

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3775798号

(P3775798)

(45) 発行日 平成18年5月17日(2006.5.17)

(24) 登録日 平成18年3月3日(2006.3.3)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
請求項の数 15 (全 50 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願平8-526260	(73) 特許権者	ジェネンテック インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成8年2月5日(1996.2.5)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(65) 公表番号	特表平11-500915		80-4990 サウス サンフランシスコ
(43) 公表日	平成11年1月26日(1999.1.26)		ポイント サン ブルノ ブルヴァード 460
(86) 国際出願番号	PCT/US1996/001598	(74) 代理人	弁理士 志賀 正武
(87) 国際公開番号	W01996/027011		
(87) 国際公開日	平成8年9月6日(1996.9.6)	(74) 代理人	弁理士 渡邊 隆
審査請求日	平成15年1月17日(2003.1.17)		
(31) 優先権主張番号	08/399,106	(72) 発明者	カーター, ポール ジェイ
(32) 優先日	平成7年3月1日(1995.3.1)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 941
(33) 優先権主張国	米国(US)		16 サンフランシスコ エイティーンズ
			アヴェニュー 2074
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異種多量体ポリペプチド類の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

異種多量体の調製方法に際し：

(a) 抗体の C_H3 領域を含む第1のポリペプチドをコードする第1の核酸について、該第1のポリペプチドの C_H3 境界部分におけるアミノ酸残基を、より大きい側鎖体積を有する 1 個のアミノ酸と置換し、これによって第1のポリペプチド上に 1 個の突起を生成すべく改変し、より大きい側鎖体積を有する 2 個のアミノ酸と置換し、これによって第1のポリペプチド上に 2 個の突起を生成すべく改変し、又はより大きい側鎖体積を有する 1 個のアミノ酸及びより小さい側鎖体積を有する 1 個のアミノ酸の対と置換し、これによって第1のポリペプチド上に 1 個の突起及び 1 個の空隙の対を生成すべく改変し；

(b) 抗体の C_H3 領域を含む第2のポリペプチドをコードする第2の核酸について、該第2のポリペプチドの C_H3 境界部分におけるアミノ酸残基を、より小さい側鎖体積を有する 1 個のアミノ酸と置換し、これによって第2のポリペプチド上に 1 個の空隙を生成し、より小さい側鎖体積を有する 2 個のアミノ酸と置換し、これによって第2のポリペプチド上に 2 個の空隙を生成し、又はより小さい側鎖体積を有する 1 個のアミノ酸及びより大きい側鎖体積を有する 1 個のアミノ酸の対と置換し、これによって第2のポリペプチド上に 1 個の空隙及び 1 個の突起の対

10

20

を生成し、

ここにおいて第1のポリペプチドのC_H3境界部分における1個の突起、2個の突起、又は、1個の突起及び1個の空隙の対が、それぞれ、第2のポリペプチドのC_H3境界部分における1個の空隙、2個の空隙、又は、1個の空隙及び1個の突起の対に設置可能であるようにすべく改変し；

(c) 宿主細胞に、該第1および第2の核酸を導入し、該第1および第2の核酸の発現が起こるように培養し；並びに

(d) 細胞培養物から形成された異種多量体を回収すること、を含む異種多量体の製造方法であって、

より大きい側鎖体積を有するアミノ酸が、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)からなる群から選択され、より小さい側鎖体積を有するアミノ酸が、システイン(C)、アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)及びバリン(V)からなる群から選択される、

異種多量体の調製方法。

【請求項2】

C_H3領域がI g G由来である請求の範囲1項に記載の方法。

【請求項3】

I g GがヒトI g G₁である請求の範囲2項に記載の方法。

【請求項4】

異種多量体が二重特異的抗体である請求の範囲1項に記載の方法。

【請求項5】

異種多量体が二重特異的イムノアドヘシンである請求の範囲1項に記載の方法。

【請求項6】

異種多量体が抗体-イムノアドヘシンキメラである請求の範囲1項に記載の方法。

【請求項7】

請求の範囲1項に記載の方法により調製される異種多量体。

【請求項8】

C_H3境界部分において接触し、それぞれ抗体のC_H3領域を含む第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含む異種多量体であり、

第1のポリペプチドのC_H3境界部分は、第2のポリペプチドのC_H3境界部分の1個の空隙、2個の空隙または1個の空隙及び1個の突起の対に、それぞれ配置されうる1個の突起、2個の突起または1個の突起及び1個の空隙の対を有する異種多量体であり、

第1のポリペプチドのC_H3境界部分において、第1のポリペプチドのC_H3境界部分のアミノ酸残基を、より大きい側鎖体積を有する1個若しくは2個のアミノ酸と、又は、より大きい側鎖体積を有する1個のアミノ酸及びより小さい側鎖体積を有する1個のアミノ酸の対と置換することによって、1個の突起、2個の突起又は1個の突起及び1個の空隙の対が導入され、

第2のポリペプチドのC_H3境界部分において、第2のポリペプチドのC_H3境界部分のアミノ酸残基を、より小さい側鎖体積を有する1個若しくは2個のアミノ酸と、又は、より小さい側鎖体積を有する1個のアミノ酸及びより大きい側鎖体積を有する1個のアミノ酸の対と置換することによって、1個の空隙、2個の空隙又は1個の空隙及び1個の突起の対が導入される異種多量体であって、

より大きい側鎖体積を有するアミノ酸が、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)からなる群から選択され、より小さい側鎖体積を有するアミノ酸が、システイン(C)、アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)及びバリン(V)からなる群から選択される異種多量体。

【請求項9】

請求の範囲8項に記載の異種多量体及び医薬的に許容される担体を含んでなる組成物。

【請求項10】

請求の範囲8項に記載の異種多量体をコードする核酸を有してなる宿主細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

第 1 のポリペプチドをコードする核酸及び第 2 のポリペプチドをコードする核酸が、単一ベクターに存在する請求の範囲 1 0 項に記載の宿主細胞。

【請求項 1 2】

第 1 のポリペプチドをコードする核酸及び第 2 のポリペプチドをコードする核酸が、別個のベクターに存在する請求の範囲 1 0 項に記載の宿主細胞。

【請求項 1 3】

請求の範囲 1 0 項に記載の宿主細胞を、核酸が発現されるべく培養し、細胞培養物から異種多量体を回収することを含む異種多量体の製造方法。

【請求項 1 4】

宿主細胞が哺乳動物細胞である請求の範囲 1 3 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

異種多量体が細胞培養培地から回収される請求の範囲 1 3 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景発明の分野

この発明は、多重特異的抗体（例えば、二重特異的抗体）、多重特異的イムノアドヘシン（例えば、二重特異的イムノアドヘシン）及び抗体－イムノアドヘシンキメラ等の異種多量体ポリペプチドの製造方法、並びに該方法を用いて製造される異種多量体ポリペプチド類に関するものである。

関連技術の記述

二重特異的抗体

少なくとも 2 種類の異なる抗原に対する結合特異性を有する二重特異的抗体（B s A b）は、インビトロ及びインビボにおける免疫診断及び治療用、並びに診断的免疫アッセイ用の標的試薬として、広範囲の臨床的応用における重要な可能性をもっている。

診断領域においては、二重特異的抗体は細胞表面分子の機能的特性を調査するため、並びに細胞毒性を媒介する異なった F c レセプタの能力を決定するために極めて有用であった（Fanger等、Crit.Rev.Immunol.12:101-124[1992]）。Nolan等、Biochem.Biophys.Acta.1040:I-11(1990)は、B s A b の別の診断的応用を記述している。特に、B s A b は、酵素

免疫アッセイにおいて使用するための酵素を固定化するために固定化されうる。これを達成するために、B s A b の一方のアームを、結合が酵素の阻害を起こさないように酵素上の特定のエピトープに結合するように設計し、B s A b の他方のアームを所望の部位において高い酵素密度が保証されるように固定化担体に結合するよう設計されうる。そのような診断用 B s A b は、Hammerling等、J.Exp.Med.128:1461-1473(1968)に記述され、表面抗原の位置を決定するために使用されるウサギ抗－I g G / 抗－フェリチン B s A b を含む。西洋ワサビパーオキシダーゼ（H R P）と共にホルモンに対して結合特異性を有する B s A b も開発されている。B s A b の他の可能性ある免疫化学的応用は、2 部位免疫アッセイにおけるそれらの使用に関する。例えば、分析対象蛋白質の 2 種の異なったエピトープに結合する 2 種類の B s A b が製造されており、一つの B s A b は、不溶化担体との複合体を結合し、他方は指示酵素を結合する（N o l a n 等、上記文献）。

二重特異的抗体は、癌等の種々の疾患のインビトロまたはインビボ診断のためにも使用され得る（Songsivilai等、Clin.Exp.Immunol.79:315[1990]）。該 B s A b の診断的使用を容易にするために、B s A b の一方のアームは腫瘍関連抗原に結合し、他方のアームは放射性核種に強固の結合するキレート剤等の検出可能なマーカーと結合し得る。この方法を使用して、Le Doussal等は、ガン胎児性抗原（C E A）と結合する一つのアームと、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（D P T A）と結合する他方のアームとを有し、直腸及び甲状腺癌の放射免疫検出のために有用な B s A b を作成した。Le Doussal等、Int.J.Cancer Suppl.7:58-62(1992)及びLe Doussal等、J.Nucl.Med.34:1662-1671(1993)参照。Stickney等は、同様に放射免疫検出を使用して、C E A を発現する直腸癌検出方法を記述している。これらの研究者は、C E A 並びにヒドロキシエチルチオウレア－ベンジルー E D T A

10

20

30

40

50

(E O T U B E) に結合する B s A b を記述している。Stickner等、Cancer Res.51:6650-6655(1991)参照。

二重特異的抗体は、標的（例えば、病原または腫瘍細胞）に結合する一方のアーム、及び T-細胞レセプタまたは F c γ レセプタ等の細胞毒性トリガー分子結合する他方のアームを与えることによる再度向けられた細胞毒性において、ヒトの治療の為に使用され得る。したがって、二重特異的抗体は、患者の細胞免疫防御機構を腫瘍細胞または感染性物質に特異的に向けるために使用され得る。この戦略を使用して、F c γ R I I I（即ち、C D 1 6）に結合する二重特異的抗体が、ヒンビトロにおいてナチュラルキラー（NK）細胞／大顆粒リンパ球（L G L）細胞による腫瘍細胞殺滅を媒介しうること、及びインビボにおいて腫瘍成長の阻害に有効であることが例示された。Segal等、Chem.Immunol.47:179(1989)及びSegal等、Biologic Therapy of Cancer2(4)DaVita等編、Lippincott, Philadelphia(1992) p 1 参照。同様に、F c γ R I I I に結合する一方のアームと H E R 2 レセプタに結合する他方のアームとを有する二重特異的抗体が、H E R 2 抗原を過剰発現する卵巣及び乳癌の治療のために開発された。（Hseih-Ma等、Cancer Research 52:6832-6839[1992]及びWeiner等、Cancer Research 53:94-100[1993]）。二重特異的抗体は、T細胞による殺滅をも媒介しうる。通常、二重特異的抗体は、T細胞上のC D 3 複合体を腫瘍関連抗原に結合させる。抗-p 1 8 5^{H E R 2}に結合する抗-C D 3 からなる完全にヒト化されたF (a b ')₂ B s A B は、H E R 2 レセプタを過剰発現する腫瘍細胞を殺滅するためにT細胞を標的とすべく使用された。Shalaby等、J.Exp.Med.175(I):217(1992)。二重特異的抗体は、幾つかの早期第2相臨床試験において、希望がもてる結果を得て試験されている。一つの試験において、肺、卵巣または乳癌を有する12人の患者が、抗-C D 3 / 抗-腫瘍(M O C 3 1)二重特異的抗体二より標的とされる活性化T-リンパ球の輸液により治療された。deLeij等、Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity, Romet-Lemonne, Fanger及びSegal編、Lienhart(1991)p249。標的細胞は、腫瘍細胞のかなりな局所的溶解、穏和な炎症性反応を誘発したが、毒性の副作用あるいは抗-マウス抗体応答を誘発することはなかった。B-細胞悪性腫瘍を有する患者における抗-C D 3 / 抗-C D 1 9 二重特異的抗体による極めて予備的な試験において、末梢血腫瘍細胞含有量についてのかんりの低減も達成されている。Clark等、Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity, Romet-Lemonne, Fanger及びSegal編、Lienhart(1991)p243。B s A b に関する治療適応については、Kroesen等、Cancer Immunol.Immunother.37:400-407(1993)、Kroesen等、Br.J.Cancer70:652-661(1994)及びWeiner等、J.Immunol.152:2385(1994)も参照。

二重特異的抗体は、線維素溶解剤またはワクチンアジュバントとしても使用され得る。更にこれらの抗体は、感染症（例えば、H I V またはインフルエンザウイルス等のウイルス性感染細胞に対する、またはトキソプラズマ・ゴンジ等の原生動物に対するエフェクター細胞を標的として）の治療において、またイムノトキシンを腫瘍細胞に届けるために、あるいは免疫複合体を細胞表面レセプタに向かわせるために使用され得る（Fanger等、前出文献）。

B s A b の使用は、十分な量及び純度をもってB s A b を得ることの困難性のために事実上困難に直面していた。伝統的には二重特異的抗体はハイブリッド-ハイブリドーマ技術を使用して作成された（Millstein及びCuellar、Nature 305:537-539[1983]）。免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の無作為な取り合わせのために、これらのハイブリドーマ（クオドローマ）は、10種の異なる抗体分子の可能性ある混合物を製造し、それらのうちわずか1種のみが適切な二重特異的構造を有する（添付の図1参照）。通常はアフィニティクロマトグラフィーにより行われる適切な分子の精製は、かなり煩雑であって、生成物の収率は低い。従って、より高収率のB s A b の製造技術が開発されてきた。これらはここに添付の図2 A - 2 E に記述される。図2 A に示されるように、二重特異的抗体は、化学結合を使用して調製され得る。抗体断片の化学結合を達成するために、Brennan等、Science 229:81(1985)は、完全な抗体を蛋白分解的に切断してF (a b ') 断片を精製する方法を記述している。これらの断片は、隣接炭素のジチオールを安定化し、分子内ジスルフィド

10

20

30

40

50

形成を阻害するためにジチオール複合体形成試薬亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元される。生成されたF a b '断片は、次いでチオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換される。次いでF a b ' - TNB誘導体は、メルカプトエチルアミンを用いる還元によりF a b ' - チオールに再変換され、等モル量の他のF a b ' - TNB誘導体と混合されてB s A bを形成する。精製されるB s A bは、酵素の選択的固定化のための試薬として使用され得る。

最近の発展は、化学的に結合し得て二重特異的抗体を形成するF a b ' - S H断片をE . c o l iから直接回収することを容易にした(図2 B参照)。Shalaby等、J.Exp.Med.175:217-225(1992)は、p 1 8 5^{H E R 2}に結合する一方のアーム及びC D 3に結合する他のアームを有する完全ヒト化B s A b F (a b ')₂の製造を記述している。各F a b '断片は、E . c o l iから別個に分泌され、インビトロにおける直接的な化学的カップリングに付されてB s A bが形成される。斯くして形成されるB s A bは、H E R 2レセプタを過剰発現する細胞及び正常ヒトT細胞に結合し得、また、ヒト乳癌標的に対するヒト細胞毒性リンパ細胞の溶菌活性をトリガーする。Rodrigues等、Int.J.Cancers(Suppl.)7:45-50(1992)も参照。

B s A b断片を組換え細胞培養物から直接に製造し、単離する種々の技術も記述されている。例えば、二重特異的F (a b ')₂異種二量体が、ロイシンジッパーを使用して製造されている(図2 C参照)。Kostelny等、J.Immunol.148(5):1547-1553(1992)。F o s及びJ u n蛋白質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって抗-C D 3及び抗-インターロイキン-2 (I L - 2 R)抗体のF a b '部分に連結される。該抗体同種二量体は、ヒンジ領域において還元された単量体を形成し、次いで再酸化されて抗体異種二量体を形成する。該B s A bは、インビトロにおいてH u T - 1 0 2細胞を溶解するために細胞毒性T細胞の補充において高度に有効であることが見い出された。Hollinger等、PNAS(USA)90:6444-6448(1993)により記述される“ジアボディ(diabody)”技術の出現は、B s A b断片製造の別の技術を提供した。該断片は、同じ鎖上の2つの領域間で対形成を許容するには短すぎるリンカーによって軽鎖可変領域(V_L)に連結する重鎖可変領域(V_H)を含んでなる。従って、一つの断片のV_H及びV_L領域は、他の断片の相補的なV_H及びV_L領域と対形成することを強いられ、これによって、2個の抗原結合部位を形成する(これに添付の図2 D参照)。単一鎖F_V(s F_V)二量体を使用することによるB s A b製造のための他の方策も報告されている。Gruber等、J.Immunol.152:5368(1994)参照。これらの研究者等は、抗-フルオレセイン抗体のV_H及びV_L領域に対して25アミノ酸リンカーにより結合する、T細胞レセプタに対して向けられた抗体のV_H及びV_L領域を含んでなる抗体を設計した。再度折り畳まれた分子(ここに添付の図2 E参照)は、フルオレセイン及びT細胞レセプタに結合し、表面に共有的に結合されたフルオレセインを有するヒト腫瘍細胞の溶解に再度向けられた。

組換え細胞培養物から直接回収されうる二重特異的抗体断片の製造のための幾つかの技術が報告されていることは見たとおりである。しかしながら、完全長B s A bが、それらの予想されるより長い半減期及び可能性あるエフェクター機能故に、多くの臨床的応用のためのB s A b断片として好ましいであろう。

イムノアドヘシン

イムノアドヘシン類(I a)は、細胞表面レセプタまたはリガンド等の蛋白質の結合領域(“アドヘシン”)と、イムノグロブリンの定常領域のエフェクター機能とを組み合わせた抗体様分子である。イムノアドヘシンは、ヒト抗体の多くの有用な化学的及び生物学的性質を有している。イムノアドヘシンは、適切なイムノグロブリンヒンジ及び定常領域(F c)配列に結合される所望の特異性を持ったヒト蛋白質配列から構築され得るため、興味ある結合特異性は、完全にヒト成分を使用して達成されうる。この様なイムノアドヘシン類は、患者に対して最小の免疫原性であり、継続的または反復的使用について安全である。

文献中に報告されているイムノアドヘシン類は、T細胞レセプタ(Gascoigne等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:2936-2940[1987]) ; C D 4 (Capon等、Nature 337:525-531[1989]);

10

20

30

40

50

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ーセ렉チンまたは帰巢レセプタ (Watson等、J.Cell.Biol. 110:2221-2229[1990] ; 及びWatson等、Nature 349:164-167[1991]) ; C D 4 4 (Aruffo等、Cell 61:1303-1313[1990]) ; C D 2 8 及び B 7 (Linsley等、J.Exp.Med.173:721-730[1991]) ; C T L A - 4 (Linsley等、J.Exp.Med.174:561-569[1991]) ; C D 2 2 (Stamenkovic等、Cell 66:1133-1144[1991]) ; T N F レセプタ (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]) ; N P レセプタ (Bennett等、J.Biol.Chem.266:23060-23067[1991]) ; インターフェロン γ レセプタ (Kurschner等、J.Biol.Chem.267:9354-9360[1992]) ; 4 - 1 B B (Chalupny等、PNAS[USA]89:10360-10364[1992]) 並びに I g E レセプタ α (Ridgway及びGorman、J.Cell.Biol.115 巻、要約番号1448[1991]) の融合物を含む。

治療的使用に関して記述されているイムノアドヘシンの例は、H I V の細胞表面 C D 4 に対する結合を阻害するための C D 4 - I g G イムノアドヘシンを含む。C D 4 - I g G が出産直前の妊婦に対して投与された臨床試験の第 I 相から得られたデータは、このイムノアドヘシンが H I V の母胎 - 胎児転移の阻害に有用であろうことを示唆している。Ashkenazi等、Intern.Rev.Immunol.10:219-227(1993)。腫瘍壊死因子 (T N F) に結合するイムノアドヘシンも開発されている。T N F は敗血性ショックの主要な媒介因子であることが示されている前炎症性サイトカインである。敗血性ショックのマウスモデルに基づいて、T N F レセプタ イムノアドヘシンは、敗血性ショックの治療における臨床的使用の候補として有望であることを示した (Ashkenazi等、前出文献)。イムノアドヘシンは、非治療的用途も有する。例えば、Lーセ렉チンレセプタ イムノアドヘシンは、末梢リンパ節の高内皮小静脈 (H E V) の組織化学的染色のための試薬として使用された。この試薬は、Lーセ렉チンリガンドの単離及び性質決定の為に使用された (Ashkenazi等、前出文献)。

イムノアドヘシン構造の2つのアームが、異なる特異性を有する場合には、イムノアドヘシンは二重特異的抗体との類似において“二重特異的イムノアドヘシン”と称される。Dietz等、J.Immunol.Methods 162:123(1993)は、粘着分子の細胞外領域、Eーセ렉チン及びPーセ렉チンを結合するそのような二重特異的イムノアドヘシンを記述している。結合研究は、形成された二重特異的イムノグロブリン融合蛋白質が、それから誘導される単一特異的イムノアドヘシンに比べて骨髓細胞系に結合する向上した能力を有することを示した。

抗体ーイムノアドヘシンキメラ類

抗体ーイムノアドヘシン (A b / I a) キメラ類も、文献中に記述されている。これらの分子は、イムノアドヘシンの結合領域と抗体の結合領域とを組み合わせている。

Berg等、PNAS(USA) 88:4723-4727(1991)は、ネズミ C D 4 - I g G から誘導された二重特異的抗体ーイムノアドヘシンキメラを作成した。これらの研究は、2つのアームを有する4量体分子を構築した。一方のアームは、抗体軽鎖定常領域との C D 4 融合と共に、抗体重鎖定常領域との C D 4 融合からなる。他方のアームは、同じ抗体の完全軽鎖と共に、抗 - C D 3 抗体の完全重鎖からなる。C D 4 - I g G アームによって、この二重特異的分子は、細胞毒性 T 細胞表面の C D 3 に結合する。細胞毒性細胞と H I V - 感染細胞との並置は、後者の細胞の特異的殺滅を生じる。

B e r g 等は構造的に4量体であった二重特異的分子を記述しているが、1個のみの C D 4 - I g G 融合を含む3量体融合分子を製造することも可能である。Chamow等、J.Immunol. 153:4268(1994)参照。この構造の第1のアームは、ヒト化抗 - C D 3 κ 軽鎖及びヒト化 C D 3 γ 重鎖から形成される。第2のアームは、g p 1 2 0 結合に関わる C D 4 の細胞外領域部分と I g G の F c 領域との組合せである C D 4 - I g G イムノアドヘシンである。得られた A b / I a キメラは、純粋な細胞毒性 T 細胞調製物、または F c レセプタを持つ大顆粒リンパ球エフェクター細胞を付加的に含む全末梢血リンパ球 (P B L) のいずれかを使用して、H I V - 感染細胞の殺滅を媒介した。

10

20

30

40

50

上述の異種多量体の製造において、所望の異種多量体の同種多量体を上回る収率の向上が望まれる。ここに記述する発明は、これを達成する手段を提供する。

発明の要約

この出願は、異種オリゴマー形成の為の第1および第2のポリペプチド間の境界部分の操作に供せられる“空隙への突起 (protuberance-into-cavity)”戦略を記述する。採用される戦略の模式的例示については図4を参照されたい。好ましい境界部分は、抗体定常領域のC_H3領域の一部を少なくとも含んでなる。“突起”は、第1のポリペプチドの境界部分からの小さいアミノ酸側鎖を、大きい側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）に置換することにより構築される。該突起と同等かまたは似た大きさの補償的“空隙”は、場合により第2のポリペプチドの境界部分に、大きいアミノ酸側鎖を小さいもの（例えば、アラニンまたはスレオニン）に置換することによって創製される。適切に配置された寸法が決められた突起または空隙が、第1または第2のポリペプチドのいずれかの境界部分に存在する場合には、対応する空隙または突起のそれぞれを隣接する境界部分に作成するのみでよい。

10

従って、本発明は境界部分において接触する第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含んでなり、第1のポリペプチドは第2のポリペプチドの境界部分の空隙に位置させることができる突起をその境界部分に有する異種多量体の調製方法に関するものであるといえる。一側面において、該方法は、(a) 第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドをコードする核酸を有し、第1のポリペプチドをコードする該核酸が突起をコードするように元の核酸から改変されるか、または第2のポリペプチドをコードする核酸が空隙をコードするように元の核酸から改変され、あるいはその両者である宿主細胞を、該核酸が発現されるべく培養し；及び(b) 宿主細胞培養物から該異種多量体を回収することを含む。

20

通常は、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの両者をコードする核酸が、突起及び空隙をそれぞれコードするように改変される。好ましくは、第1および第2のポリペプチドの各々は、ヒトIgG₁のC_H3領域等の抗体定常領域を含む。

本発明は、境界部分で接触する第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドを含んでなる異種多量体（二重特異的抗体、二重特異的イムノアドヘシンまたは抗体／イムノアドヘシンキメラ等）をも提供するものである。第1のポリペプチドの境界部分は、第2のポリペプチドの境界部分の空隙内に配置されうる突起を有し、また、突起または空隙または両者が第1または第2のポリペプチドの境界部分にそれぞれ導入される。異種多量体は、更に医薬的に許容される担体を含む組成物の形態で提供されてもよい。

30

本発明は、前節の異種多量体をコードする核酸を有し、該第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドをコードする核酸が、単一のベクターまたは別個のベクターに存在する宿主細胞にも関するものである。該宿主細胞は、宿主細胞を該核酸が発現されるべく培養し、該細胞培養物から該異種多量体を回収することを含んでなる異種多量体の製造方法において使用され得る。

更なる側面において、本発明は、

(a) 第1のポリペプチドをコードする第1の核酸を、該第1のポリペプチドの境界部分におけるアミノ酸残基を、より大きい側鎖体積を有するアミノ酸残基に置換し、これによって第1のポリペプチド上に突起を生成すべく改変し；

40

(b) 第2のポリペプチドをコードする第2の核酸を、該第2のポリペプチドの境界部分におけるアミノ酸残基を、より小さい側鎖体積を有するアミノ酸残基に置換し、これによって第1のポリペプチド上に空隙を生成し、ここにおいて該突起が該空隙内に配置可能であるようにすべく改変し；

(c) 宿主細胞に、該第1および第2の核酸を導入し、該第1および第2の核酸の発現が起こるように培養し；並びに

(d) 細胞培養物から形成された異種多量体を回収すること、
を含んでなる異種多量体の製造方法を提供する。

本発明は、同種多量体等の他の望ましからぬ最終生成物を上回って異種多量体の収率を上

50

昇させる機構を提供する。好ましくは、組換え細胞培養物から回収される異種多量体の収率は、副生成物同種多量体に対比して少なくとも80%より多く、好ましくは90%より多い。

図面の簡単な記述

図1は、Millstein及びCuelloの前出文献の伝統的融合ーハイブリドーマ技術が全長BsAbの製造に使用された場合に創製されうる種々の抗体分子を示す。

図2Aー2Eは、上記背景の節で検討したBsAb断片製造についての背景の種々の技術を例示する。

図3Aー3Cは、レセプタの結合領域(図3A)及びIgG₁イムノグロブリンの定常領域(図3B)を有してなるイムノアドヘシン二量体(図3C)の製造のための例示的方策を示している。

10

図4は、異種多量体創製のための本出願の空隙への突起(protuberance-into-cavity)戦略を模式的に例示する。

図5は、イムノグロブリンIgG(配列番号:1ー3)、IgA(配列番号:4)、IgD(配列番号:5)、IgE(配列番号:6)及びIgM(配列番号:7)のC_H3領域の境界部分残基を示す。これらのイムノグロブリンの各C_H3領域は、2つの異なる平行した“βーシート”を有してなる“βーサンドイッチ”を作る。βーシートの一方は、境界部分残基を提供し、他方は、“外部βーシート”である。境界部分を形成する該βーシートは、4つの“βー鎖”から形成される。種々のイムノグロブリンのC_H3領域の7つのβー鎖の各残基は、ダッシュの上線により同一性を示してある。境界部分の中間及び端部のβー鎖の残基は、外部βーシートのものと同様に同定されている。残基の番号付けは、Fc結晶構造に従っている(Deisenhofer、BioChem. 20:2361[1981])。C_H3領域の境界部分内部に埋もれた残基は“B”により特定され、C_H3領域の境界部分内部に部分的に埋もれたものは“b”により特定され、境界部分に部分的に埋もれる(即ち26%ー10%露出する)“接触”残基は“i”により特定され、並びに境界部分に埋もれる(即ち<6%露出する)残基は“I”により特定される。太字の残基は、外来残基により置換されるべき最適の候補である元々の残基である。

20

図6は、ヒト(h)(配列番号:8ー11および16)またはネズミ(m)(配列番号:12ー15)のIgGサブタイプの境界部分残基を特定する(B=ASX及びZ=GLX)。境界部分の端部及び中間部のβー鎖の残基は、括弧が付され、また“定常”残基は矢印により示される。配列は、Miller等、J.Mol.Biol. 216:965(1990)及びKabat等、Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 5版(1991)。定常残基が高度の保存されていることが明らかである。

30

図7は、ヒトIgG₁のC_H3領域の境界部分残基を表す。データは、Miller等、J.Mol.Biol. 216:965(1990)から導かれた。“接触”残基が示され、またここに記述される実施例において変異を受けた残基は枠が付されている。

図8は、実施例に記述されるFc異種2量体化を試験するための共ートランスフェクションアッセイを模式的に示す。

図9は、残基Phe⁴⁰⁵及びThr³⁹⁴と共に、境界部分の反対側のT366Y及びY407T変異に強調を付したヒトIgG₁Fcの2.9オングストローム構造に基づくC_H3の2量体を示す(“Kabat番号”ーKabat等、Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 5版[1991])。

40

図10Aー10Eは、イムノアドヘシン(Ia)を伴う抗体(Ab)重鎖(H)及び軽鎖(L)の共ートランスフェクションからの生成物のSDSーPAGEの走査密度測定的分析を示す。図10Aは天然型を示し;図10Bは変異体AbY407T, IaT366Yを示し;図10Cは変異体AbT366Y, IaY407Tを示し;図10Dは変異体AbF405A, IaT394Wを示し;図10Eは変異体AbT366Y:F405A, IaT394W:Y407Tを示す。示されるデータは、少なくとも2回の独立した実験からの平均値である。密度測定的信号応答は、密接に関連するヒト化抗体、hUMA b4D5ー8(Carter等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285[1992])を使用した対照実験によ

50

り判断されるように、使用した実験範囲（0.02－10 μ g）に亘って線形であることが見い出された（ $R = 0.9993$ ）。

I. 定義

一般的には、下記の用語及び句は、この記述、実施例及び請求の範囲において使用される場合に下記の定義を有する：

“異種多量体”または“異種多量体性ポリペプチド”は、少なくとも第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドを有し、ここにおいて第2のポリペプチドはアミノ酸配列において第1のポリペプチドとは少なくとも1個のアミノ酸残基が異なる分子である。好ましくは、該異種多量体は、少なくとも2種の異なるリガンドまたは結合部位に対して結合特異性を有する。該異種多量体は、第1および第2のポリペプチドにより形成される“異種2量体”を含むことができ、あるいは第1および第2のポリペプチドに加えてポリペプチドが存在する、より高次の3次構造を形成しうる。異種多量体の例示的構造は、異種2量体（例えば、Dietsch等の前出文献に記述される二重特異的イムノアドヘシン）、異種3量体（例えば、Chamow等の前出文献に記述されるAb/Iaキメラ）、異種4量体（例えば、二重特異的抗体）及び更なるオリゴマー構造を含む。

ここにおいて使用されるように、“ポリペプチド”は、一般に約10個以上のアミノ酸を有するペプチド及び蛋白質を指す。好ましくは、哺乳動物ポリペプチド（哺乳動物有機体から元々誘導されたポリペプチド）が使用され、更に好ましくは、直接培地中に分泌されたものである。細菌性ポリペプチドの例は、アルカリホスファターゼ及び β -ラクタマーゼを含む。哺乳動物ポリペプチドの例は、レニン、ヒト成長ホルモン及び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；リポ蛋白質；アルファ-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；第VIII因子、第IX因子、組織因子、及びフォンビルブラント因子等の凝血因子；蛋白質C等の抗凝血因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺界面活性物質；ヒト尿のウロキナーゼまたは組織型プラスミノゲン活性化因子（t-PA）等のプラスミノゲン活性化因子；ボンベシン；トロニン；造血性成長因子；腫瘍壊死因子- α 及び β ；エンケファリナーゼ；RANTES（活性化時に調節され通常T細胞に発現分泌される物質）、ヒトマクロファージ炎症性蛋白質（MIP-1- α ）；ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン；ムレリアン阻害物質；レタキシンA鎖；レタキシンB鎖；プロレタキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；ベータ-ラクタマーゼ等の微生物蛋白質；DNase；インヒピン；アクチビン；血管上皮成長因子（VEGF）；ホルモンまたは成長因子に対するレセプター類；蛋白質AまたはD；リウマチ性因子；骨誘導神経栄養性因子（BDNF）、ニューロトロフィン-3、-4、-5もしくは-6（NT-3、NT-4、NT-5、もしくはNT-6）、またはNGF- β 等の神経成長因子等の神経栄養性因子；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- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、またはTGF- β 5を含むTGF- β -アルファ及びTGF-ベータ等の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（IGF-I及びIGF-II）；デス（1-3）-IGF-I（脳IGF-I）、インシュリン様成長因子結合蛋白質；CD-3、CD-4、CD-8及びCD-19等のCD蛋白質；エリスロポイエチン；骨誘導因子；イムノトキシン；骨形態形成蛋白質（BMP）；インターフェロン- α 、 β 及び γ 等のインターフェロン；例えばM-CSF、GM-CSF及びG-CSF等のコロニー刺激因子（CSF類）；例えばIL-1～IL-10等のインターロイキン類（IL）；スーパーオキシドジスムターゼ；T細胞レセプター類；表面膜蛋白質；崩壊加速因子；例えば、AIDSエンベロープ部分等のウイルス性抗原；輸送蛋白質；帰巢レセプター；アドレシン；調節蛋白質；抗体類；並びに上記に掲げたポリペプチド類のいずれかの断片を含む。

“第1のポリペプチド”は、第2のポリペプチドと連携すべき任意のポリペプチドである。第1および第2のポリペプチドは、“境界部分”（下記に定義される）において接触す

10

20

30

40

50

る。境界部分に加えて、第1のポリペプチドは、“結合領域”（例えば、抗体可変領域、レセプタ結合領域、リガンド結合領域または酵素活性領域）またはC_H2、C_H1、およびC_L領域を含む抗体定常領域（またはその一部）等の、1個以上の付加的な領域を含んでもよい。通常は、第1のポリペプチドは、抗体から誘導される少なくとも1個の領域を含むであろう。この領域は都合よくは、抗体のC_H3領域等の定常領域であり、第1のポリペプチドの境界部分を形成しうる。例示的な第1のポリペプチドは、抗体重鎖ポリペプチド、抗体定常領域と異種ポリペプチドの結合領域とが結合するキメラ（即ち、イムノアドヘシン、下記の定義参照）、レセプタポリペプチド（特に、例えばインターロイキン-8レセプタ [IL-8R] 及びインテグリン異種2量体 [例えば、LFA-1またはGPIIb/IIIa] 等の他のレセプタポリペプチドと2量体を形成するもの）、リガンドポリペプチド（例えば、神経成長因子 [NGF]、ニューロトロフィン-3 [NT-3]、及び脳-誘導神経栄養因子 [BDNF] - Arakawa等、J.Biol.Chem. 269(45):27833-27839[1994]及びRadziejewski等、Biochem. 32(48):1350[1993]）、並びに抗体可変領域ポリペプチド（例えば、ジアボディ類）を含む。好ましい第1のポリペプチドは、抗体重鎖及びイムノアドヘシンから選択される。

“第2のポリペプチド”は、第1のポリペプチドと“境界部分”を介して連携する任意のポリペプチドである。境界部分に加えて、第2のポリペプチドは、“結合領域”（例えば、抵抗可変領域、レセプタ結合領域、リガンド結合領域または酵素活性領域）またはC_H2、C_H1およびC_L領域を含む抗体定常領域（またはその一部）等の、1個以上の付加的な領域を含んでもよい。通常は、第2のポリペプチドは、抗体から誘導される少なくとも1個の領域を含むであろう。この領域は都合よくは、抗体のC_H3領域等の定常領域であり、第2のポリペプチドの境界部分を形成しうる。例示的な第2のポリペプチドは、抗体重鎖ポリペプチド、抗体定常領域と異種ポリペプチドの結合領域とが結合するキメラ（即ち、イムノアドヘシン、下記の定義参照）、レセプタポリペプチド（特に、例えばインターロイキン-8レセプタ [IL-8R] 及びインテグリン異種2量体 [例えば、LFA-1またはGPIIb/IIIa] 等の他のレセプタポリペプチドと2量体を形成するもの）、リガンドポリペプチド（例えば、神経成長因子 [NGF]、ニューロトロフィン-3 [NT-3]、及び脳-誘導神経栄養因子 [BDNF] - Arakawa等、J.Biol.Chem. 269(45):27833-27839[1994]及びRadziejewski等、Biochem. 32(48):1350[1993]）、並びに抗体可変領域ポリペプチド（例えば、ジアボディ類）を含む。好ましい第2のポリペプチドは、抗体重鎖及びイムノアドヘシンから選択される。

“結合領域”は、興味ある分子（例えば、抗原、リガンド、レセプタ、基質または阻害剤）に対する選択的結合を担うポリペプチドのいずれかの領域を含む。例示的な結合領域は、抗体可変領域、レセプタ結合領域、リガンド結合領域、及び酵素活性領域を含む。

“抗体”なる用語は、興味ある抗原上のエピトープに結合可能な1個以上の領域を含み、このような領域が抗体の可変領域から誘導されるか、あるいは相同的であるポリペプチドを意味するであろう。抗体類の例は、完全長抗体、抗体断片、単鎖分子、二重特異的または二重機能的分子、ジアボディ類、及びキメラ抗体（例えば、ヒト化または霊長類化 [PrimateizedTM] 抗体）を含む。“抗体断片”は、Fv、Fv'、Fab、Fab' 及びF(ab')₂断片を含む。

非ヒト（例えば、齧歯類または霊長類）抗体の“ヒト化”形態は、非ヒトイムノグロブリンから誘導される最小の配列を含む特定のキメライムノグロブリン、イムノグロブリン鎖またはその断片である。殆どの部分について、ヒト化抗体は、受容者の相補性決定領域（CDR）由来の残基が、所望の特異性、親和性及び容量を有するマウス、ラット、ウサギまたは霊長類等の非ヒト分子種（提供者抗体）のCDRに由来する残基に置換されたヒトイムノグロブリン（受容者抗体）である。ある例においては、ヒトイムノグロブリンのFVフレームワーク領域（FR）の残基が、対応する非ヒト残基に置換されている。更に、ヒト化抗体は、受容者抗体及び導入したCDR若しくはフレームワーク配列のいずれにも見い出されない残基を有していてもよい。これらの修飾は、抗体の性能を更に改善し至適化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1個、または典型的には2

10

20

30

40

50

個の可変領域の実質的に全てを含み、ここにおいてCDR領域の実質的に全ては、非ヒトイムノグロブリンのそれらに対応し、またFR領域の全てまたは実質的に全てがヒトイムノグロブリンのそれらである。ヒト化抗体は、至適には、イムノグロブリンの定常領域（Fc）、典型的にはヒトイムノグロブリンのものの少なくとも一部を有するであろう。ヒト化抗体は、霊長類化（PrimatizedTM）抗体を含み、ここにおいて抗体の抗原結合領域は、興味ある抗原により免疫されたマカクザルにより産生された抗体から誘導される。

“多重特異的抗体”は、少なくとも種類の異なる抗原に対して結合特異性を有する分子である。通常はこの様な分子は2個の抗原に結合するのみであろうが（即ち、二重特異的抗体、BsAb）、ここにおいて使用される場合に三重特異的抗体等の更なる特異性を持った抗体もこの表現に包含される。BsAbの例は、一方のアームが腫瘍細胞抗原に向けられ、他方のアームが抗-FcγRI／抗-CD15、抗-p185^{HER2}／FcγRIII（CD16）、抗-CD3／抗-悪性B細胞（1D10）、抗-CD3／抗-p185^{HER2}、抗-CD3／抗-p97、抗-CD3／抗-腎臓細胞悪性腫瘍、抗-CD3／抗-OVCAR-3、抗-CD3／L-D1（抗-結腸癌）、抗-CD3／抗-メラニン細胞刺激ホルモン類似体、抗-EGFレセプタ／抗-CD3、抗-CD3／抗-CAMA1、抗-CD3／抗-CD19、抗-CD3／MoV18、抗-神経細胞粘着分子（NCAM）／抗-CD3、抗-葉酸結合蛋白質（FBP）／抗-CD3、抗-顔面悪性腫瘍関連抗原（AMOC-31）／抗-CD3等の細胞毒性トリガー分子に対して向けられたもの；腫瘍抗原に特異的に結合する一方のアームと、抗-サポリン／抗-Id-1、抗-CD22／抗-サポリン、抗-CD7／抗-サポリン、抗-CD38／抗-サポリン、抗-CEA／抗-リシンA鎖、抗-インターフェロン-α（IFN-α）／抗-ハイブリドマイディオタイプ、抗-CEA／抗-ピンカアルカロイド等に結合するもう一方のアームを有するBsAb；抗-CD30／抗-アルカリホスファターゼ（マイトマイシンリン酸塩プロドラッグのマイトマイシンアルコールへの変換を触媒する）等の、酵素活性化プロドラッグの変換のためのBsAb；抗-フィブリン／抗-組織プラスミノゲン活性化因子（tPA）、抗-フィブリン／抗-ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子（uPA）等の線維素溶解剤として使用され得るBsAb；抗-低密度リポ蛋白質（LDL）／抗-Fcレセプタ（例えば、FcγRI、FcγRIIまたはFcγRIII）等の細胞表面レセプタに対する免疫複合体を標的とするBsAb；抗-CD3／抗-単純ヘルペスウイルス（HSV）、抗-T細胞レセプタ：CD3複合体／抗-インフルエンザ、抗-FcγRI／抗-HIV等の感染症治療に使用するためのBsAb；抗-CEA／抗-EOTUBE、抗-CEA／抗-DPTA、抗-p185^{HER2}／抗-ハプテン等のインビトロまたはインビボにおける腫瘍検出のためのBsAb；ワクチンアジュバントとしてのBsAb（Fanger等、前出文献参照）；並びに抗-ウサギIgG／抗-フェリチン、抗-西洋ワサビパーオキシダーゼ（HRP）／抗-ホルモン、抗-ソマトスタチン／抗-物質P、抗-HRP／抗-FITC、抗-CEA／抗-β-ガラクトシダーゼ等の診断道具としてのBsAb（Nolan等、前出文献参照）等を含む。三重特異的抗体の例は、抗-CD3／抗-CD4／抗-CD37、抗-CD3／抗-CD5／抗-CD37及び抗-CD3／抗-CD8／抗-CD37を含む。

ここにおいて使用されるように、“イムノアドヘシン”なる用語は、異種蛋白質（例えば、レセプタ、リガンドまたは酵素等の“アドヘシン”）の“結合領域”と、イムノグロブリンの定常領域のエフェクター機能とを組み合わせた抗体様分子を指す。構造的にはイムノアドヘシンは、抗体の抗原認識及び結合部位（抗原結合部位）以外の（即ち、異種的な）所望の結合特異性を有するアドヘシンのアミノ酸配列と、イムノグロブリン定常領域配列との融合を有してなる。イムノアドヘシンのイムノグロブリン定常領域配列は、IgG₁、IgG₂、IgG₃、若しくはIgG₄サブタイプ、IgA、IgE、IgDまたはIgM等の任意のイムノグロブリンから得ることができる。

ここにおいて使用されるように“リガンド結合領域”なる用語は、任意の天然細胞表面レセプタ、または少なくとも定性的なりガンド結合能力、好ましくは対応する天然レセプタの生物学的活性を維持するその任意の領域若しくは誘導体を指す。特定の実施態様におい

10

20

30

40

50

て、レセプタは、イムノグロブリン超遺伝子ファミリーの一員に相同的である細胞外領域を有する細胞表面ポリペプチド由来である。イムノグロブリン超遺伝子ファミリーの一員ではないが、それにも関わらずこの定義に特定の包含される他の典型的なレセプタ類は、サイトカインレセプタ類、特にチロシンキナーゼ活性を有するレセプタ類（チロシンキナーゼレセプタ）、造血因子及び神経成長因子レセプタ超ファミリーの一員、並びに細胞粘着分子、例えば（E-、L-及びP-）セレクトインである。

“レセプタ結合領域”なる用語は、細胞粘着分子を含む、レセプタに対する任意の天然リガンド、または少なくとも定性的なレセプタ結合能力、好ましくは対応する天然リガンドの生物学的活性を維持するその任意の領域若しくは誘導体を指す。この定義は、他のものの間にあって特に上記レセプタに対するリガンドに由来する結合配列を含む。

10

ここにおいて使用されるように“多重特異的イムノアドヘシン”なる句は、少なくとも2種の結合特異性（即ち、2種以上のアドヘシン結合領域）を有するイムノアドヘシン（上記に定義）を示す。多重特異的イムノアドヘシンは、基本的にWO 89/02922（1989年4月6日発行）、EP 314,317（1989年5月3日発行）及び1992年5月2日発行の米国特許第5,116,964号に開示されているように異種2量体、異種3量体または異種4量体として組み立てられ得る。好ましい多重特異的イムノアドヘシンは、二重特異的である。二重特異的イムノアドヘシンの例は、CD4-IgG/TNFレセプター-IgG及びCD4-IgG/L-セレクトイン-IgGを含む。最後に述べた分子は、リンパ細胞帰巢レセプタ（LHR、L-セレクトイン）のリンパ節結合機能を、CD4のHIV結合機能と組み合わせたもので、HIV感染または関連症状の予防または治療、または診断薬としての有望な応用が見い出される。

20

“抗体-イムノアドヘシンキメラ（Ab/Igキメラ）”は、抗体（この定義される）の少なくとも1個の結合領域と、少なくとも1個のイムノアドヘシン（本願に定義される）とを組み合わせた分子を指す。例示的Ab/Igキメラは、Berg等の前出文献及びChamow等の前出文献に記述される二重特異的CD4-IgGキメラである。

“境界部分”は、第2のポリペプチドの境界部分の1個以上の“接触”アミノ酸残基（または他の非アミノ酸基）と相互作用する第1のポリペプチドの“接触”アミノ酸残基（または炭化水素基、NADH、ビオチン、FAD若しくはヘム基等の他の非アミノ酸基）を含む。好ましい境界部分は、可変領域または定常領域等のイムノグロブリンの領域（またはその一部）であるが、異種多量体レセプタを形成するポリペプチド間の境界部分、またはNGF、NT-3及びBDNF等の2種以上のリガンドの間の境界部分は、この用語の範囲内に含まれる。好ましい境界部分は、好ましくはIgG抗体から、最も好ましくはヒトIgG₁抗体から誘導されるイムノグロブリンのC_H3領域を含む。

30

“突起”は、第1のポリペプチドの境界部分から突出する少なくとも1個のアミノ酸側鎖を指し、如かして異種多量体を安定化するように隣接する境界部分（即ち、第2のポリペプチドの境界部分）の補償的空隙内に配置可能であって、これによって例えば、好ましい異種多量体の形成が同種多量体の形成を上回るようになる。突起は、元々の境界部分に存在してもよく、あるいは合成的に（例えば、境界部分をコードする核酸の変更により）導入されてもよい。通常は、第1のポリペプチドの境界部分をコードする核酸が、突起をコードするように変更される。これを達成するために、第1のポリペプチドの境界部分内の少なくとも1個の“元々の”アミノ酸残基をコードする核酸が、該元々のアミノ酸残基よりも大きい側鎖体積を有する少なくとも1個の“導入”アミノ酸残基をコードする核酸に置換される。1個より多い元々の及び対応する導入残基があり得ることは認識されるであろう。置換される元々の残基数の上限は、第1のポリペプチドの境界部分の全残基数である。種々のアミノ残基の側鎖体積は下記の表に示されている。

40

表 1

アミノ酸側鎖の性質

アミノ酸	1 文字 略号	質量 ^a (ドルトン)	体積 ^b ($\text{\AA}^3$)	接近表面積 ^c ($\text{\AA}^2$)
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
リジン (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
スレオニン (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 アミノ酸の分子量から水の分を差し引いた。値はHandbook of Chemistry and Physics, 43版. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961から取った。

^b A. A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972からの値。

^c C. Chothia, J. Mol. Biol. 105: 1-14, 1975からの値。接近表面積はこの文献の図6-20に定義される。

突起形成のための好ましい導入残基は、一般に天然に生じるアミノ酸残基であって、好ましくはアルギニン (R)、フェニルアラニン (F)、チロシン (Y) 及びトリプトファン

10

20

30

40

50

(W) から選択される。最も好ましくはトリプトファン及びチロシンである。好ましい実施態様において、突起形成のための元の残基はアラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、セリン、スレオニンまたはバリン等の小さい側鎖体積を有するものである。“空隙”は、第2のポリペプチドの境界部分から窪んだ少なくとも1個のアミノ酸側鎖を指し、如かして第1のポリペプチドの隣接する境界部分の対応する突起を収容する。該空隙は、元の境界部分に存在してもよく、あるいは合成的に（例えば、境界部分をコードする核酸の変更により）導入されてもよい。通常は、第2のポリペプチドの境界部分をコードする核酸が、空隙をコードするように変更される。これを達成するために、第2のポリペプチドの境界部分内の少なくとも1個の“元々の”アミノ酸残基をコードする核酸が、該元々のアミノ酸残基よりも小さい側鎖体積を有する少なくとも1個の“導入”アミノ酸残基をコードするDNAに置換される。1個以上の元々の及び導入残基があり得ることは認識されるであろう。置換される元々の残基数の上限は、第2のポリペプチドの境界部分の全残基数である。種々のアミノ酸残基の側鎖体積は上記の第1に示されている。空隙形成のために好ましい導入残基は、通常は天然に生じるアミノ酸残基であり、好ましくはアラニン（A）、セリン（S）、スレオニン（T）及びバリン（V）から選択される。最も好ましくはセリン、アラニンまたはスレオニンである。好ましい実施態様において、突起形成のための元の残基は、チロシン、アルギニン、フェニルアラニンまたはトリプトファン等の大きい側鎖体積を有する。

“元の”アミノ酸残基は、該元々のアミノ酸残基より小さいかまたは大きい側鎖体積を有しうる“導入”残基により置換されるものである。導入アミノ酸残基は、天然に生じるか、または非天然のアミノ酸残基であり得るが、好ましくは前者である。“天然に生じる”アミノ酸残基は、遺伝子コードによりコードされる残基であって、上記表1に掲げられている。“非天然”のアミノ酸残基は、遺伝子コードによりコードされない残基を意味するが、ポリペプチド鎖において隣接するアミノ酸残基に共有的に結合可能なものである。非天然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Ellman等、Meth.Enzym. 202:301-336(1991)に記述されるような他のアミノ酸残基類似体である。この様な非天然アミノ酸残基を生じさせるためには、Noren等、Science 244:182(1989)及びEllman等の前出文献の方法が使用されうる。略述すれば、サブレッサー tRNA を非天然アミノ酸残基を用いて化学的に活性化し、次いでRNAをインビトロにて転写、翻訳することを含む。本発明の方法は、少なくとも1個の元のアミノ酸残基を置換することを含むが、1個より多くの元の残基を置換することもできる。通常は、第1または第2のポリペプチドの境界部分の全残基を越えて、元のアミノ酸残基が置換されることはない。置換のための好ましい元の残基は、“埋もれたもの”である。“埋もれたもの”は、本質的に溶媒に接触しない残基を意味する。好ましい導入残基は、起こりうる酸化またはジスルフィド結合の誤った対形成を防ぐためにシステインではない。

突起は、空隙内に“配置可能”であるが、このことは、第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドのそれぞれの境界部分の突起及び空隙の空間的配置、並びに突起及び空隙の大きさが、第1及び第2のポリペプチドの境界部分での通常の会合が著しく攪乱されることなく該突起が空隙内に配置され得るものであることを意味する。Tyr、Phe及びTrp等の突起は、境界部分の軸方向から典型的に直角に伸びるものではなく、好ましい形態を持たないため、突起と対応する空隙との整列は、X-線結晶解析または核磁気共鳴（NMR）により得られる3次元構造に基づく突起／空隙対のモデル化を頼りにする。これは、この技術分野で広く受け入れられている技術を使用することにより達成されうる。

“元の核酸”は、突起または空隙をコードするように改変され得る（即ち、遺伝子的に操作されるか、変異される）興味あるポリペプチドをコードする核酸を意味する。元のまたは最初の核酸は、天然に生じる核酸であってよく、または先行する改変を受けた（例えば、ヒト化抗体断片）核酸を含んでもよい。核酸の“改変”は、元の核酸が、興味あるアミノ酸残基をコードする少なくとも一つのコドンにおける挿入、除去または置換によって変異生成されることを意味する。通常は、元の残基をコードするコドンが、導入残基をコードするコドンにより置換される。この様な様式でDNAを遺伝子的に修飾する技術は、Mu

10

20

30

40

50

tagenesis: a Practical Approach, M.J. McPherson, 編 (IRL Press, Oxford, UK (1991)) に総説が与えられ、例えば、部位指向変異生成、カセット変異生成及びポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 変異生成を含む。

突起または空隙は、例えば、組換え技術、インビトロペプチド合成、酵素的または化学的なペプチド結合による前述の非天然アミノ酸残基を導入するための技術等、あるいはこれらの技術の何らかの組合せによって、合成的手段により第1または第2のポリペプチドの境界部分に“導入”されうる。従って、“導入”された突起または空隙は、“非天然”または“非本来的”であって、このことは、それが天然には、あるいは元のポリペプチドには存在しないことを意味する (例えば、ヒト化モノクローナル抗体)。

好ましくは、突起形成のための導入アミノ酸残基は、比較的少数の“回転異性体” (例えば3-6) を有する。“回転異性体”は、アミノ酸側鎖のエネルギー的に好ましい配位である。種々のアミノ酸残基の回転異性体の数は、Ponders及びRichards, *J. Mol. Biol.* 193: 775-791 (1987) に総説がある。

“単離された”異種多量体は、同定され、及びその天然の細胞培養環境の成分から分離及び/または回収された異種多量体を意味する。この天然環境の夾雑成分は、異種多量体の診断的または治療的使用を妨害しうる物質であって、酵素、ホルモン類、及び多くの蛋白質性または非蛋白質性の溶質を含みうる。好ましい実施態様において、該異種多量体は、(1) ロウリー法により測定される場合に蛋白質重量で95%より多くまで、最も好ましくは重量で99%より多くまで、

(2) スピニングカップシークエネーターを使用することにより、N-末端または内部アミノ酸配列を少なくとも15残基得るに十分な程度まで、または(3) クーマシーブルー若しくは、好ましくは銀染色を使用して、還元または非還元条件下でのSDS-PAGEにより均質である程度に精製されるであろう。

本発明の異種多量体は、一般的には実質的に均質まで精製される。“実質的に均質な”、“実質的に均質な形態”及び“実質的均質性”等の句は、生成物が望ましからぬポリペプチドの組合せに由来する副生成物 (例えば、同種多量体) を実質的に欠くことを示すために使用される。純度によって表される場合に、実質的均質性は、副生成物の量が重量百分率で10%を越えず、好ましくは5%未満であり、更に好ましくは1%未満、最も好ましくは0.5%未満であることを意味する。

発現“調節配列”との表現は、特定の宿主生物内で機能可能に結合されたコード配列の発現のために必要なDNA配列を指す。原核生物について適当な調節配列は、例えば、プロモーター、場合によりオペレーター配列、リボソーム結合部位、及び多分、未だに十分理解されていない配列等を含む。真核性細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを使用することが知られている。

核酸は、それが他の核酸配列と機能的に関連性をもって配置される場合に“機能可能に連結”される。例えば、先行配列または分泌先行配列のDNAは、ポリペプチドが前駆蛋白質として発現され、該ポリペプチドの分泌に関与する場合にポリペプチドのDNAに対して機能可能に連結されており；プロモータまたはエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合にコード配列に対して機能可能に連結されており；あるいはリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように配置されている場合にコード配列に対して機能可能に連結されている。一般的には、“機能可能に結合”は、連結されるDNA配列が連続的であり、また分泌先行配列の場合には連続かつ読み枠内である。しかしながら、エンハンサーは連続的である必要はない。結合は、都合の良い制限部位にて連結することにより行われる。そのような部位が存在しない場合には、合成オリゴヌクレオチドアダプタまたはリンカーが、常法に従って使用される。

II. 異種多量体の調製

1. 出発材料の調製

第1段階として、第1及び第2のポリペプチド (及び異種多量体を形成するいずれかの付加的なポリペプチド) が選択される。通常は、これらのポリペプチドをコードする核酸が、ここで定義したような突起または空隙または両者をコードするように改変されるべく、

10

20

30

40

50

単離される必要がある。しかしながら、変異は、例えばペプチド合成装置を用いて合成的手段を使用して導入されうる。導入残基が非天然残基である場合に、Noren等の前出文献の方法が、そのような置換を有するポリペプチドを調製するために利用可能である。更に、異種多量体の一部分が、細胞培養物にて組換え的に適切に調製され、かつ分子の他の部分が上記技術によって調製される。

抗体の単離及びイムノアドヘシンの調製のための技術が引き続く。しかしながら、異種多量体がこの分野で既知の技術を使用する他のポリペプチドから形成されるか、またはそれを取り込むこともできる。例えば、興味あるポリペプチド（例えば、リガンド、レセプタまたは酵素）をコードする核酸は、該ポリペプチドmRNAを有し、それを検出可能な水準で発現するものと考えられる組織由来のcDNAライブラリーから単離されうる。該ライブラリーは、興味ある遺伝子またはそれによりコードされる蛋白質を同定するように設計されたプローブ（抗体類または20-80塩基のオリゴヌクレオチド）を用いてスクリーニングされる。選択されたプローブを用いるcDNAまたはゲノムライブラリーのスクリーニングは、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)の10-12章に記述されているように標準的方法を使用して行われ得る。

(i) 抗体調製

抗体生成のための幾つかの技術が記述されており、それらはモノクローナル抗体作成のための伝統的ハイブリドーマ法、抗体作成のための組換え技術（例えば、ヒト化抗体等のキメラ抗体を含む）、トランスジェニック動物における抗体産生、及び最近記述された“完全ヒト”抗体調製のためのファージディスプレイ技術を含む。これらの技術は、以下に略述される。

興味ある抗原に対するポリクローナル抗体は、一般に該抗原及びアジュバントの複数回の皮下（s.c）または腹腔内の（i.p）注射によって、動物内に生じうる。抗原（または標的アミノ酸配列を含む断片）を、免疫される動物種において免疫原性である蛋白質、例えば、キーホールリンペットのヘモシアニン、血清アルブミン、チログロブリン、またはダイズトリプシン阻害酵素等に、二官能性または誘導化剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介しての接合）、グルタルアルデヒド、スクシンアルデヒド、SOCl₂、またはR及びR¹が異なるアルキル基であるR¹N=C=N R等を使用して結合させることは有用であろう。動物は、1mgまたは1μgの接合体（ウサギまたはマウスのそれぞれについて）を3倍容のフロイント完全アジュバントと合わせ、溶液を複数部位に皮内注射することにより、免疫原性接合体または誘導体に対して免疫される。1カ月後に、動物はフロイント完全アジュバント中の接合体の元の量の1/5〜1/10を用いて、複数部位に皮下注射することにより追加免疫される。7〜14日後に、動物を採血して血清を抗体力価についてアッセイする。力価がプラトーに至るまで動物は追加免疫を受ける。好ましくは動物は同じ抗原であるが、異なる蛋白質に結合されるか、及び／または異なる交差結合剤を介して結合される接合体により追加免疫を受ける。接合体は、蛋白質融合物として組み換え細胞培養物中でも調製され得る。アルム等の凝集剤も、免疫応答を増強するために使用される。

モノクローナル抗体は、Kohler&Milstein, Nature 256:495(1975)により最初に記述されたハイブリドーマ法を使用して実質的に均質は抗体の母集団から得られるか、あるいは組換えDNA法（Cabilly等、米国特許第4,816,567号）によって作成されうる。ハイブリドーマ法においては、マウスまたはハムスター等の他の適当な宿主動物が、上述のようにして免疫され、免疫に使用した蛋白質に特異的に結合するであろう抗体を産生するか、または産生しうるリンパ細胞を引き出す。別法として、リンパ細胞はインビトロにて免疫されてもよい。次いで、リンパ球は、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を使用してミエローマ細胞と融合され、ハイブリドーマ細胞が形成される（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103[Academic Press, 1986]）。斯くして調製されたハイブリドーマは、好ましくは非融合の親ミエローマ細胞の成長または生存を妨げる1種以上の物質を含んだ適切な培地に播種され、育成される。例えば、親ミエローマ細胞が、

10

20

30

40

50

酵素ハイポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPR T）を欠く場合には、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的にはHGPRT-欠損細胞の成長を阻害する物質であるハイポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう（HAT培地）。好ましいミエローマ細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による安定した高水準の抗体発現を支持するもので、かつHAT培地等の培地に感受性の細胞である。これらのうちで好ましいミエローマ細胞系は、ソーキンスティチュート細胞分譲センター、San Diego, California, USAから入手可能なMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍から誘導されるもの、及びアメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville, Maryland USAから入手可能なSP-2等のネズミミエローマ系である。ヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞系も、ヒトモノクローナル抗体の産生に関して記述がなされている（Kozbor, J. Immunol., 133:3001[1984];及びBrodeur等、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987）。ヒトモノクローナル抗体産生技術に関しては、Boerner等、J. Immunol., 147(1):86-95(1991)及び1991年11月28日発行のWO 91/17769も参照。ハイブリドーマ細胞が生育される培養培地は、興味ある抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降により、あるいは放射イムノアッセイ（RIA）または酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）等のインビトロ結合アッセイにより測定される。

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson&Pollard, Anal. Biochem. 107:220(1980)のスキッチャード分析により測定され得る。所望の特異性、親和性及び／または活性をもった抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後には、該クローンは制限希釈法によりサブクローニングされ、標準的方法で育成される。Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-104(Academic Press, 1986)。このために好適な培養培地は、Dulbeccoの修飾Eagle培地、またはRPMI-1640培地を含む。更に、ハイブリドーマ細胞は、動物の腹水腫瘍のようにインビボにて育成されてもよい。サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、培養培地、腹水、または血清から例えば、蛋白質A-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィー等の慣用のイムノグロブリン精製方法により好適に分離される。

別法として、現在では免疫により、内因性イムノグロブリンの産生なしに、ヒト抗体の完全なレパートリーを産生しうるトランスジェニック動物（例えばマウス）を作成することが可能である。例えば、キメラ性の生殖系列の変異マウスにおける抗体重鎖結合領域（J_H）遺伝子の同系接合的削除が、内因性抗体産生の完全な阻害を生じたことが記述されている。ヒト生殖系列イムノグロブリン遺伝子配列の、そのような生殖系列変異マウスへの転移は、抗体の攻撃によってヒト抗体の産生を招くであろう。例えば、Jakobovits等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-255(1993)及びJakobovits等、Nature 362:255-258(1993)参照。

更なる実施態様において、抗体または抗体断片は、McCafferty等、Nature, 348:552-554(1990)に記述される技術を使用して抗体ファージライブラリーから、適当な抗体または抗体断片を選択するための興味ある抗原を使用して単離されうる。Clackson等、Nature, 352:624-628(1991)及びMark等、J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)は、ファージライブラリーを使用したネズミ及びヒト抗体の単離をそれぞれ記述している。引き続く文献は、鎖混合わせ(shuffling)による高親和性（nM範囲）のヒト抗体の産生（Mark等、Bio/Technol. 10:779-783[1992]）、並びに極めて大きいファージライブラリーを構築するための方策として、組合せ感染及びインビボ組換え（Waterhouse等、Nuc. Acids Res., 21:2265-2266[1993]）を記述している。如かして、これらの技術は、本発明に包含されるモノクローナル抗体（特にヒト抗体）の単離の為の伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に対する実行可能な別法である。

本発明の抗体をコードするDNAは、慣用の方法を使用して容易に単離及び配列決定され

10

20

30

40

50

得る（例えば、ネズミ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しうるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる）。本発明のハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい供給源として役に立つ。一旦単離されれば、DNAは発現ベクター中に配置され、次いでこれを、サルCOS細胞、モルモット卵巣（CHO）細胞、または別途イムノグロブリンを産生しない限りミエローマ細胞等の宿主細胞に感染させ、該組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の産生を得る。DNAは、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常領域についてのコード配列を、同種ネズミ配列に代えて置換することにより修飾されうる；Morrison等、Proc.Natl.Acad.Sci. 81:6851(1984)。この様にして、ここに示す抗-抗原モノクローナル抗体の結合特異性を有する“キメラ”抗体が調製される。

非ヒト抗体のヒト化方法は、この分野で周知である。一般的には、ヒト化抗体は非ヒト供給源から導入された1個以上のアミノ酸残基を有している。これらの非ヒトアミノ酸残基は、典型的には“導入”可変領域領域から取られ、しばしば“導入”残基と称される。ヒト化は、基本的にはWinter及び共同研究者等（Jones等、Nature 321:522-525[1986]；Riechman等、Nature 332:323-327[1988]；Verhoeyen等、Science 239:1534-1536[1988]）の方法に従って、齧歯類CDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより行われ得る。従って、そのようなヒト化抗体はキメラ抗体であり（Cabilly,前出文献）、ここにおいて実質的に完全なヒト可変領域未満の部分が非ヒト動物種に由来する対応する配列によって置換されている。実際的には、ヒト化抗体は、典型的には幾つかのCDR残基及び多分幾つかのFR残基が、齧歯類抗体の類似部位に由来する残基によって置換されたヒト抗体である。抗原に対する高い親和性及び他の望ましい生物学的性質を維持して抗体をヒト化することが重要である。この目標を達成するために、好ましい方法に従って、親及びヒト化配列の3次元イムノグロブリンモデルを使用し、親配列及び種々の概念的ヒト化生成物を分析する工程により、ヒト化抗体が調製された。3次元イムノグロブリンモデルは、当業者にはよく知られている。選択されたイムノグロブリン配列の候補の可能性ある3次元配置構造を例示し、表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示を見ることは、候補のイムノグロブリン配列の機能における残基の可能性ある役割の分析、即ち候補のイムノグロブリンのその抗原に結合する能力に影響する残基の分析が可能となる。この様にして、FR残基が共通及び導入配列から選択され、結合され得て、標的抗原に対する増大した親和性等の所望の抗体特性が達成される。更なる詳細については、1992年12月23日発行のWO 92/22653参照。

(ii) イムノアドヘシン調製

イムノグロブリンおよびそのある種の変異体が知られており、多くは国か得細胞培養により調製されている。例えば、米国特許第4,745,055号；EP 256,654号；Faulkner等、Nature 298:286(1982)；EP 120,694；EP 125,023；Morrison, J.Immun. 123:793(1979)；Koehler等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:2197(1980)；Raso等、Cancer Res. 41:2073(1981)；Morrison等、Ann.Rev.Immunol. 2:239(1984)；Morrison, Science 229:1202(1985)；Morrison等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851(1984)；EP 255,694；EP 266,663；及びWO 88/03559参照。細分類されたイムノグロブリンも知られている。例えば、米国特許第4,444,878号；WO 88/03565；及びEP 68,763並びにそれらに引用された文献参照。

適切なイムノグロブリン定常領域配列に結合されたアドヘシン結合領域配列から構築されたキメラ（イムノアドヘシン）は、この分野で知られている。文献中に報告されたイムノアドヘシンは、T細胞レセプタ（Gascoigne等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:2936-2940[1987]）；CD4（Capon等、Nature 337:525-531[1989]；Tranuecker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렉チン（帰巢レセプタ）（Watson等、J.Cell.Buil. 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]）；CTL A-4（Linsley等、J.Exp.Med. 174:561-569[1991]）；CD22（Stamenkovic等、Cell 66:1133-1144[1991]）；TNFレセプタ（Ashkenazi等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:10535-10539[1991]；Lesslauer等、Eur.J.Immunol 27:2883-2886[1991]；及びPepp

10

20

30

40

50

el等、J.Exp.Med.174:1483-1489:[1991]) ;並びに I g E レセプタ α (Ridgway及びGorman、J.Cell.Biol.115巻、要約番号1448[1991]) の融合物を含む。

最も単純かつ直接的なイムノアドヘシンの設計は、アドヘシン (例えば、レセプタの細胞外領域 [E C D]) を、イムノグロブリン重鎖のヒンジ及び F c 領域と組み合わせることである (図 3 参照)。通常、本発明のイムノアドヘシンを調製する場合に、アドヘシンの結合領域をコードする核酸が、イムノグロブリン定常領域配列の N-末端をコードする核酸に、C-末端側において融合されるが、N-末端側の融合も可能である。

典型的には、この様な融合物において、コードされるキメラポリペプチドは、少なくともイムノグロブリン重鎖の定常領域の機能的な活性ヒンジ、C_H 2 及び C_H 3 領域が維持されるであろう。融合物は、定常領域の F C 部分の C-末端、または直接に重鎖の C_H 1 の N-末端に、あるいは軽鎖の対応する領域にも作成されうる。融合が作られる正確な部位は重要ではなく ; 特定の部位は周知であり、I a の生物学的活性、分泌、または結合特性を至適化するために選択され得る。

好ましい実施態様において、アドヘシン配列は、イムノグロブリン G₁ (I g G₁) の F c 領域の N-末端に融合される。全重鎖定常領域をアドヘシン配列に融合することが可能である。しかしながら、より好ましくは I g G F c をキメラ的に定義するパパイン切断部位の直ぐ上流のヒンジ領域において始まる配列 (即ち、重鎖定常領域の第 1 の残基を 1 1 4 位として、2 1 6 位の残基)、または他のイムノグロブリンの同様な部位が、融合において使用される。特に好ましい実施態様において、アドヘシンアミノ酸配列は、I g G₁、I g G₂ または I g G₃ 重鎖の (a) ヒンジ領域及び C_H 2 及び C_H 3、あるいは (b) C_H 1、ヒンジ、C_H 2 及び C_H 3 領域と融合される。融合物が生成される正確な部位は臨界的なものではなく、至適部位は機械的な実験により決定されうる。

二重特異的イムノアドヘシンについては、該アドヘシンは多量体、特に異種二量体または異種四量体として組み立てられる。一般に、これらの組み上げられたイムノグロブリンは、既知の単位構造を有するであろう。基本的な 4 本鎖構造単位は、I g G、I g D 及び I g E が存在する形態である。四本鎖単位はより高分子量のイムノグロブリンにおいては反復され ; I g M はジスルフィド結合のより一緒に維持された四個の基本単位の 5 量体として存在する。I g A グロブリン及び場合により I g G グロブリンは、血清中において多量体形態においても存在し得る。多量体において、四個の単位のそれぞれは同一でも異なってもよい。

ここにおいて範囲内にある種々の例示的な組み上げられたイムノアドヘシンは、以下に模式的に図表化される :

- (a) AC_L-AC_L ;
- (b) AC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, または V_LC_L-AC_H] ;
- (c) AC_L-AC_H-[AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, または V_LC_L-V_HC_H] ;
- (d) AC_L-V_HC_H-[AC_H, または AC_L-V_HC_H, または V_LC_L-AC_H] ;
- (e) V_LC_L-AC_H-[AC_L-V_HC_H, または V_LC_L-AC_H] ; 及び
- (f) [A-Y]_n-[V_LC_L-V_HC_H]₂

ここにおいて、各 A は、同一または異なったアドヘシンアミノ酸配列を表し ;

V_L は、イムノグロブリン軽鎖可変領域であり ;

V_H は、イムノグロブリン重鎖可変領域であり ;

C_L は、イムノグロブリン軽鎖定常領域であり ;

C_H は、イムノグロブリン重鎖定常領域であり ;

n は、1 より大きい整数であり ;

Y は、共有的交差結合剤の残基を示す。

簡潔さのために、上記構造は主要な特徴のみを示し ; それらは結合 (J) またはイムノグロブリンの他の領域を示しておらず、またジスルフィド結合も示されない。しかしながら、この様な領域が結合活性について要求される場合には、それらはイムノグロブリン分子中に占める通常的位置に存在するように構築されるであろう。

別法として、アドヘシン配列は、イムノグロブリン重鎖及び軽鎖の間に挿入されることも

でき、如かしてキメラ重鎖を有するイムノグロブリンが得られる。この実施態様においては、アドヘシン配列は、イムノグロブリンの各アームのイムノグロブリン重鎖の3'末端に、ヒンジ及びC_H2領域の間、あるいはC_H2及びC_H3領域の間のいずれかにおいて融合される。同様な構築物が、Hoogenboom等、Mol.Immunol. 28:1027-1037(1991)により報告されている。

本発明のイムノアドヘシンにおいてはイムノグロブリン軽鎖の存在は必要とされないが、イムノグロブリン軽鎖は、アドヘシンーイムノグロブリン重鎖融合ポリペプチドに共有結合的に伴われるか、あるいはアドヘシンに直接融合するいずれかとして存在するであろう。前者の場合には、イムノグロブリン軽鎖をコードするDNAは、典型的にはアドヘシンーイムノグロブリン重鎖融合蛋白質をコードするDNAと共に発現される。分泌において、ハイブリッド重鎖及び軽鎖は、共有結合的に一緒になって、2個のジスルフィド結合イムノグロブリン軽鎖ー軽鎖対を有するイムノグロブリン様構造を与えるであろう。この様な構造の調製のために適当な方法は、1989年3月28日発行の米国特許第4,816,567号に開示されている。

好ましい実施態様において、本発明のイムノアドヘシンの構築において使用されるイムノグロブリン配列は、IgGイムノグロブリン重鎖定常領域由来のものである。ヒトイムノアドヘシンについては、ヒトIgG₁及びIgG₃イムノグロブリン配列の使用が好ましい。IgG₁を使用することの主な優位点は、IgG₁イムノアドヘシンが固定化蛋白質Aにて効率的に精製され得ることである。対照的にIgG₃の精製は、優位に用途が狭い媒質である蛋白質Gを必要とする。しかしながら、特定のイムノアドヘシン構築のためにIg融合相手を選択する場合には、イムノグロブリンの別の構造的及び機能的性質も考慮されなければならない。例えば、IgG₃ヒンジは、より長く、より柔軟性を有するもので、IgG₁に融合した場合には折り畳まれず、あるいは適切に機能しないより大きい“粘着”領域に適合しうる。他の考慮点は、抗体価であって；IgGイムノアドヘシンは、2価の同種二量体であり、その一方でIgA及びIgM等のIgサブタイプは基本的Ig同種二量体単位の二量体的または五量体的構造を生じるであろう。インビボでの応用のために設計されるイムノアドヘシンについては、FC領域によって特定される薬理動態的性質及びエフェクター機能も重要である。IgG₁、IgG₂及びIgG₄は、全て21日のインビボ半減期を有するが、それらの補体系活性化における相対的能力は異なっている。IgG₄は補体を活性化せず、またIgG₂は、補体活性化についてIgG₁より顕著に弱い。更にIgG₁とは異なって、IgG₂は、単核細胞または好中球のFcレセプタに結合しない。IgG₃は、補体活性化について至適であるが、そのインビボ半減期は他のIgGアイソタイプに比べておよそ3分の1である。ヒト治療薬として使用すべく設計されるイムノアドヘシンについての他の重要な考慮点は、特定のアイソタイプのアロタイプ変異体の数である。一般に、血清学的に定義されるアロタイプが少ないIgGアイソタイプほど好ましい。例えば、IgG₁は4個のみの血清学的に定義されるアロタイプ部位を有し、それらのうち2個(G1m及び2)は、Fc領域に位置し；これらの部位の一つ、G1m1は、非免疫原性である。対照的に、IgG₃には12個の血清学的に定義されるアロタイプが存在し、それら全てがFc領域に存在し、これらの部位のうち僅かに3個(G3m5、11及び21)のみが非免疫原性の一つのアロタイプを有する。従って、γ3イムノアドヘシンの潜在的免疫原性は、γ1イムノアドヘシンに比べて高い。

イムノアドヘシンは、アドヘシン部分をコードするcDNAを、Ig cDNA配列に読み枠内で融合することにより最も都合良く構築される。しかしながら、ゲノムIg断片に対する融合も使用され得る(例えば、Gascoigne等の前出文献；Aruffo等、Cell 61:1303-1313[1990]；及びStamenkovic等、Cell 66:1133-1144[1991]参照)。融合の後者のタイプは、発現のためのIg制御配列の存在を必要とする。IgG重鎖定常領域をコードするcDNAは、脾臓または末梢血リンパ球から誘導されるcDNAライブラリーから、文献記載の配列に基づいてハイブリダイゼーションにより、あるいはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術により単離されうる。イムノアドヘシンの“アドヘシン”及びIg部分をコードするcDNAは、選択された宿主細胞において効率的な発現を支配するプラスミドベク

10

20

30

40

50

ターにタンデムに挿入される。

2. 突起及び／または空隙の創製

突起及び／または空隙を形成するための元の残基の選択の第一の工程として、異種多量体の3次元構造が、X線結晶解析法またはNMR等のこの分野で周知の技術を使用して得られた。3次元構造に基づき、当業者は境界部分残基を同定することができるであろう。

好ましい境界部分は、イムノグロブリン定常領域のC_H3領域である。IgG、IgA、IgD、IgE及びIgMのC_H3領域の境界部分残基は、導入残基による置換のために至適なものも含めて図5に特定されている。種々のIgGサブタイプの境界部分残基は、図6に例示されている。“埋もれた”残基も特定されている。C_H3境界部分の操作の基礎は、X線結晶解析がFc領域におけるヒトIgG₁重鎖間の分子間会合が、C_H3領域間の広範囲な蛋白質／蛋白質相互作用を含み、一方でグリコシル化されたC_H2領域はそれらの炭化水素を介して相互作用することが例示されたことにある (Deisehofer, Biochem. 20:2361[1981])。加えて、重鎖が切断されてC_H2およびC_H3領域が除去されない限り、哺乳動物細胞での抗体発現において効率的に形成された2本の重鎖間のジスルフィド結合が存在する (King等, Biochem.J. 281:317[1992])。従って、重鎖会合はジスルフィド結合形成を、促進するものと考えられ、むしろその逆ではない。これらの構造的及び機能的データを合わせ見ると、抗体重鎖の会合は、C_H3領域に支配されるとの仮説が導かれる。更に、C_H3領域間の境界部分は、異なった重鎖の異種多量体形成を促進し、対応する同種多量体の組立を阻害するために操作されうることが推定される。ここに記述される実験は、この方法論を使用して、同種多量体を上回って異種多量体の形成が促進可能であったことを例示する。如かして、第1または第2のポリペプチドを形成するための興味あるポリペプチド及び抗体のC_H3領域を含んでなるポリペプチド融合体を創製することが可能である。好ましいC_H3領域は、ヒトIgG₁等のIgG抗体から誘導される。ヒトIgG₁の境界部分残基は、図7に示される。

これらの突起または空隙形成の為の候補となりうる境界部分残基が特定される。置換するために“埋もれた”残基を選択することが望ましい。残基が埋もれたものであるかを決定するために、Lee等、J.Mol.Biol. 55:379-400(1971)の表面接近性プログラムを使用して、境界部分の残基の溶媒接近性(SA)を計算することができる。従って、他方のポリペプチドを取り去った後に第1および第2のポリペプチドの各々について残基のSAが別個に計算されう。境界部分の単量体及び二量体形態の間の各残基のSAの差が、次のように計算される：SA(二量体)－SA(単量体)。これは、二量体形成においてSAを失う残基のリストを提供する。二量体における各残基のSAは、X＝興味あるアミノ酸である場合のトリペプチド、Gly－X－Glyにおける同じアミノ酸の理論的SAと比較される (Rose等、Science 229:834-838[1985])。(a)単量体に比べて二量体でSAを失い、かつ(b)対応するトリペプチドのものに対して26%未満のSAを有する残基が、境界部分残基として考慮される。二つの種類、即ちそれらの対応するトリペプチドに比較してSA<10%を有する(即ち“埋もれた”)もの、及び対応するトリペプチドに比例して25%>SA>10%を有する(即ち、“部分的に埋もれた”)ものが描かれるであろう。

表 2

残基番号 ¹	S A 損失単量体→二量体		%トリペプチド	
	ポリペプチド	ポリペプチド	ポリペプチド	ポリペプチド
	A	B	A	B
Q347	22.1	31.0	25.0	26.5
Y349	79.8	83.9	5.2	5.7
L351	67.4	77.7	3.9	2.0
S354	53.4	52.8	11.3	11.7
E357	43.7	45.3	0.4	1.3
S364	21.5	15.1	0.5	1.4
T366	29.3	25.8	0.0	0.1
L368	25.5	29.7	1.0	1.1
K370	55.8	62.3	11.5	11.0
T394	64.0	58.5	0.6	1.4
V397	50.3	49.5	13.2	11.0
D399	39.7	33.7	5.7	5.7
F405	53.7	52.1	0.0	0.0
Y407	89.1	90.3	0.0	0.0
K409	86.8	92.3	0.7	0.6
T411	4.3	7.5	12.7	9.8

¹ I g G 結晶構造における残基番号 (Deisenhofer, Biochemistry 20:2361-2370 [1981])

ポリペプチド鎖構造における残基置換の効果は、InsightTMプログラム (Biosym Technologies) 等の分子グラフィクスモデル化プログラムを使用して研究する。このプログラムを使用して、例えば、小さい側鎖体積を有する第1のポリペプチドの境界部分の埋もれた残基を、より大きい側鎖体積を有する残基（即ち突起）に変更する。次いで、突起に近接する第2のポリペプチドの境界部分の残基が、空隙を形成するために適切な残基を見い出すべく検査される。通常、この残基は大きい側鎖体積を有し、これがより小さい側鎖体積を有する残基に置換される。ある実施態様において、境界部分の3次構造の検査は、第1のポリペプチドの境界部分に適切に配置され、大きさの決められた突起、または第2のポリペプチドの境界部分の空隙を明らかにするであろう。これらの例において、単一の変異体、即ち、合成的に導入された突起または空隙を持つもののモデル化のみが必要である。

第1および第1のポリペプチドが各々C_H3領域を含む場合に、置換について可能性ある元の残基を選択することの関しては、ヒトIgG₁のC_H3/C_H3境界は各表面から1090Å²を埋める4本の逆平行のβ-鎖上に位置する各領域に、16個の残基を含む (Dei

10

20

30

40

50

senhofer、前出文献及びMiller, *J. Mol. Biol.* 216:965[1990])。これに添付の図7参照。変異は、好ましくは2本の中央の逆平行 β -鎖上に位置する残基を標的とする。この目標は、生成される突起が、相手のC_H3領域の補完的空隙ではなくして周囲の溶媒中に突出することによって適応されうる危険性を小さくする。

分子モデルによって一旦好ましい元々／導入残基が同定されれば、アミノ酸の置換は、この分野で周知の技術を使用してポリペプチドに導入される。通常は、該ポリペプチドをコードするDNAが、*Mutagenesis: a Practical Approach*, 前出文献に記述される技術を使用して、遺伝的に操作される。

オリゴヌクレオチド-媒介変異生成は、第1および第2のポリペプチドをコードするDNAの置換変異体調製のために好ましい方法である。この技術は、Adelman等、*DNA*, 2:183(1983)により記述されているようにこの分野で周知である。略述すれば、第1および第2のポリペプチドは、所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドを、異種多量体の未改変または天然のDNA配列を含むプラスミドまたはバクテリオファージの単鎖形態のDNAテンプレートにハイブリダイズさせることにより改変される。ハイブリダイゼーションの後、オリゴヌクレオチドプライマーを取り込み、異種多量体DNAにおいて選択された改変をコードするであろうテンプレートの第2の相補鎖全体を合成するためにDNAポリメラーゼが使用される。

カセット変異生成は、Well等、*Gene* 34:315(1985)に記述されるように、興味あるDNAの領域を、相補的オリゴヌクレオチドにアニール化することにより生成された合成的変異断片により置換することによって行われ得る。PCR変異生成も、第1および第2のポリペプチドDNAの変異体を作成するために好適である。下記の議論においてはDNAを引用するが、この技術はRNAに対しても応用が見い出されるものと理解される。PCR技術は、一般に下記の方法が参照される(Erlich, *Science*, 252:1643-1650[1991], R. Higuchiによる章, p61-70参照)。

この発明は、突起または空隙の変異に加えて、適切なヌクレオチド変化を異種多量体DNAに導入するか、あるいは所望の異種多量体ポリペプチドの合成により調製される異種多量体のアミノ酸配列変異を包含する。この様な変異体は、例えば、異種多量体を形成する第1および第2のポリペプチドのアミノ酸配列内の残基に、削除、または挿入若しくは置換を含む。削除、挿入及び置換の任意の組合せは、最終構築物が所望の抗原結合特性を有する限り、最終構築物に到達する。アミノ酸の変更は、グリコシル化部位の数また配置の変化等の異種多量体の翻訳後工程を変えるであろう。

変異生成のために好ましい位置にある異種多量体のある残基または領域を同定する有用な方法は、Cunningham及びWells, *Science*, 244:1081-1085(1989)により記述されるように“アラニン走査変異生成”と称される。これにおいては、ある残基または標的残基の基が特定され(例えば、Arg、Asp、His、Lys及びGlu等の電荷を持つ残基)、中性または負電荷のアミノ酸(最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン)により置換されて、細胞内または外の水性環境とのアミノ酸の相互作用に影響を与える。置換に対して機能的に感受性であることが示される領域は、次いで置換部位においてまたはそれに対して更なる、または他の変異を導入することにより改善される。従って、アミノ酸配列変化が導入される部位は予め特定されるが、変異の性質自体は予め決定される必要がない。通常は、変異は異種多量体の非機能領域において保存的アミノ酸の置換を含む。例示的変異が、下記の表に示される。

表 3

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; 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)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	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

異種多量体ポリペプチドの共有結合的修飾も本発明の範囲に含まれる。異種多量体の共有結合的修飾は、異種多量体またはその断片の標的アミノ酸残基を、選択される側鎖、またはN-末端若しくはC-末端残基と反応しうる有機誘導試薬と反応させることによって分子に導入されうる。本発明の範囲に含まれる異種多量体ポリペプチドの他の共有結合的修飾は、ポリペプチドの天然のグリコシル化パターンの変更を含む。変更は、元の異種多量体に見い出される1個以上の炭水化物残基の除去、及び／または元の異種多量体に存在しない1個以上のグリコシル化部位の付加を意味する。異種多量体に対するグリコシル化部位の付加は、1個以上のN-結合グリコシル化部位を含む様にアミノ酸配列を改変することにより都合良く達成される。変更は、元の異種多量体配列に対して、1個以上のセリンまたはスレオニン残基の付加または置換（O-結合グリコシル化部位について）を行うことによって成され得る。簡便さのため、異種多量体アミノ酸配列は、好ましくはDNA水準での変更を介して、特に異種多量体ポリペプチドをコードするDNAを、所望のアミノ酸に翻訳されるようなコドンを生じる様に予め選択された塩基において変異させるこ

10

20

30

40

50

とによって変更される。異種多量体ポリペプチド上に炭水化物残基数を増加させる別の方法は、グリコシドのポリペプチドに対する化学的または酵素的な結合である。これらの方法は、1987年9月11日発行のWO 87/05330、及びAplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp.259-306(1981)に記述されている。異種多量体に存在する炭水化物残基の除去は、化学的または酵素的に行われ得る。

異種多量体の他のタイプの共有結合的修飾は、異種多量体ポリペプチドを、種々の非蛋白質性ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレンのうちの一つに、米国特許第4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192または4,179,337に示されるようにして結合することを含む。

変異異種多量体の性質を先に予測することはしばしば困難であるため、至適な変異体を選択するためには回収される変異種のある種のスクリーニングが必要であることは確認されるであろう。

3. 異種多量体の発現

前節にて検討したように、DNAの変異に続いて、分子をコードするDNAは、この分野で広く利用可能な組換え技術を使用して発現される。しばしば選択される発現系は、異種多量体が適切にグリコシル化されるように（例えば、グリコシル化された抗体領域を含む異種多量体の場合）、哺乳動物細胞の発現ベクター及び宿主を含む。しかしながら、下記に詳細に検討するように分子を原核性発現系にて産生させることもできる。通常は、宿主細胞は、単一ベクターまたは独立した複数ベクター上の、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの両者並びに異種多量体を形成するために必要な他のポリペプチドをコードするDNAにより形質転換される。しかしながら、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを独立した発現系にて発現させ、外発現されたポリペプチドをインビトロにて結合させることも可能である。

異種多量体をコードする核酸（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）は、更なるクローニング（DNAの増幅）または発現の為に複製可能なベクターに挿入される。多くのベクターが利用可能である。ベクターの成分は、限定されるものではないが、次の1種以上を含む：シグナル配列、複製のオリジン、1種以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終止配列。

異種多量体のポリペプチドは、シグナル配列または成熟蛋白質若しくはポリペプチドのN-末端に特異的な切断部位をもった他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして産生されうる。一般的には、シグナル配列はベクターの部品であるか、あるいはベクターに挿入されるDNAの一部であり得る。選択される異種シグナル配列は、好ましくは宿主細胞によって認識され、処理される（即ち、シグナルペプチドにより切断される）ものである。原核性宿主細胞については、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、lpp、または熱安定性エンテロトキシンIIリーダーからなる群から選択される原核性シグナル配列に置換され得る。酵母分泌については、天然のシグナル配列は、例えば、酵母インペルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（サッカロマイセス及びクルイベロマイセス (*Kluyveromyces*) α -因子リーダー、後者は1991年4月23日発行の米国特許第5,010,182号に記述される）、または酸ホスファターゼリーダー、C-アルピカンスグルコアミラーゼリーダー（1990年4月4日発行のEP 362,179）、または1990年11月15日発行のWO 90/13646に記載のシグナル等によって置換されてもよい。哺乳動物細胞発現において、天然のシグナル配列（例えば、通常インビボにおいてヒト細胞からのこれらの分子の分泌を支配する抗体またはアドヘシンの先行配列）は、十分なものであるが、例えば単純ヘルペスgDシグナル等のウイルス性分泌リーダーに加えて他の哺乳動物シグナル配列も好適であり得る。この様な前駆体領域のDNAは、異種多量体を形成するポリペプチドをコードするDNAに対して読み枠内で連結される。

発現及びクローニングベクターの両者は、1種以上の選択される宿主細胞内でベクターが複製することを可能とする核酸配列を含む。一般に、クローニングベクターにおいては、この配列は宿主染色体DNAとは独立して、ベクターが複製することを可能とするもので、複製のオリジンまたは自己複製配列を含む。この様な配列は、種々の細菌、酵母及びウ

10

20

30

40

50

ウイルスについて周知である。プラスミド p B R 3 2 2 由来の複製オリジンは、殆どのグラム陰性細菌に適しており、2 μ プラスミドオリジンは、酵母に適しており、また種々のウイルスオリジン (S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V または B P V) は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般に、複製部品のオリジンは、哺乳動物発現ベクターについては必要はない (S V 4 0 オリジンは、それが早期プロモーターを含むために典型的に使用される)。

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まなければならない。典型的な選択遺伝子は、(a) 例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートまたはテトラサイクリン等の抗生物質または他のトキシシンにたいする耐性を付与する、(b) 栄養要求性欠損を補う、または (c) 例えば、バチルスの D -アラニンラセマーゼをコードする遺伝子のように複合培地から得られない重要な栄養素を供給する蛋白質をコードする。選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を阻止する薬剤を使用する。異種遺伝子により成功裏に形質転換されたそれらの細胞は、薬剤耐性を与える蛋白質を産生し、従って、選択培養において生き延びる。このような優勢選択の例は、ネオマイシン (Southern等、J.Molec.Appl.Genet. 1:327[1982])、マイコフェノール酸 (Mulligan等、Science 209:1422[1980]) またはハイグロマイシン (Sugden等、Mol.Cell.Biol. 5:410-413[1985]) 等の薬剤を使用する。上記の3種の例は、適切な薬剤、G 4 1 8 またはネオマイシン (ゲネチシン)、x g p t (マイコフェノール酸) またはハイグロマイシンに対する耐性を与えるために、それぞれ真核性の制御下において細菌性遺伝子を使用される。

哺乳動物細胞についての適当な選択マーカーの別の例は、D H F R またはチミジンキナーゼ等の異種多量体核酸を取り上げる為に有能な細胞の同定を可能とするものである。哺乳動物の形質転換は、マーカーを取り上げることによって形質転換体が生存するために固有に適合する選択圧のもとにおかれる。選択圧は、媒質中の選択剤濃度が順次変化させられ、これによって選択遺伝子及び異種多量体をコードする D N A の両者の増幅が導かれるような条件下で、形質転換体を培養することにより負荷される。異種多量体の増大された量は、増幅された D N A から合成される。増幅可能な遺伝子の別の例は、メタロチオネイン I 及び II、好ましくは霊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を含む。

例えば、D H F R 選択遺伝子により形質転換された細胞は、最初に全ての形質転換体を D H F R 拮抗剤であるメトトレキセート (M t x) を含む培養培地中で培養することにより同定される。天然型 D H F R を採用した場合、適切な宿主細胞は、Urlaub and Chasin, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980)に記述されているように調製され、増殖された D H F R 活性を欠失するモルモットの卵巣 (C H O) 細胞である。次いで、形質転換された細胞は増大する濃度のメトトレキセートに曝される。これは、D H F R 遺伝子の複数コピーの合成を導き、付随して異種多量体の部分をコードする D N A 等の発現ベクターを含む他の D N A の複数コピーを合成する。この増幅技術は、例えば、M t x に対して高度に耐性である変異 D H F R 遺伝子が採用された場合に、内因性 D H F R の存在に関わらず例えば a T C C N o . C C L 6 1 C H O - K 1 等の任意の適当な宿主に利用できる (E P 117,060)。

別法として、異種多量体、天然型 D H F R 蛋白質、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) 等の他の選択可能なマーカーをコードする D N A 配列により形質転換または共形質転換された宿主細胞 (特に内因性 D H F R を含む天然型宿主) は、カナマイシン、ネオマイシン、または G 4 1 8 等のアミノグリコシド抗生物質等の選択マーカー様の選択試薬を含む培地中で細胞培養することにより選択され得る。米国特許第 4,965,199号参照。

酵母において使用するための適当な選択遺伝子は、酵母プラスミド Y R p 7 に存在する t r p 1 遺伝子である (Stinchcob等、Nature 282:39[1979];Kingsman等、Gene 7:141[1979];またはTschemper等、Gene 10:157[1980])。t r p 1 遺伝子は、例えば、A T C C N o . 44076または P E P 4 - 1 等のトリプトファン中での生育能力を欠く酵母の変異株に

10

20

30

40

50

対して選択マーカーを与える (Jones, Genetics 85:12[1977])。酵母宿主細胞ゲノム中の *trp1* 損傷の存在は、トリプトファンの不在下での生育による形質転換の検出のための有効な環境を与える。同様に、*Leu2* 欠損酵母株 (ATCC 20,622 または 38,626) は、*Leu2* 遺伝子を保有する既知のプラスミドにより補完される。

更に、1.6 μ m 環状プラスミド pKD1 から誘導されるベクターは、クルイベロマイセス酵母の形質転換のために使用され得る。Bianchi 等、Curr. Genet. 12:185 (1987)。更に最近には、組換え子牛キモシンの大規模産生のための発現系が、*K. lactis* (K. *lactis*) について報告されている。Van den Berg, Bio/Technology 8:135 (1990)。クルイベロマイセスの工業用株による成熟組換えヒト血清アルブミンの分泌用の安定な複数コピー発現ベクターも開示されている。Fleer 等、Bio/Technology 9:968-975 (1991)。

発現及びクローニングベクターは、通常は宿主生物に認識され、異種多量体核酸に機能的に連結されるプロモーターを含む。種々の可能性ある宿主細胞に認識される多くのプロモーターが周知である。これらのプロモーターは、制限酵素消化により供給源 DNA からプロモーターを取り出し、単離されたプロモーター配列をベクター中に挿入することにより、異種多量体コード DNA に機能的に連結される。

原核性宿主と共に使用するために適したプロモーターは、 β -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 (Chang 等、Nature 275:615 [1978]; 及び Goeddel 等、Nature 281:544 [1979])、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (*trp*) プロモーター系 (Goeddel, Nucleic Acids Res. 8:4057 [1980] 及び EP 36,776) 並びに *tac* プロモーター等のハイブリッドプロモーター (deBoer 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 [1983]) を含む。しかしながら、他の既知の細菌性プロモーターも適している。それらのヌクレオチド配列は文献に記載されており、これによって熟練した研究者が、いずれかの必要とされる制限部位を供給する為のリンカーまたはアダプターを使用して、それらを異種多量体をコードする DNA (Siebenlist 等、Cell 20:269 [1980]) に機能的に連結することを可能としている。細菌系において使用されるプロモーターは、異種多量体をコードする DNA に機能的に連結されたシャイン-ダルガルノ (S. D.) 配列も含むであろう。

プロモーター配列は、真核細胞系についても知られている。実質的には、全ての真核性遺伝子は、転写開始部位から約 25~30 塩基上流に位置する AT 富有領域を有している。多くの遺伝子の転写開始から 70~80 塩基上流に見い出される他の配列は、X が任意のヌクレオチドであり得る CXCAAT 領域である。殆どの真核性遺伝子の 3' 末端は、コード配列の 3' 末端にポリ A テイルを付加するシグナルであり得る AATAA 配列である。これらの配列の全ては、真核性発現ベクターに適切に挿入される。

酵母宿主により使用するための適当なプロモーター配列の例は、3-ホスホグリセレートキナーゼのプロモーター (Hitzeman 等、J. Biol. Chem. 255:2073 [1980]) または他の解糖酵素 (Hess 等、J. Adv. Enzyme Reg. 7:149 [1968]; 及び Holland, Biochemistry 17:4900 [1978])、例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセレートミューターゼ、ピルベートキナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼ等のプロモーターを含む。

育成条件により制御される転写という付加的優位点を有する誘導可能なプロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソサイトクローム C、酸ホスファターゼ、窒素代謝に伴う分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、並びにマルトース及びガラクトース利用に関与する酵素のプロモーター領域である。酵母発現において使用するために好適なベクター及びプロモーターは、Hitzeman 等、EP 73,657A に更に記述されている。酵母エンハンサーも、酵母プロモーターと共に有利に使用される。

哺乳動物宿主細胞中でのベクターからの異種多量体転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス (1989 年 7 月 5 日発行の UK 2,211,504)、アデノウイルス (アデノウイルス 2 等)、ウシパピローマウイルス、トリサルコーマウイルス、サイトメガロウイ

10

20

30

40

50

ルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及び最も好ましくはサルウイルス40 (SV40)等のウイルスゲノム由来、例えばアクチンプロモーターまたはイムノグロブリンプロモーター等の異種哺乳動物プロモーター由来、または熱ショックプロモーター由来にて得られるプロモーターによって制御される。

SV40ウイルスの初期または後期プロモーターは、SV40ウイルス性複製オリジンも含むSV40制限断片として都合良く得られる。Fiers等、Nature 273:113(1978);Mulligan and Berg,Science 209:1422-1427(1980);Pavlikis等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:7398-7402(1981)。ヒトサイトメガロウイルスの即時型プロモーターは、HindIII制限断片として都合良く得られる。Greenaway等、Gene 18:355-360(1982)。ベクターとしてウシパピローマウイルスを使用する哺乳動物宿主におけるDNA発現系は、米国特許第4,419,446号に開示されている。この系の修飾は、米国特許第4,601,978号に記述されている。サル細胞における免疫インターフェロンをコードするcDNAの発現について、Gray等、Nature 295:503-508(1982);単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下におけるマウス細胞中でのヒトβ-インターフェロンcDNAの発現について、Reyes等、Nature 297:598-601(1982);培養されたマウス及びウサギ細胞中でのヒトインターフェロンβ1遺伝子の発現について、Canaani and Berg,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79:5166-5170(1982);ラウスサルコーマウイルスの長末端反復をプロモーターとして使用するCV-1サル腎細胞、ニワトリ胚線維芽細胞、モルモット卵巣細胞、HeLa細胞及びマウスNIH-3T3細胞における細菌性CAT配列の発現について、Gorman等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79:6777-6781(1982)も参照。

より高度な真核性細胞による異種多量体をコードする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りしばしば増大される。エンハンサーは、相対的には配向及び位置に依存せず、転写単位の5' (Laimins等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:993[1981])及び3' (Lusky等、Mol.Cell Bio. 3:1108[1983])、イントロン内 (Banerji等、Cell 33:729[1983])並びにコード配列それ自体内部 (Osborne等、Mol.Cell Bio. 4:1293[1984])に見い出されている。今日では多くのエンハンサー配列が哺乳動物遺伝子から知られている (グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェト蛋白及びインシュリン)。しかしながら、典型的には真核性細胞ウイルス由来のエンハンサーが使用されるであろう。例としては、複製オリジンの後期側にあるSV40エンハンサー (bp100-270)、サイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、複製オリジンの後期側に位置するポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーを含む。真核性プロモーターの活性化の増強要素については、Yaniv,Nature 297:17-18(1982)も参照。エンハンサーは、異種多量体コード配列の5'または3'位置においてベクター中にスプライスされ得るが、好ましくはプロモーターの5'部位に配置される。

真核性宿主細胞 (酵母、真菌、昆虫、動物、ヒト、または他の複細胞有機体由来の有核細胞)は、転写終了及びmRNAの安定化に必要な配列を含むであろう。この様な配列は、真核性またはウイルス性DNAまたはcDNAの5'及び場合により3'非翻訳領域から一般に入手可能である。これらの領域は、異種多量体をコードするmRNAの非翻訳部分においてポリアデニル化された断片として転写されるヌクレオチド部分を含む。

上記にあげた1種以上の部品を含む適当なベクターの構築は、標準的連結技術を使用する。単離されたプラスミドまたはDNA断片は、必要とされるプラスミドを生成させるために要求される形態に切断され、つなぎ合わされ、再度連結される。

構築されたプラスミドにおいて正しい配列を確認するための分析には、連結混合物が、E.coli K12 294株 (ATCC 31,446)を形質転換するために使用され、成功した形質転換体が適当な場合にアンピシリンまたはテトラサイクリン耐性により選択される。形質転換体からのプラスミドが調製され、制限エンドヌクレアーゼにより分析され、及び/またはMessing等、Nucleic Acids Res. 9:309(1981)の方法、若しくはMaxam等、Methods in Enzymology 65:499(1980)の方法により配列決定される。

この発明の実施において特に有用なものは、異種多量体をコードするDNAの哺乳動物細胞における一時的発現を与える発現ベクターである。一般に、一時的発現は、宿主細胞に

10

20

30

40

50

において効率的複製を可能とする発現ベクターの使用を含み、如かして宿主細胞が発現ベクターの多数のコピーを蓄積し、次いで該発現ベクターによりコードされる所望のポリペプチドを高水準で合成する。Sambrook等、前出文献pp.16.17-16.22。好適な発現ベクター及び宿主細胞を有する一時的発現系は、クローン化されたDNAによりコードされるポリペプチドの都合良い陽性の同定を可能とし、並びに所望の結合特異性／アフィニティを有する異種多量体の迅速なスクリーニングを可能とする。

組換え脊椎動物細胞における異種多量体の合成に適用するために好適な他の方法、ベクター、及び宿主細胞は、Gething等、Nature 293:620-625(1981);Mantei等、Nature 281:40-46(1979);Levinson等、EP 117,060;及びEP 117,058に記述されている。異種多量体の哺乳動物細胞培養物発現のために特に有用なプラスミドは、p R K 5 (EP 307,247) または p S V I 6 B (1991年6月13日発行のPCT発行番号WO91/08291) である。

異種多量体発現のための宿主細胞の選択は、主に発現ベクターに依存する。他の考慮点は、必要とされる蛋白量である。ミリigramの量は一時的トランスフェクションによりしばしば産生可能である。例えば、アデノウイルスE I A -形質転換293ヒト胚腎細胞系は、リン酸カルシウム法の修飾によるp R K 5 -ベースのベクターを用いて一時的にトランスフェクトされ得、効率的な異種多量体発現を許容する。C D M 8 -ベースのベクターは、D E A E -デキストラン法によってC O S細胞をトランスフェクトするために使用され得る(Aruffo等、Cell 61:1303-1313[1990];及びZettmeissl等、DNA Cell Biol.(US) 9:347-353[1990])。大量の蛋白が望まれる場合に、イムノアドヘシンは宿主細胞系の安定したトランスフェクションの後に発現されうる。例えば、p R K 5 -ベースのベクターは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(D H F R)をコードし、G 4 1 8に対する耐性を付与する付加的プラスミドの存在下で、モルモット卵巣(C H O)細胞に導入されうる。G 4 1 8耐性のクローンは、培養において選択され得る。これらのクローンは、増大する濃度のD H F R阻害剤メトトレキセートの存在下で培養され、D H F R及び異種多量体配列をコードする遺伝子コピーの数が、共に増幅されるクローンが選択される。イムノアドヘシンがN -末端に疎水性のリーダー配列を含む場合には、それはトランスフェクトされた細胞により切断され、分泌されるであろう。より複雑な構造をもったイムノアドヘシンの発現は、固有に適合させた宿主細胞が必要となろう。例えば、軽鎖またはJ鎖等の部品は、ある種のエロイマまたはハイブリドーマ宿主細胞により与えられるであろう(Gascoigne等、前出文献;及びMartin等、J.Virol. 67:3561-3568[1993])。

ここにおいてベクターをクローン化し、発現する為の他の適当な宿主細胞は、上述した原核細胞、酵母、または他のより高度な真核細胞である。この目的に適当な原核細胞は、グラム陰性またはグラム陽性生物等の新生細菌、例えば、腸内細菌科の、例えば、E. コリ等のエシェリヒア、エンテロバクター、エルウィナ、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ・チフィムリウム等のサルモネラ、セラチア・マルセスカンス等のセラチア、及びシゲラ、並びにB. スプチリス及びB. リヒェニホルミス等のバチルス(例えば、1989年4月12日発行のD D 2 6 6, 7 1 0に開示されるB. リヒェニホルミス4 1 P)、P. アエルギノザ等のシュードモナス、並びにストレプトマイセスを含む。一つの好ましいE. コリクローニング宿主は、E. c o l i 2 9 4 (A T C C 3 1, 4 4 6) であるが、E. c o l i B、E. c o l i X 1 7 7 6 (A T C C 3 1, 5 3 7) 及びE. c o l i W 3 1 1 0 (A T C C 2 7, 3 2 5) 等の他の株も好適である。これらの例は例示的であって、限定的なものではない。W 3 1 1 0株は、組換えDNA生成物発酵のための一般的な宿主株であって、特に好ましい宿主または親宿主である。好ましくは宿主細胞は、最小限の原核性酵素を分泌するものであるべきである。例えば、W 3 1 1 0株は、E. c o l i W 3 1 1 0 2 7 C 7株の例があるように蛋白質をコードする遺伝子において遺伝的変異を生じるように修飾されうる。2 7 C 7の完全な遺伝子形は、tonAΔ tpr3 phoA Δ E15 Δ (argF-lac)169 ompTΔ degP41karfである。2 7 C 7株は、アメリカンタイプカルチャーコレクションにA T C C No. 5 5, 2 4 4として、1991年10月30日付で寄託されている。別法として、1990年8月7日発行の米国特許第4,946,783号に開示された変異ペリプラズムプロテアーゼを有するE. c o l i株が採用されうる。別法

10

20

30

40

50

として、例えば、PCRまたは他の核酸ポリメラーゼ反応のクローニング方法も好適である。

原核生物に加えて、糸状菌または酵母等の真核性微生物も、異種多量体コードベクターの為のクローニング及び発現宿主である。サッカロマイセス・セレビシアまたは通常のパン酵母は、下等真核性宿主微生物の内では最も普通に使用されている。しかしながら、シゾサッカロマイセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach and Nurse, Nature 290: 140[1981]; 1985年5月2日発行のEP139,383); クルイベロマイセス宿主(米国特許第4,943,529号; Fleer等、前出文献) 例えばK. ラクティス(*K.lactis*) [MW 98-8C, CBS 683, CBS 4574; Louvencourt等、J.Bacteriol. 737(1983)]、K. フラギリス(*K.fragilis*) (ATCC 12,424)、K. ブルガリカス(*K.bulgaricus*) (ATCC 16,045)、K. ウィケラミ(*K.wickeramii*) (ATCC 24,178)、K. ワルチ(*K.walti*) (ATCC 56,500)、K. ドロソフィラルム(*K.drosophilum*) (ATCC 36,906; Van den Berg等、前出文献)、K. サーモトレランス(*K.thermotolerans*)、及びK. マルキシアヌス(*K.marxianus*)等; ヤロウィア(*Yarrowia*) [EP 402,226]; ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sreekrishna等、J.Basic Microbiol. 28:265-278[1988]); カンジダ; トリコダルマ・リーシア(*Trichoderma reesia*) [EP 244,234]; ニューロスポラ・クラッサ(*Neurospora crassa*) (Case等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76:5259-5263[1979]); シュワンニオマイセス属(*Schwanniomyces*) 例えばシュワンニオマイセス・オクシデンタリス(1990年10月31日発行のEP 394,538); 並びに糸状菌類、例えば、ニューロスポラ(*Neurospora*)、ペニシリウム(*Penicillium*)、トリポクラジウム(*Tolypocladium*) (1991年1月10日発行のWO 91/000357)、及びアスペルギルス宿主、例えば、A. ニヂュランス(*A.nidulans*) (Ballance等、Biochem.Biophys.Res.Commun. 112:284-289[1983]; Tilburn等、Gene 26:205-221[1983]; Yelton等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:1470-1474[1984])及びA. ニジェール(*A.niger*) (Kelly and Hyne, EMBO J. 4:475-479[1985])等の多くの他の属、種、及び株が、普通に入手可能であり、また有用である。

グリコシル化異種多量体の発現に好適な宿主細胞は、複細胞的微生物から誘導される。そのような宿主細胞は、複雑な処理及びグリコシル化活性が可能である。原則的には、任意のより高度な真核性細胞培養物が、脊椎動物であるか無脊椎動物であるかに関わらず使用可能である。無脊椎動物細胞の例は、植物及び昆虫を含む。多くのバキュロウイルス株及び変異体並びに対応する許容される昆虫宿主細胞、例えば、スポドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*) (イモムシ)、アエデス・アエギプチ(*Aedes aegypti*) (蚊)、アエデス・アルボピクタス(*Aedes albopictus*) (蚊)、ドロソフィラ・メラノガステル(*Drosophila melanogaster*) (ミバエ)、及びボンビックス・モリ(*Bombyx mori*)が同定されている。例えば、Luckow等、Bio/Technology 6:47-55(1988); Miller等、Genetic Engineering, Selow等編、Vol.8(Plenum Publishing, 1986) pp.277-279; 及びMaeda等、Nature 315:592-594(1985)参照。トランスフェクションのための種々のウイルス株、例えばアウトグラフィ・カルフォルニカ(*Autographa californicas*) NPVのL-1変異体及びボンビックス・モリNPVのBm-5株が、公的に入手可能であり、この様なウイルスは、本発明に従って、特にスポドプテラ・フルギペルダ細胞のトランスフェクションのためにウイルスとして使用され得る。

綿、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト及びタバコ等の植物細胞培養物が宿主として使用され得る。典型的には、植物細胞は、予め異種多量体DNAを含むように操作された細菌、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)のある種の株と共に培養することによってトランスフェクトされる。A. ツメファシエンスとの植物細胞培養物の培養の間に、異種多量体をコードするDNAは植物細胞宿主に移動されてトランスフェクトされ、適切な条件下では異種多量体DNAを発現するであろう。更に、植物細胞に適合する制御及びシグナル配列、例えば、ノバリンシンターゼプロモーター、及びポリアデニル化シグナル配列等が入手可能である。Depicker等、J.Mol.Appl.Gen. 1:561(1982)。加えて、T-DNA 780の上流領域から単離されたDNA

10

20

30

40

50

断片は、組換えDNA含有植物組織において、植物発現可能な遺伝子の転写水準を活性化または増大することが可能である。1989年6月21日発行のEP 321,196。

好ましい宿主は、脊椎動物細胞であり、培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖は近年では常法になっている（Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson編 [1973]）。有用な哺乳動物宿主細胞系の例は、SV40（COS-7, ATCC CRL 1651）により形質転換されたサル腎臓CV1；ヒト胚腎臓系（293または懸濁培養における生育についてサブクローン化された293細胞、Graham等、J.Gen.Virol. 36:59[1977]）；仔ハムスター腎細胞（BHK, ATCC CCL 10）；モルモット卵巣細胞／－DHFR（CHO, Urlaub and Chasin, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216[1980]）；マウスセルトリー細胞（TM4, Mather, Biol.Reprod. 23:243-251[1980]）；サル腎臓細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76, ATCC CRL-1587）；ヒト頸部悪性腫瘍細胞（HeLa, ATCC CCL 2）；イヌ腎臓細胞（MDCK, ATCC CCL 34）；パッファローラット肝臓細胞（BRL 3A, ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138, ATCC CCL 75）；ヒト肝臓細胞（Hep G2, HB 8065）；マウス乳癌（MMT 060562, ATCC CCL 51）；TRI細胞（Mather等、Annals N.Y.Acad.Sci. 383:44-68[1982]）；MRC 5細胞；FS 4細胞；及びヒトヘパトーマ系（Hep G2）である。

10

宿主細胞は、本発明の上記発現またはクローニングベクターによりトランスフェクトされ、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適切に修正した慣用の栄養培地中で培養される。使用される宿主細胞に依存して、トランスフェクションはそのような細胞に適切な標準的技術を使用して行われる。Sambrook等の前出文献の1.82節に記述されるように塩化カルシウムを使用するカルシウム処理、またはエレクトロポレーションが、原核細胞または実質的に細胞壁障壁を有する他の細胞について一般に使用される。アグロバクテリウム・ツメファシエンスによる感染は、Shaw等、Gene 23:315(1983)及び1989年6月29日発行のW0 89/05859に記述されるように、ある種の植物細胞の形質転換に使用される。更に、植物は、1991年1月10日発行のW0 91/00358に記述される様に、超音波処理を使用してトランスフェクトされてもよい。

20

細胞壁を持たない哺乳動物細胞については、Graham and van der Eb, Virology 52:456-457(1978)のリン酸カルシウム沈殿法が好ましい。哺乳動物細胞宿主系の形質転換の一般的側面は、1983年8月16日発行の米国特許第4,399,216号においてAxxelにより記述されている。酵母への形質転換は、典型的には、Van Solingen等、J.Bact. 139:946(1977)及びHsiao等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76:3829(1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞に導入する他の方法、例えば、核のマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、完全細胞との細菌プロトプラスト融合、またはポリブレン、ポリオルニチン等の多価陽イオンも使用され得る。哺乳動物細胞の形質転換のための種々の技術については、Keown等、Methods in Enzymology (1989)、Keown等、Methods in Enzymology 185:527-537(1990)、及びMansour等、Nature 336:348-352(1988)を参照。

30

本発明の異種多量体ポリペプチドの産生に使用される原核性細胞は、Sambrook等の前出文献に一般的に記述されているように、適当な培地において培養される。

40

本発明の異種多量体ポリペプチドの産生に使用される哺乳動物宿主細胞は、種々の培地中で培養されうる。商業的に入手可能な培地、例えば、Ham F10（Sigma）、最小必須培地（[MEM]、Sigma）、RPMI-1640（Sigma）、ダルベッコの修飾イーグル培地（[DMEM]、Sigma）は、宿主細胞の培養に好適である。加えて、それらの開示の全てをここに参考として取り入れる、Ham and Wallace, Meth.Enz. 58:44(1979)；Barnes and Sato, Anal.Biochem. 102:255(1980)；米国特許第4,767,704号；第4,657,866号；第4,927,762号；第4,560,655号；W0 90/03430；W0 87/00195；米国再審査特許第30,985号または米国特許第5,122,469号に記述されているいずれの培地も宿主細胞の培養培地として使用され得る。これらの培地のいずれも必要に応じて、ホルモン類及

50

び／又は他の成長因子（インシュリン、トランスフェリン、または上皮成長因子等）、塩類（塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩等）、緩衝剤（H E P E S等）、ヌクレオシド（アデノシン及びチミジン等）、抗生物質（ゲンタマイシンTM剤等）、微量元素（通常、マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物として定義される）及びグルコースまたは同等なエネルギー源等が補充されてもよい。他のいずれの必要な補充剤も、当業者に既知の適切な濃度で含まれてもよい。温度、pH等の培養条件は、発現に選択された宿主細胞について以前に使用された条件であり、また当業者には明らかであろう。

哺乳動物細胞培養物の生産性を最大にするための原則、プロトコール、及び実際の技術は、一般的には Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler 編、IRL Press, 1991に見出し得る。

10

この開示において引用される宿主細胞は、培養物中の細胞、並びに宿主動物内にある細胞を包含する。

4. 異種多量体の回収

好ましくは異種多量体は、一般に分泌されたポリペプチドとして培養培地から回収されるが、それが分泌シグナルを持たずに直接に産生された場合には宿主細胞溶解物から回収されてもよい。異種多量体が膜結合性である場合には、適当な洗浄剤（例えば、トライトン-X 100）を使用して膜から開放されうる。

異種多量体がヒト由来のもの以外の組換え細胞において産生された場合には、ヒト由来の蛋白質またはポリペプチドを全く含有しない。しかしながら、異種多量体について実質的に均質な調製物を得るために、該異種多量体を組み換え細胞蛋白質またはポリペプチドから精製する必要がある。最初の工程として、培養培地または溶解物が、粒状の細胞破片を除くために通常遠心分離される。

20

抗体定常領域を有する異種二量体は、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィーによって都合良く精製され、ここでアフィニティクロマトグラフィーは、好ましい精製技術である。異種多量体が C_H3 領域を含む場合には、Bakerbond ABXTM レジン (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) が、精製のために有用である。蛋白質精製のための他の技術、例えば、イオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相 HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンセファロースでのクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオンレジンでのクロマトグラフィー（ポリアスパラギン酸カラム等）、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等も、回収されるポリペプチドに依存して利用可能である。アフィニティリガンドとしての蛋白質 A の適性は、キメラにおいて使用されるイムノグロブリン Fc 領域の種及びアイソタイプに依存する。蛋白質 A は、ヒト γ 1、 γ 2、または γ 4 重鎖に基づくイムノアドヘシンの精製に使用されうる (Lindmark 等、J. Immunol. Meth. 62:1-13[1983])。蛋白質 G は、全てのマウスアイソタイプ及びヒト γ 3 について推奨される (Guss 等、EMBO J. 5:1567-1575-[1986])。アフィニティリガンドが結合される担体は、多くの場合アガロースであるが、他の担体も利用可能である。調整多孔質ガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼン等の機械的に安定した担体は、アガロースで達成されるよりも速い流速及び短い処理時間を可能とする。イムノアドヘシンの蛋白質 A または G アフィニティカラムに対する結合条件は、Fc 領域の性質、即ちその種及びアイソタイプに全く依存する。一般に適切なリガンドが選択された場合に、条件設定されない培養液からの直接的な効率の結合が起こる。イムノアドヘシンの顕著な一つの特徴は、ヒト γ 1 分子について、蛋白質 A の結合容量が同じ Fc 型の抗体に比べてやや減少することである。結合されたイムノアドヘシンは、酸性 pH（3.0 またはそれ以上）において、あるいは穏和なカオトロピズム塩を含む中性 pH の緩衝溶液のいずれかにおいて効率的に溶出される。このアフィニティクロマトグラフィー工程は、> 95% の純度の異種二量体調製物を生じうる。

30

40

5. 異種多量体の使用

異種多量体において、多くの治療的応用が考慮される。例えば、該異種多量体は、再指向

50

細胞毒性（例えば腫瘍細胞の殺滅のため）、ワクチンアジュバントとして、イムノトキシンを腫瘍細胞に運ぶため、標的部位（例えば腫瘍）において酵素活性化プロドラッグを変換するため、感染症の治療のため、または免疫複合体を細胞表面レセプタに対して標的とするため等）に使用され得る。

異種多量体の治療用剤型は、所望の純度を有する異種多量体を、選択され得る生理学的に許容される担体、賦形剤、または安定化剤と共に混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で貯蔵のために調製され得る（Remington's Pharmaceutical Science, 16版, 0sol, A.編 [1980]）。許容される担体、賦形剤または安定化剤は、採用される投与量及び濃度において受容者に対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩及び多の有機酸等の緩衝剤；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたはイムノグロブリン等の蛋白質；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、アルギニンまたはリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む単糖類、二糖類及び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；マンニトールまたはソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び／またはトウイーン、プルロニクスまた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。

異種多量体は、例えばコアセルベート技術によって、または界面ポリマー化によって調製されるマイクロカプセル（例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ- [メチルメタクリレート] マイクロカプセル）中、コロイド状薬剤分配系（例えば、リボソーム、アルブミン微小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）、またはマクロエマルジョン等に捕捉されてもよい。この技術は前出のRemington's Pharmaceutical Sciencesに開示されている。

インビボ投与のために使用される異種多量体は、無菌的でなければならない。これは、凍結乾燥及び再構成に先行するかまたは引き続いて、無菌フィルター膜を通しての濾過によって容易に行われる。異種多量体は、普通には凍結乾燥形態または溶液において保存されるであろう。

治療用異種多量体組成物は、無菌的口部を有する容器、例えば、静脈内溶液用バッグ、または皮下注射針によりさし込めるストッパーを有するバイアル等に入れられる。

異種多量体投与の経路は、既知の方法に従って、静脈内、腹腔内、大脳内、筋内、眼内、動脈内、または病巣部内経路による注射または輸液、あるいは下記のような持続放出系による。異種多量体は、輸液により連続的に、または大量注射により投与される。

持続放出調製物の好適な例は、蛋白質を含む固体疎水性ポリマーの半透過性担体を含み、該担体は、例えばフィルムまたはマイクロカプセル等の成型物の形態である。持続放出担体の例は、ポリエステル、ハイドロゲル [例えば、Langer等、J.Biomed.Master.Res.15:167-277(1980)及びLanger, Chem.Tech.12:98-105(1982)に記述されるポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール)]、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号、EP 58,481）、L-グルタミン酸及びガンマエチル-L-グルタメートのコポリマー（Sidman等、Biopolymers 22:547-556[1983]）、非一分解性エチレン-ビニルアセテート（Langer等、前出文献）、Lupron DepotTM等の分解性乳酸-グリコール酸コポリマー（分解性乳酸-グリコール酸コポリマー及びロイプロライドアセテートからなる注射可能な微小球）、並びにポリ-D-(1-3-ヒドロキシ酪酸（EP 133,988）を含む。

エチレン-ビニルアセテート及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは、100日以上に亘って分子の放出を可能とするが、ある種のハイドロゲルは、蛋白質をより短期間で放出する。カプセル化された蛋白質が長期間体内に残った場合には、それらが37℃において水分に曝される結果として変性または凝集を起し得て、生物学的活性の喪失及び可能性をもった免疫原性への変化を生じうる。関与する機構に依存して、蛋白質安定化の合理的な戦略が考察されうる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を介しての分子間S-S結合形成であることが分かった場合には、安定化は、スルヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含量の調製、適切な添加剤の使用、特異的なポリマー担体組成物

10

20

30

40

50

の開発等により達成されうる。

持続性放出異種多量体組成物は、リポソーム的に捕捉された異種多量体も含む。異種多量体を含むリポソームは、それ自体既知の方法により調製される：DE 3,218,121;Epstein等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030-4034(1980);EP 52,322;EP 36,676;EP 88,046;EP 143,949;EP142,641;日本出願83-118008;米国特許第4,485,045及び4,544,545号；並びにEP 102,324。通常、リポソームは、微小な（約200-800オングストローム）単層型であって、その脂質含量は、約30%コレステロール以上であるが、至適な異種多量体療法のために選択された比率が調整されうる。

治療的に採用される異種多量体の有効量は、例えば、治療対象、投与経路、及び患者の症状等に依存するであろう。従って、治療医は、投与量の力価を測定し、至適治療効果を得るために必要とされる投与経路を修正する必要がある。典型的な1日投与量は、上述の因子に依存して、約1 μ g/kg から10 mg/kg またはそれ以上までの範囲に亘るであろう。典型的には臨床医は、投与量が所望の効果を達成するに至るまで異種多量体を投与するであろう。この治療の進行は、慣用のアッセイ法にて容易に監視されうる。

ここに記述される異種多量体は、酵素イムノアッセイにも使用されうる。これを行うためには、異種多量体の一方のアームは、結合が酵素阻害を生じないように酵素上の特定のエピトープに結合するよう設計され、異種多量体の他方のアームが所望の部位において高い酵素密度が保証されるように固定化担体に結合するよう設計されうる。この様な診断用異種多量体の例は、IgGと共にフェリチンに対する特異性を有するもの、及び、西洋ワサビパーオキシダーゼ（HRP）と共に例えばホルモンに対して結合特異性を有するものを

含む。

異種多量体は、2部位イムノアッセイにおいて使用するために設計されうる。例えば、2種の二重特異的異種多量体は、分析対象蛋白質の2つの異なるエピトープに結合するよう生成され、一方の異種多量体は不溶性担体に対する複合体に結合し、他方は指示酵素に結合する。

異種多量体は、癌等の種々の疾患のインビトロまたはインビボ免疫診断に使用され得る。この診断用使用を容易にするために、異種多量体の一方にアームは、腫瘍関連抗原に結合するに、また他方のアームは検出可能なマーカー（例えば放射性核種を結合するキレート化剤）に結合するよう設計され得る。例えば、腫瘍関連抗原CEAに加えて二価ハプテンに対して特異性を有する異種多量体は、直腸及び甲状腺悪性腫瘍の造影に使用され得る。

異種多量体について、他の非治療的、診断用途は、熟練した実務家には明らかであろう。診断適応用について、異種多量体の少なくとも一方のアームは、典型的には直接または間接的に検出可能な残基により標識されるであろう。検出可能な残基は、直接または間接的に検出可能なシグナルを生成しうるものであり得る。例えば、検出可能な残基は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S または ^{125}I 等の放射性同位体；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミンまたはルシフェリン等の蛍光性または化学発光性化合物；またはアルカリホスファターゼ、ペーターガラクトシダーゼ若しくは西洋ワサビパーオキシダーゼ（HRP）等の酵素であり得る。

異種多量体を別個に検出可能な残基に接合するためにはこの分野で既知のいずれかの方法が使用でき、例えば、Hunter等、Nature 144:945(1962);David等、Biochemistry 13:1014 (1974);Pain等、J.Immunol.Meth.40:219(1981)及びNygren,J.Histochem.and Cytochem.30:407(1982)に記述される方法が含まれる。

本発明の異種多量体は、競合結合アッセイ、直接または間接サンドイッチアッセイ、免疫沈降アッセイ等の任意の既知のアッセイ方法において使用されうる。Zola,Monoclonal Antibodies:A Manual of Technique,pp.147-158(CRC Press,Inc.,1987)

競合結合アッセイは、限定された量の異種多量体との結合において、試験試料対象物と競合する標識標準の能力に基づく。試験試料中の分析対象物の量は、異種多量体に結合された標準の量に逆比例する。供給される標準の量の決定を容易にするために、異種多量体は一般に競合の前または後に不溶化され、如かして異種多量体に結合した標準及び分析対象物は、未結合のまま残る標準及び分析対象物から都合良く分離される。

10

20

30

40

50

異種多量体は、各々が検出されるべき試料の異なった免疫原性部分またはエピトープに結合可能である２種類の分子の使用を含むサンドイッチアッセイについて特に有用である。サンドイッチアッセイにおいては、試験試料分析対象物は、固体支持体に固定化された異種多量体の第１のアームにより結合され、その後第２のアームが分析対象物に結合し、如かして不溶性の３部分接合体を形成する。米国特許第4,376,110号参照。異種多量体の第２のアームは、それ自体が検出可能な残基により標識されていてもよく（直接サンドイッチアッセイ）、あるいは検出可能な残基により標識された抗－イムノグロブリン抗体を使用して測定されてもよい（間接サンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの一つの型は、検出可能な残基が酵素であるELISAアッセイである。

下記は、本発明を実施するための特定の実施態様の例である。実施例は、例示のみを目的として提供されるもので、本発明の範囲を限定することを何ら意図するものではない。ここにおいて引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、前出または後述に関わらず、それらの全体をここに参考として取り入れる。

実施例

Chamow等、J.Immunol.153:4268(1994)によって既に記述されているヒト化抗体－CD3／CD4－IgGキメラ間のCH3境界部分を、回収される異種多量体の百分率が最大となるように操作した。突起を空隙に入れたもの（protuberance-into-cavity）と天然型のCH3変異体をヒト化抗－イムノアドヘシンキメラ（Ab／Ia）抗－CD3／CD4－IgGに形成を支配する能力について比較した。

如かして、ヒト化抗－CD3抗体重鎖のCH3領域及びCD4－IgGに、不一致のオリゴヌクレオチドを用いて部位指向的変異生成により変異を構築し（Kunkel等、Methods Enzymol.154:367[1987]及びP.Cater,Mutagenesis:a Practical Approach,M.J.Mcpherson編、IRL Press,Oxford,UK,pp.1-25[1991]）、ジデオキシヌクレオチド配列決定により確認した（Sanger等、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463[1977]）。下記表４及び図７参照。

表 4

最も好ましい変異体	
抗－CD3のCH3	CD4のCH3
T366Y	Y407T
T366W	Y497A
F405A	T394W
Y407T	T366Y
T366Y:F405A	T394W:Y407T
T366W:F405W	T394S:Y407A
F405W:Y407A	T366W:T394S

好ましい変異体	
F405W	T394S

残基T366は、相手のCH3領域の残基Y407の水素結合距離の範囲内にある。実際に、残基T366に対する主要な分子間接触は残基T407に対するもので、逆もまた同様である。突起を空隙に入れた対の一つは、一方のCH3領域のT366Y及び相手の領

域の Y 4 0 7 T の相互変異生成によりこれらの残基を逆にし、如かして境界部分の側鎖の体積を維持して生成された (図 9)。変異は、天然型残基、次いで Kabat 番号システム (Kabat 等、Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 5 版 [1991]) を使用して位置、次いで置換残基を一文字コードにより示される。複数の変異は、単一の変異構成要素をコロンで分離して示される。

抗-CD3 軽 (L) 及び重 (H) 鎖変異体をコードするファージミド (phagemid) (Shalaby 等、J. Exp. Med. 175:217 [1992] 及び Rodrigues 等、Int. J. Cancer (Suppl.) 7:45 [1992]) を、既に記述されているように (Chamow 等、J. Immunol. 153:4268 [1994])、CD4-IgG 変異体をコードするファージミド (Byrn 等、Nature 344:667 [1990]) と共にヒト胚腎臓細胞 293S に共トランスフェクトした。手法は図 8 に例示されている。トランスフェクトしたファージミド DNA の量を固定し、一方で異なる DNA の比率を、Ab/Ia キメラの収率が最大となるように変化させた。Ia:H 鎖:L 鎖入力 DNA (15 µg の全量) の比率 (質量で) は、次の通りに変化させた: 8:1:3; 7:1:3; 6:1:3; 5:1:3; 4:1:3; 3:1:3; 1:0:0; 0:1:3。

生成物を、SDS-PAGE 分析に先立ってスタフィロコッカス蛋白質 A (PorSep A, Bio Processing Ltd. UK) を用いてアフィニティ精製し、次いで走査 LASER 密度測定を行った (図 10A-10E)。L 鎖が制限的となることを避けるために、H 鎖 DNA を越える過剰の L 鎖を使用した。生成物の同定は、PVDf 膜 (Matsudaira, J. Biol. Chem. 262:10035 [1987]) 上のエレクトロブロットング及び引き続きアミノ末端配列決定により行った。

L 鎖の為のファージミドの、H 鎖及び天然型 C_H3 を取り込んだ Ia の為のファージミドと一緒に共トランスフェクションは、予想されたとおりの Ab/Ia キメラ、IgG 及び Ia 同種二量体生成物の混合物を生じた (Chamow 等、J. Immunol. 153:4268 [1994])。図 10A 参照。抗体 H 鎖及び L 鎖、または Ia をコードする入力 DNA の分画が大きいほど、回収される対応する同種二量体の分画が高くなる。Ia:H:L の 6:1:3 の入力 DNA 比は、54.5% の Ab/Ia キメラを、Ia 同種二量体 (22.5%) 及び IgG (23.0%) の同様な分画を伴って生じた。これらの比は、各鎖の等モル量の発現及び引き続き無作為の H 鎖の取り合わせから、分析方法に先入観を入れずに行った結果: 50% Ab/Ia キメラ、25% Ia 同種二量体及び 25% IgG とよく一致した。

天然型 C_H3 を含む鎖とは対照的に、抗-CD3 H 鎖及び CD4-IgG が、Y407T の空隙及び T366Y の突起変異をそれぞれ含む場合に Ab/Ia キメラが 92% を越える収率をもって回収された (図 10B)。Ab/Ia キメラの同様な収率が、H 鎖に突起、また Ia に空隙をもった相互変異を導入した場合にも得られた (図 10C)。両方の場合において、単量体は突起を含むが空隙を含まない鎖について観察された。何らか一つの理論に限定されるものではないが、T366Y 突起は、Y407T の空隙よりも同種二量体形成に対してより混乱性のものであると考えられる。Ab/Ia ハイブリッドの分画は、突起及び空隙の両者の大きさの増大 (Ab T366W、Ia Y407A) によっては顕著には変化しなかった。第 2 の突起及び空隙対 (Ab F405A、Ia T394W) は、Ia T394W 突起変異体の同種二量体形成の予想されない傾向を相殺するために、Ia 入力 DNA の小さい分画を使用して、71% Ab/Ia キメラを生じた (図 10D)。2 つの独立した突起を空隙に入れた変異対 (Ab T366Y: F405A、Ia T394W: Y407T) の組合せは、Ab T366Y、Ia Y407A 対以上には Ab/Ia ハイブリッドの収率を改善しなかった (図 10C 及び 10E を比較のこと)。

Ab T366Y、Ia Y407A 変異対を用いて得られた Ab/Ia キメラ分画は、試験した範囲に亘って入力 DNA の比に実質的に依存しなかった。更に、夾雑する分子種は、モノ S HR5/5 カラム (Pharmacia, Piscataway, NJ) 上でのイオン交換クロマトグラフィー (20 mM トリス-HCl 中の 0-300 mM NaCl、pH 8.0) により、Ab/Ia キメラから容易に除去された。このことは、Ab 及び Ia の相対的発現レベルが過渡的発現系ほどには容易に操作できない場合に、安定な細胞系を使用してのより

10

20

30

40

50

大量の A b / I a キメラの調製を予言している。

確認された突起を空隙に入れた変異体は、可能性ある 10 種の主要な分子種 (Suresh 等、Methods Enzymol. 121:210[1990]) から得られる生成物の混合物の複雑さを 4 種またはそれ未満に減少することにより、F c -含有 B s A b の可能性ある応用を拡大することを予言している。T 3 6 6 及び Y 4 0 7 は完全に保存され、また I g G₁ の境界部分の C_H3 領域における他の残基は高度に保存的であることから (図 6 参照)、T 3 6 6 Y 及び Y 4 0 7 変異体対は、ヒト I g G アイソタイプ以外の異種多量体の創製のためにも有用であろうことが期待される。

配列表

(1) 一般情報

10

(i) 出願人: ジェネンテック インコーポレーテッド

(ii) 発明の名称: 異種多量体ポリペプチド類の製造方法

(iii) 配列の数: 16

(iv) 通信住所:

(A) 名宛人: ジェネンテック インコーポレーテッド

(B) 通り: 460 Point San Bruno Blvd

(C) 都市名: South San Francisco

(D) 州名: カリフォルニア

(E) 国名: アメリカ合衆国

(F) 郵便番号: 94080

20

(v) コンピュータが読み込むことができる形態:

(A) 媒体種: 3.5 インチ、720 Kb フロッピーディスク

(B) コンピュータ: IBM PC 互換機

(C) オペレーティングシステム: PC-DOS / MS-DOS

(D) ソフトウェア: ウィンパットイン (WinPatIn) (ジェネンティック)

(vi) 本出願のデータ:

(A) 出願番号:

(B) 出願日: 1996 年 2 月 5 日

(C) 分類:

(vii) 先の出願のデータ:

30

(A) 出願番号: 08 / 399106

(B) 出願日: 1995 年 3 月 1 日

(viii) 弁護士 / 代理人情報

(A) 氏名: Lee, Wendy M.

(B) 登録番号: 00,000

(C) 参照 / ドケット番号: P0927PCT

(ix) 通信情報:

(A) 電話: 415/225-1994

(B) ファクシミリ: 415/952-9881

(C) テレックス: 910/371-7168

40

(2) 配列番号: 1 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 108 アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: SEQ ID NO: 1

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 341 345 350 355
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 360 365 370
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Asp
 375 380 385
 Gly Glx Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 448

(2) 配列番号：2の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：108アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(xi) 配列：SEQ ID NO：2

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 341 345 350 355
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 360 365 370
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Asp
 375 380 385
 Gly Glx Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 448

(2) 配列番号：3の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：108アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(xi) 配列：SEQ ID NO：3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 341 345 350 355
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 360 365 370
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Asp
 375 380 385
 Gly Glx Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 448

10

(2) 配列番号：4の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：113アミノ酸

20

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(xi) 配列：SEQ ID NO：4

Gly Asn Thr Phe Arg Pro Gln Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser
 341 345 350 355
 Glu Glu Leu Ala Leu Asx Glx Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala
 360 365 370
 Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly
 375 380 385
 Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg
 390 395 400
 Gln Glx Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile
 405 410 415
 Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser
 420 425 430
 Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys
 435 440 445
 Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys
 450 453

30

(2) 配列番号：5の情報：

40

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：107アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(xi) 配列：SEQ ID NO：5

Gln Ala Pro Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp
 341 345 350 355

Pro Pro Glu Ala Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe
 360 365 370

Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu
 375 380 385

Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro
 390 395 400

Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala
 405 410 415

Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr Cys Val Val Ser His
 420 425 430

Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg Ser Leu Glu Val
 435 440 445

Ser Tyr
 447

10

(2) 配列番号：6 の情報：

(i) 配列の特徴：

20

(A) 配列の長さ：110 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(xi) 配列：SEQ ID NO：6

Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu
 341 345 350 355

Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln
 360 365 370

Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu
 375 380 385

Val Gln Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys
 390 395 400

Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr
 405 410 415

Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val
 420 425 430

His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser
 435 440 445

Val Asn Pro Gly Lys
 450

30

(2) 配列番号：7 の情報

(i) 配列の特徴：

40

(A) 配列の長さ：106 アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(xi) 配列：SEQ ID NO：7

Asp Glx Asx Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe
 342 345 350 355
 Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val
 360 365 370
 Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asx Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg
 375 380 385
 Glx Asp Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asx Ile Ser Glx Ser
 390 395 400
 His Pro Asx Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys
 405 410 415
 Glu Asx Asx Trp Asx Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr
 420 425 430
 His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro
 435 440 445

Lys
447

(2) 配列番号：8の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：108アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(xi) 配列：SEQ ID NO：8

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 361 365 370 375
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 380 385 390
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asx Asp
 395 400 405
 Gly Glx Pro Glx Asx Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 410 415 420
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 425 430 435
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 440 445 450
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 455 460 465

Pro Gly Lys
468

(2) 配列番号：9の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：107アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(xi) 配列：SEQ ID NO：9

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 361 365 370 375
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 380 385 390
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 395 400 405
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 410 415 420
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 425 430 435
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 440 445 450
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 455 460 465
 Gly Lys
 467

10

(2) 配列番号：10の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：107アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

20

(D) トポロジー：直線状

(xi) 配列：SEQ ID NO：10

Gly Gln Pro Arg Glx Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 361 365 370 375
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 380 385 390
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly
 395 400 405
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 410 415 420
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 425 430 435
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 440 445 450
 Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 455 460 465

30

Gly Lys
 467

(2) 配列番号：11の情報：

(i) 配列の特徴：

40

(A) 配列の長さ：107アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(xi) 配列：SEQ ID NO：11

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 361 365 370 375
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 380 385 390
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glx Ser Asn Gly
 395 400 405
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 410 415 420
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 425 430 435
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 440 445 450
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 455 460 465

Gly Lys
 467

(2) 配列番号: 12 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 107 アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: SEQ ID NO: 12

Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
 361 365 370 375
 Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
 380 385 390
 Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asx Gly
 395 400 405
 Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asx Thr
 410 415 420
 Asx Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser
 425 430 435
 Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
 440 445 450
 Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
 455 460 465

Gly Lys
 467

(2) 配列番号: 13 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 107 アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: SEQ ID NO: 13

Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala
 361 365 370 375

Glu Glu Met Thr Lys Lys Glx Phe Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
 380 385 390

Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly
 395 400 405

Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr Val Leu Asp Ser
 410 415 420

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glx Lys Ser
 425 430 435

Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val His Glu
 440 445 450

Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Phe Ser Arg Ser Leu
 455 460 465

Gly Lys
 467

(2) 配列番号：14の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：107アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(xi) 配列：SEQ ID NO:14

Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro Ala
 361 365 370 375

Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val
 380 385 390

Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly
 395 400 405

His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asx Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser
 410 415 420

Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser
 425 430 435

Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu
 440 445 450

Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro
 455 460 465

Gly Lys
 467

(2) 配列番号：15の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：107アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直線状

(xi) 配列：SEQ ID NO:15

Gly Arg Ala Gln Thr Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Arg
 361 365 370 375
 Glu Gln Met Ser Lys Lys Lys Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Thr
 380 385 390
 Asn Phe Phe Ser Glu Ala Ile Ser Val Glu Trp Glu Arg Asn Gly
 395 400 405
 Glu Leu Glu Gln Asp Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Ile Leu Asp Ser
 410 415 420
 Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Thr Asp
 425 430 435
 Ser Trp Leu Gln Gly Glu Ile Phe Thr Cys Ser Val Val His Glu
 440 445 450
 Ala Leu His Asn His His Thr Gln Lys Asn Leu Ser Arg Ser Pro
 455 460 465
 Gly Lys
 467

(2) 配列番号: 16 の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 29 アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(xi) 配列: SEQ ID NO: 16

Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro
 451 455 460 465
 Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
 470 475 479

10

20

【図 1】

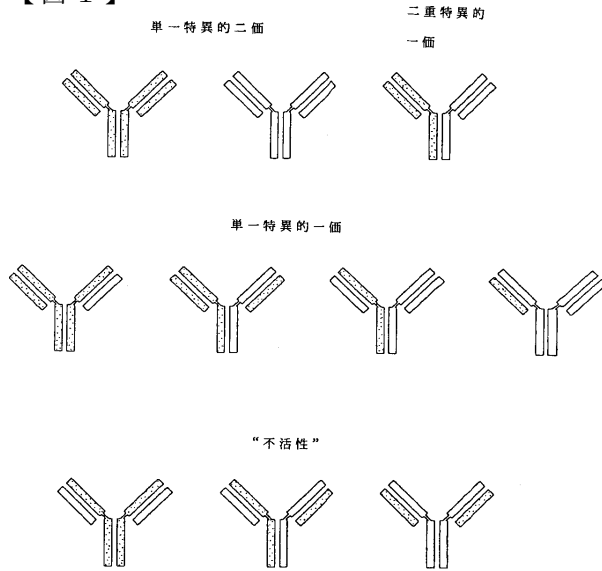


FIG. 1

【図 2 A】

BsF(ab')₂

化学的に結合される

ゲッ歯類断片

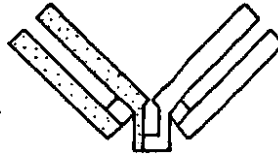


FIG. 2A

【図 2 B】

BsF(ab')₂

化学的に結合される

E. coli 誘導断片

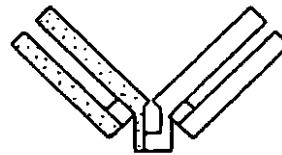


FIG. 2B

【図 2 C】

BsF(ab')₂

ロイシンジッパー

による組立て

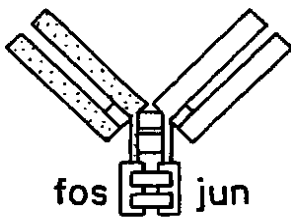
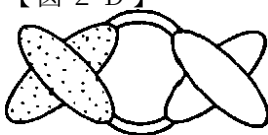


FIG. 2C

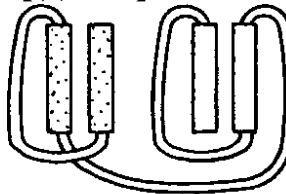
【図 2 D】



ジアボディ

FIG. 2D

【図 2 E】



sFv 二量体

FIG. 2E

【図 3 A】

レセプタ

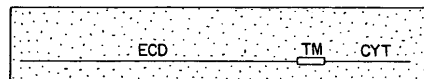


FIG. 3A

【図 3 B】

IgG1-重鎖

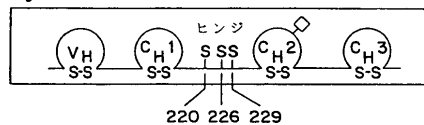


FIG. 3B

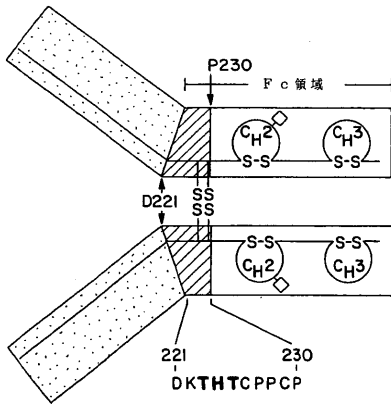
【図 3 C】
イムノアドヘンシ

FIG. 3C

【図 4】

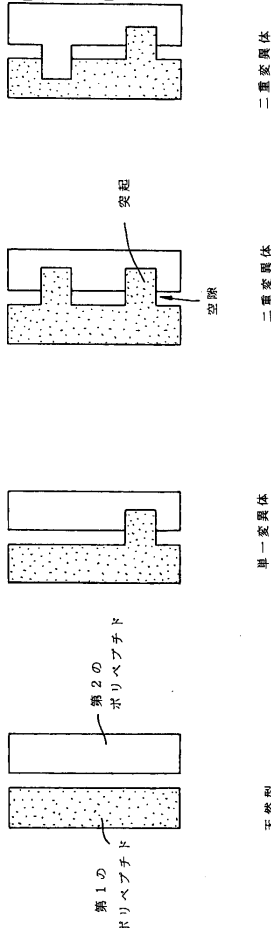


FIG. 4

【図 5】

エッジ、インターフェース	
IgG	G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q
IgA	G N T F R P Q V H L L P P P S E E L A L B Z L
IgD	Q A P V K L S L N L L A S S D P - - P E A A A
IgE	G P R A A P E V Y A F A T P E W P G S R D K
IgM	- D Z B T A I R V F A I P P S F A S I P L T K S
	350 360
ミドル、インターフェース	
IgG	B I B I B I B i
IgA	V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E E S N
IgD	V T L T C L A R G F S P K D V L V R W L Q G
IgE	S W L L C E V S G F S P P N I L L M W L E D Q
IgM	R T L A C L I Q N F M P E D I S V Q W L H N
	370 380
エッジ、インターフェース	
IgG	D - G Q P E N N Y K T T P P V M L D S D G S
IgA	S Q E L P R E K Y L T W A S R Q Z P S Q G T T
IgD	R E V N T S G F A P A R P P P Q P G S T T
IgE	E V Q L P D A R H S T T Q P R K T K G S S G
IgM	D - - G E A V K T H T B I S Z S H P B A T
	390 400
ミドル、インターフェース	
IgG	B I B I B I B i B
IgA	F F L Y S K R L T V D K S R W Q Q G D N V F S C C M V G M
IgD	F A V T S I L R V A A E D W K K G D T F F S C C M V G M
IgE	F W A W S V L R V P A P P S P Q K D E F F I C C C M V G M
IgM	F S A V G E A S I C E B B W B S G E R F T C C C M V G M
	410 420
エッジ、インターフェース	
IgG	B
IgA	H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
IgD	H E A L P L A F T Q K T I D R L A G K
IgE	H E A S P S Q T L N A S R S L E V S Y
IgM	H T D L P S P L K Q T I S R P K - -
	430 440
エッジ、インターフェース	
IgG	B
IgA	H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
IgD	H E A L P L A F T Q K T I D R L A G K
IgE	H E A S P S Q T L N A S R S L E V S Y
IgM	H T D L P S P L K Q T I S R P K - -
	430 440

FIG. 5

【図 6 A】

エッジ	
IgG1	G - Q P R E E - - M T K N Q V S L T C
IgG2	G - Q P R E E - - M T K N Q V S L T C
IgG3	G - Q P R E E - - M T K N Q V S L T C
IgG4	G - Q P R E E - - M T K N Q V S L T C
	361 370 380 390
ミドル	
IgG1	G - R P K A P Q V Y T I P P K E Q - - M A K D K V S L T C
IgG2	G - P V R A P Q V Y T I P P K E Q - - M A K D K V S L T C
IgG3	G - L V R A P Q V Y T I P P K E Q - - M A K D K V S L T C
IgG4	G - R A Q T P Q V Y T I P P K E Q - - M A K D K V S L T C
	361 370 380 390
エッジ	
IgG1	L V K G F Y P S D - - I A V E W E S - B D - G Z B N Y K
IgG2	L V K G F Y P S D - - I A V E W E S - N G - Q P E N N Y K
IgG3	L V K G F Y P S D - - I A V E W E S - S G - Q P E N N Y K
IgG4	L V K G F Y P S D - - I A V E W E S - N G - Q P E N N Y K
	400 410
ミドル	
IgG1	M I T D F F P E D I T V - - E W Q W - B G - - Q P A E N Y K
IgG2	M I T D F F P E D I T V - - E W T S - N G - - R T E E N Y K
IgG3	M I T D F F P E D I T V - - E W T S - N G - - H T E E N Y K
IgG4	M I T D F F P E D I T V - - E W T S - N G - - E L E Q D Y K
	400 410

FIG. 6A

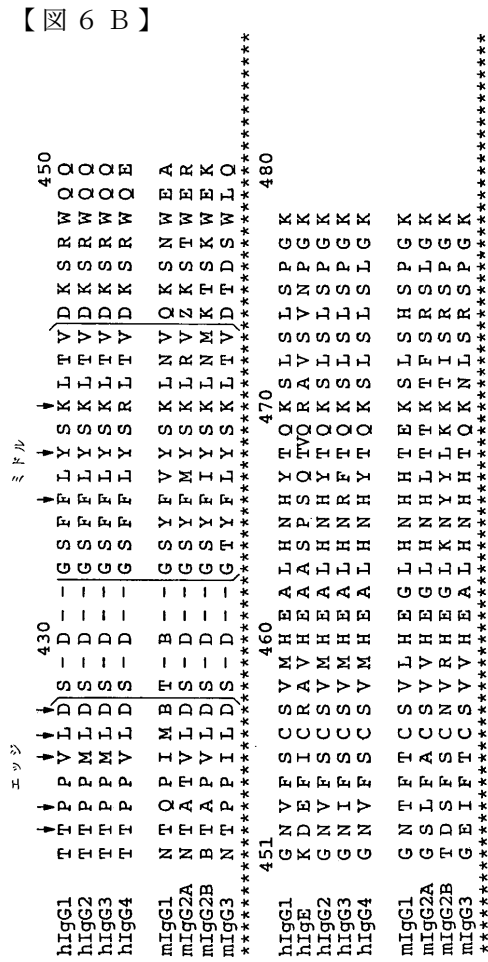


FIG.6B

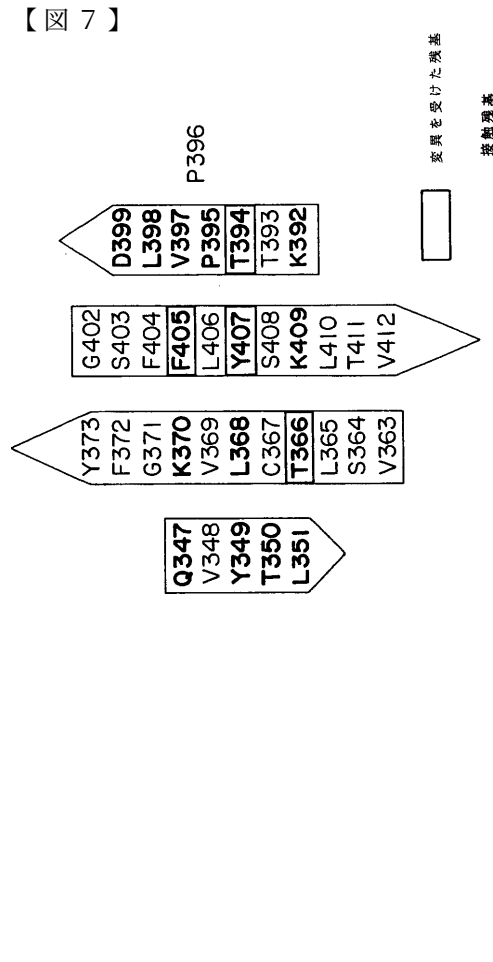


FIG.7

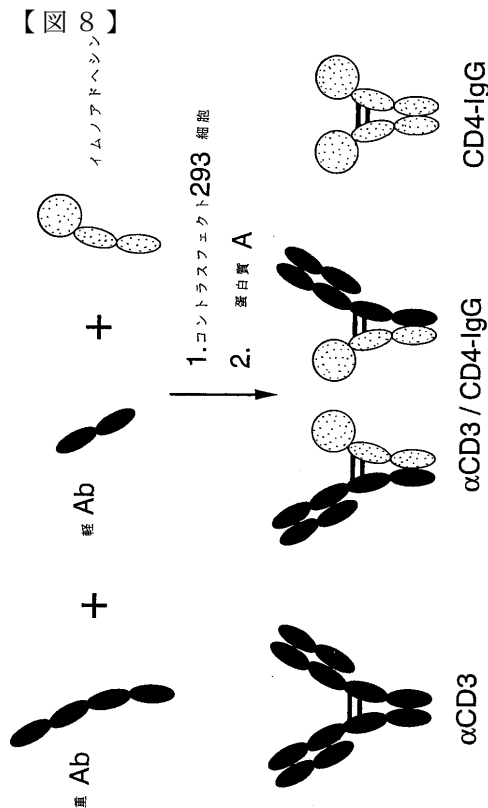


FIG.8

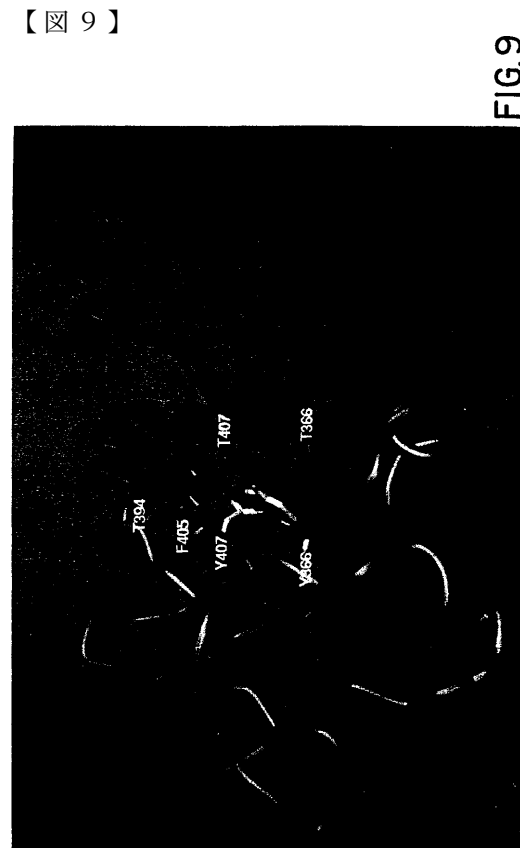
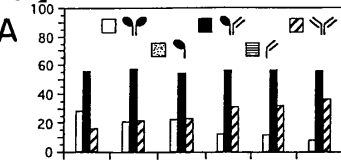


FIG.9

【図 10】

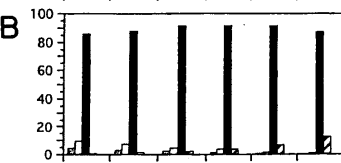
FIG.10A



Ab/la

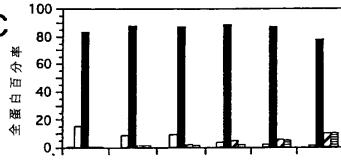
WT/WT

FIG.10B



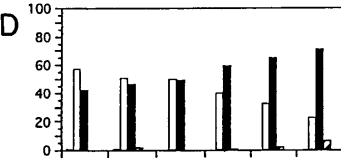
Y407T/T366Y

FIG.10C



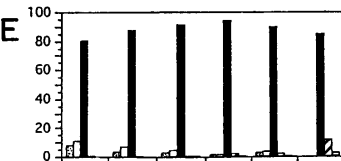
T366Y/Y407T

FIG.10D



F405A/T394W

FIG.10E

T366Y:F405A/
T394W:Y407T

入力DNAの比: IA:H:L

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	Z
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
C 1 2 R 1/91	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	
		C 1 2 R 1:91	

(72)発明者 プレスタ, レオナルド ジー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94109 サンフランシスコ ゴフ ストリート #206
 1900

(72)発明者 リッジウェイ, ジョン ビー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94114 サンフランシスコ ダイヤモンド ストリート
 #1821

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 特表平07-501698 (JP, A)
 J Hematotherapy 4 p.389-394 (1995)
 J Immunol 148(5) 1547-1553 (1992)
 Protein Engineering 9(7) p.617-621 (1996)
 Science 240 p.1759-1764 (1988)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C07K 19/00
 C07K 16/46
 C12N 15/00 - 15/90
 PubMed