

(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

F I

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

L

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

Y

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

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)

審査番号 不服2020-1364(P2020-1364/J1)

審査請求日 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  
欧州特許庁(EP)

最終頁に続く

(73)特許権者 515255205

エヌビーイー セラピューティクス アク

チェン ゲゼルシャフト

スイス ツェーハー 4 0 5 7 パーゼル

ホッホベルガーシュトラッセ 6 0 ツェー

(74)代理人 110000109

弁理士法人特許事務所サイクス

(72)発明者 グラウンダー ウルフ

スイス ツェーハー 4 0 5 7 パーゼル

ホッホベルガーシュトラッセ 6 0 ツェー

テクノロジー パーク パーゼル

(72)発明者 ベールリ ロジャー レンツォ

スイス ツェーハー 4 0 5 7 パーゼル

ホッホベルガーシュトラッセ 6 0 ツェー

テクノロジー パーク パーゼル

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<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、またはC<sub>H</sub>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、リボカリン、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 crystallin 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 ( c o n j u g a t i n g )、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、G l y<sub>n</sub>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G l y G l y G l y G l y S e r ( G G G G S ) ペプチドスパーサーを含み、

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 ( e n t i t y ) 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、LPXTG 又は NPQTN 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。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 (API) 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 (ADC) で特に当てはまる (パノウスキーら (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 (ランベール (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異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（パノウスキーら（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におよび／または望ましい結合部位（つまりリシンおよび／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（ホファーら（2009）、アクスアップら（2012）、またはレムケ（2011））。

【0009】

しかしながら、これらいず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（I g）」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I g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ドメイン抗体（d A b））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（I g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、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、およびI g Y）であってもまたはサブクラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、およびI g A 2）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<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、またはC<sub>H</sub>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<sub>H</sub>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<sub>H</sub>および/またはV<sub>L</sub>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<sub>H</sub>、および/またはV<sub>L</sub>、および/またはC<sub>H</sub>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せられているおよび/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関する。

#### 【 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）F a b断片（軽鎖可変部（V<sub>L</sub>）、重鎖可変部（V<sub>H</sub>）、軽鎖定常部（C<sub>L</sub>）および重鎖定常部1（C<sub>H</sub>1）ドメインからなる一価の断片）；（ii）F（a b'）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F a b断片を含んでいる二価の断片）；（iii）F<sub>ab</sub>（F<sub>d</sub>）断片の重鎖部分（V<sub>H</sub>ドメインとC<sub>H</sub>1ドメインからなる）；（iv）可変断片（F<sub>v</sub>）断片（抗体の単一のアームにあるV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>ドメインからなる）；（v）ドメイン抗体（d A b）断片（単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<sub>v</sub>断片（s c F<sub>v</sub>）；（viii）二重特異性抗体（V<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>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

二価の二重特異性抗体)；(i x)直鎖状抗体(相補的な軽鎖ポリペプチドと一緒にあって抗原結合領域の対を形成する、縦に並んだF<sub>v</sub>セグメント(V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>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scFv、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。

#### 【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、アプ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。

#### 【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、標的の特異的抗体模倣物も、確立されたディスプレイ技術、例えばファージディスプレイ、細菌ディスプレイ、酵母または哺乳類ディスプレイ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、フィブ्रोネクチンの10番目のIII型ドメイン、クニツツ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、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Ca<sup>2+</sup>によって安定化した膜受容体の「Aドメイン」、CTLA4を基礎とする化合物、Fyn SH3、およびアプタマー(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。

#### 【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、例えばアプタマーの場合には、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。

#### 【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。

10

20

30

40

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アブラー」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、インティンおよびスプリットインティンが含まれる。

## 【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。

## 【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。

## 【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ィン)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ィ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。

## 【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

10

20

30

40

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ィン）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に、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）。

10

#### 【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ィ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）。

20

#### 【００３８】

ソルターゼ酵素とスプリットインティ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。

30

#### 【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 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る、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ＬＰＸＴＧ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（アントスら（２００９ａ））

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る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(ショウら(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Ssp GyrB S11スプリットインテインが開発されたことにより(サンら(2004))、この条件が満たされ、このスプリットインテインはピ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(フォルクマンら(2009))(図3a)。同様に、Ssp DnaX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ストレッチまたはアミノ酸を6個含むSsp GyrB C-インテインドメインもしくはアミノ酸が11個のSsp DnaX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GVFVHNSXXXXX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、Ssp GyrB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Ssp DnaX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することができるように、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

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（アントスら（2009b））、先行技術において広く記載されている（マオら（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（ムルマンら（2011）、マーデイら（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、ゲロニン）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（スウィーら（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。

10

【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すること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。

20

【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（パノウスキーら（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。

30

【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、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。

40

【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LPXTG（Xは任意のアミノ酸）とは異なるペント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

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 ペンタ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。

【 0 0 4 8 】

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 l 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。

【 0 0 4 9 】

このフォーマットには、A D C 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 A D C 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。

【 0 0 5 0 】

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 ペンタ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 A D C、つまり D A R 2 を生じる ) もしくは軽鎖のみ ( 薬物対抗体比が 2 の A D C、つまり D A R 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 A D C、つまり D A R 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。

【 0 0 5 1 】

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ィン介在性結合を組み合わせ、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 )。

【 0 0 5 2 】

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ィン介在性結合を組み合

10

20

30

40

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 6 b）、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。

#### 【 0 0 5 3 】

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）。

#### 【 0 0 5 4 】

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で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。

#### 【 0 0 5 5 】

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（In Base）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 S s p G y r B S 1 1 スプリットインテインが開示されており（フォルクマンら（2009））、これは、C - インテインドメインは直鎖状の 6 m e r 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 O R F 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。

#### 【 0 0 5 6 】

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 S s p G y r B S 1 1 スプリットインテインの C - インテインまたは S s p D n a X 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可能であるため、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。

#### 【 0 0 5 7 】

10

20

30

40

50



ペイロード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、strept-tag、MYC-tagまたはHA-tag)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かつ部位特異的な結合を触媒することができる。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（ADC）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ンタ - ペプチド認識モチーフ（本明細書ではLPXTG、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 $H_2N -$ 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、LPXTGペンタ - 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。LPXTG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）、LPXTGソルターゼ認識ペンタ - 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る（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LPXTGモチーフへのペプチド転移が触媒され、それによって、LPXTG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、インティン（a）およびスプリットインティン（b）介在性ペプチド転移の原理を示している。（a）インティンは、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ィンは、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。インティン、つまり「タンパク質イントロン」は、インティンと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、インティンである「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 - インティ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）インティン活性については、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ィンと呼ばれてきた。スプリットインティンのN - インティンおよびC - インティ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ィ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 - エクステインドメインとC - エクステイ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 - インティンとC - インティンのスプリットインティ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 - エクステイ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 - インティンドメインまたは非常に短いN - インティンの特徴とする特定のスプリットインティ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ことを示している。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 スプリットインティン（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 - インティ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<sub>n</sub>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 - インティン／C - インティン複合体が、G V F V H N - S X<sub>n</sub>（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 - インティ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 - インティンドメインおよび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 スプリットインティン（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 - インティ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 - インティ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<sub>n</sub>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、スプリットインティ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 スプリットインティンのものなどの、短い最小C - インティンまたは最小N - インティ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ィ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 6 a】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ィン ) 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 - インティ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 - インティン - 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 A D C 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 A D C 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 6 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、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ィン ) 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 - インティ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 - インティン - 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。 ( 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。

10

【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 ) およびウェスタンブロット ( b ) 解析。 ( a ) SDS - PAGE のレーン 1 は B S A (およそ 66 . 4 k D )、レーン M<sub>1</sub> 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 M O O 5 0 5 )、レーン 2 は H i s 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 A O O 1 8 6 ) を使ってウェスタンブロットを展開した。レーン 3 は H i s 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 M<sub>2</sub> は分子量の標準物質 (ジーンスクリプト、カタログ番号 M M O 9 0 8 ) を含んでいる。

20

【図 8】 DM 1 - 毒素複合体化 T r a s - H C - G S - L H S ( A ) および T r a s - L C - G S - L H S ( B ) の疎水性相互作用クロマトグラフィー ( H I C ) 解析。 D A R 1 は、薬物対抗体比が 1 であることを ; D A R 2 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 H E R 2 を過剰発現している S K B R 3 ( A ) および H E R 2 陰性の T 4 7 D - 5 R 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 C e l l T i t e r - G l o (登録商標) L u m i n e s c e n t S o l u t i o n (プロメガ) で検出した。 L C : DM 1 - ソルターゼ A 複合体化 T r a s - L C - G S - L H S ; H C : DM 1 - ソルターゼ A 複合体化 T r a s - H C - G S - L H S 。

30

【図 10】 GS ペプチドスペーサーを含むまたは含まない m A b A c 1 0 変異体と G l y 5 - F I T C 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 G l y 5 - F I T C を m A b A c 1 0 - H C - G S - L H S / L C - G S - L H S ( A ) および m A b A c 1 0 - H C - L S / L C - L S ( 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 F I T C を可視化した。用いたソルターゼ A の濃度は : レーン 1、9 : 50 μ M ; レーン 2、10 : 25 μ M ; レーン 3、11 : 12 . 5 μ M ; レーン 4、12 : 6 . 25 μ M ; レーン 5、13 : 3 . 13 μ M ; レーン 6、14 : 1 . 56 μ M ; レーン 7、15 : 0 . 78 μ M ; レーン 8、16 : 0 . 39 μ M 。

40

【図 11】軽鎖への結合効率におよ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、 G l y 5 - F I T C を m A b s A c 1 0 - H C - L S / L C - G S - L S ( A、左側)、 A c 1 0 - H C - L S / L C - G G S - L S ( A、右側)、 A c 1 0 - H C - L S / L C - G G G S - L S ( B、左側) および A c 1 0 - H C - L S / L C - G G G G S - L S ( 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

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  $\mu$ M；レーン2、9、16、23：12.5  $\mu$ M；レーン3、10、17、24：6.25  $\mu$ M；レーン4、11、18、25：3.13  $\mu$ M；レーン5、12、19、26：1.56  $\mu$ M；レーン6、13、20、27：0.78  $\mu$ M；レーン7、14、21、28：0.39  $\mu$ M。

【図12】ここに示すように、未反応基質（DAR0 = 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（DAR1 = 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（DAR2 = 薬物対抗体比が2）に分離可能なmAb Ac10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ADCの疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）による解析。パネルAは、HC修飾型Ac10 mAbの標準的なソルターゼ介在性結合後のHICプロファイルを示しており、ここでは所望のDAR2産物の横に、まだDAR0およびDAR1種が検出可能である。パネルBはパネルAで分析したADCをStreptActin（登録商標）アフィニティ精製カラムに4回通した後のHICプロファイルを示している。

10

【図13A】合成したGly5 - 修飾型アルファ - アマニチン毒素（a）およびGly5 - 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HPLC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Gly5 - 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。RP - HPLC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Gly5 - 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。RP - HPLC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。

20

【図13B】合成したGly5 - 修飾型アルファ - アマニチン毒素（a）およびGly5 - 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HPLC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Gly5 - 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。RP - HPLC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Gly5 - 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。RP - HPLC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。

30

【図14A】コンコルティス（Concortis、サンディエゴ、カリフォルニア、米国）で合成した5 x 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 / 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。

40

【図14B】コンコルティス（Concortis、サンディエゴ、カリフォルニア、米国）で合成した5 x 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 / スペーサー構造を含むように合成す

50

ることも、あるいは図 1 4 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 1 4 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 1 4 C】コンコルティス (Concortis、サンディエゴ、カリフォルニア、米国) で合成した 5 x 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 1 4 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 / スペース構造を含むように合成することも、あるいは図 1 4 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 1 4 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。

10

【図 1 5】実施例 1 2 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 Kadcy1a (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、Kadcy1a (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 1 6】ゲルを実施例 1 3 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。

20

【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、

30

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可能な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。

40

【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。

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、規制当局はバッチ間の変動および/または医薬品原料（API）の変動を否定的に見るため、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、規制当局はバッチ間の変動および/または医薬品原料（API）の変動を否定的に見るため、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(DAR2またはDAR4)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包含される。

【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可能な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包含される。

【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（例えば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、  
・スプリットインティンまたは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ィン、例えばSspGyrBスプリットインティ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、GVFVHN-SX<sub>n</sub>（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、スプリットインティ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ィンを使用することは、先行技術には記載されていない（パノウスキーら（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

## 【 0 0 9 3 】

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））。

## 【 0 0 9 4 】

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。

## 【 0 0 9 5 】

インティンは最初、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（ショウら（1993））（図 2 a ）。

## 【 0 0 9 6 】

天然に存在するスプリットインティンと人工のスプリットインティンは、後でエクステインドメイン（図 2 b ）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 - インティンドメインと C - インティンドメインに分けられたインティンコード領域を含む。

## 【 0 0 9 7 】

そのため、スプリットインティンは 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ィ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。

## 【 0 0 9 8 】

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。スプリットインティンの場合には、S s p G y r B 由来の 6 アミノ酸 C - インティン（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、スプリットインティンを介在して、S s p G y r B スプリットインティンの N - インティ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））。機能性のインティ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ィンも同様に利用することができる。

## 【 0 0 9 9 】

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。

10

20

30

40

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。

## 【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に、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。

## 【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。

## 【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、ウェスタンブロット、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。

## 【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（FLASH）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。

## 【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。本発明の別の好ましい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包含される。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、不安定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（ImSAID）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るような、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、ラプタンシン (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		ドキシソルピシン
MUC1	カンツズマブ (mAb)	細菌性シュードモナス外毒素 PE38
CD30	ブレンツキシマブ (mAb)	モノメチルアウリスタチンF (MMAF)；モノメチルアウリスタチン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 (GPNMB)	グレンマツムマブ (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 <sup>90</sup>
CD74	ミラツズマブ (mAb)	ヨウ素 <sup>131</sup>
CD70		ルテチウム <sup>177</sup>
AGS-16		シクロスポリン
インテグリン		メトトレキサート
CD19		タキサン、例えばバ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ことが可能な、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。

## 【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。

## 【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。

## 【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 peptide、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。

## 【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

10

20

30

40

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に、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。

【 0 1 2 8 】

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

【 0 1 2 9 】

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。

【 0 1 3 0 】

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

【 0 1 3 1 】

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。

【 0 1 3 2 】

30

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。

【 0 1 3 3 】

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、プ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。

【 0 1 3 4 】

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

【 0 1 3 5 】

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。

【 0 1 3 6 】

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。

【 0 1 3 7 】

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。

【 0 1 3 8 】

「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包含される。

【 0 1 3 9 】

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。

【 0 1 4 0 】

「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（K P）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。

【 0 1 4 1 】

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。

【 0 1 4 2 】

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、例えばクローン病や潰瘍性大腸炎、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包含される。

【 0 1 4 3 】

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。

【 0 1 4 4 】

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。

【 0 1 4 5 】

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ず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（H I V）、A、B、およびC型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス（H S V）、サイトメガロウイルス（C M V）エプスタイン・バーウイルス（E B V）、ヒト乳頭腫ウイルス（H P V））、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、およびプリオンが含まれ得る。

10

20

30

40

50

## 【0146】

本発明はさらに、Gly<sub>n</sub>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、「Gly<sub>n</sub>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。

## 【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、

- ・ メイタンシン
- ・ モノメチルアウリスチン、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Gly<sub>n</sub>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ィ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。

## 【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行われることを意味している。

実験および図

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 6 】

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

## 【 0 1 5 7 】

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】

## 【 0 1 5 8 】

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 x H i sおよびs t r e p I Iアフィニティ精製用タグが付加されたC D 1 9モノクローナル抗体の発現

## 【 0 1 5 9 】

20

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。

## 【 0 1 6 0 】

この目的で、抗ヒトC D 1 9特異的抗体の重鎖および軽鎖の第一のO R F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(G e n s c r i p t、www.g e n s c r i p t . c o m、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(C R O)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C D 1 9抗体h B U 1 2の重鎖および軽鎖配列を、米国特許第8, 2 4 2, 2 5 2号B 2の配列5 3(変異体H F)および配列5 8(変異体L G)として見ることができる。この抗ヒトC D 1 9抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域は以下の通りである。

30

## 【 0 1 6 1 】

配列番号1(ヒト化抗ヒトC D 1 9抗体h B U 1 2のV<sub>H</sub>コード領域)：

```
ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTTTTCCTCCTGTCAGGAAGTGCAGGTGTCCATTGTCTAGGTTCTAGCTGCAAGA  
GTCTGGCCCTGGGTTGGTTAAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTACTGTGTCTGGGGGTTCAATCAGCA  
CTTCTGGTATGGGTGTAGGCTGGATTAGGCAGCACCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGATTGGACACATTGGTGG  
GATGATGACAAGAGATATAACCCAGCCCTGAAGAGCAGAGTGACAATCTCTGTGGATACCTCCAAGAACCAGTT  
TAGCCTCAAGCTGTCCAGTGTGACAGCTGCAGATACTGCTGTCTACTACTGTGCTAGAAATGGAACCTTTGGTCCT  
ACTATTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTTGTCTACAGTCTCCTCA
```

## 【 0 1 6 2 】

40

これは以下のアミノ酸配列に翻訳される(配列番号2)：

```
MGWSWIFLFLLSGTAGVHCQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISTSGMGVGVIRQHPGKGLEWIGHIWW  
DDDKRYNPALKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARMELWSYYFDYWGQGLTVTVSS
```

## 【 0 1 6 3 】

配列番号3(ヒト化抗ヒトC D 1 9抗体h B U 1 2のV<sub>L</sub>コード領域)：

50

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGAAATTGTTCTCACCCA  
GTCTCCAGCAACCCTGTCTCTCTCTCCAGGGGAAAGGGCTACCCCTGAGCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTT  
ACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGCAGGCTCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCT  
GGTATTCCAGCAAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTTTACACTCACAATCAGCAGCCTGGAGCCAGA  
GGATGTTGCTGTCTATTACTGTTTTTCAGGGGAGTGATACCCATTCACTTTTGGCCAAGGGACAAAGTTGGAAA  
TCAAA

## 【 0 1 6 4 】

これは以下のアミノ酸配列に翻訳される（配列番号 4）：

MKLPVRLLVLMFWIPASSSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLA  
S  
GIPARFSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDVAVYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIK

10

## 【 0 1 6 5 】

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 Ig G<sub>1</sub> 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。

## 【 0 1 6 6 】

本発明を実現するために、3' に L P E T G 黄色ブドウ球菌ソルターゼ A 認識タグ、次いで 6 × H i s タグ（H H H H H H）、M Y C タグ（E Q K L I S E E D L）および s t r e p I I タグ（W S H P Q F E K）をコードしているコドンを含んでいるヒト Ig G<sub>1</sub> 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。

## 【 0 1 6 7 】

配列番号 5（3' 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 Ig G<sub>1</sub> 重鎖定常コード領域）：

20

AGCACCAAGGGCCCATCTGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCTGCCCTGGG  
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAACCTGTGACAGTGCTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC  
ACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC  
TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC  
CAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC  
TCTTCCCCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG  
AGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC  
GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATG  
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAA  
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCT  
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA  
ACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG  
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAA  
GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAACTGCCCGAGACCGGCCACCACCACCACCGCGAGCAGAAAGCTGA  
TCAGCGAGGAGGACCTGGGCTGGAGCCACCCCAAGTTCGAGAAGTAG

30

## 【 0 1 6 8 】

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）：

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS  
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
SRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKLPETGHHHHHGEQKLISEEDLGWSHPQFEK・

40

## 【 0 1 6 9 】

さらに、3' に L P E T G 黄色ブドウ球菌ソルターゼ A 認識タグ、次いで 6 × H i s タグ（H H H H H H）および s t r e p I I タグ（W S H P Q F E K）をコードしているコドンさらに含んでいるヒト Ig G<sub>1</sub> カップ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。

## 【 0 1 7 0 】

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 カッパ 軽鎖 定常コード領域 ) :

ACGGTGGCTGCACCATCTGCTTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT  
GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA  
ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA  
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTCTGCCCGAGACCGGCCACCAACCACCAACCGCGAGCAGAAGCTGATCA  
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 ) :

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS  
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECLPETGHHHHHHGEQKLISEEDLGWSPQFEK•

## 【 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<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>重鎖コード領域 ) :

20

ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTTTTCTCCTCTGTCAGGAACTGCAGGTGTCCATTGTTCAGGTTTCAGCTGCAAGA  
GTCTGGCCCTGGGTTGGTTAAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTACTGTGTCTGGGGGTTCAATCAGCA  
CTTCTGGTATGGGTGTAGGCTGGATTAGGCAGCACCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGATTGGACACATTGGTGG  
GATGATGACAAGAGATATAACCCAGCCCTGAAGAGCAGAGTGACAATCTCTGTGGATACCTCCAAGAACCAGTT  
TAGCCTCAAGCTGTCCAGTGTGACAGCTGCAGATACTGCTGTCTACTACTGTGCTAGAATGGAACCTTTGGTCCT  
ACTATTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTTGTACAGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGGCCATCTGTCTTC  
CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC  
TGAACCTGTGACAGTGTCTTGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGT  
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACAC  
ATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACA  
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG  
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC  
GTACCGTGTGGTACGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT  
CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG  
TACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA  
TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAGAACAACCTACAAGACCAGCCTCCCGTGC  
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC  
TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA  
ACTGCCCAGACCGGCCACCACCACCACCACCGCGAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGGGCTGGA  
GCCACCCCCAGTTCGAGAAGTAG

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 ) :

40

MGWSWIFLFLLSGTAGVHCQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISTSGMGVGVIRQHPGKGLEWIGHIWW  
DDDKRYNPALKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMELWSYFYFDYWQGTLTVTVSSASTKGPSVF  
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC  
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKLPPETGHHHHHHGEQKLISEEDLGWSPQFEK•

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<sub>L</sub> - C<sub>L</sub> カッパ鎖コード領域 ) :

ATGAAGTTGCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGAAATTGTTCTCACCCA  
GTCTCCAGCAACCCCTGTCTCTCTCTCCAGGGGAAAGGGCTACCCCTGAGCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTT  
ACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGCAGGCTCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCT  
GGTATTCCAGCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTTTACACTCACAAATCAGCAGCCTGGAGCCAGA  
GGATGTTGCTGTCTATTACTGTTTTTCAGGGGAGTGTATACCCATTCACTTTTGGCCAAGGGACAAAGTTGGAAA  
TCAAAAGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCC  
TCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCA  
ATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGA  
CGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC  
GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTCTGCCCGAGACCGGCCACCACCACCACCACGGCGAGCAGAA  
GCTGATCAGCGAGGAGGACCTGGGCTGGAGCCACCCCCAGTTTCGAGAAGTAG

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 ) :

MKLPVRLLVLMFWIPASSSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLAS  
GIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDVAVYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA  
SVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP  
VTKSFNRGECLEPETGHHHHHHGEQKLISEEDLGSHPQFEK•

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 ( + ) ( インピトロジェン ) 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 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。

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<sub>H</sub> - C<sub>H</sub> 重鎖コード領域 ) :

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGC  
CAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCA  
AGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCA  
GATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTTCATAGCCCA  
TATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATT  
GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATT  
TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGAC  
GGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGT  
ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCAC  
GGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCA  
AAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG  
AGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCC

40

AAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAACTTCCATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTTTTCTCTCTGTCAGGAACCTGC  
 AGGTGTCCATTGTCAAGTTTCAAGTCTGCAAGAGTCTGGCCCTGGGTTGGTTAAGCCCTCCCAGACCCCTCAGTCTGA  
 CTGTGACTGTGTCTGGGGGTTCAATCAGCACTTCTGGTATGGGTGTAGGCTGGATTAGGCAGCACCCAGGGAAG  
 GGCTGGAGTGGATTGGACACATTTGGTGGGATGATGACAAGAGATATAACCCAGCCCTGAAGAGCAGAGTGAC  
 AATCTCTGTGGATACTCCCAAGAACAGTTTAGCCTCAAGCTGTCCAGTGTGACAGCTGCAGATACTGCTGTCT  
 ACTACTGTGCTAGAATGGAATTTGGTCTACTATTTTGAAGTCTGGGGCCCAAGGCACCCCTTGTACAGTCTCC  
 TCAGTACGACCAAGGGCCCTCTGTCTTCCCTGGCACCTCTCCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCTGC  
 CCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAACCTGTGACAGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACACGG  
 GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCC  
 AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGT  
 TGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAG  
 TCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGT  
 GAGTGTAGCCAGCAAGAGCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC  
 AAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACAGGTCTCACCCTCTGCACACAGGACTGGC  
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAA  
 GCCAAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT  
 CAGCTGACCGGAGTGGGCTGGGCTGGGACCCACCCAGTTCGAGAAAGTAGGCGCGCTCGAGTCTAGAG  
 AGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTG  
 GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC  
 ACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAACTGCCGAGACCGGCCACCCACCACCACCCAGCGGAGCAGA  
 AGCTGACCGGAGTGGGCTGGGCTGGGACCCACCCAGTTCGAGAAAGTAGGCGCGCTCGAGTCTAGAG  
 GCGGTTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCGG  
 TGCTTCTTGAACCTGGAAGGTGCCACTCCACCTGTCTTCTTAATAAAATGAGGAAATGTCATCGCATGT  
 CTGAGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAG  
 GTGATGGTTACAGTGTGGGATCGGCTGATGACGCTTCTGAGCGGAAAGAACAGCTGGGGCTCAGGGGTATC  
 CCCACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGGC  
 AGCGCCTTAGCGCCGCTCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCGGCTTTCGCCGTCAAGC  
 TCTAAATCGGGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGG  
 GTGATGGTTACAGTGTGGGATCGGCTGATGACGCTTCTGAGCGGTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCAGTCTT  
 AATAGTGGACTCTTGTTCAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGAT  
 TTTGGGATTTCCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTAACGCAATTAATTCTGTGGAA  
 TGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCGAGGCTCCCGAGGACGAGAGTATGCAAAGCATGTCATCTCAAT  
 TAGTCAGCAACCAAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCTTCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCTTCCCGC  
 CCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTATGAGAGGCGGAGGCGCTCTGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAG  
 TGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGA  
 TCAGCAGCTGATGAAAAGCCTGAACCTACCGCGAGCTCTGTCGAGAAGTTCTGATCGAAAAGTTTCGACGCG  
 TCTCCGACCTGATGCAAGCTCTCGGAGGGCGAAGAAATCTCGTCTTTCAGCTTTCGATGTAGGAGGCGTGGATAT  
 GTCTGCGGGTAAATAGCTGCGCGGATGGTTCTACAAAGATCGTTATGTTATCGGCACCTTGCATCGGCGCG  
 GCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCGTGCAC  
 AGGTGTGTCAGTTGCAAGAGCTGCTGAAACCGAAGTCCCGCTGTCTGACGCGGTCGCGGAGGCGCATGGAT  
 GCGATCGCTCGCGCGGATCTTAGCCAGACGAGCGGTTCCGCCCTTCCGACCGCAAGGAATCGGTCAATACAC  
 TACATGGCGTGATTTCAATATGCGCGATTGTGATCCCATGTGTATCACTGGCAAACTGTGATGGACGACACCG  
 TCAGTGCCTCGCTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCCGAAGTCCGGCACCTC  
 GTGCACGCGGATTTCCGCTCCAACAATGTCTGACGGACAATGGCCGATAACAGCGGTCAATTGACTGGAGCGA  
 GCGATGTTCCGGGATTTCCCAATACGAGGTGCGCAACATCTTCTTCTGGAGGCGTGGTTGGCTTGTATGGAGC  
 AGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCTATCCGAGCTTGCAGGATCGCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGC  
 ATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTTTCGATGATGACGCTTGGGCGCAGGGTTCGATG  
 CGACGCAATCGTCCGATCCGAGCGCGGACTGTCCGGCTACACAAATCGCCGAGAAAGCGCGCGCTCTGGA  
 CCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCGGATAGTGGAACCGACGCCCGAGCACTCGTCCGAGGGCAAGGAATAG  
 CACGTGCTACGAGATTTTCGATTCACCGCGCCTTCTATGAAAGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGC  
 CGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCATGTGGAGTTCTTCGCCCAACCCCACTTGTATTGACGCTT  
 ATAATGGTTACAAATAAGCAATAGCATCACAATTTACAAATAAAGCAATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGT  
 GGTGTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATC  
 ATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAATTTGTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAA  
 AGTGTAAAGCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAG  
 CTCGGAAACCTGTGTCGAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGAGAGGCGGTTTGGTATTGGGCG  
 CTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA  
 AGGCGGTAATACGGTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCGAGGAAAGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAG  
 GCCAGGAACCGTAAAAGGCGCGTGTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAATAA  
 TCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACAGGCGTTTTCCCTTGAAGCTCCC  
 TCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCTTCCGGGAAGCGTGGCG

10

20

30

40

50



CTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCTGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA  
 ACCCCCCGTTACGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACT  
 TATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTG  
 AAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTT  
 CGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGC  
 AGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGG  
 AACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA  
 AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTG  
 AGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACG  
 ATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCAGGCTCCAGATTT  
 ATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGT  
 CTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCGAGTTAATAGTTTGCAGAACGTTGTTGCCATTGCT  
 ACAGGCATCTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGT  
 TACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCCGTTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGG  
 CCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCAAGCCATCCGTAAGATGCTTT  
 TCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGC  
 GTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAACAGTTCTTCCGGGGC  
 GAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCAGTGAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCA  
 GCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAG  
 GGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTC  
 TCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAA  
 GTGCCACCTGACGTC

10

【 0 1 8 0 】

20

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  
 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。

【 0 1 8 1 】

配列番号 1 4 ( 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<sub>L</sub> - C<sub>L</sub> カッパ軽鎖コード領域 ) :

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCTATGGTTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGC  
 CAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTGCGTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCA  
 AGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCA  
 GATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCA  
 TATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATT  
 GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGTGGAATATT  
 TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTGACTGAC  
 GGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTTGGCAGTACATCTACGT  
 ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAC  
 GGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCA  
 AAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG  
 AGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCC  
 AAGCTGGCTAGCGTTTTAACTTACCTTCCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTTGGAATCC  
 TGCTTCCAGCAGTGAAATTGTTCTACCCAGTCTCCAGCAACCCCTGCTCTCTCTCCAGGGGAAAGGGCTACCC  
 TGAGCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGCAGGCTCCAGACTC  
 CTGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGTATTCCAGCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTT  
 TACACTACAATCAGCAGCCTGGAGCCAGAGGATGTTGCTGTCTATTACTGTTTTTCAGGGGAGTGATATCCCAT  
 TCACTTTTGGCCAAAGGGACAAAGTTGGAAATCAAAAGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA  
 TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA  
 AGTACAGTGGAAAGTTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGG  
 ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC  
 GAAGTACCCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTCTGCCCGAGACGG  
 CCACCACCACCACCACCGCGAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGGGCTGGAGCCACCCCACTTCG  
 AGAAGTAGGCGGCTGAGTCTAGAGGGCCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTG  
 CCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCTTCTTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCT  
 AATAAATGAGGAAATTGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCAATCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGAC

30

40

50

AGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGA  
 AAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGGGCGGGTGTGGTGG  
 TTACGGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCCTTTCTC  
 GCCACGTTTCGCGCGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTAGTGCTTTACG  
 GCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTC  
 GCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCATATC  
 TCGGTCTATTCTTTTGAATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACA  
 AAAATTTAACGCGAATTAATTTCTGTGGAATGTGTGTACGTAGGGTGTGGAAAGTCCCGAGGCTCCCGAGGCAG  
 GCAGAAGTATGCAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCGAGGCTCCCGAGCAGGC  
 AGAAGTATGCAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCT  
 AACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCAATGGCTGACTAATTTTTTTATTTATGAGAGGCCGAGGCCG  
 CACTCTGCCCTCTGAGCTATTCAGAAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCATAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCG  
 GGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGATGAAAAAGCCTGAACTACCCGCGACGCTGTGCGA  
 GAAGTTTCTGATCGAAAAAGTTTCGACAGCGCTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCTT  
 TAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCTCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTTCTACAAAGATCGT  
 TATGTTTATCGCGCACTTTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTCAGCGAGAG  
 CCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCGCTG  
 TTCTGACGCGGCTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCCGGCCCA  
 TTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTA  
 TCACTGCTCAGCTTGGGCGCAGGTCACCGCTCAGTGCCTCGCTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGG  
 CCGAGGACTGCCCGCAAGTCCCGCACCTCGTGACGCGGATTTCCGCTCCACAATGTCTGACGGACAATGGC  
 CGCATAACAGCGGTCATTGACTGGAGCGAGCGGATGTTCCGGGATTTCCCAATACGAGGTCGCCAACATCTTCTT  
 CTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGTATGGAGCAGCAGACGCGTACTTCGAGCGGAGGCAATCCGAGCTTTCAGGAT  
 CGCCCGCGCTCCGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTT  
 GATGATCGCTGAGCTTGGGCGCAGGGTCGATGCGACGCAATCTCCGATCCGGAGCGCGGACTGTCCGGCGTACACA  
 AATCGCCCGCAGAAGCGCGCGCTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCGGATAGTGGAAACCGACGCC  
 CCAGCACTCGTCCGAGGGCAAGGAATAGCACGTGCTACGAGATTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGG  
 TTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTT  
 CGCCACCCCACTTGGGCGCAGGGTTCGATGAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCAAAATA  
 AAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCG  
 TCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAATTTGTTATCCGCTCACAAAT  
 TCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCTTGGGGTGCTTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAA  
 TTGCTTTCGCGCTCAGTGCAGCTTCCAGTCCGGAAACCTGTCTGCTCCAGCTGCATTAATGAACTCGGCCAACG  
 CGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCG  
 GCTGCGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGAGGAA  
 AGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAGGCGCGCTTGTGCGCTTTTTCCATAGG  
 CTCGCCCGCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG  
 ATACCGCGCTTCCCGCTTGGAAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTGCGGCTTACCGGATACCTGT  
 CCGCTTTCTCCCTTCGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTC  
 GTTCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTCCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCG  
 TCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA  
 GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGT  
 ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCCGC  
 TGGTAGCGGTGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGA  
 TCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAATGAGATTATCAAAA  
 AGGATCTTCACCTTACCTTTTAAATTAATAAGTGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTG  
 GTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTG  
 CCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCG  
 CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGG  
 TCTTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTGCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTA  
 ATAGTTTTCGCAACGTTGCTTTGCCATTGCTACAGGCACTGTTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCAATC  
 AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGG  
 TCCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTC  
 TTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGT  
 ATGCGCGCACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGT  
 GCTCATCATTGAAAAAGCTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGT  
 AACCCTACTCGTGCACCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAACAGGA  
 AGGCAAAATGCCGCAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATA  
 TTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAA  
 TAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGGAAAGTGCCACCTGACGTC

10

20

30

40

#### 【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、Mycタグ、およびstreptII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hBU12を発現  
 させることができる。

#### 【0183】

実施例2：C末端にSspGyrB11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streptIIアフィニティ精製用タグを含む

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](http://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スプリットインテインのN-インテイ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スプリットインテインのN-インテイ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スプリットインテインのN-インテインドメイン）：

```
CFSGDTLVALTDGRSVSFEEQLVEEEKQGKQNFCTIRHDGSIGVEKIINARKTKTNKVIKVTLDNGESIICTP
DHKFMLRDGSYKCAMDLTLDSSLMLPLHRKISTTEDSGHMEAVLNYNHRIVNIEAVSETIDVYDIEVPHTHNFAL
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スプリットインテインのN-インテイ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スプリットインテインのN-インテインドメインのコード配列）：

```
TGCTTCAGCGGCGACACCCCTGGTGGCCCTGACCGACGGCAGAACGCTGAGCTTCGAGCAGCTGGTGGAGGAGGA
GAAGCAGGGCAAGCAGAACTTCTGCTACACCATCAGACACGACGGCAGCATCGGCGTGGAGAAGATCATCAACG
CCAGAAAAGACCAAGACCAACGCCAAGGTGATCAAGGTGACCCTGGACAACGGCGAGAGCATCATCTGCACCCCC
GACCACAAGTTTCATGCTGAGAGACGGCAGCTACAAGTGCGCCATGGACCTGACCCCTGGACGACAGCCTGATGCC
CCTGCACAGAAAGATCAGCACCCACCGAGGACAGCGGCCACATGGAGGCCGTGCTGAACTACAACCCACAGAATCG
TGAACATCGAGGCCGTGAGCGAGACCATCGACGTGTACGACATCGAGGTGCCCCACACCCACAACCTTCGCCCTG
GCCAGC
```

## 【0189】

この配列情報をもとに、下記配列17に開示する、Ssp GyrB 11スプリットインテインのN-インテインドメイン、続いて6xHisタグおよびstreptII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重鎖コード領域を設計できる：

10

20

30

40

50

ATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCTGGTGCTGACCCTGAAAGGCGTCCAGTGTGAGGTTGAGCTGCAAGA  
 GTCTGGCCCTGGGTTGGTTAAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTACTGTGTCTGGGGGTTCAATCAGCA  
 CTTCCTGGTATGGGTGTAGGCTGGATTAGGCAGCAGCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGATTGGACACATTTGGTGG  
 GATGATGACAAAGAGATATAACCCAGCCCTGAAGAGCAGAGTGACAATCTCTGTGGATACCTCCAAGAACCAGTT  
 TAGCCTCAAGCTGTCCAGTGTGACAGCTGCAGATACTGCTGTCTACTACTGTGCTAGAATGGAACCTTTGGTCCT  
 ACTATTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCCTTGTACAGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCTGTCTTC  
 CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCTGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCC  
 TGAACCTGTGACAGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGT  
 CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
 AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACAC  
 ATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACA  
 CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG  
 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC  
 GTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCT  
 CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG  
 TACACCTTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA  
 TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC  
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGACAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC  
 TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA  
 ATGCTTCAGCGGCGACACCCTGGTGGCCCTGACCGACGGCAGAAGCGTGAGCTTCGAGCAGCTGGTGGAGGAGG  
 AGAAGCAGGGCAAGCAGAACTTCTGCTACACCATCAGACACGACGGCAGCATCGGCGTGGAGAAGATCATCAAC  
 GCCAGAAAGACCAAGACCAACGCCAAGGTGATCAAGGTGACCTGGACAACGGCGAGAGCATCATCTGCACCCC  
 CGACCACAAGTTCATGCTGAGAGACGGCAGCTACAAGTGCGCCATGGACCTGACCTGGACGACAGCCTGATGC  
 CCCTGCACAGAAAGATCAGCACACCACCGAGGACAGCGGCCACATGGAGGCCGTGCTGAACCTACAACCACAGAATC  
 GTGAACATCGAGGCCGTGAGCGAGACCATCGACGTGTACGACATCGAGGTGCCCCACACCCACAACCTTCGCCCT  
 GGCCAGCCACCATCACCATCACCATGGCTGGAGCCACCCCAAGTTCGAGAAGTAG

10

20

## 【 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）：

MNFGRLRLIFLVLTLLKGVQCQVQLQESGPGVLKPSQTLSTLCTVSGGSISTSGMGVGVIRQHPGKGLEWIGHIWW  
 DDDKRYNPALKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMELWSYFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPVSVF  
 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC  
 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK  
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKCFSGDITLVALTDGRSVSFEQLVEEEKQKQNFCTIRHDSIGVEKIIN  
 ARKTKTNAKVIKVTLDNGESICTPDHKFMLRDGSYKCAMDLTLDDSLMPLHRKISTTEDSGHMEAVLNYNHRI  
 VNIEAVSETIDVDIEVPHTHNFALAS

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 - インテインドメイン、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カップ軽鎖コード領域を設計できる：

40

10

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 x His タグおよび strep II タグを影で示す）：

20

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 CD 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 pCDNA3.1-hygro(+)(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 HindIII および NotI)を含める形で合成することができる。

N - インテインタグ化 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 鎖発現ベクターの完全な DNA 配列は以下のようになる。

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  
インドメイン、次いで 6 x H i s タグ、 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 クローニング部位 (影付部分) を含む h B U 1 2 の ヒト I g G 1 V<sub>H</sub>-C  
H 重鎖コード領域) :

40

GGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTTGGCAGTACATCTACGT  
ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAC  
GGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCA  
AAATGTCTGTAACTCCGCCCATTTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGTTGGGAGGTCATATAAGCAG  
AGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCACCTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCC  
AAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTTCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCCTGGTGTGCTGACCTGAA  
AGGCGTCCAGTGTGAGGTTTCCAGTGTGCAAGAGTGTGGCCCTGGGTTGGTTAAGCCCTCCAGACCCCTCAGTCTGA  
CTTGTACTGTGTCTGGGGGTTCAATCAGCACTTCTGGTATGGGTGTAGGCTGGATTAGGCAGCACCCAGGGAAG  
GGTCTGGAGTGGATTGGACACATTTGGTGGGATGATGACAAGAGATATAACCCAGCCCTGAAGAGCAGAGTGAC  
AATCTCTGTGGATACCTCCCAAGAACCACTTTAGCCTCAAGCTGTCCAGTGTGACAGCTGCAGATACTGCTGTCT  
ACTACTGTGCTAGAATGGAATTTGGTCTACTATTTTGGTACTTGGGGCCAAGGCACCCCTTGTACAGTCTCC  
TCAGCTAGCACCAAGGGGCCATCTGTCTTCCCTTGGCACCCCTCTCCAGAGCACCTTGGGGGCACAGCTGC  
CCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAACCTGTGACAGTGTCTTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG  
GCGTGTGACCACTTCCCGCTGTCCAGTCTTCCAGTCTTACTTCCCTCAGCAGCGTGGTGAAGTGCATATGCCAAGC  
AGCAGCTTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT  
TGAGCCCAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAATCTCTGGGGGACCGTCTAG  
TCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGT  
GAGCTGTGACCTGCTTCCAGCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATATGCCAAGC  
AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTGTGAGTGTCTTCCCTGTGACAGGACTGGC  
TGATGGCAAGGAGTACAGTGTCAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCTATCGAGAAAACCATCTCCAA  
GCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTTCCCGCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT  
CAGCTGTGACCTGCTTCCAGCTGAGGTCAAGTTCATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGCCG  
AGAACAACATAAGACCACGCTTCCCGTGTGGACTCCGACGGTCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTG  
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCTCGTGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC  
ACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGCTTACGCGCGACACCCCTGGTGGCCCTGACCGACCGGAGAA  
GCGTGTAGCTTCCAGCAGCTGGTGGAGGAGGAGAAGCAGGCAAGCAGAACTTCTGTACACCATCAGACACGAC  
GGCAGCATCGGCGTGGAGAAGATCATCAACGCCAGAAAGACCAAGACCAAGCCAAAGGTGATCAAGGTGACCC  
GGACAACGGCGAGAGCATCATCTGCACCCCGACCCACAGTTTCATGCTGAGAGACGGCAGCTACAAGTGTGCGCA  
TGACCTGACCTGGACGACAGCCTGATGCCCCGACAGAAAGATCAGCACCACCGAGGACAGCGGCCACATG  
GAGGCCGTGTGAGTACAACCCAGCAATCGTGAACATCGAGGCCGTGAGCGAGACCATCGACGTGTACGACAT  
CGAGGTGCCCCACACCCACAACCTTCCGCTTGGCCAGCCACCATCACCATCACCATGGCTGGAGCCACCCCGAGT  
TCGAGAAGTAGTTCGAGTCTAGAGGCGCCGTTAAACCCCGTGTATGAGCTTGCAGCTGTGCTTCTAG  
TTGCCAGCCATCTGTGTTTGGCCCTCCCGCTGCTTCTTGGACCTTGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTT  
CTTAATAAAATCAGGAATTTTCCCGCTCAAGCTTAAATCGGGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTAGTGCTT  
GACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCAATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGC  
GGAAAGAACAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGGTGTGG  
TGGTTACGCGCAGCGTACCGCTACACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCTTTTGGCTTTCTTCCCTTCTTT  
CTGCTCAGCTTCCCGGCTTCCCGCTCAAGCTTAAATCGGGCATCCCTTTAGGGTTCCGATTAGTGCTT  
ACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGTTTACGCTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT  
TTCGCCCTTTGAGCTTGGAGTCCAGTCTTAAATAGTGGACTTGTGTCCAACTGGAACAACACTCAACCT  
ATCTCGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTTGGGGATTTTGGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTA  
ACAAAAATTTAAGCAATTAATCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAGTCCCGAGGCTCCCGAGG  
CAGGCAGAAATGATGCAAGCATGATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCGAGGCTCCCGAGCA  
GGCAGAAATGATGCAAGCATGATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAATCCCGCCATCCCGCC  
CCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGGGCCGAGG  
CCGCTCTGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTTGCAAAAAGCTC  
CCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCCGATCTGATCAGCAGTGTGAAAAAGCTGAACACCCGCGACGCTGTGT  
CGAGAAGTTTCTGATCGAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTG  
CTTTACGCTTCTGATGTAGGAGGGCGTGGATATGCTTCCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGAT  
CGTTATGTTTATCGGCACTTTTGCATCGGCCGCGCTCCGATTCCGGAAGTGTGACATTGGGGAATTACGCGA  
GAGCTGACCTATTGCACTCTCCCGCGTGCACAGGGTGTACAGTTGCAAGACCTGCTTGAACCGAAGTGCCTG  
CTGTTCTGACGCCGTGCGGAGGCCATGGATGCGATGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGC  
CATTTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTATATGCGCGATTGCTGATCCCATGT  
GTATCAATTGGCAACTGTGATGGACGACACCGTCACTGCGTCCGTGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTT  
GGGCGGAGGACTGCCCCAAGTCCGGCACCTCTGTGCACGCGGATTTCCGCTCCAACAATGCTTGCAGGACAAT  
GGCCGCATAACAGCGGTCTTACTGGAGCGAGGCGATGTTCGGGGATTCCCAATACGAGGTTCGCAACATCTT  
CTTCTGGAGGCGGTGGTTGGTTGTATGGAGCAGCAGCGCTACTTTCAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAG  
GATCCCGCGGCTCCGGGCTATATGCTCCGCTTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAAT  
TTCGATGATGAGCTTGGGCGCAGGGTGTGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTGCGGCGTAC  
ACAAATCGCCCGCAGAAGCGCGCGCTGTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAACCGCAG  
GCCCCAGCACTCTCGAGGGCAAGGAATAGCAGCTGTACGAGATTTGATTCCACCGCCGCTTCTATGAA  
AGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTT

10

20

30

40

50



CTTCGCCCCACCCCACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAA  
 AATAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATA  
 CCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCAIGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCAC  
 AATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACAT  
 TAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGTCGCCAGCTGCATTAAATGAATCGGCCAA  
 CGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGT  
 TCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAG  
 GAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCAT  
 AGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATA  
 AAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACC  
 TGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAG  
 GTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTACGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAAC  
 TCGTCTTGAGTCCAACCCGGAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAG  
 CGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTT  
 GGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCAC  
 CGCTGGTAGCGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTT  
 TGATCTTTTTCTACGGGCTCGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAIGAGATTATCA  
 AAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAC  
 TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCCATAG  
 TTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATA  
 CCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAG  
 TGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAG  
 TTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGCTGTTTGGTATGGCTTCA  
 TTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTT  
 CGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATT  
 CTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAG  
 TGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAA  
 AGTGCTCATCATTGGAACCGTTCTTCCGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCA  
 TGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTACGATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACA  
 GGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTCA  
 ATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGCTCATGACGGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAC  
 AAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

10

20

## 【0196】

Ssp GyrB S11 N - インテインドメインタグ化 hBU12 抗ヒトCD19 抗体、pCDNA3.1-hygro(+)-IgL 鎖発現ベクターの完全なDNA配列は以下の通りである。

30

## 【0197】

配列番号22(C末端にSsp GyrB S11 N - インテインドメイン、6×HisタグおよびstreptIIタグ(下線部)、およびHindIIIとNotIクローニング部位(影付部分)を含むhBU12のヒトIgG1 VL-CLカップ軽鎖コード領域)：

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGC  
 CAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCA  
 AGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGAIGTACGGGCCA  
 GATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCA  
 TATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCAT  
 GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATT  
 TACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGAC  
 GGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT  
 ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCAC  
 GGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCA  
 AAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG  
 AGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCC  
 AAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCTGGTGTGCTGACCCTGAA  
 AGGCGTCCAGTGTGACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCA

40

50

TCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTTTGTATGGTGATAGTTATATGAACCTGGTACCAACAGAAACCAGGA  
CAGCCACCCAAAGTCTCTATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCAGCCAGGTTTAGTGCCAGTGG  
GTCTGGGACAGACTTCACCTCAACATCCATCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTGACGAAA  
GTAATGAGGATCCGTGGACGTTGGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGTTGGCTGCACCATCTGTCT  
TTCTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTTCTA  
TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACACAG  
AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAC  
AAAGTCTACGCTGCGAAGTACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG  
CTTCAGCGGCGACACCTGGTGGCCCTGACCGACGGCAGAGCGTGAGCTTCGAGCAGCTGGTGGAGGAGGAGA  
AGCAGGGCAAGCAGAACTTCTGTACACCATCAGACACGACGGCAGCATCGGGCTGGAGAAGATCATCAACGCC  
AGAAAGACCAAGACCAACGCCAAGGTGATCAAGGTGACCTGGACAAACGGCAGAGCATCATCTGCACCCCCGA  
CCACAAGTTCATGCTGAGAGACGGCAGCTACAAGTGCCTGACCTGACCTGGACGACAGCCTGATGCCCC  
TGACAGAAAGATCAGCACCACCGAGGACAGCGGCCACATGGAGGCCGTGCTGAACCTACAACCACAGAATCTGT  
AATCTCGAGGCTAGTGCAGGACCATCGACGTGTACGACATCGAGGTGCCCCACACCCACAACCTTCGCCCTTGGC  
CAGCCACCATCACCATCACCATGGCTGGAGCCACCCAGTTTCGAGAAGTAGTTCGAGTCTAGAGGG  
CCCGTTTTAAACCGCTGATCAGCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGT  
GCCTTCCCTGACCTGGAAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTCTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTC  
TGATAGTGTGCTATCTTCTGGGGGTGGGTGGGACAGCAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC  
AGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGCGGAAAGAACAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCC  
CCACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACAGTTGCCA  
GCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCGGGCTTTCCCGGTCAAGCT  
CTAAATCGGGGCATCCCTTTAGGGTTCGATTTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAAATTGATTAGG  
TGATGGTTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTA  
ATAGTGGACTCTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAGGGATT  
TTGGGGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAATAATTAACGCGAATTAATTCTGTGGAAT  
GTGCTGATTTCCGGAAGTGTGGAAGTCCCGAGGCTCCCGAGGACAGCAGAGTATGCAAGCATGCATCTCAATT  
AGTCAGCAACCAAGGTGTGGAAGTCCCGAGGCTCCCGACGAGCAGAGTATGCAAGCATGCATCTCAATTAG  
TCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACITCGGCCATCCCGCCCTAACITCGGCCAGTTCCCGCCATTCTCCGCC  
CCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGAGGCCGAGGCGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT  
GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGAT  
CAGCACGTGATGAAAAAGCCTGAACCTACCGCGACGCTGTGTCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAGTTTCGACAGCGT  
CTCCGACCTGATGACGCTCTCGGAGGGCGAAGAAATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGATAGGAGGGCGTGGATATG  
TCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCGGATGGTTTCTACAAGATCGTTATGTTTTATCGGCACCTTTGCATCGGCCGCG  
TTGGTCTTGACCAACTCTCGAGGCTTGGTTGACGGCAATTCGATGATGACGCTTGGGCGCAGGGTTCGATCG  
GACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTGCGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAAGCGCGGCCGTCTGGAC  
CGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAACCGACGCCCGCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGC  
ACGTGCTACGAGATTTGATTTCCACCGCCGCCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCC  
GGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTCTTTCGCCCAACCCAACTTGTTTATTGCAGCTTA  
TAATGGTTACAAATAAGCAATAGCATCACAATTTCAAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTG  
GTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCA  
TGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACAATTCACACAAACATACGAGCCGGAAGCATAAA  
GTGTAAAGCCITGGGGTGCCATAATGAGTGAGCTAACTACATTAATTGCGTGTGCTCACTGCCCGCTTCCAGT  
CGGGAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGGCGC  
TCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA  
GGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGG  
CCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAATAAT  
CGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCCCT  
CGTGCGCTCTCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC  
TTTCTCAATGCTCAGCGTGTAGGTATCTCAGTTCCGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAGAA  
CCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTT  
ATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGA  
AGTGGTGGCCTAACCTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTC  
GGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACCAACCCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCA  
GCAGATTACCGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGGA

10

20

30

40

50



ACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAA  
AAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGA  
GGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTACCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGA  
TACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTA  
TCAGCAATAAACACGACCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTC  
TATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTA  
CAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTT  
ACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGC  
CGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTT  
CTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCG  
TCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCG  
AAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAG  
CATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGG  
GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCT  
CATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAG  
TGCCACCTGACGTC

10

## 【 0 1 9 8 】

配列番号 2 1 および 2 2 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。

20

## 【 0 1 9 9 】

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

## 【 0 2 0 0 】

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  
2 3 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）：

MKKWTNRLMTIAGVVLILVAAYLFAKPHIDNYLHDKDKDEKIEQYDKNVKEQASKDKKQQAQKPQIPKDKSKVAG  
YIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNRGVSF AEENESLDDQNI SIAGHTFIDRPNYQFTNLKAAKKGSMVYFKVGN  
ETRKYKMTSIRDVKPTDVGVLDEQKGKDKQLTLITCDDYNEKTGVWEKRKIFVATEVK

30

## 【 0 2 0 1 】

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 2 4 に示す：

ATGAAAAAATGGACAAATCGATTAATGACAATCGCTGGTGTGGTACTTATCCTAGTGGCAGCATATTTGTTTGC  
TAAACCACATATCGATAATTATCTTCACGATAAAGATAAAGATGAAAAGATTGAACAATATGATAAAAAATGTAA  
AAGAACAGGCGAGTAAAGATAAAAAAGCAGCAAGCTAAACCTCAAATTCCGAAAGATAAATCGAAAGTGGCAGGC  
TATATTGAAATTCCAGATGCTGATATTAAAGAACCAGTATATCCAGGACCAGCAACACCTGAACAATTAAATAG  
AGGTGTAAGCTTTGCAGAAGAAAAATGAATCACTAGATGATCAAAATATTTCAATTGCAGGACACACTTTCATTG  
ACCGTCCGAACATCAATTTACAAATCTTAAAGCAGCCAAAAAGGTAGTATGGTGTACTTTAAAGTTGGTAAT  
GAAACACGTAAGTATAAAATGACAAGTATAAGAGATGTTAAGCCTACAGATGTAGGAGTTCTAGATGAACAAAA  
AGGTAAAGATAAACAAATTAACATTAATTACTTGTGATGATTACAATGAAAAGACAGGCGTTTGGGAAAAACGTA  
AAATCTTTGTAGCTACAGAAGTCAAATAA

40

## 【 0 2 0 2 】

組換えソルターゼ A の、6 0 ~ 2 0 5 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 2 0 0 7 / 1 0 8 0 1 3 号 A 2 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（6 0 ~ 2 0 5 番目のアミノ酸）を下記配列番号 2 5 に  
示す：

50

ATGCAAGCTAAACCTCAAATTCGAAAGATAAATCGAAAGTGGCAGGCTATATTGAAATTCAGATGCTGATAT  
TAAAGAACCAGTATATCCAGGACCAGCAACACCTGAACAATTAAATAGAGGTGTAAGCTTTGCAGAAGAAAATG  
AATCACTAGATGATCAAAATATTTCAATTGCAGGACACACTTTTCATTGACCGTCCGAACATCAATTTACAAAT  
CTTAAAGCAGCCAAAAAAGGTAGTATGGTGTACTTTAAAGTTGGTAATGAAACACGTAAGTATAAAATGACAAG  
TATAAGAGATGTTAAGCCTACAGATGTAGGAGTTCTAGATGAACAAAAAGGTAAAGATAAACAAATTAACATTAA  
TTACTTGTGATGATTACAATGAAAAGACAGGCGTTTGGGAAAAACGTAAATCTTTGTAGCTACAGAAGTCAA  
CACCATCACCATCACCATTAA

#### 【 0 2 0 3 】

これは配列番号 2 6 のアミノ酸配列に翻訳される：

MQAKPQIPKDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNRGVSF AEENESLDDQNI SIAGHTFIDRPNYQFTN  
LKA AKKGS MVYFKVGN ETRKYKMTSIRDVKPTDVGVLDEQKGKDKQLTLITCDDYNEKTGVWEKRKIFVATEVK  
HHHHHH・

10

#### 【 0 2 0 4 】

大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) 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に、配列番号 2 5 に示す黄色ブドウ球菌の 6 × H i s 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 p E T 2 9 ( 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 B L 2 1 ( D E 3 ) をソルターゼ A の p E T 2 9 発現プラスミドで形質転換し、5 0 μ g / m L カナマイシンを含む L B 培地中、3 7 ° で、O D<sub>600</sub> 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 . 4 m M になるように I P T G を加え、3 時間、3 0 ° 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 ( 5 0 m M のトリス、p H 8 . 0、3 0 0 m M の N a C l ; 1 m M の M g C l<sub>2</sub>、2 単位 / m L の D N A s e I ( N E B )、2 6 0 n M のアプロチニン、1 . 2 μ M のロイペプチン、および 1 m M の P M S F 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、N i - N T A 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

#### 【 0 2 0 5 】

S D S - P A G E で判定される純度が 9 0 % を上回る画分をその後固定し、トリス緩衝食塩水 ( 2 5 m M のトリス、p H 7 . 5、1 5 0 m M の N a C l ) で透析することができる。次いで酵素濃度を A 2 8 0 の測定値から、公開されている吸光係数 1 7 , 4 2 0 M<sup>-1</sup> c m<sup>-1</sup> 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 2 0 m g の純度が 9 0 % 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 1 7 k D ) が生産された。S D S - P A G E およびウェスタンブ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

#### 【 0 2 0 6 】

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

#### 【 0 2 0 7 】

a ) C H O 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 I g G 1 抗体は、一過性の形質転換、例えば市販されている C H O 発現系、例えばフリースタイル ( F r e e S t y l e ) C H O 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 C H O システムを用いて発現させることができる。

40

#### 【 0 2 0 8 】

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 C H O 培地を用い、C H O 細胞を 1 m l 当たり 5 ~ 6 × 1 0<sup>6</sup> 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、3 7 °、7 . 5 % C O<sub>2</sub> 雰囲気下で、1 2 0 r p m 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 × 1 0<sup>6</sup> / m l 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 × 1 0<sup>6</sup> 個 / m l 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 Ig H および Ig L 発現プラスミドの 1 : 1 混合物 (DNA 40  $\mu$ g) を 600  $\mu$ l の OptiPro SF 培地 (インビトロジェン) に加える。同時に、600  $\mu$ l の OptiPro SF 培地に 40  $\mu$ 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% CO<sub>2</sub> 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。

10

#### 【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 (サーモフィッシャー、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 Ig G を低 pH 緩衝液、例えば 0.1 M 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 Ig G を直ちに 10 分の 1 量の 1 M トリス / Cl、pH 7.4 で中和する。Ig G 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。

20

#### 【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】

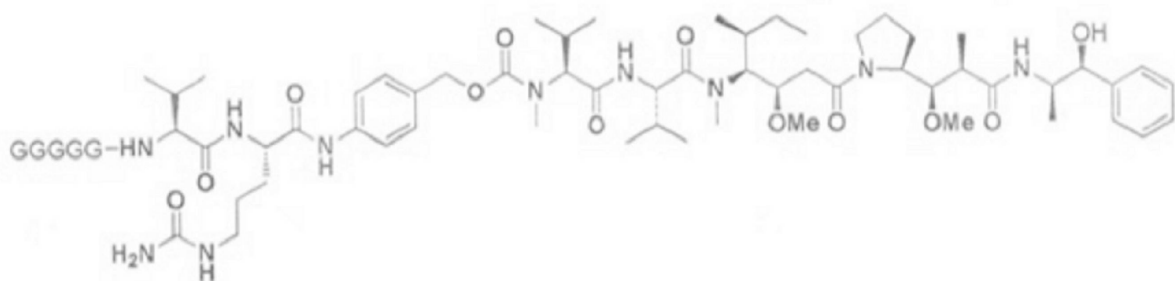
実施例 5: 毒素ペイロードが部位特異的に C 末端に結合したモノクローナル抗体のソルターゼ介在性およびスプリットインティン介在性ペプチド転移による生成

#### 【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 SSp GyrB 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ウリスチン A 毒素を、資格をもつ化学 CRO で特注することができる。

30

#### 【化 1】



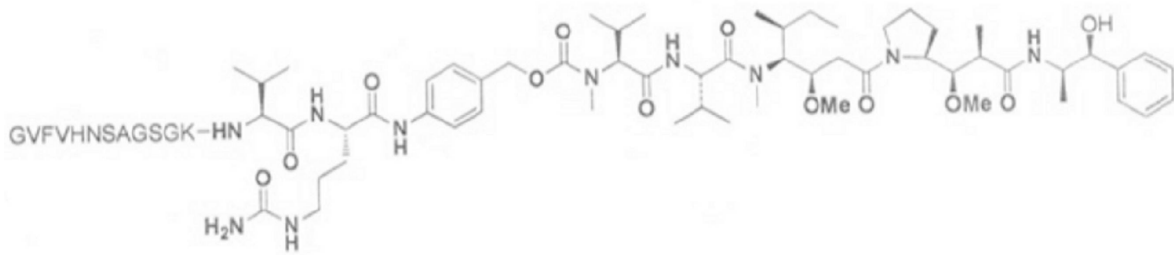
40

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

Me = メチル (-CH<sub>3</sub>) 基

G = グリシンアミノ酸残基

## 【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 ( - C H <sub>3</sub> ) 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

## 【 0 2 1 4】

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

## 【 0 2 1 5】

生理的なインキュベート用緩衝液、例えば、5 m M トリス / C l 、 1 5 m M の N a C l 、 6 m M の C a C l <sub>2</sub>、p H 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、5 0 μ M 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 μ M 濃度）を 3 7 ~ 4 0 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。

## 【 0 2 1 6】

反応を停止した後に 6 × H i s タグおよび / または s t r e p I I タグがないことを、例えば抗 H i s タグおよび / または抗 s t r e p I I タグ抗体を使ったウェスタンブロット解析または E L I S A 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。

## 【 0 2 1 7】

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 × H i s タグまたは s t r e p I I タグそれぞれと結合する N i c k e l - N T A カラムまたは s t r e p t a c t i n 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。

## 【 0 2 1 8】

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

## 【 0 2 1 9】

生理的なインキュベート用緩衝液、例えば、2 0 m M トリス / C l 、 2 5 0 m M の N a C l 、 1 m M の E D T A、p H 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 : 1 0 または 1 : 2 5 の比、I g G 抗体の濃度 5 μ M で）を室温または 3 7 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 に従って生産可能）を結合させることができる。

## 【 0 2 2 0】

反応を停止した後に 6 × H i s タグおよび / または s t r e p I I タグがないことを、例えば抗 H i s タグおよび / または抗 s t r e p I I タグ抗体を使ったウェスタンブロッ

ト解析またはE L I S A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×HisタグまたはstreptII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ィ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×HisおよびStreptII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×Hisタグ、およびStreptII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×Hisタグ+streptII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×His-タグ、およびstreptII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×His-タグ、およびstreptII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

30

【0225】

実施例7：トラスツズマブの重鎖または軽鎖とGly5修飾型DM1毒素のソルターゼA介在性結合

【0226】

Gly5修飾型DM1毒素（コンコルティス（Concortis）、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CaCl<sub>2</sub>）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℃で2時間、Tras-LC-GS-LHS結合反応は25℃で18時間インキュベートした。次いで各反応混合液をStrept-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Strept-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、1 ml のプロテイン A Hi Trap カラムを 10 倍量の平衡化緩衝液 (25 mM 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 (0.1 M 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 1 M 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、G 25 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、10 mM のコハク酸ナトリウム、pH 5.0、100 mg/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-複体の収量はそれぞれ、8.0 mg (76.2%) および 5.9 mg (56.2%) であった。プロテイン A と G 25 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理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 $\mu$ l	—	5 $\mu$ M
Tras-LC-GS-LHS (5.5mg/ml)	—	1911 $\mu$ l	5 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O	7775.25 $\mu$ l	7714 $\mu$ l	—
Gly <sub>5</sub> -DM1 (1mM)	1400 $\mu$ l	1400 $\mu$ l	100 $\mu$ M
ソルターゼ A (0.85mg/ml=およそ 50 $\mu$ M)	43.75 $\mu$ l	175 $\mu$ l	0.156/0.625 $\mu$ M
5×ソルターゼ緩衝液*	2800 $\mu$ l	2800 $\mu$ 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 4.6 mm × 3.5 cm、2.5  $\mu$ m カラムを使用し、移動相 A (1.5 M の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、25 mM の NaPi、pH = 6.95 ± 0.05) と移動相 B (75%、25 mM の NaPi、pH = 6.95 ± 0.05、25% IPA) を用い、0.8 mL / 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ビ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-

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  $\mu$ lのDMEM に入れた細胞を96ウェルプレートにプレATING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  $\mu$ l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  $\mu$ l加えた。最終的なADC濃度は20  $\mu$ g/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、5% CO<sub>2</sub>雰囲気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  $\mu$ lのCell Titer - Glo（登録商標）Luminescent 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分間攪拌した後、10分間、攪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EC<sub>50</sub>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LPETGSol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LPETGSolターゼA認識モチーフとstrept - II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、LPETGSolターゼAモチーフ、6xHisタグおよびstrept - IIタグ

10

20

30

40

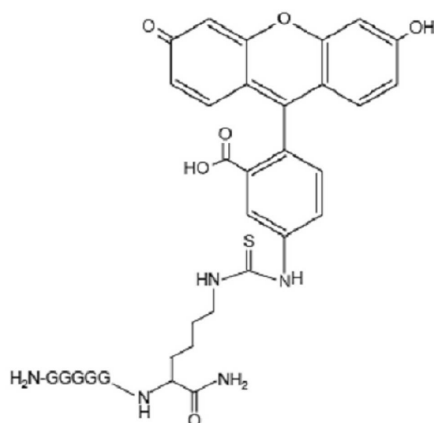
50

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った。

#### 【 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 】



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 x 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 ) スペースの有無によって、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ス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。

#### 【 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ス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



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った。

#### 【 0 2 3 6 】

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、ペンタ - 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 x 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。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 1 1 )。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。

#### 【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-WSHPQF EK	39, 40	GS-LPETG-G-HH HHHH-G-WSHPQF EK	41, 42
Ac10-HC-LS/LC -LS	LPETG-G-WSHPQ FEK	43, 44	LPETG-G-WSHPQ FEK	45, 46
Ac10-HC-LS/LC -GS-LS	LPETG-G-WSHPQ FEK	43, 44	GS-LPETG-G-WS HPQFEK	47, 48
Ac10-HC-LS/LC -GGS-LS	LPETG-G-WSHPQ FEK	43, 44	GGS-LPETG-G-W SHPQFEK	49, 50
Ac10-HC-LS/LC -GGGS-LS	LPETG-G-WSHPQ FEK	43, 44	GGGS-LPETG-G- WSHPQFEK	51, 52
Ac10-HC-LS/LC -GGGGS-LS	LPETG-G-WSHPQ FEK	43, 44	GGGGS-LPETG-G -WSHPQFEK	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

【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 $\mu$ M)	10	—	5 $\mu$ M
Ac10-HC-LS/LC-LS (3.75mg/ml=25 $\mu$ M)	—	10	5 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O	20	20	—
Gly <sub>5</sub> -FITC (1mM)	5	5	100 $\mu$ M
ソルターゼ A (2×段階希釈、およそ 50 $\mu$ M)	5	5	5→0.039 $\mu$ M
5×ソルターゼ緩衝液	10	10	1×

10

表 4. mAb s 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 $\mu$ M)	10	—	—	—	5 $\mu$ M
Ac10-HC-LS/LC-GGS-LS (3.75mg/ml=25 $\mu$ M)	—	10	—	—	5 $\mu$ M
Ac10-HC-LS/LC-GGGS-LS (3.75mg/ml=25 $\mu$ M)	—	—	10	—	5 $\mu$ M
Ac10-HC-LS/LC-GGGGS-LS (3.75mg/ml=25 $\mu$ M)	—	—	—	10	5 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O	20	20	20	20	—
Gly <sub>5</sub> -FITC (1mM)	5	5	5	5	100 $\mu$ M
ソルターゼ A (2×段階希釈、およそ 25 $\mu$ M)	5	5	5	5	2.5→0.039 $\mu$ M
5×ソルターゼ緩衝液	10	10	10	10	1×

20

30

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

## 【0237】

40

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】

Gly<sub>5</sub>- 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。

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Ac10

## 【0239】

表 4 の Ac10 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。

## 【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 vc - 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 vc - 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 vc - 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。

## 【0243】

図 12 のパネル B では、不均一な vc - 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。

【 0 2 4 6 】

1 1 . 1 グリシン修飾型アルファ - アマニチンの合成：

3 0 m g のアルファ - アマニチン（構造 1 ）（シグマ・アルドリッチ、注文番号 A 2 2 6 3 ）を 1 m l の無水 D M S O に溶解した。この溶液に 1 9 m g の N H - B o c - アミノ - ヘキシルブロミドを、次いでカリウム t e r t - ブトキシド（ 1 M の T H F 溶液、 3 5  $\mu$  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 t e r t - ブトキシド（ 1 M の T H F 溶液、 2 0  $\mu$  l ）を加えた。この反応物を 1 6 時間室温に維持した。酢酸（ 1 0  $\mu$  l ）を加え、粗混合液を直接、 R P - H P L C （サンファイヤー（ S u n f i r e ） C 1 8 5  $\mu$  3 c m  $\times$  1 0 c m カラム、 5 0 m L / 分、 5 ~ 5 0 % アセトニトリル / 水、 1 5 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（ 1 5 m g ）。これを T F A / D C M 溶液（ 1 / 1 、容積比、 1 m l ）により、室温で 3 0 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。

【 0 2 4 7 】

F m o c - G l y 5 - O H （ 8 m g ）を無水 D M F （ 0 . 5 m l ）に溶解した。H A T U （シグマ・アルドリッチ、注文番号 4 4 5 4 6 0 ）（ 6 m g ）を、次いで D I E A （ 1 0 m l ）（シグマ・アルドリッチ、注文番号 4 9 6 2 1 9 ）を加えた。この混合物を室温で 3 0 秒間そっと攪拌し、その後、D M F 中に溶解した化合物 3 の溶液（ 0 . 5 m l ）に移した。3 0 分後の L C / M S 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（ 3 0  $\mu$  l ）を加え、反応の進行を L C / M S で監視した。1 時間後、酢酸（ 1 0  $\mu$  l ）を加えて反応液を中和し、混合液を R P - H P L C （サンファイヤー C 1 8 5  $\mu$  3 c m  $\times$  2 5 c m カラム、 5 0 m L / 分、 2 ~ 4 0 % アセトニトリル / 水、 3 0 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（ 1 2 m g ）。化合物 5 の分析データを図 1 3 のパネル A で示している。

10

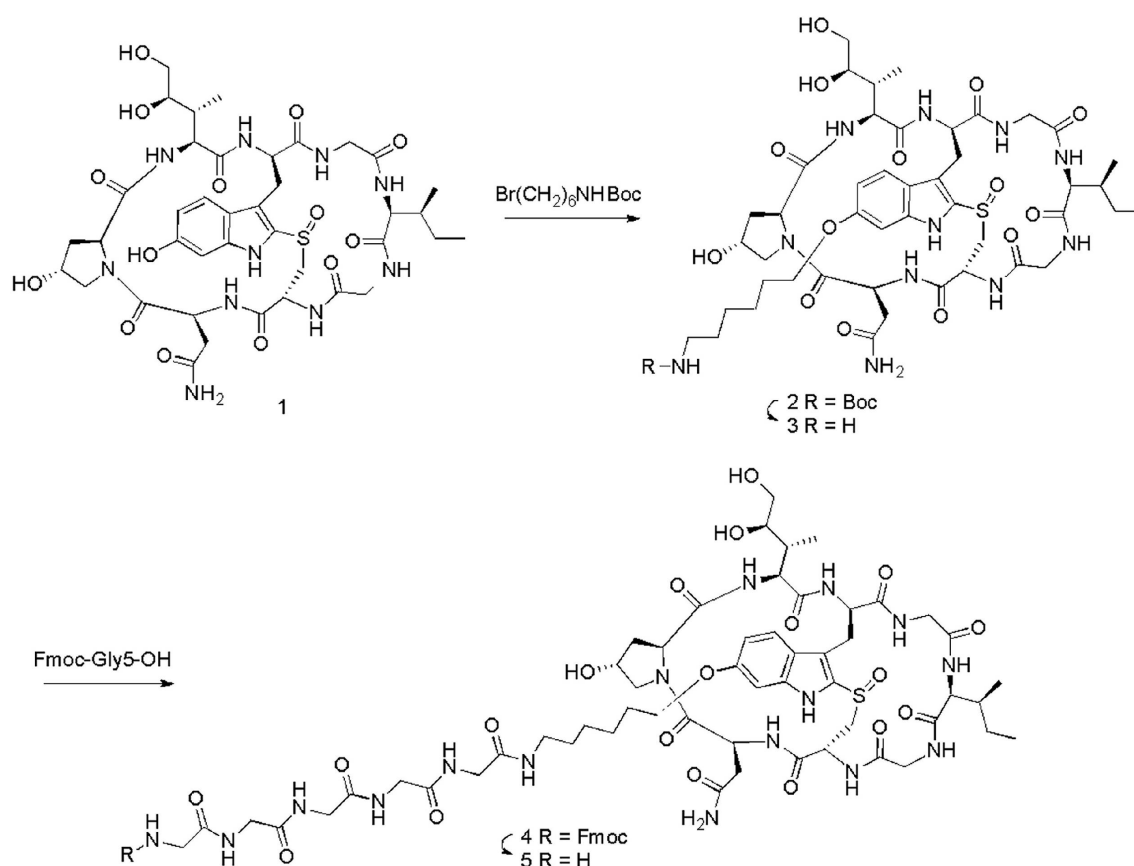
20

30

40

50

## 【化 4】



模式図 1 : グリシン修飾型アルファアマニチンの合成

## 【 0 2 4 8】

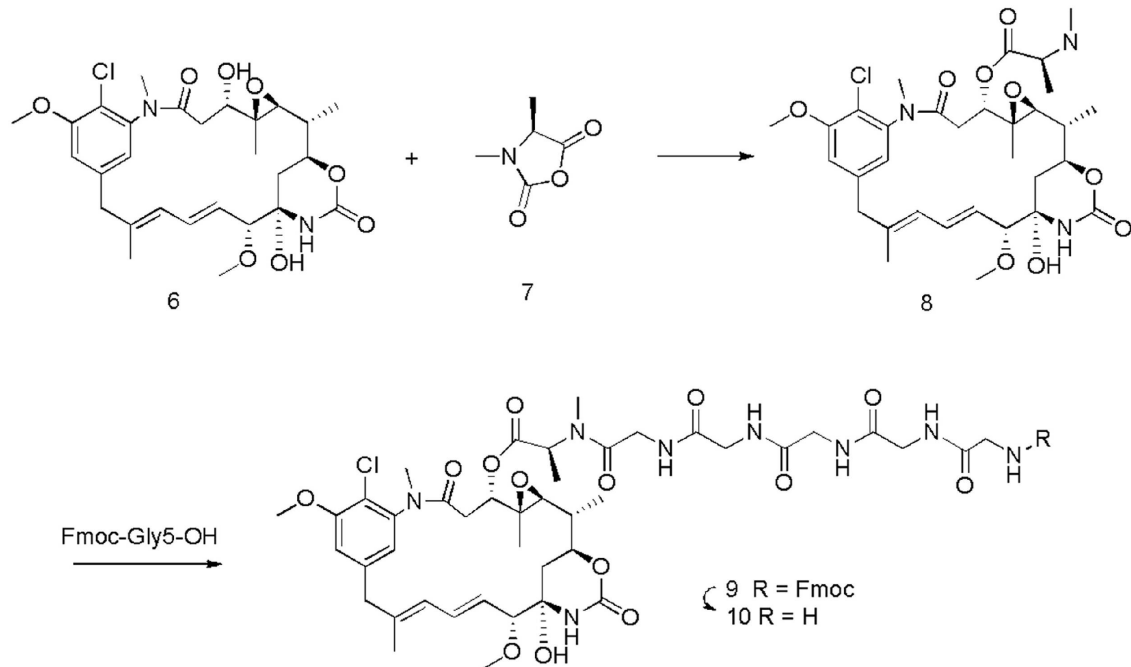
## 11. 2. グリシン修飾型メイトンシンの合成 :

メイトンシノール (0.6 g、1.1 mmol) (クリアシンス研究所 (Clearsynth 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・アルドリッチ、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 NaHCO<sub>3</sub> (水溶液、2 × 50 ml) および塩水 (50 ml) で洗浄した。有機相を MgSO<sub>4</sub> で乾燥させ、濃縮して粗メイトンシノール 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。

## 【 0 2 4 9】

Fmoc - Gly5 - OH (26 mg) を無水 DMF (1 ml) に溶解した。HATU (シグマ・アルドリッチ、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 (サンファイヤー (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。

## 【化 5】



模式図 2：グリシン修飾型メイタンシンの合成

## 【 0 2 5 0】

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 1 4 を参照のこと）。

## 【 0 2 5 1】

実施例 1 2：S K O V 3 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

## 【 0 2 5 2】

2 0 0  $\mu$  l の P B S / マトリゲル（1：1 の割合）に入れた  $5 \times 10^6$  個の S K O V 3 腫瘍細胞を、5 ~ 6 週齢のメスの N M R I ノ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 1 0 0 ~ 2 0 0  $\text{mm}^3$  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 1 0 匹）。無作為化した当日（0 日目）と 2 1 日目に、第 1、2 および 3 群の動物に、それぞれ、5 m l / k g の P B S、1 5 m g / k g の K a d c y l a（登録商標）または 1 5 m g / k g 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 1 5）。試験を 3 9 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楽死させた。

## 【 0 2 5 3】

試験の経過中、見せかけのために P B S を投与した対照動物の腫瘍は着実に、およそ 6 0 0  $\text{mm}^3$  まで成長した。一方、K a d c y l a（登録商標）で処理した動物の腫瘍は小さくなり、3 9 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 K a d c y l a（登録商標）の D A R 3 . 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 K a d c y l a（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 A D C は薬物対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 K a d c y l a（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。

## 【 0 2 5 4 】

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

## 【 0 2 5 5 】

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 0 5 5 - 0 5 6）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 G l y<sub>4</sub> - S e r スペース（ 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 0 5 7 ~ 0 5 8）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 1 5 7 m g / 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、 G l y<sub>5</sub> - F I T C 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。4 2 に 4 時間置いた後、変性還元 S D S - P A G E ゲル電気泳動で反応液を解析した。ゲルを U V 箱の上に置いて F I T C 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 1 6）。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、 A D C 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

20

## 【 0 2 5 6 】

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。

## [ 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

ずれか 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、

・スプリットインティンまたは 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 カ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関係は化学量論的に規定することができる、[ 1 ] ~ [ 1 3 ] のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 1 5 ]

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、[ 1 4 ] に記載の方法。

[ 1 6 ]

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 ] ~ [ 1 5 ] のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 1 7 ]

[ 1 ] ~ [ 1 6 ] 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。

[ 1 8 ]

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、[ 1 7 ] の免疫リガンド / ペイロード複合体。

[ 1 9 ]

[ 1 ] ~ [ 1 8 ] 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。

[ 2 0 ]

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、[ 1 9 ] に記載の方法。

[ 2 1 ]

$Gly_n$  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。

[ 2 2 ]

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 2 1 に記載の低分子量ペイロード。

[ 2 3 ]

[ 2 1 ] または [ 2 2 ] 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。

[ 2 4 ]

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 ] ~ [ 1 6 ] のいずれか 1 項に記載の方法。

参考文献

アントスら ( 2 0 0 9 a ) 米国化学会誌 1 3 1、1 0 8 0 0 ~ 1 0 8 0 1 頁

アントスら ( 2 0 0 9 b ) 米国生化学分子生物学会誌 ( J . B i o l . C h e m . ) 2 8

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、12047～57  
 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  
 ランベール(2012)英国臨床薬理学雑誌( British J Clin Pharmacol ) 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  
 パルサラシーら(2007)生物複合体化学( Bioconjugate Chem. ) 18、469～476  
 パーラー(2002)核酸研究( Nucl. 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 7 】

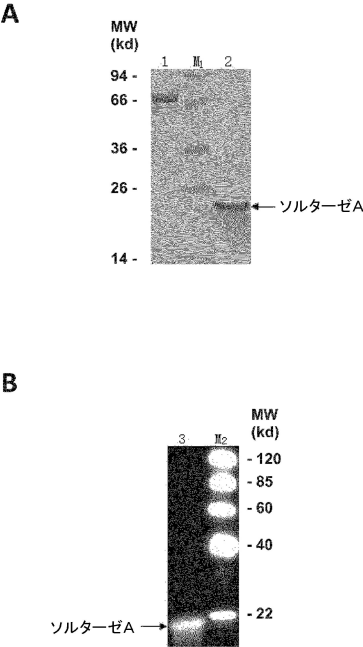


図 7

【 図 8 】

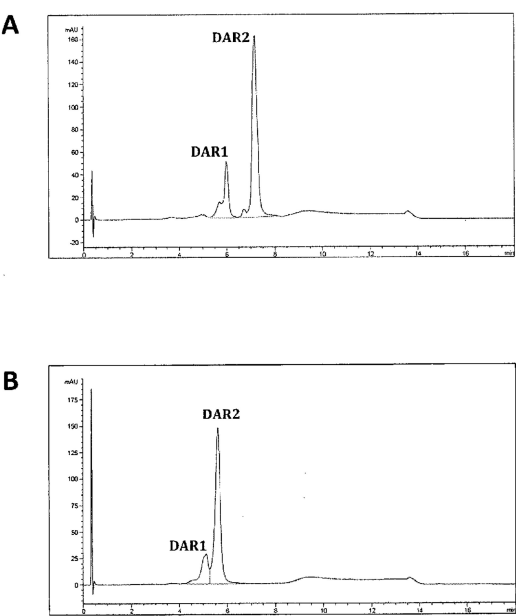


図 8

【 図 9 】

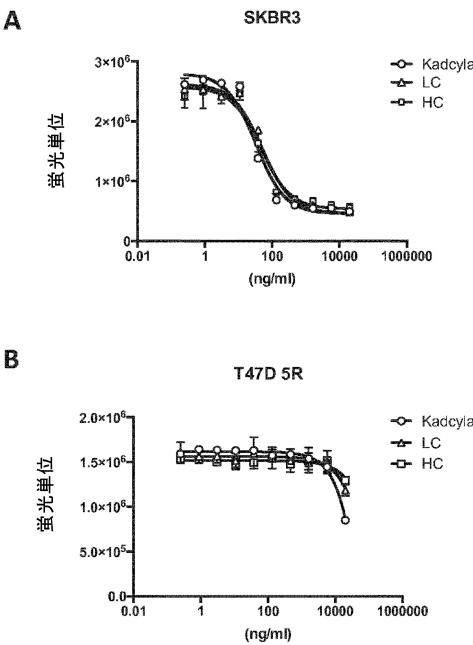


図 9

【 図 10 】

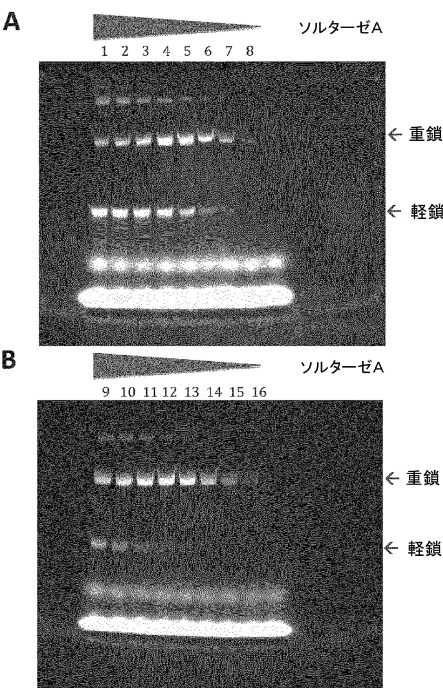


図 10

10

20

30

40

50

【図 1 1】

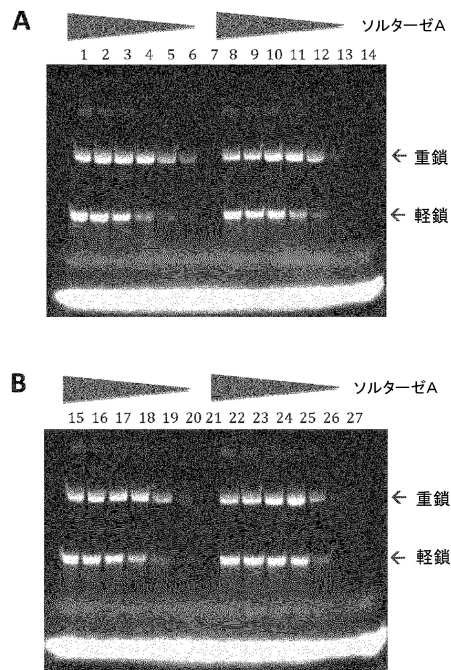


図 11

【図 1 2】

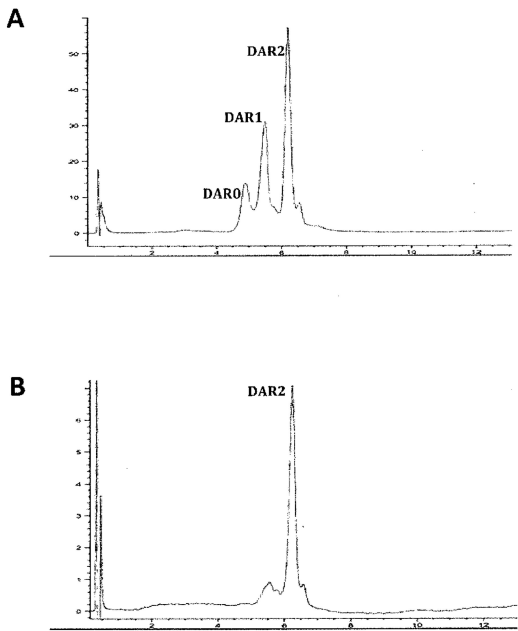
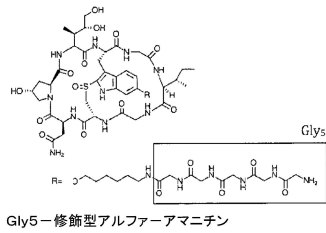
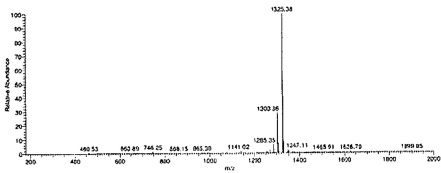


図 12

【図 1 3 A】



Gly5-修飾型アルファアミニチンの質量分析:



RP-HPLCによるGly5-修飾型アルファアミニチンの分析:

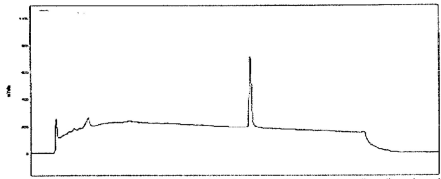
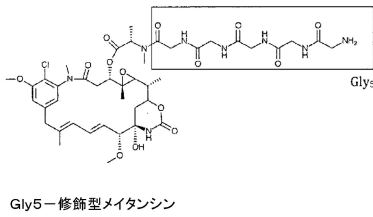
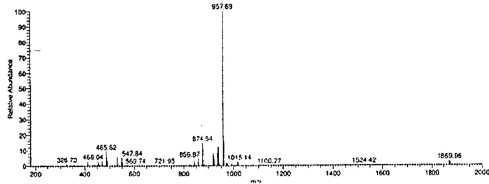


図 13A

【図 1 3 B】



Gly5-修飾型メイトンシンの質量分析:



RP-HPLCによるGly5-修飾型メイトンシンの分析:

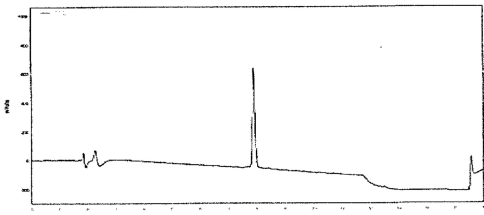


図 13B

10

20

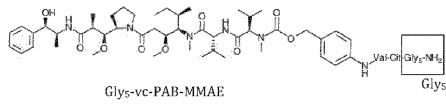
30

40

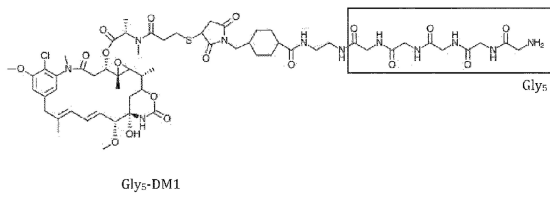
50

【 図 1 4 A 】

構造1:



構造2:



構造3:

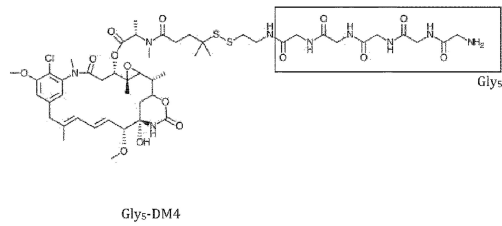
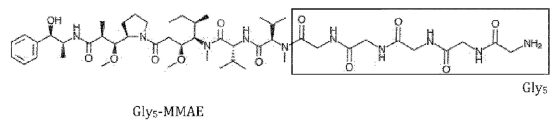


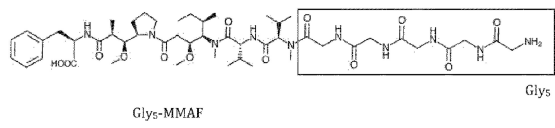
図14A

【 図 1 4 B 】

構造4:



構造5:



構造6:

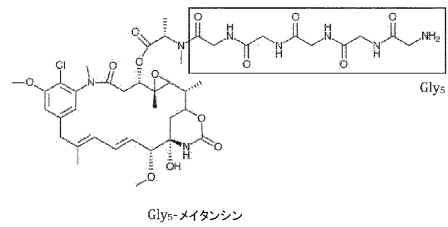
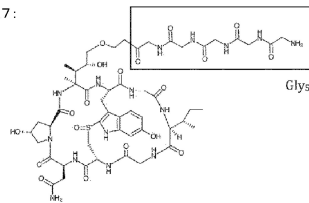


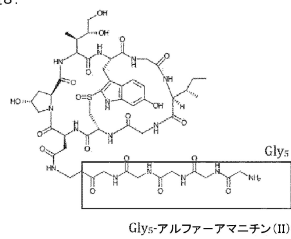
図14B

【 図 1 4 C 】

構造7:



構造8:



構造9:

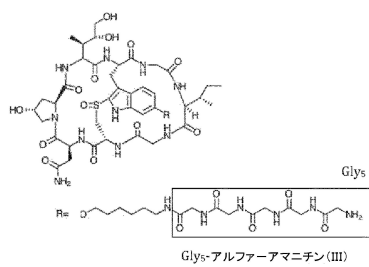


図14C

【 図 1 5 】

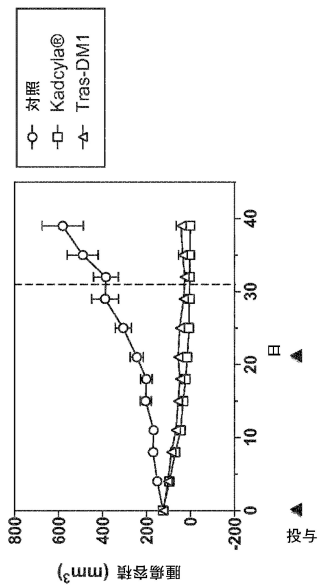


図15

10

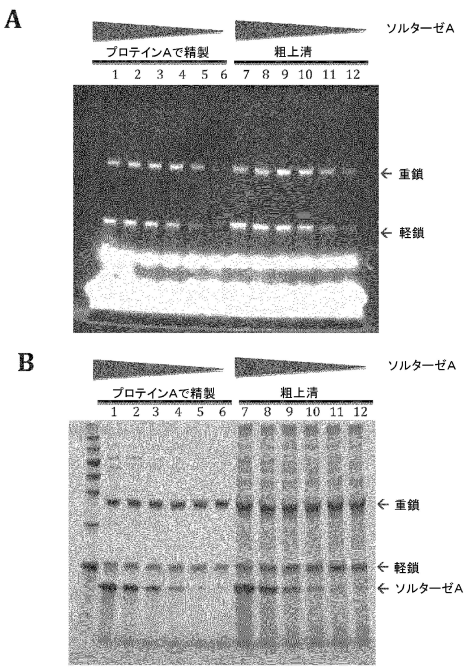
20

30

40

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 , 2011年, Vol. 6 , I s s u e 4 , e 18342 , p p . 1  
- 6 , S u p p o r t i n g I n f o r m a t i o nM 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 , 2013年8月14日,  
V o l . 12 , p p . 2273 - 2281T 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 , 2012年, V o  
l . 22 , N o . 4 , p . 105 - 111

日本外科系連合学会誌, 1997年, V o l . 22 , N o . 4 , p . 555 - 561

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 ) , 2007年, p . 1 - 7N a t u r e P r o t o c o l s , 2013年8月29日, V o l . 8 , N o . 9 ,  
p p . 1787 - 1799

(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 7580 ( J D r e a m I I I )