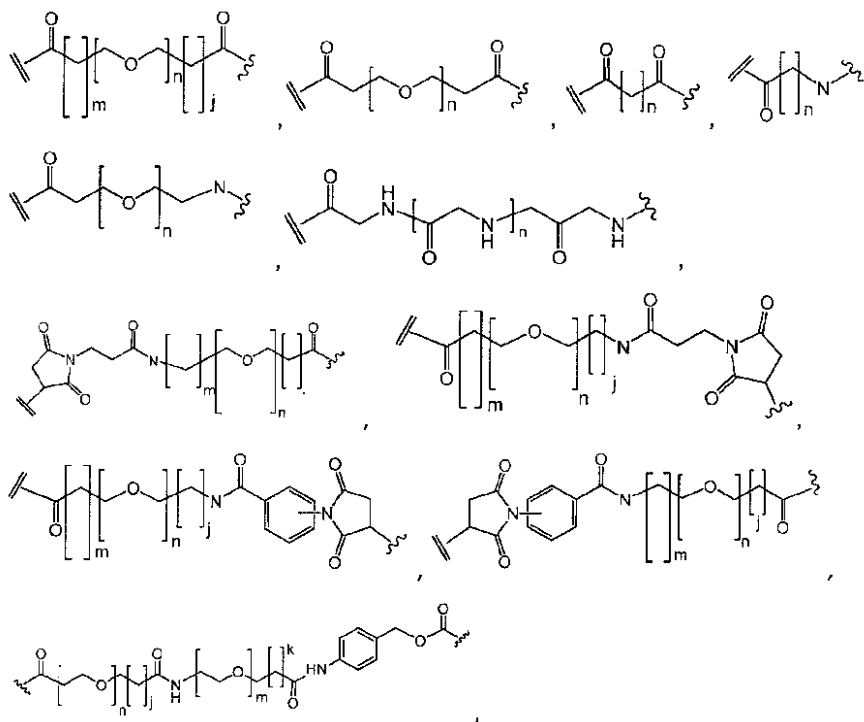
[式中、波線および平行線はそれぞれ、適切に X^1 、 Y^1 、または Z^1 基のいずれかへの結合点を示している] の基である、請求項 5 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 7】

リンカーが、

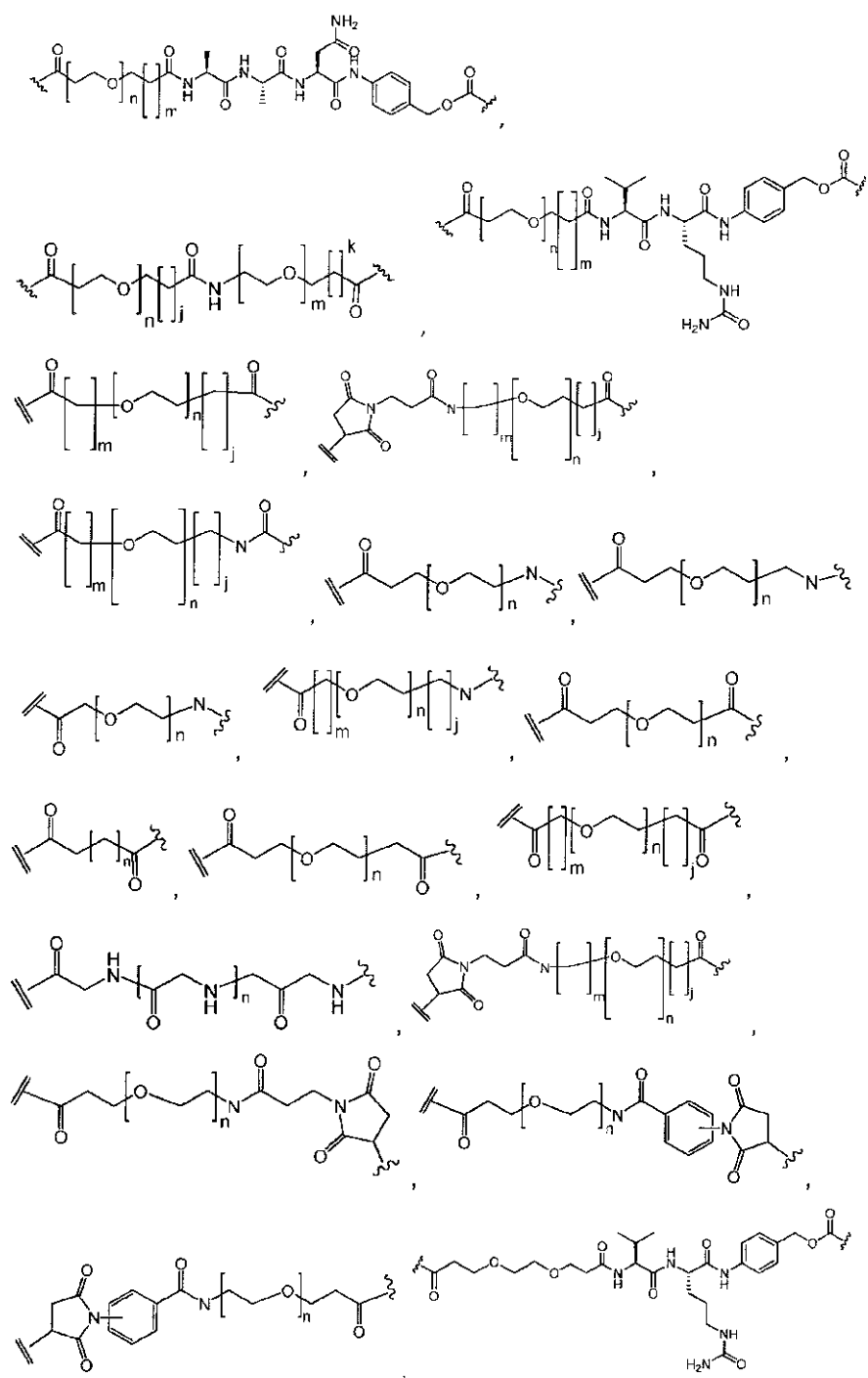
【化 2 - 1】



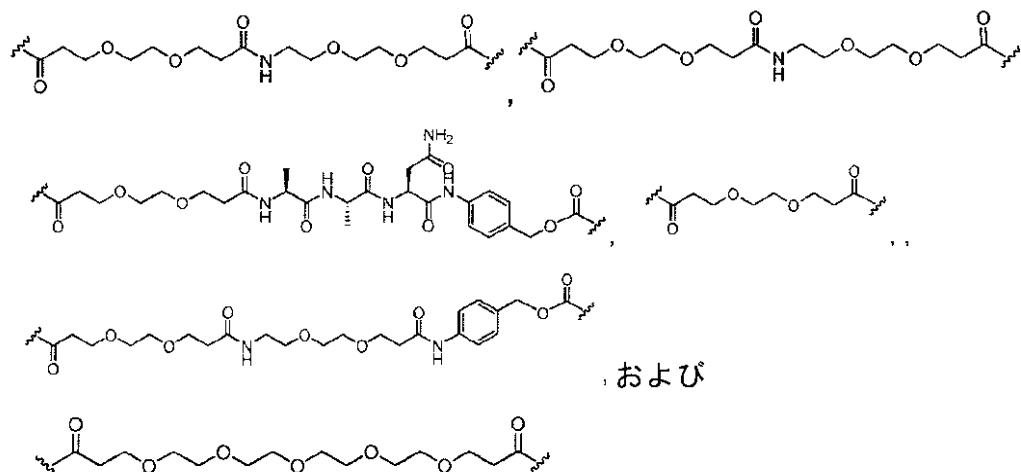
10

20

【化 2 - 2】



【化 2 - 3】



[式中、m、n、j、およびkはそれぞれ独立に、その下限が0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、および20からなる群から選択され、その上限が2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、および30からなる群から選択される範囲である]

からなる群から選択され、リンカーの全体長さが200原子を超えない、請求項5または6に記載のポリペプチド。

20

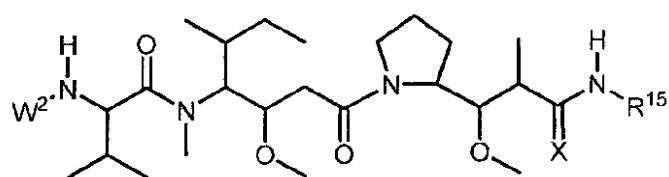
【請求項 8】

請求項7に記載のポリペプチドであって、リンカー全体長さが60原子を超えない、ポリペプチド。

【請求項 9】

請求項5から8のいずれか一項に記載のポリペプチドであって、エフェクター部分が毒素である時に、下式：

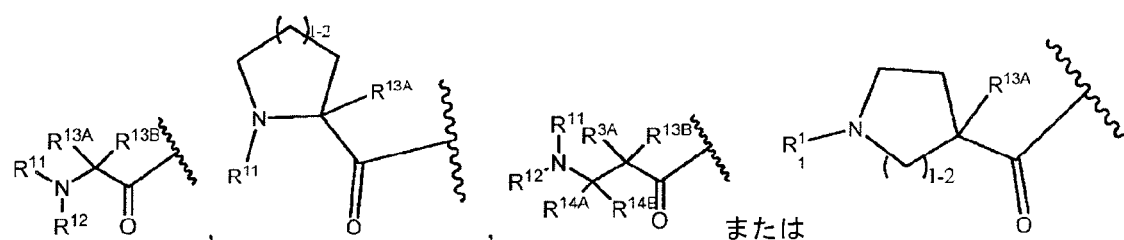
【化 3】



[式中、出現する毎に独立に、

W^2 は、

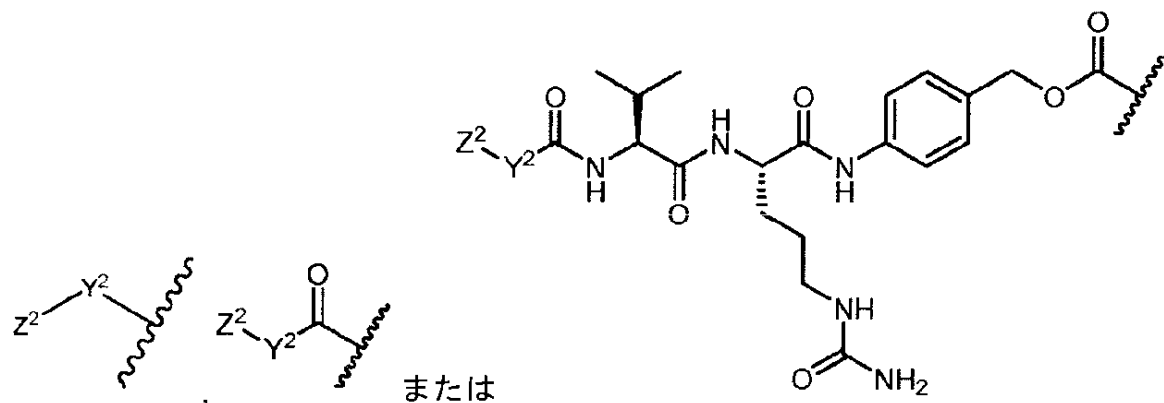
【化 4】



であり、

R^{11} は、

【化 5】

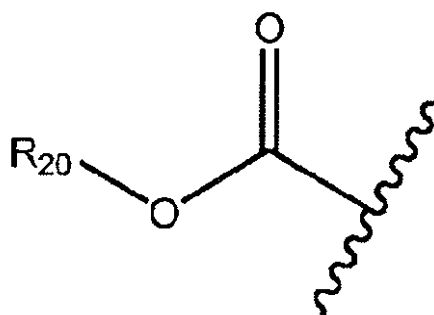


であり、

Y^2 は、 $-C_2 \sim C_{20}$ アルキレン、 $-C_2 \sim C_{20}$ ヘテロアルキレン； $-C_3 \sim C_8$ カルボシクロ、 $-$ アリーレン、 $-C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン-アリーレン、 $-$ アリーレン- $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $(C_3 \sim C_8$ カルボシクロ)-、 $-(C_3 \sim C_8$ カルボシクロ)- $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $(C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ)-または $-(C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ)- $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンであり、

Z^2 は、

【化 6】



であり、

R^{12} は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、または $C_1 \sim C_8$ ハロアルキルであり、

R^{13A} および R^{13B} は、次の (iii) または (iv) のいずれかであり：

(iii) R^{13A} は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ ハロアルキル、 $C_3 \sim C_8$ カルボシクリル、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアラルキル、アラルキル、またはハロゲンであり、かつ

R^{13B} は、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ ハロアルキル、 $C_3 \sim C_8$ カルボシクリル、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアラルキルもしくはアラルキル、またはハロゲンであるか、または

(iv) R^{13A} および R^{13B} は一緒になって、 $C_2 \sim C_8$ アルキレンまたは $C_1 \sim C_8$ ヘテロアルキレンであり、

R^{14A} および R^{14B} は、次の (iii) または (iv) のいずれかであり：

(iii) R^{14A} は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ ハロアルキル、 $C_3 \sim C_8$ カルボシクリル、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアラルキル、またはアラルキルであり、かつ

R^{14B} は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ ハロアルキル、 $C_3 \sim C_8$ カルボシクリル、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアラルキル、またはアラルキルであるか、または

10

20

30

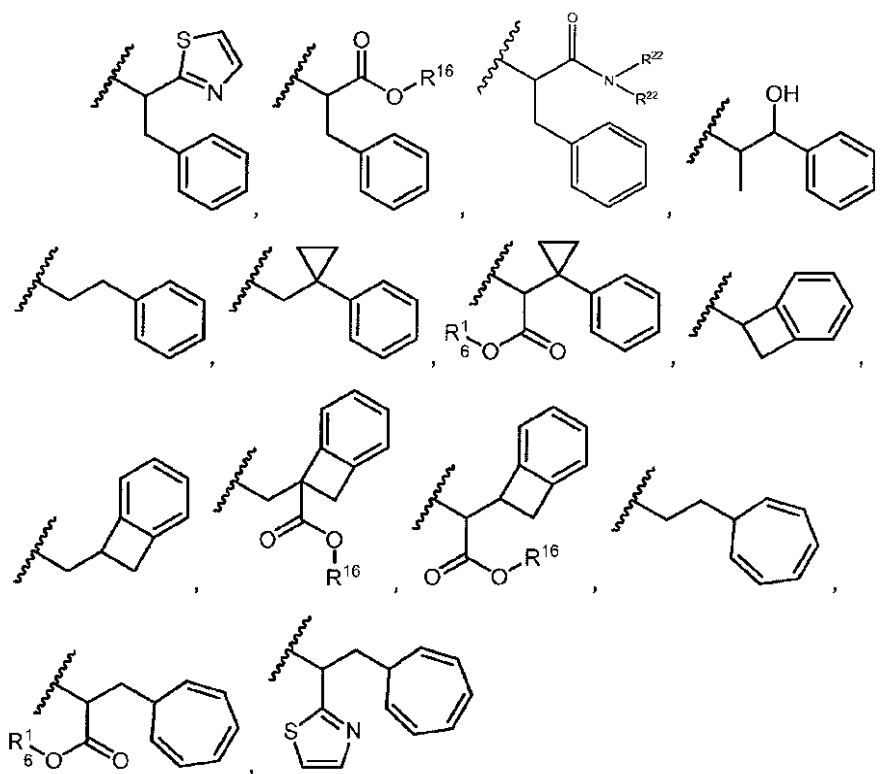
40

50

(iv) R^{14A} および R^{14B} は一緒になって、 $C_2 \sim C_8$ アルキレンまたは $C_1 \sim C_8$ ヘテロアルキレンであり、

R^{15} は、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル- $N(R')$ ₂、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル- $C(O)R'$ 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル- $C(O)OR'$ 、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)N(R')$ ₂、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-N(R')$ ₂、 $-CN$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-NHCONH_2$ 、 $-S(=O)_2R'$ および $-SR'$ (ここで、各 R' は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、および非置換のアリールからなる群から独立に選択されるか、または2個の R' は、それらが結合している窒素と一緒に、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリルを形成することができる) からなる群から独立に選択される1、2、3、4または5個の基で置換されているかまたは置換されていない

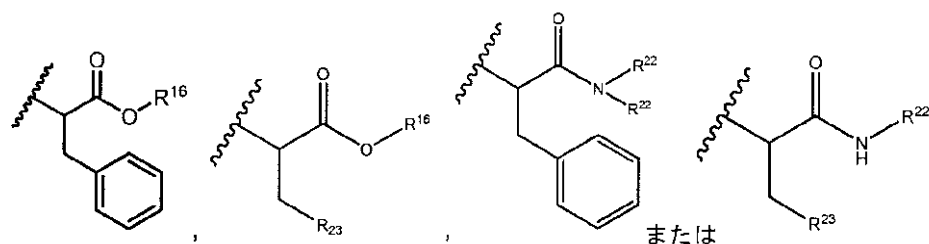
【化7】



、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリル、 $C_3 \sim C_8$ カルボシクリルおよび $C_6 \sim C_{14}$ アリールであるか、または

R^{15} は、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル- $N(R')$ ₂、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル- $C(O)R'$ 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル- $C(O)OR'$ 、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)N(R')$ ₂、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-N(R')$ ₂、 $-CN$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-NHCONH_2$ 、 $-S(=O)_2R'$ 、 $-SR'$ およびアリール- R' (ここで、各 R' は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ ヘテロシクリル、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン- $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリル、およびアリールからなる群から独立に選択されるか、または2個の R' は、それらが結合している窒素と一緒に、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリルを形成することができる) からなる群から独立に選択される1、2、3、4、または5個の基で置換されているかまたは置換されていない

【化 8】



であり、

R^{16} は、水素、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、または $-C_1 \sim C_8$ ハロアルキルであり、

R^{22} は、水素、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリル、または $C_6 \sim C_{14}$ アリールであり、

R^{23} は、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリルであり、

R^{17} は、出現する毎に、F、Cl、I、およびBrからなる群から独立に選択され、

R^{20} は、 $-$ アリール、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-$ アリールであり、アリールを含む R^{10} 上のアリールは、 $[R^{17}]_h$ で置換されており、

h は、5であり、

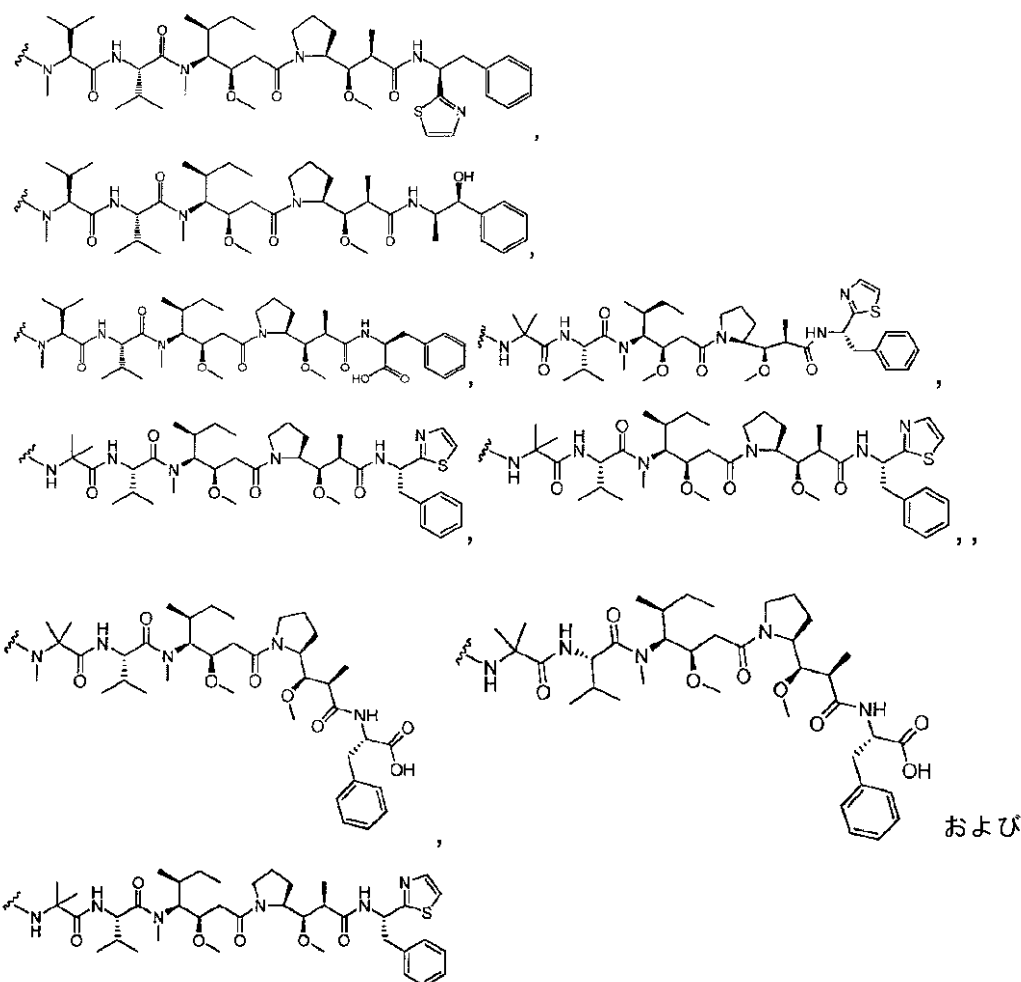
X は、OまたはSであるが、

ただし、 R^{13A} が水素である場合、 X はSであることを条件とし；

かつ、前記エフェクター部分が

下式

【化 9】



からなる群から選択される]

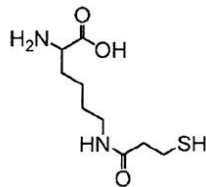
または薬学的に許容される塩、またはその溶媒和物を含む、請求項5から8のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項10】

請求項5に記載のポリペプチドであって、少なくとも1個のエフェクター部分が存在し、それがタンパク質またはペプチドであり、リンカーのX¹基が、タンパク質またはペプチド中のペプチド連結残基のアミノ末端、カルボキシル末端、または側鎖に共有結合されており、ペプチド連結残基が、K、R、C、T、Y、S、ジアミノ酪酸(Dap)、ジアミノプロピオン酸(Dab)、およびK_{S H}からなる群から選択される、

[ここでK_{S H}は

10



である]

ポリペプチド。

【請求項11】

請求項1から10のいずれか一項に記載のポリペプチドであって、抗体定常軽鎖(C_L)ドメインがカッパドメイン(C_Lκ)またはラムダドメイン(C_Lλ)であり、

20

C_Lκが、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号115、配列番号116、配列番号117、配列番号118、配列番号123、配列番号124、配列番号125、配列番号126、配列番号170、配列番号171、配列番号172、配列番号173、配列番号174、配列番号175、配列番号176、配列番号177、配列番号178、配列番号179、配列番号180、配列番号181、配列番号182、配列番号183、配列番号184、配列番号185、配列番号186、配列番号187、配列番号188、配列番号189、配列番号190、配列番号191、配列番号192、配列番号193、配列番号194、配列番号195、配列番号196、配列番号197、配列番号198、配列番号199、配列番号200、配列番号201、配列番号202、配列番号203、配列番号204、配列番号205、配列番号206、配列番号207、配列番号208、配列番号209、配列番号210、配列番号211、配列番号212、配列番号213、配列番号214、配列番号215、配列番号216、配列番号217、配列番号218、配列番号219、配列番号220、配列番号221、配列番号222、配列番号223、および配列番号224からなる群から選択される中間配列によって互いに連続接続されている、配列番号225によって定義されるN末端部分および配列番号226によって定義されるC末端部分を含むものであり、

30

C_Lλは、中間配列によって、配列番号234または配列番号235のいずれかによって定義されるC末端部分に互いに連続接続されている、配列番号227、配列番号228、配列番号229、配列番号230、配列番号231、配列番号232、または配列番号233のうちの1つによって定義されるN末端部分を含み、中間配列が、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号115、配列番号116、配列番号117、配列番号118、配列番号123、配列番号124、配列番号125、配列番号126、配列番号170、配列番号171、配列番号172、配列番号173、配列番号174、配列番号175、配列番号176、配列番号177、配列番号178、配列番号179、配列番号180、配列番号181、配列番号182、配列番号183、配列番号184、配列番号185、配列番号186、配列番号187、配列番号188、配列番号189、配列番号190、配列番号191、配列番号192、配列番号193、配列番号194、配列番号195、配列番号196、配列番号197、配列番号198、配列番号199、配列番号200、配列番号201、配列番号202、配

40

50

列番号 203、配列番号 204、配列番号 205、配列番号 206、配列番号 207、配列番号 208、配列番号 209、配列番号 210、配列番号 211、配列番号 212、配列番号 213、配列番号 214、配列番号 215、配列番号 216、配列番号 217、配列番号 218、配列番号 219、配列番号 220、配列番号 221、配列番号 222、配列番号 223、および配列番号 224 からなる群から選択されるものである、ポリペプチド。

【請求項 12】

配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 54、配列番号 60、配列番号 61、配列番号 77、配列番号 78、配列番号 94、配列番号 95、配列番号 96、配列番号 97、配列番号 104、配列番号 105、配列番号 106、配列番号 119、配列番号 120、配列番号 121、配列番号 122、配列番号 127、配列番号 128、配列番号 129、配列番号 134、配列番号 135、配列番号 140、配列番号 141、配列番号 142、配列番号 143、配列番号 144、配列番号 148、配列番号 149、配列番号 150、配列番号 151、配列番号 156、配列番号 158、配列番号 159、配列番号 160、配列番号 161、配列番号 163、配列番号 165、配列番号 167、配列番号 168、配列番号 169、配列番号 236、配列番号 237、配列番号 238、配列番号 239、配列番号 240、配列番号 241、および配列番号 254 からなる群から選択される配列を含む、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の ポリペプチド。

10

20

【請求項 13】

組成物または試料中のリンカーのうちの少なくとも 70% が、配列番号 6 の残基 80 に対応する位置に位置する K の側鎖の ϵ -アミノ基にコンジュゲートされている、請求項 5 から 12 のいずれか一項に記載の ポリペプチド を含む組成物。

【請求項 14】

ポリペプチドのうちの少なくとも 70% が、配列番号 6 の残基 80 に対応する位置に位置する K の側鎖の ϵ -アミノ基に共有結合されているリンカーを含む、請求項 5 から 12 のいずれか一項に記載の複数種の ポリペプチド を含む組成物。

【請求項 15】

請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の ポリペプチド を含む抗体またはその抗原結合部分であって、抗体が、全長抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、V_H、二重特異性抗体、またはミニボディである、抗体またはその抗原結合部分。

30

【請求項 16】

抗体が、h38C2、リツキシマブ、セツキシマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、ラニビズマブ、トラスツマブ、およびパリビズマブからなる群から選択される抗体からの V_H および V_L ドメインを含む、請求項 15 に記載の抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 17】

請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の ポリペプチド、請求項 13 もしくは請求項 14 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 15 もしくは請求項 16 のいずれか一項に記載の抗体を含み、かつ許容できる担体をさらに含む医薬組成物。

40

【請求項 18】

請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の ポリペプチド または請求項 15 もしくは請求項 16 のいずれか一項に記載の抗体をコードする核酸。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の核酸を含むベクター。

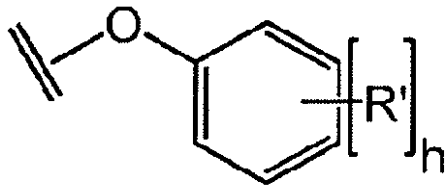
【請求項 21】

請求項 5 から 12 のいずれか一項に記載の ポリペプチド を含む多機能性抗体コンジュゲ

50

ート（MAC）、または請求項 13 もしくは請求項 14 に記載の組成物を調製する方法であって、リンカーを、下式：

【化 10】



〔式中、R¹はFまたはClであり、h = 2、3、4または5である〕の脱離基Z*に共有結合させるステップと、このリンカー-Z*基を前記抗体またはその抗原結合部分と反応させるステップとを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

【背景技術】

【0002】

二機能性治療薬の開発は、併用療法戦略を増強させる大きな将来性を有している。二機能性治療薬は、1つの治療実体で2つの異なる経路をモジュレートすることによって、併用療法の有益性をもたらし得る。加えて、二機能性治療薬は、各経路間の相乗作用による有益性も有し、一機能性薬剤と比較して増大した活性を実証し得る。さらに、二機能性治療薬は、製造、貯蔵、および輸送コストの低減、さらには、患者に施される治療の回数の低減、ならびに投与計画の簡略化の点においても有益性をもたらし得る。

【0003】

本明細書におけるいずれの技術についての言及も、その言及されている技術が、共通する一般的知識の一部を成しているという何らかの形式または示唆を承認するものではなく、かつそのようにみなされるべきものでもない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、抗体定常ドメインを配列番号6の配列とアラインさせた場合に、残基KおよびHを、配列番号6の80および81位に対応する位置に含む抗体定常ドメインを含むポリペプチドにおいて、抗体定常ドメインが、A、G、I、V、L、R、S、T、Q、P、N、M、H、Wからなる群から選択される残基を、配列番号6の77位に対応する位置にさらに含むことを特徴とするポリペプチドを提供する。

【0006】

一部の態様では、本発明は、配列番号98（および配列番号98の範囲内に該当する本明細書に記載のすべての配列）を含む抗体定常ドメインであって、その定常ドメイン配列を配列番号6とアラインさせた場合に、前記定常ドメインにおける配列番号98の位置は、配列番号6の残基76～81に対応する、抗体定常ドメインを提供する。

【0007】

2種のポリペプチドの構造が既知である場合には構造的アラインメントによって、または配列アラインメントによって、配列をアラインさせることができるが、配列アラインメントを使用する場合には、その構造が既知である相同なポリペプチドの構造的知識を使用して、その方法を好ましくは補強する。

【0008】

本発明は、K a b a tナンバリングによる残基K 1 8 8およびH 1 8 1を含む抗体定常軽鎖ドメインを含むポリペプチドにおいて、抗体定常ドメインが、K a b a tナンバリングによる1 8 5位に対応する位置にA、G、I、V、L、R、S、T、Q、P、N、M、H、Wからなる群から選択される残基をさらに含むことを特徴とする、ポリペプチドを提供する。

【0009】

本発明は、接続アミノ酸の鎖によって互いに順次接続されている7つのβストランドA、B、C、D、E、F、およびGを含む免疫グロブリンドメインを含むポリペプチドであって、βストランドが、βストランドA、B、D、およびEを含む第1のβシートと、βストランドC、F、およびGを含む第2のβシートとを形成するように配置されており、前記第1および第2のβシートは互いに共有結合されており；βストランドEおよびFが、EF鎖によって互いに接続されており、前記EF鎖が、配列 $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - K^5 - H^6$ （配列番号98）を含み、ここで、 X^1 、 X^3 、および X^4 はそれぞれ独立に、任意のアミノ酸残基である、ポリペプチドにおいて、 X^2 がA、G、I、V、L、R、S、T、Q、P、N、M、H、Wからなる群から選択されることを特徴とするポリペプチド、ならびに薬学的に許容できるその塩、立体異性体、互変異性体、溶媒和物、およびプロドラッグを提供する。

【0010】

X^2 は、A、G、I、L、R、S、T、P、N、およびMからなる群から選択され得る（配列番号99）。 X^2 は、A、G、I、L、S、T、P、およびMからなる群から選択され得る（配列番号100）。一部の態様では、EF鎖が配列番号101、配列番号102、および配列番号103の配列からなる群から選択される配列を含む。 X^2 は、A、G、I、V、L、R、S、T、Q、N、P、およびMからなる群から選択され得る（配列番号123）。 X^2 は、A、G、I、V、L、R、S、T、P、およびMからなる群から選択され得る（配列番号124）。 X^2 は、A、G、I、V、L、S、T、およびMからなる群から選択され得る（配列番号125）。 X^2 は、A、G、I、L、S、T、およびMからなる群から選択され得る（配列番号126）。 X^2 は、SまたはTであってよい。 X^2 は、AまたはGであってよい。 X^2 は、IまたはLであってよい。本明細書に記載の X^2 の選択は、本発明の抗体定常ドメインにも適用することができ、 X^2 位は、配列番号6の残基77か、またはK a b a tナンバリングによる定常軽鎖ドメインの残基185と一致する。

【0011】

一部の態様では、EF鎖は、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号115、配列番号116、配列番号117、配列番号123、配列番号124、配列番号125、および配列番号126からなる群から選択される配列を含み、さらに、配列番号170、配列番号171、配列番号172、配列番号173、配列番号174、配列番号175、配列番号176、配列番号177、配列番号178、配列番号179、配列番号180、配列番号181、配列番号182、配列番号183、配列番号184、配列番号185、配列番号186、配列番号187、配列番号188、配列番号189、配列番号190、配列番号191、配列番号192、配列番号193、配列番号194、配列番号195、配列番号196、配列番号197、配列番号198、配列番号199、配列番号200、配列番号201、配列番号202、配列番号203、配列番号204、配列番号205、配列番号206、配列番号207、配列番号208、配列番号209、配列番号210、配列番号211、配列番号212、配列番号213、配列番号214、配列番号215、配列番号216、配列番号217、配列番号218、配列番号219、配列番号220、配列番号221、配列番号222、配列番号223、および配列番号224からなる群から選択することができる。

【0012】

一部の態様では、配列番号10；または配列番号6の残基75～79と比較した場合に、単一の残基の相違が存在してよい。一部の態様では、配列番号10；または配列番号6

10

20

30

40

50

の残基 75～79 と比較した場合に、2 つまでの相違が存在してよい。一部の態様では、配列番号 10；または配列番号 6 の残基 75～79 と比較した場合に、3 つまでの相違が存在してよい。一部の態様では、配列番号 10；または配列番号 6 の残基 75～79 と比較した場合に、4 つまでの相違が存在してよい。一部の態様では、配列番号 10；または配列番号 6 の残基 75～79 と比較した場合に、2 つまでの非連続的な相違が存在してよい。一部の態様では、配列番号 10；または配列番号 6 の残基 75～79 と比較した場合に、3 つまでの非連続的な相違が存在してよい。

【0013】

一部の態様では、配列番号 10；または配列番号 6 の残基 76～79 と比較した場合に、単一の残基の相違が存在してよい。一部の態様では、配列番号 10；または配列番号 6 の残基 76～79 と比較した場合に、2 つまでの相違が存在してよい。一部の態様では、配列番号 10；または配列番号 6 の残基 76～79 と比較した場合に、3 つまでの相違が存在してよい。一部の態様では、配列番号 10；または配列番号 6 の残基 76～79 と比較した場合に、4 つまでの相違が存在してよい。一部の態様では、配列番号 10；または配列番号 6 の残基 76～79 と比較した場合に、2 つまでの非連続的な相違が存在してよい。

【0014】

当該ポリペプチドは、EF 鎖上に位置する EF α ヘリックスを含み得る。一部の態様では、配列番号 98 の残基 X^1 、 X^2 、 X^3 、および X^4 のうちの 1 個または複数は、EF α ヘリックスの一部を構成している。一部の態様では、配列番号 98 の残基 X^1 、 X^2 、 X^3 、および X^4 のうちの 2 個以上は、EF α ヘリックスの一部を構成している。一部の態様では、配列番号 98 の残基 X^1 、 X^2 、 X^3 、および X^4 のうちの 3 個以上は、EF α ヘリックスの一部を構成している。一部の態様では、配列番号 98 の残基 X^1 、 X^2 、 X^3 、および X^4 のすべてが、EF α ヘリックスの一部を構成している。一部の態様では、配列番号 98 の残基 K^5 および H^6 は、 α ヘリックスの一部を形成していない。本明細書に記載の X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 K^5 、および H^6 の選択は、本発明の抗体定常ドメインにも適用することができ、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 K^5 、および H^6 位は、配列番号 6 の残基 76、77、78、79、80、および 81、または Kabat ナンバリングによる定常軽鎖ドメインの 184、185、186、187、188、および 189 位に一致する。

【0015】

一部の態様では、EF 鎖は、配列番号 99、配列番号 100、配列番号 101、配列番号 102、配列番号 103、配列番号 115、配列番号 116、配列番号 117、配列番号 118、配列番号 123、配列番号 124、配列番号 125、配列番号 126、配列番号 170、配列番号 171、配列番号 172、配列番号 173、配列番号 174、配列番号 175、配列番号 176、配列番号 177、配列番号 178、配列番号 179、配列番号 180、配列番号 181、配列番号 182、配列番号 183、配列番号 184、配列番号 185、配列番号 186、配列番号 187、配列番号 188、配列番号 189、配列番号 190、配列番号 191、配列番号 192、配列番号 193、配列番号 194、配列番号 195、配列番号 196、配列番号 197、配列番号 198、配列番号 199、配列番号 200、配列番号 201、配列番号 202、配列番号 203、配列番号 204、配列番号 205、配列番号 206、配列番号 207、配列番号 208、配列番号 209、配列番号 210、配列番号 211、配列番号 212、配列番号 213、配列番号 214、配列番号 215、配列番号 216、配列番号 217、配列番号 218、配列番号 219、配列番号 220、配列番号 221、配列番号 222、配列番号 223、および配列番号 224 からなる群から選択される配列を含む。

【0016】

本発明の一部の態様では、特に、 X^1 に対応する残基に変異性を伴う本出願中のすべての配列に関して、上記の配列による X^1 は、A、I、V、L、G、P、F、W、Y、S、T、C、M、N、Q、K、R、H、E、および D からなる群から選択され得る。一部の態

10

20

30

40

50

様では、 X^1 は、A、I、V、L、G、F、W、Y、S、T、C、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。一部の態様では、 X^1 は、A、I、V、L、F、W、Y、S、T、C、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。一部の態様では、 X^1 は、A、I、V、L、F、W、Y、S、T、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。一部の態様では、 X^1 は、A、I、V、L、S、T、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。一部の態様では、 X^1 は、A、I、V、L、S、T、M、N、Q、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^1 は、A、I、V、L、S、T、M、N、Q、E、およびDからなる群から選択され得る。本明細書に記載の X^1 の選択は、本発明の抗体定常ドメインにも適用することができ、 X^1 位は、配列番号6の残基76、またはK a b a tナンバリングによる定常軽鎖ドメインの残基184と一致する。

10

【0017】

本発明の一部の態様では、特に、 X^3 に対応する残基に変異性を伴う本出願中のすべての配列に関して、上記の配列による X^3 は、A、I、V、L、G、P、F、W、Y、S、T、C、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^3 は、A、I、V、L、G、F、W、Y、S、T、C、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^3 は、A、I、V、L、F、W、Y、S、T、C、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^3 は、A、I、V、L、F、W、Y、S、T、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^3 は、I、L、F、W、Y、S、T、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^3 は、I、L、F、W、Y、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^3 は、I、L、F、W、Y、N、Q、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^3 は、I、L、F、W、およびYからなる群から選択され得る。 X^3 は、F、W、およびYからなる群から選択され得る。 X^3 は、WおよびYからなる群から選択され得る。本明細書に記載の X^3 の選択は、本発明の抗体定常ドメインにも適用することができ、その際、 X^3 位は、配列番号6の残基78、またはK a b a tナンバリングによる定常軽鎖ドメインの残基186と一致する。

20

【0018】

本発明の一部の態様では、特に、 X^4 に対応する残基に変異性を伴う本出願中のすべての配列に関して、上記の配列による X^4 は、A、I、V、L、G、P、F、W、Y、S、T、C、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^4 は、A、I、V、L、G、P、F、W、Y、S、T、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^4 は、A、I、V、L、G、F、W、Y、S、T、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^4 は、A、I、V、L、F、W、Y、S、T、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^4 は、A、I、V、L、G、S、T、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^4 は、A、I、V、L、S、T、M、N、Q、K、R、H、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^4 は、I、L、S、T、M、N、Q、K、R、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^4 は、S、T、M、N、Q、K、R、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^4 は、S、T、N、Q、K、R、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^4 は、N、Q、K、R、E、およびDからなる群から選択され得る。 X^4 は、N、Q、K、R、およびEからなる群から選択され得る。 X^4 は、Q、K、およびEからなる群から選択され得る。本明細書に記載の X^4 の選択は、本発明の抗体定常ドメインにも適用することができ、その際、 X^4 位は、配列番号6の残基79、またはK a b a tナンバリングによる定常軽鎖ドメインの残基187と一致する。

30

40

【0019】

一部の態様では、EF鎖は、6～12残基長さである。一部の態様では、EF鎖は、7～12残基長さである。一部の態様では、EF鎖は、8～12残基長さである。一部の態様では、EF鎖は、9～12残基長さである。一部の態様では、EF鎖は、6～11残基

50

長さである。一部の態様では、E F鎖は、6～10残基長さである。一部の態様では、E F鎖は、6～9残基長さである。一部の態様では、E F鎖は、7～11残基長さである。一部の態様では、E F鎖は、7～10残基長さである。一部の態様では、E F鎖は、8～10残基長さである。

【0020】

E F鎖は、 α ヘリックス（E F α ヘリックス）を含み得る。E F α ヘリックスの第1の残基は、E F鎖の最初の3個の残基内に位置し得る。E F α ヘリックスの第1の残基は、E F鎖の最初の2個の残基内に位置し得る。E F α ヘリックスの第1の残基は、E F鎖の残基に位置し得る。E F α ヘリックスは、配列番号98または配列番号98の範囲内に該当する本明細書に記載の対応する配列のうちの1つの少なくとも残基X¹およびX²を含み得る。一部の態様では、配列番号98に対応する残基K⁵およびH⁶は、 α ヘリックスの範囲内にはない。一部の態様では、配列番号6の80および81位に対応する残基KHは、 α ヘリックスの範囲内にはない。抗体定常ドメインに関する本発明の一部の態様では、配列番号6の77位に対応する残基は、 α ヘリックスの範囲内に該当する。

【0021】

一部の態様では、C Lドメインであってよい本発明の免疫グロブリンドメインは、残基D、E、Q、またはNを、 β ストランドCとDとの間の接続鎖であるC D鎖上にさらに含む。一部の態様では、C Lドメインは、残基D、E、Q、またはNをC D鎖上にさらに含む、この残基は、そのアミノ酸側鎖が、配列番号98のK⁵またはH⁶の側鎖のうちの少なくとも1個と相互作用することが可能であるようにポジショニングされている。一部の態様では、当該ポリペプチドは、一部の態様ではB L A S T配列アラインメントによる配列番号10または配列番号6の43位に対応する位置に位置しているD、E、Q、またはN残基を含む。一部の態様では、残基は、D、E、またはNである。一部の態様では、残基は、DまたはEである。一部の態様では、残基は、DまたはNである。

【0022】

一部の態様では、 β ストランドCおよびDは、C DモチーフC¹—C²—C³—C⁴を含むC D鎖（配列番号255）によって互いに接続されており、ここで、C¹、C²、C³、およびC⁴はそれぞれ、任意のアミノ酸であってよいか、または、下記で明示するとおりにさらに規定され得る。このC Dモチーフは、配列番号245、配列番号246、配列番号247、配列番号248、配列番号249、配列番号250、配列番号251、配列番号252、および配列番号253からなる群から選択され得、ここで、前記C Dモチーフは、前記C D鎖の第1または第2の残基から始まる。一部の態様では、このC Dモチーフは、C D鎖の第1の残基から始まる。一部の態様では、このC Dモチーフは、C D鎖の第2の残基から始まる。有利には、このC Dモチーフは、 α ヘリックスの一部を形成し得ない。

【0023】

一部の態様では、C Dモチーフの残基C¹は、A、I、L、G、V、M、P、S、T、F、Y、W、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、C Dモチーフの残基C¹は、I、L、V、M、P、F、Y、およびWからなる群から選択され得る。一部の態様では、C Dモチーフの残基C¹は、I、L、V、P、F、Y、およびWからなる群から選択され得る。一部の態様では、C Dモチーフの残基C¹は、I、L、V、P、F、およびWからなる群から選択され得る。一部の態様では、C Dモチーフの残基C¹は、I、L、V、F、およびWからなる群から選択され得る。一部の態様では、C Dモチーフの残基C¹は、I、L、およびVからなる群から選択され得る。一部の態様では、C Dモチーフの残基C¹は、LおよびVからなる群から選択され得る。一部の態様では、このC Dモチーフの残基C¹はVであってよい。本明細書に記載のC DモチーフのC¹の選択は、本発明の抗体定常ドメインに適用することもでき、このC DモチーフのC¹位は、配列番号6の残基42、またはK a b a tナンバリングによる定常軽鎖ドメインの残基150と一致する。

【0024】

一部の態様では、CDモチーフの残基C²は、A、I、L、G、V、M、P、S、T、F、Y、W、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C²は、A、I、L、G、V、M、P、S、T、F、Y、W、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C²は、A、I、L、G、V、M、P、S、T、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C²は、A、I、L、V、M、P、S、T、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C²は、M、P、S、T、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C²は、S、T、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C²は、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、このCDモチーフの残基C²はDであってよい。本明細書に記載のCDモチーフのC²の選択は、本発明の抗体定常ドメインに適用することもでき、その際、このCDモチーフのC²位は、配列番号6の残基43、またはKabatナンバリングによる定常軽鎖ドメインの残基151と一致する。

10

【0025】

一部の態様では、CDモチーフの残基C³は、A、I、L、G、V、M、P、S、T、F、Y、W、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C³は、A、I、L、G、V、M、P、S、T、F、Y、W、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C³は、A、I、L、G、V、M、P、S、T、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C³は、A、I、L、V、M、P、S、T、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C³は、M、P、S、T、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C³は、S、T、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C³は、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、このCDモチーフの残基C³はNであってよい。本明細書に記載のCDモチーフのC³の選択は、本発明の抗体定常ドメインに適用することもでき、その際、このCDモチーフのC³位は、配列番号6の残基44、またはKabatナンバリングによる定常軽鎖ドメインの残基152と一致する。

20

【0026】

一部の態様では、CDモチーフの残基C⁴は、A、I、L、G、V、M、P、S、T、F、Y、W、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C⁴は、A、I、L、G、V、M、P、S、T、F、Y、W、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C⁴は、A、I、L、G、V、M、P、S、T、N、Q、D、E、K、R、およびHからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C⁴は、A、I、L、V、G、M、P、S、T、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C⁴は、A、I、L、V、G、S、T、N、Q、D、およびEからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C⁴は、A、V、Q、およびSからなる群から選択され得る。一部の態様では、CDモチーフの残基C⁴は、AおよびSからなる群から選択され得る。一部の態様では、このCDモチーフの残基C⁴はAであってよい。本明細書に記載のCDモチーフのC⁴の選択は、本発明の抗体定常ドメインに適用することもでき、その際、このCDモチーフのC⁴位は、配列番号6の残基45、またはKabatナンバリングによる定常軽鎖ドメインの残基153と一致する。

30

40

【0027】

一部の態様では、CD鎖は、6～12残基長さである。一部の態様では、CD鎖は、7～12残基長さである。一部の態様では、CD鎖は、8～12残基長さである。一部の態様では、CD鎖は、9～12残基長さである。一部の態様では、CD鎖は、6～11残基長さである。一部の態様では、CD鎖は、6～10残基長さである。一部の態様では、CD鎖は、6～9残基長さである。一部の態様では、CD鎖は、7～11残基長さである。

50

一部の態様では、C D鎖は、7～10残基長さである。一部の態様では、C D鎖は、8～10残基長さである。

【0028】

免疫グロブリンドメインは、抗体ドメインであってよい。この抗体ドメインは、抗体定常ドメインであってよい。この抗体定常ドメインは、定常重鎖（CH）ドメインまたは定常軽鎖（CL）ドメインであってよい。抗体CHドメインは、CH α 1、CH α 2、CH α 3、CH δ 1、CH δ 2、CH δ 3、CH ϵ 1、CH ϵ 2、CH ϵ 3、CH ϵ 4、CH γ 1、CH γ 2、CH γ 3、CH μ 1、CH μ 2、CH μ 3、およびCH μ 4からなる群から選択され得る。

【0029】

一部の態様では、本発明の免疫グロブリンドメインは、哺乳類のものである（任意の人工的に変異させたか、または別段に操作したバージョンを発生させるために使用した方法には関係なく）。哺乳類種は、ヒト、マウス、ウサギ、ラット、げっ歯類、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ロバ、ウマ、ラクダ、霊長類、サル、イヌ、またはネコであってよい。本発明の免疫グロブリンドメインおよび、それらを含むか、またはそれらに結合する抗体などの他のタンパク質は、ヒト化されていてよい。

【0030】

一部の態様では、本発明は、変異免疫グロブリンドメインを含み、ここで、変異体は、その天然の正準配列以外の配列へと操作または改変されている配列と定義されるので、本発明のポリペプチドの一定の実施形態は、定義の範囲内に該当する天然に生じる配列を特に除外することとなる。したがって一部の態様では、本発明は、それらの天然に生じる対応する配列とは異なるE F鎖を含む本発明のポリペプチドに関する。

【0031】

本発明の抗体ドメインは、ボルネオオランウータンおよびボルネオオランウータン（*Pongo pygmaeus*）からなる群から選択される1種または複数の種に由来する1つまたは複数の天然IgA定常重鎖ドメイン（CH α 1、CH α 2、CH α 3）を、かつ／またはマウス、ラット、ウマ、ウマ（*Equus caballus*）、ハダカデバネズミ（*Heterocephalus glaber*）、コウモリ、エプテシカスフスカ（*Eptesicus fuscus*）からなる群から選択される1種または複数の種に由来する1つまたは複数の天然IgM定常重鎖ドメイン（CH μ 1、CH μ 2、CH μ 3、およびCH μ 4）を、かつ／またはヒト、チンパンジー、サル、パタスモンキー（*Erythrocebus patas*）、マウス、ラット、コウモリ、シノプテルススフィンクス（*Cynopterus sphinx*）、ヒツジ、ヒツジ（*Ovis aries*）、ハリモグラ、およびハリモグラ（*Tachyglossus aculeatus*）からなる群から選択される1種または複数の種に由来する1つまたは複数の天然IgE定常重鎖ドメイン（CH ϵ 1、CH ϵ 2、CH ϵ 3、およびCH ϵ 4）を特に除外し得る。

【0032】

一部の態様では、ヒト、マウス、ウサギ、ラット、げっ歯類、ブタ、雌ウシ、ヒツジ、ヤギ、ロバ、ウマ、ラクダ、霊長類、サル、イヌ、またはネコからなる群から選択される1種または複数の種に由来するCH α 1、CH α 2、CH α 3、CH δ 1、CH δ 2、CH δ 3、CH ϵ 1、CH ϵ 2、CH ϵ 3、CH ϵ 4、CH γ 1、CH γ 2、CH γ 3、CH μ 1、CH μ 2、CH μ 3、およびCH μ 4からなる群から選択される1つまたは複数の定常重鎖ドメインを特に除外する。

【0033】

一部の態様では、本発明は、アミノ酸の鎖によって互いに順次接続されている7つの β ストランドA、B、C、D、E、F、およびGを含む定常軽鎖（CL）ドメインであって、 β ストランドが、 β ストランドA、B、D、およびEを含む第1の β シートと、 β ストランドC、F、およびGを含む第2の β シートとを形成するように配置されており、前記第1および第2の β シートは互いに共有結合されており； β ストランドEとFとの間の鎖

10

20

30

40

50

が、配列 $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - K^5 - H^6$ (配列番号 98) を含み、ここで、 X^1 、 X^3 、および X^4 はそれぞれ独立に、任意のアミノ酸残基である、ポリペプチドにおいて、 X^2 が A、G、I、V、L、R、S、T、Q、P、N、M、H、および W からなる群から選択されることを特徴とする定常軽鎖 (CL) ドメインであってよい免疫グロブリンドメイン、ならびに薬学的に許容できるその塩、立体異性体、互変異性体、溶媒和物、およびプロドラッグを提供する。本発明は、本発明の CL ドメインを含む医薬組成物および試料も提供する。一部の態様では、 α ヘリックスを、 β ストランド E と F との間の接続鎖上に連続して位置させる。

【0034】

一部では、本発明の態様は、定常軽鎖 (CL) ドメインであってよい免疫グロブリンドメインの EF 鎖上に位置している反応性 KH 基への部位特異的コンジュゲーションが、D または E などの酸性残基の存在を削除し、芳香族残基 F もしくは Y、または K もしくは C などの他の潜在的なコンジュゲーション部位の導入を回避する 3 アミノ酸残基上流での変異によって改善されるという意外な発見に基づく。

【0035】

EF 鎖上に本発明の配列をグラフトすることで、免疫グロブリンドメイン、特に、CL ドメイン上へのコンジュゲーションの特異性の増大を付与することができる。これは、リンカーおよび／またはエフェクター部分を免疫グロブリンドメインおよび一般に CL ドメインに、かつ特にその抗体および抗原結合部分にコンジュゲートさせる場合に有用であり得る。したがって一部の態様では、本発明は、リンカーに、かつ／またはリンカーを介してエフェクター部分に共有結合的にコンジュゲートされている抗体またはその抗原結合部分を含む多機能性抗体コンジュゲート (MAC) の新規のクラスにおいて、抗体またはその抗原結合部分が本発明のポリペプチドを含み、リンカーが、配列番号 98 の K^5 の側鎖の ϵ -アミノ基に共有結合されていることを特徴とする多機能性抗体コンジュゲートの新規のクラスに関する。

【0036】

一部の態様では、CL ドメインであってよい本発明の免疫グロブリンドメインは、可変軽鎖 (VL) ドメインに接続されている。これらは一緒に、抗体軽鎖を構成し得る。

【0037】

一部の態様では、第 1 および第 2 の β シートの間の共有結合はジスルフィド結合である。一部の態様では、 β ストランド B と F との間は、ジスルフィド結合である。

【0038】

CL ドメインは、定常軽鎖カッパ (CL κ) であってよく、ラット、マウス、サル、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ブタ、ウマ、ロバ、イヌ、ネコ、またはヒトのものであってよい。一部の態様では、CL κ は、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 54、配列番号 104、配列番号 105、配列番号 106、配列番号 119、配列番号 120、配列番号 121、および配列番号 122 からなる群から選択される配列を含む。

【0039】

一部の態様では、CL κ は、配列番号 99、配列番号 100、配列番号 101、配列番号 102、配列番号 103、配列番号 115、配列番号 116、配列番号 117、配列番号 118、配列番号 123、配列番号 124、配列番号 125、配列番号 126、配列番号 170、配列番号 171、配列番号 172、配列番号 173、配列番号 174、配列番号 175、配列番号 176、配列番号 177、配列番号 178、配列番号 179、配列番号 180、配列番号 181、配列番号 182、配列番号 183、配列番号 184、配列番号 185、配列番号 186、配列番号 187、配列番号 188、配列番号 189、配列番号 190、配列番号 191、配列番号 192、配列番号 193、配列番号 194、配列番号 195、配列番号 196、配列番号 197、配列番号 198、配列番号 199、配列番号 200、配列番号 201、配列番号 202、配列番号 203、配列番号 204、配列番

10

20

30

40

50

号205、配列番号206、配列番号207、配列番号208、配列番号209、配列番号210、配列番号211、配列番号212、配列番号213、配列番号214、配列番号215、配列番号216、配列番号217、配列番号218、配列番号219、配列番号220、配列番号221、配列番号222、配列番号223、および配列番号224からなる群から選択される中間配列によって互いに連続接続されている配列番号225によって定義されるN末端部分および配列番号226によって定義されるC末端部分を含む。

【0040】

免疫グロブリンドメインは、CLλドメインであってよく、配列番号60、配列番号61、配列番号141、配列番号144、配列番号143、配列番号236、配列番号237、配列番号238、配列番号239、配列番号240、配列番号241、配列番号242、配列番号243、および配列番号244からなる群から選択される配列を含んでよい。一部の態様では、CLλドメインは、配列番号60、配列番号61、配列番号143、配列番号236、配列番号237、配列番号238、配列番号239、配列番号240、配列番号241、配列番号242、配列番号243、および配列番号244からなる群から選択される配列を含む。

【0041】

CLλは、中間配列によって配列番号234または配列番号235のいずれかによって定義されるC末端部分に互いに連続接続されている配列番号227、配列番号228、配列番号229、配列番号230、配列番号231、配列番号232、または配列番号233の1つによって定義されるN末端部分を含んでよく、ここで、この中間配列は、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号115、配列番号116、配列番号117、配列番号118、配列番号123、配列番号124、配列番号125、配列番号126、配列番号170、配列番号171、配列番号172、配列番号173、配列番号174、配列番号175、配列番号176、配列番号177、配列番号178、配列番号179、配列番号180、配列番号181、配列番号182、配列番号183、配列番号184、配列番号185、配列番号186、配列番号187、配列番号188、配列番号189、配列番号190、配列番号191、配列番号192、配列番号193、配列番号194、配列番号195、配列番号196、配列番号197、配列番号198、配列番号199、配列番号200、配列番号201、配列番号202、配列番号203、配列番号204、配列番号205、配列番号206、配列番号207、配列番号208、配列番号209、配列番号210、配列番号211、配列番号212、配列番号213、配列番号214、配列番号215、配列番号216、配列番号217、配列番号218、配列番号219、配列番号220、配列番号221、配列番号222、配列番号223、および配列番号224からなる群から選択される。

【0042】

免疫グロブリンドメインがCLλドメインを含む一部の実施形態では、このドメインは、本明細書に記載のとおりCDモチーフをさらに含んでよい。

【0043】

免疫グロブリンドメインがCHγ1ドメインを含む一部の実施形態では、このドメインは、本明細書に記載のとおりCDモチーフをさらに含んでよい。

【0044】

免疫グロブリンドメインがCHγ2ドメインを含む一部の実施形態では、このドメインは、本明細書に記載のとおりCDモチーフをさらに含んでよい。

【0045】

免疫グロブリンドメインがCHγ3ドメインを含む一部の実施形態では、EF鎖の残基X²は、Rではあり得ない；一部の態様では、EF鎖配列は、配列番号100、配列番号103、配列番号117、配列番号125、配列番号203、配列番号204、配列番号205、配列番号206、配列番号207、配列番号208、配列番号209、配列番号210、配列番号211、配列番号212、配列番号213、配列番号214、配列番号215、配列番号216、配列番号217、配列番号218、配列番号219、配列番号

220、配列番号221、配列番号222、配列番号223、および配列番号224からなる群から選択され得る。一部の態様では、本発明のCH γ 3ドメインのCD鎖は、本明細書に記載のとりのCDモチーフをさらに含んでよい。

【0046】

エフェクター部分にコンジュゲートさせるために適したリンカーにコンジュゲートさせる場合、配列番号98のK⁵の側鎖の ϵ -アミノ基は、リンカーに共有結合されていてよい。

【0047】

一部では、本発明は、CL κ -D⁷⁷をA、G、I、V、L、R、S、T、Q、P、N、M、H、またはWの1つに変異させると、CL κ -K⁸⁰へのコンジュゲーションの特異性の程度が有意に増大するという意外な発見に基づく。

【0048】

抗体のFc部分とFc受容体(Fc γ RおよびFcRnなど)との結合、または抗体とその個々の標的との結合に伴うあらゆる干渉を最小化または防止するために、エフェクター部分と抗体の定常軽鎖ドメインとの反応は特に望ましい。逆に、個々のエフェクター部分が、抗体のFc部分にコンジュゲーションすると、*in vivo*における抗体半減期および/または免疫系と相互作用するその能力(エフェクター機能)が低下し得る。抗体の可変重鎖(VH)または可変軽鎖(VL)領域におけるエフェクター部分のコンジュゲーションは、抗体とその同族との結合を減少させるリスクを有する。

【0049】

CL κ または定常軽鎖ラムダ(CL λ)ドメインにエフェクター部分を優先的にコンジュゲートさせることで、抗体へのエフェクター部分のコンジュゲーション部位に影響を及ぼすことなく、抗体の定常重鎖(CH)ドメインのアイソタイプスイッチを可能にすることによって、MACアイソタイプの作成が簡単になる。

【0050】

リンカーおよび/またはエフェクター部分は、CL κ -K⁸⁰の側鎖に共有結合され得る(例えば、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号119、配列番号120、配列番号121、および配列番号122からなる群から選択される配列)。このCLは、パラトープ領域、FcRn結合ドメイン、ヒンジ、FcR結合ドメインなど、その一部を形成しているであろう典型的な抗体の重要な領域からは離れて位置している;このことによって、MACがエフェクター部分にコンジュゲートされている場合に、これらの部位における優先的な連結が、抗体-抗原相互作用への干渉量を限定するという利点をもたらされる。

【0051】

一部の態様では、CL κ 領域は、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、または配列番号109、配列番号119、配列番号120、配列番号121、または配列番号122の少なくとも残基62~103を含む。一部の態様では、CL κ -x⁸²は、任意のアミノ酸であってよい。一部の態様では、CL κ -x⁸²は、K、R、G、A、V、L、I、S、T、C、M、N、Q、D、E、H、F、W、およびYからなる群から選択され得る。一部の態様では、CL κ -x⁸²は、G、A、V、L、またはIであってよい。一部の態様では、CL κ -x⁸²は、K、R、N、またはQであってよい。一部の態様では、CL κ -x⁸²は、DまたはEであってよい。一部の態様では、CL κ -x⁸²は、K、R、G、A、V、L、I、N、またはQであってよい。一部の態様では、CL κ -x⁸²は、DまたはEであってよい。一部の態様では、CL κ -x⁸²は、K、R、G、A、V、L、I、N、Q、D、またはEであってよい。一部の態様では、CL κ -x⁸²は、H、F、W、またはYであってよい。一部の態様では、CL κ -x⁸²はプロリンではない。一部の態様では、CL κ -x⁸²はKである。一部の態様では、CL κ -x⁸²はRである。

【0052】

一部の態様では、本発明の抗体またはその抗原結合部分は、両方の軽鎖上の配列番号 98 の K⁵ にコンジュゲートされているエフェクター部分を含む。一部の態様では、エフェクター部分は、一方のみの軽鎖上の配列番号 98 の K⁵ にコンジュゲートされている。一部の態様では、エフェクター部分は、配列番号 98 の K⁵ のみにコンジュゲートされている。一部の態様では、エフェクター部分は、一方の軽鎖上の配列番号 98 の K⁵ と、抗体またはその抗原結合部分上の 1 つの他の位置とでコンジュゲートされている。一部の態様では、エフェクター部分は、一方の軽鎖上の配列番号 98 の K⁵ と、抗体またはその抗原結合部分上の 2 つの他の位置とでコンジュゲートされている。一部の態様では、エフェクター部分は、一方の軽鎖上の配列番号 98 の K⁵ と、抗体またはその抗原結合部分上の 3 つの他の位置とでコンジュゲートされている。一部の態様では、エフェクター部分は、両方の軽鎖上の配列番号 98 の K⁵ と、1 つの他の位置とでコンジュゲートされている。一部の態様では、エフェクター部分は、両方の軽鎖上の配列番号 98 の K⁵ と、2 つの他の位置とでコンジュゲートされている。一部の態様では、エフェクター部分は、両方の軽鎖上の配列番号 98 の K⁵ と、3 つの他の位置でコンジュゲートされている。

10

【0053】

一部の態様では、本発明は、配列番号 10；または配列番号 6 の 77 位に対応する変異 I g ドメイン内の置換残基を含む変異免疫グロブリン (I g) ドメインにおいて、置換残基が A、G、I、V、L、R、S、T、M、Q、N、P、H、および W からなる群から選択され、ただし、変異 I g ドメインが、それぞれ配列番号 10；または配列番号 6 の 80 および 81 位に対応する位置に残基 K および H をさらに含むことを特徴とする、変異免疫グロブリン ドメインに関する。一部の態様では、変異 I g ドメインは、配列番号 38、39、40、41、42、44、46、47、49、50、51、52、54、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、115、116、117、119、120、121、122、123、124、125、および 126 からなる群から選択される配列を含む。

20

【0054】

寄託

一部の態様では、本発明は、ATCC に寄託したとおりのベクターおよび核酸、前記ベクターおよび核酸によってコードされるポリペプチド、前記ベクターおよび核酸によってコードされるポリペプチドを含む組成物、ならびに前記核酸およびベクターが発現するポリペプチドを提供する。以下の材料をアメリカ培養細胞系統保存機関 (American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 20110-2209、USA (ATCC)) に寄託してある：

30

【0055】

【表 1】

材料	配列番号	ATCC受託番号	寄託日
hCLk-Km(3)-D77A	37	PTA-13394	12/12/2012
h38C2-[LC-D185A]	254	PTA-13395	12/12/2012

40

【0056】

ベクター hCLk-Km(3)-D77A は、配列番号 37 で明示されるとおりの D77A 変異を含むヒト定常軽鎖カッパ (Km(3)) ドメインをコードするポリヌクレオチド DNA 挿入を含む TA クローニングベクターであり、ベクター h38C2-[LC-D185A] は、配列番号 254 で明示されるとおりの D77A 変異を含むヒト化 38C2 軽鎖をコードするポリヌクレオチド DNA 挿入である。

【0057】

一部の態様では、本発明は、本発明の免疫グロブリン ドメイン、または本発明の免疫グ

50

ロブリンドメイン含有タンパク質もしくは抗体を組換え産生する単離宿主細胞を提供する。本発明は、本発明のタンパク質、ドメイン、および抗体をコードするヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド、ならびに前記ポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。本発明のベクターは、A T C C 寄託配列を含み得る。一部の態様では、本発明は、抗体、免疫グロブリンドメイン、またはタンパク質を生産する方法を提供し、その方法は、抗体、免疫グロブリンドメイン、またはタンパク質の産生が生じる条件下で、宿主細胞を培養し、宿主細胞または培養から、抗体、免疫グロブリンドメイン、またはタンパク質を単離することを含む。

【0058】

一部の態様では、本発明は、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号47、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号54、配列番号60、配列番号61、配列番号77、配列番号78、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号119、配列番号120、配列番号121、配列番号122、配列番号127、配列番号128、配列番号129、配列番号134、配列番号135、配列番号140、配列番号141、配列番号142、配列番号143、配列番号144、配列番号148、配列番号149、配列番号150、配列番号151、配列番号156、配列番号158、配列番号159、配列番号160、配列番号161、配列番号163、配列番号165、配列番号167、配列番号168、配列番号169、配列番号236、配列番号237、配列番号238、配列番号239、配列番号240、配列番号241、および配列番号254からなる群から選択される配列を含むポリペプチド、または上述の配列のうちの1つまたは複数に対して少なくとも約85%、もしくは少なくとも約90%、もしくは少なくとも約95%、もしくは少なくとも約96%、もしくは少なくとも約97%、もしくは少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%同一であるポリペプチドを提供する。

【0059】

本発明の試料および組成物

一部の態様では、本発明は、エフェクター部分に共有結合的にコンジュゲートされている本発明のC Lドメインを含む抗体またはその抗原結合部分の組成物または試料を提供し、ここで、組成物または試料中のエフェクター部分のうちの少なくとも約50%は、配列番号98のK⁵にコンジュゲートされている。一部の態様では、これは、少なくとも約60%である。一部の態様では、これは、少なくとも約70%である。一部の態様では、これは、少なくとも約80%である。一部の態様では、これは、少なくとも約90%である。

【0060】

一部の態様では、本発明は、本発明のC Lドメインを含む抗体またはその抗原結合部分の組成物（または試料）を提供し、ここで、抗体のうちの少なくとも約50%は、少なくとも一方の軽鎖上の配列番号98のK⁵に共有結合されているエフェクター部分を含む。一部の態様では、これは、少なくとも約60%である。一部の態様では、これは、少なくとも約70%である。一部の態様では、これは、少なくとも約80%である。一部の態様では、これは、少なくとも約90%である。一部の態様では、エフェクター部分は、両方の軽鎖定常領域上の配列番号98のK⁵に共有結合的にコンジュゲートされている。

【0061】

一部の態様では、本発明は、エフェクター部分に共有結合的にコンジュゲートされている本発明のC Lドメインを含む抗体またはその抗原結合部分の組成物（または試料）を提供し、ここで、試料のうちの少なくとも約30%は、抗体1個当たり約2つの位置でコンジュゲートされているエフェクター部分を含み、少なくとも1つのエフェクター部分コンジュゲーション部位は、配列番号98のK⁵である。一部の態様では、この量は約40%である。一部の態様では、この量は約50%である。一部の態様では、この量は約60%である。一部の態様では、この量は約70%である。一部の態様では、この量は約80%

である。一部の態様では、この量は約 90 % である。一部の態様では、この量は約 95 % である。一部の態様では、この量は約 99 % である。

【0062】

一部の態様では、本発明は、エフェクター部分に共有結合的にコンジュゲートされている本発明の C L ドメインを含む抗体またはその抗原結合部分の組成物（または試料）を提供し、ここで、試料のうちの少なくとも約 30 % は、抗体 1 個当たり約 3 つの位置でコンジュゲートされているエフェクター部分を含み、少なくとも 2 つのエフェクター部分コンジュゲーション部位は、各軽鎖上の配列番号 98 の K⁵ である。一部の態様では、この量は約 40 % である。一部の態様では、この量は約 50 % である。一部の態様では、この量は約 60 % である。一部の態様では、この量は約 70 % である。一部の態様では、この量は約 80 % である。一部の態様では、この量は約 90 % である。一部の態様では、この量は約 95 % である。一部の態様では、この量は約 99 % である。

10

【0063】

一部の態様では、本発明は、本発明の C L ドメインを含む抗体またはその抗原結合部分の組成物（または試料）を提供し、ここで、軽鎖分子のうちの少なくとも 50 % は、少なくとも 1 個のエフェクター部分と、配列番号 98 の K⁵ でコンジュゲートされている。一部の態様では、これは、少なくとも約 60 % である。一部の態様では、これは、少なくとも約 65 % である。一部の態様では、これは、少なくとも約 70 % である。一部の態様では、これは、少なくとも約 75 % である。一部の態様では、これは、少なくとも約 80 % である。一部の態様では、これは、少なくとも約 85 % である。一部の態様では、これは、少なくとも約 90 % である。一部の態様では、これは、少なくとも約 95 % である。

20

【0064】

一部の態様では、本発明は、エフェクター部分に配列番号 98 の K⁵ でコンジュゲートされている本発明の C L ドメインを含む抗体またはその抗原結合部分の組成物（または試料）を提供し、ここで、重鎖分子のうちの少なくとも約 70 % は、エフェクター部分とコンジュゲートされていない。一部の態様では、この量は約 75 % である。一部の態様では、この量は約 80 % である。一部の態様では、この量は約 85 % である。一部の態様では、この量は約 90 % である。一部の態様では、この量は約 95 % である。一部の態様では、この量は約 99 % である。一部の態様では、重鎖分子の実質的にすべてが、エフェクター部分とコンジュゲートされていない。

30

【0065】

一部の態様では、コンジュゲートされていない個々の軽鎖断片の量は、約 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、および 55 % からなる群から選択される下限、ならびに約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、および 60 % からなる群から選択される上限を有する。一部の態様では、1 つの位置でコンジュゲートされている個々の軽鎖断片の量は、約 25、30、35、40、45、50、および 55 % からなる群から選択される下限、ならびに約 30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、および 95 % からなる群から選択される上限を有する。一部の態様では、2 つの位置でコンジュゲートされている個々の軽鎖断片の量は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、5、10、15、20、および 25 % からなる群から選択される下限、ならびに約 5、16、7、8、9、5、10、15、20、25、30、35、および 40 % からなる群から選択される上限を有する。

40

【0066】

一部の態様では、コンジュゲートされていない個々の重鎖断片の量は、約 50、55、60、65、70、75、および 80 % からなる群から選択される下限、ならびに約 60、65、70、75、80、85、90、95、および 99 % からなる群から選択される上限を有する。一部の態様では、1 つの位置でコンジュゲートされている個々の重鎖断片の量は、約 1、2、5、10、15、20、および 25 % からなる群から選択される下限、ならびに約 5、10、15、20、25、30、35、40、および 50 % からなる群

50

から選択される上限を有する。一部の態様では、2つの位置でコンジュゲートされている個々の重鎖断片の量は、約0、1、2、3、4、5、10、および15%からなる群から選択される下限、ならびに約2、3、4、5、10、15および20%からなる群から選択される上限を有する。

【0067】

一部の態様では、本発明の試料または組成物における抗体1個当たりのコンジュゲーションの数は、約0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.55、1.6、1.65、1.7、1.75、1.8、1.85、1.9、1.95、および2からなる群から選択される下限、ならびに約1.6、1.7、1.75、1.8、1.85、1.9、1.95、2.0、2.05、2.1、2.15、2.2、2.25、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.5、4.0、4.5、および5からなる群から選択される上限を有する。一部の態様では、本発明の試料または組成物における抗体1個当たりのコンジュゲーションの数は、約1.5～約2.5である。一部の態様では、本発明の試料または組成物における抗体1個当たりのコンジュゲーションの数は、約1.6～約2.4である。一部の態様では、本発明の試料または組成物における抗体1個当たりのコンジュゲーションの数は、約1.7～約2.3である。一部の態様では、本発明の試料または組成物における抗体1個当たりのコンジュゲーションの数は、約1.8～約2.2である。一部の態様では、本発明の試料または組成物における抗体1個当たりのコンジュゲーションの数は、約1.5、約1.55、約1.6、約1.65、約1.7、約1.75、約1.8、約1.85、約1.9、約1.95、約2.0、約2.05、約2.1、約2.15、約2.2、約2.25、約2.3、約2.4、および約2.5からなる群から選択される量である。一部の態様では、この量は約1.7である。一部の態様では、この量は約1.8である。一部の態様では、この量は約1.9である。一部の態様では、この量は約2である。一部の態様では、この量は約2.1である。一部の態様では、この量は約2.2である。一部の態様では、この量は約2.3である。

【0068】

本発明の一部の態様では、抗体1個当たりのコンジュゲーションの数は2未満であり、抗体集団のうちの少なくとも50%は、抗体1個当たり単一のコンジュゲーションのみを有する。これらの試料は、残りのCL κ 部位を標的とする追加的なコンジュゲーション反応を可能にするので、有利である。一部の態様では、本発明の試料または組成物における抗体1個当たりのコンジュゲーションの数は、約0.5～約1.5である。一部の態様では、本発明の試料または組成物における抗体1個当たりのコンジュゲーションの数は、約0.6～約1.4である。一部の態様では、本発明の試料または組成物における抗体1個当たりのコンジュゲーションの数は、約0.7～約1.3である。一部の態様では、本発明の試料または組成物における抗体1個当たりのコンジュゲーションの数は、約0.8～約1.2である。一部の態様では、本発明の試料または組成物における抗体1個当たりのコンジュゲーションの数は、約0.9～約1.1である。

【0069】

本発明の利点の1つは、試薬および反応条件（特に、脱離基エステルおよびリンカー：抗体のモル比）に応じて、本発明の組成物および試料を、定義された数の抗体に対して定義された数のエフェクター部分を伴って生成することができることである。これは、エフェクター部分および抗体の相対的反応性および治療ウィンドウのバランスをとる場合に、特に有用であり得る。さらに、一部の状況では、一定の閾値を超えて抗体1個当たりのペプチドまたは他の活性部分の数を増加させても、標的結合または治療効果の増大が生じないおそれがある。したがって、抗体1個当たりのコンジュゲートするペプチドの数を制御し、そうする際に、Fcまたは結合部位の干渉を最小化するように、コンジュゲーションの位置を方向付けることができることは有用である。したがって一部の状況では、単一のCL κ -K⁸⁰のみを優先的に装飾する少ないコンジュゲーションを可能にする本発明の態様が、有利であり得る。さらに、CL κ -K⁸⁰へのコンジュゲーションは信頼性が高

く、かつ強固であるのに対して、反応性およびpIがそれぞれやや異なる他の抗体表面リシンへのコンジュゲーションは、循環中および抗体認識によってエフェクター部分が標的に送達される前（またはエフェクター部分での認識によって抗体が標的に送達される前）など、時機が悪いか、または不規則な時刻にコンジュゲートされた分子を放出し得るコンジュゲート抗体の不均一な試料をもたらす得る。毒素（すなわち、腫瘍および腫瘍細胞を死滅させる際に潜在的な有用性を有する細胞毒性薬）では、このことは特に望まれ得ない。

【0070】

一部の態様では、毒素はオーリスタチン；天然生成物ドラスタチン10（MMAD）の誘導体である。代表的なオーリスタチンには、MMAE（N-メチルバリニン-バリニードライソロイシン-ドラプロリン-ノルエフェドリン）およびMMAF（N-メチルバリニン-バリニードライソロイシン-ドラプロリン-フェニルアラニン）が含まれる。

10

【0071】

一部の態様では、抗体は、エフェクター部分と同じ経路内の異なる標的を標的化する。一部の態様では、抗体は、エフェクター部分とは異なる標的を標的化する。

【0072】

一部の態様では、コンジュゲーションのために使用される抗体のVHおよびVLは、腫瘍学の分野において有用であり得る。適切な抗体には；癌、特に、非ホジキンリンパ腫、他にも関節リウマチを治療するために使用されるキメラのIgG1κ抗CD20抗体であるリツキシマブ（Rituxan（商標））；癌、特に、結腸、頭頸部癌を治療するために使用されるキメラのIgG1κ抗EGF受容体抗体であるセツキシマブ（Erbix（商標））が含まれる。

20

【0073】

一部の態様では、コンジュゲーションのために使用される抗体は、自己免疫障害および他の免疫学的障害の分野において有用であり得る。適切な抗体には、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、クローン病、乾癬、乾癬性関節炎、および強直性脊椎炎を治療するために使用されるキメラのIgG1κ抗TNFα抗体であるインフリキシマブ（Remicade（商標））；関節リウマチ、クローン病、乾癬、乾癬性関節炎、若年性特発性関節炎、および強直性脊椎炎を治療するために使用されるヒトのIgG1κ抗TNFα抗体であるアダリムマブ（Humira（商標））；多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、若年性特発性関節炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病を治療するために使用されるヒト化IgG4κ抗α4インテグリン抗体であるナタリズマブ（Tysabri（商標））；アレルギー性喘息を治療するために使用されるヒト化IgG1κ抗IgE抗体であるオマリズマブ（Xolair（商標））；滲出型AMDを治療するために使用されるヒト化IgG1κ抗VEGF抗体であるラニビズマブ（Lucentis（商標））；ならびに呼吸器多核体ウイルスを包含する感染性疾患を治療するために使用されるヒト化IgG1κ抗RSV抗体であるパリビズマブ（Synagis（商標））が含まれる。

30

【0074】

一部の態様では、本発明の化合物および組成物を使用して、上述の状態を治療することができる。

40

【0075】

エフェクター部分

エフェクター部分は、治療薬、タンパク質、ペプチド、核酸、アプタマー、低分子、タンパク質アゴニスト、タンパク質アンタゴニスト、代謝調節物質、ホルモン、毒素、成長因子、もしくは他の調節性タンパク質であってよい、またはホースラディッシュペルオキシダーゼなどの容易に検出または可視化することができる酵素などの診断薬であってよい。

【0076】

一部の態様では、エフェクター部分は、タンパク質またはペプチドであってよく、ペプチド連結残基を介してリンカーに接続されていてよい。タンパク質またはペプチドは、ア

50

ミノ末端キャッピング基 R^1 およびカルボキシル末端キャッピング基 R^2 の一方または両方を含んでよい。 R^1 は、 CH_3 、 $C(O)CH_3$ 、 $C(O)CH_2CH_3$ 、 $C(O)CH_2CH_2CH_3$ 、 $C(O)CH(CH_3)CH_3$ 、 $C(O)CH_2CH_2CH_2CH_3$ 、 $C(O)CH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 $C(O)C_6H_5$ 、 $C(O)CH_2CH_2(CH_2CH_2O)_{1\sim5}Me$ 、ジクロロベンゾイル (DCB)、ジフルオロベンゾイル (DFB)、ピリジニルカルボキシレート (PyC)、またはアミド-2-PEG、アミノ保護基、脂質脂肪酸基、または炭水化物であってよい。 R^2 は、OH、 NH_2 、 $NH(CH_3)$ 、 $NHCH_2CH_3$ 、 $NHCH_2CH_2CH_3$ 、 $NHCH(CH_3)CH_3$ 、 $NHCH_2CH_2CH_2CH_3$ 、 $NHCH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 NHC_6H_5 、 $NHCH_2CH_2OCH_3$ 、 $NHOCH_3$ 、 $NHOCH_2CH_3$ 、カルボキシ保護基、脂質脂肪酸基、または炭水化物であってよい。

10

【0077】

タンパク質またはペプチド連結残基は、K、 K_{SH} 、リシン同族体、Dap、Dab、Orn、R、C、チオール含有残基、S、T、Y、D、E、N、またはQであってよい。タンパク質またはペプチドは、N末端アミノ酸のアミノ末端を介してリンカーに接続させることができる。タンパク質またはペプチドは、C末端アミノ酸のカルボキシル末端を介してリンカーに接続させることができる。連結残基として機能させるために、アミノ酸側鎖を介する接続か、またはアミノもしくはカルボキシル末端を介する接続かにかかわらず、追加のアミノ酸残基をNまたはC末端に加えることができる。

【0078】

20

リンカー

エフェクター部分を有するコンジュゲート、特に、コンジュゲートおよびMACを調製する方法に関する本発明の態様では、本発明は、エフェクター部分が存在しない状態でリンカーを有するコンジュゲートにも等しく当てはまることは理解されるであろう。そのようなコンジュゲートの有用性の例は、本発明のエフェクター部分-リンカー-ポリペプチドコンジュゲートを調製するために有用に使用することができる中間体としてのものであろう。

【0079】

本発明のエフェクター部分（低分子、アプタマー、核酸、タンパク質、またはペプチドなど）を抗体またはその抗原結合部分に、リンカーによって共有結合させることができる。リンカーを、ペプチド連結残基の側鎖のアミノ基によってペプチドに共有結合させることができる。これは、リシン残基であってよい。一部の実施形態では、連結残基は、Cysまたは K_{SH} などのチオール保有残基であり、リンカーを、連結残基の末端チオール基を介してペプチドに共有結合させる。

30

【0080】

リンカーは、直鎖または分枝（コンジュゲーション付加 (CA) 1つ当たり1つより多いエフェクター部分へのコンジュゲーションを可能とするために）であってよく、場合によって、1個または複数の炭素環式基または複素環式基を包含してよい。リンカーの長さは、エフェクター部分と抗体との間の直鎖原子の数の点において考えることができ、芳香環などの環式部分は、環の周りの最短経路をとることによって数えられる。一部の実施形態では、リンカーは、5~15原子、他の実施形態では15~30原子、なお他の実施形態では30~50原子、なお他の実施形態では50~100原子、なお他の実施形態では100~200原子の直線的伸張を有する。一部の実施形態では、リンカーの長さは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、120、130、140、150、160、170、180、190からなる群から選択される下限と、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、120、130、140、150、160、170、180、190、および200

40

50

からなる群から選択される上限との範囲である。

【0081】

他のリンカーの検討事項には、溶解度、親油性、親水性、疎水性、安定性（おおよそ安定的、さらに、計画分解）、剛性、柔軟性、免疫原性、抗体結合のモジュレーション、ミセルまたはリポソームに組み込まれる能力などの、生じた化合物の物理的または薬物動態学的特性に対する作用が包含される。

【0082】

リンカーは、ペプチジルリンカーであってよい。一部の実施形態では、ペプチジルリンカーは、好ましいエフェクター部分の提示または薬物動態を付与するペプチドリリンカーが得られるように、単一アミノ酸残基の繰返し（例えば、ポリグリシン）またはアミノ酸残基の組合せなど、3～20アミノ酸長さであってよい。活性化基の存在と最も適合性であろうペプチジルリンカーは、リシンおよびヒスチジン残基を欠いてよい。配列番号79は、例示的なペプチジルリンカーである。

10

【0083】

別法では、リンカーは、非ペプチジルリンカーであってよい。これらの種類のリンカーの典型的な例は、直鎖もしくは分枝鎖炭化水素、または様々な長さのポリエチレングリコールに基づくものであろう。これらに、芳香環または非芳香環、ハロゲン、ケトン、アルデヒド、エステル、スルホニル、ホスファート基などの他の基を組み込んで、溶解度、剛性、等電点に影響を及ぼすことができる。

20

【0084】

本発明の一部の態様では、リンカーは、式： $-X^1-Y^1-Z-$ を含んでよく；ここで、 X^1 はエフェクター部分への結合基であり（例えば、ペプチド連結残基を介する）、 Y^1 は、スペーサー領域であり、 Z は、抗体（例えば、抗IGF1R抗体）上のリシン残基の側鎖への結合部分である。一部の態様では、リンカーは、抗体に結合されていない場合、式 $X^1Y^1Z^*$ のものであってよく、ここで、 Z^* は、抗体にコンジュゲートさせた場合に、脱離基 Z^* が抗体のコンジュゲーション部位と反応して、コンジュゲートリンカー X^1Y^1Z を形成するような脱離基である。

【0085】

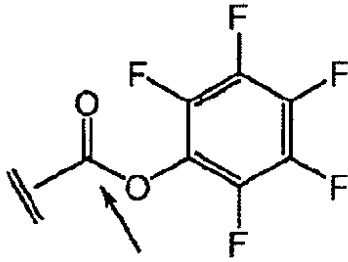
X^1 は、エフェクター部分への（例えば、ペプチド連結残基を介しての）特異的な方向性共有結合的連結戦略が可能であるように選択することができる。一部の態様では、 X^1 は、 $COOH$ 、イソシアナート、イソチオシアナート、アシルアジド、スルホン酸、スルホニルハライド、アルデヒド、ケトン、エポキシド、カルボナート、アリール化試薬、イミドエステル、アミン基、およびマレイミド基からなる群から選択することができる。例えば、ペプチド連結残基が求核性基を含んでいる場合、 X^1 は、求電子性基であってよく、逆も同様である。例えば、ペプチド連結残基の側鎖がK、H、オルニチン、Dap、またはDabなどのアミン基を含んでいるならば、 X^1 は、 $COOH$ 、または他の同様の反応性求電子試薬、例えば、イソシアナート、イソチオシアナート、アシルアジド、スルホン酸もしくはスルホニルハライド、アルデヒドもしくはケトン、エポキシド、カルボナート、アリール化試薬、またはイミドエステルであってよい。ペプチド連結残基がDまたはEであるならば、 X^1 は、アミン基などの求核性基を含んでよい。これらの戦略のいずれも、アミド結合形成戦略によって、 X^1 基とペプチド連結残基との間に共有結合が形成されることを可能にする。例えば、 X^1 が $COOH$ である場合、これは、ペンタフルオロフェニルエステルとして活性化され得る。この場合、ペプチド連結ペプチド上のアミン基との反応は、アミド結合の形成をもたらす一方で、ペンタフルオロフェノールは脱離基（これは X^1^* と称され得る）である。

30

40

【0086】

【化 1】

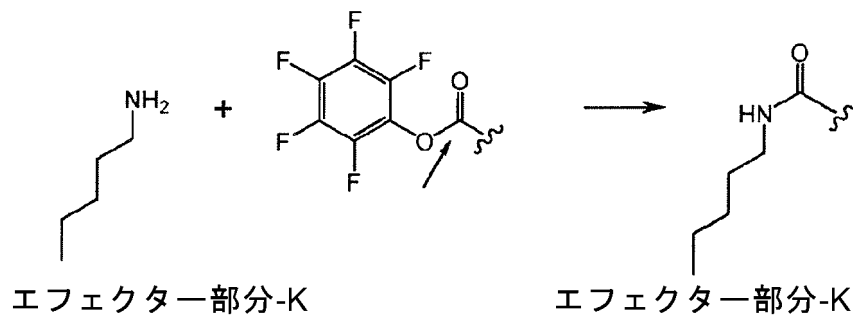


矢印は、ペプチド連結残基への結合点を示し、平行線は、リンカーの Y^1 基への結合点を表す。

10

【0087】

【化 2】

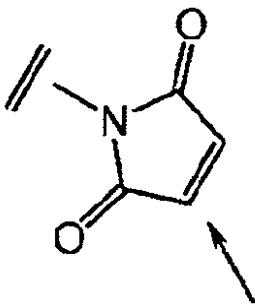


20

ペプチド連結基が、C、C の同族体、または他のチオール基含有残基 (K_{SH} など) である場合、 X^1 は、 X^1 基をペプチド連結残基に共有結合的に連結するためのチオール-マレイミド付加反応戦略を可能にするマレイミド基を含んでよい。一部の態様では、 X^1 は、下式のマレイミドであってよい：

【0088】

【化 3】



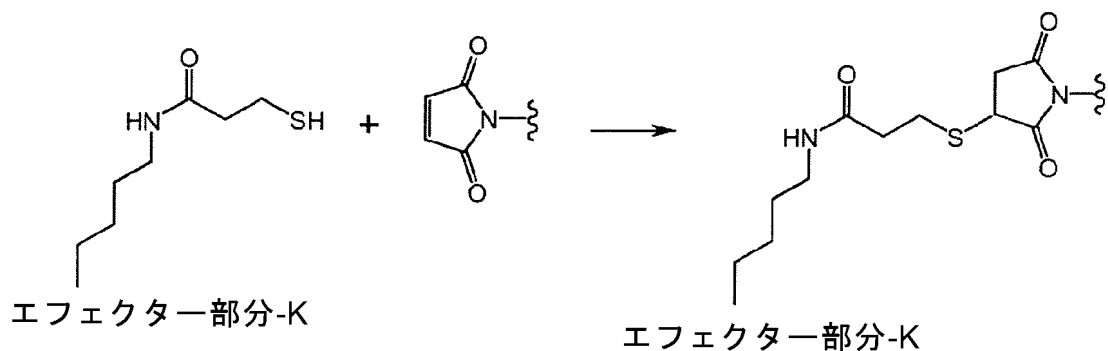
30

〔式中、矢印は、ペプチド連結残基への結合点を示し、平行線は、リンカーの Y^1 基への結合を表す〕。命名が容易であるので、マレイミド基を使用して構築された本明細書に記載のリンカーは、リンカーの構築後に、マレイミド基が一般的にスクシンイミド環に転換されるとしても、マレイミド含有リンカーと記載され、これを示すために M A L と呼ばれる。

40

【0089】

【化 4】



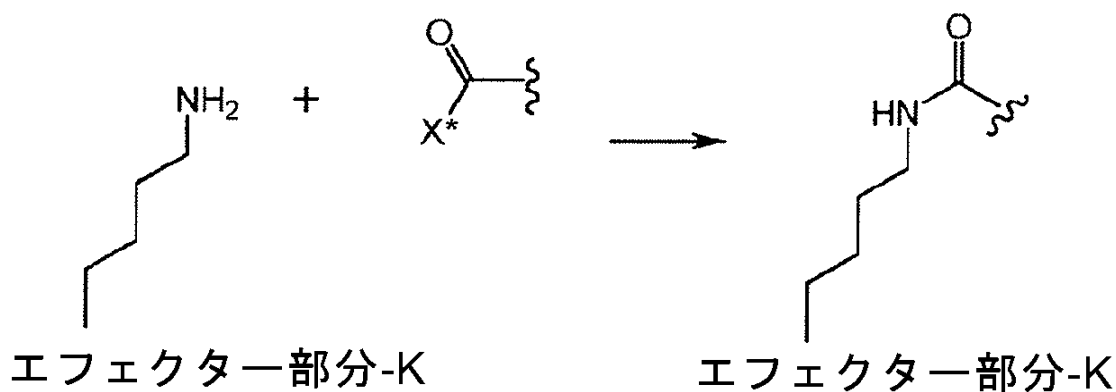
10

【0090】

一部の態様では、連結残基は K_{SH} であり、 X^1 基はマレイミドである。一部の態様では、 X^1 は、ペンタフルオロフェニルエステルで活性化されたカルボキシル官能基を含んでよく、これは、ペプチド上のリシン側鎖と共にアミドを形成することができる。

【0091】

【化 5】



20

30

【0092】

一部の態様では、 X^1 は、チオール基を含んでよく、ペプチド連結残基と X^1 基との間にジスルフィド橋が形成されることが可能となっている。

【0093】

一部の実施形態では、 Y^1 は、C、H、N、O、P、S、F、Cl、Br、およびIからなる群から選択される任意の原子を包含する生物学的に適合性の接続鎖であり、1つまたは複数のアミノ酸、ポリマー、またはブロックコポリマーを含んでよい。 Y^1 は、2～100原子のリンカーの全体長さが得られるように選択することができる。 Y^1 は、リンカーの全体長さが5～30原子であるように選択することができる。 Y^1 は、リンカーの全体長さが15～25原子であるように選択することができる。 Y^1 は、リンカーの全体長さが約17～約19原子であるように選択することができる。

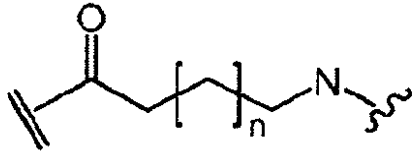
40

【0094】

一部の態様では、 Y^1 は、下式：

【0095】

【化 6】



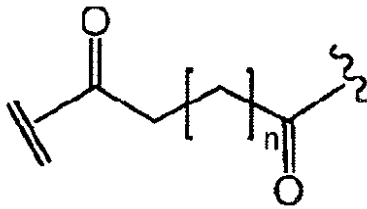
〔式中、 $n = 0 \sim 20$ 、一部の態様では、 $1 \sim 10$ 、一部の態様では、 $1 \sim 5$ 、一部の態様では、 1 、一部の態様では、 2 である〕などのアミノアルカン酸であってよい。

【0096】

一部の態様では、 Y^1 は、下式：

【0097】

【化 7】



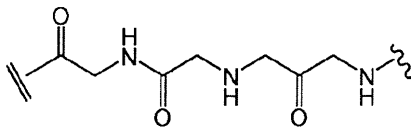
〔式中、 $n = 0 \sim 20$ 、一部の態様では、 $1 \sim 10$ 、一部の態様では、 $1 \sim 5$ 、一部の態様では、 1 、一部の態様では、 2 である〕などのアルカン二酸であってよい。

【0098】

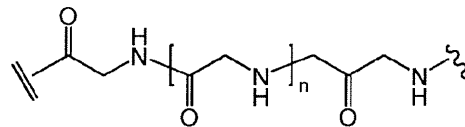
一部の態様では、 Y^1 は、下式：

【0099】

【化 8】



または



〔式中、 $n = 0 \sim 10$ 、一部の態様では、 $1 \sim 10$ 、一部の態様では、 $1 \sim 5$ 、一部の態様では、 1 、一部の態様では、 2 である〕などのポリグリシンであってよい。

【0100】

一部の態様では、 Y^1 、 $X^1 - Y^1$ 、 $Y^1 - Z$ 、および $X^1 - Y^1 - Z$ は、

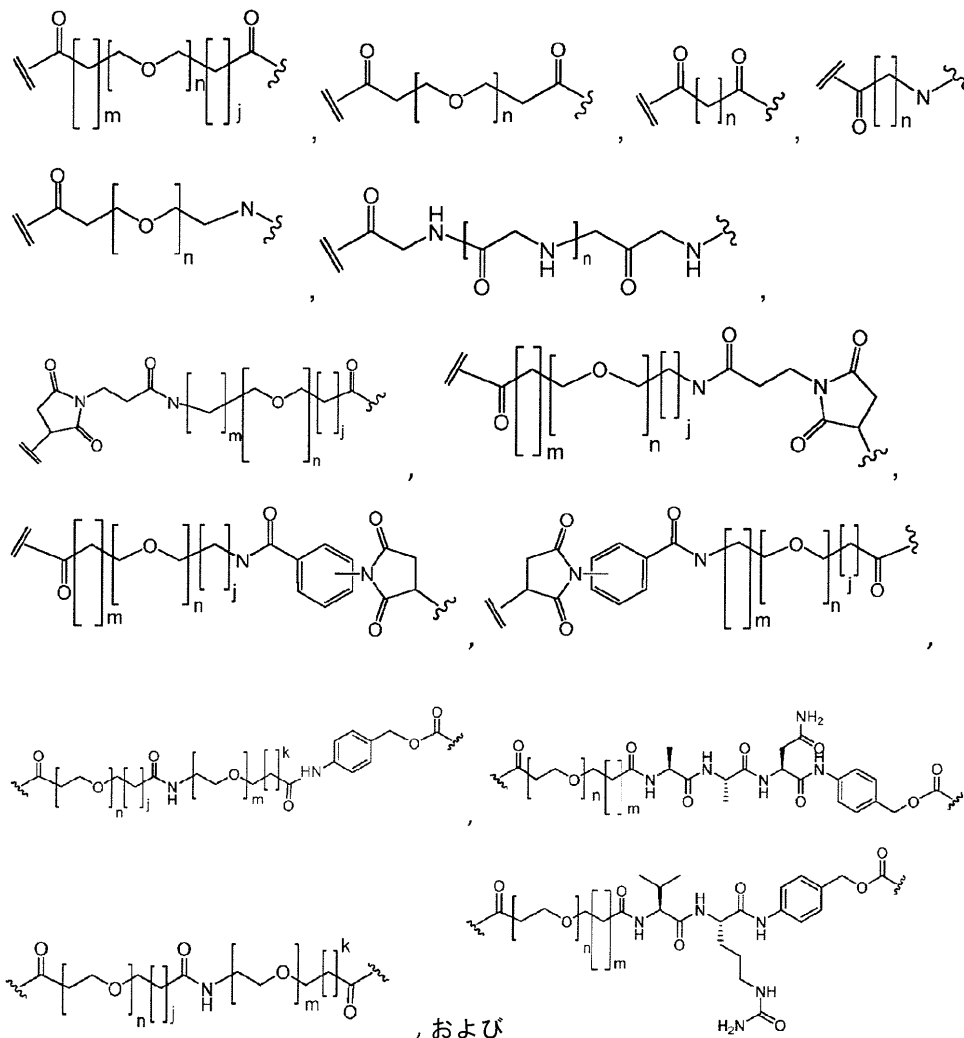
【0101】

10

20

30

【化 9】



〔式中、 m 、 n 、 j 、および k はそれぞれ独立に、0～30である〕からなる群から選択することができる。一部の態様では、 $n = 1 \sim 10$ 、一部の態様では、 $n = 1 \sim 5$ である。一部の態様では、 n の値の範囲の下限は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、および20からなる群から選択され、 n の値の範囲の上限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、および30からなる群から選択される。 n は1であってよい。 n は2であってよい。 n は3であってよい。 n は4であってよい。 n は5であってよい。 n は6であってよい。一部の態様では、 $m = 1 \sim 10$ 、一部の態様では、 $m = 1 \sim 5$ である。一部の態様では、 m の値の範囲の下限は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、および20からなる群から選択され、 m の値の範囲の上限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、および30からなる群から選択される。 m は1であってよい。 m は2であってよい。 m は3であってよい。 m は4であってよい。 m は5であってよい。 m は6であってよい。一部の態様では、 $j = 1 \sim 10$ 、一部の態様では、 $j = 1 \sim 5$ である。一部の態様では、 j の値の範囲の下限は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、および20からなる群から選択され、 j の値の範囲の上限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、および30からなる群から選択される。 j は1で

10

20

30

40

50

あってよい。j は 2 であってよい。j は 3 であってよい。j は 4 であってよい。j は 5 であってよい。j は 6 であってよい。一部の態様では、k = 1 ~ 10、一部の態様では、k = 1 ~ 5 である。一部の態様では、k の値の範囲の下限は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、および 20 からなる群から選択され、k の値の範囲の上限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、および 30 からなる群から選択される。k は 1 であってよい。k は 2 であってよい。k は 3 であってよい。k は 4 であってよい。k は 5 であってよい。k は 6 であってよい。一部の態様では、Y¹ の全体長さは、200 原子を超えない。一部の態様では、Y¹ の全体長さは、150 原子を超えない。一部の態様では、Y¹ の全体長さは、100 原子を超えない。一部の態様では、Y¹ の全体長さは、50 原子を超えない。一部の態様では、原子の数における Y¹ の全体鎖長の範囲は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、および 60 からなる群から選択される下限、ならびに 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、および 100 からなる群から選択される上限を有し得る。一部の態様では、X¹ Y¹ Z リンカーは、上記の Y¹ 基と同一であってよい。一部の態様では、波線は、X¹ 基に接続している。一部の態様では、平行線は、X¹ 基に接続している。一部の態様では、波線は、Z 基に接続している。一部の態様では、平行線は、Z 基に接続している。一部の態様では、波線は C L κ - K^{8 0} の側鎖に接続している。一部の態様では、平行線は、C L κ - K^{8 0} の側鎖に接続している。一部の態様では、波線は、エフェクター部分に接続している。一部の態様では、平行線は、エフェクター部分に接続している。一部の態様では、波線または平行線の一方は、リンカー (Φ) の切断部分への結合点である。

【0102】

脱離基

Z* は、抗体上のリシン側鎖に対する特異的な方向性共有結合的連結戦略が可能であるように選択することができる。例えば、いくつかの可能なアミド結合形成戦略のうちの 1 つを使用して、表面リシン側鎖の ε - アミノと反応させるために、Z は、COOH または他の同様の反応性求電子試薬であってよい。

【0103】

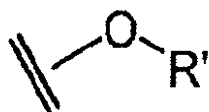
一部の態様では、Z* を、活性なエステルを形成するために使用することができる。活性なエステルは、アミンに接続し、したがって、抗体のリシン側鎖の ε - アミノにコンジュゲートすることができる。活性なエステルの形成を可能にする Z カルボキシル官能基は、Y 基の末端に存在するはずである。活性なエステルのアルコールまたはフェノール官能基は、コンジュゲーション反応中に脱離基 Z* として作用して、アミドの生成を介しての抗体上のリシン側鎖との接続を可能にする。

【0104】

一部の実施形態では、Z* 基は、下式：

【0105】

【化10】



[式中、R' は、脂肪族または芳香族基である] の構造を含む。

【0106】

一部の実施形態では、Z* 基は、下式：

【0107】

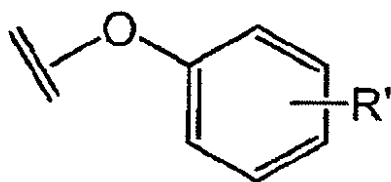
10

20

30

40

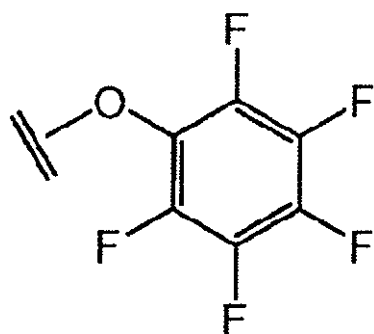
【化 1 1】



〔式中、 R' = 単独か、または組合せでの F、Cl、Br、または I、ニトロ、シアノ、トリフルオロメチルのうちのいずれかであり、1～5 個の量で存在してよい〕の基である。一部の実施形態では、 R' はハロゲンであってよく、4 または 5 個のハロゲン原子が存在してよい。一部の実施形態では、4 個の R' 原子が存在してよい。一部の実施形態では、5 個の R' 原子が存在してよい。一部の実施形態では、 Z^* は、テトラフルオロフェニルであってよい。一部の実施形態では、 Z^* は、下式：

【0108】

【化 1 2】



ペンタフルオロフェニル

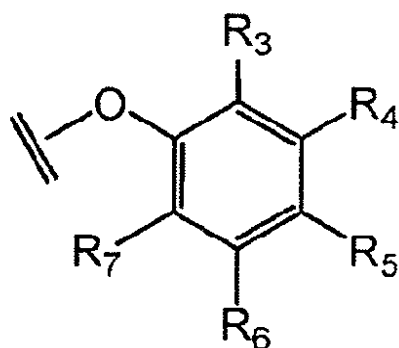
〔式中、平行線は、リンカーの Y^1 部分への結合点を表す〕を含んでよい。

【0109】

一部の実施形態では、 Z^* は、下式：

【0110】

【化 1 3】



〔式中、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、および R^7 はそれぞれ、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 および R^7 のうちの 2 個以下が H であり、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、および R^7 のうちの 1 個が $CR^8R^9R^{10}$ であるように、F、Cl、H、および式 $CR^8R^9R^{10}$ からなる群から独立に選択され、 R^8 、 R^9 、および R^{10} はそれぞれ、 R^8 、 R^9 、および R^{10} のうちの 1 個以下が H であるように、F、Cl、および H からなる群から独立に選択され、平行線は、リンカーの Y^1 部分への結合点を表す〕を含んでよい。一部の態様では、基 $CR^8R^9R^{10}$ は、 R^4 、 R^5 、または R^6 のうちの 1 つに位置する。一部の態様では、基 $CR^8R^9R^{10}$ は、 R^5 に位置する。

10

20

30

40

50

【0111】

一部の態様では、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、および R^7 はそれぞれ、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、および R^7 のうちの1個以下がHであり、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、および R^7 のうちの1個が $CR^8R^9R^{10}$ であるように、F、Cl、H、および式 $CR^8R^9R^{10}$ からなる群から独立に選択される。一部の態様では、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、および R^7 はそれぞれ、F、Cl、および式 $CR^8R^9R^{10}$ からなる群から独立に選択され、1個は $CR^8R^9R^{10}$ である。

【0112】

一部の態様では、 R^3 、 R^4 、 R^6 、および R^7 はそれぞれ、Fである。一部の態様では、 R^8 、 R^9 、および R^{10} はそれぞれ、FおよびClからなる群から独立に選択される。一部の態様では、 R^8 、 R^9 、および R^{10} はそれぞれ、Fである。

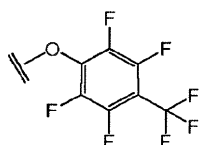
10

【0113】

一部の実施形態では、 Z^* は、下式：

【0114】

【化14】



2,3,5,6-テトラフルオロ-4-(トリフルオロメチル)フェニル

20

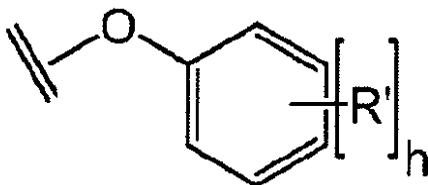
[式中、平行線は、リンカーの Y^1 部分への結合点を表す]を含んでよい。

【0115】

一部の態様では、 Z^* 基は、下式：

【0116】

【化15】



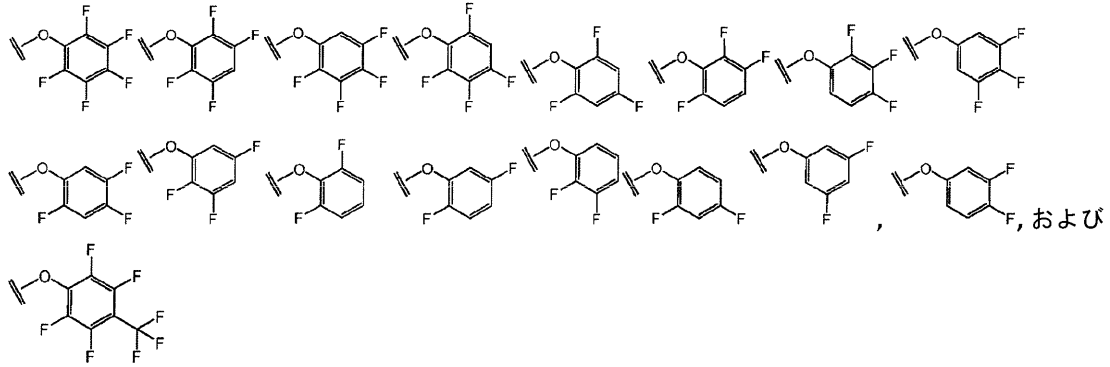
30

[式中、 R' = 単独か、または組合せでのF、Cl、Br、またはI、ニトロ、シアノ、トリフルオロメチルのうちのいずれかであり、 $h = 1, 2, 3, 4$ 、または5である]の基である。一部の実施形態では、 R^1 はハロゲンであってよい。一部の実施形態では、 R^1 は、FまたはClであり、 $h = 4$ または5である。一部の実施形態では、 R^1 は、FまたはClであり、 $h = 5$ である。一部の実施形態では、 R^1 は、Fであり、 $h = 2, 3, 4$ 、または5である。一部の実施形態では、 R^1 はFであり、 $h = 3, 4$ 、または5である。一部の実施形態では、 R^1 はFであり、 $h = 4$ または5である。一部の実施形態では、 R^1 は、Fであり、 $h = 5$ である。一部の態様では、 Z^* は、

40

【0117】

【化 1 6】



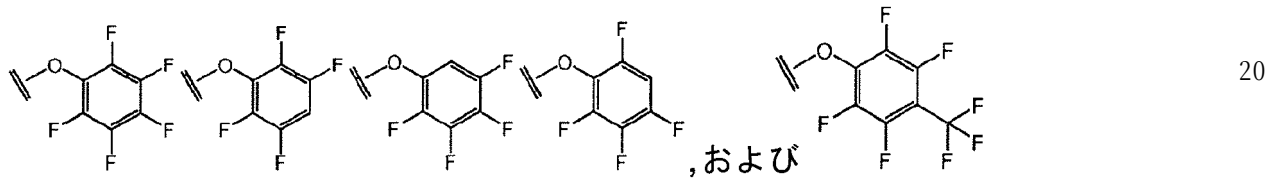
からなる群から選択され得る。

【 0 1 1 8】

一部の態様では、Z* は、

【 0 1 1 9】

【化 1 7】



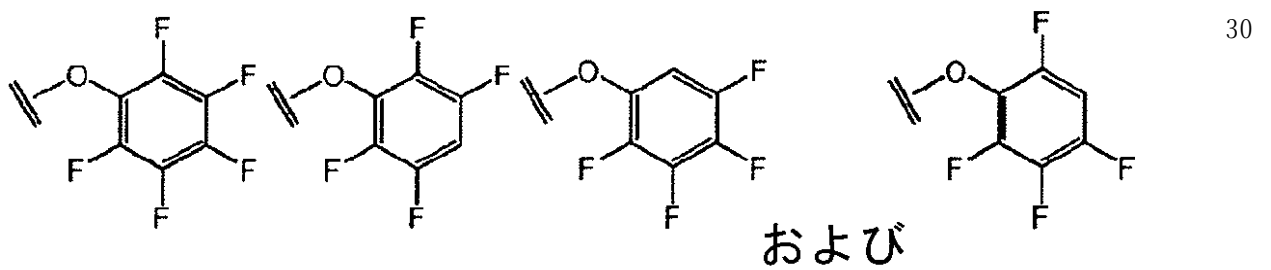
からなる群から選択され得る。

【 0 1 2 0】

一部の態様では、Z* は、下式

【 0 1 2 1】

【化 1 8】



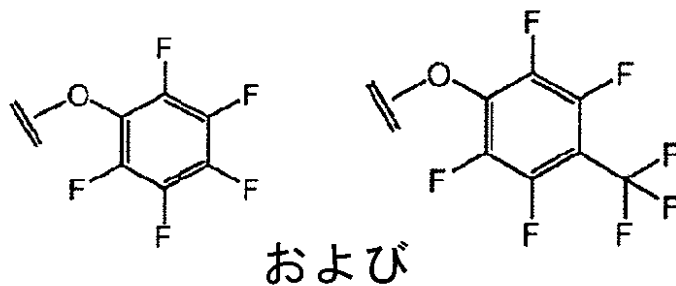
からなる群から選択され得る。

【 0 1 2 2】

一部の態様では、Z* は、

【 0 1 2 3】

【化 1 9】



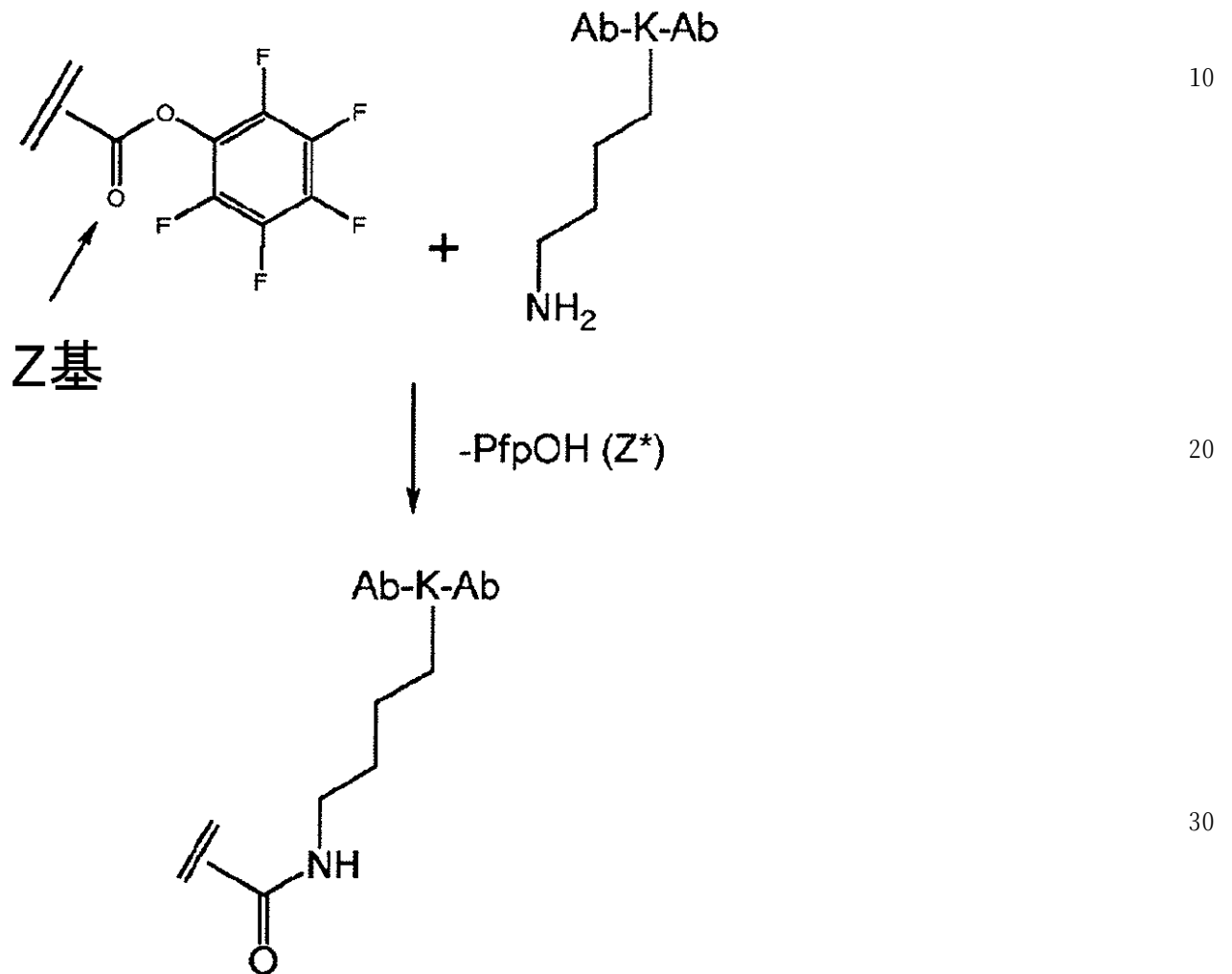
からなる群から選択され得る。

【0124】

このような活性なエステルでは、脱離基は Z^* であり、 Z 基自体は、 Y^1 基に結合されているカルボニルである。抗体と反応した場合、 Z^* 基は、以下に示すとおり、アミドを形成する。

【0125】

【化20】

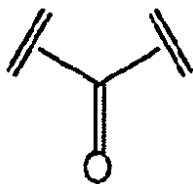


【0126】

一部の実施形態では、 Z は、

【0127】

【化21】



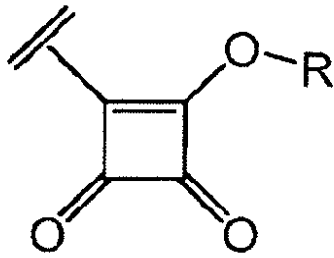
である。

【0128】

一部の実施形態では、 Z^* 基は、

【0129】

【化 2 2】

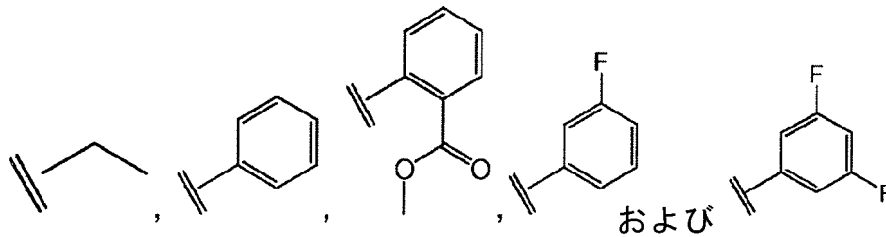


10

〔式中、R＝脂肪族基または置換芳香族であり、

【0 1 3 0】

【化 2 3】



20

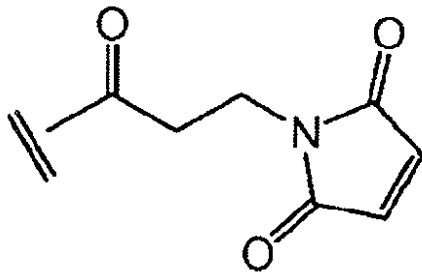
からなる群から選択され得る〕などのスクアリン酸エステルを含む。

【0 1 3 1】

一部の実施形態では、Z基は、マレイミド基を含む：

【0 1 3 2】

【化 2 4】



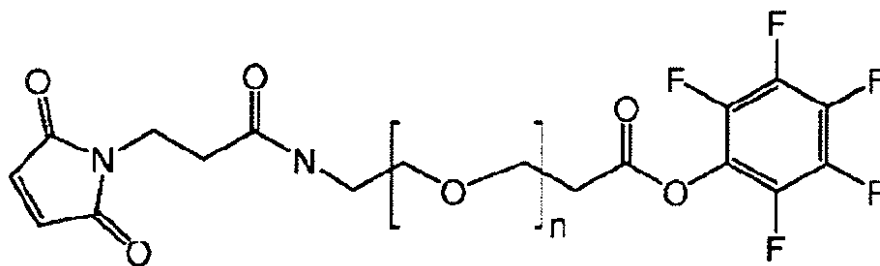
30

【0 1 3 3】

一部の態様では、X¹ * Y¹ Z * リンカーは、構造：

【0 1 3 4】

【化 2 5】



40

〔式中、n＝1～12〕のマレイミド－PEG－PFPエステルを含む。一部の態様では、n＝1～5である。一部の態様では、n＝2である。一部の態様では、n＝1である。

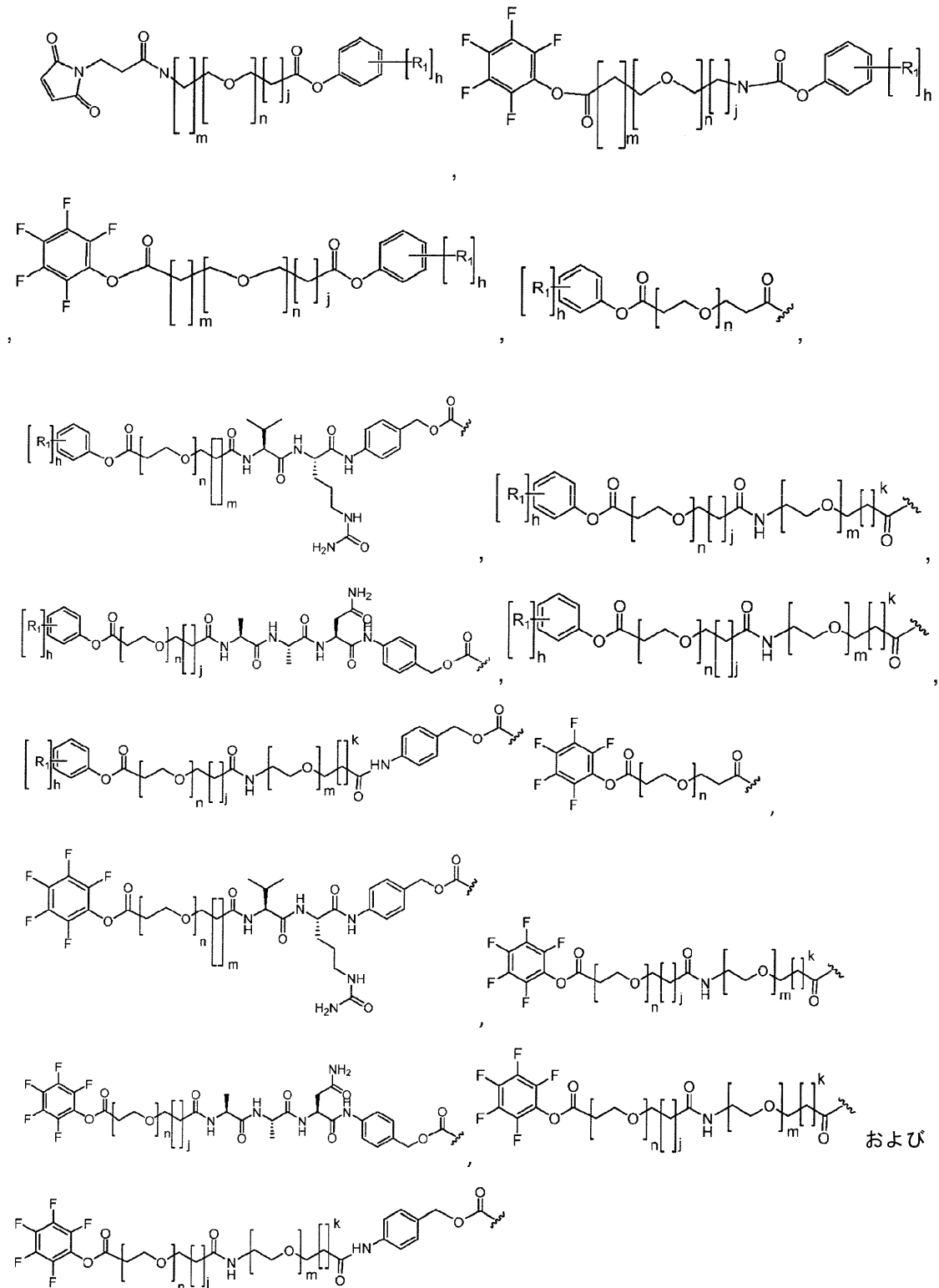
【0 1 3 5】

一部の態様では、X¹ * Y¹ Z * リンカーは、

50

【0136】

【化26】



〔式中、 m 、 n 、および j はそれぞれ独立に、 $0 \sim 30$ であり、 R_1 は F であり、 $h = 2$ 、 3 、 4 、または 5 である〕 からなる群から選択される構造を含む。一部の態様では、 $n = 1 \sim 10$ 、一部の態様では、 $n = 1 \sim 5$ である。一部の態様では、 n の値の範囲の下限は、 0 、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 、 11 、 12 、 13 、 14 、 15 、 16 、 17 、 18 、 19 、および 20 からなる群から選択され、 n の値の範囲の上限は、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 、 11 、 12 、 13 、 14 、 15 、 16 、 17 、 18 、 19 、 20 、 21 、 22 、 23 、 24 、 25 、 26 、 27 、 28 、 29 、および 30

10

20

30

40

50

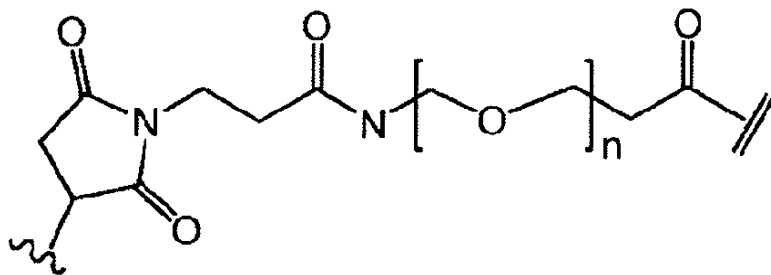
0 からなる群から選択される。n は 1 であってよい。n は 2 であってよい。n は 3 であってよい。n は 4 であってよい。n は 5 であってよい。n は 6 であってよい。一部の態様では、m = 1 ~ 10、一部の態様では、m = 1 ~ 5 である。一部の態様では、m の値の範囲の下限は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、および 20 からなる群から選択され、m の値の範囲の上限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、および 30 からなる群から選択される。m は 1 であってよい。m は 2 であってよい。m は 3 であってよい。m は 4 であってよい。m は 5 であってよい。m は 6 であってよい。一部の態様では、j = 1 ~ 10、一部の態様では、j = 1 ~ 5 である。一部の態様では、j の値の範囲の下限は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、および 20 からなる群から選択され、j の値の範囲の上限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、および 30 からなる群から選択される。j は 1 であってよい。j は 2 であってよい。j は 3 であってよい。j は 4 であってよい。j は 5 であってよい。j は 6 であってよい。一部の態様では、k = 1 ~ 10、一部の態様では、k = 1 ~ 5 である。一部の態様では、k の値の範囲の下限は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、および 20 からなる群から選択され、k の値の範囲の上限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、および 30 からなる群から選択される。k は 1 であってよい。k は 2 であってよい。k は 3 であってよい。k は 4 であってよい。k は 5 であってよい。k は 6 であってよい。一部の態様では、Y¹ の全体長さは、200 原子を超えない。一部の態様では、Y¹ の全体長さは、150 原子を超えない。一部の態様では、Y¹ の全体長さは、100 原子を超えない。一部の態様では、Y¹ の全体長さは、50 原子を超えない。一部の態様では、原子の数における Y¹ の全体鎖長の範囲は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、および 60 からなる群から選択される下限、ならびに 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、および 100 からなる群から選択される上限を有し得る。

【0137】

一部の態様では、MAC は、下式：

【0138】

【化27】



n=2.

の X¹ Y¹ Z リンカーを含む。

【0139】

一部の態様では、X¹ * Y¹ Z * リンカーは、下式：

【0140】

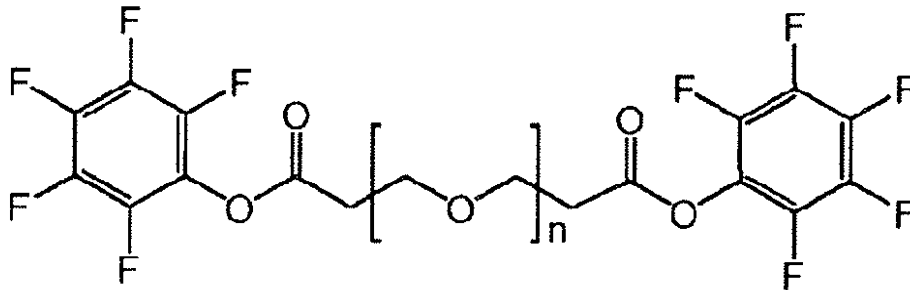
10

20

30

40

【化 2 8】



10

〔式中、 $n = 1 \sim 25$ 〕のPEG-ビス-ペンタフルオロフェニルエステルを含む。一部の態様では、 $n = 1 \sim 20$ である。一部の態様では、 $n = 1 \sim 10$ である。一部の態様では、 $n = 4$ である。一部の態様では、 $n = 3$ である。一部の態様では、 $n = 2$ である。一部の態様では、 $n = 1$ である。

【0141】

一部の態様では、MACは、抗体1個当たり2個のコンジュゲートされたペプチドを含む。一部の態様では、1個のペプチドが、抗体またはその抗原結合断片の2個のCL κ -K $^{\delta}$ 残基のそれぞれにコンジュゲートされている。

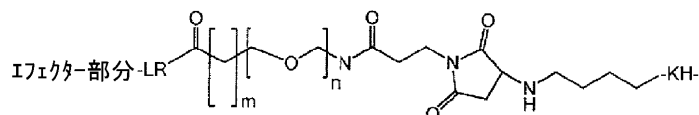
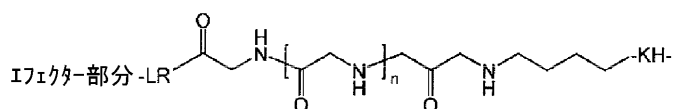
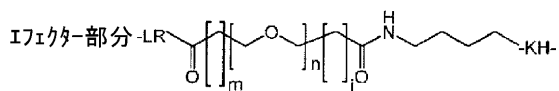
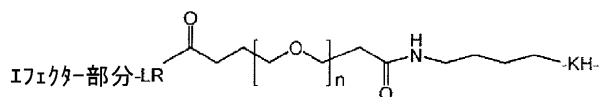
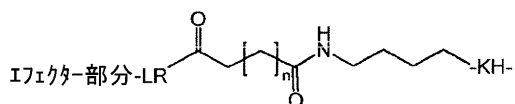
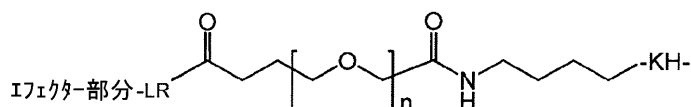
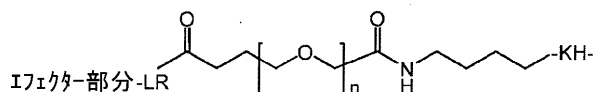
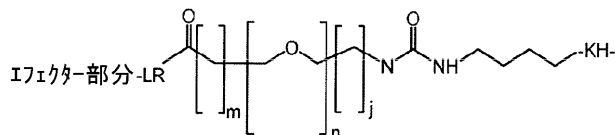
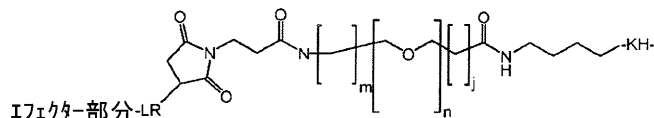
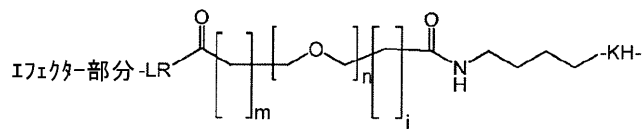
【0142】

一部の態様では、本発明のポリペプチドは、

20

【0143】

【化 29】



〔式中、－KH－は、配列番号98のK⁵の側鎖への共有結合的連結部であり、エフェクター部分－LRは、エフェクター部分への共有結合的連結部であり、m、n、およびjはそれぞれ独立に、0～30である〕からなる群から選択される式を含む。一部の態様では、n＝1～10、一部の態様では、n＝1～5である。一部の態様では、nの値の範囲の下限は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、および20からなる群から選択され、nの値の範囲の上限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、および30からなる群から選択される。nは1であってよい。nは2であってよい。nは3であってよい。nは4であってよい。nは5であってよい。nは6であってよい。一部の態

10

20

30

, および

40

50

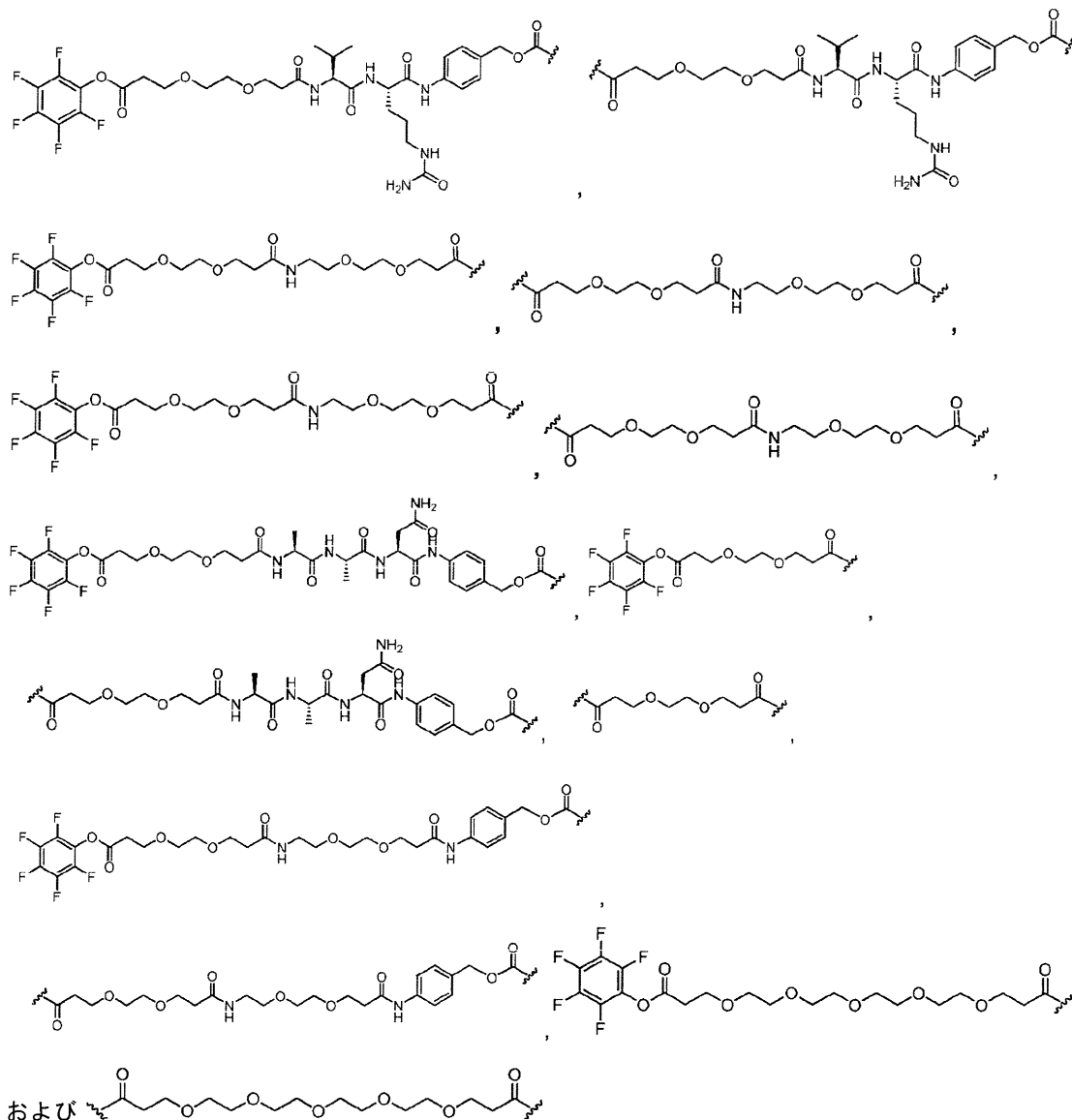
様では、 $m = 1 \sim 10$ 、一部の態様では、 $m = 1 \sim 5$ である。一部の態様では、 m の値の範囲の下限は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、および20からなる群から選択され、 m の値の範囲の上限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、および30からなる群から選択される。 m は1であってよい。 m は2であってよい。 m は3であってよい。 m は4であってよい。 m は5であってよい。 m は6であってよい。一部の態様では、 $j = 1 \sim 10$ 、一部の態様では、 $j = 1 \sim 5$ である。一部の態様では、 j の値の範囲の下限は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、および20からなる群から選択され、 j の値の範囲の上限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、および30からなる群から選択される。 j は1であってよい。 j は2であってよい。 j は3であってよい。 j は4であってよい。 j は5であってよい。 j は6であってよい。一部の態様では、 Y^1 の全体長さは、200原子を超えない。一部の態様では、 Y^1 の全体長さは、150原子を超えない。一部の態様では、 Y^1 の全体長さは、100原子を超えない。一部の態様では、 Y^1 の全体鎖長の範囲は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、および60からなる群から選択される下限、ならびに5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、および100からなる群から選択される上限を有し得る。

【0144】

一部の態様では、リンカーは、

【0145】

【化 30】



10

20

30

からなる群から選択される。

【0146】

切断可能なリンカー

一部の態様では、本発明は、「切断不可能な」リンカーを含む本明細書に記載のとおり
のMACを提供する。他の態様では、本発明は、「切断可能な」リンカーを含むMACを
提供する。用語「切断可能なリンカー」は、本明細書では、所望の位置で積荷を放出する
ように、細胞内もしくは細胞外の酵素によってか、またはpHもしくはレドックス環境の
変化を受けると分解するように設計されている、迅速に切断されるリンカーを記載するた
めに使用される。例えば、切断可能なリンカーは、血漿中、血液中、または血清中では優
40 先的に安定的であり得、細胞内環境では安定性が劣り得る。

【0147】

切断可能な部分(Φ)を、リンカーのY¹部分(または、リンカーが、触媒抗体結合部
位のためのものである場合には、P¹部分)に付加することによって、切断可能なリン
カーを形成することができる。したがって、リンカーは、式X¹-Φ-Y¹-Z、X¹-Φ
-Y¹-Z*およびP¹-Φ-Q¹-W¹となるであろう。

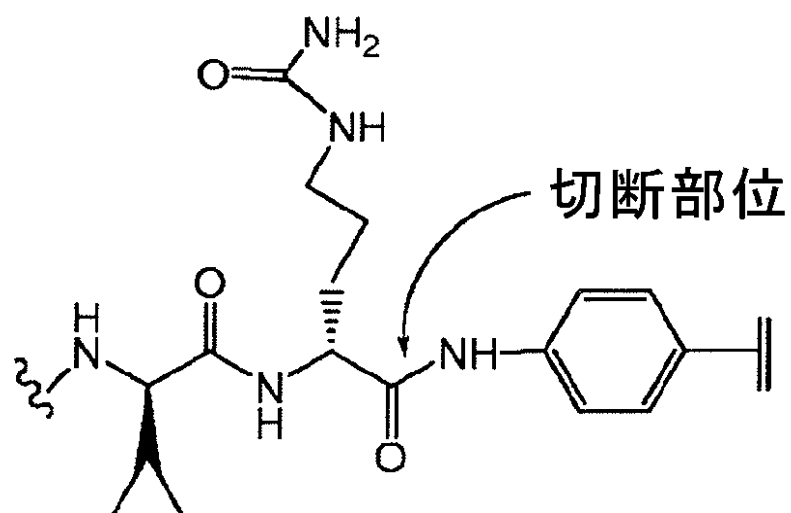
【0148】

リンカーの切断可能な部分の代表的な例は、カテプシンBなどの細胞内プロテアーゼに
よって切断されるバリニン-シトルリンp-アミノベンジルカルバマート(VitCitA
50

BC)である。

【0149】

【化31】



10

〔式中、波線は典型的には、リンカーの Y^1 （または Q^1 ）部分への結合点を示し、平行線は、リンカーの X^1 （または P^1 ）部分への、またはさらにはエフェクター部分自体への結合点を表す〕。一部の態様ではもちろん、波線は、 X^1 または P^1 リンカー部分（またはエフェクター部分）への結合点を示してよく、平行線は、リンカーの Y^1 または Q^1 部分への結合点を示してよい。

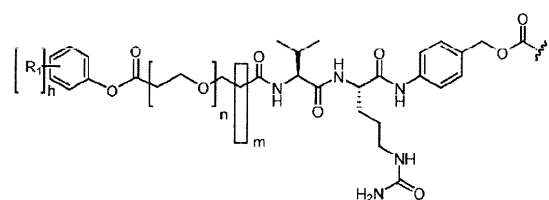
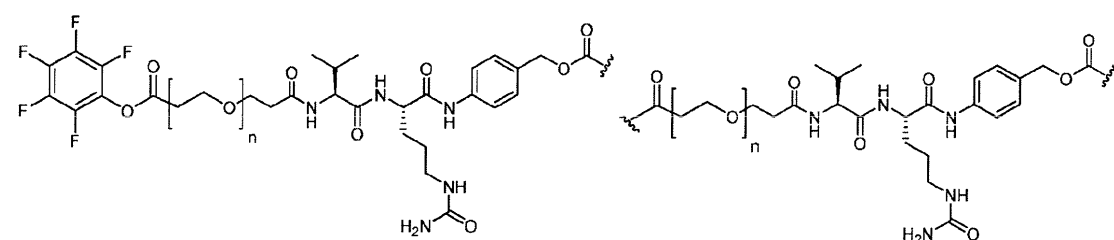
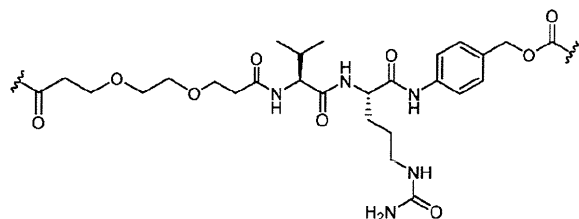
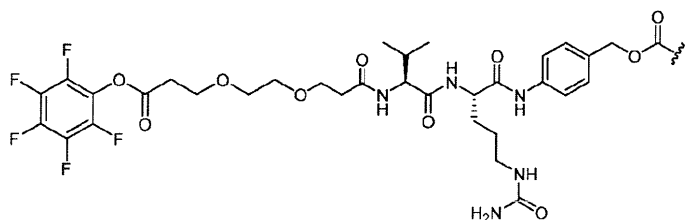
20

【0150】

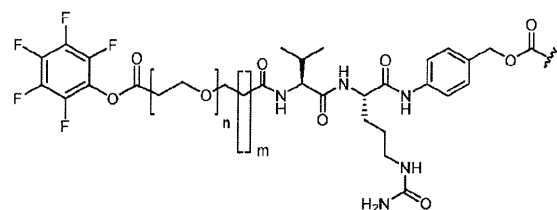
したがって、一部の態様では、本発明は、下式：

【0151】

【化 3 2】



, および



〔式中、 m 、 n 、および j はそれぞれ独立に、 $0 \sim 30$ であり、 R_1 は F であり、 $h = 2$ 、 3 、 4 、または 5 である〕のリンカーを提供する。一部の態様では、 $n = 1 \sim 10$ 、一部の態様では、 $n = 1 \sim 5$ である。一部の態様では、 n の値の範囲の下限は、 0 、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 、 11 、 12 、 13 、 14 、 15 、 16 、 17 、 18 、 19 、および 20 からなる群から選択され、 n の値の範囲の上限は、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 、 11 、 12 、 13 、 14 、 15 、 16 、 17 、 18 、 19 、 20 、 21 、 22 、 23 、 24 、 25 、 26 、 27 、 28 、 29 、および 30 からなる群から選択される。 n は 1 であってよい。 n は 2 であってよい。 n は 3 であってよい。 n は 4 であってよい。 n は 5 であってよい。 n は 6 であってよい。一部の態様では、 $m = 1 \sim 10$ 、一部の態様では、 $m = 1 \sim 5$ である。一部の態様では、 m の値の範囲の下限は、 0 、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 、 11 、 12 、 13 、 14 、 15 、 16 、 17 、 18 、 19 、および 20 からなる群から選択され、 m の値の範囲の上限は、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 、 11 、 12 、 13 、 14 、 15 、 16 、 17 、 18 、 19 、 20 、 21 、 22 、 23 、 24 、 25 、 26 、 27 、 28 、 29 、および 30 からなる群から選択される。 m は 1 であってよい。 m は 2 であってよい。 m は 3 であってよい。 m は 4 であってよい。 m は 5 であってよい。 m は 6 であってよい。一部の態様では、 $j =$

10

20

30

40

50

1～10、一部の態様では、 $j = 1 \sim 5$ である。一部の態様では、 j の値の範囲の下限は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、および20からなる群から選択され、 j の値の範囲の上限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、および30からなる群から選択される。 j は1であってよい。 j は2であってよい。 j は3であってよい。 j は4であってよい。 j は5であってよい。 j は6であってよい。一部の態様では、 $k = 1 \sim 10$ 、一部の態様では、 $k = 1 \sim 5$ である。一部の態様では、 k の値の範囲の下限は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、および20からなる群から選択され、 k の値の範囲の上限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、および30からなる群から選択される。 k は1であってよい。 k は2であってよい。 k は3であってよい。 k は4であってよい。 k は5であってよい。 k は6であってよい。一部の態様では、 Y^1 の全体長さは、200原子を超えない。一部の態様では、 Y^1 の全体長さは、150原子を超えない。一部の態様では、 Y^1 の全体長さは、100原子を超えない。一部の態様では、 Y^1 の全体鎖長の範囲は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、および60からなる群から選択される下限、ならびに5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、および100からなる群から選択される上限を有し得る。

【0152】

オーリスタチンをベースとするペイロード (payload) の使用

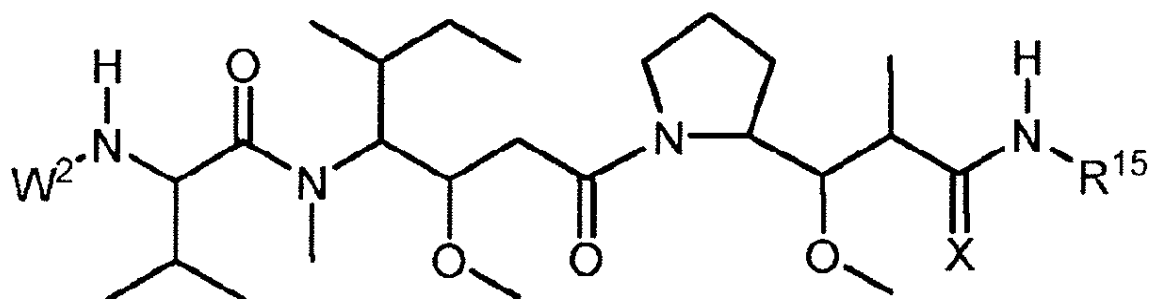
適切なリンカー技術と一緒に使用する場合、本発明の標的化コンジュゲーション技術に関連して、オーリスタチンをベースとするエフェクター部分も有用である。具体的には、有用なペイロードには、薬学的に許容できる塩、水和物、および遊離塩基をすべて包含する PCT/IB2012/056224 に開示されているものが包含される。

【0153】

したがって、次のエフェクター部分およびリンカー、またはその薬学的に許容できる塩もしくは溶媒和物を、本発明の態様で 사용할ことができる：

【0154】

【化33】



[式中、出現する毎に独立に、

W^2 は、

【0155】

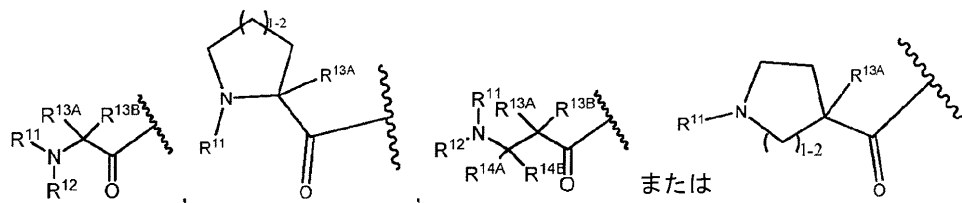
10

20

30

40

【化 3 4】

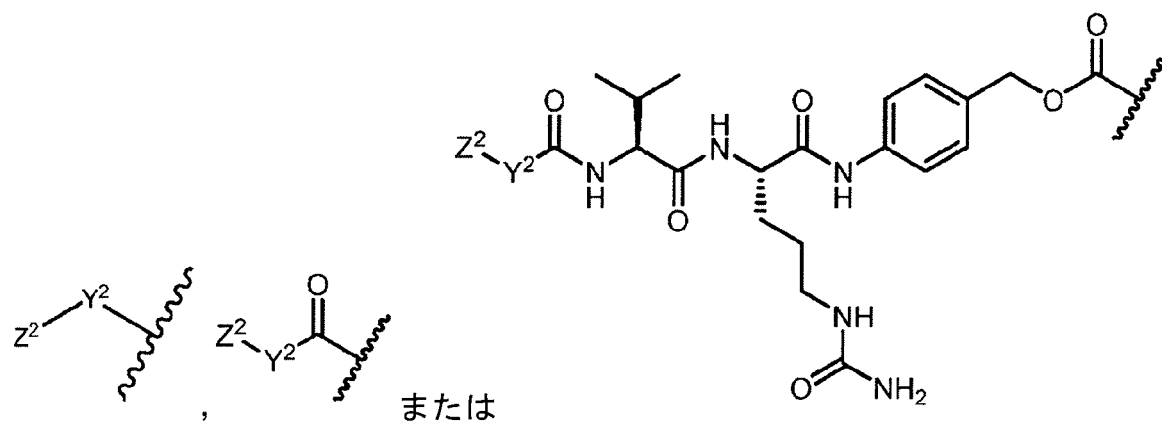


であり、

R¹¹ は、

【0156】

【化 3 5】



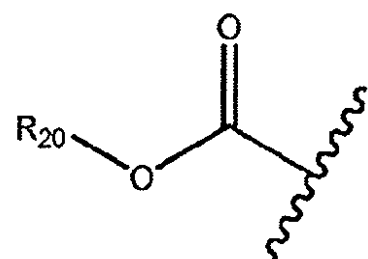
であり、

Y² は、-C₂~C₂₀ アルキレン-、-C₂~C₂₀ ヘテロアルキレン-；-C₃~C₈ カルボシクロ-、-アリーレン-、-C₃~C₈ ヘテロシクロ-、-C₁~C₁₀ アルキレン-アリーレン-、-アリーレン-C₁~C₁₀ アルキレン-、-C₁~C₁₀ アルキレン- (C₃~C₈ カルボシクロ) -、- (C₃~C₈ カルボシクロ) -C₁~C₁₀ アルキレン-、-C₁~C₁₀ アルキレン- (C₃~C₈ ヘテロシクロ) -または- (C₃~C₈ ヘテロシクロ) -C₁~C₁₀ アルキレン-であり、

Z² は、

【0157】

【化 3 6】



であり、

R¹² は、水素、C₁~C₈ アルキル、またはC₁~C₈ ハロアルキルであり、

R^{13A} および R^{13B} は、次の (i) または (ii) のいずれかであり：

(i) R^{13A} は、水素、C₁~C₈ アルキル、C₁~C₈ ハロアルキル、C₃~C₈ カルボシクリル、C₁~C₁₀ ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアラルキル、アラルキル、またはハロゲンであり、かつ

R^{13B} は、C₁~C₈ アルキル、C₁~C₈ ハロアルキル、C₃~C₈ カルボシクリル

10

20

30

40

50

ル、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアラルキルもしくはアラルキル、またはハロゲンであるか、または

(i i) R^{13A} および R^{13B} は一緒になって、 $C_2 \sim C_8$ アルキレンまたは $C_1 \sim C_8$ ヘテロアルキレンであり、

R^{14A} および R^{14B} は、次の (i) または (i i) のいずれかであり：

(i) R^{14A} は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ ハロアルキル、 $C_3 \sim C_8$ カルボシクリル、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアラルキル、またはアラルキルであり、かつ

R^{14B} は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ ハロアルキル、 $C_3 \sim C_8$ カルボシクリル、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアラルキル、またはアラルキルであるか、または

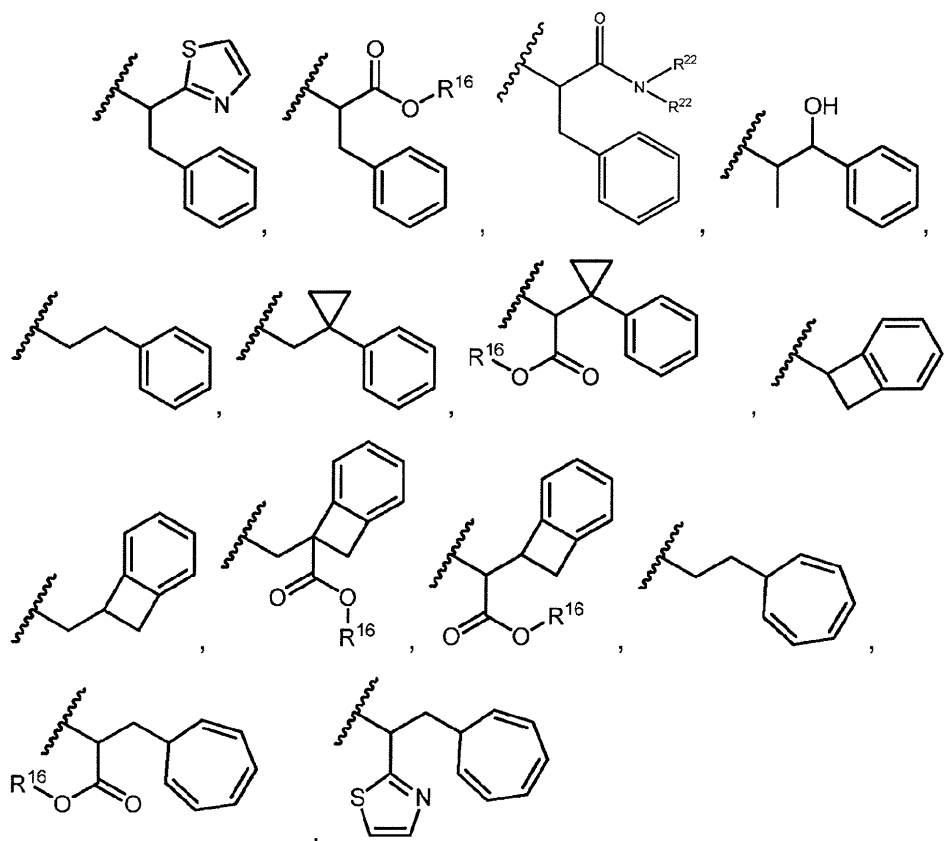
(i i) R^{14A} および R^{14B} は一緒になって、 $C_2 \sim C_8$ アルキレンまたは $C_1 \sim C_8$ ヘテロアルキレンであり、

R^{15} は、

$-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル- $N(R')_2$ 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル- $C(O)R'$ 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル- $C(O)OR'$ 、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-N(R')_2$ 、 $-CN$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-NHCONH_2$ 、 $-S(=O)_2R'$ および $-SR'$ (ここで、各 R' は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、および非置換のアリールからなる群から独立に選択されるか、または2個の R' は、それらが結合している窒素と一緒に、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリルを形成することができる) からなる群から独立に選択される1、2、3、4または5個の基で置換されていてもよい

【0158】

【化37】



、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリル、 $C_3 \sim C_8$ カルボシクリルおよび $C_6 \sim C_{14}$ アリールであるか、または

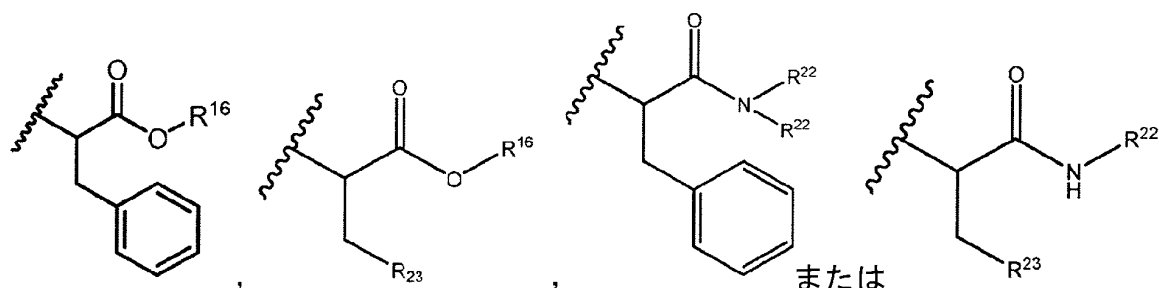
R^{15} は、

$C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル $-N(R')$ ₂、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル $-C(O)R'$ 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル $-C(O)OR'$ 、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)N(R')$ ₂、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-N(R')$ ₂、 $-CN$ 、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-NHCONH_2$ 、 $-S(=O)_2R'$ 、 $-SR'$ およびアリーレン $-R'$ (ここで、各 R' は、水素、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ ヘテロシクリル、 $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリル、およびアリールからなる群から独立に選択されるか、または2個の R' は、それらが結合している窒素と一緒に、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリルを形成することができる) からなる群から独立に選択される1、2、3、4、または5個の基で置換されていてもよい

10

【0159】

【化38】



20

であり、

R^{16} は、水素、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $-C_2 \sim C_8$ アルキニル、または $-C_1 \sim C_8$ ハロアルキルであり、

R^{22} は、水素、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリル、または $C_6 \sim C_{14}$ アリールであり、

R^{23} は、 $C_1 \sim C_{10}$ ヘテロシクリルであり、

R^{17} は、出現する毎に、F、Cl、I、およびBrからなる群から独立に選択され、

R^{20} は、 $-$ アリール、 $-C_1 \sim C_{10}$ アルキレン $-$ アリールであり、その際、アリールを含む R^{10} 上のアリールは、 $[R^{17}]_h$ で置換されており、

30

h は、5であり、

X は、OまたはSであるが、

ただし、 R^{13A} が水素である場合、 X はSであることを条件とする]。

【0160】

一部の態様では、エフェクター部分は、表73から選択され得る。一部の態様では、エフェクター部分は毒素#54である。一部の態様では、エフェクター部分は毒素#115である。一部の態様では、エフェクター部分は毒素#69である。

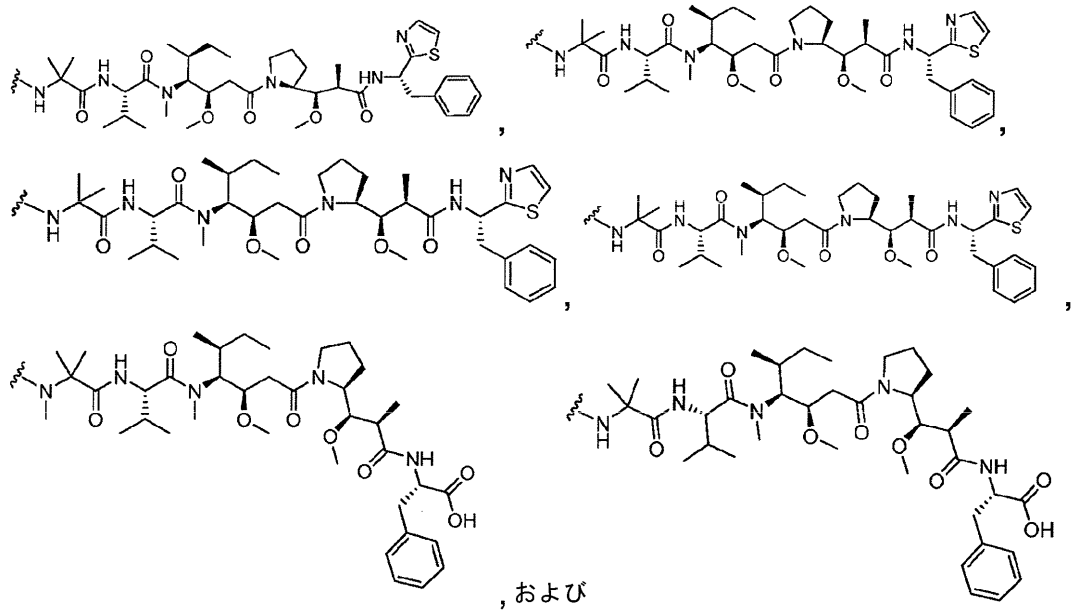
【0161】

一部の態様では、本発明のリンカーにコンジュゲートされている場合のエフェクター部分は、下式：

40

【0162】

【化 3 9】



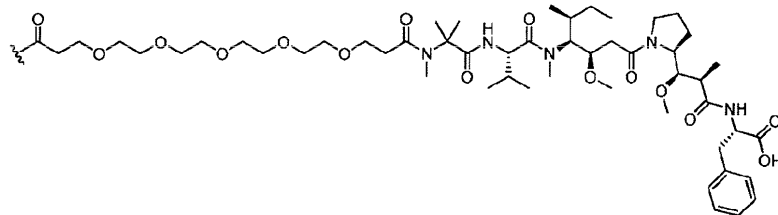
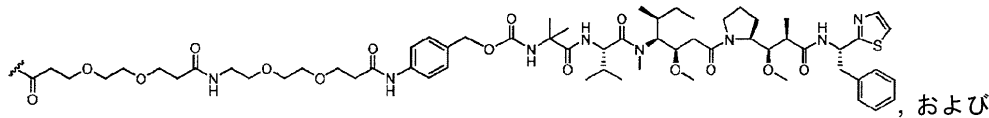
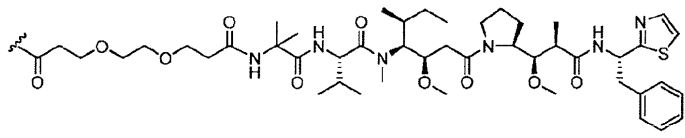
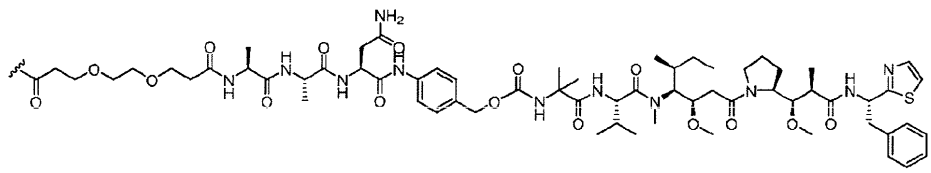
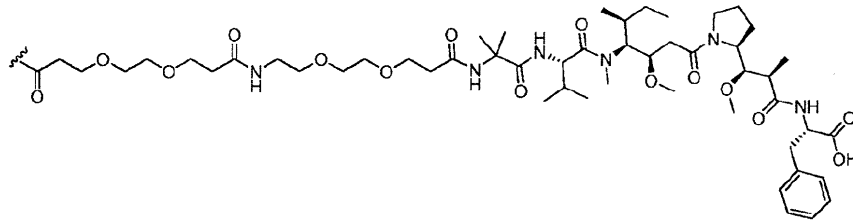
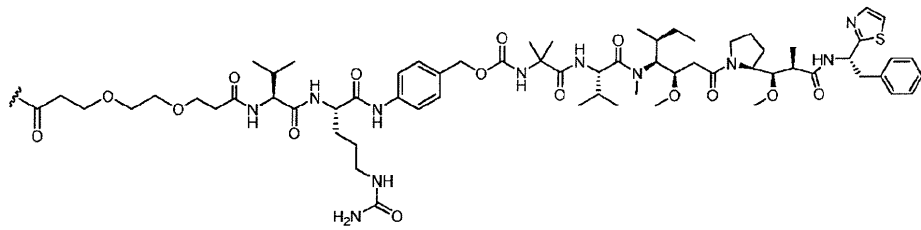
からなる群から選択される式を含む。

【0163】

本発明に関連して有用な、リンカーにコンジュゲートされているエフェクター部分には、PCT/IB2012/056224に開示されているものなどのオーリスタチンをベースとする毒素ーリンカーが包含される。一部の態様では、本発明の毒素ーリンカーは、

【0164】

【化 4 0】



からなる群から選択され得る。

【0165】

コンジュゲーション方法

一部の態様では、本発明は、抗体または抗原結合部分を含む多機能性抗体コンジュゲート（MAC）を調製する方法を提供し、抗体は、配列番号 98 の K⁵（または配列番号 98 の範囲内に該当する本明細書に開示されている配列番号）の側鎖に、または抗体定常ドメイン上の残基 K（K の位置は、配列番号 6 の残基 77 または K a b a t ナンバリングによる定常軽鎖ドメインの残基 185 と一致する）の側鎖に結合されているリンカーを介して、少なくとも 1 個のエフェクター部分に共有結合的にコンジュゲートされており、前記方法は、エフェクター部分を式：

【0166】

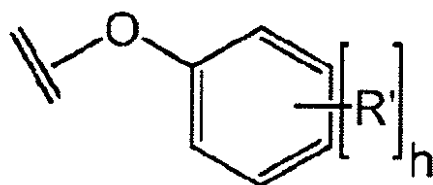
10

20

30

40

【化 4 1】

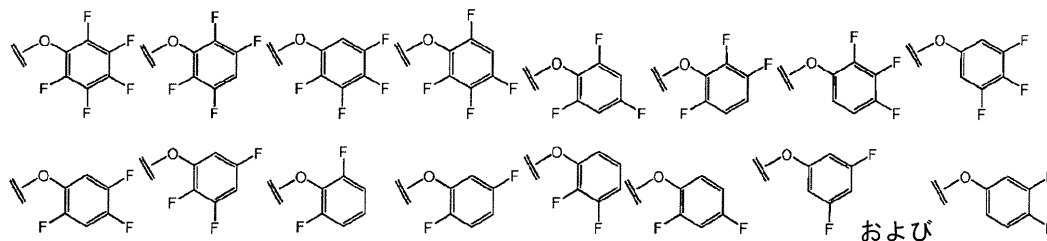


〔式中、 R^1 は、単独か、または組合せでの F、Cl、Br、または I、ニトロ、シアノ、トリフルオロメチルのいずれかであり、 $h = 1、2、3、4、$ または 5 である〕の脱離基 Z^* で終結するリンカーに共有結合させるステップと、こうして形成されたエフェクター部分ーリンカーー脱離基複合体を抗体と、約 $3.5 : 1$ から約 $4.5 : 1$ のエフェクター部分：抗体のモル比で反応させるステップとを含む。一部の態様では、このモル比は、約 $3.7 : 1$ から約 $4.3 : 1$ である。一部の実施形態では、 R^1 はハロゲンであってよい。一部の実施形態では、 R^1 は、F または Cl であり、 $h = 4$ または 5 である。一部の実施形態では、 R^1 は、F または Cl であり、 $h = 5$ である。一部の実施形態では、 R^1 は F であり、 $h = 2、3、4、$ または 5 である。一部の実施形態では、 R^1 は F であり、 $h = 3、4、$ または 5 である。一部の実施形態では、 R^1 は F であり、 $h = 4$ または 5 である。一部の実施形態では、 R^1 は F であり、 $h = 5$ である。一部の態様では、 Z^* は、

下式：

【0167】

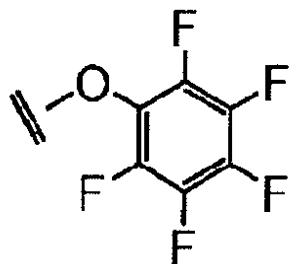
【化 4 2】



からなる群から選択され得る。 R^1 は、 $3 \sim 5$ の量で存在し得る。 3 個の R^1 基が存在し得る。 R^1 は、 $4 \sim 5$ の量で存在し得る。 4 個の R^1 基が存在し得る。 5 個の R^1 基が存在し得る。 R^1 はフッ素であってよい。 R^1 は塩素であってよい。 R^1 は臭素であってよい。脱離基は、下式：

【0168】

【化 4 3】



を含み得る。

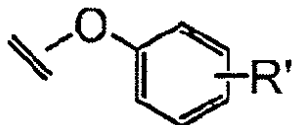
【0169】

一部の態様では、本発明は、追加の標的を結合する少なくとも 1 個のエフェクター部分（ペプチド、低分子、アプタマー、核酸分子、またはタンパク質など）に共有結合的に連結されている抗体またはその断片を含む MAC を生産する方法であって、エフェクター部

分が、抗体の表面リシン残基のε-アミノと反応し得るPFP脱離基を有するリンカーを含むことを特徴とする方法を提供する。一部の態様では、本発明は、エフェクター部分（ペプチドなど）を、配列番号98を含む本発明のCILドメインにコンジュゲートさせるための方法を提供し、この方法は、エフェクター部分を、下式：

【0170】

【化44】



10

〔式中、R¹は、単独か、または組合せでのF、Cl、Br、またはI、ニトロ、シアノ、トリフルオロメチルのいずれかであり、1～5の量で存在し得る〕

の脱離基を含むリンカーとコンジュゲートさせるステップと、その脱離基を配列番号98のK⁵の側鎖と反応させるステップとを含む。

【0171】

一部の態様では、当該方法は、抗体またはその抗原結合部分を、PFP脱離基を含むリンカーに共有結合されているエフェクター部分と組み合わせることを含む。

【0172】

一部の態様では、エフェクター部分：抗体のモル比は、約2.5から約4.6：1である。本発明の一部の態様では、このモル比は、約3.7：1および約4.3：1である。本発明の一部の態様では、エフェクター部分：抗体のモル比は、約4：1である。一部の態様では、このモル比は、約2：1から約7：1である。一部の態様では、このモル比は、約3：1から約6：1である。一部の態様では、このモル比は、約3：1から約7：1である。一部の態様では、このモル比は、約3：1から約5：1である。

20

【0173】

抗体1個当たり1.5未満のコンジュゲーションを有することが望ましい本発明の態様では（単一のエフェクター部分が必要とされる場合など）、このモル比は、約1：1から約6：1であってよく、ここで、緩衝液は、HEPESを少なくとも0.02Mの濃度で含む。HEPESの濃度は、約0.1M～約1Mであってよい。HEPESの濃度は、約0.1M～約0.5Mであってよい。抗体1個当たり1.5未満のコンジュゲーションを有することが望ましい本発明の態様では（単一のエフェクター部分が必要とされる場合など）、このモル比は、約1：1から約3：1であってよい。

30

【0174】

一部の態様では、好ましいモル比は、約1、約1.2、約1.4、約1.5、約1.6、約1.8、約2、約2.2、約2.4、約2.5、約2.6、約2.8、約3、約3.2、約3.3、約3.4、約3.5、約3.6、約3.7、約3.8、約3.9、約4、約4.0、約4.1、約4.2、約4.3、約4.4、約4.5、約4.6、約4.7、約4.8、約4.9、約5、約5.2、約5.4、約5.5、約5.6、約5.8、約6、約6.2、約6.4、約6.5、約6.6、約6.8、約7、約7.3、約7.5、約7.7、約8、約8.5、約9、約9.5、および約15対1からなる群から選択される下限と、約1.5、約1.6、約1.8、約2、約2.2、約2.4、約2.5、約2.6、約2.8、約3、約3.2、約3.3、約3.4、約3.5、約3.6、約3.7、約3.8、約3.9、約4.0、約4.1、約4.2、約4.3、約4.4、約4.5、約4.6、約4.7、約4.8、約4.9、約5、約5.2、約5.4、約5.5、約5.6、約5.8、約6、約6.2、約6.4、約6.5、約6.6、約6.8、約7、約7.3、約7.5、約7.7、約8、約8.5、約9、約9.5、約10、および約15対1からなる群から選択される上限とを有する範囲である。

40

【0175】

一部の態様では、本発明は、エフェクター部分およびタンパク質を少なくとも約30分

50

間互いにコンジュゲートさせることをさらに含む。一部の態様では、この継続時間は少なくとも約60分である。一部の態様では、この継続時間は少なくとも約2時間である。一部の態様では、本発明は、エフェクター部分および抗体を約4℃～約40℃でコンジュゲートさせることをさらに含む。一部の態様では、本発明は、エフェクター部分および抗体を約10℃～約30℃でコンジュゲートさせることをさらに含む。一部の態様では、本発明は、エフェクター部分および抗体を約15℃～約30℃でコンジュゲートさせることをさらに含む。一部の態様では、反応を約18℃～約25℃で行う。一部の態様では、反応を約22℃で行う。一部の態様では、反応をほぼ室温で行う。

【0176】

一部の態様では、コンジュゲーション反応をpH約6.5～pH約8.0で行う。一部の態様では、コンジュゲーション反応をpH約6.75～pH約8.0で行う。一部の態様では、コンジュゲーション反応をpH約7.7で行う。一部の態様では、コンジュゲーション反応をpH約7で行う。一部の態様では、コンジュゲーション反応をpH約7.2で行う。一部の態様では、コンジュゲーション反応をpH約7.5で行う。一部の態様では、コンジュゲーション反応を、その下限が5.5、6.6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、および8からなる群から選択され、その上限が6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.5、および9からなる群から選択されるpH値の範囲の間で行う。

【0177】

一部の態様では、pHは6.5未満であってよい；これは特に、抗体1個当たり約1.5未満のコンジュゲーションを必要とする用途において特に有用である。一部の態様では、pHは、約5.5～約6.5である。

【0178】

一部の態様では、塩濃度は、約0.2M未満であってよい。塩は、ハロゲン化物塩（F、Cl、Br、I）であってよく、Li、Na、K、Be、Mg、Caなどの金属を含んでよい。塩は、NaClであってよい。塩は、KClであってよい。約0.1M超の塩濃度を、抗体1個当たりのコンジュゲーションの率および／または数を制限するために使用することができる。塩濃度は、約0～約0.1Mであってよい。塩濃度は、約0～約0.5Mであってよい。塩濃度は、約0～約0.3Mであってよい。

【0179】

一部の態様では、本発明の方法は、抗体またはその抗原結合部分をpH約5.5の製剤緩衝液中で製剤化することを含む。製剤緩衝液は、酢酸ナトリウムおよびトレハロース緩衝液であってよい。この緩衝液は、いずれの第一級アミンも含有しないという利点を有し、それ自体がpH調節のために十分に役立つ。当該抗体は、約15～約25mg・ml⁻¹の量で存在し得る。一部の態様では、抗体は、20mg・ml⁻¹の量で存在し得る。

【0180】

製剤緩衝液のpHを、pH約7.2～pH約8.0に調整することができる。一部の実施形態では、製剤緩衝液を、pH7.7に調整することができる。製剤緩衝液のpHを、リン酸緩衝液で調整することができる。リン酸緩衝液は、約40mM～約80mMの濃度であってよい。リン酸緩衝液は、約10mM～約200mMの濃度であってよい。

【0181】

一部の態様では、エフェクター部分／リンカーおよび脱離基Z*とのコンジュゲーション反応中の抗体の濃度は、範囲の下限が、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約15、約20、約30、および約40mg・ml⁻¹から選択され、範囲の上限が、約7、約8、約9、約10、約15、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100、約150、約200、約500mg・ml⁻¹からなる群から選択される範囲であってよい。

【0182】

エフェクター部分は、少なくとも約 $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ の濃度で再構成することができる。エフェクター部分は、使用する前に希釈されたプロピレングリコール中で、約 $5 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ の濃度で再構成することができ、一部の実施形態では、 $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ の濃度であってよい。

【0183】

コンジュゲーション反応は、抗体またはその抗原結合部分およびエフェクター部分を、抗体1モルに対してエフェクター部分4モルのモル比で組合せることによって行い、約 $18^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ で約2時間～約24時間インキュベートすることができる。一部の実施形態では、抗体とエフェクター部分との間のコンジュゲーション反応は、室温で2時間である。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、少なくとも約2時間である。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、少なくとも約30分間である。

10

【0184】

反応物をクエンチし、 pH 約 $5.0 \sim 6.0$ に調整することができる。一部の実施形態では、クエンチした反応物を、 pH 5.5 に調整することができる。これは、コハク酸塩およびグリシン緩衝液を、例えば pH 約 4.0 で使用して達成することができる。この緩衝液は、TRISまたは他のアミノ酸緩衝液などの他のより一般的な緩衝液を上回る利点を有する。コハク酸塩は、コンジュゲート分子に対してストレス性であり得る透析濾過中の凝集および沈殿の制限を援助し、グリシンは追加の第一級アミンを含有する。

【0185】

反応物を濃縮することができ、未反応のエフェクター部分、関連する種（水溶媒との反応によってリンカーが加水分解された場合のペプチドなど）および反応混合物の他の未反応成分（PF₆など）を、例えば 50 kDa 膜またはサイズ排除クロマトグラフィーを使用する透析濾過によって、 pH 5.5 、 $30 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ でコハク酸塩、グリシン、塩化ナトリウム、およびトレハロース緩衝液に除去することができる。

20

【0186】

一部の態様では、この方法は、エフェクター部分を $\text{C}_{\text{L}}\text{K}-\text{K}^{80}$ にコンジュゲートさせることを含み得る。一部の態様では、本発明は、エフェクター部分を Igドメインにコンジュゲートさせることを含み、これは、 β スtrand EとFとの間のEF接続鎖ループ上に配列番号98を含むように $\text{C}_{\text{L}}\lambda$ を変異させることと、エフェクター部分に、本明細書で定義したとおりの脱離基 Z^* を含むリンカーを結合させることと、前記エフェクター部分ーリンカー脱離基複合体を配列番号98の K^5 の側鎖と反応させることとを含む。

30

【0187】

本発明の医薬組成物

本発明は、MACおよび薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物を提供する。本明細書で使用する場合、「薬学的に許容できる担体」には、生理学的に適合性のあらゆるすべての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張性の吸収遅延剤などが包含される。薬学的に許容できる担体の例には、水、生理食塩水、リン酸緩衝溶液、デキストロース、グリセロール、エタノールなどのうちの1種または複数、さらにはこれらの組合せが包含され、等張化剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、または塩化ナトリウムが組成物中に包含され得る。抗体もしくは抗体部分の貯蔵寿命もしくは有効性を高める湿潤剤もしくは乳化剤、保存剤、または緩衝液などの湿潤物質あるいは少量の補助物質などの薬学的に許容できる物質。

40

【0188】

本発明の組成物は、様々な形態であってよい。これらには例えば、液体液剤（例えば、注射用および注入用液剤）、分散剤または懸濁剤、錠剤、丸剤、散剤、リポソーム、および坐剤などの液体、半固体、および固体剤形が包含される。好ましい形態は、意図されている投与様式および治療適用に左右される。典型的な好ましい組成物は、一般的に抗体でヒトを受動免疫化するために使用されるものと同様の組成物などの注射用または注入用液剤の形態である。好ましい投与様式は、非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。好ましい実施形態では、抗体を、静脈内点滴または注射によって投与する。他

50

の好ましい実施形態では、抗体を、筋肉内または皮下注射によって投与する。

【0189】

医薬組成物は、抗腫瘍薬または画像診断薬などの別の成分をさらに含んでよい。本発明の別の態様は、本発明のMACおよびこれらの抗体を含む医薬組成物を含むキットを提供する。キットは、MACまたは医薬組成物に加えて、診断薬または治療薬を包含することができる。キットは、診断法または治療法において使用するための説明書を包含することもできる。一部の実施形態では、キットは、抗体またはその医薬組成物および診断薬を包含する。他の実施形態では、キットは、抗体またはその医薬組成物および1種または複数の追加の抗新生物薬、抗腫瘍薬、または化学療法薬などの治療薬を包含する。

【0190】

これらの薬剤および本発明の化合物を、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液などの薬学的に許容できるビヒクルと組み合わせることができる。特定の投与計画、すなわち、用量、タイミング、および頻度は、特定の個体およびその個体の病歴に左右されるはずである。

【0191】

許容できる担体、添加剤、または安定剤は、使用される投薬量および濃度において受容者にとって非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝液；塩化ナトリウムなどの塩；アスコルビン酸およびメチオニンを包含する抗酸化剤；保存剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；メチルパラベンまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レソルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、またはIgなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；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、またはリシンなどのアミノ酸；単糖、二糖、およびグルコース、マンノース、またはデキストリンを包含する他の炭水化物；EDTAなどのキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；および／またはTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含み得る。

【0192】

本発明のリポソーム含有化合物は、米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号中に記載されている方法などの当技術分野において知られている方法によって調製される。拡張された循環時間を伴うリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導化ホスファチジルエタノールアミン（PEDE-PE）を含む脂質組成物を用いる逆相蒸発法によって生成することができる。リポソームを、規定の空孔サイズのフィルターを介して押し出して、所望の直径を持つリポソームを得る。

【0193】

活性成分を、例えば、コアセルベーション技術もしくは界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセルおよびポリマー（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロ乳剤、ナノ粒子、およびナノカプセル）中に、またはマクロ乳剤中に封入することもできる。このような技術は、Remington, The Science and Practice of Pharmacy、第20版、Mack Publishing（2000）に開示されている。

【0194】

持続放出製剤を調製することができる。持続放出製剤の適切な例には、抗体を含有する固体の疎水性ポリマーの半浸透性マトリックスが包含され、このマトリックスは、成形さ

10

20

30

40

50

れた物品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリックスの例には、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）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸および7エチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドからなる注射用マイクロスフェア）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、イソ酪酸酢酸スクロース、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が包含される。

【0195】

in vivo 投与のために使用される製剤は、滅菌でなければならない。これは、例えば、滅菌濾過膜での濾過によって容易に達成される。本発明の治療用化合物を一般的に、滅菌アクセスポートを有するコンテナ、例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアル内に入れる。

10

【0196】

適切な乳剤は、Intralipid（商標）、Liposyn（商標）、Infontrol（商標）、Lipofundin（商標）、およびLipiphysan（商標）などの市販の脂肪乳剤を使用して調製することができる。活性成分を、事前混合された乳剤組成物中に溶解させるか、または別法では、これを油（例えば、ダイズ油、ベニバナ油、綿実油、ゴマ油、トウモロコシ油、またはアーモンド油）およびリン脂質（例えば、卵リン脂質、ダイズリン脂質、または大豆レシチン）と水との混合によって形成された乳剤中に溶解させることができるか、いずれでもよい。乳剤の等張性を調整するために、他の成分、例えばグリセロールまたはグルコースを加えることができることは分かるであろう。適切な乳剤は典型的には、20%まで、例えば5~20%の油を含有するはずである。脂肪乳剤は、0.1~1.0 μmの間、特に0.1~0.5 μmの脂肪液滴を含むことができ、5.5~8.0の範囲のpHを有する。

20

【0197】

乳剤組成物は、本発明の化合物をIntralipid（商標）またはその成分（ダイズ油、卵リン脂質、グリセロール、および水）と混合することによって調製されたものであってよい。

【0198】

吸入または吹送のための組成物には、薬学的に許容できる水性もしくは有機溶媒、またはこれらの混合物中の溶液および懸濁液、ならびに粉末が包含される。液体または固体の組成物は、上記で提示したとおりの適切な薬学的に許容できる添加剤を含有し得る。一部の実施形態では、組成物を、局所または全身作用のために、経口あるいは経鼻呼吸経路によって投与する。好ましい薬学的に許容できる滅菌溶媒中の組成物を、ガスの使用によって噴霧することができる。噴霧された溶液を、噴霧デバイスから直接呼吸することができるか、または噴霧デバイスを、フェイスマスク、テント、または間欠的正圧呼吸器に取り付けることができる。溶液、懸濁液、または粉末組成物を、好ましくは経口または経鼻で、製剤を適切な手法で送達するデバイスから投与することができる。

30

【0199】

本発明の化合物および組成物は、関連する適応症について確立された治療と一緒に使用することができる。例には、血管新生障害、詳細には特に癌を治療するための5-フルオロウラシル、イリノテカン、オキサリプラチン、セツキシマブ、スニチニブ、およびリツキシマブが包含される。他の例には、ラニビズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、およびパリビズマブが包含される。

40

【0200】

本発明の治療方法

本発明は、治療方法も提供する。治療方法は、本発明の化合物または組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【0201】

50

本発明は、血管新生を阻害もしくは低減する、または血管新生障害に関連する疾患もしくは症状を治療もしくは防止する方法における本発明の化合物または本発明の医薬組成物の使用を提供する。本発明は、血管新生を阻害もしくは低減する、または血管新生障害に関連する疾患もしくは症状を治療もしくは防止する方法を提供し、この方法は、治療上有効な用量の本発明の化合物および組成物を患者に投与することを含む。本発明の化合物または組成物を送達または投与する方法、および本発明の化合物または組成物を使用する治療方法も提供する。癌を治療する方法も提供し、この方法は、治療有効量の本発明による化合物または医薬組成物を対象に投与することを含む。本明細書で使用する場合、血管新生が媒介する状態は、異常な血管新生活性起因する状態、または血管新生活性をモジュレートする化合物が治療用途を有する状態である。本発明の化合物および組成物で治療および／または診断することができる疾患および状態には、癌、関節炎、高血圧、腎臓疾患、乾癬、眼疾患に伴う眼の血管新生、感染または外科的介入、黄斑変性、糖尿病性網膜症などが包含される。

10

【0202】

より具体的には、本発明に関連して本明細書で使用する場合、「癌」の例には、肺（NSCLCおよびSCLC）、頭頸部、卵巣、結腸、直腸、前立腺、肛門領域、胃、乳房、腎臓もしくは尿管、腎盂、甲状腺、膀胱、脳腫瘍、腎細胞癌、中枢神経系（CNS）の癌腫、その新生物、原発性CNSリンパ腫、非ホジキンスリンパ腫、脊髄軸腫瘍、中咽頭、下咽頭、食道、膵臓、肝臓、胆嚢および胆管、小腸、尿路の癌腫；またはリンパ腫、あるいは上述の癌のうちの1種または複数の癌の組合せが包含される。いっそうより具体的には、本発明に関連して本明細書で使用する場合、「癌」の例には、肺癌（NSCLCおよびSCLC）、乳癌、卵巣癌、結腸癌、直腸癌、前立腺癌、肛門領域の癌から選択される癌、または上述の癌のうちの1種もしくは複数の癌の組合せが包含される。

20

【0203】

他の実施形態では、本発明の医薬組成物は、限定ではないが、加齢性黄斑変性、血管形成術後の再狭窄、および乾癬などの非癌性過剰増殖性障害に関する。別の実施形態では、本発明は、IGF1Rおよび／またはAng2の活性化を必要とする哺乳類を治療するための医薬組成物に関し、この際、この医薬組成物は、治療有効量の本発明の活性化抗体および薬学的に許容できる担体を含む。本発明の医薬組成物は、骨粗鬆症、虚弱、または哺乳類が少なすぎる活性成長ホルモンを分泌するか、もしくは成長ホルモンに反応し得ない障害を治療するために使用することができる。

30

【0204】

本明細書で使用する場合、薬物、化合物、または医薬組成物の「有効な投薬量」または「有効量」は、任意の1種または複数の有益か、または所望の結果に影響を及ぼすために十分な量である。予防的使用では、有益か、または所望の結果には、リスクを排除または低減すること、重症度を低下させること、あるいは疾患の生化学的、組織学的、および／または行動的症状、疾患の発生中に存在するその合併症および中間の病理学的表現型を包含する疾患の発症を遅延することが包含される。治療的使用では、有益か、または所望の結果には、腫瘍のサイズ、伝播、腫瘍の血管系、または癌もしくは血管新生の増大に伴う他の疾患の1つもしくは複数の症状を低減すること、疾患を治療するために必要な他の薬物の用量を減少させること、他の薬物の作用を強化すること、および／あるいは患者の疾患の進行を遅延させることなどの臨床結果が包含される。有効な投薬量は、1回または複数回の投与で投与することができる。本発明の目的のために、薬物、化合物、または医薬組成物の有効な投薬量は、予防的または治療的治療を直接的または間接的のいずれかで達成するために十分な量である。臨床的文脈において理解されたとおり、薬物、化合物、または医薬組成物の有効な投薬量は、別の薬物、化合物、または医薬組成物との関連で、達成されることもあれば、達成されないこともある。したがって、「有効な投薬量」は、1種または複数の治療薬を投与する文脈において判断することができ、単一の薬剤は、1種または複数の他の薬剤との関連において所望の結果を達成することができるか、または達成しているならば、有効な量で与えられたと判断することができる。

40

50

【0205】

「個体」または「対象」は、哺乳類、より好ましくは、ヒトである。哺乳類にはまた、これらだけに限定されないが、家畜、競技動物、愛玩動物、霊長類、およびウマが含まれる。

【0206】

有利には、本発明の化合物の治療的投与は、血管新生の減少および／または癌の場合には、腫瘍体積の安定化または縮小をもたらす。好ましくは、腫瘍体積は、本発明のMACの投与前よりも少なくとも約10%または約15%低い。より好ましくは、腫瘍体積は、MACの投与前よりも少なくとも約20%低い。まだより好ましくは、腫瘍体積は、MACの投与前よりも少なくとも30%低い。有利には、腫瘍体積は、MACの投与前よりも少なくとも40%低い。より有利には、腫瘍体積は、MACの投与前よりも少なくとも50%低い。非常に好ましくは、腫瘍体積は、MACの投与前よりも少なくとも60%低い。最も好ましくは、腫瘍体積は、MACの投与前よりも少なくとも70%低い。

10

【0207】

本発明の方法による本発明の化合物の投与は、例えば、受容者の生理学的状態、投与の目的が治療的または予防的のいずれであるか、かつ熟練した医師が知っている他の因子に応じて、連続的または間欠的であってよい。本発明の化合物の投与は、予め選択された期間にわたって本質的に連続的であってよい、または一連の間隔を空けた投与であってよい。

【0208】

20

抗体

免疫グロブリン(Ig)ドメインは、グリークキートポロジで2つのβシートに配置された7~9の逆平行βストランドの2層サンドイッチからなるタンパク質ドメインの1種である。βストランドは、ほぼ完全に伸びたコンホメーションにある主鎖を有する典型的には3~10アミノ酸長さのポリペプチド鎖の伸張である。βシートは、少なくとも2つまたは3つの主鎖水素結合によって、側面で接続されたβストランドからなり、一般的には、ねじれたプリーツ状のシートを形成している。主鎖は、2つのβシートの間で繰り返しスイッチしている。典型的には、そのパターンは、(シート1中のN末端β-ヘアピン) - (シート2中のβ-ヘアピン) - (シート1中のβストランド) - (シート2中のC末端β-ヘアピン)である。シート間の交差は「X」を形成していて、N末端ヘアピンおよびC末端ヘアピンが、互いに向き合うようになっている。Igスーパーファミリーのメンバーは、種々の機能を有する数百種類のタンパク質において見出されている。例には、抗体、ジャイアントマッスルタイチン(giant muscle kinase titin)、および受容体チロシンキナーゼが含まれる。Ig様ドメインは、タンパク質-タンパク質およびタンパク質-リガンド相互作用に関係していることもある。

30

【0209】

αヘリックスは、アミノ酸の右巻きコイルまたはらせんコンホメーションであり、その際、いずれの主鎖N-H基も、4残基前のアミノ酸の主鎖C=O基に水素結合を供与している。この二次構造は時として、古典的Pauling-Corey-Branson αヘリックスとも称される。タンパク質におけるローカル構造の種類のうち、αヘリックスは、最も規則的であり、配列から最も予測可能であり、さらには、最も優勢である。

40

【0210】

免疫グロブリン(Ig)は、四量体の分子である。天然に存在するIgにおいて、各四量体は、ポリペプチド鎖の2つの同一のペアからなり、各ペアは、1つの「軽」鎖(約25 kDa)および1つの「重」鎖(約50~70 kDa)を有する。

【0211】

各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識を主に担う約100~110個またはそれ以上のアミノ酸の変換領域を包含する。各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能を主に担う定常領域を画定する。ヒトの軽鎖は、κおよびλ軽鎖として分類される。重鎖は、α、δ、ε、γ、およびμとして分類され、抗体のアイソタイプをIgA、IgD、IgE、

50

I g G、I g Mとしてそれぞれ決定する。軽鎖および重鎖内で、可変および定常領域は、約12以上のアミノ酸の「J」領域によって接合され、その際、重鎖も約10以上のアミノ酸の「D」領域を包含する。各軽鎖／重鎖ペアの可変領域は、インタクトなI gが2つの結合部位を有するように抗体結合部位を形成している。

【0212】

抗体分子中の各ドメインは、圧縮された逆平行βバレル内において相対して密にパックされた2つのβシートからなる同様の構造を有する。この保存構造は、免疫グロブリン(I g)フォールドと称される。定常ドメインのI gフォールドは、4ストランドβシートに対してパックされた3ストランドβシートを含有し、その際、各シートは鎖によって分離され；これらの鎖は典型的には、αヘリックス、ループ、ターン、およびショート、シャープターンをβヘアピンと呼ばれる2つのβシートの間に含む。

10

【0213】

I g鎖は、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって接合された比較的保存されたフレームワーク領域(FR)の同じ一般構造を示す。各ペアの2つの鎖からのCDRは、フレームワーク領域によってアラインされて、特異的エピトープへの結合を可能にする。N末端からC末端まで、軽鎖および重鎖は両方とも、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸のアサインメントは、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987および1991))の定義による。

20

【0214】

CDRを構成する特定の抗体中のアミノ酸残基の同一性は、当技術分野においてよく知られている方法を使用して決定することができる。例えば、抗体のCDRは、元々はKabatらによって定義された超可変領域として同定することができる(Kabatら、1992、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service, NIH, Washington D. C.)。CDRの位置はまた、元々はChothiaらによって記載された構造的ループ構造として同定することができる(Chothiaら、1989、Nature 342:877~883)。CDR同定のための他の手法には、KabatとChothiaとの折衷であり、Oxford Molecular's

30

AbM抗体モデル化ソフトウェア(現在はAccelrys(登録商標))を使用して誘導される「AbM定義」、またはMacCallumら、1996、J. Mol. Biol.、262:732~745中に提示された、観察された抗原接触に基づくCDRの「接触定義」が包含される。CDRの「コンホメーション定義」として本明細書において言及される別の手法では、CDRの位置は、抗原結合に対してエンタルピー的寄与をする残基として同定することができる(Makabeら、2008、Journal of Biological Chemistry、283:1156~1166)。さらに他のCDR境界定義は、上記手法のうちの1つに厳密に従うことはできないが、それにもかかわらず、それらは、KabatのCDRの少なくとも一部と重複するはずであり、ただし、それらを、特定の残基もしくは残基の群またはCDR全体さえも、抗原の結合に有意に強い影響を及ぼさないという予測または実験所見に照らして、短く、または長くすることはできる。本明細書で使用する場合、CDRは、手法の組合せを包含する当技術分野で知られているあらゆる手法によって定義されるCDRを指し得る。本明細書で使用方法は、これらの手法のうちのいずれかによって定義されたCDRを利用することができる。1つより多いCDRを含有する任意の所与の実施形態において、CDR(または抗体の他の残基)は、Kabat、Chothia、延長、AbM、接触、および／またはコンホメーション定義のいずれかに従って定義することができる。

40

【0215】

CLκおよびCLλドメインの残基のナンバリングは、様々であり得る。例えば、CL

50

κ のナンバリングは、Kabat ナンバリングによる LC-R¹⁰⁸（例えば、配列番号 2 の R¹⁰⁸）または Kabat ナンバリングによる LC-T¹⁰⁹（例えば、配列番号 2 の T¹⁰⁹）のいずれかから始まり得る。本明細書で使用するナンバリング規則は、Swiss Institute of Bioinformatics の一部である Swiss-Prot グループによって提供されたものであり、LC-T¹⁰⁹ から始まる。異なるナンバリングシステムが好ましい場合には、本発明の指定の残基のナンバリングを、それに応じて調整することができることは分かるであろう。LC は、軽鎖を指す。

【0216】

「抗体」は、特異的結合のためにインタクトな抗体と競合するインタクトな Ig またはその抗原結合部分を指す。抗原結合部分は、組換え DNA 技術、またはインタクトな抗体の酵素的もしくは化学的開裂によって生産することができる。抗原結合部分には特に、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dAb、および相補性決定領域 (CDR) 断片、単鎖抗体 (scFv)、キメラ抗体、二重特異性抗体、およびポリペプチドに特異的抗原結合を与えるために十分である Ig の少なくとも一部を含有するポリペプチドが含まれる。Fab 断片は、VL、VH、CL、および CH₁ ドメインからなる一価断片であり；F(ab')₂ 断片は、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された 2 つの Fab 断片を含む二価断片であり；Fd 断片は、VH および CH₁ ドメインからなり；Fv 断片は、抗体の一本腕の VL および VH ドメインからなり；dAb 断片は、VH ドメインまたは VL ドメイン（例えば、ヒト、ラクダ科、またはサメ）からなる。

【0217】

一般に、抗体に対する言及は、その抗原結合部分を、特に、それらの E および F の β ストランド間の配列番号 98 を含むその抗原結合部分も指すと解釈されるべきである。

【0218】

単鎖抗体 (scFv) は、VL および VH 領域がペアとなって、それらが 1 本のタンパク質鎖となることを可能にする合成リンカーを介して一価の分子を形成している抗体である。二重特異性抗体は、VH および VL ドメインが 1 本のポリペプチド鎖上に発現しているが、同じ鎖上で 2 つのドメインの間でのペア形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインが別の鎖の相補的ドメインとペアを形成し、2 つの抗原結合部位を作成させる二価の二重特異性抗体である。1 個または複数の CDR を、共有結合的または非共有結合的のいずれかで分子に組み込んで、これをイムノアドヘンシンにすることができる。イムノアドヘンシンは、CDR（複数可）をより大きいポリペプチド鎖の一部として組み込むことができるか、CDR（複数可）を別のポリペプチド鎖に共有結合的に連結することができるか、または CDR（複数可）を非共有結合的に組み込むことができる。CDR は、イムノアドヘンシンが、該当する特定の抗原に特異的に結合することを可能にする。

【0219】

哺乳類軽鎖は、2 つの種類 κ および λ からなり、あらゆる所与の抗体分子において、1 種類のみが存在する。ヒトにおいては、 κ 分子が λ 分子よりも約 2 倍多く産生されるが、他の哺乳類では、この比は様々であり得る。各遊離軽鎖分子は、折り畳まれて、定常領域ドメインおよび可変領域ドメインを形成している 1 本のポリペプチド鎖中に約 220 のアミノ酸を含有する。

【0220】

B 細胞の発生中には、DNA レベルでの組換え事象によって、1 本の可変 (V) セグメントが接合 (J) セグメントと接合し；定常 (C) セグメントは後で、RNA レベルでのスプライシングによって接合される。多くの異なる V セグメントがいくつかの J セグメントで組み換えられることで、広範な抗原認識が得られる。追加の多様性は、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによる、および B 細胞の成熟中に脾臓およびリンパ節で生じる体細胞超変異によるヌクレオチドの無作為の追加から生じる接合多様性によって達成される。定常カッパ (CL κ) 領域は単一遺伝子によってコードされるのに対して、ラムダ定常 (CL λ) 領域は、同義遺伝子によってコードされ、スプライシングを受ける

。C L λ の特定の多型種に関連するいくつかのマーカーが知られており：例えば、I g C L λ 1 (M c g マーカー)；I G L C 2 - I g C L λ 2 (K e r n - O z - マーカー)；I g C L λ 3 (K e r n - O z + マーカー)、および I g C L λ 7 である。当業者であれば、ヒト C L λ 鎖においてこれまでに同定された多型のすべてを容易に確立することができる。配列番号 9 3 は、現在同定されている多型のうちの多くを組み込んでいる。本発明の配列は、C L κ および C L λ、ならびに抗体の他の知られている多型を一般に包含する。2つの多型遺伝子座、すなわち、C L κ - V / A^{4 5} および C L κ - L / V^{8 3} が、C L κ において同定されており、これまでに同定された3つの多型は：K m (1) : C L κ - V^{4 5} / L^{8 3} ; K m (1, 2) : C L κ - A^{4 5} / L^{8 3} ; および K m (3) : C L κ - A^{4 5} / V^{8 3} である。

10

【0221】

抗体は、1つまたは複数の結合部位を有することができる。1つより多い結合部位が存在する場合、結合部位は、互いに同一であってもよいし、または異なってもよい。例えば、天然に存在する I g は、2つの同一の結合部位を有し、単鎖抗体または F a b 断片は、1つの結合部位を有する一方で、「二重特異性」または「二機能性」抗体は、2つの異なる結合部位を有する。

【0222】

「単離された抗体」は、(1) その天然の状態では、天然に会合される成分を伴う他の天然に会合される抗体を包含する、天然に会合される成分と会合していない抗体、(2) 同一の種からの他のタンパク質を含まない抗体、(3) 抗体を天然には発現しない細胞によって発現されるか、もしくは異なる種に由来する細胞によって発現される抗体、または(4) 天然に存在しない抗体である。

20

【0223】

用語「ヒト抗体」には、ヒト I g 配列から誘導される1つまたは複数の可変および定常領域を有するすべての抗体が包含される。本発明の一部の実施形態では、抗 I G F 1 R 抗体のすべての可変および定常ドメインは、ヒト I g 配列から誘導される(全ヒト抗体)。ヒト化抗体は、重鎖および軽鎖のフレームワークおよび定常ドメイン中のある種のアミノ酸が、ヒトにおける免疫応答を回避または抑制するように変異されている非ヒト種から誘導される抗体である。別法では、ヒト化抗体は、ヒト抗体からの定常ドメインを非ヒト種の可変ドメインに融合することによって生産することができる。

30

【0224】

用語「キメラ抗体」は、1つの抗体からの1つまたは複数の領域および1つまたは複数の他の抗体からの1つまたは複数の領域を含有する抗体を指す。

【0225】

用語「エピトープ」には、I g または T 細胞受容体に特異的に結合し得るあらゆるタンパク質決定基が包含される。エピトープの決定基は通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面分子団からなり、通常、特異的な三次元構造的な特性、さらには特異的な電荷特性を有する。抗体は、解離定数が < 1 μM、好ましくは < 100 nM、より好ましくは < 10 nM である場合に、抗原を特異的に結合すると言われる。

【0226】

多機能性抗体コンジュゲートまたは M A C という用語は、標的に結合する少なくとも1個のエフェクター部分に共有結合的にコンジュゲートされている本明細書において定義するおりの抗体またはその抗原結合部分を指す。エフェクター部分は、ペプチド、低分子、タンパク質、核酸分子、毒素、アプタマー、もしくは抗原結合性抗体、またはその断片であってよい。本明細書を通じて言及されるペプチドなどのコンジュゲーションに対する言及は一般的に、タンパク質および(抗原結合性)抗体またはその断片へのコンジュゲーションについて当てはまる。

40

【0227】

完全ヒト抗体は、マウスまたはマウス由来のモノクローナル抗体(M a b)に固有の免疫原性およびアレルギー性応答を最小化する、したがって、投与される抗体の有効性およ

50

び安全性を増大させると予期される。完全ヒト抗体の使用は、繰り返しの抗体投与を必要とし得る炎症および癌などの慢性および再発性のヒト疾患を治療する際に、実質的な利点を提供すると予期され得る。別の実施形態では、本発明は、補体を結合しない抗体を含むMACを提供する。

【0228】

加えて、2つ（またはそれ以上）の単鎖抗体が互いに連結されている融合抗体を作成することができる。これは、1本のポリペプチド鎖上に二価もしくは多価の抗体を作成することを所望する場合、または二重特異性抗体を作成することを所望する場合に有用である。

【0229】

1つの種類の誘導された抗体は、2つ以上の抗体（同一の種類または異なる種類；例えば二重特異性抗体を作成するため）を架橋することによって生産される。適切な架橋剤には、適切なスペーサーによって分離された2つの別個の反応性基を有するヘテロ二機能性であるもの（例えば、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）、またはホモ二機能性（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）が包含される。

【0230】

別の種類の誘導された抗体は、標識された抗体である。本発明の抗体または抗体の一部を誘導することができる有用な検出薬には、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホンクロリド、フィコエリトリン、ランタニドリンなどを包含する蛍光化合物が包含される。抗体を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼなどの検出のために有用な酵素で標識することもできる。抗体が検出可能な酵素で標識された場合、これは、識別することができる反応生成物を産生するために酵素が使用する追加の試薬を加えることによって検出される。例えば、薬剤ホースラディッシュペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素およびジアミノベンジンを追加することで、反応生成物は着色されて、それを検出することができる。抗体を、ビオチンで標識し、アビジンまたはストレプトアビジン結合の間接的測定を介して検出することもできる。抗体を、ガドリニウムなどの磁性薬剤で標識することもできる。抗体を、二次レポーター（例えば、ロイシンジッパーペア配列、二次抗体のための結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）によって認識される予め決定されたポリペプチドエピトープで標識することもできる。一部の実施形態では、標識は、様々な長さのスペーサーアームによって結合されて、潜在的な立体障害を低減する。

【0231】

抗体を、ポリエチレングリコール（PEG）、メチルもしくはエチル基、または炭水化物基などの化学基で誘導することもできる。これらの基は、抗体の生物学的特性を改良するために、例えば、血清半減期を増大させるか、または組織結合を増大させるために有用であり得る。

【0232】

抗体特異性

抗原結合ドメインを含む一部の実施形態では、抗原結合ドメイン（例えば、これらだけに限定されないが、6つのCDRすべてを有する抗体可変領域、または抗体可変領域と少なくとも90パーセント同一である同等な領域）は、アバゴボマブ、アバタセプト（OR EN C I A（登録商標））、アブシキシマブ（RE O P R O（登録商標））、c7E3 Fab）、アダリムマブ（HUM I R A（登録商標））、アデカツムマブ、アレムツズマブ（CAMPATH（登録商標）、MabCampathもしくはCampath-1H）、アルツモマブ、アフエリモマブ、アナツモマブマフェナトックス、アネツムマブ、アンルキズマブ、アポリズマブ、アルシツモマブ、アセリズマブ、アトリズマブ、アトロリムマブ、バピネウズマブ、バシリキシマブ（SIMUL E C T（登録商標））、バビツキシマブ、ベクツモマブ（LYMPH O S C A N（登録商標））、ベリムマブ（LYMPH O - S T A T - B（登録商標））、ベルチリムマブ、ベシレソマブ、βセプト（EMBRE

10

20

30

40

50

L (登録商標))、ベバシズマブ (AVASTIN (登録商標))、ビシロマブブラロバルビタール、ビバツズマブメルタンシン、ブレンツキシマブベドチン (ADCETRIS (登録商標))、カナキヌマブ (ACZ885)、カンツズマブメルタンシン、カプロマブ (PROSTASCINT (登録商標))、カツマキシマブ (REMOV AB (登録商標))、セデリズマブ (CIMZIA (登録商標))、セルトリズマブペゴール、セツキシマブ (ERBITUX (登録商標))、クレノリキシマブ、ダセツズマブ、ダクリキシマブ、ダクリズマブ (ZENAP AX (登録商標))、デノスマブ (AMG 162)、デツモマブ、ドルリモマブアリトックス、ドルリキシズマブ、ダンツムマブ、デュリムルマブ、デュルムルマブ、エクロメキシマブ、エクリズマブ (SOLIRIS (登録商標))、エドバコマブ、エドレコロマブ (Mab17-1A、PANOREX (登録商標))、エファリズマブ (RAPTIVA (登録商標))、エフングマブ (MYCOGRAB (登録商標))、エルシリモマブ、エンリモマブペゴール、エピツモマブシツキセタン、エファリズマブ、エピツモマブ、エブラツズマブ、エルリズマブ、エルツマキシマブ (REXOMUN (登録商標))、エタラシズマブ (エタラツズマブ、VITAXIN (登録商標)、ABEGRAIN (商標))、エクスピビルマブ、ファノレソマブ (NEUTROSPEC (登録商標))、ファラリモマブ、フェルビズマブ、フォントリズマブ (HUZAF (登録商標))、ガリキシマブ、ガンテネルマブ、ガビリモマブ (ABX-CBL (R))、ゲムツズマブオゾガマイシン (MYLOTARG (登録商標))、ゴリムマブ (CNTO 148)、ゴミリキシマブ、イバリズマブ (TNX-355)、イブリツモマブチウキセタン (ZEVALIN (登録商標))、イゴボマブ、イムシロマブ、インフリキシマブ (REMICADE (登録商標))、イノリモマブ、イノツズマブオゾガマイシン、イピリムマブ (YERVOY (登録商標)、MDX-010)、イラツムマブ、ケリキシマブ、ラベツズマブ、レマレソマブ、レブリリズマブ、レルデリムマブ、レキシツムマブ (HGS-ETR2、ETR2-STO1)、レキシツムマブ、リビビルマブ、リンツズマブ、ルカツムマブ、ルミリキシマブ、マパツムマブ (HGS-ETRI、TRM-I)、マスリモマブ、マツズマブ (EMD72000)、メボリズマブ (BOSATRIA (登録商標))、メテリムマブ、ミラツズマブ、ミンレツモマブ、ミツモマブ、モロリムマブ、モタビズマブ (NUMAX (商標))、ムロモナブ (OKT3)、ナコロマブタフェナトックス、ナプツモマブエスタフェナトックス、ナタリズマブ (TYSABRI (登録商標)、ANTEGREN (登録商標))、ネバクマブ、ネレリモマブ、ニモツズマブ (THERACIM hR3 (登録商標)、THERA-CIM-hR3 (登録商標)、THERALOC (登録商標))、ノフェツモマブメルペンタン (VERLUMA (登録商標))、オクレリズマブ、オデュリモマブ、オフアツムマブ、オマリズマブ (XOLAIR (登録商標))、オレゴボマブ (OVAREX (登録商標))、オテリキシマブ、パギバキシマブ、パリビズマブ (SYNAGIS (登録商標))、パニツムマブ (ABX-EGF、VECTIBIX (登録商標))、パスコリズマブ、ペムツモマブ (THERAGYN (登録商標))、ペルツズマブ (2C4、OMNITARG (登録商標))、ペキセリズマブ、ピンツモマブ、ポネズマブ、プリリキシマブ、ブリツムマブ、ランビズマブ (LUCENTIS (登録商標))、ラキシバクマブ、レガビルマブ、レスリズマブ、リツキシマブ (RITUXAN (登録商標)、MabTHERA (登録商標))、ロベリズマブ、ルプリズマブ、サツモマブ、セビルマブ、シブロッツズマブ、シプリズマブ (MEDI-507)、ソンツズマブ、スタムルマブ (Myo-029)、スレソマブ (LEUKOSCAN (登録商標))、タカツズマブテトラキセタン、タドシズマブ、タリズマブ、タブリツモマブパプトックス、テフィバズマブ (AUREXIS (登録商標))、テリモマブアリトックス、テネリキシマブ、テブリズマブ、チシリムマブ、トシリズマブ (ACTEMRA (登録商標))、トラリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ (HERCEPTIN (登録商標))、トレメリムマブ (CP-675, 206)、ツコツズマブセルモロイキン、ツビルマブ、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ (CNTO 1275)、バパリキシマブ、ベルツズマブ、ベパリモマブ、ビシリズマブ (NUVION (登録商標))、ボロシキシマブ (M200)、ボツムマブ (HUMASPECT (登録商標

10

20

30

40

50

))、ザルツムマブ、ザノリムマブ (HuMAX-CD4)、ジラリムマブ、またはゾリモマブアリトックスから選択される。

【0233】

抗原結合ドメインを含む一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、6つのCDRを有する重鎖および軽鎖可変ドメインを含み、かつ／または結合について、先行するリストから選択される抗体と競合する。抗原結合ドメインを含む一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、先行するリストにおける抗体と同じエピトープを結合する。抗原結合ドメインを含む一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、6つ全部のCDRを有する重鎖および軽鎖可変ドメインを含み、先行するリストにおける抗体と同じ抗原に結合する。

【0234】

抗原結合ドメインを含む一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、6つ全部のCDRを有する重鎖および軽鎖可変ドメインを含み、PDGFR α 、PDGFR β 、PDGF、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、FGF、FGF2、HGF、KDR、flt-1、FLK-1、Ang-2、Ang-1、PLGF、CEA、CXCL13、Baff、IL-21、CCL21、TNF- α 、CXCL12、SDF-1、bFGF、MAC-1、IL23p19、FPR、IGFBP4、CXCR3、TLR4、CXCR2、EphA2、EphA4、EphrinB2、EGFR (ErbB1)、HER2 (ErbB2またはp185neu)、HER3 (ErbB3)、HER4 (ErbB4またはtyro2)、SC1、LRP5、LRP6、RAGE、s100A8、s100A9、Nav1.7、GLP1、RSV、RSV Fタンパク質、インフルエンザHAタンパク質、インフルエンザNAタンパク質、HMGB1、CD16、CD19、CD20、CD21、CD28、CD32、CD32b、CD64、CD79、CD22、ICAM-1、FGFR1、FGFR2、HDGF、EphB4、GITR、 β -アミロイド、hMPV、PIV-1、PIV-2、OX40L、IGFBP3、cMet、PD-1、PLGF、ネプリライシン (Neprilysin)、CTD、IL-18、IL-6、CXCL-13、IL-IR1、IL-15、IL-4R、IgE、PAI-1、NGF、EphA2、uPARt、DLL-4、 α v β 5、 α v β 6、 α 5 β 1、 α 3 β 1、インターフェロン受容体I型およびII型、CD19、ICOS、IL-17、第II因子、Hsp90、IGF、IGF-I、IGF-II、CD19、GM-CSFR、PIV-3、CMV、IL-13、IL-9、およびEBVから選択される抗原に特異的に結合する。

【0235】

抗原結合ドメインを含む一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、TNFスーパーファミリーのメンバー (受容体またはリガンド) に特異的に結合する。様々な分子は、これだけに限定されないが、腫瘍壊死因子- α (「TNF- α 」)、腫瘍壊死因子- β (「TNF- β 」)、リンホトキシン- α (「LT- α 」)、CD30リガンド、CD27リガンド、CD40リガンド、4-1BBリガンド、Apo-1リガンド (FasリガンドまたはCD95リガンドとも呼ばれる)、Apo-2リガンド (TRAILとも呼ばれる)、Apo-3リガンド (TWEAKとも呼ばれる)、オステオプロテゲリン (OPG)、APRIL、RANKリガンド (TRANCEとも呼ばれる)、TALL-1 (BlyS、BAFFまたはTHANKとも呼ばれる)、DR4、DR5 (Apo-2、TRAIL-R2、TR6、Tango-63、hAPO8、TRICK2、またはKILLERとしても知られる)、DR6、DcR1、DcR2、DcR3 (TR6またはM68としても知られる)、CARI、HVEM (ATARまたはTR2としても知られる)、GITR、ZTNFR-5、NTR-1、TNFRI、CD30、LTBr、4-1BB受容体およびTR9を包含する。

【0236】

抗原結合ドメインを含む一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、5T4、ABL、ABCB5、ABCF1、ACVR1、ACVR1B、ACVR2、ACVR2B、AC

10

20

30

40

50

VRL1、ADORA2A、アグレカン、AGR2、AICDA、AIFI、AIG1、
 AKAP1、AKAP2、AMH、AMHR2、アンジオゲニン (ANG)、ANGPT1、ANGPT2、ANGPTL3、ANGPTL4、アネキシンA2、ANPEP、A
 PC、APOC1、AR、アロマトーゼ、ATX、AX1、AZGP1 (亜鉛-a-糖タ
 ンパク質)、B7.1、B7.2、B7-H1、BAD、BAFF、BAG1、BAI1
 、BCR、BCL2、BCL6、BDNF、BLNK、BLR1 (MDR15)、Bi y
 S、BMP1、BMP2、BMP3B (GDF10)、BMP4、BMP6、BMP7、
 BMP8、BMP9、BMP11、BMP12、BMPR1A、BMPR1B、BMPR
 2、BPAG1 (プレクチン)、BRCA1、C19orf10 (IL27w)、C3、
 C4A、C5、C5R1、CANT1、CASP1、CASP4、CAV1、CCBP2 10
 (D6/JAB61)、CCL1 (1-309)、CCL11 (エオタキシン)、CC
 L13 (MCP-4)、CCL15 (MIP-Id)、CCL16 (HCC-4)、CC
 L17 (TARC)、CCL18 (PARC)、CCL19 (MIP-3b)、CCL2
 (MCP-1)、MCAF、CCL20 (MIP-3a)、CCL21 (MEP-2)、
 SLC、エクソダス-2、CCL22 (MDC/STC-1)、CCL23 (MPIF-
 I)、CCL24 (MPIF-2/エオタキシン-2)、CCL25 (TECK)、CC
 L26 (エオタキシン-3)、CCL27 (CTACK/ILC)、CCL28、CCL
 3 (MIP-1a)、CCL4 (MIP-1b)、CCL5 (RANTES)、CCL7
 (MCP-3)、CCL8 (mcp-2)、CCNA1、CCNA2、CCND1、CC
 NE1、CCNE2、CCR1 (CKR1/HM145)、CCR2 (mcp-IRB/
 RA)、CCR3 (CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCR5 (CMKBR5/C
 hemR13)、CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、
 CCR7 (CKR7/EBI1)、CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1)
 、CCR9 (GPR-9-6)、CCRL1 (VSHK1)、CCRL2 (L-CCR)
 、CD164、CD19、CD1C、CD20、CD200、CD-22、CD24、C
 D28、CD3、CD33、CD35、CD37、CD38、CD3E、CD3G、CD
 3Z、CD4、CD40、CD40L、CD44、CD45RB、CD46、CD52、
 CD69、CD72、CD74、CD79A、CD79B、CD8、CD80、CD81
 、CD83、CD86、CD105、CD137、CDH1 (E-カドヘリン)、CDC
 P1CDH10、CDH12、CDH13、CDH18、CDH19、CDH20、CD 30
 H5、CDH7、CDH8、CDH9、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CD
 K6、CDK7、CDK9、CDKN1A (p21Wap1/Cip1)、CDKN1B
 (p27Kip1)、CDKN1C、CDKN2A (p16INK4a)、CDKN2B
 、CDKN2C、CDKN3、CEBPB、CER1、CHGA、CHGB、キチナーゼ
 、CHST10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、
 CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、CLDN3、CLDN7 (クラウジ
 ン-7)、CLN3、CLU (クラスレリン)、CMKLR1、CMKOR1 (RDC1
)、CNR1、COL18A1、COL1A1、COL4A3、COL6A1、CR2
 、Crip1、CRP、CSF1 (M-CSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF
 3 (G-CSF)、CTLA4、CTL8、CTNNB1 (b-カテニン)、CTSB (カ
 テプシンB)、CX3CL1 (SCYD1)、CX3CR1 (V28)、CXCL1 (G
 RO1)、CXCL10 (IP-10)、CXCL11 (I-TAC/IP-9)、CX
 CL12 (SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、CXCL2 (G
 RO2)、CXCL3 (GRO3)、CXCL5 (ENA-78/LIX)、CXCL
 6 (GCP-2)、CXCL9 (MIG)、CXCR3 (GPR9/CKR-L2)、C
 XCR4、CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo)、CYB5、CYC
 1、Cyr61、CYSLTR1、c-Met、DAB2IP、DES、DKFZp45
 1J0118、DNCL1、DPP4、E2F1、ECGF15EDG1、EFNA1、
 EFNA3、EFNB2、EGF、ELAC2、ENG、エンドグリン、ENO1、EN
 02、EN03、EPHA1、EPHA2、EPHA3、EPHA4、EPHA5、EP 50

HA6、EPHA7、EPHA8、EPHA9、EPHA10、EPHB1、EPHB2、EPHB3、EPHB4、EPHB5、EPHB6、EHRIN-A1、EHRIN-A2、EHRIN-A3、EHRIN-A4、EHRIN-A5、EHRIN-A6、EHRIN-B1、EHRIN-B2、EHRTN-B3、EPHB4、EPG、ERBB2 (Her-2)、EREG、ERK8、エストロゲン受容体、ESR1、ESR2、F3 (TF)、FADD、ファルネシルトランスフェラーゼ、FasL、FASnf、FCER1A、FCER2、FCGR3A、FGF、FGF1 (aFGF)、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF2 (bFGF)、FGF20、FGF21 (例えばmimAb1)、FGF22、FGF23、FGF3 (int-2)、FGF4 (HST)、FGF5、FGF6 (HST-2)、FGF7 (KGF)、FGF8、FGF9、FGFR3、FIGF (VEGFD)、FIL1 (EPSILON)、FBL1 (ZETA)、FLJ12584、FLJ25530、FLRT1 (フィブロネクチン)、FLT1、FLT-3、FOS、FOSL1 (FRA-1)、FY (DARC)、GABRP (GABAa)、GAGEB1、GAGEC1、GALNAC4S-6ST、GATA3、GD2、GD3、GDF5、GDF8、GF11、GGT1、GM-CSF、GNAS1、GNRH1、GPR2 (CCR10)、GPR31、GPR44、GPR81 (FKSG80)、GRCC10 (C10)、gremlin、GRP、GSN (ゲルゾリン)、GSTP1、HAVCR2、HDAC、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、ヘッジホッグ、HGF、HIF1A、HIP1、ヒスタミンおよびヒスタミン受容体、HLA-A、HLA-DRA、HM74、HMOX1、HSP90、HUMCYT2A、ICEBERG、ICOSL、ID2、IFN-a、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、EFNA6、BFNA7、IFNB1、IFNガンマ、IFNW1、IGBP1、IGF1、IGF1R、IGF2、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP6、DL-1、IL10、IL10RA、IL10RB、IL-1、IL1R1 (CD121a)、IL1R2 (CD121b)、IL-1RA、IL-2、IL2RA (CD25)、IL2RB (CD122)、IL2RG (CD132)、IL-4、IL-4R (CD123)、IL-5、IL5RA (CD125)、IL3RB (CD131)、IL-6、IL6RA (CD126)、IR6RB (CD130)、IL-7、IL7RA (CD127)、IL-8、CXCR1 (IL8RA)、CXCR2 (IL8RB/CD128)、IL-9、IL9R (CD129)、IL-10、IL10RA (CD210)、IL10RB (CDW210B)、IL-11、IL11IR A、IL-12、IL-12A、IL-12B、IL-12RB1、IL-12RB2、IL-13、IL13RA1、IL13RA2、IL14、IL15、IL15RA、IL16、IL17、IL17A、IL17B、IL17C、IL17R、IL18、IL18BP、IL18R1、IL18RAP、IL19、IL1A、IL1B、IL1F1O、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、DL1F9、IL1HY1、IL1R1、IL1R2、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RL1、IL1RL2、IL1RN、IL2、IL20、IL20RA、IL21R、IL22、IL22R、IL22RA2、IL23、DL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3、IL30、IL3RA、IL4、IL4R、IL6ST (糖タンパク質130)、ILK、INHA、INHBA、INSL3、INSL4、IRAK1、IRAK2、ITGA1、ITGA2、ITGA3、ITGA6 (α 6インテグリン)、ITGAV、ITGB3、ITGB4 (β 4インテグリン)、JAK1、JAK3、JTB、JUN、K6HF、KAI1、KDR、KIM-1、KITLG、KLF5 (GCボックスBP)、KLF6、KLK10、KLK12、KLK13、KLK14、KLK15、KLK3、KLK4、KLK5、KLK6、KLK9、KRT1、KRT19 (ケラチン19)、KRT2A、KRTHB6 (毛髪特異的II型ケラチン)、LAMA5、LEP (レプチン)、Lingo-p75、Lingo-Troy、LPS、LRP5、LRP6、LTA (T

NF-b)、LTB、LTB4R (GPR16)、LTB4R2、LTBR、MACMARCKS、MAGまたはOmgp、MAP2K7 (c-Jun)、MCP-1、MDK、MIB1、ミドカイン、MIF、MISRII、MJP-2、MK、MKI67 (Ki-67)、MMP2、MMP9、MS4A1、MSMB、MT3 (メタロチオネクチン-Ui)、mTOR、MTSS1、MUC1 (ムチン)、MYC、MYD88、NCK2、ニューロカン、ニューレグリン-1、ニューロピリン-1、NFKB1、NFKB2、NGFB (NGF)、NGFR、NgR-Lingo、NgR-Nogo66 (Nogo)、NgR-p75、NgR-Troy、NME1 (NM23A)、NOTCH、NOTCH1、NOX5、NPPB、NROB1、NROB2、NR1D1、NR1D2、NR1H2、NR1H3、NR1H4、NR1I2、NR1I3、NR2C1、NR2C2、NR2E1、NR2E3、NR2F1、NR2F2、NR2F6、NR3C1、NR3C2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、NR5A1、NR5A2、NR6A1、NRP1、NRP2、NT5E、NTN4、OCT-1、ODZ1、OPN1、OPN2、OPRD1、P2RX7、PAP、PART1、PATE、PAWR、PCA3、PCDGF、PCNA、PDGFA、PDGFB、PDGFRA、PDGFRB、PECAM1、peg-アスパラギナーゼ、PF4 (CXCL4)、Plexin B2 (PLXNB2)、PGF、PGR、ホスファカン、PIAS2、PI3キナーゼ、PIK3CG、PLAU (uPA)、PLG5PLXDC1、PKC、PKC- β 、PPBP (CXCL7)、PPID、PR1、PRKCQ、PRKD1、PRL、PROC、PROK2、pro-NGF、プロサポシン、PSAP、PSCA、PTAFR、PTEN、PTGS2 (COX-2)、PTN、RAC2 (P21Rac2)、RANK、RANKリガンド、RARB、RGS1、RGS13、RGS3、RNFI10 (ZNF144)、Ron、ROB2、RXR、セレクチン、S100A2、S100A8、S100A9、SCGB1D2 (リポフィリンB)、SCGB2A1 (マンマグロビン2)、SCGB2A2 (マンマグロビン1)、SCYE1 (内皮単球活性化サイトカイン)、SDF2、SERPENA1、SERPINA3、SERPINB5 (マスピン)、SERPINE1 (PAI-1)

、SERPINF1、SHIP-1、SHIP-2、SHB1、SHB2、SHBG、SfcaZ、SLC2A2、SLC33A1、SLC43A1、SLIT2、SPPL1、SPRR1B (Spr1)、ST6GAL1、STAB1、STAT6、STEAP、STEAP2、SULF-1、Sulf-2、TB4R2、TBX21、TCP1O、TDGF1、TEK、TGFA、TGFB1、TGFB1I1、TGFB2、TGFB3、TGFB1、TGFB1R1、TGFB1R2、TGFB1R3、TH1L、THBS1 (トロンボスポンジン-1)、THBS2/THBS4、THPO、TIE (Tie-1)、TIMP3、組織因子、TIKI2、TLR10、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6JLR7、TLR8、TLR9、TM4SF1、TNF、TNF-a、TNFAIP2 (B94)、TNFAIP3、TNFRSF11A、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF21、TNFRSF5、TNFRSF6 (Fas)、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANCE)、TNFSF12 (AP03L)、TNFSF13 (Aprilin)、TNFSF13B、TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF15 (VEGI)、TNFSF18、TNFSF4 (OX40リガンド)、TNFSF5 (CD40リガンド)、TNFSF6 (FasL)、TNFSF7 (CD27リガンド)、TNFSF8 (CD30リガンド)、TNFSF9 (4-1BBリガンド)、TOLLIP、Toll様受容体、TLR2、TLR4、TLR9、TOP2A (トポイソメラーゼIIa)、TP53、TPM1、TPM2、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5、TRAF6、TRKA、TREM1、TREM2、TRPC6、TROY、TSLP、TWEAK、チロシナーゼ、uPAR、VEGF、VEGFB、VEGFC、パーシカン、VHLC5、VLA-4、Wnt-1、XCL1 (リンホタクチン)、XCL2 (SCM-Ib)、XCR1 (GPR5/CCXCR1)、YY1、および

Z F P M 2 から選択される 1 種または複数の標的に結合し得る。

【0237】

触媒抗体

本発明の一部の態様では、M A C は、触媒抗体またはその抗原結合部分を含む。一部の態様では、抗体は、アルドラーゼ抗体であってよい。

【0238】

抗体技術の他の要素の中でも、抗体、その有用な断片およびバリエーションおよび修飾、結合部位および C D R、抗体製剤、発現、ヒト化、アミノ酸修飾、糖鎖形成、A D C C、C D C、抗体の血清半減期の増大、発現ベクター、哺乳類宿主系、ならびに折畳みを記載している米国特許出願公開第 2 0 0 6 2 0 5 6 7 0 号の内容、特に段落 [0 1 5 3] ~ [0 2 3 3] は、参照によって本明細書に組み込まれる。

10

【0239】

本明細書で使用する場合、「結合部位」（抗原結合部位としても知られている）は、適切な抗原（または構造的に同様のタンパク質）の決定基と結合する（または結合することができる）I g の領域または I g ドメインを指す。この用語は一般的に、C D R および抗原結合に関係する隣接するフレームワーク残基を包含する。

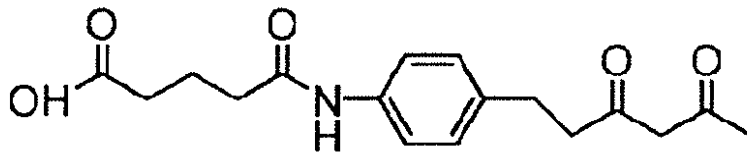
【0240】

本明細書で使用する場合、「アルドラーゼ抗体」は、（例えばコンジュゲーションによって）妨害がなくなった場合に、脂肪族ケトンドナーとアルデヒドアクセプターとの間のアルドール付加反応を触媒する結合部位部分を含有する抗体を指す。アルドラーゼ抗体は、担体タンパク質にカップリングされている下式：

20

【0241】

【化 4 5】



の 1, 3-ジケトンハプテンを包含する免疫原で免疫反応性動物を免疫化することによって生成され得、抗体の結合部位において反応性 ε-アミノ基を有するリシンを有することによってさらに特徴づけられる。アルドラーゼ抗体は、1, 3-ジケトンハプテンと触媒抗体のリシンの ε-アミノ基との間での複合体の形成によって 1, 3-ジケトンハプテンでの阻害を受けるその触媒活性によってさらに特徴づけられる。

30

【0242】

検討したとおり、ある種の実施形態では、本発明の M A C、組成物、および試料を製造するために使用され得るある種の抗体は、反応性側鎖を抗体結合部位に含むことができる。反応性側鎖は、天然に存在してもよいが、または変異によって抗体中に入れることもできる。抗体を製造するために最初に同定されたリンパ系細胞中に存在する核酸によって残基がコードされる場合のように、抗体結合部位の反応性残基は抗体に随伴されてよい。別法では、アミノ酸残基を、特定の残基をコードするように D N A を意図的に変異させることによって生じさせることができる。反応性残基は、例えば、本明細書において検討したとおりの独特なコドン、t R N A、およびアミノアシル-t R N A を使用する生合成による組み込みによって生じる非天然の残基であってよい。別の手法では、アミノ酸残基またはその反応性官能基（例えば、求核性アミノ基またはスルフヒドリル基）を、抗体結合部位中のアミノ酸残基に結合させることができる。したがって、「抗体の結合部位中のアミノ酸残基を介して」生じる抗体との共有結合的連結は、本明細書で使用する場合、連結が、抗体結合部位のアミノ酸残基に直接的であるか、または抗体結合部位のアミノ酸残基の側鎖に連結される化学部分を介することができることを意味する。一部の実施形態では、アミノ酸はシステインであり、側鎖の反応性基はスルフヒドリル基である。他の実施形態で

40

50

は、アミノ酸残基はリシンであり、側鎖の反応性基はε-アミノ基である。一部の実施形態では、アミノ酸は、K a b a tナンバリングによる重鎖上のK⁹³である。一部の実施形態では、アミノ酸は、配列番号65および66のナンバリングによるh38C2のHC-K⁹⁹上にある。

【0243】

触媒抗体は、1個または複数の反応性アミノ酸側鎖を含む適切な結合部位を伴う抗体の1つの供給源である。このような抗体には、アルドラーゼ抗体、βラクタマーゼ抗体、エステラーゼ抗体、およびアミダーゼ抗体が包含される。

【0244】

一実施形態は、マウスモノクローナル抗体mAb33F12およびmAb38C2（そのVLおよびVHは、配列番号68および69を含む）などのアルドラーゼ抗体、さらには、そのような抗体の適切なキメラバージョンおよびヒト化バージョン（例えば、h38C2IgG1：配列番号64および65、ならびにh38C2-IgG2：配列番号64および66）を含む。好ましい態様では、配列番号65または配列番号66などの重鎖を、配列番号98を含む本発明のCLドメインの1つに融合しているh38C2-VL（配列番号67）と一緒に使用する。

【0245】

マウスmAb38C2（およびh38C2）は、反応性リシンをHCDR3の近くに、ただし、その外側に有し、反応性免疫化によって産生され、機能的に天然のアルドラーゼ酵素を模倣する触媒抗体の新しいクラスのプロトタイプである。使用することができる他のアルドラーゼ触媒抗体には、ATCC受託番号PTA-1015を有するハイブリドーマ85A2；ATCC受託番号PTA-1014を有するハイブリドーマ85C7；ATCC受託番号PTA-1017を有するハイブリドーマ92F9；ATCC受託番号PTA-823を有するハイブリドーマ93F3；ATCC受託番号PTA-824を有するハイブリドーマ84G3；ATCC受託番号PTA-1018を有するハイブリドーマ84G11；ATCC受託番号PTA-1019を有するハイブリドーマ84H9；ATCC受託番号PTA-825を有するハイブリドーマ85H6；ATCC受託番号PTA-1016を有するハイブリドーマ90G8によって産生される抗体が包含される。反応性リシンを介して、これらの抗体は、天然のアルドラーゼのエナミン機構を使用してアルドールおよびレトロアルドール反応を触媒する。

【0246】

本発明の化合物は、チオエステラーゼおよびエステラーゼ触媒抗体の結合部位において見出されるものなどの反応性システインにターゲティング作用剤を連結させることによって形成することもできる。反応性アミノ酸を含有する抗体は、反応性アミノ酸をコードするように抗体結合部位残基を変異させるか、または抗体結合部位中のアミノ酸側鎖を、反応性基を含有するリンカーで化学的に誘導することを包含する当技術分野においてよく知られている手段によって調製することができる。

【0247】

抗体は、ヒト化抗体であってよい。本発明の化合物が抗体の結合部位に共有結合的に連結され、そのような抗体がヒト化される場合、そのような抗体が、W基に対する高い連結親和性を維持しつつヒト化されることが重要である。様々な形態のヒト化マウスアルドラーゼ抗体が企図される。一実施形態では、ヒト定常ドメインCLκおよびCHγ₁1を有するヒト化アルドラーゼ触媒抗体h38c2IgG1またはh38c2Fabを使用する。ヒト生殖細胞系VLκ遺伝子DPK-9およびヒトJk遺伝子JK4を、m38c2のカッパ軽鎖可変ドメインのヒト化のためのフレームワークとして使用し、ヒト生殖細胞系遺伝子DP-47およびヒトJH遺伝子JH4を、m38c2の重鎖可変ドメインのヒト化のためのフレームワークとして使用した。図8Aは、m38c2、h38c2、およびヒト生殖細胞系中の可変軽鎖と重鎖との間の配列アラインメントを図示している。h38c2は、あらゆるそのアロタイプを包含するIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4の定常ドメインを利用することができる。別の実施形態では、h38c2の可変ドメ

イン（VLおよびVH）（配列番号67および68）と、配列番号98をβシートEとFとの間に含む本発明のポリペプチドを含むIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4抗体からの定常ドメインとを含むキメラ抗体を使用する。LCは、配列番号254を含んでよい。抗体は、全長抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、VH、VL、二重特異性抗体、またはh38c2からのVHおよびVLドメインを含むミニボディであってよい。抗体は、h38c2からのVLおよびVHドメインと、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群から選択される定常ドメインとを含む抗体であってよい。抗体は、ヒトIgG、IgA、IgM、IgD、またはIgE抗体からの定常領域を含むマウスアルドラーゼ抗体のヒト化バージョンであってよい。別の実施形態では、抗体は、マウスアルドラーゼ抗体からのVLおよびVH領域（例えば、配列番号69および70）と、配列番号98をβシートEとFとの間に含む本発明のポリペプチドを含むヒトIgG、IgA、IgM、IgD、またはIgE抗体からの定常領域とを含むキメラ抗体である。さらなる実施形態では、抗体は、天然または未変性のヒトIgG、IgA、IgM、IgD、またはIgE抗体からのポリペプチド配列を含むマウスアルドラーゼ抗体の完全なヒトバージョンである。

10

【0248】

一実施形態では、h38c2 F(ab')₂を使用する。h38c2 F(ab')₂は、h38c2 IgG1のタンパク分解性消化によって生産することができる。

【0249】

本発明で使用する場合、「薬物動態」は、経時的な血清中における投与化合物の濃度を指す。薬力学は、経時的な標的および非標的組織中における投与化合物の濃度、ならびに標的組織（例えば、有効性）および非標的組織（例えば、毒性）に対する作用を指す。特定のターゲティング作用剤あるいは生物学的薬剤について、不安定な連結を使用するか、または任意のリンカーの化学的性質を改変する（例えば、溶解度、電荷などを変更することなどによって、例えば、薬物動態または薬力学における改善を設計することができる。用語「K_{off}」は、抗体／抗原複合体からの抗体の解離の切断速度定数を指す。用語「K_d」は、特定の抗体－抗原相互作用の解離定数を指す。

20

【0250】

一部の態様では、本発明は、本発明の化合物の薬学的に許容できる塩、立体異性体、互変異性体、溶媒和物、およびプロドラッグ、試料、組成物、ならびに医薬組成物を提供する。

30

【0251】

触媒抗体リンカー

ターゲティング作用剤（TA）を触媒抗体の結合部位に接続するために適したある種のリンカー（触媒抗体リンカー：CAbーリンカー）は、その内容が参照により本明細書に組み込まれている米国特許出願公開第2009098130号に開示されている。用語「ターゲティング作用剤」を、用語「エフェクター部分」と区別するために本明細書において使用するが、CAbーリンカーの末端にTAとして結合されているか、またはMACーリンカーの末端にエフェクター部分として結合されている分子の種類が互換的であってよいことは明白である。特に、（CAbーリンカーを記載する一般式、具体的なCAbーリンカー構造、CAbーリンカーの合成、ならびにP¹、Q¹、およびW¹の異なる要素（そこでは、それぞれX、Y、およびZ基として分類されている）の組合せに関する米国特許出願公開第2009098130号の態様は、具体的、かつ一般的に本明細書に記載されているかのように、本明細書に包含される。

40

【0252】

CAbーリンカーは、直鎖または分枝であってよく、場合によって、1個または複数の炭素環式基または複素環式基を包含する。CAbーリンカーの長さは、直鎖原子の数の点において考えることができ、その際、芳香環などの環式部分は、環の周りの最短経路をとることによって数えられる。一部の実施形態では、CAbーリンカーは、5～15原子、他の実施形態では、15～30原子、なお他の実施形態では30～50原子、なお他の実

50

施形態では50～100原子、なお他の実施形態では100～200原子の直線的伸張を有する。他のC A bーリンカーの検討事項には、溶解度、親油性、親水性、疎水性、安定性（多かれ少なかれ安定的、さらには、計画された分解）、剛性、柔軟性、免疫原性、および抗体結合のモジュレーション、ミセルまたはリポソーム中に組み込まれる能力などの、生じた化合物の物理的または薬物動態的特性に対する作用が包含される。

【0253】

一部の態様では、C A bーリンカーは、T A連結残基の側鎖に共有結合的に連結させることができる。リンカーは、式： $P^1-Q^1-W^1$ を含むことができ；ここで、 P^1 は、C、H、N、O、P、S、F、Cl、Br、およびIからなる群から選択される任意の原子を包含する生物学的に適合性な接続鎖であり、ポリマーまたはブロックコポリマーを含むことができ、リンカーが直鎖である場合、連結残基に（適切に、側鎖、アミノ末端、またはカルボキシル末端を介して）共有結合的に連結され、 Q^1 は、少なくとも1つの環構造を含む場合によって存在する認識基であり、 W^1 は、抗体の結合部位中のアミノ酸側鎖への共有結合的連結を含む結合部分である。

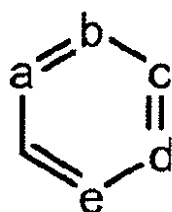
10

【0254】

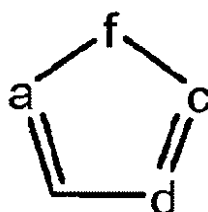
存在する場合、 Q^1 は、置換されていてもよい構造：

【0255】

【化46】



または



20

〔式中、a、b、c、d、およびeは独立に、炭素または窒素であり、fは、炭素、窒素、酸素、または硫黄である〕を有し得、 Q^1 は、 P^1 および W^1 に、独立に、十分な原子価の任意の2つの環位で結合されており、a、b、c、d、e、またはfのうちの4個以下が、同時に窒素であり、好ましくは、環構造中のa、b、c、d、およびeはそれぞれ炭素である。一部の態様では、 Q^1 はフェニルであってよい。いかなる理論にも束縛されることは望まないが、 W^1 基が反応性アミノ酸側鎖と反応することができるように、 Q^1 基は、反応性基を適切な抗体結合部位中にポジショニングすることを援助することができると思われる。

30

【0256】

抗体、タンパク質、またはこれらの断片などの高分子との結合を共有結合的に、または非共有結合的に形成し得る反応性基を含有するように、C A bーリンカーを設計することができる。反応性基を、特定の結合部位中の反応性残基と共に使用するために選択する。例えば、アルドラーゼ抗体によって修飾するための化学部分は、ケトン、ジケトン、βラクタム、活性なエステルハロケトン、ラクトン、無水物、マレイミド、α-ハロアセトアミド、シクロヘキシルジケトン、エポキシド、アルデヒド、アミジン、グアニジン、イミン、エナミン、ホスファート、ホスホナート、エポキシド、アジリジン、チオエポキシド、マスクまたは保護されたジケトン（例えば、ケタール）、ラクタム、ハロケトン、アルデヒドなどであってよい。

40

【0257】

一部の実施形態では、 W^1 は、抗体の結合部位中の残基の側鎖とのコンジュゲーションの前に、アゼチジノン、ジケトン、アシルβ-ラクタム、活性なエステル、ハロケトン、シクロヘキシルジケトン基、アルデヒド、マレイミド、活性化されたアルケン、活性化されたアルキン、または一般的に、求核性または求電子性置換に感受性のある脱離基を含む分子を形成するために配置された1個または複数のC=O基を包含する。他の基は、ラク

50

トン、無水物、 α -ハロアセトアミド、イミン、ヒドラジド、またはエポキシドを包含することができる。抗体の結合部位中の反応性求核性基（例えば、リシンまたはシステイン側鎖）に共有結合することができる例示的なリンカーの求電子性反応性基には、アシル β -ラクタム、単純なジケトン、スクシンイミド活性なエステル、マレイミド、リンカーを含むハロアセトアミド、ハロケトン、シクロヘキシルジケトン、アルデヒド、アミジン、グアニジン、イミン、エナミン、ホスファート、ホスホナート、エポキシド、アジリジン、チオエポキシド、マスクまたは保護されたジケトン（例えば、ケタール）、ラクタム、スルホナートなど、イミン、ケタール、アセタールなどのマスクされたC=O基、ならびに任意の他の知られている求電子性基が包含される。ある種の実施形態では、反応性基は、アシル β -ラクタム、単純なジケトン、スクシンイミド活性なエステル、マレイミド、リンカーを含むハロアセトアミド、ハロケトン、シクロヘキシルジケトン、またはアルデヒドを形成するように配置された1個または複数のC=O基を包含する。 W^1 は、置換アルキル、置換シクロアルキル、置換アリール、置換アリールアルキル、置換ヘテロシクリル、または置換ヘテロシクリルアルキルであってよく、ここで、少なくとも1個の置換基は、1, 3-ジケトン部分、アシル β -ラクタム、活性なエステル、 α -ハロケトン、アルデヒド、マレイミド、ラクトン、無水物、 α -ハロアセトアミド、アミン、ヒドラジド、またはエポキシドである。一部の態様では、 W^1 基を、本発明のペプチドに半減期の増大を提供することができる高分子骨格に共有結合的に連結させる。一部の態様では、存在する場合、 W^1 基を、抗体の結合部位に共有結合的に連結させる。

10

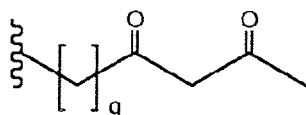
【0258】

20

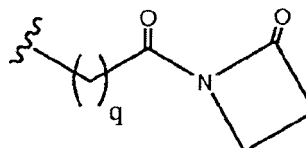
一部の態様では、コンジュゲーションの前に（例えば、抗体の結合部位との）、 W^1 は、構造式：

【0259】

【化47】



または



30

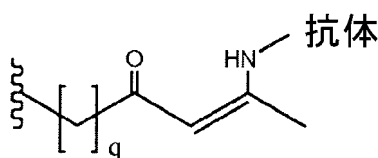
〔式中、 $q = 0 \sim 5$ である〕を有する。 q は1または2であってよい。 q は1であってよい。他の態様では、 q は2であってよい。

【0260】

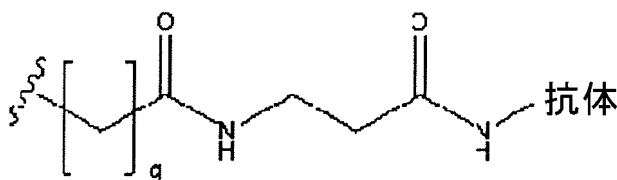
一部の態様では、抗体の結合部位とのコンジュゲーションの後に、 W^1 は、構造：

【0261】

【化48】



または



40

〔式中、 $q = 0 \sim 5$ であり、抗体-N-は、抗体の結合部位中の側鎖への共有結合である〕を有する。 q は、1または2であってよい。 q は、1であってよい。他の態様では、 q は2であってよい。

【0262】

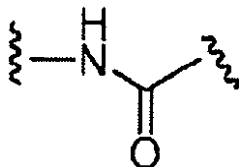
P^1 は、3つの成分； $P^1 p - P^1 s - P^1 y$ を含む基であってよく、ここで、 $P^1 p$ は、ターゲティング作用剤と結合可能なように特異的に適合された基であり、 $P^1 s$ は、 P^1 基のスペーサー領域であり、 $P^1 y$ は、 W^1 基に結合するように適合された基である。一部の態様では、 $P^1 y$ は、アミド結合、エナミン結合、またはグアニジニウム結合か

50

ら選択される。P¹yは、Q¹基に（2原子以内で）隣接する水素分子を提供するように選択することができる。理論に束縛されることは望まないが、H原子が、H結合相互作用を介しての疎水性ポケットの、特にh38C2などの触媒抗体の結合間隙の疎水性ポケットに関するQ¹基の認識を援助することができると考えられる。したがって、例えば、NH基のHを水素結合のために提供して、NH基がQ¹基に直接結合するように、アミド結合を方向付けすることができる。別法では、Q¹基に原子約2個分隣接するが、しかしなおH-結合のために利用可能なNH基のHで、アミドのC=O基をQ¹基に結合させることができる。一部の実施形態では、P¹yは存在しない。一部の実施形態では、P¹y基は下式：

【0263】

【化49】



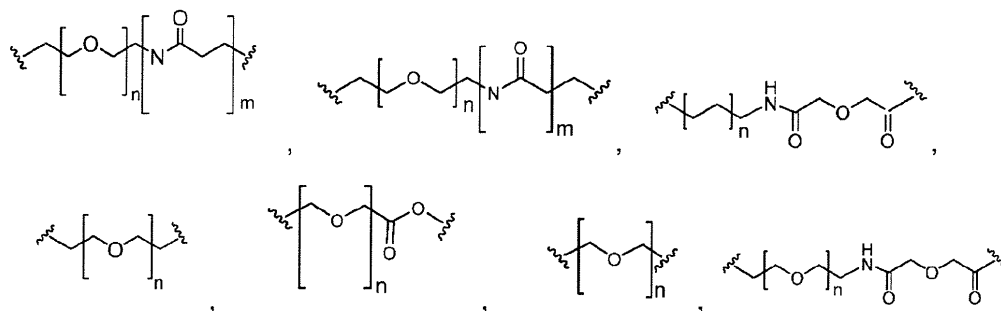
を有する。

【0264】

一部の態様では、P¹sを、P¹sがいずれの過度に反応性の基も提供しないように選択する。P¹sは、2～15原子のP¹基の全体長さを提供するように選択することができる。P¹sは、2～10原子のP¹基の全体長さを提供するように選択することができる。X¹基は、P¹基の全体長さが、4～8原子であるように選択することができる。P¹基は、P¹基の全体長さが5原子であるように選択することができる。P¹基は、P¹基の全体長さが6原子であるように選択することができる。一部の態様では、P¹基は、以下の式のうちの1つを含むことができる：

【0265】

【化50】



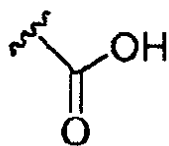
[式中、n=1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり、mは、存在するか、または存在せず、nは、1、2、3、4、5、または6であってよく、nは、1、2、3、または4であってよく、nは1であってよく、nは2であってよく、nは3であってよく、nは4であってよい]。

【0266】

P¹pを理想的には、ペプチド、タンパク質、低分子、核酸、またはアプタマーなどのターゲティング分子の連結残基（TA連結残基）への特異的な方向性共有結合的連結戦略が可能となるように選択する。例えば、TA連結残基が求核性基を含む場合、P¹pは、求電子基であってよく、逆も同様である。例えば、TA連結残基の側鎖が、K、H、Y、オルニチン、Dap、またはDabなどのアミン基を含む場合、Xpは、COOH、または他の同様の反応性求電子試薬であってよい。TA連結残基がDまたはEである場合、P¹pは、アミン基などの求核性基を含むことができる。これらの戦略のいずれかは、アミド結合形成戦略によって、P¹p基とTA連結残基との間に共有結合が形成されることを可能にする。TA連結基がアミン基である場合、P¹pは、下式：

【0267】

【化51】



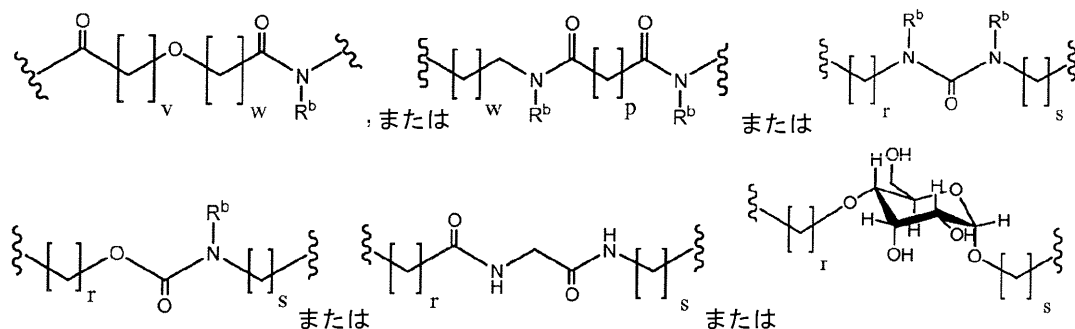
を含み得る。

【0268】

P¹ は、場合によって存在する生物学的に適合性のポリマーまたはブロックコポリマーであってよい。P¹ は、以下の構造式：

【0269】

【化52】



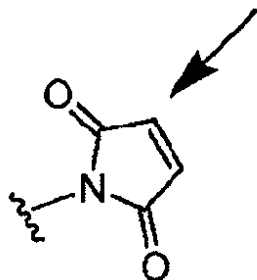
[式中、pは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、32、43、44、または45であり、w、r、およびsはそれぞれ独立に、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20であり、R^bは、出現する毎に独立に、水素、置換もしくは非置換のC₁～₁₀アルキル、置換もしくは非置換のC₃～₇シクロアルキル-C₁～₆アルキル、または置換もしくは非置換のアリール-C₁～₆アルキルである]のものであってよい。

【0270】

TA連結残基がC、Cの同族体、または他のチオール基含有残基である場合、P¹pは、マレイミド基（または同様のもの）を含むことができ、チオール-マレイミド付加反応戦略がP¹p基をTA連結残基に共有結合的に連結させることを可能にする。一部の態様では、P¹pは、チオール基を含むこともでき、TA連結残基とP¹p基との間にジスルフィド橋が形成されることを可能にする。一部の態様では、P¹pは、マレイミド：

【0271】

【化53】



[式中、矢印は、ターゲティング分子への結合点を示し、平行線は、リンカーのQ¹基への結合部を表す]であってよい。ターゲティング分子への結合点がシステイン残基または

10

20

30

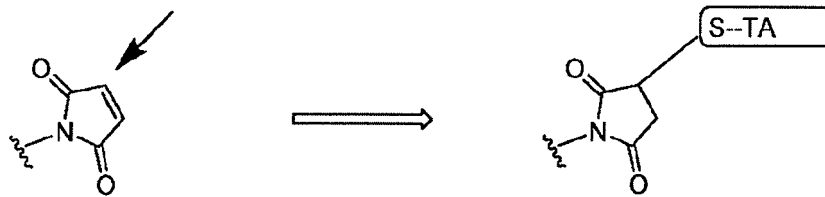
40

50

他のチオール保有側鎖を含む場合、コンジュゲーションの機構は、以下：

【0272】

【化54】



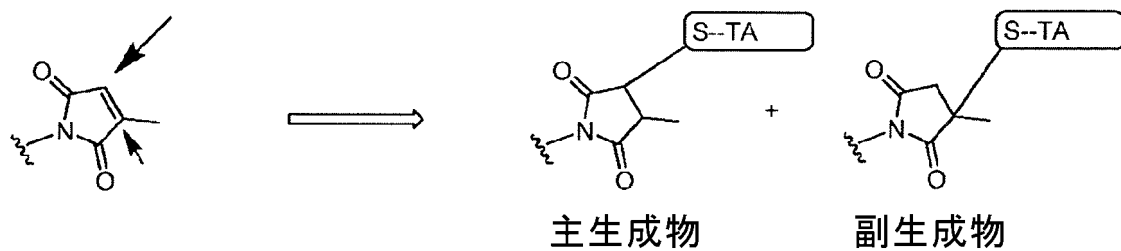
のとおりであってよい。

【0273】

一部の態様では、 P^1 基は、置換のマレイミド：

【0274】

【化55】



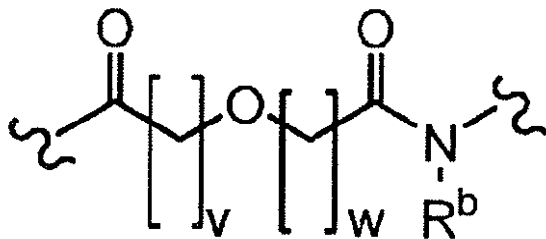
を含む。

【0275】

一部の態様では、 P^1 は、

【0276】

【化56】



〔式中、 v および w は、 X^1 の主鎖長さが 6 ～ 12 原子であるように選択される〕である。

【0277】

一部の態様では、TA-リンカーは、下式：

【0278】

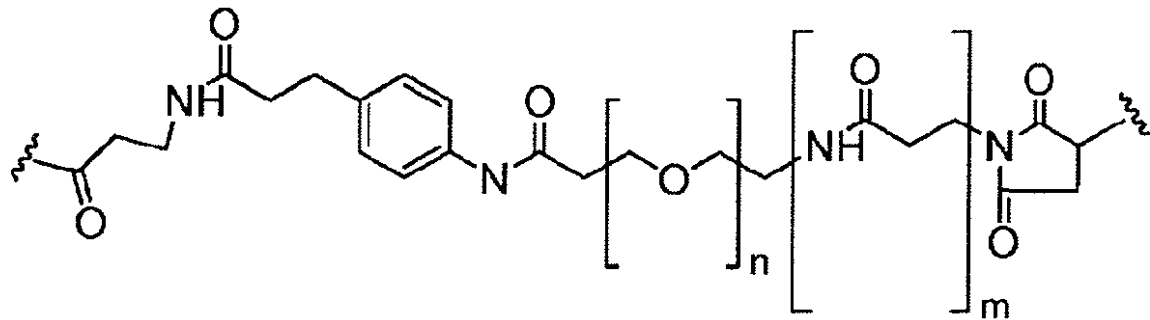
10

20

30

40

【化 5 7】



10

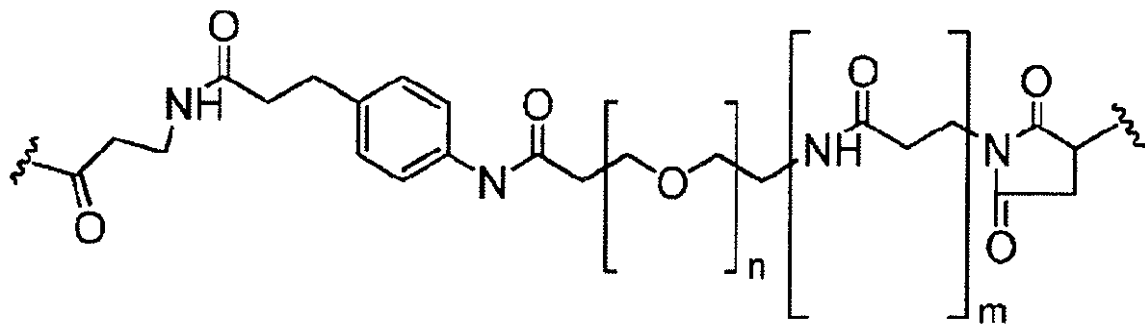
〔式中、 $n = 1$ 、または 2、または 3、または 4、5、6、7、8、9、または 10 であり、 n は、1、2、3、4、5、または 6 であってよく、 n は 1 であってよく、 n は 2 であってよく、 n は 3 であってよく、 n は 4 であってよい〕のものである。 m は存在しなくてよい。 m は存在してよい。

【0 2 7 9】

一部の態様では、T A - リンカーは、下式：

【0 2 8 0】

【化 5 8】



20

〔式中、 $n = 1$ 、または 2、または 3、または 4、5、6、7、8、9、または 10 であり、 n は、1、2、3、4、5、または 6 であってよく、 n は 1 であってよく、 n は 2 であってよく、 n は 3 であってよく、 n は 4 であってよい〕のものである。 m は存在しなくてよい。 m は存在してよい。

30

【0 2 8 1】

一部の態様では、C A - リンカーの P^1 部分を、本発明の M A C のためのリンカーの Y^1 、 $X^1 - Y^1$ 、 $Y^1 - Z$ および $X^1 - Y^1 - Z$ 部分として使用することができる。

【0 2 8 2】

ペプチドおよびタンパク質

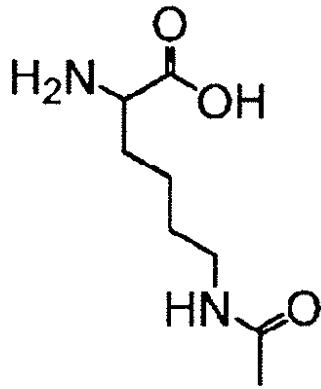
アシルリシンまたは

K_{ac} (A c K も) は、

【0 2 8 3】

40

【化 5 9】

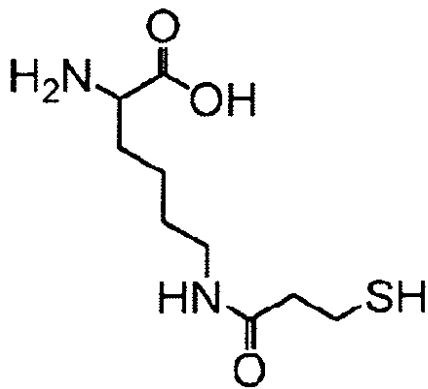


10

を指し、K_{S H} は、

【 0 2 8 4】

【化 6 0】

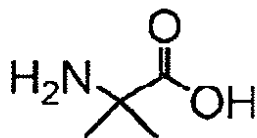


20

を指し、A i b (2-アミノイソ酪酸) は

【 0 2 8 5】

【化 6 1】



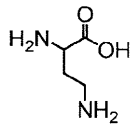
を指す。

【 0 2 8 6】

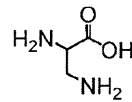
40

【化 6 2】

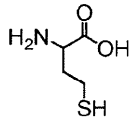
ジアミノ酪酸(Dab)



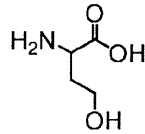
ジアミノプロピオン酸(Dap)



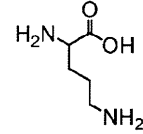
ホモシステイン



ホモセリン



オルニチン



10

【0 2 8 7】

一般的に、本明細書に記載の細胞および組織培養物、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝子学、ならびにタンパク質および核酸化学、ならびにハイブリダイゼーションに関連して、かつその技術において使用する命名法は、当技術分野においてよく知られていて、一般に使用されるものである。本発明の方法および技術は一般的に、当技術分野においてよく知られていて、別段に示さない限り、本明細書を通じて引用および検討される様々な一般的で、より具体的な参考文献中に記載されているとおりの従来の方法によって行われる。本明細書で使用する場合、20個の天然または従来のアミノ酸およびその略語は、IUPAC 1文字および3文字コードに従う。「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用される。本明細書で使用する場合、これらの用語は、1個または複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工的化学類似体であるアミノ酸ポリマーに適用される。これらの用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマーにも適用される。アミノ酸は、結合およびペプチドの他の所望の特性が維持されている限り、L型またはD型であってよい。ポリペプチドは、モノマー性またはポリマー性であってよい。

20

【0 2 8 8】

別段に、「D」接頭辞、例えば、D-AlaもしくはN-Me-D-Ileによって示されていない限り、または小文字様式、例えば、a、i、l、(Ala、Ile、LeuのDバージョン)で書かれていない限り、本明細書および添付の特許請求の範囲において記載するペプチド中のアミノ酸およびアミノアシル残基のα炭素の立体化学は、天然か、または「L」配置である。

30

【0 2 8 9】

すべてのペプチド配列は、α-N末端アミノ酸残基が左にあり、α-C末端アミノ酸残基が右にある一般的に許容されている規則に従って書かれている。本明細書で使用する場合、用語「N末端」は、ペプチド中のアミノ酸の遊離α-アミノ基を指し、用語「C末端」は、ペプチド中のアミノ酸の遊離α-カルボン酸末端を指す。1つの基でN終結したペプチドは、N末端アミノ酸残基のα-アミノ窒素上に1つの基を保有するペプチドを指す。1つの基でN終結したアミノ酸は、α-アミノ窒素上に1つの基を保有するアミノ酸を指す。

40

【0 2 9 0】

本明細書で使用する場合、「ハロ」、「ハロゲン」、または「ハライド」は、F、Cl、Br、またはIを指す。

【0 2 9 1】

本明細書で使用する場合、「生物学的活性」は、化合物、組成物、もしくは他の混合物のin vivo活性、または化合物、組成物、もしくは他の混合物をin vivo投与すると生じる生理学的反応を指す。したがって、生物学的活性は、このような化合物、組成物、および混合物の治療作用、診断作用および医薬活性を包含する。

【0 2 9 2】

50

用語「生物学的に適合性」は、本明細書で使用する場合、細胞内および細胞外の生物学的分子と生物学的に不活性または非反応性であり、非毒性である何らかの物を意味する。

【0293】

単独か、または他の用語の部分としての用語「アルキル」は、示されている数の炭素原子を有する直鎖または分枝の飽和炭化水素を指す（例えば、「 $C_1 \sim C_8$ 」アルキルは、1～8個の炭素原子を有するアルキル基を指す）。炭素原子の数が示されていない場合、そのアルキル基は、1～8個の炭素原子を有する。代表的な直鎖 $C_1 \sim C_8$ アルキルには、これらだけに限定されないが、メチル、エチル、*n*-プロピル、*n*-ブチル、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシル、*n*-ヘプチルおよび*n*-オクチルが包含され；分枝 $C_1 \sim C_8$ アルキルには、これらだけに限定されないが、*isopropyl*、*sec-butyl*、*isobutyl*、*tert-butyl*、*isopentyl*、および2-メチルブチルが包含され；不飽和 $C_2 \sim C_8$ アルキルには、これらだけに限定されないが、ビニル、アリル、1-ブテニル、2-ブテニル、イソブチレニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-メチル-1-ブテニル、2-メチル-2-ブテニル、2,3-ジメチル-2-ブテニル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、アセチレニル、プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニルおよび3-メチル-1-ブチニルが包含される。

【0294】

語句「置換アルキル」は、炭素（複数可）または水素（複数可）に対する1つまたは複数の結合が、これらだけに限定されないが、F、Cl、Br、およびIなどのハライド中のハロゲン原子；ヒドロキシ基、アルコキシ基、アリーロキシ基、およびエステル基などの基中の酸素原子；チオール基、アルキルおよびアリールスルフィド基、スルホン基、スルホニル基、およびスルホキシド基などの基中の硫黄原子；アミン、アミド、アルキルアミン、ジアルキルアミン、アリールアミン、アルキルアリールアミン、ジアリールアミン、*N*-オキシド、イミド、およびエナミンなどの基中の窒素原子；トリアルキルシリル基、ジアルキルアリールシリル基、アルキルジアリールシリル基、およびトリアリールシリル基などの基中のケイ素原子；ならびに様々な他の基中の他のヘテロ原子などの非水素および非炭素原子への結合によって置き換えられているアルキル基を指す。置換アルキル基はまた、炭素（複数可）または水素（複数可）原子への1つまたは複数の結合が、カルボニル、カルボキシ基、およびエステル基中の酸素；イミン、オキシム、ヒドラゾン、およびニトリルなどの基中の窒素などのヘテロ原子への結合によって置き換えられている基を包含する。置換アルキル基は、特に、炭素または水素原子への1つまたは複数の結合がフッ素原子への1つまたは複数の結合によって置き換えられているアルキル基を包含する。置換アルキル基の一例は、トリフルオロメチル基およびトリフルオロメチル基を含有する他のアルキル基である。他のアルキル基には、置換アルキル基が、ヒドロキシ、アルコキシ、アリーロキシ基、またはヘテロシクリルオキシ基を含有するように、炭素または水素原子への1つまたは複数の結合が酸素原子への結合によって置き換えられているものが包含される。さらに他のアルキル基には、アミン、アルキルアミン、ジアルキルアミン、アリールアミン、（アルキル）（アリール）アミン、ジアリールアミン、ヘテロシクリルアミン、（アルキル）（ヘテロシクリル）アミン、（アリール）（ヘテロシクリル）アミン、またはジヘテロシクリルアミン基を有するアルキル基が包含される。

【0295】

語句「非置換のアルキル」は、上記で定義したとおりの二価の非置換アルキル基を指す。したがって、メチレン、エチレン、およびプロピレンは、非置換のアルキレンのそれぞれの例である。語句「置換アルキル」は、上記で定義したとおりの二価の置換アルキル基を指す。置換または非置換の低級アルキレン基は、1～約6個までの炭素を有する。

【0296】

語句「非置換のシクロアルキル」は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルなどの環式アルキル基、ならびに上記で定義したとおりの直鎖または分枝鎖アルキル基で置換されたそのような環を指

す。この語句には、これらだけに限定されないが、アダマンチル、ノルボルニル、およびビシクロ〔2. 2. 2〕オクチルなどの多環式アルキル基、さらには上記で定義したとおりの直鎖または分枝鎖アルキル基で置換されたそのような環も包含される。したがって、この語句は、特にメチルシクロヘキシル基を包含するであろう。この語句は、ヘテロ原子を含有する環式アルキル基を包含しない。非置換のシクロアルキル基は、親化合物中の1個または複数の炭素原子（複数可）、酸素原子（複数可）、窒素原子（複数可）、および／または硫黄原子（複数可）に結合されていてよい。一部の実施形態では、非置換のシクロアルキル基は、3～20個の炭素原子を有する。他の実施形態では、そのような非置換のアルキル基は、3～8個までの炭素原子を有する一方で、他では、そのような基は、3～7個の炭素原子を有する。

10

【0297】

語句「置換シクロアルキル」は、置換アルキル基が非置換アルキル基に対して有する意味と同じ意味を非置換シクロアルキル基に対して有する。したがって、この語句は、これらだけに限定されないが、オキソシクロヘキシル、クロロシクロヘキシル、ヒドロキシシクロペンチル、およびクロロメチルシクロヘキシル基を包含する。

【0298】

単独か、または他の用語の一部としての用語「アリール」は、親芳香環系の単一の炭素原子から1個の水素原子を除去することによって誘導される6～20個の炭素原子の置換または非置換の一価炭素環式芳香族炭化水素ラジカルを意味する。典型的なアリール基には、これらだけに限定されないが、ベンゼン、置換ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニルなどから誘導されるラジカルが包含される。置換の炭素環式芳香族基（例えば、アリール基）は、以下の基： $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{アルキル})$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、および $-CN$ のうちの1個または複数、好ましくは1～5個で置換されていてよく、ここで、各 R' は、 $-H$ 、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、および非置換アリールから独立に選択される。一部の実施形態では、置換の炭素環式芳香族基は、 $-NHC(=NH)NH_2$ 、 $-NHCONH_2$ 、 $-S(=O)_2R'$ 、および $-SR'$ のうちの1個または複数を含めることができる。「アリーレン」は、対応する二価部分である。

20

30

【0299】

用語「置換アルキル」は、1個または複数の水素原子がそれぞれ独立に、置換基で置き換えられているアルキルを意味する。典型的な置換基には、これらだけに限定されないが、 $-X$ 、 $-R$ 、 $-O-$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-S^-$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR_3$ 、 $=NR$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-N=C=O$ 、 $-NCS$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $=N_2$ 、 $-N_3$ 、 $-NRC(=O)R$ 、 $-C(=O)NR_2$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_3H$ 、 $-S(=O)_2R$ 、 $-OS(=O)_2OR$ 、 $-S(=O)_2NR$ 、 $-S(=O)R$ 、 $-OP(=O)(OR)_2$ 、 $-P(=O)(OR)_2$ 、 $-PO_3^{2-}$ 、 PO_3H_2 、 $-AsO_2H_2$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)X$ 、 $-C(=S)R$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CO_2^-$ 、 $-C(=S)OR$ 、 $-C(=O)SR$ 、 $-C(=S)SR$ 、 $-C(=O)NR_2$ 、 $-C(=S)NR_2$ 、または $-C(=NR)NR_2$ 、が包含され、ここで、各 X は独立に、ハロゲン： $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、または $-I$ であり、各 R は独立に、 $-H$ 、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ ヘテロアルキル、 $C_6 \sim C_{20}$ アリール、 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクリル、保護基、またはプロドラッグ部分である。上記のとおりのアリール、アルキレン、およびヘテロアルキレン基はまた、同様に置換されていてよい。

40

【0300】

単独か、または他の用語の一部としての用語「アラルキル」は、上記で定義したとおりのアリール基で置換されている上記で定義したとおりのアルキル基を意味する。

【0301】

単独か、または他の用語の一部としての用語「アルキレン」は、規定の数の炭素原子、

50

典型的には1～18個の炭素原子からなり、親アルカンの同じか、または2個の異なる炭素原子から2個の水素原子を除去することによって誘導される2つの一価ラジカル中心を有する飽和の分枝または直鎖または環式炭化水素ラジカルを指す。典型的なアルキレンラジカルには、これらだけに限定されないが：メチレン（ $-\text{CH}_2-$ ）、1, 2-エチレン（ $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ）、1, 3-プロピレン（ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ）、1, 4-ブチレン（ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ）などが包含される。「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ 」直鎖アルキレンは、式 $-(\text{CH}_2)_{1 \sim 10}-$ の直鎖の飽和炭化水素基である。 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ アルキレンの例には、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン、ノニレン、およびデカレンが包含される。

【0302】

単独か、または他の置換基の一部としての用語「ヘテロアルキレン」は、ヘテロアルキル（上記で検討したとおりの）から誘導される二価基を意味する。ヘテロアルキレン基では、ヘテロ原子はまた、鎖の末端の一方または両方を占めてよい。

【0303】

単独か、または他の用語の一部としての用語「 $\text{C}_3 \sim \text{C}_8$ ヘテロシクリル」は、3～8個の炭素原子（環員とも称される）およびN、O、P、またはSから独立に選択される1～4個のヘテロ原子環員を有し、親環系の環原子から1個の水素原子を除去することにより誘導される一価の置換または非置換芳香族または非芳香族単環式、二環式、または三環式環系を指す。ヘテロシクリル中の1個または複数のN、C、またはS原子は、酸化してよい。ヘテロ原子を包含する環は、芳香族または非芳香族であってよい。別段に特記されていない限り、ヘテロシクリルは、安定な構造をもたらす任意のヘテロ原子または炭素原子で、そのペンダント基に結合されている。 $\text{C}_3 \sim \text{C}_8$ ヘテロシクリルの代表的な例には、これらだけに限定されないが、テトラヒドロフラン（tetrahydrofuran）、オキセタニル、ピラニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ベンゾフランニル、ベンゾチオフェン、インドリル、ベンゾピラゾリル、ピロリル、チオフェニル（チオペン）、フラニル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、キノリニル、ピリミジニル、ピリジニル、ピリドニル、ピラジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、およびテトラゾリルが包含される。 $\text{C}_3 \sim \text{C}_8$ ヘテロシクリルは、これらだけに限定されないが、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ ヘテロアルキル、 $-\text{OR}'$ 、アリール、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、ハロゲン、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ および $-\text{CN}$ を包含する7個までの基で置換されていてよく、ここで、各 R' は、 $-\text{H}$ 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ ヘテロアルキル、およびアリールから独立に選択される。一部の実施形態では、置換ヘテロシクリルには、 $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}'$ 、および $-\text{SR}'$ のうちの1個または複数も包含され得る。「ヘテロシクロ」は、対応する二価部分である。

【0304】

単独か、または他の用語の一部としての用語「 $\text{C}_3 \sim \text{C}_8$ カルボシクリル」は、親環系の環原子から1個の水素原子を除去することにより誘導される3員、4員、5員、6員、7員、または8員の一価の置換または非置換、飽和または不飽和の非芳香族単環式または二環式炭素環である。代表的な $\text{C}_3 \sim \text{C}_8$ カルボシクリルには、これらだけに限定されないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンタジエニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、1, 3-シクロヘキサジエニル、1, 4-シクロヘキサジエニル、シクロヘプチル、1, 3-シクロヘプタジエニル、1, 3, 5-シクロヘプタトリエニル、シクロオクチル、シクロオクタジエニル、ビスクロ(111)ペンタン、およびビスクロ(222)オクタンが包含される。 $\text{C}_3 \sim \text{C}_8$ カルボシクリル基は、非置換であるか、または、これらに限られないが、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ ヘテロアルキル、 $-\text{OR}'$ 、アリール、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、ハロゲン、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ および $-\text{CN}$ を包含する7個までの基で置換されていてよく、ここで、各 R' は、 $-\text{H}$ 、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ ヘテロアルキル、およびアリールから独立に選択される。

$S(=O)_2R'$ 、 $-S(=O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ および $-CN$ を包含する 7 個までの基で置換されていてよく、ここで、各 R' は、 $-H$ 、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ ヘテロアルキル、およびアリールから独立に選択される。「 $C_3 \sim C_8$ カルボシクロ」は、対応する二価部分である。

【0305】

単独か、または他の用語の一部としての用語「ヘテロアラルキル」は、上記で定義したとおりの芳香族ヘテロシクリル基で置換されている上記で定義したとおりのアルキル基を意味する。ヘテロアラルクロ (heteroaralclo) は、対応する二価部分である。

【0306】

「約」または「ほぼ」は、測定可能な数値の変数に関連して使用する場合、示されているその変数値と、示されている値の実験誤差の範囲内（例えば、平均に対して 95% の信頼区間の範囲内）または示されている値の 10 パーセントの範囲内であり、いずれにせよより大きなすべての変数値とを指す。

【0307】

本明細書で使用する場合、「接続鎖」または「鎖」は、免疫グロブリンドメインの個々の β スtrand を接続する β スtrand 以外の任意の三次構造形態にあるアミノ酸の配列を指す。この用語には、 α ヘリックス、ターン、ループ、および β ヘアピンの構造モチーフが包含される。用語「 α ヘリックス」、「ターン」、「ループ」、および「 β ヘアピン」は、これら 4 つの別個の三次元構造モチーフを識別し得るように、当技術分野においてこれらに一般に与えられている意味を有する。

【0308】

用語「同一性」は、当技術分野で知られているとおり、配列を比較することによって決定されるとおりの、2 つ以上のポリペプチド分子または 2 つ以上の核酸分子の配列の間の関係を指す。当技術分野では、「同一性」はまた、場合によって、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の列をマッチすることによって決定されるとおりの、ポリペプチドまたは核酸分子配列の間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、コンピュータプログラムの特定の数学的モデル（すなわち、「アルゴリズム」）によってアドレスされたギャップアラインメントを有する 2 つ以上の配列の間の同一マッチのパーセントを測定するものである。

【0309】

用語「類似性」は、「同一性」と関連する概念であるが、「同一性」とは対照的に、同一マッチおよび保存的置換マッチの両方を包含する類似性の測度を指す。保存的置換はポリペプチドには当てはまるが、核酸分子には当てはまらないので、類似性は、ポリペプチド配列の比較のみを扱う。2 つのポリペプチド配列が、20 のうち 10 は同一のアミノ酸を有し、残りはすべて非保存的置換である場合、同一性および類似性のパーセントは両方とも、50% であろう。同じ例で、保存的置換が存在する位置が 5 つ超である場合、同一性パーセントは 50% のままであるが、類似性パーセントは 75% になるであろう（20 のうち 15）。したがって、保存的置換が存在する場合には、2 つのポリペプチド配列の間での類似度は、それら 2 つの配列の間での同一性パーセントよりも高くなるはずである。

【0310】

用語「保存的アミノ酸置換」は、その位でのアミノ酸残基の極性または電荷に対してほとんど作用しないか、または全く作用しないような非天然残基での天然アミノ酸残基の置換を指す。例えば、保存的置換は、ポリペプチド中の非極性残基の、任意の他の非極性残基での置き換えから生じる。

【0311】

構造的アラインメント

タンパク質および時には RNA 配列に通常は特異的な構造的アラインメントでは、配列をアラインさせる際の助けとなるように、タンパク質または RNA 分子の二次および三次

10

20

30

40

50

構造についての情報を使用する。これらの方法は、2つ以上の配列のために使用され、典型的にはローカルアラインメントをもたらす；しかしながら、これらは、構造情報の利用可能性に依存しているので、その対応する構造が既知（通常は、X線結晶学またはNMR分光法によって）である配列でしか使用することができない。タンパク質およびRNA構造は両方とも、配列よりも進化的に保存されているので、非常に離れた関連を有し、配列を比較しても、その類似性を確かに検出することができないほど広範に異なっている配列の間では、構造的アラインメントは、より信頼性が高くなり得る。タンパク質の一方について利用可能な構造データが存在しない場合でも、構造データが一方について、または好ましくは、種を超えた免疫グロブリン、特に種およびサブタイプを超えた抗体定常ドメインなどの、より近い関連タンパク質について利用可能であるならば、比較を行うことができる。

10

【0312】

構造的アラインメントは、相同性をベースとするタンパク質の構造予測のためにアラインメントを評価する際に「ゴールドスタンダード」として使用される。それというのも、構造的アラインメントは、配列情報に専ら頼るよりもむしろ、構造的に類似しているタンパク質配列の領域を明確にアラインするためである。

【0313】

DALI法または距離マトリックスアラインメント (distance matrix alignment) は、問い合わせ配列中の連続ヘキサペプチドの間での接触類似性パターン (contact similarity patterns) に基づき構造的アラインメントを構築するための、断片をベースとする方法である。これは、対アラインメントまたは多重アラインメントを発生させ、問い合わせ配列の構造的隣接体 (neighbors) を Protein Data Bank (PDB) において同定することができる。これは、FSSP構造的アラインメントデータベース (Fold classification based on Structure-Structure alignment of Proteins、またはFamilies of Structurally Similar Proteins) を構築するために使用されている。DALIウェブサーバには、EBI DALIからアクセスすることができ、FSSPは、The Dali Databaseにある。

20

【0314】

SSAP (連続構造アラインメントプログラム) は、構造空間における原子-対-原子ベクトル (atom-to-atom vectors) を比較点として使用する構造的アラインメントの、ダイナミックプログラミングをベースとする方法である。これは、そのオリジナルの記載以来、多重アラインメント、さらには対アラインメントを包含するように拡張されており、タンパク質フォールドのCATH (クラス (Class)、構造 (Architecture)、トポロジー (Topology)、ホモロジー (Homology)) 階層型データベース分類を構築する際に使用されている。CATHデータベースには、CATH Protein Structure Classificationからアクセスすることができる。

30

【0315】

構造的アラインメントの組合せ拡張法は、解析される2つのタンパク質の短い断片をアラインさせるためにローカルなジオメトリを使用することによって、一对の構造的アラインメントを生成し、次いで、これらの断片を集成して、より大きなアラインメントにする。剛体二乗平均距離 (rigid-body root mean square distance)、残基距離、ローカル二次構造、および残基隣接体の疎水性などの周囲環境特徴などの測度に基づき、「アラインされた断片対」と呼ばれるローカルアラインメントが生成され、事前定義されたカットオフ基準内で可能な構造的アラインメントのすべてを表す類似性マトリックスを作るために使用される。次いで、1つのタンパク質構造状態から他のタンパク質構造状態への経路が、マトリックスを介して、成長中のアラインメントを一度に1つの断片で拡張することによって追跡される。最適なそのような経路によ

40

50

て、組合せ拡張アラインメントが画定される。方法を実行し、Protein Data Bankにおいて構造の対アラインメントのデータベースを提供するウェブベースのサーバは、Combinatorial Extensionのウェブサイトにある。

【0316】

配列アラインメント

例えば、標的配列NMRまたは結晶構造データが存在しないことによって、本発明の配列との構造的アラインメントが不可能である場合には、配列アラインメントを使用することができる。当業者は、配列アラインメントツール（本明細書に記載のものなど、当業者に知られているBLAST、CLUSTALなど）を熟知しており、既知の構造モチーフに従って、特に、免疫グロブリンドメイン、抗体、および抗体定常ドメインについての、特にサブタイプおよび種を超えて既に存在する多数の例示的な構造的な研究によって、配列を、特に、抗体定常ドメイン配列をアラインさせることができる。

【0317】

配列アラインメントのためのコンピュータによる手法は一般的に、グローバルアラインメントおよびローカルアラインメントの2つのカテゴリーに分類される。グローバルアラインメントの計算は、アラインメントがすべての問い合わせ配列の全長さに及ぶことを「強制する」グローバル最適化の一形態である。対照的に、ローカルアラインメントは、全体では多くの場合に大きく異なる長い配列内における類似性の領域を同定する。ローカルアラインメントが多くの場合に好ましいが、これは、類似性の領域を同定する追加的なチャレンジによって、計算がより困難であり得る。様々なコンピュータアルゴリズムが、配列アラインメントの問題に適用されている。これらには、ダイナミックプログラミングのような速度は遅いが、形式上は正しい方法、また、ベストマッチを見出すことを保証するものではない大規模データベースサーチのために設計された効率的な発見的アルゴリズムまたは確率法が包含される。

【0318】

問い合わせセット中の配列が類似していて、ほぼ等しいサイズを有する場合には、あらゆる配列中のあらゆる残基をアラインさせることを試みるグローバルアラインメントが最も有用である。一般的なグローバルアラインメント技術は、Needleman-Wunschアルゴリズムであり、これは、ダイナミックプログラミングに基づく。それらの比較的大きな配列文脈内に類似性の領域または類似の配列モチーフを含有すると推測される非類似の配列では、ローカルアラインメントが、より有用である。Smith-Watermanアルゴリズムは、これもダイナミックプログラミングに基づく一般的なローカルアラインメント法である。

【0319】

2つの問い合わせ配列の区分的（ローカル）アラインメントまたはグローバルアラインメントのベストマッチングを見出すためには、対配列アラインメント法が使用される。対アラインメントを生成する3つの主な方法は、ドットマトリックス法、ダイナミックプログラミング、およびワード法（word methods）であるが；しかしながら、多重配列アラインメント技術も、配列対をアラインさせることができる。各方法は、その個々の強みおよび弱みを有するが、情報内容の少ない高度に反復性の配列では、特に、反復回数が、アラインさせる2つの配列において異なる場合には、3つの対方法はすべて困難を伴う。所与の対アラインメントの有用性を定量化する1つの方法は、「最大ユニークマッチ（maximum unique match）」（MUM）であるか、または両方の問い合わせ配列中に生じている最長部分配列である。典型的には、より長いMUM配列ほど、より近い関連性を反映している。同一性および／または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列の間で最大のマッチが得られるように設計されている。同一性および類似性を決定するための方法は、公に利用可能なコンピュータプログラムにおいて体系化されている。2つの配列の間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータプログラム法には、これらだけに限定されないが、GAP（Devereuxら、Nuc. Acids Res. 12:387(1984)；Genetics C

omputer Group、University of Wisconsin、Madison、WI)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA (Altschulら、J. Mol. Biol. 215:403~10 (1990)) を包含するGCGプログラムパッケージが包含される。BLAST Xプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他の供給元 (Altschulら、BLAST Manual (NCB NLM NIH、Bethesda、MD) ; Altschulら、1990、前出) から公に利用可能である。よく知られているSmith Watermanアルゴリズムも、同一性を決定するために使用することができる。

【0320】

例として、コンピュータアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group) を使用して、配列同一性パーセントを決定すべき2つのポリペプチドを、それらの個々のアミノ酸が最適にマッチングするようにアラインさせる (アルゴリズムによって決定される「マッチドスパン (matched span) 」)。ギャップオープニングペナルティー (平均ダイアゴナルの3倍と計算される; 「平均ダイアゴナル」は、使用される比較マトリックスのダイアゴナルの平均であり; 「ダイアゴナル」は特定の比較マトリックスによる、それぞれ完全なアミノ酸マッチに割り当てられるスコアまたは数である) およびギャップエクステンションペナルティー (通常、ギャップオープニングペナルティーの0.1倍である)、さらには、PAM250またはBLOSUM62などの比較マトリックスを、アルゴリズムと一緒に使用する。ポリペプチド配列の比較のための好ましいパラメーターには、以下が包含される: アルゴリズム: NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol. 48:443~53 (1970)。比較マトリックス: BLOSUM 62、Henikoffら、Proc. Natl. Acad. Sci.、U. S. A. 89:10915~19 (1992)。

【0321】

Program Manual、WisconsinPackage、Version 9、September、1997に提示されているものを包含する、他の例示的なアルゴリズム、ギャップオープニングペナルティー、ギャップエクステンションペナルティー、比較マトリックス、類似性の閾値なども、当業者によって使用され得る。成されるべき特定の選択は、DNAとDNA、タンパク質とタンパク質、タンパク質とDNAなどの成されるべき具体的な比較; 加えて、その比較が所与の配列対の間のものであるか (この場合、GAPまたはBest Fitが一般的に好ましい)、または1つの配列と、大きな配列データベースとの間のものであるか (この場合、FASTAまたはBLASTAが好ましい) に左右されるはずである。

【0322】

【表 2 - 1】

配列リスト

配列番号	説明	配列
1	重鎖 2.12.1.fx CDR に下線	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYYMSWIRQA PGKGLEWVSY ISSSGSTRDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCVRDG VETTFYYYYY GMDVWGQGT VTSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVTVTPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVKCCVE CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAEWESNGQ PENNYKTPP MLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
2	軽鎖 2.12.1.fx CDR に下線	DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQDIR RDLGWYQQKP GKAPKRLIYA ASRLQSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HNNYPRTFGQ GTKLVIKRTV AAPS VFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSK STYLSSTLT LSKADYEKKH VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
3	HC 可変 2.12.1.fx	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYYMSWIRQA PGKGLEWVSY ISSSGSTRDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCVRDG VETTFYYYYY GMDVWGQGT VT
4	HC 定常 2.12.1.fx	VSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVTVTPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVKCCVE CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAEWESNGQ PENNYKTPP MLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
5	LC 可変 2.12.1.fx	DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQDIR RDLGWYQQKP GKAPKRLIYA ASRLQSGVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ HNNYPRTFGQ GTKLVIKR
6	ヒト CL _k 1-106 (Km (3)) $X^{45}=A/X^{83}=V$ K^{80} は太字および下線 2.12.1.fx	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYE K HKLYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
7	ヒト CL _k 1-106 Km (1, 2) $X^{45}=A/X^{83}=L$ K^{80} は太字および下線	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYE K HKLYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
8	ヒト CL _k 1-106 (Km (1)) $X^{45}=V/X^{83}=L$ K^{80} は太字および下線	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNVLQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYE K HKLYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
9	hCL _k 1-106 X^{82} = 任意の AA $X^{45}=V/A$ $X^{83}=L/V$	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNXLQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYE K HxxYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
10	ヒト CL _k 1-106 $X^{45}=V/A$ $X^{83}=L/V$	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNXLQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYE K HKxYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
11	ヒト CL _k 1-106 X^{82} =任意の aa	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYE K HxVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
12	ヒト CL _k . $K^{80}R$	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYE R HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

10

20

30

【 0 3 2 3 】

【表 2 - 2】

13	ヒ ト CLk.K ⁸² R	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HRVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
14	ヒ ト CLk.K ⁸⁰ R/K ⁸² R	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYER HRVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
15	ヒ ト CLk.D ⁴³ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
16	ヒ ト CLk.K ⁸⁰ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEA HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
17	ヒ ト CLk.H ⁸¹ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK AKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
18	ヒ ト CLk.K ⁸² A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HAVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
19	ヒ ト CLk.D ⁴³ A/H ⁸¹ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK AKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
20	ヒ ト CLk.K ⁴¹ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW AVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
21	ヒ ト CLk.V ⁴² A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KADNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
22	ヒ ト CLk.N ⁴⁴ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
23	ヒ ト CLk.L ⁴⁶ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNAAQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
24	ヒ ト CLk.Q ⁴⁷ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALASGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
25	ヒ ト CLk.S ⁴⁸ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQAGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
26	ヒ ト CLk.N ⁵⁰ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGA SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
27	ANG2 結合ペプチド X1=COCH ₃ X3 および x10 = K _{ac} X24=NH ₂	xQxYQPLDEx DKTLYDQFML QQGx
28	ヒ ト CLk.L ⁷³ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTASKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
29	ヒ ト CLk.S ⁷⁴ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLAKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

10

20

30

【 0 3 2 4 】

【表 2 - 3】

30	ヒ ト CLk.K ⁷⁵ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLAADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
31	ヒ ト CLk.Y ⁷⁸ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKADA EK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
32	ヒ ト CLk.E ⁷⁹ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKADYAK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
33	ヒ ト CLk.H ⁸¹ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKADYEK AKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
34	ヒ ト CLk.Y ⁸³ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKADYEK HKAYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
35	ヒ ト CLk.Y ⁸⁴ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKADYEK HKVAACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
36	ヒ ト CLk.R ¹⁰³ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNAGEC
37	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKAAYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
38	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ G	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKAGYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
39	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ V	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKAVYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
40	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ L	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKALYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
41	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ I	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKAIYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
42	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ P	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKAPYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
43	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ F	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKAFYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
44	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ W	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKAWYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
45	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ Y	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKAYYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
46	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ H	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKAHYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
47	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ M	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKAMY EK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

10

20

30

【表 2 - 4】

48	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ C	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKACYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
49	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ S	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKASYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
50	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ T	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKATYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
51	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ Q	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKAQYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
52	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ N	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKANYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
53	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ E	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKAQYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
54	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ R	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKARYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
55	ヒ ト CLk.D ⁷⁷ K	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKAKYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
56	ヒ ト CLk.D ⁴³ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
57	ヒ ト CL λ	GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTEC
58	mCLk	ADAAPTVSIF PPSSEQLTSG GASVVCFLNN FYPRDINVKW KIDGSRQNG VLNSWTDQDS KDSTYSMSST LTLTKDEYER HNSYTCEATH KTSTSPIVKS FNRNEC
59	hAb λ テスト LC 軽鎖定 常領域 (ラムダ)	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
60	hAb λ テスト- λ K	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
61	hAb λ テスト- λ KJ	KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
62	hAb λ テスト S ⁸¹ H/H ⁸² S	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
63	2.12.1.fx Fab HC	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYYMSWIRQA PGKGLEWVSY ISSSGSTRDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCVRDG VETTFYYYYY GMDVWGQGT VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVKRCCKVE

10

20

30

【 0 3 2 6 】

【表 2 - 5】

64	h38C2-IgG1 LC	ELQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRSSQSLL HTYGSPYLNW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAV YFCSQGTHLP YTFGGGKTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVC LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC
65	h38C2-IgG1 HC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYWMSWVRQS PEKGLEWVSE IRLRSDNYAT HYAESVKGRF TISRDN SKNT LYLMNSLRA EDTGIYCYCKT YFYSFSYWGQ GTLTVTVSS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGEVHNNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
66	h38C2-IgG2 HC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYWMSWVRQS PEKGLEWVSE IRLRSDNYAT HYAESVKGRF TISRDN SKNT LYLMNSLRA EDTGIYCYCKT YFYSFSYWGQ GTLTVTVSS TKGPSVFPLA PCRSSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVKRC CVECPCPCAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLSDGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
67	VL h38C2	ELQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRSSQSLL HTYGSPYLNW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAV YFCSQGTHLP YTFGGGKTKVE IKR
68	VH h38C2	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYWMSWVRQS PEKGLEWVSE IRLRSDNYAT HYAESVKGRF TISRDN SKNT LYLMNSLRA EDTGIYCYCKT YFYSFSYWGQ GTLTVTVSS
69	VL m38C2	DVVMVTQPLS LPVRLGDQAS ISCRSSQSLL HTYGSPYLNW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDLG VYFCSQGTHLP YTFGGGKTKLE IK
70	VH m38C2	EVQLVESGGG LVQPGGTMKL SCEISGLTFR NYWMSWVRQS PEKGLEWVAE IRLRSDNYAT HYAESVKGKF TISRDDSKSR LYLMNSLR T EDTGIYCYCKY YFYSFSYWGQ GTLTVVSA
71	トラスツズマブ HC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWRQA PGKLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQ GTLTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEV TCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
72	トラスツズマブ VH	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWRQA PGKLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQ GTLTVTVSS

10

20

30

【 0 3 2 7 】

【表 2 - 6】

73	トラスツズマブ CH	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
74	トラスツズマブ LC	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPS VFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSK STYSLSSLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
75	トラスツズマブ VL	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTPPTFGQ GTKVEIKR
76	トラスツズマブ CL	TVAAPS VFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
77	トラスツズマブ D77A CL	TVAAPS VFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKA ~~A~~ YEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
78	トラスツズマブ D77x CL X45=V/A; X77= A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W; X83=V/L	TVAAPS VFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDN ~~x~~ LQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKA ~~x~~ YEK HK ~~x~~ YACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
79	(Gly ₄ Ser) ₃	GGGGSGGGG SGGGGG
80	試験ペプチド-1	GRGDSPK
81	試験ペプチド-2	DVPKSDQFVG LM
82	開裂例	SKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
83	トリプシン開裂生成物 1	ADYEK HK
84	トリプシン開裂生成物 2	HKVYACEVTH QGLSSPVTK
85	2.12.1.fx.LC.FOR	CAA CAA GAT CTG CCA CCA TGG ACA TGA GGG T
86	2.12.1.fx.LC.REV	CAA CAG CTA GCC TAA CAC TCT CCC CTG TTG A
87	L181A.FOR	CAA CAG GTC TCG GCC AGC AAA GCA GAC TAC GAG AA
88	L181A.REV	CAA CAG GTC TCC TGG CCG TCA GGG TGC TGC TGA G
89	TRAST.VL.FOR	CAA CAG GTC TCA GAT CTG CCA CCA TGG GAT GGA GC
90	TRAST.VL.REV	CAA CAG GTC TCA TCC GCT TGA TTT CCA CCT TG
91	TRAST.CL.D185A.FOR	CAA CAG GTC TCA CGG ACC GTG GCC GCT CC
92	TRAST.CL.D185A.REV	CAA CAG CTA GCC TAT CAG CAC TCG CCC CG
93	CL λ コンセンサス X6=N/A; X8=S/T; x23=K/S/R/Q/E; x37=A/V; X39=T/K; X46=S/G; x49=V/A/I; x50=K/E; x51=A/T; x57=T/K/A; x65=K/R/N; x80=K/Q; x83=K/R; x88=Q/L; x103=A/T	GQPKAxPxVT LFPPSSEELQ ANxATLVCLI SDFYPGxVxV AWKADxSPxx xGVETT ~~x~~ PSK QSN ~~x~~ YAASS YLSLTPEQW ~~x~~ SH ~~x~~ SYSCxVT HEGSTVEKTV APx ECS

10

20

30

【 0 3 2 8 】

【表 2 - 7】

94	CL _A コンセンサス S ⁸¹ K X ₆ =N/A; X ₈ =S/T; x ₂₃ =K/S/R/Q/E; x ₃₇ =A/V; X ₃₉ =T/K; X ₄₆ =S/G; x ₄₉ =V/A/I; x ₅₀ =K/E; x ₅₁ =A/T; x ₅₇ =T/K/A; x ₆₅ =K/R/N; x ₈₀ =K/Q; x ₈₃ =K/R; x ₈₈ =Q/L; x ₁₀₃ =A/T	GQPKA×P×VT LFPPSSEELQ AN×ATLVCLI SDFYPG×V×V AWKAD×SP×× xGVETT×PSK QSNN×YAASS YLSLTPEQW× KH×SYSC×VT HEGSTVEKTV AP×ECS
95	CL _A コンセンサス; K ⁸⁰ X/S ⁸¹ K X ₆ =N/A; X ₈ =S/T; x ₂₃ =K/S/R/Q/E; x ₃₇ =A/V; X ₃₉ =T/K; X ₄₆ =S/G; x ₄₉ =V/A/I; x ₅₀ =K/E; x ₅₁ =A/T; x ₅₇ =T/K/A; x ₆₅ =K/R/N; x ₈₀ = G, A, I, L, V, S, T, M, N, Q, F, Y, W, D, or E x ₈₃ =K/R; x ₈₈ =Q/L; x ₁₀₃ =A/T	GQPKA×P×VT LFPPSSEELQ AN×ATLVCLI SDFYPG×V×V AWKAD×SP×× xGVETT×PSK QSNN×YAASS YLSLTPEQW× KH×SYSC×VT HEGSTVEKTV AP×ECS
96	CL _A コンセンサス E ⁷⁷ x/ S ⁸¹ Δ X ₆ =N/A; X ₈ =S/T; x ₂₃ =K/S/R/Q/E; x ₃₇ =A/V; X ₃₉ =T/K; X ₄₆ =S/G; x ₄₉ =V/A/I; x ₅₀ =K/E; x ₅₁ =A/T; x ₅₇ =T/K/A; x ₆₅ =K/R/N; x ⁷⁷ = R/L/S/G/Q/P/N/V/I/T/ M; x ₈₃ =K/R; x ₈₈ =Q/L; x ₁₀₃ =A/T	GQPKA×P×VT LFPPSSEELQ AN×ATLVCLI SDFYPG×V×V AWKAD×SP×× xGVETT×PSK QSNN×YAASS YLSLTP×QW× -H×SYSC×VT HEGSTVEKTV AP×ECS
97	CL _A コンセンサス; E ⁷⁷ x/K ⁸⁰ X/S ⁸¹ K X ₆ =N/A; X ₈ =S/T; x ₂₃ =K/S/R/Q/E; x ₃₇ =A/V; X ₃₉ =T/K; X ₄₆ =S/G; x ₄₉ =V/A/I; x ₅₀ =K/E; x ₅₁ =A/T; x ₅₇ =T/K/A; x ₆₅ =K/R/N; x ⁷⁷ = R, L, S, G, Q, P, N, V, I, T, および M x ₈₀ = G, A, I, L, V, S, T, M, N, Q, F, Y, W, D, または E x ₈₃ =K/R; x ₈₈ =Q/L; x ₁₀₃ =A/T	GQPKA×P×VT LFPPSSEELQ AN×ATLVCLI SDFYPG×V×V AWKAD×SP×× xGVETT×PSK QSNN×YAASS YLSLTP×QW× KH×SYSC×VT HEGSTVEKTV AP×ECS

10

20

30

【表 2－8】

98	X^1 = 任意の aa; X^2 =A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W; X^3 =任意の aa; X^4 =任意の aa.	xxxxKH
99	X^1 = 任意の aa; X^2 =A, G, I, L, R, S, T, P, N, M; X^3 = 任意の aa; X^4 =任意の aa.	xxxxKH
100	X^1 = 任意の aa; X^2 =A, G, I, L, S, T, P, M; X^3 =任意の aa; X^4 =任意の aa.	xxxxKH
101	X^3 =A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W.	KAxYEKH
102	X^3 =A, G, I, L, R, S, T, P, N, M.	KAxYEKH
103	X^3 =A, G, I, L, S, T, P, M.	KAxYEKH
104	hCLk 1-106 X^{45} =V/A x^{77} = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W; X^{82} = 任意の AA; X^{83} =L/V	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDN ~~x~~ LQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKAXYE ~~K~~ HxxYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
105	hCLk 1-106 X^{45} =V/A x^{77} = A, G, I, L, R, S, T, P, N, M; X^{82} = 任意の AA X^{83} =L/V	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDN ~~x~~ LQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKAXYE ~~K~~ HxxYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
106	hCLk 1-106 X^{45} =V/A x^{77} = A, G, I, L, S, T, P, M; X^{82} = 任意の AA X^{83} =L/V	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDN ~~x~~ LQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKAXYE ~~K~~ HxxYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
107	ヒト CLk.D ⁴³ E	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVENALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
108	ヒト CLk.D ⁴³ N	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVNNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
109	ヒト CLk.D ⁴³ L	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVLNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
110	ヒト CLk.H ⁸¹ N	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK NKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
111	ヒト CLk.H ⁸¹ Q	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK QKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

10

20

30

【 0 3 3 0 】

【表 2－9】

112	ヒト CLk.H ⁸¹ Y	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK YKVIYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
113	ヒト CLk.H ⁸¹ W	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK WKVIYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
114	ヒト CLk.H ⁸¹ F	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK FKVIYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
115	X ¹ = 任意の aa; X ² = 任意の aa; X ³ = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W; X ⁴ = 任意の aa; X ⁵ = 任意の aa.	xxxxxxKH
116	X ¹ = 任意の aa; X ² = 任意の aa; X ³ = A, G, I, L, R, S, T, P, N, M; X ⁴ = 任意の aa; X ⁵ = 任意の aa.	xxxxxxKH
117	X ¹ = 任意の aa; X ² = 任意の aa; X ³ = A, G, I, L, S, T, P, M; X ⁴ = 任意の aa; X ⁵ = 任意の aa.	xxxxxxKH
118	X ¹ = 任意の aa; X ² = 任意の aa; X ³ = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W; X ⁴ = 任意の芳香族アミノ酸; X ⁵ = 任意の aa.	xxxxxxKH
119	hCLk 1-106 x43=D, E, N, Q; X ⁴⁵ =V/A; x76=任意の aa; x77= A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W; x78=任意の aa; x79=任意の aa; X ⁸² = 任意の AA; X ⁸³ =L/V	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDN ~~x~~ LQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSK ~~xxxxx~~ K H ~~xx~~ <u>y</u> ACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
120	hCLk 1-106 x43=D, E, N, Q; X ⁴⁵ =V/A; x76=任意の aa; x77= A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W; x78=任意の芳香族 aa; x79=任意の aa; X ⁸² = 任意の AA; X ⁸³ =L/V	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDN ~~x~~ LQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSK ~~xxxxx~~ K H ~~xx~~ <u>y</u> ACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

10

20

30

【 0 3 3 1 】

【表 2 - 1 0】

121	hCLk 1-106 x43=D, E, N, Q; X ⁴⁵ =V/A; x76=任意の aa; x ⁷⁷ = A, G, I, L, S, T, P, M; x78= 任意の aa; x79=任意の aa; X ⁸² = 任意の AA; X ⁸³ =L/V	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNXLQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKxxxxK HxxYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
122	hCLk 1-106 x43=D, E, N, Q; X ⁴⁵ =V/A; x76=任意の aa; x ⁷⁷ = A, G, I, L, S, T, P, M; x78= 任意の芳香族 aa; x79=任意の aa; X ⁸² = 任意の AA; X ⁸³ =L/V	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNXLQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKxxxxK HxxYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
123	X ¹ = 任意の aa; X ² =A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M; X ³ =任意の aa; X ⁴ =任意の aa.	xxxxKH
124	X ¹ = 任意の aa; X ² =A, G, I, V, L, R, S, T, P, M; X ³ =任意の aa; X ⁴ =任意の aa.	xxxxKH
125	X ¹ = 任意の aa; X ² =A, G, I, V, L, S, T, M; X ³ =任意の aa; X ⁴ =任意の aa.	xxxxKH
126	X ¹ = 任意の aa; X ² =A, G, I, L, S, T, M; X ³ =任意の aa; X ⁴ =任意の aa.	xxxxKH
127	カップ軽鎖 D ⁴³ A/D ⁷⁷ A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KV ~~A~~ ANALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKA ~~A~~ YEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
128	ヒト CLk D77A/H81A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKA ~~A~~ YEK ~~A~~ KVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
129	ヒト CLk D43A/D77A/H81A	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KV ~~A~~ ANALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKA ~~A~~ YEK ~~A~~ KVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
130	ウサギ CLk	RDPVAPTCLI FPPAADQVAT GTVTIVCVAN KYFPDVTVTW EV ~~D~~ GTQTGTG IENSKTPQNS ADCTYNLSST LTLTSTQYNS ~~H~~ KEYTCKVTQ GTTSVVQSFN RGDC
131	ウサギ定常重鎖 rCH	GQPKAPSVFP LAPCCGDTPS STVTILGCLVK GYLPEPVTVT WNSGTLTNGV RTFPSVRQSS GLYSLSSVVS VTSSSQPVTC NVAHPATNTK VDKTVAPSTC SKPTCPPPEL LGGPSVFIFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQDDPEVQ FTWYINNEQV RTARPPLEQ QFNSTIRVVS TLPIAHQDWL RGKEFKCKVH NKALPAPIEK TISKARGQPL EPKVYTMGPP REELSSRSVS LTCMINGFYP SDISVEWEKN GKAEDNYKTT PAVLSDSGSY FLYSKLSVPT SEWQRGDVFT CSVMHEALHN HYTQKSISRS PGK

10

20

30

【 0 3 3 2 】

40

【表 2 - 1 1】

132	トラスツズマブ-ウサギ k1 キメラ (可変ドメイン) rTrast-LC	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFGSGRSRGT FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRDP VAPTVLIFPP AADQVATGTV TIVCVANKYF PDVTVTWEVD GTTQTTGIEN SKTPQNSADC TYNLSSTLTL TSTQYNSHKE YTCKVTQGT SVVQSFNRGD C
133	トラスツズマブウサギ IgG キメラ (可変ドメイン) rTrast-HC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYV GQGTLLTVSS GQPKAPSVFP LAPCCGDTSP STVTLGCLVK GYLPEPVTVT WNSGTLTNGV RTFPSVRQSS GLYSLSVVVS VTSSSQPVTC NVAHPATNTK VDKTVAPSTC SKPTCPPPEL LGGPSVFIFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQDDPEVQ FTWYINNEQV RTARPPLEQ QFNSTIRVVS TLPIAHQDWL RGKEFKCKVH NKALPAPIEK TISKARGQPL EPKVYTMGPP REELSSRSVS LTCMINGFYP SDISVEWEKN GKAEDNYKTT PAVLDSGSGY FLYSKLSVPT SEWQRGDVFT CSVMHEALHN HYTKKSIRS PGK
134	ウサギ CLk-S80K	RDPVAPTCLI FPPAADQVAT GTVTIVCVAN KYFPDVTVTW EVDTGTTQTTG IENSKTPQNS ADCTYNLSST LTLTSTQYNK HKEYTCKVTQ GTTSVVQSFN RGDC
135	トラスツズマブ-ウサギ k1 キメラ S188K (可変ドメイ ン) rTrastLC-[rCLk-S80K]	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFGSGRSRGT FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRDP VAPTVLIFPP AADQVATGTV TIVCVANKYF PDVTVTWEVD GTTQTTGIEN SKTPQNSADC TYNLSSTLTL TSTQYNKHKE YTCKVTQGT SVVQSFNRGD C
136	hIL22 LC	QAVLTQPPSV SGAPGQRTI SCTGSSSNIG AGYGVHWYQQ LPGTAPKLLI YGDSNRPSGV PDRFSGSKSG TSASLAITGL QAEDEADYYC QSYDNLSSGY VFGGGTQLTV LGQPKAAPSV TLFPPSSEEL QANKATLVCL ISDFYPGAVT VAWKADSSPV KAGVETTTTPS KQSNNKYAAS SYLSLTPEQW KSHRSYSCQV THEGSTVEKT VAPTECS
137	hIL22 HC	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMHWRQA PGQGLEWVGW INPYTGSAFY AQKFRGRVTM TRDTSISTAY MELSLRSDD TAVYYCAREP EKFDSDSDV WGRGTLTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFLL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K
138	hIL22 VL	QAVLTQPPSV SGAPGQRTI SCTGSSSNIG AGYGVHWYQQ LPGTAPKLLI YGDSNRPSGV PDRFSGSKSG TSASLAITGL QAEDEADYYC QSYDNLSSGY VFGGGTQLTV L
139	hIL22 ラムダ定常	GQPKAAPSVT LFPSSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADSSPVK AGVETTTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS

10

20

30

【 0 3 3 3】

【表 2 - 1 2】

140	hIL22-[CLλ-S ⁸¹ K]	GQPKA APSVTLFPPS SEELQANKAT LVCLISDFYP GAVTVAWKAD SSPVKAGVET TTPSKQSNNK YAASSYLSLT PEQWK <u>K</u> HRSY SCQVTHEGST VEKTVAPTEC S
141	hIL22- [CLλ-Q ⁷⁸ A /S ⁸¹ K]	GQPKA APSVTLFPPS SEELQANKAT LVCLISDFYP GAVTVAWKAD SSPVKAGVET TTPSKQSNNK YAASSYLSLT PE <u>A</u> WK <u>K</u> HRSY SCQVTHEGST VEKTVAPTEC S
142	hIL22-[CLλ-A ⁴⁴ V/S ⁸¹ K]	GQPKA APSVTLFPPS SEELQANKAT LVCLISDFYP GAVTVAWK <u>V</u> D SSPVKAGVET TTPSKQSNNK YAASSYLSLT PEQWK <u>K</u> HRSY SCQVTHEGST VEKTVAPTEC S
143	hIL22- [CLλ-A ⁴⁴ V/Q ⁷⁸ A/S ⁸¹ K]	GQPKA APSVTLFPPS SEELQANKAT LVCLISDFYP GAVTVAWK <u>V</u> D SSPVKAGVET TTPSKQSNNK YAASSYLSLT PE <u>A</u> WK <u>K</u> HRSY SCQVTHEGST VEKTVAPTEC S
144	hIL22- [CLλ-λ ⁷⁶⁻⁸⁴ /145]	GQPKA APSVTLFPPS SEELQANKAT LVCLISDFYP GAVTVAWKAD SSPVKAGVET TTPSKQSNNK YAASSYLSLT <u>KAAYEKHKV</u> Y SCQVTHEGST VEKTVAPTEC S
145	CLκ 9-aa loop	KAAYEKHKV
146	トラスツズマブ LC K188A (可変ドメイン)	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFGSGRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYE <u>A</u> HK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
147	hIGg1-CH1	ASTKGPSVFPP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV
148	hIGg1-CH1-m1	ASTKGPSVFPP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSEKHKV YICNVNHKPS NTKVDKKV
149	hIGg1-CH1-m1-D44	ASTKGPSVFPP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNS <u>D</u> GALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSS <u>E</u> KHK <u>V</u> YICNVNHKPS NTKVDKKV
150	hIGg1-CH1-m2	ASTKGPSVFPP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSS <u>Y</u> EKHK <u>V</u> YICNVNHKPS NTKVDKKV
151	hIGg1-CH1-m2-D44	ASTKGPSVFPP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNS <u>D</u> GALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSS <u>Y</u> EKH <u>KV</u> YICNVNHK PSNTKVDKKV
152	hIGg1-CH1 Δ 断片	LGTQT
153	M1 挿入断片	EKKHV
154	M2 挿入断片	YEKKV
155	hIGg1-CH2	APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
156	hIGg1-CH2m	APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWL <u>KH</u> KEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
157	hIGg1-H3	GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPPVLD S DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

10

20

30

【 0 3 3 4】

【表 2 - 1 3】

158	hIGg1-CH3m	GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQKH NVFSCSVMHE ALHNNHYTQKS LSLSPGK
159	トラスツズマブ CH1-m2	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSSYEKHK VYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNNHY TQKSLSLSPG K
160	トラスツズマブ CH1-m1-D44	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSD ~~G~~ GALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSEKHK VYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNNHY TQKSLSLSPG K
161	トラスツズマブ CH1-m2-D44	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSD ~~G~~ GALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSEKHK KVYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK
162	トラスツズマブ CH2m	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLT V ~~L~~ HQDWLKH ~~K~~ EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSGDSFFLY SKLTVDKSRW WQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

【 0 3 3 5】

【表 2 - 1 4】

163	トラスツズマブ CH3m	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLLTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP KSCDKHTTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LSDSGSFFLY SKLTVDKSRW <u>QKH</u> NVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
164	Ex4 相同体 x2 は Aib で ある X14=KSH	HxEGTFTSDL SKQ <u>x</u> EEEA VR LFIEWLKNNG PSSGAPPPS
165	hIgG1-CH1- T78K/Q79K/CD ループス ワップ	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WKVDNALATS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSEKH <u>KV</u> YICNVNHNK PSNTKVDKKV
166	hIgG1-CH1-CD 挿入	KVDNALA
167	hIgG1-CH2m- D82A/N85K/G86H	APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLT ¹ VLH <u>QAWLKH</u> KEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
168	hIgG1-CH3m-CD1/EF	GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE <u>WEVD</u> GQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKS <u>AWQKH</u> NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK
169	hIgG1-CH3m-CD2/EF	GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE <u>WELE</u> GQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKS <u>AWQKH</u> NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK
170	X ¹ = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E, G, P. X ² =A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W. X ³ = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E, G, P; X ⁴ = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E, G, P;	xxxxKH X1 X3 X4 は cys ではない
171	X ¹ = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E, G. X ² =A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W. X ³ = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E, G; X ⁴ = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E, G;	xxxxKH X1 X3 X4 は Cys、Pro ではない

10

20

30

【表 2 - 1 5】

172	$X^1 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W.$ $X^3 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は Cis、Pro、Gly ではない
173	$X^1 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X3 は A または V ではない
174	$X^1 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X3 は A または V、S または T ではない
175	$X^1 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y, N, Q, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X3 は A、V、S または T、M、K、R、H ではない

10

20

30

【表 2 - 1 6】

176	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $X^4 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X3$ は C、G、P、A、V、S または T、M、K、R、H、N、Q、D、または E ではない;
177	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $X^4 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X3$ は Y または W である
178	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, K, R, H,$ $D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X4$ は F、Y、W ではない
179	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, K, R, D,$ $E;$ $X^4 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X4$ は F、W、Y、H ではない

10

20

30

【 0 3 3 8】

【表 2 - 1 7】

180	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $S, T, M, N, Q, K, R,$ $H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, K, R, H,$ $D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X3$ は A または V ではない $X4$ は F、Y、W ではない
181	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $M, N, Q, K, R, H, D,$ $E;$ $X^4 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, K, R, H,$ $D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X3$ は A または V、S または T ではない $X4$ は F、Y、W ではない
182	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $N, Q, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, K, R, D,$ $E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X3$ は A、V、S または T、M、K、R、H ではない $X4$ は F、Y、W、または H ではない
183	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $X^4 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, K, R, D,$ $E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X3$ は C、G、P、A、V、S または T、M、K、R、H、N、Q、D、または E ではない; $X4$ は F、Y、W、または H ではない

10

20

30

【表 2 - 1 8】

184	$X^1 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $X^4 = N, Q, K, R, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X3$ は Y または W である $X4$ は E、K、D、R、N、または Q である
185	$X^1 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W.$ $X^3 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = N, Q, K, R, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X4$ は E、K、D、R、N、または Q である
186	$X^1 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W.$ $X^3 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X1$ は芳香族ではない
187	$X^1 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W.$ $X^3 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X1$ は芳香族または K ではない

10

20

30

【 0 3 4 0 】

【表 2－19】

188	$X^1 = A, V, L, I, S, T, M, N.$ $X^2 = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W.$ $X^3 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4 \text{ no } c, p, g$ $X1$ は芳香族もしくはK、または帯電ではない
189	$X^1 = A, V, L, I, M.$ $X^2 = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W.$ $X^3 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ はC、P、Gではない $X1$ は親水性である
190	$X^1 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W.$ $X^3 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ はC、P、Gではない $X1$ は芳香族ではない $X4$ はF、Y、Wではない
191	$X^1 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L, R, S, T, Q, P, N, M, H, W.$ $X^3 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ はC、P、Gではない $X1$ は芳香族ではない $X4$ はF、W、Y、Hではない

10

20

30

【0341】

【表 2 - 2 0】

192	$X^1 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, K, R, H,$ $D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $S, T, M, N, Q, K, R,$ $H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, K, R, H,$ $D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X1 は芳香族ではない X3 は A または V ではない X4 は F、Y、W ではない
193	$X^1 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, R, H, D,$ $E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $M, N, Q, K, R, H, D,$ $E;$ $X^4 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, K, R, H,$ $D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X1 は芳香族または K ではない X3 は A または V、S または T ではない X4 は F、Y、W ではない
194	$X^1 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $N, Q, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, K, R, D,$ $E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X1 は芳香族、K、または帯電ではない X3 は A、V、S または T、M、K、R、H ではない X4 は F、Y、W、または H ではない
195	$X^1 = A, V, L, I.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $X^4 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, K, R, D,$ $E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X1 は親水性である X3 は C、G、P、A、V、S または T、M、K、R、H、N、Q、D、または E ではない; X4 は F、Y、W、または H ではない
196	$X^1 = A, V, L, I.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $X^4 = N, Q, K, R, D,$ $E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X1 は親水性である X3 は Y または W である X4 は E、K、D、R、N、または Q である

10

20

30

【 0 3 4 2 】

【表 2 - 2 1】

197	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H.$ $X^3 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, K, R, H,$ $D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X2$ は W ではない $X4$ は F、Y、W ではない
198	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, K, R, D,$ $E;$ $X^4 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X2$ は W ではない $X4$ は F、W、Y、H ではない
199	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E, G, P.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E, G, P;$ $X^4 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E, G, P;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X2$ は W ではない
200	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E, G.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E, G;$ $X^4 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E, G;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X2$ は W ではない

10

20

30

【表 2 - 2 2】

201	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X2 は W ではない
202	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $R, S, T, Q, P, N, M,$ $H, W.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $S, T, M, N, Q, K, R,$ $H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X2 は W ではない X3 は A または V ではない
203	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, V, S, T,$ $Q, P, N, M, H.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $M, N, Q, K, R, H, D,$ $E;$ $X^4 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X2 は W、I、L、R ではない X3 は A または V、S または T ではない
204	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, V, S, T,$ $Q, P, N, M, H.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $N, Q, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X2 は W、I、L、R ではない X3 は A、V、S または T、M、K、R、H ではない
205	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, S, T, P,$ $M.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $X^4 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X2 は A、G、P、S、T、M である X3 は C、G、P、A、V、S または T、M、K、R、H、N、Q、D、または E ではない;

10

20

30

【0 3 4 4】

【表 2 - 2 3】

206	$X^1 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, S, T, P, M.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $X^4 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X2 は A、G、P、S、T、M である X3 は Y または W である
207	$X^1 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, S, T, P, M.$ $X^3 = L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X2 は A、G、P、S、T、M である X3 は A または V ではない X4 は F、Y、W ではない
208	$X^1 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, S, T, P, M.$ $X^3 = L, I, F, W, Y, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X2 は A、G、P、S、T、M である X3 は A または V、S または T ではない X4 は F、Y、W ではない
209	$X^1 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, S, T, P, M.$ $X^3 = L, I, F, W, Y, N, Q, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X2 は A、G、P、S、T、M である X3 は A、V、S または T、M、K、R、H ではない X4 は F、Y、W、または H ではない
210	$X^1 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, S, T, P, M.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $X^4 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, D, E;$	xxxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X2 は A、G、P、M、S、T である X3 は C、G、P、A、V、S または T、M、K、R、H、N、Q、D、または E ではない; X4 は F、Y、W、または H ではない

10

20

30

【 0 3 4 5】

【表 2 - 2 4】

211	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, S, T, P,$ $M.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $X^4 = N, Q, K, R, D,$ $E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X2$ は A、G、P、M、S、T である $X3$ は Y または W である $X4$ は E、K、D、R、N、または Q である
212	$X^1 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $S, T, Q, P, N, M, H.$ $X^3 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$ $X^4 = N, Q, K, R, D,$ $E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X2$ は W または R ではない, $X4$ は E、K、D、R、N、または Q である
213	$X^1 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, K, R, H,$ $D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $S, T, Q, P, N, M, H.$ $X^3 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $W2$ は W または R ではない $X1$ は芳香族ではない
214	$X^1 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N, Q, R, H, D,$ $E.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $S, T, Q, P, N, M, H.$ $X^3 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X1$ は芳香族または K ではない $X2$ は W または R ではない
215	$X^1 = A, V, L, I, S,$ $T, M, N.$ $X^2 = A, G, I, V, L,$ $S, T, Q, P, N, M, H.$ $X^3 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F,$ $W, Y, S, T, M, N, Q,$ $K, R, H, D, E;$	xxxxxKH $X1 \ X3 \ X4$ は C、P、G ではない $X1$ は芳香族もしくは K、または帯電ではない $X2$ は W または R ではない

10

20

30

【 0 3 4 6 】

【表 2 - 2 5】

216	$X^1 = A, V, L, I, M.$ $X^2 = A, G, I, V, L, S, T, Q, P, N, M, H.$ $X^3 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxKH X1 X3 X4 はC、P、Gではない X1 は親水性である X2 はWまたはRではない
217	$X^1 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L, S, T, Q, P, N, M, H.$ $X^3 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxKH X1 X3 X4 はC、P、Gではない X1 は芳香族ではない X2 はWまたはRではない X4 はF、Y、Wではない
218	$X^1 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L, S, T, Q, P, N, M, H.$ $X^3 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxKH X1 X3 X4 はC、P、Gではない X1 は芳香族ではない X2 はW、またはRではない X4 はF、W、Y、Hではない
219	$X^1 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L, S, T, Q, P, N, M, H.$ $X^3 = L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxKH X1 X3 X4 はC、P、Gではない X1 は芳香族ではない X2 はWまたはRではない X3 はAまたはVではない X4 はF、Y、Wではない
220	$X^1 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, I, V, L, S, T, Q, P, N, M, H.$ $X^3 = L, I, F, W, Y, M, N, Q, K, R, H, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E;$	xxxxKH X1 X3 X4 はC、P、Gではない X1 は芳香族またはKではない X2 はWまたはRではない X3 はAまたはV、SまたはTではない X4 はF、Y、Wではない

10

20

30

40

【表 2 - 2 6】

221	$X^1 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q.$ $X^2 = A, G, S, T, M.$ $X^3 = L, I, F, W, Y, N, Q, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, D, E;$	xxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X1 は芳香族、K、または帯電ではない X2 は A、G、P、S、T、M である X3 は A、V、S または T、M、K、R、H ではない X4 は F、Y、W、または H ではない
222	$X^1 = A, V, L, I.$ $X^2 = A, G, S, T, M.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $X^4 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, D, E;$	xxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X1 は親水性である X2 は A、G、P、S、T、M である X3 は C、G、P、A、V、S または T、M、K、R、H、N、Q、D、または E ではない; X4 は F、Y、W、または H ではない
223	$X^1 = A, V, L, I.$ $X^2 = A, G, S, T, M.$ $X^3 = L, I, F, W, Y,$ $X^4 = N, Q, K, R, D, E;$	xxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X2 は A、G、P、S、T、M である X1 は親水性である X3 は Y または W である X4 は E、K、D、R、N、または Q である
224	$X^1 = A, V, L, I, F, W, Y, S, T, M, N, Q, K, R, H, D, E.$ $X^2 = A, G, S, T, M.$ $X^3 = L, I, F, W, Y, N, Q, D, E;$ $X^4 = A, V, L, I, S, T, M, N, Q, K, R, D, E;$	xxxxKH X1 X3 X4 は C、P、G ではない X2 は A、G、P、S、T、M である X3 は A、V、S または T、M、K、R、H ではない X4 は F、Y、W、または H ではない
225	hCLk 1-75 x42=V, I, L, x43=D, E, N, Q; $X^{45}=V/A$; x75=任意のアミノ酸	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KxxN $\underline{x}$ LQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSx
226	hCLk 81-106 $X^1 =$ 任意の AA; $X^2=L/V$	xxYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
227	CL λ コンセンサス 1-76 $X_6=N/A$; $X_8=S/T$; $x_{23}=K/S/R/Q/E$; $x_{37}=A/V$; $x_{39}=T/K$; $x_{46}=S/G$; $x_{49}=V/A/I$; $x_{50}=K/E$; $x_{51}=A/T$; $x_{57}=T/K/A$; $x_{65}=K/R/N$;	GQPKAxPxVT LFPPSSEELQ ANxATLVCLI SDFYPGxVxV AWKADxSPxx xGVETTxPSK QSNNxYAASS YLSLTP

10

20

30

【 0 3 4 8】

【表 2 - 2 7】

228	CLΛ コンセンサス 1-76, x44 inc A X6=N/A; X8=S/T; x23=K/S/R/Q/E; x37=A/V; X39=T/K; X44 は A、V、I、L である X46=S/G; x49=V/A/I; x50=K/E; x51=A/T; x57=T/K/A; x65=K/R/N;	GQPKAxPxVT LFPPSSEELQ ANxATLVCLI SDFYPGxVxV AWKxDxSPxx xGVETTxxPSK QSNNxYAASS YLSLTP
229	CLΛ コンセンサス 1-76, X44 no A X6=N/A; X8=S/T; x23=K/S/R/Q/E; x37=A/V; X39=T/K; x44= V, I L X46=S/G; x49=V/A/I; x50=K/E; x51=A/T; x57=T/K/A; x65=K/R/N;	GQPKAxPxVT LFPPSSEELQ ANxATLVCLI SDFYPGxVxV AWKxDxSPxx xGVETTxxPSK QSNNxYAASS YLSLTP
230	CLΛ コンセンサス 1-76, X44 =V X6=N/A; X8=S/T; x23=K/S/R/Q/E; x37=A/V; X39=T/K; X46=S/G; x49=V/A/I; x50=K/E; x51=A/T; x57=T/K/A; x65=K/R/N;	GQPKAxPxVT LFPPSSEELQ ANxATLVCLI SDFYPGxVxV AWKVDxSPxx xGVETTxxPSK QSNNxYAASS YLSLTP
231	CLΛ 1-76 X44 は A、V、I、L である	GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKxDSSPVK AGVETTTPSK QSNNKYAASS YLSLTP
232	CLΛ 1-76 X44 は V、I、L である	GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKxDSSPVK AGVETTTPSK QSNNKYAASS YLSLTP
233	CLΛ 1-76 X44 は V である	GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKVDSSPVK AGVETTTPSK QSNNKYAASS YLSLTP
234	CLΛ コンセンサス 83- 103 x1=K/R; x6=Q/L; x21=A/T	xSYSCxVTHE GSTVEKTVAP xECS
235	CLΛ 83-103	RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS

10

20

30

【 0 3 4 9 】

【表 2 - 2 8】

236	CLλ コンセンサス S81K, x44= AVIL, X6=N/A; X8=S/T; x23=K/S/R/Q/E; x37=A/V; X39=T/K; x44 A, V, I, L X46=S/G; x49=V/A/I; x50=K/E; x51=A/T; x57=T/K/A; x65=K/R/N; Q78=A/Q x80=K/Q; x83=K/R; x88=Q/L; x103=A/T	GQPKAxPxVT LFPPSSEELQ ANxATLVCLI SDFYPGxVxV AWKxDxSPxx xGVETTxxPSK QSNNxYAASS YLSLTPExWx KHxSYSCxVT HEGSTVEKTV APxECS
237	CLλ コンセンサス S81K, X44= VIL, X6=N/A; X8=S/T; x23=K/S/R/Q/E; x37=A/V; X39=T/K; x44 V, I, L X46=S/G; x49=V/A/I; x50=K/E; x51=A/T; x57=T/K/A; x65=K/R/N; X78=A/Q x80=K/Q; x83=K/R; x88=Q/L; x103=A/T	GQPKAxPxVT LFPPSSEELQ ANxATLVCLI SDFYPGxVxV AWKxDxSPxx xGVETTxxPSK QSNNxYAASS YLSLTPExWx KHxSYSCxVT HEGSTVEKTV APxECS
238	CLλ コンセンサス S81K, x44= V, X6=N/A; X8=S/T; x23=K/S/R/Q/E; x37=A/V; X39=T/K; X46=S/G; x49=V/A/I; x50=K/E; x51=A/T; x57=T/K/A; x65=K/R/N; x78=A/Q x80=K/Q; x83=K/R; x88=Q/L; x103=A/T	GQPKAxPxVT LFPPSSEELQ ANxATLVCLI SDFYPGxVxV AWKVDxSPxx xGVETTxxPSK QSNNxYAASS YLSLTPExWx KHxSYSCxVT HEGSTVEKTV APxECS
239	CLλ コンセンサス S81K, x44= AVIL, A78 X6=N/A; X8=S/T; x23=K/S/R/Q/E; x37=A/V; X39=T/K; x44 A, V, I, L X46=S/G; x49=V/A/I; x50=K/E; x51=A/T; x57=T/K/A; x65=K/R/N; x80=K/Q; x83=K/R; x88=Q/L; x103=A/T	GQPKAxPxVT LFPPSSEELQ ANxATLVCLI SDFYPGxVxV AWKxDxSPxx xGVETTxxPSK QSNNxYAASS YLSLTPEAWx KHxSYSCxVT HEGSTVEKTV APxECS

10

20

30

【 0 3 5 0】

【表 2 - 2 9】

240	CL λ コンセンサス S81K, X44= VIL, A78 X6=N/A; X8=S/T; x23=K/S/R/Q/E; x37=A/V; X39=T/K; x44 V, I, L X46=S/G; x49=V/A/I; x50=K/E; x51=A/T; x57=T/K/A; x65=K/R/N; x80=K/Q; x83=K/R; x88=Q/L; x103=A/T	GQPKAxPxVT LFPPSSEELQ ANxATLVCLI SDFYPGxVxV AWKxDxSPxx xGVETT $\times$ PSK QSNNxYAASS YLSLTPEAW $\times$ KHxSYSCxVT HEGSTVEKTV APxECS
241	CL λ コンセンサス S81K, x44= V, A78 X6=N/A; X8=S/T; x23=K/S/R/Q/E; x37=A/V; X39=T/K; X46=S/G; x49=V/A/I; x50=K/E; x51=A/T; x57=T/K/A; x65=K/R/N; x80=K/Q; x83=K/R; x88=Q/L; x103=A/T	GQPKAxPxVT LFPPSSEELQ ANxATLVCLI SDFYPGxVxV AWKVD $\times$ SPxx xGVETT $\times$ PSK QSNNxYAASS YLSLTPEAW $\times$ KHxSYSCxVT HEGSTVEKTV APxECS
242	CL λ X44 は A、V、I、L である X78 は A である	GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWK $\times$ DSSPVK AGVETTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPE $\times$ WK <u>K</u> HRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS
243	CL λ X44 は V、I、L である X78 は A である	GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWK $\times$ DSSPVK AGVETTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPE $\times$ WK <u>K</u> HRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS
244	CL λ X44 は V である X78 は A である	GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKVDSSPVK AGVETTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPE $\times$ WK <u>K</u> HRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS
245	CD モチーフ X1 は V、I、または L である X2 は D、N、Q、E である X3、x4 は任意の AA である	xxxx
246	CD モチーフ X1 は V または I である X2 は D、N、Q、E である X3、x4 は任意の AA である	xxxx

10

20

30

【 0 3 5 1 】

【表 2 - 3 0】

247	CD モチーフ X2 は D、N、Q、E である X3、x4 は任意の AA である	Vxxx	10
248	CD モチーフ X1 は V、I、または L である X2 は D または N である X3、x4 は任意の AA である	xxxx	
249	CD モチーフ X1 は V、I、または L である X2 は Q または E である X3、x4 は任意の AA である	xxxx	
250	CD モチーフ X1 は V、I、または L である X3、x4 は任意の AA である	xDxx	20
251	CD モチーフ X3、x4 は任意の AA である	VDxx	
252	CD モチーフ X3、x4 は任意の AA である	LExx	
253	CD モチーフ X3、x4 は任意の AA である	IExx	
254	h38C2-[LC-D185A]	ELQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSL HTYGSPYLNW YLQKPGQSPK LLIY KVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAV YFC SQGTHLP YTF GGGKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAA YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC	30
255	CD モチーフ X1、x2、x3、x4 = 任意 のアミノ酸	xxxx	

【図面の簡単な説明】

【0352】

【図 1 - 1】図 1 A：質量分析法による MAC のインタクトな分子量分析は、複数のペプチドが抗 IGF1R 抗体 2. 12. 1. fx に結合されていることを実証している。抗 IGF1R 抗体 2. 12. 1. fx の質量分析データである。

【図 1 - 2】図 1 B：MAC - 2 の質量分析データであり、3 つの個別のロットの反復実験を示している。

【図 1 - 3】図 1 C：MAC - 2 の質量分析データであり、3 つの個別のロットの反復実験を示している。

【図 1 - 4】図 1 D：MAC - 2 の質量分析データであり、3 つの個別のロットの反復実験を示している。

【図 2 - 1】図 2 A：2. 12. 1. fx (IGF1R) および 3 ロットの MAC - 2 (MAC) の質量分析データであり、ここで、ジスルフィド結合は還元されている。2. 12. 1. fx (IGF1R)、軽鎖の質量分析データである。

【図 2 - 2】図 2 B：2. 12. 1. fx (IGF1R)、重鎖の質量分析データである。

【図 2 - 3】図 2 C：MAC - 2 の軽鎖、ロット 1 の質量分析データである。

【図 2 - 4】図 2 D：MAC - 2 の重鎖、ロット 1 の質量分析データである。

【図 2 - 5】図 2 E：MAC - 2 の軽鎖、ロット 2 の質量分析データである。

【図2-6】図2F：MAC-2の重鎖、ロット2の質量分析データである。

【図2-7】図2G：MAC-2の軽鎖、ロット3の質量分析データである。

【図2-8】図2H：MAC-2の重鎖、ロット3の質量分析データである。

【図3-1】図3A：黒丸で記述されたキモトリプシン開裂部位を伴う抗体2.12.1.f xの軽鎖のアミノ酸配列である。Lys残基（潜在的なコンジュゲーションの部位）を含有するキモトリプシン断片は、N末端からの番号によって標識されている。軽鎖のY15断片は、下線を引かれている。

【図3-2】図3B：黒丸で記述されたキモトリプシン開裂部位を伴う抗体2.12.1.f xの重鎖のアミノ酸配列である。Lys残基（潜在的なコンジュゲーションの部位）を含有するキモトリプシン断片は、N末端からの番号によって標識されている。

10

【図4-1】図4A：コンジュゲートされたリシン含有ペプチド：軽鎖Y15の質量分析データであり、コンジュゲートされていない抗IGF1R抗体2.12.1.f x（IGF1r）およびMAC-2（MAC）についての質量分析データ、さらにはY15断片の代表を示している。

【図4-2】図4B：コンジュゲートされていない軽鎖Y15断片の質量分析データであり、コンジュゲートされていない抗IGF1R抗体2.12.1.f x（IGF1r）およびMAC-2（MAC）に対する質量分析データ、さらにはY15断片の代表を示している。

【図5-1】図5A：2.12.1.f xのトリプシン断片についての、選択されたイオンのLCMSクロマトグラムのデータである。

20

【図5-2】図5B：LC-K¹⁸⁸がMAC-2のABPで修飾された場合のトリプシン断片についての、選択されたイオンのLCMSクロマトグラムのデータである。

【図6-1】図6A：2.12.1.f xのトリプシン断片についての、選択されたイオンのLCMSクロマトグラムのデータである。

【図6-2】図6B：LC-K¹⁹⁰がMAC-2のABPで修飾された場合のトリプシンペプチドについての、選択されたイオンのLCMSクロマトグラムのデータである。

【図7-1】図7A：インタクトなMAC-2の質量スペクトルである。

【図7-2】図7B：MAC-2についての還元重鎖の質量スペクトルである。

【図7-3】図7C：MAC-2についての還元軽鎖の質量スペクトルである。

【図8-1】図8A：m38c2、h38c2、およびヒト生殖細胞系の可変ドメインのアミノ酸配列アラインメントである。フレームワーク領域（FR）および相補性決定領域（CDR）は、Kabataらに従って画定されている。アスタリスクが、m38c2とh38c2との、またはh38c2とヒト生殖細胞系との相違を明示している。

30

【図8-2】図8B：マウス定常軽鎖カッパ領域（mCL κ ）、ヒト定常軽鎖カッパ領域（hCL κ ）、およびヒト定常軽鎖ラムダ領域（hCL λ ）のアミノ酸配列アラインメントである。mCL κ とhCL κ との；およびhCL κ とhCL λ との相違はアスタリスクとして示されており、保存置換は、十字記号として示されている。βストランドA～Gは下線を引かれている。βストランドAとBとの間のターンおよびβストランドEとFとの間のαヘリックスはそれぞれ、イタリック体で示されている。第1のβシート（βストランドABDEから構成；一重下線）と第2のβシート（βストランドCGFから構成、二重下線）との間にジスルフィド結合を形成するシステインは、§によって示されている。ヒト配列における既知の多型遺伝子座は太字で示されている。

40

【図9】図9A：トラスツズマブ、および[PEG₅-K¹¹-配列番号27]とのトラスツズマブー[CL κ -D¹⁸⁵A]コンジュゲーション生成物の、HER2受容体結合についての結合ELISAデータである。図9B：MMAD毒素へのトラスツズマブおよびトラスツズマブー[CL κ -D¹⁸⁵A]コンジュゲーション生成物の、HER2受容体結合についての結合ELISAデータである。

【図10】図10A：2つのβシートを形成する7つのβストランドを示す定常Igドメインの表示である。図10B：βシートEとFとの間のαヘリックスの拡大図である。

50

【図11】CL κ の、結晶構造をベースとする最小化リボン表示 (minimized ribbon representation) であり、ハローフェニルエステル反応性「結合部位」(スモールジャック (small jack)) を、3D構造によって作成される全体立体的「結合ポケット」内に示している。 β ストランドは標識されている。

【図12】CL κ 「結合ポケット」の、結晶構造をベースとする最小化リボン表示であり、CL κ -D⁷⁷およびCL κ -D⁴³を(スティックモデルとして)CL κ -H⁸¹N ϵ またはN δ との水素結合、および原子間距離Åにおいて示している。

【図13-1】図13A: CL κ およびCL κ -D⁷⁷A変異体「結合ポケット」の結晶構造をベースとする最小化リボン表示である。CL κ -D⁴³のカルボニル酸素とCL κ -H⁸¹のN δ との間の距離は、CL κ とCL κ -D⁷⁷A変異体とで1Å異なり、CL κ -D⁷⁷A変異体における触媒活性なCL κ -H⁸¹互変異性体N δ の優勢を指し示している。加えて、このモデリングは、図に表されているCL κ -D⁷⁷A変異体におけるポケットの全体サイズの明確な増大を同定している。図13B: CL κ およびCL κ -D⁷⁷A変異体「結合ポケット」の結晶構造をベースとする最小化リボン表示である。CL κ -D⁴³のカルボニル酸素とCL κ -H⁸¹のN δ との間の距離は、CL κ とCL κ -D⁷⁷A変異体とで1Å異なり、CL κ -D⁷⁷A変異体における触媒活性なCL κ -H⁸¹互変異性体N δ の優勢を指し示している。加えて、このモデリングは、図に表されているCL κ -D⁷⁷A変異体におけるポケットの全体サイズの明確な増大を同定している。

【図13-2】図13C: 互いに重ね合わせたCL κ (灰色)およびCL κ -D⁷⁷A変異体(黒色)の「結合ポケット」の、結晶構造をベースとするリボン表示である。CL κ -D⁷⁷A変異体では、CL κ -D⁷⁷AがCL κ -H⁸¹のN ϵ と水素結合を形成することができないので、CL κ -H⁸¹は、水素結合の相互作用によってCL κ -D⁴³の方へシフトしている。

【図14】CL κ 「結合ポケット」の、結晶構造をベースとする最小化リボン表示である。結合部位は、スモールジャックとして示されている。入ってくるハローフェニルエステル基質に関して最適な位置にイミダゾール環を保持する、CL κ -H⁸¹との π 電子スタッキング相互作用が示されている。

【図15】図15A: CL κ およびCL λ 「結合ポケット」の、結晶構造をベースとする最小化リボン表示である。CL κ -H⁸¹イミダゾール環およびN ϵ 電子対を、触媒反応中の求核的攻撃に必要な平面に維持することを援助する、CL κ -V⁴²とCL κ -H⁸¹との間の π 電子相互作用を示している。CL κ -H⁸¹イミダゾール環の中心と、CL κ -V⁴²上の水素原子それぞれとの間の距離は、2.8Åであり、強い相互作用を可能にしている。図15B: CL κ およびCL λ 「結合ポケット」の、結晶構造をベースとする最小化リボン表示である。CL λ -A⁴⁹がCL λ -H⁸²(比較を明瞭にする目的のために、図中ではH81として同定されている)から4.2Åの距離で示されている。この距離は、CL λ -H⁸²の位置または互変異性型に有意な影響を有するには遠すぎる可能性があるとしてモデリングされている。

【図16】hCH λ 1、hCH λ 2、hCH λ 3、hCL κ 、およびhCL λ の配列アラインメントである。CL κ の β ストランドは、下線を引いた領域に示されている。 α ヘリックスはイタリック体で示されている。

【図17】最小化3D相同性によるhCH λ 1、hCH λ 2、hCH λ 3、hCL κ 、およびhCL λ の配列の、結晶構造をベースとするアラインメントである。 β ストランドは、囲った領域として示されており、 α ヘリックスは、波形の囲み内に示されている。CL κ -V⁴²、CL κ -D⁴³、CL κ -D⁷⁷、CL κ -K⁸⁰、およびCL κ -H⁸¹に対応する重要な残基は、配列の間に垂直に延びる長方形の点線の囲みで同定されている。このアラインメントを発生させたドメインの結晶構造モデリングは、hCH λ 1、hCH λ 2、hCH λ 3、およびhCL λ ドメインにおけるD β ストランドの短い破断を示唆した。他のモデリングおよび結晶構造分析は、すべてではないが多くの抗体定常ドメインが7つの β ストランドを含み、D β ストランドが連続していることを示している。し

10

20

30

40

50

たがって、ここでモデリングされている2つのD β ストランドは、D'およびD''と示されている。CL λ およびCH γ ドメインを図示している図18B~31Bは、D β ストランドが構造の左下方で下向きになっていて、E β ストランドに向き合っているように配向されている。D'およびD'' β ストランドと一緒に、CL κ D β ストランドとほぼ同じ相対的位置を占めていることが分かる（判断基準として、図18では、 β ストランドDおよびD'、D''が標識されている）。

【図18】hCL κ (A)およびhCL λ (B)ドメインの、結晶構造をベースとする最小化リボン表示である。

【図19】hCL κ (A)およびWT-hCH γ 1(B)ドメインの、結晶構造をベースとする最小化リボン表示である。

10

【図20】hCL κ (A)およびWT-hCH γ 1(B)ドメインの、結晶構造をベースとする最小化リボン表示であり、重要な残基の側鎖位置を示している。

【図21】hCL κ (A)およびhCH γ 1-m1-D44変異体(B)ドメインの、結晶構造をベースとする最小化リボン表示であり、重要な残基の側鎖位置を示している。

【図22】hCL κ (A)およびhCH γ 1-T78K/Q79H/CDループスワップ変異体(B)ドメインの、結晶構造をベースとする最小化リボン表示であり、重要な残基の側鎖位置を示している。

【図23】hCL κ (A)およびWT-hCH γ 2(B)ドメインの、結晶構造をベースとする最小化リボン表示である。

【図24】hCL κ (A)およびWT-hCH γ 2(B)ドメインの、結晶構造をベースとする最小化リボン表示であり、重要な残基の側鎖位置を示している。

20

【図25】hCL κ (A)およびhCH γ 2m変異体(B)ドメインの、結晶構造をベースとする最小化リボン表示であり、重要な残基の側鎖の位置を示している。

【図26】hCL κ (A)およびhCH γ 2m-D⁸₂A変異体(B)ドメインの、結晶構造をベースとする最小化リボン表示であり、重要な残基の側鎖の位置を示している。

【図27】hCL κ (A)およびWT-hCH γ 3(B)ドメインの、結晶構造をベースとする最小化リボン表示である。

【図28】hCL κ (A)およびWT-hCH γ 3(B)ドメインの、結晶構造をベースとする最小化リボン表示であり、重要な残基の側鎖の位置を示している。

【図29】hCL κ (A)およびhCH γ 3m変異体(B)ドメインの、結晶構造をベースとする最小化リボン表示であり、重要な残基の側鎖の位置を示している。

30

【図30】hCL κ (A)およびhCH γ 3m-CD/EF変異体(B)ドメインの、結晶構造をベースとする最小化リボン表示であり、重要な残基の側鎖の位置を示している。

【図31】hCL κ (A)およびhCH γ 3m-CD/EF-m2変異体(B)ドメインの、結晶構造をベースとする最小化リボン表示であり、重要な残基の側鎖の位置を示している。

【図32-1】図32A:CH γ 1、CH γ 2、およびCH γ 3、それらの個々の変異体および提案変異体と、CL κ およびCL λ とのアラインメントである。

【図32-2】図32B:CH γ 1、CH γ 2、およびCH γ 3、それらの個々の変異体および提案変異体と、CL κ およびCL λ とのアラインメントである。

40

【発明を実施するための形態】

【0353】

本発明がより良く理解され得るように、以下の実施例を記載する。これらの実施例は、単に例示を目的としたものであり、いずれの手法によっても、本発明の範囲を制限すると解釈されるべきではない。

【0354】

コンジュゲーション付加(CA)、平均CAの説明

質量分析法によってインタクトな質量測定を使用して、コンジュゲーション付加(CA)を抗体骨格で測定する。コンジュゲートすると、インタクトな生成物の全体質量は、コンジュゲートされたペプチド、毒素などの付加の質量および数の分だけ増大する。複数の

50

付加が起こった場合、コンジュゲート形態の分布は質量スペクトルで観察され、各コンジュゲート形態の観察されたシグナル強度によって定量測定が得られる。この分析は常套的に表で、観察されたCA形態すべてに対するパーセンテージとして、各CA形態を列挙することによって提示される。平均CA（例えば：骨格上に存在するCAの全体数）は、平均コンジュゲート負荷を説明する追加の値である。2つのコンジュゲート薬物生成物の例を以下に提供する。例1は、CAの様な分布を平均CA = 2.00個で有する。例2は、2CAの存在にかなり偏った分布を、軽微な量の他のコンジュゲーション形態と共に有する。平均CAは、これらの例の間で（2.13個と2.00個とで）同様であるが；しかしながら、例1は、比較的多いコンジュゲーション形態からなるより不均一な生成物であり、例2は、主として2CAを含有するより均一な生成物である。

10

【0355】

【表3】

	0 CA %	1 CA %	2 CA %	3 CA %	4 CA %	平均 CA
例 1	11	22	33	22	11	2.00
例 2	2	4	77	12	5	2.13

表1

【0356】

20

ジスルフィド結合が還元されて、遊離の軽鎖および重鎖が生じた後にも、同様の分析処理が、これらの抗体骨格において可能である。コンジュゲート軽鎖／重鎖のインタクトな質量の測定は、これらの個々のサブユニット上でのCAの位置についての情報を提供する。

【0357】

CL κ -K⁸⁰への方向性コンジュゲーションの説明

抗体骨格への薬物コンジュゲートの部位特異的結合を決定するために、ペプチドマップを生成する。ペプチドマップは、コンジュゲート薬物生成物のタンパク分解性消化後に生成するペプチドを詳細に特徴づけするためのタンパク質配列の分析である。タンパク質が消化されたら、生じたペプチドを、逆相液体クロマトグラフィーと質量分析検出（RPLC/MS）とによって分析する。ディスクリートな（discr $\acute{e}$ et）アミノ酸残基におけるコンジュゲーション付加の存在は、コンジュゲートされていないペプチドと比較すると、対応する質量シフトとして観察される。このプロセスを、標的リシン残基に対してPF $\acute{e}$ 反応性エステルを使用する複数のコンジュゲート付加でコンジュゲートされている複数の抗体で繰り返す（データは、以下に、かつ他にもその内容全体が本明細書に組み込まれているWO2012007896において提示されている）。これらの研究において、以下の観察が一致した：（1）コンジュゲート付加は、HCよりもLCにおいてより頻繁に観察され、（2）CL κ -K⁸⁰は、修飾される特に好ましい残基であり、（3）複数の他の位置も、LCおよびHCの両方で修飾される；しかしながら、それぞれ別の部位が、低いレベルで修飾される。まとめると、ハローフェニルエステルコンジュゲーションは、CL κ -K⁸⁰の好ましい修飾をもたらし、追加のコンジュゲーションは、複数の残基全体で低いレベルに分布している。この理由で、2コンジュゲート付加について高い%CA値をもたらすように、コンジュゲーションプロセスは一般的に最適化されるが、それというの、このことによって、各LCにおいて単一の位置で完全にコンジュゲートされている生成物が促進されるためである。0～1コンジュゲートの高い%CAレベルは好ましいCL κ -K⁸⁰修飾をもたらす一方で、これらのコンジュゲート形態は、かなりの量の未反応骨格も意味する。2個を大きく超える平均CA値を示す生成物は、ディスクリートな残基を標的としな $\acute{e}$ コンジュゲート付加の存在を示唆している。HCおよびLCを還元し、別々に分析すると、1CAの%値は、単一のLC種におけるコンジュゲーション%を示しており、したがって、CL κ -K⁸⁰残基へのコンジュゲーション効率の信頼可能

30

40

50

な指標である。

【実施例】

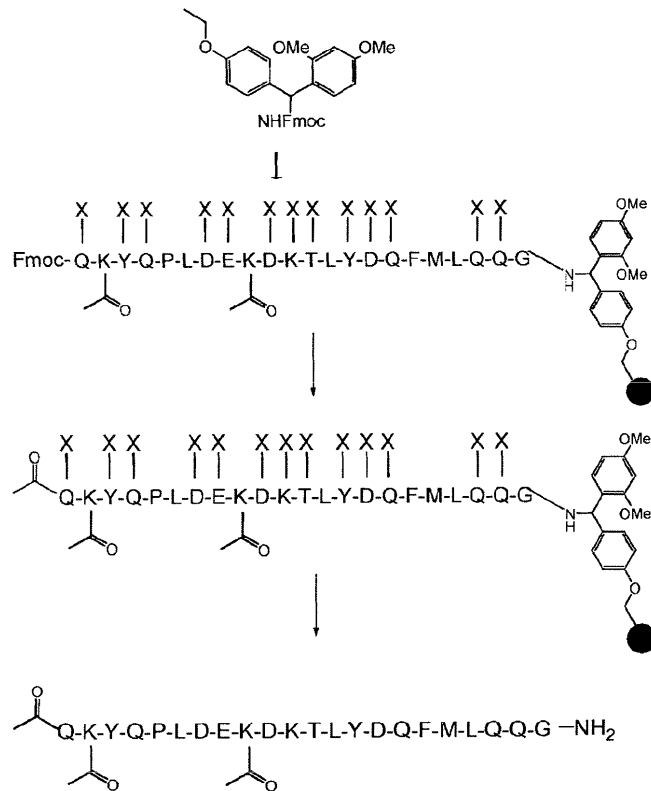
【0358】

(実施例1)

本発明で使用するペプチドの例示的な合成

【0359】

【化63】



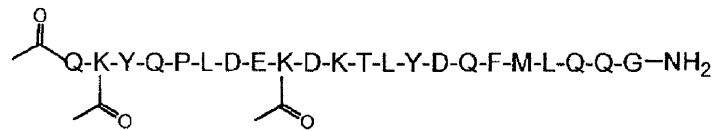
スキーム1: Fmoc化学を使用してのペプチド鎖の固相合成(典型的なAng2-結合ペプチド(ABP)配列番号27で例示)。TFA/水/フェノール/トリイソプロピルシラン(90:4:4:2)。Rink Amide Resin。Fmoc化学を使用するSPPSのためのステップ: (i) 20%ピペリジン/DMFでFmocを除去、(ii)アミノ酸カップリング;樹脂アミン負荷に対するHBTU:アミノ酸:HOBt:NMM比は5:5:5:20。使用する溶媒はNMP、(iii)各アミノ酸カップリングのためにステップを繰り返す。X=酸不安定性側鎖の保護基。完全に保護された樹脂結合ペプチドの完全アセンブリ:

【0360】

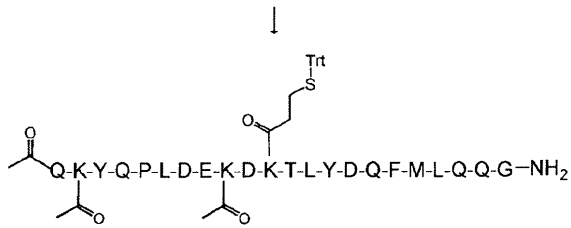
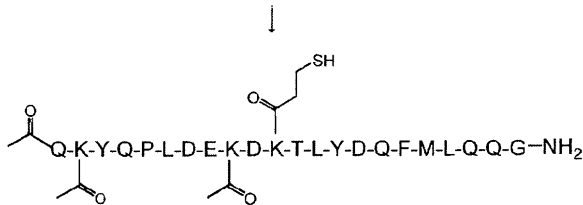
ペプチド-チオール-リンカー化合物の合成

【0361】

【化 6 4】



配列番号27

配列番号27-K_{SH}¹¹-Trt配列番号27-K_{SH}¹¹

スキーム2: 配列番号27-K_{SH}¹¹ (連結残基K_{SH}で置換されているK¹¹)の合成。S-トリチル-メルカプトプロピオン酸/HBTU/NMM (ペプチドに関して5:5:10の比)。トリチル保護されたチオールAng2ペプチド中間体。TFA/DCM/TIPS (5:93:2の比)。チオール保有Ang2修飾されたペプチド。

【0362】

Ang2結合ペプチド(ABP; 配列番号27)(284mg、0.1mmol)を攪拌しながら、ジメチルホルムアミド(0.5ml)に溶かした。別に、S-トリチル-メルカプトプロピオン酸(MPA、62mg、約0.125mmol)、HBTU(48mg、0.125mmol)、およびN-メチルモルホリン(0.025ml、0.25mmol)をDMF(0.5ml)中で、溶解するまで5分間攪拌した。ABP溶液および活性化MPA溶液を一緒に2時間混合した。反応の進行をLCMSによってモニタリングした。2時間後に、この溶液を、氷冷エーテル(40ml)に徐々に加え、ABP-S-トリチル-MPA生成物を沈殿させた。白色の沈殿物を濾過によって収集し、次いで、乾燥させた。次いで、固体残渣をトリフルオロ酢酸のジクロロメタン中の溶液(1:10、10ml)に溶かし、トリイソプロピルシラン(TIPS)(0.050ml)を加え、1時間攪拌した。この溶液を減圧下で蒸発させて薄黄色のオイルにし、次いで、粗製のチオールペプチドを、氷冷エーテルを加えることによって沈殿させた。生成物を遠心分離によって収集し、真空乾燥させた。残渣を50%アセトニトリル水溶液に溶かし、次いで、凍結乾燥させて、粗製のチオールペプチド(HPLC分析によると純度約80%)を得た。粗製のチオールペプチドを半分取HPLCによって精製して、配列番号27-K_{SH}¹¹を145mg得た。

【0363】

Ang-2-結合ペプチド-チオール中間体の生成

ペプチド鎖の組み立てを0.1mmol規模で行った。使用した樹脂は、Fmoc-Rink-PL樹脂(150mg、0.67mmol/g置換)であった。標準的なFmoc化学プロトコルを使用して、ペプチドを組み立てた。Fmocの除去は、20%ピペリジン/DMFで3×5分間であり、すべての樹脂の洗浄ステップはDMFを使用した。アミノ酸を組み込むために、各残基について、HBTU/HOBt/NMM活性化を使用する1回のカップリングステップを2時間使用した。連結残基(K_{SH})を、Fmoc-Lys(N^ε-メルカプトプロピオン酸-S-Trt)-OHとして組み込んだ。鎖を組み立てたら、N末端Fmoc基を除去し、ペプチド樹脂をアセチル化によってキャップした

。最終の樹脂をDCMで洗浄し、一晚真空中で乾燥させた。

【0364】

保護基の加酸分解による (a c i d o l y t i c) 除去および樹脂からのペプチドの開裂は、TFA／水／ジオトレイトール／トリイソプロピルシラン (90 : 4 : 4 : 2 の比、5 ml) のカクテルを2時間使用して達成した。溶液を樹脂から濾過し、樹脂をさらなる未希釈TFA 5 ml で洗浄した。合わせた濾液をシロップ状まで蒸発させ、次いで、氷冷エーテルの添加によって、白色の粉末を沈殿させた。粉末を遠心分離によって収集し、次いで、50%アセトニトリル水溶液 (20 ml) に溶かし、冷凍し、一晚凍結乾燥させた。

【0365】

分取HPLCカラムを、希TFA水溶液およびアセトニトリルで事前平衡させた。粗製のABP-チオール中間体 (すなわち、K_{SH}を連結残基として有するABP) をDMF (3 ml) に溶かし、次いで、カラムに吸着させ、アセトニトリルから希TFAへの勾配を適用することによって溶離した。質量 (M=1465) によって、画分を自動的に収集した。カラムからの溶離物をUVによってモニタリングし、得られた画分を分析RPHPLCによって分析した。

【0366】

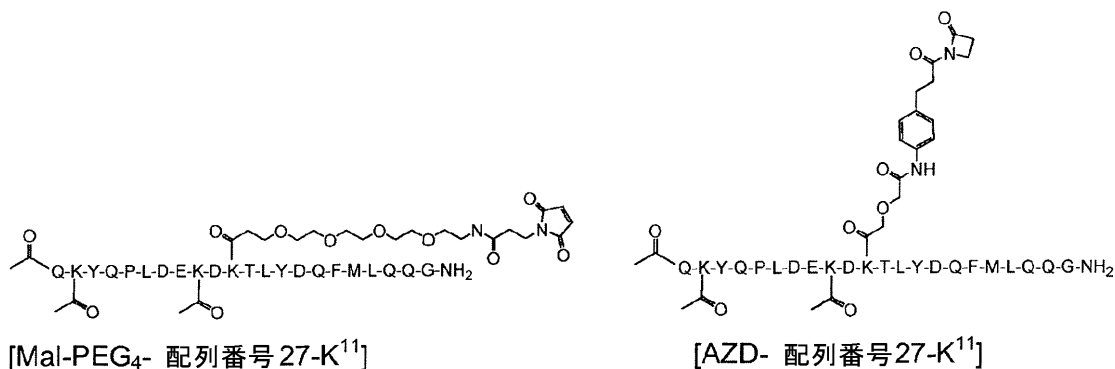
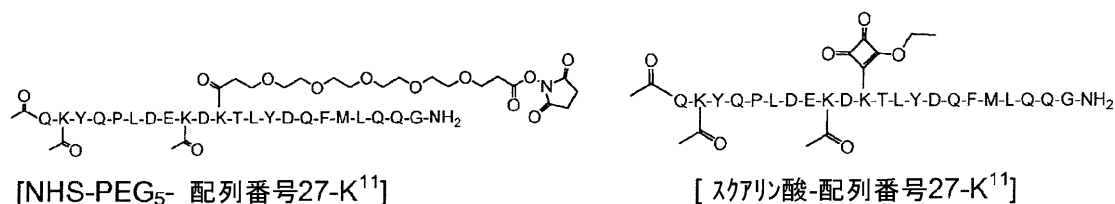
(実施例2)

コンジュゲーション戦略

5種類の異なるコンジュゲーション戦略を、ペプチドを抗体にコンジュゲートさせるために考察した (例示的な構造は、配列番号27-K_{SH}¹¹および2.12.1.f_xを使用して示されている) (完全な詳細は、その内容全体が本明細書に組み込まれている2011年7月11日出願のPCT/US2011/053092の実施例において提示されている)。簡単には、NHSエステル、マレイミド、スクアリン酸エステル、AZD、およびハローフェニルエステルをすべて、抗体への方向性コンジュゲーションを開発するための有望な機構として調査した。

【0367】

【化65】



NHSエステルが不活性カルボキシルに変換される場合に、NHSエステルは、遊離形態への変換が遅いという問題を被った。NHSエステルを用いると、多少の成功は得られるが、生じたNHS-エステルの水に対する不安定性によって、後続のコンジュゲーション反応へのその適用に限られるおそれがあると思われると結論づけられた。NHS-PEG₂-MALのさらなる試験を以下に示す (Z*基Z13を含む)。

【0368】

スクアリン酸エチルは、遊離チオールにはよくコンジュゲートするが、タンパク質および抗体上の遊離アミンに対しては、pHが9超でない限り不十分である。

【0369】

一般に、マレイミド活性化ペプチドは、内因性チオール（遊離システイン側鎖から誘導される）または他の化学的手段によって、例えばT r a u t 試薬を介して導入されるチオールのいずれかを欠くタンパク質または抗体には十分にはコンジュゲートしなかった。

【0370】

A Z Dは抗体アミノ基とゆっくりと反応し、pHを7～9に上昇させる試みは、低レベルのコンジュゲーションおよび高レベルのA Z D加水分解をもたらした（表面リシンのpK aが約9.1～11.2であるので、その電荷を低下させることによって、抗体表面リシンの求核傾向を増大させるために）。

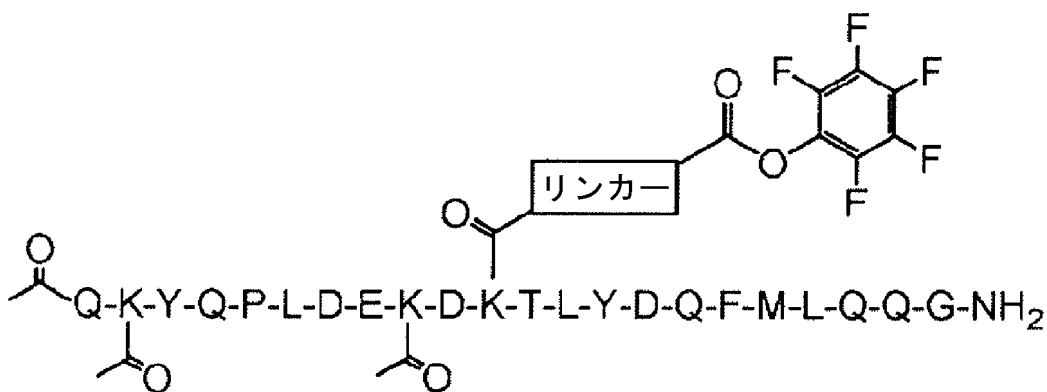
【0371】

（実施例3）

ペンタフルオロフェニルエステル（P F P）の合成

【0372】

【化66】



【0373】

本発明はまた、相対的に安定なエフェクター部分ーリンカー複合体を形成するために、ペンタフルオロフェニル（P F P；Z^{*} = Z 1）エステルを使用することを提供する。この方法は、標準的なH P L C法を使用して、P F Pエステル加水分解をほとんど観察することなく、それ自体を精製することができる安定な活性化ペプチド生成物から容易に、P F P基を溶液で導入することができるということにおいて、他の手法を上回るいくつかの利点を有する。

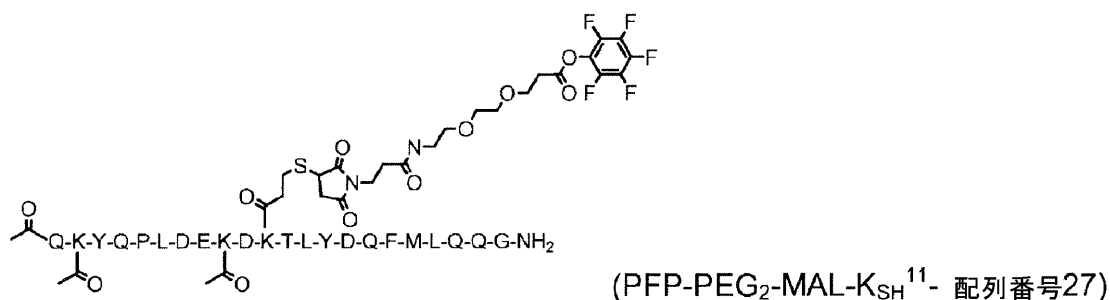
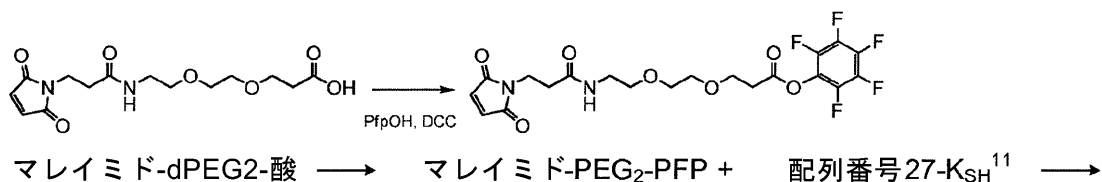
【0374】

本発明は、化学選択性反応（チオール／マレイミド化学を使用して）によるか、またはペプチド側鎖とアミドを形成するが、他の末端は活性なエステルとして残す二重活性なエステル試薬を使用するか、のいずれかによって、P F Pなどの活性化エステル基をペプチド上の側鎖リシンに直接カップリンさせることができる合成経路を提供する。

【0375】

一部の実施形態では、この戦略は、それぞれの酸がP F Pエステルとして活性化されているビスー酸（b i s - a c i d）P E Gであってよい。多少の塩基が存在する有機溶液中で、ビスーP F Pリンカーの末端は、リシンのN-ε-アミノ側鎖と必要な繫留点で反応して、安定なアミド連結を形成する一方で、他の末端は、他のP F P基を維持した。この戦略に伴う潜在的な問題の1つは、ペプチドが、リンカーのそれぞれの末端に存在するP F P部分のそれぞれに付加しているペプチドダイマーを形成する可能性である。一部の態様では、本発明は、それぞれのペプチドおよびビスーP E G-P F Pリンカーの化学量論および付加を変更することによってこの追加の問題を克服する。本発明によって提供される解決の1つは、ペプチドを超える過剰のリンカーが常に存在するように、過剰のビス

【化 6 8】



10

スキーム4 [PFP-PEG₂-MAL-K_{SH}¹¹-配列番号27]の合成

マレイミド-dPEG₂-酸 (328mg、1mmol、Quanta Bio Design)、ペンタフルオロフェノール (0.103ml、1mmol、PFP)、およびジシクロヘキシルカルボジイミド (206mg、1mmol、DCC) を無水DCM (10ml) に溶かし、室温で1時間攪拌した。形成した微細な白色の沈殿物 (DCU副産物) を濾過によって除去し、濾液を真空中で蒸発乾固させた。生成物を微細な白色の粉末として高い収量 (490mg、定量的) で得た。純度は、分析用HPLCによって>95%であった; MSは [M+H]⁺ = 495を示した。

20

【0381】

配列番号27-K_{SH}¹¹の試料 (30~40mg) を、無水のDMF (2ml) に溶かした。マレイミド-PEG₂-PFP (20mg) を、N-メチルモルホリン (5ml) と共に加えた。反応物を攪拌し、生成物形成の時間経過を追跡するためにHPLCによって室温でモニタリングした。出発ペプチドの、PFP活性化ABP生成物への完全な転換は、最初の2時間で観察された。溶液を濾過し、生成物のピークを、半分取HPLCによって直接単離した。それぞれの場合に、凍結乾燥後、生成物を収率約40%で単離した。

30

【0382】

(実施例4)

抗体コンジュゲーション

MAC-1およびMAC-2の例示的抗体-エフェクター部分コンジュゲートを、抗体2.12.1.f_x (配列番号1および配列番号2) をAng2結合ペプチド (配列番号27) とコンジュゲートさせることによって製造した。MAC-1は、2.12.1.f_x-[PEG₂-MAL-K_{SH}¹¹-配列番号27] が得られるように、[PFP-PEG₂-MAL-K_{SH}¹¹-配列番号27] にコンジュゲートされている2.12.1.f_xを含み、MAC-2は、2.12.1.f_x-[PEG₅-K¹¹-配列番号27] が得られるように、[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号27] にコンジュゲートされている2.12.1.f_xを含む。

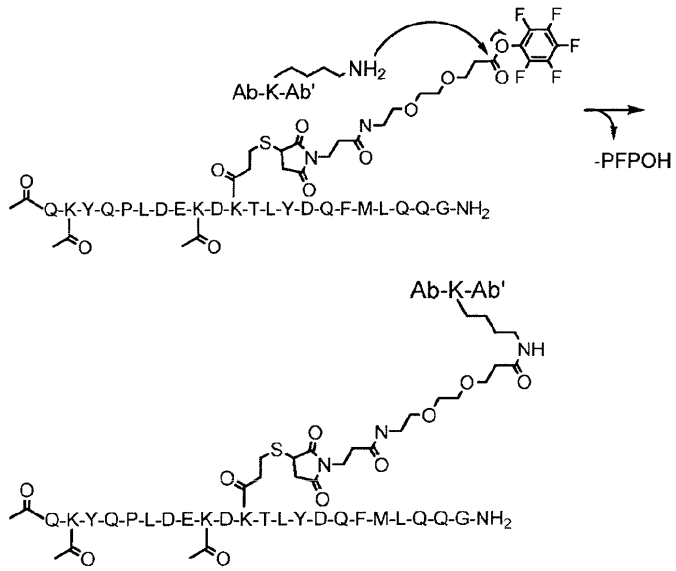
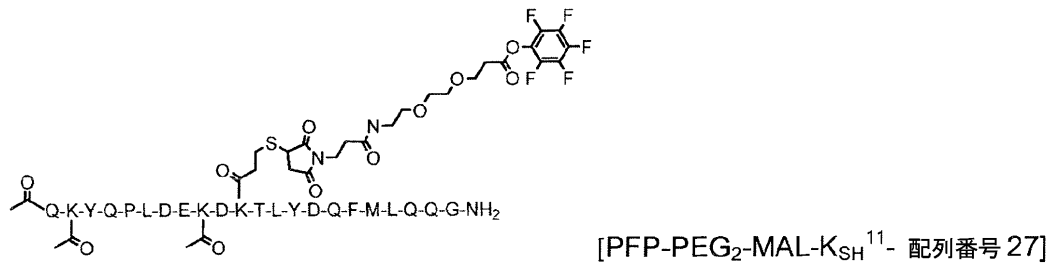
40

【0383】

MAC-1の生成

【0384】

【化 6 9】



スキーム5: [PFP-PEG₂-MAL-K_{SH}¹¹-配列番号27]と抗体(Ab-K-Ab)のリシン側鎖との反応:ここで、抗体は2.12.1.fxであり、MACは、MAC-1である。

【 0 3 8 5】

MAC-2の生成

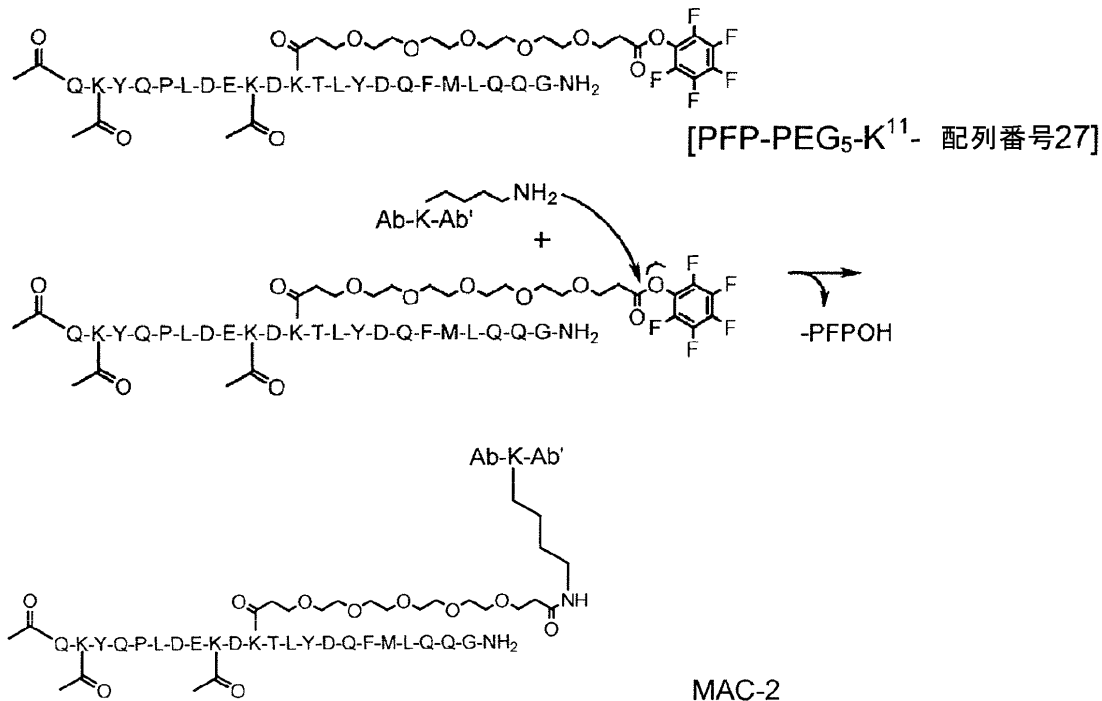
【 0 3 8 6】

10

20

30

【化 7 0】



スキーム6: [PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号27]と抗体(Ab-K-Ab)のリシン側鎖との反応:
ここで、抗体は2.12.1.fxであり、MACはMAC-2である。

【0387】

各MACの試料中の2.12.1.fx抗体1個当たりのペプチドコンジュゲーションの個数を計算した(表2を参照されたい)。

【0388】

【表4】

	コンジュゲーション付加(CA) (%)					
	0	1	2	3	4	平均 CA
MAC-1	3	26	42	25	3	1.97
MAC-2	2	20	47	26	5	2.12

表2 MAC-1 および MAC-2 のコンジュゲーションプロフィール。

【0389】

(実施例5)

PFPベースのコンジュゲーションのための条件の最適化

特異的コンジュゲーションのために最適な反応条件を確立するために、一連のアッセイ
を実行した。それぞれの反応物のコンジュゲーションの終了時に、反応物をコハク酸塩お
よびグリシン緩衝液でクエンチして、pHを約5.5に低下させ、あらゆる遊離ペプチド
またはペプチド/リンカーをクエンチした。エレクトロスプレー飛行時間型質量分析法検
出を、続いて、サイズ排除クロマトグラフィーカラムを介しての塩および添加剤からのタン
パク質の分離を使用して、MACのインタクトな分子量(MW)を測定することによっ
て、MAC-2の分析を行った。

【0390】

温度

2.12.1.fx抗体を18mg・ml⁻¹に、pH7.7でリン酸緩衝液を用いて
、0.06Mのリン酸ナトリウムの最終濃度に調整した。[PFP-PEG₅-K¹¹-

30

40

50

配列番号 27] を、プロピレングリコール溶液中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、2.12.1. f x 抗体に 4.3:1 のモル比で加え、18、22、または 25℃で 2 時間反応させた。結果を表 3 に示す。

【0391】

【表 5】

	CA (%)					
温度	0	1	2	3	4	平均 CA
18C	1	16	51	23	8	2.21
22C	3	15	57	21	5	2.11
25C	2	12	53	25	7	2.24

表 3 4.3:1 のペプチド:抗体での 0.06M のリン酸塩中での反応温度

【0392】

反応 pH

2.12.1. f x 抗体を $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、pH 6.5、6.75、7.0、7.25、7.5、7.75、または 8.0 でリン酸緩衝液を用いて、0.06M のリン酸ナトリウムの最終濃度に調整した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、プロピレングリコール溶液中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、2.12.1. f x に 4.3:1 のモル比で加え、2 時間室温

【0393】

【表 6】

	CA (%)					
pH	0	1	2	3	4	平均 CA
6.5	7	42	41	9	0	1.51
6.75	3	31	52	12	3	1.83
7.0	3	24	53	16	4	1.94
7.25	2	18	54	22	5	2.12
7.5	2	12	57	23	7	2.23
7.75	3	15	55	22	6	2.15
8.0	1	14	52	29	4	2.21

表 4 4.3:1 のペプチド:抗体での 0.06M のリン酸ナトリウム緩衝液中での pH

【0394】

2.12.1. f x を $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、pH 7.0、7.5、および 8.0 で HEPES 緩衝液を用いて、0.02M の最終濃度に調整した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、DMSO 中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、2.12.1. f x に 5:1 のモル比で加え、室温で一晩反応させた。結果を表 5 に示す。コンジュゲーションのレベルは、pH 8.0 超で低下した。

【0395】

10

20

30

40

【表 7】

	ABP 付加(%)					
pH	0	1	2	3	4	平均 CA
7	2	21	41	28	4	2.03
7.5	3	22	44	26	5	2.08
8	9	30	42	17	2	1.73

表 5 5:1 のペプチド:抗体での 0.02M の HEPES 緩衝液中での pH

【0396】

10

コンジュゲーション反応の継続時間

2. 12. 1. f x を $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、pH 7. 7 でリン酸緩衝液を用いて、0. 06 M のリン酸ナトリウムの最終濃度に調整した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、プロピレングリコール溶液中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、2. 12. 1. f x に 4. 3 : 1 のモル比で加え、30、60、120、180、240、300、または 2400 分間、室温で反応させた（表 6）。

【0397】

【表 8】

20

	CA (%)					
時間 (min)	0	1	2	3	4	平均 CA
30	6	38	44	13	0	1.64
60	1	22	52	21	3	2.02
120	0	15	50	29	6	2.24
180	1	12	51	31	5	2.28
240	1	9	51	33	5	2.33
300	1	9	50	35	5	2.35
2400	1	10	48	35	6	2.35

表 6 4.3:1 のペプチド:抗体での 0.06M のリン酸ナトリウム中でのコンジュゲーション反応の継続時間

30

【0398】

ペプチドとタンパク質のモル比

2. 12. 1. f x を $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、pH 7. 5 で HEPES 緩衝液を用いて、0. 2 M の HEPES の最終濃度に調整した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、プロピレングリコール溶液中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、2. 12. 1. f x に 1、2、3、4、および 5 : 1 のモル比で加え（表 7）、室温で少なくとも 2 時間反応させたが、高濃度の HEPES 緩衝液は、コンジュゲーションの減少をもたらした。

【0399】

40

【表 9】

	CA (%)								
ペプチド:2.12.1.fx	0	1	2	3	4	5	6	7	平均 CA
1:1	80	20	0	0	0	0	0	0	0.20
2:1	60	35	5	0	0	0	0	0	0.45
3:1	39	49	12	0	0	0	0	0	0.73
4:1	27	51	19	3	0	0	0	0	0.98
5:1	11	47	37	5	0	0	0	0	1.36

表 7 0.2M HEPES 中でのペプチドとタンパク質のモル比 1:1~5:1

10

【0400】

2.12.1.fx を $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、pH 7.7 でリン酸緩衝液を用いて、0.06 M のリン酸ナトリウムの最終濃度に調整した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、プロピレングリコール溶液中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、2.12.1.fx に 5、7、10、12、および 15:1 のモル比で加え（表 8）、室温で 2 時間反応させて、MAC を高いコンジュゲーションレベルで生成した。

【0401】

【表 10】

20

	CA (%)								
ペプチド:2.12.1.fx	0	1	2	3	4	5	6	7	平均 CA
7:1	1	1	29	39	17	10	2	0	3.06
10:1	1	1	18	33	25	19	3	0	3.49
12:1	3	1	11	22	26	26	8	3	3.92
15:1	1	2	9	19	23	32	12	3	4.22

表 8 0.06M リン酸ナトリウム中でのペプチドとタンパク質のモル比 7:1~15:1

【0402】

30

2.12.1.fx および [PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] のモル比をさらに最適化するために、2.12.1.fx を $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、pH 7.7 でリン酸緩衝液を用いて、0.06 M のリン酸ナトリウムの最終濃度に調整した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、プロピレングリコール溶液中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、2.12.1.fx 抗体に 2.5、2.8、3.1、3.4、3.7、4.0、4.3、または 4.6:1 のモル比で加え（表 9）、室温で 2 時間反応させた。

【0403】

【表 1 1】

	CA (%)								
ペプチド:2.12.1.fx	0	1	2	3	4	5	6	7	平均 CA
2.5:1	14	53	30	4	0	0	0	0	1.25
2.8:1	10	45	37	8	0	0	0	0	1.43
3.1:1	7	39	45	8	0	0	0	0	1.53
3.4:1	5	40	44	11	0	0	0	0	1.61
3.7:1	4	25	51	15	5	0	0	0	1.92
4.0:1	2	26	55	15	2	0	0	0	1.89
4.3:1	1	24	55	16	4	0	0	0	1.98
4.6:1	2	19	56	19	5	0	0	0	2.08

表 9 0.06M リン酸ナトリウム中でのペプチドとタンパク質のモル比 2.5:1~4.6:1

【0 4 0 4】

2. 1 2. 1. f x を $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、pH 7. 0 で HEPES 緩衝液を用いて、0. 0 2 M の最終濃度に調整した。[PFP-PEG₅-K^{1 1}-配列番号 2 7] を、DMSO 中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。[PFP-PEG₅-K^{1 1}-配列番号 2 7] を、2. 1 2. 1. f x に、5、6、7、8、10:1 のモル比で加え、室温で一晩反応させた。結果を表 1 0 に示す。

【0 4 0 5】

【表 1 2】

	CA (%)								
ペプチド:2.12.1.fx	0	1	2	3	4	5	6	7	平均 CA
5:1	2	21	49	24	4	0	0	0	2.07
6:1	2	15	42	32	9	0	0	0	2.31
7:1	1	11	34	42	13	0	0	0	2.57
8:1	0	9	32	42	16	1	0	0	2.68
10:1	0	4	21	47	25	4	0	0	3.07

表 10 0.02M HEPES 中でのペプチドとタンパク質のモル比 5:1~10:1

【0 4 0 6】

様々なタンパク質濃度での 2. 1 2. 1. f x のコンジュゲーションプロファイル

様々な濃度での [PFP-PEG₅-K^{1 1}-配列番号 2 7] との 2. 1 2. 1. f x のコンジュゲーションプロファイルを分析した。2. 1 2. 1. f x を $> 50 \text{ mg} / \text{mL}$ に濃縮し、20 mM の酢酸ナトリウム、pH 5. 5 の 200 m のトレハロースで所望の濃度に希釈し、60 mM の pH 7. 7 のリン酸ナトリウムでスパイクした。[PFP-PEG₅-K^{1 1}-配列番号 2 7] を 50 % のプロピレングリコールで再懸濁し、抗体と 4. 3:1 のモル比で混合し、一晩室温で反応させた。すべての試料を $2 \text{ mg} / \text{mL}$ に希釈し、サイズ排除クロマトグラフィー質量分析法 (SEC-MS) によってインタクトなコンジュゲートタンパク質として分析して、タンパク質のコンジュゲート形態の数および量を決定した。この技術で、各タンパク質の形態の分子量を測定する；複数のコンジュゲーション部位は、ペプチドの質量差によって分離される別個のシグナルとして観察される。複数のコンジュゲーション種の相対的な定量化を、シグナルの大きさを測定することによって行う。表 1 1 は、抗体の様々な濃度でのペプチドとの 2. 1 2. 1. f x のコンジュゲーションプロファイルを示している。 $10 \text{ mg} / \text{mL} \sim 50 \text{ mg} / \text{mL}$ の抗体濃度では、コンジュゲーションは、1. 8 個以上の付加の平均で、0~5 個の付加の分布で起こる。 $0. 5 \sim 5 \text{ mg} / \text{mL}$ の抗体濃度では、コンジュゲーションは、1. 5 個以下の付加の平均で、0~3 個の付加の分布で起こる。

【0407】

【表13】

抗体濃度(mg/ml)	CA (%)						平均 CA
	0	1	2	3	4	5	
0.5	65	32	3	-	-	-	0.37
1	44	44	12	-	-	-	0.67
5	10	41	40	8	-	-	1.45
10	3	30	47	17	2	1	1.87
15	1	24	51	20	3	1	2.02
20	1	16	57	22	2	1	2.11
30	2	20	55	20	3	1	2.04
40	2	21	53	22	2	0	2.04
50	2	19	50	24	4	1	2.11

表 11 抗体濃度の作用

【0408】

反応緩衝液の選択

2. 12. 1. fxを18mg・ml⁻¹に、pH7.7で炭酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、またはリン酸ナトリウム緩衝液を用いて、0.05Mのリン酸ナトリウムの最終濃度に調整した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号27]を、プロピレングリコール溶液中で10mg・ml⁻¹に再構成した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号27]を、2.12.1.fxに、1、2、3、4、または5:1のモル比で加え、室温で2時間反応させた。低い反応pHは、コンジュゲーションレベルの低下をもたらした(表12)。

【0409】

【表14】

緩衝液	CA (%)					平均 CA
	0	1	2	3	4	
50mM 炭酸ナトリウム pH 7.4	2	24	48	26	0	1.98
50mM ホウ酸ナトリウム pH 7.0	1	17	45	31	5	2.20
50mM リン酸ナトリウム pH 7.0	10	48	38	4	0	1.36

表 12 緩衝液および pH 変化

【0410】

2. 12. 1. fxを18mg・ml⁻¹に、pH7.5、7.7、および8.0でホウ酸ナトリウムおよびリン酸ナトリウム緩衝液を用いて、0.04Mの最終濃度に調整した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号27]を、プロピレングリコール溶液中で10mg・ml⁻¹に再構成し、2.12.1.fxに、4.3:1のモル比で加え、室温で2時間反応させた(表13)。

【0411】

10

20

30

40

【表 1 5】

	CA (%)					
緩衝液	0	1	2	3	4	平均 CA
リン酸塩、pH 7.5	1	21	53	21	3	2.02
リン酸塩、pH 7.7	0	15	50	29	6	2.26
リン酸塩、pH 8.0	1	14	52	29	4	2.21
ホウ酸塩、pH 7.5	46	44	10	0	0	0.64
ホウ酸塩、pH 7.7	22	51	23	4	0	1.09
ホウ酸塩、pH 8.0	1	17	48	30	4	2.19

10

表 13 緩衝液および pH 変化

【0 4 1 2】

2. 1 2. 1. f x を $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、pH 7. 7 でリン酸緩衝液を用いて、0. 0 4 M、0. 0 6 M、または 0. 0 8 M のリン酸ナトリウムの最終濃度に調整した。〔PFP-PEG₅-K^{1 1}-配列番号 2 7〕を、プロピレングリコール溶液中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。〔PFP-PEG₅-K^{1 1}-配列番号 2 7〕を、2. 1 2. 1. f x に 4. 3 : 1 のモル比で加え、室温で 2 時間反応させた。結果を表 1 4 に示す。

【0 4 1 3】

【表 1 6】

20

	CA (%)					
pH7.7 のリン酸塩の濃度 (mM)	0	1	2	3	4	平均 CA
40	2	23	54	16	4	1.95
60	2	28	51	15	4	1.91
80	2	29	51	13	4	1.86

表 14 リン酸塩の濃度

30

【0 4 1 4】

コンジュゲーションに対する緩衝液成分の作用

プロピレングリコール：2. 1 2. 1. f x を $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、pH 7. 7 でリン酸緩衝液を用いて、0. 0 6 M のリン酸ナトリウムの最終濃度に調整した。〔PFP-PEG₅-K^{1 1}-配列番号 2 7〕を、プロピレングリコール溶液中で $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した（コンジュゲーション反応物中 5 % のプロピレングリコール）。〔PFP-PEG₅-K^{1 1}-配列番号 2 7〕を、2. 1 2. 1. f x に 4. 3 : 1 のモル比で加え、追加の 0 ~ 1 5 % のプロピレングリコールでスパイクし（5、1 0、1 5、および 2 0 % の最終プロピレングリコールのパーセンテージ）、室温で 2 時間反応させた。結果を表 1 5 に示す。

40

【0 4 1 5】

【表 17】

	CA (%)					
プロピレングリコールのパーセント(%)	0	1	2	3	4	平均 CA
5	2	18	55	20	5	2.08
10	2	20	53	21	5	2.09
15	2	23	49	20	5	2.01
20	4	23	50	19	4	1.96

表 15 0.06M リン酸ナトリウム中におけるプロピレングリコールのパーセント

10

【0416】

NaCl : 2.12.1. fx を $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、pH 7.0 で HEPES 緩衝液を用いて、0.02 M の最終濃度に、0.14 M の NaCl の存在および不在で調整した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、DMSO 中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、2.12.1. fx に 5 : 1 のモル比で加え、室温で一晩反応させた。コンジュゲーションレベルは、NaCl の存在下で低下する（表 16）。

【0417】

【表 18】

	ABP 付加(%)					
塩化ナトリウムの濃度(mM)	0	1	2	3	4	平均 CA
0	2	21	41	28	4	2.03
0.14	9	34	42	14	1	1.64

20

表 16 0.02M HEPES 中における塩化ナトリウムの濃度

【0418】

HEPES : 2.12.1. fx を $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、pH 7.0 で HEPES 緩衝液を用いて、0.2 M および 0.02 M の最終濃度に調整した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、50 % のプロピレングリコール中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、2.12.1. fx に 5 : 1 のモル比で加え、室温で 2 時間反応させた。結果を表 17 に示す。コンジュゲーションレベルは、0.2 M の HEPES 緩衝液で低下する。

30

【0419】

【表 19】

	ABP 付加(%)					
HEPES(mM)の濃度	0	1	2	3	4	平均 CA
0.02	2	35	47	16	0	1.77
0.2	21	49	26	4	0	1.13

40

表 17 HEPES 濃度

【0420】

DMSO : 2.12.1. fx を $15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に、pH 7.7 でリン酸ナトリウム緩衝液を用いて、0.06 M の最終濃度に調整し、DMSO を 30 % の最終濃度まで加えた。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、プロピレングリコール溶液中で $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ に再構成した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、2.12.1. fx に 4 : 1 のモル比で加え、室温で 2 時間反応させた。結果を表 18 に示す。

【0421】

50

【表 20】

	ABP 付加(%)					
DMSO のパーセント	0	1	2	3	4	平均 CA
0	3	28	49	14	6	1.92
30	8	28	32	22	10	1.98

表 18 0.06M リン酸ナトリウム中における DMSO

【0422】

コンジュゲーション反応パラメーターの検討

10

エフェクター部分（この実施例では、ペプチド）と抗体のモル比が、約 3.5 : 1 未満に低下した場合、コンジュゲーションレベルは、表 9 に示すように低下する。代わって、表 10 は、モル比を増大させると、コンジュゲーションレベルの増大が生じることを示す。抗体 1 個当たりのペプチドの数を増大させることは一般的に、その抗原（この場合、IGF1R 受容体）に対する抗体（この場合、2.12.1 f x）の結合効率を低下させ、したがって、ペプチドと抗体のモル比は、抗体-抗原、およびペプチド-同族の結合の両方を最大にするように最適化された。

【0423】

コンジュゲーション緩衝液を変更することで、コンジュゲーションパターンを変更することができることも見出された。アミンを含有する添加剤は、これらが PFP 基と反応し得るので、一般的にあまり好ましくない。炭酸塩およびホウ酸塩などの緩衝液を、コンジュゲーションのために使用することができるが、しかしこれらの pKa（ホウ酸は pKa 約 9 を有し、炭酸塩は約 6 および約 11 の 2 つの pKa を有する）が、MAC-1 および MAC-2 に最適として同定された 7.7 のコンジュゲーション pH から離れている（表 12）ために回避された。コンジュゲーションレベルは、反応の化学的条件のみに依存するのではなく、時間にも基づいている。2 時間後に、ほとんどの PFP 活性化ペプチドは、抗体と反応したか、または PFPZ* は、加水分解されている（表 6）。

20

【0424】

PFP 活性化ペプチド/リンカーは、リシン側鎖のアミノ基と迅速に反応した。コンジュゲーションを、リン酸緩衝液中で pH 6.5 ~ 8 で行って、表 4 および 5 に示すとおり、その電荷（表面タンパク質上のリシンの pKa は約 9.1 ~ 11.2 である）を減少させることによって、抗体表面リシンの求核性の傾向を増大させた。

30

【0425】

MAC-1 および MAC-2 のコンジュゲーションのための最適な条件は、以下のとおり記載される：2.12.1 f x 抗体を pH 7.7 にリン酸緩衝液を用いて、0.06 M のリン酸ナトリウムの最終濃度に調整した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、プロピレングリコール中で 10 mg/ml に再構成した（反応物中での最終プロピレングリコール濃度は 10 %）。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] を、2.12.1 f x 抗体に 4.3 : 1 のモル比で加え、室温で 2 時間反応させた。反応物をコハク酸塩およびグリシン緩衝液でクエンチし、pH を約 6.0 に低下させ、あらゆる遊離ペプチドをクエンチした。一部の態様では、反応物を濃縮することができ、ペプチド関連種（水溶媒との反応によってリンカーが加水分解された場合のペプチドなど）および反応混合物中の他の要素（PFP など）を、例えば 50 kDa 膜またはサイズ排除クロマトグラフィーを使用する透析濾過によって、pH 5.5、30 mg/ml でコハク酸塩、グリシン、塩化ナトリウム、およびトレハロース緩衝液に除去することができる。

40

【0426】

上記で列挙したコンジュゲーション条件を、各プロセスパラメーターの範囲を決定するために変化させた。パラメーターの範囲は、コンジュゲーション中に起き得る、かつ/または種の集団中に 10 % 超の変化が観察されるまで拡大した変動性に基づいて設定した。表 19 に、MAC-2 について同様のコンジュゲーションプロファイルをもたらすパラメ

50

ーターをまとめる。

【0427】

【表21】

試験パラメーター	試験範囲	望ましい範囲	最適値
温度	18～25℃	18～25℃	室温
反応 pH	6.5～8.0	pH 7.25～8.0	7.7
反応継続時間	30～2400 分	180～2400 分	>約 2 時間
ペプチドと抗体のモル比	2.5～4.6	3.7:1～4.3:1	4.3:1
反応物に加える 2.12.1.fx 濃度	0.5～50 mg/mL	10～50 mg/mL	20mg/mL
反応緩衝液中におけるリン酸塩濃度	40～80mM	40～80mM	60mM
最終プロピレングリコール濃度	5～20%	5～20%	10 %

10

表 19 MAC-2 について最適化されたプロセスパラメーター

【0428】

(実施例 6)

抗体上におけるコンジュゲートされたペプチドの位置

MAC-2 薬物生成物分子は、2.12.1.fx 抗体 (α -IGF1R-1) に結合された 1～4 個の [PEG₅-K¹¹-配列番号 27] 分子の分布からなる。これは、サイズ排除クロマトグラフィーカラムを介しての塩および添加剤からのタンパク質の分離後に、エレクトロスプレー飛行時間型質量分析検出を使用して MAC-2 のインタクトな分子量 (MW) を測定することによって決定された。2.12.1.fx および 3 ロットの MAC-2 の MW を実証する質量分析データを、図 2 に示す。図 1A は、コンジュゲーション前の 2.12.1.fx を示す。これは、単一の MW を示す均一な分子である。MAC-2 のロットは、2.12.1.fx にコンジュゲートされたペプチドの分布を示す；1～4 個のコンジュゲーション付加 (CA) が観察される。それぞれの形態の相対量は、ロット間で一貫しており、各ロットにおける最も普通の形態は、それぞれの個々の 2.12.1.fx 抗体に結合された 2 個のペプチド (配列番号 27) を有する。

20

【0429】

2.12.1.fx 抗体中のジスルフィド結合を還元することによって、軽鎖および重鎖を別々に観察することができる。ジスルフィドの還元を、インタクトな 2.12.1.fx 抗体を 20 mM のトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) で処理することによって行う。生じた重鎖および軽鎖の混合物を、上記のとおりインタクトな分子量のために分析する。図 2 に示したデータは、2.12.1.fx の上での ABP の位置に対する証拠を提供している。MAC-2 のロット中の軽鎖の大部分 (>65%) は、コンジュゲートされている。ほとんどのコンジュゲートされた軽鎖は、1 CA を含有する。2 CA も低いレベルで観察される。ほとんどすべての観察された重鎖 (>90%) は、修飾されてなく、これは、非常に僅かなコンジュゲートされたペプチドが重鎖上に位置することを示唆している。

30

【0430】

ペプチドマッピングを、コンジュゲーションの正確な位置を決定するために使用した。この手順は、次のとおりであった：MAC-2 の一定分量を 8 M のグアニジン塩酸塩で変性し、ジスルフィド結合を TCEP で還元し、生じたシステインスルフィドヒドリルをヨードアセトアミドでアルキル化する。次いで、この処理されたタンパク質の試料を、プロテアーゼキモトリプシン (1:125 のプロテアーゼ:MAC の重量比) で消化した。次いで、生じたキモトリプシンペプチドを、C8 液体クロマトグラフィーカラムを介しての分離の後に、質量分析によって別個に検出した。この技術で、MAC-2 は、キモトリプシンによって、重鎖および軽鎖上で図 3 中の配列中に (黒丸で) 特記された位置で断片に消化された。次いで、各ペプチドの MW の液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 検出を使用して、どのリシン残基がコンジュゲートペプチドによって修飾されたかを決定した。断片がコンジュゲートペプチドの結合によって修飾された場合、その MW は、それに応じてシフトした。

40

50

【0431】

重鎖の断片Y1、Y6、Y9、Y10、Y20、Y25、Y26、Y29、Y32、Y33、Y34、Y37、Y40、およびY43は、Lys残基を含有する。これらのうち、ペプチドのコンジュゲーションは、Y6、Y10、Y25、Y33、およびY37において検出された。軽鎖の断片Y3、Y10、Y11、Y12、Y13、Y14、Y15、およびY16は、Lys残基を含有する。これらのうち、コンジュゲーションは、Y3、Y13、およびY15において検出された。

【0432】

Y15と称される軽鎖断片（軽鎖上のN末端から15番目のキモトリプシン断片）は、図4に示したデータに基づき、コンジュゲートされていることが見出された。MACの修飾されたY15断片のMWは、明確に検出された。コンジュゲートされていない2.12.1.fx試料において、修飾されたY15断片の証拠は存在しなかった。修飾されていないY15断片は、MAC-2および2.12.1.fxの両方で観察された。この断片の大きさは、この断片の全体が修飾されていない形態で存在するために、2.12.1.fx試料において、より高い。この断片がMAC-2ではコンジュゲートされるので、修飾されていないY15の観察されるレベルは低下し、これは、図4中で、より小さい面積を持つピークとして観察される。

【0433】

MAC-2の軽鎖断片Y15上で観察される[配列番号27-K¹¹-PEG5]のコンジュゲーションの量は、修飾されていないY15のピーク面積の低減を測定することによって推定される。コンジュゲートされていない2.12.1.fxが、100%を示すようにシグナル強度を正規化した後、MAC-2の3つの独立したロットは、それぞれ17%、27%、および22%のコンジュゲートされていないY15断片を示した。

【0434】

MAC試料中において観察されたY15の大きさを、2.12.1.fx試料におけるY15の大きさに対して正規化した。Y15断片のうちの75~85%が、MAC-2では修飾されたと決定した。MAC-2がほとんど1~2のコンジュゲーション付加を含有することを考慮すると、このことは、MAC-2におけるコンジュゲーションのうちのほとんどが、軽鎖断片Y15の2個のK残基（LC-K¹⁸⁸またはLC-K¹⁹⁰）の一方に位置することを示唆している。2.12.1.fxの配列に関係した断片Y15の位置を、図3に示す。

【0435】

トリプシン酵素による消化を、LC-K¹⁸⁸とLC-K¹⁹⁰とを識別するために使用した（トリプシンはKおよびRのC末端について特異性を有する）。トリプシンは、コンジュゲートされたK残基を消化しないので、この酵素による消化は、どのK残基がコンジュゲートされているかに応じて、異なったペプチドの長さを生成する。トリプシンで消化されたMAC-2からのLCMSデータの調査によって、ペプチドが、LC-K¹⁸⁸に特異的に結合する証拠が得られる。修飾されたLC-K¹⁹⁰の証拠は、観察されなかった。

【0436】

MAC-2をTCEPで還元し、上記のとおりグアニジン塩酸塩で変性した。タンパク質濃度を2mg/mlに、pHを7.8にトリス消化緩衝液を用いて調整した。精製したトリプシンを、1:125のプロテアーゼ:MACの重量比で加え、30℃で4時間インキュベートした。試料を、LCMSによって分析するまで、-20℃で保存した。断片の試料を、C18逆相カラムで、水/アセトニトリル+0.1%TFAの移動相を使用して分離した。断片の検出を、214nmのUVおよびESI-TOF質量分析の両方によってモニタリングした。すべてのデータの分析を、MassLynxソフトウェアを使用して行った。

【0437】

MAC-2のトリプシン消化による断片の形成は、ペプチドコンジュゲーションの部位

10

20

30

40

50

に依存する。リシンは、コンジュゲーションのために標的化された残基である。図1～4に示したデータは、ペプチド結合の支配的な部位が、 $LC-K^{188}$ または $LC-K^{190}$ のいずれかであることを示す。以下のスキームは、 $2.12.1.f_x-[LC-K^{188}]$ または $2.12.1.f_x-[LC-K^{190}]$ のいずれかでのコンジュゲーションで起こるであろうトリプシン消化反応を示している。

【0438】

【化71】

トリプシン消化



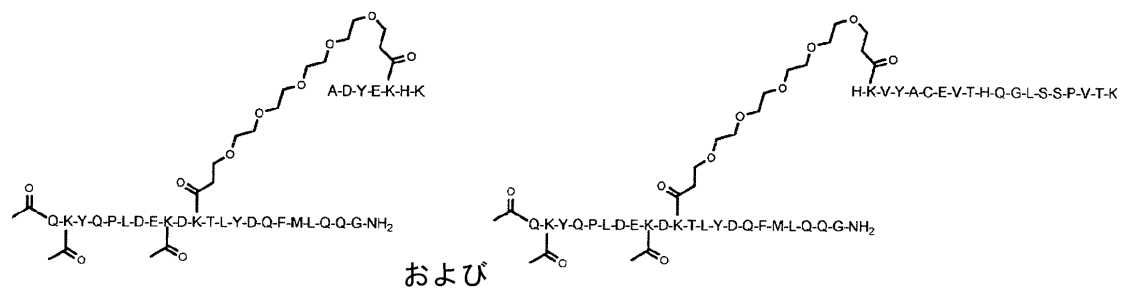
10

【0439】

問題となっている2つの潜在的な消化断片の化学構造は以下のとおりである：

【0440】

【化72】



20

【0441】

図5は、 $LC-K^{188}$ がペプチドにコンジュゲートされた場合のトリプシンペプチドについての選択されたイオンのLCMSクロマトグラムデータを示す。図6は、 $LC-K^{190}$ がコンジュゲートされたペプチドで修飾された場合のトリプシン断片についての選択されたイオンのLCMSクロマトグラムデータを示す。これらのデータは、唯一 $LC-K^{188}$ のみがコンジュゲートされることを示唆しており；この状況は、MAC-2においては検出されるが、 $2.12.1.f_x$ 対照実験においては存在しない有意なシグナルをもたらす。 $LC-K^{190}$ での修飾からの結果は、陰性対照と比較して独特であるどのようなデータも提供しない。

30

【0442】

予測できることとは対照的に、ペプチド／リンカーは、 $2.12.1.f_x$ の軽鎖の $LC-K^{188}$ を優先的に装飾すると考えられる。これは、 $2.12.1.f_x$ 抗体のFc部分が影響を受けないという意外な利点を有する。試験は、生じたMAC-2のPKが、コンジュゲートされていない $2.12.1.f_x$ のPKとほぼ等しいことを示す。抗体上の複数の部位に対する乱雑な非特異的コンジュゲーションは、より低いPKを有する生成物をもたらし得る。MAC-1およびMAC-2によって例示される本発明の方向性コンジュゲーションは、より低いPKを包含する乱雑な非特異的コンジュゲーションに起因し得る可能な有害作用のうちの一部を最小にする利点を提供する。軽鎖(LC)が、可変領域、さらには定常軽鎖カッパ鎖(C κ)を含むので、 $LC-K^{188}$ は、C κ -K ^{80} (すなわち、配列番号6のK ^{80})と同じ残基である。

40

【0443】

このプロセスの再現性を確立するために、実験を繰り返した。MAC-2を2mg/mlに希釈し、インタクトなコンジュゲートタンパク質として、サイズ排除クロマトグラフィー質量分析(SEC-MS)によって分析して、タンパク質のコンジュゲート形態の数および量を決定した。この技術は、各タンパク質の形態の分子量を測定する；複数のコ

50

ンジュゲーション部位が、コンジュゲートされたペプチド／リンカーの質量差によって分離された別個のシグナルとして観察される。複数のコンジュゲーション種の相対的な定量化を、シグナルの大きさを測定することによって行う。図7Aは、代表的なMAC-2のスペクトルを示す；定量化のために使用された計算を、表20に示す。インタクトなMAC-2についての平均コンジュゲーション付加は、次式：SUMPRODUCT（コンジュゲーション付加（CA）の数、CA当たりパーセント）を使用して、2.11個と計算される。この例は、0～4個のペプチド付加の分布として起こるペプチドのコンジュゲーションを実証し、その際、最大の形態は、2個のペプチド付加であり、ペプチド付加の平均個数は2.11である。複数の個人による反復分析は、コンジュゲーションのプロファイルが一貫していて、再現可能であることを実証している。

10

【0444】

【表22】

コンジュゲーション付加	予測された質量	強度	パーセント
0	149210	1615	1%
1	152350	20533	17%
2	155490	69395	56%
3	158630	27708	22%
4	161770	4818	4%
		124069	100%

表20 コンジュゲーション付加の重みつき平均:2.11

20

【0445】

ペプチドコンジュゲーションの程度を、2.12.1. f x MAC-2の軽鎖および重鎖で別々に試験した。MAC-2を変性し、ジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩およびジチオトレイトールを使用して還元した。生じた遊離の軽鎖および重鎖を、LCMSを使用して分析して、それぞれのコンジュゲーションプロファイルを決した。図7Bおよび7Cは、各鎖の代表的なスペクトルを示す；定量化のために使用した計算を、表21に示す。次式：SUMPRODUCT（コンジュゲーション付加（CA）の数、CA当たりパーセント）を使用すると、還元された重鎖MAC-2についての平均コンジュゲーション付加（平均CA）は、0.14個と計算され、還元された軽鎖MAC-2に対する平均CAは、0.86個と計算された。これらのデータは、コンジュゲーションの位置が軽鎖において、より多いことを実証しており；軽鎖上の最も豊富な形態は、1個のペプチド付加を含有し、軽鎖は、平均0.86個のペプチド付加を含有する。重鎖上のコンジュゲーションは、有意により低いレベルで観察される。複数の個人によるこの実験の反復分析は、コンジュゲーションのプロファイルが一貫していて、再現可能であることを実証している。

30

【0446】

【表23】

質量(Da)	コンジュゲーション付加	種	強度	パーセント	平均 CA
51020	0	HC	102093	86%	
54165	1	HC + (1x) ABP-1	16204	14%	
		HC 全体	118297	100%	0.14
23584	0	LC	19752	21%	
26729	1	LC + (1x) ABP-1	68757	72%	
29874	2	LC + (2x) ABP-2	6561	7%	
		LC 全体	95070	100%	0.86

40

表21 コンジュゲーションの特異的位置を同定するMAC-2のペプチドマッピング特徴づけ

【0447】

MAC-2をジチオトレイトールで還元し、システイン残基を、ヨードアセトアミドで

50

のカルボキシメチル化によってアルキル化した。キモトリプシンをタンパク分解性消化のために使用した。溶液中の消化された断片を、液体クロマトグラフィー質量分析（LCMS）を使用して分析した。個々の断片をC18のHPLCカラムで分離し、それらの正確な質量を四重飛行時間（Q-ToF）質量分析計で測定した。生じた断片の質量を使用して、修飾されていない断片またはコンジュゲートペプチドで修飾された断片を確認した。この実験は、リシン残基を含有するキモトリプシン断片に焦点を当てることによって、これらがペプチドコンジュゲーションのための可能な部位であると解釈された。表22は、すべてのそのような断片の列挙を示す。空白の項目は、この技術を使用して検出されない断片である。ペプチド修飾物質と共に観察された検出された断片は、コンジュゲーションの潜在的部位であると考えられる。

10

【0448】

表17について表の項目を以下に説明する：

断片番号：N末端からのキモトリプシン断片ナンバリング；接合された断片（すなわち、Y1-2）は、欠損した開裂部位を示す。

始点／終点：N末端からの断片位置のナンバリング。

ペプチド質量（Da）：ダルトンで記載された断片の理論的質量。

保持時間（対照／分析物）：LCMS断片マッピング実験におけるクロマトグラフィーの保持／溶離の時間。

MSシグナル強度（対照／分析物）：MSによって観察された観察シグナルの大きさ。

質量誤差－ppm（対照／分析物）：断片の理論質量と観察質量との比較；>10、特にゼロ（0）に近い値は、良好な質量確度を実証している。

20

修飾物質：断片に対する潜在的共有結合的付加；Lys残基のペプチド-抗体結合断片、CAM-システイン残基のカルボキシメチル化。

アスタリスクは、個々の断片の修飾された（例えば、コンジュゲートされた）バージョンを示す。

Peptideは、コンジュゲートされたペプチドを示す。

【0449】

Y15断片へのペプチドの方向性コンジュゲーションは、コンジュゲーションレベルを定量化することによって実証される。次の分析を、2.12.1. fx基準生成物のペプチドマッピング実験中にコンジュゲーションを有することが観察されたそれぞれのペプチド断片に対して行った。コンジュゲートされた基準生成物（MAC-2）と比較した、コンジュゲートされていない対照（2.12.1. fx抗体骨格-コンジュゲーション無し）中の修飾されていないペプチドについて観察されたシグナル強度の比を、表23に示す。各試料において同じペプチドシグナルの直接的な比較が可能であるので、修飾されていないシグナルが使用される。例えば、コンジュゲートされていないペプチドは、対照と生成物試料とにおいて同じ観察シグナル強度を有し、1の比をもたらすと予測されるであろう。コンジュゲーションは、生成物試料において修飾されていないペプチドの観察量の減少をもたらし、それは、1超の比によって示されるであろう。表23のデータは、対照と生成物との間の試料および実験の変動を補正するためにさらに正規化した。表23は、軽鎖ペプチドY15が、それぞれの他のコンジュゲートされたペプチドよりも有意に高いレベルでコンジュゲートされることを実証している。これは、コンジュゲーションが、方向性の手法で起こり、K残基全体に無作為に分布されないことを示唆している。

30

40

【0450】

【表 2 4 - 1】

断片番号	開始	終了	ペプチド 質量(Da)	保持時間		MS シグナル強度		質量誤差(ppm)		修飾物質
				対照	分析物	対照	分析物	対照	分析物	
Y1	1	27	2617.3533							
Y1-2	1	29	2865.4695							
Y5-6	34	47	1657.8398							
Y6	37	47	1253.688	19.2	19.2	516640	583534	1.9	-1.1	
Y6-7	37	50	1602.8518	22.1	22.1	26537	37988	-1.6	-2.2	
Y6-7*	37	50	3295.7017		21.8		6316		-19.4	Pep(1)
Y8-9	51	68	1931.9337	16.5	16.5	60894	85742	-2.2	0.4	
Y9	61	68	878.461	11.3	11.3	376224	412997	0	-1	
Y9-10	61	80	2241.1501							
Y10	69	80	1380.6997	13.3	13.3	261813	299847	-1.1	0.7	
Y10*	69	80	3073.5498		23.4		6350		-8.7	Pep(1)
Y10-011	69	94	2972.4661							
Y19-20	111	157	4748.2773							
Y20	116	157	4160.0405							
Y20-21	116	166	5202.5527							
Y20-21*	116	166	5316.5957	34.1		6445		0.5		CAM(2)
Y24-25	202	245	4702.2109							
Y25	207	245	4151.9722							
Y25*	207	245	4437.0796	20.9	20.9	1495322	1800079	1.1	-3.1	CAM(5)
Y25*	207	245	6129.9297		24.4		6652		-4.5	CAM(5) Pep(1)
Y25-26	207	279	7985.9092							
Y26	246	279	3851.9478							
Y26-27	246	281	4152.0698							

表 22 MAC-2 重鎖基準生成物のペプチドマッピング特徴づけ

【表 2 4 - 2】

断片番号	開始	終了	ペプチド 質量(Da)	保持時間		MS シグナル強度		質量誤差(ppm)		修飾物質
				対照	分析物	対照	分析物	対照	分析物	
Y28-29	282	300	2245.1128							
Y29	283	300	2082.0493	14.6	14.6	20665	16662	-0.6	-3.8	
Y29-30	283	304	2531.2405							
Y31-32	305	323	2241.1907							
Y32	318	323	722.3599	7.9	7.9	93966	96639	0.1	2.6	
Y32	318	323	722.3599	17.7	18.4	37943	12802	11.4	30.6	
Y32	318	323	722.3599	18.4		11761		23.8		
Y32-33	318	353	4028.188							
Y33	324	353	3323.8386	20		5422		3.1		
Y33*	324	353	3380.8601	19.7	19.7	2196329	2497507	-2.5	-3.1	CAM(1)
Y33*	324	353	5073.71		24		5973		1.3	CAM(1) Pep(1)
Y33-34	324	376	5883.1577							
Y34	354	376	2577.3293							
Y34-35	354	385	3637.8159							
Y34-35*	354	385	3694.8374	33	32.9	10095	20682	1.9	-2.4	CAM(1)
Y36-37	386	408	2527.0808							
Y37	396	408	1394.6388	19.6	19.6	62942	71902	-0.9	-0.4	
Y37-38	396	409	1541.7072	25.1	25.1	827336	878570	0	-1.9	
Y37-38*	396	409	3234.5571		29.7		7749		-5.3	Pep(1)
Y39-40	410	421	1494.8195							
Y40	412	421	1218.672	15.8	15.8	77917	88243	-0.3	-1.6	
Y40-41	412	427	1891.9905	20.3	20.3	107513	149676	0.2	-2	
Y42-43	428	450	2525.1792							
Y43	441	450	1016.5502							

表 22 (続き) MAC-2 重鎖基準生成物のペプチドマッピング特徴づけ

【表 2 4 - 3】

断片番号	開始	終了	ペプチド 質量(Da)	保持時間		MS シグナル強度		質量誤差(ppm)		修飾物質
				対照	分析物	対照	分析物	対照	分析物	
Y2-3	36	49	1688.9725	16.2	16.2	145374	170451	-1.7	-2.6	
Y2-3*	36	49	3381.8225		24.2		7192		-9.2	Pep(1)
Y3	37	49	1525.9093	15.5	15.5	331068	393638	-2.7	-2.9	
Y3*	37	49	3218.7593		24		28193		-9	Pep(1)
Y3-4	37	62	2882.6355							
Y9-10	88	116	3244.729							
Y10	99	116	1871.0992							
Y10-11	99	139	4331.335							
Y11	117	139	2478.2463		22.8		47035		-5.9	
Y11-12	117	148	3635.8445							
Y12	140	148	1175.6088							
Y12-13	140	173	3886.8245							
Y13	149	173	2729.2263	13.1	13.1	1140556	1218022	-1.1	0.1	
Y13*	149	173	4422.0762		21.4		8424		-6.5	Pep(1)
Y13-14	149	186	4095.9243							
Y14	174	186	1384.7086							
Y14-15	174	192	2169.1318							
Y15	187	192	802.4337	7.5	7.5	275639	62720	-1.9	-0.2	
Y15*	187	192	2495.2837		20.9		936267		-9.8	Pep(1)
Y15-16	187	209	2574.29							
Y16	193	209	1789.8668	18.7		5400		4.4		
Y16*	193	209	1846.8883	18.1	18.1	169490	235914	-1.7	-2.5	CAM(1)
Y16-17	193	214	2349.0842	17.8		9211		0.1		

表 22 - MAC-2 軽鎖基準生成物のペプチドマッピング特徴づけ

【表 2 5】

断片	非修飾強度比:対照/分析物 (正規化済み)
軽鎖 Y3	1.000
軽鎖 Y13	1.112
軽鎖 Y15	5.218
重鎖 Y6	0.831
重鎖 Y10	1.038
重鎖 Y25	0.988
重鎖 Y33	1.045
重鎖 Y37	1.120

10

表 23 軽鎖上の Y15 断片へのペプチドの方向性コンジュゲーション

【0 4 5 4】

(実施例 7)

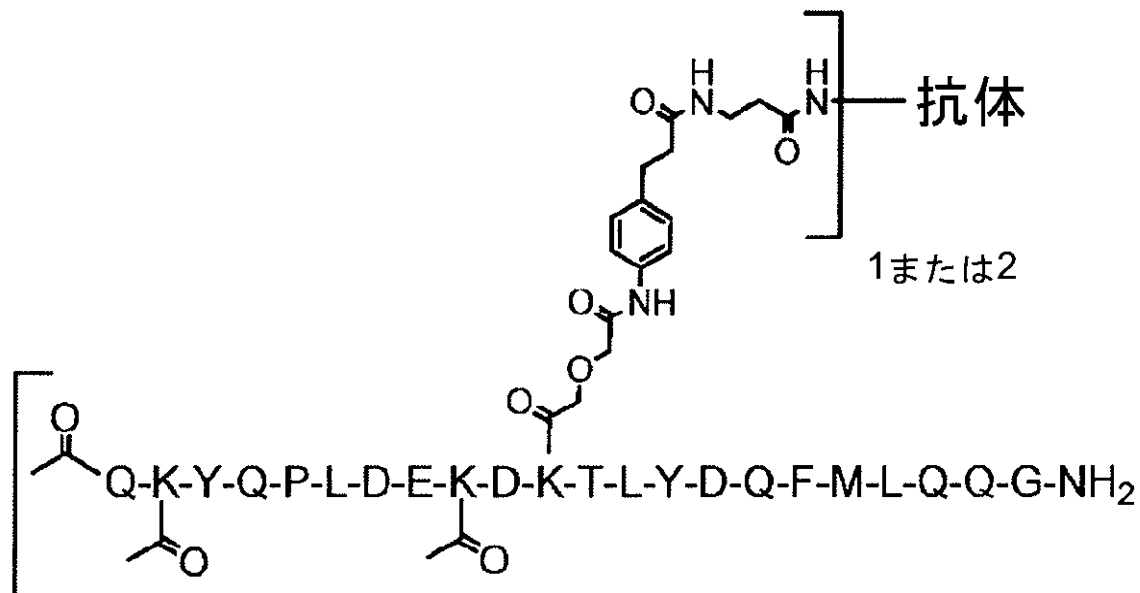
MAC 生成物の抗力の実証

MAC-1 および MAC-2 の *in vitro* および *in vivo* アッセイの完全な詳細は、PCT/US2011/053092 (WO2012/007896) の実施例において得られる。一部の実施例では、Ang2-h38C2-IgG1 を対照として使用した。Ang2-h38C2 の生成および構造は、その内容が、本明細書に組み込まれている WO2008056346 において化合物 43 として、特に化合物 43 の生成に関する態様について完全に記載されている。簡単には、その構造は以下のとおりである：

20

【0 4 5 5】

【化 7 3】



30

[式中、リンカーは、抗体の結合部位の HC-K^{9 9} (Kabat ナンバリングによる K^{9 3}) の ε-アミノ基に共有結合されており、抗体は、h38C2-IgG1 (配列番号 64 および 65) (WO2008/056346 の配列番号 189 および配列番号 190) である]。

【0 4 5 6】

まとめると、MAC-1 および MAC-2 は、Ang2 競合アッセイにおいて示されているとおり、Ang2 を結合することが可能であり、Tie2 へのその結合を防止し、MAC-1 および MAC-2 は両方とも、IGF1R 結合についての IGF1 との競合に関して、親抗 IGF1R 抗体 (2.12.1. fx) と同様の活性を有する (表 24)。意

50

外にも、Ang2-h38c2との比較において、MAC-1およびMAC-2は両方とも、Ang2を競合的に結合する能力の増大を示した。したがって、限られたAng2ペプチドのコンジュゲーションは、抗体の自然の結合および阻害を変化させるとは考えられず、場合によっては、エフェクター部分の活性を向上させ得る。

【0457】

MACを、ヒト結腸癌細胞系Colo205上のIGF1Rレベルを下方調節する能力について試験した。細胞を、培養液中でMAC化合物の滴定で3時間処理した。細胞を収集し、IGF1Rの表面発現をフローサイトメトリーによって決定した。陰性対照のhIgG2と比較した場合のIGF1Rの下方調節のパーセンテージを決定した（表24）。

【0458】

【表26】

	Ang2 IC ₅₀ (nM)	IGF1R IC ₅₀ (nM)	IGF1R リン酸化 IC ₅₀ (nM)	下方調節された IGF1R%
MAC-1	0.092 ± 0.049	5.1 ± 1.1	150.7 ± 59.6	43 ± 5
MAC-2	0.057 ± 0.022	6.1 ± 1.1	91.4 ± 40.2	50 ± 5
2.12.1.fx 抗体	nd	3.8 ± 0.8	48.7 ± 14.0	48 ± 3
Ang2-h38c2-IgG1	0.582 ± 0.242	nd	nd	nd

表 24 IGF1R および Ang2 を結合および変調する MAC-1 および MAC-2 の能力

【0459】

抗体1個当たり2個のペプチドをコンジュゲートすることがIGF1Rの自己リン酸化および下方調節を行うにあたっては理想的であり、抗体1個当たり2個より多いか、または少ないペプチドのコンジュゲーションが、これらの機能をMACが行う能力を低下させることも実証された。

【0460】

IGF1R活性をモジュレートするための2.12.1.fxの能力に対する、抗体1個当たりのペプチドの数の作用を評価するために、MAC-1の2種類の試料を調製したが、ここで、反応条件を、コンジュゲーションを低減する（低MAC-1）か、またはコンジュゲーションを増大させる（高MAC-1）かのいずれかをもたらすように設定した（表25）。試料を、IGF1Rを下方調節およびリン酸化する能力について分析した（表25）。IGF1R経路を有効にモジュレートする低MAC-1の能力と比較すると、高MAC-1の能力には、有意な差が存在する。抗体1個当たり約2個超のペプチドのコンジュゲーションは、抗体1個当たり約2個以下のペプチドのコンジュゲーションと比較して、IGF1Rの自己リン酸化を阻害することと、IGF1Rの下方調節を誘導することとの両方のMACの機能活性を制限する。したがって、1つの二重機能性実体中の2つの異なる生物学的経路を効率よくモジュレートするために、抗体1個当たり約2個のペプチドのコンジュゲーションが理想的であり得る（ペプチドおよび標的の薬物動態プロファイルに応じて）。

【0461】

【表27】

	Ang2 IC ₅₀ (nM)	下方調節された IGF1R%	リン酸化 IGF1R IC ₅₀ (nM)	CA (%)						平均 CA
				0	1	2	3	4	5	
低 MAC-1	0.103	32 ± 1	12.8	14	42	32	12	0	0	1.42
高 MAC-1	0.035	9 ± 2	>300	0	4	19	41	32	5	3.18
2.12.1.fx	nd	36 ± 3	3.5							
Ang2-h38c2-IgG1	0.252	nd	nd							

表 25 高 MAC-1 および低 MAC-1 の分析

【0462】

(実施例 8)

i n v i v o 薬物動態

PK 研究を、オスの Swiss Webster マウスおよび 2 匹のオスのカニクイザル (*Macaca fascicularis*) を使用して行った。PK 研究の完全な詳細は、PCT/US 2011/053092 の実施例において得られる。マウスでは、MAC-1 および MAC-2 は、383~397 時間の β 相半減期を有する親抗 IGF1R 抗体と同様の滞留時間を実証した。MAC-1 および MAC-2 Ang 2 結合性能は、マウスにおいて、単回静脈内投与研究で、105~120 時間の $T^{1/2}$ を有する Ang 2-h38c2 と同様の滞留時間を実証した。カニクイザルでは、MAC-2 は、100.4 時間の $T^{1/2}$ を有する親抗 IGF1R 抗体よりもやや短い滞留時間を実証した。MAC-2 Ang 2 結合性能は、97.8 時間の $T^{1/2}$ を有する Ang 2-h38c2 と同様の滞留時間を実証した。

【0463】

【表 28】

	マウス β -T $\frac{1}{2}$ (hr)		サル T $\frac{1}{2}$ (hr)	
化合物(mg.Kg ⁻¹)	Ang2	IGF1R	Ang2	IGF1R
Ang2-h38c2, (10)	95.2	--	95.3	--
α -IGF1R 抗体, (10), (5)	--	390	--	146.4
MAC-1, (10)	105	383	NT	NT
MAC-2, (10)	120	397	97.8	100.4

表 26 マウスおよびカニクイザルに 10mg/mkg で静脈内投与された MAC の単回投与 PK。マウスには 10mg/kg で、サルには 5mg/kg で α -IGF1R 抗体を投与。NT:試験せず。

【0464】

(実施例 9)

i n v i v o 薬理学

MAC-2 の抗腫瘍活性を、Colo205 (ヒト結腸腺癌) または MDA-MB-435 (黒色腫) 異種移植モデルで評価した。腫瘍研究の完全な詳細は、PCT/US 2011/053092 (WO 2012/007896) の実施例において得られる。Ang 2-h38c2 または抗 IGF1R 抗体 (2.12.1. fx) の週 1 回の投与は、Colo205 腫瘍増殖を阻害した。週 1 回投与する Ang 2-h38c2 および抗 IGF1R 抗体の組合せは、Colo205 腫瘍増殖の阻害において追加的な利益を示した。MAC-2 単独を週 1 回投与しても、組合せと同様の利益が示された。別の試験において、MAC-2 は、Colo205 腫瘍増殖および最終腫瘍重量を用量依存的に阻害した。

【0465】

28 日目に、化合物で処理した後の腫瘍の微小血管密度は、MAC-2 (10mg/kg、週 1 回) によって、ビヒクル処置群との比較において、有意に低減し (約 42%)、MAC-2 処理の抗血管新生活性が確認された。

【0466】

MAC-2 が、i n v i v o で Ang 2 および IGF1R の両方を標的化するかを調査するために、Ang 2 および IGF1R 発現レベルに対する MAC-2 の作用を、ビヒクル、Ang 2-h32c2、IGF1R 抗体 (2.12.1. fx)、または MAC-2 (0.3mg/kg~10mg/kg までの用量反応範囲) で処置された 2 つの独立した Colo205 異種移植腫瘍で評価した。結果は、Ang 2 および IGF1R の免疫反応性は、MAC-2 処理によって用量依存的な手法 (1、3、および 10mg/kg) で、ビヒクル処置群との比較において有意に低下したことを示した。IGF1R レベルに対する MAC-2 の作用は、IGF1R 拮抗性抗体について観察されたものと同様であった。加えて、リン酸化された IGF1R のレベルは、MAC-2 で処置された動物からの腫瘍

では低下した。これらのデータは、MAC-2処置が、Colo205異種移植モデルのAng2およびIGF1R経路の両方に影響を及ぼすことを実証している。MAC-2処置は、体重増加に影響を及ぼすことはなく、マウスは、研究を通じて良好な健康状態にあったと考えられた。MAC-2の抗腫瘍有効性を、MDA-MB-435黒色腫異種移植モデルにおいても評価した。MAC-2の週1回の投与（3および20mg/kg IP）は、MDA-MB-435モデルにおける腫瘍増殖の有意な40%の減少（67日目）をもたらした。したがって、MAC-2は、2つの異なるヒト異種移植腫瘍モデルにおいて有意な抗腫瘍有効性を実証している。

【0467】

（実施例10）

様々な抗体のペプチドコンジュゲーションプロファイル

いくつかの異なる抗体のペプチドとのコンジュゲーションプロファイルを、配列番号27およびPEG₅をそれぞれ例示的ペプチドおよびリンカーとして使用して分析した。すべての試験された抗体は、十分に画定され、特徴づけされた抗原相互作用を持つヒトIgG抗体または完全ヒト化IgG抗体であった。hAbλテストは、CLλ（hIL22：配列番号136および137）を含む一方で、2.12.1.fx、mAbκテスト1（参照によって本明細書に組み込まれている米国特許7537762号に開示されているとりのIgG2抗Alk1抗体）、h38C2-IgG1（配列番号64および65）、およびh38C2-IgG2（配列番号64および66）はそれぞれ、CLκを含む。それぞれの抗体を、20mMのpH7.0のHEPESに緩衝液交換し、5~20mg/mLに濃縮した。[PFPEG₅-K¹¹-配列番号27]を、50%のプロピレングリコールで再懸濁し、該当する抗体と4.3：1のモル比で混合し、室温で少なくとも2時間反応させた。すべての試料を2mg/mLに希釈し、サイズ排除クロマトグラフィー質量分析（SEC-MS）によって、インタクトなコンジュゲートされたタンパク質として分析して、コンジュゲート形態のタンパク質の数および定量化を決定した。この技術で、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；複数のペプチドコンジュゲーション部位は、結合したペプチドの質量差によって分離された別個のシグナルとして観察される。複数のペプチドコンジュゲーション種の相対的定量化を、シグナルの大きさを測定することによって行う。表22は、様々な抗体のペプチドコンジュゲーションプロファイルを示す。

【0468】

CLκを含有する抗体では、ペプチドコンジュゲーションは、0~4個のペプチド付加の分布で起こり、最大の形態は2~3個のペプチド付加である。対照的に、CLλを含む抗体、hAbλテストでは、ペプチドのコンジュゲーションは、0~4個のペプチド付加の分布で起こり、最大の形態は、1~2個のペプチド付加である。

【0469】

ペプチドコンジュゲーションの程度を、軽鎖および重鎖で別々に調査した。それぞれの試料を変性し、ジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩およびジチオトレイトールを使用して還元した。生じた遊離の軽鎖および重鎖を、LCMSを使用して分析して、それぞれのコンジュゲーション特性を決定した。様々な抗体の軽鎖および重鎖上のペプチドコンジュゲーションプロファイルを、表27に示す。2.12.1.fxおよびhAbκテスト1において、データは、コンジュゲーションの位置が軽鎖において、より多いことを実証している；軽鎖において最も豊富な形態は、1個のペプチド付加を含有する。重鎖におけるコンジュゲーションは、有意に低いレベルで観察される。h38C2-IgG1およびh38C2-IgG2においては、コンジュゲーションの匹敵するレベルが軽鎖および重鎖上で観察され、その際、軽鎖に、僅かなコンジュゲーションの優先性がある。CLλを含有する抗体（hAbλテスト；配列番号136および137）を含む）においては、コンジュゲーションの大部分は重鎖において起こり、低いレベルのコンジュゲーションが軽鎖において観察された。

【0470】

【表 2 9】

抗体	CA (%)					平均 CA	軽鎖 CA%			重鎖 CA%		
	0	1	2	3	4		0	1	2	0	1	2
2.12.1.fx	1	15	53	26	5	2.2	20	70	9	84	16	0
hAbλ テスト	10	37	37	11	6	1.66	95	5	0	74	22	4
hAbκ テスト 1	7	10	35	27	14	2.55	11	74	14	87	13	0
h38C2 IgG1	1	3	28	55	13	2.75	49	46	4	70	30	0
h38C2 IgG2	4	6	31	44	15	2.6	61	35	4	73	27	0

表 27 様々な抗体のコンジュゲーションプロファイル

10

【0 4 7 1】

それぞれの抗体 2. 1 2. 1. f x、h A b λ テストおよび h A b κ テスト 1 を、コンジュゲーションプロセスの後に評価して、その受容体結合を保持する抗体骨格の能力に対するコンジュゲーション付加の作用を決定した（天然の m A b と比較）（表 2 8）。結果は、試験抗体へのペプチドの方向性コンジュゲーションが、抗体結合を変更しないと考えられたことを示している。

【0 4 7 2】

【表 3 0】

抗体	抗原結合	
	天然(IC ₅₀ , nM)	コンジュゲーション後(IC ₅₀ , nM)
2.12.1.fx	3.2	5.7
hAbλ テスト	0.4	1.7
hAbκ テスト 1	59	53

20

表 28 コンジュゲーション前後での個々の天然抗原への抗体結合

【0 4 7 3】

(実施例 1 1)

I g G 2 - κ 抗体のペプチドコンジュゲーションプロファイル

I g G 2 - κ 抗体（h A b κ テスト 2）と 3 9 - マーペプチドとのコンジュゲーションプロファイルを分析した（配列番号 1 6 4）。抗体を 8 m g / m L に濃縮し、p H 8. 0 の 4 0 m M の H E P E S に緩衝液交換した。ペプチドを 1 0 0 % の D M S O で再懸濁し、抗体と 5. 0 : 1 のモル比で混合し、室温で一晩反応させた。すべての試料を 2 m g / m l に希釈し、サイズ排除クロマトグラフィー質量分析（S E C - M S）によって、インタクトなコンジュゲートされたタンパク質として分析して、コンジュゲート形態のタンパク質の数および定量化を決定した。この技術で、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；複数のペプチドコンジュゲーション部位は、ペプチドの質量差によって分離された別個のシグナルとして観察される。複数のペプチドコンジュゲーション種の相対的定量化を、シグナルの大きさを測定することによって行う。表 2 9 は、3 9 - マーペプチドとの h A b κ テスト 2 のペプチドコンジュゲーションプロファイルを示している。ペプチドのコンジュゲーションは、0 ~ 4 個の C A の分布で起こり、2. 0 3 個の C A の平均であり、C L κ - K ^{8 0} 上の方向性コンジュゲーションと一致する。

30

40

【0 4 7 4】

【表 3 1】

抗体骨格	結合ペプチド	%CA					平均 CA
		0	1	2	3	4	
hAbk テスト 2	39 マーペプチド	1	22	53	18	5	2.03

表 29 39 マーペプチドおよび hAbk テスト 2 のコンジュゲーションプロファイル。

【0 4 7 5】

別の実験では、39 マーペプチドを上記のとおり、MAL-PEG2-PFPと共に、h38C2-IgG2に異なるモル濃度でコンジュゲートさせた。加えて、39 マーペプチドに対する同族受容体の結合をアッセイした。示した結果（表 3 0）は、CLK-K⁸⁰での方向性コンジュゲーションと一致する。さらに、抗体 1 個当たりのペプチドの平均個数の増大は、標的への結合全体を、実質的に増大させなかった。このことは、ある種のシナリオでは、抗体 1 個当たりのコンジュゲーションの増大が標的結合を増大させないことを実証しており、本発明の利点の 1 つを実証している；抗体 1 個当たりのコンジュゲートするペプチドの数を制御することで、単位ペプチド 1 個当たりの最大の標的結合の達成を助けることができる。

【0 4 7 6】

【表 3 2】

39 マーペプチド: h38C2-IgG2 のモル比	CA (%)				コンジュゲート平均数	ペプチド標的: EC50 (nM)
	0	1	2	3		
2:1	57	32	10	0	0.52	0.99
2.5:1	19	56	25	0	1.06	1.06
4:1	20	25	35	20	1.55	1.01
5:1	0	16	45	40	2.26	0.82

表 30 39 マーペプチドおよび H38C2-IgG2 のコンジュゲーションプロファイル

【0 4 7 7】

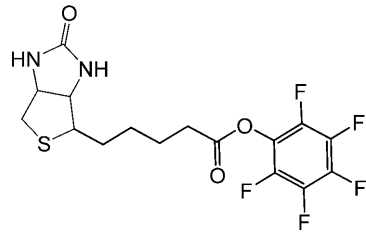
(実施例 1 2)

2. 1 2. 1. fx Fab へのビオチンのコンジュゲーション

2. 1 2. 1. fx の Fab 領域（配列番号 4 および 6 4）と PFP-ビオチンとのコンジュゲーションプロファイルを分析した。抗体 Fab を 20 mg/mL に濃縮し、pH 5. 5 の 20 mM の酢酸ナトリウム + 200 mM のトレハロースに緩衝液交換し、pH 7. 7 の 60 mM のリン酸ナトリウムでスパイクした。PFP-ビオチンを 100 % の DMSO で再懸濁し、抗体と一連のモル比で混合し、室温で一晩反応させた。すべての試料を 2 mg/mL に希釈し、サイズ排除クロマトグラフィー質量分析（SEC-MS）によって、インタクトなコンジュゲートされたタンパク質として分析して、コンジュゲート形態の数および定量化を決定した。この技術で、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；複数のコンジュゲーション部位は、コンジュゲートされたペプチドの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。複数のコンジュゲーション種の相対的定量化を、シグナルの大きさを測定することによって行う。表 3 1 は、2. 1 2. 1. fx Fab と PFP-ビオチンとのコンジュゲーションプロファイルをモル比で示している。コンジュゲーションは、モル比が増大するにつれて、0 ~ 2 個の付加の分布で起こる。抗体 1 個当たりの少ない分子の数は、使用されたモル比に基づき、先の結果と一致する。これは、反応パラメーターを変更することによって、コンジュゲーションの量を制御するためのこのプロセスの柔軟性を実証している。

【0 4 7 8】

【表 3 3】



ビオチン-PFP

結合ペプチド	ペプチド:抗体のモ ル比	%CA				平均 CA
		0	1	2	3	
ビオチン-PFP	1:1	54	46	-	-	0.46
ビオチン-PFP	1.5:1	42	51	7	-	0.65
ビオチン-PFP	2:1	34	55	10	-	0.76
ビオチン-PFP	3:1	28	55	17	-	0.88
ビオチン-PFP	4:1	21	46	26	8	1.21

表 31 2.12.1.fx Fab へのビオチンのコンジュゲーションプロファイル。

【0 4 7 9】

(実施例 1 3)

h 3 8 C 2 - I g G 1 へのビオチンのコンジュゲーション

抗体 h 3 8 C 2 - I g G 1 を 2 0 m g / m L に、p H 7 . 5 の H E P E S 緩衝液を用いて、0 . 0 2 M の最終濃度に調整した。ビオチン-PFP を、水中で 1 0 m g / m L に再構成し、h 3 8 C 2 - I g G 1 に 5 : 1 のモル比で加え、室温で 2 時間反応させた。未反応の PFP-ビオチンを、サイズ排除クロマトグラフィーによって除去し、p H 6 . 5 のヒスチジン、グリシン、およびスクロース緩衝液に緩衝液交換した。試料を 2 m g / m l に希釈し、サイズ排除クロマトグラフィー質量分析 (SEC-MS) によって、インタクトなコンジュゲートされたタンパク質として分析して、コンジュゲーション形態のタンパク質の数および定量化を決定した。表 3 2 は、h 3 8 C 2 - I g G 1 とビオチン-PFP とのコンジュゲーションプロファイルを示している。h 3 8 C 2 - I g G 1 のコンジュゲーションは、1 . 1 個のコンジュゲーションの平均で、0 ~ 3 個の CA の分布で起こる。コンジュゲーションの増大は、反応条件の最適化後に可能となるであろう。h 3 8 C 2 - I g G 1 における V H - K ^{9 9} (K a b a t ナンバリングによる K ^{9 3}) の反応性は、触媒抗体試験化合物 CATC-1 と反応させた場合、> 9 5 % であることが確認され、逆相クロマトグラフィーを介して分析された。

【0 4 8 0】

【表 3 4】

抗体	0	1	2	3	平均 CA
h38C2-IgG1	16	61	20	3	1.1

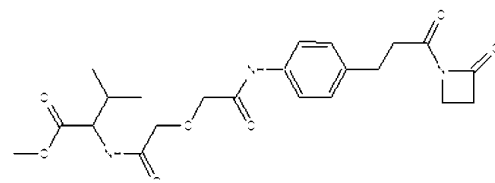


表 32: ビオチンおよび h38C2-IgG1 のコンジュゲーション。

CATC-1

【0 4 8 1】

(実施例 1 4)

2 . 1 2 . 1 . f x および C L κ - K ^{8 0}、C L κ - K ^{8 2} 変異体のコンジュゲーション

10

20

30

40

50

プロファイル

ペプチドマッピングに基づく、Y15断片中には2個のLysが存在する。活性なコンジュゲーション部位を識別するために、CLκ-K⁸⁰およびCLκ-K⁸²をRに、個々に、または組み合わせて変異させた。試験抗体の変異体、2.12.1.fxを、QuickChange部位特異的突然変異誘発キット（Stratagene（登録商標））に記載されているプロトコルに従って生成した。変異を、オリゴヌクレオチドプライマーによって導入し、DNA配列決定によって確認した。変異したmAbを、HEK293細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製したmAbを、MSを使用して特徴づけた。配列番号12、13、および14は、変異体CLκ配列を示している。

10

【0482】

抗体を、pH7.5または6.5の0.02MのHEPES緩衝液に、2mg/mLで緩衝液交換した。pHが6.5の場合、次いで、抗体をpH7.7の60mMのリン酸ナトリウムでスパイクした。[PFPP-PEG₅-K¹¹-配列番号27]を、50%のプロピレングリコールで再懸濁し、タンパク質と4.3:1のモル比で混合し、室温で一晩反応させた。すべての試料を2mg/mLに希釈し、サイズ排除クロマトグラフィー質量分析（SEC-MS）によって、インタクトなコンジュゲートされたタンパク質として分析して、コンジュゲート形態のタンパク質の数および定量化を決定した。この技術で、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；複数のコンジュゲーション部位は、コンジュゲートされたタンパク質の質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。複数のタンパク質コンジュゲーション種の相対的定量化を、シグナルの大きさを測定することによって行う。表33は、修飾されていない2.12.1.fx、2.12.1.fx-[CLκ-K⁸⁰R]（CLκ：配列番号12）、2.12.1.fx-[CLκ-K⁸²R]（CLκ：配列番号13）、および2.12.1.fx-[CLκ-K⁸⁰R-K⁸²R]（CLκ：配列番号14）のコンジュゲーションプロファイルを示している。CLκ-K⁸⁰R変異体は、コンジュゲーションの低減を示した。CLκ-K⁸²Rは、コンジュゲートされていない2.12.1.fxと同様のコンジュゲーションを有した。MAC-2のコンジュゲーションは、組合せのHEPES/リン酸緩衝液を使用することによる他のアッセイで観察されたものより低かった。

20

【0483】

30

【表35】

LC 配列番号	変異体	CA (%)					平均 CA
		0	1	2	3	4	
6	MAC-2	14	49	31	5	1	1.29
12	K80R	82	14	4	0	0	0.22
13	K82R	11	46	36	6	0	1.37
14	K80R / K82R	51	37	9	3	0	0.63

表33 2.12.1.fx、K⁸⁰およびR⁸²変異体のコンジュゲーションプロファイル

【0484】

40

（実施例15）

K⁸⁰への方向性コンジュゲーションの機構の解明

CLκ-H⁸¹側鎖は、CLκ-K⁸⁰のε-アミノ基に非常に近い。Hisは多くの場合に、プロトン移動反応に関係するので、CLκ-H⁸¹が、CLκ-K⁸⁰コンジュゲーションのために必要である可能性が非常に高い。CLκ-K⁸⁰部位特異的コンジュゲーションにおけるCLκ-H⁸¹の役割を研究するために、CLκ-H⁸¹A変異によって、イミダゾール環を除去した。部位特異的コンジュゲーションにおけるCLκ-D⁴³の役割ならびにCLκ-D⁴³およびCLκ-H⁸¹の組合せ作用を研究するために、CLκ-D⁴³AおよびCLκ-D⁴³A/H⁸¹A変異体を製造した。

【0485】

50

変異体を、QuickChange部位特異的突然変異誘発キット（Stratagene（登録商標））に記載されたプロトコルに従って生成した。変異を、オリゴヌクレオチドプライマーによって導入し、DNA配列決定によって確認した。変異したmAbを、HEK293細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製したmAbを、MSを使用して特徴づけた。次の2.12.1.f x 1 CLκ変異体を生成した：CLκ-D⁴³A（配列番号15）、CLκ-K⁸⁰A（配列番号16）、CLκ-H⁸¹A（配列番号17）、CLκ-K⁸²A（配列番号18）、およびCLκ-D⁴³A/H⁸¹A（配列番号19）。

【0486】

それぞれの抗体を、pH5.5の20mMの酢酸ナトリウム、200mMのトレハロースに20mg/mlで緩衝液交換した。次いで、タンパク質をpH7.7の60mMのリン酸ナトリウムでスパイクした。[PFPEG₅-K¹¹-配列番号27]を、50%のプロピレングリコールで再懸濁し、抗体と4.3:1のモル比で混合し、室温で一晩反応させた。すべての試料を2mg/mlに希釈し、サイズ排除クロマトグラフィー質量分析（SEC-MS）によって、インタクトなコンジュゲートされたタンパク質として分析して、コンジュゲート形態のタンパク質の数および定量化を決定した。この技術で、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定する；複数のコンジュゲーション部位は、コンジュゲートされたペプチドの質量差によって分離された個別のシグナルとして観察される。複数のペプチドコンジュゲーション種の相対的定量化を、シグナルの大きさを測定することによって行う。

【0487】

表34は、2.12.1.f x、2.12.1.f x-[CLκ-D⁴³A]、2.12.1.f x-[CLκ-K⁸⁰A]、2.12.1.f x-[CLκ-H⁸¹A]、2.12.1.f x-[CLκ-K⁸²A]、および2.12.1.f x-[CLκ-D⁴³A/H⁸¹A]変異体のコンジュゲーションプロファイルを示している。方向性コンジュゲーションを維持したCLκ-K⁸⁰Aを除いて、すべての変異体は、修飾されていない2.12.1.f x抗体と比較して、平均コンジュゲーションレベルの低下を示した。

【0488】

コンジュゲーションの程度を、軽鎖および重鎖上で別々に試験した。それぞれの試料を変性し、ジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩およびジチオトレイトールを使用して還元した。生じた遊離の軽鎖および重鎖を、LCMSを使用して分析して、それぞれのコンジュゲーションプロファイルを決した。2.12.1.f xおよび変異体上の軽鎖および重鎖上のコンジュゲーションプロファイルを表34に示す。表に記載したすべての変異体は、CLκ-K⁸⁰Aを除いて、修飾されていない2.12.1.f xと比較して軽鎖上でのコンジュゲーションレベルの低下を示した。変異体の重鎖のコンジュゲーションレベルは、修飾されていない2.12.1.f xと同様のレベルであった。個々のWT操作に対する1-LC%の%を、表34に記載されているとおり、右欄に示す。

【0489】

【表36】

LC 配列 番号	変異体	CA (%)					平均 CA	LC CA%			LC 平均 CA- LC	HC CA %			HC 平均 CA- HC	1 LC WT %
		0	1	2	3	4		0	1	2		0	1	2		
6	MAC-2	1	15	53	26	5	2.2	23	69	8	0.85	86	14	0	0.14	
15	D ⁴³ A	17	38	31	14	0	1.41	68	30	1	0.33	79	21	0	0.21	43
16	K ⁸⁰ A	56	31	10	4	0	0.61	89	11	0	0.11	91	9	0	0.09	16
17	H ⁸¹ A	34	44	17	6	0	0.95	89	11	0	0.11	78	22	0	0.22	16
18	K ⁸² A	9	7	31	37	16	2.42	8	77	15	1.06	83	17	0	0.17	111
19	D ⁴³ A/ H ⁸¹ A	34	39	18	9	0	1.02	83	17	0	0.17	87	13	0	0.13	25

表34 MAC-2ならびにK⁸⁰A、D⁴³、およびH⁸¹変異体のコンジュゲーションプロファイル

10

20

30

40

50

【0490】

(実施例16)

ラムダ/カッパ置換

hAbλテスト1中のCLλ（配列番号136および137）を、LCκで置換して、これがCL特異的コンジュゲーションのレベル、方向性、および/または制御を増大させるかを決定した。CLλ/CLκドメイン置換ハイブリッドコンストラクトを、オーバーラップPCRを使用して生成した。VLλおよびCLκを、hAbλテストおよびカッパmA b軽鎖を、別々にテンプレートとして使用してPCR増幅した。これらの2種のPCR産物をテンプレートとして混合し；hAbλテスト1フォワードプライマーおよびLCCLκリバースプライマーを、オーバーラップPCR反応中で使用して、全長のhAbλテストVL/CLκDNAを増幅した。ハイブリッド抗体コンストラクトを、HEK293細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製した抗体を、MSを使用して特徴づけた。hAbλテストCLκハイブリッドは、その同族リガンドに、天然のmA b（hAbλテスト）と同様に結合した（表35）。配列番号59、60、および61は、hAbλテスト、hAbλテスト-λκ（λJを伴う）、およびhAbλテスト-λκJ（κJを伴う）からの軽鎖定常領域である。

10

【0491】

【表37】

hAbλ テスト1 変異体	LC 配列番号	抗原への IL22 の結合の阻害(IC ₅₀ , nM)
hAbλ テスト(対照)	59	0.4
hAbλ テスト-λκ	60	0.3
hAbλ テスト-λκJ	61	0.3

20

表 35 ラムダ/カッパ置換の抗体:抗原結合

【0492】

(実施例17)

hAbλテスト1変異体：モチーフ修飾

短いモチーフ「KH」が、CLλの対応する領域でのMAC形成のために十分であることを確立するために、hAbλテスト中の残基CLλ⁸¹/⁸²の簡単な配列スイッチを有する変異体を、K⁸⁰のそばにヒスチジンに入れるために製造し、したがって「K⁸⁰S⁸¹H⁸²」は、「K⁸⁰H⁸¹S⁸²」となった。変異体を、QuickChange部位特異的突然変異誘発キット（Stratagene）に記載されたプロトコルに従って生成した。変異を、オリゴヌクレオチドプライマーによって導入し、DNA配列決定によって確認した。変異抗体コンストラクトを、HEK293細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製した抗体をMSを使用して特徴づけた。hAbλテスト- [CLλ-S⁸¹H/H⁸²S]（CL：配列番号62）変異体は、そのリガンド、さらには親hAbλテスト抗体に結合した（表36）。

30

【0493】

【表38】

40

hAbλ テスト1 変異体	LC 配列番号	リガンド結合(IC ₅₀ , nM)
hAbλ テスト(対照)	59	0.3
hAbλ テスト-S ⁸¹ H/H ⁸² S	62	0.4

表 36 hAbλテスト-S⁸¹H/H⁸²S.

【0494】

(実施例18)

hAbλ Test 1 変異体のコンジュゲーションプロファイル

50

各抗体（hAbλテスト、hAbλテスト-λκ、hAbλテスト-λκJ、およびhAbλテスト- $[CL\lambda-S^{81}H/H^{82}S]$ ）を、pH5.5の20mM酢酸ナトリウム、200mMのトレハロースに、20mg/mlで緩衝液交換した。次いで、タンパク質をpH7.7の60mMのリン酸ナトリウムでスパイクした。 $[PFPP-PEG_5-K^{11}$ -配列番号27]を、50%のプロピレングリコールで再懸濁し、抗体と4.3:1のモル比で混合し、室温で一晩反応させた。すべての試料を2mg/mlに希釈し、サイズ排除クロマトグラフィー-質量分析（SEC-MS）によって、インタクトなコンジュゲートされたタンパク質として分析して、コンジュゲート形態のタンパク質の数および定量化を決定した。この技術で、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定し；複数のペプチドコンジュゲーション部位は、ペプチドの質量差によって分離された別個のシグナルとして観察される。複数のペプチドコンジュゲーション種の相対的定量化を、シグナルの大きさを測定することによって行う。表37は、コンジュゲーションの全体のレベルが、2つのLCがスイッチされたハイブリッドにおいて増大したことを示している（λκおよびλκJ-前者はλJ断片を包含し、後者はκJ断片を包含する）。コンジュゲーションレベルは、hAbλテスト対照の平均CAを超えて増大し、1.66個から、それぞれ2.19個（λκ）および2.53個（λκJ）になった。変異体は、天然の配列と比較してほとんど影響を有さず、単独の「KH」モチーフでは、MACを形成するために十分ではないことを示唆していた。

【0495】

ペプチドコンジュゲーションの程度を、軽鎖および重鎖上で別々に試験した（表37）。各試料を変性し、ジスルフィド結合をグアニジン塩酸塩およびジチオトレイトールを使用して還元した。生じた遊離の軽鎖および重鎖を、LCMSを使用して分析して、それぞれのコンジュゲーションプロファイルを決した。還元分析において、天然のhAbλテストのLCは、5%のみの1CAを有するが、これは、hAbλテスト-λκでは58%の1CAに、かつhAbλテスト-λκJでは63%の1CAに劇的に跳ね上がる。LCスイッチは、HCコンジュゲーションのレベルにほとんど作用を有さず、これは、明らかに一定なままであった（HCコンジュゲーションが中程度に増大するλκJを除いて）。再び、変異体は、天然の配列と比較してほとんど作用を有さず、単独の「KH」モチーフではMAC形成のために十分ではないことを示唆していた。個々のWT操作に対する1-LC%の%を、表37に記載されているとおり、右欄に示す。

【0496】

【表39】

hAbλ テスト変異体	LC 配列 番号	CA (%)					平均 CA	LC CA%			平均 CA- LC	HC CA %			平均 CA- HC	1LC WT%
		0	1	2	3	4		0	1	2		0	1	2		
hAbλ テスト	59	10	37	37	11	6	1.66	95	5	0	0.05	74	22	4	0.3	
hAbλ テスト-λκ	60	3	18	43	29	7	2.19	42	58	0	0.58	78	22	0	0.22	1160
hAbλ テスト-λκJ	61	2	11	34	36	17	2.53	33	63	4	0.71	64	36	0	0.36	1260
hAbλ テスト- $S^{81}H/H^{82}S$	62	7	34	37	16	6	1.79	82	18	0	0.18	79	21	0	0.21	360

表 37 hAbλ テスト変異体のコンジュゲーションプロファイル

【0497】

これらのコンジュゲート形態の受容体結合の特質も評価して、コンジュゲートされた抗体がそのリガンドになお結合する能力に対する、 $[PFPP-PEG_5-K^{11}$ -配列番号

27] とのコンジュゲーションの作用を決定した (表 38)。

【0498】

【表 40】

配列番号 27 コンジュゲート hAbλ テスト 1 変異体	LC 配列番号	抗原への IL22 の結合の阻害 (IC ₅₀ , nM)
hAbλ テスト	59	1.7
hAbλ テスト-λκ	60	1.5
hAbλ テスト-λκJ	61	1.6
hAbλ テスト 1-S ⁸¹ H/H ⁸² S	62	1.6

表 38 抗体におけるラムダの抗体:抗原結合

【0499】

(実施例 19)

種々の脱離基を使用しての M A C の生成

活性なエステル脱離基の活性化の程度および／または構造が、方向性コンジュゲーション作用の決定において重要であることを調査するために、[P F P-P E G₂-M A L-K_{S H}^{1 1}-配列番号 27] の一連の代替活性化エステル類似体を合成した。コンジュゲート生成物の分布を、インタクトなコンジュゲートの M S によって試験し、インタクトなコンジュゲートの還元ならびに軽鎖および重鎖の分離の後に、軽鎖および重鎖の両方へのペプチド付加の程度も M S によって決定した。

【0500】

代替活性化エステルの構造および命名を、以下に示す。代替活性化ペプチドを、上記で示したものと同一戦略および方法を使用して合成した。簡単には、それぞれの活性化された基を、Z* が P F P に置き換わる新しい脱離基を表す M A L-P E G₂-Z* リンカーに組み込んだ。上記の化合物を合成するために、精製された A B P-チオールペプチド (すなわち、連結残基として K_{S H} を有する A B P) の試料 (30~40 mg) を無水の D M F (2 ml) に溶かした。M A L-P E G₂-Z* (20 mg) を、N-メチルモルホリン (5 mL) と共に加えた。反応物を攪拌し、生成物の形成の時間経過を追跡するために室温で H P L C によってモニタリングした。活性化エステルが連結された A B P 生成物への出発ペプチドの完全な転換は、2~6 時間以内に観察された。溶液を濾過し、生成物のピークを、半分取 H P L C によって直接単離した。生成物を、凍結乾燥後、約 30~50% の範囲の収率で単離した。

【0501】

コンジュゲーション反応を標準的な条件下で行った。簡単には、2.12.1. f x 溶液を pH 7.7 のリン酸ナトリウムで 0.06 M の最終濃度に希釈することによって、2.12.1. f x 抗体溶液を調製した。別に、ペプチドを 20 mg/ml までプロピレングリコールに溶かし、次いで、この溶液を水で 10 mg/ml に希釈することによって、ペプチド溶液を調製した。コンジュゲーション反応のために、ペプチドおよび抗体溶液を 4:1 のモル比で、規定された時間混合した。時間経過研究のために、コンジュゲーション反応の試料を、pH 4.0 の 40 mM のコハク酸、200 mM のグリシン (1:1、v/v) の溶液と混合することによって、コンジュゲーション溶液の試料を様々な時点でクエンチした。コンジュゲーション反応の時間経過を、H P L C によって追跡した。配列番号 27 を、例示的なペプチドとして使用した。

【0502】

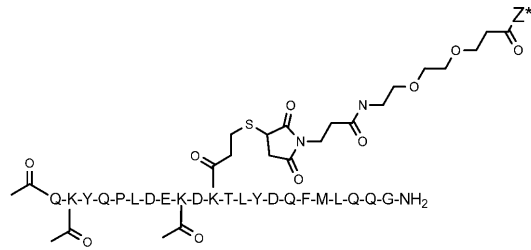
10

20

30

40

【表 4 1】

Z*-PEG₂-MAL-K_{SH}¹¹-SEQ:27

CA	Z1 PFP	Z2 2,3,4 TFP	Z3 2,3,6 TFP	Z4 2,3,6 TCP	Z5 2,6 DCP	Z6 2,4 DCN	Z7 5,7 DCQ	Z8 NH5 NB2,3 DCI	Z9 2HI 1,3 D	Z10 4NP	Z11 2,6- DFP	Z12 1 NAP
0	3	32	17	100	81	38	73	34	20	41	50	100
1	34	45	43	0	19	45	25	40	36	42	39	0
2	51	20	30	0	0	16	2	18	31	15	11	0
3	12	3	11	0	0	2	0	5	12	3	0	0

表 39 反応性エステル-24 時間目でのインタクトなコンジュゲーション

【0 5 0 3】

表 3 9 は、コンジュゲーション反応が開始してから 2 4 時間後のインタクトなコンジュゲートの最終生成物分布を示す。結果は、エステルの一部は全く反応せず（Z 4、Z 1 2）、他は鈍く反応した（例えば、Z 5）一方で、いくつかは P F P（Z 1）のプロファイルに迫るプロファイルをもたらした（例えば、Z 3）ことを示している。

【0 5 0 4】

コンジュゲーションの動態

それぞれの最終コンジュゲートについての経時的な付加速度を、表 3 9、4 0、4 1、および 4 2 に示す。0 C A は、誘導体化されていない 2 . 1 2 . 1 . f x 抗体を表す一方で、1 C A、2 C A、または 3 C A は、それぞれの試験時点での 2 . 1 2 . 1 . f x 抗体への 1、2、または 3 個のペプチドの付加を表す。

【0 5 0 5】

【表 4 2】

0CA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
時間 (h)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6- DFP	1 nap
0	84	97	94	100	100	100	100	95	95	96	100	100
1	5	83	58	100	100	95	96	43	24	79	93	100
2	4	75	40	100	100	89	93	42	20	67	88	100
4	4	62	27	100	96	81	88	40	20	54	79	100
24	3	32	17	100	81	38	73	34	20	41	50	100

表 40 0CA をもたらす種々の Z* 基のコンジュゲーションの動態

【0 5 0 6】

10

20

30

40

【表 4 3】

1CA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
時間 (h)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6- DFP	1 nap
0	16	3	6	0	0	0	0	5	5	5	0	0
1	38	17	36	0	0	5	4	39	39	21	8	0
2	37	25	45	0	0	11	7	39	38	29	12	0
4	33	34	43	0	4	19	12	42	39	37	21	0
24	34	45	43	0	19	45	25	40	36	42	39	0

表 41 1CA をもたらす種々の Z^{*}基のコンジュゲーションの動態

【 0 5 0 7】

【表 4 4】

2CA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
時間 (h)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6- DFP	1 nap
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	49	0	6	0	0	0	0	15	27	0	0	0
2	50	0	14	0	0	0	0	16	30	4	0	0
4	52	4	25	0	0	0	0	15	29	9	0	0
24	51	20	30	0	0	16	2	18	31	15	11	0

表 42 2CA をもたらす種々の Z^{*}基のコンジュゲーションの動態

【 0 5 0 8】

【表 4 5】

3CA	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12
時間 (h)	PFP	2,3,4 TFP	2,3,6 TFP	2,3,6 TCP	2,6 DCP	2,4 DCN	5,7 DCQ	NH5 NB2,3 DCI	2HI 1,3 D	4NP	2,6- DFP	1 nap
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	8	0	0	0	0	0	0	3	11	0	0	0
2	10	0	2	0	0	0	0	3	12	0	0	0
4	12	0	5	0	0	0	0	4	12	0	0	0
24	12	3	11	0	0	2	0	5	12	3	0	0

表 43 3CA をもたらす種々の Z^{*}基のコンジュゲーションの動態

【 0 5 0 9】

軽鎖および重鎖の分布

それぞれの代替活性化エステルについてのペプチドコンジュゲーションの程度を、軽鎖および重鎖について別々に試験した。それぞれの試料を変性し、ジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩およびジチオトレイトールを使用して還元した。生じた遊離の軽鎖および重鎖を、LCMSを使用して分析して、それぞれのコンジュゲーションプロファイルを設定した。2. 12. 1. fxおよび変異体の軽鎖および重鎖上のペプチドコンジュゲーションプロファイルを、表 4 4 に示す。同様のコンジュゲーションレベルを示した 2, 3, 6-トリフルオロフェニル (Z3) を除いて、表に列挙したほとんどすべての活性化ペプチドは、PFP (Z1) を使用する化合物と比較して、軽鎖上のコンジュゲーションレベルの低下を示した。N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) から誘導された活性化されたエステル、すなわち、N-ヒドロキシルー 5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボン酸イミドおよび 2-ヒドロキシルーイソインドリン-1, 3-ジオン (Z8 および Z9) は、重鎖の誘導体化に対してより大きな傾向を示した。

【 0 5 1 0】

10

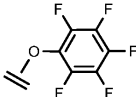
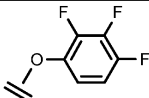
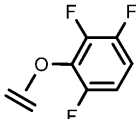
20

30

40

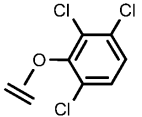
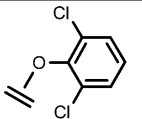
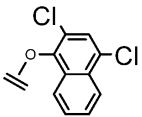
50

【表 4 6 - 1】

Z* #	Z* 名称	Z* 構造	コンジュゲーション付加物の時間経過 [太字以外は 24 時間で分離]	24 時間目でのコンジ ュゲーションの低下																																										
1	ペン タ フル オ ロ フ ェ ニ ル		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><td>0</td><td>84</td><td>5</td><td>4</td><td>4</td><td>3</td></tr><tr><td>1</td><td>16</td><td>38</td><td>37</td><td>33</td><td>34</td></tr><tr><td>2</td><td>0</td><td>49</td><td>50</td><td>52</td><td>51</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td><td>8</td><td>10</td><td>12</td><td>12</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	84	5	4	4	3	1	16	38	37	33	34	2	0	49	50	52	51	3	0	8	10	12	12	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>L+ 2CA</th></tr><tr><td>30</td><td>64</td><td>7</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>94</td><td>6</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	L+ 2CA	30	64	7	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	94	6	-
CA	0	1	2	4	24																																									
0	84	5	4	4	3																																									
1	16	38	37	33	34																																									
2	0	49	50	52	51																																									
3	0	8	10	12	12																																									
LC	LC+ 1CA	L+ 2CA																																												
30	64	7																																												
HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																																												
94	6	-																																												
2	2,3,4-ト リフル オロ-フ ェニル		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><td>0</td><td>97</td><td>83</td><td>75</td><td>62</td><td>32</td></tr><tr><td>1</td><td>3</td><td>17</td><td>25</td><td>34</td><td>45</td></tr><tr><td>2</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>4</td><td>20</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>3</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	97	83	75	62	32	1	3	17	25	34	45	2	0	0	0	4	20	3	0	0	0	0	3	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>L+ 2CA</th></tr><tr><td>59</td><td>41</td><td>-</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>94</td><td>6</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	L+ 2CA	59	41	-	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	94	6	-
CA	0	1	2	4	24																																									
0	97	83	75	62	32																																									
1	3	17	25	34	45																																									
2	0	0	0	4	20																																									
3	0	0	0	0	3																																									
LC	LC+ 1CA	L+ 2CA																																												
59	41	-																																												
HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																																												
94	6	-																																												
3	2,3,6-ト リフル オロ-フ ェニル		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><td>0</td><td>94</td><td>58</td><td>40</td><td>27</td><td>17</td></tr><tr><td>1</td><td>6</td><td>36</td><td>45</td><td>43</td><td>43</td></tr><tr><td>2</td><td>0</td><td>6</td><td>14</td><td>25</td><td>30</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td><td>5</td><td>11</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	94	58	40	27	17	1	6	36	45	43	43	2	0	6	14	25	30	3	0	0	2	5	11	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>L+ 2CA</th></tr><tr><td>30</td><td>64</td><td>7</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>90</td><td>10</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	L+ 2CA	30	64	7	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	90	10	-
CA	0	1	2	4	24																																									
0	94	58	40	27	17																																									
1	6	36	45	43	43																																									
2	0	6	14	25	30																																									
3	0	0	2	5	11																																									
LC	LC+ 1CA	L+ 2CA																																												
30	64	7																																												
HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																																												
90	10	-																																												

【 0 5 1 1】

【表 4 6 - 2】

4	2,3,6-トリクロロ-フェニル		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><td>0</td><td>100</td><td>100</td><td>100</td><td>100</td><td>100</td></tr><tr><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>2</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	100	100	100	100	100	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>L+ 2CA</th></tr><tr><td>95</td><td>5</td><td>-</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>100</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	L+ 2CA	95	5	-	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	100	-	-
CA	0	1	2	4	24																																									
0	100	100	100	100	100																																									
1	0	0	0	0	0																																									
2	0	0	0	0	0																																									
3	0	0	0	0	0																																									
LC	LC+ 1CA	L+ 2CA																																												
95	5	-																																												
HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																																												
100	-	-																																												
5	2,6 ジクロロ-フェニル		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><td>0</td><td>100</td><td>100</td><td>100</td><td>96</td><td>81</td></tr><tr><td>1</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>4</td><td>19</td></tr><tr><td>2</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	100	100	100	96	81	1	0	0	0	4	19	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>L+ 2CA</th></tr><tr><td>89</td><td>11</td><td>-</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>100</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	L+ 2CA	89	11	-	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	100	-	-
CA	0	1	2	4	24																																									
0	100	100	100	96	81																																									
1	0	0	0	4	19																																									
2	0	0	0	0	0																																									
3	0	0	0	0	0																																									
LC	LC+ 1CA	L+ 2CA																																												
89	11	-																																												
HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																																												
100	-	-																																												
6	2,4DiClナフタレン		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><td>0</td><td>100</td><td>95</td><td>89</td><td>81</td><td>38</td></tr><tr><td>1</td><td>0</td><td>5</td><td>11</td><td>19</td><td>45</td></tr><tr><td>2</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>16</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	100	95	89	81	38	1	0	5	11	19	45	2	0	0	0	0	16	3	0	0	0	0	2	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>L+ 2CA</th></tr><tr><td>66</td><td>34</td><td>-</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>95</td><td>5</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	L+ 2CA	66	34	-	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	95	5	-
CA	0	1	2	4	24																																									
0	100	95	89	81	38																																									
1	0	5	11	19	45																																									
2	0	0	0	0	16																																									
3	0	0	0	0	2																																									
LC	LC+ 1CA	L+ 2CA																																												
66	34	-																																												
HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																																												
95	5	-																																												

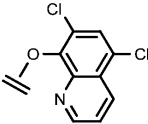
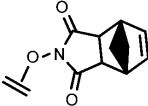
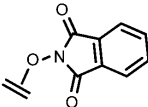
10

20

30

【 0 5 1 2 】

【表 4 6 - 3】

7	5,7-ジクロロキノリン-8-イル		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><td>0</td><td>100</td><td>96</td><td>93</td><td>88</td><td>73</td></tr><tr><td>1</td><td>0</td><td>4</td><td>7</td><td>12</td><td>25</td></tr><tr><td>2</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	100	96	93	88	73	1	0	4	7	12	25	2	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>L+ 2CA</th></tr><tr><td>92</td><td>8</td><td>-</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>95</td><td>5</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	L+ 2CA	92	8	-	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	95	5	-
CA	0	1	2	4	24																																									
0	100	96	93	88	73																																									
1	0	4	7	12	25																																									
2	0	0	0	0	2																																									
3	0	0	0	0	0																																									
LC	LC+ 1CA	L+ 2CA																																												
92	8	-																																												
HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																																												
95	5	-																																												
8	N-ヒドロキシル-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボン酸イミド		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><td>0</td><td>95</td><td>43</td><td>42</td><td>40</td><td>38</td></tr><tr><td>1</td><td>5</td><td>39</td><td>39</td><td>42</td><td>40</td></tr><tr><td>2</td><td>0</td><td>15</td><td>16</td><td>15</td><td>18</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td><td>3</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	95	43	42	40	38	1	5	39	39	42	40	2	0	15	16	15	18	3	0	3	3	4	5	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>L+ 2CA</th></tr><tr><td>77</td><td>23</td><td>-</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>82</td><td>18</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	L+ 2CA	77	23	-	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	82	18	-
CA	0	1	2	4	24																																									
0	95	43	42	40	38																																									
1	5	39	39	42	40																																									
2	0	15	16	15	18																																									
3	0	3	3	4	5																																									
LC	LC+ 1CA	L+ 2CA																																												
77	23	-																																												
HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																																												
82	18	-																																												
9	2-ヒドロキシル-インドリン-1,3-ジオン		<table><tr><th>CA</th><th>0</th><th>1</th><th>2</th><th>4</th><th>24</th></tr><tr><td>0</td><td>95</td><td>24</td><td>20</td><td>20</td><td>20</td></tr><tr><td>1</td><td>5</td><td>39</td><td>38</td><td>39</td><td>36</td></tr><tr><td>2</td><td>0</td><td>27</td><td>30</td><td>29</td><td>31</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td><td>11</td><td>12</td><td>12</td><td>12</td></tr></table>	CA	0	1	2	4	24	0	95	24	20	20	20	1	5	39	38	39	36	2	0	27	30	29	31	3	0	11	12	12	12	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>L+ 2CA</th></tr><tr><td>70</td><td>30</td><td>-</td></tr><tr><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>50</td><td>50</td><td>-</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	L+ 2CA	70	30	-	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	50	50	-
CA	0	1	2	4	24																																									
0	95	24	20	20	20																																									
1	5	39	38	39	36																																									
2	0	27	30	29	31																																									
3	0	11	12	12	12																																									
LC	LC+ 1CA	L+ 2CA																																												
70	30	-																																												
HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																																												
50	50	-																																												

10

20

30

【 0 5 1 3 】

【表 4 6 - 4】

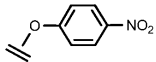
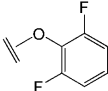
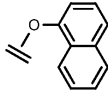
10	4-ニトロ-フェニル		CA	0	1	2	4	24	LC	LC+ 1CA	L+ 2CA
			0	96	79	67	54	41			
			1	5	21	29	37	42			
			2	0	0	4	9	15			
			3	0	0	0	0	3			
11	2,6-ジフルオロ-フェニル		CA	0	1	2	4	24	68	32	-
			0	100	93	88	79	50			
			1	0	8	12	29	39			
			2	0	0	0	0	11			
			3	0	0	0	0	0			
12	1-ナフチル		CA	0	1	2	4	24	92	8	-
			0	100	100	100	100	100			
			1	0	0	0	0	0			
			2	0	0	0	0	0			
			3	0	0	0	0	0			

表 44 活性化エステルの結果のまとめ

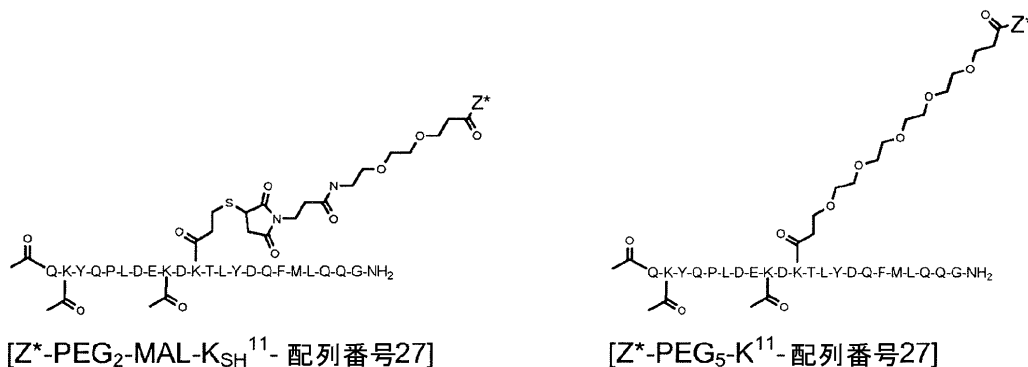
【0 5 1 4】

(実施例 20)

代替活性化エステルのさらなる例を、表 4 5 に示す。P F P エステルのいくつかの類似体のコンジュゲーションの時間経過を試験した。P F P 中のフッ素基の数および位置を低減することによって、より反応性の低い活性なエステルの形態を合成することができ、調査した。2, 3, 5, 6-テトラフルオロフェニルエステルおよび 2, 4, 6-トリフルオロフェニルエステルの両方を、[PEG₂-MAL-K_{SH}^{1 1}-配列番号 27] へのコンジュゲーション後に試験した。1-ヒドロキシルーピロリジン-2, 5-ジオン (NHS) を、[PEG₂-MAL-K_{SH}^{1 1}-] にコンジュゲートさせた。

【0 5 1 5】

【化 7 4】



10

20

30

40

50

2時間のコンジュゲーションの後に、これらのより低く活性化された形態は、PFPよりも低い2.12.1.f_xに対する全体コンジュゲーションをもたらした。NHS基も、より低い全体コンジュゲーションを示した。NHSおよびPFPを含有するペプチドは、2.12.1.f_xにコンジュゲートされた。還元された形態を、2時間目での分布を観察するために分析した。PFPは、1-ヒドロキシルーピロリジン-2,5-ジオン(NHS)(LCには全体で31%、ただし重鎖には全体で34%)と比較して、軽鎖の誘導体化について、はるかに大きい傾向(LCには全体で77%、重鎖には6%のみ)を示した。

【0516】

【表 4 7】

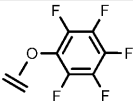
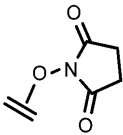
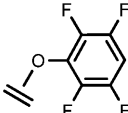
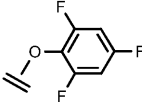
	名称	構造	2 時間目での CA	活性エステル-2 時間目でのコンジュゲーションの還元分析																								
1	ペンタフルオロフェニル		<table><tr><th>CA</th><th>2 hr</th></tr><tr><td>0</td><td>3</td></tr><tr><td>1</td><td>40</td></tr><tr><td>2</td><td>42</td></tr><tr><td>3</td><td>14</td></tr><tr><td>4</td><td>1</td></tr></table>	CA	2 hr	0	3	1	40	2	42	3	14	4	1	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>LC+ 2CA</th><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>23</td><td>72</td><td>5</td><td>94</td><td>6</td><td>0</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	LC+ 2CA	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	23	72	5	94	6	0
CA	2 hr																											
0	3																											
1	40																											
2	42																											
3	14																											
4	1																											
LC	LC+ 1CA	LC+ 2CA	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																							
23	72	5	94	6	0																							
13	1-ヒドロキシル-ピロリジン-2,5-ジオン (NHS)		<table><tr><th>CA</th><th>2 hr</th></tr><tr><td>0</td><td>18</td></tr><tr><td>1</td><td>44</td></tr><tr><td>2</td><td>24</td></tr><tr><td>3</td><td>12</td></tr><tr><td>4</td><td>3</td></tr></table>	CA	2 hr	0	18	1	44	2	24	3	12	4	3	<table><tr><th>LC</th><th>LC+ 1CA</th><th>LC+ 2CA</th><th>HC</th><th>HC+ 1CA</th><th>HC+ 2CA</th></tr><tr><td>70</td><td>28</td><td>3</td><td>66</td><td>31</td><td>3</td></tr></table>	LC	LC+ 1CA	LC+ 2CA	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA	70	28	3	66	31	3
CA	2 hr																											
0	18																											
1	44																											
2	24																											
3	12																											
4	3																											
LC	LC+ 1CA	LC+ 2CA	HC	HC+ 1CA	HC+ 2CA																							
70	28	3	66	31	3																							
14	2,3,5,6-テトラフルオロフェニル		<table><tr><th>CA</th><th>2 hr</th></tr><tr><td>0</td><td>21</td></tr><tr><td>1</td><td>44</td></tr><tr><td>2</td><td>29</td></tr><tr><td>3</td><td>5</td></tr><tr><td>4</td><td>2</td></tr></table>	CA	2 hr	0	21	1	44	2	29	3	5	4	2													
CA	2 hr																											
0	21																											
1	44																											
2	29																											
3	5																											
4	2																											
15	2,4,6-トリフルオロフェニル		<table><tr><th>CA</th><th>2 hr</th></tr><tr><td>0</td><td>80</td></tr><tr><td>1</td><td>27</td></tr><tr><td>2</td><td>2</td></tr><tr><td>3</td><td>0</td></tr><tr><td>4</td><td>0</td></tr></table>	CA	2 hr	0	80	1	27	2	2	3	0	4	0													
CA	2 hr																											
0	80																											
1	27																											
2	2																											
3	0																											
4	0																											

表 45 代替活性化エステル-さらなる例

【0517】

化合物 Z 1 ~ Z 1 5 は、様々な異なる構造の種類の活性なエステルを表す。これは、芳香環の周りに異なる数およびパターンのフッ素原子の置換を有する一連のフッ素化された芳香族の活性なエステル（化合物 Z 1、Z 2、Z 3、Z 1 1、Z 1 4、および Z 1 5）を考慮し、これらの構造が、タンパク質の誘導体化のためのその反応性および傾向にどのような影響を及ぼすかを考慮することを啓発している。これらの誘導体の抗体コンジュゲーションの動態は、ペンタフルオロフェニル（Z 1）の反応が完了している 2 時間の時点で好都合に比較することができる。環の周りでのフッ素置換のレベルが上昇するにつれて、

10

20

30

40

50

全体のコンジュゲーションレベルは上昇し、それに随伴して、未反応抗体が減少する。反応の速度は、フッ素化されたフェノール脱離基の pK_a に直接関係し、その際、最も酸性のフェノールがより高い反応速度をもたらす。コンジュゲーションの速度は、 $Z1 > Z14 > Z3 > Z15 > Z2 > Z11$ である。フッ素置換パターンの些少の影響は、化合物 $Z2$ 、 $Z3$ 、および $Z15$ を比較することによって観察することができる。

【0518】

活性なエステルの構造も、コンジュゲーション反応の方向性に有意に影響を及ぼした。一般的に、フッ素化された芳香族エステルは、軽鎖誘導体化（先に記述したとおり主として $CLK-K^{80}$ ）に対する顕著な傾向を示した。対照的に、 N -ヒドロキシスクシンイミド誘導体をベースとするいくつかのエステル（ $Z8$ 、 $Z9$ 、および $Z13$ ）は、より低い優先性を示し、その際、多くの場合に、より高いレベルの重鎖誘導体化が観察された。

【0519】

（実施例21）

$MAC-1$ （ペプチドと PFP 活性化基との間に PEG_2 - MAL -メルカプトプロピオニルリンカー）と $MAC-2$ （ペプチドと PFP 活性化基との間に直鎖 PEG_5 リンカー）とでコンジュゲーションの速度を評価した。表46は、 $2.12.1x$ に対して、これらの活性化されたペプチドを比較している。結果は、これらの活性化されたペプチドは、これらの僅かに異なるリンカーの構造にもかかわらず、誘導体化の速度および程度の点においてかなり同様の行動をとることを示している。

【0520】

【表48】

インタクトな 時間(min)	MAC-2					MAC-1				
	OCA	1CA	2CA	3CA	4CA	OCA	1CA	2CA	3CA	4CA
0	72	27	1	0	0	82	18	1	0	0
10	26	56	17	1	0	29	49	20	2	0
20	13	53	29	5	0	15	47	33	5	0
30	9	51	32	8	1	9	43	40	8	0
40	7	45	39	9	1	8	41	41	8	2
50	6	43	39	11	1	7	41	42	9	2
60	5	41	40	11	2	6	36	45	11	2
70	4	40	40	14	2	6	35	46	11	2
80	3	38	44	14	2	5	36	47	10	2
90	4	37	45	13	1	6	35	46	12	2
100	4	40	41	13	2	6	35	46	11	2
110	3	40	42	14	1	6	34	46	12	3
120	4	37	44	13	1	5	35	46	12	2

表 46 $MAC-1$ と $MAC-2$ との間でのコンジュゲーションの比較

【0521】

（実施例22）

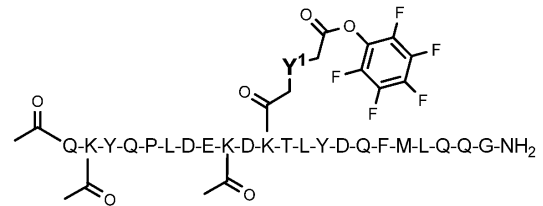
リンカーの長さの作用

異なる長さのリンカーを有することによる最終コンジュゲート分布プロファイルに対する作用を試験した。ペプチドを PFP 基に接合する種々の PEG 長さのリンカーを用いて、化合物を合成した。0、1、2、3、および4個のペプチドの $2.12.1.f x$ への付加についての結果を、表47にまとめる。概して、 PEG リンカーの長さを変化させることは一般的に、得られるコンジュゲートの分布にほとんど作用を有さなかった。

【0522】

【表 4 9】

$Y^1 =$					
	CA (%)				
n	0	1	2	3	4
2	8	39	44	8	0
3	6	34	47	10	2
5	4	37	44	13	1
7	4	35	49	11	0
9	3	28	49	19	2
13	3	32	54	10	0
17	6	37	51	7	0
21	4	43	45	5	2
25	11	44	38	7	0



10

実施例 21 の化合物の構造

2.12.1.fx を[PFP-PEG_n-K¹¹-配列 27]にコ
ンジュゲートさせた

表 47 リンカーの長さの作用

【0 5 2 3】

20

(実施例 2 3)

代替ペプチド配列のコンジュゲーション

他のペプチド配列への本発明の適用可能性を確認するために、配列番号 8 0 および配列番号 8 1 (テストペプチド-1 および-2) をコンジュゲートさせた。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号 2 7] との反応のために先に最適化した条件下で、配列番号 8 0 および 8 1 を [PFP-PEG₅] と、次いで、2. 1 2. 1. fx とコンジュゲートさせた。コンジュゲーションプロファイルおよび LC/HC コンジュゲーションの分析の結果を表 4 8 に示す。配列番号 8 0 および配列番号 8 1 は両方とも、軽鎖に対する方向性コンジュゲーションを示した。LC/HC 分布をさらに分析すると、約 7 0 % の LC の誘導体化および HC では 1 0 % 未満の誘導体化で、MAC-2 のプロファイルと同様のプロファイルが観察された。

30

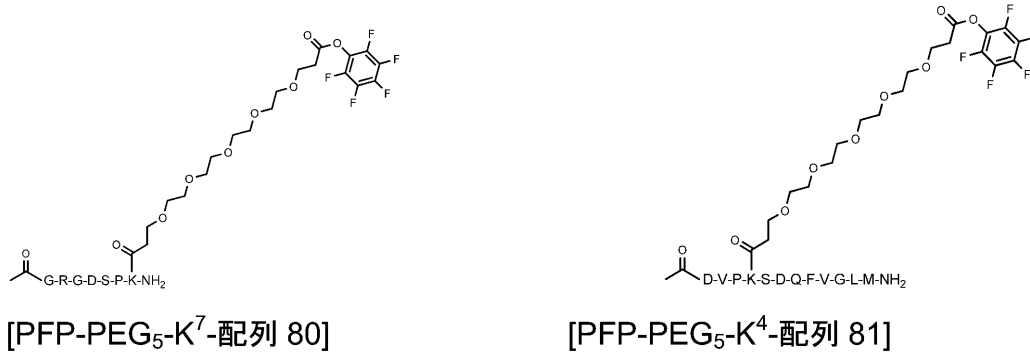
【0 5 2 4】

【表 5 0】

配列番号	% CA					LC %CA			HC %CA		
	0	1	2	3	4	LC	LC + 1	LC + 2	HC	HC + 1	HC + 2
27	2	24	55	17	3	24	65	11	91	9	-
80	11	39	43	8	0	32	68	-	95	5	-
81	8	35	48	10	0	29	71	-	94	6	-

表 48 配列番号 80 および配列番号 81 のコンジュゲーションプロファイル

10



20

【 0 5 2 5】

(実施例 2 4)

ペプチドコンジュゲーションの分析のまとめ

ペプチドマッピング実験を、抗体の軽鎖上の C L κ - K ^{8 0} での方向性コンジュゲーションへと導く重要なパラメーターを確認する目的で、ある範囲のタンパク質／コンジュゲートの組合せについて行った。表 4 9 に、行ったペプチドマッピング実験の結果を列挙する。各研究パラメーターのために、先に記載したペプチドマッピング手順を使用した。「***」は、C L κ - K ^{8 0} に対する高いレベルの方向性コンジュゲーションを示す。「**」およびより低い程度に対する「*」は、方向性コンジュゲーションはまだ観察されるが、より遅い反応条件、より少ない全体コンジュゲーション、または一方の軽鎖のみにおける平均などの差を示すことができ、したがって、抗体 1 個当たり 0. 5 ～ 1. 5 個のペプチドを有する M A C を生成するなどの特殊な状況（例えば）には、より適し得ることを示す。「—」は、これらの反応条件が、C L κ - K ^{8 0} での方向性コンジュゲーションに対して好ましいとは考えられないことを示す。

30

【 0 5 2 6】

C L κ - K ^{8 0} が、M A C - 2 では方向性コンジュゲーションの位置であると観察されたので、別のパラメーターでのペプチドマッピング研究は、この位置に焦点を合わせた。それぞれの研究のパラメーターについての詳細なペプチドマッピングデータは包含されていないが、しかし、他の K 残基では有意なコンジュゲーションレベルは観察されず、他の M A C の観察は、C L κ - K ^{8 0} における方向性コンジュゲーションと一致した。

40

【 0 5 2 7】

2. 1 2. 1. f x の C L κ - K ^{8 0} R および C L κ - K ^{8 0} A の変異は、この部位での方向性コンジュゲーションの喪失をもたらし；この特異的残基の本質的な役割を示唆していた。C L κ - K ^{8 2} R および C L κ - K ^{8 2} A の変異は、C L κ - K ^{8 0} に対する方向性コンジュゲーションを妨害せず、なおこれを増大させ得る。試験された他の研究パラメーターのうち、軽鎖定常領域のサブタイプの少なくとも一部は、方向性コンジュゲーションに対して有意な影響を有することが観察された；軽鎖サブタイプカッパの少なくとも一部は、必要であると決定された。C L λ サブタイプへのコンジュゲーション（例示的な λ 含有抗体、h A b λ テスト 1 を使用）は、方向性コンジュゲーションを実証しなかった

50

。hAbλテスト1のLCλをCLκに変異させると、K⁸⁰における方向性コンジュゲーションは回復された。

【0528】

【表51】

抗体	LC	変異/ 差 対 MAC1/2	配列番号	リンカー	Z*	方向性コン ジュゲーション
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	PFP	***
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₅	PFP	***
2.12.1.fx Fab	κ		27	PEG ₅	PFP	***
h38C2-IgG1	κ		27	PEG ₅	PFP	***
h38C2-IgG2	κ		27	PEG ₅	PFP	***
hAbλ テスト	λ	K ⁸⁰ SH	27	PEG ₅	PFP	-
hAbκ テスト1	κ		27	PEG ₅	PFP	***
hAbκ テスト3	κ		39 マー	PEG ₅	PFP	***
hAbλ テスト	λκ		27	PEG ₅	PFP	***
hAbλ テスト	λκJ		27	PEG ₅	PFP	***
2.12.1.fx	κ	K ⁸⁰ R	27	PEG ₅	PFP	-
2.12.1.fx	κ	K ⁸² R	27	PEG ₅	PFP	***
2.12.1.fx	κ	K ⁸⁰ R/R ⁸² R	27	PEG ₅	PFP	-
2.12.1.fx	κ	D ⁴³ A	27	PEG ₅	PFP	**
2.12.1.fx	κ	K ⁸⁰ A	27	PEG ₅	PFP	-
2.12.1.fx	κ	H ⁸¹ A	27	PEG ₅	PFP	-
2.12.1.fx	κ	K ⁸² A	27	PEG ₅	PFP	***
2.12.1.fx	κ	D ⁴³ A/H ⁸¹ A	27	PEG ₅	PFP	-
hAbλ テスト1	λ	S ⁸¹ H/H ⁸² S	27	PEG ₅	PFP	-
2.12.1.fx	κ		39 マー	PEG ₅	PFP	***
2.12.1.fx	κ		80	PEG ₅	PFP	***
2.12.1.fx	κ		81	PEG ₅	PFP	***
h38C2-IgG2	κ		39 マー	PEG ₅	PFP	***
2.12.1.fx Fab	κ		ビオチン	PEG ₅	PFP	***
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	PFP	***
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	2,3,4 TFP (2)	**
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	2,3,6 TFP (3)	**
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	2,3,6 TCP (4)	-
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	2,6 DCP (5)	-
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	2,4 DCN (6)	*
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	5,7 DCQ (7)	-
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	NH-5-N2,3DI (8)	*
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	2Hi1,3 DIO (9)	*
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	4NP (10)	**
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	2,6 DFP (11)	**
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	NAP (12)	-
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	1HP 2,5D (13)	*
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	2,3,5,6 TFP (14)	**
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	2,4,6 TFP (15)	**
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	スクアラート	*
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂ -MAL	AZD	*
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂₋₁₇	PFP	***
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₁₇₋₂₁	PFP	**
2.12.1.fx	κ		27	PEG ₂₅	PFP	**

表: 49 CLκ-K⁸⁰での方向性コンジュゲーションのまとめ

【0529】

(実施例25)

CLκ-D⁷⁷の試験

3D構造においてCLκ-K⁸⁰に地理的に近い残基を試験した。当初の結晶構造分析は、CLκ-D⁷⁷が、CLκ-K⁸⁰方向性コンジュゲーションに対して影響を有し得るCLκ-K⁸⁰との塩橋を形成し得る可能性を示唆した。CLκ-K⁸⁰へのコンジュ

10

20

30

40

50

ゲーションに対するCLκ-D⁷⁷の作用を研究するために、CLκ-D⁷⁷を2.12.1.f_x抗体上でCLκ-A⁷⁷に変異させて、2.12.1.f_x-[CLκ-D⁷⁷A]（配列番号37のCLκ）を作成した。CLκ-D⁷⁷A変異を、QuickChange部位特異的突然変異誘発キット（Stratagene（登録商標））に記載されているプロトコルに従って抗体軽鎖上で生成した。変異をオリゴヌクレオチドプライマーによって導入し、DNA配列決定によって確認した。2.12.1.f_x-[CLκ-D⁷⁷A]を、HEK293細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製したmAbを、MSを使用して特徴づけた。

【0530】

2.12.1.f_xおよび2.12.1.f_x-[CLκ-D⁷⁷A]（反応サイズは1mg）を18mg/mlに、pH7.7にリン酸緩衝液を用いて、0.06Mのリン酸ナトリウム最終濃度に調整した。例示的な試験ペプチドリンカー対[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号27]をプロピレングリコール溶液中で10mg/mlに再構成した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号27]を抗体に4.3:1のモル比で加え、室温で2時間反応させた。コンジュゲート生成物を2mg/mlに希釈し、SEC-MSによって、インタクトなコンジュゲートされたタンパク質として分析して、コンジュゲート形態のタンパク質の数および定量化を決定した。複数のペプチドリンカーコンジュゲーション種の相対的定量化を、シグナルの大きさを測定することによって行った。

【0531】

表50は、[2.12.1.f_x]-[PEG₅-K¹¹-配列番号27]および[2.12.1.f_x-[CLκ-D⁷⁷A]-[PEG₅-K¹¹-配列番号27]のコンジュゲーションプロファイルと比較している。[2.12.1.f_x]-[PEG₅-K¹¹-配列番号27]のコンジュゲーションプロファイルは、0~4個のペプチド付加の分布として、最大形態は2個のペプチド付加であるように起こり、ペプチドの付加の平均個数は2.16個である。骨格タンパク質において残基CLκ-D⁷⁷をCLκ-A⁷⁷に変異させた場合のプロファイル変化；ペプチド付加の平均個数は2.38個に上昇し、かなり少ない単一ペプチド付加が観察される。この結果は、単一の点突然変異CLκ-D⁷⁷Aは、骨格に対する全体コンジュゲーションを増大させる効果を有することを示唆している。両方の条件において、反復分析（n=3）は、観察されたコンジュゲーションプロファイルは再現可能であることを実証している。

【0532】

ペプチドコンジュゲーションの程度を2.12.1.f_xおよび2.12.1.f_x-[CLκ-D⁷⁷A]の軽鎖および重鎖で別々に試験した。生成したMACを変性し、ジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩およびジチオトレイトールを使用して還元した。生じた遊離の軽鎖および重鎖を、LCMSを使用して分析して、それぞれのコンジュゲーションプロファイルを決した。表50は、平均コンジュゲーションが、2.12.1.f_x-[CLκ-D⁷⁷A]の軽鎖において、2.12.1.f_xの軽鎖よりも多いこと；2.12.1.f_x-[CLκ-D⁷⁷A]での平均コンジュゲート付加値が、2.12.1.f_xでの0.85個と比較すると1.15個であることを実証している。加えて、コンジュゲートされていない軽鎖は、2.12.1.f_x-[CLκ-D⁷⁷A]では検出されない。重鎖上でのコンジュゲーションは、かなり低いレベルで観察される。2.12.1.f_xおよび2.12.1.f_x-[CLκ-D⁷⁷A]の両方について、観察された重鎖の大部分はコンジュゲートされていない；このことは特に、2.12.1.f_x-[CLκ-D⁷⁷A]重鎖の場合に当てはまる。これらの結果は、CLκ-D⁷⁷A変異は、軽鎖を、それが有意によりコンジュゲートされやすいように変更することを示唆している。複数の科学者によるこの実験の反復分析を、コンジュゲーションのプロファイルが一貫しており、再現可能であることを実証する表50に示す。

【0533】

【表 5 2】

Ab	Ab % CA					平均 CA	LC % CA			平均 CA	HC % CA		平均 CA
	0	1	2	3	4		0	1	2		0	1	
WT													
Rep1	1	17	56	22	4	2.11	21	72	7	0.86	86	14	0.14
Rep2	2	14	54	25	5	2.18	25	67	8	0.83	85	15	0.15
Rep3	2	13	55	25	6	2.2	23	69	8	0.85	85	15	0.15
Av.Rep	2	15	55	24	5	2.16	23	69	8	0.85	85	15	0.15
StdDev	1	2	1	2	1	0.05	2	3	1	0.02	1	1	0.01
D ⁷⁷ A													
Rep1	5	4	54	30	8	2.32	0	84	16	1.16	94	6	0.06
Rep2	6	4	43	36	12	2.44	0	85	15	1.15	94	6	0.06
Rep3	3	3	56	31	7	2.37	0	86	14	1.14	94	6	0.06
AvRep	5	4	51	32	9	2.38	0	85	15	1.15	94	6	0.06
StdDev	2	1	7	3	3	0.06	0	1	1	0.01	0	0	0.00

表 50 Abs2.12.1.fx(WT)および 2.12.1.fx-[CLK-D⁷⁷A]に対する[PEG₅-K¹¹-配列 27]のコンジュゲーションの分析。Rep=反復。AvReps は、3 回の反復実験の結果の平均であり、その下に標準偏差(StdDev)が示されている。Ab%CA は、抗体 1 個当たりのコンジュゲーション付加の%を示しており、その次は、抗体 1 個当たりの平均 CA である。還元された軽鎖および重鎖の分析も、鎖 1 つ当たりの個々の平均 CA と共に示されている。CLK-D⁷⁷A は、天然 CLK と比較すると、1CA 種の LC%の 123%の率を示している。

【0 5 3 4】

(実施例 2 6)

2. 1 2. 1. f x - [C L κ - D^{7 7} A] - [配列番号 2 7 - K^{1 1} - P E G 5] の重鎖および軽鎖基準生成物のペプチドマッピング特徴づけ

2. 1 2. 1. f x - [C L κ - D^{7 7} A] - [P E G₅ - K^{1 1} - 配列番号 2 7] コンジュゲート抗体を、ジチオスレイトールで還元し、システイン残基を、ヨードアセトアミドでのカルボキシメチル化によってアルキル化した。キモトリプシンをタンパク分解性消化のために使用した。溶液中の消化された断片を、LCMS を使用して分析した。個々の断片を C 1 8 の H P L C カラムで分離し、それらの正確な質量を Q - T o F 質量分析計で測定した。生じた断片の質量を使用して、修飾されていない断片または [P E G₅ - K^{1 1} - 配列番号 2 7] コンジュゲーション基で修飾された断片を同定した。この実験は、リシン残基を含有し、したがって、ペプチドコンジュゲーションのための可能な部位であるキモトリプシン断片に焦点を当てることによって解釈された。表 5 1 および 5 2 は、それぞれ重鎖および軽鎖上のそのような断片すべてを列挙している。空白の項目は、この技術を使用して検出されなかった断片である。[P E G₅ - K^{1 1} - 配列番号 2 7] 修飾物質と共に観察された検出された断片は、ペプチドコンジュゲーションの潜在的部位であると考えられる。

【0 5 3 5】

2 個の [P E G₅ - K^{1 1} - 配列番号 2 7] - コンジュゲーション断片を、2. 1 2. 1. f x - [C L κ - D^{7 7} A] - [P E G₅ - K^{1 1} - 配列番号 2 7] 生成物の LCMS ペプチドマッピングを使用して検出した。これらのコンジュゲート断片は両方とも、2. 1 2. 1. f x - [C L κ - D^{7 7} A] 抗体の軽鎖上に存在した。これに対して、[P E G₅ - K^{1 1} - 配列番号 2 7] にコンジュゲートされた 8 個の断片が、2. 1 2. 1. f x - [P E G₅ - K^{1 1} - 配列番号 2 7] では検出された。

【0 5 3 6】

総じて、これらの結果は、C L κ - D^{7 7} A 変異体におけるコンジュゲーションレベル

が、より僅かなコンジュゲーション部位で上昇することを示唆しており、変異されていない抗体に対してコンジュゲーション特異性の増大をおそらく示唆している。さらに、構造分析は、CLκ-D⁷⁷残基が、同定された主なコンジュゲーション部位CLκ-K⁸⁰の近接(<10 Å)にあることを示している。おそらく塩橋である静電相互作用が、CLκ-D⁷⁷のカルボン酸とCLκ-K⁸⁰の第一級アミンとの間に存在し得ることが推量された。CLκ-D⁷⁷A変異は、そのような静電相互作用を破壊して、CLκ-K⁸⁰上の反応性アミンをより露出させて、本発明の反応性エステルとコンジュゲーションしやすいものとするのであろう。精巧なモデリングと結びつけられる後続の分析は、より完全な反応部位の画像を構成するために役立ち、CLκ-D⁷⁷がその作用を主に、CLκ-H⁸¹とのその相互作用を介して発揮することを示しているが、CLκ-D⁷⁷とCLκ-K⁸⁰との間の相互作用の当初の仮定は、CLκ-D⁷⁷残基の重要性を裏打ちする際に役立った。

10

【0537】

2. 12. 1. fx-[CLκ-D⁷⁷A]-[PEG₅-K¹¹配列: 27]生成物において観察されたコンジュゲーション部位は、軽鎖キモトリプシン断片Y3およびY15である。これらの断片についてのシグナル強度の分析は、CLκ-K⁸⁰残基を持つ断片Y15が主なコンジュゲーション部位であることを示唆している。断片Y15は、[PEG₅-K¹¹配列番号27]-修飾断片として、非常に高いシグナル強度(1118572カウント、表52)で観察されるに過ぎないが、Y15の修飾されていない形態は観察されず、このことは、すべて、またはほぼすべてのY15の断片が、修飾された形態で存在することを示唆している。断片Y3は、[PEG₅-K¹¹配列番号27]-修飾された形態および修飾されていない形態の両方で観察された；2. 12. 1. fx-[PEG₅-K¹¹配列番号27]および2. 12. 1. fx-[CLκ-D⁷⁷A]-[PEG₅-K¹¹配列番号27]における修飾されていないY3のシグナル強度は、15%以内である。[PEG₅-K¹¹配列番号27]-修飾Y3は、相対的に低いレベル(9737カウント、表52)で観察された。

20

【0538】

表51および52についての表の項目を以下に説明する：

断片番号：N末端からのキモトリプシン断片ナンバリング；接合された断片（すなわち、Y1～2）は、欠損した開裂部位を示す。

30

始点／終点：N末端からの断片位置のナンバリング。

断片質量(Da)：ダルトンで記載された断片の理論的質量。

保持時間(対照／分析物)：LCMSペプチドマッピング実験におけるクロマトグラフィーの保持／溶離の時間。

MSシグナル強度(対照／分析物)：MSによって観察された観察シグナルの大きさ。

質量誤差-ppm(対照／分析物)：ペプチド断片の理論質量と観察質量との比較；ゼロ(0)に近い値は、良好な質量確度を実証している。保持時間、MSシグナル強度、および質量誤差についての対照タンパク質は、2. 12. 1. fx-[CLκ-D⁷⁷A]であり、それぞれの場合の分析物であるタンパク質は、2. 12. 1. fx-[CLκ-D⁷⁷A]+[PEG₅-K¹¹配列番号27]である。

40

修飾物質：断片に対する潜在的共有結合的付加；リシン残基の[PEG₅-K¹¹配列番号27]-抗体結合ペプチド、CAM-システイン残基のカルボキシメチル化。

【0539】

【表 5 3 - 1】

断片番号	開始	終了	断片質量(Da)	保持時間		MS シグナル強度		質量誤差(ppm)		修飾物質
				対照	分析物	対照	分析物	対照	分析物	
Y1	1	27	2617.3533							
Y1-2	1	29	2865.4695							
Y5-6	34	47	1657.8398							
Y6	37	47	1253.688	19.2	19.2	516640	548267	1.9	0	
Y6-7	37	50	1602.8518	22.1	22.1	26537	31229	-1.6	-2	
Y8-9	51	68	1931.9337	16.5	16.5	60894	82459	-2.2	0.5	
Y9	61	68	878.461	11.3	11.4	376224	403402	0	-0.3	
Y9-10	61	80	2241.1501							
Y10	69	80	1380.6997	13.3	13.3	261813	286406	-1.1	0.3	
Y10-011	69	94	2972.4661							
Y19-20	111	157	4748.2773							
Y20	116	157	4160.0405							
Y20-21	116	166	5202.5527							
Y20-21*	116	166	5316.5957	34.1	34.1	6445	8275	0.5	-5.7	CAM(2)
Y24-25	202	245	4702.2109							
Y25	207	245	4151.9722							
Y25*	207	245	4437.0796	20.9	20.9	1495322	1771622	1.1	0.7	CAM(5)
Y25-26	207	279	7985.9092							
Y26	246	279	3851.9478							
Y26-27	246	281	4152.0698							
Y28-29	282	300	2245.1128							
Y29	283	300	2082.0493	14.6	14.6	20665	18618	-0.6	-0.2	
Y29-30	283	304	2531.2405							
Y31-32	305	323	2241.1907							
Y32	318	323	722.3599	7.9	7.9	93966	81618	0.1	3	

表 51 2.12.1.fx-[CLK-D⁷⁷A]-[PEG₆-K¹¹]-配列 27]重鎖基準生成物のペプチドマッピング特徴づけ

【表 5 3 - 2】

断片番号	開始	終了	ペプチド質量(Da)	保持時間		MS シグナル強度		質量誤差(ppm)		修飾物質
				対照	分析物	対照	分析物	対照	分析物	
Y32	318	323	722.3599	17.7	18.4	37943	11371	11.4	27.1	
Y32	318	323	722.3599	18.4		11761		23.8		
Y32-33	318	353	4028.188							
Y33	324	353	3323.8386	20		5422		3.1		
Y33*	324	353	3380.8601	19.7	19.7	2196329	2374835	-2.5	-3.8	CAM(1)
Y33-34	324	376	5883.1577							
Y34	354	376	2577.3293							
Y34-35	354	385	3637.8159							
Y34-35*	354	385	3694.8374	33	33	10095	10026	1.9	-2	CAM(1)
Y36-37	386	408	2527.0808							
Y37	396	408	1394.6388	19.6	19.6	62942	65871	-0.9	-1.6	
Y37-38	396	409	1541.7072	25.1	25.1	827336	874876	0	-3.8	
Y39-40	410	421	1494.8195							
Y40	412	421	1218.672	15.8	15.8	77917	78774	-0.3	0.2	
Y40-41	412	427	1891.9905	20.3	20.3	107513	150305	0.2	0.1	
Y42-43	428	450	2525.1792							
Y43	441	450	1016.5502							

表 51 続き 2.12.1.fx-[CLK-D⁷⁷A]-[PEG₅-K¹¹-配列 27]重鎖基準生成物のペプチドマッピング特徴づけ(続き)

【表 5 4】

断片番号	開始	終了	ペプチド質量(Da)	保持時間		MS シグナル強度		質量誤差(ppm)		修飾物質
				対照	分析物	対照	分析物	対照	分析物	
Y2-3	36	49	1688.9725	16.2	16.2	145374	172582	-1.7	-1.1	
Y3	37	49	1525.9093	15.5	15.5	331068	390175	-2.7	-2.4	
Y3*	37	49	3218.7593		24		9737		-6.8	[SEQ:27-K11-PEG5](1)
Y3-4	37	62	2882.6355							
Y9-10	88	116	3244.729							
Y10	99	116	1871.0992							
Y10-11	99	139	4331.335							
Y11	117	139	2478.2463		22.8		61217		-1.7	
Y11*	117	139	2535.2678		21.5		5127		-16.8	CAM(1)
Y11-12	117	148	3635.8445							
Y12	140	148	1175.6088							
Y12-13	140	173	3886.8245							
Y13	149	173	2729.2263	13.1	13.1	1140556	1153543	-1.1	-1.8	
Y13-14	149	186	4051.9346							
Y14	174	186	1340.7188							
Y14-15	174	192	2125.1418							
Y15	187	192	802.4337	7.5		275639		-1.9		
Y15*	187	192	2495.2837		20.9		1118572		-6.3	[SEQ:27-K11-PEG5](1)
Y15-16	187	209	2574.29							
Y16	193	209	1789.8668	18.7		5400		4.4		
Y16*	193	209	1846.8883	18.1	18.1	169490	246823	-1.7	-2.2	CAM(1)
Y16-17	193	214	2349.0842	17.8		9211		0.1		

表 52 2.12.1.fx-[CLκ-D⁷⁷A]-[PEG₅-K¹¹-配列 27]軽鎖基準生成物のペプチドマッピング特徴づけ

【 0 5 4 2 】

(実施例 2 7)

C L κ - D ^{7 7} 変異の試験

10

20

30

40

50

2. 12. 1. fx抗体のCLκ-D⁷⁷残基を、CLκ-D⁷⁷A変異に加えて、他の18種のアミノ酸にそれぞれ変異させた。CLκ-D⁷⁷G（配列番号38）、CLκ-D⁷⁷L（配列番号40）、CLκ-D⁷⁷S（配列番号49）、CLκ-D⁷⁷E（配列番号53）、およびCLκ-D⁷⁷R（配列番号54）ならびに変異体を、Quick Change部位特異的突然変異誘発キット（Stratagene（登録商標））に記載されているプロトコルに従って生成した。変異を、オリゴヌクレオチドプライマーによって導入し、DNA配列決定によって確認した。CLκ-D⁷⁷部位での他の13種の変異体（CLκ-D⁷⁷V（配列番号39）、CLκ-D⁷⁷I（配列番号41）、CLκ-D⁷⁷P（配列番号42）、CLκ-D⁷⁷F（配列番号43）、CLκ-D⁷⁷W（配列番号44）、CLκ-D⁷⁷Y（配列番号45）、CLκ-D⁷⁷H（配列番号46）、CLκ-D⁷⁷M（配列番号47）、CLκ-D⁷⁷C（配列番号48）、CLκ-D⁷⁷T（配列番号50）、CLκ-D⁷⁷Q（配列番号51）、CLκ-D⁷⁷N（配列番号52）、CLκ-D⁷⁷K（配列番号55））を、Quick PCR Cloning Kit（BPS Bioscience）に記載されているプロトコルに従って生成した。変異を、オリゴヌクレオチドプライマーによって導入し、BglIIおよびNheIでカットされた修飾p2. 12. 1. fxP4ベクター（Invitrogen）にクローニングした。挿入DNAを、DNA配列決定により確認した。変異させたmAbをHEK293細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製したmAbを、MSを使用して特徴づけた。

10

【0543】

20

2. 12. 1. fxおよび2. 12. 1. fx変異体を18mg/mlに、pH7. 7にリン酸緩衝液を用いて、0. 06Mのリン酸ナトリウムの濃度に調整した。[PFPP-EG₅-K¹¹-配列番号27]をプロピレングリコール溶液中で、10mg/mlに再構成した。ペプチド/リンカーを抗体に、4. 3: 1のモル比で加え、室温で2時間反応させた。

【0544】

表53に、CLκ-D⁷⁷変異体の全体コンジュゲーションプロファイルに記載する。CLκ-D⁷⁷Cは、遊離システインの導入によって凝集し、結果を解釈することができなかった。変異CLκ-D⁷⁷W、CLκ-D⁷⁷M、CLκ-D⁷⁷H、CLκ-D⁷⁷Q、CLκ-D⁷⁷N、およびCLκ-D⁷⁷Vは、野生型2. 12. 1. fxと比較して、全体コンジュゲーションプロファイルを変化させなかった。変異CLκ-D⁷⁷F、CLκ-CLκ-D⁷⁷K、CLκ-D⁷⁷Y、およびCLκ-D⁷⁷Eは、コンジュゲーションの全体レベルを低下させた。変異CLκ-D⁷⁷P、CLκ-D⁷⁷I、CLκ-D⁷⁷T、CLκ-D⁷⁷R、CLκ-D⁷⁷L、CLκ-D⁷⁷S、およびCLκ-D⁷⁷Gは、コンジュゲーションレベルを上昇させた。

30

【0545】

還元されたLCおよびHCの分析は、変異CLκ-D⁷⁷F、CLκ-D⁷⁷K、CLκ-D⁷⁷Y、CLκ-D⁷⁷E、およびCLκ-D⁷⁷Cのみが、軽鎖におけるコンジュゲーションレベルの低下をもたらすことを示した。軽鎖におけるコンジュゲーションレベルは、CLκ-D⁷⁷M、CLκ-D⁷⁷H、CLκ-D⁷⁷Q、CLκ-D⁷⁷N、CLκ-D⁷⁷W、およびCLκ-D⁷⁷Vでは上昇した（そして、重鎖におけるコンジュゲーションはやや低下した）。変異CLκ-D⁷⁷P、CLκ-D⁷⁷I、CLκ-D⁷⁷T、CLκ-D⁷⁷R、CLκ-D⁷⁷L、CLκ-D⁷⁷S、およびCLκ-D⁷⁷Gは、コンジュゲートされていない軽鎖のレベルの低下によって、軽鎖におけるコンジュゲーションのレベルを上昇させた。CLκ-D⁷⁷Kは、潜在的なコンジュゲーション部位である別のリシンの導入によって、軽鎖における2コンジュゲートのレベルを上昇させた。

40

【0546】

【表 5 5】

Ab	Ab % CA					平均 CA	LC % CA			平均 CA	HC % CA		平均 CA	1LC WT %
	0	1	2	3	4		0	1	2		0	1		
WT	1	16	54	24	4	2.14	19	69	13	0.94	88	12	0.12	
D ⁷⁷ R	6	12	41	26	15	2.33	8	87	5	0.96	94	6	0.06	126
D ⁷⁷ L	5	5	53	28	10	2.33	1	88	11	1.11	91	9	0.09	127
D ⁷⁷ E	8	27	39	18	8	1.90	32	57	10	0.78	84	16	0.78	82
D ⁷⁷ S	5	6	47	29	12	2.36	0	92	8	1.08	94	6	0.06	133
D ⁷⁷ G	7	7	44	28	13	2.34	0	91	9	1.09	92	8	0.08	131
WT	2	24	50	21	3	1.99	24	66	10	0.85	90	10	0.1	
D ⁷⁷ Q	2	10	78	10		1.96	15	81	4	0.88	96	4	0.04	122
D ⁷⁷ P	3	4	63	24	7	2.26	5	88	7	1.02	96	4	0.04	133
D ⁷⁷ K	9	30	36	17	8	1.84	34	45	21	0.86	93	7	0.07	68
D ⁷⁷ N	3	8	79	11		1.98	11	83	6	0.94	96	4	0.04	125
D ⁷⁷ Y	28	41	19	11		1.14	54	42	4	0.51	89	11	0.11	63
D ⁷⁷ V	6	10	63	21		1.98	13	79	9	0.96	95	5	0.05	119
D ⁷⁷ I	3	4	63	24	7	2.27	6	85	9	1.03	93	7	0.07	128
D ⁷⁷ T	3	11	59	18	9	2.17	8	88	4	0.97	95	5	0.05	133
WT	4	30	44	20	3	1.88	28	63	10	0.82	89	11	0.11	
D ⁷⁷ M	4	15	67	14		1.90	16	81	3	0.87	96	4	0.04	132
D ⁷⁷ F	21	42	24	13		1.29	54	42	4	0.49	86	14	0.14	66
D ⁷⁷ H	5	16	60	19		1.92	16	75	9	0.93	94	6	0.06	119
WT	5	36	47	12		1.66	30	60	10	0.8	90	10	0.1	
D ⁷⁷ W	8	29	46	18		1.73	20	75	4	0.84	91	9	0.09	125
D ⁷⁷ C							60	37	2	0.42	95	5	0.05	61

表 53 代替アミノ酸に対する CLκ-D⁷⁷ 変異体のコンジュゲーション分析(コンジュゲーション反応中に使用されたタンパク質量に従って、またはコンジュゲーション反応を異なる時間に開始させたために、データを表内で分割している)。0.5 および 0.25mg/ml で操作した試験でのコンジュゲーションレベルの低下は、低レベルの抗体によるものであった。Ab%CA は、抗体 1 個当たりのコンジュゲーション付加の%を示しており、その次は、抗体 1 個当たりの平均 CA である。還元された軽鎖および重鎖の分析も、鎖 1 つ当たりの個々の平均 CA と共に示されている。個々の WT 操作に対する 1-LC%の%を右欄に示す:例えば、81 の D⁷⁷Q;1-LC%値は、その実験操作での 69 の個々の WT 1-LC%の 126%である。D⁷⁷M、D⁷⁷F および D⁷⁷H(0.5mg)を包含する操作ならびに D⁷⁷W および D⁷⁷C(0.25mg)を包含する操作を除いて、すべての試料を 1mg の Ab で試験した。

【0 5 4 7】

(実施例 2 8)

コンジュゲーションに対する、C H κ 領域への他の変異の作用

C L κ - D ^{7 7} A に加えて、C L κ - K ^{8 0} から 1 0 Å 距離内の他の残基をアラニンに変異させた: C L κ - K ^{4 1} A (配列番号 2 0)、V ^{4 2} A (配列番号 2 1)、C L κ - D ^{4 3} A (配列番号 5 6)、C L κ - N ^{4 4} A (配列番号 2 2)、C L κ - L ^{4 6} A (配列番号 2 3)、C L κ - Q ^{4 7} A (配列番号 2 4)、C L κ - S ^{4 8} A (配列番号 2 5)、C L κ - N ^{5 0} A (配列番号 2 6)、C L κ - L ^{7 3} A (配列番号 2 8)、C L κ - S ^{7 4} A (配列番号 2 9)、C L κ - K ^{7 5} A (配列番号 3 0)、C L κ - Y ^{7 8} A (配列

10

20

30

40

50

番号31)、CLκ-E^{7 9}A(配列番号32)、CLκ-H^{8 1}A(配列番号33)、CLκ-V^{8 3}A(配列番号34)、CLκ-Y^{8 4}A(配列番号35)、およびCLκ-R^{1 0 3}A(配列番号36)もAlaに変異させた。CLκ-D^{4 3}AおよびCLκ-H^{8 1}Aのデータは実施例14において検討している。

【0548】

三方向連結法(three way ligation method)を使用して、L^{7 3}A変異体を、2.12.1.fx-CLκに導入した。2.12.1.fx-LCの5'末端に特異的なプライマー(2.12.1.fx.LC.FOR:配列番号85)および所望のL^{7 3}A変異を含有するリバースプライマー(L181A.REV:配列番号88)を使用して、2.12.1.fx-LC DNAをPCRテンプレートとして使用して、2.12.1.fx-LCの最初の半分をPCRした。次いで、このPCR断片を、制限酵素BglIIおよびBsaIを使用して消化した。2.12.1.fx-LCの3'末端に特異的なリバースプライマー(2.12.1.fx.LC.REV:配列番号86)と対になっているCLκ-L^{7 3}A変異(L181A.FOR:配列番号87)を含有するフォワードプライマーを使用して、2.12.1.fx-LC DNAをPCRテンプレートとして使用して、変異を有する2.12.1.fx-LC DNA断片の後の半分をPCR増幅した。次いで、このPCR断片を、制限酵素BsaIおよびNheIを使用して消化した。2つの制限酵素で消化されたPCR断片を、BglIIおよびNheIでカットされた修飾p2.12.1.fxP4プラスミド(Invitrogen(登録商標))と連結させた。挿入配列をDNA配列決定によって確認した。2.12.1.fx-[CLκ-L^{7 3}A](すなわち、配列番号28を含む)をHEK293細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製したmAbを、MSを使用して特徴づけた。

【0549】

CLκ-V^{4 2}AおよびCLκ-K^{7 5}A変異体をオーバーラップPCRを使用して生成した。変異をオリゴヌクレオチドプライマーによって導入した。所望の変異を有するリバースプライマーと対になっている2.12.1.fx-LC(2.12.1.fx.LC.FOR)の5'末端に特異的なプライマー、および2.12.1.fx軽鎖の3'末端に特異的なリバースプライマーと対になっている所望の変異を有するフォワードプライマー(2.12.1.fx.LC.FOR)を使用して、2.12.1.fx-LCをテンプレートとして使用して、2.12.1.fx-LC DNA断片をPCR増幅した。これら2種のPCR生成物を、テンプレートとして混合し;2.12.1.fx-LCフォワードプライマーおよびリバースプライマーを、オーバーラップPCR反応において使用して、所望の変異を有する全長2.12.1.fx-LC DNAを増幅した。次いで、PCRを制限酵素BglIIおよびNheIで消化した。消化されたPCRを、BglIIおよびNheIでカットされた修飾p2.12.1.fxP4プラスミド(Invitrogen(登録商標))と連結させた。挿入配列をDNA配列決定によって確認した。変異させたmAbをHEK293細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製したmAbを、MSを使用して特徴づけた。

【0550】

他の変異体を、2.12.1.fx-LCにおいて、QuickChange部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene(登録商標))に記載されているプロトコルに従って生成した。変異を、オリゴヌクレオチドプライマーによって導入し、DNA配列決定によって確認した。変異したmAbを、HEK293細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製したmAbを、MSを使用して特徴づけた。

【0551】

2.12.1.fxおよび2.12.1.fx変異体(反応サイズは1mg)を18mg/mlに、pH7.7にリン酸緩衝液を用いて、0.06Mのリン酸ナトリウム最終濃度に調整した。[PFP-PEG₅-K^{1 1}-配列番号27]をプロピレングリコール溶

10

20

30

40

50

液中で10mg/mlに再構成した。ペプチド／リンカーを抗体に4.3:1のモル比で加え、室温で2時間反応させた。

【0552】

表54は、2.12.1.f_x-[PEG₅-K¹¹-配列番号27]のコンジュゲーションプロファイルと2.12.1.f_x-[CL_κ-変異体]-[PEG₅-K¹¹-配列番号27]のコンジュゲーションプロファイルと比較している。2.12.1.f_x-[PEG₅-K¹¹-配列番号27]のコンジュゲーションプロファイルは、0~4個のペプチド付加の分布として起こり、その際、最多の形態は2個のペプチド付加である。残基をAlaに骨格タンパク質において変異させると、プロファイルが変化する；[PEG₅-K¹¹-配列番号27]付加の平均個数は、それらの対応する2.12.1.f_x-[PEG₅-K¹¹-配列番号27]対照と比較すると、低下するか（CL_κ-V⁴²A、CL_κ-L⁴⁶A、CL_κ-S⁷⁴A、CL_κ-Y⁷⁸AおよびCL_κ-Y⁸⁴A）、または増大した（CL_κ-Q⁴⁷A、CL_κ-N⁵⁰A、およびCL_κ-D⁷⁷A/E⁷⁹Aの二重変異体）。CL_κ-D⁷⁷A/E⁷⁹AのコンジュゲーションプロファイルをCL_κ-E⁷⁹Aのコンジュゲーションプロファイルと比較すると、抗体に対する平均[PEG₅-K¹¹-配列番号27]付加の有意な増大は、主にCL_κ-D⁷⁷A変異によるものである。

10

【0553】

[PEG₅-K¹¹-配列番号27]コンジュゲーションの程度を、2.12.1.f_xおよび2.12.1.f_x-[CL_κ-変異体]の軽鎖および重鎖で別々に試験した。MACを変性し、ジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩およびジチオトレイトールを使用して還元した。生じた遊離の軽鎖および重鎖を、LCMSを使用して分析して、それぞれのコンジュゲーションプロファイルを決定した。表54は、2.12.1.f_x-[CL_κ-Q⁴⁷A]および[CL_κ-N⁵⁰A]の軽鎖上の1CAが、2.12.1.f_xにおいてよりも多いことを実証している。平均CAは、2.12.1.f_x抗体の0.78個と比較して、0.84個および0.85個である。CL_κ-Q⁴⁷AおよびCL_κ-N⁵⁰A変異体は両方とも、2.12.1.f_x野生型抗体の59%の1CAと比較して、70%超の1CAを有する。加えて、これら2種の変異体のコンジュゲートされていない軽鎖のレベルは、野生型抗体の31%から、22%および19%へと低下した。V⁴²Aは、軽鎖コンジュゲーションのレベルを低下させた。平均軽鎖CAは0.45個であり、59%のコンジュゲートされていない軽鎖および37%の1CAである。個々のWT操作に対する1-LC%の%を、表54に記載されているとおり、右欄に示す。

20

30

【0554】

[PEG₅-K¹¹-配列番号27]へのCL_κ-V⁴²A、CL_κ-Q⁴⁷A、およびCL_κ-N⁵⁰Aのコンジュゲーションを繰り返し、結果を表の下部に示す。CL_κ-Q⁴⁷AおよびCL_κ-N⁵⁰Aにおける軽鎖コンジュゲーションのレベルの上昇と、CL_κ-V⁴²Aにおける軽鎖コンジュゲーションの減少を、インタクトおよび還元の両方のLC-MS分析によって確認した。概して、コンジュゲーションデータは、CL_κ-V⁴²、CL_κ-D⁴³、およびCL_κ-H⁸¹がすべて、CL_κ-K⁸⁰でのPFP方向性コンジュゲーションについて影響を有することを示唆している。

40

【0555】

【表 5 6】

Ab	AB % CA					平均 CA	LC % CA			平均 CA	HC % CA		平均 CA	1LC WT %
	0	1	2	3	4		0	1	2		0	1		
WT	5	40	43	10	2	1.63	31	59	9	0.78	90	10	0.1	
K ⁴¹ A	6	32	49	10	2	1.70	28	65	7	0.78	90	10	0.1	110
V ⁴² A	26	45	21	8		1.11	59	37	4	0.45	90	10	0.1	63
N ⁴⁴ A	9	37	40	10	4	1.6	31	63	6	0.75	93	7	0.07	107
L ⁴⁶ A	14	42	35	9		1.4	35	62	3	0.68	95	5	0.05	105
Q ⁴⁷ A	6	27	53	9	4	1.78	22	73	5	0.84	95	5	0.05	124
S ⁴⁸ A	6	34	46	9	4	1.72	34	59	7	0.73	93	7	0.07	100
N ⁵⁰ A	4	23	56	13	4	1.89	19	76	4	0.85	95	5	0.05	129
L ⁷³ A	12	36	33	13	7	1.69	41	55	3	0.62	87	13	0.13	93
S ⁷⁴ A	11	42	39	7		1.43	35	61	5	0.7	96	4	0.04	103
K ⁷⁵ A	12	38	41	9		1.48	35	62	3	0.68	93	7	0.07	105
D ⁷⁷ A														
-E ⁷⁹ A	3	7	71	15	4	2.1	5	87	8	1.04	95	5	0.05	147
V ⁸³ A														
-	9	35	39	11	6	1.7	33	61	6	0.73	86	14	0.14	103
WT	2	23	49	22	4	2.03	34	60	5	0.71	81	19	0	
E ⁷⁹ A	6	13	51	24	6	2.12	21	73	6	0.86	85	15	0	122
R ¹⁰³ A	4	18	51	20	6	2.06	23	70	7	0.83	82	18	0	117
WT	1	17	51	25	5	2.16	14	77	9	0.96	84	16	0.16	
D ⁷⁷ A	4	6	60	23	7	2.23	0	86	13	1.13	92	8	0.08	112
V ⁴² A	13	28	29	21	9	1.86	49	42	9	0.61	86	14	0.14	55
Q ⁴⁷ A	6	7	58	21	9	2.2	8	85	7	0.99	91	9	0.09	110
N ⁵⁰ A	7	8	51	25	9	2.2	10	81	9	0.99	90	10	0.1	105

表 54 軽鎖 K⁸⁰ の 10 Å 以内でのアミノ酸変異体を示す、[配列 27-K¹¹-PEG5]にコンジュゲートされている 2.12.1.fx バリエーションのコンジュゲーション分析。Ab%CA は、抗体 1 個当たりのコンジュゲーション付加の%を示しており、その次は、抗体 1 個当たりの平均 CA である。還元された軽鎖および重鎖の分析も、鎖 1 つ当たりの個々の平均 CA と共に示されている。個々の WT 操作に対する 1-LC%の%を、表 53 に記載されているとおり、右欄に示す。

【0 5 5 6】

(実施例 2 9)

C L κ - D ^{4 3} A および C L κ - H ^{8 1} A 変異体の分析

C L κ - D ^{4 3} の電荷、水素結合、またはサイズが、C L κ - K ^{8 0} 方向性コンジュゲーションにとって重要であるかを決定するために、C L κ - D ^{4 3} を C L κ - D ^{4 3} E (配列番号 1 0 7)、C L κ - D ^{4 3} N (配列番号 1 0 8)、および C L κ - D ^{4 3} L (配列番号 1 0 9) にそれぞれ変異させた。変異体を、2. 1 2. 1. f x 抗体軽鎖で Q u i c k C h a n g e 部位特異的突然変異誘発キット (S t r a t a g e n e (登録商標)) に記載されているプロトコルに従って生成した。変異を、オリゴヌクレオチドプライマーによって導入し、DNA 配列決定によって確認した。変異させた m A b を、H E K 2 9 3 細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質 A 親和カラムを使用して精製した。精製した m A b を、M S を使用して特徴づけた。

【0 5 5 7】

同様に、C L κ - H ^{8 1} の役割を評価するために、試験抗体 2. 1 2. 1. f x の次の変異体バージョンを評価した：C L κ - H ^{8 1} N (配列番号 1 1 0)、C L κ - H ^{8 1} Q (配列番号 1 1 1)、C L κ - H ^{8 1} Y (配列番号 1 1 2)、C L κ - H ^{8 1} W (配列番

号 1 1 3)、および C L κ-H^{8 1}F (配列番号 1 1 4)。

【0 5 5 8】

2. 1 2. 1. f x 抗体および 2. 1 2. 1. f x-[C L κ-変異体]-抗体 (反応サイズは 1 m g) を 1 8 m g / m l に、p H 7. 7 にリン酸緩衝液を用いて、0. 0 6 M のリン酸ナトリウム最終濃度に調整した。[P F P-PEG₅-K^{1 1}-配列番号 2 7] をプロピレングリコール溶液中で 1 0 m g / m l に再構成した。ペプチド / リンカーを抗体に 4. 3 : 1 のモル比で加え、室温で 2 時間反応させた。

【0 5 5 9】

C L κ-D^{4 3}N は、野生型抗体と比較すると、同様の全体コンジュゲーションおよび軽鎖レベルを有する (表 5 5)。C L κ-D^{4 3}E および C L κ-D^{4 3}L は、全体コン

10

【0 5 6 0】

C L κ-H^{8 1}N、C L κ-H^{8 1}Q、C L κ-H^{8 1}Y、C L κ-H^{8 1}W、および C L κ-H^{8 1}F 変異体は、全体コンジュゲーションレベル、軽鎖コンジュゲーションレベルの低下を示し、このことは、イミダゾール環が、P F P 方向性コンジュゲーションには必要であることを示唆している。コンジュゲーション反応は、π-スタッキング相互作用にも、イミダゾール環の N ε 2 または N δ 1 で形成される H 結合にも関係していない。

【0 5 6 1】

【表 5 7】

Ab	Ab % CA					平均 CA	LC % CA			平均 CA	HC % CA			平均 CA	1LC WT %
	0	1	2	3	4		0	1	2		0	1	2		
WT	2	23	49	22	4	2.03	34	60	5	0.71	81	19	0	0.19	
D ⁴³ N	7	24	39	21	8	2.00	34	59	7	0.73	84	16	0	0.16	98
D ⁴³ L	14	33	34	19	0	1.57	55	40	5	0.50	74	26	0	0.26	67
D ⁴³ E	9	33	37	17	4	1.75	44	48	8	0.63	74	26	4	0.34	80
H ⁸¹ N	32	41	20	7	0	1.04	84	16	0	0.16	70	26	5	0.35	27
H ⁸¹ Q	29	40	21	11	0	1.14	82	17	1	0.19	73	27	0	0.27	28
H ⁸¹ Y	27	40	24	8	0	1.14	80	20	0	0.20	70	26	4	0.35	33
H ⁸¹ W	29	45	19	8	0	1.05	85	15	0	0.15	69	26	5	0.36	25
H ⁸¹ F	13	41	30	15	0	1.48	79	21	0	0.21	70	30	0	0.30	35

20

表 55 [PEG₅-K¹¹-配列 27]にコンジュゲートされた 2.12.1.fx バリエント (WT は

2.12.1.1fx である)。Ab%CA は、抗体 1 個当たりのコンジュゲーション付加の%を示しており、その次は、抗体 1 個当たりの平均 CA である。還元された軽鎖および重鎖の分析も、鎖 1 つ当たりの個々の平均 CA と共に示されている。個々の WT 操作に対する 1-LC%の%を、表 53 に記載されているとおり、右欄に示す。

30

【0 5 6 2】

(実施例 3 0)

種々の反応性エステルを使用しての 2. 1 2. 1. f x-[C L κ-D^{7 7}A] コンジュゲーション

2. 1 2. 1. f x および 2. 1 2. 1. f x-[C L κ-D^{7 7}A] を、種々の反応性エステル (実施例 1 8 および 1 9 を参照されたい) を使用して [P E G₅-K^{1 1}-配列番号 2 7] にコンジュゲートさせた (結果は表 5 6 に示す)。種々の活性化エステルのすべてについて、2. 1 2. 1. f x-[C L κ-D^{7 7}A] 変異体は、コンジュゲートすると、wt の 2. 1 2. 1. f x と比較して、より高いレベルのインタクトな平均 C A をもたらした。他の明瞭な傾向は、野生型 2. 1 2. 1. f x における 0 および 1 C A のレベルが、2. 1 2. 1. f x-[C L κ-D^{7 7}A] 変異体ではそれぞれの活性化エス

40

50

テルについて顕著に低下したこと、および 2 C A のレベルが、Z 9 を除く大抵の活性化エステルについてそれぞれの場合に上昇したことであった。

【0563】

還元 LC / HC 分析の結果は、2. 12. 1. f x および 2. 12. 1. f x - [C L κ - D⁷⁷ A] コンジュゲーション結果を比較すると、さらに明白な傾向を示した。それぞれの場合において、誘導体化されていない LC の程度が低下し、場合によってはかなり低下した。これは、再びそれぞれ異なる活性エステルについて、LC における 1 C A レベルの同時の上昇を随伴したので、LC における誘導体化の平均量全体は増大することとなった。LC についての全般的な傾向は、それぞれの場合に存在する 2 C A の量は本質的に変化しなかったので、0 C A が減少した量だけ、1 C A の量が増大したことであった。

10

【0564】

HC を考慮すると、それぞれの活性エステルについて、既に低い量の 1 C A 誘導体化がさらに減少するという別の傾向が明らかであった。この傾向における異常値は、Z 9、非フェノールエステルのみであった。このエステルは、他のフェノールエステルと比較すると、C L κ - K⁸⁰ に対する方向性コンジュゲーションの作用をほとんど示さず、LC および HC 両方の誘導体化のレベルは同様であり、2. 12. 1. f x - [C L κ - D⁷⁷ A] 変異体によって付与された方向性の僅かな向上のみを伴った。概して、2. 12. 1. f x - [C L κ - D⁷⁷ A] 変異体は、一連の活性化エステルについて、天然 2. 12. 1. f x と比較すると、方向性 LC コンジュゲーションの向上の明確な証拠をもたらす。

20

【0565】

【表 58】

Z#	Ab	Ab % CA						Δ	LC %				0	1	2	平均 CA	1LC WT%
		0	1	2	3	4	平均 CA		0	1	2	平均 CA					
1	WT	1	17	51	25	5	2.16	0.07	14	77	9	0.96	84	16		0.16	
	D ⁷⁷ A	4	6	60	23	7	2.23		0	86	13	1.13	92	8		0.08	112
2	WT	15	43	33	9		1.36	0.72	49	49	3	0.54	84	16		0.16	
	D ⁷⁷ A	7	14	53	19	8	2.09		16	81	3	0.87	90	10		0.1	33
10	WT	23	44	26	7		1.18	0.73	60	38	2	0.42	81	19		0.19	
	D ⁷⁷ A	6	27	43	18	6	1.91		29	67	4	0.74	89	11		0.11	176
3	WT	7	32	39	18	5	1.82	0.43	44	48	7	0.63	79	21		0.21	
	D ⁷⁷ A	6	11	46	25	12	2.25		12	79	9	0.97	90	10		0.1	165
6	WT	15	46	30	9		1.34	0.71	41	52	7	0.66	88	12		0.12	
	D ⁷⁷ A	6	21	44	20	9	2.05		18	73	8	0.9	93	7		0.07	140
9	WT	7	29	35	21	8	1.94	0.26	57	34	9	0.51	56	34	10	0.54	
	D ⁷⁷ A	10	19	29	27	15	2.20		47	44	9	0.63	61	32	7	0.46	129

30

表 56 種々の反応性エステル(実施例 26 および 27 を参照されたい)を使用した

[PEG₅-K¹¹-配列 27]への 2.12.1.fx-[CLκ-D⁷⁷A]コンジュゲーションの分析。Ab%CA は、抗体 1 個当たりのコンジュゲーション付加の全体%を示しており、還元された軽鎖および重鎖の分析も示されている(LC%CA、HC%CA)。Δ は、Ab%CA についての WT と D¹⁸⁵A 変異体との結果の差を示している。個々の WT 操作に対する 1-LC%の%を、表 53 に記載されているとおり、右欄に示す。

40

【0566】

(実施例 31)

トラスツズマブ (Herceptin (登録商標)) コンジュゲーション

50

CL κ -D⁷⁷変異に起因するCL κ -K⁸⁰への方向性コンジュゲーションの向上を、CL κ を含む他の抗体に適用することができることを確認するために、D⁷⁷A変異を、トラスツズマブ(hTrast)のCL κ にも挿入した。トラスツズマブ軽鎖および重鎖DNAを、Drug Bank、受託番号DB00072(BIOD00098、BT D00098)でのアミノ酸配列に基づき合成した。

【0567】

hTrast-[CL κ -D⁷⁷A]変異体を2ステップで生成した。初めに、D⁷⁷A変異を抗体軽鎖において、QuickChange部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene(登録商標))に記載されているプロトコルに従って生成した。変異を、オリゴヌクレオチドプライマーによって導入し、DNA配列決定によって確認した。トラスツズマブのVLを、D⁷⁷A変異を有する抗体のCLと連結させた。プライマー対のTRAST.VL.FOR(配列番号89)およびTRAST.VL.REV(配列番号90)を使用して、トラスツズマブVLを増幅した。PCR断片を、BglIIおよびBsaIで消化した。プライマー対のTRAST.CL.D185A.FOR(配列番号91)およびTRAST.CL.D185.A.REV(配列番号92)を使用して、D⁷⁷A変異を有するCLを増幅した。生じたPCR断片をBsaIおよびNheIで消化した。制限酵素で消化されたPCR断片を、BglIIおよびNheIでカットされた修飾p2.12.1.fxP4プラスミド(Invitrogen(登録商標))と連結させた。挿入配列を、DNA配列決定によって確認した。変異させたmAbを、HEK293細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製したmAbを、MSを使用して特徴づけた。

【0568】

トラスツズマブおよびhTrast-[CL κ -D⁷⁷A](反応サイズは1mg)を18mg/mlに、pH7.7にリン酸緩衝液を用いて、0.06Mのリン酸ナトリウム最終濃度に調整した。[PFP-PEG₅-K¹¹-配列番号27]をプロピレングリコール溶液中で10mg/mlに再構成した。ペプチド/リンカーを抗体に4.3:1のモル比で加え、室温で2時間反応させた。

【0569】

表57では、トラスツズマブ-[PEG₅-K¹¹-配列番号27]とhTrast-[CL κ -D⁷⁷A]-[PEG₅-K¹¹-配列番号27]とのコンジュゲーションプロファイルと比較している。トラスツズマブ-[PEG₅-K¹¹-配列番号27]のコンジュゲーションプロファイルは、0~4個のペプチド付加の分布として起こり、その際、ペプチド付加の平均個数は1.75個である。プロファイルはD⁷⁷A変異の後に変化し；ペプチド付加の平均個数は2.18個に上昇し、かつ0個および1個のペプチド付加のかなり低い全体レベルが観察される。この結果は、テスト抗体2.12.1.fxにおいて観察されたとおり、単一の点突然変異CL κ -D⁷⁷Aは、骨格への全体コンジュゲーションを増大させる作用を有することを示唆している。

【0570】

還元した軽鎖および重鎖の分析は、平均コンジュゲーションは、修飾されていないトラスツズマブよりも、hTrast-[CL κ -D⁷⁷A]の軽鎖において多いことを実証し；hTrast-[CL κ -D⁷⁷A]での平均軽鎖コンジュゲート付加値は、トラスツズマブでの0.70と比較すると、1.01である。加えて、コンジュゲートされていない軽鎖は、hTrast-[CL κ -D⁷⁷A]では有意に低減される。重鎖におけるコンジュゲーションは、有意に低いレベルで観察される。トラスツズマブおよびhTrast-[CL κ -D⁷⁷A]の両方で観察された重鎖のうちの大部分は、コンジュゲートされてなく；このことは、hTrast-[CL κ -D⁷⁷A]重鎖の場合に特に当てはまる。これらの結果は、CL κ -D⁷⁷A変異が軽鎖を、それが有意によりコンジュゲートされやすいように変更することを示唆している。

【0571】

【表 5 9】

Ab	Ab% CA					平均 CA	LC % CA			平均 CA	HC % CA		平均 CA
WT	0	1	2	3	4		0	1	2		0	1	
Rep1	6	33	42	15	5	1.80	35	65	ND	0.65	85	15	0.15
Rep2	7	34	39	14	6	1.79	26	74	ND	0.74	84	16	0.16
Rep3	9	38	38	11	5	1.65	30	70	ND	0.7	82	18	0.18
Av.Rep	7	35	40	13	5	1.75	30	70		0.70	84	16	0.16
StdDev	2	3	2	2	1	0.08	5	5		0.05	2	2	0.02
D ⁷⁷ A							5	92	3	0.99	94	6	0.06
Rep1	4	5	66	20	6	2.19	1	94	5	1.04	91	9	0.09
Rep2	3	5	65	21	6	2.22	3	95	2	0.99	94	6	0.06
Rep3	3	8	69	17	4	2.12	3	94	3	1.01	93	7	0.07
AvRep	3	6	67	19	5	2.18	2	2	2	0.03	2	2	0.02
StdDev	1	2	2	2	1	0.05	5	92	3	0.99	94	6	0.06

表 57 Ab トラスツズマブ(WT)および hTrast-[CLκ-D⁷⁷A]への[PEG₅-K¹¹-配列 27]のコンジュゲーションの分析。Rep=反復。AvReps は、3 回の反復実験の結果の平均であり、その下に標準偏差(StdDev)が示されている。Ab%CA は、抗体 1 個当たりのコンジュゲーション付加の%を示しており、その次は、抗体 1 個当たりの平均 CA である。還元された軽鎖および重鎖の分析も示されている。

【0 5 7 2】

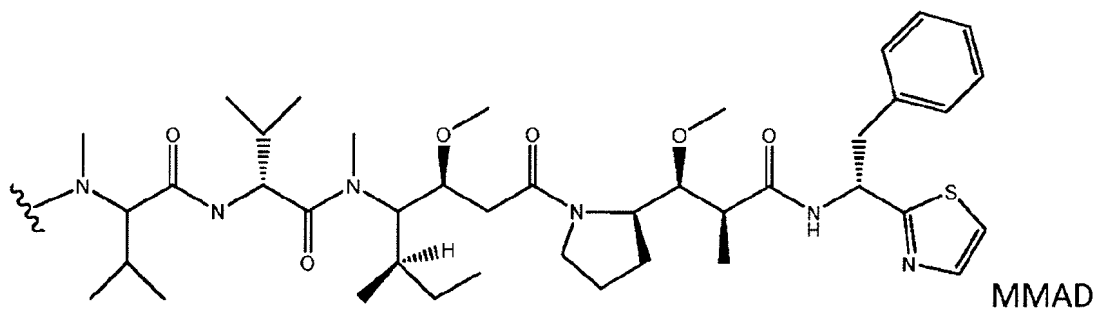
(実施例 3 2)

トラスツズマブと MMAD とのコンジュゲーション

表 5 8 は、トラスツズマブー [PEG₅-MMAD] (オーリスタチン誘導体) と h T r a s t - [C L κ - D ^{7 7} A] - [PEG₅-MMAD] とのコンジュゲーションプロファイルと比較している。

【0 5 7 3】

【化 7 5】



トラスツズマブー [PEG₅-MMAD] のコンジュゲーションプロファイルは、抗体 1 個当たり 0 ~ 4 個のコンジュゲーションの分布として起こり、その際、最多の形態は、2 個のコンジュゲーションであり、コンジュゲーションの平均個数は 1.65 個である。CLκ-D⁷⁷A を変異させると、コンジュゲーションの平均個数は 2.00 個に上昇し、0 および 1 個の MMAD 付加の有意に低い全体レベルが観察された。この結果は、単一の点突然変異 CLκ-D⁷⁷A が、骨格への全体コンジュゲーションを増大させる作用を有すること、およびこの技術が、抗体-毒素コンジュゲーションモデルに適用可能であることを示唆している。

【0 5 7 4】

還元した軽鎖および重鎖の分析は、平均コンジュゲーションが、修飾されていないトラスツズマブよりも、h T r a s t - [C L κ - D ^{7 7} A] の軽鎖において多いことを実証し；h T r a s t - [C L κ - D ^{7 7} A] での平均軽鎖コンジュゲート付加値は、トラス

ツズマブでの0.56と比較すると、0.88である。加えて、コンジュゲートされていない軽鎖は、hTrast-[CLκ-D⁷⁷A]では有意に低減される。重鎖におけるコンジュゲーションは、有意に低いレベルで観察される。トラスツズマブおよびhTrast-[CLκ-D⁷⁷A]の両方で観察された重鎖のうちの大部分は、コンジュゲートされてなく；このことは、hTrast-[CLκ-D⁷⁷A]重鎖の場合に特に当てはまる。これらの結果は、CLκ-D⁷⁷A変異が、軽鎖を、それが有意によりコンジュゲートされやすいように変更することを示唆している。

【0575】

【表60】

MMAD に コンジュ ゲートさ れた hTrast	パーセント CA						LC % CA				HC % CA		1LC WT %	
	0	1	2	3	4	平均 CA	0	1	2	平均 CA	0	1		平均 CA
WT	8	35	42	13	2	1.65	45	54	1	0.56	76	23	0.23	
D ⁷⁷ A	1	16	65	16	1	2.00	11	88		0.88	84	14	0.14	163

表 58 トラスツズマブ(WT)および hTrast-[CLκ-D⁷⁷A]への[PEG₅-MMAD]のコンジュ

ゲーションの分析であり、還元された LC および HC の分析も示されている。Ab%CA は、抗体 1 個当たりのコンジュゲーション付加の%を示しており、その次は、抗体 1 個当たりの平均 CA である。還元された軽鎖および重鎖の分析も示されている。個々の WT 操作に対する 1-LC%の%を、表 53 に記載されているとおり、右欄に示す。

【0576】

(実施例 33)

標的に結合するコンジュゲートトラスツズマブの能力

コンジュゲートされていない、および [PEG₅-K¹¹-配列番号 27] もしくは [PEG₅-MMAD] のいずれかにコンジュゲートされているトラスツズマブおよび hTrast-[CLκ-D⁷⁷A] の、Her2 受容体に結合する能力を、Her2 結合 ELISA アッセイを使用して研究した。ハーフウェル ELISA プレートを、PBS 中 1 μg/ml の Fc-ErbB2 融合タンパク質でコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。プレートを KPL 洗浄緩衝液で 3 回洗浄し、その後、Superblock で室温で 1 時間ブロックした。試料の 10×系列希釈物を Superblock 中、100 μg/ml の最高濃度で調製した。試料をウェルに加え、プレートを室温で 1 時間インキュベートした。プレートを KPL 洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。抗ヒト Fab-HRP 二次抗体の 1:1000 希釈物と共に室温で 1 時間インキュベートすることによって、結合した試料を検出した。プレートを再び、KPL 洗浄緩衝液で 3 回洗浄し、HRP を TMB 基質で検出した。反応を 2 M の H₂SO₄ で停止し、OD を、Spectramax プレートリーダーで 450 nm で測定した。

【0577】

図 9A および 9B は、市販のトラスツズマブ、利用可能な配列から生成したトラスツズマブ、および hTrast-[CLκ-D⁷⁷A]、さらには [PEG₅-K¹¹-配列番号 27] または [PEG₅-MMAD] のいずれかに結合させた場合のトラスツズマブおよび hTrast-[CLκ-D⁷⁷A] は、それぞれ、同様の Her2 結合特性を示すことを実証している。これらの結果は、主に CLκ-K⁸⁰でのコンジュゲーションは、天然抗体の受容体結合機能に有意に干渉しないことを示唆している。

【0578】

(実施例 34)

PF P および NH S コンジュゲーション戦略の比較

2つの別の戦略：PFPエステル（Z1）をZ*基として使用するCLκ-K⁸⁰への方向性コンジュゲーション（トラスツズマブ-[5PEG-MMAD]を生成）、または抗体全体により幅広いコンジュゲーションパターンをもたらすNHS（Z13；トラスツズマブ-[MMAD]_nを生成）を使用して、トラスツズマブを[PEG₅-MMAD]にコンジュゲートさせ、抗体薬物コンジュゲートの耐容性を比較するために、ラットに投与した。両方のコンジュゲートを、10、30および100mg/kgの単回ボラス用量として与えた。1週間の研究期間の間に10、および30mg/kg用量の両方のコンジュゲートを投与されたすべての動物は、有意な体重減少を伴うことなく生存した。しかしながら、100mg/kg用量群は、無作為コンジュゲーション（Z13）と、CLκ-K⁸⁰（Z1）への部位選択的コンジュゲーションとで明確な相違を示した。無作為コンジュゲート（NHSコンジュゲーション）の100mg/kg用量における動物のうちの50%超が、1週間の研究期間内に死亡したのに対して、部位選択的コンジュゲート（PFPコンジュゲーション）の100mg/kg用量における動物はすべて、有意な体重減少を伴うことなく生存した（表59）。このことは、CLκ-K⁸⁰での優先的コンジュゲーションが、エフェクター部分のコンジュゲーションについてより信頼性の高い機構を提供し得ていて、複数の表面リシン残基でのコンジュゲーションである従来の「無作為」手法は、より信頼性の低い開裂および分解パターンを有するエフェクター部分をもたらしているおそれがあることを示唆している可能性がある。

【0579】

【表61】

コンジュゲート	コンジュゲーションタイプ	用量(mg/Kg)	生存%
トラスツズマブ-[PEG ₅ -MMAD]	PFP	10	100
		30	100
		100	100
トラスツズマブ-[MMAD] _n	NHS	10	100
		30	100
		100	50

表 59 毒素の部位選択的コンジュゲーションは、抗体薬物コンジュゲートの耐容性を向上させる。Z1およびZ13をZ*基として使用してコンジュゲートさせた後のラットにおけるトラスツズマブ-[PEG₅-MMAD]の耐容性の比較。

【0580】

（実施例35）

毒素および切断可能なリンカーとコンジュゲートさせたh38C2

ターゲティングペプチドを、触媒抗体h38C2（HC＝配列番号65およびLC＝配列番号37および67）のCLκ-D⁷⁷A変異バージョンの結合部位に、本明細書において記載したとおりの、W基としてβ-ラクタム基を有する式P-Q-Wのリンカーを使用してコンジュゲートさせて、配列番号65のK⁹⁹の側鎖との共有結合を形成した。次いで、このコンジュゲート抗体を、バリナーシトルリンp-アミノベンジルカルバマート切断可能なリンカーに結合させた例示的なオーリスチチンベースとする毒素（[PFP-PEG₂-ValCitABC-毒素]）のPFP-活性化エステルとさらにコンジュゲートさせた。

【0581】

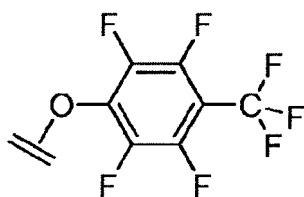


【表 6 2】

	コンジュゲーション付加(CA) (%)						
	0	1	2	3	4	5	平均 CA
PFP-PEG ₂ -ValCitABC-毒素	4	8	31	29	18	10	2.8

(实施例 36)

【化 7 7】



2,3,5,6-テトラフルオロ-4-(トリフルオロメチル)フェニル

これを使用して、Z16-PEG₅リンカーを生成し、これをテストペプチド配列番号27にコンジュゲートさせ、テスト抗体2.12.1.f_xとのコンジュゲーションにおいて試験した。試験した他のZ*基とは対照的に、この誘導体は、2.12.1.f_x-[CLκ-D⁷⁷A]と比較して、天然2.12.1.f_xに対してやや高いレベルのコンジュゲーションを有するコンジュゲートをもたらしたが、インタクトなコンジュゲーションのレベルは両方とも、対応するPF₅(Z1)類似体よりも、Z16基を使用するコンジュゲートについてより高かった(Z1と比較すると、全体平均CAの約10%の上昇)。Z16を使用すると、天然2.12.1.f_xおよび2.12.1.f_x-[CLκ-D⁷⁷A]コンジュゲーションは両方とも、同等レベルの1CAを示し、これは、[PF₅-PEG₅-K¹¹-配列番号27]とコンジュゲートされた天然2.12.1.f_xで観察されたものよりも低かった：他のコンジュゲーションでは、1CAのレベルは典型的には、対応する天然抗体と比較して、D⁷⁷Aにおいて低下する。概して、結果は、

脱離基 D 1 6 は、Z 1 (P F P) よりも反応性が高いことを示唆している (表 6 1)。

【0 5 8 5】

Z 1 6 脱離基は、天然 2. 1 2. 1. f x および 2. 1 2. 1. f x - [C L κ - D⁷ A] 抗体の両方について、およそ同等な誘導体化を示し、誘導体化されていない L C の量は、両方の場合に少ない。そのうえ、Z 1 と比較すると、Z^{*} 1 6 を使用すると、L C および H C 誘導体化の全体レベルが上昇する。脱離基 Z 1 6 は、P F P よりも反応性なエステルであるようであるが、C F₃ 基が C L κ - K^{8 0} 領域付近で、追加の相互作用をもたらしていて、このことがまた、L C の反応性および優先的誘導体化を駆動していることがあり得る。

【0 5 8 6】

【表 6 3】

Z [*]	2.12 .1.fx	Ab %CA					平均 CA	Δ	LC % CA			平均 CA- LC	HC% CA		平均 CA- HC	1LC WT %
		0	1	2	3	4			0	1	2		0	1		
1	WT	1	17	51	25	5	2.16		14	77	9	0.96	84	16	0.16	
1	D ⁷⁷ A	4	6	60	23	7	2.23	0.07	0	86	13	1.13	92	8	0.08	112
16	WT	4	4	44	36	12	2.48		5	83	12	1.07	81	19	0.19	
16	D ⁷⁷ A	9	9	31	33	18	2.43	0.05	1	79	20	1.2	89	11	0.11	95

表 61 異なる反応性 Z^{*} 基 Z1 および Z16 を使用しての、[PEG₅-K¹¹-配列 27]への

2.12.1.fx および 2.12.1.fx-[CLκ-D⁷⁷A]コンジュゲーションの分析。Ab%CA は、抗体 1 個当たりのコンジュゲーション付加の全体%を示しており、還元された軽鎖および重鎖の分析も示されている(LC%CA、HC%CA)。Δ は、Ab%CA についての WT と D¹⁸⁵A 変異体との結果の相違を示している。個々の WT 操作に対する 1-LC%の%を、表 53 に記載されているとおり、右欄に示す。

【0 5 8 7】

(実施例 3 7)

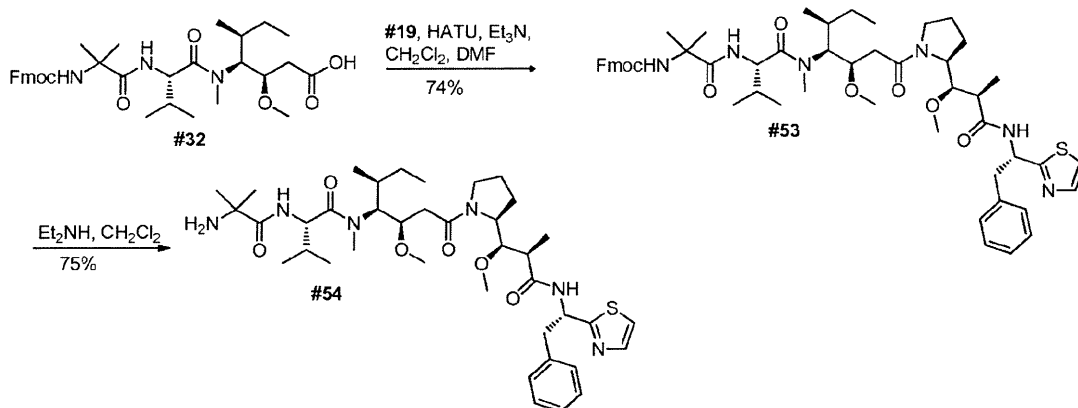
毒素 0 1 0 1 の合成

毒素 0 1 0 1 (図解中の # 5 4) についての実験

2-メチルアラニル-N-[(3 R, 4 S, 5 S) -3-メトキシ-1- { (2 S) -2- [(1 R, 2 R) -1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3- { [(1 S) -2-フェニル-1- (1, 3-チアゾール-2-イル) エチル] アミノ } プロピル] ピロリジン-1-イル } -5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル] -N-メチル-L-バリンアミドの調製 (# 5 4)

【0 5 8 8】

【化 7 8】



10

ステップ 1. N-[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]-2-メチルアラニル-N-[(3R, 4S, 5S)-3-メトキシ-1-{(2S)-2-[(1R, 2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-{[(1S)-2-フェニル-1-(1, 3-チアゾール-2-イル)エチル]アミノ}プロピル]ピロリジン-1-イル}-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N-メチル-L-バリンアミド(#53)の合成。一般的手順D(以下)に従って、ジクロロメタン(20 mL、0.1 M)およびN, N-ジメチルホルムアミド(3 mL)中の#32(2.05 g、2.83 mmol、1当量)、アミン#19((2R, 3R)-3-メトキシ-2-メチル-N-[(1S)-2-フェニル-1-(1, 3-チアゾール-2-イル)エチル]-3-[(2S)-ピロリジン-2-イル]プロパンアミド、トリフルオロ酢酸塩)(2.5 g、3.4 mmol、1.2当量)、HATU(1.29 g、3.38 mmol、1.2当量)、ならびにトリエチルアミン(1.57 mL、11.3 mmol、4当量)から、粗製の所望の物質を合成し、これを、シリカゲルクロマトグラフィー(勾配:ヘプタン中0%~55%のアセトン)によって精製して、#53(2.42 g、74%)を固体として生成した。LC-MS:m/z 965.7[M+H⁺]、987.6[M+Na⁺]、保持時間=1.04分;HPLC(プロトコルA):m/z

20

965.4[M+H⁺]、保持時間=11.344分(純度>97%);¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆), 回転異性体と推定され、特徴的シグナル:δ 7.86-7.91(m, 2H), [7.77(d, J=3.3 Hz)および7.79(d, J=3.2 Hz), 合計1H], 7.67-7.74(m, 2H), [7.63(d, J=3.2 Hz)および7.65(d, J=3.2 Hz), 合計1H], 7.38-7.44(m, 2H), 7.30-7.36(m, 2H), 7.11-7.30(m, 5H), [5.39(ddd, J=11.4, 8.4, 4.1 Hz)および5.52(ddd, J=11.7, 8.8, 4.2 Hz), 合計1H], [4.49(dd, J=8.6, 7.6 Hz)および4.59(dd, J=8.6, 6.8 Hz), 合計1H], 3.13, 3.17, 3.18および3.24(4 s, 合計6H), 2.90および3.00(2 br s, 合計3H), 1.31および1.36(2 br s, 合計6H), [1.05(d, J=6.7 Hz)および1.09(d, J=6.7 Hz), 合計3H]。

30

【0589】

40

ステップ 2. 2-メチルアラニル-N-[(3R, 4S, 5S)-3-メトキシ-1-{(2S)-2-[(1R, 2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-{[(1S)-2-フェニル-1-(1, 3-チアゾール-2-イル)エチル]アミノ}プロピル]ピロリジン-1-イル}-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N-メチル-L-バリンアミド(#54)の合成

一般的手順A(以下)に従って、ジクロロメタン(10 mL、0.07 M)中の#53(701 mg、0.726 mmol)から、粗製の所望の物質を合成し、これを、シリカゲルクロマトグラフィー(勾配:ジクロロメタン中0%~10%のメタノール)によって精製した。残渣を、ジエチルエーテルおよびヘプタンで希釈し、真空濃縮して、#54(406 mg、75%)を白色の固体として得た。LC-MS:m/z 743.6[M+H⁺]、保持時間=0.70

50

分;HPLC(プロトコルA):m/z 743.4[M+H⁺]、保持時間=6.903分、(純度>97%);¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), 回転異性体と推定され、特徴的シグナル: δ [8.64 (br d, J=8.5 Hz)および8.86 (br d, J=8.7 Hz), 合計1H], [8.04 (br d, J=9.3 Hz)および8.08 (br d, J=9.3 Hz), 合計1H], [7.77 (d, J=3.3 Hz)および7.80 (d, J=3.2 Hz), 合計1H], [7.63 (d, J=3.3 Hz)および7.66 (d, J=3.2 Hz), 合計1H], 7.13-7.31 (m, 5H), [5.39 (ddd, J=11, 8.5, 4 Hz)および5.53 (ddd, J=12, 9, 4 Hz), 合計1H], [4.49 (dd, J=9, 8 Hz)および4.60 (dd, J=9, 7 Hz), 合計1H], 3.16, 3.20, 3.21および3.25 (4 s, 合計6H), 2.93および3.02 (2 br s, 合計3H), 1.21 (s, 3H), 1.13および1.13 (2 s, 合計3H), [1.05 (d, J=6.7 Hz)および1.10 (d, J=6.7 Hz), 合計3H], 0.73-0.80 (m, 3H).

【0590】

一般的手順A: ジエチルアミンを使用してのFmoc除去。Fmoc含有化合物のジクロロメタン中の溶液に、等体積のジエチルアミンを加えた。反応の進行をLC-MS (またはHPLCもしくはTLC) によってモニタリングした; 反応は通常、3時間以内に完了した。溶媒を真空中で除去し、残渣をヘプタンと共に3回共沸させた。次いで、残渣をジクロロメタンおよび少量のメタノールで希釈し、その後、シリカ上で減量し、ジクロロメタン中のメタノールで溶離するシリカゲル上のクロマトグラフィーによって精製して、所望の物質を得た。

【0591】

一般的手順D: O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (HATU) とのカップリング。アミン (1当量) および酸 (1.1当量) のジクロロメタン: N, N-ジメチルホルムアミド (4:1, アミン中0.3M) 中の攪拌溶液に、HATU (1.2当量)、続いて、Et₃N (3当量) を加えた。反応の進行をLC-MS (またはHPLCもしくはTLC) によってモニタリングした; 反応は通常、3時間以内に完了した。溶媒を真空中で除去し、残渣をヘプタンと共に3回共沸させ、少量の酢酸エチルで希釈し、その後、シリカ上で減量し、シリカゲルクロマトグラフィーまたは逆相クロマトグラフィーによって精製した。

【0592】

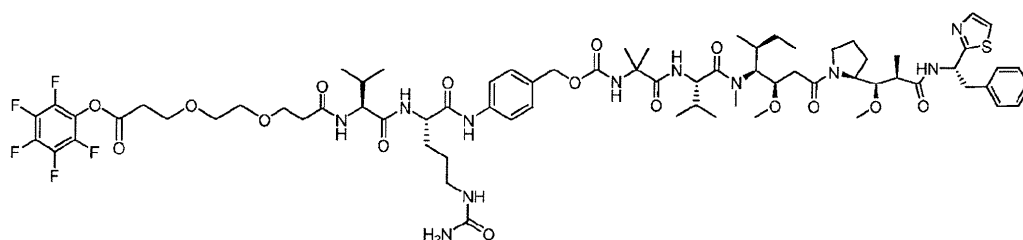
(実施例38)

mAb hu08および毒素0101を含むMACの調製

Hu08は、ヒト抗IL-13Rα2抗体であり、その内容が参照によって本明細書に組み込まれている米国特許仮出願61/723,545号に完全に記載されている。CLκ-D⁷⁷A変異を含むhu08の変異体バージョンを、標準プロトコルに従って生成した(hu08-[CLκ-D77A])。毒素-0101(#54:実施例36)を、切断可能なリンカーとコンジュゲートさせて、構造:

【0593】

【化79】

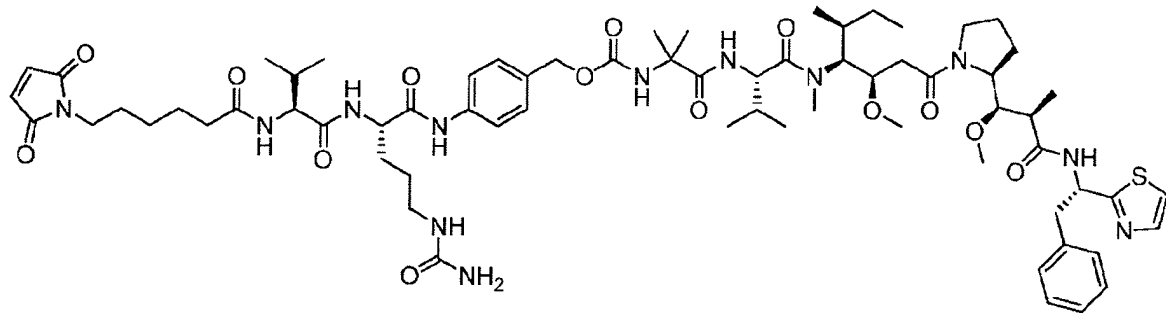


を形成し、次いで、この毒素-リンカーを、本明細書に記載の技術に従って、hu08-

〔CLκ-D77A〕にコンジュゲートさせた。リンカー-毒素-0101種を介して抗体hu08上で複数の毒素-0101の非特異的コンジュゲーションをもたらす化合物hu08-vc-0101を生成した：

【0594】

【化80】



10

【0595】

In vitro 細胞毒性アッセイ

IL-13Ra2 抗原を発現する細胞系および陰性対照細胞系を、漸増する濃度のhu08-〔CLκ-D⁷⁷A〕と共に培養した。4日後に、培養の生存率を評価した。IC₅₀ 値を、ロジスティック非線形回帰によって計算し、ng Ab/mLとして表す。

20

【0596】

データは、hu08-vc0101およびhu08-〔CLκ40、-D⁷⁷A〕は両方とも、試験されたIL-13Ra2 陽性細胞系（PC3MM2およびA375）の両方に対して有効であり、2.5~7.9 ng Ab/mLの範囲のIC₅₀を有したことを実証している（表62）。hu08-vc0101もhu08-〔CLκ-D⁷⁷A〕も、IL-13Ra2 陰性細胞系、H460に対しては活性ではなく、非IL-13Ra2 結合対照、hlgG8.84-vc0101は、試験された細胞系のいずれに対しても活性ではなかった。

【0597】

【表64】

30

ADC	毒素:Ab	IC ₅₀ (ng Ab/mL)		
		PC3MM2	A375	H460
hu08-vc-0101	3.2	2.5	3.8	>400000
hu08-[CLκ-D ⁷⁷ A]-0101	1.9	4.9	7.9	>400000
hlgG8.8-vc-0101	3.7	>400000	>400000	>400000

表 62 hu08-[CLκ-D⁷⁷A]-0101 の in vitro 細胞毒性アッセイ

40

【0598】

Cys 変異体ADCの皮下異種移植モデル

雌の無胸腺（ヌード）マウスに、PC3MM2 腫瘍細胞を皮下注射した。約0.1~0.3 gの段階の腫瘍を有するマウス（n=8~10マウス/治療群）に、通常生理食塩水（ビヒクル）またはMAC-0001を4日に1回で4回、静脈内投与した。化合物を、AB含有量に基づき投与した。腫瘍を、少なくとも週に1回測定し、そのサイズ（mm² ±SEM）を、mm³ = 0.5 × （腫瘍幅²） × （腫瘍長さ）として計算した。表63のデータは、hu08-〔CLκ-D⁷⁷A〕-0101が、PC3MM2 異種移植片の増殖を阻害することを示している。

【0599】

50

【表 6 5】

ADC	用量 単回 用量	PC3MM2 異種移植片、腫瘍体積(mm ³ ±SEM)									
		0 日 目	5 日 目	8 日 目	12 日目	15 日目	20 日目	30 日目	41 日目	55 日目	77 日目
ビヒクル	0	325 ± 9	590 ± 41	782 ± 79	1140 ± 142	GT	GT	GT	GT	GT	GT
hu08-[CLk- D ⁷⁷ A]-0101	1.5	328 ± 49	393 ± 96	352 ± 106	432 ± 124	556 ± 236	732 ± 305	GT	GT	GT	GT
hu08-vc- 0101	1.5	333 ± 12	431 ± 40	281 ± 25	299 ± 32	362 ± 47	450 ± 58	956 ± 166	GT	GT	GT

表 63

GT=腫瘍サイズが大きいため終了した群

【0 6 0 0】

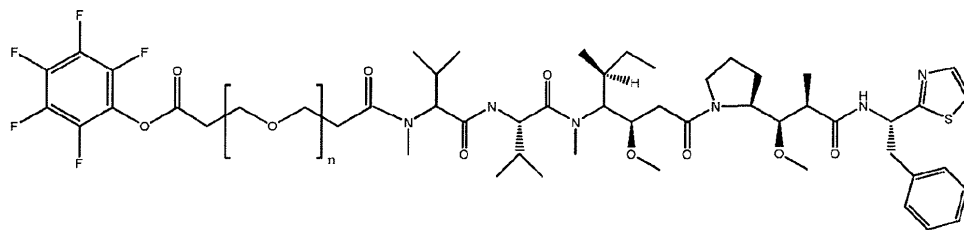
(実施例 3 9)

トラスツズマブMMADコンジュゲートの活性

3 種のトラスツズマブコンジュゲートを製造した：トラスツズマブー [5 P E G - M M A D]、h T r a s t - [C L k - D⁷⁷A] - [5 P E G - M M A D]、およびトラスツズマブー (M M A D)_n (ここで、M M A D は、脱離基としての Z 1 3 (N H S) で 5 P E G リンカーに接続されており、方向性コンジュゲーション技術を用いることなく、トラスツズマブにコンジュゲートされているので、トラスツズマブ表面リシンへの M M A D の非特異的コンジュゲーションが生じている) (実施例 3 0 ~ 3 3 を参照されたい)。

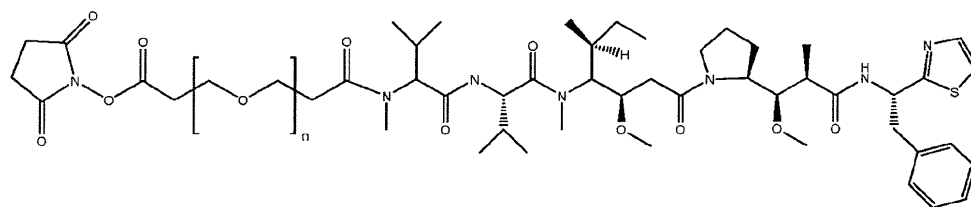
【0 6 0 1】

【化 8 1】



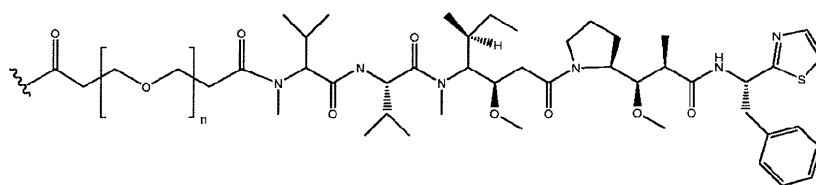
n=5

[PFP-5PEG-MMAD]



n=5

[NHS-5PEG-MMAD]



n=5

-[5PEG-MMAD]

ラットでの審査毒性研究において、3 種の m A b コンジュゲートを評価したが、その際

10

20

30

40

50

、動物は、それぞれのADCの単回静脈内ボラス用量を0（ビヒクル）、10、30、および100mg/kg（雄のラット5匹/群）で投与され、次いで14日間観察された。毒性学評価は、毎日の臨床観察、1週に1回の体重測定、および検死日での臨床的病理評価を包含した。動物を15日目に安楽死させ、選択された組織を顕微鏡検査のために収集した。加えて、血液試料をすべての動物から、投薬後約0.0833（5分）、6、24（2日目）、48（3日目）、72（4日目）、96（5日目）、168（8日目）、および312（14日目）時間目に収集し、抗体-コンジュゲートおよびトラストズマブ抗体濃度について分析した。

【0602】

結果

血漿曝露（AUCに基づく）は、3種のコンジュゲートのすべてで、いずれの所与の用量でも概して同様であった。100mg/kgでのhTrast- [CLκ-D⁷⁷A] - [5PEG-MMAD]、トラストズマブ- [5PEG-MMAD]、およびトラストズマブ- (MMAD)_nのAUC（0-312）はそれぞれ、177000、174000、および139000ng・h/mLであった。hTrast- [CLκ-D⁷⁷A] - [5PEG-MMAD] およびトラストズマブ- [5PEG-MMAD] は、すべての用量において、臨床的に忍容性が良好であった。しかしながら、100mg/kgでのトラストズマブ- (MMAD)_nの投与は、顕著な臨床徴候および8日目での1/5のラットの早期安楽死に関連した。この群の他のラットは、皮膚膨張の低下および体重増加の減少を示した。

【0603】

臨床病理変化は、hTrast- [CLκ-D⁷⁷A] - [5PEG-MMAD] およびトラストズマブ- [5PEG-MMAD] で概して同様であり、特に、 ≥ 10 または ≥ 30 mg/kgでの赤血球（RBC）量（RBCカウント、ヘモグロビンおよび/またはヘマトクリット）の軽度の低下、ならびに100mg/kgでのアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）の軽微な増加が包含された。RBC質量の変化は、トラストズマブ- (MMAD)_nではさらに著しく、骨髓における赤血球細胞充実度の低下に関連していた。他の注目すべき100mg/kgでのトラストズマブ- (MMAD)_n 関連の臨床病理変化には、血小板カウントの中程度の低下、ならびにALT、AST、ALP、および全ビリルビンの軽度の増加が包含された。

【0604】

顕微鏡所見は、hTrast- [CLκ-D⁷⁷A] - [5PEG-MMAD] およびトラストズマブ- [5PEG-MMAD] で概して同様であり、肺における肺胞組織球増殖/炎症、肝臓における小さな胆管の変性、および骨髓における可染小体マクロファージ（細胞破片を含有する）の増加を包含した。複数の組織における有糸分裂の増加および角膜における単細胞の壊死は、有糸分裂停止およびアポトーシスをもたらすチューブリン阻害の薬理的に媒介される作用と考えられた。対照的に、トラストズマブ- (MMAD)_n 投与は、より顕著な顕微鏡的組織変化に関連しており、これらには、腎臓における尿管変性/壊死および糸球体症；肝臓における単細胞壊死、胆管変性および過形成、ならびに小葉中心壊死/線維症；肺における肺胞組織球増殖/炎症；骨髓における有形体（tangible body）マクロファージの増加、造血細胞の変性/減少、および骨溶解；脾臓における辺縁帯細胞充実度の低下が包含される。特に記載したもののうち、正常な小葉構成の破壊に関連した肝臓における小葉中心性線維症は、より早期で、より広範な治療関連の肝細胞損傷を示唆する修復性変化と一致した。加えて、薬理的に媒介された有糸分裂および/または単細胞壊死の増加が、いくつかの組織において観察された。

【0605】

まとめると、hTrast- [CLκ-D⁷⁷A] - [5PEG-MMAD] およびトラストズマブ- [5PEG-MMAD] は、すべての用量（10、30、および100mg/kg）で良好に忍容され、概して同様の毒性プロファイルを実証した。トラストズマブ- (MMAD)_n 投与は、100mg/kgで早期死亡率をもたらし、特に肝臓、腎臓

、肺、および骨髄における重大な標的臓器毒性に関連した。

【0606】

(実施例39)

CL κ およびCL λ のモデリング

図10Aは、4ストランド β シートに対してバックされた3ストランド β シートを含有する定常軽鎖ドメインのIgフォールドを図示している。それぞれの β シートの β ストランドの間での水素結合によって、内側で向かい合っている β シートの残基間での疎水性結合によって、かつ β シート間でのジスルフィド結合によって、このフォールドは安定化されている。3ストランド β シートは、 β ストランドC、F、およびGを含み、4ストランド β シートは、 β ストランドA、B、E、およびDを有する。AからGの文字は、Igフォールドのアミノ酸配列に沿った β ストランドの連続位置を示している。各 β ストランドと次の β ストランドとの連結は、ターン(A/B)または α ヘリックス(E/F)を含んでもよいし、または含まなくてもよいアミノ酸接鎖である(図10B)。

10

【0607】

図8Bは、マウスおよびヒトのCL κ 、ならびにヒトCL λ の一次配列に沿って二次構造をプロットしている。CL κ およびCL λ の β ストランドEとFとの間のEF接鎖は、同一の二次構造を有し、5～6残基の α ヘリックス領域(CL κ -K⁷⁵-K⁸⁰およびCL λ -P⁷⁶-S⁸¹)、続いて、2～3アミノ酸ターン(CL κ -H⁸¹-K⁸²およびCL λ -H⁸²-S⁸⁴)からなる(図8Bおよび10)。CD接鎖は、EF鎖の周辺(約3.5 Å)と構造的に同等なアスパラギン酸の側鎖(CL κ -D⁵³、CL λ -D⁴⁵)を持ち、CL κ -D⁵³がCL κ -H⁸¹のイミダゾール環と相互作用することを可能にしている。

20

【0608】

CL λ のモデリングおよびCL κ との比較は、CL λ -D⁴⁵がCL λ -H⁸²のイミダゾール環と同様に協力すること、CL λ -S⁸¹をCL λ -K⁸¹に変異させることは、CL κ において見出されるものと同様の局所環境を再現するので、CL λ への方向性コンジュゲーションを可能にすることを示唆している。

【0609】

したがって、本発明は、次の変異のうちの1つを含むCL λ ドメインも提供する：CL λ -S⁸¹KおよびCL λ -K⁸⁰x/S⁸¹K(ここで、xは、P、K、R、またはHを除いた任意のアミノ酸であり、ナンバリングは、配列番号93による)。一部の態様では、本発明は、K⁸¹、またはx⁸⁰/K⁸¹を含む新規のCL λ ドメインを提供する(ここで、xは、G、A、I、L、V、S、T、M、N、Q、F、Y、W、D、またはEの1つである)。一部の態様では、本発明は、配列番号94および配列番号95からなる群から選択される配列を含むCL λ ドメインも提供する。

30

【0610】

モデリングはまた、CL κ -D⁷⁷がCL κ -K⁸⁰への塩橋を形成していると考えられるので、同じ手法で、CL λ -E⁷⁷を、CL λ -K⁸⁰またはCL λ -K⁸¹のいずれかと塩橋を形成するために利用することができるであろうことを示唆している。したがって、CL λ -E⁷⁷をR、L、S、G、Q、P、N、V、I、T、およびMのうちのいずれかに変異させることで、S⁸¹ Δ (すなわち、S⁸¹の欠失)の場合にはCL λ -K⁸⁰CL λ またはCL λ -K⁸¹のいずれかでの方向性コンジュゲーションをおそらく促進し得る。したがって、本発明は、配列番号96および配列番号97からなる群から選択される配列を含むCL λ ドメインも提供する。

40

【0611】

(実施例41)

CL κ -K⁸⁰コンジュゲーション機構のモデリング

構造および配列の記載

2.12.1. fxおよびh38C2-[CL κ -D⁷⁷A]のFabドメインの結晶構造を使用して、ハローフェノール(PFPなど)/エステル媒介コンジュゲーションに

50

対する $\text{CL}\kappa\text{-K}^{80}$ 反応性の特異性をモデリングした。複数の様々な抗体でのコンジュゲーションの経験、さらには初期モデリング分析によって、抗体の残りの部分は、コンジュゲーションの機構について、もしあるとしても非常に僅かな影響しか発揮しないと考えられるので、モデリングは、 $\text{CL}\kappa$ にのみ焦点を当てればよいことが示された。

【0612】

コンピュータによる手法

コンピュータによる計算の目的は、 $\text{CL}\kappa\text{-K}^{80}$ の決定的な特質、およびこの部位を PFPE -エステルコンジュゲーション反応に優先的に偏らせる残基の相互作用を明白にすることであった。 $\text{CL}\kappa$ および $\text{CL}\kappa\text{-D}^{77}\text{A}$ の3D座標を結晶構造から選択した後に（方向性コンジュゲーションに関連していると既に同定されているこれらの残基を含有する座標に基づく）、その座標を、タンパク質調製、水素原子の結合、および力場パラメーターアサインメント（*force field parameters assignment*）などの標準的なコンピュータプロトコルに掛けた。

10

【0613】

計算された pK_a 値および pI （タンパク質イオン化ポテンシャル）に従って、水素原子を、個々の3D $\text{CL}\kappa$ ドメイン上のすべてのアミノ酸原子にアサインした。 pK_a は、中性 pH での所与の滴定可能なアミノ酸のプロトン化状態の値であり（水素濃度の負対数）、タンパク質鎖におけるアミノ酸の影響を考慮する（*Spassov; A fast and accurate computational approach to protein ionization. Protein Science 2008, 17, 1955~1970*）。これらの計算の結果を表64に示す。

20

【0614】

【表 6 6】

滴定可能な残基	計算された pKa	標準 pKa
CLk-D ¹⁴	3.315	3.65
CLk-D ⁴³	3.324	3.65
CLk-D ⁵⁹	3.667	3.65
CLk-D ⁶²	4.411	3.65
CLk-D ⁷⁷	3.307	3.65
CLk-E ¹⁵	3.93	4.25
CLk-E ³⁵	3.906	4.25
CLk-E ⁵³	4.604	4.25
CLk-E ⁵⁷	4.284	4.25
CLk-E ⁷⁹	3.636	4.25
CLk-E ⁸⁹	4.244	4.25
CLk-Y ³²	10.276	10.07
CLk-Y ⁶⁵	11.847	10.07
CLk-Y ⁷⁸	11.844	10.07
CLk-Y ⁸⁴	14	10.07
CLk-H ⁸¹	7.22	6.0
CLk-H ⁹⁰	6.126	6.0
CLk-K ¹⁸	11.057	10.53
CLk-K ³⁷	10.761	10.53
CLk-K ⁴⁰	10.505	10.53
CLk-K ⁶¹	10.852	10.53
CLk-K ⁷⁵	10.952	10.53
CLk-K ⁸⁰	11.119	10.53
CLk-K ⁸²	10.451	10.53
CLk-K ⁹⁹	10.706	10.53
CLk-R ³⁴	13.428	12.48
CLk-R ¹⁰³	14	12.48

表 64 CLk 中のアミノ酸残基の pKa 値

【0 6 1 5】

すべての滴定可能なアミノ酸および残りのアミノ酸での pKa 値によって、原子価数に従って、水素原子を加える。計算は、CLk-H⁸¹が、pH 7.0～7.4（生理学的 pH）ではプロトン化されていないことを示した。この観察は、CLk-H⁸¹が求核性触媒として作用する触媒反応で提案されていた機構と一致する。一般に、pH が pH 約 6.5～7.0 になると、CLk-H⁸¹がプロトン化されるであろうために、コンジュゲーションが減少すると予測されるであろう。pH が約 7.4 超に上昇すると、他の残基（特に、リシン）がより反応性になり、全体コンジュゲーション反応に寄与するので、より高い全体コンジュゲーションレベルが予測され、そのため本発明者らは、pH が上昇するにつれて次第に、方向性作用は失われるであろうと予測した。これは、実施例 4 の表 4 に

において示した pH 研究において観察されたことと相関している。

【0616】

最小化

CHARMM [Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics] は、エネルギー最小化技術であり、これを使用して、3D 構造を平衡位置に持っていき、その原子構造について最良の幾何学的位置を見出した。CHARMM を第1のステップでは、SMART Minimizer を用いて、1000 ステップの、3 [Kcal / (mol * Å)] の RMS 勾配許容 (gradient tolerance) での Steepest Descent 最小化、続く、0.01 の RMS 勾配での Conjugate Gradient 最小化で使用した。エネルギー変化 10
については、3 [Kcal / (mol * Å)] の許容を、最小化のサイクルの間の平均勾配に当てはめた。Steepest Descent 法は、分子を最近接最小量 (nearest minimum) にし、Conjugate Gradient は、得られた最終コンホメーションを改善した。Moman y Rone 電荷を使用した (Moman y & Rone; Validation of the general purpose QUANTA 3.2 / CHARMM force field. Comp. Chem. 1992, 13, 888 ~ 900 に記載されているとおり)。CLκ の最小化された構造は、最小化されていない構造と比較して 1 Å 異なった。

【0617】

CLκ ドメインと PFP-PEG2 との複合体

それぞれの相互作用をより良く理解するために、PFP エステルと、CLκ および CLκ-D⁷⁷ A ドメインとの個々の複合体をインシリコで組み立てた。Accelrys protocol Define and Edit Binding Site (Discovery Studio ソフトウェア version DS3.5) による 3D CLκ ドメインの構造分析によって、図 11 に示されているとおり、CD および EF 接続鎖の間で、かつ CLκ-K⁸⁰ の下に位置する「結合ポケット」と称され得るであろう領域が明らかになった。CLκ-K⁷⁵-E⁷⁹ (EF 接続鎖上の EFα ヘリックス)、CLκ-K⁸⁰-K⁸² (EF 接続鎖上の EFL ループ)、および CLκ-V⁴² (CD 接続鎖上の CD ループ) に位置して、触媒反応が必要とする形状および静電特性を与える アミノ酸によって、このポケットは促進される。 30

【0618】

ポケットのサイズを測定するために、Define and Edit Binding Site プロトコルを、先に最小化した CLκ 構造で使用した。このプロトコルは、空洞サイズを計算し、PFP などの特定のサイズを有する分子の結合についてのその適性を評価するために、CLκ ドメインを、空間充填法をそこにおいて使用するための受容部として画定することを必要とする。受容部の結合部位は、多くの方式で、例えば、球またはこの球を囲む残基のリストとして表され得る。結合部位を画定するために、受容部を初めに、グリッドにマッピングする。受容部原子から所与の距離以内にあるグリッドポイントは、受容部によって占められているとマークされるので、リガンド原子のための位置としては望ましくない。結合部位を同定するための方法は 2 つ存在する。第 1 の方法は、受容部の形状に基づき部位を同定するために、「イレーザー」アルゴリズムを使用する。第 2 の方法は、活性な部位に既にポジショニングされている既知のリガンドによって占められる体積を使用する (Venkatachalam ら、Fit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites. J. Mol. Graph. Model 2003, 21, 289 ~ 307)。 40

【0619】

プロトコルの実行の結果として、結合部位が、考察中の分子を包含するグリッド上に位置する一連のポイントとして同定される。この定義によって、結合部位としてのその資格を許可する結合部位のサイズおよび形状の測定が可能となる。PFP-PEG2 を、触媒 50

反応のために重要であると実験によって同定されたアミノ酸に囲まれている部位に手動でドッキングさせた。これらのアミノ酸は、 $\text{CL}\kappa\text{-K}^{80}$ 、 $\text{CL}\kappa\text{-H}^{81}$ 、 $\text{CL}\kappa\text{-D}^{43}$ 、および $\text{CL}\kappa\text{-K}^{80}$ から $10\text{ \AA}$ 距離以内にある他のアミノ酸であった（表54に示されている）。

【0620】

CHARMM力場を $\text{CL}\kappa$ ドメインに、かつQM計算をPFPEステルに当てはめるQM/MMハイブリッド法を使用して、それぞれの $\text{CL}\kappa$ ドメインとPFPEステルとの初期複合体を最小化した。配置の前に、初めにCHARMMを使用し、次いで、PFPEステルをQMシステムとして処理するQM/MM手法を使用して、PFPEステルを最小化した。上記のCHARMM最小化プロトコルを使用して、構造を最小化した。

10

【0621】

複合体を最小化するために、QM/MMハイブリッドプロトコルを使用した。その際、量子力学的（QM）計算は、WTまたは変異させたタンパク質と相互作用した場合の電子密度の変化についての情報をもたらして、PFPEステル電子密度およびそのコンジュゲーション反応に対する感受性に対する周囲環境の影響を本発明者らが把握することを可能にした。QM/MMプロトコルは、分子システムが2つの領域、すなわち、第1の領域、QM計算によって処理される中心領域であるPFPEステルと、第2の領域、分子力学的（MM）方法によって処理される外側領域である $\text{CL}\kappa$ ドメインとに分けられるハイブリッド法である。

【0622】

20

QM処理は、従来の力場技術と比較して、例えば、化学反応が起こるか、または分極効果が重要な役割を果たす場合に、追加の現象のモデリングを可能にするより高レベルの理論をもたらす。構造の残りのバルクを、力場 $\text{CL}\kappa$ を使用して記載する。2つの領域の相互作用を可能とする方式および全QM/MMエネルギーを評価する方法が、使用される特異的なQM/MMプロトコルを定義する。この方法で計算されるエネルギーは、3つの基本的な部分から構成される： PFPEステル （ E_{QM} ）、 CD-kappa （ E_{MM} ）のQMエネルギー、およびこれら2つのシステム間での相互作用エネルギー（ $E_{\text{QM/MM}}$ ）。式 $E_{\text{tot}} = E_{\text{QM}} + E_{\text{MM}} + E_{\text{QM/MM}}$ が使用される。

【0623】

QM領域の電子密度と力場点電荷との間のクーロン相互作用に関する限り、本出願におけるQM/MM法は常に、電子埋込み（electronic embedding）を使用する。これは、力場原子の部分電荷がQM計算値に外部ポテンシャルとして入り、それによって、QM計算値に比例してQM電子密度を真空中で分極させ、QM密度と点電荷との間の静電相互作用エネルギーをもたらすことを意味している。QM/MM法における静電相互作用の取り扱いとは反対に、ファンデルワールス相互作用は、完全に古典的なレベルで処理される。これは、適切な力場パラメーターが、シミュレーションにおけるすべての原子について決定されなければならないことを意味している。ファンデルワールスQM/MM相互作用エネルギー（および力）は、CHARMMシミュレーションサーバエネルギーの一部であり、出力ファイルに別のタームとして列挙される。

30

【0624】

40

計算

コンジュゲーション中およびコンジュゲーション後に*in vitro*実験から観察される全作用を、段階的な概算を使用するコンピュータ技術によってモデリングして、そのような現象を：

1. PFPE結合ポケットサイズ、PFPEステルの結合および方向、
2. タンパク質安定性、特に、PFPE結合ポケットの安定性、
3. $\text{CL}\kappa\text{-H}^{81}$ のイミダゾール環の互変異性化、
4. 方向性PFPE配置
5. PFPEステルと $\text{CL}\kappa$ との初期相互作用、
6. 触媒アミノ酸それぞれの反応性

50

として記載することができる。

【0625】

モデリング結果

C L κドメインにおける結合ポケットの同定は、P F Pエステルのモデリングおよびドッキング配置を可能にした。P F Pエステルを、個々のC L κ結合部位にドッキングされたようにモデリングした後に、この複合体の3D構造を、ハイブリッド法QM/MMを使用して最小化した。この手法では、P F PエステルをQMシステムとして画定し、C L κドメインをMM法によって処理した。複合体を最小化した後に、C L κとP F Pエステルとの間の分子間相互作用のネットワークが明らかとなった。このネットワークは、分子間水素結合、疎水性相互作用、およびπ電子スタッキングによって形成された。これらの力がすべて一緒に、C L κ-K⁸⁰へのP F Pエステルの方向性配置およびコンジュゲーションを担うネットワークの形成に関係しているようである。複合体の最小化構造は、C L κ-H⁸¹が重要な触媒アミノ酸であることを示している。

10

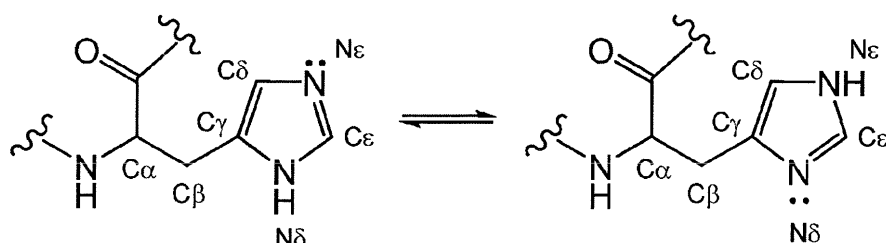
【0626】

ヒスチジン側鎖中のイミダゾール部分は、酵素反応において触媒アミノ酸として役立ち得、その際、触媒遷移状態の間に、イミダゾールは求核試薬として作用し、アシルイミダゾールを形成することが知られている[J Phys Chem B、2011年10月20日; 115(41): 11895~901. Epub 2011年9月23日]。ヒスチジンのイミダゾール環は、NδまたはNε原子がHと結合するかに応じて、互変異性化を受け得ることも知られている：

20

【0627】

【化82】



スキームI 互変異性体型Nδ

互変異性体型Nε

30

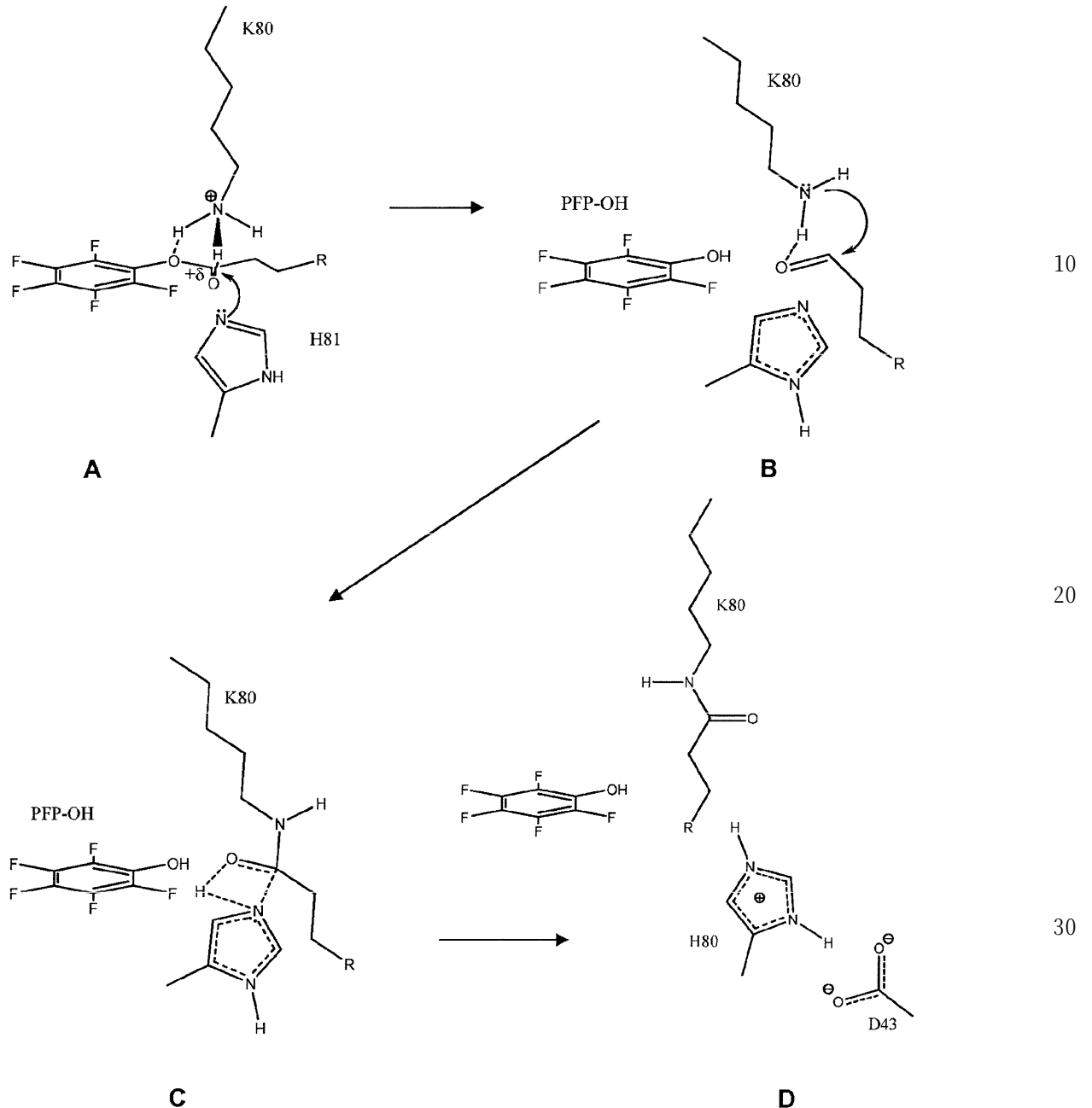
【0628】

P F P結合ポケットにおけるC L κ-H⁸¹の空間ポジショニングは、P F Pエステルのカルボニル炭素での求核的攻撃のためには、イミダゾール環C L κ-H⁸¹のNδ互変異性型が必要であることを指摘している。これは、Nεでの孤立電子対がP F Pエステルのカルボニル炭素と同じ平面にあることが必要であることも示している。これは、C L κ-H⁸¹のイミダゾール環が、Nδ互変異性型であると可能である（スキームIIを参照されたい）。互変異性平衡は、隣接する水素アクセプターアミノ酸との水素結合相互作用によって制御され得る。C L κ-H⁸¹の付近には、C L κ-D⁷⁷およびC L κ-D⁴³の2個のアスパラギン酸残基があり、これらの両方が、C L κ-H⁸¹イミダゾール環の互変異性化状態を制御すると考えられる。

40

【0629】

【化 8 3】



スキームII A:初期分子間複合体は、CLκ-K⁸⁰、PFP-エステル、およびCLκ-H⁸¹の間で形成される。B~C:アシルイミダゾールおよびPFPアルコールとの遷移状態。C:コンジュゲーション反応の生成物

【0630】

図12は、CLκ-H⁸¹、CLκ-D⁴³、およびCLκ-D⁷⁷の3D配置を、アスパラギン酸の酸素原子とイミダゾール環の窒素原子との間の距離と共に図示している。CLκ-D⁴³とCLκ-H⁸¹との間の水素結合は、触媒活性な互変異性型Nδを促進および安定化させるが、CLκ-D⁷⁷との水素結合は、CLκ-H⁸¹の触媒不活性な形態Nεを促進するはずである。CLκ-H⁸¹ NδおよびCLκ-D⁷⁷ Oδ（負に帯電）、CLκ-H⁸¹ NεおよびCLκ-D⁷⁷ Oδの間に形成される水素結合に加えて、CLκ-H⁸¹ Nδは、CLκ-D⁷⁷主鎖のカルボニル酸素と共に水素結合を形成し得る。この最後の相互作用は、CLκ-K⁸¹ Nδの触媒活性なコンホメーションを安定させ、これを触媒作用し得るようにする。本明細書において検討した変異の分析およびコンピュータによる作業から、CLκ-K⁸¹反応性のために最適なコンホメ

10

20

30

40

50

ーションは、 $N\delta$ を介しての $CL\kappa-D^{43}$ との水素結合に関係していることが分かる。それというのもこれは、 $CL\kappa-K^{80}$ $N\epsilon$ からの水素 $H\epsilon$ の移動を可能にする活性なコンホメーションを安定化させるためである。したがって、他の2種の $CL\kappa-K^{81}$ 互変異性型はおそらく、触媒反応において活性が低いか、または不活性であるはずである。

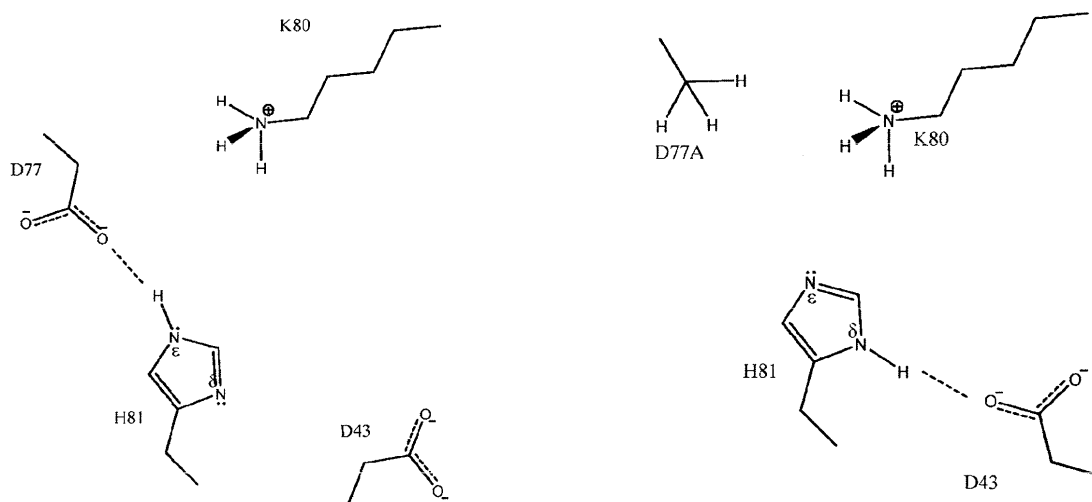
【0631】

$CL\kappa-D^{77}$ A変異の作用のモデリング

WTモデルから予測されたとおり、 $[CL\kappa-D^{77}A]$ ドメインにおいて、 $CL\kappa-H^{81}$ は、イミダゾール $N\delta$ 原子を介して $CL\kappa-D^{43}$ と共に水素結合を形成して、 $PFP-PEG$ 2分子中のエステル基のカルボニル炭素での求核的攻撃のために、 $N\epsilon$ において電子対を露出させる（スキームIII）。図13A、13B、および13Cは、結晶構造モデリングされた $CL\kappa$ および $CL\kappa-D^{77}A$ ドメインの比較を図示しており、 $CL\kappa-D^{77}A$ 変異体における $CL\kappa-H^{81}$ の空間的位置のシフトを示している。

【0632】

【化84】



スキームIII $N\epsilon$ 孤立電子対をもたらし $CL\kappa-H^{81}$ の能力に対する、 $CL\kappa-D^{77}A$ 変異の作用を示す図。

【0633】

$CL\kappa-D^{77}$ に対する変異

モデリングは、 $CL\kappa-D^{77}$ 変異が、 $CL\kappa-K^{80}$ のコンジュゲーション率に有意な影響を有するであろうことを示唆している。一連のQM/MM計算を、 PFP と複合させた $CL\kappa$ ドメインで行ったが、その際、 $CL\kappa-D^{77}$ を、すべての他の天然アミノ酸（ $CL\kappa-D^{77}C$ は除いた）に変異させた。

【0634】

モデリングおよび実験分析は、 $CL\kappa-D^{77}$ は PFP に結合し、触媒反応に関する PFP 部分のエステル原子における好ましくない電子密度を変化させることができることを示唆している。そうだとすると、 $CL\kappa-D^{77}A$ 変異は、 PFP エステルの反応性原子における電子密度のより良好な分布を可能にすることによって、コンジュゲーション率を向上させるであろう。

【0635】

$CL\kappa-D^{77}$ の変異体で行った計算結果の分析は、最良の性能を有する変異体（コンジュゲーション効率の点において）は、 PFP 部分への水素結合を形成し得ない小さな疎水性アミノ酸である可能性があることを示している。したがって、モデリングデータは、 $CL\kappa-D^{77}G$ 、 $CL\kappa-D^{77}P$ 、 $CL\kappa-D^{77}M$ 、 $CL\kappa-D^{77}L$ 、 $CL\kappa-D^{77}I$ 、 $CL\kappa-D^{77}A$ 、および $CL\kappa-D^{77}V$ の変異が、方向性コンジュゲーションを向上させるであろうことを示唆している。実施例26において見られたとおり、こ

れは、実験試験によって支持されている。疎水性アミノ酸を有するすべての $CL\kappa^{77}$ 変異体は、 $CL\kappa-H^{81}$ の互変異性平衡に対して影響を有さないので、 $CL\kappa-H^{81}$ は $N\delta$ 互変異性型のままであり、その結果、コンジュゲーション率は向上する。

【0636】

モデリングはまた、最も親水性のアミノ酸は、QM/MM計算に従うと、 $CL\kappa-D^{77}$ よりも高いタンパク質安定性をおそらくもたらし得ることを示唆しており；特に $CL\kappa-D^{77}S$ および $CL\kappa-D^{77}T$ 、他にも $CL\kappa-D^{77}Q$ 、 $CL\kappa-D^{77}N$ 、 $CL\kappa-D^{77}H$ 、および $CL\kappa-D^{77}R$ の変異が、方向性コンジュゲーションを向上させる可能性があるとして指摘している。実施例26において示されているとおり、これも、実験試験によって支持されている。

10

【0637】

相互作用エネルギーおよび電荷分布の変更に加えて、最も強い相互作用およびより低いコンジュゲーション率が、 $CL\kappa-D^{77}F$ および $CL\kappa-D^{77}Y$ 変異体で観察された。このモデルは、これらの芳香族アミノ酸の側鎖が結合ポケットに直接進入 (indude) し、PFP基との π 電子スタッキング相互作用におそらく関係していて、したがって、PFP部分の方向性配置を変化させることを示している。加えて、芳香族アミノ酸は、PFPを立体的に妨害して、WTタンパク質において可能な結合様式と同様の結合様式を防止して、PFP部分の方向性配置にマイナスの影響を及ぼし、コンジュゲーション率の低下をもたらし得る。興味深いことに、このモデルは、 $CL\kappa-D^{77}W$ の側鎖が、 $CL\kappa-D^{77}F$ および $CL\kappa-D^{77}Y$ の芳香族側鎖とはやや異なる空間的な位置を占めており、その際、 $CL\kappa-D^{77}W$ インドール基は、結合ポケットの外側にあり、結合ポケットに対するハローフェニルエステルの空間的アクセスを妨げるとは予測されないことを示唆している。このモデルはまた、 $CL\kappa-D^{77}E$ などの保存的変異は、 $CL\kappa-H^{81}$ の互変異性型に対して同様の作用をおそらく有するが、比較的長い側鎖によって、結合ポケットにおいて追加的な立体干渉をもたらすと予測している。 $CL\kappa-D^{77}C$ または $CL\kappa-D^{77}K$ への変異も、部位の反応性に干渉すると予測される。

20

【0638】

$CL\kappa-D^{77}$ が、イミダゾール環の $N\epsilon$ 上での水素原子の存在を支持する一方で、 $CL\kappa-D^{77}A$ は、 $N\delta$ 位に水素を維持することを支持する。この部位でのアミノ酸の空間的分布は、エステル基のカルボニル炭素での $N\epsilon$ による求核的攻撃を可能にし、方向性コンジュゲーションをさらに促進する触媒反応における、 $CL\kappa-H^{81}$ の $N\delta$ 互変異性型の重要な機能を示している。

30

【0639】

(実施例42)

$CL\kappa$ および $CL\kappa-D^{77}A$ のモデルをベースとする予測モデリング

タンパク質安定性およびPFPエステルとの相互作用強度に対する変異の影響を分析して、最も適している反応性の $CL\kappa$ の変異体を同定した。このコンピュータによる実験では、 $CL\kappa-K^{80}$ の $C\alpha$ 炭素から $10\text{ \AA}$ 距離以内にある重要なアミノ酸を選択して、分析した (それぞれの残基について特有の要件から、 $CL\kappa-K^{80}$ および $CL\kappa-H^{81}$ は除く)。

40

【0640】

$CL\kappa$ または $CL\kappa-D^{77}A$ とのPFPコンジュゲーションについてモデリングされた変異のうちの多く、またはほとんどについて、より大きいか、またはより小さいハローフェノールをZ1基として使用する場合、または特定の免疫グロブリンドメインの正確な寸法がそのような形態にはふさわしいと考えられる場合など、ポケットサイズを縮小または増大させることが望ましいことがあり得るので、ある種の用途では、 $CL\kappa$ または $CL\kappa-D^{77}A$ においてPFPコンジュゲーションを低減するであろう残基を置換または保持することが適切である可能性もあることは理解されるであろう。

【0641】

$CL\kappa-K^{75}$

50

この残基は、QM/MM計算によると、天然またはCLK-D⁷⁷A変異体におけるCLK-K⁸⁰のコンジュゲーション反応性に対して、何らかの直接的な影響を有するとは考えられない。

【0642】

CLK-A⁷⁶

CLK-A⁷⁶は、αヘリックスの始まりに位置し、CLK-D⁷⁷の水素結合カルボキシル基およびCLK-S⁷⁴のヒドロキシル基を含有する平面上にある。この位置は、大きな側鎖を有するアミノ酸がCLK-D⁷⁷と相互作用することを可能にし、それらは、コンジュゲーション反応、特に、水素結合の形成を可能にする親水基とのコンジュゲーション反応にプラスの影響を有し得る。この残基でのほとんどのアミノ酸置換、具体的には、CLK-S⁷⁴A、CLK-S⁷⁴D、CLK-S⁷⁴E、CLK-S⁷⁴I、CLK-S⁷⁴L、CLK-S⁷⁴M、CLK-S⁷⁴F、CLK-S⁷⁴W、およびCLK-S⁷⁴Vは、コンジュゲーションにほとんど作用を有しないと予測されるであろう。水素結合の可能性をもたらし得るであろう他の残基、すなわち、CLK-S⁷⁴R、CLK-S⁷⁴N、CLK-S⁷⁴Q、CLK-S⁷⁴H、およびCLK-S⁷⁴K、ならびにより低い度合いでCLK-S⁷⁴S、CLK-S⁷⁴T、およびCLK-S⁷⁴Yは、コンジュゲーションを増強すると予測されるであろう。CLK-S⁷⁴GおよびCLK-S⁷⁴Pなどのαヘリックスを破壊する残基は、CLK-K⁸⁰への方向性コンジュゲーションに対して多少のマイナスの作用を有し得るが、方向性コンジュゲーションはおそらく排除されず、単に低下する。システインの導入は、発現の際に凝集を形成する可能性のリスクを提示するであろう。

【0643】

CLK-Y⁷⁸

CLK-Y⁷⁸はαヘリックス上に位置し、結合ポケットの反対方向に面している。CLK-Y⁷⁸は、周囲アミノ酸と共にいくつかの疎水性相互作用を成しており、CLK構造を支持している。したがって、より小さい側鎖(Ala、Ser、Thr、およびVal)またはαヘリックスの安定性もしくは形成に影響を及ぼすもの(Gly、Pro)は、CLK-K⁸⁰へのコンジュゲーション反応におそらく不利な影響を及ぼすが、ただし、これらの変異は、CLK-K⁸⁰反応性に直接的に干渉するとは予測されていないので、そのような変異は、方向性コンジュゲーションを必ずしも排除し得ない。加えて、CLK-Y⁷⁸は、CLK-R¹⁰³の側鎖と相互作用すると考えられるので、疎水性または負に帯電している側鎖(Asn、Asp、Gln、Glu、Phe、およびTrp)は、コンジュゲーションを支持して、この相互作用を促進すると予測されるであろう。他の側鎖(Arg、His、Ile、Leu、Lys、およびMet)は、コンジュゲーション反応をもたらすとは予測されないであろう。

【0644】

CLK-E⁷⁹

モデリングは、CLK-E⁷⁹の側鎖が結合部位とは逆の方向に向いていることを示唆している。加えて、CLK-E⁷⁹は、CLK-K⁷⁵の側鎖と共に塩橋を形成していると考えられる。モデリングに基づき、この位置でのほとんどのアミノ酸置換は、コンジュゲーション反応に対してほとんど作用を有さないであろうと仮定される(Asn、Asp、Gln、His、Met、Phe、Ser、Thr、Tyr、およびTrp)。小さな親水性または帯電残基は、おそらくコンジュゲーション反応を支持するが(Ala、Arg、Ile、Leu、Lys、およびVal)、αヘリックスの安定性または形成に影響を及ぼすもの(Gly、Pro)は、方向性コンジュゲーションを必ずしも排除しないが、CLK-K⁸⁰へのコンジュゲーション反応に不利な影響を及ぼし得る。

【0645】

CLK-V⁸³

この残基は、実験データおよびQM/MM計算により、CLK-K⁸⁰とのコンジュゲーション反応に対して直接的な影響を有するとは考えられない。

【 0 6 4 6 】

【表 6 7】

	A ⁷⁶	D ⁷⁷	Y ⁷⁸	E ⁷⁹
G	0	+++	--	-
P	0	+++	--	-
A	WT	++	-	+
V	0	+	-	+
L	0	++	0	+
I	0	++	0	+
M	0	+++	0	0
F	0	---	+	0
W	0	+	+	0
Y	+	---	WT	0
T	+	+++	-	0
S	+	+++	-	0
N	++	++	+	0
Q	++	++	+	0
D	0	WT	+	0
E	0	--	+	WT
H	++	++	0	0
R	++	++	0	+
K	++	--	0	+

10

20

30

表 65 CLK-K⁸⁰ への方向性コンジュゲーションに対する一定の CLK 残基での変異の作用のまとめ

40

【 0 6 4 7 】

追加のモデリング

CLκ-V^{4 2}

CLκ-V^{4 2} は、β ストランド C の末端、CD ループの始まりにポジショニングされている。構造を慎重に試験したところ、CLκ-V^{4 2} は、CLκ-H^{8 1} のイミダゾール環の下に位置していることが観察された（図 1 4 および 1 5）。CLκ-H^{8 1} と CLκ-V^{4 2} との間の相互作用の性質の決定を助けるために、イミダゾール環での重心の x y z 座標を計算し、続いて、計算された重心と CLκ-V^{4 2} の水素原子 H δ との間の距離を測定した。この 2.9 Å の距離は、イミダゾール環上の π 電子と CLκ-V^{4 2} の水素 H δ との間の直接的な相互作用を示している。したがって、この相互作用は、ポケット

50

内における $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ の最適なポジショニングに、かつ $\text{N}\delta$ 互変異性体への互変異性平衡のシフトのために強い影響を及ぼすと考えられる。したがって、必ずしもではないが、 $\text{CL}\kappa\text{-V}^{4\ 2}$ の存在は、方向性コンジュゲーションに対してプラスの影響を発揮する。これらの分析は、 $\text{CL}\kappa\text{-V}^{4\ 2}$ A 変異がコンジュゲーション率の低下の原因となるということが見出された実験データによって指示されている（表 5 4）。モデリングは、 $\text{CL}\kappa\text{-V}^{4\ 2}$ I が、 $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ イミダゾール環のポジショニングを援助して、方向性コンジュゲーションをおそらく支持するが、ただし、やや大きな側鎖は、結合ポケットのサイズ全体を縮小させるであろうことを示唆している。多くの状況において、ポケットのサイズのこの縮小は、方向性コンジュゲーション機構に対して明らかな作用を有し得ない。 $\text{CL}\kappa\text{-V}^{4\ 2}$ L もまた、 $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ イミダゾール環のポジショニングを援助し得ることがある。

10

【0648】

$\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$

$\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ は、CD ループ上に位置している。天然 $\text{CL}\kappa$ では、 $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ は、 $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ および $\text{CL}\kappa\text{-K}^{8\ 2}$ の主鎖と相互作用して、タンパク質の安定性に寄与していると考えられる。 $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ の $\text{H}\delta$ と $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ のカルボキシル基との間の水素結合は、 $\text{CL}\kappa$ の結晶構造では同定されなかった。これは、 $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ が $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ の $\text{N}\delta$ 触媒活性形態の互変異性平衡に軽微な影響しか発揮しないことを示唆し得る。しかしながら、2. 12. 1. f x - [$\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ A] 変異体での実験分析は、この残基の変異が、方向性コンジュゲーションに対して有意な阻害作用を有することを示した。モデル全体をまとめると、 $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ が触媒活性形態と不活性形態との間を行き来して、 $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ と $\text{CL}\kappa\text{-D}^{7\ 7}$ との間に水素結合を形成していて、そしてそうであるとすると、 $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ 残基の除去は、活性な $\text{N}\delta$ 互変異性体へと $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ をプッシュする力の一方を排除する可能性がある。

20

【0649】

$\text{CL}\kappa\text{-D}^{7\ 7}$ A 結晶構造の分析は、水素 $\text{N}\delta$ と $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ カルボキシル基との間のよく画定された水素結合を明らかにした。これは、図 1 3 および 1 4 に示されているとおり、 $\text{CL}\kappa\text{-D}^{7\ 7}$ A 変異体の最も重大な作用の 1 つは、 $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ の触媒的に有利な互変異性型 $\text{N}\delta$ の安定化にあることを示唆している。最終的には、 $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ と $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ とが近いことによって、 $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ が、推定の反応機構の最後のステップにおいて、水素原子のレシピエントとして触媒反応に参加することが可能になるであろう（スキーム I I I）。したがって、天然 $\text{CL}\kappa$ および $\text{CL}\kappa\text{-D}^{7\ 7}$ A 変異体における $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ の役割は、 $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ の触媒活性な $\text{N}\delta$ 互変異性型の安定化と、水素原子のレシピエントとしての、触媒反応への参加とにあると考えられる。

30

【0650】

モデリング分析は、天然 $\text{CL}\kappa$ における P F P 分子の結合が、 $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ の互変異性型によって制御され、次いで、この結合の親和性は、互変異性平衡定数の状態によって制御されることを強く示唆している。 $\text{N}\delta$ 互変異性型の存在は、 $\text{N}\epsilon$ 上の孤立電子対が P F P カルボニルを求核的に攻撃することを可能にする（スキーム I I I）。

【0651】

$\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ は、水素イオンのアクセプターであることによって、触媒反応に関係している（スキーム I I I）。 $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ をインシリコで、19 種のアミノ酸すべてに変異させたが、最終的な一連の計算された変異体において、WT タンパク質（ $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ を含む）は、 $\text{CL}\kappa\text{-P F P}$ エステル複合体で最も高い相互作用エネルギーをもたらし、その際、 $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ N も同様の鎖長であり、 $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ $\text{N}\delta$ への水素結合を形成して、 $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ の触媒活性な互変異性型 $\text{N}\delta$ を補助し得ると予測された。おそらく許容できる置換である他の残基は、 $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ E、 $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ Q、および $\text{CL}\kappa\text{-D}^{4\ 3}$ S であり、これらは、 $\text{CL}\kappa\text{-H}^{8\ 1}$ と所望の H 結合を形成し得るが、P F P との $\text{CL}\kappa$ コンジュゲーションのための最適なサイズであるにはやや大きすぎるか、または小さすぎるかのいずれかの鎖長をおそらく有するが、P F P との方向性コンジュゲ

40

50

ーションのための非CL κ 免疫グロブリンドメインを最適化するためか、または異なるハローフェニルエステルとのコンジュゲーションのためのIgドメインを最適化するためかのいずれかに、より良好に適していることがある。

【0652】

CL κ -N⁴⁴

CL κ -N⁴⁴は、CDループの上に位置している。その側鎖は、PF₃P結合ポケットから離れて、外側に向いており、コンジュゲーション反応に対していずれの役割も影響も有しないと考えられる。QM/MM計算は、極性アミノ酸および負に帯電した側鎖を有するものは、やはりポケットの外側に位置しているCL κ -K⁴¹との推定の相互作用によって、タンパク質安定性を増強し得ると予測した。

10

【0653】

CL κ -L⁴⁶

実験データに基づき、さらには、本発明者らのQM/MM計算からも、CL κ -L⁴⁶A変異は、コンジュゲーション率に相対的に中性の影響を有した。CL κ -L⁴⁶Aは、PF₃P結合ポケットの外側に位置するが、これは、その側鎖のサイズによって、ポケット形状を促進し得る。ポケットの外側に位置することで、これは、同じくポケットの外側に位置するアミノ酸と相互作用し得る。大きくて親水性の側鎖への変異は、CL κ -Q³⁹との相互作用によって、タンパク質の安定性を増大させ、QM/MM計算によれば、PF₃Pポケットの形状を支持し得る。

20

【0654】

CL κ -Q⁴⁷

CL κ -Q⁴⁷A変異によって、コンジュゲーション率が向上した。この変異はおそらく、モデリング計算によれば、PF₃P結合部位のサイズを増大させて、複合体の形成およびタンパク質の安定性にプラスの影響を及ぼすことによって作用を発揮している。QM/MM計算によれば、より大きな側鎖を有するアミノ酸は、コンジュゲーションにややマイナスの影響をおそらく及ぼす。したがって、CL κ -Q⁴⁷A、CL κ -Q⁴⁷G、CL κ -Q⁴⁷V、CL κ -Q⁴⁷I、CL κ -Q⁴⁷L、CL κ -Q⁴⁷T、CL κ -Q⁴⁷S、CL κ -Q⁴⁷N、CL κ -Q⁴⁷D、CL κ -Q⁴⁷H、CL κ -Q⁴⁷P、またはCL κ -Q⁴⁷Eへの変異がおそらく、有利か、または中性であるのに対して；CL κ -Q⁴⁷W、CL κ -Q⁴⁷F、CL κ -Q⁴⁷Y、またはCL κ -Q⁴⁷Kへの変異は、CL κ ドメインへのPF₃Pコンジュゲーションにややマイナスの影響を有し得る。前のおり、ある種の用途では、より小さいハローフェノールをZ1基として使用する場合、または特定の免疫グロブリンドメインの正確な寸法がそのような形態にふさわしいと考えられる場合など、ポケットサイズを縮小させることが望ましいことがあることは理解されるであろう。

30

【0655】

CL κ -S⁴⁸

実験データによれば、CL κ -S⁴⁸Aの変異によって、コンジュゲーション率が向上した：モデリングは、この理由が十中八九、ポケットの静電特性の変化によることを示唆している。したがって、この位置の疎水性アミノ酸はおそらく、方向性コンジュゲーションにプラスの影響を有する。そのため、次の変異が、特に有利であり得る：CL κ -S⁴⁸A、CL κ -S⁴⁸G、CL κ -S⁴⁸V、CL κ -S⁴⁸I、CL κ -S⁴⁸L、CL κ -S⁴⁸P、およびCL κ -S⁴⁸M。他の変異もおそらく、許容される。

40

【0656】

(実施例43)

CL κ -D⁷⁷Aの二重および三重変異

抗体2.12.1.f_xを使用して、CL κ 領域へのさらなる変異の作用を試験した。前のおり、残基のナンバリングは、CL κ 内でのそれらの位置による（例えば、配列番号6）。コンジュゲーション機構を理解するために、CL κ -D⁴³およびCL κ -H⁸¹をそれぞれ、2.12.1.f_x-[CL κ -D⁷⁷A]抗体においてAlaに変異さ

50

せた。変異を、QuickChange部位特異的突然変異誘発キット (Stratagene) に記載されているプロトコルに従って、2.12.1.fx 軽鎖で生成した。抗体 2.12.1.fx、2.12.1.fx-[CLκ-D⁷⁷A] (配列番号 37 を含む CLκ)、2.12.1.fx-[CLκ-D⁴³A] (配列番号 15 を含む CLκ)、2.12.1.fx、2.12.1.fx-[CLκ-D⁴³A/D⁷⁷A] (配列番号 127 を含む CLκ)、2.12.1.fx-[CLκ-D⁷⁷A/H⁸¹A] (配列番号 128 を含む CLκ)、および 2.12.1.fx-[CLκ-D⁴³A/D⁷⁷A/H⁸¹A] (配列番号 129 を含む CLκ) を HEK293 細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質 A 親和カラムを使用して精製した。精製した mAb を、MS を使用して特徴づけた。

10

【0657】

発現した抗体を、pH 5.5 の 20 mM 酢酸ナトリウム、200 mM のトレハロースに、20 mg/ml で緩衝液交換した。次いで、抗体溶液を pH 7.7 の 60 mM のリン酸ナトリウムでスパイクした。[PFPP-PEG₅-K¹¹-配列番号 27] (ABP) を、50 % のプロピレングリコールで再懸濁し、タンパク質と 4.3 : 1 のモル比で混合し、室温で一晩反応させた。すべての試料を 2 mg/ml に希釈し、サイズ排除クロマトグラフィー-質量分析 (SEC-MS) によって、インタクトなコンジュゲートされたタンパク質として分析して、コンジュゲート形態のタンパク質の数および定量化を決定した。この技術で、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定し；複数の ABP コンジュゲーション部位は、ABP の質量差によって分離された別個のシグナルとして観察される。複数の ABP コンジュゲーション種の相対的定量化を、シグナルの大きさを測定することによって行う。%CA の結果を、表 66 に示す。

20

【0658】

【表 68】

	CLκ 配列 番号	%CA					平均 CA
		0	1	2	3	4	
2.12.1.fx	6	1	15	53	26	5	2.2
D ⁷⁷ A	37	2	3	56	32	7	2.39
D ⁴³ A	15	17	38	31	14	0	1.41
D ⁴³ A/D ⁷⁷ A	127	4	21	46	21	7	2.06
D ⁷⁷ A/H ⁸¹ A	128	33	38	20	10	0	1.07
D ⁴³ A/D ⁷⁷ A/H ⁸¹ A	129	25	40	28	7	0	1.18

30

表 66 2.12.1.fx-[CLκ-変異体]と ABP とのインタクトなコンジュゲーションの分析

【0659】

ABP コンジュゲーションの程度を、2.12.1.fx および 2.12.1.fx-[CLκ 変異体] の軽鎖および重鎖で別々に試験した。MAC を変性し、ジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩およびジチオトレイトールを使用して還元した。生じた遊離の軽鎖および重鎖を、LCMS を使用して分析して、それぞれのコンジュゲーションプロファイルを決した (表 67)。

40

【0660】

【表 6 9】

	CLk 配列 番号	LC %CA			平均 CA- LC	HC %CA		平均 CA- HC	1LC WT%
		0	1	2		0	1		
2.12.1.fx	6	23	69	8	0.85	86	14	0.14	
D ⁷⁷ A	37	1	92	7	1.06	97	3	0.03	133
D ⁴³ A	15	68	30	1	0.33	79	21	0.21	43
D ⁴³ A/D ⁷⁷ A	127	24	64	12	0.88	90	10	0.1	93
D ⁷⁷ A/H ⁸¹ A	128	72	28	0	0.28	85	15	0.15	41
D ⁴³ A/D ⁷⁷ A/H ⁸¹ A	129	76	20	4	0.28	87	13	0.13	29

表 67 2.12.1.fx-[CLk-変異体]と ABP との還元した重鎖、軽鎖のコンジュゲーションの分析。個々の WT 操作に対する 1-LC%の%を、表 67 に記載されているとおり、右欄に示す。

【0 6 6 1】

これらの結果は、H i s 互変異性体の仮定と一致する。C L κ-D^{7 7}A 変異体では、C L κ-D^{4 3}が C L κ-H^{8 1}の触媒活性な互変異性体を安定させて、そしてこのことが、C L κ-K^{8 0}が P F P エステルに対してより受容性かつ反応性であることを可能にしている。逆に、C L κ-D^{4 3}A 変異体では、C L κ-D^{7 7}が、C L κ-H^{8 1}の不活性な互変異性体を安定化させているので、C L κ-K^{8 0}で観察される方向性コンジュゲーションの低減に至っている。二重変異体の C L κ-D^{4 3}A/D^{7 7}A では、C L κ-H^{8 1}と、C L κ-D^{4 3}または C L κ-D^{7 7}のいずれかとの間に相互作用はなく、したがって、二重変異体は、WT C L κとより類似して作用する。

【0 6 6 2】

(実施例 4 4)

ウサギ C L κ 分析

ウサギ抗体の軽鎖カッパ領域 (r C L κ) は、他の免疫グロブリンの 3 D 構造と同じ 3 D 構造を有する。r C L κ は、1 5 1 位 (カバット番号) に A s p、1 8 8 位に S e r、および 1 8 9 位に H i s を有する (r C L κ-D^{4 3}、r C L κ-S^{8 0}、r C L κ-H^{8 1})。r C L κ-S^{8 0}K 変異体は、P F P 方向性コンジュゲーションのための反応部位を作り得ると仮定された。この仮定を確認するために、2 種のトラスツズマブウサギキメラ抗体を構築した。m A b 「r T r a s t」(ウサギトラスツズマブ)は、r C L κ およびウサギ定常重鎖 (r C H) (それぞれ配列番号 1 3 0 および 1 3 1) に融合しているトラスツズマブの V L および V H ドメイン (それぞれ配列番号 7 5 および 7 2) を含み、全長 r T r a s t-L C (配列番号 1 3 2) および r T r a s t-H C (配列番号 1 3 3) を生成する。

【0 6 6 3】

r T r a s t-[r C L κ-S^{8 0}K] は、r C L κ-S^{8 0}K (配列番号 1 3 4) およびウサギ定常重鎖 (r C H) (配列番号 1 3 1) に融合しているトラスツズマブの V L および V H ドメイン (それぞれ配列番号 7 5 および 7 2) を含み、全長 r T r a s t-L C-[r C L κ-S^{8 0}K] (配列番号 1 3 5) および r T r a s t-H C (配列番号 1 3 3) を生成する。

【0 6 6 4】

ウサギ I g G 重鎖およびカッパ 1 軽鎖を、トラスツズマブ可変ドメインおよびベクターとオーバーラップしている末端をそれぞれ有するプラスミド p F U S E-C H I g-r G および p F U S E 2 s s-C L I g-r k 1 (I n v i v o g e n) から P C R した。トラスツズマブ V H および V L を、ベクターおよびウサギ定常ドメインとオーバーラップしている末端を有する合成遺伝子から P C R した。Q u i c k P C R C l o n i n g K i t (B P S B i o s c i e n c e) に記載されているプロトコルに従って、P C R を、B g l I I および N h e I でカットされた修飾 p C E P 4 ベクター (I n v i t r o

gen)と混合した。挿入DNAを、DNA配列決定によって確認した。Quick PCR Cloning Kit (BPS Bioscience)に記載されているプロトコルに従って、rCLκ-S⁸⁰K変異を生成した。変異をオリゴヌクレオチドプライマーによって導入し、BglIIおよびNheIでカットされた修飾pCEP4ベクター (Invitrogen)にクローニングした。挿入DNAをDNA配列決定によって確認した。

【0665】

キメラmAbをHEK293細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製したmAbをMSを使用して特徴づけた。それぞれの抗体をpH5.5の20mM酢酸ナトリウム、200mMのトレハロースに、20mg/mlで緩衝液交換し、次いで、pH7.7の60mMのリン酸ナトリウムでスパイクした。[PFPP-PEG₅-K¹¹-配列番号27] (ABP)を、50%のプロピレングリコールで再懸濁し、タンパク質と4.3:1のモル比で混合し、室温で一晩反応させた。すべての試料を2mg/mlに希釈し、サイズ排除クロマトグラフィー質量分析 (SEC-MS)によって、インタクトなコンジュゲートされたタンパク質として分析して、コンジュゲート形態のタンパク質の数および定量化を決定した。この技術で、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定し；複数のABPコンジュゲーション部位は、ABPの質量差によって分離された別個のシグナルとして観察される。複数のABPコンジュゲーション種の相対定量化を、シグナルの大きさを測定することによって行う。

【0666】

ABPコンジュゲーションの程度を、抗体の軽鎖について試験した。MACを変性し、ジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩およびジチオトレイトールを使用して還元した。生じた遊離の軽鎖および重鎖を、LCMSを使用して分析して、それぞれのコンジュゲーションプロファイルを決定した (表68)。

【0667】

【表70】

	%CA				平均 CA	LC %CA			平均 CA- LC	1LC WT%
	0	1	2	3		0	1	2		
rTrast	58	24	19	0	0.61	56	38	6	0.5	
rTrast-[rCLκ-S ⁸⁰ K]	10	25	54	11	1.657	18	73	8	0.89	192

表 68 ABP とコンジュゲートされたウサギキメラのインタクトなコンジュゲーションおよび還元した軽鎖の分析。

【0668】

rCLκ-S⁸⁰K変異は、軽鎖での全体コンジュゲーション (0.61から1.657に) および1CA (38%から73%に) を有意に上昇させた。この結果は、重要な残基、CLκ-K⁸⁰H⁸¹が免疫グロブリン上に存在する限り、方向性コンジュゲーション部位がヒト以外の種からのCLκ鎖上に作られ得ることを示唆している。個々のWT操作に対する1-LC%の%を、表68に記載されているとおり、右欄に示す。

【0669】

(実施例45)

ラムダ鎖

上記の実施例10において実証されたとおり、hCLλは、PFPEステルとの方向性コンジュゲーションを実証しない。hCLλは、hCLκ-D⁴³ (CLλ-D⁴⁵) およびhCLκ-H⁸¹ (CLλ-H⁸²) でhCLκと配列同一性を共有し、hCLκ-K⁸⁰ (CLλ-S⁸¹) の位置にセリンを有する。CLλ-S⁸¹K変異体は、CLλ-S⁸¹K残基でのPFPコンジュゲーションを可能にし得ることが仮定された。

【0670】

CL κ およびCL λ (図17および18)の結晶構造を比較すると、CL κ -V⁴²は、推定のPF₂結合ポケットの底部に位置する一方で、CL λ における対応する残基はCL λ -A⁴⁴である。上記で検討したとおり、CL κ -V⁴²A変異は、おそらくCL κ -H⁸¹のイミダゾール環の配向を安定化させるCL κ -V⁴²の能力によって、方向性コンジュゲーションにマイナスの影響を有する。モデリングは、CL λ -A⁴⁴V変異が、CL λ -H⁸²に対して同様の作用を発揮するはずであることを示唆している。

【0671】

実施例10および実施例16～18においてのとおり、モノクローナル抗ヒトIL22抗体(hIL22)を、例示的な、CL λ を含む抗体として使用した。hIL22は、配列番号136および137(それぞれhIL22-LCおよびhIL22-HC)、なら

10

【0672】

方向性コンジュゲーションに対する様々なCL λ 変異の作用を評価するために、hIL22のいくつかの変異体バージョンを生成した。すべてのhIL22変異抗体は、配列番号137(hIL22-HC)および配列番号138(hIL22-CL λ -VL)を含んだ。

【0673】

hIL22-[LKJ]は、実施例15において記載されたとおりの λ/κ スワップを含み、配列番号61のCLを含んだ。hIL22-[CL λ -S⁸¹K]は、CL λ -S⁸¹Kの単一の残基スワップを含み、配列番号140を含んだ。hIL22-[CL λ -Q⁷⁸A/S⁸¹K]は、ループ中に二重変異を含み、配列番号141を含んだ。hIL22-[CL λ -A⁴⁴V/S⁸¹K]は、CL λ -S⁸¹K残基スワップ、他にも「結合ポケット」の底部にCL λ -A⁴⁴V変異を含み、配列番号142を含んだ。hIL22-[CL λ -A⁴⁴V/Q⁷⁸A/S⁸¹K]は、CL λ -Q⁷⁸AおよびCL λ -S⁸¹Kの両方のループ変異、さらには、「結合ポケット」CL λ -A⁴⁴V変異を含み、配列番号143を含んだ。すべての点突然変異を、hIL22-LCで、QuickChange部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene)に記載されているプロトコルに従って生成した。変異を、オリゴヌクレオチドプライマーによって導入し、DNA配列決定によって確認した。

20

【0674】

hIL22-[CL λ - λ ⁷⁶⁻⁸⁴/145]は、CL λ -P⁷⁶からCL λ -S⁸³まで(それらを包括)に位置するCL λ E-Fループの代わりに、配列番号145の挿入を含んだ。配列番号145は、[CL κ -D⁷⁷A]-K⁷⁵から[CL κ -D⁷⁷A]-K⁸²まで(それらを包括)の[CL κ -D⁷⁷A] E-Fループ(すなわち、 β ストランドEとFとの間)に対応する配列KAA₂YE₂KHKVを含む。

30

【0675】

hIL22-[CL λ - λ ⁷⁶⁻⁸⁴/145]を、オーバーラップPCRによって生成した。変異を、オリゴヌクレオチドプライマーによって導入した。配列番号145をコードするリバースプライマーと対になっているhIL22-LCの5'末端に特異的なプライマー、およびIL22-LCの3'末端に特異的なリバースプライマーと対になっている配列番号145をコードするフォワードプライマーを使用して、IL22-LCをテンプレートとして使用して、CL κ E-Fループを持つDNA断片をPCR増幅させた。これら2種のPCR産物をテンプレートとして混合し；IL22-LCフォワードプライマーおよびリバースプライマーをオーバーラップPCR反応において使用して、配列番号145を有する全長IL22-LC DNAを増幅した。次いで、PCRを、制限酵素BglIIおよびNheIで消化した。消化されたPCRを、BglIIおよびNheIでカットされた修飾pCEP4プラスミド(Invitrogen(登録商標))と連結させた。

40

【0676】

変異させたmAbをHEK293細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質A親和カラム

50

を使用して精製した。精製したmAbを、MSを使用して特徴づけた。

【0677】

それぞれの抗体を、pH 5.5の20mM酢酸ナトリウム、200mMのトレハロースに、20mg/mlで緩衝液交換し、次いで、pH 7.7の60mMのリン酸ナトリウムでスパイクした。[PFPP-PEG₅-K¹¹-配列番号27] (ABP)を、50%のプロピレングリコールで再懸濁し、タンパク質と4.3:1のモル比で混合し、室温で一晩反応させた。すべての試料を2mg/mlに希釈し、ABPコンジュゲーションの程度を、抗体の軽鎖および重鎖で別々に試験した。MACを変性し、ジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩およびジチオトレイトールを使用して還元した。生じた遊離の軽鎖および重鎖を、LCMSを使用して分析して、それぞれのコンジュゲーションプロファイルを設定した(表69)。

【0678】

【表71】

ABP とコンジュゲートされた Ab	CL 配列番号	LC %CA				HC %CA			
		0	1	2	平均 LC	0	1	2	平均 HC
2.12.1.fx	6	15	79	6	0.91	93	7	0	0.07
2.12.1.fx-CLK-D ⁷⁷ A	37	0	92	8	1.08	98	2	0	0.02
トラスツズマブ- WT	76	32	66	2	0.7	83	17	0	0.17
トラスツズマブ- CLK-D ⁷⁷ A	77	0	95	5	1.05	90	10	0	0.1
hIL22	136	100	0	0	0	76	22	2	0.26
hIL22-[LKJ]	61	55	45	0	0.45	79	21	0	0.21
hIL22-[CLλ-S ⁸¹ K]	140	69	31	0	0.31	80	20	0	0.2
hIL22-[CLλ-Q ⁷⁸ A/S ⁸¹ K]	141	89	11	0	0.11	85	15	0	0.15
hIL22-[CLλ-A ⁴⁴ V/S ⁸¹ K]	142	48	52	0	0.52	87	13	0	0.13
hIL22-[CLλ-A ⁴⁴ V/Q ⁷⁸ A/S ⁸¹ K]	143	30	70	0	0.7	82	18	0	0.18
hIL22-[CLλ-λ ⁷⁶⁻⁸⁴ /145]	144	83	17	0	0.34	82	18	0	0.2

表 69 ラムダ抗体および変異体の還元された重鎖、軽鎖のコンジュゲーションの分析

【0679】

単一の点突然変異CLλ-S⁸¹Kは、CLλへのPFPPコンジュゲーションを可能にした。LC% 1CAは、変異されていないhIL22と比較して、CLλ-S⁸¹K変異体で0%から31%へと上昇し、その際、さらなるコンジュゲーション付加が、抗体上のいずれか他の単一部位以外の新たに作られたコンジュゲーション部位で起こっているようであった。ペプチドマッピング研究によって、コンジュゲーション事象が、CLλ-S⁸¹Kで起こっていることが確認された(表70)。

【0680】

【表72】

タンパク質鎖	ペプチド	平均 Δ(%コンジュゲーション、n=3)
hIL22-[CLλ-S ⁸¹ K]-CL	配列番号 140、残基 80-85	54 ±10
hIL22-[CLλ-S ⁸¹ K]-HC	配列番号 137、残基 96-103	21 ±10
hIL22-[CLλ-S ⁸¹ K]-HC	配列番号 137、残基 95-103	19 ±10

表 70 hIL22-[CLλ-S⁸¹K]-CL でのペプチドマッピング研究の概要

【0681】

表69を参照し直すと、CLλ-S⁸¹KおよびCLλ-A⁴⁴V (hIL22-[C

10

20

30

40

50

L λ -A⁴⁴V/S⁸¹K]) での変異の組合せは、軽鎖 1 C A を 52 % までさらに上昇させた。

【0682】

興味深いことに、C L λ -Q⁷⁸A/C L λ -S⁸¹K 二重変異は、W T C L λ と比較して C L λ -S⁸¹K のコンジュゲーションを向上させたが (1 C A は 0 % から 11 % に)、この向上は、単一の C L λ -S⁸¹K 変異体において見られた向上よりも、顕著なものではなかった。これは、モデルとよく相関している：C L κ -D⁷⁷の変異の作用は、C L κ -D⁷⁷と C L κ -H⁸¹との間の水素結合を除去して、C L κ -H⁸¹が、触媒互変異性な N δ 型に戻ることを可能にすることである。C L κ -D⁷⁷に対応する位置は C L λ -Q⁷⁸であり、これについては、モデリングおよび変異分析の両方が、C L λ -H⁸²に対して限定的な作用を有するであろうと示唆している。まとめると、これは、方向性コンジュゲーションに対する C L λ -Q⁷⁸A の低い作用がおそらく、結合ポケットのサイズおよび形状に対する変更に起因することを示唆している。

10

【0683】

しかしながら、C L λ -A⁴⁴V/Q⁷⁸A/S⁸¹K の三重変異の結果が、最も意外であった。1 C A % によって測定されるとおりの方向性コンジュゲーションが 70 % まで上昇し；天然 C L κ ドメインにおいて典型的に見られるレベルを達成した。

【0684】

これらの結果および分析は、ループスワップ (h I L 22-[C L λ - λ ⁷⁶⁻⁸⁴/145]) において見られた方向性コンジュゲーションの同様のレベルによって指示された。

20

【0685】

概して、これらのデータは、結合ポケットのサイズおよび形状が使用される特異的な Z 基に適合していることを条件として、C L λ -Q⁷⁸A 変異こそが、C L λ -S⁸¹K コンジュゲーションの方向性を改善することを示唆した。さらに、C L λ 変異体の結果は、モチーフ K H が、正確な 3 D 位置に存在することを条件として、方向性コンジュゲーション部位が C L κ 以外の免疫グロブリンの上で作られ得ることを示唆した。もちろん、結合ポケットは、使用される特異的なハローフェニルエステルを収容するために適したサイズおよび形状でなければならず、本明細書において実証されているとおり、C L κ -V⁴²、C L κ -D⁴³、および C L κ -D⁷⁷に対応する残基の存在または不在などの追加の特徴が、特異的な免疫グロブリンドメインおよびハローフェニルエステルに関係した K H モチーフの方向性コンジュゲーションの率および最適化に対して有意な作用を有し得る。P F P をこれらの実施例では使用したが、許容されるレベルの方向性コンジュゲーションを伴う他の Z 基を選択することができることと、合理的なモデリング技術を使用して、所望の Z 基、結合ポケットのサイズ、および活性な結合ポケットを維持するために必要な特異的な変異の間でバランスを得ることができることは、明らかである。

30

【0686】

(実施例 46)

C H ドメイン上での P F P コンジュゲーション部位の再現：

抗体の C H ドメインも、免疫グロブリン構造を含む。実施例 41 および 42 において記載したとおりにドメインをモデリングする前に、コンジュゲーションモチーフを他の C H ドメインの E F 接続鎖の E F ループ部分に移動させると、方向性コンジュゲーションが可能となり得ると仮定された。C H γ 1 (配列番号 147)、C H γ 2 (配列番号 155)、C H γ 3 (配列番号 158)、C L κ (配列番号 6)、および C L λ (配列番号 57) ドメインの配列アラインメントを図 16 に示す。

40

【0687】

2 種の変異体バージョンを、C H1 ドメイン上で製作した。

【0688】

h C H γ 1-m1 では、配列番号 147 の残基 L⁷⁶-T⁸⁰に対応する配列 L G T Q T (配列番号 152) を除去し、C L κ の E⁷⁹-V⁸³に対応する E K H K V (配列番

50

号153)に置き換えた。生じた変異体hCH γ 1-m1は配列番号148を含んだ。

【0689】

CH γ 1-m2では、配列番号147の残基L⁷⁶-T⁸⁰に対応する配列LGTQT(配列番号152)を除去し、CL κ -のY⁷⁸-V⁸³に対応するYEKKKV(配列番号154)に置き換えた。生じた変異体hCH γ 1-m2は配列番号150を含んだ。追加のY残基を組み込んで、hCH γ 1-m2配列がCL κ 配列とより良好にアラインし得るようにした。

【0690】

配列アラインメントは、hCH γ 1がCL κ -D⁴³に対応するAsp残基を欠失していることを示した。そこで、2種の追加の変異体を生成したが；その際、hCH γ 1-m1およびhCH γ 1-m2のそれぞれを、CH γ 1-S⁴³とCH γ 1-G⁴⁴との間へのAsp残基の追加の挿入変異に掛けて、hCH γ 1-m1-D⁴⁴(配列番号149)およびhCH γ 1-m2-D⁴⁴(配列番号151)の2種の新たな変異体を作成した。

【0691】

hCH γ 2(配列番号155)の変異体バージョンを生成したが、その際、配列番号155の残基N⁸⁵G⁸⁶をKHで置換して、hCH γ 2-m(配列番号156)を生成した。配列アラインメントは、hCH γ 2(配列番号155)がAsp残基(D⁵⁰)を、CL κ -D⁴³に対応し得る位置に含むことを示唆した。

【0692】

hCH γ 3(配列番号157)の変異体バージョンを生成したが、その際、配列番号157の残基Q⁷⁹G⁸⁰をKHで置換して、hCH γ 3-m(配列番号158)を生成した。配列アラインメントは、hCH γ 3(配列番号155)がAsn残基(N⁴⁴)を、CL κ -D⁴³に対応する位置に含むことを示唆した。

【0693】

トラスツズマブを、モデルAbとして研究において使用した。すべてのhTrast-CH γ 変異体が[CL κ -K⁸⁰A]変異を伴って発現されたので、コンジュゲーション事象は、試験CH γ ドメインで優先的に起こったのであろう。hTrast-LC-[CL κ -K⁸⁰A](配列番号146)変異を、QuickChange部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene)に記載されているプロトコルに従って生成した。

【0694】

CH γ ドメインでの変異を、オーバーラップPCRを使用して生成した。変異を、オリゴヌクレオチドプライマーによって導入した。所望の変異を有するリバースプライマーと対になったトラスツズマブHCの5'末端に特異的なプライマー、およびトラスツズマブHCの3'末端に特異的なリバースプライマーと対になった所望の変異を有するフォワードプライマーを使用して、トラスツズマブHCをテンプレートとして使用して、DNA断片をPCR増幅した。これら2種のPCR生成物をテンプレートとして混合し；トラスツズマブ重鎖フォワードプライマーおよびリバースプライマーをオーバーラップPCR反応で使用して、所望の変異を有する全長トラスツズマブHC DNAを増幅した。次いで、PCRを制限酵素BglIおよびNheIで消化した。消化されたPCRを、BglIおよびNheIでカットされた修飾pCEP4プラスミド(Invitrogen(登録商標))と連結させた。

【0695】

変異を有するトラスツズマブ抗体をHEK293細胞中で過渡的に発現させ、タンパク質A親和カラムを使用して精製した。精製したmAbを、MSを使用して特徴づけた。

【0696】

発現された抗体をpH5.5の20mM酢酸ナトリウム、200mMのトレハロースに、20mg/mlで緩衝液交換した。次いで、タンパク質をpH7.7の60mMのリン酸ナトリウムでスパイクした。ABPを、50%のプロピレングリコールで再懸濁し、タンパク質と4.3:1のモル比で混合し、室温で一晩反応させた。すべての試料を2mg/mlに希釈し、サイズ排除クロマトグラフィー質量分析(SEC-MS)によって、

10

20

30

40

50

インタクトなコンジュゲートされたタンパク質として分析して、コンジュゲート形態のタンパク質の数および定量化を決定した。この技術で、それぞれのタンパク質の形態の分子量を測定し；複数のＡＢＰコンジュゲーション部位は、ＡＢＰの質量差によって分離された別個のシグナルとして観察される。複数のＡＢＰコンジュゲーション種の相対的定量化を、シグナルの大きさを測定することによって行う。

【０６９７】

【表７３】

Ab +ABP	%CA				平均 CA
	0	1	2	3	
hTrast	1	16	56	24	2.112
hTrast-[CLk-D77A]	0	1	62	34	2.338
hTrast-[CLk-K80A]	48	41	10	2	0.665
hTrast-[CLk-K ⁸⁰ A]/CHγ1-m1	23	48	24	5	1.107
hTrast-[CLk-K ⁸⁰ A]/CHγ1-m2	24	48	24	4	1.087
hTrast-[CLk-K ⁸⁰ A]/CHγ1-m1-D ⁴⁴	33	49	17	1	0.854
hTrast-[CLk-K ⁸⁰ A]/CHγ1-m2-D ⁴⁴	41	45	12	2	0.746
hTrast-[CLk-K ⁸⁰ A]/CHγ2m	45	44	9	3	0.694
hTrast-[CLk-K ⁸⁰ A]/CHγ3m	40	44	13	3	0.78

表 71 hTrast 抗体および CHγ ドメイン変異体のインタクトなコンジュゲーションの分析

【０６９８】

ＡＢＰコンジュゲーションの程度を、トラスツズマブおよびトラスツズマブ変異体の軽鎖および重鎖で別々に試験した。ＭＡＣ産生物を変性し、ジスルフィド結合を、グアニジン塩酸塩およびジチオトレイトールを使用して還元した。生じた遊離の軽鎖および重鎖を、ＬＣＭＳを使用して分析して、それぞれの鎖でのコンジュゲーションプロファイルを決定した（表 72）。

【０６９９】

【表 74】

	LC %CA				HC %CA				1HC WT%
	0	1	2	平均 CA-LC	0	1	2	平均 CA-HC	
hTrast	32	66	2	0.7	83	17	0	0.17	N/A
hTrast-[CLk-D ⁷⁷ A]	0	95	5	1.05	90	10	0	0.1	N/A
hTrast-[CLk-K ⁸⁰ A]	98	2	0	0.02	79	21	0	0.21	
hTrast-[CLk-K ⁸⁰ A]/CHγ1-m1	99	1	0	0.01	64	31	5	0.41	148
hTrast-[CLk-K ⁸⁰ A]/CHγ1-m2	98	2	0	0.02	62	32	6	0.44	152
hTrast-[CLk-K ⁸⁰ A]/CHγ1-m1-D ⁴⁴	97	3	0	0.03	74	24	2	0.28	114
hTrast-[CLk-K ⁸⁰ A]/CHγ1-m2-D ⁴⁴	97	3	0	0.03	73	24	3	0.3	114
hTrast-[CLk-K ⁸⁰ A]/CHγ2m	99	1	0	0.01	75	23	2	0.27	110
hTrast-[CLk-K ⁸⁰ A]/CHγ3m	100	0	0	0	70	27	3	0.33	129

表 72 hTrast 抗体および CHγ ドメイン変異体の還元された重鎖、軽鎖のコンジュゲーションの分析。個々の WT 操作に対する 1-HC%の%を、表 53 に記載されているとおり、右欄に示すが、この実施例では、hTrast-[CLk-K⁸⁰A]HC 1CA を、WT 形態とみなした。

【０７００】

hTrast-[CLk-K⁸⁰A]/CHγ1-m1およびhTrast-[CLk-K⁸⁰A]/CHγ1-m2での全コンジュゲーションは、hTrast-[CLk-K⁸⁰A]

10

20

30

40

50

K⁸⁰A]と比較すると、0.66CAから約1CAへと増大し；これら2種の変異体のHC1CAは、21%から31%へと上昇し、約150%の向上であった。これは、KHモチーフの導入によって、CLκおよびCLλ以外の免疫グロブリンドメインに、方向性コンジュゲーションが導入され得るという仮定を裏付けた。

【0701】

hTrast-[CLκ-K⁸⁰A]/CHγ2mでの全コンジュゲーションも増大したが、CHγ1変異体の規模よりは低い規模であった。CHγ1の配列とCHγ2配列との比較は、CLκ-D⁷⁷に対応する残基に、CHγ1はSerを含み、CHγ2はAspを含むことを示している。これは、CHγ2ドメインにおけるCLκ-D⁷⁷変異と同様の変異が、コンジュゲーションの程度を向上させ得るであろうことを示唆し得ている。

10

【0702】

加えて、CHγ3HCでのコンジュゲーションの向上も、明らかではあるが、CHγ1ドメイン変異体と比較すると、中程度であった。CHγ3ドメイン配列は、CLκ-D⁷⁷に対応する位置にArgを、かつCLκ-D⁴³に対応する位置にSerを含むと考えられた。

【0703】

さらに、hTrast-[CLκ-K⁸⁰A]/CHγ1-m1-D⁴⁴およびhTrast-[CLκ-K⁸⁰A]/CHγ1-m2-D⁴⁴の両方でのCA%HCのコンジュゲーションは、hTrast-[CLκ-K⁸⁰A]/CHγ1-m1およびhTrast-[CLκ-K⁸⁰A]/CHγ1-m2の両方において見られる明らかなコンジュゲーションの増大が、WTの約150%からWTの僅か約114%になるという非常に意外な結果を示した。

20

【0704】

説明的な仮定は、図17の配列アラインメントは、3D免疫グロブリン構造において見出されるところに従って、個々の残基を正確にアラインすることができないことを示唆した。

【0705】

(実施例47)

免疫グロブリンフォールドのモデリング

そのため、hCHγ1、hCHγ2、およびhCHγ3ドメインについての結晶構造座標を、Rutgers, the State University of New Jersey, Center for Integrative Proteomics Research, the San Diego Supercomputer Center (SDSC) および Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, San Diegoによって維持されている「Protein Data Bank」から得た。hCHλ1の構造は、「Protein Data Bank」を介して利用可能な3dvのX線構造に基づく。hCHλ2の構造は、「Protein Data Bank」を介して利用可能な2dtsのX線構造に基づく。hCHλ3の構造は、「Protein Data Bank」を介して利用可能な2dtsのX線構造に基づく。hCLλの構造は、「Protein Data Bank」を介して利用可能な4fqhのX線構造に基づく。

30

40

【0706】

構造に従って配列をアラインする相同性アラインメントを生成した(図17)。CLκおよびhCHγ1-m1の結晶構造の比較(図19)は、hCHγ-CD接続鎖が、短いαヘリックスを含むことを示した。モデリングは、このCDαヘリックスが、天然S⁴³およびhTrast-[CLκ-K⁸⁰A]/CHγ1-m1-D⁴⁴Asp挿入を、結合ポケットを離れて伸長する側鎖と共にもたらすこと(図20および21)、およびCHγ1-D⁴⁴の付加が、CDαヘリックスのサイズを増大させ、伸長させることを示唆した。加えて、モデルは、CHγ1-Q⁷⁹H残基が、最適な平面配向になく、PF Pと隣接するCHγ1-T⁷⁸Kとの間の反応に参加するその能力を低減していることを

50

示唆している（図21）。

【0707】

図22のCLκおよびCHγ1-m1-D44ドメインの比較は、CD接続鎖上のCDαヘリックスを除去し、ループ構造と置き換えることによって、ポケットの形状が最適化され得ることを示唆している。したがって、変異体CHγ1ドメイン、配列番号165をモデリングし、最小化した。配列番号165は、CHγ1-m1変異体のCHγ1-T⁸⁴K/Q⁷⁹H二重変異、さらには、CHγ1-N⁴²からCHγ1-L⁴⁶までの（それらを含む）CHγ1-CD接続鎖の、KVDNALA（配列番号166）での置換を含み；配列番号166は、追加のAla残基が加えられているCLκドメイン（配列番号6）の残基に対応する。図22に示したモデリング結果は、CHγ1-Q⁷⁹Hが、CD接続鎖上へのVal残基の導入によって補助されて、より平面な配向を占めていることを示唆している。この残基をLeuまたはIleに変異させると、天然CLκにおける距離に関して、より長い側鎖がH残基までの大きなギャップを埋めることができることによって、イミダゾール環にさらなる安定化を与えることができる。重大なことに、モデルは、隣接するAsp残基をCHγ1-Q⁷⁹Hから適切な配向および距離に置いて、δ-互変異性型を支持し、CHγ1-T⁷⁸Kの反応性の増大を促進する。

【0708】

同様のモデリングを、CHγ2およびCHγ3ドメインで行った。図24は、CLκおよびCHγ2の重要なWT残基を比較している。CHγ2-D⁴⁹およびCHγ2-D⁵⁰は、方向性コンジュゲーションを援助する正確な位置および配向で存在していると考えられるが、CHγ2-D⁸²は、3DモデルにおいてCHγ2-G⁸⁶Hにさらに近い位置を占めているので、ε-互変異性型を支持し、CHγ2-N⁸⁵Kの反応性を低減している。このモデルは、CHγ2-D⁸²残基が、CHγ2m変異体において見られた方向性コンジュゲーションの相対的に低い増大を説明し得ることを示唆している。図26は、変異CHγ2-D⁸²A/N⁸⁵K/G⁸⁶Hを含む、CHγ2について提案された変異体の最小化モデルを図示している（配列番号167）。直ちに相違が見られる：イミダゾール環は、より平面の配向で、δ-互変異性体の形成に偏らせるために適したCHγ2-D⁵⁰への距離の範囲内に出現しており、CHγ2-D⁸²A変異は、結合ポケットを広げて、おそらくPFPアクセスの立体的障害の低減に導いている可能性がある。

【0709】

図27～29は、CLκとCHγ3WTおよびCHγ3m変異体との対応する比較を示している。モデルは、CHγ3-G⁸⁰Hをε-互変異性体型へと偏らせる残基が存在しないにもかかわらず、コンジュゲートするためのCHγ3-Q⁷⁹Kの利用可能性がおそらく、長いCHγ3-R⁷⁶側鎖によって立体的に障害されていることを示唆している。図30は、変異CHγ3-S⁴³V/N⁴⁴D/R⁷⁶A/Q⁷⁹K/G⁸⁰Hを含む、CHγ3:hCH3γm-CD1/EFについて第1の提案変異体の最小化モデルを図示している（配列番号168）。モデリングされた相違は、図30Bにおいて容易に観察され得る：結合ポケットの利用可能性が広がり、反応性Lys上の立体干渉を低減している。

【0710】

図30Bのモデリングされた構造における側鎖の距離から、CHγ3-S⁴³VまたはCHγ3-N⁴⁴Dは、CLκにおける対応する残基と同程度に、CHγ3-G⁸⁰Hと相互作用することはなさそうである。したがって、CHγ3についての第2の提案された変異体も最小化し、モデリングした：変異CHγ3-S⁴³L/N⁴⁴E/R⁷⁶A/Q⁷⁹K/G⁸⁰Hを含むhCH3γm-CD2/EF（配列番号169）。CLκ（図31）の構造に対してより大きな構造相似性を有し、かつCHγ3-N⁴⁴DとCHγ3-G⁸⁰Hとの間よりも、CHγ3-N⁴⁴EとCHγ3-G⁸⁰Hとの間に、より大きな水素結合の可能性を有する結合ポケットが得られるように、適切な残基をCD接続鎖上により長い側鎖と共に導入すること（CHγ3-S⁴³Vの代わりにCHγ3-S⁴³L、およびCHγ3-E⁴⁴Dの代わりに、CHγ3-N⁴⁴E）をモデリングした。

【0711】

CH γ ドメインおよび変異体の配列を、CL κ およびCL λ とアラインさせた（図32）。

【0712】

このように、本発明を、上記の代表的な実施形態を参照して、幅広く開示および例示した。当業者は、様々な変更形態を、本発明の思想および範囲から逸脱することなく、本発明に対して成すことができることを認識するであろう。すべての刊行物、特許出願、および公表された特許は、それぞれ個々の刊行物、特許出願、または公表された特許が、その全体が参照によって組み込まれると具体的かつ個別に示されている場合と同程度に、参照によって本明細書に組み込まれる。参照によって組み込まれた文章中に含有される定義は、それらが本開示中の定義に矛盾する限りにおいて、排除される。

10

【0713】

明確化のために別々の実施形態の文脈において記載された本発明のある種の特徴を、単一の実施形態に組み合わせることもできることは、分かるであろう。逆に、簡略化のために、単一の実施形態の文脈において記載された本発明の様々な特徴を、別々に、または任意の適切な部分的組合せにおいて提供することもできる。

【0714】

本発明の1つの実施形態に関して検討したあらゆる制限を、本発明の任意の他の実施形態に適用することができることが明確に企図されている。さらに、本発明のいずれの組成物も、本発明のいずれの方法においても使用することができ、本発明のいずれの方法も、本発明のいずれの組成物を製造または利用するためにも使用することができる。特に、単独で、または1種もしくは複数の追加の請求項および／もしくは明細書の態様と組み合わせて特許請求の範囲に記載される本発明のいずれの態様も、特許請求の範囲および／または明細書および／または配列表および／または図面中の他の場所に明記された本発明の他の態様と組み合わせることができると理解されるべきである。

20

【0715】

本明細書に見出される具体的な例が発明の範囲内に該当しない場合に限って、上記の具体的な実施例は、明確に放棄され得る。

【0716】

特許請求の範囲における用語「または」の使用は、代替物のみを指すことが明確に示されていない限り、「および／または」、あるいは、開示が代替物のみおよび「および／または」を指す定義を支持するが、代替物が互いに排他的であることを意味するために使用される。本明細書の仕様で使用する場合、「a」または「an」は、別段に明確に示されていない限り、1つまたは複数を意味し得る。本明細書の請求項（複数可）で使用する場合、語「含むこと」と共に使用する場合、語「a」または「an」は、1つまたは1つより多くを意味し得る。本明細書で使用する場合、「別の」は、少なくとも第2以上を意味し得る。本明細書において別段に定義されていない限り、本発明に関して使用される科学および技術的用語は、当業者によって普通に理解される意味を有することとする。さらに、内容によって別段に必要とされていない限り、単数の用語は、複数を包含することとし、複数の用語は、単数を包含することとする。語「含む／含むこと」および語「有すること／包含すること」は、本発明に関して本明細書で使用する場合、記述した特徴、整数、ステップ、または成分の存在を規定するために使用されるが、1つまたは複数の他の特徴、整数、ステップ、成分、または基の存在あるいは付加を排除するものではない。

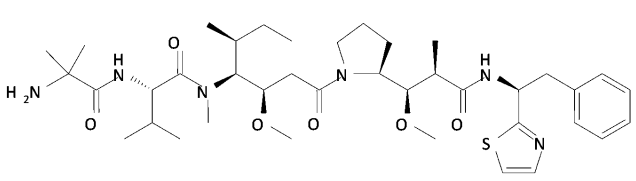
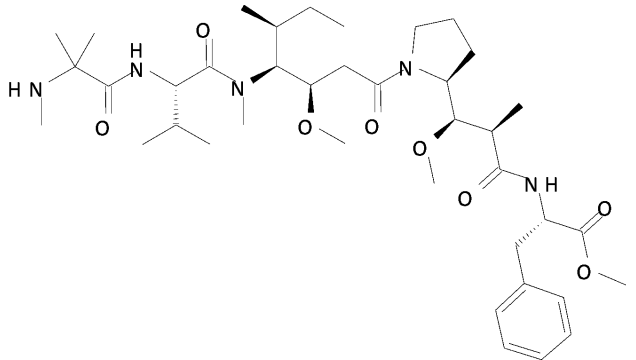
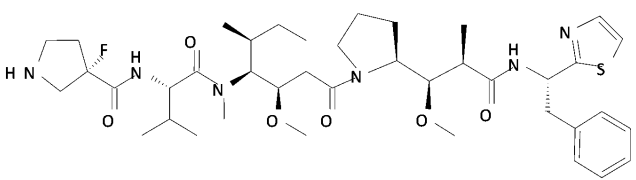
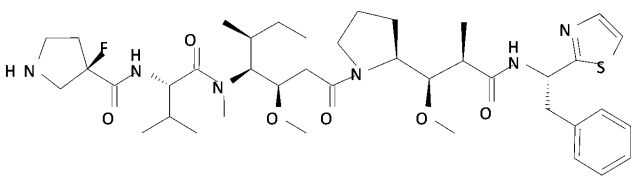
30

40

【0717】

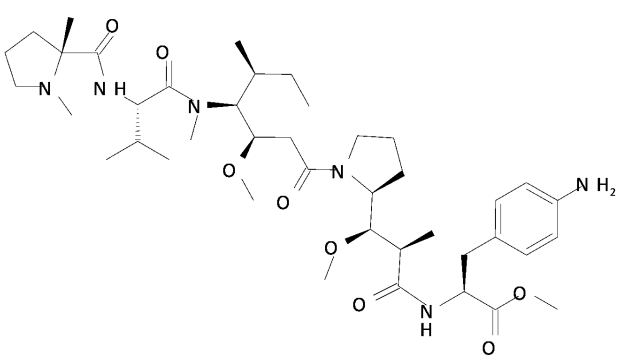
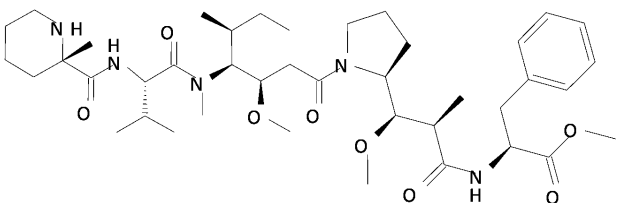
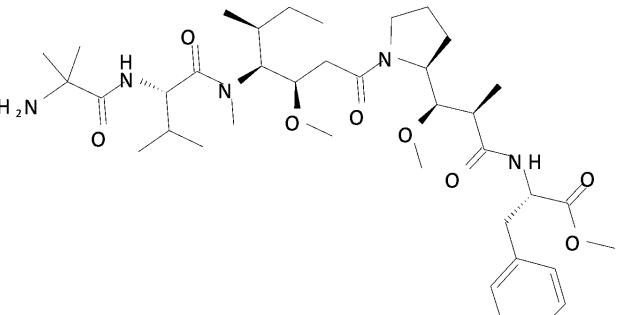
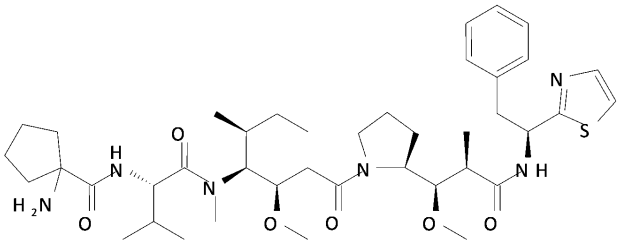
【表 7 5 - 1】

表 73

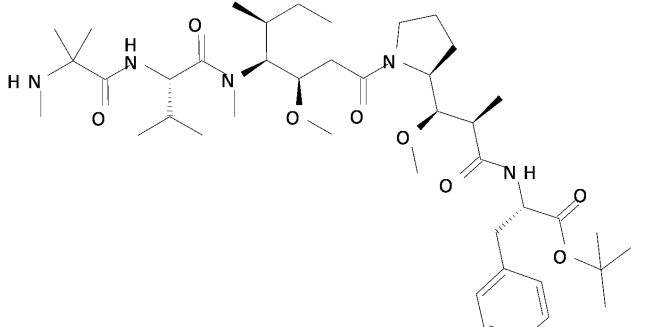
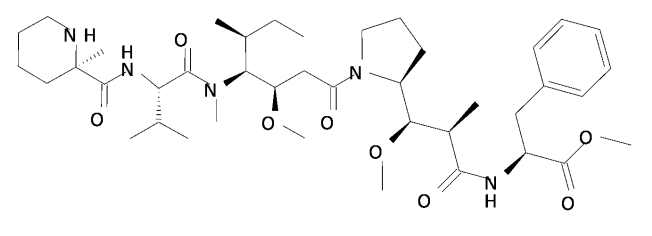
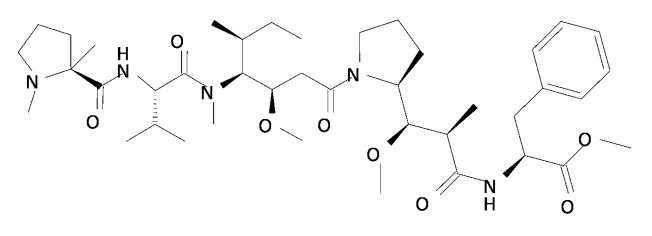
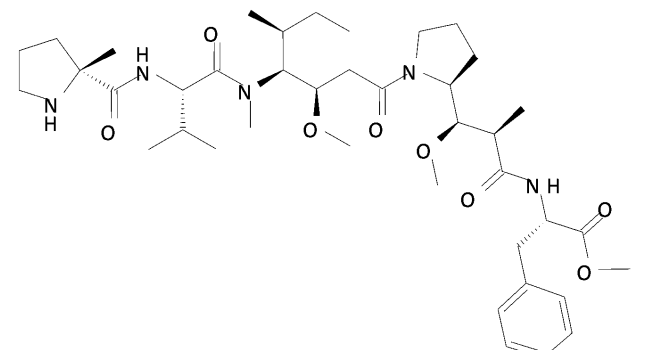
毒素 #	IUPAC 名称	構造	
#54	2-メチルアラニル-N-[(3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-[(1S)-2-フェニル-1-(1,3-チアゾール-2-イル)エチル]アミノ}プロピル]ピロリジン-1-イル]-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N-メチル-L-バリンアミド(#54)		10
#226	N,2-ジメチルアラニル-N-[(3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-メトキシ-3-[(2S)-1-メトキシ-1-オキソ-3-フェニルプロパン-2-イル]アミノ]-2-メチル-3-オキソプロピル]ピロリジン-1-イル]-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N-メチル-L-バリンアミド(#226)		20
#194	N,2-[(3S)-3-フルオロピロリジン-3-イル]カルボニル]-N-[(3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-[(1S)-2-フェニル-1-(1,3-チアゾール-2-イル)エチル]アミノ}プロピル]ピロリジン-1-イル]-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N-メチル-L-バリンアミド・トリフルオロ酢酸塩(#194)		
#192	N,2-[(3R)-3-フルオロピロリジン-3-イル]カルボニル]-N-[(3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-[(1S)-2-フェニル-1-(1,3-チアゾール-2-イル)エチル]アミノ}プロピル]ピロリジン-1-イル]-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N-メチル-L-バリンアミド・トリフルオロ酢酸塩(#192)		30

【 0 7 1 8 】

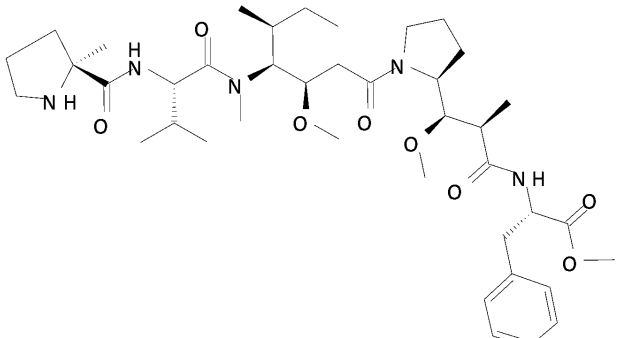
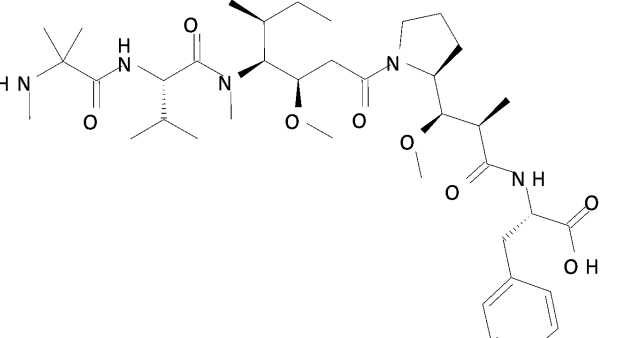
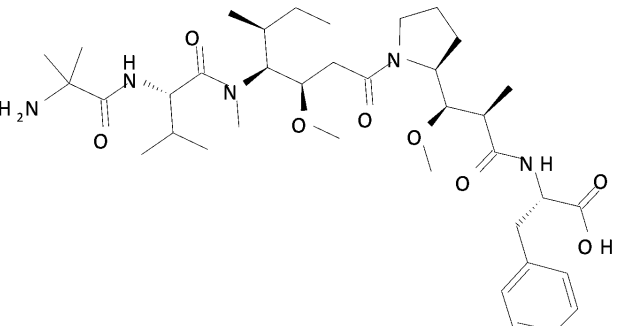
【表 7 5 - 2】

#201	1,2-ジメチル-D-プロリル-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(2S)-3-(4-アミノフェニル)-1-メトキシ-1-オキソプロパン-2-イル]アミノ]-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソプロピル]ピロリジン-1-イル]-3-メトキシ-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N-メチル-L-バリンアミド・ギ酸塩(#201)		10
#158	N-[(2R,3R)-3-メトキシ-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-メトキシ-5-メチル-4-[メチル(N-[(2S)-2-メチルピペリジン-2-イル]カルボニル)-L-バリン)アミノ]ヘプタノイル]ピロリジン-2-イル]-2-メチルプロパノイル]-L-フェニルアラニネート・トリフルオロ酢酸塩(#158)		20
#70	2-メチルアラニル-N-[(3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-メトキシ-3-[(2S)-1-メトキシ-1-オキソ-3-フェニルプロパン-2-イル]アミノ]-2-メチル-3-オキソプロピル]ピロリジン-1-イル]-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N-メチル-L-バリンアミド(#70)		30
#47	N ² -[(1-アミノシクロペンチル)カルボニル]-N-[(3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-[(1S)-2-フェニル-1-(1,3-チアゾール-2-イル)エチル]アミノ]プロピル]ピロリジン-1-イル]-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N-メチル-L-バリンアミド(#47)		

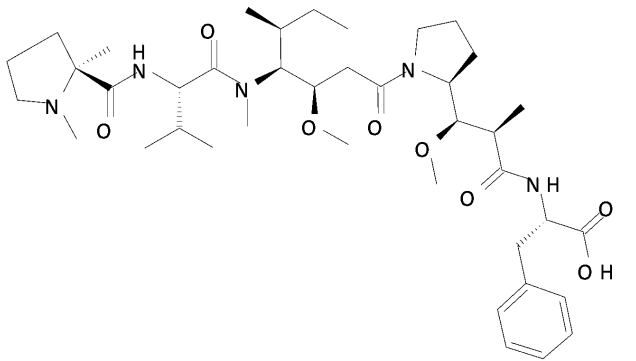
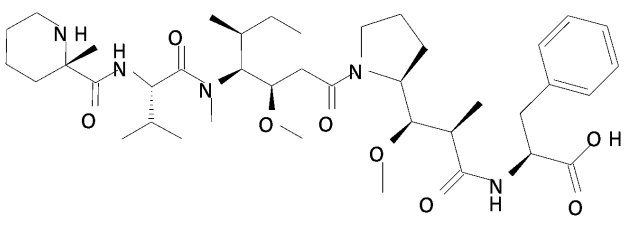
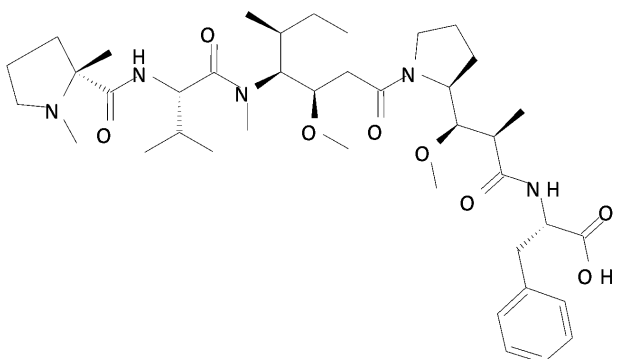
【表 7 5 - 3】

#130	N,2-ジメチルアラニル-N- [(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3- {[(2S)-1-tert-ブトキシ-1-オキシ-3- フェニルプロパン-2-イル]アミノ}- 1-メトキシ-2-メチル-3-オキソプロ ピル]ピロリジン-1-イル)-3-メトキ シ-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N-メチル-L-バリンアミド(#130)		10
#159	メチル N-((2R,3R)-3-メトキシ-3- [(2S)-1-((3R,4S,5S)-3-メトキシ-5- メチル-4-[メチル(N-((2R)-2-メチル ピペリジン-2-イル)カルボニル)-L- バリン)アミノ]ヘプタノイル)ピロ リジン-2-イル)-2-メチルプロパノイ ル)-L-フェニルアラニネート・トリ フルオロ酢酸塩(#159)		20
#209	1,2-ジメチル-L-プロリル-N- [(3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-((2S)-2- [(1R,2R)-1-メトキシ-3-[(2S)-1-メ トキシ-1-オキシ-3-フェニルプロパ ン-2-イル]アミノ}-2-メチル-3-オキ ソプロピル]ピロリジン-1-イル)-5- メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]- N-メチル-L-バリンアミド・トリフ ルオロ酢酸塩(#209)		30
#131	2-メチル-D-プロリル-N- [(3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-((2S)-2- [(1R,2R)-1-メトキシ-3-[(2S)-1-メ トキシ-1-オキシ-3-フェニルプロパ ン-2-イル]アミノ}-2-メチル-3-オキ ソプロピル]ピロリジン-1-イル)-5- メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]- N-メチル-L-バリンアミド・トリフ ルオロ酢酸塩(#131)		

【表 7 5 - 4】

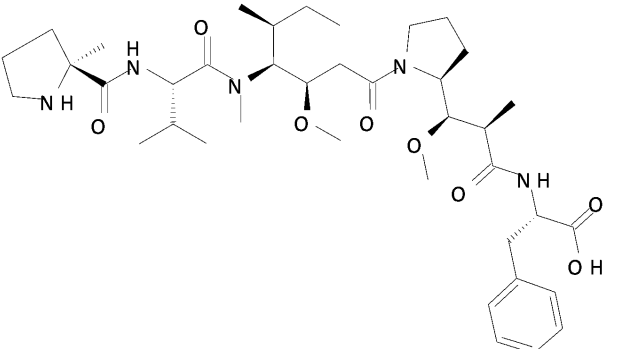
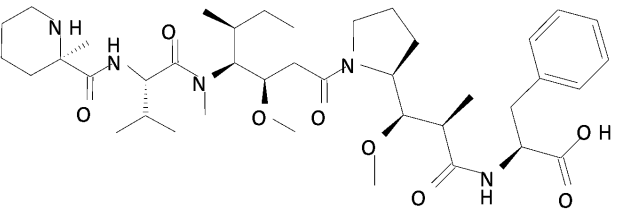
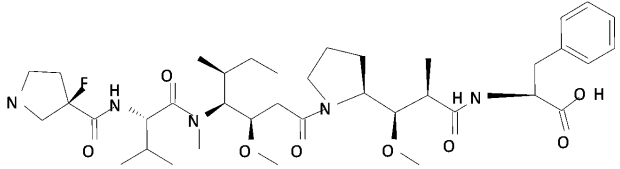
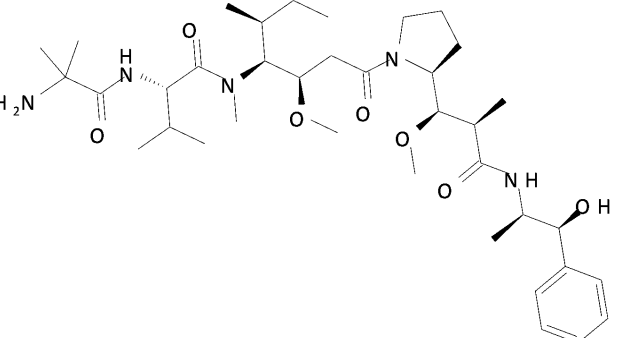
#117	2-メチル-L-プロリル-N-[(3R,4S,5S)-3-メトキシ-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-メトキシ-3-[(2S)-1-メトキシ-1-オキシ-3-フェニルプロパン-2-イル]アミノ]-2-メチル-3-オキソプロピル]ピロリジン-1-イル]-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N-メチル-L-バリンアミド・トリフルオロ酢酸塩(#117)		10
#115	N,2-ジメチルアラニル-N-[(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-カルボキシ-2-フェニルエチル]アミノ}-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソプロピル]ピロリジン-1-イル}-2-メトキシ-1-[(1S)-1-メチルプロピル]-4-オキソブチル]-N-メチル-L-バリンアミド・トリフルオロ酢酸塩(115)		20
#69	2-メチルアラニル-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-カルボキシ-2-フェニルエチル]アミノ]-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソプロピル]ピロリジン-1-イル]-3-メトキシ-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N-メチル-L-バリンアミド(#69)		30

【表 7 5 - 5】

#151	1,2-ジメチル-L-プロリル-N- {(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3- {[(1S)-1-カルボキシ-2-フェニルエ チル]アミノ}-1-メトキシ-2-メチル- 3-オキソプロピル]ピロリジン-1-イ ル}-2-メトキシ-1-[(1S)-1-メチルプ ロピル]-4-オキソブチル}-N-メチル- L-バリンアミド(#151)		10
#162	N-[(2R,3R)-3-メトキシ-3-[(2S)-1- {(3R,4S,5S)-3-メトキシ-5-メチル- 4-メチル(N-[(2S)-2-メチルピペリ ジン-2-イル]カルボニル)-L-バリン) アミノ}ヘプタノイル]ピロリジン-2- イル]-2-メチルプロパノイル]-L-フ ェニルアラニン・トリフルオロ酢 酸塩(#162)		20
#153	1,2-ジメチル-D-プロリル-N- {(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3- {[(1S)-1-カルボキシ-2-フェニルエ チル]アミノ}-1-メトキシ-2-メチル- 3-オキソプロピル]ピロリジン-1-イ ル}-2-メトキシ-1-[(1S)-1-メチルプ ロピル]-4-オキソブチル}-N-メチル- L-バリンアミド(#153)		30

【 0 7 2 2 】

【表 7 5 - 6】

#118	2-メチル-L-プロリル-N-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-カルボキシ-2-フェニルエチル]アミノ]-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソプロピル]ピロリジン-1-イル)-3-メトキシ-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N-メチル-L-バリンアミド・トリフルオロ酢酸塩(#118)		
#163	N-((2R,3R)-3-メトキシ-3-[(2S)-1-((3R,4S,5S)-3-メトキシ-5-メチル-4-[メチル(N-[(2R)-2-メチルピペリジン-2-イル]カルボニル)-L-バリン)アミノ]ヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-2-メチルプロパノイル]-L-フェニルアラニン・トリフルオロ酢酸塩(#163)		
#217	N-((2R,3R)-3-[(2S)-1-((3R,4S,5S)-4-[(N-[(3R)-3-フルオロピロリジン-3-イル]カルボニル)-L-バリン)(メチル)アミノ]-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパノイル]-L-フェニルアラニン・トリフルオロ酢酸塩(#217)		
#112	2-メチルアラニル-N-[(3R,4S,5S)-1-((2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S,2R)-1-ヒドロキシ-1-フェニルプロパン-2-イル]アミノ]-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソプロピル]ピロリジン-1-イル)-3-メトキシ-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル]-N-メチル-L-バリンアミド(#112)		

10

20

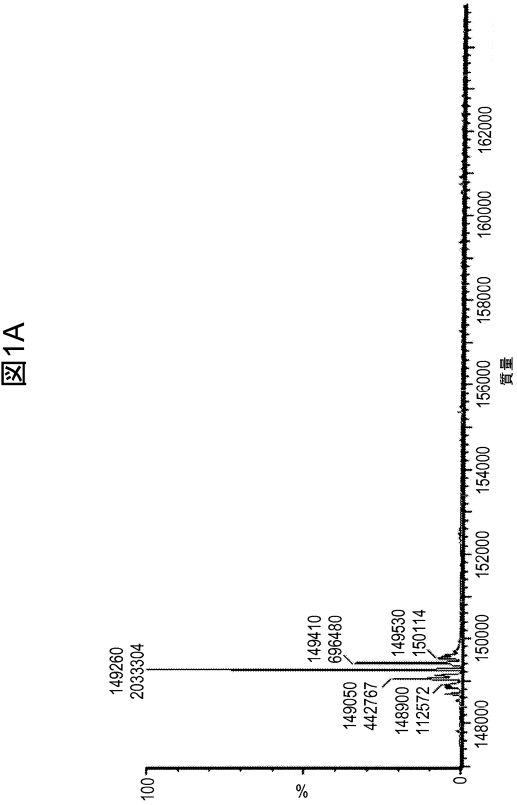
30

【 0 7 2 3】

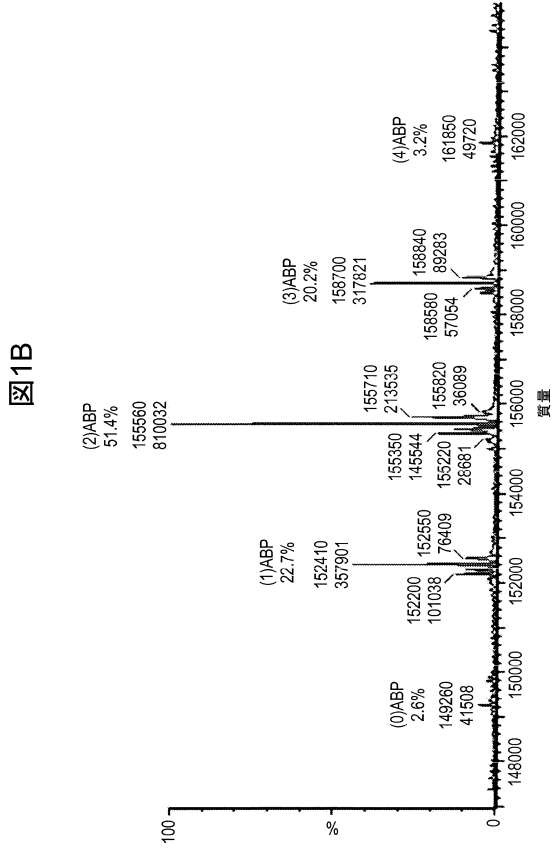
【表 7 5－7】

	MMAD 波線はリンカーの結合のための典型的な位置を示している。コンジュゲートされていない形態では、波線は典型的には H 原子に接続されている。	
	MMAE 波線はリンカーの結合のための典型的な位置を示している。コンジュゲートされていない形態では、波線は典型的には H 原子に接続されている。	
	MMAF 波線はリンカーの結合のための典型的な位置を示している。コンジュゲートされていない形態では、波線は典型的には H 原子に接続されている。	

【図 1－1】

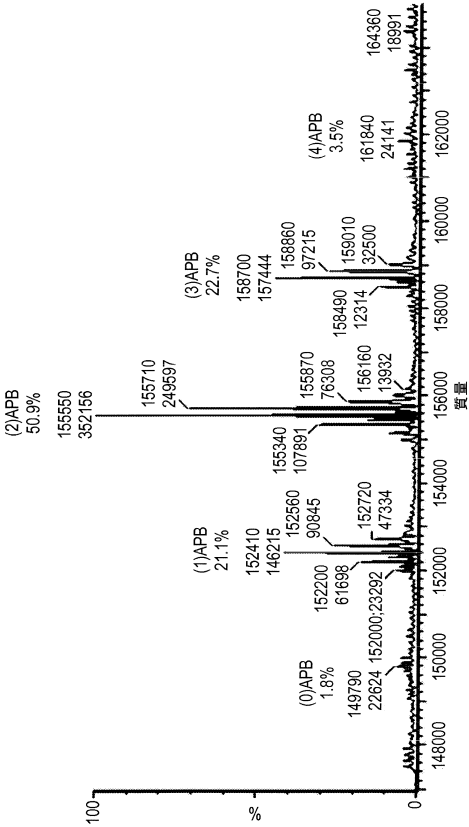


【図 1－2】



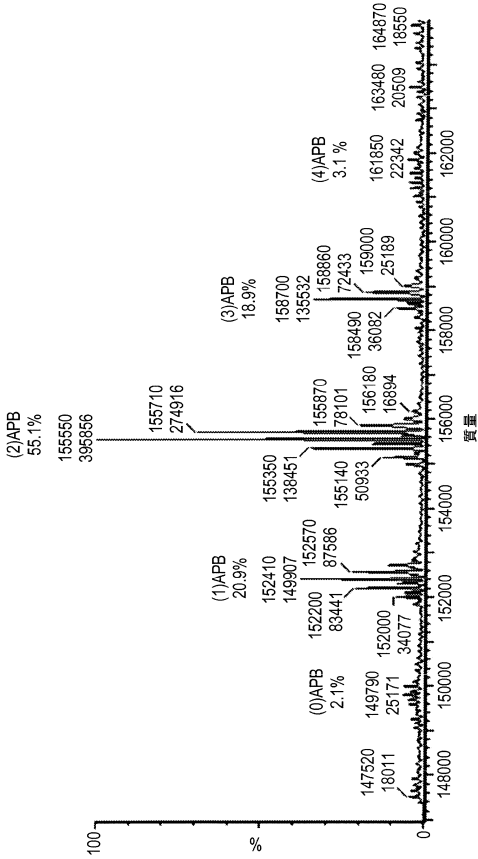
【図 1 - 3】

図 1C



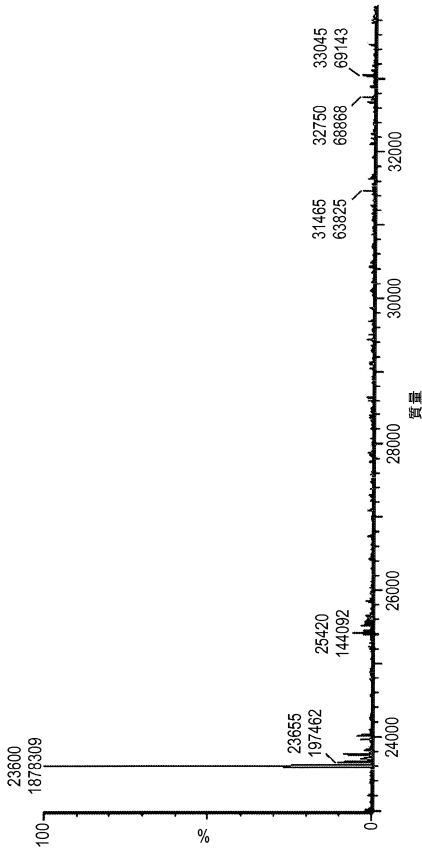
【図 1 - 4】

図 1D



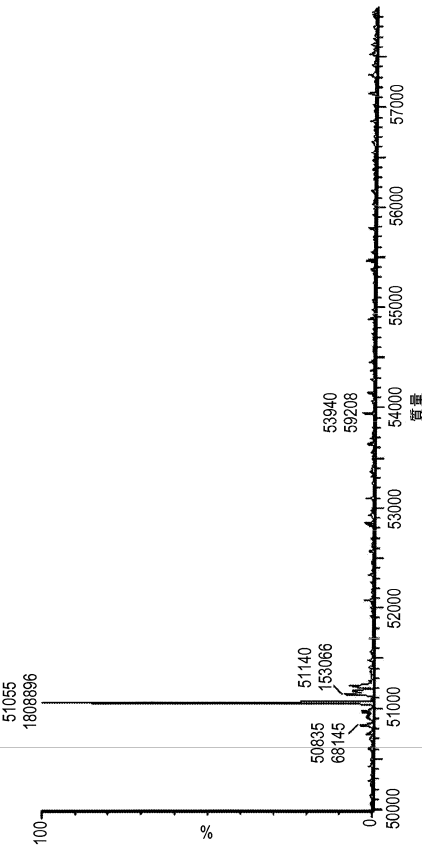
【図 2 - 1】

図 2A

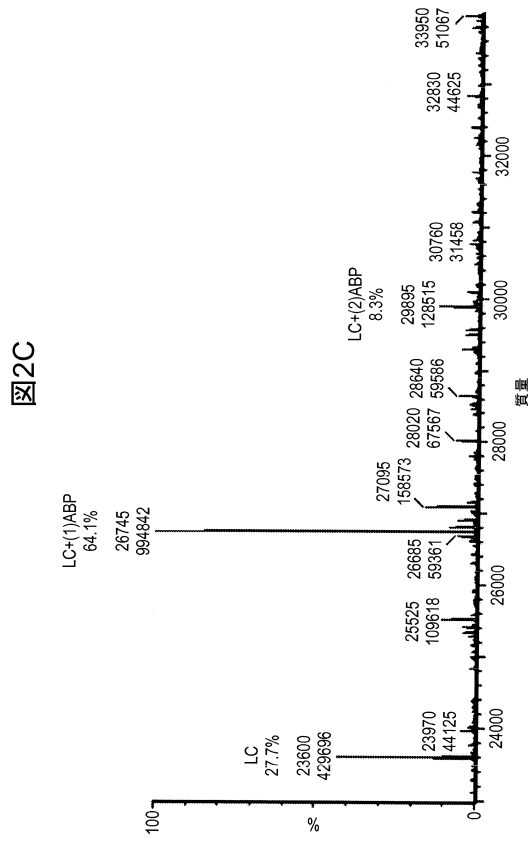


【図 2 - 2】

図 2B



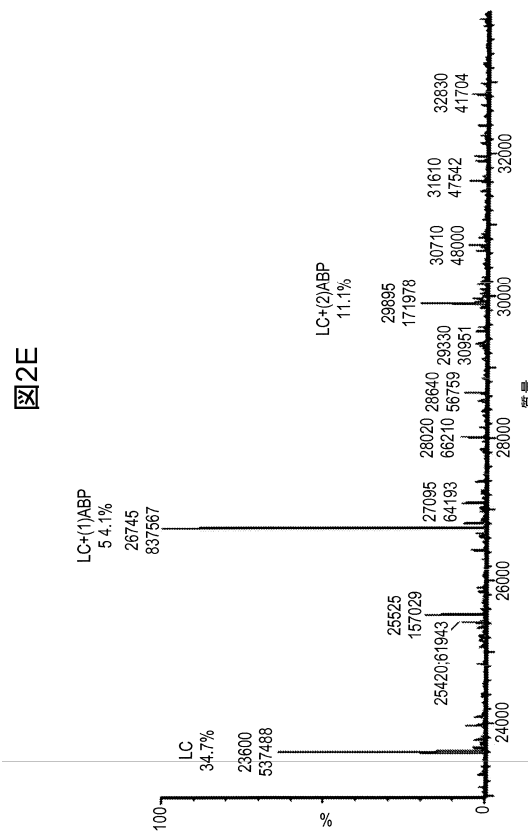
【図 2 - 3】



【図 2 - 4】



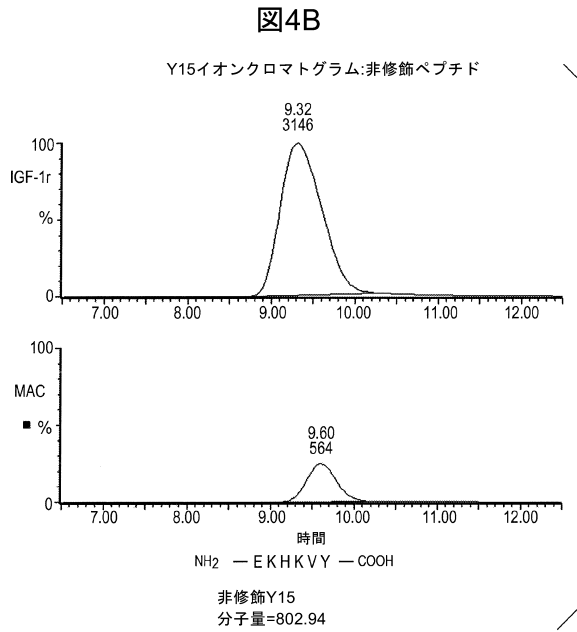
【図 2 - 5】



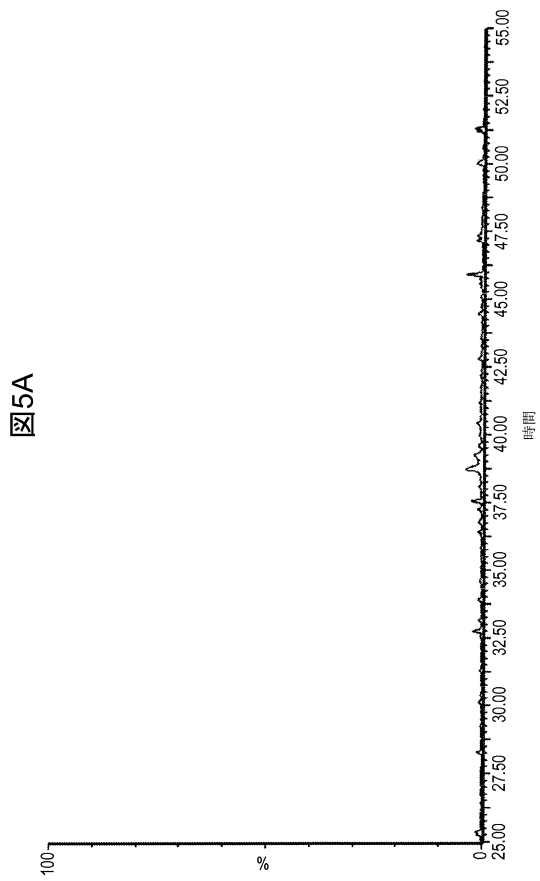
【図 2 - 6】



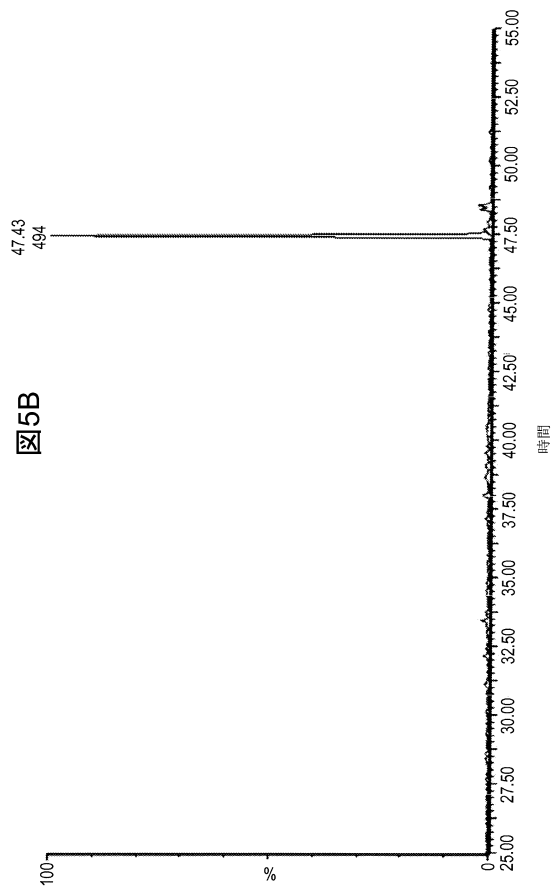
【図 4 - 2】



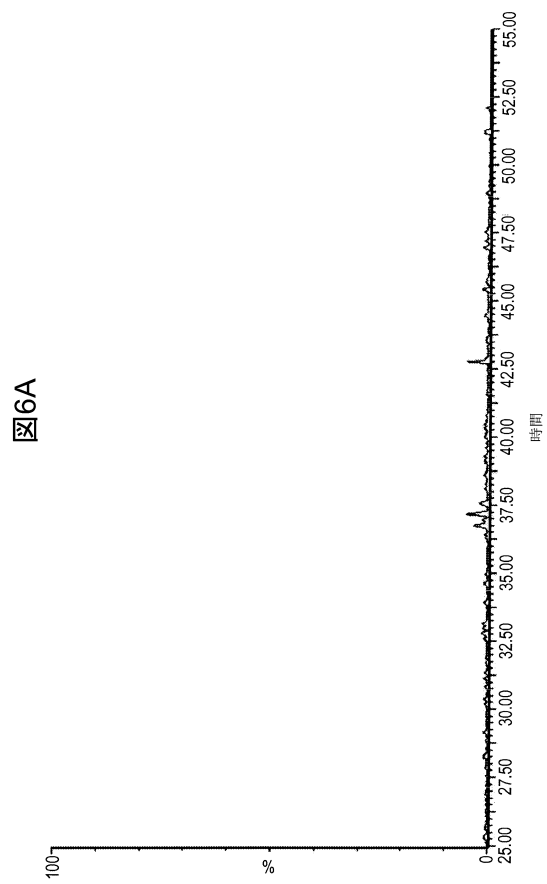
【図 5 - 1】



【図 5 - 2】

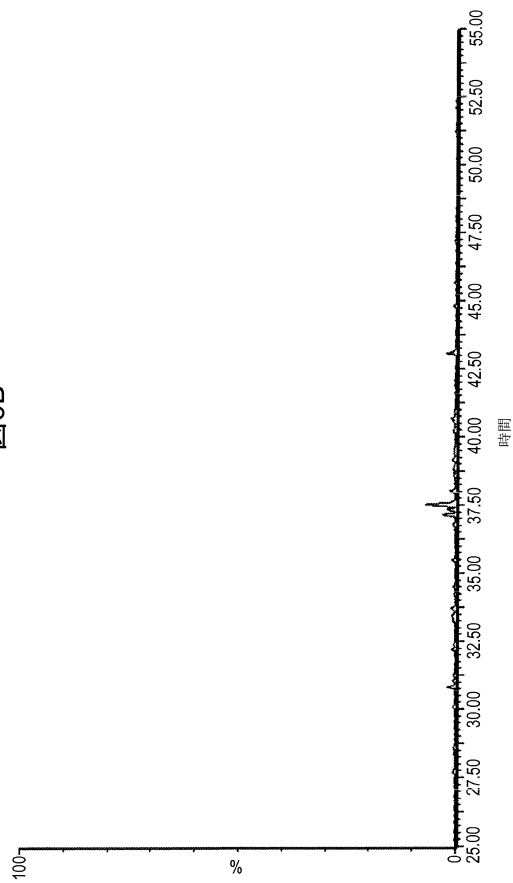


【図 6 - 1】



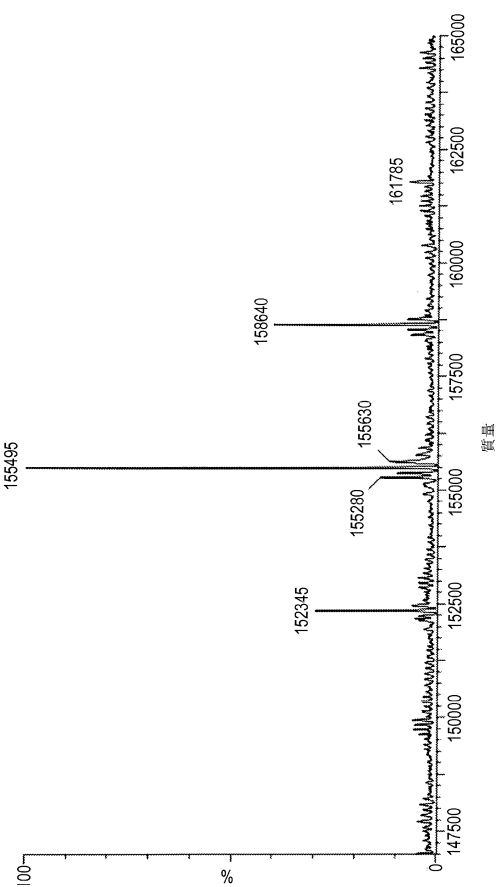
【図6-2】

図6B



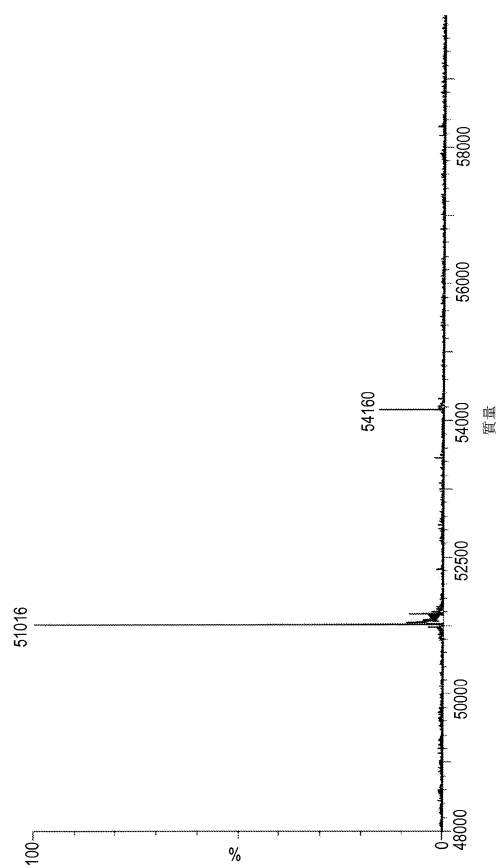
【図7-1】

図7A



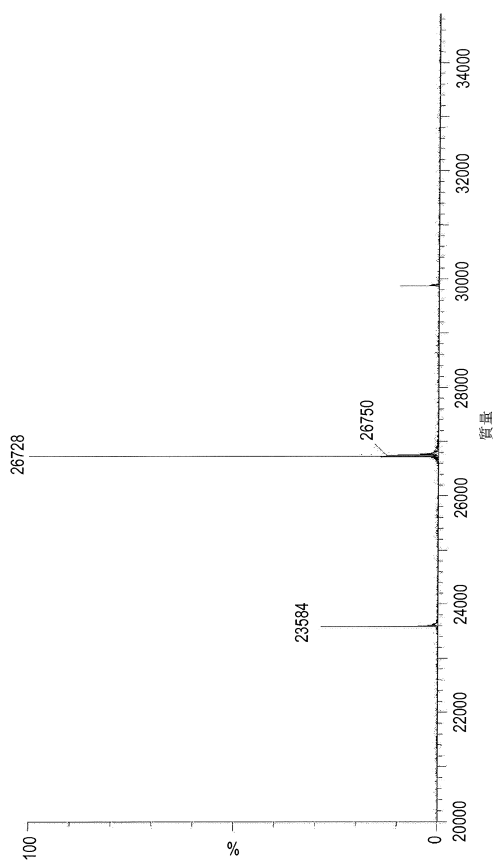
【図7-2】

図7B



【図7-3】

図7C



【図 8-1】

8A

I	Fr1	Fr2	Fr3	Fr4	Fr5	Fr6	Fr7	Fr8	Fr9	Fr10	Fr11	Fr12	Fr13	Fr14	Fr15	Fr16	Fr17	Fr18	Fr19	Fr20	Fr21	Fr22	Fr23	Fr24	Fr25	Fr26	Fr27	Fr28	Fr29	Fr30	Fr31	Fr32	Fr33	Fr34	Fr35	Fr36	Fr37	Fr38	Fr39	Fr40	Fr41	Fr42	Fr43	Fr44	Fr45	Fr46	Fr47	Fr48	Fr49	Fr50	Fr51	Fr52	Fr53	Fr54	Fr55	Fr56	Fr57	Fr58	Fr59	Fr60	Fr61	Fr62	Fr63	Fr64	Fr65	Fr66	Fr67	Fr68	Fr69	Fr70	Fr71	Fr72	Fr73	Fr74	Fr75	Fr76	Fr77	Fr78	Fr79	Fr80	Fr81	Fr82	Fr83	Fr84	Fr85	Fr86	Fr87	Fr88	Fr89	Fr90	Fr91	Fr92	Fr93	Fr94	Fr95	Fr96	Fr97	Fr98	Fr99	Fr100	Fr101	Fr102	Fr103	Fr104	Fr105	Fr106	Fr107	Fr108	Fr109	Fr110	Fr111	Fr112	Fr113	Fr114	Fr115	Fr116	Fr117	Fr118	Fr119	Fr120	Fr121	Fr122	Fr123	Fr124	Fr125	Fr126	Fr127	Fr128	Fr129	Fr130	Fr131	Fr132	Fr133	Fr134	Fr135	Fr136	Fr137	Fr138	Fr139	Fr140	Fr141	Fr142	Fr143	Fr144	Fr145	Fr146	Fr147	Fr148	Fr149	Fr150	Fr151	Fr152	Fr153	Fr154	Fr155	Fr156	Fr157	Fr158	Fr159	Fr160	Fr161	Fr162	Fr163	Fr164	Fr165	Fr166	Fr167	Fr168	Fr169	Fr170	Fr171	Fr172	Fr173	Fr174	Fr175	Fr176	Fr177	Fr178	Fr179	Fr180	Fr181	Fr182	Fr183	Fr184	Fr185	Fr186	Fr187	Fr188	Fr189	Fr190	Fr191	Fr192	Fr193	Fr194	Fr195	Fr196	Fr197	Fr198	Fr199	Fr200	Fr201	Fr202	Fr203	Fr204	Fr205	Fr206	Fr207	Fr208	Fr209	Fr210	Fr211	Fr212	Fr213	Fr214	Fr215	Fr216	Fr217	Fr218	Fr219	Fr220	Fr221	Fr222	Fr223	Fr224	Fr225	Fr226	Fr227	Fr228	Fr229	Fr230	Fr231	Fr232	Fr233	Fr234	Fr235	Fr236	Fr237	Fr238	Fr239	Fr240	Fr241	Fr242	Fr243	Fr244	Fr245	Fr246	Fr247	Fr248	Fr249	Fr250	Fr251	Fr252	Fr253	Fr254	Fr255	Fr256	Fr257	Fr258	Fr259	Fr260	Fr261	Fr262	Fr263	Fr264	Fr265	Fr266	Fr267	Fr268	Fr269	Fr270	Fr271	Fr272	Fr273	Fr274	Fr275	Fr276	Fr277	Fr278	Fr279	Fr280	Fr281	Fr282	Fr283	Fr284	Fr285	Fr286	Fr287	Fr288	Fr289	Fr290	Fr291	Fr292	Fr293	Fr294	Fr295	Fr296	Fr297	Fr298	Fr299	Fr300	Fr301	Fr302	Fr303	Fr304	Fr305	Fr306	Fr307	Fr308	Fr309	Fr310	Fr311	Fr312	Fr313	Fr314	Fr315	Fr316	Fr317	Fr318	Fr319	Fr320	Fr321	Fr322	Fr323	Fr324	Fr325	Fr326	Fr327	Fr328	Fr329	Fr330	Fr331	Fr332	Fr333	Fr334	Fr335	Fr336	Fr337	Fr338	Fr339	Fr340	Fr341	Fr342	Fr343	Fr344	Fr345	Fr346	Fr347	Fr348	Fr349	Fr350	Fr351	Fr352	Fr353	Fr354	Fr355	Fr356	Fr357	Fr358	Fr359	Fr360	Fr361	Fr362	Fr363	Fr364	Fr365	Fr366	Fr367	Fr368	Fr369	Fr370	Fr371	Fr372	Fr373	Fr374	Fr375	Fr376	Fr377	Fr378	Fr379	Fr380	Fr381	Fr382	Fr383	Fr384	Fr385	Fr386	Fr387	Fr388	Fr389	Fr390	Fr391	Fr392	Fr393	Fr394	Fr395	Fr396	Fr397	Fr398	Fr399	Fr400	Fr401	Fr402	Fr403	Fr404	Fr405	Fr406	Fr407	Fr408	Fr409	Fr410	Fr411	Fr412	Fr413	Fr414	Fr415	Fr416	Fr417	Fr418	Fr419	Fr420	Fr421	Fr422	Fr423	Fr424	Fr425	Fr426	Fr427	Fr428	Fr429	Fr430	Fr431	Fr432	Fr433	Fr434	Fr435	Fr436	Fr437	Fr438	Fr439	Fr440	Fr441	Fr442	Fr443	Fr444	Fr445	Fr446	Fr447	Fr448	Fr449	Fr450	Fr451	Fr452	Fr453	Fr454	Fr455	Fr456	Fr457	Fr458	Fr459	Fr460	Fr461	Fr462	Fr463	Fr464	Fr465	Fr466	Fr467	Fr468	Fr469	Fr470	Fr471	Fr472	Fr473	Fr474	Fr475	Fr476	Fr477	Fr478	Fr479	Fr480	Fr481	Fr482	Fr483	Fr484	Fr485	Fr486	Fr487	Fr488	Fr489	Fr490	Fr491	Fr492	Fr493	Fr494	Fr495	Fr496	Fr497	Fr498	Fr499	Fr500	Fr501	Fr502	Fr503	Fr504	Fr505	Fr506	Fr507	Fr508	Fr509	Fr510	Fr511	Fr512	Fr513	Fr514	Fr515	Fr516	Fr517	Fr518	Fr519	Fr520	Fr521	Fr522	Fr523	Fr524	Fr525	Fr526	Fr527	Fr528	Fr529	Fr530	Fr531	Fr532	Fr533	Fr534	Fr535	Fr536	Fr537	Fr538	Fr539	Fr540	Fr541	Fr542	Fr543	Fr544	Fr545	Fr546	Fr547	Fr548	Fr549	Fr550	Fr551	Fr552	Fr553	Fr554	Fr555	Fr556	Fr557	Fr558	Fr559	Fr560	Fr561	Fr562	Fr563	Fr564	Fr565	Fr566	Fr567	Fr568	Fr569	Fr570	Fr571	Fr572	Fr573	Fr574	Fr575	Fr576	Fr577	Fr578	Fr579	Fr580	Fr581	Fr582	Fr583	Fr584	Fr585	Fr586	Fr587	Fr588	Fr589	Fr590	Fr591	Fr592	Fr593	Fr594	Fr595	Fr596	Fr597	Fr598	Fr599	Fr600	Fr601	Fr602	Fr603	Fr604	Fr605	Fr606	Fr607	Fr608	Fr609	Fr610	Fr611	Fr612	Fr613	Fr614	Fr615	Fr616	Fr617	Fr618	Fr619	Fr620	Fr621	Fr622	Fr623	Fr624	Fr625	Fr626	Fr627	Fr628	Fr629	Fr630	Fr631	Fr632	Fr633	Fr634	Fr635	Fr636	Fr637	Fr638	Fr639	Fr640	Fr641	Fr642	Fr643	Fr644	Fr645	Fr646	Fr647	Fr648	Fr649	Fr650	Fr651	Fr652	Fr653	Fr654	Fr655	Fr656	Fr657	Fr658	Fr659	Fr660	Fr661	Fr662	Fr663	Fr664	Fr665	Fr666	Fr667	Fr668	Fr669	Fr670	Fr671	Fr672	Fr673	Fr674	Fr675	Fr676	Fr677	Fr678	Fr679	Fr680	Fr681	Fr682	Fr683	Fr684	Fr685	Fr686	Fr687	Fr688	Fr689	Fr690	Fr691	Fr692	Fr693	Fr694	Fr695	Fr696	Fr697	Fr698	Fr699	Fr700	Fr701	Fr702	Fr703	Fr704	Fr705	Fr706	Fr707	Fr708	Fr709	Fr710	Fr711	Fr712	Fr713	Fr714	Fr715	Fr716	Fr717	Fr718	Fr719	Fr720	Fr721	Fr722	Fr723	Fr724	Fr725	Fr726	Fr727	Fr728	Fr729	Fr730	Fr731	Fr732	Fr733	Fr734	Fr735	Fr736	Fr737	Fr738	Fr739	Fr740	Fr741	Fr742	Fr743	Fr744	Fr745	Fr746	Fr747	Fr748	Fr749	Fr750	Fr751	Fr752	Fr753	Fr754	Fr755	Fr756	Fr757	Fr758	Fr759	Fr760	Fr761	Fr762	Fr763	Fr764	Fr765	Fr766	Fr767	Fr768	Fr769	Fr770	Fr771	Fr772	Fr773	Fr774	Fr775	Fr776	Fr777	Fr778	Fr779	Fr780	Fr781	Fr782	Fr783	Fr784	Fr785	Fr786	Fr787	Fr788	Fr789	Fr790	Fr791	Fr792	Fr793	Fr794	Fr795	Fr796	Fr797	Fr798	Fr799	Fr800	Fr801	Fr802	Fr803	Fr804	Fr805	Fr806	Fr807	Fr808	Fr809	Fr810	Fr811	Fr812	Fr813	Fr814	Fr815	Fr816	Fr817	Fr818	Fr819	Fr820	Fr821	Fr822	Fr823	Fr824	Fr825	Fr826	Fr827	Fr828	Fr829	Fr830	Fr831	Fr832	Fr833	Fr834	Fr835	Fr836	Fr837	Fr838	Fr839	Fr840	Fr841	Fr842	Fr843	Fr844	Fr845	Fr846	Fr847	Fr848	Fr849	Fr850	Fr851	Fr852	Fr853	Fr854	Fr855	Fr856	Fr857	Fr858	Fr859	Fr860	Fr861	Fr862	Fr863	Fr864	Fr865	Fr866	Fr867	Fr868	Fr869	Fr870	Fr871	Fr872	Fr873	Fr874	Fr875	Fr876	Fr877	Fr878	Fr879	Fr880	Fr881	Fr882	Fr883	Fr884	Fr885	Fr886	Fr887	Fr888	Fr889	Fr890	Fr891	Fr892	Fr893	Fr894	Fr895	Fr896	Fr897	Fr898	Fr899	Fr900	Fr901	Fr902	Fr903	Fr904	Fr905	Fr906	Fr907	Fr908	Fr909	Fr910	Fr911	Fr912	Fr913	Fr914	Fr915	Fr916	Fr917	Fr918	Fr919	Fr920	Fr921	Fr922	Fr923	Fr924	Fr925	Fr926	Fr927	Fr928	Fr929	Fr930	Fr931	Fr932	Fr933	Fr934	Fr935	Fr936	Fr937	Fr938	Fr939	Fr940	Fr941	Fr942	Fr943	Fr944	Fr945	Fr946	Fr947	Fr948	Fr949	Fr950	Fr951	Fr952	Fr953	Fr954	Fr955	Fr956	Fr957	Fr958	Fr959	Fr960	Fr961	Fr962	Fr963	Fr964	Fr965	Fr966	Fr967	Fr968	Fr969	Fr970	Fr971	Fr972	Fr973	Fr974	Fr975	Fr976	Fr977	Fr978	Fr979	Fr980	Fr981	Fr982	Fr983	Fr984	Fr985	Fr986	Fr987	Fr988	Fr989	Fr990	Fr991	Fr992	Fr993	Fr994	Fr995	Fr996	Fr997	Fr998	Fr999	Fr1000
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					

【図 9】

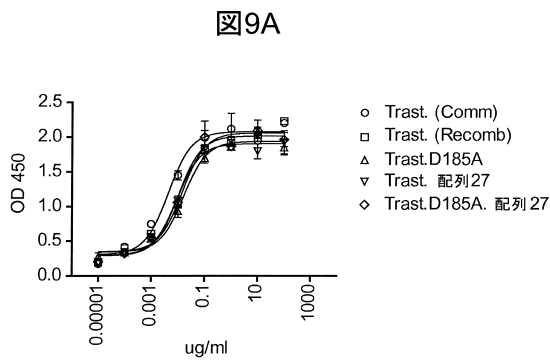
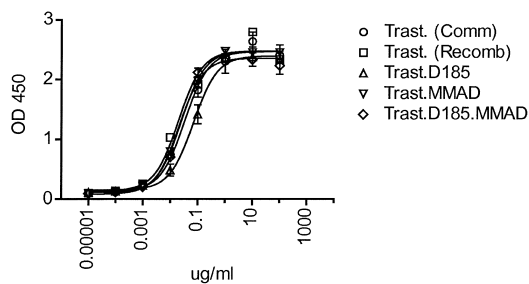


図9B



【图 8-2】

8B

mC1uk	--ADAAPTWSIF	PPSEQITSG	GASVVCFLNN	FYPRDINVKW	KIDGSRQNG	VLSNSTDQDS	
	+	*	*	*	+	*** *	
hC1uk	--TVAAPSFVIF	PPSDEQLKSG	TASVVCFLNN	FYPRAKVYNG	KVQNA ¹⁰⁶ LOSGN	SOESVTEODS	60
	**	**	**	**	*	*****	*** +
hC1A	GQPKAAPS ⁶¹ VTLE	PPSSEELQAN	KATIVCLISD	FPGAV ¹⁰⁶ TVAW	KADSSPVKAG	--VETTFPSKQ	61
mC1uk	KDSTYSWSST	LTILTKDEYR	HSNYTCEATH	KTSTSPIVKS	FNRNEC		
	*	+	+	*	*** +	*	
hC1uk	KDSTYLSIST	LTUSKADY ¹⁰⁶ K	HKVYACEVTH	QQLSPSPVKS	FNRGEC	106	
	***	+	+++++*	+	*	*** +	
hC1A	SNNK ¹⁰⁶ AASSY	LSLITPEQW-K	HRSYSQ ¹⁰⁶ UTH	EG-ST-VEKT	VAPTEC	105	

【図 10】

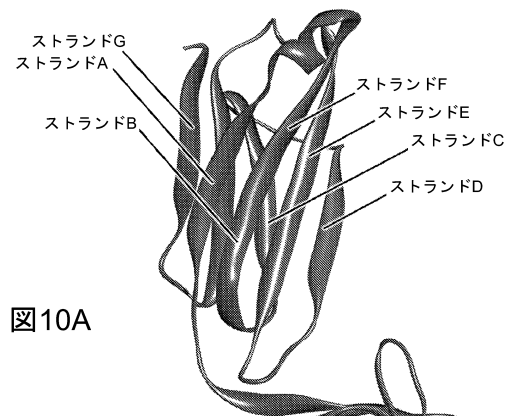


図10A

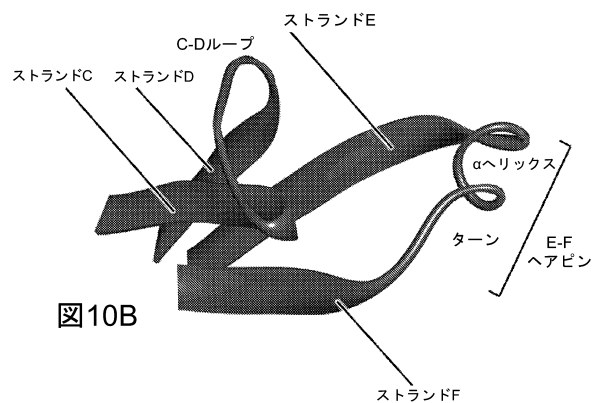
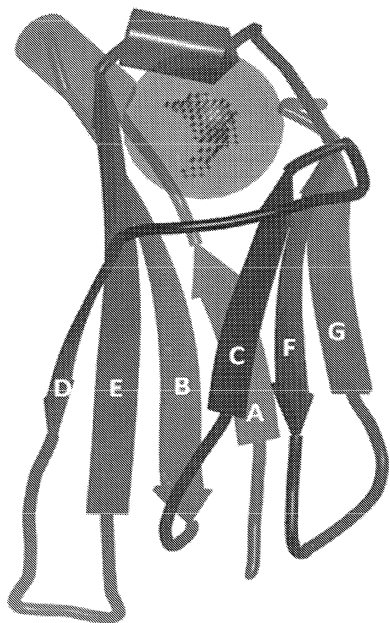


図10B

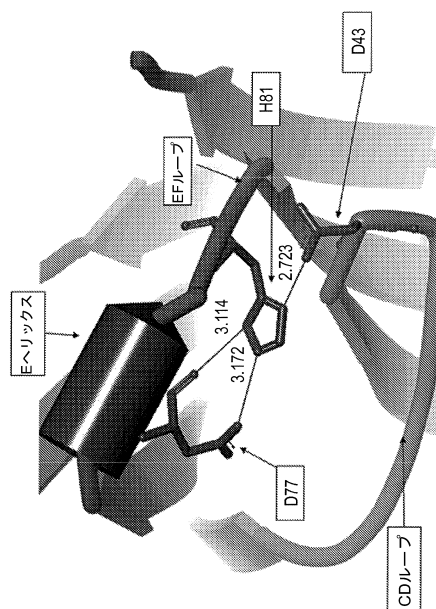
【図 1 1】

図 11



【図 1 2】

図 12



【図 1 3 - 1】

図 13B

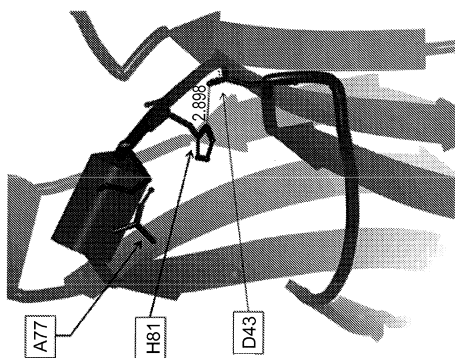
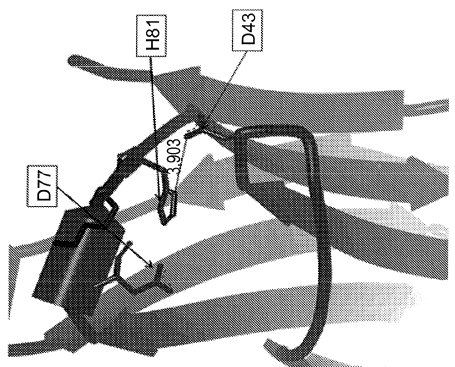
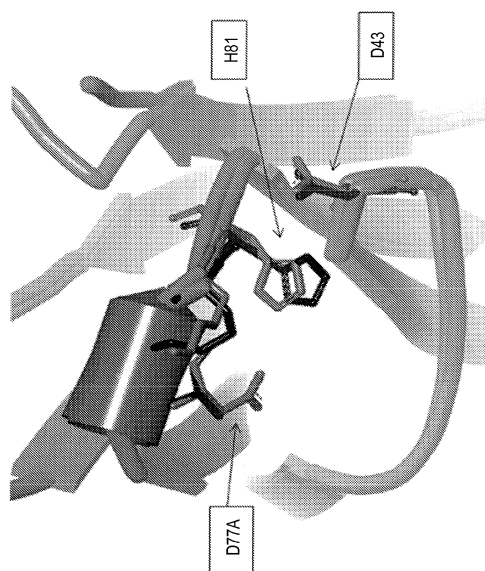


図 13A



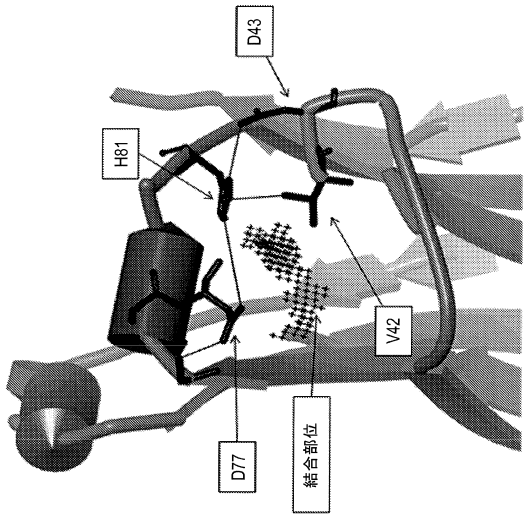
【図 1 3 - 2】

図 13C



【図 14】

図 14



【図 15】

図 15B

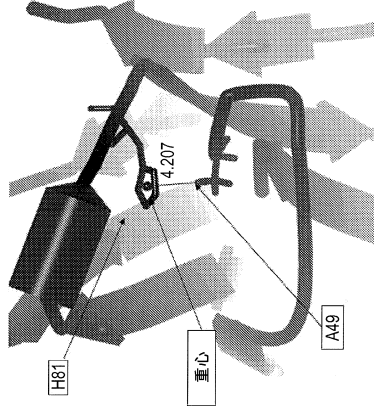
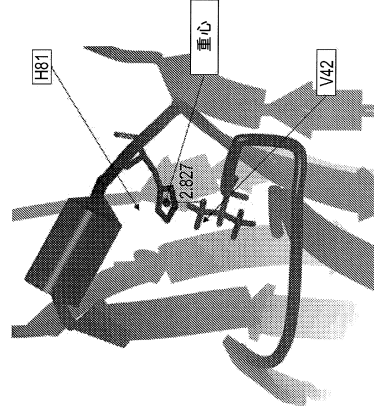


図 15A



【図 16】

図 16

	A	B	C	D
hChA1	-----AST-KGPSVFPL APSKST--SGG TAALGCLVKD YFPEPTVSW NS---GALTSG- VHTFPAVLQS			
hChA2	-----APELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVWD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVHN AKTKPREEQY			
hChA3	-----QGP-REPOVYTL PP8REEM--TKN QVSLTCLVRG FYPSDIAVEW E---SNGQPENN YKTTPEVLDS			
hCLk	-----TVAAPTVEIF PP8DEQL--KSG TASVWCLLNN FYPREAKQW K--VDNALQSGN SQESVTEQDS			
	* * *	*		
hCLa	QLTVLGQPK-AAPSVTLF PP8SEEL--QAN KATIVCLISD FYGAVTVAM K-ADSSPVKAG VEITTPSKQS			

	E	F	G
hChA1	-SGLYSLSSV VTFSSS-LG TQTYICNVNH KPNTKVDKK VEPKSC-		
hChA2	-NSTYRVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KALPAPIEKT ISKAK--		
hChA3	-DGSFFLYSK LTVDKSRWQO GNVFSCSVNH EALHNHYTQK SLSL---		
hCLk	KDSTYSLSSST LTLSKADYK HKYVACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC-		
hCLa	-NNKYAASSY LSLPTEQWKS HRSYSCQVTH EG--STVEKT VAPTECS		

【図 17】

図 17

	A	B	C	D'	D''
hChV1	-----ASP-KGPSVFPL APSKST--SGG TAALGCLVKD Y FPEPTVSW- NSGALTSG VHTFPAVLQS				
hChV2	-----APELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISR TPEVTCVWDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHN AKTKPREEQY				
hChV3	-----QGP-REPOVYTL PP8REEM--TKN QVSLTCLVRG FYPSD IAVEM ESNGQPENN YKTTPEVLDS				
hCLk	-----TVAAPTVEIF PP8DEQL--KSG TASVWCLLNN FYPRE AKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS				
hCLa	-----GQPK-AAESVTLF PP8SEEL--QAN KATIVCLISD FYPGA VTIVAM KADSSPVKAG VEITTPSKQS				

	E	F	G
hChV1	-SGLYSLSSV VTF--SSS-LG TQ TTYICNVNHK PSNTKVDKK VEPKSC-		
hChV2	-NSTYRVSV LTVL--HQDWLN NG GKEYCKVSN KALPAPIEKT ISKAK--		
hChV3	-DGSFFLYSK LTVD--KSRWQO QG NVFSCSVNH EALHNHYTQK SLSL---		
hCLk	KDSTYSLSSST LTLS--KADYB KH KYVACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC-		
hCLa	-NNKYAASSY LSLT--EQRK SH HSYSCQVTH EG-STVEKT VAPTECS		

【図 18】

図18B

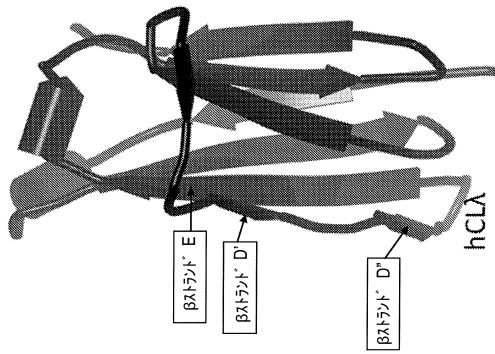
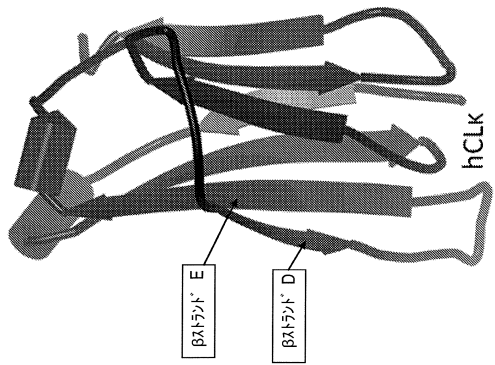


図18A



【図 19】

図19B

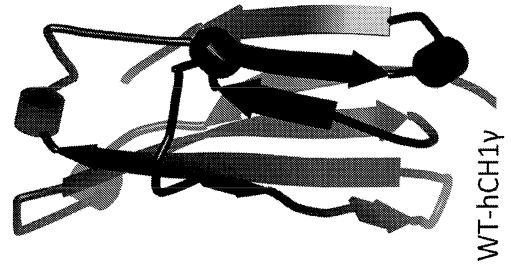
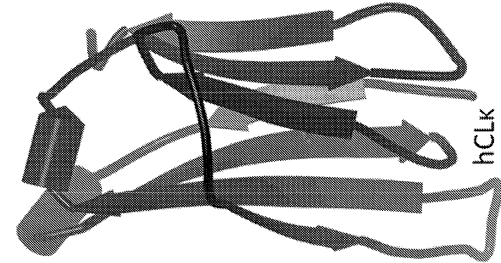


図19A



【図 20】

図20B

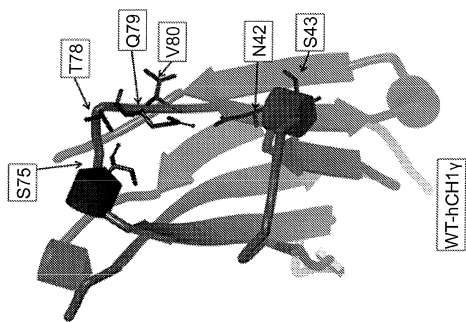
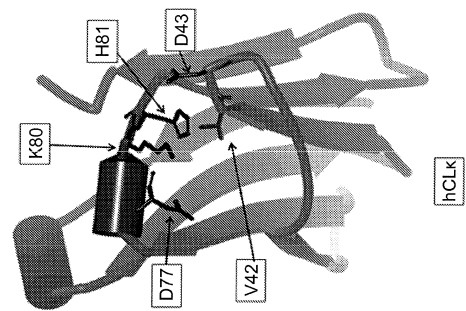


図20A



【図 21】

図21B

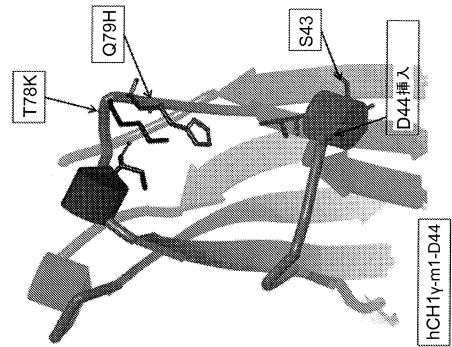
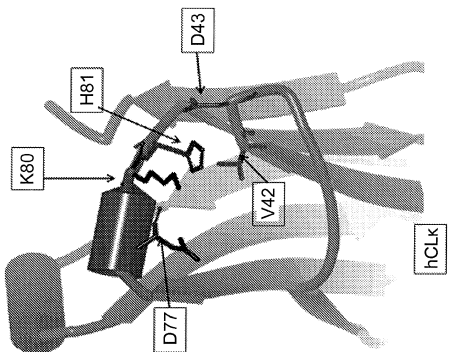


図21A



【図 2 2】

図22B

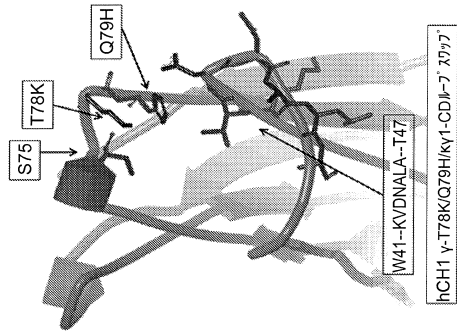
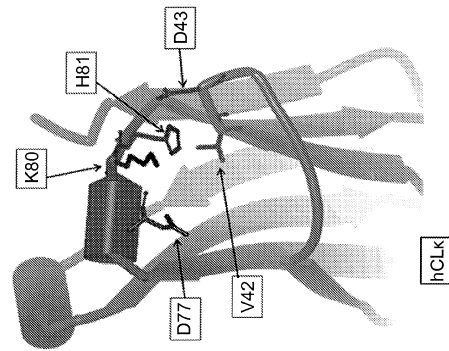


図22A



【図 2 3】

図23B

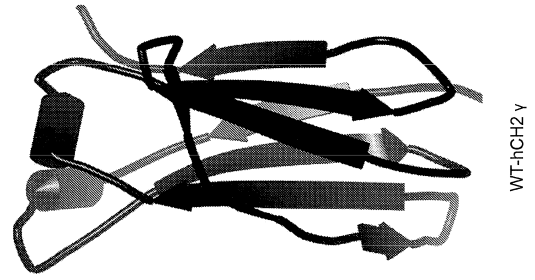
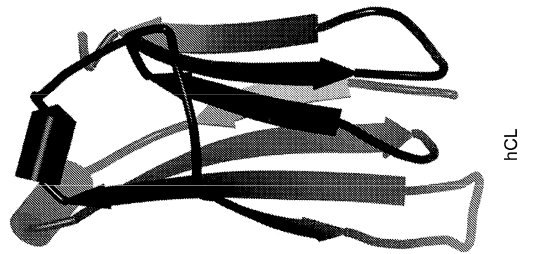


図23A



【図 2 4】

図24B

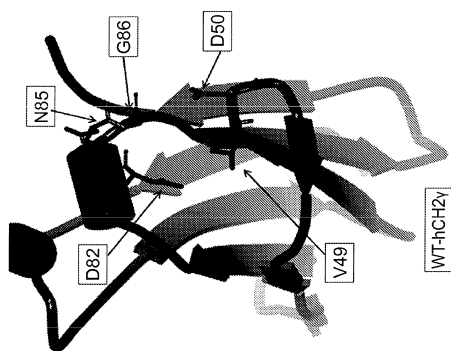
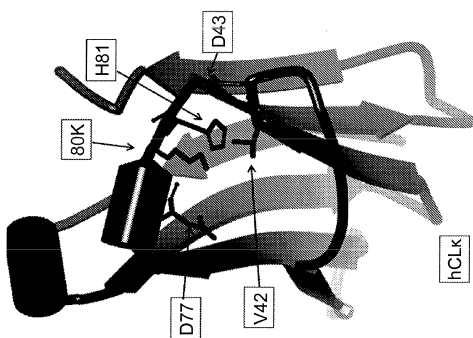


図24A



【図 2 5】

図25B

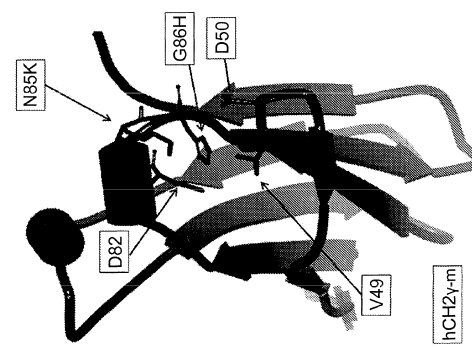
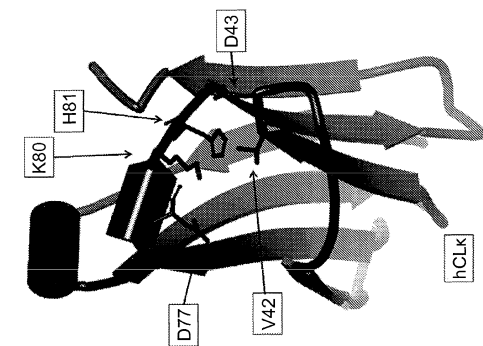
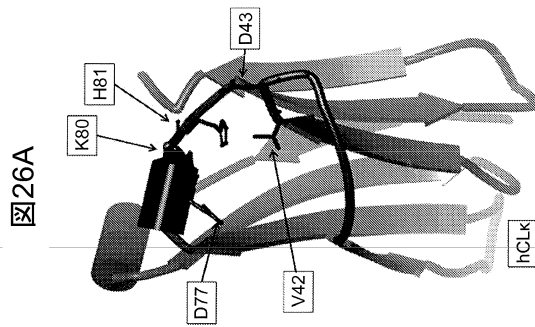
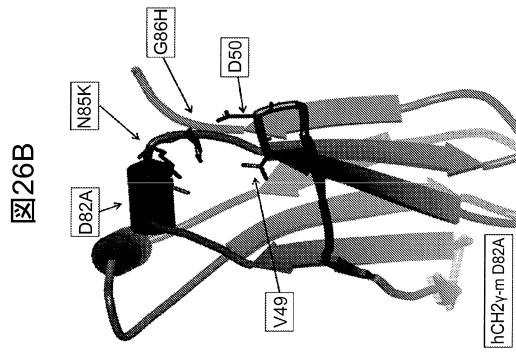


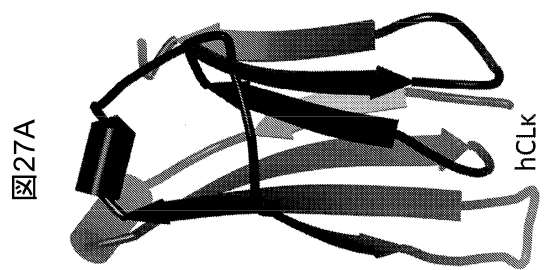
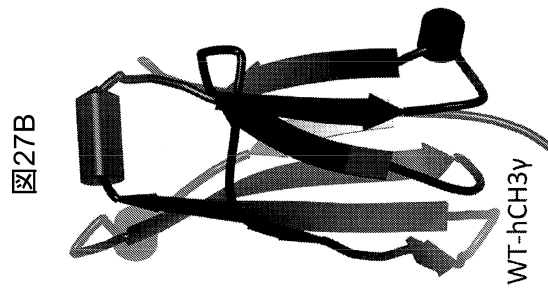
図25A



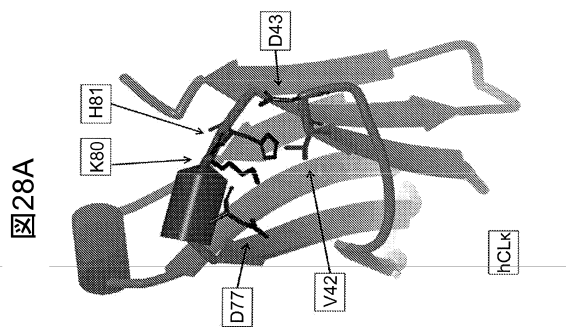
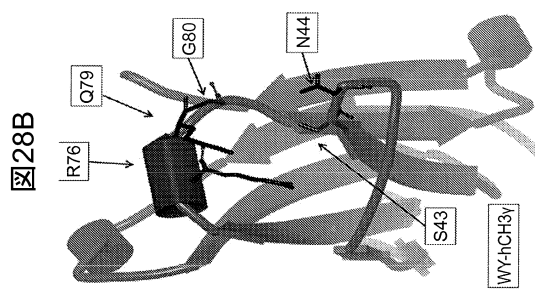
【図 26】



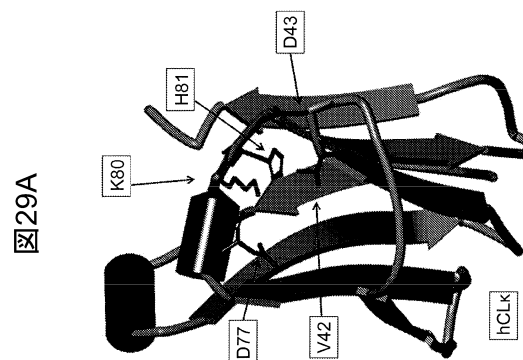
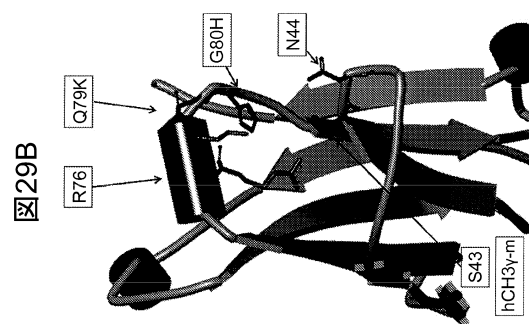
【図 27】



【図 28】



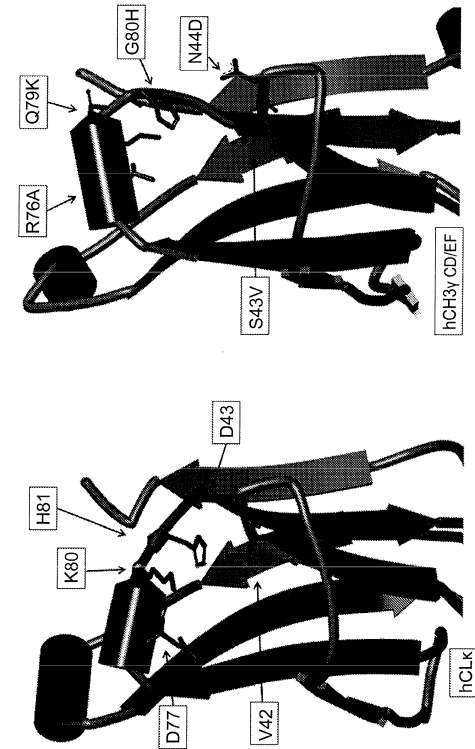
【図 29】



【図 30】

図 30A

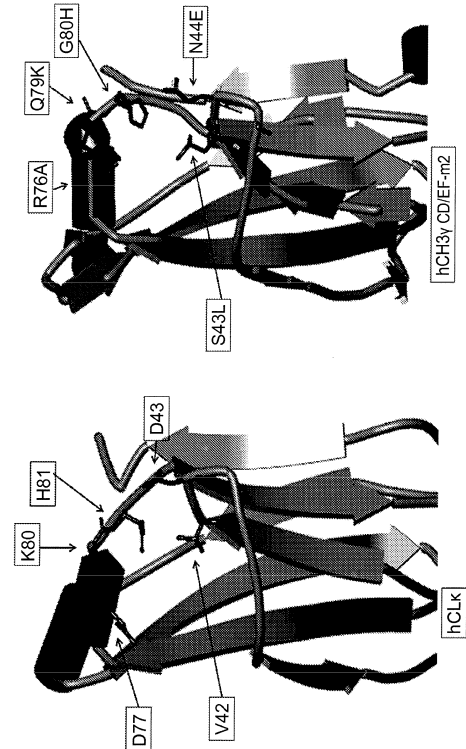
図 30B



【図 31】

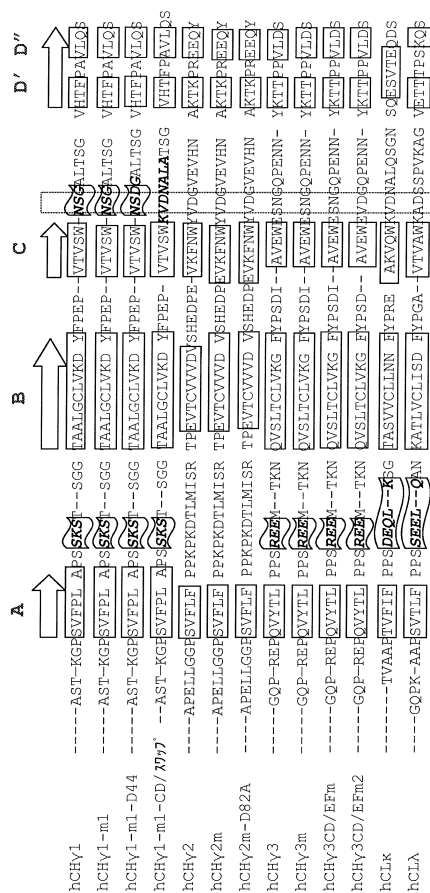
図 31B

図 31A



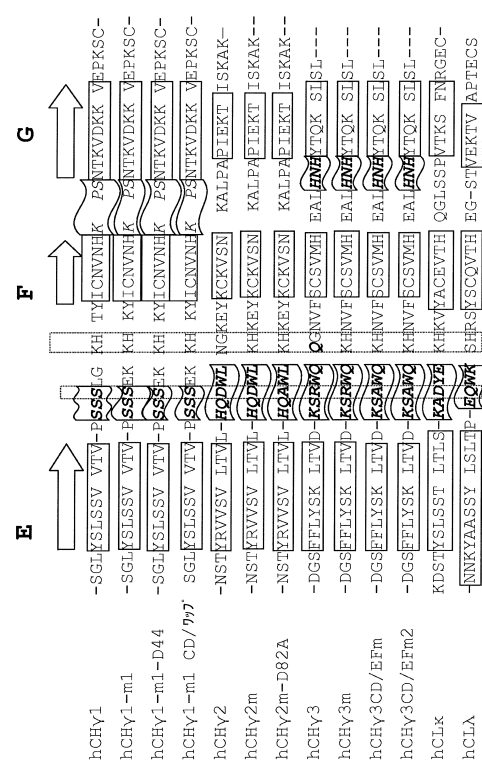
【図 32-1】

図 32A



【図 32-2】

図 32B



【配列表】

0006413127000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10
A 6 1 K 39/395 (2006.01) A 6 1 K 39/395 A
- (72)発明者 オリヴィエ アレクサンドラ ローレント
 アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州 サンディエゴ市 コンドン・ドライブ 6 8 2
 0
- (72)発明者 アリス リー
 アメリカ合衆国 9 2 0 6 4 カリフォルニア州 ポウエイ市 ワネスタ・ドライブ 1 3 0 5 1
- (72)発明者 リチャード リアン プレストン
 アメリカ合衆国 9 2 0 2 6 カリフォルニア州 エスコンディッド市 アンバー・レーン 2 3 6
 0
- (72)発明者 デイヴィッド タマルティ
 アメリカ合衆国 9 2 1 2 7 カリフォルニア州 サンディエゴ市 イーグル・キャニオン・プレ
 イス 1 7 3 6 2
- (72)発明者 ウェイ ホング ユ
 アメリカ合衆国 9 1 2 9 カリフォルニア州 サンディエゴ市 ヴィア・パナシア 8 3 6 3
- (72)発明者 アビジット サレシュ バット
 アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア州 エンシニタス市 アヴェニダ・エステバン 1
 1 7 5
- (72)発明者 アンナ テンプズィクーラッセル
 アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州 サンディエゴ市 ヴィア・カングレジョ 4 0
 5 4

審査官 宮岡 真衣

- (56)参考文献 特表2010-509315 (JP, A)
 特表2011-522794 (JP, A)
 米国特許出願公開第2004/0115165 (US, A1)
 特許第5913307 (JP, B2)
 LINTAO WANG, Structural characterization of the maytansinoid-monoclonal antibody immun
 oconjugate, huN901-DM1, by, Protein Science, 米国, 2005年, Vol.14, Page 2436-2446
 BORK P. et al., J. Mol. Biol. , 242(1994), p.309-320

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6
 C 1 2 N 1 5 / 1 3
 A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 P u b M e d
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 U n i P r o t / G e n e S e q