

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6967221号

(P6967221)

(45) 発行日 令和3年11月17日 (2021. 11. 17)

(24) 登録日 令和3年10月27日 (2021. 10. 27)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C 1 2 P 21/08 (2006. 01)	C 1 2 P 21/08
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18
C O 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15

請求項の数 29 (全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-535557 (P2017-535557)	(73) 特許権者	503359821
(86) (22) 出願日	平成28年8月18日 (2016. 8. 18)		国立研究開発法人理化学研究所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2016/074056		埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
(87) 国際公開番号	W02017/030156	(73) 特許権者	000001029
(87) 国際公開日	平成29年2月23日 (2017. 2. 23)		協和キリン株式会社
審査請求日	令和1年8月15日 (2019. 8. 15)		東京都千代田区大手町一丁目 9 番 2 号
(31) 優先権主張番号	特願2015-162160 (P2015-162160)	(74) 代理人	230104019
(32) 優先日	平成27年8月19日 (2015. 8. 19)		弁護士 大野 聖二
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)	(74) 代理人	100119183
			弁理士 松任谷 優子
		(74) 代理人	100149076
			弁理士 梅田 慎介
		(74) 代理人	100173185
			弁理士 森田 裕

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非天然アミノ酸導入抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体の定常領域に、N6-（（ベンジルオキシ）カルボニル）-L-リジン誘導体（以下、Z-リジン誘導体）を少なくとも1つ含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって

EUインデックスにおいて、ヒトIgG抗体の重鎖の177番目ならびにヒト抗体のκ鎖の191および197番目からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がZ-リジン誘導体であり、

前記Z-リジン誘導体がオルト-アジド-Z-リジンである、前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

少なくとも1つのZ-リジン誘導体が修飾されている、請求項1に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

前記修飾が、Z-リジン誘導体と反応性を有する分子による化学修飾である、請求項2に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

前記Z-リジン誘導体と反応性を有する分子が、親水性高分子、両親媒性高分子および機能性分子からなる群より選ばれる少なくとも1つの分子である、請求項3に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

前記Z-リジン誘導体と反応性を有する分子が、PEG、抗原結合分子、薬物および蛍光化合物からなる群より選ばれる少なくとも1つの分子である、請求項3または4に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

前記抗原結合分子がモノクローナル抗体またはその抗原結合断片である、請求項5に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7】

前記抗原結合断片が、Fab、Fab'、(Fab')₂、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(diabody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)およびCDRを含むペプチドからなる群より選ばれる抗原結合断片である、請求項1～6のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 8】

前記モノクローナル抗体が遺伝子組換え抗体である、請求項1～7のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

前記遺伝子組換え抗体がマウス抗体、ラット抗体、ラビット抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項8に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 10】

請求項1～9のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードする塩基配列を有する核酸。

20

【請求項 11】

請求項10に記載の核酸を含有するベクター。

【請求項 12】

請求項11に記載のベクターを含む形質転換細胞。

【請求項 13】

前記細胞が原核細胞または真核細胞である、請求項12に記載の形質転換細胞。

【請求項 14】

請求項12または13に記載の形質転換細胞を培地中で培養し、培養物から抗体またはその抗原結合断片を採取することを含む、請求項1～9のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片の製造方法。

30

【請求項 15】

請求項1～9のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む組成物。

【請求項 16】

抗体の定常領域に、N6-((トランス-シクロオクト-2-エン-1-イル)オキシ)カルボニル)-L-リジン(以下、TCO*-Lys)およびN6-((ビシクロ[6.1.0]ノン-4-イン-9-イルメトキシ)カルボニル)-L-リジン(以下、BCN-Lys)からなる群より選ばれる少なくとも1つのリジン誘導体を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、

40

EUインデックスにおいて、ヒトIgG抗体の重鎖の121番目のアミノ酸残基がTCO*-Lysである、および/または、ヒトIgG抗体の重鎖の131番目のアミノ酸残基がTCO*-LysまたはBCN-Lysである、前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 17】

少なくとも1つのリジン誘導体が修飾されている、請求項16に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 18】

前記修飾が、リジン誘導体と反応性を有する分子による化学修飾である、請求項17に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 19】

50

前記リジン誘導体と反応性を有する分子が、親水性高分子、両親媒性高分子および機能性高分子からなる群より選ばれる少なくとも1つの分子である、請求項18に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項20】

前記リジン誘導体と反応性を有する分子が、PEG、抗原結合分子、薬物および蛍光化合物からなる群より選ばれる少なくとも1つの分子である、請求項18または19に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項21】

前記抗原結合分子がモノクローナル抗体またはその抗原結合断片である、請求項20に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項22】

前記抗原結合断片が、Fab、Fab'、(Fab')₂、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(diabody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)およびCDRを含むペプチドからなる群より選ばれる抗原結合断片である、請求項16～21のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項23】

前記モノクローナル抗体が遺伝子組換え抗体である、請求項16～22のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項24】

前記遺伝子組換え抗体がマウス抗体、ラット抗体、ラビット抗体、キメラ抗体、ヒト抗体またはヒト抗体である、請求項23に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項25】

請求項16～24のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードする塩基配列を有する核酸。

【請求項26】

請求項25に記載の核酸を含有するベクター。

【請求項27】

請求項26に記載のベクターを含む形質転換細胞。

【請求項28】

請求項27に記載の形質転換細胞を培地中で培養し、培養物から抗体またはその抗原結合断片を採取することを含む、請求項16～24のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片の製造方法。

30

【請求項29】

請求項16～24のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

[関連出願]

本出願は、日本特許出願2015-162160号(2015年8月19日出願)に基づく優先権を主張しており、この内容は本明細書に参照として取り込まれる。

[技術分野]

本発明は、ヒトIgG抗体の定常領域において、少なくとも1つのリジン誘導体を含むモノクローナル抗体または該抗体断片に関する。また本発明は、該リジン誘導体が化学修飾された修飾化抗体または該修飾化抗体断片に関する。

【背景技術】

【0002】

50

抗体の高い結合特異性を活かした新たな抗体誘導体として、抗体薬物融合体 (Antibody-Drug Conjugate、ADC) が注目されている。ADCは、抗体結合に起因した標的抗原のエンドサイトーシスを利用して、抗体誘導体内に搭載した機能性分子の1つである薬物を標的細胞内に特異的に送達することが可能である。既に、Mylotarg (登録商標) (Gemtuzumab Ozogamicin) やKadcyla (登録商標) (Trastuzumab-DM1)、Adcetris (登録商標) (Brentuximab vedotin) がADC製剤として承認を受け、さらに多数のADC製剤が臨床開発されており、ADC製剤は今後の新しい医薬品形態として期待されている (非特許文献1)。

【0003】

既存のADC製剤は、抗体分子中のリジン残基の ϵ -アミノ基、またはCys残基のチオール基を介して共有結合されている。この様な修飾方法は通常、抗体1分子当りに付加された個数が異なる不均一な混合物を形成することが明らかとなっており、それぞれの体内動態に差異を生じる懸念や安定した生産プロセスを構築していく上での困難を生じる (非特許文献2)。

【0004】

結合親和性、結合特異性および血中での安定性に影響を与えず、均一性の高いADC製剤を作製する方法のひとつとして、抗体または抗体断片の特定部位、特定領域内へのCys残基の導入が報告されている (特許文献8)。その後、様々なアプローチにより抗体または抗体断片の軽鎖ならびに重鎖定常領域の特定部位へのCys残基の導入により、部位特異的な抗体が調製可能であることが報告されている (特許文献1、9)。

【0005】

一方で、天然アミノ酸と異なる反応性を持つ非天然アミノ酸をタンパク質に導入し、その非天然アミノ酸残基を選択的に化学修飾する方法が開発されている。例えば、非天然アミノ酸であるアセチルフェニルアラニンを導入し、反応基で修飾されたリンカーが付加された薬剤分子オーリスチン誘導体を、オキシムライゲーションと呼ばれる反応によって、特異的にアセチルフェニルアラニンに結合させることができる (特許文献2、非特許文献3)。しかしこの手法は反応効率が十分に高くなく、反応に際して高濃度のアセチルフェニルアラニン導入抗体または抗体断片と、酸性条件下における長時間の反応を要することから、抗体または抗体断片、あるいは薬剤への変性等の影響が懸念されることが課題である。

【0006】

反応効率がより高く、また特異性も高い反応として、アジド基とアルキンとの間で生じるクリックケミストリーが知られている。実際に、アジド基で修飾された非天然アミノ酸を抗体または抗体断片に導入して化学修飾を施すことが可能である。例えば、非天然アミノ酸であるアジドフェニルアラニンあるいはアジドメチルフェニルアラニンを抗体に導入し、クリックケミストリーにより薬剤分子を付加したことが報告されている (特許文献3、非特許文献4)。

【0007】

前述のアセチルフェニルアラニン、アジドフェニルアラニンあるいはアジドメチルフェニルアラニンはいずれもチロシルtRNA合成酵素 (tyrosyl tRNA synthetase, Tyr RS) を用いて導入され、導入部位としては溶媒露出面積の割合が比較的高いタンパク質表面に近い部位、例えば、溶媒露出面積 (ASA ; Accessible Surface Area) の割合 (ASA Ratio) が40 %以上の部位が主として報告されている。一方で、ピロリジルtRNA合成酵素 (Pyrrolysyl tRNA synthetase, Pyl RS) を用いて、長い側鎖を持つ非天然アミノ酸であるピロリジン誘導体を導入する方法も開発され、クリックケミストリーにより化学修飾したことも報告されている (特許文献4、非特許文献5)。

【0008】

実際に、ピロリジン誘導体を抗体に導入した例が報告されているが、抗体種間で配列が共通である定常領域においてはASA Ratioの高い部位に注目し、ピロリジン誘導体が導入されている (特許文献5、特許文献6)。

【0009】

抗体に非天然アミノ酸を導入することによる部位選択的な化学修飾は、優れたADC製剤の作製法とは別の観点でも有用である。例えば、化学コンジュゲーションによる遺伝子組換え二重特異性抗体の作製法を提供する。二重特異性抗体とは通常、異なる抗原またはエピトープに対する2つの異なる結合パラトープを有する改変免疫グロブリン誘導体である。安定で均一な二重特異性抗体を産生するため、これまでに主として遺伝子工学的に抗原結合ドメインを融合した新規構造フォーマットの開発が行われてきた。しかし、化学コンジュゲーションにより二重特異性抗体を作製した例として、前述のアセチルフェニルアラニンが導入された異なる抗体同士をオキシムライゲーション反応によりヘテロ二量体化した例（非特許文献6）や、アジドホモアラニンが導入された異なる抗体同士をクリックケミストリーによりヘテロ二量体化した例（特許文献7）も報告されている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】国際公開第2011/118739号

【特許文献2】国際公開第2013/068874号

【特許文献3】国際公開第2014/004639号

【特許文献4】特開第2007/37445号

【特許文献5】国際公開第2014/044872号

【特許文献6】国際公開第2014/124258号

【特許文献7】特表第2013/545438号

20

【特許文献8】米国特許第5219996号

【特許文献9】国際公開第2006/034488号

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Nat Rev Drug Discov., 12, 329-332 (2013)

【非特許文献2】MAbs, 6, 34-45 (2014)

【非特許文献3】Proc Natl Acad Sci USA, 109, 16101-10606 (2012)

【非特許文献4】Bioconjugate Chem., 25, 351-361 (2014)

【非特許文献5】Chem Biol., 15, 1187-1197 (2008)

【非特許文献6】J. Am. Chem. Soc., 134, 9918-9921 (2012)

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の課題は、抗体の可変領域のアミノ酸配列に依存することなく部位特異的な化学修飾を行うための新規な手段を提供することにある。また、本発明の課題は、抗体の可変領域のアミノ酸配列に依存することなく高効率に部位特異的な化学修飾を行うための新規な手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

上記課題を解決するための手段として、本発明ではリジン誘導体を抗体または該抗体断片に導入する。具体的には、本発明ではZ-リジン誘導体、TCO^{*}-LysまたはBCN-Lysなどのリジン誘導体を抗体または抗体断片に導入する。非天然アミノ酸をタンパク質に導入し、該非天然アミノ酸残基を選択的に化学修飾する方法が複数報告されているが、非天然アミノ酸の一種であるZ-リジン誘導体、TCO^{*}-LysまたはBCN-Lysを抗体または抗体断片の定常領域に導入した例は報告されていない。

40

【0014】

すなわち、本発明は、抗体の定常領域に化学修飾が可能なリジン誘導体を少なくとも1つ含むモノクローナル抗体または該抗体断片、具体的には抗体の定常領域に化学修飾が可能な、Z-リジン誘導体、TCO^{*}-LysまたはBCN-Lysを少なくとも1つ含むモノクローナル抗体または該抗体断片、該リジン誘導体が化学修飾された修飾化抗体または該修飾化抗体断片

50

、該抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を含む核酸、該核酸を含むベクター、該ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞、該抗体または該抗体断片の製造方法、該抗体または該抗体断片を含む組成物に関する。

【0015】

具体的には、本発明は以下の(1)～(41)に関する。

(1) 抗体の定常領域に、N6-((ベンジルオキシ)カルボニル)-L-リジン誘導体(以下、Z-リジン誘導体)を少なくとも1つ含む、モノクローナル抗体または該抗体断片。

(2) 前記抗体の定常領域が、ヒト、ラット、ラビットおよびマウスから選ばれる抗体の定常領域である、(1)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(3) 前記抗体の定常領域が、抗体の重鎖定常領域および軽鎖定常領域からなる群より選ばれる少なくとも1つの定常領域である、(1)または(2)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

10

(4) 前記抗体の定常領域が、CH1領域、 κ 鎖定常領域および λ 鎖定常領域からなる群より選ばれる少なくとも1つの定常領域である、(1)～(3)のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(5) 下記a)～c)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がZ-リジン誘導体である、(1)～(4)のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

a) KabatらによるEUインデックス(以下、EUインデックス)において、ヒトIgG抗体の重鎖の118、120、121、127、129、131、133、135、152、159、169、173、174、177、180、190、199、205および210番目のアミノ酸残基。

20

b) EUインデックスにおいて、ヒト抗体の κ 鎖の110、112、119、138、141、145、147、149、153、154、155、158、161、167、169、180、183、184、191、195、197、205、207、210および211番目のアミノ酸残基。

c) EUインデックスにおいて、ヒト抗体の λ 鎖の110、119、125、127、129、143、147、160、161、165、166、172、173、180、187、189、191、195、205、207、210、および215番目のアミノ酸残基。

(6) EUインデックスにおいて、ヒトIgG抗体の重鎖の131、177および199番目ならびにヒト抗体の κ 鎖の155、191および197番目からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がZ-リジン誘導体である、(1)～(5)のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

30

(7) 少なくとも1つのZ-リジン誘導体が修飾されている、(1)～(6)のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(8) 前記修飾が、Z-リジン誘導体と反応性を有する分子による化学修飾である、(7)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(9) 前記Z-リジン誘導体と反応性を有する分子が、親水性高分子、両親媒性高分子および機能性分子からなる群より選ばれる少なくとも1つの分子である、(8)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(10) 前記Z-リジン誘導体と反応性を有する分子が、PEG、抗原結合分子、薬物および蛍光化合物からなる群より選ばれる少なくとも1つの分子である、(8)または(9)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

40

(11) 前記抗原結合分子がモノクローナル抗体または該抗体断片である、(10)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(12) 前記抗体断片が、Fab、Fab'、(Fab')₂、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(diabody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)およびCDRを含むペプチドからなる群より選ばれる抗体断片である、(1)～(11)のいずれか1つに記載の抗体断片。

(13) 前記モノクローナル抗体が遺伝子組換え抗体である、(1)～(12)のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(14) 前記遺伝子組換え抗体がマウス抗体、ラット抗体、ラビット抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である、(13)に記載のモノクローナル抗体または該抗体

50

断片。

(15) (1) ~ (14) のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を有する核酸。

(16) (15) に記載の核酸を含有するベクター。

(17) (16) に記載のベクターを含む形質転換細胞。

(18) 前記細胞が原核細胞または真核細胞である、(17) に記載の形質転換細胞。

(19) (17) または(18) に記載の形質転換細胞を培地中で培養し、培養物から抗体または該抗体断片を採取することを含む、(1) ~ (14) のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の製造方法。

(20) (1) ~ (14) のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を含む組成物。 10

(21) 抗体の定常領域に、N6-((トランス-シクロオクト-2-エン-1-イル) オキシ) カルボニル)-L-リジン(以下、TCO^{*}-Lys) およびN6-(ビシクロ[6.1.0] ノン-4-イン-9-イルメトキシ) カルボニル)-L-リジン(以下、BCN-Lys) からなる群より選ばれる少なくとも1つのリジン誘導体を含むモノクローナル抗体または該抗体断片。

(22) 抗体の定常領域が、ヒト、ラット、ラビットおよびマウスから選ばれる抗体の定常領域である、(21) に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(23) 抗体の定常領域が、抗体の重鎖定常領域および軽鎖定常領域からなる群より選ばれる少なくとも1つの定常領域である、(21) または(22) に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。 20

(24) 抗体の定常領域が、CH1領域、κ鎖定常領域およびλ鎖定常領域からなる群より選ばれる少なくとも1つの定常領域である、(21) ~ (23) のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(25) 下記a)~c)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がリジン誘導体である、(21) ~ (24) のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

a) KabatらによるEUインデックス(以下、EUインデックス)において、ヒトIgG抗体の重鎖の118、120、121、127、129、131、133、135、152、159、169、173、174、177、180、190、199、205および210番目のアミノ酸残基。

b) EUインデックスにおいて、ヒト抗体のκ鎖の110、112、119、138、141、145、147、149、153、154、155、158、161、167、169、180、183、184、191、195、197、205、207、210および211番目のアミノ酸残基。 30

c) EUインデックスにおいて、ヒト抗体のλ鎖の110、119、125、127、129、143、147、160、161、165、166、172、173、180、187、189、191、195、205、207、210、および215番目のアミノ酸残基。

(26) 少なくとも1つのリジン誘導体が修飾されている、(21) ~ (25) のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(27) 前記修飾が、リジン誘導体と反応性を有する分子による化学修飾である、(26) に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(28) 前記リジン誘導体と反応性を有する分子が、親水性高分子、両親媒性高分子および機能性高分子からなる群より選ばれる少なくとも1つの分子である、(27) に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。 40

(29) 前記リジン誘導体と反応性を有する分子が、PEG、抗原結合分子、薬物および蛍光化合物からなる群より選ばれる少なくとも1つの分子である、(27) または(28) に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(30) 前記抗原結合分子がモノクローナル抗体または該抗体断片である、(29) に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(31) 前記抗体断片が、Fab、Fab'、(Fab')₂、一本鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(diabody)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)およびCDRを含むペプチドからなる群より選ばれる抗体断片である、(21) ~ (30) のいずれか1つに記載の抗体断片。 50

(32) 前記モノクローナル抗体が遺伝子組換え抗体である、(21)～(31)のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(33) 前記遺伝子組換え抗体がマウス抗体、ラット抗体、ラビット抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である、(32)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(34) (21)～(33)のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を有する核酸。

(35) (34)に記載の核酸を含有するベクター。

(36) (35)に記載のベクターを含む形質転換細胞。

(37) (36)に記載の形質転換細胞を培地中で培養し、培養物から抗体または該抗体断片を採取することを含む、(21)～(33)のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片の製造方法。

(38) (21)～(33)のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体または該抗体断片を含む組成物。

(39) Z-リジン誘導体がアジド-Z-リジン、エチニル-Z-リジン、アミノ-Z-リジンおよびホルミル-Z-リジンから選ばれる少なくとも1つである(1)～(13)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(40) Z-リジン誘導体がアジド-Z-リジンまたはエチニル-Z-リジンの少なくともいずれか1つである(1)～(13)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

(41) Z-リジン誘導体がアジド-Z-リジンである(1)～(13)に記載のモノクローナル抗体または該抗体断片。

【発明の効果】

【0016】

本発明の抗体または該抗体断片は、定常領域に少なくとも1つのリジン誘導体を含むことにより、抗体の可変領域のアミノ酸配列に依存することなく部位特異的な化学修飾を行うことができる。具体的には、本発明の抗体または該抗体断片は、定常領域に少なくとも1つのZ-リジン誘導体、TCO^{*}-LysまたはBCN-Lysなどのリジン誘導体を含むことにより、抗体の可変領域のアミノ酸配列に依存することなく部位特異的な化学修飾を行うことができる。すなわち、いずれの抗体においても部位特異的にリジン誘導体を導入し、化学修飾を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-FabのHer2に対する結合活性を示す。縦軸は450 nmの吸光度から600 nmの吸光度を差し引いた数値を、横軸はFabの濃度(nM)をそれぞれ表す。

【図2】図2は、o-Az-Z-Lys導入Cixutumumab-FabのIGF-1Rに対する結合活性を示す。縦軸は450 nmの吸光度から600 nmの吸光度を差し引いた数値を、横軸はFabの濃度(nM)をそれぞれ表す。

【図3】図3は、o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fab修飾化抗体の細胞傷害活性を示す。縦軸は、細胞の生存率(%)を、横軸はFabまたはDM1の濃度(nM)をそれぞれ表す。

【図4】図4は、o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fab修飾化抗体の細胞傷害活性を示す。縦軸は、細胞の生存率(%)を、横軸はFabの濃度(nM)をそれぞれ表す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明は、非天然アミノ酸・リジン誘導体を含む抗体または該抗体断片に関する。具体的には、本発明は、N⁶-((ベンジルオキシ)カルボニル)-L-リジン誘導体(以下、Z-リジン誘導体、Z-リジンは、N^ε-ベンジルオキシカルボニル-リジン(WO2009/038195)ともいう。)、N⁶-((トランス-シクロオクト-2-エン-1-イル)オキシ)カルボニル)-L-リジン(以下、TCO^{*}-Lys)またはN⁶-((ピシクロ[6.1.0]ノン-4-イン-9-イルメトキシ)カルボニル)-L-リジン(以下、BCN-Lys)を含む抗体または該抗体断片に関する。

【0019】

より具体的には、抗体の定常領域において、少なくとも1つのZ-リジン誘導体、TCO^{*}-LysまたはBCN-Lysなどのリジン誘導体を含む抗体または該抗体断片に関する（以下、単に本発明の抗体または、該抗体断片と記載する。また、Z-リジン誘導体導入抗体または該抗体断片、TCO^{*}-Lys導入抗体または該抗体断片、BCN-Lys導入抗体または該抗体断片などと記載することもある。）。

【0020】

非天然アミノ酸とは、天然の生物で遺伝的にコードされているアミノ酸以外のアミノ酸を意味する。なお、遺伝的にコードされているアミノ酸とは、生物が普遍的に利用する20種類の標準型アミノ酸に、セレンオメチオニン（Selenomethionine）、ピロリジン（Pyrrolysine）を加えた22種類のアミノ酸のことである。

10

【0021】

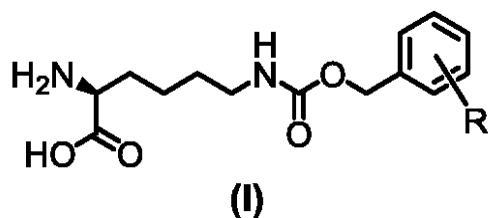
リジン誘導体とは、非天然アミノ酸であって、リジン中の原子あるいは原子団が、他の原子あるいは原子団によって置換された化合物をいう。本発明において、リジン誘導体は反応性を有する非天然アミノ酸であればいかなるものでもよい。また、リジンはL-リジンまたはD-リジンのいずれでもよいが、L-リジンであることが好ましい。リジン誘導体の具体例としては、Z-リジン誘導体、TCO^{*}-LysまたはBCN-Lysなどがあげられる。

【0022】

本発明において、Z-リジン誘導体は、下記一般式（I）

【化1】

20



で表わされる化合物である。

【0023】

一般式（I）中、Rは反応性を有する置換基であれば、いかなる置換基でもよいが、アジド、アジド低級アルキル、低級アルキニル、アミノまたはホルミルであることが好ましく、アジド、エチニル、アミノまたはホルミルであることがより好ましい。アジド低級アルキルの低級アルキル部分としては、例えば炭素数2～4のアルキルがあげられ、より具体的にはメチル、エチル、プロピル、ブチルなどがあげられる。低級アルキニルとしては、例えば炭素数2～4のアルキニルがあげられ、より具体的には、エチニル、プロピニル、ブチニルなどがあげられる。一般式（I）中、Rは1つ、2つまたは3つ存在していてもよいが、オルト位またはメタ位に1つ置換されているのが好ましい。また、Rが2つまたは3つ存在する場合は、Rはそれぞれ同一または異なってもよい。

30

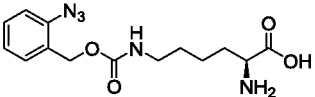
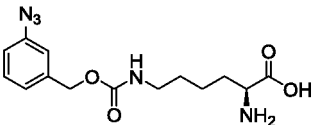
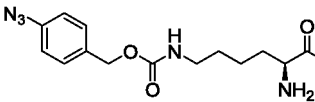
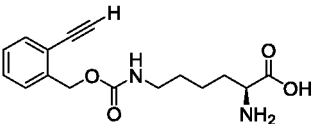
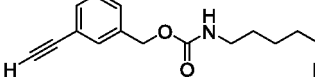
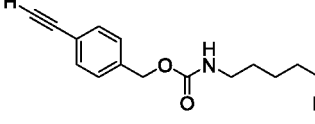
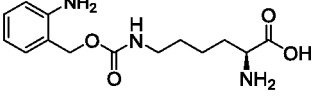
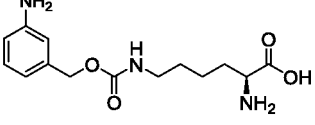
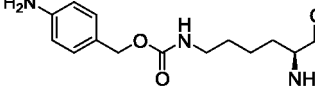
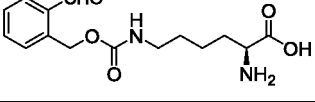
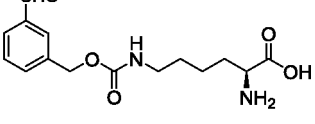
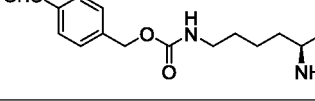
【0024】

本発明に使用されるZ-リジン誘導体の具体例を表1に示す。ただし、本発明に使用されるZ-リジン誘導体はこれらに限定されるものではない。

40

【0025】

【表 1】

化合物名	化学構造
オルト-アジド-Z-リジン	
メタ-アジド-Z-リジン	
パラ-アジド-Z-リジン	
オルト-エチニル-Z-リジン	
メタ-エチニル-Z-リジン	
パラ-エチニル-Z-リジン	
オルト-アミノ-Z-リジン	
メタ-アミノ-Z-リジン	
パラ-アミノ-Z-リジン	
オルト-ホルミル-Z-リジン	
メタ-ホルミル-Z-リジン	
パラ-ホルミル-Z-リジン	

【0026】

本発明において、オルト-アジド-Z-リジン、メタ-アジド-Z-リジンおよびパラ-アジド-Z-リジンの総称をアジド-Z-リジンとする。オルト-エチニル-Z-リジン、メタ-エチニル-Z

10

20

30

40

50

-リジンおよびパラ-エチニル-Z-リジンの総称をエチニル-Z-リジンとする。オルト-アミノ-Z-リジン、メタ-アミノ-Z-リジンおよびパラ-アミノ-Z-リジンの総称をアミノ-Z-リジンとする。オルト-ホルミル-Z-リジン、メタ-ホルミル-Z-リジンおよびパラ-ホルミル-Z-リジンの総称をホルミル-Z-リジンとする。

アジド-Z-リジンの中でも、オルト-アジド-Z-リジンまたはメタ-アジド-Z-リジンが好ましく、エチニル-Z-リジンの中でも、オルト-エチニル-Z-リジンまたはメタ-エチニル-Z-リジンが好ましく、アミノ-Z-リジンの中でも、オルト-アミノ-Z-リジンまたはメタ-アミノ-Z-リジンが好ましく、ホルミル-Z-リジンの中でも、オルト-ホルミル-Z-リジンまたはメタ-ホルミル-Z-リジンが好ましい。

【0027】

10

本発明の抗体としては、具体的には、抗体の定常領域において、Z-リジン誘導体を少なくとも1つ含む抗体があげられる。より好ましくは、抗体の定常領域において、アジド、アジド低級アルキル、低級アルキニル、アミノおよびホルミルから選ばれる置換基を有するZ-リジン誘導体を少なくとも1つ含む抗体があげられる。

【0028】

また、本発明の抗体として、より具体的にはアジド-Z-リジン、エチニル-Z-リジン、アミノ-Z-リジンおよびホルミル-Z-リジンから選ばれるZ-リジン誘導体を少なくとも1つ含む、抗体があげられる。なかでも、アジド-Z-リジン及びエチニル-Z-リジンから選ばれるZ-リジン誘導体を少なくとも1つ含む抗体が好ましく、アジド-Z-リジンを少なくとも1つ含む抗体がより好ましい。

20

【0029】

本発明の抗体および該抗体断片は、抗体の定常領域において、少なくとも1つのZ-リジン誘導体を含むことにより、部位特異的な化学修飾を行うことができる。

Z-リジン誘導体がアジド-Z-リジンであるときには、本発明の抗体および該抗体断片は、抗体の定常領域において、少なくとも1つのアジド-Z-リジンを含むことにより、部位特異的な化学修飾を高効率かつ簡便に行うことが可能となる。

Z-リジン誘導体がエチニル-Z-リジンであるときには、本発明の抗体および該抗体断片は、抗体の定常領域において、少なくとも1つのエチニル-Z-リジンを含むことにより、部位特異的な化学修飾を簡便に行うことが可能となる。

Z-リジン誘導体がアミノ-Z-リジンであるときには、本発明の抗体および該抗体断片は、抗体の定常領域において、少なくとも1つのアミノ-Z-リジンを含むことにより、部位特異的な化学修飾を行うことが可能となる。

30

Z-リジン誘導体がホルミル-Z-リジンであるときには、本発明の抗体および該抗体断片は、抗体の定常領域において、少なくとも1つのホルミル-Z-リジンを含むことにより、部位特異的な化学修飾を行うことが可能となる。

【0030】

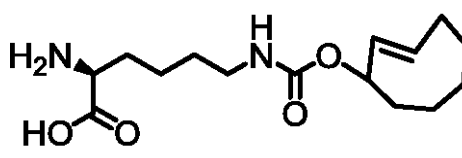
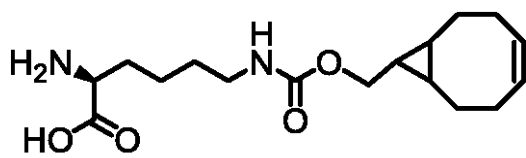
また、本発明の抗体として、具体的には、抗体の定常領域に、TCO^{*}-LysまたはBCN-Lysを少なくとも1つ含む抗体または該抗体断片があげられる。

TCO^{*}-Lys及びBCN-Lysの化学構造を、表2に示す。

【0031】

40

【表 2】

化合物名	化学構造
TCO*-Lys	
BCN-Lys	

10

【0032】

本発明の抗体および該抗体断片は、抗体の定常領域において、TCO*-LysまたはBCN-Lysを含むことにより、部位特異的な化学修飾を行うことが可能となる。

【0033】

抗体の定常領域としては、ヒト、マウス、ラビットおよびラットなどの動物種由来の抗体の定常領域が挙げられ、本発明においては、ヒト由来の抗体の定常領域であることが好ましい。

20

【0034】

抗体の定常領域としては、抗体の重鎖の定常領域または軽鎖の定常領域が挙げられる。抗体の重鎖の定常領域としては、CH1、ヒンジ、CH2およびCH3領域が挙げられ、本発明においてはCH1領域であることが好ましい。また、抗体の重鎖定常領域のサブクラスは特に限定されないが、IgGであることが好ましい。抗体の軽鎖の定常領域としては、CκとCλが挙げられ、本発明においてはいずれでもよい。

【0035】

本発明の抗体または抗体断片として、具体的には以下(a)～(g)から選ばれる抗体または該抗体断片が挙げられる。

30

(a) KabatらによるEUインデックス（以下、EUインデックス）において、ヒトIgG抗体の重鎖の118、120、121、127、129、131、133、135、152、159、169、173、174、177、180、190、199、205および210番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がZ-リジン誘導体である抗体または該抗体断片。

(b) EUインデックスにおいて、ヒトIgG抗体の重鎖の118、127、129、131、133、135、159、173、174、177、180、199、205および210番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がZ-リジン誘導体である抗体または該抗体断片。

(c) EUインデックスにおいて、ヒト抗体のκ鎖の110、112、119、138、141、145、147、149、153、154、155、158、161、167、169、180、183、184、191、195、197、205、207、210および211番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がZ-リジン誘導体である抗体または該抗体断片。

40

(d) EUインデックスにおいて、ヒト抗体のκ鎖の110、112、119、138、145、149、153、155、158、161、167、169、183、184、191、195、197、205、207、210および211番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がZ-リジン誘導体である抗体または該抗体断片。

(e) EUインデックスにおいて、ヒト抗体のλ鎖の110、119、125、127、129、143、147、160、161、165、166、172、173、180、187、189、191、195、205、207、210および215番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がZ-リジン誘導体である抗体または抗体断片。

(f) EUインデックスにおいて、ヒト抗体のλ鎖の110、125、143、160、161、165、166、

50

172、173、180、191、205、210、および215番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がZ-リジン誘導体である抗体または抗体断片。

(g) EUインデックスにおいて、ヒトIgG抗体の重鎖の131、177および199番目ならびにヒト抗体のκ鎖の155、191および197番目からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がZ-リジン誘導体である抗体または抗体断片。

【0036】

本発明の抗体または抗体断片として、具体的には以下(a)～(d)から選ばれる抗体または該抗体断片が挙げられる。

(a) KabatらによるEUインデックス(以下、EUインデックス)において、ヒトIgG抗体の重鎖の118、120、121、127、129、131、133、135、152、159、169、173、174、177、180、190、199、205および210番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がTCO^{*}-LysまたはBCN-Lysである抗体または該抗体断片。

(b) EUインデックスにおいて、ヒト抗体のκ鎖の110、112、119、138、141、145、147、149、153、154、155、158、161、167、169、180、183、184、191、195、197、205、207、210および211番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がTCO^{*}-LysまたはBCN-Lysである抗体または該抗体断片。

(c) EUインデックスにおいて、ヒト抗体のλ鎖の110、119、125、127、129、143、147、160、161、165、166、172、173、180、187、189、191、195、205、207、210および215番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がTCO^{*}-LysまたはBCN-Lysである抗体または抗体断片。

(d) EUインデックスにおいて、ヒトIgG抗体の重鎖の121および131番目ならびにヒト抗体のκ鎖の169番目からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基がTCO^{*}-LysまたはBCN-Lysである抗体または抗体断片。

【0037】

本発明においてEUインデックスとは、シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト第5版(1991)に示されるアミノ酸残基の位置をいう。以下に示すアミノ酸残基の位置は、特に記載の無い場合は全てEUインデックスに記載されるアミノ酸残基の位置を示す。

【0038】

抗体分子はイムノグロブリン(以下、Igと表記する)とも称され、ヒト抗体は、分子構造の違いに応じて、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4およびIgMのアイソタイプに分類される。アミノ酸配列の相同性が比較的高いIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を総称してIgGともいう。本発明の抗体分子はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれでもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましい。

【0039】

抗体分子は重鎖(Heavy chain、以下H鎖と記す)および軽鎖(Light chain、以下L鎖と記す)と呼ばれるポリペプチドより構成される。また、H鎖はN末端側よりH鎖可変領域(VHとも表記される)、H鎖定常領域(CHとも表記される)、L鎖はN末端側よりL鎖可変領域(VLとも表記される)、L鎖定常領域(CLとも表記される)の各領域により、それぞれ構成される。CHは各サブクラスごとに、α、δ、ε、γおよびμ鎖がそれぞれ知られている。CHはさらに、N末端側よりCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメインの各ドメインにより構成される。ドメインとは、抗体分子の各ポリペプチドを構成する機能的な構造単位をいう。また、CH2ドメインとCH3ドメインを併せてFc(Fragment, crystallizable)領域または単にFcという。CLは、Cλ鎖およびCκ鎖が知られている。

【0040】

本発明におけるCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメインおよびFc領域は、EUインデックスにより、N末端からのアミノ酸残基の番号で特定することができる。具体的には、CH1はEUインデックス118～215番のアミノ酸配列、ヒンジはEUインデックス216～230番のアミノ酸配列、CH2はEUインデックス231～340番のアミノ酸配列、CH3はEUインデックス341～447番のアミノ酸配列とそれぞれ特定される。

【0041】

本発明の抗体としては、マウス抗体、ラット抗体、ラビット抗体、ヒト型キメラ抗体（以下、単にキメラ抗体とも略記する）、ヒト化抗体（「相補性決定領域（Complementarity Determining Region; CDR）移植抗体」ともいう）およびヒト抗体などの遺伝子組換え抗体も含まれる。

【0042】

キメラ抗体とは、ヒト以外の動物（非ヒト動物）の抗体のVHおよびVLと、ヒト抗体のCHおよびCLからなる抗体を意味する。非ヒト動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

10

【0043】

ハイブリドーマとは、非ヒト動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と、マウスなどに由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞をいう。したがって、ハイブリドーマが産生する抗体を構成する可変領域は、非ヒト動物抗体のアミノ酸配列からなる。

【0044】

ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産する非ヒト動物細胞由来のハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

20

【0045】

ヒト化抗体とは、非ヒト動物抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの対応するCDRに移植した抗体をいう。VHおよびVLのCDR以外の領域はフレームワーク領域（以下、FRと表記する）と称される。

【0046】

ヒト化抗体は、非ヒト動物抗体のVHのCDRのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のVHのFRのアミノ酸配列からなるVHのアミノ酸配列をコードするcDNAと、非ヒト動物抗体のVLのCDRのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のVLのFRのアミノ酸配列からなるVLのアミノ酸配列をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

30

【0047】

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

【0048】

ヒト抗体は、ヒトイムノグロブリン遺伝子を保持するマウス(Tomizuka K. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 722-7, 2000.)に所望の抗原を免疫することにより、取得することができる。また、ヒト由来のB細胞から抗体遺伝子を増幅したphage displayライブラリーを用いることにより、所望の結合活性を有するヒト抗体を選択することで、免疫を行わずにヒト抗体を取得することができる(Winter G. et al., Annu Rev Immunol.12:433-55. 1994)。さらに、EBウイルスを用いてヒトB細胞を不死化することにより、所望の結合活性を有するヒト抗体を生産する細胞を作製し、ヒト抗体を取得することができる(Rosen A. et al., Nature 267, 52-54.1977)。

40

【0049】

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血から単離したリンパ球を、EBウイルス等を感染させることによって不死化した後、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を得て、その培養物中より該抗体を精製することにより取得することができる。

【0050】

50

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab、scFv等の抗体断片を表面に発現させたファージのライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

【0051】

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が宿主動物の染色体内に組込まれた動物をいう。具体的には、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法により得たヒト抗体産生ハイブリドーマを培養して培養物中にヒト抗体を産生蓄積させ、該培養物から抗体を精製することにより行うことができる。

【0052】

本発明の抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列、非ヒト動物抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列、あるいは非ヒト動物抗体のCDRを、ヒト抗体のフレームワークに移植したヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列のいずれでもよい。具体的には、ハイブリドーマが産生する非ヒト動物抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列、ヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列、ヒト抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列などがあげられる。

【0053】

本発明の抗体としては、Fcと抗体断片とが結合したFc融合タンパク質、Fcと天然に存在するリガンドまたは受容体とが結合したFc融合タンパク質（イムノアドヘシンともいう）、複数のFc領域を融合させたFc融合タンパク質等も本発明に包含される。また、抗体を安定化させるためおよび血中半減期を制御するためにアミノ酸残基改変を行ったFc領域なども本発明の抗体に用いることができる。

【0054】

本発明の抗体または該抗体断片は、翻訳後修飾されたいかなるアミノ酸を含む抗体をも包含する。翻訳後修飾としては、例えばH鎖のC末端におけるリジン残基の欠失〔リジン・クリッピング（lysine clipping）〕、およびポリペプチドのN末端におけるグルタミン残基のピログルタミン（puroGlu）への変換などがあげられる〔Beck et al, Analytical Chemistry, 85, 715-736（2013）〕。

【0055】

また、本発明の抗体または該抗体断片は、Z-リジン誘導体、TCO^{*}-LysまたはBCN-Lysに加えて、他の非天然アミノ酸を含む抗体をも包含する。他の非天然アミノ酸としては、チロシン誘導体やZ-リジン誘導体、TCO^{*}-LysまたはBCN-Lys以外のリジン誘導体などが挙げられる。チロシン誘導体としては、例えば、アジドフェニルアラニン等が挙げられ、Z-リジン誘導体、TCO^{*}-LysまたはBCN-Lys以外のリジン誘導体としては、例えば、ピロリジン誘導体等が挙げられる。

【0056】

本発明において抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、single chain Fv（scFv）、diabody、dsFv、複数のCDRを含むペプチドなどがあげられる。

【0057】

Fabは、IgG抗体をタンパク質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（H鎖の24番目のアミノ酸残基で切断される）、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合（S-S結合）で結合した、分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0058】

F(ab')₂は、IgGをタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の34番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のS-S結合を介して結合されたも

10

20

30

40

50

のよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0059】

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のS-S結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0060】

scFvは、1本のVHと1本のVLとを4個のGlyおよび1個のSer残基からなるリンカー（G4S）を任意の個数つなげたリンカーペプチドなどの適当なペプチドリinker（P）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0061】

Diabodyは、抗原結合特異性の同じまたは異なるscFvが2量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する2価の抗原結合活性または異なる抗原に対する特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0062】

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のS-S結合を介して結合させたものをいう。

【0063】

CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、CDR同士を直接または適当なペプチドリinkerを介して結合させることができる。本発明の抗体のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法、またはtBoc法などの化学合成法によって製造することもできる。

【0064】

本発明の抗体または該抗体断片は、いかなる特異性を有する抗体をも包含するが、以下に記載する抗原に結合する抗体、腫瘍関連抗原を認識し、結合する抗体、アレルギーもしくは炎症に関連する抗原を認識し、結合する抗体、ウイルスもしくは細菌感染に関連する抗原を認識し、結合する抗体、または循環器疾患に関連する抗原を認識し、結合する抗体であることが好ましい。

【0065】

本発明の抗体が結合する抗原としては、例えば、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD9、CD10、CD13、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD28、CD30、CD32、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40 ligand (CD40L)、CD44、CD45、CD46、CD47、CD52、CD53、CD54、CD55、CD59、CD63、CD64、CD66b、CD69、CD70、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86、CD89、CD95、CD98、CD105、CD134、CD137、CD138、CD147、CD158、CD160、CD162、CD164、CD200、CD227、CD274、adrenomedullin、angiopoietin related protein 4 (ARP4)、aurora、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-DC、ICOS、PD-1、BTLA、OX40、OX40 Ligand (OX40L)、integrin、bone marrow stromal antigen 2 (BST2 OR HM1.24)、CA125、CA19.9、carbohydra-
nic anhydrase 9 (CA9)、cadherin、cc-chemokine receptor (CCR) 4、CCR7、CCR8、CCR10、carcinoembryonic antigen (CEA)、cysteine-rich fibroblast growth factor receptor-1 (CFR-1)、c-Met、c-Myc、collagen、CTA、connective tissue growth factor (CTGF)、CTLA-4、cytokeratin-18、DF3、E-catherin、epidermal growth factor (EGF)、epidermal growth factor receptor (EGFR)、EGFRvIII、EGFR2 (HER2)、EGFR3 (HER3)、EGFR4 (HER4)、heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)、endoglin、epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)、endothelial protein C receptor (EPCR)、ephrin、ephrin receptor (Eph)、EphA2、endothelinase-2 (ET2)、FAM3D、fibroblast activating protein (FAP)、Fc receptor homolog 1 (FcRH1)、ferritin、fibroblast growth factor-8 (FGF-8)、FGF8 receptor、basic FGF (bFGF)、bFGF receptor、F

10

20

30

40

50

GF receptor (FGFR) 3、FGFR4、FLT1、FLT3、folate receptor、Frizzled homologue 10 (FZD10)、frizzled receptor 4 (FZD-4)、G250、G-CSF receptor、ganglioside (例えば、GD2、GD3、GM2およびGM3等)、globo H、gp75、gp88、GPR-9-6、heparanase I、hepatocyte growth factor (HGF)、HGF receptor、HLA antigen (例えば、HLA-DR等)、human milk fat globule (HMFG)、hRS7、heat shock protein 90 (hsp90)、idiotype epitope、insulin-like growth factor (IGF)、IGF receptor (IGFR)、interleukin (例えば、IL-6、IL-12およびIL-15等)、interleukin receptor (例えば、IL-2R、IL-3R、IL-6R、IL-10RおよびIL-15R等)、Chemokine (例えば、SLC、ELC、I-309、TARC、MDC、CTACKなど)、integrin、immune receptor translocation associated-4 (IRTA-4)、kallikrein 1、KDR、KIR2DL1、KIR2DL2/3、KS1/4、lamp-1、lamp-2、laminin-5、Lewis y、sialyl Lewis x、lymphotoxin-beta receptor (LTBR)、LUNX、melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP)、mesothelin、MICA、Mullerian inhibiting substance type II receptor (MISIIR)、mucin、neural cell adhesion molecule (NCAM)、Necl-5、Notch1、osteopontin、platelet-derived growth factor (PDGF)、PDGF receptor、platelet factor-4 (PF-4)、phosphatidylserine、Prostate Specific Antigen (PSA)、prostate stem cell antigen (PSCA)、prostate specific membrane antigen (PSMA)、Parathyroid hormone related protein/peptide (PTHrP)、receptor activator of NF-kappaB (RANK)、receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)、Folate receptor、receptor for hyaluronic acid mediated motility (RHAMM)、ROBO1、SART3、semaphorin 4B (SEMA4B)、secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)、SM5-1、sphingosine-1-phosphate、tumor-associated glycoprotein-72 (TAG-72)、transferrin receptor (TfR)、TGF-beta、Thy-1、Tie-1、Tie2 receptor、T cell immunoglobulin domain and mucin domain 1 (TIM-1)、human tissue factor (hTF)、Tn antigen、tumor necrosis factor (TNF)、Thomsen-Friedenreich antigen (TF antigen)、TNF receptor、tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)、TRAIL receptor (例えば、DR4およびDR5等)、system asc amino acid transporter 2 (ASCT2)、trkC、TROP-2、TWEAK receptor Fn14、urokinase plasminogen activator receptor (uPAR)、type IV collagenase、urokinase receptor、vascular endothelial growth factor (VEGF)、VEGF receptor (例えば、VEGFR1、VEGFR2およびVEGFR3等)、vimentinおよびVLA-4、erythropoietin (EPO)、erythropoietin receptor (EPOR)、angiopoietin、angiopoietin receptor、SDF-1、CXCR4等が挙げられる。

【 0 0 6 6 】

腫瘍関連抗原を認識し、結合する抗体としては、例えば、抗GD2抗体 [アンチ・キャンサー・リサーチ (Anticancer Res.), 13,331 (1993)]、抗GD3抗体 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36,260 (1993)]、抗GM2抗体 [キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 54, 1511 (1994)]、抗HER2抗体 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 89, 4285 (1992)、欧州特許第882794号明細書]、抗CD52抗体 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 89, 4285 (1992)]、抗CD4抗体、抗MAGE抗体 [ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー (British J. Cancer), 83,493 (2000)]、抗CCR4抗体 (米国特許第6,989,145号明細書、国際公開第2009/086514号)、抗HM1.24抗体 [モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunol.), 36,387 (1999)、国際公開第2002/057316号]、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 [キャンサー (Cancer), 88, 2909 (2000)]、抗bFGF抗体、抗FGF-8抗体 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 86, 9911 (1989)]、抗bFGFR抗体、抗FGF-8R抗体 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 265, 16455 (1990)]、抗IGF抗体 [ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス・リサーチ (J. Neurosci. Res.), 40,647 (1995)]、抗IGF-IR抗体 [ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス・リサーチ (J. Neurosci. Res.), 40,647 (1995)]、抗

PSMA抗体 [ジャーナル・オブ・ウロロジー (J. Urology), 160, 2396 (1998)]、抗VEGF抗体 [キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 57, 4593 (1997)]、抗VEGFR抗体 [オンコジーン (Oncogene), 19, 2138 (2000)、国際公開第96/30046号]、抗c-Met抗体 (米国特許第7,498,420号明細書)、抗CD20抗体 [Rituxan (登録商標)、カレント・オピニオン・イン・オンコロジー (Curr. Opin. Oncol.), 10, 548 (1998)、米国特許第5,736,137号明細書]、抗HER2抗体 [Herceptin (登録商標)、米国特許第5,725,856号明細書]、抗HER3抗体 (国際公開第2008/100624号、国際公開第2007/077028号)、抗Bip抗体 (国際公開第2008/105560号)、抗CD10抗体、抗HB-EGF抗体 (国際公開第2007/142277号)、抗EGFR抗体 (Erbix (登録商標)、国際公開第1996/402010号)、抗Apo-2R抗体 (国際公開第98/51793号)、抗ASCT2抗体 (国際公開第2010/008075号)、抗5T4抗体 (米国特許出願公開第2006/0088522号明細書)、抗CA9抗体 (米国特許第7,378,091号明細書)、抗CEA抗体 [キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 55 (23 suppl): 5935s-5945s, (1995)]、抗LewisY抗体、抗葉酸受容体抗体 (国際公開第2005/080431号)、抗TROP-2抗体 (米国特許第6,794,494号明細書)、抗CD38抗体、抗CD33抗体 [Mylotag (登録商標)]、抗CD22抗体 (Epratuzumab)、抗EpCAM抗体、抗A33抗体、抗IL-3R α 抗体 (国際公開第2010/126066号)、抗uPAR抗体 (米国特許第2008/0152587号明細書)、TRAIL2抗体 (国際公開第2002/94880号) などが挙げられる。

【0067】

アレルギーまたは炎症に関連する抗原を認識し、結合する抗体としては、例えば、抗インターロイキン6抗体 [イムノロジカル・レビューズ (Immunol. Rev.), 127, 5 (1992)]、抗インターロイキン6受容体抗体 [モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunol.), 31, 371 (1994)]、抗インターロイキン5抗体 [イムノロジカル・レビューズ (Immunol. Rev.), 127, 5 (1992)]、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体 [サイトカイン (Cytokine), 3, 562 (1991)]、抗インターロイキン4受容体抗体 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 217, 41 (1998)]、抗インターロイキン10受容体 (IL-10R) 抗体 (国際公開第2009/154995号)、抗腫瘍壊死因子抗体 [ハイブリドーマ (Hybridoma), 13, 183 (1994)]、抗腫瘍壊死因子受容体抗体 [モレキュラー・ファーマコロジー (Molecular Pharmacol.), 58, 237 (2000)]、抗CCR4抗体 [ネイチャー (Nature) 400776, (1999)]、抗CCR5抗体、抗CCR6抗体、抗ケモカイン抗体 (Peri et al., J. Immunol. Meth. 174249-257, 1994) または抗ケモカイン受容体抗体 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Exp. Med.), 186, 1373 (1997)] であり、循環器疾患に関連する抗原を認識し、結合する抗体が抗GPIIb/IIIa抗体 [ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 152, 2968 (1994)]、抗血小板由来増殖因子抗体 [サイエンス (Science), 253, 1129 (1991)]、抗血小板由来増殖因子受容体抗体 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 272, 17400 (1997)]、抗血液凝固因子抗体 [サーキュレーション (Circulation), 101, 1158 (2000)]、抗IgE抗体 [Xolair (登録商標)]、抗CD22抗体 (Epratuzumab)、抗BAFF抗体 (Belimumab) 抗 $\alpha V \beta 3$ 抗体および $\alpha 4 \beta 7$ 抗体などが挙げられる。

【0068】

ウイルスまたは細菌感染に関連する抗原を認識し、結合する抗体としては、例えば、抗gp120抗体 [ストラクチャー (Structure), 8, 385 (2000)]、抗インフルエンザA型ウイルスのマトリックスタンパク質2 (M2, 国際公開第2003/078600号)、抗CD4抗体 [ジャーナル・オブ・リウマトロジー (J. Rheumatology), 25, 2065 (1998)]、抗CCR5抗体および抗ペロ毒素抗体 [ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクrobiオロジー (J. Clin. Microbiol.), 37, 396 (1999)] などが挙げられる。

【0069】

循環器疾患に関連する抗原を認識し、結合する抗体としては、例えば、抗GPIIb/IIIa抗体 [J. Immunol., 152, 2968 (1994)]、抗血小板由来増殖因子抗体 [Science, 253, 1129 (1991)]、抗血小板由来増殖因子受容体抗体 [J. Biol. Chem., 272, 17400 (1997)]、抗血

10

20

30

40

50

液凝固因子抗体[Circulation, 101, 1158 (2000)]、抗IgE抗体、抗 $\alpha V\beta 3$ 抗体および $\alpha 4\beta 7$ 抗体等が挙げられる。

【0070】

本発明の抗体および該抗体断片は、本発明の抗体または該抗体断片に含まれる少なくとも1つのアミノ酸残基、非天然アミノ酸残基または糖鎖が修飾された修飾化抗体および該修飾化抗体断片も含む（以下、本発明の修飾化抗体または該修飾化抗体断片と記載する）。修飾されるアミノ酸残基または糖鎖は、抗体分子のH鎖あるいはL鎖のN末端側、C末端側、抗体分子中に存在するいずれのアミノ酸残基または糖鎖であってもよい。アミノ酸残基として好ましくは、抗体に含まれる少なくとも1つのシステイン、チロシン、フェニルアラニン、リジン、ピロリジン、グルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸および該誘導体などが挙げられる。糖鎖として好ましくは、抗体の定常領域に存在する糖鎖が挙げられる。

10

【0071】

本発明の修飾化抗体および該修飾化抗体断片として、より好ましくはアジドフェニルアラニンなどのチロシン誘導体、ならびにZ-リジン誘導体、TCO^{*}-Lys およびBCN-Lysなどのリジン誘導体の少なくとも1つが修飾された修飾化抗体および該修飾化抗体断片、最も好ましくはZ-リジン誘導体、TCO^{*}-Lys およびBCN-Lysなどのリジン誘導体の少なくとも1つが修飾された修飾化抗体および該修飾化抗体断片が挙げられる。

【0072】

また、本発明の修飾化抗体および該修飾化抗体断片としては、上述のアミノ酸残基、非天然アミノ酸残基または糖鎖が、複数修飾されている修飾化抗体および該修飾化抗体断片も含む。

20

【0073】

本発明の抗体または該抗体断片を修飾する方法は特に限定されず、所望のアミノ酸残基および糖鎖を修飾できるものであればいずれの方法を用いることができる。例えば、化学反応を利用した化学修飾[抗体工学入門, 地人書館 (1994)、Kolb et al., Angew Chem Int Ed Engl. 40. 2004-21, 2001]や、遺伝子組換え技術を利用し、組換えタンパク質発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入して発現させる遺伝子工学的手法での修飾などが挙げられる。

【0074】

前記チロシン誘導体、リジン誘導体の化学修飾としては、本発明の抗体または該抗体断片が有する非天然アミノ酸のアジド基と、アジド基と反応性を有する分子とを結合させる修飾であることがあげられる。高い化学反応性を有する点から、前記非天然アミノ酸のアジド基と、アルキニル基を有する分子とを結合させる化学修飾がより好ましい。当該結合反応としてはヒュスゲン[3+2]環化付加反応（以下、クリックケミストリーと記載する）[Kolb et al., Angew Chem Int Ed Engl. 40. 2004-21, 2001]を用いることができる。本発明において、アジド基を有する非天然アミノ酸としては、アジドフェニルアラニン、アジド-Z-リジン、アジド低級アルキル-Z-リジンなどがあげられる。

30

【0075】

また、その他のリジン誘導体の化学修飾としては、本発明の抗体または該抗体断片が有する非天然アミノ酸が有するアルキニル基と、該アルキニル基と反応性を有する分子とを結合させる修飾があげられる。アルキニル基と反応性を有する分子としては、アジド基を有する分子があげられ、これらの結合反応には、クリックケミストリーを用いることができる。本発明において、アルキニル基を有する非天然アミノ酸としては、エチニル-Z-リジンなどの低級アルキニル-Z-リジンなどがあげられる。

40

【0076】

また、その他のリジン誘導体の化学修飾としては、本発明の抗体または該抗体断片が有する非天然アミノ酸が有するアミノ基と、該アミノ基と反応性を有する分子とを結合させる修飾があげられる。アミノ基と反応性を有する分子としては、ホルミル基を有する分子があげられ、これらの結合反応には、還元的アミノ化反応 (Bioconjugate Chem. 2016, 2

50

7, 198-206) を用いることができる。本発明において、アミノ基を有する非天然アミノ酸としては、アミノ-Z-リジンなどがあげられる。

【0077】

また、その他のリジン誘導体の化学修飾としては、本発明の抗体または該抗体断片が有する非天然アミノ酸が有するホルミル基と、該ホルミル基と反応性を有する分子とを結合させる修飾があげられる。ホルミル基と反応性を有する分子としては、アミノ基を有する分子があげられ、これらの結合反応には、還元的アミノ化反応を用いることができる。本発明において、ホルミル基を有する非天然アミノ酸としては、ホルミル-Z-リジンなどがあげられる。

【0078】

10

また、その他のリジン誘導体の化学修飾としては、本発明の抗体または該抗体断片が有するTCO^{*}-Lysのトランス-シクロオクテン環と、該トランス-シクロオクテン環と反応性を有する分子とを結合させる修飾があげられる。トランス-シクロオクテン環と反応性を有する分子としては、1,2,4,5-テトラジン環を有する分子があげられ、これらの結合反応には逆電子要請型ディールズ・アルダー反応 (Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 2245-2249) を用いることができる。

【0079】

また、その他のリジン誘導体の化学修飾としては、本発明の抗体または該抗体断片が有するBCN-Lysのビスクロ[6.1.0]ノン-4-イン環と、該ビスクロ[6.1.0]ノン-4-イン環と反応性を有する分子とを結合させる修飾があげられる。ビスクロ[6.1.0]ノン-4-イン環と反応性を有する分子としては、1,2,4,5-テトラジン環を有する分子があげられ、これらの結合反応には逆電子要請型ディールズ・アルダー反応 (J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 10317-10320) を用いることができる。

20

【0080】

本発明の抗体および該抗体断片を修飾する分子としては、親水性高分子、両親媒性高分子、および機能性分子などが挙げられる。前記親水性高分子、両親媒性高分子としては、例えばポリオキシアルキレン、ポリオールまたは多糖を含む分子などが挙げられる。

【0081】

ポリオキシアルキレンとしては、例えば、直鎖または分岐鎖からなるポリエチレングリコール (polyethylene glycol、以下PEGと記載する)、ポリプロピレングリコール、ポリ

30

【0082】

ポリオールまたは多糖を含む分子としては、例えば、直鎖または分岐鎖からなるポリグリセロールからなるアミロース、デキストラン、プルランまたはグリコーゲン等のホモまたはヘテロ多糖類等が挙げられる。

【0083】

親水性高分子または両親媒性高分子を含む分子の分子量は特に限定されないが、100Da以上であることが好ましく、例えば100Da~100kDaであることが好ましい。

【0084】

機能性分子としては、例えば、抗原結合分子、抗原結合断片、薬物、生理活性ペプチド、生理活性タンパク質、核酸、放射性標識化合物、糖鎖、脂質または蛍光化合物などが挙げられる。

40

【0085】

抗原結合分子としては、抗原に特異的に結合する分子であればいずれでもよいが、例えば抗体および該抗体断片、受容体、ならびにリガンドなどが挙げられる。抗体は、上述の抗原に結合する抗体、上述の腫瘍関連抗原を認識し、結合する抗体、アレルギーもしくは炎症に関連する抗原を認識し、結合する抗体、ウイルスもしくは細菌感染に関連する抗原を認識し、結合する抗体、または循環器疾患に関連する抗原を認識し、結合する抗体のいずれの抗体であってもよい。

【0086】

50

抗原結合断片としては、前記抗原結合分子の断片であって、抗原結合活性を有するものであれば、いかなるものでもよい。

【0087】

薬物としては、例えば、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗ウイルス剤、抗生物質、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、チューブリン重合阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、M期阻害剤、あるいはキナーゼ阻害剤などの抗癌剤[臨床腫瘍学、癌と化学療法社(1996)]、またはハイドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、あるいはクレマシチンのような抗ヒスタミン剤などの抗炎症剤[炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社(1982)]などがあげられる。抗癌剤としては、メルタンシン、エムタンシン、アミフォスチン(エチオール)、シスプラチン、ダカルバジン(DTIC)、ダクチノマイシン、メクロレタミン(ナイトロジェンマスタード)、ストレプトゾシン、シクロフォスファミド、イホスファミド、カルムスチン(BCNU)、ロムスチン(CCNU)、ドキソルビシン(アドリアマイシン)、エピルビシン、ゲムシタピン(ゲムザール)、ダウノルビシン、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エトポシド、5-フルオロウラシル、フルオロウラシル、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ブレオマイシン、ダウノマイシン、ペプロマイシン、エストラムスチン、パクリタキセル(タキソール)、ドセタキセル(タキソテア)、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、クラドリビン、カンプトテシン、10-ヒドロキシ-7-エチル-カンプトテシン(SN38)、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、メスナ、イリノテカン(CPT-11)、ノギテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパラガーゼ、ペントスタチン、ピポプロマン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、ゴセレリン、リュープロレニン、フルタミド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ビノレルビン、クロラムブシル、ハイドロコチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ビンデシン、ニムスチン、セムスチン、カペシタビン、トムデックス、アザシチジン、UFT、オキザロプラチン、ゲフィチニブ(イレッサ)、イマチニブ(STI571)、エルロチニブ、FMS-like tyrosine kinase 3(Flt3)阻害剤、vascular endothelial growth factor receptor(VEGFR)阻害剤、fibroblast growth factor receptor(FGFR)阻害剤、タルセバなどのepidermal growth factor receptor(EGFR)阻害剤、ラディシコール、17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン、ラパマイシン、アムサクリン、オール-トランスレチノイン酸、サリドマイド、レナリドマイド、アナストロゾール、ファドロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、金チオマレート、D-ペニシラミン、ブシラミン、アザチオプリン、ミゾリビン、シクロスポリン、ラパマイシン、ヒドロコチゾン、ベキサロテン(ターグレチン)、タモキシフェン、デキサメタゾン、プロゲスチン類、エストロゲン類、アナストロゾール(アリミデックス)、ロイプリン、アスピリン、インドメタシン、セレコキシブ、アザチオプリン、ペニシラミン、金チオマレート、マレイン酸クロルフェニラミン、クロロフェニラミン、クレマシチン、トレチノイン、ベキサロテン、砒素、ボルテゾミブ、アロプリノール、カリケアマイシン、イブリツモマブチウキセタン、タルグレチン、オゾガミン、クラリスロマシン、ロイコボリン、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、スラミン、メトトレキセート、メイタンシノイドまたはその誘導体などがあげられる。

【0088】

薬物と抗体とを結合させる方法としては、上述の方法の他、グルタルアルデヒドを介して薬物と抗体のアミノ基間を結合させる方法、または水溶性カルボジイミドを介して薬物のアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法などがあげられる。

【0089】

生理活性ペプチドまたは生理活性タンパク質としては、例えば、インターフェロン(以

10

20

30

40

50

下、IFNと記す)- α 、IFN- β 、IFN- γ 、インターロイキン(以下、ILと記す)-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、またはマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)など、NK細胞、マクロファージ、または好中球などの免疫担当細胞を活性化するサイトカインあるいは増殖因子、ヒドラーゼ、リアーゼおよびイソメラーゼ等のタンパク質分解酵素、リシン、ジフテリアトキシン、またはONTAKなどの細菌毒素および植物毒素等の毒素、細胞膜傷害活性を有する抗菌ペプチド、細胞膜結合性または細胞膜透過性を有するペプチド、およびそれらの誘導体等が挙げられる。

【0090】

核酸としては、ヌクレオチドまたは該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子が重合した分子であればいかなる分子であってもよく、siRNA、microRNA、アンチセンスRNA、DNAアプタマーなどが挙げられる。

放射性標識化合物としては、診断用または治療用用途に使用される核種であればよく、例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{18}F 、 ^{153}Gd 、 ^{159}Gd 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ge 、 ^{166}Ho 、 ^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I 、 ^{140}La 、 ^{177}Lu 、 ^{54}Mn 、 ^{99}Mo 、 ^{103}Pd 、 ^{142}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{153}Sm 、 ^{47}Sc 、 ^{75}Se 、 ^{85}Sr 、 ^{99}Tc 、 ^{201}Ti 、 ^{113}Sn 、 ^{117}Sn 、 ^{133}Xe 、 ^{169}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{90}Y および ^{65}Zn 等、または上述の核種を含む化合物が挙げられる。放射性標識化合物は、クロラミンT法などによって抗体に直接結合させることができる。また、放射性標識化合物をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。キレート剤としては例えば、DOTA、PA-DOTA、TRITAおよびDTPA等が挙げられ、キレート剤によって修飾された抗体、キレート剤を介して放射性標識化合物が標識された修飾化抗体も本発明の抗体に含まれる。

【0091】

糖鎖としては、例えば、フコース、マンノース、グルコース、アロース、アルトース、ギャロース、イドース、ガラクトース、タロース、リボース、アラビノース、キシロース、リキソース、エリトース、エリトロース、トレオース、セロビオース、マルトース、イソマルトース、ラクトース、リポアラビノマンナン、ルイスX型三糖およびシアリルルイスX型四糖等を含む、単糖、二糖類またはオリゴ糖等が挙げられる。また、イムノアジュバントとして知られる糖鎖を含む天然物でもよく、 β (1 $\rightarrow$ 3)グルカン(レンチナン、シゾフィラン)、または α ガラクトシルセラミド(KRN7000)などがあげられる。

【0092】

脂質としては、例えば、脂肪酸と各種アルコールとのエステルおよびその類似体である単純脂質(中性脂質)が挙げられる。例えば、油脂(例えば、トリアシルグリセロール)、ろう(高級アルコールの脂肪酸エステル)、ステロールエステル、コレステロールエステル、ビタミンの脂肪酸エステル等、脂肪酸とアルコールのほかにリン酸、糖、硫酸、アミンなど極性基をもつ複合脂質、例えば、リン脂質(グリセロリン脂質、スフィンゴリン脂質等)および糖脂質(グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質等)、単純脂質および複合脂質の加水分解によって生成する化合物のうち脂溶性のものをさす誘導脂質、例えば、脂肪酸、高級アルコール、脂溶性ビタミン、ステロイド、炭化水素等が挙げられる。

【0093】

蛍光化合物としては、例えば、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)などのフルオレセイン系列、ローダミン系列、Cy3、Cy5、エオシン系列、アレクサフルオロ系列およびNBD系列等の蛍光色素、アクリジニウムエステル、あるいはロフィンなどの発光物質並びに緑色蛍光タンパク質(GFP)等の蛍光性タンパク質等が挙げられる。

【0094】

また本発明の抗体は、上述の親水性高分子または両親媒性高分子、および機能性分子は直接または適当なリンカーを介して結合させることができる。リンカーとしては、例えばエステル、ジスルフィド、ヒドラゾンおよびジペプチド等が挙げられる。

【0095】

本発明の抗体を遺伝子工学的な手法によって修飾し、融合抗体を作製する場合には、抗

10

20

30

40

50

体または抗体断片をコードするcDNAにタンパク質をコードするcDNAを連結させ、融合抗体をコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物あるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入して融合抗体を発現させることにより、融合抗体を作製することができる。

【0096】

本発明の組成物は、本発明の抗体または該抗体断片を含有する組成物であればいかなるものでもよい。即ち、抗体の定常領域に、少なくとも1つのリジン誘導体、具体的にはZ-リジン誘導体、TCO^{*}-LysまたはBCN-Lysを含むモノクローナル抗体分子、または該抗体断片分子を含む組成物であればいずれの組成物でもよい。かかる組成物は、抗体分子または該抗体断片分子の他に、適当なキャリア、安定化剤などの添加剤を含んでいる場合であってもよい。本発明の組成物としては、例えば、本発明の抗体または該抗体断片を有効成分として含有する治療剤（医薬組成物）などが挙げられ、薬理学的に許容しうる担体とともに所望の剤型に製剤化される。

10

【0097】

本発明の抗体または該抗体断片を含有する治療剤は、当該抗体が特異的に結合する抗原が発現している疾患であれば、いずれの疾患の治療剤でもよいが、上述した抗原または癌、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、循環器疾患またはウイルスもしくは細菌の感染症に関連する抗原を発現している疾患の治療剤が好ましい。

【0098】

癌としては、例えば、血液癌、頭頸部癌、グリオーマ、舌癌、喉頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌（例えば、膵頭癌、膵体癌、膵尾癌および膵管癌）、小腸癌、大腸癌、肺癌（例えば、小細胞性肺癌、大細胞性肺癌、腺癌および扁平上皮癌）、中皮腫、肝癌、胆嚢癌、胆管癌、腎癌、子宮癌（例えば、子宮頸癌および子宮体癌）、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、骨肉腫、皮膚癌、菌状息肉症、ウイング腫瘍、悪性骨腫瘍およびメラノーマなどが挙げられる。

20

【0099】

血液癌としては、例えば、白血病、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病、T細胞由来の癌などが挙げられる。具体的には、例えば、皮膚T細胞性リンパ腫（Cutaneous T cell lymphoma, CTCL）、末梢T細胞性リンパ腫（peripheral T cell lymphoma, PTCL）、未分化大細胞型リンパ腫（Anaplastic large cell lymphoma, ALCL）、急性リンパ性白血病（Acute lymphatic leukemia, ALL）、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、または非ホジキンリンパ腫（例えば、バーキットリンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、びまん性体細胞性B細胞性リンパ腫、未分化体細胞リンパ腫、MANTLリンパ腫および濾胞性リンパ腫）などが挙げられる。

30

【0100】

自己免疫疾患としては、例えば、橋本病、バセドウ病、突発性血小板減少性紫斑病、突発性好中球減少症、巨赤芽球性貧血、溶血性貧血、重症筋無力症、乾癬、天疱瘡、類天疱瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、強直性脊椎炎、多発性硬化症、I型糖尿病、肝炎、心筋炎、シェーグレン症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（SLE）、抗リン脂質抗体症候群、多発性筋炎、皮膚筋炎、全身性皮膚硬化症および移植後拒絶反応などが挙げられる。

40

【0101】

アレルギー性疾患としては、例えば、急性または慢性気道過敏症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎およびアレルギー性鼻炎などが挙げられる。

【0102】

本発明の抗体または該抗体断片を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体もしくは該抗体断片のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される1以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

【0103】

50

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内あるいは静脈内などの非経口投与があげられ、好ましくは静脈内投与をあげられる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、またはテープ剤などがあげられる。

【0104】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、および体重などにより異なるが、通常成人1日当たり10 $\mu\text{g/kg}$ ～20 mg/kg である。

【0105】

〔製造方法〕

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993)、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996)等に記載された方法を用いて製造することができる。例えば、以下に記載する本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を非天然アミノ酸を添加した培地中で培養し、該培養物から精製することにより、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片を製造することができる。

【0106】

さらに、以下のように本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片のアミノ酸残基、非天然アミノ酸残基、または糖鎖を修飾することにより、本発明の非天然アミノ酸を含む修飾化抗体または修飾化抗体断片を得ることができる。

【0107】

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体は、非天然アミノ酸を導入したい抗体（以下、親抗体と記載する）のアミノ酸残基を非天然アミノ酸残基に置換した抗体であってもよいし、親抗体のアミノ酸配列の中に非天然アミノ酸残基を挿入した抗体であってもいずれでもよい。

【0108】

1. 本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の発現ベクターの構築

(1)抗体または該抗体断片の発現ベクターの構築

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の発現ベクターは、その目的に応じて、または該発現ベクターを導入すべき宿主細胞に適したものを適宜選択し、使用することができる。

【0109】

前記発現ベクターが組換えベクターである場合、該組換えベクターは、適切なプロモーターに連結されたCLおよびCHをコードする塩基配列をそれぞれ含み、好ましくは本発明のポリヌクレオチドの下流に転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含む。

【0110】

さらに、前記組換えベクターは形質転換体を選択するための選択マーカー遺伝子(例えば、薬剤耐性遺伝子、栄養要求性変異を相補する遺伝子等)をさらに含むこともできる。また、発現したタンパク質の分離・精製に有用なタグ配列をコードする配列等を含んでもよい。

【0111】

抗体遺伝子の軽鎖および重鎖を含む発現カセットの両端に、適切な制限酵素認識配列を挿入しておくことで、原核細胞用抗体発現ベクターと真核細胞用抗体発現ベクターのいずれの発現ベクターにも、組み込むことができる。

【0112】

他の態様においては、多様な抗体可変領域に対応できる発現ベクターを構築するために、可変領域のみを適当な制限酵素によって、後から導入できるように設計した発現ベクタ

10

20

30

40

50

ーでもよい。

【0113】

大腸菌等の原核細胞を宿主細胞として用いる場合、発現ベクターとしては上述の本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片をコードする遺伝子を組込み発現できるのであればいかなるものも用いることができる。例えば、pFLAG-CTS [SIGMA社、Journal of Molecular Recognition, 5, 15(2002)]、pET26b [Novagen社、Molecular Immunology, 8, 44(2007)]、pFab1、pFab2、pFab3 [Protein Expression and Purification, 2, 34(2004)] 等が挙げられる。

【0114】

原核細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとしては、例えば、Tacプロモーター [Journal of Molecular Recognition, 5, 15(2002)] およびラムノースプロモーター [Journal of Molecular Biology, 234, (1993)] 等が挙げられる。

【0115】

さらに、前記ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列をも含んでもよい。大腸菌の周辺質(periplasm)へのポリペプチド分泌を指令するシグナル配列の一例は、PelBシグナル配列[J. Bacteriol. 169, 4379 (1987)]である。

【0116】

例えば、大腸菌が宿主細胞であって、ベクターを大腸菌(例えば、JM109、DH5 α 、HB101、またはXL1Blue)の内部で大量に増幅および産生させる場合には、ベクターは、大腸菌内で増幅させるための「ori」、および、形質転換された大腸菌を選択するためのマーカー遺伝子(例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシンおよびクロラムフェニコール等の薬剤によって選択される薬剤抵抗性遺伝子)を有する必要がある。該マーカー遺伝子を有するベクターとしては、例えば、M13シリーズのベクター、pUCシリーズのベクター、pBR322およびpBluescript等が挙げられる。

【0117】

真核細胞のうち、動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターとして、上述の本発明の非天然アミノ酸を含む抗体および該抗体断片をコードする遺伝子を組込み発現できるのであればいかなるものでも用いることができる。

【0118】

前記発現ベクターとしては、例えば、pKANTEX93 [Mol. Immunol., 37, 1035 (2000)]、pAGE107[日本国特開平3-22979号公報、Cytotechnology, 3, 133-140 (1990)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 1527 (1981)]、N5KG1-Val Larkベクター [IDEC Pharmaceuticals, N5KG1 (米国特許第6001358号明細書)の改変ベクター]、Tol2トランスポゾンベクター[国際公開第2010/143698号]およびpSG1 β d2-4 [Cytotechnology, 4, 173 (1990)] 等が挙げられる。

【0119】

動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、例えば、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)] 並びに免疫グロブリン重鎖のプロモーター [Cell, 41, 479 (1985)] とエンハンサー [Cell, 33, 717 (1983)] 等が挙げられる。

【0120】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13(ATCC37115)、YEp24(ATCC37051)およびYCp50(ATCC37419)等が挙げられる。

【0121】

酵母用発現ベクターに用いるプロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよい。例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、M

10

20

30

40

50

Fig 1 プロモーターおよびCUP 1プロモーター等が挙げられる。

【0122】

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pVL1392、pVL1393およびpBlueBacIII(ともにInvitrogen社)等が挙げられる。

【0123】

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミドおよびタバコモザイクウイルスベクター等が挙げられる。

【0124】

植物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーターおよびイネアクチン1プロモーター等が挙げられる。

10

【0125】

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片発現用ベクターは、抗体軽鎖および重鎖が別々のベクター上に存在するタイプまたは同一のベクター上に存在するタンデム型のどちらでも用いることができる [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]。

【0126】

タンデム型の発現ベクターの構築方法としては、プロモーター配列に結合した軽鎖および重鎖をコードしたDNAを適当な制限酵素サイトを用いて、連結する方法が挙げられる。例えば、タンデム型の発現ベクターに関しては、pKANTEX 93(国際公開第97/10354号)、pE18[Hybridoma, 559 (1998)]、N5KG1-Val Larkベクター [IDEC Pharmaceuticals, N5KG1 (米国特許第6001358号明細書)の改変ベクター]等が挙げられる。

20

【0127】

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、トランスフォーメーション法、エレクトロポレーション法[日本国特開平2-257891号公報、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)]等が挙げられる。

【0128】

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の発現ベクターは、親抗体または該抗体断片のアミノ酸配列をコードする塩基配列をもとにして、非天然アミノ酸を導入したい部位にナンセンスコドン(ストップコドンともいう)を含む抗体または該抗体断片の塩基配列を設計して作製することができる。このとき、親抗体または該抗体断片のアミノ酸残基をコードするコドンを前記ナンセンスコドンに置換してもよいし、親抗体または該抗体断片のアミノ酸配列をコードする塩基配列の中に前記ナンセンスコドンを挿入してもよい。ナンセンスコドンとしては、UAG(アンバー)、UAA(オーカー)、UGA(オパール)が挙げられるが、本発明においては、UAGまたはUGAコドンであることが好ましく、UAGコドンであることがより好ましい。また、ナンセンスコドンに代えて、4塩基以上(好ましくは4塩基もしくは5塩基)の塩基からなるコドン(以下、フレームシフトコドンと記載する)を用いることもできる。

30

【0129】

以下に、非天然アミノ酸をUAGコドンにコードさせる場合の、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体の製造方法について記載する。親抗体に非天然アミノ酸を導入する場合は、親抗体のアミノ酸残基をコードするコドンを非天然アミノ酸をコードするUAGコドンに置換すること、または親抗体のアミノ酸配列をコードする塩基配列の中に非天然アミノ酸をコードするUAGを挿入することによって、非天然アミノ酸を抗体の任意の位置に導入することができる。非天然アミノ酸をその他のナンセンスコドンまたはフレームシフトコドンにコードさせる場合も、同様の方法で本発明の非天然アミノ酸を含む抗体を製造することができる。

40

【0130】

親抗体または該抗体断片のアミノ酸配列をコードする塩基配列において、非天然アミノ酸を導入する部位のアミノ酸残基をコードするコドンをUAGコドンに置換することは、部

50

位特異的変異誘発法により行うことができる。例えば、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene社)を使用して、説明書に準じて、目的の非天然アミノ酸の導入部位のコドンにUAGコドンに置き換えたプライマーを設計し、部位特異的変異誘発を行うことができる。

【0131】

または、目的の非天然アミノ酸の導入部位のコドンがUAGとなるようにCHまたはCLをコードする塩基配列を設計し、5'末端および3'末端に適当な制限酵素認識配列を付加して全合成し、親抗体の発現ベクターが有するCHまたはCLをコードする塩基配列と入れ替えてもよい。このとき、UAGコドンは親抗体のアミノ酸残基をコードするコドンを置換してもよいし、親抗体のアミノ酸残基をコードするコドンの前後に挿入してもよい。

10

【0132】

UAGコドンへの導入の有無は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー(Sanger)らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM377 DNAシーケンサー(Applied Biosystems社製)等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより確認することができる。

【0133】

構築した本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の発現ベクターは、例えば、以下の原核細胞または真核細胞における遺伝子組換え技術によって作製されるマウス抗体、ラット抗体、ラビット抗体、ハムスター抗体、サル抗体、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体などの遺伝子組換え抗体またはそれらの抗体断片の発現に使用することができる。

20

【0134】

発現ベクターには、適当なプロモーターに連結された、UAGコドン进行認識するtRNA(以下、単にtRNAと記載する)をコードする塩基配列および前記tRNAを非天然アミノ酸によってアシル化するアミノアシルtRNA合成酵素(以下、単にアミノアシルtRNA合成酵素と記載する)のアミノ酸配列をコードする塩基配列が含まれる。

【0135】

前記tRNAをコードする塩基配列および前記アミノアシルtRNA合成酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の発現ベクターとは、異なる発現ベクターに含まれていてもよいし、いずれもが別々の発現ベクターに含まれていてもいずれの形態でもよい。

30

【0136】

上述したように、複数の発現ベクターを宿主細胞に遺伝子導入する場合、遺伝子導入は同時に行ってもよいし、別個に行ってもよい。例えば、tRNAおよび/またはアミノアシルtRNA合成酵素の発現ベクターを宿主細胞に導入して得られた形質転換体を凍結保存し、必要に応じて当該細胞を融解して本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の発現ベクターの遺伝子導入を行ってもよい。

【0137】

本発明において、tRNAは、アミノアシルtRNA合成酵素の存在下で、所望の非天然アミノ酸と結合可能で、かつ本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片をコードする塩基配列に含まれるUAGコドン进行認識することができる。

40

【0138】

tRNAとアミノアシルtRNA合成酵素は、抗体に導入する非天然アミノ酸の種類および宿主細胞の種類に応じて適切なものを適宜選択し、使用することができる。例えば抗体にアジド-Z-リジン、エチニル-Z-リジン、アミノ-Z-リジンもしくはホルミル-Z-リジンなどのZ-リジン誘導体、TCO^{*}-LysまたはBCN-Lysを導入するときには、メタノサルシナ・マゼイの野生型ピロリジンtRNA(Pyl tRNA、tRNA^{Pyl}) (配列番号1)とメタノサルシナ・マゼイのピロリジンtRNA合成酵素(Pyrrolysyl tRNA synthetase, Pyl RS)のY384FおよびY306A二重変異体(配列番号8) [Yanagisawa T. et al, Chem. Biol., 15, 1187-1197 (2008)]とを用いることができる。

50

【0139】

例えば、抗体にZ-リジンを導入する場合には、メタン生成古細菌メタノサルシナ・マゼイ由来の野生型ピロリジンtRNAとメタノサルシナ・マゼイのピロリジルtRNA合成酵素のL309AおよびC348V二重変異体[国際公開第2009/038195号]とを用いることができる。また、抗体にアジドチロシンまたはアジドフェニルアラニンを導入する場合には、グラム陽性菌ゲオバチルス・ステアロサーモフィルスのチロシンtRNA (Tyr tRNA、tRNA^{Tyr}) の変異体BYRおよび大腸菌のチロシルtRNA合成酵素 (Tyrosyl-tRNA synthetase、Tyr RS) の変異体(V37C195)、大腸菌のチロシンtRNAの変異体EYRおよび大腸菌のチロシルtRNA合成酵素の変異体(V37C195)と超好熱性古細菌パイロコッカス・ホリコシイのフェニルアラニルtRNA合成酵素の校正ドメインの融合タンパク質 [日本国特開第2009-207490号]を用いることができる。

10

【0140】

また、前記tRNAとアミノアシルtRNA合成酵素は、内在性のtRNAおよびアミノアシルtRNA合成酵素と相互作用しない、いわゆる直交系であることが好ましい。

【0141】

前記ピロリジンtRNAがメタン古細菌由来であって、当該ピロリジンtRNAをコードする塩基配列を含む発現ベクターを動物細胞に遺伝子導入する場合には、当該ピロリジンtRNAをコードする塩基配列の5'末端に、真核生物のtRNAをコードする塩基配列やU6snRNA遺伝子のプロモーター配列が結合されていることが好ましい。前記真核生物のtRNAをコードする塩基配列としては、ヒトバリンtRNAをコードする塩基配列であることが好ましい。また、前記ピロリジンtRNAをコードする塩基配列の3'末端に転写終結配列が結合されていることがより好ましい。tRNAをコードする塩基配列を含む発現ベクターは、真核生物のtRNAをコードする塩基配列やU6snRNA遺伝子のプロモーター配列が結合されたピロリジンtRNAをコードする塩基配列を複数回繰り返した塩基配列クラスターを有していてもよい。

20

【0142】

前記ピロリジンtRNAをコードする塩基配列を含む発現ベクターは、W02007/099854またはMukai et al, [Biochem. Biophys. Res. Commun, 371, 818-822 (2008)]に記載された方法に準じて作製することができ、これにより前記ピロリジンtRNAを動物細胞で効率的に発現させることが可能となる。

【0143】

また、前記メタン古細菌由来のピロリジンtRNAをコードする塩基配列の5'末端に、バクテリオファージ由来のプロモーター配列が結合されていてもよい。前記バクテリオファージ由来のプロモーターとしては、T7プロモーターが挙げられる。当該塩基配列を含む発現ベクターについても、W02007/099854に記載された方法に準じて作製することができ、これにより前記ピロリジンtRNAを動物細胞で効率的に発現させることが可能となる。

30

【0144】

前記ピロリジンtRNAを動物細胞で効率的に発現させることにより、本発明のリジン誘導体を含む抗体または該抗体断片を動物細胞で効率的に作製することが可能となる。

【0145】

また、前記チロシンtRNAが大腸菌由来であって、当該チロシンtRNAをコードする塩基配列を含む発現ベクターを動物細胞に遺伝子導入する場合においても同様に、チロシンtRNAをコードする塩基配列の5'末端に、U1snRNA遺伝子、U6snRNA遺伝子またはT7などのプロモーター配列が結合されていることが好ましい。また、前記チロシンtRNAをコードする塩基配列の3'末端に、転写終結因子が結合されていることがより好ましい。当該塩基配列を含む発現ベクターについても、W02007/099854に記載された方法に準じて作製することができる。これにより前記チロシンtRNAを動物細胞で効率的に発現させ、本発明のチロシン誘導体を含む抗体または該抗体断片を動物細胞で効率的に作製することが可能となる。

40

【0146】

(2) 抗体のV領域をコードするcDNAの取得

抗体のVLおよびVHをコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

50

任意の抗体を産生する抗体産生細胞またはハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として用い、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージまたはプラスミド等のベクターに挿入してcDNAライブラリーを作製する。

【0147】

前記ライブラリーより、既存の動物種由来の抗体のC領域またはV領域をコードするDNAをプローブとして用い、重鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミドおよび軽鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。

【0148】

組換えファージまたは組換えプラスミド上の目的の抗体のVLおよびVHの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVLおよびVHの全アミノ酸配列を推定する。

10

【0149】

任意のヒト以外の動物の抗体を生産するハイブリドーマ細胞は、抗体が結合する抗原をヒト以外の動物に免疫し、周知の方法〔モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、アンチボディズ、モノクローナルアンチボディズ、アンチボディエンジニアリング〕に従って、免疫された動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞とでハイブリドーマを作製する。次いで単一細胞化したハイブリドーマを選択し、これを培養し、培養上清から精製し、取得することができる。

【0150】

ヒト以外の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、サル、ラクダおよびラビット等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。また、ヒト抗体産生マウス等、遺伝子組換え動物を用いて抗原を免疫して、ハイブリドーマを作製することで、ヒト以外の動物由来の抗体作製と同様にしてヒト抗体を作製することもできる。更に、ヒト末梢血液細胞やヒト抗体を産生するヒト免疫細胞を不死化することでもヒト抗体を確立することができる。

20

【0151】

ハイブリドーマ細胞または抗体産生細胞から全RNAを調製する方法としては、例えば、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法〔Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)〕等が挙げられる。

【0152】

また全RNAからmRNAを調製する方法としては、例えば、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法〔Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989〕等が挙げられる。

30

【0153】

また、ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、例えば、Fast Track mRNA Isolation Kit(Invitrogen社製)およびQuick Prep mRNA Purification Kit(Pharmacia社製)等が挙げられる。

【0154】

cDNAの合成およびcDNAライブラリー作製法としては、常法〔Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34〕、および市販のキットを用いる方法等が挙げられる。市販のキットとしては、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(GIBCO BRL社製)およびZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratagene社製)等が挙げられる。

40

【0155】

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。

【0156】

前記ベクターとしては、例えば、ZAP Express〔Strategies, 5, 58 (1992)〕、pBluesc

50

ript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、λZAP II(Stratagene社製)、λgt10、λgt11 [DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid(Clontech社製)、λExCell、pT7T3 18U(Pharmacia社製)、pcD2 [Cell. Biol., 3, 280 (1983)] およびpUC18 [Gene, 33, 103 (1985)] 等が挙げられる。

【0157】

ファージまたはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。

【0158】

前記大腸菌としては、例えば、XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)]、C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)] およびJM105 [Gene, 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

【0159】

cDNAライブラリーからの抗体のVLおよびVHをコードするcDNAクローンを選択する方法としては、アイソトープあるいは蛍光等で標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブランク・ハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989)] により選択することができる。

【0160】

また、プライマーを調製し、cDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34] によりVLおよびVHをコードするcDNAを調製することもできる。

【0161】

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素等で切断後、pBluescript SK(-)(Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、1-(1)に記載の塩基配列解析方法により、該cDNAの塩基配列を決定することができる。

【0162】

決定した塩基配列からVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のVLおよびVHの全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のVLおよびVHを完全に含んでいるアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

【0163】

さらに、抗体可変領域のアミノ酸配列または該可変領域をコードするDNAの塩基配列が既に公知である場合には、以下の方法を用いて製造することができる。

【0164】

アミノ酸配列が公知である場合には、コドンの使用頻度 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] を考慮して該可変領域をコードするDNA配列を設計し、設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行うことによりDNAを得ることができる。塩基配列が公知である場合には、その情報を基に100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行うことによりDNAを得ることができるし、また目的の塩基配列を全合成することによっても目的のDNAを得ることができる。

【0165】

(3)抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体のVLおよびVHの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVLおよびVHのアミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] と比較することにより、分泌シグナル配列

10

20

30

40

50

の長さおよびN末端アミノ酸配列を推定でき、更には抗体が属するサブグループを知ることができる。また、VLおよびVHの各CDRのアミノ酸配列についても、同様の方法で見出すことができる。

【0166】

(4) ヒト型キメラ抗体または該抗体断片の発現ベクターの構築

上述1-(3)で取得した抗体のV領域アミノ酸配列が、非ヒト抗体のV領域の場合は、その抗体のVLおよびVHの配列を用いてヒト型キメラ抗体を作製することができる。1-(1)に記載の抗体または該抗体断片の発現用ベクターのCLおよびCHをコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体のVLおよびVHをコードするcDNAを挿入し、ヒト型キメラ抗体または該抗体断片の発現ベクターを構築することができる。

10

【0167】

例えば、ヒト以外の動物の抗体のVLおよびVHをコードするcDNAを、ヒト以外の動物の抗体のVLおよびVHの3'末端側の塩基配列とヒト抗体のCLおよびCHの5'末端側の塩基配列とからなり、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAとそれぞれ連結する。さらに、それぞれを1-(1)記載の本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の発現用ベクターのヒト抗体のCLおよびCHをコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するように挿入し、ヒト型キメラ抗体または該抗体断片の発現ベクターを構築することができる。

【0168】

(5) ヒト化抗体のV領域をコードするcDNAの構築

20

ヒト化抗体のVLおよびVHをコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体のVLおよびVHのCDRを移植するヒト抗体のVLおよびVHのFRのアミノ酸配列を選択する。

【0169】

ヒト抗体のVLおよびVHのFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、PDB等のデータベースに登録されているヒト抗体のVLおよびVHのFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のVLおよびVHのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]等が挙げられる。その中でも、十分な活性を有するヒト化抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のVLおよびVHのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性(少なくとも60%以上)を有するアミノ酸配列を選択することが好ましい。

30

【0170】

次に、選択したヒト抗体のVLおよびVHのFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のVLおよびVHのCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト化抗体のVLおよびVHのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]を考慮したDNA配列に変換し、ヒト化抗体のVLおよびVHのアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。

【0171】

40

前記設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率および合成可能なDNAの長さから、重鎖、軽鎖とも4~6本の合成DNAを設計することが好ましい。

【0172】

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、1-(1)で構築した本発明の抗体または該抗体断片発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。また、目的のDNA配列を全合成して取得することもできる。

【0173】

PCR後、増幅産物をpBluescript SK(-)(Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、1-(1)に記載の塩基配列解析方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト化抗体のVL

50

およびVHのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

【0174】

(6)ヒト化抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVLおよびVHのCDRのみをヒト抗体のVLおよびVHのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。

【0175】

この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体のVLおよびVHでは、CDRのみならず、FRのいくつかのアミノ酸残基が直接的あるいは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基がCDRの移植に伴い、ヒト抗体のVLおよびVHのFRの異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。

10

【0176】

この問題を解決するため、ヒト化抗体では、ヒト抗体のVLおよびVHのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、抗体の立体構造を維持し間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基等を同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に由来するアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。

【0177】

ヒト化抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのためにX線結晶解析 [J. Mol. Biol., 112, 535 (1977)] またはコンピューターモデリング [Protein Engineering, 7, 1501 (1994)] 等による抗体の立体構造の構築および解析が行われている。

20

【0178】

これら抗体の立体構造の情報は、ヒト化抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来た。しかしながら、あらゆる抗体に適応可能なヒト化抗体の作製法は未だ確立されていない。現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

【0179】

ヒト化抗体のVLおよびVHのFRのアミノ酸残基の改変は、改変用合成DNAを用いて本項1の(5)に記載のPCR法を行うことにより、達成できる。PCR後の増幅産物について本項1の(1)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

30

【0180】

(7)ヒト化抗体または該抗体断片の発現ベクターの構築

1-(1)に記載の抗体または該抗体断片の発現用ベクターのヒト抗体のCLおよびCHをコードする遺伝子の上流に、1-(5)および1-(6)で構築したヒト化抗体のVLおよびVHをコードするcDNAを挿入し、ヒト化抗体または該抗体断片の発現ベクターを構築することができる。

【0181】

例えば、1-(5)および1-(6)でヒト化抗体のVHおよびVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項1-(1)に記載の抗体または該抗体断片の発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するように挿入し、ヒト化抗体または該抗体断片の発現ベクターを構築することができる。

40

【0182】

2. 本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の作製

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片は、前記1.で作製した本発明の抗体または該抗体断片の発現ベクターを適当な宿主細胞に導入して得られた形質転換体を、目的の非天然アミノ酸を添加した培地で培養して培養物中に本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から精製することにより取得することができる。

50

【0183】

また、本発明における宿主細胞としては、例えば、原核細胞および真核細胞など、組換えタンパク質生産に一般的に用いられる宿主細胞であればいかなるものも包含される。

【0184】

(1)宿主細胞が原核細胞の場合

本発明における宿主細胞が原核細胞である場合、遺伝子組換え抗体を生産させることができる原核細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。該原核細胞としては、例えば、大腸菌、枯草菌、サルモネラ菌、セネチア属およびシュードモナス属等が挙げられ、中でも、大腸菌が好ましい。

【0185】

宿主細胞が原核細胞の場合、当該細胞にてUAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子（以下、release factor; RF）の活性が低下または欠損していることが好ましく、当該翻訳終結因子の活性が欠損していることがより好ましい。

【0186】

宿主細胞では、翻訳終結因子と、発現ベクターの遺伝子導入により発現させたUAGコドンに結合するtRNAとが競合してUAGコドンを認識することが知られている。そのため、翻訳終結因子の活性が低下または欠損している細胞で、目的の抗体を効率的に発現させることができる。

【0187】

前記翻訳終結因子の活性を減弱または欠損させる手法としては、翻訳終結因子をコードする遺伝子に、付加、欠失または置換等の遺伝子改変を行うことが挙げられる。具体的には、翻訳終結因子をコードする遺伝子の一部または全部を欠損させることにより、翻訳終結因子の活性を低下または欠損させること、点変異を導入して翻訳終結因子の活性を低下または欠損させること、不要な配列を挿入することで翻訳終結因子の活性を低下または欠損させること、大過剰のUAGコドンに結合するtRNAを発現させることでドミナントネガティブの表現型にすること、siRNA、anti-sense RNA等により転写レベルで翻訳終結因子の発現を低下または欠損させることができる。いずれの方法であっても、翻訳終結因子の活性が低下または欠損していればよい。

【0188】

さらに、本発明に用いられる宿主細胞は、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子の活性が低下または欠損、もしくは翻訳終結因子をコードする遺伝子の発現の低下または欠損によって、機能を喪失する遺伝子の群から選択される1以上の遺伝子の機能を、翻訳終結因子の非存在下において発現させることができる細胞であることがより好ましい。具体的には、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子の活性が低下または欠損、もしくは翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子から選択される1以上の遺伝子について、UAGコドンがUGAまたはUAAコドンに置換された遺伝子を組み込んだ細菌人工染色体（Bacterial artificial chromosome、以下BACと記載する）が導入された細胞などが挙げられる。かかる細胞は、WO2011/158895に記載する方法に準じて作製することができる。

【0189】

本発明において、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子群とは、当該遺伝子を単独で欠損させると致死になる遺伝子群と、当該遺伝子の欠損によって機能を喪失し、これにより原核細胞の増殖速度が低下する遺伝子群が挙げられる。

【0190】

前記遺伝子を単独で欠損させると致死になる遺伝子群としては、大腸菌のcoaD、murF、hda、mreC、lpxK、hemAおよびlolAが挙げられる。また、枯草菌のaccD、acpS、cspR、dapB、divIC、dnaA、fmt、folD、ftsA、map、mrpD、murE、murG、plsX、ppnK、racE、resB、resC、rnpA、rplX、rpmGB、rpmH、rpsG、secA、secY、topA、trmD、yacM、ydiC、yloQ、ypuHおよびysxCの遺伝子が挙げられる。他には、大腸菌のmreDおよびhemKの遺伝子が挙げ

10

20

30

40

50

られる。

【0191】

前記遺伝子の欠損によって機能を喪失し、これにより原核細胞の増殖速度が低下する遺伝子群としては、大腸菌のfliN、fliP、fliQ、sucB、ubiF、ulaF、atpE、fabHが挙げられ、中でもsucB遺伝子が好ましい。

【0192】

大腸菌において前記翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子群から選択される1以上の遺伝子としては、具体的にはcoaD、hda、hemA、mreC、murF、lolA、lpxKおよびSucBの8遺伝子を選択することが好ましい。

【0193】

UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子としては、例えば大腸菌および枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 等の細菌では、RF-1が挙げられ、RF-1をコードする遺伝子としては、prfA遺伝子等が挙げられる。

【0194】

発現ベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入しうる方法であればいずれも用いることができる。例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)、Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)] に記載の方法およびエレクトロポレーション法 [日本国特開平2-257891号公報、Cytotechnology, 3, 133 (1990)] 等が挙げられる。

【0195】

発現ベクターの導入後、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片を安定に生産する形質転換体は、アンピシリン等の薬剤を含む原核細胞培養用培地により選択することができる。

原核細胞培養用培地としては、例えば、LB培地 (Becton, Dickinson and Company社製)、NZYM GIT培地 (日本製薬社製)、Terrific Broth培地 (Applichem社製)、SOB培地 (Applichem社製)、SOC培地 (Ampliqon社製)、またはこれら培地にアンピシリン等の各種抗生物質を添加した培地等が挙げられる。

【0196】

得られた形質転換体を、目的の非天然アミノ酸を加えた上記の培地中で培養することで、所望の位置に目的の非天然アミノ酸が導入された抗体または該抗体断片を培養上清中に生産蓄積させることができる。また、形質転換体は、プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した場合には、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。

【0197】

前記インデューサーとしては、例えば、tacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等が挙げられる。

【0198】

原核細胞の形質転換体、または培養上清中の本発明の抗体または該抗体断片の生産量および抗原結合活性は、酵素免疫抗体法 [以下、ELISA法と表記する、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1998)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)] 等により測定することができる。

【0199】

原核細胞の形質転換体、または培養上清中の本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片は、大腸菌抽出液またはペリプラズム抽出画分から、プロテインGによるアフィニティ精製、または定常領域のC末端に結合したタグ、例えばヒスチジンタグ配列 (6個の連続したHisからなるタグ配列であり、以下、ヒスタグと記載する) を用いたアフィニティ精製により、精製することができる。

10

20

30

40

50

【0200】

また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。

【0201】

精製した本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の軽鎖、重鎖または抗体分子全体の分子量は、SDS変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下、SDS-PAGEと表記する)[Nature, 227, 680 (1970)] およびウエスタンブロッティング法 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)] 等で測定することができる。

10

【0202】

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片が作製できたことは、質量分析にて分子量を測定し、理論分子量と比較することで確認できる。

【0203】

(2)真核細胞を用いた場合

本発明において、宿主細胞が真核細胞である場合、遺伝子組換え抗体を生産させることができる真核細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。具体的には、動物細胞、酵母細胞、昆虫細胞および植物細胞などが挙げられる。

【0204】

20

本発明において、動物細胞としては、例えば、マウスミエローマ細胞であるNS0細胞、S P2/0細胞、チャイニーズハムスター卵巢細胞CHO/dhfr(-)細胞、CHO/DG44細胞、CHO-K1細胞、ラットミエローマ細胞YB2/0細胞、IR983F細胞、シリアンハムスター腎臓由来であるB HK細胞、ヒト腎臓由来であるHEK293細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞等が挙げられる。

【0205】

これらの中でも、チャイニーズハムスター卵巢細胞であるCHO/DG44細胞、CHO-K1細胞、ヒト腎臓由来であるHEK293細胞、ラットミエローマYB2/0細胞等の動物細胞が好ましい。また、例えば、国際公開第00/61739号、国際公開第02/31140号に記載される、ADCC活性の高い遺伝子組換え抗体を発現させる細胞も宿主細胞として用いることができる。

30

【0206】

発現ベクターの導入法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、Gene, 17, 107 (1982)、Molecular&General Genetics, 168, 111 (1979)] に記載の方法、エレクトロポレーション法[日本国特開平2-257891号公報、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]およびリポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)] 等が挙げられる。

【0207】

発現ベクターの導入後、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片を安定に生産する形質転換体は、日本国特開平2-257891号広報に開示されている方法に従い、G418硫酸塩(以下、G418と表記する)(SIGMA社製)等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択することができる。

40

【0208】

動物細胞培養用培地としては、RPMI1640培地(日水製薬社製)、GIT培地(日本製薬社製)、EX-CELL302培地(JRH社製)、IMDM培地(GIBCO BRL社製)、Hybridoma-SFM培地(GIBCO BRL社製)、FreeStyle™ 293 Expression Medium(Invitrogen社製)、FreeStyle™ CHO Expression Medium(invitrogen社製)またはこれら培地に牛胎児血清(以下、FCSと表記する)等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。

【0209】

また、形質転換体は、日本国特開平2-257891号公報に開示されている方法に従い、dihy

50

drofolate reductase (DHFR) 遺伝子増幅系等を利用して本発明の抗体または該抗体断片の生産量を上昇させることができる。

【0210】

得られた形質転換体を目的の非天然アミノ酸を添加した培地中で培養することで、所望の位置に目的の非天然アミノ酸が導入された抗体または該抗体断片を培養上清中に生産蓄積させることができる。

【0211】

動物細胞を用いて本発明の抗体または該抗体断片を作製する方法としては、Mukai et al, [Biochem. Biophys. Res. Commun, 371, 818-822 (2008)]に記載する方法などがあげられる。

10

【0212】

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片は、培養上清から、プロテインGによるアフィニティ精製、または定常領域のC末端に結合したタグ、例えばヒスチジンタグ配列(6個の連続したHisからなるタグ配列であり、以下、ヒスタグと記載する)を用いたアフィニティ精製などにより、精製することができる。

【0213】

また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。

【0214】

20

精製した本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の軽鎖、重鎖または抗体分子全体の分子量は、SDS変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下、SDS-PAGEと表記する)[Nature, 227, 680 (1970)] およびウエスタンブロッティング法 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)] 等で測定することができる。

【0215】

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片が作製できたことは、質量分析にて分子量を測定し、理論分子量と比較することで確認できる。

【0216】

30

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)]、Whitten培地[発生工学実験マニュアル-トランスジェニック・マウスの作り方(講談社)勝木元也編(1987)]、FreeStyle™ 293 Expression Medium(invitrogen社製)、FreeStyle™ CHO Expression Medium(invitrogen社製)またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が挙げられる。

【0217】

培養は、通常pH6.0~8.0、30~40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1~7日間行うことが好ましい。

40

【0218】

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0219】

培養上清中の本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の生産量および抗原結合活性は、ELISA法 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1998)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)] 等により測定できる。

【0220】

50

培養上清中の本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片は、形質転換体の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)]。

【0221】

また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。

【0222】

精製した本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の、軽鎖、重鎖または抗体分子全体の分子量は、SDS-PAGE[Nature, 227, 680 (1970)] およびウエスタンブロッティング法 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12 (1988)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)] 等で測定することができる。

10

【0223】

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片が作製できたことは、質量分析にて分子量を測定し、理論分子量と比較することで確認できる。

【0224】

また、酵母、昆虫細胞または植物細胞等のその他の真核細胞においても、上述の動物細胞と同様の方法により、本発明の抗体または該抗体断片を製造することができる。

20

【0225】

酵母を用いる場合の宿主細胞としては、例えば、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイペロミセス属、トリコスポロン属およびシュワニオミセス属等に属する微生物が挙げられる。該微生物としては、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis* および *Trichosporon pullulans* および *Schwanniomycetes alluvius* 等が挙げられる。

【0226】

発現ベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 1929 (1978)] および酢酸リチウム法 [J. Bacteriology, 153, 163 (1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 1929 (1978)] 等が挙げられる。

30

【0227】

得られた酵母を宿主細胞とする形質転換体を目的の非天然アミノ酸を添加した培地で培養し、所望の位置に目的の非天然アミノ酸が導入された抗体または該抗体断片を培養物中に生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明の抗体または該抗体断片を製造することができる。形質転換体を培養する方法は、酵母の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0228】

酵母を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

40

【0229】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、例えば、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンおよびデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸およびプロピオン酸等の有機酸、並びにエタノールおよびプロパノール等のアルコール類等が挙げられる。

【0230】

窒素源としては、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウムおよびリン酸アンモニウム等の無機酸または有機酸のアンモニウム塩、その他

50

の含窒素化合物、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、並びに各種発酵菌体およびその消化物等が挙げられる。

【0231】

無機塩類としては、例えば、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅および炭酸カルシウム等が挙げられる。

【0232】

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃が好ましく、培養時間は、通常16時間～7日間であることが好ましい。培養中のpHは3.0～9.0に保持することが好ましい。pHは、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウムおよびアンモニア等を用いて調整することが好ましい。

10

【0233】

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンおよびテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0234】

この場合、培養上清より本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の精製標品を得ることができる。

20

【0235】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34, Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、本発明の抗体または該抗体断片を発現することができる。

【0236】

即ち、発現ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、本発明の抗体または該抗体断片を発現させることができる。

【0237】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等が挙げられる。

30

【0238】

昆虫細胞としては、例えば、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34, Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、およびTrichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5(Invitrogen社)等が挙げられる。

【0239】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への発現導入ベクターとバキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(日本国特開平2-227075号公報)およびリポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)]等が挙げられる。

40

【0240】

得られた昆虫細胞を宿主細胞とする形質転換体を目的の非天然アミノ酸を添加した培地で培養し、培養物中に所望の位置に目的の非天然アミノ酸が導入された抗体または該抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明の抗体または該抗体断片を製造することができる。形質転換体を培養する方法は、昆虫細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0241】

50

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば、一般に使用されているTNM-FH培地(Pharmingen社)、Sf-900 II SFM培地(Life Technologies社)、Ex Cell400、ExCell405(いずれもJRH Biosciences社)およびGrace's Insect Medium [Nature, 195, 788 (1962)] 等が挙げられる。

【0242】

培養は、通常pH6.0~7.0、25~30℃等の条件下で、1~5日間行うことが好ましい。また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0243】

この場合、培養上清から本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の精製標品を得ることができる。

10

【0244】

植物細胞を用いる場合の宿主細胞としては、例えば、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギおよびオオムギ等の由来の細胞等が挙げられる。

【0245】

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、アグロバクテリウム(Agrobacterium)(日本国特開昭59-140885号公報、日本国特開昭60-70080号公報、国際公開第94/00977号)、エレクトロポレーション法(日本国特開昭60-251887号公報)、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法(日本特許第2606856号、日本特許第2517813号)等が挙げられる。

20

【0246】

発現ベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法(日本国特開平2-227075号公報)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)]、インジェクション法[Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)]、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法 [日本特許第2606856号、日本特許第2517813号]、DEAE-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ4—遺伝子導入と発現・解析法(羊土社)横田崇・新井賢一編 (1994)] およびウイルスベクター法[Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)]等が挙げられる。

30

【0247】

得られた植物細胞を宿主細胞とする形質転換体を目的の非天然アミノ酸を添加した培地で培養し、培養物中に所望の位置に目的の非天然アミノ酸が導入された抗体または該抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片を製造することができる。形質転換体を培養する方法は、植物細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0248】

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、例えば、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地およびホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシシンおよびサイトカイニン等の植物ホルモンを添加した培地等が挙げられる。

40

【0249】

培養は、通常pH5.0~9.0、20~40℃の条件下で3~60日間行うことが好ましい。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0250】

50

この場合、培養上清から本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の精製標品を得ることができる。

【0251】

(3)無細胞発現系の場合

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の製造方法は、無細胞タンパク質合成系（無細胞発現系ともいう）を採用することもできる。無細胞タンパク質合成系とは、タンパク質の翻訳に必要なタンパク質因子を細胞抽出液として取り出し、試験管内で目的とするタンパク質を合成させる系である。様々な生物種に由来する抽出液を利用して無細胞系を構成することができ、例えば、大腸菌や好熱性細菌等の細菌、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球、マウスL細胞、エールリッヒ腹水癌細胞、HeLa細胞、CHO細胞および出芽酵母等の、高いタンパク質合成活性の状態の真核細胞、および原核細胞の抽出液を用いることができる(Clemens, M. J., Transcription and Translation - A Practical Approach, (1984), pp. 231-270, Henes, B.D. et al. eds., IRL Press, Oxford)。

【0252】

また、上記(1)、(2)で得られた本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片を生産することができる形質転換体の抽出液を調製することで、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片を無細胞発現系にて製造することができる。

【0253】

大腸菌を用いる場合では、例えば、Zubayら (Zubay et al., Ann. Rev. Genet. Vol.7, pp.267-287 (1973))、Prattら (Pratt, J.M. et al., Transcription and Translation - A practical approach, (1984), pp.179-209, Henes, B.D. et al. eds., IRL Press, Oxford)、またはKigawaら (Kigawa, T. et al, J. Struct. Funct. Genomics, Vol.5, pp63-68 (2004)) に開示の方法に従って組換え細菌株の抽出液を調製し、該抽出液の中で、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片を製造してもよい。

【0254】

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片製造用の形質転換体の抽出物は、例えば、以下の調製方法を用いて調製することができる。抗体にアジド-Z-リジン、エチニル-Z-リジン、アミノ-Z-リジンもしくはホルミル-Z-リジンなどのZ-リジン誘導体、TCO^{*}-LysまたはBCN-Lysを導入する場合には、メタノサルシナ・マゼイのピロリジルtRNA合成酵素のY384FおよびY306A二重変異体を生成することができる細胞の形質転換体を培養し、遠心分離により該形質転換体を回収する。抗体にアジド-Z-リジン、エチニル-Z-リジン、アミノ-Z-リジンもしくはホルミル-Z-リジンなどのZ-リジン誘導体、TCO^{*}-LysまたはBCN-Lys以外の非天然アミノ酸を導入する場合には、上述したように適切なアミノアシルtRNA合成酵素を選択し、該アミノアシルtRNA合成酵素を生成することができる細胞の形質転換体を回収する。

【0255】

回収した細胞を、洗浄し、緩衝液に再懸濁し、フレンチプレスやガラスビーズ、ワーリングブレンダー等を用いて破碎する。細胞の不溶分画を遠心分離で除去し、インキュベーションする。このインキュベーションによって内在性の核酸（DNAおよびRNA）を分解することができる。内在性の核酸は、インキュベーション溶液に、さらにカルシウム塩やマイクロコッカスのヌクレアーゼ等を添加することでさらに分解できる。インキュベーション後、透析によって内在性のアミノ酸、核酸、ヌクレオシドなど除去して、抽出液を調製する。

【0256】

無細胞系での本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の製造は、以下の製造方法を採用することができる。上述のとおり、非天然アミノ酸の種類に応じて適宜選択されたtRNAと、市販のtRNA画分と、鋳型DNA/RNAとを、上記の抽出物に加える。ここで、タンパク質および製造系の種類に応じて、目的の非天然アミノ酸を加え、さらにエネルギー

一、イオン、緩衝液、ATP再生系、核酸分解酵素阻害剤、還元剤、ポリエチレングリコール、cAMP、葉酸類および抗菌剤等を加えてもよい。また、鋳型としてDNAを用いる場合には、RNA合成系（基質、およびポリメラーゼなど）を加えることが好ましい。

【0257】

（４）各種非天然アミノ酸の一般的製造方法

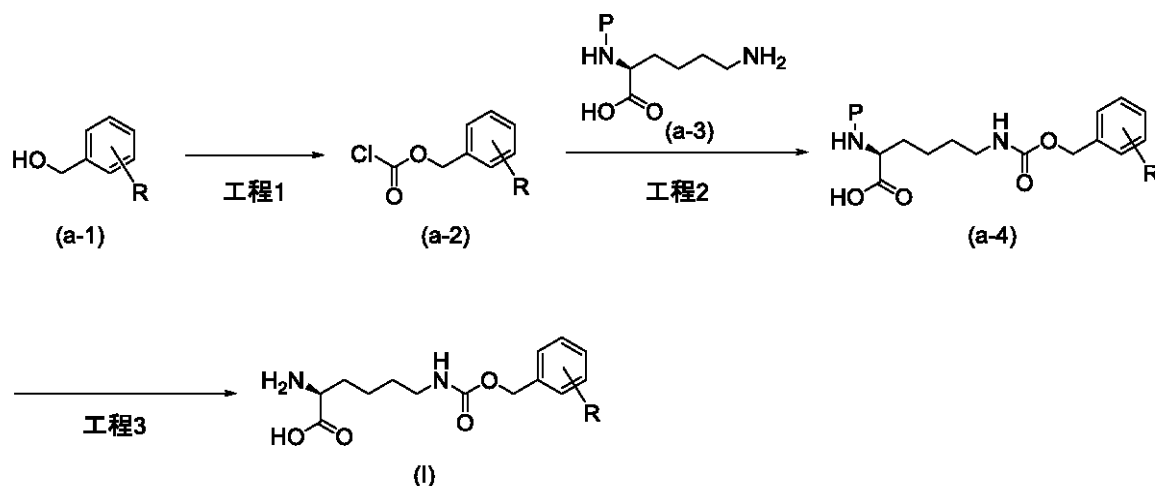
本発明において、各種非天然アミノ酸はW02013/068874、W02014/004639、W02014/044872およびW02014/124258などに記載する方法に準じて合成することができる。または市販の非天然アミノ酸を使用することができる。

【0258】

一般式（I）で表されるZ-リジン誘導体は、例えば、以下に示す製造法にて製造することができる。なお、定義した基が該製造法の条件下で変化するか、または該製造法を実施するのに不適切な場合、有機合成化学で常用される保護基の導入、及び除去方法[例えば、プロテクトィブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス第3版(Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、グリーン(T. W. Greene)著、John Wiley & Sons Inc.(1999年)などに記載の方法]などを用いることにより、目的化合物を製造することができる。また、必要に応じて置換基導入などの反応工程の順序を入れ替えることもできる。

【0259】

【化2】



式中、Rは前記と同義であり、Pは、例えばベンジルオキシカルボニル(Cbz)、tert-ブトキシカルボニル(Boc)、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)などの保護基を表す。以下、一般式(a-1)で表される化合物を化合物(a-1)という。他の式番号の化合物についても同様である。

【0260】

（工程1）

化合物(a-2)は、化合物(a-1)及び1～20当量の酸クロリド化剤を、溶媒中、必要により、1～50当量の添加剤存在下、-20℃と用いる溶媒の沸点の間の温度で、5分から72時間反応することにより製造することができる。

化合物(a-1)は、市販品として得られるか、又は公知の方法[例えば、実験化学講座、第5版、16巻、p.1、丸善株式会社(2005年)など]もしくはそれらに準じた方法により得ることができる。

酸クロリド化剤は、例えばホスゲン、トリホスゲン、トリクロロメチルクロロホルメートなどがあげられる。

溶媒としては、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン(THF)、1,2-ジメトキシエタン(DME)、ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、N-メ

チルピロリドン(NMP)、ピリジンなどがあげられ、これらは単独でまたは混合して用いられる。

添加剤としては、ピリジン、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン(DBU)、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸セシウムなどがあげられる。

【0261】

(工程2)

化合物(a-4)は、化合物(a-2)及び1~10当量の化合物(a-3)を、溶媒中、必要により、1~50当量の添加剤存在下、-20℃と用いる溶媒の沸点の間の温度で、5分から72時間反応することにより製造することができる。

化合物(a-3)は、市販品として得られるか、又は公知の方法[例えば、Amino Acid, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Volume 4, Protection Reactions, Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis, Andrew B. Hughes, 2011年、ISBN: 978-3-527-32103-2など]もしくはそれらに準じた方法により得ることができる。

溶媒としては、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、アセトニトリル、酢酸エチル、ジエチルエーテル、THF、DME、ジオキサン、DMF、DMA、NMP、ピリジン、水などがあげられ、これらは単独でまたは混合して用いられる。

添加剤としては、ピリジン、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、DBU、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸セシウムなどがあげられる。

【0262】

(工程3)

化合物(I)は、化合物(a-4)を、溶媒中、1~50当量の添加剤存在下、-20℃と用いる溶媒の沸点の間の温度で、5分から72時間反応することにより製造することができる。

溶媒としては、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、トルエン、アセトニトリル、酢酸エチル、ジエチルエーテル、THF、DME、ジオキサン、DMF、DMA、NMP、ピリジン、水などがあげられ、これらは単独でまたは混合して用いられる。

添加剤としては、保護基であるPの種類に応じて適切なものを選択することができ、より具体的には、例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス第3版(Protective Groups in Organic Synthesis, third edition)、グリーン(T. W. Greene)著、John Wiley & Sons Inc. (1999年)などに記載の脱保護反応に必要な添加剤などがあげられる。例えば、PがBocである場合には、塩酸などの酸が好ましい。

なお、上記各製造法における中間体、及び目的化合物は、有機合成化学で常用される分離精製法、例えば、濾過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、再結晶、各種クロマトグラフィー等に付して単離精製することができる。また、中間体においては特に精製することなく次の反応に供することも可能である。

化合物(I)の塩を取得したいとき、化合物(I)が塩の形で得られるときはそのまま精製すればよく、また、遊離の形で得られるときは、化合物(I)を適当な溶媒に溶解又は懸濁し、酸又は塩基を加えることにより塩を形成させて単離、精製すればよい。

【0263】

3. 本発明の非天然アミノ酸を含む修飾化抗体または該修飾化抗体断片の作製

本発明の非天然アミノ酸を含む修飾化抗体または該修飾化抗体断片は、上述の本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片に含まれる少なくとも1つのアミノ酸残基、非天然アミノ酸残基または糖鎖を、化学修飾または遺伝子工学的手法で修飾することにより、作製することができる。化学修飾は[抗体工学入門、地人書館(1994) Kolb et al., Angew Chem Int Ed Engl. 40. 2004-21, 2001]に記載された方法で行うことができ、遺伝子工学的手法としては、組換えタンパク質発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入して発現させる等の方法が挙げられるが、これらの方法に限定されない。

【0264】

修飾されるアミノ酸残基としては、システイン、チロシン、フェニルアラニン、リジン

、ピロリジン、グルタミン、アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸および該誘導体などが好ましく、アジドフェニルアラニンなどのチロシン誘導体、およびZ-リジン誘導体、TCO^{*}-LysおよびBCN-Lysなどのリジン誘導体などがより好ましく、Z-リジン誘導体、TCO^{*}-LysおよびBCN-Lysなどのリジン誘導体が最も好ましい。修飾される糖鎖としては、抗体の定常領域に存在する糖鎖が好ましい。

【0265】

本発明の非天然アミノ酸を含む修飾化抗体または該修飾化抗体断片は、例えば、本発明の抗体または該抗体断片が、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片に含まれる目的のアミノ酸残基、アミノ酸誘導体、非天然アミノ酸残基または非天然アミノ酸誘導体と反応性を有する分子により化学修飾されていれば、いかなるものでもよい。

10

【0266】

また、本発明の非天然アミノ酸を含む修飾化抗体または該修飾化抗体断片は、例えば、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片に含まれる目的のアミノ酸残基、アミノ酸誘導体、非天然アミノ酸残基または非天然アミノ酸誘導体に含まれるアジド基と、当該アジド基と反応性を有する分子とを、化学反応により結合させることで作製することができる。

【0267】

前記アジド基と反応性を有する分子としては、アルキニル基を有する分子であることが好ましく、当該アルキニル基を有する分子は、Alexa Fluor 488 DIBO Alkyne (ライフテックテクノロジー社)などの市販されている分子や、Synlett 1996; 1996(6): 521-522、またはChem. Commun.; 2010; 46, 97-99などに記載される公知の方法により調製することができる分子などがあげられる。前記アジド基を有する分子とアルキニル基を有する分子とは、例えば[Kolb et al., Angew Chem Int Ed Engl.40, 2004-21, 2001]に記載されるクリックケミストリーと呼ばれる化学反応を用いて結合することができる。

20

【0268】

また、本発明の非天然アミノ酸を含む修飾化抗体または該修飾化抗体断片は、例えば、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片に含まれる目的のアミノ酸残基、アミノ酸誘導体、非天然アミノ酸残基または非天然アミノ酸誘導体に含まれるアルキニル基と、当該アルキニル基と反応性を有する分子とを、化学反応により結合させることで作製することができる。

30

【0269】

前記アルキニル基と反応性を有する分子としては、アジド基を有する分子であることが好ましく、当該アジド基を有する分子は、Click-IT Azide Alexa Fluor 488 (Life Technologies社製)などの市販の分子や、公知の方法により調製される分子などがあげられる。前記アルキニル基を有する分子とアジド基を有する分子とは、例えば[Kolb et al., Angew Chem Int Ed Engl.40, 2004-21, 2001]に記載されるクリックケミストリーと呼ばれる化学反応を用いて結合することができる。

【0270】

また、本発明の非天然アミノ酸を含む修飾化抗体または該修飾化抗体断片は、例えば、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片に含まれる目的のアミノ酸残基、アミノ酸誘導体、非天然アミノ酸残基または非天然アミノ酸誘導体に含まれるアミノ基と、当該アミノ基と反応性を有する分子とを、化学反応により結合させることで作製することができる。

40

【0271】

前記アミノ基と反応性を有する分子としては、ホルミル基を有する分子であることが好ましく、当該ホルミル基を有する分子は、Fluorescein PEG aldehyde (Nanocs社製)などの市販される分子や、公知の方法により調製することができる分子などがあげられる。前記アミノ基を有する分子とホルミル基を有する分子とは、例えば還元的アミノ化反応(Bioconjugate Chem. 2016, 27, 198-206)と呼ばれる化学反応を用いて結合することができる。

50

【0272】

また、本発明の非天然アミノ酸を含む修飾化抗体または該修飾化抗体断片は、例えば、本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片に含まれる目的のアミノ酸残基、アミノ酸誘導体、非天然アミノ酸残基または非天然アミノ酸誘導体に含まれるホルミル基と、当該ホルミル基と反応性を有する分子とを、化学反応により結合させることで作製することができる。

【0273】

前記ホルミル基と反応性を有する分子としては、アミノ基を有する分子であることが好ましく、当該アミノ基を有する分子は、Fluorescein PEG amine (Nanocs社製)などの市販される分子や、公知の方法により調製することができる分子などがあげられる。前記ホルミル基を有する分子とアミノ基を有する分子とは、例えば還元的アミノ化反応と呼ばれる化学反応を用いて結合することができる。

10

【0274】

また、本発明の非天然アミノ酸を含む修飾化抗体または該修飾化抗体断片は、例えば、本発明の抗体または該抗体断片に含まれるTCO^{*}-Lysトランス-シクロオクテン環と、当該トランス-シクロオクテン環と反応性を有する分子とを、化学反応により結合させることで作製することができる。

【0275】

前記トランス-シクロオクテン環と反応性を有する分子としては、1,2,4,5-テトラジン環を有する分子であることが好ましく、当該1,2,4,5-テトラジン環を有する分子は、Cy3 Tetrazine (Click Chemistry Tools社製)などの市販される分子や、公知の方法により調製することができる分子などがあげられる。前記トランス-シクロオクテン環を有する分子と1,2,4,5-テトラジン環を有する分子とは、例えば逆電子要請型ディールズ・アルダー反応 (Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 2245-2249) と呼ばれる化学反応を用いて結合することができる。

20

【0276】

また、本発明の非天然アミノ酸を含む修飾化抗体または該修飾化抗体断片は、例えば、本発明の抗体または該抗体断片に含まれるBCN-Lysのビスクロ[6.1.0]ノン-4-イン環と、当該ビスクロ[6.1.0]ノン-4-イン環と反応性を有する分子とを、化学反応により結合させることで作製することができる。

30

【0277】

前記ビスクロ[6.1.0]ノン-4-イン環と反応性を有する分子としては、1,2,4,5-テトラジン環を有する分子であることが好ましく、当該1,2,4,5-テトラジン環を有する分子は、Cy3 Tetrazine (Click Chemistry Tools社製)などの市販される分子や公知の方法により調製することができる。前記ビスクロ[6.1.0]ノン-4-イン環を有する分子と1,2,4,5-テトラジン環を有する分子とは、例えば逆電子要請型ディールズ・アルダー反応 (J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 10317-10320) と呼ばれる化学反応を用いて結合することができる。

【0278】

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の化学修飾は、本発明の抗体または該抗体断片と反応性を有する分子を該抗体または該抗体断片1 molあたり好ましくは1～1000 mol、より好ましくは1～50 mol用いて反応させることによって行うことが好ましい。

40

【0279】

本発明の非天然アミノ酸を含む修飾化抗体または該修飾化抗体断片の化学修飾の程度、すなわち本発明の抗体または該抗体断片が有する目的のアミノ酸残基、アミノ酸誘導体、非天然アミノ酸残基または非天然アミノ酸誘導体と反応性を有する分子との反応性は、反応させる分子のモル比、反応温度、pHおよび反応時間等を調節することによって、任意に選択することができる。

【0280】

本発明の抗体または該抗体断片が有するアジド基を含むアミノ酸残基、アミノ酸誘導体

50

、非天然アミノ酸残基または非天然アミノ酸誘導体と、アルキニル基を含む分子との反応性は、Bioconjugate Chem. 2014, 25, 351-361などに記載される方法に準じて確認することができる。例えば、抗体または該抗体断片がアジド基を1つ有する非天然アミノ酸残基を有しているとき、当該非天然アミノ酸残基とアルキニル基を有する蛍光色素Alexa488との反応性は、以下に記載する方法により確認することができる。アルキニル基を有する分子がAlexa488以外の時にも、以下に記載する方法に準じて反応性を確認することができる。

【0281】

前記抗体または該抗体断片をDPBSで適当な濃度に調製し、Alexa Fluor 488 DIBO Alkyne (ライフテクノロジー社) を添加して、室温で一晩反応させる。その後、反応液について、陽イオン交換クロマトグラフィーにて波長280 nm、495 nmの吸光度をモニタリングする。得られた各吸光度でのエリア面積値を用いて、以下の式により前記抗体または該抗体断片とAlexa488との反応性(%)を算出する。例えば、1分子の非天然アミノ酸を含むFabに、1分子のAlexa488が結合した時に、当該反応性は100%となる。

【0282】

抗体または該抗体断片の濃度(M) = { (波長280 nmのエリア面積値) - 0.11 × (波長495 nmのエリア面積値) } / 抗体または該抗体断片のモル吸光係数

反応性(%) = [波長495 nmのエリア面積値 / (Alexa488のモル吸光係数 × 上記の式で得られた抗体または該抗体断片の濃度(M)) / 抗体または該抗体断片1分子あたりの非天然アミノ酸の分子数] × 100

【0283】

また、本発明の抗体または該抗体断片が有するアルキニル基を含むアミノ酸残基、アミノ酸誘導体、非天然アミノ酸残基または非天然アミノ酸誘導体とアジド基を有する分子との反応性についても、上記と同様の方法で確認することができる。本発明の抗体または該抗体断片と反応させる物質としては、例えばClick-IT Azide Alexa Fluor 488 (Life Technologies社製) などを用いることができる。

【0284】

また、本発明の抗体または該抗体断片が有するアミノ基を含むアミノ酸残基、アミノ酸誘導体、非天然アミノ酸残基または非天然アミノ酸誘導体とホルミル基を有する分子との反応性については、以下に記載する方法で確認することができる。

【0285】

前記本発明の抗体または該抗体断片を、適当な溶媒、例えば50 mM クエン酸三ナトリウム(和光純薬社製)と50 mM クエン酸(ナカライテスク社製)を含むpH 4.0の溶媒を用いて適当な濃度に調製する。当該抗体溶液にFluorescein PEG aldehyde (Nanocs社製)および2-Methylpyridine borane complex (Sigma-Aldrich社製)を添加して4 °Cで一晩反応させる。

【0286】

その後、限外ろ過により未反応のFluorescein PEG aldehydeを除去した後、分光光度計UV-1800(島津製作所製)にて分析する。例えば、本発明の抗体または該抗体断片が、アミノ基を1つ有する非天然アミノ酸残基を有しているときは、以下の式により反応性(%)を算出することができる。1分子の本発明の抗体に2分子の非天然アミノ酸が導入されているときは、当該抗体に2分子のFluoresceinが付加されたときに100 %となる。

【0287】

抗体または該抗体断片の濃度(M) = { (波長280 nmのエリア面積値) - 0.30 × (波長495 nmのエリア面積値) } / 抗体または該抗体断片のモル吸光係数

反応性(%) = [波長495 nmのエリア面積値 / (Fluoresceinのモル吸光係数 × 上記式により算出される抗体または該抗体断片の濃度(M)) / 抗体または該抗体断片1分子あたりの非天然アミノ酸の分子数] × 100

【0288】

なお、非天然アミノ酸を含んでいない親抗体(または野生型抗体)とFluorescein PEG

10

20

30

40

50

aldehydeとが反応するときには、上記式で計算される本発明の抗体または該抗体断片とFluorescein PEG aldehydeとの反応性から、親抗体とFluorescein PEG aldehydeとの反応性を減じた値が、本発明の抗体が有する非天然アミノ酸とFluorescein PEG aldehydeとの反応性(%)になる。

【0289】

また、本発明の抗体または該抗体断片が有するホルミル基を含むアミノ酸残基、アミノ酸誘導体、非天然アミノ酸残基または非天然アミノ酸誘導体とアミノ基を有する分子との反応性についても、上記と同様の方法で確認することができる。本発明の抗体または該抗体断片と反応させる物質としては、例えばFluorescein PEG amineなどを用いることができる。

10

【0290】

また、本発明の抗体または該抗体断片が有するTCO^{*}-Lysと1,2,4,5-テトラジン環を有する分子、および本発明の抗体または該抗体断片が有するBCN-Lysと1,2,4,5-テトラジン環を有する分子との反応性についても、上記の本発明の抗体または該抗体断片とアジド基またはアルキニル基を有する分子との反応性を測定する方法に準じて測定することができる。このとき、本発明の抗体または該抗体断片と反応させる物質としては、たとえばCy3 Tetrazine (Click Chemistry Tools社製)を用いることができ、このときの反応性は以下の式により算出される。

【0291】

抗体または該抗体断片の濃度(M) = { (波長280 nmのエリア面積値) - 0.08 × (波長550 nmのエリア面積値) } / 抗体または該抗体断片のモル吸光係数

20

反応性(%) = [波長550 nmのエリア面積値 / (Cy3のモル吸光係数 × 上記式で算出される抗体または該抗体断片の濃度(M)) / 抗体または該抗体断片1分子あたりの非天然アミノ酸の分子数] × 100

【0292】

修飾反応に使用する溶媒は反応を妨害しないものであればいずれでもよい。例えば、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、炭酸水素ナトリウム水溶液、酢酸ナトリウム緩衝液、クエン酸緩衝液、水、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、メタノール、アセトニトリル、ジオキサンおよびテトラヒドロフラン等並びにこれらの混合溶媒から選択される[稲田祐二・前田浩編、続蛋白質ハイブリッド、共立出版(1988)参照]。

30

【0293】

反応の温度、pHおよび時間は、化学修飾に用いる本発明の抗体または該抗体断片、並びに化学修飾に用いる分子の活性が損なわれない条件であればいずれでもよい。例えば、0~50℃の間の温度、10分間~100時間、pH4~10が好ましい。

【0294】

上述の化学反応で得られた本発明の非天然アミノ酸を含む修飾化抗体または該修飾化抗体断片は、常法に従って、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーおよび限外濾過等を単独または組み合わせることにより精製することができる。また、任意の化学修飾率を有する本発明の非天然アミノ酸を含む修飾化抗体または該修飾化抗体断片等を、これらの精製法で分画して精製することもできる。

40

【0295】

精製された本発明の非天然アミノ酸を含む修飾化抗体または該修飾化抗体断片の構造は、例えば、質量分析、核磁気共鳴(NMR)およびアミノ酸分析計によるアミノ酸組成分析により確認することができる。また、例えば、気相プロテインシーケンサーによりエドマン分解して得られたフェニルチオヒダントイン(PTH)アミノ酸を逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析することによるアミノ酸配列分析等により確認することができる。

【0296】

4. 抗体のエフェクター活性を制御する方法

50

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片のエフェクター活性を制御する方法としては、例えば、抗体の定常領域の297番目のアスパラギン(Asn)に結合するN結合複合型糖鎖の還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)に α -1,6結合するフコース(コアフコースともいう)の量を制御する方法(国際公開第2005/035586号、国際公開第2002/31140号、国際公開第00/61739号)および抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することで制御する方法などが挙げられる。本発明の非天然アミノ酸を含む抗体にはいずれの方法を用いても、エフェクター活性を制御することができる。

【0297】

エフェクター活性とは、抗体のFc領域を介して引き起こされる抗体依存性の活性をいう。例えば、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC活性)、補体依存性傷害活性(CDC活性)、およびマクロファージや樹状細胞などの食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス(antibody-dependent phagocytosis, ADP活性)などが挙げられる。

10

【0298】

Fc領域上のN結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンに付加するフコースの含量を制御することで、抗体のエフェクター活性を増加または低下させることができる。抗体のFc領域に結合しているN結合複合型糖鎖に付加するフコースの含量を低下させる方法としては、 α 1,6-フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞を用いて抗体を発現することで、フコースが結合していない抗体を取得することができる。フコースが結合していない抗体は高いADCC活性を有する。

【0299】

20

一方、抗体のFc領域に結合しているN結合複合型糖鎖に付加するフコースの含量を増加させる方法としては、 α 1,6-フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用いて抗体を発現させることで、フコースが結合している抗体を取得できる。フコースが結合している抗体は、フコースが結合していない抗体よりも低いADCC活性を有する。

【0300】

また、抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することでADCC活性やCDC活性を増加または低下させることができる。例えば、米国特許出願公開第2007/0148165号明細書に記載のFc領域のアミノ酸配列を用いることで、抗体のCDC活性を増加させることができる。また、米国特許第6,737,056号明細書、米国特許第7,297,775号明細書および米国特許第7,317,091号明細書に記載のアミノ酸改変を行うことで、ADCC活性またはCDC活性を増加させることも低下させることもできる。

30

更に、上述の方法を組み合わせ、一つの抗体に使用することにより、抗体のエフェクター活性が制御された抗体を取得することができる。

【0301】

5. 精製した本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の活性評価

精製した本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の活性評価は、以下のように行うことができる。

【0302】

抗原に対する結合活性または抗原陽性培養細胞株に対する結合活性は、例えば、バインディングアッセイ、蛍光抗体法[Cancer Immunol. Immunother. , 36, 373 (1993)]およびBiacoreシステム等を用いた表面プラズモン共鳴法等を用いて測定できる。

40

【0303】

抗原としては、抗原をコードするcDNAを含む発現ベクターを、大腸菌、酵母、昆虫細胞および動物細胞などに導入して得られた遺伝子導入細胞、リコンビナントタンパク質、またはヒト組織から得た精製ポリペプチドまたは部分ペプチド等を用いることができる。

【0304】

抗原が部分ペプチドである場合には、BSAまたはKLHなどのキャリアタンパク質とコンジュゲートを作製して、これを用いることができる。

【0305】

バインディングアッセイの手法を以下に記載する。抗原を96ウェルプレートなどのプレ

50

ートに分注し、固相化した後、第1抗体として血清、ハイブリドーマの培養上清または精製モノクローナル抗体などの被験物質を分注し、反応させる。PBSまたは0.05% tween 20を含むPBS(PBS-Tween)などで、よく洗浄した後、第2抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質または放射線化合物などで標識した抗イムノグロブリン抗体を分注して反応させる。PBS-Tweenでよく洗浄した後、第2抗体の標識物質に応じた検出反応を行ない、当該被験物質の抗原結合活性を測定する。

【0306】

また、抗原陽性培養細胞株に対するADCC活性またはCDC活性は公知の測定方法[Cancer Immunol. Immunother. , 36, 373 (1993)]により測定する。

【0307】

本発明の抗体がFc γ RおよびFcRへの結合活性を有することは、遺伝子組換えFc γ RIIIAタンパク質や遺伝子組換え胎児FcR (neonatal Fc receptor, FcRn) タンパク質を作製して、結合活性を測定することで確認することができる (米国特許出願公開第2004/0259150号明細書)。

【0308】

また、本発明の抗体または該抗体断片を、殺細胞活性を有する薬剤で修飾した修飾化抗体または修飾化抗体断片を作製したときには、当該修飾化抗体または修飾化抗体断片の殺細胞活性を以下に記載する方法で測定することができる。

【0309】

前記修飾化抗体または修飾化抗体断片が結合する適当な細胞を96ウェルプレートなどのプレートに播種する。そこに前記修飾化抗体または修飾化抗体断片を適当な濃度で添加し、インキュベートする。その後、例えばCellTiter-Glo™(Promega社製)などの細胞の生存を検出できる試薬を用いてプレート中の細胞の生存を検出し、細胞の生存率(%)を算出する。

【0310】

6. 本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片の医薬への使用

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片は、例えば診断薬、治療剤等の医薬等への使用が可能である。

【0311】

本発明の非天然アミノ酸を含む抗体または該抗体断片を含有する医薬は、治療剤として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した組成物、すなわち医薬製剤として提供するのが好ましい。

【0312】

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが好ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与が挙げられる。抗体製剤の場合、静脈内投与が好ましい。

【0313】

投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏およびテープ剤等が挙げられる。

【0314】

経口投与に適当な製剤としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤および顆粒剤等が挙げられる。

【0315】

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、例えば、水、ショ糖、ソルビトールおよび果糖等の糖類、ポリエチレングリコールおよびプロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油および大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、並びにストロベリーフレーバーおよびペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造することができる。

【0316】

カプセル剤、錠剤、散剤および顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖およびマンニトール等の賦形剤、デンプンおよびアルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムおよびタルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロースおよびゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、並びにグリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0317】

非経口投与に適切な製剤としては、例えば、注射剤、座剤および噴霧剤等が挙げられる。

【0318】

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、または両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。または、本発明の抗体または該抗体断片を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

10

【0319】

座剤は、カカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製する。

【0320】

また、噴霧剤は、本発明の抗体または該抗体断片そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ本発明の抗体または該抗体断片を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。

【0321】

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。本発明の抗体または該抗体断片および用いる担体の性質により、エアロゾルおよびドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

20

【0322】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢および体重等により異なるが、有効成分の量として、通常成人1日当たり10 μ g/kg~20 mg/kgである。

【0323】

例えば、抗腫瘍剤として使用する場合、本発明の抗体または該抗体断片の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法としては、インビトロ実験またはインビボ実験による方法が挙げられる。

30

【0324】

インビトロ実験としては、例えば、細胞傷害活性測定法、CDC活性測定法およびADCC活性測定法等が挙げられる。また、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等が挙げられる。

【実施例】

【0325】

以下に、実施例により本発明を説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

40

【0326】

大腸菌 W3110株を宿主とした遺伝子組換え大腸菌の作製

非天然アミノ酸・オルト-アジド-Z-リジン（以下、o-Az-Z-Lysと記載する）導入抗体を作製するために、大腸菌W3110株（ATCC）を親株宿主細胞として、遺伝子組換え大腸菌（以下、W3110RF-Zero株と記載する）を下記の方法で作製した。

【0327】

W3110RF-Zero細胞は、W02011/158895に記載の方法に従い、野生型W3110株が有する翻訳終結因子RF-1をコードする遺伝子prfAを欠損させ、かつprfA遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子coaD, hda, hemA, mreC, murF, lolA, lpxKおよびSucBのナンセンスコドンTAGからTAAに改変した遺伝子が組み込まれた細菌人工染色体（Bacterial artificial

50

chromosome; BAC) を導入して作製した。

【実施例 2】

【0328】

Lys残基をo-Az-Z-Lysに置換したo-Az-Z-Lys導入抗Her2ヒト化抗体-Fab (Trastuzumab-Fab) の発現ベクターの構築

抗Her2ヒト化抗体 (IgG1、 κ) のFabであるTrastuzumab-Fabについて、CH1およびC κ のLys残基をo-Az-Z-Lysに置換したo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabを、以下に記載する方法で作製した。

【0329】

最初に、当該Fabの大腸菌用の発現ベクターの作製方法について以下に記載する。

(1) 大腸菌用のo-Az-Z-Lys導入Fabの基本発現ベクターの構築

大腸菌用o-Az-Z-Lys導入Fabの基本発現ベクターとしては、市販ベクターpFLAG-CTS (SIGMA社製) を利用した。pFLAG-CTSのlacリ

プレッサー遺伝子lacIの直下流に、文献[Mukai et al, Biochem Biophys Res Commun 411, 757-761, 2011]記載の方法に準じて、ピロリジンtRNA (以下、Pyl tRNA、tRNA^{Pyl}とも記載する) の塩基配列およびピロリジンtRNA合成酵素 (以下Pyl RSとも記載する) をコードする塩基配列を挿入した。以下、当該発現ベクターをpFLAG-CTS PylTSと記載する。Pyl tRNAの塩基配列およびPyl RSをコードする塩基配列としては、Methanosarcina mazei由来の野生型Pyl tRNAをコードする塩基配列 (配列番号1)、およびMethanosarcina mazei由来のPyl RSの変異体 (Y306A/Y384F) [Yanagisawa et al, Chem Biol., 15, 1187-1197, 2008]のアミノ酸配列 (配列番号8) をコードする塩基配列を使用した。

【0330】

(2) 大腸菌用のo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabの発現ベクターの構築

(2-1) 野生型Trastuzumab-Fabの発現ベクターの構築

Trastuzumab-Fabをコードする塩基配列は、Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A., 89, 4285(1992)に記載されるTrastuzumabのFabの軽鎖領域のアミノ酸配列 (配列番号2) とFabの重鎖領域のアミノ酸配列 (配列番号3) をもとにして設計した。

【0331】

軽鎖可変領域と軽鎖定常領域の境界はBsiWI制限酵素認識配列、重鎖可変領域と重鎖定常領域の境界はNheI制限酵素認識配列となるように塩基配列を設計した。

軽鎖、重鎖ともに、Tacプロモーターとシャイン・ダルガノ配列からなる塩基配列 (配列番号4) の支配下に、PelB分泌シグナル (配列番号5) に連結させた。

【0332】

軽鎖に関しては、上記Fabの軽鎖の塩基配列の5'末端にNdeI制限酵素認識配列を、3'末端にHindIII制限酵素認識配列を付加した塩基配列 (配列番号6) を全合成して取得した。当該塩基配列を制限酵素NdeIサイトとHindIIIサイトとを利用して、(1)で作製したpFLAG-CTS PylTSに挿入した。

【0333】

重鎖に関しては、上記Fabの重鎖の塩基配列の5'末端にNdeI制限酵素認識配列、3'末端にはHisタグとSalI制限酵素認識配列を付加した塩基配列を全合成して取得した (配列番号7)。当該塩基配列を制限酵素NdeIサイトとEcoRIサイトとを利用して、pFLAG-CTSのTaqプロモーターの上流に公知のEcoRI制限酵素認識配列を挿入したpFLAG-CTS-Hに挿入した。

【0334】

(2-2) アンバー (TAG) コドン変異の導入

表3に記載した各o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabの発現ベクターを以下に記載する方法で作製した。

【0335】

(2-1)で作製した野生型Trastuzumab-Fabの軽鎖または重鎖をコードする塩基配列を基に

して、o-Az-Z-Lysを導入する部位に相当するコドンアンバー（TAG）コドンに置換した塩基配列（配列番号9-62）を全合成して取得した。表3には、作製した各o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabと、当該Fabの作製のために全合成した、TAGコドンが導入された塩基配列を記載した。

【0336】

配列番号9-16および配列番号28-47の塩基配列は、Trastuzumabの軽鎖定常領域の塩基配列の5'末端をBsiWI制限酵素認識配列とし、3'末端にはHindIII制限酵素認識配列を付加した塩基配列である。該塩基配列を制限酵素BsiWIとHindIIIで処理することで、(2-1)で作製したpFLAG-CTS PylTSが有する野生型のFabの軽鎖定常領域の塩基配列をTAGコドンが導入された軽鎖定常領域の塩基配列に置換した。

10

【0337】

配列番号17-23,26-27および配列番号48-62の塩基配列は、Trastuzumabの重鎖定常領域の塩基配列の5'末端をNheI制限酵素認識配列とし、3'末端にはSalI制限酵素認識配列を付加した塩基配列である。該塩基配列を制限酵素NheIとSalIで処理することで、(2-1)で作製したpFLAG-CTS-Hが有する野生型のFabの重鎖定常領域の塩基配列をTAGコドンが導入された重鎖定常領域の塩基配列に置換した。

【0338】

また、配列番号24、25の塩基配列は、o-Az-Z-Lys導入部位のコドンアンバー（TAG）コドンに置換したTrastuzumabの重鎖定常領域および重鎖可変領域の塩基配列の5'末端にNdeI制限酵素認識配列、3'末端にはHisタグとSalI制限酵素認識配列を付加した塩基配列である。

20

【0339】

(2-3)大腸菌用のo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabの発現ベクターの構築

Trastuzumab-Fab発現ベクターは、(2-1)、(2-2)で得られたベクター（配列番号9-23および26-62の塩基配列をそれぞれ含むベクター）を制限酵素EcoRIとSalIにて処理し、目的の軽鎖の塩基配列が挿入されたpFLAG-CTS PylTSへ、目的の重鎖塩基配列を挿入して構築した。

【0340】

また、全合成した配列番号24、25の塩基配列については、制限酵素NdeIサイトとEcoRIサイトとを利用してpFLAG-CTS-Hに挿入し、発現ベクターを構築した。

【実施例3】

30

【0341】

野生型およびo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabの調製

o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabを調製するために、実施例2にて構築した大腸菌用Trastuzumab-Fab発現ベクターを、実施例1で作製したW3110 RF-zero株に導入した。

各種Trastuzumab-Fab発現ベクターを10 ng/μLとなるように滅菌蒸留水に懸濁した。3 μLの該DNA溶液を50 μLのコンピテントセルに加えて穏やかに混和し、エッペンドルフチューブに分注し氷上に30分間保持した。続いて、42 °Cのウォーターバスに30秒間保持した後、再度氷上に2分間静置した。

【0342】

終濃度0.1 mg/mLのZ-Lys（Bachem社製）を添加した500 μLの滅菌LB培地（DIFCO製）を加えた後、37 °Cに設定したインキュベータにて60分間振とう培養を行った。培養後、終濃度0.1 mg/mLのZ-Lys（Bachem社製）および終濃度100 μg/mLのアンプシリン（和光純薬社製）を添加したLBプレート[1.5 %（W/V）アガロース]に全量プレーティングした。37 °Cに設定したインキュベータで1晩培養を行った後、プレートに生育してくる大腸菌を遺伝子導入株として選抜した。

40

【0343】

得られた形質転換株を、37 °Cで終濃度0.1 mg/mLのZ-Lys を添加した10 mLのLB培地を用いて一晩振とう培養を行った。得られた菌体溶液を終濃度1 mMのo-Az-Z-Lys（参考例1に記載の方法に従いGVK Biosciences社にて合成）、および終濃度100 μg/mLのアンプシリン（和光純薬社製）を添加した100 mLのSuper Broth[MOPS（ナカライテスク社製） 1 g

50

、Tryptone (DIFCO社製) 3 g、Yeast Extract (DIFCO社製) 2 g]に播種し、37℃で培養した。

【0344】

菌体溶液の600 nmの吸光度（以下、OD₆₀₀と記載する）の値が2.0になった段階で培養を停止し、室温で15分間程度静置した。該菌体溶液に終濃度1.0 mmol/Lのイソプロ-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) ((ナカライテスク社製) を添加し、22℃に設定したバイオシェーカーで、50 rpmで一晩振とう培養してFabを発現させた。

【0345】

培養後の菌体溶液を遠心分離し[CR21E(日立製作所社製)、7000 rpm、4℃、5分間]、得られた沈殿の重量を量り、大腸菌重量1 g当たり10mLの20 mM クエン酸 (ナカライテスク社製)、150 mM NaCl (ナカライテスク社製) および2 mM EDTA (ナカライテスク社製) を含むpH 6.0のバッファー（以下、クエン酸バッファーと記載する）を加えて十分に懸濁した。該懸濁液を63℃に設定したシェーカー付き恒温槽（ヤマト科学社製）で15分間、加温しながら振とう培養した。その後、遠心分離[CR21E (日立製作所社製)、7000 rpm、4℃、15分間]により菌体を沈殿させ、得られた上清をフィルターろ過し[Millex-G 0.2 μm(ミリポア社製)]、以下に記載する精製に使用した。

【0346】

Poly-Prepカラム（バイオラッド社製）にProsep Gレジン（ミリポア社製）を0.5 mL充填し、10 mLのクエン酸バッファーにて洗浄した。上記で調製したFab発現培養上清をカラムにアプライして、10 mLのクエン酸バッファーで洗浄後、2 mLの100 mM クエン酸 (ナカライテスク社製)、150 mM NaCl (ナカライテスク社製) および2 mM EDTA (ナカライテスク社製) を含むpH 5.0のバッファー、2 mLの100 mM クエン酸 (ナカライテスク社製)、150 mM NaCl (ナカライテスク社製) および2 mM EDTA (ナカライテスク社製) を含むpH 3.5のバッファー、で順次洗浄した。その後、2 mLの100 mM クエン酸 (ナカライテスク社製)、150 mM NaCl (ナカライテスク社製) および2 mM EDTA (ナカライテスク社製) を含むpH 3.0のバッファーで溶出を行い、ただちに700 μL の1.0 M Tris-HCl (ナカライテスク社製) を溶出画分に加えて中和した。

【0347】

溶出画分は、Amicon Ultra-4 30K（ミリポア社製）を用いて20 mM クエン酸 (ナカライテスク社製) および150 mM NaCl (ナカライテスク社製) を含むpH 6.0のバッファー（以下、保存用クエン酸バッファーと記載する）へのバッファー交換を行った。適量のバッファーを充填しながら、遠心濃縮[CF15R (日立製作所社製)、15000 rpm、4℃、5分間]を4回行い、上清を回収して最終サンプルとして以降の実験に使用した。

【0348】

得られたo-Az-Z-Lys導入FabについてWaters社の質量分析装置Synapt G2 HDMSを用いて、通常の方法により質量分析を行った結果、実測値と理論分子量が一致した。これにより、1分子のTrastuzumab-Fabに1分子のo-Az-Z-Lysが導入され、o-Az-Z-Lys導入Fabが作製できたことが確認できた。

【実施例4】

【0349】

o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-FabとAlexa 488 DIBOとの反応性の解析

実施例3で得られた各o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-FabとAlexa488 DIBOとの反応性を、以下に記載する方法で測定した。当該反応には、クリックケミストリーを用いた。

【0350】

実施例3で得られた各o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabを、DPBS（ナカライテスク社製）を用いて5 μMの濃度に調製した。各o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabに対して40 当量に相当するClick-IT Alexa Fluor 488 DIBO Alkyne（ライフテクノロジーズ社製）を添加して、室温で一晩反応させた。

【0351】

得られた反応液を陽イオン交換クロマトグラフィーにて分析し、o-Az-Z-Lys導入Trastu

10

20

30

40

50

zumab-FabとAlexa488との反応性を測定した。陽イオン交換クロマトグラフィーはProminence（島津製作所社製）を用いて、カラム：TSKgel SP-5PW（東ソー社製）、通筒液A：20 mM 酢酸バッファー（pH 5.0）、通筒液B：1M NaCl、20 mM 酢酸バッファー（pH 5.0）、流速：1mL/min、温度：25 °Cという条件下にて行った。検出器はSPD-M10A（島津製作所社製）を利用し、波長280 nm、495 nmの吸光度をモニタリングした。それぞれの吸光度におけるエリア面積値を用いて、以下の式により反応性（%）を算出し、表3に記載した。当該反応性は、1分子のo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabに1分子のAlexa488が付加されたときに100%となる。

【0352】

Fab濃度（M）＝{（波長280 nmのエリア面積値）－0.11×（波長495 nmのエリア面積値）} /67980 10

反応性（%）＝[波長495 nmのエリア面積値/（71,000×Fab濃度（M））] ×100

ここで、67980はTrastuzumab-Fabのモル吸光係数、71,000はAlexa488のモル吸光係数である。

【0353】

また表3には、Trastuzumab-Fabについて、o-Az-Z-Lysに置換されたLys残基の側鎖の溶媒露出面積の割合（以下、ASA Ratio(S)と記載する）も合わせて示した。ASA Ratio(S)は、タンパク質中の目的のアミノ酸残基の側鎖の溶媒露出面積を、Gly-X-Gly（Xは目的のアミノ酸残基）のXの側鎖の溶媒露出面積で除することにより求めた。Trastuzumab-Fab中の目的のアミノ酸残基の側鎖の溶媒露出面積は、Protein Data Bank(PDB)[<http://www.rcsb.org/pdb>]に登録されているPDB ID: 1N8Zの立体構造データ、およびカナダ Chemical Computing Group社のMolecular Operating Environment (MOE) 2013.08で稼働する、MOE ASA_Calculatorプログラム(株式会社菱化システム提供 (2011))を使用して算出した。目的アミノ酸残基のASA Ratio(S)の値が大きいほど、当該目的アミノ酸残基がタンパク質表面付近に存在することを示している。

20

【0354】

【表 3】

定常領域	o-Az-Z-Lys 導入部位(EU 番号)	o-Az-Z-Lys に 置換されたア ミノ酸残基	TAG コドン を導入した 塩基配列	ASA Ratio(S)	反応性(%)
Cκ	126	Lys	配列番号 9	0.65	63.8
Cκ	145	Lys	配列番号 10	0.64	90.9
Cκ	149	Lys	配列番号 11	0.35	94.3
Cκ	169	Lys	配列番号 12	0.91	92.6
Cκ	183	Lys	配列番号 13	0.48	98.5
Cκ	188	Lys	配列番号 14	0.64	74.5
Cκ	190	Lys	配列番号 15	0.57	70.3
Cκ	207	Lys	配列番号 16	0.20	104.0
CH ₁	121	Lys	配列番号 17	0.73	87.2
CH ₁	133	Lys	配列番号 18	0.44	102.2
CH ₁	147	Lys	配列番号 19	0.08	32.0
CH ₁	205	Lys	配列番号 20	0.62	96.4
CH ₁	210	Lys	配列番号 21	0.66	91.3
CH ₁	213	Lys	配列番号 22	0.36	9.7
CH ₁	214	Lys	配列番号 23	0.53	66.4
CH ₁	118	Ala	配列番号 24	0.55	92.9
CH ₁	119	Ser	配列番号 25	1.00	69.9
CH ₁	162	Ala	配列番号 26	0.92	55.1
CH ₁	176	Ser	配列番号 27	1.00	34.9

【0355】

表3に示すように、o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-FabのAlexa488との反応性は、o-Az-Z-Lysの導入部位により異なっていた。ASA Ratio(S)が0.9~1のアミノ酸残基をo-Az-Z-Lysに置換したFabと比べて、ASA Ratio(S)が0.9よりも小さいアミノ酸残基をo-Az-Z-Lysに置換した他のFabは、Alexa488との反応性が高い傾向にあった。中でも、ASA Ratio(S)が0.2から0.4のアミノ酸残基をo-Az-Z-Lysに置換したFabについては、Alexa488との反応性が高い傾向にあった。

【実施例 5】

【0356】

ASA Ratio (S)が0.2 から0.4のアミノ酸残基、および疎水性アミノ酸残基をo-Az-Z-Lysに置換したo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fab、および抗IGF-1Rヒト抗体-Fab (Cixtumumab-Fab) の発現ベクターの構築

実施例 4 で得られた結果より、高効率での化学修飾が可能なo-Az-Z-Lys導入抗体-Fabを作製できるo-Az-Z-Lys導入部位を見出すため、以下に記載する実験を行った。

【0357】

Fabの重鎖または軽鎖定常領域に存在するASA Ratio(S)が0.2~0.4のアミノ酸残基、またはASA Ratio(S)に関係なく、疎水性アミノ酸残基を網羅的にo-Az-Z-Lysに置換して各種o-Az-Z-Lys 導入Fabを作製し、Alexa488との反応性を測定した。

【0358】

軽鎖κ鎖定常領域ならびに重鎖定常領域CH1におけるASA Ratio (S)が 0.2 から0.4のアミノ酸残基、および疎水性アミノ酸残基をo-Az-Z-Lysに置換したo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabの大腸菌用発現ベクターを、実施例2と同様の方法で構築した。作製した各o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabおよび、当該Fabの発現ベクターを作製するために全合成したTAGコドンが導入された軽鎖または重鎖の塩基配列（配列番号28-62）を表4および表5に記載した。

【0359】

また、軽鎖λ鎖定常領域におけるASA Ratio (S) 0.2 から0.4のアミノ酸残基、および疎水性アミノ酸残基をo-Az-Z-Lysに置換した抗IGF-1Rヒト抗体 (IgG1、λ) -Fab（以下Cixutumumab-Fabと記載する）の発現ベクターを実施例2と同様の方法で作製した。

10

【0360】

Cixutumumab-Fabおよびo-Az-Z-Lys導入Cixutumumab-Fabの発現ベクターは、CixutumumabのFabの軽鎖領域のアミノ酸配列（配列番号63）とFabの重鎖領域のアミノ酸配列（配列番号64）[WHO Drug Information., 22, 317(2008)]をもとにして設計した。

【0361】

軽鎖については、CixutumumabのFabの軽鎖領域の塩基配列、および当該塩基配列にTAG変異を導入した塩基配列の5'末端にNdeI制限酵素認識配列を、3'末端にHindIII制限酵素認識配列を付加した塩基配列（配列番号65, 67-93）を全合成して取得した。作製したo-Az-Z-Lys導入Cixutumumab-Fab、および当該Fabの発現ベクターを作製するために全合成したTAG変異を導入した軽鎖の塩基配列を表6に記載した。重鎖については、配列番号66の塩基配列を全合成して取得した。

20

【0362】

配列番号65, 67-93に記載される軽鎖の塩基配列について、それぞれ制限酵素NdeIサイトとHindIIIサイトを利用してpFLAG-CTS PylTSへ導入した。得られたベクターについて、配列番号66に記載される重鎖の塩基配列を制限酵素EcoRIサイトとSalIサイトを利用して導入することで、目的のCixutumumab-Fabおよびo-Az-Z-Lys導入Cixutumumab-Fabの発現ベクターを構築した。

【実施例6】

【0363】

o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-FabおよびCixutumumab-Fabの調製

30

実施例5で作製したベクターを用いて、実施例3と同様にo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fab、およびCixutumumab-Fabを調製した。

【0364】

上記で調製したo-Az-Z-Lys導入Cixutumumab-Fabについて実施例3と同様の方法で質量分析を行った結果、実測値と理論分子量が一致した。これにより、1分子のCixutumumab-Fabに1分子のo-Az-Z-Lysが導入され、o-Az-Z-Lys導入Fabが作製できたことが確認できた。

【実施例7】

【0365】

o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-FabおよびCixutumumab-FabとAlexa 488 DIBOとの反応性の解析

40

実施例6で得られたo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabおよびo-Az-Z-Lys導入Cixutumumab-FabとAlexa488 DIBOとの反応性を、実施例4と同様に測定した。Cixutumumab-Fabのモル吸光係数としては、74820を用いた。o-Az-Z-Lys導入FabとAlexa488との反応は、クリックケミストリーを用いた。

【0366】

各o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabの反応性を表4、表5に、各o-Az-Z-Lys導入Cixutumumab-Fabの反応性を表6に示す。また、各Fabについて、o-Az-Z-Lysに置換されたアミノ酸残基の側鎖の溶媒露出面積の割合（ASA Ratio(S)）を実施例4と同様の方法で算出し、表4～6に記載した。ASA Ratio(S)の算出に際し、o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabについては、PDB ID:1N8Zの立体構造データを使用し、o-Az-Z-Lys導入Cixutumumab-Fabについては、

50

PDB ID : 3n9gの立体構造データを使用した。

【0367】

【表4】

定常領域	o-Az-Z-Lys 導入部位 (EU 番号)	o-Az-Z-Lys に 置換されたア ミノ酸残基	TAG コドンを導入 した塩基配列	ASA Ratio (S)	反応性(%)
Cκ	119	Pro	配列番号 28	0.24	106.4
Cκ	138	Asn	配列番号 29	0.37	91.1
Cκ	141	Pro	配列番号 30	0.30	86.0
Cκ	147	Gln	配列番号 31	0.30	86.9
Cκ	155	Gln	配列番号 32	0.21	106.6
Cκ	158	Asn	配列番号 33	0.22	101.5
Cκ	161	Glu	配列番号 34	0.39	103.5
Cκ	167	Asp	配列番号 35	0.35	103.2
Cκ	180	Thr	配列番号 36	0.26	88.8
Cκ	191	Val	配列番号 37	0.38	104.3
Cκ	195	Glu	配列番号 38	0.26	108.1
Cκ	197	Thr	配列番号 39	0.30	99.4
Cκ	210	Asn	配列番号 40	0.40	109.7
Cκ	211	Arg	配列番号 41	0.30	101.2
Cκ	110	Val	配列番号 42	0.60	101.2
Cκ	112	Ala	配列番号 43	0.64	93.2
Cκ	153	Ala	配列番号 44	0.89	97.1
Cκ	154	Leu	配列番号 45	0.61	81.9
Cκ	184	Ala	配列番号 46	1.00	93.5
Cκ	205	Val	配列番号 47	0.43	100.4

【0368】

【表 5】

定常領域	o-Az-Z-Lys 導入部位 (EU 番号)	o-Az-Z-Lys に 置換されたア ミノ酸残基	TAG コトンを導 入した塩基配列	ASA Ratio (S)	反応性(%)
CH ₁	120	Thr	配列番号 48	0.31	80.6
CH ₁	127	Pro	配列番号 49	0.22	90.8
CH ₁	131	Ser	配列番号 50	0.31	96.1
CH ₁	135	Thr	配列番号 51	0.24	96.3
CH ₁	148	Asp	配列番号 52	0.36	79.8
CH ₁	152	Glu	配列番号 53	0.29	81.9
CH ₁	159	Asn	配列番号 54	0.22	90.4
CH ₁	169	Thr	配列番号 55	0.28	82.6
CH ₁	173	Val	配列番号 56	0.26	93.7
CH ₁	177	Ser	配列番号 57	0.39	93.8
CH ₁	180	Tyr	配列番号 58	0.28	102.0
CH ₁	190	Ser	配列番号 59	0.35	83.0
CH ₁	199	Ile	配列番号 60	0.38	101.2
CH ₁	129	Ala	配列番号 61	0.46	101.6
CH ₁	174	Leu	配列番号 62	0.64	98.5

10

20

【 0 3 6 9 】

【表 6】

定常領域	o-Az-Z-Lys 導入部位 (EU 番号)	o-Az-Z-Lys に 置換されたア ミノ酸残基	TAG コドンを導入した塩基配列	ASA Ratio (S)	反応性(%)
Cλ	110	Lys	配列番号 67	0.57	92.3
Cλ	129	Lys	配列番号 68	0.65	87.4
Cλ	149	Lys	配列番号 69	0.22	75.4
Cλ	156	Lys	配列番号 70	0.82	76.7
Cλ	166	Lys	配列番号 71	0.17	94.1
Cλ	172	Lys	配列番号 72	0.45	90.0
Cλ	187	Lys	配列番号 73	0.70	82.6
Cλ	207	Lys	配列番号 74	0.51	84.8
Cλ	119	Pro	配列番号 75	0.24	80.5
Cλ	125	Leu	配列番号 76	0.28	116.0
Cλ	137	Ser	配列番号 77	0.28	32.0
Cλ	160	Glu	配列番号 78	0.24	92.8
Cλ	161	Thr	配列番号 79	0.24	90.5
Cλ	165	Ser	配列番号 80	0.29	92.9
Cλ	173	Tyr	配列番号 81	0.24	90.8
Cλ	180	Ser	配列番号 82	0.38	91.9
Cλ	189	His	配列番号 83	0.35	83.4
Cλ	191	Ser	配列番号 84	0.29	99.8
Cλ	195	Gln	配列番号 85	0.24	88.5
Cλ	197	Thr	配列番号 86	0.40	77.4
Cλ	205	Val	配列番号 87	0.34	93.6
Cλ	210	Ala	配列番号 88	0.33	135.2
Cλ	215	Ser	配列番号 89	0.36	108.6
Cλ	127	Ala	配列番号 90	0.57	84.9
Cλ	143	Ala	配列番号 91	1.00	92.1
Cλ	147	Ala	配列番号 92	0.60	88.0
Cλ	157	Ala	配列番号 93	1.00	65.6

【0370】

表4、表5に示すように、Trastuzumab-FabのCH1、κ鎖定常領域のいずれにおいても、ASA Ratio(S)が0.2~0.4のアミノ酸残基、および疎水性アミノ酸残基をo-Az-Z-Lysに置換したo-Az-Z-Lys導入Fabのほとんどは、Alexa488と80%以上の高い反応性を示した。さらに、上記o-Az-Z-Lys導入Fabの半数以上は、Alexa488と90%以上の非常に高い反応性を示した。表4に示すように、Cixutumumab-Fabのλ鎖定常領域においても、同様の結果が得られた。

【0371】

また、当該反応にはクリックケミストリーが用いられており、o-Az-Z-Lys導入Fabの化学修飾体を簡便に作製することができた。

【0372】

10

20

30

40

50

以上より、FabのCH1、C κ およびC λ について、Alexa488による部位特異的な化学修飾が高効率かつ簡便にできるo-Az-Z-Lys導入部位が多数見出された。

【実施例 8】

【0373】

o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabの抗原結合活性の測定

実施例 3、6 で作製した各o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabと野生型Trastuzumab-Fabとの抗原結合活性を以下に記載する方法で測定した。

【0374】

Protein Eng. Des. Sel., 17, 455 (2004)の記載に準じて調製した遺伝子組換えHer2細胞外ドメインタンパク質をDPBS（ナカライテスク社製）で希釈して 1 μ g/mLとし、96ウェルのELISAプレート（グライナー社製）に50 μ L/wellで添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩固相化した。DPBSにて洗浄後、1 %ウシ血清アルブミン（BSA）（SIGMA社製）を含むDPBS（1 %-BSA-PBS）を150 μ L/wellで添加し、室温で1時間静置して吸着させた。

【0375】

DPBSで洗浄後、実施例 3、6 で得られた各Trastuzumab-Fabの希釈溶液を50 μ L/wellで添加し、室温で1時間反応させた。反応後、0.05 % Tween20（ナカライテスク社製）を含むPBS（PBST）で洗浄し、1 %-BSA-PBSで1000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識マウス抗Hisタグ抗体溶液（QIAGEN社製）を50 μ L/wellで添加して、室温で1時間静置して反応させた。

【0376】

反応後、PBSTにて洗浄し、発色基質TMB（Dako社製）を50 μ L/wellで添加して室温で10分間静置し発色反応させた後、1 N硫酸（ナカライテスク社製）を50 μ L/wellで添加させて発色反応を停止させた。その後、プレートリーダーiMark（バイオラッド社製）で波長450 nmの吸光度から600 nmの吸光度を差し引いた数値を測定値として利用し、各Trastuzumab-Fabの抗原結合活性を算出した。

【0377】

算出された各Trastuzumab-Fabの抗原結合活性の代表例を図1に示す。図1に示すように、Trastuzumab-Fabの軽鎖 κ 鎖の155、158、161、167または180番目のアミノ酸残基をo-Az-Z-Lysに置換したo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabは、いずれも野生型Trastuzumab-Fabと同等の結合活性を保持していた。表3～5に記載された他の全てのo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabについても、同様の結果が得られた。

【0378】

以上より、表3～5に記載するTrastuzumab-FabのCH1または κ 鎖定常領域の特定の部位にo-Az-Z-Lysを導入しても、当該Fabの抗原結合活性には影響を与えないことが示された。

【実施例 9】

【0379】

o-Az-Z-Lys導入Cixutumumab-Fabの抗原結合活性の測定

実施例 6 で作製した各o-Az-Z-Lys導入Cixutumumab-Fabと野生型Cixutumumab-Fabとの抗原結合活性を実施例 8 と同様の方法で測定した。

【0380】

組換えIGF-1R細胞外ドメイン（R&D社製）をDPBS（ナカライテスク社製）で希釈して 2 μ g/mLとし、96ウェルのELISAプレート（グライナー社製）に50 μ L/wellで添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩固相化した。DPBSにて洗浄後、1 %-BSA-PBSを150 μ L/wellで添加し、室温で1時間静置して吸着させた。

【0381】

DPBSで洗浄後、実施例 6 で得られた各Cixutumumab-Fabの希釈溶液を50 μ L/wellで添加し、室温で1時間反応させた。反応後、PBSTで洗浄し、1 %-BSA-PBSで1000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識マウス抗Hisタグ抗体溶液（QIAGEN社製）を50 μ L/wellで添加して、室温で1時間静置して反応させた。

【0382】

反応後、PBSTにて洗浄し、発色基質TMB（Dako社製）を50 μ L/wellで添加して室温で10分間静置し発色反応させた後、1 N硫酸（ナカライテスク社製）を50 μ L/wellで添加させて発色反応を停止させた。その後、プレートリーダーiMark（バイオラッド社製）で波長450 nmの吸光度から600 nmの吸光度を差し引いた数値を測定値として利用し、各Cixutumumab-Fabの抗原結合活性を算出した。

【0383】

算出された各Cixutumumab-Fabの抗原結合活性の代表例を図2に示す。図2に示すように、野生型Cixutumumab-Fabの軽鎖λ鎖の119、125、137、149または160番目のアミノ酸残基をo-Az-Z-Lysに置換したo-Az-Z-Lys導入Cixutumumab-Fabは、いずれも野生型Cixutumumab-Fabと同等の結合活性を保持していた。表6に記載する他の全てのo-Az-Z-Lys導入Cixutumumab-Fabについても、同様の結果が得られた。

10

【0384】

以上より、表6に記載するCixutumumab-Fabのλ鎖定常領域の特定の部位にo-Az-Z-Lysを導入しても、当該Fabの抗原結合活性に影響を与えないことが示された。

【実施例10】

【0385】

各種Fabを用いたo-Az-Z-Lys導入Fabの作製とその反応性の測定

表3～5に記載する各種o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabのうち、6ヶ所のo-Az-Z-Lys導入部位を表7に記載した。Trastuzumab-Fab以外のFabを用いて、表7に記載する部位にo-Az-Z-Lysを導入した各種Fabを作製し、反応性を測定した。

20

【0386】

Fabは、抗Folate Receptor 1ヒト化抗体Farletuzumab（IgG1、 κ ）のFabであるFarletuzumab-Fab、抗TNF- α ヒト抗体Adalimumab（IgG1、 κ ）のFabであるAdalimumab-Fab、抗CD-20キメラ抗体Rituximab（IgG1、 κ ）のFabであるRituximab-Fab、および抗VEGFヒト化抗体（IgG1、 κ ）BevacizumabのFabであるBevacizumab-Fabを使用した。

【0387】

それぞれのFabのアミノ酸配列をコードするDNAの配列情報は、Farletuzumab-FabについてはW02005/080431 A2より（配列番号94-95）、Adalimumab-Fabについては[Marisic J. et al, J. Biol. Chem. 287, 8613-8620 (2012)]より（配列番号96-97）、Rituximab-Fabについては[Du J. et al, J. Biol. Chem. 282, 15073-15080 (2007)]より（配列番号98-99）、Bevacizumab-Fabについては[Chung C. et al, J. Biol. Chem. 291, 5500-5511 (2016)]より（配列番号100-101）、入手した。この情報をもとに、実施例2と同様の方法で各種o-Az-Z-Lys導入Fab発現ベクターを作製した。

30

【0388】

得られた上記の各種Fab発現ベクターを実施例1で作製したW3110 RF-zero株に導入して、実施例3と同様に各種o-Az-Z-Lys導入Fabを調製した。

【0389】

得られた各種o-Az-Z-Lys導入Fabについて、実施例3と同様に質量分析を行った結果、実測値と理論分子量が一致した。これにより、1分子の各種Fabに1分子のo-Az-Z-Lysが導入され、o-Az-Z-Lys導入Fabが作製できたことが確認できた。

40

【0390】

その後、実施例4と同様の方法で各種o-Az-Z-Lys導入FabとAlexa488とのクリックケミストリーにおける反応性を測定した結果を表7に示した。いずれのo-Az-Z-Lys導入Fabも、o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabと同様に、Alexa488と高効率に反応することが確認できた。

【0391】

以上より、C κ のEU番号197、155、もしくは191番目、またはCH1のEU番号177、199もしくは131番目がo-Az-Z-LysであるFabは、可変領域のアミノ酸配列に関わらず、高効率に化学修飾体を作製できることが示された。

【0392】

50

【表 7】

定常領域	o-Az-Z-Lys 導入部位 (EU 番号)	o-Az-Z-Lys に置換され たアミノ酸 残基	各種 o-Az-Z-Lys 導入 Fab の反応性 (%)				
			Trastuzumab -Fab	Farletuzumab -Fab	Adalimumab -Fab	Rituximab -Fab	Bevacizumab -Fab
Cκ	197	Thr	103.3	90.1	89.5	71.9	69.0
Cκ	155	Gln	109.3	94.0	104.1	93.3	97.1
Cκ	191	Val	113.2	100.4	97.1	93.6	102.4
CH1	177	Ser	100.7	84.8	86.7	89.0	72.3
CH1	199	Ile	111.6	105.1	85.4	88.7	106.2
CH1	131	Ser	112.0	93.9	105.2	117.6	99.9

10

【実施例 1 1】

【0 3 9 3】

Fabホモダイマーの作製

o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fab を用いて、リンカーを介してFabを二量体化できるか検討した。実施例2、3と同様の方法で、表7で示した6ヶ所の部位それぞれにo-Az-Z-Lysを導入した6種類のo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabを作製し、以下に記載する方法で同種のFabを二量体化したFabホモダイマーを作製した。

20

【0 3 9 4】

各種o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fab溶液を100 μMに調製後、20当量に相当するリンカー-DBCO-PEG4-DBCO (Click Chemistry Tools社製)と混合し、室温で一晩反応させた。その後、Amicon Ultra-0.5 30K (ミリポア社製)を用いて限外ろ過により未反応のリンカーを除去し、2当量に相当する同種のo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabと混合して室温で一晩反応させた。反応液をSuperdex 200カラム (GE Healthcare社製)を用いてゲルろ過法により精製し、Fab二量体に相当するフラクションを分取し、Amicon Ultra-0.5 30Kを用いて濃縮し、SDS-PAGEにより分子量を確認した。

30

【0 3 9 5】

その結果、Fabの二量体に相当する分子量にバンドが確認され、o-Az-Z-Lys導入Trastuzumabはリンカーを介して二量体 (Fabホモダイマー) を作製できることが確認できた。

【実施例 1 2】

【0 3 9 6】

複数のo-Az-Z-Lysが導入されたFabの作製とその反応性の測定

Trastuzumab-Fabに複数のo-Az-Z-Lysが導入されたFabを作製し、その反応性を測定した。表8に記載するTAGコドンを導入した塩基配列を用いて、複数箇所のコドン进行amberコドンに置換したTrastuzumab-Fab発現ベクターを実施例2と同様の方法で作製した。得られたFab発現ベクターを実施例1で作製した3110 RF-zero株に導入し、実施例3と同様の方法で、各種o-Az-Z-Lys導入Fabを取得した。

40

【0 3 9 7】

得られた各種o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabについて、実施例3と同様に質量分析を行った結果、実測値と理論分子量が一致した。これにより、1分子の各種Fabに目的の分子数のo-Az-Z-Lysが導入されたことが確認できた。

【0 3 9 8】

得られた各種o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabを用いて、実施例4と同様の方法で各種o-Az-Z-Lys導入FabとAlexa488とのクリックケミストリーにおける反応性を評価した。反応性 (%) は、以下の式を用いて算出した。例えば、1分子のTrastuzumab-Fabに2分子のo-Az

50

-Z-Lysが導入されているとき、o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabに2分子のAlexa488が付加されると反応性は100%に、1分子のAlexa488が付加されると反応性は50 %となる。

【0399】

Fab濃度 (M) = { (波長280 nmのエリア面積値) - 0.11 × (波長495 nmのエリア面積値) } / 67980

反応性 (%) = [波長495 nmのエリア面積値 / (71,000 × 上記式で算出されるFab濃度 (M))] / Fab1分子あたりの非天然アミノ酸の分子数 × 100

【0400】

67980はFabのモル吸光係数、71,000はAlexa488のモル吸光係数である。

【0401】

得られた結果を表8に記載した。その結果、Trastuzumab-Fabへ合計4ヶ所までo-Az-Z-Lysを導入した場合でも、o-Az-Z-Lys導入FabはAlexa488と高効率に反応することが確認できた。

【0402】

【表8】

抗体 No.	o-Az-Z-Lys 導入-Fab						反応 性(%)
	Cκ			CH1			
	o-Az-Z-Ly s 導入部位 (EU 番 号)	o-Az-Z-Ly s に置換さ れたアミ ノ酸	TAG コド ンを導入 した塩基 配列	o-Az-Z-Ly s 導入部位 (EU 番 号)	o-Az-Z-Lys に置 換されたアミノ 酸	TAG コド ンを導入 した塩基 配列	
1	155	Gln	配列番号 32	177	Ser	配列番号 57	84.2
2	155	Gln	配列番号 32	177	Ser	配列番号 102	79.2
				131	Ser		
3	155	Gln	配列番号 32	177	Ser	配列番号 103	71.1
				199	Ile		
				131	Ser		
4	191	Val	配列番号 37	177	Ser	配列番号 57	92.8
5	191	Val	配列番号 37	177	Ser	配列番号 102	82.2
				131	Ser		
6	191	Val	配列番号 37	177	Ser	配列番号 103	81.2
				199	Ile		
				131	Ser		

【実施例13】

【0403】

o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabの化学修飾体の作製と細胞傷害活性の測定

実施例3および実施例12にて作製した1ヶ所または2ヶ所にo-Az-Z-Lysが導入されたTrastuzumab-FabをMertansine (DM1-SH) と反応させて、Trastuzumab-Fabの化学修飾体を作製し、その細胞傷害活性を測定した。

【0404】

1ヶ所にo-Az-Z-Lysが導入されたTrastuzumab-Fabとして、表7に記載するそれぞれの部位にo-Az-Z-Lysが導入された6種のFabを使用した。2ヶ所にo-Az-Z-Lysが導入Trastuzumab

10

20

30

40

50

-Fabとして、表8に記載する抗体No.1およびNo.4の2種類のFabを使用した。

【0405】

化学修飾体の作製およびその細胞傷害活性の測定は以下に記載する方法で行った。

【0406】

各種o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fab溶液を20 mM クエン酸（ナカライテスク社製）、150 mM NaCl（ナカライテスク社製）および2 mM EDTA（ナカライテスク社製）を含むpH 4.0のバッファーを用いて20 μMに調製し、8 当量のリンカー-DBCO-PEG4-Maleimide (Click Chemistry Tools社製)と混合し、4 °Cで一晩反応させた。その後、Amicon Ultra-0.5 30K（ミリポア社製）を用いて限外ろ過により未反応のリンカーを除去し、実施例3に記載のクエン酸バッファーを用いて30 μMに調製し、チオール基を有する10当量の薬剤Mertansi 10
ne(DM1-SH, Santa Cruz社製)と混合し、室温で一晩反応させた後、Amicon Ultra-0.5 30K（ミリポア社製）を用いて限外ろ過により未反応の薬剤を除去した。実施例3と同様に質量分析により、1分子のo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabに1分子、または2分子のMertansi neが期待どおり導入されたことを確認した。

【0407】

次に、得られたTrastuzumab-Fab化学修飾体の細胞傷害活性を、Her2発現細胞株SK-BR-3を用いて測定した。SK-BR-3(ATCC)細胞を10 %のウシ血清（Life Technologies社製）を含むRPMI 1640培地（ナカライテスク社製）で5000個/ウェルとなるように希釈し96ウェルプレートに播種し、上記Trastuzumab-Fab化学修飾体を同様の培地で適切な濃度に希釈して 20
ウェルに添加した。37 °C 5 % CO₂で5日間インキュベート後、CellTiter-Glo™(Promega 社製)により細胞数を測定し、培地のみを添加したコントロールウェルを100 %とした生存率を算出した。

【0408】

得られた結果を図3、4に示した。これらの図について、Trastuzumab-FabのCκの197番目のアミノ酸残基がo-Az-Z-Lysである化学修飾体をTrastuzumab-Fab Cκ197Thr DM1と記載し、その他の修飾体についても同様の表記とした。また、野生型Trastuzumab-FabをTrastuzumab-Fab WT、野生型Trastuzumab-FabとDM1との併用をTrastuzumab-Fab WT+DM1、DM1 単独をDM1 onlyと記載した。

【0409】

その結果、いずれのTrastuzumab-Fabの化学修飾体においても、野生型Trastuzumab-Fab 30
、または野生型Trastuzumab-FabおよびMertansineの併用と比較して強い細胞傷害活性を有することが確認できた（図3、4）。

【実施例14】

【0410】

o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab IgG抗体の作製とその反応性の測定

Trastuzumab IgG抗体において、表7に記載する部位にそれぞれo-Az-Z-Lysを導入した6種類のIgG抗体を作製し、Alexa488との反応性を測定した。

【0411】

実施例2およびMukai T. et al, [Biochem. Biophys. Res. Commun, 371, 818-822 (2008)]に記載された方法に従い、pOriPベクターにTrastuzumabの重鎖、軽鎖、9コピーのU6-tRNA^{Py1} (9×U6-tRNA^{Py1})（配列番号106）、およびピロリジルトRNA合成酵素(メタノサルシナ・マゼイ由来、Y306A、Y384F二重変異体)をコードする遺伝子（配列番号107）をそれぞれ導入した4種類のベクターを作製した。Trastuzumabの重鎖および軽鎖の塩基配列は、それぞれ配列番号104および配列番号105の塩基配列をもとにして作製した。

【0412】

これら発現ベクターをExpi293細胞（Life Technologies社製）ヘトランスフェクション試薬ExpiFectamine™293 Transfection Kit（Life Technologies社製）を用いて導入し、培養6日後に培養上清を回収し、Protein Gレジンを用いて抗体を精製した。精製後、SDS-PAGEにより期待通り抗体が発現していることを確認した。

【0413】

得られた各種o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab IgG抗体について、実施例3と同様に質量分析を行った結果、実測値と理論分子量が一致した。これにより、1分子の各種o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab IgG抗体に2分子のo-Az-Z-Lysが導入され、o-Az-Z-Lys導入Trastuzumab IgG抗体が作製できたことが確認できた。

【0414】

さらに実施例4と同様の方法で各種o-Az-Z-Lys導入IgG抗体とAlexa488とのクリックケミストリーにおける反応性を測定した。反応性(%)は以下の式により算出した。

【0415】

抗体濃度(M) = { (波長280 nmのエリア面積値) - 0.11 × (波長495 nmのエリア面積値) } / 204080

反応性(%) = [波長495 nmのエリア面積値 / (71,000 × 上記式で算出される抗体濃度(M)) / 2] × 100

【0416】

ここで、204080はTrastuzumabのモル吸光係数である。当該反応性は、1分子のo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab IgG抗体に、2分子のAlexa488が付加されたときに100%となる。

【0417】

得られた結果を表9に記載した。いずれのo-Az-Z-Lys導入Trastuzumab IgG抗体も、Alexa488との反応性が高かった。以上より、FabのみならずIgG抗体においても、CκのEU番号197、155、もしくは191番目、またはCH1のEU番号177、199もしくは131番目がo-Az-Z-Lysである抗体は、高効率に化学修飾体を作製できることが示された。

【0418】

【表9】

抗体 No.	定常領域	o-Az-Z-Lys 導入部位 (EU 番号)	o-Az-Z-Lys に置換された アミノ酸残基	反応性(%)
7	Cκ	197	Thr	90.1
8	Cκ	155	Gln	88.4
9	Cκ	191	Val	85.8
10	CH1	177	Ser	91.4
11	CH1	199	Ile	97.7
12	CH1	131	Ser	91.2

【実施例15】

【0419】

各種非天然アミノ酸導入Trastuzumab-Fabの作製とその反応性の測定

参考例2~7に従い合成した各種Z-Lys誘導体、Lys誘導体BCN-Lys (SciChem社製) またはTCO^{*}-Lys (SciChem社製) を導入したTrastuzumab-Fabを以下に記載する方法で作製し、その反応性を測定した。作製した各種非天然アミノ酸導入Trastuzumab-Fabを表10に記載した。

【0420】

表10に記載するTAGコドンを導入した塩基配列を使用して実施例2と同様の方法で各種Fab発現ベクターを作製し、実施例3と同様の方法で各種非天然アミノ酸導入Fabを取得した。Trastuzumab-Fab発現ベクターを導入したW3110 RF-Zero株を培養する際に、o-Az-Z-Lysに代えて表10の各非天然アミノ酸を1 mM で培地に添加した。

【0421】

質量分析の結果、いずれの非天然アミノ酸導入Fabも実測値と理論分子量が一致し、1分子のTrastuzumab-Fabに1分子の非天然アミノ酸が導入されたことが確認された。

【0422】

得られた各種非天然アミノ酸導入Trastuzumab-Fabの反応性を以下に記載する方法で測定した。

【0423】

m-Az-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabの反応性は、実施例4と同様の方法で測定した。当該反応には、クリックケミストリーを用いた。

【0424】

o-Ethynyl-Z-Lysおよびm-Ethynyl-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabの反応性は、以下の方法で測定した。当該反応には、クリックケミストリーを用いた。

【0425】

o-Ethynyl-Z-Lys導入Trastuzumab-Fab溶液またはm-Ethynyl-Z-Lys導入Trastuzumab-Fab溶液を、DPBS（ナカライテスク社製）を用いて40 μMの濃度に調製した。各抗体溶液に対して、40 当量に相当するClick-IT Azide Alexa Fluor 488（Life Technologies社製）、終濃度1 mMのCuSO₄（和光純薬社製）、終濃度50 mMのSodium Ascorbate（東京化成工業社製）、終濃度250 μMのTHPTA[Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine]（Sigma-Aldrich社製）および終濃度1 mMのAminoguanidine bicarbonate（和光純薬社製）を添加して、室温で一晩反応させた。その後、Amicon Ultra-0.5 30K（ミリポア社製）を用いて限外ろ過により未反応のClick-IT Azide Alexa Fluor 488を除去した後、実施例4と同様に陽イオン交換クロマトグラフィーにて分析し、Alexa488との反応性を測定した。

【0426】

m-Amino-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabの反応性は以下の方法で測定した。当該反応には、還元的アミノ化反応を用いた。

【0427】

m-Amino-Z-Lys導入Trastuzumab-Fab溶液を50 mM クエン酸三ナトリウム（和光純薬社製）と50 mM クエン酸（ナカライテスク社製）を含むpH 4.0のバッファーを用いて20 μMに調製した。当該溶液に2当量のFluorescein PEG aldehyde（Nanocs社製）および終濃度1.5 mMの2-Methylpyridine borane complex（Sigma-Aldrich社製）を添加して4 °Cで一晩反応させた。その後、Amicon Ultra-0.5 30K（ミリポア社製）を用いて限外ろ過により未反応のFluorescein PEG aldehydeを除去した後、分光光度計UV-1800（島津製作所製）にて分析し、以下の式により反応性（%）を算出した。

【0428】

当該反応性は、1分子のm-Amino-Z-Lys導入Trastuzumab-Fabに1分子のFluoresceinが付加されたときに100 %となる。

【0429】

Fab濃度 (M) = { (波長280 nmのエリア面積値) - 0.30 × (波長495 nmのエリア面積値) } / 67980

反応性 (%) = [波長495 nmのエリア面積値 / (70,000 × 上記式で算出されるFab濃度 (M))] × 100

ここで70,000はFluoresceinのモル吸光係数である。また、67980はTrastuzumab-Fabのモル吸光係数である。

【0430】

このとき、m-Amino-Z-Lys導入を行っていない野生型Trastuzumab-Fabにおいても、野生型アミノ酸との反応と考えられるFluorescein付加が確認された。そのため、m-Amino-Z-Lys導入Fabの反応性と野生型Trastuzumab-Fabの反応性との差を、m-Amino-Z-Lys導入Fab中のm-Amino-Z-Lysの反応性として算出し、表10に記載した。

【0431】

BCN-Lys導入Trastuzumab-FabおよびTCO^{*}-Lys導入Trastuzumab-Fabの反応性は、以下の方法で測定した。当該反応は、逆電子要請型ディールズ・アルター反応を用いた。

【0432】

BCN-Lys導入Trastuzumab-Fab溶液、またはTCO^{*}-Lys導入Trastuzumab-Fab溶液を、DPBS

10

20

30

40

50

(ナカライテスク社製)を用いて40 μ Mの濃度に調製した。各抗体溶液に対して、40 当量に相当するCy3 Tetrazine (Click Chemistry Tools社製)を添加して、室温で一晩反応させた。その後、Amicon Ultra-0.5 30K (ミリポア社製)を用いて限外ろ過により未反応のCy3 Tetrazine を除去した後、実施例4と同様に陽イオン交換クロマトグラフィーにて分析し、Cy3との反応性を測定した。

【0433】

この際、波長280 nm、550 nmの吸光度をモニタリングし、それぞれの吸光度におけるエリア面積値を用いて、以下の式により反応性(%)を算出した。当該反応性は、1分子のBCN-Lys導入Trastuzumab-FabまたはTCO^{*}-Lys導入Trastuzumab-Fabに1分子のCy3が付加されたときに100 %となる。

10

【0434】

Fab濃度(M) = { (波長280 nmのエリア面積値) - 0.08 × (波長550nmのエリア面積値) } / 67980

反応性(%) = [波長550 nmのエリア面積値 / (150,000 × Fab濃度(M))] × 100

ここで150,000はCy3のモル吸光係数である。また、67980はTrastuzumab-Fabのモル吸光係数である。

【0435】

得られた結果を表10に示した。m-Az-Z-Lys導入Fab(抗体No.14)では、o-Az-Z-Lys導入Fab(抗体No.13)と同様に、Alexa488との高い反応性が確認できた。またo-Ethynyl-Z-Lys導入Fab(抗体No.15,16)またはm-Ethynyl-Z-Lys導入Fab(抗体No.17,18)とAlexa488との反応性、m-Amino-Z-Lys導入Fab(抗体No.19,20)とPEGとの反応性、BCN-Lys導入Fab(抗体No.21~23)、またはTCO^{*}-Lys導入Fab(抗体No.24~26)とCy3との反応性も確認できた。

20

【0436】

以上より、m-Az-Z-Lys導入Fabは、o-Az-Z-Lys導入Fabと同様に高効率かつ簡便に化学修飾体を作製できること、ならびにo-Ethynyl-Z-Lys導入Fab、m-Ethynyl-Z-Lys導入Fab、m-Amino-Z-Lys導入Fab、BCN-Lys導入FabおよびTCO^{*}-Lys導入Fabも化学修飾体を作製できることが示された。

【0437】

【表 10】

抗体 No.	定常 領域	非天然 アミノ 酸 導入部 位 (EU 番 号)	非天然アミ ノ酸に 置換された アミノ酸残 基	TAG コドン を 導入した 塩基配列	導入した 非天然アミノ酸	反応性 (%)
13	Cκ	155	Gln	配列番号 32	o-Az-Z-Lys	101.4
14	Cκ	155	Gln	配列番号 32	m-Az-Z-Lys	93.7
15	Cκ	155	Gln	配列番号 32	o-Ethynyl-Z-Lys	54.2
16	CH1	131	Ser	配列番号 50	o-Ethynyl-Z-Lys	40.2
17	Cκ	155	Gln	配列番号 32	m-Ethynyl-Z-Lys	62.8
18	CH1	131	Ser	配列番号 50	m-Ethynyl-Z-Lys	51.8
19	Cκ	155	Gln	配列番号 32	m-Amino-Z-Lys	28.2
20	CH1	131	Ser	配列番号 50	m-Amino-Z-Lys	33.9
21	Cκ	169	Lys	配列番号 12	BCN-Lys	36.9
22	CH1	121	Lys	配列番号 17	BCN-Lys	24.9
23	CH1	131	Ser	配列番号 50	BCN-Lys	35.2
24	Cκ	169	Lys	配列番号 12	TCO*-Lys	61.3
25	CH1	121	Lys	配列番号 17	TCO*-Lys	52.0
26	CH1	131	Ser	配列番号 50	TCO*-Lys	49.2

【実施例 16】

【0438】

ホルミル-Z-リジン導入Trastuzumab-Fabの作製

参考例8に従い合成したm-formyl-Z-Lysを導入したTrastuzumab-Fabを、実施例15と同様の方法で作製した。作製したm-formyl-Z-Lys導入Fabや、抗体作成に使用した塩基配列を表11に記載した。

【0439】

【表 11】

定常 領域	<i>m</i> -formyl-Z-Lys 導入部位 (EU 番号)	<i>m</i> -formyl-Z-Lys に 置換された アミノ酸残基	TAG コドン を 導入した 塩基配列
Cκ	155	Gln	配列番号 32
CH1	131	Ser	配列番号 50

得られたm-formyl-Z-Lys導入Fabを質量分析した結果、実測値と理論分子量が一致し、1分子のTrastuzumab-Fabに1分子のm-formyl-Z-Lysが導入されたことが確認できた。

【0440】

なお、本発明に使用されるリジン誘導体である、オルト-アジド-Z-リジン、メタ-アジ

ド-Z-リジン、パラ-アジド-Z-リジン、オルト-エチニル-Z-リジン、メタ-エチニル-Z-リジン、パラ-エチニル-Z-リジン、メタ-アミノ-Z-リジン及びメタ-ホルミル-Z-リジンの各塩酸塩は以下に記載する参考例により取得した。ただし、本発明に使用されるリジン誘導体はこれらに限定されるものではない。なお、参考例で用いられるプロトン核磁気共鳴スペクトル(^1H NMR)は、300 MHzまたは400 MHzで測定されたものであり、化合物及び測定条件によって交換性プロトンが明瞭には観測されないことがある。なお、シグナルの多重度の表記としては通常用いられるものを用いるが、brとは見かけ上幅広いシグナルであることを表す。また、各化合物の命名には、ChemBioDraw Ultra14.0.0.117を用いた。

【0441】

[参考例1]

10

N6-{[(2-アジドベンジル)オキシ]カルボニル}-L-リジン塩酸塩(オルト-アジド-Z-リジン塩酸塩)

(2-アミノフェニル)メタノールを原料に用いて、文献記載(Bioconjugate Chem. 2016, 27, 198)のmAzZLys合成方法と同様の手法により、オルト-アジド-Z-リジン塩酸塩を取得した。

ESIMS m/z: 322(M - HCl) $^+$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , D_2O , δ): 1.23-1.45 (m, 4H), 1.68-1.82 (m, 2H), 2.97-3.01 (m, 2H), 3.57-3.60 (m, 1H), 4.95 (s, 2H), 7.18-7.24 (m, 1H), 7.31-7.47 (m, 3H).

【0442】

[参考例2]

20

N6-{[(3-アジドベンジル)オキシ]カルボニル}-L-リジン塩酸塩(メタ-アジド-Z-リジン塩酸塩)

文献記載(Bioconjugate Chem. 2016, 27, 198)のmAzZLys合成方法に従い、メタ-アジド-Z-リジン塩酸塩を取得した。

【0443】

[参考例3]

N6-{[(4-アジドベンジル)オキシ]カルボニル}-L-リジン塩酸塩(パラ-アジド-Z-リジン塩酸塩)

(4-アミノフェニル)メタノールを原料に用いて、文献記載(Bioconjugate Chem. 2016, 27, 198)のmAzZLys合成方法と同様の手法により、パラ-アジド-Z-リジン塩酸塩を取得した。

30

ESIMS m/z: 322(M - HCl) $^+$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , D_2O , δ): 1.22-1.44 (m, 4H), 1.58-1.78 (m, 2H), 2.94-3.02 (m, 2H), 3.24-3.28 (m, 1H), 4.97 (s, 2H), 7.12 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.39 (d, J=8.4 Hz, 2H).

【0444】

[参考例4]

N6-{[(2-エチニルベンジル)オキシ]カルボニル}-L-リジン塩酸塩(オルト-エチニル-Z-リジン塩酸塩)

(工程1)

市販の(2-ヨードフェニル)メタノール(75.0 g, 0.321 mol)をトリエチルアミン(1 L)に溶解し、エチニルトリメチルシラン(34.7 g, 0.353 mol)及びビストリフェニルホスフィン-塩化パラジウム(II)(4.51 g, 6.40 mmol)を加え、窒素雰囲気下室温で10分攪拌した。反応混合物にヨウ化銅(I)(0.61 g, 3.20 mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。反応混合物をセライトろ過し、ろ液を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/石油エーテル=5/95~10/90)で精製し、{2-[(トリメチルシリル)エチニル]フェニル}メタノール(60 g, 92%)を得た。

40

ESIMS m/z: 205(M + H) $^+$.

【0445】

(工程2)

工程1で得られた{2-[(トリメチルシリル)エチニル]フェニル}メタノール(36.0 g, 0.17

50

6 mol)をテトラヒドロフラン(THF)(350 mL)に溶解し、氷冷下、ホスゲン(20%トルエン溶液, 174 mL, 0.352 mol)を加え、室温で16時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、2-[(トリメチルシリル)エチニル]ベンジル カルボノクロリデートの粗生成物(47.0 g)を得た。得られた粗生成物はそのまま次工程へ用いた。

【0446】

(工程3)

工程2で得られた2-[(トリメチルシリル)エチニル]ベンジル カルボノクロリデートの粗生成物(47.0 g, 0.158 mol)をTHF(500 mL)に溶解し、2-[(トリメチルシリル)エチニル]ベンジル カルボノクロリデートの溶液を得た。市販の(*tert*-ブトキシカルボニル)-*L*-リジン(39.0 g, 0.158 mol)を1 mol/L NaOH水溶液(470 mL)及びTHF(250 mL)に溶解し、(*tert*-ブトキシカルボニル)-*L*-リジンの溶液を得た。上記2-[(トリメチルシリル)エチニル]ベンジル カルボノクロリデートの溶液を、氷冷下10分かけて、上記(*tert*-ブトキシカルボニル)-*L*-リジンの溶液に滴下し、室温で2時間攪拌した。反応混合物を冷却し、ジエチルエーテルを加え、水で抽出した。得られた水層に、pHが1~2になるように1 mol/L塩酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をTHF(85 L)に溶解し、氷冷下、1 mol/L テトラブチルアンモニウムフルオリド溶液(28 mL)を加え、室温で2時間攪拌した。反応混合物に1 mol/L 塩酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン/メタノール=98/2~97/3)で精製し、N2-(*tert*-ブトキシカルボニル)-N6-{[(2-エチニルベンジル)オキシ]カルボニル}-*L*-リジン(16.0 g, 2段階トータル収率22%)を得た。

ESIMS m/z : 405($M + H$)⁺.

【0447】

(工程4)

工程3で得られたN2-(*tert*-ブトキシカルボニル)-N6-{[(2-エチニルベンジル)オキシ]カルボニル}-*L*-リジン(16.0 g, 0.039 mol)を1,4-ジオキサン(30 mL)に溶解し、塩酸-ジオキサン溶液(30 mL)をゆっくり滴下し、室温で16時間攪拌した。反応混合物の溶媒を減圧留去し、得られた残渣をジエチルエーテルでリスラリー精製し、オルト-エチニル-*Z*-リジン塩酸塩(11.8 g, 99%)を得た。

ESIMS m/z : 305($M - HCl$)⁺; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, D₂O, δ): 1.28-1.50 (m, 4H), 1.71-1.86 (m, 2H), 2.97-3.01 (m, 2H), 3.85-3.90 (m, 1H), 4.37 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 7.34-7.47 (m, 3H), 7.52-7.54 (m, 1H).

【0448】

[参考例5]

N6-{[(3-エチニルベンジル)オキシ]カルボニル}-*L*-リジン塩酸塩(メタ-エチニル-*Z*-リジン塩酸塩)

(工程1)

市販の(3-ヨードフェニル)メタノール(75.0 g, 0.321 mol)を用いて、参考例4の工程1と同様にして、{3-[(トリメチルシリル)エチニル]フェニル}メタノール(60.0 g, 91%)を得た。

ESIMS m/z : 205($M + H$)⁺.

【0449】

(工程2)

工程1で得られた{3-[(トリメチルシリル)エチニル]フェニル}メタノール(60 g, 0.293 mol)をメタノール(1 L)に溶解し、炭酸カリウム(20.3 g, 0.146 mol)を加え、室温で3時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/石油エーテル=30/70~40/60)で精製し、(3-エチニルフェニル)メタノール(33 g, 83%)を得た。

ESIMS m/z : 133($M + H$)⁺.

【0450】

(工程3)

工程2で得られた(3-エチニルフェニル)メタノール(33.0 g, 0.249 mol)を用いて、参考例4の工程2と同様にして、3-エチニルベンジル カルボノクロリデートの粗生成物(40.0 g)を得た。得られた粗生成物はそのまま次工程へ用いた。

【0451】

(工程4)

工程3で得られた3-エチニルベンジル カルボノクロリデートの粗生成物(40 g, 0.205 mol)をTHF(50 mL)に溶解し、3-エチニルベンジル カルボノクロリデートの溶液を得た。市販の(tert-ブトキシカルボニル)-L-リジン(50.4 g, 0.205 mol)を1 mol/L NaOH水溶液(500 mL)及びTHF(200 mL)に溶解し、(tert-ブトキシカルボニル)-L-リジンの溶液を得た。上記3-エチニルベンジル カルボノクロリデートの溶液を、氷冷下10分かけて、上記(tert-ブトキシカルボニル)-L-リジンの溶液に滴下し、室温で2時間攪拌した。反応混合物を冷却し、ジエチルエーテルを加え、水で抽出した。得られた水層に、pHが1~2になるように1 mol/L塩酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン/メタノール=98/2~97/3)で精製し、N2-(tert-ブトキシカルボニル)-N6-{[(3-エチニルベンジル)オキシ]カルボニル}-L-リジン(20 g, 2段階トータル収率25%)を得た。

ESIMS m/z: 405(M + H)⁺.

【0452】

(工程5)

工程4で得られたN2-(tert-ブトキシカルボニル)-N6-{[(3-エチニルベンジル)オキシ]カルボニル}-L-リジン(17.0 g, 0.042 mol)を用いて、参考例4の工程4と同様にして、メタ-エチニル-Z-リジン塩酸塩(11.1 g, 87%)を得た。

ESIMS m/z: 305(M - HCl)⁺; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, D₂O, δ): 1.28-1.50 (m, 4H), 1.70-1.85 (m, 2H), 2.97-3.01 (m, 2H), 3.83-3.90 (m, 1H), 4.21 (s, 1H), 5.01 (s, 2H), 7.28-7.47 (m, 4H).

【0453】

[参考例6]

N6-{[(4-エチニルベンジル)オキシ]カルボニル}-L-リジン塩酸塩(パラ-エチニル-Z-リジン塩酸塩)

(工程1)

市販の4-エチニルベンズアルデヒド(5.00 g, 38.5 mmol)をエタノール(100 mL)に溶解し、氷冷下、水素化ホウ素ナトリウム(4.40 g, 116 mmol)を加え、0℃で2分間攪拌した。反応混合物に塩化アンモニウム水溶液を加え、ジクロロメタンで抽出した。有機層を水及び飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/石油エーテル=20/80)で精製し、(4-エチニルフェニル)メタノール(5.00 g, 100%)を得た。

ESIMS m/z: 133(M + H)⁺.

【0454】

(工程2)

工程1で得られた(4-エチニルフェニル)メタノール(7.80 g, 58.7 mmol)をジクロロメタン(100 mL)に溶解し、室温でピリジン(10 mL)及び市販の4-ニトロフェニルクロロホルメート(11.8 g, 58.7 mmol)を加え、終夜攪拌した。反応混合物に水を加え、ジクロロメタンで抽出した。有機層を水及び飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去することで、4-エチニルベンジル (4-ニトロフェニル)カルボナートの粗生成物(17.5 g)を得た。得られた粗生成物はそのまま次工程へ用いた。

【0455】

(工程3)

工程2で得られた4-エチニルベンジル (4-ニトロフェニル)カルボナート(7.50 g, 25.0 mmol)をTHF(100 mL)に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン(6.40 g, 50.0 mmol)及び市

販の(tert-ブトキシカルボニル)-L-リジン(6.20 g, 25.0 mmol)を加え、室温で終夜撹拌した。反応混合物にpHが3になるように4 mol/L 塩酸水溶液を加え、ジクロロメタンで抽出した。有機層を水及び飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン/メタノール=98/2~97/3)で精製し、N2-(tert-ブトキシカルボニル)-N6-{[(4-エチニルベンジル)オキシ]カルボニル}-L-リジン(4.00 g, 2段階トータル収率40%)を得た。ESIMS m/z: 405(M + H)⁺.

【0456】

(工程4)

工程3で得られたN2-(tert-ブトキシカルボニル)-N6-{[(4-エチニルベンジル)オキシ]カルボニル}-L-リジン(3.40 g, 8.30 mmol)を塩酸-酢酸エチル溶液(25 mL)に溶解し、室温で2時間撹拌した。反応混合物を減圧濃縮し、得られた残渣を逆層分取クロマトグラフィーで精製し、パラ-エチニル-Z-リジン塩酸塩(1.30 g, 50%)を得た。

ESIMS m/z: 305(M - HCl)⁺; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, δ): 1.26-1.50 (m, 4H), 1.70-1.84 (m, 2H), 2.94-3.04 (m, 2H), 3.80-3.90 (m, 1H), 4.20 (s, 1H), 5.02 (s, 2H), 7.28-7.38 (m, 3H), 7.47 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 8.20-8.36 (br, 3H).

【0457】

[参考例7]

N6-{[(3-アミノベンジル)オキシ]カルボニル}-L-リジン塩酸塩(メタ-アミノ-Z-リジン塩酸塩)

(工程1)

市販の(3-アミノフェニル)メタノール(3.24 g, 26.3 mmol)を用いて、文献記載 (Chem. Mater. 2011, 23, 4844.)の合成方法と同様の手法により、tert-ブチル [3-(ヒドロキシメチル)フェニル]カルバメート(7 g, quant.)を得た。

ESIMS m/z: 224(M + H)⁺.

【0458】

(工程2)

工程1で得られたtert-ブチル [3-(ヒドロキシメチル)フェニル]カルバメート(1.49 g, 6.70 mmol)を用いて、参考例6の工程2と同様にして、tert-ブチル [3-({[(4-ニトロフェノキシ)カルボニル]オキシ}メチル)フェニル]カルバメートの粗生成物(2.35 g)を得た。得られた粗生成物はそのまま次工程へ用いた。

【0459】

(工程3)

工程2で得られたtert-ブチル [3-({[(4-ニトロフェノキシ)カルボニル]オキシ}メチル)フェニル]カルバメートの粗生成物(2.35 g)を用いて、参考例6の工程3と同様にして、N2-(tert-ブトキシカルボニル)-N6-[(3-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]ベンジル)オキシ]カルボニル]-L-リジン(2.90 g, 2段階トータル収率87%)を得た。

ESIMS m/z: 496(M + H)⁺.

【0460】

(工程4)

工程3で得られたN2-(tert-ブトキシカルボニル)-N6-[(3-[(tert-ブトキシカルボニル)アミノ]ベンジル)オキシ]カルボニル]-L-リジン(2.80 g, 5.65 mmol)を用いて、参考例4の工程4と同様にして、メタ-アミノ-Z-リジン塩酸塩(1.15 g, 70%)を得た。

ESIMS m/z: 296(M - HCl)⁺; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 1.24-1.42 (m, 4H), 1.62-1.80 (m, 2H), 2.50 (br s, 2H), 2.93-3.01 (m, 2H), 3.59 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.84 (s, 2H), 6.42-6.53 (m, 3H), 6.97 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.17 (t, J = 5.6 Hz, 1H).

【0461】

[参考例8]

N6-{[(3-ホルミルベンジル)オキシ]カルボニル}-L-リジン塩酸塩(メタ-ホルミル-Z-リジン塩酸塩)

(工程1)

市販の(3-ヨードフェニル)メタノール(1.00 g, 4.25 mmol)をTHF(15 mL)に溶解し、メシチレン(0.3 mL, 2.12 mmol)、トリエチルアミン(0.6 mL, 4.25 mmol)及びトリエチルシラン(1.3 mL, 8.40 mmol)を加え、室温で5分間攪拌した。反応混合物に[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]ジクロロパラジウム(II)(0.700 g, 1.06 mmol)を加え、一酸化炭素封入下(70 psi)、100℃で16時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/石油エーテル=5/95)で精製し、3-(ヒドロキシメチル)ベンズアルデヒド(512 mg, 88%)を得た。

ESIMS m/z: 137(M + H)⁺.

【0462】

10

(工程2)

工程1で得られた3-(ヒドロキシメチル)ベンズアルデヒド(510 mg, 3.75 mmol)を用いて、参考例4の工程2と同様にして、3-ホルミルベンジル カルボノクロリデートの粗生成物(410 mg)を得た。得られた粗生成物はそのまま次工程へ用いた。

【0463】

(工程3)

工程2で得られた3-ホルミルベンジル カルボノクロリデートの粗生成物(410 mg)を用いて、参考例5工程4と同様にして、N2-(tert-ブトキシカルボニル)-N6-{[(3-ホルミルベンジル)オキシ]カルボニル}-L-リジン(540 mg, 2段階トータル収率66%)を得た。

ESIMS m/z: 409 (M + H)⁺.

20

【0464】

(工程4)

工程3で得られたN2-(tert-ブトキシカルボニル)-N6-{[(3-ホルミルベンジル)オキシ]カルボニル}-L-リジン(540 mg, 1.32 mmol)を用いて、参考例4の工程4と同様にして、メタ-ホルミル-Z-リジン塩酸塩(130 mg, 29%)を得た。

ESIMS m/z: 309(M - HCl)⁺; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ): 1.30-1.50 (m, 4H), 1.70-1.85 (m, 2H), 2.90-3.10 (m, 2H), 3.85 (br s, 1H), 5.10 (s, 2H), 7.33 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 7.55-7.75 (m, 2H), 7.80-7.94 (m, 2H), 8.28 (br s, 2H), 10.02 (s, 1H), 13.8 (br s, 1H).

【0465】

30

また、TCO^{*}-LysおよびBCN-Lysは市販のもの(SciChem社製)を用いることができる。

【産業上の利用可能性】

【0466】

本発明により、ヒトIgG抗体の定常領域において、少なくとも1つのリジン誘導体を含むモノクローナル抗体または該抗体断片、該リジン誘導体が化学修飾された修飾化抗体または該修飾化抗体断片、該抗体または該抗体断片をコードする塩基配列を含む核酸、該核酸を含有するベクター、該ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞、該抗体または該抗体断片の製造方法、該抗体または該抗体断片を含む組成物を提供することができる。

【0467】

40

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

【配列表フリーテキスト】

【0468】

配列番号2-人工配列の説明: Trastuzumab-Fab軽鎖領域のアミノ酸配列

配列番号3-人工配列の説明: Trastuzumab-Fab重鎖領域のアミノ酸配列

配列番号4-人工配列の説明: Tacプロモーターとシャイン・ダルガノ配列からなる塩基配列

配列番号5-人工配列の説明: PelB分泌シグナルをコードする塩基配列

配列番号6-人工配列の説明: Trastuzumab-Fab軽鎖領域をコードする塩基配列

50

配列番号7-人工配列の説明：Trastuzumab-Fab重鎖領域をコードする塩基配列

配列番号8-人工配列の説明：Methanosarcina mazei由来のPyl RS の変異体（Y306A/Y384F）のアミノ酸配列

配列番号9-人工配列の説明：軽鎖κ鎖 126Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号10-人工配列の説明：軽鎖κ鎖 145Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号11-人工配列の説明：軽鎖κ鎖 149Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号12-人工配列の説明：軽鎖κ鎖 169Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab軽鎖定常領域の塩基配列 10

配列番号13-人工配列の説明：軽鎖κ鎖 183Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号14-人工配列の説明：軽鎖κ鎖 188Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号15-人工配列の説明：軽鎖κ鎖 190Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号16-人工配列の説明：軽鎖κ鎖 207Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号17-人工配列の説明：重鎖CH1 121Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab重鎖定常領域の塩基配列 20

配列番号18-人工配列の説明：重鎖CH1 133Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号19-人工配列の説明：重鎖CH1 147Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号20-人工配列の説明：重鎖CH1 205Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号21-人工配列の説明：重鎖CH1 210Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号22-人工配列の説明：重鎖CH1 213Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab重鎖定常領域の塩基配列 30

配列番号23-人工配列の説明：重鎖CH1 214Lys部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号24-人工配列の説明：重鎖CH1 118Ala部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab重鎖可変領域および定常領域の塩基配列

配列番号25-人工配列の説明：重鎖CH1 119Ser部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab重鎖可変領域および定常領域の塩基配列

配列番号26-人工配列の説明：重鎖CH1 162Ala部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号27-人工配列の説明：重鎖CH1 176Ser部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab重鎖定常領域の塩基配列 40

配列番号28-人工配列の説明：軽鎖κ鎖119Pro部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号29-人工配列の説明：軽鎖κ鎖138Asn部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号30-人工配列の説明：軽鎖κ鎖141Pro部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号31-人工配列の説明：軽鎖κ鎖147Gln部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号32-人工配列の説明：軽鎖κ鎖155Gln部位へamberコドン挿入したTrastuzumab- 50

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号33- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖158Asn部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号34- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖161Glu部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号35- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖167Asp部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号36- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖180Thr部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号37- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖191Val部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号38- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖195Glu部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号39- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖197Thr部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号40- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖210Asn部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号41- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖211Arg部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号42- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖110Val部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号43- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖112Ala部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号44- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖153Ala部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号45- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖154Leu部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号46- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖184Ala部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号47- 人工配列の説明：軽鎖κ鎖205Val部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab軽鎖定常領域の塩基配列

配列番号48- 人工配列の説明：重鎖CH1 120Thr部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号49- 人工配列の説明：重鎖CH1 127Pro部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号50- 人工配列の説明：重鎖CH1 131Ser部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号51- 人工配列の説明：重鎖CH1 135Thr部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号52- 人工配列の説明：重鎖CH1 148Asp部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号53- 人工配列の説明：重鎖CH1 152Glu部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号54- 人工配列の説明：重鎖CH1 159Asn部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号55- 人工配列の説明：重鎖CH1 169Thr部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号56- 人工配列の説明：重鎖CH1 173Val部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号57- 人工配列の説明：重鎖CH1 177Ser部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

10

20

30

40

50

Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号58-人工配列の説明：重鎖CH1 180Tyr部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号59-人工配列の説明：重鎖CH1 190Ser部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号60-人工配列の説明：重鎖CH1 199Ile部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号61-人工配列の説明：重鎖CH1 129Ala部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab重鎖定常領域の塩基配列

配列番号62-人工配列の説明：重鎖CH1 174Leu部位へamberコドン挿入したTrastuzumab-

Fab重鎖領域の塩基配列

配列番号63-人工配列の説明：Cixutumumab-Fab軽鎖領域のアミノ酸配列

配列番号64-人工配列の説明：Cixutumumab-Fab重鎖領域のアミノ酸配列

配列番号65-人工配列の説明：Cixutumumab-Fab軽鎖領域をコードする塩基配列

配列番号66-人工配列の説明：Cixutumumab-Fab重鎖領域をコードする塩基配列

配列番号67-人工配列の説明：軽鎖λ鎖110Lys部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号68-人工配列の説明：軽鎖λ鎖129Lys部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号69-人工配列の説明：軽鎖λ鎖149Lys部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号70-人工配列の説明：軽鎖λ鎖156Lys部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号71-人工配列の説明：軽鎖λ鎖166Lys部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号72-人工配列の説明：軽鎖λ鎖172Lys部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号73-人工配列の説明：軽鎖λ鎖187Lys部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号74-人工配列の説明：軽鎖λ鎖207Lys部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号75-人工配列の説明：軽鎖λ鎖119Pro部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号76-人工配列の説明：軽鎖λ鎖125Leu部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号77-人工配列の説明：軽鎖λ鎖137Ser部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号78-人工配列の説明：軽鎖λ鎖160Glu部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号79-人工配列の説明：軽鎖λ鎖161Thr部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号80-人工配列の説明：軽鎖λ鎖165Ser部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号81-人工配列の説明：軽鎖λ鎖173Tyr部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号82-人工配列の説明：軽鎖λ鎖180Ser部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号83-人工配列の説明：軽鎖λ鎖189His部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号84-人工配列の説明：軽鎖λ鎖191Ser部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

10

20

30

40

50

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号85- 人工配列の説明：軽鎖λ鎖195Gln部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号86- 人工配列の説明：軽鎖λ鎖197Thr部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号87- 人工配列の説明：軽鎖λ鎖205Val部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号88- 人工配列の説明：軽鎖λ鎖210Ala部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号89- 人工配列の説明：軽鎖λ鎖215Ser部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号90- 人工配列の説明：軽鎖λ鎖127Ala部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号91- 人工配列の説明：軽鎖λ鎖143Ala部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号92- 人工配列の説明：軽鎖λ鎖147Ala部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号93- 人工配列の説明：軽鎖λ鎖157Ala部位へamberコドン挿入したCixutumumab-

Fab軽鎖領域の塩基配列

配列番号94- 人工配列の説明：Farletuzumab-FabのVLの塩基配列

配列番号95- 人工配列の説明：Farletuzumab-FabのVHの塩基配列

配列番号96- 人工配列の説明：Adalimumab-FabのVLの塩基配列

配列番号97- 人工配列の説明：Adalimumab-FabのVHの塩基配列

配列番号98- 人工配列の説明：Rituximab-FabのVLの塩基配列

配列番号99- 人工配列の説明：Rituximab-FabのVHの塩基配列

配列番号100- 人工配列の説明：Bevacizumab-FabのVLの塩基配列

配列番号101- 人工配列の説明：Bevacizumab-FabのVHの塩基配列

配列番号102- 人工配列の説明：抗体No.2またはNo.5の重鎖の塩基配列

配列番号103- 人工配列の説明：抗体No.3またはNo.6の重鎖の塩基配列

配列番号104- 人工配列の説明：Trastuzuzumabの軽鎖の塩基配列

配列番号105- 人工配列の説明：Trastuzuzumabの重鎖の塩基配列

配列番号106- 人工配列の説明：9コピーのU6-tRNA^{Py1}の塩基配列

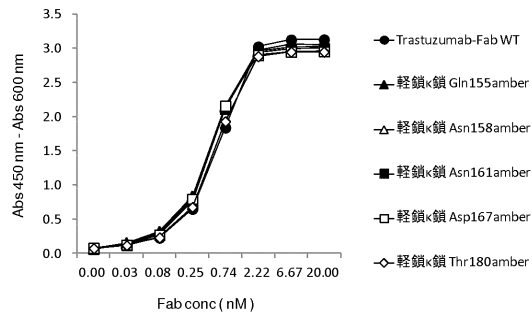
配列番号107- 人工配列の説明：Py1 RS (Y306A/Y384F)の変異体の塩基配列

10

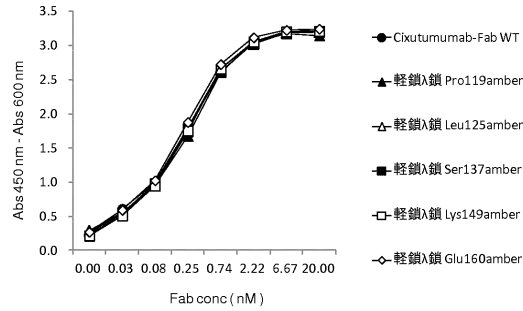
20

30

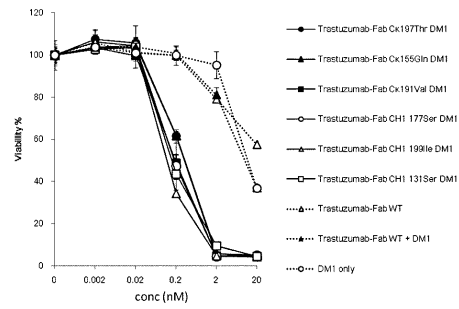
【図 1】



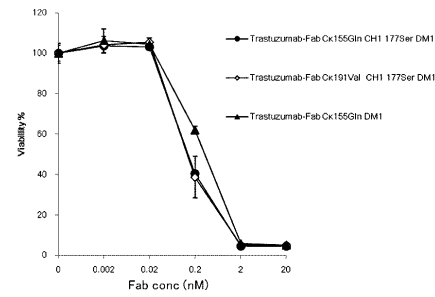
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

0006967221000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10

(72)発明者 坂本 健作
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内

(72)発明者 大竹 和正
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内

(72)発明者 山口 芳美
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内

(72)発明者 横山 茂之
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内

(72)発明者 柳沢 達男
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内

(72)発明者 松元 明子
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内

(72)発明者 加藤 明文
東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社内

(72)発明者 白石 泰久
東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社内

(72)発明者 木村 要
東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社内

(72)発明者 本間 正一
東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和発酵キリン株式会社内

審査官 玉井 真人

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 9 / 0 3 8 1 9 5 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 1 3 / 1 7 1 4 8 5 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 1 4 / 0 4 4 8 7 2 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 1 4 / 1 2 4 2 5 8 (WO, A 2)
Angew. Chem. Int. Ed., 2013, Vol.52, pp.14080-14083
Angew. Chem. Int. Ed., 2014, Vol.53, pp.2245-2249

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)