

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-532764

(P2010-532764A)

(43) 公表日 平成22年10月14日(2010.10.14)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	Z N A	4B024
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08		4B064
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	A	4C085
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00		4H045
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-515288 (P2010-515288)	(71) 出願人	508025677 トウルビオン・ファーマシューティカルズ ・インコーポレーテッド アメリカ合衆国・ワシントン・98121 ・シアトル・フォース・アベニュー・24 O 1・スヴィート・1050
(86) (22) 出願日	平成20年7月7日 (2008.7.7)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成22年3月2日 (2010.3.2)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(86) 國際出願番号	PCT/US2008/069378	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 國際公開番号	W02009/023386	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(87) 國際公開日	平成21年2月19日 (2009.2.19)		
(31) 優先権主張番号	60/948,397		
(32) 優先日	平成19年7月6日 (2007.7.6)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C末端に配置された特異的結合性ドメインを有する結合性ペプチド

(57) 【要約】

C_{H_2} 領域および C_{H_3} 領域を含む免疫グロブリン由来の定常サブ領域に連結されたオプションのN末端ヒンジ領域と、続いて、PIMSリソルカーペプチドと、少なくとも1つの特異的結合性ドメインと、よりなる一般的図式化構造を有する特異的結合性ペプチドを、コード核酸、ベクター、および宿主細胞と共に提供する。また、そのようなペプチドを作製する方法、ならびにさまざまな疾患、障害、または病態を治療または予防するために、さらにはそのような疾患、障害、または病態に関連する少なくとも1つの症状を改善するために、そのようなペプチドを使用する方法を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

抗体に由来する定常サブ領域と、
該定常サブ領域のC末端に配置されたPIMSリンカーと、
 V_L ドメインおよび V_H ドメインの少なくとも1つを含む特異的結合性ドメインと、ただし
、該特異的結合性ドメインは、該PIMSリンカーのC末端に配置されるものとする、
を含む特異的結合性タンパク質であって、少なくとも1つの標的に特異的に結合しあつ抗体分子の少なくとも1つのエフェクター機能を呈する、上記特異的結合性タンパク質。

【請求項 2】

前記定常サブ領域が C_{H_2} ドメインおよび C_{H_3} ドメインを含み、該 C_{H_2} ドメインおよび該 C_{H_3} ドメインの少なくとも1つが完全抗体ドメインである、請求項1に記載の特異的結合性タンパク質。 10

【請求項 3】

前記抗体ドメインが、IgG抗体ドメイン、IgE抗体ドメイン、IgD抗体ドメイン、IgA抗体ドメイン、およびIgM抗体ドメインよりなる群から選択される、請求項2に記載の特異的結合性タンパク質。

【請求項 4】

前記 C_{H_2} ドメインおよび前記 C_{H_3} ドメインの少なくとも1つが、配列番号377および配列番号379よりなる群から選択される配列を含む、請求項2に記載の特異的結合性タンパク質。 20

【請求項 5】

前記エフェクター機能が抗体依存性細胞傷害性または補体媒介性細胞傷害である、請求項1に記載の特異的結合性タンパク質。

【請求項 6】

前記PIMSリンカーがタイプII C-レクチンのストーク領域に由来する、請求項1に記載の特異的結合性タンパク質。

【請求項 7】

前記PIMSリンカーが、抗体ヒンジ領域、CD72ストーク領域、NKG2a、およびNKG2a C18Sよりなる群から選択される、請求項1に記載の特異的結合性タンパク質。 30

【請求項 8】

前記PIMSリンカーが、IgGヒンジ、IgAヒンジ、IgDヒンジ、IgEヒンジ、およびそれらの変異体よりなる群から選択される抗体ヒンジ領域である、請求項1に記載の特異的結合性タンパク質。

【請求項 9】

前記ヒンジが、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4、およびそれらのヒト変異体よりなる群から選択される抗体ヒンジ領域である、請求項8に記載の特異的結合性タンパク質。

【請求項 10】

前記PIMSリンカーが、鎖間ジスルフィド結合を形成するための单一のシステイン残基を有する、請求項1に記載の特異的結合性タンパク質。 40

【請求項 11】

前記PIMSリンカーが、鎖間ジスルフィド結合を形成するための2つのシステイン残基を有する、請求項1に記載の特異的結合性タンパク質。

【請求項 12】

前記PIMSリンカーが、配列番号61～118よりなる群から選択される配列を含む、請求項1に記載の特異的結合性タンパク質。

【請求項 13】

前記タンパク質が、CD3、CD19、CD20、CD28、CD37、およびDRよりなる群から選択される標的に特異的に結合する、請求項1に記載の特異的結合性タンパク質。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記タンパク質が、W0001、W0002、W0003、W0004、W0005、W0006、W0007、W0008、W0009、W0011、W0012、W0023、W0024、W0025、W0028、W0029、W0030、W0031、W0035、W0036、W0041、W0042、W0044、W0045、W0050、W0051、W0052、W0053、W0055、W0056、W0057、W0083、W0087、W0094、W0095、W0096、およびW0097よりなる群から選択される、請求項1に記載の特異的結合性タンパク質。

【請求項15】

前記V_LドメインおよびV_Hドメインがドメイン間リンカーにより分離される、請求項1に記載の特異的結合性タンパク質。

【請求項16】

前記ドメイン間リンカーの構造が(Gly₄Ser)_n〔式中、n=1～5〕である、請求項15に記載の特異的結合性タンパク質。 10

【請求項17】

前記ドメイン間リンカーが、配列番号544、配列番号545、配列番号184、配列番号240、配列番号242、配列番号243、配列番号245、配列番号247、配列番号248、配列番号539、および配列番号540よりなる群から選択される配列を含む、請求項15に記載の特異的結合性タンパク質。

【請求項18】

前記V_Lドメインおよび前記V_Hドメインの少なくとも1つが、配列番号2の残基23～128、配列番号2の残基145～265、配列番号2の残基520～640、配列番号2の残基661～772、配列番号28の残基508～629、配列番号28の残基647～754、配列番号30の残基508～629、配列番号30の残基652～759、配列番号44の残基21～127、配列番号44の残基143～264、配列番号354の残基1～121、および配列番号354の残基134～239よりなる群から選択される配列を含む、請求項1に記載の特異的結合性タンパク質。 20

【請求項19】

前記サブ領域のN末端に配置されたヒンジをさらに含む、請求項1に記載の特異的結合性タンパク質。

【請求項20】

前記ヒンジが、前記定常サブ領域と前記特異的結合性ドメインとの間に配置された前記PIMSリンカーと同一の配列を含む、請求項19に記載の特異的結合性タンパク質。 30

【請求項21】

前記定常サブ領域のC末端に配置された少なくとも第2の特異的結合性ドメインをさらに含む、請求項1に記載の特異的結合性タンパク質。

【請求項22】

前記特異的結合性ドメインのそれぞれが同一の標的に結合する、請求項21に記載の特異的結合性タンパク質。

【請求項23】

請求項1に記載の特異的結合性タンパク質を產生する方法であって、

請求項1に記載の特異的結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む細胞と培地とを接触させることと、

該ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下の該培地中で該細胞をインキュベートすることと、 40

を含む、上記方法。

【請求項24】

癌、炎症、および自己免疫性障害よりなる群から選択される病態を治療する方法であって、必要とする生物に有効量の請求項1に記載の特異的結合性タンパク質を投与することを含む、上記方法。

【請求項25】

前記生物がヒトである、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

癌、炎症、および自己免疫性障害よりなる群から選択される病態の症状を改善する方法

50

であって、必要とする生物に有効量の請求項 1 に記載の特異的結合性タンパク質を投与することを含む、上記方法。

【請求項 27】

前記生物がヒトである、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

癌、炎症、および自己免疫性障害よりなる群から選択される病態を治療するための医薬の調製における、請求項 1 に記載の特異的結合性タンパク質の使用。

【請求項 29】

前記生物がヒトである、請求項 28 に記載の使用。

【請求項 30】

癌、炎症、および自己免疫性障害よりなる群から選択される病態の症状を改善するための医薬の調製における、請求項 1 に記載の特異的結合性タンパク質の使用。

10

【請求項 31】

前記生物がヒトである、請求項 30 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的には、特異的結合性分子およびその治療的適用の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

健常哺乳動物では、免疫系は、外来物質および病原体による生体の損傷を防御する。けれども、いくつかの場合には、免疫系は、誤りを生じて、外傷性の傷害および／または疾患を引き起こす。たとえば、B細胞は、外来タンパク質ではなく自己タンパク質を認識する抗体を產生して、エリテマトーデス、関節リウマチなどのような自己免疫性疾患に特有な自己抗体の產生を引き起こす可能性がある。他の場合には、外来物質を駆除する免疫系の典型的に有益な効果は、臓器移植後のように逆効果になる。哺乳動物免疫系とくにヒト免疫系の能力が確認されており、異常な環境（たとえば臓器移植）での免疫系の正常な機能または他の点では見掛け上正常な環境（たとえば自己免疫性疾患の進行）での免疫系の異常な機能のいずれかから生じる健康への有害な影響を回避または改善すべく系を制御する努力がなされてきた。このほかに、特異性を有する抗原性標的を特異的に認識してそれに結合する抗体の能力に基づいて、いくつかの標的特異的な診断方法および治療方法を提供すべく免疫系を活用する努力がなされてきた。

20

【0003】

免疫系が生体を保護する一方法は、Bリンパ球またはB細胞と呼ばれる特殊な細胞の産生によるものである。B細胞は、外来物質または病原体に結合して場合によりそれらの破壊を媒介する抗体を产生する。けれども、いくつかの場合には、ヒト免疫系、特定的にはヒト免疫系のBリンパ球は、誤りを生じて、疾患を引き起こす。B細胞の無制御な増殖が関与する多数の癌が存在する。また、外来物質および病原体に結合する代わりに生体の一部に結合する抗体がB細胞により產生されることが関与する多数の自己免疫性疾患が存在する。それに加えて、たとえば、T細胞へのB細胞による不適切な抗原提示を介してまたはB細胞が関与する他の経路を介して、病理にB細胞が関与する多数の自己免疫性および炎症性の疾患が存在する。たとえば、B細胞が欠損した自己免疫傾向のマウスは、自己免疫性の腎疾患も脈管炎も自己抗体も生じない。（Shlomchik et al., J Exp. Med. 1994, 180:12 95-306）。興味深いことに、B細胞を有するが免疫グロブリン産生が欠損した上述の自己免疫傾向のマウスは、実験的に誘導した時に自己免疫性疾患を発症することから（Chane et al., J Exp. Med. 1999, 189:1639-48）、B細胞は自己免疫性疾患の発症に不可欠な役割を果たすことが示唆される。

30

【0004】

B細胞は、その細胞表面上の分子により同定可能である。CD20は、モノクローナル抗体により同定された最初のヒトB細胞系列特異的表面分子であった。それは、アミノ末端お

40

50

よびカルボキシ末端の両方が細胞内に位置する35kDaの非グリコシリ化疎水性B細胞膜貫通リンタンパク質である。Einfeld et al., EMBO J. 1988, 7:711-17。CD20は、すべての正常成熟B細胞により発現されるが、前駆B細胞や形質細胞により発現されない。CD20の天然リガンドは同定されておらず、B細胞の生態におけるCD20の機能は、いまだに完全には理解されていない。

【0005】

他のB細胞系列特異的細胞表面分子は、CD37である。CD37は、テトラスパニン膜貫通ファミリーの細胞表面抗原に属する40~52kDaの高グリコシリ化タンパク質である。それは、細胞膜を4回横切って、2つの細胞外ループを形成し、そのアミノ末端およびカルボキシ末端を細胞質に露出する。CD37は、正常な抗体産生(sIg+)B細胞上で高度に発現されるが、プレB細胞や形質細胞上では発現されない。休止状態または活性化状態のT細胞上、単球上、および顆粒球上のCD37の発現は少なく、NK細胞上、血小板上、および赤血球上では、検出可能なCD37発現は見られない。Belov et al., Cancer Res., 61(11):4483-4489 (2001)、Schwartz-Albiez et al., J. Immunol., 140(3): 905-914 (1988)、およびLink et al., J. Immunol., 137(9): 3013-3018 (1988)を参照されたい。正常B細胞のほかに、CLL、NHL、および有毛細胞白血病を含めてB細胞由来のほとんどすべての悪性疾患は、CD37発現に関して陽性である(Moore, et al. 1987; Merson and Brochier 1988; Faure, et al. 1990)。CD37の欠失したマウスは、低レベルの血清IgG1を有しかつウイルス抗原およびモデル抗原に対するその体液性応答が障害されることが見いだされたので、CD37は、B細胞の機能の調節に関与する。それは、非古典的共刺激分子として作用するかまたはMHCクラスII分子との複合体形成を介して抗原提示に直接影響を及ぼすことにより作用するようと思われる。Knobeloch et al., Mol. Cell. Biol., 20(15):5363-5369 (2000)を参照されたい。

10

20

30

40

【0006】

CD37やCD20のようなB細胞系列特異的細胞表面分子はそれ自体、表面上にCD37およびCD20を有する癌性および自己免疫性の疾患を引き起こすB細胞に結合してその破壊を媒介する可能性のある抗体の標的になりうるという考え方に基づいて、研究および薬剤開発が行われてきた。「免疫療法」と称して、癌性または自己免疫性の疾患を引き起こすB細胞を枯渇させるべく、CD37もしくはCD20に結合する非ヒト動物内で生成された（または生成された抗体に基づく）抗体が患者に投与された。

30

【0007】

モノクローナル抗体技術および遺伝子工学的方法により、ヒト疾患の診断および治療のための免疫グロブリン分子の開発が促進してきた。抗原結合性ドメインおよびエフェクター機能付与性ドメインが免疫グロブリンのクラスおよびサブクラスの間で交換可能であるという意味で、免疫グロブリンのドメイン構造は、工学的操作に適合しうる。免疫グロブリンの構造および機能は、たとえば、Harlow et al., Eds., Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988)にレビューされている。組換え抗体技術のあらゆる側面に関する広範な序論さらには詳細な情報は、書籍"Recombinant Antibodies" (John Wiley & Sons, NY, 1999)に見いだしうる。詳細な抗体工学実験プロトコルの網羅的なコレクションは、R. Kontermann and S. Duebel (eds.), "The Antibody Engineering Lab Manual" (Springer Verlag, Heidelberg/New York, 2000)に見いだしうる。

40

【0008】

免疫グロブリン分子(Igと略記される)は、典型的には、鎖間ジスルフィド結合、すなわち、近接するシステイン残基のスルフヒドリル基間の共有結合により巨大分子複合体の形態に連結された2つの同一の軽鎖ポリペプチドおよび2つの同一の重鎖ポリペプチド(H₂L₂)で構成される多量体タンパク質である。5つのヒト免疫グロブリンクラスが、これらの重鎖の組成に基づいて定義され、IgG、IgM、IgA、IgE、およびIgDと命名される。IgGクラスおよびIgAクラスの抗体は、サブクラス、すなわち、それぞれ、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4、ならびにIgA1およびIgA2にさらに分けられる。鎖内ジスルフィド結合は、同

50

ーのポリペプチド鎖の異なる領域を連結することによりループを形成し、ループは、隣接するアミノ酸と一緒にになって免疫グロブリンドメインを構成する。アミノ末端部分において、各軽鎖および各重鎖は、抗体ごとにアミノ酸組成のかなりの差異を示す単一の可変領域を有する。軽鎖の可変領域 V_L は、単一の抗原結合性ドメインを有し、重鎖の可変領域 V_H （同様に単一の抗原結合性ドメインを含有する）と会合して免疫グロブリンの抗原結合性部位Fvを形成する。

【0009】

可変領域に加えて、全長抗体鎖のそれぞれは、1つ以上のドメインを含有する定常領域を有する。軽鎖は、単一のドメインを含有する定常領域を有する。したがって、軽鎖は、1つの可変ドメインと1つの定常ドメインとを有する。重鎖は、いくつかのドメインを含有する定常領域を有する。 IgG 、 IgA 、および IgD の抗体中の重鎖は、 C_{H1} 、 C_{H2} 、および C_{H3} で表される3つのドメインを有し、 IgM および IgE の抗体中の重鎖は、4つのドメイン C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 、および C_{H4} を有する。したがって、重鎖は、1つの可変ドメインと3つもしくは4つの定常ドメインとを有する。注目すべきは、すべての既知の種においてこれらのドメインの構成が不变であることであり、1つ以上のドメインを含有する定常領域は、免疫グロブリン分子の軽鎖および重鎖の両者のC末端またはその近傍に位置し、可変ドメインは、軽鎖および重鎖のN末端の方向に位置する。免疫グロブリンの構造および機能は、たとえば、Harlow et al., Eds., Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988)にレビューされている。

10

【0010】

免疫グロブリンの重鎖はまた、3つの機能性領域、すなわち、Fd領域（ V_H と C_{H1} とを含むフラグメント、すなわち、重鎖の2つのN末端ドメイン）、ヒンジ領域、およびFc領域（「結晶性フラグメント」領域）に分割可能である。Fc領域は、細胞上の免疫グロブリンレセプターとの相互作用および補体カスケードの初期要素との相互作用を行うドメインを含有する。したがって、Fc領域またはFcフラグメントは、一般的には、ADCC（抗体依存性細胞媒介性細胞傷害）、CDC（補体依存性細胞傷害）、および補体結合のような免疫グロブリンのエフェクター機能、Fcレセプターへの結合、Fc領域の欠失したポリペプチドと比較してより長いin vivo半減期、プロテインA結合、ならびにおそらく胎盤通過にも関与していると考えられる。Capon et al., Nature, 337: 525-531, (1989)。さらに、Fc領域を含有するポリペプチドは、ポリペプチドの二量体化／多量体化が可能である。これらの用語はまた、他の免疫グロブリンの類似の領域に対しても用いられる。

20

30

【0011】

ヒト免疫グロブリンのアイソタイプはすべて、共通の認識可能な構造を含有するが、各アイソタイプは、エフェクター機能の識別可能なパターンを呈する。網羅的ではないが、たとえば、 IgG は、トキシンおよびウイルスを中和し、オプソニン化し、補体を結合し（CDC）、かつADCCに関与する。これとは対照的に、 IgM は、血液媒介病原体を中和しかつオプソニン化に関与する。 IgA は、その分泌片と会合した時に分泌されかつ粘膜を介する微生物感染に対して一次防御を提供し、さらには、トキシンを中和しかつオプソニン化を支援する。 IgE は、炎症反応を媒介し、全応答を開始するのに必要とされる他の細胞の動員で中心的な役割を担う。 IgD は、免疫調節機能を提供し、B細胞の活性化を制御することが知られている。アイソタイプのエフェクター機能のこうした特徴付けは、広範にわたるものではないがヒトアイソタイプ間で見いだしうる差異の実例を提供する。

40

【0012】

IgG クラス、 IgA クラス、 IgD クラス、および IgE クラスの抗体中に見いだされるヒンジ領域は、可撓性スペーサーとして作用し、Fab部分が空間内を自由に移動できるようにする。定常領域とは対照的に、ヒンジドメインは、構造的にさまざまであり、免疫グロブリンのクラスおよびサブクラスの間で配列および長さの両方が異なる。たとえば、ヒンジ領域の長さおよび可撓性は、 IgG のサブクラス間で異なる。 $IgG1$ のヒンジ領域は、アミノ酸216～231を含み、それは自由に撓曲しうるので、Fabフラグメントは、その対称軸を中心にして回転可能であり、かつ2つの重鎖間ジスルフィド架橋の1番目を中心とする球内を移動可

50

能である。IgG2は、IgG1よりも短いヒンジを有し、このヒンジは、12個のアミノ酸残基と4個のジスルフィド架橋とを有する。IgG2のヒンジ領域は、グリシン残基を欠失し、比較的短く、かつ追加の重鎖間ジスルフィド架橋により安定化された剛性ポリプロリン二重螺旋を含有する。これらの性質によりIgG2分子の可撓性が制限される。IgG3は、62個のアミノ酸（21個のプロリンと11個のシステインとを含む）を含有するその特有の伸長ヒンジ領域（IgG1ヒンジの約4倍程度の長さ）が不撓性ポリプロリン二重螺旋を形成する点で他のサブクラスと異なる。IgG3では、Fabフラグメントは、Fcフラグメントから比較的離れており、より大きい可撓性を分子に付与する。IgG3中の細長いヒンジはまた、他のサブクラスと比較してその分子量がより大きい原因となっている。IgG4のヒンジ領域は、IgG1のものよりも短く、その可撓性は、IgG1のものとIgG2のものとの中間である。ヒンジ領域の可撓性は、報告によれば、IgG3>IgG1>IgG4>IgG2の順に減少する。IgGの4つのサブクラスはまた、それらのエフェクター機能が互いに異なる。この差異は、可変領域、Fabフラグメント、および定常Fcフラグメントの間の相互作用に関する差異を含めて、構造上の差異に関連する。

10

【0013】

結晶学的研究によれば、免疫グロブリンのヒンジ領域は、機能上、3つの領域、すなわち、上側ヒンジ領域、コア領域、および下側ヒンジ領域にさらに細分可能である。Shine et al., 1992 *Immunological Reviews* 130:87。上側ヒンジ領域は、C_{H1}のカルボキシル末端から、運動を制限するヒンジ中の最初の残基まで、一般的には、2本の重鎖間の鎖間ジスルフィド結合を形成する最初のシステイン残基まで、のアミノ酸を含む。上側ヒンジ領域の長さは、抗体のセグメントの可撓性と相關する。コアヒンジ領域は、重鎖間ジスルフィド架橋を含有し、下側ヒンジ領域は、C_{H2}ドメインのアミノ末端に連結しあつC_{H2}中の残基を含む。上掲文献参照。ヒトIgG1のコアヒンジ領域は、配列Cys-Pro-Pro-Cysを含有し、この配列は、ジスルフィド結合形成により二量化された場合、回転軸として作用すると考えられる環状オクタペプチドを生成することにより可撓性を付与する。ヒンジ領域はまた、いくつかの構造上異なるタイプの炭水化物結合部位を含む1つ以上のグリコシル化部位を含有しうる。たとえば、IgA1は、ヒンジ領域の17アミノ酸のセグメント内に5つのグリコシル化部位を含有し、腸プロテアーゼに対するヒンジ領域ポリペプチドの耐性を付与性する。この耐性は、分泌型免疫グロブリンに有利な性質であると考えられる。

20

【0014】

また、免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチド配列の構造および可撓性によりコンホーメーション変化が可能になることによって、抗体のFc部分のエフェクター機能が影響を受ける可能性もある。Fc領域に関連するエフェクター機能の3つの一般的なカテゴリーとしては、（1）古典的補体カスケードの活性化、（2）エフェクター細胞との相互作用、および（3）免疫グロブリンのコンパートメント化が挙げられる。異なるヒトIgGサブクラスは、補体に結合するかまたは補体カスケードの段階を活性化しあつ増幅する相対的有効性が異なる。たとえば、Kirschfink, 2001 *Immunol. Rev.* 180:177、Chakraborti et al., 2000 *Cell Signal* 12:607、Kohl et al., 1999 *Mol. Immunol.* 36:893、Marsh et al., 1999 *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 8:557、Speth et al., 1999 *Wien Klin. Wochenschr.* 111:378を参照されたい。

30

【0015】

通常の抗体のH₂L₂構造の例外は、ラクダ科動物（ラクダ、ヒトコブラクダ、およびラマ；Hamers-Casterman et al., 1993 *Nature* 363:446、Nguyen et al., 1998 *J. Mol. Biol.* 275:413）、テンジクザメ（Roux et al., 1998 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:11804）、およびスポットテッドラットフィッシュ（Nguyen, et al., 2002 *Immunogenetics* 54(1):39-47）に見いだされる免疫グロブリンのいくつかのアイソタイプに存在する。これらの抗体は、明らかに、重鎖可変領域のみを用いて抗原結合性領域を形成可能である。すなわち、これらの機能性抗体は、重鎖のみのホモ二量体である（「重鎖抗体」または「HCAb」と呼ばれる）。疾患の診断および治療における抗体技術の利点にもかかわらず、診断用および/または治療用の試薬として全長抗体技術を開発するうえでいくつかの不利な側面が

40

50

存在する。全長抗体は、2本の軽鎖と2本の重鎖とを含有するIgGアイソタイプのヘテロ四量体型構造により例示される大きいタンパク質構造である。そのような大分子は、特定の用途では立体障害を受ける。たとえば、固体腫瘍の治療では、全長抗体は、容易には腫瘍の内部に浸透しない。さらに、全長抗体のサイズが比較的大きいため、そのような分子のin vivo投与を行っても免疫応答の誘導が確保されないという難題を生じる。さらに、活性抗体分子を産生するには、典型的には、新生抗体分子の適切な翻訳後プロセシングを提供しうる組換え真核細胞の培養が必要であり、そのような細胞は、活性抗体を商業上有用な収率で提供するように培養することが困難でありかつ誘導することが困難ある可能性がある。

【0016】

10

最近、全長免疫グロブリン法に伴う問題を克服すべく、より小さい免疫グロブリン分子が構築されている。一本鎖可変抗体フラグメント(scFv)は、短いペプチドを介して抗体軽鎖可変ドメインに連結された抗体重鎖可変ドメインを含む(Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85: 5879-83)。scFv分子は、サイズが小さいので、全長免疫グロブリンよりも組織内へのより効果的な浸透を呈する。抗腫瘍scFvは、対応するキメラ抗体よりも迅速な腫瘍内浸透および腫瘍塊全体にわたりより一様な分布を示した(Yokota et al., Cancer Res. 1992, 52:3402-08)。

【0017】

20

scFv分子が血清療法にもたらす利点にもかかわらず、この治療法にはいくつかの欠点が存在する。scFvは、血流からの迅速なクリアランスを受けるので、正常細胞内での毒性作用を低減しうるが、そのような迅速なクリアランスを受けると標的組織への最小有効用量の送達が妨げられる。scFvの発現および単離は困難であり収率に悪影響を及ぼすので、患者に投与するためのscFvを適正量で生産することは難題であった。scFvを治療に使用するうえでの他の欠点は、エフェクター機能の欠如である。他の選択肢として、トキシンのような他の分子へのscFvの融合により特異的抗原結合活性およびscFvの小サイズの利点を生かしてトキシンを標的組織に送達しうることが提案されているが、そのようなコンジュゲートまたはキメラの投与は、そのような製剤のトキシン部分に起因する過剰毒性およびまたは非特異的毒性により制限される可能性がある。それに加えて、イムノトキシンは、それ自体、宿主に投与したときに免疫原性が高く、個体の反復治療処置の潜在的有用性は、イムノトキシンに対して産生される宿主抗体により制限される。

30

【0018】

外部照射や化学療法のような非外科的癌治療は、これらの治療が癌細胞に対して呈する特異性の欠如が原因で正常な組織および細胞に毒性作用を及ぼすので、有効性が制限されるという問題を生じる可能性がある。この制限を克服するために、治療を必要とする細胞および組織に対する治療の特異性を増大させるべく標的化治療法が開発してきた。in vivoで使用されるそのような標的化法の一例は、抗体コンジュゲートの投与である。その場合、抗体は、治療を必要とする細胞または組織に関連するマーカーを特異的に認識するようにデザインされ、かつ抗体は、癌治療の場合にはトキシンのような治療剤にコンジュゲートされる。全身用剤としての抗体は、骨髄のような感受性でかつ望ましくない生体コンパートメントに循環される。急性放射線傷害では、リンパ系および造血系のコンパートメントの破壊は、敗血症の進行およびそれに続く死亡の主要な因子である。さらに、抗体は、治療を必要とする組織への不十分な浸透を呈する可能性のある大きい球状タンパク質である。

40

【0019】

さまざまな末期疾患過程を抱えるヒト患者および非ヒト被験者は、多くの場合、臓器移植を必要とする。しかしながら、臓器移植では、リンパ組織および造血系の他の部分に影響を及ぼす細胞傷害剤を用いて他者の臓器に対する細胞性免疫応答を抑制することにより、レシピエントの有害免疫応答に対処してレシピエントの移植臓器の免疫学的拒絶反応を防御しなければならない。移植片受容は、多くは抗癌(抗増殖)剤に類似しているこうした細胞傷害性化学物質に対するレシピエントの耐性により制限される。同様に、細胞傷害

50

性抗微生物剤とくに抗ウイルス剤を使用する場合または全身性紅斑性狼瘡の治療などで自己免疫性疾患治療用の細胞傷害薬剤を使用する場合、重大な制限要因は、生体の骨髄細胞および造血細胞に及ぼす治療剤の毒性作用である。

【0020】

標的化抗体コンジュゲート療法のような標的化療法の使用は、可能なかぎり所望の作用の部位に最大量の治療剤を局在化せるようにデザインされ、そのような療法の奏効度は、治療剤の比較的高いシグナル対バックグラウンド比により明らかにされる。標的化抗体の例としては、抗体または抗体フラグメント、細胞特異的または組織特異的なペプチド、ならびにホルモンおよび他のレセプター結合性分子の、診断剤コンジュゲートまたは治療剤コンジュゲートが挙げられる。たとえば、広範にわたるさまざまな病態または病変の検出および治療のために、病的細胞および正常細胞に関連するさらには病原性微生物に関連するさまざまな決定基に対する抗体が使用されてきた。これらの方法では、たとえば、Hansenらの米国特許第3,927,193号、ならびにGoldenbergの米国特許第4,331,647号、同第4,348,376号、同第4,361,544号、同第4,468,457号、同第4,444,744号、同第4,460,459号、同第4,460,561号、同第4,624,846号、および同第4,818,709号に記載されるように、ターゲッティング抗体は、適切な検出剤または治療剤に直接コンジュゲートされる。

10

【0021】

直接ターゲッティング法、すなわち、診断剤または治療剤（「活性剤」）がターゲッティング部分に直接コンジュゲートされる方法で遭遇する問題点の1つは、コンジュゲートの比較的小部分が実際に標的部位に結合し、コンジュゲートの大部分は血流中に残存して標的化コンジュゲートの機能をさまざまな形で損なうことである。活性剤の最大局在化を確保するために、典型的には、過剰量の標的化コンジュゲートを投与することにより、一部のコンジュゲートが未結合の状態で残存して活性剤のバックグラウンドレベルに寄与するようとする。

20

【0022】

補体依存性細胞傷害（CDC）は、腫瘍細胞のような特定の標的細胞のクリアランスに重要な機序であると考えられる。CDCは、カスケード方式で相互に活性化状態になる一群の酵素よりなる一連のイベントである。補体は、抗原のクリアランスを行ううえで重要な役割を担う。この役割は、その4つの主要な機能、すなわち、（1）局所血管拡張、（2）免疫細胞とくに食細胞の求引性（化学走性）、（3）食作用のための外来生物のタグ付け（オプソニン化）、および（4）膜侵襲複合体による侵入生物の破壊（MAC侵襲）により達成される。中心的分子はC3タンパク質である。それは、古典経路または副経路のいずれかの経路の成分により2つのフラグメントに分解される酵素である。古典経路は、抗体とくにIgGおよびIgMにより誘導され、一方、副経路は、リポポリサッカリド（LPS）のような細菌産物により非特異的に刺激される。簡潔に述べると、C3分解の産物は、小分子ペプチドC3aを含み、このC3aは、食作用免疫細胞に対して化学走性があり、かつC5からのC5aフラグメントの放出を引き起こすことにより局所血管拡張をもたらす。C3の他の部分C3bは、外来生物の表面上の抗原を覆って、破壊対象の生物をオプソニン化するように作用する。C3bはまた、補体系の他の成分と反応して、C5b、C6、C7、C8、およびC9よりなるMACを形成する。

30

【0023】

いかなる抗原に対しても、たとえ最も単純な抗原であっても、免疫系の応答は「ポリクローナル」であるので、すなわち、この系は、結合性領域でもエフェクター領域でも広範にわたる構造の抗体を生産するので、ヒト治療における抗体の使用に伴う問題が存在する。免疫原性抗体の問題を軽減する試みの中で、2つの手法が用いられてきた。第1の手法は、マウスモノクローナル抗体の抗原結合性部分（可変領域）がヒト抗体のエフェクター部分（定常領域）に融合されたキメラ抗体の產生である。第2の手法では、抗体は、相補性決定領域（CDR）移植または「ヒト化」として知られる技術により改変してきた。このプロセスは、「再構成」（Verhoeyen, et al., 1988 Science 239:1534-1536、Riechmann, et al., 1988 Nature 332:323-337、Tempest, et al., Bio/Technol 1991 9:266-271）

40

50

、「ハイパー・キメラ化 (hyperchimerization)」(Queen, et al., 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86:10029-10033、Co, et al., 1991 Proc Natl Acad Sci USA 88:2869-2873、Co, et al., 1992 J Immunol 148:1149-1154)、および「ベニヤリング (veneering)」(Mark, et al., In: Metcalf BW, Dalton BJ, eds. Cellular adhesion: molecular definition to therapeutic potential. New York: Plenum Press, 1994:291-312)と呼ばれる変更を含むようにさらに改良されてきた。

【0024】

より有効な治療剤および緩和剤の開発および販売の取組みの中で、さまざまな抗体技術に関心が払われてきた。残念ながら、依然として問題があり、これらの各療法の将来は保証されない。たとえば、リツキシマブで治療された癌患者の大多数は、一般的には、約6～12ヶ月以内に再発を起こし、しかもリツキシマブ注入の24時間以内の致命的注入反応が報告されている。トラスツズマブ投与を行うと、心室機能不全、鬱血性心不全、ならびに重篤な過敏性反応（アナフィラキシーを含む）、注入反応、および肺イベントを生じる。ダクリズマブ免疫抑制療法は、リンパ増殖性障害および日和見感染症を発症する危険性を増大させる。ゲムツズマブ投与を受けた患者では、重篤な肝毒性および静脈閉塞性疾患（VOD）に起因する肝不全による死亡が報告されている。また、アレムツズマブ投与を受けた患者では、肝毒性が報告された。

10

【0025】

癌は、広範にわたる疾患を含み、全世界で4人に約1人が罹患する。悪性細胞の急速かつ無制御な増殖は、血液学的悪性疾患を含めて多くのタイプの癌の顕著な特徴である。血液学的悪性病態を有する患者は、過去20年間にわたり癌治療の進歩の恩恵を受け、かつ寛解期間が増大されてきたが（Multani et al., 1998 J. Clin. Oncology 16:3691-3710）、ほとんどの患者は、依然として、再発を起こしてそうした疾患で死亡する。細胞傷害薬剤を用いて治癒する際の障害になるものとしては、たとえば、腫瘍細胞の耐性および化学療法の高毒性が挙げられる。こうした障害があるため、多くの患者で最適投与が行えない。

20

【0026】

キメラCD20モノクローナル抗体を用いて低悪性度または濾胞性のB細胞リンパ腫の患者を治療すると患者において部分的または完全な応答が誘導されることが報告されている。McLaughlin et al., 1996 Blood 88:90a (abstract, suppl. 1)、Maloney et al., 1997 Blood 90:2188-95。しかしながら、以上で述べたように、通常、6ヶ月～1年以内に腫瘍の再発が起こる。低悪性度B細胞リンパ腫などでより持続性のある応答を誘導しあつ高悪性度リンパ腫および他のB細胞疾患の有効な治療を可能にするには、血清療法のさらなる改良が必要である。

30

【0027】

自己免疫性疾患としては、グレーブス病および橋本甲状腺炎を含む自己免疫性甲状腺疾患が挙げられる。他の自己免疫性疾患は、関節リウマチ（RA）である。これは、関節の炎症により特徴付けられる慢性疾患であり、腫脹、疼痛、および機能喪失を引き起こす。RAは、初期の感染または傷害、異常な免疫応答、および遺伝的因素を含むイベントの組合せにより引き起こされる。自己反応性のT細胞およびB細胞がRAに存在する間、関節に集まるリウマチ因子と呼ばれる高レベルの抗体の検出がRAの診断に使用される。RAに対する現在の療法は、疼痛に対処しあつ疾患の進行を緩徐化するための多くの医薬を含む。全身性エリテマトーデス（SLE）は、腎臓、皮膚、および関節をはじめとする多くの器官の血管が反復損傷を受けることにより引き起こされる自己免疫性疾患である。SLEの患者では、T細胞とB細胞との間の間違った相互作用により、細胞核を攻撃する自己抗体が産生される。

40

【0028】

いくつかの他の確認されている自己免疫性疾患が存在する。シェーグレン症候群は、生体の水分産生腺の破壊により特徴付けられる自己免疫性疾患である。免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）は、血小板に結合してその破壊を引き起こす自己抗体により引き起こされる。多発性硬化症（MS）もまた、自己免疫性疾患である。それは、中枢神経系の炎症、な

50

らびに脳内、脊髄内、および生体内の神経細胞纖維を絶縁するミエリンの破壊により特徴付けられる。重症筋無力症(MG)は、随意筋群の衰弱により特徴付けられる慢性自己免疫性神経筋障害である。MGは、神経筋接合部で発現されたアセチルコリンレセプターに結合する自己抗体により引き起こされる。自己抗体は、アセチルコリンレセプターを低減またはロックして、神経から筋肉へのシグナルの伝達を妨害する。乾癬は、約500万人に発症しており、皮膚の自己免疫性炎症により特徴付けられる。強皮症は、全身性硬化症として知られる結合組織の慢性自己免疫性疾患である。強皮症は、皮膚の肥厚をもたらすコラーゲンの過剰産生により特徴付けられる。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0029】

- 【特許文献1】米国特許第3,927,193号公報
- 【特許文献2】米国特許第4,331,647号公報
- 【特許文献3】米国特許第4,348,376号公報
- 【特許文献4】米国特許第4,361,544号公報
- 【特許文献5】米国特許第4,468,457号公報
- 【特許文献6】米国特許第4,444,744号公報
- 【特許文献7】米国特許第4,460,459号公報
- 【特許文献8】米国特許第4,460,561号公報
- 【特許文献9】米国特許第4,624,846号公報
- 【特許文献10】米国特許第4,818,709号公報

20

【非特許文献】

【0030】

30

- 【非特許文献1】Shlomchik et al., J Exp. Med. 1994, 180:1295-306
- 【非特許文献2】Chan et al., J Exp. Med. 1999, 189:1639-48
- 【非特許文献3】Einfeld et al., EMBO J. 1988, 7:711-17
- 【非特許文献4】Belov et al., Cancer Res., 61(11):4483-4489 (2001)
- 【非特許文献5】Schwartz-Albiez et al., J. Immunol., 140(3): 905-914 (1988)
- 【非特許文献6】Link et al., J. Immunol., 137(9): 3013-3018 (1988)
- 【非特許文献7】Moore, et al. 1987; Merson and Brochier 1988
- 【非特許文献8】Knobeloch et al., Mol. Cell. Biol., 20(15):5363-5369 (2000)
- 【非特許文献9】Harlow et al., Eds., Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988)
- 【非特許文献10】Recombinant Antibodies (John Wiley & Sons, NY, 1999)
- 【非特許文献11】R. Kontermann and S. Duebel (eds.), "The Antibody Engineering Lab Manual" (Springer Verlag, Heidelberg/New York, 2000)
- 【非特許文献12】Capon et al., Nature, 337: 525-531, (1989)
- 【非特許文献13】Shin et al., 1992 Immunological Reviews 130:87
- 【非特許文献14】Kirschfink, 2001 Immunol. Rev. 180:177
- 【非特許文献15】Chakraborti et al., 2000 Cell Signal 12:607
- 【非特許文献16】Kohl et al., 1999 Mol. Immunol. 36:893
- 【非特許文献17】Marsh et al., 1999 Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 8:557
- 【非特許文献18】Speth et al., 1999 Wien Klin. Wochenschr. 111:378
- 【非特許文献19】Hamers-Casterman et al., 1993 Nature 363:446
- 【非特許文献20】Nguyen et al., 1998 J. Mol. Biol 275:413
- 【非特許文献21】Roux et al., 1998 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:11804
- 【非特許文献22】Nguyen, et al., 2002 Immunogenetics 54(1):39-47
- 【非特許文献23】Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85: 5879-83
- 【非特許文献24】Yokota et al., Cancer Res. 1992, 52:3402-08
- 【非特許文献25】Verhoeven, et al., 1988 Science 239:1534-1536

40

50

【非特許文献 26】Riechmann, et al., 1988 Nature 332:323-337
 【非特許文献 27】Tempest, et al., Bio/Technol 1991 9:266-271
 【非特許文献 28】Queen, et al., 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86:10029-10033
 【非特許文献 29】Co, et al., 1991 Proc Natl Acad Sci USA 88:2869-2873
 【非特許文献 30】Co, et al., 1992 J Immunol 148:1149-1154
 【非特許文献 31】Mark, et al., In: Metcalf BW, Dalton BJ, eds. Cellular adhesion: molecular definition to therapeutic potential. New York: Plenum Press, 1994:2 91-312

【非特許文献 32】Multani et al., 1998 J. Clin. Oncology 16:3691-3710
 【非特許文献 33】cLaughlin et al., 1996 Blood 88:90a (abstract, suppl. 1) 10
 【非特許文献 34】Maloney et al., 1997 Blood 90:2188-95

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0031】

癌、炎症、および自己免疫性疾患をはじめとするさまざまな疾患、障害、および病態を治療、改善、または予防するための改良された組成物および方法の必要性は、以上の考察から明らかである。

【課題を解決するための手段】

【0032】

本発明は、抗体ヒンジ領域または結合性ドメインに連結する領域または結合性ドメインを細胞表面の膜貫通領域もしくは膜アンカーに連結する領域に由来するアミノ酸配列を有するリンカー (PIMSリンカー) を介して、抗体分子に由来する定常サブ領域を、少なくとも1つの特異的結合性ドメインに連結して含有するタンパク質と、さらにはそのようなタンパク質をコードする核酸と、そのようなタンパク質および核酸の產生、診断的使用、および治療的使用と、を提供することにより、当技術分野における上述の必要性の少なくとも1つを満たす。本明細書中では、本発明に係るタンパク質をPIMS分子として参照する。PIMSリンカーは、抗体ヒンジ領域または結合性ドメインに連結する領域または結合性ドメインを細胞表面の膜貫通領域もしくは膜アンカーに連結する領域に由来するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーは、標準的なペプチド条件下で少なくとも1つのジスルフィド結合に関与しうる少なくとも1つのシスティン残基を有する。いくつかの実施形態では、PIMS分子は、定常サブ領域と特異的結合性ドメインとを連結するPIMSリンカーと同一であっても異なっていてもよい抗体ヒンジ領域に由来するN末端ドメインをさらに含む。抗体に由来する定常領域をタンパク質の内部またはそのN末端に配置すると、抗体の定常領域を抗体鎖のカルボキシ末端に通常どおり配置した場合からの類推により、エフェクター機能が妨害される可能性があるというのが典型的な考え方であった。しかしながら、本発明に従ってポリペプチド鎖またはタンパク質鎖のN末端または内部に定常サブ領域を配置したところ、立体障害によりそれほど妨害されないエフェクター機能および特異的結合能を呈するタンパク質が得られた。本開示を考慮すれば当業者には自明なことであろうが、そのような構造のタンパク質およびそうしたタンパク質をコードする核酸は、医学的および獣医学的な用途をはじめとする多種多様な用途を有するであろう。 20 30 40

【0033】

一態様では、本発明は、C_{H2}ドメインの一部もしくは全部およびC_{H3}ドメインの一部もしくは全部を含む定常サブ領域と、定常サブ領域のC末端に配置されたPIMSリンカー領域と、V_Lドメインの一部もしくは全部およびV_Hドメインの一部もしくは全部を含みかつ結合性パートナーに特異的に結合する能力を呈する少なくとも1つの特異的結合性ドメインと、を含む好ましい形態の特異的結合性タンパク質を提供する。ただし、特異的結合性ドメイン（複数可）は、PIMSリンカーのC末端に配置され、特異的結合性タンパク質は、少なくとも1つの標的に特異的に結合しつつ抗体分子の少なくとも1つのエフェクター機能を呈する。したがって、好ましいPIMSタンパク質分子では、PIMSリンカーひいては定常サブ領域は、分子の各特異的結合性ドメインのN末端に配置される。いくつかの実施形態では、C_{H2} 50

ドメインおよびC_{H3}ドメインの少なくとも1つは、完全抗体ドメインである。本発明に係る好適な特異的結合性タンパク質としては、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) 、IgE、IgD、IgA (IgA1、IgA2) 、およびIgM抗体ドメインよりなる群から選択される抗体ドメインを有するタンパク質が挙げられる。そのような分子としては、C_{H2}ドメインが配列番号377で示される配列を含みかつ / またはC_{H3}ドメインが配列番号379で示される配列を含む特異的結合性タンパク質が挙げられる。定常サブ領域により提供される代表的なエフェクター機能としては、抗体依存性細胞傷害および / または補体媒介性細胞傷害が挙げられる。

【 0 0 3 4 】

本発明に係るPIMS分子に使用するのに好適なPIMSリンカー領域は、抗体ヒンジ領域、タイプII C-レクチンのストーク領域 (たとえばCD72ストーク領域) 、NKG2a領域、NKG2A C1 8S領域、およびそれらの変異体よりなる群から選択可能である。たとえば、好適なPIMSリンカーとしては、IgG、IgA、IgD、およびIgEヒンジ、ならびにそれらの変異体よりなる群から選択される抗体ヒンジ領域が挙げられる。たとえば、PIMSリンカーは、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、およびヒトIgG4、ならびにそれらの変異体よりなる群から選択される抗体ヒンジ領域でありうる。いくつかの実施形態では、PIMSリンカー領域は、鎖間ジスルフィド結合を形成するための単一のシステイン残基を有する。他の実施形態では、PIMSリンカーは、鎖間ジスルフィド結合を形成するための2個のシステイン残基を有する。PIMS分子に使用可能と考えられるPIMSリンカー領域としては、配列番号61～配列番号118よりなる群から選択される配列を含むヒンジ領域が挙げられる。

【 0 0 3 5 】

次のものもPIMS分子のPIMSリンカー領域として利用可能と考えられる。配列番号2の残基268～281、配列番号3の残基268～282、配列番号5の残基268～282、配列番号6の残基268～282、配列番号8の残基268～282、配列番号9の残基268～281、配列番号11の残基268～282、配列番号12の残基268～282、配列番号14の残基268～281、配列番号16の残基268～282、配列番号18の残基268～282、配列番号20の残基268～282、配列番号22の残基268～282、配列番号24の残基268～282、配列番号26の残基268～282、配列番号28の残基268～282、配列番号30の残基268～282、配列番号32の残基279～293、配列番号34の残基274～288、配列番号34の残基274～288、配列番号36の残基261～275、配列番号38の残基268～283、配列番号40の残基268～282、配列番号42の残基270～284、配列番号44の残基265～279、配列番号46の残基265～279、配列番号48の残基265～279、配列番号50の残基265～279、配列番号52の残基265～279、配列番号54の残基265～279、配列番号56の残基265～279、配列番号58の残基265～279、配列番号60の残基268～282、配列番号359の残基24～38、配列番号361の残基24～38、配列番号363の残基24～38、配列番号365の残基24～38、配列番号367の残基24～38、配列番号369の残基24～38、配列番号371の残基23～37、配列番号373の残基23～37、および配列番号375の残基23～37。それに加えて、ヒンジ領域の配列を提供するものとして配列リスト中に規定されたアミノ酸の配列はいずれも、本発明に係るPIMS分子中のPIMSリンカーとして使用可能と考えられる。より一般的には、PIMSリンカーは、鎖間ジスルフィド結合に関与しうる少なくとも1つの遊離システインを有するヒンジ様ペプチドドメインでありうる。このほかに、PIMSリンカーは、タイプII C-レクチンのストーク領域である。

【 0 0 3 6 】

いくつかの実施形態では、特異的結合性タンパク質もしくはPIMSタンパク質 (またはポリペプチド) は、CD3、CD19、CD20、CD28、CD37、およびDRをはじめとする広範にわたるさまざまな標的の1つに特異的に結合するが、ただし、これらに限定されるものではない。代表的なPIMS分子またはPIMSタンパク質は、次のものよりなる群から選択される特異的結合性タンパク質である。W0001 (たとえば配列番号358によりコードされる配列番号359) 、W0002 (たとえば配列番号360によりコードされる配列番号361) 、W0003 (たとえば配列番号362によりコードされる配列番号363) 、W0004 (たとえば配列番号364によりコードされる配列番号365) 、W0005 (たとえば配列番号366によりコードされる配列番号367) 、W0006 (たとえば配列番号368によりコードされる配列番号369) 、W0007 (たとえば配列番

10

20

30

40

50

号370によりコードされる配列番号371)、W0008(たとえば配列番号372によりコードされる配列番号373)、W0009(たとえば配列番号374によりコードされる配列番号375)、W0011(たとえば配列番号390によりコードされる配列番号391)、W0012(たとえば配列番号404によりコードされる配列番号405)、W0023(たとえば配列番号406によりコードされる配列番号407)、W0024(たとえば配列番号408によりコードされる配列番号409)、W0025(たとえば配列番号410によりコードされる配列番号411)、W0028(たとえば配列番号486によりコードされる配列番号487)、W0029(たとえば配列番号480によりコードされる配列番号481)、W0030(たとえば配列番号482によりコードされる配列番号483)、W0031(たとえば配列番号484によりコードされる配列番号485)、W0035(たとえば配列番号489によりコードされる配列番号490)、W0036(たとえば配列番号491によりコードされる配列番号492)、W0041(たとえば配列番号497によりコードされる配列番号498)、W0042(たとえば配列番号499によりコードされる配列番号500)、W0044(たとえば配列番号503によりコードされる配列番号504)、W0045(たとえば配列番号505によりコードされる配列番号506)、W0050(たとえば配列番号452によりコードされる配列番号453)、W0051(たとえば配列番号454によりコードされる配列番号455)、W0052(たとえば配列番号456によりコードされる配列番号457)、W0053(たとえば配列番号458によりコードされる配列番号459)、W0055(たとえば配列番号510によりコードされる配列番号511)、W0056(たとえば配列番号493によりコードされる配列番号494)、W0057(たとえば配列番号507によりコードされる配列番号508)、W0083(たとえば配列番号460によりコードされる配列番号461)、W0087(たとえば配列番号495によりコードされる配列番号496)、W0094(たとえば配列番号444によりコードされる配列番号445)、W0095(たとえば配列番号446によりコードされる配列番号447)、W0096(たとえば配列番号448によりコードされる配列番号449)、W0097(たとえば配列番号450によりコードされる配列番号451)、DNE090(たとえば配列番号392によりコードされる配列番号393)、DNE091(たとえば配列番号394によりコードされる配列番号395)、DNE092(たとえば配列番号396によりコードされる配列番号397)、DNE093(たとえば配列番号398によりコードされる配列番号399)、DNE094(たとえば配列番号400によりコードされる配列番号401)、およびDNE095(たとえば配列番号402によりコードされる配列番号403)。

【0037】

PIMS分子に使用可能と考えられるのは、次のうちのいずれか1つで示されるアミノ酸配列を含むPIMSリンカーである。配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、配列番号158、配列番号160、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号168、配列番号172、配列番号174、配列番号176、配列番号180、配列番号182、配列番号184、配列番号186、配列番号188、配列番号190、配列番号192、配列番号194、配列番号196、配列番号198、配列番号200、SEQ ID NO202および配列番号204、配列番号206、配列番号208、配列番号210、配列番号212、配列番号214、配列番号216、配列番号222、配列番号230、配列番号238、配列番号240、配列番号242、配列番号244、配列番号246、配列番号248、配列番号541、配列番号542、配列番号543、配列番号544、配列番号545、配列番号546、配列番号547、および配列番号548。同様に利用可能と考えられるのは、 V_L ドメインと V_H ドメインとがドメイン間リンカーにより分離された特異的結合性タンパク質である。そのような実施形態では、ドメイン間リンカーは、nが好ましくは1~5である($Gly_4Ser)_n$ 構造を呈しうる。PIMS分子に使用するのに好適な代表的なドメイン間リンカーとしては、H11(配列番号544)、H12(配列番号545)、H17(配列番号184)、H45(配列番号240)、およびH46(配列番号242)、さらには($Gly_4Ser)_n$ 系リンカー、たとえば、配列番号243、配列番号245、配列番号247、配列番号248、配列番号539、および配列番号540で開示されるものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。それに加えて、リンカーの配列を提供するものとして配列リスト中に規定されたアミノ酸の配列はいずれも、本発明に係るPIMS分子に使用可能と考えられる。

【0038】

いくつかの実施形態では、特異的結合性タンパク質は、次のものよりなる群から選択さ

10

20

30

40

50

れる配列を含む V_L ドメインおよび V_H ドメインの少なくとも1つを有する。配列番号2の残基23～128、配列番号2の残基145～265、配列番号2の残基520～640、配列番号2の残基661～772、配列番号28の残基508～629、配列番号28の残基647～754、配列番号30の残基508～629、配列番号30の残基652～759、配列番号44の残基21～127、配列番号44の残基143～264、配列番号354の残基1～121、および配列番号354の残基134～239。順次、以上の配列は、抗CD20抗体 V_L (2H7)、抗CD20抗体 V_H (2H7)、抗CD28抗体 V_H (2E12)、抗CD28抗体 V_L (2E12)、抗CD3抗体 V_H (G19-4)、抗CD3抗体、 V_L (G19-4)、抗CD37抗体 V_H (G28-1)、抗CD37抗体 V_L (G28-1)、抗CD20抗体 V_H (2Lm 20-4)、および抗CD20抗体 V_L (2Lm 20-4)のアミノ酸配列である。本発明は、ラクダ科動物の抗体構成からの類推により、単一の特異的結合性ドメインを有するPIMS、さらには抗体に由来するそうした特異的結合性ドメインの重鎖と軽鎖とのもと普通の対を有するPIMSを包含する。後者の構成では、PIMS分子が結合性パートナーに特異的に結合する能力を保持するかぎり、 V_L ドメインの一部もしくは全部および V_H ドメインの一部もしくは全部を利用可能と考えられる。さらに、 V_L および V_H は、いずれの配置構成でも配置可能であり、かつ本明細書中に開示されるようなリンカーペプチドを用いてまたは2つのそのようなドメインもしくはその多重体を有するPIMSの2つのドメインの相互作用に適合しうるスペーサー機能を提供可能な任意の他のアミノ酸配列を用いて少なくとも約5～8アミノ酸だけ離間可能である。多重特異性PIMSは、ラクダ科動物の抗体構成からの類推により、少なくとも2つの特異的結合性ドメインを有するか、または対をなす V_H 鎖および V_L 鎖のもと普通の哺乳動物の抗体構成からの類推により、少なくとも4つの特異的結合性ドメインを有するであろう。それに加えて、PIMSタンパク質は、定常サブ領域のN末端に配置されたヒンジをさらに含む以上に記載の特異的結合性タンパク質でありうる。いくつかの実施形態では、ヒンジは、定常サブ領域と特異的結合性ドメインとの間に配置されたPIMSリンカーと同一の配列を含む。いくつかの実施形態では、PIMS特異的結合性タンパク質は、定常サブ領域のC末端に配置された少なくとも第2の特異的結合性ドメインをさらに含み、かつ複数の特異的結合性ドメインは、同一もしくは異なる標的に結合しうる。

【0039】

本発明の他の態様は、特異的結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む細胞と培地とを接触させることと、ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下の培地中で細胞をインキュベートすることと、を含む、本明細書中に記載の特異的結合性タンパク質の产生方法に関する。

【0040】

本発明のさらに他の態様は、必要とする生物に有効量の本明細書中に記載の特異的結合性タンパク質を投与することを含む、癌、炎症、および自己免疫性障害よりなる群から選択される病態の治療方法である。治療対象の好ましい生物はヒトである。本発明の関連態様は、癌、炎症、自己免疫性障害よりなる群から選択される病態を治療するための医薬の調製における以上に記載の特異的結合性タンパク質の使用である。医薬は、哺乳動物たとえばヒトのような脊椎動物に投与するのに好適でありうると考えられる。

【0041】

本発明の他の態様は、必要とする生物に有効量の本明細書中に記載の特異的結合性タンパク質を投与することを含む、癌、炎症、および自己免疫性障害よりなる群から選択される病態の症状の改善方法である。この場合も、好ましい生物はヒトである。本発明の関連態様は、癌、炎症、自己免疫性障害よりなる群から選択される病態の症状を改善するための医薬の調製における以上に記載の特異的結合性タンパク質の使用である。医薬は、哺乳動物たとえばヒトのような脊椎動物に投与するのに好適でありうると考えられる。

【0042】

本発明のさらに他の態様は、癌、炎症、および自己免疫性障害よりなる群から選択される障害を治療するための医薬の調製における本明細書中に記載の特異的結合性タンパク質の使用である。本発明の他の特徴および利点は、実施例を含めて、以下の詳細な説明を参照すれば、よりよく理解されるであろう。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】図1は、エフェクター機能を有する特異的結合性タンパク質またはPIMSペプチドの構造の概略図を示している。

【図2】図2は、CD16(高親和性)結合ELISAアッセイで比較されたPIMS(W0001)、SMIP(CD20結合性2Lm20-4)、およびScorpion(S0129、CD20xCD20多重特異的結合性タンパク質)の結合のグラフを示しており、結合されたタンパク質の平均蛍光強度をタンパク質濃度の関数として表している。

【図3】図3は、CD16(低親和性)結合ELISAアッセイで比較されたPIMS(W0001)、SMIP(2Lm20-4)、およびScorpion(S0129)の結合のグラフであり、結合されたタンパク質の平均蛍光強度をタンパク質濃度の関数として表している。10

【図4】図4は、ヒト末梢CD3+T細胞へのPIMS(W001)およびSMIP(2E12)の比較された結合のグラフを示している。

【図5】図5は、2E12 SMIP、2E12 PIMS、またはPE CD3+とGAHのみと共にインキュベートされた末梢血単核細胞によるPE(フィコエリトリン)標識化CD3+リンパ球のFITC F'2 GAH(ヤギ抗ヒト二次抗体)染色の平均蛍光強度を示している。アッセイされた試薬サンプル(2E12 SMIP、2E12 PIMS、または対照(PEコンジュゲート化抗CD3抗体(BD Pharmingen)とヤギ抗ヒト二次抗体との組合せ)の濃度の関数として平均蛍光強度をグラフにした。

【図6】図6は、WIL2-S細胞へのPIMSの結合を示している。PIMSの濃度($\mu\text{g/ml}$)の関数として結合を幾何平均蛍光強度として測定した。黒四角：TRU-015(抗CD20 SMIP)、白四角：2Lm20-4scc、上向き黒三角：2Lm20-4HL17、2Lm20-4HL12、上向き白三角：PIMS20-17、および白菱形：PIMS20-12。20

【図7】図7は、WIL2-S細胞に結合する抗DR PIMSに及ぼすPIMSリンカーの影響を示している。500,000個の細胞に暴露されたタンパク質の濃度($\mu\text{g/ml}$)の関数として結合を幾何平均蛍光強度として測定した。黒菱形：M0019(DR SMIP)、黒四角：W0035 PIMS、上向き黒三角：W0036 PIMS、および「X」：W0056 PIMS。

【図8】図8は、細胞に接触する抗CD37 PIMS分子の濃度(nM)の関数としてRamos細胞への対最大結合パーセント(対最大結合%)を示している。黒四角：TRU-016、抗CD37 SMIP、上向き黒三角：W0012(H7に基づく25アミノ酸のPIMSリンカー)、黒逆三角：W0023(H7に基づく10アミノ酸のPIMSリンカー)、黒菱形：W0024(H7に基づく15アミノ酸のPIMSリンカー)、黒丸：W0025(H7に基づく20アミノ酸のPIMSリンカー)、白四角：W0094(H65に基づく25アミノ酸のPIMSリンカー)、上向き白三角：W0095(H65に基づく10アミノ酸のPIMSリンカー)、白逆三角：W0096(H65に基づく15アミノ酸のPIMSリンカー)、および白丸：W0097(H65に基づく20アミノ酸のPIMSリンカー)。30

【図9】図9は、酵素コンジュゲート化二次抗体を用いて蛍光標識化した後の平均蛍光強度により表されたRamos B細胞への種々のPIMS分子およびSMIPの結合を示している。白四角：aHer2(抗Her2)、黒四角：TRU-016(抗CD37 SMIP)、W0028(マウス抗CD37 PIMS)、白菱形：W0029(半ヒト化抗CD19 PIMS)、黒菱形：W0030-HD37(マウス抗CD19)、および黒丸：W0031-4G7(マウス抗CD19)。

【図10】図10は、Jurkat T細胞への抗CD28 PIMSの結合を示している。結合を平均蛍光強度により測定し、MFIをタンパク質の濃度($\mu\text{g/ml}$)の関数としてプロットした。黒菱形：W0001(H7 PIMSリンカー)、黒四角：W0050(H9 PIMSリンカー)、上向き黒三角：W0051(H47 PIMSリンカー)、隅角突起付き四角：W0052、隅角突起・上中央突起付き四角：W0053(H62 PIMSリンカー)、黒丸：W0083(H65 PIMSリンカー)、および四角の中心を通る縦棒付き黒四角：抗CD28 SMIP。40

【図11】図11は、Ramos細胞に結合されたCAS PIMSへのCD16Loの結合を示している。幾何平均蛍光強度をPIMSの濃度の関数として示している。菱形(1)：TRU-016(抗CD37 SMIP)、四角(2)：W0012、上向き三角(3)：W0023、×印(4)：W0024、米印(5)：W0025、菱形(6)：W0094、縦棒(7)：W0095、小さい矩形(8)：W0096、および大きい矩形(9)：W0097。50

【図12】図12は、BJAB B細胞の抗CD20 PIMS媒介性ADCCを示している。特異的BJAB B細胞死滅パーセントをPIMSの濃度の関数としてプロットする。青菱形：W0008（10アミノ酸のPIMSリンカー）、赤丸：W0009（15アミノ酸のPIMSリンカー）、上向き緑三角：2Lm20-4 SMIP、黒丸：培地。

【図13】図13は、Jurkat T細胞の抗CD28 PIMS媒介性ADCCを示している。特異的Jurkat T細胞死滅パーセントをPIMSの濃度の関数として示している。菱形：W0001（抗CD28 PIMS）、四角：2E12 Ig（抗CD28 SMIP）、三角：2E12 N297D Ig（変異体抗CD28 SMIP）、および丸：培地。

【図14】図14は、BJAB B細胞の抗DR PIMS媒介性ADCCを示している。特異的BJAB B細胞死滅パーセントをPIMSの濃度の関数として提供する。菱形：M0019（F3.3 SMIP）、四角：W0035（F3.3 H7 PIMS）、三角：W0036（F3.3 NKG2A PIMS）、W0056（F3.3 NKG2A cys K/O PIMS）、破線付き四角：リツキシマブ、および接続線なしの四角：培地。
10

【図15】図15は、BJAB B細胞の抗CD37 PIMS媒介性ADCCを示している。特異的細胞死滅パーセントをタンパク質濃度（nM）の関数として測定した。菱形：W0012（H7 PIMSリンカー）、四角：W0094（H65 PIMSリンカー）、上向き三角：TRU-016（抗CD37 SMIP）、破線付き丸：リツキシマブ、および実線付き丸：培地。

【図16】図16は、ヒト血清の存在下におけるRamos B細胞のPIMS媒介性CDCを示している。ヨウ化プロピジウム（PI）陽性細胞パーセントをPIMSの濃度（μg/ml）の関数としてプロットした。菱形：2Lm20-4 SMIP（ヒト化抗CD20 SMIP）、四角：W0008（10アミノ酸のPIMSリンカー、HL結合性ドメイン配置構成）、上向き三角：W0009（15アミノ酸のPIMSリンカー、HL結合性ドメイン配置構成）、黒丸：TRU-015（抗CD20 SMIP）、および白丸：培地。
20

【図17】図17は、抗DR PIMSがDHL-6 B細胞内でATP放出を阻害することを示している。相対発光ユニット（RLU）をタンパク質濃度（μg/ml）の関数として測定した。黒菱形：F3.3 SMIP + GAH（ヤギ抗ヒト二次抗体）、白四角：F3.3 H7 PIMS + GAH、上向き白三角：F3.3 NKG2A PIM + GAH、黒丸：TDR31.1モノクローナル抗体 + GAM（ヤギ抗マウス二次抗体）、上向き黒三角：GAM(3:1)、黒四角：GAH(3:1)、および白丸：培地。

【図18】図18は、SKBR3細胞への抗Her2 PIMSの結合を示している。タンパク質の濃度（μg/ml）の関数として結合を平均蛍光強度として測定した。黒菱形：W0042 PIMS、黒四角：W0044 PIMS、上向き黒三角：W0045 PIMS、大きい黒四角：W0041 PIMS、および大きい黒四角：Her033 SMIP。
30

【図19】図19は、MDA-MB453細胞への抗Her2 PIMSの結合を示している。タンパク質の濃度（μg/ml）の関数として結合を平均蛍光強度として測定した。黒菱形：Her033 SMIP、小さい黒四角：W0042、上向き黒三角：W0057、大きい黒四角：対照。

【発明を実施するための形態】

【0044】

本発明は、特異的結合性ドメインと定常サブ領域とを連結する（典型的にはヒンジ様）PIMSリンカー領域を用いて定常サブ領域を分子のN末端の方向にかつ特異的結合性ドメインを分子のC末端の方向に配置した形で、望ましくない細胞（たとえば、癌細胞または炎症もしくは自己免疫性障害に関与する細胞）上の標的のような所与の標的に特異的に結合する能力と、抗体エフェクター様活性と、を兼備する分子を提供する。ただし、このリンカー領域は、場合により、少なくとも1つのジスルフィド結合を形成しうる少なくとも1つのシステインを含有する。エフェクター様機能としては、ADCC（抗体依存性細胞傷害）およびCDC（補体依存性細胞傷害）が挙げられる。したがって、有害な細胞（たとえば、癌細胞および炎症もしくは自己免疫性障害を惹起または増悪させる細胞）に細胞傷害性が関連付けられる。定常領域が分子のC末端に位置する天然に見いだされるいかなる抗体構成とも異なり、定常サブ領域のC末端を分子の残りの部分にペプチド結合させた状態で定常サブ領域をN末端の方向に配置することにより活性が失われないという点で、分子は有効である。分子はまた、典型的には、天然の抗体および類似のポリペプチドよりも小さく、したがって、分子の浸透性を改善できる可能性がある。本明細書中では、逆Small Modula
40

r ImmunoPharmaceutical (すなわちSMIP) 分子またはPIMS分子として参照される。注目すべきこととして、小サイズであっても、生物への投与に利用可能と考えられる他の小ペプチド分子に見られるようにPIMSの *in vivo* 残存性が損なわれることはない。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、定常サブ領域の存在は、分子の *in vivo* 耐久性に寄付しうる。

【 0 0 4 5 】

代表的なPIMS分子の模式的構造を図1に示す。一般的には、PIMS分子は、N末端からC末端の方向に、同一（好ましい）もしくは異なる動物種、免疫グロブリンアイソタイプ、および / または免疫グロブリンサブクラスのC_{H₂}ドメインおよびC_{H₃}ドメインを含む免疫グロブリン（複数種可）に由来する定常サブ領域と、典型的には免疫グロブリンに由来するヒンジ領域であるPIMSリンカーペプチドと、機能的結合性ドメインに共同して寄与するペプチドメンバーから誘導可能な1つ以上の領域を含む、特異的結合対のペプチドメンバーの特異的結合性ドメインと、を含む一本鎖ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、PIMS分子は、免疫グロブリンから誘導可能なN末端に配置されたヒンジ領域をさらに含有し、かつN末端ヒンジ領域は、定常サブ領域と結合性ドメインとの間に見られるPIMSリンカー領域と同一であっても異なっていてもよい。さらにまた、PIMS分子は、ポリペプチド產生に有用なN末端リーダー配列を含有可能であり、かつリーダー配列は、コード核酸中に見られる工学的に操作される制限エンドヌクレアーゼ切断部位によりコードされたアミノ酸を含みうる。したがって、いくつかのPIMS分子の代表的な模式的構成としては、次のもの、すなわち、N-定常サブ領域-PIMSリンカー-結合性ドメイン-C、N-ヒンジ-定常サブ領域-PIMSリンカー-結合性ドメイン-C、N-リーダー-定常サブ領域-PIMSリンカー-結合性ドメイン-C、またはN-リーダー-ヒンジ-定常サブ領域-PIMSリンカー-結合性ドメイン-Cが挙げられる。次に、PIMS分子の機能性成分についてさらに詳細に説明する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

本発明はまた、PIMSをコードするポリヌクレオチドを含む組成物、加えて、そのようなポリヌクレオチドを含むベクター、およびそのようなポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主細胞と、好ましくは組換えタンパク質の產生方法による、ただし、タンパク質のサイズが比較的小さいことを考えれば化学合成による、そのような分子の製造方法と、を提供する。さらに、本発明は、癌、炎症、および自己免疫性障害のような障害を治療する方法と、さらにはそのような障害の症状を改善する関連方法と、を提供する。

【 0 0 4 7 】

そのような分子および組換えによる *in vivo* でのその產生方法が提供されることにより、たとえば、癌細胞や感染因子のような破壊または隔離すべき細胞、組織、因子、および外来物への免疫系のエフェクター細胞（たとえば、細胞傷害性Tリンパ球、ナチュラルキラー細胞など）の標的化動員を行いうる新しい標的化診断法および標的化治療法が利用可能になった。治療部位への治療用細胞の局在化に加えて、ペプチドは、放射性標識化タンパク質のような治療用化合物の局在化に有用である。さらに、ペプチドはまた、たとえば、トキシンのような有害な組成物をそのトキシンの破壊または排除の可能な細胞（たとえばマクロファージ）と会合させることにより、有害な組成物を捕捉するうえでも有用である。本発明に係る分子は、細胞表面レセプターのような結合性パートナー分子の活性の調節に有用である。規定細胞集団の排除が有益である疾患および病態としては、感染性および寄生虫性の疾患、炎症性および自己免疫性の病態、悪性疾患などが挙げられる。本発明の開示に関してさらに考慮すべき点は、本明細書中で用いられる用語の以下の明確な定義を考慮すれば容易にわかるであろう。

【 0 0 4 8 】

「一本鎖結合性タンパク質」とは、検出可能に一本鎖結合性タンパク質により結合されるように結合性部位の十分な決定基を共有する1つ以上の結合性パートナーに単量体および / または多量体として特異的に結合可能な鎖を有する共有結合されたアミノ酸の单一の連続配置のことである。代表的な結合性パートナーとしては、タンパク質、炭水化物、脂質、および小分子が挙げられる。

【0049】

説明を容易にするために、本発明に係るタンパク質および／またはポリペプチドおよび／またはペプチドとの差異に基づいて、本発明に係るタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドの「誘導体」および「変異体」を記述する。このことは、本発明に係るタンパク質／ポリペプチド／ペプチドである誘導体および変異体が、規定したように本発明に係る非誘導体型もしくは非変異体型のタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドと異なることを意味する。当業者であれば、誘導体および変異体それ自体が本発明に係るタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドであることはわかるであろう。

【0050】

「抗体」には、当技術分野でのその意味に合致する最広義の定義が与えられ、その例としては、タンパク質抗原や非タンパク質抗原のような少なくとも1つの結合性パートナーに結合可能なタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドが挙げられる。本明細書中で用いられる「抗体」としては、一本鎖組成または多本鎖組成の任意の種の免疫グロブリンスーパーファミリーのタンパク質のメンバー、ならびにそのような分子の変異体、類似体、誘導体、およびフラグメントが挙げられる。特定的には、「抗体」は、当技術分野で公知の任意の形態の抗体を包含し、その例としては、モノクロナール抗体およびポリクロナール抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、一本鎖可変フラグメント、二重特異性抗体、ダイアボディ、抗体融合体などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0051】

「結合性ドメイン」とは、1つ以上の特異的結合性パートナーに特異的に結合する、免疫グロブリン(たとえば抗体)に由来するポリペプチドのフラグメントのようなペプチド領域のことである。複数の結合性パートナーが存在する場合、それらのパートナーは、検出可能に結合性ドメインに結合するのに十分な結合性決定基を共有する。好ましくは、結合性ドメインはアミノ酸の連続配列である。

20

【0052】

「エピトープ」には、本明細書中では、たとえば結合により抗体が特異的に相互作用する物質(たとえばタンパク質)上の単一の抗原性部位すなわち抗原性決定基のその通常の意味が与えらる。免疫グロブリン(たとえば抗体)の技術分野で十分に確定した意味を獲得した他の用語、たとえば、「可変軽領域」、「可変重領域」、「定常軽領域」、「定常重領域」、「抗体ヒンジ領域」、「相補性決定領域」、「フレームワーク領域」、「抗体アイソタイプ」、「Fc領域」、「定常領域」、「一本鎖可変フラグメント」または「scFv」、「ダイアボディ」、「キメラ」、「CDR移植抗体」、「ヒト化抗体」、「シェイプド(shaped)抗体」、「抗体融合体」などには、本明細書中にとくに明示的に断りのないかぎり、それぞれ、当技術分野で公知のそれらの十分に確定した意味が与えられる。

30

【0053】

抗体技術に関して当業者により理解されている用語には、本明細書中に明示的に定義されていないかぎり、それぞれ、当技術分野で取得された意味が与えられる。そのような用語の例は、それぞれ抗体の軽鎖および重鎖に由来する可変結合性領域を意味する「 V_L 」および「 V_H 」、ならびに「免疫グロブリンの定常領域」すなわちそれぞれ抗体の軽鎖または重鎖に由来する定常領域を意味する C_L および C_H であり、後者の領域は、その領域の由来の抗体アイソタイプ(IgA、IgD、IgE、IgG、IgM)に依存して、 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 、および C_{H4} 定常領域ドメインにさらに分割可能であると理解されている。CDRとは、「相補性決定領域」を意味する。「ヒンジ領域」は、抗体の一本鎖の C_{H1} 領域および C_{H2} 領域の間に挿入されかつそれらを接続するアミノ酸配列に由来し、当技術分野では、「蝶番」の形態で全長抗体に可撓性を提供することが知られている。

40

【0054】

「定常サブ領域」は、定常サブ領域ポリペプチドの対応する由来源／親の抗体の必ずしもすべての定常領域ドメインというわけではなく1つ以上の定常領域ドメインの一部もしくは全部に対応または由来するペプチド配列、ポリペプチド配列、またはタンパク質配列

50

を意味すべく本明細書中で定義された用語である。したがって、定常サブ領域は、次のドメイン、すなわち、 CH_2 ドメイン、 C_{H_3} ドメイン（IgA、IgD、IgG、IgE、またはIgM）、および C_{H_4} ドメイン（IgEまたはIgM）のいずれかの一部もしくは全部を含みうる。したがって、本明細書中で定義された定常サブ領域は、抗体に関連する少なくとも1つのエフェクター機能を保持するかぎり、免疫グロブリン定常領域の一部分に対応するポリペプチドを意味しうる。典型的には、本発明に係るポリペプチドまたはコード核酸の定常サブ領域は、 C_{H_2} ドメインおよび C_{H_3} ドメインを有するが、PIMS分子は、場合により、定常サブ領域に連結されたN末端ヒンジ領域を有していてもよい。いくつかの実施形態では、定常サブ領域は、分子の1つ以上の特異的結合性ドメインのN末端に配置される。定常サブ領域のN末端になんらかの配列たとえば以上に述べたN末端ヒンジが存在していてもよいが、こうした実施形態では、定常サブ領域のN末端に特異的結合性ドメインは存在しない。

10

【0055】

「エフェクター機能」とは、抗体の定常領域に関連するかまたはそれにより提供される機能のことである。代表的なエフェクター機能としては、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、補体活性化および補体依存性細胞傷害（CDC）、 F_c レセプター結合、および血漿中半減期の増大、さらには胎盤通過が挙げられる。本発明に係る組成物のエフェクター機能は、定常サブ領域により提供され、かつ検出可能であり、好ましくは、その機能に対する本発明に係る組成物の特異的活性は、そのエフェクター機能に関して野生型抗体の特異的活性とほぼ同じである。すなわち、PIMS分子の定常サブ領域は、好ましくは、野生型抗体と対比していかなるエフェクター機能をも喪失することはない。

20

【0056】

「リンカー」とは、他のペプチドまたはポリヌクレオチドを結合または連結させるペプチドまたはポリヌクレオチドのことである。典型的には、ペプチドリンカーは、約2~50アミノ酸のオリゴペプチドであり、したがって、そのようなペプチドリンカーをコードする典型的なポリヌクレオチドリンカーは、約6~150ヌクレオチドの長さである。PIMSリンカーとは、免疫グロブリン由来の定常サブ領域を結合性ドメインにまたは2つ以上の結合性ドメインが存在する場合には特異的結合性ペプチドのN末端の最も近くに位置する結合性ドメインに連結するタイプのペプチドリンカーのことである。このPIMSリンカーは、抗体ヒンジ領域に由来するかまたは結合性ドメインに連結する領域に由来するかまたは結合性ドメインを細胞表面の膜貫通領域もしくは膜アンカーに連結する領域に由来するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、PIMSリンカーは、標準的なペプチド条件（たとえば、生理学的条件、従来のペプチド精製条件、ペプチドの維持または貯蔵のための従来の条件など）の下で少なくとも1つのジスルフィド結合に関与しうる少なくとも1つのシステイン残基を有する。好ましくは、こうしたシステインにより形成されるジスルフィド結合は、鎖間ジスルフィド結合である。定常サブ領域およびN末端の特異的結合性ドメインの間に挿入された以上に記載のリンカーと同一であっても異なっていてもよい結合性ドメインリンカーはそれ自体、2つ以上の結合性ドメインを含有するタンパク質中のすべての結合性ドメイン間に挿入可能である。代表的な結合性ドメインリンカーは、好ましくはn=1~5である(Gly4Ser)_nファミリーに属するペプチドである。

30

【0057】

「標的」には、いずれの場合も一義的な意味を規定する用法との関連で、2つ以上の意味が与えられる。その最狭義の意味では、「標的」とは、本発明に係るペプチド組成物の結合性パートナーの結合性部位すなわち結合性ドメインのことである。より広義の意味では、「標的」または「分子標的」とは、必然的に結合性部位を呈する結合性パートナー（たとえばタンパク質）の全部分を意味する。「CD20」、「CD37」などのような特異的標的には、それぞれ、その用語が当技術分野で獲得した通常の意味が与えられる。「標的細胞」とは、健常であるか疾患を有するかにかかわらず、本発明に係る標的分子と会合した任意の原核細胞または真核細胞のことである。当然ながら、標的分子はまた、いかなる細胞とも会合していない状態（すなわち無細胞標的）、またはウイルス（バクテリオファージを含む）、有機もしくは無機の標的分子担体、および外来物のような他の組成物と会合し

40

50

た状態で見いだされる。

【0058】

標的分子と会合しうる物質の例としては、自己細胞（たとえば、癌細胞または他の疾患細胞）、感染因子（たとえば、感染性細胞および感染性ウイルス）などが挙げられる。標的分子は、使用目的にかかわらず（たとえば、医療のために、良性の事象または非意図的な事象の結果として、またはさらにはバイオテロリストの脅威に備えて）、標的分子を送達、輸送、または局在化するために使用可能な除核細胞、細胞膜、リポソーム、スポンジ、ゲル、カプセル、タブレットなどと会合させることが可能である。「無細胞」、「無ウイルス」、「無担体」、「無対象」などは、指定の組成物や物質と会合していない標的分子を意味する。

10

【0059】

「結合親和性」とは、本発明に係るペプチド組成物とその結合性パートナーとの非共有結合の強度を意味する。好ましくは、結合親和性は、結合対のメンバー間の求引力の定量的尺度を意味する。

【0060】

「アジュvant」とは、活性剤とアジュvantとを含む医薬組成物の形態で見られるよう、それと会合した状態にある化合物の機能的効果を増大または助長する物質のことである。「賦形剤」とは、医薬組成物を製剤化する時に希釈剤として使用される不活性物質のことである。「担体」とは、医薬組成物を送達するための媒体を提供すべく使用される典型的には不活性な物質のことである。

20

【0061】

「宿主細胞」とは、本発明に係るポリヌクレオチド、タンパク質、またはペプチドが内部に見いだされる任意の原核細胞または真核細胞を意味する。

【0062】

核酸またはポリヌクレオチドを宿主細胞内に「導入する」とは、ネイキッド核酸／ポリヌクレオチドまたはベクター媒介核酸／ポリヌクレオチドのin vitro塩媒介沈殿および他の形態のトランスフォーメーションまたはトランスフェクション、「ヘルパー」分子を併用するかまたは併用しないウイルス媒介感染および場合によりトランスタクション、バリスティックプロジェクタイル送達、コンジュゲーションなど（ただし、これらに限定されるものではない）をはじめとする当技術分野で公知の任意の手段によりその細胞内への核酸またはポリヌクレオチドの進入を提供することを意味する。

30

【0063】

宿主細胞を「インキュベートする」とは、遺伝子発現のような所与の目的に適するよう当技術分野で公知の環境条件下でその細胞を保持することを意味する。温度、イオン強度、酸素分圧、二酸化炭素濃度、栄養組成物などをはじめとするそのような条件は、当技術分野で周知である。

【0064】

本発明に係るタンパク質またはペプチドのような化合物を「単離する」とは、単離される化合物を発現する宿主細胞内のような天然環境でそれと会合した状態で見いだされる少なくとも1種の識別可能な化合物から、たとえば、化合物を含有する使用済み培地をその培地中で増殖された宿主細胞から単離することにより、その化合物を分離することを意味する。

40

【0065】

「必要とする生物」とは、本発明に係る組成物を用いて治療または改善を行いうる任意の疾患、障害、または病態、たとえば、限定されるものではないが、種々の形態の癌のいずれか、いくつかの自己免疫性疾患のいずれか、放射性標識化されたタンパク質、ペプチド、および類似の化合物による放射能中毒、摂取または内部産生されたトキシンなどに罹患する危険性があるかまたはそれらに罹患している任意の生物のことであり、全開示内容を精査すれば明らかになるであろう。好ましくは、必要とする生物はヒト患者である。

【0066】

50

疾患の症状を「改善する」とは、当技術分野では公知であろうが、疾患のその症状の重症度を検出可能に低下させることを意味する。代表的な症状としては、疼痛、発熱、腫脹、および関節硬直が挙げられる。

【0067】

文脈から明らかでないかぎり、「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」という用語は、本明細書中では同義的に用いられ、それぞれ、アミノ酸の少なくとも1本の連続鎖を意味する。同様に、「ポリヌクレオチド」、「核酸」、および「核酸分子」という用語は、特定の非同義的な意味が意図されていることが文脈から明らかでないかぎり、同義的に用いられる。

【0068】

「製薬上許容される塩」とは、本発明に係る化合物の塩であって、そのような化合物と有機酸もしくは無機酸との組合せ(酸付加塩)または有機塩基もしくは無機塩基との組合せ(塩基付加塩)に由来するものを意味する。

【0069】

いくつかの実施形態では、PIMS分子の組換え発現に有用なポリヌクレオチドは、AgeI部位(たとえば、リーダーコード配列の末尾に)やXhoI部位(たとえば、IgG1ヒンジのようなヒンジをコードする配列の先頭に)のような分子の組換えDNA工学に有用な制限エンドヌクレアーゼ切断部位の配列を含むさまざまな短いジ-またはトリ-ペプチドをコードする配列によりN末端ヒンジ領域(たとえばIgG1ヒンジ)に連結されたリーダー-ペプチドと、続いて、ヒンジ(たとえばSCC-P)と、H7 Scorpionリンカー(たとえば配列番号163によりコードされる配列番号164のアミノ酸配列を有する)のような(ヒンジ様)PIMSリンカーによりscFvに融合されたC_{H2}ドメインおよびC_{H3}ドメイン(たとえばIgG1ドメイン)と、をコードするであろう。このように、PIMS分子は、大まかな構造レベルでは「逆方向」SMIPに類似しているとみなしうるが、PIMS分子は、典型的には、2つのヒンジ様ジスルフィド結合性領域を含有し、その一方は、N末端に存在し、かつ他方は、エフェクタードメインの末尾と1つもしくは複数の特異的結合性ドメインとの間に存在する。

【0070】

PIMS結合性ドメイン

PIMSタンパク質またはPIMSポリペプチドは、他の特異的結合性分子、たとえば、ポリクロナール抗体もしくはモノクロナール抗体、それらのフラグメント、たとえば、Fab、F(ab')₂、もしくはscFv、SMIP、ダイアボディ、scorpionなどの構造とは異なる構造を有する。PIMSタンパク質またはPIMSポリペプチドは、N末端にエフェクタードメイン(C_{H2}-C_{H3}、場合により、ヒンジ-C_{H2}-C_{H3})かつC末端に標的特異的(たとえば抗原特異的)結合性ドメインを含有し、両ドメインは、(ヒンジ様)PIMSリンカーにより分離される。PIMSリンカーがIgヒンジに由来する場合、それは、好ましくは、そのPIMS分子のC_{H2}ドメインおよびC_{H3}ドメインの少なくとも1つと同一の抗体クラス、アイソタイプ、またはサブアイソタイプに由来する。標的特異的結合性ドメインは、単一のドメイン、たとえば、ラクダ科動物抗体結合性ドメインに由来する結合性ドメインでありうるか、またはより典型的には、VL様ドメインおよびVH様ドメインの鎖間もしくは鎖内の会合のように複数の領域が会合して少なくとも1つの結合性ドメインを形成しうる。PIMS構造では、エフェクター機能と結合性ドメインの機能特性との両方を最適化することが可能である。こうした分子は、単独で活性を有し、加えて、ScorpionのC末端結合性ドメインのような多重特異的結合性タンパク質の結合性ドメイン(すなわち、Scorpion結合性ドメイン2(BD2))を評価するための、さらにはエフェクタードメイン-BD2 Scorpionリンカーを評価するためのプラットフォームを提供する。

【0071】

特異的結合性ドメインは、特異的結合対のタンパク質メンバーまたはポリペプチドメンバーの1つ以上の領域に由来しうる。典型的には、結合性ドメインは、同一もしくは異なる免疫グロブリンタンパク質構造たとえば抗体分子の少なくとも1つの領域に由来する。特異的結合性ドメインは、免疫グロブリンの領域の配列と同一の配列を呈しうるか、また

10

20

30

40

50

はたとえば改変された結合性または改変された安定性を提供するそのような配列の修飾体でありうる。そのような修飾体は当技術分野で公知であり、その例としては、たとえば、ペプチドに対して改変された二次もしくはより高次の構造を誘起することにより、改変された結合性のような改変された性質に直接寄与するアミノ酸配列の改変体が挙げられる。同様に利用可能と考えられるのは、非天然の従来型のアミノ酸、非従来型のアミノ酸およびイミノ酸のような非天然のアミノ酸の組みから生じる修飾型アミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、改変された配列は、改変された翻訳後プロセシングを受けて、たとえば、改変されたグリコシル化パターンを生じる。

【0072】

結合性ドメインが免疫グロブリンの2つ以上の領域（たとえば、Ig VL領域およびIg VH領域）に由来する実施形態では、複数の領域は、以下に記載のリンカーペプチドにより連結可能である。本発明に係る組成物に使用するのに好適な代表的な結合性ドメインの構造を表1に提供するが、これらに限定されるものではない。

【表1】

表1

結合性ドメイン	ドメインを含む代表的な分子	配列識別子 (代表的なコード核酸)
抗-CD20 可変領域	2H7 (H_3N -VL-VH-CO ₂ H 配置構成)	120 (119)
抗-CD20 (2Lm20-4) HL 12	2Lm20-4 (H_3N -VH-VL-CO ₂ H 配置構成)	122 (121)
抗-CD20 (2Lm20-4) HL 17	2Lm20-4 (H_3N -VH-VL-CO ₂ H 配置構成)	124 (123)
抗-CD28 可変領域	2E12 (H_3N -VL-VH-CO ₂ H 配置構成)	126 (125)
抗-CD28 可変領域	2E12 (H_3N -VH-VL-CO ₂ H 配置構成)	128 (127)
抗-CD37 可変ドメイン	G28-1 (H_3N -VL-VH-CO ₂ H 配置構成)	130 (129)
抗-CD37 可変ドメイン	G28-1 (H_3N -VH-VL-CO ₂ H 配置構成)	132 (131)
抗-CD3 可変ドメイン	G19-4 (H_3N -VL-VH-CO ₂ H 配置構成)	134 (133)
抗-CD3 可変ドメイン	G19-4 (H_3N -VH-VL-CO ₂ H 配置構成)	136 (135)

【0073】

PIM定常サブ領域

ポリペプチドのN末端またはN末端に配置される定常サブ領域は、免疫グロブリンタンパク質の定常領域に由来する。定常サブ領域は、一般的には、免疫グロブリンの定常重鎖領域の部分（必ずしも全部というわけではない）に由来する。典型的には、定常サブ領域は、免疫グロブリンのCH領域のヒンジ-C_{H2}部分を含有するが、定常サブ領域が抗体に関連する少なくとも1つのエフェクター機能を保持するかぎり、それはヒンジ-C_{H2}-C_{H3}部分に由来しうるか、またはそれはCH領域のヒンジ-部分的C_{H2}部分に由来しうる。また、定常サブ領域の部分は、異なる免疫グロブリンのCH領域に由来しうる。好ましい実施形態では、ヒンジおよびC_{H2}領域、さらには適切であればC_{H3}領域は、同一の抗体アイソタイプに由来する。さらに利用可能と考えられるのは、定常サブ領域またはN末端ヒンジに連結されたN末端リーダー配列を有する分子である。定常サブ領域は、免疫グロブリンのCH領域に関連する少なくとも1つの活性、たとえば、次のエフェクター機能、すなわち、当業者であればわかるように、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、補体依存性細胞傷害（CDC）、プロテインA結合、少なくとも1つのFcレセプターへの結合、定常サブ領域が不在である以外は本発明に係るタンパク質と対比される再現性よく検出可能な安定性、および、本発明に係る分子の世代移転が有利である場合にはおそらく胎盤通過のうちの1つ以上を提供する。本発明に係る組成物に使用するのに好適な定常サブ領域としては、表2に例示された構造が挙げられるが、これらに限定されるものではない。定常サブ領域は、少なくとも1つの免疫グロブリン分子に由来し、かつ少なくとも1つの免疫グロブリンの1つまたは複数の領域と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を呈する。いくつかの実施形態では、定常サブ領域は、少なくとも1つの免疫グロブリンの1つもしくは複数の配列から

10

20

30

40

50

修飾され（1つ以上の非天然の従来型もしくは非従来型の、たとえば合成のアミノ酸またはイミノ酸の置換により）、改変された二次もしくはより高次の構造をそれに関連する改変された性質と共に生じうるかまたはグリコシル化のような翻訳後プロセシングの改変を引き起こしうる一次構造をもたらす。

【0074】

代表的な修飾型定常サブ領域を表2に示す。その例としては、hIgG1(P238S)-C_{H2}C_{H3}（たとえば配列番号141によりコードされる配列番号142）、hIgG1(P331S)-C_{H2}C_{H3}（たとえば配列番号143によりコードされる配列番号144）、およびhIgG1(P238S/P331S)-CH₂C_{H3}（たとえば配列番号145によりコードされる配列番号146）が挙げられる。「P238S」は、Kabat番号付け体系を用いて238位でPro残基をSer残基により置換することを意味することに留意されたい。238位（Kabat）は、配列番号142および146の8位であり、8位（Kabat 238）の残基をコードするコドンは、代表的なコード核酸（配列番号141および145）中の対応する位置に見いだされる。同様に、P331S置換は、331位（Kabat）に存在し、これは、配列番号144および146の101位に存在し、代表的なコード核酸（配列番号143および145）中の対応する位置にコグネイトコドンを有する。

10

【0075】

1つ以上の免疫グロブリンポリペプチドと同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を呈する結合性ドメインおよび定常サブ領域に対して、本発明に係る分子の翻訳後修飾を行うことにより、修飾の基礎となる免疫グロブリン（複数可）に対して修飾された分子を得ることが可能である。たとえば、非修飾型（たとえばCHO）宿主細胞中の対応するポリペプチドに対して改変されたポリペプチドグリコシル化パターンを生じるように、当技術分野で公知の技術を用いて、宿主細胞たとえばCHO細胞を修飾することが可能である。

20

【表2】

表2

エフェクタードメイン	配列識別子 (代表的なコード核酸)
hIgG1-C _{H2} C _{H3}	140 (139)
hIgG1 (P238S)-C _{H2} C _{H3}	142 (141)
hIgG1 (P331S)-C _{H2} C _{H3}	144 (143)
hIgG1 (P238S/P331S)-C _{H2} C _{H3}	146 (145)

30

【0076】

PIMSヒンジ領域

典型的なPIMS分子のPIMSリンカー領域の実際の構造を表3に提供する。表中、いくつかの好適な領域に対してアミノ酸配列および適切であればコードポリヌクレオチド配列が提供されているが、これらの領域に限定されるものではない。典型的には、これらのPIMSリンカー領域は、免疫グロブリンのヒンジ領域に由来する。同様に典型的には、PIMSリンカーの配列は、標準的なペプチド条件下でジスルフィド結合、好ましくは鎖間ジスルフィド結合を形成しうるシステイン残基を含む。少なくとも1つのシステインを有するヒンジ様PIMSリンカーを含むPIMS分子では、ホモ二量体化およびエフェクター機能が増大される。とくに指定がないかぎり、表3中の配列は、IgG1ヒンジ領域由来である。

40

【0077】

PIMS修飾を介してADCC活性およびCDC活性に影響を及ぼしうる可能性がある。これは、N末端ヒンジ（たとえば、IgG1 SCC-Pヒンジ [配列番号81]）または特異的結合性ドメインから定常サブ領域を分離するヒンジ様PIMSリンカー（たとえば配列番号163によりコードされるScorpionリンカー（H7）、配列番号164など）に対する変更を含むことが予想される。COS-7細胞内での発現時に成熟PIMSペプチドのN末端に翻訳後切断を誘導すべくシグナル配列（リーダー）を取り囲む領域を最適化するように変異体を構築した。発現、凝集、ならびに／またはADCC機能および／もしくはCDC機能に影響を及ぼすようにIgG1上側ヒンジ領域に対応する配列を改変しうる他の変異体が想定される。さらに、発現、凝集、ならび

50

に / またはADCC機能および / もしくはCDC機能に影響を及ぼすべく、加えて、FcRへの結合親和性の改変を行うすべく、エフェクタードメインと特異的結合性ドメインとの間に挿入されるPIMSリンカー領域の改変も利用可能と考えられる。

【 0 0 7 8 】

表3中のPIMSリンカー（すなわちヒンジ1～26）は、同様にその表中に提供された野生型ヒンジの変異体である。ヒンジを長くまたは短くするように、Cys残基の付加または欠失により鎖間結合の可能性を増大または減少させるべく配列を改変するように、および可撓性向上残基（たとえばGly）または可撓性阻害残基（たとえばPro）の導入によりヒンジの可撓性を改変するように変異体が形成されたことは、種々の配列を調べれば明らかである。表3中の野生型IgG1ヒンジとヒンジ1～26とを比較することにより（Dall'Acqua et al., J. Immunol. 177:1129-1138 (2006)（参照により本明細書に組み入れられるものとする）を参照されたい）、ヒンジ11、13、14、および17は野生型ヒンジよりも低いF_cRIIIAへの結合親和性を呈し、一方、ヒンジ1～10、12、15～16、および18～26は野生型ヒンジに匹敵するF_c。RIIIAへの結合親和性を呈することが判明した。したがって、当業者であれば、表3中の配列を比較することにより、F_cRIIIAに対してほぼ野生型の結合親和性を呈することが知られているかまたはF_cRIIIAに対して低減された結合親和性を呈することが知られているIgG1ヒンジ配列に基づいてヒンジ様PIMSリンカーをデザインすることが可能であろう。さらに、結合親和性は、ADCC活性と直接相關するので、当業者であれば、ほぼ野生型レベルのADCC活性を伴うPIMSリンカー領域またはより低いADCC活性を伴うPIMSリンカーをデザインすることが可能であろう。配列の比較を行ってPIMSリンカーまたはPIMSヒンジのデザインを最終決定する際、好適なデザインに容易に到着できるように、目的にかなったいくつかの標準的ソフトウェアプログラムおよびパッケージのいずれか1つを選択することが可能であり、そのような配列は、本発明に係る組成物の成分として利用可能と考えられる。
10

【 0 0 7 9 】

表3中の配列の1つを有するヒンジ様PIMSリンカー領域はまた、C1_qに対してさまざまなレベルの結合親和性を呈し、ひいてはさまざまなレベルの補体媒介性細胞傷害を呈する。ヒンジ19、21～22、および24～25は、C1_qに対して野生型ヒンジよりも高い結合親和性を呈し、ヒンジ3～6、11、13～14、および18は、C1_qに対して野生型ヒンジよりも低い結合親和性を呈し、そしてヒンジ1～2、7～10、12、15～17、20、23、および26は、その補体タンパク質に対する野生型ヒンジの結合親和性に匹敵するC1_qに対する結合親和性を呈する。したがって、野生型IgG1ヒンジに関連付けられるCDC活性と対比して、ヒンジ19、21～22、および24～25は、より高いCDC活性に関連付けられ、ヒンジ3～6、11、13～14、および18は、より低いCDC活性に関連付けられ、そしてヒンジ1～2、7～10、12、15～17、20、23、および26は、野生型ヒンジとほぼ同一レベルのCDC活性に関連付けられる。たとえば、F_cRIIIAへの相対的結合への寄与および / またはADCCレベルへの寄与に関してPIMSリンカーまたはPIMSヒンジをデザインする場合、当業者であれば、本明細書中に開示されるPIMSリンカー配列またはPIMSヒンジ配列を比較することはわかるであろう。また、C1_qに対するさまざまな結合親和性および / またはさまざまなレベルのCDCに基づいて、容易に入手可能なソフトウェアプログラムおよびパッケージに組み込まれた周知のアルゴリズムを用いて、C1_q結合親和性および / またはCDCの相対レベルを達成するようにデザインを最適化することが可能であろう。以上に記載のヒンジのいくつかについて、Dall'Acquaらは、解離定数を決定することにより結合の観測を確認した。F_cRIIIAまたはC1_qのいずれかに対して低減された結合親和性を呈するヒンジはまた、それらの分子に対してより高いK_Dを呈した。
20
30

【 0 0 8 0 】

V_HドメインとV_Lドメインとの間のscFvリンカー領域のような特異的結合性ドメイン領域の変更も利用可能と考えられる。また、分子の結合親和性、発現レベル、凝集傾向、または全体的機能に影響を及ぼすように、こうした変化を個別にまたは以上の変異体と組み合わせてPIMS分子に導入することが可能である。
40
50

【表3】

表3

ヒンジ領域	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (代表的な コード核酸)
ccc - hIgG1			63
sss(s) - hIgG1	gagcccaaattcttctgacaaaact cacacatctccaccgagctca	EPKSSDKTHTSPPSS	89 (88)
csc(s) - hIgG1	gagcccaaattttgtgacaaaact cacacatctccaccgtgctca	EPKSCDKTHTSPPCS	91 (90)
ssc(s) - hIgG1	gagcccaaattttctgacaaaact cacacatctccaccgtgctca	EPKSSDKTHTSPPCS	65 (64)
scc(s) - hIgG1	gagcccaaattttctgacaaaact cacacatgtccaccgtgctca	EPKSSDKTHTCPPCS	67 (66)
css(s) - hIgG1	gagcccaaattttgtgacaaaact cacacatctccaccgagctca	EPKSCDKTHTSPPSS	69 (68)
scs(s) - hIgG1	gagcccaaattttgtgacaaaact cacacatgtccaccgagctca	EPKSSDKTHTCPPSS	71 (70)
ccc(s) - hIgG1	gagcccaaattttgtgacaaaact cacacatgtccaccgtgctca	EPKSCDKTHTSPPCS	73 (72)
ccc(p) - hIgG1	gagcccaaattttgtgacaaaact cacacatgtccaccgtgcccc	EPKSCDKTHTSPPCP	75 (74)
sss(p) - hIgG1	gagcccaaattttctgacaaaact cacacatctccaccgagcccc	EPKSSDKTHTSPPSP	77 (76)
csc(p) - hIgG1	gagcccaaattttgtgacaaaact cacacatctccaccgtgcccc	EPKSCDKTHTSPPCP	62 (61)
ssc(p) - hIgG1	gagcccaaattttctgacaaaact cacacatctccaccgtgcccc	EPKSSDKTHTSPPCP	79 (78)
scc(p) - hIgG1	gagcccaaattttctgacaaaact cacacatgtccaccgtgcccc	EPKSSDKTHTCPPCP	81 (80)
css(p) - hIgG1	gagcccaaattttctgacaaaact cacacatctccaccgagcccc	EPKSCDKTHTSPPSP	83 (82)
scs(p) - hIgG1	gagcccaaattttgtgacaaaact cacacatgtccaccgagcccc	EPKSSDKTHTCPPSP	85 (84)
scppcp	agtgtccaccgtgcccc	SCPPCP	87 (86)
野生型 ヒンジ		EPKSCDKTHTCPPCP	92
ヒンジ1		GGGGCDKTHTCPPCP	93
ヒンジ2		EPKSCGGGGGCPPCP	94
ヒンジ3		EPKSCDKTHTCGGCP	95
ヒンジ4		EPKSCDKTHTCPPCG	96
ヒンジ5		EPKSCDKTHTCPPSP	97
ヒンジ6		EPKSCDKTHTSPPCP	98
ヒンジ7		EPKSCDKCHTCPPCP	99
ヒンジ8		EPKSCDKTCCCPPCP	100
ヒンジ9		EPKSCPPPPPCPPCP	101
ヒンジ10		PPPPCDKTHTCPPCP	102
ヒンジ11		EPKSCDKTHTC--CP	103
ヒンジ12		EPKSCDK--TCPSCP	104
ヒンジ13		EPKSCDK--TC--CP	105
ヒンジ14		EPKSCDKTHTCPGGGCP	106
ヒンジ15		EPKSCDGGGKTHTCPPCP	107

【0081】

10

20

30

40

ヒンジ 16		EPKSCDPPPCKTHTCPPCP	108
ヒンジ 17		EPKSCDKTHTCPPPPCP	109
ヒンジ 18		EPKSCDKTHTCWWCP	110
ヒンジ 19		EPKSCDWWHTCPPCP	111
ヒンジ 20		EPKCSDKTHTCPPCP	112
ヒンジ 21		EPKSDCKTHTCPPCP	113
ヒンジ 22		EPKSDCWWHTCPPCP	114
ヒンジ 23		EPKSCDFHTCPPCP	115
ヒンジ 24		EPKSCDWWTCPPCP	116
ヒンジ 25		EPKSCWWTHTCPPCP	117
ヒンジ 26		EPWWCDKTHTCPPCP	118

10

20

【 0 0 8 2 】

PIMSリンカーペプチド

PIMSリンカーペプチドは、多くの場合、ヒンジ領域であるので、表3中に例示されたヒンジ領域構造をはじめとする本明細書中で規定されたヒンジ領域構造はいずれも、PIMSリンカーペプチドとして使用するのに好適である。本発明に係る組成物に有用なPIMSリンカーペプチドは、好ましくは、約2~45アミノ酸または2~38アミノ酸または5~45アミノ酸の間である。たとえば、H1リンカーは2アミノ酸の長さであり、かつSTD2リンカーは38アミノ酸の長さである。さらに、PIMSリンカーは、特異的結合性ドメインを定常サブ領域に連結するために使用可能であり、かつこのPIMSリンカーは、免疫グロブリンのヒンジ領域に由来しうる。本明細書中に提供された一般に好適な長さパラメーターを用いれば、当業者であれば、たとえば立体障害を回避すべく、定常サブ領域および結合性ドメインの所望のレベルの可撓性および/または間隔を達成するように、所与のPIMSリンカーペプチドの配列および/または長さを改変することが可能であろう。代表的なPIMSリンカーペプチドの構造としては、表3中に提供されたヒンジ領域および表4中に提供されたペプチドリンカーが挙げられる。

【表4】

表4

リンカー	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列識別子 (代表的な コード核酸)
STD1	aattatggtggcggtggctcgccc ggtgtggatctggaggaggtgg agtggaaattct	NYGGGGSGGGSGGGSGNS	148 (147)
STD2	aattatggtggcggtggctcgccc ggtgtggatctggaggaggtgg agtggaaattatggtggcggtgg tcggcggtggatctggagga ggtggagtgaaattct	NYGGGGSGGGSGGGSGNS NYGGGGSGGGSGNS	150 (149)
H1	aattct	NS	152 (151)
H2	ggtgtggatctggaaattct	GGGGSGNS	154 (153)
H3	aattatggtggcggtggctctgg aattct	NYGGGGSGNS	156 (155)
H4	ggtgtggatctggcggtgg ggatctggaaattct	GGGGSGGGSGNS	158 (157)
H5	aattatggtggcggtggctcgccc ggtgtggatctggaaattct	NYGGGGSGGGSGNS	160 (159)
H6	ggtgtggatctggcggtgg ggatctggggaggaggcagcggg aattct	GGGGSGGGSGGGSGNS	162 (161)
H7	gggtgtccaccttgtccaaattct	GCPPCPNS	164 (163)
H8	gggtctccaccttctccaaattct	GSPPSPNS	166 (165)
H9	tctccaccttctccaaattct	SPPSPNS	168 (167)
H11	gagccacatctaccgacaaaact cacacatctccacccagccccaaat tct	EPTSTDKTHTSPPSPNS	172 (171)
H12	gagccacatctaccgacaaaact cacacatctccacccagccccaaat tct	EPTSTDKTHTCPCPNS	174 (173)
H13	gagccacatctaccgacaaaact cacacatctccacccagccccaaat tct	EPKSSDKTHTCPCPNS	176 (175)
H15	ggcggtggtgccctgtccacct tgtccaaattct	GGGGSCPPCPNS	180 (179)
H16	ctgtctgtgaaagctgacttcctc actccatccatcgaaattct	LSVKADFLTPSIGNS	182 (181)
H17	ctgtctgtgaaagctgacttcctc actccatccatctccctgtccacct tgccccaaattct	LSVKADFLTPSISCPCCPNS	184 (183)
H18	ctgtctgtgctcgctaacttcagt cagccagagatcgccaaattct	LSVLANFSQPEIGNS	186 (185)
H19	ctgtctgtgctcgctaacttcagt cagccagagatctccgtccacct tgccccaaattct	LSVLANFSQPEISCPCCPNS	188 (187)
H20	ctgaaaatccaggagagggtcagt aagccaaagatctcgaaattct	LKIQERVSKPKISNS	190 (189)
H21	ctgaaaatccaggagagggtcagt aagccaaagatctccgtccacct tgccccaaattct	LKIQERVSKPKISCPCCPNS	192 (191)
H22	ctggatgtgagtgagaggcatttt cctccacacatccagaattct	LDVSERPFPPPHIQNS	194 (193)
H23	ctggatgtgagtgagaggcatttt cctccacacatccagtcgtcca	LDVSERPFPPPHIQSCPPCPNS	196 (195)

【0083】

10

20

30

40

リンクー	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列識別子 (代表的な コード核酸)
	ccttccccgaattct		
H24	cgggaacagctggcagaggtaact ttgagcttgcggaaagcgaattct	REQLAEVTLKANS	198 (197)
H25	cgggaacagctggcagaggtaact ttgagcttgcggaaagcttgcaccc tgccccgaattct	REQLAEVTLKACPPCPNS	200 (199)
H26	cggattcaccagatgaactccgag ttgagcttgcgcgaattct	RIHQMNSELVLANS	202 (201)
H27	cggattcaccagatgaaccccgag ttgagcttgcgtcgcttgcaccc tgccccgaattct	RIHQMNSELVLACPPCPNS	204 (203)
H28	gataccaaaggaaagaacgtcctc gagaagatottctcgaattct	DTKGKNVLEKIFSNS	206 (205)
H29	gataccaaaggaaagaacgtcctc gagaagatottcgactccctgtcca ccttccccgaattct	DTKGKNVLEKIFDSCPPCPNS	208 (207)
H30	ctgccacctgagacacaggagat caagaagtacccctgaattct	LPPETQESQEVTLNS	210 (209)
H31	ctgccacctgagacacaggagat caagaagtacccctgtccgtcca ccttccccgaattct	LPPETQESQEVTLSCPPCPNS	212 (211)
H32	cggattcacctgaacgtgtccgag aggccccttcctccgaattct	RIHLNVSERPFPNS	214 (213)
H33	cggattcacctgaacgtgtccgag aggccccttcctccgtccaccc tgccccgaattct	RIHLNVSERPFPPCPCPN	216 (215)
H36	gggtgtccacccgttgcaggcggt ggtgttatcgaattct	GCPPCPGGGSNS	222 (221)
H40	ggatgtccacccgttgcggcgaat tct	GCPPCPANS	230 (229)
H44	ggaggagctagttgtccacccgt cccgaaaattct	GGASCPPCPGNS	238 (237)
H45	ggaggagccagggtgtccacccgt gccggaaaattct	GGASCPPCAGNS	240 (239)
H46	ggaggagccagggtgtccacccgt gcgaattct	GGASCPPCANS	242 (241)
(G4S)3	ggtgtccgggtggatccggcggagg gggtccgggtggcggcggatct	GGGGGGGGGGGGGGGG	245 (244)
(G4S)4	ggtgtccgggtggatccggcgggt ggatctggaggagggtggagcggg ggagggtggcagg	GGGGGGGGGGGGGGGG	247 (246)

接続領域として使用可能な他の選択肢のヒンジ配列およびリンカー配列は、IgV様ドメインまたはIgC様ドメインを接続する細胞表面レセプターの部分から作製可能である。細胞表面レセプターが多数のIgV様ドメインをタンデムに含有する場合にはIgV様ドメイン間の領域および細胞表面レセプターが多数のタンデムIgC様領域を含有する場合にはIgC様ドメイン間の領域を接続領域またはリンカーペプチドとして使用することが可能である。好みしいヒンジ配列およびリンカー配列は、5~60アミノ酸長であり、主に可撓性でありうるが、より剛性の特性を提供することも可能であり、また、最小限のシート構造を有して主に螺旋構造を含有しうる。好みしい配列は、血漿中および血清中で安定であり、かつタンパク質分解切断に対して耐性がある。好みしい配列は、分子のC末端を安定化させるように1つのジスルフィド結合または多数のジスルフィド結合を形成する能力を付与する天然に存在するまたは追加のモチーフたとえばCPPCを含有しうる。好みしい配列は、1つ以上のグリコシリ化部位を含有しうる。好みしいヒンジ配列およびリンカー配列の例と

しては、CD2、CD4、CD22、CD33、CD48、CD58、CD66、CD80、CD86、CD96、CD150、CD166、およびCD244のIgV様ドメインとIgC様ドメインとの間またはIgC様ドメイン間もしくはIgV様ドメイン間のドメイン間領域が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、CD69、CD72、およびCD161のような非IgSFメンバー由来のII型レセプターのジスルフィド含有領域から他の選択肢のヒンジを作製することも可能である。

【0085】

PIMSリーダーペプチド

PIMSリーダーペプチドは、発現されたPIMS分子の分泌を促進するシグナル配列として機能するというその既知の目的に使用すべくデザインされる。発現されたばかりの新生のPIMS分子を分泌経路内に誘導してリーダーペプチドとPIMS分子との間の連結部またはその近傍でリーダーペプチドを成熟PIMS分子から切り離すために、従来のリーダーペプチド（シグナル配列）のいずれかの使用が期待される。特定のリーダーペプチドは、当技術分野で公知の要件に基づいて選択されるであろう。また、分子工学的操作を容易にするために、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を指定するポリヌクレオチドによりコードされる配列をリーダーペプチドに対するコード配列の先頭および末尾に導入することが可能である。ただし、そのような導入配列は、発現されたばかりの新生のタンパク質からのリーダーペプチドのいかなる所望のプロセシングをも許容できないほど妨害したり、リーダーペプチドがPIMS分子の成熟時に切斷されない場合にPIMS分子のいかなる所望の機能をも許容できないほど妨害したりしないアミノ酸を指定するものとする。実施例で使用される代表的なリーダーペプチドとしては、アミノ酸配列H₃N-MDFQVQIFSFLLISASVIMSRG-CO₂H（たとえば、配列番号2の残基1～22を参照されたい；C末端が單一のV残基により伸長されたリーダーである配列番号4の残基1～23も参照されたい）を有する本明細書中に開示される2E12または抗CD28抗体リーダーペプチド、およびヒトVK3リーダーペプチドH₃N-MEAPAQLLFLLLLWLPDTT G-CO₂H（たとえば配列番号358のヌクレオチド1～60によりコードされる配列番号250）が挙げられる。

【0086】

PIMS分子は、他の抗体および抗体様結合性タンパク質と対比して著しく異なる構造を呈する。PIMS分子は、IgG1エフェクタードメインのような免疫グロブリンエフェクタードメイン（すなわち定常サブ領域）のC末端に位置する少なくとも1つの特異的結合性ドメインたとえばscFv抗原結合性ドメインを有する。また、PIMS分子の構造は、典型的には、ジスルフィド結合連結に関与しうる少なくとも1つの領域と、エフェクタードメインと特異的結合性ドメインとの間に配置された常に存在するPIMSリンカー領域と、PIMS分子中に見いだされることもあるN末端ヒンジ領域と、を有するという点で、ユニークである。好ましくは、N末端ヒンジ領域は、そのPIMS分子のC_{H2}ドメインおよびC_{H3}ドメインの少なくとも1つと同一の抗体クラス、アイソタイプ、およびサブアイソタイプに由来する。さらに、PIMS分子のヒンジドメインまたはヒンジ様ドメインは、エフェクタードメイン、結合性ドメインの一方または両方に影響を及ぼすように改変可能である。それに加えて、PIMS分子は、最小限の凝集で精製することがより容易であると期待されるので、安定性および産生または生産への適合性に関するかぎり、この分子構成で実用上の利点が得られるはずである。

【0087】

ポリペプチドのN末端の近傍に定常サブ領域を配置したPIMS分子と、天然に見いだされるタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドとの間には、デザインに関して抜本的な違いが存在する。PIMS分子は、PIMSポリペプチドとそのコード核酸またはポリヌクレオチドとの両方を含めて、広範にわたるさまざまな分子に適合可能なモジュラーデザインを呈する。本明細書に記載されるように、PIMS分子は、典型的には同一（好ましい）もしくは異なる抗体に由来するC_{H2}ドメインおよびC_{H3}ドメインを含有する、免疫グロブリンに由来する定常サブ領域と、抗体に由来するヒンジ領域であってもよいPIMSリンカーペプチドと、少なくとも1つの結合性領域を含む特異的結合性ドメインと、を含む。多くの場合、成熟PIMS分子は、抗体ヒンジ領域に由来するN末端配列をさらに呈する。したがって、本発明に

10

20

30

40

50

係るPIMS分子は、本明細書中に開示されるかまたは当技術分野で公知であるモジュールの組合せ（定常サブ領域、リンカー（ヒンジ）、および特異的結合性ドメイン）を、本明細書中で規定される相対配置構成で配置して含むが、これらに限定されるものではない。本発明では、表5中に明記されたSMIP分子由来およびScorpion分子由来のモジュールを表に記された種々のモジュールの配列端点で組み合わせることがとくに利用可能と考えられる。

【表5】

表5

内容	特徴（アミノ酸端点）	配列識別子（代表的なコードポリヌクレオチド）
抗-CD20 (2H7) LH (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカ一: 129-144 VH: 145-265	120 (119)
抗-CD28 (2e12) LH (AA)	リーダー: 1-23 VL: 24-135 リンカ一: 136-150 VH: 151-271	126 (125)
抗-CD28 (2e12) HL (AA)	リーダー: 1-23 VH: 24-144 リンカ一: 145-164 VL: 165-276	128 (127)
G-28-1 VLVH (AA)	VL: 1-107 リンカ一: 108-124 VH: 125-239	130 (129)
G28-1 VHVL (AA)	VH: 1-121 リンカ一: 122-144 VL: 145-253	132 (131)
G-19-4 VLVH (AA)	VL: 1-108 リンカ一: 109-125 VH: 126-247	134 (133)
G19-4 VHVL (AA)	VH: 1-122 リンカ一: 123-139 VL: 140-248	136 (135)
019044 VHVL (AA)		138 (137)
2H7sssIgG1-STD1-2e12HL (w/2E12 リーダー) (AA) $C_{H2}C_{H3}$	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカ一: 129-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-281 EFD-BD2 リンカ一: 500-519 VH2: 520-640 リンカ一2: 641-660 VL2: 661-772	2 (1)
2H7sssIgG1(P238S/P331S)- STD1-2e12HL (w/2e12 リー ダ一) (AA) $C_{H2}C_{H3}$	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカ一: 129-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカ一: 500-519 VH2: 520-640 リンカ一2: 641-660 VL2: 661-772	3
2H7sssIgG1-STD1-2e12LH (w/2e12 リーダー) (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカ一: 129-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカ一: 500-519	5 (4)

【0088】

内容	特徴（アミノ酸端点）	配列識別子（代表的なコードポリヌクレオチド）
	VL2: 520-631 リンカー2: 632-646 VH2: 647-767	
2H7sssIgG1(P238S/P331S)-STD1-2e12LH (w/2e12 リーダー) (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカー: 129-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカー: 500-519 VL2: 520-631 リンカー2: 632-646 VH2: 647-767	6
2H7sssIgG1-STD2-2e12LH (w/2e12 リーダー) (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-129 リンカー: 130-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカー: 500-537 VL2: 538-649 リンカー2: 650-664 VH2: 665-785	8 (7)
2H7sssIgG1(P238S/P331S)-STD2-2e12LH (w/2e12 リーダー) (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカー: 129-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-281 EFD-BD2 リンカー: 500-537 VL2: 538-649 リンカー2: 650-664 VH2: 665-785	9
2H7sssIgG1-STD2-2e12HL (w/2e12 リーダー) (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカー: 129-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカー: 500-537 VL2: 538-658 リンカー2: 659-678 VH2: 679-790	11 (10)
2H7sssIgG1(P238S/P331S)-STD2-2e12HL (w/2e12 リーダー) (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカー: 129-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカー: 500-537 VL2: 538-658 リンカー2: 659-678 VH2: 679-790	12
2H7sssIgG1-H1-2e12HL (w/2e12 リーダー) (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカー: 129-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-281 EFD-BD2 リンカー: 500-501	14 (13)

内容	特徴 (アミノ酸端点)	配列識別子 (代表的なコードポリヌクレオチド)
	VH2: 502-622 リンカー2: 623-642 VL2: 643-754	
2H7sssIgG1-H2-2e12HL (w/2e12 リーダー) (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-127 リンカー: 128-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカー: 500-507 VH2: 508-628 リンカー2: 629-648 VL2: 649-760	16 (15)
2H7sssIgG1-H3-2e12HL (w/e12 リーダー) (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカー: 129-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカー: 500-509 VH2: 510-630 リンカー2: 631-650 VL2: 651-762	18 (17)
2H7sssIgG1-H4-2e12HL (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカー: 129-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカー: 500-512 VH2: 513-633 リンカー2: 634-653 VL2: 654-765	20 (19)
2H7sssIgG1-H5-2e12HL (w/2e12 リーダー) (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカー: 129-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカー: 500-514 VH2: 515-635 リンカー2: 636-655 VL2: 656-767	22 (21)
2H7sssIgG1-H6-2e12HL (w/2e12 リーダー) (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカー: 129-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカー: 500-517 VH2: 518-638 リンカー2: 639-658 VL2: 659-770	24 (23)
2H7ssclgG1-H7-2e12HL (w/2e12 リンカー) (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカー: 129-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカー: 500-507	26 (25)

内容	特徴（アミノ酸端点）	配列識別子（代表的なコードポリヌクレオチド）
	VH2: 508-628 リンカー2: 629-648 VL2: 649-760	
2H7sssIgG1-H7-G194 HL (w/2e12 リーダー) (AA)	リーダー: 1-22 VL1: 23-128 リンカー: 129-144 VH1: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカー: 500-507 VH2: 508-629 リンカー2: 630-646 VL2: 647-754	28 (27)
2H7sssIgG1-H7-G281 HL (w/2e12 リーダー) (AA)	リーダー: 1-22 VL1: 23-128 リンカー: 129-144 VH1: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカー: 500-507 VH2: 508-629 リンカー2: 630-651 VL2: 652-759	30 (29)
2e12sss-IgG1 HL SMIP (AA)	リーダー: 1-22 VH: 24-144 リンカー: 145-164 VL: 165-276 ヒンジ: 279-293	32 (31)
2e12sss-IgG1 LH SMIP (AA)	リーダー: 1-23 VL: 24-135 リンカー: 136-150 VH: 151-271 ヒンジ: 274-288	34 (33)
G28-1 LH SMIP (AA)	リーダー: 1-20 VL: 21-127 リンカー: 128-144 VH: 145-260 ヒンジ: 261-275	36 (35)
G28-1 HL SMIP (AA)	リーダー: 1-20 VH: 21-136 リンカー: 137-158 VL: 159-266 ヒンジ: 268-283	38 (37)

【 0 0 9 1 】

内容	特徴（アミノ酸端点）	配列識別子（代表的なコードポリヌクレオチド）	
G19-4 LH SMIP (AA)	リーダー: 1-20 VL: 21-128 リンカー: 129-145 VH: 146-267 ヒンジ: 268-282	40 (39)	
G19-4 HL SMIP (AA)	リーダー: 1-20 VH: 21-142 リンカー: 143-159 VL: 160-267 ヒンジ: 270-284	42 (41)	10
n2H7sssIgG1-STD1-2e12HL (AA)	リーダー: 1-20 VL: 21-127 リンカー: 128-142 VH: 143-264 ヒンジ: 265-279 EFD-BD2 リンカー: 497-516 VH2: 517-637 リンカー2: 638-657 VL2: 658-769	44 (43)	20
n2H7sssIgG1-STD2-2e12LH (AA)	リーダー: 1-20 VL: 21-126 リンカー: 127-142 VH: 143-264 ヒンジ: 265-279 EFD-BD2 リンカー: 497-516 VL2: 517-628 リンカー2: 629-643 VH2: 644-764	46 (45)	30
n2H7sssIgG1-H1-2e12HL (AA)	リーダー: 1-20 VL: 21-126 リンカー: 127-142 VH: 143-264 ヒンジ: 265-279 EFD-BD2 リンカー: 497-498 VH2: 499-619 リンカー2: 620-639 VL2: 640-751	48 (47)	
n2H7sssIgG1-H2-2e12HL (AA)	リーダー: 1-20 VL: 21-126 リンカー: 127-142 VH: 143-264 ヒンジ: 265-279 EFD-BD2 リンカー: 497-504 VH2: 505-625 リンカー2: 626-645 VL2: 646-757	50 (49)	40

内容	特徴（アミノ酸端点）	配列識別子（代表的なコードポリヌクレオチド）
n2H7sssIgG1-H3-2e12HL (AA)	リーダー: 1-20 VL: 21-126 リンカー: 127-142 VH: 143-264 ヒンジ: 265-279 EFD-BD2 リンカー: 497-506 VH2: 507-627 リンカー2: 628-647 VL2: 648-759	52 (51)
n2H7sssIgG1-H4-2e12HL (AA)	リーダー: 1-20 VL: 21-126 リンカー: 127-142 VH: 143-264 ヒンジ: 265-279 EFD-BD2 リンカー: 497-509 VH2: 510-630 リンカー2: 631-650 VL2: 651-762	54 (53)
n2H7sssIgG1-H5-2e12HL (AA)	リーダー: 11-20 VL: 21-126 リンカー: 127-142 VH: 143-264 ヒンジ: 265-279 EFD-BD2 リンカー: 497-511 VH2: 512-632 リンカー2: 633-652 VL2: 653-764	56 (55)
n2H7sssIgG1-H6-2e12HL (AA)	リーダー: 1-20 VL: 21-126 リンカー: 127-142 VH: 143-264 ヒンジ: 265-279 EFD-BD2 リンカー: 497-514 VH2: 515-635 リンカー2: 636-655 VL2: 656-767	58 (57)
2H7cscIgG1-STD1-2e12HL (w/2E12 リーダー) (AA)	リーダー: 1-22 VL: 23-128 リンカー: 129-144 VH: 145-265 ヒンジ: 268-282 EFD-BD2 リンカー: 500-519 VH2: 520-640 リンカー2: 641-660 VL2: 661-772	60 (59)

【 0 0 9 3 】

PIMS分子の一使用は、たとえばscorpionのような多重特異的結合性タンパク質のエフェクタードメインおよび／または特異的結合性ドメインの評価および／または最適化における使用である。こうしたPIMS分子は、単独で活性を有するとともに、Scorpion結合性ドメイン2 (BD2) およびエフェクタードメイン-BD2 Scorpionリンカーをより良く評価するためのプラットフォームを提供する。エフェクター機能を有する特異的結合性タンパク質としての使用ならびにScorpion BD2活性およびエフェクタードメイン-BD2リンカー活性の評価における使用のほかに、PIMS分子は、たとえば、ADCC活性および／またはCDC活性のよ

10

20

30

40

50

うなエフェクタードメイン活性を改変するように修飾可能であり、これには、N末端ヒンジ（たとえば、IgG1 SCC-Pヒンジ）、または定常サブ領域もしくはもエフェクタードメインと特異的結合性ドメイン／（複数可）との間に配置されたヒンジ様PIMSリンカー、のいずれかの変更が含まれる。これまでに得られたデータから、ヒト化CD20 PIMSのADCC活性は、少なくともその対応するSMIPと同程度に良好であり、CD20を提示する細胞のような特異的標的に増強されたエフェクター機能を送達するための強力な他の選択肢の分子になりうる可能性を有することが示される。

【0094】

タンパク質およびポリペプチド

本発明の特定の実施形態では、エフェクター機能を有する本明細書に記載の特異的結合性タンパク質（すなわちPIMS）のいずれかを提供する。ただし、エフェクター機能を有する特異的結合性のタンパク質またはペプチドは、少なくとも1つの特異的結合部位を構成する2つ以上の結合性ドメインポリペプチド配列（たとえば、VLおよびVH）を含む。結合性ドメインポリペプチド配列は、抗原可変領域に由来する。結合性ドメインの由来となる抗体は、次のような抗体、すなわち、ポリクローナル抗体（単一特異性ポリクローナル抗体を含む）、モノクローナル抗体（mAb）、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体（たとえばCDR移植抗体）、ヒト抗体、一本鎖抗体、触媒抗体、および当技術分野で公知の任意の他の形態の抗体、さらにはそれらのフラグメント、変異体、または誘導体である。いくつかの実施形態では、結合性ドメインは結合性部位である（たとえばラクダ科動物結合性ドメイン）。いくつかの実施形態では、本発明に係るタンパク質の結合性ドメインのそれぞれは、免疫グロブリンの完全可変領域に由来する。好ましい実施形態では、結合性ドメインは、それぞれ、ヒトIg可変領域に基づく。他の実施形態では、タンパク質は、Ig可変領域のフラグメントに由来する。そのような実施形態では、各結合性ドメインポリペプチド配列は、所与のIg可変領域の相補性決定領域のそれぞれの配列に対応することが好ましい。同様に本発明の範囲内で利用可能と考えられるのは、所与のIg可変領域のCDRの全部ではなくそれよりも少ない部分に対応する結合性ドメインである。ただし、そのような結合性ドメインは、少なくとも1つの標的に特異的に結合する能力を保持するものとする。

【0095】

エフェクター機能を有する特異的結合性タンパク質すなわちPIMSはまた、免疫グロブリン定常領域、好ましくは抗体重鎖定常領域に由来する定常サブ領域配列を、そのC末端を介してPIMSリンカー領域に共有結合して有し、さらに、PIMSリンカー領域を、そのC末端を介してPIMS分子中の結合性ドメインに連結して有する。

【0096】

いくつかの実施形態では、定常サブ領域と結合性ドメインとの間に挿入されるPIMSリンカーは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、またはIgEのヒンジ領域のような免疫グロブリンの野生型ヒンジ領域に由来する。他の実施形態では、本発明は、改変されたヒンジに由来するPIMSリンカーを有するPIMSを提供する。PIMS分子に組み込むのに好適な改変されたヒンジ領域の一カテゴリーは、改変されたいいくつかのシステイン残基、とくに、野生型ヒンジを有する対応する免疫グロブリン分子中の鎖間ジスルフィド結合形成に関与することが当技術分野で公知であるCys残基、を有するヒンジのカテゴリーである。したがって、タンパク質は、鎖間ジスルフィド結合形成に関与しうる3つのヒンジCys残基の1つが欠失したIgG1ヒンジを有しうる。改変されたヒンジのシステイン部分構造を示すために、Cys部分配列は、N末端からC末端の方向に提示される。この識別システムを用いると、改変されたIgGヒンジを有するPIMSは、cxc、xxc、ccx、xxc、xcx、cxx、およびxxxとして特徴付けられるヒンジ構造を含む。ただし、「x」は「c以外」である。Cys残基は、保存的置換または非保存的置換を生じるアミノ酸により欠失させるかまたは置換することが可能である。いくつかの実施形態では、システインは、セリンにより置き換えられる。

【0097】

IgG1ヒンジまたはIgG1ヒンジ様構造を有するPIMSタンパク質では、PIMSリンカー中また

10

20

30

40

50

はN末端ヒンジ領域中に、0、1、2、または3つのCys残基、好ましくは1または2つのCys残基が存在する。IgG2ヒンジを有するタンパク質では、0、1、2、3、または4つのCys残基、好ましくは1または2つのCys残基が存在する。1、2、または3つのCys残基を含有する改変されたIgG2ヒンジでは、Cys残基のすべての可能なサブセットが利用可能と考えられる。したがって、1つのCysを有するIgG2ヒンジでは、PIMS分子は、次のCysモチーフ、すなわち、cxxx、xcxx、xxcx、またはxxxxをヒンジ領域中に有しうる。2または3つのCys残基を有するIgG2ヒンジ変異体では、保持されたCys残基および置換された（または欠失された）Cys残基のすべての可能な組合せが利用可能と考えられる。改変されたIgG3ヒンジ領域または改変されたIgG4ヒンジ領域を有するPIMSでは、減少が欠失を介するかまたは保存的もしくは非保存的なアミノ酸（たとえばセリン）による置換を介するかにかかわらず、ヒンジ領域中のCys残基のうちの1～全数のCys残基の減少が利用可能と考えられる。同様にして、野生型のIgAヒンジ、IgDヒンジ、またはIgEヒンジを有するPIMSも利用可能と考えられ、対応する野生型ヒンジ中に見られるCys残基のうちの0から全数にわたる減少した数のCys残基を有する対応する改変されたヒンジ領域の場合も同様である。IgG1ヒンジを有するいくつかの実施形態では、ヒンジの最初またはN末端のCys残基は保持される。PIMSは、ホモ二量体のようなホモ多量体を形成しうるであろうと考えられる。さらに、改変されたヒンジを有するタンパク質は、ヒンジ領域の末端の改変、たとえば、本明細書中に開示されるPIMSリンカーやPIMSヒンジドメインのような所与の領域またはドメインのN末端、C末端、または両末端の1つ以上のアミノ酸残基の減少または置換を有しうる。

10

20

30

【0098】

他の例示的な実施形態では、定常サブ領域は、天然のまたは工学的に操作されたIgDヒンジ領域を含む定常領域に由来する。野生型ヒトIgDヒンジは、天然のIgD構造中の軽鎖とジスルフィド結合を形成する1つのシステインを有する。いくつかの実施形態では、このIgDヒンジシステインは、定常サブ領域と特異的結合性ドメインとの間のPIMSリンカー領域として使用するための改変されたヒンジを生成するように突然変異（たとえば欠失）される。望ましくないヒンジ非可撓性を生じないIgDヒンジ中の他のアミノ酸の変更または欠失または改変は、本発明の範囲内にある。他の種由来の天然のまたは工学的に操作されたIgDヒンジ領域もまた、本発明の範囲内にあり、非ヒト種由来のヒト化された天然のまたは工学的に操作されたIgDヒンジ、および他のヒトまたは非ヒトの抗体アイソタイプ由来の（他の非IgD）ヒンジ領域（たとえばラマIgG2ヒンジ）の場合も同様である。

30

【0099】

本発明はさらに、以上に述べたように、C末端で、および場合によりN末端で、ヒンジに、およびIgG1ヒンジやIgDヒンジのような既知のヒンジ領域に対応するPIMSリンカーに、結合された定常サブ領域を包含する。ヒンジは、鎖間ジスルフィド結合連結に関与することが知られている少なくとも1つのシステイン残基が保存的置換（たとえば、Cysに対してSer）または非保存的置換で他のアミノ酸により置き換えられている修飾または改変された（野生型に対して）ヒンジ領域でありうる。

40

【0100】

接続領域として使用可能な他の選択肢のヒンジ配列およびPIMSリンカー配列は、免疫グロブリンV様ドメインまたは免疫グロブリンC様ドメインを接続する細胞表面レセプターの部分に由来する。細胞表面レセプターが多数のIg V様ドメインをタンデムに含有する場合にはIg V様ドメイン間の領域および細胞表面レセプターが多数のタンデムIg C様領域を含有する場合にはIg C様ドメイン間の領域を接続領域として利用可能と考えられる。ヒンジ配列およびPIMSリンカー配列は、典型的には、5～60アミノ酸長であり、主に可撓性でありうるが、より剛性の特性を提供することも可能である。それに加えて、PIMSリンカーは、多くの場合、結合性ドメイン間の立体障害の最小化を容易にする間隔を提供する。好ましくは、こうしたヒンジおよびPIMSリンカーのペプチドは、最小限のシート構造を有して、主にヘリックス構造である。好ましい配列は、血漿中および血清中で安定であり、かつタンパク質分解切断に対して耐性がある。好ましい配列は、二量体形成を安定化させるようにジスルフィド結合を付与するCPPCモチーフのような天然に存在するまたは追加さ

50

れたモチーフを含有しうる。好ましい配列は、1つ以上のグリコシル化部位を含有しうる。好ましいヒンジ配列およびPIMSリンカー配列の例としては、CD2、CD4、CD22、CD33、CD48、CD58、CD66、CD80、CD86、CD150、CD166、およびCD244のIg V様領域とIg C様領域との間のドメイン間領域が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0101】

定常サブ領域は、ラクダ科動物の定常領域、たとえば、ラマまたはラクダのIgG2またはIgG3のいずれかに由来しうる。とくに利用可能と考えられるのは、任意のIgクラスまたは任意のIgGサブクラスたとえばIgG1(たとえばヒトIgG1)に由来するC_{H2}-C_{H3}領域またはヒンジ-C_{H2}-C_{H3}領域を有する定常サブ領域である。定常サブ領域はまた、任意のIgクラスまたはIgサブクラスたとえばIgG1(たとえばヒトIgG1)に由来するC_{H3}ドメインでありうる。

10

【0102】

突然変異または欠失された尾片を有するIgA定常ドメイン、たとえば、IgA1ヒンジドメイン、IgA2ヒンジドメイン、IgA C_{H2}ドメイン、およびIgA C_{H3}ドメインもまた、定常サブ領域として利用可能と考えられる。当技術分野では当然のことであろうが、定常サブ領域はまた、たとえば、天然のF_cR(CD16、CD32、CD64、F_c R1)以外のレセプターに対する結合性部位を生成するように、IgGフレームワークを用いて、選択されたアミノ酸置換を行うことにより、ループ移植片が構築された、工学的に操作された抗体に対応しうる。このタイプの代表的な定常サブ領域はCD89結合性部位を有するように修飾されたIgG C_{H2}-C_{H3}領域である。

20

【0103】

本発明のこの態様は、(a)免疫グロブリン定常領域に由来するN末端に配置された定常サブ領域ペプチド結合性ドメインポリペプチド配列を、(b)PIMSリンカー領域配列に、融合または他の形で接続したもの、を含むか、本質的にそれよりなるか、またはそれよりなる、エフェクター機能を有する特異的結合性のタンパク質またはペプチドを提供する。ただし、PIMSリンカー領域ポリペプチドは、本明細書中に記載されたとおりであってもよく、かつたとえばヒンジ領域または代替的ヒンジ領域のポリペプチド配列を、さらに、(c)免疫グロブリンに由来するC末端に配置された天然のまたは工学的に操作された結合性ドメインポリペプチド配列に、融合または他の形で接続したもの、を含むか、本質的にそれよりなるか、またはそれよりなるものであってもよい。

30

【0104】

免疫グロブリン定常領域に由来する定常サブ領域ポリペプチド配列は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害、CDC、補体結合、およびF_cレセプター結合よりなる群から選択される少なくとも1つの免疫学的活性を発揮しうる。また、結合性ドメインポリペプチドは、抗原のような標的に特異的に結合可能である。

40

【0105】

本発明のこの態様はまた、本明細書中に開示される特異的配列よりなるエフェクター機能を有する特異的結合性タンパク質と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%、99%、または99.5%同一であるエフェクター機能を呈する変異体タンパク質または変異体ポリペプチドを包含する。

40

【0106】

ポリヌクレオチド

本発明はまた、本発明に係るタンパク質またはペプチドをコードするポリヌクレオチド(単離されたまたは精製されたまたは純粋なポリヌクレオチド)、そのようなポリヌクレオチドを含むベクター(クローニングベクターおよび発現ベクターを含む)、および本発明に係るポリヌクレオチドまたはベクターでトランスフォームまたはトランスフェクトされた細胞(たとえば宿主細胞)を提供する。本発明に係るタンパク質またはポリペプチドをコードする際、ポリヌクレオチドは、定常サブ領域(F_cドメイン)、PIMSリンカー、および特異的結合性ドメインをコードし、これらはすべて、免疫グロブリン、好ましくはヒト免疫グロブリンに由来する。結合性ドメインは、全長可変領域配列(重鎖およびノ

50

は軽鎖のいずれか)に対応するかまたはその部分配列に対応する配列を含有しうる。ただし、そのような結合性ドメインはそれぞれ、特異的に結合する能力を保持するものとする。定常サブ領域またはF_cドメインは、全長免疫グロブリンF_cドメイン配列に対応するかまたはその部分配列に対応する配列を有しうる。ただし、F_cドメインは、本明細書中に規定される少なくとも1つのエフェクター機能を呈するものとし、かつF_cドメインは、完全抗体Fc領域ではないものとする。それに加えて、所与の結合性部位の結合性ドメインのそれぞれは、典型的には少なくとも8アミノ酸、好ましくは少なくとも13アミノ酸の長さであるリンカーベプチドを介して連結可能である。好ましいリンカー配列は、(Gly4Ser)_n〔式中、n=3~5〕のようなGly4Serモチーフに基づく配列である。

【0107】

10

エフェクター機能を有する特異的結合性タンパク質の変異体もまた、本発明に包含される。変異体ポリヌクレオチドは、本明細書中に記載の規定の配列のポリヌクレオチドの1つと、または65~68で0.015M塩化ナトリウムかつ0.0015Mクエン酸ナトリウム、もしくは42で0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、かつ50%ホルムアミドのストリンジエントハイブリダイゼーション条件下で規定の配列のポリヌクレオチドの1つにハイブリダイズするポリヌクレオチドの1つと、少なくとも90%、好ましくは95%、99%、もしくは99.9%同一である。ポリヌクレオチド変異体は、エフェクター機能を有する特異的結合性タンパク質またはPIMSをコードする能力を保持する。

【0108】

20

「ストリンジエント」という用語は、ストリンジエントとして当技術分野で一般に理解される条件を参照すべく使用される。ハイブリダイゼーションストリンジエンシーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の濃度により決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄に対するストリンジエント条件の例は、65~68で0.015M塩化ナトリウムかつ0.0015Mクエン酸ナトリウム、または42で0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、かつ50%ホルムアミドである。Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989)を参照されたい。

【0109】

30

よりストリンジエントな条件(たとえば、より高い温度、より低いイオン強度、より高濃度のホルムアミド、または他の変性剤)を使用することも可能であるが、ハイブリダイゼーションの速度が影響を受けるであろう。デオキシオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションが関係する場合、追加の代表的なストリンジエントハイブリダイゼーション条件は、6×SSC、0.05%ピロリン酸ナトリウム中、37(14塩基のオリゴヌクレオチドの場合)、48(17塩基のオリゴヌクレオチドの場合)、55(20塩基のオリゴヌクレオチドの場合)、および60(23塩基のオリゴヌクレオチドの場合)での洗浄を含む。

【0110】

40

本発明の関連態様では、たとえばPIMSをはじめとする本発明に係るポリペプチドもしくはタンパク質または他の構築物を产生する方法を提供する。この方法は、(a)構築物の発現を可能にする条件下で、本明細書中に記載または規定される宿主細胞を培養する工程と、(b)宿主細胞または宿主細胞培養物からPIMS発現産物を単離する工程と、を含む。

【0111】

構築物

本発明はまた、ベクターと、公知のベクターから調製された構築物と、(ただし、それぞれ、本発明に係るポリヌクレオチドまたは核酸を含むものとする)、特定的には、本明細書中に規定される、たとえばPIMSをコードする任意の核酸を含む、遺伝子療法に有用な、送達構築物をはじめとする種々の公知の構築物のいずれかを含む組換え発現構築物と、本発明に係るベクターおよび/または他の構築物を用いて遺伝子工学的に操作された宿主細胞と、PIMSまたはそのフラグメントもしくは変異体をコードする核酸配列を組換え技術により含む発現構築物または他の構築物を投与する方法と、に関する。

【0112】

50

PIMSをコードする本発明に係る種々の構築物は、構築物の性質（たとえば、以上に記載のプロモーターのタイプ）に依存して、および所望の宿主細胞の性質（たとえば、有糸分裂後の最終分化細胞または活発に分裂する細胞；たとえば、エピソームとしてのまたは宿主細胞ゲノム中に一体化された発現可能な構築物の維持）に依存して、適切なプロモーターの制御下で、遺伝子療法に使用する場合の *in vivo*宿主細胞をはじめとする実質上任意の宿主細胞内で発現可能である。

【 0 1 1 3 】

原核生物宿主および真核生物宿主で使用するのに適切なクローニングベクターおよび発現ベクターについては、たとえば、Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, (1989)に記載されている。代表的なクローニング／発現ベクターとしては、プラスミド、ファージミド、ファスミド、コスミド、ウイルス、人工染色体、または内包ポリヌクレオチドの増幅、移動、および／もしくは発現に好適な当技術分野で公知の任意の核酸媒体に基づく、クローニングベクター、シャトルベクター、および発現構築物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本明細書に記載されるように、本発明の好ましい実施形態では、組換え発現は、本発明に係る核酸でトランスフェクト、トランスフォーム、またはトランスジュースされた哺乳動物細胞内で行われる。たとえば、Machida, CA., "Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols"、Wolff, JA, "Gene Therapeutics: Methods and Applications of Direct Gene Transfer" (Birkhauser 1994)、Stein, U and Walther, W (eds., "Gene Therapy of Cancer: Methods and Protocols" (Humana Press 2000)、Robbins, PD (ed.) , "Gene Therapy Protocols" (Humana Press 1997)、Morgan, JR (ed.), "Gene Therapy Protocols" (Humana Press 2002)、Meager, A (ed.), "Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations: From Laboratory to Clinic" (John Wiley & Sons Inc. 1999)、MacHida, CA and Constant, JG, "Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols" (Humana Press 2002)、"New Methods Of Gene Therapy For Genetic Metabolic Diseases NIH Guide," Volume 22, Number 35, October 1, 1993も参照されたい。また、米国特許第6,384,210号明細書、同第6,384,203号明細書、同第6,384,202号明細書、同第6,384,018号明細書、同第6,383,814号明細書、同第6,383,811号明細書、同第6,383,795号明細書、同第6,383,794号明細書、同第6,383,785号明細書、同第6,383,753号明細書、同第6,383,746号明細書、同第6,383,743号明細書、同第6,383,738号明細書、同第6,383,737号明細書、同第6,383,733号明細書、同第6,383,522号明細書、同第6,383,512号明細書、同第6,383,481号明細書、同第6,383,478号明細書、同第6,383,138号明細書、同第6,380,382号明細書、同第6,380,371号明細書、同第6,380,369号明細書、同第6,380,362号明細書、同第6,380,170号明細書、同第6,380,169号明細書、同第6,379,967号明細書、および同第6,379,966号明細書も参照されたい。

【 0 1 1 4 】

典型的には、発現構築物は、プラスミドベクターに由来する。好ましい一構築物は、アンピシリン耐性遺伝子、ポリアデニル化シグナル、およびT7プロモーター部位をコードする核酸配列を有する修飾型pNASSベクター (Clontech, Palo Alto, CA) である。他の好適な哺乳動物発現ベクターは周知である（たとえば、Ausubel et al., 1995; Sambrook et al., supraを参照されたい；また、たとえば、Invitrogen, San Diego, CA; Novagen, Madison, WI; Pharmacia, Piscataway, NJからのカタログも参照されたい）。PIMSの产生レベルの増大を促進するために、好適な調節制御下にジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) コード配列を含む現時点で好ましい構築物を調製することが可能である。このレベルは、適切な選択剤（たとえばメトトレキセート）の適用後の遺伝子増幅から得られる。

【 0 1 1 5 】

一般的には、組換え発現ベクターは、以上に記載したように、複製起点と、宿主細胞のトランスフォーメーションを可能にする選択性マーカーと、下流の構造配列の転写を誘導するための高発現遺伝子に由来するプロモーターと、を含むであろう。本発明に係るポリヌクレオチドと機能しうる形で連結されたベクターは、クローニング構築物または発現構

10

20

30

40

50

築物を生成する。代表的なクローニング／発現構築物は、本発明に係るポリヌクレオチドに機能しうる形で連結された少なくとも1つの発現制御エレメントたとえばプロモーターを含有する。エンハンサー、因子特異的結合性部位、ターミネーター、およびリボソーム結合性部位のような追加の発現制御エレメントもまた、本発明に係るベクターおよびクローニング／発現構築物で利用可能と考えられる。本発明に係るポリヌクレオチドの異種構造配列は、適切な時期に翻訳開始配列および翻訳終止配列と共に集合される。したがって、たとえば、本明細書中で規定されるPIMSコード核酸は、宿主細胞内でそのようなタンパク質を発現するために組換え発現構築物としてさまざまな発現ベクター構築物のいずれか1つに組み込まれる。特定の好ましい実施形態では、構築物は、*in vivo*で投与される製剤に組み込まれる。そのようなベクターおよび構築物としては、染色体DNA配列、非染色体DNA配列、および合成DNA配列、たとえば、SV40、細菌プラスミド、ファージDNA、酵母プラスミド、プラスミドとファージDNAとの組合せに由来するベクター、ウイルスDNA、たとえば、ワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病ウイルスのDNA、または以下に記載される複製欠損レトロウイルスのDNAの誘導体が挙げられる。しかしながら、組換え発現構築物を調製するために、任意の他のベクターを使用することが可能であり、好ましい実施形態では、そのようなベクターは、宿主内で複製可能かつ生存可能である。

10

【0116】

適切なDNA配列（複数可）は、さまざまな手順により、たとえばベクター中に挿入可能である。一般的には、DNA配列は、当技術分野で公知の手順により、適切な制限エンドヌクレアーゼ切断部位（複数可）に挿入される。クローニング、DNAの単離、増幅、および精製のための標準的技術、DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼなどが関与する酵素反応のための標準的技術、ならびに種々の分離技術が利用可能と考えられる。いくつかの標準的技術については、たとえば、Ausubel et al. (1993 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA)、Sambrook et al. (1989 Molecular Cloning, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY)、Maniatis et al. (1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY)、Glover (Ed.) (1985 DNA Cloning Vol. I and II, IRL Press, Oxford, UK)、Hames and Higgins (Eds.), (1985 Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, UK)、および他の文献に記載されている。

20

【0117】

発現ベクター中のDNA配列は、mRNA合成を誘導するための少なくとも1つの適切な発現制御配列（たとえば、構成プロモーターまたは調節プロモーター）に機能的に連結される。そのような発現制御配列の代表例としては、以上に記載の真核細胞またはそのウイルスのプロモーターが挙げられる。プロモーター領域は、選択性マーカーを有するCAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）ベクターまたは他のベクターを用いて任意の所望の遺伝子から選択可能である。真核生物プロモーターとしては、CMV前初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、初期および後期SV40プロモーター、レトロウイルスのLTRプロモーター、およびマウスマタロチオネイン-Iプロモーターが挙げられる。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、十分に当業者のレベルの範囲内にあり、本発明に係るタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸に機能しうる形で連結された少なくとも1つのプロモーターまたは調節プロモーターを含む特定のとくに好ましい組換え発現構築物の調製は、本明細書中に記載されている。

30

【0118】

高等真核生物による本発明に係るタンパク質およびポリペプチドをコードするDNAの転写は、エンハンサー配列をベクター中に挿入することにより増大させることが可能である。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサーbp100～270、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスのエンハンサーが挙げられる。

40

【0119】

50

欠損遺伝子を置き換えるかまたは新しい遺伝子を細胞および／または組織に追加する戦略を含む本発明に係る核酸を用いた遺伝子療法が利用可能と考えられ、癌の治療、代謝障害の是正、および免疫療法の分野で適用すべく開発が進められている。本発明に係る遺伝子療法は、本明細書中で述べた疾患、障害、および／または病態を治療するために、個別の担体または送達媒体または構築物を併用してまたは併用せずに、本発明に係る種々の構築物を使用することを含む。そのような構築物はまた、本明細書中で述べた疾患、障害、および／または病態を治療または予防するためのワクチンとして使用することも可能である。たとえば、DNAワクチンでは、免疫原性タンパク質をコードするポリヌクレオチドおよび病原体または腫瘍細胞に対抗して免疫系を刺激する核酸決定基を利用する。そのような戦略は、後天性免疫または先天性免疫のいずれかを刺激しうるかまたはサイトカイン発現を介して免疫機能を修飾することを含みうる。in vivo遺伝子療法は、典型的には疾患または疾患に関する症状を治療、予防、または改善するために、患者または動物に遺伝物質を直接注射することを含む。ワクチンおよび免疫調節は全身療法である。癌の治療を目的とするような組織特異的in vivo療法に関しては、局所的な遺伝子送達および／または発現／ターゲッティングシステムが好ましい。特定の組織を標的にするさまざまな遺伝子療法ベクターが当技術分野で公知であり、また、たとえばカテーテルに基づく技術を用いて特定の組織を物理的に標的にする手順が開発されてきた。これらはすべて、本発明で利用可能と考えられる。

10

【0120】

ex vivo遺伝子療法もまた、本発明で利用可能と考えられ、これには、被験者たとえばヒト患者の自己細胞の採取、遺伝子修飾、増殖、および再投与が含まれる。例としては、癌治療またはリンパ球前駆細胞の遺伝子修飾のための骨髄移植が挙げられる。ex vivo遺伝子療法は、好ましくは、容易に取得可能かつ遺伝子移入プロセス時に培養下で生存可能な細胞の治療に適用される（たとえば、血液細胞または皮膚細胞）。

20

【0121】

有用な遺伝子療法ベクターとしては、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクター、およびレトロウイルスベクターが挙げられる。遺伝子療法はまた、「ネイキッドDNA」、リポソーム系送達、脂質系送達（正荷電脂質に結合されたDNAを含む）、エレクトロポレーション、およびバリスティック照射を用いて実施可能である。

30

【0122】

限定されるものではないが、遺伝子療法の実施形態をはじめとする特定の実施形態では、ベクターは、たとえばレトロウイルスベクターなどのウイルスベクターでありうる。Miller et al., 1989 BioTechniques 7:980, Coffin and Varmus, 1996 Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY。たとえば、レトロウイルスプラスミドベクターの由来となるレトロウイルスとしては、モロニーマウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルスのようなレトロウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、ギボン類人猿白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アデノウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳腺腫瘍ウイルスが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【0123】

レトロウイルスは、複製可能かつDNA中間体を介して宿主細胞のゲノム中に組込み可能なRNAウイルスである。このDNA中間体またはプロウイルスは、宿主細胞DNA中に安定に組込み可能である。本発明に係る特定の実施形態によれば、発現構築物は、外来タンパク質をコードする外来遺伝子が正常なレトロウイルスRNAの代わりに組み込まれたレトロウイルスを含みうる。感染と同時にレトロウイルスRNAが宿主細胞に入った時、外来遺伝子もまた細胞内に導入され、次に、あたかもレトロウイルスゲノムの一部であるかのように宿主細胞DNA中に組み込まれうる。この外来遺伝子が宿主内で発現されると、外来タンパク質の発現が起こる。

【0124】

50

遺伝子療法のために開発してきたほとんどのレトロウイルスベクターシステムは、ネズミ科動物レトロウイルスに基づく。そのようなレトロウイルスは、ビリオンと呼ばれる遊離ウイルス粒子としてまたは宿主細胞DNA中に組み込まれるプロウイルスとして、2つの形態で存在する。ビリオン形態のウイルスは、レトロウイルスの構造タンパク質および酵素タンパク質（酵素リバーストランスクリプターゼを含む）、ウイルスゲノムの2つのRNAコピー、およびウイルスエンベロープ糖タンパク質を含有するソース細胞形質膜の部分を含有する。レトロウイルスゲノムは、4つの主要領域、すなわち、転写の開始および終止に必要なシス作用性エレメントを含有しあつコード遺伝子の5'側および3'側の両方に位置する長末端反復（LTR）、ならびにgag、pol、およびenvをコードする3つの遺伝子で構成されている。これらの3つの遺伝子gag、pol、およびenvは、それぞれ、内部ウイルス構造体、酵素タンパク質（たとえばインテグラーゼ）、ならびに感染性およびウイルスの宿主域特異性を付与するエンベロープ糖タンパク質（gp70およびp15eと称される）さらには機能未確定の「R」ペプチドをコードする。

10

【0125】

発現構築物での使用をはじめとするレトロウイルスの使用に関する安全性の問題が理由で、個別のパッケージング細胞系およびベクター產生細胞系が開発されてきた。簡潔に述べると、この方法では、2つの構成要素、すなわち、レトロウイルスベクターおよびパッケージング細胞系（PCL）の使用が採用される。レトロウイルスベクターは、長末端反復（LTR）、移入される外来DNA、およびパッケージング配列（y）を含有する。構造タンパク質およびエンベロープタンパク質をコードする遺伝子はベクターゲノム中に組み込まれないので、このレトロウイルスベクターは、単独では複製しないであろう。PCLは、gag、pol、およびenvタンパク質をコードする遺伝子を含有するが、パッケージングシグナル「y」を含有しない。したがって、PCLは、単独では空のビリオン粒子を形成しうるにすぎない。この一般的方法の範囲内では、レトロウイルスベクターは、PCL内に導入され、それにより、ベクター產生細胞系（VCL）を形成する。このVCLは、レトロウイルスベクターの外来ゲノムのみを含有するビリオン粒子を生産するので、治療に使用するための安全なレトロウイルスベクターであるこれまで考えられてきた。

20

【0126】

「レトロウイルスベクター構築物」とは、本発明の好ましい実施形態では、PIMSコード核酸配列のような対象の配列（複数可）または遺伝子（複数可）の発現を誘導しうる集合体を意味する。簡潔に述べると、レトロウイルスベクター構築物は、5'LTR、tRNA結合性部位、パッケージングシグナル、第二鎖DNA合成の起点、および3'LTRを含まなければならない。たとえば、タンパク質（たとえば、細胞傷害性タンパク質、疾患関連抗原、免疫アクセサリー分子、もしくは代替タンパク質）をコードする配列または分子自体として（たとえば、リボザイムもしくはアンチセンス配列として）有用な配列をはじめとする広範にわたるさまざまな異種配列をベクター構築物中に組み込むことが可能である。

30

【0127】

本発明に係るレトロウイルスベクター構築物は、たとえば、B型、C型、およびD型レトロウイルスさらにはスプーマウイルスおよびレンチウイルスをはじめとする広範にわたるさまざまなレトロウイルスから容易に構築可能である（たとえば、RNA Tumor Viruses, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985を参照されたい）。そのようなレトロウイルスは、寄託機関もしくは保存機関、たとえば、American Type Culture Collection ("ATCC"; Rockville, Maryland)から容易に入手可能であるか、または一般に利用可能な技術を用いて公知のソースから単離可能である。以上のレトロウイルスはいずれも、本明細書中に提供された開示および標準的組換え技術（たとえば、Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Kunkle, 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:488）を用いれば、本発明に係るレトロウイルスベクター構築物、パッケージング細胞、またはプロデューサー細胞を集合または構築するために容易に利用可能である。

40

【0128】

50

ウイルスベクターで使用するのに好適なプロモーターとしては、一般的には、レトロウイルスLTR、SV40プロモーター、およびMiller, et al., 1989 Biotechniques 7:980 990に記載のヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターまたは任意の他のプロモーター(たとえば、限定されるものではないが、ヒストンプロモーター、pol IIIプロモーター、および-アクチンプロモーターをはじめとする真核生物細胞プロモーターのような細胞プロモーター)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。利用しうる他のウイルスプロモーターとしては、アデノウイルスプロモーター、チミジンキナーゼ(TK)プロモーター、およびB19パルボウイルスプロモーターが挙げられるが、これらに限定されるものではない。好適なプロモーターの選択は、本明細書に含まれる教示から当業者には自明であろう。また、調節プロモーターまたは以上に記載のプロモーターのいずれかに基づきうる。

10

【0129】

レトロウイルスプラスミドベクターは、パッケージング細胞系をトランスジュースしてプロデューサー細胞系を形成するために利用される。トランスフェクト可能なパッケージング細胞の例としては、PE501、PA317、-2、-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、CRE、CRIP、GP+E-86、GP+envAm12、およびMiller, Human Gene Therapy, 1:5-14 (1990)に記載のDAN細胞系が挙げられるが、これらに限定されるものではない。当技術分野で公知の任意の手段を介して、ベクターによりパッケージング細胞をトランスジュースすることが可能である。そのような手段としては、エレクトロポレーション、リポソームの使用、およびCa·PO₄沈殿が挙げられるが、これらに限定されるものではない。一選択肢では、レトロウイルスプラスミドベクターをリポソーム内に封入するかまたは脂質に結合させてから宿主に投与することが可能である。

20

【0130】

プロデューサー細胞系は、PIMSをコードする核酸配列(複数可)を含む感染性レトロウイルスベクター粒子を生成する。次に、そのようなレトロウイルスベクター粒子は、in vitroもしくはin vivoのいずれかで、真核細胞をトランスジュースするために利用可能である。トランスジュースされた真核細胞は、タンパク質またはポリペプチドをコードする核酸配列を発現するであろう。トランスジュース可能な真核細胞としては、胚幹細胞、さらには造血幹細胞、肝細胞、纖維芽細胞、血流中末梢血单核および多形核細胞、たとえば、骨髄单球細胞、リンパ球、筋芽細胞、組織マクロファージ、樹状細胞、Kupffer細胞、リンパ節および脾臓のリンパ系細胞および細網内皮細胞、角化細胞、内皮細胞、ならびに気管支上皮細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0131】

宿主細胞

本発明のさらなる態様は、本発明に係るポリヌクレオチドまたはクローニング/発現構築物のいずれかでトランスフォームもしくはトランスフェクトされたかまたはそれらを他の形で含有する宿主細胞を提供する。ポリヌクレオチドおよびクローニング/発現構築物は、トランスフォーメーション、トランスフェクション、およびトランスタクションをはじめとする当技術分野で公知の任意の方法を用いて、好適な細胞内に導入される。宿主細胞としては、たとえばex vivo遺伝子療法などのex vivo細胞療法を受ける被験者の細胞が挙げられる。本発明に係るポリヌクレオチド、ベクター、またはタンパク質を保有する場合の本発明の態様として利用可能と考えられる真核宿主細胞としては、被験者の自己細胞(たとえば、ヒト患者の自己細胞)のほかに、VERO細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞系(発現PIMSのグリコシル化パターンを改変しうる改変CHO細胞を含む;米国特許出願公開第2003/0115614A1号明細書(参照により本明細書に組み入れられるものとする)を参照されたい)、COS細胞(たとえばCOS-7細胞)、W138細胞、BHK細胞、HepG2細胞、3T3細胞、RIN細胞、MDCK細胞、A549細胞、PC12細胞、K562細胞、HEK293細胞、HepG2細胞、N細胞、3T3細胞、スピードブテラ・フルギペルダ(Spodoptera frugiperda)細胞(たとえば、Sf9細胞)、サッカロミセス・セレビシアエ(Saccharomyces cerevisiae)細胞、ならびに本発明に係るタンパク質またはペプチドの発現および場合により単離に

40

50

有用な当技術分野で公知の任意の他の真核細胞が挙げられる。同様に利用可能と考えられるのは、限定されるものではないが、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*)、バシラス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)、ストレプトミセス属の放線菌をはじめとする原核細胞、または本発明に係るタンパク質もしくはペプチドの発現および場合により単離に好適な当技術分野で公知の任意の原核細胞である。とくに、原核細胞からタンパク質またはペプチドを単離する場合、封入体からタンパク質を抽出するため

の当技術分野で公知の技術を使用しうると考えられる。適切な宿主の選択は、本明細書に記載の教示から当業者の実施可能な範囲内にある。

【0132】

工学的に操作された宿主細胞は、プロモーターの活性化、トランスフォーマントの選択、または特定の遺伝子の増幅に適するように改変された従来の栄養培地中で培養可能である。発現のために選択される特定の宿主細胞に対する培養条件、たとえば、温度、pHなどは、当業者には自明であろう。種々の哺乳動物細胞培養系もまた、組換えタンパク質の発現に利用可能である。哺乳動物発現系の例としては、Gluzman, 1981 *Cell* 23:175に記載のサル腎臓纖維芽細胞のCOS-7系、および適合ベクターの発現が可能な他の細胞系、たとえば、C127細胞系、3T3細胞系、CHO細胞系、HeLa細胞系、およびBHK細胞系が挙げられる。哺乳動物発現ベクターは、複製起点、好適なプロモーター、および場合によりエンハンサー、さらには任意の必要なりボソーム結合性部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位およびスプライスアクセプター部位、転写終止配列、および5' フランкиング非転写配列、たとえば、PIMS発現構築物の調製に関して本明細書中に記載した配列を含むであろう。SV40スプライスに由来するDNA配列およびポリアデニル化部位を用いて所要の非転写遺伝子エレメントを提供することが可能である。宿主細胞内への構築物の導入は、当業者であれば熟知しているであろうさまざまな方法、たとえば、限定されるものではないが、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、またはエレクトロポレーション (Davis et al., 1986 *Basic Methods in Molecular Biology*) により実施可能である。

10

20

30

40

【0133】

一実施形態では、宿主細胞は、本発明に係るタンパク質またはポリペプチドの発現を誘導する組換えウイルス構築物によりトランスジュースされる。トランスジュースされた宿主細胞は、ウイルス出芽時にウイルス粒子により組み込まれた宿主細胞膜の部分に由来する発現タンパク質または発現ポリペプチドを含有するウイルス粒子を産生する。

【0134】

医薬組成物

いくつかの実施形態では、本発明に係る組成物、たとえば、PIMS、または本明細書中に記載のそのようなタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む組成物は、遺伝子療法などのためにin vivoもしくはin vitroで宿主細胞内でのコードタンパク質の発現を可能にするのに十分な条件下でかつ十分な時間をかけて投与するのに好適である。そのような組成物は、周知の方法に従って、投与に供される医薬組成物の形態に製剤化可能である。医薬組成物は、一般的には、製薬上許容される担体、賦形剤、または希釈剤と組み合わせて、1つ以上の組換え発現構築物および/またはそのような構築物の発現産物を含む。そのような担体は、利用される投与量および濃度ではレシピエントに対して非毒性であろう。本発明に係る核酸系製剤の場合または発現産物を含む製剤の場合、たとえば、真皮内経路、皮下経路、筋肉内経路、もしくは静脈内経路により、または所与の一群の状況下で好適な当技術分野で公知の任意の経路により、約0.01 μg/kg ~ 約100mg/kg(体重)で投与されるであろう。好みしい投与量、たとえば、約1 μg/kg ~ 約1mg/kgであり、約5 μg/kg ~ 約200 μg/kgがとくに好みしい。

【0135】

当業者には自明なことであろうが、投与の回数および頻度は、宿主の応答に依存するであろう。治療に使用するための製薬上許容される担体は、製薬技術分野で周知であり、た

50

とえば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985)に記載されている。たとえば、生理的pHの滅菌生理食塩水およびリン酸緩衝生理食塩水を使用することが可能である。保存剤、安定化剤、染料などを医薬組成物中に提供することが可能である。たとえば、ナトリウムベンゾエート、ソルビン酸、およびp-ヒドロキシ安息香酸のエステルを保存剤として添加することが可能である。上掲文献1449頁参照。それに加えて、抗酸化剤および懸濁化剤を使用することが可能である。上掲文献参照。本発明に係る化合物は、遊離塩基形または塩形のいずれかで使用可能であり、いずれの形態も本発明の範囲内にあると見なされる。

【0136】

本発明に係る1つ以上の核酸構築物またはそのような核酸構築物によりコードされる産物に対応するタンパク質を含有する医薬組成物は、組成物を患者に投与しうる任意の形態をとりうる。たとえば、組成物は、固体、液体、または気体（エアロゾル）の形態をとりうる。典型的な投与経路としては、経口、局所、非経口、頸腔内、舌下、直腸内、膣内、および鼻腔内が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本明細書中で用いられる非経口という用語は、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、胸骨内注射、空洞内注射、髄腔内注射、道内注射、尿道内注射、または注入技術を包含する。医薬組成物は、患者に組成物を投与したときに内包されている活性成分が生物学的に利用可能になるように製剤化される。患者に投与される組成物は、1つ以上の投与ユニットの形態をとりうる。この場合、たとえば、錠剤は、単回投与ユニットでありうる。また、エアロゾルの形態の本発明に係る1つ以上の化合物の入った容器は、複数の投与ユニットを保持しうる。

10

20

30

40

【0137】

経口投与に供する場合、賦形剤および／または結合剤が存在しうる。その例は、スクロース、カオリン、グリセリン、デンプンデキストリン、ナトリウムアルギネート、カルボキシメチルセルロース、およびエチルセルロースである。着色剤および／または風味剤が存在しうる。コーティングシェルが利用可能である。

【0138】

組成物は、液体、たとえば、エリキシル、シロップ、溶液、エマルジョン、またはサスペンションの形態をとりうる。液体は、2つの例として、経口投与または注射による送達に供することが可能である。経口投与が意図される場合、好ましい組成物は、1つ以上のPIMS構築物または発現産物に加えて、1つ以上の甘味剤、保存剤、染料／着色剤、および風味向上剤を含有する。注射による投与が意図される組成物では、界面活性剤、保存剤、湿润剤、分散剤、懸濁化剤、緩衝剤、安定化剤、および等張化剤のうちの1つ以上を組み込むことが可能である。

【0139】

本明細書中で用いられる液体医薬組成物は、溶液の形態かサスペンションの形態か他の類似の形態かにかかわらず、次の化合物、すなわち、滅菌希釈剤、たとえば、注射用水、塩類溶液、好ましくは、生理食塩水、リングル液、等張食塩水、固定油、たとえば、溶媒もしくは懸濁媒体として機能しうる合成のモノグリセリドまたはジグリセリド、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の溶媒；抗細菌剤、たとえば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化剤、たとえば、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム；キレート化剤、たとえば、エチレンジアミン四酢酸；緩衝剤、たとえば、酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩、張度調整のための作用剤、たとえば、塩化ナトリウムまたはデキストロース、ならびに当技術分野で公知の任意のアジュvantのうちの1つ以上を含みうる。免疫刺激性物質（アジュvant）の例としては、N-アセチルムラミル-L-アラニン-D-イソグルタミン（MDP）、リポポリサッカリド（LPS）、グルカン、IL 12、GM CSF、ガンマインターフェロンおよびIL 15が挙げられる。非経口製剤は、ガラス製またはプラスチック製のアンプル、ディスポーザブルシリンジ、または複数回用量バイアル中に封入可能である。注射用医薬組成物は、好ましくは滅菌されている。

【0140】

また、他の成分、たとえば、限定されるものではないが、アルミニウム塩、油中水型工

50

マルジョン、生分解性油媒体、水中油型エマルジョン、生分解性マイクロカプセル、およびリポソームをはじめとする送達媒体を製剤に組み込むことが望ましいことも。そのような媒体で使用するための免疫刺激性物質（アジュvant）の例は、以上に規定されている。

【0141】

当業者に公知の任意の好適な担体を本発明に係る医薬組成物で利用しうるが、担体のタイプは、投与形態に依存しておよび持続放出が望まれるかどうかによって異なるであろう。皮下注射のような非経口投与に供する場合、担体は、好ましくは、水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ワックス、または緩衝剤を含む。経口投与に供する場合、以上の担体、またはマンニトール、ラクトース、デンプン、マグネシウムステアレート、サッカリントリウム、タルカム、セルロース、グルコース、スクロース、および炭酸マグネシウムのような固体担体のうちのいずれかを利用することが可能である。生分解性マイクロスフェア（たとえば、ポリ乳酸ガラクチド）もまた、本発明に係る医薬組成物用の担体として利用可能である。好適な生分解性マイクロスフェアは、たとえば、米国特許第4,897,268号明細書および同第5,075,109号明細書（参照により本明細書に組み入れられるものとする）に開示されている。これに関連して、マイクロスフェアは、約25ミクロン超であることが好ましい。

10

【0142】

医薬組成物はまた、希釈剤たとえば緩衝剤、抗酸化剤たとえばアスコルビン酸、低分子量（約10残基未満）ポリペプチド、タンパク質、アミノ酸、炭水化物（たとえば、グルコース、スクロース、またはデキストリン）、キレート化剤（たとえばEDTA）、グルタチオン、ならびに他の安定化剤および賦形剤を含有しうる。中性緩衝生理食塩水または非特異的血清アルブミンと混合された塩類溶液は、代表的な適切な希釈剤である。好ましくは、産物は、適切な賦形剤溶液（たとえばスクロース溶液）を希釈剤として用いて凍結乾燥物として製剤化される。

20

【0143】

本発明に係る医薬組成物はまた、米国特許出願公開第2006/0008415A1号明細書（参照により本明細書に組み入れられるものとする）に開示される技術をはじめとする当技術分野で公知の技術に基づく安定化タンパク質および安定な液体医薬製剤を包含する。そのような技術としては、タンパク質の誘導体化が挙げられる。この場合、このタンパク質は、N-アセチル-L-システイン、N-エチル-マレイミド、またはシステインに結合されたチオール基を含む。

30

【0144】

以上に記載したように、本発明は、PIMS分子をコードする核酸分子を送達しうる組成物を包含する。そのような組成物としては、組換えウイルスベクター、たとえば、レトロウイルスベクター（国際公開第90/07936号パンフレット、国際公開第91/02805号パンフレット、国際公開第93/25234号パンフレット、国際公開第93/25698号パンフレット、および国際公開第94/03622号パンフレットを参照されたい）、アデノウイルスベクター（Berkner, 1988 Biotechniques 6:616-627; Li et al., 1993 Hum. Gene Ther. 4:403-409; Vincent et al., Nat. Genet. 5:130-134; and Kolls et al., 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219を参照されたい）、ポックスウイルスベクター（米国特許第4,769,330号明細書、米国特許第5,017,487号明細書、および国際公開第89/01973号パンフレットを参照されたい）、ポリカチオン性分子と複合体化された組換え発現構築物核酸分子（国際公開第93/03709号パンフレットを参照されたい）、およびリポソームと会合した核酸（Wang et al., 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7851を参照されたい）が挙げられる。特定の実施形態では、DNAは、死滅アデノウイルスまたは不活性化アデノウイルスに連結可能である（Curiel et al., 1992 Hum. Gene Ther. 3:147-154; Cotton et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6094を参照されたい）。他の好適な組成物としては、DNA-リガンドの組合せ（Wu et al., 1989 J. Biol. Chem. 264:16985-16987を参照されたい）および脂質-DNAの組合せ（Felgner et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-74

40

50

17を参照されたい)が挙げられる。

【0145】

直接的なin vivo手順のほかに、宿主(たとえば、ヒト患者のような被験者)から細胞を採取し、修飾し、そして同一もしくは他の宿主動物内に配置するex vivo手順を使用することも可能である。自明なことであろうが、本発明に係る構築物、タンパク質/ポリペプチドまたはそれらをコードする核酸のいずれかをex vivo状況で組織細胞内に導入することに関連して以上に述べた組成物はいずれかも、利用可能である。ウイルス的、物理的、および化学的な取込み方法に関するプロトコルは、当技術分野で周知である。

【0146】

抗体の生成

抗原ポリペプチドに対するポリクローナル抗体は、一般的には、抗原ポリペプチドまたはそのフラグメントとアジュバントとの複数回の皮下注射または腹腔内注射を利用して、動物(たとえば、ウサギ、ハムスター、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ラット、アレチネズミ、モルモット、マウス、または任意の他の好適な哺乳動物種、さらには他の非哺乳動物種)内で產生される。アジュバントとしては、完全または不完全フロイントアジュバント、ミネラルゲル、たとえば、水酸化アルミニウム、および界面活性物質、たとえば、リゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、ならびにジニトロフェノールが挙げられるが、これらに限定されるものではない。BCG(カルメット・ゲラン(Calmette-Guerin)桿菌)およびコリネバクテリウム・パルバム(Corynebacterium parvum)もまた、潜在的に有用なアジュバントである。免疫化される種において免疫原性である担体タンパク質に抗原ポリペプチドをコンジュゲートすることが有用なこともあります。典型的な担体としては、キーホールリンベットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシ科動物チログロブリン、またはダイズトリプシン阻害剤が挙げられる。また、免疫応答を増強するために、ミョウバンのような凝集剤も使用される。免疫化の後、動物から採血し、そして従来技術を用いて抗原ポリペプチド抗体力価に関して血清をアッセイする。ポリクローナル抗体は、検出された血清中で利用可能であるか、または、たとえば、抗原アフィニティークロマトグラフィーを用いて血清から精製可能である。

10

20

30

40

50

【0147】

抗原ポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、培養下で連續継代細胞系により抗体分子の產生を行う任意の方法を用いて產生される。たとえば、モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature 256:495 [1975]に記載のハイブリドーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosbor et al., Immunol Today 4:72, 1983; Cote et al., Proc Natl Acad Sci 80: 2026-2030, 1983)、およびEBVハイブリドーマ技術(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc, New York N.Y., pp 77-96, (1985))により作製可能である。

【0148】

ハイブリドーマ技術を利用する場合、骨髄腫細胞系が使用可能である。ハイブリドーマ產生融合手順で使用するのに適した細胞系は、好ましくは、内因性抗体を產生せず、高い融合効率を有し、かつ所望の融合細胞(ハイブリドーマ)のみの増殖を支援する特定の選択培地中で増殖できないようにする酵素欠損を呈する。たとえば、免疫化動物がマウスである場合、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1.Ag 4.1、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-1.1、MPC11-X45-GTG 1.7、およびS194/5XX0 BulIを使用することが可能であり、ラットの場合、R210.RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983F、および4B210を使用ことが可能であり、そしてU-2.66、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2、およびUC729-6はすべて、細胞融合に関して有用である。

【0149】

他の選択肢の実施形態では、ファージディスプレイライブラリーからヒト抗体を作製することが可能である(Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227: 381 [1991]、Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581; また、米国特許第5,885,793号明細書も参照されたい)。これらのプロセスでは、糸状バクテリオファージの表面上での抗体レパートリーの提示を

介して免疫選択を模倣し、続いて、最適な抗原へのそれらの結合によりファージの選択を行う。そのような技術の1つは、アダムらの名義で出願されたPCT出願第PCT/US98/17364号に記載されており、そこには、そのような手法を用いてMPLレセプターおよびmskレセプターに対する高親和性かつ高機能性のアゴニスト抗体を単離することが記載されている。この手法では、先に記載したように、天然で再配列されたヒトV遺伝子を末梢血リンパ球からクローニングすることにより、ヒト抗体遺伝子の完全なレパートリーを生成することが可能である (Mullinax, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 8095-8099 [1990])。

【0150】

他の選択肢として、ヒトJセグメントと一緒に各ヒトVHセグメントをランダムスクレオチドのDセグメントと集合させることにより、非再配列V遺伝子セグメントから全合成のヒト重鎖レパートリーを生成することが可能である (Hoogenboom, et al., J. Mol. Biol. 227:381-388 [1992])。同様に、各ヒトVセグメントをJセグメントと一緒に組み合わせることにより、軽鎖レパートリーを構築することが可能である (Griffiths, et al., EMBO J. 13:3245-3260 [1994])。完全抗体（すなわち、重鎖および軽鎖の両方）をコードするスクレオチドを一本鎖Fvフラグメントに連結し、このポリスクレオチドを、纖維状ファージマイナーコートタンパク質をコードするスクレオチドにライゲートする。この融合タンパク質がファージの表面上に発現された場合、固定化抗原を用いた選択により、特異的抗体をコードするポリスクレオチドを同定することが可能である。

10

【0151】

ポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体を生成する典型的な方法を超えて、任意の公知の抗体形態を生成するための任意の方法が利用可能と考えられる。ポリクロナールおよびモノクロナールのほかに、抗体形態としては、キメラ化抗体、ヒト化抗体、CDR移植抗体、および抗体フラグメント、および変異体が挙げられる。

20

【0152】

特異的結合剤の変異体および誘導体

一例では、1つ以上のアミノ酸残基が特異的結合性ドメインの配列に追加された挿入変異体を提供する。挿入は、タンパク質の一方もしくは両方の末端に位置しうるか、または特異的結合性ドメインの内部領域中に定置しうる。本発明に係る変異体産物には、リーダー配列またはシグナル配列を除去して追加のアミノ末端残基を有するタンパク質を生成するようにした成熟PIMSが含まれる。追加のアミノ末端残基は、他のタンパク質に由来しうるか、または特異的タンパク質に由来するものとして同定できない1つ以上の残基を含みうる。1位に追加のメチオニン残基を有するポリペプチド（たとえば、Met-1-PIMS）が利用可能と考えられ、2位および1位に追加のメチオニン残基およびリシン残基を有する本発明に係るポリペプチド（Met-2-Lys-1-PIMS）の場合も同様である。括弧内の表記は、記述される特徴（すなわちN末端残基）を強調したものであり、そのようなN末端を欠失している分子としてPIMSを規定しようとするものではない。Met-1-PIMSおよびMET-2-Lys-1-PIMSのそれぞれは、事実上、PIMSである。追加のMet残基、Met-Lys残基、もしくはLys残基（または一般に1つ以上の塩基性残基）を有する本発明に係るポリペプチドの変異体は、細菌宿主細胞内での組換えタンパク質産生の増大に有用である。

30

【0153】

本発明はまた、特異的発現系の使用に起因して生じる追加のアミノ酸残基を有する本発明に係る特異的ポリペプチドを包含する。たとえば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）融合産物の一部として所望のポリペプチドを発現する市販のベクターの使用では、所望のポリペプチドからGST成分を切り離した後、1位に追加のグリシン残基を有する所望のポリペプチドが提供される。他のベクター系内での発現から生じる変異体もまた、利用可能と考えられ、例としては、ヒスチジンタグが一般的には配列のカルボキシ末端および/またはアミノ末端でアミノ酸配列中に組み込まれたものが挙げられる。

40

【0154】

他の態様では、本発明は、本発明に係るポリペプチド中の1つ以上のアミノ酸残基が除

50

去された欠失変異体を提供する。欠失は、ポリペプチドの一方もしくは両方の末端で行われるか、またはアミノ酸配列の内部から1つ以上の残基を除去することにより行われる。欠失変異体は、必然的に、本発明に係るポリペプチドのすべてのフラグメントを含む。

【0155】

抗体フラグメントとは、免疫グロブリン可変領域配列の少なくとも一部に対応する配列を有するポリペプチドを意味する。フラグメントは、たとえば、全長抗体に対応するポリペプチドの酵素的切断または化学的切断より生成可能である。他の結合性フラグメントとしては、合成技術または組換えDNA技術により、たとえば、部分的抗体可変領域をコードする核酸配列を含有する組換えプラスミドの発現により生成されたものが挙げられる。好みのポリペプチドフラグメントは、本明細書中に記載の標的に対してユニークなまたは特異的な免疫学的性質を示す。所望の免疫学的性質を有する本発明に係るフラグメントは、当技術分野で慣用される周知の方法のいずれかにより調製可能である。

10

【0156】

さらに他の態様では、本発明は、PIMSの置換変異体を提供する。置換変異体としては、アミノ酸配列中の1つ以上のアミノ酸残基が除去されかつ代替残基で置き換えられたポリペプチドが挙げられる。いくつかの実施形態では、置換は、本質的に保存的であるが、本発明は、非保存的でもある置換を包含する。アミノ酸は、物理的性質ならびに二次および三次のタンパク質構造への寄与に従って分類可能である。保存的置換は、あるアミノ酸で類似の性質を有する他のアミノ酸を置換することとして当技術分野で認識されている。代表的な保存的置換は、真下の表A(1997年3月13日公開の国際公開第97/09433号パンフレットの10頁(1996年9月6日出願のPCT/GB96/02197)を参照されたい)に示される。

20

【0157】

表A

保存的置換I

側鎖特性	アミノ酸
脂肪族	G A P I L V
非極性	S T M N Q
極性-非荷電	D E K R
芳香族	H F W Y
その他	N Q D E

30

他の選択肢として、保存的アミノ酸は、真下の表Bに示されるとおり、Lehninger, [Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY:NY (1975), pp.71-77]に記載されるように分類可能である。

【0158】

表B

保存的置換II

タイプ	側鎖特性	アミノ酸
非極性(疎水性)	A. 脂肪族:	A L I V P
	B. 芳香族	F W
	C. 硫黄含有	M
	D. 境界	G
非荷電-極性	A. ヒドロキシリル	S T Y
	B. アミド	N Q
	C. スルフヒドリル	C
	D. 境界	G
正荷電(塩基性)		K R H
負荷電(酸性)		D E
保存的置換II		
側鎖	特性	アミノ酸

40

50

非極性(疎水性)	A. 脂肪族:	A L I V P
	B. 芳香族:	F W
	C. 硫黄含有:	M
	D. 境界:	G
非荷電-極性	A. ヒドロキシル:	S T Y
	B. アミド:	N Q
	C. スルフヒドリル:	C
	D. 境界:	G
正荷電(塩基性)		K R H
負荷電(酸性)		D E

10

本発明はまた、PIMSポリペプチドの誘導体を提供する。誘導体としては、アミノ酸残基の挿入、欠失、置換のいずれでもない修飾を有するPIMSポリペプチドが挙げられる。好ましくは、修飾は、本質的に共有結合であり、その例としては、ポリマー、脂質、他の有機部分および無機部分との化学結合が挙げられる。本発明に係る誘導体は、特異的PIMSポリペプチドの血流中半減期を増大させるように調製可能であるか、または所望の細胞、組織、もしくは器官へのポリペプチドのターゲッティング能力を改良するようにデザイン可能である。

【0159】

本発明はさらに、米国特許第4,640,835号明細書、同第4,496,689号明細書、同第4,301,144号明細書、同第4,670,417号明細書、同第4,791,192号明細書、および同第4,179,337号明細書に記載のごとく、1つ以上の水溶性ポリマーアタッチメント、たとえば、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレングリコール、またはポリプロピレングリコールを含むように共有結合で修飾または誘導体化されたPIMSを包含する。当技術分野で公知のさらに他の有用なポリマーとしては、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、および他の炭水化物系ポリマー、ポリ-(N-ビニルピロリドン)-ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(たとえばグリセロール)、ならびにポリビニルアルコール、さらにはこうしたポリマーの混合物が挙げられる。とくに好ましいのは、ポリエチレングリコール(PEG)誘導体化タンパク質である。水溶性ポリマーは、たとえば、本発明に係るタンパク質およびポリペプチドのアミノ末端の特定位置に結合可能であるか、またはポリペプチドの1つ以上の側鎖にランダムに結合可能である。治療能力を改善するためのPEGの使用については、Gonzalesらに付与された米国特許第6,133,426号明細書に記載されている。

20

30

40

50

【0160】 免疫グロブリン突然変異誘発の標的部位

非免疫グロブリン系結合性分子に利用できない抗原特異的免疫グロブリン(たとえば抗体)の固有の特性を操作する特定の戦略が利用可能である。こうした代替手段に対するよりも、たとえば抗体系分子に対して有利に機能する戦略の良好な例は、免疫応答が進行するにつれて親和性の増大する抗体を生成するように免疫グロブリン遺伝子の体細胞超突然変異を利用する親和性成熟を介して標的への抗体の親和性をin vivo調節することである。このほかに、免疫グロブリンの構造ならびに免疫グロブリンの領域およびドメインを改変するために、組換え技術が開発されてきた。したがって、所与の抗原に対する改変された親和性を呈する、抗体に由来するポリペプチドを産生することが可能であり、こうしたポリペプチドを同定および精製または単離するためのいくつかの精製プロトコルおよびモニタリング選別が当技術分野で公知である。こうした公知の技術を用いて、抗原に対する低減または増大された親和性を呈する、抗体由来の結合性ドメインを含むポリペプチドを、得ることが可能である。改変された親和性を呈するポリペプチド変異体を生成するための戦略としては、タンパク質中に存在するアミノ酸を変化させるように、抗体をコードするDNAの部位特異的突然変異誘発またはランダム突然変異誘発を使用し、続いて、所望の変化、たとえば、改変されていない親または参照対象の抗体と対比して増大または低減さ

れた親和性を呈する抗体変異体を回収するようにデザインされたスクリーニング工程を行うことが挙げられる。

【0161】

親和性を改変するための突然変異誘発の戦略で最も一般的に標的にされるアミノ酸残基は、抗体の軽鎖および重鎖の可変領域の相補性決定領域（CDR）または超可変領域である。これらの領域は、抗原と物理化学的に相互作用する残基さらにはこれらの残基の空間的配置に影響を及ぼす他のアミノ酸を含有する。しかしながら、CDR領域の外側の可変ドメインのフレームワーク領域中のアミノ酸もまた、抗体の抗原結合性に対して実質的に寄与することが示されており、そのような性質を操作すべく標的にすることが可能である。Hudson, P.J. Curr. Opin. Biotech., 9: 395-402 (1999)およびそれに引用された参考文献を参照されたい。10

【0162】

体細胞性親和性成熟過程の間に「超突然変異」を受けやすい領域に対応するCDR中の部位にランダム突然変異誘発または部位指向性突然変異誘発を限定することにより、より小さくかつより効果的にスクリーニングされる抗体変異体ライブラリーを产生することが可能である。Chowdhury, et al., Nature Biotech., 17: 568-572 (1999)およびそれに引用された参考文献を参照されたい。このようにして超突然変異部位を規定するための公知のDNAエレメントのタイプとしては、直接反復配列および逆方向反復配列、特定のコンセンサス配列、二次構造、ならびにパリンドロームが挙げられる。コンセンサスDNA配列としては、四塩基配列プリン-G-ピリミジン-A/T（すなわち、AまたはG-G-CまたはT-AまたはT）およびセリンコドンAGY（式中、YはCまたはTでありうる）が挙げられる。20

【0163】

したがって、本発明の他の態様は、標的に対する抗体の親和性を改変するための一群の突然変異誘発の戦略である。こうした戦略としては、重鎖および/または軽鎖の全可変領域の突然変異誘発、CDR領域のみの突然変異誘発、CDR内のコンセンサス超突然変異部位の突然変異誘発、フレームワーク領域の突然変異誘発、またはこれらの手法の任意の組合せ（これに関連する「突然変異誘発」は、ランダムまたは部位指向性でありうる）が挙げられる。CDR領域の確定的な描写および抗体の結合性部位を含む残基の同定は、X線結晶解析のような当業者に公知の技術により、対象の抗体および抗体:リガンド複合体の構造を解明することにより達成可能である。そのような抗体結晶構造の分析および特徴付けに基づく種々の方法は、当業者に公知であり、CDR領域を近似するために利用可能である。そのような一般に使用される方法の例としては、Kabat定義、Chothia定義、AbM定義、およびコンタクト定義が挙げられる。30

【0164】

Kabat定義は、配列多様性に基づいており、CDR領域を予測するために最もよく使用される定義である。Johnson, et al., Nucleic Acids Research, 28: 214-8 (2000)。Chothia定義は、構造ループ領域の位置に基づく。(Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901-17 [1986]; Chothia et al., Nature, 342: 877-83 [1989])。AbM定義は、Kabat定義とChothia定義との折衷案である。AbMは、Oxford Molecular Group (Martin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 86:9268-9272 [1989]、Rees, et al., ABMTM, a computer program for modeling variable regions of antibodies, Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd.)により作成された抗体構造モデリングのための統合プログラムスイートである。AbMスイートは、知識データベースとab initio法との組合せを用いて一次配列から抗体の三次構造をモデリングする。コンタクト定義として知られる他の定義が最近導入された。MacCallum et al., J. Mol. Biol., 5:732-45 (1996)を参照されたい。この定義は、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。40

【0165】

慣例により、重鎖中のCDRドメインは、典型的には、H1、H2、およびH3として参照され、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に移動する順序で逐次的に番号付けされる。軽鎖中のCDR領域は、典型的には、L1、L2、およびL3として参照され、アミノ末端からカルボ50

キシ末端の方向に移動する順序で逐次的に番号付けされる。

【0166】

CDR-H1は、約10～12残基の長さであり、Chothia定義およびAbM定義によれば、典型的には、Cysの4残基後の位置で開始され、Kabat定義によれば、典型的には、5残基後の位置で開始される。典型的には、H1に続いて、Trp、典型的にはTrp-Valが存在するが、それだけでなくTrp-IleまたはTrp-Alaが存在することもある。H1の長さは、AbM定義によれば、約10～12残基であり、一方、Chothia定義では、最後の4残基が除外される。

【0167】

CDR-H2は、Kabat定義およびAbM定義によれば、典型的には、H1の末尾の15残基後の位置で開始される。H2に先行する残基は、典型的には、Leu-Glu-Trp-Ile-Glyであるが、いくつつかの変異が存在する。H2に続いて、典型的には、アミノ酸配列Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phen/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Alaが存在する。Kabat定義によれば、H2の長さは、約16～19残基であり、一方、AbM定義では、典型的には、長さは9～12残基であると予測される。

10

【0168】

CDR-H3は、典型的には、H2の末尾の33残基後の位置で開始され、典型的には、それに続いて、アミノ酸配列Cys-Ala-Argが存在する。H3に続いて、典型的には、アミノ酸Glyが存在する。H3の長さは、3～25残基の範囲内である。

【0169】

CDR-L1は、典型的には、ほぼ残基24の位置で開始され、典型的には、Cysに続く。CDR-L1の後の残基は、常に、Trpであり、典型的には、次の配列、すなわち、Trp-Tyr-Gln、Trp-Leu-Gln、Trp-Phe-Gln、またはTrp-Tyr-Leuのうちの1つを開始するであろう。CDR-L1の長さは、約10～17残基である。

20

【0170】

CDR-L2は、L1の末尾の約16残基後の位置で開始される。それは、一般的には、残基Ile-Tyr、Val-Tyr、Ile-Lys、またはIle-Pheに続く。CDR-L2の長さは、約7残基である。

【0171】

CDR-L3は、典型的には、L2の末尾の33残基後の位置で開始され、典型的には、Cysに続く。L3に続いて、典型的には、アミノ酸配列Phe-Gly-XXX-Glyが存在する。L3の長さは、約7～11残基である。

30

【0172】

抗体を改変するための種々の方法が当技術分野で報告されており、その例としては、ヒト化抗体を産生する方法が挙げられる。この方法では、ヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列は、ドナー免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列と65%～95%同一である。各ヒト化免疫グロブリン鎖は、通常、CDRのほかに、たとえばCDRと相互作用して結合親和性に影響を及ぼすしうるドナー免疫グロブリンフレームワーク由来のアミノ酸、たとえば、ドナー免疫グロブリン中のCDRに直接隣接した1つ以上のアミノ酸、または分子モデリングにより予想されるように、約3オングストローム以内のアミノ酸を含むであろう。重鎖および軽鎖は、それぞれ、種々の位置基準のいずれか1つまたはすべてを用いることによりデザイン可能である。組み合わせてインタクトな抗体中に導入した場合、ヒト化免疫グロブリンは、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、適合エピトープを含有するタンパク質または他の化合物のような抗原に対するドナー免疫グロブリンと実質的に同一の親和性を保持する。

40

【0173】

一例では、親抗体に類似した結合特異性を有するが増大されたヒト特性を有する抗体および抗体フラグメントの産生方法を記述する。たとえば、ファージディスプレイ技術と、対象の抗原に特異的な非ヒト抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域を含むポリペプチドと、を用いて、鎖シャッフリングによりヒト化抗体を取得し、次に、ヒト相補的（軽または重）鎖可変領域のレパートリーと組み合わせる。対象の抗原に特異的なハイブリッド対形成を同定し、選択された対形成由来のヒト鎖をヒト相補的可変ドメイン（重または軽）のレパートリーと組み合わせる。他の実施形態では、非ヒト抗体由来のCDRの成分をヒト

50

抗体由来のCDRの構成部分のレパートリーと組み合わせる。抗体ポリペプチド二量体の得られたライブラリーからハイブリッドを選択し、第2のヒト化シャッフリング工程で使用することが可能である。他の選択肢として、ハイブリッドが治療的価値のある十分なヒト特性をすでに備えている場合、この第2の工程は排除される。ヒト特性を増大させる修飾方法は、当技術分野で公知である。

【0174】

他の例は、CDRアミノ酸配列で対応するヒトCDRアミノ酸配列を置き換えることによるおよび／またはFRアミノ酸配列で対応するヒトFRアミノ酸配列を置き換えることによるヒト化抗体の作製方法である。

【0175】

さらに他の例は、抗原結合性ドメインの天然の親和性は減少させないが異種に対するその免疫原性は低減せしめるように修飾可能な抗体可変ドメインのアミノ酸残基の同定方法を提供する。こうした修飾された抗体可変領域の調製方法は、異種への投与に有用である。

【0176】

当技術分野で公知の方法のいずれかによる抗体のような免疫グロブリンの修飾は、抗原への増大または減少された結合親和性を達成するように、および／またはレシピエントにおける抗体の免疫原性を低減するように、および／またはがエフェクター活性レベルを調節するように、デザインされる。一手法では、コグネイト抗原に対する抗体の親和性を増大させるために、グリコシル化部位を排除するようにヒト化抗体を修飾することが可能である (Co, et al., Mol. Immunol. 30:1361-1367 [1993])。「再構成」、「ハイパー・キメラ化 (hyperchimerization)」、および「ベニヤリング (veeneering)」／リサーフェイシング (resurfacing)」のような技術を用いて、より大きな治療可能性を有するヒト化抗体が産生されてきた。Vaswami, et al., Annals of Allergy, Asthma, & Immunol. 81:105 (1998); Roguska, et al., Prot. Engineer. 9:895-904 (1996)]。また、抗体の再構成方法が記載されている米国特許第6,072,035号明細書も参照されたい。これらの技術は外来残基の数を低減することにより抗体免疫原性を減少させるが、それらは、抗体の反復投与後、抗イディオタイプ応答および抗アロタイプ応答を妨害しない。免疫原性を低減するためのこれらの方法の代替手段については、Gilliland et al., J. Immunol. 62(6):3663-71 (1999)に記載されている。

【0177】

多くの場合、抗体をヒト化すると抗原結合能が喪失される。したがって、抗体の結合親和性を回復させる試みの中で、元の(ほとんどの場合、齧歯動物)抗体中に見られるアミノ酸残基の1つ以上を組み込むように、ヒト化抗体を「復帰突然変異」させることが好ましい。たとえば、Saldanha et al., Mol. Immunol. 36:709-19 (1999)を参照されたい。

【0178】

免疫グロブリンをグリコシル化すると、エフェクター機能、構造安定性、および抗体產生細胞からの分泌速度が影響を受けることを示されている (Leatherbarrow et al., Mol. Immunol. 22:407 (1985) (参考により本明細書に組み入れられるものとする) を参照されたい)。これらの性質に関する炭水化物基は、一般的には、抗体の定常領域に結合される。たとえば、CH2ドメイン中のAsn 297でIgGをグリコシル化すると、補体依存性細胞溶解を活性化するIgGの全能力が向上する (Tao et al., J. Immunol. 143:2595 (1989))。たとえば、CH3ドメイン中のAsn 402でIgMをグリコシル化すると、抗体の適正集合および細胞溶解活性が向上する (Muraoka et al., J. Immunol. 142:695 (1989))。IgA抗体のCH1ドメイン中およびCH3ドメイン中の162位および419位のグリコシル化部位を除去したところ、細胞内分解および少なくとも90%の分泌阻害が起こった (Taylor et al., Wall, Mol. Cell. Biol. 8:4197 (1988))。したがって、本発明に係る分子は、エフェクター機能を改変するために、たとえば定常サブ領域中の特異的残基を突然変異させることにより、改変されたグリコシル化パターンを呈する突然変異により改変された免疫グロブリンを含む。Co et al., Mol. Immunol. 30:1361-1367 (1993)、Jacquemon et al., J. Thromb. Haemost. 4:1047-1055 (2006)、Schuster et al., Cancer Res. 65:7934-7941 (2005)、

10

20

30

40

50

およびWarnock et al., Biotechnol Bioeng. 92:831-842 (2005)（いずれも参照により本明細書に組み入れられるものとする）を参照されたい。

【0179】

本発明はまた、公知の免疫グロブリン可変領域配列と配列が少なくとも80%、好ましくは90%もしくは95%もしくは99%同一でありかつそのような免疫グロブリン可変領域と異なる少なくとも1つの残基を有する少なくとも1つの結合性ドメインを有するPIMSを包含する。ただし、変更された残基により、グリコシル化部位が追加されるか、1つ以上のグリコシル化部位の位置が変更させるか、または好ましくは、免疫グロブリン可変領域のグリコシル化部位が除去されるものとする。いくつかの実施形態では、この変更により、免疫グロブリン可変領域フレームワーク中のN結合グリコシル化部位が除去されるか、またはCo et al., J. Immunol. 148: 1149, (1992)の番号付け規約を用いて、ほぼアミノ酸残基65からほぼアミノ酸残基85にわたる領域の免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワーク中に存在するN結合グリコシル化部位が除去される。

10

【0180】

免疫グロブリン参照対象配列に対して改変されたグリコシル化パターンを呈するPIMSを产生するために、当技術分野で公知の任意の方法が利用可能と考えられる。たとえば、さまざまな遺伝学的技術のいずれかを利用して、1つ以上の特定の残基を改変することが可能である。他の選択肢として、改変されたグリコシル化パターンを生成するように、產生に用いられる宿主細胞を工学的に操作することが可能である。たとえば、当技術分野で公知の一方法では、ADCCを増大させる二等分された非フコシル化変異体の形態で改変されたグリコシル化が提供される。変異体は、オリゴサッカリド修飾酵素を含有する宿主細胞内での発現から生じる。他の選択肢として、本発明に係るグリコシル化分子のフコース含有率を低減するために、BioWa/Kyowa HakkoのPotelligent技術が利用可能と考えられる。公知の一方法では、GDP-フコースの产生を介して免疫グロブリンFc領域のグリコシル化パターンを改変する組換え免疫グロブリン產生用のCHO宿主細胞が提供される。この技術は、本発明に係るPIMSの定常サブ領域のグリコシル化パターンを改変するために利用可能である。

20

【0181】

免疫グロブリンの結合性ドメインのような結合性ドメインの結合性の改変のほかに、およびヒト化のような改変のほかに、本発明は、免疫グロブリン定常サブ領域のエフェクター機能のようなエフェクター機能に寄与する残基を変更または突然変異することによるエフェクター機能の調節を包含する。こうした改変は、Presta et al., Biochem. Soc. Trans. 30:487-490 (2001)（参照により本明細書に組み入れられるものとする）に開示される手法のような当技術分野で公知の任意の技術を用いて実施可能である。代表的な手法としては、FC RI、FC RII、FC RIII、FC R、および／またはFC Rへの1つ以上の定常サブ領域の結合に影響を及ぼすことが知られている特異的残基を修飾するようPrestaらの文献に開示されるプロトコルを使用することが挙げられよう。

30

【0182】

他の手法では、Fcドメインに対応する定常サブ領域を工学的に操作して細胞死滅エフェクター機能を増強するために、Xencor XmAb技術が利用可能である。Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 103(11):4005-4010 (2006)（参照により本明細書に組み入れられるものとする）を参照されたい。たとえば、この手法を用いて、Fc R特異性および結合に関して最適化された定常サブ領域を生成し、それにより細胞死滅エフェクター機能を増強することが可能である。

40

【0183】

PIMSの产生

本発明に係るPIMSを含有しつつそれを発現するように、さまざまな発現ベクター／宿主系を使用することが可能である。こうした系としては、組換えバクテリオファージ、組換えプラスミド、組換えコスミド、または他の発現ベクターでトランスフォームされた細菌のような微生物、酵母発現ベクターまたは酵母シャトルベクターでトランスフォームされ

50

た酵母、ウイルス発現ベクター（たとえば、バキュロウイルスベクター）を感染させた昆虫細胞系、ウイルス発現ベクター（たとえば、カリフラワーモザイクウイルスCaMVベクター、タバコモザイクウイルストMVベクター）でトランスフェクトされた植物細胞系または細菌発現ベクター（たとえば、TiもしくはpBR322プラスミド）でトランスフォームされた植物細胞系、あるいは動物細胞系が挙げられるが、これらに限定されるものではない。組換えPIMS産生に有用な哺乳動物細胞としては、VERO細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、COS細胞（たとえばCOS-7細胞）、W138細胞、BHK細胞、HepG2細胞、3T3細胞、RIN細胞、MDCK細胞、A549細胞、PC12細胞、K562細胞、およびHEK293細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。PIMSの組換え発現の代表的なプロトコルを本明細書の以下に記載する。

10

【0184】

発現ベクターは、（1）遺伝子発現において調節的役割を有する1つもしくは複数の遺伝子エレメント、たとえば、プロモーター、エンハンサー、または因子特異的結合性部位と、（2）mRNAに転写されてタンパク質に翻訳される、PIMSをコードする構造配列と、（3）適切な転写および翻訳の開始配列および終止配列と、の集合体を含む転写ユニットを含みうる。酵母発現系または真核生物発現系に使用することが意図される構造ユニットは、好みしくは、宿主細胞による翻訳タンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。他の選択肢として、組換えPIMSがリーダー配列や輸送配列を含まずに発現される場合、それはアミノ末端メチオニン残基を含みうる。この残基は、発現された組換えタンパク質から後続的に切り離されて、最終PIMSを提供することもあればそうでないこともある。

20

【0185】

たとえば、製造業者の使用説明書に従って、*Pichia Expression System* (Invitrogen, San Diego, CA)などの市販の発現系を用いて、酵母内でPIMSを組換え発現することが可能である。この系はまた、分泌を誘導するためにプレ-プロ-アルファ配列に依拠するが、インサートの転写は、メタノールによる誘導を受けてアルコールオキシダーゼ (AOX1) プロモーターにより主導される。分泌されたPIMSペプチドは、たとえば、細菌細胞上清および哺乳動物細胞上清からペプチドを精製するために用いられる方法により、酵母増殖培地から精製可能である。

20

【0186】

他の選択肢として、PIMSペプチドをコードするcDNAをバキュロウイルス発現ベクター-pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA) 中にクローニングすることが可能である。このベクターを製造業者の使用説明書 (PharMingen) に従って使用し、SF9無タンパク質培地中でスプードブテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) 細胞に感染させて組換えタンパク質を産生することが可能である。ヘパリン-セファロースカラム (Pharmacia, Piscataway, NJ) を用いて、PIMSタンパク質を培地から精製し濃縮することが可能である。SF9系のようなタンパク質発現用の昆虫系については、当業者に周知である。そのような系の一つでは、アウトグラファ・カリフォルニア (Autographa californica) 核多角体病ウイルス (AcNPV) をベクターとして使用し、スプードブテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) 細胞内またはトリコブルシア・ラルバエ (Trichoplusia larvae) 細胞内で外来遺伝子を発現させることができる。PIMSペプチドコード配列は、ポリヘドリン遺伝子のようなウイルスの非必須領域中にクローニング可能であり、かつポリヘドリンプロモーターの制御下に配置可能である。PIMSペプチドをうまく挿入すれば、ポリヘドリン遺伝子が不活性になり、コートタンパク質の欠失した組換えウイルスが生成されるであろう。組換えウイルスを用いて、ペプチドが発現されるS.フルギペルダ (S. frugiperda) 細胞またはトリコブルシア・ラルバエ (Trichoplusia larvae) 細胞に感染させることができある (Smith et al., J Virol 46: 584, 1983; Engelhard et al., Proc Nat Acad Sci (USA) 91: 3224-7, 1994)。

40

【0187】

他の例では、PIMSペプチドをコードするDNA配列をPCRにより増幅して、適切なベクターたとえばpGEX-3X (Pharmacia, Piscataway, NJ) 中にクローニングすることが可能である

50

。pGEXベクターは、ベクターによりコードされるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)と、ベクターのクローニング部位に挿入されたDNA断片によりコードされるPIMSタンパク質と、を含む融合タンパク質を産生するようにデザインされる。PCR用のプライマーは、適切なクローニングを容易にするために、たとえば適切な切断部位を含むように生成可能である。PIMSタンパク質融合部分が単に発現を容易にするために使用される場合またはそれ以外では対象のペプチドへのアタッチメントとして望ましくない場合、組換えPIMSタンパク質融合体を融合タンパク質のGST部分から切り離すことが可能である。pGEX-3X/PIMSペプチド構築物をE. coli XL-1 Blue細胞(Stratagene, La Jolla CA)内にトランスフォームし、そして個々のトランスフォーマントを単離して増殖させる。個々のトランスフォーマント由来のプラスミドDNAを精製し、自動シーケンサーを用いて部分的に配列決定を行い、所望のPIMSタンパク質をコードする核酸インサートが適正配置構成で存在することを確認する。

10

【0188】

細菌内で不溶性封入体として産生される可能性のある融合PIMSタンパク質は、以下のように精製可能である。遠心分離により宿主細胞を採取し、0.15M NaCl、10mM Tris、pH8、1mM EDTAで洗浄し、そして室温で0.1mg/mlのリゾチーム(Sigma Chemical Co.)により15分間処理することが可能である。超音波処理により溶解物を清浄化することが可能であり、そして12,000gで10分間遠心分離することにより細胞片をペレット化することが可能である。融合PIMSタンパク質含有ペレットを50mM Tris、pH8、および10mM EDTA中に再懸濁させ、50%グリセロール上に層状化し、そして6000gで30分間遠心分離することが可能である。Mg⁺⁺およびCa⁺⁺を含まない標準的リン酸塩緩衝食塩溶液(PBS)中にペレットを再懸濁せることが可能である。変性SDSポリアクリルアミドゲル(Sambrook et al.)中で再懸濁ペレットを分画することにより、PIMSタンパク質融合体をさらに精製することが可能である。ゲルを0.4M KCl中に浸漬してタンパク質を可視化し、これを取り出してSDSの欠如したゲル泳動緩衝液中で電気溶出させる。GST/PIMSペプチド融合タンパク質が可溶性タンパク質として細菌内で産生される場合、GST精製モジュール(Pharmacia Biotech)を用いてそれを精製することが可能である。

20

【0189】

好みしくは、PIMSタンパク質融合体を消化に付して、本発明に係るPIMSペプチドからGSTを切り離す。消化反応系(20~40μgの融合タンパク質、20~30ユニットのヒトトロンビン(4000U/mg(Sigma)、0.5ml PBS中)を室温で16~48時間インキュベートし、そして変性SDS-PAGEゲル上に充填して反応産物を分画することが可能である。ゲルを0.4M KCl中に浸漬してタンパク質バンドを可視化することが可能である。PIMSペプチドの予想分子量に対応するタンパク質バンドの正体は、自動シーケンサー(Applied Biosystems Model 473A, Foster City, CA)を用いてアミノ酸配列分析により確認可能である。他の選択肢として、ペプチドのHPLCおよび/または質量分析を行うことにより正体を確認することが可能である。

30

【0190】

他の選択肢として、PIMSペプチドをコードするDNA配列を、所望のプロモーターと場合によりリーダー配列とを含有するプラスミド中にクローニングすることが可能である(たとえば、Better et al., Science, 240:1041-43, 1988を参照されたい)。この構築物の配列は、自動配列決定により確認可能である。次に、細菌CaCl₂インキュベーションおよび熱ショック処理を利用する標準的手順を用いて、菌株MC1061のような好適なE.コリ(E. coli)株中にプラスミドをトランスフォームすることが可能である(Sambrook et al.)。トランスフォームされた細菌は、カルベニシリンが追加されたLB培地内で、または当技術分野で公知の他の好適な選択形態で、増殖させことが可能であり、かつ発現タンパク質の产生は、好適な培地中での増殖により誘導可能である。存在する場合、リーダー配列は、PIMSペプチドの分泌に影響を及ぼす可能性があり、かつ分泌時に切り離される可能性がある。分泌された組換えタンパク質は、本明細書の以下で記載の方法により、細菌培養培地から精製可能である。

40

50

【0191】

組換えタンパク質を発現する哺乳動物宿主系は、当業者に周知であり、好ましい系である。宿主細胞株は、発現タンパク質をプロセシングする特定の能力またはタンパク質活性を提供するのに有用な特定の翻訳後修飾を生成する特定の能力に関して選択可能である。ポリペプチドのそのような修飾としては、アセチル化、カルボキシリ化、グリコシリ化、リン酸化、脂質化、およびアシル化が挙げられるが、これらに限定されるものではない。CHO、HeLa、MDCK、293、WI38などのようなさまざまな宿主細胞は、そのような翻訳後活性に適した特異的細胞機構および特徴的機序を有しており、外来タンパク質の適正な修飾およびプロセシングを確保するように選択可能である。

【0192】

10

長期間にわたる高収率のタンパク質産生のために、トランスフォーム細胞を使用することが好ましい。したがって、安定な発現が望ましい。好ましくは所望の発現力セットと共に少なくとも1つの選択性マーカーを含有するベクターでそのような細胞をトランスフォームした後、選択培地に切り替える前に富化培地で細胞を1~2日間増殖させる。選択性マーカーは、選択に対する耐性を付与するようにデザインされ、その存在により、外来タンパク質をうまく発現する細胞の増殖および回収が可能になる。安定にトランスフォームされた細胞の耐性集塊は、細胞に適合した組織培養技術を用いて増殖させことが可能である。

【0193】

20

いくつかの選択性を用いて、組換えタンパク質産生のためにトランスフォームされた細胞を回収することが可能である。そのような選択性としては、それぞれ、HSVチミジンキナーゼ遺伝子、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスクレオチダーゼ遺伝子、およびアデニンホスホリボシルトランスクレオチダーゼ遺伝子を含む、tk-細胞、hgprt-細胞、またはaprt-細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、メトレキセート耐性を付与するdhfr、ミコフェノール酸耐性を付与するgpt、アミノグリコシドG418耐性を付与しかつクロルスルフロン耐性を付与するneo、およびハイグロマイシン耐性を付与するhygroに対する選択の基礎として、抗代謝剤耐性を使用することが可能である。有用でありうるそのほかの選択性遺伝子としては、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用できるようにするtrpB、または細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノール(histinol)を利用できるようにhisDが挙げられる。トランスフォーマントの同定のための視覚的指標を与えるマーカーとしては、アントシアニン、-グルクロニダーゼおよびその基質GUS、ならびにルシフェラーゼおよびその基質ルシフェリンが挙げられる。

30

【0194】

タンパク質の精製

タンパク質精製技術については、当業者に周知である。こうした技術は、あるレベルで、ポリペプチド画分と非ポリペプチド画分との粗分画を含む。少なくとも1つの他のタンパク質からPIMSポリペプチドを分離して、PIMSポリペプチドを精製するが、多くの場合、部分精製もしくは完全精製(または均一になるまで精製)を達成すべく、クロマトグラフィー、電気泳動、および/または他の公知の技術を用いてさらなる精製を行うことが望ましい。純粋PIMSペプチドの調製にとくに適した分析法は、イオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、および等電点フォーカシングである。ペプチドを精製するとくに効率的な方法は、高速タンパク質液体クロマトグラフィーおよびHPLCである。

40

【0195】

本発明の特定の態様は、コードされたPIMSタンパク質またはPIMSペプチドの精製、特定の実施形態では、実質的な精製に関する。本明細書中で用いられる「精製されたPIMSタンパク質またはPIMSペプチド」という用語は、PIMSタンパク質またはPIMSペプチドがその天然で取得可能な状態と対比して任意の程度まで精製されている、他の成分から単離可能な組成物を意味するものとする。したがって、精製されたPIMSタンパク質またはPIMSペプチ

50

ドはまた、それが天然に存在しうる環境から取り出されたPIMSタンパク質またはPIMSペプチドをも意味する。

【0196】

一般的には、「精製された」とは、分画に付されて種々の他の成分が除去されておりかつ発現される生物活性を実質的に保持しているPIMSタンパク質組成物を意味するであろう。「実質的に精製された」という用語が用いられる場合、この表現は、PIMSタンパク質またはPIMSペプチドが、たとえば、重量基準で組成物中のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、またはそれ以上を構成する場合のように、組成物の主成分を形成するPIMSタンパク質組成物を意味する。

【0197】

PIMSタンパク質の精製度を定量する種々の方法については、当業者であればわかるであろう。こうした方法としては、たとえば、活性画分の特異的結合活性の測定またはSDS/PAGE分析による画分内のPIMSポリペプチドの量の評価が挙げられる。PIMSタンパク質画分の純度を評価する好ましい方法は、画分の結合活性を計算し、それを初期抽出物の結合活性と比較し、それにより、本明細書中では「精製倍率」により評価される精製度を計算することである。結合活性の大きさを表するために用いられる実際の単位は、当然ながら、精製を行うために選択される特定のアッセイ技術および発現されたPIMSタンパク質またはPIMSペプチドが検出可能な結合活性を呈するか否かに依存する。

【0198】

PIMSタンパク質の精製に使用するのに好適な種々の技術については、当業者に周知である。こうした技術としては、たとえば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体などとの沈殿または熱変性、それに続く遠心分離；クロマトグラフィー工程、たとえば、イオン交換クロマトグラフィー工程、ゲル濾過クロマトグラフィー工程、逆相クロマトグラフィー工程、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー工程、およびアフィニティーコロマトグラフィー工程；等電点フォーカシング；ゲル電気泳動；ならびにこれらの組合せ、さらには他の公知の技術が挙げられる。当技術分野で一般に知られているように、種々の精製工程を行う順序は変更可能であるかまたは特定の工程は省略可能であり、それでも依然として実質的に精製されたPIMSタンパク質の好適な調製方法になると考えられる。

【0199】

PIMSタンパク質を常にその最も精製された状態で提供することが一般に要求されるわけではない。実際には、それほど実質的に精製されていないPIMSタンパク質が特定の実施形態では有用であろうと考えられる。より少ない精製工程を組み合わせて用いることによりまたは同一の一般的精製スキームを異なる形態で利用することにより、部分精製を達成することが可能である。たとえば、当然のことながら、HPLC装置を利用して陽イオン交換カラムクロマトグラフィーを行えば、一般的には、低圧クロマトグラフィーシステムを利用する同一の技術よりも高度に精製されるであろう。PIMSタンパク質産物を全回収したりまたは発現されたPIMSタンパク質の結合活性を保持したりするうえで、より低い相対精製度を呈する方法が有利なこともある。

【0200】

SDS/PAGEの条件が異なると、場合によりポリペプチドの泳動が有意に変化する可能性のあることが知られている(Capaldi et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 76:425, 1977)。したがって、当然のことであろうが、異なる電気泳動条件下では、精製または部分精製されたPIMSタンパク質発現産物の見掛けの分子量は異なる可能性がある。

【0201】

エフェクター細胞

たとえば、標的細胞に対するADCCを誘導するためのエフェクター細胞としては、ヒト白血球、マクロファージ、単球、活性化好中球、活性化ナチュラルキラー(NK)細胞、および好酸球が挙げられる。エフェクター細胞は、Fc R (CD89)、Fc RI、Fc RII、Fc RIII、および/またはFc R1を発現し、その例としては、単球および活性化好中球が挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 2 】

たとえば、Fc RIの発現は、インターフェロンガンマ(IFN- γ)によりアップレギュレートされることが明らかにされている。この増強された発現により、標的細胞に対する単球および好中球の細胞傷害活性が増大される。したがって、エフェクター細胞は、本発明に係るPIMSタンパク質と接触させる前に、(IFN- γ)または、他のサイトカイン(たとえば、TNF- α または、コロニー刺激因子、IL-2)により活性化されて細胞の表面上のFc RIの存在量を増大させる可能性がある。

【 0 2 0 3 】

本発明に係るPIMSタンパク質は、標的細胞に対して使用すべく抗体依存性エフェクター細胞媒介性細胞傷害(ADCC)のような抗体エフェクター機能を提供する。エフェクター機能を有するPIMSタンパク質は、本明細書中に教示されるように、単独で投与されるか、またはエフェクター細胞に連結させることにより「活性化工エフェクター細胞」を形成した後、投与される。「活性化工エフェクター細胞」とは、投与前にエフェクター細胞にターゲッティング機能が効果的に備わるように本明細書中に規定されるPIMSタンパク質に連結された本明細書中に規定されるエフェクター細胞のことである。

10

【 0 2 0 4 】

活性化工エフェクター細胞は、生理学上許容される溶液中の細胞のサスペンジョンとしてin vivoで投与される。投与された細胞の数は、 10^8 ~ 10^9 個程度であるが、治療目的に依存して異なるであろう。一般的には、標的細胞へのエフェクター細胞の局在化が達成され、かつその場所で所望のレベルのエフェクター細胞機能たとえばADCCおよび/または食作用による細胞死滅が提供される量であれば、十分であろう。本明細書中で用いられる「生理学上許容される溶液」という用語は、in vivo投与に供される標的化工エフェクター細胞を安定化させる任意の担体溶液、たとえば、生理食塩水および緩衝水溶液、溶媒、抗細菌剤および抗菌類剤、等張化剤などを含む溶液を包含するものとする。

20

【 0 2 0 5 】

したがって、本発明の他の態様は、被験者の細胞に対してADCCのような特異的抗体エフェクター機能を誘導する方法を提供する。この方法は、生理学上許容される媒体中のPIMSタンパク質(もしくはコード核酸)または活性化工エフェクター細胞を被験者に投与することを含む。投与経路はさまざまである。また、好適な投与経路は、当技術分野で公知のように、症例特有の変動要因および慣例的手順を考慮して当業者により決定されるであろう。

30

【 0 2 0 6 】**疾患、障害、および病態**

本発明は、1つ以上の結合性パートナーに結合するPIMSタンパク質ならびにその変異体および誘導体を提供する。この結合イベントは、疾患、障害、または病態(好ましくは、ヒトが罹患しているもの)の症状の治療、予防、または改善に有用である。こうした方法の好ましい実施形態では、PIMSタンパク質は、腫瘍特異的細胞表面マーカーのような標的を有する細胞を、細胞傷害活性を呈する免疫系の細胞のようなエフェクター細胞に会合させる。他の実施形態では、適正標的が免疫系の細胞傷害性細胞のようなエフェクター細胞と確実に会合するように、2つ以上の特異的結合性部位を有するPIMSタンパク質は、2つの異なる疾患特異的、障害特異的、または病態特異的な細胞表面マーカーに特異的に結合する。このほかに、抗原活性の誘導もしくは増大または抗原活性の阻害のために、PIMSタンパク質を使用することが可能である。PIMSタンパク質はまた、組合せ療法および緩和レジームに好適である。

40

【 0 2 0 7 】

一態様では、本発明は、細胞に関連する抗原活性の異常なレベルにより特徴付けられる疾患および病態を治療または予防するのに有用な組成物および方法を提供する。こうした疾患としては、癌および他の過増殖性病態、たとえば、過形成、乾癬、接触皮膚炎、免疫学的疾患、および不妊症が挙げられる。固形腫瘍および白血病をはじめとする広範にわたるさまざまな癌は、本明細書に開示される組成物および方法に適合しうる。治療可能な癌

50

のタイプとしては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。乳房、前立腺、および結腸の腺癌；肺の気管支原性癌のすべての形態；骨髄系；黒色腫；肝細胞腫；神経芽細胞腫；乳頭腫；アプローマ；分離腫；鰓腫；悪性カルチノイド症候群；カルチノイド心疾患；および癌腫（たとえば、ウォーカー癌、基底細胞癌、基底扁平細胞癌、ブラウン・ピアース癌、腺管癌、エールリッヒ腫瘍、クレブス2癌、メルケル細胞癌、粘液性癌、非小細胞肺癌、燕麦細胞癌、乳頭癌、スキルス癌、細気管支癌、気管支原性癌、扁平上皮細胞癌、および移行細胞癌）。治療に好適なそのほかのタイプの癌としては、次のものが挙げられる。組織球性障害；白血病；悪性組織球増殖症；ホジキン病；免疫増殖性小腸疾患（immunoproliferative small）；非ホジキンリンパ腫；形質細胞腫；細網内皮症；黒色腫；軟骨芽細胞腫；軟骨腫；軟骨肉腫；纖維腫；纖維肉腫；巨細胞腫；組織球腫；脂肪腫；脂肪肉腫；中皮腫；粘液腫；粘液肉腫；骨腫；骨肉腫；脊索腫；頭蓋咽頭腫；未分化胚細胞腫；過誤腫；間葉腫；中腎腫；筋肉腫；エナメル上皮腫；セメント質腫；歯牙腫；奇形腫；胸腺腫；および绒毛性腫瘍。さらに、次のタイプの癌もまた、治療を行いうると考えられる。腺腫；胆管腫；コレステリン腫；円柱腫（cyclindroma）；囊胞腺癌；囊胞腺腫；顆粒膜細胞腫瘍；男女性胚細胞腫；肝細胞腫；汗腺腫；島細胞腫瘍；ライディッヒ細胞腫瘍；乳頭腫；セルトリ細胞腫瘍；卵胞膜細胞腫瘍；平滑筋腫（leiomyoma）；平滑筋肉腫；筋芽細胞腫；筋腫（myomma）；筋肉腫；横紋筋腫；横紋筋肉腫；上衣腫；神経節腫；神経膠腫；髓芽腫；髓膜腫；神経鞘腫；神経芽細胞腫；神経上皮腫；神経纖維腫；神経腫；傍神経節腫；非クロム親和性傍神経節腫。治療可能な癌のタイプとしては、次のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。被角血管腫；好酸球増加を伴う血管リンパ組織過形成；硬化性血管腫；血管腫症；グロムス血管腫；血管内皮腫；血管腫；血管周囲細胞腫；血管肉腫；リンパ管腫；リンパ管筋腫；リンパ管肉腫；松果体腫；癌肉腫；軟骨肉腫；葉状囊胞肉腫；纖維肉腫；血管肉腫；平滑筋肉腫；白血肉腫；脂肪肉腫；リンパ管肉腫；筋肉腫；粘液肉腫；卵巣癌；横紋筋肉腫；肉腫；新生物；神経纖維腫症（neurofibromatosis）；および子宮頸部形成異常。本発明はさらに、細胞が抗原の異常に高い発現に起因して不死化または過増殖の状態になった他の病態の治療に有用な組成物および方法を提供する。

【0208】

本発明に係る組成物および方法に適合しうるさまざまな過増殖性障害の例は、B細胞リンパ腫（たとえば、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（NHL）、または中枢神経系リンパ腫の種々の形態）、白血病（たとえば、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、有毛細胞白血病、および慢性骨髓芽球性白血病（chronic myoblastic leukemia））、ならびに骨髄腫（たとえば、多発性骨髄腫）をはじめとするB細胞癌である。そのほかのB細胞癌としては、小リンパ球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾辺縁帯リンパ腫、形質細胞骨髄腫、孤立性骨形質細胞腫、骨外性形質細胞腫、粘膜関連（MALT）リンパ組織の節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、瀰漫性大B細胞リンパ腫、縦隔（胸腺）大B細胞リンパ腫、血管内大B細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、バーキットリンパ腫/白血病、悪性度不詳のB細胞増殖、リンパ腫様肉芽腫症、および移植後リンパ球増殖性障害が挙げられる。

【0209】

自己抗体産生により特徴付けられる障害は、多くの場合、自己免疫性疾患と考えられる。本発明に係る組成物および方法を用いて治療または症状改善を行いうる自己免疫性疾患としては、次のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。関節炎、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、骨関節炎、多発性軟骨炎、乾癬性関節炎、乾癬、皮膚炎、多発性筋炎／皮膚筋炎、封入体筋炎、炎症性筋炎、中毒性表皮壞死症、全身性強皮症および硬化症、クレスト症候群、炎症性腸疾患に関連する応答、クローン病、潰瘍性結腸炎、呼吸窮迫症候群、成人呼吸窮迫症候群（ARDS）、髓膜炎、脳炎、ブドウ膜炎、結腸炎、糸球体腎炎、アレルギー病態、湿疹、喘息、T細胞の浸潤および慢性炎症反応を伴う病態、アテローム硬化症、自己免疫性心筋炎、白血球接着不全、全身性エリテマトーデス（SLE

10

20

30

40

50

)、亜急性皮膚エリテマトーデス、円板状狼瘡、ループス脊髄炎、ループス脳炎、若年発症糖尿病、多発性硬化症、アレルギー性脳脊髄炎、視神経脊髄炎、リウマチ熱、シデナム舞踏病、サイトカインおよびTリンパ球により媒介される急性および遅延型の過敏症に関連する免疫応答、結核、サルコイド症、肉芽腫症、たとえば、ウェグナー肉芽腫症およびチャーグ・ストラウス病、顆粒球減少症、脈管炎（たとえば、過敏性脈管炎／血管炎、ANCA脈管炎およびリウマチ性脈管炎）、再生不良性貧血、ダイアモンド・ブラックファン貧血、免疫性溶血性貧血、たとえば、自己免疫性溶血性貧血(AIHA)、悪性貧血、赤芽球病(PRCA)、第VIII因子欠損症、血友病A、自己免疫性好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球血管外漏出を伴う疾患、中枢神経系(CNS)炎症性障害、多臓器傷害症候群、重症筋無力症、抗原-抗体複合体媒介疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット病、キャッスルマン症候群、グッドパスチャー症候群、ランバート・イートン筋無力症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンス・ジョンソン症候群、固形臓器移植拒絶反応、移植片対宿主病(GVHD)、水疱性類天疱瘡、天疱瘡、自己免疫性多腺性内分泌症、血清反応陰性脊椎関節症、ライター病、全身硬直症候群、巨細胞性動脈炎、免疫複合体性腎炎、IgA腎症、IgM多発性神経症またはIgM媒介神経症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、自己免疫性血小板減少症、自己免疫性の精巣炎および卵巣炎を含む精巣および卵巣の自己免疫疾患、原発性甲状腺機能低下症；自己免疫性内分泌疾患、たとえば、自己免疫性甲状腺炎、慢性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)、亜急性甲状腺炎、特発性甲状腺機能低下症、アジソン病、グレーブス病、自己免疫性多腺性症候群(または多腺性内分泌症候群)、インスリン依存性糖尿病(IDDM)とも呼ばれるI型糖尿病、およびシーハン症候群；自己免疫性肝炎、リンパ性間質性肺炎(HIV)、閉塞性細気管支炎(非移植性)vs NSIP、ギラン・バレー症候群、大脈管性脈管炎(たとえば、リウマチ性多発性筋痛症および巨細胞(高安)動脈炎)、中脈管性脈管炎(たとえば、川崎病および結節性多発性動脈炎)、結節性多発性動脈炎(PAN)、強直性脊椎炎、ベルジェ病(IgA腎症)、急速進行性糸球体腎炎、原発性胆汁性肝硬変、セリアックスブルー(グルテン腸症)、クリオグロブリン血症、肝炎に関連するクリオグロブリン血症、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、冠動脈疾患、家族性地中海熱、顕微鏡的多発性血管炎、コーガン症候群、ウィスコット・オールドリッヂ症候群(Whiskott-Aldrich syndrome)、および閉塞性血栓性血管炎。

10

20

30

40

50

【0210】

関節リウマチ(RA)は、関節の炎症により特徴付けられる慢性疾患であり、腫脹、疼痛、および機能喪失を引き起こす。長期間にわたりRAを有する患者は、通常、進行性関節破壊、変形、能力障害、および早死さえも呈する。RAのほかに、一般的な炎症性の疾患、障害、および病態は、炎症過程に関連する症状(たとえば、発熱、疼痛、腫脹、潮紅)の治療、予防、または改善を行いうる。また、本発明に係る組成物および方法は、RAを含めて、異常な炎症過程を治療、予防、または改善するのに有益である。

【0211】

クローン病および関連疾患、潰瘍性結腸炎は、炎症性腸疾患(IBD)と呼ばれる一群の疾病に属する2つの主要な疾患カテゴリーである。クローン病は、消化管または胃腸(GI)管の炎症を引き起こす慢性障害である。口腔から肛門までのGI管のいずれの領域にも影響を与えるが、最も一般的には、小腸および/または結腸を侵す。潰瘍性結腸炎では、GIへの影響は、結腸に限定される。クローン病は、好中球抗原に対する抗体すなわち「核周囲型抗好中球抗体」(pANCA)およびサッカロミセス・セレビシアエ(Saccharomyces cerevisiae)に対する抗体すなわち「抗サッカロミセス・セレビシアエ(Saccharomyces cerevisiae)抗体」(ASCA)により特徴付けられうる。潰瘍性結腸炎の多くの患者は、自身の血中にpANCA抗体を有するがASCA抗体を有しておらず、一方、多くのクローン病患者は、ASCA抗体を呈するがpANCA抗体を呈することはない。クローン病を評価する一方法は、医師により収集された18個の予測変数スコアに基づくクローン病活性指数(CDAI)を用いるものである。150以下のCDAI値は、非活動性疾患に関連付けられ、それより大きい値

は、活動性疾患の指標となり、450を超える値は、きわめて重篤な疾患で見られる[Best et al., "Development of a Crohn's disease activity index." Gastroenterology 70:439-444 (1976)]。しかしながら、最初の研究以来、一部の研究者は、健常スコアとして200~250の「主観的値」を用いている。

【0212】

全身性エリテマトーデス(SLE)は、腎臓、皮膚、および関節をはじめとする多くの器官の血管が反復損傷を受けることにより引き起こされる自己免疫性疾患である。SLEの患者では、T細胞とB細胞との間の間違った相互作用により、細胞核を攻撃する自己抗体が産生される。自己抗体はSLEの原因となるというのが一般的に一致した見解であるので、B細胞系列を枯渇させて新しいB細胞が前駆体から生成されるように免疫系をリセットできるようにする新しい療法は、SLE患者において長期にわたる便益をもたらすことが期待されよう。

10

【0213】

多発性硬化症(MS)もまた、自己免疫性疾患である。それは、中枢神経系の炎症、ならびに脳内、脊髄内、および生体内の神経細胞纖維を絶縁するミエリンの破壊により特徴付けられる。MSの原因は不明であるが、自己免疫性T細胞が疾患の病理発生の主要な寄与因子であると広く考えられている。しかしながら、高レベルの抗体がMS患者の脳脊髄液中に存在し、いくつかの理論からは、抗体産生を引き起こすB細胞応答が疾患の発症に重要であると予想される。

20

【0214】

自己免疫性甲状腺疾患は、甲状腺を刺激して甲状腺機能亢進(グレープス病)を引き起すかまたは甲状腺を破壊して甲状腺機能低下症(橋本甲状腺炎)を引き起こす自己抗体の産生から生じる。甲状腺の刺激は、甲状腺刺激ホルモン(TSH)レセプターに結合してそれを活性化する自己抗体により引き起こされる。甲状腺の破壊は、他の甲状腺抗原と反応する自己抗体により引き起こされる。

【0215】

本発明に係る組成物および方法により提供された便益に適合しうるそのほかの疾患、障害、および病態としては、生体の水分産生腺の破壊により特徴付けられる自己免疫性疾患である上述のシェーグレン症候群が挙げられる。さらに、免疫性血小板減少性紫斑病(ITP)は、血小板に結合してその破壊を引き起こす自己抗体により引き起こされ、この病態は、本発明に係る物質および方法の適用に好適である。神経筋接合部で発現されたアセチルコリンレセプターに結合して随意筋群の衰弱を引き起こす自己抗体により特徴付けられる慢性自己免疫性神経筋障害である重症筋無力症(MG)は、本発明に係る組成物および方法を用いて治療可能な症状を有する疾患であり、本発明は、MGの治療および/または予防に有益であろうと期待される。さらにまた、ラウス肉腫ウイルス感染は、本発明に係る組成物および方法を用いて少なくとも1つの症状の治療または改善を行いうると期待される。

30

【0216】

本発明の他の態様は、乾癬および接触皮膚炎または他の過増殖性疾患をはじめとする皮膚のいずれかの過増殖性病態を予防および/または治療するために本発明に係る物質および方法を使用することである。乾癬は、皮膚の自己免疫性炎症により特徴付けられ、症例の30%が関節炎をも併発しており、強皮症および炎症性腸疾患(たとえば、クローン病および潰瘍性大腸炎)の場合も同様である。乾癬および接触皮膚炎の患者は、これらの病変内で高い抗原活性を有することが実証されている(Ogoshi et al., J. Inv. Dermatol., 110:818-23 [1998])。

40

【0217】

PIMSタンパク質は、たとえば、免疫系の細胞傷害性細胞を、高レベルの抗原を発現する病変内の細胞に直接送達することが可能である。PIMSタンパク質は、病変の近傍で皮下に投与可能であるか、または本明細書中に記載の種々の投与経路および当業者に周知の他の投与経路のいずれかを用いて投与可能である。

50

【0218】

同様に利用可能と考えられるのは、皮膚筋炎(DM)および多発性筋炎(PM)をはじめとする特発性炎症性筋症(IIM)の治療である。炎症性筋症は、いくつかの分類スキームを用いて分類されてきた。Millerの分類スキーマ(Miller, *Rheum Dis Clin North Am.* 20: 811-826, 1994)では、2つの特発性炎症性筋症(IIM)、多発性筋炎(PM)、および皮膚筋炎(DM)が規定される。

【0219】

多発性筋炎および皮膚筋炎は、筋肉およびDMの場合には皮膚が関係する慢性衰弱性炎症性疾患である。これらの障害は稀であり、米国では、毎年100万人の成人あたり約5~10例の症例および100万人の子供あたり0.6~3.2例の症例の年間発生率が報告されている(Tar goff, *Curr Probl Dermatol.* 1991, 3:131-180)。特発性炎症性筋症は、かなりの罹患率および死亡率を伴い、罹患した成人の半分までは、かなりの障害を患うことが確認されている(Gottdiener et al., *Am J Cardiol.* 1978, 41:1141-49)。Miller(*Rheum Dis Clin North Am.* 1994, 20:811-826 and *Arthritis and Allied Conditions*, Ch. 75, Eds. Koopman and Moreland, Lippincott Williams and Wilkins, 2005)は、筋力低下、変性の筋生検的証拠、筋肉関連酵素の血清中レベルの上昇、筋症の電磁的三主徴、皮膚筋炎内の皮疹の証拠、さらには二次判定基準として自己抗体の証拠を含む、IIMの診断に使用される5群の判定基準、すなわち特発性炎症性筋症判定基準(IIMC)の評価を設定している。

10

【0220】

筋肉関連酵素および自己抗体をはじめとするIIM関連因子としては、クレアチニナーゼ(CK)、乳酸デヒドロゲナーゼ、アルドラーゼ、C反応性タンパク質、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、さらには抗核自己抗体(ANA)、筋炎特異的抗体(MSA)、および可溶性核抗原に対する抗体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

【0221】

本発明に係る方法に適合しうる好ましい自己免疫性疾患としては、次のものが挙げられる。クローン病、ギラン・バレー症候群(GBS;急性炎症性脱髓性多発性神経症、急性特発性多発性神経根炎、急性特発性多発性神経炎、およびランドリー上行性麻痺としても知られる)、エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、視神経炎、乾癬、関節リウマチ、甲状腺機能亢進(たとえば、グレーブス病)、甲状腺機能低下症(たとえば、橋本病)、オード(Ord)甲状腺炎(橋本病に類似した甲状腺炎)、真性糖尿病(1型)、再生不良性貧血、ライター症候群、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、抗リン脂質抗体症候群(APS)、眼球クローヌスミオクローヌス症候群(OMS)、側頭動脈炎(「巨細胞性動脈炎」としても知られる)、急性播種性脳脊髄炎(ADEM)、グッドパスチャー症候群、ウェグナー肉芽腫症、セリアック病、天疱瘡、イヌ多発性関節炎、および温式自己免疫性溶血性貧血。それに加えて、本発明は、子宮内膜症、間質性膀胱炎、神経性筋強直症、強皮症、白斑、外陰部痛、シャーガス心臓病(心肥大)を引き起こすシャーガス病、サルコイド症、慢性疲労症候群、および自律神経失調症に関連する症状の治療または改善の方法を意図する。

30

【0222】

補体系は、免疫成分が関与する多くの疾患、たとえば、アルツハイマー病、喘息、エリテマトーデス、種々の形態の関節炎、自己免疫性心疾患、および多発性硬化症の一因となると考えられる。これらはすべて、本発明に係る方法を用いて治療または症状改善を行う疾患、障害、または病状であると考えられる。

40

【0223】

多重特異性一本鎖結合性分子が呈する特定の1つもしくは複数のエフェクター機能に依存して、特定の定常サブ領域が好ましい。たとえば、補体の活性化には、IgG(IgG1、2、または3)およびIgMが好ましく、オブソニン化およびトキシン中和には、いずれかのサブタイプのIgGが好ましく、病原体結合には、IgAが好ましく、そして蠕虫のような寄生生物の結合には、IgEが好ましい。

【0224】

50

例として、IgG抗体の定常領域を認識するFc_cRは、構造性および機能性さらには抗CDモノクローナル抗体により検出される抗原構造により識別可能な3つの異なるタイプのFcレセプターとしてヒト白血球上に見いだされている。それらは、Fc RI、Fc RII、およびFc RIIIとして知られ、白血球の（重複）サブセット上で示差的に発現される。

【0225】

単球上、マクロファージ上、好中球上、骨髄前駆体上、および樹状細胞上で発現される高親和性レセプターFc RI (CD64) は、アイソフォームIaおよびIbを含む。Fc RIは、単量体ヒトIgG1およびIgG3に対して高い親和性を有する。IgG4に対するその親和性は、約1/10であり、一方、それは、IgG2に結合しない。Fc RIは、遺伝的多型を示さない。

【0226】

アイソフォームIIa、IIb1、IIb2、IIb3、およびIIcを含むFc RII (CD32) は、最も広く分布するヒトFc Rタイプであり、ほとんどのタイプの血中白血球上、さらにはランゲルハンス細胞上、樹状細胞上、および血小板上で発現される。Fc RIIは、凝集IgGにのみ結合する低親和性レセプターである。それは、IgG2に結合可能な唯一のFc Rクラスである。Fc RIIaは、2つの異なるアロタイプRIIa-H131およびFc RIIa-R131を生じる遺伝的多型を示す。この機能的多型現象は、单一アミノ酸差、すなわち、それぞれ、IgG結合に重要な131位のヒスチジン(H)残基またはアルギニン(R)残基に起因する。Fc RIIaは、IgG4以外のヒトIgGサブアイソタイプに容易に結合する。Fc RIIa-H131は、複合体化IgG2に対してFc RIIa-R131アロタイプよりも高い親和性を有する。

【0227】

Fc RIII (CD16) は、2つのアイソフォームを有し、両方ともIgG1およびIgG3に結合可能である。IgGに対して中間的親和性を有するFc RIIIaは、マクロファージ上、単球上、ナチュラルキラー(NK)細胞上、およびT細胞のサブセット上で発現される。Fc RIIIbは、好中球上で選択的に発現されるIgGに対する低親和性レセプターである。それは、他の膜レセプターと効率的に協同する高移動性レセプターである。骨髄腫IgG二量体を用いた研究から、IgG1およびIgG3のみがFc RIIIbに結合し(低親和性で)、一方、IgG2およびIgG4の結合は見いだされないことが示された。Fc RIIIbは、共優性両対立遺伝子性多型現象を示し、アロタイプは、NA1(好中球抗原)およびNA2で表される。

【0228】

本発明のさらに他の態様は、広範にわたるさまざまな感染因子のいずれかから生じる感染の治療、予防、または作用軽減を行うことにより感染に対抗するための本発明に係る物質および方法の使用である。本発明に係るPIMS分子は、外来生物、外来細胞、外来ウイルス、または外来無生物から生じる感染に抵抗すべく宿主生物の免疫系を効率的かつ効果的に動員するようにデザインされる。

【0229】

本発明の対象と考えられる感染性細胞は、任意の公知の感染性細胞を包含し、その例としては、さまざまな細菌(たとえば、病原性E.コリ(E. coli)、S.ティフィムリウム(S. typhimurium)、P.アエルギノサ(P. aeruginosa)、B.アントラシス(B. anthracis)、C.ボツリナム(C. botulinum)、C.ディフィシレ(C. difficile)、C.ペルフリンゲンス(C. perfringens)、H.ピロリ(H. pylori)、V.コレラエ(V. cholerae)など)、ミコバクテリア、マイコプラズマ、菌類(たとえば、酵母および糸状菌)、ならびに寄生生物(たとえば、原生動物、吸虫綱(Trematoda)、多節条虫亜綱(Cestoda)、および線形動物門(Nematoda)の任意の公知の寄生生物メンバー)のいずれかが挙げられるが、これらに限定されるものではない。感染性ウイルスとしては、真核生物ウイルス(たとえば、アデノウイルス、ブンヤウイルス、ヘルペスウイルス、パポバウイルス、パラミクソウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、レオウイルス、レトロウイルスなど)、さらにはバクテリオファージが挙げられるが、これらに限定されるものではない。外来物としては、侵入のモードにかかわらず、かつ危害が意図的であるかかどうかにかかわらず、生物、好ましくはヒトに侵入する物体が挙げられる。とくに院内感染の原因因子として、多剤耐性感染因子(たとえば細菌)の存在割合が増加傾向にあることを考えれば、抗生素

10

20

30

40

50

質耐性の増大によりもたらされる困難を回避する治療法を提供する本発明に係る物質および方法は、こうした状況に対抗するために利用可能な医学的および獣医学的な備品への歓迎すべき追加を提供することが期待される。

【0230】

感染因子に関連し、かつ本明細書中に開示される物質および方法を用いて治療（予防的もしくは治療的）を行いうる、疾患、病状、または障害としては、炭疽、アスペルギルス症、細菌性髄膜炎、細菌性肺炎（たとえば、クラミジア肺炎）、プラストミセス症、ボツリヌス中毒、ブルセラ症、カンジダ症、コレラ、コクシジオイデス症（coccidioidomycosis）、クリプトコッカス症、下痢原性（diarrheogenic）、腸管出血性、または腸毒素原性の大腸菌症、ジフテリア、鼻疽、ヒストラスマ症、レジオネラ症、癲病、リストリア症、ノカルジア症、百日咳、サルモネラ症、猩紅熱、スポットリクム症、連鎖球菌咽頭炎、毒素性ショック症候群、旅行者下痢、および腸チフスが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0231】

本発明のさらなる態様および詳細は、以下の実施例から明らかになろう。ただし、これらの実施例は、限定を意図したものではなく例示を意図したものである。

【実施例】

【0232】

（実施例1）

PIMSの構築

20

図1に示されるように、PIMSペプチドは、次の構造ドメイン、すなわち、N末端に配置された定常サブ領域および少なくとも1つのC末端に配置された特異的結合性部位を有し、これらの2つのドメインのそれぞれは、免疫グロブリンヒンジ由来しうるPIMSリンカーにより連結される。いくつかの実施形態では、免疫グロブリン由来するヒンジ領域は、定常サブ領域のN末端に位置するが、定常サブ領域は、依然として、特異的結合性部位のN末端側に配置される。いくつかの実施形態では、発現されたばかりの新生のPIMS分子のN末端は、コードペプチドの発現および分泌に有用であることが当技術分野で公知であるリーダーペプチドでありうる。このリーダーペプチドは、さらに、免疫グロブリンヒンジ由来する領域に共有結合で連結可能であるか、または定常サブ領域に直接連結可能である（ヒンジ領域由来するN末端ドメインを欠失しているPIMS分子）。

30

【0233】

PIMSコードポリヌクレオチド用の媒体の組換え工学技術は、たとえば、好適な制限エンドヌクレアーゼ切断部位の指向性配置により、これらの種々のPIMS分子の構築を容易にすることが期待される。組換え工学技術によりPIMSポリヌクレオチドおよびコードされるPIMSペプチドのレパートリーを生成することのほかに、部位指向性突然変異誘発をはじめとする種々の突然変異誘発技術を用いてさまざまなPIMSおよびその変異体を产生することが可能であると考えられる。たとえば、部位指向性突然変異誘発は、鎖間ジスルフィド結合形成に関与しうるシステイン残基を指定するコドンを改変するのに好適である。典型的には、そのようなCys残基は、定常サブ領域と少なくとも1つの特異的結合性部位とを連結するリンカー領域中および/またはN末端ヒンジ領域中に位置するであろう。代表的なヒンジとしては、IgG1ヒンジから誘導される領域が挙げられる。この誘導されたヒンジ領域は、単一のCys残基を有するかまたは2つのCys残基を有する。

40

【0234】

同様に図1から明らかであるのは、所与の結合性部位に関する結合性ドメインの相対配置である。たとえば、本発明は、いずれかの配置構成で所与の結合性部位の2つの結合性ドメインを有するPIMS分子を包含する。たとえば、一方のPIMS分子は、配置構成N--[オプションのリーダーペプチド]--[オプションのヒンジ領域]--定常サブ領域-PIMSリンカー--V_L-V_H--Cを有し、他方のPIMS分子は、配置構成N--[オプションのリーダーペプチド]--[オプションのヒンジ領域]--定常サブ領域-PIMSリンカー-V_H-V_L-Cを有する。他の代表的なPIMS分子は、C末端結合性ドメインが单一可変ドメイン（V_HまたはV_Lのいずれか

50

)さらには同一、類似、または多様の結合性を有しうる2つの可変ドメイン(V_H - V_H または V_L - V_L)で構成される分子である。たとえば、CD3細胞外ドメインに結合する1つの V_H 、またはCD3細胞外ドメイン上の同一もしくは個別のエピトープに結合する2つの V_H ドメイン、または一方のドメインがCD3細胞外ドメインに結合しかつ他方のドメインがたとえばCD28の細胞外ドメインに結合する2つの V_H ドメインである。PIMS分子としては、免疫グロブリンに由来する定常サブ領域と、免疫グロブリンに由来しうるPIMSリンカーと、少なくとも1つの特異的結合性ドメインと、を含有するポリペプチド(およびコードポリヌクレオチド)が挙げられる。ただし、定常サブ領域は、分子の特異的結合性ドメインのそれぞれに對してN末端に配置されるものとする。

【0235】

10

SMIP、Scorpion、またはPIMSに含まれる種々の成分の交換を可能にする既存のベクターカセット戦略の利点を生かして、PIMS分子を構築した。戦略および分子構造については、米国特許出願第60/813,261号明細書とくにその中の実施例3に記載されており、米国特許出願第60/813,261号明細書は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。SMIPカセットを用いて、制限酵素AgeIおよびBsrGI (New England Biolabs)でベクターカセットDNAを完全に消化することにより、「結合性ドメイン1」(BD1)と、この場合はヒトIgG1のヒンジ- C_{H_2} - C_{H_3} 中のエフェクタードメインの最初の400ヌクレオチドと、を含むscFvを除去した。全pD18ベクターと、ヒトVK3リーダーと、ヒトIgG1のC末端300ヌクレオチドと、を含有する、得られたDNA断片のうちの最大のものをゲル精製して、将来の使用のために-20°で貯蔵した。

20

【0236】

PIMS W0001～PIMS W0007を生成するために、AgeI切断部位(Thr-GlyをコードするACCGGT)に対応する、VK3リーダー中の最後の2つのアミノ酸と、IgG1エフェクタードメインのヒンジ領域内でシグナルペプチド切断が起こらないことを保証すべく一連の介在アミノ酸と、をコードするように、オリゴヌクレオチドプライマー(W0001F～W0007F)をデザインした。この場合、ヌクレオチドは、制限酵素Xholに対する認識配列を正しいリーディングフレームで含有する。これにより、オープンリーディングフレームがリーダー配列からスペーサーアミノ酸を通ってさらに全エフェクタードメインにわたり保持されることを保証した。これらのプライマーをリバースプライマーIgBsrG1Rと共にPCR増幅反応で使用してPCR産物を產生し、次に、この産物をAgeIおよびBsrGIの両方で消化し、ゲル精製し、そしてあらかじめ消化された以上に記載のベクターにライゲートした。

30

【0237】

このデザインにより、リーダー配列とエフェクタードメインの先頭との間にコードされるアミノ酸だけが異なる7つのPIMS分子を得た(配列リスト中のPIMS W0001～W0007のアミノ酸配列を参照されたい)。これらの分子中のすべての他の配列は同一である。これらの「スペーサー」アミノ酸は、翻訳時にリーダーペプチド切断を限定する役割を果たすだけでなく、エフェクタードメイン機能、種々の生体系内でのタンパク質発現、さらには他の生物学的に適合するペプチド用の挿入ポイントに影響を及ぼすタンパク質工学的取組みを先導する鑄型としての役割も果たす。

【0238】

40

より詳細には、最初にScorpion分子S0033のアリコートを5 μg/mLの濃度に希釈することにより、抗CD28 PIMS分子を構築した。Platinum PCR Supermix High Fidelity PCR mix (Invitrogen)中に50 μLの全反応容積で100 μMストック溶液からのそれぞれ20pmolのプライマーW0001Fおよび12HL-XbaR(たとえばプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、表6に提供される)を含有するPCRにおいて、1 μLを鑄型として使用した。次に、このPCR混合物をABI 9700サーマルサイクラー中に配置し、95°で最初に3分間インキュベートした後、94°で30秒間、60°で15秒間、および68°で2分間を30回サイクルさせ、続いて、68°で最終に3分間伸長させた。次に、反応系を室温に戻し、製造業者のプロトコルに従ってQiagen MinEluteカラムを用いて精製し、塩、過剰のプライマー、および酵素を除去した。次に、20 μLの全体積で10mM Tris、pH8を用いて、この精製されたPCR産物をカラム

50

ムから溶出させた。次に、4 μLのPCR産物を1 μLの1M塩化ナトリウム溶液と混合し、そして1 μLのpCR2.1-TOPOベクターミックス(Invitrogen)を添加しながら注意深く混合し、さらに反応混合物を卓上で20分間インキュベートした。次に、すべて製造業者の使用説明書(Invitrogen)に従って、2 μLのこの反応系を20 μLの化学的コンピテント細菌株TOP 10と混合して氷上で15分間インキュベートし、42℃で30秒間熱ショックを与え、SOCプロスで200 μLにし、そして37℃で30分間インキュベートした。次に、LB寒天+50 μg/mLカナマイシン+X-gal/IPTGプレート(Teknova)上に細菌をプレーティングした。プレートを37℃で一晩インキュベートし、翌日、ディープウェルの96ウェルプレート中に1ウェルあたり1 mL T-プロス+カナマイシン50 μg/mL(Teknova)と共にコロニーを接種し、37℃で一晩振盪させた。翌日、20 μLを各ウェルから採取し、そして96ウェルプレート中で20 μLの50%グリセロール溶液と混合し、次に、それを-20℃で一晩貯蔵した。次に、ディープウェルプレート中に残存する細菌をBeckman Avanti遠心分離機により4K rpmで10分間ペレット化し、そして清澄化プロスを除去して細菌ペレットだけを残した。次に、プレートをQiaRobot 8000上に配置し、QiaRobot 8000上で使用すべく製造業者により提供されたQiaPrep Turbo Kitを用いてプラスミドDNAを精製した。分析用に採取されたすべてのコロニーに対して、このようにして精製されたDNAを調製した。

【0239】

PCR配列決定反応のために、5 μLの精製されたDNAを96ウェルプレートの各ウェルから採取し、そして2枚の二重反復試験用96ウェルプレート中にピペットで添加した。4ピコモルのDNA配列決定プライマーM13R(プレート1)またはM13F(プレート2)と4 μLのBigDye Terminator Sequencing Mix version 3.1(ABI)との混合物を10 μLの全体積で各ウェルに添加した。次に、これらのPCR配列決定反応系をABI 9700 Thermal cycler中に配置し、96℃で10秒間、50℃で15秒間、および60℃で16分間を25回サイクルさせた。その後、配列決定反応系を滅菌水で20 μLに希釈し、あらかじめ遠心されたCentri-Sep G-25カラム(Princeton Separations)上に充填して、取り込まれていない標識化ヌクレオチドを反応系から除去した。次に、得られたPCR産物をABI 3130-XL DNA Sequencerに充填して操作し、そしてVector NTI 10.0(Invitrogen)のConTig Express Moduleを用いてDNA配列を分析した。次に、所望のDNA配列を含有する1つのクローンに由来するDNAを60 μLの反応系で制限酵素AgeIおよびXbaI(両方ともNew England BioLabs製)で消化した。消化物を37℃で6時間インキュベートし、次に、1%アガロースTAEゲル上に充填し、そして110Vで40分間泳動させた。この時点で、1.5KbpのW0001 DNA(配列番号358)バンドを4KbpのベクターDNAバンドから容易に解像することが可能であった。W0001 DNAをアガロースゲルから取り出し、アガロースゲルからDNA抽出を行うための製造業者の使用説明書(Qiagen)を用いてQiagen MinEluteカラムで精製した。得られた消化および精製されたDNAを10 μLの体積で溶出させた。15 μLの反応系中に、AgeIおよびXbaIで消化された10ngのpD18+VK3リーダーDNAと、1.5 μLの10×ライゲーション緩衝液(Roche)と、1 μLのT4 DNAリガーゼ(Roche)と、を含むライゲーション反応系で、2 μLのこのDNAを使用し、室温で一晩インキュベートした。ライゲーション後、5 μLを化学的コンピテントTOP 10中にトランスフォームした。細胞を2xYT+カルベニシリン(100 μg/mL)プレート上にプレーティングしつつ37℃で一晩インキュベートしたこと以外は以上に記載したとおり行った。コロニーを以上に記載したように増殖させ、1.5KbpのAgeI-XbaI DNA断片の存在に関してスクリーニングし、再び配列決定を行って、DNAが所望のヌクレオチド配列を有することを確認した。この時点でW0001として同定された単一クローンを100mL T-プロス+カルベニシリン中で一晩培養を行って増幅させた。製造業者のプロトコルに従ってQiagen Maxi Prep Kitを用いて、この細菌培養物からDNAを調製した。得られたDNA調製物を、Nanodrop分光光度計を用いて260nmにおける吸光度により定量した。

【表6】

表6

名称	配列識別子
重鎖 GSP1 プライマー	251
ネステッド重鎖 GSP2 プライマー	252
軽鎖 GSP1 プライマー	253
ネステッド軽鎖 GSP2 プライマー	254
5' RACE 短縮アンカープライマー	255
T7 配列決定プライマー	256
M13 リバースプライマー	257
PCR プライマー hVK3L-F3H3	258
PCR プライマー hVK3L-F2	259
PCR プライマー hVK3L-F1-2H7VL	260
PCR プライマー 2H7VH-NheF	261
PCR プライマー G4S-NheR	262
PCR プライマー 015VH-XhoR	263
PCR プライマー G1H-S-XHO	265
PCR プライマー CH3R-EcoR1	266
PCR プライマー G1-XBA-R	267
PCR プライマー G4SLinkR1-S	268
PCR プライマー G4SLinkR1-AS	269
PCR プライマー 2E12VLXbaR	270
PCR プライマー 2E12VLR1F	271
PCR プライマー 2E12VHR1F	272
PCR プライマー 2E12VHXbaR	273

【0240】

10

20

30

40

名称	配列識別子
PCR プライマー 2e12VHdXbaF1	274
PCR プライマー 2e12VHdXbaR1	275
PCR プライマー IgBsrG1F	276
PCR プライマー IgBsrG1R	277
PCR プライマー M13R	278
PCR プライマー M13F	279
PCR プライマー T7	280
PCR プライマー pD18F-17	281
PCR プライマー pD18F-20	282
PCR プライマー pD18F-1	283
PCR プライマー pD18R-s	284
PCR プライマー CH3seqF1	285
PCR プライマー CH3seqF2	286
PCR プライマー CH3seqR1	287
PCR プライマー CH3seqR2	288
PCR プライマー L1-11R	289
PCR プライマー L1-6R	290
PCR プライマー L3R	291
PCR プライマー L4R	292
PCR プライマー L5R	293
PCR プライマー IgBsrG1F	294
PCR プライマー L-CPPCPR	295
CD37 結合性ドメインプライマー G281LH-NheR	309

10

20

30

40

名称	配列識別子
CD37 結合性ドメインプライマー G281LH-NheF	310
CD37 結合性ドメインプライマー G281-LH-LPinF	311
CD37 結合性ドメインプライマー G281-LH-HXhoR	312
CD37 結合性ドメインプライマー G281-LH-LEcoF	313
CD37 結合性ドメインプライマー G281-LH-HXbaR	314
CD37 結合性ドメインプライマー G281-HL-HF	315
CD37 結合性ドメインプライマー G281-HL-HR3	316
CD37 結合性ドメインプライマー G281-HL-HR2	317
CD37 結合性ドメインプライマー G281-HL-HNheR	318
CD37 結合性ドメインプライマー G281-HL-LNheF	319
CD37 結合性ドメインプライマー G281-HL-LXhoR	320
CD37 結合性ドメインプライマー G281-HL-LXbaR	321
CD37 結合性ドメインプライマー G281-HL-EcoF	322
CD3 結合性ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LH-LF1	323
CD3 結合性ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LF2	324
CD3 結合性ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LF3	325
CD3 結合性ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LF4	326
CD3 結合性ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LF5	327
CD3 結合性ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LF6	328
CD3 結合性ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LF7	329
CD3 結合性ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LR7	330
CD3 結合性ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LR6	331
CD3 結合性ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LR5	332
CD3 結合性ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LR4	333

名称	配列識別子
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LR3	334
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LR2	335
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LH-LR1	336
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LH-HF1	337
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HF2	338
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HF3	339
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HF4	340
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HF5	341
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HF6	342
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HR6	343
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HR5	344
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HR4	345
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HR3	346
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HR2	347
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LH-HR1	348
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HL-HF1	349
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HL-HR1	350
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HL-HR0	351
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HL-LF1	352
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HL-LR3Xho	353
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HL-LR3Xba	354
CD3 結合性 ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-HL-HF1R1	355

10

20

30

40

名称	配列識別子
CD3 結合性ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LH-LF1R1	356
CD3 結合性ドメインプライマー (G19-4 temp.) 194-LH-HR1Xba	357
W0001F PCR プライマー	296
W0002F PCR プライマー	297
W0003F PCR プライマー	298
W0004F PCR プライマー	299
W0005F PCR プライマー	300
W0006F PCR プライマー	301
W0007F PCR プライマー	302
W0008F PCR プライマー	303
W0009F PCR プライマー	304
W0010F PCR プライマー	305
W0011F PCR プライマー	306
W0012F PCR プライマー	307
12HL-XbaR PCR プライマー	308

【 0 2 4 4 】

W0001 PIMS中に見られるドメインの一般的構成（すなわち、C_{H2}領域とC_{H3}領域とを含む定常サブ領域F_cエフェクタードメインに連結されたN末端ヒンジ領域、それに続いて、PIM Sリンカー、およびC末端に配置された結合性ドメイン）に一致するそのほかのPIMS分子を構築した。これらのPIMS分子をW0002～W0009で表した。それらの配列は、配列番号360～375で示される。W0002～W0007はそれぞれ、2E12結合性ドメインを含み、CD28に特異的に結合する。W0008は、2Lm20-4 V_HV_L 12結合性ドメインを含み、そしてW0009は、2Lm20-4 V_HV_L 17を含み、それぞれ、CD20に特異的に結合する。これらのPIMSのアミノ酸配列さらには代表的コード核酸配列の特徴を表7に示す。したがって、所望の分子を標的にすべくさまざまな特異的結合性ドメインをPIMS中で使用しうることは明らかである。

10

20

30

【表7】

表7

PIMS分子	特徴
W0001 核酸(配列番号:358)	ヒト VK3 リーダー: ヌクレオチド 1-60 リーダー-ヒンジ連結部: 61-69 ヒンジ領域: 70-114 CH2CH3 領域: 115-765 リンカーペプチド: 766-789 結合性ドメイン: 790-1551 結合性領域リンカー: 1153-1212
W0001 ポリペプチド(配列番号:359)	ヒト VK3 リーダー: アミノ酸 1-20 リーダー-ヒンジ連結部: 21-23 ヒンジ領域: 24-38 CH2CH3 領域: 39-255 リンカーペプチド: 256-263 結合性ドメイン: 264-516 結合性領域リンカー: 385-404
W0002 核酸(配列番号:360)	ヒト VK3 リーダー: ヌクレオチド 1-60 リーダー-ヒンジ連結部: 61-69 ヒンジ領域: 70-114 CH2CH3 領域: 115-765 リンカーペプチド: 766-789 結合性ドメイン: 790-1551 結合性領域リンカー: 1153-1212
W0002 ポリペプチド(配列番号:361)	ヒト VK3 リーダー: アミノ酸 1-20 リーダー-ヒンジ連結部: 21-23 ヒンジ領域: 24-38 CH2CH3 領域: 39-255 リンカーペプチド: 256-262 結合性ドメイン: 263-516 結合性領域リンカー: 385-404
W0003 核酸(配列番号:362)	ヒト VK3 リーダー: ヌクレオチド 1-60 リーダー-ヒンジ連結部: 61-69 ヒンジ領域: 70-114 CH2CH3 領域: 115-765 リンカーペプチド: 766-789 結合性ドメイン: 790-1551 結合性領域リンカー: 1153-1212
W0003 ポリペプチド(配列番号:363)	ヒト VK3 リーダー: アミノ酸 1-20 リーダー-ヒンジ連結部: 21-23 ヒンジ領域: 24-38 CH2CH3 領域: 39-255 リンカーペプチド: 256-263 結合性ドメイン: 264-516 結合性領域リンカー: 385-404

10

20

30

40

【0 2 4 5】

W0004 核酸(配列番号:364)	ヒト VK3 リーダー: :ヌクレオチド 1-60 リーダー-ヒンジ連結部: 61-69 ヒンジ領域: 70-114 CH2CH3 領域: 115-765 リンカーペプチド: 766-789 結合性ドメイン: 790-1551 結合性領域リンカー: 1153-1212	
W0004 ポリペプチド(配列番号:365)	ヒト VK3 リーダー: アミノ酸 1-20 リーダー-ヒンジ連結部: 21-23 ヒンジ領域: 24-38 CH2CH3 領域: 39-255 リンカーペプチド: 256-263 結合性ドメイン: 264-516 結合性領域リンカー: 385-404	10
W0005 核酸(配列番号:366)	ヒト VK3 リーダー: :ヌクレオチド 1-60 リーダー-ヒンジ連結部: 61-69 ヒンジ領域: 70-114 CH2CH3 領域: 115-765 リンカーペプチド: 766-789 結合性ドメイン: 790-1551 結合性領域リンカー: 1153-1212	20
W0005 ポリペプチド(配列番号:367)	ヒト VK3 リーダー: アミノ酸 1-20 リーダー-ヒンジ連結部: 21-23 ヒンジ領域: 24-38 CH2CH3 領域: 39-255 リンカーペプチド: 256-263 結合性ドメイン: 264-516 結合性領域リンカー: 385-404	
W0006 核酸(配列番号:368)	ヒト VK3 リーダー: :ヌクレオチド 1-60 リーダー-ヒンジ連結部: 61-69 ヒンジ領域: 70-114 CH2CH3 領域: 115-765 リンカーペプチド: 766-789 結合性ドメイン: 790-1551 結合性領域リンカー: 1153-1212	30
W0006 ポリペプチド(配列番号:369)	ヒト VK3 リーダー: アミノ酸 1-20 リーダー-ヒンジ連結部: 21-23 ヒンジ領域: 24-38 CH2CH3 領域: 39-255 リンカーペプチド: 256-263 結合性ドメイン: 264-516 結合性領域リンカー: 385-404	40
W0007 核酸(配列番号:370)	ヒト VK3 リーダー: ヌクレオチド 1-60 リーダー-ヒンジ連結部: 61-66 ヒンジ領域: 67-111 CH2CH3 領域: 112-762 リンカーペプチド: 763-786 結合性ドメイン: 787-1548	

	結合性領域リンカー: 1150-1209	
W0007 ポリペプチド(配列番号:371)	ヒト VK3 リーダー: アミノ酸 1-20 リーダー-ヒンジ連結部: 21-22 ヒンジ領域: 23-37 CH2CH3 領域: 38-254 リンカーペプチド: 255-262 結合性ドメイン: 263-515 結合性領域リンカー: 384-403	10
W0008 核酸(配列番号:372)	ヒト VK3 リーダー: ヌクレオチド 1-60 リーダー-ヒンジ連結部: 61-66 ヒンジ領域: 67-111 CH2CH3 領域: 112-762 リンカーペプチド: 763-786 結合性ドメイン: 787-1503 結合性領域リンカー: 1150-1185	20
W0008 ポリペプチド(配列番号:373)	ヒト VK3 リーダー: アミノ酸 1-20 リーダー-ヒンジ連結部: 21-22 ヒンジ領域: 23-37 CH2CH3 領域: 38-254 リンカーペプチド: 255-262 結合性ドメイン: 263-501 結合性領域リンカー: 384-395	20
W0009 核酸(配列番号:374)	ヒト VK3 リーダー: ヌクレオチド 1-60 リーダー-ヒンジ連結部: 61-66 ヒンジ領域: 67-111 CH2CH3 領域: 112-762 リンカーペプチド: 763-786 結合性ドメイン: 787-1518 結合性領域リンカー: 1150-1200	30
W0009 ポリペプチド(配列番号:375)	ヒト VK3 リーダー: アミノ酸 1-20 リーダー-ヒンジ連結部: 21-22 ヒンジ領域: 23-37 CH2CH3 領域: 38-254 リンカーペプチド: 255-262 結合性ドメイン: 263-506 結合性領域リンカー: 384-400	30

【 0 2 4 7 】

異なる結合性ドメイン、異なるPIMSリンカー長さ、異なるPIMSリンカーソースなどを探索するさらに他のPIMS分子を構築した。表7中のいくつかのPIMS分子に対して同定された特徴を含めて、これらのそのほかのPIMS分子の構造を配列リスト中に提供する。これらのPIMS分子のいくつかは、表8に示される構成を呈する。

40

【表8】

表8

名称	結合性ドメイン	PIMS リンカー
W0035	DR	H7
W0036	DR	H62
W0056	DR	H65
W0087	DR	H64

【0248】

10

抗DR V_k(VL)およびV_h(VH)結合性領域をオーバーラップオリゴヌクレオチドPCRにより構築した。簡潔に述べると、10pmolの各オリゴヌクレオチド(1μlの10μMストック)をPCR反応系に添加し、PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen cat # 10790-020)で体積を50μlにした。次のプロトコルに従ってPCR反応を行った。94℃で2分間、次に、94℃で30秒間それに続いて50℃で20秒間それに続いて68℃で3分間を30サイクル、そして30サイクルの終了時、68℃で5分間インキュベーションそれに続いて4℃でインキュベーション。PCR産物をpCR 4-TOPO (Invitrogen cat # 45-0030)中にクローニングし、そして配列を確認した。抗DR V_k(AgeI/BamHI)フラグメントおよび抗DR V_h(BamHI/BclI)フラグメントをpD18 pD18 scc-p AgeI/BclI消化ベクター中にライゲートし、抗DR SMIP (M0019)を作製した。

【0249】

20

PCR増幅時にEcoRI部位を5'末端に、XbaI部位を3'末端に付加することにより、PIMSを作製した。各末端にクローニングに有用な制限部位を有するPCR増幅フラグメントを、EcoRI/XbaI消化によりTRU-015(CD20)結合性ドメインが欠失されたW0011構築物中にクローニングした。より特定的には、H7 PIMSリンカー (W0035) を有するPIMSを構築するためにW0011 EcoRI/XbaIを使用し、H62 PIMSリンカー (W0036) を有するPIMSを構築するためにW0011 H62 EcoRI/XbaIを使用し、そしてPIMSリンカー (W0087) としてH64を有するPIMSを構築するためにW0011 H64を使用した。pD18For、5'オリゴヌクレオチドとして配列決定プライマー、および次の3'オリゴヌクレオチド：5'-ttcagaattcgagaaatgacgtgcgg-3' (配列番号549)と共に、オリゴヌクレオチド指向性突然変異誘発用の鋳型としてW0036 DNA構築物を用いることにより、W0056を作製した。続いて、HindIII/BsrGI制限部位を用いてフラグメントをW0036中にクローニングした。

30

【0250】

(実施例2)

CHO-S細胞内へのPIMSコードポリヌクレオチドのトランスフェクション

本来のトランスフェクション実験を行う1日前、2つの滅菌フラスコのそれぞれに、8mM L-グルタミンが添加された250mlのFreestyle (登録商標) CHO発現培地中 5×10^5 細胞/mlで接種した。8% CO₂を用いて37℃でフラスコをインキュベートし、70rpmで回転させた。トランスフェクションの日に、各フラスコ中の細胞を計数し、10⁶細胞/mlになるようにFreestyle (登録商標) 培地を添加した。個別の15ml滅菌チューブ中で、313μgのFreestyle (登録商標) Max Transfection試薬 (1.0μg/ml) を4,687μlのOptiPro (登録商標) SFMに添加し、そして313μgのW0001 DNAプラスミド (1.0μg/ml) を4,687μlのOptiPro SFM (登録商標) に添加した。希釈されたFreestyle (登録商標) Max Transfection試薬を希釈状態されたW0001プラスミドに添加し、そして室温で10分間インキュベートした。次に、DNA-Freestyle (登録商標) Max Reagent複合体を細胞の入ったフラスコに徐々に添加し、そして70rpmで回転するオービタルシェーカー上、37℃、8% CO₂で細胞をインキュベートした。7日後、各フラスコの上清を回収し、500mlの全体積になるように再び組み合わせ、次に、2μmフィルターに通して濾過した。W0001タンパク質濃度は、ELISAにより測定したところ、7.38μg/mlであった。

40

【0251】

50

(実施例3)

発現試験

エフェクター機能を有する特異的結合性タンパク質をコードする以上に記載の核酸またはPIMS分子を用いて、発現試験を行った。PIMSタンパク質をコードする核酸をCOS細胞内に一過的にトランスフェクトし、この細胞の異種遺伝子発現を許容する周知の条件下にトランスフェクト細胞を保持した。先に記載したようにPEIまたはDEAE-デキストランを用いてDNAをCOS細胞内に一過的にトランスフェクトした(PEIに対しては、Boussif O. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 92: 7297-7301, (1995)(参照により本明細書に組み入れられるものとする)、Pollard H. et al., J. Biol. Chem. 273:7507-7511, (1998)(参照により本明細書に組み入れられるものとする)を参照されたい)。それぞれの新しい形態の平均発現レベルを決定するために、それぞれの新しい分子の多数の独立したトランスフェクションを行った。PEIによるトランスフェクションでは、COS細胞をDMEM/10% FBS培地で60mmの組織培養プレート上にプレーティングし、トランスフェクションの日に約90%の集密度になるように一晩インキュベートした。抗生物質を含有しない無血清DMEMに培地を変更して4時間インキュベートした。トランスフェクション培地(4ml/プレート)は、50μgのPEIおよび10~20μgの対象のDNAプラスミドたとえばW0001プラスミドと共に無血清DMEMを含有していた。トランスフェクション培地をボルテックスにより混合し、室温で15分間インキュベートし、そして既存の培地を吸引した後、プレートに添加した。上清の捕集前の3~7日間にわたり培養物をインキュベートした。培養物上清をSDS-PAGEおよびウェスタンプロットティングによりタンパク質発現に関してアッセイした。

【0252】

SDS-PAGEのために、1ウェルあたり8μgのタンパク質を含有する、粗製の培養物上清(通常30μl/ウェル)または精製タンパク質アリコートのいずれかからサンプルを調製し、1×最終濃度になるように2×Tris-グリシンSDS緩衝剤(Invitrogen)を添加した。MWサイズ標準を提供するために10μlのSeeBlue Marker(Invitrogen, Carlsbad, CA)を泳動させた。PIMSタンパク質を4~20% Novex Tris-グリシングル(Invitrogen, San Diego, CA)上でSDS-PAGE分析に付した。95℃で3分間加熱後、サンプルを還元性もしくは非還元性の条件下でNovex Tris-グリシンSDSサンプル緩衝液(2×)を用いて充填し、続いて、175Vで60分間電気泳動させた。1×Novex Tris-グリシンSDS泳動緩衝液(Invitrogen)を用いて電気泳動を行った。

【0253】

COS細胞内での発現試験の結果から、PIMSは、scorpion分子とSMIP分子との中間のレベルで発現されることが示された。特定的には、PIMS分子は、5~6μg/mlで発現され、scorpionは、1~2μg/mlで発現され、そしてSMIP分子は、10μg/mlで発現された。

【0254】

(実施例4)

ELISA結合アッセイ

PIMS分子、SMIP分子、およびScorpion分子を用いて、比較に基づくELISA結合アッセイを行った。2つの捕捉用抗体、すなわち、高親和性および低親和性の抗CD16抗体を使用した。アッセイを行うために、MaxiSorbプレート(Costar MaxiSorb黒色プラスチック96ウェルプレート)をそれぞれ最初に100μlの2μg/ml抗CD16低親和性または高親和性抗体でコーティングした(CD16 mIgG高親和性(870μg/ml):7.8μl/3.4ml PBS; CD16 mIgG低親和性(560μg/ml):23.6μl/6.6ml PBS)。プレートを覆って、4℃で一晩インキュベートした。翌朝、各プレートを200μlのNFDM(1日前に調製されたPBS/3%脱脂粉乳、3g/100ml)で2回洗浄した。次に、各ウェルに200μlのNFDMを添加することによりプレートをプロックし、室温で1時間インキュベートした。最高濃度未満でウェルに120μlのNFDMを添加することにより、希釈プレート(96ウェルプラスチックプレート)を作製した(カラム1~7のC~H)。続いて、8μg/mlの対象のタンパク質120μlを添加した。CD16高および低の対象のタンパク質(POI)のアッセイ:S0129(抗CD20 × 抗CD20多重特異的結合性タンパク質またはscorpion;1.2mg/ml)3.32μl~500μl PBS; 2Lm20-4(抗CD20 SMIP;1.0mg/ml-54mg/mlストックから希釈)、4μl~500μl PBS; W0001(抗CD28 PIMS;348μg/ml)11

10

20

30

40

50

.5 μl PBSを、次に、500 μlの最終体積になるように添加した。

【0255】

1つのウェル中の混合物から、120 μlを次のウェルに移し、このパターンをウェルごとに継続して二倍段階希釈を行った。次に、NFDMをMaxiSorbプレートから機械的に除去した（すなわち、フリッキングより）。希釈プレートの各ウェルから、100 μlをELISAプレート中の対応するウェルに移した。移した後、ELISAプレートを室温で1時間インキュベートした。このインキュベーション時、ヤギ抗ヒトIgG(fcSp)および(H+L)-HRPOコンジュゲート(Caltech code no. H10307, lot no. 14010107、有効期限2007年1月)をNFDMで1:1000に希釈した（すなわち、10ml NFDMの最終体積中に10 μl）。次に、ELISAプレートをPBST(PBS+0.2% Tween20 = 200ml PBSに400 μl Tween 20を添加)で3回洗浄し、100 μlのホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)試薬を適切なウェルに添加した。次に、ELISAプレートを室温で1時間インキュベートした。このインキュベーション時、1.1mlのペルオキシダーゼを8.9mlの基質(1:9)に添加することにより、Pierce Quanta Blue試薬(Pierce Chemicals catalog no. 15169)を調製した。ELISAプレートをPBSTで3回洗浄し、起泡を回避しながら、100 μlのPierce QuantaBlueミックスを各ウェルに添加した。次に、ウェルを暗所中、室温で30分間インキュベートした。次に、SpectraMAX GeminiXSを用いてプレートウェル中の比色反応産物を測定し、タンパク質濃度の関数としてカウント数を平均蛍光強度(MFI)としてグラフにした。結果を高親和性結合については図2および低親和性結合については図3に示す。サンプルソースの最大タンパク質濃度におけるMFIの差さらにはタンパク質サンプルのさらなる希釈によりどれほど急速にシグナルが減少したかの差は両方とも、CD16結合の差を反映した。アッセイにおけるバックグラウンドシグナルのレベルを提供するために、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)陰性対照もプロットした。
10

【0256】

(実施例5)

Jurkat細胞結合アッセイ

W0001 PIMSのようなPIMS分子の特異的結合性を評価するために、結合試験を行った。最初に、従来技術を用いてJurkat細胞をプレーティングした。接種されたマルチウェルプレートに、プレートを横切って20 μg/mlから0.16 μg/mlまで2倍漸減を用いて、CD28精製タンパク質を添加した。タンパク質を含有しない1つのウェルは、バックグラウンド対照としての役割を果たした。
20

【0257】

タンパク質を含有する接種されたプレートを氷上で1時間インキュベートした。続いて、ウェルを200 μlのPBS中1% FBSで1回洗浄した。次に、1:100でFITCにより標識されたヤギ抗ヒト抗体(Fc sup)を各ウェルに添加し、プレートを再び氷上で1時間インキュベートした。次に、プレートを、200 μlのPBS中1% FBSで1回洗浄し、細胞を200 μlの1% FBS中に再懸濁させ、そしてFACSにより分析した。
30

【0258】

W0001抗CD28ペプチドの結合性を評価するために、培養プレートの個々のウェル中に接種することにより、CD28発現Jurkat細胞をプレーティングした。次に、20 μg/mlから0.16 μg/mlまでにわたり二倍希釈スキームを用いて、CD28精製タンパク質を個々のウェルに添加した。再び二倍希釈スキーム、すなわち、20 μg/mlから0.16 μg/mlまでを用いて、W0001 PIMS精製タンパク質を個々の接種されたウェルに添加した。バックグラウンド対照を提供するために、1つのウェルにはタンパク質を接種しなかった。次に、プレートを氷上で1時間インキュベートし、200 μlのPBS中1% FBSで1回洗浄し、そして1:100でFITCにより標識されたヤギ抗ヒト抗体(Fc sup)を各ウェルに添加した。プレートを再び氷上で1時間インキュベートし、続いて、200 μlのPBS中1% FBSで1回洗浄した。200 μlの1% FBS中に細胞を再懸濁させた後、FACS分析を行った。発現されたタンパク質は、フローサイトメトリー(FACS)により、Jurkat細胞上に提示されたCD28に結合することが示されたことから、W0001ペプチドは、特異的標的抗原に結合するように機能しうることが実証される。そのほかに、使用される(H1~H6)リンカーは、標的抗原への結合活性に有意な影響を及ぼす
40

さないことが判明した。

【0259】

このほかに、末梢血単核細胞（PBMC）を用いて、抗CD28 PIMSおよびSMIP分子がJurkat細胞のADCC起因性細胞死を媒介する能力を調べた。簡潔に述べると、10% FBS (#16140-071, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) を含むIscoves培地 (#12440-053, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) 中、37 度で、 $1 \times 10^7/\text{ml}$ Jurkat T細胞を $500 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ [51Cr]クロム酸ナトリウム (#CJS1, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) で90分間標識した。次に、10% FBSを含むRPMI (#11875-093, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) 培地で ^{51}Cr 担持Jurkat細胞を3回洗浄し、そしてRPMI中に $4 \times 10^5/\text{ml}$ で再懸濁させた。Lymphocyte Separation Medium (#50494, MP Biomedicals, Aurora, OH) を用いて遠心分離により、社内のドナー由來のPBMCをヘパリン処理された全血から単離し、RPMI培地で2回洗浄し、10% FBSを含むRPMI中に $5 \times 10^6/\text{ml}$ で再懸濁させた。10% FBSを含むRPMI培地に最終濃度の4倍で試薬サンプルを添加し、各試薬の3つの10倍逐次希釈液を調製した。次に、これらの試薬を指示最終濃度になるように $50 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ で96ウェルU底プレートに添加した。次に、 ^{51}Cr 標識化Jurkat細胞を $50 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ ($2 \times 10^4/\text{ウェル}$) でプレートに添加した。次に、25:1エフェクター (PBMC) : 標的 (Jurkat細胞) の最終比になるように、PBMCを $100 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ ($5 \times 10^5/\text{ウェル}$) でプレートに添加した。エフェクターおよび標的を培地単独に添加して、バックグラウンド死滅を測定した。 ^{51}Cr 標識化Jurkat細胞を培地単独に添加して ^{51}Cr の最大放出を測定し、5% NP40 (#28324, Pierce, Rockford, IL) を含む培地に添加して ^{51}Cr の自然放出を測定した。プレートを5% CO₂中、37 度で5時間インキュベートした。次に、各ウェルの上清 $50 \mu\text{l}$ をLumaPlate-96 (#6006633, Perkin Elmer, Boston, MA) に移し、室温で一晩乾燥させた。朝、Packard TopCount-NXTを用いて放射能放出を測定した (cpm)。特異的死滅パーセントを次のように((サンプル - cpm 自然放出)/(cpm 最大放出 - cpm 自然放出)) × 100として計算した。単位はすべてcpmであり、サンプルは四重反復試験サンプルの平均値であった。図4に示された結果は、PIMS分子 (W0001) がJurkat細胞死を誘導または媒介したことを見ている。

【0260】

(実施例6)

CD3+リンパ球結合アッセイ

また、CD3+リンパ球へのW0001 PIMSのようなPIMS分子の特異的結合性を評価するために結合試験を行った。試験のデザインは、フィコエリトリンコンジュゲート化ネズミ科動物抗CD3+抗体でリンパ球調製物のCD3+画分を標識することと、PIMSおよびSMIPの定常サブ領域に結合可能なFITC標識化ヤギ抗ヒト二次抗体を用いて、これらの細胞に結合するPIMS、SMIP、またはバックグラウンドを検出することと、を含む。

【0261】

実験を行う際、末梢血単核細胞 (PBMC) をヒトドナーから取得した。Lymphocyte Separation Media (MP Biomedicals) を用いて遠心分離によりヘパリン処理全血からPBMCを単離し、RPMI培地 (Gibco) で2回洗浄し、そして染色培地 (PBS w/2.5%マウス血清/2.5%ヤギ血清) 中に 8×10^6 細胞/mlで再懸濁させた。試薬サンプル (2E12 SMIP、W0001(2E12 PIMS)) をアッセイにおける最終濃度の2倍の濃度で染色培地に添加し、4倍希釈シリーズを行った。そのように処理された試薬サンプルを1ウェルあたり60マイクロリットルで96ウェルV底プレート (Falcon) にプレーティングし、そして培地単独を対照ウェルに添加した。適切な量のPBMCを傍に置いて、PEコンジュゲート化抗CD3 (BD Pharmingen) をこの試薬が $10 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ に等しくなるようにこれら細胞に添加した。次に、PE (フィコエリトリン) 抗CD3抗体で染色された細胞を、試薬サンプル (SMIP、PIMS) または培地を含有するウェルに $60 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ で添加した。細胞を暗所中、氷上で45分間インキュベートした。次に、冷PBSを用いてプレートを遠心分離により2.5回洗浄した。(2.5回洗浄という表現は、実際には、3回の洗浄を含む。すなわち、当技術分野では当然のことであろうが、1回の洗浄は、最初の遠心分離の前にPBSの全量の半分をサンプルに添加することを含み、それに続く2回の洗浄は、それぞれ、BSの全量を添加することを含む)。次に、FITC (フルオレセイン

10

20

30

40

50

イソチオシアネート) -F'2ヤギ抗ヒトIgG(Caltag)の1:100希釈液を50 μlの染色培地でウェルに添加した。細胞を暗所中、氷上で45分間インキュベートした。次に、細胞を冷PB Sで2.5回洗浄し、1%パラホルムアルデヒド(USB Corp)で固定し、4℃で一晩貯蔵し、翌日、FACsCalibur Flow Cytometerで読み取ってCell Questソフトウェア(Becton Dickinson)を用いて分析した。図5中に提供される結果から、CD3+リンパ球に関連する平均蛍光強度がW0001(2E12 PIMS)または2E12 SMIPのいずれについてもその濃度の増加に伴って増加することが確認される。したがって、蛍光強度は、人為的な読みでなく、CD3+リンパ球への2E12 PIMSの結合を反映していることから、PIMSタンパク質構造の機能的有用性がさらに確認される。

【0262】

10

(実施例7)

結合競合

B細胞への結合に関して、TRU-016、抗CD37 SMIPと競合する抗CD37 PIMSの能力を測定するために、結合試験を行った。10mLのRAMOS細胞を 2×10^6 細胞/mLの濃度になるようにTSA/FBS(0.5% FBSを含む1×TSA-50mM Tris HCl pH7.8、0.9% NaCl)中で再懸濁させた。この細胞懸濁液100 μlを200,000細胞/ウェルになるように96ウェルU底プレートの個々のウェルに添加した。プレートを遠心分離して細胞をペレット化し、TSA/FBSを除去した。競合タンパク質の希釈を希釈プレート中であらかじめ行った。競合タンパク質の開始濃度は1.0 μMであり、タンパク質は逐次3倍希釈した。100 μlの希釈された競合タンパク質をU底プレートのウェルに添加した。100 μLの12nM TRU-016-Eu(ユウロピウム標識化TRU-016)を各ウェル中の100 μLの競合タンパク質および細胞に添加し、各ウェルで6nM TRU-016-Euの最終濃度を得た。タンパク質および細胞を4℃で30分間インキュベートした。処理細胞を200 μLのTSA/FBSで3回洗浄した。細胞を200 μLの強化溶液中に再懸濁させ、黄色の96ウェルプレートに移し、5分間振盪し、次に、EnVision-プレートリーダー(PerkinElmer, Waltham, MA)で読み取った。結果を図9に示す。結果から示されるように、PIMSリンカーの長さ(10~25アミノ酸長を検査した)にかかわらず、かつPIMSリンカー(のタイプH7またはH65)にかかわらず、種々のPIMS分子はいずれもその濃度が増加するにつれてTRU-016-Euと置き換わる。データから、さまざまなPIMSリンカーは、CD37に結合するさまざまなPIMSにより実証されるように機能的であり、H65構造に基づくPIMSリンカーを含有するPIMSは、免疫グロブリンヒンジ領域に由来するH7リンカーに基づくPIMSリンカーを含有するPIMSよりも良好に結合することが確認される。

20

30

30

【0263】

(実施例8)

PIMSのそのほかの結合試験

A. WI12-S細胞への抗CD20 PIMSの結合

WI12-S B細胞結合試験では、100 μg/mlのPIMSを使用した。簡潔に述べると、図6に示されるように、1ウェルあたり 5×10^5 個のWI12-S B細胞を、分子(たとえば、PIMSまたはSMIP)のそれと共に、FACS緩衝液(1×PBS、1%ウシ胎仔血清、0.02%アジュバントリウム)中、氷上でインキュベートした。フィコエリトリシン(PE)(Jackson Immunoresearch # 109-116-098)にコンジュゲートされたヤギ抗ヒトIgG(ガンマ特異的)を用いて、FACS緩衝液中、1:100希釈で結合を検出した。CellQuestソフトウェアを用いてFACsCaliburによる一色フローサイトメトリーにより結果を分析した。WI12-S細胞への抗CD20 PIMSの結合を評価するほかに、表面上にCD20を発現するWI12-S細胞への抗CD20 SMIPの結合をも評価した。以上で述べたように、SMIP分子またはPIMS分子のFc部分を認識して図6に示されるように蛍光シグナル(幾何平均として表される)を誘起する蛍光標識化二次抗体を用いて、結合の検出を達成した。その図では、2Lm20-4sccは、DNE076としても知られるLH SMIPであり、2Lm20-4HL17は、17アミノ酸のgly4serリンカーを有するHL SMIPであり、DNE079としても知られ、2Lm20-4HL12は、12アミノ酸のgly4serリンカーを有するHL SMIPであり、DNE078としても知られ、PIMS20-17は、W0009としても知られ、PIMS20-12は、W0008としても知られる。

40

50

【0264】

図6に示される結果から明らかなように、より高濃度のタンパク質は、飽和結合（シグナルのプラトー）に達しうるより大きい結合に相当する増強されたシグナルを呈した。タンパク質濃度の関数として達成されたシグナルのレベルおよびシグナルのグラフの勾配は両方とも、結合強度および親和性の指標である。これらのデータにより示されるように、より低い濃度では、CD20指向性PIMSは、CD20指向性SMIPのほとんどと比較してそれほど十分に結合しないが、より高い濃度では、PIMSのシグナルは、SMIPのシグナルを上回る。飽和度は、PIMS分子では、同一のCD20結合性ドメイン（2Lm20-4）および構成（VHVL）を有するSMIPと比較してその約2倍である。それに加えて、gly4serリンカーの長さ（12または17）は、HL SMIPの結合に影響を及ぼしたが（黒丸／三角）、PIMSでは両方のリンカー型で類似の結合パターンを示した（白三角／菱形）。 10

【0265】

B. WiI2-S細胞への抗DR PIMSの結合

また、WiI2-S B細胞に結合する抗DR PIMS分子の能力を評価するために、結合試験を行った。対象のタンパク質の適切な置換を行って、以上に記載の結合アッセイを使用した。簡潔に述べると、500,000個のWiI2-S細胞をマルチウェルプレートの各ウェルに配置し、FACS緩衝液（1×PBS、1% FBS、0.02%アジ化ナトリウム）中、氷上で、試験対象のPIMSまたはSMIPの1つと共にインキュベートした。FACS緩衝液中でPEコンジュゲート化ヤギ抗ヒトIgG（ガンマ特異的）二次抗体（Jackson Immunoresearch #109-116-098）の1:100希釈液に細胞を暴露した後、フィコエリトリンの検出を達成した。図7に示される結果から、抗DR PIMS分子の結合は、PIMSリンカーに強く依存することがわかる。H7リンカーを有する抗DR PIMSであるW0035は、最小の結合活性を有する。H62リンカーを有する他の抗DR PIMSであるW0036は、W0035よりも良好に結合する。H65リンカーを含有するW0056は、親の抗DR SMIP（M0019）に匹敵する最良の結合活性を呈した。 20

【0266】

C. Ramos細胞への抗CD37 PIMSおよび抗CD19 PIMSの結合

他方の結合試験により、Ramos B細胞に結合するマウス抗CD37 PIMSおよび抗CD19 PIMSの能力を評価した。以上の一般的な記載および実施例5の記載と同じようにアッセイを行った。その結果を図9に示す。この実験での試験対象のタンパク質は、aHer2（抗Her2）であった。Her2）、TRU-016（抗CD37 SMIP）、W0028（マウス抗CD37 PIMS）、W0029（半ヒト化抗CD19 SMIP）、W0030（マウス抗CD19 PIMS、およびW0031（異なるマウス抗CD19 PIMS）に関連する開示について、実施例12を参照されたい。各タンパク質ごとに、16.7 μg～0.01 μgにわたる範囲で3:1逐次希釈液を調製した。図9の結果に示されるように、TRU-016 SMIPおよびW0028は、タンパク質の濃度が0.01 μg/mlから増大すると、他のPIMSまたはaHer2よりも有意に多くの量で結合するが、図9ではまた、試験した種々のPIMSタンパク質がそれらの標的に結合したことが確認される。 30

【0267】

D. Jurkat T細胞への抗CD28 PIMSの結合

Jurkat T細胞への抗CD28 PIMSの結合についても調べた。さまざまな抗CD28 PIMSタンパク質、すなわち、W0001（H7 PIMSリンカーを有する抗CD28 PIMS）、W0050（H9 PIMSリンカーを有する抗CD28 PIMS）、W0051（H47 PIMSリンカーを有する抗CD28 PIMS）、W0052（H56 PIMSリンカーを有する抗CD28 PIMS）、W0053（H62 PIMSリンカーを有する抗CD28 PIMS）、W0083（H65 PIMSリンカーを有する抗CD28 PIMS）、および抗CD28 SMIPを分析した。この結合試験を行うために、以上に述べたタンパク質のそれぞれについて、10 μg/mlから5ng/mlまでのさまざまな濃度で50 μlのタンパク質溶液をV字形96ウェルプレートのウェルに個別に添加した。次に、50 μl中 2.5×10^5 個のJurkat細胞を各ウェルに添加した。次に、サンプルを氷上で30分間インキュベートし、PBS中1% BSAで2回洗浄し、そして、PBS中1% BSAで抗ヒトIgG PEの1:200希釈液を添加した。プレートを氷上でさらに30分間インキュベートし、PBS中1% BSAで1回洗浄した。細胞をPBS中2%ホルムアルデヒドに再懸濁させた。Facscanを用いて各ウェル中の結合の平均蛍光強度を測定した。 40 50

【0268】

抗CD28 PIMSおよびJurkat T細胞が関与する結合試験の結果を図10に示す。特定のPIMSリンカーにかかわらず、抗CD28 PIMSはすべて、同等の結合活性を呈した。PIMSリンカーは、Jurkat細胞に結合する抗CD28 PIMSに影響を与えるようには見えなかった。これは、抗DR PIMS結合の場合と異なるが、結合は、使用されるscorpionリンカーのタイプにより、強く影響される。

【0269】

E. CD16へのPIMS定常サブ領域の結合

また、F_cレセプターF_c RIIIaおよびF_c RIIIbとして同定されるCD16を用いて、PIMS分子の定常サブ領域の結合試験を行った。CD16は、IgG抗体のFc領域に結合する。CD16へのPIMSの結合性を評価するために、低親和性CD16を利用した。アッセイを行うために、Ramos細胞を350,000細胞/ウェルで細胞培養物ウェルに添加した。TRU-016(抗CD37 SMIP)および抗CD37 PIMS分子を含む対象のタンパク質の溶液を0.011 μg/ウェルから1.2 μg/ウェルまでの範囲の濃度で添加した。CD16を1 μg/ウェルになるように添加した。次に、反応混合物を200 μl FACS緩衝液(1×PBS、1% FBS、0.02%アジ化ナトリウム)で2.5回洗浄した。次に、フィコエリトリン(PE)にコンジュゲートされた1:100希釈のヤギ抗マウス(Jackson Immunoresearch # 115-116-071)を添加し、混合物を氷上で45分間インキュベートした。続いて、反応混合物をFACS緩衝液で1.5回洗浄し、そして分析に付した。CD16lo(低親和性CD16)結合データを表9に示す。

【表9】

表9

幾何平均
MFI

サンプル濃度 (ug/ml)	TRU016	W0012	W0023	W0024	W0025	W0094	W0095	W0096	W0097
24	157.72	119.99	75.33	145.82	124.11	77.19	85.82	65.36	64.89
8	227.94	69.76	41.97	102.88	81.76	105.02	89.6	99.77	96.44
2.67	228.76	30.74	17.71	44.38	32.29	98.89	59.99	93.57	97.8
0.89	214.19	11.73	6.67	16.38	10.27	52.42	24.32	43.65	54.55
0.3	143.31	4.25	2.86	5.17	3	16.69	5.1	11.53	20.39
0.1	57.46	2.25	1.7	2.03	1.61	3.88	1.64	2.71	6.12
0.033	21.75	1.59	1.45	1.49	1.31	1.57	1.36	1.46	2.02
0.011	7.41	1.34	1.38	1.33	1.42	1.28	1.19	1.25	1.61

【0270】

抗CD37 PIMS分子および対照に結合するCD16loが関与する結合試験の結果のグラフ図を図11に示す。

【0271】

広範にわたるさまざまなPIMSリンカーを有するPIMSを含む、分析に付された抗CD37 PIM Sはすべて、TRU-016(抗CD37 SMIP)と比較して低いCD16結合を示した。これらの知見は、以下の実施例9に記載のADCCアッセイの結果と一致する。

【0272】

(実施例9)

PIMSのADCC活性

PIMSにより誘導または媒介される抗体依存性細胞傷害(ADCC)を評価するために、ADCCアッセイを行った。簡潔に述べると、10% FBS (#16140-071, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY)を含むIscoves培地(#12440-053, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY)中、37℃で、1×10⁷細胞/ml BJAB B細胞を、500 μCi/ml ⁵¹Crクロム酸ナトリウム(#CJS1, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)で2時間標識した。次に、10% FBSを含むRPMI (#11875-093, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY)培地で⁵¹Cr担持BJAB B細胞を3回洗

10

20

30

40

50

浄し、そしてRPMI中に 4×10^5 細胞/mlで再懸濁させた。Lymphocyte Separation Medium (#50494, MP Biomedicals, Aurora, OH)を用いて遠心分離により、社内のドナー由来の末梢血単核細胞(PBMC)をヘパリン処理全血から単離し、RPMI培地で2回洗浄し、10% FBSを含むRPMI中に 5×10^6 細胞/mlで再懸濁させた。10% FBSを含むRPMI培地に最終濃度の4倍で試薬サンプルを添加し、各試薬の3つの10倍逐次希釈液を調製した。次に、指示最終濃度が達成されるように、これらの試薬を50 μl/ウェルで96ウェルU底プレートに添加した。次に、 ^{51}Cr 標識化BJAB細胞を50 μl/ウェル(2×10^4 細胞/ウェル)でプレートに添加した。

【0273】

次に、25:1エフェクター(PBMC) : 標的(BJAB)の最終比になるように、PBMCを100 μl/ウェル(5×10^5 細胞/ウェル)でプレートに添加した。エフェクターおよび標的を培地単独に添加して、バックグラウンド死滅を測定した。 ^{51}Cr 標識化BJAB B細胞を培地単独に添加して ^{51}Cr の最大放出を測定し、5% NP40 (#28324, Pierce, Rockford, IL)を含む培地に添加して ^{51}Cr の自然放出を測定した。プレートを5% CO₂中、37 °Cで6時間インキュベートした。次に、各ウェルの上清50 μlをLumaPlate-96 (#6006633, Perkin Elmer, Boston, Mass.)に移動し、室温で一晩乾燥させた。朝、Packard TopCount-NXTを用いてcpmを読み取った。特異的死滅パーセントを次式：((サンプルのcpm(サンプルの四重反復試験セットの平均) - cpm自然放出)/(cpm最大放出-cpm自然放出)) × 100に従って計算した。結果を図12に示す。この結果から明らかなように、試験したタンパク質、すなわち、2Lm20-4(ヒト化抗CD20 SMIP)、W0008(10アミノ酸のPIMSリンカーを有する抗CD20 PIMS)、およびW0009(15アミノ酸のPIMSリンカーを有する抗CD20 PIMS)のそれぞれについて、タンパク質濃度が0.01 μg/mlから10 μg/mlまで増加すると、特異的に死滅するBJAB B細胞のパーセントが一般に約40%から約58%に増加する。予想どおり、培地対照は、細胞死滅をほとんど示さなかった。

【0274】

Jurkat T細胞のADCC媒介性死滅を誘導する抗CD28 PIMS分子の能力を以上に記載のADCCアッセイで評価した。結果を図13に示す。この結果から明らかなように、W001、抗CD28 PIMSは、そのタンパク質の濃度が増加するにつれて、2つの抗CD28 SMIP分子(2E12 Igもしくは2E12 N297D Igの形態のその変異体)または培地単独のいずれで見いだされたよりも大きいJurkat T細胞の特異的死滅パーセントをもたらした。

【0275】

BJAB B細胞のADCCを誘導する抗DR PIMSの能力を決定するために、類似のADCCアッセイを行った。以上に記載したようにアッセイを再び行った。その結果を図14に示す。リツキシマブは、試験したすべての濃度で特異的細胞死滅の最高パーセントを示し、特異的に死滅した細胞のパーセントは、タンパク質の濃度の増加に伴って増加した。同様に、M0019、抗DR SMIP(H7リンカー領域を有する)は、高レベルの特異的細胞死滅を示し、死滅細胞のパーセントは、タンパク質濃度を増加させることに増大した。抗DR PIMSはまた、PIMSタンパク質のパーセントを0.2nMから20nMまで増加させたとき死滅細胞のパーセントの増加を伴って特異的細胞死滅を示した。W0056、抗DR PIMS(H65 PIMSリンカーを含有する)は、試験したすべての濃度でどの抗DR PIMSよりも大きい最高レベルの特異的細胞死滅を呈した。W0036(H62 PIMSリンカーを有する抗DR PIMS)は、W0056と同様に、適合PIMS濃度を20から200nMに増加させたとき、特異的細胞死滅パーセントの減少を示した。これとは対照的に、W0035(H7 PIMSリンカーを有する抗DR PIMS)は、PIMS濃度が0.2から20nMに増加するとともに、特異的に死滅する細胞のパーセントの劇的な増加を呈し、次に、濃度が20nMを超えて200nMに増加すると、死滅細胞のパーセントはほぼプラトー状態になった。結果からわかるように、H65 PIMSリンカーを有するPIMSに帰属しうる範囲の上端とH7 PIMSリンカーを有するPIMSに帰属しうる範囲の下端とを有する抗DR PIMSは、20nMのPIMS濃度でBJAB B細胞の42~58%のADCC媒介性細胞死を誘導することが可能である。

【0276】

また、BJAB B細胞のADCC媒介性細胞死を誘導する抗CD37 PIMSの能力を評価するために、以上に記載のADCCアッセイを行った。このアッセイでは、2つのPIMS(W0012およびW009

10

20

30

40

50

4) をTRU-016(抗CD37 SMIP)と比較した。W0012は、H7 PIMSリンカーを有する抗CD37 PIMSである。W0094は、H65 PIMSリンカーを有する抗CD37 PIMSである。同様にこのアッセイで評価したのは、陽性対照としてのリツキシマブおよび陰性対照としての培地単独であった。結果から示されるように、両PIMSは、図15に示されるごとくSMIPよりも低いADCC活性を有していた。本明細書中に開示される結合試験では、W0094は、W0012よりも良好に結合したが、W0094は、抗DR PIMSに関して以上に開示された結果とは異なり、W0012よりも大きいADCCを誘導する能力を示さず、一方、H65 PIMSリンカーを有する抗DR PIMSは、H7 PIMSリンカーを有する抗DR PIMSよりも常に大きいADCC活性を示した。

【0277】

(実施例10)

PIMSのCDC活性

補体依存性細胞傷害(CDC)は、B細胞のような真核生物(たとえば哺乳動物)細胞が死滅する他の機序を提供する。特異的標的結合を呈するこれらの一本鎖分子が、表面上にPIMS結合性パートナーを発現するB細胞のように、標的細胞のCDCを誘導または媒介することが可能であるかを調べるために、PIMSのCDC活性を探究した。CDC活性を評価するために、1ウェルあたり $5 \sim 2.5 \times 10^5$ 個のRamos B細胞を50 μlのIscoves (#12440-053, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) 培地(FBSなし)で96ウェルV底プレートに添加した。アッセイに付したタンパク質は、2Lm20-4(ヒト化抗CD20 SMIP)、TRU-015(抗CD20 SMIP)、W008(10アミノ酸PIMSリンカーと共にHL配置構成の結合性ドメインを有するPIMS)、W0009(15アミノ酸PIMSリンカーと共にHL配置構成の結合性ドメインを有するPIMS)、および陰性対照としての培地単独であった。個別に、Iscoves中のこれらの各タンパク質(またはIscoves単独)を指示最終濃度の2倍の濃度で50 μlでウェルに添加した。細胞および試薬を37℃で45分間インキュベートした。FBSを含まないIscoves培地で細胞を2 1/2回洗浄し、指示濃度で96ウェルプレート中でヒト血清(#A113, Quidel, San Diego, CA)を含むIscoves中に再懸濁させた。次に、細胞を37℃で90分間インキュベートした。細胞を遠心分離により洗浄し、125 μl冷PBS中に再懸濁させた。細胞をFACクラスターーチューブ(#410, CoStar, Corning, NY)に移し、ヨウ化プロピジウム(#P-16063, Molecular Probes, Eugene, OR)を含む125 μl PBSを5 μg/mlで添加した。細胞をヨウ化プロピジウムと共に暗所中、室温で15分間インキュベートし、次に、氷上に配置し、CellQuestソフトウェア(Becton Dickinson)を備えたFACsCaliburを用いて読み取りおよび分析を行った。

【0278】

結果を図16に示す。図から明らかなように、タンパク質の濃度が増加するにつれて、2つのSMIPのそれぞれのCDC活性は、0.2 μg/mlタンパク質での約5% PI陽性細胞から20 μg/mlでの約88% PI陽性細胞まで増加した。また、2つのPIMS分子は、0.2 μg/mlで約5% PI陽性細胞を示したが、20 μg/mlで約69% PI陽性細胞に増大させた。誘導されるCDC活性のレベルの尺度となるPI陽性細胞のパーセントは、試験したすべての濃度で2つのPIMS分子について実質上同一の状態が保持されたことから、10~15アミノ酸のPIMSリンカーは、CDC誘導に対して同じように機能することが示唆される。

【0279】

(実施例11)

PIMSによる細胞増殖阻害

以上の実施例により、PIMS分子は、ADCCおよび/CDCにより細胞死を誘導するのに有用であることが確認された。それに加えて、PIMS分子は、真核細胞の増殖を阻害するのに有用である。PIMS分子のこの性質を確認するために、10% FCS(Gibco/Invitrogen #01-40200J, Grand Island, NY)を含むRPMI 1640(Gibco Invitrogen #11875, Grand Island, NY)を用いて、図17に示される最終濃度の4倍の濃度になるように、種々のPIMSタンパク質、SMIPタンパク質、および他の対照の4倍希釈液を調製した。SU-DHL-6 B細胞(DMSZ # ACC 572, Braunschweig, Germany)を、 2×10^5 細胞/mlの濃度になるように、10% FCSを含むRPMI中に懸濁させた。黒色の96ウェル平底プレートをアッセイに使用し、所要により、200マイクロリットルの最終ウェル体積になるように培地をウェルに添加した。次に

10

20

30

40

50

、細胞を50マイクロリットル/ウェル (10^4 細胞/ウェル) で添加した。次に、対象のタンパク質を50マイクロリットル/ウェルでウェルに個別に添加した。培地中のFab'2ヤギ抗マウスIgG (GAM; Jackson Immunoresearch Labs #115-006-062, West Grove, PA) またはFab'2ヤギ抗ヒトIgG (GAH; Jackson Immunoresearch Labs #109-006-008, West Grove, PA) の架橋性溶液を調製した。対象のタンパク質の濃度の3倍の架橋剤の最終濃度が得られるように、4倍希釈液を調製した。次に、これらのタンパク質をウェルに個別に添加した。ただし、ヤギ抗ヒト二次抗体をPIMおよびSMIPと共にウェルに添加し、ヤギ抗マウス二次抗体をモノクローナル抗体とにウェルに添加した(図17参照)。プレートを5% CO₂中、37℃で72時間インキュベートした。

【0280】

10

ATP放出に及ぼす種々の対象のタンパク質の影響をATPlite (Perkin Elmer # 6016943, Waltham, MA) により測定した。各サンプル中に存在するATPに比例するように光を発する基質溶液を利用して、製造業者により推奨されるとおりに、これらの細胞傷害性試験を行った。簡潔に述べると、哺乳動物細胞溶解緩衝液を添加して細胞を溶解させ、続いて、基質溶液を添加した。各ウェル中で生成される光量をTopCountR Microplate Scintillation and Luminescence Counter (Perkin Elmer, Waltham, MA) で測定した。図17に示される結果は、四重反復試験サンプルの平均および標準偏差として表されている。結果からわかるように、PIMS(またはSMIP)濃度が0.03 μg/mlから0.5 μg/mlまで増加するにつれて、DHL-6 B細胞の増殖阻害は、同一のタンパク質濃度で試験されたモノクローナル抗体で見られたより穏やかな増殖阻害と対比して劇的に増加する。したがって、PIMSは、細胞増殖を阻害する能力を呈する。

20

【0281】

(実施例12)

抗Her2 PIMS

Her2(neu、ErbB-2、およびERBB2としても知られる)は、侵攻性乳癌に関連するタンパク質である。このタンパク質は、ErbBタンパク質ファミリーまたは表皮増殖因子レセプターファミリーのメンバーである。それは、通常、シグナルransduction経路に関与して細胞の増殖および分化を引き起こす細胞膜表面結合レセプターチロシンキナーゼであり、それは、乳癌、卵巣癌、胃癌などの治療のような抗癌治療の標的になるとみなされてきた。Her2を特異的に認識するPIMS分子は、Her2を高レベルで発現する細胞すなわち癌細胞に、PIMSのADCC、CDC、および増殖阻害性をターゲッティングすることが期待されよう。

30

【0282】

Her2を認識するPIMSの能力を評価するために、抗Her2 PIMS、およびHer2を発現するSKBR3乳癌細胞に適切に置き換えて、実施例5および6に記載のプロトコルを用いて結合アッセイを行った。結果を図18に示す。結果から示されるように、Her033smip(すなわち、抗Her2 SMIP)は、タンパク質濃度が0.0046 μg/mlから10.0000 μg/mlまで増加するにつれて、平均蛍光強度の劇的な増加を呈した。3つの抗Her2 PIMS分子W042、W044、およびW045を用いた場合、それほど劇的ではないが、それでもなお、タンパク質濃度が増加するにつれて、平均蛍光強度の有意な増加が見られた。W041 PIMSは、SKBR3細胞上のHer2に結合するには見えなかった。データから、抗Her2 PIMS分子は、SKBR3細胞の表面上のHer2に結合することが実証される。

40

【0283】

SKBR3細胞を用いて得られた結果はまた、Her2 PIMSを他方の乳癌細胞系のMDA-MB453細胞系に暴露したときにも見いだされた。対象のタンパク質および細胞に適切に置き換えて、以上ならびに実施例5および6に記載のプロトコルに従った。結果を図19に示す。結果から示されるように、Her033、抗Her2 SMIPのときの平均蛍光強度は、タンパク質濃度の増加に伴って急速に増加し、次に、2.222~20.000 μg/mlでプラトー状態になった。W0042およびW0057 PIMS分子もまた、タンパク質濃度の増大に伴う平均蛍光強度の顕著な増加から明らかなように、MDA-MB453細胞への結合の有意な増加を示した。PIMS結合に関しては、

50

プラトーは見られなかった。予想どおり、対照は、試験したすべての濃度にわたり観測された最小平均蛍光強度により示されるような無視しうる結合を呈した。

【0284】

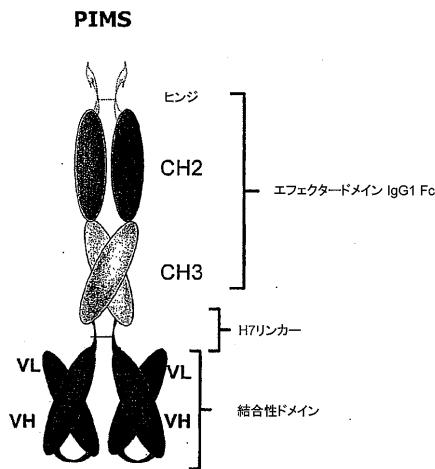
多数の乳癌細胞系上に提示されるHer2へのPIMS分子による結合から示唆されるように、PIMSは、癌、たとえば、限定されるものではないが、乳癌、卵巣癌、および胃癌のような、Her2の発現または過剰発現に関連する癌の診断、予後判定、および治療に有用であろう。より一般的には、癌マーカーを標的にするPIMSは、有用な診断剤、予後判定剤、および治療剤であることが期待される。

【0285】

エフェクター機能を有する特異的結合性タンパク質の構造上の特性の変化については、
本開示内容を精査すれば当業者には明らかであろう。また、そのような変化構造は本発明
の範囲内にある。

10

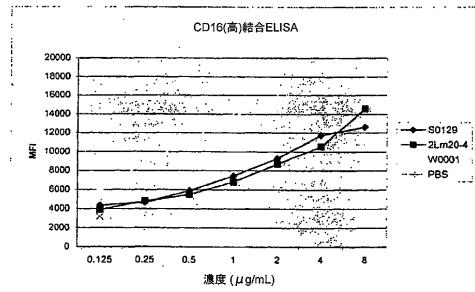
【図1】



【図2】

CD16(高)データ (30分間読み取り)				
	S0129	2Lm20-4	W0001	PBS
0.125	4332.091	3900.822	6200.239	3159.28
0.25	4680.122	4827.506	8801.978	
0.5	5699.813	5509.538	11231.53	
1	7471.331	6845.705	13753.33	
2	9314.948	8722.129	15724.54	
4	11747.45	10542.34	16995.64	
8	12628.235	14571.1	17739.22	

PBS陰性対照 - 3つのウェルの平均値
2948.251 | 3015.527 | 3514.082

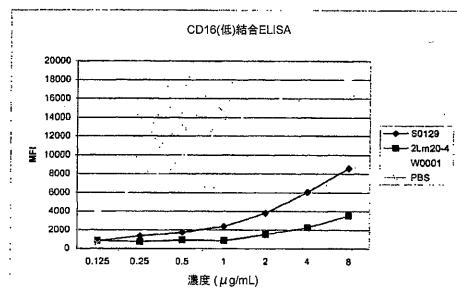


【図3】

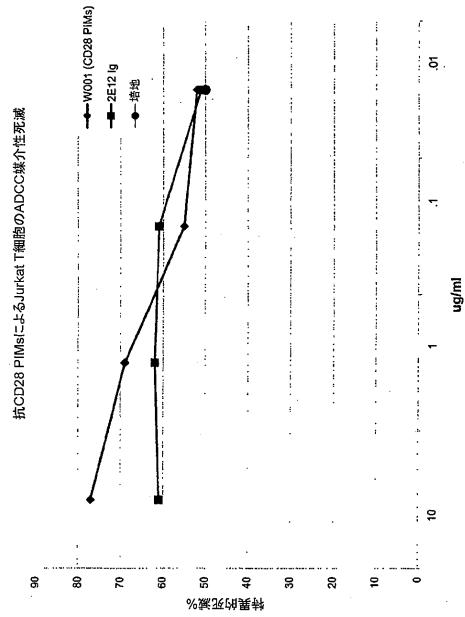
CD16(低)データ (30分間採取)				
S0129	2Lm20-4	W0001	PBS	
0.125 844.192	870.616	4336.849	615.245	
0.25 1349.737	737.392	6775.06		
0.5 1734.488	927.225	9742.545		
1 2387.618	870.672	12055.27		
2 3918.847	1526.304	15307.14		
4 6051.314	2248.092	17132.39		
8 6610.13	3552.533	18054.67		

PBS陰性対照 -3つのウェルの平均値

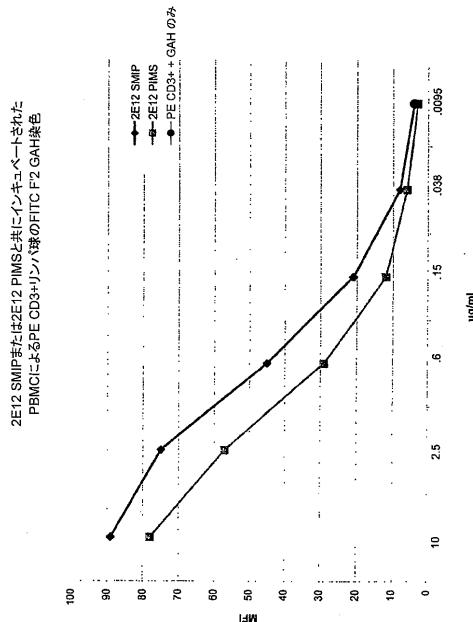
562.574 610.928 672.233



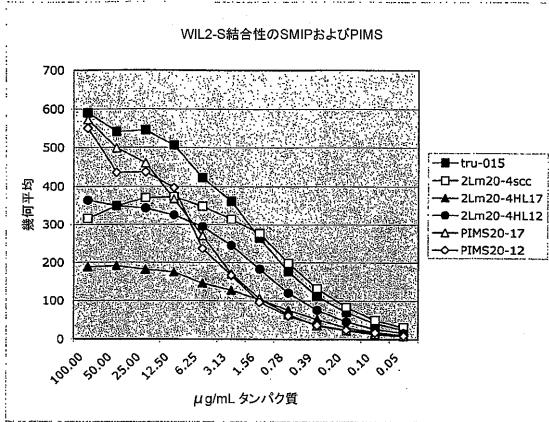
【図4】



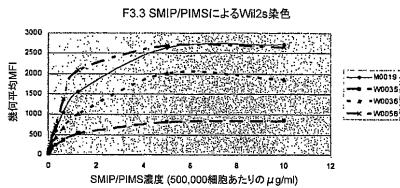
【図5】



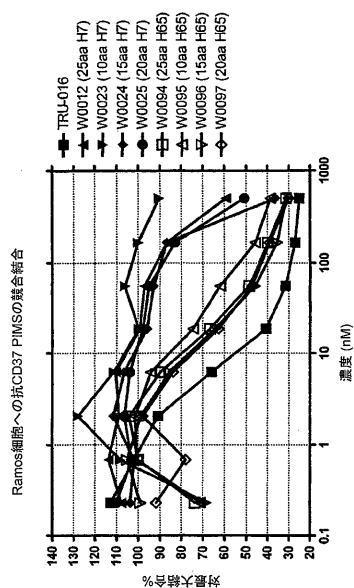
【図6】



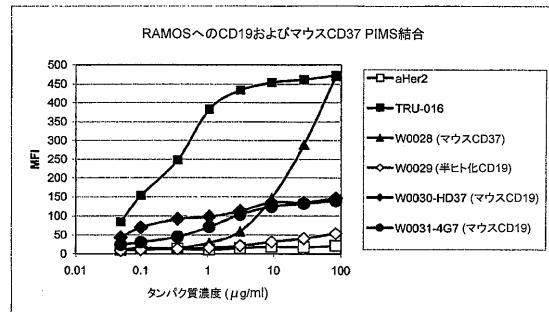
【図7】



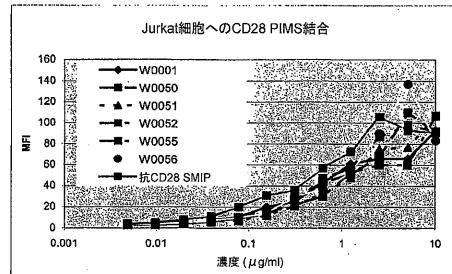
【図 8】



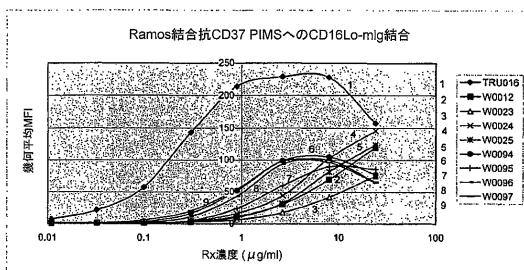
【図 9】



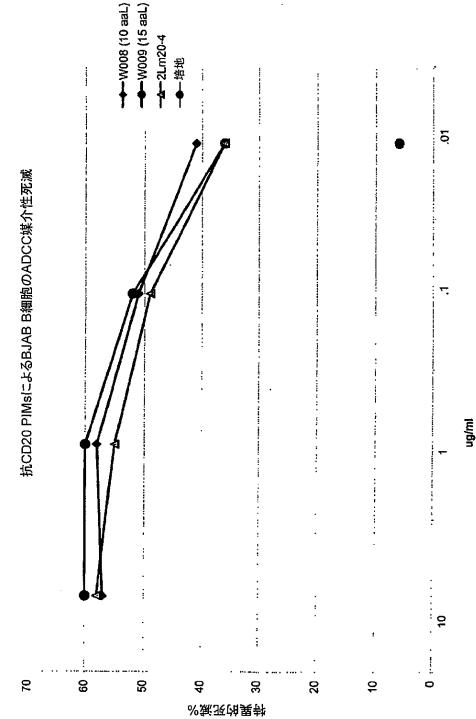
【図 10】



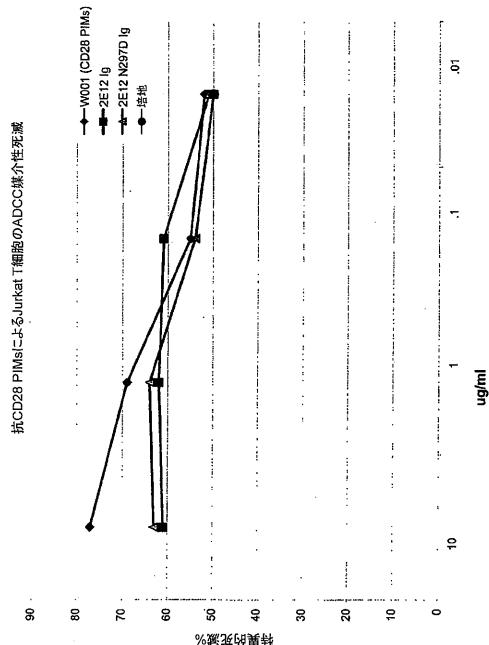
【図 11】



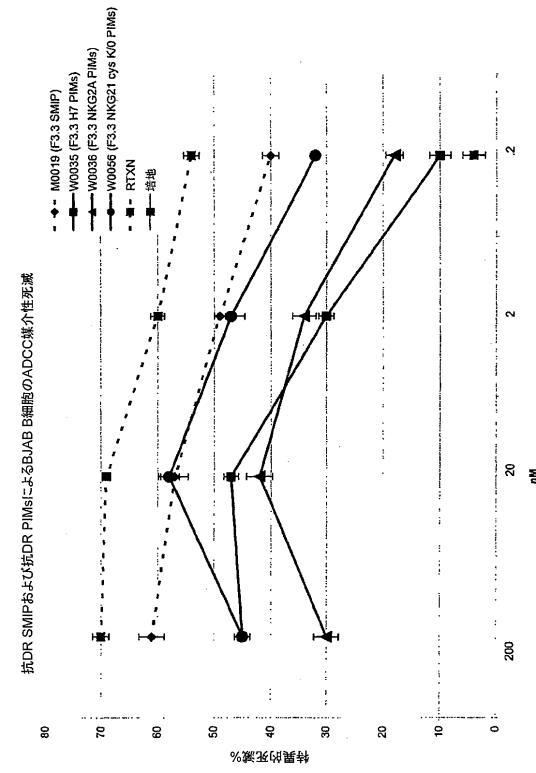
【図 12】



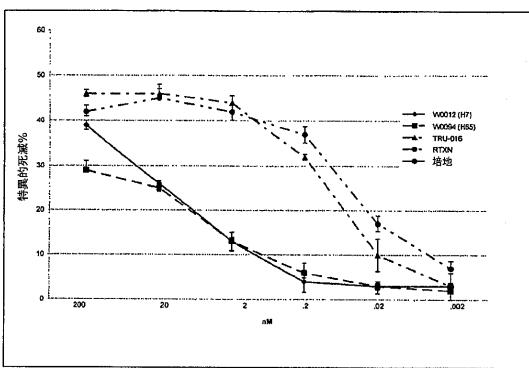
【図 1 3】



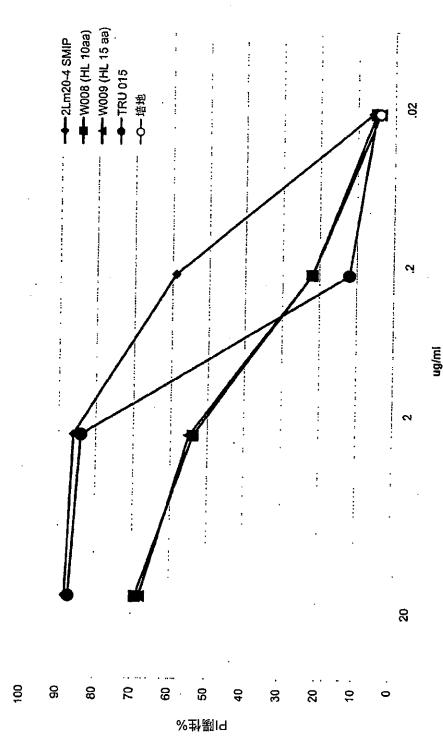
【図 1 4】



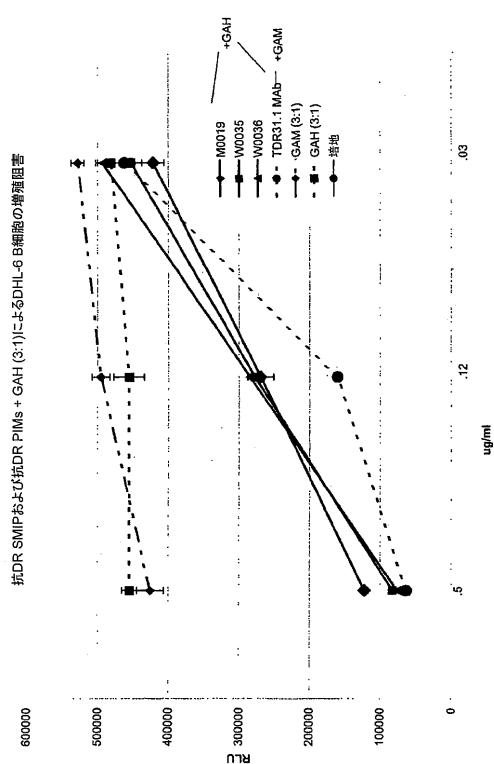
【図 1 5】



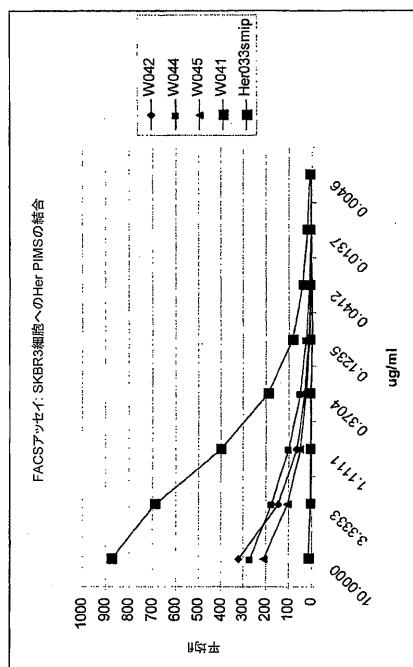
【図 1 6】



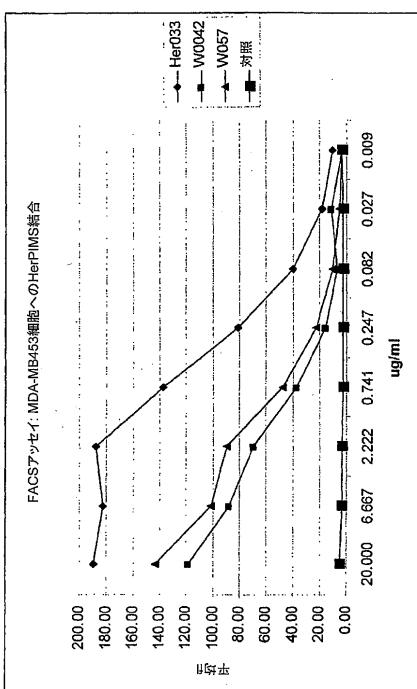
【図17】



【図18】



【図19】



【配列表】

2010532764000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2008/069378
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/395		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2007/146968 A (TRUBION PHARMACEUTICALS [US]; THOMPSON PETER ARMSTRONG [US]; LEDBETTER) 21 December 2007 (2007-12-21) claims 1,38,41; sequence 195	1-31
X	US 2003/118592 A1 (LEDBETTER JEFFREY A [US] ET AL) 26 June 2003 (2003-06-26) claims 1,3,23,58-61	1-3,5, 7-9, 16-20, 23-31 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report	
23 September 2009	01/10/2009	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Bochelen, Damien	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2008/069378

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	COLOMA M J ET AL: "DESIGN AND PRODUCTION OF NOVEL TETRAVALENT BISPECIFIC ANTIBODIES" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 15, no. 2, 1 February 1997 (1997-02-01), pages 159-163, XP000647731 ISSN: 1087-0156 the whole document	1-31
A	WO 2007/011363 A (TRUBION PHARMACEUTICALS INC [US]; LEDBETTER JEFFREY A [US]; HAYDEN-LED) 25 January 2007 (2007-01-25) the whole document	1-31

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

International Application No. PCT/US2008 /069378

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**Continuation of Box II.2**

Claims Nos.: -

The present claim 1 relates to an extremely large number of possible compounds. Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is to be found however for only a very small proportion of the compounds claimed, see claim 14 and Table 7. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claim 1 (PCT Guidelines 9.19 and 9.23).

The search of claim 1 was restricted to those claimed compounds which appear to be supported in claim 14 and Table 7.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/069378

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/069378

Patent document cited in search report		Publication date		Patient family member(s)		Publication date
WO 2007146968	A	21-12-2007		AU 2007257692 A1 CA 2654317 A1 CL 36232007 A1 EC SP099058 A EP 2041178 A2 KR 20090059104 A US 2009175867 A1		21-12-2007 21-12-2007 08-08-2008 27-02-2009 01-04-2009 10-06-2009 09-07-2009
US 2003118592	A1	26-06-2003	NONE			
WO 2007011363	A	25-01-2007		AU 2005334481 A1 BR PI0514259 A CA 2578613 A1 CN 101124248 A EC SP077315 A EP 1791866 A2 JP 2008509666 T KR 20070041781 A US 2008181892 A1 ZA 200702004 A		25-01-2007 03-06-2008 25-01-2007 13-02-2008 26-04-2007 06-06-2007 03-04-2008 19-04-2007 31-07-2008 26-11-2008

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	(2006.01) A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 29/00	(2006.01) A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06	(2006.01) A 6 1 P 29/00	
		A 6 1 P 37/06

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

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(72)発明者 レッドベター, ジェフリー, エー.

アメリカ合衆国 9 8 1 7 7 ワシントン州, ショアライン, リッジフィールド ロード エヌダ
ブリュ 1 8 7 9 8

(72)発明者 ブラディ, ウィリアム

アメリカ合衆国 9 8 0 2 1 ワシントン州, ボセル, 2 1 9 ティーエイチ プレイス エスタブ
リュ 6 1 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA41 CA07 DA02 DA05 DA12 EA04 GA11 HA03
4B064 AG01 AG27 CA02 CA06 CA10 CA19 CC24 CE10 DA01
4C085 AA13 AA14 BB31 CC22 CC32 DD62
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA22
EA28 FA74 GA21