

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-163986

(P2017-163986A)

(43) 公開日 平成29年9月21日(2017.9.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5

審査請求 有 請求項の数 27 O L 外国語出願 (全 215 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-77334 (P2017-77334)	(71) 出願人	500049716 アムジェン・インコーポレーテッド
(22) 出願日	平成29年4月10日 (2017. 4. 10)		アメリカ合衆国 シーエー 9 1 3 2 0,
(62) 分割の表示	特願2015-1336 (P2015-1336) の分割		サウザンド オークス, ワン アムジェン センター ドライブ
原出願日	平成22年3月19日 (2010. 3. 19)	(74) 代理人	110001173 特許業務法人川口国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	61/210, 594	(72) 発明者	ケネス・ダブリュ・ウオーカー アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0、ニューベリー・パーク、メサ・アベ ニュー・1 7 5
(32) 優先日	平成21年3月20日 (2009. 3. 20)	(72) 発明者	ユエーシユヨン・リー アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 6 0、サウザンド・オークス、シヤドウ・ ヒル・サークル・3 0 2 5
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 担体免疫グロブリンおよびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】薬物動態特性を改善する為に1つ又は複数の薬理学的に活性化化学部分に結合できる担体免疫グロブリンの提供。

【解決手段】特定な配列のアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域;及び、特定な配列のアミノ酸と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、単離された抗原結合タンパク質、当該タンパク質をコードする単離核酸、当該単離核酸を含む発現ベクター、及び当該発現ベクターを含む単離宿主細胞。抗原結合タンパク質が少なくとも一本の免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖を含み、免疫グロブリン重鎖又は軽鎖のN末端又はC末端に薬理学的に活性化ポリプチドが非ペプチブル又はペプチブルリンカーを介して、結合され結合されている、単離抗原結合タンパク質。

【選択図】 図1 A

図 1 A



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が配列番号 250、配列番号 252、配列番号 254、配列番号 256、配列番号 258、もしくは配列番号 260 の配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む、単離抗原結合タンパク質。

【請求項 2】

軽鎖可変領域が配列番号 232、配列番号 234、配列番号 236、配列番号 238、もしくは配列番号 240 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 3】

重鎖可変領域が CDRH1、CDRH2 および CDRH3 と命名された 3 つの相補性決定領域を含み：

(a) CDRH1 は配列番号 188、配列番号 189、配列番号 190、もしくは配列番号 191 のアミノ酸配列を含む；

(b) CDRH2 は配列番号 192、配列番号 193、配列番号 194、もしくは配列番号 195 のアミノ酸配列を含む；ならびに

(c) CDRH3 は配列番号 196、配列番号 197、配列番号 198、配列番号 199、配列番号 200、もしくは配列番号 201 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 4】

免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域が CDR L1、CDR L2 および CDR L3 と命名された 3 つの CDR を含み：

(a) CDR L1 は配列番号 202、配列番号 203、配列番号 204、もしくは配列番号 205 のアミノ酸配列を含む；

(b) CDR L2 は配列番号 206 もしくは配列番号 207 のアミノ酸配列を含む；ならびに

(c) CDR L3 は配列番号 208、配列番号 209、配列番号 210、配列番号 211、もしくは配列番号 212 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 5】

重鎖可変領域が CDRH1、CDRH2 および CDRH3 と命名された 3 つの相補性決定領域を含み、ならびに軽鎖可変領域が CDR L1、CDR L2 および CDR L3 と命名された 3 つの CDR を含み：

(a) CDRH1 は配列番号 188、配列番号 189、配列番号 190、もしくは配列番号 191 のアミノ酸配列を含む；

(b) CDRH2 は配列番号 192、配列番号 193、配列番号 194、もしくは配列番号 195 のアミノ酸配列を含む；

(c) CDRH3 は配列番号 196、配列番号 197、配列番号 198、配列番号 199、配列番号 200、もしくは配列番号 201 のアミノ酸配列を含む；

(d) CDR L1 は配列番号 202、配列番号 203、配列番号 204、もしくは配列番号 205 のアミノ酸配列を含む；

(e) CDR L2 は配列番号 206 もしくは配列番号 207 のアミノ酸配列を含む；ならびに

(f) CDR L3 は配列番号 208、配列番号 209、配列番号 210、配列番号 211、もしくは配列番号 212 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 6】

抗体または抗体断片を含む、請求項 1 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 7】

IgG1、IgG2、IgG3 または IgG4 を含む請求項 6 の単離抗原結合タンパク

10

20

30

40

50

質。

【請求項 8】

モノクローナル抗体を含む請求項 6 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 9】

キメラまたはヒト化抗体を含む請求項 8 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 10】

ヒト抗体を含む請求項 8 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 11】

(a) 配列番号 77、配列番号 107、配列番号 111、配列番号 113、配列番号 115、配列番号 117、配列番号 119、配列番号 123、配列番号 129、配列番号 144、配列番号 145、配列番号 181、配列番号 182、配列番号 183、配列番号 184、もしくは配列番号 185 のアミノ酸配列を含むか、または N 末端か C 末端、もしくは両端のアミノ酸残基が 1 個、2 個、3 個、4 個もしくは 5 個欠けている前述の任意の一配列を含む免疫グロブリン重鎖；

(b) 配列番号 105、配列番号 109、配列番号 121；配列番号 125、もしくは配列番号 127 のアミノ酸配列を含むか、または N 末端か C 末端、もしくは両端のアミノ酸残基が 1 個、2 個、3 個、4 個もしくは 5 個欠けている前述の任意の一配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または

(c) (a) の免疫グロブリン重鎖および (b) の免疫グロブリン軽鎖を含む請求項 6 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 12】

1 から 24 の、結合された薬理学的に活性な化学部分をさらに含む、請求項 1 乃至請求項 11 のうちのいずれかの単離抗原結合タンパク質。

【請求項 13】

薬理学的に活性な化学部分が薬理学的に活性なポリペプチドである、請求項 12 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 14】

抗原結合ペプチドが組換え産生される、請求項 13 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 15】

抗原結合タンパク質が少なくとも 1 本の免疫グロブリン重鎖および少なくとも 1 本の免疫グロブリン軽鎖を含み、ならびに前記免疫グロブリン重鎖の一次アミノ酸配列において免疫グロブリン重鎖 Fc ドメイン内部ループ内に薬理学的に活性なポリペプチドが挿入されている、請求項 14 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 16】

抗原結合タンパク質が少なくとも 1 本の免疫グロブリン重鎖および少なくとも 1 本の免疫グロブリン軽鎖を含み、ならびに前記免疫グロブリン重鎖の N 末端または C 末端に薬理学的に活性なポリペプチドが結合されている、請求項 13 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 17】

抗原結合タンパク質が少なくとも 1 本の免疫グロブリン重鎖および少なくとも 1 本の免疫グロブリン軽鎖を含み、ならびに前記免疫グロブリン軽鎖の N 末端または C 末端に薬理学的に活性なポリペプチドが結合されている、請求項 13 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 18】

薬理学的に活性なポリペプチドが毒素ペプチド、IL-6 結合ペプチド、CGRP ペプチドアンタゴニスト、ブラジキニン B1 受容体ペプチドアンタゴニスト、PTH アゴニストペプチド、PTH アンタゴニストペプチド、ang-1 結合ペプチド、ang-2 結合ペプチド、ミオスタチン結合ペプチド、EPO 模倣ペプチド、TPO 模倣ペプチド、NGF 結合ペプチド、BAFF アンタゴニストペプチド、GLP-1 もしくはそのペプチド模倣物、または GLP-2 もしくはそのペプチド模倣物である、請求項 13 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 19】

毒素ペプチドが S h K または S h K ペプチドアナログである、請求項 18 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 20】

請求項 1 乃至請求項 19 のうちのいずれかの抗原結合タンパク質、ならびに医薬上許容可能な希釈液、賦形剤もしくは担体、を含む医薬組成物。

【請求項 21】

請求項 1 乃至請求項 4 のうちのいずれかの抗原結合タンパク質をコードする単離核酸。

【請求項 22】

請求項 5 の抗原結合タンパク質をコードする単離核酸。

【請求項 23】

請求項 11 の抗原結合タンパク質をコードする単離核酸。

【請求項 24】

請求項 14 乃至請求項 19 のうちのいずれかの抗原結合タンパク質をコードする単離核酸。

【請求項 25】

請求項 21 乃至請求項 24 のうちのいずれかの単離核酸を含むベクター。

【請求項 26】

発現ベクターを含む請求項 25 のベクター。

【請求項 27】

請求項 26 の発現ベクターを含む単離宿主細胞。

【請求項 28】

(a) 発現ベクターによりコードされた抗原結合タンパク質を発現させる条件下の培養基で請求項 27 の宿主細胞を培養すること；および

(b) 培養基から抗原結合タンパク質を回収すること、を含む方法。

【請求項 29】

請求項 11 の抗原結合タンパク質を産生するハイブリドーマ。

【請求項 30】

(a) ハイブリドーマにより抗原結合タンパク質を発現させる条件下の培養基で請求項 29 のハイブリドーマを培養すること；および

(b) 培養基から抗原結合タンパク質を回収すること、を含む方法。

【請求項 31】

免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が配列番号 262、配列番号 264、もしくは配列番号 266 の配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む、単離抗原結合タンパク質。

【請求項 32】

軽鎖可変領域が配列番号 242、配列番号 244、配列番号 246、もしくは配列番号 248 のアミノ酸配列を含む、請求項 31 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 33】

重鎖可変領域が C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 と命名された 3 つの相補性決定領域を含み：

(a) C D R H 1 は配列番号 213、配列番号 214、もしくは配列番号 215 のアミノ酸配列を含む；

(b) C D R H 2 は配列番号 216、配列番号 217、もしくは配列番号 218 のアミノ酸配列を含む；ならびに

(c) C D R H 3 は配列番号 219、配列番号 220、もしくは配列番号 221 のアミノ酸配列を含む、請求項 31 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 34】

免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域が C D R L 1、C D R L 2 およ

10

20

30

40

50

びCDRL3と命名された3つのCDRを含み：

(a)CDRL1は配列番号204、配列番号222、配列番号223、もしくは配列番号224のアミノ酸配列を含む；

(b)CDRL2は配列番号206、配列番号225、もしくは配列番号226のアミノ酸配列を含む；ならびに

(c)CDRL3は配列番号227、配列番号228、配列番号229、もしくは配列番号230のアミノ酸配列を含む、請求項31の単離抗原結合タンパク質。

【請求項35】

重鎖可変領域がCDRH1、CDRH2およびCDRH3と命名された3つの相補性決定領域を含み、ならびに軽鎖可変領域がCDRL1、CDRL2およびCDRL3と命名された3つのCDRを含み：

(a)CDRH1は配列番号213、配列番号214、もしくは配列番号215のアミノ酸配列を含む；

(b)CDRH2は配列番号216、配列番号217、もしくは配列番号218のアミノ酸配列を含む；ならびに

(c)CDRH3は配列番号219、配列番号220、もしくは配列番号221のアミノ酸配列を含む；

(d)CDRL1は配列番号204、配列番号222、配列番号223、もしくは配列番号224のアミノ酸配列を含む；

(e)CDRL2は配列番号206、配列番号225、もしくは配列番号226のアミノ酸配列を含む；ならびに

(f)CDRL3は配列番号227、配列番号228、配列番号229、もしくは配列番号230のアミノ酸配列を含む、請求項31の単離抗原結合タンパク質。

【請求項36】

抗体または抗体断片を含む、請求項31の単離抗原結合タンパク質。

【請求項37】

IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4を含む請求項36の単離抗原結合タンパク質。

【請求項38】

モノクローナル抗体を含む請求項36の単離抗原結合タンパク質。

【請求項39】

キメラまたはヒト化抗体を含む請求項38の単離抗原結合タンパク質。

【請求項40】

ヒト抗体を含む請求項38の単離抗原結合タンパク質。

【請求項41】

(a)配列番号46、配列番号133、配列番号139、配列番号143、配列番号186、もしくは配列番号187、配列番号366、もしくは配列番号367のアミノ酸配列を含むか、またはN末端かC末端、もしくは両端のアミノ酸残基が1個、2個、3個、4個もしくは5個欠けている前述の任意の一配列を含む免疫グロブリン重鎖；

(b)配列番号28、配列番号131、配列番号135、配列番号137；もしくは配列番号141のアミノ酸配列を含むか、またはN末端もしくはC末端、または両端のアミノ酸残基が1個、2個、3個、4個もしくは5個欠けている前述の任意の一配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または

(c)(a)の免疫グロブリン重鎖および(b)の免疫グロブリン軽鎖、を含む請求項36の単離抗原結合タンパク質。

【請求項42】

1から24の、結合された薬理学的に活性な化学部分をさらに含む、請求項31乃至請求項41のうちのいずれかの単離抗原結合タンパク質。

【請求項43】

薬理学的に活性な化学部分が薬理学的に活性なポリペプチドである、請求項42の単離

10

20

30

40

50

抗原結合タンパク質。

【請求項 4 4】

抗原結合ペプチドが組換え産生される、請求項 4 3 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 4 5】

抗原結合タンパク質が少なくとも 1 本の免疫グロブリン重鎖および少なくとも 1 本の免疫グロブリン軽鎖を含み、ならびに前記免疫グロブリン重鎖の一次アミノ酸配列において免疫グロブリン重鎖 F c ドメイン内部ループ内に薬理的に活性なポリペプチドが挿入されている、請求項 4 4 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 4 6】

抗原結合タンパク質が少なくとも 1 本の免疫グロブリン重鎖および少なくとも 1 本の免疫グロブリン軽鎖を含み、ならびに前記免疫グロブリン重鎖の N 末端または C 末端に薬理的に活性なポリペプチドが結合されている、請求項 4 3 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 4 7】

抗原結合タンパク質が少なくとも 1 本の免疫グロブリン重鎖および少なくとも 1 本の免疫グロブリン軽鎖を含み、ならびに前記免疫グロブリン軽鎖の N 末端または C 末端に薬理的に活性なポリペプチドが結合されている、請求項 4 3 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 4 8】

薬理的に活性なポリペプチドが毒素ペプチド、I L-6 結合ペプチド、C G R P ペプチドアンタゴニスト、ブラジキニン B 1 受容体ペプチドアンタゴニスト、P T H アゴニストペプチド、P T H アンタゴニストペプチド、a n g-1 結合ペプチド、a n g-2 結合ペプチド、ミオスタチン結合ペプチド、E P O 模倣ペプチド、T P O 模倣ペプチド、N G F 結合ペプチド、B A F F アンタゴニストペプチド、G L P-1 もしくはそのペプチド模倣物、または G L P-2 もしくはそのペプチド模倣物である、請求項 4 3 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 4 9】

毒素ペプチドが S h K または S h K ペプチドアナログである、請求項 4 8 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 5 0】

請求項 3 1 乃至請求項 4 9 のうちのいずれかの抗原結合タンパク質、ならびに医薬上許容可能な希釈液、賦形剤もしくは担体、を含む医薬組成物。

【請求項 5 1】

請求項 3 1 乃至請求項 3 4 のうちのいずれかの抗原結合タンパク質をコードする単離核酸。

【請求項 5 2】

請求項 3 5 の抗原結合タンパク質をコードする単離核酸。

【請求項 5 3】

請求項 4 1 の抗原結合タンパク質をコードする単離核酸。

【請求項 5 4】

請求項 4 4 乃至請求項 4 9 のうちのいずれかの抗原結合タンパク質をコードする単離核酸。

【請求項 5 5】

請求項 5 1 乃至請求項 5 4 のうちのいずれかの単離核酸を含むベクター。

【請求項 5 6】

発現ベクターを含む請求項 5 5 のベクター。

【請求項 5 7】

請求項 5 6 の発現ベクターを含む、単離宿主細胞。

【請求項 5 8】

(a) 発現ベクターによりコードされた抗原結合タンパク質を発現させる条件下の培養基で請求項 5 7 の宿主細胞を培養すること；および

(b) 培養基から抗原結合タンパク質を回収すること、

10

20

30

40

50

を含む方法。

【請求項 59】

請求項 41 の抗原結合タンパク質を産生するハイブリドーマ。

【請求項 60】

(a) ハイブリドーマにより抗原結合タンパク質を発現させる条件下の培養基で請求項 59 のハイブリドーマを培養すること；および

(b) 培養基から抗原結合タンパク質を回収すること、
を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本出願は、2009年3月20日に提出された米国仮出願第61/210,594号の利益を主張するものであり、この開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本出願は、2010年3月19日にEFS-WEBを介して提出されたASCII「txt」遵守配列リストを含み、これは米国特許規則37CFR1.821(c)および1.821(e)に必要なコンピュータ媒体(CRF)と文書複写の両役目を果たし、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2010年3月18日に作成した「txt」ファイルについて、名称はA-1537-WO-PC TSeq List 031810-368-ST25.txtであり、サイズは545kbである。

20

【0003】

本出願を通して、丸括弧または角カッコ内に各種刊行物を参照する。本出願において、これら刊行物の開示は、本発明の属する分野の状態をより詳細に記載するためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

1. 技術分野

本発明は、薬物動態特性を改善するために1つまたは複数の薬理学的に活性な化学部分に結合できる担体抗体に関する。

【0005】

30

2. 関連技術に関する論議

「担体」部分とは、非ペプチド有機部分（すなわち、「低分子」）またはポリペプチド薬剤など、薬理学的に活性な化学部分が共有結合または融合できる薬理学的に不活性な分子を指す。薬理学的に活性な化学部分のタンパク質分解もしくは他のインビボ活性を低下させる化学修飾によって薬理学的に活性な部分のインビボ減成を防止もしくは軽減するため、または腎臓クリアランスを低下させるため、インビボ半減期もしくは他の治療的な薬物動態特性を高める（薬理学的に活性な部分の非結合形態と比較して、吸収率を高める、毒性もしくは免疫原性を低減する、溶解度を改善する、ならびに／または製造可能性もしくは保存安定性を増加するなどの）ため、効果的な担体が探究されている。

【0006】

40

製薬業界で使用されているかかる担体部分の例としては、ポリエチレングリコール（例えば、Burg et al., Erythropoietin conjugates with polyethylene glycol、WO01/02017号を参照されたい）、免疫グロブリンFcドメイン（例えば、Feige et al., Modified peptides as therapeutic agents、米国特許第6,660,843号を参照されたい）、ヒト血清アルブミン（例えば、Rosen et al., Albumin fusion proteins、米国特許第6,926,898号および米国特許第2005/0054051号；Bridon et al., Protection of endogenous therapeutic peptides from peptidase activity thr

50

ough conjugation to blood components、米国特許第6, 887, 470号を参照されたい)、トランスチレチン(例えば、Walker et al., Use of transthyretin peptide/protein fusions to increase the serum half-life of pharmacologically active peptides/proteins、米国特許第2003/0195154A1号;同第2003/0191056A1号を参照されたい)、またはチロキシン結合グロブリン、または、例えば免疫グロブリン(軽鎖+重鎖)およびFcドメインの組み合わせ(いわゆる「ヘミボディ」であるヘテロ三量体の組み合わせ)が挙げられ、例えばSullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、PCT/米国特許第2007/022831号(WO2008/088422号として公開)に記載されている。薬理学的に活性な部分は、長い半減期血清タンパク質に対して親和性を有するペプチドまたは低分子にも結合されている(例えば、Blaney et al., Method and compositions for increasing the serum half-life of pharmacologically active agents by binding to transthyretin-selective ligands、米国特許第5, 714, 142号;Sato et al., Serum albumin binding moieties、米国特許第2003/0069395A1号;Jones et al., Pharmaceutical active conjugates、米国特許第6, 342, 225号を参照されたい)。

【0007】

Fischer et alは、免疫グロブリンが2本の重鎖、または2本の重鎖と2本の軽鎖からなり、免疫グロブリンが機能性免疫グロブリンではなかったペプチド-免疫グロブリン結合体について記載している(Fischer et al., A peptide-immunoglobulin conjugate、WO2007/045463A1号)。

【0008】

本発明は、組換え発現の例外的均一性および有効性、インビトロ安定性および非凝集、光分解耐性および酸化耐性、ヒト抗原との非交差反応、ならびに良好な薬物動態特性をもたらし担体免疫グロブリンを提供する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開第2001/02017号

【特許文献2】米国特許第6, 660, 843号明細書

【特許文献3】米国特許第6, 926, 898号明細書

【特許文献4】米国特許出願公開第2005/0054051号明細書

【特許文献5】米国特許第6, 887, 470号明細書

【特許文献6】米国特許出願公開第2003/0195154号明細書

【特許文献7】米国特許出願公開第2003/0191056号明細書

【特許文献8】国際公開第2008/088422号

【特許文献9】米国特許第5, 714, 142号明細書

【特許文献10】米国特許出願公開第2003/0069395号明細書

【特許文献11】米国特許第6, 342, 225号明細書

【特許文献12】国際公開第2007/045463号

【発明の概要】

【0010】

本発明は、抗原結合タンパク質に関する。本発明の抗原結合タンパク質(抗体および抗体断片を含む)はラットおよびカニクイザルにおいて確実な発現および精製特性を有し、

それにより安定的かつ相対的に均一であり、顕著な薬物動態（PK）特性を有する生成物である。本発明の抗原結合タンパク質は、ジニトロフェノール（DNP）またはキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に特異的に結合することが見出されているが、ヒトタンパク質、細胞または組織への結合は検出されていない。これらの抗原結合タンパク質は、多くの目的（抗体ベース薬の品質管理もしくは分析的標準および生物学的に関連したアイソタイプ適合抗体の対照が挙げられるが、これらに限定されない）のために使用できる。

【0011】

いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、薬理学的に活性な化学部分、例えば、低分子、ペプチド、および／またはタンパク質のPK特性を高めるための担体として用いられる。薬理学的に活性な部分は、化学結合反応により、または組換え遺伝子発現を介して本発明の免疫グロブリンに結合（すなわち、共有結合）でき、それらは抗原結合タンパク質に融合できる。

【0012】

本発明は、かかる本発明の免疫グロブリン、例えばそれらをコードする単離核酸、ベクターおよび単離宿主細胞、ならびにハイブリドーマを産生するための物質および方法も提供する。また、本明細書に開示の免疫グロブリン重鎖および／もしくは軽鎖配列ならびに／またはVHおよび／もしくはVL配列ならびに／またはCDR配列のいずれかをコードする単離核酸も提供する。関連実施形態では、上記核酸のいずれかを含む発現ベクターを提供する。さらに別の実施形態では、上記核酸または発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。

【0013】

本発明の免疫グロブリンは、医薬組成物または薬の製造において使用できる。本発明の医薬組成物もしくは薬は、薬理学的に活性な薬剤と結合した免疫グロブリン、ならびに医薬上許容可能な希釈液、担体または賦形剤を含む。

【0014】

本発明では幾多の方法を意図する。例えば、コードした抗原結合タンパク質が発現するように本発明の発現ベクターを含む上記宿主細胞の培養に関わる方法を提供する。ハイブリドーマにより抗原結合タンパク質を発現させる条件下での培養基における上記ハイブリドーマの培養に関わる方法も提供する。かかる方法は、宿主細胞培養から抗原結合タンパク質を回収する工程も含むことができる。関連実施形態では、上記の方法で産生された単離抗原結合タンパク質を提供する。

【0015】

前述の概要は、本発明のすべての態様を定義することを意図せず、さらなる態様が（発明を実施するための形態などの）他の項目に記載されている。本文書全体が統合された開示として関連していることを意図し、本文書の同一文章、または段落、または項目に特徴の組み合わせが見出されない場合でも、本明細書に記載の特徴のすべての組み合わせを意図していることが理解されるべきである。

【0016】

前述に加えて、本発明は、追加の態様として、上記の特定の段落により定義されるバリエーションよりも何らかの点で範囲がさらに狭くなる、本発明のすべての実施形態を含む。例えば、属として記載されている本発明のある態様では、その属のすべてのメンバーが単独で本発明の1つの態様であることが理解されるべきである。また、属または属の1メンバーの選択として記載されている態様は、属の2つ以上のメンバーの組み合わせを包含するものと理解されるべきである。出願人（ら）は本明細書に記載の本発明の全範囲を発明したが、出願人らは他の先行技術に記載の対象物を請求することは意図していない。したがって、特許庁もしくは他の団体または個人により特許請求の範囲内における法定の先行技術が出願人らの注意をひいた場合、出願人（ら）は特許法のもと、権利を保留して修正権利を行使し、かかる請求項の主題を再定義してかかる請求項の範囲からかかる法定の先行技術または法定の先行技術の明らかなバリエーションを具体的に除外する。かかる改

訂された特許請求の範囲により定義される本発明のバリエーションも、本発明の態様であることを意図する。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1A】任意選択的にペプチジルリンカー部分（これらに限定されないが、本明細書に記載のL5またはL10など）を介して、薬理学的に活性な毒素ペプチドアナログが1単位または複数単位（波形）融合した免疫グロブリンの1つまたは複数のドメインを含む、本発明の組成物の一部の実施形態の図式構造を示す。これらの図式はより典型的なIgG1を示し（ただし、IgG2にも同様に適用されることを意図する）、これはヒンジに4個のジスルフィド結合を有し、重鎖と軽鎖、およびIgG3とIgG4のジスルフィド結合の様々なアレンジがある。図1Aは、免疫グロブリンFcドメイン単量体の片方のC末端に毒素ペプチドアナログが融合している1価ヘテロ二量体Fc毒素ペプチドアナログ融合物を表す。

10

【図1B】意選択的にペプチジルリンカー部分（これらに限定されないが、本明細書に記載のL5またはL10など）を介して、薬理学的に活性な毒素ペプチドアナログが1単位または複数単位（波形）融合した免疫グロブリンの1つまたは複数のドメインを含む、本発明の組成物の一部の実施形態の図式構造を示す。これらの図式はより典型的なIgG1を示し（ただし、IgG2にも同様に適用されることを意図する）、これはヒンジに4個のジスルフィド結合を有し、重鎖と軽鎖、およびIgG3とIgG4のジスルフィド結合の様々なアレンジがある。図1Bは、免疫グロブリンFcドメイン単量体の両C末端に毒素ペプチドアナログが融合している2価ホモ二量体Fc毒素ペプチドアナログ融合物を表す。

20

【図1C】意選択的にペプチジルリンカー部分（これらに限定されないが、本明細書に記載のL5またはL10など）を介して、薬理学的に活性な毒素ペプチドアナログが1単位または複数単位（波形）融合した免疫グロブリンの1つまたは複数のドメインを含む、本発明の組成物の一部の実施形態の図式構造を示す。これらの図式はより典型的なIgG1を示し（ただし、IgG2にも同様に適用されることを意図する）、これはヒンジに4個のジスルフィド結合を有し、重鎖と軽鎖、およびIgG3とIgG4のジスルフィド結合の様々なアレンジがある。図1Cは、免疫グロブリンFcドメイン単量体の片方のN末端に毒素ペプチドアナログが融合している1価ヘテロ二量体毒素ペプチドアナログ-Fc融合物を表す。

30

【図1D】意選択的にペプチジルリンカー部分（これらに限定されないが、本明細書に記載のL5またはL10など）を介して、薬理学的に活性な毒素ペプチドアナログが1単位または複数単位（波形）融合した免疫グロブリンの1つまたは複数のドメインを含む、本発明の組成物の一部の実施形態の図式構造を示す。これらの図式はより典型的なIgG1を示し（ただし、IgG2にも同様に適用されることを意図する）、これはヒンジに4個のジスルフィド結合を有し、重鎖と軽鎖、およびIgG3とIgG4のジスルフィド結合の様々なアレンジがある。図1Dは、免疫グロブリンFcドメイン単量体の両N末端に毒素ペプチドアナログが融合している2価ホモ二量体毒素ペプチドアナログ-Fc融合物を表す。

40

【図1E】意選択的にペプチジルリンカー部分（これらに限定されないが、本明細書に記載のL5またはL10など）を介して、薬理学的に活性な毒素ペプチドアナログが1単位または複数単位（波形）融合した免疫グロブリンの1つまたは複数のドメインを含む、本発明の組成物の一部の実施形態の図式構造を示す。これらの図式はより典型的なIgG1を示し（ただし、IgG2にも同様に適用されることを意図する）、これはヒンジに4個のジスルフィド結合を有し、重鎖と軽鎖、およびIgG3とIgG4のジスルフィド結合の様々なアレンジがある。図1Eは、そのC末端に毒素ペプチドアナログが融合している免疫グロブリン重鎖（HC）+免疫グロブリン軽鎖（LC）+免疫グロブリンFc単量体を含む1価ヘテロ三量体Fc毒素ペプチドアナログ/Abを表す。

【図1F】意選択的にペプチジルリンカー部分（これらに限定されないが、本明細書に記

50

載の L 5 または L 1 0 など) を介して、薬理学的に活性な毒素ペプチドアナログが 1 単位または複数単位 (波形) 融合した免疫グロブリンの 1 つまたは複数のドメインを含む、本発明の組成物の一部の実施形態の図式構造を示す。これらの図式はより典型的な I g G 1 を示し (ただし、I g G 2 にも同様に適用されることを意図する)、これはヒンジに 4 個のジスルフィド結合を有し、重鎖と軽鎖、および I g G 3 と I g G 4 のジスルフィド結合の様々なアレンジがある。図 1 F は、H C 単量体の片方の C 末端に毒素ペプチドアナログが融合している 1 価ヘテロ四量体 (H T) 抗体 H C 毒素ペプチドアナログ融合物を表す。

【図 1 G】意選択的にペプチジルリンカー部分 (これらに限定されないが、本明細書に記載の L 5 または L 1 0 など) を介して、薬理学的に活性な毒素ペプチドアナログが 1 単位または複数単位 (波形) 融合した免疫グロブリンの 1 つまたは複数のドメインを含む、本発明の組成物の一部の実施形態の図式構造を示す。これらの図式はより典型的な I g G 1 を示し (ただし、I g G 2 にも同様に適用されることを意図する)、これはヒンジに 4 個のジスルフィド結合を有し、重鎖と軽鎖、および I g G 3 と I g G 4 のジスルフィド結合の様々なアレンジがある。図 1 G は、両 H C 単量体の C 末端上に毒素ペプチドアナログを有する 2 価 H T 抗体 A b H C 毒素ペプチドアナログ融合物を表す。

【図 1 H】意選択的にペプチジルリンカー部分 (これらに限定されないが、本明細書に記載の L 5 または L 1 0 など) を介して、薬理学的に活性な毒素ペプチドアナログが 1 単位または複数単位 (波形) 融合した免疫グロブリンの 1 つまたは複数のドメインを含む、本発明の組成物の一部の実施形態の図式構造を示す。これらの図式はより典型的な I g G 1 を示し (ただし、I g G 2 にも同様に適用されることを意図する)、これはヒンジに 4 個のジスルフィド結合を有し、重鎖と軽鎖、および I g G 3 と I g G 4 のジスルフィド結合の様々なアレンジがある。図 1 H は、L C 単量体の片方の N 末端に毒素ペプチドアナログが融合している 1 価 H T 毒素ペプチドアナログ-L C A b を表す。

【図 1 I】意選択的にペプチジルリンカー部分 (これらに限定されないが、本明細書に記載の L 5 または L 1 0 など) を介して、薬理学的に活性な毒素ペプチドアナログが 1 単位または複数単位 (波形) 融合した免疫グロブリンの 1 つまたは複数のドメインを含む、本発明の組成物の一部の実施形態の図式構造を示す。これらの図式はより典型的な I g G 1 を示し (ただし、I g G 2 にも同様に適用されることを意図する)、これはヒンジに 4 個のジスルフィド結合を有し、重鎖と軽鎖、および I g G 3 と I g G 4 のジスルフィド結合の様々なアレンジがある。図 1 I は、H C 単量体の片方の N 末端に毒素ペプチドアナログが融合している 1 価 H T 毒素ペプチドアナログ-H C A b を表す。

【図 1 J】意選択的にペプチジルリンカー部分 (これらに限定されないが、本明細書に記載の L 5 または L 1 0 など) を介して、薬理学的に活性な毒素ペプチドアナログが 1 単位または複数単位 (波形) 融合した免疫グロブリンの 1 つまたは複数のドメインを含む、本発明の組成物の一部の実施形態の図式構造を示す。これらの図式はより典型的な I g G 1 を示し (ただし、I g G 2 にも同様に適用されることを意図する)、これはヒンジに 4 個のジスルフィド結合を有し、重鎖と軽鎖、および I g G 3 と I g G 4 のジスルフィド結合の様々なアレンジがある。図 1 J は、L C 単量体の片方の C 末端に毒素ペプチドアナログが融合している 1 価 H T A b L C 毒素ペプチドアナログ融合物 (すなわち、L C 毒素ペプチドアナログ融合物 + L C + 2 (H C)) を表す。

【図 1 K】意選択的にペプチジルリンカー部分 (これらに限定されないが、本明細書に記載の L 5 または L 1 0 など) を介して、薬理学的に活性な毒素ペプチドアナログが 1 単位または複数単位 (波形) 融合した免疫グロブリンの 1 つまたは複数のドメインを含む、本発明の組成物の一部の実施形態の図式構造を示す。これらの図式はより典型的な I g G 1 を示し (ただし、I g G 2 にも同様に適用されることを意図する)、これはヒンジに 4 個のジスルフィド結合を有し、重鎖と軽鎖、および I g G 3 と I g G 4 のジスルフィド結合の様々なアレンジがある。図 1 K は、L C 単量体の両 C 末端に毒素ペプチドアナログが融合している 2 価 H T A b L C 毒素ペプチドアナログ融合物 (すなわち、2 (L C 毒素ペプチドアナログ融合物) + 2 (H C)) を表す。

【図 1 L】意選択的にペプチジルリンカー部分 (これらに限定されないが、本明細書に記

10

20

30

40

50

載の L 5 または L 1 0 など) を介して、薬理学的に活性な毒素ペプチドアナログが 1 単位または複数単位 (波形) 融合した免疫グロブリンの 1 つまたは複数のドメインを含む、本発明の組成物の一部の実施形態の図式構造を示す。これらの図式はより典型的な I g G 1 を示し (ただし、I g G 2 にも同様に適用されることを意図する)、これはヒンジに 4 個のジスルフィド結合を有し、重鎖と軽鎖、および I g G 3 と I g G 4 のジスルフィド結合の様々なアレンジがある。図 1 L は、L C 単量体の両方および H C 単量体の片方の C 末端に毒素ペプチドアナログが融合している 3 価 H T A b L C 毒素ペプチドアナログ / H C 毒素ペプチドアナログ (すなわち、2 (L C 毒素ペプチドアナログ融合物) + H C 毒素ペプチドアナログ融合物 + H C) を表す。

【図 1 M】意選択的にペプチジルリンカー部分 (これらに限定されないが、本明細書に記載の L 5 または L 1 0 など) を介して、薬理学的に活性な毒素ペプチドアナログが 1 単位または複数単位 (波形) 融合した免疫グロブリンの 1 つまたは複数のドメインを含む、本発明の組成物の一部の実施形態の図式構造を示す。これらの図式はより典型的な I g G 1 を示し (ただし、I g G 2 にも同様に適用されることを意図する)、これはヒンジに 4 個のジスルフィド結合を有し、重鎖と軽鎖、および I g G 3 と I g G 4 のジスルフィド結合の様々なアレンジがある。図 1 M は、各 H C 単量体の免疫グロブリン F c ドメインの内部ループ内に毒素ペプチドアナログ部分が挿入されている 2 価抗体を表す。

【図 1 N】意選択的にペプチジルリンカー部分 (これらに限定されないが、本明細書に記載の L 5 または L 1 0 など) を介して、薬理学的に活性な毒素ペプチドアナログが 1 単位または複数単位 (波形) 融合した免疫グロブリンの 1 つまたは複数のドメインを含む、本発明の組成物の一部の実施形態の図式構造を示す。これらの図式はより典型的な I g G 1 を示し (ただし、I g G 2 にも同様に適用されることを意図する)、これはヒンジに 4 個のジスルフィド結合を有し、重鎖と軽鎖、および I g G 3 と I g G 4 のジスルフィド結合の様々なアレンジがある。図 1 N は、H C 単量体の片方の免疫グロブリン F c ドメインの内部ループ内に毒素ペプチドアナログ部分が挿入されている 1 価抗体を表す。二量体または三量体は、ある宿主細胞内で単鎖をコードするデオキシリボ核酸 (DNA) 構築物の発現時に自発的に形成される。他の宿主細胞内では、細胞を二量体 / 三量体の好都合な形態条件におくこともでき、二量体 / 三量体をインビトロ形成することもできる。複数の H C 単量体、L C 単量体、または免疫グロブリン F c ドメイン単量体が単一の実施形態の一部である場合、個々の単量体は、所望により互いに同一であることも異なることもできる。

【図 2 A】P a t c h X p r e s s (商標) 電気生理学的手法により、実施例 4 および 5 に記載の 1 価 a K L H H C - S h K (1 - 3 5 Q 1 6 K) A b (配列番号 2 8、2 9、3 2) は、ヒト K v 1. 1 電流 (図 2 B) よりもヒト K v 1. 3 電流 (図 2 A) をより強力にブロックすることを示す。

【図 2 B】P a t c h X p r e s s (商標) 電気生理学的手法により、実施例 4 および 5 に記載の 1 価 a K L H H C - S h K (1 - 3 5 Q 1 6 K) A b (配列番号 2 8、2 9、3 2) は、ヒト K v 1. 1 電流 (図 2 B) よりもヒト K v 1. 3 電流 (図 2 A) をより強力にブロックすることを示す。

【図 3 A】本明細書の実施例 4 に記載の最終 1 価 F c - L 1 0 - S h k [1 - 3 5、Q 1 6 K] / 抗 K L H A b 生成物のクーマシーブリリアントブルーで着色したトリスーグリシン 4 ~ 2 0 % S D S - P A G E を示す。レーン 1 ~ 1 2 を以下のとおり負荷した: レーン 1: N o v e x M a r k 1 2 広範囲タンパク質標準 (1 0 μ L); レーン 2: 非還元生成物 0. 5 μ g; レーン 3: ブランク; レーン 4: 非還元生成物 2. 0 μ g; レーン 5: ブランク; レーン 6: 非還元生成物 1 0 μ g; レーン 7: N o v e x M a r k 1 2 広範囲タンパク質標準 (1 0 μ L); レーン 8: 還元生成物 0. 5 μ g; レーン 9: ブランク; レーン 1 0: 還元生成物 2. 0 μ g; レーン 1 1: ブランク; レーン 1 2: 還元生成物 1 0 μ g。

【図 3 B】P h e n o m e n e x B i o S e p S E C - 3 0 0 0 カラム (7. 8 × 3 0 0 m m) の 5 0 m M N a H ₂ P O ₄、2 5 0 m M N a C l 溶液 (p H 6. 9) に 1 m L / 分で注入し、吸光度 2 8 0 n m で観察した実施例 4 に記載の最終 1 価 F c - L 1 0

10

20

30

40

50

ーShK [1-35、Q16K] / 抗KLH Ab生成物50 µg上のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図3C】実施例4に記載の1価Fc-L10-ShK [1-35、Q16K] / 抗KLH Abの最終試料のLC-MS分析を示す。生成物をWaters社製ACQUITY UPLCシステムを用いてWaters社製MassPREPマイクロ脱塩カラムを介してクロマトグラフ化した。カラムを80℃で設定して、0.1%ギ酸中でアセトニトリル濃度を増大する直線勾配を用いてタンパク質を溶出した。質量分析のためWaters社製LC-MS Premier ESI-TOF質量分析計にカラム流出の一部を流用した。この機器を陽性Vモードで作動した。キャピラリー電圧を3,200Vで、コーン電圧を80Vで設定した。質量スペクトルを800~3000 ttm/zで得て、機器製造業者の提供するMaxEnt1ソフトウェアを用いて逆重畳した。

【図4A】実施例4に記載の最終1価抗KLH HC-L10-ShK [1-35、Q16K] Ab生成物のクーマシーブリリアントブルーで着色したトリス-グリシン4~20% SDS-PAGEを示す。レーン1~12を以下のとおり負荷した：レーン1：Novex Mark12広範囲タンパク質標準(10 µL)；レーン2：非還元生成物0.5 µg；レーン3：ブランク；レーン4：非還元生成物2.0 µg；レーン5：ブランク；レーン6：非還元生成物10 µg；レーン7：Novex Mark12広範囲タンパク質標準(10 µL)；レーン8：還元生成物0.5 µg；レーン9：ブランク；レーン10：還元生成物2.0 µg；レーン11：ブランク；レーン12：還元生成物10 µg。

【図4B】Phenomenex BioSep SEC-3000カラム(7.8×300 mm)の50 mM NaH₂PO₄、250 mM NaCl溶液(pH 6.9)に1 mL/分で注入(吸光度280 nmで検出)した実施例4に記載の最終1価抗KLH 120.6 HC-L10-ShK [1-35、Q16K] 抗体生成物25 µg上のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。約11分目に観察された偏向は注入関連アーチファクトである。

【図4C】窒素レーザー付きMicromass MALDI micro MX質量分析計を用いた、実施例4に記載の1価抗KLH HC-L10-ShK [1-35、Q16K] Abの最終試料のMALDI質量スペクトル分析を示す。試料を、陽性線状モードで実行した。この機器の電圧を12 kVで設定して、高質量検出器を5 kVで設定した。約200レーザーショットのデータを蓄積して各スペクトルを生成した。分子質量が既知である精製タンパク質を用いて外部物質カリブレーションを成し遂げた。

【図5A】実施例4に記載の最終2価aKLH HC-L10-ShK [1-35、Q16K] Ab生成物のクーマシーブリリアントブルーで着色したトリス-グリシン4~20% SDS-PAGEを示す。レーン1~12を以下のとおり負荷した：レーン1：Novex Mark12広範囲タンパク質標準(10 µL)；レーン2：非還元生成物0.5 µg；レーン3：ブランク；レーン4：非還元生成物2.0 µg；レーン5：ブランク；レーン6：非還元生成物10 µg；レーン7：Novex Mark12広範囲タンパク質標準(10 µL)；レーン8：還元生成物0.5 µg；レーン9：ブランク；レーン10：還元生成物2.0 µg；レーン11：ブランク；レーン12：還元生成物10 µg。

【図5B】Phenomenex BioSep SEC-3000カラム(7.8×300 mm)の50 mM NaH₂PO₄、500 mM NaCl溶液(pH 6.9)に1 mL/分で注入(吸光度280 nmで検出)した実施例4に記載の最終2価抗KLH HC-L10-ShK [1-35、Q16K] Ab生成物25 µg上のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。約11.5分目に観察された偏向は注入関連アーチファクトである。

【図5C】窒素レーザー付きMicromass MALDI micro MX質量分析計を用いた、実施例4に記載の2価抗KLH HC-L10-ShK [1-35、Q16K] Abの最終試料のMALDI質量スペクトル分析を示す。試料を、陽性線状モードで実行した。この機器の電圧を12 kVで設定して、高質量検出器を5 kVで設定した。約200レーザーショットのデータを蓄積して各スペクトルを生成した。分子質量が既知である精製タンパク質を用いて外部物質カリブレーションを成し遂げた。

【図6A】実施例4に記載の最終1価KLH HC-L10-ShK [2-35、Q16K] Ab生成物のクーマシーブリリアントブルーで着色したトリス-グリシン4~20% SDS-PAGEを示す。レーン1~12を以下のとおり負荷した：レーン1：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μ L）；レーン2：非還元生成物0.5 μ g；レーン3：ブランク；レーン4：非還元生成物2.0 μ g；レーン5：ブランク；レーン6：非還元生成物10 μ g；レーン7：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μ L）；レーン8：還元生成物0.5 μ g；レーン9：ブランク；レーン10：還元生成物2.0 μ g；レーン11：ブランク；レーン12：還元生成物10 μ g。

【図6B】Phenomenex BioSep SEC-3000カラム（7.8 $\times$ 300mm）の50mM NaH₂PO₄、250mM NaCl溶液（pH6.9）に1mL/分で注入（吸光度280nmで検出）した実施例4に記載の最終1価抗KLH HC-L10-ShK [2-35、Q16K] Ab生成物20 μ g上のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。約11分目に観察された偏向は注入関連アーチファクトである。

【図6C】実施例4に記載の1価抗KLH HC-L10-ShK [2-35、Q16K] Abの最終試料のLC-MS質量スペクトル分析を示す。生成物をWaters社製ACQUITY UPLCシステムを用いてWaters社製MassPREPマイクロ脱塩カラムを介してクロマトグラフ化した。カラムを80℃で設定して、0.1%ギ酸中でアセトニトリル濃度を増大する直線勾配を用いてタンパク質を溶出した。質量分析のためWaters社製LC-MS Premier ESI-TOF質量分析計にカラム流出の一部を流用した。この機器を陽性Vモードで作動した。キャピラリー電圧を3,200Vで、コーン電圧を80Vで設定した。質量スペクトルを800~3000m/zで獲得し、機器製造業者の提供するMaxEnt1ソフトウェアを用いて逆重畳した。

【図7】Sprague-Dawleyラットにおいて実施した薬物動態試験の結果を示す（単回皮下投与量=6mg/kg）。白四角は、実施例5および表7Hに記載の1価Fc/Fc-L10-ShK（1-35、Q16K）（配列番号1および配列番号26のヘテロ二量体）データを表し、黒丸は、1価抗KLH抗体-ShK（1-35、Q16K）（配列番号28、配列番号29、配列番号28、および配列番号32の四量体）データを表す；ならびに黒三角は、1価抗KLH抗体（ループ）-ShK（1-35、Q16K）（配列番号28；配列番号35；配列番号28；および配列番号34の四量体）データを表す。

【図8】Sprague-Dawleyラットにおいて実施した、実施例5、および表7Jに詳述の2価（白四角）および1価（黒丸）抗KLH抗体-ShK（1-35、Q16K）（それぞれ、[配列番号28、配列番号32、配列番号28、配列番号32]および[配列番号28、配列番号29、配列番号28、配列番号32]の四量体）の薬物動態試験の結果を示す（単回皮下投与量=6mg/kg用量）。

【図9】Sprague-Dawleyラットにおいて実施した、実施例5、および表7Lに詳述の2価（白四角）および1価（黒丸）抗KLH抗体（ループ）-ShK（1-35、Q16K）（それぞれ、[配列番号28、配列番号35、配列番号28、配列番号35]および[配列番号28、配列番号34、配列番号28、配列番号35]の四量体）の薬物動態試験の結果を示す（単回皮下投与量=6mg/kg）。

【図10】1価Fc-ShK/Fcヘテロ二量体（白四角）、1価Fc-ShK/KLH Ab（ヘテロ三量体またはヘミボディ）（白三角）および2価ShK-Fc/ShK-Fcホモ二量体（黒丸）のSDラットにおける薬物動態試験の結果を示す（単回2mg/kg皮下用量）。1価ヘテロ二量体およびヘテロ三量体は2価ホモ二量体よりも高い曝露を提供した。この試験に関する詳細を実施例5に提示する。

【図11】還元負荷緩衝液およびQuickBlue（Boston Biologicals）による染色を用いて220Vで展開した1.0mmトリス-グリシン4~20% SDS-PAGE（Novex）上での抗体分析を示す。レーンを以下のとおり負荷した（左から右）：レーン1、Novex Mark12標準；レーン2、一過性細胞培養由来のaDNP3B1Ab2 μ g；レーン3、安定した細胞培養由来のaDNP-3B1A

10

20

30

40

50

b 2 μ g ; レーン 4、一過性細胞培養由来の a D N P 3 H 4 A b 2 μ g ; レーン 5、安定した細胞培養由来の a D N P 3 H 4 A b 2 μ g ; レーン 6、一過性細胞培養由来の a D N P 3 A 1 A b 2 μ g ; レーン 7、一過性細胞培養由来の a D N P 3 C 2 A b 2 μ g ; ならびに レーン 8、一過性細胞培養由来の a D N P 3 A 4 A b 2 μ g 。

【図 1 2 A】非還元負荷緩衝液および Quick Blue (Boston Biologicals) による染色を用いて 2 2 0 V で展開した 1 . 0 mm トリス-グリシン 4 ~ 2 0 % S D S - P A G E (Novex) 上での抗体分析を示す。レーンを以下のとおり負荷した (左から右) : (図 1 2 A) : レーン 1、Novex Mark 1 2 標準 ; レーン 2、a D N P 3 A 1 A b 0 . 5 μ g ; レーン 3、a D N P 3 A 4 A b 0 . 5 μ g ; レーン 4、a D N P 3 C 2 A b 0 . 5 μ g ; レーン 5、a K L H 1 2 0 . 6 A b 0 . 5 μ g ; レーン 6、Novex Mark 1 2 標準 ; レーン 7、a D N P 3 A 1 A b 5 μ g ; レーン 8、a D N P 3 A 4 A b 5 μ g ; レーン 9、a D N P 3 C 2 A b 5 μ g ; レーン 1 0、a K L H 1 2 0 . 6 A b 5 μ g ; (図 1 2 B) : レーン 1、Novex Mark 1 2 標準 ; レーン 2、a D N P 3 B 1 A b 0 . 5 μ g ; レーン 3、ブランク ; レーン 4、Novex Mark 1 2 標準 ; レーン 5、a D N P 3 B 1 A b 5 μ g 。

【図 1 2 B】非還元負荷緩衝液および Quick Blue (Boston Biologicals) による染色を用いて 2 2 0 V で展開した 1 . 0 mm トリス-グリシン 4 ~ 2 0 % S D S - P A G E (Novex) 上での抗体分析を示す。レーンを以下のとおり負荷した (左から右) : (図 1 2 A) : レーン 1、Novex Mark 1 2 標準 ; レーン 2、a D N P 3 A 1 A b 0 . 5 μ g ; レーン 3、a D N P 3 A 4 A b 0 . 5 μ g ; レーン 4、a D N P 3 C 2 A b 0 . 5 μ g ; レーン 5、a K L H 1 2 0 . 6 A b 0 . 5 μ g ; レーン 6、Novex Mark 1 2 標準 ; レーン 7、a D N P 3 A 1 A b 5 μ g ; レーン 8、a D N P 3 A 4 A b 5 μ g ; レーン 9、a D N P 3 C 2 A b 5 μ g ; レーン 1 0、a K L H 1 2 0 . 6 A b 5 μ g ; (図 1 2 B) : レーン 1、Novex Mark 1 2 標準 ; レーン 2、a D N P 3 B 1 A b 0 . 5 μ g ; レーン 3、ブランク ; レーン 4、Novex Mark 1 2 標準 ; レーン 5、a D N P 3 B 1 A b 5 μ g 。

【図 1 3 A】非還元負荷緩衝液および Quick Blue (Boston Biologicals) による染色を用いて 2 2 0 V で展開した 1 . 0 mm トリス-グリシン 4 ~ 2 0 % S D S - P A G E (Novex) 上での抗体分析を示す。レーンを以下のとおり負荷した (左から右) : レーン 1、Novex Mark 1 2 標準 ; レーン 2、ブランク ; レーン 3、a D N P 3 B 1 A b 0 . 2 μ g ; レーン 4、a D N P 3 A 1 A b 0 . 2 μ g ; レーン 5、ブランク ; レーン 6、a D N P 3 B 1 A b 0 . 6 μ g ; レーン 7、a D N P 3 A 1 A b 0 . 6 μ g ; レーン 8、ブランク ; レーン 9、a D N P 3 B 1 A b 1 . 8 μ g ; レーン 1 0、a D N P 3 A 1 A b 1 . 8 μ g 。

【図 1 3 B】非還元負荷緩衝液および Quick Blue (Boston Biologicals) による染色を用いて 2 2 0 V で展開した 1 . 0 mm ビス-トリス 4 ~ 1 2 % N u P A G E (Novex) 上での抗体分析を示す ; レーンを以下のとおり負荷した (左から右) : : レーン 1、Novex Mark 1 2 標準 ; レーン 2、ブランク ; レーン 3、a D N P 3 B 1 A b 0 . 2 μ g ; レーン 4、a D N P 3 A 1 A b 0 . 2 μ g ; レーン 5、ブランク ; レーン 6、a D N P 3 B 1 A b 0 . 6 μ g ; レーン 7、a D N P 3 A 1 A b 0 . 6 μ g ; レーン 8、ブランク ; レーン 9、a D N P 3 B 1 A b 1 . 8 μ g ; レーン 1 0、a D N P 3 A 1 A b 1 . 8 μ g 。

【図 1 4 A】非還元負荷緩衝液および Quick Blue (Boston Biologicals) による染色を用いて 2 2 0 V で展開した 1 . 0 mm トリス-グリシン 4 ~ 2 0 % S D S - P A G E (Novex) 上での抗体分析を示す。レーンを以下のとおり負荷した (左から右) : (図 1 4 A : 0 . 1 % S D S の流れる緩衝液) : レーン 1、Novex Mark 1 2 標準 ; レーン 2、a D N P 3 B 1 A b 0 . 5 μ g を室温で 1 0 分間インキュベートした ; レーン 3、a D N P 3 B 1 A b 0 . 5 μ g を 8 5 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした ; レーン 4、a D N P 3 B 1 A b 0 . 5 μ g を 1 0 0 $^{\circ}$ C で 1 0 分間インキュベートした ; レーン 5、ブランク ; レーン 6、a D N P 3 B 1 A b 1 μ g を室温で 1 0 分間イ

10

20

30

40

50

ンキュベートした；レーン7、aDNP3B1Ab1 μ gを85℃で5分間インキュベートした；レーン8、aDNP3B1Ab1 μ gを100℃で10分間インキュベートした；（図14B：0.4%SDSの流れる緩衝液；85℃で5分間処置）：レーン1、Novex Mark12標準、レーン2、ブランク；レーン3、aDNP3B1Ab0.25 μ g；レーン4、ブランク；レーン5、aDNP3B1Ab0.5 μ g；レーン6、ブランク；レーン7、aDNP3B1Ab1.0 μ g；レーン8、ブランク；レーン9、aDNP3B1Ab2.0 μ g。

【図14B】非還元負荷緩衝液およびQuickBlue (Boston Biologicals) による染色を用いて220Vで展開した1.0mmトリスーグリシン4~20%SDS-PAGE (Novex) 上での抗体分析を示す。レーンを以下のとおり負荷した（左から右）：（図14A：0.1%SDSの流れる緩衝液）：レーン1、Novex Mark12標準；レーン2、aDNP3B1Ab0.5 μ gを室温で10分間インキュベートした；レーン3、aDNP3B1Ab0.5 μ gを85℃で5分間インキュベートした；レーン4、aDNP3B1Ab0.5 μ gを100℃で10分間インキュベートした；レーン5、ブランク；レーン6、aDNP3B1Ab1 μ gを室温で10分間インキュベートした；レーン7、aDNP3B1Ab1 μ gを85℃で5分間インキュベートした；レーン8、aDNP3B1Ab1 μ gを100℃で10分間インキュベートした；（図14B：0.4%SDSの流れる緩衝液；85℃で5分間処置）：レーン1、Novex Mark12標準、レーン2、ブランク；レーン3、aDNP3B1Ab0.25 μ g；レーン4、ブランク；レーン5、aDNP3B1Ab0.5 μ g；レーン6、ブランク；レーン7、aDNP3B1Ab1.0 μ g；レーン8、ブランク；レーン9、aDNP3B1Ab2.0 μ g。

【図15】100mMリン酸ナトリウム、250mM NaCl (pH6.8)の移動相（流速0.5mL/分）に乗せる連続する2つのサイズ排除カラム（TSK-GEL G3000SWXL、5mm粒径、7.8×300mm、Tosoh Bioscience、08541）を用いた抗体DNP 3A1（「3A1」、肩の後ろでより濃いトレース）；aDNP3B1（「3B1」）；aKLH120.6（「aKLH」）；aDNP3C2（「3C2」）、およびaDNP3A4（「3A4」）の分析を示す。

【図16】光曝露の前および3週間後、100mMリン酸ナトリウム、250mM NaCl (pH6.8)の移動相（流速0.5mL/分）に乗せる連続する2つのサイズ排除カラム（TSK-GEL G3000SWXL、5mm粒径、7.8×300mm、Tosoh Bioscience、08541）を用いた抗体DNP 3A1（「3A1」）、aDNP3C2（「3C2」）およびDNP-3A4の分析を示す。

【図17A】光曝露の前（図17A）および2日後（図17B）における、100mMリン酸ナトリウム、250mM NaCl (pH6.8)の移動相（流速0.5mL/分）に乗せる連続する2つのサイズ排除カラム（TSK-GEL G3000SWXL、5mm粒径、7.8×300mm、Tosoh Bioscience、08541）を用いた抗体DNP 3A4、aDNP3A4-Y（「W1010Y」）、aDNP3A4-F（「W101F」）、aDNP3A4 YSS（「W101Y/CCSS」）、およびaDNP-3A4-FSS（「W101F/CCSS」）の分析を示す。

【図17B】光曝露の前（図17A）および2日後（図17B）における、100mMリン酸ナトリウム、250mM NaCl (pH6.8)の移動相（流速0.5mL/分）に乗せる連続する2つのサイズ排除カラム（TSK-GEL G3000SWXL、5mm粒径、7.8×300mm、Tosoh Bioscience、08541）を用いた抗体DNP 3A4、aDNP3A4-Y（「W1010Y」）、aDNP3A4-F（「W101F」）、aDNP3A4 YSS（「W101Y/CCSS」）、およびaDNP-3A4-FSS（「W101F/CCSS」）の分析を示す。

【図18】aDNP抗体（aDNP-3A4、aDNP-3A4-Y、aDNP-3A4-F、aDNP-3A4-YSSおよびaDNP-3A4-FSS）のイオン交換分析を示す。これらの均一性について、Tosoh Haas SP-5PWカラム（10 μ m粒子

10

20

30

40

50

、7.5 mm ID×7.5 cm長)を用いて、緩衝液A(10 mM酢酸ナトリウム、pH 5.0)および緩衝液B(10 mM酢酸ナトリウム、600 mM NaCl、pH 5.0)をプログラム化直線勾配(1分0%B、10分35%B、30分70%B、3分90%Bおよび3分0%B)で1 mL/分で流して、分析した。

【図19A】非還元CE-SDSによるaDNP3B1(図19A)、aDNP3A4-F(図19B)、およびaDNP3A4-FSS(図19C)抗体の分析を示す(吸光度220 nmでの検出)。裸のフューズドシリカキャピラリー50 μm×30.2 cmを分離分析のために用いた。

【図19B】非還元CE-SDSによるaDNP3B1(図19A)、aDNP3A4-F(図19B)、およびaDNP3A4-FSS(図19C)抗体の分析を示す(吸光度220 nmでの検出)。裸のフューズドシリカキャピラリー50 μm×30.2 cmを分離分析のために用いた。

【図19C】非還元CE-SDSによるaDNP3B1(図19A)、aDNP3A4-F(図19B)、およびaDNP3A4-FSS(図19C)抗体の分析を示す(吸光度220 nmでの検出)。裸のフューズドシリカキャピラリー50 μm×30.2 cmを分離分析のために用いた。

【図20A】還元CE-SDSによるaDNP3B1(図20A)、aDNP3A4-F(図20B)、およびaDNP3A4-FSS(図20C)抗体の分析を示す(吸光度220 nmでの検出)。裸のフューズドシリカキャピラリー50 μm×30.2 cmを分離分析のために用いた。

【図20B】還元CE-SDSによるaDNP3B1(図20A)、aDNP3A4-F(図20B)、およびaDNP3A4-FSS(図20C)抗体の分析を示す(吸光度220 nmでの検出)。裸のフューズドシリカキャピラリー50 μm×30.2 cmを分離分析のために用いた。

【図20C】還元CE-SDSによるaDNP3B1(図20A)、aDNP3A4-F(図20B)、およびaDNP3A4-FSS(図20C)抗体の分析を示す(吸光度220 nmでの検出)。裸のフューズドシリカキャピラリー50 μm×30.2 cmを分離分析のために用いた。

【図21】aDNP-3A4-F(点線曲線)、aDNP-3A4-FSS(実曲線)およびaDNP-3B1(破線曲線)抗体試料を20℃から95℃に1℃/分で加熱し、Micra VP-DSCを用いたDSC分析を示す。10 mM酢酸ナトリウム、9%ショ糖(pH 5.0)中タンパク質濃度は0.5 mg/mLであった。

【図22】aDNP3A4-F、aDNP3A4-FSS、およびaDNP3B1抗体を5 mg/kg単回皮下注射したラットにおいてELISAにより決定した各抗体の血清濃度を示す。投与後0、0.25、1、4、24、48、72、96、168、336、504、672、840および1008時間に血液試料を採取した。

【図23】aDNP3A4(4 mg/kg)またはaKLH120.6(3 mg/kg)抗体をそれぞれボーラス静脈内注射した雄カニクイザルにおけるaDNP3A4またはaKLH120.6の血漿濃度を示す。血清試料を定期的に採取して抗体の血漿濃度をELISAにより決定した。aDNP3A4のデータを比較のため3 mg/kgに正規化した。

【図24】実施例4に記載の最終1価aKLH120.6 LC-ShK[1-35、Q16K]Ab生成物のクーマシーブリリアントブルーで着色したトリス-グリシン4~20% SDS-PAGEを示す。レーン1~12を以下のとおり負荷した：レーン1：Novex Mark12 広範囲タンパク質標準(10 μL)；レーン2：非還元生成物0.5 μg；レーン3：ブランク；レーン4：非還元生成物2.0 μg；レーン5：ブランク；レーン6：非還元生成物10 μg；レーン7：Novex Mark12 広範囲タンパク質標準(10 μL)；レーン8：還元生成物0.5 μg；レーン9：ブランク；レーン10：還元生成物2.0 μg；レーン11：ブランク；レーン12：還元生成物10 μg。

【図25】Phenomenex BioSep SEC-3000カラム(7.8×3

10

20

30

40

50

00 mm) の 50 mM NaH_2PO_4 、250 mM NaCl 溶液 (pH 6.9) に 1 mL/分で注入 (吸光度 280 nm で検出) した実施例 4 に記載の最終 1 価 aK L H 1 2 0.6 L C - S h K [1-35、Q16 K] A b 生成物 25 μg 上のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図 26 A】窒素レーザー付き Micromass MALDI micro MX 質量分析計を用いた、実施例 4 に記載の 1 価 aK L H 1 2 0.6 L C - S h K [1-35、Q16 K] 生成物の最終試料の非還元 (図 26 A) および還元 (図 26 B) MALDI-MS 質量スペクトル分析を示す。試料を、陽性線状モードで実行した。この機器の電圧を 12 kV で設定して、高質量検出器を 5 kV で設定した。約 200 レーザショットのデータを蓄積して各スペクトルを生成した。分子質量が既知である精製タンパク質を用いて外部物質カリブレーションを成し遂げた。

10

【図 26 B】窒素レーザー付き Micromass MALDI micro MX 質量分析計を用いた、実施例 4 に記載の 1 価 aK L H 1 2 0.6 L C - S h K [1-35、Q16 K] 生成物の最終試料の非還元 (図 26 A) および還元 (図 26 B) MALDI-MS 質量スペクトル分析を示す。試料を、陽性線状モードで実行した。この機器の電圧を 12 kV で設定して、高質量検出器を 5 kV で設定した。約 200 レーザショットのデータを蓄積して各スペクトルを生成した。分子質量が既知である精製タンパク質を用いて外部物質カリブレーションを成し遂げた。

【図 27】実施例 4 に記載の最終 2 価 aK L H 1 2 0.6 L C - S h K [1-35、Q16 K] A b 生成物のクーマシーブリリアントブルーで着色したトリス-グリシン 4~20 % SDS-PAGE を示す。レーン 1~12 を以下のとおり負荷した：レーン 1：Novex Mark12 広範囲タンパク質標準 (10 μL)；レーン 2：非還元生成物 0.5 μg ；レーン 3：ブランク；レーン 4：非還元生成物 2.0 μg ；レーン 5：ブランク；レーン 6：非還元生成物 10 μg ；レーン 7：Novex Mark12 広範囲タンパク質標準 (10 μL)；レーン 8：還元生成物 0.5 μg ；レーン 9：ブランク；レーン 10：還元生成物 2.0 μg ；レーン 11：ブランク；レーン 12：還元生成物 10 μg 。

20

【図 28】Phenomenex BioSep SEC-3000 カラム (7.8 $\times$ 300 mm) の 50 mM NaH_2PO_4 、250 mM NaCl 溶液 (pH 6.9) に 1 mL/分で注入 (吸光度 280 nm で検出) した実施例 4 に記載の最終 2 価 aK L H 1 2 0.6 L C - S h K [1-35、Q16 K] A b 生成物 25 μg 上のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

30

【図 29 A】窒素レーザー付き Micromass MALDI micro MX 質量分析計を用いた、実施例 4 に記載の 2 価 aK L H 1 2 0.6 L C - S h K [1-35、Q16 K] A b 生成物の最終試料の非還元 (図 29 A) および還元 (図 29 B) MALDI-MS 質量スペクトル分析を示す。試料を、陽性線状モードで実行した。この機器の電圧を 12 kV で設定して、高質量検出器を 5 kV で設定した。約 200 レーザショットのデータを蓄積して各スペクトルを生成した。分子質量が既知である精製タンパク質を用いて外部物質カリブレーションを成し遂げた。

【図 29 B】窒素レーザー付き Micromass MALDI micro MX 質量分析計を用いた、実施例 4 に記載の 2 価 aK L H 1 2 0.6 L C - S h K [1-35、Q16 K] A b 生成物の最終試料の非還元 (図 29 A) および還元 (図 29 B) MALDI-MS 質量スペクトル分析を示す。試料を、陽性線状モードで実行した。この機器の電圧を 12 kV で設定して、高質量検出器を 5 kV で設定した。約 200 レーザショットのデータを蓄積して各スペクトルを生成した。分子質量が既知である精製タンパク質を用いて外部物質カリブレーションを成し遂げた。

40

【図 30】実施例 4 に記載の最終 3 価 aK L H 1 2 0.6 L C - S h K [1-35、Q16 K] A b 生成物のクーマシーブリリアントブルーで着色したトリス-グリシン 4~20 % SDS-PAGE を示す。レーン 1~12 を以下のとおり負荷した：レーン 1：Novex Mark12 広範囲タンパク質標準 (10 μL)；レーン 2：非還元生成物 0.5 μg ；レーン 3：ブランク；レーン 4：非還元生成物 2.0 μg ；レーン 5：ブランク；

50

レーン6：非還元生成物10 μ g；レーン7：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μ L）；レーン8：還元生成物0.5 μ g；レーン9：ブランク；レーン10：還元生成物2.0 μ g；レーン11：ブランク；レーン12：還元生成物10 μ g。

【図31】Phenomenex BioSep SEC-3000カラム（7.8 $\times$ 300mm）の50mM NaH₂PO₄、250mM NaCl溶液（pH6.9）に1mL/分で注入（吸光度280nmで検出）した実施例4に記載の最終3価aK L H 1 2 0.6 L C - S h K [1-35、Q16K] Ab生成物25 μ g上のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図32A】窒素レーザ付きMicromass MALDI micro MX質量分析計を用いた、実施例4に記載の3価aK L H 1 2 0.6 L C - S h K [1-35、Q16K] Ab生成物の最終試料の非還元（図32A）および還元（図32B）MALDI-MS質量スペクトル分析を示す。試料を、陽性線状モードで実行した。この機器の電圧を12kVで設定して、高質量検出器を5kVで設定した。約200レーザショットのデータを蓄積して各スペクトルを生成した。分子質量が既知である精製タンパク質を用いて外部物質カリブレーションを成し遂げた。

10

【図32B】窒素レーザ付きMicromass MALDI micro MX質量分析計を用いた、実施例4に記載の3価aK L H 1 2 0.6 L C - S h K [1-35、Q16K] Ab生成物の最終試料の非還元（図32A）および還元（図32B）MALDI-MS質量スペクトル分析を示す。試料を、陽性線状モードで実行した。この機器の電圧を12kVで設定して、高質量検出器を5kVで設定した。約200レーザショットのデータを蓄積して各スペクトルを生成した。分子質量が既知である精製タンパク質を用いて外部物質カリブレーションを成し遂げた。

20

【図33】実施例4に記載の最終1価aK L H 1 2 0.6 I g G 2 H C - S h k [1-35、R1A、I4A、Q16K] Ab生成物のクーマシーブリリアントブルーで着色したトリス-グリシン4～20% SDS-PAGEを示す。レーン1～12を以下のとおり負荷した：レーン1：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μ L）；レーン2：非還元生成物0.5 μ g；レーン3：ブランク；レーン4：非還元生成物2.0 μ g；レーン5：ブランク；レーン6：非還元生成物10 μ g；レーン7：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μ L）；レーン8：還元生成物0.5 μ g；レーン9：ブランク；レーン10：還元生成物2.0 μ g；レーン11：ブランク；レーン12：還元生成物10 μ g。

30

【図34】Phenomenex BioSep SEC-3000カラム（7.8 $\times$ 300mm）の50mM NaH₂PO₄、250mM NaCl溶液（pH6.9）に1mL/分で注入（吸光度280nmで検出）した実施例4に記載の最終1価aK L H 1 2 0.6 I g G 2 H C - S h k [1-35、R1A、I4A、Q16K] Ab生成物25 μ g上のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図35】実施例4に記載の1価aK L H 1 2 0.6 I g G 2 H C - S h K [1-35、R1A、I4A、Q16K] Ab生成物の最終試料における重鎖の還元LC-MS質量スペクトル分析を示す。生成物をWaters社製ACQUITY UPLCシステムを用いてWaters社製MassPREPマイクロ脱塩カラムを介してクロマトグラフ化した。カラムを80℃で設定して、0.1%ギ酸中でアセトニトリル濃度を増大する直線勾配を用いてタンパク質を溶出した。質量分析のためWaters社製LC-MS Premier ESI-TOF質量分析計にカラム流出の一部を流用した。この機器を陽性Vモードで作動した。キャピラリー電圧を3,200Vで、コーン電圧を80Vで設定した。質量スペクトルを800～3000m/zで獲得し、機器製造業者の提供するMaxEnt1ソフトウェアを用いて逆重畳した。

40

【図36】実施例11に記載の最終aK L H 1 2 0.6 I g G 2 H C - C 6 8 1 A b 生成物のクーマシーブリリアントブルーで着色したトリス-グリシン4～20% SDS-PAGEを示す。レーン1～12を以下のとおり負荷した：レーン1：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μ L）；レーン2：非還元生成物0.5 μ g；レーン

50

3：ブランク；レーン4：非還元生成物2.0 μg ；レーン5：ブランク；レーン6：非還元生成物10 μg ；レーン7：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μL ）；レーン8：還元生成物0.5 μg ；レーン9：ブランク；レーン10：還元生成物2.0 μg ；レーン11：ブランク；レーン12：還元生成物10 μg 。

【図37】Phenomenex BioSep SEC-3000カラム（7.8 $\times$ 300 mm）の50 mM NaH_2PO_4 、250 mM NaCl 溶液（pH 6.9）に1 mL/分で注入（吸光度280 nmで検出）した実施例11に記載の最終aKLH120.6 IgG2 HC-C681Ab生成物25 μg 上のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図38A】窒素レーザ付きMicromass MALDI micro MX質量分析計を用いた、実施例11に記載のaKLH120.6 IgG2 HC-C681生成物の最終試料の非還元（図38A）および還元（図38B）MALDI-MS質量スペクトル分析を示す。試料を、陽性線状モードで実行した。この機器の電圧を12 kVで設定して、高質量検出器を5 kVで設定した。約200レーザショットのデータを蓄積して各スペクトルを生成した。分子質量が既知である精製タンパク質を用いて外部物質カリブレーションを成し遂げた。

【図38B】窒素レーザ付きMicromass MALDI micro MX質量分析計を用いた、実施例11に記載のaKLH120.6 IgG2 HC-C681生成物の最終試料の非還元（図38A）および還元（図38B）MALDI-MS質量スペクトル分析を示す。試料を、陽性線状モードで実行した。この機器の電圧を12 kVで設定して、高質量検出器を5 kVで設定した。約200レーザショットのデータを蓄積して各スペクトルを生成した。分子質量が既知である精製タンパク質を用いて外部物質カリブレーションを成し遂げた。

【図39】Phenomenex BioSep SEC-3000カラム（7.8 $\times$ 300 mm）の50 mM NaH_2PO_4 、250 mM NaCl 溶液（pH 6.9）に1 mL/分で注入（吸光度280 nmで検出）した実施例9に記載の各aKLH IgG1（N297Q）、AMP5-HC aKLH IgG2、HC-AMP5 aKLH IgG2、AMP5-LC aKLH IgG1およびLC-AMP5 aKLH IgG1）生成物50 μg 上のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

【図40A】非還元負荷緩衝液およびQuickBlue（Boston Biologicals）による染色を用いて220 Vで展開した1.0 mmトリス-グリシン4～20% SDS-PAGE（Novex）上での（実施例9に記載の）aKLH IgG1 N297Q（図40A）、AMP5-HC aKLH IgG2（図40B）、LC-AMP5 aKLH IgG2（図40C）、HC-AMP5 aKLH IgG2（図40D）、およびAMP5-LC aKLH IgG1（図40E）抗体の分析を示す。レーン1～12を以下のとおり負荷した：レーン1：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μL ）；レーン2：非還元生成物0.5 μg ；レーン3：ブランク；レーン4：非還元生成物2.0 μg ；レーン5：ブランク；レーン6：非還元生成物10 μg ；レーン7：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μL ）；レーン8：還元生成物0.5 μg ；レーン9：ブランク；レーン10：還元生成物2.0 μg ；レーン11：ブランク；レーン12：還元生成物10 μg 。

【図40B】非還元負荷緩衝液およびQuickBlue（Boston Biologicals）による染色を用いて220 Vで展開した1.0 mmトリス-グリシン4～20% SDS-PAGE（Novex）上での（実施例9に記載の）aKLH IgG1 N297Q（図40A）、AMP5-HC aKLH IgG2（図40B）、LC-AMP5 aKLH IgG2（図40C）、HC-AMP5 aKLH IgG2（図40D）、およびAMP5-LC aKLH IgG1（図40E）抗体の分析を示す。レーン1～12を以下のとおり負荷した：レーン1：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μL ）；レーン2：非還元生成物0.5 μg ；レーン3：ブランク；レーン4：非還元生成物2.0 μg ；レーン5：ブランク；レーン6：非還元生成物10 μg

；レーン7：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μ L）；レーン8：還元生成物0.5 μ g；レーン9：ブランク；レーン10：還元生成物2.0 μ g；レーン11：ブランク；レーン12：還元生成物10 μ g。

【図40C】非還元負荷緩衝液およびQuickBlue（Boston Biologicals）による染色を用いて220Vで展開した1.0mmトリスーグリシン4～20%SDS-PAGE（Novex）上での（実施例9に記載の）aK L H I g G 1 N 2 9 7 Q（図40A）、AMP5-HC aK L H I g G 2（図40B）、LC-AMP5 aK L H I g G 2（図40C）、HC-AMP5 aK L H I g G 2（図40D）、およびAMP5-LC aK L H I g G 1（図40E）抗体の分析を示す。レーン1～12を以下のとおり負荷した：レーン1：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μ L）；レーン2：非還元生成物0.5 μ g；レーン3：ブランク；レーン4：非還元生成物2.0 μ g；レーン5：ブランク；レーン6：非還元生成物10 μ g；レーン7：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μ L）；レーン8：還元生成物0.5 μ g；レーン9：ブランク；レーン10：還元生成物2.0 μ g；レーン11：ブランク；レーン12：還元生成物10 μ g。

【図40D】非還元負荷緩衝液およびQuickBlue（Boston Biologicals）による染色を用いて220Vで展開した1.0mmトリスーグリシン4～20%SDS-PAGE（Novex）上での（実施例9に記載の）aK L H I g G 1 N 2 9 7 Q（図40A）、AMP5-HC aK L H I g G 2（図40B）、LC-AMP5 aK L H I g G 2（図40C）、HC-AMP5 aK L H I g G 2（図40D）、およびAMP5-LC aK L H I g G 1（図40E）抗体の分析を示す。レーン1～12を以下のとおり負荷した：レーン1：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μ L）；レーン2：非還元生成物0.5 μ g；レーン3：ブランク；レーン4：非還元生成物2.0 μ g；レーン5：ブランク；レーン6：非還元生成物10 μ g；レーン7：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μ L）；レーン8：還元生成物0.5 μ g；レーン9：ブランク；レーン10：還元生成物2.0 μ g；レーン11：ブランク；レーン12：還元生成物10 μ g。

【図40E】非還元負荷緩衝液およびQuickBlue（Boston Biologicals）による染色を用いて220Vで展開した1.0mmトリスーグリシン4～20%SDS-PAGE（Novex）上での（実施例9に記載の）aK L H I g G 1 N 2 9 7 Q（図40A）、AMP5-HC aK L H I g G 2（図40B）、LC-AMP5 aK L H I g G 2（図40C）、HC-AMP5 aK L H I g G 2（図40D）、およびAMP5-LC aK L H I g G 1（図40E）抗体の分析を示す。レーン1～12を以下のとおり負荷した：レーン1：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μ L）；レーン2：非還元生成物0.5 μ g；レーン3：ブランク；レーン4：非還元生成物2.0 μ g；レーン5：ブランク；レーン6：非還元生成物10 μ g；レーン7：Novex Mark12広範囲タンパク質標準（10 μ L）；レーン8：還元生成物0.5 μ g；レーン9：ブランク；レーン10：還元生成物2.0 μ g；レーン11：ブランク；レーン12：還元生成物10 μ g。

【図41A】実施例9に記載の還元試料LC-AMP5 aK L H I g G 2（図41A）、AMP5-HC aK L H I g G 2（図41B）、HC-AMP5 aK L H I g G 2（図41C）、およびAMP5-LC aK L H I g G 1（図41D）の質量分光分析を示す。各試料をWaters社製Massprepマイクロ脱塩カラム（2.1 $\times$ 5mm）を介してAcquity UPLC systemを用いてクロマトグラフ化してから、質量測定のためにWaters社製飛行時間型LC T premier質量分析計に導入し、質量スペクトルをMaxEnt1ソフトウェアを用いて逆重畳した。

【図41B】実施例9に記載の還元試料LC-AMP5 aK L H I g G 2（図41A）、AMP5-HC aK L H I g G 2（図41B）、HC-AMP5 aK L H I g G 2（図41C）、およびAMP5-LC aK L H I g G 1（図41D）の質量分光分析を示す。各試料をWaters社製Massprepマイクロ脱塩カラム（2.1 $\times$

5 mm) を介して *Acquity UPLC system* を用いてクロマトグラフ化してから、質量測定のために *Waters* 社製飛行時間型 *LCT premier* 質量分析計に導入し、質量スペクトルを *MaxEnt 1* ソフトウェアを用いて逆重畳した。

【図 4 1 C】実施例 9 に記載の還元試料 *LC-AMP5 aK L H I g G 2* (図 4 1 A)、*AMP5-HC aK L H I g G 2* (図 4 1 B)、*HC-AMP5 aK L H I g G 2* (図 4 1 C)、および *AMP5-LC aK L H I g G 1* (図 4 1 D) の質量分光分析を示す。各試料を *Waters* 社製 *Massprep* マイクロ脱塩カラム (2.1 × 5 mm) を介して *Acquity UPLC system* を用いてクロマトグラフ化してから、質量測定のために *Waters* 社製飛行時間型 *LCT premier* 質量分析計に導入し、質量スペクトルを *MaxEnt 1* ソフトウェアを用いて逆重畳した。

10

【図 4 1 D】実施例 9 に記載の還元試料 *LC-AMP5 aK L H I g G 2* (図 4 1 A)、*AMP5-HC aK L H I g G 2* (図 4 1 B)、*HC-AMP5 aK L H I g G 2* (図 4 1 C)、および *AMP5-LC aK L H I g G 1* (図 4 1 D) の質量分光分析を示す。各試料を *Waters* 社製 *Massprep* マイクロ脱塩カラム (2.1 × 5 mm) を介して *Acquity UPLC system* を用いてクロマトグラフ化してから、質量測定のために *Waters* 社製飛行時間型 *LCT premier* 質量分析計に導入し、質量スペクトルを *MaxEnt 1* ソフトウェアを用いて逆重畳した。

【図 4 2】実施例 10 に記載のエキセンディン-4 (「*Ex 4*」) -1 k G-aK L H 1 2 0. 6 L C 融合構築物の図式マップである。

【図 4 3】*Phenomenex BioSep SEC-3000* カラム (7.8 × 300 mm) の 50 mM *NaH₂PO₄*、250 mM *NaCl* 溶液 (pH 6.9) に 1 mL/分で注入 (吸光度 280 nm で検出) した実施例 10 に記載の最終 *Ex 4-1 k G-aK L H 1 2 0. 6 L C* 抗体融合物 25 μg のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

20

【図 4 4】還元および非還元負荷緩衝液ならびに *QuickBlue (Boston Biologics)* による染色を用いて 220 V で展開した 1.0 mm トリス-グリシン 4 ~ 20 % SDS-PAGE (*Novex*) 上での分析を示す。レーン 1 ~ 10 を以下のとおり負荷した：レーン 1 : *Novex Mark 12* 広範囲タンパク質標準 (10 μL)；レーン 2 : 他のタンパク質 0.5 μg；レーン 3 : 非還元 *Ex 4-aK L H 1 2 0. 6 A b 0. 5 μg*；レーン 4 : 他のタンパク質 2.0 μg、レーン 5 : 非還元 *Ex 4-aK L H 1 2 0. 6 A b 2. 0 μg*；レーン 6 : *Novex Mark 12* 広範囲タンパク質標準 (10 μL)；レーン 7 : 他のタンパク質 0.5 μg；レーン 8 : 還元 *Ex 4-aK L H 1 2 0. 6 A b 0. 5 μg*；レーン 9 : 他のタンパク質 2.0 μg、レーン 10 : 還元 *Ex 4-aK L H 1 2 0. 6 A b 2. 0 μg*。

30

【図 4 5】実施例 9 にさらに例示する、本発明の抗体の HC および LC 単量体の薬理学的に活性な化学部分の N 末端および C 末端融合物の図解を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本明細書で使用する項目の表題は、構成上の目的にすぎず、記載の対象物を限定するものとは解釈されない。

【0019】

定義

本明細書において別段の定めがない限り、本出願に関連して使用する科学用語および専門用語は、当業者によって一般的に理解されている意味を有する。さらに、文脈において別段の必要がない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含む。したがって、本明細書および添付の特許請求の範囲で使用する単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈上ははっきりと別段の指摘がされない限り、複数形の指示対象を含む。例えば、「タンパク質 (a protein)」という言葉及は複数のタンパク質を含む；「細胞 (a cell)」という言葉及は複数の細胞集団を含む。

【0020】

「ポリペプチド」と「タンパク質」は本明細書で同義的に使用し、ペプチド結合を介し

50

て共有結合した2つ以上のアミノ酸の分子鎖を含む。この用語は特定の長さの生成物を指さない。したがって、「ペプチド」、および「オリゴペプチド」は、ポリペプチドの定義に含まれる。この用語は、ポリペプチドの翻訳後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などを含む。加えて、タンパク質断片、アナログ、変異または変異型タンパク質（融合タンパク質など）は、ポリペプチドの意味に含まれる。この用語は、1つもしくは複数のアミノ酸アナログまたは非限界もしくは非天然アミノ酸が既知のタンパク質工学技術を用いて組換え発現できる分子も含む。加えて、本明細書に記載の融合タンパク質を周知の有機化学技術により誘導体化できる。

【0021】

「単離タンパク質」という用語は、標的タンパク質が（1）通常、天然で見出される他のタンパク質の少なくとも一部を欠く、（2）同じ供給源由来、例えば、同種由来の他のタンパク質を本質的に欠く、（3）異なる種（species or kind）の細胞により組換え発現している、（4）少なくとも約50%のポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、または天然で結合している他の物質から分離している、（5）天然で結合していないポリペプチドと（共有結合または非共有結合の相互作用により）操作可能に連結している、ならびに／または（6）天然で生じない、ことを意味する。典型的には、「単離タンパク質」は、所定の試料の少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約25%、または少なくとも約50%を構成する。合成起点のゲノムDNA、cDNA、mRNAもしくは他のRNA、またはそれらの任意の組み合わせがかかる単離タンパク質をコードし得る。好ましくは、単離タンパク質は、その治療的、診断的、予防的、研究もしくは他の使用を妨害し得るタンパク質もしくはポリペプチド、または自然環境に見出される他の汚染物質が実質的にない。

【0022】

ポリペプチド（例えば、抗原結合タンパク質、または抗体）の「変異型」は、別のポリペプチド配列と比較して、1つまたは複数のアミノ酸残基がアミノ酸配列内に挿入されている、アミノ酸配列から欠失しているおよび／またはアミノ酸配列内に置換されているアミノ酸配列を含む。変異体は、融合タンパク質を含む。

【0023】

「融合タンパク質」という用語は、複数の親タンパク質またはポリペプチドに由来するポリペプチド成分を含むタンパク質を示す。典型的には、融合タンパク質は、1つのタンパク質に由来するポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列がインフレームで付加されている融合遺伝子から発現しており、異なるタンパク質由来のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列から任意選択的にリンカーにより分離されている。融合遺伝子は次いで組換え宿主細胞により単一のタンパク質として発現できる。

【0024】

「分泌された」タンパク質とは、分泌シグナルペプチド配列の結果としてER、分泌小胞、または細胞外空間を指向できるタンパク質、ならびにシグナル配列を含む必要なく細胞外空間内へ放出されるタンパク質を指す。分泌されたタンパク質が細胞外空間に放出される場合、分泌されたタンパク質は「成熟」タンパク質を産生する細胞外プロセスを経ることができる。細胞外空間内への放出は、エキソサイトーシスおよびタンパク分解切断を含む多くの機序により生じ得る。本発明の組成物の一部の他の実施形態では、毒素ペプチドアナログは分泌されたタンパク質として宿主細胞により合成でき、次いで細胞外空間および／または培地からさらに精製できる。

【0025】

本明細書で使用する「溶解性」とは、組換えDNA技術により宿主細胞内に産生されたタンパク質について言及する場合、水溶液中に存在するタンパク質である；タンパク質がツイン-アルギニンシグナルアミノ酸配列を含む場合、溶解性タンパク質はグラム陰性細菌宿主内で細胞膜周辺腔にエクスポートされるか、または分泌可能な真核宿主細胞により、または適切な遺伝子（例えば、kil遺伝子）を有する細菌宿主により培養基内に分泌される。したがって、溶解性タンパク質は、宿主細胞内の封入体に見出されないタンパク

質である。あるいは、溶解性タンパク質は、文脈により、細胞膜への統合が見出されないタンパク質である；対して、不溶性タンパク質は、宿主細胞内の細胞質果粒（封入体と呼ばれる）に変性形態で存在するか、またはこれも文脈により、不溶性タンパク質は、細胞膜（細胞質膜、糸粒体膜、葉緑体膜、小胞体膜などが挙げられるが、これらに限定されない）に存在するものである。

【0026】

「組換え」という用語は、ヒトの介入により物質（例えば、核酸またはポリペプチド）が人工的にまたは合成的に（すなわち、非天然）改変されていることを示す。改変は、自然環境もしくは状態における物質上で行うこともでき、自然環境もしくは状態から除去した物質上で行うこともできる。例えば、「組換え核酸」とは、核酸の組換え、例えば、クローニング中、DNA混合または他の周知の分子生物学的手段により作製されるものである。かかる分子生物学的手段の例は、Maniatis et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N. Y (1982)に見出される。「組換えDNA分子」は、かかる分子生物学的技术により結合したDNAセグメントを含む。本明細書で使用する「組換えタンパク質」または「組換えポリペプチド」という用語は、組換えDNA分子を用いて発現するタンパク質分子を指す。「組換え宿主細胞」とは、組換え核酸を含むおよび／または発現する細胞である。

10

【0027】

「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、2つ以上のヌクレオチド残基を含む単鎖ヌクレオチドポリマーと二重鎖ヌクレオチドポリマーの両方を含む。ポリヌクレオチドを含むヌクレオチド残基は、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチド、またはいずれかのヌクレオチドタイプの修飾形態であり得る。前記修飾としては、塩基修飾（プロモウリジンおよびイノシン誘導体など）、リボース修飾（2', 3'-ジデオキシリボースなど）、およびヌクレオチド結合間修飾（ホスホロチオアート、ジチオリン酸、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニーロチオエート、ホスホルアニラデートおよびホスホロアミデートなど）が挙げられる。

20

【0028】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、200個以下のヌクレオチド残基を含むポリヌクレオチドを意味する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの長さは、10～60塩基である。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドの長さは、12、13、14、15、16、17、18、19、または20～40個のヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは単鎖であってもよく、二重鎖であってもよい（例えば、変異遺伝子の構築における使用のため）。オリゴヌクレオチドはセンスであってもよく抗センスオリゴヌクレオチドであってもよい。オリゴヌクレオチドは、検出アッセイのために放射標識、蛍光標識、ハプテンまたは抗原標識などの標識を含むことができる。オリゴヌクレオチドは、例えば、PCRプライマー、クローニングプライマーまたはハイブリッド化プローブとして用いてよい。

30

【0029】

「ポリヌクレオチド配列」または「ヌクレオチド配列」または「核酸配列」とは、本明細書で同義的に使用し、ポリヌクレオチド（オリゴヌクレオチド、DNA、およびRNA、核酸、または文字列を含む）におけるヌクレオチド残基の一次配列であり、文脈によりヌクレオチド残基の一次配列を表す。任意の特定のポリヌクレオチド配列から、所定の核酸または相補性ポリヌクレオチド配列のいずれかを決定できる。単鎖の場合も二重鎖の場合もあるゲノムまたは合成起点のDNAまたはRNAを含み、センス鎖もしくは抗センス鎖を表す。別段の指定のない限り、本明細書で論じる任意の単鎖ポリヌクレオチド配列の左端は5'末端である；二重鎖ポリヌクレオチド配列の左方向は5'方向と呼ぶ。新生RNA転写物の添加の5'から3'方向を転写方向と呼ぶ；RNA転写物の5'から5'末端のRNA転写物と同じ配列を有するDNA鎖上の配列領域は、DNA鎖上の「上流配列」

40

50

、配列領域と呼び、RNA転写物の3'末端への3'であるRNA転写物は「下流配列」と呼ばれるRNA転写物と同じ配列を有する。

【0030】

本明細書で使用する「単離核酸分子」または「単離核酸配列」とは、(1)通常、天然の核酸供給源と結合している少なくとも1つの汚染核酸分子から同定および分離されている、または(2)目的の核酸配列を決定できるようにクローン化、増幅、タグ化、あるいは背景核酸から区別されている、のいずれかの核酸分子である。単離核酸分子は、天然で見出される形態または状態以外である。しかしながら、単離核酸分子は、例えば、核酸分子の染色体位置が天然細胞と異なる抗原結合タンパク質(例えば、抗体)を通常、発現する細胞内に含まれる核酸分子を含む。

10

【0031】

本明細書で使用する「核酸分子コーディング」、「DNA配列コーディング」、および「DNAコーディング」という用語は、デオキシリボ核酸の一本鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順または配列を指す。これらのデオキシリボヌクレオチド順は、mRNA鎖に沿ったリボヌクレオチド順を決定し、ポリペプチド(タンパク質)鎖に沿ったアミノ酸順も決定する。DNA配列はしたがってRNA配列およびアミノ酸配列をコードする。

【0032】

広義に使用する「遺伝子」という用語は、生体機能と関連した任意の核酸を指す。典型的には遺伝子は、かかるコード配列の発現のために必要なコード配列および/または調節配列を含む。「遺伝子」という用語は、特異的ゲノムもしくは組換え配列、ならびにその配列によりコードされたcDNAもしくはmRNAに適用する。「融合遺伝子」は毒素ペプチドアナログをコードするコード領域を含む。遺伝子は、例えば、他のタンパク質のための認識配列を形成する非発現核酸セグメントも含む。調節タンパク質(転写因子など)に対する転写制御因子を含む非発現調節配列は結合し、隣接または近接配列が転写される。

20

【0033】

「遺伝子の発現」または「核酸の発現」とは、文脈に応じて、DNAのRNA内への転写(任意選択的にRNA修飾、例えば、スプライシングを含む)、RNAのポリペプチド内への翻訳(おそらくは、その後続くポリペプチドの翻訳後修飾を含む)、または転写と翻訳の両方を意味する。

【0034】

本明細書で使用する「コード領域」または「コード配列」という用語は、構造的遺伝子についての言及に使用する場合、mRNA分子の翻訳結果として新生ポリペプチド内に見出されるアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を指す。コード領域は、真核生物において、開始メチオニンをコードするヌクレオチドトリプレット「ATG」により5'側上で結合し、終止コドン(すなわち、TAA、TAG、TGA)のうち1個により3'側で結合する。

30

【0035】

「制御配列」または「制御シグナル」という用語は、特定の宿主細胞内で、結紮するコード配列の発現およびプロセスに影響を与えることができるポリヌクレオチド配列を指す。かかる制御配列の性質は宿主生物によって決定され得る。特定の実施形態では、原核生物のための制御配列は、プロモーター、リボソームの結合部位、および転写終止配列を含み得る。真核生物のための制御配列は、転写因子の1つもしくは複数の認識部位を含むプロモーター、転写エンハンサー配列もしくはエレメント、ポリアデニル化部位、ならびに転写終止配列を含み得る。制御配列は、リーダー配列および/または融合パートナー配列を含み得る。プロモーターおよびエンハンサーは、転写に関わる細胞タンパク質と特異的に相互作用するDNAの短いアレイからなる(Maniatis, et al., Science 236:1237 (1987))。プロモーターおよびエンハンサーエレメントは、酵母、昆虫および哺乳類細胞内の遺伝子ならびにウイルスを含む様々な真核供給源から単離されている(アナログ制御因子、すなわち、プロモーターは原核生物にも見出される)。特定のプロモーターおよびエンハンサーの選択は、目的のタンパ

40

50

ク質を発現するために使用する細胞タイプによって決まる。一部の真核プロモーターおよびエンハンサーは広範な宿主範囲を有する一方、他は細胞タイプの限定的な部分集合において機能性である（総論については、Voss, et al., Trends Biochem. Sci., 11:287 (1986) and Maniatis, et al., Science 236:1237 (1987)を参照されたい）。

【0036】

「ベクター」という用語は、タンパク質コード情報を宿主細胞内に移すために使用する任意の分子または実体（例えば、核酸、プラスミド、バクテリオファージまたはウイルス）を意味する。

【0037】

本明細書で使用する「発現ベクター」または「発現構築物」という用語は、特定の宿主細胞内で操作可能に連結しているコード配列の発現のために必要である所望のコード配列および適切な核酸制御配列を含む組換えDNA分子を指す。発現ベクターは、転写、翻訳に影響を与えるかこれらを制御する配列、およびイントロンが存在する場合、そこに操作可能に連結しているコード領域のRNAスプライシングに影響を与える配列を挙げることができるが、これらに限定されない。原核生物における発現のために必要な核酸配列は、プロモーター、任意選択的にオペレーター配列、リボソーム結合部位およびおそらくは他の配列を含む。真核細胞はプロモーター、エンハンサー、ならびに終止およびポリアダニル化シグナルを利用することが知られている。分泌シグナルペプチド配列は、所望の場合、細胞からの目的のポリペプチド単離をさらに促進するため、発現ポリペプチドが組換え宿主細胞により分泌され得るように、任意選択的に、発現ベクターによりコードされ得、目的のコード配列と操作可能に連結され得る。かかる技術は当技術分野において周知である。（例えば、Goodey, Andrew R.; et al., Peptide and DNA sequences、米国特許第5,302,697号；Weiner et al., Compositions and methods for protein secretion、米国特許第6,022,952号および米国特許第6,335,178号；Uemura et al., Protein expression vector and utilization thereof、米国特許第7,029,909号；Ruben et al., 27 human secreted proteins、米国特許第2003/0104400A1号）。

【0038】

本明細書で使用する「操作可能な組み合わせの」、「操作可能な順の」および「操作可能に連結している」という用語は、所定の遺伝子の転写および／または所望のタンパク質分子の合成を指向できる核酸分子が産生される形の核酸配列の結合を指す。この用語は、機能性タンパク質が産生される形のアミノ酸配列の結合も指す。例えば、タンパク質コード配列に対し「操作可能に連結している」ベクター中の制御配列は、制御配列の転写活性と適合する条件下でタンパク質コード配列が発現するように結紮している。

【0039】

「宿主細胞」という用語は、核酸と形質転換されているか、または形質転換されることができ、それにより目的の遺伝子が発現する細胞を意味する。この用語は、目的の遺伝子が存在する限り、後代が元の親細胞と形態的または遺伝的に同一であるかを問わず、親細胞の後代を含む。大量の利用可能かつ周知の宿主細胞のいずれも本発明の実践に用いてよい。特定宿主の選択は、当技術分野において認識された、いくつかの要因に依存する。これらの要因としては、例えば、選択した発現ベクターとの適合性、DNA分子によりコードされたペプチド毒性、形質転換率、ペプチド回収の容易さ、発現特徴、生体安全性および費用が挙げられる。これらの要因のバランスは、必ずしもすべての宿主が特定のDNA配列の発現のために同様に効果的ではない場合があることの理解を伴わなければならない。これらの一般的なガイドライン内で、培養に有用な微生物宿主細胞としては、細菌（*Escherichia coli* sp. など）、酵母（*Saccharomyces*

10

20

30

40

50

s p. など) および他の真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、哺乳類 (ヒトを含む) 細胞、例えば、CHO細胞およびHEK-293細胞が挙げられる。同様に、DNAレベルで修飾を行うことができる。ペプチドコードDNA配列は、選択した宿主細胞とより適合するコドンに置換し得る。E. coliにおいて、至適化コドンは当技術分野において知られている。コドンは置換して、制限部位を除去するかまたはサイレント制限部位を含むことができ、これは選択した宿主細胞内でDNAプロセスを補助し得る。次に、形質転換した宿主を培養して精製する。宿主細胞は、従来の発酵条件下で所望の化合物が発現するように培養し得る。かかる発酵条件は当技術分野において周知である。

【0040】

「トランスフェクション」という用語は、細胞による外来または外因性DNAの取り込みを意味し、外因性DNAが細胞膜内に導入されている場合、細胞は「トランスフェクト」されている。いくつかのトランスフェクション技術が当技術分野において周知であり、本明細書に開示されている。例えば、Graham et al., 1973, Virology 52:456; Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: 上記A Laboratory Manual; Davis et al., 1986, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier; Chu et al., 1981, Gene 13:197を参照されたい。かかる技術は1つまたは複数の外因性DNAの一部を適切な宿主細胞内に導入するために使用できる。

【0041】

「形質転換」という用語は、細胞の遺伝的特性の変化を指し、新規DNAまたはRNAを含むように修飾されている場合、細胞は形質転換されている。例えば、トランスフェクション、形質導入、または他の技術を介して新規遺伝的物質を導入することによりその天然状態から遺伝的に修飾されている場合、細胞は形質転換されている。トランスフェクションまたは形質導入後、DNAの形質転換は、細胞の染色体内へ物理的に統合することにより細胞のそれと組換えしてもよいし、複製せずにエピソードエレメントとして一時的に維持してもよいし、またはプラスミドとして独立して複製してもよい。DNAの形質転換が細胞分割なしに複製される場合、細胞は「安定的に形質転換している」とみなされる。

【0042】

合成物の「生理的許容可能な塩」、例えば抗原結合タンパク質 (抗体など) の塩とは、医薬上許容可能であることが既知であるかもしくは医薬上許容可能であることが後日見出される任意の塩を意味する。製薬上許容可能な塩の一部の非制限的な例は、酢酸塩; トリフルオロ酢酸塩; ハロゲン化水素 (塩酸塩および臭化水素酸塩など); 硫酸塩; クエン酸塩; マレイン酸塩; 酒石酸塩; グリコール酸塩; グルコン酸塩; コハク酸塩; メシル酸塩; ベシル酸塩; 没食子酸エステル塩 (没食子酸は、3, 4, 5トリヒドロキシ安息香酸としても既知である)、例えば、ペンタガロイルグルコース (PGG) および没食子酸エピガロカテキン (EGCG)、コレステリル硫酸塩、パモ酸塩、タンニン酸塩ならびにシュウ酸塩である。

【0043】

(本明細書で同義的に使用する) タンパク質の「ドメイン」または「領域」とは、タンパク質全体の任意の一部であり、完全なタンパク質も含むが、典型的には不完全なタンパク質を含む。ドメインは、残りのタンパク質鎖と独立して折畳まれることができるおよび/または特定の生物学的、生化学的、もしくは構造的機能もしくは位置 (例えば、リガンド結合ドメイン、または細胞基質、経膜もしくは細胞外ドメイン) と相関し得るが必須ではない。

【0044】

「処置 (treatment)」または「処置 (treating)」とは、障害病理の発現または改変を予防することを意図して実施した介入である。したがって、「処置」は、治療的処置と予防 (prophylactic or preventative) 法の両方を指す。処置を必要としているものとしては、既に障害を呈するものならびに障

10

20

30

40

50

害を予防すべきものが挙げられる。「処置」は、任意の客観的または主観的変数（例えば、症状の軽減；寛解；減少または患者に対してより耐性の損傷、病理もしくは状態の生成；変性速度もしくは低減速度の遅延化；衰弱の少ない最終時点での変性；患者の身体的もしくは精神健康状態の改善を含む）、損傷、病理または状態の改善における成功の任意の適応を含む。症状の処置または改善は客観的変数に基づくこともでき主観的変数に基づくこともできる（身体検査結果、患者による自己報告、精神神経検査、および／または精神医学的評価を含む）。

【0045】

「有効量」とは、一般に、症状の重症度および／もしくは頻度を減らす、症状および／もしくは原病因を除く、症状および／もしくはそれらの原病因の発現の予防、ならびに／または片頭痛に起因するか片頭痛に関連する損傷の改善（improve）もしくは改善（remediate）する上で十分な量である。いくつかの実施形態では、有効量は、治療有効量または予防的有効量である。「治療有効量」とは、疾患状態（例えば、移植拒絶反応またはGVHD、炎症、多発性硬化症、癌、糖尿病、ニューロパシー、疼痛）または症状（1つまたは複数）、特に疾患状態に関連した状態もしくは症状（1つまたは複数）の治療、あるいは疾患状態もしくは疾患に関連した他の任意の望ましくない症状を何らかの形で予防する、妨害する、遅延または逆進行させる（すなわち、「治療効果」を提供する）上で十分な量である。「予防的有効量」とは、対象に投与時、意図した予防効果を有する医薬組成物の量、例えば、片頭痛もしくは多発性硬化症の症状の発現（または再発）を予防もしくは遅延化する、または片頭痛、片頭痛症状、もしくは多発性硬化症症状の発現（または再発）の可能性を低減する。完全な治療または予防効果は必ずしも1回の投与で現れる必要はなく、一連の用量の投与後のみに現れてもよい。したがって、治療的または予防的有効量は、1回または複数回投与してよい。

【0046】

治療目的の「哺乳類」とは、哺乳類として分類される任意の動物を指し、ヒト、家畜、農場動物、および動物園の動物、スポーツ動物、または飼育動物（イヌ、ウマ、ネコ、雌牛、ラット、マウス、サルなど）が挙げられる。好ましくは、哺乳類はヒトである。

【0047】

生物学的物質（ポリペプチド、核酸、宿主細胞など）に関連して本明細書を通して使用する「天然」という用語は、天然で見出される物質を指す。

【0048】

「抗体」、または同義的に「Ab」という用語は、最も広義に使用し、完全に組み立てられた抗体、モノクローナル抗体（ヒト、ヒト化またはキメラ抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および所望の生体活性を示す限り前述の相補性決定領域（CDR）を含む抗原（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、単鎖抗体、ダイアボディ）に結合できる抗体断片を含む。化学的に誘導体化された抗体を含む、インタクト分子および／または断片の多量体または会合体を意図する。IgG、IgM、IgD、IgA、ならびにIgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2を含む、任意のアイソタイプクラスもしくはサブクラスの抗体、または任意のアロタイプを意図する。異なるアイソタイプは異なるエフェクター機能を有する；例えば、IgG1およびIgG3アイソタイプは抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を有する。

【0049】

「抗原結合タンパク質」（ABP）という用語は、上に定義した抗体または抗体断片、所望の抗原結合特性を有するCDRに由来する配列を含む組換えペプチドまたは他の化合物を含む。

【0050】

通常、抗原結合タンパク質（例えば、抗体または抗体断片）は、類似の結合アッセイ条件下における他の未関連タンパク質に対する親和性と比較して、抗原（例えば、キーホールリンベットヘモシアニン（KLH）またはジニトロフェノール（DNP））に対して有

意に高い結合親和性を有する場合、抗原に「特異的に結合する」、およびその結果、その抗原を識別できる。典型的には、抗原結合タンパク質は、解離定数 (K_D) が $\leq 10^{-8}$ M である場合、その標的抗原に「特異的に結合する」と言及される。抗体は K_D が $\leq 5 \times 10^{-9}$ M である場合「高親和性」で抗原と特異的に結合し、 K_D が $\leq 5 \times 10^{-10}$ M である場合「非常に高親和性」で抗原と特異的に結合する。1つの実施形態では、抗体は K L H または D N P に約 10^{-8} M ~ 10^{-10} M の K_D で結合し、さらに別の実施形態では、抗体は $K_D \leq 5 \times 10^{-9}$ で結合する。

【0051】

「抗原結合領域」または「抗原結合部位」とは、特異的な抗原（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H) またはジニトロフェノール (D N P)）と特異的に結合するタンパク質の一部を意味する。例えば、抗原と相互作用するアミノ酸残基を含み、抗原結合タンパク質上で抗原に対するその特異性および親和性を付与する抗原結合タンパク質の一部は、「抗原結合領域」と呼ぶ。典型的には抗原結合領域は1つまたは複数の「相補性結合領域」（「C D R」）を含む。ある抗原結合領域は、1つまたは複数の「フレームワーク」領域（「F R」）も含む。「C D R」とは、抗原結合特異性および親和性に役立つアミノ酸配列である。「フレームワーク」領域は、適切な C D R 立体構造の維持を補助して抗原結合領域と抗原との間の結合を促進することができる。

【0052】

「単離」抗体とは、自然環境、またはその抗体が産生細胞により分泌されている培養基の1つもしくは複数成分から同定され、分離されている抗体である。自然環境または培地の「汚染」成分とは、抗体の診断的または治療的使用を妨害し得る物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質様または非タンパク質様溶質を含み得る。いくつかの実施形態では、(1) 抗体の95重量%を超えるまで、最も好ましくは99重量%を超えるまで、または(2) 任意選択的に染色（例えば、クーマシーブルーまたは銀染色）を用いた還元もしくは非還元条件下で S D S - P A G E による均一性が得られるまで、抗体を精製する。単離された天然抗体には、抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内の原位置抗体が含まれる。しかしながら、典型的には、単離抗体は、少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0053】

本明細書で使用する「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体集団から得られる抗体を指す。すなわち、集団を成す個々の抗体は、少量で存在し得る潜在的な天然の変異を除き同一である。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、個々の抗原部位またはエピトープを指向とし、典型的には、異なるエピトープを指向とする異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と対照的である。モノクローナル抗体の例としては、マウス、ウサギ、ラット、ニワトリ、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体、完全に組み立てられた抗体、多重特異性抗体（二重特異性抗体を含む）、抗原に結合できる抗体断片 (F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、単鎖抗体、ダイアボディを含む)、マキシボディ、ナノボディ、ならびに所望の生体活性を示す限り前述の C D R を含む組換えペプチド、またはその変異体もしくは誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0054】

修飾「モノクローナル」とは、実質的に均一な抗体集団から得られる抗体特性を示し、任意の特定の手段による抗体産生を必要とするものとは解釈されない。例えば、本発明に従って用いるモノクローナル抗体は、K o h l l e r e t a l. , N a t u r e , 256:495 [1975] により最初に記載されたハイブリドーマ方法によって作製してもよいし、組換え D N A 方法によって作製してもよい（例えば、米国特許第 4,816,567 号を参照されたい）。「モノクローナル抗体」は、例えば C l a c k s o n e t a l. , N a t u r e , 352:624-628 [1991] and M a r k s e t a l. , J. M o l. B i o l. , 222:581-597 (1991) に記載の技術を用いてファージ抗体ライブラリーからも単離し得る。

【0055】

「多重特異性」結合剤または抗原結合タンパク質または抗体は、複数の抗原またはエピトープを標的とするものである。

【0056】

「二重特異性 (b i s p e c i f i c)」、「二重特異性 (d u a l - s p e c i f i c)」または「二機能性」結合剤または抗原結合タンパク質または抗体は、2つの異なる抗原結合部位を有するハイブリッドである。二抗原結合タンパク質、抗原結合タンパク質および抗体は、多抗原結合タンパク質、抗原結合タンパク質または多重特異性抗体の種であり、ハイブリドーマ融合または Fab' 断片の連結が挙げられるが、これらに限定されない様々な方法により産生し得る。例えば、Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553を参照されたい。二重特異性抗原結合タンパク質または抗体の2つの結合部位は、2つの異なるエピトープに結合し、これらは同じタンパク質標的に備わっていてもよいし、異なるタンパク質標的に備わっていてもよい。

【0057】

「免疫グロブリン」という用語は、それぞれ軽鎖 (LC) に共有結合している2本の二量体重鎖 (HC) ; 単一の非二量体化免疫グロブリン重鎖および共有結合した軽鎖 (HC + LC)、またはキメラ免疫グロブリン (軽鎖 + 重鎖) - Fcヘテロ三量体 (いわゆる「ヘミボディ」) を含む完全抗体を包含する。

【0058】

「抗体」は、四量体糖タンパク質である。天然抗体の場合、各四量体は同じ2組のポリペプチド鎖からなり、各組は約220個のアミノ酸 (約25kDa) の1本の「軽」鎖および約440個のアミノ酸 (約50~70kDa) の1本の「重」鎖を有する。各鎖のアミノ末端部分には、抗原認識に主に関与する約100~110個以上のアミノ酸の「可変」(「V」) 領域が含まれる。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能に関与する定常領域を規定する。可変領域は異なる抗体間で異なる。定常領域は異なる抗体間で同一である。各重鎖または軽鎖の可変領域には、抗体の抗原特異性を決定する上で役立つ3つの超可変小領域がある。超可変領域の間の可変ドメイン残基はフレームワーク残基と呼ばれ、一般に、異なる抗体間で、ある程度相同である。免疫グロブリンは、重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて異なるクラスに割り当てることができる。ヒト軽鎖は、カッパ (κ) とラムダ (λ) 軽鎖に分類される。軽鎖および重鎖内で、可変および定常領域は、アミノ酸約10個以上の「D」領域も含む重鎖と共に、アミノ酸約12個以上の「J」領域により結合している。概論については、Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989)) を参照されたい。本発明の範囲内における「抗体」は、組換え産生抗体、およびグリコシル化を欠いた抗体も包含する。

【0059】

「軽鎖」または「免疫グロブリン軽鎖」という用語は、完全長軽鎖および結合特異性を付与する上で十分な可変領域配列を有するその断片を含む。完全長軽鎖は可変領域ドメインである V_L と定常領域ドメインである C_L を含む。軽鎖の可変領域ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端である。軽鎖はκ鎖とλ鎖を含む。

【0060】

「重鎖」または「免疫グロブリン重鎖」という用語は、完全長重鎖および結合特異性を付与する上で十分な可変領域配列を有するその断片を含む。完全長重鎖は可変領域ドメインである V_H、および3つの定常領域ドメインである C_H1、C_H2、および C_H3を含む。V_Hドメインはポリペプチドのアミノ末端、C_Hドメインはカルボキシ末端にあり、C_H3がポリペプチドのカルボキシ末端に最も近い。重鎖は、ミュー (μ)、デルタ (δ)、ガンマ (γ)、アルファ (α)、およびエプシロン (ε) に分類され、抗体のアイソタイプはそれぞれ IgM、IgD、IgG、IgA、および IgE として定義する。本発明の分離する実施形態では、重鎖は、IgG (IgG1、IgG2、IgG3 および I

g G 4 サブタイプを含む)、I g A (I g A 1 および I g A 2 サブタイプを含む)、I g M および I g E を含む任意のアイソタイプであり得る。これらのうちのいくつかは、さらにサブクラスまたはアイソタイプ、例えば I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1 および I g A 2 に分類し得る。異なる I g G アイソタイプは、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) および補体依存性細胞障害性 (C D C) などの (F c 領域媒介性の) 異なるエフェクター機能を有し得る。A D C C では、抗体の F c 領域は免疫エフェクター細胞 (天然キラーおよびマクロファージなど) の表面上の F c 受容体 (F c γ R s) に結合し、標的細胞の貪食または溶解に至る。C D C 内で、抗体は相補性カスケードを細胞表面上に惹起することにより標的細胞を殺傷する。

【0061】

「F c 領域」、または本明細書で同義的に使用する「F c ドメイン」もしくは「免疫グロブリン F c ドメイン」は、完全抗体が抗体の C_H 1 および C_H 2 ドメインを含む 2 本の重鎖断片を含む。2 本の重鎖断片は、2 つ以上のジスルフィド結合によりおよび C_H 3 ドメインの疎水性相互作用により結合している。

【0062】

「サルベージ受容体結合エピトープ」という用語は、I g G 分子 (例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃、または I g G₄) のインビボ血清半減期の増加に関与する I g G 分子の F c 領域のエピトープを指す。

【0063】

「アロタイプ」は、ヒトにおいて免疫原性であり得、特異的対立遺伝子によりコードされ得る、しばしば、定常領域における抗体配列のバリエーションである。アロタイプは 5 つのヒト I G H C 遺伝子 (I G H G 1、I G H G 2、I G H G 3、I G H A 2 および I G H E 遺伝子) について同定されており、それぞれ G 1 m、G 2 m、G 3 m、A 2 m、および E m アロタイプとして命名されている。少なくとも 18 個の G m アロタイプ: n G 1 m (1)、n G 1 m (2)、G 1 m (1、2、3、17) または G 1 m (a、x、f、z)、G 2 m (23) または G 2 m (n)、G 3 m (5、6、10、11、13、14、15、16、21、24、26、27、28) または G 3 m (b 1、c 3、b 5、b 0、b 3、b 4、s、t、g 1、c 5、u、v、g 5) が知られている。A 2 m (1) と A 2 m (2) の 2 つの A 2 m アロタイプがある。

【0064】

抗体の構造および生成の詳細な説明については、R o t h, D. B., and C r a i g, N. L., C e l l, 94:411-414 (1998) を参照されたい (その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。簡単に述べると、重鎖および軽鎖の免疫グロブリン配列をコードする D N A の生成プロセスは主に成長する B 細胞内で起こる。各種免疫グロブリン遺伝子セグメント (V、D、J および定常 (C) 遺伝子セグメント) は、再編成および結合の前に、単一染色体上で一般に比較的近接して見出される。B 細胞の分化中、V、D、J (または軽鎖遺伝子の場合は V および J のみ) 遺伝子セグメントの適切な各ファミリーメンバーの 1 つは、重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子の機能的に再編成された可変領域を形成するように組換えられる。この遺伝子セグメントの再編成プロセスは、順次的であると考えられる。まず、重鎖 D-J 結合が作製され、次いで、重鎖 V-D-J 結合および軽鎖 V-J 結合が作製される。V、D および J セグメントの再編成に加えて、軽鎖中の V と J セグメントの結合位置および重鎖中の D と J セグメントの結合位置で異なる組換えの故に、免疫グロブリン重鎖と軽鎖の一次レパートリーにおいてさらなる多様性が生じた。典型的には、軽鎖内のかかる変化は V 遺伝子セグメントの最終コドンおよび J セグメントの第一コドン内で起こる。結合における類似の不正確性は D と J_H セグメント間の重鎖染色体上で生じ、ヌクレオチド 10 個分ほど伸張し得る。さらに、ゲノム D N A によってコードされないいくつかのヌクレオチドを D と J_H の間および V_H と D 遺伝子セグメントの間に挿入し得る。これらのヌクレオチドの添加は、N 領域の多様性として知られている。可変領域遺伝子セグメントにおけるかかる再編成およびかかる結合中に生じ得る可変組換えによる最終的な結果は、一次抗体レパートリーの産生である

10

20

30

40

50

。

【0065】

「超可変」領域という用語は、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、相補性決定領域またはCDR由来のアミノ酸残基〔すなわちKabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)により記載の、軽鎖可変ドメイン中の残基24～34 (L1)、50～56 (L2)および89～97 (L3)ならびに重鎖可変ドメイン中の31～35 (H1)、50～65 (H2)および95～102 (H3)〕を含む。単一CDRさえも、全CDRを含む完全抗原結合部位より低い親和性ではあるが、抗原を認識して抗原と結合し得る。

10

【0066】

超可変「ループ」からの残基の代替的な定義は、軽鎖可変ドメイン中の残基26～32 (L1)、50～52 (L2)および91～96 (L3)、ならびに重鎖可変ドメイン中の26～32 (H1)、53～55 (H2)および96～101 (H3)として、Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)により記載されている。

【0067】

「フレームワーク」すなわち「FR」残基は、超可変領域残基以外の可変領域残基である。

20

【0068】

「抗体断片」は、インタクトな完全長抗体の一部分、好ましくはインタクト抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片；ダイアボディ；線状抗体(Zapata et al., Protein Eng., 8(10): 1057-1062 (1995))；単鎖抗体分子；ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。

【0069】

抗体のパパイン消化は、それぞれ単一の抗原結合部位、および定常領域を含む残りの「Fc」断片を有する、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片を産生する。Fab断片はすべての可変ドメイン、ならびに軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第一定常ドメイン(CH1)を含む。Fc断片は炭水化物を示し、あるクラスの抗体を別のものと区別する多くの抗体エフェクター機能（結合相補性および細胞受容体など）に関与する。

30

【0070】

ペプシン処置は、抗体のVHおよびVLドメイン（これらのドメインは、単一ポリペプチド鎖に存在する）を含む2つの「単鎖Fv」または「scFv」抗体断片を有するF(ab')₂断片を得る。Fab断片は、抗体ヒンジ領域の1つまたは複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に追加残基を数個含んでいる点でFab'断片と異なる。好ましくは、Fvポリペプチドは、Fvが抗原結合のために所望の構造を形成することを可能にするポリペプチドリンカーをVHとVLドメインの間にさらに含む。scFvの総説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 1 13, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照されたい。

40

【0071】

「Fab断片」は、1本の軽鎖ならびに1本の重鎖のCH1および可変領域を含む。Fab分子の重鎖は別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成できない。

【0072】

「Fab'断片」は、2つのFab'断片の2本の重鎖の間で鎖間ジスルフィド結合を形成してF(ab')₂分子を形成できるように、1本の軽鎖ならびにVHドメインおよ

50

びC_H1ドメインを含む1本の重鎖の一部、ならびにC_H1とC_H2ドメインの間の領域も含む。

【0073】

「F(ab')₂断片」は、2本の重鎖の間で鎖間ジスルフィド結合が形成されるように、C_H1とC_H2ドメインの間に定常領域部分を含む2本の軽鎖と2本の重鎖を含む。したがって、F(ab')₂断片は、2本の重鎖の間でジスルフィド結合により結合した2つのFab'断片からなる。

【0074】

「Fv」とは、完全な抗原認識および結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、密接に非共有結合した1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。これはその配置において、各可変ドメインの3つのCDRが相互作用して、VHVL二量体表面上の抗原結合部位を規定している。単一の可変ドメイン（または抗原特異的なCDRを3つのみ含む、Fvの半分）は、完全結合部位よりも低い親和性ではあるが、抗原を認識して抗原と結合する能力を有する。

【0075】

「単鎖抗体」は、重鎖および軽鎖可変領域が可動性リンカーにより接続して単一ポリペプチド鎖を形成し、抗原結合領域を形成するFv分子である。単鎖抗体は、国際特許第WO88/01649号ならびに米国特許第4,946,778号および同第5,260,203号に詳細に論じられており、これらの開示は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0076】

「単鎖Fv」または「scFv」抗体断片は抗体のV_HおよびV_Lドメインを含み、ここでこれらのドメインは単一ポリペプチド鎖に存在し、任意選択的に、Fvが抗原結合のために所望の構造を形成することを可能にするポリペプチドリンカーをV_HとV_Lドメインの間に含む。(Bird et al., Science 242:423-426, 1988, and Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988)。「Fd」断片は、V_HおよびC_H1ドメインからなる。

【0077】

「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指し、この断片は、同じポリペプチド鎖(V_HV_L)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に接続する重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。同鎖上で2つのドメイン間の対を形成させるには短すぎるリンカーを用いることによって、ドメインを別の鎖の相補性ドメインと強制的に対形成させて2つの抗原結合部位を作製する。ダイアボディについては、例えば、欧州特許第404,097号；WO93/11161号；ならびにHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により更に詳細に記載されている。

【0078】

「ドメイン抗体」とは、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含む免疫学的機能性免疫グロブリン断片である。一部の場合では、2つ以上のV_H領域がペプチドリンカーで共有結合して2価ドメイン抗体を作製する。2価ドメイン抗体の2つのV_H領域は同じ抗原を標的としてもよいし異なる抗原を標的としてもよい。

【0079】

「競合」という用語は、同じエピトープと競合する抗原結合タンパク質（例えば、抗原結合タンパク質を中和するまたは抗体を中和する）の文脈に使用する場合、試験下の抗原結合タンパク質（例えば、抗体またはその免疫学的機能性断片）が共通抗原（例えば、KLHもしくはその断片、またはDNP）に対する参照抗原結合タンパク質（例えば、リガンド、または参照抗体）の特異的結合を防止または阻害するアッセイにより決定される抗原結合タンパク質の間の競合を意味する。幾多のタイプの競合的結合アッセイ、例えば：固体相直接または間接放射免疫アッセイ(RIA)、固体相直接または間接酵素免疫アッ

10

20

30

40

50

セイ (E I A)、サンドイッチ競合アッセイ (例えば、Stahl et al., 1983, Methods in Enzymology 9:242-253を参照されたい) ; 固体相直接ビオチン-アビジンE I A (例えば、Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137:3614-3619を参照されたい)、固体相直接標識アッセイ、固体相直接標識サンドイッチアッセイ (例えば、Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Pressを参照されたい) ; I-125 標識を用いた固体相直接標識R I A (例えば、Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25:7-15を参照されたい) ; 固体相直接ビオチン-アビジンE I A (例えば、Cheung, et al., 1990, Virology 176:546-552を参照されたい) ; ならびに直接標識R I A (Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82) を使用できる。典型的には、かかるアッセイは、固体表面、または非標識試験抗原結合タンパク質および標識参照抗原結合タンパク質のいずれかを有する細胞へ結合した精製抗原の使用に関わる。競合的阻害は、試験抗原結合タンパク質の存在下で固体表面または細胞へ結合した標識量を決定することにより測定する。通常、試験抗原結合タンパク質は、過剰に存在する。競合アッセイにより同定された抗原結合タンパク質 (競合抗原結合タンパク質) は、参照抗原結合タンパク質および生じる立体障害のための参照抗原結合タンパク質により結合したエピトープに十分に近位の隣接エピトープへ結合する抗原結合タンパク質と同じエピトープへ結合する抗原結合タンパク質を含む。競合的結合の決定方法に関する詳細を本明細書の実施例に提示する。通常、競合抗原結合タンパク質が過剰に存在する場合、参照抗原結合タンパク質の共通抗原に対する特異的結合を少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%または75%阻害する。一部の場合では、結合は少なくとも80%、85%、90%、95%、または97%以上阻害される。

【0080】

「抗原」という用語は、抗原結合タンパク質 (例えば、抗体またはその免疫学的機能性断片を含む) などの選択的結合剤により結合でき、追加的にその抗原へ結合できる抗体を産生するために動物において使用できる分子または分子の一部を指す。抗原は、異なる抗原結合タンパク質 (例えば、抗体) と相互作用し得る1つまたは複数のエピトープを有し得る。

【0081】

「DNP」または「ジニトロフェノール」という用語は、本明細書で同義的に使用し、抗原2, 4-ジニトロフェノールを示す。「抗DNP」または「 α DNP」または「aDNP」は、本明細書で同義的に使用し、DNPに特異的に結合する抗原結合タンパク質 (例えば、抗体または抗体断片) を指す。

【0082】

「KLH」または「キーホールリンペットヘモシアニン」という用語は、本明細書で同義的に使用し、Imject (商標) 海中養殖キーホールリンペットヘモシアニン (mcKLH; Pierce Biotechnology, Rockford, IL) を示す。製造業者に従い、mcKLHを、野生型集団から抽出するのではなく、海中養殖で増殖するmollusk Megathura crenulata (キーホールリンペット) の選択集団から回収する; KLHは高分子質量 (350および390 kDaサブユニットの混合した会合体 $4.5 \times 10^5 \sim 1.3 \times 10^7$ ダルトン) を有し、BSAまたはオボアルブミンよりも強い免疫応答を引き出す。「抗KLH」または「 α KLH」または「aKLH」は、本明細書で同義的に使用し、KLHに特異的に結合する抗原結合タンパク質 (例えば、抗体または抗体断片) を指す。

【0083】

「エピトープ」という用語は、抗原結合タンパク質 (例えば、抗体) により結合している分子の一部である。この用語は、抗原結合タンパク質 (抗体など) またはT細胞受容体

に特異的に結合できる任意の決定因子を含む。エピトープは連続的であることもでき、非連続的であることもできる（例えば、単鎖ポリペプチドにおいて、ポリペプチド配列において互いに連続していないが分子の文脈においてアミノ酸残基は抗原結合タンパク質により結合している）。ある実施形態では、エピトープは、抗原結合タンパク質を産生するために使用するエピトープに類似の3次元構造を含むが、抗原結合タンパク質を産生するために使用するエピトープ中に見出されるアミノ酸残基がないか一部しかない点で模倣物であり得る。ほとんどの場合、エピトープはタンパク質上に備わっているが、一部の 경우에는、他の種類の分子（核酸など）上に備わっている場合がある。エピトープ決定は、分子の化学的に活性な表面群（アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニル基など）を含み得、特異的3次元構造特性、および／または特異的電荷特性を有し得る。一般に、特定の標的抗原に特異的な抗体は、タンパク質および／または巨大分子の複合混合物における標的抗原上のエピトープを選択的に認識する。

【0084】

「同一性」という用語は、配列を整列および比較して決定した2つ以上のポリペプチド分子または2つ以上の核酸分子の配列間の関係を指す。「同一率」とは、比較分子におけるアミノ酸またはヌクレオチド間の同一残基%を意味し、比較する分子の最小サイズに基づき算出する。これらの算出において、（もしあれば）整列内のギャップは、特定の数学的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）により対応されなければならない。整列した核酸またはポリペプチドの同一性を算出するために使用できる方法としては、Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Grisakov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; ならびに Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073 に記載のものが挙げられる。例えば、配列同一性は、2つのポリペプチドのアミノ酸の位置における類似性を比較するために一般的に用いる標準的な方法により決定できる。BLASTまたはFASTAなどのコンピュータプログラムを用いて、（完全長の片方もしくは両方の配列、または所定部分の片方もしくは両方の配列のいずれかと共に）2つのポリペプチドまたは2つのポリヌクレオチド配列を各残基の至適適合のために整列する。これらのプログラムは初期設定オープニングペナルティおよび初期設定ギャップペナルティを提供し、スコアリング行列、例えばPAM250 [標準的なスコアリング行列; Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp. 3 (1978) を参照されたい] をコンピュータプログラムと連結して使用できる。次いで例えば、同一率を、適合範囲内の長い方の配列の同一適合総数に100を乗じてから、配列の長さ合計および2つの配列を整列するために長い方の配列内に導入したギャップ数で割って算出できる。同一率の算出において、比較する配列は、配列間の適合度が最も高くなる方法で整列する。

【0085】

GCGプログラムパッケージは、同一率を決定するために使用できるコンピュータプログラムであり、このパッケージにはGAPが含まれる (Devereux et al.

, 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)。コンピュータアルゴリズムGAPは、配列同一率を決定する2つのポリペプチドまたは2つのポリヌクレオチドを整列するために使用する。配列の各アミノ酸またはヌクレオチドの至適適合（アルゴリズムにより決定した「適合範囲」）のために配列を整列する。ギャップオープニングペナルティ（ $3 \times$ 平均対角として算出する。「平均対角」とは、使用されている比較行列の対角の平均である；「対角」とは特定の比較行列によるそれぞれの完全なアミノ酸適合に割り当てられるスコアまたは数である）およびギャップ伸長ペナルティ（通常、ギャップオープニングペナルティの10分の1倍）、ならびに比較行列（PAM250またはBLOSUM62など）を、アルゴリズムと連結して用いる。ある実施形態では、標準的な比較行列（BLOSUM62比較行列については、Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 for the PAM 250 comparison matrix; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:10915-10919を参照されたい）もアルゴリズムにより使用する。

10

【0086】

GAPプログラムを用いたポリペプチドまたはヌクレオチド配列の同一率決定のための推奨変数は、以下を含む。

20

アルゴリズム：Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453；

比較行列：上記Henikoff et al., 1992のBLOSUM62；

ギャップペナルティ：12（ただし、末端ギャップペナルティなし）

ギャップ長ペナルティ：4

類似性の閾値：0

【0087】

2つのアミノ酸配列を整列するためのある整列体系により、2つの配列の短い領域のみが適合し得、この整列した狭い領域は、2つの完全長配列間に有意な関連性はなくとも非常に高い配列同一性を有し得る。したがって、選択した整列方法（GAPプログラム）は、所望の場合、標的ポリペプチドの少なくとも50個の連続アミノ酸範囲を整列させるように調整できる。

30

【0088】

「修飾」という用語は、本発明の抗原結合タンパク質（抗体および抗体断片を含む）に関連して使用する場合、1つまたは複数のアミノ酸変化（置換、挿入または欠失を含む）；化学修飾；治療薬もしくは診断薬への接合による共有結合修飾；（例えば、放射性核種または各種酵素による）標識化；PEG化などのポリマー共有結合（ポリエチレングリコールによる誘導体化）ならびに非天然アミノ酸の化学合成による挿入もしくは置換が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の修飾抗原結合タンパク質は本発明の非修飾分子の結合特性を保持する。

40

【0089】

「誘導体」という用語は、本発明の抗原結合タンパク質（抗体および抗体断片を含む）に関連して使用する場合、治療薬もしくは診断薬への接合による共有結合修飾、（例えば、放射性核種または各種酵素による）標識化、PEG化などのポリマー共有結合（ポリエチレングリコールによる誘導体化）ならびに非天然アミノ酸の化学合成による挿入もしくは置換が行われた抗原結合タンパク質を指す。本発明の誘導体は、本発明の非誘導体分子の結合特性を保持する。

【0090】

抗原結合タンパク質の免疫グロブリン実施形態

完全長の免疫グロブリン軽鎖および重鎖では、可変および定常領域は、アミノ酸が約1

50

0 個多い「D」領域も含む重鎖とアミノ酸約 12 個以上の「J」領域により結合している。例えば、Fundamental Immunology, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press を参照されたい (すべての目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。各軽鎖／重鎖ペアの可変領域は典型的には抗原結合部位を形成する。

【0091】

ヒト IgG2 重鎖 (HC) 定常ドメインの 1 例は、アミノ酸配列：

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T
Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F
L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G
V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D
G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
S L S P G K / / 配列番号 86 を有する。

10

【0092】

本発明の抗原結合タンパク質の組換えバージョンを作製するための他の IgG アイソタイプの定常領域配列 (所望の場合、IgG1、IgG2、IgG3、または IgG4 免疫グロブリンアイソタイプを有する) は、当技術分野において知られている。通常、ヒト IgG2 はエフェクター機能が所望されない対象に使用でき、ヒト IgG1 はかかるエフェクター機能 (例えば、抗体依存性細胞傷害 (ADCC)) が望ましい状態において使用できる。ヒト IgG3 の半減期は比較的短く、ヒト IgG4 は抗体「半分子」を形成する。ヒト IgG1 には 4 つの既知のアロタイプがある。好ましいアロタイプは「hIgG1z」と呼ばれ、「KEEM」アロタイプとしても知られている。ヒト IgG1 アロタイプ「hIgG1za」(KDEL)、「hIgG1f」(REEM)、および「hIgG1fa」も有用である；すべて、ADCC エフェクター機能を有すると考えられる。

20

【0093】

ヒト hIgG1z 重鎖 (HC) 定常ドメインは、アミノ酸配列：

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K / / 配列番号 87 を有する。

30

【0094】

ヒト hIgG1za 重鎖 (HC) 定常ドメインは、アミノ酸配列：

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K / / 配列番号 88 を有する。

40

【0095】

50

ヒトhIgG1f重鎖(HC)定常ドメインは、アミノ酸配列：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNEWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK／／配列番号89を有する。

10

【0096】

ヒトhIgG1fa重鎖(HC)定常ドメインは、アミノ酸配列：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNEWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK／／配列番号90を有する。

20

【0097】

ヒト免疫グロブリン軽鎖(LC)定常領域配列の1例は、以下：

GQPKANPTVTTLFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV
AWKADGSPVKAGVETTTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK
SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS／／配列番号91である(「CL-1」と命名)。

【0098】

CL-1は、抗体のpIを増加するために有用であり、好都合である。「CL-2」、「CL-3」および「CL-7」と命名された3つの他のヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域があり、これらも本発明の範囲内で使用できる。CL-2とCL-3がヒト集団においてより一般的である。

30

【0099】

CL-2ヒト軽鎖(LC)定常ドメインは、アミノ酸配列：

GQPKAAPSVTLFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV
AWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK
SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS／／配列番号92を有する。

【0100】

CL-3ヒトLC定常ドメインは、アミノ酸配列：

GQPKAAPSVTLFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV
AWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK
SHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS／／配列番号93を有する。

40

【0101】

CL-7ヒトLC定常ドメインは、アミノ酸配列：

GQPKAAPSVTLFPPSSSEELQANKATLVCLVSDFYYPGAVTV
AWKADGSPVKVGVETTTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK
SHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS／／配列番号94を有する。

【0102】

免疫グロブリン鎖の可変領域は一般に同じ全体構造を示し、3つの超可変領域(多くの場合、「相補性決定領域」すなわちCDRと呼ばれる)により結合した比較的保存的なフ

50

レームワーク領域（FR）を含む。典型的には上述した各重鎖／軽鎖ペアの2本鎖由来のCDRは、標的上の特異的エピトープまたはドメイン（例えば、KLHまたはDNP）と特異的に結合する構造を形成するフレームワーク領域により整列している。典型的には、天然の軽鎖可変領域と重鎖可変領域は両方とも、これらのエレメントとN末端からC末端で：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4の順で一致する。番号付け系は、それぞれこれらのドメイン内の位置を占めるアミノ酸に割り当てられる番号のために考案されている。この番号付け系は、免疫学的目的のタンパク質のカバット配列（1987 and 1991, NIH, Bethesda, MD）、またはChothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196 : 901-917; Chothia et al., 1989, Nature 3 42 : 878-883において規定される。

10

【0103】

下表1Aおよび下表1Bに、抗体の完全長軽鎖および重鎖の一部の具体例を提示し、それらの対応するアミノ酸配列を要約する。表1Aには軽鎖配列の例を示し、これらはすべて、全λ軽鎖で共通する定常領域λ定常領域1（CL-1；配列番号91）を有する。表1Bには重鎖配列の例を示し、これらはすべて定常領域ヒトIgG2（配列番号86）を含む。しかしながら、表1Aおよび／または表1Bに列挙した定常またはフレームワーク領域の配列変化を有する免疫グロブリン（例えばIgG4対IgG2、CL2対CL1）も本発明に包含される。また、表1Aおよび表1Bの全配列のシグナルペプチド（SP）配列は同一であり（すなわち、VK-1SPシグナルペプチド：MDMRVPAQLLG L L L L W L R G A R C（配列番号103；一重下線））、大量クローニングプロセスに用いられるが、任意の他の適切なシグナルペプチド配列を本発明の範囲内で適用してよい。別の有用なシグナルペプチド配列の例は、VH21 SP MEWSWVFLFFLS V T T G V H S（配列番号95）である。他のシグナルペプチド配列の例を表1A～Bに示す。

20

【0104】

【表 1】

表 1 A 免疫グロブリン軽鎖配列。シグナルペプチド配列は二重下線で示し、CDR領域は一重下線で示し、フレームワークおよび定常領域は下線以外である。

配列 番号	命名	クローン (1つまたは複数) に含まれる	配列
抗 DNP			
105	L1	3A1	<u>MDMRVPAQLLG</u> <u>LLLLWL</u> <u>RGARCDIQMTQSPSSVSASVGDRVT</u> <u>ITCRASQGI</u> <u>SNLAWYQRKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF</u> SGSGSGTDFLTISSLPEDFAAYYCQQASSFPWTFGQGTRV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
109	L2	3A4	<u>MDMRVPAQLLG</u> <u>LLLLWL</u> <u>RGARCDIQMTQSPSSVSASVGDRVT</u> <u>ITCRASQGI</u> <u>SRRLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF</u> SGSGSGTDFLTISSLPEDFATYYCQQANSFPFTFGPGTKV DIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
121	L3	3B1	<u>MDMRVPAQLLG</u> <u>LLLLWL</u> <u>RGARCDIQMTQSPSSLSASEGDRVT</u> <u>ITCRASQGI</u> <u>RNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPLRF</u> SGSGSGTEFTLTISSLPEDFATYYCLQYNSSYPWTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
125	L4	3C2	<u>MDMRVPAQLLG</u> <u>LLLLWL</u> <u>RGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVT</u> <u>ITCRASQGM</u> <u>SNLAWYQQKPRKVPKLLIYAASLTQSGVPSRF</u> SGSGSGTDFLTISSLPEDVATYYCQKFNSAPFTFGPGTKV DIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
127	L5	3H4	<u>MDMRVPAQLLG</u> <u>LLLLWL</u> <u>RGARCDIQMTLSPSSLSASVGDRVT</u> <u>ITCRASQGI</u> <u>RNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRF</u> SGSGSGTEFTLTISSLPEDFATYYCLQYNSSPWTFGQGTEV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

抗 KLH			
131	L6	16. 3. 1	MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARCDIQMTQSPSSLSVSGDRVT ITCQAGQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTAFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLTFGGGKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
135	L7	108. 1. 2	METPAQLLFLLLLWLDDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQNISTNYLAWYQQKPGQAPRFLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGRSPRCSFGGGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
137	L8	108. 1. 2 (N>Q、C>S)	METPAQLLFLLLLWLDDTTGEIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQQISTNYLAWYQQKPGQAPRFLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGRSPRSSFSGGGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
141	L9	120. 6	MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARCDIQMTQSPSSLSASVSGDRVT ITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISRLEPEDFATYYCLQHNSYPLTFGGGKTV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
28	L10	120. 6	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSLSASVSGDRVT ITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTEFTLTISRLEPEDFATYYCLQHNSYPLTFGGGKTV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

【表 2】

表 1 B 免疫グロブリン重鎖配列。シグナルペプチド配列は二重下線で示し、CDR領域は一重下線で示し、フレームワークおよび定常領域は下線以外である。

配列番号	命名	クローン (1つまたは複数)に含まれる	配列
抗 DNP			
107	H1	3A1	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLQESG</u> <u>PGLVKPSETLSL</u> <u>TCTVSGGSISHYYWSWIRQPPGKGLGWIGYIYYSGSTNYNPS</u> <u>LKSRVTISVDTSKNQFSLKLT</u> <u>SVTAADTAVYYCARARGDGYN</u> <u>YPDAFDI</u> <u>WGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA</u> <u>LGCLVKDYFPEPVT</u> <u>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS</u> <u>SVVTV</u> <u>PSSNFGTQTYTCNV</u> <u>DHKPSNTKVDK</u> <u>TKVERKCCVECP</u> <u>CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP</u> <u>EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS</u> <u>VLTVVHQDW</u> <u>LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR</u> <u>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM</u> <u>LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCSVMHEALHNHYTQK</u> <u>SLSLSPGK</u>
111	H2	3A4 3C2	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGVVQ</u> <u>PGRSLRL</u> <u>SCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA</u> <u>VIWYDGSNKYYAD</u> <u>SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYN</u> <u>WNYG</u> <u>MDVWGQGT</u> <u>TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA</u> <u>ALGCL</u> <u>VKD</u> <u>YFPEPVT</u> <u>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS</u> <u>SVVTV</u> <u>VPSSNFGTQTYTCNV</u> <u>DHKPSNTKVDK</u> <u>TKVERKCCVECP</u> <u>PCPAP</u> <u>PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF</u> <u>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS</u> <u>VLTVVHQDWLNGK</u> <u>EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT</u> <u>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM</u> <u>LDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL</u> <u>SPGK</u>

10

20

30

40

113	H3	3A4-F (W101F)	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYNFNYG MDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGITQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTIVVHQQDLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	10
115	H4	3A4-Y (W101Y)	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYNFNYG MDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGITQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTIVVHQQDLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	20
117	H5	3A4-FSS	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYNFNYG MDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGITQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSSVECPPCPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTIVVHQQDLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	40

119	H6	3A4-YSS	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGVVQPGRSLRL</u> <u>SCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSKYYAD</u> <u>SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYNYNYG</u> <u>MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL</u> <u>VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT</u> <u>VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSSVECP</u> <u>PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQF</u> <u>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGK</u> <u>EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT</u> <u>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL</u> <u>SPGK</u>	10
123	H7	3B1	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLQESGPGLVKPSETLSL</u> <u>TCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGNTNSNPS</u> <u>LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTYYDSSG</u> <u>YYYRAFDIWCQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA</u> <u>ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL</u> <u>SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECP</u> <u>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED</u> <u>PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQD</u> <u>WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS</u> <u>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP</u> <u>MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQ</u> <u>KSLSLSPGK</u>	20
129	H8	3H4	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLQESGPGLVKPLQTLSL</u> <u>TCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGYIYYSRSTYYN</u> <u>PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTGYSS</u> <u>GWYPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA</u> <u>ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL</u> <u>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECP</u> <u>CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP</u> <u>EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDW</u> <u>LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR</u> <u>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM</u> <u>LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQK</u> <u>SLSLSPGK</u>	40

144	H9	3A1	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGGSISHYYWSWIRQPPGKGLGWIGYIYSGSTNYNPS LKSRVTISVDTSKNQFSLKLTSVTAADTAVYYCARARGDGYN YPDADFIIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
145	H10	3A4 3C2	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGVVQGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYNWNYG MDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
77	H11	3A4-F (W101F)	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGVVQGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYNFNYG MDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG

10

20

30

40

181	H12	3A4-Y (W101Y)	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGVVQPGRSLRL</u> <u>SCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYAD</u> <u>SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARYNYNG</u> <u>MDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL</u> VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	10
182	H13	3A4-FSS	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGVVQPGRSLRL</u> <u>SCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYAD</u> <u>SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARYNFNYG</u> <u>MDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL</u> VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSSVECPPCPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	20 30
183	H14	3A4-YSS	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGGVVQPGRSLRL</u> <u>SCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYAD</u> <u>SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARYNYNG</u> <u>MDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL</u> VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSSVECPPCPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	40

184	H15	3B1	<u>MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCQVQLQESGPGLVKPSSETLSL</u> <u>TCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYSGNTNSNPS</u> <u>LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTYYDSSG</u> <u>YYYRAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA</u> ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQD WLNKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG	10
185	H16	3H4	<u>MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCQVQLQESGPGLVKPLQTL</u> <u>TCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYSRSTYYN</u> <u>PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARTGYSS</u> <u>GWYPFDYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA</u> LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPM LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	20 30
抗 KLH				
133	H17	16. 3. 1	<u>MELGLSWVFLFAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA</u> <u>ASGFTFSNYDMYWRQTTGKGLEWVSAIGTAGDTYYPGSVKG</u> <u>RFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAREKSSTSAFDY</u> WGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG	40

139	H18	108. 1. 2	<u>MKHLWFFLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLMKPSETLSLTCT</u> <u>VSGGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGNTFYNP</u> <u>SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLN</u> <u>SMTAADTAVYFCARQGGIAART</u> <u>GYWYFDLWGRGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA</u> <u>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL</u> <u>SVVTVPSSNFGTQTYTCNV</u> <u>DHKPSNTKVDKTVERKCCVECPP</u> <u>CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP</u> <u>EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDW</u> <u>LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR</u> <u>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM</u> <u>LDS</u> <u>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQK</u> <u>SLSLSPGK</u>	10
143	H19	120. 6	<u>MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK</u> <u>ASGYTFTGYHMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQ</u> <u>GRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARD</u> <u>RGSYWFD</u> <u>PWGQGT</u> <u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK</u> <u>DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>VTV</u> <u>SSNFGTQTYTCNV</u> <u>DHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPV</u> <u>AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW</u> <u>YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY</u> <u>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN</u> <u>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDS</u> <u>DGS</u> <u>F</u> <u>FLYSKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSP</u> <u>GK</u>	20 30
46	H20	120. 6	<u>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u> <u>SCKASGYTFTGYHMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ</u> <u>KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARD</u> <u>RGSY</u> <u>WFD</u> <u>PWGQGT</u> <u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC</u> <u>LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>VTVPSSNFGTQTYTCNV</u> <u>DHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPA</u> <u>PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ</u> <u>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNG</u> <u>KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM</u> <u>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDS</u> <u>DGS</u> <u>F</u> <u>FLYSKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLS</u> <u>LSPG</u>	40

186	H21	16. 3. 1	<u>MELGLSWVFLFAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA</u> <u>ASGFTFSNYDMYWVRQTTGKGLEWVSAIGTAGDTYYPGSVKG</u> <u>RFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAREKSSTSAFDY</u> <u>WGQGT</u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPVA GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	10
187	H22	108. 1. 2	<u>MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLMKPSETLSLTCT</u> <u>VSGGSISSSSYFWGWI</u>RQPPGKGLEWIGSIYYSGNTFYNP<u>SL</u> <u>KSRVTISVDTSKNQFSLKLNSMTAADTAVYFCARQGGIAART</u> <u>GYWYFDLWGRGTT</u>TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPM LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	20
366	H23	120. 6	<u>MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK</u> <u>ASGYTFTGYHMH</u>WVRQAPGGGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQ <u>GRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARD</u>RGSYWFD <u>PWGQGT</u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPV AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	30 40

367	H24	120.6	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDGRSYY WFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCA PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
-----	-----	-------	---

10

【0106】

単離した抗DNP抗原結合タンパク質（抗体または抗体断片を含む）の一部の実施形態は、以下を含む：

（a）配列番号77、配列番号107、配列番号111、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号123、配列番号129、配列番号144、配列番号145、配列番号181、配列番号182、配列番号183、配列番号184、もしくは配列番号185のアミノ酸配列を含むか、またはN末端かC末端、もしくは両端のアミノ酸残基が1個、2個、3個、4個もしくは5個欠けている前述の任意の一配列を含む免疫グロブリン重鎖；

（b）配列番号105、配列番号109、配列番号121；配列番号125、もしくは配列番号127のアミノ酸配列を含むか、またはN末端もしくはC末端、または両端のアミノ酸残基が1個、2個、3個、4個もしくは5個欠けている前述の任意の一配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または

（c）（a）の免疫グロブリン重鎖および（b）の免疫グロブリン軽鎖。

20

30

【0107】

単離した抗KLH抗原結合タンパク質（抗体または抗体断片を含む）の一部の実施形態は、以下を含む：

（a）配列番号46、配列番号133、配列番号139、配列番号143、配列番号186、もしくは配列番号187、配列番号366、もしくは配列番号367のアミノ酸配列を含むか、またはN末端かC末端、もしくは両端のアミノ酸残基が1個、2個、3個、4個もしくは5個欠けている前述の任意の一配列を含む免疫グロブリン重鎖；

（b）配列番号28、配列番号131、配列番号135、配列番号137；もしくは配列番号141のアミノ酸配列を含むか、またはN末端もしくはC末端、または両端のアミノ酸残基が1個、2個、3個、4個もしくは5個欠けている前述の任意の一配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または

（c）（a）の免疫グロブリン重鎖および（b）の免疫グロブリン軽鎖。

40

【0108】

同様に、表1Bに列挙した抗DNP重鎖（H1、H2、H3……など）の各例は、表1Aに示す任意の抗DNP軽鎖の例と組み合わせて抗体を形成することができる。かかる組み合わせの例としては、任意のL1～L5と組み合わせたH1；任意のL1～L5と組み合わせたH2；任意のL1～L5と組み合わせたH3、任意のL1～L5と組み合わせたH4、などが挙げられる。一部の 경우에는、抗体は、表1Aおよび表1Bに列挙したうち少なくとも1つの抗DNP重鎖と1つの抗DNP軽鎖を含む。一部の 경우에는、抗体は表1Aおよび表1Bに列挙した2本の異なる抗DNP重鎖と2本の異なる抗DNP軽鎖を含

50

む。他の場合では、抗体は2本の同一軽鎖と2本の同一重鎖を含む。例として、抗体もしくは免疫学的機能性断片は、表1 Aおよび表1 Bに列挙した2本のH 1重鎖と2本のL 1軽鎖、または2本のH 2重鎖と2本のL 2軽鎖、または2本のH 3重鎖と2本のL 3軽鎖ならびに他の類似の一对の抗DNP軽鎖と一对の抗DNP重鎖の組み合わせを含み得る。

【0109】

同様に、表1 Bに列挙した抗KLH重鎖（H 1、H 2、H 3……など）の各例は、表1 Aに示す任意の抗KLH軽鎖の例と組み合わせて抗体を形成することができる。かかる組み合わせの例としては、任意のL 1～L 5と組み合わせたH 1；任意のL 1～L 5と組み合わせたH 2；任意のL 1～L 5と組み合わせたH 3、任意のL 1～L 5と組み合わせたH 4、などが挙げられる。一部の場 10
合では、抗体は、表1 Aおよび表1 Bに列挙したうち少なくとも1つの抗KLH重鎖と1つの抗KLH軽鎖を含む。一部の場 10
合では、抗体は表1 Aおよび表1 Bに列挙した2本の異なる抗KLH重鎖と2本の異なる抗KLH軽鎖を含む。他の場合では、抗体は2本の同一軽鎖と2本の同一重鎖を含む。例として、抗体もしくは免疫学的機能性断片は、表1 Aおよび表1 Bに列挙した2本のH 1重鎖と2本のL 1軽鎖、または2本のH 2重鎖と2本のL 2軽鎖、または2本のH 3重鎖と2本のL 3軽鎖ならびに他の類似の一对の抗KLH軽鎖と一对の抗KLH重鎖の組み合わせを含み得る。

【0110】

提供する他の抗原結合タンパク質は、表1 Aおよび表1 Bに示す重鎖と軽鎖の組み合わせにより形成され、これらの鎖とそれぞれ少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97 20
%または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖および／または重鎖を含む抗体変異体である。一部の場 20
合では、かかる抗体は、少なくとも1つの重鎖と1本の軽鎖を含み、他の場合では、変異形態は、2本の同一軽鎖と2本の同一重鎖を含む。重鎖（1本または複数本）および／または軽鎖（1本または複数本）が、例えば、翻訳後修飾のために、表1 Aおよび表1 Bに記載する重鎖および軽鎖の任意の1本に関して、N末端かC末端、もしくは両端のアミノ酸残基が1個、2個、3個、4個もしくは5個欠け得るものも本発明の範囲内である。例えば、CHO細胞は典型的にはC末端のリジンが切断されている。

【0111】

抗体の可変ドメイン

本明細書に提供する各種重鎖および軽鎖可変領域を表2 A～Bに示す。これらの可変領域はそれぞれ上記の重鎖および軽鎖定常領域に結合して、それぞれ完全な抗体重鎖および軽鎖を形成し得る。さらに、このように産生された重鎖および軽鎖配列はそれぞれ結合して完全な抗体構造を形成し得る。本明細書に提供する重鎖および軽鎖可変領域は、上記に列挙した配列例と異なる配列を有する他の定常ドメインに結合することもできることが理解されるべきである。

【0112】

また、下表2 Aに示すように、V_H 1、V_H 2、V_H 3、V_H 4、V_H 5、およびV_H 6から選択される少なくとも1つの免疫グロブリン抗DNP重鎖可変領域ならびに／またはV_L 1、V_L 2、V_L 3、V_L 4、およびV_L 5から選択される少なくとも1つの免疫 40
グロブリン抗DNP軽鎖可変領域を含む（contain or include）抗原結合タンパク質（抗体または抗体断片を含む）、ならびにこれらの軽鎖および重鎖可変領域の免疫学的機能性断片、誘導体、変異タンパク質および変異体も提供する。

【0113】

また、下表2 Bに示すように、V_H 7、V_H 8、およびV_H 9から選択される少なくとも1つの免疫グロブリン抗KLH重鎖可変領域ならびに／またはV_L 6、V_L 7、V_L 8、およびV_L 9から選択される少なくとも1つの免疫グロブリン抗KLH軽鎖可変領域を含む（contain or include）抗原結合タンパク質（抗体または抗体断片を含む）、ならびにこれらの軽鎖および重鎖可変領域の免疫学的機能性断片、誘導体、 50
変異タンパク質および変異体も提供する。

【0114】

このタイプの抗原結合タンパク質は一般に式「 $V_H x / V_L y$ 」により示すことができ、式中「 x 」は抗原結合タンパク質に含まれる重鎖可変領域数と相関し、「 y 」は抗原結合タンパク質に含まれる軽鎖可変領域数と相関する（通常、 x および y はそれぞれ1または2である）。

【0115】

【表 3】

表 2 A 抗DNPV_HおよびV_L鎖の例：CDR領域は下線で示し、フレームワーク領域は下線以外である。任意選択的なN末端シグナル配列は示していない（表 1 A～Bを参照されたい）。

表 1A～B の参照に 含まれる	命名	配列 番号	アミノ酸配列
L1	VL1	232	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQRKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFAAYYCQ ~~QASSF~~ PWTFGQGT ~~TRVEIK~~
L2	VL2	234	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISRRLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQ ~~QANSF~~ PFTFGPGTKVDIK
L3	VL3	236	DIQMTQSPSSLSASEGDRVITITCRASQGI ~~RNDLGWYQQKPGKAPKRL~~ IYAASSLQSGVPLRFSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFATYYC ~~LQYNSY~~ PWTFGQGT ~~KVEIK~~
L4	VL4	238	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGM ~~SNYLAWYQQKPRKVPKLL~~ IYAAS ~~TLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQKFNSA~~ PFTFGPGTKVDIK
L5	VL5	240	DIQMTLSPSSLSASVGDRVITITCRASQGI ~~RNDLGWYQQKPGKAPKRL~~ IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFATYYC ~~LQYNSS~~ PWTFGQGT ~~EVEIK~~
H1、H9	VH1	250	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS ~~HYYSWIRQPPGKGLGW~~ IGYIYYSGSTNYP ~~SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLT~~ SVTAADTAVYY CARARGDGYNPDAFDI ~~WGQGTMTVSS~~
H2、H10	VH2	252	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM ~~HWVRQAPGKGLEW~~ VAVI ~~IWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN~~ SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARYN ~~WNYGMDVWGQGT~~ TVTVSS
H3、H5、 H11、H13	VH3	254	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM ~~HWVRQAPGKGLEW~~ VAVI ~~IWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN~~ SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARYN ~~FNYGMDVWGQGT~~ TVTVSS
H4、H6、 H12、H14	VH4	256	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM ~~HWVRQAPGKGLEW~~ VAVI ~~IWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN~~ SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARYN ~~NYGMDVWGQGT~~ TVTVSS

10

20

30

40

表 1A～B の参照に 含まれる	命名	配列 番号	アミノ酸配列
H7、H15	VH5	258	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS <u>SSYY</u> WSWIRQPPGKGLEW IGYIYYSGNTNSNP <u>SLKSR</u> VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARTYYDSSGYYYRAFDI <u>WGQ</u> GMTVTVSS
H8、H16	VH6	260	QVQLQESGPGLVKPLQTLTLCTVSGGSIS <u>SGGY</u> WSWIRQHPGKGL EWIGYIYYSRSTYYNP <u>SLKSR</u> VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV YYCARTGYSSGWYPFDY <u>WGQ</u> GLTVTVSS

10

【 0 1 1 6 】

【表 4】

表 2 B 抗 K L H V_H および V_L 鎖の例：CDR 領域は下線で示し、フレームワーク領域は下線以外である。任意選択的な N 末端シグナル配列は示していない（表 1 A～B を参照されたい；例えば、配列番号 9 5 および配列番号 1 0 3 を参照されたい）。

表 1A～B の参照に 含まれる	命名	配 列 番 号	アミノ酸配列
L6	VL6	242	DIQMTQSPSSLSVSGDRVTITCQAGQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLI YDASNLETGVPSRFSGSGSGTAFTFTISSLPEDIATYYCQQYDNLTF GQGTKLEIK
L7	VL7	244	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQNIISTNYLAWYQQKPGQAPRFL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGRSP RCSFGQGTKLEIK
L8	VL8	246	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQQISTNYLAWYQQKPGQAPRFL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFGRSP RSSFGQGTKLEIK
L9、L10	VL9	248	DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFATYYCLQHNSYPL TFGGGTKVEIK
H17、H21	VH7	262	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMYWRQTGKGLEWV SAIGTAGDTYYPGSVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCA REKSSTSAFDYWGQGTLLTVSS
H18、H22	VH8	264	QLQLQESGPGLMKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLE WIGSIYYSGNTFYNP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSMTAADTAVYF CARQGGIAARTGYWYFDLWGRGTTTVTVSS
H19、 H20、 H23、H24	VH9	266	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWM GWINPNSSGGTNYAQKFQGRVTMTDRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYC ARDRGSYYWFDLPWGQGTLLTVTVSS

【0117】

単離した抗原結合タンパク質（抗 D N P 抗体または抗体断片を含む）の一部の実施形態は、以下の免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む：

（a）重鎖可変領域が配列番号 2 5 0、配列番号 2 5 2、配列番号 2 5 4、配列番号 2 5 6、配列番号 2 5 8、もしくは配列番号 2 6 0 の配列と少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む；または

（b）軽鎖可変領域が配列番号 2 3 2、配列番号 2 3 4、配列番号 2 3 6、配列番号 2 3 8、もしくは配列番号 2 4 0 の配列と少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む；または

（c）（a）の重鎖可変領域および（b）の軽鎖可変領域。

【0118】

10

20

30

40

50

単離した抗原結合タンパク質（抗DNP抗体または抗体断片を含む）の一部の実施形態は、以下の免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む：

（a）重鎖可変領域が配列番号262、配列番号264、もしくは配列番号266の配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であるアミノ酸配列を含む；または

（b）軽鎖可変領域が配列番号242、配列番号244、配列番号246、もしくは配列番号248の配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%同一であるアミノ酸配列を含む；または

（c）（a）の重鎖可変領域および（b）の軽鎖可変領域。

【0119】

表2Aに列挙した各重鎖可変領域は、より大きな重鎖に含まれているかいないかを問わず、表2Aに示す任意の軽鎖可変領域と組み合わせて抗原結合タンパク質を形成し得る。かかる組み合わせの例としては、任意の V_L1 、 V_L2 、 V_L3 、 V_L4 、または V_L5 と組み合わせた V_H1 ；任意の V_L1 、 V_L2 、 V_L3 、 V_L4 、または V_L5 と組み合わせた V_H2 ；任意の V_L1 、 V_L2 、 V_L3 、 V_L4 、または V_L5 と組み合わせた V_H3 ；任意の V_L1 、 V_L2 、 V_L3 、 V_L4 、または V_L5 と組み合わせた V_H4 、などが挙げられる。

【0120】

表2Bに列挙した各重鎖可変領域は、より大きな重鎖に含まれているかいないかを問わず、表2Bに示す任意の軽鎖可変領域と組み合わせて抗原結合タンパク質を形成し得る。かかる組み合わせの例としては、任意の V_L6 、 V_L7 、 V_L8 または V_L9 と組み合わせた V_H7 ；任意の V_L6 、 V_L7 、 V_L8 または V_L9 と組み合わせた V_H8 ；任意の V_L6 、 V_L7 、 V_L8 または V_L9 と組み合わせた V_H9 が挙げられる。

【0121】

一部の場合では、抗原結合タンパク質は表2Aに列挙したうち少なくとも1つの重鎖可変領域および／または1本の軽鎖可変領域を含む。一部の場合では、抗原結合タンパク質は表2Aに列挙したうち少なくとも2つの異なる重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む。かかる抗原結合タンパク質の例は、（a）1つの V_H1 、ならびに（b） V_H2 、 V_H3 、もしくは V_H4 などの1つを含む。別の例は、（a）1つの V_H2 、ならびに（b） V_H1 、 V_H3 、もしくは V_H4 などの1つを含む。さらに別の例は、（a）1つの V_H3 、ならびに（b） V_H1 、 V_H2 、もしくは V_H4 などの1つを含む。さらに別の例は、（a）1つの V_H4 、ならびに（b） V_H1 、 V_H2 、もしくは V_H3 などの1つを含む。さらに別の例は、（a）1つの V_H5 、ならびに（b） V_H1 、 V_H2 、もしくは V_H3 などの1つを含む。さらに別の例は、（a）1つの V_H6 、ならびに（b） V_H1 、 V_H2 、もしくは V_H3 などの1つを含む。

【0122】

さらにかかる抗原結合タンパク質の別の例は、（a）1つの V_L1 、ならびに（b） V_L2 もしくは V_L3 などの1つを含む。さらにかかる抗原結合タンパク質の別の例は、（a）1つの V_L2 、ならびに（b） V_L1 もしくは V_L3 などの1つを含む。さらにかかる抗原結合タンパク質の別の例は、（a）1つの V_L3 、ならびに（b） V_L1 もしくは V_L2 などの1つ、などを含む。

【0123】

表2Aに説明する重鎖可変領域の各種組み合わせは、表2Aに説明する軽鎖可変領域の各種組み合わせの任意と組み合わせ得る。

【0124】

他の例では、抗原結合タンパク質は2本の同一軽鎖可変領域および／または2本の同一重鎖可変領域を含む。例として、抗原結合タンパク質は、表2Aに列挙した一对の軽鎖可変領域と一对の重鎖可変領域の組み合わせにおいて2本の軽鎖可変領域および2本の重鎖可変領域を含む抗体または免疫学的機能性断片であり得る。

10

20

30

40

50

【0125】

一部の場合では、抗原結合タンパク質は表2Bに列挙したうちの少なくとも1つの重鎖可変領域および／または1本の軽鎖可変領域を含む。一部の場合では、抗原結合タンパク質は表2Bに列挙したうちの少なくとも2つの異なる重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む。かかる抗原結合タンパク質の例は、(a) 1つのV_H7、ならびに(b) V_H7、V_H8、もしくはV_H9の1つを含む。別の例は、(a) 1つのV_H8、ならびに(b) V_H7、V_H8、もしくはV_H9の1つを含む。さらに別の例は、(a) 1つのV_H9、ならびに(b) V_H7、V_H8、もしくはV_H9の1つを含む。

【0126】

さらにかかる抗原結合タンパク質の別の例は、(a) 1つのV_L6、ならびに(b) V_L6、V_L7、V_L8もしくはV_L9の1つを含む。さらにかかる抗原結合タンパク質の別の例は、(a) 1つのV_L7、ならびに(b) V_L6、V_L7、V_L8もしくはV_L9の1つを含む。さらにかかる抗原結合タンパク質の別の例は、(a) 1つのV_L8、ならびに(b) V_L6、V_L7、V_L8もしくはV_L9の1つを含む。さらにかかる抗原結合タンパク質の別の例は、(a) 1つのV_L9、ならびに(b) V_L6、V_L7、V_L8もしくはV_L9の1つを含む。

【0127】

表2Bに説明する重鎖可変領域の各種組み合わせは、表2Bに説明する軽鎖可変領域の各種組み合わせの任意と組み合わせ得る。

【0128】

他の例では、抗原結合タンパク質は2本の同一軽鎖可変領域および／または2本の同一重鎖可変領域を含む。1例として、抗原結合タンパク質は、表2Bに列挙した一对の軽鎖可変領域と一对の重鎖可変領域の組み合わせにおいて2本の軽鎖可変領域および2本の重鎖可変領域を含む抗体または免疫学的機能性断片であり得る。

【0129】

提供する一部の抗原結合タンパク質は、V_H1、V_H2、V_H3、V_H4、V_H5、V_H6、V_H7、V_H8、およびV_H9から選択される重鎖可変ドメインの配列とアミノ酸残基が1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個のみ異なるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含み、ここにかかる配列相違は前述の可変ドメイン配列と比較してわずか15個以下のアミノ酸変化に至るそれぞれ独立した1個のアミノ酸の欠失、挿入もしくは置換のいずれかである。一部の抗原結合タンパク質中の重鎖可変領域は、V_H1、V_H2、V_H3、V_H4、V_H5、V_H6、V_H7、V_H8、またはV_H9の重鎖可変領域のアミノ酸配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または少なくとも99%同一である配列を有するアミノ酸配列を含む。

【0130】

ある抗原結合タンパク質は、V_L1、V_L2、V_L3、V_L4、V_L5、V_L6、V_L7、V_L8、およびV_L9から選択される軽鎖可変ドメインの配列とアミノ酸残基が1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個のみ異なるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含み、ここにかかる配列相違は前述の可変ドメイン配列と比較してわずか15個以下のアミノ酸変化に至るそれぞれ独立した1個のアミノ酸の欠失、挿入もしくは置換のいずれかである。一部の抗原結合タンパク質における軽鎖可変領域は、V_L1、V_L2、V_L3、V_L4、V_L5、V_L6、V_L7、V_L8、またはV_L9の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または少なくとも99%同一である配列を有するアミノ酸配列を含む。

【0131】

さらに他の抗原結合タンパク質（例えば、抗体または免疫学的機能性断片）としては、本明細書に記載の変異型重鎖および変異型軽鎖の変異形態が挙げられる。

【0132】

10

20

30

40

50

CDR

本明細書で開示する抗原結合タンパク質は、1つまたは複数のCDR内にグラフト化、挿入／または結合されるポリペプチドである。抗原結合タンパク質は、1、2、3、4、5または6個のCDRを有することができる。したがって抗原結合タンパク質は、例えば、1つの重鎖CDR1（「CDRH1」）、および／または1つの重鎖CDR2（「CDRH2」）、および／または1つの重鎖CDR3（「CDRH3」）、および／または1つの軽鎖CDR1（「CDRL1」）、および／または1つの軽鎖CDR2（「CDRL2」）、および／または1つの軽鎖CDR3（「CDRL3」）を有することができる。一部の抗原結合タンパク質は、CDRH3とCDRL3の両方を含む。具体的な重鎖および軽鎖CDRを、それぞれ表3A～B（抗DNP）および表3C～D（抗KLH）に同定する。

10

【0133】

所定の抗体の相補性決定領域（CDR）およびフレームワーク領域（FR）は、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991により記載の体系を用いて同定し得る。本明細書に開示されているある抗体は、表3A（抗DNP CDRH）、表3B（抗DNP CDRL）、表3C（抗KLH CDRH）、および表3D（抗KLH CDRL）に提示する1つまたは複数のCDRのアミノ酸配列と同一または実質的に同一であるアミノ酸配列を1つまたは複数含む。

20

【0134】

【表 5】

表 3 A 抗DNP CDRH配列の例

HC に含まれる	命名	配列	配列番号
H1、H9	CDRH1-1	HYYWS	188
H2、H3、H4、H5、H6、H10、 H11、H12、H13、H14	CDRH1-2	SYGMH	189
H7、H15、	CDRH1-3	SYYWS	190
H8、H16	CDRH1-4	SGGYWS	191
H1、H9	CDRH2-1	YIYYSGSTNYPNPSLKS	192
H2、H3、H4、H5、H6、H10、 H11、H12、H13、H14	CDRH2-2	VIWYDGSNKYYADSVKG	193
H7、H15	CDRH2-3	YIYYSGNTNSNPSLKS	194
H8、H16	CDRH2-4	YIYYSRSTYYNPSLKS	195
H1、H9	CDRH3-1	ARGDGYNYPDAFDI	196
H2、H10	CDRH3-2	YNWNYGMDV	197
H3、H5、H11、H13	CDRH3-3	YNFNYGMDV	198
H4、H6、H12、H14	CDRH3-4	YNNYNYGMDV	199
H7、H15	CDRH3-5	TYDSSGYYYRAFDI	200
H8、H16	CDRH3-6	TGYSSGWYPFDY	201

【 0 1 3 5 】

10

20

30

【表 6】

表 3 B 抗DNP CDRL配列の例

LCに含まれる	命名	配列	配列番号
L1	CDRL1-1	RASQGISNWLA	202
L2	CDRL1-2	RASQGISRRLA	203
L3、L5	CDRL1-3	RASQGIRNDLG	204
L4	CDRL1-4	RASQGMSNYLA	205
L1、L2、L3、L5	CDRL2-1	AASSLQS	206
L4	CDRL2-2	AASTLQS	207
L1	CDRL3-1	QQASSFPWT	208
L2	CDRL3-2	QQANSFPFT	209
L3	CDRL3-3	LQYNSYPWT	210
L4	CDRL3-4	QKFNSAPFT	211
L5	CDRL3-5	LQYNSSPWT	212

【 0 1 3 6 】

【表 7】

表 3 C 抗KLH CDRH配列の例

HC に含まれる	命名	配列	配列番号
H17、H21	CDRH1-5	NYDMY	213
H18、H22	CDRH1-6	SSSYFWG	214
H19、H20、H23、H24	CDRH1-7	GYHMH	215
H17、H21	CDRH2-5	AIGTAGDTYYPGSVKG	216
H18、H22	CDRH2-6	SIYYSGNTFYNP SLKS	217
H19、H20、H23、H24	CDRH2-7	WINPNSGGTNYAQKFQG	218
H17、H21	CDRH3-7	EKSSTSAFDY	219
H18、H22	CDRH3-8	QGGIAARTGYWYFDL	220
H19、H20、H23、H24	CDRH3-9	DRGSYYWFDP	221

10

20

【 0 1 3 7 】

【表 8】

表 3D 抗KLH CDRL配列の例

LCに含まれる	命名	配列	配列番号
L6	CDRL1-5	QAGQDIRNYLN	222
L7	CDRL1-6	RASQNISTNYLA	223
L8	CDRL1-7	RASQQISTNYLA	224
L9、L10	CDRL1-8	RASQGIRNDLG	204
L6	CDRL2-3	DASNLET	225
L7、L8	CDRL2-4	GASSRAT	226
L9、L10	CDRL2-5	AASSLQS	206
L6	CDRL3-6	QQYDNLT	227
L7	CDRL3-7	QQFGRSPRCS	228
L8	CDRL3-8	QQFGRSPRSS	229
L9、L10	CDRL3-9	LQHNSYPLT	230

【0138】

天然抗体内のCDRの構造および特性は上記のとおりである。簡単に述べると、従来の抗体において、CDRは、抗原結合および認識に参与する領域を構成する重鎖および軽鎖可変領域におけるフレームワーク内に含まれる。可変領域は、フレームワーク領域（上記 Kabat et al., 1991により命名されたフレームワーク領域1～4、FR1、FR2、FR3、およびFR4；上記 Chothia and Lesk, 1987も参照されたい）に少なくとも3本の重鎖または軽鎖CDRを含む（上記を参照されたい、Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N. I. H., Bethesda, MD; see also Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342:877-883も参照されたい）。しかしながら、本明細書に提供するCDRは、従来の抗体構造の抗原結合ドメインを定義するためだけに用い得るのではなく、他の本明細書に記載の各種ポリペプチド構造に組み込まれ得る。

【0139】

単離した抗原結合タンパク質の一部の実施形態は、免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗DNP抗体または抗体断片を含む。重鎖可変領域はCDRH1、CDRH2およびCDRH3と命名された3つの相補性決定領域を含む、ならびに／または軽鎖可変領域はCDRL1、CDRL2およびCDRL3と命名された3つのCDRを含み：

(a) CDRH1は配列番号188、配列番号189、配列番号190、もしくは配列番号191のアミノ酸配列を有する；ならびに／または

(b) CDRH2は配列番号192、配列番号193、配列番号194、もしくは配列番号195のアミノ酸配列を有する；ならびに／または

(c) CDRH3は配列番号196、配列番号197、配列番号198、配列番号199、配列番号200、もしくは配列番号201のアミノ酸配列を有する；ならびに／または

(d) CDRL1は配列番号202、配列番号203、配列番号204、もしくは配列番号205のアミノ酸配列を有する；ならびに／または

(e) CDRL2は配列番号206または配列番号207のアミノ酸配列を有する；ならびに／または

(f) CDRL3は配列番号208、配列番号209、配列番号210、配列番号211、もしくは配列番号212のアミノ酸配列を有する。

【0140】

他の態様では、(A) (i) 配列番号188、配列番号189、配列番号190、および配列番号191から選択されるCDRH1；(ii) 配列番号192、配列番号193、配列番号194、および配列番号195から選択されるCDRH2；(iii) 配列番号196、配列番号197、配列番号198、配列番号199、配列番号200、および配列番号201から選択されるCDRH3、から選択されるCDRH；ならびに(iv) アミノ酸がわずか5個、4個、3個、2個、もしくは1個以下、置換、欠失もしくは挿入されているアミノ酸を1個もしくは複数含む(i)、(ii)および(iii)のCDRH；(B) (i) 配列番号202、配列番号203、配列番号204、および配列番号205から選択されるCDRL1；(ii) 配列番号206および配列番号207から選択されるCDRL2；(iii) 配列番号208、配列番号209、配列番号210、配列番号211、および配列番号212から選択されるCDRL3、から選択されるCDRL；ならびに(iv) アミノ酸がわずか5個、4個、3個、2個、もしくは1個以下、置換、欠失もしくは挿入されているアミノ酸を1個もしくは複数含む(i)、(ii)および(iii)のCDRL、であるCDRを提供する。

【0141】

単離した抗原結合タンパク質の一部の実施形態は、免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗KLH抗体または抗体断片を含む。重鎖可変領域はCDRH1、CDRH2およびCDRH3と命名された3つの相補性決定領域を含む、ならびに／または軽鎖可変領域はCDRL1、CDRL2およびCDRL3と命名された3つのCDRを含み：

(a) CDRH1は配列番号213、配列番号214、もしくは配列番号215のアミノ酸配列を有する；ならびに／または

(b) CDRH2は配列番号216、配列番号217、もしくは配列番号218のアミノ酸配列を有する；ならびに／または

(c) CDRH3は配列番号219、配列番号220、もしくは配列番号221のアミノ酸配列を有する；ならびに／または

(d) CDRL1は配列番号204、配列番号222、配列番号223、もしくは配列番号224のアミノ酸配列を有する；ならびに／または

(e) CDRL2は配列番号206、配列番号225、もしくは配列番号226のアミノ酸配列を有する；ならびに／または

(f) CDRL3は配列番号227、配列番号228、配列番号229、もしくは配列番号230のアミノ酸配列を有する。

【0142】

他の態様では、(A) (i) 配列番号213、配列番号214、および配列番号215から選択されるCDRH1；(ii) 配列番号216、配列番号217、および配列番号218から選択されるCDRH2；(iii) 配列番号219、配列番号220、および

配列番号 2 2 1 から選択される C D R H 3、から選択される C D R H；ならびに (i v) アミノ酸がわずか 5 個、4 個、3 個、2 個、もしくは 1 個以下、置換、欠失もしくは挿入されているアミノ酸を 1 個もしくは複数含む (i)、(i i) および (i i i) の C D R H；(B) (i) 配列番号 2 0 4、配列番号 2 2 2、配列番号 2 2 3、および配列番号 2 2 4 から選択される C D R L 1；(i i) 配列番号 2 0 6、配列番号 2 2 5、および配列番号 2 2 6 から選択される C D R L 2；(i i i) 配列番号 2 2 7、配列番号 2 2 8、配列番号 2 2 9、および配列番号 2 3 0 から選択される C D R L 3、から選択される C D R L；ならびに (i v) アミノ酸がわずか 5 個、4 個、3 個、2 個、もしくは 1 個以下、置換、欠失もしくは挿入されているアミノ酸を 1 個もしくは複数含む (i)、(i i) および (i i i) の C D R L、である C D R を提供する。

10

【0143】

別の態様では、抗原結合タンパク質は表 3 A および表 3 B に列挙した C D R の変異形態を 1、2、3、4、5、または 6 個含み、表 3 A および表 3 B に列挙した C D R 配列と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90% または少なくとも 95% 同一である配列をそれぞれ有する。一部の抗原結合タンパク質は、表 3 A および表 3 B に列挙した 1、2、3、4、5、または 6 個の C D R、それぞれわずか 1、2、3、4 または 5 個以下のアミノ酸がこれらの表に列挙する C D R と異なるものを含む。

【0144】

別の態様では、抗原結合タンパク質は表 3 C および表 3 D に列挙した C D R の変異形態を 1、2、3、4、5、または 6 個含み、表 3 C および表 3 D に列挙した C D R 配列と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90% または少なくとも 95% 同一である配列をそれぞれ有する。一部の抗原結合タンパク質は、表 3 C および表 3 D に列挙した 1、2、3、4、5、または 6 個の C D R、それぞれわずか 1、2、3、4 または 5 個以下のアミノ酸がこれらの表に列挙する C D R と異なるものを含む。

20

【0145】

さらに別の態様では、本明細書に開示する C D R は、関連モノクローナル抗体の群に由来するコンセンサス配列を含む。本明細書に記載の「コンセンサス配列」とは、いくつかの配列間で共通する保存的アミノ酸および所定のアミノ酸配列内で異なる可変アミノ酸を有するアミノ酸配列を指す。提供する C D R コンセンサス配列は、C D R H 1、C D R H 2、C D R H 3、C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 のそれぞれに対応する C D R

30

【0146】

抗体抗原相互作用は会合速度定数 $M^{-1} s^{-1}$ (k_a)、または解離速度定数 s^{-1} (k_d)、あるいは解離平衡定数 M (K_D) を特徴とし得る。

【0147】

本発明は、D N P もしくは K L H の各 K_D (解離平衡定数) により測定された 10^{-9} M 以下の範囲、または 10^{-12} M もしくはそれを下回る範囲までに及ぶ結合親和性、または D N P もしくは K L H の各 k_d (解離速度定数) により測定された $10^{-4} s^{-1}$ 以下の範囲、または $10^{-10} s^{-1}$ もしくはそれを下回る範囲までに及ぶ結合活性などの望ましい特徴を示して D N P もしくは K L H とそれぞれ特異的に結合する抗体が挙げられるが、これらに限定されない各種抗原結合タンパク質を提供する。(本明細書の実施例 1 2 を参照されたい)。

40

【0148】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質 (例えば、抗体または抗体断片) は、D N P もしくは K L H の各 k_d (解離速度定数) により測定された約 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 $10^{-10} s^{-1}$ もしくはそれを下回る結合活性 (値が低いほど、高い結合活性を示す)、ならびに/または D N P もしくは K L H の各 K_D (解離平衡定数) により測定された約 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 、 10^{-14} 、 10^{-15} 、 10^{-16} M もしくはそれを下回る結合親和性 (値が低いほど、高い結合親和性を示す) などの望ましい特徴

50

を示す。会合速度定数、解離速度定数、または解離平衡定数は、反応速度分析技術（表面プラズモン共鳴（B I A c o r e（商標）；例えば、F i s c h e r e t a l. , A p e p t i d e - i m m u n o g l o b u l i n - c o n j u g a t e、WO2007/045463A1号の実施例10（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）、または製造業者により概説された一般的な手段または当技術分野において知られている他の方法を用いたK i n E x Aを用いて容易に決定し得る。B I A c o r e（商標）またはK i n E x Aから得られる反応速度データは製造業者により記載されている方法により分析し得る。

【0149】

いくつかの実施形態では、抗体は、全3つの軽鎖C D R、全3つの重鎖C D R、または全6つのC D Rを含む。一部の例示的な実施形態では、抗体由来の2つの軽鎖C D Rは、異なる抗体由来の第三の軽鎖C D Rと組み合わせ得る。あるいは、1つの抗体由来のC D R L 1は、特にC D Rの相同性が高い場合、異なる抗体由来のC D R L 2とさらに別の抗体由来のC D R L 3と組み合わせることができる。さらに、抗体由来の2つの重鎖C D Rは、異なる抗体由来の第三の重鎖C D Rと組み合わせ得る；または1つの抗体由来のC D R H 1は、特にC D Rの相同性が高い場合、異なる抗体由来のC D R H 2とさらに別の抗体由来のC D R H 3と組み合わせることができる。

【0150】

したがって、本発明は、抗体の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域の1つ、2つ、および／または3つのC D Rを含む各種組成物（それらの修飾または誘導体を含む）を提供する。かかる組成物は、本明細書に記載のまたは当技術分野において知られている技術により産生し得る。

【0151】

いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質（抗体および抗体断片を含む）は、所望の効果をj得るために単独または他の治療と組み合わせて使用できる治療分子として有用であり得る。かかる実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質（抗体および抗体断片を含む）は、1対24、1対16、1対8、または1対4で結合された薬理学的に活性な化学部分（低分子かポリペプチドかどうかを問わず）をさらに含む。薬理学的に活性な低分子またはポリペプチド化学部分は、抗原結合タンパク質免疫グロブリン単量体（例えば、L CまたはH C単量体）のN末端またはC末端残基、当技術分野において知られており本明細書に詳述する化学反応物にまたはそれらを介して結合できる。あるいは、本発明の抗原結合タンパク質の主鎖内のアミノ酸残基（1つまたは複数）の1つまたは複数の側鎖上の官能基にまたはそれらを介して接合した薬理学的に活性な化学部分（1つまたは複数）が本発明に包含される。有用な方法および免疫グロブリン鎖内の内部接合部位（例えば、特定のシステイン残基）は、当技術分野において知られている（例えば、G e g g e t a l. , M o d i f i e d F c M o l e c u l e s、WO2007/022070号および米国特許第20070269369号公開、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。

【0152】

薬理学的に活性な化学部分がポリペプチドである本発明の他の実施形態では、本明細書の実施例および当技術分野に詳述されているように、N末端および／またはC末端の代わりに免疫グロブリン重鎖のF cドメインの内部ループ内の免疫グロブリン重鎖の一次アミノ酸配列に挿入されている薬理学的に活性なポリペプチドを有する組換え融合タンパク質を産生できる（例えば、G e g g e t a l. 、米国特許第7,442,778号；米国特許第7,655,765号；米国特許第7,655,764号；米国特許第7,662,931号；米国特許第7,645,861号；公開された米国特許第2009/0281286号；ならびに米国特許第2009/0286964号、これらはそれぞれ参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。

【0153】

「結合した」とは、薬理学的に活性な化学部分が、抗原結合タンパク質のアミノ酸残基

に共有結合もしくは直接結合しているか、または任意選択的に、抗原結合タンパク質のアミノ酸残基に共有結合しているペプチジルもしくは非ペプチジルリンカー部分に共有結合もしくは直接結合していることを意味する。

【0154】

上記のとおり、本発明の組成物の一部の実施形態は、本発明の薬理学的に不活性な抗原結合タンパク質に結合する少なくとも1つの薬理学的に活性なポリペプチド部分（例えば、本発明の薬理学的に不活性な抗原結合タンパク質に結合する薬理学的に活性なポリペプチド部分の組換え融合タンパク質を構成する）に関わる。「薬理学的に活性」という用語は、そのように記載されている物質が医学的要因（例えば、血圧、血球数、コレステロールレベル、疼痛知覚）または疾患状態（例えば、癌、自己免疫障害、慢性疼痛）に影響を与える活性を有すると決定されたことを意味する。逆に、「薬理学的に不活性」という用語は、物質が医学的要因または疾患状態に影響を与える活性を有しないと決定できることを意味する。したがって、薬理学的に活性なペプチドまたはタンパク質は、以下に定義されるアゴニストもしくは模倣ペプチドおよびアンタゴニストペプチドを含む。本発明は、約5～約80個のアミノ酸残基の長さのアミノ酸配列を有し、組換え発現に反応する任意の薬理学的に活性なタンパク質の使用を包含する。本発明の一部の有用な実施形態では、薬理学的に活性なタンパク質は、必要な生体活性が維持される限り、目的の天然配列と比較して、アミノ酸の添加もしくは挿入、アミノ酸欠失、ペプチド切断、アミノ酸置換、またはアミノ酸残基の化学的誘導体化（既知の化学技術により成し遂げられる）などの1つまたは複数の方法において修飾する。

【0155】

「一模倣ペプチド」、「ペプチド模倣物」、および「一アゴニストペプチド」という用語は、目的の天然タンパク質に相当する生体活性を有するペプチドまたはタンパク質、例えば、これらに限定されないが、毒素ペプチド分子、例えば、ShKもしくはOSK1毒素ペプチド、またはそれらのペプチドアナログを指す。これらの用語はさらに、天然ペプチド分子の活性を、天然分子の効果増強などにより直接模倣物するペプチドを含む。

【0156】

「一アンタゴニストペプチド」、「ペプチドアンタゴニスト」、および「ペプチド阻害剤」という用語は、目的の受容体の生体活性をブロックするもしくは目的の受容体の生体活性と何らかの形で相互作用するか、または目的の受容体の既知のアンタゴニストもしくは阻害剤に相当する生体活性を有するペプチドを指す（これらに限定されないが、イオンチャネルまたはGタンパク質共役型受容体（GPCR）など）。

【0157】

本発明で利用できる薬理学的に活性なタンパク質の例としては、毒素ペプチド（例えば、OSK1またはOSK1ペプチドアナログ；ShKまたはShKペプチドアナログ）、IL-6結合ペプチド、CGRPペプチドアンタゴニスト、ブラジキニンB1受容体ペプチドアンタゴニスト、副甲状腺ホルモン（PTH）アゴニストペプチド、副甲状腺ホルモン（PTH）アンタゴニストペプチド、ang-1結合ペプチド、ang-2結合ペプチド、ミオスタチン結合ペプチド、エリスロポエチン模倣（EPO模倣）ペプチド、トロンボポイエチン模倣（TPO模倣）ペプチド（例えば、AMP2またはAMP5）、神経増殖因子（NGF）結合ペプチド、B細胞活性化因子（BAFF）結合ペプチド、およびグルカゴン様ペプチド（GLP）-1もしくはそのペプチド模倣物またはGLP-2もしくはそのペプチド模倣物が挙げられるが、これらに限定されない。グルカゴン様ペプチド1（GLP-1）および関連ペプチドグルカゴンはプログルカゴンの分化プロセスを介して産生され、対抗する生体活性を有する。プログルカゴン自体は、膵臓α細胞内および腸内分泌L細胞内で産生され、これらは主に遠位小腸および結腸に位置する。膵臓内では、グルカゴンは、プログルカゴンから選択的に切断される。対して、腸内では、プログルカゴンは、GLP-1およびグルカゴン様ペプチド2（GLP-2）を形成するようにプロセス化され、これらはそれぞれプログルカゴンのアミノ酸残基78～107および126～158に相当する（例えば、Irwin and Wong, 1995, Mol.

Endocrinol. 9:267-277 and Bell et al., 1983, Nature 304:368-371を参照されたい)。慣例により、GLP-1のアミノ酸の番号付けは、プログルカゴン切断から形成されるGLP-1(1~37)に基づく。生体活性形態は、このペプチドのさらなるプロセスから産生し、これは、ある番号付け規定においてGLP-1(7~37)-OHおよびGLP-1(7~36)-NH₂をもたらす。GLP-1(7~37)-OH(または単にGLP-1(7~37))およびGLP-1(7~36)-NH₂は両方とも同じ活性を有する。便宜上、「GLP-1」という用語は、これらの形態の両方を指すために使用する。これらのプロセス化したペプチドの第一アミノ酸は、この番号付け規定においてHis7である。しかしながら、当技術分野において認識される別の番号付け規定では、Hisで開始するプロセス化したペプチド番号は7位ではなく1位とみなされる。したがって、この番号付け体系では、GLP-1(1~31)はGLP-1(7~37)と同じであり、GLP-1(1~30)はGLP-1(7~36)と同じである。GLP-1模倣ポリペプチド配列の例としては、以下が挙げられる：

HGEGTFTSDQSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG// (配列番号290)；

HGEGTFTSDQSSYLEGQAAKEFIAWLQKGRG// (配列番号291)；

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG// (配列番号292)；

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAQLVKGRG// (配列番号293)；

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAQLQKGRG// (配列番号294)；

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLQKGRG// (配列番号295)；

HNETTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG// (配列番号296)；

HGEGTFTSDVSSYLENQTAKEFIAWLVKGRG// (配列番号297)；

HGEGTFTSDVSSYLEGNATKEFIAWLVKGRG// (配列番号298)；

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVNGTG// (配列番号299)；

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKNRT// (配列番号300)；

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRNGT// (配列番号301)；

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGGTGNGT// (配列番号302)；ならびに

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGGSGNGT// (配列番号303)。

【0158】

ヒトGLP-2およびGLP-2模倣アナログも当技術分野において知られている。(例えば、Prasad et al., Glucagonlike peptide-2 analogue enhances intestinal mucosal mass after ischemia and reperfusion, J. Pediatr. Surg. 2000 Feb;35(2):357-59 (2000)；Yusta et al., Glucagon-like peptide-2 receptor activation engages bad and gl

10

20

30

40

50

ycogen synthase kinase-3 in a protein kinase A-dependent manner and prevents apoptosis following inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase, J. Biol. Chem. 277 (28):24896-906 (2002)を参照されたい)。

【0159】

「毒素ペプチド」は、毒から単離できる天然の薬理的に活性なペプチドまたはポリペプチドの同じアミノ酸配列を有するペプチドおよびポリペプチドを含み、かかる天然分子の修飾ペプチドアナログも含む。(例えば、Kalman et al., ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide, J. Biol. Chem. 273 (49):32697-707 (1998); Kem et al., 米国特許第6,077,680号; Mouhat et al., OSK1 derivatives、WO2006/002850A2号; Chandry et al., Analogs of SHK toxin and their uses in selective inhibition of Kv1.3 potassium channels、WO2006/042151号; Sullivan et al., Toxin Peptide therapeutic agents、WO2006/116156A2号を参照されたく、これらはすべて参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。ヘビ、サソリ、クモ、ハチ、カタツムリおよびイソギンチャクは、小さな生体活性毒素ペプチド、または強力かつ選択的なイオンチャネルおよび受容体を標的とする「毒素」の豊富な供給源として役立ち得る毒を産生する生物の数例である。毒素ペプチドの1例は、Orthochirus scrobiculosusサソリ毒から単離した毒素ペプチドであるOSK1である(OSK1としても知られている)。(例えば、Mouhat et al., K⁺ channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from Orthochirus scrobiculosus scorpion venom, Biochem. J. 385:95-104 (2005); Mouhat et al., Pharmacological profiling of Orthochirus scrobiculosus toxin 1 analogs with a trimmed N-terminal domain, Molec. Pharmacol. 69:354-62 (2006); Mouhat et al., OSK1 derivatives、WO2006/002850A2号)。別の例は、イソギンチャクStichodactyla helianthus毒から単離されるShKである(例えば、Tudor et al., Ionisation behaviour and solution properties of the potassium-channel blocker ShK toxin, Eur. J. Biochem. 251(1-2):133-41(1998); Pennington et al., Role of disulfide bonds in the structure and potassium channel blocking activity of ShK toxin, Biochem. 38(44):14549-58 (1999); Kem et al., ShK toxin compositions and methods of use、米国特許第6,077,680号; Lebrun et al., Neuropeptides originating in scorpion、米国特許第6,689,749号; Beeton et al., Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases, Molec. Pharmacol. 67(4):1369-81 (2005))。

10

20

30

40

50

【0160】

毒素ペプチドは、通常、約20～約80個のアミノ酸の長さであり、2～5個のジスルフィド結合を含み、非常にコンパクトな構造を形成する。毒素ペプチドが（例えば、サソリ、イソギンチャクおよびイモガイ毒から）単離されており、イオンチャンネルに与える影響が特性決定されている。かかるペプチドは、特に効能および安定性の重要課題に取り組む上で十分に適した比較的少数の構造的フレームワークから発達していると考えられる。大部分のサソリおよびイモガイ毒ペプチドは、例えば、10～40個のアミノ酸および最大5個のジスルフィド結合を含み、しばしばタンパク質分解耐性である非常にコンパクトかつ拘束された構造（マイクロタンパク質）を形成している。コノトキシンおよびサソリ毒素ペプチドは、それらのジスルフィド結合およびペプチドの折畳みに基づき、いくつかの上科に分類できる。これらの多くの溶液構造が、それらのコンパクトな構造を例証してそれらのファミリー折畳み保存を検証するNMR分光器により決定されている。（例えば、Tudor et al., Ionisation behaviour and solution properties of the potassium-channel blocker ShK toxin, Eur. J. Biochem. 251 (1-2): 133-41 (1998); Pennington et al., Role of disulfide bonds in the structure and potassium channel blocking activity of ShK toxin, Biochem. 38 (44): 14549-58 (1999); Jaravine et al., Three-dimensional structure of toxin OSK1 from Orthochirus scrobiculosus scorpion venom, Biochem. 36 (6): 1223-32 (1997); del Rio-Portillo et al.; NMR solution structure of Cn12, a novel peptide from the Mexican scorpion Centruroides noxius with a typical beta-toxin sequence but with alpha-like physiological activity, Eur. J. Biochem. 271 (12): 2504-16 (2004); Prochnick a-Chalufour et al., Solution structure of discrepin, a new K⁺-channel blocking peptide from the alpha-KTx15 subfamily, Biochem. 45 (6): 1795-1804 (2006)）。本発明の実践が有用であり得る薬理的に活性な毒素ペプチドの例としては、ShK、OSK1、カリブドトキシン（ChTx）、カリオトキシン1（KTX1）、もしくはモーロトキシン、または天然配列の1つもしくは複数のアミノ酸残基が修飾されているこれらの任意の毒素ペプチドアナログが挙げられるが、これらに限定されない。他の例が当技術分野において知られており、あるいはSullivan et al., WO06116156A2号または米国特許第11/406,454号（題名：毒素ペプチド治療薬（Toxin Peptide Therapeutic Agents, 米国特許第2007/0071764号として公開）；Mouhat et al., OSK1 derivatives, WO2006/002850A2号；Sullivan et al., 米国特許第11/978,076号（題名：結合された毒素ペプチド治療薬（Conjugated Toxin Peptide Therapeutic Agents）、2007年10月25日出願、米国特許第20090291885号として2009年11月26日公開）、Sullivan et al., WO2008/088422号；Lebrun et al., 米国特許第6,689,749号、およびSullivan et al., Selective and Potent Peptide Inhibitors of Kv1.3、米国仮出願第61/210,594号、2009年3月20日出願（これらはそれぞれ参照によりそれらの全体が組み込まれる））に見出すことができ

る。

【0161】

「ペプチドアナログ」という用語は、少なくとも1つのアミノ酸残基の置換、内部添加、または少なくとも1つのアミノ酸の内部欠失、ならびに／またはアミノ末端もしくはカルボキシ末端の切断もしくは添加により天然ペプチド配列とアミノ酸が異なる配列を有するペプチドを指す。「内部欠失」とは、天然配列のN末端位またはC末端位以外のアミノ酸欠失を指す。同様に、「内部添加」とは、天然配列におけるN末端位またはC末端位以外のアミノ酸の存在を指す。「毒素ペプチドアナログ」は、これらに限定されないが、目的の天然毒素ペプチド配列と比較してOSK1ペプチドアナログ、ShKペプチドアナログ、またはChTxペプチドアナログなど、目的の天然毒素ペプチド配列の修飾（例えば、前述のアミノ酸残基の置換、内部添加もしくは挿入、内部欠失、ならびに／またはアミノ末端もしくはカルボキシ末端の切断もしくは添加）を含む。

10

【0162】

「CGRPペプチドアンタゴニスト」とは、生理状態の温度、pH、およびイオン強のもと、CGRP₁受容体（これらに限定されないが、CGRPペプチドアナログなど）と選択的に結合し、完全長の天然ヒト α CGRPまたは β CGRPにより、CGRP₁受容体活性化を拮抗化、ブロック、低減（decrease）、軽減（reduce）、妨害、または阻害するペプチドである。CGRPペプチドアンタゴニストとしては、完全および部分的なアンタゴニストが挙げられる。かかるアンタゴニスト活性は既知のインビトロ方法またはインビボ機能性アッセイ方法により検出できる。（例えば、Smith et al., Modifications to the N-terminus but not the C-terminus of calcitonin gene-related peptide (8-37) produce antagonist with increased affinity, J. Med. Chem., 46:2427-2435 (2003)を参照されたい）。有用なCGRPペプチドアンタゴニストの例は、Gegg et al., CGRP peptide antagonists and conjugates, WO2007/048026A2号および米国仮出願第11/584,177号（2006年10月19日出願、米国特許第2008/0020978A1号として公開）に開示されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

30

【0163】

「副甲状腺ホルモン（PTH）アゴニスト」および「PTHアゴニスト」という用語は、完全長天然ヒト副甲状腺ホルモンのようにPTH-1もしくはPTH-2受容体に結合し、1つもしくは複数のPTH活性アッセイ変数を増大または低減する分子を指す。有用なPTHアゴニストペプチドの例は、副甲状腺ホルモンおよび副甲状腺ホルモン関連タンパク質の受容体の修飾因子（Modulators of receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein）という題名の米国特許第6,756,480号の表1に開示されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。PTH活性アッセイの1例は、米国特許第6,756,480号の実施例1に開示されている。

40

【0164】

「副甲状腺ホルモン（PTH）アンタゴニスト」という用語は、完全長天然ヒト副甲状腺ホルモンによりPTH-1もしくはPTH-2受容体に結合し、それらの変数に対する正常な作用をブロックまたは防止する分子を指す。有用なPTHアンタゴニストペプチドの例は、米国特許第6,756,480号の表2に開示されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。PTH活性アッセイの1例は、米国特許第6,756,480号の実施例2に開示されている。

【0165】

「ブラジキニンB1受容体アンタゴニストペプチド」および「ブラジキニンB1受容体

50

ペプチドアンタゴニスト」という用語は、ヒトブラジキニンB1受容体(hB1)に関してアンタゴニスト活性を有するペプチドを意味する。有用なブラジキニンB1受容体アンタゴニストペプチドは、Ng et al., Antagonist of the bradykinin B1 receptor、米国特許第2005/0215470 A1号(2005年9月29日公開、米国特許第7,605,120号;米国特許第5,834,431号または同第5,849,863号として発行)に記載されているように同定もしくは生成できる。B1受容体活性アッセイの1例は、米国特許第2005/0215470 A1号の実施例6~8に開示されている。

【0166】

「トロンボポイエチン(TPO)模倣ペプチド」および「TPO模倣ペプチド」という用語は、Cwirala et al. (1997), Science 276: 1696-9、米国特許第5,869,451号および同第5,932,946号(これらは参照によりそれらの全体が組み込まれる);米国特許第2003/0176352号(2003年9月18日公開、これは参照によりその全体が組み込まれる);WO03/031589号(2003年4月17日公開);WO00/24770号(2000年5月4日公開)に記載されているように同定もしくは生成できるペプチド;ならびに米国特許第2006/0140934号(米国仮出願第11/234,731号、修飾Fc分子(Modified Fc Molecules)という題名で2005年9月23日に出願、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)の表5に記載されている任意のペプチドを指す。これらの各参考文献に開示されている手順に従い開示されているものと異なるペプチドライブラリーを用いて、実際に開示されているものと異なるペプチドを選択できることを当業者は理解する。

【0167】

「EPO模倣ペプチド」および「エリスロポエチン模倣ペプチド」という用語は、Wrighton et al. (1996), Science 273: 458-63およびNaranda et al. (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7569-74(これらは両方とも参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)に記載されているように同定または生成できるペプチドを指す。有用なEPO模倣ペプチドとしては、米国特許第2007/0269369 A1号の表5および米国特許第6,660,843号(これらは両方とも参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)に列举のEPO模倣ペプチドが挙げられる。

【0168】

「ang-2結合ペプチド」という用語は、米国特許第2003/0229023号(2003年12月11日公開);WO03/057134号(2003年7月17日公開);米国特許第2003/0236193号(2003年12月25日公開)(これらはそれぞれ参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)に記載されているように同定もしくは生成できるペプチド;ならびに米国特許第2006/0140934号(米国仮出願第11/234,731号、修飾Fc分子(Modified Fc Molecules)という題名で2005年9月23日に出願、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)の表6に記載されている任意のペプチドを含む。これらの各参考文献に開示されている方法に従い開示されているものと異なるペプチドライブラリーを用いて、実際に開示されているものと異なるペプチドを選択できることを当業者は理解する。

【0169】

「神経増殖因子(NGF)結合ペプチド」および「NGF結合ペプチド」という用語は、WO04/026329号(2004年4月1日公開)に記載されているように同定もしくは生成できるペプチドならびに米国特許第2006/0140934号(米国仮出願第11/234,731号、修飾Fc分子(Modified Fc Molecules)という題名で2005年9月23日に出願、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)の表7に同定されている任意のペプチドを含む。この参考文献に開示されている方法に従い開示されているものと異なるペプチドライブラリーを用いて、実際に開

示されているものと異なるペプチドを選択できることを当業者は理解する。

【0170】

「ミオスタチン結合ペプチド」という用語は、米国特許第10/742,379号(2003年12月19日出願、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されているように同定もしくは生成できるペプチド、ならびに米国特許第2006/0140934号(米国仮出願第11/234,731号、修飾Fc分子(Modified Fc Molecules))という題名で2005年9月23日出願、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)の表8に記載されているペプチドを含む。これらの各参考文献に開示されている方法に従い開示されているものと異なるペプチドライブラリーを用いて、実際に開示されているものと異なるペプチドを選択できることを当業者は理解する。

10

【0171】

「BAFF-アンタゴニストペプチド」および「BAFF結合ペプチド」という用語は、米国特許第2003/0195156A1号(これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されているように同定もしくは生成できるペプチド、ならびに米国特許第2006/0140934号(米国仮出願第11/234,731号、修飾Fc分子(Modified Fc Molecules))という題名で2005年9月23日出願、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)の表9に記載されているペプチドを含む。前述の参考文献に開示されている方法に従い開示されているものと異なるペプチドライブラリーを用いて、実際に開示されているものと異なるペプチドを選択できることを当業者は理解する。

20

【0172】

前述は、本発明の抗原結合タンパク質(抗体および抗体断片を含む)に有用に結合または融合できる薬理的に活性なポリペプチドの非限定的な例としてのみ意図する。薬理的に活性なポリペプチド部分を含む任意のものを本発明の範囲内に使用できる(いわゆるアビマー構造のポリペプチドを含む)(例えば、Kolkman et al., Novel Proteins with Targeted Binding、米国特許第2005/0089932号; Baker et al., IL-6 Binding Proteins、米国特許第2008/0281076号; Stemmer et al., Protein Scaffolds and Uses Thereof、米国特許第2006/0223114号および米国特許第2006/0234299号を参照されたい)。

30

【0173】

目的の治療適応における薬剤の検証に用いられる有用な前臨床動物モデルが当技術分野において知られている(例えば、an adoptive-transfer model of periodontal disease by Valverde et al., J. Bone Mineral Res. 19:155 (2004); an ultrasonic perivascular Doppler flow meter-based animal model of arterial thrombosis in Gruner et al., Blood 105:1492-99 (2005); pulmonary thromboembolism model, aorta occlusion model, and murine stroke model in Braun et al., WO2009/115609A1号)。例えば、免疫疾患(多発性硬化症など)の検討のため、多発性硬化症の養子移入実験的自己免疫性脳脊髄炎(AT-EAE)モデルについて記載されている(Beeton et al., J. Immunol. 166:936 (2001); Beeton et al., PNAS 98:13942 (2001); Sullivan et al., WO2008/088422A2号の実施例45、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。AT-EAEモデルでは、有効量の本発明の医薬組成物で処理した動物の有意に低下した疾患重症度および増加した生存率が予期され

40

50

、対して未処置動物は重症疾患および／または致死を発現することが予期される。A T - E A Eモデルの実行において、ミエリン塩基性タンパク質 (M B P) に特異的な脳骨髄性 C D 4 + ラット T 細胞系 P A S は E v e l y n e B e r a u d 博士から入手する。A T - E A Eモデルにおけるこれらのインビトロ細胞の維持およびそれらの使用については、既に記載されている [B e e t o n e t a l . (2 0 0 1) P N A S 9 8 , 1 3 9 4 2] 。 P A S T 細胞は、抗原刺激、または M B P および照射した胸腺細胞による活性化 (2 日間) 、ならびに T 細胞増殖因子による増殖 (5 日間) ラウンドを改変することによりインビトロで維持される。 P A S T 細胞 (3×10^5 / m L) の活性化は、 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ の M B P および 15×10^6 / m L の同系照射 (3 5 0 0 ラド) 胸腺細胞による 2 日間の細胞インキュベートに関わる。インビトロ活性化後 2 日目、 $10 \sim 15 \times 10^6$ 生存 P A S T 細胞を 6 ~ 1 2 週齢の雌 L e w i s ラット (C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s) 尾に I V 注射した。ビヒクル (2 % L e w i s ラット血清の P B S 溶液) または試験医薬組成物の 1 日皮下注射を - 1 日目から 3 日目まで投与する。ここで - 1 日目とは P A S T 細胞の注射 1 日前 (0 日目) を表す。ビヒクル処置ラットにおいて、急性 E A E は P A S T 細胞注射から 4 ~ 5 日後に発現することが予期される。典型的には、阻害剤レベル分析のため、4 日目の尾静脈出血により、および 8 日目 (試験最終日) の心穿刺により血清を採取する。典型的には、ラットを - 1 、 4 、 6 、および 8 日目に測定する。動物は、細胞移入日 (0 日目) ~ 3 日目に 1 日 1 回、および 4 日目 ~ 8 日目に 1 日 2 回盲検的にスコア化し得る。臨床徴候を各肢および尾の不全麻痺程度の総スコアとして評価する。臨床的スコアリングは、 0 = 徴候なし、 0 . 5 = 末梢尾を引きずる、 1 . 0 = 尾を引きずる、 2 . 0 = 軽度不全対麻痺、運動失調、 3 . 0 = 中等度の不全対麻痺、 3 . 5 = 片方の後肢麻痺、 4 . 0 = 完全な後肢麻痺、 5 . 0 = 完全な後肢麻痺および失禁、 5 . 5 = 四肢麻痺、 6 . 0 = 瀕死状態または死である。スコア 5 . 0 に至るラットは、典型的には安楽死させる。

【 0 1 7 4 】

抗原結合タンパク質の抗体産生の実施形態

ポリクローナル抗体。ポリクローナル抗体は、好ましくは関連抗原およびアジュバントの複数回皮下 (s c) または腹腔内 (i p) 注射した動物において増加する。あるいは、抗原は動物のリンパ節内に直接注射し得る (K i l p a t r i c k e t a l . , H y b r i d o m a , 1 6 : 3 8 1 - 3 8 9 , 1 9 9 7 を参照されたい) 。二機能性薬剤または誘導化剤、例えば、マレイミドベンジルスルホコハク酸イミドエステル (システイン残基を介した接合) 、 N - ヒドロキシコハク酸イミド (リジン残基を介して) 、グルタルアルデヒド、コハク酸無水物または当技術分野において知られている他の薬剤を用いて、免疫化対象種において免疫原性であるタンパク質 (例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、または大豆トリプシンインヒビター) に関連抗原を接合することにより、改善された抗体反応が得られ得る。

【 0 1 7 5 】

例えば、 $100 \mu\text{g}$ タンパク質または結合体 (マウスの場合) を 3 容量のフロインド完全アジュバントと結合させて溶液を複数部位に皮内注射することにより、動物を、抗原、免疫原性結合体、または誘導体に対して免疫化する。 1 ヶ月後、動物は、フロインド完全アジュバントを複数部位に皮下注射することにより元の量の 5 分の 1 ~ 1 0 分の 1 のペプチドまたは結合体でブーストする。ブースト注射の 7 ~ 1 4 日後、動物を出血させ、血清の抗体価をアッセイする。力価安定期まで動物をブーストする。好ましくは、同じ抗原の結合体で動物をブーストするが、異なるタンパク質に結合するおよび／または異なる架橋試薬を介する。結合体はタンパク質融合物として組換え細胞培養内でも作製できる。また、凝集剤 (ミョウバンなど) も免疫応答を高めるために適切に用いられる。

【 0 1 7 6 】

モノクローナル抗体。 D N P または K L H にそれぞれ結合するモノクローナル抗体も、本発明の抗原結合タンパク質または抗原結合タンパク質として提供する。モノクローナル抗体は、当技術分野において知られている任意の技術を用いて、例えば、免疫化スケジュー

ール完了後にトランスジェニック動物から収集した不死化脾臓細胞により産生し得る。脾臓細胞は、当技術分野において知られている任意の技術を用いて、例えば、骨髓腫細胞と融合してハイブリドーマを産生することにより不死化できる。例えば、モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) により最初に記載されたハイブリドーマ方法を用いて作製してもよいし、組換えDNA方法（例えば、Cabilly et al., Methods of producing immunoglobulins, vectors and transformed host cells for use therein、米国特許第6,331,415号）により作製してもよく、これは任意選択的に抗体をグリコシル化できる哺乳類細胞系（例えば、CHO細胞）を用いて、一般に軽鎖および重鎖の等モル産生を促進する「スプリットDHFR」方法などの方法を含む（例えば、Page, Antibody production、欧州特許第0481790A2号および米国特許第5,545,403号を参照されたい）。

10

【0177】

ハイブリドーマ方法では、マウスまたは他の適切な宿主哺乳類（ラット、ハムスターまたはマカクザルなど）を本明細書に記載のように免疫化して、免疫化に用いるタンパク質と特異的に結合する抗体を産生するか産生可能なリンパ球を引き出す。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫化し得る。次いで適切な融合剤（ポリエチレングリコールなど）を用いて、リンパ球を骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)）。

20

【0178】

一部の場合では、ハイブリドーマ細胞系の産生は、aDNPまたはKLH免疫原を含むヒト免疫グロブリン配列を有するトランスジェニック動物を免疫化すること；免疫化動物から脾臓細胞を収集すること；収集した脾臓細胞を骨髓腫細胞系に融合して、ハイブリドーマ細胞を生成すること；ハイブリドーマ細胞系をハイブリドーマ細胞から確立すること、ならびにDNPもしくはKLHにそれぞれ結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞系を同定すること、により行う。かかるハイブリドーマ細胞系、およびかかるハイブリドーマ細胞系から産生したモノクローナル抗体は、本発明の態様である。

30

【0179】

本発明は、モノクローナル抗体である本発明の抗原結合タンパク質を産生するハイブリドーマも包含する。したがって、本発明は、以下を含む方法にも関する：

(a) ハイブリドーマにより抗原結合タンパク質を発現させる条件下の培養基でハイブリドーマを培養すること；ならびに

(b) 培養基から抗原結合タンパク質を回収することであり、これは既知の抗体精製技術（これに限定されないが、本明細書の実施例1に開示のモノクローナル抗体精製技術など）により成し遂げることができる。

【0180】

ハイブリドーマ細胞は調製後、（好ましくは、融合していない親骨髓腫細胞の増殖もしくは生存を阻害する物質を1つまたは複数含む）適切な培養基内で播種および増殖する。例えば、親骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRRT）を欠く場合、ハイブリドーマの培養基は、典型的には、HGPRT欠損細胞の増殖を防止する物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン（HAT培地）を含む。

40

【0181】

好ましい骨髓腫細胞は、効果的に融合し、選択された抗体産生細胞によって安定した高レベルの抗体産生を支え、培地に感受性である。ヒトモノクローナル抗体産生のためのヒト骨髓腫およびマウスーヒトヘテロ骨髓腫細胞系についても記載されている（Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984) ; Brodeu

50

ret al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。ハイブリドーマを産生する融合手順に用いる骨髓腫細胞は、好ましくは、非抗体産生であり、高い融合効率、および所望の融合細胞（ハイブリドーマ）のみの増殖を支持する特定の選択的培地において増殖不能にする酵素欠乏を有する。マウス融合物における使用に適した細胞系の例としては、Sp-20、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1. Ag 4 1、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1. 7およびS194/5XXO Bul；ラット融合物に用いる細胞系の例としては、R210. RCY3、Y3-Ag 1. 2. 3、IR983Fおよび4B210が挙げられる。細胞融合物に有用な他の細胞系としては、U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2およびUC729-6が挙げられる。

10

【0182】

ハイブリドーマ細胞の増殖する培養基において、抗原指向性モノクローナル抗体の産生に関してアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈殿によりまたはインビトロ結合アッセイ（放射免疫アッセイ（RIA）または酵素結合免疫吸収アッセイ（ELISA）など）により決定される。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、BIACore（商標）またはスキャッチャード分析により決定できる（Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980); Fischer et al., A peptide-immunoglobulin-conjugate, WO2007/045463 A1号の実施例10、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

20

【0183】

所望の特異性、親和性、および／または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定後、限定的な希釈手順によりクローンをサブクローン化し得、標準的な方法により増殖させ得る（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。この目的に適した培養基としては、例えば、D-MEMまたはRPMI-1640培地が挙げられる。加えて、ハイブリドーマ細胞は動物内の腹水腫瘍としてインビボ増殖させ得る。

30

【0184】

ハイブリドーマまたはmAbは、特定の特性（Kv1. xチャンネルを介したK⁺流動を阻害する能力など）を有するmAbを同定するためにさらにスクリーニングし得る。かかるスクリーニング例を以下の実施例に提示する。サブクローンに分泌されたモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順（例えば、タンパク質Aセファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、親和性クロマトグラフィー、または当技術分野において知られている他の任意の適切な精製技術など）により、培養基、腹水液、または血清から適切に分離する。

40

【0185】

抗体の組換え産生。本発明は、本明細書に記載の本発明の任意の（ポリクローナルおよびモノクローナル）抗体（抗体断片を含む）をコードし、任意選択的に、核酸を含む宿主細胞、ベクターおよび宿主細胞により認識される配列を制御するように操作可能に連結された単離核酸、ならびに抗体産生のための組換え技術（核酸を発現させるように宿主細胞を培養すること、ならびに任意選択的に、宿主細胞培養もしくは培養基から抗体を回収することを含み得る）を提供する。類似の物質および方法をポリペプチドベースの抗原結合タンパク質の産生に適用する。

【0186】

目的の免疫グロブリンまたはポリペプチド由来の関連アミノ酸配列は、直接タンパク質

50

配列決定により決定し得、適切なコード化ヌクレオチド配列を汎用コドン表に従い設計できる。あるいは、モノクローナル抗体をコードするゲノムまたはcDNAは、従来の手順を用いて（例えば、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いて）かかる抗体を産生する細胞から単離して配列決定し得る。

【0187】

DNAのクローニングは、標準的な技術を用いて実行する（例えば、参照により本明細書に組み込まれるSambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Pressを参照されたい）。例えば、cDNAライブラリーは、polyA+mRNA、好ましくは膜結合型mRNA、およびヒト免疫グロブリンポリペプチド遺伝子配列に特異的なプローブを用いてスクリーニングしたライブラリーの逆転写により構築し得る。しかしながら、1つの実施形態では、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて、目的の免疫グロブリン遺伝子セグメント（例えば、軽鎖または重鎖可変セグメント）をコードするcDNA（または完全長cDNAの一部）を増幅する。増幅された配列は、任意の適切なベクター、例えば、発現ベクター、ミニ遺伝子ベクター、またはファージディスプレイベクター内に容易にクローン化できる。目的の免疫グロブリンポリペプチドの一部配列を決定できる限り、使用する特定のクローニング方法は重要ではないことが理解されるであろう。

【0188】

抗体核酸の1つの供給源は、目的の抗原により免疫化した動物からB細胞を得て不死細胞に融合することにより産生されるハイブリドーマである。あるいは、核酸は免疫化動物のB細胞（または完全脾臓）から単離できる。抗体をコードする核酸のさらに別の供給源は、例えば、ファージディスプレイ技術を介して産生したかかる核酸のライブラリーである。目的のペプチド、例えば、所望の結合特性を有する可変領域ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、標準的な技術（パニングなど）により同定できる。

【0189】

免疫グロブリンポリペプチドの完全可変領域をコードする配列を決定し得る；しかしながら、時には可変領域の一部のみ、例えば、CDRコード部分のみの配列決定が適している。配列決定は、標準的な技術を用いて行う（例えば、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, and Sanger, F. et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467を参照されたい、これらは参照により本明細書に組み込まれる）。ヒト免疫グロブリン遺伝子およびcDNAの公開された配列とクローン化した核酸配列を比較することにより、当業者は配列決定した領域に応じて、(i) ハイブリドーマ免疫グロブリンポリペプチド（重鎖のアイソタイプを含む）の生殖系列セグメント使用ならびに(ii) 重鎖および軽鎖の可変領域の配列（N領域添加および体細胞変異プロセスに起因する配列を含む）を容易に決定できるであろう。免疫グロブリン遺伝子配列情報の1つの供給源は、National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md. である。

【0190】

単離DNAは、制御配列と操作可能に連結させることも発現ベクター中に入れることもでき、次いでこれらを、そうしなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞内にトランスフェクトし、組換え宿主細胞内のモノクローナル抗体の合成を指向する。抗体の組換え産生は、当技術分野において周知である。

【0191】

核酸は、別の核酸配列との機能的関係におかれる場合、操作可能に連結している。例え

ば、プレ配列もしくは分泌リーダーについてのDNAは、ポリペプチド分泌に関わるプレタンパク質として発現する場合、ポリペプチドについてのDNAと操作可能に連結している；プロモーターもしくはエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合、コード配列と操作可能に連結している；またはリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように位置する場合、コード配列と操作可能に連結している。一般に、操作可能に連結しているとは、連結しているDNA配列が連続的であること、および分泌リーダーの場合は、連続的かつ読み込み相にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは連続的である必要はない。連結は、好都合の制限部位での結紮により成し遂げられる。かかる部位が存在しない場合、従来の実践に従い合成オリゴヌクレオチド接着体またはリンカーを用いる。

【0192】

10

多くのベクターが当技術分野において知られている。ベクター成分は、下記を1つまたは複数含み得る：シグナル配列（例えば、抗体の分泌を指向とし得る；例えば、ATGGACATGAGGGGTGCCCGCTTCAGCTCCTTGGGGCTCCTGCTGCTGTGGCTGAGAGGTGCGCGCTGT／／配列番号102、これはVK-1シグナルペプチド配列MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARC／／配列番号103をコードする）、複製起点、1つもしくは複数の選択的マーカー遺伝子（例えば、抗生剤もしくは他の薬剤耐性、相補性栄養要求欠陥を付与し得るか、または培地中で入手不能な重要栄養剤を補給し得る）、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終止配列であり、これらはすべて当技術分野において周知である。

【0193】

20

細胞、細胞系、および細胞培養は頻繁に同義的に使用し、本明細書におけるかかる指示対象はすべて後代を含む。形質転換体および形質転換細胞は、転写数を問わず、一次標的細胞およびそこから生成する培養を含む。後代は、故意または偶然の変異のためにDNA内容物において必ずしも厳密に同一ではない場合があることも理解される。元の形質転換細胞においてスクリーニングした機能または生体活性と同じ機能または生体活性を有する変異後代も含まれる。

【0194】

宿主細胞の例としては、原核生物、酵母、高等真核生物細胞が挙げられる。原核生物の宿主細胞としては、真正細菌（グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば、Enterobacteriaceae (Escherichia、例えば、E. coli、Enterobacter、Erwinia、Klebsiella、Proteus、Salmonella、例えば、Salmonella typhimurium、Serratia、例えば、Serratia marcescans、およびShigellaなど) ならびにBacillus (B. subtilis および B. licheniformis など)、Pseudomonas、およびStreptomycesが挙げられる。真核微生物（糸状菌または酵母など）は、組換えポリペプチドまたは抗体に適したクローニングまたは発現宿主である。Saccharomyces cerevisiae、すなわち一般的なパン酵母が、低等真核宿主微生物の間で最も一般的に用いられる。しかしながら、他のいくつかの属、種、および系統も本明細書において一般的に利用可能であり有用である (Pichia、例えばP. pastoris、Schizosaccharomyces pombe など；Kluyveromyces、Yarrowia；Candida；Trichoderma reesia；Neurospora crassa；Schwanniomyces、例えばSchwanniomyces occidentalis など；ならびに糸状菌、例えば、Neurospora、Penicillium、Tolypocladium、およびAspergillus 宿主、例えば A. nidulans および A. niger など)。

30

40

【0195】

グリコシル化抗原結合タンパク質（抗体を含む）の発現のための宿主細胞は、多細胞生物に由来し得る。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞および昆虫細胞が挙げられる。幾多のバキュロウイルスの系統および変異体、ならびにSpodoptera frug

50

iperda (毛虫)、Aedes aegypti (蚊)、Aedes albopictus (蚊)、Drosophila melanogaster (ショウジョウバエ)、およびBombyx moriなどの宿主由来の対応する許容可能な昆虫宿主細胞が同定されている。かかる細胞のトランスフェクションのための各種ウイルス系統は、公的に入手可能である (例えば、Autographa californica NPVのL-1変異型およびBombyx mori NPVのBm-5系統)。

【0196】

脊椎動物宿主細胞も適切な宿主であり、かかる細胞由来の抗原結合タンパク質 (抗体を含む) の組換え産生は通例の手順となっている。有用な哺乳類宿主細胞系の例としては、CHOK1細胞 (ATCC CCL61)、DXB-11、DG-44、およびチャイニーズハムスター卵巣細胞/DHFRなどのチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); SV40により形質転換したサル腎臓CV1系 (COS-7、ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓系 (懸濁培養内の増殖のためにサブクローン化した293または293細胞、[Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977)]; ベビーハムスター腎細胞 (BHK、ATCC CCL 10); マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); サル腎細胞 (CV1 ATCC CCL 70); ミドリザル腎細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587); ヒト頸癌細胞 (HELA、ATCC CCL 2); イヌ腎細胞 (MDCK、ATCC CCL 34); バッファローラット肝細胞 (BRL 3A、ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL 75); ヒト肝細胞癌 (Hep G2、HB 8065); マウス乳房腫瘍 (MMT 060562、ATCC CCL51); TRI細胞 (Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); MRC5細胞もしくはFS4細胞; または哺乳類骨髄腫細胞が挙げられる。

【0197】

宿主細胞は、抗原結合タンパク質の産生のための上記の核酸またはベクターと形質転換またはトランスフェクトし、プロモーター導入のため、形質転換体の選択のため、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適切に修飾した従来の栄養培地で培養する。加えて、新規ベクターおよび選択的マーカーにより分離される転写単位の複数の複写とトランスフェクトした細胞系は、特に抗原結合タンパク質の発現のために有用である。

【0198】

本発明の抗原結合タンパク質を産生するために用いられる宿主細胞は、各種培地で培養し得る。Ham's F10 (Sigma)、Minimal Essential Medium (MEM)、Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、およびダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Sigma)などの市販の培地が宿主細胞の培養に適している。加えて、Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980)、米国特許第4,767,704号; 同第4,657,866号; 同第4,927,762号; 同第4,560,655号; または同第5,122,469号; WO90103430号; WO87/00195号; または米国特許第30,985号に記載されている任意の培地を宿主細胞のための培養基として用いてよい。任意のこれらの培地を、必要に応じてホルモンおよび/もしくは他の増殖因子 (インスリン、トランスフェリン、または上皮細胞増殖因子など)、塩 (塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸など)、緩衝液 (HEPESなど)、ヌクレオチド (アデノシンおよびチミジンなど)、抗生剤 (Gentamycin (登録商標) 薬剤など)、微量元素 (通常、最終濃度がマイクロモル範囲で存在する無機化合物として定義)、ならびにグルコースもしくは等価エネルギー供給源で補充し得る。他の任意の必要な栄養補助剤も当業

者に知られている適切な濃度で含み得る。培養条件（温度、pHなど）は、発現のために選択した宿主細胞で先に用いたものであり、当業者にとって明らかである。

【0199】

宿主細胞の培養時、抗原結合タンパク質は細胞内の細胞膜周辺腔内で産生することもでき、培地に直接分泌することもできる。抗原結合タンパク質が細胞内で第一工程として産生される場合、微粒子破片（宿主細胞または溶解断片のいずれか）は、例えば、遠心分離または限外ろ過により除去される。

【0200】

抗原結合タンパク質（例えば、抗体または抗体断片）は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、陽イオンもしくは陰イオン交換クロマトグラフィー、または好ましくは親和性クロマトグラフィーを用いて、目的の抗原もしくは親和性リガンドとしてタンパク質Aもしくはタンパク質Gを用いて精製できる。タンパク質Aは、タンパク質（ヒト γ 1、 γ 2、または γ 4重鎖に基づくポリペプチドを含む）を純化するために使用できる（Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)）。タンパク質Gは、すべてのマウスアイソタイプおよびヒト γ 3において推奨される（Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)）。親和性リガンドが結合する基質は、ほとんどの場合はアガロースであるが、他の基質も利用可能である。制御細孔ガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼンなどの機械的に安定した基質は、アガロースで達し得るよりも速い流速および短いプロセス時間を可能とする。タンパク質がCH3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX（登録商標）樹脂（J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.）は、精製のために有用である。収集する抗体に応じて、タンパク質精製のための他の技術（エタノール沈殿、逆相HPLC、等電点電気泳動、SDS-PAGE、および硫酸アンモニウム沈殿など）も可能である。

【0201】

キメラ抗体、ヒト化およびHuman Engineered（登録商標）モノクローナル抗体。齧歯類モノクローナル抗体の可変Igドメインがヒト定常Igドメインに融合されているキメラモノクローナル抗体を、当技術分野において知られている標準的な手順を用いて産生できる（Morrison, S. L., et al. (1984)

Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855; and, Boulianne, G. L., et al., Nature 312, 643-646. (1984)を参照されたい）。例えば、（1）ヒトフレームワークおよび定常領域上への非ヒト相補性決定領域（CDR）のグラフト（当技術分野において「CDRグラフト」を介したヒト化と呼ばれるプロセス）または（2）完全非ヒト可変ドメインを移植するが、表面残基の置換によりヒト様表面でそれらを「覆うこと」（当技術分野において「化粧張り」と呼ばれるプロセス）または（3）各残基の抗原結合もしくは抗体構造に関わる可能性ならびに免疫原性の可能性に基づきさらにヒト化するための選択された非ヒトアミノ酸残基の修飾、により抗体配列をさらにヒト様とするためのヒト化もしくは修飾技術についていくつか記載されている。例えば、Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 81: 6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44: 65-92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239: 1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28: 489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3): 169-217 (1994); ならびにKettleborough, C. A. et al., Protein Eng. 4(7): 77

10

20

30

40

50

3 83 (1991); Co, M. S., et al. (1994), J. Immunol. 152, 2968-2976); Studnicka et al. Protein Engineering 7: 805-814 (1994)を参照されたい;これらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【0202】

例えば、(1)ヒトフレームワークおよび定常領域上への非ヒト相補性決定領域(CDR)のグラフト(当技術分野において「CDRグラフト」を介したヒト化と呼ばれるプロセス)または(2)完全非ヒト可変ドメインを移植するが、表面残基の置換によりヒト様表面でそれらを「覆うこと」(当技術分野において「化粧張り」と呼ばれるプロセス)または(3)各残基の抗原結合もしくは抗体構造に関わる可能性ならびに免疫原性の可能性に基づきさらにヒト化するための選択された非ヒトアミノ酸残基の修飾、により抗体配列をさらにヒト様とするためのヒト化もしくは修飾技術についていくつか記載されている。例えば、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immunol. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169-217 (1994);ならびにKettleborough, C. A. et al., Protein Eng. 4(7):773-83 (1991); Co, M. S., et al. (1994), J. Immunol. 152, 2968-2976); Studnicka et al. Protein Engineering 7: 805-814 (1994)を参照されたい;これらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0203】

1つの態様では、本明細書(表2A~Bを参照されたい)に提供する抗体の軽鎖および重鎖可変領域のCDRを、同一または異なる系統発生種由来の抗体のフレームワーク領域(FR)にグラフト化する。例えば、重鎖可変領域(例えば、V_H1、V_H2、V_H3、V_H4、V_H5、V_H6、V_H7、V_H8、またはV_H9)および/または軽鎖可変領域(例えば、V_L1、V_L2、V_L3、V_L4、V_L5、V_L6、V_L7、V_L8、またはV_L9)のCDRはコンセンサスヒトFRにグラフト化できる。コンセンサスヒトFRを作製するため、いくつかのヒト重鎖または軽鎖アミノ酸配列由来のFRを整列してコンセンサスアミノ酸配列を同定し得る。他の実施形態では、本明細書で開示する重鎖または軽鎖のFRは異なる重鎖または軽鎖のFRと置換されている。1つの態様では、抗体の重鎖および軽鎖のFR内にある稀なアミノ酸は置換されておらず、対して残りのFRアミノ酸は置換されている。「稀なアミノ酸」とは、通常はFRに見出されない位置にある特異的なアミノ酸である。あるいは、1つの重鎖または軽鎖由来のグラフト化可変領域を、本明細書に開示の特定の重鎖または軽鎖の定常領域と異なる定常領域と用いてよい。他の実施形態では、グラフト化可変領域は、単鎖Fv抗体の一部である。

【0204】

抗体は、内因性免疫グロブリンを産生せずヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むように加工されたトランスジェニック動物を用いて産生することもできる。例えば、WO98/24893号には、内因性重鎖および軽鎖遺伝子座の不活性化のために機能性内因性免疫グロブリンを産生しない、ヒトIg遺伝子座を有するトランスジェニック動物について開示されている。WO91/10741号にも、免疫原に対する免疫応答を開始できるトランスジェニック非霊長類哺乳類宿主について開示されており、この抗体は霊長類の定常および/または可変領域を有し、ここで遺伝子座をコードする内因性免疫グロブリンは置換または不活性化されている。WO96/30498号には、哺乳類における免疫グロブリン遺伝子座を修飾する(定常または可変領域のすべてまたは一部を置換して修飾抗体分子を

形成するなど) ための Cre/Lox 系の使用について開示されている。WO94/02602 号には、内因性 Ig 遺伝子座を不活性化されて機能性ヒト Ig 遺伝子座を有する非ヒト哺乳類宿主について開示されている。米国特許第 5, 939, 598 号には、内因性重鎖を欠き、外因性免疫グロブリン遺伝子座 (1 つまたは複数の異種間定常領域を含む) を発現するトランスジェニックマウスの作製方法について開示されている。

【0205】

上記トランスジェニック動物を用いて、選択された抗原分子に対する免疫応答を起こすことができ、細胞を産生する抗体を動物から除去してヒト由来モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを産生するために使用できる。免疫化プロトコール、アジュバントなどは当技術分野において知られており、例えば、WO96/33735 号に記載のトランスジェニックマウスの免疫化に用いられる。モノクローナル抗体について、対応するタンパク質の生体活性または生理的効果を阻害または中性化する能力を試験できる。Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); Mendez et al., Nat. Genet. 15:146-156 (1997); ならびに米国特許第 5, 591, 669 号、米国特許第 5, 589, 369 号、米国特許第 5, 545, 807 号; ならびに米国特許第 20020199213 号も参照されたい。米国特許第 20030092125 号には、所望のエピトープに対する動物の免疫応答に偏向させるための手順について記載されている。ヒト抗体はインビトロ活性化 B 細胞によっても産生し得る (米国特許第 5, 567, 610 号および同第 5, 229, 275 号を参照されたい)。

【0206】

ファージディスプレイ技術による抗体産生

組換えヒト抗体遺伝子のレパートリー作製のための技術開発および線維状バクテリオファージ表面上のコードされた抗体断片のディスプレイにより、ヒト由来抗体を生成する別の手順が提供されている。ファージディスプレイについては、例えば、Dower et al., WO91/17271 号、McCafferty et al., WO92/01047 号、および Caton and Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-6454 (1990) (これらはそれぞれ参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる) に記載されている。ファージ技術により産生された抗体は、通常、抗原結合断片 (例えば Fv または Fab 断片) として細菌内に産生されるため、エフェクター機能を欠く。エフェクター機能は、2 つの戦略の 1 つにより導入できる: 断片は、哺乳類細胞内における発現のために完全な抗体内か、またはエフェクター機能を惹起できる第二結合部位を有する二重特異性抗体断片内のいずれかに加工できる。

【0207】

典型的には、抗体の Fd 断片 ($V_H - C_H1$) および軽鎖 ($V_L - C_L$) を PCR により別々にクローン化し、コンビナトリアルファージディスプレイライブラリーで無作為に組換えてから、特定の抗原への結合のために選択することができる。抗体断片をファージ表面上で発現させ、抗原結合による Fv または Fab の選択 (したがって抗体断片をコードする DNA を含むファージ) は、数回の抗原結合および再増幅 (パニングと呼ばれる手順) を介して成し遂げる。抗原特異的な抗体断片を濃縮し、最終的に単離する。

【0208】

ファージディスプレイ技術はまた、「ガイド選択」と呼ばれる齧歯類モノクローナル抗体のヒト化アプローチにも使用できる (Jespersen, L. S., et al., Bio/Technology 12, 899-903 (1994) を参照されたい)。この技術において、マウスモノクローナル抗体の Fd 断片をヒト軽鎖ライブラリーと組み合わせて提示でき、次いで生成したハイブリッド Fab ライブラリーを抗原で選

択し得る。このようにして、マウスF d断片は、選択をガイドするための鑄型を提供する。続いて、選択したヒト軽鎖を、ヒトF d断片ライブラリーと組み合わせる。得られたライブラリーの選択により、完全ヒトF a bが得られる。

【0209】

ファージディスプレイライブラリーからヒト抗体を引き出すための様々な手順について記載されている（例えば、Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); 米国特許第5,565,332号および同第5,573,905号; Clackson, T., and Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994)を参照されたい）。特に、ファージディスプレイライブラリーに由来する抗体のインビトロ選択および進化は強力な手段となっている（Burton, D. R., and Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); ならびに、Winter, G., et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994); 米国特許第20020004215号およびWO92/01047号; 米国特許第20030190317号（2003年10月9日公開）および米国特許第6,054,287号; 米国特許第5,877,293号を参照されたい）。

【0210】

Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178: 187-193、および米国特許第20030044772号（2003年3月6日公開）には、固体支持体への候補結合分子の固定化に関わる方法である捕獲リフトによるファージ発現抗体ライブラリーまたは他の結合分子のスクリーニング方法について記載されている。

【0211】

抗原結合タンパク質：抗体断片の他の実施形態

上記のとおり、抗体断片はインタクトな完全長抗体の一部、好ましくはインタクト抗体の抗原結合領域もしくは可変領域を含み、抗体断片から形成される線状抗体および多重特異性抗体を含む。限定されない抗体断片の例としては、抗体が所望の生体活性を保持する限り、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、F d、ドメイン抗体（d A b）、相補性決定領域（C D R）断片、単鎖抗体（s c F v）、単鎖抗体断片、マキシボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、線状抗体、キレート化組換え抗体、トリボディまたはバイボディ、細胞内抗体、ナノボディ、小モジュール免疫薬剤（S M I P）、抗原結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化抗体、V H Hを含む抗体、またはそれらの変異タンパク質もしくは誘導体、ならびにポリペプチドへ結合する特異的抗原を付与する上で十分な免疫グロブリンを少なくとも一部含むポリペプチド（C D R配列など）が挙げられる。かかる抗原断片は、完全抗体の修飾により産生してもよいし、組換えD N A技術またはペプチド合成を用いてd e n o v o合成してもよい。

【0212】

追加の抗体断片としては、V_Hドメインからなるドメイン抗体（d A b）断片（Ward et al., Nature 341:544-546, 1989）が挙げられる。

【0213】

「線状抗体」は、一対の抗原結合領域を形成する一対の直列F dセグメント（V_H-C_H1-V_H-C_H1）を含む。線状抗体は、二重特異性であることもでき、単一特異性であることもできる（Zapata et al. Protein Eng. 8:1057-62 (1995)）。

【0214】

ペプチドリンカー（ヒンジなし）を介してまたはIgGヒンジを介してC_H3に融合しているscFvからなる「ミニボディ」については、Olafsen, et al., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr; 17(4): 315-23に記載されている。

【0215】

「マキシボディ」という用語は、免疫グロブリンのFc領域に共有結合している2個scFvを指す。例えば、Fredericks et al., Protein Engineering, Design & Selection, 17: 95-106 (2004) および Powers et al., Journal of Immunological Methods, 251: 123-135 (2001)を参照されたい。

【0216】

軽鎖を欠く機能性重鎖抗体は、テンジクザメ、アラフラオオセ（wobbegong shark）およびラクダ科（ラクダ、ヒトコブラクダ、アルパカおよびラマなど）などの特定の動物種において天然で生じる。抗原結合部位は、これらの動物において単ドメインであるV_HHドメインのみとなる。これらの抗体は重鎖可変領域のみを用いて抗原結合領域を形成する、すなわち、これらの機能性抗体はH₂L₂構造のみを有する重鎖ホモ二量体である（「重鎖抗体」または「HCAb」と呼ばれる）。ラクダ化V_HHは、ヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含み、CH1ドメインを欠くIgG2およびIgG3定常領域と再結合することが報告されている。従来のV_H単独断片は、可溶性形態で産生することは困難であるが、フレームワーク残基をさらにV_HH様に改変した場合、溶解度を改善して特異的結合を得ることができる。（例えば、Reichman, et al., J Immunol Methods 1999, 231: 25-38を参照されたい）。ラクダ化V_HHドメインは高親和性で抗原に結合し（Desmyter et al., J. Biol. Chem. 276: 26285-90, 2001）、溶液中における安定性が高いことが見出されている（Ewert et al., Biochemistry 41: 3628-36, 2002）。ラクダ化重鎖を有する抗体の生成方法は、例えば、米国特許第2005/0136049号および同第2005/0037421号に記載されている。代替的な足場は、サメV-NAR足場にさらに厳密に適合するヒト可変様ドメインから作製でき、長い貫通ループ構造のためのフレームワークを提供し得る。

【0217】

重鎖抗体の可変ドメインは分子質量が15 kDaのみの最小の完全な機能性抗原結合断片であるため、この実体はナノボディと呼ばれる（Cortez-Retamozo et al., Cancer Research 64: 2853-57, 2004）。ナノボディライブラリーは、Conrath et al., (Antimicrob Agents Chemother 45: 2807-12, 2001)に記載されているように免疫化ヒトコブラクダから産生し得る。

【0218】

細胞内抗体は、細胞内発現を示し、細胞内タンパク質機能を操作することができる単鎖抗体である（Biocca, et al., EMBO J. 9: 101-108, 1990; Colby et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 17616-21, 2004）。細胞領域内に抗体構築物を保持する細胞シグナル配列を含む、細胞内抗体は、Mhashilkar et al. (EMBO J 14: 1542-51, 1995) および Wheeler et al. (FASEB J. 17: 1733-5, 2003)に記載されているように産生され得る。トランスボディは、タンパク質導入ドメイン（PTD）が単鎖可変断片（scFv）抗体と融合している細胞浸性抗体であるHeng et al., (Med Hypotheses. 64: 1105-8, 2005)。

【0219】

さらに、SMIPすなわち標的タンパク質に特異的な結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質である抗体も本発明に包含される。これらの構築物は、抗体エフェクター機能を実行するために必要な免疫グロブリンドメインに融合した抗原結合ドメインを含む単鎖ポリペプチドである。例えば、WO03/041600号、米国特許第20030133939号および米国特許第20030118592号を参照されたい。

【0220】

抗体断片産生のために様々な技術が開発されている。従来、これらの断片はインタクト抗体のタンパク質分解による消化を介して生成していたが、組換え宿主細胞により直接産生することもできる。例えば、Better et al., Science 240 : 1041-1043 (1988); Skerra et al. Science 240 : 1038-1041 (1988); Carter et al., Bio/Technology 10 : 163-167 (1992)を参照されたい。

【0221】

抗原結合タンパク質：多価抗体の他の実施形態

いくつかの実施形態では、多価またはさらには多重特異性（例えば二重特異性、三重特異性など）モノクローナル抗体を産生することが望ましい場合がある。かかる抗体は、標的抗原の少なくとも2つの異なるエピトープに対して特異的に結合し得るか、あるいは2つの異なる分子、例えば標的抗原と細胞表面タンパク質または受容体に結合し得る。例えば、二重特異性抗体は、細胞防御機序を標的発現細胞に集中させるために、標的に結合する腕と、（T細胞受容体分子（例えば、CD2またはCD3）などの白血球上の引き金分子、またはIgGのためのFc受容体（FcγR）、例えばFcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）およびFcγRIII（CD16）に結合する別の腕を含み得る。別の例では、二重特異性抗体を、標的抗原を発現する細胞に細胞障害性薬を局在化させるために用いてよい。これらの抗体は、標的結合腕と細胞障害性薬（例えば、サボリン、抗インターフェロン60、ビンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキサートまたは放射性同位体ハプテン）に結合する腕を有する。多重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製できる。

【0222】

追加的に、本発明の抗DNPまたは抗KLH抗体は、多価形態に折り畳むように構築することもでき、結合親和性、特異性および／または血中の増長した半減期を改善し得る。抗DNPまたは抗KLHの多価形態は、当技術分野において知られている技術により調製できる。

【0223】

二特異性または多重特異性抗体には、架橋された抗体または「ヘテロ複合」抗体が含まれる。例えば、ヘテロ複合体中の抗体の片方をアビジンに結合し、他方をビオチンに結合することができる。ヘテロ複合抗体は、任意の好都合な架橋手順を用いて作製し得る。適切な架橋剤は、当技術分野において周知であり、いくつかの架橋技術とあわせて米国特許第4,676,980号に開示されている。scFvのC末端にストレプトアビジンをコードする配列を添加することによって四量体を作製する別の方法が指定されている。ストレプトアビジンは、4つのサブユニットからなるため、scFv-ストレプトアビジンが折畳まれた場合、4つのサブユニットが結合して四量体を形成する（Kipriyanov et al., Hum Antibodies Hybridomas 6(3) : 93-101 (1995)、この開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

【0224】

二重特異性抗体を作製するための別のアプローチに従い、1組の抗体分子の間の界面を加工して、組換え細胞培養物から収集されるヘテロ二量体率を最大化できる。1つの界面は、抗体定常ドメインのC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第一抗体分子の界面からの1つまたは複数の小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖（例えば、チ

ロシンまたはトリプトファン)で置換する。第二抗体分子の界面では、大きなアミノ酸側鎖をより小さなアミノ酸側鎖(例えば、アラニンまたはトレオニン)で置換することにより、大きな側鎖(1本または複数本)と同一または類似サイズの補償的な「腔」が作製される。これは、他の望ましくない最終生成物(ホモ二量体など)を上回ってヘテロ二量体の収率を上昇させるための機序を提供する。WO 96/27011号(1996年9月6日公開)を参照されたい。

【0225】

抗体断片から二重特異性または多重特異性抗体を生成する技術についても文献に記載されている。例えば、二重特異性または三重特異性抗体は化学結合を用いて調製できる。Brennan et al., Science 229:81 (1985)には、インタクト抗体をタンパク質分解的に切断してF(ab')₂断片を産生する手順について記載されている。これらの断片は、ジチオール複合剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して隣接ジオールを安定させ、分子間のジスルフィド形態を防止する。次いで産生したFab'断片をチオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に形質転換する。次いでFab'-TNB誘導体の1つをメルカプトエチルアミンと還元してFab'-チオールに再変換し、等モル量の他のFab'-TNB誘導体と混合して二重特異性抗体を形成する。産生した二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用できる。Better et al., Science 240:1041-1043 (1988)には細菌由来の機能性抗体断片の分泌について開示されている(例えば、Better et al., Skerra et al., Science 240:1038-1041 (1988)を参照されたい)。例えば、Fab'-SH断片は、E. coliから直接収集し、化学的結合させて二重特異性抗体を形成することができる(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992); Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992))。

【0226】

Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)には、完全ヒト化二重特異性抗体F(ab')₂分子の産生について記載されている。各Fab'断片をE. coliから別々に分泌させ、インビトロ指向性化学結合に供して、二重特異性抗体を形成した。

【0227】

二重特異性または多重特異性抗体断片を組換え細胞培養から直接作製して単離する各種技術についても記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパー、例えばGCN4を用いて産生されている(一般にKostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)を参照されたい)。FosおよびJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合により2つの異なる抗体のFab'部分に結合した。抗体ホモ二量体はヒンジ領域で還元し、単量体を形成してから再び酸化して抗体ヘテロ二量体を形成する。この方法は、抗体ホモ二量体の産生においても使用できる。

【0228】

上記のダイアボディは、二重特異性抗体の1例である。例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照されたい。2価のダイアボディは、ジスルフィド結合により安定させることができる。

【0229】

安定した単一特異性または二重特異性Fc₂配置で産生することもでき、ビスーテトラボディとして非共有結合により産生することもできる。あるいは、2つの異なるscFvを直列に結合してビス-scFvを形成することもできる。

【0230】

単鎖Fv(sFv)二量体を用いて二重特異性抗体断片を作製する別の戦略も報告され

ている。Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994)を参照されたい。あるアプローチでは、2つのscFv抗体をリンカーまたはジスルフィド結合で連結させる(Mallender and Voss, J. Biol. Chem. 269:199-206 1994、WO94/13806号、および米国特許第5,989,830号、これらの開示は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

【0231】

あるいは、二重特異性抗体はZapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)に記載されているように産生される「線状抗体」であり得る。簡単に述べると、これらの抗体は、一对の抗原結合領域を形成する一对の直列Fdセグメント($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$)を含む。線状抗体は二重特異性であることもでき、単一特異性であることもできる。

【0232】

2価を超える抗体も意図する。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。(Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991))。

【0233】

「キレート化組換え抗体」とは、標的抗原の隣接するかつ重複しないエピトープを認識する二重特異性抗体であり、両エピトープに同時に結合する上で十分に可動性である(Neriet al., J Mol Biol. 246:367-73, 1995)。

【0234】

二重特異性Fab-scFv(「バイボディ」)および三重特異性Fab-(scFv)(2)(「トリボディ」)の産生については、Schoonjans et al. (J Immunol. 165:7050-57, 2000)およびWillemse et al. (J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003)に記載されている。バイボディまたはトリボディにおいて、scFv分子は、例えば、2つのscFvがFabのC末端に融合しているトリボディを産生するためにVL-CL(L)およびVH-CH₁(Fd)鎖の片方または両方に融合しており、対してバイボディでは1つのscFvがFabのC末端に融合している。

【0235】

さらに別の方法では、遊離システインを親タンパク質に導入後、二量体、三量体、および四量体が産生される。変数(2~4)のマレイミド基とのペプチドベースの交差リンカーを用いて目的のタンパク質が遊離システインに架橋された(Cochran et al., Immunity 12(3): 241-50 (2000)、この開示はその全体が本明細書に組み込まれる)。

【0236】

抗原結合タンパク質の他の実施形態

発明の抗原結合タンパク質は、ペプチボディも含む。「ペプチボディ」という用語は、少なくとも1つのペプチドに結合した抗体Fcドメインを含む分子を指す。ペプチボディの産生については、PCT公開WO00/24782号(2000年5月4日公開)に一般的に記載されている。これらのペプチドはいずれも、リンカーを伴いまたは伴わず、直列で(すなわち、連続的に)結合し得る。システイニル残基を含むペプチドは、別のCys含有ペプチドと架橋し得、この片方または両方がビヒクルに結合し得る。同様に、複数のCys残基を有するペプチドはいずれも、ペプチド間でジスルフィド結合を形成し得る。これらのペプチドはいずれも誘導体化し得、例えばカルボキシル末端はアミノ基とカップリングし得、システインはカップリングし得、またはアミノ酸残基はアミノ酸残基以外の部分により置換し得る(例えば、Bhatnagar et al., J. Med. Chem. 39: 3814-9 (1996), and Cuthbertson et al., J. Med. Chem. 40: 2876-82 (19

97)を参照されたく、これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。ペプチド配列は至適化し得、抗体の親和性成熟に類似しているか、あるいはアラニンスキャニングまたは無作為もしくは部位指向変異により改変され、続くスクリーニングにより最高の結合剤が同定される。Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26: 401-24 (1997)。抗原結合タンパク質の所望の活性を維持しつつ、各種分子を抗原結合タンパク質構造、例えば、抗原結合タンパク質のペプチド部分自体内またはペプチドとビヒクル部分の間に挿入できる。例えば、Fcドメインもしくはその断片、ポリエチレングリコールなどの分子、またはデキストラン、脂肪酸、脂質、コレステロール基、小さな炭水化物、ペプチド、本明細書に記載の検出可能な部分(蛍光剤、放射同位体などの放射標識を含む)、オリゴ糖、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、干渉(または他の)RNA、酵素、ホルモンなどの他の関連分子を容易に挿入できる。この方法での挿入に適した他の分子は当業者に理解されており、本発明の範囲内に包含される。これは、例えば、任意選択的に適切なリンカーにより結合した2つの連続したアミノ酸間へ所望の分子を挿入することを含む。

【0237】

リンカー。本明細書で同義的に使用する「リンカー」または「リンカー部分」とは、本発明の組成物に含まれるポリペプチド鎖のアミノ酸残基(例えば、免疫グロブリンHCまたは免疫グロブリンLCまたは免疫グロブリンFcドメイン)へ共有結合する生物学的に許容可能なペプチジルもしくは非ペプチジル有機群を指し、このリンカー部分はポリペプチド鎖を分子内の他のペプチドもしくはポリペプチド鎖に、または治療部分(生体活性低分子もしくはオリゴペプチドなど)に、または半減期延長部分に共有結合もしくは結合する。例えば、Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、米国特許第2007/0071764号; Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、PCT/米国特許第2007/022831号(WO2008/088422号として公開);ならびに米国仮出願第61/210,594号(2009年3月20日出願)を参照されたく、これらはすべてそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0238】

本発明の抗原結合タンパク質において、いずれのリンカー部分の存在も任意選択的である。リンカーが存在する場合、その化学構造は重要ではない。なぜなら、それは主にスペーサーとして、本発明の抗原結合タンパク質の分子の1つもしくは複数の他の機能性部分に関して1つの機能性部分の存在もしくは位置の位置付け、接合、連結、または至適化に関与するからである。リンカー部分の存在は、本発明の抗原結合タンパク質(抗体および抗体断片を含む)の一部の実施形態の薬理活性の至適化に有用であり得る。リンカーは、好ましくはペプチド結合により互いに結合したアミノ酸からなる。リンカー部分が存在する場合、それらは独立して、本発明の抗原結合タンパク質に存在し得る他のリンカー(1つまたは複数)と同じであることも異なることもできる。

【0239】

上記のとおり、リンカー部分は、存在する場合(抗原結合タンパク質の一次アミノ酸配列内であるか、または本発明の抗原結合タンパク質に対する治療部分もしくは半減期延長部分に結合するリンカーとしてかどうかを問わず)、天然で「ペプチジル」であり得(すなわち、ペプチド結合により互いに結合したアミノ酸からなり)、好ましくは、1個から最大約40個までのアミノ酸残基、より好ましくは、1個から最大約20個までのアミノ酸残基、最も好ましくは1~約10個のアミノ酸残基の長さからなる。リンカーのアミノ酸残基は、必ずしもその必要はないが、好ましくは、20個の基準アミノ酸のうちのいずれかであり、より好ましくは、システイン、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、および/またはセリンである。さらにより好ましくは、ペプチジルリンカーは、ペプチド結合により結合した立体的に妨害されていない多数派のアミノ酸(グリシン、セリン、およびアラニンなど)からなる。存在する場合、インビボ循環において急

速なタンパク質分解のターンオーバーを避けるペプチジルリンカーを選択することも望ましい。これらのアミノ酸の一部は、当業者が十分に理解しているようにグリコシル化し得る。例えば、シアリル化部位を構成する有用なリンカー配列は、 $X_1 X_2 N X_4 X_5 G$ （配列番号148）であり、式中 X_1 、 X_2 、 X_4 および X_5 はそれぞれ独立して任意のアミノ酸残基である。

【0240】

他の実施形態では、ペプチジルリンカー部分の1～40個のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、およびリジンから選択される。好ましくは、リンカーは、立体的に妨害されていない多数派のアミノ酸（グリシンおよびアラニンなど）からなる。したがって、好ましいリンカーとしては、ポリグリシン、ポリセリン、およびポリアラニン、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。一部のペプチジルリンカーの例は、ポリ(Gly)₁～₈、特に(Gly)₃、(Gly)₄（配列番号149）、(Gly)₅（配列番号150）および(Gly)₇（配列番号151）、ならびにポリ(Gly)₄ Ser（配列番号152）、ポリ(Gly～Ala)₂～₄およびポリ(Ala)₁～₈である。他のペプチジルリンカーの具体例としては、(Gly)₅ Lys（配列番号154）、および(Gly)₅ Lys Arg（配列番号155）が挙げられる。他の有用なペプチジルリンカーの例は以下である：他の有用なペプチジルリンカーの例は以下である：

(Gly)₃ Lys (Gly)₄（配列番号159）；

(Gly)₃ Asn Gly Ser (Gly)₂（配列番号156）；

(Gly)₃ Cys (Gly)₄（配列番号157）；ならびに

Gly Pro Asn Gly Gly（配列番号158）。

【0241】

上の命名法を説明すると、例えば、(Gly)₃ Lys (Gly)₄は、Gly-Gly-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly（配列番号159）を意味する。GlyおよびAlaの他の組み合わせも有用である。

【0242】

一般に用いられるリンカーとしては、本明細書において「L5」（GGGG S；すなわち「G₄ S」；配列番号152）、「L10」（GGGG SGGGG S；配列番号153）、「L25」（GGGG SGGGG SGGGG SGGGG SGGGG S；配列番号146）として同定し得るものおよび以下の実施例に用いられる任意のリンカーが挙げられる。

【0243】

ペプチドリンカー部分を含む本発明の組成物のいくつかの実施形態では、酸性残基（例えば、グルタミン酸塩またはアスパラギン酸残基）をリンカー部分のアミノ酸配列内に入れる。例としては、以下のペプチドリンカー配列が挙げられる：

GGEGGG（配列番号160）；

GGE E EGGG（配列番号161）；

GE E E G（配列番号162）；

GE E E（配列番号163）；

GGDGGG（配列番号164）；

GGDDDDGG（配列番号165）；

GDDDDG（配列番号166）；

GDDDD（配列番号167）；

GGGGSDDSDEGS DGEDGGGG S（配列番号168）；

WEWEW（配列番号169）；

FEFEF（配列番号170）；

EE EWWW（配列番号171）；

EE EFFF（配列番号172）；

WWE E EWW（配列番号173）；または

F F E E E F F (配列番号 174)。

【0244】

他の実施形態では、リンカーは、リン酸化部位、例えば、 $X_1 X_2 Y X_4 X_5 G$ (配列番号 175) (式中 X_1 、 X_2 、 X_4 、および X_5 はそれぞれ独立して任意のアミノ酸残基である)； $X_1 X_2 S X_4 X_5 G$ (配列番号 176) (式中 X_1 、 X_2 、 X_4 および X_5 はそれぞれ独立して任意のアミノ酸残基である)；または $X_1 X_2 T X_4 X_5 G$ (配列番号 177) (式中 X_1 、 X_2 、 X_4 および X_5 はそれぞれ独立して任意のアミノ酸残基である)を構成する。

【0245】

本明細書に示すリンカーは代表例である；本発明の範囲内のペプチジルリンカーはより長くてよく、他の残基を含んでよい。ペプチジルリンカーは、例えば、半減期延長部分との接合のためのシステイン、別のチオール、または求核剤を含むことができる。別の実施形態では、リンカーは、マレイミド、ヨードアセトアミドもしくはチオエステル、官能化半減期延長部分への接合のためのシステインもしくはホモシステイン残基、または他の 2-アミノ-エタントチオールもしくは 3-アミノ-プロパントチオール部分を含む。

【0246】

別の有用なペプチジルリンカーは、約 1 kDa サイズの PEG 分子であると推測される大型、可動性リンカーであり、無作為 Gly / Ser / Thr 配列、例えば：G S G S A T G G S G S T A S S G S G S A T H (配列番号 178) または H G S G S A T G G S G S T A S S G S G S A T (配列番号 179) を含む。あるいは、有用なペプチジルリンカーは当技術分野において知られているアミノ酸配列からなり、固定らせん構造 (例えば、固定リンカー：-A E A A A K E A A A K E A A A K A G G-) (配列番号 180) を形成する。追加的に、ペプチジルリンカーは、非ペプチジルセグメント (式 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ の 6 個の炭素脂肪族分子など) も含むことができる。ペプチジルリンカーは、改変して本明細書に記載の誘導体を形成することができる。

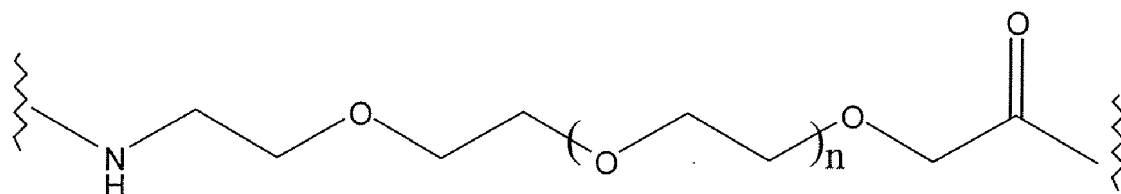
【0247】

任意選択的に、非ペプチジルリンカー部分は、半減期延長部分を毒素ペプチドアナログに接合した半減期延長部分のペプチド部分に結合するためにも有用である。例えば、 $-NH-(CH_2)_s-C(O)-$ (式中 $s=2\sim 20$) などのアルキルリンカーを使用できる。これらのアルキルリンカーは、低級アルキル (例えば、 $C_1\sim C_6$) 低級アシル、ハロゲン (例えば、Cl、Br)、CN、 NH_2 、フェニルなどの任意の非立体的障害基によりさらに置換し得る。非ペプチジルリンカーの例は、ポリエチレングリコール (PEG) リンカー (例えば、以下に示すもの) である：

【0248】

【化 1】

(I)



式中、 n はリンカーの分子量が約 100 ~ 約 5000 ダルトン (Da)、好ましくは約 100 ~ 約 500 Da となるものである。

【0249】

1つの実施形態では、非ペプチジルリンカーは、アリアルである。リンカーは、当技術分野、(例えば、Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、米国特許第 2007/0071764 号；Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic

Agents、PCT／米国特許第2007／022831号（WO2008／088422号として公開）；ならびに米国仮出願第61／210,594号（2009年3月20日出願）、これらはすべて参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているものと同じ様式で改変して誘導体を形成し得る。

【0250】

加えて、PEG部分は、PEGアルデヒドを用いた還元アルキル化またはPEGのヒドロキシコハク酸イミドもしくは炭酸エステルを用いたアシル化のいずれかにより、またはチオール接合によりN末端アミンもしくは選択された側鎖アミンに結合し得る。

【0251】

「アリール」とは、フェニル、または飽和、部分的飽和、もしくは非飽和3員環、4員環、もしくは5員環炭素架橋と隣接融合したフェニル、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 4$ ハロアルキルもしくはハロから選択される0、1、2もしくは3個の置換基と置換されたフェニルもしくは架橋である。

【0252】

「ヘテロアリール」とは、非飽和5、6もしくは7員単環または部分的飽和もしくは非飽和6員、7員、8員、9員、10員または11員二環であり、ここで少なくとも1つの環は、N、OおよびSから選択される1、2、3もしくは4個の原子を含む非飽和、単環および二環であり、環は $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 4$ ハロアルキルおよびハロから選択される0、1、2もしくは3個の置換基により置換される。

【0253】

本発明の合成物の非ペプチド部分（非ペプチジルリンカーまたは非ペプチド半減期延長部分など）は従来の有機化学反応により合成できる。

【0254】

上記は単に例証にすぎず、本発明に従い任意選択的に使用できるリンカー種類の包括的な処置ではない。

【0255】

抗原結合タンパク質変異体の産生。上記のとおり、本発明の組成物を作製するために、組換えDNAおよび／またはRNA媒介性タンパク質発現およびタンパク質工学技術、または他の任意のペプチド調製方法を適用できる。例えば、形質転換した宿主細胞内でポリペプチドを作製できる。簡単に述べると、ペプチドをコードする組換えDNA分子または構築物を調製する。かかるDNA分子の調製方法は当技術分野において周知である。例えば、適切な制限酵素を用いてペプチドをコードする配列をDNAから切除できる。大量の利用可能かつ周知の宿主細胞のいずれも本発明の実践に用いてよい。特定宿主の選択は、当技術分野において認識されたいくつかの要因に依存する。これらの要因としては、例えば、選択した発現ベクターとの適合性、DNA分子によりコードされたペプチド毒性、形質転換率、ペプチド回収の容易さ、発現特徴、生体安全性および費用が挙げられる。これらの要因のバランスは、必ずしもすべての宿主が特定のDNA配列の発現のために同様に効果的ではない場合があることの理解を伴わなければならない。これらの一般的なガイドライン内で、培養に有用な微生物宿主細胞としては、細菌（*Escherichia coli* sp. など）、酵母（*Saccharomyces* sp. など）および他の真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、哺乳類（ヒトを含む）細胞、例えば、CHO細胞およびHEK-293細胞、ならびに本明細書に記載しているかあるいは当技術分野において知られている他のものが挙げられる。同様に、DNAレベルで修飾を行うことができる。ペプチドコードDNA配列は、選択した宿主細胞とより適合するコドンに置換し得る。E. coliにおいて、至適化コドンは当技術分野において知られている。コドンは置換して、制限部位を除去するかまたはサイレント制限部位を含むことができ、これは選択した宿主細胞内でDNAプロセスを補助し得る。次に、形質転換した宿主を培養して精製する。宿主細胞は、従来の発酵条件下で所望の化合物が発現するように培養し得る。かかる発酵条件は当技術分野において周知である。加えて、DNAは任意選択的に、発現した特異的結合剤または抗原結合タンパク質（例えば、免疫グロブリンタンパク質）と操作可能に連

10

20

30

40

50

結された融合タンパク質、シグナルペプチド配列（例えば、分泌シグナルペプチド）の5'からコード領域をさらにコードする。本発明の特異的結合剤に結合される（二量体Fc融合タンパク質（「ペプチボディ」）またはキメラ免疫グロブリン（軽鎖+重鎖）-Fcヘテロ三量体（「ヘミボディ」）を含む）哺乳類細胞による本発明の組成物の適切な組換え方法および組換え発現に有用な例示的DNA構築物のさらなる例については、例えば、Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、米国特許第2007/0071764号；Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、PCT/米国特許第2007/022831号（WO2008/088422号として公開）；ならびに米国仮出願第61/210,594号（2009年3月20日出願）を参照されたく、これらはすべて参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0256】

適切なヌクレオチド変化をコードしたDNA配列に導入することにより、またはペプチド合成により、所望の抗原結合タンパク質のアミノ酸配列変異体を調製し得る。かかる変異体は、例えば、抗原結合タンパク質または抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失および/または挿入および/または置換を含む。最終構築物が所望の特徴を有する限り、最終構築物を得るために欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせが行われる。アミノ酸変化は抗原結合タンパク質の翻訳後プロセスも改変し得る（グリコシル化部位の数または位置の変化など）。ある場合では、エピトープ結合に直接関わるアミノ酸残基を修飾することを意図して抗原結合タンパク質変異体を調製する。他の実施形態では、本明細書で論じる目的のためエピトープ結合に直接関わらない残基またはエピトープ結合に決して関わらない残基の修飾が望ましい。任意のCDR領域および/またはフレームワーク領域の変異を意図する。抗原結合タンパク質（抗体または抗体断片を含む）のアミノ酸配列に有用な修飾を設計するために当業者は共分散分析技術を使用できる。（例えば、Choulhier, et al., Covariance Analysis of Protein Families: The Case of the Variable Domains of Antibodies, Proteins: Structure, Function, and Genetics 41:475-484 (2000); Demarest et al., Optimization of the Antibody C_H3 Domain by Residue Frequency Analysis of IgG Sequences, J. Mol. Biol. 335:41-48 (2004); Hugo et al., VL position 34 is a key determinant for the engineering of stable antibodies with fast dissociation rates, Protein Engineering 16(5):381-86 (2003); Aurora et al., Sequence covariance networks, methods and uses thereof、米国特許第2008/0318207A1号；Glaser et al., Stabilized polypeptide compositions、米国特許第2009/0048122A1号；Sequence based engineering and optimization of single chain antibodies、WO2008/110348A1号；Borrás et al., Methods of modifying antibodies, and modified antibodies with improved functional properties、WO2009/000099A2号）。共分散分析により決定するかかる修飾は、抗原結合タンパク質の効能、薬物動態、薬力学、および/または製造可能性の特徴を改善し得る。

20

30

40

【0257】

抗原結合タンパク質または抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当技術分野において知られている様々な方法により調製される。かかる方法としては、抗原結合

50

タンパク質のオリゴヌクレオチド媒介性（または部位指向）変異、PCR変異、および先に調製した変異型もしくは非変異型のカセット変異が挙げられる。

【0258】

任意の超可変またはCDR領域またはフレームワーク領域の置換変異を意図する。変異位置が好ましい抗原結合タンパク質のある残基または領域の有用な同定方法は、Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989)に記載されているように「アラニンスキャニング変異」と呼ばれる。ここで、1残基または対象残基群は同定され（例えば、arg、asp、his、lys、およびgluなどの電荷残基）、アミノ酸と抗原の相互作用に影響を与えるように中性または負電荷アミノ酸（最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン）により置換される。次いで、置換部位または置換部位のためにさらなるまたは他の変異体を導入することにより、置換基に対し機能的感受性を示すアミノ酸位置を正確にする。したがって、アミノ酸配列変化の導入部位はあらかじめ決められている一方、変異自体の性質はあらかじめ決められている必要はない。例えば、所定部位における変異の動向を分析するため、アラニンスキャニングまたは無作為変異を標的コドンまたは領域で実行し、発現した変異体の所望の活性をスクリーニングする。

10

【0259】

本発明の抗原結合タンパク質の一部の実施形態は、合成方法によって行うこともできる。固体相合成は最も対費用効果の高い小型ペプチドの作製方法であるため、個々のペプチドの好ましい作製技術である。例えば、周知の固体相合成技術としては、保護基、リンカー、および固体相支持体の使用、ならびに特異的保護および脱保護反応状態、リンカー切断状態、スカベンジャーの使用、および固体相ペプチド合成の他の態様が挙げられる。適切な技術は当技術分野において周知である。（例えば、Merrifield (1973), Chem. Polypeptides, pp. 335-61 (Katsouyannis and Panayotis eds.); Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85: 2149; Davis et al. (1985), Biochem. Intl. 10: 394-414; Stewart and Young (1969), Solid Phase Peptide Synthesis; 米国特許第3,941,763号; Finn et al. (1976), The Proteins (3rd ed.) 2: 105-253; and Erickson et al. (1976), The Proteins (3rd ed.) 2: 257-527; "Protecting Groups in Organic Synthesis," 3rd Edition, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, Eds., John Wiley & Sons, Inc., 1999; NovaBiochem Catalog, 2000; "Synthetic Peptides, A User's Guide," G. A. Grant, Ed., W. H. Freeman & Company, New York, N. Y., 1992; "Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Organic Chemistry," W. D. Bennet, J. W. Christensen, L. K. Hamaker, M. L. Peterson, M. R. Rhodes, and H. H. Saneii, Eds., Advanced Chemtech, 1998; "Principles of Peptide Synthesis, 2nd ed.," M. Bodanszky, Ed., Springer-Verlag, 1993; "The Practice of Peptide Synthesis, 2nd ed.," M. Bodanszky and A. Bodanszky, Eds., Springer-Verlag, 1994; "Protecting Groups," P. J. Kocienski, Ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart

20

30

40

50

t, Germany, 1994; "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach," W. C. Chan and P. D. White, Eds., Oxford Press, 2000, G. B. Fields et al., Synthetic Peptides: A User's Guide, 1990, 77-183). 本発明の合成物の作製に適用できる、当技術分野において知られている合成および精製方法のさらなる例については、例えば、Sullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、米国特許第2007/0071764およびSullivan et al., Toxin Peptide Therapeutic Agents、PCT/米国特許第2007/022831号(WO2008/088422A2号として公開)を参照されたく、これらは両方とも参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0260】

本明細書において任意の抗原結合タンパク質、ならびに変異体について詳述するにあたり、天然ペプチドおよびタンパク質に一般に組み込まれる20個の「基準」アミノ酸残基と同一であることを示す一文字略語系を頻繁に適用する(表4)。かかる一文字略語は、三文字略語、または略していないアミノ酸名と完全に同義の意味を有する。本明細書で使用する一文字略語系において、大文字はL-アミノ酸を示し、小文字はD-アミノ酸を示す。例えば、「R」という略語はL-アルギニンを示し、「r」という略語はD-アルギニンを示す。

20

【0261】

【表 9】

表 4 基準アミノ酸の一文字略語。三文字略語は丸括弧内である。

•			
•	アラニン(Ala)	A	
•	グルタミン(Gln)	Q	
•	ロイシン(Leu)	L	10
•	セリン(Ser)	S	
•	アルギニン(Arg)	R	
•	グルタミン酸(Glu)	E	
•	リジン(Lys)	K	
•	トレオニン(Thr)	T	
•	アスパラギン(Asn)	N	20
•	グリシン(Gly)	G	
•	メチオニン(Met)	M	
•	トリプトファン(Trp)	W	
•	アスパラギン酸(Asp)	D	
•	ヒスチジン(His)	H	
•	フェニルアラニン(Phe)	F	30
•	チロシン(Tyr)	Y	
•	システイン(Cys)	C	
•	イソロイシン(Ile)	I	
•	プロリン(Pro)	P	
•	バリン(Val)	V	

40

【0262】

典型的には、アミノ酸配列におけるアミノ酸置換は、本明細書において特定の位置におけるアミノ酸残基の一文字略語、その後、元の目的配列に対するアミノ酸位置の番号、その後、置換したアミノ酸残基の一文字記号で命名する。例えば、「T30D」は、元の目的配列に対してアミノ酸30位でのアスパラギン酸残基によるトレオニン残基置換を表す記号である。別の例として、「W101F」は、元の目的配列に対してアミノ酸101位でのフェニルアラニン残基によるトリプトファン残基置換を表す記号である。

【0263】

非基準アミノ酸残基は、組換え発現細胞を用いる既知のタンパク質工学技術を用いて本発明の範囲内のポリペプチドに組み込むことができる。(例えば、Link et al

50

. , Non-canonical amino acids in protein engineering, Current Opinion in Biotechnology, 14 (6) : 603-609 (2003) を参照されたい)。「非基準アミノ酸残基」という用語は、天然タンパク質に一般に組み込まれる20個の基準アミノ酸ではないD形態またはL形態のアミノ酸残基、例えば、 β -アミノ酸、ホモアミノ酸、環状アミノ酸および誘導体化側鎖を有するアミノ酸を指す。例として、(L形態またはD形態の) β -アラニン、 β -アミノプロピオン酸、ピペリジン酸、アミノカブロン酸、アミノヘプタン酸、アミノピメリン酸、デスモシン、ジアミノピメリン酸、 N^{α} -エチルグリシン、 N^{α} -エチルアスパラギン酸、ヒドロキシリジン、アローヒドロキシリジン、イソデスモシン、アローイソロイシン、 ω -メチルアルギニン、 N^{α} -メチルグリシン、 N^{α} -メチルイソロイシン、 N^{α} -メチルバリン、 γ -カルボキシグルタミン酸塩、 ϵ -N, N, N-トリメチルリジン、 ϵ -N-アセチルリジン、O-ホスホセリン、 N^{α} -アセチルセリン、 N^{α} -ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジン、および他の類似のアミノ酸、および下表5に列挙されるもの、および本明細書に記載のこれらの任意の誘導体化形態が挙げられる。表5は、本発明に従い有用である非基準アミノ酸残基の一部の例を含み、本明細書において典型的に使用する略語と関連するが、異なる略語および命名法を同じ物質に適用してよく、本明細書において同義的に記載され得ることを当業者は理解するであろう。

10

【0264】

【表 10】

表5 本発明に従ったペプチド配列内へのアミノ酸の添加、挿入、または置換に有用な非基準アミノ酸。表5に列挙する略語は、本明細書の他の箇所に開示する同じ物質の別の略語と異なり、両略語が適用可能であることが理解される。表5に列挙するアミノ酸はL形態であることもD形態であることもできる。

アミノ酸	略語(1つまたは複数)
アセトアミドメチル	Acm
アセチルアルギニン	acetylarg
α -アミノアジピン酸	Aad
アミノ酪酸	Abu
6-アミノヘキサン酸	Ahx; ϵ Ahx
3-アミノ-6-ヒドロキシ-2-ピペリドン	Ahp
2-アミノインダン-2-カルボン酸	Aic
α -アミノ-イソ酪酸	Aib
3-アミノ-2-ナフトエ酸	Anc
2-アミノテトラリン-2-カルボン酸	Atc
アミノフェニルアラニン	Aminophe; Amino-Phe
4-アミノ-フェニルアラニン	4AmP
4-アミジノ-フェニルアラニン	4AmPhe
2-アミノ-2-(1-カルバミミドイルピペリジン-4-イル)酢酸	4AmPig
Arg ϕ (CH ₂ NH)還元アミド結合	rArg
β -ホモアルギニン	bhArg
β -ホモリジン	bhomoK
β -ホモ Tic	BhTic
β -ホモフェニルアラニン	BhPhe
β -ホモプロリン	BhPro
β -ホモトリプトファン	BhTrp
4,4'-ビフェニルアラニン	Bip
β , β -ジフェニルアラニン	BiPhA
β -フェニルアラニン	BPhe
<i>p</i> -カルボキシル-フェニルアラニン	Cpa
シトルリン	Cit
シクロヘキシルアラニン	Cha
シクロヘキシルグリシン	Chg
シクロペンチルグリシン	Cpg
2-アミノ-3-グアニジノプロパン酸	3G-Dpr
α , γ -ジアミノ酪酸	Dab
2,4-ジアミノ酪酸	Dbu
ジアミノプロピオン酸	Dap
α , β -ジアミノプロピオン酸(または	Dpr

10

20

30

40

2,3-ジアミノプロピオン酸	
3,3-ジフェニルアラニン	Dip
4-グアニジノフェニルアラニン	Guf
4-グアニジノプロリン	4GuaPr
ホモアルギニン	hArg;hR
ホモシトルリン	hCit
ホモグルタミン	hQ
ホモリジン	hLys;hK;homoLys
ホモフェニルアラニン	hPhe;homoPhe
4-ヒドロキシプロリン(またはヒドロキシプロリン)	Hyp
2-インダニルグリシン(またはインダニルグリシン)	IgI
インドリン-2-カルボン酸	Idc
ヨードチロシン	I-Tyr
Lys ϕ (CH ₂ NH)還元アミド結合	rLys
メチオニンオキシド	Met[O]
メチオニンスルホン	Met[O] ₂
N ^α -メチルアルギニン	NMeR
N α -[(CH ₂) ₃ NHCH(NH)NH ₂]置換グリシン	N-Arg
N ^α -メチルシトルリン	NMeCit
N ^α -メチルグルタミン	NMeQ
N ^α -メチルホモシトルリン	N ^α -MeHoCit
N ^α -メチルホモリジン	NMeHoK
N ^α -メチルロイシン	N ^α -MeL;NMeL;NMeLeu;NMe-Leu
N ^α -メチルリジン	NMe-Lys
N ϵ -メチルレーリジン	N-eMe-K
N ϵ -エチルレーリジン	N-eEt-K
N ϵ -イソプロピルレーリジン	N-eIPr-K
N ^α -メチルノルロイシン	NMeNle;NMe-Nle
N ^α -メチルオルニチン	N ^α -MeOrn;NMeOrn
N ^α -メチルフェニルアラニン	NMe-Phe
4-メチルフェニルアラニン	MePhe
α -メチルフェニルアラニン	AMeF
N ^α -メチルトレオニン	NMe-Thr;NMeThr
N ^α -メチルバリン	NMeVal;NMe-Val
N ϵ -(0-(アミノエチル)-0'-(2-プロパノイル)-ウンデカエチレングリコール)-リジン	K(NPeg11)
N ϵ -(0-(アミノエチル)-0'-(2-プロパノ	K(NPeg27)

10

20

30

40

イル)-(エチレングリコール)27-リジン	
3-(1-ナフチル)アラニン	1-Nal;1Nal
3-(2-ナフチル)アラニン	2-Nal;2Nal
ニペコチン酸	Nip
ニトロフェニルアラニン	nitrophe
ノルロイシン	Nle
ノルバリン	Nva or Nvl
O-メチルチロシン	Ome-Tyr
オクタヒドロインドール-2-カルボン酸	Oic
オルニチン	Orn
Orn ϕ (CH ₂ NH)還元アミド結合	rOrn
4-ピペリジニルアラニン	4PipA
4-ピリジニルアラニン	4Pal
3-ピリジニルアラニン	3Pal
2-ピリジニルアラニン	2Pal
p-アミノフェニルアラニン	4AmP;4-Amino-Phe
p-ヨードフェニルアラニン(または 4-ヨードフェニルアラニン)	pI-Phe
フェニルグリシン	Phg
4-フェニル-フェニルアラニン(またはビフェニルアラニン)	4Bip
4,4'-ビフェニルアラニン	Bip
ピペコリン酸	Pip
4-アミノ-1-ピペリジン-4-カルボン酸	4Pip
サルコシン	Sar
1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン	Tic
1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-1-カルボン酸	Tiq
1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-7-ヒドロキシ-3-カルボン酸	Hydroxyl-Tic
1,2,3,4-テトラヒドロノルハルマン-3-カルボン酸	Tpi
チアゾリジン-4-カルボン酸	Thz
3-チエニルアラニン	Thi

10

20

30

40

【0265】

U P A C - I U B 生物化学の命名法に関する合同委員会 (J C B N) によるアミノ酸およびペプチドの命名および表記法については、以下の文書に公開されている: B i o c h e m . J . , 1 9 8 4 , 2 1 9 , 3 4 5 - 3 7 3 ; E u r . J . B i o c h e m . , 1 9 8 4 , 1 3 8 , 9 - 3 7 ; 1 9 8 5 , 1 5 2 , 1 ; 1 9 9 3 , 2 1 3 , 2 ; I n t e r n a t . J . P e p t . P r o t . R e s . , 1 9 8 4 , 2 4 , f o l l o w i n g p 8 4 ; J . B i o l . C h e m . , 1 9 8 5 , 2 6 0 , 1 4 - 4 2 ; P u r e A p p l . C h e m . , 1 9 8 4 , 5 6 , 5 9 5 - 6 2 4 ; A m i n o A c i d s a n d P e p t

50

ides, 1985, 16, 387-410; Biochemical Nomenclature and Related Documents, 2nd edition, Portland Press, 1992, pages 39-69. 【0266】

本発明の抗原結合タンパク質のペプチドドメインに対する1つもしくは複数の有用な修飾は、既知の化学技術により成し遂げられるアミノ酸の添加もしくは挿入、アミノ酸欠失、ペプチド切断、アミノ酸置換、ならびに／またはアミノ酸残基の化学的誘導体化を含むことができる。例えば、そのようにして修飾されたアミノ酸配列は、目的の天然配列のアミノ酸配列と比較して挿入または置換された少なくとも1つのアミノ酸残基を含み、挿入または置換されたアミノ酸残基はペプチドがリンカーおよび／または半減期延長部分に結合されることにより求核性または求電子性反応官能基を含む側鎖を有する。本発明に従い、かかる求核性または求電子性反応官能基の有用な例としては、チオール、一次アミン、セレノ、ヒドラジド、アルデヒド、カルボン酸、ケトン、アミノオキシ、覆面（保護）アルデヒド、または覆面（保護）ケト官能基が挙げられるが、これらに限定されない。求核性反応官能基を含む側鎖を有するアミノ酸残基の例としては、リジン残基、ホモリジン、 α , β -ジアミノプロピオン酸残基、 α , γ -ジアミノ酪酸残基、オルニチン残基、システイン、ホモシステイン、グルタミン酸残基、アスパラギン酸残基、またはセレノシステイン残基が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0267】

アミノ酸残基は、異なる化学的および／または物理的特徴に応じて一般的に分類される。「酸性アミノ酸残基」という用語は、酸性基を含む側鎖を有するD形態またはL形態のアミノ酸残基を指す。酸性残基の例としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸残基が挙げられる。「アルキルアミノ酸残基」という用語は、線状、分岐、または環状（アミノ酸アミンをプロリンなどで含む）であり得る $C_1 \sim 6$ アルキル側鎖を有するD形態またはL形態のアミノ酸残基を指し、ここで $C_1 \sim 6$ アルキルは $C_1 \sim 4$ ハロアルキル、ハロ、シアノ、ニトロ、 $-C(=O)R^b$ 、 $-C(=O)OR^a$ 、 $-C(=O)NR^aR^a$ 、 $-C(=NR^a)NR^aR^a$ 、 $-NR^aC(=NR^a)NR^aR^a$ 、 $-OR^a$ 、 $-OC(=O)R^b$ 、 $-OC(=O)NR^aR^a$ 、 $-OC_2 \sim 6$ アルキル NR^aR^a 、 $-OC_2 \sim 6$ アルキル OR^a 、 $-SR^a$ 、 $-S(=O)R^b$ 、 $-S(=O)_2R^b$ 、 $-S(=O)_2NR^aR^a$ 、 $-NR^aR^a$ 、 $-N(R^a)C(=O)R^b$ 、 $-N(R^a)C(=O)OR^b$ 、 $-N(R^a)C(=O)NR^aR^a$ 、 $-N(R^a)C(=NR^a)NR^aR^a$ 、 $-N(R^a)S(=O)_2R^b$ 、 $-N(R^a)S(=O)_2NR^aR^a$ 、 $-NR^aC_2 \sim 6$ アルキル NR^aR^a および $-NR^aC_2 \sim 6$ アルキル OR^a から選択される0、1、2もしくは3置換基により置換されており；式中 R^a は、各例で独立してHもしくは R^b であり；ならびに R^b は、各例で独立してハロ、 $C_1 \sim 4$ アルキル、 $C_1 \sim 3$ ハロアルキル、 $-OC_1 \sim 4$ アルキル、 $-NH_2$ 、 $-NHC_1 \sim 4$ アルキル、および $-N(C_1 \sim 4$ アルキル) $C_1 \sim 4$ アルキル；またはそれらの任意のプロトン化形態（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、セリン、トレオニン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、アスパラギン、グルタミン、システイン、メチオニン、ヒドロキシプロリンを含む）から選択される0、1、2もしくは3置換基により置換されているが、残基はアリールもしくは芳香族基を含まない $C_1 \sim 6$ アルキルである。「芳香族アミノ酸残基」という用語は、芳香族基を含む側鎖を有するD形態またはL形態のアミノ酸残基を指す。芳香族残基の例としては、トリプトファン、チロシン、3-(1-ナフチル)アラニン、またはフェニルアラニン残基が挙げられる。「塩基性アミノ酸残基」という用語は、塩基性基を含む側鎖を有するD形態またはL形態のアミノ酸残基を指す。塩基性アミノ酸残基の例としては、ヒスチジン、リジン、ホモリジン、オルニチン、アルギニン、N-メチル-アルギニン、 ω -アミノアルギニン、 ω -メチル-アルギニン、1-メチル-ヒスチジン、3-メチル-ヒスチジン、およびホモアルギニン(hR)残基が挙げられる。「親水性アミノ酸残基」という用語は、極性基を含む側鎖を有するD形態またはL形態のアミノ酸残基を指す。親水性残基の例としては、システイン、セリン、ト

20

30

40

50

レオニン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、グルタミン、およびシトルリン (C i t) 残基が挙げられる。「親油性アミノ酸残基」という用語は、非電荷、脂肪族または芳香族基を含む側鎖を有するD形態またはL形態のアミノ酸残基を指す。親油性側鎖の例としては、フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、バリン、トリプトファン、およびチロシンが挙げられる。アラニン (A) は両親媒性であり、親水性残基としても親油性残基としても作用できる。したがって、アラニンは、「親油性残基」と「親水性残基」の両定義に含まれる。「非機能性アミノ酸残基」という用語は、酸性、塩基性、または芳香族基を欠く側鎖を有するD形態またはL形態のアミノ酸残基を指す。中性アミノ酸残基の例としては、メチオニン、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、およびノルロイシン (N l e) 残基が挙げられる。

10

【0268】

追加の有用な実施形態は、本明細書に開示のポリペプチドのアミノ酸配列の保存的修飾に起因し得る。保存的修飾により、かかる修飾を行った結合（例えば、PEG結合）ペプチドの機能性、物理的、および化学的特徴に類似の特徴を有する半減期延長部分結合ペプチドが産生される。本明細書で開示する結合ポリペプチドのかかる保存的修飾形態も本発明の実施形態であることを意図する。

【0269】

対して、ペプチドの機能的小および／または化学的特徴の実質的な修飾は、(a) 置換領域における分子骨格の構造、例えば、 α らせん立体構造、(b) 分子の標的部位の電荷もしくは疎水性、または(c) 分子サイズの維持に与える影響が有意に異なるアミノ酸配列中の置換基の選択により成し遂げられ得る。

20

【0270】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、天然アミノ酸残基を、当該位置のアミノ酸残基の極性または電荷に対して影響を与えないかほとんど与えないように非天然残基と置換することに関わり得る。さらに、「アラニンスキャニング変異」（例えば、Mac Lennan et al., Acta Physiol. Scand. Suppl., 643:55-67 (1998); Sasaki et al., 1998, Adv. Biophys. 35:1-24 (1998)を参照されたく、これらはアラニンスキャニング変異について論じている）として既に記載されているとおり、ポリペプチド内のいずれの天然残基もアラニンと置換し得る。

30

【0271】

当業者は、所望のアミノ酸置換（保存的か非保存的かどうかを問わず）を、かかる置換が望ましい時点で決定できる。例えば、アミノ酸置換はペプチド配列の重要残基を同定するためにも使用でき、本明細書に記載のペプチドまたはビヒクル結合ペプチド分子の親和性を増加または低下させるためにも使用できる。

【0272】

天然残基は側鎖の共通の特性に基づき以下のクラスに分類し得る：

- 1) 疎水性：ノルロイシン (N o rまたはN l e)、Met、Ala、Val、Leu、I l e；
- 2) 中性で親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n；
- 3) 酸性：A s p、G l u；
- 4) 塩基性：H i s、L y s、A r g；
- 5) 鎖の方向に影響を与える残基：G l y、P r o；ならびに
- 6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

40

【0273】

保存的アミノ酸置換は、これらのクラスのあるメンバーを同じクラスの別メンバーと置換することに関わり得る。保存的アミノ酸置換は非天然アミノ酸残基を含み得、これは典型的には生体系の合成ではなく化学ペプチド合成により組み込まれる。これらとしては、ペプチド模倣物ならびに他の逆 (r e v e r s e d) 形態もしくは逆転した (i n v e r

50

t e d) 形態のアミノ酸部分が挙げられる。

【0274】

非保存的置換は、これらのクラスのあるメンバーを別のクラスのメンバーと置換することに関わり得る。かかる置換された残基は毒素ペプチドアナログ領域に導入し得る。

【0275】

かかる変化の作製において、ある実施形態に従い、アミノ酸の疎水性親水性指標を考慮してよい。各アミノ酸には、疎水性および電荷特性に基づき疎水性親水性指標が割り当てられている。各アミノ酸の疎水性親水性指標は、イソロイシン (+4.5) ; バリン (+4.2) ; ロイシン (+3.8) ; フェニルアラニン (+2.8) ; システイン / シスチン (+2.5) ; メチオニン (+1.9) ; アラニン (+1.8) ; グリシン (-0.4) ; トレオニン (-0.7) ; セリン (-0.8) ; トリプトファン (-0.9) ; チロシン (-1.3) ; プロリン (-1.6) ; ヒスチジン (-3.2) ; グルタミン酸塩 (-3.5) ; グルタミン (-3.5) ; アスパラギン酸塩 (-3.5) ; アスパラギン (-3.5) ; リジン (-3.9) ; ならびにアルギニン (-4.5) である。

【0276】

タンパク質に相互作用的な生体機能を付与するにあたり疎水性親水性アミノ酸指標の重要性が当技術分野において理解されている (例えば、K y t e e t a l. , 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131を参照されたい)。あるアミノ酸は、疎水性親水性指標またはスコアが類似している他のアミノ酸と置換しながらも類似の生体活性を保持し得ることが知られている。疎水性親水性指標に基づく変化の作製において、ある実施形態では、疎水性親水性指標が±2以内であるアミノ酸の置換が含まれる。ある実施形態では、疎水性親水性指標が±1以内であるアミノ酸の置換が含まれ、ある実施形態では、±0.5以内であるアミノ酸の置換が含まれる。

【0277】

可能性のあるアミノ酸の置換は、特に、本明細書に開示のように生物学的に機能性のタンパク質またはその結果作製されるペプチドが免疫学的実施形態における使用のために意図される場合、親水性に基づき効果的に作製することも当技術分野において理解されている。ある実施形態では、タンパク質の最大の局所平均親水性は、その隣接アミノ酸の親水性に準じるように、その免疫原性および抗原性、すなわち、タンパク質の生物学的特性と相関する。

【0278】

以下の親水性値はこれらのアミノ酸残基に割り当てられている: アルギニン (+3.0) ; リジン (+3.0) ; アスパラギン酸塩 (+3.0±1) ; グルタミン酸塩 (+3.0±1) ; セリン (+0.3) ; アスパラギン (+0.2) ; グルタミン (+0.2) ; グリシン (0) ; トレオニン (-0.4) ; プロリン (-0.5±1) ; アラニン (-0.5) ; ヒスチジン (-0.5) ; システイン (-1.0) ; メチオニン (-1.3) ; バリン (-1.5) ; ロイシン (-1.8) ; イソロイシン (-1.8) ; チロシン (-2.3) ; フェニルアラニン (-2.5) およびトリプトファン (-3.4)。類似の親水性値に基づく変化の作製において、ある実施形態では、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が含まれ、ある実施形態では、親水性値が±1以内であるアミノ酸の置換が含まれ、ある実施形態では、±0.5以内であるアミノ酸の置換が含まれる。親水性に基づき、一次アミノ酸配列由来のエピトープも同定し得る。これらの領域は「エピトープのコア領域」とも呼ばれる。

【0279】

保存的置換の例としては、1つの非極性 (疎水性) アミノ酸残基 (イソロイシン、バリン、ロイシン、ノルロイシン、アラニン、またはメチオニンなど) と別のものとの置換、1つの極性 (親水性) アミノ酸残基と別のものとの置換 (アルギニンとリジンとの間、グルタミンとアスパラギンとの間、グリシンとセリンとの間など)、1塩基性アミノ酸残基 (リジン、アルギニンまたはヒスチジンなど) と別のものとの置換、または1酸性残基 (アスパラギン酸またはグルタミン酸など) と別のものとの置換が挙げられる。「保存的ア

ミノ酸置換」という語句は、かかるポリペプチドが不可欠な生体活性を示す限り、非誘導体化残基の代わりに化学的誘導体化残基の使用も含む。本発明に従い有用であり得る他のアミノ酸置換の例を下表 6 に記載する。

【0280】

【表 11】

表 6 一部の有用なアミノ酸置換。

元の残基	置換例
Ala	Val、Leu、Ile
Arg	Lys、Gln、Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser、Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro、Ala
His	Asn、Gln、Lys、Arg
Ile	Leu、Val、Met、Ala、Phe、ノルロイシン
Leu	ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、Phe
Lys	Arg、1,4-ジアミノ酪酸、Gln、Asn
Met	Leu、Phe、Ile
Phe	Leu、Val、Ile、Ala、Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr、Ala、Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr、Phe
Tyr	Trp、Phe、Thr、Ser
Val	Ile、Met、Leu、Phe、Ala、ノルロイシン

10

20

30

40

【0281】

通常、抗原結合タンパク質のアミノ酸配列変異体は、重鎖もしくは軽鎖可変領域のいずれかの元の抗原結合タンパク質または抗体アミノ酸配列と少なくとも 60% 同一であるアミノ酸配列を有するか、または少なくとも 65%、もしくは少なくとも 70%、もしくは少なくとも 75% もしくは少なくとも 80% 同一であり、より好ましくは少なくとも 85% 同一であり、さらにより好ましくは少なくとも 90% 同一であり、最も好ましくは少な

50

くとも95%同一である（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、および100%を含む）アミノ酸配列を有する。この配列に関して、本明細書における同一性または相同性は、必要な場合、配列同一率が最大に達するように配列を整列しギャップを導入した後の候補配列におけるアミノ酸残基の元の配列との同一率として定義し、保存的置換はいずれも配列同一性の一部とはみなさない。抗原結合タンパク質または抗体配列のN末端、C末端、または内部の伸張、欠失、もしくはそれらへの挿入はいずれも配列同一性または相同性に影響を与えないものとして解釈されるべきである。

【0282】

アミノ酸配列挿入としては、1残基から100個以上の残基を含むポリペプチドにわたる長さのアミノ末端および／もしくはカルボキシル末端融合、ならびに単一もしくは複数アミノ酸残基の内部配列挿入が挙げられる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗原結合タンパク質またはエピトープタグもしくはサルベージ受容体結合エピトープに融合した抗原結合タンパク質（抗体または抗体断片を含む）が挙げられる。抗原結合タンパク質または抗体分子の他の挿入変異体としては、抗原結合タンパク質の血清半減期を増長するポリペプチド（例えばN末端またはC末端）への融合が挙げられる。

【0283】

エピトープタグの例としては、flu HAタグポリペプチドおよびその抗体12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)] ; c-mycタグならびにそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7、および9E10抗体 [Evan et al., Mol. Cell. Biol. 5 (12): 3610-3616 (1985)] ; ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD) タグおよびその抗体 [Paborsky et al., Protein Engineering 3 (6): 547-553 (1990)] が挙げられる。他のタグ例は、ポリ-ヒスチジン配列（一般に約6個のヒスチジン残基）であり、ニッケルキレート化を用いて標識した化合物を単離させる。他の標識およびタグ、例えばFLAG（商標）タグ（Eastman Kodak, Rochester, NY）などは当技術分野において周知であり、日常的に用いられている。

【0284】

本発明の抗原結合タンパク質（抗体および抗体断片を含む）のアミノ酸置換変異体の一部の特定の、非制限的、実施形態を以下に例示する。

【0285】

分子の酸化安定性を改善して異常な架橋を防止するために、抗原結合タンパク質の適切な適合の維持に関わらない任意のシステイン残基も一般にセリンと置換し得る。逆に、システイン結合（1つまたは複数）は、（特に抗原結合タンパク質がFv断片などの抗体断片である場合）安定性を改善するために抗原結合タンパク質に添加し得る。

【0286】

ある場合では、抗原結合タンパク質変異体は、エピトープ結合に直接関わるアミノ酸残基を修飾することを意図して調製する。他の実施形態では、本明細書で論じる目的のため、エピトープ結合に直接関わらない残基、またはエピトープ結合に決して関わらない残基の修飾が望ましい。任意のCDR領域および／またはフレームワーク領域の変異を意図する。

【0287】

どの抗原結合タンパク質のアミノ酸残基がエピトープ認識および結合にとって重要であるかを決定するため、アラニンスキニング変異を実施して置換変異体を産生できる。例えば、Cunningham et al., Science, 244: 1081-1085 (1989)を参照されたく、この開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。この方法では、個々のアミノ酸残基をアラニン残基で一度に置換し、生成し

10

20

30

40

50

た抗DNPまたは抗KLH抗原結合タンパク質について、非修飾ポリペプチドと比較した特異的エピトープに対する結合能をスクリーニングする。結合能の低下した修飾抗原結合タンパク質の配列を決定してどの残基が変化したかを決定し、結合または生物学的特性におけるその重要性を示す。

【0288】

無作為アミノ酸変化を親ポリペプチド配列内に導入する親和性成熟により抗原結合タンパク質の置換変異体を調製できる。例えば、Ouweland et al., Vox Sang 74 (Suppl 2): 223-232, 1998; Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915, 1998; Dall'Acqua et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 8: 443-450, 1998を参照されたく、これらの開示は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。親和性成熟は、抗DNPもしくは抗KLH抗原結合タンパク質またはそれらの変異体の調製およびスクリーニング、ならびに生成した変異体から修飾生物学的特性（親抗DNPまたは抗KLH抗原結合タンパク質と比較して増加した結合親和性など）を有するものの選択に関わる。置換変異体の生成のための好都合な方法は、ファージディスプレイを用いた親和性成熟である。簡単に述べると、いくつかの超可変領域部位を変異させて各部位ですべての可能なアミノ置換を産生する。このように産生した変異体は、各粒子内にパッケージされたM13の遺伝子III生成物への融合物として線維状ファージ粒子表面上の1価様式において発現する。次いでファージディスプレイ変異体の生体活性（例えば、結合親和性）をスクリーニングする。例えば、WO92/01047号、WO93/112366号、WO95/15388号およびWO93/19172号を参照されたい。

【0289】

現在の抗体の親和性成熟手順は、2つの変異分類、すなわち確率論的および非確率論的分類に属する。変異性PCR、変異誘発細菌菌株（Low et al., J. Mol. Biol. 260, 359-68, 1996）、および飽和変異（Nishimiya et al., J. Biol. Chem. 275: 12813-20, 2000; Chowdhury, P. S. Methods Mol. Biol. 178, 269-85, 2002）は確率論的変異方法の典型例である（Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 8466-71, 2005）。非確率論的技術はアラニンスキャニングまたは部位指向変異を頻繁に使用して特定の変異タンパク質を限定的に収集する。方法の一部を以下に詳述する。

【0290】

パニング方法を介した親和性成熟—組換え抗体の親和性成熟は、一般に、徐々に減少させた量の抗原の存在下で、候補抗体の数回のパニングを介して行われる。1回当たりの抗原量を減らして抗原に対する親和性が最も高い抗体を選択することにより、出発物質の大きなプールから高親和性抗体が得られる。パニングを介した親和性成熟は、当技術分野において周知であり、例えば、Huls et al. (Cancer Immunol Immunother. 50: 163-71, 2001)に記載されている。ファージディスプレイ技術を用いた親和性成熟の方法については、本明細書の他の箇所に記載されており、当技術分野において知られている（例えば、Daugherty et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 2029-34, 2000を参照されたい）。

【0291】

ルックスルー突然変異誘発—ルックスルー突然変異誘発（LTM）（Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 8466-71, 2005）により、抗体結合部位の迅速なマッピング方法が提供されている。LTMでは、20個の天然アミノ酸によって提供される主要な側鎖化学の代表であるアミノ酸9個を選択して、抗体の全6つのCDR中のすべての位置における結合に関与する

官能性側鎖を精査する。L T Mによって、選択されたアミノ酸 9 個中 1 個により各「野生型」残基が体系的に置換される C D R 内で一連の位置的な単一変異が作製される。変異 C D R を組み合わせることにより、すべての変異タンパク質の定量ディスプレイが抑制されることなく、複雑度が増してサイズの拡大したコンビナトリアル単鎖可変断片 (s c F v) ライブラリーが得られる。陽性選択後、結合の改善されたクローンの配列を決定し、有益な変異をマッピングする。

【0292】

変異性 P C R－変異性 P C R は様々な選択ラウンド間における核酸の無作為化に関わる。無作為化は、使用するポリメラーゼの固有エラー率により低率で生じるが、転写中に固有エラー率の高いポリメラーゼ (Hawkins et al., J Mol Biol. 226:889-96, 1992) を用いる変異性 P C R (Zaccollo et al., J. Mol. Biol. 285:775-783, 1999) により増強することができる。変異サイクル後、当技術分野の通例の方法を用いて抗原に対する親和性の改善されたクローンを選択する。

【0293】

遺伝子シャフリングおよび指向性進化に利用する技術も、所望の活性の抗 D N P もしくは抗 K L H 抗原結合タンパク質またはそれらの変異体の調製およびスクリーンのために用い得る。例えば、Jermutus et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 98(1):75-80 (2001) により、リボソームディスプレイに基づき適合させたインビトロ選択戦略は D N A シャフリングによりインビトロ多様化と組み合わせたり s c F v の解離または熱力学的安定性のいずれかを生じることが示されている; Fermer et al., Tumour Biol. 2004 Jan-Apr; 25(1-2):7-13 には、D N A シャフリングと組み合わせたファージディスプレイの使用により親和性がほぼ 3 桁増加したことが報告されている。Dougherty et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Feb. 29; 97(5):2029-2034 には (i) 超変異ライブラリーにおいて機能性クローンは予期せず高い頻度で生じること、(i i) 機能獲得変異は、かかるライブラリーにおいて十分表されること、ならびに (i i i) 高親和性に至る s c F v 変異の大部分が結合部位から離れた残基に相当することが報告されている。

【0294】

あるいは、または加えて、抗原抗体複合体の結晶構造を分析して抗体と抗原間の接触点を同定するか、またはかかる接触点をモデリングするコンピュータソフトウェアを用いることが有益であり得る。かかる接触残基および隣接残基は、本明細書において精密技術に従う置換候補である。かかる変異体は、産生後、本明細書に記載のスクリーニングに供し、1 つまたは複数の関連アッセイにおける優れた特性を有する抗体をさらなる開発のために選択し得る。

【0295】

修飾炭水化物を有する抗原結合タンパク質

例えば、抗原結合タンパク質へ結合した 1 つもしくは複数の炭水化物部分の添加もしくは欠失、ならびに／または抗原結合タンパク質における 1 つもしくは複数のグリコシル化部位の添加もしくは欠失により、親ポリペプチドと比較して修飾グリコシル化パターンを有する抗原結合タンパク質変異体も産生できる。

【0296】

典型的にはポリペプチド (抗体を含む) のグリコシル化は、N 結合または O 結合のいずれかである。N 結合とは、炭水化物部分のアスパラギン残基側鎖への結合を指す。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン (X はプロリンを除く任意のアミノ酸) は、炭水化物部分のアスパラギン側鎖に対する酵素結合の認識配列である。ポリペプチド中のこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は潜在的グリコシル化部位を作製する。したがって、N 結合したグリコシル化部位は、これらのトリペプチド配列を 1 つまたは複数含むようにアミノ酸配列を改変することにより抗原結合タン

パク質に添加し得る。O結合グリコシル化とは、糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの1つのヒドロキシアミノ酸（最も一般的にセリンまたはトレオニンであるが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンも用い得る）への結合を指す。O結合したグリコシル化部位は、1つまたは複数のセリンまたはトレオニン残基を元の抗原結合タンパク質または抗体の配列に挿入または置換することにより抗原結合タンパク質に添加し得る。

【0297】

改変されたエフェクター機能

システイン残基（1つまたは複数）は、抗体またはFc含有ポリペプチドのFc領域で除去または誘発され得、その結果、この領域で鎖間ジスルフィド結合形態を除去または増加する。そのように産生されたホモ二量体抗原結合タンパク質は内部移行能力を改善しならびに／または相補性媒介性細胞殺傷および抗体依存性細胞傷害（ADCC）を増大し得る。Caron et al., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) and Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)を参照されたい。ホモ二量体抗原結合タンパク質または抗体は、Wolff et al., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に記載のヘテロ二機能性交差リンカーを用いることによって調製し得る。あるいは、二重Fc領域を有する抗原結合タンパク質を加工でき、その結果、高まった相補性溶解およびADCC能力を有し得る。Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)を参照されたい。

【0298】

CDR内配列は、抗体をMHCクラスIIに結合させて望ましくないヘルパーT細胞反応を惹起し得ることが示されている。保存的置換は抗原結合タンパク質の結合活性を保持して望ましくないT細胞反応を惹起する能力を減らすことができる。重鎖または軽鎖の1つまたは複数のN末端の20個のアミノ酸が除去されることも意図する。

【0299】

血清半減期を増長するための修飾も望ましい場合がある。例えば、分子（PEGまたは多糖ポリマーをはじめとした他の水溶性ポリマーなど）を添加することによって行いか、サルベージ受容体結合エピトープを組み込むか添加することによって（例えば、抗原結合タンパク質の適切な領域の変異によってまたは（例えば、DNAもしくはペプチド合成により）ペプチドタグ中にエピトープを組み込み、それを抗原結合タンパク質のいずれかの末端または中間位において融合することによっても行い得る（例えば、WO96/32478号を参照されたい）。

【0300】

サルベージ受容体結合エピトープは、好ましくは、Fcドメインの1つまたは2つのループ由来の任意の1つまたは複数のアミノ酸残基が抗原結合タンパク質または断片のアナログ位置に移されている領域を構成する。さらにより好ましくは、Fcドメインの1つまたは2つのループ由来の3つ以上の残基が移されている。さらにより好ましくは、エピトープは、（例えば、IgGの）Fc領域のCH2ドメイン由来であり、抗原結合タンパク質もしくは抗体のCH1、CH3、もしくはVH領域、または複数のかかる領域に移されている。あるいは、エピトープは、Fc領域のCH2ドメイン由来であり、抗原結合タンパク質断片のCL領域もしくはVL領域、または両方に移されている。Fc変異体と、それらのサルベージ受容体との相互作用について記載している国際特許第WO97/34631号およびWO96/32478号も参照されたい。

【0301】

補体依存性細胞障害性（CDC）（C1q結合部位など）、および／または抗体依存性細胞傷害（ADCC）に関与する定常領域の他の部位およびアミノ酸残基（1つまたは複数）が同定されている〔例えば、Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992); Shields et al., J. Biol

. Chem., 276(9):6591-6604 (2001); Lazar et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 103(11):4005 (2006)を参照されたい。これらには特定の位置における変異の影響について記載されており、それぞれ参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる]。Fc受容体結合部位の残基の変異は、改変された(すなわち増加または低下した)エフェクター機能(Fc受容体に対する改変された親和性、改変されたADCCもしくはCDC活性、または改変された半減期など)に至り得る。上記のとおり、潜在的変異としては、1つまたは複数の残基の挿入、欠失または置換が挙げられる(アラニンとの置換、保存的置換、非保存的置換、または異なるサブクラスの同位置での対応するアミノ酸残基との置換(例えばIgG1残基の、当該位置の対応するIgG2残基との置換)を含む)。

10

【0302】

本発明は、炭水化物構造が改変されてエフェクター活性の改変に至った抗原結合タンパク質分子(抗体および抗体断片を含む)(フコシル化が欠失または低減してADCC活性の改善が示された抗体分子など)の産生も包含する。これを成し遂げるための様々な方法が当技術分野において知られている。例えば、ADCCエフェクター活性は、抗体分子のFcγRIII受容体への結合により媒介され、これはCH2ドメインのAsn-297でN結合したグリコシル化の炭水化物構造に依存することが示されている。非フコシル化抗体は増加した親和性でこの受容体に結合し、天然フコシル化抗体よりも効果的にFcγRIII媒介性エフェクター機能を惹起する。例えば、α-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ酵素がノックアウトされているCHO細胞内の非フコシル化抗体の組換え産生により、抗体のADCC活性は100倍増加する(Yamane-Ohnuki et al., Biotechnol Bioeng. 2004 Sep 5;87(5):614-22)。類似の効果は、フコシル化経路におけるこの酵素もしくは他の酵素の活性低下を介して、例えば、siRNAもしくは抗センスRNA処置、酵素(1つまたは複数)をノックアウトする細胞系工学、または選択的グリコシル化阻害剤との培養を介して成し遂げることができる(Rothman et al., Mol Immunol. 1989 Dec;26(12):1113-23)。

20

一部の宿主細胞系、例えばLecl3またはラットハイブリドーマYB2/0細胞系は、低級フコシル化レベルで抗体を天然で産生する。Shields et al., J Biol Chem. 2002 Jul 26;277(30):26733-40; Shinkawa et al., J Biol Chem. 2003 Jan 31;278(5):3466-73。(例えばGnTIII酵素を過剰発現する細胞内の抗体の組換え産生を介した)二分された炭水化物レベルの増加はADCC活性を増大することも決定されている。Um ana et al., Nat Biotechnol. 1999 Feb;17(2):176-80。ADCC活性を増大する上でフコース残基2つのうち1つのみの欠失で十分であり得ることが予想されている。(Ferrara et al., J Biol Chem. 2005 Dec 5)。

30

【0303】

抗原結合タンパク質の他の共有結合修飾

抗DNPまたは抗KLH抗原結合タンパク質の他の特定の共有結合修飾も本発明の範囲内に含まれる。それらは、妥当な場合、抗原結合タンパク質または抗体の化学合成によりまたは酵素もしくは化学切断により作製し得る。他のタイプの共有結合修飾は、選択された側鎖またはN末端残基もしくはC末端残基と反応できる有機誘導化剤と標的アミノ酸残基を反応させることにより導入できる。

40

【0304】

システイニル残基は、最も一般的には、α-ハロ酢酸塩(および対応するアミン)、例えばクロロ酢酸またはクロロアセトアミドなどと反応させてカルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を得る。システイニル残基は、プロモトリフルオロアセトン、α-プロモ-β-(5-イミダゾイル)プロピオン酸、クロロアセチルリン酸、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフ

50

イド、p-クロロ第二水銀安息香酸、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノールまたはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1, 3-ジアゾールとの反応によっても誘導体化される。

【0305】

ヒスチジル残基は、pH 5.5～7.0で二炭酸ジエチルとの反応により誘導体化する。なぜならこの薬剤は、ヒスチジル側鎖に対して比較的特異的であるためである。p-臭化ブromoフェナシルも有用である；この反応は、好ましくは0.1Mカコジル酸ナトリウム中、pH 6.0で行う。

【0306】

リジニルおよびアミノ末端残基はコハク酸またはその他のカルボン酸無水物と反応させる。これらの薬剤による誘導体化はリジニル残基の電荷を逆にする作用を有している。αアミノを含有している残基を誘導体化するのに適した他の試薬としては、メチルピコリンイミデートなどのイミドエステル類；リン酸ピリドキサル；ピリドキサル；水素化ホウ素類；トリニトロベンゼンスルホン酸；O-メチルイソ尿素；2,4-ペンタンジオン；およびグリオキシレートとのトランスアミナーゼ触媒の反応が挙げられる。

【0307】

アルギニル残基は、1つまたは複数の従来の試薬、とりわけフェニルグリオキサール、2, 3-ブタンジオン、1, 2-シクロヘキサジオン、およびニンヒドリンとの反応により修飾される。アルギニン残基の誘導体化のためには、グアニジン官能基の高 pK_a の故に、アルカリ条件で反応が行われる必要がある。さらに、これらの試薬はリジン基ならびにアルギニンε-アミノ基と反応し得る。

【0308】

芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によりチロシル残基内にスペクトル標識を導入する特定の目的にて、チロシル残基の特異的修飾を行い得る。最も一般的には、N-アセチルイミダゾイルおよびテトラニトロメタンが、それぞれO-アセチルチロシル種および3-ニトロ誘導体を形成するために用いられる。チロシル残基は、 ^{125}I または ^{131}I を用いてヨウ化し、放射免疫アッセイにおける使用のため標識タンパク質を調製する。

【0309】

カルボキシル側基（アスパルチルまたはグルタミル）は、カルボジイミド（ $R-NH-C(=O)-R'$ ）との反応により選択的に修飾され、ここでRとR'は異なるアルキル基である（1-シクロヘキシル-3-（2-モルホリニル-4-エチル）カルボジイミドまたは1-エチル-3-（4-アゾニア-4, 4-ジメチルペンチル）カルボジイミドなど）。さらに、アスパルチルおよびグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によりアスパラギニルおよびグルタミニル残基に形質転換される。

【0310】

グルタミニルおよびアスパラギニル残基は、それぞれ対応するグルタミルおよびアスパルチル残基に対して頻繁に脱アミド化されている。これらの残基は、中性または塩基性条件下で脱アミド化されている。これらの残基の脱アミド化形態は本発明の範囲内である。

【0311】

他の修飾としては、プロリンおよびリジンの水酸化、セリルもしくはトレオニル残基の水酸基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化（T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983))、N末端アミンのアセチル化、および任意のC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【0312】

別のタイプの共有結合修飾は、抗原結合タンパク質（例えば、抗体または抗体断片）に対する化学的または酵素的カップリンググリコシドに関わる。これらの手順は、N結合またはO結合グリコシル化のためのグリコシル化能を有する宿主細胞内の抗原結合タンパク

10

20

30

40

50

質の産生を必要としない利点がある。使用するカップリング方法に応じて、糖類（1つまたは複数）は、（a）アルギニンおよびヒスチジン、（b）遊離カルボキシル基、（c）遊離スルフヒドリル群（システインなどのもの）、（d）遊離水酸基（セリン、トレオニン、またはヒドロキシプロリンなどのもの）、（e）芳香族残基（フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンなどのもの）、または（f）グルタミンのアミド基に結合し得る。これらの方法は、WO 87/05330号（1987年9月11日公開）、および Applin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem. , pp. 259-306（1981）に記載されている。

【0313】

抗原結合タンパク質上に存在するいずれの炭水化物部分の除去も、化学的または酵素的に成し遂げ得る。化学的脱グリコシル化には、抗原結合タンパク質を化合物トリフルオロメタンスルホン酸、または等価化合物へ曝露することが必要である。この処置により、連結糖類（N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン）を除くほとんどまたはすべての糖類が切断される一方で抗原結合タンパク質はインタクトのまま残る。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin, et al. Arch. Biochem. Biophys. 259: 52（1987）により、および Edge et al. Anal. Biochem. , 118: 131（1981）により記載されている。抗原結合タンパク質上の炭水化物部分の酵素切断は、Thotakura et al. Meth. Enzymol. 138: 350（1987）により記載されている様々なエンドグルコシダーゼおよびエキソグルコシダーゼを用いて成し遂げることができる。

【0314】

本発明の抗原結合タンパク質（抗体および抗体断片を含む）の別のタイプの共有結合修飾は、様々な非タンパク質様ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシエチル化ポリオール、ポリオキシエチル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グルコース、ポリオキシエチル化グリセロール、ポリオキシアルキレン、または多糖ポリマー（デキストランなど）の1つに対する抗原結合タンパク質の連結を含む。かかる方法は当技術分野において知られており、例えば米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号、同第4,179,337号、同第4,766,106号、同第4,179,337号、同第4,495,285号、同第4,609,546号または欧州特許第315456号を参照されたい。

【0315】

単離核酸

本発明の別の態様は、本発明の抗原結合タンパク質をコードする単離核酸、例えばこれらに限定されないが、本発明の抗体または抗体断片をコードする単離核酸などである。かかる核酸は、当技術分野において知られているおよび／または本明細書に開示する組換え技術により作製される。

【0316】

例えば、単離核酸は、配列番号250、配列番号252、配列番号254、配列番号256、配列番号258、もしくは配列番号260と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む抗原結合タンパク質をコードする。

【0317】

他の実施形態では、単離核酸は、配列番号232、配列番号234、配列番号236、配列番号238、もしくは配列番号240と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗原結合タンパク質をコードする。

【0318】

他の単離核酸の例としては、免疫グロブリン重鎖可変領域をコードする単離核酸が挙げられ、ここで単離核酸はCDRH1、CDRH2およびCDRH3と命名された3つの相補性決定領域のためのコード配列を含み：

(a) CDRH1は配列番号188、配列番号189、配列番号190、もしくは配列番号191のアミノ酸配列を含む；

(b) CDRH2は配列番号192、配列番号193、配列番号194、もしくは配列番号195のアミノ酸配列を含む；ならびに

(c) CDRH3は配列番号196、配列番号197、配列番号198、配列番号199、配列番号200、もしくは配列番号201のアミノ酸配列を含む。

【0319】

さらに他の単離核酸の例としては、免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードする単離核酸が挙げられ、ここで単離核酸はCDRL1、CDRL2およびCDRL3と命名された3つの相補性決定領域のためのコード配列を含み；

(a) CDRL1は配列番号202、配列番号203、配列番号204、もしくは配列番号205のアミノ酸配列を含む；

(b) CDRL2は配列番号206もしくは配列番号207のアミノ酸配列を含む；ならびに

(c) CDRL3は配列番号208、配列番号209、配列番号210、配列番号211、もしくは配列番号212のアミノ酸配列を含む。

【0320】

他の実施形態では、単離核酸は、配列番号77、配列番号107、配列番号111、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号123、配列番号129、配列番号144、配列番号145、配列番号181、配列番号182、配列番号183、配列番号184、もしくは配列番号185のアミノ酸配列を含むか、またはN末端かC末端、もしくは両端のアミノ酸残基が1個、2個、3個、4個もしくは5個欠けている前述の任意の一配列を含む免疫グロブリン重鎖を含む抗原結合タンパク質をコードする。

【0321】

また、いくつかの実施形態では、単離核酸は、配列番号105、配列番号109、配列番号121；配列番号125、もしくは配列番号127のアミノ酸配列を含むか、またはN末端かC末端、もしくは両端のアミノ酸残基が1個、2個、3個、4個もしくは5個欠けている前述の任意の一配列を含む免疫グロブリン軽鎖を含む抗原結合タンパク質をコードする。

【0322】

別の例において、単離核酸は、配列番号262、配列番号264、もしくは配列番号266の配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む抗原結合タンパク質をコードする。

【0323】

他の実施形態では、単離核酸は、配列番号242、配列番号244、配列番号246、もしくは配列番号248と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗原結合タンパク質をコードする。

【0324】

他の単離核酸の例としては、免疫グロブリン重鎖可変領域をコードする単離核酸が挙げられ、ここで単離核酸はCDRH1、CDRH2およびCDRH3と命名された3つの相補性決定領域のためのコード配列を含み；

(a) CDRH1は配列番号213、配列番号214、もしくは配列番号215のアミノ酸配列を含む；

(b) CDRH2は配列番号216、配列番号217、もしくは配列番号218のアミノ酸配列を含む；ならびに

(c) CDRH3は配列番号219、配列番号220、もしくは配列番号221のアミノ酸配列を含む。

【0325】

さらに他の単離核酸の例としては、免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードする単離核酸

10

20

30

40

50

が挙げられ、ここで単離核酸はCDRL1、CDRL2およびCDRL3と命名された3つの相補性決定領域のためのコード配列を含み：

(a) CDRL1は配列番号204、配列番号222、配列番号223、もしくは配列番号224のアミノ酸配列を含む；

(b) CDRL2は配列番号206、配列番号225、もしくは配列番号226のアミノ酸配列を含む；ならびに

(c) CDRL3は配列番号227、配列番号228、配列番号229、もしくは配列番号230のアミノ酸配列を含む。

【0326】

他の実施形態では、単離核酸は、配列番号46、配列番号133、配列番号139、配列番号143、配列番号186のアミノ酸配列を含むか、またはN末端かC末端、もしくは両端のアミノ酸残基が1個、2個、3個、4個もしくは5個欠けている前述の任意の一配列を含む免疫グロブリン重鎖を含む抗原結合タンパク質をコードする。

【0327】

また、いくつかの実施形態では、単離核酸は、配列番号28、配列番号131、配列番号135、配列番号137；もしくは配列番号141のアミノ酸配列を含むか、またはN末端かC末端、もしくは両端のアミノ酸残基が1個、2個、3個、4個もしくは5個欠けている前述の任意の一配列を含む免疫グロブリン軽鎖を含む抗原結合タンパク質をコードする。

【0328】

本発明は、任意の本発明の単離核酸を含むベクター（発現ベクターを含む）にも関する。当技術分野において知られているおよび／または本明細書に開示されている分子生物学的技術により作製された、発現ベクターを含む単離宿主細胞も本発明に包含される。本発明は、以下に関わる方法にも関する：

(a) 発現ベクターによりコードされた抗原結合タンパク質を発現させる条件下の培養基で宿主細胞を培養すること；ならびに

(b) 培養基から抗原結合タンパク質を回収すること。抗原結合タンパク質の回収は、抗体の既知の精製方法（これらに限定されないが、本明細書の実施例1および他の箇所に開示の抗体精製技術など）により成し遂げられる。

【0329】

遺伝子療法

適切な細胞への治療抗原結合タンパク質の送達は、当技術分野において知られている任意の適切なアプローチを用いてエキスピボ、原位置、またはインビボ遺伝子療法を介してもたすことができる。例えば、インビボ療法において、所望の抗原結合タンパク質もしくは抗体をコードする核酸を、単独またはベクター、リポソーム、もしくは沈殿物と連結するかのいずれかで対象に直接注射し得、いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質化合物の発現が望ましい部位で注射し得る。エキスピボ処置において、対象の細胞を除去し、これらの細胞内に核酸を導入し、直接または、例えば、患者に移植する多孔膜に被包するかのいずれかで修飾細胞を対象に戻す。例えば米国特許第4,892,538号および同第5,283,187号を参照されたい。

【0330】

核酸を生存細胞内に導入するために様々な技術が利用可能である。これらの技術は、核酸がインビトロ培養細胞内に移されたのか、または意図した宿主のインビボ細胞内に移されたのかによって決まる。核酸のインビトロ哺乳類細胞の転写に適した技術としては、リポソームの使用、電気穿孔、微量注入、細胞融合、化学的処置、DEAEーデキストラン、およびリン酸カルシウム沈殿が挙げられる。他のインビボ核酸の転写技術としては、ウイルスベクター（アデノウイルス、単純ヘルペスIウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはレトロウイルスなど）とのトランスフェクションおよび脂質ベース系が挙げられる。核酸およびトランスフェクション剤は、任意選択的に微粒子と結合している。トランスフェクション剤の例としては、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAEーデキ

10

20

30

40

50

ストラン仲介型トランスフェクション、第四級アンモニウム両親媒性物質DOTMA（臭化（ジオレオイルオキシプロピル）トリメチルアンモニウム、GIBCO-BRLによりLipofectinとして市販されている）（Felgner et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417; Malone et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 6077-6081); トリメチルアンモニウムのペンダントヘッドを有する親油性グルタミン酸ジエステル（Ito et al. (1990) Biochem. Biophys. Acta 1023, 124-132); 陽イオン性脂質ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン（DOGS, Transfectam, Promega）およびジバルミトイルホスファチジルエタノールアミドスベルミン（DPPEs）などの代謝可能な親脂質（J. P. Behr (1986) Tetrahedron Lett. 27, 5861-5864; J. P. Behr et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6986）など; 代謝可能な第四級アンモニウム塩（DOTB、N-（1-〔2, 3-ジオレオイルオキシ〕プロピル）-N, N, N-トリメチルアンモニウムメチルスルファート（DOTAP）（Boehringer Mannheim）、ポリエチレンイミン（PEI）、ジオレオイルエステル、ChoTB、ChoSC、DOSC）（Leventis et al. (1990) Biochim. Inter. 22, 235-241); 3β [N-（N', N'-ジメチルアミノエタン）-カルバモイル] コレステロール（DC-Chol）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）/ 3β [N-（N', N'-ジメチルアミノエタン）-カルバモイル] コレステロールDC-Cholの1対1混合物（Gao et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 1065, 8-14）、スベルミン、スベルミジン、リボポリアミン（Behr et al., Bioconjugate Chem, 1994, 5: 382-389）、親油性ポリリジン（LPLL）（Zhou et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18）、過剰ホスファチジルコリン/コレステロールを有する〔〔（1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル）クレソキシ〕エトキシ〕エチル〕ジメチルベンジルアンモニウムヒドロキシド（DEBDA水酸化物）（Ballas et al., (1988) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18）、臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）/DOPE混合物（Pinnaduwa et al., (1989) Biochim. Biophys. Acta 985, 33-37）、DOPE、CTAB、DEBDA、臭化ジドデシルアンモニウム（DDAB）とグルタミン酸との親油性ジエステル（TMAG）、およびホスファチジルエタノールアミンと混合されたステアリルアミン（Rose et al., (1991) Biotechnique 10, 520-525）、DDAB/DOPE（TransfectACE, GIBCO BRL）、ならびにオリゴガラクトース担持脂質が挙げられる。導入効率を高めるトランスフェクションエンハンサー剤の例としては、例えば、DEAE-デキストラン、ポリブレン、リソソーム崩壊ペプチド（Ohmori N I et al, Biochem Biophys Res Commun Jun. 27, 1997; 235 (3): 726-9）、コンドロイチンベースのプロテオグリカン、硫酸プロテオグリカン、ポリエチレンイミン、ポリリジン（Pollard H et al. J Biol Chem, 1998 273 (13): 7507-11）、インテグリン結合ペプチドCYGGRGDTTP（配列番号235）、線状デキストランノナサッカリド、グリセロール、オリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオチド結合に係留したコレステリル基（Lettinger, R. L. 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86: (17): 6553-6）、リソホスファチド、リソホスファチジルコリン、リソホスファチジルエタノールアミン、および1-オレオイルリソホスファチジルコリンが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0331】

一部の状況では、核酸を含むベクターを標的細胞に指向させる薬剤と共に核酸を送達することが望ましい場合がある。かかる「標的」分子としては、標的細胞上の細胞表面膜タンパク質に特異的な抗原結合タンパク質、または標的細胞上の受容体のためのリガンドが挙げられる。リポソームを用いる場合、標的化および／または取り込み促進のために、食食に関連した細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質を用いてよい。かかるタンパク質の例としては、特定の細胞タイプに対して屈性の殻タンパク質およびその断片、循環内で内部化されるタンパク質のための抗原結合タンパク質、ならびに細胞内局在化を標的として細胞内半減期を増長するタンパク質が挙げられる。他の実施形態では、受容体媒介性食食を使用できる。かかる方法については、例えば、Wu et al., 1987またはWagner et al., 1990に記載されている。現在既知の遺伝子作製および遺伝子療法プロトコールの総論については、Anderson 1992を参照されたい。WO 93/25673号および引用文献も参照されたい。遺伝子療法技術に関するさらなる総論については、Friedmann, Science, 244: 1275-1281 (1989); Anderson, Nature, supplement to vol. 392, no 6679, pp. 25-30 (1998); Verma, Scientific American: 68-84 (1990); and Miller, Nature, 357: 455-460 (1992)を参照されたい。

10

【0332】

20

医薬製剤の投与および調製

本発明の方法の実践に用いられる抗DNPまたは抗KLH抗原結合タンパク質または抗体は所望の送達方法に適した担体を含む医薬組成物および薬剤に製剤化し得る。適切な担体は、抗DNPまたは抗KLH抗原結合タンパク質または抗体と組み合わせた場合、それぞれDNPまたはKLHの高親和性結合を保持し、対象の免疫系と反応しない任意の物質を含む。例としては、滅菌リン酸緩衝生理食塩水、静菌水などの任意のいくつかの標準的な医薬担体が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシンなどの各種水性担体を用いてよく、軽度化学修飾などに供するアルブミン、リポタンパク質、グロブリンなどの安定性向上のための他のタンパク質を含み得る。

30

【0333】

製剤中の抗原結合タンパク質濃度の例は、約0.1mg/mL～約180mg/mLまたは約0.1mg/mL～約50mg/mL、または約0.5mg/mL～約25mg/mL、あるいは約2mg/mL～約10mg/mLの範囲であり得る。抗原結合タンパク質の水性製剤は、例えば、pHが約4.5～約6.5、または約4.8～約5.5の範囲、あるいは約5.0であるpH緩衝溶液で調製し得る。この範囲内のpHに適した緩衝液の例としては、酢酸塩（例えば酢酸ナトリウム）、コハク酸塩（コハク酸ナトリウムなど）、グルコン酸塩、ヒスチジン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸緩衝液が挙げられる。緩衝液の濃度は、例えば、緩衝液および製剤の所望の等張性に応じて、約1mM～約200mMとすることもでき、約10mM～約60mMとすることもできる。

40

【0334】

等張化剤も抗原結合タンパク質を安定させ得、製剤中に含み得る。等張化剤の例としては、ポリオール（マンニトール、ショ糖またはトレハロースなど）が挙げられる。水性製剤は好ましくは等張であるが、高張溶液も低張溶液も適切であり得る。製剤中のポリオール濃度の例は、約1%～約15%w/vの範囲であり得る。

【0335】

製剤化した抗原結合タンパク質の凝集を減らすおよび／または製剤中の微粒子形態を最小限にするおよび／または吸着を減らすため、界面活性剤を抗原結合タンパク質製剤に添加し得る。界面活性剤の例としては、ポリソルベート（例えばポリソルベート20、またはポリソルベート80）またはポロキサマー（例えばポロキサマー188）などの非イオ

50

ン性界面活性剤が挙げられる。界面活性剤の濃度の例は、約0.001%～約0.5%、または約0.005%～約0.2%、あるいは約0.004%～約0.01%w/vの範囲であり得る。

【0336】

1つの実施形態では、製剤は上に同定した薬剤（すなわち抗原結合タンパク質、緩衝液、ポリオールおよび界面活性剤）を含み、本質的に1つまたは複数の防腐剤（ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、クロロブタノールおよびベンゼトニウムClなど）がない。別の実施形態では、例えば、約0.1%～約2%、あるいは約0.5%～約1%の範囲の濃度で防腐剤を製剤中に含み得る。製剤の所望の特徴に対して有害な影響を与えない限り、1つまたは複数の他の医薬上許容可能な担体、賦形剤または安定剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に記載のものなど）を製剤中に含み得る。許容可能な担体、賦形剤または安定剤は、使用する投与量および濃度においてレシピエントに対して無毒であり、以下を含む；追加の緩衝剤；共溶媒；抗酸化剤（アスコルビン酸およびメチオニンを含む）；キレート化剤（EDTAなど）；金属複合体（例えばZn-タンパク質複合体）；生物分解性ポリマー（ポリエステルなど）；ならびに／または塩形成対イオン（ナトリウムなど）。

【0337】

抗原結合タンパク質の治療製剤は、保存のため、任意選択的に生理的許容可能な担体、賦形剤または安定剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）を、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、望ましい純度の抗原結合タンパク質と混合することにより調製する。使用する投与量および濃度においてレシピエントに対して無毒である許容可能な担体、賦形剤、または安定剤としては、緩衝液（リン酸、クエン酸、および他の有機酸など）；抗酸化剤（アスコルビン酸およびメチオニンを含む）；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウムなど）；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン（メチルまたはプロピルパラベンなど）；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなど）；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）；アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンなど）；単糖類、二糖類、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、マルトース、またはデキストリンを含む）；キレート化剤（EDTAなど）；糖類（ショ糖、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトールなど）；塩形成対イオン（ナトリウムなど）；金属複合体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；ならびに／または非イオン性界面活性剤（TWEEN（登録商標）、PLURONICS（登録商標）もしくはポリエチレングリコール（PEG）など）が挙げられる。

【0338】

1つの実施形態では、本発明の特許請求の範囲の適切な製剤は、等張化して安定化させる等張化剤（ポリオール、ソルビトール、ショ糖または塩化ナトリウムなど）と組み合わせた等張緩衝液（リン酸、酢酸、またはトリス緩衝液など）を含む。かかる等張化剤の1例は、5%ソルビトールまたはショ糖である。加えて、製剤は任意選択的に、（凝集を防止して0.01～0.02%wt/volで安定化させるなどのために）界面活性剤を含むことができる。製剤のpHは4.5～6.5または4.5～5.5の範囲でよい。抗体のための医薬製剤の他の詳細例については、米国特許第2003/0113316号および米国特許第6,171,586号に見出され得、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0339】

本明細書における製剤は、好ましくは互いに有害な影響を与えない相補性活性を有する

もので治療されている特定の適応のために必要に応じて複数の活性化合物も含み得る。例えば、さらに免疫抑制剤を提供することが望ましい場合がある。かかる分子は、組み合わせにおいて意図した目的のための有効量で適切に存在する。

【0340】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術によりまたは界面ポリマー化により、例えば、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-（メタクリル酸メチル）マイクロカプセルは、それぞれ、コロイド薬剤送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）または巨大エマルジョンにおいて調製されたマイクロカプセルに封入してもよい。かかる技術については、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) 10
に開示されている。

【0341】

抗原結合タンパク質の懸濁液および結晶形態も意図する。懸濁液および結晶形態の作製方法は当業者に知られている。

【0342】

インビボ投与に用いる製剤は滅菌されていなければならない。本発明の組成物は従来の周知の滅菌技術により滅菌し得る。例えば、滅菌は、滅菌ろ過膜を介したろ過により容易に成し遂げられる。生成溶液は使用用にパッケージ化してもよいし、滅菌条件下でろ過して凍結乾燥してもよく、凍結乾燥した調製物は投与前に滅菌溶液と組み合わせられる。 20

【0343】

凍結乾燥プロセスは、ポリペプチドを長期間保存のために安定させるため、特にポリペプチドが液体組成物中で比較的不安定である場合に頻繁に用いられる。凍結乾燥サイクルは、通常3つの工程：凍結、一次乾燥、および二次乾燥からなる；Williams and Polli, Journal of Parenteral Science and Technology, Volume 38, Number 2, pages 48-59 (1984)。凍結工程では、適切に凍結するまで溶液を冷却する。この段階で溶液中の水は大部分が氷を形成する。一次乾燥段階で氷を蒸散させる。これは、真空機器を用いて燃焼室圧力を氷の蒸気圧以下に低下させることにより行う。最終的に、低下した燃焼室圧力および上昇した放置温度下の二次乾燥段階で収着水または結合水を除去する。このプロセスは、凍結乾燥塊として知られている物質を産生する。その後、この塊は使用前に再構成できる。 30

【0344】

凍結乾燥物質の標準的な再構成を行うため、一定容量（典型的には凍結乾燥中に除去した容量と等容量）の純水を添加するが、時には非経口投与用の製薬に抗菌剤の希釈溶液を用いる；Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, Volume 18, Numbers 11 and 12, pages 1311-1354 (1992)。

【0345】

一部の例における凍結乾燥した生成物の安定剤として作用する賦形剤について記載されている；Carpenter et al., Developments in Biological Standardization, Volume 74, pages 225-239 (1991)。例えば、既知の賦形剤としては、ポリオール（マンニトール、ソルビトールおよびグリセロールを含む）；糖類（グルコースおよびショ糖を含む）；ならびにアミノ酸（アラニン、グリシンおよびグルタミン酸を含む）が挙げられる。 40

【0346】

加えて、ポリオールおよび糖類も、凍結乾燥誘発性の損傷からポリペプチドを保護するため、および乾燥状態で保存中の安定性を高めるために頻繁に用いられる。通常、糖類、特に二糖類は、凍結乾燥プロセスおよび保存中の両方において効果的である。単糖類およ 50

び二糖類ならびにポリマー（PVPなど）を含む他のクラスの分子も、凍結乾燥した生成物の安定剤として報告されている。

【0347】

注射において、医薬製剤および／または薬剤は、上記のとおり、適切な溶液を用いた再構成に適した粉末剤であり得る。これらの例としては、凍結乾燥、回転乾燥またはスプレー乾燥粉末剤、無定形粉末剤、顆粒、沈殿物、または微粒子が挙げられるが、これらに限定されない。注射において、製剤は任意選択的に安定剤、pH調整剤、界面活性剤、生体利用能調整剤およびこれらの組み合わせを含み得る。

【0348】

徐放調製物を調製し得る。適切な徐放調製物の例としては、半透性基質の固体疎水性ポリマー（基質が加工物質、例えば、フィルム、またはマイクロカプセル状である抗原結合タンパク質を含む）が挙げられる。徐放基質の例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸のコポリマーおよびγ-エチル-L-グルタミン酸塩、分解不能なエチレン酢酸ビニル、分解可能な乳酸グリコール酸コポリマー（Lupron Depot（登録商標）など）（乳酸グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドからなる注射用ミクロスフィア）、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。ポリマー（エチレン酢酸ビニルおよび乳酸グリコール酸など）では100日間かけた分子放出が可能である一方、あるヒドロゲルではより短時間でタンパク質が放出される。被包性ポリペプチドが体内に長期間残る場合（変性している場合もあり、37℃で湿気に曝露して凝集している場合もある）、生体活性の損失および免疫原性の可能な変化に至る。関連機序に応じて安定化のために合理的な戦略を考案できる。例えば、凝集機序がチオージスルフィド置換を介した内分子S-S結合形態であることが見出された場合、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、含水量の制御、適切な添加物の使用、および特異的ポリマー基質組成物の発現により安定化を成し遂げ得る。

【0349】

本発明の製剤を、本明細書に記載の短期作用、即放、長期作用、または持続放出として設計し得る。したがって、医薬製剤は制御放出または徐放型にも製剤化し得る。

【0350】

具体的な投与量は、対象の疾患状態、年齢、体重、全身の健康状態、性別、ならびに食事、投与間隔、投与経路、排泄率、および薬剤の組み合わせにより調整し得る。有効量を含む上記の投与量形態はいずれも十分に通例実験の範囲内であるため、十分に本発明の範囲内である。

【0351】

抗原結合タンパク質を、非経口、皮下、腹腔内、肺内、および経鼻的、ならびに、局所処置を所望の場合、病巣内投与を含む任意の適切な手段により投与する。非経口注射としては、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮内または皮下投与が挙げられる。加えて、抗原結合タンパク質は、パルス注入により、特に減量した抗原結合タンパク質または抗体で適切に投与する。投薬は好ましくは注射により、最も好ましくは（部分的に投与が一過性か慢性かに応じて）静脈内または皮下注射により行う。例えば所望の部位近くに入れたカテーテルを介した局所的、特に経皮的、粘膜内、直腸的、経口または局所投与を含む他の投与手段を意図する。最も好ましくは、本発明の抗原結合タンパク質を生理溶液中で0.01mg/kg～100mg/kgの用量範囲、1日1回～週1回～月1回の頻度範囲（例えば毎日、隔日、3日ごと、または2、3、4、5、もしくは6回/週）、好ましくは0.1～45mg/kg、0.1～15mg/kgまたは0.1～10mg/kgの用量範囲、2または3回/週の頻度で、または最大45mg/kg月1回で静脈内投与する。

【0352】

本発明は、以下の実施例により例証し、これらは決して限定することを意図していない。

10

20

30

40

50

【0353】

(実施例)

【実施例1】

【0354】

DNPまたはKLHに対する抗体の生成およびスクリーニング

免疫化。Xenomouse（商標）マウスをDNP-KLHにより4週間免疫化して抗DNP抗体を生成し、DNP-リジンに結合する抗体をスクリーニングした。より詳細には、国際特許第WO98/24893号、およびWO00/76310号（これらの開示はすべて、参照により本明細書に組み込まれる）に開示の方法に従い、Xenomouse（登録商標）のXMG2系統の初回免疫化のため、既に記載されている（Mendez et al., Nat. Genet. 15:146-156 (1997)；国際特許第WO98/24893号、およびWO00/76310号公開、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）ようにマウスのXenomouse（商標）XMG2系統を一般に生成し、TiterMax Goldアジュバント（Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario）中で乳化した免疫原（マウス1匹当たり10～30μgの範囲）を用いて、2, 4-ジニトロフェニルキーホールリンペットヘモシアニン（DNP-KLH conjugate；BioSearch Technologies, Novato, CA）で免疫化した。初回免疫化後、続く免疫原（マウス1匹当たり5～20μg）ブーストをマウスにおいて適切な抗DNP価を導入するために必要なスケジュールおよび期間で投与した。固定化したDNP-BSA（BioSearch Technologies, Novato, CA）を用いた酵素免疫アッセイにより力価を決定し、最終DNP：BSAモル比が30：1であるようにこの結合体を調製した。

【0355】

Imject（商標）海中養殖キーホールリンペットヘモシアニン（mckLH；Pierce Biotechnology, Rockford, IL；cat #77600、lot #B144095B）を用いて、抗KLH抗体を増大する免疫化を4週間行った。免疫化は、足蹠注射を介して送達したAluminium Phosphate Gel Adjuvantにおいてマウス1匹当たりKLH10μgを用いて行った（HCI Biosector, Frederikssund, Denmark；カタログ#1452-250）。Xenomouse（商標）のXMG1K系統の初回免疫化は既に開示されている方法に従い（Mendez et al., Nat. Genet. 15:146-156 (1997)；国際特許第WO98/24893号、およびWO00/76310号公開、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる、これらはすべて参照により本明細書に組み込まれる）。初回免疫化後、続く免疫原（マウス1匹当たり5～10μg）ブーストをマウスにおいて適切な抗KLH価を導入するために必要なスケジュールおよび期間で投与した。固定化したKLH（Pierce Biotechnology, Rockford, IL）を用いた酵素免疫アッセイにより力価を決定した。

【0356】

モノクローナル抗体の調製。適切な力価を示すマウスを同定し、リンパ球および脾細胞を流入領域リンパ節および脾臓から得てから、各コホートをプールした。B細胞を適切な培地（例えば、ダルベッコ変法イーグル培地；DMEM；Invitrogen, Carlsbad, CA）中で粉砕することにより組織から解離して細胞を組織から放出させ、DMEM内で懸濁した。標準的な方法を用いて、および当技術分野において知られている技術を用いてB細胞を選択および／または拡大し、適切な融合パートナー、例えば、非分泌骨髓腫P3X63Ag8.653細胞と融合した（American Type Culture Collection CRL 1580；Kearney et al, J. Immunol. 123:1548-1550 (1979)）。

【0357】

B細胞を融合パートナー細胞と1:4比で混合した。細胞混合物を4分間の遠心分離400×gにより穏やかにペレットし、容器を傾けて上清を移し、1mLピペットを用いて細胞混合物を穏やかに混合した。融合物をPEG/DMSO（ポリエチレングリコール/ジメチルスルホキシド；Sigma-Aldrich, St. Louis MOから入手；1mL/百万リンパ球）で導入した。PEG/DMSOを穏やかに攪拌しながら1分かけてゆっくりと添加後、1分間混合した。次いでIDMEM（グルタミン非含有DMEM；2mL/百万B細胞）を穏やかに攪拌しながら2分かけて添加し、追加のIDMEM（8mL/百万B細胞）を3分かけて添加した。

【0358】

融合した細胞を穏やかにペレットし（400×g、6分）、20mL選択培地（例えば、アザセリンおよびヒポキサンチン〔HA〕ならびに必要な応じて他の補助的物質を含むDMEM）/百万B細胞内で再懸濁した。細胞を37℃で20～30分インキュベートしてから、200mL選択培地で再懸濁し、T175フラスコで3～4日間培養した後、96ウェルでプレーティングした。

【0359】

標準的な技術を用いて細胞を96ウェルプレートに分配し、生成コロニーのクローン性を最大化した。培養の数日後、以下の実施例に詳述したように、ハイブリドーマ上清を収集し、それぞれKLHまたはDNPへの結合確認を含むスクリーニングアッセイに供した。陽性細胞をさらに選択し、標準的なクローニングおよびサブクローニング技術に供した。クローナル系をインビトロ拡大し、分析用の分泌ヒト抗体を得た。DNP特異性抗体を分泌するいくつかの細胞系を得、さらに抗体の特性を決定した。その配列は本明細書および配列リストにおいて存在し、これらの抗体を用いた様々な試験結果が提供される。

【0360】

担体抗体の抗KLHおよび抗DNPのクローニングおよび工学。

5'RACEとして知られているポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅技術（cDNA末端の急速な増幅）により、Xenomouse配列由来のヒト抗KLH抗体を得た。TRIzol試薬（Invitrogen）を用いて、KLH結合モノクローナル抗体を発現する3つのハイブリドーマ；16.3.1、108.1.2および120.6から総RNAを単離してから、RNeasy Miniキット（Qiagen）を用いてさらに精製した。混合した無作為およびオリゴdTプライマー第一鎖、RACE ready cDNAをGeneRacerキット（Invitrogen）を用いて調製した。順行プライマー、GeneRacer（登録商標）ネステッドプライマーを用いたAdvantage HF2 DNAポリメラーゼ（Clontech）でcDNAのPCR増幅を実施した：

5'-GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA-3' //（配列番号271）；ならびに逆行プライマー：

軽鎖において5'-CTC CTG GGA GTT ACC CGA TTG-3' //（配列番号272）、および重鎖において5'-GAT GGG CCC TTG GTG GAG GCT GAG GAG ACG GTG ACC GTG G-3' //

（配列番号273）。PCR反応サイクルは94℃で30秒のcDNA変性からなり、94℃で20秒間；55℃で30秒間；ならびに72℃で90秒間からなる各サイクルの増幅の3サイクル+94℃で20秒間；65℃で30秒間；ならびに72℃で90秒間からなる追加の27サイクルが続く。次いで反応物を72℃で7分間インキュベートして、最終PCRサイクルが続いて完全な延長部を保証する。RACE PCR生成物をPCR4-TOPO（Invitrogen）内にクローン化して、ABI DNA配列決定機器（Perkin Elmer）を用いてそれらの配列を決定した。ベクターNTI 8.0ソフトウェア（Invitrogen）を用いてコンセンサス配列を決定し、完全長抗体鎖PCR増幅プライマーを設計するために用いられる。

【0361】

抗KLH抗体の発現のための完全なコード領域配列を得るために、例として16.3.

1を用いて、PCRを再使用した。シグナル配列のアミノ末端をコードした軽鎖5' PCRプライマー、Sal I制限酵素部位、および至適化Kozak配列は：

5' - AAG CTC GAG GTC GAC TAG ACC ACC ATG
GAC ATG AGG - 3' // (配列番号274)であり、およびカルボキシル末端をコードした3' プライマーおよび終止コドン、ならびにNot I制限部位は：

5' - AAC CGT TTA AAC GCG GCC GCT CAA CAC
TCT CCC CTG TTG AA - 3' // (配列番号275)であった。

【0362】

シグナル配列のアミノ末端をコードした重鎖5' PCRプライマー、Sal I制限酵素部位、および至適化Kozak配列は：

5' - AAG CTC GAG GTC GAC TAG ACC ACC ATG
GAA TTG GGA CTG AG - 3' // (配列番号276)であり、カルボキシル末端をコードした3' プライマーおよび終止コドン、ならびにNot I制限部位は：

5' - AAC CGT TTA AAC GCG GCC GCT CAT TTA
CCC GGA GAC AGG GA - 3' // (配列番号277)であった。

【0363】

Advantage HF2 DNAポリメラーゼを用いてPCRを実施し、反応サイクルは94℃で30秒のcDNA変性からなり、94℃で20秒間；65℃で30秒間；ならびに72℃で90秒間からなる30サイクルが続く。次いで反応物を72℃で7分間インキュベートして、最終PCRサイクルが続いて完全な延長部を保証する。生成したPCR生成物をゲル単離し、QIAquick spinカラム(Qiagen)を用いて精製し、Sal I (NEBL)およびNot I (NEBL)で消化し、QIAquick spinカラムを用いてゲル単離および精製してから、哺乳類発現ベクターpTT5中に結紮した。

【0364】

Xenomouse (商標) 由来ヒト抗DNP抗体可変領域のための配列を逆転写PCR生成物の配列決定により得た。次いでPCRを可変領域配列末端を(VK1シグナルペプチドおよび適切な抗体定常領域を含む)pTT5ベクター末端と適合させるように可変領域配列末端を適用させるために用いる。例として、Vk1シグナルペプチド末端の独特なBs s H I I部位を用いておよびヒトκ定常領域開始の独特なBs i W I部位を用いて、抗DNP 3A4軽鎖をpTT5内にクローン化した。Bs s H I IおよびBs i W I部位を3A4可変領域末端に添加するため、以下の5' プライマーを用いてPCRにより増幅した：

5' TTT TTT TTG GCG GCT GTG ACA TCC AGA
TGA CCC AGT C 3' // (配列番号278)、

および3' プライマー 5' AAA AAA CGT ACG TTT GAT ATC
CAC TTT GGT CC 3' // (配列番号279)。

【0365】

抗DNP 3A4は、重鎖の可変領域にトリプトファンを含有した。トリプトファンコドン(+)鎖プライマー：

5' CTG TGT ATT ACT GTG CGA GGT ATA ACT
TCA ACT ACG GTA TGG ACG TCT GG 3' // (配列番号280)および(-)鎖プライマー：

5' CCA GAC GTC CAT ACC GTA GTT GAA GTT
ATA CCT CGC ACA GTA ATA CAC AG 3' // (配列番号281)を用いたPCRによりフェニルアラニンに変異し、

重鎖5'末端プライマー

5' AAG CTC GAG GTC GAC TAG ACC ACC ATG
GAC ATG AGG GTG CCC GCT CAG CTC CTG GGG
CT 3' // (配列番号284)および重鎖3' プライマー：

10

20

30

40

50

5' AAC CGT TTA AAC GCG GCC GCT CAT TTA
CCC GGA GAC AGG GA 3' // (配列番号285)と連結している (+)鎖プライマー:

5' CTG TGT ATT ACT GTG CGA GGT ATA ACT
ACA ACT ACG GTA TGG ACG TCT GG 3' // (配列番号282)および(-)鎖プライマー:

5' CCA GAC GTC CAT ACC GTA GTT GTA GTT
ATA CCT CGC ACA GTA ATA CAC AG 3' // (配列番号283)を用いたPCRによりチロシンに変異した。また、3A4 IgG2重鎖のヒンジ領域のジスルフィドスクランプリングを減らすため、例として、ヒンジシステイン219および220(EU番号付け)を

10

重鎖5末端プライマー:

5' AAG CTC GAG GTC GAC TAG ACC ACC ATG
GAC ATG AGG GTG CCC GCT CAG CTC CTG GGG
CT 3' // (配列番号288)および重鎖3'プライマー:

5' AAC CGT TTA AAC GCG GCC GCT CAT TTA
CCC GGA GAC AGG GA 3' // (配列番号289)と連結している (+)鎖プライマー:

5' GGA CAA GAC AGT TGA GCG CAA ATC TTC
TGT CGA GTG CCC ACC GTG CCC AG 3' // (配列番号286)および(-)鎖プライマー:

20

5' CTG GGC ACG GTG GGC ACT CGA CAG AAG
ATT TGC GCT CAA CTG TCT TGT CC 3' // (配列番号287)を用いたPCRにより変異させた。

【0366】

組換えモノクローナル抗体を産生する一過性発現。一過性トランスフェクションをHEK 293-6E細胞内で以下のとおり実行した。エプスタインバーウイルス核抗原-1(293-6E細胞)を安定的に発現しているヒト胚腎臓293細胞系を、国家研究会議(Montreal, Canada)から得た。6mM L-グルタミン(Invitrogen, Carlsbad, CA)、1.1%F-68 Pluronic(Invitrogen, Carlsbad, CA)および250μg/μl Geneticin(Invitrogen, Carlsbad, CA)で補充したF17培地(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて細胞を血清を含まない懸濁培養として維持した。懸濁細胞培養を攪拌三角フラスコ培養内で維持した。培養フラスコを37℃、加湿した5%CO₂雰囲気中で65rpmで攪拌した。原液(1mg/mL)の25kDa線状PEI(PolySciences, Warrington, PA)を水中で調製し、溶解するまでHClでpH2.0に酸性化してから、NaOHで中性化して、滅菌ろ過し(0.2μm)、アリコートし、使用時まで-20℃で保存した。Tryptone N1をOrganoTechni S. A. (TekniScience, QC, Canada)から得た。原液(20%、w/v)をFreeStyle培地(Invitrogen, Carlsbad, CA)内で調製し、0.2μmフィルターを介して滅菌ろ過し、使用時まで4℃で保存した。典型的には、トランスフェクションを1L尺度で実施した。細胞(293-6E)を生存細胞密度1.1×10⁶細胞/mLまで増殖してから、トランスフェクション複合体を1/10容量の最終培養容量内で調製した。1Lトランスフェクション培養において、トランスフェクション複合体を100mLのF17基礎培地で調製し、500μgプラスミドDNA(重鎖および軽鎖DNA、1:1比)をまず100mLのF17培地で希釈した。室温で5分インキュベーション後、1.5mLのPEI溶液を添加した。複合体を軽くボルテックスしてから、室温で15分間インキュベートした。攪拌フラスコ培養内でトランスフェクション複合物を細胞に添加することにより細胞をトランスフェクトした。24時間トランスフェク

30

40

50

ション後、T r y p t o n e N1をトランスフェクトした培養に添加して最終濃度0.5%とし、トランスフェクトした培養を振盪機上、37℃、加湿した5%CO₂雰囲気では65rpmでさらに5日間維持してから、回収した。条件培地を4000rpmの遠心分離により回収してから、0.2μmフィルター(Corning Inc.)を介して滅菌ろ過した。

【0367】

標準的な電気穿孔手段を用いて発現プラスミドpDC323抗KLH120.6κLCおよびpDC324抗KLH120.6-IgG2HCとCHO-d-宿主細胞のトランスフェクトにより、安定的に発現しているaKLH120.6対照抗体プールを作製した。トランスフェクション後、血清を含まないGHT選択的増殖培地中プールとして細胞を増殖して、細胞含有プラスミドの選択および回収を可能とした。GHT選択的培地で増殖した細胞プールを85%未満の生存能に至るまで培養した。選択された細胞プールを150nmおよび300nmメトトレキサート(MTX)で増幅した。85%より大きい生存能に至った際、150nmプールを500nmMTX中でさらに再増幅した。MTXで増幅したプールの生存能が85%より大きい生存能に至った際、簡潔化した6日のバッチ産生アッセイを用いて、濃縮した産生培地でプールをスクリーニングして発現を評価した。増幅したプールの発現は120~400μg/mLの範囲であった。最高のプールを6日アッセイに基づき選択し、10日のフェドバッチプロセスを用いて拡大した。条件培地を回収し、精製して分析用タンパク質を得た。

【0368】

標準的な電気穿孔手段を用いて発現プラスミドpDC323抗KLH120.6κLCおよびpDC324抗KLH120.6-IgG2HCとCHO-d-宿主細胞のトランスフェクトにより安定的に発現しているaKLH120.6抗体プールを作製した。トランスフェクション後、血清を含まないGHT選択的増殖培地中プールとして細胞を増殖して、細胞含有プラスミドの選択および回収を可能とした。-GHT選択的培地で増殖した細胞プールを85%より大きい生存能に至るまで培養した。選択された細胞プールを150nmおよび300nmMTXで増幅した。85%より大きい生存能に至った際、150nmプールを500nmMTX中でさらに再増幅した。MTX増幅プールの生存能が85%未満の生存能に至った際、簡潔化した6日のバッチ産生アッセイを用いて、濃縮した産生培地でプールをスクリーニングして発現を評価した。増幅したプールの発現は120~400μg/mLの範囲であった。最高のプールを6日アッセイに基づき選択し、10日のフェドバッチプロセスを用いて拡大した。条件培地を回収し、精製して分析用タンパク質を得た。

【0369】

標準的な電気穿孔手段を用いて、CHO-DHFR(-)宿主細胞を、対応する重鎖および軽鎖発現プラスミドセットでトランスフェクトすることによりaDNP3A4-FおよびaDNP3B1抗体の安定的に発現しているプールを作製した。各抗体分子につき、3~4個の異なるトランスフェクションを実施して複数のプールを産生した。トランスフェクション後、血清を含まないGHT選択的増殖培地中プールとして細胞を増殖して、細胞含有プラスミドの選択および回収を可能とした。-GHT選択的培地で増殖した細胞プールを85%より大きい生存能に至るまで培養した。選択された細胞プールを150nmメトトレキサートで増幅した。メトトレキサートで増幅したプールの生存能が85%より大きい生存能に至った際、簡潔化した6日のバッチ産生アッセイを用いて濃縮した産生培地でプールをスクリーニングして発現を評価した。最高のプールを6日アッセイ力価および正確な質量の確認に基づき選択した。

【0370】

抗体精製および選択。2価陽イオンを含まないダルベッコのPBS8カラム容量を洗浄緩衝液として、および100mM酢酸(pH3.5)を溶出緩衝液として7℃で用いて、Mab Select Sureクロマトグラフィー(GE Life Sciences)により抗体を精製した。クロマトグラムに基づき溶出ピークをプールして、2Mt

リス塩基を用いてpHを約5.0に増大した。次いでプールを少なくとも3容量の水で希釈し、0.22 µm酢酸セルロースフィルターを介してろ過してから、SP-HPセファロースカラム (GE Life Sciences) 上に負荷し、10カラム容量のS緩衝液A (20 mM酢酸、pH 5.0) で洗浄した後、50 % S緩衝液B勾配 (20 mM酢酸、1 M NaCl、pH 5.0) の20カラム容量を用いて7℃で溶出した。プールをクロマトグラムおよびSDS-PAGE分析に基づき作製してから、物質を約7倍濃縮し、約5容量の10 mM酢酸、9 %ショ糖 (pH 5.0) に対して、30 kDa膜のVivaFlow TFFカセットを用いてダイアフィルターした。次いで透析物質を0.22 µm酢酸セルロースフィルターを介してろ過し、吸光度280 nmで濃度を決定した。

【0371】

次いで、SDS-PAGEにより生成物の性質に基づきリード候補を選択した。一過性かつ安定的に発現している哺乳類細胞系の両方に由来するaDNP

3B1、3H4、3C2、3A1および3A4抗体の生成物品質を、還元負荷緩衝液を用いて1.0 mmトリス-グリシン4~20 % SDS-PAGE (Novex) 上で分析した (図11)。aDNP 3H4抗体が安定した細胞系から不均一な生成物を産生したというこれらのデータから、aDNP 3H4抗体は担体抗体として良好な候補ではなかったことが示された (均一生成物が望ましいため)。aDNP 3A1、3A4、3C2、および3B1ならびにaK L H 1 2 0.6抗体の生成物品質を、非還元負荷緩衝液を用いて1.0 mmトリス-グリシン4~20 % SDS-PAGE (Novex) 上で分析した (図12 A~B)。aDNP 3C2抗体は例外的な高分子質量物質を伴う不均一生成物を産生し、これは担体抗体として理想的な候補ではないことが示された (高分子質量物質が含まれる生成物は望ましくないため)。加えて、aDNP 3B1抗体は、これらの条件下で二重線を示した。次いで、トリス-グリシンSDS-PAGEならびにビス-トリスNuPAGE系の両方を用いて、非還元条件下でaDNP 3B1抗体とaDNP 3A1抗体を比較した (図13 A~B)。aDNP 3B1抗体では、トリス-グリシンSDS-PAGE上のaDNP 3A1では観察されなかった二重線がはっきりと生じることが見出された；しかしながら、ビス-トリスNuPAGEにより分析した場合、aDNP 3B1抗体はaDNP 3A1抗体よりも均一であると考えられ、二重線は分析法のアーチファクトであり得ることが示された。aDNP 3B1抗体を室温、85℃、または100℃で非還元試料緩衝液で処置後にトリス-グリシンSDS-PAGEにより分析した場合、二重線は除去されなかった (図14 A)。しかしながら、aDNP 3B1抗体を通常の0.1 %ではなく0.4 % SDSゲルの流れる緩衝液を用いてトリス-グリシンSDS-PAGEにより評価した際、二重線は激減し (図14 B)、二重線は分析系のアーチファクトであったというさらなる証拠が得られた。

【0372】

100 mMリン酸ナトリウム、250 mM NaCl (pH 6.8) の移動相 (流速0.5 mL/分) に乗せる連続する2つのサイズ排除カラム (TSK-GEL G3000 SWXL、5 mm粒径、7.8×300 mm、Tosoh Bioscience、08541) を用いて、抗体の均一性についてさらに分析した (図15)。aDNP 3C2抗体は実質的な後ピーク肩を示し、これは望ましくないとみなされたので、この抗体は候補担体抗体から外した。加えて、aDNP 3C2およびaDNP 3A4抗体は予期したよりも後に溶出されたことが観察され、クロマトグラフィーカラムの固定相との潜在的相互作用が示された。

【0373】

抗体 (aDNP 3A1、aDNP 3C2およびaDNP 3A4) の光分解耐性を試験した。抗体を4℃で3週間蛍光曝露するかまたは各試料をアルミニウムホイルで覆って遮光するかのいずれかとした。次いで抗体試料を、100 mMリン酸ナトリウム、250 mM NaCl (pH 6.8) の移動相 (流速0.5 mL/分) に乗せる連続する2つのサイズ排除カラム (TSK-GEL G3000 SWXL、5 mm粒径、7.8×300 mm、Tosoh Bioscience、08541) を用いて分析した (図16)。aDNP

10

20

30

40

50

P 3 C 2 および a D N P 3 A 4 抗体は、光曝露後、影響を受けやすいトリプトファン酸化と実質的に一致したピーク広がりを示した。a D N P 3 A 4 抗体の酸化感受性を減らすため、チロシンまたはフェニルアラニンのいずれかに変異している C D R 3 トリプトファンのいくつかの変異体を構築した (a D N P 3 A 4、a D N P 3 A 4-Y、a D N P 3 A 4-F、a D N P 3 A 4-Y S S および a D N P 3 A 4-F S S)。次いで、6℃で光曝露の2日後 (336 W/m² UV光および 331 k-lux 蛍光)、100 mM リン酸ナトリウム、250 mM NaCl (pH 6.8) の移動相 (流速 0.5 mL/分) に乗せる連続する2つのサイズ排除カラム (TSK-GEL G3000 SWXL、5 mm 粒径、7.8×300 mm、Tosoh Bioscience、08541) を用いた分析により、これらの抗体の光分解耐性を SEC により評価した (図 17 A~B)。

10

【0374】

全4つの a D N P 3 A 4 変異体が、野生型分子より実質的に狭いピーク広がりを示し、C D R 3 トリプトファンはこの望ましくない現象に関与したことが示された。さらに、SEC 上の延長保持時間も変異体で激減し、カラムの固定相との相互作用が少ないことを示した。Tosoh Haas SP-5PW カラム (10 μm 粒子、7.5 mm ID×7.5 cm 長) を用いて、緩衝液 A (10 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.0) および緩衝液 B (10 mM 酢酸ナトリウム、600 mM NaCl、pH 5.0) をプログラム化直線勾配 (1分0%B、10分35%B、30分70%B、3分90%B および 3分0%B) で 1 mL/分 で流して用いて、各種変異の抗 D N P 3 A 4 抗体 (a D N P 3 A 4、a D N P 3 A 4-Y、a D N P 3 A 4-F、a D N P 3 A 4-Y S S および a D N P 3 A 4-F S S) の均一性を分析した (図 18)。C D R 3 トリプトファンを有する a D N P 3 A 4 抗体をフェニルアラニンに形質転換して、野生型またはチロシン変異型よりも望ましい狭い溶出ピークが得られた；したがって、a D N P 3 A 4-F 変異型は優れた分子であるとみなされた。a D N P 3 B 1、a D N P 3 A 4-F、および a D N P 3 A 4-F S S 抗体を非還元 CE-SDS により分析した (図 19 A~C)。すべての CE-SDS 実験を UV ダイオード検出器付き Beckman PA800 CE 系 (Fullerton, CA) を用いて実施した。221 nm および 220 nm 波長を用いた。裸のフューズドシリカキャピラリー 50 μm×30.2 cm を分離分析のために用いた。緩衝液バイアル調製および負荷ならびに Install Capillary Cartridge については、IgG Purity/Heterogeneity の Beckman Coulter マニュアルに記載されていた。還元、非還元 CE-SDS の流れる状態は、一部修正点を除き IgG Purity/Heterogeneity の Beckman Coulter マニュアルに記載されていたものと類似し、この一部修飾点について下記に簡単に述べる。非還元状態では、抗体試料 (150 μg) を 20 μL の SDS 反応緩衝液および 5 μL の 70 mM N-エチルマレイミドに添加した。次いで水を添加して最終容量 35 μL とし、タンパク質濃度を 4.3 mg/mL とした。SDS 反応緩衝液は 4% SDS、0.01 M クエン酸リン酸緩衝液 (Sigma) および 0.036 M リン酸ナトリウム二塩基性から構成された。調製物を完全にボルテックスして、45℃で5分間加熱した。次いで調製物に追加の 4% SDS を 115 μL 添加した。ボルテックスおよび遠心分離後、調製物を 200 μL の PCR バイアルに入れてから PA800 機器上に負荷した。試料を -10 kV の逆極性陽極で 30 秒間注入してから、35 分間の分離中、キャピラリー両端の -15 kV、20 psi 圧力で分離した。a D N P 3 B 1 抗体では、非還元条件下で均一性が最高レベルであるという最も望ましいプロファイルが得られた。a D N P 3 B 1、a D N P 3 A 4-F、および a D N P 3 A 4-F S S 抗体を還元 CE-SDS により分析した (本明細書の図 20 A~C)。還元状態では、精製 H₂O を添加して抗体試料を 2.1 mg/mL に希釈し、抗体 95 μL を、5.6% βメルカプトエタノールを有する SDS 試料緩衝液 (Beckman) 105 μL に添加した。次いで調製物を完全にボルテックスしてから 70℃で10分間加熱した。遠心分離後、上清を 200 μL の PCR バイアルに入れてから PA800 機器上に負荷した。試料を -5 kV の逆極性陽極で 20 秒間注入してから、30 分間の分離中、キャピラリー両端の -15 kV、20 psi 圧力で

20

30

40

50

分離した。a D N P 3 A 4 - F では、還元条件下で最も望ましい均一ピークが得られた。

【0375】

a D N P 3 A 4 - F、a D N P 3 A 4 - F S S および a D N P 3 B 1 抗体の熱耐性について、試料を 20℃ から 95℃ に 1℃/分 で加熱し、M i c r C a l V P - D S C を用いて D S C 分析した。タンパク質は 10mM 酢酸ナトリウム、9% ショ糖 (pH 5.0) 中 0.5mg/mL であった (図 21)。a D N P 3 B 1 および a D N P 3 A 4 - F 抗体にて、初回転移のためにより高温で最も望ましい融解プロファイルが得られた。a D N P 3 B 1 および a D N P 3 A 4 - F 抗体を a D N P 3 B 1 抗体については単一の融解転移および a D N P 3 A 4 - F 抗体については二重転移の存在により識別した。

【0376】

E L I S A アッセイ。E L I S A アッセイを以下のとおり実行した。C o s t a r 3 0 7 2 培地結合 384 ウェルプレート (C o r n i n g L i f e S c i e n c e s) を D N P - B S A (B i o S e a r c h T e c h n o l o g i e s, N o v a t o, C A) 5 μg/mL の 1×P B S / 0.05% アジド溶液 (40 μL / ウェル) でコーティングした。プレートを 4℃ で一晩インキュベートした。次いで T i t e r t e k M 3 8 4 プレート洗浄器 (T i t e r t e k, H u n t s v i l l e, A L) 上で 3 サイクル洗浄を用いてプレートを洗浄した。プレートを 90 μL の 1×P B S / 1% 乳液でブロックし、室温で約 30 分間インキュベートした。次いでプレートを T i t e r t e k プレート洗浄器上で 3 サイクル洗浄を用いてプレートを洗浄した。10 μL 抗体試料を 40 μL 1×P B S / 1% 乳液に添加した。次いでプレートを室温で 1 時間インキュベートした。次いで T i t e r t e k M 3 8 4 プレート洗浄器 (T i t e r t e k, H u n t s v i l l e, A L) 上で 3 サイクル洗浄を用いてプレートを洗浄した。次いでヤギ抗ヒト I g G F c H R P を 100 ng/mL (1:4000) 1×P B S / 1% 乳液 / 10mM C a ²⁺ 溶液 (50 μL / ウェル) でプレートを添加し、室温で 1 時間インキュベートした。3 サイクル洗浄を用いてプレートを再度洗浄した。次いでプレートを紙タオルで軽く叩いて乾燥させた。最終的に、一段階 T M B (N e o g e n, L e x i n g t o n, K e n t u c k y) (50 μL / ウェル) をプレートを添加し、30 分後に 1 N 塩酸 (50 μL / ウェル) で室温でクエンチした。T i t e r t e k プレート読取り器を用いて O D を迅速に 450 nm で読み込んだ。

【実施例 2】

【0377】

本発明の抗 D N P 抗体の実施形態の薬物動態 (P K) および薬力学 (P D) 試験

a D N P 3 A 4 - F、a D N P 3 A 4 - F S S および a D N P 3 B 1 抗体の薬物動態プロファイルについて、成体 S p r a g u e - D a w l e y ラット (8~12 週齢) に 5mg/kg を皮下注射し、投与から 0、0.25、1、4、24、48、72、96、168、336、504、672、840 および 1008 時間後に側面尾静脈から血液約 250 μL を M i c r o t a i n e r (商標) 血清分離管に採取して決定した (図 22)。各試料を採取後に室温で維持し、30~40 分凝固させた後に、目盛り付き E p p e n d o r f 5417 R 遠心分離系 (B r i n k m a n n I n s t r u m e n t s, I n c., W e s t b u r y, N Y) を用いて試料を 2~8℃、11,500 rpm で約 10 分間遠心分離した。次いで採取した血清を分析のために (各ラットにおいて) 前標識した低温貯蔵管内に移して、-60℃~-80℃で保存した。P K 試験試料から血清試料濃度を測定するため、以下の方法を用いた: 2 分の 1 部分黒プレート (C o r n i n g 3694) を 2 μg/mL の抗 h u F C、A b 1.35.1 の 1×P B S 溶液でコーティングしてから 4℃ で一晩インキュベートした。プレートを洗浄し、I - B l o c k (登録商標) (A p p l i e d B i o s y s t e m s) で 4℃ で一晩ブロックした。試料を希釈する必要がある場合は、ラット S D 血清で希釈した。標準および試料を I - B l o c k (登録商標) + 5% B S A で 1:20 希釈し 380 μL の希釈緩衝液とした。プレートを洗浄し、前処置した標準の 50 μL 試料および各試料を A b 1.35.1 コーティングプレートに移して室温で 1.5 時間インキュベートした。プレートを洗浄してから、抗 h u

10

20

30

40

50

FC Ab 21. 1-HRP 結合体の I-Block (登録商標) + 5% BSA 100 ng/mL を 50 μ L 添加し、1. 5 時間インキュベートした。プレートを洗浄してから、ピコ基質 50 μ L を添加後、プレートを照度計で直ちに分析した。すべての抗体の薬物動態プロファイルが良好であったが、aDNP 3 B 1 が最高の全体プロファイルを示した。

【0378】

6 匹の雄カニクイザル (3~7 kg) に 6 mg/kg をボーラス静脈内注射し、0 分および 30 分目、2、7、9、11、14、21、28、35、42、49、56 および 63 日目に血液試料を採取して、aDNP 3 A 4-F 抗体の薬物動態プロファイルを決した (図 23)。4 匹の雄カニクイザル (2~4 kg) に 3 mg/kg ボーラス静脈内注射し、0、0.25、1、4、8、12、24、72、168、240、336、408、504、576、672、744、840、1008、1176 および 1344 時間に血液試料を採取して、aKLH 120. 6 抗体の薬物動態プロファイルを決した (図 23)。PK 試験試料由来の血清試料濃度を測定するため、上述のラット薬物動態試験と同じ方法を用いた。カニクイザルにおける両抗体の薬物動態プロファイルは良好であったが、aKLH 120. 6 のための用量正規化プロファイルは aDNP 3 A 4-F のプロファイルよりもわずかに優れていた。

【実施例 3】

【0379】

ヒト組織交差反応評価

概して、ヒト使用のためのモノクローナル抗体生成物の製造および検査における考慮点 (Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use) (U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research (1997)) におけるガイダンスに従い、発明の抗体の各種ヒト組織との交差反応を決定する非 GLP 予備試験を実施した。抗体による薬剤発現が意図される場合、GLP 条件下のより広範な検査が必要である。抗体 DNP 3 A 4-F および aKLH 120. 6 の組織交差反応を、試験物質の Alexa Fluor 488 標識形態を用いて選択されたヒト組織の凍結切片で検討した (Charles River Laboratories, Preclinical Services, Reno, NV)。(別段の指定のない限り)互いに依存しない 2 人の正常ヒト組織を Special Pathology Services Human Tissue Bank collected by the National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA)、Cureline, Inc. (Burlingame, CA)、Cybrdi (Rockville, MD)、または Rocky Mountain Lions Eye Bank (Aurora, CO) から得た。試験組織は、ヒト小脳、肺、大脳皮質、卵巣 (成熟女性由来)、眼部、胎座、消化管 (小腸)、皮膚 (1 人)、心臓、脾臓、腎臓 (1 人)、甲状腺、肝臓、精巣を含む。新しい凍結ヒト組織切片および対照ビーズブロック (DNP [31] -ウシ血清アルブミン [BSA] ビーズ [陽性]、およびヒト血清アルブミン [HSA] ビーズ [陰性]) を冷却器上で切断し、キャピラリーギャップスライド上に乗せて解凍した。組織および対照ビーズのスライドを冷却アセトン中で -10 $^{\circ}$ C ~ -25 $^{\circ}$ C で約 10 分間固定した。固定スライドを少なくとも 1 時間 (~一晩) 乾燥させた。凍結保存の場合、実験の前日に固定スライドを凍結器から除去して使用前に一晩解凍させた。以降の工程はすべて別段の定めがない限り室温で実施した。スライドを 1 $\times$ Morphosave (登録商標) で約 15 分間インキュベートして組織形態を保持してから、1 $\times$ リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回、それぞれ約 5 分間洗浄した。内因性ペルオキシダーゼをブロックするため、スライドをグルコースオキシ

ダーゼ溶液中で約 37℃で約 1 時間インキュベートした。スライドを 1×PBS で 2 回、それぞれ約 5 分間洗浄した。内因性ビオチンをアビジンおよびビオチン溶液中の逐次インキュベーション（それぞれ約 15 分間）によりブロックした。ビオチン内でインキュベーション後、組織切片をブロック抗体溶液で約 25 分間ブロックした。Alexa Fluor 488-A b 3 A 4 W 1 0 1 F（抗 DNP）、および Alexa Fluor 488 抗 K L H（抗 K L H A b）を至適濃度（2.0 μg/mL）または至適濃度の 5 倍（10.0 μg/mL）で切片に約 25 分間適用した。スライドを洗浄緩衝液で 3 回洗浄してから、二次抗体（ウサギ抗 Alexa Fluor 488）で約 25 分間インキュベートした。二次抗体でインキュベーション後、スライドを洗浄緩衝液で 4 回洗浄してから、三次抗体（セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ Ig G 抗体）で約 25 分間インキュベートし、ジアミノ酪酸（DAB）色素原基質で結合を視覚化した。すべての実験において DNP（31）-BSA ビーズを陽性対照として用いた。HSA ビーズを陰性対照として用いた。CD31 に対する抗体（抗 CD31）、すなわち、血小板内皮細胞接着分子（PECAM-1）染色を介して免疫組織化学に妥当な組織を適格とした。任意の試験抗体の 2.0 または 10.0 μg/mL 濃度のいずれかで評価したいずれのヒト組織においても特定の染色はなかった。

【実施例 4】

【0380】

1 価または多価免疫グロブリンおよび／または Fc ドメイン毒素ペプチドアナログ融合物の発現および精製

本発明の例示的な実施形態を含み、一種別の 1 価、2 価および 3 価構造を比較のために発現させて精製した。それらには、aK L H I g G 2 / F c - S h K 変異体（図 1 E：「ヘミボディ」配置の図解を参照されたい）、および抗 K L H I g G 2 - S h K 変異体（図 1 F～L を参照されたい）が含まれる。例えば、2 価 F c - L 1 0 - S h K [1-35]、1 価抗キーホールリンペットヘモシアニン（K L H）免疫グロブリン重鎖-[L y s 1 6] S h K 融合抗体（「aK L H H C - [L y s 1 6] S h K A b」と命名；図 1 F を参照されたい）、および 1 価抗 K L H 免疫グロブリン軽鎖-[L y s 1 6] S h K 抗体（「aK L H L C - [L y s 1 6] S h K A b」と命名；図 1 J を参照されたい）。I g G 2 F c / F c - S h K 変異体（図 1 A を参照されたい）、2 価 F c - L 1 0 - S h K [2-35]、1 価 F c / F c - L 1 0 - S h K [2-35] を比較のため、S u l l i v a n e t a l . 、W O 2 0 0 8 / 0 8 8 4 2 2 A 2 号、特に実施例 1、2、および 56（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載の、または本明細書に修正されるように組換え方法により作製した。

【0381】

一過性発現系を用いて毒素ペプチドアナログ-Fc 融合物（「ペプチボディ」）または他の免疫グロブリン融合の実施形態を生じた。HEK 293-6E 細胞を、L-グルタミン（6mM）およびジェネテシン（Geneticin、25 μg/mL）で補充した F17 培地の 2e5 と 1.2e6 細胞/mL の間、3L フェルンバッハ三角フラスコ内で、37℃、5%CO₂ で維持して、65RPM で攪拌した。トランスフェクション時、上述した F17 培地で細胞を 1.1×10⁶ 細胞/mL、最終培養容量 90% に希釈した。DNA 複合体を FreeStyle 293 培地で最終培養容量 10% で調製した。DNA 複合体は、500 μg 総 DNA / リットルの培養および 1.5mL の PEI max / リットルの培養を含む。DNA 複合体は、成分を添加後に簡単に攪拌し、室温で 10～20 分インキュベートした後、細胞培養に添加し、インキュベーター内に戻した。トランスフェクションの翌日、Tryptone N1（5g/L）を液体 20% ストックからの培養に添加した。トランスフェクションの 6 日後、培養を 4,000 RPM で 40 分間遠心分離して細胞をペレットし、培養培地を 0.45 μm フィルターを介して回収した。

【0382】

DNA 複合体の調製において、プラスミド比は、意図した生成物を産生するために必要なペプチドの所望のモル比に比例した。I g G 2 F c / F c - S h K 成分は、I g G 2

FcおよびIgG2 Fc-ShKを1:1比で含む。発現中、これらはIgG2 Fcホモ二量体、IgG2 Fc/Fc-ShKヘテロ二量体、およびIgG2 Fc-ShKホモ二量体に会合する。陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製中にIgG2 Fc/Fc-ShKヘテロ二量体(1価形態)を単離した。

【0383】

IgG2 Fc-ShK [2-35] ; IgG2 Fc Shk [2-35、Q16K] ; IgG2 Fc-Shk [1-35] ; IgG2 Fc-ShK [1-35、Q16K] 哺乳類発現。ヒトIgG2の免疫グロブリンFcドメインをコードするDNA配列：MEWSWVFLFFLSVT TGVHSE RKVECP PCPAPPVAGPSVFL FPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNGKEYKCKK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TTPPMLDSDG SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK// (配列番号1) は、標準的なPCR技術を用いて、Kv1.3阻害剤ペプチドShK [2-35] の単量体にインフレーム融合させたかまたは変異ShK [2-35、Q16K] を構築した。PCR反応においてpcDNA3.1 (+) CMV i内の元のFc-2×L-ShK [2-35] を鋳型として用いて、ShK [2-35] もしくはShK [2-35、Q16K] および分子の10個のアミノ酸リンカー部分を生成した (Sullivan et al.、WO2008/088422 A2号の実施例2、図15A~Bを参照されたい)。PCR反応においてpcDNA3.1 (+) CMV i内の元のFc-2×L-ShK [1-35] を鋳型として用いてShK [1-35] を生成した (Sullivan et al.、WO2008/088422 A2号の実施例1、図14A~B)。これらのShK構築物は、

以下のオリゴ：

5'-CAT GAA TTC CCC ACC ATG GAA TGG AGC TGG-3' (配列番号3) ; および

5'-CA CGG TGG GCA CTC GAC TTT GCG CTC GGA GTG GAC ACC-3' (配列番号4)

を有するpSelenis-Vh21-hIgG2-Fc鋳型から産生した修飾VH21シグナルペプチドのアミノ酸配列MEWSWVFLFFLSVT TGVHSE RKVECP PCP//配列番号2を有する。

【0384】

N末端リンカー伸張部分 (アミノ酸配列

GGGSGGGGSSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC//配列番号6) を有する野生型ShK [2-35] を：

GGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAAGCAGCTGCATCGACACCATCCCAAGAGCGCGCTGCACCGCGCTTCCAGTGCAAGCACAGCATGAAGTACCGCGCTGAGCTTCTTGCCGCAAGACCTGCGGCGACCTGC// (配列番号5) のDNA配列によりコードした。このコード配列 (配列番号5) を含む断片を、以下のオリゴ (配列番号7および配列番号8) を用いて、ならびにpcDNA3.1 (+) CMV i中の元のFc-L10-ShK [2-35] を鋳型として用いて生成した (参照により組み込まれるSullivan et al.、WO2008/088422 A2号の実施例2、図15A~B)：

5'-GTC CAC TCC GAG CGC AAA GTC GAG TGC CCA CCG TGC C-3' (配列番号7) ; および

5'-TCC TCC TCC TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG-3'// (配列番号8)。

【0385】

変異体ShK [2-35、Q16K] をStratageneのQuickChange

Multi site Directed Mutagenesisキットcat # 200531を製造業者の説明書に従いつつ用いて部位指向変異により生成した。変異を発生するために用いたオリゴは：

5' - GCT GCA CCG CCT TCA AGT GCA AGC ACA GC 3' (配列番号9) ; および

5' - GCT GTG CTT GCA CTT GAA GGC GGT GCA GC - 3' (配列番号10) ; であり、p cDNA 3.1 (+) CMV i 中の元のFc - L10 - ShK [2 - 35] を鋳型として用いて、DNAコード配列

GGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAAGCAGCTGCATCG
ACACCATCCCCAAGAGCGCGCTGCACCGCGCTTCAAGTGC AA
GCACAGCATGAAGTACCGCGCTGAGCTTCTGCCGCAAGACC
TGCGGCACTGC // (配列番号11) を生成し、これはN末端リンカー伸張部
分：GGGGSSGGGGSSSCIDTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCR
KTCGTC // 配列番号12) を有するShk (2 - 35、K16) アミノ酸配列をコ
ードする (Sullivan et al.、WO2008/088422A2号の実施
例2、図15A~B)。

【0386】

p cDNA 3.1 (+) CMV i 中の元のFc - 2 × L - ShK [1 - 35] を鋳型として用いて、以下のオリゴ：

5' - GTC CAC TCC GAG CGC AAA GTC GAG TGC CCA CCG TGC C - 3' (配列番号7) ; および

5' - TCC TCC TCC TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG - 3' (配列番号8)

を用いてShK [1 - 35] WT断片を生成した (Sullivan et al.、WO2008/088422A2号の実施例1、図14A~B)。

【0387】

5' - CCG GGT AAA GGA GGA GGA GGA TCC GGA G - 3' (配列番号13) ; および

5' - CAT GCG GCC GCT CAT TAG CAG GTG - 3' (配列番号14) のオリゴを用いて、ならびにp Sel ex is Vh21 - h IgG2 - Fc鋳型を用いてIgG2Fc領域を生成し、アミノ酸配列

APPVAGPSVFLFPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLT VVHQ
DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK配列番号16) をコードするコード配列：

GCACCACTGTGGCAGGACCGTCAAGTCTTCTCTTCCCCC
CAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCC
GAGGTCCAGTTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
ATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTTCAACAG
CACGTTTCCGTGTGGTCAAGCGTCTCTCACCGTTGTGCAACAG
GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
ACAAAGGCCTCCCCAGCCCCCATCGAGAAACCATCTCCA
AACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTG
CCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGGTCAAGCC
TGACCTGCTGTGGTCAAAGGCTTCTTACCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC
AAGACCACACCTCCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCTCTTCT

10

20

30

40

50

TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAA／／配列番号15を含むDNA断片を得た。

【0388】

PCR断片を生成し、生成物をゲル上に流した。ゲル精製後、DNA断片を共にPCR管内に入れて外プライマー：

5' - CAT GAA TTC CCC ACC ATG GAA TGG AGC
TGG - 3' (配列番号3) ; および

5' - CAT GCG GCC GCT CAT TAG CAG GTG - 3' (配
列番号14)

と一緒に縫い合わせた。

【0389】

PCR生成物をEcoRIおよびNotI (Roche) 制限酵素で消化し、Gel
Purificationキットによりアガロースゲルで精製した。同時に、pTT14
ベクター (CMVプロモーター、Poly A tailおよびピューロマイシン耐性遺
伝子を含むAmgenベクター) をEcoRIおよびNotI制限酵素で消化し、大型断
片をGel Purificationキットにより精製した。各精製PCR生成物を大
型断片と結紮して、One Shot Top10細菌に形質転換した。形質転換細菌コロ
ニーからDNAを単離し、EcoRIおよびNotI制限酵素による消化に供して、1%
アガロースゲル上で分解した。予期したパターンに至るDNAを配列決定用に提出した。
いくつかのクローン配列分析において上記配列と100%適合したが、各構築物につき1
クローンのみを大規模プラスミド精製用を選択した。最終pTT14-VH1SP-Ig
G2-Fc構築物は以下の配列を有するIgG2-Fc-L10-ShK (2-35) 融
合ポリペプチド：

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEKVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT TVVH QDWLNGKEYKCK
VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPMLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGKGGGGSGGGGSSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLS
FCRKTCGTC／／ (配列番号17) をコードした。

【0390】

pTT14-VH21SP-IgG2-Fc-L10-ShK (2-35、Q16K)
構築物はIgG2-Fc L10-ShK (2-35、Q16K) 融合ポリペプチド配列
：

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEKVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT TVVH QDWLNGKEYKCK
VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPMLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGKGGGGSGGGGSSCIDTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLS
FCRKTCGTC／／配列番号18をコードした；

また、pTT14-VH21SP-IgG2-Fc ShK1-35構築物には、以下
の配列：

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEKVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT TVVH QDWLNGKEYKCK

V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q
 V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G
 S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S
 L S P G K G G G G S G G G G S R S C I D T I P K S R C T A F Q C K H S M K Y R L
 S F C R K T C G T C / / (配列番号 19)

を有する I g G 2 F c - L 1 0 - S h K (1-35) 融合ポリペプチドのためのコード配列が含まれた。

【0391】

p Y D 1 6 中の V H 2 1 S P - I g G 2 - F c - 単独構築物 (C M V プロモーター、P o l y A t a i l およびハイグロマイシン耐性遺伝子を含む A m g e n ベクター) の生成は以下のとおり行った：以下のオリゴ：

5' - C A T A A G C T T C C C A C C A T G G A A T G G A G C
 T G G - 3' (配列番号 20) ; および

5' - C A C G G T G G G C A C T C G A C T T T G C G C T C G
 G A G T G G A C A C C - 3' (配列番号 4) を用いて、ならびに上記 p S e l e x i s 鋳型を用いて V H 2 1 シグナルペプチドを生成した。

【0392】

上記 p S e l e x i s 鋳型ならびに以下のオリゴ：

5' - G T C C A C T C C G A G C G C A A A G T C G A G T G C
 C C A C C G T G C C - 3' (配列番号 7) ; および

5' - C A T G G A T C C T C A T T T A C C C G G A G A C A G
 G G A G - 3' (配列番号 21)

を用いて F c 領域を生成した。

【0393】

P C R 断片をゲル精製し、外プライマー配列番号 335 および配列番号 336 を用いて単一の P C R 反応において一緒に縫い合わせた。生成した P C R 断片をゲル精製し、H i n d I I I および B a m H I により消化した。同時に、p Y D 1 6 ベクター (C M V プロモーター、P o l y A t a i l およびハイグロマイシン耐性遺伝子を含む A m g e n ベクター) も H i n d I I I および B a m H I により切断して、大型ベクター断片を Q i a g e n の G e l P u r i f i c a t i o n キットにより精製した。精製した P C R 生成物を大型断片と結紮して、O n e S h o t T o p 1 0 細菌に形質転換した。形質転換細菌コロニーから D N A を単離し、H i n d I I I および B a m H I 制限酵素による消化に供して、1% アガロースゲル上で分解した。予期したパターンに至る D N A を配列決定用に提出した。いくつかのクローン配列分析において上記配列と 100% 適合したが、1 クローンのみを大規模プラスミド精製用に選択した。最終 p Y D 1 6 - V H 2 1 S P - I g G 2 - F c 構築物はヒト I g G 2 - F c (上記の配列番号 1) をコードした。

【0394】

抗 K L H I g G 2 - F c S h K [1-35、Q16K] 哺乳類発現。 D N A p T
 T 5 - a K L H 1 2 0 . 6 - V K 1 S P - I g G 2 - H C - L 1 0 - S h K [1-35、
 Q 1 6 K] 構築物を用いて、D N A コード配列

G G A T C C G G A G G A G G A A A G C C G C A G C T G C A T C G A C A C C A
 T C C C C A A G A G C C G C T G C A C C G C C T T C A A G T G C A A G C A C A G
 C A T G A A G T A C C G C C T G A G C T T C T G C C G C A A G A C C T G C G G C
 A C C T G C T A A T G A G C G G C C G C T C G A G G C C G G C A A G G C C G G A
 T C C / / (配列番号 22)

を含む断片を B a m H I / B a m H I を用いて切断した。このコード配列 (配列番号 23) は N 末端リンカー配列：

G S G G G G S R S C I D T I P K S R C T A F K C K H S M K Y R L S F C R K T C G
 T C / / (配列番号 23) を有する S h K (1-35、Q16K) をコードする。

【0395】

10

20

30

40

50

MEWSWVFLFFLSVT TGVHSE R KVECP PCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSL S
LSPGKGGG／／（配列番号25）をコードするコード配列

【 0 3 9 6 】

MEWSWVFLFFLSVT TGVHSE R KVECP PCPAPPVAGPSVFL
FPKPKD TLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLP PSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTT P PMLDS DG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSL S
LSPGKGGGSGGGGSRSCIDTIPKSRCTAFKCKHSMKYRL
SFCRKTCGTC／／（配列番号26）をコードした。

【 0 3 9 7 】

抗K L H免疫グロブリン重鎖（H C）および軽鎖（L C）毒素ペプチド（および毒素ペプチドアナログ）融合物の哺乳類発現。a K L H I g G 2 / F c - S h K成分（図1 Eにより図解）は以下を含有した。

（a）N末端V K - 1 S Pシグナルペプチド配列（配列番号1 0 3）を組み入れるa K L H 1 2 0 . 6 κ L C（以下の配列番号2 8）：

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRL
VTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPLTF
GGGTTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVKQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC//（配
列番号2 8）；

10

（b）N末端V K - 1 S Pシグナルペプチド配列（配列番号1 0 3）を組み入れるa K L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C（以下の配列番号2 9）：

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR
DRGSYYWFDPWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST
ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSSVVTVPSNFGFTQTYTCNVLDHKPSNTKVDKTV
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYITLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK//（配列番号2 9）；

20

および、

（c）I g G 2 F c - L 1 0 - S h K（1 - 3 5）：

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSERKVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLPPSRREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPMLDSDG
SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGKGGGGSGGGGSRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRL
SFCRKTCGTCT//（配列番号3 0）。

30

【0 3 9 8】

所望のa K L H I g G 2 / F c - S h K生成物には、上述し図1 Eに企図した各成分（a）～（c）の1複写が含まれる。このため、比率は1：1：1であった。この生成物は、F cドメインで結合している半抗体と半F c融合物（「ヘミボディ」）として記載できる。培養物から除去しなければならない追加のペプチド集合体はa K L H A bおよびF c - S h Kホモ二量体であった。

40

【0 3 9 9】

1価a K L H 1 2 0 . 6 I g G 2 - S h KおよびS h Kペプチドアナログ融合物。

a K L H 1 2 0 . 6 I g G 2 - S h K融合抗体の成分（図1 Fに図解）は以下の単量体を含有した。

（a）a K L H 1 2 0 . 6 κ L C（上記の配列番号2 8）；

（b）a K L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C（上記の配列番号2 9）；および

（c）以下のH C配列を有するa K L H 1 2 0 . 6 I g G 2 - S h K融合物：

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCVQLVQSGAEVKKPGASV

50

KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR
DRGSYYWFDPWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
SGLYSLSLVVTVPSSTNFGGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTV
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
RVVSVLTTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSRSCI
DTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCKRKTCTC// (配列番号31)

10

【0400】

1価aKLH120.6IgG2-ShK[1-35、Q16K]融合抗体の成分(図1Fに図解)は以下の単量体を含有した。

(a) aKLH120.6κLC(上記の配列番号28)；

(b) aKLH120.6IgG2 HC(上記の配列番号29)；および

(c) 以下の配列を有するaKLH120.6IgG2-ShK[1-35、Q16K]
]融合物：

20

MDMRVPAQLLLGLLLWLRLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR
DRGSYYWFDPWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
SGLYSLSLVVTVPSSTNFGGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTV
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
RVVSVLTTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSRSCI
DTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCKRKTCTC// (配列番号32)

30

【0401】

1価aKLH120.6HC-ShK[1-35、R1A、I4A、Q16K]融合抗体の成分(図1Fに図解)は以下の単量体を含有した。

(a) aKLH120.6κLC(配列番号28)；

(b) aKLH120.6IgG2 HC(配列番号29)；および

(c) 以下のアミノ酸配列を有するaKLH120.6IgG2 HC-ShK[1-
35、R1A、I4A、Q16K]融合物：

40

MDMRVPAQLLLGLLLWLRLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR
DRGSYYWFDPWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
SGLYSLSLVVTVPSSTNFGGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTV
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
RVVSVLTTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK

50

G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E
W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G G G G G S G G G G S A S C A
D T I P K S R C T A F K C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C / / (配列番号 30
4)。

所望の1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C - S h Kアナログ生成物は1本の重鎖の
C末端に融合したS h Kペプチドを有する完全抗体であった。1種類の軽鎖を共有する2
つの異なる重鎖を含み、重鎖：軽鎖：重鎖-S h Kの比率は1：2：1であった。予期し
た発現生成物はaK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 抗体、1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C
- S h Kペプチドアナログ、および2価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C - S h Kペプ
チドアナログである。本明細書に記載のとおり、抗体を含む1価aK L H 1 2 0 . 6 I g
G 2 H C 毒素ペプチド融合物を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて混合物から単
離した。

10

【0402】

1価aK L H 1 2 0 . 6 H C - S h K [1-35、R1A、Q16K、K30E] 融合
抗体の成分(図1Fに図解)は以下の単量体を含有した。

(a) aK L H 1 2 0 . 6 κ L C (配列番号28)；

(b) aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C (配列番号29)；および

(c) 以下の配列を有するaK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 - S h K [1-35、R1A、
Q16K、K30E] 融合物：

20

M D M R V P A Q L L G L L L L W L R G A R C Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V
K V S C K A S G Y T F T G Y H M H W V R Q A P G Q G L E W M G W I N P N S G G T
N Y A Q K F Q G R V T M T R D T S I S T A Y M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R
D R G S Y Y W F D P W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S
E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S
S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E
R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T
C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F
R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K
G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E
W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G G G G G S G G G G S A S C I
D T I P K S R C T A F K C K H S M K Y R L S F C R E T C G T C / / (配列番号 30
5)。

30

所望の1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C - S h Kアナログ生成物は1本の重鎖の
C末端に融合したS h Kペプチドを有する完全抗体であった。1種類の軽鎖を共有する2
つの異なる重鎖を含み、重鎖：軽鎖：重鎖-S h Kの比率は1：2：1であった。予期し
た発現生成物は、aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 抗体、1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C
- S h Kペプチドアナログ、および2価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C - S h Kペ
プチドアナログである。本明細書に記載のとおり、抗体を含む1価aK L H 1 2 0 . 6 I
g G 2 H C 毒素ペプチド融合物を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて混合物から
単離した。

40

【0403】

1価aK L H 1 2 0 . 6 H C (I g G 2) - S h K [1-35、R1H、I4A、Q1
6K] 融合抗体の成分(図1Fに図解)は以下の単量体を含有した。

(a) aK L H 1 2 0 . 6 κ L C (配列番号28)；

(b) aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C (配列番号29)；および

(c) 以下のアミノ酸配列を有するaK L H 1 2 0 . 6 H C I g G 2 - S h K [1-
35、R1H、I4A、Q16K] 融合物：

M D M R V P A Q L L G L L L L W L R G A R C Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V

50

KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR
DRGSYYWFDPWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
SGLYSLSLVVTVPSSTNFGGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKKTVE
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTITVHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYITLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSHSCA
DTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRKTCGTCT// (配列番号306)。

10

所望の1価aKLH120.6IgG2 HC-ShKアナログ生成物は1本の重鎖のC末端に融合したShKペプチドを有する完全抗体であった。1種類の軽鎖を共有する2つの異なる重鎖を含み、重鎖：軽鎖：重鎖-ShKの比率は1：2：1であった。予期した発現生成物は、aKLH120.6IgG2抗体、1価aKLH120.6IgG2 HC-ShKペプチドアナログ、および2価aKLH120.6IgG2 HC-ShKペプチドアナログである。本明細書に記載のとおり、抗体を含む1価aKLH120.6IgG2 HC毒素ペプチド融合物を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて混合物から単離した。

20

【0404】

1価aKLH120.6HC-ShK [1-35、R1H、Q16K、K30E] 融合抗体の成分 (図1Fに図解) は以下の単量体を含有した。

(a) aKLH120.6κLC (配列番号28) ;

(b) aKLH120.6IgG2 HC (配列番号29) ; および

(c) 以下の配列を有するaKLH120.6IgG2-ShK [1-35、R1H、Q16K、K30E] 融合物：

MDMRVPAQLLLGLLLLWLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR
DRGSYYWFDPWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
SGLYSLSLVVTVPSSTNFGGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKKTVE
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTITVHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYITLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSHSCI
DTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRETCTGTCT// (配列番号307)。

30

40

所望の1価aKLH120.6IgG2 HC-ShKアナログ生成物は1本の重鎖のC末端に融合したShKペプチドを有する完全抗体であった。1種類の軽鎖を共有する2つの異なる重鎖を含み、重鎖：軽鎖：重鎖-ShKの比率は1：2：1であった。予期した発現生成物は、aKLH120.6IgG2抗体、1価aKLH120.6IgG2 HC-ShKペプチドアナログ、および2価aKLH120.6IgG2 HC-ShKペプチドアナログである。本明細書に記載のとおり、抗体を含む1価aKLH120.6IgG2 HC毒素ペプチド融合物を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて混合物から単離した。

50

【0405】

1価aK L H 1 2 0 . 6 H C - S h K [1 - 3 5、R 1 K、I 4 A、Q 1 6 K] 融合抗体の成分（図1 Fに図解）は以下の単量体を含有した。

（a）aK L H 1 2 0 . 6 κ L C（配列番号28）；

（b）aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C（配列番号29）；および

（c）以下の配列を有するaK L H 1 2 0 . 6 H C（I g G 2）- S h K [1 - 3 5、R 1 K、I 4 A、Q 1 6 K] 融合物：

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR 10
DRGSYYWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSLVVTVTPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNTKVDKKTVE
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTITLVHQLDNLNGKEYKKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYITLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFFLYSKLTITVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGKSCA 20
DTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCKRKTCTCGTC／／（配列番号308）。

所望の1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C - S h Kアナログ生成物は1本の重鎖のC末端に融合したShKペプチドを有する完全抗体であった。1種類の軽鎖を共有する2つの異なる重鎖を含み、重鎖：軽鎖：重鎖-ShKの比率は1：2：1であった。予期した発現生成物は、aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 抗体、1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C - S h Kペプチドアナログ、および2価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C - S h Kペプチドアナログである。本明細書に記載のとおり、抗体を含む1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C毒素ペプチド融合物を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて混合物から単離した。

【0406】

1価aK L H 1 2 0 . 6 H C - S h K [1 - 3 5、R 1 K、Q 1 6 K、K 3 0 E] 融合抗体の成分（図1 Fに図解）は以下の単量体を含有した。

（a）aK L H 1 2 0 . 6 κ L C（配列番号28）；

（b）aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C（配列番号29）；および

（c）以下のアミノ酸配列を有するaK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 - S h K [1 - 3 5、R 1 K、Q 1 6 K、K 3 0 E] 融合物：

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR 40
DRGSYYWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSLVVTVTPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNTKVDKKTVE
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTITLVHQLDNLNGKEYKKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYITLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFFLYSKLTITVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGKSC I
DTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCKRETCTCGTC／／（配列番号309）。

所望の1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C - S h Kアナログ生成物は1本の重鎖のC末端に融合したS h Kペプチドを有する完全抗体であった。1種類の軽鎖を共有する2つの異なる重鎖を含み、重鎖：軽鎖：重鎖-S h Kの比率は1：2：1であった。予期した発現生成物は、aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 抗体、1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C - S h Kペプチドアナログ、および2価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C - S h Kペプチドアナログである。本明細書に記載のとおり、抗体を含む1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C 毒素ペプチド融合物を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて混合物から単離した。

【0407】

1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 - S h K [2-35、Q16K] 融合抗体の成分（図1Fに図解）は以下の単量体を含有した。

(a) aK L H 1 2 0 . 6 κ L C（上記の配列番号28）；

(b) aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C（上記の配列番号29）；および

(c) 以下のH C配列を有するaK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 - S h K [2-35、Q16K] 融合物：

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR
DRGSYYWFDPWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSLVVTVPSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKKTVE
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTITVHQLDNLGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSSCID
TIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRKTCTGTC／／（配列番号33）

所望のaK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 - S h Kアナログ生成物は、図1Fに企図する1本の重鎖のC末端に融合したS h Kペプチドを有する完全抗体である。1種類の軽鎖を共有する2つの異なる重鎖を含み、重鎖：軽鎖：重鎖-S h Kの比率は1：2：1であった。予期した発現生成物は、aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2、1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 - S h K、および2価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 - S h Kである。本明細書に記載のとおり、1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 毒素ペプチド（または毒素ペプチドアナログ）融合抗体を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて混合物から単離した。

【0408】

抗K L H I g G 1-ループ-S h K。aK L H I g G 1-ループ-S h Kも、1本の重鎖内に挿入されたS h Kペプチド配列の単一複写を有するが、この場合、C末端の代わりにF cドメインの内部接合に挿入された。（例えば、G e g g e t a l .、米国特許第7,442,778号；米国特許第7,655,765号；米国特許第7,655,764号；米国特許第7,662,931号；米国特許第7,645,861号；公開された米国特許第2009/0281286号；ならびに米国特許第2009/0286964号を参照されたく、これらはそれぞれ参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。aK L H I g G 1-ループ-S h K抗体の成分は、以下を含有した

(a) aK L H 1 2 0 . 6 κ L C（上記の配列番号28）；

(b) aK L H 1 2 0 . 6 I g G 1 H C：

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR

DRGSYYWFDPWGGQGTLLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS G VHTFPAVLQS
SGLYSLSSSVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT I
SKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK// (配列番号34
)

10

および、

(c) aKLH120. 6 IgG1-ループ-ShK:

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCAQVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAR
DRGSYYWFDPWGGQGTLLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS G VHTFPAVLQS
SGLYSLSSSVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT I
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELGGGRSCIDTIPKSRCTAFK
CKHSMKYRLSFCRKTCGTCGGTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK// (配列番号35)

20

【0409】

1 軽鎖を共有する2つの異なる重鎖を含み、重鎖:軽鎖:重鎖-ShKの比率は1:2:1である。予期した発現生成物は、aKLH120. 6 IgG1、1価aKLH120. 6 IgG1-ループ-ShK、および2価aKLH120. 6 IgG1-ループ-ShK
である。本明細書に記載のとおり、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて1価aKLH120. 6 IgG1-ループ-ShK融合抗体(図1Nにより図解)を混合物から単離した。

30

【0410】

1価aKLH120. 6 κLC-ShK [1-35、Q16K] 融合物。1価aKLH120. 6 κLC-ShK [1-35、Q16K] 融合抗体の成分(図1Jに図解)は以下の単量体を含むした。

(a) aKLH120. 6 IgG2 HC (配列番号29);

(b) aKLH120. 6 κLC (配列番号28); および

(c) 以下の配列を有するaKLH120. 6 κLC-ShK [1-35、Q16K]
融合物:

40

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGD
RVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPLTF
GGGTTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDDSTYSLSST
LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGECGGGG
SGGGGSRSCIDTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRKTCGT
C// (配列番号267)。

1価aKLH120. 6 IgG2 LC-ShK [1-35、Q16K] 生成物のこの

50

実施形態は、図1Jに示すように、1本の軽鎖のC末端に融合したShKペプチドを有する完全抗体であった。1種類の重鎖を共有する2つの異なる軽鎖を含み、軽鎖：重鎖：軽鎖-ShK[1-35、Q16K]の比率は1：2：1であった。予期した発現生成物は、aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2、1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 LC-ShK[1-35、Q16K]、および2価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 LC-ShK[1-35、Q16K]である。本明細書に記載のとおり、抗体を含む1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 LC毒素ペプチド融合物を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて混合物から単離した。

【0411】

1価aK L H 1 2 0 . 6 κ L C-ShK[2-35、Q16K]融合物。1価aK L H 1 2 0 . 6 κ L C-ShK[2-35、Q16K]融合抗体の成分(図1Jに図解)は以下の単量体を含有した。

(a) aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 HC(配列番号29)；

(b) aK L H 1 2 0 . 6 κ L C(配列番号28)；および

(c) 以下の配列を有するaK L H 1 2 0 . 6 κ L C-ShK[2-35、Q16K]融合物：

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGD
RVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGV
PSRFSGSGSGSGTEFTLTITSSSLQPEDFATYYCLQHNSYPLTF
GGGTTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
LTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGECGGGG
SGGGGSSSCIDTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRKTCTCGTC
// (配列番号268)。

1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 LC-ShK[2-35、Q16K]生成物のこの実施形態は、図1Jに示すように、1本の軽鎖のC末端に融合したShKペプチドを有する完全抗体であった。1種類の重鎖を共有する2つの異なる軽鎖を含み、軽鎖：重鎖：軽鎖-ShK[2-35、Q16K]の比率は1：2：1であった。予期した発現生成物は、aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2、1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 LC-ShK[2-35、Q16K]、および2価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 LC-ShK[2-35、Q16K]である。本明細書に記載のとおり、抗体を含む1価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 LC毒素ペプチド融合物を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて混合物から単離した。

【0412】

2価aK L H 1 2 0 . 6 κ L C-ShK[1-35、Q16K]融合物。2価aK L H 1 2 0 . 6 κ L C-ShK[1-35、Q16K]融合抗体の成分(図1Kに図解)は以下の単量体を含有した。

(a) aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 HC(配列番号29)；および

(b) 上記のaK L H 1 2 0 . 6 κ L C-ShK[1-35、Q16K]融合物(配列番号267)。

2価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 LC-ShK[1-35、Q16K]抗体生成物のこの実施形態は、図1Kに示すように、両軽鎖のC末端に融合したShKペプチドを有する完全抗体であった。重鎖：軽鎖-ShK[1-35、Q16K]の比率は1：1であった。予期した発現生成物は、2価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 LC-ShK[1-35、Q16K]である。本明細書に記載のとおり、抗体分子を含む2価aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 LC-ShK[1-35、Q16K]ペプチド融合物を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて混合物から単離した。

【0413】

2価aK L H 1 2 0 . 6 κ L C-ShK[2-35、Q16K]融合物。2価aK L H 1 2 0 . 6 κ L C-ShK[2-35、Q16K]融合抗体の成分(図1Kに図解)は以下

の単量体を含有した。

(a) aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C (配列番号 2 9) ; および

(b) 上記の aK L H 1 2 0 . 6 κ L C - S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] 融合物 (配列番号 2 6 8) 。

2 価 aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 L C - S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] 生成物のこの実施形態は、図 1 K に示すように、両軽鎖の C 末端に融合した S h K ペプチドを有する完全抗体であった。重鎖：軽鎖 - S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] の比率は 1 : 1 であった。予期した発現生成物は、2 価 aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 L C - S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] 抗体である。本明細書に記載のとおり、抗体を含む 2 価 aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 L C - S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] 毒素融合物を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて混合物から単離した。

10

【0414】

3 価 aK L H 1 2 0 . 6 κ L C - S h K [1 - 3 5、Q 1 6 K] 融合物。 3 価 aK L H 1 2 0 . 6 κ L C - S h K [1 - 3 5、Q 1 6 K] 融合抗体の成分 (図 1 L に図解) は以下の単量体を含有した。

(a) aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C (上記の配列番号 2 9) ;

(b) 上記の配列番号 3 2 のアミノ酸を有する aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C - S h k [1 - 3 5、Q 1 6 K] 融合物 ; および

(c) 上記の配列番号 2 6 7 のアミノ酸配列を有する aK L H 1 2 0 . 6 κ L C - S h K [1 - 3 5、Q 1 6 K] 融合物。

20

3 価 aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 L C - S h K 生成物のこの実施形態は、図 1 L に示すように、両軽鎖の C 末端に融合した S h K [1 - 3 5、Q 1 6 K] ペプチドおよび 1 本の重鎖を有する完全抗体であった。1 種類の軽鎖を共有する 2 つの異なる重鎖を含み、重鎖：軽鎖 - S h K [1 - 3 5、Q 1 6 K] : 重鎖 - S h K [1 - 3 5、Q 1 6 K] の比率は 1 : 2 : 1 であった。予期した発現生成物は 2 価 aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 L C - S h K [1 - 3 5、Q 1 6 K] 抗体、3 価 aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 L C - S h K [1 - 3 5、Q 1 6 K] 抗体、および 4 価 aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 L C - S h K [1 - 3 5、Q 1 6 K] 抗体であった。本明細書に記載のとおり、抗体分子を含む 3 価 aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 L C 毒素ペプチド融合物を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて混合物から単離した。

30

【0415】

3 価 aK L H 1 2 0 . 6 κ L C - S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] 融合物。 3 価 aK L H 1 2 0 . 6 κ L C - S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] 融合抗体の成分 (図 1 L に図解) は以下の単量体を含有した。

a) aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C (配列番号 2 9) ;

(b) 上記の aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C - S h k [2 - 3 5、Q 1 6 K] 融合物 (配列番号 3 3) ; および

(c) 上記の aK L H 1 2 0 . 6 κ L C - S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] 融合物 (配列番号 2 6 8) 。

3 価 aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 L C - S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] 抗体生成物のこの実施形態は、図 1 L に示すように、両軽鎖の C 末端に融合した S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] ペプチドおよび 1 本の重鎖を有する完全抗体であった。1 種類の軽鎖を共有する 2 つの異なる重鎖を含み、重鎖：軽鎖 - S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] : 重鎖 - S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] の比率は 1 : 2 : 1 であった。予期した発現生成物は 2 価 aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 L C - S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] 抗体、3 価 aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 L C - S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] 抗体、および 4 価 aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 L C - S h K [2 - 3 5、Q 1 6 K] 抗体であった。本明細書に記載のとおり、抗体分子を含む 3 価 aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 L C 毒素ペプチド融合物を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて混合物から単離した。

40

【0416】

50

抗KLH120.6抗体軽鎖哺乳類発現。TRIzol（商標）試薬（Invitrogen）を用いて総RNAを単離するため、KLHモノクローナル抗体120.6を発現するXenomouse（商標）ハイブリドーマを供給源として用いた。伸張接着体5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT-3'（配列番号36）を有する無作為プライマーを用いて第一鎖cDNAを合成し、5'RACE（cDNA末端の急速な増幅）をGeneRacer（登録商標）キット（Invitrogen）を用いて実施した。軽鎖配列決定において、順行プライマーは5'-GTG GTT GAG AGG TGC CAG ATG TGA CAT TGT GAT GAC TCA GTC TCC-3'（配列番号37）および逆行プライマーは5'-AAC CGT TTA AAC GCG GCC GCT CAA CAC TCT CCC CTG TTG AA-3'（配列番号38）であった。RACE生成物をpCR4-TOPO（Invitrogen）にクローン化して配列を決定した。候補フレームワークおよびシグナルペプチド配列を決定するためにコンセンサス配列を用い、完全長の抗体鎖PCR増幅のためのプライマーを設計する。

【0417】

抗KLH120.6κ軽鎖の発現クローンをPCRにより調製した。5'PCRプライマーはシグナル配列のアミノ末端、SalI制限酵素部位、および至適化Kozak配列5'-AAG CTC GAG GTC GAC TAG ACC ACC ATG GAC ATG AGG GTC CCC G-3'（配列番号39）をコードした。3'プライマーはカルボキシル末端および終止コドン、ならびにNotI制限部位5'-AAC CGT TTA AAC GCG GCC GCT CAA CAC TCT CCC CTG TTG AA-3'（配列番号38）をコードした。生成物をpCR4-TOPO（Invitrogen）内にクローン化して、配列を決定した。挿入物を確認後、pCR4-TOPO生成物をSalIおよびNotIにより切断し、挿入物をゲル単離およびQiagen精製してから、哺乳類発現ベクターpTT5中に結紮した。

【0418】

ハイブリドーマに由来する天然ペプチドからシグナルペプチドをVK1/O12ペプチドに変化させるPCRを行った。VK1/O12断片のために用いたプライマーは5'-AAG CTC GAG GTC GAC TAG ACC ACC ATG GAC ATG AGG GTG CCC GCT 3'（配列番号40）および5'-TCA TCT GGA TGT CAC ATC TGG CAC C-3'（配列番号41）であった。成熟軽鎖ペプチドのために用いたプライマーは5'-GGT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG A-3'（配列番号42）および（配列番号38）であった。プライマー（配列番号40）および（配列番号38）を用いた重複PCRにより生成断片を結合した。生成クローン配列は以下の免疫グロブリンκLC配列：MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGGGTTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC//（配列番号28）をコードする。

【0419】

抗KLH120.6抗体軽鎖-ShKペプチドアナログ哺乳類発現。上記のとおり、pTT14-huIgG2-Fc ShK[1-35、Q16K]コード（配列番号26）を鋳型として用いて、以下のオリゴ：

5'-AAC AGG GGA GAG TGT GGA GGA GGA GGA TCC GGA G-3'（配列番号269）；および

5'-CAT GCG GCC GCT CAT TAG CAG G-3'（配列番号270）

10

20

30

40

50

を用いてPCRによりShk [1-35、Q16K]断片を生成した。

【0420】

次いで軽鎖断片およびShK PCR生成物を外プライマーCAT TCT AGA ACC ACC ATG GAC ATG AGG GTG// (配列番号343) および配列番号270を用いてPCRにより増幅した。次いでPCR生成物をXbaIおよびNotIにより消化して、PCRクリーンアップキット (Qiagen) で精製した。同時に、pYD16をXbaIおよびNotIにより切断した。pYD16ベクターを1%アガロースゲル上に流して、大型断片を切断し、QiagenのGel Purificationキットによりゲル精製した。精製したPCR生成物を大型ベクター断片と結紮して、OneShot Top10細菌に形質転換した。形質転換細菌コロニーからDNAを単離し、XbaIおよびNotI制限酵素による消化に供して、1%アガロースゲル上で分解した。予期したパターンに至るDNAを配列決定用に提出した。いくつかのクローン配列分析において上記配列と100%適合したが、1クローンのみを大規模プラスミド精製用を選択した。最終pYD16-aK1H120.6-VK1SP-LC-L10-ShK [1-35、Q16K] 構築物はaK1H120.6 LC-L10-ShK [1-35、Q16K] 融合ポリペプチド (配列番号267) をコードした。

10

【0421】

上記のとおりpTT5-aK1H120.6 HC-ShK [2-35、Q16K] を鋳型として用いて、オリゴヌクレオチドプライマー配列番号269および配列番号270を用いてShk [2-35、Q16K] 断片を生成した。

20

【0422】

軽鎖およびShK PCR生成物を外プライマー配列番号343および配列番号270を用いてPCRにより増幅した。次いでPCR生成物をXbaIおよびNotIにより消化して、PCRクリーンアップキット (Qiagen) で精製した。同時に、pYD16をXbaIおよびNotIにより切断した。pYD16ベクターを1%アガロースゲル上に流して、大型断片を切断し、QiagenのGel Purificationキットによりゲル精製した。精製したPCR生成物を大型ベクター断片と結紮して、OneShot Top10細菌に形質転換した。形質転換細菌コロニーからDNAを単離し、XbaIおよびNotI制限酵素による消化に供して、1%アガロースゲル上で分解した。予期したパターンに至るDNAを配列決定用に提出した。いくつかのクローン配列分析において上記配列と100%適合したが、1クローンのみを大規模プラスミド精製用を選択した。最終pYD16-aK1H120.6-VK1SP-LC-L10-ShK [2-35、Q16K] 構築物はIgG2-LC-L10-ShK [2-35、Q16K] 融合ポリペプチド単量体 (配列番号268) をコードした。

30

【0423】

哺乳類発現におけるaK1H-IgG2重鎖-L10-ShK [1-35] およびaK1H-IgG2重鎖-L10-ShKペプチドアナログ。

以下のオリゴ

5'-CAT TCT AGA CCC ACC ATG GAC ATG AGG GTG-3' (配列番号43) ; および

40

5'-GGA TCC TCC TCC TCC ACC CGG AGA CAG GGA GAG G-3' (配列番号44)

を用いて、

aK1H120.6-VK1SP-IgG2重鎖 (配列番号46 ; 以下) をコードするコード配列 (配列番号45 ; 以下) を含むpTT5-aK1H120.6-VK1SP-IgG2重鎖 (HC) 構築物からaK1H-IgG2重鎖領域をPCRにより増幅した ;

ATGGACATGAGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGGCTCCTGCT
TGCTGTGGCTGAGAGGTGCCAGATGTTCAGGTGCAGCTGGT
GCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGGCTCAGTG

50

A A G G T C T C C T G C A A G G C T T C T G G A T A C A C C T T C A C C G G C T
 A C C A C A T G C A C T G G G T G C G A C A G G C C C C T G G A C A A G G G C T
 T G A G T G G A T G G G A T G G A T C A A C C C T A A C A G T G G T G G C A C A
 A A C T A T G C A C A G A A G T T T C A G G G C A G G G T C A C C A T G A C C A
 G G G A C A C G T C C A T C A G C A C A G C C T A C A T G G A G C T G A G C A G
 G C T G A G A T C T G A C G A C A C G G C C G T G T A T T A C T G T G C G A G A
 G A T C G T G G G A G C T A C T A C T G G T T C G A C C C C T G G G G C C A G G
 G A A C C C T G G T C A C C G T C T C C T C A G C C T C C A C C A A G G G C C C
 A T C G G T C T T C C C C C T G G C G C C C T G C T C C A G G A G C A C C T C C
 G A G A G C A C A G C G G C C C T G G G C T G C C T G G T C A A G G A C T A C T
 T C C C C G A A C C G G T G A C G G T G T C G T G G A A C T C A G G C G C T C T
 G A C C A G C G G C G T G C A C A C C T T C C C A G C T G T C C T A C A G T C C
 T C A G G A C T C T A C T C C C T C A G C A G C G T G G T G A C C G T G C C C T
 C C A G C A A C T T C G G C A C C C A G A C C T A C A C C T G C A A C G T A G A
 T C A C A A G C C C A G C A A C A C C A A G G T G G A C A A G A C A G T T G A G
 C G C A A A T G T T G T G T C G A G T G C C C A C C G T G C C C A G C A C C A C
 C T G T G G C A G G A C C G T C A G T C T T C C T C T T C C C C C C A A A A C C
 C A A G G A C A C C C T C A T G A T C T C C C G G A C C C C T G A G G T C A C G
 T G C G T G G T G G T G G A C G T G A G C C A C G A A G A C C C C G A G G T C C
 A G T T C A A C T G G T A C G T G G A C G G C G T G G A G G T G C A T A A T G C
 C A A G A C A A A G C C A C G G G A G G A G C A G T T C A A C A G C A C G T T C
 C G T G T G G T C A G C G T C C T C A C C G T T G T G C A C C A G G A C T G G C
 T G A A C G G C A A G G A G T A C A A G T G C A A G G T C T C C A A C A A A G G
 C C T C C C A G C C C C C A T C G A G A A A A C C A T C T C C A A A A C C A A A
 G G G C A G C C C C G A G A A C C A C A G G T G T A C A C C C T G C C C C C A T
 C C C G G G A G G A G A T G A C C A A G A A C C A G G T C A G C C T G A C C T G
 C C T G G T C A A A G G C T T C T A C C C C A G C G A C A T C G C C G T G G A G
 T G G G A G A G C A A T G G G C A G C C G G A G A A C A A C T A C A A G A C C A
 C A C C T C C C A T G C T G G A C T C C G A C G G C T C C T T C T T C C T C T A
 C A G C A A G C T C A C C G T G G A C A A G A G C A G G T G G C A G C A G G G G
 A A C G T C T T C T C A T G C T C C G T G A T G C A T G A G G C T C T G C A C A
 A C C A C T A C A C G C A G A A G A G C C T C T C C C T G T C T C C G G G T / /
 (配列番号45)、

これはアミノ酸配列

M D M R V P A Q L L G L L L L W L R G A R C Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V
 K V S C K A S G Y T F T G Y H M H W V R Q A P G Q G L E W M G W I N P N S G G T
 N Y A Q K F Q G R V T M T R D T S I S T A Y M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R
 D R G S Y Y W F D P W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S
 E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S
 S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E
 R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T
 C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F
 R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K
 G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E
 W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
 N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G / / (配列番号46)をコード
 する。

【0424】

(参照によりその全体が本明細書に組み込まれるSullivan et al.,
 Toxin Peptide Therapeutic Agents、PCT/米国特

許第2007/022831号(WO2008/088422号として公開)の実施例1、図14A~14Bに記載のように) ShK [1-35] WT断片をp cDNA3.1 (+) CMV i 中の元のFc-L10-ShK [1-35] を鋳型として用いて、以下のオリゴ:

5'-TCC CTG TCT CCG GGT GGA GGA GGA GGA
TCC GGA G-3' (配列番号47); および5'-CAT GCG GCC G
CT CAT TAG CAG GTG-3' (配列番号14)を用いて生成した。PCR生成物を1%アガロースゲル上に流した。バンドにアガロースプラグ用の穴を開けてプラグを新しいPCR反応管に入れた。次いで外プライマー配列番号357および配列番号330を用いてPCRによりアガロースプラグを増幅した。次いでPCR生成物をXba I およびNot I により消化して、PCRクリーンアップキット(Qiagen)で精製した。同時に、pTT5ベクター(CMVプロモーターおよびPoly A tailを含むAmgenベクター)をXba I およびNot I により切断した。pTT5ベクターを1%アガロースゲル上に流して、大型断片を切断し、QiagenのGel Purificationキットによりゲル精製した。精製したPCR生成物を大型ベクター断片と結紮して、One Shot Top10細菌に形質転換した。形質転換細菌コロニーからDNAを単離し、Xba I およびNot I 制限酵素による消化に供して、1%アガロースゲル上で分解した。予期したパターンに至るDNAを配列決定用に提出した。いくつかのクローン配列分析において上記配列と100%適合したが、1クローンのみを大規模プラスミド精製用に選択した。最終pTT5-aK L H 1 2 0 . 6 - V K 1 S P - I g G 2 - H C - L 1 0 - S h K [1 - 3 5] 構築物はアミノ酸配列:

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCAQVQLVQSGAEVKKPGASVKV
SCKASGYTFRTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQK
FKQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARDRGSYYW
FDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVTPSSNFG
TQTYTCNVLDHKPSNTKVDKKTVE RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPKPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTFRVVS VLT VVH QD W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K
G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E
W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G G G G S G G G G S R S C I
D T I P K S R C T A F Q C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C / / (配列番号48)

とのIgG2-HC-L10-ShK [1-35] 融合ポリペプチドをコードした。

【0425】

この構築物のShK [1-35、Q16K] 変異型を産生するため、Stratagene QuikChange Multi site Directed Mutagenesisキット(Cat#200531)を製造業者の説明書に従いつつ用いて、なら

びにオリゴ:
5'-GCT GCA CCG CCT TCA AGT GCA AGC ACA
GC 3' (配列番号9); および
5'-GCT GTG CTT GCA CTT GAA GGC GGT GCA
GC-3' (配列番号10)

を用いて部位指向変異を実施した。最終構築物pTT5-aK L H 1 2 0 . 6 - V K 1 S P - I g G 2 - H C - L 1 0 - S h K [1 - 3 5 、 Q 1 6 K] はアミノ酸配列:

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCAQVQLVQSGAEVKKPGASVKV
SCKASGYTFRTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQK
FKQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR

DRGSYYWFDPWGGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTS
ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
SGLYSSLSSVVTVPSSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKKTVE
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTV
CVVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSRSCI
DTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRKTCGTC／／（配列番号49）

10

とのIgG2-HC-L10-ShK[1-35、Q16K]融合ポリペプチドをコードした。

【0426】

aKLH-IgG2重鎖-L10-ShK[2-35、Q16K]哺乳類発現。DNA構築物pTT5-aKLH120.6-VK1SP-IgG2-HC-L10-ShK[1-35]をベクターとして用いて、ShK[1-35]をBamHI/BamHIを用いて切断した。ShK[1-35]非含有pTT5-aKLH120.6-VK1SP-IgG2-HC由来のベクター断片は、アミノ酸配列

20

MDMRVPAQLLLGLLLLWLRGARCAQVQLVQSGAEVKKPGASVK
KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR
DRGSYYWFDPWGGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTS
ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
SGLYSSLSSVVTVPSSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKKTVE
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTV
CVVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTVTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGG／／（配列番号51）を
コードするコード配列：

30

ATGGACATGAGGGGTGCCCGCTCAGCTCCTGGGGGCTCCTGCT
TGCTGTGGCTGAGAGGTGCCAGATGTCAGGTGCAGCTGGT
GCAGTCTGGGGGCTGAGGTGAAGAAAGCCTGGGGGCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCAACGGCT
ACCACATGCACCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCT
TGAGTTGGATGGGATGGATCAACCTTAACAGTTGGTGGCACAA
AACTATGCACAGAAGTTTTCAGGGCAGGGTCAACCATGACCA
GGGACACGTTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAG
GCTGAGATCTGACGACACGGCCGCTGTATTACTGTGCGAGA
GATCGTTGGGAGCTACTACTGTTTCGACCCCTGGGGGCCAGG
GAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC
ATCGGTCTTCCCCCTGGCGGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACCTCAGGCGCTCT
GACCAGCGGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTTACAGTCC
TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTTGGTGACCGTGCCTT
CCAGCAACTTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAAACGTAGA
TCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAG

40

50

CGCAAATGTTGTGTCGAGTGCACCGTGCACAGCACCAAC
CTGTGGCAGGACCGTCAAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAACC
CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAAG
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCC
AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTC
CGTGTGGTCAAGCGTCCCTCACCGTTGTGCAACCAGGACTGGC
TGAACGGGCAAGGAGTACAAGTGCAGAGGTCTCCAACAAAGG
CCTCCCAAGCCCCCATCGAGAAACCAATCTCCAACAAACCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCCAT
CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAAGCCTGACCTG
CCTGGTCAAAAGGCTTCTTACCCCAAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA
CACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGGCTCCTTCTTCTCTTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACCTACACGCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGGTGG
AGGAGGA／／（配列番号50）を含有した。次いでベクター断片をCal Int
testine Phosphatase（CIP）で処理して5'リン酸基を除去し、
フェノール／クロロホルムを抽出してベクター自体の再結紮を防止した。挿入物はIgG
2 Fc-L10-ShK（2-35、Q16K）をコードするpTT14-VH21S
P-IgG2-Fc-ShK〔2-35、Q16K〕に由来した：
MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEKVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPMLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNNHYTQKSLS
LSPGKGGGGSGGGGSSCIDTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLS
FCRKTCTC／／（配列番号18）、
また、挿入物はBamHI／BamHIを用いて消化もさせた。挿入ShK〔2-35
、Q16K〕断片をそのベクターからゲル精製して、QiagenのGel Purif
icationキットでクリーンアップした。精製したDNA挿入物は、アミノ酸配列G
SGGGGSSCIDTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRKTCTC
（配列番号53）をコードするコード配列GGA TCC GGA GGA GGA G
GA AGC AGC TGC ATC GAC ACC ATC CCC AAG A
GC CGC TGC ACC GCC TTC AAG TGC AAG CAC A
GC ATG AAG TAC CGC CTG AGC TTC TGC CGC A
AG ACC TGC GGC ACC TGC TAA TGA／／（配列番号52）
を含み、大型ベクター断片と結紮して、One Shot Top10細菌に形質転換した
。形質転換細菌コロニーからDNAを単離し、BamHI制限酵素による消化に供して、
1%アガロースゲル上で分解した。予期したパターンに至るDNAを配列決定用に提出し
た。いくつかのクローン配列分析において上記配列と100%適合したが、1クローンの
みを大規模プラスミド精製用に選択した。最終構築物pTT5-aKHLH-IgG2 H
C-L10-ShK〔2-35、Q16K〕はIgG2 HC-L10-ShK〔2-3
5、Q16K〕融合ポリペプチド：
MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCAQVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR
DRGSYYWFDPWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS

ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 SGLYSLSLVVTVPS SNFGTQT YTCNV DHKPSNTKVDKTVE
 RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVT
 C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F
 R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K
 G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E
 W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
 N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G G G G G S G G G G S S C I D
 T I P K S R C T A F K C K H S M K Y R L S F C R K T C G T C / / (配列番号54)
 をコードした。

10

【0427】

Shk [1-35、R1A、I4A、Q16K]断片をpTT5-aKLH120.6
 -VK1SP-IgG2-HC-L10-ShK [1-35 Q16K]を鋳型として用
 いて、以下のオリゴ：

5'-AGG AGG AGG AAG CGC CAG CTG CGC CGA
 CAC CAT CCC C-3' / / (配列番号310)；および

5'-GGG GAT GGT GTC GGC GCA GCT GGC GCT
 TCC TCC TCC T-3' / / (配列番号311)

を用いて生成した。

Stratagene QuikChange Multi site Direct
 ed Mutagenesisキットを製造業者の説明書に従いつつ用いて部位指向変異
 を実施した。最終pTT5-aKLH120.6-VK1SP-IgG2-HC-L10
 -ShK [1-35 R1A、I4A、Q16K]構築物はIgG2-HC-L10-S
 hK [1-35、R1A、I4A、Q16K]融合ポリペプチド(配列番号304)をコ
 ードした。

20

【0428】

以下の4つのオリゴ：

5'-GAG GAG GAG GAA GCG CCA GCT GCA TCG
 ACA-3' / / (配列番号312)；

5'-GAG CTT CTG CCG CGA GAC CTG CGG CAC-
 3' / / (配列番号313)；

5'-CGA TGC AGC TGG CGC TTC CTC CTC CTC-
 3' / / (配列番号314)；および

5'-GTG CCG CAG GTC TCG CGG CAG AAG CTC-
 3' / / (配列番号315)

を用いて上記のとおりShk [1-35、R1A、Q16K、K30E]断片を生成した
 。

30

最終pTT5-aKLH120.6-VK1SP-IgG2-HC-L10-ShK [1-35
 R1A、Q16K、K30E]構築物はIgG2-HC-L10-ShK [1-35、R1A、Q16K、K30E]
 融合ポリペプチド(配列番号305)をコードし
 た。

40

【0429】

pTT5-aKLH120.6-VK1SP-IgG2-HC-L10-ShK [1-35
 Q16K]を鋳型として用いて、以下のオリゴ：

5'-GGA GGA GGA AGC CAC AGC TGC GCC GAC
 ACC ATC CCC-3' / / (配列番号316)；および

5'-GGG GAT GGT GTC GGC GCA GCT GTG GCT
 TCC TCC TCC-3' / / (配列番号317)

を用いてShK [1-35、R1H、I4A、Q16K]断片を生成した。

Stratagene QuikChange Multi site Direct

50

ed Mutagenesisキット (Cat # 200531) を製造業者の説明書に従いつつ用いて部位指向変異を実施した。最終 pTT5-aK L H 1 2 0 . 6 - V K 1 S P - I g G 2 - H C - L 1 0 - S h K [1 - 3 5 R 1 H、I 4 A、Q 1 6 K] 構築物は I g G 2 - H C - L 1 0 - S h K [1 - 3 5、R 1 H、I 4 A、Q 1 6 K] 融合ポリペプチド (配列番号 306) をコードした。

【0430】

以下の4つのオリゴ：

5' - G G A G G A G G A A G C C A C A G C T G C A T C G A C -
3' // (配列番号 318) および配列番号 313；

5' - G T C G A T G C A G C T G T G G C T T C C T C C T C C -
3' // (配列番号 319) および配列番号 315 を用いて上記のとおり Shk [1 - 3 5、R 1 H、Q 1 6 K、K 3 0 E] 断片を生成した。

10

最終 pTT5-aK L H 1 2 0 . 6 - V K 1 S P - I g G 2 - H C - L 1 0 - S h K [1 - 3 5 R 1 H、Q 1 6 K、K 3 0 E] 構築物は I g G 2 - H C - L 1 0 - S h K [1 - 3 5、R 1 H、Q 1 6 K、K 3 0 E] 融合ポリペプチド (配列番号 307) をコードした。

【0431】

pTT5-aK L H 1 2 0 . 6 - V K 1 S P - I g G 2 - H C - L 1 0 - S h K [1 - 3 5 Q 1 6 K] を鋳型として用いて、以下のオリゴ：

5' - C C G G A G G A G G A G A A G C A A G A G C T G C G
C C G A C A C C A T C C C C A A G A - 3' // (配列番号 320)；および

20

5' - T C T T G G G G A T G G T G T C G G C G C A G C T C T
T G C T T C C T C C T C C C G G - 3' // (配列番号 321)

を用いて Shk [1 - 3 5、R 1 K、I 4 A、Q 1 6 K] 断片を生成した。

Stratagene QuikChange Multi site Directed Mutagenesisキット (Cat # 200531) を製造業者の説明書に従いつつ用いて部位指向変異を実施した。最終 pTT5-aK L H 1 2 0 . 6 - V K 1 S P - I g G 2 - H C - L 1 0 - S h K [1 - 3 5 R 1 K、I 4 A、Q 1 6 K] 構築物は I g G 2 - H C - L 1 0 - S h K [1 - 3 5、R 1 K、I 4 A、Q 1 6 K] 融合ポリペプチド (配列番号 308) をコードした。

30

【0432】

以下の4つのオリゴ：

5' - C G G A G G A G G A G G A A G C A A G A G C T G C A T
C G A C A C C A - 3' // (配列番号 322) および配列番号 313；

5' - T G G T G T C G A T G C A G C T C T T G C T T C C T C
C T C C T C C G - 3' // (配列番号 323) および配列番号 315 を用いて S h k [1 - 3 5、R 1 K、Q 1 6 K、K 3 0 E] 断片を上記のとおり生成した。

最終 pTT5-aK L H 1 2 0 . 6 - V K 1 S P - I g G 2 - H C - L 1 0 - S h K [1 - 3 5 R 1 H、Q 1 6 K、K 3 0 E] 構築物は I g G 2 - H C - L 1 0 - S h K [1 - 3 5、R 1 K、Q 1 6 K、K 3 0 E] 融合ポリペプチド (配列番号 309) をコードした。

40

【0433】

1 価 A b H C - ならびに 1 価、2 価および 3 価 A b L C 毒素ペプチドアナログ融合物の単離方法。タンパク質 A セファロース (G E H e a l t h c a r e) を用いた F c 領域の親和性高速タンパク質液体クロマトグラフィー (F P L C) 捕獲、続いて 2 価陽イオンを含まないダルベッコの P B S (I n v i t r o g e n) によるカラム洗浄および 100 m M 酢酸 (p H 3 . 5) を 2 . 5 c m / 分 で 流 した 溶 出 工 程 に よ り 条 件 培 地 の 初 回 精 製 を 行 った。タンパク質を含む留分をプールし、10 N N a O H を用いて p H を 5 . 0 に調整し、5 容量の水でさらに希釈した。物質を 0 . 4 5 μ m 酢酸セルロースフィルター

50

(Corning) を介してろ過し、陽イオン交換 FPLC (SP Sepharose High Performance; GE Healthcare) によりさらに精製した。試料を 100% 緩衝液 A (50 mM 酢酸、pH 5.0) で平衡させたカラム上に負荷し、勾配 0~80% 緩衝液 B (50 mM 酢酸、1 M NaCl、pH 5.0) 30 カラム容量、流速 1.5 cm/分 で溶出した。ピークを含む標的種をプールして、10 mM 酢酸ナトリウム、9% ショ糖 (pH 5.0) 中に製剤化した。1 価、2 価および 3 価の免疫グロブリン毒素ペプチドアナログ融合タンパク質の精製例を図 24~26 A~B、27~29 A~B、30~32 A~B、および 33~35 に示す。非還元 SDS-PAGE 分析 (図 24、28、30 および 33) により、完全に組み立てられた抗体が形成され得ることが示され、還元 SDS-PAGE 分析により所望の成分が存在することが示される。サイズ排除クロマトグラム (図 25、28、31 および 34) により、精製した生成物の大部分が所望の非凝集状態にあることが示される。最終的に、質量スペクトル分析 (図 26 A~B、29 A~B、32 A~B および 35) により、所望の融合生成物が存在することが示される。まとめると、これらの例により、aK L H 1 2 0.6 抗体は少なくとも 1~8 個の薬理学的に活性なポリペプチド部分の偶数または奇数価を含む種などの多種多様の配置における融合が許容可能であることが示される。

【0434】

VH21SP-N 末端 ShK [1-35] 野生型-IgG1-Fc 哺乳類発現。 ヒト IgG1 の N 末端 Fc 領域にインフレーション融合させた Kv1.3 阻害剤ペプチド ShK [1-35] の単量体をコードする DNA 配列を下記のとおりに構築した。

【0435】

VH21SP-ShK (1-35)-L10-IgG1 Fc 発現ベクターの構築のため、HindIII および BamHI 制限部位に挟まれた 4 つのグリシンと 1 つのセリンアミノ酸に結合した VH21 シグナルペプチド ShK (1-35) 遺伝子を産生し、BamHI および NotI 制限部位に挟まれた IgG1 Fc 断片に結合した 4 つのグリシンと 1 つのセリンアミノ酸を、PCR 反応において pcDNA3.1 (+) CMV i 中の Fc-L10-OSK1 を鋳型として用いて生成する PCR 戦略を用いた (参照により組み込まれる Sullivan et al.、WO2008/088422 A2 号の実施例 41 および図 42 A~B に記載)。

【0436】

VH21SP-ShK (1-35)-G₄S を産生するため、以下に示す配列と 2 つのオリゴを、PfuTurbo HotStart DNA ポリメラーゼ (Stratagene) で、95℃ で 30 秒、55℃ で 30 秒、75℃ で 45 秒の 35 サイクル PCR 反応に用いた；HindIII (aagctt) および BamHI (ggatcc) 制限部位は下線部分である：

順行プライマー：

TGCAGAAAGCTTCTAGACCAACCATGGAAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTTCTCCTGTCAGTAACGACTGGTGTCCTCACTCCCGCAGCTGCAATCGACACCAATCCCCAAGAGCCGCTGCACCGCCTTCCAGT// (配列番号 55)；および

逆行プライマー：

CTCCGGATCCCTCCTCCTCCGCGCAGGTGCCGCGCAGGTCTTTGCGGCAGAAAGCTCAGGCGGTACTTCAATGCTGTGTGCTTGCACCTGGAAGGCGGTGCAGCGGCTCTTTGGGGATGGTGTCGAT// (配列番号 56)。

【0437】

生成した PCR 生成物を 2% アガロースゲル上で 202 bp バンドとして分解した。202 bp PCR 生成物を PCR 精製キット (Qiagen) を用いて精製してから、HindIII および BamHI (Roche) 制限酵素で消化し、アガロースゲルを Gel Extraction キット (Qiagen) により精製した。

【0438】

G₄S-IgG1 Fcを産生するため、以下に示す配列と2つのオリゴを、Pfu Turbo Hot Start DNAポリメラーゼ (Stratagene) で、95℃で30秒、55℃で30秒、75℃で1分の30サイクルPCR反応に用いた；BamHI (ggatcc) およびNotI (cgggcgc) 制限部位は下線部分である：

順行プライマー：

GTAG G A T C C G G A G G A G G A A G C G A C A A A A C T C A C A C /
/ (配列番号57)；および

逆行プライマー：

C G A G C G G C C G C T T A C T A T T T A C C C G G A G A C A G G G A / / (配
列番号58)。

【0439】

生成したPCR生成物を1%アガロースゲル上で721bpバンドとして分解した。721bp PCR生成物をPCR精製キット (Qiagen) を用いて精製してから、BamHIおよびNotI (Roche) 制限酵素で消化し、アガロースゲルをGel Extractionキット (Qiagen) により精製した。

【0440】

p cDNA 3.1 (+) CMV i-Fc-L10-OSK1ベクターをBamHIおよびNotI制限酵素で消化し、大型断片をGel Extractionキットにより精製した。ゲル精製した4GS-IgG1 Fc断片を精製した大型断片と結紮して、One Shot (商標) Top10 (Invitrogen) に形質転換してpCMV i-Fc-L10-IgG1 Fcベクターを作製した。続いて、pCMV i-Fc-L10-IgG1 FcベクターをHindIIIおよびBamHI制限酵素で消化し、大型断片をGel Extractionキットにより精製した。ゲル精製したVH21SP-ShK (1-35)-4GS断片を精製した大型断片と結紮して、One Shot (商標) Top10 (Invitrogen) に形質転換し、pCMV i-VH21SP-ShK (1-35)-L10-IgG1 Fc構築物において生成した。形質転換細菌コロニーからDNAを単離し、BamHIおよびNotI制限酵素で消化し、1%アガロースゲル上で分解した。予期したパターンに至るDNAを配列決定用に提出した。いくつかのクローン配列分析において上記配列と100%適合したが、各遺伝子から1クロンのみを大規模プラスミド精製用を選択した。pCMV iベクター中のVH21SP-ShK (1-35)-L10-IgG1 FcからDNAを再編成して、Fcおよびリンカー領域ならびに配列が上記配列と100%同一であったことを確認した。断片VH21SP-ShK (1-35)-L10-IgG1 Fcは、VH21SP-ShK (1-35)-L10-IgG1 Fcアミノ酸配列

MEWSWVFLFFLSVT TGVHSRSCIDTIPKSRCTAFQCKHSM
KYRLSFCRKTCGTCGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDS DGS FFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALH NHY
TQKSLSLSPGK / / (配列番号60) をコードするコード配列

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTTCTCCTGTCAGTAA
CGACTGGTGTCCACTCCCGCAGCTGCATCGACACCATCCC
CAAGAGCCGCTGCACCGCCTTCCAGTGCAAGCACAGCATG
AAGTACCGCCCTGAGCTTCTTGCCGCAAGACCTGCGGCACCT
GCGGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAAGCGACAAAAC
TCACACATGCCCAACCGTGCCCAAGCACCTGAACCTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACA

CCCTCATGATCTCTCCCGGACCCCTGAGGTCACCATGCGTGGT
GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAGGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAACAGCACGTACCGTGTGGT
CAGCGTCTCTCACCGTCTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAAGTGCAGGTTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG
CCCCCATCGAGAAACCATCTCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCC
CCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCAGGAT
GAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAAGCCTGACCTGCCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCTCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
CAATGGGCGAGCCGGAGAACAACTACAAAGACCACGCCCTCCC
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTCTACAGCAAGC
TCACCGGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCACTAC
ACGCAGAAAGAGCCTCTCTCCCTGTCTCTCCGGGTAAATAGTAA／
／（配列番号59）を含有した。

【0441】

N末端ShK [1-35、Q16K] -aKLH HC；およびN末端ShK [1-35 Q16K] -aKLH LCの哺乳類発現。N末端ShK [1-35] 野生型-L10-IgG1-Fcをコードする構築物を用いて、以下のオリゴ：

5'-GCT GCA CCG CCT TCA AGT GCA AGC ACA
GC-3'／／（配列番号9）；および
5'-GCT GTG CTT GCA CTT GAA GGC GGT GCA
GC-3'（配列番号10）

を用いる部位指向変異を実施してShK領域にQ16K変異を産生した。

Stratagene QuickChange Multi site Directed Mutagenesisキットを製造業者の説明書に従いつつ用いた。pCMV i-N末端-ShK [1-35 Q16K] -L10-IgG1-Fcのための最終構築物は、以下のシグナルペプチド（VH21SP）-ShK [1-35、Q16K] -L10-IgG1-Fc融合ポリペプチド：

MEWSWVFLFFLSVT TGVHSRSCIDTIPKSRCTAFKCKHSM
KYRLSFCRKTCGTCGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPKPKD TLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK／／（配列番号61）をコードした。

【0442】

N末端ShK [1-35、Q16K] -aKLH HC構築物を産生するため、シグナルペプチド-ShK [1-35 Q16K] -L10リンカーを含むPCR生成物を、以下のオリゴ：

5'-CAT TCT AGA CCA CCA TGG AAT GG-3'（配列番号62）；
5'-CAG CTG CAC CTG GCT TCC TCC TCC TCC
GG-3'（配列番号63）；

およびpCMV i-N末端-ShK [1-35、Q16K] -L10-IgG1-Fc鋳型を用いて産生し、VH21SP-ShK (1-35、Q16K) -L10アミノ酸配列

MEWSWVFLFFLSVT TGVHSRSCIDTIPKSRCTAFKCKHSM

KYRLSFCRKTCGTCGGGGSGGGGS// (配列番号65) をコードするコード配列

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTTCTCTGTCAGTAA
CGACTGGTGTCCACTCCCGCAGCTGCATCGACACCATCCC
CAAGAGCCGCTGCACCGCCCTTCAAGTGC AAGCACAGCATG
AAGTACCGCCTGAGCTTCTGCGCGCAAGACCTGCGGCGACCT
GCGGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAGGAAGC// (配列番号64) を含む断片を得た。

【0443】

aK L H-HC断片を産生するため、以下のオリゴ：

10

5'-GGA GGA GGA AGC CAG GTG CAG CTG GTG
CAG-3' (配列番号66)；

5'-CAT GCG GCC GCT CAT TTA CCC-3' (配列番号67)；

およびpTT5-aK L H120.6-HC鋳型を用いてPCR生成物を作製し、アミノ酸配列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMHWRQA
PGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAY
MELSLRLRSDDTAVYYCARDRGSYYWFDPWGQGTLLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVSVTVPSNFGTQTY
TCNVLDHKPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL
FPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPMLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS C SVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK// (配列番号69) をコードするコード配列

20

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGCTGAGGTGAAGAAGC
CTGGGGGCCCTCAGTGAAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTTGGATA
CACCTTTCACCGGCTACCAACATGCACCTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAAGTGGATGGGATGGATCAACCCTA
ACAGTGGTGGCACAAACTATGCACAGAAGTTTTCAGGGCAG
GGTCACCATGACCAGGGACACGTC CATCAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGGCCGTGT
ATTACTGTGCGAGAGATCGTGGGAGCTACTACTGGTTTCGA
CCCCCTGGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCC
TCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGGCCCTGCT
CCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGGCTGCCT
GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGG
AACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAAG
CTGTCTTACAGTCTTCAAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
GGTGACCGTGCCTTCCAGCAACTTTCGGCACCCAGACCTAC
ACCTGCAACGTAGATCACAAAGCC CAGCAACACCAAGGTGG
ACAAAGACAGTTTGAGCGCAAAATGTTGTGTCTGAGTGCCCAAC
GTGCC CAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAAGTCTTCTCTC
TTCCCCCCCAAAACCCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGA
CCCCCTGAGGTCAACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
AGACCCCGAGGTCCAGTTTCAACTGGTACGTGGACGGCGGTG
GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGT

30

40

50

T C A A C A G C A C G T T C C G T G T G G T C A G C G T C C T C A C C G T T G T
G C A C C A G G A C T G G C T G A A C G G C A A G G A G T A C A A G T G C A A G
G T C T C C A A C A A A G G C C T C C C A G C C C C C A T C G A G A A A A C C A
T C T C C A A A A C C A A A G G G C A G C C C C G A G A A C C A C A G G T G T A
C A C C C T G C C C C C A T C C C G G G A G G A G A T G A C C A A G A A C C A G
G T C A G C C T G A C C T G C C T G G T C A A A G G C T T C T A C C C C A G C G
A C A T C G C C G T G G A G T G G G A G A G C A A T G G G C A G C C G G A G A A
C A A C T A C A A G A C C A C A C C T C C C A T G C T G G A C T C C G A C G G C
T C C T T C T T C C T C T A C A G C A A G C T C A C C G T G G A C A A G A G C A
G G T G G C A G C A G G G G A A C G T C T T C T C A T G C T C C G T G A T G C A
T G A G G C T C T G C A C A A C C A C T A C A C G C A G A A G A G C C T C T C C
C T G T C T C C G G G T A A A T G A / / (配列番号68)を含むDNA断片を得た。

【0444】

2つのPCR生成物をゲル上に流して、適切なサイズのバンドにアガロースプラグ用の穴を開けた。アガロースプラグを単一の新規PCR反応に置き、最も外側のプライマー（配列番号62）および（配列番号67）を用いて断片を一緒に縫い合わせた。PCR断片をXbaIおよびNotIを用いて切断し、QiagenのPCRクリーンアップキットでクリーンした。同時に、pTT5ベクターもXbaIおよびNotIにより切断して、ゲル精製した。精製した挿入物を大型ベクター断片と結紮して、One Shot Top 10細菌に形質転換した。形質転換細菌コロニーからDNAを単離し、XbaIおよびNotI制限酵素による消化に供して、1%アガロースゲル上で分解した。予期したパターンに至るDNAを配列決定用に提出した。いくつかのクローン配列分析において上記配列と100%適合したが、1クローンのみを大規模プラスミド精製用に選択した。最終構築物pTT5-N末端ShK[1-35Q16K]-L10-aK1H120.6-HCはVH21SP-ShK[1-35、Q16K]-L10-aK1H120.6-HC融合ポリペプチド：

M E W S W V F L F F L S V T T G V H S R S C I D T I P K S R C T A F K C K H S M
K Y R L S F C R K T C G T C G G G G S G G G S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A
S V K V S C K A S G Y T F T G Y H M H W V R Q A P G Q G L E W M G W I N P N S G
G T N Y A Q K F Q G R V T M T R D T S I S T A Y M E L S R L R S D D T A V Y Y C
A R D R G S Y Y W F D P W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S
T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L
Q S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T C N V D H K P S N T K V D K T
V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E
V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S
T F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K
T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A
V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q
Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K / / (配列番号70)をコードした。

【0445】

最後に、N末端-ShK[1-35、Q16K]-L10-aK1H120.6軽鎖(LC)を上記と同じ様式において生成した。シグナルペプチド-ShK[1-35、Q16K]-L10を含むPCR生成物を、以下のオリゴ：

5'-CAT TCT AGA CCA CCA TGG AAT GG-3' (配列番号62)；および

5'-CAT CTG GAT GTC GCT TCC TCC TCC TCC GG-3' (配列番号71)；

ならびにpCMVi-N末端-ShK[1-35Q16K]-L10-IgG1-Fc鋳型を用いて作製し、シグナルペプチド(VH21SP)-ShK(1-35、Q16K)

10

20

30

40

50

ー L 1 0 リンカーのためのアミノ酸配列：

MEWSWVFLFFLSVT TGVHSRSCIDTIPKSRCTAFKCKHSM
KYRLSFCRKTCGTCGGGGSGGGGS／／（配列番号 6 5）をコードする
コード配列

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTTCTTCTGTCAGTAA
CGACTGGTGTCCACTCCCGCAGCTGCATCGACACCATCCC
CAAGAGCGCGCTGCACCGCCTTCAAGTGCAGCAGCATG
AAGTACCGCGCTGAGCTTCTTGCCGCAAGACCTGCGGCACCT
GCGGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGC／／（配列番号 6
4）を含む DNA 断片を得た。

10

鋳型ならびに以下のオリゴ：

5' - GGA GGA GGA AGC GAC ATC CAG ATG ACC
CAG TC - 3'（配列番号 7 2）；および

5' - CAT CTC GAG CGG CCG CTC AAC - 3'（配列番号 7
3）を用いた。

N 末端シグナルペプチド：

MEWSWVFLFFLSVT TGVHSRSCIDTIPKSRCTAFKCKHSM
KYRLSFCRKTCGTCGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLASV
DRVITICRASQGI RNDLGWYQQKPKAPKRLIYAASSLQS
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPL
TFGGGTKEVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC／／
（配列番号 7 5）

20

を有する N 末端 VH 2 1 SP - ShK [1 - 3 5、Q 1 6 K] - L 1 0 - aK L H 1 2 0
． 6 軽鎖（LC）のためのアミノ酸配列をコードするコード配列

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTTCTTCTGTCAGTAA
CGACTGGTGTCCACTCCCGCAGCTGCATCGACACCATCCC
CAAGAGCGCGCTGCACCGCCTTCAAGTGCAGCAGCATG
AAGTACCGCGCTGAGCTTCTTGCCGCAAGACCTGCGGCACCT
GCGGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGC
GATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCCTGTCATCTGTAGGA
GACAGAGTCAACCATCACTTGCCTGGGCAAGTCAAGGGCATTA
GAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGGAAAGC
CCCTAAACGCGCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTTCGAAAGT
GGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAG
AATTCACCTCTCACAAATCAGCAGCCTGCAAGCCTGAAGATTT
TGCAACTTTATTA CTGTCTACAGCATATAATAGTTTACCCGCTC
ACTTTTCGGCGGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAACGAAC TG
TGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA
GCAGTTTGAAATCTGGAACTGCCCTCTGTTGTGTGTGCCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCAAGAGAGGCCAAAGTACAGTTGGAAGG
TGGATAACGCCCTCCAAATCGGGTAACCTCCCAAGGAGAGTGT
CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCCCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACA
AAGTCTACGCCCTGCGAAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT TGA／／（
配列番号 7 4）を含むクローン化 PCR 断片を生成した。

30

40

【0 4 4 6】

コード配列（配列番号 6 4）を含む DNA 断片）およびコード配列（配列番号 7 4）を

50

含むaK L H 1 2 0. 6 軽鎖 L C 断片の両 P C R 断片をゲル上に流し、適切なサイズのバンドにアガロースプラグ用の穴を開けた。アガロースプラグを単一の新規 P C R 反応に置き、最も外側のプライマー（配列番号 6 2）および（配列番号 7 3）を用いて断片と一緒に縫い合わせた。生成した P C R 断片を X b a I および N o t I を用いて切断し、Q i a g e n の P C R クリーンアップキットでクリーンした。

【0447】

同時に、p T T 1 4 ベクター（C M V プロモーター、P o l y A t a i l およびピュロマイシン耐性遺伝子を含む A m g e n ベクター）も X b a I および N o t I により切断して、ゲル精製した。精製した挿入物を大型ベクター断片と結紮して、O n e S h o t T o p 1 0 細菌に形質転換した。形質転換細菌コロニーから D N A を単離し、X b a I および N o t I 制限酵素による消化に供して、1 % アガロースゲル上で分解した。予期したパターンに至る D N A を配列決定用に提出した。最終構築物 p T T 1 4 - N 末端 S h K [1 - 3 5 Q 1 6 K] - L 1 0 - a K L H 1 2 0. 6 - L C はシグナルペプチド - S h K [1 - 3 5、Q 1 6 K] - L 1 0 - a K L H 1 2 0. 6 - L C 融合ポリペプチド配列（すなわち、配列番号 7 5）をコードする。

【0448】

a D N P 3 A 4 (W 1 0 1 F) I g G 2 - S h k [1 - 3 5] の哺乳類発現。

プラスミド p T T 5 - a D N P 3 A 4 (W 1 0 1 F) I g G 2 - S h k [1 - 3 5 Q 1 6 K] の作製：

K v 1. 3 阻害剤毒素ペプチドアナログ S h K [1 - 3 5、Q 1 6 K] （配列番号 7 6）の単量体にインフレイム融合させたヒト抗 2, 4 - ジニトロフェニル（a D N P）抗体の重鎖をコードする D N A 配列を標準的なクローニング技術を用いて構築した。以下のアミノ酸配列：

M D M R V P A Q L L G L L L L W L R G A R C Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
R L S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K
Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
Y N F N Y G M D V W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E
S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R
K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C
V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R
V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G
Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W
E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G / / （配列番号 7 7）を有する抗

D N P 3 A 4 (W 1 0 1 F) I g G 2 重鎖の一部（p D C 3 2 4 : a D N P 3 A 4 H C (W 1 0 1 F) および I g G 2 F c - S h k [1 - 3 5、Q 1 6 K] の一部に p T T 5 ベクターを結紮する 3 つの方法によりプラスミド p T T 5 - a D N P 3 A 4 (W 1 0 1 F) I g G 2 - S h k [1 - 3 5、Q 1 6 K] を生成した。複数のクローニング部位を放出する S a l I / N o t I により p T T 5 ベクターを切断した。次いでベクターを C a l f

I n t e s t i n e P h o s p h a t a s e (C I P) で処理して背景を減らした。第一挿入物は p D C 3 2 4 由来であった：a D N P 3 A 4 H C (W 1 0 1 F) を S a l I / S t u I で切断することにより、アミノ酸配列

M D M R V P A Q L L G L L L L W L R G A R C Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
R L S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K
Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
Y N F N Y G M D V W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E
S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R
K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C

V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R
V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G / / (配列番号 79) をコード
するコード配列

A T G G A C A T G A G G G T G C C C G C T C A G C T C C T G G G G C T C C T G C
T G C T G T G G C T G A G A G G T G C G C G C T G T C A G G T G C A G C T G G T
G G A G T C T G G G G A G G C G T G G T C C A G C C T G G G A G G T C C C T G
A G A C T C T C C T G T G C A G C G T C T G G A T T C A C C T T C A G T A G C T
A T G G C A T G C A C T G G G T C C G C C A G G C T C C A G G C A A G G G G C T
G G A G T G G G T G G C A G T T A T A T G G T A T G A T G G A A G T A A T A A A
T A C T A T G C A G A C T C C G T G A A G G G C C G A T T C A C T A T C T C C A
G A G A C A A T T C C A A G A A C A C G C T G T A T C T G C A A A T G A A C A G
C C T G A G A G C C G A G G A C A C G G C T G T G T A T T A C T G T G C G A G G
T A T A A C T T C A A C T A C G G T A T G G A C G T C T G G G G C C A A G G G A
C C A C G G T C A C C G T C T C T A G T G C C T C C A C C A A G G G C C C A T C
G G T C T T C C C C C T G G C G C C C T G C T C C A G G A G C A C C T C C G A G
A G C A C A G C G G C C C T G G G C T G C C T G G T C A A G G A C T A C T T C C
C C G A A C C G G T G A C G G T G T C G T G G A A C T C A G G C G C T C T G A C
C A G C G G C G T G C A C A C C T T C C C A G C T G T C C T A C A G T C C T C A
G G A C T C T A C T C C C T C A G C A G C G T G G T G A C C G T G C C C T C C A
G C A A C T T C G G C A C C C A G A C C T A C A C C T G C A A C G T A G A T C A
C A A G C C C A G C A A C A C C A A G G T G G A C A A G A C A G T T G A G C G C
A A A T G T T G T G T C G A G T G C C C A C C G T G C C C A G C A C C A C C T G
T G G C A G G A C C G T C A G T C T T C C T C T T C C C C C C A A A A C C C A A
G G A C A C C C T C A T G A T C T C C C G G A C C C C T G A G G T C A C G T G C
G T G G T G G T G G A C G T G A G C C A C G A A G A C C C C G A G G T C C A G T
T C A A C T G G T A C G T G G A C G G C G T G G A G G T G C A T A A T G C C A A
G A C A A A G C C A C G G G A G G A G C A G T T C A A C A G C A C G T T C C G T
G T G G T C A G C G T C C T C A C C G T T G T G C A C C A G G A C T G G C T G A
A C G G C A A G G A G T A C A A G T G C A A G G T C T C C A A C A A A G G C / /
(配列番号 78) を含む DNA 断片を得た。

第二挿入物を S t u I / N o t I を用いて消化し、以下の切断された I g G 2 F c -
L 10 - S h K (1 - 35、Q 16 K) アミノ酸配列

L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C
L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y
S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
G G G G S G G G G S R S C I D T I P K S R C T A F K C K H S M K Y R L S F C R K
T C G T C / / (配列番号 81) をコードするコード配列

C T C C C A G C C C C C A T C G A G A A A A C C A T C T C C A A A A C C A A A G
G G C A G C C C C G A G A A C C A C A G G T G T A C A C C C T G C C C C C A T C
C C G G G A G G A G A T G A C C A A G A A C C A G G T C A G C C T G A C C T G C
C T G G T C A A A G G C T T C T A C C C C A G C G A C A T C G C C G T G G A G T
G G G A G A G C A A T G G G C A G C C G G A G A A C A A C T A C A A G A C C A C
A C C T C C C A T G C T G G A C T C C G A C G G C T C C T T C T T C C T C T A C
A G C A A G C T C A C C G T G G A C A A G A G C A G G T G G C A G C A G G G G A
A C G T C T T C T C A T G C T C C G T G A T G C A T G A G G C T C T G C A C A A
C C A C T A C A C G C A G A A G A G C C T C T C C C T G T C T C C G G G T A A A
G G A G G A G G A G G A T C C G G A G G A G G A G G A A G C C G C A G C T G C A
T C G A C A C C A T C C C C A A G A G C C G C T G C A C C G C C T T C A A G T G
C A A G C A C A G C A T G A A G T A C C G C C T G A G C T T C T G C C G C A A G
A C C T G C G G C A C C T G C T A A T G A / / (配列番号 80) を含有した。

【0449】

ベクターおよび挿入断片をゲル精製し、QiagenのGel Purificationキットでクリーンアップした。精製した挿入物を大型ベクター断片と結紮して、One Shot Top10細菌に形質転換した。形質転換細菌コロニーからDNAを単離し、SalI/NotI制限酵素による消化に供して、1%アガロースゲル上で分解した。予期したパターンに至るDNAを配列決定用に提出した。上記配列と100%適合したクローンを大規模プラスミド精製用を選択した。最終pTT5-aDNP3A4(W101F)IgG2-Shk[1-35、Q16K]構築物は以下のアミノ酸配列：

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCCVQLVESGGGVVQPGRSL
RLSCAASGFTTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSK
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
YNFNYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSLVVTVPS SNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ER
KCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVS VLT TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
V FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSRSCID
TIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRKTCGTC// (配列番号82)
を有するaDNP3A4(W101F)IgG2 HC-L10-Shk[1-35、Q
16K]をコードした。

【0450】

抗DNP 3A4抗体軽鎖の哺乳類発現。DNPモノクローナル抗体3A4を発現するXenomouse(商標)ハイブリドーマを供給源として用い、総RNAを単離した。多重遺伝子特異的プライマーで一段階RT-PCRを行い、可変領域生成物を得た。この生成物を、順行プライマーを5' BssHII制限部位5'-TTT TTT TTG
CGC GCT GTG ACA TCC AGA TGA CCC AGT C-3
' (配列番号83)に追加して、逆行プライマーを3' BsiWI制限部位5'-AAA
AAA CGT ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CC
-3' (配列番号84)に追加して再増幅した。生成したPCR生成物をQiagenのPCRクリーンアップによりクリーンし、BssHIIおよびBsiWI制限酵素で消化し、Qiagenヌクレオチド除去によりクリーンし、5' VK1/O12シグナルペプチドおよび3' ヒトκ定常領域を含む哺乳類発現ベクターpTT5中に結紮した。生成した抗DNP 3A4抗体軽鎖のアミノ酸配列は下記である：

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCDIQMTQSPSSVSASVGD
VTITCRASQGISRRLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV
PSRFGSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCQQANSFPFTF
GPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
LTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC// (配
列番号109)。

【0451】

1価Fc毒素ペプチドアナログおよびAb HCまたはAb LC毒素ペプチドアナログ融合物の単離方法。タンパク質Aセファロース(GE Healthcare)を用いたFc領域の親和性高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)捕獲、続いて2価陽イオンを含まないダルベッコのPBS(Invitrogen)によるカラム洗浄および100mM酢酸(pH3.5)を2.5cm/分で流した溶出工程により条件培地の初回精製を行った。タンパク質を含む留分をプールし、10N NaOHを用いてpHを

5.0に調整し、5容量の水でさらに希釈した。物質を0.45 μ m酢酸セルロースフィルター(Corning)を介してろ過し、陽イオン交換FPLC(SP Sepharose High Performance; GE Healthcare)によりさらに精製した。試料を100%緩衝液A(50mM酢酸、pH5.0)で平衡させたカラム上に負荷し、勾配0~80%緩衝液B(50mM酢酸、1M NaCl、pH5.0)30カラム容量、流速1.5cm/分で溶出した。ピークを含む1価種をプールして、10mM酢酸ナトリウム、9%ショ糖(pH5.0)中に製剤化した。免疫グロブリン毒素ペプチドアナログ融合タンパク質の精製例を図3A~C、図4A~C、図5A~C、図6A~Cおよび図24~35に示す。

【0452】

1価Ab HCならびに1価、2価および3価Ab LC毒素ペプチドアナログ融合物の単離方法。タンパク質Aセファロース(GE Healthcare)を用いたFc領域の親和性高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)捕獲、続いて2価陽イオンを含まないダルベッコのPBS(Invitrogen)によるカラム洗浄および100mM酢酸(pH3.5)を2.5cm/分で流した溶出工程により条件培地の初回精製を行った。タンパク質を含む留分をプールし、10N NaOHを用いてpHを5.0に調整し、5容量の水でさらに希釈した。物質を0.45 μ m酢酸セルロースフィルター(Corning)を介してろ過し、陽イオン交換FPLC(SP Sepharose High Performance; GE Healthcare)によりさらに精製した。試料を100%緩衝液A(50mM酢酸、pH5.0)で平衡させたカラム上に負荷し、勾配0~80%緩衝液B(50mM酢酸、1M NaCl、pH5.0)30カラム容量、流速1.5cm/分で溶出した。ピークを含む標的種をプールして、10mM酢酸ナトリウム、9%ショ糖(pH5.0)中に製剤化した。4~12%または4~20%SDS-PAGEトリス-グリシンゲル(Invitrogen)上でQuickBlue(Boston Biologicals)で着色した0.5 μ g、2 μ g、および10 μ gタンパク質の還元および非還元(+ヨードアセトアミド)分析を行った。Biosep SEC-S3000カラム(Phenomenex)、および50mMリン酸ナトリウム、250mM NaCl(pH6.9)の無勾配溶出を18分かけて用いて分析的SECを行った。免疫グロブリン毒素ペプチドアナログ融合タンパク質の精製例を図24~26A~B、27~29A~B、30~32A~B、および33~35に示す。

【実施例5】

【0453】

本発明の1価Fc/Fc-L10-ShK[2-35]ヘテロ二量体ならびに1価もしくは2価Fc/Fc-ShK(1-35 Q16K)(IgG2)ヘテロ二量体および免疫グロブリン融合タンパク質の薬物動態/薬力学評価

薬理学的に活性なポリペプチドのための免疫グロブリン担体として用いられる本発明の抗原結合タンパク質の実施形態は、良好な薬物動態および薬力学特性を提供することが示された。1価もしくは2価Fc-L10-ShK[2-35]、1価もしくは2価Fc-L10-ShK[1-35]、1価もしくは2価Fc-L10-ShK(1-35、Q16K)、1価もしくは2価抗KLH HC-ShK(1-35、Q16K)Ab、1価もしくは2価抗KLH Abループ-[Lys16]ShK融合タンパク質、1価Fc-ShK(1-35 Q16K)/aKLH Abヘテロ三量体、ならびに表7Hに列挙する他の例示的な実施形態を、実施例4に記載の手段により発現させ、単離して精製した。表7HのPEG化および非PEG化毒素ペプチド比較物を以下のとおり合成的に調製した。

【0454】

ペプチド合成。N^α-Fmoc、側鎖保護アミノ酸およびH-Cys(Trt)-2Cl- α -Trt樹脂をNovabiochem、Bachem、またはSigma Aldrichから購入した。以下の側鎖保護戦略を用いた：Asp(OtBu)、Arg(Pbf)、Cys(Trt)、Glu(OtBu)、His(Trt)、Lys(N^ε-Boc)、Ser(OtBu)、Thr(OtBu)およびTyr(OtBu)。ShK(R

10

20

30

40

50

SCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTC//配列番号361)、[Lys16]ShK(RSCIDTIPKSRCTAFKCKHSMKYRLSFCRKTCGTC//配列番号76)、または他の毒素ペプチドアナログアミノ酸配列を、H-Cys(Trt)-2Cl-Trt樹脂(0.2mmol、0.32mmol/g負荷)を用いて0.2mmol等価尺度でDIC/HOBtカップリング化学を用いて(SPPSによる)CS Bioペプチド合成機上で段階的に合成した。各カップリングサイクルにおいて、1mmol N^α-Fmoc-アミノ酸をN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)の0.4M 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)2.5mLに溶解した。この溶液に1.0M N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)のDMF溶液1.0mLを添加した。この溶液を窒素通気で15分間攪拌して前活性化させてから、樹脂に添加した。混合物を2時間攪拌した。樹脂をろ過し、DMFで3回、ジクロロメタン(DCM)で2回、およびDMFで3回洗浄した。Fmoc脱保護を20%ピペリジンのDMF溶液(5mL、2×15分)による処置で実行した。上記のFmoc-アミノ酸カップリングおよびFmoc除去工程を反復して最初の23残基を単結合させた。Fmoc除去に進む前にカップリング工程を2回実施することにより残りの残基を二重結合させた。

10

【0455】

次いで合成後に樹脂を抜き、DCM、DMF、DCMで連続洗浄してから、真空乾燥した。ペプチド樹脂を250mLプラスチック丸底フラスコに移した。ペプチドを脱保護してトリイソプロピルシラン(1.5mL)、3,6-ジオキサ-1,8-オクタンジチオール(DODT、1.5mL)、水(1.5mL)、トリフルオロ酢酸(TFA、20mL)および攪拌棒での処置により樹脂から放し、混合物を3時間攪拌した。150mL焼結ガラス漏斗を介して混合物を250mLプラスチック丸底フラスコに入れてろ過した。150mL焼結ガラス漏斗を介して混合物を250mLプラスチック丸底フラスコに入れてろ過し、ろ液を真空濃縮した。冷却ジエチルエーテルを添加して粗ペプチドを沈殿させ、遠心分離により収集し、真空乾燥した。

20

【0456】

ペプチド折畳み。乾燥粗線状ペプチド(約600mg)、例えば[Lys16]ShKペプチド(配列番号76)または[Lys16]ShK-Ala([Lys16、Ala36]-ShK;配列番号362としても知られている)ペプチドを、16mL酢酸、64mL水、および40mLアセトニトリルに溶解した。混合物を迅速に15分間攪拌して完全に溶解した。水1700mLおよび大型攪拌棒を含む2Lプラスチックボトルにペプチド溶液を添加した。このように希釈した溶液に濃縮水酸化アンモニウム20mLを添加し、溶液pHを9.5に増大した。pHは、少量の酢酸または必要に応じてNH₄OHで調整した。溶液を80rpmで一晩攪拌し、LC-MSによりモニタリングした。折畳みは通常、24~48時間内に完了すると判断して、酢酸およびTFA(pH=2.5)の添加により溶液をクエンチした。水溶液をろ過した(0.45μmセルロース膜)。

30

【0457】

逆相HPLC精製。逆相高速液体クロマトグラフィーを、分析用(C18、5μm、0.46cm×25cm)または調製用(C18、10μm、2.2cm×25cm)カラム上で実施した。緩衝液A中の緩衝液B(A=0.1%水性TFA;B=0.09%TFA含有90%水性ACN)の直線勾配は、典型的には、分析では5~95%を35分かけて流速1mL/分で、調製用分離では5~65%を90分かけて流速20mL/分で用いてクロマトグラフ分離を成し遂げた。分析および調製用HPLC留分は、組み合わせて凍結乾燥したESSMSおよびフォトダイオードアレイ(PDA)HPLCを特徴とした。

40

【0458】

質量分析。イオンスプレー大気圧イオン化供給源付きの単一の4極子質量分析計上で質量スペクトルを得た。フューズドシリカキャピラリー界面(50μm i.d.)を介してイオン化供給源に直接結合した移動溶媒(10μL/分;30:50:20ACN/MeOH、0.05%TFA含有)内に試料(25μL)を注入した。試料液滴を陽電位5

50

kVでイオン化し、界面プレートを通して、続いてオリフィス（直径100～120 μ m）、電位60Vを通して分析器に入れた。完全なスキャン質量スペクトルをサイズ0.1Daのスキャン工程により400～2200Da質量範囲で得た。分子質量は観察されたm/z値から引き出した。

【0459】

PEG化、精製および分析。ペプチド、例えば、[Lys16]ShK（配列番号76）または[Lys16]ShK-Ala（配列番号362）をN末端の還元アルキル化により、活性化線状または分岐PEGを用いて選択的にPEG化した。接合を2mg/mLの50mM NaH₂PO₄（pH4.5）反応緩衝液（20mMシアノヒドリドホウ酸ナトリウムおよび2モル過剰の20kDaモノメトキシーPEG-アルデヒド（NOF, Japan）含有）で実施した。結合反応物を室温で約5時間攪拌し、それらの進行度をRP-HPLCによりモニタリングした。反応完了物を20mM NaOAc（pH4）の4倍希釈液によりクエンチし、4℃に冷却した。次いで、直線勾配の0～1M NaClの20mM NaOAc（pH4.0）溶液で溶出したSPセファロースHPカラム（GE Healthcare, Piscataway, NJ）を用いて、PEG-ペプチドを40℃でクロマトグラフ的に精製した。溶出したピーク留分をSDS-PAGEおよびRP-HPLCにより分析し、プールを純度97%超により決定した。観察された本質的な汚染物質はジ-PEG化毒素ペプチドアナログであった。選択されたプールを3kDa MWC膜に対する遠心ろ過により2～5mg/mLに濃縮し、10mM NaOAc（pH4）、5%ソルビトール含有）中に透析した。次いで透析したプールを0.2ミクロンフィルターにより滅菌ろ過し、SDS-PAGEにより純度97%超と決定した（データは示していない）。逆相HPLCをAgilent 1100モデルHPLC上で、1mL/分で流れるZorbax（商標）5 μ m 300SB-C8 4.6×50mmカラム（Agilent）の0.1%TFA/H₂O溶液で実施し、カラム温度を40℃に維持した。PEG-ペプチド試料（20 μ g）を注入し、波長215nmでモニタリング中に直線勾配6～60%で溶出した。

【0460】

融合タンパク質。一般に、図1Aおよび図1Bはそれぞれ1価および2価Fc毒素ペプチド（または毒素ペプチドアナログ）融合タンパク質（または「ペプチボディ」）の図解を示す。2価Fc-ShK分子は、2本のFc-ShK鎖を含むホモ二量体である。1価Fc-ShK毒素ペプチド（または毒素ペプチドアナログ）分子は、Fc鎖1本とFc-ShK（またはアナログ）鎖1本を含むヘテロ二量体である。1価Fc-ShK分子は単一のShKペプチド/二量体のみを含むため、1価とみなされる。構築物または鎖はFc-（毒素ペプチドアナログ）と呼ばれ、N末端Fc領域および任意選択的にN末端からC末端配向が：Fc-リンカー毒素ペプチドまたは毒素ペプチドアナログとなるように毒素ペプチドまたは毒素ペプチドアナログに共有結合する可動性リンカー配列（例えば、L10ペプチジルリンカーGGGGSGGGGS；配列番号153）を含む。

【0461】

Sullivan et al.、WO2008/088422A2号の実施例1および2には、哺乳類細胞から発現した2価Fc-ShKペプチボディ、Fc-L10-ShK（1-35）およびFc-L10-ShK（2-35）の活性について記載されている。WO2008/088422A2号の実施例1には、発現中に少量の最終生成物として形成される1価Fc-L10-ShK（1-35）分子の単離についても記載されている。2価Fc-L10-ShK（1-35）およびFc-L10-ShK（2-35）結合体はKv1.3およびヒト全血中のT細胞サイトカイン分泌を強力にブロックする（表7Hを参照されたい）。完全細胞パッチクランプ電気生理学的手法により、2価Fc-L10-ShK（1-35）分子のKv1.3活性は、ShKのArg1を欠く2価Fc-L10-ShK（2-35）分子と比較して約8倍高い。天然ShKのN末端PEG結合体（実施例4を参照されたい）と同様に、2価Fc-ShK結合体は両方ともKv1.3対Kv1.1に対してほとんど選択性を示さなかった。したがって、（PEGまたはFc-

リンカーのいずれかを伴う)天然ShK単独のN末端接合はそのKv1.3対Kv1.1選択性を有意に改善しない。ラットにおける薬物動態(PK)試験を2価Fc-L10-ShK(1-35)およびFc-L10-ShK(2-35)ペプチボディ上で実施して、それらのインビボ安定性および半減期を評価する。対照として、PKもCHO由来組換えヒトFc(IgG1)上で実施した。全分子を単回静脈内ボラス投与して送達した。

【0462】

PKアッセイ

ShKに対する抗体。ShK(配列番号361)に対するウサギポリクローナルおよびマウスモノクローナル抗体を動物のFc-ShKペプチボディ結合体による免疫化により生成した。抗ShK特異的ポリクローナル抗体を抗血清から親和性精製して結合体のShK部分に特異的な抗体のみを単離した。融合およびスクリーニング後、ShKに特異的なハイブリドーマを選択し、単離した。マウス抗ShK特異的モノクローナル抗体をクローン条件培地から精製した。ELISA分析により、精製した抗ShKポリクローナルおよびモノクローナル抗体はShKペプチド単独のみに反応し、Fcとは交差反応しなかった。

10

【0463】

ラットおよびサルにおける20kDa-PEG-ShK(配列番号363)および20kDa-PEG-[Lys16]ShK(配列番号364)ペプチド結合体の薬物動態(PK)試験。動物に単回皮下用量を送達し、注射後各時点で血清を収集した。2~3匹の動物/用量群がラットにおける試験対象となり、試験過程の各時点で血液および血清を採取した。本明細書に記載の試験において雄Sprague-Dawley(SD)ラット(約0.3kg)および雄カニクイザル(約4kg)を用いた(n=3動物/用量群)。我々のマウス薬物動態試験において用量および時点当たり約5匹の雄CD-1マウスを用いた。酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)分析時まで血清試料を-80℃で凍結保存した。

20

【0464】

PEG-ShKおよびPEG-[Lys16]ShKの血清レベルを検出するためのELISAプロトコルの簡単な説明を以下に提示する：

【0465】

(1)プロトコル1の下記(a)~(g)は、PEG-ShKおよびPEG-[Lys16]ShK、ならびにShKおよび[Lys16]ShKペプチド単独を検出する：

30

(a)ストレプトアビジンマイクロタイタープレートに250ng/mLビオチン化抗ShKマウスモノクローナル抗体(mAb2.10、Amgen)のIブロック緩衝液[1リットルにつき：1000mL1×PBS、CaCl₂、MgCl₂非含有、5mLのTween 20(Thermo Scientific)、2gのIブロック試薬(Tropix)]で4℃でコーティングし、一晩攪拌せずにインキュベートした。

(b)プレートをKPL洗浄緩衝液(Kirkegaard & Perry Laboratories)で3回洗浄した。

(c)プールした血清100%を有する標準(STD)、品質管理(QC)および試料希釈を調製してから、Iブロック緩衝液で5分の1に希釈した(前処置)。前処置したSTD、QCおよび試料を洗浄したプレートに添加し、室温で2時間インキュベートした。

40

(STD、QCの連続希釈をプールした血清100%内で調製した。希釈する必要のある試料はプールした血清100%でも調製した。std、QCおよび試料の両方に対して前処置を行い、基質効果を最小化した。)

(d)プレートをKPL洗浄緩衝液で3回洗浄した。

(e)HRP標識ウサギ抗ShKポリクローナルAb、250ng/mLのIブロック緩衝液を添加し、プレートを室温で1時間攪拌しながらインキュベートした。

(f)プレートをKPL洗浄緩衝液で再び3回洗浄し、Femto[Thermo Scientific]基質を添加した。

(g)プレートをLmax II 384(Molecular Devices)照

50

度計で読み込んだ。

【0466】

ShKおよび[Lys16] ShKのFc結合体、Ig結合体、またはAb結合体の薬物動態(PK)試験を雄SDラットにおいて実施した。動物に単回皮下用量を送達し、注射後各時点で血清を収集した。1用量群当たり3匹の動物を用い、試験過程の各時点で血液および血清を採取した。血清試料を酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)分析時まで -80°C で凍結保存した。ShKおよび[Lys16] ShKのFc結合体、Ig結合体、またはAb結合体の血清レベルを検出するためのELISAプロトコルの簡単な説明を以下に提示する。下記のプロトコル2は、分子のヒトIg、FcもしくはAb部分の両方、ならびにShKペプチド部分を検出する。下記のプロトコル3は、ヒトFc領域単独を検出する初期アッセイであり、齧歯類の薬物動態試験におけるFc-ShKペプチボディの血清レベルの初期評価のために用いた。これらのELISAプロトコルの簡単な説明を提示する：

【0467】

(2) プロトコル2の下記(a)～(g)は、分子のヒトIg、FcもしくはAb部分の両方、ならびにShKペプチド部分を検出する：

(a) ストレプトアビジンマイクロタイタープレートを 250 ng/mL ビオチン化抗ShKマウスモノクローナル抗体(mab2.10、Amgen)のIブロック緩衝液[1リットルにつき： 1000 mL の $1\times\text{PBS}$ 、 CaCl_2 、 MgCl_2 非含有、 5 mL のTween 20(Thermo Scientific)で、 2 g のIブロック試薬(Tropix)]で 4°C で、一晚攪拌せずにコーティングした；

(b) プレートをKPL洗浄緩衝液(Kirkegaard & Perry Laboratories)で3回洗浄した

(c) プールした血清100%を有する標準(STD)、品質管理(QC)および試料希釈を調製してから、Iブロック緩衝液で5分の1に希釈した(前処置)。前処置したSTD、QCおよび試料を洗浄したプレートに添加した。インキュベーションは室温で2時間行った。(STD、QCの連続希釈をプールした血清100%内で調製した。希釈する必要のある試料はプールした血清100%でも調製した。std、QCおよび試料の両方に対して前処置を行い、基質効果を最小化した。)；

(d) プレートをKPL洗浄緩衝液で3回洗浄した；

(e) HRP標識Ab35(ヒトIgG Fcに対して)、 150 ng/mL のIブロック緩衝液を添加し、プレートを室温で1時間攪拌しながらインキュベートした。

(f) プレートをKPL洗浄緩衝液で3回洗浄し、Femto[Thermo Scientific]基質を添加した；

(g) プレートをLmax II 384[Molecular Devices]照度計で読み込んだ。

【0468】

(3) プロトコル3の下記(a)～(h)は、ヒトFc領域単独を検出する初期アッセイであり、齧歯類の薬物動態試験におけるFc-ShKペプチボディの血清レベルの初期評価のために用いた。

(a) $1\times$ コーティング緩衝液で希釈したCostar3590 96ウェルEIA/RIAプレートを 0.1 mL/ウェル の $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ ヤギ抗HuFc、Fab2、(Sigma I-3391)($10\times$ コーティング緩衝液： $1.59\text{ g Na}_2\text{CO}_3$ 、 2.93 g NaHCO_3 の H_2O 溶液 100 mL)でコーティングした。プレートを密封して 4°C で一晩インキュベートした；

(b) プレートをPBST($\text{PBS}+0.1\%\text{ Tween-20}$)で3回洗浄し、 0.3 mL のblotto(PBS 、 $0.1\%\text{ Tween-20}$ 、 5% 脱脂粉乳)を各ウェルへ添加してブロックし、室温(RT)で攪拌しながら1時間インキュベートした；

(c) プレートをKP洗浄溶液(Cat#50-63-00, KPL, Gaithersburg, MD)で洗浄した；

(d) 希釈した血清試料および対照／標準の希釈緩衝液 (PBS、0.1% BSA、0.1% Tween-20) + ラット血清で、必要な場合、最終ラット血清10%とし、0.1 mL 試料を各ウェルへ添加した。プレートを室温で攪拌しながら、1時間インキュベートした；

(e) プレートをKP洗浄溶液 (Cat # 50-63-00, KPL, Gaithersburg, MD) で洗浄した；

(f) HRP 標識二次抗体 (Pierce # 31416-HRP ヤギ α -Hu IgG Fc) を PBST で 1:5000 希釈してから 100 μ L / ウェルを追加し、RT で攪拌しながら、1時間インキュベートした；

(g) プレートをKP洗浄溶液 (Cat # 50-63-00, KPL, Gaithersburg, MD) で洗浄して ABTS 基質 (ABTS Microwell Substrate 1-Component, Cat # 50-66-018, KPL) 100 μ L / ウェルを添加した；

(h) 基質を添加して攪拌した後、適切な時点で、SpectraMax 340 [Molecular Devices] プレート読取り器でプレートを読み込んだ。

【0469】

哺乳類の2価分子発現中、元の1価Fc-L10-ShK (1-35) 分子を少量の最終生成物として単離した一方、本明細書の実施例4では1価Fc-L10-ShK [2-35] ヘテロ二量体のクローニングおよび哺乳類発現についても記載する。簡単に述べると、組換え1価Fc-L10-ShK [2-35] を産生するため、ヒトFc (IgG1) 鎖およびFc-L10-ShK [2-35] 鎖である2つの組換えポリペプチドを同じ細胞内で共発現させる (ヒトIgG1 Fc 領域とも)。これらの条件下において、Fc / Fc ホモ二量体、Fc-L10-ShK (2-35) / Fc-L10-ShK (2-35) ホモ二量体およびFc / Fc-L10-ShK (2-35) ヘテロ二量体を含む3つの異なる二量体を形成することが可能である。発現条件を至適化することにより、1価Fc / Fc-L10-ShK (2-35) ヘテロ二量体 (単に1価Fc-L10-ShK (2-35) とも呼ばれる) を効果的に産生し、容易に精製して均一とした (本明細書の実施例4)。1価Fc-L10-ShK (2-35) 分子のヒト全血液からのIL-2 分泌ブロック IC50 は 2.1 nM (表7H) であった。1価Fc-ShK / Fc ヘテロ二量体のインビボ半減期は長く、2価ホモ二量体 ShK-Fc / ShK-Fc (図10) および Fc-ShK / Fc-ShK よりも有意に高い曝露を示した。この構築物の効能はPEG-ShK 結合体よりも約10倍低く、天然ShK 結合体の Kv1.3 / Kv1.1 選択性は低かったため、我々はさらなる1価ペプチドボディを開発し、形成されたShK 毒素ペプチドアナログ結合体の Kv1.3 対 Kv1.1 選択性は改善されていることを同定した。以下の実施例は、選択性およびインビボ薬理学の改善された1価ペプチドボディの詳細を提示する。これらの試験結果により、ラットにおいて1価ShK 毒素ペプチドアナログ分子は同分子の2価形態と比較して高い血清レベルおよび曝露を示しつつ、元の2価ペプチドボディにおいて観察された遅い排出速度を保持することが示された。

【0470】

1価Fc / Fc-ShK (1-35 Q16K) ヘテロ二量体 (IgG2)。ShK [Lys16] 毒素ペプチドアナログ (配列番号76) はニューロンの Kv1.1 に対する有意な Kv1.3 選択性を示す (表7H)。この毒素ペプチドアナログのインビボ安定性を高めるため、N末端からC末端で：ヒトFc (IgG2) -L10リンカー-[Lys16] ShK 分子を含む1価Fc 融合構築物を我々は産生し、これはヒトFc (IgG2) 鎖単独と共発現して1価ヘテロ二量体を産生した (実施例4を参照されたい)。この1価構築物の図解を図1Aに提示する。1価Fc / Fc-L10-ShK (1-35 Q16K) ヘテロ二量体 [1価Fc / Fc-ShK (1-35、Q16K) とも呼ばれる] は、全血中のT細胞炎症を強力にブロックし、IL-2 分泌を0.16 nMのIC50で抑制した (表7H)。分子の Kv1.3 対 Kv1.1 選択性を評価する試験により、1価Fc-L10-ShK (1-35 Q16K) 結合体の Kv1.3 選択性は [Lys16]

ShK ペプチド単独よりも有意に優れていることが予期せず明らかとなった。[Lys 16] ShK (配列番号 76) ペプチド単独の Kv1.3 対 Kv1.1 選択性は約 18 倍であることが示された一方 (表 7H)、1 価 Fc/Fc-L10-ShK (1-35 Q16K) ヘテロ二量体の Kv1.3 対 Kv1.1 ブロックは約 1225 倍活動的であった。したがって、[Lys 16] ShK ペプチドは結合時、選択性の高まった独特な薬理学を示す。Na-20kDa-PEG-[Lys 16] ShK 結合体 (配列番号 364) もペプチド単独と比較して高まった Kv1.3 選択性を示したため (表 7H)、統合データにより、[Lys 16]-ShK (配列番号 76) ペプチドは N 末端で PEG または Fc-リンカーのいずれかと融合時に、Kv1.3 対 Kv1.1 選択性の改善された異なる薬理学を示すことが示唆される。

10

【0471】

本発明の分子の比較に基づき、分子のインビボ薬物動態および安定性を評価するため、ラットにおいて単回投与 PK 試験を実施した。単回 6 mg/kg 皮下投与後、(単量体の配列番号 1 および 26 の) 1 価 Fc/Fc-L10-ShK (1-35, Q16K) ヘテロ二量体のインビボ半減期は長いことが示された (図 7)。分子 (「プロトコール 2」) の血清レベルを測定するために使用したサンドイッチ ELISA は、ヒト Fc 領域に特異的な抗体と、[Lys 16] ShK (配列番号 76) を認識する抗体の 2 つの抗体の結合を必要とするため、本明細書のデータにより、結合体の半減期は長く、かつ Fc-L10-ShK (1-35 Q16K) 融合タンパク質 (図 7、白四角; 下表 7I) としてインビボでインタクトのまま残ることが示される。1 価 Fc/Fc-L10-ShK (1-35 Q16K) 分子は長い半減期 (約 56 時間) を示し、20~30 分であることが報告されている (C. Beeton et al., PNAS 98:13942 (2001)) ShK (配列番号 361) ペプチド単独の半減期よりも約 112 倍長かった。

20

【0472】

2 価 Fc-ShK (1-35 Q16K) ホモ二量体 (IgG2)。2 価 Fc-ShK (1-35, Q16K) ホモ二量体は、N 末端から C 末端で: ヒト Fc (IgG2)-L10 リンカー-[Lys 16] ShK (配列番号 26) を含む。この 2 価構築物の図解を図 1B に提示する。本明細書の実施例 4 に記載のように分子 (配列番号 26 のホモ二量体) をクローン化し、発現させて、精製した。精製した分子の炎症のヒト全血液アッセイにおける活性を試験し、IL-2 分泌ブロック IC50 は 1.850 nM であることが見出された (表 7H)。この 2 価形態の活性は、この同一アッセイにおいて 0.16 nM の IC50 を有した 1 価形態 (上記) より約 12 倍低かった。2 価形態の活性が 1 価形態の活性より低い理由は不明である。末端に 2 つの陽電荷 [Lys 16] ShK (配列番号 76) ペプチドを含む 2 価分子はより不安定である、および/または Kv1.3 チャネル結合にある程度干渉する可能性がある。

30

【0473】

1 価および 2 価 aKLH-HC-ShK (1-35, Q16K) Ab。本発明の 1 価抗 KLH 重鎖 (HC) 融合抗体 (Ab) 構築物の実施形態は、N 末端から C 末端で: ヒト KLH Ab 重鎖-ペプチジルリンカー-[Lys 16] ShK 分子 (配列番号 32) を含み、これはヒト aKLH 重鎖単独 (配列番号 29) およびヒト aKLH 軽鎖 (配列番号 28) と共発現して 1 価 aKLH Ab-[Lys 16] ShK 分子 (配列番号 28; 配列番号 29; 配列番号 28; および配列番号 32 のヘテロ四量体) を形成した。この 1 価構築物の図解を図 1F に提示する。1 価 aKLH-HC-ShK (1-35, Q16K) Ab は全血中の T 細胞炎症を強力にブロックし、IL-2 分泌を 0.274 nM の IC50 で抑制した (表 7H)。分子の Kv1.3 対 Kv1.1 選択性を評価する試験により、1 価 aKLH-HC-ShK (1-35, Q16K) Ab (配列番号 28; 配列番号 29; 配列番号 28; および配列番号 32 のヘテロ四量体) の Kv1.3 選択性は [Lys 16] ShK (配列番号 76) ペプチド単独よりも有意に優れていることが予期せず明らかとなった。この 1 価 Ab-ShK 結合体の Kv1.3 対 Kv1.1 ブロックは約 1458 倍活動的であった (表 7H および図 2A~B)。

40

50

【0474】

分子のインビボ薬物動態および安定性を評価するため、ラットにおいて単回投与PK試験を実施した。単回6mg/kg皮下投与後、1価aK_LH₂HC-S_HK(1-35 Q16K)Ab結合体は長いインビボ半減期を示した(図7、黒丸)。分子(「プロトコール2」)の血清レベルを測定するために使用したサンドイッチELISAは、ヒトIg領域に特異的な抗体と、[Lys16]S_HK(配列番号76)を認識する抗体の2つの抗体の結合を必要とするため、本明細書のデータにより、結合体の半減期は長く、かつ1価aK_LH₂HC-S_HK(1-35 Q16K)Ab融合タンパク質としてインビボでインタクトのまま残ることが示される(図7、図8、および表7J)。2価aK_LH₂HC-S_HK(1-35、Q16K)Ab分子(図1Gにより図解)を同用量の6mg/kg投与して同様に遅い排出速度が示されたが(図8)、1価分子と比較して約37倍低い曝露(AUC_{0-_t}により測定、表7J)が提供された(図8)。強力かつ選択的な1価抗K_LH₂Ab-[Lys16]S_HK分子はラットにおいて非常に遅いクリアランスを示した(C_L/F=10.9mL/h⁻¹kg⁻¹) (表7J)。

【0475】

1価aK_LH₂HC-S_HK(2-35 Q16K)Ab。本発明のこの1価aK_LH₂重鎖(HC)融合抗体(Ab)構築物の実施形態は、N末端からC末端で：ヒト抗K_LH₂Ab重鎖-リンカー-[desArg1、Lys16]S_HK分子(配列番号33)を含み、これはヒトaK_LH₂重鎖(配列番号29)およびヒトaK_LH₂軽鎖(配列番号28)と共発現して1価aK_LH₂Ab-[desArg1、Lys16]S_HK分子を形成した。この1価構築物の図解を図1Fに提示する。1価aK_LH₂HC-S_HK(2-35、Q16K)Ab(配列番号28；配列番号29；配列番号28；および配列番号33のヘテロ四量体)は全血中のT細胞炎症を強力にブロックし、IL-2分泌を0.570nMのIC₅₀で抑制し(表7H)、T細胞カリウムチャネルKv1.3のブロックは、予期せずニューロンのチャネルKv1.1より約1576倍強力であった。

【0476】

1価Fc-S_HK(1-35 Q16K)/aK_LH₂Abヘテロ三量体。本発明の1価Fc-S_HK(1-35、Q16K)/aK_LH₂Abヘテロ三量体またはヘミボディの実施形態は、N末端からC末端で：ヒトFc(IgG2)-L10リンカー-[Lys16]S_HK分子(配列番号26)を含み、これはヒトaK_LH₂重鎖(IgG2)(配列番号29)およびヒトaK_LH₂軽鎖(配列番号28)と共発現した。この1価構築物の図解を図1Eに提示する。1価Fc-S_HK(1-35、Q16K)/aK_LH₂Abヘテロ三量体(配列番号28；配列番号29；配列番号26)はヒト全血中のT細胞炎症を強力にブロックし、IL-2分泌を0.245nMのIC₅₀で抑制した(表7H)。驚いたことに、分子のKv1.3対Kv1.1選択性を評価する試験により1価Fc-S_HK(1-35、Q16K)/aK_LH₂Abヘテロ三量体のKv1.3選択性は[Lys16]S_HKペプチド単独(配列番号76)よりも有意に優れていることが明らかとなった。この1価ヘテロ三量体のKv1.3対Kv1.1ブロックは約1935倍活動的であった(表7H)。

【0477】

我々は、Kv1.3選択的1価Fc-S_HK(1-35、Q16K)/aK_LH₂Abヘテロ三量体またはヘミボディの薬物動態(PK)は評価しなかったが、Fc-S_HK(2-35)/aK_LH₂Abヘテロ三量体である類似のヘミボディのPKプロファイルを評価した。この分子構造図式を図1Eに提示する。この分子はN末端からC末端で：ヒトFc(IgG2)-S_HK(2-35)を含み、これはヒトaK_LH₂重鎖および軽鎖と共発現する。単回2mg/kg皮下投与後、1価Fc-S_HK(2-35)/aK_LH₂Abヘテロ三量体(1価Fc-S_HK/K_LH₂Abヘテロ三量体とも呼ばれる)はラットにおいて長い半減期を示した(図10)。分子(「プロトコール2」)の血清レベルを測定するために使用したサンドイッチELISAは、ヒトIg領域に特異的な抗体と、S_HK(2-35)を認識する抗体の2つの抗体の結合を必要とするため、本明細書のデータ

により、結合体の半減期は長く、かつインビボでインタクトのまま残ることが示される（図10、表7K）。約103kDaの大型1価Fc-ShK（2-35）aKLH Abヘテロ三量体またはヘミボディは、約56kDaの1価Fc/Fc-ShKヘテロ二量体よりも高い曝露および約2倍低いクリアランスを示した（図10、表7K）。約4kDaの極小ShK-L5ペプチドはラットにおいてより迅速に消失し、このクリアランス値は1価Fc-ShK（2-35）/aKLH Abヘテロ三量体（CL/F=22.6 mL h⁻¹ kg⁻¹）高分子より約91倍速かった（CL/F=2052 mL h⁻¹ kg⁻¹、実施例5）。

【0478】

1価および2価抗KLH Abループ-[Lys16] ShK融合タンパク質。本発明の組換え1価および2価抗KLH Abループ-[Lys16] ShK融合タンパク質の実施形態は、実施例4および米国特許第7,442,778B2号に記載されているように構築して、片方（1価）または両方（2価）のHC単量体におけるFcドメインのループ領域に挿入された[Lys16] ShK毒素ペプチドアナログを有する完全抗体を産生した。1価aKLH HC-ループ-ShK（1-35、Q16K）Abには、3本鎖：ヒトaKLH Ab重鎖、ヒトaKLH Ab軽鎖およびヒトaKLH Ab重鎖が含まれ、[Lys16] ShKペプチドは重鎖のFc領域内ループに挿入された。Fcループ内[Lys16] ShKペプチドは、そのN末端およびC末端に結合した可動性リンカー配列を含み、独立した折畳みおよびループからの伸張を可能とする。この分子の図解を図1Nに提示する。アミノ酸組成物および長さの異なるリンカー配列を評価した。1価抗KLH Abループ-[Lys16] ShK融合タンパク質はKv1.3活性の選択的阻害剤であった（Kv1.1に対し、Kv1.3に121倍超選択的；表7Hおよび図2A~B）。1価KLH-Abループ-[Lys16] ShK分子は、ラットにおいて我々が評価したすべての新規毒素結合体のうち最も遅いクリアランスを示した（図7および図9ならびに表7L）。

【0479】

2価aKLH HC-ループ-ShK（1-35、Q16K）Abには、2本鎖：ヒトaKLH Ab軽鎖およびヒトaKLH Ab重鎖が含まれ、[Lys16] ShKペプチドは重鎖のFc領域内ループに挿入された。この分子の図解を図1Mに提示する。この2価分子のインビボ薬物動態および安定性を1価形態と比較するため、各分子の単回6mg/kg皮下用量をラットに送達した。2価aKLH HC-ループ-ShK（1-35、Q16K）Abは、遅い排出速度を示すにも関わらず、同分子の1価形態（1価aKLH HC-ループ-ShK（1-35、Q16K）Ab）よりもラットにおいて曝露が非常に低かった（図9を参照されたい）。AUC₀₋₄により測定した曝露は、2価aKLH HC-ループ-ShK（1-35、Q16K）Ab分子において、1価aKLH HC-ループ-ShK（1-35、Q16K）Ab分子と比較して約161倍低かった（表7L）。したがって、我々の新規1価形態は、同分子の典型的な2価形態と比較して、予期せず非常に優れたインビボ薬物動態プロファイルを示す。

【0480】

1価ShK（1-35、Q16K）-Fc/Fcヘテロ二量体。1価ShK（1-35、Q16K）-Fc/Fcヘテロ二量体は2本鎖を含み、片方はヒトFc（IgG2）鎖であり、他方はN末端からC末端で：[Lys16] ShK-L10リンカー-ヒトFc（IgG2）を含むFcに融合したShK（1-35、Q16K）ペプチドである。このペプチド融合タンパク質は、N末端からC末端で：35個のアミノ酸[Lys16] ShKペプチド、10個のアミノ酸GGGSGGGGS（配列番号153）L10リンカー配列およびヒトFc（IgG2）配列を含有した。したがって、リンカー-Fc領域を[Lys16] ShKのCys35に続くC末端に結合した。この分子は1価ShK（1-35、Q16K）-Fcヘテロ二量体とも呼ばれる。この1価構築物の図解を図1Cに提示する。本明細書の実施例4に記載のように、分子をクローン化し、発現させて、精製した。精製した分子は、炎症のヒト全血液アッセイにおいて、IL-2分泌を0.11 nM

10

20

30

40

50

の I C 5 0 で非常に強力にブロックした (表 7 H)。その優れた効能にも関わらず、1 価 S h K (1-35、Q16K)-F c/F c ヘテロ二量体は、K v 1.3 対 K v 1.1 のわずかに中程度から 10 倍の選択性を示した (表 7 H)。したがって、[L y s 16] S h K の C 末端に結合したこのリンカー-F c 融合パートナーは K v 1.3 選択性をさらに向上させないと考えられる。これは、約 1225 倍の選択性を示し、[L y s 16] S h K の N 末端 A r g 1 残基に結合した F c-リンカー配列を有した 1 価 F c/F c-S h K (1-35、Q16K) ヘテロ二量体などの [L y s 16] S h K に対する N 末端融合と対照的である (表 7 H)。しかしながら、重要かつ顕著な例外は、[L y s 16] S h K の単一 C 末端の C y s 35 に続いて添加された A l a 残基を含む [L y s 16] S h K-A l a ペプチド (配列番号 362) である。この分子は、K v 1.3 対 K v 1.1 に対する選択性が 262 倍高まり改善したことを示した (表 7 H)。したがって、我々は、[L y s 16] S h K の C 末端の C y s 35 に続いて添加された特異的アミノ酸残基は、融合タンパク質の選択性プロファイルを変更できると想定する。例えば、この実施例に記載の 1 価 S h K (1-35、Q16K)-L10-F c 分子は [L y s 16] S h K の C y s 35 に続いて添加されたリンカー G l y 残基を含む。C y s 35 に続いて A l a 残基が代わりに添加された場合、高まった K v 1.3 選択性が観察され得る。実際、我々は [L y s 16] S h K-A l a ペプチドにより 262 倍改善された K v 1.3 選択性を認めた。したがって、融合結合部の特異的アミノ酸残基は選択性プロファイルを変更すると我々は予期する。これらの残基は、[L y s 16] S h K ペプチドおよびヒト F c ドメインまたは免疫グロブリン軽鎖もしくは重鎖間のリンカー配列に容易に組み込み、結合体の K v 1.3 選択性を改善することができる。

10

20

【0481】

1 価 S h K (1-35、Q16K)-H C a K L H A b。 本発明の 1 価 S h K (1-35、Q16K)-H C a K L H A b の実施形態は 3 本鎖を含み、1 本はヒト a K L H A b 軽鎖、もう 1 本はヒト a K L H A b 重鎖、3 本目は N 末端から C 末端で：[L y s 16] S h K-L10 リンカー-ヒト a K L H 重鎖を含むペプチド-a K L H A b 重鎖融合物である。したがって、この融合物には、[L y s 16] S h K の C y s 35 に続く C 末端に結合したリンカー-重鎖領域が含まれる。1 価 S h K (1-35、Q16K)-H C a K L H A b 分子の図解を図 1 I に提示する。精製した分子は炎症のヒト全血液アッセイにおいて、I L-2 分泌を 0.214 nM の I C 50 で非常に強力にブロックした (表 7 H)。1 価 [L y s 16]-a K L H A b 分子は、非常に大きなサイズでありヒト I g 重鎖に融合しているにも関わらず、T 細胞反応の非常に強力なブロックを保持した。

30

【0482】

1 価 a D N P H C-S h K (1-35、Q16K) A b。 本発明の 1 価 a D N P 重鎖 (H C) 融合抗体 (A b) 構築物の実施形態は、N 末端から C 末端で：ヒト抗 D N P A b 重鎖-リンカー-[L y s 16] S h K 分子を含み、これはヒト a D N P 重鎖およびヒト a D N P 軽鎖と共発現して 1 価 a D N P A b-[L y s 16] S h K 分子を形成した。この 1 価構築物の図解を図 1 F に提示する。1 価 a D N P H C-S h K (1-35、Q16K) A b はヒト全血中の T 細胞炎症を強力にブロックし、I L-2 分泌を 0.278 nM の I C 50 で抑制した (表 7 H)。分子の K v 1.3 対 K v 1.1 選択性を評価する試験において、1 価 a D N P H C-S h K (1-35、Q16K) A b 結合体の K v 1.3 選択性は [L y s 16] S h K ペプチド単独よりも有意に優れていることが予期せず明らかとなった。この 1 価 A b-S h K 結合体の K v 1.3 対 K v 1.1 ブロックは 5806 倍超活動的であった (表 7 H)。

40

【0483】

【表 1 2】

表7 H K v 1. 3 選択性の改善された [L y s 1 6] S h K の各種結合体を示すデータ。本明細書の実施例 4 に記載のように毒素ペプチドおよび毒素ペプチドアナログを P E G 化した。実施例 4 に記載のように免疫グロブリン含有化合物を組換え発現させ、精製した。電気生理学的手法は P a t c h X p r e s s (商標) (P X) によって行ったが、アステリスクは完全細胞パッチクランプのデータを示す(本明細書の実施例 6 および 8 を参照されたい)。I L - 2 およびインターフェロン γ (「I F N g」) のヒト全血液 (「W B」) アッセイを本明細書の実施例 7 に記載のように実行した。

配列番号または引用	結合体タイプ	命名	Kv1. 3 (PX) IC50 (nM)	Kv1. 1 (PX) IC50 (nM)	PX による Kv1. 1/ Kv1. 3 選択性比率	WB (IL-2) IC50 (nM)	WB (IFNg) IC50 (nM)	ShK (W B、 IL2) と比較した効 能
361	なし	ShK (1-35)	0.062	0.087	1.40	0.067	0.078	1.00
76	なし	[Lys16]ShK	0.207	3.677	17.76	0.110	0.158	1.64
362	なし	[Lys16]ShK-Ala	0.06	15.72 6	262.10	0.138	0.266	2.06
363	PEG	20kDa-PEG-ShK	0.299*	1.628*	5.44	0.380	0.840	5.67
364	PEG	20kDa-PEG-[Lys16]ShK	0.94	997	1060.64	0.092	0.160	1.37
365	PEG	20kDa-PEG-[Lys16]ShK-A 1a	0.596	2156	3617.45	0.754	1.187	11.25
実施例 1、 WO2008/088 422A2 号	IgG1	2 価 Fc-L10-ShK [1-35] ホ モ二量体	0.015*	0.067*	4.47	0.386	0.320	5.76
実施例 2、 WO2008/088 422A2 号	IgG1	2 価 Fc-L10-ShK [2-35] ホ モ二量体	0.116*	0.411*	3.54	0.585	2.285	8.73
実施例 2、 WO2008/088 422A2 号	IgG1	1 価 Fc/Fc-L10-ShK [2-35] ヘ テロ二量体	ND	ND	ND	2.149	5.199	32.07
1:26	IgG2	1 価 Fc/Fc-ShK (1-35 Q16K) ヘテロ二量体	2.73	3344	1224.91	0.160	0.499	2.39
26:26	IgG2	2 価 Fc-ShK (1-35 Q16K) ホモ二量体	ND	ND	ND	1.850	3.140	27.61
28:29:26	IgG2	1 価 Fc-ShK (1-35 Q16K) /a K L H A b ヘテロ三量体	0.98	1896	1934.69	0.245	0.665	3.66
109:82:109 ;77	IgG2	1 価 a D N P HC-ShK (1-35 Q16K) Ab	0.574	>3333	>5806.62	0.278	0.660	4.15

10

20

30

40

28;29;28; 32	IgG2	1 価 a K L H HC-ShK(1-35 Q16K)Ab	3.96	5774	1458.08	0.274	0.657	4.09
28;32;28; 32	IgG2	2 価 a K L H HC-ShK(1-35 Q16K)Ab	ND	ND	ND	1.392	3.568	20.78
28;29;28; 33	IgG2	1 価 a K L H HC-ShK(2-35 Q16K)Ab	1.66	2617	1576.51	0.570	0.820	8.51
28;29;28; 70	IgG2	1 価 ShK(1-35 Q16K)-HC a K L H Ab	ND	ND	ND	0.214	0.332	3.19
28;35;28; 34	IgG1	1 価 a K L H HC-ループ -ShK(1-35 Q16K)Ab	8.264	>1000	>121.01	1.604	5.386	23.94
28;35;28; 35	IgG1	2 価 a K L H HC-ループ -ShK(1-35 Q16K)Ab	ND	ND	ND	3.910	55.235	58.36

10

【0484】

【表13】

表7I Sprague-Dawleyラット (n=3) における1価Fc/Fc-
[Lys16] ShKの薬物動態。

CMPD	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-t} (ng・時間 ・ mL ⁻¹)	AUC _{0-inf} (ng・時間 ・ mL ⁻¹)	CL/F (mL・ 時間 ⁻¹ ・ kg ⁻¹)	HL(h)
1 価Fc/Fc-[Lys16]ShK	4±3.46	1530±1230	39600±13900	43900±14600	146±47.1	56.3±19.3

20

【0485】

【表14】

表7J Sprague-Dawleyラット (n=3) に組換え1価および2価抗
KLH Ab-[Lys16] ShK融合タンパク質を皮下注射 (用量=6 mg/kg)
した薬物動態データ。

CMPD	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-t} (ng・時間・ mL ⁻¹)	AUC _{0-inf} (ng・時間・ mL ⁻¹)	CL/F (mL・ 時間 ⁻¹ ・ kg ⁻¹)	HL(h)
1 価	32±13.9	5890±1770	481000±157000	594000±182000	10.9±3.47	32±13.9
2 価	60±50.5	126±83.4	12900±9750	17800±17100	655±551	60±50.5

30

【0486】

【表 15】

表7K Sprague-Dawleyラット (n=3) に組換え1価Fc/Fc-ShKヘテロ二量体、1価Fc-ShK/KLH Abヘテロ三量体および2価ShK-Fc/ShK-Fcホモ二量体融合タンパク質を皮下注射 (用量=2mg/kg) した薬物動態データ。

CMPD	Tmax (h)	Cmax (ng/mL)	AUC0-t (ng・時間 ・ mL ⁻¹)	AUC0-inf (ng・時間 ・ mL ⁻¹)	CL/F (mL・ 時間 ⁻¹ ・ kg ⁻¹)	MRT(h)
1 価Fc/Fc-ShK (ヘテロ二量体)	18.7±9.2	728±64.6	42469±6566	44012±7484	46.4±8.6	46.8±6.6
1 価Fc-ShK/ KLH Ab (ヘテロ三量体)	32.0±13.9	1107±26.2	83355.2±5673	89158.6±7915	22.6±1.9	63.0±8.7
2 価ShK-Fc/ShK- Fc(ホモ二量体)	18.7±9.2	27.0±4.7	1418.8±232	1460.7±238	1395.0±239	43.6±2.3

10

【0487】

【表 16】

表7L Sprague-Dawleyラット (n=3) に組換え1価および2価抗KLH Abループ [Lys16] ShK融合タンパク質を皮下注射 (用量=6mg/kg) した薬物動態データ。

CMPD	Tmax (h)	Cmax (ng/mL)	AUC0-t (ng・時間・ mL ⁻¹)	AUC0-inf (ng・時間・ mL ⁻¹)	CL/F (mL・時間 ⁻¹ ・ kg ⁻¹)	HL(h)
1 価	40.7±35.6	7870±605	878000±259000	2730000±2060000	3.11±2.28	245±151
2 価	3.33±1.15	102±41.3	5460±3930	6070±4510	1440±985	49.5±13.1

20

【実施例 6】

【0488】

Kv1.3およびKv1.1電気生理学的手法

Kv1.7を介したKv1.1発現細胞系。CHO-K1細胞をヒトKv1.3で、またはカウンタースクリーンのため (本明細書の実施例8を参照されたい)、hKv1.4、hKv1.6、もしくはhKv1.7で安定的にトランスフェクトした；HEK293細胞はヒトKv1.3もしくはヒトKv1.1を安定的に発現していた。細胞系はAmgenまたはBioFocus DPI (A Galapagos Company) から得た。hKv1.2を安定的に発現しているCHO-K1細胞は、カウンタースクリーンのため、Millipore (Cat#. CYL3015) から購入した。

30

【0489】

完全細胞パッチクランプ電気生理学的手法。完全細胞電流を、Molecular Devices Corp. (Sunnyvale, CA) のMultiClamp 700B増幅器を用いて、ホウケイ酸ガラス (World Precision Instruments, Inc) から引き出した3~5MΩピペットで室温で記録した。データ獲得中、容量性電流をアナログ減法により中止し、一連の抵抗補償作用を用い、すべての電流を2kHzで波した。細胞を細胞外溶液 (1.8mM CaCl₂、5mM KCl、135mM NaCl、5mM グルコース、10mM HEPES含有、pH7.4、290~300mOsm) 中に浸した。内溶液は、90mM KCl、40mM KF、10mM NaCl、1mM MgCl₂、10mM EGTA、10mM HEPES (pH7.2、290~300mOsm) を含有した。脱分極性電圧工程 -80mV~

40

50

+30 mVを30秒ごと (Kv1.3) または10秒ごと (Kv1.1) に200ミリ秒間の間隔で、-80 mV電位を保持しつつ適用することにより電流を引き起こした。IC50を決定するため、5~6個のペプチドまたはペプチド結合体 (濃度1:3希釈) を0.1% BSAを含む細胞外溶液中で作製し、Rapid Solution Changer RSc-160 (BioLogic Science Instruments) で細胞に局所的に送達した。各濃度において電流は定常状態に達した。pCLAMP (9.2版) およびOriginPro (7版) を用いてデータ分析を実施し、各試験物質の適応前後のピーク電流を用いて各濃度の電流阻害率を算出した。

【0490】

PatchXpress (商標)、平面パッチクランプ電気生理学的手法。細胞を細胞外溶液 (1.8 mM CaCl_2 、5 mM KCl 、135 mM NaCl 、5 mM グコース、10 mM HEPES 含有、pH 7.4、290~300 mOsm) 中に浸した。内溶液は、90 mM KCl 、40 mM KF、10 mM NaCl 、1 mM MgCl_2 、10 mM EGTA、10 mM HEPES (pH 7.2、290~300 mOsm) を含有した。IC50を決定するため、概して、5個のペプチドまたはペプチド結合体 (濃度1:3希釈) を作製した。ペプチドまたはペプチド結合体は、0.1% BSAを含む細胞外溶液中で調製する。デンドロトキシン-kおよびマルガトキシンをAlomone Labs Ltd. (Jerusalem, Israel) から購入した; ShK毒素をBachem Bioscience, Inc. (King of Prussia, PA) から購入した; 4-APをSigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO) から購入した。Molecular Devices Corp. (Sunnyvale, CA) のPatchXpress (商標) 7000A電気生理系を用いて室温で電流を記録した。hKv1.3およびhKv1.1の電圧プロトコルを本明細書の実施例8の表7Mに示す。0.1% BSAを含む細胞外溶液を最初に適用して100%対照 (POC) を得てから、5つの異なる濃度の1:3ペプチドまたはペプチド結合体希釈をそれぞれ400ミリ秒インキュベーションした。最終的に、過剰な特異的基準イオンチャネル阻害剤 (実施例8の表7M) を添加して完全な、すなわち100%ブロックを定義した。一部の例で基準阻害剤の添加後に存在する残りの電流を用いてゼロ%対照を算出した。Kv1.3およびKv1.1の基準阻害剤を実施例8の表7Mに記載する。個々のセットのトレースをそれぞれ視認して、許容または拒絶した。一般的な許容基準は以下であった。

1. ベースライン電流は安定していなければならない
2. 初回ピーク電流は300 pA超でなければならない
3. 初回Rmおよび最終Rmは300 Ohm超でなければならない
4. ピーク電流は第一化合物の添加前に定常状態に達さなければならない。

【0491】

次の濃度の化合物を添加前に直近の5つの平均ピーク電流からPOCを算出し、IC50を算出するためにエクセルにエクスポートした。

【0492】

IonWorks、ハイスループット平面パッチクランプ電気生理学的手法。

hKv1.3を安定的に発現しているCHO細胞およびhKv1.1を安定的に発現しているHEK293細胞上で電気生理学的手法を行った。IWQ電気生理学的手法のためのShKアナログおよび結合体を含む「アッセイプレート」の調製手順は以下のとおりであった: 0.3% BSAを含む細胞外緩衝液 (0.9 mM Ca^{2+} および0.5 mM Mg^{2+} 含有PBS) ですべてのアナログを溶解し、96ウェルポリプロピレンプレートのH列にカラム1~カラム10に濃度100 nMで分配した。カラム11および12を陰性および陽性対照のために保留してから、1:3比で連続希釈してA列で分配した。IonWorks Quattro (IWQ) 電気生理学的手法およびデータ分析を以下のとおり成し遂げた: 再懸濁した細胞 (細胞外緩衝液中)、アッセイプレート、Population Patch Clamp (PPC) パッチプレートならびに適切な細胞内 (9

10

20

30

40

50

0 mM グルコン酸カリウム、20 mM KF、2 mM NaCl、1 mM MgCl₂、10 mM EGTA、10 mM HEPES、pH 7.35) および細胞外緩衝液を IonWorks Quattro 上に位置した。アナログをパッチプレートに添加した場合、アッセイプレートから 0.1% BSA でさらに 3 倍希釈して 33.3 nM ~ 15 pM の範囲の最終試験濃度に達した。アンホテリシンベースの穿孔パッチクランプ手順を用いて CHO-Kv1.3 および HEK-Kv1.1 細胞の電気生理記録を取った。IonWorks Quattro の電圧クランプ回路構成を用いて、細胞を膜電位 -80 mV で保持し、膜電位を 400 ミリ秒間 +30 mV に進めることにより電圧活性化 K⁺ 電流を引き起こした。対照条件下すなわち実験開始時に阻害剤の非存在下、10 分インキュベーション後にアナログおよび対照の存在下で K⁺ 電流を引き起こした。430 ~ 440 ミリ秒の平均 K⁺ 電流振幅を測定し、データを Microsoft 社のエクセルシートにエクスポートした。各濃度のアナログおよび対照の存在下における K⁺ 電流振幅を同じウェル中の前化合物の電流振幅の K⁺ 電流率として表した。これらの対照値 % を濃度関数としてプロット時、各化合物の IC₅₀ 値は以下の方程式を用いるエクセル適合プログラムにおいて用量反応適合モデル 201 を用いて算出し得る：

【0493】

【数1】

$$\boxed{\text{対照\%}} = y_{\min} + \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + \left(\frac{\text{conc.}}{\text{IC}_{50}} \right)^n}$$

式中、y_{min} は曲線の y 最小値であり、y_{max} は曲線の y 最大値であり、conc は試験濃度であり、n は曲線の傾斜値である。

【実施例7】

【0494】

ヒト全血中の生体活性の測定

IL-2 および IFN-γ 分泌に与える毒素ペプチドアナログ Kv1.3 阻害剤の影響を評価するための Ex vivo アッセイ。既に記載されているエクスピボアッセイ（その全体が参照により本明細書に組み込まれる WO2008/088422A2 号の実施例 46 を参照されたい）を用いて、ShK アナログおよび結合体がヒト全血中の T 細胞炎症をブロックする効能を評価した。簡単に述べると、50% ヒト全血液をタブシガルジンで刺激してストア枯渇、カルシウム可動化およびサイトカイン分泌を誘発する。T 細胞サイトカイン分泌のブロックにおける分子の効能を評価するため、タブシガルジン刺激を加える 30 ~ 60 分前に各種濃度の Kv1.3 ブロックペプチドおよびペプチド結合体をヒト全血液試料でプレインキュベートした。48 時間後、37℃、5% CO₂ で、条件培地を収集し、Mesoscale Discovery から 4 点電気化学発光免疫アッセイを用いてサイトカイン分泌レベルを決定した。タブシガルジン刺激を用いて、複数ドナーから単離した血液からロバスタ的にサイトカイン IL-2 および IFN-γ を分泌した。タブシガルジン刺激後にヒト全血中に産生された IL-2 および IFN-γ を、細胞内サイトカイン染色および蛍光標示式細胞分取器 (FACS) 分析により明らかにしたように T 細胞から産生した。

【0495】

Kv1.3 は、T 細胞上に存在する大電位依存性カリウムチャネルである。Kv1.3 は K⁺ を流出させ、有効な T 細胞活性化およびサイトカイン分泌のために必要な細胞内カルシウムの持続的増加のために必要である持続的 Ca²⁺ 流入の駆動力を提供する。Kv1.3 阻害剤は TCR 結紮により誘発されたこのカルシウム流動を抑制することが既に示

されている (G. C. Koo et al., 1999, Cell. Immunol. 197, 99-107)。タプシガルジン誘発性のストア枯渇およびTCR結紮は、単離されたT細胞において Ca^{2+} 可動化の類似パターンを引き出す (E. Donnadieu et al., 1991, J. Biol. Chem. 267, 25864-25872)、タプシガルジンは全血中でより大きいロバスト反応を与えることを我々は見出した。したがって、我々は、Kv1.3阻害剤のヒト全血中のT細胞からのタプシガルジン誘発サイトカイン分泌のブロック能を評価することにより生体活性を評価するバイオアッセイを開発した。全血液は高タンパク質レベルを含む複合流体であるため、この全血液アッセイにおけるペプチドおよびペプチド結合体の活性は生物学的に関連した流体中の48時間にわたる分子安定性の評価においてさらなる利点を有する。全血液アッセイにより、電気生理学的手法 (ePhys) により決定した分子のKv1.3効能の重要な再確認が行われる。なぜなら、ePhysアッセイは一般に短時間 (1~2時間未満) であり、タンパク質を含まない生理食塩水を用いるためである。長時間の全血液アッセイでは、短時間のePhys検査と比較してより効果的な平衡結合反応速度の決定が可能であり得る。

【実施例8】

【0496】

イオンチャネルのカウンタースクリーン

Kv1.1、Kv1.2、Kv1.3、Kv1.4、Kv1.6およびKv1.7、PatchXpress (商標)、平面パッチクランプ電気生理学的手法。上記の実施例6に記載の方法および細胞を用いるMDCのPatchXpress (商標) 7000A電気生理系を用いて、イオンチャネル電流を室温で記録できる。各チャネルの電圧プロトコールを下表7Mに示す。

【0497】

【表17】

表7M 電圧プロトコールおよび記録条件。

イオンチャネル	電圧工程	パルス時間	パルス間隔	保持電位	基準阻害剤
hKv1.1	-80mV~+30mV	200 ミリ秒	10 秒	-80mV	10nM DTX-k
hKv1.2	-80mV~+60mV	400 ミリ秒	10 秒	-80mV	1nM MgTx
hKv1.3	-80mV~+30mV	200 ミリ秒	30 秒	-80mV	1nM ShK
hKv1.4	-80mV~+30mV	200 ミリ秒	30 秒	-80mV	1mM 4-AP
hKv1.6	-80mV~+60mV	500 ミリ秒	15 秒	-80mV	1mM 4-AP
hKv1.7	-80mV~+30mV	1000 ミリ秒	15 秒	-80mV	1mM 4-AP

【0498】

心イオンチャネルカウンタースクリーン (hERG、hKvLQT1/hminK、hNav1.5、hKv1.5、hCav1.2、hKv4.3)。

【0499】

細胞系。hKvLQT1/hminKおよびhERGで安定的にトランスフェクトしたHEK293細胞をAmgenまたはCytomx, Incから得た。ヒトhNav1.5で安定的にトランスフェクトしたHEK293細胞をCytomx, Incから購入した。hKv4.3を安定的に発現しているHEK293細胞およびhKv1.5を安定的に発現しているCHO細胞をChanTestから得た。ヒトL型カルシウムチャネルhCav1.2を安定的に発現しているCHO細胞をChanTestから得て、hCav1.2をコードするヒトCACNA1C遺伝子を含み、ヒトCACNB2によりコードした $\beta 2$ サブユニットおよびCACNA2D1遺伝子によりコードした $\alpha 2\delta 1$ を

共発現した。

【0500】

FAST Patch (商標) 試験をChantestで実施して、PatchXpress (Model 7000A, Molecular Devices, Union City, CA) 電気生理学的手法に關与するクローン化ヒトL型カルシウムチャネルhCav1.2、クローン化hKv4.3およびクローン化hKv1.5に与えるペプチドおよび結合体の影響を室温で評価した。細胞外記録溶液(HB-PS)は、137mM NaCl、4mM KCl、1.8mM CaCl₂、1mM MgCl₂、10mM HEPESおよび10mMグルコースを含有し、NaOHでpH7.40に調整した。hKv4.3およびhKv1.5のための細胞内記録溶液は、130mMアスパラギン酸カリウム、5mM MgCl₂、5mM EGTA、4mM ATPおよび10mM HEPESを含有し、KOHでpH7.2に調整した。hCav1.2のための細胞内溶液は、130mMアスパラギン酸セシウム、5mM MgCl₂、5mM EGTA、4mM ATP、2mM EDTA、1mM CaCl₂、0.1mM GTPおよび10mM HEPESを含有し、N-メチル-D-グルカミンでpH7.2に調整した。記録調製において、細胞内溶液は、Sealチップ₁₆平面電極の細胞内区画中に負荷する。細胞懸濁液は、Sealチップ₁₆平面電極の細胞外区画内にピペットした。完全細胞配置を確立後、PatchXpress (商標) 系における二重チャネルパッチクランプ増幅器を用いて膜電流を記録する。デジタル化前、電流は5分の1のサンプリング頻度で低域ろ波した。1%BSAでHB-PSに希釈した3つの濃度のペプチド結合体(試験物質)を5分間隔で天然細胞に適用する。溶液交換を4回行い、各試験物質濃度への曝露時間を5分とした。ビヒクル対照は天然細胞にも適用し、溶液交換後、陽性対照を適用してイオンチャネルブロックに対する感受性を検証する。すべての陽性対照を0.3%DMSOでHB-PSに希釈した。チャネルブロックの陽性対照は、hCav1.2電流を約75%ブロックするニフェジピン(0.01μM)、hKv4.3電流を約75%阻害するフレカイニド(0.1mM)、hKv1.5電流を約80%ブロックする4-アミノピリジン(2mM)などであった。有効な完全細胞記録は以下の基準:(1)膜耐性(Rm)≥200MΩ、(2)漏電≤チャネル電流の25%、を満たさなければならない。hCav1.2、hKv4.3およびhKv1.5の試験手段は以下のとおりとした。

【0501】

a.) hCav1.2試験手段。保持電位-40mVから10秒間隔で行う脱分極試験パルス(時間、200ミリ秒;振幅、10mV)からなる刺激電圧パターンを用いてhCav1.2/β2/α2δチャネルの発現および定常状態ブロックを測定した。試験物質濃度は、適用間で洗浄せずに昇順に累積的に適用してよい。10mVへ進む間にピーク電流を測定した。hCav1.2電流をブロックするため、各実験最後に飽和濃度のニフェジピン(10μM)を追加する。漏電を記録した総膜電流からデジタル方式で減じた。

【0502】

b.) hKv4.3試験手段。固定振幅(脱分極:0mV、300ミリ秒間)で保持電位-80mVから10秒間隔で反復したパルスパターンを用いて、hKv4.3電流の発現および定常状態ブロックを測定した。0mVへ進む間にピークおよび持続した試験パルス電流振幅を測定した。

【0503】

c.) hKv1.5試験手段。固定振幅(脱分極:+20mV振幅、300ミリ秒時間)で保持電位-80mVから10秒間隔で反復したパルスパターンを用いて、hKv1.5電流の発現および定常状態ブロックを測定した。+20mVへ進む最後に電流の振幅を測定した。

【0504】

PatchXpress (商標) 系を用いたクローン化ヒトNav1.5 ナトリウムチャネルに対するカウンタースクリーン。細胞外(HB-PS2)記録溶液は、70mM NaCl、67mM N-メチル-D-グルカミン、4mM KCl、1.8mM C

aCl₂、1mM MgCl₂、10mM HEPES、10mMグルコースを含有し、HClでpH7.4に調整した。内記録溶液は、130mM CsF、10mM NaCl、10mM EGTA、2mM MgCl₂、10mM HEPESを含有し、CsOHでpH7.20に調整した。参照標準または試験物質の原液を適用前にHB-PS2に希釈した。試験物質は本明細書に記載のペプチドまたはペプチド結合体のいずれかを含む。リドカイン(1~30μM)を参照標準とした。標準化工程プロトコールは、hNav1.5ナトリウムチャンネルを介してイオン電流を引き出すために用いる。細胞は-80mVで保持する。固定振幅(プレパルス条件:-120mV、50ミリ秒;-30mV、20ミリ秒に進める脱分極試験)でパルスパターンを10秒間隔で反復して用いて、試験物質によるhNav1.5ナトリウム電流の発現および定常状態ブロックを測定した。エピソードモードで電流を3kHzでろ波して10kHzで得た。良好な記録を確立した場合、細胞を2分間洗浄してから、対照ビヒクルを5分間適用した。次いで対照および各濃度の試験物質を5分間適用した。各濃度を1分間隔で3回添加した。吸引分配速度は40μL/sであった。IC₅₀を決定するため、試験物質1μM、3μM、10μMおよび30μMを細胞(n=3細胞)に昇順に累積的に(試験物質濃度の間で洗浄せず)、各細胞(n=細胞数の場合、n=3)に対して適用した。各濃度の試験物質を5分間適用した。各濃度を1分間隔で3回添加した。PatchXpress Commander v1.4(Axon Instruments, Union City, CA)を用いて電気生理データを得て、分析はDataXpress v1.4(Axon Instruments, Union City, CA)を用いて行った。試験物質適応前後の5ピーク電流を用いて各濃度の電流阻害率を算出した。良好な記録の許容基準は:(1)シール耐性>200MΩ、(2)アクセス耐性<10MΩ、(3)ピーク尾電流>200pA、(4)漏電<ピーク尾電流の25%、(5)対照ビヒクルにおける分析<2.5%/分などである。

10

20

【0505】

PatchXpress(商標)系を用いた、ヒトIK(hKvLQT1+hminK)カリウムチャンネルに対するカウンタースクリーン。細胞外記録溶液はHB-PSとした。内記録溶液は、20mM KF、90mM KCl、10mM NaCl、10mM EGTA、5mM K₂ATP、1mM MgCl₂、10mM HEPESを含有し、KOHでpH7.20に調整した。参照標準または試験物質の原液を適用前にHB-PS2に希釈した。試験物質は本明細書に記載のペプチドまたはペプチド結合体のいずれかを含有した。Chromanol 293B(0.3~10μM)を参照標準とした。標準化工程プロトコールを用いて、IKカリウムチャンネルを介してイオン電流を引き出した。細胞を-80mVで保持した。固定振幅(+50mV、5秒間に進める脱分極試験)でパルスパターンを10秒間隔で反復して用いて、試験物質によるIKカリウム電流の発現および定常状態ブロックを測定した。エピソードモードで電流を3kHzでろ波して10kHzで得た。良好な記録を確立した場合、細胞を2分間洗浄してから、対照ビヒクルを5分間適用した。次いで対照および各濃度の試験物質を5分間適用した。各濃度を1分間隔で3回添加した。吸引分配速度は40μL/sであった。1μM、3μM、10μMおよび30μMの試験物質を細胞(n=3細胞)に昇順に累積的に(試験物質濃度の間で洗浄せずに)各細胞(n=細胞数の場合、n=3)に適用した。各濃度の試験物質を5分間適用した。各濃度を1分間隔で3回添加した。PatchXpress(商標)Commander v1.4(Axon Instruments, Union City, CA)を用いて電気生理データを得て、分析はDataXpress v1.4(Axon Instruments, Union City, CA)を用いて行った。試験物質適応前後の5ピーク電流を用いて、各濃度の電流阻害率を算出した。良好な記録の許容基準は:(1)シール耐性>200MΩ、(2)アクセス耐性<10MΩ、(3)ピーク尾電流>200pA、(4)漏電<ピーク電流の25%、(5)対照ビヒクルにおける分析<2.5%/分、などである。

30

40

【0506】

50

従来の完全細胞パッチクランプ電気生理学的手法によるヒト I K r (h E R Gまたはh K v 1 1. 1) カリウムチャネルに対するカウンタースクリーン。電気生理実験前に一晚インキュベーションのため、3 5 mmポリドーリジンでコーティングしたカバーガラス上に細胞懸濁液を1~2滴添加した。パッチクランプ技術の強固なGΩシール配置を用いて、単一細胞から完全細胞電流を記録した。培養基をすすいで、細胞外記録緩衝液(1 3 5 mM NaCl、5 mM KCl、1. 8 mM CaCl₂、1 0 mM HEPES、および5 mMグルコース含有、pHを7. 4 0にNaOHで調整し、浸透圧を3 0 0 mOsmで設定した)で置換後、3 5 mmカバーガラスを記録段階に移した。平行して配置し、記録する細胞上面にガラスキャピラリーを直接乗せる運動性化ロッドに結合したガラスキャピラリーの1つを介して細胞外記録緩衝液で細胞を連続的に灌流した。h E R Gプロファイリングにおいて、記録ピペット溶液は、1 3 0 mM KF、2 mM MgCl₂、1 0 mM EGTA、および1 0 mM HEPESを含有し、KOHでpH 7. 4 0に調整して、浸透圧を2 8 0 mOsmで設定した。室温で実験を実施し、MultiClamp 700A増幅器(Molecular Devices Inc.)を用いて記録した。ピペット耐性は典型的には2~3 MΩであった。細胞を電位-8 0 mVで保持した。ピーク外向き尾電流のベースラインまたは基準点を得るために、-5 0 mV、5 0 0 ミリ秒間への工程を用いた。この後、+2 0 mV、2 秒間の脱分極性工程を行い、チャネルを不活性状態へ促進した。-5 0 mV、2 秒間に戻す工程は、不活性化させて緩和し、ピークh E R G電流を測定した。パルスを1 0 秒ごとに反復した。総h E R G電流を、-5 0 mV工程で再分極時のピーク電流と-5 0 mVのベースライン電流間の差として測定した。試験物質(最大1 0 μM)(本明細書に記載のペプチドおよびペプチド結合体を含む)を細胞外記録緩衝液(0. 1 %ウシ血清アルブミン(BSA)含有)中に混合し、続いてガラス灌流容器に移した。電子ピンチ弁は容器から記録する細胞上への試験物質の流出を制御した。IC50値および曲線適合は、XLFitソフトウェアの4変数ロジスティック適合を用いて推測した。h E R Gチャネル阻害剤、シサプリドを用いてアッセイを有効化した。

10

20

【0 5 0 7】

従来の完全細胞パッチクランプ電気生理学的手法によるカルシウム活性化カリウムチャネルヒト I K C a 1 およびB K C a に対するカウンタースクリーン。CHO I K C a およびB K C 細胞系をBioFocus DPI (A Galapagos Company) から得た。電気生理実験前に一晚インキュベーションのため、3 5 mmポリドーリジンでコーティングしたカバーガラス上に細胞懸濁液を1~2滴添加した。パッチクランプ技術の強固なGΩシール配置を用いて、単一細胞から完全細胞電流を記録した。培養基をすすいで、細胞外記録緩衝液(1 3 5 mM NaCl、5 mM KCl、1. 8 mM CaCl₂、1 0 mM HEPES、および5 mMグルコース含有、pHを7. 4 0にNaOHで調整し、浸透圧を3 0 0 mOsmで設定した)で置換後、3 5 mmカバーガラスを記録段階に移した。平行して配置し、記録する細胞上面にガラスキャピラリーを直接乗せる運動性化ロッドに結合したガラスキャピラリーの1つを介して細胞外記録緩衝液で細胞を連続的に灌流した。h E R Gプロファイリングにおいて、記録ピペット溶液は、1 3 0 mMアスパラギン酸カリウム、1 mM MgCl₂、1. 2 6 mM CaCl₂、2 mM EGTA、2 mM Mg-ATPおよび1 0 mM HEPESを含有し、KOHでpH 7. 4 0に調整して、浸透圧を2 8 0 mOsmで設定した。室温で実験を実施し、MultiClamp 700A増幅器(Molecular Devices Inc.)を用いて記録した。細胞を電位-8 0 mVで保持した。BK電流とIK電流の両方を、記録ピペット溶液から細胞内に拡散したカルシウムイオンとして活性化した。カルシウム拡散によるカルシウム依存性の外向きのカリウム電流の活性化は一般に完全な活性化のために3~5分かかる。薬剤曝露前および曝露中、外向きの電流を保持電位+5 0 mVで持続的にモニタリングした。あるいは、4 0 0 ミリ秒電圧ランプ-1 2 0 ~+6 0 mVを1 0 秒ごとに反復して、薬剤の曝露前と曝露中の両チャネルの電流電圧関係を特性化した。試験物質(最大1 0 μM)(本明細書に記載のペプチドおよびペプチド結合体を含む)を細

30

40

50

胞外記録緩衝液（0.1%ウシ血清アルブミン（BSA）含有）中に混合し、続いてガラス灌流容器に移した。電子ピンチ弁は容器から記録する細胞上への試験物質の流出を制御した。ピペット抵抗は通常2-3MΩであった。IC50値および曲線適合は、XLFitソフトウェアの4変数ロジスティック適合を用いて推測した。IKCaおよびBK阻害ペプチド、カリブドトキシン（100nM）をアッセイの薬理的検証に用いるアッセイ手段の終了時に適用した。

【実施例9】

【0508】

AMP5-aK_{LH}融合物

AMP5 TPO模倣ペプチドを全4つの可能な末端融合配置（図1F～1K；図45に図解）で本発明の抗K_{LH}抗体に遺伝的に融合した、すなわち、両免疫グロブリン軽鎖単量体および両免疫グロブリン重鎖単量体にN末端融合およびC末端融合し、哺乳類（CHO）細胞内で発現させた。次いで融合物をタンパク質Aクロマトグラフィー（GE Lifesciences）により2価陽イオンを含まないダルベッコのPBS 10カラム容量を洗浄緩衝液として、および100mM酢酸を溶出緩衝液として7℃で用いて精製した。クロマトグラムに基づき溶出ピークをプールして、2Mトリス塩基を用いてpHを約5.0に増大した。次いでプールを少なくとも4容量の水で希釈してからSP-HPセファロースカラム（GE Lifesciences）上に負荷し、10カラム容量のS緩衝液A（20mM酢酸、pH5.0）で洗浄した後、60%S緩衝液B勾配（20mM酢酸、1M NaCl、pH5.0）の20カラム容量を用いて7℃で溶出した。クロマトグラムに基づきプールを作製し、10kDa Slide-A-Lyzers（Pierce）を4℃で用いて物質を20容量超の10mM酢酸、9%ショ糖（pH5.0）に対して透析した。次いで透析物質を0.22μm酢酸セルロースフィルターを介してろ過し、吸光度280nmで濃度を決定した。各抗体50μgを融合していない対照と共にPhenomenex SEC 3000カラム（7.8×300mm）の50mM NaH₂PO₄、pH6.5、250mM NaCl溶液に注入し、1mL/分で展開して吸光度280nmで観察した（図39）。各抗体の分析を、220Vで展開した1.0mmトリス-グリシン4～20%SDS-PAGE（Novex）を用いて、還元および非還元負荷緩衝液を用いて、QuickBlue（Boston Biologicals）により染色して行い（図40A～E）、LC-MSにより質量を決定した（図41A～D）。

【0509】

様々なaK_{LH}120.6IgG2-AMP5、AMP5-aK_{LH}120.6IgG2、aK_{LH}120.6hIgG1（N297Q）-AMP5-Fc（CH3）ループ融合、およびAMP5-aK_{LH}120.6κの成分の実施形態は、以下のポリペプチド単量体を含む：

（a）aK_{LH}120.6κLC（上記の配列番号28）；

（b）aK_{LH}120.6IgG2 HC（上記の配列番号29）；

（c）aK_{LH}120.6IgG1 HC（上記の配列番号34）；

（c）以下のアミノ酸配列を有するaK_{LH}120.6IgG2 HC-Amp5：

MDMRVPAQLLLGLLLLWLRGARCQVQLVQSGAEVKKKPGASV
KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR
DRGSYYWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
ESTAAALGCLVKDYFPEPTVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTQYTCNVNDHKPSNTKVKDKTVE
RKCCVECWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV
HQDWLNGKEYKCKVSPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGQGCSSSGGPTLREWQQCRR
AQHS (配列番号 324) ;

(d) 以下のアミノ酸配列を有する Amp 5-aKLH120. 6 IgG2 HC (配列番号 332) :

MDMRVPAQLLLGLLLWLRLGARCQGCSSSGGPTLREWQQCRR
AQHSGGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTG
YHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMT
RDTSTISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARDRGSYYWFDPWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDITLMISRTPPEVTCVVVDV
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFS (配列番号 332) ;

(e) 以下のアミノ酸配列を有する aKLH120. 6 h IgG1 N297Q-Amp 5 Fc (CH3) ループ :

MDMRVPAQLLLGLLLWLRLGARCQVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTTRDTSTISTAYMELSRRLRSDDTAVYYC
ARDRGSYYWFDPWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
STSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSSVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKD
ITLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTI (配列番号 341) ;

(f) 以下のアミノ酸配列を有する Amp 5-aKLH120. 6 κLC ポリペプチド 融合物 :

MDMRVPAQLLLGLLLWLRLGARCQGCSSSGGPTLREWQQCRR
AQHSGGGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRN
DLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGSTEF
TLTISSSLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGGGTKEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 342) ;

【0510】

aKLH120. 6-IgG2 重鎖 (HC) -AMP5 哺乳類発現。所望の aKLH120. 6 IgG2 DesK-AMP5 生成物は、1 本の重鎖の C 末端に融合した AMP5 ペプチドを有する完全抗体であり、図 1F の図解を企図し、PFU High Fidelity Ultra (Stratagene 製) を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の 2 つの別々のラウンドにより会合した。第一ラウンドの PCR により 2 つの断片 : VK1sp-aKLH120. 6 IgG2 HC DesK-G5 および G5-AMP5 断片が産生された。これらの断片を産生するために用いたオリゴおよび PCR 鑄型は以下

の配列番号 3 2 5 および 3 2 6 であった。ポリメラーゼ連鎖反応 1 (PCR 1) により VK1 sp-aKLH120. 6 IgG2 HC DesK-G5 断片が産生され、VK1 sp-aKLH120. 6 IgG2 DesK HC ペプチドのためにコードした既存の DNA を鋳型として用いた。

【0511】

順行プライマー配列は：

AAG CTC GAG GTC GAC TAG ACC ACC ATG GAC
ATG AGG GTG CCC GCT CAG CTC CTG GGG CT/
／ (配列番号 3 2 5) であり；および

逆行プライマー配列は：

GCC GCT GCT GCA GCC CTG ACC ACC ACC TCC
ACC ACC CGG AGA CAG GGA GAG／／ (配列番号 3 2 6) で
あった。

【0512】

PCR 1 から産生した VK1 sp-aKLH120. 6 IgG2 HC DesK-G5 断片によりコードされたアミノ酸配列は：

MDMRVPAQLLGLLLWLRGARCAQVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFRTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR
DRGSYYWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS
ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTVE
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGQGC／／ (配列番
号 3 2 7) であった。

【0513】

ポリメラーゼ連鎖反応 2 (PCR 2) により G5-AMP5 断片 (配列番号 3 3 0) が産生され、AMP5 ポリペプチドをコードする既存の DNA を以下のプライマー配列と共に鋳型として用いた。

【0514】

順行プライマー配列は

CTC TCC CTG TCT CCG GGT GGT GGA GGT GGT
GGT CAG GGC TGC AGC AGC GGC／／ (配列番号 3 2 8) で
あり；および

逆行プライマー配列は：

CTA CTA GCG GCC GCT CAG CTA TGC TGA GCG
CGG CG／／ (配列番号 3 2 9) であった。PCR 2 から産生した断片によりコー
ドされたアミノ酸配列は：

LSLSPGGGGGGGQGCSSGGPTLREWQQCRRAQHS／／ (配列番
号 3 3 0) であった。

【0515】

生成物を 1 % アガロースゲル上に流した。バンドにアガロースプラグ用の穴を開けてプ
ラグを新しい PCR 反応管に入れた。次いで外プライマー配列番号 3 2 5 および配列番号
3 2 9 を用いて PCR 3 によりアガロースプラグを増幅した。最終 PCR 生成物を 1 % ア
ガロースゲル上に流した。正確なサイズの生成物を切断してから、Qiagen の Gel
Purification キットによりゲル精製した。VK1 sp-aKLH120. 6 IgG2 HC DesK-G5

10

20

30

40

50

6 IgG2 DesK HC-G5-AMP5の精製したゲル断片を制限酵素SalIおよびNotIで消化してから、消化した生成物をQiagenのPCR Purificationキットにより精製した。同時に、pTT5ベクター（CMVプロモーターおよびPoly A tailを含むAmgenベクター）をSalIおよびNotIにより切断した。pTT5ベクターを1%アガロースゲル上に流して、大型断片を切断し、QiagenのGel Purificationキットによりゲル精製した。VK1sp-aK1H120.6IgG2 DesK HC-G5-AMP5生成物を大型ベクター断片と結紮して、OneShot（商標）Top10細菌性細胞に形質転換した。形質転換細菌コロニーからDNAを単離し、配列分析のために提出した。1つの正確なクローンを大規模プラスミド精製用を選択した。

【0516】

最終pTT5:VK1sp-aK1H120.6-IgG2 DesK HC-G5-AMP5構築物は以下のIgG2 DesK HC-AMP5ポリペプチドをコードする：

MDMRVPAQLLLGLLLWLRLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASVKV
 SCKASGYTFRTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYA
 QKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARDRGS
 YYWFDPWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPVSSNFGTQTYYTCNVNDHKPSNTKVDKKTVE
 RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFNSTFRVVS
 VLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVME
 EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGQGCGSSGGPTLREWQQCRRA
 QHS//（配列番号331）。

【0517】

AMP5-aK1H120.6-IgG2重鎖（HC）哺乳類発現。

単量体を含む所望のAMP5-aK1H120.6IgG2 DesK HC生成物（上記の配列番号332）は、1本の重鎖のN末端に融合するAMP5ペプチドを有する完全抗体であり、図1Iの図解を企図し、PFU High Fidelity Ultra（Stratagene製）を用いてPCRの2つの別々のラウンドにより会合した。第一ラウンドのPCRにより3つの断片：VK1sp-AMP5、AMP5-G5、およびG5-aK1H120.6IgG2 DesK HC断片が産生された。これらの断片を産生するために用いたオリゴおよびPCR鑄型を以下に列挙する。ポリメラーゼ連鎖反応1（PCR1）によりVK1sp-AMP5が産生され、VK1spをコードする既存のDNAを鑄型として用いた。この断片も、VK1sp-AMP5-G5-aK1H120.6κ LC構築において用いた点に留意されたい。

【0518】

順行プライマー配列は：

AAG CTC GAG GTC GAC TAG ACC ACC ATG GAC
 ATG AGG GTG CCC GCT CAG CTC CTG GGG CT//

（配列番号325）であり；および

逆行プライマー配列は：

GCC GCT GCT GCA GCC CTG ACA TCT GGC ACC
 TCT CAA CC//（配列番号333）であった。PCR1から産生した断片によりコードされたアミノ酸配列は：

MDMRVPAQLLLGLLLWLRLRGARCQGCSSG//（配列番号334）であった。

【0519】

PCR2によりAMP5-G5を産生し、AMP5ペプチドをコードする既存のDNAを鋳型として用いた。

【0520】

順行プライマー配列は：

GGT TGA GAG GTG CCA GAT GTC AGG GCT GCA
GCA GCG GC//（配列番号335）であり；および

逆行プライマー配列は：

CAG CTG CAC CTG ACC ACC ACC TCC ACC GCT
ATG CTG AGC GCG//（配列番号336）であった。

10

【0521】

PCR2から産生した断片によりコードされたアミノ酸配列は：

WLRGARCCQGCS SGGPTLREWQQCRR AQHSGGGGGQVQLV/
/（配列番号337）であった。

【0522】

PCR3によりG5-aK1H120.6IgG2 DesK HCを産生し、aK1H120.6IgG2 HC（配列番号29）単量体をコードする既存のDNAを鋳型として用いた。

【0523】

順行プライマー配列は：

CGC GCT CAG CAT AGC GGT GGA GGT GGT GGT
CAG GTG CAG CTG//（配列番号338）であり；および

逆行プライマー配列は：

CTA CTA GCG GCC GCT CAA CCC GGA GAC AGG
GAG A//（配列番号339）であった。

20

【0524】

PCR3から産生した断片によりコードされたアミノ酸配列は：

RAQHSGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTF T
GYHMHWRQAPGQGLEWMGW INPNSGGTNYAQKFQGRVTM
TRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCARD RGSYYWFD PWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPG//（配列番号340）であった。

30

【0525】

生成物を1%アガロースゲル上に流した。バンドにアガロースプラグ用の穴を開けてプラグを新しいPCR反応管に入れた。次いで外プライマー配列番号325および配列番号339を用いてPCR4によりアガロースプラグを増幅した。最終PCR生成物を1%アガロースゲル上に流した。正確なサイズの生成物を切断してから、QiagenのGel

40

Purificationキットによりゲル精製した。VK1sp-AMP5-G5-aK1H120.6IgG2 DesK HCの精製したゲル断片を制限酵素SalIおよびNotIで消化してから、消化した生成物をQiagenのPCR Purificationキットにより精製した。同時に、pTT5ベクター（CMVプロモーターおよびPoly A tailを含むAmgenベクター）をSalIおよびNotIにより切断した。pTT5ベクターを1%アガロースゲル上に流して、大型断片を切断し、Qi

50

agenのGel Purificationキットによりゲル精製した。VK1sp-AMP5-G5-aK1H120.6IgG2 DesK HC生成物を大型ベクター断片と結紮して、One Shot (商標) Top10細菌性細胞に形質転換した。形質転換細菌コロニーからDNAを単離し、配列分析のために提出した。1つの正確なクローンを大規模プラスミド精製用を選択した。最終pTT5:VK1sp-AMP5-G5-aK1H120.6-IgG2 DesK HC構築物はAMP5-IgG2 DesK HCポリペプチド(上記の配列番号332)をコードした。

【0526】

aK1H120.6グリコシル化hIgG1-AMP5 Fc(CH3)ループ重鎖(HC)哺乳類発現。HC融合単量体配列番号341(上記)を含む所望のaK1H120.6IgG1グリコシル化(N297Q)-AMP5-Fc HC生成物は、IgG1(N297Q)Fc DesK重鎖のCH3ドメイン内に挿入されたAmp5ペプチドを有する完全抗体であり、図1Mの図解を企図する。VK1sp-aK1H120.6IgG1(N297Q)-AMP5-Fc DesK HC生成物を合成遺伝子会社であるBlue Heronから注文した。VK1sp-aK1H120.6IgG1(N297Q)-AMP5-Fc DesK HCを対応する制限酵素SalIおよびNotIにより消化して最終生成物を生成した。消化した生成物を1%アガロースゲル上に流した。断片を切断し、QiagenのGel Purificationキットによりゲル精製した。同時に、pTT5ベクター(CMVプロモーターおよびPoly A tailを含むAmgenベクター)をSalIおよびNotIにより切断した。pTT5ベクターを1%アガロースゲル上に流して大型断片を切断し、QiagenのGel Purificationキットによりゲル精製した。aK1H120.6IgG1(N297Q)-AMP5-Fc DesK HCの精製したゲル断片を大型ベクター断片と結紮して、One Shot (商標) Top10細菌性細胞に形質転換した。形質転換細菌コロニーからDNAを単離し、配列分析のために提出した。1つの正確なクローンを大規模プラスミド精製用を選択した。最終pTT5:VK1sp-aK1H120.6IgG1(N297Q)-AMP5-Fc DesK HC構築物はaK1H120.6IgG1(N297Q)-AMP5-DesKポリペプチド融合単量体(上記の配列番号341)をコードする。

【0527】

AMP5-G5-aK1H120.6-κ軽鎖(LC)哺乳類発現。所望のAMP5-aK1H120.6κ LC生成物は、1本の軽鎖融合単量体のN末端に融合したAMP5ペプチドを有する完全抗体であり(上記の配列番号342)、図1Hの図解を企図し、PFU High Fidelity Ultra(Stratagene製)を用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の2つの別々のラウンドにより会合した。第一ラウンドのPCRにより3つの断片(VK1sp-AMP5、AMP5-G5、およびG5-aK1H120.6κ LCを含む)が産生された。これらの断片を産生するためにPCR反応のために用いたオリゴおよび鋳型を以下に列挙する。VK1sp-AMP5を産生した断片は、AMP5-aK1H120.6IgG2 DesK HC構築物に用いて当該項目に記載した断片と同じ断片である。ポリメラーゼ連鎖反応2(PCR2)によりAMP5-G5断片が産生され、AMP5ペプチドをコードする既存のDNAを鋳型として用いた。順行プライマー配列は(上記の配列番号335)であり、逆行プライマー配列はCTGGGT CAT CTG GAT GTC ACC ACC ACC TCC ACC GCT ATG CTG AGC GCG// (配列番号344)であった。PCR2から産生した断片によりコードされたアミノ酸配列はWLRGARCCQGCS SGGPTLREWQQCRRRAQHSGGGGGDIQMTQ// (配列番号345)であった。

【0528】

PCR3によりG5-aK1H120.6-κ LC断片を産生し、aK1H120.6κ LC(配列番号28)をコードする既存のDNAを鋳型として用いた。

【0529】

順行プライマー配列は：

C G C G C T C A G C A T A G C G G T G G A G G T G G T G G T
G A C A T C C A G A T G A C C C A G / / 配列番号346)であり；および

逆行プライマー配列は：

A A C C G T T T A A A C G C G G C C G C T C A A C A C T C T
C C C C T G T T G A A / / (配列番号347)であった。PCR3から産生した断片のペプチド配列は：

RAQHSGGGGGGDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQGIR 10
NDLGWYQQKPKKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGSGTE
FTLTITSSSLQPEDFATYYCLQHNSYPLTTFGGGTKEIKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNA LQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC / / (配列番号348)であった。

【0530】

生成物を1%アガロースゲル上に流した。バンドにアガロースプラグ用の穴を開けてプラグを新しいPCR反応管に入れた。次いで外プライマー配列番号325および配列番号347を用いてPCR4によりアガロースプラグを増幅した。最終PCR生成物を1%アガロースゲル上に流した。正確なサイズの生成物を切断してから、QiagenのGel 20

Purificationキットによりゲル精製した。VK1sp-AMP5-G5-aK1H120.6κ LCの精製したゲル断片を制限酵素SalIおよびNotIで消化してから、消化した生成物をQiagenのPCR Purificationキットにより精製した。同時に、pTT5ベクター(CMVプロモーターおよびPoly A tailを含むAmgenベクター)をSalIおよびNotIにより切断した。pTT5ベクターを1%アガロースゲル上に流して、大型断片を切断し、QiagenのGel

Purificationキットによりゲル精製した。VK1sp-AMP5-G5-aK1H120.6κ LC生成物を大型ベクター断片と結紮して、OneShot(商標)Top10細菌に形質転換した。形質転換細菌コロニーからDNAを単離し、配列分析のために提出した。1つの正確なクローンを大規模プラスミド精製用を選択した。最終 30
pTT5:VK1sp-AMP5-G5-aK1H120.6κ LC構築物はAMP5-κ LCポリペプチド融合単量体(上記の配列番号342)をコードした。

【0531】

293-6E細胞(NRCC)内でPEI(ポリエチレンジアミン、線状、25kDa、1mg/mLの滅菌原液、pH7.0、Polysciences)を用いて一過性トランスフェクションを実施した。トランスフェクション前の293-6E細胞密度は 1.1×10^6 であり、次いでDNA500マイクログラム(重鎖および軽鎖DNA、1:1比) / リットルのトランスフェクトした細胞を用いた。DNAを50mLの293 FreeStyle培地(Invitrogen)に添加し、1.5mLのPEI溶液と組み合わせ、軽くボルテックスしてから、室温で15分インキュベートした。完全PEI-DNA混合物を培養に添加することにより細胞をトランスフェクトした。次いで細胞を振盪機(120rpm、5%CO₂含有)上で37℃で24時間インキュベートした。次いでTrypTone N1(TekniScience Inc、20%のFreeStyle培地)を添加して最終濃度0.5%とし、インキュベーションを5日間継続した。5日目に条件培地を回収し、遠心分離4000rpmにより、続いて0.45μmフィルター(Corning Inc.)を介してろ過した。 40

【0532】

次いで融合物をタンパク質Aクロマトグラフィー(GE Life Sciences)により2価陽イオンを含まないダルベッコのPBS 10カラム容量を洗浄緩衝液として、および100mM酢酸を溶出緩衝液として7℃で用いて精製した。クロマトグラムに 50

に基づき溶出ピークをプールして、2 M トリス塩基を用いて pH を約 5.0 に増大した。次いでプールを少なくとも 4 容量の水で希釈してから SP-HP セファロースカラム (GE Life Sciences) 上に負荷し、10 カラム容量の S 緩衝液 A (20 mM 酢酸、pH 5.0) で洗浄した後、60 % S 緩衝液 B 勾配 (20 mM 酢酸、1 M NaCl、pH 5.0) の 20 カラム容量を用いて 7 °C で溶出した。プールをクロマトグラムに基づき作製し、10 kDa Slide-A-Lyzers (Pierce) を 4 °C で用いて物質を 20 容量超の 10 mM 酢酸、9 % ショ糖 (pH 5.0) に対して透析した。次いで透析物質を 0.22 μm 酢酸セルロースフィルターを介してろ過し、吸光度 280 nm で濃度を決定した。各抗体 50 μg を融合していない対照と共に、Phenomenex SEC3000 カラム (7.8 × 300 mm) の 50 mM NaH₂PO₄、pH 6.5、250 mM NaCl に注入して 1 mL/分 で展開し、吸光度 280 nm で検出した (図 39)。全 5 個の抗体がそれらのサイズの分子において予期した保持時間を示し、会合体はほとんど存在しなかったことが示された。各抗体の分析を、220 V で展開した 1.0 mm トリス-グリシン 4 ~ 20 % SDS-PAGE (Novex) を用いて、還元および非還元負荷緩衝液を用いて、QuickBlue (Boston Biologicals) により染色して行い (図 40 A ~ E)、LC-MS により質量を決定した (図 41 A ~ D)。典型的な実験では、10 μg の試料を 25 μL の 8 M GdHCl 50 mM トリス (pH 8.5) に 30 分間 55 °C で還元してから、還元物質を Waters 社製 Massprep マイクロ脱塩カラム (2.1 × 5 mm) を介して Acquity UPLC system を用いてクロマトグラフ化した (溶媒 A は 0.1 % ギ酸水溶液、および溶媒 B は 0.1 % ギ酸のアセトニトリル溶液とした)。5 % 溶媒 B、流速 0.2 mL/分、80 °C でカラムを平衡させ、試料導入時にカラムを 5 % B で 1 分間洗浄した後、直線勾配 5 ~ 40 % B を 10 分かけて用いてタンパク質を溶出した。質量測定のために、Waters 社製飛行時間型 LCT premier 質量分析計にカラム流出を誘発した。CsI イオン (3 mg CsI/mL の 50 % イソプロパノール溶液) を基準物質として用いた。機器に付随する MaxEnt 1 ソフトウェアを用いて質量スペクトルを逆重畳した。SDS-PAGE 分析により、予期された第四構造がすべて形成されたことが示され、質量スペクトル分析により、精製した分子に予期された融合物が存在したことが示された。まとめると、これらのデータにより、融合物は aKLH120.6 抗体単量体の任意の 4 つの可能な N 末端または C 末端融合配置ならびに Fc ドメイン内部ループ挿入物で作製され得ることが示される (図 1 F ~ 1 N および図 45 の図解を参照されたい)。

【実施例 10】

【0533】

Ex 4-aKLH Ab 融合物

エキセンディン-4 ペプチド (HGE GTFTSDL SKQMEEEA VR LF IEWLKN GG PSSGAPPPS // 配列番号 349) を 1 kG リンカーを介して抗 KLH120.6 抗体の軽鎖の N 末端に遺伝的に融合し (「Ex-4-1kG-aKLH120.6-Ab」と命名)、哺乳類細胞内で発現させた。図 42 は、エキセンディン-4 (「Ex 4」)-1kG-aKLH120.6 LC 融合構築物の図式マップである。

【0534】

Ex-4-1kG-aKLH120.6-Ab 融合物の成分は以下の単量体を含有した。

(a) 以下のアミノ酸配列を有する Ex-4-1kG-aKLH120.6 κ LC :

MDMRVPAQLLGLLLWL R GARCHGE GTFTSDL SKQMEE
EA VR LF IEWLKN GG PSSGAPPPSG SG SATGGSGSGAS
SGSGSAT GSDIQMTQSP SSL SASVGDR VTITCRASQG
IRNDLGWYQQKPGKAPKRLI YAASSLQSGV PSRFSGS
GSG TEFTLTITSSL QPEDFATYYCLQHNSYPLTF GGGT
KVEIKR TVAAPS VFIF PPSDEQLKSG TASVVC LLNNF
YPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLS

ST L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E
C / / (配列番号 355) ; および

(b) aK L H 1 2 0 . 6 I g G 2 H C (上記の配列番号 29) 。

【0535】

所望の E x - 4 - 1 k G - a K L H 1 2 0 . 6 - A b 生成物は両軽鎖の N 末端に融合した E x - 4 ペプチドで構成される完全抗体であった (図 1 K の図解を参照されたい) 。 E x - 4 - 軽鎖 : 重鎖の比率は 1 : 1 であった。aK L H 1 2 0 . 6 モノクローナル抗体 1 2 0 . 6 重鎖および軽鎖を発現する X e n o M o u s e (商標) ハイブリドーマをコードする遺伝子の単離およびクローニングについては、上記の実施例 1 および実施例 4 に記載されている。その天然シグナルペプチドは、上記のとおり V K 1 / O 1 2 ペプチド (M D M R V P A Q L L G L L L L W L R G A R C / / 配列番号 103) により置換されている。aK L H 1 2 0 . 6 L C (配列番号 28) および aK L H 1 2 0 . 6 H C I g G 2 (配列番号 29) 単量体をコードする DNA 断片を哺乳類発現ベクター p T T 5 (C M V プロモーターおよび P o l y A t a i l を含む A m g e n ベクター) 中に個別にクローン化し、それぞれ p T T 5 : aK L H 1 2 0 . 6 - V K 1 S P - κ 軽鎖 (L C) 構築物および p T T 5 : aK L H 1 2 0 . 6 - V K 1 S P - I g G 2 重鎖 (H C) 構築物を産生した。

10

【0536】

K o z a k 配列を含む S a l I (5') および B a m H I (3') に挟まれた DNA 断片 (以下の配列番号 351) ならびに V K 1 / O 1 2 シグナルペプチド (配列番号 103) 、 E x - 4 (1-39) ペプチド (配列番号 349) 、 および 1 k G リンカーペプチドを含む O R F の第一部分を合成し、標準的な遺伝子合成技術に従い G e n S c r i p t (P i s c a t a w a y 、 N J) によりクローン化した。

20

S a l I

~~~~~

G T C G A C T A G A C C A C C A T G G A C A T G A G G G T C C C C G C T C A G C  
T C C T G G G G C T C C T G C T A T T G T G G T T G A G A G G T G C C A G A T G  
T C A T G G G G A G G G A A C A T T T A C A A G C G A T C T G A G C A A A C A A  
A T G G A G G A A G A G G C A G T T A G A C T G T T C A T T G A A T G G C T C A  
A G A A C G G C G G A C C G A G T A G T G G T G C T C C G C C T C C C A G C G G  
A T C T G G C A G C G C T A C T G G T G  
G A T C T G G A T C G G G T G C A T C C T C T G G A T C T G G A A G C G C T A C  
C G G A T C C / / (配列番号 351)

30

~~~~~

B a m H I

【0537】

成熟 aK L H 1 2 0 . 6 - A b L C からなる O R F の後部を網羅する B a m H I (5') ~ N o t I (3') 断片 (以下の配列番号 368) を、標準的な P C R 技術に従い、オリゴプライマーの組 :

A A T G G A T C C G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C /
(配列番号 352) ; および A A T G C G G C C G C T C A A C A C T C T
C C / / (配列番号 353) と上記 (p T T 5 - aK L H 1 2 0 . 6 - V K 1 S P - κ 軽鎖 (L C) 構築物) の aK L H 1 2 0 . 6 - A b L C DNA 鋳型から増幅した。

40

B a m H I

~~~~~

G G A T C C G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C C T C C C T G T  
C T G C A T C T G T A G G A G A C A G A G T C A C C A T C A C T T G C C G G G C  
A A G T C A G G G C A T T A G A A A T G A T T T A G G C T G G T A T C A G C A G  
A A A C C A G G G A A A G C C C C T A A A C G C C T G A T C T A T G C T G C A T  
C C A G T T T G C A A A G T G G G G T C C C A T C A A G G T T C A G C G G C A G

50

TGGATCTGGGACAGAAATTCACCTCTCACAAATCAGCAGCCTG  
CAGCCTGAAGATTTTGCACCTTATTACTGTCTACAGCATATA  
ATAGTTACCCGCTCAGCTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGA  
GATCAAACGAACCTGTGGCTGCAACCATCTGTCTTTCATCTTC  
CCGCCATCTGATGAGCAGTTTGA AATCTTGGAACTGCGCTCTG  
TTGTGTGCTGTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCCAA  
AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAATCGGGTAAC  
TCCAGAGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA  
CCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGA  
CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAACCCAT  
CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG  
GAGAGTGTGAGCGGCGCGC／／（配列番号368）

10

~~~~~

Not I

【0538】

合成SalI-BamHI断片およびPCR増幅したBamHI-NotI断片を、標準的な分子クローニング技術（および上記実施例4のaKLH120.6-HC-[Lys16]ShKAb）に従い、対応する制限酵素により消化し、アガロースゲルから単離し、pTT5哺乳類一過性発現ベクターのSalIおよびNotIクローニング部位に結紮し、Ex-4-1kG-aKLH120.6LC単量体（N末端VK1/O12シグナルペプチドを有する）アミノ酸配列（配列番号355）をコードするクローンを含む発現ベクターpTT5:Ex-4-1kG-aKLH120.6LC（配列番号354）を生成した。

20

SalI

~~~~~

GTCGACTAGACCAACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGC  
TCCTGGGGGCTCCTGCTATTGTGGTTTGAGAGGTGCCAGATG  
TCATGGGGAGGGGAACATTTACAAGCGATCTGAGCAAACAA  
ATGGAGGAAGAGGCGAGTTAGACTGTTTCATTTGAATGGCTCA  
AGAACGGCGGACCGAGTAGTGGTGTCTCCGCCCTCCCAGCGG  
ATCTGGCAGCGCTACTGGTG GATCTGGATCGGGGTGCATC  
CTCTGGATCTTGAAGCGCTACCGGATCCGACATCCAGATG  
ACCCAGTCTCCATCCTCCTCCTGTCTGCACTCTGTAGGAGACA  
GAGTCAACCATCACTTTGCCGGGGCAAGTCAAGGGCATTAGAAA  
TGATTTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGGAAAGCCCCCT  
AAACGCCCTGATCTATGCTGCAATCCAGTTTGC AAAGTGGGG  
TCCCATCAAGGTTTCAGCGGCGAGTGGATCTGGGGACAGAAATT  
CACTCTCACAAATCAGCAGCCTGCAAGCCTGAAGATTTTGC  
ACTTATTACTGTCTACAGCATATAATAGTTACCCGCTCACTT  
TCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACCTGTGGC  
TGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG  
TTGAAATCTTGAACCTGCGCTCTGTGTTGTGTGCTGTGAATA  
ACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGA  
TAACGCCCTCCAAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTCAACA  
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA  
CCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT  
CTACGCCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC  
GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGAGCGGCGCG  
C／／（配列番号354）

30

40

~~~~~

50

N o t e

【0539】

Ex 4-1 kG-aK L H 1 2 0 . 6 - A b 融合物の精製のための条件培地を産生するため、発現ベクター (p T T 5 : E x - 4 - 1 k G - a K L H 1 2 0 . 6 L C および p T T 5 : a K L H 1 2 0 . 6 H C) のこれらの対で一過性発現を行った。エプスタインバーウイルス核抗原-1を安定的に発現しているヒト胚腎臓293細胞系 (293-6 E 細胞) を国家研究会議 (M o n t r e a l , C a n a d a) から得た。6 m M L - グルタミン (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) 、1. 1 % F - 6 8 P l u r o n i c (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) および 250 μ g / μ l の G e n e t i c i n (I n v i t r i g e n , C a r l s b a d , C A) で 10 補充した F 1 7 培地 (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) を用いて、血清を含まない懸濁培養として細胞を維持した。懸濁細胞培養を攪拌三角フラスコ培養内で維持した。培養フラスコを 37 °C、加湿した 5 % C O ₂ 雰囲気で 65 r p m で攪拌した。25 k D a 線状 P E I (P o l y s c i e n c e s , W a r r i n g t o n , P A) の原液 (1 m g / m L) を水中で調製し、溶解するまで H C l で p H 2. 0 に酸性化してから、N a O H で中性化して、滅菌ろ過し (0. 2 μ m) 、アリコートし、使用時まで - 20 °C で保存した。T r y p t o n e N 1 を O r g a n o T e c h n i S . A . (T e k n i S c i e n c e , Q C , C a n a d a) から得た。原液 (20 % , w / v) を F r e e S t y l e 培地 (I n v i t r o g e m , C a r l s b a d , C A) 内で調製し、0. 2 μ m フィルターを介して滅菌ろ過し、使用時まで 4 °C で保存した。典型的には、トランスフェクションを 1 L 尺度で実施した。細胞 (293-6 E) を生存細胞密度 1. 1 $\times 10^6$ 細胞 / m L まで増殖してから、トランスフェクション複合体を 1 / 10 容量の最終培養容量内で調製した。1 L トランスフェクション培養において、トランスフェクション複合体を 100 m L の F 1 7 基礎培地で調製し、500 μ g プラスミド D N A (重鎖および軽鎖 D N A、1 : 1 比) をまず 100 m L の F 1 7 培地で希釈した。室温で 5 分インキュベーション後、1. 5 m L の P E I 溶液を添加した。複合体を軽くボルテックスしてから、室温で 15 分間インキュベートした。攪拌フラスコ培養内でトランスフェクション複合混合物を細胞に添加することにより細胞をトランスフェクトした。24 時間トランスフェクション後、T r y p t o n e N 1 をトランスフェクトした培養に添加して最終濃度 0. 5 % とし、トランスフェクトした培養を振盪機上、37 °C、加湿した 5 % C O ₂ 雰囲気 30 で 65 r p m でさらに 5 日間維持してから、回収した。条件培地を 4000 r p m の遠心分離により回収してから、0. 2 μ m フィルター (C o r n i n g I n c .) を介して滅菌ろ過した。

【0540】

次いで融合物をタンパク質 A クロマトグラフィー (G E L i f e S c i e n c e s) により 2 価陽イオンを含まないダルベッコの P B S 10 カラム容量を洗浄緩衝液として、および 100 m M 酢酸 (p H 3. 5) を溶出緩衝液として 7 °C で用いて精製した。留分の p H はフラクションコレクター管中に 0. 025 容量の 2 M トリス塩基を残すことにより増大した。クロマトグラムに基づき溶出ピークをプールしてから、10 k D a S l i d e - A - L y z e r s (P i e r c e) を用いて室温で 3 時間、20 容量超の 10 m M 酢酸、9 % ショ糖 (p H 5. 0) に対して透析した。次いで透析物質を 0. 22 μ m 酢酸セルロースフィルターを介してろ過し、吸光度 280 n m で濃度を決定した。P h e n o m e n e x S E C 3000 カラム (7. 8 $\times$ 300 m m) の 50 m M N a H ₂ P O ₄、p H 6. 5、250 m M N a C l 溶液に抗体融合物 25 μ g 試料を注入し、1 m L / 分で展開して吸光度 280 n m で観察した (図 43)。予期したサイズのタンパク質において予期した保持時間で溶出した融合タンパク質から、タンパク質が過剰に凝集せずに予期した複合体を形成できたことが示される。Ex 4-aK L H 1 2 0 . 6 抗体の分析を、220 V で展開した 1. 0 m m トリス-グリシン 4 ~ 20 % S D S - P A G E (N o v e x) を用いて、還元および非還元負荷緩衝液を用いて、Q u i c k B l u e (B o s t o n B i o l o g i c a l s) による染色により行った (図 44)。非還元 S D S - 40 50

PAGEは、融合タンパク質の予期した第四級複合体を形成し、エキセンディン-4ペプチドのaKLH120.6抗体との融合により、予期した構造の生成物に至ることを示す。

【実施例11】

【0541】

アビマー-aKLH融合

C681ポリペプチドは、いわゆるアビマー構造のIL-6結合ポリペプチドである。(例えば、Kolkman et al., Novel Proteins with Targeted Binding、米国特許第2005/0089932号; Baker et al., IL-6 Binding Proteins、米国特許第2008/0281076号; Stemmer et al., Protein Scaffolds and Uses Thereof、米国特許第2006/0223114号および米国特許第2006/0234299号を参照されたい)。

【0542】

C681-aKLH120.6 IgG2 HC融合物の成分は以下の単量体を含有した。

(a) aKLH120.6 κLC (配列番号28) ; および

(b) 以下のアミノ酸配列を有する(VK-1SP)-C681-(G5)-aKLH120.6 IgG2 HC融合物:

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCSGGSCLPDQFRCGNGQCIPLDWVCDGVNDPCDDSDDEEGCPPRTCAPSQFQCGSGYCI
QRWVCDGENDCEDGSDDEANCAAGSVPTCPSDEFRCRNGRCIPRAWRC
DGVNDCADNSDEEDCTEHTGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKV
SCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGR
VTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARDRGSYYWFDPWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSTNFGTQTYTCNVDHKPSN
TKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTFRVVSIVLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI
SKTKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG// (配列番号356)。

【0543】

所望のC681-aKLH120.6 IgG2 HC生成物は、両重鎖のN末端に融合したアビマーを有する完全抗体であった。C681-重鎖:軽鎖の比率は1:1であった。予期したC681-aKLH120.6 IgG2 HC融合タンパク質を本明細書に記載のイオン交換クロマトグラフィーを用いて単離した。

【0544】

C681-aKLH120.6 IgG2可変HC融合物を、以下のアミノ酸配列をコードする合成遺伝子としてBlue Heronから注文した:

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCSGGSCLPDQFRCGNGQCIPLDWVCDGVNDPCDDSDDEEGCPPRTCAPSQFQCGSGYCI
QRWVCDGENDCEDGSDDEANCAAGSVPTCPSDEFRCRNGRCIPRAWRC
DGVNDCADNSDEEDCTEHTGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKV
SCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGR
VTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARDRGSYYWFDPWGQGT
LVTVSSASTK// (配列番号

350)。

【0545】

断片をSalIおよびBsmBIで消化し、1%アガロースゲル上に流して、対応する断片を切断し、QiagenのGel Purificationキットにより精製した。同時に、pTT5-VK1SP-aK1H120.6IgG2 HC DNA鋳型を同様に消化して精製し、定常HC領域を有するpTT5ベクター骨格を得た。アビマー断片をpTT5-IgG2 HC定常領域と結紮して、One Shot (商標) Top10細菌に形質転換した。DNAを配列決定用に提出した。いくつかのクローン配列分析において上記配列と100%適合したが、1クローンのみを大規模プラスミド精製用を選択した。最終pTT5-VK1SP-C681-aK1H120.6IgG2 HC構築物はC681-(G5)-aK1H120.6IgG2 HC融合ポリペプチド(配列番号356)をコードした。

10

【0546】

aK1H120.6IgG2 HC-C681融合物の成分は以下の単量体を含有した。

(a) aK1H120.6κLC(配列番号28)；および

(b) 以下のアミノ酸配列を有するaK1H120.6IgG2 HC-C681融合物：

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARQCQVQLVQSGAEVKKPGASV
KVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT
NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAR
DRGSYYWFDPWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
ESTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
SGLYSLSLVVTVPSSTNFGGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTV
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF
RVVSVLTITVHQLDNLNGKEYKKCKVSNKGLPAPIEKTI
SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGSCLPDQ
FRCGNGQCIPLDWVC DGVND CPDD SDEEGC PPRTCAPSQF
QCGSGYCSISRWVC DGENDC EDGSDEAN CAGSVPTCPSDE
FRCRNGRCIPRAWRC DGVND CADNSDEEDCTEHT// (配列番
号357)。

20

30

【0547】

所望のaK1H120.6IgG2 HC-C681生成物は両重鎖のC末端に融合したアビマーを有する完全抗体であった(図1Gに図解)。重鎖-C681：軽鎖の比率は1：1であった。予期したaK1H120.6IgG2 HC-C681融合タンパク質を本明細書に記載のイオン交換クロマトグラフィーを用いて単離した。

【0548】

側面SexAIおよびNotI制限部位を有するC681断片を、以下のアミノ酸配列をコードする合成遺伝子としてBlue Heronから注文した：

MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
MLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYT
QKSLSLSLSPGGGGGGSGGSCLPDQFRCGNGQCIPLDWVC D
GVND CPDD SDEEGC PPRTCAPSQFQCGSGYCSISRWVC DGE
NDC EDGSDEAN CAGSVPTCPSDEFRCRNGRCIPRAWRC DGV
VND CADNSDEEDCTEHT// (配列番号358)。

40

【0549】

断片をSexAIおよびNotIで消化し、1%アガロースゲル上に流して、対応する

50

断片を切断し、QiagenのGel Purificationキットにより精製した。同時に、pTT5-VK1SP-aK1H120.6IgG2 HC DNA鋳型をSalIおよびSexAIで同様に消化して精製し、aK1H120.6IgG2 HC単量体（配列番号29）のためのDNAコード配列を産生した。pTT5ベクターをSalIおよびNotIにより切断し、1%アガロースゲル上に流して、大型断片を切断し、QiagenのGel Purificationキットによりゲル精製した。アビマーおよびaK1H120.6IgG2 HC断片をpTT5断片と結紮して、One Shot Top10細菌に形質転換した。DNAを配列決定用に提出した。いくつかのクローン配列分析において上記配列と100%適合したが、1クローンのみを大規模プラスミド精製用を選択した。最終pTT5-VK1SP-aK1H120.6IgG2 HC-C681構築物はaK1H120.6IgG2 HC-(G5)-C681融合ポリペプチド（配列番号357）をコードした。

10

【0550】

C681-aK1H120.6κLC融合物の成分は以下の単量体を含有した。

(a) aK1H120.6IgG2 HC（配列番号29）；および

(b) 以下のアミノ酸配列を有するC681-aK1H120.6κLC融合物：

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCSGGSCLPDQFRCGNGQCIPLDWVCDGVNDPCDDSDDEEGC PPRTCAPSQFQCGSGGYCISQRWVCDGENDCEDGSDDEANCAGSVPTCPSDEFRCRNGRCIPRAWRC DGVND CADNSDEEDCTEHTGGGGGDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGGG TKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC//（配列番号359）。

20

【0551】

所望のC681-aK1H120.6κLC生成物は、両軽鎖のN末端に融合したアビマーを有する完全抗体であった。C681-軽鎖：重鎖の比率は1：1であった。予期したC681-aK1H120.6κLC融合タンパク質を本明細書に記載のイオン交換クロマトグラフィーを用いて単離した。

30

【0552】

側面SalI BsiWI制限部位を有する（VK-1SP）-C681-（G5）-aK1H120.6κ可変LC融合物を、以下のアミノ酸配列をコードする合成遺伝子としてBlue Heronから注文した：

MDMRVPAQLLGLLLWLRLRGARCSGGSCLPDQFRCGNGQCIPLDWVCDGVNDPCDDSDDEEGC PPRTCAPSQFQCGSGGYCISQRWVCDGENDCEDGSDDEANCAGSVPTCPSDEFRCRNGRCIPRAWRC DGVND CADNSDEEDCTEHTGGGGGDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGGG TKVEIKRTVA//（配列番号360）

40

【0553】

断片をSalIおよびBsiWIで消化し、1%アガロースゲル上に流し、対応する断片を切断し、QiagenのGel Purificationキットにより精製した。同時に、pTT5-VK1SP-aK1H120.6κLC DNA鋳型を同様に消化して精製し、定常LC領域でpTT5ベクター骨格を生成した。アビマー断片をpTT5-κLC定常領域と結紮して、One Shot Top10細菌に形質転換した。DNAを配列決定用に提出した。いくつかのクローン配列分析において上記配列と100%適合したが、1クローンのみを大規模プラスミド精製用を選択した。最終pTT5-VK1SP

50

－C 6 8 1－aK L H 1 2 0． 6 κ L C 構築物はC 6 8 1－（G 5）－aK L H 1 2 0． 6 κ L C 融合ポリペプチド（配列番号 3 5 9）をコードした。

【0 5 5 4】

アビマー－免疫グロビン融合物の単離方法。

タンパク質 A セファロース（GE Health care）を用いた Fc 領域の親和性高速タンパク質液体クロマトグラフィー（FPLC）捕獲、続いてトリス緩衝生理食塩水、1 mM CaCl₂（Teknova）によるカラム洗浄および 100 mM 酢酸、1 mM CaCl₂（pH 3.5）を 2.5 cm/分 で流した溶出工程により条件培地の初回精製を行った。タンパク質を含む留分をプールし、10 N NaOH を用いて pH を 8.0 に調整し、5 容量の水でさらに希釈した。物質を 0.45 μm 酢酸セルロースフィルター（Corning）を介してろ過し、陽イオン交換 FPLC（SP Sepharose High Performance；GE Health care）によりさらに精製した。試料を 100 % 緩衝液 A（20 mM トリス、1 mM、pH 8.0）で平衡させたカラム上に負荷し、勾配 0～80 % 緩衝液 B（20 mM トリス、1 M NaCl、1 mM CaCl₂、pH 8.0）30 カラム容量、流速 1.5 cm/分 で溶出した。ピークを含む標的種をプールして、10 mM トリス、150 mM NaCl、1 mM CaCl₂（pH 8.0）中に製剤化した。N 末端 HC および N 末端 LC ならびに C 末端 HC 融合タンパク質の精製例を図 3 6～3 8 に示す。非還元 SDS－PAGE 分析（図 3 6）により、完全に組み立てられた抗体が形成され得ることが示され、還元 SDS－PAGE 分析により所望の成分が存在することが示される。サイズ排除クロマトグラム（図 3 7）により、精製した生成物の大部分が所望の非凝集状態にあることが示される。最終的に、質量スペクトル分析（図 3 8）により、所望の融合生成物が存在することが示される。まとめると、これらの例により、aK L H 1 2 0． 6 抗体は、所望の生成物を形成するアビマーとの融合物を受容できることが示される。

10

20

【実施例 1 2】

【0 5 5 5】

a D N P および a K L H 抗体の B I A c o r e（商標）結合アッセイ

物質。ハイブリドーマ（3 A 1、3 C 2、3 A 4 および 3 B 1）または組換え CHO（3 A 4－F－G 2 および 3 B 1－G 2）のいずれか由来の精製した抗 D N P 抗体の発現を試験した。抗ヒト Ig G、Fc γ－特異性抗体は Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.（West Grove, PA）から得た。D N P－B S A（ウシ血清アルブミンに結合される 2，4－ジニトロフェノール）は Biosearch Technologies, Inc.（Novato, CA）から得た。B I A C o r e 2 0 0 0，research grade センサーチップ CM 5、界面活性剤 P－2 0（ポリオキシエチレンソルビタン）、HBS－EP（10 mM HEPES、0.15 M NaCl、3.4 mM EDTA、0.005 % P－2 0、pH 7.4）、アミンカップリング試薬、10 mM 酢酸塩（pH 4.0）および 10 mM グリシン（pH 1.5）は B I A C o r e，Inc.（Piscataway, NJ）から得た。リン酸緩衝生理食塩水（PBS、1×、塩化カルシウム非含有、塩化マグネシウム非含有）は Invitrogen（Carlsbad, CA）から得た。ウシ血清アルブミン（BSA、分留 V、Ig G 非含有）は Sigma（St. Louis, MO）から得た。

30

40

【0 5 5 6】

ハイブリドーマから発現し、精製した抗 K L H 抗体（ヒト Ig G 1、クローン 1 2 0． 6． 1）を試験した。多量体の高分子量キーホールリンペットヘモシアニン（K L H）は Pierce（Rockford, IL）から得た。抗ヒト Ig G、Fc γ－特異性抗体は Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.（West Grove, PA）から得た。B I A C o r e 2 0 0 0，research grade センサーチップ CM 5、界面活性剤 P－2 0（ポリオキシエチレンソルビタン）、HBS－EP（10 mM HEPES、0.15 M NaCl、

50

3. 4 mM EDTA、0.005% P-20、pH 7.4)、アミンカップリング試薬、10 mM 酢酸塩 (pH 4.5) および 10 mM グリシン (pH 1.5) は B I A C o r e, Inc. (P i s c a t a w a y, N J) から得た。リン酸緩衝生理食塩水 (P B S、1×、塩化カルシウム非含有、塩化マグネシウム非含有) は I n v i t r o g e n (C a r l s b a d, C A) から得た。ウシ血清アルブミン (B S A、分留 V、I g G 非含有) は S i g m a (S t. L o u i s, M O) から得た。

【0557】

方法。 B I A c o r e (商標) 分析を以下のとおり実行した。抗ヒト I g G、F c γ -特異性抗体の C M 5 センサーチップ表面に対する固定化を、連続フローの 10 mM H E P E S、0.15 M N a C l、3.4 mM E D T A、0.005% P-20、pH 7.4 (H B S-E P 緩衝液) を製造業者の説明書に従いつつ用いて実施した。簡単に述べると、センサーチップ表面上のカルボキシル基を、0.2 M 1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル] 塩酸カルボジイミド (E D C) および 0.05 M N-ヒドロキシコハク酸イミド (N H S) を含む混合物 60 μ L を注入することにより活性化した。10 mM 酢酸緩衝液で希釈した (a K L H 抗体アッセイにおいて: pH 4.5、濃度 30 μ g/mL; a D N P 抗体アッセイにおいて: pH 4.0、濃度 60 μ g/mL) 抗ヒト I g G、F c γ -特異性抗体 180 μ L を注入することにより特異的表面を得た。表面上の過剰反応基を 60 μ L の 1 M エタノールアミンを注入することにより脱活性化した。最終固定化レベルは (a K L H 抗体アッセイにおいて) 約 9,000 または (a D N P 抗体アッセイにおいて) 約 10,000 共鳴単位 (R U) であった。ブランク、偽結合した参照表面もセンサーチップ上で調製した。抗体および抗原を P B S + 0.005% P-20 + 0.1 mg/mL B S A からなる試料緩衝液で希釈した。

【0558】

抗 D N P 抗体を個々のフローセル上で捕獲後、試料緩衝液または D N P-B S A のいずれかを、濃度 0.78~100 nM の範囲で注入した。2つの異なる D N P-B S A 試料の抗 D N P 抗体に対する親和性について試験した。D N P-B S A 試料は、B S A の各分子に結合する D N P 部分数が異なり、一方の試料は B S A 当たり 3 個の D N P 部分を含む、他方の試料は B S A 当たり 31 個の D N P 部分を含む。組換え抗 D N P 抗体に対する親和性については、D N P (31)-B S A (濃度 0.39~50 nM) のみ試験した。各サイクルにおいて、3つの個々の抗体をフローセル 2、3 および 4 上で捕獲し、フローセル 1 はブランクのまま残して参照表面とした。試料緩衝液または抗原を注入後、10 mM グリシン (pH 1.5) を 2 回注入して各表面を再生し、固定化した抗ヒト F c 表面から捕獲抗体を解離させた。B I A e v a l u a t i o n ソフトウェアを用いて、捕獲した抗 D N P 抗体に対する D N P-B S A 結合の明らかな反応速度変数を決定した。

【0559】

抗 K L H 抗体を個々のフローセル上で捕獲後、試料緩衝液または a K L H のいずれかを、濃度 0.19~100 nM の範囲で注入した。多量体の高分子量 a K L H の希釈物を調製するため、平均分子量 5,000,000 ダルトンを用いた。試料緩衝液または抗原を注入後、10 mM グリシン (pH 1.5) を 2 回注入して各表面を再生し、固定化した抗ヒト F c 表面から捕獲抗体を解離させた。B I A e v a l u a t i o n ソフトウェアを用いて、捕獲した抗 K L H 抗体に対する a K L H 結合の明らかな反応速度変数を決定した。

【0560】

B I A c o r e (商標) 結合アッセイ結果。 D N P-B S A に対する抗 D N P 抗体結合の結合分析において得られた明らかな会合 (k_a) および解離 (k_d) 速度定数、ならびに解離平衡定数 (K_D) を下表 8 A に要約する。表 8 A のデータは、D N P に特異的に結合する抗 D N P 抗体、および予期されたように低密度 D N P (3)-B S A よりも高密度 D N P (31)-B S A に対して密接に結合することを示す。D N P (31)-B S A に対する明らかな結合親和性はすべて一桁ナノモル以上である。

【0561】

K L H に対する抗 K L H 120.6.1 抗体結合の結合分析において得られた明らかな

10

20

30

40

50

会合 (k_a) および解離 (k_d) 速度定数、ならびに解離平衡定数 (K_D) を下表 8 B に要約する。表 8 B のデータは、このハイブリドーマ産生抗 K L H 抗体は明らかなサブナノモルの結合親和性で多量体 K L H に対して特異的に結合することを示す。

【 0 5 6 2 】

【表 1 8】

表 8 A a D N P 抗体の B I A c o r e (商標) 結合アッセイ。ND=未測定； $n e (y) = n \times 10^{(y)}$

抗体	DNP (3) -BSA への結合				DNP (31) -BSA への結合		
	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (nM)$		$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (nM)$
3A1	1.2e3	6.5e-4	526		3.4e4	3.1e-4	9
3C2	9.2e4	5.5e-4	6		1.3e5	2.8e-4	2
3A4	2.0e5	4e-4	2		5.9e5	4.8e-4	0.8
3B1	1.4e5	3.6e-4	3		3.7e5	5.8e-5	0.2
3A4-F-G2 (組換え)	ND	ND	ND		2.6e5	5.5e-4	2
3B1-G2 (組換え)	ND	ND	ND		4.2e5	3.1e-4	0.7

10

20

【 0 5 6 3 】

【表 1 9】

表 8 B a K L H 抗体のための B I A c o r e (商標) 結合アッセイ。 $n e (y) = n \times 10^{(y)}$

抗体	多量体 KLH への結合		
	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (nM)$
IgG1 (120.6.1)	1.2e5	2.5e-5	0.2

30

【 0 5 6 4 】

略語

本明細書を通して使用する略語は、特定の状況で別段の指定のない限り、以下のとおり定義する。

A c アセチル (以前はアセチル化残基を指していた)

A c B p a アセチル化 p -ベンジル-L-フェニルアラニン

A C N アセトニトリル

A c O H 酢酸

A D C C 抗体依存性細胞傷害

A i b アミノイソ酪酸

b A β -アラニン

B p a p -ベンゾイル-L-フェニルアラニン

B r A c ブロモアセチル (B r C H ₂ C (O))

B S A ウシ血清アルブミン

B z l ベンジル

C a p カプロン酸

C B C 全血球計算値

C O P D 慢性閉塞性肺疾患

C T L 細胞傷害性 T リンパ球

40

50

D C C	ジシクロヘキシルカルボジイミド	
D d e	1- (4, 4-ジメチル-2, 6-ジオキソ-シクロヘキシリデン) エチル	
D N P	2, 4-ジニトロフェノール	
D O P C	1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン	
D O P E	1, 2-ジオレオイル-s n-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン	
D P P C	1, 2-ジパルミトイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン	
D S P C	1, 2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン	
D T T	ジチオスレイトール	
E A E	実験的自己免疫性脳脊髄炎	
E C L	電気化学発光	10
E S I-M S	エレクトロスプレーイオン化質量分析	
F A C S	蛍光標示式細胞分取器	
F m o c	フルオレニルメトキシカルボニル	
H O B t	1-ヒドロキシベンゾトリアゾール	
H P L C	高速液体クロマトグラフィー	
H S L	ホモセリンラクトン	
I B	封入体	
K C a	カルシウム活性化カリウムチャネル (I K C a、B K C a、S K C a 含有)	
K L H	キーホールリンペットヘモシアニン	
K v	電位依存性カリウムチャネル	20
L a u	ラウリン酸	
L P S	リポ多糖類	
L Y M P H	リンパ液	
M A L D I-M S	マトリックス支援レーザー脱離イオン化法質量分析	
M e	メチル	
M e O	メトキシ	
M e O H	メタノール	
M H C	主要組織適合複合体	
M M P	マトリックスメタロプロテイナーゼ	
M W	分子量	30
M W C O	分子量カットオフ	
1-N a p	1-ナフチルアラニン	
N E U T	好中球	
N l e	ノルロイシン	
N M P	N-メチル-2-ピロリジノン	
O A c	酢酸塩	
P A G E	ポリアクリルアミドゲル電気泳動	
P B M C	末梢血液単核細胞細胞	
P B S	リン酸緩衝生理食塩水	
P b f	2, 2, 4, 6, 7-ペンダメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル	40
P C R	ポリメラーゼ連鎖反応	
P D	薬力学	
P e c	ピペコリン酸	
P E G	ポリ (エチレングリコール)	
p G l u	ピログルタミン酸	
P i c	ピコリン酸	
P K	薬物動態	
p Y	ホスホチロシン	
R B S	リボソーム結合部位	
R T	室温 (約 25 °C)	50

S a r サルコシン
S D S ドデシル硫酸ナトリウム
S T K セリントレオニンキナーゼ
t - B o c t e r t - ブトキシカルボニル
t B u t e r t - ブチル
T C R T細胞受容体
T F A トリフルオロ酢酸
T H F 胸腺液性因子
T r t トリチル

【図 1 A】

図 1 A



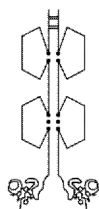
【図 1 C】

図 1 C



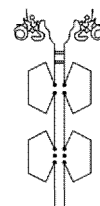
【図 1 B】

図 1 B



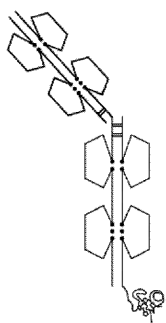
【図 1 D】

図 1 D



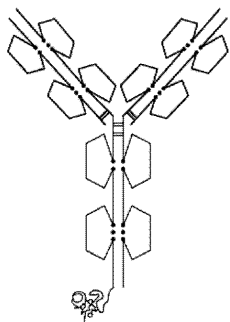
【図 1 E】

図 1 E



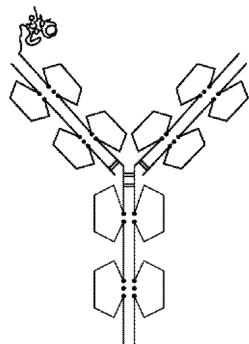
【図 1 F】

図 1 F



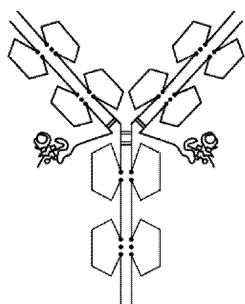
【図 1 I】

図 1 I



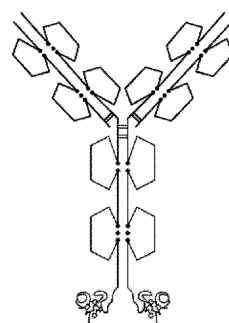
【図 1 J】

図 1 J



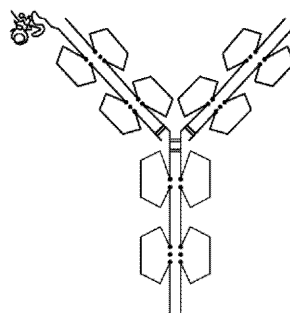
【図 1 G】

図 1 G



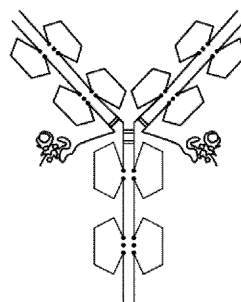
【図 1 H】

図 1 H



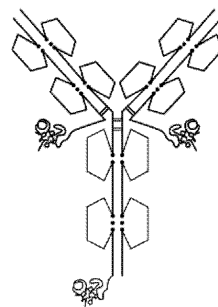
【図 1 K】

図 1 K



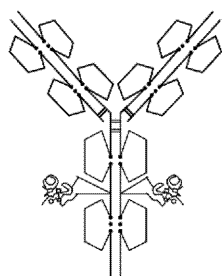
【図 1 L】

図 1 L



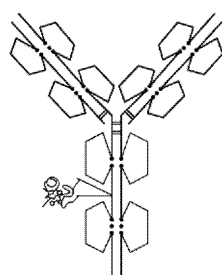
【図 1 M】

図 1 M



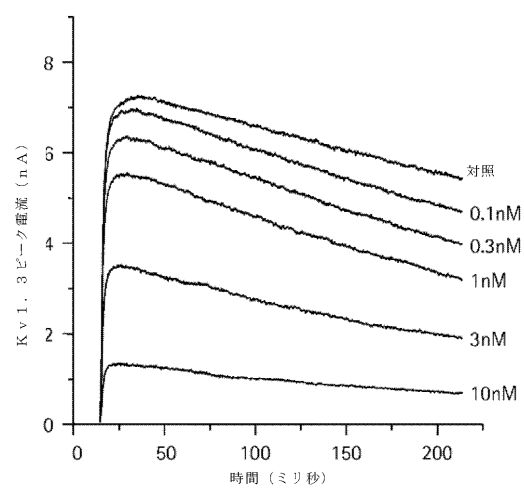
【図 1 N】

図 1 N



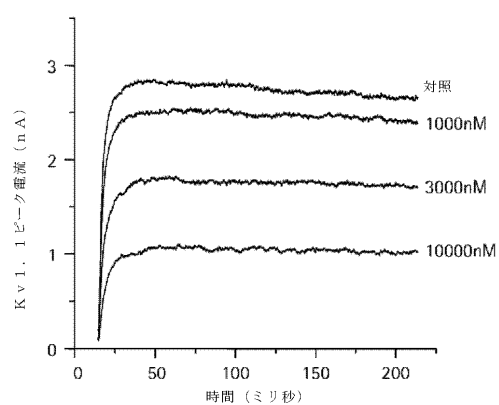
【図 2 A】

図 2 A



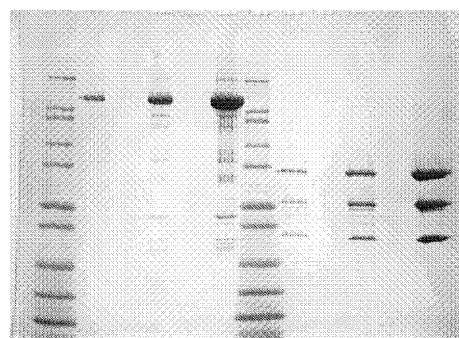
【図 2 B】

図 2 B



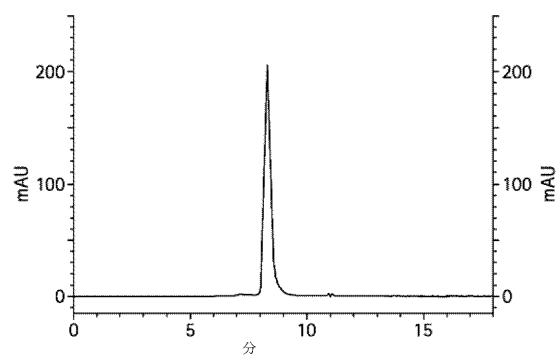
【図 3 A】

図 3 A

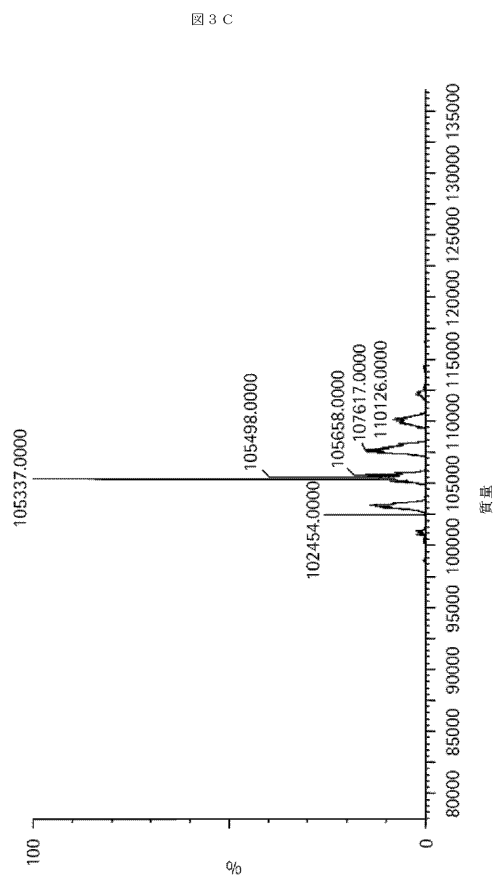


【図 3 B】

図 3 B

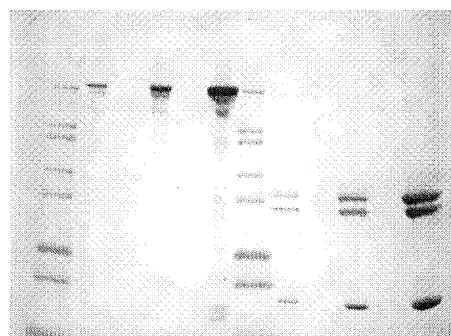


【図 3 C】



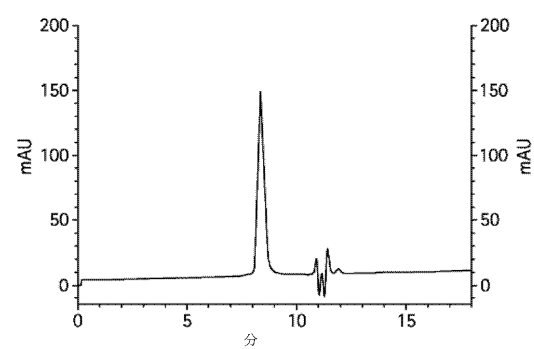
【図 4 A】

図 4 A



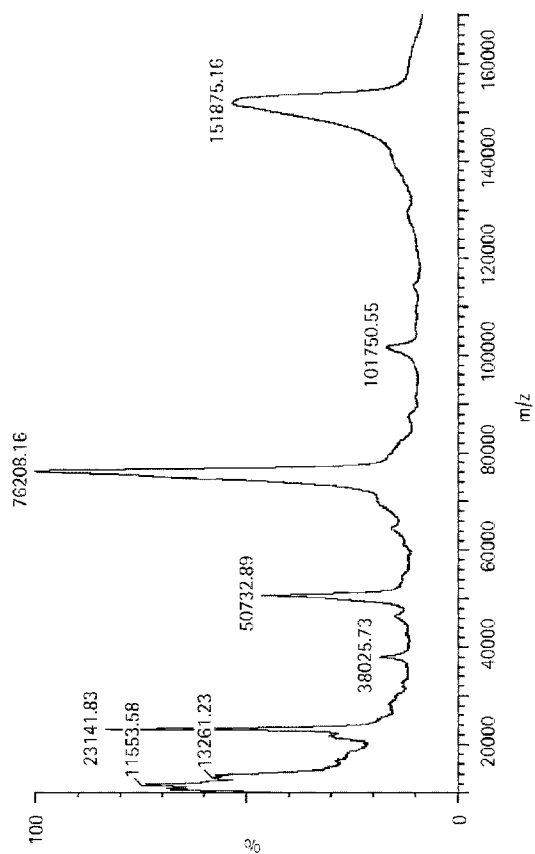
【図 4 B】

図 4 B



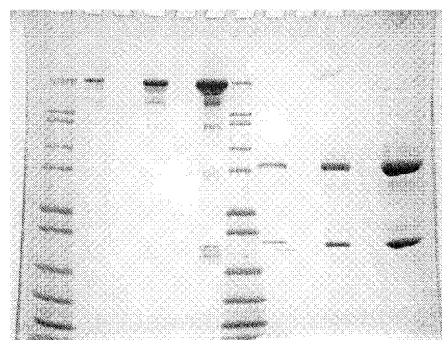
【図 4 C】

図 4 C



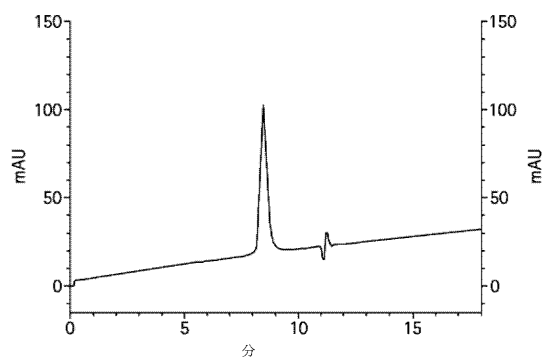
【図 5 A】

図 5 A

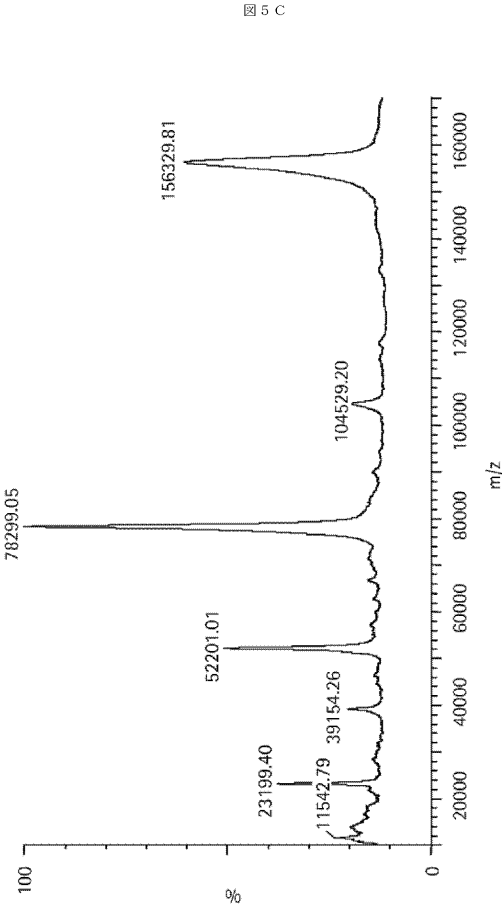


【図 5 B】

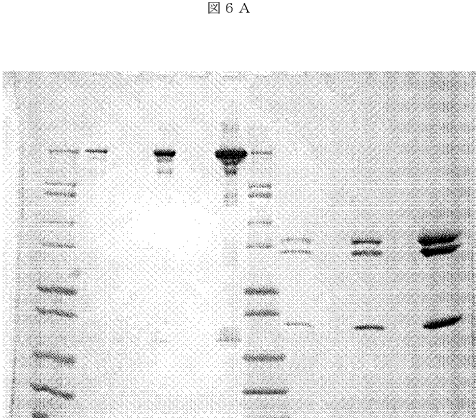
図 5 B



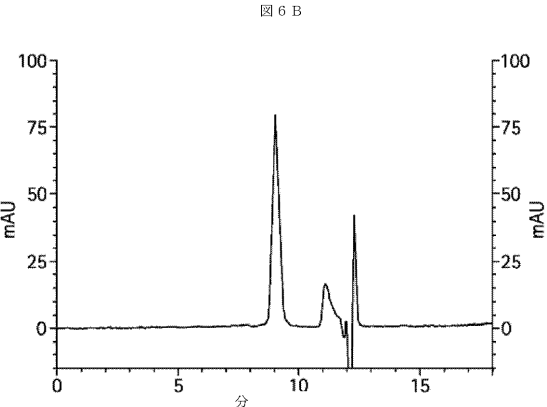
【図 5 C】



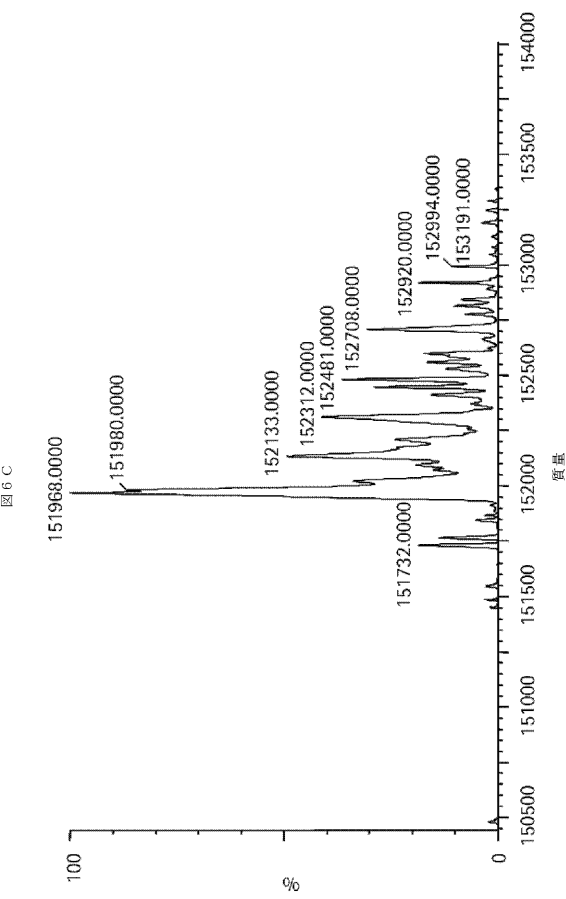
【図 6 A】



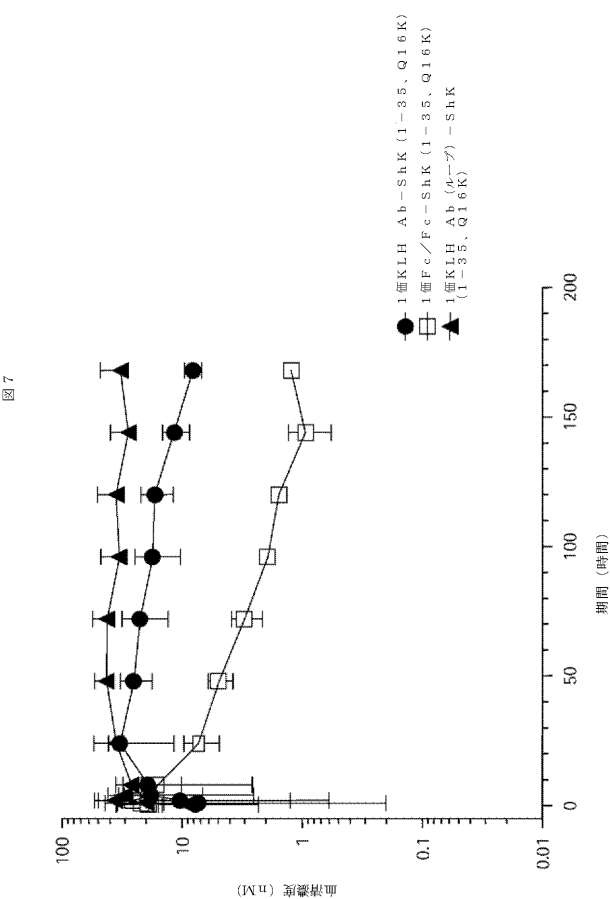
【図 6 B】



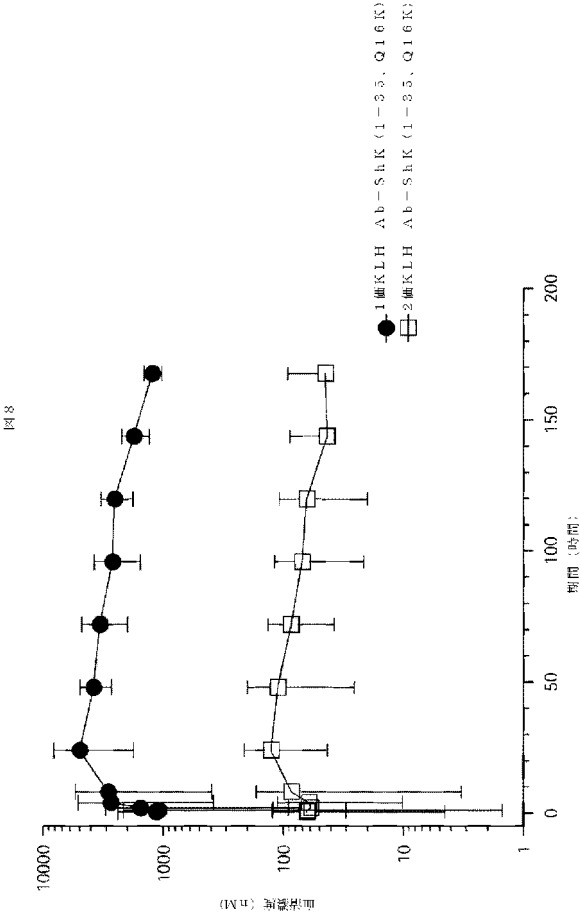
【図 6 C】



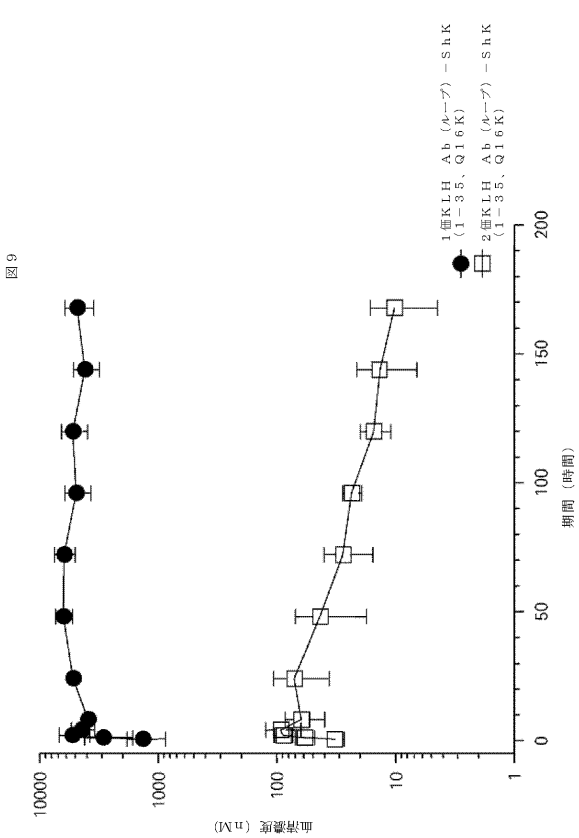
【図 7】



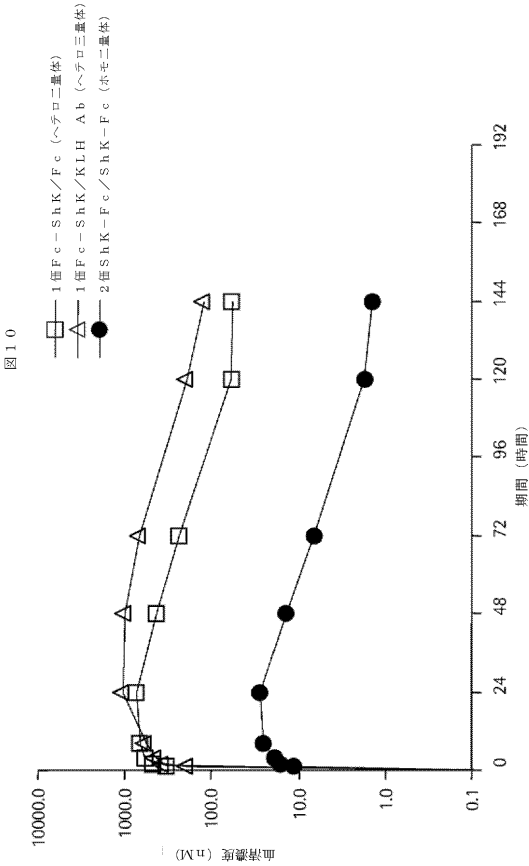
【図 8】



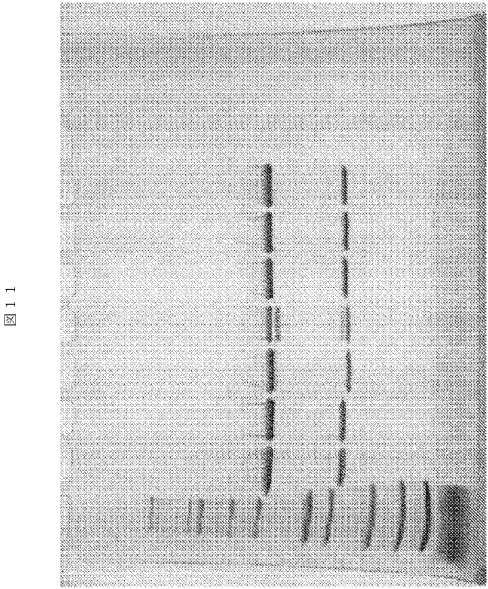
【図 9】



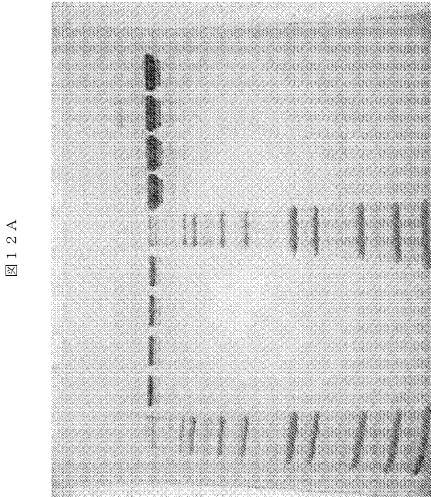
【図 10】



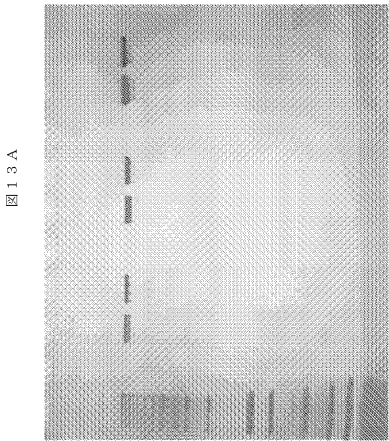
【図 11】



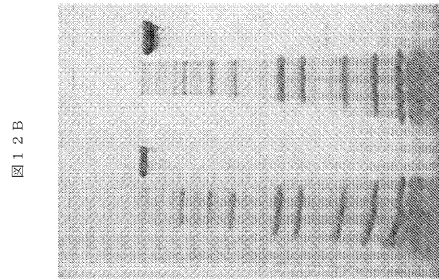
【図 1 2 A】



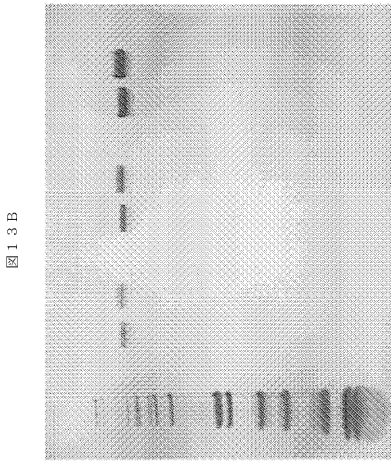
【図 1 3 A】



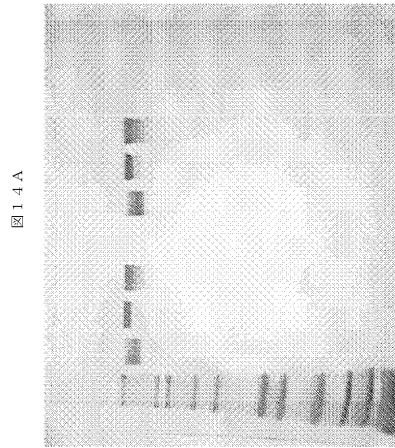
【図 1 2 B】



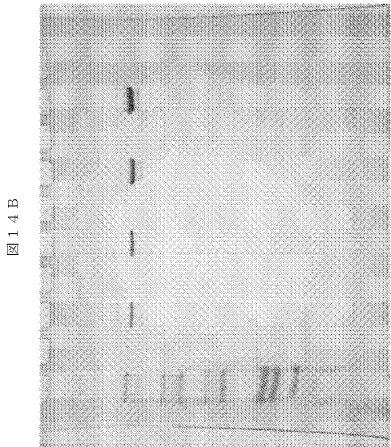
【図 1 3 B】



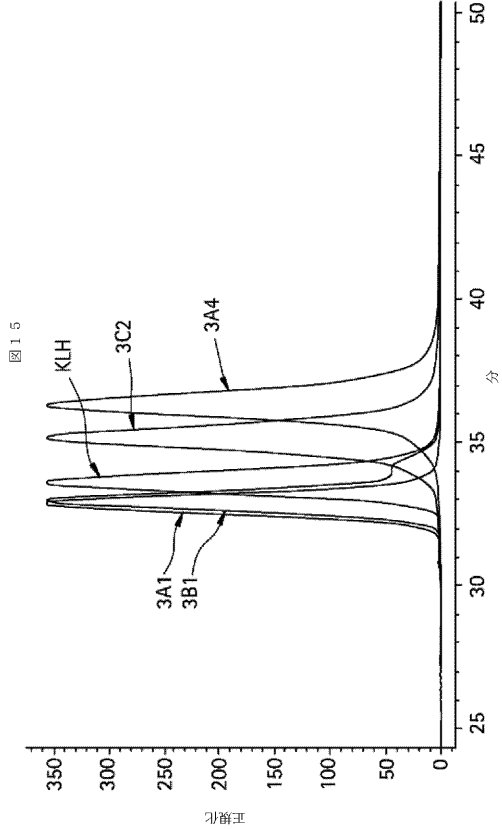
【図 1 4 A】



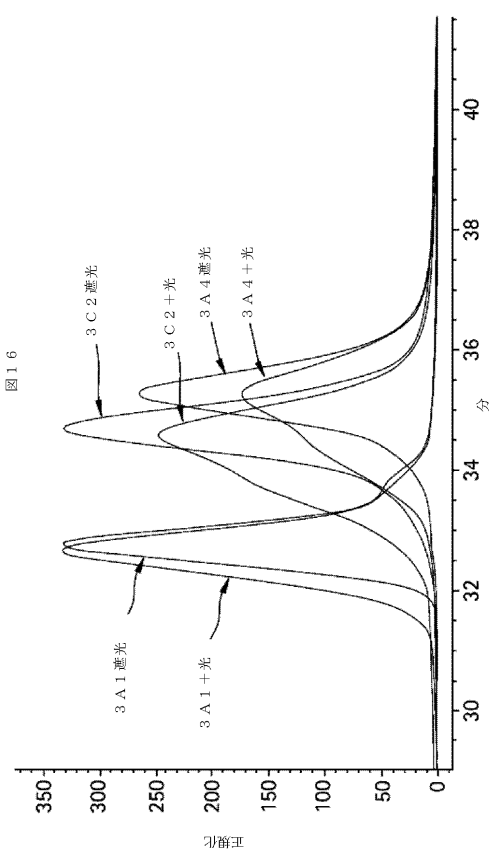
【図 1 4 B】



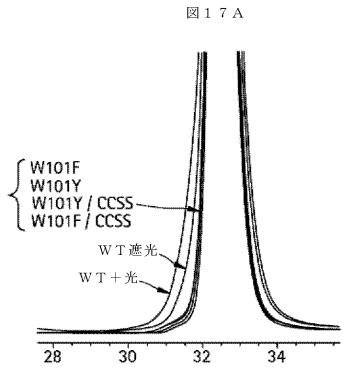
【図 1 5】



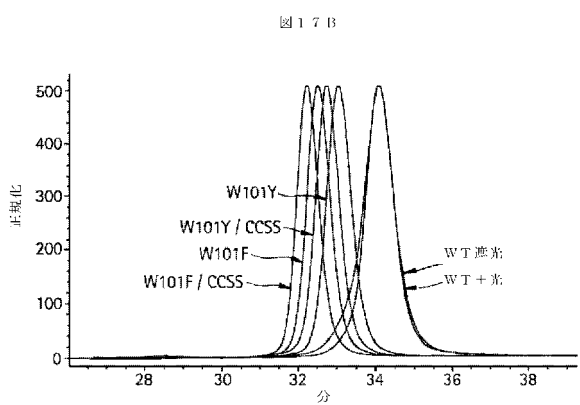
【図 1 6】



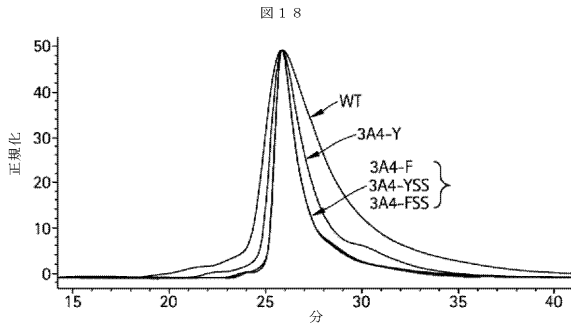
【図 1 7 A】



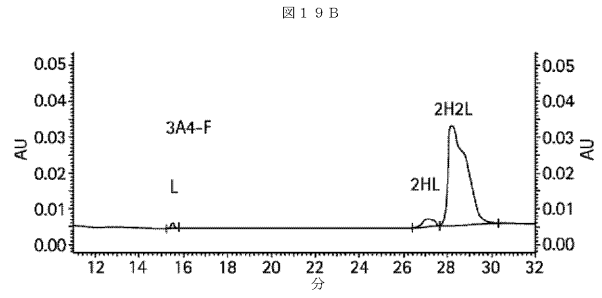
【図 1 7 B】



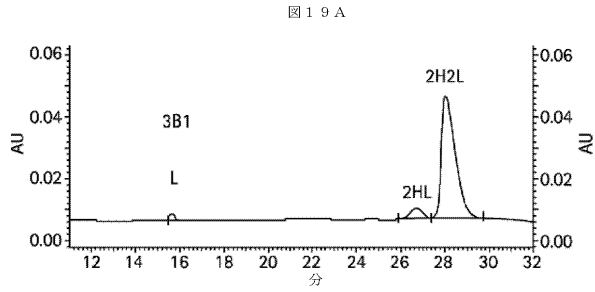
【図 18】



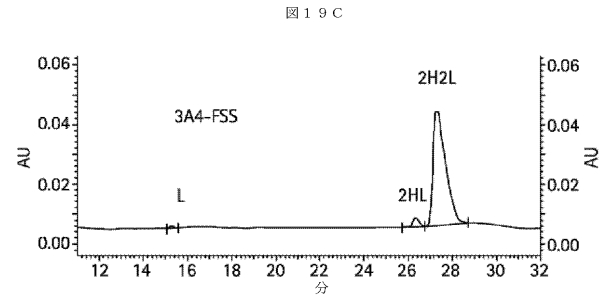
【図 19 B】



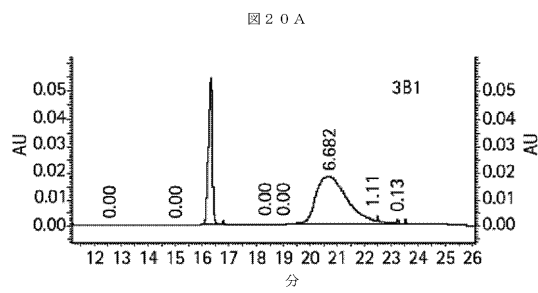
【図 19 A】



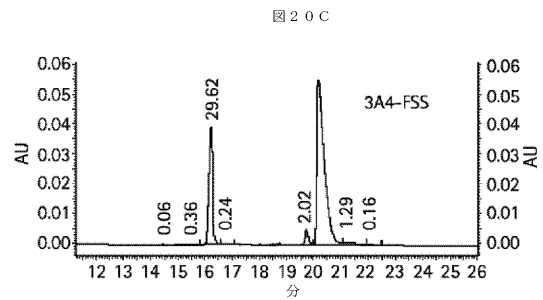
【図 19 C】



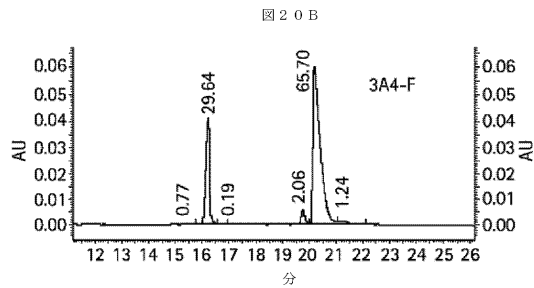
【図 20 A】



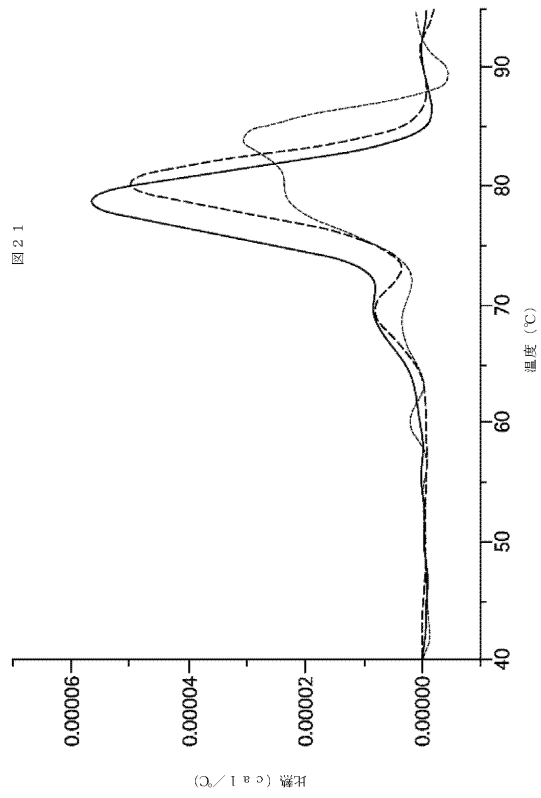
【図 20 C】



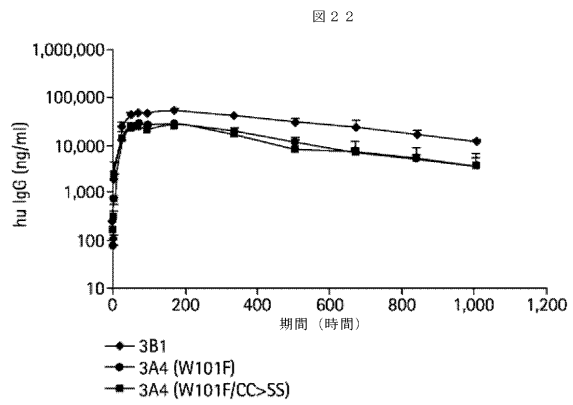
【図 20 B】



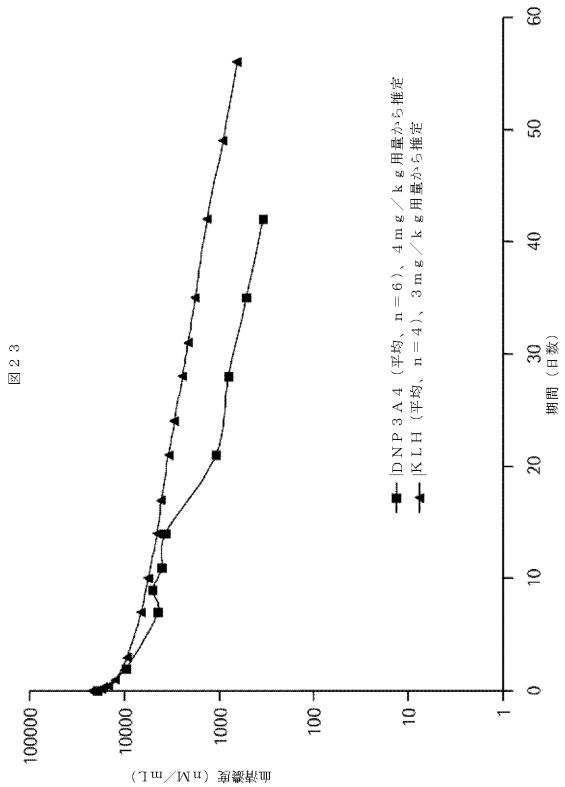
【図 2 1】



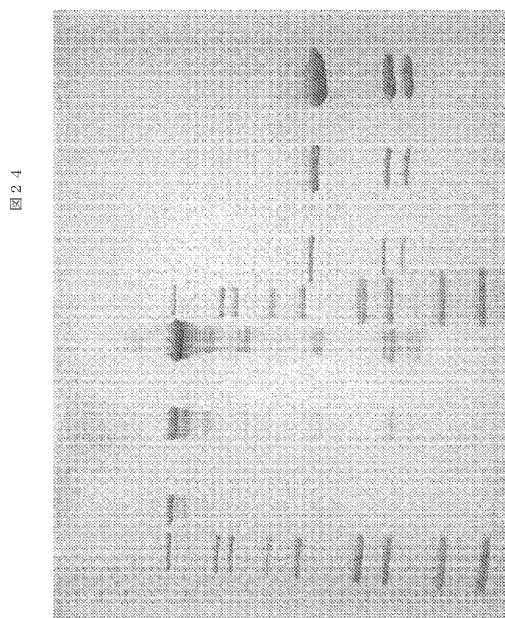
【図 2 2】



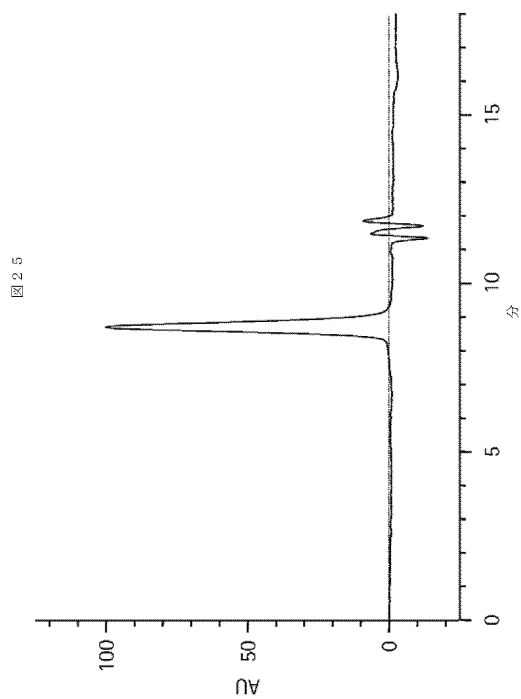
【図 2 3】



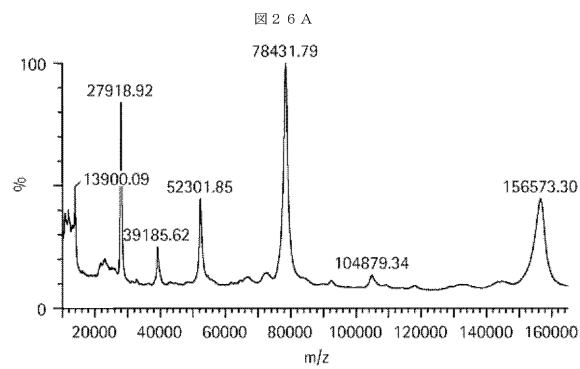
【図 2 4】



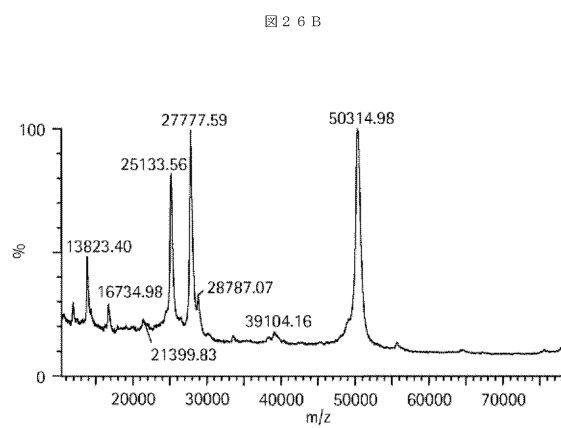
【図 2 5】



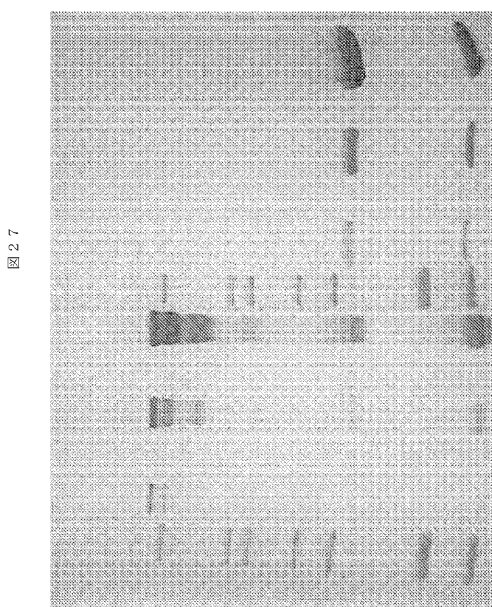
【図 2 6 A】



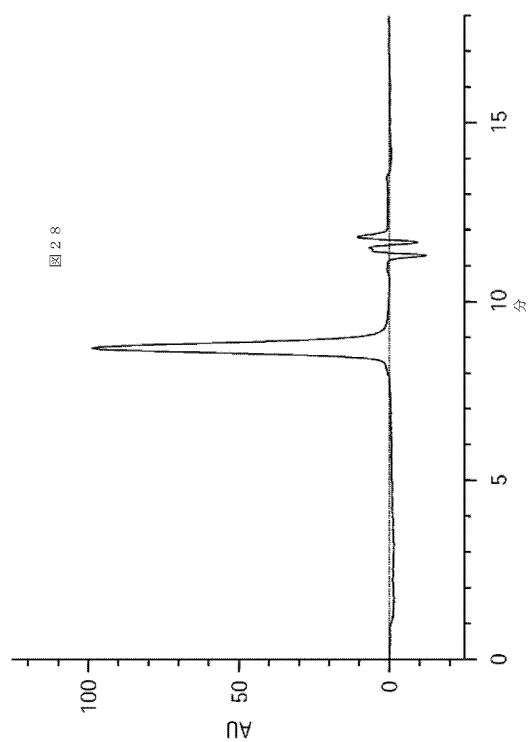
【図 2 6 B】



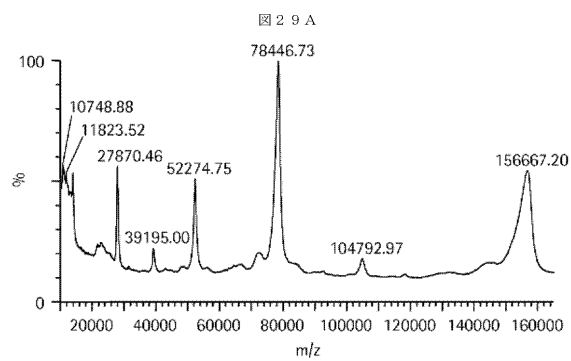
【図 2 7】



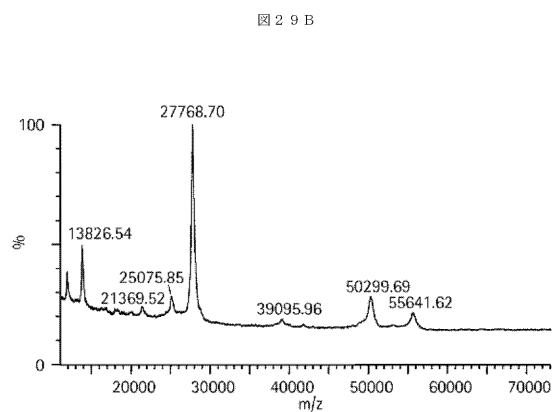
【図 2 8】



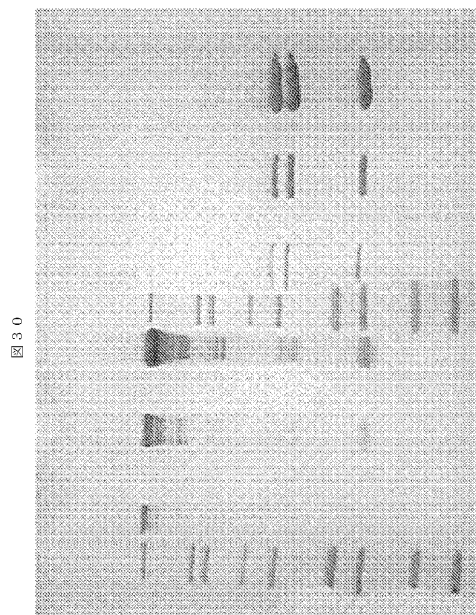
【図 29 A】



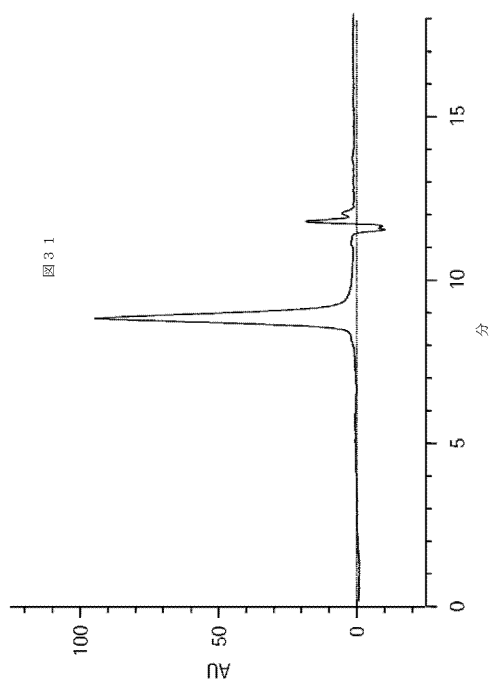
【図 29 B】



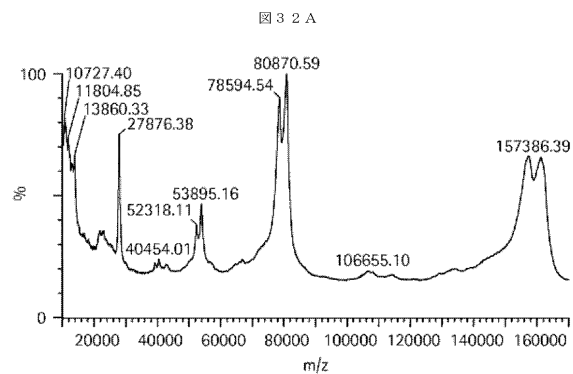
【図 30】



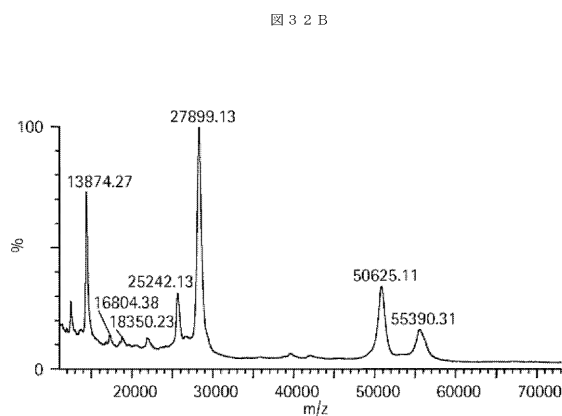
【図 31】



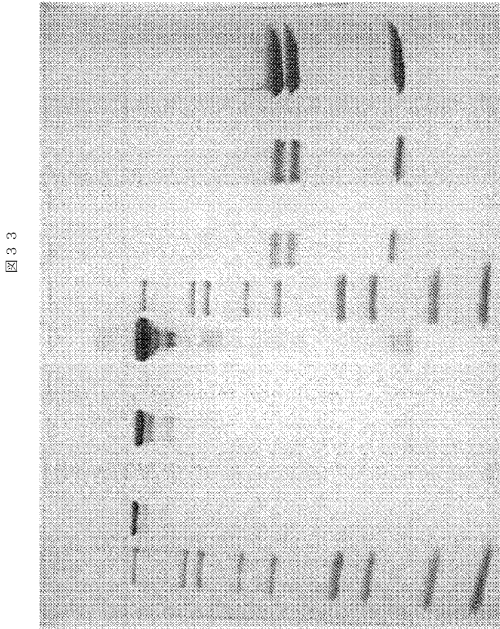
【図 32 A】



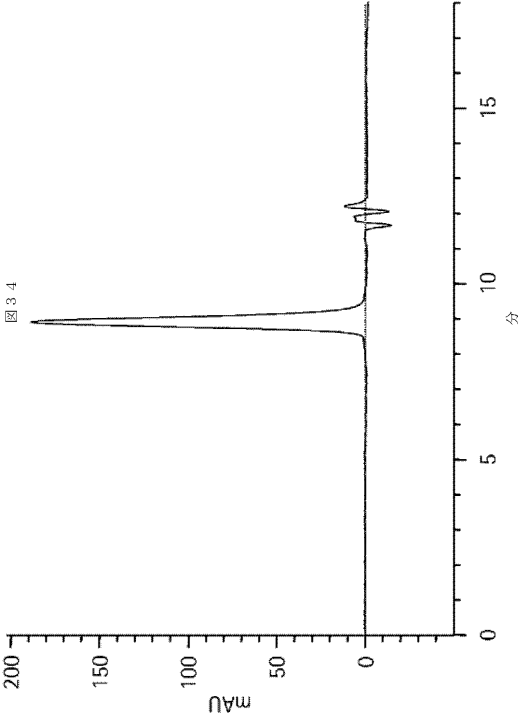
【図 32 B】



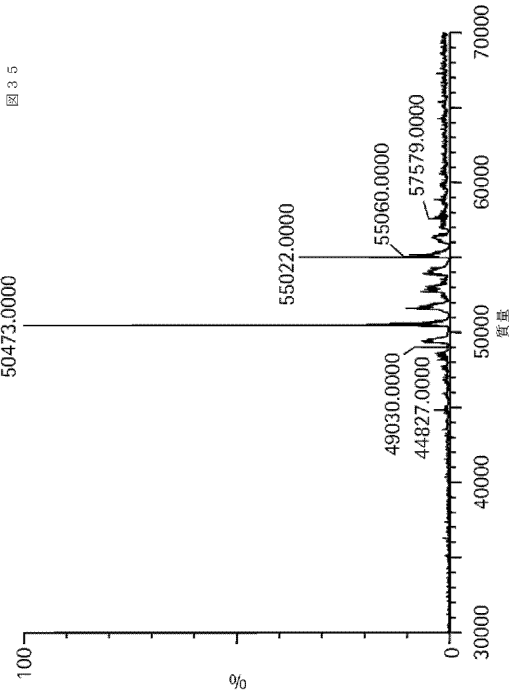
【図 3 3】



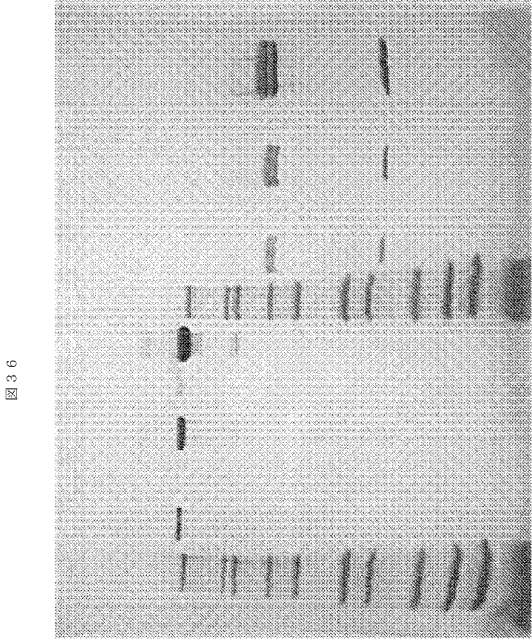
【図 3 4】



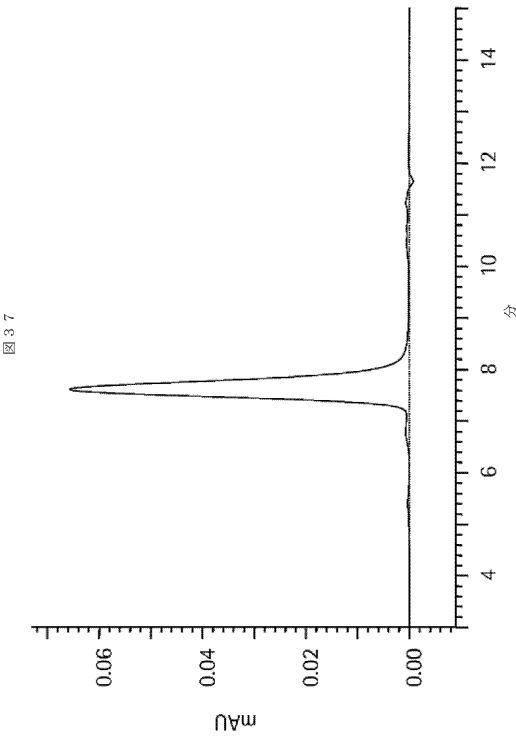
【図 3 5】



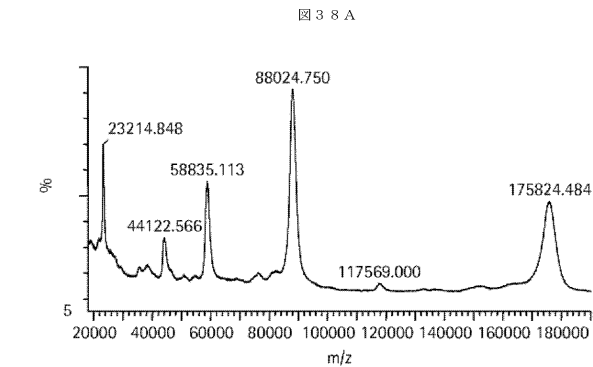
【図 3 6】



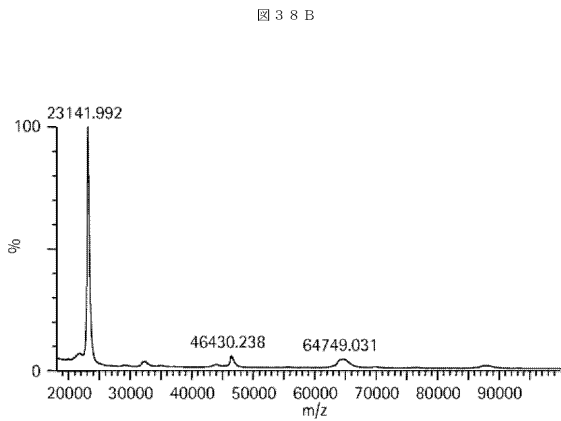
【図 3 7】



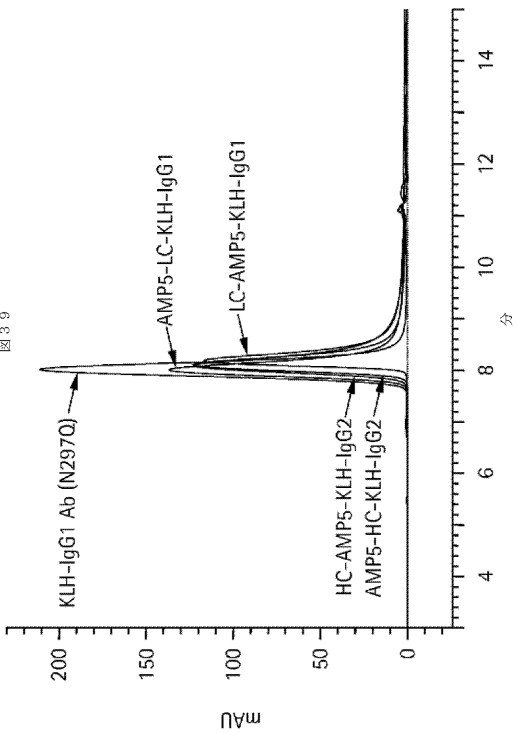
【図 3 8 A】



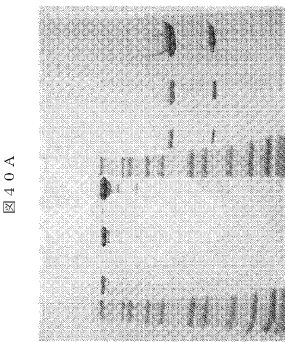
【図 3 8 B】



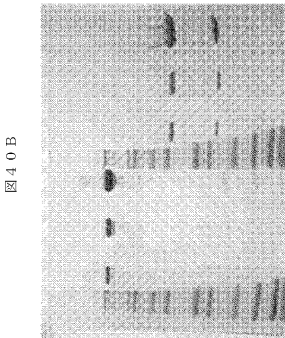
【図 3 9】



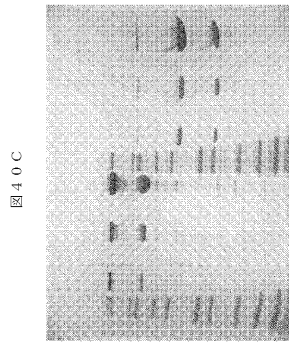
【図 4 0 A】



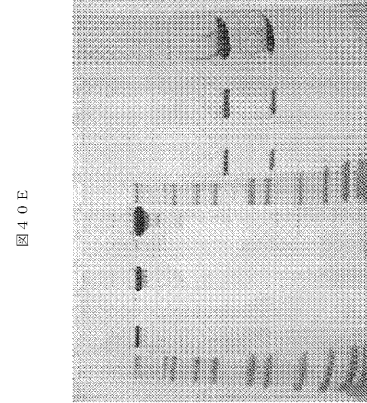
【図 4 0 B】



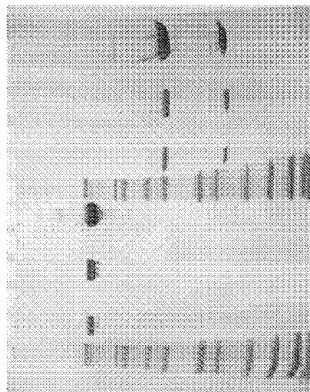
【図 4 0 C】



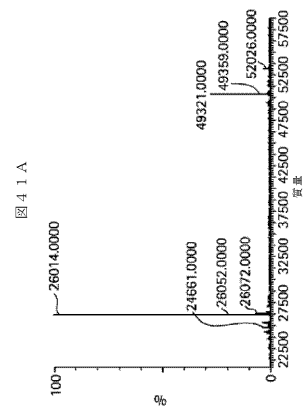
【図 4 0 E】



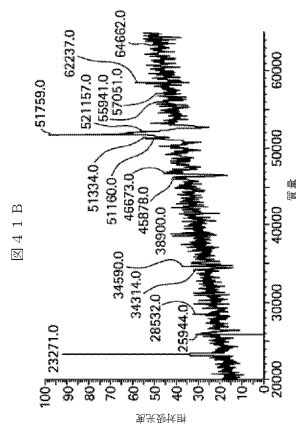
【図 4 0 D】



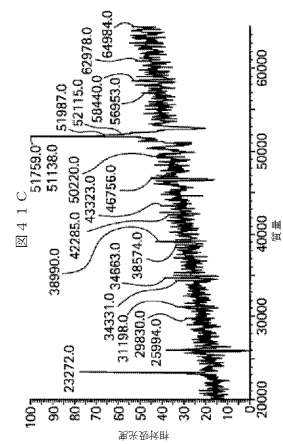
【図 4 1 A】



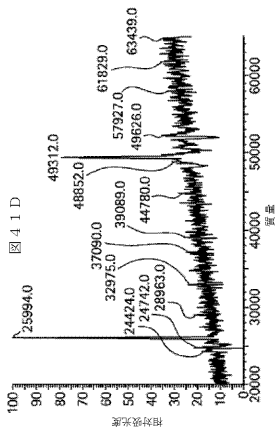
【図 4 1 B】



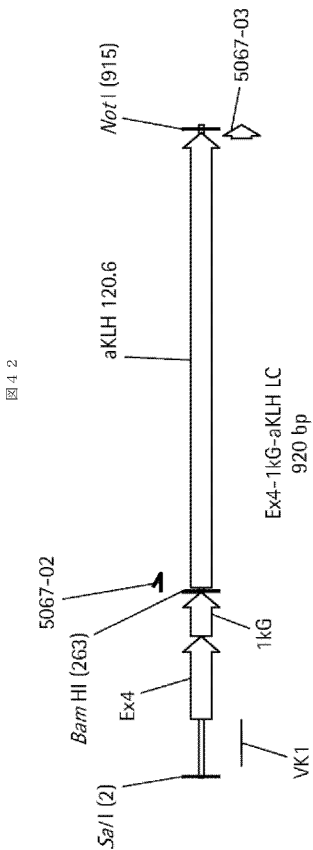
【図 4 1 C】



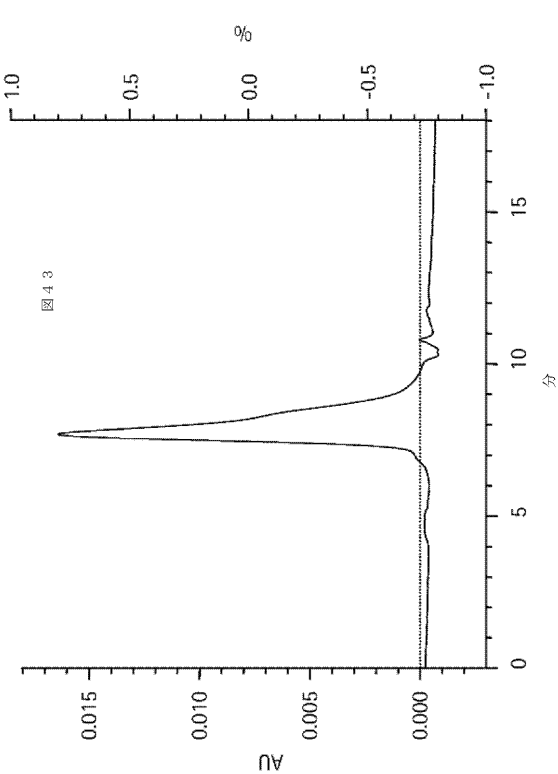
【 図 4 1 D 】



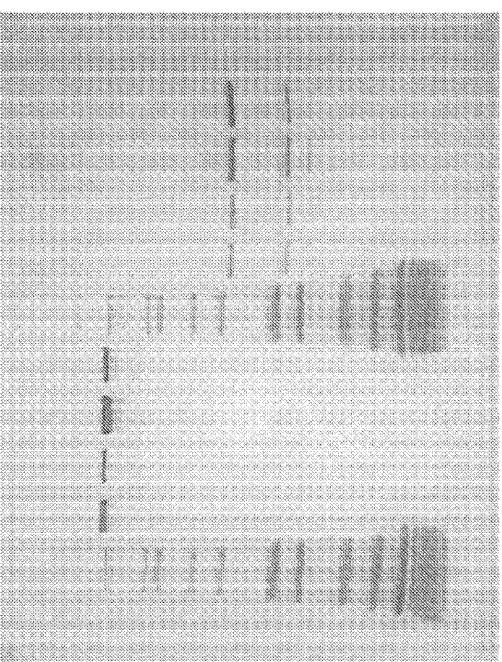
【 図 4 2 】



【 図 4 3 】



【 図 4 4 】



【図 4 5】

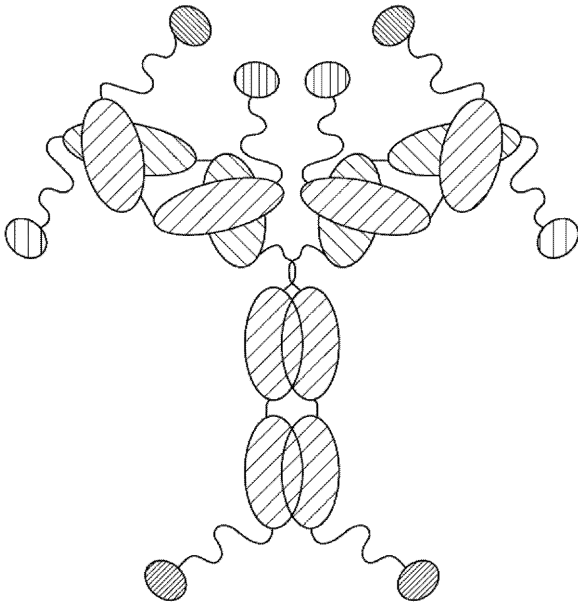


図 4 5

【配列表】

2017163986000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年5月9日(2017.5.9)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、ジニトロフェノール（DNP）に特異的に結合する単離抗原結合タンパク質であって、重鎖可変領域は、CDRH1、CDRH2およびCDRH3と命名された3つの相補性決定領域（CDR）を含み、軽鎖可変領域は、CDRL1、CDRL2およびCDRL3と命名された3つのCDRを含み、

- (a) CDRH1は配列番号189に記載のアミノ酸配列を含み、
 - (b) CDRH2は配列番号193に記載のアミノ酸配列を含み、
 - (c) CDRH3は配列番号198に記載のアミノ酸配列を含み、
 - (d) CDRL1は配列番号203に記載のアミノ酸配列を含み、
 - (e) CDRL2は配列番号206に記載のアミノ酸配列を含み、および
 - (f) CDRL3は配列番号209に記載のアミノ酸配列を含む、
- 抗原結合タンパク質。

【請求項 2】

重鎖可変領域が、配列番号254に記載の配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸

配列を含む、請求項 1 に記載の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 3】

軽鎖可変領域が、配列番号 2 3 4 に記載の配列と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 4】

重鎖可変領域が配列番号 2 5 4 に記載のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号 2 3 4 に記載のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 5】

抗体または抗体断片を含む、請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 6】

I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 を含む、請求項 5 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 7】

モノクローナル抗体を含む、請求項 5 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 8】

キメラまたはヒト化抗体を含む、請求項 7 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 9】

ヒト抗体を含む、請求項 7 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 10】

(a) 配列番号 1 1 3 もしくは配列番号 1 1 7 に記載の成熟ポリペプチドのアミノ酸配列を含むか、または、いずれかの配列において、N 末端か C 末端、もしくは両端のアミノ酸残基が 1 個、2 個、3 個、4 個もしくは 5 個欠けている前記成熟ポリペプチドのアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖；

(b) 配列番号 1 0 9 のアミノ酸配列を含むか、または N 末端か C 末端、もしくは両端のアミノ酸残基が 1 個、2 個、3 個、4 個もしくは 5 個欠けている前記配列を含む免疫グロブリン軽鎖；または

(c) (a) の免疫グロブリン重鎖および (b) の免疫グロブリン軽鎖を含む請求項 5 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 11】

結合された薬理学的に活性な化学部分を少なくとも 1 つさらに含む、請求項 1 乃至請求項 10 のうちのいずれかの単離抗原結合タンパク質。

【請求項 12】

薬理学的に活性な化学部分が薬理学的に活性なポリペプチドである、請求項 11 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 13】

抗原結合ペプチドが組換え産生される、請求項 12 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 14】

抗原結合タンパク質が少なくとも 1 本の免疫グロブリン重鎖および少なくとも 1 本の免疫グロブリン軽鎖を含み、ならびに前記免疫グロブリン重鎖の一次アミノ酸配列において免疫グロブリン重鎖の F c ドメインの内部ループ内に薬理学的に活性なポリペプチドが挿入されている、請求項 13 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 15】

抗原結合タンパク質が少なくとも 1 本の免疫グロブリン重鎖および少なくとも 1 本の免疫グロブリン軽鎖を含み、ならびに前記免疫グロブリン重鎖の N 末端または C 末端に薬理学的に活性なポリペプチドが結合されている、請求項 12 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 16】

抗原結合タンパク質が少なくとも 1 本の免疫グロブリン重鎖および少なくとも 1 本の免疫グロブリン軽鎖を含み、ならびに前記免疫グロブリン軽鎖の N 末端または C 末端に薬理学的に活性なポリペプチドが結合されている、請求項 12 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 17】

薬理学的に活性なポリペプチドが、非ペプチジルリンカーまたはペプチジルリンカーを介して抗原結合タンパク質にコンジュゲートしている、請求項 12、13、15 または 16 に記載の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 18】

ペプチジルリンカーがグリシン、セリン、アラニンまたはそれらの組合せを含む、請求項 17 に記載の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 19】

非ペプチジルリンカーがポリエチレングリコールリンカーである、請求項 17 に記載の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 20】

薬理学的に活性なポリペプチドが毒素ペプチドもしくは毒素ペプチドアナログ、IL-6 結合ペプチド、CGRP ペプチドアンタゴニスト、ブラジキニン B1 受容体ペプチドアンタゴニスト、PTH アゴニストペプチド、PTH アンタゴニストペプチド、ang-1 結合ペプチド、ang-2 結合ペプチド、ミオスタチン結合ペプチド、EPO 模倣ペプチド、TPO 模倣ペプチド、NGF 結合ペプチド、BAFF アンタゴニストペプチド、GLP-1 もしくはそのペプチド模倣物、または GLP-2 もしくはそのペプチド模倣物である、請求項 12 乃至 19 のいずれか一項に記載の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 21】

毒素ペプチドまたは毒素ペプチドアナログが ShK または ShK ペプチドアナログである、請求項 20 の単離抗原結合タンパク質。

【請求項 22】

請求項 1 乃至請求項 21 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、および医薬上許容可能な希釈液、賦形剤もしくは担体、を含む医薬組成物。

【請求項 23】

請求項 1 に記載の免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードする単離核酸。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 25】

請求項 24 の発現ベクターを含む単離宿主細胞。

【請求項 26】

(a) 発現ベクターによりコードされた抗原結合タンパク質を発現させる条件下の培養基で請求項 25 の宿主細胞を培養すること；および

(b) 培養基から抗原結合タンパク質を回収すること、を含む方法。

【請求項 27】

請求項 1 乃至 10 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質にポリペプチドをコンジュゲートさせることを含む、薬理学的に活性なポリペプチドの薬物動態特性の改善のための方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	4 H 0 4 5
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	16/44	(2006.01)	C 0 7 K	16/44	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	47/60	(2017.01)	A 6 1 K	47/60	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/06	(2006.01)	A 6 1 P	25/06	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	

(72)発明者 トーマス・シー・ブーン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９１３２０、ニューベリー・パーク、ケリー・ノール・レイン・２７１５

(72)発明者 ホースン・ミン
大韓民国、キョンギードウ、ソンナムーシ、１０４・ドン・４０１・ホー、ザ・シヤープ・スター・パーク、ブンダニング・チョンジャードン・１７４－１

(72)発明者 ジェーン・タルベンハイモ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９１３６０、サウザンド・オークス、カーレ・ペイコス・１３６３

(72)発明者 タルナ・アローラ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９１３２０、サウザンド・オークス、ピア・ピサ・５３８０

(72)発明者 フレデリック・ダブリュ・ジェイコブセン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９１３２０、ニューベリー・パーク、ホームステイク・プレイス・１１６８

(72)発明者 ジョージ・ドールガスト
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９１３２０、サウザンド・オークス、サツパンウッド・アベニュー・１４８８

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA93Y AB01 AB02 AC14 BA01 BA08
CA24 CA25 CA44 CA60
4C076 EE23 EE59
4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA08 BA22 CA17 CA18 DA39 NA03
NA14 ZA022 ZA082 ZB072 ZB082 ZB112 ZB262 ZC352
4C085 AA13 AA14 AA16 AA25 BA01 CC02 CC22 CC23 DD51 DD62
EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74

【外国語明細書】
2017163986000001.pdf