

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-523459

(P2009-523459A)

(43) 公表日 平成21年6月25日 (2009.6.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00 Z N A	4 B O 6 4
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 107 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-551863 (P2008-551863)	(71) 出願人	502197046
(86) (22) 出願日	平成19年1月24日 (2007.1.24)		ドマンティス リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成20年9月16日 (2008.9.16)		イギリス国 ティーダブリュ8 9 ジーエ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2007/000227		ス ミドルセックス, プレントフォード,
(87) 国際公開番号	W02007/085814		グレート ウェスト ロード 980
(87) 国際公開日	平成19年8月2日 (2007.8.2)	(74) 代理人	100091096
(31) 優先権主張番号	60/761, 708		弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成18年1月24日 (2006.1.24)	(74) 代理人	100096183
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石井 貞次
(31) 優先権主張番号	PCT/GB2006/004559	(74) 代理人	100118773
(32) 優先日	平成18年12月5日 (2006.12.5)		弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 天然の連結部を含有する融合タンパク質

(57) 【要約】

少なくとも1つの天然の連結部を含む組換え融合タンパク質の調製方法を記載する。少なくとも1つの天然の連結部を含有する融合タンパク質は、従来の融合タンパク質と比較して、低減された免疫原性可能性、改良された安定性、低減された凝集傾向、改良された発現、および／または改良された生成収率を有する。少なくとも1つの天然の連結部を含む新規な融合タンパク質、該融合タンパク質を含む組成物、および該タンパク質の使用方法をも開示する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ハイブリッドドメインを含む組換え融合タンパク質であって、該ハイブリッドドメインが、第 1 のポリペプチドに由来する第 1 の部分と第 2 のポリペプチドに由来する第 2 の部分とを含み、該第 1 のポリペプチドが、式 (X 1 - Y - X 2) を有するドメインを含み、かつ該第 2 のポリペプチドが、式 (Z 1 - Y - Z 2) を有するドメインを含み、

〔式中、

Y は、保存アミノ酸モチーフであり、

X 1 および Z 1 は、それぞれ、該第 1 のポリペプチド中および該第 2 のポリペプチド中の Y のアミノ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフであり、

X 2 および Z 2 は、それぞれ、該第 1 のポリペプチド中および該第 2 のポリペプチド中の Y のカルボキシ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフであり、

付帯条件として、X 1 および Z 1 のアミノ酸配列が同一である場合、X 2 および Z 2 のアミノ酸配列は同一ではなく、X 2 および Z 2 のアミノ酸配列が同一である場合、X 1 および Z 1 のアミノ酸配列は同一ではない〕

該ハイブリッドドメインが、式

(X 1 - Y - Z 2)

を有する、上記組換え融合タンパク質。

【請求項 2】

前記組換え融合タンパク質が、式

D - (X 1 - Y - Z 2) - E

〔式中、

D は、不在であるかまたは前記第 1 のポリペプチド中の (X 1 - Y - X 2) のアミノ末端に隣接するアミノ酸配列であり、そして

E は、不在であるかまたは前記第 2 のポリペプチド中の (Z 1 - Y - Z 2) のカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である〕

を有する構造を含むように、前記ハイブリッドドメインが、アミノ末端アミノ酸配列 D に結合されており、かつ／またはカルボキシ末端アミノ酸配列 E に結合されている、請求項 1 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 3】

D が存在する、請求項 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 4】

E が存在する、請求項 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 5】

D および E が存在する、請求項 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 6】

(X 1 - Y - Z 2) がハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインである、請求項 1 または請求項 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 7】

前記ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインがハイブリッド抗体可変ドメインである、請求項 6 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 8】

Y がフレームワーク領域 (FR) 4 中に存在する、請求項 7 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 9】

Y が Gly Xaa Gly Thr または Gly Xaa Gly Thr Xaa (Val / Leu) である、請求項 8 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 10】

X 1 が、FR 1、相補性決定領域 (CDR) 1、FR 2、CDR 2、FR 3、および CDR 3 を含む抗体可変ドメインの一部である、請求項 8 に記載の組換え融合タンパク質

10

20

30

40

50

。

【請求項 11】

Y が FR 3 中に存在する、請求項 7 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 12】

Y が Glu Asp Thr Ala、Val Tyr Tyr Cys または Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys である、請求項 11 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 13】

X 1 が、FR 1、CDR 1、FR 2、および CDR 2 を含む抗体可変ドメインの一部である、請求項 11 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 14】

(X 1-Y-Z 2) がハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインである、請求項 1 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 15】

前記ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインがハイブリッド抗体定常ドメインである、請求項 14 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 16】

Y が、(Ser/Ala/Gly) Pro (Lys/Asp/Ser) Val、(Ser/Ala/Gly) Pro (Lys/Asp/Ser) Val Phe、Lys Val Asp Lys (Ser/Arg/Thr)、または Val Thr Val である、請求項 15 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 17】

Y が、Ser Pro Lys Val、Ser Pro Asp Val、Ser Pro Ser Val、Ala Pro Lys Val、Ala Pro Asp Val、Ala Pro Ser Val、Gly Pro Lys Val、Gly Pro Asp Val、Gly Pro Ser Val、Ser Pro Lys Val Phe、Ser Pro Asp Val Phe、Ser Pro Ser Val Phe、Ala Pro Lys Val Phe、Ala Pro Asp Val Phe、Ala Pro Ser Val Phe、Gly Pro Lys Val Phe、Gly Pro Asp Val Phe、Gly Pro Ser Val Phe、Lys Val Asp Lys Ser、Lys Val Asp Lys Arg、Lys Val Asp Lys Thr、または Val Thr Val よりなる群から選択される、請求項 16 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 18】

D が不在であり、(X 1-Y-Z 2) がハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインであり、かつ E が免疫グロブリン定常ドメインである、請求項 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 19】

(X 1-Y-Z 2) のアミノ末端に存在する第 2 の免疫グロブリン可変ドメインをさらに含む、請求項 18 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 20】

D が免疫グロブリン可変ドメインであり、かつ (X 1-Y-Z 2) がハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインである、請求項 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 21】

(X 1-Y-Z 2) がハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインであり、かつ E が免疫グロブリン定常ドメインである、請求項 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 22】

D が不在であり、かつ前記融合タンパク質が、(X 1-Y-Z 2) のアミノ末端に存在するさらなるドメインを含む、請求項 21 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 23】

D が免疫グロブリン定常ドメインであり、かつ (X 1-Y-Z 2) がハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインである、請求項 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 24】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが両方ともに同一のタンパク質スーパーファミリーのメンバーである、請求項 1 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 5】

前記タンパク質スーパーファミリーが、免疫グロブリンスーパーファミリー、TNFスーパーファミリー、およびTNFレセプタースーパーファミリーよりなる群から選択される、請求項 1 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 6】

前記第 1 のポリペプチドおよび前記第 2 のポリペプチドが両方ともヒトポリペプチドである、請求項 1 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 7】

X 1、X 2、Z 1、および Z 2 が、それぞれ独立して、約 1 ～ 約 2 0 0 アミノ酸よりなる、請求項 1 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 8】

前記ハイブリッドドメインが免疫グロブリン可変ドメインとほぼ等しいサイズである、請求項 1 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 9】

前記ハイブリッドドメインが免疫グロブリン定常ドメインとほぼ等しいサイズである、請求項 1 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 3 0】

前記ハイブリッドドメインが約 8 k D a ～ 約 2 0 k D a である、請求項 1 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 3 1】

請求項 1 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質をコードする、単離された組換え核酸分子。

【請求項 3 2】

請求項 1 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質をコードする組換え核酸分子を含む、宿主細胞。

【請求項 3 3】

組換え核酸の発現に好適な条件下で請求項 3 2 に記載の宿主細胞を維持することにより該組換え核酸を発現させて組換え融合タンパク質を産生することを含む、組換え融合タンパク質の産生方法。

【請求項 3 4】

前記組換え融合タンパク質を単離することをさらに含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

免疫グロブリン定常ドメインに融合されているハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインを含む組換え融合タンパク質であって、該ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインが、第 1 の免疫グロブリン由来の第 1 の免疫グロブリン F R に由来する部分と第 2 の免疫グロブリン由来の第 2 の免疫グロブリン F R に由来する部分とを含むハイブリッドフレームワーク領域 (F R) を含み、該第 1 の免疫グロブリン F R および該第 2 の免疫グロブリン F R が、それぞれ、保存アミノ酸モチーフ Y を含み、かつ該ハイブリッド免疫グロブリン F R が、式

$$(F ^ { 1 } - Y - F ^ { 2 })$$

〔式中、

Y は、該保存アミノ酸モチーフであり、

F ¹ は、該第 1 の免疫グロブリン F R 中の Y のアミノ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフであり、そして

F ² は、該第 2 の免疫グロブリン F R 中の Y のカルボキシ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフである〕

を有する、上記組換え融合タンパク質。

【請求項 3 6】

Yが、前記第1の免疫グロブリンおよび前記第2の免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)1、FR2、またはFR3中に位置する、請求項35に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項37】

Yが、前記第1の免疫グロブリンおよび前記第2の免疫グロブリンのFR4中に位置する、請求項35に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項38】

前記ハイブリッドFRがハイブリッドFR4であり、かつF²が、前記免疫グロブリン定常ドメインを含む天然に存在するタンパク質中の前記免疫グロブリン定常ドメインのアミノ末端に隣接する、請求項35のに記載の組換え融合タンパク質。

10

【請求項39】

前記免疫グロブリン定常ドメインがT細胞レセプター定常ドメインであり、かつ前記第2の免疫グロブリンFRがT細胞レセプター可変ドメイン由来のFR4である、請求項35に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項40】

F²が、天然に存在する免疫グロブリン中の前記免疫グロブリン定常ドメインのアミノ末端に存在する、請求項39に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項41】

前記免疫グロブリン定常ドメインが抗体軽鎖定常ドメインであり、かつ前記第2の免疫グロブリンFRが抗体軽鎖可変ドメイン由来のFR4である、請求項35に記載の組換え融合タンパク質。

20

【請求項42】

F²が、天然に存在する抗体軽鎖中の前記抗体軽鎖定常ドメインのアミノ末端に存在する、請求項41に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項43】

前記抗体定常ドメインがCκまたはCλであり、かつ前記第2の抗体FR4がそれぞれVκFR4またはVλFR4である、請求項41に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項44】

前記第1の抗体可変ドメインが抗体重鎖可変ドメインである、請求項43に記載の組換え融合タンパク質。

30

【請求項45】

前記免疫グロブリン定常ドメインが抗体重鎖定常ドメインであり、かつ前記第2の免疫グロブリンFRが抗体重鎖可変ドメイン由来のFR4である、請求項35に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項46】

前記第1の免疫グロブリンが非ヒト免疫グロブリンである、請求項35に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項47】

前記非ヒト免疫グロブリンが、マウス、ラット、サメ、サカナ、オポッサム、ヒツジ、ブタ、ラクダ科動物、ウサギ、または非ヒト霊長動物に由来する免疫グロブリンである、請求項46に記載の組換え融合タンパク質。

40

【請求項48】

前記非ヒト免疫グロブリンがラクダ科動物またはナースシャークの重鎖抗体である、請求項47に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項49】

前記第2の免疫グロブリンがヒト免疫グロブリンである、請求項46に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項50】

前記免疫グロブリン定常ドメインがヒト免疫グロブリン定常ドメインである、請求項35に記載の組換え融合タンパク質。

50

【請求項 51】

前記ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインがハイブリッド抗体可変ドメインである、請求項 35 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 52】

Y が Gly Xaa Gly Thr である、請求項 51 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 53】

F¹ が Phe であり、かつ F² が (Leu/Met/Thr) Val The Val Ser Ser である、請求項 52 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 54】

F² が、Leu Val The Val Ser Ser、Met Val The Val Ser Ser、および Thr Val The Val Ser Ser よりなる群から選択される、請求項 53 に記載の組換え融合タンパク質。

10

【請求項 55】

前記免疫グロブリン定常ドメインがヒト抗体定常ドメインである、請求項 53 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 56】

前記ヒト抗体定常ドメインが IgG CH1 ドメインである、請求項 55 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 57】

前記ハイブリッド抗体可変ドメインがハイブリッド重鎖可変ドメインであり、F¹ が Trp であり、かつ F² が (Lys/Arg) (Val/Leu) (Glu/Asp) Ile Lys または (Lys/Gln/Glu) (Val/Leu) (Thr/Ile) (Val/Ile) Leu である、請求項 52 に記載の組換え融合タンパク質。

20

【請求項 58】

F² が、Lys Val Glu Ile Lys、Lys Val Asp Ile Lys、Lys Leu Glu Ile Lys、Lys Leu Asp Ile Lys、Arg Val Glu Ile Lys、Arg Val Asp Ile Lys、Arg Leu Glu Ile Lys、Arg Leu Asp Ile Lys、Lys Val Thr Val Leu、Lys Val Thr Ile Leu、Lys Val Ile Val Leu、Lys Val Ile Ile Leu、Lys Leu Thr Val Leu、Lys Leu Thr Ile Leu、Lys Leu Ile Val Leu、Lys Leu Ile Ile Leu、Gln Val Thr Val Leu、Gln Val Thr Ile Leu、Gln Val Ile Val Leu、Gln Val Ile Ile Leu、Gln Leu Thr Val Leu、Gln Leu Thr Ile Leu、Gln Leu Ile Val Leu、Gln Leu Ile Ile Leu、Glu Val Thr Val Leu、Glu Val Thr Ile Leu、Glu Val Ile Val Leu、Glu Val Ile Ile Leu、Glu Leu Thr Val Leu、Glu Leu Thr Ile Leu、Glu Leu Ile Val Leu、および Glu Leu Ile Ile Leu よりなる群から選択される、請求項 57 に記載の組換え融合タンパク質。

30

【請求項 59】

前記抗体定常ドメインがヒト抗体軽鎖定常ドメインである、請求項 57 に記載の組換え融合タンパク質。

40

【請求項 60】

Y が Gly Xaa Gly Thr Xaa (Val/Leu) である、請求項 51 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 61】

F¹ が Phe であり、かつ F² が Thr Val Ser Ser である、請求項 60 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 62】

前記抗体定常ドメインがヒト抗体定常ドメインである、請求項 61 に記載の組換え融合タンパク質。

50

【請求項 63】

前記ヒト抗体定常ドメインが I g G C H 1 ドメインまたは I g G C H 2 ドメインである、請求項 62 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 64】

前記 I g G が I g G 1 または I g G 4 である、請求項 63 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 65】

F^1 が Trp であり、かつ F^2 が (Glu / Asp) Ile Lys または (Thr / Ile) (Val / Ile) Leu である、請求項 60 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 66】

F^2 が、Glu Ile Lys、Asp Ile Lys、Thr Val Leu、Thr Ile Leu、Ile Val Leu、および Ile Ile Leu よりなる群から選択される、請求項 65 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 67】

前記抗体定常ドメインがヒト抗体軽鎖定常ドメインである、請求項 65 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 68】

前記組換え融合タンパク質が、式 $(F^1 - Y - F^2) - C_L$ 、 $(F^1 - Y - F^2) - C_{H1}$ 、 $(F^1 - Y - F^2) - C_{H2}$ 、または $(F^1 - Y - F^2) - F_c$ を有する部分構造を含む、請求項 31 ~ 67 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 69】

前記組換え融合タンパク質が第 2 の免疫グロブリン可変ドメインをさらに含む、請求項 68 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 70】

前記第 2 の免疫グロブリン可変ドメインが $(F^1 - Y - F^2)$ のアミノ末端に存在する、請求項 69 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 71】

前記第 2 の免疫グロブリン可変ドメインが $(F^1 - Y - F^2)$ のカルボキシ末端に存在する、請求項 69 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 72】

請求項 35 ~ 71 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質をコードする、単離された組換え核酸分子。

【請求項 73】

請求項 35 ~ 71 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質をコードする組換え核酸分子を含む、宿主細胞。

【請求項 74】

組換え核酸の発現に好適な条件下で請求項 73 に記載の宿主細胞を維持することにより該組換え核酸を発現させて組換え融合タンパク質を産生することを含む、組換え融合タンパク質の産生方法。

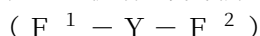
【請求項 75】

前記組換え融合タンパク質を単離することをさらに含む、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 76】

ヒト抗体定常ドメインに融合されている非ヒト抗体可変領域を含む組換え融合タンパク質であって、改良点として、

該非ヒト抗体可変領域が、式



〔式中、

F^1 は、Phe または Trp であり、

Y は Gly Xaa Gly Thr であり、かつ F^2 は、(Leu / Met / Thr) Val Thr Val Ser Ser、(Lys / Arg) (Val / Leu) (Glu / Asp

10

20

30

40

50

) IleLys、もしくは(Lys/Gln/Glu)(Val/Leu)(Thr/Ile)(Val/Ile)Leuであるか、または

YはGlyXaaGlyThrXaa(Val/Leu)であり、かつF²は、ThrValSerSer、(Glu/Asp)IleLys、もしくは(Thr/Ile)(Val/Ile)Leuである]

を有するハイブリッドFR4を含む、

上記組換え融合タンパク質。

【請求項77】

前記ヒト抗体定常ドメインがCH1ドメインであり、YがGlyXaaGlyThrであり、かつF²が(Leu/Met/Thr)ValThrValSerSerである、請求項76に記載の組換え融合タンパク質。

10

【請求項78】

F²が、LeuValThrValSerSer、MetValThrValSerSer、およびThrValThrValSerSerよりなる群から選択される、請求項77に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項79】

前記ヒト抗体定常ドメインがCH1ドメインであり、YがGlyXaaGlyThrXaa(Val/Leu)であり、かつF²がThrValSerSerである、請求項76に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項80】

前記ヒト抗体定常ドメインが軽鎖定常ドメインであり、YがGlyXaaGlyThrであり、かつF²が(Lys/Arg)(Val/Leu)(Glu/Asp)IleLysまたは(Lys/Gln/Glu)(Val/Leu)(Thr/Ile)(Val/Ile)Leuである、請求項76に記載の組換え融合タンパク質。

20

【請求項81】

F²が、LeuValThrValSerSer、MetValThrValSerSer、ThrValThrValSerSer、LysValGluIleLys、LysValAspIleLys、LysLeuGluIleLys、LysLeuAspIleLys、ArgValGluIleLys、ArgValAspIleLys、ArgLeuGluIleLys、ArgLeuAspIleLys、LysValThrValLeu、LysValThrIleLeu、LysValIleValLeu、LysValIleIleLeu、LysLeuThrValLeu、LysLeuThrIleLeu、LysLeuIleValLeu、LysLeuIleIleLeu、GlnValThrValLeu、GlnValThrIleLeu、GlnValIleValLeu、GlnValIleIleLeu、GlnLeuThrValLeu、GlnLeuThrIleLeu、GlnLeuIleValLeu、GlnLeuIleIleLeu、GluValThrValLeu、GluValThrIleLeu、GluValIleValLeu、GluValIleIleLeu、GluLeuThrValLeu、GluLeuThrIleLeu、GluLeuIleValLeu、およびGluLeuIleIleLeuよりなる群から選択される、請求項80に記載の組換え融合タンパク質。

30

40

【請求項82】

前記ヒト抗体定常ドメインが軽鎖定常ドメインであり、YがGlyXaaGlyThrXaa(Val/Leu)であり、かつF²が(Glu/Asp)IleLysまたは(Thr/Ile)(Val/Ile)Leuである、請求項76に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項83】

YがGlyXaaGlyThrXaaValまたはGlyXaaGlyThrXaaLeuであり、かつF²が、GluIleLys、AspIleLys、ThrValLeu、ThrIleLeu、IleValLeu、およびIleIleLeuよりなる群か

50

ら選択される、請求項 8 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 8 4】

請求項 7 6 ～ 8 3 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質をコードする、単離された組換え核酸分子。

【請求項 8 5】

請求項 7 6 ～ 8 3 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質をコードする組換え核酸分子を含む、宿主細胞。

【請求項 8 6】

組換え核酸の発現に好適な条件下で請求項 8 5 に記載の宿主細胞を維持することにより該組換え核酸を発現させて組換え融合タンパク質を産生することを含む、組換え融合タンパク質の産生方法。

【請求項 8 7】

前記組換え融合タンパク質を単離することをさらに含む、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインに融合された免疫グロブリン可変ドメインを含む組換え融合タンパク質であって、該ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインが、第 1 の免疫グロブリン定常ドメイン由来の部分と第 2 の免疫グロブリン定常ドメイン由来の部分とを含み、該第 1 の免疫グロブリン定常ドメインおよび該第 2 の免疫グロブリン定常ドメインが、それぞれ、保存アミノ酸モチーフ Y を含み、該ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインが、式

$$C^1 - Y - C^2$$

〔式中、

Y は、該保存アミノ酸モチーフであり、

C¹ は、該第 1 の免疫グロブリン定常領域中の Y のアミノ末端に隣接するアミノ酸モチーフであり、

C² は、該第 2 の免疫グロブリン定常領域中の Y のカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフである〕

を有する、上記組換え融合タンパク質。

【請求項 8 9】

前記ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインが、第 1 の抗体定常ドメイン由来の部分と第 2 の抗体定常ドメイン由来の部分とを含むハイブリッド抗体定常ドメインである、請求項 8 8 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 9 0】

前記ハイブリッド抗体定常ドメインが、ハイブリッド抗体 C H 1、ハイブリッド抗体ヒンジ、ハイブリッド抗体 C H 2、またはハイブリッド抗体 C H 3 である、請求項 8 9 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 9 1】

前記抗体が I g G である、請求項 9 0 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 9 2】

前記第 1 の抗体定常ドメインおよび前記第 2 の抗体定常ドメインが、異なる種由来である、請求項 8 8 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 9 3】

前記第 2 の抗体定常ドメインがヒト抗体定常ドメインである、請求項 8 8 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 9 4】

前記第 1 の抗体定常ドメインが、マウス、ラット、サメ、サカナ、オポッサム、ヒツジ、ブタ、ラクダ科動物、ウサギ、または非ヒト霊長動物定常ドメインである、請求項 9 3 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 9 5】

前記免疫グロブリン可変ドメインが非ヒト抗体可変ドメインであり、かつ前記第 1 の定

10

20

30

40

50

常ドメインが、対応する非ヒトC H 1ドメイン、C λドメイン、またはC κドメインである、請求項 8 8 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 9 6】

前記第 1 の抗体定常ドメインが軽鎖定常ドメインであり、かつ前記第 2 の抗体定常ドメインが重鎖定常ドメインである、請求項 8 8 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 9 7】

前記第 1 の抗体定常ドメインがラクダ科動物重鎖定常ドメインであり、かつ前記第 2 の抗体定常ドメインが重鎖定常ドメインである、請求項 8 8 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 9 8】

V H H が前記ハイブリッド定常ドメインのアミノ末端に存在する、請求項 9 7 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 9 9】

前記第 1 の抗体定常ドメインおよび前記第 2 の抗体定常ドメインが、異なるアイソタイプである、請求項 8 8 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 0 0】

前記第 2 の抗体定常ドメインが I g G 定常ドメインである、請求項 9 9 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 0 1】

前記抗体可変ドメインが軽鎖可変ドメインであり、かつ前記第 1 の抗体定常ドメインが軽鎖定常ドメインである、請求項 8 8 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 0 2】

前記第 2 の抗体定常ドメインがヒト抗体重鎖定常ドメインである、請求項 1 0 1 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 0 3】

前記第 2 の抗体定常ドメインがヒト抗体軽鎖定常ドメインである、請求項 1 0 1 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 0 4】

前記ヒト抗体重鎖定常ドメインが、C H 1、ヒンジ、C H 2、またはC H 3である、請求項 1 0 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 0 5】

前記ヒト抗体重鎖定常ドメインが I g G C H 1 または I g G C H 2 である、請求項 1 0 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 0 6】

前記抗体可変ドメインが重鎖可変ドメインであり、かつ前記第 1 の抗体定常ドメインがC H 1ドメインである、請求項 8 8 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 0 7】

前記第 2 の抗体定常ドメインがヒト抗体軽鎖定常ドメインである、請求項 1 0 6 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 0 8】

前記第 2 の抗体定常ドメインがヒト抗体重鎖定常ドメインである、請求項 1 0 6 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 0 9】

Y が、(S e r / A l a / G l y) P r o (L y s / A s p / S e r) V a l、(S e r / A l a / G l y) P r o (L y s / A s p / S e r) V a l P h e、L y s V a l A s p L y s (S e r / A r g / T h r)、またはV a l T h r V a l である、請求項 8 8 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 1 0】

Y が、S e r P r o L y s V a l、S e r P r o A s p V a l、S e r P r o S e r V a l、A l a P r o L y s V a l、A l a P r o A s p V a l、A l a P r o S e r V a

10

20

30

40

50

l、GlyProLysVal、GlyProAspVal、GlyProSerVal、SerProLysValPhe、SerProAspValPhe、SerProSerValPhe、AlaProLysValPhe、AlaProAspValPhe、AlaProSerValPhe、GlyProLysValPhe、GlyProAspValPhe、GlyProSerValPhe、LysValAspLysSer、LysValAspLysArg、LysValAspLysThr、およびValThrValよりなる群から選択される、請求項109に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項111】

前記第2の抗体定常ドメインがヒト抗体定常ドメインである、請求項109に記載の組換え融合タンパク質。

10

【請求項112】

前記ヒト抗体定常ドメインが、C κ 、C λ 、CH1、ヒンジ、CH2、およびCH3よりなる群から選択される、請求項111に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項113】

前記ヒト抗体定常ドメインがIgG CH1またはIgG CH2である、請求項111に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項114】

前記組換え融合タンパク質が、ハイブリッドヒトCH1ドメインに融合されたヒト軽鎖可変ドメインを含み、しかも

C¹が、GlnProLysAlaまたはThrValAlaであり、

20

Yが、(Ala/Gly)ProSerValであり、かつ

C²が、ヒトIgG CH1中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフである、

請求項88に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項115】

A) 前記組換え融合タンパク質が、ハイブリッドヒトCH2に融合されたヒト軽鎖可変ドメインを含み、しかも

C¹が、GlnProLysAlaもしくはThrValAlaであり、

Yが、(Ala/Gly)ProSerValであり、かつ

C²が、ヒトIgG CH2中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフであるか、または

30

B) 前記組換え融合タンパク質が、ハイブリッドヒトCH2に融合されたヒト重鎖可変ドメインを含み、しかも

C¹が、SerThrLysであり、

Yが、(Ala/Gly)ProSerValPheであり、かつ

C²が、ヒトIgG CH2中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフである、

請求項88に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項116】

A) 前記組換え融合タンパク質が、ハイブリッドヒトC κ に融合されたヒト λ 鎖可変ドメインを含み、しかも

40

C¹が、GlnProLysAlaであり、

Yが、(Ala/Gly)ProSerValであり、かつ

C²が、ヒトC κ 中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフであるか、または

B) 前記組換え融合タンパク質が、ハイブリッドヒトC κ に融合されたヒト重鎖可変ドメインを含み、しかも

C¹が、SerThrLysであり、

Yが、(Ala/Gly)ProSerValPheであり、かつ

C²は、ヒトC κ 中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフである、

50

請求項 88 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 117】

A) 前記組換え融合タンパク質が、ハイブリッドヒト C λ に融合されたヒト κ 鎖可変ドメインを含み、しかも

C¹ が、ThrValAla であり、

Y が、(Ala/Gly)ProSerVal であり、かつ

C² が、ヒト C λ 中の Y のカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフであるか、または

B) 前記組換え融合タンパク質が、ハイブリッドヒト C λ に融合されたヒト重鎖可変ドメインを含み、しかも

C¹ が、SerThrLys であり、

Y が、(Ala/Gly)ProSerVal であり、かつ

C² が、ヒト C λ 中の Y のカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフである、

請求項 88 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 118】

請求項 88 ～ 117 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質をコードする、単離された組換え核酸分子。

【請求項 119】

請求項 88 ～ 117 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質をコードする組換え核酸分子を含む、宿主細胞。

【請求項 120】

組換え核酸の発現に好適な条件下で請求項 119 に記載の宿主細胞を維持することにより該組換え核酸を発現させて組換え融合タンパク質を産生することを含む、組換え融合タンパク質の産生方法。

【請求項 121】

前記組換え融合タンパク質を単離することをさらに含む、請求項 120 に記載の方法。

【請求項 122】

第 1 のポリペプチドに由来する第 1 の部分と第 2 のポリペプチドに由来する第 2 の部分とを含む組換え融合タンパク質であって、該第 1 のポリペプチドが、式

(A) - L1

〔式中、

(A) は、該第 1 のポリペプチド中に存在するアミノ酸配列であり、そして

L1 は、該第 1 のポリペプチド中の (A) のカルボキシ末端に隣接する 1 ～ 約 50 アミノ酸を含むアミノ酸モチーフである〕

を有する構造を含み、

該融合ポリペプチドが、式

(A) - L1 - (B)

〔式中、

(B) は、該第 2 のポリペプチドに由来する該部分であり、

付帯条件として、(A) および (B) の少なくとも一方はドメインであり、しかも (A) および (B) が両方とも抗体可変ドメインである場合、

a) (A) および (B) はそれぞれヒト抗体可変ドメインであるか、

b) (A) および (B) はそれぞれ抗体重鎖可変ドメインであるか、

c) (A) および (B) はそれぞれ抗体軽鎖可変ドメインであるか、

d) (A) は抗体軽鎖可変ドメインでありかつ (B) は抗体重鎖可変ドメインであるか、もしくは

e) (A) は VHH でありかつ (B) は抗体軽鎖可変ドメインであるものとするか、または

付帯条件として、(A) および (B) が両方とも抗体可変ドメインである場合、次のものは本発明から除外されるものとする、(A) - L1 - (B) {ここで、(A) は、マウ

10

20

30

40

50

スVHであり、(B)は、マウスVLであり、そしてL1は、SerAlaLysThrThrPro、SerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGly、AlaLysThrThrProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArgVal、またはAlaLysThrThrProLysLeuGluGluである}]

を有する、上記組換え融合タンパク質。

【請求項123】

付帯条件として、(A)がV_Hでありかつ(B)がV_Lである場合、L1がCH1のアミノ末端から1～5もしくは1～6個の連続したアミノ酸よりなることはないものとする、請求項122に記載の組換え融合タンパク質。

10

【請求項124】

前記第1のポリペプチドが免疫グロブリン可変ドメインである、請求項122に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項125】

前記免疫グロブリン可変ドメインが抗体可変ドメインである、請求項124に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項126】

前記第2のポリペプチドが免疫グロブリン定常領域である、請求項124に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項127】

(B)が、抗体CH1の少なくとも一部分、抗体ヒンジの少なくとも一部分、抗体CH2の少なくとも一部分、または抗体CH3の少なくとも一部分を含む、請求項126に記載の組換え融合タンパク質。

20

【請求項128】

(A)が免疫グロブリン可変ドメインである、請求項122に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項129】

前記免疫グロブリン可変ドメインが抗体可変ドメインである、請求項128に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項130】

前記抗体可変ドメインが抗体軽鎖可変ドメインである、請求項129に記載の組換え融合タンパク質。

30

【請求項131】

L1がC_κまたはC_λの1～約50個の連続したアミノ末端アミノ酸を含む、請求項130に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項132】

前記抗体可変ドメインが抗体重鎖可変ドメインである、請求項129に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項133】

前記抗体重鎖可変ドメインがVHまたはVHHである、請求項132に記載の組換え融合タンパク質。

40

【請求項134】

L1がCH1の1～約50個の連続したアミノ末端アミノ酸を含む、請求項132に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項135】

(A)が抗体重鎖可変ドメインであり、かつ(B)が抗体重鎖可変ドメインである、請求項129に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項136】

(A)が抗体軽鎖可変ドメインであり、かつ(B)が抗体重鎖可変ドメインまたは抗体軽鎖可変ドメインである、請求項128に記載の組換え融合タンパク質。

50

【請求項 1 3 7】

- (A) が V κ でありかつ (B) が V κ であるか、
- (A) が V κ でありかつ (B) が V λ であるか、
- (A) が V κ でありかつ (B) が VH もしくは VHH であるか、
- (A) が V λ でありかつ (B) が V κ であるか、
- (A) が V λ でありかつ (B) が V λ であるか、または
- (A) が V λ でありかつ (B) が VH もしくは VHH である、

請求項 1 3 6 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 3 8】

(A) が VH でありかつ L 1 が CH 1 の最初の 3 ～ 約 1 2 アミノ酸を含むか、(A) が V κ でありかつ L 1 が C κ の最初の 3 ～ 約 1 2 アミノ酸を含むか、または (A) が V λ でありかつ L 1 が C λ の最初の 3 ～ 約 1 2 アミノ酸を含む、請求項 1 2 2 に記載の組換え融合タンパク質。

10

【請求項 1 3 9】

(A) が、抗体軽鎖可変ドメインの FR 1、CDR 1、FR 2、CDR 3、FR 3、および CDR 3 と、アミノ酸配列 Gly Gln Gly Thr Lys Val Thr Val Ser Ser を含む FR 4 とを含む抗体可変ドメインであり、かつ L 1 が、CH 1 の最初の 3 ～ 約 1 2 アミノ酸を含む、請求項 1 2 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 4 0】

L 1 が、Ala Ser Thr、Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser、または Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Gly である、請求項 1 3 9 に記載の組換え融合タンパク質。

20

【請求項 1 4 1】

(A) が、VH または V κ ドメインの FR 1、CDR 1、FR 2、CDR 3、FR 3、および CDR 3 と、アミノ酸配列 Gly Xaa Gly Thr (Lys / Gln / Glu) (Val / Leu) (Thr / Ile) Val Leu を含む FR 4 とを含む抗体可変ドメインであり、かつ L 1 が、C λ の最初の 3 ～ 約 1 2 アミノ酸を含む、請求項 1 2 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 4 2】

(A) が、VH または V λ ドメインの FR 1、CDR 1、FR 2、CDR 3、FR 3、および CDR 3 と、アミノ酸配列 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg を含む FR 4 とを含む抗体可変ドメインであり、かつ L 1 が、C κ の最初の 3 ～ 約 1 2 アミノ酸を含む、請求項 1 2 2 に記載の組換え融合タンパク質。

30

【請求項 1 4 3】

(A) が免疫グロブリン定常ドメインである、請求項 1 2 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 4 4】

前記免疫グロブリン定常ドメインが抗体定常ドメインである、請求項 1 4 3 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 4 5】

前記抗体定常ドメインが抗体重鎖定常ドメインである、請求項 1 4 4 に記載の組換え融合タンパク質。

40

【請求項 1 4 6】

(A) が非ヒト免疫グロブリン定常ドメインであり、かつ (B) がヒトポリペプチドに由来する、請求項 1 4 5 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 4 7】

前記第 2 のポリペプチドが、サイトカイン、サイトカインレセプター、増殖因子、増殖因子レセプター、ホルモン、ホルモンレセプター、接着分子、止血因子、T 細胞レセプター、T 細胞レセプター鎖、T 細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかもしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか 1 つの機能性部分よりな

50

る群から選択される、請求項 1 2 2 ～ 1 2 4 および 1 2 8 ～ 1 4 6 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 4 8】

前記第 1 のポリペプチドが、サイトカイン、サイトカインレセプター、増殖因子、増殖因子レセプター、ホルモン、ホルモンレセプター、接着分子、止血因子、T 細胞レセプター、T 細胞レセプター鎖、T 細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかもしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか 1 つの機能性部分よりなる群から選択される、請求項 1 2 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 4 9】

前記第 2 のポリペプチドが免疫グロブリン定常領域または免疫グロブリン定常領域の F c 部分である、請求項 1 4 8 に記載の組換え融合タンパク質。

10

【請求項 1 5 0】

請求項 1 2 2 ～ 1 4 9 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質をコードする、単離された組換え核酸分子。

【請求項 1 5 1】

請求項 1 2 2 ～ 1 4 9 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質をコードする組換え核酸分子を含む、宿主細胞。

【請求項 1 5 2】

組換え核酸の発現に好適な条件下で請求項 1 5 1 に記載の宿主細胞を維持することにより該組換え核酸を発現させて組換え融合タンパク質を産生することを含む、組換え融合タンパク質の産生方法。

20

【請求項 1 5 3】

前記組換え融合タンパク質を単離することをさらに含む、請求項 1 5 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

免疫グロブリン可変ドメインである第 1 の部分と第 2 の部分とを含む組換え融合タンパク質であって、該第 1 の部分がリンカーを介して該第 2 の部分に結合され、かつ該組換え融合タンパク質が、式

$$(A') - (L2) - (B)$$

〔式中、

(A') は、該免疫グロブリン可変ドメインでありかつフレームワーク (FR) 4 を含み、

30

L 2 は該リンカーであり {ここで、L 2 は、該 FR 4 を含む天然に存在する免疫グロブリン中の該 FR 4 のカルボキシ末端に隣接する 1 ～ 約 5 0 個の連続したアミノ酸を含む}、そして

(B) は該第 2 の部分であり、

付帯条件として、L 2 - (B) は、該 FR 4 を含む天然に存在する抗体中の該 FR 4 に結合されたペプチドである C_L ドメインでも C_H1 ドメインでもなく、しかも (A) および (B) が両方とも抗体可変ドメインである場合、

a) (A) および (B) はそれぞれヒト抗体可変ドメインであるか、

b) (A) および (B) はそれぞれ抗体重鎖可変ドメインであるか、

40

c) (A) および (B) はそれぞれ抗体軽鎖可変ドメインであるか、

d) (A) は抗体軽鎖可変ドメインでありかつ (B) は抗体重鎖可変ドメインであるか、もしくは

e) (A) は V_HH でありかつ (B) は抗体軽鎖可変ドメインであるものとするか、または

付帯条件として、(A) および (B) が両方とも抗体可変ドメインである場合、次のものは本発明から除外されるものとする、(A) - L 1 - (B) {ここで、(A) は、マウス V_H であり、(B) は、マウス V_L であり、そして L 1 は、Ser Ala Lys Thr Thr Pro、Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly、Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu

50

AlaArgVal、またはAlaLysThrThrProLysLeuGlyGlyである}]

を有する、上記組換え融合タンパク質。

【請求項155】

(A')が抗体重鎖可変ドメインまたはハイブリッド抗体軽鎖可変ドメインである、請求項154に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項156】

前記抗体重鎖可変ドメインおよび前記ハイブリッド軽鎖可変ドメインが、それぞれ、アミノ酸配列GlyXaaGlyThr(Leu/Met/Thr)ValThrValSerSerを含むFR4を含む、請求項155に記載の組換え融合タンパク質。

10

【請求項157】

FR4が、GlyXaaGlyThrLeuValThrValSerSer、GlyXaaGlyThrMetValThrValSerSer、またはGlyXaaGlyThrThrValThrValSerSerを含む、請求項156に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項158】

X4がCH1のアミノ末端から1～約50個の連続したアミノ酸を含む、請求項157に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項159】

L2が、AlaSerThr、AlaSerThrLysGlyProSer、またはAlaSerThrLysGlyProSerGlyを含む、請求項158に記載の組換え融合タンパク質。

20

【請求項160】

(A')がハイブリッド抗体可変ドメインまたはVκである、請求項154に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項161】

前記ハイブリッド可変ドメインおよびVκが、それぞれ、アミノ酸配列GlyXaaGlyThr(Lys/Arg)(Val/Leu)(Glu/Asp)IleLysArgを含むFR4を含む、請求項160に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項162】

FR4が、GlyXaaGlyThrLysValGluIleLysArg、GlyXaaGlyThrLysLeuGluIleLysArg、GlyXaaGlyThrLysValAspIleLysArg、またはGlyXaaGlyThrArgLysGluIleLysArgを含む、請求項161に記載の組換え融合タンパク質。

30

【請求項163】

L2がCκのアミノ末端から1～約50個の連続したアミノ酸を含む、請求項161に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項164】

L2が、ThrValAla、ThrValAlaAlaProSer、またはThrValAlaAlaAlaProSerGlyを含む、請求項163に記載の組換え融合タンパク質。

40

【請求項165】

(A')がハイブリッド抗体可変ドメインまたはVλである、請求項154に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項166】

前記ハイブリッド抗体可変ドメインおよびVλが、それぞれ、アミノ酸配列GlyXaaGlyThr(Lys/Gln/Glu)(Val/Leu)(Thr/Ile)(Val/Ile)Leuを含むFR4を含む、請求項165に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項167】

50

FR4が、GlyXaaGlyThrLysValThrValLeu、GlyXaaGlyThrLysLeuThrValLeu、GlyXaaGlyThrGlnLeuIleIleLeu、GlyXaaGlyThrGluLeuThrValLeu、またはGlyXaaGlyThrGlnLeuThrValLeuを含む、請求項166に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項168】

(B)が免疫グロブリン可変ドメインを含む、請求項154に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項169】

前記免疫グロブリン可変ドメインが(B)のアミノ末端に存在する、請求項168に記載の組換え融合タンパク質。

10

【請求項170】

(B)が抗体軽鎖可変ドメインまたは抗体重鎖可変ドメインを含む、請求項168に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項171】

(B)が免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部分を含む、請求項154に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項172】

免疫グロブリン定常領域ドメインの前記少なくとも一部分が(B)のアミノ末端に存在する、請求項171に記載の組換え融合タンパク質。

20

【請求項173】

前記免疫グロブリン定常領域がIgG定常領域である、請求項171に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項174】

前記免疫グロブリン定常領域がIgG1定常領域またはIgG4定常領域である、請求項173に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項175】

(B)が、CH1の少なくとも一部分、ヒンジの少なくとも一部分、CH2の少なくとも一部分、またはCH3の少なくとも一部分を含む、請求項174に記載の組換え融合タンパク質。

30

【請求項176】

(B)がヒンジの少なくとも一部分を含む、請求項175に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項177】

ヒンジの前記部分がThrHisThrCysProProCysProを含む、請求項176に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項178】

(B)がCH2-CH3をさらに含む、請求項177に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項179】

(B)がCH1-ヒンジ-CH2-CH3の一部分を含む、請求項175に記載の組換え融合タンパク質。

40

【請求項180】

(B)がヒンジ-CH2-CH3を含む、請求項175に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項181】

(B)がCH2-CH3を含む、請求項175に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項182】

(B)がCH3を含む、請求項175に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項183】

第1の部分と免疫グロブリン定常領域に由来する第2の部分とを含む組換え融合タンパ

50

ク質であって、該第 1 の部分がリンカーを介して該第 2 の部分に結合されており、かつ該組換え融合タンパク質が、式

(A) - L 3 - (C³)

〔式中、

(A) は、該第 1 の部分であり、

(C³) は、免疫グロブリン定常領域に由来する該第 2 の部分であり、そして

L 3 は、該リンカーであり {ここで、L 3 は、(C³) を含む天然に存在する免疫グロブリン中の (C³) のアミノ末端に隣接する 1 ～約 50 個の連続したアミノ酸を含む}、付帯条件として、(A) は、該天然に存在する免疫グロブリン中に見いだされる抗体可変ドメインではないものとする〕

を有する、上記組換え融合タンパク質。

【請求項 184】

(C³) が少なくとも 1 つの抗体定常ドメインを含む、請求項 183 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 185】

前記抗体定常ドメインがヒト抗体定常ドメインである、請求項 184 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 186】

前記抗体定常ドメインが IgG 定常ドメインである、請求項 185 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 187】

前記抗体定常ドメインが IgG1 定常ドメインまたは IgG4 定常ドメインである、請求項 186 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 188】

(C³) が CH3 を含む、請求項 187 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 189】

L 3 が CH2 のカルボキシ末端から 1 ～約 50 個の連続したアミノ酸を含む、請求項 188 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 190】

(C³) が CH2 または CH2 - CH3 を含む、請求項 189 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 191】

L 3 がヒンジのカルボキシ末端から 1 ～約 34 個の連続したアミノ酸を含む、請求項 190 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 192】

L 3 が ThrHisThrCysProProCysPro または GlyThrHisThrCysProProCysPro を含む、請求項 191 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 193】

(C³) がヒンジを含む、請求項 187 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 194】

L 3 が CH1 のカルボキシ末端から 1 ～約 50 個の連続したアミノ酸を含む、請求項 193 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 195】

(C³) が CH1 を含む、請求項 186 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 196】

L 3 が抗体重鎖 V ドメインのカルボキシ末端から 1 ～約 50 個の連続したアミノ酸を含む、請求項 195 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 197】

L 3 が GlyXaaGlyThr (Leu/Met/Thr) ValThrValSe

10

20

30

40

50

r S e rを含む、請求項 1 9 6 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 9 8】

L 3 が、G l y X a a G l y T h r L e u V a l T h r V a l S e r S e r、G l y X a a G l y T h r M e t V a l T h r V a l S e r S e r、または G l y X a a G l y T h r T h r V a l T h r V a l S e r S e rを含む、請求項 1 9 7 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 1 9 9】

前記抗体定常ドメインが抗体軽鎖定常ドメインである、請求項 1 8 4 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 0 0】

前記抗体軽鎖定常ドメインが C κ である、請求項 1 9 9 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 0 1】

L 3 が抗体軽鎖 V ドメインのカルボキシ末端から 1 ～約 5 0 個の連続したアミノ酸を含む、請求項 2 0 0 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 0 2】

L 3 が G l y X a a G l y T h r (L y s / A r g) (V a l / L e u) (G l u / A s p) I l l e L y s A r g を含む、請求項 2 0 1 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 0 3】

L 3 が、G l y X a a G l y T h r L y s V a l G l u I l l e L y s A r g、G l y X a a G l y T h r L y s L e u G l u I l l e L y s A r g、G l y X a a G l y T h r L y s V a l A s p I l l e L y s A r g、または G l y X a a G l y T h r A r g L y s G l u I l l e L y s A r g である、請求項 2 0 2 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 0 4】

前記抗体軽鎖定常ドメインが C λ である、請求項 1 9 9 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 0 5】

L 3 が抗体軽鎖 V ドメインのカルボキシ末端から 1 ～約 5 0 個の連続したアミノ酸を含む、請求項 2 0 4 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 0 6】

L 3 が G l y X a a G l y T h r (L y s / G l n / G l u) (V a l / L e u) (T h r / I l l e) (V a l / I l l e) L e u を含む、請求項 2 0 5 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 0 7】

L 3 が、G l y X a a G l y T h r L y s V a l T h r V a l L e u、G l y X a a G l y T h r L y s L e u T h r V a l L e u、G l y X a a G l y T h r G l n L e u I l l e I l l e L e u、G l y X a a G l y T h r G l u L e u T h r V a l L e u、または G l y X a a G l y T h r G l n L e u T h r V a l L e u である、請求項 2 0 6 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 0 8】

(A) が、サイトカイン、サイトカインレセプター、増殖因子、増殖因子レセプター、ホルモン、ホルモンレセプター、接着分子、止血因子、T 細胞レセプター、T 細胞レセプター鎖、T 細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかもしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか 1 つの機能性部分よりなる群から選択される、請求項 1 8 3 ～ 2 0 7 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 0 9】

抗体可変ドメインに由来する第 1 の部分と第 2 のポリペプチドに由来する第 2 の部分とを含む組換え融合タンパク質であって、該抗体可変ドメインが、式 (A) - L 1

〔式中、

(A) は C D R 3 よりなり、そして

10

20

30

40

50

L 1 は F R 4 よりなる〕
を有する構造を含み、該融合ポリペプチドが、式

(A) - L 1 - (B)

〔式中、

(B) は、該第 2 のポリペプチドに由来する該部分である〕
を有する、上記組換え融合タンパク質。

【請求項 2 1 0】

前記第 2 のポリペプチドが免疫グロブリン定常領域である、請求項 2 0 9 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 1 1】

(B) が、抗体 C H 1 の少なくとも一部分、抗体ヒンジの少なくとも一部分、抗体 C H 2 の少なくとも一部分、または抗体 C H 3 の少なくとも一部分を含む、請求項 2 1 0 に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 1 2】

請求項 1 5 4 ~ 2 1 1 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質をコードする、単離された組換え核酸分子。

【請求項 2 1 3】

請求項 1 5 4 ~ 2 1 1 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質をコードする組換え核酸分子を含む、宿主細胞。

【請求項 2 1 4】

組換え核酸の発現に好適な条件下で請求項 2 1 3 に記載の宿主細胞を維持することにより該組換え核酸を発現させて組換え融合タンパク質を産生することを含む、組換え融合タンパク質の産生方法。

【請求項 2 1 5】

前記組換え融合タンパク質を単離することをさらに含む、請求項 2 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 1 6】

治療、診断、および／または予防に使用するための、請求項 1 ~ 3 0、3 5 ~ 7 1、7 6 ~ 8 3、8 8 ~ 1 1 7、1 2 2 ~ 1 4 9、および 1 5 4 ~ 2 1 1 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質。

【請求項 2 1 7】

免疫応答を誘導する可能性が低減された、ヒトにおける治療、診断、および／または予防のための医薬を製造するための、請求項 1 ~ 3 0、3 5 ~ 7 1、7 6 ~ 8 3、8 8 ~ 1 1 7、1 2 2 ~ 1 4 9、および 1 5 4 ~ 2 1 1 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質の使用。

【請求項 2 1 8】

天然の連結部を含有していない対応する融合タンパク質と比較して免疫応答を誘導する可能性が低減された、請求項 1 ~ 3 0、3 5 ~ 7 1、7 6 ~ 8 3、8 8 ~ 1 1 7、1 2 2 ~ 1 4 9、および 1 5 4 ~ 2 1 1 のいずれか 1 項に記載の有効量の組換え融合タンパク質をヒトに投与することを含む、ヒトにおける治療、診断、および／または予防の方法。

【請求項 2 1 9】

天然の連結部を含有していない対応する融合タンパク質と比較して免疫応答を誘導する可能性が低減された、ヒトの治療、診断、および／または予防のための組換え融合タンパク質を調製するための、天然の連結部の使用。

【請求項 2 2 0】

天然の連結部を含有していない対応する融合タンパク質と比較して凝集傾向が低減された、ヒトの治療、診断、および／または予防のための組換え融合タンパク質を調製するための、天然の連結部の使用。

【請求項 2 2 1】

ヒトの治療、診断、および／または予防のための組換え融合タンパク質を調製するための、天然の連結部の使用であって、該組換え融合タンパク質が、天然の連結部を含有して

10

20

30

40

50

いない対応する融合タンパク質と比較してより高レベルで発現される、上記使用。

【請求項 2 2 2】

ヒトの治療、診断、および／または予防のための組換え融合タンパク質を調製するための、天然の連結部の使用であって、該組換え融合タンパク質が、天然の連結部を含有していない対応する融合タンパク質を基準にして比較して向上した安定性を有する、上記使用。

【請求項 2 2 3】

第 1 の部分 (A) と、第 2 の部分 (B) と、(A) と (B) との間の少なくとも 1 つの天然の連結部とを含む組換え融合タンパク質を調製するための、天然の連結部の使用であって、該組換え融合タンパク質が、(A) と (B) との境界部が天然の連結部でないものとして (A) と (B) とを含む対応する融合タンパク質と比較して低減された凝集傾向を有する、上記使用。

10

【請求項 2 2 4】

第 1 の部分 (A) と、第 2 の部分 (B) と、(A) と (B) との間の少なくとも 1 つの天然の連結部とを含む組換え融合タンパク質を調製するための、天然の連結部の使用であって、該組換え融合タンパク質が、対応する融合タンパク質が (A) と (B) との間に天然の連結部を含有していないものとして (A) と (B) とを含む対応する融合タンパク質と比較してより高レベルで発現される、上記使用。

【請求項 2 2 5】

第 1 の部分 (A) と、第 2 の部分 (B) と、(A) と (B) との間の少なくとも 1 つの天然の連結部とを含む組換え融合タンパク質を調製するための、天然の連結部の使用であって、該組換え融合タンパク質が、対応する融合タンパク質が (A) と (B) との間に天然の連結部を含有していないものとして (A) と (B) とを含む対応する融合タンパク質と比較して向上した安定性を有する、上記使用。

20

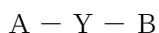
【請求項 2 2 6】

請求項 1 ～ 3 0、3 5 ～ 7 1、7 6 ～ 8 3、8 8 ～ 1 1 7、1 2 2 ～ 1 4 9、および 1 5 4 ～ 2 1 1 のいずれか 1 項に記載の組換え融合タンパク質と生理学上許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 2 2 7】

第 1 の部分と第 2 の部分とを天然の連結部で融合して含む融合タンパク質の作製方法であって、該第 1 の部分が第 1 のポリペプチドに由来し、かつ該第 2 の部分が第 2 のポリペプチドに由来し、該第 1 のポリペプチドもしくはその一部分のアミノ酸配列と該第 2 のポリペプチドもしくはその一部分のアミノ酸配列とを解析して、解析された配列の両方に存在する保存アミノ酸モチーフを同定することと、式

30



〔式中、

A は、該第 1 の部分であり、

Y は、該保存アミノ酸モチーフであり、

B は、該第 2 の部分であり、しかも、

該第 1 のポリペプチドは A-Y を含み、かつ該第 2 のポリペプチドは Y-B を含む〕

40

を有する融合タンパク質を調製することと、が含まれる、上記方法。

【請求項 2 2 8】

Y が 1 ～ 約 5 0 アミノ酸よりなる、請求項 2 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 2 9】

Y が 3 ～ 1 0 アミノ酸よりなる、請求項 2 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 3 0】

前記第 2 のポリペプチドが免疫グロブリン定常ドメインを含む、請求項 2 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 3 1】

前記免疫グロブリン定常ドメインがヒト免疫グロブリン定常ドメインである、請求項 2

50

30に記載の方法。

【請求項232】

前記免疫グロブリン定常ドメインが非ヒト免疫グロブリン定常ドメインである、請求項230に記載の方法。

【請求項233】

前記第2のポリペプチドがT細胞レセプター定常ドメインを含む、請求項230～232のいずれか1項に記載の方法。

【請求項234】

前記第2のポリペプチドが抗体定常ドメインを含む、請求項230～232のいずれか1項に記載の方法。

【請求項235】

前記抗体定常ドメインが軽鎖定常ドメインまたは重鎖定常ドメインである、請求項234に記載の方法。

【請求項236】

前記抗体定常ドメインがヒト抗体重鎖定常ドメインである、請求項234に記載の方法。

【請求項237】

前記第2のポリペプチドおよびBが抗体ヒンジ領域を含む、請求項234に記載の方法。

【請求項238】

前記第2のポリペプチドおよびBがCH1－ヒンジ－CH2－CH3の一部を含む、請求項234に記載の方法。

【請求項239】

前記第2のポリペプチドおよびBがヒンジ－CH2－CH3を含む、請求項234に記載の方法。

【請求項240】

前記第2のポリペプチドおよびBがCH2－CH3を含む、請求項234に記載の方法。

【請求項241】

前記第2のポリペプチドおよびBがCH3を含む、請求項234に記載の方法。

【請求項242】

前記ヒト抗体重鎖定常ドメインがIgG定常ドメインである、請求項236に記載の方法。

【請求項243】

前記IgG定常ドメインがIgG1定常ドメインまたはIgG4定常ドメインである、請求項242に記載の方法。

【請求項244】

前記第1のポリペプチドが、サイトカイン、サイトカインレセプター、増殖因子、増殖因子レセプター、ホルモン、ホルモンレセプター、接着分子、止血因子、T細胞レセプター、T細胞レセプター鎖、T細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかもしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか1つの機能性部分よりなる群から選択される、請求項227～243のいずれか1項に記載の方法。

【請求項245】

前記第1のポリペプチドおよびAが免疫グロブリン可変ドメインを含む、請求項227に記載の方法。

【請求項246】

前記免疫グロブリン可変ドメインがヒト免疫グロブリン可変ドメインである、請求項245に記載の方法。

【請求項247】

前記免疫グロブリン可変ドメインが非ヒト免疫グロブリン可変ドメインである、請求項

10

20

30

40

50

246に記載の方法。

【請求項248】

前記第1のポリペプチドおよびAがT細胞レセプター可変ドメインを含む、請求項245～247のいずれか1項に記載の方法。

【請求項249】

前記第1のポリペプチドおよびAが抗体可変ドメインを含む、請求項245～247のいずれか1項に記載の方法。

【請求項250】

前記抗体可変ドメインが非ヒト抗体可変ドメインである、請求項249に記載の方法。

【請求項251】

前記非ヒト抗体可変ドメインがラクダ科動物抗体可変ドメインまたはナースシャーク抗体可変ドメインである、請求項250に記載の方法。

【請求項252】

前記抗体可変ドメインがヒト抗体可変ドメインである、請求項249に記載の方法。

【請求項253】

前記ヒト抗体可変ドメインが、 V_{κ} 、 V_{λ} 、または V_H である、請求項252に記載の方法。

【請求項254】

前記第2のポリペプチドが、サイトカイン、サイトカインレセプター、増殖因子、増殖因子レセプター、ホルモン、ホルモンレセプター、接着分子、止血因子、T細胞レセプター、T細胞レセプター鎖、T細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかもしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか1つの機能性部分よりなる群から選択される、請求項227～229および244～253のいずれか1項に記載の方法。

【請求項255】

前記第1のポリペプチドが第1の抗体鎖であり、かつ前記第2のポリペプチドが第2の抗体鎖である、請求項227に記載の方法。

【請求項256】

Yが前記第1の抗体鎖の可変ドメイン中および前記第2の抗体鎖の可変ドメイン中に存在する、請求項255に記載の方法。

【請求項257】

Yがフレームワーク領域(FR)4中に存在する、請求項256に記載の方法。

【請求項258】

YがGlyXaaGlyThrまたはGlyXaaGlyThrXaa(Val/Leu)である、請求項257に記載の方法。

【請求項259】

Aが、FR1、相補性決定領域(CDR)1、FR2、CDR2、FR3、およびCDR3を含む抗体可変ドメインの一部を含む、請求項257または258に記載の方法。

【請求項260】

YがFR3中に存在する、請求項255に記載の方法。

【請求項261】

Yが、GluAspThrAla、ValTyrTyrCys、またはGluAspThrAlaValTyrTyrCysである、請求項260に記載の方法。

【請求項262】

Aが、FR1、CDR1、FR2、およびCDR2を含む抗体可変ドメインの一部を含む、請求項260または261に記載の方法。

【請求項263】

Yが前記第1の抗体鎖の定常ドメイン中および前記第2の抗体鎖の定常ドメイン中に存在する、請求項255に記載の方法。

【請求項264】

10

20

30

40

50

Yが、(Ser/Ala/Gly)Pro(Lys/Asp/Ser)Val、(Ser/Ala/Gly)Pro(Lys/Asp/Ser)ValPhe、LysValAspLys(Ser/Arg/Thr)、またはValThrValである、請求項263に記載の方法。

【請求項265】

Yが、SerProLysVal、SerProAspVal、SerProSerVal、AlaProLysVal、AlaProAspVal、AlaProSerVal、GlyProLysVal、GlyProAspVal、GlyProSerVal、SerProLysValPhe、SerProAspValPhe、SerProSerValPhe、AlaProLysValPhe、AlaProAspValPhe、AlaProSerValPhe、GlyProLysValPhe、GlyProAspValPhe、GlyProSerValPhe、LysValAspLysSer、LysValAspLysArg、LysValAspLysThr、およびValThrValよりなる群から選択される、請求項264に記載の方法。

10

【請求項266】

前記第1の抗体鎖および前記第2の抗体鎖が異なる種由来である、請求項255～265のいずれか1項に記載の方法。

【請求項267】

前記第1の抗体鎖がヒト由来であり、かつ前記第2の抗体鎖が非ヒト由来である、請求項266に記載の方法。

20

【請求項268】

前記第1の抗体鎖が非ヒト由来であり、かつ前記第2の抗体鎖がヒト由来である、請求項266に記載の方法。

【請求項269】

前記第1の抗体鎖および前記第2の抗体鎖が同一の種由来のある、請求項255～265のいずれか1項に記載の方法。

【請求項270】

前記第1の抗体鎖および前記第2の抗体鎖がヒト由来である、請求項269に記載の方法。

【請求項271】

前記融合タンパク質が、Aのアミノ末端に位置する第3の部分を含み、請求項227～270のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項272】

前記第3の部分が免疫グロブリン可変ドメインを含む、請求項271に記載の方法。

【請求項273】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドが両方ともに同一のタンパク質スーパーファミリーのメンバーである、請求項227に記載の方法。

【請求項274】

前記タンパク質スーパーファミリーが、免疫グロブリンスーパーファミリー、TNFスーパーファミリー、およびTNFレセプタースーパーファミリーよりなる群から選択される、請求項273に記載の方法。

40

【請求項275】

前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドが両方ともヒトポリペプチドである、請求項227に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、天然の連結部を含有する組換え融合タンパク質に関する。

【0002】

関連出願

50

本出願は、米国を指定した2006年12月5日出願の国際出願PCT/GB2006/004559号の一部継続出願であり、本出願は、2006年1月24日出願の米国仮出願第60/761,708号に基づく利益を主張する。以上の出願の教示はすべて、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

【背景技術】

【0003】

融合タンパク質は、一群の潜在的に有効な治療剤および診断剤であると認識されている。融合タンパク質技術により提供される利点の1つは、所望の機能、増大された望ましい性質、および／または低減された望ましくない性質を有する融合タンパク質をデザインできる可能性である。

10

【0004】

融合タンパク質は、さまざまな親タンパク質に由来する成分ポリペプチドを含有し、これらの成分ポリペプチドは、ペプチド結合を介して互いに結合すなわち融合されている。融合タンパク質中の各成分ポリペプチドは、融合タンパク質の性質に寄与するので、成分ポリペプチドの活性の低下を生じない位置で成分ポリペプチドを融合することが望ましい。したがって、従来の融合タンパク質は、一般的には、天然の親タンパク質中のドメイン境界またはドメイン間ループに対応する位置で融合される。たとえば、従来のキメラ抗体軽鎖は、ヒト軽鎖定常ドメインに融合された非ヒト抗体軽鎖可変ドメインを含有する融合タンパク質である。

【0005】

20

商業用途を制限する可能性のある従来の融合タンパク質の一側面は、融合部位を取り囲むアミノ酸の配列および構造がいずれの親タンパク質の対応するアミノ酸配列にもマッチしないことである。その結果として、融合タンパク質は、融合部位に隣接するアミノ酸を含む「非自己」アミノ酸配列を含有する。融合タンパク質が、同一の種由来のタンパク質に由来するポリペプチドを含有する場合でさえも（たとえば、2つのヒトポリペプチドが融合される場合でさえも）、一般的には、融合部位のアミノ酸配列は、異なる親タンパク質由来のアミノ酸残基の並置により生成された非自己配列を含むであろう。こうした非自己配列は、抗体および／またはT細胞エпитープとして機能する可能性があるとともに融合タンパク質を免疫原性にする可能性があるため、融合タンパク質の*in vivo*使用を制限したりまたは融合タンパク質を*in vivo*用途に適さなくしたりする可能性がある。

30

【0006】

また、従来の融合タンパク質中の融合部位のアミノ酸残基の並置は、他の望ましくない効果を有する可能性もある。たとえば、並置されたアミノ酸は、発現、活性、および／または安定性に重要な構造上の特徴の破壊を引き起こす可能性がある。その結果、従来の融合タンパク質は、多くの場合、アグリゲートもしくはオリゴマーを形成したり、低い溶解性を有していたり、かつ／または親タンパク質よりもタンパク質分解を受けやすかったりする。そのほかに、従来の融合タンパク質は、多くの場合、親タンパク質よりも低い収率で生成されるにすぎない可能性がある。

【発明の開示】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

改良された融合タンパク質ならびに融合タンパク質のデザインおよび作製のための改良された方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、天然の連結部を含有する組換え融合タンパク質に関する。本発明に係る融合タンパク質は、2つの異なるポリペプチドに由来する少なくとも2つの部分と、2つの部分間の少なくとも1つの天然の連結部とを含む。

【0009】

50

組換え融合タンパク質は、第1のポリペプチドに由来する第1の部分と第2のポリペプチドに由来する第2の部分とを含有するハイブリッドドメインを含みうる。ここで、第1のポリペプチドは、式(X1-Y-X2)を有するドメインを含み、かつ第2のポリペプチドは、式(Z1-Y-Z2)を有するドメインを含む〔式中、Yは、保存アミノ酸モチーフであり、X1およびZ1は、それぞれ、該第1のポリペプチド中および該第2のポリペプチド中のYのアミノ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフであり、そしてX2およびZ2は、それぞれ、該第1のポリペプチド中および該第2のポリペプチド中のYのカルボキシ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフであり、ただし、X1およびZ1のアミノ酸配列が同一である場合、X2およびZ2のアミノ酸配列は同一ではなく、X2およびZ2のアミノ酸配列が同一である場合、X1およびZ1のアミノ酸配列は同一ではない〕。

10

【0010】

所望により、組換え融合タンパク質が式D-(X1-Y-Z2)-E〔式中、Dは、不在であるかまたは前記第1のポリペプチド中の(X1-Y-X2)のアミノ末端に隣接するアミノ酸配列であり、そしてEは、不在であるかまたは前記第2のポリペプチド中の(Z1-Y-Z2)のカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である〕を有する構造を含むように、ハイブリッドドメインをアミノ末端アミノ酸配列Dに結合させたりかつ/またカルボキシ末端アミノ酸配列Eに結合させたりすることが可能である。特定の実施形態では、Dが存在するか、Eが存在するか、またはDおよびEが存在する。

【0011】

20

いくつかの実施形態では、ハイブリッドドメイン(X1-Y-Z2)は、ハイブリッド抗体可変ドメインのようなハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインである。Yは、フレームワーク領域(FR)4中に存在しうる。たとえば、Yは、GlyXaaGlyThr(配列番号386)またはGlyXaaGlyThrXaa(Val/Leu)(配列番号387)でありうる。そのような実施形態では、X1は、FR1、相補性決定領域(CDR)1、FR2、CDR2、FR3、およびCDR3を含む抗体可変ドメインの一部でありうる。

【0012】

他の実施形態では、Yは、FR3中に存在する。たとえば、Yは、GluAspThrAla(配列番号388)、ValTyrTyrCys(配列番号389)、またはGluAspThrAlaValTyrTyrCys(配列番号390)でありうる。そのような実施形態では、X1は、FR1、CDR1、FR2、およびCDR2を含む抗体可変ドメインの一部でありうる。

30

【0013】

いくつかの実施形態では、ハイブリッドドメイン(X1-Y-Z2)は、ハイブリッド抗体定常ドメインのようなハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインである。Yは、(Ser/Ala/Gly)Pro(Lys/Asp/Ser)Val(配列番号391)、(Ser/Ala/Gly)Pro(Lys/Asp/Ser)ValPhe(配列番号392)、LysValAspLys(Ser/Arg/Thr)(配列番号393)、またはValThrVal(配列番号394)でありうる。たとえば、特定の実施形態では、Yは、SerProLysVal(配列番号398)、SerProAspVal(配列番号399)、SerProSerVal(配列番号400)、AlaProLysVal(配列番号401)、AlaProAspVal(配列番号402)、AlaProSerVal(配列番号403)、GlyProLysVal(配列番号404)、GlyProAspVal(配列番号405)、GlyProSerVal(配列番号406)、SerProLysValPhe(配列番号407)、SerProAspValPhe(配列番号408)、SerProSerValPhe(配列番号409)、AlaProLysValPhe(配列番号410)、AlaProAspValPhe(配列番号411)、AlaProSerValPhe(配列番号412)、GlyProLysValPhe(配列番号413)、GlyProAspValPhe(配列番号41

40

50

4)、GlyProSerValPhe (配列番号415)、LysValAspLysSer (配列番号416)、LysValAspLysArg (配列番号417)、LysValAspLysThr (配列番号418)、およびまたはValThrVal (配列番号394) よりなる群から選択される。

【0014】

いくつかの実施形態では、Dは不在であり、(X1-Y-Z2)はハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインであり、かつEは免疫グロブリン定常ドメインである。融合タンパク質は、(X1-Y-Z2)のアミノ末端またはカルボキシル末端に存在する第2の免疫グロブリン可変ドメインをさらに含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、Dは免疫グロブリン可変ドメインであり、かつ(X1-Y-Z2)はハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインである。他の実施形態では、(X1-Y-Z2)はハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインであり、かつEは免疫グロブリン定常ドメインである。他の実施形態では、Eは不在であり、(X1-Y-Z2)はハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインであり、かつ融合タンパク質は(X1-Y-Z2)のアミノ末端に存在するさらなるドメインを含む。

【0016】

他の実施形態では、Dは免疫グロブリン定常ドメインであり、かつ(X1-Y-Z2)はハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインである。

【0017】

本発明に係る融合タンパク質は、第1のポリペプチド由来の第1の部分と第2のポリペプチド由来の第2の部分とを含む。ここで、ポリペプチドは両方とも、同一のタンパク質スーパーファミリーのメンバーである。たとえば、ポリペプチドは両方とも、免疫グロブリンスーパーファミリー、TNFスーパーファミリー、およびTNFレセプタースーパーファミリーよりなる群から選択されるタンパク質スーパーファミリーのメンバーでありうる。追加としてまたは他の選択肢として、前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドは両方ともヒトポリペプチドである。

【0018】

一般的には、X1、X2、Z1、およびZ2は、それぞれ独立して、約1～約200アミノ酸よりなる。いくつかの実施形態では、ハイブリッドドメインは、免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン定常ドメインとほぼ等しいサイズである。

【0019】

より特定のな実施形態では、組換え融合タンパク質は、免疫グロブリン定常ドメインに融合されたハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインを含む。ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインは、第1の免疫グロブリン由来の第1の免疫グロブリンフレームワーク領域(FR)に由来する部分と第2の免疫グロブリン由来の第2の免疫グロブリンFRに由来する部分とを含むハイブリッドFRを含み、第1の免疫グロブリンFRおよび第2の免疫グロブリンFRは、それぞれ、保存アミノ酸モチーフYを含み、かつハイブリッド免疫グロブリンFRは、式

$$(F^1-Y-F^2)$$

〔式中、Yは、保存アミノ酸モチーフであり、

F¹は、第1の免疫グロブリンFR中のYのアミノ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフであり、そして

F²は、第2の免疫グロブリンFR中のYのカルボキシル末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフである〕

を有する。

【0020】

Yは、第1の免疫グロブリンおよび第2の免疫グロブリンのFR1、FR2、FR3、またはFR4に位置しうる。

【0021】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、Yは、FR 4に位置し、かつF²は、免疫グロブリン定常ドメインを含む天然に存在するタンパク質中の免疫グロブリン定常ドメインのアミノ末端に隣接するアミノ酸配列（該アミノ末端に結合されたペプチド）である。いくつかの実施形態では、免疫グロブリン定常ドメインは、抗体軽鎖定常ドメインであり、かつ前記第2の免疫グロブリンFRは、抗体軽鎖可変ドメイン由来のFR 4である。たとえば、抗体定常ドメインは、C κ またはC λ であり、かつ該第2の抗体FR 4は、それぞれ、V κ FR 4またはV λ FR 4である。

【0022】

いくつかの実施形態では、第1の免疫グロブリンは、マウス、ラット、サメ、サカナ、オポッサム、ヒツジ、ブタ、ラクダ科動物、ウサギ、または非ヒト霊長動物に由来する免疫グロブリンのような非ヒト免疫グロブリンである。そのような実施形態では、第2の免疫グロブリンは、ヒト免疫グロブリンでありうる。好ましくは、そのような実施形態では、ハイブリッドFRは、ヒト免疫グロブリン定常ドメインに結合される。

10

【0023】

特定の実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインはハイブリッド抗体可変ドメインであり、かつYはGlyXaaGlyThr（配列番号386）である。そのような実施形態では、F¹はPheでありうる。また、F²は（Leu/Met/Thr）ValThrValSerSer（配列番号420）である。好ましくは、この実施形態に係る融合タンパク質は、ヒト抗体定常ドメイン、たとえば、IgG CH1ドメインを含む。

20

【0024】

特定の実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインはハイブリッド抗体可変ドメインであり、YはGlyXaaGlyThr（配列番号386）であり、F¹はTrpであり、かつF²は（Lys/Arg）（Val/Leu）（Glu/Asp）IleLys（配列番号424）または（Lys/Gln/Glu）（Val/Leu）（Thr/Ile）（Val/Ile）Leu（配列番号425）である。好ましくは、この実施形態に係る融合タンパク質は、ヒト抗体軽鎖定常ドメインを含む。

【0025】

特定の実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインはハイブリッド抗体可変ドメインであり、かつYはGlyXaaGlyThrXaa（Val/Leu）（配列番号387）である。そのような実施形態では、F¹はPheでありうる。また、F²はThrValSerSer（配列番号419）でありうる。好ましくは、この実施形態に係る融合タンパク質は、ヒト抗体重鎖定常ドメイン、たとえば、IgG1もしくはIgG4のCH1ドメインまたはIgG1もしくはIgG4のCH2ドメインを含む。

30

【0026】

特定の実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインはハイブリッド抗体可変ドメインである。YはGlyXaaGlyThrXaa（Val/Leu）（配列番号387）であり、F¹はTrpであり、かつF²は（Glu/Asp）IleLys（配列番号458）または（Thr/Ile）（Val/Ile）Leu（配列番号459）である。好ましくは、この実施形態に係る融合タンパク質は、ヒト抗体軽鎖定常ドメインを含む。

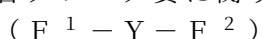
40

【0027】

所望により、組換え融合タンパク質は、式（F¹－Y－F²）－C_L、（F¹－Y－F²）－CH1、（F¹－Y－F²）－CH2、または（F¹－Y－F²）－Fcを有する構造を含む。組換え融合タンパク質は、（F¹－Y－F²）のアミノ末端またはカルボキシ末端に存在する第2の免疫グロブリン可変ドメインをさらに含む。

【0028】

本発明はまた、ヒト抗体定常ドメインに融合された非ヒト抗体可変領域を含む改良された融合タンパク質に関する。この改良物は、式



50

〔式中、

F^1 は、PheまたはTrpであり、

Yは、GlyXaaGlyThr（配列番号386）であり、かつ F^2 は、（Leu／Met／Thr）ValThrValSerSer（420）、（Lys／Arg）（Val／Leu）（Glu／Asp）IleLys（配列番号424）、もしくは（Lys／Gln／Glu）（Val／Leu）（Thr／Ile）（Val／Ile）Leu（配列番号425）であるか、または

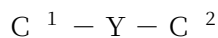
Yは、GlyXaaGlyThrXaa（Val／Leu）（配列番号387）であり、かつ F^2 は、ThrValSerSer（配列番号419）、（Glu／Asp）IleLys（配列番号458）、もしくは（Thr／Ile）（Val／Ile）Leu（配列番号459）である〕

10

を有する非ヒト可変領域中にハイブリッドFR4を含む。

【0029】

組換え融合タンパク質は、ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインに融合された免疫グロブリン可変ドメインを含みうる。ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインは、第1の免疫グロブリン定常ドメイン由来の部分と第2の免疫グロブリン定常ドメイン由来の部分とを含み、第1の免疫グロブリン定常ドメインおよび第2の免疫グロブリン定常ドメインは、それぞれ、保存アミノ酸モチーフYを含む。ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインは、式



20

〔式中、

Yは、該保存アミノ酸モチーフであり、

C^1 は、第1の免疫グロブリン定常領域中のYのアミノ末端に隣接するアミノ酸モチーフであり、

C^2 は、第2の免疫グロブリン定常領域中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフである〕

を有する。

【0030】

いくつかの実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインは、第1の抗体定常ドメイン由来の部分と第2の抗体定常ドメイン由来の部分とを含むハイブリッド抗体定常ドメインである。ハイブリッド抗体定常ドメインは、ハイブリッド抗体CH1、ハイブリッド抗体ヒンジ、ハイブリッド抗体CH2、またはハイブリッド抗体CH3でありうる。

30

【0031】

いくつかの実施形態では、第1の抗体定常ドメインおよび前記第2の抗体定常ドメインは、異なる種に由来する。

【0032】

他の実施形態では、第2の抗体定常ドメインはヒト抗体定常ドメインである。他の選択肢としてまたは追加として、第1の抗体定常ドメインは、マウス、ラット、サメ、サカナ、オポッサム、ヒツジ、ブタ、ラクダ科動物、ウサギ、または非ヒト霊長動物の定常ドメインである。

40

【0033】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、非ヒト抗体可変ドメインである免疫グロブリン可変ドメインを含み、かつ第1の定常ドメインは、対応する非ヒトCH1ドメイン、 $C\lambda$ ドメイン、または $C\kappa$ ドメインである。いくつかの実施形態では、前記第1の抗体定常ドメインは軽鎖定常ドメインであり、かつ前記第2の抗体定常ドメインは重鎖定常ドメインである。

【0034】

他の実施形態では、前記第1の抗体定常ドメインはラクダ科動物重鎖定常ドメインであり、かつ前記第2の抗体定常ドメインは重鎖定常ドメインである。所望により、VHHは

50

、ハイブリッド定常ドメインのアミノ末端に存在しうる。

【0035】

いくつかの実施形態では、第1の抗体定常ドメインおよび前記第2の抗体定常ドメインは、異なるアイソタイプのものである。好ましくは、第2の抗体定常ドメインは、IgG定常ドメインである。

【0036】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、軽鎖可変ドメインである抗体可変ドメインを含み、かつ第1の抗体定常ドメインは軽鎖定常ドメインである。そのような実施形態では、第2の抗体定常ドメインは、ヒト抗体重鎖定常ドメインまたはヒト抗体軽鎖定常ドメインでありうる。いくつかの実施形態では、ヒト抗体重鎖定常ドメインは、CH1、ヒンジ、CH2、またはCH3である。

10

【0037】

特定の実施形態では、Yは、(Ser/Ala/Gly)Pro(Lys/Asp/Ser)Val(配列番号391)、(Ser/Ala/Gly)Pro(Lys/Asp/Ser)ValPhe(配列番号392)、LysValAspLys(Ser/Arg/Thr)(配列番号393)、またはValThrVal(配列番号394)である。これらの実施形態のいくつかでは、第2の抗体定常ドメインは、ヒト抗体定常ドメイン、たとえば、Cκ、Cλ、CH1、ヒンジ、CH2、およびCH3である。

【0038】

特定の実施形態では、組換え融合タンパク質は、ハイブリッドヒトCH1ドメインに融合されたヒト軽鎖可変ドメインを含み、しかも

20

C¹は、GlnProLysAla(配列番号466)またはThrValAla(配列番号467)であり、

Yは、(Ala/Gly)ProSerVal(配列番号468)であり、かつ

C²は、ヒトIgG CH1中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフである。

【0039】

特定の実施形態では、組換え融合タンパク質は、ハイブリッドヒトCH2に融合されたヒト軽鎖可変ドメインを含み、ここで、

C¹は、GlnProLysAla(配列番号466)またはThrValAla(配列番号467)であり、

30

Yは、(Ala/Gly)ProSerValPhe(配列番号470)であり、かつ

C²は、ヒトIgG CH2中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフである。

【0040】

特定の実施形態では、組換え融合タンパク質は、ハイブリッドヒトCH2に融合されたヒト重鎖可変ドメインを含み、ここで、

C¹は、SerThrLys(配列番号469)であり、

Yは、(Ala/Gly)ProSerValPhe(配列番号470)であり、かつ

C²は、ヒトIgG CH2中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフである。

40

【0041】

特定の実施形態では、組換え融合タンパク質は、ハイブリッドヒトCκに融合されたヒトλ鎖可変ドメインを含み、しかもここで、

C¹は、GlnProLysAla(配列番号466)であり、

Yは、(Ala/Gly)ProSerValPhe(配列番号468)であり、かつ

C²は、ヒトCκ中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフである。

【0042】

特定の実施形態では、組換え融合タンパク質は、ハイブリッドヒトCκに融合されたヒト重鎖可変ドメインを含み、ここで、

50

C¹は、SerThrLys（配列番号469）であり、
Yは、(Ala/Gly)ProSerValPhe（配列番号470）であり、かつ
C²は、ヒトCκ中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフである。

【0043】

特定の実施形態では、組換え融合タンパク質は、ハイブリッドヒトCλに融合されたヒトκ鎖可変ドメインを含み、しかもここで、

C¹は、ThrValAla（配列番号467）であり、
Yは、(Ala/Gly)ProSerVal（配列番号468）であり、かつ
C²は、ヒトCλ中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフである。

【0044】

特定の実施形態では、組換え融合タンパク質は、ハイブリッドヒトCλに融合されたヒト重鎖可変ドメインを含み、ここで、

C¹は、SerThrLys（配列番号469）であり、
Yは、(Ala/Gly)ProSerVal（配列番号468）であり、かつ
C²は、ヒトCλ中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸モチーフである。

【0045】

本発明はまた、第1のポリペプチドに由来する第1の部分と第2のポリペプチドに由来する第2の部分とを含む組換え融合タンパク質に関する。ここで、該第1のポリペプチドは、式(A)－L1〔式中、(A)は、該第1のポリペプチド中に存在するアミノ酸配列であり、そしてL1は、該第1のポリペプチド中の(A)のカルボキシ末端に隣接する1～約50アミノ酸を含むアミノ酸モチーフである〕を有する構造を含み、該融合ポリペプチドは、式

(A)－L1－(B)

〔式中、(B)は、該第2のポリペプチドに由来する該部分であり、付帯条件として、(A)および(B)の少なくとも一方はドメインであり、しかも(A)および(B)が両方とも抗体可変ドメインである場合、

- a) (A)および(B)はそれぞれヒト抗体可変ドメインであるか、
- b) (A)および(B)はそれぞれ抗体重鎖可変ドメインであるか、
- c) (A)および(B)はそれぞれ抗体軽鎖可変ドメインであるか、
- d) (A)は抗体軽鎖可変ドメインでありかつ(B)は抗体重鎖可変ドメインであるか、もしくは

e) (A)はVHHでありかつ(B)は抗体軽鎖可変ドメインであるものとするか、または付帯条件として、(A)および(B)が両方とも抗体可変ドメインである場合、次のものは本発明から除外されるものとする、(A)－L1－(B)〔ここで、(A)はマウスVHであり、(B)はマウスVLであり、そしてL1は、SerAlaLysThrThrPro（配列番号537）、SerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGly（配列番号538）、AlaLysThrThrProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArgVal（配列番号539）、もしくはAlaLysThrThrProLysLeuGluGlu（配列番号540）である〕〕

を有する。

【0046】

いくつかの実施形態では、第1のポリペプチドは抗体可変ドメインである。第2のポリペプチドは免疫グロブリン定常領域でありうる。いくつかの実施形態では、(B)は、抗体CH1の少なくとも一部分、抗体ヒンジの少なくとも一部分、抗体CH2の少なくとも一部分、または抗体CH3の少なくとも一部分を含む。

【0047】

いくつかの実施形態では、(A)は抗体軽鎖可変ドメインである。そのような実施形態では、L1は、CκまたはCλの1～約50個の連続したアミノ末端アミノ酸を含む。他の実施形態では、(A)は、VHやVHHのような抗体重鎖可変ドメインである。そのよ

10

20

30

40

50

うな実施形態では、L 1 は、C H 1 の 1 ～約 5 0 個の連続したアミノ末端アミノ酸を含むうる。

【0048】

いくつかの実施形態では、(A) は抗体重鎖可変ドメインでありかつ (B) は抗体重鎖可変ドメインであるか、または (A) は抗体軽鎖可変ドメインでありかつ (B) は抗体重鎖可変ドメインもしくは抗体軽鎖可変ドメインである。たとえば、特定の実施形態では、

(A) は V κ でありかつ (B) は V κ であるか、(A) は V κ でありかつ (B) は V λ であるか、(A) は V κ でありかつ (B) は V H もしくは V H H であるか、(A) は V λ でありかつ (B) は V κ であるか、(A) は V λ でありかつ (B) は V λ であるか、または (A) は V λ でありかつ (B) は V H もしくは V H H である。

10

【0049】

いくつかの実施形態では、(A) は V H でありかつ L 1 は C H 1 の最初の 3 ～約 1 2 アミノ酸を含むか、(A) は V κ でありかつ L 1 は C κ の最初の 3 ～約 1 2 アミノ酸を含むか、または (A) は V λ でありかつ L 1 は C λ の最初の 3 ～約 1 2 アミノ酸を含む。

【0050】

特定の実施形態では、(A) は、抗体軽鎖可変ドメインの F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 3、F R 3、および C D R 3 と、アミノ酸配列 G l y G l n G l y T h r L y s V a l T h r V a l S e r S e r (配列番号 4 7 2) を含む F R 4 とを含む抗体可変ドメインであり、かつ L 1 は、C H 1 の最初の 3 ～約 1 2 アミノ酸を含む。これらの実施形態では、L 1 は、A l a S e r T h r (4 7 3)、A l a S e r T h r L y s G l y P r o S e r (配列番号 4 7 4)、または A l a S e r T h r L y s G l y P r o S e r G l y (配列番号 4 7 5) でありうる。

20

【0051】

特定の実施形態では、(A) は、V H または V κ ドメインの F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 3、F R 3、および C D R 3 と、アミノ酸配列 G l y X a a G l y T h r (L y s / G l n / G l u) (V a l / L e u) (T h r / I l e) V a l L e u (配列番号 4 7 6) を含む F R 4 とを含む抗体可変ドメインであり、かつ L 1 は、C λ の最初の 3 ～約 1 2 アミノ酸を含む。他の実施形態では、(A) は、V H または V λ ドメインの F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 3、F R 3、および C D R 3 と、アミノ酸配列 G l y G l n G l y T h r L y s V a l G l u I l e L y s A r g (配列番号 4 7 7) を含む F R 4 とを含む抗体可変ドメインであり、かつ L 1 は、C κ の最初の 3 ～約 1 2 アミノ酸を含む。

30

【0052】

他の実施形態では、(A) は、抗体定常ドメインのような免疫グロブリン定常ドメインである。他の実施形態では、(A) は非ヒト免疫グロブリン定常ドメインであり、かつ (B) はヒトポリペプチドに由来する。

【0053】

いくつかの実施形態では、第 2 のポリペプチドは、サイトカイン、サイトカインレセプター、増殖因子、増殖因子レセプター、ホルモン、ホルモンレセプター、接着分子、止血因子、T 細胞レセプター、T 細胞レセプター鎖、T 細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかもしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか 1 つの機能性部分よりなる群から選択される。

40

【0054】

他の実施形態では、第 1 のポリペプチドは、サイトカイン、サイトカインレセプター、増殖因子、増殖因子レセプター、ホルモン、ホルモンレセプター、接着分子、止血因子、T 細胞レセプター、T 細胞レセプター鎖、T 細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかもしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか 1 つの機能性部分よりなる群から選択される。そのような実施形態では、第 2 のポリペプチドは、免疫グロブリン定常領域または免疫グロブリン定常領域の F c 部分でありうる。

【0055】

本発明は、免疫グロブリン可変ドメインである第 1 の部分と第 2 の部分とを含む組換え

50

融合タンパク質に関する。ここで、該第1の部分、リンカーを介して該第2の部分に結合され、かつ組換え融合タンパク質は、式



〔式中、(A')は該免疫グロブリン可変ドメインでありかつフレームワーク(FR)4を含み、L2は、該リンカーであり、ここで、L2は、該FR4を含む天然に存在する免疫グロブリン中の該FR4のカルボキシ末端に隣接する1～約50個の連続したアミノ酸を含み、そして(B)は該第2の部分であり、

付帯条件として、L2-(B)は、該FR4を含む天然に存在する抗体中の該FR4に結合されたペプチドであるC_LドメインでもCH1ドメインでもなく、しかも(A)および(B)が両方とも抗体可変ドメインである場合、

- a) (A)および(B)はそれぞれヒト抗体可変ドメインであるか、
- b) (A)および(B)はそれぞれ抗体重鎖可変ドメインであるか、
- c) (A)および(B)はそれぞれ抗体軽鎖可変ドメインであるか、
- d) (A)は抗体軽鎖可変ドメインでありかつ(B)は抗体重鎖可変ドメインであるか、もしくは

e) (A)はVHHでありかつ(B)は抗体軽鎖可変ドメインであるものとするか、

または付帯条件として、(A)および(B)が両方とも抗体可変ドメインである場合、次のものは本発明から除外されるものとする、(A)-L1-(B)〔ここで、(A)はマウスVHであり、(B)はマウスVLであり、そしてL1は、SerAlaLysThrThrPro(配列番号537)、SerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGly(配列番号538)、AlaLysThrThrProLysLeuGluGlyGlyGluPheSerGluAlaArgVal(配列番号539)、もしくはAlaLysThrThrProLysLeuGlyGly(配列番号540)である〕

を有する。

【0056】

いくつかの実施形態では、(A')は、抗体重鎖可変ドメインまたはハイブリッド抗体可変ドメインである。いくつかの実施形態では、抗体重鎖可変ドメインまたはハイブリッド抗体可変ドメインは、それぞれ、アミノ酸配列GlyXaaGlyThr(Leu/Met/Thr)ValThrValSerSer(配列番号478)を含むFR4を含む。これらの実施形態では、L2は、CH1のアミノ末端から1～約50個の連続したアミノ酸を含みうる。特定の実施形態では、L2は、AlaSerThr(配列番号473)、AlaSerThrLysGlyProSer(配列番号474)、またはAlaSerThrLysGlyProSerGly(配列番号475)を含む。

【0057】

いくつかの実施形態では、(A')は、アミノ酸配列GlyXaaGlyThr(Lys/Arg)(Val/Leu)(Glu/Asp)IleLysArg(配列番号485)を含むFR4を含むハイブリッド抗体可変ドメインまたはVκである。これらの実施形態では、L2は、Cκのアミノ末端から1～約50個の連続したアミノ酸を含みうる。特定の実施形態では、L2は、ThrValAla(配列番号467)、ThrValAlaAlaProSer(配列番号490)、またはThrValAlaAlaProSerGly(配列番号491)を含む。いくつかの実施形態では、(A')は、アミノ酸配列GlyXaaGlyThr(Lys/Gln/Glu)(Val/Leu)(Thr/Ile)(Val/Ile)Leu(配列番号492)を含むFR4を含むハイブリッド抗体可変ドメインまたはVλである。

【0058】

いくつかの実施形態では、(B)は、抗体軽鎖可変ドメインまたは抗体重鎖可変ドメインを含む。他の実施形態では、(B)は、たとえば(B)のアミノ末端に、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部分を含む。免疫グロブリン定常領域は、IgG1定常領域やIgG4定常領域のようなIgG定常領域でありうる。いくつかの実施形態では、(B)

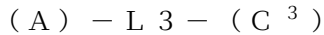
は、CH 1 の少なくとも一部分、ヒンジの少なくとも一部分、CH 2 の少なくとも一部分、またはCH 3 の少なくとも一部分を含む。

【0059】

特定の実施形態では、(B)は、ThrHisThrCysProProCysPro (配列番号520)を含むヒンジの少なくとも一部分を含む。追加として、(B)は、CH 2 -CH 3 をさらに含む。他の実施形態では、(B)は、CH 1 -ヒンジ-CH 2 -CH 3、ヒンジ-CH 2 -CH 3、CH 2 -CH 3、またはCH 3 の一部分を含む。

【0060】

本発明は、免疫グロブリン定常領域に由来する第1の部分と第2の部分とを含む組換え融合タンパク質に関する。第1の部分は、リンカーを介して該第2の部分に結合され、かつ組換え融合タンパク質は、式



〔式中、(A)は、該第1の部分であり、(C³)は、免疫グロブリン定常領域に由来する該第2の部分であり、そしてL3は、該リンカーであり、ここで、L3は、(C³)を含む天然に存在する免疫グロブリン中の(C³)のアミノ末端に隣接する1〜約50個の連続したアミノ酸を含み、付帯条件として、(A)は、該天然に存在する免疫グロブリン中に見いだされる抗体可変ドメインではないものとする〕

を有する。

【0061】

いくつかの実施形態では、(C³)は、少なくとも1つの抗体定常ドメイン、たとえば、ヒト抗体定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体定常ドメインは、IgG1定常ドメインやIgG4定常ドメインのようなIgG定常ドメインである。

【0062】

いくつかの実施形態では、(C³)はCH3を含む。これらの実施形態では、L3は、CH2のカルボキシ末端から1〜約50個の連続したアミノ酸を含む。他の実施形態では、(C³)はCH2またはCH2-CH3を含む。これらの実施形態では、L3は、ヒンジのカルボキシ末端から1〜約34個の連続したアミノ酸を含む。たとえば、L3は、ThrHisThrCysProProCysPro (配列番号520)またはGlyThrHisThrCysProProCysPro (配列番号521)を含む。

【0063】

いくつかの実施形態では、(C³)はヒンジを含む。これらの実施形態では、L3は、CH1のカルボキシ末端から1〜約50個の連続したアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、(C³)はCH1を含む。これらの実施形態では、L3は、抗体重鎖Vドメインのカルボキシ末端から1〜約50個の連続したアミノ酸を含む。たとえば、L3は、GlyXaaGlyThr (Leu/Met/Thr) ValThrValSerSer (配列番号478)を含む。

【0064】

いくつかの実施形態では、抗体定常ドメインは、CκまたはCλである。そのような実施形態では、L3は、抗体軽鎖Vドメインのカルボキシ末端から1〜約50個の連続したアミノ酸を含む。たとえば、抗体定常ドメインがCκである場合、L3は、GlyXaaGlyThr (Lys/Arg) (Val/Leu) (Glu/Asp) IleLysArg (配列番号485)を含む。抗体定常ドメインがCλである場合、L3は、GlyXaaGlyThr (Lys/Gln/Glu) (Val/Leu) (Thr/Ile) (Val/Ile) Leu (配列番号492)を含む。

【0065】

特定の実施形態では、(A)は、サイトカイン、サイトカインレセプター、増殖因子、増殖因子レセプター、ホルモン、ホルモンレセプター、接着分子、止血因子、T細胞レセプター、T細胞レセプター鎖、T細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかもしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか1つの機能性部分よりなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【0066】

本発明はまた、抗体可変ドメインに由来する第1の部分と第2のポリペプチドに由来する第2の部分とを含む組換え融合タンパク質に関する。ここで、該抗体可変ドメインは、式(A)－L1〔式中、(A)はCDR3よりなり、L1はFR4よりなる〕を有する構造を含み、該融合ポリペプチドは、式(A)－L1－(B)〔式中、(B)は、該第2のポリペプチドに由来する該部分である〕を有する。

【0067】

いくつかの実施形態では、第2のポリペプチドは免疫グロブリン定常領域である。他の実施形態では、(B)は、抗体CH1の少なくとも一部分、抗体ヒンジの少なくとも一部分、抗体CH2の少なくとも一部分、または抗体CH3の少なくとも一部分を含む。

10

【0068】

本発明はまた、本明細書に記載の天然の連結部を含む組換え融合タンパク質をコードする単離された組換え核酸分子と、本明細書に記載の天然の連結部を含む組換え融合タンパク質をコードする組換え核酸分子を含む宿主細胞とに関する。

【0069】

本発明はまた、天然の連結部を含む融合タンパク質をコードする組換え核酸の発現に好適な条件下で本発明に係る宿主細胞を維持することにより該組換え核酸を発現させて組換え融合タンパク質を産生することを含む、組換え融合タンパク質の産生方法に関する。特定の実施形態では、本方法は、該組換え融合タンパク質を単離することをさらに含む。

【0070】

本発明はまた、治療、診断、および／または予防に使用するための、本明細書に記載の天然の連結部を含む組換え融合タンパク質に関する。本発明はまた、免疫応答を誘導する可能性が低減された、ヒトにおける治療、診断、および／または予防のための医薬を製造するための、本明細書に記載の天然の連結部を含む組換え融合タンパク質の使用に関する。

20

【0071】

本発明はまた、本明細書に記載の天然の連結部を含むことにより天然の連結部を含有していない対応する融合タンパク質と比較して免疫応答を誘導する可能性が低減された有効量の組換え融合タンパク質をヒトに投与することを含む、ヒトにおける治療、診断、および／または予防の方法に関する。

30

【0072】

本発明はまた、天然の連結部を含有していない対応する融合タンパク質と比較して免疫応答を誘導する可能性が低減された、ヒトの治療、診断、および／または予防のための組換え融合タンパク質を調製するための、天然の連結部の使用に関する。

【0073】

本発明は、天然の連結部を含有していない対応する融合タンパク質と比較して凝集傾向が低減された、ヒトの治療、診断、および／または予防のための組換え融合タンパク質を調製するための、天然の連結部の使用に関する。

【0074】

本発明は、ヒトの治療、診断、および／または予防のための組換え融合タンパク質を調製するための、天然の連結部の使用に関する。ここで、該組換え融合タンパク質は、天然の連結部を含有していない対応する融合タンパク質と比較してより高レベルで発現される。

40

【0075】

本発明は、ヒトの治療、診断、および／または予防のための組換え融合タンパク質を調製するための、天然の連結部の使用に関する。ここで、該組換え融合タンパク質は、天然の連結部を含有していない対応する融合タンパク質を基準にして比較して向上した安定性を有する。

【0076】

本発明は、第1の部分(A)と、第2の部分(B)と、(A)と(B)との間の少なく

50

とも1つの天然の連結部とを含む組換え融合タンパク質を調製するための、天然の連結部の使用に関する。ここで、該組換え融合タンパク質は、(A)と(B)との境界部が天然の連結部でないものとして(A)と(B)とを含む対応する融合タンパク質と比較して低減された凝集傾向を有する。

【0077】

本発明は、第1の部分(A)と、第2の部分(B)と、(A)と(B)との間の少なくとも1つの天然の連結部とを含む組換え融合タンパク質を調製するための、天然の連結部の使用に関する。ここで、該組換え融合タンパク質は、対応する融合タンパク質が(A)と(B)との間に天然の連結部を含有していないものとして(A)と(B)とを含む対応する融合タンパク質と比較してより高レベルで発現される。

10

【0078】

本発明は、第1の部分(A)と、第2の部分(B)と、(A)と(B)との間の少なくとも1つの天然の連結部とを含む組換え融合タンパク質を調製するための、天然の連結部の使用に関する。ここで、該組換え融合タンパク質は、対応する融合タンパク質が(A)と(B)との間に天然の連結部を含有していないものとして(A)と(B)とを含む対応する融合タンパク質と比較して向上した安定性を有する。

【0079】

本発明は、本明細書に記載の天然の連結部を含む組換え融合タンパク質と生理学的に許容される担体とを含む医薬組成物に関する。

【0080】

本発明は、第1の部分と第2の部分とを天然の連結部で融合して含む融合タンパク質をデザインまたは生成する方法に関する。ここで、該第1の部分は、第1のポリペプチドに由来し、かつ該第2の部分は、第2のポリペプチドに由来する。本方法は、該第1のポリペプチドもしくはその一部分のアミノ酸配列と該第2のポリペプチドもしくはその一部分のアミノ酸配列とを解析して、解析された配列の両方に存在する保存アミノ酸モチーフを同定することと、式



〔式中、Aは該第1の部分であり、Yは該保存アミノ酸モチーフであり、Bは該第2の部分であり、しかもここで、該第1のポリペプチドはA-Yを含み、かつ該第2のポリペプチドはY-Bを含む〕

30

を有する融合タンパク質を調製することを含む。

【0081】

いくつかの実施形態では、第2のポリペプチドは、ヒト免疫グロブリン定常ドメインや非ヒト免疫グロブリン定常ドメインのような免疫グロブリン定常ドメインを含む。特定の実施形態では、第2のポリペプチドは抗体定常ドメインを含む。

【0082】

いくつかの実施形態では、第2のポリペプチドおよびBは、抗体重鎖定常ドメイン、たとえばヒンジ領域、またはCH1-ヒンジ-CH2-CH3、ヒンジ-CH2-CH3、CH2-CH3、もしくはCH3の一部分を含む。好ましくは、定常ドメインは、ヒト抗体重鎖定常ドメイン、たとえば、IgG（たとえば、IgG1定常ドメインまたはIgG4定常ドメイン）である。

40

【0083】

いくつかの実施形態では、第1のポリペプチドは、サイトカイン、サイトカインレセプター、増殖因子、増殖因子レセプター、ホルモン、ホルモンレセプター、接着分子、止血因子、T細胞レセプター、T細胞レセプター鎖、T細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか1つの機能性部分よりなる群から選択される。

【0084】

いくつかの実施形態では、第1のポリペプチドおよびAは、ヒト免疫グロブリン可変ドメインや非ヒト免疫グロブリン可変ドメインのような免疫グロブリン可変ドメインを含む

50

。特定の実施形態では、第1のポリペプチドは、非ヒト抗体可変ドメインまたはヒト抗体可変ドメインを含む。これらの実施形態では、第2のポリペプチドは、サイトカイン、サイトカインレセプター、増殖因子、増殖因子レセプター、ホルモン、ホルモンレセプター、接着分子、止血因子、T細胞レセプター、T細胞レセプター鎖、T細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかもしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか1つの機能性部分よりなる群から選択されうる。

【0085】

いくつかの実施形態では、第1のポリペプチドは第1の抗体鎖であり、第2のポリペプチドは第2の抗体鎖である。これらの実施形態では、Yは、該第1の抗体鎖の可変ドメイン中および該第2の抗体鎖の可変ドメイン中に存在する。一実施形態では、Yは、フレームワーク領域（FR）4中に存在する。これらの実施形態では、Yは、Gly Xaa Gly Thr（配列番号386）またはGly Xaa Gly Thr Xaa（Val / Leu）（配列番号387）でありうる。他の実施形態では、Yは、FR3中に存在する。これらの実施形態では、Yは、Glu Asp Thr Ala（配列番号388）、Val Tyr Tyr Cys（配列番号389）、またはGlu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys（配列番号390）でありうる。他の実施形態では、Yは、該第1の抗体鎖の定常ドメイン中および該第2の抗体鎖の定常ドメイン中に存在する。これらの実施形態では、Yは、（Ser / Ala / Gly）Pro（Lys / Asp / Ser）Val（配列番号391）、（Ser / Ala / Gly）Pro（Lys / Asp / Ser）Val Phe（配列番号392）、Lys Val Asp Lys（Ser / Arg / Thr）（配列番号393）、またはVal Thr Val（配列番号394）でありうる。

【0086】

いくつかの実施形態では、前記第1の抗体鎖および前記第2の抗体鎖は、異なる種に由来する。他の実施形態では、前記第1の抗体鎖および前記第2の抗体鎖は、同一の種に由来する。特定の実施形態では、前記第1の抗体鎖および前記第2の抗体鎖は、ヒト由来である。

【0087】

ある実施形態では、融合タンパク質は、Aのアミノ末端に位置する第3の部分を含み。ある実施形態では、第3の部分は、免疫グロブリン可変ドメインを含む。

【0088】

いくつかの実施形態では、前記第1のポリペプチドおよび前記第2のポリペプチドは両方とも、同一のタンパク質スーパーファミリーのメンバーである。たとえば、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドは、免疫グロブリンスーパーファミリー、TNFスーパーファミリー、およびTNFレセプタースーパーファミリーよりなる群から選択されるタンパク質スーパーファミリーのメンバーでありうる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0089】

本明細書内では、実施形態は、明瞭かつ簡潔な明細書を作成しうるように記載されているが、本発明から逸脱することなく実施形態をさまざまに組み合わせたりまたは分離したりしうることが意図されており、そのことは理解されよう。明瞭かつ簡潔に本発明を記載しうるように、本明細書は、開示された融合タンパク質の部分構造を表す式を含む。これらの式は、当技術分野の慣例に従ってアミノ末端からカルボキシ末端の方向（式中では左から右の方向）に配置された融合タンパク質の部分を示している。

【0090】

本明細書内では、「約」という用語は、好ましくは場合により±50%、より好ましくは場合により±20%、さらにより好ましくは場合により±10%、さらにより好ましくは場合により±5%、さらにより好ましくは場合により±2%、さらにより好ましくは場合により±1%を意味するものと解釈される。

【0091】

「融合タンパク質」は、異なる親アミノ酸配列（たとえば、タンパク質）に由来する一

10

20

30

40

50

【 0 0 9 2 】

【 0 0 9 3 】

10

20

【 0 0 9 4 】

30

【 0 0 9 5 】

40

【 0 0 9 6 】

【 0 0 9 7 】

50

変ドメイン」とは、1つ以上のフレームワーク領域がヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子セグメントによりコードされる可変ドメインまたはヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子セグメントによりコードされるアミノ酸配列に対して5個までのアミノ酸の差異を有する可変ドメインを意味する。免疫グロブリン可変ドメインは、本質的に多様なアミノ酸配列を含有する超可変領域（たとえば、CDR1、CDR2、CDR3）を含有する。免疫グロブリン技術分野で認められた基準によれば、ヒト生殖系列によりコードされないアミノ酸が超可変領域中に存在していても免疫グロブリン可変ドメインは非ヒト性であるとみなされない。ヒト免疫グロブリン可変ドメインは、ヒト生殖系列によりコードされない1つ以上のCDRを含有可能であり、しかもCDR中に存在せずかつヒト生殖系列によりコードされない10個までの追加のアミノ酸を追加的に含有可能である。好ましくは、FW1、FW2、FW3、およびFW4のアミノ酸配列は、それぞれ、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子セグメントによりコードされるか、または全体として、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子セグメントによりコードされる対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列に対して10個までのアミノ酸の差異を含有する。

10

【0098】

本明細書中で使用する場合、「ハイブリッドドメイン」とは、同一のタイプの第1のドメイン由来の部分と同一のタイプの第2のドメイン由来の部分とを含む組換えドメインを意味する。たとえば、ハイブリッド抗体可変ドメインは、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3と、V κ 由来のFR4の一部と、抗体重鎖可変ドメイン由来のFR4の一部とを含む。同一のタイプのドメインとしては、免疫グロブリン可変ドメイン（たとえば、抗体軽鎖および重鎖可変ドメイン、ならびにTCR可変ドメイン）さらには免疫グロブリン定常ドメイン（たとえば、抗体軽鎖および重鎖定常ドメイン、TCR定常ドメイン）が挙げられる。

20

【0099】

本明細書中で使用する場合、「保存アミノ酸モチーフ」とは、1つ以上のポリペプチド中およびそのようなポリペプチドに由来する部分を含有する本発明に係る特定の融合タンパク質中に存在する保存アミノ酸配列を有する1〜約50個の連続したアミノ酸を含有する領域を意味する。保存アミノ酸モチーフのアミノ酸配列は、保存アミノ酸モチーフを含有する個別のポリペプチド間で同一であっても同一でなくてもよい。当技術分野で公知のように、アミノ酸配列モチーフは、ある程度、アミノ酸配列が異なってもよいが、アミノ酸モチーフの全配列多様性は、不変アミノ酸残基の存在と保存的アミノ酸置換のような限られた変異を有する位置の存在とにより制限される。多くの種由来の免疫グロブリン可変ドメインのフレームワーク4中に存在するGlyXaaGlyThr（配列番号386）モチーフのような保存アミノ酸モチーフは、アミノ酸配列のアライメントにより従来の方法で同定可能である。好ましくは、2つ以上のポリペプチド中に存在する保存アミノ酸モチーフのアミノ酸配列は、モチーフの長さにわたり互いに少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%のアミノ酸配列類似性または同一性を有する。

30

40

【0100】

本明細書中で使用する場合、第1のアミノ酸、アミノ酸配列、またはモチーフは、第1のアミノ酸配列またはモチーフが、連続ポリペプチド鎖を形成するように第2のアミノ酸配列またはモチーフに直接結合されたペプチドである場合、第2のアミノ酸、アミノ酸配列、またはモチーフに「隣接」する。

【0101】

アミノ酸配列およびヌクレオチド配列のアライメントならびに相同性、類似性、または同一性は、本明細書中で規定される場合、好ましくは、デフォルトパラメーターを用いてBLAST 2 Sequencesアルゴリズムにより作成および決定が行われる（Tatusova, T. A. et al., FEMS Microbiol Lett, 174:187-188 (1999)）。他の選択肢として

50

、パラメーターをデフォルト値に設定してBLASTアルゴリズム（バージョン2.0）が配列アライメントに利用される。BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）は、blastp、blastn、blastx、tblastn、およびtblastxプログラムにより利用される発見的検索アルゴリズムであり、これらのプログラムは、Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(6):2264-8 (1990)の統計的手法を用いてそれらの発見に重点を置く。

【0102】

本発明は、天然の連結部を含有する組換え融合タンパク質に関する。本発明に係る融合タンパク質は、一般的には、融合される2つのポリペプチド中に存在する保存アミノ酸配列モチーフを含む。保存モチーフのアミノ末端に隣接するアミノ酸配列は、一方の元のポリペプチド中の保存モチーフのアミノ末端に隣接するアミノ配列と同一であり、かつ保存モチーフのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列は、他方の元のポリペプチド中の保存モチーフのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列と同一である。

【0103】

本発明に係る融合タンパク質は、従来の融合タンパク質よりも優れたいくつかの利点を備えている。たとえば、タンパク質中のドメイン相互作用は、タンパク質の安定性（たとえば、凝集耐性、プロテアーゼ耐性）に重要な寄与をする。しかしながら、従来の融合タンパク質の成分は典型的にはドメイン境界で融合されるので、融合タンパク質中のドメイン相互作用は、多くの場合、改変される。その結果、異なる親タンパク質由来のドメインが並置されることになることから、安定性の低下を生じる可能性がある。

【0104】

天然の連結部を含有する融合タンパク質の1つの特徴は、一般にドメイン相互作用を保持するようにデザインすることにより融合タンパク質の安定性の向上および免疫原性の低下が達成されることである。好ましくは、いくつかの実施形態では、本発明に係る融合タンパク質においてドメイン反発の可能性が低減され、それによりさらにタンパク質分解に対する感受性が低減される。従来の融合タンパク質に関連する共通の問題は、生成時に組換えタンパク質の一部が一般に可溶性もしくは不溶性のアグリゲートを形成することにより所望の可溶性単量体型融合タンパク質の収率が低減されることである。本発明に係る融合タンパク質の改良された安定性は、追加的または代替的に、凝集の低減、発現の向上、および／または生成収率の向上をもたらす。天然の連結部を含有する融合タンパク質はまた、親ポリペプチドが患者と同一の種由来である場合、免疫原性が低減される可能性があるので、in vivo 治療剤または診断剤として使用するのに有利である。

【0105】

従来の融合タンパク質は、異なる親タンパク質由来のアミノ酸配列の並置であるので非自己配列を含有する。これらの配列は、天然に存在しないので免疫原性になる可能性がある（たとえば、B細胞エпитープを形成したり、T細胞エпитープを形成したりする可能性がある）。その結果、従来の融合タンパク質は、患者において免疫応答を誘導することが可能である。免疫原性は、融合タンパク質のin vivo使用を制限したりまたは阻止したりする可能のある重要な側面である。免疫原性は、たとえば、組換え融合タンパク質上のエпитープが細胞性（T細胞）免疫応答を刺激する場合に生じる。T細胞エпитープは、通常は8～11アミノ酸の長さである線状ペプチドよりなる。したがって、本明細書に記載されるように、所望の生物学的機能を有するが従来の方法を用いて調製される融合タンパク質と比較して少ない数のTエпитープを有するかまたはまったく有していない組換え融合タンパク質をデザインし生成することが可能である。

【0106】

T細胞エпитープとして機能するために、組換えタンパク質に由来するペプチドは、いくつかの要件を満たさなければならない。それらは、細胞内タンパク質分解プロセッシングに耐えなければならない、かつ宿主の主要組織適合性分子（たとえば、ヒトHLA分子）に結合できなければならない。ペプチドがT細胞エпитープとして認識されるかどうかに影響を及ぼす他の因子は、自己性の度合いである。重要なこととして、自己タンパク質に属

するエピトープを対象とする T 細胞は、胸腺発生時に寛容化または排除される（たとえば、Rosmalen et al., 2002を参照されたい）。しかしながら、いくつかの自己特異的 T 細胞は、末梢で存続し、そこでは C D 4（+）C D 2 5（+）調節性 T 細胞により抑制される（たとえば、Papiernik, 2001およびShevach et al., 2001を参照されたい）。T 細胞エピトープを含有する融合タンパク質が投与された場合、寛容が破壊される可能性がある。この状況では、融合タンパク質に由来する外来ペプチドさらには自己ペプチドでさえも、免疫応答を誘導する可能性がある。したがって、融合タンパク質中の T 細胞エピトープの数を減少させることが望ましい。本明細書に記載されるように、これは、組換え融合タンパク質内に見いだされる任意の所与の連続ペプチド配列内の「自己性」の度合いを最大化することにより達成可能である。

10

【0107】

天然に存在するタンパク質中では互いに隣接して存在しない 2 つ以上の部分（たとえば、ドメイン）で構成された組換え融合タンパク質は、該部分を連結する連結部を含む。該部分は天然の状況下では連結されていないので、そのような連結部は、一般に、連結部（一方の天然のペプチド配列から他方の天然のペプチド配列への切換えが起こる部位）に非自己アミノ酸配列モチーフを含む。このタイプの連結部は、天然の状況下では通常は隣接しない 2 つのアミノ酸を含む。したがって、そのような連結部にわたって存在するペプチドは、非自己ペプチドであり、T 細胞に対するエピトープとして作用する可能性を有する。本明細書に記載の方法を用いる場合、連結部は、T 細胞に対するエピトープとして作用する可能性を低減させたりまたは排除したりするようにデザインされる。本明細書に記載の方法は、仮定上のタンパク質 X に由来する部分と仮定上のタンパク質 Y に由来する部分とを含有する融合タンパク質が生成される以下のスキームで概念的に示される。

20

【0108】

タンパク質 X は、次の配列を有する：

... XXXXXX111111111111XXXXXX2XXXXXXXXX - XXXXXXXX333X3XXXXXXXXX ...

タンパク質 Y は、次の配列を有する：

... YYYYYY111111111111YYYYYY2YYYYYYYYY - YYYYYYYY333Y3YYYYYYYYY ...

概念上の各タンパク質配列において、「-」は、タンパク質 X 内およびタンパク質 Y 内の N 末端ドメインと C 末端ドメインとの境界を表す。タンパク質 X のアミノ末端ドメインが天然のドメイン境界でタンパク質 Y のカルボキシ末端ドメインに融合される従来の融合タンパク質は、スキーム 1 で示される。このタイプの連結部は、天然の状況下では通常は隣接しない 2 つのアミノ酸（x-y）t を含む。したがって、そのような連結部にわたって存在するペプチドは、非自己ペプチドであり、T 細胞に対するエピトープとして作用する可能性を有する。

30

【0109】

スキーム 1

....XXXXXX111111111111XXXXXX2XXXXXXXXX - YYYYYYYYYY333Y3YYYYYYYYY....

スキーム 2～4 に示されるように、本発明の一適用は、第 1 のポリペプチド由来のドメインが第 2 のポリペプチド由来のドメインに融合される融合タンパク質を含む。新しい T 細胞エピトープが生成される可能性を回避するために、連結部は、天然のドメイン境界から 1 アミノ酸以上離間させて（N 末端側または C 末端側のいずれか）、融合される両方のドメイン中に保存されるアミノ酸配列モチーフまで移動される。新しい融合部位に対応する保存アミノ酸モチーフが両方の親ドメイン中に見いだされるので、新しい連結部にわたって存在する *in vivo* で生成されうるペプチドは、親タンパク質中では通常は隣接しないアミノ酸をより少量有するかまたはまったく有しておらず、その結果、T 細胞エピトープとして機能する可能性が低減される。

40

【0110】

スキーム 2

....XXXXXX111111111111YYYYYY2YYYYYYYYY - YYYYYYYYYY333Y3YYYYYYYYY....

50

たとえば、スキーム 2 に示されるように、タンパク質 X 由来のドメインとタンパク質 Y 由来のドメインとを含む融合タンパク質を調製することが可能である。この例では、タンパク質 X および Y は、それぞれ、保存アミノ酸配列モチーフ（下線部）を含有する。この共有モチーフは融合部位であり、T 細胞エピトープである可能性を有しうる新しいドメイン融合部位にわたって存在するいかなるペプチドも、N 末端ドメインに関しておよび／または C 末端ドメインに関して、完全に自己性であり、したがって、T 細胞により非自己性として認識される可能性が排除されるであろう。

【0111】

スキーム 3

| $\geq 1aa$ |

....XXXXXX1111111111XXXXXX2YYYYYYYY - YYYYYYYYYY333Y3YYYYYYYY....

他の例では、新しいドメイン融合部位に対応する保存アミノ酸モチーフは、1 アミノ酸の長さでありうる。その結果、T 細胞エピトープである可能性を有しうる融合タンパク質中の 2 つのドメインの境界にわたって存在するいかなるペプチドも、天然の状況下にある親タンパク質 Y 中のドメイン境界では隣接して見いだされることのないアミノ酸をまったく含有しないであろう（スキーム 3）。

【0112】

スキーム 4

| $\geq 1aa$ |

....XXXXXX1111111111XXXXXX2XXXXXXX - XXXXXXXXXX333Y3YYYYYYYY....

または

....XXXXXX1111111111XXXXXX2XXXXXXX - XXXXXXXXXX333X3YYYYYYYY....

スキーム 4 に示されるように、いくつかの例では、保存アミノ酸モチーフは、2 ～ 10 アミノ酸の長さであり、かつ保存アミノ酸モチーフのアミノ酸配列は、2 つの親ポリペプチド間で同一ではない。

【0113】

CH1 ドメインへの V κ ドメインの融合への適用

このほかに、ドメイン相互作用は、免疫グロブリンフォールドを含有するタンパク質および融合タンパク質をはじめとする多くのタンパク質の一体性および機能に重要である。たとえば、免疫グロブリンの可変ドメインと定常ドメインとの相互作用は、IgG の構造に重要な役割を果たす（たとえば、Rothlisberger et al., 2005 を参照されたい）。免疫グロブリンドメインまたは免疫グロブリンドメインの一部を含有する融合タンパク質を生成するために、これらのドメインが天然の状況下で関与するタンパク質-タンパク質相互作用を考慮に入れることが重要である。たとえば、免疫グロブリン中において V κ と C κ との相互作用が V H と CH1 との相互作用と異なることは、V κ -CH1 または V H -C κ 融合タンパク質を生成するうえで問題を生じる可能性があることを示唆する。しかしながら、いくつかの用途では、4 つの V κ 可変ドメインを含む IgG 様分子、2 つの V κ 可変ドメインを含む Fab' フラグメント、または Morrison et al. (1998) および Chan et al. (2004) に記載のものに類似した「インサイドアウト」分子を生成することが望ましい。そのような作業は、V κ ドメインと CH1 ドメインとの融合タンパク質の生成を必要とするであろう。

【0114】

典型的なヒト Fab' フラグメントの構造は図 1A に示されており、これは Chacko et al. (1996) により発表された構造 1VGE に対応する。Lesk および Chothia は、V H ドメインと CH1 ドメインとの相互作用が、V H 中の 3 つの高度保存残基（H11 [Leu または Val]、H110 [Thr]、および H112 [Ser]）と、CH1 中の 2 つの高度保存残基（H148 [Phe] および H149 [Pro]）とにより有意に決定付けられると報告した（1988）。図 1B に示される 5 つの残基のこのクラスターは、免疫グロブリン中において C κ または CH1 ドメインに対してそれぞれ V κ または V H ドメインの配向を変化させるある程度の制御された可撓性（肘運動と称される）を提

10

20

30

40

50

供する。このドメイン境界は、いくつかの抗体の機能に寄与する可能性がある (Landolfi et al. 2001)。そのほかに、保存残基H108 (Leu)の疎水性側鎖は、VH-CH1境界部に位置し、VHとCH1との疎水性相互作用に参与する可能性がある。

【0115】

全Vκドメイン(残基L108またはL109まで)をCH1ドメイン(残基H114 [Ala]から)に単純に連結することによりVκ-CH1融合体を調製した場合、CH1が天然で相互作用する以上の4つの保存残基のうちの3つは、新しい可変ドメイン中に存在しないであろう。残基H11 (Leu/Val)は、多くのVHおよびVκドメイン間で保存されるが、残基H108 (Leu)、H110 (Thr)、およびH112 (Ser)は保存されない。この結果、可変ドメイン定常ドメイン境界において保存VH-CH1ドメイン境界部の消失、特定的には疎水性相互作用の消失を生じるであろう。さらに、この結果、Fab構造1VGE (図1A)の例のように残基H112 (Ser)の側鎖と残基H114 (Ala)のバックボーン窒素との間に存在する可能性のある水素結合が消失する可能性がある。VH-CH1境界部を安定化させる残基の消失に加えて、融合タンパク質を不安定化させる可能性のある新しい残基が導入されるであろう。荷電残基は、新しい可変ドメインのC末端部分、たとえば、L103 (Lys)、L107 (Lys)、またはL108 (Arg)に存在するであろう。これらの荷電Vκ残基は、可変ドメイン-定常ドメイン境界部においてVκとCH1との反発を引き起こし、良好なドメイン充填を阻害するであろう。

【0116】

Swiss-PdbViewer (バージョン3.7)およびGROMOS96 43 B1パラメーターセット (van Gunsteren et al. 1996)を用いて、ヒトFab構造1VGE中のC末端VH残基H108~H113 (配列LeuValThrValSerSer)が分子の全エネルギーに-100.953 kJ/molの寄与をすることが決定付けられた。これらの残基を配列LysValGluIleLysArg (一般にC末端Vκ残基L103~L108に対応する配列)で置き換えた場合、分子の全エネルギーへの寄与は、+57.4 kJ/molになるであろう。このことから、全VHドメインを全Vκドメインで置き換えることによりC末端VH残基H108~H113の置換えを行うとFabフラグメントが有意に不安定化される可能性があることが示唆される。さらに、天然の状況下にあるVκ-Cκ連結部に見いだされるときに天然で関与するCκとの相互作用が受け入れられない状況下では、導入された荷電Vκ残基はいずれも、タンパク質分解を受けやすいであろう。

【0117】

本発明によれば、融合部位が、Vκ(残基L99~L102)とVH(残基H104~H107)との間で保存されるGlyXaaGlyThr (配列番号386)モチーフになるように、VκドメインのN末端部分をVHドメインのC末端部分に連結することにより、Vκ-CH1融合タンパク質を生成することが可能である。このようにすれば、CH1が天然で相互作用する4つの保存残基のうちの4つすべてが、新しい可変ドメイン中に存在可能になる。残基H11 (Leu/Val)は、多くのVHおよびVκドメイン間ですでに保存されており、かつ残基H108 (Leu)、H110 (Thr)、およびH112 (Ser)もまた、融合部位がVκのN末端の方向に移動されているので存在するであろう。しかも残基H104~H113は、VH残基になるであろう。この天然の連結部は、全Vκドメイン(残基L108/L109まで)をCH1ドメイン(残基H114から)に単純に連結した場合よりも大きい度合いで、肘連結の保持ならびに疎水性相互作用および水素結合の保持を含めてVH-CH1ドメイン境界部を保持するであろう。そのほかに、天然の連結部は、領域L103~L108中の荷電Vκ残基の存在により引き起こされる可能性のある反発およびタンパク質分解感受性を回避するであろう。

【0118】

CκドメインへのVHドメインの融合への適用

VκドメインとCκドメインとの間に見いだされかつ1VGE中にも見られる典型的な

相互作用は、図 1 C 中に強調表示されている。特定のには、V κ -C κ 境界部は、V κ 残基 L 1 0 3 (L y s) の側鎖と C κ 残基 L 1 6 5 (G l u) との水素結合ならびに V κ 残基 L 1 0 8 (A r g、ヒトでは J κ エキソンにより部分的にコードされかつ C κ エキソンにより部分的にコードされる) の側鎖と C κ 残基 L 1 0 9 (T h r) および L 1 7 0 (A s p) との水素結合により安定化される。そのほかに、残基 L 1 0 6 (I l e) もまた、そのバックボーン窒素および酸素を介して、C κ 残基 L 1 6 6 (G l n) の側鎖と水素結合に参与する。

【0119】

全 V H ドメイン (残基 H 1 1 3 (S e r) まで) を C κ ドメイン (残基 L 1 0 8 [A r g] または残基 L 1 0 9 [T h r] から) に単純に連結することにより V κ -C H 1 融合体を調製した場合、上記の相互作用は消失するであろう (またはバックボーン相互作用の場合、改変される可能性がある)。S w i s s - P d b V i e w e r (バージョン 3. 7) および G R O M O S 9 6 4 3 B 1 パラメーターセット (van Gunsteren et al. 1996) を用いて、ヒト F a b 構造 1 V G E 中の C 末端 V κ 残基 L 1 0 3 ~ L 1 0 8 (配列 L y s V a l G l u I l e L y s A r g (配列番号 5 4 1)) が分子の全エネルギーに - 3 0 9 . 3 2 K J / m o l の寄与をすることが決定付けられた。これらの残基を配列 L e u V a l T h r V a l S e r S e r (配列番号 4 2 1) (一般に C 末端 V κ 残基 H 1 0 8 ~ H 1 1 3 に対応する配列) で置き換えた場合、分子の全エネルギーへの寄与は、- 5 . 2 0 2 k J / m o l になるであろう。このことから、全 V κ ドメインを全 V H ドメインで置き換えることにより C 末端 V κ 残基 L 1 0 3 ~ L 1 0 8 の置換えを行うと F a b フラグメントが有意に不安定化される可能性があることが示唆される。

【0120】

本発明によれば、融合部位が、V κ (残基 L 9 9 ~ L 1 0 2) と V H (残基 H 1 0 4 ~ H 1 0 7) との間で保存される G l y X a a G l y T h r (配列番号 3 8 6) モチーフになるように、V H ドメインの N 末端部分を V κ ドメインの C 末端部分に連結することにより、V H - C κ 融合タンパク質を生成することが可能である。このようにすれば、C κ が天然で相互作用する残基が、新しい可変ドメイン中に存在可能になる。この天然のドメイン連結部は、非天然のドメイン連結部を有する融合タンパク質よりも有意に良好な性質を有する融合タンパク質をもたらすはずである。

【0121】

融合タンパク質

本発明に係る融合タンパク質は、2 つの異なるポリペプチドに由来する少なくとも 2 つの部分と、2 つの部分間の少なくとも 1 つの天然の連結部とを含む。所望により、融合タンパク質は、3 つ以上の部分を含有可能であり、かつ該部分間の連結部のいくつかは、非天然でありうる。一態様では、組換え融合タンパク質はハイブリッドドメインを含む。ハイブリッドドメインは、第 1 のポリペプチドに由来する第 1 の部分 (アミノ酸配列) と、第 2 のポリペプチドに由来する第 2 の部分 (アミノ酸配列) と、第 1 のポリペプチド中および第 2 のポリペプチド中に存在する保存アミノ酸モチーフとを含む。第 1 のポリペプチドは、式 (X 1 - Y - X 2) を有するドメインを含み、かつ第 2 のポリペプチドは、式 (Z 1 - Y - Z 2) を有するドメインを含み、かつ融合タンパク質は、式 (X 1 - Y - Z 2) を有するハイブリッドドメインを含むであろう。

【0122】

上記式中、

Y は、保存アミノ酸モチーフであり、

X 1 および Z 1 は、それぞれ、第 1 のポリペプチド中および第 2 のポリペプチド中の Y のアミノ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフであり、

X 2 および Z 2 は、それぞれ、第 1 のポリペプチド中および第 2 のポリペプチド中の Y のカルボキシ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフであり、

付帯条件として、X 1 および Z 1 のアミノ酸配列が同一である場合、X 2 および Z 2 のアミノ酸配列は同一ではなく、X 2 および Z 2 のアミノ酸配列が同一である場合、X 1 お

よび Z 1 のアミノ酸配列は同一ではないものとする。

【0123】

X 1、X 2、Z 1、および Z 2 により表されるアミノ酸の数は、ハイブリッドドメインのサイズおよび親ポリペプチド中におけるドメインのサイズに依存する。一般的には、X 1、X 2、Z 1、および Z 2 は、それぞれ独立して、約 1～約 400、約 1～約 200、約 1～約 100、約 1～約 50、約 1～約 40、約 1～約 30、約 1～約 20、約 1～約 15、約 1～約 10、約 1～約 6、約 15、約 14、約 13、約 12、約 11、約 10、約 9、約 8、約 7、約 6、約 5、約 4、約 3、約 2、または 1 アミノ酸よりなる。同様に、ハイブリッドドメインのサイズは、さまざまな大きさが可能であり、親タンパク質中における Y を含有するドメインのサイズに依存する。ハイブリッドドメインの全サイズは、約 75～約 400、約 75～約 350、約 75～約 300、約 75～約 250、約 75～約 150、約 75～約 125、約 75～約 100、または約 75 アミノ酸でありうる。特定の実施形態では、ハイブリッドドメインは、免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン定常ドメインとほぼ等しいサイズである。いくつかの実施形態では、ハイブリッドドメインは、約 1 kDa～約 25 kDa、約 5 kDa～約 25 kDa、約 5 kDa～約 20 kDa、約 5 kDa～約 15 kDa、約 6 kDa、約 7 kDa、約 8 kDa、約 9 kDa、約 10 kDa、約 11 kDa、約 12 kDa、約 13 kDa、または約 14 kDa である。

【0124】

保存アミノ酸モチーフ Y は、1～約 50 アミノ酸残基よりなりうる。特定の実施形態では、Y は、約 3～約 50 アミノ酸、約 3～約 40 アミノ酸、約 3～約 30 アミノ酸、約 3～約 20 アミノ酸、約 3～約 15 アミノ酸、約 3～約 14 アミノ酸、約 3～約 13 アミノ酸、約 3～約 12 アミノ酸、約 3～約 11 アミノ酸、約 3～約 10 アミノ酸、約 3～約 9 アミノ酸、約 3～約 8 アミノ酸、約 3～約 7 アミノ酸、約 3～約 6 アミノ酸、約 3～約 5 アミノ酸、少なくとも約 8 アミノ酸、約 11 アミノ酸まで、または約 8～約 11 アミノ酸よりなる。他の実施形態では、Y は、約 1～約 11 アミノ酸、約 15 アミノ酸、約 14 アミノ酸、約 13 アミノ酸、約 12 アミノ酸、約 11 アミノ酸、約 10 アミノ酸、約 9 アミノ酸、約 8 アミノ酸、約 7 アミノ酸、約 6 アミノ酸、約 5 アミノ酸、約 4 アミノ酸、約 3 アミノ酸、約 2 アミノ酸、または約 1 アミノ酸よりなる。

【0125】

保存アミノ酸モチーフ Y は、本発明に係る融合タンパク質中に少なくとも一部分が組み込まれる 2 つ以上の親ポリペプチド中に見いだされる。本発明に係る融合タンパク質および融合タンパク質中のハイブリッドドメインは、各親タンパク質が保存アミノ酸モチーフを含有するのであれば、任意の所望の親ポリペプチド由来の部分を含有しうる。たとえば、親ポリペプチドは、関連性のないもの（たとえば、異なるタンパク質スーパーファミリー由来のもの）または関連性のあるもの（たとえば、同一のタンパク質スーパーファミリー由来のもの）でありうる。特定の実施形態では、融合タンパク質およびハイブリッドドメインは、同一のタンパク質スーパーファミリー（たとえば、免疫グロブリンスーパーファミリー、腫瘍壊死因子（TNF）スーパーファミリー、または TNF レセプタースーパーファミリー）由来の親ポリペプチドに由来する部分を含有する。

【0126】

親タンパク質は、同一の種由来または異なる種由来でありうる。たとえば、親ポリペプチドは、独立して、ヒト（ホモ・サピエンス（Homo sapiens））に由来しうるか、または非ヒト種、たとえば、マウス、ニワトリ、ブタ、トラフグ、カエル、ウシ（たとえば、ボス・タウラス（Bos taurus））、ラット、サメ（たとえば、オオメジロザメ、メジロザメ、ナースシャーク、ネコザメ、クモハダオオセ）、ガンギエイ（たとえば、クリアノーズスケート（clearnose skate）、リトルスケート）、サカナ（たとえば、タイセイヨウサケ、アメリカナマズ、カライワシ、スポッテッドラットフィッシュ、タイセイヨウタラ、ケツギョ、ニジマス、スポッテッドウルフフィッシュ、ゼブラフィッシュ）、オポッサム、ヒツジ、ラクダ科動物（たとえば、ラマ、グアナコ、アルパカ、ビクーナ、ヒトコブラ

クダ、フタコブラクダ)、ウサギ、非ヒト霊長動物(たとえば、シンセカイザル、キュウセカイザル、カニクイザル(マカカ・ファスシクラリス(*Macaca fascicularis*))、キヌザル科(*Callithricidae*))(たとえば、マーモセット))、または任意の他の所望の非ヒト種に由来しうる。特定の実施形態では、親タンパク質は両方とも、ヒト由来であるか、または一方の親タンパク質はヒト由来でありかつ他方は非ヒト種由来である。

【0127】

保存アミノ酸モチーフは、任意の好適な方法を用いて、たとえば、2つ以上のアミノ酸配列をアライメントして保存アミノ酸配列の領域を同定することにより、容易に同定可能である。(たとえば、図2Aおよび2Bを参照されたい)。たとえば、本明細書に記載されるように、免疫グロブリンタンパク質中に存在する保存アミノ酸モチーフは、免疫グロブリンアミノ酸配列のアライメントにより同定されている。保存アミノ酸モチーフの特定の例としては、抗体可変ドメインのフレームワーク領域(FR)4中のGlyXaaGlyThr(配列番号386)またはGlyXaaGlyThrXaa(Val/Leu)(配列番号387);抗体可変ドメインのFR3中のGluAspThrAla(配列番号388)、ValTyrTyrCys(配列番号389)、またはGluAspThrAlaValTyrTyrCys(配列番号390);抗体定常領域中の(Ser/Ala/Gly)Pro(Lys/Asp/Ser)Val(配列番号391)、(Ser/Ala/Gly)Pro(Lys/Asp/Ser)ValPhe(配列番号392)、LysValAspLys(Ser/Arg/Thr)(配列番号393)、またはValThrVal(配列番号394)が挙げられる。

【0128】

本発明に係る融合タンパク質中のハイブリッドドメインは、ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインやハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインのようなハイブリッド免疫グロブリンドメインでありうる。たとえば、本発明に係る融合タンパク質は、ハイブリッドT細胞レセプター可変ドメインまたはハイブリッド抗体可変ドメインを含みうる。

【0129】

いくつかの実施形態では、ハイブリッドドメインは、ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメイン(たとえば、ハイブリッド抗体可変ドメイン)であり、かつYは、FR1、FR2、FR3、またはFR4のようなフレームワーク領域(FR)中に位置する。特定の例では、YはFR4中に存在し、GlyXaaGlyThr(配列番号386)またはGlyXaaGlyThrXaa(Val/Leu)(配列番号387)である。たとえば、Yは、GlyXaaGlyThrXaaVal(配列番号395)またはGlyXaaGlyThrXaaLeu(配列番号396)でありうる。これらの実施形態では、X1は、FR1、相補性決定領域(CDR)1、FR2、CDR2、FR3、およびCDR3を含む抗体可変ドメインの一部でありうる。

【0130】

他の特定の例では、ハイブリッドドメインはハイブリッド免疫グロブリン可変ドメイン(たとえば、ハイブリッド抗体可変ドメイン)であり、かつYはFR3に位置し、GluAspThrAla(配列番号388)、ValTyrTyrCys(配列番号389)、またはGluAspThrAlaValTyrTyrCys(配列番号390)である。これらの実施形態では、X1は、FR1、CDR1、FR2、およびCDR2を含む抗体可変ドメインの一部でありうる。

【0131】

本発明に係る融合タンパク質中のハイブリッドドメインは、ハイブリッドT細胞レセプター定常ドメインやハイブリッド抗体定常ドメインのようなハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインでありうる。いくつかの実施形態では、ハイブリッドドメインは、ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメイン(たとえば、ハイブリッド抗体定常ドメイン)であり、かつYは、抗体軽鎖定常ドメイン(たとえば、Cκ、Cλ)や抗体重鎖定常ドメイン(たとえば、CH1、ヒンジ、CH2、CH3)のような定常ドメイン中に位置する。たとえば、ハイブリッドドメインは、ハイブリッド免疫グロブリンCH1、CH2、Cκ、もし

くはCλ〔ここで、Yは、(Ser/Ala/Gly)Pro(Lys/Asp/Ser)Val(配列番号391)である〕；ハイブリッドCH1、CH2、もしくはCκ〔ここで、Yは、(Ser/Ala/Gly)Pro(Lys/Asp/Ser)ValPhe(配列番号392)である〕；ハイブリッドCH1〔ここで、Yは、LysValAspLys(Ser/Arg/Thr)(配列番号393)もしくはValThrVal(配列番号394)である〕；またはハイブリッドTCR定常ドメイン〔ここで、Yは、ProSerValPhe(配列番号397)である〕でありうる。これらの例の特定の実施形態では、Yは、SerProLysVal(配列番号398)、SerProAspVal(配列番号399)、SerProSerVal(配列番号400)、AlaProLysVal(配列番号401)、AlaProAspVal(配列番号402)、AlaProSerVal(配列番号403)、GlyProLysVal(配列番号404)、GlyProAspVal(配列番号405)、GlyProSerVal(配列番号406)、SerProLysValPhe(配列番号407)、SerProAspValPhe(配列番号408)、SerProSerValPhe(配列番号409)、AlaProLysValPhe(配列番号410)、AlaProAspValPhe(配列番号411)、AlaProSerValPhe(配列番号412)、GlyProLysValPhe(配列番号413)、GlyProAspValPhe(配列番号414)、GlyProSerValPhe(配列番号415)、LysValAspLysSer(配列番号416)、LysValAspLysArg(配列番号417)、LysValAspLysThr(配列番号418)、またはValThrVal(配列番号394)でありうる。

【0132】

本発明に係る融合タンパク質中のハイブリッドドメインは、組換え融合タンパク質が式D-(X1-Y-Z2)-E

〔式中、

Dは、不在であるかまたは第1のポリペプチド中の(X1-Y-X2)のアミノ末端に隣接するアミノ酸配列であり、そしてEは、不在であるかまたは第2のポリペプチド中の(Z1-Y-Z2)のカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である〕

を有する部分構造を含むように、隣接するアミノ末端アミノ酸配列Dに結合させたりかつ／また隣接するカルボキシ末端アミノ酸配列Eに結合させたりすることが可能である。

【0133】

たとえば、本発明に係る融合タンパク質は、D-(X1-Y-Z2)〔式中、Dは免疫グロブリン可変ドメインであり、そして(X1-Y-Z2)はハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインである〕を含みうる。所望により、融合タンパク質は、Eをさらに含み、かつ式D-(X1-Y-Z2)-B〔式中、Dは免疫グロブリン可変ドメインであり、(X1-Y-Z2)はハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインであり、そしてEは免疫グロブリン定常ドメインである〕を有しうる。以上に記載したように、融合タンパク質の成分は、任意の所望の種由来の親タンパク質に由来しうる。本発明に係る融合タンパク質のこの例では、Dは、非ヒト起源(たとえば、サメ、マウス、ラクダ科動物由来)の抗体可変領域でありうるし、Eは、ヒト免疫グロブリン定常ドメインを含みうるし、かつハイブリッド定常ドメイン(X1-Y-Z2)は、非ヒト定常ドメインの部分(X1)と、ヒト定常ドメインの部分(Z2)と、非ヒト定常ドメイン中およびヒト定常ドメイン中に存在する保存アミノ酸モチーフ(Y)とを含有する。他の実施形態では、Dは不在であり、かつ融合タンパク質は、(X1-Y-Z2)のアミノ末端に存在するさらなるドメインを含む。さらなるアミノ末端ドメインは、天然の連結部または非天然の連結部を介して(X1-Y-Z2)に直接的もしくは間接的に結合可能である。

【0134】

他の例では、本発明に係る融合タンパク質は、D-(X1-Y-Z2)〔式中、Dは、免疫グロブリン定常ドメインであり、そして(X1-Y-Z2)は、ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインである〕を含む。所望により、この例の融合タンパク質は、(X1

ーYーZ 2) のアミノ末端に存在する追加の成分を含有しうる。たとえば、一実施形態では、融合タンパク質は、Dのアミノ末端に存在する V_L 、 V_H 、または V_{HH} のような免疫グロブリン可変ドメインを含む。したがって、融合タンパク質は、次の構造：抗体可変ドメインーDー(X 1ーYーZ 2)〔式中、Dは、免疫グロブリン定常ドメイン（たとえば、抗体定常ドメイン）であり、そして(X 1ーYーZ 2)は、ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメイン（たとえば、ハイブリッド抗体定常ドメイン）である〕を有しうる。

【0135】

他の例では、本発明に係る融合タンパク質は、(X 1ーYーZ 2)ーE〔式中、(X 1ーYーZ 2)はハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインであり、そしてEは免疫グロブリン定常ドメインである〕を含む。所望により、この例の融合タンパク質は、(X 1ーYーZ 2)のアミノ末端に存在する追加の成分を含有しうる。たとえば、一実施形態では、融合タンパク質は、(X 1ーYーZ 2)のアミノ末端に存在する V_L 、 V_H 、または V_{HH} のような他の免疫グロブリン可変ドメインを含む。したがって、融合タンパク質は、次の構造：抗体可変ドメインー(X 1ーYーZ 2)ーE〔式中、(X 1ーYーZ 2)は、ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメイン（たとえば、ハイブリッド抗体可変ドメイン）であり、そしてEは免疫グロブリン定常ドメイン（たとえば、抗体定常ドメイン）である〕を有しうる。

【0136】

他の例では、本発明に係る融合タンパク質は、(X 1ーYーZ 2)ーE〔式中、(X 1ーYーZ 2)はハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインであり、そしてEは免疫グロブリン定常ドメインである〕を含む。所望により、融合タンパク質は、(X 1ーYーZ 2)のアミノ末端に存在する追加の成分を含有しうる。たとえば、一実施形態では、融合タンパク質は、(X 1ーYーZ 2)のアミノ末端に存在する V_L 、 V_H 、または V_{HH} のような免疫グロブリン可変ドメインを含む。したがって、融合タンパク質は、次の構造：抗体可変ドメインー(X 1ーYーZ 2)ーE〔式中、(X 1ーYーZ 2)は、ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメイン（たとえば、ハイブリッド抗体CH1ドメイン）であり、そしてEは、免疫グロブリン定常ドメイン（たとえば、ヒンジ、ヒンジーCH2、ヒンジーCH2ーCH3）を含む〕を有しうる。

【0137】

本発明に係る融合タンパク質のいくつかは、免疫グロブリン定常ドメインに融合されたハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインを含む。ここで、該ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインは、第1の免疫グロブリン由来の第1の免疫グロブリンFRに由来する部分と第2の免疫グロブリン由来の第2の免疫グロブリンFRに由来する部分とを含むハイブリッドフレームワーク領域(FR)を含み、第1および第2の免疫グロブリンは、それぞれ、保存アミノ酸モチーフを含む。ハイブリッドFRは、式

$$(F^1 - Y - F^2)$$

〔式中、

Yは、保存アミノ酸モチーフであり、

F^1 は、第1の免疫グロブリンFR中のYのアミノ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフであり、そして

F^2 は、第2の免疫グロブリンFR中のYのカルボキシ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフである〕

を有する。

【0138】

ハイブリッドFRは、ハイブリッドFR 1、ハイブリッドFR 2、ハイブリッドFR 3、またはハイブリッドFR 4でありうる。一例では、第1の免疫グロブリンは、抗体重鎖であり、第2の免疫グロブリンは、抗体軽鎖であり、 F^1 は、抗体重鎖可変ドメインのFR 1、FR 2、FR 3、またはFR 4に由来し、かつ F^2 は、抗体軽鎖可変ドメインの対応するFRに由来する。したがって、ハイブリッド免疫グロブリンドメインは、抗体重鎖可変ドメインのFR 1、CDR 1、FR 2、CDR 2、FR 3、CDR 3、およびFR 4

の一部分 (F^1) と、抗体軽鎖可変ドメインの FR 4 の一部分 (F^2) と、重鎖および軽鎖可変ドメインの両方の FR 4 中に存在する保存アミノ酸モチーフ (Y) とを含みうる。他の実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリンドメインは、抗体重鎖可変ドメインの FR 1、CDR 1、FR 2、CDR 2、および FR 3 の一部分 (F^1) と、抗体軽鎖可変ドメインの FR 3 の一部分、CDR 3、および FR 4 (F^2) と、重鎖および軽鎖可変ドメインの両方の FR 3 中に存在する保存アミノ酸モチーフ (Y) とを含みうる。同様に、ハイブリッド免疫グロブリンドメインは、抗体重鎖可変ドメインの FR 1、CDR 1、および FR 2 の一部分 (F^1) と、抗体軽鎖可変ドメインの FR 2 の一部分 (F^2)、CDR 2、FR 3、CDR 3、および FR 4 と、重鎖および軽鎖可変ドメインの両方の FR 2 中に存在する保存アミノ酸モチーフ (Y) とを含みうる。ハイブリッド免疫グロブリンドメインは、抗体重鎖可変ドメインの FR 1 の一部分 (F^1) と、抗体軽鎖可変ドメインの FR 1 の一部分 (F^2)、CDR 1、FR 2、CDR 2、FR 3、CDR 3、および FR 4 と、重鎖および軽鎖可変ドメインの両方の FR 1 中に存在する保存アミノ酸モチーフ (Y) とを含みうる。

10

【0139】

他の例では、第 1 の免疫グロブリンは、抗体軽鎖であり、第 2 の免疫グロブリンは、抗体重鎖であり、 F^1 は、抗体軽鎖可変領域の FR 1、FR 2、FR 3、または FR 4 に由来し、かつ F^2 は、抗体重鎖可変領域の対応する FR に由来する。したがって、ハイブリッド免疫グロブリンドメインは、抗体軽鎖可変ドメインの FR 1、CDR 1、FR 2、CDR 2、FR 3、CDR 3、および FR 4 の一部分 (F^1) と、抗体重鎖可変ドメインの FR 4 の一部分 (F^2) と、軽鎖および重鎖可変ドメインの両方の FR 4 中に存在する保存アミノ酸モチーフ (Y) とを含みうる。他の実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリンドメインは、抗体軽鎖可変ドメインの FR 1、CDR 1、FR 2、CDR 2、および FR 3 の一部分 (F^1) と、抗体重鎖可変ドメインの FR 3 の一部分 (F^2)、CDR 3、および FR 4 と、軽鎖および重鎖可変ドメインの両方の FR 3 中に存在する保存アミノ酸モチーフ (Y) とを含みうる。同様に、ハイブリッド免疫グロブリンドメインは、抗体軽鎖可変ドメインの FR 1、CDR 1、および FR 2 の一部分 (F^1) と、抗体重鎖可変ドメインの FR 2 の一部分 (F^2)、CDR 2、FR 3、CDR 3、および FR 4 と、軽鎖および重鎖可変ドメインの両方の FR 2 中に存在する保存アミノ酸モチーフ (Y) とを含みうる。ハイブリッド免疫グロブリンドメインは、抗体軽鎖可変ドメインの FR 1 の一部分 (F^1) と、抗体重鎖可変ドメインの FR 1 の一部分 (F^2)、CDR 1、FR 2、CDR 2、FR 3、CDR 3、および FR 4 と、軽鎖および重鎖可変ドメインの両方の FR 1 中に存在する保存アミノ酸モチーフ (Y) とを含みうる。

20

30

【0140】

ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインは、任意の所望の免疫グロブリン定常ドメインに融合可能である。一般的には、ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインのカルボキシ末端は、免疫グロブリン定常ドメインのアミノ末端に直接融合される。融合タンパク質は、所望により、追加の免疫グロブリン定常ドメインおよび／または可変ドメインを含みうる。たとえば、ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインは、 $C\lambda$ 、 $C\kappa$ 、 $CH1$ 、 $CH2$ 、 $CH3$ 、 $CH1$ －ヒンジ－ $CH2$ － $CH3$ 、ヒンジ－ $CH2$ － $CH3$ 、 $CH2$ － $CH3$ 、または T 細胞レセプター定常ドメインに融合可能である。

40

【0141】

好ましい実施形態では、アミノ酸配列 F^2 は、ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインが融合される免疫グロブリン定常ドメインのアミノ末端に、該免疫グロブリン定常ドメインを含む天然に存在するタンパク質中で、隣接する。たとえば、第 2 のポリペプチドが TCR 鎖でありかつ F^2 が TCR FR 4 に由来する場合、ハイブリッド免疫グロブリンドメインは、TCR 定常ドメインのアミノ末端に結合されたペプチドである。同様に、第 2 のポリペプチドが抗体軽鎖でありかつ F^2 が抗体軽鎖可変領域 FR 4 に由来する場合、ハイブリッド免疫グロブリンドメインは、抗体軽鎖定常ドメインのアミノ末端に結合されたペプチドでありうる。特定の実施形態では、第 2 のポリペプチドは κ または λ 軽鎖であ

50

り、 F^2 は $V\kappa$ または $V\lambda$ FR4に由来し、かつハイブリッド免疫グロブリンドメインは $C\kappa$ または $C\lambda$ のアミノ末端にそれぞれ結合される。第2のポリペプチドが抗体重鎖でありかつ F^2 が抗体重鎖可変ドメインFR4に由来する場合、ハイブリッド免疫グロブリンドメインは、抗体重鎖定常ドメインのアミノ末端に結合可能である。特定の実施形態では、第2のポリペプチドは抗体重鎖であり、 F^2 は抗体重鎖可変ドメインFR4（たとえば、VH FR4、VHH FR4）に由来し、かつハイブリッド免疫グロブリンドメインはCH1のアミノ末端に結合される。

【0142】

特定の実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインは、ハイブリッド抗体可変ドメインであり、かつYは、GlyXaaGlyThr（配列番号386）またはGlyXaaGlyThrXaa（Val/Leu）（配列番号387）である。たとえば、融合タンパク質は、 F^1 がPheであり、YがGlyXaaGlyThr（配列番号386）であり、かつ F^2 が（Leu/Met/Thr）ValThrValSerSer（配列番号420）である、ハイブリッド抗体可変ドメインを含みうる。特定の実施形態では、 F^2 は、LeuValThrValSerSer（配列番号421）、MetValThrValSerSer（配列番号422）、またはThrValThrValSerSer（配列番号423）である。他の例では、融合タンパク質は、 F^1 がPheであり、YがGlyXaaGlyThrXaa（Val/Leu）（配列番号387）であり、かつ F^2 がThrValSerSer（配列番号419）である、GlyXaaGlyThrXaa（Val/Leu）（配列番号387）を含みうる。特定の実施形態では、Yは、GlyXaaGlyThrXaaVal（配列番号395）またはGlyXaaGlyThrXaaLeu（配列番号396）である。好ましくは、これらのタイプのハイブリッド抗体可変ドメインのカルボキシ末端は、IgG（たとえば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）定常ドメインのような抗体重鎖定常ドメインに直接結合される。好ましくは、抗体重鎖定常ドメインは、ヒト抗体重鎖定常ドメインである。特定の実施形態では、ハイブリッド抗体可変ドメインのカルボキシ末端は、IgG CH1またはIgG CH2（たとえば、IgG1 CH1、IgG4 CH1、IgG1 CH2、IgG4 CH2）に直接結合される。

【0143】

他の実施形態では、融合タンパク質は、 F^1 がTrpであり、YがGlyXaaGlyThr（配列番号386）であり、かつ F^2 が（Lys/Arg）（Val/Leu）（Glu/Asp）IleLys（配列番号424）または（Lys/Gln/Glu）（Val/Leu）（Thr/Ile）（Val/Ile）Leu（配列番号425）である、ハイブリッド可変ドメインを含む。特定の実施形態では、 F^2 は、LysValGluIleLys（配列番号426）、LysValAspIleLys（配列番号427）、LysLeuGluIleLys（配列番号428）、LysLeuAspIleLys（配列番号429）、ArgValGluIleLys（配列番号430）、ArgValAspIleLys（配列番号431）、ArgLeuGluIleLys（配列番号432）、ArgLeuAspIleLys（配列番号433）、LysValThrValLeu（配列番号434）、LysValThrIleLeu（配列番号435）、LysValIleValLeu（配列番号436）、LysValIleIleLeu（配列番号437）、LysLeuThrValLeu（配列番号438）、LysLeuThrIleLeu（配列番号439）、LysLeuIleValLeu（配列番号440）、LysLeuIleIleLeu（配列番号441）、GlnValThrValLeu（配列番号442）、GlnValThrIleLeu（配列番号443）、GlnValIleValLeu（配列番号444）、GlnValIleIleLeu（配列番号445）、GlnLeuThrValLeu（配列番号446）、GlnLeuThrIleLeu（配列番号447）、GlnLeuIleValLeu（配列番号448）、GlnLeuIleIleLeu（配列番号449）、GluValThrValLeu（配列番号450）、GluValThrIleLeu（配列番号451）

)、GluValIleValLeu (配列番号452)、GluValIleIleLeu (配列番号453)、GluLeuThrValLeu (配列番号454)、GluLeuThrIleLeu (配列番号455)、GluLeuIleValLeu (配列番号456)、またはGluLeuIleIleLeu (配列番号457)である。

【0144】

他の例では、融合タンパク質は、 F^1 がTrpであり、YがGlyXaaGlyThrXaaVal (配列番号395)であり、かつ F^2 が(Glu/Asp)IleLys (配列番号458)または(Thr/Ile)(Val/Ile)Leu (配列番号459)である、ハイブリッド抗体可変ドメインを含みうる。特定の実施形態では、 F^2 は、GluIleLys (配列番号460)、AspIleLys (配列番号461)、ThrValLeu (配列番号462)、ThrIleLeu (配列番号463)、IleValLeu (配列番号464)、またはIleIleLeu (配列番号465)である。好ましくは、これらのタイプのハイブリッド抗体可変ドメインのカルボキシ末端は、C κ またはC λ のような抗体軽鎖定常ドメインに直接結合される。好ましくは、抗体軽鎖定常ドメインは、ヒト抗体軽鎖定常ドメインである。

【0145】

特定の実施形態では、免疫グロブリン定常ドメインに融合されたハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインを含む融合タンパク質は、式(F^1 -Y- F^2)-C κ 、(F^1 -Y- F^2)-C λ 、(F^1 -Y- F^2)-CH1、(F^1 -Y- F^2)-CH2、または(F^1 -Y- F^2)-Fc (たとえば、 F^1 -Y- F^2)-Fc-Vを有する部分構造を含む。ここで、ハイブリッドドメインは、重鎖Vドメイン (たとえば、ヒトVH、VHH、またはラクダ化VH)であり、かつVは、重鎖Vドメイン (たとえば、ヒトVH、VHH、またはラクダ化VH)であり、好ましくは、ハイブリッドドメインおよびVの両者は、両方ともヒト由来、両方ともVHH、または両方ともラクダ化VHである。本発明はまた、そのような構造の二量体を提供する。

【0146】

特定の実施形態では、免疫グロブリン定常ドメインに融合されたハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインを含む融合タンパク質は、第2の免疫グロブリン可変ドメイン (たとえば、抗体可変ドメイン)をさらに含む。第2の免疫グロブリン可変ドメインは、ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインのアミノ末端またはカルボキシ末端に存在しうる。好ましくは、第2の免疫グロブリン可変ドメインは、融合タンパク質中のハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインのアミノ末端に存在する。

【0147】

いくつかの実施形態では、本発明に係る融合タンパク質は、ヒト抗体定常ドメインに融合された非ヒト抗体可変領域を含む。ここで、非ヒト抗体可変領域は、ハイブリッドFR4を含有する。融合部位がFR4中に存在しかつ可変ドメインとヒト定常ドメインとの境界には存在しないので、融合タンパク質は、非ヒト抗体可変ドメインとヒト抗体定常ドメインとの間に天然の連結部を含有する。ハイブリッドFR4は、式(F^1 -Y- F^2)を有する。

【0148】

いくつかの実施形態では、 F^1 は、PheまたはTrpであり、Yは、GlyXaaGlyThr (配列番号386)であり、かつ F^2 は、(Leu/Met/Thr)ValThrSerSer (配列番号420)、(Lys/Arg)(Val/Leu)(Glu/Asp)IleLys (配列番号424)、または(Lys/Gln/Glu)(Val/Leu)(Thr/Ile)(Val/Ile)Leu (配列番号425)である。

【0149】

他の実施形態では、 F^1 は、PheまたはTrpであり、Yは、GlyXaaGlyThrXaa (Val/Leu) (配列番号387)であり、かつ F^2 は、ThrValSerSer (配列番号419)、(Glu/Asp)IleLys (配列番号458)、

または (Thr/Ile) (Val/Ile) Leu (配列番号 459) である。

【0150】

いくつかの実施形態では、ヒト抗体定常ドメインは、CH1ドメインであり、Yは、GlyXaaGlyThr (配列番号 386) であり、かつ F² は、(Leu/Met/Thr) ValThrValSerSer (配列番号 420) である。たとえば、特定の実施形態では、F² は、LeuValThrValSerSer (配列番号 421)、MetValThrValSerSer (配列番号 422)、または ThrValThrValSerSer (配列番号 423) である。他の実施形態では、ヒト抗体定常ドメインは、CH1ドメインであり、Yは、GlyXaaGlyThrXaa (Val/Leu) (配列番号 387) であり、かつ F² は、ThrValSerSer (配列番号 418) である。

10

【0151】

いくつかの実施形態では、ヒト抗体定常ドメインは、軽鎖定常ドメインであり、Yは、GlyXaaGlyThr (配列番号 386) であり、かつ F² は、(Lys/Arg) (Val/Leu) (Glu/Asp) IleLys (配列番号 424) または (Lys/Gln/Glu) (Val/Leu) (Thr/Ile) (Val/Ile) Leu (配列番号 425) である。たとえば、特定の実施形態、F² は、LysValGluIleLys (配列番号 426)、LysValAspIleLys (配列番号 427)、LysLeuGluIleLys (配列番号 428)、LysLeuAspIleLys (配列番号 429)、ArgValGluIleLys (配列番号 430)、ArgValAspIleLys (配列番号 431)、ArgLeuGluIleLys (配列番号 432)、ArgLeuAspIleLys (配列番号 433)、LysValThrValLeu (配列番号 434)、LysValThrIleLeu (配列番号 435)、LysValIleValLeu (配列番号 436)、LysValIleIleLeu (配列番号 437)、LysLeuThrValLeu (配列番号 438)、LysLeuThrIleLeu (配列番号 439)、LysLeuIleIleLeu (配列番号 441)、GlnValThrValLeu (配列番号 442)、GlnValThrIleLeu (配列番号 443)、GlnValIleValLeu (配列番号 444)、GlnValIleIleLeu (配列番号 445)、GlnLeuThrValLeu (配列番号 446)、GlnLeuThrIleLeu (配列番号 447)、GlnLeuIleValLeu (配列番号 448)、GlnLeuIleIleLeu (配列番号 449)、GluValThrValLeu (配列番号 450)、GluValThrIleLeu (配列番号 451)、GluValIleValLeu (配列番号 452)、GluValIleIleLeu (配列番号 453)、GluLeuThrValLeu (配列番号 454)、GluLeuThrIleLeu (配列番号 455)、GluLeuIleValLeu (配列番号 456)、または GluLeuIleIleLeu (配列番号 457) である。

20

30

【0152】

他の実施形態では、ヒト抗体定常ドメインは、軽鎖定常ドメインであり、Yは、GlyXaaGlyThrXaa (Val/Leu) (配列番号 387) であり、かつ F² は、(Glu/Asp) IleLys (配列番号 458) または (Thr/Ile) (Val/Ile) Leu (配列番号 459) である。たとえば、特定の実施形態では、Yは、GlyXaaGlyThrXaaVal (配列番号 395) または GlyXaaGlyThrXaaLeu (配列番号 396) であり、かつ F² は、GluIleLys (配列番号 460)、AspIleLys (配列番号 461)、ThrValLeu (配列番号 462)、ThrIleLeu (配列番号 463)、IleValLeu (配列番号 464)、または IleIleLeu (配列番号 465) である。

40

【0153】

本発明に係る融合タンパク質のいくつかは、ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインに融合された免疫グロブリン可変ドメインを含む。ここで、該ハイブリッド免疫グロブリ

50

ン定常ドメインは、第1の免疫グロブリン定常ドメイン由来の部分と第2の免疫グロブリン定常ドメイン由来の部分とを含み、第1および第2の免疫グロブリン定常ドメインは、それぞれ、保存アミノ酸モチーフを含む。ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインは、式

$$(C^1 - Y - C^2)$$

〔式中、

Yは、保存アミノ酸モチーフであり、

C¹は、第1の免疫グロブリン定常ドメイン中のYのアミノ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフであり、そして

C²は、第2の免疫グロブリン定常ドメイン中のYのカルボキシ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフである〕

を有する。

【0154】

ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインは、保存アミノ酸モチーフを含有する任意の2つの免疫グロブリン定常ドメイン由来の部分を含みうる。特定の実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインは、第1の抗体定常ドメイン由来の部分と第2の抗体定常ドメイン由来の部分とを含むハイブリッド抗体定常ドメインである。たとえば、ハイブリッド抗体定常ドメインは、ハイブリッドCH1、ハイブリッドヒンジ、ハイブリッドCH2、またはハイブリッドCH3でありうる。ここで、ハイブリッドドメインの部分は、異なる種（たとえば、ヒトおよびラクダ科動物やナースシャークのような非ヒト）由来または異なるアイソタイプ（たとえば、IgA、IgD、IgM、IgE、IgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4））由来の抗体定常ドメインに由来する。ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインはまた、CH1ドメイン由来の部分およびCH2ドメイン由来の部分のような2つの異なる定常ドメイン由来の部分を含みうる。

【0155】

いくつかの実施形態では、ハイブリッド抗体定常ドメインは、異なる種の抗体定常ドメインに由来する部分を含む。たとえば、第1の抗体定常ドメインは、非ヒト抗体定常ドメインでありうるし、かつ第2の抗体定常ドメインは、ヒト抗体定常ドメインでありうる。好適な非ヒト抗体定常ドメインとしては、マウス、ニワトリ、ブタ、トラフグ、カエル、ウシ（たとえば、ボス・タウラス（*Bos taurus*））、ラット、サメ（たとえば、オオメジロザメ、メジロザメ、ナースシャーク、ネコザメ、クモハダオオセ）、ガンギエイ（たとえば、クリアノーズスケート（*clearnose skate*）、リトルスケート）、サカナ（たとえば、タイセイヨウサケ、アメリカナマズ、カライワシ、スポッテッドラットフィッシュ、タイセイヨウタラ、ケツギョ、ニジマス、スポッテッドウルフフィッシュ、ゼブラフィッシュ）、オポッサム、ヒツジ、ラクダ科動物（たとえば、ラマ、グアナコ、アルパカ、ビクーナ、ヒトコブラクダ、フタコブラクダ）、ウサギ、非ヒト霊長動物（たとえば、シンセカイザル、キュウセカイザル、カニクイザル（マカカ・ファスシクラリス（*Macaca fascicularis*））、キヌザル科（*Callithricidae*）（たとえば、マーモセット））、または任意の他の所望の非ヒト種に由来するものが挙げられる。好ましくは、ハイブリッド抗体定常ドメインのアミノ末端は、ハイブリッド抗体定常ドメインのアミノ末端C¹と同一の種由来の抗体可変ドメインのカルボキシ末端に直接融合される。好ましくは、ハイブリッド抗体定常ドメインのカルボキシ末端C²は、ヒト抗体定常ドメインに由来する。たとえば、融合タンパク質は、式：非ヒトVドメインー（C¹－Y－C²）〔式中、C¹は、非ヒトVドメインと同一の種由来の非ヒト定常ドメイン（たとえば、Cκ、Cλ、CH1）に由来し、Yは、保存アミノ酸モチーフであり、そしてC²は、ヒト抗体定常ドメインに由来する〕を有する部分構造を含みうる。

【0156】

いくつかの実施形態では、ハイブリッド抗体定常ドメインは、第1の抗体定常ドメイン由来の部分と、異なるアイソタイプの抗体由来の第2の抗体定常ドメイン由来の部分とを含む。たとえば、このタイプのハイブリッド抗体定常ドメインでは、C¹は、IgA、I

g D、I g M、I g E、またはI g G（たとえば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4）由来の部分であり、かつC²は、C¹と異なるアイソタイプの抗体定常ドメイン由来の部分である。好ましくは、C²は、I g G（たとえば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4）定常ドメイン由来の部分である。特定の実施形態では、ハイブリッド抗体定常ドメインは、I g G 1定常ドメイン由来の部分とI g G 4定常ドメイン由来の部分とを含む。そのような実施形態では、C¹はI g G 1定常ドメイン由来でありかつC²はI g G 4定常ドメインであるか、またはC²はI g G 4定常ドメインでありかつC²はI g G 1定常ドメイン由来である。

【0157】

いくつかの実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインは、軽鎖定常ドメインである第1の抗体定常ドメイン由来の部分と、重鎖定常ドメインである第2の抗体定常ドメイン由来の部分とを含む。たとえば、融合タンパク質は、ハイブリッド抗体定常ドメインに直接融合された軽鎖抗体可変ドメインを含みうる。ここで、第1の抗体定常ドメインは、軽鎖定常ドメインであり、かつC¹は、該軽鎖定常ドメインに由来し、第2の抗体定常ドメインは、重鎖定常ドメインであり、かつC²は、該重鎖定常ドメインに由来する。たとえば、C²は、I g G C H 1（たとえば、I g G 1 C H 1、I g G 4 C H 1）、I g G ヒンジ（たとえば、I g G 1 ヒンジ、I g G 4 ヒンジ）、I g G C H 2（たとえば、I g G 1 C H 2、I g G 4 C H 2）、I g G C H 3（たとえば、I g G 1 C H 3またはI g G 4 C H 3）のようなI g G（たとえば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4）定常ドメインに由来しうる。

【0158】

他の実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインは、重鎖定常ドメインである第1の抗体定常ドメイン由来の部分と、軽鎖定常ドメインである第2の抗体定常ドメイン由来の部分とを含む。たとえば、融合タンパク質は、ハイブリッド抗体定常ドメインに直接融合された重鎖抗体可変ドメインを含みうる。ここで、第1の抗体定常ドメインは、重鎖定常ドメインであり、かつC¹は、該重鎖定常ドメインに由来し、しかも第2の抗体定常ドメインは、軽鎖定常ドメインであり、かつC²は、該軽鎖定常ドメインに由来する。特定の実施形態では、第1の抗体定常ドメインはC H 1ドメインであり、かつC¹は該C H 1ドメインに由来する。

【0159】

特定の実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインは、ラクダ科動物重鎖定常ドメインである第1の抗体定常ドメイン由来の部分と、重鎖定常ドメインである第2の抗体定常ドメイン由来の部分とを含む。たとえば、いくつかの実施形態では、ハイブリッド抗体定常ドメインのカルボキシ末端（C²）は、ヒト重鎖定常ドメインに由来する。所望により、融合タンパク質は、ハイブリッド抗体定常ドメインのアミノ末端に存在するラクダ科動物V_{H H}を含みうる。たとえば、いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、式：ラクダ科動物V_{H H} - (C¹ - Y - C²)〔式中、C¹は、ラクダ科動物重鎖定常ドメイン（たとえば、ラクダ科動物C H 1）に由来し、Yは保存アミノ酸モチーフであり、かつC²は、抗体重鎖定常ドメイン（たとえば、ヒトC H 1のようなヒト抗体定常ドメイン）に由来する〕を有する部分構造を含む。

【0160】

本発明に係る融合タンパク質のいくつかは、ハイブリッド抗体定常ドメインに直接融合された免疫グロブリン可変ドメイン（たとえば、抗体可変ドメイン）を含む。ここで、該ハイブリッド抗体定常ドメインは、第1の抗体定常ドメイン由来の部分と第2の抗体定常ドメイン由来の部分とを含み、第1および第2の抗体定常ドメインは、それぞれ、保存アミノ酸モチーフを含む。ハイブリッド抗体定常ドメインは、式



〔式中、

Yは、保存アミノ酸モチーフであり、

C¹は、第1の抗体定常ドメイン中のYのアミノ末端に隣接して位置するアミノ酸モチ

10

20

30

40

50

ーフであり、そして

C²は、第2の抗体定常ドメイン中のYのカルボキシ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフである]

を有する。好ましくは、免疫グロブリン可変ドメインは、融合タンパク質が式：抗体可変ドメインー(C¹ーYーC²)を有する部分構造を含むように、ハイブリッド抗体定常ドメインのアミノ末端に位置する。

【0161】

いくつかの実施形態では、Yは、(Ser/Ala/Gly)Pro(Lys/Asp/Ser)Val(配列番号391)、(Ser/Ala/Gly)Pro(Lys/Asp/Ser)ValPhe(配列番号392)、LysValAspLys(Ser/Arg/Thr)(配列番号393)、またはValThrVal(配列番号394)である。たとえば、特定の実施形態では、Yは、SerProLysVal(配列番号398)、SerProAspVal(配列番号399)、SerProSerVal(配列番号400)、AlaProLysVal(配列番号401)、AlaProAspVal(配列番号402)、AlaProSerVal(配列番号403)、GlyProLysVal(配列番号404)、GlyProAspVal(配列番号405)、GlyProSerVal(配列番号406)、SerProLysValPhe(配列番号407)、SerProAspValPhe(配列番号408)、SerProSerValPhe(配列番号409)、AlaProLysValPhe(配列番号410)、AlaProAspValPhe(配列番号411)、AlaProSerValPhe(配列番号412)、GlyProLysValPhe(配列番号413)、GlyProAspValPhe(配列番号414)、GlyProSerValPhe(配列番号415)、LysValAspLysSer(配列番号416)、LysValAspLysArg(配列番号417)、LysValAspLysThr(配列番号418)、またはValThrVal(配列番号394)である。好ましくは、第2の抗体定常ドメインは、ヒト抗体定常ドメインであり、かつC²は、該ヒト抗体定常ドメインに由来する。たとえば、ヒト抗体定常ドメインは、ヒトC κ 、ヒトC λ 、またはヒト重鎖定常ドメイン、たとえば、ヒトCH1、ヒトヒンジ、ヒトCH2、またはヒトCH3でありうる。特定の好ましい実施形態では、ヒト抗体定常ドメインは、IgG CH1(たとえば、IgG1 CH1、IgG4 CH1)、IgGヒンジ(たとえば、IgG1ヒンジ、IgG4ヒンジ)、IgG CH2(たとえば、IgG1 CH2、IgG4 CH2)、またはIgG CH3(たとえば、IgG1 CH3またはIgG4 CH3)であり、かつC²は、該ヒト抗体定常ドメインに由来する。

【0162】

特定の実施形態では、融合タンパク質は、ハイブリッド抗体CH1ドメインに融合された抗体軽鎖可変ドメイン、たとえば、ヒト軽鎖可変ドメインを含む。ここで、C¹は、GlnProLysAla(配列番号466)またはThrValAla(配列番号467)であり、かつYは、(Ala/Gly)ProSerVal(配列番号468)である。これらの実施形態では、C²は、ヒトIgG CH1(たとえば、IgG1 CH1、IgG4 CH1)のようなIgG CH1中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である。

【0163】

特定の実施形態では、融合タンパク質は、ハイブリッド抗体CH2ドメインに融合された抗体軽鎖可変ドメイン、たとえば、ヒト軽鎖可変ドメインを含む。ここで、C¹は、GlnProLysAla(配列番号466)またはThrValAla(配列番号467)であり、かつYは、(Ala/Gly)ProSerVal(配列番号468)である。これらの実施形態では、C²は、ヒトIgG CH2(たとえば、IgG1 CH2、IgG4 CH2)のようなIgG CH2中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である。

【0164】

特定の実施形態では、融合タンパク質は、ハイブリッド抗体CH₂ドメインに融合された抗体重鎖可変ドメイン、たとえば、ヒト重鎖可変ドメインを含む。ここで、C¹は、SerThrLys（配列番号469）であり、かつYは、(Ala/Gly)ProSerValPhe（配列番号470）である。これらの実施形態では、C²は、ヒトIgGCH₂（たとえば、IgG1CH₂、IgG4CH₂）のようなIgGCH₂中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である。

【0165】

特定の実施形態では、融合タンパク質は、ハイブリッド抗体C κ ドメインに融合された抗体軽鎖可変ドメイン、たとえば、ヒト λ 鎖可変ドメインを含む。ここで、C¹は、GlnProLysAla（配列番号466）であり、かつYは、(Ala/Gly)ProSerValPhe（配列番号470）である。これらの実施形態では、C²は、ヒトC κ のようなC κ 中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である。

10

【0166】

特定の実施形態では、融合タンパク質は、ハイブリッド抗体C κ ドメインに融合された抗体重鎖可変ドメイン、たとえば、ヒト重鎖可変ドメインを含む。ここで、C¹は、SerThrLys（配列番号469）であり、かつYは、(Ala/Gly)ProSerValPhe（配列番号470）である。これらの実施形態では、C²は、ヒトC κ のようなC κ 中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である。

【0167】

特定の実施形態では、融合タンパク質は、ハイブリッド抗体C λ ドメインに融合された抗体軽鎖可変ドメイン、たとえば、ヒト κ 鎖可変ドメインを含む。ここで、C¹は、ThrValAla（配列番号467）であり、かつYは、(Ala/Gly)ProSerVal（配列番号468）である。これらの実施形態では、C²は、ヒトC λ のようなC λ 中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である。

20

【0168】

特定の実施形態では、融合タンパク質は、ハイブリッド抗体C λ ドメインに融合された抗体重鎖可変ドメイン、たとえば、ヒト重鎖可変ドメインを含む。ここで、C¹は、SerThrLys（配列番号469）であり、かつYは、(Ala/Gly)ProSerVal（配列番号468）である。これらの実施形態では、C²は、ヒトC λ のようなC λ 中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である。

30

【0169】

他の態様では、本発明に係る組換え融合タンパク質の第1の部分および第2の部分は、リンカーを介して融合される。リンカーは、第1の部分とリンカーとの間、第2の部分とリンカーとの間、または第1および第2の部分の両方とリンカーとの間に天然の連結部を提供するように選択またはデザインすることが可能である。たとえば、本発明に係る融合タンパク質が第1のポリペプチド由来の部分(A)と第2のポリペプチド由来の部分(B)とを含有することが望ましい場合、融合タンパク質は、式(A)ーリンカーー(B)〔式中、天然の連結部は、(A)とリンカーとの間、リンカーと(B)との間、または(A)とリンカーとの間かつリンカーと(B)との間に存在する〕を有する部分構造を含みうる。本発明に係る融合タンパク質に組み込まれるポリペプチドの部分がドメインである場合、融合タンパク質に使用されるリンカーは、ドメインを含有する天然に存在するポリペプチド中でドメインに隣接する1〜約50個の連続したアミノ酸よりなりうる。たとえば、リンカーは、ドメインを含有する天然に存在するポリペプチド中でドメインに隣接する1〜約40、1〜約30、1〜約20、1〜約15、1〜約10、1〜約5、約20、約19、約18、約17、約16、約15、約14、約13、約12、約11、約10、約9、約8、約7、約6、約5、約4、約3、約2、または約1アミノ酸よりなりうる。この方法を用いると、融合タンパク質中におけるドメイン相互作用の保持性が改良され、それにより、融合タンパク質の安定性が改良される。

40

【0170】

この態様では、融合タンパク質は、一般的には、第1のポリペプチドに由来する第1の

50

部分と第2のポリペプチドに由来する第2の部分とを含む。ここで、該第1のポリペプチドは、式(A)－L1〔式中、(A)は、該第1のポリペプチド中に存在するアミノ酸配列であり、そしてL1は、該第1のポリペプチド中の(A)のカルボキシ末端に隣接する1～約50アミノ酸を含むアミノ酸モチーフである〕を有する構造を含む。融合タンパク質は、式

(A)－L1－(B)

〔式中、(A)は、第1のポリペプチドに由来する部分であり、L1は、該第1のポリペプチド中の(A)のカルボキシ末端に隣接する1～約50個の連続したアミノ酸を含むアミノ酸モチーフであり、かつ(A)と(B)とを連結するリンカーを提供し、そして(B)は、第2のポリペプチドに由来する部分である〕

を有する。好ましくは、(A)は、第1のポリペプチドに由来するドメインである。

【0171】

いくつかの実施形態では、第1のポリペプチドは、(A)を含み、かつ第2のポリペプチドは、式L1－(B)〔式中、L1は、第2のポリペプチド中の(B)のアミノ末端に隣接する1～約50アミノ酸を含むアミノ酸モチーフである〕を有する構造を含む。

【0172】

融合タンパク質は、式

(A)－L1－(B)

〔式中、(A)は、第1のポリペプチドに由来する部分であり、L1は、該第2のポリペプチド中の(B)のアミノ末端に隣接する1～約50個の連続したアミノ酸を含むアミノ酸モチーフであり、かつ(A)と(B)とを連結するリンカーを提供し、そして(B)は、第2のポリペプチドに由来する部分である〕

を有する。好ましくは、(B)は、第2のポリペプチドに由来するドメインである。

【0173】

好ましい実施形態では、この態様は、(A)および(B)の少なくとも一方がドメインであるという付帯条件を含む(たとえば、(A)はドメインであり、(B)はドメインであり、(A)および(B)は両方ともにドメインである)。他の好ましい実施形態では、この態様は、(A)および(B)が両方とも抗体可変ドメインである場合、1) (A)および(B)はそれぞれヒト抗体可変ドメインであるか、2) (A)および(B)はそれぞれ抗体重鎖可変ドメインであるか、3) (A)および(B)はそれぞれ抗体軽鎖可変ドメインであるか、4) (A)は抗体軽鎖可変ドメインでありかつ(B)は抗体重鎖可変ドメイン(たとえば、VHHまたはVH)であるか、または5) (A)はVHHでありかつ(B)は抗体軽鎖可変ドメインであるというさらなる付帯条件を含む。追加としてまたは他の選択肢として、この態様の好ましい実施形態は、(A)がV_Hでありかつ(B)がV_Lである場合、L1がCH1のアミノ末端から1～5もしくは1～6個の連続したアミノ酸よりなることはないという付帯条件を含む。追加としてまたは他の選択肢として、(A)および(B)が両方とも抗体可変ドメインである場合、次のものは本発明から除外される、(A)－L1－(B)〔式中、(A)はマウスVHであり、(B)はマウスVLであり、そしてL1は、SerAlaLysThrThrPro(配列番号537)、SerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGly(配列番号538)、AlaLysThrThrProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArgVal(配列番号539)、またはAlaLysThrThrProLysLeuGluGlu(配列番号540)である〕。追加としてまたは他の選択肢として、(A)－L1－(B)〔式中、(A)はマウスVHであり、(B)はマウスVLであり、そしてL1は、Le Gall et al., Protein Engineering, Design & Selection, 17:357-366 (2004), Kipriyanov et al., Int. J. Cancer, 77:763-772 (1998); Le Gall et al., J. Immunol. Methods, 285:111-127 (2004); Le Gall et al., FEBS Letters, 453:164-168 (1995); または Kipriyanov et al., Protein Engineering, 10:445-453 (1997)に開示されるリンカーである〕は、融合タンパク質ではない。

10

20

30

40

50

【0174】

特定の実施形態では、第1のポリペプチドは(A)－L1を含み、かつ融合タンパク質は(A)－L1－(B)を含む〔式中、(A)は相補性決定領域(CDR)3よりなり、そしてL1はフレームワーク4よりなる〕。他の実施形態では、(A)はCDR1を含みかつL1はFR2を含むか、(A)はCDR2を含みかつL1はFR3を含むか、(A)はCDR1およびCDR2(たとえば、CDR1－FR2－CDR2)を含みかつL1はFR3を含むか、(A)はCDR2およびCDR3を含みかつL1はFR4を含むか、または(A)はCDR1、CDR2、およびCDR3(たとえば、CDR1－FR2－CDR2－FR3－CDR3)を含みかつL1はFR4を含む。

【0175】

他の実施形態では、第1のポリペプチドは(A)を含み、第2のポリペプチドはL1－(B)を含み、かつ融合タンパク質は(A)－L1－(B)を含む〔式中、(B)はCDR3よりなり、そしてL1はフレームワーク3よりなる〕。他の実施形態では、(B)はCDR1を含みかつL1はFR1を含むか、(B)はCDR2を含みかつL1はFR2を含むか、(B)はCDR1およびCDR2(たとえば、CDR1－FR2－CDR2)を含みかつL1はFR1を含むか、(B)はCDR2およびCDR3を含みかつL1はFR2を含むか、または(B)はCDR1、CDR2、およびCDR3(たとえば、CDR1－FR2－CDR2－FR3－CDR3)を含みかつL1はFR1を含む。

【0176】

いくつかの実施形態では、(A)は、抗体可変ドメインのような免疫グロブリン可変ドメインである。たとえば、(A)は、抗体軽鎖可変ドメイン(たとえば、C κ 、C λ)または抗体重鎖可変ドメイン(たとえば、VH、VHH)でありうる。そのような実施形態では、L1は、可変ドメインAを含む天然に存在するポリペプチド中の(A)のカルボキシ末端に隣接する1～約50個の連続したアミノ酸である。たとえば、(A)がV κ (たとえば、ヒトV κ)である場合、L1は、C κ (たとえば、ヒトC κ)の1～約50個の連続したN末端アミノ酸であり、(A)がV λ (たとえば、ヒトV λ)である場合、L1は、C λ (たとえば、ヒトC λ)の1～約50個の連続したN末端アミノ酸であり、(A)が重鎖可変ドメイン(たとえば、ヒトVH、ラクダ科動物VHH)である場合、L1は、CH1(たとえば、ヒトCH1、ラクダ科動物VHH)の1～約50個の連続したN末端アミノ酸である。いくつかの実施形態では、(A)はVHでありかつL1はCH1の最初の3～約12個のN末端アミノ酸を含むか、(A)はV κ でありかつL1はC κ の最初の3～約12個のN末端アミノ酸を含むか、または(A)はV λ でありかつL1はC λ の最初の3～約12個のN末端アミノ酸を含む。

【0177】

いくつかの実施形態では、第2のポリペプチドは免疫グロブリン定常領域を含み、かつ(B)は免疫グロブリン定常領域に由来する。たとえば、(B)は、抗体CH1の少なくとも一部分、抗体ヒンジの少なくとも一部分、抗体CH2の少なくとも一部分、または抗体CH3の少なくとも一部分を含むうる。

【0178】

いくつかの実施形態では、(A)は抗体可変ドメインであり、かつ(B)は抗体可変ドメインである。これらの実施形態では、抗体可変ドメイン(A)および(B)は、同一でありうるかもしくは異なりうる。たとえば、(A)は抗体重鎖可変ドメインでありうるしかつ(B)は同一のもしくは異なる抗体重鎖可変ドメインでありうるか、(A)は抗体軽鎖可変ドメインでありうるしかつ(B)は同一のもしくは異なる抗体軽鎖可変ドメインでありうるか、(A)は抗体重鎖可変ドメインでありうるしかつ(B)は抗体軽鎖可変ドメインでありうるか、または(A)は抗体軽鎖可変ドメインでありうるしかつ(B)は抗体重鎖可変ドメインでありうる。代表的な実施形態では、(A)はV κ でありかつ(B)はV κ であるか、(A)はV κ でありかつ(B)はV λ であるか、(A)はV κ でありかつ(B)はVHもしくはVHHであるか、(A)はV λ でありかつ(B)はV κ であるか、(A)はV λ でありかつ(B)はV λ であるか、または(A)はV λ でありかつ(B)はVHも

10

20

30

40

50

しくはVHHである。好ましい実施形態では、この態様は、追加としてまたは他の選択肢として、(A)および(B)が両方とも抗体可変ドメインである場合、1)(A)および(B)はそれぞれヒト抗体可変ドメインであるか、2)(A)および(B)はそれぞれ抗体重鎖可変ドメインであるか、3)(A)および(B)はそれぞれ抗体軽鎖可変ドメインであるか、4)(A)は抗体軽鎖可変ドメインでありかつ(B)は抗体重鎖可変ドメインであるか、または5)(A)はVHHでありかつ(B)は抗体軽鎖可変ドメインであるという付帯条件を含む。追加としてまたは他の選択肢として、この態様の好ましい実施形態は、(A)がVHでありかつ(B)がVLである場合、L1がCH1のアミノ末端から1~5もしくは1~6個の連続したアミノ酸よりなることはないという付帯条件を含む。

【0179】

10

いくつかの実施形態では、(A)は、抗体軽鎖可変ドメインのFR1、CDR1、FR2、CDR3、FR3、およびCDR3と、アミノ酸配列GlyGlnGlyThrLysValThrValSerSer(配列番号472)を含むFR4とを含む抗体可変ドメインであり、かつL1は、CH1の最初の3~約12アミノ酸を含む。特定の実施形態では、L1は、AlaSerThr(配列番号473)、AlaSerThrLysGlyProSer(配列番号474)、またはAlaSerThrLysGlyProSerGly(配列番号475)である。

【0180】

他の実施形態では、(A)は、V_HまたはV_κドメインのFR1、CDR1、FR2、CDR3、FR3、およびCDR3と、アミノ酸配列GlyXaaGlyThr(Lys/Gln/Glu)(Val/Leu)(Thr/Ile)ValLeu(配列番号476)を含むFR4とを含む抗体可変ドメインであり、かつL1は、Cλの最初の3~約12アミノ酸を含む。

20

【0181】

他の実施形態では、(A)は、VHまたはVλドメインのFR1、CDR1、FR2、CDR3、FR3、およびCDR3と、アミノ酸配列GlyGlnGlyThrLysValGluIleLysArg(配列番号477)を含むFR4とを含む抗体可変ドメインであり、かつL1は、Cκの最初の3~約12アミノ酸を含む。

【0182】

いくつかの実施形態では、(A)は、抗体定常ドメインやTCR定常ドメインのような免疫グロブリン定常ドメインである。特定の実施形態では、(A)は、CH1、ヒンジ、CH2、またはCH3のような抗体重鎖定常ドメインである。いくつかの実施形態では、(A)は、非ヒト抗体重鎖定常ドメイン、たとえば、マウス、ニワトリ、ブタ、トラフグ、カエル、ウシ(たとえば、ボス・タウラス(*Bos taurus*))、ラット、サメ(たとえば、オオメジロザメ、メジロザメ、ナースシャーク、ネコザメ、クモハダオオセ)、ガンギエイ(たとえば、クリアノーズスケート(*clearnose skate*)、リトルスケート)、サカナ(たとえば、タイセイヨウサケ、アメリカナマズ、カライワシ、スポッテッドラットフィッシュ、タイセイヨウタラ、ケツギョ、ニジマス、スポッテッドウルフフィッシュ、ゼブラフィッシュ)、オポッサム、ヒツジ、ラクダ科動物(たとえば、ラマ、グアナコ、アルパカ、ビクーナ、ヒトコブラクダ、フタコブラクダ)、ウサギ、非ヒト霊長動物(たとえば、シンセカイザル、キュウセカイザル、カニクイザル(マカカ・ファスシクラリス(*Macaca fascicularis*)))、キヌザル科(*Callithricidae*)(たとえば、マーモセット))、または任意の他の所望の非ヒト種に由来する抗体定常ドメインである。より特定的な実施形態では、(A)は非ヒト定常ドメインであり、かつ(B)はヒトポリペプチドに由来する。

30

40

【0183】

特定の実施形態では、(B)は、第2のポリペプチドに由来する。ここで、第2のポリペプチドは、たとえば、サイトカイン、サイトカインレセプター(たとえば、インターロイキンレセプター(たとえば、IL-1R、IL1Rタイプ)、腫瘍壊死因子レセプター(たとえば、TNFR1、TNFR2))、増殖因子(たとえば、VEGF、EGF、C

50

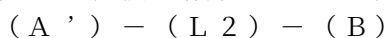
S F-1)、増殖因子レセプター(たとえば、V E G F-R 1、V E G F-R 2、E G F R、C S F-1 R)、ホルモン(たとえば、インスリン)、ホルモンレセプター(たとえば、インスリンレセプター)、接着分子、止血因子、T細胞レセプター、T細胞レセプター鎖、T細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかもしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか1つの機能性部分から選択される。たとえば、いくつかの融合タンパク質では、(A)は、免疫グロブリン可変ドメイン(たとえば、抗体可変ドメイン)であり、L 1は、可変ドメインAを含む天然に存在するポリペプチド中の(A)のカルボキシ末端に隣接する1~約50個の連続したアミノ酸であり、かつ(B)は、第2のポリペプチドに由来する。ここで、第2のポリペプチドは、たとえば、サイトカイン、サイトカインレセプター(たとえば、インターロイキンレセプター(たとえば、I L-1 R、I L 1 Rタイプ)、腫瘍壊死因子レセプター(たとえば、T N F R 1、T N F R 2))、増殖因子(たとえば、V E G F、E G F、C S F-1)、増殖因子レセプター(たとえば、V E G F-R 1、V E G F-R 2、E G F R、C S F-1 R)、ホルモン(たとえば、インスリン)、ホルモンレセプター(たとえば、インスリンレセプター)、接着分子、止血因子、T細胞レセプター、T細胞レセプター鎖、T細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか1つの機能性部分から選択される。

【0184】

他の融合タンパク質では、(A)は、第1のポリペプチドに由来し{ここで、第1のポリペプチドは、たとえば、サイトカイン、サイトカインレセプター(たとえば、インターロイキンレセプター(たとえば、I L-1 R、I L 1 Rタイプ)、腫瘍壊死因子レセプター(たとえば、T N F R 1、T N F R 2))、増殖因子(たとえば、V E G F、E G F、C S F-1)、増殖因子レセプター(たとえば、V E G F-R 1、V E G F-R 2、E G F R、C S F-1 R)、ホルモン(たとえば、インスリン)、ホルモンレセプター(たとえば、インスリンレセプター)、接着分子、止血因子、T細胞レセプター、T細胞レセプター鎖、T細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか1つの機能性部分から選択される}、L 1は、(A)を含む天然に存在するポリペプチド中の(A)のカルボキシ末端に隣接する1~約50個の連続したアミノ酸であり、かつBは、免疫グロブリン定常ドメインである。他の選択肢として、L 1は、(B)を含む天然に存在するポリペプチド中の(B)のアミノ末端に隣接する1~約50個の連続したアミノ酸であり、かつ(B)は、免疫グロブリン定常ドメインである。所望により、組換え融合タンパク質は、(B)のカルボキシル側にある1つ以上の追加の免疫グロブリン定常ドメインを含みうる。たとえば、融合タンパク質は、抗体Fc(たとえば、オプシオンのヒンジ-CH2-CH3)を含みうる。さらなる例では、融合タンパク質は、構造(A)-L 1-CH1-ヒンジ-CH2-CH3、(A)-L 1-ヒンジ-CH2-CH3、(A)-L 1-CH2-CH3、または(A)-L 1-CH3を有する。定常ドメインは、好ましくは、I g G定常ドメイン、たとえば、I g G 1またはI g G 4定常ドメインである。

【0185】

特定の実施形態では、組換え融合タンパク質は、免疫グロブリンに由来する第1の部分と第2の部分とを含む。ここで、該第1の部分は、リンカーを介して該第2の部分に結合され、かつ組換え融合タンパク質は、式



[式中、(A')は免疫グロブリン可変ドメインであり、かつ(A')は、該免疫グロブリン可変ドメインのフレームワーク(FR)4を含み、L 2は該リンカーであり{ここで、L 2は、該FR 4を含む天然に存在する免疫グロブリン中の該FR 4のカルボキシ末端に隣接する1~約50個の連続したアミノ酸を含む}、そして(B)は該第2の部分である]

を有する。

【0186】

好ましい実施形態では、この態様は、次のような付帯条件を含む。すなわち、(A') は、抗体可変ドメインであり、かつ L2-B は、FR4 を含有する天然に存在する抗体中の可変ドメイン (A') の FR4 に結合されたペプチドである CL でも CH1 ドメインでもなく、しかも (A') および (B) が両方とも抗体可変ドメインである場合、1) (A') および (B) はそれぞれヒト抗体可変ドメインであるか、2) (A') および (B) はそれぞれ抗体重鎖可変ドメインであるか、3) (A1) および (B) はそれぞれ抗体軽鎖可変ドメインであるか、4) (A') は抗体軽鎖可変ドメインでありかつ (B) は抗体重鎖可変ドメイン (たとえば、VH、VHH) であるか、または 5) (A') は VHH でありかつ (B) は抗体軽鎖可変ドメインである。追加としてまたは他の選択肢として、この態様の好ましい実施形態は、(A') が VH でありかつ (B) が VL である場合、L2 が CH1 のアミノ末端から 1~5 もしくは 1~6 個の連続したアミノ酸よりなることはないという付帯条件を含む。追加としてまたは他の選択肢として、この態様の好ましい実施形態は、(B) がドメインであるが抗体可変ドメインではないという付帯条件を含む。追加としてまたは他の選択肢として、この態様の好ましい実施形態は、(B) が、たとえば、サイトカイン、サイトカインレセプター (たとえば、インターロイキンレセプター (たとえば、IL-1R、IL1R タイプ)、腫瘍壊死因子レセプター (たとえば、TNFR1、TNFR2))、増殖因子 (たとえば、VEGF、EGF、CSF-1)、増殖因子レセプター (たとえば、VEGF-R1、VEGF-R2、EGFR、CSF-1R)、ホルモン (たとえば、インスリン)、ホルモンレセプター (たとえば、インスリンレセプター)、接着分子、止血因子、T 細胞レセプター、T 細胞レセプター鎖、T 細胞レセプター可変ドメイン、酵素、または以上のいずれか 1 つの機能性部分から選択されるポリペプチドであるかまたはそれらに由来するという付帯条件を含む。追加としてまたは他の選択肢として、(A) および (B) が両方とも抗体可変ドメインである場合、次のものは本発明から除外される、(A)-(L2)-(B) [式中、(A) はマウス VH であり、(B) はマウス VL であり、そして L2 は、SerAlaLysThrThrPro (配列番号 537)、SerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGly (配列番号 538)、AlaLysThrThrProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArgVal (配列番号 539)、または AlaLysThrThrProLysLeuGluGlu (配列番号 540) である]。追加としてまたは他の選択肢として、(A)-L2-(B) [式中、(A) はマウス VH であり、(B) はマウス VL であり、そして L1 は、Le Gall et al., Protein Engineering, Design & Selection, 17:357-366 (2004), Kipriyanov et al., Int. J. Cancer, 77:763-772 (1998); Le Gall et al., J. Immunol. Methods, 285:111-127 (2004); Le Gall et al., FEBS Letters, 453:164-168 (1995); または Kipriyanov et al., Protein Engineering, 10:445-453 (1997) に開示されるリンカーである] は、融合タンパク質ではない。

【0187】

いくつかの実施形態では、(A') は、抗体重鎖可変ドメインまたはハイブリッド抗体可変ドメイン、たとえば、アミノ酸配列 GlyXaaGlyThr (Leu/Met/Thr) ValThrValSerSer (配列番号 478) を含む FR4 を含む抗体重鎖可変ドメインまたはハイブリッド抗体可変ドメインである。特定の実施形態では、FR4 は、GlyXaaGlyThrLeuValThrValSerSer (配列番号 479)、GlyXaaGlyThrMetValThrValSerSer (配列番号 480)、または GlyXaaGlyThrThrValThrValSerSer (配列番号 481) を含む。そのような実施形態では、L2 は、CH1 のアミノ末端から 1~約 50 個の連続したアミノ酸を含む。たとえば、L2 は、AlaSerThr (配列番号 473)、AlaSerThrLysGlyProSer (配列番号 474)、または AlaSerThrLysGlyProSerGly (配列番号 475) を含む。

【0188】

他の実施形態では、(A') は、アミノ酸配列 GlyXaaGlyThr (Lys/Arg) (Val/Leu) (Glu/Asp) IleLysArg (配列番号 485) を

含むFR4を含むハイブリッド抗体重鎖可変ドメインまたはVkである。たとえば、FR4は、GlyXaaGlyThrLysValGluIleLysArg（配列番号486）、GlyXaaGlyThrLysLeuGluIleLysArg（配列番号487）、GlyXaaGlyThrLysValAspIleLysArg（配列番号488）、またはGlyXaaGlyThrArgLysGluIleLysArg（配列番号489）を含みうる。そのような実施形態では、L2は、Cκのアミノ末端から1～約50個の連続したアミノ酸を含む。たとえば、L2は、ThrValAla（配列番号467）、ThrValAlaAlaProSer（配列番号490）、またはThrValAlaAlaAlaProSerGly（配列番号491）を含みうる。

【0189】

他の実施形態では、(A')は、アミノ酸配列GlyXaaGlyThr(Lys/Gln/Glu)(Val/Leu)(Thr/Ile)(Val/Ile)Leu（配列番号492）を含むFR4を含むハイブリッド抗体可変ドメインまたはVλである。たとえば、FR4は、GlyXaaGlyThrLysValThrValLeu（配列番号493）、GlyXaaGlyThrLysValThrIleLeu（配列番号494）、GlyXaaGlyThrLysValIleValLeu（配列番号495）、GlyXaaGlyThrLysValIleIleLeu（配列番号496）、GlyXaaGlyThrLysLeuThrValLeu（配列番号497）、GlyXaaGlyThrLysLeuThrIleLeu（配列番号498）、GlyXaaGlyThrLysLeuIleValLeu（配列番号499）、GlyXaaGlyThrLysLeuIleIleLeu（配列番号500）、GlyXaaGlyThrGlnValThrValLeu（配列番号501）、GlyXaaGlyThrGlnValThrIleLeu（配列番号502）、GlyXaaGlyThrGlnValIleValLeu（配列番号503）、GlyXaaGlyThrGlnValIleIleLeu（配列番号504）、GlyXaaGlyThrGlnLeuThrValLeu（配列番号505）、GlyXaaGlyThrGlnLeuThrIleLeu（配列番号506）、GlyXaaGlyThrGlnLeuIleValLeu（配列番号507）、GlyXaaGlyThrGlnLeuIleIleLeu（配列番号508）、GlyXaaGlyThrGluValThrValLeu（配列番号509）、GlyXaaGlyThrGluValThrIleLeu（配列番号510）、GlyXaaGlyThrGluValIleValLeu（配列番号511）、GlyXaaGlyThrGluValIleIleLeu（配列番号512）、GlyXaaGlyThrGluLeuThrValLeu（配列番号513）、GlyXaaGlyThrGluLeuThrIleLeu（配列番号514）、GlyXaaGlyThrGluLeuIleValLeu（配列番号515）、およびGlyXaaGlyThrGluLeuIleIleLeu（配列番号516）を含みうる。好ましくは、FR4は、GlyXaaGlyThrLysValThrValLeu（配列番号493）、GlyXaaGlyThrLysLeuThrValLeu（配列番号497）、GlyXaaGlyThrGlnLeuIleIleLeu（配列番号508）、GlyXaaGlyThrGluLeuThrValLeu（配列番号513）、またはGlyXaaGlyThrGlnLeuThrValLeu（配列番号505）を含む。そのような実施形態では、L2は、Cλのアミノ末端から1～約50個の連続したアミノ酸を含む。

【0190】

いくつかの実施形態では、(B)は、免疫グロブリン可変ドメインを含む。好ましくは、免疫グロブリン可変ドメイン（たとえば、抗体可変ドメイン）は、(B)のアミノ末端に存在し、かつL2のカルボキシ末端に直接結合される。特定の例では、免疫グロブリン可変ドメインは、抗体軽鎖可変ドメインまたは抗体重鎖可変ドメイン（たとえば、VH、VHH）である。

【0191】

いくつかの実施形態では、(B)は、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部分を含

10

20

30

40

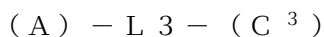
50

む。好ましくは、該少なくとも一部分の免疫グロブリン定常領域は、(B)のアミノ末端に存在し、かつL2のカルボキシ末端に直接結合される。特定の例では、(B)は、IgG定常領域、たとえば、IgG1定常領域、IgG2定常領域、IgG3定常領域、またはIgG4定常領域の少なくとも一部分を含む。たとえば、(B)は、CH1の少なくとも一部分、ヒンジの少なくとも一部分、CH2の少なくとも一部分、またはCH3の少なくとも一部分を含む。特定の実施形態では、(B)は、ヒンジの少なくとも一部分、たとえば、ThrHisThrCysProProCysPro（配列番号520）を含むヒンジの一部分を含む。他の実施形態では、(B)は、ヒンジの少なくとも一部分を含み、かつCH2-CH3をさらに含む。他の実施形態では、(')は、CH1-ヒンジーCH2-CH3、ヒンジーCH2-CH3、CH2-CH3、またはCH3の一部分を含む。

10

【0192】

他の態様では、組換え融合タンパク質は、第1のポリペプチドに由来する第1の部分と、免疫グロブリン定常領域に由来する第2の部分と、含む。ここで、該第1の部分は、リンカーを介して該第2の部分に結合され、かつ組換え融合タンパク質は、式



〔式中、(A)は、該第1の部分であり、(C³)は、免疫グロブリン定常領域に由来する該第2の部分であり、そしてL3は、該リンカーである〔ここで、L3は、(C³)を含む天然に存在する免疫グロブリン中の(C³)のアミノ末端に隣接する1〜約50個の連続したアミノ酸を含む〕〕

20

を有する。この態様の特定の実施形態では、本発明は、(A)が、L3-(C³)を含む天然に存在する免疫グロブリン中のL3に結合された可変ドメインペプチドではない、という付帯条件を含む。

【0193】

好ましい実施形態では、第1のポリペプチドは、サイトカイン、サイトカインレセプター（たとえば、インターロイキンレセプター（たとえば、IL-1R、IL1Rタイプ）、腫瘍壊死因子レセプター（たとえば、TNFR1、TNFR2））、増殖因子（たとえば、VEGF、EGF、CSF-1）、増殖因子レセプター（たとえば、VEGF-R1、VEGF-R2、EGFR、CSF-1R）、ホルモン（たとえば、インスリン）、ホルモンレセプター（たとえば、インスリンレセプター）、接着分子、止血因子、T細胞レセプター、T細胞レセプター鎖、T細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかもしれないポリペプチド、または以上のいずれか1つの機能性部分である。したがって、好ましい実施形態では、(A)は、サイトカイン、サイトカインレセプター（たとえば、インターロイキンレセプター（たとえば、IL-1R、IL1Rタイプ）、腫瘍壊死因子レセプター（たとえば、TNFR1、TNFR2））、増殖因子（たとえば、VEGF、EGF、CSF-1）、増殖因子レセプター（たとえば、VEGF-R1、VEGF-R2、EGFR、CSF-1R）、ホルモン（たとえば、インスリン）、ホルモンレセプター（たとえば、インスリンレセプター）、接着分子、止血因子、T細胞レセプター、T細胞レセプター鎖、T細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかもしれないポリペプチド、または以上のいずれか1つの機能性部分に由来するかまたはそれらである。

30

40

【0194】

いくつかの実施形態では、(C³)は、少なくとも1つの抗体定常ドメイン、たとえば、ヒト抗体定常ドメインを含む。好ましくは、抗体定常ドメインは、ヒトIgG定常ドメイン（たとえば、IgG1定常ドメイン、IgG2定常ドメイン、IgG3定常ドメイン、IgG4定常ドメイン）である。いくつかの実施形態では、(C³)はCH3を含む。これらの例では、3は、CH2のカルボキシ末端から1〜約50個の連続したアミノ酸を含む。

【0195】

他の実施形態では、(C³)は、CH2またはCH2-CH3、たとえば、IgG1ま

50

たは I g G 4 C H 2 または C H 2 - C H 3 を含む。これらの実施形態では、L 3 は、ヒンジのカルボキシ末端から 1 ～ 約 3 4 個の連続したアミノ酸を含みうる。たとえば、L 3 は、T h r H i s T h r C y s P r o P r o C y s P r o (配列番号 5 2 0) または G l y T h r H i s T h r C y s P r o P r o C y s P r o (配列番号 5 2 1) を含みうる。他の実施形態では、(C³) はヒンジを含む。これらの実施形態では、L 3 は、C H 1 のカルボキシ末端から 1 ～ 約 5 0 個の連続したアミノ酸を含みうる。

【0196】

他の実施形態では、(C³) は C H 1 を含む。これらの実施形態では、L 3 は、抗体重鎖 V ドメインのカルボキシ末端から 1 ～ 約 5 0 個の連続したアミノ酸を含む。たとえば、L 3 は、G l y X a a G l y T h r (L e u / M e t / T h r) V a l T h r V a l S e r S e r (配列番号 4 7 8) を含みうる。特定の実施形態では、L 3 は、G l y X a a G l y T h r L e u V a l T h r V a l S e r S e r (配列番号 4 7 9)、G l y X a a G l y T h r M e t V a l T h r V a l S e r S e r (配列番号 4 8 0)、または G l y X a a G l y T h r T h r V a l T h r V a l S e r S e r (配列番号 4 8 1) を含む。

【0197】

いくつかの実施形態では、(C³) は、抗体軽鎖定常ドメインの少なくとも一部分を含む。特定の実施形態では、(C³) は C κ である。そのような実施形態では、L 3 は、抗体軽鎖 V ドメインのカルボキシ末端から 1 ～ 約 5 0 個の連続したアミノ酸を含む。たとえば、L 3 は、G l y X a a G l y T h r (L y s / A r g) (V a l / L e u) (G l u / A s p) I l l e L y s A r g (配列番号 4 8 5) を含みうる。特定の実施形態では、L 3 は、G l y X a a G l y T h r L y s V a l G l u I l l e L y s A r g (配列番号 4 8 6)、G l y X a a G l y T h r L y s L e u G l u I l l e L y s A r g (配列番号 4 8 7)、G l y X a a G l y T h r L y s V a l A s p I l l e L y s A r g (配列番号 4 8 8)、または G l y X a a G l y T h r A r g L y s G l u I l l e L y s A r g (配列番号 4 8 9) を含む。

【0198】

他の実施形態では、(C³) は C λ である。そのような実施形態では、L 3 は、抗体軽鎖 V ドメインのカルボキシ末端から 1 ～ 約 5 0 個の連続したアミノ酸を含む。たとえば、L 3 は、G l y X a a G l y T h r (L y s / G l n / G l u) (V a l / L e u) (T h r / I l l e) (V a l / I l l e) L e u (配列番号 4 9 2) を含みうる。特定の実施形態では、L 3 は、G l y X a a G l y T h r L y s V a l T h r V a l L e u (配列番号 4 9 3)、G l y X a a G l y T h r L y s V a l T h r I l l e L e u (配列番号 4 9 4)、G l y X a a G l y T h r L y s V a l I l l e V a l L e u (配列番号 4 9 5)、G l y X a a G l y T h r L y s V a l I l l e I l l e L e u (配列番号 4 9 6)、G l y X a a G l y T h r L y s L e u T h r V a l L e u (配列番号 4 9 7)、G l y X a a G l y T h r L y s L e u I l l e V a l L e u (配列番号 4 9 9)、G l y X a a G l y T h r L y s L e u I l l e I l l e L e u (配列番号 5 0 0)、G l y X a a G l y T h r G l n V a l T h r V a l L e u (配列番号 5 0 1)、G l y X a a G l y T h r G l n V a l T h r I l l e L e u (配列番号 5 0 2)、G l y X a a G l y T h r G l n V a l I l l e V a l L e u (配列番号 5 0 3)、G l y X a a G l y T h r G l n V a l I l l e I l l e L e u (配列番号 5 0 4)、G l y X a a G l y T h r G l n L e u T h r V a l L e u (配列番号 5 0 5)、G l y X a a G l y T h r G l n L e u T h r I l l e L e u (配列番号 5 0 6)、G l y X a a G l y T h r G l n L e u I l l e V a l L e u (配列番号 5 0 7)、G l y X a a G l y T h r G l n L e u I l l e I l l e L e u (配列番号 5 0 8)、G l y X a a G l y T h r G l u V a l T h r V a l L e u (配列番号 5 0 9)、G l y X a a G l y T h r G l u V a l T h r I l l e L e u (配列番号 5 1 0)、G l y X a a G l y T h r G l u V a l I l l e V a l L e u (配列番号 5 1 1)、G l y X a a G l y T h r G l u V a l I l l e I l l e L e u (配列番号 5 1 2)、G l y X a a G l y T h r G l u L e u T h r V a l L e u (配列番号 5 1 3)、G l y X a a G l y T h r G l u

10

20

30

40

50

LeuThrIleLeu（配列番号514）、GlyXaaGlyThrGluLeu
IleValLeu（配列番号515）、およびGlyXaaGlyThrGluLeu
IleIleLeu（配列番号516）を含む。好ましくは、L3は、GlyXaaGly
ThrLysValThrValLeu（配列番号493）、GlyXaaGlyThr
LysLeuThrValLeu（配列番号497）、GlyXaaGlyThrGln
LeuIleIleLeu（配列番号508）、GlyXaaGlyThrGluLeu
ThrValLeu（配列番号513）、またはGlyXaaGlyThrGlnLeu
ThrValLeu（配列番号505）を含む。

【0199】

融合タンパク質の生成方法

本発明は、1つ以上の天然の連結部を含有する融合タンパク質の生成方法に関する。本方法は、一般的には、融合される2つのポリペプチドもしくはその一部分に存在する保存アミノ酸配列モチーフを同定することを含む。次に、保存アミノ酸モチーフを含有する融合タンパク質を調製する。ただし、この融合タンパク質において、保存モチーフのアミノ末端に隣接するアミノ酸配列は、一方の元のポリペプチド中の保存モチーフのアミノ末端に隣接するアミノ配列と同一であり、かつ保存モチーフのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列は、他方の元のポリペプチド中の保存モチーフのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列と同一である。一般的には、2つのポリペプチドまたはポリペプチドの一部分のアミノ酸配列を解析して、両方の部分のポリペプチド中に存在する保存アミノ酸配列モチーフを同定する。解析は、任意の好適な方法を用いて実施可能である。一例では、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドのアミノ酸配列を提供し（たとえば、データベースから）、各ポリペプチド中に存在する保存アミノ酸配列モチーフを同定する（たとえば、手作業でまたは好適な配列解析ソフトウェアパッケージを用いて）。

【0200】

本発明は、2つの異なるポリペプチドに由来する少なくとも2つの部分と、2つの部分間の少なくとも1つの天然の連結部とを含む融合タンパク質の生成方法を提供する。所望により、融合タンパク質は、3つ以上の部分を含有可能であり、かつ該部分間の連結部のいくつかは、非天然でありうる。

【0201】

一般的態様において、本発明は、第1の部分と第2の部分とを天然の連結部で融合して含む融合タンパク質の生成方法を提供する。ここで、該第1の部分は、第1のポリペプチドに由来し、かつ該第2の部分は、第2のポリペプチドに由来する。本方法は、第1のポリペプチドもしくはその一部分のアミノ酸配列と第2のポリペプチドもしくはその一部分のアミノ酸配列とを解析して、解析された配列（第1のポリペプチドもしくはその一部分および第2のポリペプチドもしくはその一部分）中に存在する保存アミノ酸モチーフを同定することと、式



〔式中、Aは該第1の部分であり、Yは該保存アミノ酸モチーフであり、Bは該第2の部分であり、しかも該第1のポリペプチドはA-Yを含み、かつ該第2のポリペプチドはY-Bを含む〕

を有する融合タンパク質を調製することを含む。

【0202】

本発明はまた、本明細書に記載の融合タンパク質のような融合タンパク質の改良された作製方法に関する。たとえば、いくつかの実施形態では、本発明は、第1の部分と第2の部分とを少なくとも1つの天然の連結部により連結して含む融合タンパク質の改良された生成方法に関する。ここで、該第1の部分は、第1のポリペプチドに由来し、かつ該第2の部分は、第2のポリペプチドに由来し、改良点として、該第1のポリペプチドもしくはその一部分のアミノ酸配列と該第2のポリペプチドもしくはその一部分のアミノ酸配列とを解析して、解析された配列の両方に存在する保存アミノ酸モチーフを同定することと、式

A-Y-B

〔式中、Aは該第1の部分であり、Yは該保存アミノ酸モチーフであり、Bは該第2の部分であり、しかも該第1のポリペプチドはA-Yを含み、かつ該第2のポリペプチドはY-Bを含む〕

を有する融合タンパク質を調製することと、が含まれる。

【0203】

保存アミノ酸モチーフYは、1～約50アミノ酸残基よりなりうる。特定の実施形態では、Yは、約3～約50アミノ酸、約3～約40アミノ酸、約3～約30アミノ酸、約3～約20アミノ酸、約3～約15アミノ酸、約3～約14アミノ酸、約3～約13アミノ酸、約3～約12アミノ酸、約3～約11アミノ酸、約3～約10アミノ酸、約3～約9アミノ酸、約3～約8アミノ酸、約3～約7アミノ酸、約3～約6アミノ酸、約3～約5アミノ酸、少なくとも8アミノ酸、約11アミノ酸まで、または約8～約11アミノ酸よりなる。他の実施形態では、Yは、約15アミノ酸、約14アミノ酸、約13アミノ酸、約12アミノ酸、約11アミノ酸、約10アミノ酸、約9アミノ酸、約8アミノ酸、約7アミノ酸、約6アミノ酸、約5アミノ酸、約4アミノ酸、約3アミノ酸、約2アミノ酸、または約1アミノ酸よりなる。

10

【0204】

保存アミノ酸モチーフYは、本発明に係る融合タンパク質中に少なくとも一部分が組み込まれる第1および第2のポリペプチド（親ポリペプチド）中に見いだされる。本発明に係る融合タンパク質および融合タンパク質中のハイブリッドドメインは、各親タンパク質が保存アミノ酸モチーフを含有するのであれば、任意の所望の親ポリペプチド由来の部分を含む。たとえば、第1および第2のポリペプチド（親ポリペプチド）は、関連性のないもの（たとえば、異なるタンパク質スーパーファミリー由来のもの）または関連性のあるもの（たとえば、同一のタンパク質スーパーファミリー由来のもの）でありうる。特定の実施形態では、融合タンパク質およびハイブリッドドメインは、同一のタンパク質スーパーファミリー（たとえば、免疫グロブリンスーパーファミリー、腫瘍壊死因子（TNF）スーパーファミリー、またはTNFレセプタースーパーファミリー）由来の第1および第2のポリペプチド（親ポリペプチド）に由来する部分を含む。

20

【0205】

第1および第2のポリペプチド（親ポリペプチド）は、同一の種由来または異なる種由来でありうる。たとえば、第1および第2のポリペプチドは、独立して、ヒト（ホモ・サピエンス（*Homo sapiens*））に由来しうるか、または非ヒト種、たとえば、マウス、ニワトリ、ブタ、トラフグ、カエル、ウシ（たとえば、ボス・タウラス（*Bos taurus*））、ラット、サメ（たとえば、オオメジロザメ、メジロザメ、ナースシャーク、ネコザメ、クモハダオオセ）、ガンギエイ（たとえば、クリアノーズスケート（*clearnose skate*）、リトルスケート）、サカナ（たとえば、タイセイヨウサケ、アメリカナマズ、カライワシ、スポッテッドラットフィッシュ、タイセイヨウタラ、ケツギョ、ニジマス、スポッテッドウルフフィッシュ、ゼブラフィッシュ）、オボッサム、ヒツジ、ラクダ科動物（たとえば、ラマ、グアナコ、アルパカ、ビクーナ、ヒトコブラクダ、フタコブラクダ）、ウサギ、非ヒト霊長動物（たとえば、シンセカイザル、キュウセカイザル、カニクイザル（*Macaca fascicularis*））、キヌザル科（*Callithricidae*）（たとえば、マーモセット））、または任意の他の所望の非ヒト種に由来しうる。特定の実施形態では、第1および第2のポリペプチドは両方ともヒト由来であるか、または一方はヒト由来でありかつ他方は非ヒト種由来である。

30

40

【0206】

第1および第2のポリペプチド（親ポリペプチド）は、任意の所望のポリペプチドでありうる。第1および第2のポリペプチドの好適な例としては、サイトカイン、サイトカインレセプター（たとえば、インターロイキンレセプター（たとえば、IL-1R、IL1Rタイプ）、腫瘍壊死因子レセプター（たとえば、TNFR1、TNFR2））、増殖因子（たとえば、VEGF、EGF、CSF-1）、増殖因子レセプター（たとえば、VE

50

G F-R 1、V E G F-R 2、E G F R、C S F-1 R)、ホルモン(たとえば、インスリン)、ホルモンレセプター(たとえば、インスリンレセプター)、接着分子、止血因子、T細胞レセプター、T細胞レセプター鎖、T細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかもしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか1つの機能性部分が挙げられる。

【0207】

保存アミノ酸モチーフは、任意の好適な方法を用いて、たとえば、2つ以上のアミノ酸配列をアライメントして保存アミノ酸配列の領域を同定することにより、容易に同定可能である。これは、手作業でまたは任意の他の好適な方法を用いて、たとえば、好適な配列解析アルゴリズムもしくはソフトウェアパッケージ(たとえば、C L U S T A L (Thompson et al.. Nucleic Acids Research, 25:4876-4882(1997); Chenna R, et al., Nucleic Acids Res, 31:3497-3500. (2003))、B L A S T (Altschul, et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990), Gish, W. & States, D.J., Nature Genet. , 3:266-272 (1993), Madden, et al., Meth. Enzymol., 266:131-141 (1996), Altschul, et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997), Zhang et al., J Comput Biol; 7(1-2):203-14 (2000), Zhang, J. & Madden, T.L., Genome Res. , 7:649-656 (1997))、Genomenet, Bioinformatics Center, Institute for Chemical Research, Kyoto University (www.genome.jp)からオンラインで利用可能なM O T I F)を用いて、達成可能である。たとえば、本明細書に記載されるように、免疫グロブリンタンパク質中に存在する保存アミノ酸モチーフは、免疫グロブリンアミノ酸配列のアライメントにより同定されている。保存アミノ酸モチーフの特定の例としては、抗体可変ドメインのフレームワーク領域(FR)4中のG l y X a a G l y T h r (配列番号386)またはG l y X a a G l y T h r X a a (V a l / L e u) (配列番号387);抗体可変ドメインのFR3中のG l u A s p T h r A l a (配列番号388)、V a l T y r T y r C y s (配列番号389)、またはG l u A s p T h r A l a V a l T y r T y r C y s (配列番号390);抗体定常領域中の(S e r / A l a / G l y) P r o (L y s / A s p / S e r) V a l (配列番号391)、(S e r / A l a / G l y) P r o (L y s / A s p / S e r) V a l P h e (配列番号392)、L y s V a l A s p L y s (S e r / A r g / T h r) (配列番号393)、またはV a l T h r V a l (配列番号394)が挙げられる。

【0208】

いくつかの実施形態では、第2のポリペプチドは、T C R定常ドメインや抗体定常ドメインのような免疫グロブリン定常ドメインを含む。免疫グロブリン定常ドメインは、ヒト免疫グロブリン定常ドメインまたは非ヒト免疫グロブリン定常ドメインでありうる。一例では、第2のポリペプチドは、T細胞レセプター定常ドメインを含む。

【0209】

特定の実施形態では、第2のポリペプチドは、抗体軽鎖定常ドメインまたは抗体重鎖定常ドメイン、好ましくは、ヒト軽鎖定常ドメインまたはヒト重鎖定常ドメインを含む。特定の実施形態では、Bは、抗体ヒンジ領域、C H 1-ヒンジ-C H 2-C H 3の一部分、F c (ヒンジ-C H 2-C H 3もしくはC H 2-C H 3)、またはC H 3を含む。好ましくは、ヒト抗体重鎖定常ドメインは、I g G (I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4)定常ドメインである。たとえば、いくつかの実施形態では、I g G定常ドメインは、I g G 1定常ドメインまたはI g G 4定常ドメインである。

【0210】

特定の実施形態では、第1のポリペプチドは、サイトカイン、サイトカインレセプター(たとえば、インターロイキンレセプター(たとえば、I L-1 R、I L 1 Rタイプ)、腫瘍壊死因子レセプター(たとえば、T N F R 1、T N F R 2))、増殖因子(たとえば、V E G F、E G F、C S F-1)、増殖因子レセプター(たとえば、V E G F-R 1、V E G F-R 2、E G F R、C S F-1 R)、ホルモン(たとえば、インスリン)、ホルモンレセプター(たとえば、インスリンレセプター)、接着分子、止血因子、T細胞レセプター、T細胞レセプター鎖、T細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメイン

を含むかもしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか1つの機能性部分であり、かつ第2のポリペプチドおよびBは、免疫グロブリン定常ドメインを含む。

【0211】

いくつかの実施形態では、第1のポリペプチドおよびAは、TCR定常ドメインや抗体定常ドメインのような免疫グロブリン可変ドメインを含む。免疫グロブリン可変ドメインは、ヒト免疫グロブリン可変ドメインまたは非ヒト免疫グロブリン可変ドメインでありうる。一例では、第1のポリペプチドは、T細胞レセプター可変ドメインを含む。

【0212】

特定の実施形態では、第1のポリペプチドは、抗体軽鎖可変ドメイン（たとえば、V_K、V_λ）または抗体重鎖可変ドメイン（たとえば、V_H、V_{H H}）を含む。ある実施形態では、抗体可変ドメインは、非ヒト軽鎖可変ドメインまたは非ヒト重鎖可変ドメインである。たとえば、非ヒト抗体可変ドメインは、ラクダ科動物抗体可変ドメインまたはナースシャーク抗体可変ドメインでありうる。他の実施形態では、抗体可変ドメインは、ヒト抗体可変ドメイン、たとえば、ヒトV_K、ヒトV_λ、またはヒトV_Hである。

【0213】

特定の実施形態では、前記第1のポリペプチドおよびAは、免疫グロブリン可変ドメイン（たとえば、抗体可変ドメイン）を含み、かつ前記第2のポリペプチドは、サイトカイン、サイトカインレセプター（たとえば、インターロイキンレセプター（たとえば、IL-1R、IL1Rタイプ）、腫瘍壊死因子レセプター（たとえば、TNFR1、TNFR2））、増殖因子（たとえば、VEGF、EGF、CSF-1）、増殖因子レセプター（たとえば、VEGF-R1、VEGF-R2、EGFR、CSF-1R）、ホルモン（たとえば、インスリン）、ホルモンレセプター（たとえば、インスリンレセプター）、接着分子、止血因子、T細胞レセプター、T細胞レセプター鎖、T細胞レセプター可変ドメイン、酵素、抗体可変ドメインを含むかしくはそれよりなるポリペプチド、または以上のいずれか1つの機能性部分である。

【0214】

他の実施形態では、第1のポリペプチドは第1の抗体鎖であり、かつ第2のポリペプチドは第2の抗体鎖である。そのような実施形態では、Yは、該第1および第2の抗体鎖の可変ドメイン中または該第1および第2の抗体鎖の定常ドメイン中に存在しうる。たとえば、Yは、第1および第2の抗体鎖の可変ドメインのフレームワーク領域中に存在しうる。特定の実施形態では、Yは、FR4中に存在する。たとえば、Yは、GlyXaaGlyThr（配列番号386）またはGlyXaaGlyThrXaa（Val/Leu）（配列番号387）でありうる。そのような実施形態では、Aは、FR1、相補性決定領域（CDR）1、FR2、CDR2、FR3、およびCDR3を含む抗体可変ドメインの一部を含む。

【0215】

他の特定の実施形態では、YはFR3中に存在する。たとえば、Yは、GluAspThrAla（配列番号388）、ValTyrTyrCys（配列番号389）、またはGluAspThrAlaValTyrTyrCys（配列番号390）でありうる。そのような実施形態では、Aは、FR1、CDR1、FR2、およびCDR2を含む抗体可変ドメインの一部を含む。

【0216】

他の実施形態では、Yは、前記第1の抗体鎖の定常ドメイン（たとえば、CH1、ヒンジ、CH2、CH3）中および前記第2の抗体鎖の定常ドメイン中に存在する。たとえば、Yは、（Ser/Ala/Gly）Pro（Lys/Asp/Ser）Val（配列番号391）、（Ser/Ala/Gly）Pro（Lys/Asp/Ser）ValPhe（配列番号392）、LysValAspLys（Ser/Arg/Thr）（配列番号393）、またはValThrVal（配列番号394）でありうる。特定の実施形態では、Yは、SerProLysVal（配列番号398）、SerProAspVal（配列番号399）、SerProSerVal（配列番号400）、AlaProLys

10

20

30

40

50

sVal (配列番号401)、AlaProAspVal (配列番号402)、AlaProSerVal (配列番号403)、GlyProLysVal (配列番号404)、GlyProAspVal (配列番号405)、GlyProSerVal (配列番号406)、SerProLysValPhe (配列番号407)、SerProAspValPhe (配列番号408)、SerProSerValPhe (配列番号409)、AlaProLysValPhe (配列番号410)、AlaProAspValPhe (配列番号411)、AlaProSerValPhe (配列番号412)、GlyProLysValPhe (配列番号413)、GlyProAspValPhe (配列番号414)、GlyProSerValPhe (配列番号415)、LysValAspLysSer (配列番号416)、LysValAspLysArg (配列番号417)、LysValAspLysThr (配列番号418)、またはValThrVal (配列番号394)である。

10

【0217】

第1のポリペプチドが第1の抗体鎖でありかつ第2のポリペプチドが第2の抗体鎖である場合、抗体鎖は、同一のもしくは異なる種由来でありうる。たとえば、いくつかの実施形態では、該第1の抗体鎖および該第2の抗体鎖は、両方ともヒト由来である。他の実施形態では、第1の抗体鎖はヒト由来でありかつ第2の抗体鎖は非ヒト由来であるか、または第1の抗体鎖は非ヒト由来でありかつ第2の抗体鎖はヒト由来である。

【0218】

本明細書に記載の方法により調製される組換え融合タンパク質は、本明細書中に提示される式で示される部分構造を含む。本明細書に記載されるように、融合タンパク質は、式で特定される部分に天然の連結部または非天然の連結部を介して直接的もしくは間接的に融合された追加の部分または成分を含みうる。たとえば、所望により、本発明に係る融合タンパク質は、Aのアミノ末端に位置する第3の部分を含みうる。第3の部分は、任意の所望のポリペプチドに由来しうる。特定の実施形態では、Aのアミノ末端に位置する第3の部分は、免疫グロブリン可変ドメイン（たとえば、抗体可変ドメイン）である。

20

【0219】

組換え融合タンパク質は、ハイブリッドドメインを含みうる。ここで、該ハイブリッドドメインは、第1のポリペプチドに由来する第1の部分と、第2のポリペプチドに由来する第2の部分と、該第1のポリペプチド中および該第2のポリペプチド中に存在する保存モチーフとを含む。このタイプの組換え融合タンパク質は、第1のポリペプチド由来の第1のドメインのアミノ酸配列と第2のポリペプチド由来の第2のドメインのアミノ酸配列とを解析して該第1のドメイン中および該第2のドメイン中に存在する保存アミノ酸モチーフを同定することと {ここで、該第1のドメインは式(X1-Y-Z1)を有しかつ該第2のドメインは式(X2-Y-Z2)を有する}、式(X1-Y-Z2)を有するハイブリッドドメインを含む融合タンパク質を調製することを含む方法により調製可能である〔式中、Yは、該保存アミノ酸モチーフであり、

30

X1およびZ1は、それぞれ、該第1のポリペプチド中および該第2のポリペプチド中のYのアミノ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフであり、

X2およびZ2は、それぞれ、該第1のポリペプチド中および該第2のポリペプチド中のYのカルボキシ末端に隣接して位置するアミノ酸モチーフである〕。

40

【0220】

いくつかの実施形態では、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドは、両方とも、同一のタンパク質スーパーファミリー（たとえば、免疫グロブリンスーパーファミリー、TNFスーパーファミリー、およびTNFレセプタースーパーファミリー）のメンバーである。第1および第2のポリペプチドは両方ともヒトポリペプチドでありうるか、または一方はヒトポリペプチドかつ他方は非ヒトポリペプチドでありうる。

【0221】

X1、X2、Z1、およびZ2により表されるアミノ酸の数は、ハイブリッドドメインのサイズおよび親ポリペプチド中におけるドメインのサイズに依存する。一般的には、X

50

1、X2、Z1、およびZ2は、それぞれ独立して、約1～約400、約1～約200、約1～約100、または約1～約50アミノ酸よりなる。同様に、ハイブリッドドメインのサイズは、さまざまな大きさが可能であり、親タンパク質中におけるYを含有するドメインのサイズに依存する。特定の実施形態では、ハイブリッドドメインは、免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン定常ドメインとほぼ等しいサイズである。いくつかの実施形態では、ハイブリッドドメインは、約1kDa～約25kDa、約5kDa～約25kDa、約5kDa～約20kDa、約5kDa～約15kDa、約6kDa、約7kDa、約8kDa、約9kDa、約10kDa、約11kDa、約12kDa、約13kDa、または約14kDaである。

【0222】

いくつかの実施形態では、第1のポリペプチドは、Yを含有する免疫グロブリン可変ドメインを含み、第2のポリペプチドは、Yを含有する免疫グロブリン可変ドメインを含み、かつ(X1-Y-Z2)は、ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインである。たとえば、第1のポリペプチドは、抗体可変ドメインを含みうるし、第2のポリペプチドは、抗体可変ドメインを含みうるし、かつYは、FR1、FR2、FR3、またはFR4のようなフレームワーク領域(FR)中に存在しうる。特定の例では、YはFR4中に存在し、GlyXaaGlyThr(配列番号386)またはGlyXaaGlyThrXaa(Val/Leu)(配列番号387)である。たとえば、Yは、GlyXaaGlyThrXaaVal(配列番号395)またはGlyXaaGlyThrXaaLeu(配列番号396)でありうる。これらの実施形態では、X1は、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、およびCDR3を含む第1のポリペプチドの抗体可変ドメインの一部でありうる。他の例では、Yは、FR3中に存在し、かつGluAspThrAla(配列番号388)、ValTyrTyrCys(配列番号389)、またはGluAspThrAlaValTyrTyrCys(配列番号390)である。これらの実施形態では、X1は、FR1、CDR1、FR2、およびCDR2を含む第1のポリペプチドの抗体可変ドメインの一部でありうる。

【0223】

他の実施形態では、第1のポリペプチドは、Yを含有する免疫グロブリン定常ドメインを含み、第2のポリペプチドは、Yを含有する免疫グロブリン定常ドメインを含み、かつ(X1-Y-Z2)は、ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインである。たとえば、Yは、抗体軽鎖定常ドメイン(たとえば、Ck、Cl)または抗体重鎖定常ドメイン(たとえば、CH1、ヒンジ、CH2、CH3)に位置しうる。たとえば、抗体定常ドメイン中では、Yは、(Ser/Ala/Gly)Pro(Lys/Asp/Ser)Val(配列番号391)、(Ser/Ala/Gly)Pro(Lys/Asp/Ser)ValPhe(配列番号392)、LysValAspLys(Ser/Arg/Thr)(配列番号393)、またはValThrVal(配列番号394)でありうるし、TCR定常ドメイン中では、Yは、ProSerValPhe(配列番号397)でありうる。特定の実施形態では、Yは、抗体定常ドメイン中に存在し、かつSerProLysVal(配列番号398)、SerProAspVal(配列番号399)、SerProSerVal(配列番号400)、AlaProLysVal(配列番号401)、AlaProAspVal(配列番号402)、AlaProSerVal(配列番号403)、GlyProLysVal(配列番号404)、GlyProAspVal(配列番号405)、GlyProSerVal(配列番号406)、SerProLysValPhe(配列番号407)、SerProAspValPhe(配列番号408)、SerProSerValPhe(配列番号409)、AlaProLysValPhe(配列番号410)、AlaProAspValPhe(配列番号411)、AlaProSerValPhe(配列番号412)、GlyProLysValPhe(配列番号413)、GlyProAspValPhe(配列番号414)、GlyProSerValPhe(配列番号415)、LysValAspLysSer(配列番号416)、LysValAspLysArg(配列番号417)、LysValAspLysThr(配列番

10

20

30

40

50

号 4 1 8)、または V a l T h r V a l (配列番号 3 9 4)である。

【0 2 2 4】

いくつかの実施形態では、(X 1 - Y - Z 2)はハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインであり、かつ A は免疫グロブリン可変ドメインである。他の実施形態では、(X 1 - Y - Z 2)はハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインであり、かつ B は免疫グロブリン定常ドメインである。

【0 2 2 5】

いくつかの実施形態では、組換え融合タンパク質は、免疫グロブリン定常ドメインに融合されたハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインを含む。ここで、該ハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインは、第 1 の免疫グロブリン由来の第 1 の免疫グロブリン F R に由来する部分と第 2 の免疫グロブリン由来の第 2 の免疫グロブリン F R に由来する部分とを含むハイブリッドフレームワーク領域 (F R) を含む。このタイプの組換え融合タンパク質は、第 1 の免疫グロブリン由来の第 1 の免疫グロブリン F R のアミノ酸配列と第 2 の免疫グロブリン由来の第 2 の免疫グロブリン F R のアミノ酸配列とを解析して該第 1 の免疫グロブリン F R 中および該第 2 の免疫グロブリン F R 中に存在する保存アミノ酸モチーフを同定することと、式

$$(F^1 - Y - F^2)$$

〔式中、

Y は、該保存アミノ酸モチーフであり、

F¹ は、該第 1 の免疫グロブリン F R 中の Y のアミノ末端に隣接して位置するアミノ酸配列であり、そして

F² は、該第 2 の免疫グロブリン F R 中の Y のカルボキシ末端に隣接して位置するアミノ酸配列である〕

を有するハイブリッド免疫グロブリン F R を含む融合タンパク質を調製することを含む方法により調製可能である。

【0 2 2 6】

ハイブリッド F R は、ハイブリッド F R 1、ハイブリッド F R 2、ハイブリッド F R 3、またはハイブリッド F R 4 でありうる。一例では、第 1 の免疫グロブリンは、抗体重鎖であり、第 2 の免疫グロブリンは、抗体軽鎖であり、F¹ は、抗体重鎖可変領域の F R 1、F R 2、F R 3、または F R 4 に由来し、かつ F² は、抗体軽鎖可変領域の対応する F R に由来する。他の例では、第 1 の免疫グロブリンは、抗体軽鎖であり、第 2 の免疫グロブリンは、抗体重鎖であり、F¹ は、抗体軽鎖可変領域の F R 1、F R 2、F R 3、または F R 4 に由来し、かつ F² は、抗体重鎖可変領域の対応する F R に由来する。

【0 2 2 7】

いくつかの実施形態では、第 2 の免疫グロブリンは、F R 4 中の Y および F² を含有する可変ドメインと、定常ドメインとを含む。たとえば、第 2 のポリペプチドは、Y および F² が T C R F R 4 中に存在する T C R 鎖でありうる。この例では、組換え融合タンパク質は、T C R 定常ドメインのアミノ末端に結合されたハイブリッド免疫グロブリンドメインを含有する。同様に、第 2 のポリペプチドは、Y および F² が F R 4 中に存在する抗体軽鎖でありうるし、かつ組換え融合タンパク質は、抗体軽鎖定常ドメインのアミノ末端に結合されたハイブリッド免疫グロブリンドメインを含有する。特定の実施形態では、第 2 のポリペプチドは κ または λ 軽鎖であり、F² は V κ または V λ F R 4 に由来し、かつハイブリッド免疫グロブリンドメインは C κ または C λ のアミノ末端にそれぞれ結合される。第 2 のポリペプチドが抗体重鎖でありかつ F² が抗体重鎖可変ドメイン F R 4 に由来する場合、ハイブリッド免疫グロブリンドメインは、抗体重鎖定常ドメインのアミノ末端に結合可能である。特定の実施形態では、第 2 のポリペプチドは抗体重鎖であり、F² は抗体重鎖可変ドメイン F R 4 (たとえば、V_H F R 4、V_{H H} F R 4) に由来し、かつハイブリッド免疫グロブリンドメインは C H 1 のアミノ末端に結合される。

【0 2 2 8】

特定の実施形態では、Y は、F R 4 中に存在し、かつ G l y X a a G l y T h r (配列

番号386)またはGlyXaaGlyThrXaa(Val/Leu)(配列番号387)である。たとえば、第1の免疫グロブリンは、F¹がPheでありかつYがGlyXaaGlyThr(配列番号386)であるFR4を含む抗体軽鎖可変ドメインを含みうるし、かつ第2の免疫グロブリンは、YがGlyXaaGlyThr(配列番号386)でありかつF²が(Leu/Met/Thr)ValThrValSerSer(配列番号420)であるFR4ドメインを含む抗体重鎖可変を含みうる。特定の実施形態では、F²は、LeuValThrValSerSer(配列番号421)、MetValThrValSerSer(配列番号422)、またはThrValThrValSerSer(配列番号423)でありうる。

【0229】

他の例では、第1の免疫グロブリンは、F¹がPheでありかつYがGlyXaaGlyThrXaa(Val/Leu)(配列番号387)であるFR4を含む抗体軽鎖可変ドメインを含み、かつ第2の免疫グロブリンは、YがGlyXaaGlyThrXaa(Val/Leu)(配列番号387)でありかつF²がThrValSerSer(配列番号419)であるFR4を含む抗体重鎖可変ドメインを含む。特定の実施形態では、Yは、GlyXaaGlyThrXaaVal(配列番号395)またはGlyXaaGlyThrXaaLeu(配列番号396)である。好ましくは、これらのタイプのハイブリッド抗体可変ドメインのカルボキシ末端は、IgG(たとえば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)定常ドメインのような抗体重鎖定常ドメインに直接結合される。好ましくは、抗体重鎖定常ドメインは、ヒト抗体重鎖定常ドメインである。特定の実施形態では、ハイブリッド抗体可変ドメインのカルボキシ末端は、IgGCH1またはIgGCH2(たとえば、IgG1CH1、IgG4CH1、IgG1CH2、IgG4CH2)に直接結合される。

【0230】

他の実施形態では、第1の免疫グロブリンは、XがTrpでありかつYがGlyXaaGlyThr(配列番号386)であるFR4を含む抗体重鎖可変ドメインを含み、かつ第2の免疫グロブリンは、YがGlyXaaGlyThr(配列番号386)でありかつF²が(Lys/Arg)(Val/Leu)(Glu/Asp)IleLys(配列番号424)または(Lys/Gln/Glu)(Val/Leu)(Thr/Ile)(Val/Ile)Leu(配列番号425)であるFR4を含む抗体軽鎖可変ドメインを含む。特定の実施形態では、F²は、LysValGluIleLys(配列番号426)、LysValAspIleLys(配列番号427)、LysLeuGluIleLys(配列番号428)、LysLeuAspIleLys(配列番号429)、ArgValGluIleLys(配列番号430)、ArgValAspIleLys(配列番号431)、ArgLeuGluIleLys(配列番号432)、ArgLeuAspIleLys(配列番号433)、LysValThrValLeu(配列番号434)、LysValThrIleLeu(配列番号435)、LysValIleValLeu(配列番号436)、LysValIleIleLeu(配列番号437)、LysLeuThrValLeu(配列番号438)、LysLeuThrIleLeu(配列番号439)、LysLeuIleValLeu(配列番号440)、LysLeuIleIleLeu(配列番号441)、GlnValThrValLeu(配列番号442)、GlnValThrIleLeu(配列番号443)、GlnValIleValLeu(配列番号444)、GlnValIleIleLeu(配列番号445)、GlnLeuThrValLeu(配列番号446)、GlnLeuThrIleLeu(配列番号447)、GlnLeuIleValLeu(配列番号448)、GlnLeuIleIleLeu(配列番号449)、GluValThrValLeu(配列番号450)、GluValThrIleLeu(配列番号451)、GluValIleValLeu(配列番号452)、GluValIleIleLeu(配列番号453)、GluLeuThrValLeu(配列番号454)、GluLeuThrIleLeu(配列番号455)、GluLeuIleValLeu(配列番号456)、またはGluLe

10

20

30

40

50

u I l l e I l l e L e u (配列番号457)である。

【0231】

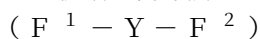
他の例では、第1の免疫グロブリンは、 F^1 がTrpでありかつYがGlyXaaGlyThrXaaVal(配列番号395)であるFR4を含む抗体重鎖可変ドメインを含み、かつ第2の免疫グロブリンは、YがGlyXaaGlyThrXaaVal(配列番号395)でありかつ F^2 が(Glu/Asp)IleLys(配列番号458)または(Thr/Ile)(Val/Ile)Leu(配列番号459)であるFR4を含む抗体軽鎖可変ドメインを含む。特定の実施形態では、 F^2 は、GluIleLys(配列番号460)、AspIleLys(配列番号461)、ThrValLeu(配列番号462)、ThrIleLeu(配列番号463)、IleValLeu(配列番号464) 10、またはIleIleLeu(配列番号465)である。好ましくは、これらのタイプのハイブリッド抗体可変ドメインのカルボキシ末端は、C κ またはC λ のような抗体軽鎖定常ドメインに直接結合される。好ましくは、抗体軽鎖定常ドメインは、ヒト抗体軽鎖定常ドメインである。

【0232】

特定の実施形態では、この方法により生成される融合タンパク質は、免疫グロブリン定常ドメインに融合されたハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインを含み、式($F^1 - Y - F^2$) - C κ 、($F^1 - Y - F^2$) - C λ 、($F^1 - Y - F^2$) - CH1、($F^1 - Y - F^2$) - CH2、または($F^1 - Y - F^2$) - Fcを有する部分構造を含む。特定の実施形態では、この方法により生成される融合タンパク質は、免疫グロブリン定常ドメイン 20に融合されたハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインを含み、第2の免疫グロブリン可変ドメイン(たとえば、抗体可変ドメイン)をさらに含む。好ましくは、第2の免疫グロブリン可変ドメインは、融合タンパク質中のハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインのアミノ末端に存在する。

【0233】

特定の実施形態では、組換え融合タンパク質は、ヒト抗体定常ドメインに直接融合された非ヒト抗体可変領域を含む。ここで、非ヒト抗体可変領域は、式



[式中、

F^1 は、PheまたはTrpであり、

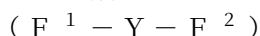
Yは、GlyXaaGlyThr(配列番号386)であり、かつ F^2 は、(Leu/Met/Thr)ValThrValSerSer(配列番号420)、(Lys/Arg)(Val/Leu)(Glu/Asp)IleLys(配列番号424)、もしくは(Lys/Gln/Glu)(Val/Leu)(Thr/Ile)(Val/Ile)Leu(配列番号425)であるか、または

Yは、GlyXaaGlyThrXaa(Val/Leu)(配列番号387)であり、かつ F^2 は、ThrValSerSer(配列番号419)、(Glu/Asp)IleLys(配列番号458)、もしくは(Thr/Ile)(Val/Ile)Leu(配列番号459)である]

を有するハイブリッドFR4を含む。

【0234】

このタイプの組換え融合タンパク質は、非ヒト抗体可変領域を含む第1のポリペプチドのアミノ酸配列とヒト抗体可変ドメインを含む第2のポリペプチドのアミノ酸配列とを解析して該非ヒト抗体可変ドメインのFR4中および該ヒト抗体可変ドメインのFR4中の保存アミノ酸モチーフYを同定することと、式



[式中、

F^1 は、PheまたはTrpであり、

Yは、GlyXaaGlyThr(配列番号386)であり、かつ F^2 は、(Leu/Met/Thr)ValThrValSerSer(配列番号420)、(Lys/Arg 50

g) (Val/Leu) (Glu/Asp) IleLys (配列番号424)、もしくは (Lys/Gln/Glu) (Val/Leu) (Thr/Ile) (Val/Ile) Leu (配列番号425) であるか、または

Yは、GlyXaaGlyThrXaa (Val/Leu) (配列番号387) であり、かつF²は、ThrValSerSer (配列番号419)、(Glu/Asp) IleLys (配列番号458)、もしくは (Thr/Ile) (Val/Ile) Leu (配列番号459) である]

を有するハイブリッドFR4を含む融合タンパク質を調製することを含む方法により調製可能である。

【0235】

非ヒト抗体可変領域は、任意の所望の種、たとえば、マウス、ニワトリ、ブタ、トラフグ、カエル、ウシ (たとえば、ボス・タウラス (Bos taurus))、ラット、サメ (たとえば、オオメジロザメ、メジロザメ、ナースシャーク、ネコザメ、クモハダオオセ)、ガンギエイ (たとえば、クリアノーズスケート (clearnose skate)、リトルスケート)、サカナ (たとえば、タイセイヨウサケ、アメリカナマズ、カライワシ、スポッテッドラットフィッシュ、タイセイヨウタラ、ケツギョ、ニジマス、スポッテッドウルフフィッシュ、ゼブラフィッシュ)、オポッサム、ヒツジ、ラクダ科動物 (たとえば、ラマ、グアナコ、アルパカ、ビクーナ、ヒトコブラクダ、フタコブラクダ)、ウサギ、非ヒト霊長動物 (たとえば、シンセカイザル、キュウセカイザル、カニクイザル (マカカ・ファスシクラリス (Macaca fascicularis)))、キヌザル科 (Callithricidae) (たとえば、マーモセット))、または任意の他の所望の非ヒト種に由来しうる。特定の実施形態では、非ヒト可変領域は、マウス可変領域、ラクダ科動物可変領域、またはナースシャーク可変領域である。第2のポリペプチドは、ヒト重鎖もしくは軽鎖可変ドメインを含みうる。

【0236】

特定の例では、非ヒト抗体可変ドメインは、F¹がPheまたはTrpでありかつYがGlyXaaGlyThr (配列番号368) であるFR4を含む軽鎖可変ドメインまたは重鎖可変ドメインであり、しかも第2のポリペプチドは、F²が (Lys/Arg) (Val/Leu) (Glu/Asp) IleLys (配列番号424) または (Lys/Gln/Glu) (Val/Leu) (Thr/Ile) (Val/Ile) Leu (配列番号425) であるFR4を含むヒト抗体軽鎖可変ドメインを含む。好ましくは、ハイブリッドFR4を含有するこのタイプの非ヒト可変ドメインのカルボキシ末端は、ヒト抗体軽鎖定常ドメイン、たとえば、CκまたはCλに直接結合される。他の例では、非ヒト抗体可変ドメインは、F¹がPheまたはTrpでありかつYがGlyXaaGlyThr (配列番号386) であるFR4を含む軽鎖可変ドメインまたは重鎖可変ドメインであり、しかも第2のポリペプチドは、F²が (Leu/Met/Thr) ValThrValSerSer (配列番号420) であるFR4を含むヒト抗体軽鎖可変ドメインを含む。好ましくは、ハイブリッドFR4を含有するこのタイプの非ヒト可変ドメインのカルボキシ末端は、ヒト抗体重鎖定常ドメインに直接結合される。好ましくは、抗体重鎖定常ドメインは、ヒト抗体重鎖定常ドメイン、たとえば、IgG (たとえば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) 定常ドメインである。特定の実施形態では、ヒト抗体重鎖定常ドメインは、IgG CH1またはIgG CH2 (たとえば、IgG1 CH1、IgG4 CH1、IgG1 CH2、IgG4 CH2) である。

【0237】

特定の例では、非ヒト抗体可変ドメインは、F¹がPheまたはTrpでありかつYがGlyXaaGlyThrXaa (Val/Leu) (配列番号387) であるFR4を含む軽鎖可変ドメインまたは重鎖可変ドメインであり、しかも第2のポリペプチドは、F²が (Glu/Asp) IleLys (配列番号458) または (Thr/Ile) (Val/Ile) Leu (配列番号459) であるFR4を含むヒト抗体軽鎖可変ドメインを含む。好ましくは、ハイブリッドFR4を含有するこのタイプの非ヒト可変ドメインのカルボキシ末端は、ヒト抗体軽鎖定常ドメイン、たとえば、CκまたはCλに直接結合さ

10

20

30

40

50

れる。他の例では、非ヒト抗体可変ドメインは、 F^1 がPheまたはTrpでありかつYがGlyXaaGlyThrXaa (Val/Leu) (配列番号387)であるFR4を含む軽鎖可変ドメインまたは重鎖可変ドメインであり、しかも第2のポリペプチドは、 F^2 がThrValSerSer (配列番号419)であるFR4を含むヒト抗体軽鎖可変ドメインを含む。好ましくは、ハイブリッドFR4を含有するこのタイプの非ヒト可変ドメインのカルボキシ末端は、ヒト抗体重鎖定常ドメインに直接結合される。好ましくは、抗体重鎖定常ドメインは、ヒト抗体重鎖定常ドメイン、たとえば、IgG (たとえば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) 定常ドメインである。特定の実施形態では、ヒト抗体重鎖定常ドメインは、IgG CH1またはIgG CH2 (たとえば、IgG1 CH1、IgG4 CH1、IgG1 CH2、IgG4 CH2) である。

10

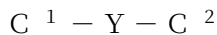
【0238】

特定の実施形態では、この方法により生成される融合タンパク質は、免疫グロブリン定常ドメインに融合されたハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインを含み、式($F^1 - Y - F^2$) - C κ 、($F^1 - Y - F^2$) - C λ 、($F^1 - Y - F^2$) - CH1、($F^1 - Y - F^2$) - CH2、または($F^1 - Y - F^2$) - Fcを有する部分構造を含む。特定の実施形態では、この方法により生成される融合タンパク質は、免疫グロブリン定常ドメインに融合されたハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインを含み、第2の免疫グロブリン可変ドメイン (たとえば、抗体可変ドメイン) をさらに含む。好ましくは、第2の免疫グロブリン可変ドメインは、融合タンパク質中のハイブリッド免疫グロブリン可変ドメインのアミノ末端に存在する。

20

【0239】

いくつかの実施形態では、組換え融合タンパク質は、ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインに融合された免疫グロブリン可変ドメインを含む。ここで、該ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインは、第1の免疫グロブリン定常ドメイン由来の部分と第2の免疫グロブリン定常ドメイン由来の部分とを含む。このタイプの組換え融合タンパク質は、第1の免疫グロブリン定常ドメインおよび第2の免疫グロブリン定常ドメインのアミノ酸配列を解析して該第1の免疫グロブリン定常ドメイン中および該第2の免疫グロブリン定常ドメイン中に存在する保存アミノ酸モチーフを同定することと、式



〔式中、

30

Yは、該保存アミノ酸モチーフであり、

C¹は、該第1の免疫グロブリン定常ドメイン中のYのアミノ末端に隣接するアミノ酸配列であり、そしてC²は、該第2の免疫グロブリン定常ドメイン中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である〕

を有するハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインを含む融合タンパク質を調製することを含む方法により調製可能である。ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインは、保存アミノ酸モチーフを含有する任意の2つの免疫グロブリン定常ドメイン由来の部分を含む。特定の実施形態では、ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインは、第1の抗体定常ドメイン由来の部分と第2の抗体定常ドメイン由来の部分とを含むハイブリッド抗体定常ドメインである。たとえば、ハイブリッド抗体定常ドメインは、ハイブリッドCH1、ハイブリッドヒンジ、ハイブリッドCH2、またはハイブリッドCH3でありうる。ここで、ハイブリッドドメインの部分は、異なる種 (たとえば、ヒトおよびラクダ科動物やナースシャークのような非ヒト) 由来または異なるアイソタイプ (たとえば、IgA、IgD、IgM、IgE、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)) 由来の抗体定常ドメインに由来する。ハイブリッド免疫グロブリン定常ドメインはまた、CH1ドメイン由来の部分およびCH2ドメイン由来の部分のような2つの異なる定常ドメインに由来するかまたは異なるアイソタイプ (たとえば、IgG1およびIgG4) の定常ドメインに由来する部分を含む。うる。

40

【0240】

いくつかの実施形態では、本方法は、異なる種に由来する第1の免疫グロブリン定常ド

50

メインおよび第2の免疫グロブリン定常ドメインの配列を解析することを含む。たとえば、第1の免疫グロブリン定常ドメインは、非ヒト抗体定常ドメイン（たとえば、ラクダ科動物またはナースシャークの定常ドメイン）でありうるし、かつ第2の免疫グロブリン定常ドメインは、ヒト抗体定常ドメインである。特定の実施形態では、第1の免疫グロブリン定常ドメインは、ラクダ科動物抗体定常ドメイン（たとえば、ラクダ科動物CH1）である。そのような実施形態では、ラクダ科動物VHHは、融合タンパク質中のハイブリッド定常ドメインのアミノ末端に位置しうる。たとえば、VHHのカルボキシ末端は、C¹に結合可能である。

【0241】

他の実施形態では、本方法は、第1の免疫グロブリン定常ドメインおよび第2の免疫グロブリン定常ドメインまたは異なるアイソタイプの抗体定常ドメインの配列を解析することを含む。第2の抗体定常ドメインは、好ましくは、IgG定常ドメイン（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）である。

【0242】

特定の実施形態では、融合タンパク質は、C¹に直接結合された抗体可変ドメインを含む。そのような実施形態では、第1の免疫グロブリン定常ドメインは、天然に存在する抗体中の可変ドメインに結合された抗体定常ドメインでありうる。そのような定常ドメインは、可変ドメインに対応する。たとえば、可変ドメインがV κ またはV λ である場合、第1の免疫グロブリン定常ドメインは、それぞれ、C κ またはC λ に対応しうる。同様に、可変ドメインが抗体重鎖可変ドメインである場合、第1の免疫グロブリン可変ドメインは、対応するCH1ドメインでありうる。

【0243】

いくつかの実施形態では、本方法は、抗体軽鎖定常ドメインである第1の免疫グロブリン定常ドメインのアミノ酸配列と、抗体重鎖定常ドメイン、好ましくはヒト抗体重鎖定常ドメインである第2の免疫グロブリン定常ドメインのアミノ酸配列とを解析することを含む。いくつかの実施形態では、ヒト抗体重鎖定常ドメインは、CH1、ヒンジ、CH2、またはCH3ドメインである。好ましくは、ヒト抗体重鎖定常ドメインは、IgG（たとえば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）定常ドメイン、たとえば、IgG1 CH1、IgG4 CH1、IgG1ヒンジ、IgG4ヒンジ、IgG1 CH2、IgG4 CH2、IgG1 CH3、IgG4 CH3である。

【0244】

他の実施形態では、融合タンパク質は、抗体重鎖可変ドメインを含み、かつ本方法は、CH1ドメインである第1の免疫グロブリン定常ドメインのアミノ酸配列を解析することを含む。そのような実施形態では、第2の免疫グロブリン定常ドメインは、異なるアイソタイプもしくは種に由来する抗体CH1ドメインまたは異なる抗体定常ドメイン（たとえば、CH2）でありうる。特定の実施形態では、第2の免疫グロブリン定常ドメインは、抗体軽鎖定常ドメインである。

【0245】

いくつかの実施形態では、本方法は、選択された保存アミノ酸モチーフ（Y）（Ser／Ala／Gly）Pro（Lys／Asp／Ser）Val（配列番号391）、（Ser／Ala／Gly）Pro（Lys／Asp／Ser）Val Phe（配列番号392）、Lys Val Asp Lys（Ser／Arg／Thr）（配列番号393）、またはVal Thr Val（配列番号394）を両方とも含有する第1の抗体定常ドメインおよび第2の抗体定常ドメインのアミノ酸配列を解析することを含む。たとえば、特定の実施形態では、Yは、Ser Pro Lys Val（配列番号398）、Ser Pro Asp Val（配列番号399）、Ser Pro Ser Val（配列番号400）、Ala Pro Lys Val（配列番号401）、Ala Pro Asp Val（配列番号402）、Ala Pro Ser Val（配列番号403）、Gly Pro Lys Val（配列番号404）、Gly Pro Asp Val（配列番号405）、Gly Pro Ser Val（配列番号406）、Ser Pro Lys Val Phe（配列番号407）、Ser Pro As

pValPhe（配列番号408）、SerProSerValPhe（配列番号409）、AlaProLysValPhe（配列番号410）、AlaProAspValPhe（配列番号411）、AlaProSerValPhe（配列番号412）、GlyProLysValPhe（配列番号413）、GlyProAspValPhe（配列番号414）、GlyProSerValPhe（配列番号415）、LysValAspLysSer（配列番号416）、LysValAspLysArg（配列番号417）、LysValAspLysThr（配列番号418）、またはValThrVal（配列番号394）である。好ましくは、第2の抗体定常ドメインは、ヒト抗体定常ドメインであり、かつC²は、該ヒト抗体定常ドメインに由来する。たとえば、ヒト抗体定常ドメインは、ヒトC κ 、ヒトC λ 、またはヒト重鎖定常ドメイン、たとえば、ヒトCH1、ヒトヒンジ、ヒトCH2、またはヒトCH3でありうる。特定の好ましい実施形態では、ヒト抗体定常ドメインは、IgG CH1（たとえば、IgG1 CH1、IgG4 CH1）、IgGヒンジ（たとえば、IgG1ヒンジ、IgG4ヒンジ）、IgG CH2（たとえば、IgG1 CH2、IgG4 CH2）、またはIgG CH3（たとえば、IgG1 CH3もしくはIgG4 CH3）であり、かつZ'は、該ヒト抗体定常ドメインに由来する。

10

【0246】

いくつかの融合タンパク質は、ハイブリッド抗体CH1ドメインに融合された抗体軽鎖可変ドメイン、たとえば、ヒト軽鎖可変ドメインを含む。ここで、C¹は、GlnProLysAla（配列番号466）またはThrValAla（配列番号467）であり、かつYは、（Ala/Gly）ProSerVal（配列番号468）である。これらの実施形態では、C²は、IgG CH1、たとえば、ヒトIgG CH1（たとえば、IgG1 CH1、IgG4 CH1）中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である。このタイプの融合タンパク質は、C κ またはC λ ドメインのアミノ酸配列およびCH1ドメインのアミノ酸配列を提供して本明細書に記載の方法を用いて調製可能である。

20

【0247】

いくつかの融合タンパク質は、ハイブリッド抗体CH2ドメインに融合された抗体軽鎖可変ドメイン、たとえば、ヒト軽鎖可変ドメインを含む。ここで、C¹は、GlnProLysAla（配列番号466）またはThrValAla（配列番号467）であり、かつYは、（Ala/Gly）ProSerVal（配列番号468）である。そのような融合タンパク質では、C²は、ヒトIgG CH2（たとえば、IgG1 CH2、IgG4 CH2）のようなCH2中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である。このタイプの融合タンパク質は、C κ またはC λ ドメインのアミノ酸配列およびCH2ドメインのアミノ酸配列を提供して本明細書に記載の方法を用いて調製可能である。

30

【0248】

いくつかの融合タンパク質は、ハイブリッド抗体CH2ドメインに融合された抗体重鎖可変ドメイン、たとえば、ヒト重鎖可変ドメインを含む。ここで、C¹は、SerThrLys（配列番号469）であり、かつYは、（Ala/Gly）ProSerValPhe（配列番号470）である。これらの実施形態では、C²は、ヒトIgG CH2（たとえば、IgG1 CH2、IgG4 CH2）のようなIgG CH2中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である。このタイプの融合タンパク質は、CH1ドメインのアミノ酸配列およびCH2ドメインのアミノ酸配列を提供して本明細書に記載の方法を用いて調製可能である。

40

【0249】

いくつかの融合タンパク質は、ハイブリッド抗体C κ ドメインに融合された抗体軽鎖可変ドメイン、たとえば、ヒト λ 軽鎖可変ドメインを含む。ここで、C¹は、GlnProLysAla（配列番号466）であり、かつYは、（Ala/Gly）ProSerVal（配列番号468）である。これらの実施形態では、Z'は、ヒトC κ のようなC κ 中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である。このタイプの融合タンパク質は、C λ ドメインのアミノ酸配列およびC κ ドメインのアミノ酸配列を提供して本明細書に

50

記載の方法を用いて調製可能である。

【0250】

いくつかの融合タンパク質は、ハイブリッド抗体C κ ドメインに融合された抗体重鎖可変ドメイン、たとえば、ヒト重鎖可変ドメインを含む。ここで、C¹は、SerThrLys（配列番号469）であり、かつYは、(Ala/Gly)ProSerValPhe（配列番号470）である。これらの実施形態では、C²は、ヒトC κ のようなC κ 中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である。このタイプの融合タンパク質は、CH1ドメインのアミノ酸配列およびC κ ドメインのアミノ酸配列を提供して本明細書に記載の方法を用いて調製可能である。

【0251】

いくつかの融合タンパク質は、ハイブリッド抗体C λ ドメインに融合された抗体軽鎖可変ドメイン、たとえば、ヒト κ 鎖可変ドメインを含む。ここで、C¹は、ThrValAla（配列番号467）であり、かつYは、(Ala/Gly)ProSerVal（配列番号468）である。これらの実施形態では、C²は、ヒトC λ のようなC λ 中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である。このタイプの融合タンパク質は、C κ ドメインのアミノ酸配列およびC λ ドメインのアミノ酸配列を提供して本明細書に記載の方法を用いて調製可能である。

【0252】

いくつかの融合タンパク質は、ハイブリッド抗体C λ ドメインに融合された抗体重鎖可変ドメイン、たとえば、ヒト重鎖可変ドメインを含む。ここで、C¹は、SerThrLys（配列番号469）であり、かつYは、(Ala/Gly)ProSerVal（配列番号468）である。これらの実施形態では、C²は、ヒトC λ のようなC λ 中のYのカルボキシ末端に隣接するアミノ酸配列である。このタイプの融合タンパク質は、CH1ドメインのアミノ酸配列およびC λ ドメインのアミノ酸配列を提供して本明細書に記載の方法を用いて調製可能である。

本発明に係る融合タンパク質は、任意の好適な方法を用いて生成可能である。たとえば、融合タンパク質をコードする核酸の発現または化学合成により。発現の場合、任意の好適な方法を用いて、融合タンパク質をコードする核酸を発現させることが可能である（たとえば、*in vitro*発現、*in vivo*発現）。たとえば、本発明に係る融合タンパク質をコードする核酸を好適な発現ベクター中に挿入することが可能である。次に、得られた構築物を発現に好適な宿主細胞中に導入する。発現の後、任意の好適な方法を用いて、細胞溶解物から、好ましくは培地またはペリプラズムから、融合タンパク質を単離または精製することが可能である。（たとえば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. et al., eds., Vol. 2, Suppl. 26, pp. 16.4.1-16.7.8 (1991)を参照されたい）。

【0253】

好適な発現ベクターは、いくつかの成分、たとえば、複製起点、選択性マーカー遺伝子、1つ以上の発現制御エレメント、たとえば、転写制御エレメント（たとえば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター）および／または1つ以上の翻訳シグナル、シグナル配列またはリーダー配列などを含有しうる。好適な発現ベクターとしては、たとえば、pTT (National Research Council Canada)、pcDNA3.1 (Invitrogen)、pIRES (Clontech)、pEAK8 (EdgeBioSystems)、pCEP4 (invitrogen) が挙げられる。発現制御エレメントおよびシグナル配列は、存在する場合、ベクターまたは他の供給元により提供可能である。たとえば、抗体鎖をコードするクローン化核酸の転写および／または翻訳制御配列を用いて、発現を指令することが可能である。

【0254】

プロモーターは、所望の宿主細胞中で発現を行うべく提供可能である。プロモーターは、構成性または誘導性でありうる。たとえば、核酸の転写を指令するように、本発明に係る融合タンパク質をコードする核酸にプロモーターを機能しうる形で連結することが可能である。原核宿主用のさまざまな好適なプロモーター（たとえば、E. コリ (E. coli)

10

20

30

40

50

用の *l a c*、*t a c*、T 3、T 7 プロモーター) および真核宿主用のさまざまな好適なプロモーター (たとえば、シミアンウイルス 40 初期もしくは後期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス長末端反復プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター) が利用可能である。

【0255】

そのほかに、発現ベクターは、典型的には、ベクターを保有する宿主細胞を選択するための選択性マーカーと、複製可能な発現ベクターの場合、複製起点とを含む。抗生物質耐性または薬剤耐性を付与する産物をコードする遺伝子は、一般的な選択性マーカーであり、原核細胞中 (たとえば、ラクタマーゼ遺伝子 (アンピシリン耐性)、テトラサイクリン耐性の *T e t* 遺伝子) および真核細胞中 (たとえば、ネオマイシン (G 4 1 8 もしくはゲネチシン) 耐性、*g p t* (ミコフェノール酸) 耐性、アンピシリン耐性、またはハイグロマイシン耐性の遺伝子) で使用可能である。ジヒドロ葉酸レダクターゼマーカー遺伝子は、さまざまな宿主におけるメトトレキセートによる選択を可能にする。宿主の栄養要求性マーカー (たとえば、L E U 2、U R A 3、H I S 3) の遺伝子産物をコードする遺伝子は、多くの場合、酵母における選択性マーカーとして使用される。ウイルス (たとえば、バキュロウイルス) ベクターまたはファージベクターおよび宿主細胞のゲノム中に組み込みうるベクター、たとえば、レトロウイルスベクターの使用も考えられる。哺乳動物細胞および原核細胞 (*E. コリ* (*E. coli*))、昆虫細胞 (ショウジョウバエ *S c h n e i d e r S 2* 細胞、*S f 9*)、ならびに酵母 (*P. メタノリカ* (*P. methanolica*)、*P. パストリス* (*P. pastoris*)、*S. セレビシアエ* (*S.cerevisiae*)) における発現に好適な発現ベクターは、当技術分野で周知である。

【0256】

本発明に係る融合タンパク質を発現する組換え宿主細胞および本明細書に記載される融合タンパク質の調製方法を提供する。組換え宿主細胞は、組換え融合タンパク質をコードする組換え核酸を含む。組換え融合タンパク質は、好適な宿主細胞におけるタンパク質をコードする組換え核酸の発現によりまたは他の好適な方法を用いて生成可能である。たとえば、本明細書に記載の発現構築物を好適な宿主細胞中に導入することが可能であり、得られた細胞を構築物の発現に好適な条件下で維持することが可能である (たとえば、培養下、動物中)。好適な宿主細胞は、原核細胞、たとえば、細菌細胞、たとえば、*E. コリ* (*E. coli*)、*B. スブティリス* (*B. subtilis*)、およびまたは他の好適な細菌の細胞、真核細胞、たとえば、菌類細胞もしくは酵母細胞 (たとえば、*ピキア・パストリス* (*Pichia pastoris*)、*アスペルギルス属* (*Aspergillus*) の種、*サッカロミセス・セレビシアエ* (*Saccharomyces cerevisiae*)、*シゾサッカロマイセス・ポンベ* (*Schizosaccharomyces pombe*)、*ニューロスボラ・クラッサ* (*Neurospora crassa*) の細胞)、または他の下等真核細胞、ならびに高等真核生物の細胞、たとえば、昆虫由来の細胞 (たとえば、*S f 9* 昆虫細胞 (WO 94/26087 (O' Connor))) または哺乳動物由来の細胞 (たとえば、*C O S* 細胞、たとえば、*C O S* - 1 細胞 (A T C C 寄託番号 C R L - 1 6 5 0) および *C O S* - 7 細胞 (A T C C 寄託番号 C R L - 1 6 5 1)、*C H O* 細胞 (たとえば、A T C C 寄託番号 C R L - 9 0 9 6)、2 9 3 細胞 (A T C C 寄託番号 C R L - 1 5 7 3)、*H e L a* 細胞 (A T C C 寄託番号 C C L - 2)、*C V 1* 細胞 (A T C C 寄託番号 C C L - 7 0)、*W O P* 細胞 (Dailey et al., J. Virol. 54:739-749 (1985))、3 T 3 細胞、2 9 3 T 細胞 (Pear et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:8392-8396 (1993))、2 9 3 - 6 E 細胞 (National Research Council Canada)、*N S O* 細胞、*S P 2 / 0* 細胞、*H u T 7* 8 細胞など) でありうる (たとえば、Ausubel, F.M. et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., (1993) を参照されたい)。

【0257】

本発明はまた、組換え融合タンパク質の発現に適合する条件下で本発明に係る組換え宿主細胞を維持することを含む組換え融合タンパク質の産生方法を包含する。本方法は、所望により、組換え融合タンパク質を単離または回収する工程をさらに含む。他の実施

形態では、組換え融合タンパク質の成分は、連続ポリペプチド鎖を形成するように化学的に集合される。

【0258】

本発明はまた、本明細書に記載の新規な融合タンパク質をコードする単離された組換え核酸と、本明細書に記載の新規な融合タンパク質をコードする組換え核酸を含有する組換えベクター（たとえば、発現ベクター）とを提供する。本発明はまた、そのような核酸または組換えベクターを含有する単離された宿主細胞（たとえば、非ヒト宿主細胞）に関する。

【0259】

本発明はまた、本明細書に記載の新規な融合タンパク質をコードする組換え核酸かまたは本明細書に記載の新規な融合タンパク質をコードする組換え核酸を含有する組換えベクター（たとえば、発現ベクター）かを含有する宿主細胞（たとえば、非ヒト宿主細胞）を発現に好適な条件下で維持することにより組換え融合タンパク質を産生することを含む、本発明に係る組換え融合タンパク質の産生方法に関する。いくつかの実施形態では、本方法は、組換え融合タンパク質を（たとえば、宿主細胞からまたは宿主細胞が保持される培地から）単離することをさらに含む。

【0260】

組成物ならびに治療法および診断法

本発明に係る融合タンパク質を含む組成物、たとえば、医薬組成物または生理学的組成物（たとえば、ヒト投与および／または動物投与のための組成物）を提供する。医薬組成物または生理学的組成物は、1種以上の融合タンパク質と製薬上もしくは生理学上許容される担体とを含む。典型的には、こうした担体としては、水性もしくはアルコール性／水性の溶液、エマルジョンまたはサスペンション、たとえば、生理食塩水および／または緩衝化媒体が挙げられる。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース＋塩化ナトリウム、および乳酸加リンゲルが挙げられる。ポリペプチド複合体を懸濁状態に保持することが必要な場合に好適な生理学的に許容されるアジュバントは、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、およびアルギネートのような増粘剤から選択可能である。静脈内ビヒクルとしては、体液および栄養素の補充液ならびに電解質の補充液、たとえば、リンゲルデキストロースをベースとする補充液が挙げられる。保存剤および他の添加剤、たとえば、抗微生物剤、抗酸化剤、キレート化剤、および不活性ガスもまた、存在させてもよい（Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition）。

【0261】

組成物は、所望の量の融合タンパク質を含みうる。たとえば、組成物は、約5重量％～約99重量％の融合タンパク質を含みうる。特定の実施形態では、組成物は、約10重量％～約99重量％または約20重量％～約99重量％または約30重量％～約99重量％または約40重量％～約99重量％または約50重量％～約99重量％または約60重量％～約99重量％または約70重量％～約99重量％または約80重量％～約99重量％または約90重量％～約99重量％または約95重量％～約99重量％の融合タンパク質を含みうる。一例では、組成物は、フリーズドライ（凍結乾燥）される。

【0262】

本明細書に記載の薬剤組成物は、典型的には、炎症状態、癌、疼痛などのような疾患状態の抑制、治療、または予防に使用されるであろう。本明細書に記載の薬剤組成物（たとえば、薬剤コンジュゲート、非共有結合薬剤コンジュゲート、薬剤融合体）はまた、診断目的のために投与することも可能である。

【0263】

本出願において、「予防」という用語は、疾患の誘導前に防御組成物を投与することを包含する。「抑制」とは、疾患の誘導事象後かつ臨床出現前に組成物を投与することを意味する。「治療」は、疾患症状が顕在化した後に防御組成物を投与することを包含する。

【0264】

10

20

30

40

50

疾患の防御または治療における薬剤組成物の有効性のスクリーニングに使用しうる動物モデル系は、入手可能である。感受性マウスにおける全身性エリテマトーデス（SLE）の試験方法は、当技術分野で公知である（Knight et al. (1978) J. Exp. Med., 147: 1653; Reinersten et al. (1978) New Eng. J. Med., 299: 515）。重症筋無力症（MG）は、他の種由来の可溶性AChRタンパク質で疾患を誘導することによりSJL/J雌マウスで試験される（Lindstrom et al. (1988) Adv. Immunol., 42: 233）。関節炎は、I型コラーゲンを注射することにより感受性系統のマウスで誘導される（Stuart et al. (1984) Ann. Rev. Immunol., 42: 233）。マイコバクテリア熱ショックタンパク質を注射することにより感受性ラットでアジュバント関節炎が誘導されるモデルが報告されている（Van Eden et al. (1988) Nature, 331: 171）。骨関節炎の治療の有効性は、コラゲナーゼを関節内注射することにより関節炎が誘導されるネズミモデルで評価可能である（Blom, A.B. et al., Osteoarthritis Cartilage 12:627-635 (2004)）。甲状腺炎は、報告されているようにチログロブリンを投与することによりマウスで誘導される（Maron et al. (1980) J. Exp. Med., 152: 1115）。インスリン依存性糖尿病（IDDM）は、天然に存在するか、またはKanasawa et al. (1984) Diabetologia, 27: 113に記載されるように特定の系統のマウスで誘導可能である。マウスおよびラットにおけるEAEは、ヒトにおけるMSのモデルとして機能する。このモデルでは、脱髄疾患は、ミエリン塩基性タンパク質を投与することにより誘導される（Paterson (1986) Textbook of Immunopathology, Mischer et al., eds., Grune and Stratton, New York, pp. 179-213; McFarlin et al. (1973) Science, 179: 478; および Satoh et al. (1987) J. Immunol., 138: 179を参照されたい）。

【0265】

本発明に係る薬剤組成物は、個別に投与される組成物としてまたは他の薬剤と組み合わせて使用可能である。医薬組成物は、本発明に係る薬剤組成物と組み合わせられた種々の細胞傷害剤もしくは他の薬剤の「カクテル」、またはさまざまな薬剤を含む本発明に係る薬剤組成物（たとえば、融合タンパク質）の組合せを包含しうる。

【0266】

薬剤組成物は、任意の好適な技術に基づいて任意の個体または被験体に投与可能である。薬剤組成物および治療対象の疾患または病状に依存して、さまざまな投与経路が利用可能であり、例としては、経口投与経路、食事投与経路、局所投与経路、経皮投与経路、直腸内投与経路、非経口投与経路（たとえば、静脈内注射、動脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、皮内注射、腹腔内注射、脊髄内注射、関節内注射）、および吸入投与経路（たとえば、気管支内吸入、鼻腔内吸入、または経口吸入、鼻腔内滴剤）が挙げられる。投与は、必要に応じて、局所投与または全身投与でありうる。好ましい投与形態は、選択される融合タンパク質および治療される病状（たとえば、疾患）に依存して、さまざまでありうる。用量および投与頻度は、患者の年齢、性別、および病状、他の薬剤の併行投与、使用禁忌、ならびに臨床医により考慮される他のパラメーターに依存するであろう。治療上有効量の薬剤組成物（たとえば、融合タンパク質）が投与される。治療上有効量とは、投与条件下で所望の治療効果を達成するのに十分な量のことである。

【0267】

「被験体」または「個体」という用語は、本明細書中では、哺乳動物などの動物を包含するように定義され、その例としては、霊長動物（たとえば、ヒト）、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス、または他のウシ科動物種、ヒツジ科動物種、ウマ科動物種、イヌ科動物種、ネコ科動物種、齧歯動物種、もしくはネズミ科動物種が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0268】

薬剤組成物（たとえば、融合タンパク質）は、中性化合物としてまたは塩として投与可能である。アミンまたは他の塩基性基を含有する化合物（たとえば、融合タンパク質）の塩は、たとえば、好適な有機酸または無機酸、たとえば、塩化水素、臭化水素、酢酸、過塩素酸などと反応させることにより取得可能である。第四級アンモニウム基を有する化合

物は、クロリド、ブロミド、ヨージド、アセテート、ペルクロレートなどのような対アニオンをも含有する。カルボン酸または他の酸性官能基を含有する化合物の塩は、好適な塩基たとえば水酸化物塩基と反応させることにより調製可能である。酸性官能基の塩は、ナトリウム、カリウムなどのような対カチオンを含有する。

【0269】

本発明はまた、薬剤組成物（たとえば、融合タンパク質）を被験体（たとえば、患者）に投与するために使用されるキットを提供する。このキットは、薬剤組成物（たとえば、融合タンパク質）と薬剤送達デバイスと場合により使用説明書とを含む。薬剤組成物（たとえば、融合タンパク質）は、フリーズドライ製剤などの製剤として提供可能である。特定の実施形態では、薬剤送達デバイスは、シリンジ、吸入器、鼻腔内投与デバイスまたは眼投与デバイス（たとえば、ミスト器、点眼器または点鼻器）、および無針注射デバイスよりなる群から選択される。

10

【0270】

本発明に係る薬剤組成物（たとえば、融合タンパク質）は、貯蔵のために凍結乾燥して使用前に好適な担体中に再構成することが可能である。任意の好適な凍結乾燥法（たとえば、スプレー乾燥法、ケーキ乾燥法）および／または再構成技術を利用することが可能である。当業者であればわかるであろうが、凍結乾燥および再構成は、さまざまな度合いで抗体活性損失を引き起こす可能性があり（たとえば、従来の免疫グロブリンを用いた場合、IgM抗体は、IgG抗体よりも大きい活性損失を有する傾向がある）、補償のために使用レベルを調整しなければならないこともある。特定の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される凍結乾燥（フリーズドライ）薬剤組成物（たとえば、融合タンパク質）を含む組成物を提供する。凍結乾燥（フリーズドライ）薬剤組成物（たとえば、融合タンパク質）は、好ましくは、再水和時にその活性の約20%以下または約25%以下または約30%以下または約35%以下または約40%以下または約45%以下または約50%以下を損失する。活性は、凍結乾燥前において薬剤組成物の効果を引き起こすのに必要な薬剤組成物（たとえば、融合タンパク質）の量である。たとえば、所望の期間にわたり所望の血清中濃度を達成および保持するのに必要とされる融合タンパク質の量。凍結乾燥前、任意の好適な方法を用いて薬剤組成物（たとえば、融合タンパク質）の活性を測定することが可能であり、かつ再水和後、同一の方法を用いて活性を測定して活性損失量を決定することが可能である。

20

30

【0271】

薬剤組成物（たとえば、融合タンパク質）またはそのカクテルを含有する組成物は、予防処置および／または治療処置のために投与することが可能である。特定の治療用途では、投与条件下における所望の治療効果または予防効果、たとえば、選択された細胞の集団の少なくとも部分的な阻害、抑制、調節、死滅、またはなんらかの他の測定可能なパラメータを達成するのに十分な量は、「治療上有効量または用量」として定義される。この用量を達成するのに必要とされる量は、疾患の重症度および患者自身の免疫系の一般的状態および全般的健康状態に依存するであろうが、一般的には、融合タンパク質換算で体重1キログラムあたり約0.005～10.0mgの範囲内であり、より一般的には、0.05～2.0mg/kg/回の用量が使用される。予防用途では、薬剤組成物（たとえば、融合タンパク質）またはそのカクテルを含有する組成物は、類似のもしくはわずかに少ない用量で投与可能である。本発明に係る薬剤組成物（たとえば、融合タンパク質）を含有する組成物は、哺乳動物において、選択された標的細胞集団の変化、不活性化、死滅、または除去を支援するために、予防および治療の場で利用可能である。

40

【0272】

本発明はまた、本発明に係る組成物（たとえば、医薬組成物）または融合タンパク質を含む薬剤送達デバイスに関する。いくつかの実施形態では、薬剤送達デバイスは、非経口送達デバイス、静脈内送達デバイス、筋肉内送達デバイス、腹腔内送達デバイス、経皮送達デバイス、肺送達デバイス、動脈内送達デバイス、脊髄内送達デバイス、関節内送達デバイス、皮下送達デバイス、鼻腔内送達デバイス、膣送達デバイス、直腸内送達デバイス

50

、シリンジ、経皮送達デバイス、カプセル、錠剤、ネブライザー、吸入器、アトマイザー、エアロゾル器、ミスト器、乾燥粉末吸入器、定量噴霧式吸入器、定量噴霧式スプレー器、定量噴霧式ミスト器、定量噴霧式アトマイザー、およびカテーテルよりなる群から選択される。

【0273】

いくつかの状況下で天然の連結部により達成されうる構造上の特徴の保存および荷電残基の露出の回避は、タンパク質分解アッセイにおいて実証されることが期待される。アッセイは、次のように実施可能である。組換えタンパク質（リン酸緩衝食塩水中1mg/mL）の溶液に0.04mg/mLの配列決定グレードのトリプシン（Promegaから入手可能）を追加し、30℃でインキュベートする。ある時間間隔で、タンパク質溶液のアリコートを取り出し、停止液（SDS充填緩衝液とプロテアーゼ阻害剤とを含有する）と混合し、そしてスナップ凍結する。たとえば、5分間～24時間の範囲内の時間間隔でアリコートを取り出す。時間コースの終了後、たとえば、SDFSPAGEゲル上でのサンプルの分離およびクーマシーブルーのようなタンパク質染色剤による可視化により、タンパク質分解度を評価する。天然の連結部を有する融合タンパク質は、非天然の連結部を含有する対応する融合タンパク質よりもフラグメント化に対してより耐性があることが期待される。

【実施例】

【0274】

実施例1：一般的方法

発現ベクターの構築

Invitrogen pBudCE4.1バックボーンをベースとするベクターを用いてIgGを発現させた。ユニークなNheI制限部位を欠失させることにより、バックボーンを改変した。標準的プロトコルを用いて、NheI制限消化、クレノウ酵素を用いる埋込み、およびセルフライゲーションにより、これを達成した。コザック配列とネズミ科動物V-J2-CシグナルペプチドcDNAと定常領域cDNAとを含むIgG重鎖および軽鎖発現カセットを調製した。HindIIIおよびBglII制限酵素を用いて、ヒトIgG重鎖定常ドメインをコードする重鎖発現カセットを消化し、HindIIIおよびBamHI制限酵素を用いて消化された改変ベクターバックボーン中にサブクローニングし、それにより、ベクターバックボーン中の内部BamHI制限部位を欠失させた。NotIおよびMluI制限酵素を用いて、ヒトκまたはλ定常領域遺伝子をコードする軽鎖発現カセットをベクターバックボーン中にサブクローニングした。

【0275】

可変ドメイン遺伝子のサブクローニング

標準的分子生物学プロトコルを用いて、以上に記載の発現ベクター中にIgG可変ドメイン遺伝子をサブクローニングした。重鎖シグナルペプチドcDNA中のBamHI制限部位および成熟重鎖タンパク質をコードするcDNA中のXhoI制限部位またはNheI制限部位を用いて、重鎖の一部として発現に使用されるIgG可変ドメイン遺伝子をサブクローニングした。2つの方法のうちの1つにより、軽鎖の一部として発現に使用されるIgG可変ドメイン遺伝子をサブクローニングした。PCRオーバーラップ伸長を用いてIgG可変ドメイン遺伝子を軽鎖cDNAに連結し、続いて、軽鎖シグナルペプチドcDNA中のSalI制限部位および軽鎖発現カセットの下流に位置するMluI制限部位を用いてサブクローニングするか、または軽鎖シグナルペプチドをコードするcDNA中のSalI制限部位および成熟軽鎖ペプチドをコードするcDNA中のBsiWI制限部位を用いて直接サブクローニングした。

【0276】

IgGの発現、精製、および定量

DNA配列の確認を行った後、製造業者の取扱い説明書に従ってQiagen EndoFree Plasmid Megaキットを用いてベクターDNAを作製した。次に、ベクターDNAを用いてHEK293T細胞（ATCC（登録商標））をトランスフェク

トした。典型的には、各構築物ごとに、約70%～80%のコンフルエンスに達するまで、 175 cm^2 の表面積を有する5もしくは10個の細胞培養フラスコ（T175、Nunc）中で細胞を培養した。次に、製造業者の取扱い説明書に従ってFUGENE（登録商標）6トランスフェクション試薬（脂質ベースのトランスフェクション試薬、Roche）を用いて、フラスコ1個あたり34マイクログラムのDNAを用いて、細胞をトランスフェクトした。1%非必須アミノ酸と4%ウシ胎仔血清（FBS）とが追加された、グルタミンと高グルコースとを有するDMEM（Invitrogen）中で、トランスフェクト細胞を増殖させた。FBSは、PROSEP（登録商標）-G樹脂（組換えプロテインG樹脂、Millipore）を用いて残留ウシ科動物IgGを除去してから滅菌濾過を行うことによりInvitrogen ultra-low IgG FBSから調製したものであった。発現の4もしくは5日後、培養物上清を遠心分離により採取した。2つのVHドメインと2つのVKドメインとを含むかまたは4つのVKドメインを含むIgG分子の場合にはプロテインA樹脂（Streamline A、GE Healthcare）を用いて、4つのVHドメインを含むIgG分子の場合にはFab結合部位を含まないように工学的に作製されたプロテインG樹脂（プロテインGアガロース、Sigma Aldrich）を用いて、分泌IgGをアフィニティー精製した。典型的には、20～50床体積の2×PBSを用いて、続いて、10～20床体積の150mM NaCl、10mM Tris HCl、pH7.4を用いて、樹脂を洗浄した。典型的には、100mMグリシンpH2.0を用いてIgGを溶出させ、Trisを用いてpH8.0に中和したか、または10mMシトレート、50%エチレングリコール、pH3.5を用いて溶出させたかのいずれかであった。分光光度計を用いて280nmにおける吸光度を読み取ることにより、溶出されたタンパク質を定量した。

【0277】

CHROMELEON（登録商標）ソフトウェア（クロマトグラフィー管理ソフトウェア、Dionex Corporation）を用いてHPLCサイズ排除クロマトグラフィーにより、IgGを分析した。分析パラメーターは、最も典型的には、10%エタノールが追加された1×PBSを流動緩衝液として1mL/minの流量および注入後20分間の取得時間でTosoh G3000 SWXLカラムを使用することを含んでいた。225、280、および300nmの波長で吸光度を記録した。

【0278】

実施例2：タンパク質の発現ならびに可溶性オリゴマーおよびアグリゲートの形成

DOM9-155-25およびDOM10-176-535で示される2つのVK可変ドメインをペアにしてIgG中に導入し、1分子あたり合計で4つのVK可変ドメインを含有するようにした。天然の軽鎖の部分としてVKドメインDOM10-176-535を発現させ、一方、3つの異なる連結部を用いてVKドメインDOM9-155-25を重鎖上のCH1に融合させた。

【0279】

カバット番号： 97 114
 非天然の連結部1： TFGQGTKVEIK__ASTKGPS
 非天然の連結部2： TFGQGTKVEIKR-ASTKGPS
 天然の連結部： TFGQGLVTSS ASTKGPS

各連結部に対して融合部に下線が付されている。

【0280】

非天然の連結部1（配列番号522）は、カバット残基1～112を含むVKドメインとCH1との直接融合に対応し、一方、非天然の連結部2（配列番号523）は、カバット残基113（ヒトにおいてJKエキソンにより部分的にコードされかつCKエキソンにより部分的にコードされる）をも含むVKドメインとCH1との直接融合に対応する。天然の連結部（配列番号524）を有するIgGでは、保存GlyXaaGlyThrモチーフ（配列番号386）（VHドメイン中の残基H104～H107およびVK中のドメインL99～L102）を融合部位として使用した。

【0281】

280nmの波長における吸光度の読取りを用いて発現収率を比較し、サイズ排除HPLCおよびSDS-PAGEにより確認した。収率を表1にまとめる。発現収率は、天然の連結部（配列番号524）を用いたときのほうが非天然の連結部1（配列番号522）または非天然の連結部2（配列番号523）のいずれかを用いたときよりも有意に高かった。

【0282】

いくつかの抗体では、天然の連結部を用いることにより、非天然の連結部を用いたときと比較して可溶性オリゴマーおよびアグリゲートの割合が低減された。たとえば、VκDUM1で示される同一のVκドメインを天然の軽鎖の部分として含みかつ異なる連結部を用いて重鎖上のCH1に融合させて含む3つのIgGを発現させた。サイズ排除HPLCにより3つのIgGを分析した（表2）。オリゴマーおよびアグリゲートの画分は、非天然の連結部1（配列番号522）を有するIgGを用いたときは9%、非天然の連結部2（配列番号523）を有するIgGを用いたときは10%であったが、天然の連結部（配列番号524）を有するIgGを用いたときは7%にすぎなかったことから、天然の連結部を用いた場合、より少ないオリゴマーおよびアグリゲートが発現され精製されたことが示唆される。オリゴマーおよびアグリゲートが数パーセント減少することにより、利点が提供され、とくに工業規模の生産では、融合タンパク質を生産するのに必要な経費および時間が削減される。

【表1】

Cκに融合された可変ドメイン	CH1に融合された可変ドメイン	連結部	発現収率 (mg/L)
DOM10-176-535	DOM9-155-25	天然の連結部	1.4
DOM10-176-535	DOM9-155-25	非天然の連結部 1	1.0
DOM10-176-535	DOM9-155-25	非天然の連結部 2	0.4

【表2】

Cκに融合された可変ドメイン	CH1に融合された可変ドメイン	連結部	プロテインAにより精製されたオリゴマーおよびアグリゲートのパーセント
VHDUM-1	VκDUM-1	天然の連結部	7
VHDUM-1	VκDUM-1	非天然の連結部 1	9
VHDUM-1	VκDUM-1	非天然の連結部 2	10

【0283】

実施例3：タンパク質の溶解性

VHDUM-1で示されるVH可変ドメインを、4コピーのこの可変ドメインを含有するIgG分子の形態で発現させた。3つの分子の溶解性を比較した。これらの分子のうちの2つは、VHDUM-1とCκとの間に非天然の連結部を有し、1つのドメインは、VHDUM-1とCκとの間に天然の連結部を有していた。

【0284】

カバット番号 100 109
 非天然の連結部 1 : FDYWGQGLVTVSS__TVAAPS
 非天然の連結部 2 : FDYWGQGLVTVSS_RTVAAPS
 天然の連結部 : FDYWGQGTKVEIK R TVAAPS

各連結部に対して融合部位に下線が付されている。

【0285】

プロテインG樹脂からの溶出および中和を行った後、非天然の連結部（配列番号525）を有するIgGを用いたときは強力な沈殿が観測されたが、非天然の連結部2（配列番号526）を有するIgGを用いたときおよび天然の連結部（配列番号527）を有するIgGを用いたときは痕跡量の沈殿が観測されたにすぎなかった。中和（100mMグリシン、130mM Tris pH8）の後で溶液中に残存する可溶性タンパク質の濃度は、非天然の連結部1を有するIgGを用いたときは0.16mg/mL、非天然の連結部2を有するIgGを用いたときは1.37mg/mL、および天然の連結部を有するIgGを用いたときは1.20mg/mLであった。非天然の連結部1を有するIgGは、100mMグリシン、130mM Tris pH8中において、他のIgGよりも有意に低い溶解性を有することがデータから実証された。この結果から、VκドメインとCκドメインとの間の天然の連結部の部分である残基L108（Arg）は、試験されたIgGの構造および溶解性に重要な役割を果たすことが示唆された。この残基は、ヒトにおいてJκエキソンにより部分的にコードされかつCκエキソンにより部分的にコードされ、非天然の連結部1を有する貧溶性IgG中には不在であった。溶解性に差異が観測されたことから、Vκ（残基L99～L102）とVH（残基H104～H107）との間で保存されるGlyXaaGlyThr（配列番号386）モチーフにドメイン融合部位を移動することにより、保存モチーフの下流のJκエキソンによりコードされる残存する構造上重要なVκ残基を保持することの利点を実証された。

10

【0286】

実施例4：DOM15／16インライン融合体のクローニング、発現、および特徴付け

20

単一ポリペプチド鎖中に抗VEGFR dAbおよび抗EGFR dAbを含有する融合ポリペプチドに、VEGFまたはEGFRに結合するドメイン抗体を組み込んだ。融合ポリペプチドのいくつかは、抗体Fc領域（ヒトIgG1の—CH2—CH3）をも含んでいた。クローニングされかつ発現された融合ポリペプチドの特定の例としては、TAR15—10をDOM16—39—206およびFcに融合させたもの、DOM16—39—206をTAR15—10およびFcに融合させたもの、DOM16—39—206をTAR15—26—501およびFcに融合させたもの、TAR15—26—501をDOM16—39—206およびFcに融合させたもの、TAR15—10をDOM16—39—206に融合させたもの、DOM16—39—206をTAR15—10に融合させたもの、DOM16—39—206をTAR15—26—501に融合させたもの、およびTAR15—26—501をDOM16—39—206に融合させたものが挙げられる。以上の融合の位置は、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に融合タンパク質中に出現するように列挙されている。接頭辞TARまたはDOMを用いて参照されるポリペプチドは、抗体可変ドメインである。

30

【0287】

標準的方法を用いて、dAbをコードするDNAをPCR増幅し、発現ベクター中にクローニングした。ピキア（Pichia）中（Fc領域を含有していない融合体）またはHEK293T細胞中（Fc領域を含有する融合体）で発現ベクターを発現させることにより、インライン融合ポリペプチドを産生させた。HEK293T細胞（Fcタグ付き）発現構築物およびピキア（Pichia）発現構築物に対して、それぞれ、ストリームラインプロテインA樹脂およびストリームラインプロテインL樹脂を用いて、インライン融合体をバッチ結合させてアフィニティー精製した。

40

【0288】

Fcを含有するいくつかの融合体の部分は、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に融合タンパク質中に出現するように表3に列挙されている。したがって、左から右の方向に表を読み取ることにより、融合タンパク質の構造を理解することが可能である。表3に提示された第1の融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に、DOM15—10—リンカー1—DOM16—39—206—リンカー2—Fcの構造を有する。

【0289】

50

インライン融合体をトリプシンによるタンパク質分解に付することにより、一般的なロバスト性および耐分解性を試験した。二重特異性リガンドとトリプシンとの溶液（1／25（w／w）トリプシン対リガンド）を調製し、30℃でインキュベートした。0分（すなわち、トリプシンの添加前）、60分、180分、および24時間の時点でサンプルを採取した。所与の時間点で、PAGE充填染料と共に2×最終濃度で完全プロテアーゼ阻害剤カクテル（Rocheコード：11 836 145 001）を添加することにより反応を停止させ、続いて、液体窒素中でサンプルをフラッシュ凍結させた。SDS-PAGEによりサンプルを分析し、タンパク質バンドを可視化して融合体のプロテアーゼ分解の時間コースを明らかにした。

【0290】

これらの実験から、V_Kのカルボキシ末端アミノ酸とC_Kのアミノ末端アミノ酸とを含有する「天然の」リンカー（KVEIKRTVAAPS（配列番号528））を有するインライン融合体は、タンパク質分解を受けやすく10分の時間点で分解が顕在化することが明らかにされた。SDS-PAGE分析の結果、dAb間のリンカーおよびdAbとFcとの間のリンカーで分解が起こることが判明した。

【0291】

トリプシンによる切断点でありかつ天然のリンカー中に豊富に含まれるLysおよびarg残基をより少量含有する新しいリンカーをデザインした。工学的に作製されたリンカー（LVTVSSAST（配列番号529））または（LVTVSSGGGSGGGSS（配列番号530））を含有する融合体は、トリプシンタンパク質分解に対してかなり改良された耐性を示した。

【0292】

工学的に作製されたリンカーを含有するインライン融合体の効力を評価するために、追加の結合アッセイを行った。その結果、工学的に作製されたリンカーは、効力に対してなんら実質的な有害作用を及ぼさないことが判明した。

10

20

【表 3】

Fc を含有する融合ポリペプチド

dAb1	リンカー 1	dAb2	リンカー 2	アッセイ dAb1 (nM)	アッセイ dAb2 (nM)
DOM15-10 (Vκ)	KVEIKRTVAAPS	DOM16-39-206 (Vκ)	KVEIKRTVAAPS	0.45	23.8
DOM16-39-206 (Vκ)	KVEIKRTVAAPS	DOM15-10 (Vκ)	KVEIKRTVAAPS	3.7	0.88
DOM16-39-206 (Vκ)	KVEIKRTVAAPS	DOM15-26-501 (V _H)	LVTVSSASTKGPS	20.7	21.3
DOM15-26-501 (V _H)	LVTVSSASTKGPS	DOM16-39-206 (Vκ)	KVEIKRTVAAPS	5.7	7.7
DOM16-39-601 (Vκ)	LVTVSSAST	DOM15-10 (Vκ)	LVTVSSAST	0.68	10.8
DOM16-39-601 (Vκ)	KVEIKRTVAAPS	DOM15-10 (Vκ)	KVEIKRTVAAPS	0.77	2.9
DOM15-10 (Vκ)	LVTVSSAST	DOM16-39-601 (Vκ)	LVTVSSAST	1.2	4.2
DOM16-39-601 (Vκ)	LVTVSSGGGGSGGGS	DOM15-10 (Vκ)	LVTVSSGGGGSGGGS	5.7	0.2
DOM15-10 (Vκ)	LVTVSSGGGGSGGGS	DOM16-39-601 (Vκ)	LVTVSSGGGGSGGGS	0.8	3.1
DOM15-10 (Vκ)	KVEIKRTVAAPS	DOM16-39-601 (Vκ)	KVEIKRTVAAPS	0.2	2.9

【0293】

実施例 5. 工学的に作製された追加のリンカー

プロテアーゼ感受性を低減させるために、IgG 様形態の軽鎖上に発現される Vκ dAb の C 末端領域にいくつかのデザインされた突然変異を導入した。「天然のリンカー」は、Vκ のカルボキシ末端アミノ酸および Cκ のアミノ末端アミノ酸を含有する GQGT KV E I K R T V A A P S (配列番号 531) であった。生理的 pH で正に荷電されない最も保存的な置換で天然のリンカー中の正荷電残基の一部もしくは全部を置き換えるアミノ酸置換を用いて、変異体リンカー 1～3 をデザインした。天然のリンカー中のアルギニン残基は、CLドメイン内にイオン性相互作用を生じるので、それほど改変に適していないと思われる。

【0294】

変異体リンカー 1 (GQGT N V E I N R T V A A P S (配列番号 532)) では、天然のリンカー中のリシンが両方ともアスパラギンで置換されている。変異体リンカー 1 および天然のリンカー中のアルギニンがグルタミンに追加的に変更されている変異体リンカー 2 (GQGT N V E I N Q T V A A P S (配列番号 533)) では、リンカー中に N-グリコシル化部位 (NxT) が導入されている。変異体リンカー 1 または変異体リンカー 2 を含有する IgG 様形態の SDS-PAGE 分析の結果、軽鎖は、N-グリコシル化事

象に適合するより高分子量を有することが明らかにされた。変異体リンカー 3 (G Q G T N V E I Q R T V A A P S (配列番号 5 3 4)) では、N-グリコシル化部位が除去され、天然のリンカー中の所定の位置のアルギニンが残存されている。変異体リンカー 4 (G Q G T L V T V S S T V A A P S (配列番号 5 3 5)) では、V κ ドメインの 6 つの C 末端アミノ酸が V κ Hドメイン由来の対応する残基で置き換えられており、正電荷が含まれない。

【0295】

変異体リンカー 1~4 を含有する I g G 様形態のプロテアーゼ耐性 (実施例 4 に記載されるように評価されるトリプシン耐性) から、工学的に作製された変異体リンカーを含有する I g G 様形態は、天然のリンカーを含有する I g G 様形態よりもプロテアーゼ耐性であることが判明した。

10

【0296】

実施例 6 : D O M 9 / 1 0 インライン融合体のクローニング、発現、および特徴付け
A. 融合タンパク質

抗 I L - 4 および抗 I L - 1 3 二重特異性二量体のクローニングおよび産生

C 末端システインを有するインライン融合タンパク質をコードする構築物が形成されるように、抗 I L - 4 d A b D O M 9 - 1 1 2 および抗 I L - 1 3 d A b D O M 1 0 - 5 3 - 3 4 3 をコードする核酸をクローニングした。アミノ酸配列 A S T は、2 つの d A b 間に存在した。この配列は、天然の抗体中に存在する天然の C H 配列である。構築物をピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) ベクター p P I C Z α (Invitrogen) 中にクローニングした。エレクトロコンピテント細胞 (X - 3 3 または K M 7 1 H) を構築物でトランスフォームし、形質転換体を 1 0 0 μ g / m l ゼオシンで選択した。O D₆₀₀ が約 1.5 ~ 2.0 に達するまで、B M G Y 培地上、3 0 $^{\circ}$ C、2 5 0 r p m で、5 0 0 m l 培養物を 2 4 時間増殖させた。次に、細胞を遠心沈降させ、そして B M M Y 培地 (0.5 % (v / v) メタノールを含有する) 中に再懸濁させてタンパク質発現を誘導した。2 5 0 r p m で振盪しながら培養物を 3 0 $^{\circ}$ C に維持した。2 4 時間間隔で、5 0 % メタノール溶液を用いてメタノール濃度を次のように漸進的に増加させて培養物に供給した {1 %, 1.5 %, および 2 % (v / v)}。次に、培養物を遠心分離により採取し、発現されたタンパク質を含有する上清を必要になるまで 4 $^{\circ}$ C で貯蔵した。標準的精製プロトコルを用いて P r A ストリームラインにより上清からタンパク質を精製した。

20

30

【0297】

P r A 精製タンパク質は、二量体種および単量体種の両方を含有することがわかった。したがって、クロマトフォーカシングを用いて 2 種のタンパク質を分離した。6 $\rightarrow$ 4 の p H グラジエントを用いて M o n o P 5 / 2 0 カラム (GE Healthcare) を分離に使用した。使用するポリバッファーを製造業者の説明に従って 6 $\rightarrow$ 4 の p H 範囲にした。p H 6 でサンプルを適用し、そして 3 5 カラム体積を超える 1 0 0 % 緩衝液 B を 1 m l / m i n で流動させて使用することにより p H グラジエントを形成した。S D S - P A G E を用いて二量体を含有する画分を同定し、P E G 化に供すべくブールした。

【0298】

次に、以上に概説した方法により 4 0 K P E G 2 - M A L を用いてタンパク質を P E G 化した。陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて > 9 5 % の純度まで、この材料を精製した。得られた二重特異性リガンド (P E G 化 D O M 9 - 1 1 2 (A S T) D O M 1 0 - 5 3 - 3 4 4) の効力を I L - 4 R B A および I L - 1 3 R B A により測定した。二重特異性リガンドの抗 I L - 4 アームの効力 (1 3 n M) は、d A b D O M 9 - 1 1 2 単量体の効力 (3.5 n M) と比較してわずかに低減されたが、抗 I L - 1 3 アームの効力は保持された (二重特異性リガンドでは 3 1 0 p M であったのに対して d A b 単量体では 2 3 0 p M であった)。

40

【0299】

2 つの d A b 間に存在するアミノ酸配列 A S T K G P S (配列番号 5 3 5) (この配列は、天然の抗体中に存在する C H 配列の開始部である) を有するインライン融合体として

50

、抗 I L - 4 および抗 I L - 1 3 d A b D O M 9 - 1 1 2 および D O M 1 0 - 5 3 - 3 4 4 を同様にクローニングした。得られた精製済みの二重特異性リガンド (D O M 9 - 1 1 2 (A S T K G P S) D O M 1 0 - 5 3 - 3 4 4) の効力を I L - 4 R B A および I L - 1 3 サンドイッチ E L I S A により測定した。抗 I L - 4 アームの効力 (約 1 n M) は保持されたが、抗 I L - 1 3 アームの効力は、d A b 単量体と比較してごくわずかに低減された (d A b 単量体では 4 0 p M であったのに対して二重特異性リガンドでは 1 2 0 p M であった) 。

【 0 3 0 0 】

I L - 4 および I L - 1 3 に対する追加の二重標的化インライン融合体

I L 4 および I L 1 3 結合性 d A b の二重標的化インライン融合体の挙動をさらに理解するために、一連の新しいインライン融合体およびインライン融合体ライブラリーを構築した。F R 1、C D R 1、C D R 2、および C D R 3 のトリプレット残基を多様化するライブラリーを用いて、ファージディスプレイにより、D O M 1 0 - 5 3 系列をアフィニティー成熟させた。ライブラリーをファージベクター中にクローニングし、g e n e 3 タンパク質と (d A b 1 リンカー d A b 2) インライン融合体との融合タンパク質として提示させた。ここで、d A b 1 は、D O M 9 - 1 1 2 - 2 1 0 であり、リンカーは、アミノ酸残基 A S T K G P S (配列番号 5 3 5) であり、かつ d A b 2 は、D O M 1 0 - 5 3 ライブラリーである。本質的には以上に記載したように、選択方法、E. コリ (E c o l i) 中へのサブクローニングおよび発現、ならびにスクリーニング方法を実施したが、ただし、単一の d A b の代わりにインライン融合構築物を使用した。生成物をベクター p D O M 5 中にクローニングし、プロテイン A 被覆ビャコアチップに結合させることにより発現の改良に関して発現上清をスクリーニングした。

【 0 3 0 1 】

改良された発現レベルを有するインライン融合体を発現させ、精製し、I L - 1 3 サンドイッチ E L I S A および細胞アッセイで試験した。いくつかの変異体を選択した (たとえば、D O M 9 - 1 1 2 - 2 1 0 - A S T K G P S - D O M 1 0 - 5 3 - 5 6 6) 。最も効力のあるクローンは、D O M 1 0 - 5 3 - 5 3 1 および D O M 1 0 - 5 3 - 5 4 6 であった (表 4 参照) 。これらのクローンからさまざまなタンパク質調製物を作製し、これらを以上に記載される I L - 4 R B A および I L - 1 3 サンドイッチアッセイで試験した。

【 表 4 】

クローン名	発現レベル (mg/l)	IL-13 サンドイッチ ELISA (EC50 nM)	IL-4 RBA (IC50 nM)
DOM9-112-210- DOM10-53-531			
調製物 1	9.3	1.1/1.9	3.5/4.8
調製物 2	11.5	4.9	n.d.
調製物 3	4.5	2/2.8	13.9
調製物 4	10	1	5.4
DOM9-112-210- DOM10-53-546			
調製物 1	2.2	0.62/0.77	4.3
調製物 2	7.7	1	6

【0302】

A S T K G P S（配列番号535）であるか（第1のd A bがV hであるとき）または T V A A P S（配列番号536）であるか（第1のd A bがV κであるとき）のいずれかであるd A bリンカーをコードするD N A断片のS O E P C Rにより、さらなるインライン融合体を構築した。このP C R産物をS a l I / N o t Iで消化し、E. コリ（E. coli）発現ベクターp D O M 5中にライゲートした。M A C H 1（Invitrogen）細胞中にトランスフォームした後、クローンの配列を確認し、インライン融合体を発現させた。O n e xが添加された2 T Y培地（Novagen）中30℃でE. コリ（E. coli）を二晩増殖させることにより発現を実施し、細胞を遠心分離し、上清をプロテインL樹脂またはプロテインA樹脂のいずれかと共にインキュベートした。樹脂から溶出させた後、生成されたインライン融合体産物の質および量をS D S - P A G Eで確認した。形成された産物の大部分は、ごく限られた遊離単量体を含むインライン融合体の分子質量を有していた。したがって、追加の精製工程は必要でなかったため、材料を直接試験することが可能であった。

10

【0303】

以上に記載の方法を用いて、以下のI L - 4 / I L - 13インライン融合体を発現させ、精製し、そして特徴付けた：

DOM9-112-210 - ASTKGPS - DOM10-208
 DOM9-112-210 - ASTKGPS - DOM10-212
 DOM9-112-210 - ASTKGPS - DOM10-213
 DOM9-112-210 - ASTKGPS - DOM10-215
 DOM9-112-210 - ASTKGPS - DOM10-224
 DOM9-112-210 - ASTKGPS - DOM10-270
 DOM9-112-210 - ASTKGPS - DOM10-416
 DOM9-112-210 - ASTKGPS - DOM10-236
 DOM9-112-210 - ASTKGPS - DOM10-273
 DOM9-112-210 - ASTKGPS - DOM10-275
 DOM9-112-210 - ASTKGPS - DOM10-276
 DOM9-112-210 - ASTKGPS - DOM10-277
 DOM10-208 - TVAAPS - DOM9-155-78
 DOM10-212 - TVAAPS - DOM9-155-78
 DOM10-213 - TVAAPS - DOM9-155-78
 DOM10-215 - TVAAPS - DOM9-155-78
 DOM10-224 - TVAAPS - DOM9-155-78
 DOM10-270 - TVAAPS - DOM9-155-78
 DOM10-416 - ASTKGPS - DOM9-155-78
 DOM10-236 - ASTKGPS - DOM9-155-78
 DOM10-273 - ASTKGPS - DOM9-155-78
 DOM10-275 - ASTKGPS - DOM9-155-78
 DOM10-276 - ASTKGPS - DOM9-155-78
 DOM10-277 - ASTKGPS - DOM9-155-78

20

30

40

精製後、発現レベルを測定し（m g / l）、I L - 4結合に関してはR B AでおよびI L - 13結合に関してはサンドイッチE L I S Aで活性を試験した。列挙された可変ドメインのアミノ酸配列は、I L - 4 / I L - 13に結合するリガンドという名称でDomantis Limitedにより2007年1月24日に英国受理官庁に出願された国際特許出願に開示されている。この国際特許出願は、天然の連結部を含有する融合タンパク質を作製するのに使用可能な可変ドメインの例を提供する目的で参照により本明細書に組み入れられるものとする。以下の表（表5）は、これらのインライン融合体に対するデータをまとめたものである：

【表 5】

クローン名	発現 mg/ml			IL-13 ビアコア	Dom10 RBA (EC50 nM)	DOM9 RBA (IC50 nM)
DOM9-112-210-DOM10-208	0.3	19.2	37.4	√	-	2.48
DOM9-112-210-DOM10-212	3.7		6.3	√	999.9	3.21
DOM9-112-210-DOM10-213	5.6	0.2	4.9	√	1152	4.29
DOM9-112-210-DOM10-215	0.1	8.8	2.2	√	-	14.19
DOM9-112-210-DOM10-224	4.6		13.4	√	4575	2.75
DOM9-112-210-DOM10-270	3.7		2.7	√	397.5	2.79
DOM9-112-210-DOM10-416	6.9		0.0	√	34420	7.27
DOM9-112-210-DOM10-236	0.2	0.1	2.2	√	-	>20
DOM9-112-210-DOM10-273	1.2		0.3	√	4553	10.51
DOM9-112-210-DOM10-275	4.9	0.2	0.0	√	-	10.89
DOM9-112-210-DOM10-276	6.9		0.1	√	-	10.20
DOM9-112-210-DOM10-277	1.3	3.7	0.2	√	4385	11.74
DOM10-208-DOM9-155-78			41.0	√	4243	8.18
DOM10-212-DOM9-155-78			0.5	√	-	>20
DOM10-213-DOM9-155-78			16.9	√	62.04	6.91
DOM10-215-DOM9-155-78			22.6	√	10.82	6.65
DOM10-224-DOM9-155-78			3.6	√	-	12.49
DOM10-270-DOM9-155-78			2.9	√	37.23	8.60
DOM10-416-DOM9-155-78		1.1	26.3	√	443.7	5.88
DOM10-236-DOM9-155-78		3.6	10.8	√	372	2.54
DOM10-273-DOM9-155-78		6.4	16.2	√	185.2	2.25
DOM10-275-DOM9-155-78		0.2	0.0	-	-	-
DOM10-276-DOM9-155-78		0.2	20.0	√	-	5.02
DOM10-277-DOM9-155-78		1.1	1.3	√	648	9.45
					DOM9-112	3.60
					DOM9-155-78	0.41

【 0 3 0 4 】

さらに、DOM9-112-210およびDOM9-155-78の両方と対をなすように、DOM10-275のアフィニティー成熟変異体、すなわち、DOM10-275-1をとくに選択した。これらのインライン融合体を構築し、天然のリンカーを用いて以上に記載のように発現させた。記載のIL-4 RBAおよびIL-13サンドイッチELISAによる試験に加えて、これらのインライン融合体をTF-1細胞増殖アッセイにより機能に関しても試験した。これらのアッセイでは、一定量のIL-4またはIL-13のいずれかと共にdAbをプレインキュベートし、この混合物をTF-1細胞に添加し、そして細胞を72時間インキュベートした。このインキュベーションの後、細胞増殖のレベルを測定した。このアッセイの結果は、以下の（表6）にまとめられており、インライン融合体の両方のアームが細胞アッセイで活性であること示している。

【表 6】

サンプル	DOM9 RBA IC50 (nM)	DOM10 RBA IC50 (nM)	IL-4 細胞アッセイ IC50 (nM)	IL-13 細胞アッセイ IC50 (nM)
DOM9-112-210	0.391	-		
DOM9-155-78	0.456	-		
DOM10-275-1- DOM9-155-78	6.238	39.17	5.1 - 7.6	31 - 46
DOM9-112-210- DOM10-275-1	4.189	44.88	6.8 - 10.2	27 - 40
DOM10-275-1	-	31.30		

【表 7】

天然の連結部を有して発現される 4 VH 可変ドメインを含む IgG

番号	重鎖可変ドメイン	軽鎖可変ドメイン	JH-セグメント中の GQGT と非天然の定常ドメインとの連結部	非天然の定常ドメイン
1.	VHDUM-1	VHDUM-1	KVEIKR (SEQ ID NO:471)	CK
2.	VHDUM-1	VHDUM-1	KVTVL (SEQ ID NO:482)	CL2
3.	VHDUM-1	VHDUM-1	LVTVL (SEQ ID NO:483)	CL2
4.	VHDUM-1	DOM10-53-345	KVEIKR (SEQ ID NO:471)	CK
5.	VHDUM-1	DOM10-53-345	KVTVL (SEQ ID NO:482)	CL2
6.	HEL-4	HEL-4	KVEIKR (SEQ ID NO:471)	CK
7.	DOM9-112	DOM10-53-285	KVEIKR (SEQ ID NO:471)	CK
8.	DOM9-112	DOM10-53-347	KVEIKR (SEQ ID NO:471)	CK
9.	DOM9-112	DOM10-53-337	LVTVL (SEQ ID NO:483)	CL2
10.	DOM9-112	DOM10-53-343	KVTVL (SEQ ID NO:482)	CL2
11.	DOM9-112	DOM10-53-343	LVTVL LVTVL (SEQ ID NO:483)	CL2
12.	DOM10-53-285	DOM9-112	KVEIKR (SEQ ID NO:471)	CK
13.	DOM10-53-338	DOM9-112	KVTVL (SEQ ID NO:482)	CL2
14.	DOM10-53-338	DOM9-112	LVTVL	CL2
15.	DOM10-53-345	VHDUM-1	KVEIKR (SEQ ID NO:471)	CK
16.	DOM10-53-345	VHDUM-1	KVTVL (SEQ ID NO:482)	CL2
17.	DOM10-53-347	DOM9-112	KVEIKR (SEQ ID NO:471)	CK
18.	DOM10-53-347	DOM9-112	KVTVL (SEQ ID NO:482)	CL2
19.	DOM15-26	DOM16-201	KVEIKR (SEQ ID NO:471)	CK
20.	DOM15-26	DOM15-26	KVEIKR (SEQ ID NO:471)	CK

10

20

30

40

【表 8】

天然の連結部を有して発現される 4 VK 可変ドメインを含む IgG

番号	重鎖可変ドメイン	軽鎖可変ドメイン	J-セグメント中の GQGT と非天然の定常ドメインとの連結部	非天然の定常ドメイン
21.	VKDUM-1	VKDUM-1	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
22.	DOM2-100-206	DOM15-10	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
23.	DOM4-122-24	DOM4-130-54	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
24.	DOM4-130-54	DOM4-122-24	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
25.	DOM4-130-54	DOM4-130-54	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
26.	DOM9-155-25	DOM10-176-511	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
27.	DOM9-155-25	DOM10-176-535	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
28.	DOM9-155-25	DOM10-176	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
29.	DOM9-155-25	DOM10-176-535	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
30.	DOM9-155-25	DOM10-176-535	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
31.	DOM9-155-29	DOM10-176	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
32.	DOM9-155-29	DOM10-176-535	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
33.	DOM9-44-502	DOM10-176-511	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
34.	DOM9-44-502	DOM10-176	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
35.	DOM10-176-511	DOM9-44-502	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
36.	DOM10-176-535	DOM9-155-25	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
37.	DOM15-10	DOM15-10	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
38.	DOM15-10	DOM16-200	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
39.	DOM15-10	DOM16-32	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
40.	DOM15-10	DOM16-72	LTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)

10

20

30

40

41.	DOM15-10	DOM16-39	LVTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
42.	DOM15-10	DOM2-100-206	LVTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
43.	DOM16-200	DOM16-200	LVTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
44.	DOM16-32	DOM15-10	LVTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
45.	DOM16-39	DOM16-39	LVTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
46.	DOM16-39	DOM15-10	LVTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)
47.	DOM16-72	DOM15-10	LVTVSS (SEQ ID NO:484)	CH (IgG1)

10

【表 9】

天然の連結部を有して発現される“インサイドアウト” IgG

番号	重鎖可変ドメイン	軽鎖可変ドメイン	J-セグメント中の GQGT と非天然の定常ドメインとの連結部	非天然の定常ドメイン
48.	DOM15-10	DOM15-26	LVTVSS (SEQ ID NO:484 & KVEIKR (SEQ ID NO:471)	CH (IgG1) & CK

20

【0305】

表 7～9 中、右側の欄で参照されている非天然の定常ドメインは、2つの V κ 可変ドメインを含む IgG では CH (IgG1) であり、2つの VH 可変ドメインを含む IgG では C κ または C λ 2 のいずれかである。IgG 50 では、定常ドメイン配列は両方とも非天然である。なぜなら、これは、配列 KVEIKR を介して C κ に融合された VH 可変ドメインと、配列 LVTVSS を介して CH (IgG1) に融合された V κ 可変ドメインとを有するインサイドアウト IgG であったからである。

30

【0306】

非天然の定常ドメインの配列：

CH (IgG1) (配列番号 517)：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK

40

CK (配列番号 518)：

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

CL2 (配列番号 519)：

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

本明細書に引用されているすべての特許、公開出願、および参考文献の教示は、それらの全体が参照により組み入れられるものとする。

50

【0307】

例示の実施形態を参照しながら本発明について特定の提示および説明を行ってきたが、特許請求の範囲に包含される本発明の範囲から逸脱することなく本明細書において形態および細部にさまざまな変更を加えることは、当業者であればわかるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0308】

【図1A】図1Aは、典型的なヒトFab'フラグメントの構造を示している。

【図1B】図1Bは、典型的なヒトFab'フラグメント中の5つの残基（VH中の3つの高度保存残基（H11[LeuまたはVal]、H110[Thr]、およびH112[Ser]）ならびにCH1中の2つの高度保存残基（H148[Phe]およびH149[Pro]））のクラスターを示している。このクラスターは、免疫グロブリン中においてCκ-CH1ドメインに対してVκ-VHドメインの配向を変化させるある程度の制御された可撓性を提供する。

【図1C】図1Cは、典型的なヒトFab'フラグメントのVκドメインとCκドメインとの間にみられる典型的な相互作用を示している。

【図2A】図2Aは、ヒト抗体およびヒトTCRのJセグメント中のアミノ酸配列のアライメントであり、保存モチーフを示している。アライメントされたアミノ酸配列は、ヒトIgH Jセグメント（配列番号1～6）、ヒトIgκ Jセグメント（配列番号7～11）、ヒトIgλ Jセグメント（配列番号12～18）、ヒトTCRβ Jセグメント（配列番号19～32）、ヒトTCRγ Jセグメント（配列番号33～37）、ヒトTCRδ Jセグメント（配列番号38～41）、およびヒトTCRαセグメント（配列番号42～98）に由来する。

【図2B】図2Bは、ヒト抗体およびヒトTCRのJセグメント中のアミノ酸配列のアライメントであり、保存モチーフを示している。アライメントされたアミノ酸配列は、ヒトIgH Jセグメント（配列番号1～6）、ヒトIgκ Jセグメント（配列番号7～11）、ヒトIgλ Jセグメント（配列番号12～18）、ヒトTCRβ Jセグメント（配列番号19～32）、ヒトTCRγ Jセグメント（配列番号33～37）、ヒトTCRδ Jセグメント（配列番号38～41）、およびヒトTCRαセグメント（配列番号42～98）に由来する。

【図3】図3は、種々の種由来の抗体重鎖（IgH）Jセグメント中の保存モチーフを示している。マウスIgH Jセグメント（配列番号99～102）、ラマIgH Jセグメント（配列番号103～107）、ヒツジIgH Jセグメント（配列番号108～113）、およびブタIgH Jセグメント（配列番号114）のアミノ酸アライメントが示されている。

【図4】図4は、種々の種由来の抗体κ鎖（Igκ）Jセグメント中の保存モチーフおよび種々の種由来の抗体λ鎖（Igλ）Jセグメント中の保存モチーフを示している。マウスIgκ Jセグメント（配列番号115～119）およびIgλ Jセグメント（配列番号126～130）、オポッサムIgκ Jセグメント（配列番号120～121）およびIgλ Jセグメント（配列番号131～133）、ならびにヒツジIgκ Jセグメント（配列番号122～125）およびIgλ Jセグメント（配列番号134）のアミノ酸配列アライメントが示されている。

【図5】図5は、マウス抗体定常ドメイン中の保存モチーフを示している。アミノ酸配列アライメントは、マウスIgのCH1領域（配列番号135～143）中、CH2領域（配列番号144～151）中、CH3領域（配列番号152～160）中、ヒンジ領域（配列番号161～171）中、Cκ領域（配列番号172～173）中、およびCλ領域（配列番号174～176）中の保存モチーフを示している。

【図6】図6は、ヒト抗体定常ドメイン中の保存モチーフを示している。アミノ酸配列アライメントは、ヒトIgのCH1領域（配列番号177～185）中、CH2領域（配列番号186～194）中、CH3領域（配列番号195～203）中、ヒンジ領域（配列番号204～210）中、Cκ領域（配列番号211）中、およびCλ領域（配列番号2

12～216)中の保存モチーフを示している。

【図7】図7は、ラクダ抗体定常ドメイン中およびヒトTCR定常ドメイン中の保存モチーフを示している。アミノ酸配列アライメントは、ラクダ抗体のCH1領域(配列番号217)中、CH2領域(配列番号218～219)中、CH3領域(配列番号220～221)中、およびヒンジ領域(配列番号222～223)中の保存モチーフを示している。いくつかのヒトTCR定常ドメインのアライメントもまた、示されている(配列番号224～230)。

【図8】図8は、ナースシャーク重鎖(IgH)Jセグメント(配列番号231～282)中およびナースシャークIgI Jセグメント(配列番号283～288)中の保存モチーフを示している。

【図9A】図9Aは、マウスTCR Jセグメント中の保存モチーフを示している。マウスTCRα Jセグメント(配列番号289～338)、マウスTCRβ Jセグメント(配列番号339～351)、およびマウスTCRδ Jセグメント(配列番号352～353)のアミノ酸配列アライメントが示されている。

【図9B】図9Bは、マウスTCR Jセグメント中の保存モチーフを示している。マウスTCRα Jセグメント(配列番号289～338)、マウスTCRβ Jセグメント(配列番号339～351)、およびマウスTCRδ Jセグメント(配列番号352～353)のアミノ酸配列アライメントが示されている。

【図10A】図10Aは、いくつかのラクダ科動物VHHのアミノ酸配列(配列番号354～383)のアライメントであり、VHH中に存在する保存モチーフ(＊が付されている)を示している。

【図10B】図10Bは、いくつかのラクダ科動物VHHのアミノ酸配列(配列番号354～383)のアライメントであり、VHH中に存在する保存モチーフ(＊が付されている)を示している。

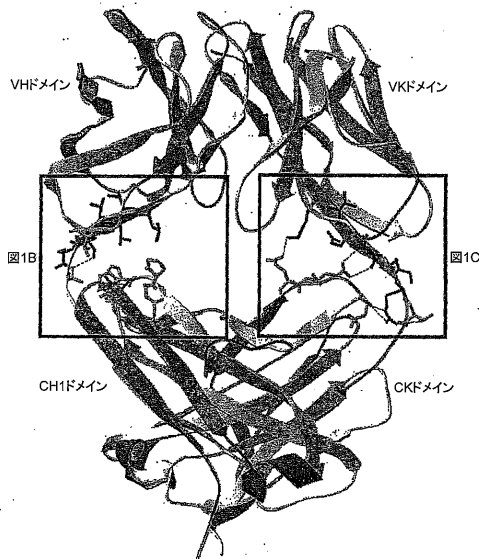
【図11】図11は、ヒトDP-47可変ドメインの生殖系列アミノ酸配列(配列番号384)およびラクダ科動物VHH#12B可変ドメインのアミノ酸配列(配列番号385)のアライメントである。アライメントは、FR1中に4アミノ酸の差異(位置1、5、28、および30)、FR3中に5アミノ酸の差異(位置74、76、83、84、および93)が存在し、かつ配列中に保存されたアミノ酸モチーフが存在することを明確に示している。

10

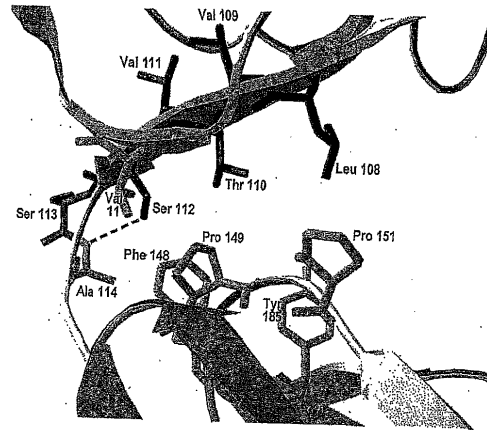
20

30

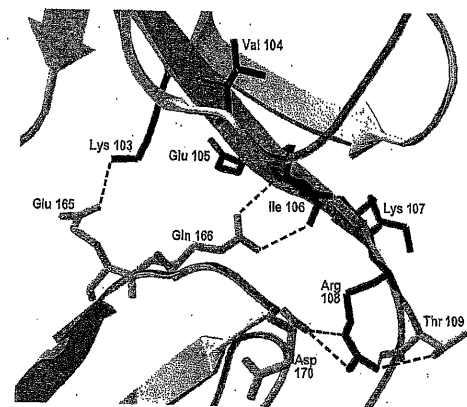
【図 1 A】



【図 1 B】



【図 1 C】



【図 2 A】

ヒトIGおよびTCR Jセグメント中の保存モチーフ

ヒトIGH Jセグメント

IGHJ1 ... AEFYFHWPGGTVTVSS
 IGHJ2 ... YHYDLMHGGTVTVSS
 IGHJ3 ... AFYFWPGGTVTVSS
 IGHJ4 ... YFYFWPGGTVTVSS
 IGHJ5 ... NMFDSWPGGTVTVSS
 IGHJ6 ... YYYTGNDWPGGTVTVSS

ヒトHGK Jセグメント

IGHK1 WFFPGGTVVEX
 IGHK2 YTFPGGTVLSX
 IGHK3 FTFPGGTVDX
 IGHK4 LTFPGGTVEX
 IGHK5 YTFPGGTVLSX

ヒトHGL Jセグメント

IGHL1 YVHGGTVTVL
 IGHJ2 VVHGGTVTVL
 IGHJ3 VVHGGTVTVL
 IGHJ4 VVHGGTVTVL
 IGHJ5 VVHGGTVTVL
 IGHJ6 VVHGGTVTVL
 IGHJ7 NVHGGTVTVL

ヒトTRB Jセグメント

TRBJ1-1 ... NTGAPFPGGTVTVV
 TRBJ1-2 ... NTGTFPGGTVTVV
 TRBJ1-3 ... SGTTFPGGTVTVV
 TRBJ1-4 ... TNEKLPFPGGTVSVL
 TRBJ1-5 ... SNQPGGTVGTVLSTL
 TRBJ1-6 ... SVNSLPFPGGTVTVV
 TRBJ2-1 ... SYNRQFPGGTVTVL
 TRBJ2-2 ... NTGHLFPFGGTVTVL
 TRBJ2-2P ... LKDAKGLPFGGTVTVL
 TRBJ2-3 ... STDQVFPFGGTVTVL
 TRBJ2-4 ... AKNTQVFPFGGTVSVL
 TRBJ2-5 ... QKQVFPFGGTVSVL
 TRBJ2-6 ... SQNVLPFGGTVSVL
 TRBJ2-7 ... SYDQVFPFGGTVTVL

ヒトTRG Jセグメント

TRGJ1 ... NYKKLLFPGGTVTVV
 TRGJ2 ... NYKKLLFPGGTVTVV
 TRGJ3 ... GQBLGKLLFPGGTVTVV
 TRGJ4 ... TIGWVLPFGGTVTVV
 TRGJ5 ... SGNVLPFGGTVTVV

ヒトTRD Jセグメント

TRDJ1 ... TDKLFPFGGTVTVV
 TRDJ2 ... TDQLFPFGGTVTVV
 TRDJ3 ... SNTDQVFPFGGTVTVV
 TRDJ4 ... RVLFPFGGTVTVV

【図 2 B】

ヒトTRA Jセグメント

TRAJ61 ... YRVHKLTPGNTVGMKL
 TRAJ59 ... KEGNKPFGGTVTVV
 TRAJ58 ... FTSGLPFGGTVTVV
 TRAJ57 ... TQGSGLPFGGTVTVV
 TRAJ56 ... YTGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ54 ... IQGAKLTPGNTVGMKL
 TRAJ53 ... NSGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ52 ... NSGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ50 ... KTSYDKVTPGNTVGMKL
 TRAJ49 ... NTGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ48 ... SNFGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ47 ... FTSGLPFGGTVTVV
 TRAJ46 ... KEGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ45 ... YSGGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ44 ... NTGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ43 ... NSGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ41 ... NSGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ40 ... TTSGLPFGGTVTVV
 TRAJ39 ... NNNAGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ38 ... KAGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ37 ... GSGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ36 ... QGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ35 ... IGFNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ34 ... SYNTDKLTPGNTVGMKL
 TRAJ33 ... DSNVQLTPGNTVGMKL
 TRAJ32 ... NSGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ31 ... NNNAGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ30 ... NRDKLTPGNTVGMKL
 TRAJ29 ... NSGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ28 ... YSGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ27 ... NTGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ26 ... DNYGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ25 ... EGQNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ24 ... TDSNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ23 ... TNGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ22 ... SSGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ21 ... YNFNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ20 ... SNDNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ19 ... YQRFNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ18 ... DRSNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ17 ... IKAAGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ16 ... FSDNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ15 ... HQAGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ14 ... YSTNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ13 ... NSGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ12 ... MDSNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ11 ... NSGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ10 ... ILGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ9 ... GTSNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ8 ... WTSNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ7 ... DYNNNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ6 ... ASGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ5 ... DTSNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ4 ... FSGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ3 ... GYSNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ2 ... NTGNSKLTPGNTVGMKL
 TRAJ1 ... YESNSKLTPGNTVGMKL

【図 10A】

```

FR1          CDR1          FR2
VHH#3G  QVQLQDSGGGLVQAGGSRLSCAVER  FFAHDS---VYMG  WFRQAPGKEREFVA
VHH#2E  QVQLQDSGGGLVQAGGSRLSCAASGR  WFDHNGYTTTG  WFRQAPGKEREFVA
VHH#1A  QVQLQDSGGGLVQAGGSRLSCAASGF  WFS--VSRNY---  WFRQAPGKEREFVA
VHH#2B  QVQLQDSGGGLVQAGGSRLSCAASGF  WFS--DTRNT---  WFRQAPGKEREFVA
VHH#12B QVQLQDSGGGLVQAGGSRLSCAASGF  WFS--VSRNY---  WFRQAPGKEREFVA
VHH#7B  QVQLQDSGGGLVQAGGSRLSCAASGS  TFEVDA-----  WFRQAPGKEREFVA
          *****
          * * * * *

CDR2          FR2
VHH#3G  NTPSSAMFTYADSVES  RFTISRDNAKFTVYLQMSLKPEDTAVTYCA
VHH#1E  NTPSSAMFTYADSVES  RFTISRDNAKFTVYLQMSLKPEDTAVTYCA
VHH#1A  RDMNGLHETVDSEVSG  RFTISRDNAKFTVYLQMSLKPEDTAVTYCA
VHH#2B  RDMNGLHETVDSEVSG  RFTISRDNAKFTVYLQMSLKPEDTAVTYCA
VHH#12B RDMNGLHETVDSEVSG  RFTISRDNAKFTVYLQMSLKPEDTAVTYCA
VHH#7B  RDMNGLHETVDSEVSG  RFTISRDNAKFTVYLQMSLKPEDTAVTYCA
          *****
          * * * * *

CDR3          FR4          Hinge
VHH#3G  RDGIPSRKTVASDNY  WSGGTQVTVS  RPTKPKQP
VHH#1E  RDGIPSRKTVASDNY  WSGGTQVTVS  RPTKPKQP
VHH#1A  -----FSGSF  WSGGTQVTVS  RPTKPKQP
VHH#2B  -VVPFSDSDSDND  WSGGTQVTVS  RPTKPKQP
VHH#12B -VVPFSDSDSDND  WSGGTQVTVS  RPTKPKQP
VHH#7B  --LQGSRLSINY  WSGGTQVTVS  RPTKPKQP
          *****

```

【図 10B】

```

FR1          CDR1          FR2
VHH#m3F  QVQLQDSGGGLVQAGGSRLSCAASGG  FFSSTLMA  WFRQAPGKEREFVGA
VHH#m4B  QVQLQDSGGGLVQAGGSRLSCAASGG  FFSSTLMA  WFRQAPGKEREFVGA
VHH#m9A  EVQLVDSGGGLVQAGGSRLSCAASGG  TFSSTLMA  WFRQAPGKEREFVGA
VHH#m9E  QVQLVDSGGGLVQAGGSRLSCAASGG  TFSSTLMA  WFRQAPGKEREFVGA
          *****

CDR2          FR2
VHH#m3F  VWSGGGTIVYADSVLG  RFTISRDNAKFTVYLQMSLKPEDTAVTYCA
VHH#m4B  VWSGGGTIVYADSVLG  RFTISRDNAKFTVYLQMSLKPEDTAVTYCA
VHH#m9A  VWSGGGTIVYADSVLG  RFTISRDNAKFTVYLQMSLKPEDTAVTYCA
VHH#m9E  VWSGGGTIVYADSVLG  RFTISRDNAKFTVYLQMSLKPEDTAVTYCA
          * * * * *

CDR3          FR4          Hinge
VHH#m3F  RPTKPKQA-SASTNY  WSGGTQVTVS  RPTKPKQP
VHH#m4B  SP--KVMAYVSTND  WSGGTQVTVS  RPTKPKQP
VHH#m9A  RPTKPKQA-SASTNY  WSGGTQVTVS  -----
VHH#m9E  RPTKPKQA-SASTNY  WSGGTQVTVS  -----
          * * * * *

```

【図 11】

- FR4中の位置108における1AA変化

以下の配列アライメントで示される

```

DP-17  WFRQAPGKEREFVA  QVQLQDSGGGLVQAGGSRLSCAASGG  FFSSTLMA  WFRQAPGKEREFVGA  AFSGGGTIVY
VHH#12B QVQLQDSGGGLVQAGGSRLSCAASGG  FFSSTLMA  WFRQAPGKEREFVGA  AFSGGGTIVY
DP-17  AFSGGGTIVY  RFTISRDNAKFTVYLQMSLKPEDTAVTYCA  -----
VHH#12B AFSGGGTIVY  RFTISRDNAKFTVYLQMSLKPEDTAVTYCA  WFPFSDSDSDND  WSGGTQVTVS

```

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2007/000227

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/62 C07K16/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/024771 A (AFFIMED THERAPEUTICS AG [DE]; LE GALL FABRICE [DE]; KIPRIYANOV SERGEY) 25 March 2004 (2004-03-25) the whole document	1-275
A	WO 00/78334 A (UNIV MARYLAND BIOTECH INST [US]; INST OF MOLECUL & CELL BIOLOGY [SG];) 28 December 2000 (2000-12-28) the whole document	1-275

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 April 2007

Date of mailing of the international search report

08/05/2007

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wagner, René

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2007/000227

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VOELKEL T ET AL: "Optimized linker sequences for the expression of monomeric and dimeric bispecific single-chain antibodies" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 14, no. 10, October 2001 (2001-10), pages 815-823, XP002185481 ISSN: 0269-2139 the whole document	1-275
A	WU A M ET AL: "Multimerization of a chimeric anti-CD20 single-chain Fv-Fc fusion protein is mediated through variable domain exchange" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 14, no. 12, 2001, pages 1025-1033, XP002982160 ISSN: 0269-2139 the whole document	1-275
A	KORTT A A ET AL: "Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting" BIOMOLECULAR ENGINEERING, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 18, no. 3, 15 October 2001 (2001-10-15), pages 95-108, XP004305907 ISSN: 1389-0344 the whole document	1-275
A	TANG Y ET AL: "Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 271, no. 26, 1996, pages 15682-15686, XP002962142 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-275
A	ALFTHAN K ET AL: "Properties of a single-chain antibody containing different linker peptides" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 8, no. 7, July 1995 (1995-07), pages 725-731, XP002112077 ISSN: 0269-2139 the whole document	1-275
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2007/000227

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/079232 A (LEXIGEN PHARM CORP [US]) 10 October 2002 (2002-10-10) the whole document	1-275
A	WO 97/00319 A (SMITHKLINE BEECHAM PLC [GB]; BROWNE MICHAEL JOSEPH [GB]; CHAPMAN CONRA) 3 January 1997 (1997-01-03) the whole document	1-275
A	LE GALL FABRICE ET AL: "Effect of linker sequences between the antibody variable domains on the formation, stability and biological activity of a bispecific tandem diabody" PROTEIN ENGINEERING DESIGN & SELECTION, vol. 17, no. 4, April 2004 (2004-04), pages 357-366, XP002429042 ISSN: 1741-0126 the whole document	1-275

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2007/000227

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004024771	A	25-03-2004	AU 2003270169 A1	30-04-2004
			CA 2498523 A1	25-03-2004
			EP 1400534 A1	24-03-2004
			JP 2006516184 T	29-06-2006
			US 2006233787 A1	19-10-2006
WO 0078334	A	28-12-2000	AU 5617900 A	09-01-2001
WO 02079232	A	10-10-2002	BR 0208207 A	28-09-2004
			CA 2442363 A1	10-10-2002
			CN 1531545 A	22-09-2004
			EP 1373301 A2	02-01-2004
			HU 0303753 A2	01-03-2004
			JP 2004532020 T	21-10-2004
			MX PA03008715 A	11-12-2003
			PL 366826 A1	07-02-2005
			WO 02079415 A2	10-10-2002
			ZA 200308430 A	03-09-2004
WO 9700319	A	03-01-1997	AU 6011096 A	15-01-1997
			CA 2224646 A1	03-01-1997
			EP 0832219 A2	01-04-1998
			JP 11507547 T	06-07-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 バックマン, ローランド
イギリス国 シービー 4 0 ダブリュジー ケンブリッジ, ケンブリッジ サイエンス パーク
3 1 5

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA61 CA02 CA07 EA04 HA01
4B064 AG26 CA19 CC24 DA01
4B065 AA90Y AB01 AC14 CA25 CA44
4C084 AA02 AA07 AA17 BA01 BA41 CA18 CA21 CA22 CA23 DA25
DB63 NA06 ZB081 ZC752
4C085 AA34 BB36 BB42 CC22 CC32 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA75 EA20 FA74