

(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2008-511337

(P2008-511337A)

(43) 公表日 平成20年4月17日(2008.4.17)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A	4 B 0 2 4
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15		4 B 0 6 4
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19		4 B 0 6 5
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21		4 C 0 8 4
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/00	A	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く

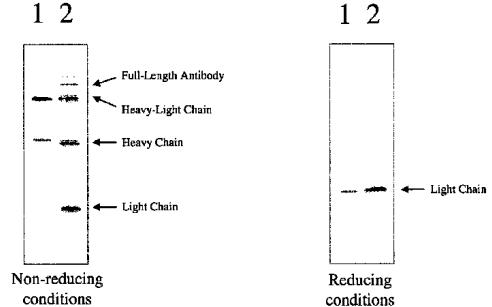
(21) 出願番号	特願2007-530373 (P2007-530373)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・9408 0-4990・サウス・サン・フランシス コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(86) (22) 出願日	平成17年9月1日 (2005.9.1)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成19年5月2日 (2007.5.2)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/031226	(72) 発明者	ヒヤング, アーサー ジェイ. アメリカ合衆国 カリフォルニア 946 10, オークランド, バーク ストリ ート 427 4番
(87) 国際公開番号	W02006/028936		
(87) 国際公開日	平成18年3月16日 (2006.3.16)		
(31) 優先権主張番号	60/607,172		
(32) 優先日	平成16年9月2日 (2004.9.2)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヘテロ多量体分子

(57) 【要約】

本発明はヘテロ多量抗体と、これら抗体を高収率と高純度で製造する方法を提供する。本発明はまたこれら抗体を使用する方法及び組成物を提供する。



Anti-Fab Western Blot Analysis

- 1) knob anti-Fcγ-RIIb (p5A6.11.Knob)
- 2) hole anti-IgE-R (p22E7.11.Hole)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第一軽鎖ポリペプチドと対をなす第一重鎖ポリペプチドと第二軽鎖ポリペプチドと対をなす第二重鎖ポリペプチドを含んでなり、第一重鎖ポリペプチドと第二重鎖ポリペプチドが重鎖間ジスルフィド結合不能の変異ヒンジ領域をそれぞれ含む二重特異性抗体を製造する方法であって、

- (a) 第一重鎖ポリペプチドと第一軽鎖ポリペプチドを第一宿主細胞で発現させ；
- (b) 第二重鎖ポリペプチドと第二軽鎖ポリペプチドを第二宿主細胞で発現させ；
- (c) (a) 及び (b) の重鎖及び軽鎖ポリペプチドを単離し；
- (d) (c) の単離ポリペプチドをアニールして、第一重鎖と対をなす第一重鎖を含む第一アームと第二軽鎖と対をなす第二重鎖を含む第二アームを含んでなる二重特異性抗体を生成することを含む方法。

【請求項 2】

(a) 第一標的分子結合アームを生成可能な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第一の対を第一宿主細胞で発現させ、

(b) 第二標的分子結合アームを生成可能な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第二の対を第二宿主細胞で発現させ、ここで、第一対及び第二対の重鎖ポリペプチドが重鎖間ジスルフィド結合不能の変異ヒンジ領域を含み、第一対及び第二対の軽鎖が異なった可変ドメイン配列を含み、

- (c) 工程 (a) の宿主細胞からポリペプチドを単離し；
- (d) 単離ポリペプチドの多量体化を許容する条件下でポリペプチドをインビトロで接触させ、二つの区別される標的分子に対して結合特異性を有する抗体の実質的に均一な集団を生成することを含んでなる方法。

【請求項 3】

(a) 4つのポリペプチドの混合物を含むサンプルを取得し、ここで、該4つのポリペプチドは、第一標的分子結合アームを生成可能な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第一の対と、第二標的分子結合アームを生成可能な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第二の対であり、第一対及び第二対の重鎖ポリペプチドが重鎖間ジスルフィド結合不能の変異ヒンジ領域を含み、

(b) ポリペプチドの多量体化を許容する条件下で4つのポリペプチドをインキュベートし、二つの区別される標的分子に対して結合特異性を有する抗体の実質的に均一な集団を生成することを含んでなる方法。

【請求項 4】

4つの免疫グロブリンポリペプチドを、ポリペプチドの多量体化を許容する条件下インキュベートして実質的に均一な抗体の集団を生成し、ここで、各抗体は二つの区別される標的分子に対して結合特異性を有し、

ここで、4つの免疫グロブリンポリペプチドは、第一標的分子結合アームを生成可能な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第一の対と、第二標的分子結合アームを生成可能な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第二の対であり、

ここで、第一対及び第二対の各重鎖ポリペプチドは重鎖間ジスルフィド結合不能の変異ヒンジ領域を含む方法。

【請求項 5】

免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第一の対と、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第二の対を、第一対及び第二対のポリペプチドの多量体化を許容する条件下インキュベートして実質的に均一な抗体の集団を生成し、

ここで、ポリペプチドの第一の対は第一標的分子に結合可能であり；

ここで、ポリペプチドの第二の対は第二標的分子に結合可能であり；

ここで、第一対及び第二対の各重鎖ポリペプチドは重鎖間ジスルフィド結合不能の変異ヒンジ領域を含む方法。

【請求項 6】

10

20

30

40

50

免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第一の対と、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第二の対を、第一対及び第二対のポリペプチドの多量体化を許容する条件下でインキュベートして実質的に均一な抗体の集団を生成し、

ここで、ポリペプチドの第一の対は第一標的分子に結合可能であり；

ここで、ポリペプチドの第二の対は第二標的分子に結合可能であり；

ここで、第一重鎖ポリペプチドのFcポリペプチドと第二重鎖ポリペプチドのFcポリペプチドは界面で合致し、第二Fcポリペプチドの界面は、第一Fcポリペプチドの界面のキャビティに位置せしめることが可能な隆起を含む方法。

【請求項7】

第一対及び第二対の各重鎖ポリペプチドが、重鎖間ジスルフィド結合不能の変異ヒンジ領域を含む請求項1から6の何れか一項に記載の方法。 10

【請求項8】

免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第一対及び第二対が、別個の発現ユニットから得られる請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

【請求項9】

発現ユニットが細胞である請求項8に記載の方法。

【請求項10】

発現ユニットが細胞培養物である請求項8に記載の方法。

【請求項11】

発現ユニットがインビトロタンパク質発現サンプル／系である請求項8に記載の方法。 20

【請求項12】

上記重鎖間ジスルフィド結合がFc領域間にある請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

【請求項13】

上記変異重鎖ヒンジ領域が、ジスルフィド結合を形成可能なシステイン残基を欠く請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

【請求項14】

上記ジスルフィド結合が分子間にある請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

【請求項15】

上記分子間ジスルフィド結合が2つの免疫グロブリン重鎖のシステイン間にある請求項1から6の何れか一項に記載の方法。 30

【請求項16】

ジスルフィド結合を通常は形成可能なヒンジ領域システイン残基が欠失している請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

【請求項17】

ジスルフィド結合を通常は形成可能なヒンジ領域システイン残基が他のアミノ酸で置換されている請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

【請求項18】

上記システイン残基がセリンで置換されている請求項1から6の何れか一項に記載の方法。 40

【請求項19】

上記抗体が重鎖定常ドメインと軽鎖定常ドメインを含む請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

【請求項20】

重鎖がヒトCH2及び／又はCH3ドメインの少なくとも一部を含む請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

【請求項21】

重鎖及び軽鎖ポリペプチドの一方又は両方の対がヒト化されている請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

【請求項22】

50

上記抗体がヒト化されている請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

抗体が完全長抗体である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

上記完全長抗体が重鎖及び軽鎖を含む請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

重鎖及び軽鎖の一方又は両方の対がヒトである請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

上記抗体がヒトである請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

10

【請求項 2 7】

抗体が、ヒト C H 2 及び / 又は C H 3 ドメインの少なくとも一部を含む抗体断片である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

上記抗体断片が F c 融合ポリペプチドである請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

抗体が I g G 、 I g A 及び I g D からなる群から選択される請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

抗体が I g G である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

20

【請求項 3 1】

抗体が I g G 1 である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

抗体が I g G 2 である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

抗体が治療用抗体である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

抗体がアゴニスト抗体である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

抗体がアンタゴニスト抗体である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

30

【請求項 3 6】

抗体が診断用抗体である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

抗体が阻止抗体である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

抗体が中和抗体である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 9】

抗体が腫瘍抗原に結合可能である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4 0】

腫瘍抗原が細胞表面分子ではない請求項 3 9 に記載の方法。

40

【請求項 4 1】

腫瘍抗原がクラスター分類因子ではない請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

抗体がクラスター分類因子に結合可能である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法

。

【請求項 4 3】

抗体が細胞生存調節因子に結合可能である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4 4】

抗体が細胞増殖調節因子に特異的に結合可能である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

50

【請求項 4 5】

抗体が組織発生又は分化に関連する分子に結合可能である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

抗体が細胞表面分子に結合可能である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

抗体がリンホカインに結合可能である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

第一対及び第二対の軽鎖が異なった可変ドメイン配列を含む請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。 10

【請求項 4 9】

第一重鎖ポリペプチドの Fc ポリペプチドと第二重鎖ポリペプチドの Fc ポリペプチドが界面で合致し、第二 Fc ポリペプチドの界面が第一 Fc ポリペプチドの界面のキャビティに位置させることができ隆起を含む請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

ポリペプチドの少なくとも 90 % が上記二重特異性抗体を生成する請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

第二 Fc ポリペプチドが鋳型 / 元のポリペプチドから改変されて隆起をコードし、又は第一 Fc ポリペプチドが鋳型 / 元のポリペプチドから改変されてキャビティをコードし、又はその双方をコードする請求項 4 9 に記載の方法。 20

【請求項 5 2】

第二 Fc ポリペプチドが鋳型 / 元のポリペプチドから改変されて隆起をコードし、かつ第一 Fc ポリペプチドが鋳型 / 元のポリペプチドから改変されてキャビティをコードし、又はその双方をコードする請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 3】

第一 Fc ポリペプチドと第二 Fc ポリペプチドが界面で合致し、ここで第二 Fc ポリペプチドの界面が、第一 Fc ポリペプチドのキャビティに位置させることができ隆起を含み、キャビティ又は隆起あるいは双方が、第一及び第二 Fc ポリペプチドの界面中にそれぞれ導入されている請求項 4 9 に記載の方法。 30

【請求項 5 4】

上記二重特異性抗体が二つの標的分子に特異的に結合可能である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

第一アームが第一標的分子に特異的に結合し、第二アームが第二標的分子に特異的に結合する請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

第一宿主細胞と第二宿主細胞が別の細胞培養物中にある請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

第一宿主細胞と第二宿主細胞が双方の宿主細胞を含む混合培養物中にある請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。 40

【請求項 5 8】

宿主細胞が原核生物である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

原核宿主細胞が大腸菌である請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

大腸菌が内因性プロテアーゼ活性を欠く株のものである請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

宿主細胞が真核生物である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。 50

【請求項 6 2】

宿主細胞が C H O である請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

ポリペプチドをコードする核酸が、ほぼ等しい強度の翻訳開始領域 (T I R) に作用可能に結合している請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 4】

アニーリング又は接触工程が、単離ポリペプチドの混合物を室温でインキュベートすることを含む請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 5】

アニーリング又は接触工程が、単離ポリペプチドの混合物を加熱することを含む請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。 10

【請求項 6 6】

混合物を少なくとも 4 0 ℃ に加熱する請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

混合物を少なくとも 5 0 ℃ に加熱する請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 8】

混合物を約 4 0 ℃ と 6 0 ℃ の間に加熱する請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 9】

混合物が 5 0 ℃ である請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 7 0】

アニーリング又は接触工程が、単離ポリペプチドの混合物を少なくとも 2 分間加熱することを含む請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。 20

【請求項 7 1】

加熱後に混合物を冷却する請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 7 2】

アニーリング又は接触工程が、単離ポリペプチドの混合物を、約 4 から 約 1 1 の間 (約 4 と 約 1 1 を含む) の pH でインキュベートすることを含む請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7 3】

pH が約 5 . 5 である請求項 7 2 に記載の方法。 30

【請求項 7 4】

pH が約 7 . 5 である請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 5】

アニーリング又は接触工程が、単離ポリペプチドの混合物を、変性剤中でインキュベートすることを含む請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7 6】

変性剤が尿素である請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

アニーリング又は接触工程が、第一及び第二重鎖ポリペプチド間に化学結合を含まない請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。 40

【請求項 7 8】

ポリペプチドの少なくとも 7 5 % が、第一重鎖及び軽鎖対と第二重鎖及び軽鎖対を含む複合体中にある請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7 9】

単離ポリペプチドの 1 0 % 以下が、抗体精製工程の前に、单量体又は二量体として存在している請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8 0】

第一の対及び第二の対の軽鎖が異なった可変ドメイン配列を含む請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8 1】

50

第一及び第二の重-軽鎖対はそれぞれ互いにジスルフィド結合した重鎖及び軽鎖を含んでなる請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8 2】

第一の対及び第二の対のポリペプチドがアニール又は接触工程においてほぼ等モル量 [比] で提供される請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8 3】

第一の対と第二の対の間の p I 値の差が少なくとも 0 . 5 である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8 4】

請求項 1 から 8 3 の何れか一項に記載の方法によって製造された二重特異性抗体。 10

【請求項 8 5】

第一の対の重鎖及び軽鎖ポリペプチドと第二の対の重鎖及び軽鎖ポリペプチドを含んでなり、軽鎖ポリペプチドが異なった可変ドメイン配列を含み、重鎖が重鎖間ジスルフィド結合不可の変異ヒンジ領域を含む二重特異性抗体。

【請求項 8 6】

請求項 1 から 8 5 の何れか一項に記載の抗体をコードする単離された核酸。

【請求項 8 7】

請求項 8 6 に記載の核酸を含んでなる宿主細胞。

【請求項 8 8】

各対の重鎖及び軽鎖ポリペプチドをコードする核酸が单一のベクター中に存在している請求項 8 7 に記載の宿主細胞。 20

【請求項 8 9】

各対の重鎖及び軽鎖ポリペプチドをコードする核酸が別のベクター中に存在している請求項 8 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 9 0】

請求項 1 から 8 5 の何れか一項に記載の二重特異性抗体を集合的にコードする一又は複数の組換え核酸を含んでなる組成物。

【請求項 9 1】

請求項 1 から 8 5 の何れか一項に記載の二重特異性抗体と担体を含有してなる組成物。

【請求項 9 2】

免疫グロブリンの少なくとも 80 % が請求項 1 から 8 5 の何れか一項に記載の二重特異性抗体である免疫グロブリン群を含んでなる組成物。 30

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0 0 0 1】

(関連した出願)

本出願は、出典明示によりその内容の全体をここに援用する 2004 年 9 月 2 日出願の仮出願第 60 / 607172 号に基づいて米国特許法第 119 条 (e) の優先権を主張して米国特許法施行規則第 1 . 53 条 (b) (1) の下に出願された非仮出願である。 40

【0 0 0 2】

(発明の分野)

本発明は例えば多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、多重特異性免疫グロブリン（例えば二重特異性イムノアドヘシン）のようなヘテロ多量体ポリペプチドを製造する方法に関し、また抗体 - イムノアドヘシンキメラ及びヘテロ多量体ポリペプチドが該方法を使用して製造される。

【0 0 0 3】

(背景)

二重特異性抗体

少なくとも二つの異なる抗原に対して結合特異性を有する二重特異性抗体 (B s A b) は、インビトロ及びインビボの免疫診断及び治療のための、及び診断免疫アッセイのた 50

めのターゲティング薬剤として広い範囲の臨床上の用途において有意な可能性を有する。一般には、Segal等, *J. Immunol. Methods* (2001), 248:1-6; Kufer等, *Trends in Biotech.* (2004), 22(5):238-244; van Spriel等, *Immunol. Today* (2000), 21(8):391-397; Talac及びNelson, *J. Biol. Reg. & Homeostatic Agents* (2000), 14(3):175-181; Hayden等, *Curr. Op. Immunol.* (1997), 9:201-212; Carter, *J. Immunol. Methods* (2001), 248:7-15; Peipp及びValerius, *Biochem. Soc. Trans.* (2002), 30(4):507-511; Milstein及びCuello, *Nature* (1983), 305:537-540; Karpovsky等, *J. Exp. Med.* (1984), 160:1686-1701; Perez等, *Nature* (1985), 316:354-356; Canevari等, *J. Natl. Cancer Inst.* (1995), 87:1463-1469; Kroesen等, *Br. J. Cancer* (1994), 70:652-661; Valone等, *J. Clin. Oncol.* (1995), 13:2281-2292; Weiner等, *Cancer Res.* (1995), 55:4586-4593; Muller等, *FEBS Letters* (1998), 422:259-264を参照のこと。
10

【0004】

診断領域では、二重特異性抗体は、細胞表面分子の機能特性を探索し細胞傷害性を媒介する異なったFcレセプターの能力を定めるのに非常に有用である (Fanger等, *Crit. Rev. Immunol.* 12:101-124 [1992])。Nolan等, *Biochem. Biophys. Acta* 1040:1-11 (1990)はBsAbに対する他の診断用途を記述している。特に、BsAbは酵素免疫測定法における使用のために酵素を固定するように構築することができる。これを達成するためには、BsAbの一つのアームを、結合が酵素阻害を引き起こさないように酵素上の特異的エピトープに結合するように設計することができ、BsAbの他のアームが所望の部位での高い酵素密度を確実にするように固定化マトリックスに結合する。そのような診断用BsAbの例には、表面抗原を見つけるために使用されたHammerling等, *J. Exp. Med.* 128:1461-1473 (1968)記載のウサギ抗IgG / 抗フェリチンBsAbが含まれる。西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 並びにホルモンに対して結合特異性を有するBsAbがまた開発されている。BsAbに対する他の潜在的な免疫化学的用途は二部位免疫測定法におけるそれらの使用を含む。例えば、分析物タンパク質上の二つの別個のエピトープに結合する二つのBsAbが製造され、一つのBsAbは不溶性マトリックスに複合体を結合させ、他方は指示酵素に結合する (上掲のNolan等を参照)。
20

【0005】

二重特異性抗体はまた癌のような様々な疾患のインビトロ又はインビボ免疫診断に使用することができる (Songsivilai等, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315 [1990])。BsAbのこの診断用用途を容易にするために、BsAbの一つのアームは腫瘍関連抗原に結合し得、他のアームは、放射性核種に強固に結合するキレーターのような検出可能なマーカーに結合し得る。このアプローチ法を使用して、Le Doussal等は、癌胎児抗原 (CEA) に結合する一方のアームと、ジエチレントリアミン五酢酸 (DPTA) に結合する他のアームを有する結腸直腸及び甲状腺癌の放射免疫検出に有用なBsAbを製造した。Le Doussal等, *Int. J. Cancer Suppl.* 7:58-62 (1992) 及びLe Doussal等, *J. Nucl. Med.* 34:1662-1671 (1993)を参照のこと。Stickney等は同様に放射免疫検出を使用してCEAを発現する結腸直腸癌を検出するための方策を記載している。これらの研究者はCEA並びにヒドロキシエチルチオ尿素-ベンジル-DOTA (EOTUBE) に結合するBsAbを記述している。Stickney等, *Cancer Res.* 51:6650-6655 (1991)を参照のこと。
30

【0006】

また、二重特異性抗体は、例えば標的 (例えば病原体又は腫瘍細胞) に結合する一方のアームとT細胞レセプター又はFcレセプターのような細胞傷害性誘発分子に結合する他のアームを付与することによって再指示細胞傷害のヒト治療のために使用することができる。従って、二重特異性抗体は、患者の細胞性免疫防御メカニズムを特に腫瘍細胞又は感染媒介物に向けるために使用することができる。この方策を使用して、FcR III (つまりCD16) に結合する二重特異性抗体がインビトロでナチュラルキラー (NK) 細胞 / 大顆粒リンパ球 (LGL) 細胞による腫瘍細胞死滅を媒介し得、腫瘍成長をインビボで防止するのに効果的であることを実証した。Segal等, *Chem. Immunol.* 47:179 (1989) 及びSegal等, *Biologic Therapy of Cancer* 2(4) DeVita等編 J.B. Lippincott, Philad
40

elphia (1992) p. 1。同様に、Fc R III I に結合するアームとHER2 レセプターに結合する他のアームを有する二重特異性抗体が、HER2 抗原を過剰発現する卵巣及び乳房腫瘍の治療のために開発されている。(Hseih-Ma等 Cancer Research 52:6832-6839 [1992] 及びWeiner等 Cancer Research 53:94-100 [1993])。二重特異性抗体はまたT 細胞による死滅を媒介することができる。通常は、二重特異性抗体はT 細胞上のCD3 複合体を腫瘍関連抗原に結合させる。抗p185^{HER2} に結合した抗CD3 からなる完全にヒト化されたFab(ab')₂ BsAb 是、T 細胞を標的とし、HER2 レセプターを過剰発現する腫瘍細胞を死滅させるために使用されている。Shalaby等, J. Exp. Med. 175(1):217 (1992)。二重特異性抗体は、初期臨床試験において試験され、有望な結果が得られている。一治験では、肺癌、卵巣癌又は乳癌の12名の患者が、抗CD3 / 抗腫瘍(MOC 31)二重特異性抗体で標的とした活性化Tリンパ球の注入で治療した。deLeij等 Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity, Romet-Lemonne, Fanger及びSegal編, Lienhart (1991) p. 249。標的細胞は腫瘍細胞のかなりの局所的溶解、穏やかな炎症反応を誘発したが、毒性のある副作用又は抗マウス抗体反応はなかった。BsAb 悪性腫瘍を持つ患者における抗CD3 / 抗CD19二重特異性抗体の非常に予備的な治験では、末梢腫瘍細胞カウントがまた達成された。Clark等 Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity, Romet-Lemonne, Fanger及びSegal編, Lienhart (1991) p. 243。またBsAb の治療用用途に関して、Kroesen等, Cancer Immunol. Immunother. 37:400-407 (1993)、Kroesen等, Br. J. Cancer 70:652-661 (1994) 及びWeiner等, J. Immunol. 152:2385 (1994)を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0007】

二重特異性抗体はまた血栓溶解薬又はワクチンアジュバントとして使用することもできる。更に、これらの抗体は、感染疾患の治療に使用することができ（例えばHIV又はインフルエンザウイルス又はトキソプラズマ原虫のような原虫のようなウイルス感染細胞にエフェクター細胞をターゲティングするため）、腫瘍細胞に免疫毒素を送達するために、又は細胞表面レセプターに免疫複合体をターゲティングするために使用される（上掲のFanger等参照）。

BsAb の使用は、十分な量と純度でBsAb を取得することの困難性によって事実上は難航している。伝統的には、二重特異性抗体はハイブリッド-ハイブリドーマ法を使用して製造されている (Millstein及びCuello, Nature 305:537-539 [1983])。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の無作為の分類のため、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は10の異なる抗体分子の混合物をつくり、その一つのみが正しい二重特異的構造を有している。従って、BsAb のより大なる収率での產生技術が試みられている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。抗体断片の化学的カップリングを達成するために、Brennan等, Science 229:81 (1985)は、無傷の抗体をタンパク分解性に切断してFab(ab')₂ 断片を產生する手順を記述している。これらの断片は、近接するジチオールを安定化し分子間ジスルフィドの形成を防止するためにジチオール錯化剤の亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元される。產生されたFab'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転化される。ついで、Fab'-TNB 誘導体の一つが、メルカプトエチルアミンでの還元によってFab'-チオールに再転化され、等モル量の他のFab'-TNB 誘導体と混合されてBsAb を生成する。產生されたBsAb は酵素の選択的固定化のための薬剤として使用することができる。

【0008】

最近の進歩は、二重特異性抗体を生成するために化学的にカップリングされ得るFab'-SH 断片の大腸菌からの直接の回収を容易にした。Shalaby等, J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)はp185^{HER2} に結合する一方のアームとCD3 に結合する他のアームを有する完全にヒト化されたBsAb Fab(ab')₂ の產生を記載している。各Fab'断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロ定方向化学カップリングを受けてBsAb を形成した。このようにして形成されたBsAb は、HER2 レセプターを過剰発現する細胞及び正常なヒトT 細胞に結合することができ、またヒト乳房腫瘍標的に対してヒト細胞傷

害性リンパ球の溶解活性を惹起することができた。Rodrigues等, Int. J. Cancers (Suppl.) 7:45-50 (1992)をまた参照のこと。

しかしながら、F_ab又はF_ab'断片よりも大きい二重特異性抗体を製造するための選択肢は一般に不足したままである。更に、多くの場合、インビトロでの化学カップリングの使用は望ましくない問題を呈する。

【0009】

組換え細胞培養物から直接B_sA_b断片を作製し単離するための様々な技術がまた記載されている。例えば、二重特異性F(a_b')₂ヘテロ二量体はロイシンジッパーを使用して產生されている。Kostelny等, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。F_os及びJ_unタンパク質からのロイシンジッパーペプチドは、抗CD3及び抗インターロイキン-2レセプター(IL-2R)抗体のF_ab'部分に遺伝子融合によって結合している。抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元して单量体を形成した後、再び酸化して抗体ヘテロ二量体が形成された。B_sA_bは、HuT-102細胞をインビトロで溶解させるために細胞傷害性T細胞を補充するのに非常に効果的であることが見いだされた。Hollinger等, PNAS (USA) 90:6444-6448 (1993)によって記載された「ダイアボディ」技術の出現は、B_sA_b断片を製造するための代替メカニズムをもたらした。その断片は、同じ鎖上の二つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーによって軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結した重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。従って、一断片のV_H及びV_Lドメインが他の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成せしめられ、二つの抗原結合部位を形成する。一本鎖Fv(sFv)二量体の使用によりB_sA_b断片を製造するための方策がまた報告されている。Gruber等 J. Immunol. 152: 5368 (1994)を参考のこと。これらの研究者は、抗フルオレセイン抗体のV_H及びV_Lドメインへ25アミノ酸残基リンカーによって結合したT細胞レセプターに対して產生された抗体のV_H及びV_Lドメインを含む抗体を設計した。再折り畳みされた分子はフロオレセイン及びT細胞レセプターに結合し、その表面に共有結合により結合したフルオレセインを有していたヒト腫瘍細胞の溶解を再指示した。

【0010】

組換え細胞培養物から直接回収することができる二重特異性抗体断片を製造するための幾つかの方法が報告されていることは明らかである。しかしながら、完全長又は実質的に完全長のB_sA_bは、その可能なより長い血清半減期と可能なエフェクター機能のため多くの臨床用途に対してB_sA_b断片より好ましい場合がある。そのようなB_sA_bを製造するために有用であることが報告されている洗練された方法は米国特許第5731168号；同第5821333号；及び同第5807706号；及びMerchant等, Nat. Biotech. (1998), 16:677-681に記載されているが、その方法は共通の軽鎖を有する二重特異性抗体を產生するもので、所望の二重特異性抗体の実質的に純粋な調製物を得るために、あらゆる過剰な单一特異性抗体を分離除去することを必要とする。

【0011】

イムノアドヘシン

イムノアドヘシン(Ia)は免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能と細胞表面レセプター又はリガンド(「アドヘシン」)のようなタンパク質の結合ドメインを組み合わせる抗体様分子である。イムノアドヘシンは、ヒト抗体の貴重な化学的及び生物学的性質の多くを保持しうる。イムノアドヘシンは適切なヒト免疫グロブリンヒンジ及び定常ドメイン(Fc)配列に結合した所望の特異性を有するヒトタンパク質配列から構築することができるので、対象の結合特異性は完全にヒトの成分を使用して達成することができる。そのようなイムノアドヘシンは患者に対して免疫原性が少なく、慢性又は繰り返し使用に対して安全である。

文献に報告されているイムノアドヘシンは、T細胞レセプターの融合物(Gascoigne等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940 [1987])；CD4(Capon等, Nature 337:525-531 [1989])；Traunecker等, Nature 339:68-70 [1989]；Zettmeissl等, DNA Cell Biol. USA 9:347-353 [1990]；及びByrn等, Nature 344:667-670 [1990])；L-セレクチン

10

20

30

40

50

又はホーミングレセプター (Watson等, *J. Cell. Biol.* 110:2221-2229 [1990] ; 及びWatson等, *Nature* 349:164-167 [1991]) ; CD44 (Aruffo等, *Cell* 61:1303-1313 [1990]) ; CD28 及びB7 (Linsley等, *J. Exp. Med.* 173:721-730 [1991]) ; CTLA-4 (Lisley等, *J. Exp. Med.* 174:561-569 [1991]) ; CD22 (Stamenkovic等, *Cell* 66:1133-1144 [1991]) ; TNFレセプター (Ashkenazi等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535-10539 [1991] ; Lesslauer等, *Eur. J. Immunol.* 27:2883-2886 [1991] ; 及びPeppel等, *J. Exp. Med.* 174:1483-1489 [1991]) ; NPFレセプター (Bennett等, *J. Biol. Chem.* 266:23060-23067 [1991]) ; インターフェロン レセプター (Kurschner等, *J. Biol. Chem.* 267:9354-9360 [1992]) ; 4-1BB (Chalupny等, *PNAS [USA]* 89:10360-10364 [1992]) 及びIgEレセプター (Ridgway及びGorman, *J. Cell. Biol.* Vol. 115, Abstract No. 1448 [1991]) を含む。

10

【0012】

治療用使用のために記載したイムノアドヘシンの例には、細胞表面CD4へのHIVの結合をブロックするためのCD4-IgGイムノアドヘシンが含まれる。CD4-IgGが出産直前に妊婦に投与されたフェーズIの臨床試験から得られたデータは、このイムノアドヘシンがHIVの母子感染の予防に有用でありうることを示唆している。Ashkenazi等, *Intern. Rev. Immunol.* 10:219-227 (1993)。腫瘍壞死因子(TNF)に結合するイムノアドヘシンがまた開発されている。TNFは敗血症ショックの主要な媒介物であることが知られている炎症誘発性サイトカインである。敗血症ショックのマウスモデルに基づいて、TNFレセプターイムノアドヘシンは敗血症ショックの治療における臨床的使用のための候補として有望性を示した(上掲のAshkenazi等)。イムノアドヘシンはまた非治療用途も有している。例えば、L-セレクチンレセプターイムノアドヘシンは末梢リンパ節高内皮静脈(HEV)の組織化学的染色のための試薬として使用されている。この試薬はまたL-セレクチンリガンドを単離し特徴付けるために使用されている(上掲のAshkenazi等)。

20

イムノアドヘシン構造の二つのアームが異なった特異性を有している場合、イムノアドヘシンは二重特異性抗体と同様に「二重特異性イムノアドヘシン」と呼ばれている。Diet sch等, *J. Immunol. Methods* 162:123 (1993)は、E-セレクチンとP-セレクチンの、接着分子の細胞外ドメインを組み合わせた二重特異性イムノアドヘシンを記載している。結合実験により、このようにして形成された二重特異性免疫グロブリン融合タンパク質が、それが誘導された单一特異性イムノアドヘシンと比較して骨髄性細胞株への結合能が向上していることが示された。

30

【0013】

抗体-イムノアドヘシンキメラ

抗体-イムノアドヘシン(Ab/Ig)キメラもまた文献に記載されている。これらの分子は抗体の結合ドメインとイムノアドヘシンの結合領域を組み合わせている。

Berg等, *PNAS (USA)* 88:4723-4727 (1991)はマウスCD4-IgGから誘導した二重特異性抗体-イムノアドヘシンを作製した。これらの研究者は二つのアームを有する四量体分子を構築した。一つのアームは、抗体軽鎖定常ドメインとのCD4融合物と共に抗体重鎖定常ドメインと融合したCD4から構成される。他のアームは、抗CD3抗体の完全な軽鎖と共に抗CD3抗体の完全な重鎖から構成される。CD4-IgGアームにより、この二重特異性分子は細胞傷害性T細胞の表面上のCD3に結合する。細胞傷害性細胞とHIV感染細胞の並置によって後者の細胞の特異的な死滅が生じる。

40

【0014】

Berg等は構造が四量体である二重特異性分子を記載しているが、一つのみのCD4-IgG融合物を含む三量体ハイブリッド分子を製造することができる。Chamow等, *J. Immunol.* 153:4268 (1994)を参照のこと。この構築物の第一のアームはヒト化抗CD3軽鎖及びヒト化抗CD3重鎖によって形成されている。第二のアームは、gp120結合の原因であるCD4の細胞外ドメインの一部をIgGのFcドメインと組み合わせたCD4-IgGイムノアドヘシンである。得られたAb/Igキメラは、Fcレセプター担持大

50

顆粒リンパ球エフェクター細胞を更に含んでいる純粋な細胞傷害性T細胞調製物又は全末梢血リンパ球（PBL）画分を使用してHIV感染細胞の死滅を媒介した。

上述のヘテロ多量体の製造において、ホモ多量体に対して所望のヘテロ多量体、特に有意な純度の完全長又は実質的に完全長のヘテロ多量体分子の収率を増加させることが望ましい。ここに記載された本発明はこれを達成するための手段を提供する。

特許出願及び文献を含むここに記載の全ての文献を出典明示によりその全体を援用する。

【0015】

(発明の開示)

本発明は一より多い標的（例えば単一分子又は異なった分子上のエピトープ）に特異的に結合可能な抗体を製造する方法を提供する。本発明はまたこれらの抗体を使用する方法、及びこれらの抗体を含む組成物、キット及び製造品を提供する。10

本発明は、伝統的な方法の制約を克服する多重特異性免疫グロブリン複合体（例えば二重特異性抗体）を製造する効果的で新規な方法を提供する。二重特異性抗体のような多重特異性免疫グロブリン複合体を、本発明の方法により、高度に均一なヘテロ多量体ポリペプチドとして提供することができる。

【0016】

一側面では、本発明は、第一軽鎖ポリペプチドと対をなす第一重鎖ポリペプチドと第二軽鎖ポリペプチドと対をなす第二重鎖ポリペプチドを含んでなり、第一重鎖ポリペプチドと第二重鎖ポリペプチドが重鎖間ジスルフィド結合不能の変異ヒンジ領域をそれぞれ含む二重特異性抗体を製造する方法であって、20

(a) 第一重鎖ポリペプチドと第一軽鎖ポリペプチドを第一宿主細胞で発現させ；
 (b) 第二重鎖ポリペプチドと第二軽鎖ポリペプチドを第二宿主細胞で発現させ；
 (c) (a) 及び (b) の重鎖及び軽鎖ポリペプチドを単離し；
 (d) (c) の単離ポリペプチドをアニールして（又は混合しもしくは接觸させて）、第一軽鎖と対をなす第一重鎖を含む第一アームと第二軽鎖と対をなす第二重鎖を含む第二アームを含んでなる二重特異性抗体を生成することを含む方法を提供する。

一側面では、本発明は、第一標的結合ポリペプチドと第二標的結合ポリペプチドを含み、第一ポリペプチドと第二ポリペプチドが重鎖間ジスルフィド結合不能の変異重鎖ヒンジ領域をそれぞれ含む多重特異性抗体を製造する方法であって、30

(a) 第一ポリペプチドを第一宿主細胞中で発現させ；
 (b) 第二ポリペプチドを第二宿主細胞中で発現させ；
 (c) (a) と (b) のポリペプチドを単離し；
 (d) (c) の単離ポリペプチドをアニールして（又は混合しもしくは接觸させて）、第一標的結合ポリペプチドと第二標的結合ポリペプチドを含む多重特異性免疫グロブリン複合体を生成することを含む方法を提供する。

【0017】

一側面では、本発明は、

(a) 第一標的分子結合アームを生成可能な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第一の対を第一宿主細胞で発現させ、40

(b) 第二標的分子結合アームを生成可能な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第二の対を第二宿主細胞で発現させ、

ここで、第一対及び第二対の重鎖ポリペプチドが重鎖間ジスルフィド結合不能の変異ヒンジ領域を含み、第一対及び第二対の軽鎖が異なった抗原結合決定基（例えば異なった可変ドメイン配列）を含み、

(c) 工程 (a) 及び (b) の宿主細胞からポリペプチドを単離し；
 (d) 単離ポリペプチドの多量体化を許容する条件下でポリペプチドをインビトロで接觸させ、二つの区別される標的分子に対して結合特異性を有する抗体の実質的に均一な集団を生成することを含んでなる方法を提供する。

【0018】

10

20

30

40

50

一側面では、本発明は、

(a) 第一標的分子結合体を生成可能な第一ポリペプチドを第一宿主細胞で発現させ、
 (b) 第二標的分子結合体を生成可能な第二ポリペプチドを第二宿主細胞で発現させ、

ここで、第一及び第二ポリペプチドが重鎖間ジスルフィド結合不能の Fc 配列 / 領域（
 例えばここに記載したような変異重鎖ヒンジ領域）を含み、第一及び第二のポリペプチド
 が異なった抗原結合決定基（例えば異なった可変ドメイン配列）を含み、

(c) 工程 (a) 及び (b) の宿主細胞からポリペプチドを単離し；

(d) 単離ポリペプチドの多量体化を許容する条件下でポリペプチドをインビトロで接
 触させ、二つの区別される標的分子に対して結合特異性を有する抗体の実質的に均一な集
 団を生成することを含んでなる方法を提供する。

10

【 0 0 1 9 】

一側面では、本発明は、

(a) 4 つのポリペプチドの混合物を含むサンプルを取得し、ここで、該 4 つのポリペ
 プチドは、第一標的分子結合アームを生成可能な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチ
 ドの第一の対と、第二標的分子結合アームを生成可能な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリ
 ペプチドの第二の対であり、第一対及び第二対の重鎖ポリペプチドが重鎖間ジスルフィド
 結合不能の変異ヒンジ領域を含み、

(b) ポリペプチドの多量体化を許容する条件下で 4 つのポリペプチドをインキュベー
 トし、二つの区別される標的分子に対して結合特異性を有する抗体の実質的に均一な集
 団を生成することを含んでなる方法を提供する。

20

一側面では、本発明は、

少なくとも 4 つの免疫グロブリンポリペプチドを、ポリペプチドの多量体化を許容する
 条件下でインキュベートし、各抗体が少なくとも二つの区別される標的分子に対して結合
 特異性を有する抗体の実質的に均一な集団を生成し、

ここで、該 4 つの免疫グロブリンポリペプチドは、第一標的分子結合アームを生成可能
 な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第一の対と、第二標的分子結合アームを生
 成可能な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第二の対であり、

ここで、第一対及び第二対の各重鎖ポリペプチドが重鎖間ジスルフィド結合不能の変異
 ヒンジ領域を含む方法を提供する。

【 0 0 2 0 】

30

一側面では、本発明は、

(a) 少なくとも 2 つのポリペプチドを含むサンプルを取得し、ここで、少なくとも一
 つのポリペプチドは第一標的分子結合アームを生成可能であり、少なくとも一つのポリペ
 プチドは第二標的分子結合アームを生成可能であり、第一標的分子結合アームと第二標的
 分子結合アームは、重鎖間ジスルフィド結合不能の免疫グロブリン重鎖変異ヒンジ領域を
 それぞれ含み、

(b) ポリペプチドの多量体化を許容する条件下でポリペプチドをインキュベートし、
 各多量体が少なくとも二つの区別される標的分子に対して結合特異性を有する方法を提供
 する。

40

一側面では、本発明は、

少なくとも 4 つの免疫グロブリンポリペプチドを、ポリペプチドの多量体化を許容する
 条件下でインキュベートし、各抗体が少なくとも二つの区別される標的分子に対して結合
 特異性を有する抗体の実質的に均一な集団を生成し、

ここで、該 4 つの免疫グロブリンポリペプチドは、第一標的分子結合アームを生成可能
 な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第一の対と、第二標的分子結合アームを生
 成可能な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第二の対であり、

ここで、第一対及び第二対の各重鎖ポリペプチドが重鎖間ジスルフィド結合不能の変異
 ヒンジ領域を含む方法を提供する。

【 0 0 2 1 】

50

一側面では、本発明は、

少なくとも4つの免疫グロブリンポリペプチドを、ポリペプチドの多量体化を許容する条件下でインキュベートして実質的に均一な抗体の集団を生成し、ここで、各抗体は二つの区別される標的分子に対して結合特異性を有し、

ここで、4つの免疫グロブリンポリペプチドは、第一標的分子結合アームを生成可能な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第一の対と、第二標的分子結合アームを生成可能な免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第二の対であり、

ここで、第一標的分子結合アームと第二標的分子結合アームは重鎖間ジスルフィド結合不能の変異免疫グロブリン重鎖ヒンジ領域をそれぞれ含む方法を提供する。

【0022】

一側面では、本発明は、

免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第一の対と、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第二の対を、第一対及び第二対のポリペプチドの多量体化を許容する条件下でインキュベートして実質的に均一な抗体の集団を生成し、

ここで、ポリペプチドの第一の対は第一標的分子に結合可能であり；

ここで、ポリペプチドの第二の対は第二標的分子に結合可能であり；

ここで、第一対及び第二対の各重鎖ポリペプチドは重鎖間ジスルフィド結合不能の変異ヒンジ領域を含む方法を提供する。

一側面では、本発明は、

第一ポリペプチド複合体と第二ポリペプチド複合体を、第一及び第二ポリペプチド複合体の多量体化を許容する条件下でインキュベートして、実質的に均一な多量体ポリペプチドの集団を生成し、ここで、各多量体は少なくとも二つの区別される標的分子に対して結合特異性を有し、

ここで、第一ポリペプチド複合体は第一標的分子に結合可能であり；

ここで、第二ポリペプチド複合体は第二標的分子に結合可能であり；

ここで、各ポリペプチド複合体は重鎖間ジスルフィド結合不能の変異免疫グロブリン重鎖ヒンジ領域を含む方法を提供する。

【0023】

一側面では、本発明は、

免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第一の対と、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖ポリペプチドの第二の対を、第一対及び第二対のポリペプチドの多量体化を許容するインピトロ条件下でインキュベートして実質的に均一な抗体の集団を生成し、

ここで、ポリペプチドの第一の対は第一標的分子に結合可能であり；

ここで、ポリペプチドの第二の対は第二標的分子に結合可能であり；

ここで、第一重鎖ポリペプチドのFcポリペプチドと第二重鎖ポリペプチドのFcポリペプチドは界面で合致し、第二Fcポリペプチドの界面は第一Fcポリペプチドの界面のキャビティに位置せしめることが可能な隆起を含む方法を提供する。

一側面では、本発明は、

第一ポリペプチドと第二ポリペプチドを、第一及び第二ポリペプチドの多量体化を許容するインピトロ条件下でインキュベートして実質的に均一な多量体の集団を生成し、ここで、各ポリペプチドは免疫グロブリン重鎖Fc領域の（全てを含む）少なくとも一部（例えばCH2及び/又はCH3）を含み、

ここで、第一ポリペプチドは第一標的分子に結合可能であり；

ここで、第二ポリペプチドは第二標的分子に結合可能であり；

ここで、第一ポリペプチドのFc配列と第二ポリペプチドのFc配列は界面で合致し、第二Fc配列の界面は第一Fc配列の界面のキャビティに位置せしめることが可能な隆起を含む方法を提供する。

【0024】

本発明の方法のある実施態様では、產生される多重特異性抗体は、野生型完全長抗体に通常存在する重鎖間ジスルフィドの少なくとも一つを欠く変異重鎖ヒンジ領域を含む。例えば、一実施態様では、本発明の方法は、少なくとも一つの重鎖間ジスルフィド結合が除

10

20

30

40

50

去された二重特異性抗体を提供する。ある実施態様では、上記抗体は、少なくとも二つ又は全てまでの任意の整数の重鎖間ジスルフィド結合が除去されたものである。ある実施態様では、上記抗体は、全ての重鎖間ジスルフィド結合が除去されたものである。よって、ある実施態様では、重鎖間ジスルフィド結合不能の変異重鎖を含む。一実施態様では、上記抗体は、少なくとも一つの重鎖間ジスルフィド結合が除去されるように改変された変異重鎖ヒンジ領域を含む。一実施態様では、上記抗体は、重鎖間ジスルフィド結合を通常は形成可能なシステイン残基の少なくとも一つ、少なくとも二つ、少なくとも三つ、少なくとも四つ、又は全てまでの任意の整数の残基を欠く変異免疫グロブリンヒンジ領域を含む。変異ヒンジ領域は、上記残基の欠失、置換又は修飾を含む任意の好適な方法によって上記システイン残基を欠くようにすることができる。一実施態様では、上記システインは、例えば二つの免疫グロブリン重鎖のシステイン間にあいて、分子間ジスルフィド結合を通常は形成可能であるものである。これらの方法のある実施態様では、変異重鎖の全ての重鎖間ジスルフィド結合形成ヒンジシステインが、ジスルフィド結合を形成することができないようにされる。

10

【0025】

多くの宿主細胞の任意のものを本発明の方法において使用することができる。そのような細胞は当該分野で知られているか（その幾つかはここに記載する）、又は当該分野で知られている常套的な技術を使用して本発明の方法での使用の適合性に関して経験的に決定することができる。ある実施態様では、宿主細胞はグラム陰性細菌細胞である。一実施態様では、宿主細胞は大腸菌である。ある実施態様では、大腸菌は内因性プロテアーゼ活性を欠く株のものである。ある実施態様では、大腸菌宿主細胞の遺伝子型は $d\ e\ g\ P$ 及び $p\ r\ c$ 遺伝子を欠き、変異体 $s\ p\ r$ 遺伝子を有する。一実施態様では、宿主細胞は哺乳動物、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である。

20

ある実施態様では、本発明の方法は、宿主細胞におけるその発現が本発明の抗体の収率を向上させる分子をコードする組換えベクター又はポリヌクレオチドを宿主細胞中で発現させることを更に含む。例えば、そのような分子はシャペロンタンパク質でありうる。一実施態様では、上記分子は $D\ s\ b\ A$ 、 $D\ s\ b\ C$ 、 $D\ s\ b\ G$ 及び $F\ k\ p\ A$ からなる群から選択される原核生物ポリペプチドである。これらの方法のある実施態様では、ポリヌクレオチドは $D\ s\ b\ A$ と $D\ s\ b\ C$ の双方をコードする。

30

【0026】

大腸菌のような原核生物細胞中に発現される抗体は非グリコシル化状態である。よって、ある側面では、本発明は本発明の方法によって得られた非グリコシル化多重特異性抗体を提供する。

40

本発明の方法による宿主細胞中で発現される抗体は、適切な細胞区画又は培地から回収することができる。例えば、分泌シグナルが抗体ポリペプチド上に存在するかどうか、培養条件、宿主の遺伝的背景（例えばある宿主は上清にタンパク質が漏れるようにすることができる）等々を含む抗体回収経路を決定する因子は当該分野で知られている。ある実施態様では、本発明の方法によって產生される抗体は細胞可溶化物から回収される。ある実施態様では、本発明の方法によって產生される抗体は周辺質又は培養培地から回収される。

【0027】

一側面では、本発明は、重鎖間ジスルフィド結合を欠く多重特異性抗体を提供する。ある実施態様では、上記重鎖間ジスルフィド結合は $F\ c$ 領域間にある。他の側面では、本発明は、重鎖間ジスルフィド結合不能の変異重鎖ヒンジ領域を含む多重特異性抗体を提供する。一実施態様では、上記変異ヒンジ領域は、重鎖間ジスルフィド結合不能の少なくとも一つ、少なくとも二つ、少なくとも三つ、少なくとも四つ又は好ましくは全てまでの任意の整数のシステインを欠く。

50

本発明の抗体は様々な用途に対して様々な設定で有用である。好ましくは、本発明の抗体は生物学的に活性である。好ましくは、本発明の抗体は、野生型対応物（すなわち、主として又は専ら、例えば一又は複数のヒンジシステインがジスルフィド結合形成を不能に

するかどうかにより決定される、それらがジスルフィド結合形成可能である度合いに関して、本発明の抗体と異なる抗体)と実質的に類似の生物学的特徴(例えば限定するものではないが、抗原結合能)及び/又は物理化学的特徴を有する。

【0028】

本発明の抗体と方法において、システイン残基は、当該分野で知られている多くの方法及び技術の任意のものによってジスルフィド結合形成を不能にすることができます。例えば、通常はジスルフィド結合を形成可能なヒンジ領域システインを欠失させることができます。他の例では、通常はジスルフィド結合を形成可能なヒンジ領域のシステイン残基を他のアミノ酸、例えばセリンで置換することができます。ある実施態様では、ヒンジ領域システイン残基は、ジスルフィド結合できないように改変されうる。

本発明の抗体は様々な形態の何れであってもよい。一実施態様では、本発明の抗体は、完全長抗体であるか又は実質的に完全長である(つまり、完全な又はほぼ完全な重鎖配列と完全な又はほぼ完全な軽鎖配列を含む)。一側面では、本発明はヒト化された抗体を提供する。他の側面では、本発明はヒト抗体を提供する。他の側面では、本発明はキメラ抗体を提供する。

【0029】

本発明の抗体はまた抗体断片、例えばFc又はFc融合ポリペプチドでありうる。Fc融合ポリペプチドは一般に異種性ポリペプチド配列(例えば抗原結合ドメイン)に融合したFc配列(又はその断片)、例えば免疫グロブリンFc配列に融合したレセプター細胞外ドメイン(ECD)(例えばIgG2Fcに融合したF1tレセプターECDF)を含む。例えば、一実施態様では、Fc融合ポリペプチドは、f1t、f1k等々を含むVEGFレセプターであってもよいVEGF結合ドメインを含む。本発明の抗体は一般に重鎖定常ドメインと軽鎖定常ドメインを含む。ある実施態様では、本発明の抗体は、重鎖間ジスルフィド結合可能なFc領域、好ましくはヒンジ領域に付加、置換又は修飾アミノ酸を含まない。一実施態様では、本発明の抗体は、重鎖間二量体化又は多量体化の形成のための修飾(例えば限定するものではないが、ロイシンジッパーのような二量体化配列を形成するための一又は複数のアミノ酸の挿入)を含まない。ある実施態様では、Fc配列の一部(全てではない)が本発明の抗体では失われている。これらの実施態様の幾つかでは、失われているFc配列はCH2及び/又はCH3ドメインの一部又は全てである。これらの実施態様の幾つかでは、抗体は、例えば重鎖断片のC末端に融合した二量体化ドメイン(例えばロイシンジッパー配列)を含む。

【0030】

本発明の方法及び抗体のある実施態様では、重鎖ポリペプチドは、第一及び第二重鎖ポリペプチドの(つまり重鎖のFc配列間の)、ホモ二量体化を最小にしながらヘテロ二量体化を促進する少なくとも一つの特徴を含む。そのような特徴はここに記載した本発明の方法によって得ることができる免疫グロブリン集団の収率及び/又は純度及び/又は均一性を改善する。一実施態様では、第一重鎖ポリペプチド及び第二重鎖ポリペプチドのFc配列は界面で合致し/相互作用する。第一及び第二FcポリペプチドのFc配列が界面で合致するある実施態様では、第二Fcポリペプチド(配列)の界面は第一Fcポリペプチド(配列)の界面のキャビティに位置させることができる隆起を含む。一実施態様では、第一Fcポリペプチドはキャビティをコードするために鋳型/元のポリペプチドから改変されており、又は第二Fcポリペプチドは隆起をコードするために鋳型/元のポリペプチドから改変されており、又は双方である。一実施態様では、第一Fcポリペプチドはキャビティをコードするために鋳型/元のポリペプチドから改変され、かつ第二Fcポリペプチドは隆起をコードするために鋳型/元のポリペプチドから改変されており、又は双方である。一実施態様では、第二Fcポリペプチドの界面は第一Fcポリペプチドの界面のキャビティに位置せしめることができ隆起を含み、ここでキャビティ又は隆起又は双方が第一及び第二Fcポリペプチドの界面にそれぞれ導入されている。第一及び第二Fcポリペプチドが界面で合致する幾つかの実施態様では、第一Fcポリペプチド(配列)の界面は第二Fcポリペプチド(配列)の界面のキャビティに位置させることができ隆起を含

10

20

30

40

50

む。一実施態様では、第二 Fc ポリペプチドはキャビティをコードするために鋳型 / 元のポリペプチドから改変されており、又は第一 Fc ポリペプチドは隆起をコードするために鋳型 / 元のポリペプチドから改変されており、又は双方である。一実施態様では、第二 Fc ポリペプチドはキャビティをコードするために鋳型 / 元のポリペプチドから改変され、かつ第一 Fc ポリペプチドは隆起をコードするために鋳型 / 元のポリペプチドから改変されており、又は双方である。一実施態様では、第一 Fc ポリペプチドの界面は第二 Fc ポリペプチドの界面のキャビティに位置せしめることができる隆起を含み、ここで、隆起又はキャビティ又は双方が第一及び第二 Fc ポリペプチドの界面にそれぞれ導入されている。

【0031】

10

一実施態様では、隆起とキャビティはそれぞれ天然に生じるアミノ酸残基を含む。一実施態様では、隆起を含む Fc ポリペプチドは、鋳型 / 元のポリペプチドの界面からの元の残基を元の残基よりも大なる側鎖体積を有する移入残基で置き換えることにより產生される。一実施態様では、隆起を含む Fc ポリペプチドは、上記ポリペプチドの界面からの元の残基をコードする核酸を、元の残基よりも大なる側鎖体積を有する移入残基をコードする核酸で置き換える工程を含む方法により產生される。一実施態様では、元の残基はトレオニンである。一実施態様では、移入残基はアルギニン (R) である。一実施態様では、移入残基はフェニルアラニン (F) である。一実施態様では、移入残基はチロシン (Y) である。一実施態様では、移入残基はトリプトファン (W) である。一実施態様では、移入残基は R、F、Y 又は W である。一実施態様では、隆起は、鋳型 / 元のポリペプチドにおいて 2 つ以上の残基を置き換えることによって產生される。一実施態様では、隆起を含む Fc ポリペプチドは、アミノ酸番号を Kabat 等 (Sequences of proteins of immunological interest, 5 版, Vol. 1 (1991; NIH, Bethesda, MD) の pp.688-696) の EU 番号付け系に従って、366 位のトレオニンをトリプトファンで置き換えることを含む。

20

【0032】

30

ある実施態様では、キャビティを含む Fc ポリペプチドは、鋳型 / 元のポリペプチドの界面の元の残基を元の残基よりも小なる側鎖体積を有する移入残基で置き換えることにより產生される。例えば、隆起を含む Fc ポリペプチドは、上記ポリペプチドの界面からの元の残基をコードする核酸を、元の残基よりも小なる側鎖体積を有する移入残基をコードする核酸で置き換える工程を含む方法により產生されうる。一実施態様では、元の残基はトレオニンである。一実施態様では、元の残基はロイシンである。一実施態様では、元の残基はチロシンである。一実施態様では、移入残基はシステイン (C) ではない。一実施態様では、移入残基はアラニン (A) である。一実施態様では、移入残基はセリン (S) である。一実施態様では、移入残基はトレオニン (T) である。一実施態様では、移入残基はバリン (V) である。キャビティは鋳型 / 元のポリペプチドの一又は複数の元の残基を置き換えることによって產生されうる。例えば、一実施態様では、キャビティを含む Fc ポリペプチドは、トレオニン、ロイシン及びチロシンからなる群から選択される二以上の元のアミノ酸を置き換えることを含む。一実施態様では、キャビティを含む Fc ポリペプチドは、アラニン、セリン、トレオニン及びバリンからなる群から選択される二以上の移入残基を含む。ある実施態様では、キャビティを含む Fc ポリペプチドは、トレオニン、ロイシン及びチロシンからなる群から選択される二以上の元のアミノ酸を置き換えることを含み、ここで上記元のアミノ酸はアラニン、セリン、トレオニン及びバリンからなる群から選択される移入残基で置き換えられる。一実施態様では、キャビティを含む Fc ポリペプチドは、アミノ酸番号を上掲の Kabat 等の EU 番号付け系に従って、366 位のトレオニンをセリンで置き換えることを含む。一実施態様では、キャビティを含む Fc ポリペプチドは、アミノ酸番号を上掲の Kabat 等の EU 番号付け系に従って、368 位のロイシンをアラニンで置き換えることを含む。一実施態様では、キャビティを含む Fc ポリペプチドは、アミノ酸番号を上掲の Kabat 等の EU 番号付け系に従って、407 位のチロシンをバリンで置き換えることを含む。一実施態様では、キャビティを含む Fc ポリペプチドは、アミノ酸番号を上掲の Kabat 等の EU 番号付け系に従って、T366S、L368

40

50

A 及び Y 4 0 7 V からなる群から選択される二以上のアミノ酸置換を含む。これらの抗体断片のある実施態様では、隆起を含む F c ポリペプチドは、アミノ酸番号を上掲のKabat 等の E U 番号付け系に従って、3 6 6 位のトレオニンをトリプトファンで置き換えることを含む。

【 0 0 3 3 】

第一及び第二重鎖ポリペプチドの F c 配列は、それらが二量体化して（ここに定めた）F c 領域を形成することができる限り、同一でも同一でなくともよい。第一 F c ポリペプチドは、一般に、例えばヒンジ、定常及び／又は可変ドメイン配列を有する、単一ポリペプチド中の免疫グロブリン重鎖の一又は複数のドメインに近接して結合している。一実施態様では、第一 F c ポリペプチドはヒンジ配列の少なくとも一部（全部を含む）、C H 2 ドメインの少なくとも一部（全てを含む）及び／又は C H 3 ドメインの少なくとも一部（全部を含む）を含む。一実施態様では、第一 F c ポリペプチドは免疫グロブリンのヒンジ配列及び C H 2 及び C H 3 ドメインを含む。一実施態様では、第二 F c ポリペプチドはヒンジ配列の少なくとも一部（全部を含む）、C H 2 ドメインの少なくとも一部（全てを含む）及び／又は C H 3 ドメインの少なくとも一部（全部を含む）を含む。一実施態様では、第二 F c ポリペプチドは免疫グロブリンのヒンジ配列及び C H 2 及び C H 3 ドメインを含む。一実施態様では、本発明の抗体は第一及び第二 F c ポリペプチドを含み、その各々が、少なくとも一つの抗体定常ドメインの少なくとも一部を含む。一実施態様では、抗体定常ドメインは C H 2 及び／又は C H 3 ドメインである。定常ドメインを含む本発明の抗体の実施態様の任意のものにおいて、抗体定常ドメインは、例えば I g G のような任意の免疫グロブリンクラスからのものでありうる。免疫グロブリン源は任意の適切な種由来（例えば I g G はヒト I g G₁ でありうる）か又は合成形態でありうる。

一実施態様では、本発明の抗体のそれぞれ第一及び第二標的分子結合アーム中の第一軽鎖ポリペプチドと第二軽鎖ポリペプチドは、異なった／別個の抗原結合決定基（例えば異なった／別個の可変ドメイン配列）を含む。一実施態様では、本発明の抗体のそれぞれ第一及び第二標的分子結合アーム中の第一軽鎖ポリペプチドと第二軽鎖ポリペプチドは、同じ（つまり、共通の）抗原結合決定基（例えば同じ可変ドメイン配列）を含む。

一実施態様では、本発明の抗体は（a）変異ヒンジ領域（ここに記載のとおり）と（b）ヘテロ多量体化を亢進する重鎖界面（ここに記載のとおり）の双方を含む。

【 0 0 3 4 】

本発明の方法における第一及び第二宿主細胞は、対象のポリペプチドの発現と単離を可能にする任意の設定下で培養することができる。例えば、一実施態様では、本発明の方法における第一及び第二宿主細胞は、別個の細胞培養物として成長させられる。他の実施態様では、本発明の方法における第一及び第二宿主細胞は、双方の宿主細胞を含む混合培養物として成長させられる。

ある場合には、本発明の方法においてポリペプチドの発現レベルを制御するのが有利であり得る。適切なレベルの制御を達成するための様々な方法が当該分野で知られている。例えば、本発明の方法の一実施態様では、ポリペプチドをコードする核酸を、発現レベルを制御するために適切な強度の翻訳開始領域（T I R）に作用可能に結合させる。一実施態様では、T I R はほぼ等しい相対強度である。例えば、一実施態様では、第一宿主細胞と第二宿主細胞中でのポリペプチドの発現のための T I R は約 1 : 1 の相対強度を有する。他の実施態様では、第一宿主細胞と第二宿主細胞中でのポリペプチドの発現のための T I R は約 2 : 2 の相対強度を有する。

本発明の方法は、一般にここに記載した本発明の方法に包含される過程を開始し及び／又は完了させるために明らかな常套的工程である他の工程を含みうることが理解されるべきである。例えば、一実施態様では、本発明の方法の工程（a）の前に、第一重鎖及び軽鎖ポリペプチドをコードする核酸を第一宿主細胞に導入し、第二重鎖及び軽鎖ポリペプチドをコードする核酸を第二宿主細胞に導入する工程がある。一実施態様では、本発明の方法は少なくとも二つの区別される標的分子に結合特異性を有するヘテロ多量体分子を精製する工程を更に含む。一実施態様では、単離ポリペプチドの約 10、15、又は 20 % 以

10

20

30

40

50

下がヘテロ多量体を精製する工程の前に单量体又は重鎖二量体として存在している。

【0035】

本発明の方法におけるポリペプチドは様々な温度でインキュベートすることができる。例えば、一実施態様では、本発明の方法におけるポリペプチドアニーリング工程（例えば本発明の所定の方法の工程（d））は単離ポリペプチドの混合物を室温でインキュベートすることを含む。他の実施態様では、本発明の方法におけるポリペプチドアニーリング工程（例えば本発明の所定の方法の工程（d））は単離ポリペプチドの混合物を例えば少なくとも約40まで、少なくとも約50まで加熱することを含む。一実施態様では、混合物は約40と60の間まで加熱する。一実施態様では、混合物は約40と65の間まで加熱する。一実施態様では、混合物は約37と65の間まで加熱する。一実施態様では、混合物は約50に加熱する。一実施態様では、本発明の方法におけるポリペプチドアニーリング工程（例えば本発明の所定の方法の工程（d））は単離ポリペプチドの混合物を少なくとも約2分、4分、6分、8分、10分、15分、30分、45分、60分、75分、120分、加熱することを含む。一実施態様では、本発明の方法におけるポリペプチドアニーリング工程（例えば本発明の所定の方法の工程（d））は単離ポリペプチドの混合物を2～75、5～120分、6～60、8～45、10～30、又は13～30分、加熱することを含む。一実施態様では、本発明の方法におけるポリペプチドアニーリング工程（例えば本発明の所定の方法の工程（d））は単離ポリペプチドの混合物を約5分、約10分、約15分、約20分、約25分、約30分、約60分、約75分、約120分、加熱することを含む。本発明の方法の一実施態様では、ポリペプチド混合物は加熱後に例えば4まで冷却される。
10
20

【0036】

ある例では、本発明のポリペプチドアニーリング工程はpH緩衝条件下で実施される。例えば、一実施態様では、本発明の方法におけるインビトロポリペプチドアニーリング工程（例えば本発明の所定の方法の工程（d））は、単離ポリペプチドの混合物を約4と約11の間のpH（約4と約11を含む）でインキュベートすることを含む。一実施態様では、pHは約5.5である。一実施態様では、pHは約7.5である。

ある例では、本発明のポリペプチドアニーリング工程は、尿素のような変性剤中で単離ポリペプチドの混合物をインキュベートすることを含む。多くの例では、幾つかの従来の方法において使用されるような化学結合工程は望ましくなく、及び/又は望ましくない性質をつくり出す。従って、ある実施態様では、本発明の方法は第一及び第二重鎖ポリペプチド間に化学結合は含まない。
30

本発明の方法は高い均一性でヘテロ多量体分子を產生することができる。従って、本発明は、ポリペプチドの少なくとも約60、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99%が、第一重鎖及び軽鎖ポリペプチド対と第二重鎖及び軽鎖ポリペプチド対を含む複合体中に存在する方法を提供する。一実施態様では、本発明は、ポリペプチドの約60～99%、70～98%、75～97%、80～96%、85～96%、又は90～95%が、第一重鎖及び軽鎖ポリペプチド対と第二重鎖及び軽鎖ポリペプチド対を含む複合体中に存在する方法を提供する。

【0037】

第一及び第二重鎖-軽鎖ポリペプチド対を含む本発明の方法の所定の実施態様では、第一及び第二重鎖-軽鎖ポリペプチド対がそれぞれ互いに共有結合した（例えばジスルフィド結合した）重鎖及び軽鎖を含む。所定の実施態様では、第一及び第二ポリペプチド対の量は、ポリペプチドアニーリング/組合せ工程において特定の比、例えばほぼ等モル量（比）で提供される。他の実施態様では、第二対に対する第一対の比は、アニーリング/組合せ工程中、約1.2：1；1.3：1；1.4：1；又は1.5：1である。他の実施態様では、第一対に対する第二対の比は、アニーリング/組合せ工程中、約1.2：1；1.3：1；1.4：1；又は1.5：1である。

本発明の所定の方法において所望のヘテロ多量体の精製を容易にするためには、第一ポリペプチド対と第二ポリペプチド対の間のpI値差を少なくとも0.5に維持することが
50

望ましい場合がある。当業者には明らかであるように、ポリペプチド p I 値は、抗原結合及び / 又は免疫原性に実質的に影響を及ぼすことなく例えば C D R 又は F R 配列における選択的置換のような常套的な方法によって変えることができる。

【 0 0 3 8 】

一実施態様では、本発明の抗体は、I g G、I g E、I g A、I g M 及び I g D からなる群から選択される。ある実施態様では、本発明の抗体のヒンジ領域は、好ましくは、I g G、I g A 及び I g D からなる群から選択される免疫グロブリンのものである。例えば、ある実施態様では、抗体又は抗体のヒンジ領域は I g G のものであり、それは、ある実施態様では、I g G 1 又は I g G 2 (例えば I g G 2 a 又は I g G 2 b) である。ある実施態様では、本発明の抗体は I g G、I g A 及び I g D からなる群から選択される。一実施態様では、抗体はヒト、ヒト化、キメラ又は非ヒト (例えばマウス) 由来である。

本発明の抗体は様々な設定で様々な用途を有する。一例では、本発明の抗体は治療用抗体である。他の例では、本発明の抗体はアゴニスト抗体である。他の例では、本発明の抗体はアンタゴニスト抗体である。本発明の抗体はまた診断用抗体であり得る。更に他の例では、本発明の抗体は阻止抗体である。他の例では、本発明の抗体は中和抗体である。

一側面では、本発明は患者の疾患を治療し又は遅延させることを提供し、該方法は、上記患者に本発明の抗体を投与することを含む。一実施態様では、疾患は癌である。他の実施態様では、疾患は血管形成の調節不全に関連する。他の実施態様では、疾患は免疫疾患、例えば関節リウマチ、自己免疫性血小板減少性紫斑病、全身性エリテマトーデス等々である。

【 0 0 3 9 】

本発明の抗体は一般に抗原に、好ましくは特異的に、結合可能である。そのような抗原には、例えば、腫瘍抗原、細胞生存調節因子、細胞増殖調節因子、組織発達又は分化に関連した (例えば機能的に寄与することが知られているか推測されている) 分子、細胞表面分子、リンホカイン、サイトカイン、細胞分裂周期の調節に関連した分子、脈管形成に関連した分子及び血管形成に関連した (例えば機能的に寄与することが知られているか推測されている) 分子が含まれる。本発明の抗体が結合可能な抗原は、上述のカテゴリーの一つのサブセットのメンバーであり得、上記カテゴリーの他のサブセットは (対象の抗原に対して) 別個の特徴を有する他の分子 / 抗原を含む。対象の抗原はまた二以上のカテゴリーに属していると思われる。一実施態様では、本発明は、細胞表面分子ではない腫瘍抗原に、好ましくは特異的に、結合する抗体を提供する。一実施態様では、腫瘍抗原は、レセプター・ポリペプチドのような細胞表面分子である。他の例では、ある実施態様では、本発明の抗体は、クラスター分類因子ではない腫瘍抗原に、好ましくは特異的に、結合する。他の例では、本発明の抗体は、ある実施態様では例えば C D 3 又は C D 4 ではないクラスター分類因子に、好ましくは特異的に、結合する。ある実施態様では、本発明の抗体は抗 V E G F 抗体である。

【 0 0 4 0 】

抗体は更なる所望の特徴を高め、及び / 又は付加するように修飾されうる。そのような特徴には、生物学的機能、例えば免疫エフェクター機能、望ましいインビボ半減期 / クリアランス、生物学的利用能、体内分布又は他の薬物動態学的特徴が含まれる。そのような修飾は当該分野でよく知られ、また経験的に決定することができ、ペプチド系であるかそうではない部分による修飾が含まれうる。例えば、抗体は、一般には宿主細胞の性質に少なくとも部分的に依存して、グリコシル化されるか非グリコシル化状態であり得る。好ましくは、本発明の抗体は非グリコシル化状態である。本発明の方法によって生産される非グリコシル化抗体は、ついで、例えば当該分野でよく知られているインビトログリコシル化法を使用してグリコシル化させることができる。上述しここに記載されるように、本発明の抗体は原核生物細胞、例えば大腸菌中で産生することができる。大腸菌で産生された抗体は一般に非グリコシル化状態であり、哺乳動物宿主細胞 (例えば C H O) で産生された抗体に見いだされるグリコシル化プロファイルに通常関連する生物学的機能を欠いている。

10

20

30

40

50

本発明はまた異種性部分とコンジュゲートせしめられて本発明の抗体を含む免疫コンジュゲートを提供する。任意の異種性部分が、抗体へのその結合が抗体の所望の機能及び/又は特徴を実質的に低減させない限り、適しているであろう。例えば、ある実施態様では、免疫コンジュゲートは細胞傷害剤である異種性部分を含む。ある実施態様では、上記細胞傷害剤は放射性同位元素、化学療法剤及び毒素からなる群から選択される。ある実施態様では、上記毒素はカリチアマイシン、メイタンシン及びトリコセンからなる群から選択される。ある実施態様では、免疫コンジュゲートは検出可能なマーカーである異種性部分を含む。ある実施態様では、上記検出可能なマーカーは、放射性同位元素、リガンド-レセプター対のメンバー、酵素-基質対のメンバー及び蛍光共鳴エネルギー転移対のメンバーからなる群から選択される。

10

【0041】

一側面では、本発明は、本発明の抗体と、ある実施態様では薬学的に許容できる担体を含有する組成物を提供する。

他の側面では、本発明は、ここに記載の免疫コンジュゲートと、ある実施態様では薬学的に許容できる担体を含有する組成物を提供する。

一側面では、本発明は本発明の多重特異性抗体の集団を含有する組成物を提供する。当業者には明らかなように、一般には、そのような組成物は完全には(つまり100%)均一ではない。しかしながら、ここに記載するように、本発明の方法は多重特異性抗体の実質的に均一な集団を製造することが可能である。例えば、本発明は、抗体を含有し、該抗体の少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99%がここに記載した本発明の多重特異性抗体である組成物を提供する。

20

一側面では、本発明はジスルフィド結合した第一対の重鎖及び軽鎖ポリペプチドとジスルフィド結合した第二対の重鎖及び軽鎖ポリペプチドを含む反応混合物を含有し、ここで、第一対と第二対の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%が多量体化(例えばヘテロ二量体化)されて多重特異性(例えば二重特異性)抗体を形成している組成物を提供する。

【0042】

一側面では、本発明は、第一宿主細胞と第二宿主細胞の混合物を含み、第一宿主細胞が第一対の重鎖及び軽鎖ポリペプチドをコードする核酸を含み、第二宿主細胞が第二対の重鎖及び軽鎖ポリペプチドをコードする核酸を含み、二つの対が異なった標的結合特異性を有している細胞培養物を提供する。一側面では、本発明は、第一宿主細胞と第二宿主細胞の混合物を含み、第一宿主細胞が第一対の重鎖及び軽鎖ポリペプチドを発現し、第二宿主細胞が第二対の重鎖及び軽鎖ポリペプチドを発現し、二つの対が異なった標的結合特異性を有している細胞培養物を提供する。

30

他の側面では、本発明は容器とそこに含まれる組成物を含む製造品を提供し、ここで、組成物は本発明の分子(例えば抗体)を含む。他の側面では、本発明は容器とそこに含まれる組成物を含む製造品を提供し、ここで、組成物はここに記載した免疫コンジュゲートを含む。ある実施態様では、これらの製造品は上記組成物を使用するための指示書を更に含む。

更に他の側面では、本発明は本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを提供する。更に他の側面では、本発明はここに記載した免疫コンジュゲートをコードするポリヌクレオチドを提供する。

40

【0043】

一側面では、本発明は本発明の分子(例えば抗体)を発現するための組換えベクターを提供する。他の例では、本発明は本発明の免疫コンジュゲートを発現するための組換えベクターを提供する。

一側面では、本発明は本発明のポリヌクレオチド又は組換えベクターを含む宿主細胞を提供する。一実施態様では、宿主細胞は哺乳動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞である。一実施態様では、宿主細胞は原核生物細胞である。ある実施態様では、宿主細胞はグラム陰性細菌細胞であり、それは、ある実施態様では大腸菌である

50

。本発明の宿主細胞は、宿主細胞におけるその発現が本発明の方法における抗体の収率を向上させる分子をコードするポリヌクレオチド又は組換えベクターを更に含みうる。例えば、そのような分子はシャペロンタンパク質でありうる。一実施態様では、上記分子は D s b A、D s b C、D s b G 及び F k p A からなる群から選択される原核生物ポリペプチドである。ある実施態様では、上記ポリヌクレオチド又は組換えベクターは D s b A と D s b C の双方をコードする。ある実施態様では、大腸菌宿主細胞は内因性プロテアーゼ活性を欠く株のものである。ある実施態様では、大腸菌宿主細胞の遺伝子型は d e g P 及び p r c 遺伝子を欠き、変異体 s p r 遺伝子を有する大腸菌株のものである。

【0044】

一側面では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍、細胞増殖性疾患、免疫（例えば自己免疫）疾患及び／又は血管新生関連疾患の治癒的及び／又は予防処置のための医薬の調製における本発明の分子（例えば抗体）の使用を提供する。10

一側面では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍、細胞増殖性疾患、免疫（例えば自己免疫）疾患及び／又は血管新生関連疾患の治癒的及び／又は予防処置のための医薬の調製における本発明の核酸の使用を提供する。

一側面では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍、細胞増殖性疾患、免疫（例えば自己免疫）疾患及び／又は血管新生関連疾患の治癒的及び／又は予防処置のための医薬の調製における本発明の発現ベクターの使用を提供する。

一側面では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍、細胞増殖性疾患、免疫（例えば自己免疫）疾患及び／又は血管新生関連疾患の治癒的及び／又は予防処置のための医薬の調製における本発明の宿主細胞の使用を提供する。20

一側面では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍、細胞増殖性疾患、免疫（例えば自己免疫）疾患及び／又は血管新生関連疾患の治癒的及び／又は予防処置のための医薬の調製における本発明の製造品の使用を提供する。

一側面では、本発明は、疾患、例えば癌、腫瘍、細胞増殖性疾患、免疫（例えば自己免疫）疾患及び／又は血管新生関連疾患の治癒的及び／又は予防処置のための医薬の調製における本発明のキットの使用を提供する。

【0045】

（発明の実施の形態）

本発明は、抗体のようなヘテロ多量体複合体分子を産生するための改善された方法、組成物、キット及び製造品を提供する。本発明は実用的な収率と所望の純度でのヘテロ多量体の産生を可能にする。本発明は、性質が多重特異的で高度に安定である分子の使用が非常に望ましく及び／又は必要とされている病理的症状を治療するために使用することができる複合体分子の効果的で商業的に実行可能な生産を可能にする。本発明の方法、組成物、キット及び製造品の詳細がここに提供される。30

【0046】

一般的技術

本発明の実施は、特に明記しない限り、当業者の技量範囲内にある分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学及び免疫学の一般的技術を使用して行う。このような技術は、例えば「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」，第2版(Sambrook等, 1989)；「Oligonucleotide Synthesis」(M. J. Gait編, 1984)；「Animal Cell Culture」(R. I. Freshney編, 1987)；「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc.)；「Current Protocols in Molecular Biology」(F. M. Ausubel等編, 1987, 及び定期的更新物)；「PCR: The Polymerase Chain Reaction」, (Mullis等編, 1994)；「A Practical Guide to Molecular Cloning」(Perbal Bernard V., 1988)のような文献に十分に説明されている。40

【0047】

定義

ここで使用される「ベクター」という用語は、それが結合している他の核酸を輸送することのできる核酸分子を意味するものである。一つのタイプのベクターは「プラスミド」

10

20

30

40

50

であり、これは付加的なDNAセグメントが結合されうる円形の二重鎖DNAループを意味する。他のタイプのベクターはファージベクターである。他のタイプのベクターはウイルスベクターであり、付加的なDNAセグメントをウイルスゲノムへ結合させうる。所定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内において自己複製することができる（例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクターとエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ得、宿主ゲノムと共に複製される。更に、所定のベクターは、それらが作用可能に結合している遺伝子の発現を指令し得る。このようなベクターはここでは「組換え発現ベクター」（又は単に「組換えベクター」）と呼ぶ。一般に、組換えDNA技術で有用な発現ベクターはしばしばプラスミドの形をとる。本明細書では、「プラスミド」と「ベクター」を相互交換可能に使用する場合が多い。

【0048】

ここで交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを意味し、DNA及びRNAが含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド又は塩基、及び／又はそれらの類似体（アナログ）、又はDNAもしくはRNAポリメラーゼにより、もしくは合成反応によりポリマー中に取り込み可能な任意の基質とすることができます。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含み得る。存在するならば、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの組み立ての前又は後になされ得る。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分により中断されてもよい。ポリヌクレオチドは合成後に、例えば標識との結合により、さらに修飾されてもよい。他のタイプの修飾には、例えば「キャップ（caps）」、類似体との自然に生じたヌクレオチドの一又は複数の置換、ヌクレオチド間修飾、例えば非荷電連結（例えばホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホアミダート、カルバマート等）及び荷電連結（ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート等）を有するもの、ペンドント部分、例えばタンパク質（例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、poly-L-リジン等）を含むもの、インターラーカー（intercalators）を有するもの（例えばアクリジン、ソラレン等）、キレート剤を含むもの（例えば金属、放射性金属、ホウ素、酸化的金属等）、アルキル化剤を含むもの、修飾された連結を含むもの（例えばアルファアノマー核酸等）、並びにポリヌクレオチド（類）の未修飾形態が含まれる。さらに、糖類中に通常存在する任意のヒドロキシル基は、例えばホスホナート基、ホスファート基で置き換えられてもよく、標準的な保護基で保護されてもよく、又は付加的なヌクレオチドへのさらなる連結を調製するように活性化されてもよく、もしくは固体又は半固体支持体に結合していてもよい。5'及び3'末端のOHはホスホリル化可能であり、又は1～20の炭素原子を有するアミン又は有機キャップ基部分で置換することもできる。また他のヒドロキシルは標準的な保護基に誘導体化されてもよい。さらにポリヌクレオチドは当該分野で一般的に知られているリボース又はデオキシリボース糖類の類似形態のものをさらに含み、これらには例えば2'-O-メチル-、2'-O-アリル、2'-フルオロ又は2'-アジド-リボース、炭素環式糖の類似体、アルファ-アノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロース類又はリキソース類、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式類似体、及び非塩基性ヌクレオシド類似体、例えばメチルリボシドが含まれる。一又は複数のホスホジエステル連結は代替の連結基で置き換えるてもよい。これらの代替の連結基には、限定されるものではないが、ホスファートがP(O)S（「チオアート」）、P(S)S（「ジチオアート」）、「(O)NR₂（「アミダート」）、P(O)R、P(O)OR'、CO又はCH₂（「ホルムアセタール」）と置き換えられた実施態様のものが含まれ、ここでそれぞれのR及びR'は独立して、H又は、エーテル(-O-)結合を含んでいてもよい置換もしくは未置換のアルキル(1-20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル又はアラルジル(araldyl)である。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。先の記述は、RNA及びDNAを含むここで引用される全てのポリヌクレオチドに適用される。

10

20

30

40

50

【0049】

ここで使用される場合、「オリゴヌクレオチド」とは、短く、一般的に単鎖であり、また必ずしもそうではないが、一般的に約200未満のヌクレオチド長さの、一般的に合成のポリヌクレオチドを意味する。「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」なる用語は、相互に排他的なものではない。ポリヌクレオチドについての上述した記載はオリゴヌクレオチドと等しく、十分に適用可能である。

「抗体」及び「免疫グロブリン」なる用語は互換性をもって広義な意味で使われ、モノクローナル抗体（例えば完全長又は無傷のモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、単価抗体、多価抗体、多特異性抗体（例えば所望の生物学的活性を示す限りの二重特異性抗体）及び本明細書で記載される抗体断片が含まれる。抗体はヒト、ヒト化及び／又は親和性成熟したものであり得る。10

「抗体断片」は、無傷の抗体の部分のみを含有するものであり、該部分は完全な抗体中に存在する場合、その部分に通常伴う機能の少なくとも一つ、好ましくはほとんど又は全てを保持する。

「抗原結合アーム」、「標的分子結合アーム」なる語句及びその変形例は対象とする標的分子に特異的に結合する能力を有する本発明の抗体の構成成分を指す。一般に、また好ましくは、抗原結合アームは免疫グロブリンポリペプチド配列の複合体、例えば免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖の可変ドメイン配列及び／又はCDRである。

【0050】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原に対している。さらに、典型的に異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。20

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体、あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同性があり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体、あるいは他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同である「キメラ」抗体、並びにそれが所望の生物的活性を有する限りこのような抗体の断片を特に含む(米国特許第4816567号；及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。30

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト免疫グロブリンから得られた最小配列を含むキメラ抗体である。多くの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト靈長類のような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのFRがヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、状況に応じて免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525(1986)；Riechmann等, Nature 332, 323-329(1988)；及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照のこと。また、以下の概説文献及びここに挙げる引用文献も参照のこと：Vaswani及びHamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)；Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)；Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)。40

【0051】

「ヒト抗体」は、ヒトにより生成される抗体のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基を

10

20

30

40

50

有するもの、及び／又は本明細書中に開示したヒト抗体をつくるためのいずれかの技術を使用して、つくられたものである。この定義におけるヒト抗体は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特別に除く。

「親和性成熟」抗体は、その1つ以上のCDRに1つ以上の変更を有する抗体であって、そのような変更を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性を向上させる。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル単位の、さらにはピコモル単位の親和性を有する。親和成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産できる。Marks他は、Bio/Technology, 10:779-783(1992年)において、VHドメインとVLドメインのシャフリングによる親和成熟を開示している。CDRおよび／またはフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas他、Proc Nat. Acad. Sci., USA 91:3809-3813(1994); Schier他、Gene, 169:147-155 (1995); Yelton他、J. Immunol., 155:1994-2004 (1995); Jackson他、J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995); およびHawkins他、J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)に開示されている。10

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質（「アドヘシン」、例えばレセプター、リガンド又は酵素）の「結合ドメイン」と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター成分と組み合わす抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位（抗原結合部位）以外であるアドヘシンアミノ酸配列（すなわち「異種性」）と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含んでなる。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄サブタイプ、IgA、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。20

【0052】

「ヘテロ多量体」、「ヘテロ多量体性複合体」又は「ヘテロ多量体性ポリペプチド」は少なくとも第一ポリペプチド及び第二ポリペプチドを含有する分子であり、該第二ポリペプチドはアミノ酸配列において少なくとも一アミノ酸残基が該第一ポリペプチドとは異なるものである。ヘテロ多量体は第一及び第二のポリペプチドにより形成される「ヘテロダイマー」を含有するかないしは、第一及び第二のポリペプチドにポリペプチドの付加が存在する高次の三次構造を形成することができる。

本明細書中で用いる「ポリペプチド」は、一般におよそ10アミノ酸以上を有するペプチド及びタンパク質を意味する。30

本明細書中で用いる「Fc領域」なる用語は、一般的に免疫グロブリン重鎖のC末端ポリペプチド配列を含有してなるダイマー複合体を指すものであり、C末端ポリペプチド配列は無傷の抗体のパパイン消化により生成されるものである。Fc領域は天然のFc配列又は変異体Fc配列を含有しうる。免疫グロブリン重鎖のFc配列の境界はまちまちであるが、ヒトIgG重鎖のFc配列は、通常、およそCys226位又はおよそPro230位のアミノ酸残基からFc配列のカルボキシル末端まで延びていると定義される。免疫グロブリンのFc配列は、通常、2つの定常ドメイン、1つのCH2ドメイン及び1つのCH3ドメインを含み、場合によってはCH4ドメインを含む。ここでの「Fcポリペプチド」はFc領域を形成するポリペプチド鎖の一つを意味する。Fcポリペプチドは、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄サブタイプ、IgA、IgE、IgD又はIgMなどの任意の好適な免疫グロブリンから得ることができる。いくつかの実施態様では、Fcポリペプチドは野生型のヒンジ配列の一部又はすべてを（一般的にはそのN末端に）含有してなる。いくつかの実施態様では、Fcポリペプチドは機能的ヒンジ配列又は野生型ヒンジ配列を含有していない。40

【0053】

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害（抗体依存性細胞性障害）」及び「ADC C」とは、Fcレセプター（FcR）を発現する非特異的な細胞障害細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球及びマクロファージ）が標的細胞上に結合した抗体を認識して、続く標的細胞の溶解を引き起こす細胞媒介性応答を意味する。

「Fcレセプター」及び「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記載す50

るものである。例えば、FcRは天然配列ヒトFcRである。一般的には、FcRは、IgG抗体(ガンマレセプター)と結合するもので、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。FcRIIIレセプターには、FcRIIA(「活性レセプター」)及びFcRIIB(「阻害レセプター」)が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。他のイソ型(isotype)の免疫グロブリンもまた特定のFcRに結合しうる(例としてJanewayら, *Immuno Biology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (第4版, 1999)を参照のこと)。活性レセプターFcRIIAは、その細胞質ドメインに免疫レセプターチロシン依存性活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)を含んでいる。阻害レセプターFcRIIBは、その細胞質ドメインに免疫レセプターチロシン依存性阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM)を含んでいる(Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)を参照)。FcRに関しては、Ravetch及びKinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel等, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のFcRはここでの「FcR」という用語によって包含される。また、該用語には、母性IgGが胎児に受け継がれる要因となっている新生児性レセプターFcRnも含まれる(Guyer等, *J. Immunol.* 117:587 (1976) Kim等, *J. Immunol.* 24:249 (1994))。

【0054】

ここで用いる「ヒンジ領域」、「ヒンジ配列」及びその変形例は、例えば、Janeway等, *Immuno Biology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (第4版, 1999); Bloom等, *Protein Science* (1997), 6:407-415; Humphreys等, *J. Immunol. Methods* (1997), 209:193-202に示すように、当該分野に知られている意味を含む。

ここで使用される「シストロン」という用語は、概してポリペプチド鎖及び隣接コントロール領域をコードしているヌクレオチド配列を含む翻訳単位に相当する遺伝子要素を指すことを意図する。「隣接コントロール領域」は例えば、翻訳開始領域(TIR; 下記に定義されるようなもの)及び末端領域を含む。

ここで使用される、「翻訳開始領域」又はTIRとは、関心のある遺伝子の翻訳開始の効力を提供する核酸領域を意図する。一般的に、特定のシストロン内にあるTIRは、リボソーム結合部位(RBS)と5'及び3'からRBSの配列を包含する。RBSは、最小で、シャイン-ダルガーノ領域及び開始コドン(AUG)を含むと定義される。従って、TIRはまた、翻訳される核酸配列の少なくとも一部を含む。いくつかの実施態様では、本発明のTIRは、シストロン内の軽鎖又は重鎖をコードする配列の前にくるシグナルペプチドをコードする分泌シグナル配列を含む。TIR変異体は、TIRの特性、例えば以下に定義されるようなその翻訳強度等を変えるTIR領域内配列変異(特に置換)を含んでなる。好ましくは、本発明のTIR変異体は、シストロン内の軽鎖及び重鎖をコードする配列の前にくる分泌シグナル配列の初めの2~約14、好ましくは約4~12、より好ましくは約6のコドン内での配列置換を含んでなる。

【0055】

ここで使用される用語「翻訳強度」とは、TIRの一以上の変異体がポリペプチドの直接分泌に使用され、その結果を同じ培地及びアッセイ条件下で野生型TIR又は幾つかの他のコントロールに比較して得た、コントロールシステムにおける分泌ポリペプチドの測定を意図する。いずれかの見解に限定する訳ではないが、ここで使用される「翻訳強度」は、例えば、mRNA安定性、リボソーム結合部位に結合するリボソームの能力、及び膜を超える転位座の機序の測定を含みうる。

「分泌シグナル配列」又は「シグナル配列」とは、細胞膜、例えば原核生物の内側の膜又は内側と外側の両方の膜を通して、対象となる新しく合成されたタンパク質の方向付けに使用することのできる短いシグナルペプチドをコードする核酸配列を意図する。このよ

10

20

30

40

50

うにして、対象となるタンパク質、例えば免疫グロブリン軽鎖又は重鎖ポリペプチドは、原核宿主細胞の周辺に、あるいは培地中に分泌される。分泌シグナル配列によってコードされるシグナルペプチドは、宿主細胞に内在しても、あるいはそれらは外因性でもよく、発現されるポリペプチドに本来あるシグナルペプチドを含む。分泌シグナル配列は、典型的には発現されるポリペプチドのアミノ末端に存在し、典型的にはポリペプチドの生合成と分泌の間に細胞質から酵素的に取り除かれる。従って、シグナルペプチドは、通常、成熟タンパク質産物には存在しない。

【0056】

「阻止」抗体又は「アンタゴニスト」抗体は、結合する抗原の生物学的活性を抑制又は減少させるものである。10

ここで用いる「アゴニスト抗体」は、対象となるポリペプチドの少なくとも一の機能的活性を模倣する抗体である。

ここで用いる「腫瘍抗原」には、当分野でよく知られた意味であり、正常細胞と比較して腫瘍細胞上に差次的に発現する任意の分子が含まれる。いくつかの実施態様では、前記分子は正常細胞と比較して腫瘍細胞で検出可能なレベル又は有意に高レベルで発現される。いくつかの実施態様では、前記分子は正常細胞と比較して腫瘍細胞で検出可能なレベル又は有意に低レベルの生物学的活性を表す。いくつかの実施態様では、前記分子は、腫瘍細胞の腫瘍原性特定に関与することが知られているか又は考えられている。多くの腫瘍抗原が当分野で公知である。また、分子が腫瘍抗原であるかどうかも、例えばクローニング性アッセイ、形質転換アッセイ、インビトロ又はインビボ腫瘍形成アッセイ、ゲル移動アッセイ、遺伝子ノックアウト分析などの当業者に公知の技術及びアッセイに従って測定することができる。20

「疾患」は、本発明の方法又は抗体を用いた治療によって利益を得る任意の症状である。これには、問題とする疾患に哺乳動物がかかりやすくなる病理学的症状を含む慢性及び急性の疾病又は疾患を含む。限定的なものではなく、ここで治療する疾患の例には、悪性及び良性の腫瘍；非白血病性及びリンパ球性悪性腫瘍；神経系、神経膠系、星状性、視床下部系及び他の腺性、マクロファージ性、上皮性、間質性及び胚盤胞性疾患；及び炎症性、免疫性及び他の血管形成性関連疾患が含まれる。

【0057】

「細胞増殖性疾患」及び「増殖性疾患」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖に関連する疾患を意味する。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。30

ここで使用される「腫瘍」は、悪性であれ良性であれ、全ての新生物細胞成長及び増殖、及び全ての前癌状態及び癌性細胞及び組織を意味する。「癌」、「癌性」、「細胞増殖性疾患」、「増殖性疾患」及び「腫瘍」はここで称される場合は相互に排他的ではない。

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫（例えば非ホジキンリンパ腫）、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平細胞癌(squamous cell cancer)、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平癌腫(squamous carcinoma)、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、脾臓癌、神経膠芽腫、子宮頸管癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝臓性癌及び様々なタイプの頭部及び頸部の癌が含まれる。40

【0058】

ここで言う「自己免疫性疾患」は個体自身の組織に由来する又はその組織に対して生じる非悪性疾患又は疾病である。ここでは、自己免疫性疾患は、特にB細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、ヘアリー細胞白血病及び慢性骨髄芽球性白血病を除く悪性腫瘍又は癌性疾患ないし症状を明確に除く。自己免疫性疾患ないし疾病の例には、限定するものではないが、炎症反応、例えば乾癬および皮膚炎（例えば過敏性皮膚炎）を含む炎症性皮膚病；全身強皮症及び硬化症；炎症性腸疾患関連の反応（例えばクローニング病及び潰瘍性大腸炎）；呼吸窮迫症候群（成人呼吸窮迫症候

群；ARDSを含む）；皮膚炎；髄膜炎；脳炎；ブドウ膜炎；大腸炎；糸球体腎炎；アレルギー性症状、例えばT細胞の浸潤ないし慢性炎症反応を伴う湿疹及び喘息及び他の症状；アテローム性動脈硬化；白血球癒着不全；慢性関節リウマチ；全身性エリテマトーデス（SLE）；真正糖尿病（例えばI型糖尿病又はインシュリン依存性糖尿病）；多発性硬化症；レイノー症候群；自己免疫性甲状腺炎；アレルギー性脳脊髄炎；シェーグレン症候群；若年型糖尿病；及び、一般的に結核、サルコイドーシス、多発性筋炎、肉芽腫症及び脈管炎でみられるサイトカイン及びTリンパ球に媒介される急性及び遅発性過敏症と関連する免疫応答；悪性貧血（アジソン病）；白血球血管外遊出を伴う疾患；中枢神経系（CNS）炎症性疾患；多器官損傷症候群；溶血性貧血（限定するものではなく、クリオグロブリン血症又はクームズ陽性貧血症を含む）；重症筋無力症；抗原-抗体複合体媒介性疾患；抗糸球体基底膜疾患；抗リン脂質症候群；アレルギー性神経炎；グレーブス病；ランパート-イートン筋無力症症候群；水疱性類天疱瘡；ペニフィグス；自己免疫多腺性内分泌障害；ライター症候群；全身強直性症候群；ベーチェット疾患；巨細胞動脈炎；免疫複合体腎炎；IgAネフロパシ；IgM多発性神経炎；免疫血小板減少性紫斑病（ITP）又は自己免疫血小板減少などが含まれる。

【0059】

血管形成調節不全により、本発明の組成物及び方法によって治療される多くの疾患が引き起こされうる。これらの疾患には、非腫瘍性又は腫瘍性症状の両方が含まれる。腫瘍性のものは上記に記載のものに限らない。非腫瘍性疾患には、限定するものではないが、望ましくない又は異常な肥大、関節炎、慢性関節リウマチ（RA）、乾癬、乾癬の斑、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化、アテローム動脈硬化性斑、未熟児の網膜症を含む糖尿病性及び他の増殖性の網膜症、水晶体後纖維増殖、血管新生線内障、年齢関連性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜／脈絡叢血管新生、虹彩(angle)（ルベオーシス）の血管新生、眼性新生血管疾患、脈管再狭窄、動静脈奇形（AVM）、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺の過形成（グレーブズ病を含む）、角膜及び他の組織移植、慢性炎症、肺炎症、急性肺損傷/ARDS、敗血症、原発性肺高血圧症、悪性の肺滲出、大脳浮腫（例えば、急性脳卒中/非開放性頭部損傷/外傷と関連している）、滑液炎症、RAのパンヌス形成、筋炎骨化、高親和性骨形成、骨関節炎（OA）、抵抗性腹水、多囊胞性卵巣の疾患、子宮内膜症、液体性疾患の第3の間隔(3rd spacing)（肺炎、コンパートメント症候群、熱傷、腸疾患）、子宮類線維腫、早産、慢性炎症、例えばIBD（クロhn病および潰瘍性大腸炎）、腎臓同種異系移植片拒絶反応、炎症性腸疾患、ネフローゼ症候群、望ましくない又は異常な組織塊成長（癌以外）、血友病関節、肥大した瘢痕、体毛成長の抑制、Osler-Weber症候群、化膿性肉芽腫水晶体後纖維増殖、強皮症、トロコーマ、脈管粘着力、関節滑膜炎、皮膚炎、子嚢前症、腹水、心嚢貯留液（例えば心外膜炎と関連しているもの）及び胸水が含まれる。

【0060】

ここで使用されるところの「治療」は、治療されている個体又は細胞の天然の過程を改変するための臨床的介入を意味し、予防のため又は臨床的病理の過程中に実施することができる。治療の望ましい効果には、疾病の発生又は再発の防止、症状の寛解、疾病的任意の直接的又は間接的病理的結果の低減、転移の防止、疾病的進行速度の低減、疾病状態の回復又は緩和、及び寛解又は改善された予後が含まれる。ある実施態様では、本発明の抗体は疾患又は疾病的進行を遅らせるために用いられる。

「有効量」とは所望の治療又は予防結果を達成するために必要な用量及び時間での効果的な量を意味する。本発明の抗体の「治療的有効量」は、例えば個体の疾病ステージ、年齢、性別、及び個体の体重、並びに個体に所望の応答を誘発する抗体の能力のような因子に従って変わりうる。また、治療的有効量は抗体の任意の毒性又は有害な効果よりも治療的に恩恵のある効果が上回るものである。「予防的有効量」とは所望の予防結果を達成するために必要な用量及び時間での効果的な量を意味する。典型的には、予防的量は疾患の初期ステージ又はその前の患者に用いるので、予防的有効量は治療的有効量よりも少ない

10

20

30

40

50

であろう。

ここで用いる「実質的に類似」、「実質的に同一」、「実質的に同じ」なる語句及び変形例は、当業者が2つの数値(一般的には、本発明の抗体に関連するものとその参照対応物に関連する他のもの)の差に、該値によって測定される生物学的、物理的又は定量的特性の点で僅かに又は全く生物学的有意性がないと考えるほど、2つの数値が十分に高く類似していることを意味する。前記2つの値間の差は、参照対応物の値の関数として好ましくは約50%未満、好ましくは約40%未満、好ましくは約30%未満、好ましくは約20%未満、好ましくは約10%未満である。

【 0 0 6 1 】

「補体依存性細胞傷害性」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。補体活性化経路は、補体系(C1q)の第一補体が、同族抗原と結合した分子(例えば、抗体)に結合することにより開始される。

一般的に「結合親和性」は、分子（例えば抗体）の单一結合部位とその結合パートナー（例えば抗原）との間の非共有結合的な相互作用の総合的な強度を意味する。特に明記しない限り、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば抗体と抗原）間の1:1相互作用を反映する内因性結合親和性を意味する。一般的に、分子Xのそのパートナーヨに対する親和性は、解離定数（Kd）として表される。親和性は、ここに記載のものを含む当業者に知られている一般的な方法によって測定することができる。低親和性抗体は一般に抗原にゆっくり結合して素早く解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は一般に抗原により速く結合しより長く結合したまとなる。結合親和性の様々な測定方法が当該分野で知られており、その何れかを本発明のために用いることができる。

ここで用いられる「細胞傷害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び／又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 及び Lu の放射性同位体）、化学治療薬、例えばメトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンプラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロランプシル、ダウノルビシン又はその他インターカレート剤、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び／又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むことを意図している。他の細胞傷害性剤を以下に記載する。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

[0 0 6 2]

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、チオテバ及びシクロホスファミド(CYTOXAN(登録商標))のようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピポスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzo-dopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(alretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoaramide)及びトリメチローロメラミン(trimethylololomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(特にプラタシン及びプラタシノン)；デルタ-9-テトラヒドロカナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標))；ラパチヨーネ；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン(合成アナログトポテカン(HYCANTIN(登録商標))、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン(scopolectin)及び9-アミノカンプトテシンを含む)；ブリオスタチン；カリスタチン；CCC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；テニポシド；クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン；ドウオカルマイシン(合成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エロイテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スponギスタチン；クロランプシル、クロロナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラ

ムスチン、イフオスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスターなど、ナイトロジエンマスター；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；抗生物質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシン I I 及びカリケアマイシン I I (例えばAgnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994)参照)；ダイネマイシン(dynemicin)Aを含むダイネマイシン；エスペラマイシン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabiciin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorbicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキソルビシン(モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシン及びデオキシドキソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マイトイマイシンCのようなマイトイマイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodrorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルビシン(zorubicin)；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸アナログ、例えばデノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、ブテロプテリン(pteropterin)、トリメトレキセート(trimetrexate)；プリンアナログ、例えばフルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えばアンシタビン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azaauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(enocitabine)、フロキシリジン(floxuridine)；アンドロゲン類、例えばカルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸リプレニッシャー(replenisher)、例えばフロリン酸(frolinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ビサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziqone)；エルフォルニチン(el fornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium)；エポチロン(epothilone)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；メイタンシノイド(maytansinoid)類、例えばメイタンシン(maytansine)及びアンサミトシン(ansamitocine)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamol)；ニトラクリン(nitraerine)；ペントスタチン；フェナメット(phenaemet)；ピラルビシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K(登録商標)多糖複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニュアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziqone)；2',2'',2'''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類(特にT-2毒素、ベラクリン(verracurin)A、ロリジン(roridine)A及びアングイジン(anguidine))；ウレタン；ビンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標))；ダカーバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド('Ara-C')；チオテバ；タキソイド類、例えばTAXOL(登録商標)パクリタキセル(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、ABRAXANETMパクリタ

10

20

30

40

50

キセルのクレモフォー無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤 (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois)、及びTAXOTERE (登録商標) ドキセタキセル (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France) ; クロランプシル；ゲムシタビン(gemcitabine) (GEMZAR (登録商標)) ; 6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；プラチナアナログ、例えばシスプラチン及びカルボプラチン；ピンプラスチン (VELBAN (登録商標)) ; プラチナ；エトポシド(VP-16)；イホスファミド；マイトキサンtron；ピンクリスチン (ONCOVIN (登録商標)) ; オキサリプラチン；ロイコボビン(leucovovin)；ビノレルビン (NAVELBINE (登録商標)) ; ノバントロン(novantrone)；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノブテリン；イバンドロナート(ibandronate)；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチロールニチニ(DMFO)；レチノイン酸のようなレチノイド；カペシタビン(capecitabine) (XELODA (登録商標))；上述したもののいずれかの薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体：並びに上記のうち2以上の組み合わせ、例えば、シクロフォスファミド、ドキソルビシン、ピンクリスチン、及びプレドニソロン併用療法の略称であるCHOP、及び5-FU及びロイコボビン(leucovovin)とオキサリプラチン (ELOXATINTM) を組み合わせた治療法の略称であるFOLFOXが含まれる。

【0063】

またこの定義に含まれるものには、癌の成長を助けるホルモンの作用を調節、低減、阻止又は阻害するように働き、多くの場合全身処置の形態で使用される抗ホルモン剤がある。それらはそれ自体がホルモンであってもよい。それらは例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体調節物質 (SERM) を含み、例えば、タモキシフェン (NOLVADEX (登録商標) タモキシフェンを含む)、EVISTA (登録商標) ラロキシフェン(raloxifene)、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、LY117018、オナプリストーン(onapristone)、及びFARESTON (登録商標) トレミフェン；抗プロゲステロン；エストロゲンレセプター下方調節剤 (ERD)；卵巣を抑止又は停止させる機能がある作用剤、例えばLUPRON (登録商標) 及びELIGARD (登録商標) 酢酸ロイプロリド等の黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) アゴニスト、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン及びトリプテリリン(tripterelin)；その他抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ビカルタミド；並びに副腎のエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGA SE (登録商標) 酢酸メゲストロール、AROMASIN (登録商標) エキセメスタン、フォルメスタン (formestanone)、ファドロゾール、RIVIROS (登録商標) ボロゾール、FEMARA (登録商標) レトロゾール、及びARIMIDE X (登録商標) アナストロゾールである。加えて、このような化学療法剤の定義には、クロドロネート (例えばBONEFOS (登録商標) 又はOSTAC (登録商標))、DIDROCAL (登録商標) エチドロン酸、NE-58095、ZOMETA (登録商標) ゾレドロン酸 / ゾレドロネート、FOSAMAX (登録商標) アレンドロネート、AREDIA (登録商標) パミドロン酸、SKELID (登録商標) チルドロン酸、又はACTONEL (登録商標) リセドロン酸、並びにトロキサシタビン(troxacitabine) (1,3-ジオキソランスクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に接着細胞の増殖に結びつくシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばPKC-、Raf、及びH-Ras、及び上皮成長因子レセプター (EGF-R)；THERATOPE (登録商標) ワクチン及び遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えばALLOTECTIN (登録商標) ワクチン、LEUVECTIN (登録商標) ワクチン、及びVAXID (登録商標) ワクチン；LURTOTECAN (登録商標) トポイソメラーゼ1阻害剤；ABARELIX (登録商標) r m R H；ラパチニブ (lapatinib ditosylate) (GW572016としても知られるErbB-2及びEGFR二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤) 及び上記のものの何れかの製薬的に許容される塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0064】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、本発明の分子によって標的とされる分子の活

10

20

30

40

50

性化に依存する成長を有する細胞の成長をインビトロ又はインビボの何れかで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、成長阻害剤は、S期でHGF/c-met依存性細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期の進行を（S期以外の位置で）阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期プロッカーは、ビンカス（ビンクリスチン及びビンプラスチン）、タキサン類、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチニン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。タキサン類（パクリタキセル及びドセタキセル）は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル（TAXOTERE（登録商標））、ロン・プーラン・ローラー）は、パクリタキセル（TAXOL（登録商標））、ブリストル-マイヤー・スクウェイブ）の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

「ドキソルビシン」はアントラサイクリン抗生物質である。ドキソルビシンの完全な化学名は、(8S-シス)-10-[(3-アミノ-2,3,6-トリデオキシ- -L-リキソ-ヘキサピラノシル)オキシ]-7,8,9,10-テトラヒドロ-6,8,11-トリヒドロキシ-8-(ヒドロキシアセチル)-1-メトキシ-5,12-ナフタセンジオンである。

【0065】

文脈により特に示されない限り、「第一」ポリペプチド及び「第二」ポリペプチドなる用語及びその変形例は、単に遺伝的同一性のみであり、特定のポリペプチド又は本発明の抗体の構成成分を特定するものではない。

「隆起」は、第一ポリペプチドの界面から突出する少なくとも一つのアミノ酸側鎖であり、従って、ヘテロ多量体を安定化させるために隣接した界面（すなわち第二ポリペプチドの界面）内の代償的なキャビティ内に位置し、これによって例えばホモ多量体形成よりも好ましいヘテロ多量体形成を起こすものを意味する。隆起は、元の界面の中に存在してもよいか又は合成的に導入されてもよい（例えば、界面をコードしている核酸を改変することによって）。通常、第一ポリペプチドの界面をコードする核酸は、隆起をコードするように改変される。これを達成するために、第一ポリペプチドの界面内の少なくとも一つの「元の」アミノ酸残基をコードする核酸は、元のアミノ酸残基より大きな側鎖体積を有する少なくとも一つの「移入」アミノ酸残基をコードする核酸によって置換される。複数の元の残基及び対応する移入残基があり得ることが理解されるであろう。置換される元の残基の数の上限は、第一ポリペプチドの界面内の全ての残基の数である。様々なアミノ残基の側鎖体積は次の表に示される。

【0066】

10

20

30

表1
アミノ酸残基の性質

アミノ酸	一文字表記	質量 ^a (ダルトン)	体積 ^b (オングストローム ³)	露出表面積 ^c (オングストローム ²)
アラニン(Ala)	A	71.08	88.6	115
アルギニン(Arg)	R	156.20	173.4	225
アスパラギン(Asn)	N	114.11	117.7	160
アスパラギン酸(Asp)	D	115.09	111.1	150
システイン(Cys)	C	103.14	108.5	135
グルタミン(Gln)	Q	128.14	143.9	180
グルタミン酸(Glu)	E	129.12	138.4	190
グリシン(Gly)	G	57.06	60.1	75
ヒスチジン(His)	H	137.15	153.2	195
イソロイシン(Ile)	I	113.17	166.7	175
ロイシン(Leu)	L	113.17	166.7	170
リシン(Lys)	K	128.18	168.6	200
メチオニン(Met)	M	131.21	162.9	185
フェニルアラニン(Phe)	F	147.18	189.9	210
プロリン(Pro)	P	97.12	122.7	145
セリン(Ser)	S	87.08	89.0	115
トレオニン(Thr)	T	101.11	116.1	140
トリプトファン(Trp)	W	186.21	227.8	255
チロシン(Tyr)	Y	163.18	193.6	230
バリン(Val)	V	99.14	140.0	155

^a アミノ酸分子量から水分子量をマイナス。値は Handbook of Chemistry and Physics, 43 版 Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961 のもの。

^b 値は A.A. Zamyatnin, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 24:107-123, 1972 のもの。

^c 値は C. Chothia, *J. Mol. Biol.* 105:1-14, 1975 のもの。露出表面積はこの文献の図 6-20 に定義あり。

10

20

30

40

【0067】

隆起の形成のために好適な移入残基は、通常、天然に生じるアミノ酸残基であって、アルギニン(R)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)及びトリプトファン(W)から選択されるのが好ましい。トリプトファン及びチロシンは最も好適である。一実施態様では、隆起の形成のための元の残基は小さな側鎖体積、例えばアラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、セリン、スレオニン又はバリンを有する。

「キャビティ」とは、第二ポリペプチドの界面から窪んでいるために第一ポリペプチド

50

の近接する界面上の一致する隆起に対応する少なくとも一のアミノ酸側鎖を指す。前記キャビティは元の界面内に存在するかあるいは、合成的に導入されてもよい（例えば界面をコードする核酸を変更することによって）。通常、第二ポリペプチドの界面をコードする核酸は、キャビティをコードするために変更される。これを達成するために、第二ポリペプチドの界面内の少なくとも一つの「元の」アミノ酸残基をコードする核酸は、元のアミノ酸残基より小さな側鎖体積を有する少なくとも一つの「移入」アミノ酸残基をコードするDNAによって置換される。複数の元の残基及び対応する移入残基があることが理解されるであろう。置換される元の残基の数の上限は、第二ポリペプチドの界面内の全ての残基の数である。様々なアミノ残基の側鎖体積は上記の表1に示される。キャビティの形成のために好適な移入残基は、通常天然に生じるアミノ酸残基であって、アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)及びバリン(V)から選択されるのが好ましい。セリン、アラニン又はスレオニンが最も好適である。一実施態様では、キャビティの形成のための元の残基は、大きな側鎖体積、例えばチロシン、アルギニン、フェニルアラニン又はトリプトファンを有する。

10

【0068】

「元の」アミノ酸残基は、元の残基より小さいかあるいはより大きな側鎖体積を有することができる「移入」残基によって置換されるものである。移入アミノ酸残基は、天然に生じるアミノ酸残基あるいは非天然に生じるアミノ酸残基でありえるが、好ましくは前者である。「天然に生じる」アミノ酸残基は、遺伝コードによってコードされるものであり、上記の表1において列記されるものである。「非天然に生じる」アミノ酸残基とは、遺伝コードによってコードされないが、ポリペプチド鎖の隣接したアミノ酸残基（一又は複数）を共有結合することが可能である残基を意味する。非天然に生じるアミノ酸残基の例は、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリン及びその他アミノ酸残基類似体、例えばEllman等, Meth. Enzym. 202:301-336 (1991)などに記載されるものである。このような非天然に生じるアミノ酸残基を生成するために、Noren等 Science 244: 182 (1989)及び上掲のEllman等の手順を用いることができる。簡単に言うと、これは、非天然に生じるアミノ酸残基によってサブレッサーtRNAを化学的に活性化した後にRNAのインビトロ転写及び翻訳を伴う。本発明の方法には少なくとも一の元のアミノ酸残基の置換を伴うが、複数の元の残基が置換されうる。通常、第一又は第二のポリペプチドの界面内の全残基のみに、置換される元のアミノ酸残基を含有しうる。典型的に、置換のための元の残基は「埋没される」。「埋没される」とは、残基が基本的に溶媒に近接しないことを意味する。一般に、移入残基は、起こりうる酸化ないしはジスルフィド結合の誤対合を防止するためのシステインではない。

20

【0069】

隆起がキャビティ内に「位置させることができる」とは、第一ポリペプチド及び第二ポリペプチドそれぞれの界面上の隆起及びキャビティの空間的位置と、隆起及びキャビティの大きさが、該隆起が界面での第一及び第二のポリペプチドの正常な会合を有意に混乱させることなくキャビティ内に位置する程度であることを意味する。Tyr、Phe及びTrpなどの隆起は典型的には界面の軸から垂直に伸びておらず、好適な高次構造をとらないので、対応するキャビティを有する隆起の配置は、X線結晶学又は核磁気共鳴(NMR)によって得られるような、三次元構造に基づいた隆起/キャビティ対のモデル化によるものである。これは、従来技術において広く受け入れられている技術を用いて達成される。

30

「元の又は鋳型の核酸」とは、隆起又はキャビティをコードするために「変更する」ことができる（すなわち遺伝子操作するかないしは突然変異させる）対象とするポリペプチドをコードする核酸を意味する。元のあるいははじめの核酸は、天然に生じる核酸でもよいし、事前に変更させてある（例えばヒト化抗体断片）核酸を含んでもよい。核酸を「変更する」とは、元の核酸が対象とするアミノ酸残基をコードする少なくとも一つのコドンを挿入、欠損又は置換することによって変異させることを意味する。通常、元の残基をコードするコドンは、移入残基をコードするコドンによって置換される。このように遺伝的

40

50

にDNAを修飾する技術は、*Mutagenesis: a Practical Approach*, M.J. McPherson, 編集, (IRL Press, Oxford, UK. (1991)に概説されており、例えば、部位特異的突然変異、カセット突然変異誘発及びポリメラーゼ連鎖反応（PCR）突然変異誘発が含まれる。従って、元の／鑄型の核酸を変異させることによって、元の／鑄型の核酸によってコードされる元の／鑄型のポリペプチドは同様に変更される。

【0070】

隆起又はキャビティは、合成手段、例えば組換え技術、インビトロペプチド合成法、前記の非天然に生じるアミノ酸残基を導入するための技術によって、ペプチドの酵素的又は化学的共役によって又はこれらの技術のいくつかの組合せによって、第一又は第二のポリペプチドの界面に「導入する」ことができる。したがって、「導入される」隆起又はキャビティは、「非天然に生じる」又は「非天然の」ものであり、天然のポリペプチド又は元のポリペプチド（例えばヒト化モノクローナル抗体）において存在しないことを意味する。
10

一般に、隆起を形成するための移入アミノ酸残基は、相対的に小さな数の「回転異性体」（例えば約3-6）を有する。「回転異性体(rotomer)」はアミノ酸側鎖のエネルギー的に好適な高次構造である。様々なアミノ酸残基の回転異性体の多くは、Ponders及びRichards, J. Mol. Biol. 193: 775-791 (1987)に概説される。

「単離された」ヘテロ多量体とは、その自然細胞培養物環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、ヘテロ多量体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。いくつかの実施態様では、ヘテロ多量体は、(1)ローリー(Lowry)法によって定量して95重量%超の、最も好ましくは99重量%超のタンパク質まで、(2)スピニングカップシーケンエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに充分な程度まで、あるいは(3)クーマシープルー又は銀染色を用いた還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。
20

【0071】

本発明のヘテロ多量体は通常、実質的な均一性まで精製される。「実質的に均一な」、「実質的に均一な形態」及び「実質的均一性」なる語句は、産物が望ましくないポリペプチドの組合せ（例えばホモ多量体）に由来する副産物を実質的に欠いていることを表すために用いられる。精製度によって表すと、実質的均一性は副産物の量が、割合を重量で表して20%、10%を上回らないか、又は5%以下であるか、又は1%以下であるか、又は0.5%以下であることを意味する。
30

「コントロール配列」という表現は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、リボソーム結合部位、あるいは滅多に用いられない配列などの他のものを含む。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接していて読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。
40

【0072】

ベクター、宿主細胞及び組換え方法

本発明の抗体の組み換え生成のために、コードする核酸を単離して、更なるクローニング(DNA の增幅)又は発現のために複製ベクターに挿入する。抗体をコードする DNA は従来の手順で簡単に単離し、配列決定される(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて)。多くのベクターが利用可能である。用いる宿主細胞にある程度依存してベクターを選択する。一般的に、好適な宿主細胞は原核生物又は真核生物(一般的に哺乳動物)由来の細胞である。

【 0 0 7 3 】

原核生物の宿主細胞を用いた抗体産生

ベクターの構築

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードしているポリヌクレオチド配列は標準的な組換え技術を使用して得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列はハイブリドーマ細胞のような抗体産生細胞から単離し配列決定することができる。あるいは、ポリヌクレオチドはヌクレオチド合成機又は PCR 法を使用して合成することができる。ひとたび得られると、ポリペプチドをコードしている配列は原核生物宿主中で異種ポリヌクレオチドを複製し、発現することが可能な組換えベクター中に挿入される。当該分野において入手でき知られている多くのベクターを本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、主として、ベクターに挿入される核酸のサイズとベクターで形質転換される特定の宿主に依存する。各ベクターは、機能(異種性ポリヌクレオチドの増幅又は発現ないしその両方)及び属する特定の宿主細胞への適合性に応じて、様々な成分を含む。一般的に、限定するものではないが、ベクター成分には複製起源、選択マーカー遺伝子、プロモータ、リボゾーム結合部位(RBS)、シグナル配列、異種性核酸挿入及び転写終末配列が含まれる。

一般には、レプリコン及び宿主細胞と適合性のある種に由来するコントロール配列を含んでいるプラスミドベクターが、宿主細胞と関連して使用される。そのベクターは、通常、複製開始点並びに形質転換細胞において表現型の選択を提供可能なマーキング配列を有する。例えば、一般的に大腸菌は、大腸菌種由来のプラスミドである pBR322 を用いて形質転換する。pBR322 はアンピシリン(Amp)及びテトラサイクリン(Tet)耐性のコード遺伝子を含んでいるため、形質転換細胞を容易に同定することができる。pBR322 、その誘導体又は他の微生物プラスミド又はバクテリオファージも外来性タンパク質を発現する微生物によって使用可能なプロモータを含むか、含むように変更される。特定の抗体の発現に使用される pBR322 誘導体の例は Carter 等の米国特許第 5 6 4 8 2 3 7 号に詳細に記載されている。

【 0 0 7 4 】

また、レプリコン及び宿主微生物と適合性のあるコントロール配列を含んでいるファージベクターを、これらの宿主との関連でトランスフォーミングベクターとして使用することができる。例えば、 GEM.TM.-11 のようなバクテリオファージを、大腸菌 LE 392 のような感受性の宿主細胞を形質転換するために使用できる組換えベクターを作製する際に利用することができる。

本発明の発現ベクターは各ポリペプチド成分をコードする 2 又はそれ以上のプロモータ - シストロン(翻訳単位)対を含みうる。プロモーターはその発現を調節するシストロンの上流(5')に位置している非翻訳配列である。原核生物のプロモーターは典型的には誘導性と構成的との二つのクラスのものがある。誘導性プロモーターは、例えば栄養分の有無又は温度の変化のような、培養条件の変化に応答してその調節下でシストロンの転写レベルを増大させるように誘導するプロモーターである。

様々な潜在的宿主細胞によって認識される非常に多数のプロモータがよく知られている。選択したプロモーターを、制限酵素消化によって供給源 DNA からプロモータを除去し、本発明のベクター内に単離したプロモータを挿入することによって軽鎖又は重鎖をコードするシストロン DNA に作用可能に連結することができる。天然プロモーター配列と多くの異種プロモーターの双方を、標的遺伝子の増幅及び / 又は発現を生じさせるために使

10

20

30

40

50

用することができる。ある実施態様では、天然の標的ポリペプチドプロモーターと比較して、一般的に発現する標的遺伝子をより多く転写させ、効率をよくするので、異種プロモーターが有用である。

【0075】

原核生物宿主での使用に好適なプロモーターには、PhoAプロモーター、ガラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン(trp)プロモーター系及びハイブリッドプロモーター、例えば tac 又は trc プロモーターが含まれる。しかし、細菌中で機能性である他のプロモーター(例えば他の既知の細菌又はファージプロモーター)も好適である。そのヌクレオチド配列は発表されており、よって当業者は、任意の必要とされる制限部位を供給するリンカー又はアダプターを使用して標的軽鎖及び重鎖をコードするシストロンにそれらを作用可能に結合させることができる(Siebenlist等 (1980) Cell 20:269)。

本発明の一側面では、組換えベクター内の各シストロンは、膜を貫通して発現されるポリペプチドの転写を誘導する分泌シグナル配列成分を含む。一般に、シグナル配列はベクターの成分でありうるか、ベクター中に挿入される標的ポリペプチドDNAの一部でありうる。この発明の目的のために選択されるシグナル配列は宿主細胞によって認識されプロセシングされる(つまりシグナルペプチダーゼにより切断される)ものでなければならない。異種ポリペプチドに天然のシグナル配列を認識せずプロセシングする原核生物宿主細胞に対しては、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ippあるいは熱安定性エンテロトキシンII(STII)リーダー、LamB、PhoE、Peb、OmpA及びMBPからなる群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。一実施態様では、発現系の双方のシストロンに使用されるシグナル配列はSTIIシグナル配列又はその変異体である。

【0076】

他の側面では、本発明による免疫グロブリンは宿主細胞の細胞質内で産生されるので、各シストロン内に分泌シグナル配列の存在は必要でない。この点において、免疫グロブリン軽鎖及び重鎖は発現され、折り畳まれ、集合して細胞質内に機能的免疫グロブリンを形成する。ジスルフィド結合形成に好適な細胞質条件を示し、発現したタンパク質サブユニットを好適に折り畳み、集合することができる宿主系が存在する(例として大腸菌trxB-系)。Proba及びPluckthun Gene, 159:203 (1995)。

本発明は、発現されるポリペプチド成分の量的割合を本発明の抗体の分泌及び好適な集積効率が最大となるように調節することができる発現系を提供する。ポリペプチド成分の翻訳強度を同時に調節することによって少なくともある程度その調節が達成される。

【0077】

翻訳強度を調節する一つの方法は、Simmons等の米国特許第5840523号に開示されている。このアプローチはシストロン内の翻訳開始領域(TIR)の変異体を利用する。与えられたTIRに対して、ある範囲の翻訳強さを持つ一群のアミノ酸又は核酸配列変異体をつくり出すことができ、それによって、所望の発現レベルの特異的鎖に対してこの因子を調節するための簡便な手段を提供する。TIR変異体はアミノ酸配列を改変することができるコドン変化を生じる一般的な突然変異誘発法によって产生することができるが、ヌクレオチド配列のサイレント変化が好ましい。TIRの変異には、例えばシグナル配列の変更と共に、シャイン-ダルガーノ配列の数又は間隔の変更が含まれうる。変異体シグナル配列を作成するためのある方法はシグナル配列のアミノ酸配列を変化させない(つまり変化がサイレントである)コード配列の最初での「コドンバンク」の产生である。これは、各コドンの第三のヌクレオチド位置を変化させることによって、達成できる; 加えて、幾つかのアミノ酸、例えばロイシン、セリン、及びアルギニンはバンクの作製に複雑さを付加し得る複数の第一及び第二の位置を有している。この突然変異誘発の方法はYanura等(1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158に詳細に記載されている。

好ましくは、そこの各シストロンに対してある範囲のTIR強さを有する一群のベクタ

10

20

30

40

50

ーが産生される。この制限された群は各鎖の発現レベルと様々なTIR強さの組合せ下で所望の抗体産物の収量の比較をもたらす。TIR強さはSimmons等の米国特許第5840523号に記載されているレポーター遺伝子の発現レベルを定量することによって決定することができる。翻訳強度を比較することによって、所望の個々のTIRsが選択され、本発明の発現ベクター構築物中で組み合わされる。

【0078】

本発明の抗体を発現するのに適した原核生物宿主細胞には、古細菌及び真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物が含まれる。有用な細菌の例には、エシェリキア属(例えば大腸菌)、バシラス属(例えば枯草菌)、エンテロバクター属、シュードモナス種(例えば緑膿菌)、ネズミチフス菌、靈菌(*Serratia marcescans*)、クレブシエラ属、プロテウス属、赤痢菌、根粒菌、ビトレオシラ(*Vitreoscilla*)又はパラコッカス(*Paracoccus*)が含まれる。一実施態様では、グラム陰性菌が使用される。一実施態様では、大腸菌細胞が本発明の宿主として使用される。大腸菌株の例として、遺伝子型W3110 fhuA (tonA) ptr3 lac Iq lacL8 ompT (nmpc-fepE) degP41 kan^R を有する33D3株(米国特許第5639635号)を含むW3110株(Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 1190-1219頁; ATC寄託番号27,325)及びその誘導体が含まれる。また、大腸菌294(ATCC 31,446), 大腸菌B, 大腸菌 1776 (ATCC 31,537)及び大腸菌RV308(ATCC 31,608)など、他の株及びその誘導体も好適である。この例は限定的なものでなく例示的なものである。定義した遺伝子型を有する上記の何れかの細菌の誘導体の構築方法は当該分野で知られており、例えばBas s等, Proteins, 8:309-314 (1990)に記載されている。一般的に、細菌細胞中のレプリコンの複製能を考慮して適した細菌を選択することが必要である。pBR322、pBR325、pACYC177、又はpKN410のようなよく知られたプラスミドを使用してレプリコンを供給する場合、例えば、大腸菌、セラシア属、又はサルモネラ種を宿主として好適に用いることができる。典型的に、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌しなければならず、望ましくは更なるプロテアーゼインヒビターを細胞培養中に導入することができる。

【0079】

抗体産生

上述した発現ベクターで宿主細胞を形質転換又は形質移入し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するのに適するように修飾された通常の栄養培地中で培養する。

形質転換とは、DNAを原核生物宿主中に導入し、そのDNAを染色体外要素として、又は染色体組込みによって複製可能にすることを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換はそのような細胞に適した標準的技術を使用してなされる。塩化カルシウムを用いるカルシウム処理は実質的な細胞壁障害を含む細菌細胞のために一般に使用される。形質転換のための他の方法はポリエチレンギリコール/DMSOを用いる。さらに別の方法はエレクトロポレーションである。

本発明のポリペプチドを生産するために使用される原核生物細胞は当該分野で知られ、選択された宿主細胞の培養に適した培地中で増殖させられる。好適な培地の例には、ルリア培地(LB)プラス必須栄養分サブリメントが含まれる。ある実施態様では、培地は発現ベクターを含む原核生物細胞の増殖を選択的に可能にするために、発現ベクターの構成に基づいて選択される選択剤をまた含む。例えば、アンピシリンがアンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の増殖用培地に加えられる。

【0080】

炭素、窒素及び無機リン酸源の他に任意の必要なサブリメントを、単独で、又は複合窒素源のような他のサブリメント又は培地との混合物として導入される適切な濃度で含有させられうる。場合によっては、培養培地はグルタチオン、システイン、システミン、チオグリコレート、ジチオエリトリトール及びジチオトレイトールからなる群から選択される又は複数の還元剤を含みうる。

10

20

30

40

50

原核生物宿主細胞は適切な温度で培養される。例えば、大腸菌の増殖に対しては、好適な温度は約20℃から約39℃、より好ましくは約25℃から約37℃の範囲、更により好ましくは約30℃である。培地のpHは、主として宿主生物に応じて、約5から約9の範囲の任意のpHでありうる。大腸菌に対しては、pHは好ましくは約6.8から約7.4、より好ましくは約7.0である。

本発明の発現ベクターに誘導性プロモータが用いられる場合、プロモータの活性に適する条件下でタンパク質発現を誘導する。本発明の一態様では、ポリペプチドの転写制御のためにPhoAプロモータが用いられる。したがって、形質転換した宿主細胞を誘導のためにリン酸限定培地で培養する。好ましくは、リン酸限定培地はC.R.A.P培地である（例えばSimmons等、J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147を参照）。当該分野で知られているように、様々な他の誘導因子を、用いるベクター構築物に応じて用いることができる。10

【0081】

一実施態様では、発現された本発明のポリペプチドは宿主細胞の細胞膜周辺中に分泌され、そこから回収される。タンパク質の回収は、一般的には浸透圧ショック、超音波処理又は溶解のような手段によって典型的には微生物を破壊することを含む。ひとたび細胞が破壊されると、細胞片又は全細胞を遠心分離又は濾過によって除去することができる。タンパク質は、例えばアフィニティー樹脂クロマトグラフィーによって更に精製することができる。あるいは、タンパク質は培養培地に輸送しそこで分離することができる。細胞を培養物から除去することができ、培養上清は濾過され、生成したタンパク質の更なる精製のために濃縮される。発現されたポリペプチドを更に単離し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（PAGE）及びウェスタンプロットアッセイ法のような一般的に知られている方法を使用して同定することができる。20

本発明の一側面では、抗体産生は発酵法によって多量に受け継がれる。組換えタンパク質の生産には様々な大規模流加発酵法を利用することができます。大規模発酵は少なくとも1000リットルの容量、好ましくは約1000から10000リットルの容量である。これらの発酵槽は、酸素と栄養分、特にグルコース（好ましい炭素／エネルギー源）を分散させる攪拌翼を使用する。小規模発酵とは一般におよそ100リットル以下の容積で、約1リットルから約100リットルの範囲でありうる発酵槽での発酵を意味する。30

【0082】

発酵法では、タンパク質の発現の誘導は、典型的には、細胞が適切な条件下にて、初期定常期に細胞があるステージで、所望の密度、例えば約180-220のOD550まで増殖したところで開始される。当該分野で知られ上述されているように、用いられるベクターコンストラクトに応じて、様々なインデューサーを用いることができる。細胞を誘導前の短い時間の間、増殖させてもよい。細胞は通常約12-50時間の間、誘導されるが、更に長い又は短い誘導時間としてもよい。

本発明のポリペプチドの生産収量と品質を改善するために、様々な発酵条件を変更することができる。例えば、分泌される抗体ポリペプチドの正しい組み立てとフォールディングを改善するために、例えばDsbタンパク質（DsbA、DsbB、DsbC、DsbD及び/又はDsbG）又はFkpA（シャペロン活性を持つペプチジルプロビルシス、トランス-イソメラーゼ）のようなシャペロンタンパク質を過剰発現する更なるベクターを用いて宿主原核細胞を同時形質転換させることができる。シャペロンタンパク質は細菌宿主細胞中で生産される異種性タンパク質の適切な折り畳みと溶解性を容易にすることが実証されている。Chen等 (1999) J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou等、米国特許第6083715号; Georgiou等、米国特許第6027888号; Bothmann及びPluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm及びPluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie等 (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。40

【0083】

発現された異種タンパク質（特にタンパク分解を受けやすいもの）のタンパク質分解を最小にするために、タンパク質分解酵素を欠くある種の宿主株を本発明に用いることができる50

きる。例えば、原核生物宿主細胞株を改変して、プロテアーゼ I I I 、 O m p T 、 D e g P 、 T s p 、プロテアーゼ I 、プロテアーゼ M i 、プロテアーゼ V 、プロテアーゼ V I 及びその組合せのような既知の細菌プロテアーゼをコードしている遺伝子に遺伝子突然変異を生じさせることができる。幾つかの大腸菌プロテアーゼ欠損株が利用でき、例えば、上掲の Joly 等 (1998) ; Georgiou 等、米国特許第 5 2 6 4 3 6 5 号 ; Georgiou 等、米国特許第 5 5 0 8 1 9 2 号 ; Hara 等 (1996) Microbial Drug Resistance 2:63-72 に記載されている。

ある実施態様では、タンパク質溶解性酵素を欠損した、一以上のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドで形質転換した大腸菌株を本発明の発現系の宿主細胞として用いる。

10

【 0 0 8 4 】

抗体精製

一実施態様では、ここで産生される抗体タンパク質を更に精製して、更なるアッセイ及び使用のために実質的に均一な調製物を得る。当該分野で知られている標準的なタンパク質精製方法を用いることができる。以下の方法は好適な精製手順の例である：免疫親和性又はイオン交換カラムによる分画、エタノール沈殿法、逆相 H P L C 、シリカ又は D E A E などの陽イオン交換樹脂によるクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、 S D S - P A G E 、硫酸アンモニウム沈降法及び、例えば S e p h a d e x G - 7 5 を用いたゲル濾過法。

一側面では、固体層に固定したプロテイン A を本発明の抗体産物の免疫親和性精製法に用いる。プロテイン A は抗体の F c 領域に高い親和性で結合する黄色ブドウ球菌から単離した 4 1 k D の細胞壁タンパク質である。Lindmark 等 (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13 。プロテイン A を固定した固体層は、ガラス又はシリカ表面、より好ましくは孔を調節したガラスカラム又はケイ酸カラムを含むカラムが好ましい。ある方法では、カラムは非特異的な混入物の接着を防ぐためにグリセロールなどの試薬でコートされている。

20

精製の初めの工程では、上述のように細胞培養物からの調製物をプロテイン A 固定固相に適用し、プロテイン A に対象とする抗体を特異的に結合させる。ついで、固相を洗浄して、固相に非特異的に結合した混入物を除去する。最後に、対象とする抗体を溶出により固相から除去する。

30

【 0 0 8 5 】

真核生物の宿主細胞を用いた抗体の產生

一般的に、ベクター成分は、限定するものではないが、以下の一以上を含む：シグナル配列、複製起点、一以上のマーカ遺伝子、エンハンサー因子、プロモータ及び転写終末因子。

30

(i) シグナル配列成分

真核生物の宿主細胞に用いるベクターは、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいは対象とするポリペプチドの N 末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドを含んでもよい。好ましく選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものである。哺乳動物細胞での発現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペス g D シグナルが利用できる。

40

このような前駆体領域の D N A は、多価抗体をコードする D N A に読み枠を一致させて結合される。

40

(i i) 複製開始点

一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である。例えば、 S V 4 0 開始点は典型的にはただ初期プロモーターを有しているために用いられる。

40

【 0 0 8 6 】

(i i i) 選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a) アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテ

50

トライクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)関連があれば、栄養要求性欠陥を補い、又は(c)複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

選択方法の一例では、宿主細胞の成長を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換した細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を生産し、よって選択工程を生存する。このような優性選択の例は、薬剤ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの他の例は、抗体核酸を捕捉することのできる細胞成分を同定することを可能にするもの、例えばD H F R、チミジンキナーゼ、メタロチオネインI及びII、好ましくは、靈長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等々である。10

例えば、D H F R選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、D H F Rの競合的アンタゴニストであるメトトリキセート(M t x)を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型D H F Rを用いた場合の好適な宿主細胞は、D H F R活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣(C H O)株化細胞である(例えばA T C C C R L - 9 0 9 6)。

あるいは、抗体をコードするD N A配列、野生型D H F Rタンパク質、及びアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(A P H)のような他の選択可能マーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞(特に、内在性D H F Rを含む野生型宿主)は、カナマイシン、ネオマイシンあるいはG 4 1 8のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を含む培地中の細胞増殖により選択することができる。米国特許第4 9 6 5 1 9 9号を参照のこと。20

【0087】

(i v) プロモーター成分

発現及びクローニングベクターは通常は宿主生物体によって認識され抗体ポリペプチド核酸に作用可能に結合しているプロモーターを含む。真核生物に対してプロモーター配列が知られている。実質的に全ての真核生物の遺伝子が、転写開始部位からおよそ25ないし30塩基上流に見出されるA Tリッチ領域を有している。多数の遺伝子の転写開始位置から70ないし80塩基上流に見出される他の配列は、Nが任意のヌクレオチドであるC N C A A T領域である。大部分の真核生物遺伝子の3'末端には、コード配列の3'末端へのポリア尾部の付加に対するシグナルであるA A T A A A配列がある。これらの配列は全て真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。30

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗体ポリペプチドの転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス、アデノウィルス(例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びサルウィルス40(S V 4 0)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節される。

S V 4 0 ウィルスの初期及び後期プロモーターは、S V 4 0 ウィルスの複製起点を更に含むS V 4 0 制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウィルスの最初期プロモーターは、H i n d I I I E制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウィルスを用いて哺乳動物宿主中でD N Aを発現させる系が、米国特許第4 4 1 9 4 4 6号に開示されている。この系の変形例は米国特許第4 6 0 1 9 7 8号に開示されている。また、単純ヘルペスウィルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの調節下でのマウス細胞中のヒト インターフェロンc D N Aの発現について、Reyes等, Nature, 297: 598-601(1982)を参照のこと。あるいは、ラウス肉腫ウィルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。40

【0088】

(v) エンハンサーメント成分

10

20

30

40

50

より高等の真核生物によるこの発明の抗体ポリペプチドをコードしているDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増強される。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスター、アルブミン、-フェトプロテイン及びインシュリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウィ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及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。真核生物プロモーターの活性化のための増強エレメントについては、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)もまた参考のこと。エンハンサーは、抗体ポリペプチドコード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされうるが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

10

【0089】

(v i) 転写終結成分

また、真核生物宿主細胞に用いられる発現ベクターは、典型的には、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列を含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの5'、時には3'の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、抗体をコードしているmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第94/11026号とそこに開示された発現ベクターを参考のこと。

20

【0090】

(v i i) 宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクター中のDNAをクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、脊椎動物の宿主細胞を含むここに記載の高等真核生物細胞を含む。培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651);ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローニングされた293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977));ハムスター乳児腎細胞(BHK, ATCC CCL 10);チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHF R (CHO, Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980));マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980));サルの腎細胞(CV1 ATCC CCL 70);アフリカミドリザルの腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);ヒト子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2);イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CC L 34);バッファローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75);ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065);マウス乳房腫瘍細胞(MMT060562, ATCC CCL 51);TRI細胞(Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982));MRC5細胞;FS4細胞;及びヒト肝癌株(Hep G2)である。

30

宿主細胞は、抗体生産のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適切に修飾された常套的栄養培地で培養される。

40

【0091】

(v i i i) 宿主細胞の培養

本発明の抗体を产生するために用いられる宿主細胞は様々な培地中で培養することができる。ハム(Ham)のF10(シグマ)、最小必須培地((MEM),(シグマ)、 RPMI-1640(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM),シグマ)のような市販培地が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第4767704号; 同4657866号; 同4927762号; 同4560655号; 又は同5122469号; 国際公開第90/03430号; 国際公開第87/00195号; 又は米国再発行特許第30985号に記

50

載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び / 又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えば H E P E S)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、G E N T A M Y C I N^{T M} 薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH 等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【0092】

10

(i x) 抗体の精製

組換え技術を用いる場合、抗体は細胞内で産生され、又は培地内に直接分泌されうる。抗体が細胞内に産生された場合、第 1 の工程として、宿主細胞が溶解された断片の何れにしても、粒子状細片が、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去される。抗体が培地に分泌される場合は、そのような発現系からの上清を、一般的には先ず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば Amicon 又は Pellicon の限外濾過装置を用いて濃縮する。PMSF などのプロテアーゼ阻害剤を上記工程の何れかに含めて、タンパク質分解を阻害してもよく、また抗生物質を含めて外来性汚染物の成長を防止してもよい。

【0093】

20

細胞から調製される抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティクロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティーリガンドとしてのプロテイン A の適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリン Fc ドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテイン A は、ヒト 1、2、又は 4 重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる (Lindmark 等, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテイン G は、全てのマウスアイソタイプ及びヒト 3 に推奨されている (Guss 等, EMBO J. 5: 1567-1575 (1986))。アフィニティーリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他のマトリックスも使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間をする。抗体が C_H 3 ドメインを含む場合、Baker bond ABX^{T M} 樹脂 (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相 HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂上での SEP HAROSE^{T M} クロマトグラフィー (ポリアスパラギン酸カラム)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿法も、回収される多価抗体に応じて利用可能である。

30

予備的精製工程に続いて、目的の抗体及び汚染物を含む混合液を pH 約 2.5 - 4.5、好ましくは低塩濃度 (例えば約 0.0.25M 塩) の溶出バッファーを用いて低 pH 碱水性作用クロマトグラフィを行ふことができる。

【0094】

40

活性アッセイ

本発明の抗体は当該分野で知られている様々なアッセイによってその物理的 / 化学的性質及び生物学的機能について特徴付けることができる。

精製された免疫グロブリンは、限定されるものではないが、N 末端シーケンシング、アミノ酸解析、非変性サイズ排除高压液体クロマトグラフィー (HPLC)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィー及びパパイン消化を含む一連のアッセイによって更に特徴付けることができる。

本発明のある実施態様では、ここで生産される免疫グロブリンはその生物学的活性について分析される。ある実施態様では、本発明の免疫グロブリンはその抗原結合活性について試験される。当該分野で知られ、ここで使用することができる抗原結合アッセイには、

50

限定するものではないが、ウェスタンプロット、ラジオイムノアッセイ、エライザ（酵素結合免疫吸着検定法）、「サンドウィッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、及びプロテインAイムノアッセイのような技術を使用する任意の直接的又は競合的結合アッセイが含まれる。

【0095】

一実施態様では、本発明は全てではなく幾つかのエフェクター機能を有する改変された抗体を考慮し、これは抗体のインビボ半減期が重要なある種のエフェクター機能（補体又はADCなど）が不要であるか有害である多くの用途に対して所望される候補となる。ある実施態様では、產生された免疫グロブリンのFc活性を測定して、所望の特性のみが維持されていることを確認する。インビトロ及び/又はインビボ細胞障害アッセイを行って、CDC及び/又はADC活性の減少/枯渇を確認することができる。例えば、Fcレセプター(FcR)結合アッセイを行って、抗体がFcR結合を欠いている（すなわちADC活性を欠いている可能性が高い）が、FcRn結合能は保持していることを確認することができる。ADCを媒介する主要細胞のNK細胞はFcRIIIのみを発現するが、単核細胞はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血系細胞でのFcR発現については、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象とする分子のADC活性を評価するためのインビトロアッセイの例は、米国特許第5500362号又は同第5821337号に記載されている。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。あるいは、又は加えて、対象とする分子のADC活性は、例えばClynes等PNAS(USA)95:652-656(1998)に開示されているもののような動物モデル内でインビボで評価することができる。また、C1q結合アッセイを行って、抗体がC1qに結合できず、よってCDC活性を欠いていることを確認してもよい。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載のように、CDCアッセイを行ってもよい。また、FcRn結合及びインビボクリアランス/半減期測定を、当該分野で知られている方法を用いて行うことができる。

【0096】

ヒト化抗体

本発明はヒト化抗体を包含する。非ヒト抗体をヒト化する様々な方法は当該分野で知られている。例えば、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と呼ばれる。ヒト化は、本質的にはヒト抗体の該当する高頻度可変領域配列を置換することによりウィンターと共同研究者の方法(Jones等(1986) Nature 321:522-525; Riechmann等(1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen等(1988) Science 239:1534-1536)に従って実施することができる。従って、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の該当する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4816567号)である。実際には、ヒト化抗体は、典型的には幾らかの高頻度可変領域残基及び場合によっては幾らかのFR残基が齧歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を產生する際に使用するヒトの軽重両方の可変ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒト配列をヒト化抗体のヒトフレームワークとして受け入れる(Sims等(1993) J. Immunol., 151:2296; Chothia等(1987) J. Mol. Biol., 196:901)。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークを幾つかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carter等(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta等(1993) J. Immunol., 151:2623)。

【0097】

10

20

30

40

50

更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、一方では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは入手可能である。これら表示を調べることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性の亢進のような、望ましい抗体特性が達成されるように、F R 残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接的かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

10

【0098】

抗体変異体

一態様では、本発明は、Fc領域を含むFcポリペプチドの作用面内に修飾を有する抗体断片を提供するものであり、修飾によって異種性二量体化を容易にし及び／又は促進する。これらの修飾は、第一Fcポリペプチド内への隆起と第二Fcポリペプチド内へのキャビティの導入を含むものであり、ここでいう隆起は第一Fcポリペプチドと第二Fcポリペプチドの複合体化を促進するためにキャビティ内に位置せしめることができる。これらの修飾を有する抗体の產生方法は当該分野で既知であり、例えば米国特許第5731168号に記載されている。

20

ある実施態様では、ここで記載した抗体のアミノ酸配列の修飾が考えられる。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善することが望まれうる。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体核酸中に適当なヌクレオチド変化を導入することにより、又はペプチド合成により調製される。そのような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の、欠失及び／又は挿入及び／又は置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせを、最終コンストラクトが所望の特徴を有するとしてその最終コンストラクトに達するまでなす。アミノ酸改変は、配列が作製されるときに目的の抗体アミノ酸配列に導入することができる。

20

【0099】

突然変異誘発の好ましい位置である抗体の所定の残基又は領域の特定のために有用な方法は、Cunningham及びWells, Science 244: 1081-1085 (1989)に記載されているように「アラニンスキャンニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的残基の残基又は基が同定され（例えば、arg, asp, his, lys, 及びglu等の荷電残基）、中性又は負に荷電したアミノ酸（最も好ましくはアラニン又はポリアラニン）に置換され、アミノ酸と抗原との相互作用に影響を及ぼす。ついで置換に対する機能的感受性を示すこれらのアミノ酸の位置を、置換部位において又はそれに対して更なる又は他の変異体を導入することにより精製される。よって、アミノ酸配列変異を導入する部位は予め決定されるが、変異自体の性質は予め決める必要はない。例えば、与えられた部位における変異の性能を解析するために、a la スキャンニング又はランダム突然変異誘発を標的コドン又は領域で実施し、発現された免疫グロブリンを所望の活性についてスクリーニングする。

30

アミノ酸配列挿入は、1残基から100以上の残基を含むポリペプチドの長さの範囲のアミノ末端及び／又はカルボキシル末端融合体、並びに一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入物を含む。末端挿入物の例には、N末端メチオニル残基を持つ抗体ないし細胞障害性ポリペプチドに融合した抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を向上させるポリペプチド又は酵素（例えばADEPT）への、抗体のN又はC末端への融合物を含む。

40

【0100】

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、抗体分子中の少なくとも一つのアミノ酸残基が異なる残基で置換されている。置換突然変異に対して最も興味深い部位は高頻度可変領域を含むが、F R 改変も考えられる。保存的置換は、「好ましい

50

置換」と題して表2に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表2に「置換例」と題名を付け、又はアミノ酸分類に関して以下に更に記載するような、より実質的な変化を導入し、生成物をスクリーニングしてもよい。

表2

元の残基	置換例	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

【0101】

抗体の生物学的性質における実質的な修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b)標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の巣を維持することについてそれらの効果が実質的に異なる置換を選択することにより達成される。アミノ酸は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる(A. L. Lehninger, Biochemistry, 2版, pp.73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) 非極性 : Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) 荷電のない極性 : Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) 酸性 : Asp (D), Glu (E)
- (4) 塩基性 : Lys (K), Arg (R), His (H)

あるいは、天然に生じる残基は共通の側鎖性質に基づきグループに分けられる:

10

20

30

40

50

- (1) 疎水性 : ノルロイシン, Met, Ala, Val, Leu, Ile ;
- (2) 中性親水性 : Cys, Ser, Thr, Asn, Gln ;
- (3) 酸性 : Asp, Glu ;
- (4) 塩基性 : His, Lys, Arg ;
- (5) 鎮配向に影響する残基 : Gly, Pro ;
- (6) 芳香族 : Trp, Tyr, Phe.

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類と交換することを必要とするであろう。また、そのような置換残基を、保存的置換部位又はより好ましくは残りの（非保存的）部位内に導入してもよい。

【0102】

ある型の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体）の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、更なる開発のために選択され、得られた変異体は、それらが產生された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を作製する簡便な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性突然変異を含む。簡潔に言えば、幾つかの高頻度可変領域部位（例えば6 - 7部位）を突然変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このようにして生成された抗体は、纖維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13の遺伝子III産物への融合物としてディスプレイされる。ファージディスプレイ変異体は、ついで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。修飾のための候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体と抗原の接点を特定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここに述べた技術に従う置換の候補である。そのような変異体が生成されると、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択する。

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、この分野で知られた種々の方法によって調製される。これらの方法は、限定するものではないが、天然源からの単離（天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合）又は初期に調製された抗体の変異体又は非変異体のオリゴヌクレオチド媒介（又は部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製を含む。

【0103】

本発明の免疫グロブリンポリペプチドのFc領域内に一以上のアミノ酸修飾を導入してFc領域変異型を生成することが望ましい。Fc領域変異体は、ヒンジシステイン修飾を含む、一以上のアミノ酸位置でのアミノ酸修飾（例えば、置換）を有するヒトFc領域配列（例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4 Fc領域）を含みうる。

本明細書や当該分野での教示に従って、ある実施態様では、本発明の抗体が野生型の対応抗体と比較して例えばFc領域内に一以上の変異を有しうることが考慮される。にもかかわらず、これらの抗体はその野生型対応物と比較して治療的有用性について実質的に同じ特徴を維持するであろう。例えば、国際公開第99/51642号に記載のように、改変された（すなわち改善又は減少した）C1q結合及び/又は補体依存性細胞障害（CDC）を生じる結果となるFc領域に特定の変異を生じさせることが考えられる。また、Fc領域変異型の他の例に関して、Duncan及びWinter Nature 322:738-40 (1988)；米国特許第5648260号；米国特許第5624821号；及び国際公開第94/29351号を参照のこと。

【0104】

免疫コンジュゲート

本発明はまた化学治療薬（上で定義され記載されたもの）、毒素（例えば、断片及び/又はその変異体を含む、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素又は小分子毒素）などの細胞毒性薬、あるいは放射性同位体（即ち、放射性コンジュゲート）にコンジュゲ

10

20

30

40

50

ートされた本発明の抗体を含む免疫コンジュゲートにも関する。

抗体と一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシン(maytansine)(米国特許第5208020号)、トリコセン及びCC1065のコンジュゲートもまたここで検討される。

本発明の一実施態様では、抗体は一又は複数のメイタンシン分子とコンジュゲートされる(例えば、抗体分子当たり約1から約10のメイタンシン分子)。メイタンシンは、例えば、May-SH3へと還元されうるMay-SS-Meに転化され、メイタンシンノイド-抗体免疫複合体を生成するために修飾抗体(Chari等, Cancer Research 52: 127-131(1992))と反応させられうる。

【0105】

対象とする他の免疫複合体は、一又は複数のカリケアマイシン分子とコンジュゲートされた免疫グロブリンを含む。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、ピコモル以下の濃度で、二本鎖DNA切断を生成することができる。使用されうるカリケアマイシンの構造類似体は、これらに限らないが、₁^I、₂^I、₃^I、N-アセチル-₁^I、PSA G及び₁^I(Hinman等 Cancer Research 53: 3336-3342(1993)及びLode等Cancer Research 58: 2925-2928(1998))を含む。米国特許第5714586号；同第5712374号；同第5264586号；及び同第5773001号を参照のこと。

用いることのできる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(綠膿菌由来の)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質(PAP I、PAP II、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サバオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(trichothecene)を含む。例えば、1993年10月28日公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。

本発明は更に本発明の免疫グロブリンとヌクレオチド切断活性を有する化合物(例えば、リボヌクレアーゼ又はデオキシリボヌクレアーゼ: DNaseのようなDNAエンドヌクレアーゼ)との間に形成された免疫コンジュゲートも考慮する。

【0106】

様々な放射性同位体が放射性複合抗体の产生に利用可能である。例として、At²¹²、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²及びLuの放射性同位体を含む。

本発明の免疫グロブリン細胞毒性薬のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン(ITT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスペレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて製造できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238: 1098 (1987)に記載されたように調製することができる。カーボン-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への複合のためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号参照。リンカーは細胞内で細胞傷害剤の放出を促進する「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸-不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー(Chari等, Cancer Research 52:127-131(1992))が使用されうる。

10

20

30

30

40

50

【0107】

別法として、免疫グロブリン及び細胞障害剤を含む融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。

更に他の実施態様では、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に本発明の免疫グロブリンをコンジュゲートし、ここで抗体-レセプター-コンジュゲートを患者に投与し、続いて浄化剤(clearing agent)を使用し、循環から未結合コンジュゲートを除去し、細胞傷害剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

【0108】

抗体誘導体

本発明の抗体は当該分野において知られ直ぐに利用できる更なる非タンパク質性部分を含むように更に修飾することができる。好ましくは、抗体の誘導体化に適した部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール(P E G)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーかランダムコポリマー)、及びデキストラン又はポリ(*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、プロリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニアルコール、及びそれらの混合物が含まれる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは水中におけるその安定性のために製造の際に有利であろう。ポリマーは任意の分子量であってよく、分枝状でも非分枝状でもよい。抗体に結合するポリマーの数は変化してもよく、一を超えるポリマーが結合する場合、それらは同じでも異なった分子でもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/又はタイプは、限定されるものではないが、その抗体誘導体が定まった条件下での治療に使用されるかどうか、改善される抗体の特定の性質又は機能を含む考慮事項に基づいて決定することができる。

10

20

30

40

50

【0109】

抗原特異性

本発明は任意の適切な抗原結合特異性の抗体に適用できる。好ましくは、本発明の方法に用いる抗体は、生物学的に重要なポリペプチドである抗原に特異的である。より好ましくは、本発明の抗体は哺乳動物の疾病又は疾患の治療又は診断に有用である。本発明の抗体には、限定するものではないが、阻止抗体、アゴニスト抗体、中和抗体又は抗体コンジュゲート(抱合体)が含まれる。治療用抗体の非限定的な例には、抗c-met、抗VEGF、抗IgE、抗CD11、抗CD18、抗CD40、抗組織因子(TF)、抗HER2及び抗TrkC抗体が含まれる。非ポリペプチド抗原(例えば腫瘍関連糖脂質抗原)に対する抗体もまた考えられる。

【0110】

抗原がポリペプチドである場合、抗原は膜貫通分子(例えばレセプター)あるいはリガンド、例えば成長因子でありうる。抗原の例には、例えば、レニン；ヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモンを含む成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク質；-1-アンチトリプシン；インシュリンA-鎖；インシュリンB-鎖；プロインシュリン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；VIT I IC因子、IX因子、組織因子(TF)、及びフォン・ウィルブランド因子等の凝固因子；プロテインC等の抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺サーファクタント；ウロキナーゼ又はヒト尿又は組織型プラスミノーゲン活性化因子(t-P A)等のプラスミノーゲン活性化因子；ポンベシン；トロンビン；造血性成長因子；腫瘍壞死因子-₁及び-₂；エンケファリナーゼ；RANTES(regulated on activation normally T-cell expressed and secreted)；ヒトマクロファージ炎症タンパク質(MIP-1_α)；ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン；ミューラー阻害物質；リラキシンA-

鎖；リラキシンB-鎖；プロリラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；-ラクタマーゼ等の微生物タンパク質；DNアーゼ；IgE；CTL A-4のような細胞毒性Tリンパ球関連抗原(CTL A)；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子(VEGF)；ホルモン又は成長因子のレセプター；プロテインA又はD；リウマチ因子；脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロphins-3、-4、-5又は-6(NT-3、NT-4、NT-5、又はNT-6)、又はNGF-等の神経成長因子等の神経栄養因子；血小板誘導成長因子(PDGF)；aFGF及びbFGF等の線維芽細胞成長因子；表皮成長因子(EGF)；TGF-及びTGF-1、TGF-2、TGF-3、TGF-4、又はTGF-5を含む、TGF-のようなトランスフォーミング成長因子(TGF)；インシュリン様成長因子-I及び-II(I GF-I及びIGF-II)；des(1-3)-IGF-I(脳IGF-I)、インシュリン様成長因子結合タンパク質；CD3、CD4、CD8、CD19、CD20及びCD40等のCDタンパク質；エリスロポエチン；骨誘導因子；免疫毒素；骨形成タンパク質(BMP)；インターフェロン-、-、及び-等のインターフェロン；コロニー刺激因子(CSFs)、例えばM-CSF、GM-CSF、及びG-CSF；インターロイキン類(IL)、例えばIL-1からIL-10；スーパーオキシドジスマスター；T細胞レセプター；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；ウイルス性抗原、例えばHIVエンベロープの一部等；輸送タンパク質；ホーミングレセプター；アドレシン；調節タンパク質；インテグリン、例えばCD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4及びVCAM；腫瘍関連抗原、例えばHER2、HER3又はHER4レセプター；及び上に列挙したポリペプチドの何れかの断片が含まれる。

【0111】

本発明の一実施態様に包含される抗体に対する抗原には、CDタンパク質、例えばCD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD34及びCD46；Erbbレセプターファミリーのメンバー、例えばEGFレセプター、HER2、HER3又はHER4レセプター；細胞接着分子、例えばLFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、4/7インテグリン及びその又はサブユニット(例えば、抗CD11a、抗CD18又は抗CD11b抗体)を何れか含むv/3インテグリン；成長因子、例えばVEGF；組織因子(TF)、及びTGF-；アルファインターフェロン(-IFN)；インターロイキン、例えばIL-8；IgE；血液型抗原Apo2、デスレセプター；f1k2/f1t3レセプター；肥満(OB)レセプター；mp1レセプター；CTL A-4；プロテインC等々が含まれる。ある実施態様では、ここで標的はVEGF、TF、CD19、CD20、CD40、TGF-、CD11a、CD18、Apo2及びC24である。

【0112】

幾つかの実施態様では、本発明の抗体は腫瘍抗原に特異的に結合可能である。幾つかの実施態様では、本発明の抗体は、腫瘍抗原がクラスター分化因子(すなわちCDタンパク質)でない腫瘍抗原に、特異的に結合可能である。幾つかの実施態様では、本発明の抗体はCDタンパク質に特異的に結合可能である。幾つかの実施態様では、本発明の抗体はCD3又はCD4以外のCDタンパク質に特異的に結合可能である。幾つかの実施態様では、本発明の抗体はCD19又はCD20に特異的に結合可能である。幾つかの実施態様では、本発明の抗体はCD40に特異的に結合可能である。幾つかの実施態様では、本発明の抗体はCD11に特異的に結合可能である。一実施態様では、本発明の抗体は免疫細胞で発現されない抗原に結合する。一実施態様では、本発明の抗体はT細胞で発現されない抗原に結合する。一実施態様では、本発明の抗体はB細胞で発現されない抗原に結合する。

【0113】

一実施態様では、本発明の抗体は細胞生存調節性因子に特異的に結合可能である。幾つかの実施態様では、本発明の抗体は細胞増殖調節性因子に特異的に結合可能である。幾つ

10

20

30

40

50

かの実施態様では、本発明の抗体は細胞周期調節に関する分子に特異的に結合可能である。他の実施形態では、本発明の抗体は、組織発達又は細胞分化に関する分子に特異的に結合可能である。幾つかの実施態様では、本発明の抗体は細胞表面分子に特異的に結合可能である。幾つかの実施態様では、本発明の抗体は、細胞表面レセプターポリペプチドでない腫瘍抗原に結合可能である。

一実施態様では、本発明の抗体はリンホカインに特異的に結合可能である。他の実施態様では、本発明の抗体はサイトカインに特異的に結合可能である。

一実施態様では、本発明の抗体は脈管形成に関する分子に特異的に結合可能である。他の実施態様では、本発明の抗体は血管形成に関する分子に特異的に結合可能である。

他の分子と場合によってはコンジュゲートしていてもよい可溶型抗原又はその断片を、抗体を産生するための免疫原として使用することができる。レセプターのような膜貫通分子に対しては、これらの分子の断片(例えばレセプターの細胞外ドメイン)を免疫原として使用することができる。あるいは、膜貫通分子を発現する細胞を免疫原として使用することもできる。そのような細胞は天然源(例えば癌細胞株)から取り出すことができ、又は膜貫通分子を発現するように組換え技術により形質転換された細胞であってもよい。抗体の調製に有用な他の抗原とその型は当業者には明らかであろう。

【0114】

医薬製剤

本発明の抗体を含んでなる治療用製剤は、所望の純度を持つ抗体を、任意成分の生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより (Remington's Pharmaceutical Sciences 16版, Osol, A. 編 (1980))、水溶液、凍結乾燥又は他の乾燥製剤の形態に調製されて保存される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトарат、ヒスチジン及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料(例えば塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール)；低分子量(約10残基未満)のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質複合体)；及び/又はTWEENTM、PLURONICSTM又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0115】

ここでの製剤は、治療される特定の徵候のために必要ならば一以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を与えない相補的活性を持つものも含んでよい。そのような分子は、好適には、意図する目的のために有効な量で組み合わされて存在する。

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリー系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルション、ナノ-粒子及びナノカプセル)に、あるいはマクロエマルションに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16版, Osol, A. 編 (1980)に開示されている。

インビオ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。

【0116】

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好ましい例は、本発明の免疫グロブリンを

10

20

30

40

50

含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3773919号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOTTM（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア）、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは、分子を100日以上かけて放出することを可能にするが、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短い時間で放出する。カプセル化された免疫グロブリンが体内に長時間残ると、37の水分に暴露された結果として変性又は凝集し、生物活性を喪失させ免疫原性を変化させるおそれがある。合理的な戦略を、関与するメカニズムに応じて安定化のために案出することができます。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合の形成であることが見いだされた場合、安定化はスルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥させ、水分含有量を制御し、適当な添加剤を使用し、また特定のポリマーマトリクス組成物を開発することによって達成されうる。

【0117】

使用

本発明の抗体は、インビトロ、エクスピボ及びインビボの治療法で用いてもよい。本発明はこれらの分子の一又は複数を使用する様々な方法を提供する。ある病理症状では、多重特異性抗体を利用することが必要であり、及び/又は望ましい。本発明は、様々な目的のために、例えば治療剤、予防剤及び診断薬として使用することができるこれらの抗体を提供する。例えば、本発明は、本発明の抗体を、治療を必要とする患者に投与し、それによって疾患が治療される、疾患の治疗方法を提供する。ここに記載される本発明の抗体の何れもここに記載される治療（又は予防又は診断）方法において使用することができる。

本発明の抗体は、インビトロ、エクスピボ及び/又はインビボで特異的抗原活性を部分的に又は完全にブロック（阻止）するアンタゴニストとして用いることができる。更に、本発明の少なくとも幾つかの抗体は、他の種から抗原活性を中和することができる。従って、本発明の抗体は、例えば、抗原を含んでいる細胞培養物中、患者、又は、本発明の抗体が交差反応する抗原を有する他の哺乳類対象体（例えばチンパンジー、ヒヒ、マーモセット、カニクイザル及び赤毛猿、ブタ又はマウス）の特異的抗原活性を阻害するために用いることができる。一実施態様では、本発明の抗体は、抗原活性が阻害されるように抗原と抗体を接触させることによって抗原活性を阻害するために用いることができる。抗原はヒトタンパク質分子であることが好ましい。

【0118】

一実施態様では、本発明の抗体を、抗原活性が有害である疾患に罹患している患者の抗原を阻害する方法に用いることができ、その方法は患者の抗原活性が阻害されるように本発明の抗体を患者に投与することを含む。好ましくは、抗原はヒトタンパク質分子であり、患者はヒト患者である。あるいは、患者は、本発明の抗体が結合する抗原を発現する哺乳動物でありうる。また更に、患者は、抗原が導入された哺乳動物でありうる（例えば、抗原の投与や、抗原導入遺伝子の発現による）。本発明の抗体は、治療的目的のためにヒト患者に投与することができる。更に、本発明の抗体は、免疫グロブリンが獣医学の分野で、又はヒト疾患の動物モデルとして交差反応する抗原を発現する非ヒト哺乳動物（例えば靈長類、ブタ又はマウス）に投与することができる。後者に関して、このような動物モデルは、本発明の抗体の治療有効性（例えば用量の試験及び投与の時間経過）を評価するために有用でありうる。治療的に有用である本発明の阻止抗体には、例えば、限定するものではないが、抗c-met、抗VEGF、抗IgE、抗CD11、抗インターフェロン及び抗組織因子抗体が含まれる。本発明の抗体は一以上の抗原分子の異常発現及び/又は活性が関与する疾患、疾病又は症状の、治療、阻害、経過を遅延、再発を予防/遅延、寛解、又は予防に用いることができ、この疾患、疾病又は症状には、限定するものではない

10

20

30

40

50

が、悪性及び良性の腫瘍；非白血病及びリンパ系の悪性腫瘍；神経系、神経膠、星状膠、視床下部、他の腺性、マクロファージ性、上皮性、間質性、胞胚腔性の疾患；及び炎症性、血管形成性、免疫系の疾患が含まれる。

【0119】

一側面では、本発明の阻止抗体はリガンド抗原に特異的で、リガンド抗原を伴うリガンド-レセプター相互作用をロックするか又は妨げることによって、対応するシグナル経路及び他の分子又は細胞性事象を阻害することによって抗原活性を阻害する。また、本発明は必ずしもリガンド結合を阻害するというわけではなく、レセプター活性化を妨害するレセプター特異的な抗体を特徴とし、それによって通常リガンド結合によって開始する任意の応答を阻害する。また、本発明は、好ましくは又は排他的にリガンド-レセプター複合体と結合する抗体を包含する。また、本発明の抗体は、特定の抗原レセプターのアゴニストとして作用し得、それによって、リガンド媒介性のレセプター活性の活性化を完全に又は部分的に潜在化、亢進又は活性化する。

ある実施態様では、細胞障害性剤とコンジュゲートした抗体を含んでなる免疫コンジュゲートを患者に投与する。ある実施態様では、免疫コンジュゲート及び／又はそれが結合する抗原が細胞に内在化されると、結合する標的細胞を殺す際の免疫コンジュゲートの治療効果が増す。一実施態様では、細胞障害性剤は標的細胞内の核酸を標的とするか又は妨げる。このような細胞障害性剤の例には、本明細書に記載の何れかの化学療法剤（例えばメイタンシノイド又はカリケアマイシン）、放射性同位元素、又はRNA分解酵素ないしDNAエンドヌクレアーゼが含まれる。

【0120】

本発明の抗体は、単独で、又は他の組成物と組み合わせて治療に用いることができる。例えば、本発明の抗体は、他の抗体、化学療法剤（一又は複数）（化学療法剤カクテルを含む）、他の細胞障害性剤（一又は複数）、抗血管形成剤（一又は複数）、サイトカイン及び／又は増殖阻害性剤（一又は複数）と一緒に投与してもよい。本発明の抗体が腫瘍成長を阻害する場合、腫瘍成長を阻害する一つ以上の他の治療薬と組み合わせることが特に望ましい。例えば転移性乳癌の治療に、VEGF活性をロックする抗VEGF抗体を、抗Erbb抗体（例えばハーセプチニン（登録商標）抗HER2抗体）と一緒に投与してもよい。あるいは又は加えて、放射線療法（例えば、外部光線照射、又は放射性標識した抗体などの作用剤を用いた治療）を患者に併用してもよい。上記の併用療法には、併用投与（2以上の作用剤が同じか又は別の製剤に含まれる）及び別々の投与が含まれ、別々の場合には、本発明の抗体の投与は補助治療（一又は複数）の前及び／又はその後に行うことができる。

【0121】

本発明の抗体（及び補助治療薬）は、非経口的、皮下、腹膜内、肺内、鼻腔内、そして、必要に応じて局所の治療のために、病巣内投与を含む任意の好適な手段によって投与する。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、又は皮下的な投与を含む。加えて、抗体を、特に抗体の用量を減少して、パルス注入によって好適に投与する。投与が短期のものであるか長期のものであるかにある程度依存して、例えば、静脈内又は皮下注射などの注射など、任意の好適な経路で投与することができる。

本発明の抗体組成物は、好ましい医療行為に合った様式で調製し、1回分に分けて、投与する。ここで考慮する要因は、治療する特定の疾患、治療する特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤のデリバリー部位、投与の方法、投与の日程計画、及び医師が知る他の因子を含む。必要ではないが場合によっては、問題の疾患を予防するか又は治療するために現在用いられている一つ以上の作用剤と共に抗体を処方する。そのような他の作用剤の有効量は、製剤中の本発明の抗体の量、疾患又は治療のタイプ、及び上で検討した他の要因に依存する。一般的に、以前用いたのと同じ用量及び投与経路で、又は前回用いた用量の約1～99%で用いる。

【0122】

疾患の予防又は治療のために、本発明の抗体の好適な用量は（単独で用いる場合、又は

10

20

30

40

50

化学療法剤などの他の作用剤と組み合わせて用いる場合)、治療する疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体を予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及び抗体への応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。抗体は一度で又は一連の治療にわたって好適に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ ~ $15 \text{mg} / \text{kg}$ (例えば $0.1 \text{mg} / \text{kg}$ ~ $10 \text{mg} / \text{kg}$) の抗体が、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初期候補用量である。ある典型的な1日量は、上記の要因に応じて、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ ~ $100 \text{mg} / \text{kg}$ 以上の範囲であろう。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。抗体の用量の例は、約 $0.05 \text{mg} / \text{kg}$ ~ 約 $10 \text{mg} / \text{kg}$ の範囲であろう。よって、約 $0.5 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $2.0 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $4.0 \text{mg} / \text{kg}$ 又は $10 \text{mg} / \text{kg}$ の一以上の用量を(又はそれらを組み合わせて)患者に投与してもよい。このような用量は、間欠的に、例えば週ごと又は3週ごとに投与してもよい(例えば患者に約2~約20、例えば約6用量の抗体が投与される)。初期のより高い負荷投与量の後、一以上のより低い用量を投与してもよい。例示的用量療法は、約 $4 \text{mg} / \text{kg}$ の初期負荷投与量の後、約 $2 \text{mg} / \text{kg}$ の毎週の維持用量抗体を投与することを含む。しかしながら、他の投与計画が有効かもしれない。この治療の進行は、一般的な技術及びアッセイにより容易にモニターすることができる。

10

20

30

40

【0123】

製造品

本発明の他の態様では、上記の疾患の治療、予防及び/又は診断に有用な物質を含む製造品が提供される。該製造品は容器と該容器の又は該容器に付随するラベル又はパッケージ挿入物を具備する。好適な容器には、例えば、ピン、バイアル、シリンジ等々が含まれる。容器は、様々な材料、例えばガラス又はプラスチックから形成されうる。容器は、それのみによって又は他の組成物と組み合わせて症状を治療、予防及び/又は診断するのに有効な組成物を収容し、滅菌アクセスポートを有しうる(例えば、容器は皮下注射針が貫通可能なストッパーを有するバイアル又は静脈内投与溶液バッグでありうる)。組成物中の少なくとも一つの活性剤は本発明の抗体である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が癌のような選択した症状の治療に使用されることを示す。更に、製造品は、(a)組成物を中に収容し、その組成物が本発明の抗体を含む第一の容器と;(b)組成物を中に収容し、その組成物が更なる細胞障害性薬物を含む第二の容器とを含みうる。本発明のこの実施態様における製造品は、第一及び第二抗体組成物を特定の症状、例えば癌の治療に使用することができることを示しているパッケージ挿入物を更に含みうる。あるいは、もしくは付加的に、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用の静菌水(BWFⅠ)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を含む第二の(又は第三の)容器を更に具備してもよい。更に、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジを含む、商業上及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

50

【0124】

以下は、本発明の方法及び組成物の実施例である。上に与えた一般的記載に照らして、様々な他の実施態様を実施しうることが理解される。

【実施例】

【0125】

この実施例はジスルフィド結合を形成するシステイン残基を欠く変異ヒンジ領域(「無ヒンジ」)を有する二重特異性抗体の構築と精製を記載する。野生型ヒンジ配列を有する二重特異性抗体の構築もまた記載され;これらの抗体は様々な種の抗体複合体を得る効率を評価するために用いることができる。

【0126】

[発現ベクターの構築]

完全長抗体の発現のためのプラスミドは全て、重鎖及び軽鎖の転写のための別個のp h o Aプロモータ(A P)(Kikuchi等, Nucleic Acids Res., 9: 5671-5678 (1981))を元として、それに転写開始のためのシャイン-ダルガーノ配列(Yanofsky等, Nucleic Acids

50

Res., 9: 6647-6668 (1981) 及びChang等, Gene, 55: 189-196 (1987)) が続く、独立したシストロン系 (Simmons等, J. Immunol. Methods, 263: 133-147 (2002)) に基づくものであった。加えて、熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列 (S T I I) (Picken等, Infect. Immun., 42: 269-275 (1983) 及びLee等, Infect. Immun., 42: 264-268 (1983)) を、重鎖及び軽鎖の周辺質分泌に用いた。翻訳開始領域 (T I R) 内にサイレントコドン変異を含む、測定した相対的翻訳強度の先に開示されたS T I Iシグナル配列変異形を用いて、両鎖の翻訳の良好なコントロールを達成した (Simmons及びYansura, Nature Biotechnol., 14: 629-634 (1996) 及びSimmons等, J. Immunol. Methods, 263: 133-147 (2002))。最後に、_{t₀}転写ターミネータ (Schlosstissek及びGrosse, Nucleic Acids Res., 15: 3185 (1987)) を両鎖のコード配列の下流に配した。全てのプラスミドは p B R 3 2 2 に基づくベクター系のフレームワークを用いている (Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43: 77-90 (1978))。

10

【0127】

(i) プラスミド p 5 A 6 . 1 1 . K n o b . H g -

所望の p 5 A 6 . 1 1 . K n o b . H g - プラスミドを产生するために 2 つの中間体 (intermediate) プラスミドが必要であった。中間体プラスミド p 5 A 6 . 1 . L . V G . 1 . H . K n o b を产生するために、最初に 5 A 6 (抗 F c - R I I b) キメラ軽鎖の可変ドメインを p V G 1 1 . V N E R K . K n o b プラスミド上に移した。ついで、中間体プラスミド p 5 A 6 . 1 1 . K n o b プラスミドを产生するために、5 A 6 キメラ重鎖の可変ドメインを p 5 A 6 . 1 . L . V G . 1 . H . K n o b プラスミド上に移した。次はこれら中間体プラスミド p 5 A 6 . 1 . L . V G . 1 . H C . K n o b 及び p 5 A 6 . 1 1 . K n o b の調製と、それに続く p 5 A 6 . 1 1 . K n o b . H g - の構築について記載する。

20

【0128】

p 5 A 6 . 1 . L . V G . 1 . H . K n o b

このプラスミドは、5 A 6 抗体のマウス軽鎖可変ドメインを、完全長抗体の產生に適合性を有するプラスミドに移入するために構築した。このプラスミドの構築には二つのDNA断片のライゲーションが伴う。第一のものは、小さなE c o R I - P a c I 断片が除去されている p V G 1 1 . V N E R K . K n o b ベクターであった。プラスミド p V G 1 1 . V N E R K . K n o b は、軽鎖及び重鎖可変ドメインが、「K n o b」変異 (T 3 6 6 W) (Merchant等, Nature Biotechnology, 16:677-681 (1998)) と上述の全ての制御エレメントを持つ抗 V E G F 抗体 (V N E R K) に変化させられている 1 - 軽及び 1 - 重の相対 T I R 強度を持つ別個のシストロンベクターの誘導体 (Simmons等, J. Immunol. Methods, 263: 133-147 (2002)) である。ライゲーションの第二部分は、上述した E c o R I - P a c I 消化 p V G 1 1 . V N E R K . K n o b ベクター中の図 8 に示した配列のライゲーションを含む。その配列は、アルカリホスファターゼプロモータ (p h o A) 、S T I Iシグナル配列及び 5 A 6 抗体の全 (可変及び定常ドメイン) 軽鎖をコードする。

30

【0129】

p 5 A 6 . 1 1 . K n o b

このプラスミドを構築して、キメラ完全長抗体を产生するためにヒト重鎖フレームワーク中に 5 A 6 抗体のマウス重鎖可変ドメインを導入した。p 5 A 6 . 1 1 . K n o b の構築には二つのDNA断片のライゲーションが伴う。第一のものは、小さなM l u I - P s p O M I 断片が除去されている p 5 A 6 . 1 . L . V G . 1 . H . K n o b ベクターであった。ライゲーションの第二部分は、M l u I - P s p O M I 消化 p 5 A 6 . 1 . L . V G . 1 . H . K n o b ベクター中の図 10 に示した配列のライゲーションを含む。その配列は、S T I Iシグナル配列の最後の 3 つのアミノ酸及び 5 A 6 抗体のマウス重鎖可変ドメインの約 1 1 9 のアミノ酸をコードする。

40

【0130】

p 5 A 6 . 1 1 . K n o b . H g -

p 5 A 6 . 1 1 . K n o b . H g - プラスミドは、完全長キメラ 5 A 6 無ヒンジ K n o b 抗体を発現するように構築した。プラスミドの構築には二つのDNA断片のライゲーション

50

が伴う。第一のものは、小さな P s p O M I - S a c I I 断片が除去されている p 5 A 6 . 1 1 . K n o b ベクターであった。ライゲーションの第二部分は、ヒト重鎖の約 1 7 1 アミノ酸をコードする p 4 D 5 . 2 2 . H g - 由来のおよそ 5 1 4 塩基対の P s p O M I - S a c I I 断片であり、そこで二つのヒンジシステインがセリンに転化されている (C 2 2 6 S , C 2 2 9 S , Kabat, E.A. 等編 1991, Sequences of proteins of immunological interest, 5 版 Vol. 1. , NIH, Bethesda, MD の 671 頁の EU 番号付け系) 。プラスミド p 4 D 5 . 2 2 . H g - は 2 - 軽及び 2 - 重の相対 T I R 強度を持つ別個のシストロンベクターの誘導体 (Simmons 等, J. Immunol. Methods, 263: 133-147 (2002)) であり、そこでは、軽鎖及び重鎖可変ドメインが抗 H E R 2 抗体に変化させられ、二つのヒンジシステインがセリンに転化されている (C 2 2 6 S , C 2 2 9 S) 。

10

【 0 1 3 1 】

(i i) プラスミド p 5 A 6 . 2 2 . K n o b . H g -

所望の p 5 A 6 . 2 2 . K n o b . H g - プラスミドを产生するために一つの中間体プラスミドが必要であった。中間体プラスミド p 5 A 6 . 2 1 . K n o b . H g - を产生するために、最初に p h o A プロモータ及び S T I I シグナル配列（軽鎖に対して 2 の相対 T I R 強度）を p 5 A 6 . 1 1 . K n o b . H g - プラスミド上に移した。次は、中間体プラスミド p 5 A 6 . 2 1 . K n o b . H g - の調製と続く p 5 A 6 . 2 2 . K n o b . H g - の構築を記載している。

【 0 1 3 2 】

p 5 A 6 . 2 1 . K n o b . H g -

このプラスミドは、 S T I I シグナル配列（軽鎖に対して 2 の相対 T I R 強度を持つ）を導入するために構築した。 p 5 A 6 . 2 1 . K n o b . H g - の構築には三つの D N A 断片のライゲーションが伴う。第一のものは、小さな E c o R I - P a c I 断片が除去されている p 5 A 6 . 1 1 . K n o b . H g - ベクターであった。ライゲーションの第二部分は、キメラ 5 A 6 抗体の軽鎖をコードする p 5 A 6 . 1 1 . K n o b . H g - プラスミド由来のおよそ 6 5 8 塩基対の N s i I - P a c I 断片であった。ライゲーションの第三部分は、次のプライマーを使用する、 p 1 H 1 . 2 2 . H g - から產生されたおよそ 4 8 9 塩基対の E c o R I - N s i I P C R 断片であった：

5' - AAAGGGAAAGAATTCAACTTCTCCAGACTTTGGATAAGG

(配列番号 1)

5' - AAAGGGAAAATGCATTTGTAGCAATAGAAAAAACGAA

(配列番号 2)

プラスミド p 1 H 1 . 2 2 . H g - は、軽鎖及び重鎖可変ドメインが、二つのヒンジシステインがセリンに転化されている (C 2 2 6 S , C 2 2 9 S) 2 - 軽及び 2 - 重の相対 T I R 強度を持つ別個のシストロンベクターの誘導体 (Simmons 等, J. Immunol. Methods, 263: 133-147 (2002)) である。

20

【 0 1 3 3 】

p 5 A 6 . 2 2 . K n o b . H g -

このプラスミドは、 S T I I シグナル配列（重鎖に対して 2 の相対 T I R 強度を持つ）を導入するために構築した。 p 5 A 6 . 2 2 . K n o b の構築には二つの D N A 断片のライゲーションが伴う。第一のものは、小さな P a c I - M l u I 断片が除去されている p 5 A 6 . 2 1 . K n o b . H g - ベクターであった。ライゲーションの第二部分は、軽鎖の t 転写ターミネータ、 p h o A プロモータ、及び S T I I シグナル配列（重鎖に対して 2 の相対 T I R 強度）をコードする p 1 H 1 . 2 2 . H g - プラスミド由来の約 5 0 3 塩基対の P a c I - M l u I 断片であった。

40

【 0 1 3 4 】

(i i i) プラスミド p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e . H g -

所望の p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e . H g - プラスミドを产生するために 2 つの中間体プラスミドが必要であった。中間体プラスミド p 2 2 E 7 . 1 . L . V G . 1 . H . H o l e を產生するために、最初に 2 2 E 7 (抗 I g E - R) キメラ軽鎖の可変ドメインを p V G 1 1 . V

50

N E R K . H o l e プラスミド上に移した。ついで、中間体プラスミド p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e プラスミドを產生するために、2 2 E 7 キメラ重鎖の可変ドメインを p 2 2 E 7 . 1 . L . V G . 1 . H . H o l e プラスミド上に移した。次はこれら中間体プラスミド p 2 2 E 7 . 1 . L . V G . 1 . H . H o l e 及び p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e の調製と、それに続く p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e . H g - の構築について記載する。

【 0 1 3 5 】

p 2 2 E 7 . 1 . L . V G . 1 . H . H o l e

このプラスミドは、2 2 E 7 抗体のマウス軽鎖可変ドメインを、完全長抗体の產生に適合性を有するプラスミドに移入するために構築した。このプラスミドの構築には二つのDNA断片のライゲーションが伴う。第一のものは、小さなE c o R I - P a c I 断片が除去されている p V G 1 1 . V N E R K . H o l e ベクターであった。プラスミド p V G 1 1 . V N E R K . H o l e は、軽鎖及び重鎖可変ドメインが、「 h o l e 」変異 (T 3 6 6 、 L 3 6 8 A 、 Y 4 0 7 V) (Merchant 等, Nature Biotechnology, 16:677-681 (1998)) と上述の全ての制御エレメントを持つ抗 V E G F 抗体 (V N E R K) に変化させられている 1 - 軽及び 1 - 重の相対 T I R 強度を持つ別個のシストロンベクターの誘導体 (Simmonds 等, J. Immunol. Methods, 263: 133-147 (2002)) である。ライゲーションの第二部分は、上述した E c o R I - P a c I 消化 p V G 1 1 . V N E R K . H o l e ベクター中への図 9 に示した配列のライゲーションを含む。その配列は、アルカリホスファターゼプロモータ (p h o A) 、 S T I I シグナル配列及び 2 2 E 7 抗体の全 (可変及び定常ドメイン) 軽鎖をコードする。

10

20

30

40

【 0 1 3 6 】

p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e

このプラスミドを構築して、キメラ完全長抗体を產生するためにヒト重鎖フレームワーク中に 2 2 E 7 抗体のマウス重鎖可変ドメインを導入した。 p 2 2 E 7 . 1 1 . K n o b の構築には二つのDNA断片のライゲーションが伴う。第一のものは、小さな M l u I - P s p O M I 断片が除去されている p 2 2 E 7 . 1 . L . V G . 1 . H . H o l e ベクターであった。ライゲーションの第二部分は、 M l u I - P s p O M I 消化 p 2 2 . E 7 . 1 . L . V G . 1 . H . H o l e ベクター中への図 1 1 に示した配列のライゲーションを含む。その配列は、 S T I I シグナル配列の最後の 3 つのアミノ酸及び 2 2 E 7 抗体のマウス重鎖可変ドメインの約 1 2 3 のアミノ酸をコードする。

【 0 1 3 7 】

p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e . H g -

p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e . H g - プラスミドは、完全長キメラ 2 2 E 7 無ヒンジ H o l e 抗体を発現するように構築した。プラスミドの構築には二つのDNA断片のライゲーションが伴う。第一のものは、小さな P s p O M I - S a c I I 断片が除去されている p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e ベクターであった。ライゲーションの第二部分は、ヒト重鎖の約 1 7 1 アミノ酸をコードする p 4 D 5 . 2 2 . H g - 由来のおよそ 5 1 4 塩基対の P s p O M I - S a c I I 断片であり、そこでは二つのヒンジシステインがセリンに転化されている (C 2 2 6 S 、 C 2 2 9 S) 。

【 0 1 3 8 】

(i v) プラスミド p 2 2 E 7 . 2 2 . H o l e . H g -

所望の p 2 2 E 7 . 2 2 . H o l e . H g - プラスミドを產生するために一つの中間体プラスミドが必要であった。中間体プラスミド p 2 2 E 7 . 2 1 . H o l e . H g - を產生するために、最初に p h o A プロモータ及び S T I I シグナル配列 (軽鎖に対して 2 の相対 T I R 強度) を p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e . H g - プラスミド上に移した。次は、中間体プラスミド p 2 2 E 7 . 2 1 . H o l e . H g - の調製と続く p 2 2 E 7 . 2 2 . H o l e . H g - の構築を記載している。

【 0 1 3 9 】

p 2 2 E 7 . 2 1 . H o l e . H g -

このプラスミドは、 S T I I シグナル配列 (軽鎖に対して 2 の相対 T I R 強度) を導入

50

するために構築した。p 2 2 E 7 . 2 1 . H o l e . H g - の構築には三つのDNA断片のライゲーションが伴う。第一のものは、小さなE c o R I - P a c I 断片が除去されているp 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e . H g - ベクターであった。ライゲーションの第二部分は、キメラ2 2 E 7 抗体の軽鎖をコードするp 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e . H g - プラスミド由来のおよそ6 4 7 塩基対のE c o R V - P a c I 断片であった。ライゲーションの第三部分は、アルカリホスファターゼプロモータ(p h o A)及びS T I I シグナル配列をコードするp 1 H 1 . 2 2 . H g - プラスミド由来のおよそ5 0 0 塩基対のE c o R I - E c o R V 断片であった。

【0 1 4 0】

p 2 2 E 7 . 2 2 . H o l e . H g -

10

このプラスミドは、S T I I シグナル配列(重鎖に対して2の相対T I R 強度を持つ)を導入するために構築した。p 2 2 E 7 . 2 2 . H o l e . H g - の構築には三つのDNA断片のライゲーションが伴う。第一のものは、小さなE c o R I - M l u I 断片が除去されているp 2 2 E 7 . 2 1 . H o l e . H g - ベクターであった。ライゲーションの第二部分は、アルカリホスファターゼプロモータ、S T I I シグナル配列、及びキメラ2 2 E 7 抗体の軽鎖をコードするp 2 2 E 7 . 2 1 . H o l e . H g - プラスミド由来のおよそ1 1 4 1 塩基対のE c o R I - P a c I 断片であった。ライゲーションの第三部分は、軽鎖の_{t 0}転写ターミネータ、p h o A プロモータ、及びS T I I シグナル配列(重鎖に対して2の相対T I R 強度)をコードするp 1 H 1 . 2 2 . H g - プラスミド由来の約5 0 3 塩基対のP a c I - M l u I 断片であった。

20

【0 1 4 1】

[抗体発現 - 5 A 6 K n o b 及び 2 2 E 7 H o l e]

「knobs into holes」技術を用いて、ヘテロ二量体化を促進し、完全長二重特異性抗F c R I I b (5 A 6) 及び抗I g E - R (2 2 E 7) 抗体を産生した。F c 配列のC H 3 ドメインにおける「knobs into holes」変異はホモ二量体の生成を大きく減少させることが報告されている(Merchant等, Nature Biotechnology, 16:677-681 (1998))。F c 領域中に「K n o b」変異(T 3 6 6 W)を導入することによって抗F c R I I b 成分(p 5 A 6 . 1 1 . K n o b)のための構築物を、「h o l e」変異(T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V)を導入することによって抗I g E - R 成分(p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e)のための構築物を調製した。

30

k n o b 抗F c R I I b に対してプラスミド p 5 A 6 . 1 1 . K n o b を、h o l e 抗I g E - R に対してp 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e を使用して、抗体の小規模誘導を実施した。各プラスミドは軽鎖と重鎖の双方に対して1の相対T I R 強度を有していた。各構築物の小規模発現のために、大腸菌株3 3 D 3 (W3110 fhuA (tonA) ptr3 lac Iq lac L8 ompT (nmpc-fepE) degP41 kan^R)を宿主細胞として使用した。形質転換後、選択された形質転換体選択物を、カルベニシリン(5 0 μg / mL)を補填した5 mLのLB培地中に播種し、3 0 ℃にて回転培養で一晩成長させた。ついで、各培養物をC . R . A . P . リン酸制限培地(Simmons等, J. Immunol. Methods 263:133-147 (2002))中に希釈した(1 : 1 0 0)。ついで、カルベニシリンを5 0 μg / mLの濃度で誘導培養物に加え、培養物を3 0 ℃にて回転培養で約2 4 時間成長させた。特記しない限り、全ての振盪フラスコ誘導は5 mL容積で実施した。

40

【0 1 4 2】

誘導培養物からの非還元全細胞可溶化物は次のようにして調製した：(1) 1 0 0 D₆₀₀ mLの誘導サンプルをマイクロチューブで遠心分離し；(2) 各ペレットを9 0 μL T E (1 0 mMのトリス、p H 7 . 6、1 mMのEDTA)中に再懸濁し；(3) 1 0 μLの1 0 0 mMヨード酢酸(シグマI-2 5 1 2)を各サンプルに添加して、あらゆる遊離システインを阻止し、ジスルフィド混合を防止し；(4) 2 0 μLの1 0 % SDSを各サンプルに添加した。サンプルをボルテックスし、約9 0 ℃に3分間加熱した後、再びボルテックスした。サンプルを室温まで冷却した後、7 5 0 μLのアセトンを添加してタンパク質を沈殿させた。サンプルをボルテックスし、約1 5 分間室温に保った。微量遠心

50

機での5分間の遠心分離後、各サンプルの上清を吸引し、各タンパク質ペレットを50μLのdH₂O + 50μLの2×NOVEX SDSサンプルバッファー中に再懸濁させた。ついで、サンプルを約90℃で4分間加熱し、十分にボルテックスし、室温まで冷却した。ついで、最後の5分の遠心分離を実施し、上清をきれいなチューブに移した。

【0143】

誘導培養物からの還元全細胞可溶化物は次のようにして調製した：(1) 100D₆₀₀ mLの誘導サンプルをマイクロチューブで遠心分離し；(2) 各ペレットを90μL TE(10mMのトリス、pH 7.6、1mMのEDTA)中に再懸濁し；(3) 10μLの1Mジチオスレイトール(シグマD-5545)を各サンプルに添加して、ジスルフィド結合を還元し；(4) 20μLの10%SDSを各サンプルに添加した。サンプルをボルテックスし、約90℃に3分間加熱した後、再びボルテックスした。サンプルを室温まで冷却した後、750μLのアセトンを添加してタンパク質を沈殿させた。サンプルをボルテックスし、約15分間室温に保った。微量遠心機での5分間の遠心分離後、各サンプルの上清を吸引し、各タンパク質ペレットを10μLの1Mジチオスレイトール+40μLのdH₂O+50μLの2×NOVEX SDSサンプルバッファー中に再懸濁させた。ついで、サンプルを約90℃で4分間加熱し、十分にボルテックスし、室温まで冷却した。ついで、最後の5分の遠心分離を実施し、上清をきれいなチューブに移した。

調製後、5-8μLの各サンプルを10ウェルの1.0mM NOVEX 製 12% トリス-グリシン SDS-PAGE に充填し、1.5-2時間の間、~120ボルトで電気泳動させた。ついで、得られたゲルをクーマシーブルーで染色するか又はウェスタンプロット分析に使用した。

【0144】

ウェスタンプロット分析では、SDS-PAGEゲルを、10mMのCAPSバッファー、pH 11+3%メタノール中のニトロセルロース膜(NOVEX)上にエレクトロプロットした。ついで、膜を、1×NET(150mMのNaCl、5mMのEDTA、50mMのTris、pH 7.4、0.05%のトリトンX-100)+0.5%ゼラチンの溶液を使用して室温で約30分-1時間振盪して、プロックした。プロック工程後に、膜を、抗Fabウェスタンプロット分析のために1×NET+0.5%ゼラチン+抗Fab抗体(ヒトIgG Fabに対するペルオキシダーゼ結合ヤギIgG画分; CAPPEL #55223)の溶液に配した。抗Fab抗体希釈は抗体のロットに応じて1:50000から1:1000000の範囲であった。あるいは、抗Fcウェスタンプロット分析では、膜を、1×NET+0.5%ゼラチン+抗Fc抗体(ヒトFc断片に対するペルオキシダーゼ結合ヤギIgG画分; BETHYL #A80-104P-41)の溶液に配した。抗Fc抗体希釈は抗体のロットに応じて1:50000から1:250000の範囲であった。それぞれの場合において膜は振盪しながら抗体溶液中に室温で一晩放置した。翌朝、膜を、1×NET+0.5%ゼラチン中で最小3×10分、洗浄した後、TBS(20mMのトリス、pH 7.5、500mMのNaCl)中で1×15分、洗浄した。抗Fab抗体及び抗Fc抗体が結合したタンパク質バンドを、Amersham Pharmacia Biotech ECL検出を使用して可視化し、その膜をX線フィルムに露光した。

p5A6.11.Knob(knob抗Fc-R III b)及びp22E7.11.Hole(hole抗IgE-R)抗体発現に対する抗Fabウェスタンプロットの結果を図1に示す。これらは、レーン1のknob抗Fc-R III b抗体及びレーン2のhole抗IgE-R抗体に対して十分に折り畳まれ構築された重-軽(HL)鎖種の発現を明らかにしている。抗Fab抗体が軽鎖の異なった可変ドメインに対して異なった親和性を有していることに留意することは重要である。抗Fab抗体は一般に重鎖に対して低い親和性を有している。非還元サンプルの場合、各抗体の発現は重-軽鎖種の検出に至った。特に、完全長抗体種はhole抗体IgE-R抗体に対して検出可能であるが、それは全部の十分に折り畳まれ構築された抗体種の一部分に過ぎない。完全長抗体種の折り畳みと構築は、抗Fc-R III b抗体では「knob」変異の、抗IgE-R抗体では「hole」変異の導入の結果、好まれるものではない。還元サンプルでは、軽鎖がknob抗Fc

10

20

30

40

50

- R I I b 抗体及び h o l e 抗 I g E - R 抗体に対して検出される。

【 0 1 4 5 】

同様に、抗 F c ウエスタンプロットの結果を図 2 に示すが、それらもまたレーン 1 の k n o b 抗 F c - R I I b 抗体及びレーン 2 の h o l e 抗 I g E - R 抗体に対して十分に折り畳まれ構築された重-軽 (H L) 鎖種の発現を明らかにしている。抗 F c 抗体は軽鎖に結合することはできず、よって検出されない。非還元サンプルでは、各抗体の発現はまた重-軽鎖種の検出に至るが、完全長抗体種ではない。還元サンプルでは、k n o b 抗 F c - R I I b 抗体及び h o l e 抗 I g E - R 抗体に対しては同様量の重鎖がある。

【 0 1 4 6 】

[5 A 6 K n o b ヒンジ変異及び 2 2 E 7 ヒンジ変異抗体の発現]

p 5 A 6 . 1 1 . K n o b 及び p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e 構築物を有する一次抗体種は、十分に折り畳まれ構築された重-軽 (H L) 鎖種であった。しかしながら、二重特異性抗 F c R I I b / 抗 I g E - R (5 A 6 / 2 2 E 7) 抗体に対してここに記載された調製法を容易にするために、二つの重鎖のヒンジ配列を、二つのヒンジシステインをセリンで置換することにより (C 2 2 6 S, C 2 2 9 S, Kabat, E.A. 等編 1991, Sequences of proteins of immunological interest, 5 版 Vol. 1., NIH, Bethesda, MD の 671 頁の EU 番号付け系) 修飾した。ヒンジ変異は以下では「無ヒンジ」とも称する。

C 2 2 6 S, C 2 2 9 S 置換を有するヒンジ変異を含む k n o b 抗 F c - R I I b (5 A 6) 抗体及び h o l e 抗 I g E - R (2 2 E 7) 抗体のための構築物を調製した。各抗体に対して二つの構築物を調製した。一つの構築物は軽鎖及び重鎖の双方に対して 1 の相対 T I R 強度を有し、第二の構築物は軽鎖及び重鎖の双方に対して 2 の相対 T I R 強度を有していた。

【 0 1 4 7 】

ついで、k n o b 抗 F c - R I I b 抗体 (p 5 A 6 . 1 1 . K n o b) 、 h o l e 抗 I g E - R 抗体 (p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e) 、 k n o b 無ヒンジ抗 F c - R I I b 抗体 (p 5 A 6 . 1 1 . K n o b . H g - 及び p 5 A 6 . 2 2 . K n o b . H g -) 、及び h o l e 無ヒンジ抗 I g E - R 抗体 (p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e . H g - 及び p 2 2 E 7 . 2 2 . H o l e . H g -) を、上記と同じようにして発現させた。全細胞可溶化物を調製し、 SDS - P A G E によって分離し、ニトロセルロースに移し、上述のヤギ抗ヒト F a b 結合抗体及びヤギ抗ヒト F c 結合抗体で検出した。

抗 F a b ウエスタンプロットの結果は図 3 に示すが、それらはレーン 2 に k n o b 無ヒンジ抗 F c - R I I b 抗体 (相対 T I R 強度 - 軽鎖に対して 1 、重鎖に対して 1) の、レーン 5 に h o l e 無ヒンジ抗 I g E - R 抗体 (相対 T I R 強度 - 軽鎖に対して 1 、重鎖に対して 1) の重-軽 (H L) 鎖種の折り畳みと構築における有意な改善を示している。また、抗 F a b ウエスタンプロットの結果は、軽鎖及び重鎖に対する相対 T I R 強度が 1 から 2 に増加させられたときの k n o b 無ヒンジ抗 F c - R I I b 抗体 (レーン 3) 及び h o l e 無ヒンジ抗 I g E - R 抗体 (レーン 6) の重-軽 (H L) 鎖種の折り畳みと構築における増加を示している。再び、抗 F a b 抗体が軽鎖の異なった可変ドメインに対して異なった親和性を有しており、一般に重鎖に対して低い親和性を有していることに留意することは重要である。非還元サンプルの場合、各抗体の発現は重-軽鎖種の検出に至るが、ヒンジシステインからセリンへの転換の結果として完全長抗体種の検出には至らない。二つのヒンジシステインがセリンに転換され、再び軽鎖及び重鎖に対する相対 T I R 強度が 1 から 2 に増加させられたとき、k n o b 無ヒンジ抗 F c - R I I b 及び h o l e 無ヒンジ抗 I g E - R 抗体双方の重-軽 (H L) 鎖種の折り畳みと構築における有意な改善がある。還元サンプルの場合、重鎖及び軽鎖が異なった抗 F c - R I I b 及び抗 I g E - R 抗体に対して検出される。重鎖及び軽鎖の量の増加が、相対 T I R 強度が 1 から 2 に増加したときに検出される。

【 0 1 4 8 】

同様に、図 4 の抗 F c ウエスタンプロットの結果は、二つのヒンジシステインがセリンに転換され、再び軽鎖及び重鎖に対する相対 T I R 強度が 1 から 2 に増加させられたとき

10

20

30

40

50

の、knob無ヒンジ抗Fc-R_IIb及びhole無ヒンジ抗IgE-R抗体双方の重-軽(HL)鎖種の折り畳みと構築における有意な改善を示している。抗Fc抗体は軽鎖に結合することはできず、よってそれは検出されない。還元サンプルの場合、重鎖は異なった抗Fc-R_IIb及び抗IgE-R抗体に対して検出される。相対TIR強度が1から2に増加したときに重鎖の量の増加が検出される。

精製された機能ある二重特異性抗体の取得容易性と効率を、上述の変異ヒンジ領域を有する抗体について更に評価する。

【0149】

[二重特異性抗体成分の精製]

1. 大腸菌ペーストからの抽出

凍結されていた大腸菌ペーストを解凍し、5容量(v/w)の蒸留水に懸濁させ、HClでpH5に調節し、遠心分離し、上清を捨てた。ポリトロン(Brinkman)を使用してpH9の5-10容量のバッファー中に不溶性ペレットを再懸濁させ、上清を遠心分離後に保持した。この工程は一度繰り返した。

ついで、5-10容量の同じバッファー中に不溶性ペレットを再懸濁させ、ミクロフルイダイザー(Microfluidics)を通して細胞を破壊した。上清を遠心分離後に保持した。

上清を、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)及びウェスタンプロットによって評価し、單一アームの抗体を含むもの(つまり、單一重鎖プラス軽鎖の分子量に対応するバンド)をプールした。

【0150】

2. プロテインAアフィニティクロマトグラフィー

プールした上清をpH8に調整し、ProSep-Aビーズ(Millipore)を添加した(10リットル当たり約250mlビーズ)。混合物を4で24-72時間攪拌し、ビーズを静置し、上清を捨てた。ビーズをクロマトグラフィーカラム(Amersham Biosciences XK50)に移し、10mMのトリスバッファーpH7.5で洗浄した。ついで、50mMのクエン酸塩、0.1MのNaClバッファー中、所定のpH勾配を使用してカラムを溶出させた。最初のバッファーをpH6に調節し、勾配はpH2のバッファーを用いて線形希釈によって形成した。

8Mの尿素とトリス塩基の添加によって画分をpH5と2M尿素に調節した後、SDS-PAGEによって評価し、プールした。

【0151】

3. 陽イオン交換クロマトグラフィー

S-セファロースFast Flowカラム(Amersham Biosciences)を2Mの尿素、15mMのMES、pH5.5を用いて平衡にした。ProSep-A溶出液プールを、等容量の平衡バッファーを用いて希釈し、カラムに添加した。平衡バッファーで、ついで25mMのMES、pH5.5での洗浄後、25mMのMES、pH5.5中0-1MのNaClの線形勾配を用いてカラムを展開した。SDS-PAGE分析に基づいて画分をプールした。

【0152】

4. 疎水性相互作用クロマトグラフィー

H.I.-プロピルカラム(J.T.Baker)を、0.5Mの硫酸ナトリウム、25mMのMES、pH6を用いて平衡にした。S-Fast Flow溶出液を0.5Mの硫酸ナトリウム、pH6に調節し、カラムに充填し、25mMのMES、pH6中0.5-0Mの硫酸ナトリウムの勾配を用いてカラムを展開した。SDS-PAGE分析に基づいて画分をプールした。

【0153】

5. サイズ排除クロマトグラフィー

H.I.-プロピル溶出液プールを、CentriPrep YM10濃縮器(Amicon)を用いて濃縮し、0.1MのNaCl、pH6中10mMのコハク酸塩又は10mMのヒスチジンで平衡にしたスーパーデックスSX200カラム(Amersham Biosciences)に充填し

10

20

30

40

50

、2.5 ml / mでカラムを展開した。SDS-PAGE分析に基づいて画分をプールした。

【0154】

[二重特異性抗体を産生するための抗体成分のアニーリング]

二つの類似した（しかし同一ではない）アニーリング法を以下に記載するが、双方とも二重特異性抗体の良好な収率を達成した。抗体の重鎖と以下に記載する抗体成分は上述の変異ヒンジ領域を含む。

【0155】

ヒンジ変異5A6Knob及びヒンジ変異22E7Holeのアニーリング・バージョン
1

25 mMのMES、pH 5.5、0.5 MのNaCl中の精製した5A6Knob及び22E7Hole抗体を、その濃度に基づいて等モル比で混合した。ついで、混合物を5分から1時間、50℃で加熱した。このアニーリング温度は、これらのCH3変異体に対して過去に記載された融解曲線（Atwell, S.等 J. Mol. Biol. 270:26-35, 1997）から誘導された。ついで、アニールされた抗体に、その二重特性を決定するための分析を施した。

【0156】

二重特異性の分析

1) 等電点電気泳動法

アニールした抗体が真に二重特異性であることを証明する最も簡単な方法は等電点電気泳動分析にサンプルをかけることである。5A6Knob抗体は7.13のpIを有する一方、22E7Holeは9.14のpIを有する。二重特異性5A6Knob/22E7Hole抗体は8.67のpIを有する。図5は、クーマシープルーでの染色後の等電点電気泳動ゲル（Invitrogen, Novex pH 3-10 IEF）上での5A6Knob、22E7Hole及び二重特異性5A6Knob/22E7Hole（加熱前と加熱後）抗体の移動を示す。室温での混合時にはある程度のアニーリングがあるが、50℃への加熱はプロセスの完了を促進するように思われる。5A6Knob及び22E7Holeのものの間のpIのバンドを持つ新しいタンパク質の出現は二重特異性抗体の形成を裏付けている。

【0157】

2) アフィニティカラム分析

5A6Knob、22E7Hole、及び二重特異性5A7Knob/22E7Hole抗体の挙動をFc RIIbアフィニティカラムで観察した。ヒトFc RIIb（細胞外ドメイン）-GST融合タンパク質を、製造者の指示書（Pierce, UltraLink Immobilization Kit #46500）に従って小カラム中の固形担体にカップリングさせた。PBS（137 mMのNaCl、2.7 mMのKCl、8 mMのNa₂HPO₄、1.5 mMのKH₂PO₄、pH 7.2）中の5A6Knob、22E7Hole、及び二重特異性5A6Knob/22E7Hole抗体を、各カラムの理論結合能の約10-20%にて3つの別個のFc RIIbアフィニティカラムに添加した。ついで、カラムを、16カラム容量のPBSで洗浄した。充填と洗浄に対するカラムフロースルーを集め、混合し、Centricon Microconcentrator（Amicon）でおよそ10倍に濃縮した。ついで、同じ容量の各濃縮物を2×SDSサンプルバッファーで2倍希釈し、SDS-PAGE（Invitrogen, Novex Tris-Glycine）で分析した。20 mMのNa₂HPO₄、pH 6.5中でのエレクトロプロットによってそのタンパク質バンドをニトロセルロースに移し、抗ヒトIgG F(ab)ペルオキシダーゼ結合抗体（CAPPELL#55223）でプローブした。ついで、Amersham Pharmacia BiotechのECLを、製造者の指示書に従って使用して、抗体バンドを検出した。

この分析の結果を図6に示す。Fc RIIbアフィニティカラムは、5A6Knob抗体と、それが二重特異性抗体ならば5A6Knob/22E7Hole二重特異性抗体を保持しなければならない。22E7Hole抗体は図に示されているようにフロースル

10

20

30

40

50

－しなければならない。5 A 6 K n o b / 2 2 E 7 H o l e 二重特異性レーンにおいて検出された抗体がないので、それが真に二重特異性であることを示唆している。

【0158】

ヒンジ変異 5 A 6 K n o b 及びヒンジ変異 2 2 E 7 H o l e のアニーリング - バージョン 2

抗体成分（單一アーム 5 A 6 K n o b 及び 2 2 E 7 H o l e）を上記のようにして精製した。

「ヘテロ二量体」を、僅かにモル過剰の 5 A 6 を使用して 50 ℃でアニーリングして形成した後、陽イオン交換カラムで精製した。

全容量 10 ml の 8 mM のスクシネートと、80 mM の NaCl バッファー中において、5 A 6 (K n o b) を 5 mg と 2 2 E 7 (H o l e) を 4.5 mg 混合し、20 mM のトリスで pH 7.5 に調整した。

混合物を、水浴中で 10 分間、50 ℃まで加熱した後、4 ℃に冷却した。

【0159】

二重特異性の分析

1) 等電点電気泳動法

等電点電気泳動ゲル (Cambrex, pH 7 - 11) での分析は、(8.67 の計算 pI を有する) 二重特異性に対応する、アニール混合物中の pI ~ 8.5 の単一バンドの形成を示した。図 7 を参照のこと。

【0160】

2) 陽イオン交換カラムでの精製

5 ml の CM-Fast Flow カラム (HiTrap, Amersham Biosciences) を、pH 5.5 のバッファー (30 mM の MES、20 mM の hepes、20 mM のイミダゾール、20 mM のトリス、25 mM の NaCl) で平衡にした。アニールされたプールを等容量の平衡バッファーで希釈し、pH 5.5 に調節し、カラムに添加し、平衡バッファーで洗浄した。カラムは 30 分かけて同じバッファー中で pH 5.5 から pH 9.0 の勾配で 1 ml / 分で展開された。

画分を IEF によって分析したところ、5 A 6 がヘテロ二量体より前に溶出したことが明らかにされた。ヘテロ二量体を含むプールされた画分の光散乱法による分析の結果、単量体が存在しないことが明らかになった。

【図面の簡単な説明】

【0161】

【図 1】 p 5 A 6 . 1 1 . K n o b (k n o b 抗 F c - R I I b) 及び p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e (h o l e 抗 I g E - R) 抗体成分の発現に対する抗 F a b ウエスタンプロットの結果を示す。

【図 2】 p 5 A 6 . 1 1 . K n o b (k n o b 抗 F c - R I I b) 及び p 2 2 E 7 . 1 1 . H o l e (h o l e 抗 I g E - R) 抗体成分の発現に対する抗 F c ウエスタンプロットの結果を示す。

【図 3】 野生型又は変異ヒンジ配列を持つ抗体成分の発現に対する抗 F a b ウエスタンプロットの結果を示す。

【図 4】 野生型又は変異ヒンジ配列を持つ抗体成分の発現に対する抗 F c ウエスタンプロットの結果を示す。

【図 5】 室温と混合物は 5 分間 50 ℃に加熱した 5 A 6 K n o b 、 2 2 E 7 H o l e 、混合した 5 A 6 K n o b 及び 2 2 E 7 H o l e (全ての重鎖は記載した変異ヒンジを有する) の等電点電気泳動分析を示す。

【図 6】 5 A 6 K n o b / 2 2 E 7 H o l e 二重特異性、 2 2 E 7 H o l e 、及び 5 A 6 K n o b 抗体 (全ての重鎖は記載した変異ヒンジを有する) に対する F c R I I b アフィニティカラムフロースルーを示す。

【図 7】 50 ℃に加熱した 5 A 6 K n o b 、 2 2 E 7 H o l e 、及び 5 A 6 K n o b 及び 2 2 E 7 H o l e 混合物 (全ての重鎖は記載した変異ヒンジを有する) の 10 分間の等電

10

20

30

40

50

点電気泳動分析を示す。

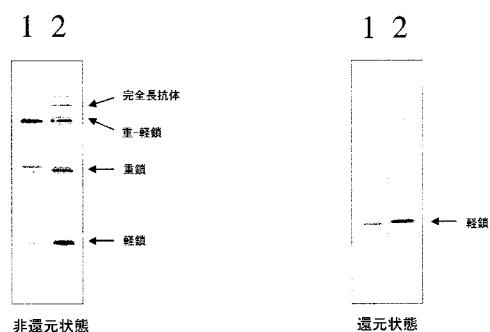
【図8】アルカリホスファターゼプロモータ(phoA)、STIIシグナル配列及び5A6抗体の全(可変及び定常ドメイン)軽鎖をコードする核酸を示す。

【図9】STIIシグナル配列の最後の3つのアミノ酸と5A6抗体のマウス重鎖ドメインのおよそ119のアミノ酸をコードする核酸を示す。

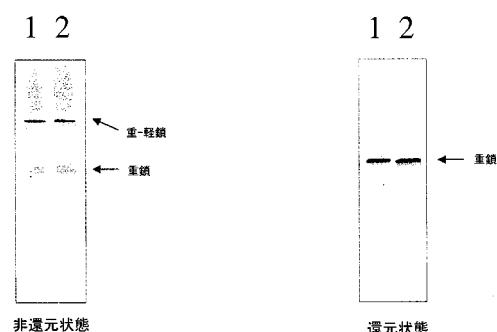
【図10】アルカリホスファターゼプロモータ(phoA)、STIIシグナル配列及び22E7抗体の全(可変及び定常ドメイン)軽鎖をコードする核酸を示す。

【図11】STIIシグナル配列の最後の3つのアミノ酸と22E7抗体のマウス重鎖ドメインのおよそ123のアミノ酸をコードする核酸を示す。

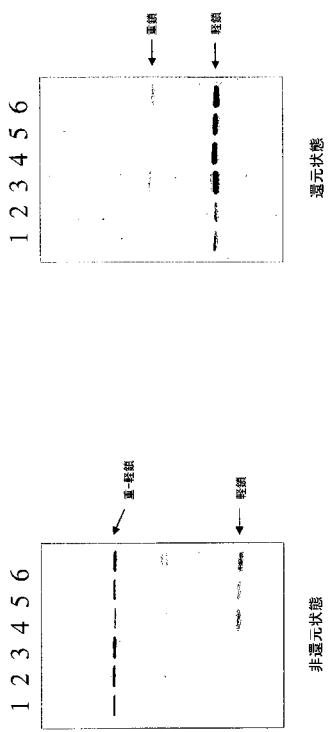
【図1】



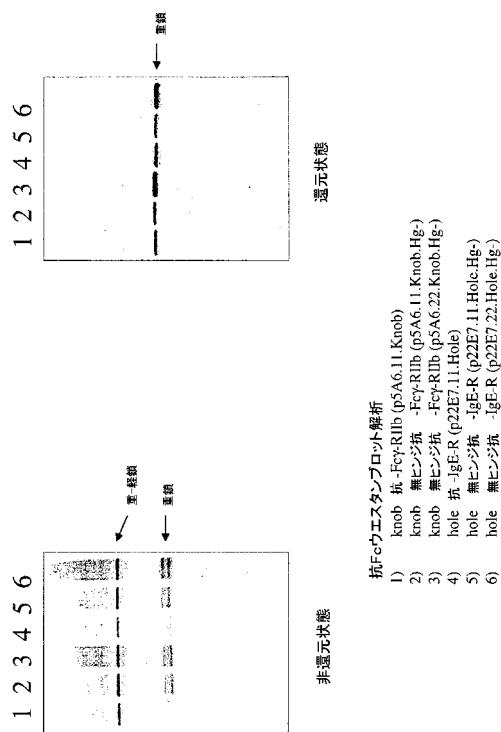
【図2】



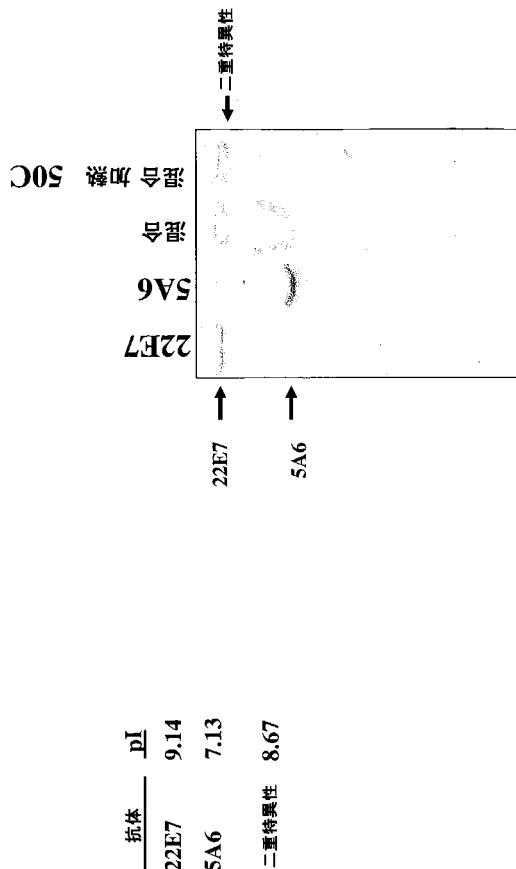
【 図 3 】



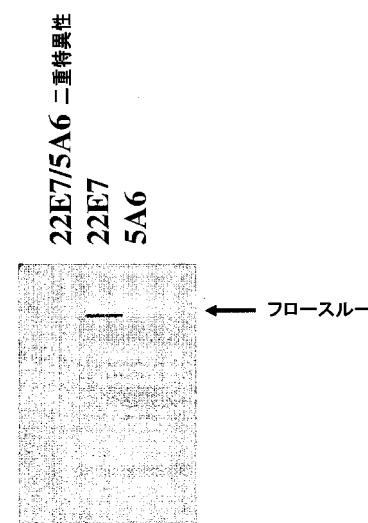
〔 図 4 〕



【 四 5 】

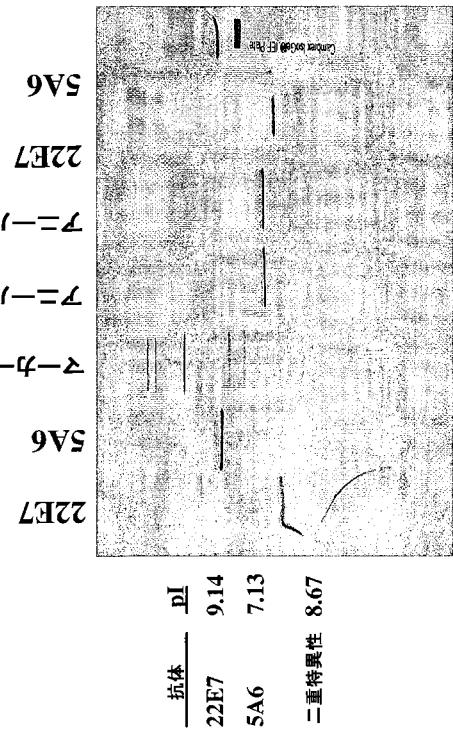


【 四 6 】



【図7】

アミニーリングのIEF解析



【図8】

GAATTCACTTCCATACTTGGATAAGGAAATACAGACATGAAAAATCTCATGGTGA
GTGTTATTAAAGCTGCCAAAAAGAAGAAGAGTCGAATGAACCTGTTGCCAGGTAGA
AGCTTGGAGATTATCGTCACTGCAATGCTGCCAAATGGCCCAAATGACCAACAGC
GTGATGATCAGGTAGGGGGCTGTAAGGGTAAAGCCCGGCCAGCTGCAGTA
CGACGATACGGAGCTGCTGGCATTACGTAAGAAGGTTAGAAGCAGATCTCTGCA
AAAAGITAATCTTCAACAGCTGCTAAAGTGTACCGGGAGACTTATAGTCGTT
TGTGTTATTAAAGCTGATGAGCTGAGGTTAGAAGGTTAGCTTACGTTAGGTTAG
GAATTATGAAGAAGAATATGGCATTCTTGACATCTATGTTGTTTTCTATTGCTA
CAAATGCAACGCTGACATCCAGATGCCAGTCTCCATTAATGCTCTGCT
GAGAAAGAGTCAGTCACTGTCGGGAAAGTGGTAACGGAAATTAGGGTAAAGCTG
TTCAAGAGCTGAGGTTAGGTTAGCTGAGGTTAGCTGAGGTTAGCTGAGGTT
AAAAGITAATCTTCAACAGCTGCTAAAGTGTACGTTACGTTAGCTGAGGTTAG
GAATTATGAAGAAGAATATGGCATTCTTGACATCTATGTTGTTTTCTATTGCTA
CAAATGCAACGCTGACATCCAGATGCCAGTCTCCATTAATGCTCTGCT
GAGAGAGTCACTATCCTGAAAGGGAGTCAAGACCTGATCTCTTCCATGTTGCT
TCCAGCAGAAACCGGGAAATCTCTAAAGACCCCTGATCTCTGCAACAGATTTGAG
ATGGTGTCCATCAAGATTCAGTCACTGAGGTTAGCTGCAACAGATTTGAG
GCAGCCTGGAATGAAAGTATGGAAATTATGTTGCTACAGTATGACTTTGCT
TCACGCTGGGGGGACCAAGCTGAAATAACCGGGCTGGCTGCAACCATCTGCT
TCACGCTGGGGGGACCAAGCTGAAATCTGGAACCTGCTGTTGCTGCT
TGAAATAACTCTACCGAGGAGCTGACAGAGCAGACAGACTACGAGAAACACA
CGAGCACCCCTGAGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGGCTGCAAG
TCACCATCAGGGCTGAGCTGCCGTCACAAAGAGCTCAACAGGGAGAGTAAAT
T

（配列番号：3）

【図9】

GAATTCACTTCCATACTTGGATAAGGAAATACAGACATGAAAAATCTCATGGTGA
GTGTTATTAAAGCTGCCAAAAAGAAGAAGAGTCGAATGAACCTGTTGCCAGGTAGA
AGCTTGGAGATTATCGTCACTGCAATGCTGCCAAATGGCCCAAATGACCAACAGC
GTGATGATCAGGTAGGGGGCTGTAAGGGTAAAGCCCGGCCAGCTGCAGTA
CGACGATACGGAGCTGCTGGCATTACGTAAGAAGGTTAGAAGCAGATCTCTGCA
AAAAGITAATCTTCAACAGCTGCTAAAGTGTACCGGGAGACTTATAGTCGTT
TGTGTTATTAAAGCTGATGAGCTGAGGTTAGAAGGTTAGCTTACGTTAGGTTAG
GAATTATGAAGAAGAATATGGCATTCTTGACATCTATGTTGTTTTCTATTGCTA
CAAATGCAACGCTGACATCCAGATGCCAGTCTCCATTAATGCTCTGCT
GAGAGAGTCACTATCCTGAAAGGGAGTCAAGACCCCTGATCTCTGCAACAGATTTGAG
ATGGTGTCCATCAAGATTCAGTCACTGAGGTTAGCTGCAACAGATTTGAG
GCAGCCTGGAATGAAAGTATGGAAATTATGTTGCTACAGTATGACTTTGCT
TCACGCTGGGGGGACCAAGCTGAAATAACCGGGCTGGCTGCAACCATCTGCT
TCACGCTGGGGGGACCAAGCTGAAATCTGGAACCTGCTGTTGCTGCT
TGAAATAACTCTACCGAGGAGCTGACAGAGCAGACAGACTACGAGAAACACA
CGAGCACCCCTGAGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGGCTGCAAG
TCACCATCAGGGCTGAGCTGCCGTCACAAAGAGCTCAACAGGGAGAGTAAAT
T

（配列番号：4）

【図10】

ACCGCTACGCTGAAGTGAAGCTGGGAGGAGTCTGGGAGGAGCTGTAAGCCTGGAGGAT
CCATGAAACTCTCTGCTGAGCCTCTGGAATCAGTTAGTGAAGCCCTGAAAGACTGG
TCCGCCAGCTCAGAGAGGGGGCTGAGTGGGTTCCCTGAAATTAGAACAACTAATA
ATCATGAAACATACTATGCTGAGCTGAGAAGGGGGCTGAGTGGGTTCCCTGAAATT
CCAAAAGTAGTGTCTACCTGCAATGACCAAGCTTAAGACCTGAAAGACACTGCA
ACTGTAACCAACTTGTACTGGGCAAGGCCACCACTCAGCTCCATGCA
CGACGGGGCC

（配列番号：5）

【図11】

ACCGCTACGCTGAAGTGAAGCTGGGAGGAGTCTGGGAGGAGCTGTAAGCCTGGAGGAT
CCCTGAAACTCTCTGCTGAGCCTCTGGAATCAGTTAGTGAAGCCCTGAAAGACTGG
TTCGCCAGACTCCGAGAAGAGGCTGAGTGGGTTCCCTGCAACCCATTAGTGGTGTAAATAIT
ACACCTCTATCCAGACAATTGAAAGGGGGCTGAGTGGGTTCCCTGCAACCCATTAGTGGTGTAAATAIT
ACATCTGACTCTGCAATCAGCACTGAGGTTCTGAGCAGCAGCTGTTGTTACTG
CAAGCCCTGGTACCGGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGGCTGCAAG
CCTCAGCAAAACGACGGGGCC

（配列番号：6）

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/031226

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/00

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 731 168 A (CARTER ET AL) 24 March 1998 (1998-03-24) column 1, line 15 - line 20 column 2, line 58 - column 3, line 10 column 3, line 58 - line 63 column 5, line 34 - line 65 claims; examples ----- -/-	1-92

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

16 May 2006

14/06/2006

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

Authorized officer

Rankin, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/031226

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2004/042017 A (GENENTECH, INC; REILLY, DOROTHEA; YANSURA, DANIEL, G) 21 May 2004 (2004-05-21) page 4, line 6 - line 31 claims; examples page 7, line 24 - line 33 page 13, line 32 - page 14, line 26 page 16, line 33 - line 37 page 28, line 4 - line 33 page 29, line 3 - line 34 claims; examples</p> <p>-----</p>	1-92
A	<p>WO 03/074569 A (IMMUNOMEDICS, INC; MCCALL, JOHN, DOUGLAS) 12 September 2003 (2003-09-12) page 1, line 5 - line 16 page 4, line 4 - line 14</p> <p>-----</p>	1-92
P, X	<p>WO 2005/027966 A (GENENTECH, INC; KRUMMEN, LYNNE, ANN; REILLY, DOROTHEA; WEIKERT, STEFAN) 31 March 2005 (2005-03-31) page 14, line 5 - line 26 page 28, line 3 - line 15 page 29, line 6 - line 25 claims; examples</p> <p>-----</p>	1-92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/031226

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5731168	A 24-03-1998	AU 702737 B2		04-03-1999
		AU 4973396 A		18-09-1996
		BR 9607622 A		09-06-1998
		CA 2211459 A1		06-09-1996
		CN 1176659 A		18-03-1998
		EP 0812357 A1		17-12-1997
		FI 973543 A		28-08-1997
		IL 117274 A		16-07-2000
		JP 11500915 T		26-01-1999
		NO 973982 A		03-11-1997
		NZ 303425 A		29-07-1999
		WO 9627011 A1		06-09-1996
		US 5807706 A		15-09-1998
		US 5821333 A		13-10-1998
		ZA 9601635 A		29-08-1997
-----	-----	-----	-----	-----
WO 2004042017	A 21-05-2004	AU 2003287345 A1		07-06-2004
		CA 2499300 A1		21-05-2004
		EP 1578447 A2		28-09-2005
-----	-----	-----	-----	-----
WO 03074569	A 12-09-2003	AU 2003209446 A1		16-09-2003
		CA 2478011 A1		12-09-2003
		EP 1487879 A2		22-12-2004
		JP 2006502091 T		19-01-2006
-----	-----	-----	-----	-----
WO 2005027966	A 31-03-2005	AU 2004273791 A1		31-03-2005
		CA 2534959 A1		31-03-2005
-----	-----	-----	-----	-----

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
	A 6 1 P 29/00	1 0 1

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

(72)発明者 モファット , バーバラ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7 0 7 , パークレー , ニールソン ストリート 6 6
0

(72)発明者 ヤンスラ , ダニエル ジー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 4 4 , パシフィカ , カーメル アベニュー 3 3 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 DA02 DA06 EA04 FA01 GA11 HA01

HA03 HA11

4B064 AG27 CA19 DA01 DA13

4B065 AA26X AA90Y AA91X AB01 BA01 CA25 CA44 CA46

4C084 AA13 MA01 NA14 ZA362 ZB072 ZB212 ZB262

4C085 AA13 AA21 AA25 AA26 AA27 CC21 CC22 DD88 EE01 EE03

GG01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA40 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74