

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7213610号
(P7213610)

(45)発行日 令和5年1月27日(2023.1.27)

(24)登録日 令和5年1月19日(2023.1.19)

(51)国際特許分類

C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	38/00
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	A 6 1 P	35/00

F I

請求項の数 14 (全69頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2015-562218(P2015-562218)
 (86)(22)出願日 平成26年3月14日(2014.3.14)
 (65)公表番号 特表2016-511279(P2016-511279
 A)
 (43)公表日 平成28年4月14日(2016.4.14)
 (86)国際出願番号 PCT/EP2014/055173
 (87)国際公開番号 WO2014/140317
 (87)国際公開日 平成26年9月18日(2014.9.18)
 審査請求日 平成28年12月13日(2016.12.13)
 審判番号 不服2020-1364(P2020-1364/J1)
 審判請求日 令和2年1月31日(2020.1.31)
 (31)優先権主張番号 13159484.8
 (32)優先日 平成25年3月15日(2013.3.15)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 歐州特許庁(EP)

最終頁に続く

(73)特許権者 515255205
 エヌピーイー セラピューティクス アク
 チエン ゲゼルシャフト
 スイス ツェーハー4057 バーゼル
 ホッホベルガーシュトラーセ 60ツェー
 110000109
 弁理士法人特許事務所サイクス
 グラヴァンダー ウルフ
 スイス ツェーハー4057 バーゼル
 ホッホベルガーシュトラーセ 60ツェー
 テクノロジー パーク バーゼル
 ベールリ ロジャー レンツォ
 スイス ツェーハー4057 バーゼル
 ホッホベルガーシュトラーセ 60ツェー
 テクノロジー パーク バーゼル
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫リガンド/ペイロード複合体の生産方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下を含む、腫瘍性疾患(neoplastic disease)の治療に適した、免疫リガンド/ペイロード複合体の生産方法であって、

a) 以下からなる群より選択される、免疫リガンドを提供し、

(i) 腫瘍細胞に特異的に結合する、抗体、

(ii) 少なくとも1つの、抗体に由来するV_H、V_L、またはC_H免疫グロブリンドメインを含むタンパク質である、腫瘍細胞に特異的に結合する、抗体を基礎とする結合タンパク質(antibody-based binding protein)、

(iii) 受容体、抗原、成長因子、サイトカイン、および/またはホルモンに結合する抗体断片であって、腫瘍細胞に特異的に結合する、抗体断片、および/または、

(iv) DARPin、C型レクチン、黄色ブドウ球菌のAドメインタンパク質、トランスフェリン、リポカリン、フィブロネクチンの10番目のIII型ドメイン(10th type III domains of fibronectin)、クニツツドメインプロテアーゼ阻害剤、アフィリン、ガンマクリスタリン由来結合剤(gamma cryostallin derived binders)、システインノットまたはノッチン(cysteine knots or knottins)、チオレドキシンA足場を基礎とする結合剤(thioredoxin A scaffold based binders)、核酸アプタマー、高分子の分子インプリンティングによって生産された人工抗体、および、ストラドボディ(stradobody)からなる群より選択される抗体模倣

10

20

物であって、腫瘍細胞に特異的に結合する、抗体模倣物、および、

b) 少なくとも 1 つのペイロードを、免疫リガンドに、配列特異的ソルターゼ酵素、または、その触媒ドメインにより酵素的に結合し (conjugating) 、前記ペイロードは、分子量が 2500 ダルトンの分子量以下の毒素であり、ここで、

免疫リガンドは、ソルターゼ認識モチーフを含み、そして、毒素が、Gly_n修飾で修飾され、ここで n は 3 ~ 5 であり、

そして、ここで、

前記免疫リガンドが、免疫リガンドの C 末端とソルターゼ認識モチーフの間に配置された ちょうど一つのみの Gly Gly Gly Gly Ser (GGGGS) ペプチドスペーサー を含み、

それにより、免疫リガンド / ペイロード複合体を生産する方法。

【請求項 2】

前記免疫リガンドが、

- ・受容体、
- ・抗原、
- ・成長因子、
- ・サイトカイン、および / または
- ・ホルモン、

からなる群より選択される実体 (entity) のうちの少なくとも 1 つに結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記配列特異的ソルターゼ酵素の少なくとも 1 つの触媒ドメインが、前記免疫リガンドまたは前記ペイロードのいずれかの C 末端に融合されている、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記免疫リガンドが、それぞれがペイロードに結合している少なくとも 2 つのサブユニットを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

方法が、免疫リガンドとペイロードの間の化学量論的に規定された定量的関係を許容する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

免疫リガンドとペイロードとの間の前記化学量論的に規定された定量的関係が、部分的に反応した C 末端に修飾を有する免疫リガンド基質を除去することで達成される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

少なくとも 2 つのアフィニティ精製用タグを用いることを含む請求項 6 に記載の方法であって、アフィニティ精製用タグは、少なくとも 1 つの小分子毒素の結合の前に、ソルターゼ認識モチーフを介して、免疫リガンドの少なくとも 2 つの異なるサイトに結合し、

前記方法は、さらに、アフィニティ精製工程を含み、このアフィニティ精製工程において、少なくとも 1 つの小分子毒素の、免疫リガンドへの結合の後に、依然としてアフィニティ精製用タグを有し、そして、従って、不完全複合体と評価される複合体が、アフィニティ精製により、アフィニティ精製用タグを有さない完全複合体から分離される、方法。

【請求項 8】

ペイロードを前記免疫リガンドに、部位特異的に結合させることを許容する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られた、腫瘍性疾患の治療に適した免疫リガンド / ペイロード複合体であって、前記複合体は、

腫瘍細胞に特異的に結合する、免疫リガンド、並びに

分子量が 2500 ダルトン以下の毒素を含む、複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

前記複合体が、ペプチド転移反応に供されたソルターゼ認識モチーフを含む、請求項9に記載の、腫瘍性疾患の治療に適した免疫リガンド／ペイロード複合体。

【請求項 11】

前記ソルターゼ認識モチーフが、L P X T G 又は N P Q T N である、請求項10に記載の腫瘍性疾患の治療に適した免疫リガンド／ペイロード複合体。

【請求項 12】

所与の病態に罹患している、または発症する危険性のある、ヒトまたは動物対象の治療に用いるための医薬の製造において、請求項9～11のいずれか1項に記載の腫瘍性疾患の治療に適した免疫リガンド／ペイロード複合体の使用。

10

【請求項 13】

前記腫瘍性疾患の治療に適した免疫リガンド - ペイロード複合体化を粗細胞培養上清中で行う、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 14】

請求項1～8のいずれか1項に記載の方法で、製造可能な、腫瘍性疾患の治療に適した免疫リガンド／ペイロードの複合体。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、免疫リガンド／ペイロード複合体の生産方法に関する。

20

【背景技術】**【0002】**

現在、分子でタンパク質を標識化する方法および／または分子をタンパク質に複合体化させる方法の大部分は、特に低分子ペイロードまたは低分子標識を検討する場合、タンパク質の遊離しているリシンおよび／またはシステインアミノ酸に共有結合させる特定のリンカー分子を使ってペイロードを化学的に結合させることを伴う。

【0003】

しかしながら、免疫ターゲティング戦略のために特に目的とする抗体などの多くのタンパク質は、リシン残基およびシステイン残基を複数含む場合のある、かなり大きなタンパク質である。リンカーが介在する化学的結合は確率論的な過程であるため、ペイロードのリンカー介在性の化学的な連結からは、治療効果および／または診断上の有用性がそれ異なる複合体化したタンパク質の不均一な混合物が生じる。安全性への懸念から、規制当局はバッチ間の変動および／または医薬品原料（A P I）の変動を否定的に見るため、治療用混合物として承認を得る過程ではタンパク質 - ペイロード複合体の混合物が大きな課題となっていることが明らかである。

30

【0004】

加えて、ペイロードとタンパク質の比が決められることが所望される場合、望ましい結合化学量論で複合体を生成することが必要になることが多い。リンカーを用いて結合させたタンパク質のうちの僅かな画分しか所望される割合のペイロード複合体とならないことが多いため、このような過程は単に面倒なだけでなく、製造過程で商品原価が相当に上がる可能性がある。このことは、使用する毒素に応じて、3～4つの毒素分子が望ましいが、通常のリンカー介在性の化学結合反応では抗体1つ当たり0～8つの毒素の結合が見られる治療関連抗体／薬物複合体（A D C）で特に当てはまる（パノウスキーラ（2014））。

40

【0005】

前述したような制約にもかかわらず、現在臨床試験に用いられている抗体／薬物複合体の全て、または疾患の治療に関する保険機関によって認可されている抗体／薬物複合体は、有毒な低分子と抗体のリンカー介在性化学結合によって生成されてきた（ランペール（2012）またはマラード（2013））。

【0006】

50

業界では、また、この分野の科学の専門家には、毒素または標識分子を免疫リガンドに結合させることなど、分子的ペイロードの部位特的で化学量論的な結合が化学的なリンカー介在性結合よりも大きな利益をもたらすだろうと広く認識されている。このことは、タンパク質構造中の特定のアミノ酸との化学結合を試みることで実証されている（パノウスキーラ（2014））。

【0007】

このことは、一方では、リンカーの連結が標的とされ得る望ましくない結合部位が欠失するようおよび／または望ましい結合部位（つまりシンおよび／またはシステイン残基）が生じるように、タンパク質構造中の特定の位置を突然変異させることで試みられている（マクドナラ（2006）またはジュヌチュラ（2008））。

10

【0008】

他方で、タンパク質への化学結合の制御は、セレノシステイン、p-アジドフェニルアラニンまたはアセチルフェニルアラニンなどの天然にはないアミノ酸を特定の位置に組み込むことでも試みられている（ホファー（2009）、アクスアップラ（2012）、またはレムケ（2011））。

【0009】

しかしながら、これらいづれのアプローチでも複合体化されるタンパク質の一次アミノ酸配列が変わり、望ましくない機能特性が生じる可能性がある。さらに、前述したような非天然のアミノ酸の導入は効果が低いことが多く、また、特定の標識部位をタンパク質に定量的に組み込むことはできない。

20

【発明の概要】

【0010】

そのため、確率論的な結合方法、具体的には、治療に関連する免疫複合体（ADCを含むがこれには限定されない）の生成方法に関して知られている問題を克服することが、この業界では急務である。

【0011】

従って本発明の目的の1つは、部位特異的に複合体化した抗体薬物複合体（ADC）を生成するために、免疫リガンドにペイロード、例えば、薬剤、毒物、サイトカイン、マーカーなどを結合させる、好ましくは完全長モノクローナル抗体に低分子量の毒物を結合させる効率的な方法を提供することである。

30

【0012】

本発明の別の目的は、より高い効力を有するおよび／または高い再現性で生産可能な免疫リガンド／ペイロード複合体を作成することである。

【0013】

本発明の別の目的は、ペイロードが、免疫リガンドに部位特異的におよび／または配列特異的に結合することを可能にすることである。

【0014】

本発明の別の目的は、その構成要素の特徴、例えば、標的親和性、標的特異性、標的感受性、溶解度、薬理学的機能などを保持している免疫リガンド／ペイロード複合体を作成することである。

40

【0015】

これらの目的は独立請求項に記載された対象によって達成されるが、従属請求項および明細書では、さらに好ましい態様を開示する。

定義

【0016】

本明細書で使用する場合、「免疫リガンド」という用語は、所与の標的に対して親和性をもつ実体、薬剤または分子、例えば、受容体、細胞表面タンパク質、サイトカインなどを定義することを意味する。このような免疫リガンドは場合により、アゴニスト介在性の反応を遮断するもしくは弱める、または受容体・アゴニスト相互作用を阻害する可能性がある。しかしながら最も重要なことは、免疫リガンドはペイロードを特定の部位に、前記

50

免疫リガンドによって認識される標的によって規定される部位に送達するためのシャトルとして役立つ可能性があることである。従って、免疫リガンドによる標的指向化、例えば、これらには限定されないが、受容体への標的指向化によって、そのペイロードは前記受容体が豊富なことを特徴とする部位に送達される。免疫リガンドとしては、これらには限定されないが、所与の標的に親和性をもつ抗体、抗体断片、抗体を基礎とする結合タンパク質、抗体模倣物、受容体、可溶性のおとり受容体、足場タンパク質および受容体のリガンドが挙げられる。

【 0 0 1 7 】

「抗体」（同じ意味で「免疫グロブリン（Ig）」とも呼ばれる）は通常、4本のポリペプチド鎖（2本の重（H）鎖と2本の軽（L）鎖）を含むため多量体タンパク質であるか、またはそのIgホモログ（例えば、重鎖のみを含むラクダ化ナノボディ、重鎖もしくは軽鎖のいずれかに由来する単一ドメイン抗体（dAb））の均等物である。抗体には、完全長の機能性変異体、突然変異体、またはその誘導体（Ig分子に必須のエピトープ結合特性を保持しているマウス、キメラ、ヒト化および完全なヒト抗体を含むがこれらには限定されない抗体が含まれ、また抗体には、二特異的、二重特異的、多重特異的、および二重可変ドメイン免疫グロブリンが含まれ；免疫グロブリン分子はいずれのクラス（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY）であってもまたはサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2）であっても、およびアロタイプであってもよい。

【 0 0 1 8 】

本明細書で使用する場合、「抗体を基礎とする結合タンパク質」は、抗体に由来するV_H、V_L、またはC_H免疫グロブリンドメインを少なくとも1つ、他の非免疫グロブリンまたは非抗体由来要素の文脈で含む任意のタンパク質であってよい。このような抗体を基礎とするタンパク質としては、これらには限定されないが、（i）結合タンパク質のFc-融合タンパク質（免疫グロブリンC_Hドメインの全体または一部を含む受容体または受容体の構成要素など）、（ii）V_Hおよび/またはV_Lドメインが別の分子的足場に結合している結合タンパク質、または（iii）免疫グロブリンのV_H、および/またはV_L、および/またはC_Hドメインが、天然に生じる抗体または抗体断片には通常見られない様式で組み合わさっているおよび/または集合している分子、が挙げられる。

【 0 0 1 9 】

本明細書で使用する場合、「抗体薬物複合体（ADC）」とは、分子量の小さい医薬品原料（API）、例えば、これらには限定されないが、毒素（例えば、これらには限定されないが、チューブリン阻害剤、アクチン結合剤、RNAポリメラーゼ阻害剤、DNA挿入剤および修正を起こす/損傷を与える薬物など）、キナーゼ阻害剤、または細胞の生存および/または特定の生理的な細胞経路に必須の細胞経路を干渉する任意のAPIと結合した抗体もしくは抗体断片または/および抗体を基礎とする結合タンパク質のいずれかに關する。

【 0 0 2 0 】

本明細書で使用する場合、「抗体誘導体または断片」とは、完全長ではない抗体に由来するポリペプチド鎖を少なくとも1本含んでいる分子に関し、「抗体誘導体または断片」は、（i）Fab断片（軽鎖可変部（V_L）、重鎖可変部（V_H）、軽鎖定常部（C_L）および重鎖定常部1（C_H1）ドメインからなる一価の断片）；（ii）F(ab')₂断片（ヒンジ領域のジスルフィド架橋で結合している2つのFab断片を含んでいる二価の断片）；（iii）Fab（F_d）断片の重鎖部分（V_HドメインとC_H1ドメインからなる）；（iv）可変断片（F_v）断片（抗体の单一のアームにあるV_LおよびV_Hドメインからなる）；（v）ドメイン抗体（dAb）断片（单一の可変ドメインを含む）；（vi）単離した相補性決定領域（CDR）；（vii）一本鎖F_v断片（scF_v）；（viii）二重特異性抗体（V_HドメインとV_Lドメインが同じポリペプチド上で発現しているが、同じ鎖にある2つのドメインを対合させるには短すぎるリンカーを使用し、これらのドメインを別の鎖にある相補性ドメインと対合させることで、2つの抗結合部位を作成している

10

20

30

40

50

二価の二重特異性抗体) ; (i ×) 直鎖状抗体(相補的な軽鎖ポリペプチドと一緒になって抗原結合領域の対を形成する、縦に並んだ V_H セグメント ($V_H - C_H 1 - V_H - C_H 1$) の対を含む) ; および (x) この他の、免疫グロブリンの重鎖および / または軽鎖の非完全長部分、あるいはその突然変異体、変異体、または誘導体のそれぞれまたはこれらの任意の組み合わせを含むがこれらには限定されない。

【0021】

本明細書で使用する場合、「修飾された抗体フォーマット」という用語は、抗体薬物複合体、ポリアルキレンオキシドで修飾した $s c F_v$ 、単一特性抗体、二重特異性抗体、ラクダ化抗体、ドメイン抗体、二特異的または三重特異的抗体、IgA、またはJ鎖と分泌成分を介して結合している2つのIgG構造体、サメ抗体、新世界霊長類のフレームワークと旧世界霊長類のCDRを加えたもの、ヒンジ領域を除去したIgG4抗体、CH3ドメインを改変してさらに2つの結合部位を加えたIgG、Fcガンマ受容体への親和性が高まるようにFc領域を改変した抗体、CH3 + VL + VHを含んでいる二量体化構築物などを包含する。

10

【0022】

本明細書で使用する場合、「抗体模倣物」という用語は、免疫グロブリンファミリーに属さず、また、アブタマーまたは合成高分子などの非タンパク質でさえないタンパク質を指す。その中の数種は、抗体様ベータシート構造をもつ。「抗体模倣物」または「代替足場」の抗体を上回る利点としては、より高い溶解度、より高い組織浸透性、熱および酵素に対するより高い安定性、および生産コストが比較的低いことが考えられる。

20

【0023】

抗体模倣物のうちのいくつかは、想像できる標的それぞれに対する特定の結合候補を与える大規模ライブラリーの状態で提供される場合がある。抗体の場合と同様に、標的特異的抗体模倣物も、確立されたディスプレー技術、例えばファージディスプレー、細菌ディスプレー、酵母または哺乳類ディスプレーを伴う高処理スクリーニング (HTS) 技術によって開発することができる。最近開発された抗体模倣物には例えば、アンキリン反復タンパク質 (DARPinと呼ばれている)、C型レクチン、黄色ブドウ球菌のAドメインタンパク質、トランスフェリン、リポカリン、フィブロネクチンの10番目のIII型ドメイン、クニッソドメインプロテアーゼ阻害剤、ユビキチン由来結合剤 (アフィリンと呼ばれている)、ガンマクリスタリン由来結合剤、システインノットつまりノッチン、チオレドキシンA足場を基礎とする結合剤、核酸アブタマー、高分子の分子インプリンティングによって生産された人工抗体、細菌ゲノムから作成したペプチドライブラリー、SH-3ドメイン、ストラドボディ (stradobody)、ジスルフィド結合とCa²⁺によって安定化した膜受容体の「Aドメイン」、CTL4を基礎とする化合物、Fyn SH3、およびアブタマー (特定の標的分子に結合するオリゴ核酸またはペプチド分子) が包含される。

30

【0024】

免疫リガンドがタンパク質でもペプチドでもない場合、例えばアブタマーの場合には、本明細書でこの後に開示する酵素結合のための好適な基質となるペプチドタグとともに提供されることが好ましい。

40

【0025】

本明細書で使用する場合「結合 / 複合体化」とは、共有結合を形成することによって、ある分子を別の分子に共有的に接続することに関する。

【0026】

本明細書で使用する場合「免疫毒素」は、毒素、例えば、これらには限定されないが、細菌性毒素、例えばジフテリア毒素A、緑膿菌外毒素、ボツリヌス毒素、あるいは例えば、無脊椎動物 (これらには限定されないが例えばクモ、サソリ、軟体動物、クラゲ) もしくは脊椎動物 (これらには限定されないが例えば、ヘビ) 由来のタンパク質性毒液、またはその機能性断片を構成しているタンパク質またはポリペプチドに結合した免疫リガンド複合体に関する。

50

【0027】

本明細書で使用する場合、「低分子量ペイロード」は、分子量が2,500ダルトンを超えないペイロードを表す。

【0028】

本明細書で使用する場合「ペイロード」という用語は、天然に存在する分子または人工的に合成された分子の全てを表し、ペイロードには、化学的に合成可能な低分子量の分子つまり化学的な実体、および宿主細胞の発酵によって生産することが必要であり、標的もしくは抗原に特異的に結合する免疫リガンドに新しい機能を付与するより大きな分子または生物学的な実体が含まれる。

【0029】

本明細書で使用する場合「低分子量毒素」という用語は、分子量が2,500ダルトンを超えず、哺乳類細胞に毒性を有する、細胞障害性の低分子量化合物を意味する。

【0030】

本明細書で使用する場合「トランスペプチダーゼ」とは、酵素もしくは酵素の触媒ドメイン、あるいは反応中に第一のペプチド結合のエネルギーを保持し、その後新しいペプチド結合に移すようにペプチド結合の切断を触媒し、それによって直接または複数の反応中間体を経て、新規ペプチド結合を形成することができるタンパク質である。好ましくは、前記トランスペプチダーゼがあるペプチドまたはタンパク質のC末端と別のペプチドまたはタンパク質のN末端を接続することが好ましい。新しいペプチド結合が形成されることから、これらの酵素または機能性ドメインも「タンパク質リガーゼ」、「ペプチドリガーゼ」と呼ばれるかもしくは「タンパク質またはペプチドステープラー」とのあだ名で呼ばれている。このようなタンパク質リガーゼには、これらには限定されないが、ソルターゼ酵素、インテインおよびスプリットインテインが含まれる。

10

【0031】

本明細書で使用する場合「配列特異的トランスペプチダーゼ」という用語は、少なくとも1つの基質ペプチドまたはタンパク質を必要とするトランスペプチダーゼを定義することを意図し、ここでこの基質ペプチドまたはタンパク質は、前記基質ペプチドまたはタンパク質を別のペプチドもしくはタンパク質に、またはペプチドもしくはタンパク質成分を含んでいる低分子量化合物に接続する（N末端側および/またはC末端側に接続する）ための認識配列として所与のペプチド配列を含んでいる。

20

【0032】

本明細書で使用する場合「部位特異的トランスペプチダーゼ」という用語は、別のペプチドもしくはタンパク質、または低分子量化合物を含んでいるペプチドもしくはタンパク質成分への結合に使用される特定の部位を少なくとも1つ含んでいる基質ペプチドまたは基質タンパク質である。

30

【0033】

本発明は、免疫リガンド/ペイロード複合体、好ましくは抗体薬物複合体（ADC）を生成するために、ペイロード（好ましくは低分子量毒素）を免疫リガンド（好ましくは抗体）に部位特異的かつ選択的に結合させるために部位特異的トランスペプチダーゼ（例えばソルターゼ酵素やスプリットインテイン）を使用する方法を開示する。好ましいペイロードは、短い（好ましくはアミノ酸が13個未満の）合成されたアミノ酸配列で修飾された低分子量毒素であり、この短いアミノ酸配列は、免疫リガンドのN末端またはC末端いずれかとの、ソルターゼ酵素またはスプリットインテイン介在性の共有結合のための基質となる（図1および3）。このような結合は部位特異的な様式で、かつ、決められた化学量論で達成され、これは、前述したようなペイロードと免疫リガンドとの標準的で確率論的な化学結合より優れた特徴である。

40

【0034】

本発明はさらに、少なくとも2つの異なる機能性ペイロードを多量体免疫リガンドに結合させるため、多量体タンパク質のそれぞれ異なる形に修飾したサブユニット（例えば抗体の重鎖および軽鎖）、および特定のトランスペプチダーゼに特異的な別の短いアミノ酸

50

配列で修飾した複数の異なるペイロードを使用することによる、部位特異的トランスペプチダーゼ（例えばソルターゼまたはスプリットインテイン）介在性の多量体免疫リガンド（好ましくは抗体）と具体的には2種類の異なる毒素分子もしくは他の標識との結合を開示する（図6）。

【0035】

完全には結合していない免疫リガンドを保持し、その上さらにそれ以上のアフィニティ精製用タグおよび／または検出用タグを保持するアフィニティ樹脂を使用することで、アフィニティ精製用タグおよび／または検出用タグを除去するとペイロードが完全に（100%）修飾された結合タンパク質に結合した免疫リガンドを選抜することができるよう、本発明はさらに、酵素介在性のペプチド転移を受ける免疫リガンドをN末端またはC末端に、アフィニティ精製用タグおよび／または検出用タグを付加する方法も開示する（図4）。

【0036】

本発明はさらに、ペプチド転移活性が複合体化させる免疫リガンドに不可欠な部分となり、トランスペプチダーゼ介在性の結合反応が起きている間にそれ以上可溶性ソルターゼ酵素を加える必要がないように、複合体化させるタンパク質のN末端またはC末端に触媒性トランスペプチダーゼドメインを直接融合させた免疫リガンドも開示する（図5）。

【0037】

前述したこれらの態様の全てにおいて、任意のペイロード、例えば低分子量毒素（化学的実体）、有毒タンパク質または蛍光標識、好ましくは低分子量毒素を免疫リガンド、好ましくは抗体に、部位特異的にかつ化学量論的に制御した様式で結合させることができ、このことは、結合の比と部位を制御することができない、標準的で化学的なリンカー化学法によるペイロードとタンパク質との結合よりも優れている。そのため抗体薬物複合体（ADC）の生成については、毒素ペイロードをトランスペプチダーゼ、好ましくはソルターゼ酵素およびスプリットインテインによって抗体に結合させることで、癌の治療に関する期待される改善された治療特性を有するより均一な産物が得られる可能性がある（図12）。

【0038】

ソルターゼ酵素とスプリットインテインによるペイロードと免疫リガンドの酵素的な結合によって、商品原価を下げ、均一な免疫リガンド・ペイロード複合体をもたらす、ペイロードのタンパク質および免疫リガンドへの部位特異的で化学量論的な結合が可能になる。特にトランスペプチダーゼの選択性によって、粗細胞培養上清におけるペイロードと免疫リガンドの結合が可能になり、従来のリンカー介在性化学的結合と同様、生成された成分が必要なくなる。その結果、ペイロードの免疫リガンドへの結合に配列な特異的トランスペプチダーゼを使用することで、免疫リガンド・ペイロード、特にADCの製造に関する商品原価が有意に下がるだろう。

【0039】

本明細書で開示する一番目のトランスペプチダーゼであるソルターゼ酵素は、様々なグラム陽性球菌、例えばブドウ球菌や肺炎連鎖球菌の種で同定されており、これは、感染を受けた宿主による効率的な免疫応答を回避するように細菌の表面特徴を変化させるため、毒素因子と細胞壁プロテオグリカンとの結合を触媒する（マズマニアンら（1999））。グラム陽性球菌である黄色ブドウ球菌（スタフィロコッカス オウレウス）のソルターゼA酵素は最初に解析が行われ（トン・タットら（1999））、その後、多くのタンパク質修飾に関するツールとしてさらに解析されてきた（ツキジ（2009））。ソルターゼ酵素の魅力は複合体化する2つの分子を、一方では、各分子に容易に付加することができ、タンパク質のN末端もしくはC末端のいずれかに結合させることができるアミノ酸が5個という長さの短いペプチドタグ（ソルターゼタグ、黄色ブドウ球菌ソルターゼAの場合にはL P X T Gであり、ここでXは天然に存在する20種類のアミノ酸のいずれであってもよい）で、好ましくは3～5アミノ酸のグリシンストレッチで修飾するか、あるいはこれらと一緒に発現させる必要があるだけという点にある（アントスラ（2009a））

10

20

30

40

50

(図1)。一方でこれは、2つのタンパク質を共役させるまたは結合させるためのシステムの利用を可能にするだけでなく、より小さい分子をタンパク質に結合させためのシステムの利用をも可能にする。

【0040】

ペプチド結合の切断と形成を起こす二番目のトランスペプチダーゼは、いわゆるインテインであり、これは最初、ペプチド結合を切断し、新しいペプチド結合を形成することでそれ自身を前駆タンパク質から除去(スプライス)することが可能なタンパク質のイントロンとして発見された(ショウラ(1993))(図2a)。インテインをさらに、N-インテインとC-インテインドメイン(いわゆるスプリットインテイン)に分離させ、それぞれ独立したタンパク質に連結させることができる。これが次いでエクステインドメインのトランススプライシングを触媒する(図2b)。スプリットインテインはN-エクステインとC-エクステイン部分を共有結合させるのに、また、タンパク質を精製および/または環状化するのに利用されてきた(エルシェ(2010))。しかしながら、スプリットインテインを低分子ペイロードの結合にも使用するためには、N-インテインまたはC-インテインドメインのいずれかが、ソルターゼ介在性ペプチド転移に必要とされる短い配列(好ましくはグリシンが3つ連続している配列)と同様に化学合成によっていかなる大きさの分子にも容易に付加することができる、僅かな数のアミノ酸に短くできる場合に機能するスプリットインテインを使用する必要がある。C-インテインドメインが僅か6個のアミノ酸しか含んでいない人工のSspGyrBS11スプリットインテインが開発されたことにより(サンラ(2004))、この条件が満たされ、このスプリットインテインはビオチンを有するタンパク質のC末端標識に利用されてきた(フォルクマンラ(2009))(図3a)。同様に、SspDnaXスプリットインテインから11アミノ酸の短いN-インテインが開発されたことにより、そのような長さ11個のアミノ酸を化学合成によって目的のペイロードに付加した場合には、タンパク質のN末端を任意の分子に結合させることができるようになる(図3b)。

【0041】

そのため、本発明の一側面は、短い、好ましくは3~5個のグリシンアミノ酸を含むグリシントレッチまたはアミノ酸を6個含むSspGyrBC-インテインドメインもしくはアミノ酸が11個のSspDnaXのN-インテインドメインを含んでいる短い12アミノ酸のGVFVHNSXXXXアミノ酸配列(Xは天然に存在するまたは人工のアミノ酸のいずれであってもよい)のいずれかを付加することであり、このことは、それぞれのトランスペプチダーゼが修飾されたペイロードをタンパク質および免疫リガンド、好ましくはソルターゼ酵素認識モチーフ、例えば、黄色ブドウ球菌(スタフィロコッカスアウレウス)のソルターゼAを利用する場合にはLPXTG、SspGyrBスプリットインテインを利用する場合には150アミノ酸のN-インテインドメイン、またはSspDnaXスプリットインテインを利用する場合には139アミノ酸のC-インテインドメイン、を含む抗体に結合させることができるようにするのに十分である(図1および3を参照のこと)。

【0042】

長さの短いアミノ酸配列、例えば、ソルターゼ介在性の結合に必要とされるのと同様の3~5個のグリシン残基、またはスプリットインテイン介在性の結合に必要とされる12個のアミノ酸配列を低分子量毒素に付加することは、アミノ酸-毒素付加物が生理的な緩衝液に溶解し、確実にソルターゼまたはスプリットインテインの結合を最適にできるよう、特定の疎水性毒素分子の水への溶解度を増大させることであると分かっている(データは示さない)。このことで、大きなタンパク質分子、特に、リンカー化学と結合に関係することが多い有機溶媒や生理的でないpHに曝された時に容易に変性する可能性のある抗体の、構造の保全に及ぼすストレスを予防する。加えて、大きなタンパク質、特に抗体に疎水性毒素分子を結合させることは、一定のレベルのタンパク質凝集を引き起こす場合がある。このことはまた、トランスペプチダーゼ、特にソルターゼ酵素を使用することで酵素的に生成された複合体中にさらに親水性のアミノ酸が残り、大きなタンパ

10

20

30

40

50

ク質、つまり抗体薬物複合体が凝集する傾向が弱まるため、改善される場合がある。

【0043】

ソルターゼ酵素は、タンパク質間の連結またはタンパク質 - ペプチド間の連結に関し、タンパク質の環状化も含めて（アントスラ（2009b））、先行技術において広く記載されている（マオラ（2004）、パルサラシーら（2007）または国際公開第2011/133704号A2）。ソルターゼタンパク質またはペプチド連結の用途には、抗体断片、例えばタンパク質またはペプチド標識を有するFab断片およびscFv断片を用いたタンパク質またはペプチドの連結も含まれた（ムルマンラ（2011）、マーデイラ（2012）、または米国特許第2010/0055761号A1および国際公開第2012/142659号A1）。完全長抗体としてソルターゼ連結タンパク質（レバリーら（2011）、例えばEGFP、アルブミン、グロニンを抗体軽鎖と結合させたもの）を、またはソルターゼ連結短ペプチド（スウェーら（2013））を使ったものの2報の先行技術文献が公開されているが、低分子量毒素、例えばアウリスタチンまたはメイタンシンなどを完全長抗体または抗体断片に結合させるソルターゼ介在性結合を例示している先行技術文献を見つけることはできなかった。具体的には、本発明で開示するように、低分子量毒素を含むADCがIgHまたはIgL鎖のいずれか（薬対抗体の比は2）、またはIgHおよびIgL鎖のいずれか（薬対抗体の比は4）に均一に結合するようになる、低分子量毒素を含むADCの生成を開示した先行技術文献を見つけることはできなかった。

【0044】

先行技術では、非タンパク質基質をグリシン残基で修飾し、それらを単純な1サブユニットタンパク質またはペプチドのソルターゼ修飾に用いることができるようになりますについて開示しているが（それぞれ、ツキジ（2009）または国際公開第2007/108013号A3）、ソルターゼ酵素介在性のタンパク質またはペプチドの連結については何年も前に先行技術中に記載されているにもかかわらず、非タンパク質基質、好ましくは低分子量毒素の多量体タンパク質、好ましくは抗体への、より課題が多い均一な結合についてはこれまで記述されていない。

【0045】

さらに、ソルターゼ酵素介在性のタンパク質またはペプチドの連結については何年も前に先行技術中に記載されているにもかかわらず（パノウスキーラ（2014））、多量体タンパク質、特に完全長モノクローナル抗体を2種類の異なるペイロードに、好ましくは本明細書で開示する2種類の異なる低分子量毒素に結合させることについてはこれまでの先行技術には記述されていない。

【0046】

先行技術から、ソルターゼ酵素が最小で3個のグリシンアミノ酸を含む基質を認識することが分かっている（パルサラシーら（2007））。そのため本発明は、目的のペイロード分子に付加された少なくとも3個のグリシンアミノ酸残基（1個または2個のグリシン残基でも十分な場合もあるが）を含有し、本明細書で開示する方法に包含されるペイロードを含み得る。低分子量ペイロードの例では、僅かな数のグリシンアミノ酸残基は、本明細書に記載の標準的な合成ペプチド化学によって付加することができる。タンパク質の場合には、その数のグリシン残基、好ましくは3個のグリシン残基をコードしているコドンを、そのタンパク質のオープンリーディングフレームに読み枠を合わせて付加するか、または組換えタンパク質が少なくとも3個のN末端グリシンアミノ酸残基を含むように、標準的な合成ペプチド化学でグリシン残基を付加することができる。

【0047】

文献から、異なる種類のソルターゼ酵素、例えば、黄色ブドウ球菌由来のソルターゼBまたは他のグラム陽性球菌由来のソルターゼは、黄色ブドウ球菌由来のソルターゼAの認識モチーフであるL P X T G（Xは任意のアミノ酸）とは異なるペンタペプチドモチーフを認識することが分かっている（シュピリーグら（2011））。そのため本発明はさらに、タンパク質および免疫リガンド、好ましくは抗体などを、異なるグラム陽性球菌種由来の異なる同族ソルターゼ酵素を使ったソルターゼ介在性結合用に準備するために、タン

10

20

30

40

50

パク質および免疫リガンド、好ましくは抗体などに、黄色ブドウ球菌由来ソルターゼAの認識モチーフであるL P X T Gとは異なる他のソルターゼの認識モチーフを付加する概念も含む。そのため、タンパク質および免疫リガンド、好ましくは抗体を、異なるソルターゼ認識モチーフ、例えば、黄色ブドウ球菌由来のソルターゼBに特異的なN P Q T Nペントペプチドモチーフと共に発現させることができ、これを次にグリシン修飾型ペイロードと結合させることができる。

【0048】

本発明の別の側面では、対応するソルターゼ酵素が存在する条件で、順次、G 1 y_n - タグ化ペイロード (n > 2) を結合させることによって、異なるペイロードを前記異なるポリペプチドに結合させることができるようにするため、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖から構成されている多量体免疫リガンド (好ましくは抗体であるがこれには限定されない) は、そのような多量体タンパク質の異なるポリペプチドに付加された前記異なるソルターゼの認識配列を利用することができる (抗体の場合には、別々のソルターゼの認識配列を抗体の重鎖および軽鎖に付加する) (図 6 b)。そのためには、抗体の、異なるソルターゼ酵素用の異なる認識モチーフを含んでいる重鎖および軽鎖のそれぞれのC末端を異なる様式で修飾して発現させる必要がある。次いでそのような抗体を順次、前述したようなグリシン修飾を含む 2 種類の異なるペイロードに結合させることができる。

10

【0049】

このフォーマットには、ADC が特異的に 2 種類の毒素に負荷されるという利点がある可能性があり、標的とされた癌細胞がADC に含まれる 2 種類の毒素からの攻撃を回避することはより難しいため、別々の細胞経路を好ましく干渉することは、癌細胞を死滅させるのにより効果的になり得る。

20

【0050】

当業者には、望ましい結合部位を得るために、黄色ブドウ球菌ソルターゼAのL P X T Gモチーフなどのソルターゼ ペントペプチド認識モチーフを多量体免疫リガンドの個々のポリペプチドに選択的に付加できることが明らかである。例えば抗体の例では、このことによって、重鎖に付加されたソルターゼ認識モチーフのみを含むもの (抗体複合体 1 つ当たり 2 つのペイロードを生じる) または軽鎖に付加されたソルターゼ認識モチーフのみを含むもの (抗体複合体 1 つ当たり 2 つのペイロードを生じる) 、あるいは重鎖と軽鎖に付加されたソルターゼ認識モチーフを含むもの (抗体複合体 1 つ当たり 4 つのペイロードを生じる) のいずれかの修飾型抗体を生成することが可能になる。このように設計された変異型によって、ソルターゼ酵素による抗体の重鎖のみ (薬物対抗体比が 2 のADC、つまり DAR 2 を生じる) もしくは軽鎖のみ (薬物対抗体比が 2 のADC、つまり DAR 2 を生じる) への特異的な結合または重鎖と軽鎖への特異的な結合を同時に (薬物対抗体比が 4 のADC、つまり DAR 4 を生じる) 起こすことができる。このように、結合部位と抗体に関する化学量論を制御された様式で変化させることができ、ペイロードを重鎖および軽鎖に付加することで、抗体の重鎖もしくは軽鎖 1 つ当たり 2 つのペイロードを、または抗体 1 つ当たり 4 つのペイロードを生じる。

30

【0051】

多量体タンパク質または免疫リガンドに含まれる異なるソルターゼ認識モチーフとソルターゼ酵素を使用して、前述したように結合部位および化学量論を変化させることと同様に、本発明のさらなる側面では、ソルターゼ介在性結合とスプリットインテイン介在性結合を組み合わせて、異なるペイロードを多量体タンパク質の異なるポリペプチド鎖に結合させる。この概念では異なるトランスペプチダーゼと基質を用いるため、異なるペイロードを、多量体タンパク質および免疫複合体に含まれている異なるペイロードに一工程で同時に結合させることができる (図 6 a)。

40

【0052】

当然のことながら、前述した 2 種類の異なるペイロードと多量体タンパク質、好ましくは抗体 (2 組のジスルフィド結合した重鎖と軽鎖で構成されている) の結合は、図 6 a に図示するように、ソルターゼ酵素介在性結合とスプリットインテイン介在性結合を組み合

50

わせることのいずれかによって達成することができるが、前で説明したように(図6b)、異なるソルターゼペプチドモチーフ、例えば黄色ブドウ球菌のソルターゼAおよびソルターゼBを認識する2種類のソルターゼ酵素を使用することでも、2種類の異なるペイロードを多量体タンパク質、好ましくは抗体に結合させることができる。しかしながら、これには、ソルターゼモチーフへの特異性が異なる他のクラスのソルターゼ(例えばソルターゼC、D、E、F)のソルターゼ酵素または他種の細菌由来のソルターゼ酵素も含まれ得る。

【0053】

タンパク質および免疫リガンドへのペイロードのソルターゼ介在性結合は、ソルターゼ認識モチーフでタグ化したタンパク質と少なくとも3個のグリシンでタグ化したペイロードを提供すること、および活性なソルターゼ酵素またはその機能性断片を可溶性酵素として付加することのいずれかによって達成することができる。本発明の別の側面では、ソルターゼ酵素の酵素活性をもつドメインは、タンパク質のN末端またはC末端のいずれかに融合させたドメインとしても提供することができる。この変異型では、ソルターゼ酵素ドメインのN末端をN末端ソルターゼ認識モチーフに、またはドメインのC末端をC末端ソルターゼ認識モチーフに付加することが都合が良い(しかし必ずしもそうでなくてもよい)。いずれの実行可能性によっても、グリシン-タグ化ペイロードとの反応後に、ソルターゼ酵素ドメインを一連の反応の中でタンパク質から除去されることが保証される(図5)。

【0054】

ペイロードとタンパク質のソルターゼ介在性結合を適用するこの変異型は、概念としては、酵素活性をもつスプリットインテインのN-インテインドメインを複合体化させるタンパク質に繋いでタンパク質中の結合部位を規定する、ペイロードのスプリットインテイン介在性結合と同様である。

【0055】

文献中で同定されている異なる基質特異性をもつ多種の異なるソルターゼトランスペプチダーゼと同様に(シュピリーグラ(2011))、いわゆるインベース(IndBase)データベースから検索可能で、異なる種やタンパク質に由来し、ペプチド転移に様々なN-インテイン配列やC-インテイン配列を必要とするスプリットインテインの数も多く、またその数は現在も増え続けている(パーラー(2002))。そのため、免疫リガンドとペイロードのスプリットインテイン介在性結合の例では好ましいSsp GyrB S 11スプリットインテインが開示されており(フォルクマンラ(2009))、これは、C-インテインドメインは直鎖状の6merのアミノ酸配列まで短くすることができ、ペイロードのタンパク質および免疫リガンドへのスプリットインテイン介在性結合は、N-インテインまたはC-インテインドメインの長さが、ペプチドを容易に合成し、選択した任意のペイロード分子に付加することができるよう十分に短い限り(好ましくは13アミノ酸よりも短い)、インベースデータベース由来の他のスプリットインテインでも達成することができるためである。しかしながら、タンパク質ペイロードの場合には、いかなる大きさのC-インテインドメインも、目的のタンパク質ペイロードのORFを遺伝子融合させることでタンパク質ペイロードに融合させることができ、小さい(12アミノ酸以下の)N-インテインまたはC-インテインドメインを有するスプリットインテインを使用することに何ら機械論的な有益性がないことが当業者には明らかである。

【0056】

しかしながら、合成した低分子ペイロードがタンパク質および免疫リガンドに結合している場合には、好ましいSsp GyrB S 11スプリットインテインのC-インテインまたはSsp DnaXのN-インテインの場合と同様に、短いペプチドを標準的な合成化学によって任意の合成低分子量ペイロードに人工的に付加することができるため、本明細書で開示の13アミノ酸未満の小さいN-インテインまたはC-インテインドメインが有効である。

【0057】

10

20

30

40

50

ペイロードのソルターゼ介在性のおよびスプリットインティン介在性の結合は、タンパク質および免疫リガンドのN末端またはC末端のいずれでも実行することができる。これは、ソルターゼモチーフ／グリシンストレッチおよびN-インティン／C-インティンドメインがタンパク質およびペイロードにどのように配置されているかだけに依存している（図1）。

【0058】

好ましい免疫リガンドである抗体の場合には、ペイロードを抗体のC末端に結合することが好ましい。なぜならば、C末端に結合させれば、ペイロードが抗体の抗原結合部位の最も遠位に配置されるためである。しかしながら、この選択は本発明を限定するものとは解釈されず、機能性結合ドメインが分子のN末端には位置していない他の免疫リガンド分子、例えば抗体模倣物のN末端にペイロードを結合させることができ有効な場合もある。

10

【0059】

本発明の別の側面は、アフィニティ精製用または検出用のタグ、例えば小さいペプチドタグ（例えばヒスチジンタグ、strep-タグ、MYC-タグまたはHA-タグ）を含むがこれらには限定されないタグまたはより大きなタンパク質アフィニティ精製用タグ（例えば麦芽糖結合タンパク質（MBP）タグ、グルタチオンS-転移酵素（GST）タグ、またはキチン結合タグ）を、ソルターゼ認識モチーフまたは目的のタンパク質もしくは免疫リガンドに融合させたソルターゼの認識モチーフまたはスプリットインティンの遠位に付加することで、タンパク質および免疫リガンドへのペイロードのソルターゼおよびスプリットインティン結合の効率を改善することである。

20

【0060】

本発明のこの側面ではペプチド転移反応の一貫として、複合体化される免疫リガンドからアフィニティ精製用タグが除去される。これを完全にペイロードと結合した免疫リガンドを濃縮するのに利用することができる。なぜならば、それでもなおアフィニティ精製用タグを含んでいる未反応のタンパク質は好適なアフィニティ用樹脂に結合させることによって除去することができるが、完全にペイロードに結合したタンパク質および免疫リガンドはもはやアフィニティ精製用タグを含んでおらず、未反応の免疫リガンド基質から特異的に分離することができるためである。本発明のこの側面は、複数のペイロードを結合する必要がある多量体タンパク質および免疫リガンド、好ましくは抗体などの場合に特に有効である。ソルターゼまたはインティントランスペプチダーゼ結合部位の遠位に配置されているアフィニティ精製用タグを使用することによって、ペイロードとの結合が不完全なため、それでもなお存在するアフィニティ精製用タグを含むタンパク質および免疫リガンドを確実に除去することができる（図5）。

30

【0061】

このことは化学結合と比較して、均一な免疫リガンド／ペイロード複合体、好ましくは低分子量毒素が抗体の重鎖および／または軽鎖のC末端に部位特異的に結合したADCを得るための過程で大きな利点である。

【0062】

ここで開示する方法は基本的に、ペイロード、好ましくは低分子量毒素を免疫リガンド、好ましくは抗体に、部位特異的にかつ化学量論的に結合させるための新規で効率的な方法を提供し、この方法によって、疾患、好ましくは癌の治療に有用な規定の免疫リガンド／ペイロード複合体、好ましくはADCが生成される。この方法はまた、疾患、好ましくは腫瘍学疾患の診断に有用な免疫リガンド／ペイロード複合体の生成に使用してもよい。この新規方法では、ソルターゼ酵素およびスプリットインティンまたはその触媒活性を有する断片などの、ペプチド結合を切断・形成する酵素（トランスペプチダーゼ）を使用することで、共有結合した免疫リガンド／ペイロード複合体の生成が可能となる。前記酵素は、短いアミノ酸配列（好ましくは13アミノ酸より短い）を含んでいるペイロードと免疫リガンドのN末端またはC末端のいずれかとの共有的かつ部位特異的な結合を触媒することができ、ここで免疫リガンドは、一連の反応の中で、ソルターゼおよびスプリットインティンがペプチド結合を切断し、形成することができるように好適に修飾されている。

40

50

規定の抗体ペイロード比または薬物抗体比を有する抗体薬物複合体（A D C）を生成するために、免疫リガンドは好ましくは、低分子量毒素が部位特異的に結合できる抗体である。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】この図では、ソルターゼAを介在させて、ペイロードを免疫リガンド（または結合タンパク質）に部位特異的に結合させる原理を示している。ペイロードは、タンパク質のN末端（a）にも、またはタンパク質のC末端（b）にも結合させることができる。N末端への結合を達成するには、ペイロードがソルターゼのペプチド認識モチーフ（本明細書ではL P X T G、黄色ブドウ球菌由来ソルターゼAの認識モチーフ、Xは20種類の天然のアミノ酸のいずれかであることを表している）を含んでいる必要があり、標識される免疫リガンド／結合タンパク質のN末端は、最低3個のグリシン残基から構成され、N末端のアミノ基が遊離している（本明細書ではより小さいH₂N-の符号で表される）N末端伸張（本明細書ではG_nと示され、n > 2である）を含む形で発現させる必要がある。ソルターゼ介在性結合用に基質を修飾するためには、基本的には、3～5個のグリシンが用いられる。黄色ブドウ球菌由来の組換えソルターゼA酵素を、本明細書に示したように付加すると、L P X T GペプチドモチーフのC末端にあるTとG残基の間のペプチド結合の切断が触媒され、そして、N末端にあるG_nストレッチ（n > 2）とT残基との間に新しいペプチド結合が形成される。L P X T GモチーフのC末端にある残基（ここでは太字で強調している）は、ペプチド転移反応中に除去される。（b）反対に、ペイロードをタンパク質のC末端に結合させるには（これはペイロード、特に毒素を抗体に結合させるのに好ましい方法である。図6を参照のこと）、L P X T Gソルターゼ認識ペプチドモチーフを免疫リガンド／結合タンパク質のC末端に付加する必要があり（例えば、実施例で記載した組換えタンパク質発現技術によって）、ペイロードを短いグリシンストレッチ（G_n、n > 2、通常は3～5個のグリシン）で修飾する必要がある。（a）で説明したように、黄色ブドウ球菌由来ソルターゼAを付加すると、次いでG_nストレッチからL P X T Gモチーフへのペプチド転移が触媒され、それによって、L P X T Gモチーフの末端G残基（太字）が除去される。

【図2】この図では、インテイン（a）およびスプリットインテイン（b）介在性ペプチド転移の原理を示している。（a）インテインは、前駆タンパク質中のいわゆる「タンパク質イントロン」として生じる場合があり、前駆タンパク質中でインテインは、通常N-エクステインおよびC-エクステインと呼ばれている成熟タンパク質のN末端部分とC末端部分とを隔てている。インテイン、つまり「タンパク質イントロン」は、インテインとC-エクステインとの間のペプチド結合の切断を触媒し、ペプチド転移反応中にC-エクステインのN末端アミノ酸をN-エクステインのC末端アミノ酸に転移させることでN-エクステインとC-エクステインとの間に新しいペプチド結合を形成することができる。反応の結果、インテインである「タンパク質イントロン」が前駆タンパク質から除去され、新しく形成されたペプチド結合をN-エクステインドメインとC-インテインドメインとの間に有する成熟タンパク質が生成される。（b）インテイン活性については、これを個別のドメインに分離可能で、それを異なるタンパク質に付加できることが記載されており、この変異体はスプリットインテインと呼ばれてきた。スプリットインテインのN-インテインおよびC-インテインドメインは非共有結合性の構造複合体を形成しており、これは、付加されているN-エクステインとC-エクステインドメインに対して、繋がったままのインテインと同じペプチド転移反応を起こすことができる。その結果、N-エクスティンドメインとC-エクスティンドメインは空間的に近接している複合体の一部となる。N-インテインとC-インテインのスプリットインテイン反応によるペプチド転移の結果は、「タンパク質のトランススプライシング」、つまり本質的に、新しいペプチド結合の形成による、N-エクステインとC-エクスティンドメインとの間のタンパク質連結となる。

【図3】この図では、非常に短いC-インテインドメインまたは非常に短いN-インテインを特徴とする特定のスプリットインテインをどのようにして使って、任意のペイロード

10

20

30

40

50

を、低分子実体などの免疫リガンド（つまり結合タンパク質）に結合させることができるかを示している。なぜならば、短いアミノ酸配列は化学的に合成することができ、標準的な化学結合によって低分子実体に容易に付加することができるためである。（a）図のこの部分では、ペイロードを免疫リガンド／結合タンパク質のC末端に結合させるための S s p G y r B S 1 1 スプリットインテイン（アップルビーら（2009）に記載されている）の使用について示している。ここでは、C - インテインドメインはわずか6アミノ酸の長さで、示している通り、G V F V H N のアミノ酸配列を含んでいる。しかしながら、C - エクステインドメインと同等のいくつかのペプチド、さらなるアミノ酸を加える必要がある。このとき、1番目のアミノ酸はセリンまたはシステインアミノ酸残基である必要があるが、その他のアミノ酸は選択できる。この付加されるアミノ酸を S X_n という符号で表している。これは、N末端側がセリンで始まり、その後、20種類の天然に存在するアミノ酸のいずれであってもよい（そのためXとして示している）n個（n > 2、好ましくは5）のアミノ酸が続いている、短いアミノ酸配列を意味している。従って実施例に記載したように、N - インテイン／C - インテイン複合体が、G V F V H N - S X_n（Xは任意のアミノ酸、n > 2、好ましくは5）に含まれているアスパラギン - セリン間のペプチド結合のペプチド転移を触媒し、N - エクステインとN - インテインとの間のペプチド結合への転移を可能にするためには、6アミノ酸の最小C - インテインドメインおよび6アミノ酸のC - エクステインアミノ酸配列を含んでいる、12個のアミノ酸から構成される短い配列で十分である。これにより、免疫リガンド／結合タンパク質のC末端に、短いC - エクステインアミノ酸配列を介してペイロードが結合する。（b）図のこの部分では、リガンド／結合タンパク質のN末端に結合させるための S s p D n a X スプリットインテイン（ソングら（2012）に記載されている）の使用について示している。ここに示すように、これに必要となるのは、短い11アミノ酸のN - インテインドメインを合成し、任意のペイロードに結合させる（または組換えタンパク質技術によって付加する）ことだけであり、それによってペイロードを、N末端に長さが139個のアミノ酸の S s p D n a X C - インテインドメインを融合させた任意の免疫リガンドまたはタンパク質のN末端に特異的に結合させることができる。この反応の結果、N末端で複合体化した免疫リガンド／結合タンパク質が得られる。そのため、N末端またはC末端への結合が、タンパク質およびペイロードに関するL P X T G およびG_nペプチドモチーフの配置にのみ依存するソルターゼによるペプチド転移の場合と同様に、スプリットインテインもタンパク質と短いペプチドで修飾した（例えば、それぞれが S s p G y r B および S s p D n a X スプリットインテインのものなどの、短い最小C - インテインまたは最小N - インテインペプチドドメインを利用することで）ペイロードとの部位特異的なN末端およびC末端での結合を仲介することができる。

【図4（a）】この図では、ペイロードと免疫リガンドとの結合において、ソルターゼタグ加えて、さらなるアフィニティ精製用タグおよび／または検出用タグを付加することの利用について示している。（a）図のこの部分では、実施例で示したように、6 × H i s 精製用タグ（H H H H H H）、M y c 検出用タグ（E Q K L I S E E D L）および s t r e p I I アフィニティ精製用タグ（W S H P Q F E K）を構成している付加されたアミノ酸が、C末端ペイロード結合の反応中に黄色ブドウ球菌のソルターゼAトランスペプチダーゼを介して、どのように除去されるのかを示している。これによって、複合体化していない基質を複合体化した産物から分離するために、N i - N T A アフィニティ樹脂（6 × H i s タグの場合）または s t r e p - t a c t i n アフィニティ樹脂（s t r e p I I タグの場合）を用いることで、複合体化した産物を選抜できる。このタグの組み合わせは、一例として挙げているだけである。

【図4（b）】（b）この図は、ここに示すように、多量体タンパク質、例えば抗体の場合に、完全に複合体化した産物を選抜／精製するのに特に有用なアフィニティ精製用タグの使用についてを示している。実施例でも記載したように、抗体の重鎖および軽鎖を特定の結合部位で修飾することができ、また、その修飾によって I g H および I g L 鎖のC末端が標的となる場合には、最大4つのペイロードを抗体に結合させることができる。1つ

10

20

30

40

50

または複数のさらなるアフィニティ精製用タグを付加することによって、例えば図4(a)に示すように、抗体に1、2、または3つ(ここで示すように)だけのペイロードが結合しているが、それでもなお、対応する精製用樹脂に結合できる、結合が不完全な産物を結合させ、完全にペイロードと複合体化した産物から容易に分離することができる。当然のことながら、この枠組みはインティンで修飾した免疫リガンドにも適用可能で、ここで示すソルターゼ-モチーフ修飾型免疫リガンドだけに適用できるものではない。

【図5】この図では、これも適用可能なソルターゼ介在性結合の変異形を示している。ここでは、ソルターゼ酵素は別々の組換えタンパク質としてソルターゼタグ化免疫リガンドおよびグリシンストレッチ修飾型ペイロードに付加されるのではないが、酵素学的なソルターゼドメインが融合タンパク質のC末端にL P X T Gソルターゼタグとして発現される。ソルターゼ酵素ドメインは、グリシンストレッチ修飾型ペイロード(つまり基質)と一緒にインキュベートしない限り不活性である。そのような構築物にグリシンストレッチ修飾型基質(つまりここではペイロード)を付加するとすぐに、融合させたソルターゼドメインが、L P X T Gタグの4番目のトレオニンと5番目のグリシンの間でタンパク質を切断することにより、グリシン-ペイロード基質からL P X T Gソルターゼタグへのペプチド転移を触媒し、これによって、ここで示すように、場合によって付加されるさらなるアフィニティ精製用タグと共に、ソルターゼ酵素ドメインが除去される。この手法には、触媒活性をもつスプリットインテインドメインを付加することと同様に、ソルターゼ酵素ドメインを組換えタンパク質技術によって、複合体化される免疫リガンドの完全な要素として発現できるという利点がある。

【図6a】この図では、異なるペイロードを、多量体タンパク質の異なるサブユニット、例えば、ここで示す抗体の重鎖と軽鎖に同時に結合させるための、異なるトランスペプチダーゼ(ここではソルターゼとスプリットインテイイン)の使用について示している。選択したこの例では、重鎖のC末端をS s p G y r BのN-インテインドメインで修飾し(実施例2に記載したように)、軽鎖をソルターゼAのペンタ-ペプチドモチーフであるL P X T G(実施例1に記載したように、簡略化するためにさらなるタグは省略してある)で修飾した。グリシンストレッチで修飾したペイロードAとC-インテイ-ドメインで修飾したペイロードB、およびソルターゼ酵素をともにインキュベートすると、同時にかつ選択的に、ペイロードBは重鎖に、ペイロードAは軽鎖に結合させることができる。ペイロードAおよびBが異なる細胞経路を標的とする毒素の場合、この戦略によって、単一の毒素部分しかもたない標準的なADCよりも強力な抗がん剤を生成することができるだろう。(b)この図では、異なるペイロードを、多量体タンパク質の異なるサブユニット、例えば、ここで示す抗体の重鎖と軽鎖に同時に結合させるための、ソルターゼ酵素(ここでは黄色ブドウ球菌由来のソルターゼAとソルターゼB)の使用について示している。選択したこの例では、重鎖のC末端をソルターゼBのペンタペプチド認識モチーフであるN P Q T Nで修飾し、軽鎖をソルターゼAのペンタ-ペプチドモチーフであるL P X T Gで修飾している。グリシンストレッチで修飾したペイロードAおよびBと、ソルターゼAおよびソルターゼBを順次結合させることで、ペイロードBを重鎖に、そしてペイロードAを軽鎖に、同時かつ選択的に結合させることができる(複合体化した構造に含まれるL P X T GおよびN P Q T N由来の他のペプチド配列は簡略化のために省略している)。ペイロードAおよびBが異なる細胞経路を標的とする毒素の場合、この戦略によって、単一の毒素部分しかもたない標準的なADCよりも強力な抗がん剤を生成することができるだろう。

【図6b】この図では、異なるペイロードを、多量体タンパク質の異なるサブユニット、例えば、ここで示す抗体の重鎖と軽鎖に同時に結合させるための、異なるトランスペプチダーゼ(ここではソルターゼとスプリットインテイイン)の使用について示している。選択したこの例では、重鎖のC末端をS s p G y r BのN-インテインドメインで修飾し(実施例2に記載したように)、軽鎖をソルターゼAのペンタ-ペプチドモチーフであるL P X T G(実施例1に記載したように、簡略化するためにさらなるタグは省略してある)で修飾した。グリシンストレッチで修飾したペイロードAとC-インテイ-ドメインで

10

20

30

40

50

修飾したペイロードB、およびソルターゼ酵素とともにインキュベートすると、同時にかつ選択的に、ペイロードBは重鎖に、ペイロードAは軽鎖に結合させることができる。ペイロードAおよびBが異なる細胞経路を標的とする毒素の場合、この戦略によって、単一の毒素部分しかもたない標準的なADCよりも強力な抗がん剤を生成することができるだろう。(b)この図では、異なるペイロードを、多量体タンパク質の異なるサブユニット、例えば、ここで示す抗体の重鎖と軽鎖に同時に結合させるための、ソルターゼ酵素(ここでは黄色ブドウ球菌由来のソルターゼAとソルターゼB)の使用について示している。選択したこの例では、重鎖のC末端をソルターゼBのペントペプチド認識モチーフであるNPQTNで修飾し、軽鎖をソルターゼAのペントペプチドモチーフであるLPXTGで修飾している。グリシンストレッチで修飾したペイロードAおよびBと、ソルターゼAおよびソルターゼBを順次結合させることで、ペイロードBを重鎖に、そしてペイロードAを軽鎖に、同時かつ選択的に結合させることができる(複合体化した構造に含まれるLPXTGおよびNPQTN由来の他のペプチド配列は簡略化のために省略している)。ペイロードAおよびBが異なる細胞経路を標的とする毒素の場合、この戦略によって、単一の毒素部分しかもたない標準的なADCよりも強力な抗がん剤を生成することができるだろう。

【図7】黄色ブドウ球菌の酵素活性を有するソルターゼA組換え断片のSDS-PAGE (a)およびウェスタンプロット(b)解析。(a) SDS-PAGEのレーン1はBSA(およそ66.4kD)、レーンM₁はタンパク質分子量の標準物質(ジーンスクリプト、カタログ番号M00505)、レーン2はHisタグで精製した黄色ブドウ球菌の組換えソルターゼA断片を含んでいる。SDS-PAGEではタンパク質をクマシーブルーで染色した。(b)抗ヒス抗体(ジーンスクリプト、カタログ番号A00186)を使ってウェスタンプロットを展開した。レーン3はHisタグで精製した黄色ブドウ球菌の組換えソルターゼA断片を、レーンM₂は分子量の標準物質(ジーンスクリプト、カタログ番号MM0908)を含んでいる。

【図8】DM1-毒素複合体化Tras-HC-GS-LHS(A)およびTras-LC-GS-LHS(B)の疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)解析。DAR1は、薬物対抗体比が1であることを; DAR2は、薬物対抗体比が2であることを意味している。

【図9】ここに示したADCがHER2を過剰発現しているSKBR3(A)およびHER2陰性のT47D-5R細胞(B)に及ぼす細胞障害性の用量反応。細胞を段階希釈したADCと3日間インキュベートし、その後、細胞の生存率をCellTiter-Glo(登録商標)Luminescent Solution(プロメガ)で検出した。LC: DM1-ソルターゼA複合体化Tras-LC-GS-LHS; HC: DM1-ソルターゼA複合体化Tras-HC-GS-LHS。

【図10】GSペプチドスペーサーを含むまたは含まないmAb Ac10変異体とGly5-FITCのソルターゼA介在性結合。段階希釈したソルターゼAを使ってGly5-FITCをmAb Ac10-HC-GS-LHS/LC-GS-LHS(A)およびmAb Ac10-HC-LS/LC-LS(B)に、それ以外は同一の条件で結合させた。反応産物は、変性還元SDS-PAGEゲルで大きさによって分離した。ゲルをUV箱の上に置いてFITCを可視化した。用いたソルターゼAの濃度は: レーン1、9:50μM; レーン2、10:25μM; レーン3、11:12.5μM; レーン4、12:6.25μM; レーン5、13:3.13μM; レーン6、14:1.56μM; レーン7、15:0.78μM; レーン8、16:0.39μM。

【図11】軽鎖への結合効率に及ぼすペプチドスペーサーの長さの影響。段階希釈したソルターゼAを使用し、Gly5-FITCをmAb Ac10-HC-LS/LC-GS-LS(A、左側)、Ac10-HC-LS/LC-GGGS-LS(A、右側)、Ac10-HC-LS/LC-GGGGS-LS(B、左側)およびAc10-HC-LS/LC-GGGGS-LS(B、右側)に、それ以外は同一の条件で結合させた。反応産物は、変性還元SDS-PAGEゲルで大きさによって分離した。ゲルをUV箱の上に置いて

10

20

30

40

50

F I T C を可視化した。用いたソルターゼ A の濃度は以下の通りである：レーン 1、8、15、22：25 μM；レーン 2、9、16、23：12.5 μM；レーン 3、10、17、24：6.25 μM；レーン 4、11、18、25：3.13 μM；レーン 5、12、19、26：1.56 μM；レーン 6、13、20、27：0.78 μM；レーン 7、14、21、28：0.39 μM。

【図 12】ここに示すように、未反応基質 (D A R 0 = 薬物対抗体比が 0)、2 本の重鎖のうちの 1 本が複合体化した基質 (D A R 1 = 薬物対抗体比が 1)、および修飾した両方の重鎖が複合体化した基質 (D A R 2 = 薬物対抗体比が 2) に分離可能な m A b A c 1 0 であるソルターゼ A v c - P A B - M M A E 毒素重鎖複合体化 A D C の疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) による解析。パネル A は、H C 修飾型 A c 1 0 m A b の標準的なソルターゼ介在性結合後の H I C プロファイルを示しており、ここでは所望の D A R 2 産物の横に、まだ D A R 0 および D A R 1 種が検出可能である。パネル B はパネル A で分析した A D C を S t r e p T a c t i n (登録商標) アフィニティ精製カラムに 4 回通した後の H I C プロファイルを示している。

【図 13 A】合成した G 1 y 5 - 修飾型アルファ - アマニチン毒素 (a) および G 1 y 5 - 修飾型メイタンシン毒素 (b) の解析。パネル a および b のそれぞれにおいて、合成した構造を上段に示し、5 個のグリシンを四角で囲って付けて強調している。質量分析および逆相 H P L C で各化合物を解析した結果を下段に示している。a) 予測される G 1 y 5 - 修飾型アルファ - アマニチン毒素の質量は 1302.07 D であり、観測された質量は 1325.38 D で、M s + N a + に相当する。R P - H P L C のプロファイルからは純度が 95 % を上回っていることが分かる。b) 予測される G 1 y 5 - 修飾型メイタンシン毒素の質量は 991.41 D であり、観測された質量は 957.69 D で、M s + N a + に相当する。R P - H P L C のプロファイルからは純度が 95 % を上回っていることが分かる。

【図 13 B】合成した G 1 y 5 - 修飾型アルファ - アマニチン毒素 (a) および G 1 y 5 - 修飾型メイタンシン毒素 (b) の解析。パネル a および b のそれぞれにおいて、合成した構造を上段に示し、5 個のグリシンを四角で囲って付けて強調している。質量分析および逆相 H P L C で各化合物を解析した結果を下段に示している。a) 予測される G 1 y 5 - 修飾型アルファ - アマニチン毒素の質量は 1302.07 D であり、観測された質量は 1325.38 D で、M s + N a + に相当する。R P - H P L C のプロファイルからは純度が 95 % を上回っていることが分かる。b) 予測される G 1 y 5 - 修飾型メイタンシン毒素の質量は 991.41 D であり、観測された質量は 957.69 D で、M s + N a + に相当する。R P - H P L C のプロファイルからは純度が 95 % を上回っていることが分かる。

【図 14 A】コンコルティス (C o n c o r t i s、サンディエゴ、カリフォルニア、米国) で合成した 5 × グリシン (G 1 y 5) 修飾型毒素 (構造 1 ~ 6 および 9) と、合成可能な毒素 (構造 7 および 8) の構造。これらは、毒素にグリシンを 5 個 (ここで示すように) または、1 個以上の任意の数のグリシン残基を付加すれば、どのような毒素をソルターゼ介在性の酵素結合用に機能化できることを示している。グリシン修飾型毒素は、図 14 a の構造 1 ~ 3 に示すように、特定のさらなる機能 (例えば特定の細胞内区画での切断性) を付与する可能性のあるさらなる有効なリンカー / スペーサー構造を含むように合成することも、あるいは図 14 b の構造 4 ~ 6 に示すようにさらなるリンカーを含めずに合成することもできる。例えばアルファ - アマニチン毒素の場合のように、所与の毒素に利用可能な官能基がいくつかあれば、図 14 c の構造 7 ~ 9 で例示するように、これら種々の基にグリシン残基を付加することができる。

【図 14 B】コンコルティス (C o n c o r t i s、サンディエゴ、カリフォルニア、米国) で合成した 5 × グリシン (G 1 y 5) 修飾型毒素 (構造 1 ~ 6 および 9) と、合成可能な毒素 (構造 7 および 8) の構造。これらは、毒素にグリシンを 5 個 (ここで示すように) または、1 個以上の任意の数のグリシン残基を付加すれば、どのような毒素をソルターゼ介在性の酵素結合用に機能化できることを示している。グリシン修飾型毒素は、図 14 a の構造 1 ~ 3 に示すように、特定のさらなる機能 (例えば特定の細胞内区画での切断性) を付与する可能性のあるさらなる有効なリンカー / スペーサー構造を含むように合成す

10

20

30

40

50

ることも、あるいは図14bの構造4～6に示すようにさらなるリンカーを含めずに合成することもできる。例えばアルファ-アマニチン毒素の場合のように、所与の毒素に利用可能な官能基がいくつかあれば、図14cの構造7～9で例示するように、これら種々の基にグリシン残基を付加することができる。

【図14C】コンコルティス(Concordtis、サンディエゴ、カリフォルニア、米国)で合成した5×グリシン(Gly5)修飾型毒素(構造1～6および9)と、合成可能な毒素(構造7および8)の構造。これらは、毒素にグリシンを5個(ここで示すように)または、1個以上の任意の数のグリシン残基を付加すれば、どのような毒素をソルターゼ介在性の酵素結合用に機能化できることを示している。グリシン修飾型毒素は、図14aの構造1～3に示すように、特定のさらなる機能(例えば特定の細胞内区画での切断性)を付与する可能性のあるさらなる有効なリンカーノスペーサー構造を含むように合成することも、あるいは図14bの構造4～6に示すようにさらなるリンカーを含めずに合成することもできる。例えばアルファ-アマニチン毒素の場合のように、所与の毒素に利用可能な官能基がいくつかあれば、図14cの構造7～9で例示するように、これら種々の基にグリシン残基を付加することができる。

【図15】実施例12で決定した腫瘍容積。結果は、化学的に複合体化されている市販のKadcyla(登録商標)と同一の抗体と毒素部分を使用しているソルターゼ複合体化ADCが、Kadcyla(登録商標)と同等の腫瘍死滅活性を有することを示している。

【図16】ゲルを実施例13と同様にクマシーブルーで染色した。このデータは、粗細胞培養上清中での抗体のソルターゼA介在性結合が、精製した抗体の結合と同様に効率的であったという予想外な発見を示している。

【発明を実施するための形態】

【0064】

本発明によると、免疫リガンド/ペイロード複合体の生産方法が開示され、この方法は、配列特異的トランスペプチダーゼまたはその触媒ドメインを使って、ペイロードを免疫リガンドに結合させることを包含する。

【0065】

本発明の好ましい態様によると、ペイロードおよび/または免疫リガンドは、
a) 主にタンパク質またはペプチドからなる、

b) 少なくとも1つのタンパク質もしくはペプチドドメインを含む、または

c) 少なくとも1つのペプチド鎖を含む、

のいずれかであって、

さらに、タンパク質またはペプチドもしくはドメインは好ましくは、配列特異的トランスペプチダーゼまたはその触媒ドメインが検出可能なアミノ酸配列を含む。

【0066】

これは例えば、ペイロードおよび/または免疫リガンドがタンパク質の場合、前記タンパク質がそのN末端またはC末端に、配列特異的トランスペプチダーゼが検出することができるアミノ酸配列を含むことを意味する。そのようなアミノ酸配列が感受性をもつタンパク質を欠損している場合には、これを当該分野で知られている組換え法によって、前記タンパク質のN末端またはC末端に融合させることができる。

【0067】

ペイロードおよび/または免疫リガンドがタンパク質ではない場合、そのような配列特異的トランスペプチダーゼによって検出が可能なアミノ酸配列を、当該分野で知られている標準的な化学的架橋法によって前者に結合させる。

【0068】

特定のトランスペプチダーゼの認識配列とペイロードとの間にさらなる機能を組み込んでも良い。これは、細胞内に内部移行した後に切断可能であるか(例えば含有しているヒドラゾンもしくはジスルフィド化学、または細胞内プロテアーゼに関する特定のペプチド配列)または切断が不可能か(例えば含有しているチオエーテル化学)のいずれかに分類する化学構造によって実現することができる。

10

20

30

40

50

【0069】

ヒドラゾン化学を含有している化学構造は、細胞内のリソソーム画分中で選択的に切断することができる（全身の血流と比較してpHが低い）。

【0070】

ペプチドリンカーは、リソソームプロテアーゼ（例えばカテプシンB）によって選択的に切断される可能性があり、ヒドラゾンリンカーよりも血清での安定性が高く、改良された抗腫瘍効果を有していることが分かっている。バリンとシトルリン（Val-Cit）の対は最も一般的に使用されているペプチドリンカーであり、かつ、アウリスタチンファミリーの薬物、例えばモノメチルアウリスタチンE（MMAE）と共に機能させるのにふさわしい。

10

【0071】

薬物を遊離させるためにはリンカーを切断するのが最も妥当な手段であると研究者らが信じていたため、切断できないリンカーは長いこと見過ごされてきた。しかしながら複合体は膜受容体と結合すると直ちに内部移行し、一旦内部に侵入すれば、ペイロード、例えば薬物が暴露される点まで免疫リガンドを分解することができる。顕著な一例としては、チオエーテルリンカー、SMCC（N-スクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）-シクロヘキサン-1-カルボキシラート）リンカーを使用する（図）。

【0072】

これら全てのアプローチは、結合反応が真に部位特異的でないという点で共通している。なぜならばリンカーが介在する化学的な連結は確率論的な過程であるため、ペイロードのリンカー介在性化学結合からは、治療効果および/または診断上の有用性がそれぞれ異なる複合体化したタンパク質の不均一な混合物が生じるためである。安全性への懸念から、規制当局はバッヂ間の変動および/または医薬品原料（API）の変動を否定的に見るために、治療用混合物として承認を得る過程ではタンパク質-ペイロード複合体の混合物が大きな課題となっていることが明らかである。

20

【0073】

薬物を遊離させるためにはリンカーを切断するのが最も妥当な手段であると研究者らが信じていたため、切断できないリンカーは長いこと見過ごされてきた。しかしながら複合体は膜受容体と結合すると直ちに内部移行し、一旦内部に侵入すれば、ペイロード、例えば薬物が暴露される点まで免疫リガンドを分解することができる。顕著な一例としては、チオエーテルリンカー、SMCC（N-スクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）-シクロヘキサン-1-カルボキシラート）リンカーを使用する（図14a、構造2を参照のこと）。

30

【0074】

これら全てのアプローチは、結合反応が真に部位特異的でないという点で共通している。なぜならばリンカーが介在する化学的な連結は確率論的な過程であるため、ペイロードのリンカー介在性化学結合からは、治療効果および/または診断上の有用性がそれぞれ異なる複合体化したタンパク質の不均一な混合物が生じるためである。安全性への懸念から、規制当局はバッヂ間の変動および/または医薬品原料（API）の変動を否定的に見るために、治療用混合物として承認を得る過程ではタンパク質-ペイロード複合体の混合物が大きな課題となっていることが明らかである。

40

【0075】

本発明の別の好ましい態様によると、免疫リガンド/ペイロード複合体中に含まれる免疫リガンドは、

- ・抗体、修飾された抗体フォーマット、抗体誘導体または断片、および/または
- ・抗体模倣物、

からなる群より選択されるもののうちの少なくとも1つである。

【0076】

この態様では、好ましくは、13アミノ酸未満のペプチドを低分子ペイロードに結合させることで、低分子ペイロードは配列特異的トランスペプチダーゼの基質となり、低分子

50

ペイロードは、トランスペプチダーゼによって認識されるC末端修飾を含んでいるモノクローナル抗体のC末端に前記トランスペプチダーゼによって結合されるようになる。このようなC末端修飾は両方の重鎖もしくは両方の軽鎖または完全長抗体の重鎖と軽鎖のいずれに含まれていてもよく、これにより、薬物と抗体の比が2または4(D A R 2またはD A R 4)の、部位特異的に結合したADCの生成が可能になる。

【0077】

本発明の別の好ましい態様によると免疫リガンドは、

- ・受容体、
- ・抗原、
- ・成長因子、
- ・サイトカイン、および/または
- ・ホルモン、

からなる群より選択される実体のうちの少なくとも1つに結合する。

【0078】

本明細書で使用する場合、「受容体」という用語は、細胞表面分子、好ましくは、(i)特定の、または特定の群のシグナル伝達分子(つまり、例えばVEGF受容体などの受容体)に結合する細胞表面分子、および/または(ii)既知のリガンドを有していない細胞表面分子(つまり、例えばHER2/neuなどのオーファン受容体)を意味する。天然の受容体は、細胞集団の表面で発現しているか、あるいは単にそのような分子の細胞外ドメインを構成しているか、あるいは血漿中でまたは細胞もしくは器官中で天然の結合機能を発揮している可溶性分子を構成している(そのような形態が天然に存在しているか否かにかかわらず)。好ましくは、そのような受容体は、特定の病原性の過程に関わっているシグナル伝達カスケードのメンバー(例えば成長因子のシグナル伝達カスケードに属している受容体)であるか、または、病理学的な過程に関わっている細胞もしくは粒子、例えば癌細胞の表面で発現している。

【0079】

本明細書で使用する場合、「抗原」という用語は、特定の免疫応答を誘導する能力をもつ物質を意味し、抗原には、表面タンパク質またはタンパク質複合体(例えばイオンチャネル)が含まれ得る。抗原は病原性の実体、例えば癌細胞と関連していることが多い。

【0080】

本明細書で使用する場合、「サイトカイン」という用語は、多数の細胞から分泌される小さい細胞シグナル伝達タンパク質分子を指し、またサイトカインは、細胞間情報伝達に広く使用されているシグナル伝達分子の分類の1つである。サイトカインはタンパク質、ペプチド、または糖タンパク質に分類することができるが、「サイトカイン」という用語には、発生起源が様々な細胞によって体内全体で生産される、多数のおよび多様な制御因子のファミリーが含まれる。

【0081】

本明細書で使用する場合、「成長因子」という用語は、細胞の成長、増殖および細胞分化を刺激することができる天然に存在する物質に関する。通常成長因子はタンパク質かまたはステロイドホルモンである。成長因子は様々な細胞過程の調節に重要である。

【0082】

本明細書で使用する場合、「ホルモン」という用語は、体内の、情報を送信する部分に存在している細胞、腺または器官から放出され、生体の他の部分に影響を及ぼす化学物質に関する。この用語には、ペプチドホルモン、脂質およびリン脂質に由来するホルモン、例えばステロイドホルモンおよびモノアミンが含まれる。

【0083】

免疫リガンドが受容体または抗原に結合する例では、免疫リガンド-ペイロード複合体を例えば、特定の部位に、例えば病原性の実体、例えば癌細胞に誘導することができ、ここでペイロード、例えば毒素または化学療法薬が送達される。従って、毒素または化学療法薬の全身に及ぼす毒性が低減され、後者の作用部位での局所濃度が上昇し、そのため、

10

20

30

40

50

副作用を低減させながら、より高い効力がもたらされる。さらに、免疫リガンドを結合させることでそれぞれのシグナル伝達カスケードを阻害することができる。ペイロードがマーカーの場合には、後者をこのように使用して特定の部位に、例えば、免疫リガンドによって検出される所与の表面抗原を特徴とする癌細胞に、診断用の目印を付けることができる。

【0084】

免疫リガンドが成長因子、サイトカインおよび／またはホルモンに結合する場合には、ペイロードを部位特異的な様式で送達するために、免疫リガンド／ペイロード複合体を例えれば、成長因子、サイトカイン、またはホルモンが通常結合する部位に誘導することができる。さらに、免疫リガンドを結合させることでそれぞれのシグナル伝達カスケードを阻害することができる。

10

【0085】

本明細書で使用する場合、「に結合する」という用語は、よく理解されている相互作用または他の、免疫リガンド（例えは抗体または抗体断片）とその標的との間の無作為でない関係を意味する。そのような結合反応が標的への高い特異性および／または感受性を特徴とすることが好ましい。好ましくは、結合反応は、解離定数（ K_d ）が $10^{-3} M$ 、好ましくは $10^{-4} M$ 、 $10^{-5} M$ 、 $10^{-6} M$ 、 $10^{-7} M$ 、 $10^{-8} M$ 、 $10^{-9} M$ 、最も好ましくは 10^{-10} であることを特徴とする。

【0086】

本発明の好ましい態様によると、配列特異的トランスペプチダーゼの少なくとも 1 つの触媒ドメインは、免疫リガンドまたはペイロードいずれかの N 末端もしくは C 末端に融合される。

20

【0087】

このような融合は、組換えを用いた改変または化学的な結合によって行うことができる。この態様では、免疫リガンドのペイロードへの部位特異的な結合を誘導する酵素活性を別個の組換え酵素として反応に付加する必要はなく、むしろ、それは複合体化されるタンパク質基質の一部である。

【0088】

好ましくは、配列特異的トランスペプチダーゼは、
 ・ソルターゼまたは 1 つ以上のその断片もしくは誘導体、
 ・スプリットインテインまたは 1 つ以上のその断片もしくは誘導体、
 からなる群より選択されるものの少なくとも 1 つである。

30

【0089】

トランスペプチダーゼがソルターゼである好ましい態様では、ペイロード、例えば毒素を好ましくは、少数のグリシンアミノ酸残基、好ましくは 3 または 5 個のグリシン残基を付加することで、ソルターゼ結合に関する基質とする。

【0090】

トランスペプチダーゼがスプリットインテイン、例えば S s p G y r B スプリットインテインである別の好ましい態様では、ペイロード、例えば毒素を、アミノ酸の数が 13 個未満の配列、G V F V H N - S X_n（ここで X は任意のアミノ酸であり、n は 0 以上 5 以下の整数である）を付加することで、スプリットインテイン結合に関する基質とする。

40

【0091】

低分子量毒素が完全長抗体に結合している抗体薬物複合体を生成するためにトランスペプチダーゼ、好ましくはソルターゼ酵素およびスプリットインテインを使用することは、先行技術には記載されていない（パノウスキーラ（2014））。

【0092】

ソルターゼ酵素は、様々なグラム陽性球菌、例えばブドウ球菌や肺炎連鎖球菌の種で同定されており、これは、感染を受けた宿主による効率的な免疫応答を回避するように細菌の表面特徴を変化させるため、インビボで毒素因子と細胞壁プロテオグリカンとの結合を触媒する（マズマニアンら（1999））。

50

【0093】

グラム陽性球菌である黄色ブドウ球菌（スタフィロコッカス アウレウス）のソルターゼA酵素は最初に解析が行われ（トン - タットラ（1999））、その後、多くのタンパク質修飾に関するツールとしてさらに解析されてきた（ツキジ（2009））。

【0094】

ソルターゼ酵素の有益な特徴の一つは、複合体化される2つの分子が短いペプチドタグ（「ソルターゼタグ」）だけを必要とするということである。例えば、黄色ブドウ球菌のソルターゼAの場合、一方の分子（例えばペイロード）のC末端にL P X T Gを、他方の分子（例えば免疫リガンド）のN末端に短い3～5個のグリシンアミノ酸ストレッチを付加する必要があるだけである（図1を参照のこと）。これらのペプチドタグは、分子に融合させるか、標準的な架橋化学によって分子に結合させることができる。これは一方で、2つのタンパク質を連結させるためのシステムの利用を可能にするだけでなく、より分子量が小さい化合物、好ましくは低分子量毒素をタンパク質に結合させためのシステムの利用をも可能にする。黄色ブドウ球菌ソルターゼBの場合、代表的なソルターゼモチーフはN P Q T Nである。

10

【0095】

インテインは最初、ペプチド結合を切断し、新しいペプチド結合を形成することでそれ自体を前駆タンパク質から除去（スプライス）することが可能なタンパク質のイントロンとして発見された（ショウラ（1993））（図2a）。

20

【0096】

天然に存在するスプリットインテインと人工のスプリットインテインは、後でエクステインドメイン（図2b）をトランススプライシングすることで2つのタンパク質を結合させるような方式で、異なるタンパク質またはペプチドに接続することが可能なN - インテインドメインとC - インテインドメインに分けられたインテインコード領域を含む。

30

【0097】

そのため、スプリットインテインはN - エクステインとC - エクステイン部分を共有結合させるのに、また、タンパク質を精製および/または環状化するのに利用されてきた（エルシェ（2010））。本明細書で開示の一態様は、低分子量化合物、好ましくは低分子量毒素および他の低分子標識の結合にスプリットインテインを使用することであり、この態様ではいかなる大きさの分子にも、ソルターゼ介在性ペプチド転移に必要とされる短いグリシンアミノ酸配列と同様、アミノ酸が13個未満の短いC - エクステインペプチド配列が結合される。

【0098】

ソルターゼ酵素の場合、選択した分子に短いグリシンストレッチ（グリシン残基が>2）を付加することが、ペンタ - ペプチドソルターゼ認識モチーフ（例えば黄色ブドウ球菌のソルターゼAの場合にはL P X T G）を含んでいる免疫リガンドに、その分子を結合させるのに十分である。スプリットインテインの場合には、S s p G y r B由来の6アミノ酸C - インテイン（G V F V H N）と短いC - エクステイン（ここではS A G S G K）を含んでいる、わずか12アミノ酸という短いG V F V H N S A G S G Kアミノ酸配列が、いかなるペイロード分子をも、好ましくは低分子量毒素を、スプリットインテインを介在して、S s p G y r BスプリットインテインのN - インテインドメインを含んでいる免疫リガンドに結合させるために修飾するのに十分である（フォルクマンら（2009））。機能性のインテインドメインをアミノ酸が13個未満の長さのペプチド配列になるまで短くすることができる他のスプリットインテインも同様に利用することができる。

40

【0099】

文献では、たとえスプリット酵素が常に酵素として書かれていなくても、そのようなものであることを保証している。なぜならば、それらが触媒する反応によってペプチド結合が切断されて新しいペプチド結合が形成され、既存のペプチド結合のエネルギーが新しいペプチド結合に転移するため、これをトランスペプチダーゼと見なすことができるためである。

50

【0100】

化学結合以外に、トランスペプチダーゼ介在性結合は生理的な水性緩衝液条件および生理的な温度でも起こり、これによって、結合反応中のタンパク質または抗体保全への影響は最小限に抑えられる。この特徴によって確実に、得られる複合体の機能が最適となる。

【0101】

本発明の別の好ましい態様によると、免疫リガンド／ペイロード複合体中に含まれるペイロードは、

- ・マーカー、
- ・処理用タグ、および／または
- ・薬物、

からなる群より選択されるもののうちの少なくとも1つである。

10

【0102】

「本明細書で使用する場合、マーカー」（いわゆる「検出用タグ」）という用語は、1つ以上の適切な化学物質または酵素を含み、化学、物理または酵素反応中に、直接または間接的に検出可能な化合物またはシグナルを生成する全ての分子または部分を指す可能性がある。

【0103】

本明細書で使用する場合、「処理用タグ」という用語には、アフィニティタグ、可溶化タグ、クロマトグラフィータグ、およびエピトープタグが含まれ得る。アフィニティタグ（いわゆる精製用タグ）は、アフィニティ技術を使用してタグ化した分子をその粗生物学的供給源から精製することができるよう、タンパク質に付加される。このようなアフィニティタグとしては、キチン結合タンパク質（CBP）、麦芽糖結合タンパク質（MBP）、およびグルタチオンS-転移酵素（GST）がある。ポリ（His）タグ、好ましくは6×Hisタグ、は広く使用されている処理用タグであり、これは金属マトリックスに結合する。可溶化タグは、特に大腸菌などのシャペロン欠損種で発現される組換えタンパク質に対し、それらが正確に折り畳まれたタンパク質となり、かつ、沈殿しないように補助するために使用される。これらには、チオレドキシン（TRX）およびポリ（NANP）が含まれる。いくつかのアフィニティタグ、例えばMBPおよびGSTは可溶化剤として、二重の機能を有する。

20

【0104】

クロマトグラフィータグは、タンパク質のクロマトグラフィーに関する特性を変化させ、特定の分離技術に関して種々の分離能を得るために使用される。これらはポリアニオン系アミノ酸からなることが多く、例えばFLAGタグがある。

30

【0105】

エピトープタグは、短いペプチド配列であり、多くの種で親和性の高い抗体を正確に生産することができることから選ばれている。通常、エピトープタグはウイルス遺伝子に由来し、このことによって、その高い免疫反応性が説明される。エピトープタグとしては例えば、V5-タグ、MYC-タグ、およびHA-タグが挙げられる。これらのタグは、ウェスタンプロット、免疫蛍光法および免疫沈降実験に特に有用であるが、これらはタンパク質の精製においても使用されている。

40

【0106】

処理用タグには、例えば特異的酵素修飾（ビオチンリガーゼタグなど）および化学修飾（FLAG）タグなど、他の利用法が多数ある。多数の機能をもつようにタンパク質を修飾するため、複数のタグを組み合わせることも多い。

【0107】

- 好ましくは、前記マーカーは、
- ・放射性標識、好ましくは放射性標識で標識したペプチドまたはタンパク質、
 - ・蛍光標識、好ましくは蛍光ペプチドまたはタンパク質、および／または、
 - ・酵素標識、好ましくはペルオキシダーゼ

からなる群より選択されるものの少なくとも1つである。

50

【0108】

ここに挙げた、可能性のあるマーカーペイロードは限定を意図しない。本発明の別の好みの態様によると前記薬物は、

- ・サイトカイン、
- ・放射性標識、
- ・抗炎症剤、
- ・毒素、および／または、
- ・化学療法剤、

からなる群より選択される実体のうちの少なくとも1つに結合する。

【0109】

ここに挙げた可能性のある薬物ペイロードは限定を意図しない。本明細書で使用する場合、「サイトカイン」という用語は、多数の細胞から分泌される小さい細胞シグナル伝達タンパク質分子を指し、またサイトカインは、細胞間情報伝達に広く使用されているシグナル伝達分子の分類の1つである。サイトカインはタンパク質、ペプチド、または糖タンパク質に分類することができるが、「サイトカイン」という用語には、発生起源が様々な細胞によって体内全体で生産される、多数のおよび多様な制御因子のファミリーが含まれる。本発明においてサイトカインは、例えば、病原性の実体、例えば癌細胞に損傷を与える、または死滅させることさえも意図している。

【0110】

本明細書で使用する場合、「放射性製剤」という用語は、不安的な核を有する原子を少なくとも1つ含み、そのため、放射性崩壊する傾向にあり、その結果、細胞死滅効果を有するガンマ線および／または粒子もしくは粒子のような亜原子粒子を発する実体に関する。本発明において放射性製剤は、病原性の実体、例えば癌細胞に損傷を与える、または死滅させることさえも意図している。

【0111】

本明細書で使用する場合、「抗炎症薬」という用語は、炎症を弱める化合物に関する。これは例えば、グルココルチコイド受容体に結合することで炎症または膨張を弱める特定のグルココルチコイドなどのステロイド（コルチコステロイドと呼ばれることが多い）によって達成することができる。この用語はさらに、シクロオキシゲナーゼ（COX）酵素に反作用する非ステロイド系抗炎症性（NSAID）も包含する。COX酵素は自然にプロスタグランジンを合成し、炎症を起こす。全体として、NSAIDは今後起こるプロスタグランジンの合成を防ぎ、痛みを低減するかまたは排除する。この用語はさらに、炎症反応が増幅する原因となる免疫細胞である炎症細胞の活性および移動を変化させるある種のペプチドである免疫選択的抗炎症性誘導体（IMS AID）を包含する。

【0112】

本明細書で使用する場合、「毒素」という用語は、生細胞または生体に有毒な分子に関する。毒素は、病原性の実体、例えば癌細胞を損傷するまたは死滅させさえもするようない、ペプチドもしくはタンパク質であってよく、または好ましくは、低分子量毒素であってもよい。本明細書で意味する毒素は、特に細胞毒を包含する。好ましくは、前記毒素は低分子量毒素、つまり分子量が2500ダルトン以下の毒素である。

【0113】

本明細書で使用する場合、「化学療法薬」という用語は、新生物、特に悪性（癌性）病変、例えば癌腫、肉腫、リンパ腫、または白血病の発展または進行を阻害する機能統制を有する分子に関する。転移または血管形成の阻害が抗がん剤または化学療法薬の特性であることが多い。化学療法薬は細胞障害性薬物または化学療法薬であってよい。好ましくは、前記化学療法薬は、癌細胞の成長および／または増加を阻害または抑制する低分子量細胞分裂阻害剤である。

【0114】

免疫リガンドにサイトカイン、放射性製剤、毒素または化学療法薬を結合させることで、これらの投与に関連する副作用や危険性を低減させることができる。その理由としては

10

20

30

40

50

以下のことが挙げられる；

a) 免疫リガンドは複合体をペイロードがその毒性機能を発揮する特定の部位、例えば病原性の実体、例えば癌細胞に誘導する。従って、ペイロードの全身に及ぼす毒性が低減され、後者の作用部位での局所濃度が上昇し、そのため、副作用を低減させながら、より高い効力がもたらされる。

b) 内部移行の後にペイロードが放出され、そのときになってその望まれる細胞毒性機能を発揮する、つまり、周辺の細胞または組織には影響を及ぼさないという様式で病原性の実体に内部移行する複合体が提供される可能性がある。

【 0 1 1 5 】

以下の表は、使用可能な標的 / 抗原（左列）と、それを標的とする既存の免疫リガンド（中列）の例の非限定的な一覧である。右列には、潜在的な毒素、サイトカインまたは化学療法薬の非限定的な一覧を示している。さらに数百もの標的およびペイロードが存在するが、左列と右列に示す例を任意に組み合わせることができることに注目すべきである。表に明示していないそれぞれの標的 / ペイロードの組み合わせも本発明の範囲に包含される。

10

20

30

40

50

【表1】

標的／抗原	既存のイムノリガンドの例	ペイロード
内皮成長因子受容体 (EGFR)	セツキシマブ	マイタンシノイド、例えばメルタンシン、アンサミトシン、ラブタンシン (Ravtansin)、DM4、DM1
CD20	リツキシマブ、イブリツモマブ、トシツモマブ (mAb)	カリチアマイシン、例えばオゾガマイシン
CD44		ドキソルビシン
MUC1	カンツズマブ (mAb)	細菌性ショードモナス外毒素 PE38
CD30	ブレンツキシマブ (mAb)	モノメチルアリスタチンF (MMAF)；モノメチルアリスタチンE (MMAE)
CD22	イノツズマブ (mAb)	ピロロベンゾジアゼピン (PBD)
膜貫通型グリコプロテイン NMB (GP NMB)	グレンツムマブ (Glembatumumab) (mAb)	インターロイキン-10 (IL10) (抗炎症性)
CD56	ロルボツズマブ (Lorvotuzumab) (mAb)	ジフテリア毒素
CanAg	hUC242 (mAb)	腫瘍壊死因子 (TNF)
黄体ホルモン放出ホルモン (LHRH) 受容体	[D-Lys (6)] LHRH	RNase
前立腺特異的膜抗原 (PSMA)		イットリウム ⁹⁰
CD74	ミラツズマブ (mAb)	ヨウ素 ¹³¹
CD70		ルテチウム ¹⁷⁷
AGS-16		シクロスボリン
インテグリン		メトトレキサート
CD19		タキサン、例えばパクリタキセルまたはドセタキセル
ネクチン-4		
インターロイキン2受容体	インターロイキン-2 (プロロイキン)	
CD3	UCHT1 (mAb)	
フィブロネクチンの外部ドメインB	L19-SIP (定常ドメインCH4と融合させたscFv)	
SLAMF7 (CD319)	エロツズマブ (mAb)	
SDC1	インダツキシマブ (Indatuximab) (mAb)	
Her-2/neu	トラスツズマブ (mAb)	
CD33	ゲムツズマブ (mAb)	

【0116】

本発明の一層さらに別の態様によると、免疫リガンドは、それぞれがペイロードに結合している少なくとも2つのサブユニットを含む。

【0117】

好ましくは、少なくとも2種類の異なるペイロードを、少なくとも2つのサブユニットに結合させることができる。この選択肢は、多種多様な免疫リガンド-ペイロード構築物を作成する事が可能な、万能なツールボックスを提供する。例えば、2つのドメインをもつ二重特異性免疫リガンドを、2種類のペイロード、例えば1つのマーカーと1つの毒素に結合させることができる。

10

20

30

40

50

【0118】

好ましくは、少なくとも2種類の異なるペイロードは、1つ以上の細胞経路を干渉する、毒性をもつペイロードである。

【0119】

このような態様は、例えば、別のソルターゼ認識モチーフを認識する2種類の異なるソルターゼ酵素と、それに加えて、重鎖と軽鎖が前記異なるソルターゼ酵素のそれぞれのソルターゼ認識モチーフを含んでおり、かつ、異なるC末端修飾を有している抗体を使って、2種類の異なるペイロードを、完全長抗体の2本の軽鎖のそれぞれに、および完全長抗体の2本の重鎖のそれぞれに結合させることによって達成することができる。

【0120】

このようにして、2本の完全長Ig軽鎖と2本の完全長Ig重鎖からなり、前記重鎖および軽鎖に共有結合している異なるペイロードを含んでいる抗体薬物複合体を作成することができる。

10

【0121】

このような態様によって、好ましくは、免疫リガンド-ペイロードを生成する、少なくとも2つのサブユニットの同期した結合（前記サブユニットそれぞれに対するペイロードの結合が等しい）が起こる。

【0122】

別の好ましい態様によると、少なくとも2つのサブユニットを含む前記免疫リガンドは、結合部位1カ所当たり少なくとも80%の効率で結合している。

20

【0123】

さらに別の好ましい態様によると、少なくとも2つのサブユニットを含む前記免疫リガンドは、少なくとも2個のアミノ酸、好ましくは2~5個のアミノ酸から構成されているペプチドスペーサー配列を含み、このスペーサー配列は、2つのサブユニットのうちの少なくとも一方のC末端に付加されている。

【0124】

このアプローチにより、好都合なことに、免疫リガンド-ペイロードを生成する、少なくとも2つのサブユニットの同期した結合（前記サブユニットそれぞれに対するペイロードの結合が等しい）が起こる。本発明の別の態様によると、この方法によって、免疫リガンドとペイロードの間の関係を化学量論的に規定することができる。この態様によれば、免疫リガンドとペイロードの間の厳密な量的関係を提供することができ、従って、免疫リガンド/ペイロード複合体、特に臨床用および/または治療用の複合体の生産性および全体の性能が改善される。このことは、トランスペプチダーゼの配列特異性および/または部位特異性によって説明される。

30

【0125】

特に好ましい態様によると、免疫リガンドとペイロードとの間の前記化学量論的に規定された関係は、部分的に反応したC末端に修飾を有する免疫リガンド基質を除去することで達成される。そのような除去は例えば、アフィニティ生成によって行うことができる。前記アプローチによって、好ましくは、均一な薬物対免疫リガンド比がもたらされる。

【0126】

前記除去は好ましくは、トランスペプチダーゼ認識モチーフまたはドメインのC末端に配置されたアフィニティタグを利用するアフィニティ精製によって行われる。この目的には、当業者に知られている標準的な方法、例えば、HISタグ、CBPタグ、CYD (covalent yet dissociable NorpD peptid e、共有しているが分離可能なNorpDペプチド) タグ、Strep IIタグ、FLAGタグ、HPC (プロテインCの重鎖) タグ、ならびにGSTおよびMBPタンパク質融合タグを使用することができる。

40

【0127】

本発明の別の態様によると、この方法によって、ペイロードを免疫リガンドに部位等位的に結合させることができる。この態様によると、この結合過程は免疫リガンドまたはペ

50

イロードそのものの活性を干渉しないことが確実であり、そのため、免疫リガンド／ペイロード複合体、特に臨床用および／または治療用複合体の生産性および全体的な性能が改善される。このことは、トランスペプチダーゼの配列特異性および／または部位特異性によって説明される。多くの場合に部位特異的でないかまたは限定的な部位特異性を有する（例えば、ペイロードがアルギニン、リシン、アスパラギンまたはグルタミンなどの遊離アミノ基に結合している場合の）標準的な結合化学を用いる以外には、免疫リガンドの特徴（例えば標的特異性）またはペイロードの特徴（例えば毒性）に影響がおよばないよう、このようにして結合部位を正確に規定することができる。

【0128】

本発明はさらに、前述の態様による方法から得られた免疫リガンド／ペイロード複合体を提供する。

10

【0129】

好ましくは、前記免疫リガンド／ペイロード複合体は、抗体／薬物複合体および／または抗体／マーカー複合体からなる群より選択される。

【0130】

本発明はさらに、前述の態様による免疫リガンド／ペイロード複合体の、
 ・所与の病態のインビトロまたはインビボでの診断
 ・所与の病態に関するインビトロまたはインビボでの予測または予後予測
 ・所与の病態に罹患しているまたは発症する危険性のあるヒトまたは動物対象の治療、および／または
 ・研究および／または開発目的
 における使用を提供する。

20

【0131】

好ましくは、前記病態は、
 ・腫瘍性疾患
 ・自己免疫疾患
 ・神経変性疾患、および／または
 ・感染症
 からなる群より選択されるものの少なくとも1つである。

【0132】

いずれの例においても、本発明による免疫リガンド／ペイロード複合体は、例えばペイロードを特定の部位、例えば癌細胞、神経病理のある部位または自己免疫反応を起こしている部位に誘導することによって、有益な効果をもたらす可能性がある。

30

【0133】

ペイロード、例えば、毒素、化学療法薬、サイトカインまたは薬物は、例えば癌細胞を枯渇させるため、癌細胞に対する抗増殖性を発揮するため、ブラークを溶解するため、自己抗体を阻害するために前記部位に送達される。

【0134】

いずれの例においても、複合体本発明による免疫リガンド／ペイロードは、ペイロード、例えば毒素または化学療法薬が、例えば癌細胞を枯渇させるため、癌細胞に対して抗増殖性作用を発揮するために送達される特定の部位、例えば癌細胞にペイロードを誘導することで、有益な効果をもたらす可能性がある。

40

【0135】

従って、毒素または化学療法薬の全身に及ぼす毒性が低減され、後者の作用部位での局所濃度が上昇し、そのため、副作用を低減させながら、より高い効力がもたらされる。さらに、免疫リガンドを結合させることでそれぞれのシグナル伝達カスケードを阻害することができる。ペイロードがマーカーの場合には、マーカーをこのように使用して特定の部位に、例えば、免疫リガンドによって検出される所与の表面抗原を特徴とする癌細胞に、診断用の目印を付けることができる。

【0136】

50

結合過程の部位特性によって、それぞれの免疫リガンド／ペイロード複合体、特に臨床用および／または治療用複合体の高い生産性および全体的な性能が保証される。

【0137】

本明細書で使用する場合、「腫瘍性疾患」という用語は、急激に増殖している細胞成長または新生物を特徴とする、細胞または組織の異常な段階または状態を指す。より具体的な意味では、この用語は癌性の過程、例えば腫瘍および／または白血病に関する。

【0138】

「神経病理学的疾患」という用語には特に、神経変性疾患、神経炎症性疾患または発作性疾患が含まれる。

【0139】

神経変性疾患とは、ニューロン死を含む、進行性のニューロンの構造または機能の喪失を特徴とする疾患である。多くの神経変性疾患、例えばパーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症および多発性硬化症は、神経変性過程の結果、生じる。様々な神経変性障害の間には非定型なタンパク質の会合や誘発性細胞死など、多くの類似点がある。さらに神経変性は、ニューロン回路網の、分子レベルから全身レベルにわたる多くの異なるレベルで見いだすことができる。

10

【0140】

「神経変性疾患」および「神経炎症性疾患」という用語は、部分的には重複した意味範囲を有する。炎症性反応は神経変性疾患の特徴であり、種々の機序を介して、ニューロンの細胞死に関与または寄与している。キヌレニン経路（KP）に沿ったトリプトファンの異化反応はこのような機序のうちの1つである。

20

【0141】

発作性疾患は脳細胞間のシグナル伝達の異常を特徴とする脳障害である。発作性疾患は、脳に部分的に（部分発作）または脳全体に（全般発作）影響をおよぼす可能性がある。最も多く見られる発作性疾患はてんかんである。

【0142】

本明細書で使用する場合、「自己免疫疾患」という用語は、自己免疫応答が単一の組織に向けられている器官特異的な自己免疫疾患、例えばクローニング病や潰瘍性大腸炎、I型糖尿病、重症筋無力症、白斑、グレーブス病、橋本病、アジソン病および自己免疫性胃炎および自己免疫肝炎を包含する。この用語にはまた、自己免疫応答が、体内全体の複数または多数の器官に存在する構成要素に向けられている非器官特異的な自己免疫疾患も含まれる。

30

【0143】

このような自己免疫疾患としては例えば、関節リウマチ、疾患、全身性エリテマトーデス、進行性全身性強皮症および変異型、多発性筋炎ならびに皮膚筋炎が挙げられる。

【0144】

その他の自己免疫疾患としては、一部の自己免疫性胃炎を含む悪性貧血、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性血小板減少症、シェーグレン症候群、多発性硬化症および乾癬が挙げられる。当業者は、本発明の方法を、これらのまたは他の自己免疫疾患に適宜適用可能であることを理解する。

40

【0145】

本明細書で使用する場合、「感染症」という用語には、これらには限定されないが、感染性の生物によって引き起こされるいざれもの疾患が含まれる。感染性の生物には、ウイルス（例えば、一本鎖RNAウイルス、一本鎖DNAウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、A、B、およびC型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）、サイトメガロウイルス（CMV）エプスタイン・バーウイルス（EBV）、ヒト乳頭腫ウイルス（HPV））、寄生生物（例えば、マラリア原虫、リーシュマニア、住血吸虫、トリパノソーマなどの原生動物および後生動物病原体）、細菌（例えば、マイコバクテリア、具体的には、結核菌、サルモネラ、連鎖球菌、大腸菌、ブドウ球菌）、真菌（例えば、カンジダ、アスペルギルス）、カリニ肺炎菌、およびプリオൺが含まれ得る。

50

【0146】

本発明はさらに、 $G1y_n$ で修飾された低分子量ペイロードを提供し、ここで n は1より大きく、好ましくは、 n は3または5である。

【0147】

本明細書で使用する場合、「 $G1y_n$ で修飾された」という用語は、グリシン残基からなるオリゴペプチドまたはポリペプチドが前記ペイロードに付加されていることを意味する。本明細書で使用する場合、「低分子量ペイロード化合物」という用語は、分子量が2500ダルトン以下のペイロードを包含するものとする。

【0148】

好ましくは、前記ペイロードは、

- ・マーカー、
- ・処理用タグ、および/または
- ・薬物

からなる群より選択されるものの少なくとも1つである。

【0149】

前記マーカーは、

- ・放射性標識、好ましくは放射性標識で標識したペプチドまたはタンパク質、
- ・蛍光標識、好ましくは蛍光ペプチドまたはタンパク質、および/または、
- ・酵素標識、好ましくはペルオキシダーゼ

からなる群より選択されるものの少なくとも1つである。

10

【0150】

前記薬物は、

- ・サイトカイン、
- ・放射性標識、
- ・毒素、および/または、
- ・化学療法剤、

からなる群より選択されるものの少なくとも1つである。

【0151】

既に前段で議論したように、前記毒素は好ましくは低分子量毒素、つまり分子量が2500ダルトン以下の毒素である。前記毒素は、

30

- ・メイタンシン
- ・モノメチルアウリスタチン、および/または
- ・アルファ-アマニチン

からなる群より選択されるものの少なくとも1つ、もしくはこれらの誘導体である。このような $G1y_n$ で修飾された毒素の例を、図14A～14Cの構造1～9に示す。

【0152】

本発明はさらに、グリシンで修飾された低分子量ペイロードの、その免疫リガンドへの結合における使用を提供する。

【0153】

好ましくは、また前述した通り、この結合はトランスペプチダーゼ、好ましくはソルターゼおよび/またはスプリットインテイン介在性の結合である。同様に、免疫リガンドは抗体であることが好ましい。

40

【0154】

前記免疫リガンドが抗体であることが好ましい。このようにして、抗体薬物複合体(ADC)を提供することができる。

【0155】

好ましくは、免疫リガンド-ペイロード複合体化反応は、粗細胞培養上清の中で行われる。このことは、好ましくは、結合反応が精製されていないまたは部分的に精製された要素と共にに行われることを意味している。

実験および図

50

【0156】

本発明を図面および前述の説明によって詳細に図示および説明してきたが、このような図示および説明は例証または例示と見なされ、本発明を限定するものとは見なされず、本発明は開示の態様には限定されない。当業者は、図面、開示および添付の請求項を検討することにより、特許請求する発明の実践における開示した態様の他の変異型を理解し、実施することができる。特許請求項における「含んでいる」という語は、他の要素または工程を排除するものではなく、また、不定冠詞の「1つ」または「1種」は、複数を排除するものでない。互いに異なる従属請求項で特定の測定値が記載されているという事実は、これら測定値の組み合わせを都合良く使用することはできないことを示しているものではない。特許請求項に含まれているいずれの参照記号も発明の範囲を制限していると解釈すべきではない。

10

【0157】

本明細書開示しているアミノ酸配列は全てN末端からC末端の方向に、本明細書で開示している核酸配列は全て5'から3'の方向に示している。

【実施例】

【0158】

実施例1：発現ベクターのクローニングおよびC末端にL P E T G ソルターゼタグと、それに加えて6×HisおよびstrepIIアフィニティ精製用タグが付加されたCD19モノクローナル抗体の発現

20

【0159】

ペイロードを抗体のC末端に結合させるためには、C末端修飾、例えば黄色ブドウ球菌ソルターゼAの認識モチーフを含む第一の組換え抗体を発現させる必要がある。

【0160】

この目的で、抗ヒトCD19特異的抗体の重鎖および軽鎖の第一のORFを遺伝的に合成することができる。例えばジーンスクリプト(Genscript、www.genscript.com、ピスカタウェイ、ニュージャージー、米国)のような開発業務受託機関(CRO)がそのような遺伝子合成サービスを提供している。一例として、ヒト化抗ヒトCD19抗体hBU12の重鎖および軽鎖配列を、米国特許第8,242,252号B2の配列53(変異体HF)および配列58(変異体LG)として見ることができる。この抗ヒトCD19抗体のV_HおよびV_L領域は以下の通りである。

30

【0161】

配列番号1(ヒト化抗ヒトCD19抗体hBU12のV_Hコード領域)：

```
ATGGGATGGAGCTGGATCTTCTTTCTCTGTCAAGGAACCTGCAGGTGTCATTGTCAGGTTCAAGCTGCAAGA
GTCTGGCCCTGGGTTGGTTAACGCCCTCCCAGACCCCTCAGTCTGACTTGTACTGTGTCAGGGGTTCAATCAGCA
CTTCTGGTATGGGTGAGGCTGGATTAGGCAGCACCAGGGAAAGGGTCTGGAGTGGATTGGACACATTTGGTGG
GATGATGACAAGAGATATAACCCAGCCCTGAAGAGCAGAGTGACAATCTGTGGATACCTCCAAGAACCAAGTT
TAGCCTCAAGCTGTCCAGTGTGACAGCTGCAGATACTGCTGTCTACTACTGTGCTAGAATGGAACCTTGGTCT
ACTATTTGACTACTGGGCCAAGGCACCCCTGTACAGTCTCCTCA
```

30

【0162】

40

これは以下のアミノ酸配列に翻訳される(配列番号2)：

```
MGWSWIFLFLSGTAGVHCQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISTSGMGVGWIRQHPGKGLEWIGHIWW
DDDKRYNPALKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCARMELWSYYFDYWGQGTLVTVSS
```

【0163】

50

配列番号3(ヒト化抗ヒトCD19抗体hBU12のV_Lコード領域)：

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCAGCAGTGAAATTGTTCTCACCCA
GTCTCCAGCAACCCCTGTCTCTCTCCAGGGAAAGGGTACCCCTGAGCTGCAAGTGTAAAGTT
ACATGCACTGGTACCGAGCAGAACGCCAGGGCAGGCTCCAGACTCTGATTATGACACATCCAAACTGGCTTCT
GGTATTCCAGCAAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTACACTACAATCAGCAGCCTGGAGCCAGA
GGATGTTGCTGTCTATTACTGTTTCAGGGGAGTGTATAACCCATTCACTTTGGCCAAGGGACAAAGTTGGAAA
TCAAA

【0164】

これは以下のアミノ酸配列に翻訳される（配列番号4）：

MKLPVRLVLMFWIPASSSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLAS
GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDVAVYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIK

10

【0165】

本明細書で開示の方法を実現するために、これらの配列を、さらなるC末端タグを有するヒトIgG₁の重鎖および軽鎖の定常領域に融合させることができる。

【0166】

本発明を実現するために、3'にLPETG黄色ブドウ球菌ソルターゼA認識タグ、次いで6×Hisタグ(HHHHHH)、MYCタグ(EQKLISEEDL)およびstrepI Iタグ(WSHPQFEK)をコードしているコドンをさらに含んでいるヒトIgG₁重鎖定常領域を合成することができる。得られる配列は以下の通りである。

【0167】

配列番号5（3'にLPETGソルターゼタグ、6×HisタグおよびstrepI Iタグをコードしている3'伸張をインフレームで含んでいるヒトIgG₁重鎖定常コード領域）：

AGCACCAAGGGCCCACATCTGTCCTCCCCCTGGCACCCCTCCAAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCTGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAACCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGC
ACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAGC
TTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC
CAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTCCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCCTAACACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTG
AGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCCCTACCGTCTGCACCCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAA
GGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCATCCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTGAGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGTTCTATCCCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAAC
ACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACACAGAA
GAGCCTCTCCCTGTCCTGGGTAACATGCCGAGACCGGCCACCAACACCACGGCGAGCAGAAGCTGA
TCAGCGAGGAGGACCTGGCTGGAGCCACCCCCAGTCAGAAGTAG

20

30

【0168】

これは以下のアミノ酸配列に翻訳される（配列番号6、下線部はタグのアミノ酸配列）：

STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
LGTQTYICNVNHPKSNKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKLPETGHCCCCAGTCAGAAGTAG.

40

【0169】

さらに、3'にLPETG黄色ブドウ球菌ソルターゼA認識タグ、次いで6×Hisタグ(HHHHHH)およびstrepI Iタグ(WSHPQFEK)をコードしているコドンさらに含んでいるヒトIgG₁カッパ軽鎖定常領域を合成することができる。得られる配列は以下の通りである。

【0170】

50

配列番号 7 (3' に L P E T G ソルターゼタグ、 6 × H i s タグ、 M y c タグおよび s t r e p I I タグをコードしている 3' 伸張をインフレームで含んでいるヒト I g G 1 カップル鎖定常コード領域) :

```
ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCCTGTTGT
GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAGATCAGTGGAAAGGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA
ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCGTGACGCTGAGC
AAAGCAGACTACGAGAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTACAAA
GAGCTTCAACAGGGAGAGTGTCTGCCGAGACCGGCCACCACCAACACCACGGCAGCAGAAGCTGATCA
GCGAGGAGGACCTGGGCTGGAGCCACCCCCAGTTCGAGAAGTAG
```

10

【 0 1 7 1 】

これは以下のアミノ酸配列に翻訳される (配列番号 8 、下線部はタグのアミノ酸配列) :

```
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECLPETGHHHHHGEQKLISEEDLGWSHPQFEK.
```

【 0 1 7 2 】

また、ヒト化抗ヒト C D 1 9 抗体 h B U 1 2 の L P E T G ソルターゼタグ、 6 × H i s および s t r e p I I タグ化重鎖および軽鎖の完全なコード領域は以下の通りである。

【 0 1 7 3 】

配列番号 9 (C 末端に L P E T G ソルターゼタグ、 6 × H i s タグ、 M y c タグおよび s t r e p I I タグを含む h B U 1 2 の完全長ヒト I g G 1 V H - C H 重鎖コード領域) :

```
ATGGGATGGAGCTGGATCTTCTTTCCCTGTCAGGAACCTGCAGGTGTCATTGTCAGGTTCAAGCTGCAAGA
GTCTGGCCCTGGGTTGGTAAGCCCTCCAGACCCCTCAGTCTGACTTGTACTGTCTGGGGTTCAATCAGCA
CTTCTGGTATGGGTGAGGCTGGATTAGGCAGCACCAGGGAAAGGGTCTGGAGTGGATTGGACACATTTGGTGG
GATGATGACAAGAGATAACCCAGCCCTGAAGAGCAGAGTGACAATCTCTGTGGATAACCTCCAAGAACAGTT
TAGCCTCAAGCTGTCACTGTGACAGCTGAGATACTGCTACTACTGTGCTAGAATGGAACCTTGGTCC
ACTATTTGACTACTGGGCAAGGCACCTTGTACAGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCATCTGTCTTC
CCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCTGCCCTGGCTGGCAAGGACTACTTCCC
TGAACCTGTGACAGTGTCTGGAACTCAGGCCTGACCAGCAGCTGGCACACCTTCCGGCTGTCTACAGT
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACAC
ATGCCAACCGTGCCAGCACCTGAACCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTCCCCAAAACCCAAGGACA
CCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGAGCTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAG
TCACACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCT
CCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCGAGAACACCACAGGTG
TACACCTGCCCCCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCTAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTA
TCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC
TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAA
ACTGCCGAGACCGGCCACCACCAACACCACGGCGAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGGCTGG
GCCACCCCCAGTTCGAGAAGTAG
```

20

30

【 0 1 7 4 】

これは以下のアミノ酸配列に翻訳される (配列番号 1 0 、下線部はタグのアミノ酸配列) :

```
MGWSWIFLFLSGTAGVHCVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISTSGMGVGWIRQHPGKGLEWIGHIWW
DDDKNYRNPALKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMELWSYYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKLPETGHHHHHGEQKLISEEDLGWSHPQFEK.
```

40

50

【 0 1 7 5 】

配列番号 1 1 (C 末端に L P E T G ソルターゼタグ、6 × H i s タグ、M y c タグおよび s t r e p I I タグを含む h B U 1 2 の完全長ヒト I g G 1 V L - C L カッパ鎖コード領域) :

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGAAATTGTTCTCACCCA
 GTCTCCAGCAACCTGTCCTCTCCAGGGAAAGGGCTACCTCTGAGCTGCAGTGCAGCTAAGTGTAAAGTT
 ACATGCACTGGTACCAAGCAGAAGCCAGGGCAGGGCTCCAGACTCTGATTATGACACATCCAAACTGGCTTCT
 GGTATTCCAGCAAGGGTCAGTGGCAGTGGGCTGGAACAGATTACACTACAATCAGCAGCCTGGAGCCAGA
 GGATGTTGCTGTCTATTACTGTTTCAAGGGAGTGTATACCCATTCACCTTGGCCAAGGGACAAAGTTGGAAA
 TCAAAAGAACGTGGCTGCACCCTGTCATCTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCC
 TCTGTTGTCGCTGCTGAATAACTCTATCCCAGAGAGGCCAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCA
 ATCGGGTAACCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGA
 CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGCCCTGAGCTCGCC
 GTCACAAAGAGCTAACAGGGAGAGTGTCTGCCAGACCGGCCACCACCACCGCGAGCAGAA
 GCTGATCAGCGAGGAGGACCTGGCTGGAGCCACCCCCAGTCGAGAAGTAG

10

【 0 1 7 6 】

これは以下のアミノ酸配列に翻訳される(配列番号 1 2、下線部はタグのアミノ酸配列) :

MKLPVRLLVLMFWIPASSSEIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLAS
 GIPARFSGSGSGTDFLTISLEPEDAVYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
 SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
 VTKSFNRGECLPETGHHHHHHGEQKLISEEDLGWSHPQFEK.

20

【 0 1 7 7 】

その後、配列番号 9 および 1 1 のそれぞれで開示した抗ヒト C D 1 9 特異的抗体の重鎖および軽鎖のコード領域を、標準的な哺乳類の発現ベクター、例えば p C D N A 3 . 1 - h y g r o (+) (インビトロジェン) に当該分野で知られている分子生物学的手法によってクローニングできるように、近くに制限酵素部位(例えば H i n d I I I および N o t I)を含める形で合成することができる。

【 0 1 7 8 】

タグ化 h B U 1 2 抗ヒト C D 1 9 抗体、p C D N A 3 . 1 - h y g r o (+) - I g H 鎮発現ベクターの完全な D N A 配列は以下の通りである。

30

【 0 1 7 9 】

配列番号 1 3 (C 末端に L P E T G ソルターゼタグ、6 × H i s タグおよび s t r e p I I タグ(下線部)およびクローニングサイトである H i n d I I I と N o t I (影付部分)を含む h B U 1 2 のヒト I g G 1 V H - C H 重鎖コード領域) :

GACGGATCGGGAGATCTCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAACGC
 CAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGGAGGTGCGCTGAGTAGTGCAGCAGCAAAATTAAAGCTACAAACAAGGCA
 AGGCTTGACCGACAATTGCAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCCTTGCCTCGCGATGTACGGGCCA
 GATATACCGGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTCATAGCCCCA
 TATATGGAGTTCCCGCTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATT
 GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATT
 TACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGAC
 GGTAAATGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGT
 ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTATGCGGTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTCAC
 GGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTGGCACCACAAATCAACGGGACTTCCA
 AAATGTCGTAACAACCCGCCCCATTGACGCAAATGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGAGGTCTATATAAGCAG
 AGCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAAACGACTCACTATAGGGAGACCC

40

50

AAGCTGGCTAGCGTTAACTT ~~GGG~~CCATGGGATGGAGCTGGATCTTCTTTCTCTGTCAAGGAACGTGC
 AGGTGTCCATTGTCAGGTCACTGCAAGAGCTGGCCCTGGGTTGAAAGCCCTCCAGACCCCTCAGTCAG
 CTGACTGTGCTGGGGTTCAATCAGCACTCTGGTATGGGTAGGCTGGATTAGGCAGCACCCAGGGAAAG
 GGTCTGGAGTGGATGGACACATTGGTGGGATGATGACAAGAGATAACCCAGCCCTGAAGAGCAGAGTGC
 ATATCTCTGGATACCTCCAAGAACAGTTAGCCTCAAGCTGTCAGTGTGACAGCTGAGATACTGCTGTCT
 ACTACTGTGCTAGAATGGAACTTGGCTCTACTATTGACTACTGGGCAAGGCACCCCTGGTACACTCTCC
 TCAGCTAGCACAAGGGCCCATGTCCTCCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGTGC
 CCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTCCCTGAACCTGTGACAGTGTCTGGAACTCAGGCCCTGACCGCG
 GCGTGCACACCTTCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACGTGCCCCTC
 AGCAGCTTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT
 TGAGGCCAAATCTGTGACAAAATCACACATGCCACCGTGCCACCTGAACCTGGGGGACCGTCAG
 TCTTCCTCTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTGAATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGT
 GACGCTGAGCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCACCTGGTACGGTACGGCGTGGAGGTGCAATAATGCCAAGAC
 AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGTACCGTGGTACGGTACCGTCCCTCAGCAGGACTGGC
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATGAGAAAACCCATCTCAA
 GCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCCACAGGTGACACCTCTGCCCATCCGGGATGAGGTGACCAAGAACAGT
 CAGCCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTCTATCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCGAGCCG
 AGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT
 GACAAGAGCAGCTGGCAGCAGGGGAACGTCTCATGCTCGTGAATGCAATGAGGCTCTGCACAACCACAC
 ACAGAAGAGCCTCTCCCTGCTCCGGTAAATCCTGGGCAAGGACGCCACCCACACCCACGGCAGCAGA
 AGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGGGCTGGAGGACCCCTGAGGTACGGTACGGTACGGCTACACTGGC
 GCGCGTTAAACCCCTGATCAGCTCGACTGTGCCCTCTAGTGGCAGCCATCTGTTGCTTCCCCCTCCCCG
 TGCCTCCCTGACCTGGAAGGTGCCACTCCACTGCTCTTCTCTAAATAAAATGAGGAATTGCAATGCACTG
 CTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGAAGACAATAG
 CAGGCATGCTGGGATGCCGTGGCTCATGGCTCTGAGGCGGAAAGAACAGCTGGGCTCTAGGGGATAC
 CCCACCGCCTGAGCGCCTTAAGCGCGCCGGTGTGGTGGTACCGCGTACCGCTACACTGGC
 AGCGCCCTAGCGCCGCTCTTCGCTTCCCTCCTCCCTCCTCCGACCTGCGCCGCTTCCCCGTCAGC
 TCTAAATGGGGCATCCCTTAAAGGTTCCGATTAGTGTCTTACCGCACCTCGACCCAAAAAAACTTGATTAG
 GTGATGGTCAGTAGTGGCATGCCCTGATGACGGTTTCTGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTT
 ATAGTGGACTCTGTTCCAACACTGGAACAACACTCAACCCATCTCGCTATTCTTGTATTATAAGGGAT
 TTGGGATTGCGCTATTGGTAAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAATTAACGCAATTATCTGTGGAA
 TGTGTGTCAGTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCAGGCAGGCAGAGTATGCAAGCATGCACTCA
 TAGTCAGCAACCAGGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCAGGCAGGCAGAGTATGCAAAAGCATGCACTCA
 GTCAGCAACCAGTCTCCGCCCTAACTCCGCCCTAACTCCGCCCTAACTCCGCCCTAATCTCCGC
 CCCATGGCTACTAATTTTTATTGCAAGGGCCAGGCCCTTGCTGAGCTTCCAGAAGTAG
 TGAGGAGGCTTTTGAGGCTGAGCTTCTGAGGACTGCTGAGAAGTTCTGATGCAAAAGTTCGACACCG
 TCTCCGACCTGATGCACTCGGAGGGCGAAGAACCTCGTGTCTCAGCTTGATGAGGAGGGCGTGGATAT
 GTCCTGCGGTTAAATAGCTGCGCGATGGTTCTACAAAGATGTTATGTTATCGGCACTTIGCATGCCCG
 GCTCCCGATTCGGAAGTGTGACATGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCACTCTCCGCCGTG
 AGGGGTGTCAGTTGCAAGACCTGCTGGAAAGCCTGAAACTGCGCTGTTCTGCGAGCCGGTGCAGGG
 CGCGATCGCTGCCGCGATCTAGCCGAGGCTGAGCTGAGCTGATGCTTGGCCAGGGACTGCCGAAGT
 CGCAGCCTGAGCTTGGCTCCAACATGCTCTGAGGACAATGGCGATAACAGCGGTCTTGACTGGAGCG
 GGCAGATGTTGGGATCCCAATACGAGGTGCGCAACATCTCTGGAGGCCGTGGTGGCTGTATGGAGC
 AGCAGACCGCTACTTCGAGCGAGGCACTCCGAGCTTGCAAGGATGCCGCCGCTCCGGCGTATATGCT
 ATTGGTCTGACCAACTTACAGAGCTTGGTACGGCAATTGATGAGCTGAGCTGCTGGGCGATG
 CGACGCAATCGCCGATCCGGAGCGGGACTGTCGGCTGACACAAATGCCCTGAGCAGCCGGTCTG
 CGGATGGCTGTTGAGACTCGCGATAGTGGAAACCGACGCCAGACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG
 CACGTGCTACGAGATTGCAATTCCACCGCCGCTCTATGAAAGGTGGCTTGGGAATCGTTTCCGGACCG
 CGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCAIGCTGGAGTTCTGCCCAACCTTGTATTGAGCTT
 ATAATGGTTACAATAAGCAATAGCATCACAAATTCAACAAATAAGCATTGTTTCACTGCAATTGAGCTT
 GGTGTTGTCACACTCATCAATGTTATCATGTCGTTGAGCTGAGCTGCTGGGCGCAGGGTCTG
 ATGGTCATAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATGCCCTCACAAATTCCACACACATGAGGCCGAAAGCATA
 AGTGTAAAGGCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAATGAGCTACATTAATGCGTTGCGCTACTGCC
 TCGGGAAACCTGCGCTGAGCTGAGCTTATGAGGAGGAGAGCGGTTTGGCTATTGGCG
 CTCTTCCGCTTCTCGCTACTGACTCGCTCGCTCGGCTGCGCTGCGGAGCGGTATCAGCTCA
 AGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGATAACGCAAGGAAAGACATGAGCAAAGGCCAG
 GCCAGGAACCGTAAAAGCCGCGTGTGGCTTCCATAGGCTCCGCCCTGACAGGACTATAAG
 TCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCAACCCGACAGGACTATAAGATAACGAGCTTCCCG
 TCGTGCCTCTCTGTTCCGACCCGCTGCCGTTACCGGATACCTGTCGCCCTTCTCC
 TCGGAAAGCGTGGCG

10

20

30

40

50

CTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTCGGTAGGTCGTCGCTCCAAGCTGGCTGTGCACGA
 ACCCCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCCTATCCGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACT
 TATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCAGGATATGAGGCTACAGAGTTCTG
 AAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGATCTGCCTGCTGAAGCCAGTTACCTT
 CGGAAAAAGAGTTGGTAGCTTGTGATCCGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTGTTGCAAGC
 AGCAGATTACCGCAGAAAAAAAGGATCTAAGAAGATCCTTGATCTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGG
 AACGAAAACACGTTAAGGGATTGGCATGAGATTATCAAAAAGGATCTCACCTAGATCCTTTAAATTA
 AAAATGAAGTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTGGCTGACAGTACCAATGCTAATCAGTG
 AGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTATTGCTCATCCATAGTGCCTGACTCCCCTGCTGAGATAACTACG
 ATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCAGTGCCTGCAATGATAACCGOGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATT
 ATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGCTGCAACTTATCCGCTCCATCCAGT
 CTATTAAATTGTCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTGCGCACGTTGCTGCAAGTGGCT
 ACAGGCATCGTGGTGCACGCTCGTGTGGTATGGCTTCAATTGCTCCCTGGCTCTCCGATGTTGTCAGAAGTAAGTGG
 TACATGATCCCCATGTTGCAAAAAGGGTTAGCTCCCTGGCTCTCCGATGTTGTCAGAAGTAAGTGG
 CCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCAGTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTT
 TCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTGAGAATAGTGTATGCCGACCGAGTTGCTTGGCC
 GTCAATAACGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACCTTAAAGTGCATCATGGAAAACGTTCTCGGGC
 GAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGGAGATCCAGTGCATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTCA
 GCATCTTTACTTCACCAGCGTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCCAAAAAGGGAATAAG
 GGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTCCTTTCAATATTATGAGCATTATCAGGGTTATTGTC
 TCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTAGAAAATAACAAATAGGGTCCGCGCACATTCCCCGAAA
 GTGCCACCTGACGTC

【0180】

10

タグ化 h B U 1 2 抗ヒト C D 1 9 抗体、p C D N A 3 . 1 - h y g r o (+) - I g L
 鎮発現ベクターの完全な D N A 配列は以下の通りである。

【0181】

20

配列番号 14 (C 末端に L P E T G ソルターゼタグ、 6 × H i s タグ、 M y c タグおよび s t r e p I I タグ (下線部) およびクローニングサイトである H i n d I I I と N o t I (影付部分) を含む h B U 1 2 のヒト I g G 1 V L - C L カッパ軽鎖コード領域) :

GACGGATCGGGAGATCTCCGATCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAACG
 CAGTATCTGCTCCCTGTTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCCTGAGCAAATTAAAGCTACAACAAGGCA
 AGGCTTGACCGACAATTGCAAGAACATGCTTAGGGTAGGGCTTGCCTGCTGCTGCGATGTACGGGCA
 GATATACCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAAAGTAACTCAATTACGGGCTTGCCTGACCGCCAACTGATCTG
 TATATGGAGTTCCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCGCTGGCTGACCGCCAAACGACCCCCGCCATT
 GACGTCATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCATGGTGGACTATT
 TACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCATGAC
 GGTAAATGGCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGACTTTCCACTTGGCAGTACATCTACGT
 ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTATGCCGTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTCAC
 GGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCATGGAGTTTGGCACC AAAATCAACGGGACTTTCCA
 AAATGTGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAATGGCGGTAGGGCTGACGGTGGAGGTCTATATAAGCAG
 AGCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATGAAATTAAACGACTCACTATAGGGAGACCC
 AAGCTGGCTAGCGTTAAACTTACCGTCAAGTGCCTGAGGCTTGGCTGATGTTCTGGGATTTGACTCAC
 TGCTTCCACCGAGTGAATTGTTCTCACCCAGTCCAGCAACCCCTGTCCTCTCCAGGGAAAGGGCTACCC
 TGAGCTGCAGTGCCTAGCTCAAGTGTAACTGACGACTGGTACCGAGCAGAACGGCAGGGCAGGCTCCAGACTC
 CTGATTATGACACATCCAAACTGGCTTGGTATCCAGCAAGGTTAGTGGCAGTGGCTGGGCTGGAAACAGATT
 TACACTCACAATCAGCAGCCTGGAGCCAGAGGATGTGCTTATTACTGTTTCAGGGAGTGTATAACCCAT
 TCACTTTGCCAAGGGACAAAGTGGAAATCAAAGAACGTGGCTGCACCATCTGCTTCATCTCCGCCA
 TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAACTGCCTCTGTTGTCGCTGTAATAACTCTATCCCAGAGAGGCCA
 AGTACAGTGGAAAGGGATAACGCCCTCCAATGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGG
 ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTACGCCCTGC
 GAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTCAACAGGGAGAGTGTCTGCCAGGCC
 CCACCAACCAACCAACCGCGAGCAGAACAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGGCTGGAGCCACCCCCAGTC
 AGAAGTAGGGGCTGAGTCTAGAGGGCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTGACTGTGCCTTCTAGTTG
 CCAGCCATCTGTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTCCTGACCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTCT
 AATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGCAGGAC

30

40

50

AGCAAGGGGGAGGAATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGCTCTATGGCTCTGAGGCAGA
 AAGAACCGAGCTGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACCGGCCCTGAGCGGCCATTAAGCGCGGCCGGTGTGGTGG
 TTACCGCGACGGTGAACCGTACACTTGCACGCCCTAGCGCCCGCTTTCGCTTCTCCCTCCTTC
 GCCACGTTGCCGGCTTCCCCGTCAAGCTCTAAATGGGGCATCCCTTAGGGTTCCGATTTAGTGTCTTACG
 GCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTATGTTACCGTAGTGGGCACTGCCCTGATAGACGGTTTTC
 GCCCTTGACGTTGGACTCCACGTTTAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGAACAAACACTCAACCCATAC
 TCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTGGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGTTAAC
 AAAATTAAACCGAATTAAATTCTGTGGAATGTGTCAGTTAGGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCAGGCAG
 GCAGAAGTATGCAAAGCATGATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCAGGCAG
 AGAAGTATGCAAAGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATACTCCGCCCATCCGCCCT
 AACTCCGCCAGTTCCGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTATTGCAAGAGGCCGAGGCCG
 CCTCTGCCCTGAGTATTCAGAAGTAGTGGAGGCTTTTGAGGCTTAGGCTTTGCAAAAAGCTCCCG
 GGAGCTTGATATCCATTGAGATCTGATCACGCGTGTGAAAGCCTGAACTCACCGGACGTGTCGA
 GAAGTTCTGATCGAAAGTTCGACAGCGTCTCGACCTGATGCAAGCTCTGGAGGGCGAAGAATCTGTC
 TCAGCTTCGATGTAAGGAGGGCTGGATATGTCCTGCGGTTAAATAGTCGCGGATGGTTCTACAAAGATCGT
 TATGTTTATCGGCACTTGCATCGGCCGCTCCGATTCGGAAGTGTGACATTGGGAATTAGCAGGAGAG
 CCTGACCTATTGCACTCCGCCGTGACAGGGTGTGACAGGCTGCAAGACTGCCCTGAAACCGAATGCCGCTG
 TTCTGCAAGCCGGTGCAGGAGGCCATGGATGCACTGCTGCCGATCTAGCCAGACGAGCGGGTTCGCCA
 TICGGACCGCAAGGAATCGGCAATACACTAGCGTGTGATTGCAATGCGCGATGGCTGAACTCCCATGIGTA
 TCACTGGCAACTGTGATGGACGACCCGTCACTGGCTCGCGCAGGGCTCTCGATGAGCTGTTGGG
 CCGAGGACTGCCCCGAAGTCCGGCACCTGTCAGCGGGATTGCGCTCCAAATGCTGACGGACATGGC
 CGCATAACAGCGGTCAITGACTGGAGGGAGGCTGTTGGGGATTCCAAATAGGAGTCGCCAACATCTTCT
 CTGGAGGCCGTGGTGGCTGTATGGAGCAGCACGCGTACTTCGAGCGAGGCATCCGGAGTCAGGAG
 CGCCGCGGCCCGTGGCTGATATGTCCTGCGGTTAACTATCAGAGCTGGTGAACGGCAATTTC
 GATGATGCAAGCTTGGGCCAGGGTCGATGCAAGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGACTGTCGGCGTACACA
 AATCGCCCGAGAAGCCGGCTGGACGATGGCTGTGAGAAGTACTGCCGATAGTGGAAACCGACGCC
 CCAGCACTCGTCCAGGGCAAGGAATAGCACGCTGAGGATTCGATCCACCGCCGCTTCTATGAAAGG
 TTGGGCTTCCAATCGTTTCCGGGAGCAGCGCTGGATGATCCTCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTT
 CGCCCAACCCAACTGTTTCCGGGAGCAGCGCTGGATGATCCTCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTT
 AACGATTTTCACTGCACTGATTGTTGCTTCTGAAACTCATGTCATAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAT
 TCGACCTCTAGCTAGGCTTGGCGTAATCATGTCATAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAT
 TCCACACAACATACGAGCCGAAGCATAAAAGTGTAAAGCCTGGGTCGTAATGAGTGAAGCTAACATTAA
 TTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGCGCAGTCGATTAATGAATCGGCCAACGC
 CGGGGAGAGGGCGTTGCGTATGGCGCTCTCCGCTCGCTACTGACTCGCTCGCCTCGGTGTTG
 GCTCGCCGAGCGGTATCAGCTACTCAAAGGCCGTAATCGGTTATCAGCGGGATAACGCAGGAA
 AGAACATGTGAGCAGGAAAGGCCGAGGAAACCGTAAAGGCCGAGGTTGCTGGCTTTCCATAGG
 CTCCGCCCCCTGACGACATCACAAAATGAGCCTCAAGTCAGGGTGGGAAACCCGACAGGACTATAAAG
 ATACCAAGCGTTTCCCTGGAGCCTCGTCTCCGCTCTCCGCTTCTCAATGTCACGCTGTAGGTATCTAGG
 CGCCCTTCTCCCTGGAGCCTCGTCTCCGCTTCTCAATGTCACGCTGTAGGTATCTAGGTTCTCGCTG
 GTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTCAGCAACCCCCGTTAGCCCAGCGCTGCCCTATCCGTAACTATCG
 TCTGAGTCCAACCGGTAAGACACGACTTATGCCACTGGCAGCAGGACTGGTAACAGGATTACAGAGCGA
 GGTATGAGGCGGTGTCAGAGTTGTAAGTGTGGCTAACTAGCCTACACTAGAAGGACAGTATTGGT
 ATCTGCGCTGCTGAAGCCAGTTACCTTGGGAAAGAGTTGAGTCTGATCCGGAAACAAACCCACCGC
 TGGTAGCGGGTTTTTGTGCAAGCAGCAGGATACCGCAGGAAAGGAGATCTCAAGAAGATCTTGA
 TCTTCTACGGGGCTGAGCCTGAGGGAAACACTCACGGTTAAGGGATTGGTATGAGATTATCAAAA
 AGGATCTCACCTAGATCTTTAAATTAAAGTGTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTTG
 GTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCAGCGATCTGCTATTGCTCATCCATAGTTG
 CCTGACTCCCCGCTGTGAGATAACTACGATAACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCAGTGTGCAATGATACCG
 CGAGACCCACGCTACCGCTCCAGGTTACGCAATAAACAGCCAGCGGAAGGGCCAGCGCAGAAGTGG
 TCTGCAACTTATCCGCTCCATCCAGTCTTAATTGTCGCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTT
 ATAGTTGCGCAAGTGTGCTACAGGGCATCGTGGTGTACCCCTCGTGTGTTGGTATGGCTTCATT
 AGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGGCAGTTACGATCCCCATGTTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCCTCGG
 TCTCGATCGTGTGAGATAAGTGTGCGCAGGTTACGATGTTGAGTATGCGCTTATGGCAGCAGTCAATTCTC
 TTAAGTGTGAGTCAACGAGTCAACTGAGTCAACGAGTCAATTCTGAGAATAGTGT
 ATGCGCGACCGAGTTGCTCTGGCCGCTCAATACGGGATAATAACCCGCGCACATAGCAGAACTTAAAGT
 GCTCATCTGGAAAAGCTTCTCGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTGAGATCCAGTTGATGT
 AACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTCAGCATCTTACTTACCTTACCCAGCGTTCTGGGTGAGCAAAACAGGA
 AGGAAAATGCCGAAAAAGGGAATAAGGGCAGACCGGAAATGTTGAATACTCATACTCTCCCTTCAATA
 TTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCATGAGCGGATAACATATTGAATGTTAGAAAATAACAAA
 TAGGGGTTCCCGCACATTCCCGAAAAGTGCACCTGACGTC

【0182】

これらの構築物によって、哺乳類細胞（例えば、組換え抗体発現に一般的に使用されているCHO細胞などを含むがこれらには限定されない哺乳類細胞）に形質転換して、ソルターゼAタグ、6×Hisタグ、My cタグ、およびstrep IIタグがIgHおよびIgL鎖の両鎖のC末端に付加された抗ヒトCD19特異的ヒト化抗体hB12を発現させることができる。

【0183】

実施例2：C末端にSsp Gyrb 11スプリットインテインのN-インテインドメインと、さらにC末端に6×Hisおよびstrep IIアフィニティ精製用タグを含む

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体に関する発現ベクターのクローニング

【0184】

黄色ブドウ球菌ソルターゼAタグ化IgG1重鎖および軽鎖の発現カセットおよびベクターと同様に、前述した抗ヒトCD19抗体のものと同じ要素を使って有資格CRO（例えばジーンスクリプト（www.genscript.com、ピスカタウェイ、ニュージャージー、米国））がその遺伝子の遺伝子合成を行うために、IgH鎖およびIgL鎖のいずれかのC末端にSsp Gyrb 11スプリットインティエンのN-インティエンドメインを融合させたコード領域を以下のように設計することができる。

【0185】

150個のアミノ酸から構成されているSsp Gyrb 11スプリットインティエンのN-インティエンドメインの配列は、アップルビーらによる発表（2009）で見られ、また、その配列は以下の通りである。

【0186】

配列番号15（Ssp Gyrb 11スプリットインティエンのN-インティエンドメイン）：

CFSGDTLVALTDGRSVSFEQLVVEEKQGKQNFCYTIHDGSIGVEKIINARKTKTNAKVIKVTLDNGESIICTP
DHKFMLRDGSYKCAMDLTLDDSLMPLHRKISTTEDSGHMEAVLNLYNHRIVNIEAVSETIDVYDIEVPHTHNFAL
AS

【0187】

哺乳類のコドン使用頻度を使ってこのアミノ酸配列を逆翻訳すると得られるSsp Gyrb 11スプリットインティエンのN-インティエンドメインのコード配列は以下の通りである。

【0188】

配列番号16（Ssp Gyrb 11スプリットインティエンのN-インティエンドメインのコード配列）：

TGCTTCAGCGGCAGACCCCTGGTGGCCCTGACCGACGGCAGAAGCGTGAGCTCGAGCAGCTGGTGGAGGAGGA
GAAGCAGGGCAAGCAGAACTTCTGCTACACCATCAGACACGACGGCAGCATCGGCAGAGCATCTGCACCCCC
CCAGAAAGACCAAGACCAACGCCAAGGTGATCAAGGTGACCCCTGGACAACGGCAGAGCATCATCTGCACCCCC
GACCACAAGTTCATGCTGAGAGACGGCAGCTACAAGTGCAGCATGGACCTGACCCCTGGACAGCAGCTGATGCC
CCTGCACAGAAAGATCAGCACCACCGAGGACAGCGGCCACATGGAGGCCGTGCTGAACATACAACCACAGAACATCG
TGAACATCGAGGCCGTGAGCGAGACCATCGACGTGTACGACATCGAGGTGCCACACCCACAACCTCGCCCTG
GCCAGC

20

30

【0189】

この配列情報をもとに、下記配列17に開示する、Ssp Gyrb 11スプリットインティエンのN-インティエンドメイン、続いて6xHisタグおよびstrepIIタグを含んでいるC末端伸張を有する抗ヒトCD19抗体hB12の完全長IgG1重鎖コード領域を設計できる：

40

50

ATGAATTGGACTGAGGCTGATTTCTGGTGTGACCCCTGAAAGGCCTCCAGTGTCAAGGTTCAAGCTGCAAGA
 GTCTGGCCCTGGGTGGTTAACGCCCTCCAGACCCCTCAGTCTGACTGTACTGTGTCTGGGGGTCAATCAGCA
 CTTCTGGTATGGGTGAGGCTGGATTAGGCAGCACCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGATTGGACACATTGGTGG
 GATGATGACAAGAGATATAACCCAGCCCTGAAAGAGCAGAGTGACAATCTCTGTGGATACCTCCAAGAACAGTT
 TAGCCTCAAGCTGTCAGTGTGACAGCTGAGATACTGCTGTACTACTGTGCTAGAATGGAACCTTGGTCTC
 ACTATTGACTACTGGGCCAAGGCACCCCTTGTACAGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCATCTGTCTTC
 CCCCTGGCACCCCTCCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCTGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
 TGAACCTGTGACAGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCAGCGTGCACACCTCCCGCTGTCTACAGT
 CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
 AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTGTGACAAAACACAC
 ATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACA
 CCCTCATGATCTCCCGAACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAG
 TTCAACTGGTACGGTACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
 GTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCT
 CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACACCACAGGTG
 TACACCCCTGCCCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCGAGTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTCTA
 TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGC
 TGGACTCCGACGGCTCCTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC
 TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGTCTGCACAAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCTGGGTAA
 ATGCTTCAGCGGCACACCCCTGGTGGCCCTGACCGACGGCAGAAGCGTGAACGCTGGGAGGAGAACATCAAC
 AGAAGCAGGGCAAGCAGAACTCTGCTACACCATCAGACACGACGGCAGCAGTCAGCCTGAGCAGCTGGTGGAGGAGG
 GCCAGAAAGACCAAGACCAACGCCAAGGTGATCAAGGTGACCCCTGGACAACGGCAGAGCATCATCTGCACCC
 CGACCACAAGTTATGCTGAGAGACGGCAGCTACAAGTGCGCCATGGACCTGACCTGGACGACAGCCTGATGC
 CCCTGCACAGAAAGATCAGCACCACCGAGGACAGCGGCCACATGGAGGCCGTGCTGAACACTACAACCACAGAAC
 GTGAACATCGAGGCCGTGAGCGAGACCATCGACGTGACATCGAGGTGCCCCACACCCACAACCTCGCCCT
 GGCCAGCCACCATCACCACCATGGCTGGAGCCACCCAGTTGAGAAGTAG

10

20

30

【 0 1 9 0 】

これは、配列番号 18 のアミノ酸配列に翻訳される (N - インティンドメインのアミノ酸を下線で、 6 × His タグおよび strep II タグを影で示す) :

MNFGLRLIFLVTLKGVQCQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGSISTSGMGVGWIROHPGKLEWIGHIWW
 DDDKRYNPALKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAADTAVYYCARMELWSYYFDYWGQGTIVTVSSASTKGPSVF
 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKCFSGDTLVALTDGRSVSFEQLVEEEKQGKQNFCTIRHDGSIGVEKIIN
 ARKTKTNAKVIKVTLDNGESIICTPDHKFLRDGSYKCAMDILTLLDDSLMPLHRKISTEDSGHMEAVLNYNHRI
 VNIEAVSETIDVYDIEVPTHNFALASPHHHHHGKQNFCTIRHDGSIGVEKIIN •

30

【 0 1 9 1 】

同様に、下記配列 19 に開示する、 Ssp GyrB 11 スプリットインテインの N - インティンドメイン、続いて 6 × His タグおよび strep II タグを含んでいる C 末端伸張を有する抗ヒト CD19 抗体 hBu12 の完全長 IgG1 カッパ軽鎖コード領域を設計できる :

40

50

ATGAATTGGACTGAGGCTGATTTCTGGCTGACCTGAAAGGCCAGTGTGACATTGTGCTGACCCA
ATCTCCAGCTCTGGCTGTGCTCAGGGCAGAGGCCACCATCTCTGCAAGGCCAGCAAAGTGTGATT
TTGATGGTGTAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAAGGACAGCCACCCAAAGTCCTCATCTATGTC
TCCAATCTAGAATCTGGATCCCAGCAGGTTAGTGGCAGTGGCTGGACAGACTTCACCCCAACATCCA
TCCTGIGGAGGAGGAGGATGTCACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGTGGACGTCGGTGGAG
GCACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGACCATCTGCTTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTG
AAATCTGAACTGCCTCTGTTGTGCTGTAATAACCTTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGTAACTCCCAGGAGGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC
TCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTGCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTCTCAGGGCGACACCCCTGGTGGCCCTGAC
CGACGGCAGAAGCGTGAGCTCGAGCAGCTGGTGGAGGAGGAGAAGCAGGGCAAGCAGAACTCTGCTACACCA
TCAGACACGACGGCAGCATCGCGTGGAGAAGATCATCAACGCCAGAAAGACCAAGACCAACGCCAAGGTGATC
AAGGTGACCCCTGGACAACGGCGAGAGCATCATCTGCACCCCCGACCACAAGTTATGCTGAGAGACGGCAGCTA
CAAGTGCGCCATGGACCTGACCTGGACGACAGCCTGATGCCCTGCACAGAAAGATCAGCACCACCGAGGACA
GCGGCCACATGGAGGCCGTGTAACATACAACCAAGAATCGTAACATCGAGGCCGTGAGCAGAACATCGAC
GTGTACGACATCGAGGTGCCCCACACCCACAACCTCGCCCTGGCCAGCCACCATCACCACCATGGCTGGAG
CCACCCCCAGTCGAGAAGTAG

10

【 0 1 9 2 】

これは、配列番号 20 のアミノ酸配列に翻訳される (N-インテインドメインのアミノ酸を下線で、6 × His タグおよび strep II タグを影で示す) :

MNFGRLIRIFLVLTKGVQCDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVFDGDSYMNWYQQKPGQPPKVLIYAA
SNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEDAATYYCQGSNEDPWTFFGGTKLEIKRTVAAPSFIGPPSDEQL
KSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEFCSGDTLVALTDGRSVSFEQLVEEKKQGKQNFCYTIRHDGSIGVEKIINARKTKTNAKVI
KVTLNDNGESIICTPDHFKMLRDGSYKCAMDITLDDSLMPLHRKISTTEDSGHMEAVLNYNHRIVNIIEAVSETID
VYDIEVPHTHNFALASIGHIIHICWQHCPPEE*.

20

【 0 1 9 3 】

その後、配列番号 17 および 19 のそれぞれで開示した抗ヒト C D 19 特異的抗体の N-インテインで修飾した重鎖および軽鎖のコード領域を、標準的な哺乳類の発現ベクター、例えば p C D N A 3 . 1 - h y g r o (+) (インビトロジエン) に当該分野で知られている分子生物学的手法によってクローニングできるように、近くに制限酵素部位 (例えば Hind III および Not I) を含める形で合成することができる。

30

[0 1 9 4]

N-インテインタグ化 hB12 抗ヒトCD19 抗体、pCDNA3.1-hygro (+)-IgH鎖発現ベクターの完全なDNA配列は以下のようになる。

〔 0 1 9 5 〕

配列番号 21 (C 末端に S s p G y r B S 1 1 スプリットインテインの N - インティ
ンドメイン、次いで $6 \times$ His タグ、 s t r e p I I タグ (下線部) 、および Hind I
I I と Not I クローニング部位 (影付部分) を含む h B U 1 2 のヒト Ig G 1 V_H - C
H 重鎖コード領域) :

40

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAC
CAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTTGGAGGTGCGTGAAGTAGTGCAGCAGCAAAATTAAAGCTACAACAAGGCA
AGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAACTGCTTAGGGTTAGGCGTTTGCCTCGCGATGTACGGGCCA
GATATACCGGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAAAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCATAGGCCA
TATATGGAGTTCCCGTGTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCCGCCCAATT
GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATT
TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGAC

50

GGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAAGTACATGACCTTATGGGACTTCTACTTGGCACTACATCTACGT
 ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTATGCCTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTCAC
 GGGGAAITCCAAGTCTCCACCCCATTGACCTCAATGGGAGTTGGCACCCTAAATCAACGGGACTTCCA
 AAATGTCGTAAACAACCTCCGGGATTGACGCAATGGCGGTAGGGCGTGTACGGTGGGAGGTATATAAGCAG
 AGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAACTACGACTCACTATAGGGAGACCC
 AAGCTGGTAGCCTTAACTTGGCATGAATTGGACTGAGGCTGATTTCCTGGTGTGACCTGAA
 AGGCGTCCAGTGTCAAGTCTGGCTGGGTGGTTAAGCCCTCCAGACCCCTCAGTCTGA
 CTTGTACTGTCTGGGTTCACTCAGCACTCTGGTATGGGTAGGGCTGGATTAGGCAGCACCCAGGGAAAG
 GGTCTGGAGGTGGATTGGACACATTGGGGATGATGACAAGAGATAAACCAGCCTGAAGAGCAGAGTGAC
 ATATCTCTGGTGTGACCTCAAGAACAGTTAGCCTCAAGCTGTCAAGTGTGACAGACTGCTGTCT
 ACTACTGTGCTAGAATGAACTTGGTCTACTATTGACTACTGGGCAAGGCACCCCTGTCACAGTCTCC
 TCAGCTAGCACCAAGGGCCATCTGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCCAAGGACACCTCTGGGGCACAGCTGC
 CCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCTGAACCTGTGACAGTGTCTGGAAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG
 GCGTCACACCTTCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCCTCAGCACCGTGGTACCCGTGCCCCTCC
 AGCAGCTTGGGCAACCCAGACCTACATCTGAAACGTAACTCACAAAGCCCAAGGACACCAAGGGTGGACAAGAAAGT
 TGAGCCCAATCTTGTGACAACAAACTCACACATGCCAACCGTGGCCACCTGAACACTCCTGGGGGACCGTCAG
 TCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTCAACATGGTGGTGTGAC
 GACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGACATAATGCCAACAC
 AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGC
 TGAATGCCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
 GCCAAAGGGCAGCCGAAACACAGGTTACACCTCTGGGGATGAGCTGACCAAGAACCGAGT
 CAGCCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTATCTGCAACCGGACATCGCCGTGGAGGAGGACATGGGAGCCGG
 AGAACAACTACAAGAACCCGCTCCGTGACTCCGACGCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG
 GACAAGAGCAGGTGGCACGGGAACGTCTCATGCTCGTGTGACATGAGGCTCTGCACCAACCAACTACAC
 ACAGAAGAGCCTCTCCCTGCTCCGGTAAATGCTTCAGCGGCACACCCCTGGGGCCCTGACCGACGGCAGAA
 GCGTGAGCTCGAGCAGCTGGTGGAGGAGAAGCAGGGCAAGCAGAAACTCTGCTACACCATCAGACACGAC
 GGCAGCATGGCGTGGAGAGATCATACACCCAGAAAGACCAAGGCCAAGGTGATCAAAGGTGACCC
 GGACACGGCAGAGCATCATGCAACCCCGACCACAAGTCTGCTGAGGAGACGGCAGCTAACAGTGCGCCA
 TGGACCTGACCTGGACGACGGCTGATGGCTGCAAGAGATCAGCACCCAGGGAGGACAGCGGCCACATG
 GAGGCCGCTGCTGACTACAACACAGAATGTAACATCGAACATCGGGCGTGGAGGACCATCGACGTGTACGACAT
 CGAGGTGCCACACCCACAACTCGCCCTGGCAGCCACCATCACCATGAGCTGGAGGCCACCCAGT
 TCGAGAAGTAGCTGAGCTAGAGGGCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTGACTGTGCTCTTAG
 TTGCCAGCCATCTGTTGCTTGGCCCTCCCCGTGCTTCTGACCCCTGAGGTGCCACTCCACTGCTCTT
 CTAATAAAATGAGGAAATGCACTGCAATTGCTGAGTAGGTGCTATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAG
 GACAGCAAGGGGGAGGATGGGAAGACAATAGCAGGATCTGGGGATGCGGTGGCTATGGCTCTGAGGC
 GGAAAAGAACCACTGGGGCTAGGGGTATGGGCTAACCTGGCGCTGTAGCGCGCATTAAAGCGGGGGGGTGTGG
 TGGTTACGCCAGCGTGTGGCCCTAACCTGGCCCTAGCGCCGCTCCCTCGCTTCTCCCTTCT
 CTCGCCACGTGCGCCGTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGCATCCCTTGGGTTCCGATTAGTGTCTT
 ACGGCACCTCGACCCCAAAACTGATTAGGGTGTGGGTTACGTAGTGGGCACTGCCCTGATAGACGGTT
 TTGCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTGTTCAAAACTGAAACAACACTCAACCT
 ATCTCGTCTATTCTTGTATTAAAGGATTGGGATTCGGCTATTGGTAAAAAAATGAGCTGATTTA
 AAAAAAAATTAACCGAATTAACTGTGGAATGTGTCTAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCCAGGCTCCCCCAGG
 CAGGCAAGAGTATGCAAGCATGCTCAATTACTCAGCAACCCAGGTGGAAAGTCCCCCAGGCTCCCCCAGCA
 GGCAGAAAGTATGCAAGCATGCTCAATTACTCAGCAACCCAGGTGGAAAGTCCCCCAGGCTCCCCCAGCA
 CCTAACTCCGCCAGTCCCCCATTCTCCGGGATGGCTGACTAAATTCTTATGCAAGAGGCCAGG
 CCGCCTCTGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTGAGGCTTAGGTTTGCAAAAGCTC
 CCGGGAGCTTGATATCCATTGGAATCTGATCAGCACGTGATGAAAAGCTGAACCTACCCGACGCTGT
 CGAGAATTCTGATCGAAAGATTCGACACGGTCTCGACCTGATGCGACTCTGGAGGGCGAAGAATCTCGT
 CTTGCGCTCGATGAGGGCGTGGGATATGCTCTGGGTAATAGTGTGCTGGGCTCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTT
 CGTTATGTTATCGGCACTTGCATCGCCGCGCTCCCGATCTGGGAGGTCTGACATTGGGAAATTGCGA
 GAGGCTGACCTATTGCACTCCCGCGTGTGACAGGGTGTACGTGCAAGACCTGCTGAAACCGAACCTGCG
 CTGTTCTGCGACCGGTCGGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCATCTAGCCAGACGAGCGGGTTGGC
 CCATTGCGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCTGATTCTCATATGCGCAGTGTGATCCCCATGT
 GTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCGTCAGTGTGCTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTT
 GGGCGAGGACTGCCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTTCGGCTCCACAAATGTCGACGGACAAT
 GGCGCATAAACAGCGGTCAATTGACTGGAGCGAGGCATGTTGGGATTCTCCAAATACGAGGTCGCCAACATCTT
 CTTCTGGAGGGCTGGTGGCTTGTATGGACGAGCAGCACGCGTACTCGAGCGGGAGTCGGAGCTTGCAG
 GATCGCGCGGCTCCGGGTATATGCTCCCATTGGCTTGTGACCAACTCTACAGAGCTGGTGTGACGGCAAT
 TTCGATGATGCGACTGGCGCAGGGTGTGACGCGACGCAATGTCGATCCGATCGGAGCCGGACTGTCGGGCTAC
 ACAAAATCGCCCGCAGAAGCGGGCTGGGAGGATGGCTGTGAGAAGTACTGCCGATAGTGGAAACCGAC
 GCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGCACGTGACTGAGATTGATCTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTT
 AGGTTGGCTCGGAATCGTTTCCGGACGCCGGCTGGATGATCTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTT

10

20

30

40

50

CTTCGCCAACCCAACTGTTATTGCAGCTATAATGGTTACAAATAAGCAATAGCATCACAAATTCAAA
 ATAAAGCATTTCACTGCATTCTAGTGTGGTTGTCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATA
 CCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTGGCGTAATCATGGCATAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC
 AATTCCACACAAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACAT
 TAATTGCGTTGCGCTACTGCCGTTTCACTGCGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCAATTAAATGAATCGGCCAA
 CGCGCGGGGAGAGGCGGTTGCGTATTGGCGCTCTCCGCTTCCGCTACTGACTCGCTGCCGCTCGGTGCGT
 TCGGCTGCCGAGCGGTATCAGCTACTCAAAGGCGGTAAACCGTTATCCACAGAATCAGGGATAACGAG
 GAAAGAACATGTGAGCAGAACAGGAGCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAACGCCGTTGCTGGCTTTCCAT
 AGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAAAATGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGACAGGACTATA
 AAGATACCAGCGTTCCCCCTGGAAGCCTCCCTGCGCTCTCTCAATGTCACGCTGTAGGTATCTCAGGTTGAG
 TGTCCGCCCTTCTCCCTCGGAAAGCGTGGCGTTTCAATGTCACGCTGTAGGTATCTCAGGTTGAG
 GTCGTTGCTCCAAGCTGGCTGTGCAAGCACCCCCCGTCAAGCCGACCGCTGCGCCTATCCGTAAC
 TCGCTTGAGTCAACCCGTAAGACACGACTTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAG
 CGAGGTATGTTAGGCGGTGCTACAGAGTTGAGTGGCTAAGTGGCTACACTAGAAGGACAGTATT
 GGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCAGTTACCTCGGAAAAGAGTTGAGTGGCTTGTGATCCGGCAAACAAACCAC
 CGCTGGTAGCGGTGGTTTTGCAAGCAGATTACGCGCAGAAAAAGGATCTAAGAAGATCCTT
 TGATCTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAATCACGTTAAGGGATTGGTATGAGATTATCA
 AAAAGGATCTCACCTAGATCCTTAAATTAAATGAAGTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAAC
 TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCAGCGATCTGCTATTGTCATCCATAG
 TTGCGCTGACTCCCCGTCGTGAGATAACTACGATAACGGGAGGGCTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATA
 CCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACAGCCAGCGGAAGGGCGAGCGCAGAAG
 TGGCCTGCAACTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCGCAG
 TTAATAGTTGCGCAACGTTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTGTGGTATGGCTTCA
 TTCAGCTCCGTTCCAACGATCAAGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGCAAAAAGCGGTAGCTCCTT
 CGGTCCTCCGATCGTGTCAAGAAGTAAGTGGCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATT
 CTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTAGACTCAACCAAGTCATTGAGAATAG
 TGTATGCGCGACCGAGTTGCTTGTGCGCTCAATACGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAA
 AGTGCTCATATTGAAAACGTTCTCGGGCGAAAATCTCAAGGATCTTACCGCTGTGAGATCCAGTTGCA
 TGTAACCCACTCGTGCACCCAACGATCTCAGCATTTTACCTTACCCAGCGTTCTGGTGAGCAAAACA
 GGAAGGCAAATGCCGAAAAAAGGAATAAGGGGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTCCCTTTCA
 ATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCATGAGCGGATACATATTGAATGATTAGAAAATAAC
 AAATAGGGTTCCCGCACATTCCCCGAAAAGTGCACACTGACGTC

【0196】

Ssp Gy r B S11 N - インテインドメインタグ化 h B U 12 抗ヒト C D 19 抗
 30 体、p C D N A 3 . 1 - h y g r o (+) - I g L 鎖発現ベクターの完全な D N A 配列は
 以下の通りである。

【0197】

配列番号 22 (C 末端に Ssp Gy r B S11 N - インテインドメイン、6 × H i
 s タグおよび s t r e p I I タグ (下線部) 、および H i n d I I I と N o t I クローニ
 40 ング部位 (影付部分) を含む h B U 12 のヒト I g G 1 V L - C L カッパ軽鎖コード領域
) :

GACGGATCGGGAGATCTCCGATCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAC
 CAGTATCTGCTCCCTGTTGTGTTGGAGGTGCGTGGAGTGTAGTAGTGCAGCAGAAAATTAAAGCTACAACAAGGCA
 AGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAAATCTGCTTAGGGTTAGGCCTTGTGCTGCTCGCGATGTACGGGCCA
 GATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAAATGTAATCAATTACGGGTCATTAGTCTAGGCCA
 TATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCGCTGGCTGACCGCCAAAGCACCCCCGCCATT
 GACGTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATT
 TACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGAC
 GGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGT
 ATTAGTCATCGTATTACCATGGTGTGCGGTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTCAC
 GGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTTGGCACCAGAACACGGGACTTCCA
 AAATGTCGTAACAACCCGCCCCATTGACGCAAATGGCGGTAGGCCTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG
 AGCTCTGGCTAAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAAACGACTCACTATAGGGAGACCC
 AAGCTGGCTAGCGTTAAACTTACGCTTACATGAATTGGACTGAGGCTGATTCTGGTGTGACCCCTGAA
AGGCCTCCAGTGTGACATTGTGCTGACCAATCTCCAGCTTGGCTGTCTAGGGCAGAGGGCCACCA

10

20

30

40

50

10

20

30

40

ACGAAAACACGTTAAGGGATTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTCACCTAGATCCTTTAAATTAA
 AAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTTGGCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGA
 GGCACCTATCTCAGCGATCTGCTATTGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTAGATAACTACGA
 TACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCATGCAATGATAACCGCAGACCCACGCTACCGGCTCCAGATT
 TCAGCAATAAACCAGCCAGCCAGGGCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTATCCGCCTCCATCCAGTC
 TATTAATTGTTGCCGGAGCTAGAGTAGTAACTGCTCAGTTAATAGTTGCACACGTTGCTTGCATTGCTA
 CAGGCATCGTGGTGTACGCTCGCTGGTATGGCTCATTCAGCTCCGGTCCAAACGATCAAGGCGAGTT
 ACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTCGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGC
 CGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCGTAAGATGCTTT
 CTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTTGCCTGGCG
 TCAATACGGGATAATAACGCGCCACATAGCAGAACTTAAAGTGCTCATATTGAAAACGTTCTCGGGCG
 AAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTCACCCAACTGATCTCAG
 CATCTTTACTTCAACCAGCCTGTTGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAAAAGGGAAATAAGG
 GCGACACGGAAATGTGAATACTCATACTCTCCTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGCT
 CATGAGCGGATAACATATTGAATGTATTAGAAAAATAACAAATAGGGTTCCGCGCACATTCCCCGAAAAG
 TGCCACCTGACGTC

【0198】

配列番号21および22で開示しているp c D N A 3 . 1 - h y g r o (+)を基礎とするこれらの発現ベクターによって、哺乳類細胞（例えば、組換え抗体発現に一般的に使用されているC H O 細胞などを含むがこれらには限定されない哺乳類細胞）に形質転換して、N - インテインドメイン、続いて6 × H i s タグおよびs t r e p I I タグがI g H およびI g L鎖の両鎖のC末端に付加された抗ヒトC D 1 9特異的ヒト化抗体h B U 1 2 を発現させることができる。

【0199】

実施例3：黄色ブドウ球菌に由来する組換えソルターゼA酵素のクローニングおよび発現

【0200】

黄色ブドウ球菌由来のソルターゼAのO R Fはジェンバンクで公開されており、登録番号A F 1 6 2 6 8 7 . 1に見ることができる。記録リードに含まれている配列を配列番号23に示す（黄色ブドウ球菌に由来するソルターゼAのアミノ酸配列）：

MKKWTNRLMTIAGVVLIILVAAYLFAKPHIDNYLHDKDKEKIEQYDKNVKEQASKDKQQAKPQIPKDKSKVAG
 YIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNRGVSFEEENESLDDQNISIAGHTFIDRPNYQFTNLKAACKGSMVYFKVGN
 ETRKYKMTSIRDVKPTDVGVLDEQKGKDKQLTLITCDDYNEKTGVWEKRKIFVATEVK

10

20

30

【0201】

このジェンバンクの登録番号に対応するヌクレオチド配列を配列番号24に示す：

ATGAAAAAATGGACAAATCGATTAAATGACAATCGCTGGTGTGGTACTTATCCTAGGGCAGCATAATTGTTGC
 TAAACACATATCGATAATTATCTCAGATAAAAGATAAAAGATGAAAAGATTGAACAATATGATAAAAATGTAA
 AAGAACAGGCGAGTAAGATAAAAGCAGCAAGCTAACCTCAAATTCCGAAAGATAATCGAAAGTGGCAGGC
 TATATTGAAATTCCAGATGCTGATAATTAAAGAACAGTATATCCAGGACCAGCAACACCTGAACAATTAAATAG
 AGGTGTAAGCTTGCAGAAGAAAATGAATCACTAGATGATCAAATATTCAATTGCAAGGACACACTTCATTG
 ACCGTCGAACTATCAATTACAAATCTAAAGCAGCAAAAAGGTAGTATGGTGTACTTAAAGTTGGTAAT
 GAAACACGTAAGTATAAAATGACAAGTATAAGAGATGTTAACGCTACAGATGTTAGGAGTTCTAGATGAACAAA
 AGGTAAAGATAAAACATTAAACATTACTTGTGATGATTACAATGAAAAGACAGGGCTTGGGAAAACGTA
 AAATCTTGTAGCTACAGAAGTCAAATAA

40

【0202】

組換えソルターゼAの、60～205番目のアミノ酸と6 × H i s タグを含んでいる酵素活性をもつ断片を大腸菌で発現させることに関する技術情報は、参照特許文献、国際公開第2007/108013号A2で開示されている。6 × H i s でタグ化した黄色ブドウ球菌ソルターゼAのコード領域（60～205番目のアミノ酸）を下記配列番号25に示す：

50

ATGCAAGCTAACCTCAAATTCCGAAAGATAATCGAAAGTGGCAGGCTATATTGAAATTCCAGATGCTGATAT
TAAAGAACAGTATATCCAGGACCAGCAACACCTGAACAATTAAATAGAGGTGTAAGCTTGCAGAAGAAAATG
AATCACTAGATGATCAAAATATTCAATTGCAAGGACACACTTCATTGACCGTCCGAACATCAATTACAAAT
CTTAAAGCAGCCAAAAAAGGTAGTATGGTGTACTTTAAAGTGTAAATGAAACACGTAAAGTATAAAATGACAAG
TATAAGAGATGTTAACGCTACAGATGTAGGAGTTCTAGATGAACAAAAAGTAAAGATAAACAAATTAAACATTAA
TTACTTGTGATGATTACAATGAAAAGACAGGCCTTGGGAAAACGTAAAATCTTGTAGCTACAGAAGTC
CACCACCATCACCACCATCAA

【0203】

これは配列番号26のアミノ酸配列に翻訳される：

MQAKPQIPKDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNRGVFAEENESLDDQNISIAGHTFIDRPNYQFTN
LKAAGKGSMDVYFKVGNETRKYKMTSIRDVKPTDVGVLDEQKGKDKQLTLITCDDYNEKTGVWEKRKIFVATEVK
HHHHHH.

10

【0204】

大腸菌BL21(DE3)株(ノバジェン)を形質転換して、当該分野で知られている標準的な方法に従って組換えソルターゼAを細菌内で生成するために用いることができるよう、配列番号25に示す黄色ブドウ球菌の6×Hisタグ化ソルターゼA断片のコード領域を、標準的な細菌性発現ベクター、例えばpET29(ノバジェン)など、にクローニングすることができる。簡単に説明すると、大腸菌BL21(DE3)をソルターゼAのpET29発現プラスミドで形質転換し、50μg/mLカナマイシンを含むLB培地中、37で、OD₆₀₀が0.5~0.8に達するまで培養することができる。その後、最終濃度が0.4mMになるようにIPTGを加え、3時間、30でタンパク質の発現を誘導することができる。次いで遠心することで細胞を回収し、溶解緩衝液(50mMのトリス、pH8.0、300mMのNaCl；1mMのMgCl₂、2単位/mLのDNase I(NEB)、260nMのアプロチニン、1.2μMのロイペプチド、および1mMのPMSF含有)に再懸濁することができる。その後、細胞を超音波処理で溶解し、清澄化した上清を、Ni-NTAアガロースを用い、製造業者の説明に従って精製することができる。

20

【0205】

SDS-PAGEで判定される純度が90%を上回る画分をその後固定し、トリス緩衝食塩水(25mMのトリス、pH7.5、150mMのNaCl)で透析することができ、次いで酵素濃度をA₂₈₀の測定値から、公開されている吸光係数17,420M⁻¹c⁻¹を使って算出することができる。前述したプロトコールを実施し、およそ20mgの純度が90%を上回る、黄色ブドウ球菌ソルターゼAの組換え酵素活性断片(約17kD)が生産された。SDS-PAGEおよびウェスタンプロットによる組換えタンパク質の解析結果を図7で開示する。

30

【0206】

実施例4：ソルターゼタグ化またはN-インティンタグ化組換え抗体のCHO細胞での発現と精製

【0207】

a) CHO細胞での発現：実施例2および3で開示した発現構築物由来の組換えIgG1抗体は、一過性の形質転換、例えば市販されているCHO発現系、例えばフリースタイル(FreeStyle)CHOの操作手順に従って行うインビトロジェンのフリースタイルCHOシステムを用いて発現させることができる。

40

【0208】

簡単に説明すると、形質転換のおよそ1日前に、フリースタイルCHO培地を用い、CHO細胞を1ml当たり5~6×10⁶個の密度で振とう培養用フラスコに播種し、湿室インキュベーター中、37、7.5%CO₂雰囲気下で、120rpmの振とう培養器上でそれらを増殖させる。翌日、細胞の密度が1.2~1.5×10⁶/mlに達したら、細胞を形質転換することができる。次に、細胞を1×10⁶個/mlまで希釈する必要がある

50

。 そのような細胞懸濁液 30 ml をその後、 125 ml の振とう培養用のフラスコに加える必要があり、 そして IgH および IgL 発現プラスミドの 1:1 混合物 (DNA 40 μ g) を 600 μ l の OptiPro SF 培地 (インビトロジェン) に加える。同時に、 600 μ l の OptiPro SF 培地に 40 μ l のフリースタイル MAX 形質転換試薬を加える必要があり、 両方の試薬をそっと混合し、 室温で 10 分間インキュベートして、 DNA - 形質転換試薬複合体を形成させる必要がある。その後、 DNA - 形質転換試薬混合物を前記 125 ml の CHO 細胞培養に徐々に加えることができ、 そして形質転換された細胞を 37 、 7.5% CO2 雰囲気下の湿室インキュベーター中、 120 rpm の振とう培養器上で最大 6 日間生育させる。その後、 細胞培養上清を回収して、 当該分野で知られている適切な方法 (ELISA、 ルミネックスなど) で抗体発現の力価を解析することができる。

【0209】

b) プロテイン A の精製 : CHO 細胞上清からの、 組換え抗体のプロテイン A の精製は、 市販されているプロテイン A セファロースカラム (サーモフィッシュ、 Pierce) を用い、 製造業者の説明に従って行うことができる。

【0210】

簡単に説明すると、 清澄化した細胞培養上清を、 PBS で平衡化した適切な大きさおよび性能のプロテイン A カラムに負荷する。残留している培地を PBS で洗浄し、 最終的に、 結合した IgG を低 pH 緩衝液、 例えば 0.1M のクエン酸 - NaOH、 pH 3.0 で溶出することができる。溶出された IgG を直ちに 10 分の 1 量の 1M トリス / C1、 pH 7.4 で中和する。 IgG を含んでいる画分をまとめて、 4 で一晩、 PBS を用いて透析してもよい。

【0211】

当業者は実施例 4 で提供したプロトコールにより、 実施例 1 および 2 で開示した構築物から、 十分な量の精製した組換え抗体を生産することができる。

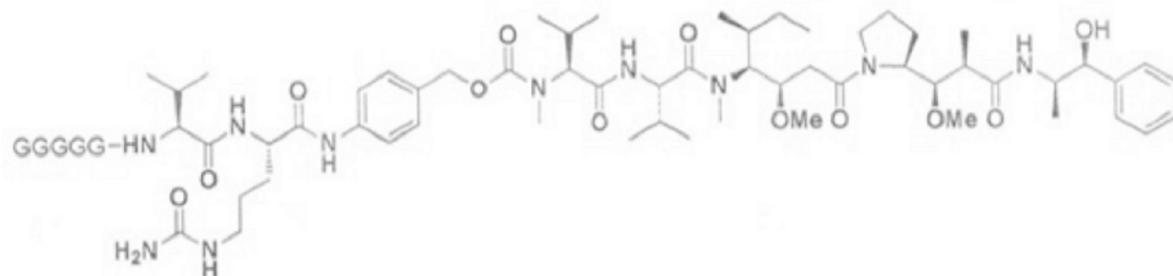
【0212】

実施例 5 : 毒素ペイロードが部位特異的に C 末端に結合したモノクローナル抗体のソルターゼ介在性およびスプリットインティン介在性ペプチド転移による生成

【0213】

下記式に示す、 5 アミノ酸のグリシンストレッチおよび 6 アミノ酸の SSPGyrB S11 スプリットインティン C - インティンペプチドが結合したモノメチルアリスタチン A 毒素を、 資格をもつ化学 CRO で特注することができる。

【化 1】



式 1 : v c P A B リンカーを含む 5 - グリシン修飾型 MMAE

M e = メチル (-CH₃) 基

G = グリシンアミノ酸残基

10

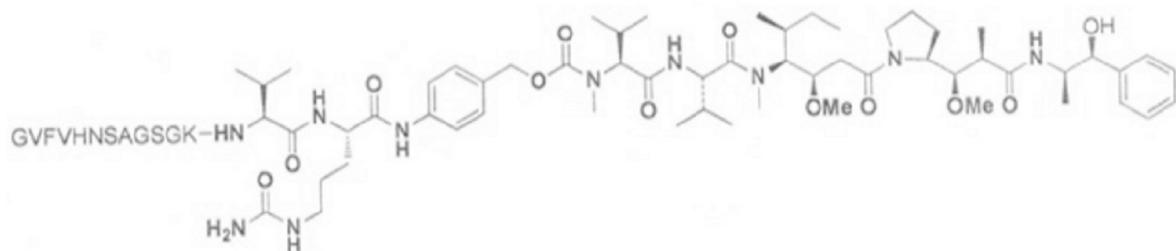
20

30

40

50

【化2】



式2：6個のアミノ酸から構成されているC-インテインドメインG V F V H Nと6個のアミノ酸から構成されているC-エクステインペプチドS A G S G Kで修飾されており、かつ、v c P A B リンカーを含むM M A E

M e = メチル(-CH₃)基

G V F V H N S A G S G K = グリシン - バリン - フェニルアラニン - バリン - ヒスチジン - アスパラギン - セリン - アラニン - グリシン - セリン - グリシン - リシン配列

【0214】

a) 毒素M M A EペイロードとL P E T GソルターゼAモチーフタグ化組換えI g G抗体との結合

【0215】

生理的なインキュベート用緩衝液、例えば、5 mMトリス/C1、15 mMのNaC1、6 mMのCaCl₂、pH 8.0などを使用し、適切な割合で混合したL P E T Gタグ化I g G 1抗体と式1で開示のグリシン修飾型M M A E毒素（例えば1対1の比、50 μM濃度）、および組換えソルターゼA（生産については実施例3で説明）（例えば5 μM濃度）を37～40で最低2時間インキュベートすることで、5グリシンアミノ酸修飾型M M A E毒素ペイロードをL P E T GソルターゼAタグ化I g G 1抗体（実施例1および4に従って生産可能）に結合させることができる。

【0216】

反応を停止した後に6×Hisタグおよび/またはstreptavidinタグがないことを、例えば抗Hisタグおよび/または抗streptavidinタグ抗体を使ったウェスタンプロット解析またはELISAで分析することにより、結合効率を監視することができる。

【0217】

完全に結合した産物を、反応が不完全に終わったI g G 1基質中にしか存在する可能性のない6×Hisタグまたはstreptavidinタグそれぞれと結合するNickel-NTAカラムまたはstreptactinカラムとの結合により濃縮することができる。最終的なI g G -ペイロード複合体を最後に、前述したプロテインA精製によって精製することができる。

【0218】

b) 毒素M M A EペイロードとS S p G y r B S 1 1 N - インテインタグ化組換えI g G抗体との結合

【0219】

生理的なインキュベート用緩衝液、例えば、20 mMトリス/C1、250 mMのNaC1、1 mMのEDTA、pH 8.5などを用い、適切な割合で混合したN-インテインタグ化I g G 1抗体と式2で開示したC-インテインアミノ酸修飾型M M A E毒素（例えば1:10または1:25の比、I g G抗体の濃度5 μMで）を室温または37で最低4時間インキュベートすることで、S S p G y r B S 1 1 C-インテインアミノ酸修飾型M M A E毒素ペイロードをN-インテインタグ化I g G 1抗体（実施例2および4によって生産可能）を結合させることができる。

【0220】

反応を停止した後に6×Hisタグおよび/またはstreptavidinタグがないことを、例えば抗Hisタグおよび/または抗streptavidinタグ抗体を使ったウェスタンプロット

10

20

30

40

50

ト解析またはELISAで分析することにより、結合効率を監視することができる。

【0221】

完全に結合した産物を、反応が不完全に終わったIgG1基質中にしか存在する可能性のない $6 \times$ HisタグまたはstrepIIタグそれぞれと結合するNickel-NTAカラムまたはstrep tactinカラムとの結合により濃縮することができる。最終的なIgG-ペイロード複合体を最後に、前述したプロテインA精製によって精製することができる。

【0222】

まとめると、これまでに開示してきた実施例1～5によって、当業者は、本発明のソルターゼA介在性またはスプリットインテイン介在性ペプチド転移のいずれかを利用した、毒素ペイロードの部位特異的なC末端への酵素学的な結合を実践することができる。

10

【0223】

実施例6：重鎖または軽鎖いずれかのC末端にGS（グリシン-セリン）リンカー、LPETGソルターゼモチーフおよびさらなる $6 \times$ HisおよびstrepIIアフィニティ精製用タグを含むトラスツズマブの生産

【0224】

タグ化されていない（配列番号31～34）またはC末端をGS（グリシン-セリン）リンカー、LPETGソルターゼタグ、 $6 \times$ Hisタグ、およびstrepIIタグでタグ化した（配列番号35～38）のトラスツズマブ（Tras）重鎖および軽鎖のモノクローナル抗体をコードしている抗体発現構築物を、本質的には実施例1で説明したのと同様に生成した。これらの発現構築物を用い、Tras-HC-GS-LHSおよびTras-LC-GS-LHS（HC=重鎖、LC=軽鎖、GS=グリシン-セリン、LHS=LPETGタグ+ $6 \times$ Hisタグ+strepIIタグ）を対応する発現構築物を同時に形質転換することで、CHO細胞内で生産した。Tras-HC-GS-LHSは、修飾されていない軽鎖（配列番号35～36）と、C末端がGS（グリシン-セリン）リンカー、LPETGソルターゼモチーフ、 $6 \times$ His-タグ、およびstrepIIで修飾されている重鎖（配列番号33～34）を含むトラスツズマブ変異体である。Tras-LC-GS-LHSは、修飾されていない重鎖（配列番号31～32）と、C末端がGSリンカー、LPETGソルターゼモチーフ、 $6 \times$ His-タグ、およびstrepIIで修飾されている軽鎖（配列番号37～38）を含むトラスツズマブ変異体である。CHO細胞の形質転換と、プロテインA-セファロースクロマトグラフィーによる抗体のアフィニティ精製は、実施例4で説明したのと本質的に同様に行った。

20

【0225】

実施例7：トラスツズマブの重鎖または軽鎖とGly修飾型DM1毒素のソルターゼA介在性結合

30

【0226】

Gly修飾型DM1毒素（コンコルティス（Concordis）、サンディエゴ、カリフォルニア、米国で製造、構造は図14aを参照のこと）と黄色ブドウ球菌由来で17kDの組換えソルターゼA断片（実施例3を参照のこと）とを含む結合反応を、下記表2に示すように、1×ソルターゼ緩衝液（25mMトリス-HCl、pH8.2；150mMのNaCl；7.5mMのCaCl₂）にそれぞれのモノクローナル抗体（mAb）（実施例6を参照のこと）10.5mgを溶解して行った。Tras-HC-GS-LHS結合反応は25度2時間、Tras-LC-GS-LHS結合反応は25度18時間インキュベートした。次いで各反応混合液をstrep-Tactin（登録商標）セファロースカラム（IBAライフサイエンス、ゲッティンゲン、ドイツ）に負荷した。これには、1mlのstrep-Tactinアガロースを自重を使ってフリットカラムに充填し、カラムの2倍量の平衡化緩衝液（100mMトリス-HCl、pH8.0；150mMのNaCl；1mMのEDTA）で平衡化した。各結合混合液を同じカラムに2度通し、自然落下させた（樹脂への滞留時間を長くするために）。複合体の収率が最大となるようにもう1倍量の平衡化緩衝液で樹脂を洗浄し、その後、回収したものを直ちにプロテ

40

50

インAカラムにかけた。これには、1mlのプロテインA HiTrapカラムを10倍量の平衡化緩衝液(25mM ナトリウムリン酸塩、pH 7.5)で平衡化した。その後、各結合反応液を平衡化したカラムにかけ、カラムをさらに5倍量の緩衝液で洗浄した。結合した複合体をカラムの5倍量の溶出用緩衝液(0.1Mのコハク酸、pH 2.8)で溶出し、カラムの1倍量に対応する画分を回収し(中和させるために25%(容積比)の1Mトリスベースを入れたチューブに回収)、そのタンパク質含量を解析した。タンパク質を含んでいる画分をたくわえ、G25カラムクロマトグラフィーによって調整した。これには、それぞれの製造規模に適した大きさのNAP 25カラムを使用して、複合体を長期保存用に調整した。カラムを平衡化し、負荷し、10mMのコハク酸ナトリウム、pH 5.0、100mg/mLのトレハロース、0.1%(%重量/容積比)のポリソルベート20(Kadcyla(登録商標)(T-DM1)用の調整用緩衝液、ロシュ/ジェネンテックより販売)を用い、製造業者の説明に従って溶出した。

【0227】

Tras-HC-GS-LHSおよびTras-LC-GS-LHS DM1-複合体の収量はそれぞれ、8.0mg(76.2%)および5.9mg(56.2%)であった。プロテインAとG25による精製過程で大きな過程損失が生じたが、これはおそらく、それぞれの次の工程または保存用に産物の最大濃度を確保するためにピークカット処を行ったためであると考えられる。

【表2】

反応の構成要素	HC	LC	最終濃度
Tras-HC-GS-LHS(5.3mg/ml)	1981 μ l	-	5 μ M
Tras-LC-GS-LHS(5.5mg/ml)	-	1911 μ l	5 μ M
H ₂ O	7775.25 μ l	7714 μ l	-
Gly ₅ -DM1(1mM)	1400 μ l	1400 μ l	100 μ M
ソルターゼA(0.85mg/ml=およそ50 μ M)	43.75 μ l	175 μ l	0.156/0.625 μ M
5×ソルターゼ緩衝液*	2800 μ l	2800 μ l	1×

表2. Tras-HC-GS-LHSおよびTras-LC-GS-LHSの結合条件。

【0228】

薬物負荷を疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)で評価した。クロマトグラフィーは、東ソーのブチル-NPR 4.6mm × 3.5cm、2.5 μ mカラムを使用し、移動相A(1.5Mの(NH₄)₂SO₄、25mMのNaPi、pH = 6.95 ± 0.05)と移動相B(75%、25mMのNaPi、pH = 6.95 ± 0.05、25%IPA)を用い、0.8mL/分の流速で12分間、直線的に勾配をかけて行った。HICのプロファイルによって、Tras-HC-GS-LHSおよびTras-LC-GS-LHSのいずれにも、検出可能な結合していないmAbが残留していないこと、および各mAbの主要画分に2つの薬物が負荷されたことが明らかになった(図8を参照のこと)。

【0229】

実施例8:ソルターゼA介在性トラスツズマブ-DM1複合体を用いたインピトロでの毒性アッセイ

【0230】

トラスツズマブ(Tras)HER-2/neuの同種抗原を過剰発現しているヒト乳癌細胞株であるSKBR3細胞と天然に低レベルのHER-2/neuを発現しており、細胞表面のHER-2/neuを欠損するように改変された乳癌細胞株であるT47D-

10

20

30

40

50

5 R 細胞（グラウス - ポルタラ（1995））を用い、DM1 - ソルターゼA - 複合体化Tras - HC - GS - LHS および DM1 - ソルターゼA - 複合体化Tras - LC - GS - LHS の細胞障害性を調査し、Kadcyla（登録商標）（ロシュ / ジェネンテック）と比較した。100 μl のDMEM に入れた細胞を96 ウェルプレートにプレーティングした（1 ウェル当たり細胞10,000 個）。1 日インキュベートした後、各ウェルから培地50 μl を注意深く除去し、代わりに、DMEM 完全培地で3.5 倍に段階希釈したそれぞれのADC を50 μl 加えた。最終的なADC 濃度は20 μg / ml ~ 0.25 ng / ml の範囲になった。それぞれの希釈物を2 つ組または3 つ組で準備した。さらに3日間、37 °C 、5% CO₂ 霧囲気の湿室インキュベーター中でインキュベートし、その後、プレートをインキュベーターから取り出して室温に戻した。およそ30 分後、それぞれのウェルに100 μl のCellTiter - Glo（登録商標）Luminescence Solution（プロメガ、カタログ番号G7570）を加えた。プレートを450 rpm で5 分間搅拌した後、10 分間、搅拌せずにインキュベートし、その後、Tecan Infinity F200 を用い、各ウェル当たりの積分時間を1秒として蛍光を測定した3種類のADC は全て、HER-2/neu を過剰発現しているSKBR3 乳癌細胞株にたいして高い細胞障害性を示したが、HER-2/neu 陰性のT47D - 5R 乳癌細胞株に対しては細胞障害性をもたなかった（図9 を参照のこと）。Her-2/neu 陽性乳癌細胞株SKBR3 のEC₅₀ 値は、Kadcyla（登録商標）、32.4 ng / ml ; DM1 複合体化Tras - HC - GS - LHS 、45.6 ng / ml ; Tras - LC - GS - LHS 、51.4 ng / ml であった。従って、インビトロの腫瘍細胞死滅実験においてみられた効力と同様の範囲である。対照的に、Her-2/neu 陰性の乳癌細胞株T47D - 5R では、どのような細胞障害性も検出されなかった。このことは、ソルターゼA の機能性等価物は、比較に同じ標的抗体と同じ毒素（DM1）を含めた場合には、酵素学的に結合したADC と、従来型の化学的に結合したADC とは対照的であることを示している（図9）。しかしながら、Tras - HC - GS - LHS およびTras - LC - GS - LHS ソルターゼA 複合体化ADC の抗体に対する薬物の比がおよそ1.80と（図8 のDAR1 とDAR2 のピークを統合することで推測される）、Kadcyla（登録商標）に関して報告されているおよそ3~4 のDAR よりも低い場合、インビトロ腫瘍細胞死滅アッセイでは、それに比例した細胞障害性の差が生じるわけではないようである（図9）。この予期していなかった発見は、あまり規定されていない、確率論的・化学的に複合体化しているKadcyla（登録商標）と比較して、毒素と抗体のより規定された部位特異的なソルターゼA 介在性結合の結果であろう。

【0231】

実施例9：抗体の重鎖および軽鎖のC末端とソルターゼA認識モチーフとの間に挿入されるペプチドスペーサーの長さを変えることによる、抗体重鎖および軽鎖、およびペイロードのソルターゼA 介在性結合の同期の最適化

【0232】

抗体の重鎖または軽鎖のC末端とLPETG ソルターゼA 認識モチーフとの間に配置されるペプチドスペーサーの長さの影響について調べた。この目的で、C末端に2個のアミノ酸から構成されているGS（グリシン - セリン）スペーサーを含んでいる配列または含んでいない配列で、さらにLPETG ソルターゼA 認識モチーフとstreptomyces精製用タグで修飾した、キメラCD30特異的mAb Ac10重鎖および軽鎖（HC配列は米国特許第2008213289号A1の配列番号1に、LC配列は米国特許第2008213289号A1の配列番号9に由来）をコードしている抗体重鎖および軽鎖の発現構築物を、本質的に、実施例1に開示した説明に従ってクローニングした（配列番号39~46）。これらの発現構築物を使い、対応するプラスミドを同時に形質転換することで、mAb であるAc10 - HC - GS - LHS / LC - GS - LHS およびAc10 - HC - LS / LC - LS をCHO細胞内で生産した。Ac10 - HC - GS - LHS / LC - GS - LHS は、重鎖および軽鎖それぞれのHC およびLC のC末端がGSペプチドスペーサー、LPETG ソルターゼA モチーフ、6×Hisタグおよびstreptomycesタグ

10

20

30

40

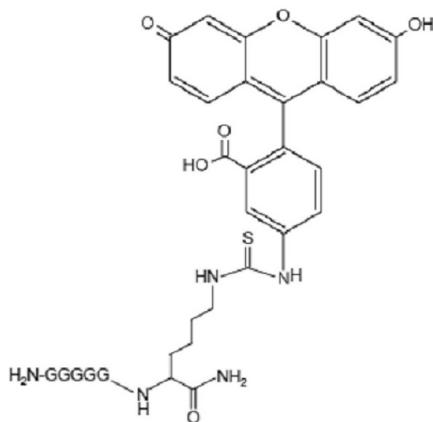
50

で修飾されている A c 1 0 変異体である（配列番号 3 9 ~ 4 2 ; 表 3）。A c 1 0 - H C - L S / L C - L S は、重鎖および軽鎖の C 末端が L P E T G ソルターゼモチーフと s t r e p - I I タグで修飾されているが、2 つのペプチドから構成される G S リンカーは含まない A c 1 0 変異体である（配列番号 4 3 ~ 4 6 ; 表 3）。C H O 細胞の形質転換と、プロテイン A - セファロースクロマトグラフィーによる抗体のアフィニティ精製は、実施例 4 で説明したのと本質的に同様に行つた。

【 0 2 3 3 】

結合の効率を調べるために、ペンタ - グリシン修飾型 F I T C (G l y 5 - F I T C 、下記式 3 参照) の結合に段階希釈したソルターゼ A を用いた。

【 化 3 】



10

20

式 3 : ペンタ - グリシン修飾型 F I T C (G l y 5 - F I T C)

G = グリシン残基

【 0 2 3 4 】

このため、ソルターゼ A を使って、G l y 5 - F I T C を 2 種類の A c 1 0 変異体に結合させた。緩衝液としては表 4 に示すように、1 × ソルターゼ緩衝液（2 5 m M のトリス - H C l 、p H 8 . 2 ； 1 5 0 m M の N a C l ； 7 . 5 m M の C a C l 2 ）を使用した。4 2 に 4 時間置いた後、変性還元 S D S - P A G E ゲル電気泳動によって反応産物を解析し、ゲルを U V 箱の上に置いて F I T C を可視化した（図 1 0 ）。重鎖の C 末端と L P E T G ソルターゼ認識モチーフとの間の G S リンカーの有無にかかわらず、重鎖への結合効率が高いことが分かった。予想外なことに、ソルターゼ A 介在性の軽鎖への結合は、ソルターゼ A 介在性の重鎖への結合と比較して、効率が有意に低かった。さらに驚くことに、抗体軽鎖の C 末端と L P E T G ソルターゼ A 認識モチーフとの間に配置された 2 つのペプチドから構成される G S (グリシン - セリン) スペーサーの有無によって、結合効率は劇的な影響を受けることが分かった。G S - リンカーがある場合、軽鎖への結合は重鎖への結合効率のおよそ 5 ~ 1 0 分の 1 低い効率で起こったが、リンカーがない場合にはその効率はおよそ 5 0 ~ 1 0 0 分の 1 であった。そのため、軽鎖と L P E T G ソルターゼ認識モチーフとの間にあるペプチドスペーサーの長さを伸ばすと結合効率がさらに改善されるだろうと結論付けた。

30

40

【 0 2 3 5 】

そこで次に、軽鎖と L P E T G ソルターゼ A 認識モチーフとの間のペプチドスペーサーの長さを伸ばすことが結合効率におよぼす影響について調べた。C 末端が、L P E T G ソルターゼ認識モチーフと s t r e p - I I 精製用タグ、そして 2 ~ 5 個のアミノ酸から構築されているリンカーでタグ化されている m A b である A c 1 0 の軽鎖をコードしている発現構築物（配列番号 4 7 ~ 5 4 ）を、実施例 1 に記載したのと本質的に同様に生成した。これらの発現構築物を使い、対応する発現構築物を同時に形質転換することで、m A b である A c 1 0 - H C - L S / L C - G S - L S 、 A c 1 0 - H C - L S / L C - G G S - L S 、 A c 1 0 - H C - L S / L C - G G G S - L S および A c 1 0 - H C - L S / L

50

C - G G G G S - L S を C H O 細胞内で生産した。これら各抗体の重鎖 C 末端は、L P E T G ソルターゼ認識モチーフと s t r e p - I I 精製用タグで修飾されている（配列番号 43 ~ 44；表 3）。軽鎖の C 末端は、L P E T G モチーフの上流に G S 、 G G S 、 G G G S 、または G G G G S ペプチドスペーサーのいずれかを含んでいる L P E T G ソルターゼタグおよび s t r e p - I I タグで修飾されている（配列番号 47 ~ 54；表 3）。C H O 細胞の形質転換と、プロテイン A - セファロースクロマトグラフィーによる抗体のアフィニティ精製は、実施例 4 で説明したのと本質的に同様に行つた。

【0236】

結合効率を調べるために、ソルターゼ A の段階希釈を使用して、ペント - グリシン修飾型 F I T C (G l y 5 - F I T C 、前記式 3 を参照のこと) を 4 種類の A c 1 0 m A b 変異体に結合させた。緩衝液としては、表 5 に示す 1 × ソルターゼ緩衝液 (2 5 m M トリス - H C l 、 p H 8 . 2 ； 1 5 0 m M の N a C l ； 7 . 5 m M の C a C l 2) を使用した。 10 42 に 4 時間置いた後、変性還元 S D S - P A G E ゲル電気泳動によって反応産物を解析し、ゲルを U V 箱の上に置いて F I T C を可視化した（図 11）。予想通り重鎖への結合効率は 4 種類全ての抗体変異体で等しかった。対照的に、軽鎖への結合はペプチドスペーサーの長さを伸ばすことで有意に改善された。特に、分析したペプチドスペーサーのなかで最も長いリンカー (G G G G S) を使用した場合、軽鎖との結合効率は重鎖の結合効率と同等であり、これにより、重鎖と軽鎖の両方が C 末端修飾されている抗体の重鎖と軽鎖の同期的な結合が可能になった。この抗体フォーマットによって、抗体 1 つ当たり 4 つの薬物が負荷された (D A R 4) 均一な A D C のソルターゼ介在性の生産が促進されるだろうと結論づけた。 20

【表 3】

抗体	重鎖の修飾	配列番号	軽鎖の修飾	配列番号
Ac10-HC-GS-LH S/LC-GS-LHS	GS-LPETG-G-HH HHHH-G-WHSPQF EK	39, 40	GS-LPETG-G-HH HHHH-G-WHSPQF EK	41, 42
Ac10-HC-LS/LC -LS	LPETG-G-WHSPQ FEK	43, 44	LPETG-G-WHSPQ FEK	45, 46
Ac10-HC-LS/LC -GS-LS	LPETG-G-WHSPQ FEK	43, 44	GS-LPETG-G-WS HPQFEK	47, 48
Ac10-HC-LS/LC -GGS-LS	LPETG-G-WHSPQ FEK	43, 44	GGS-LPETG-G-W SHPQFEK	49, 50
Ac10-HC-LS/LC -GGGS-LS	LPETG-G-WHSPQ FEK	43, 44	GGGS-LPETG-G- WHSPQFEK	51, 52
Ac10-HC-LS/LC -GGGGS-LS	LPETG-G-WHSPQ FEK	43, 44	GGGGS-LPETG-G- WHSPQFEK	53, 54

表 3. 生産した C 末端修飾型モノクローナル抗体 A c 1 0 変異体

10

20

30

40

50

【表4】

反応の構成要素	1~8	9~16	最終濃度
Ac10-HC-GS-LHS/LC-GS-LHS (3.75mg/ml=25 μM)	10	-	5 μM
Ac10-HC-LS/LC-LS (3.75mg/ml=25 μM)	-	10	5 μM
H ₂ O	20	20	-
Gly ₅ -FITC (1mM)	5	5	100 μM
ソルターゼA (2×段階希釀、およそ 50 μM)	5	5	5→0.039 μM
5×ソルターゼ緩衝液	10	10	1×

表4. mAbs Ac10-HC-GS-LHS/LC-GS-LHSおよびAc10-HC-LS/LC-LSの反応条件。

【表5】

反応の構成要素	1~7	8~14	15~21	22~28	最終濃度
Ac10-HC-LS/LC-GS-LS (3.75mg/ml=25 μM)	10	-	-	-	5 μM
Ac10-HC-LS/LC-GGS-LS (3.75mg/ml=25 μM)	-	10	-	-	5 μM
Ac10-HC-LS/LC-GGGGS-LS (3.75mg/ml=25 μM)	-	-	10	-	5 μM
Ac10-HC-LS/LC-GGGGS-LS (3.75mg/ml=25 μM)	-	-		10	5 μM
H ₂ O	20	20	20	20	-
Gly ₅ -FITC (1mM)	5	5	5	5	100 μM
ソルターゼA (2×段階希釀、およそ 25 μM)	5	5	5	5	2.5→0.039 μM
5×ソルターゼ緩衝液	10	10	10	10	1×

表5. mAbs Ac10-HC-LS/LC-GS-LS、Ac10-HC-LS/LC-GGS-LS、Ac10-HC-LS/LC-GGGGS-LSおよびAc10-HC-LS/LC-GGGGS-LSの結合条件。

【0237】

実施例10: strep IIタグを使ったアフィニティ精製による均一なADCの生成

【0238】

Gly₅-標識化vc-PAB-MMAE (実施例5の式1を参照のこと)と重鎖または軽鎖いずれかのC末端がLPETGソルターゼAモチーフおよびstrep IIアフィニティ精製用タグを含んでいる配列で修飾されている抗CD30抗体Ac10とのソルターゼA介在性結合を下記表6に示すように行った。

10

20

30

40

50

【表 6】

抗体	重鎖の修飾	配列番号	軽鎖の修飾	配列番号
Ac10-HC-LS Ac-10-LC	LPETG-G- WSHPQFEK	43、44	なし	29、30
Ac10-HC Ac10-LC-GS-LHS	なし	27、28	GS-LPETG-G- HHHHHH-G- WSHPQFEK	41、42

10

表 6. HC または LC のいずれかが修飾されている、C 末端修飾型抗体 Ac 10

【0239】

表 4 の Ac 10 重鎖または軽鎖の配列をコードしている発現ベクターを、実施例 1 で開示したのと本質的に同じように構築した。CHO 細胞の形質転換と、プロテイン A - セフアロースクロマトグラフィーによる抗体のアフィニティ精製は、実施例 4 で説明したのと本質的に同様に行った。

【0240】

重鎖または軽鎖がソルターゼモチーフでタグ化されている抗 CD30 抗体と Gly5 - 標識化 v c - PAB - MMAE (実施例 5 の式 1 を参照のこと) とのソルターゼ A 介在性結合を、本質的に実施例 7 で示したプロトコールに従って行った。

20

【0241】

本発明の詳細な説明の項で前述したように、反応しなかった抗体も C 末端に strep - II アフィニティ精製用タグを保持するので、これを、 DAR2 と完全に反応した ADC を濃縮するのに利用することができる。重鎖と v c - PAB - MMAE 毒素とのソルターゼ A 結合を疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) で解析したところ (図 12、パネル A) 、大部分のソルターゼ - モチーフ修飾型重鎖は結合したが、それでもなお、一定のパーセンテージの未反応基質 (DAR0 = 薬物対抗体比が 0) 、または反応が不完全な基質 (DAR1 = 薬物対抗体比が 1) が HIC で検出されることが示された (図 12、パネル A)。

30

【0242】

そのため、未処理または反応が不完全なソルターゼ A 修飾型抗体を除去するために、実施例 7 に記載したのと本質的に同じように、プロテイン A で精製した v c - PAB - MMAE 複合体を StrepTactin (登録商標) アフィニティカラム (IBA サイエンス、ゲッティンゲン、ドイツ) に 4 回通した。

30

【0243】

図 12 のパネル B では、不均一な v c - PAB - MMAE 抗体薬物複合体を複数回通すと、完全に反応した DAR2 ADC (DAR2 = 薬物対抗体比が 2) をうまく濃縮できたことを示している。この実験は、ソルターゼ A の LPETG 認識モチーフの C 末端にさらにアフィニティ精製用タグを使用し、規定の薬物対抗体比 (ここでは DAR2) を有する均一な ADC を生成することの実現可能性を示している。

40

【0244】

実施例 11 : 5 × グリシン修飾型メイタンシンおよびアルファ - アマニチン毒素の合成

【0245】

2 種類のペイロード、好ましくは毒素ペイロードを、重鎖および軽鎖の C 末端を異なるソルターゼモチーフで修飾した単一の抗体に結合させるためには 2 種類の毒素 (好ましくは、ペイロードで二重に複合体化された ADC が標的とする癌細胞が、 2 種類の異なる、相乗的になる可能性のある経路によって攻撃されるように、別の作用機序をもつ毒素) をグリシン残基で修飾することが必要である。この要求を満たす 2 種類のグリシン修飾型毒

50

素ペイロード（ここではメイタンシンとアルファ - アマニチン）の合成を実施し、本明細書に記載する。

【0246】

11.1グリシン修飾型アルファ - アマニチンの合成：

30 mg のアルファ - アマニチン（構造1）（シグマ・アルドリッヂ、注文番号 A 22 63）を 1 ml の無水 DMSO に溶解した。この溶液に 19 mg の NH - Boc - アミノ - ヘキシリルプロミドを、次いでカリウム tert - ブトキシド（1 M の THF 溶液、35 μ l）を加えた。反応混合液を室温で 6 時間攪拌し、さらにカリウム tert - ブトキシド（1 M の THF 溶液、20 μ l）を加えた。この反応物を 16 時間室温に維持した。酢酸（10 μ l）を加え、粗混合液を直接、RP - HPLC（サンファイヤー（Sunfire）C 18 5 μ 3 cm \times 10 cm カラム、50 mL / 分、5 ~ 50 % アセトニトリル / 水、15 分勾配）で精製した。所望の画分を回収し、凍結乾燥して構造2を白色粉末として得た（15 mg）。これを TFA / DCM 溶液（1 / 1、容積比、1 ml）により、室温で 30 分間処理した。揮発性物質を減圧下で除去し、構造3を黄みがかったゴムとして得た。これを精製せずに次の工程に用いた。

【0247】

Fmoc - Gly - OH（8 mg）を無水 DMF（0.5 ml）に溶解した。HATU（シグマ・アルドリッヂ、注文番号 445460）（6 mg）を、次いで DIEA（10 ml）（シグマ・アルドリッヂ、注文番号 496219）を加えた。この混合物を室温で 30 秒間そっと攪拌し、その後、DMF 中に溶解した化合物3の溶液（0.5 ml）に移した。30 分後の LC / MS 解析から、化合物3が完全に消費されたことが分かった。ピペリジン（30 μ l）を加え、反応の進行を LC / MS で監視した。1 時間後、酢酸（10 μ l）を加えて反応液を中和し、混合液を RP - HPLC（サンファイヤー C 18 5 μ 3 cm \times 25 cm カラム、50 mL / 分、2 ~ 40 % アセトニトリル / 水、30 分勾配）で精製した。画分を集め、凍結乾燥して構造5を白色粉末として得た（12 mg）。化合物5の分析データを図 13 のパネル A で示している。

10

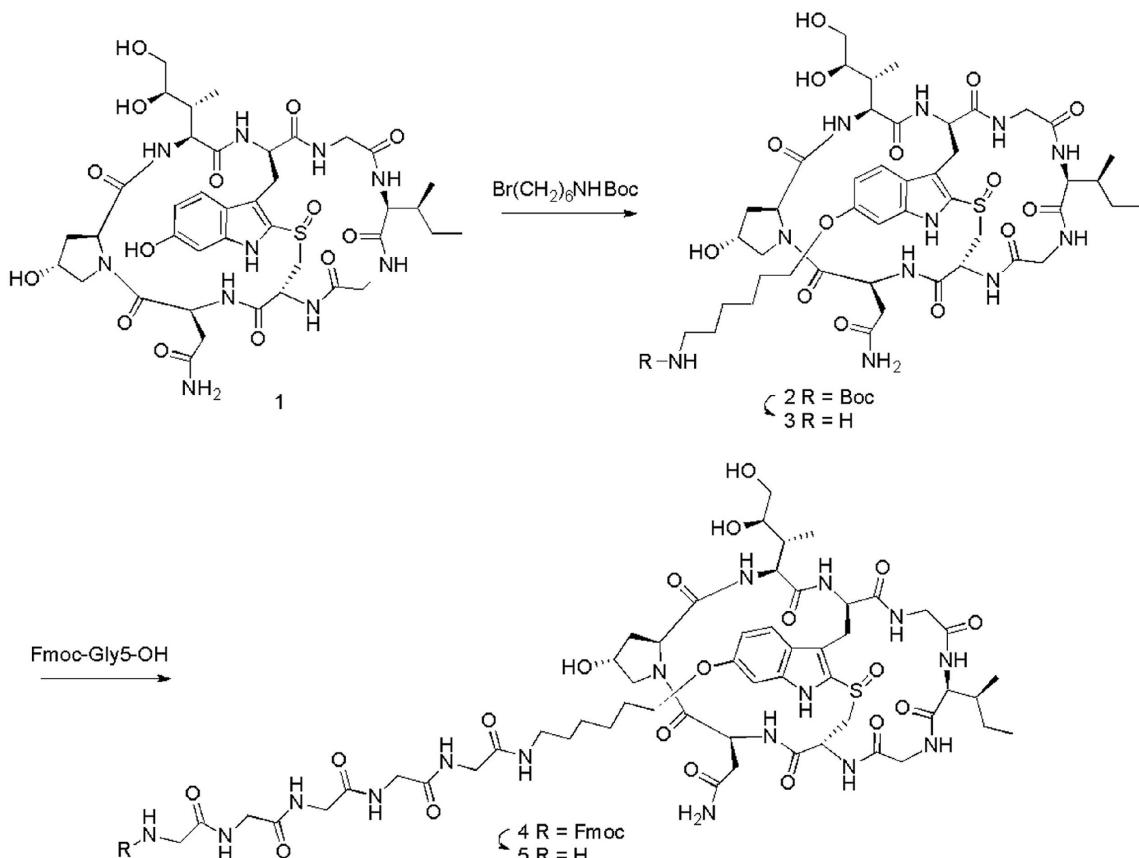
20

30

40

50

【化4】



模式図1：グリシン修飾型アルファーアマニチンの合成

【0248】

11.2. グリシン修飾型メイタンシンの合成：

メイタンシノール（0.6 g、1.1 mmol）（クリアシス研究所（Clears y nth Labs）、ムンバイ、インド）を無水THF（6 ml）と無水DMF（3 ml）に溶解し、その後、1.2 mlのDIEA（シグマ・アルドリッヂ、注文番号496219）を加えた。この溶液をアルゴン雰囲気下においてた。亜鉛トリフラート（1.2 g）とNMeAla NCA（0.7 g）を一度に加えた。この混合物を固体が溶解するまで超音波で処理した。反応混合物を室温で2日間攪拌し、その後、酢酸エチル（100 ml）で希釈した。これを飽和NaHCO₃（水溶液、2×50 ml）および塩水（50 ml）で洗浄した。有機相をMgSO₄で乾燥させ、濃縮して粗メイタンシノール3-（S）-アルファ-N-メチルアミノプロピオン酸（8）を得た。これを精製せずに直接次の工程に用いた。

【0249】

Fmoc-Gly5-OH（26 mg）を無水DMF（1 ml）に溶解した。HATU（シグマ・アルドリッヂ、注文番号445460）（19 mg）を、次いでDIEA（18 μL）を加えた。この混合物を室温で30秒間そっと攪拌し、その後、THF中に溶解した化合物8の溶液（1 ml）に移した。30分後のLC/MS解析から、化合物8が完全に消費されたことが分かった。ピペリジン（40 μL）を加え、反応の進行をLC/MSで監視した。2時間後、反応液にエーテル（40 ml）を加え、沈殿した固体を回収してエーテルで洗浄した。粗混合液をRP-HPLC（サンファイバー（Sunfire）C18 5 μ 3 cm×10 cmカラム、50 mL/分、10~60%アセトニトリル/水、20分勾配）で精製した。画分を集め、凍結乾燥して構造10を白色粉末として得た（33 mg）。化合物10の分析データを図13のパネルBで示している。

10

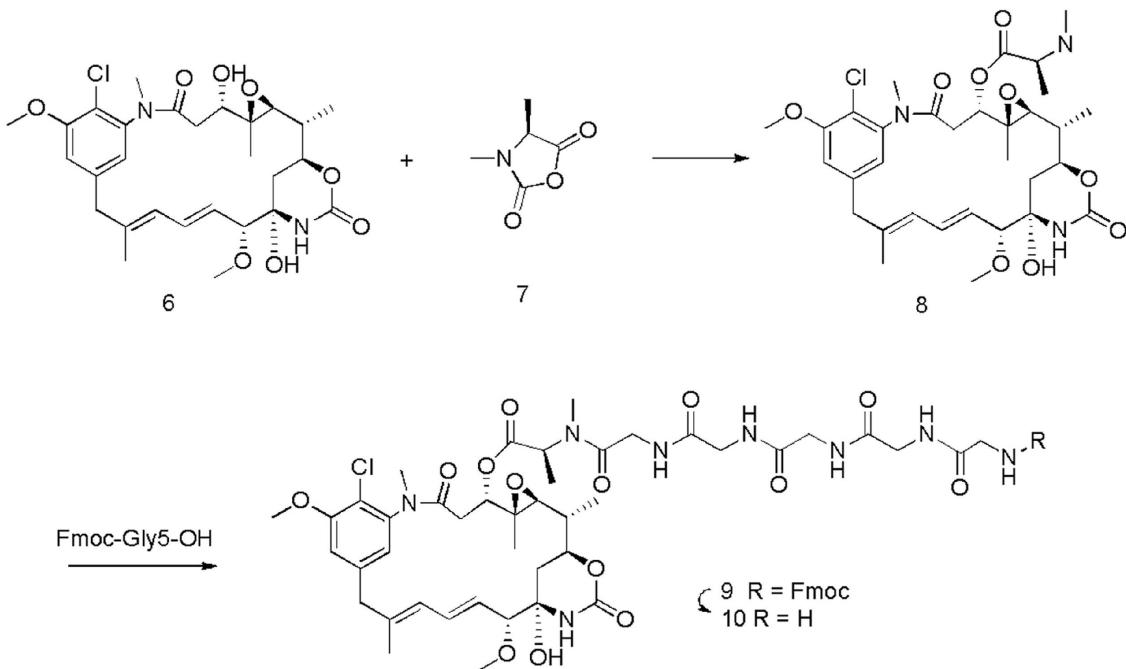
20

30

40

50

【化 5】



模式図 2 : グリシン修飾型メイタンシンの合成

【0250】

重要なことは、原理上は、5個のグリシン（本明細書で示している）、または1以上の任意の数のグリシン残基を毒素に付加すれば、どのような毒素もソルターゼ介在性酵素結合用に機能化することが可能だということである（図14を参照のこと）。

【0251】

実施例12：SKOV3卵巣癌異種移植片モデルにおけるソルターゼA複合体化トラスツズマブ-D M 1のインビボ腫瘍阻害

【0252】

200 μ lのPBS/マトリゲル（1:1の割合）に入れた 5×10^6 個のSKOV3腫瘍細胞を、5~6週齢のメスのNMR1ヌードマウスの左側腹皮下に移植した。原発性腫瘍容積を、ノギスを使った測定によって監視した。平均腫瘍容積が100~200 mm³に達した後に、腫瘍のある動物を腫瘍の大きさによって、3群に無作為化した（1群当たり10匹）。無作為化した当日（0日目）と21日目に、第1、2および3群の動物に、それぞれ、5 ml / kgのPBS、15 mg / kgのKadcyla（登録商標）または15 mg / kgのソルターゼA複合体化トラスツズマブ-D M 1を静脈内投与した。腫瘍容積を週に2回、ノギスで測定した（図15）。試験を39日後に終わらせ、動物は認可された動物実験のための指針に沿って安樂死させた。

【0253】

試験の経過中、見せかけのためにPBSを投与した対照動物の腫瘍は着実に、およそ600 mm³まで成長した。一方、Kadcyla（登録商標）で処理した動物の腫瘍は小さくなり、39日目には本質的に検出できなかった。ソルターゼ複合体化T-D M 1が示す薬物対抗体比はおよそ2で、報告されているKadcyla（登録商標）のDAR3.5より小さいという事実にもかかわらず、ソルターゼA複合体化トラスツズマブ-D M 1の抗腫瘍活性と市販されているKadcyla（登録商標）の活性との間に有意な差はなかった。実施例8のデータと合わせてこの結果は、同じ抗体と毒素部分を含むソルターゼ複合体化ADCは薬物抗体比が低いにもかかわらず、市販されている化学的に複合体化されているKadcyla（登録商標）と、インビトロでもインビボでも同等の腫瘍死滅活性をもつことを示している。

10

20

30

40

50

【0254】

実施例13：粗C H O細胞上清中でのソルターゼA介在性結合

【0255】

C末端がL P E T GソルターゼモチーフとS t r e p I I精製用タグ(配列番号055-056)でタグ化されている重鎖、およびC末端が5個のアミノ酸から構成されているG1y4-Serスペーサー(G G G G S)とL P E T Gソルターゼモチーフ、S t r e p I Iタグ(配列番号057~058)でタグ化されている軽鎖からなるトラスツズマブ変異体であるトラスツズマブ-H C - L S / L C - G G G G S - L Sを、実施例4に記載したのと本質的に同様に生産した。得られた血清を含まない粗細胞上清はおよそ157mg/Lのトラスツズマブ-H C - L S / L C - G G G G S - L Sを含んでいた。上清に直接ソルターゼ緩衝液、G1y5-FITCおよびソルターゼAの段階希釈液を加えることで、これを直接、本質的に実施例9に記載したのと同様に結合に用いた。並行して、プロテインAアフィニティクロマトグラフィーで精製したトラスツズマブ-H C - L S / L C - G G G G S - L Sも、それ以外は同じ条件で複合体化した。42に4時間置いた後、変性還元S D S - P A G Eゲル電気泳動で反応液を解析した。ゲルをUV箱の上に置いてFITCを可視化した後、タンパク質をクマシーブリリアントブルーで染色した(図16)。このデータは、粗細胞培養上清中での抗体のソルターゼA介在性結合が、精製した抗体の結合と同様に効率的であったという予想外な発見を示している。さらに、この結合反応は非常に特異的で、また、粗細胞上清中に存在したタンパク質性の汚染物質はどれも、非特異的に結合したものではなかった。合わせてこれらのデータは、ソルターゼ反応の安定性によって、薬物をC H O細胞内で生産した後、精製やその後の処理を行う前に、直接結合を行うことが可能になるため、ADCの製造を容易にする補助となり得ることを示唆している。

10

【0256】

本発明の態様を以下に示す。

[1]

免疫リガンド/ペイロード複合体の生産方法であって、配列特異的トランスペプチダーゼまたはその触媒ドメインを使って、ペイロードを免疫リガンドに結合させることを包含する、生産方法。

20

[2]

前記ペイロードおよび/または前記免疫リガンドが、

- a) 主にタンパク質またはペプチドからなる、
 - b) 少なくとも1つのタンパク質もしくはペプチドドメインを含む、または
 - c) 少なくとも1つのペプチド鎖を含む、
- のいずれかであって、

さらに、前記タンパク質またはペプチドもしくはドメインが前記配列特異的トランスペプチダーゼまたはその触媒ドメインによって検出可能なアミノ酸配列を含む、[1]に記載の方法。

30

[3]

前記免疫リガンド/ペイロード複合体に含まれる前記免疫リガンドが、抗体、修飾された抗体フォーマット、抗体誘導体または断片、および/または抗体模倣物からなる群より選択されるもののうちの少なくとも1つである、[1]または[2]の方法。

40

[4]

前記免疫リガンドが、

- ・受容体、
- ・抗原、
- ・成長因子、
- ・サイトカイン、および/または
- ・ホルモン、

からなる群より選択される実体のうちの少なくとも1つに結合する、[1]~[3]のい

50

すれか 1 項に記載の方法。

[5]

前記配列特異的トランスペプチダーゼの少なくとも 1 つの触媒ドメインが、前記免疫リガンドまたは前記ペイロードいずれかの N 末端もしくは C 末端に融合されている、[1] ~ [4] のいずれか 1 項に記載の方法。

[6]

前記配列特異的トランスペプチダーゼが、

・ソルターゼ酵素または 1 つ以上のその断片もしくは誘導体、
・スプリットインテインまたは 1 つ以上のその断片もしくは誘導体、
からなる群より選択されるもののうちの少なくとも 1 つである、[1] ~ [5] のいずれか 1 項に記載の方法。

[7]

前記免疫リガンド / ペイロード複合体に含まれる前記ペイロードが、

・マーカー、
・処理用タグ、および / または
・薬物、

からなる群より選択されるもののうちの少なくとも 1 つである、[1] ~ [6] のいずれか 1 項に記載の方法。

[8]

前記マーカーが、

・放射性標識、好ましくは放射性標識で標識したペプチドまたはタンパク質、
・蛍光標識、好ましくは蛍光ペプチドまたはタンパク質、および / または、
・酵素標識、好ましくはペルオキシダーゼ、

からなる群より選択されるもののうちの少なくとも 1 つである、[1] ~ [7] のいずれか 1 項に記載の方法。

[9]

前記薬物が、

・サイトカイン、
・放射性標識、
・抗炎症剤、
・毒素、および / または、
・化学療法剤、

からなる群より選択されるもののうちの少なくとも 1 つである、[1] ~ [8] のいずれか 1 項に記載の方法。

[10]

前記免疫リガンドが、それぞれがペイロードに結合している少なくとも 2 つのサブユニットを含む、[1] ~ [9] のいずれか 1 項に記載の方法。

[11]

少なくとも 2 つのサブユニットを有する前記免疫リガンドが、1 つ以上の細胞経路を干渉する 2 種類の異なるペイロード、好ましくは毒素ペイロードに結合している、[10] に記載の方法。

[12]

少なくとも 2 つのサブユニットを有する前記免疫リガンドが、結合部位 1 力所当たり少なくとも 80 % の効率で結合している、[10] または [11] に記載の方法。

[13]

少なくとも 2 つのサブユニットを有する前記免疫リガンドが、前記 2 つのサブユニットのうちの少なくとも一方の C 末端に付加されている少なくとも 2 個のアミノ酸、好ましくは 2 ~ 5 個のアミノ酸から構成されているペプチドスペーサー配列を含む、[10] ~ [12] のいずれか 1 項に記載の方法。

[14]

10

20

30

40

50

免疫リガンドとペイロードの間の関係を化学量論的に規定することができる、[1] ~ [13] のいずれか 1 項に記載の方法。

[15]

免疫リガンドとペイロードとの間の前記化学量論的に規定された関係が、部分的に反応した C 末端に修飾を有する免疫リガンド基質を除去することで達成される、[14] に記載の方法。

[16]

ペイロードを前記免疫リガンドに部位特異的に結合させることができる、[1] ~ [15] のいずれか 1 項に記載の方法。

[17]

[1] ~ [16] のいずれか 1 項に記載の方法によって得られた免疫リガンド / ペイロード複合体。

[18]

抗体 / 薬物複合体および / または抗体 / マーカー複合体からなる群より選択される、[17] の免疫リガンド / ペイロード複合体。

[19]

[1] ~ [18] のいずれか 1 項による免疫リガンド / ペイロード複合体の、

・所与の病態のインピトロまたはインピボでの診断

・所与の病態に関するインピトロまたはインピボでの予測または予後予測

・所与の病態に罹患しているまたは発症する危険性のあるヒトまたは動物対象の治療、および / または

・研究および / または開発目的、

における使用。

[20]

前記病態が、

・腫瘍性疾患

・自己免疫疾患

・神経変性疾患、および / または

・感染症、

からなる群より選択されるもののうちの少なくとも 1 つである、[19] に記載の方法。

[21]

G 1 y n 修飾で修飾された低分子量ペイロードであって、ここで n は 1 より大きく、好ましくは、n が 3 または n が 5 である、低分子量ペイロード。

[22]

前記ペイロードが、

・サイトカイン、

・放射性標識、

・毒素、および / または、

・化学療法剤、

からなる群より選択されるもののうちの少なくとも 1 つである、請求項 21 に記載の低分子量ペイロード。

[23]

[21] または [22] の低分子量ペイロードの、それを免疫リガンドに結合させるための使用。

[24]

前記免疫リガンド - ペイロード結合を粗細胞培養上清中で行う、[1] ~ [16] のいずれか 1 項に記載の方法。

参考文献

アントスラ (2009 a) 米国化学会誌 131、10800 ~ 10801 頁

アントスラ (2009 b) 米国生化学分子生物学会誌 (J. Biol. Chem.) 28

10

20

30

40

50

- 4、16028~16036
- アップルビーら(2009)JBC、284、6194~99
- アクスアップら(2012)米国アカデミー紀要、109、16102~16106
- エルシェ(2010)応用微生物および生物学(*Appl. Microbiol. Biotechnol.*)87、479~489
- グラウス・ポルタら(1995)分子細胞生物学(*Mol. Cell. Biol.*)15、1182ff頁
- ホファーら(2009)バイオケミストリー(*Biochemistry*)48、120 47~57
- ジュヌチュラら(2008)ネイチャー・バイオテクノロジー、26、925~932 10
- ランペール(2012)英国臨床薬理学雑誌(*British J. Clin. Pharm. acol.*)76、248~262
- レムケ(2011)分子生物の手法(*Methods Mol. Biol.*)751、3~15
- レバリーら(2011) *PLoS One* 6、e18342
- マーデイら(2012)生命工学および生体工学(*Biotechnol. Bioeng.*)109、1461~1470
- マオら(2004)米国化学会誌126、2670~2671
- マズマニアンら(1999)サイエンス285、760~763
- マクドナラ(2006)タンパク質の改変、設計および選抜(*Prot. Engin. Design Selection*)19、299~307 20
- ムルマンら(2011)ケムバイオケム(*ChemBioChem.*)12、1774~1780、
- マラード(2013)ネイチャーレビュー 創薬(*Nature Rev. Drug Discov.*)12、329~332
- バルサラシーら(2007)生物複合体化学(*Bioconjugate Chem.*)18、469~476
- パーラー(2002)核酸研究(*Nucleic Acids Res.*)30、383~384
- ソングら(2012) *PLoS One* 7、e45355
- シュピリーグら(2011)分子微生物学(*Molecular Microbiol.*)82、1044~1059 30
- サンら(2004)米国生化学分子生物学会誌 279、35281~35286
- スウィーら(2013)米国アカデミー紀要、110、1428~1433
- トン・タットら(1999)米国アカデミー紀要、96、12424~12429
- ツキジ(2009)ケムバイオケム、10、787~798
- フォルクマンら(2009) *PLoS One* 4、e8381
- ショウら(1993)セル、75、1371~1377

【図1】

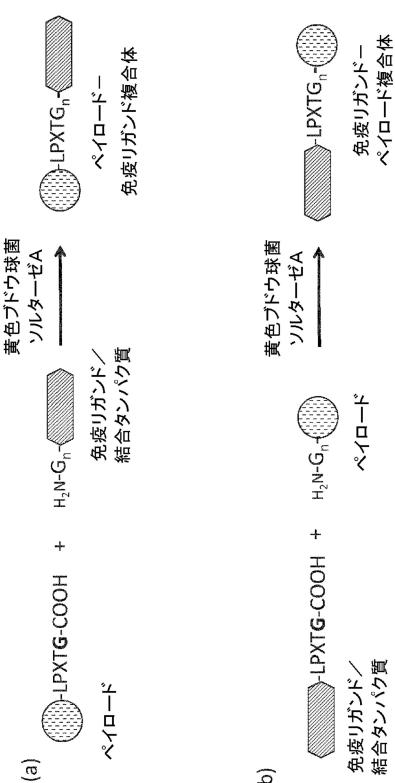


図1

【図3】

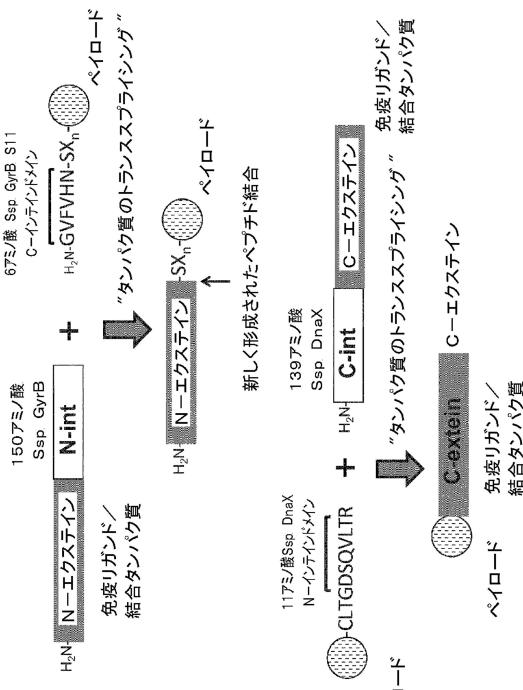


図3

【図2】

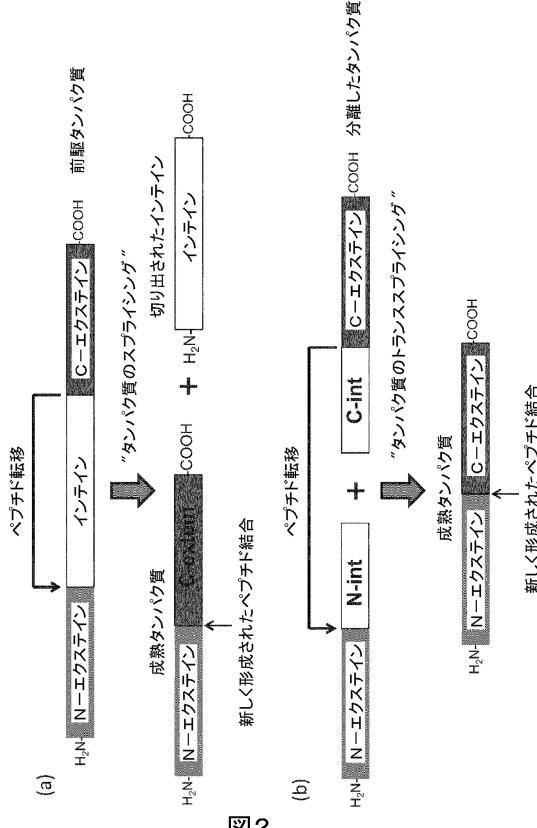


図2

【図4 (a)】

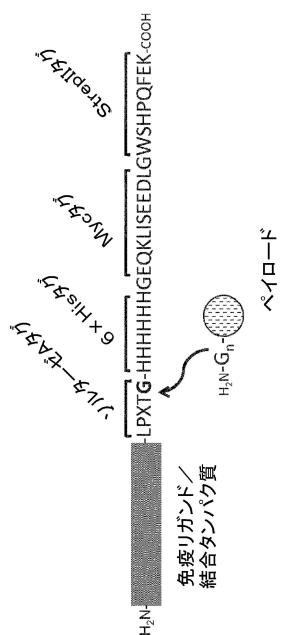
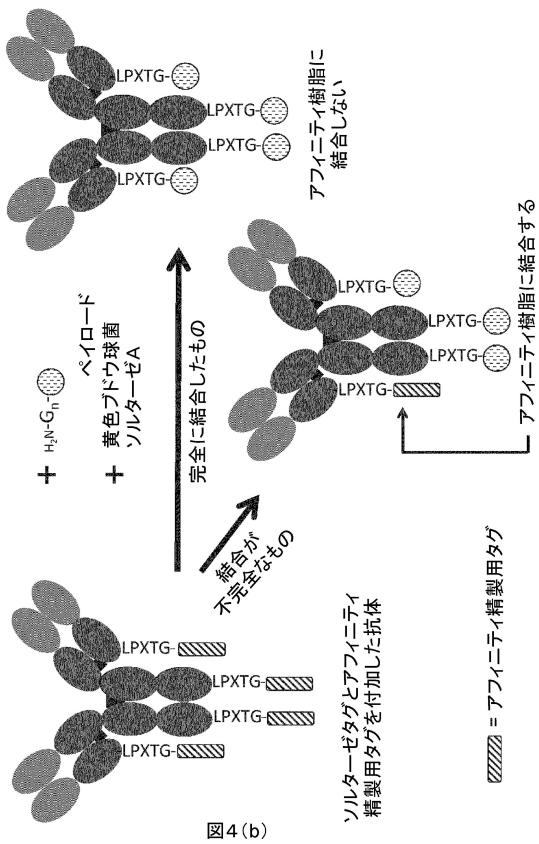
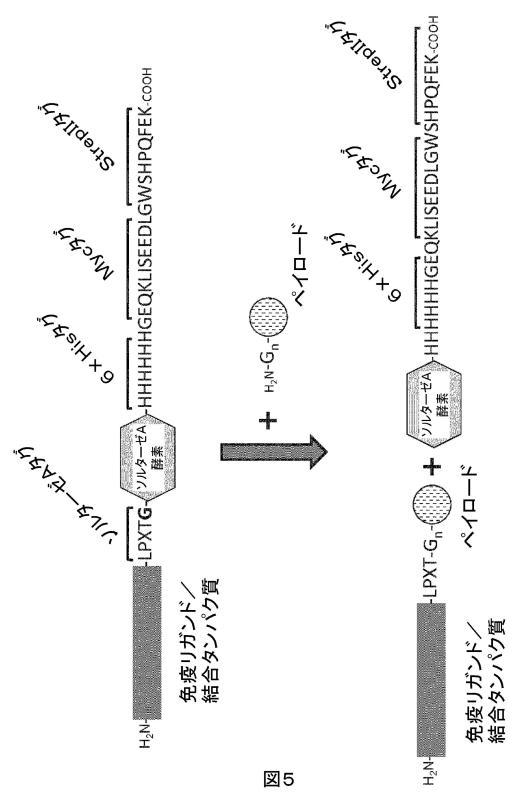


図4(a)

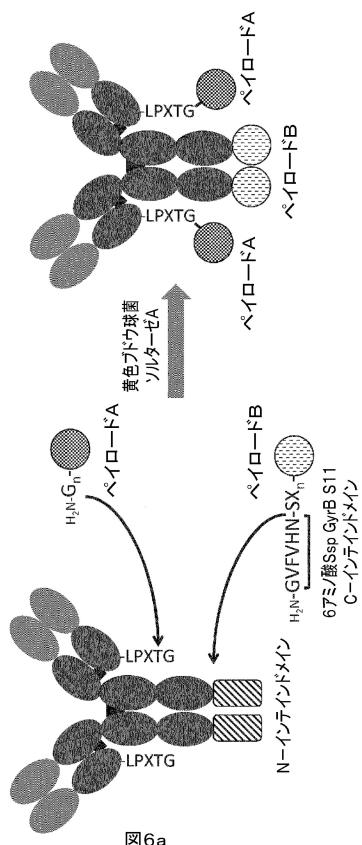
【図4 (b)】



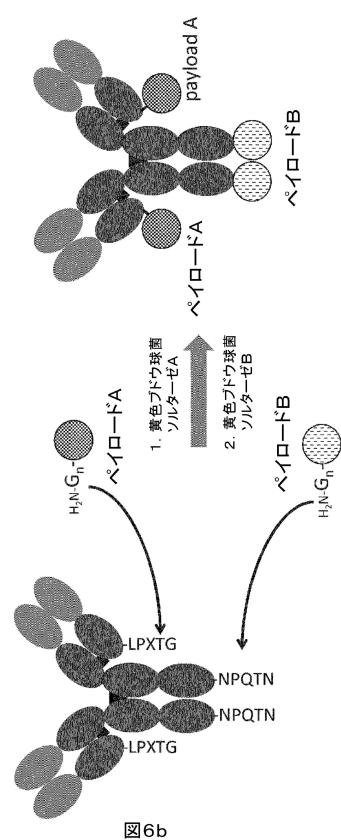
【図5】



【図6 a】



【図6 b】



【図7】

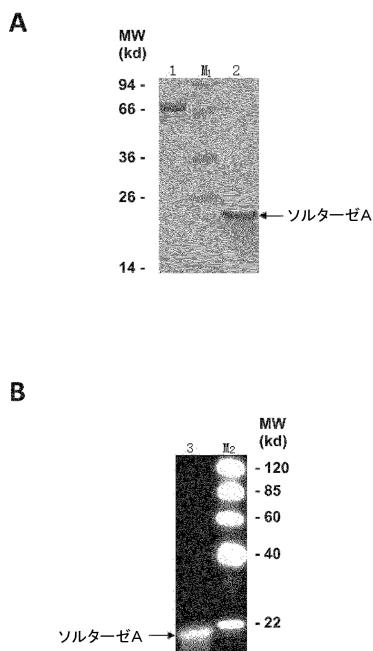


図7

【図8】

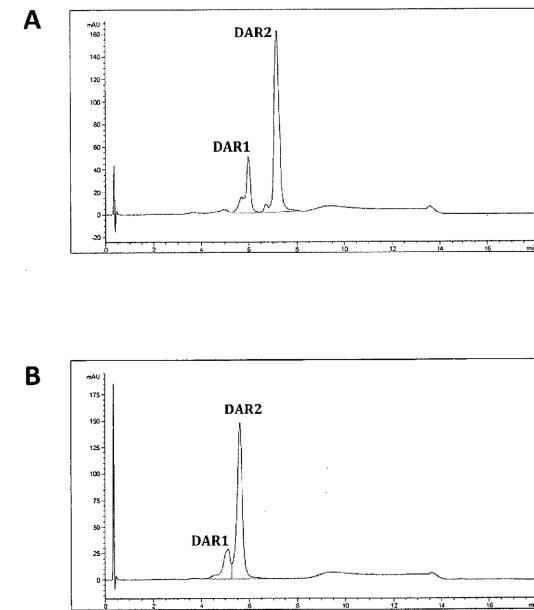


図8

【図9】

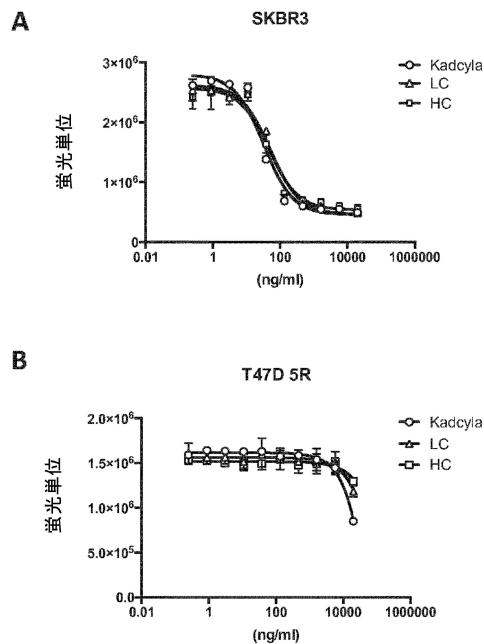


図9

【図10】

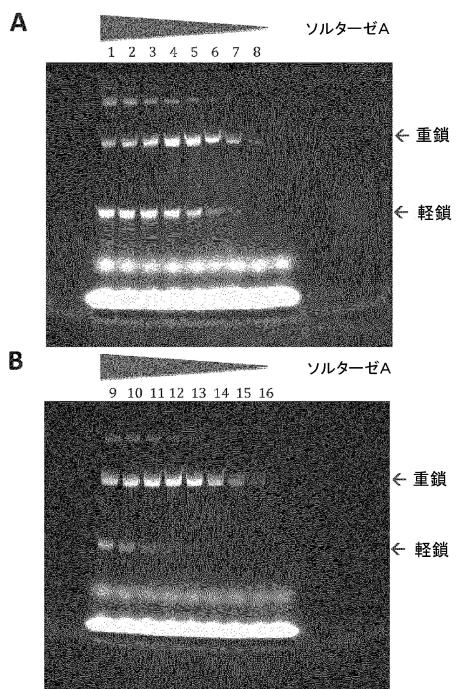


図10

10

20

30

40

50

【図 1 1】

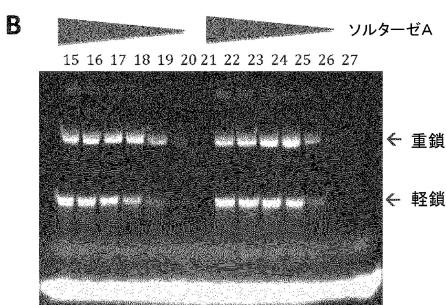
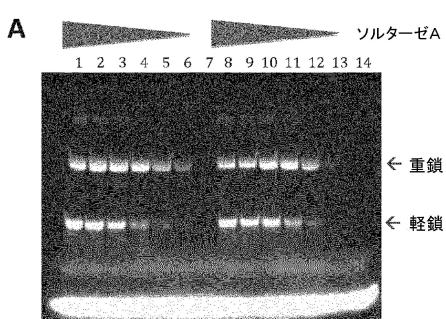
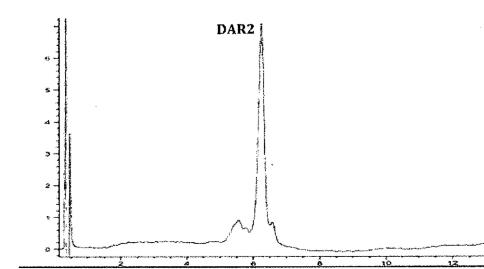
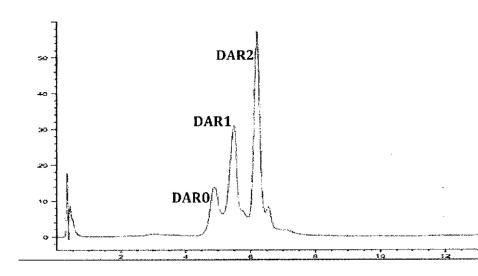


図11

【図 1 2】

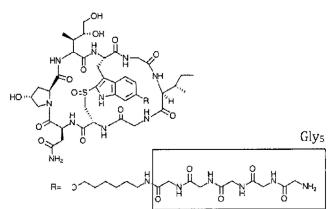


10

20

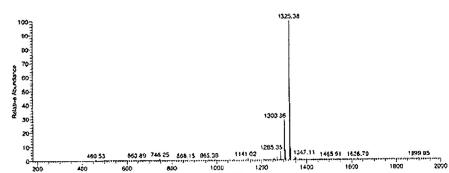
図12

【図 1 3 A】

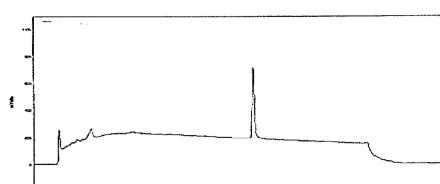


Gly5-修飾型アルファーアマニチン

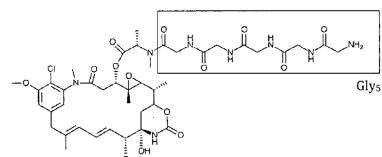
Gly5-修飾型アルファーアマニチンの質量分析:



RP-HPLCによるGly5-修飾型アルファーアマニチンの分析:

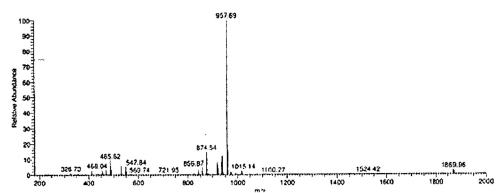


【図 1 3 B】



Gly5-修飾型メイタンシン

Gly5-修飾型メイタンシンの質量分析:



RP-HPLCによるGly5-修飾型メイタンシンの分析:

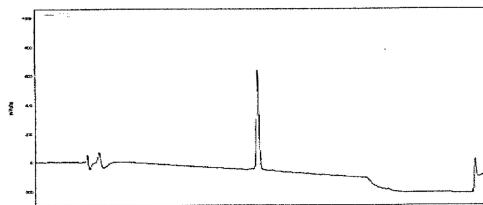


図13A

30

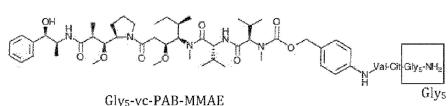
40

図13B

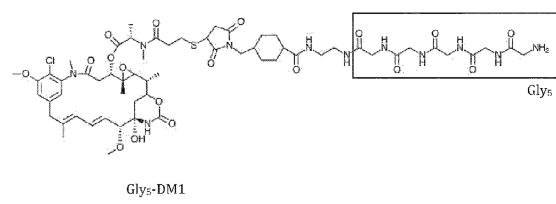
50

【図 14 A】

構造1:



構造2:



構造3:

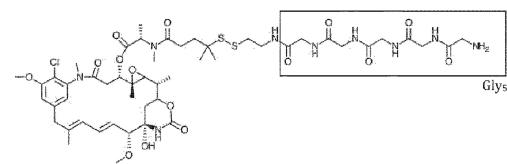


図14A

10

20

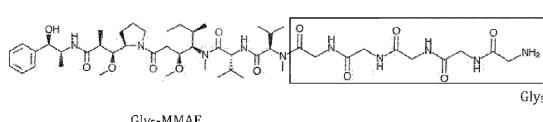
図14B

30

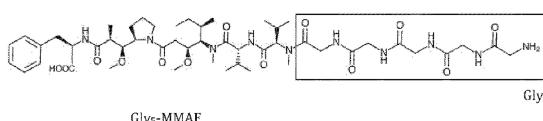
40

【図 14 B】

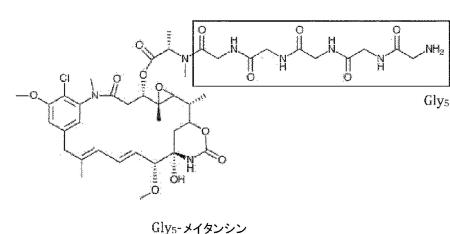
構造4:



構造5:

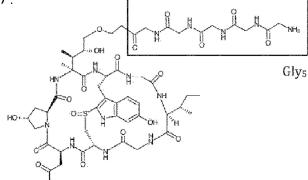


構造6:

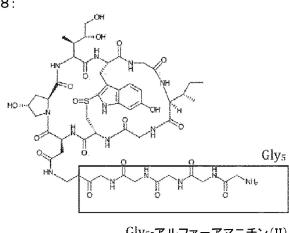


【図 14 C】

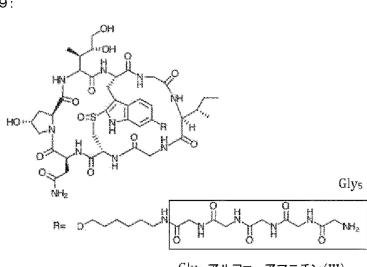
構造7:



構造8:



構造9:



Gly5-アルファーアマニチン(III)

図14C

【図 15】

対照
Kadcyla®
Tras-DM1

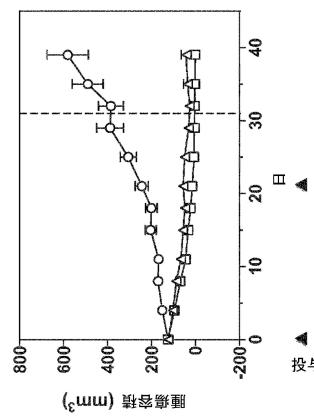
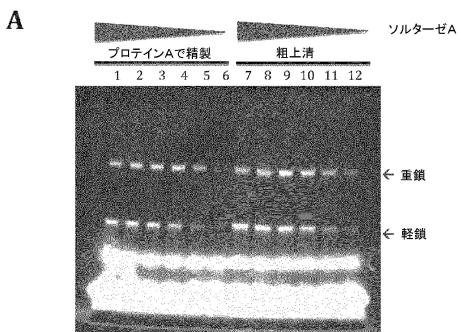


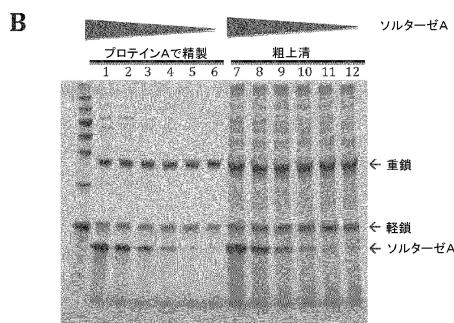
図15

50

【図16】



10



20

図16

【配列表】

0007213610000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I
C 1 2 N 15/13 Z N A

(31)優先権主張番号 61/787,371

(32)優先日 平成25年3月15日(2013.3.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 61/939,754

(32)優先日 平成26年2月14日(2014.2.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

合議体

審判長 上條 肇

審判官 飯室 里美

審判官 長井 啓子

(56)参考文献 特表2012-523383 (JP, A)

特表2012-519711 (JP, A)

特表2008-523062 (JP, A)

特開2008-138004 (JP, A)

特開2012-050441 (JP, A)

特表平8-501059 (JP, A)

特表平11-506915 (JP, A)

特表2012-528112 (JP, A)

特表2010-500967 (JP, A)

P L o S O N E , 2 0 1 1 年 , V o l . 6 , I s s u e 4 , e 1 8 3 4 2 , p p . 1 - 6 , S u p p o r t i n g I n f o r m a t i o n

M o l e c u l a r C a n c e r T h e r a p e u t i c s , 2 0 1 3 年 8 月 1 4 日 , V o l . 1 2 , p p . 2 2 7 3 - 2 2 8 1

T r e n d s i n C a r d i o v a s c u l a r M e d i c i n e , 2 0 1 2 年 , V o l . 2 2 , N o . 4 , p . 1 0 5 - 1 1 1

日本外科系連合学会誌 , 1 9 9 7 年 , V o l . 2 2 , N o . 4 , p . 5 5 5 - 5 6 1

R a d i o i o d i n a t e d h u m a n i z e d m o n o c l o n a l a n t i b o d y , M o l e c u l a r I m a g i n g a n d C o n t r a s t A g e n t D a t a b a s e (M I C A D) , 2 0 0 7 年 , p . 1 - 7

N a t u r e P r o t o c o l s , 2 0 1 3 年 8 月 2 9 日 , V o l . 8 , N o . 9 , p p . 1 7 8 7 - 1 7 9 9

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07K16/00

B I O S I S / M E D L I N E / C A p l u s / E M B A S E (S T N)

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)