

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-152802

(P2016-152802A)

(43) 公開日 平成28年8月25日(2016.8.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 C O 8 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 H O 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 J	
審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 102 頁)		

(21) 出願番号	特願2016-21638 (P2016-21638)	(71) 出願人	509012625
(22) 出願日	平成28年2月8日 (2016.2.8)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2012-537239 (P2012-537239) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
原出願日	平成22年11月5日 (2010.11.5)	(74) 代理人	110002077
(31) 優先権主張番号	61/258,565		園田・小林特許業務法人
(32) 優先日	平成21年11月5日 (2009.11.5)	(72) 発明者	マリッチ, マシュー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ー ジェネンテック, インコーポレイテ ッド
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 異種ポリペプチドの分泌のための方法及び組成物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 バクテリアからの異種ポリペプチド分泌のための方法及び組成物の提供。

【解決手段】 抗体の製造方法であって、前記方法が、(1) T I R が共翻訳原生生物分泌シグナル配列を含む、抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドに結合していてもよい第一の翻訳開始領域 (T I R) ; 及び、(2) 第二の T I R が共翻訳又は翻訳後原生生物分泌シグナル配列を含む、抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドに結合していてもよい第二の T I R を含むポリヌクレオチドを含む宿主細胞の培養を含み、これによって、宿主細胞中の抗体の発現において、重鎖と軽鎖が生物学的に活性な抗体を形成するように折りたたまれ集合する方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体の製造方法であって、前記方法が、（１）T I R が共翻訳原生生物分泌シグナル配列を含む、抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドに結合していてもよい第一の翻訳開始領域（T I R）；及び、（２）第二のT I R が共翻訳又は翻訳後原生生物分泌シグナル配列を含む、抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドに結合していてもよい第二のT I R を含むポリヌクレオチドを含む宿主細胞の培養を含み、これによって、宿主細胞中の抗体の発現において、重鎖と軽鎖が生物学的に活性な抗体を形成するように折りたたまれ集合する方法。

【請求項 2】

10

第一のT I R がS T I I 又はD s b A 変異シグナル配列を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

第一の翻訳開始領域がD s b A 変異シグナル配列を含む、請求項 2 の方法。

【請求項 4】

第一の翻訳開始領域が配列番号 1 から 1 0、3 6 から 3 9、4 1 及び 4 2 の一の配列を含む、請求項 2 の方法。

【請求項 5】

第二の翻訳開始領域がS T I I、D s b A、M a l E 又はP h o A 変異シグナル配列を含む、請求項 1 から 4 の何れか一項の方法。

【請求項 6】

20

第二の翻訳開始領域がP h o A 又はM a l E 変異シグナル配列をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 5 の方法。

【請求項 7】

第二の翻訳開始領域が配列番号 1 から 1 4、1 6 から 2 4、2 6 から 3 9、及び 4 1 から 4 2 の一つの配列を含む、請求項 5 の方法。

【請求項 8】

宿主細胞が更に（３）F c ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに結合していてもよい第三の翻訳開始領域を含む、請求項 1 から 7 の何れか一項の方法。

【請求項 9】

第三の翻訳開始領域がS T I I、P h o I 又はD s b A 変異シグナル配列を含む、請求項 8 の方法。

30

【請求項 1 0】

第三の翻訳開始領域がP h o I 又はD s b A 変異シグナル配列を含む、請求項 8 の方法。

【請求項 1 1】

第三の翻訳開始領域が配列番号 2 3、2 4、2 6 から 3 9、4 1 及び 4 2 の一つを含む、請求項 8 の方法。

【請求項 1 2】

第一と第二の翻訳開始領域がほぼ同じ翻訳強度を示す、請求項 1 から 1 1 の何れか一項の方法。

40

【請求項 1 3】

相対翻訳強度が約 1 又は 2 である、請求項 1 2 の方法。

【請求項 1 4】

第一、第二及び第三の翻訳開始領域がほぼ同じ翻訳強度を示す、請求項 8 から 1 0 の何れか一項の方法。

【請求項 1 5】

相対翻訳強度が約 1 又は 2 である、請求項 1 4 の方法。

【請求項 1 6】

宿主細胞中のポリヌクレオチドが更にプロモーターを含む、請求項 1 から 1 5 の何れか一項の方法。

50

【請求項 17】

プロモーターが *p h o A*、*t a c*、*l a c - l p p*、*l a c*、*a r a*、及び T7 プロモーターからなる群から選択される原生生物プロモーターである、請求項 16 の方法。

【請求項 18】

宿主細胞が原生生物細胞である、請求項 1 から 17 の何れか一項の方法。

【請求項 19】

原生生物細胞が大腸菌である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

大腸菌が内在性プロテアーゼ活性の欠損株である、請求項 19 の方法。

【請求項 21】

大腸菌の遺伝子型が、*d e g P* 及び *p r c* 遺伝子を欠損し、変異 *s p r* 遺伝子を有する、請求項 19 又は 20 の方法。

【請求項 22】

宿主細胞が *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生生物ポリヌクレオチドの少なくとも一つをコードするポリヌクレオチドを更に含む、請求項 1 から 21 の何れか一項の方法。

【請求項 23】

ポリヌクレオチドが *D s b A* と *D s b C* の双方をコードする、請求項 22 の方法。

【請求項 24】

宿主細胞が抗体を共同でコードする一又は複数のポリヌクレオチドを含む、請求項 1 から 23 の何れか一項の方法。

【請求項 25】

方法が宿主細胞培養物から抗体を回収することを更に含む、請求項 1 から 24 の何れか一項の方法。

【請求項 26】

抗体を宿主細胞培養培地から回収する、請求項 25 の方法。

【請求項 27】

方法が回収した抗体と薬学的に許容可能な担体、賦形剤、又は抗体を含む薬学的製剤を調製するための担体とを混合することを更に含む、請求項 25 又は 26 の方法。

【請求項 28】

形成するイムノグロブリンポリペプチド複合体の少なくとも 50 % が抗体である、請求項 25 又は 26 の方法。

【請求項 29】

形成するイムノグロブリンポリペプチド複合体の少なくとも 70 % が抗体である、請求項 28 の方法。

【請求項 30】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 から 29 の何れか一項の方法。

【請求項 31】

抗体がキメラ抗体、親和性成熟抗体、二重特異的抗体、ヒト化抗体、抗体断片又はヒト抗体である、請求項 30 の方法。

【請求項 32】

抗体断片が、一アーム抗体である、請求項 31 の方法。

【請求項 33】

抗体が *c - m e t* に結合する、請求項 32 の方法。

【請求項 34】

抗体が二重特異的抗体である、請求項 30 の方法。

【請求項 35】

変異翻訳開始領域 (*T I R*) を含むポリヌクレオチドであって、該変異 *T I R* が *P h o A*、*M a l E*、*D s b A* 又は *S T I I* 分泌シグナル領域の核酸変異体を含むポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

【請求項 36】

変異 T I R が配列番号 1 から 14、16 から 24、26 から 39、41 から 42 の何れか一つの配列を含む、請求項 35 のポリヌクレオチド。

【請求項 37】

前記変異翻訳開始領域の翻訳強度が、野生型の翻訳開始領域の翻訳強度よりも小さい、請求項 35 のポリヌクレオチド。

【請求項 38】

異種ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに結合していてもよい、請求項 35 から 37 の何れか一項のポリヌクレオチドであって、これによって、宿主細胞中の異種ポリペプチドの発現において、異種ポリペプチドが折りたたまれ、集合して生物学的に活性な異種ポリペプチドを形成するポリヌクレオチド。

10

【請求項 39】

異種ポリペプチドが抗体重鎖と抗体軽鎖から選択される、請求項 38 のポリヌクレオチド。

【請求項 40】

異種ポリペプチドが (a) 抗体重鎖と (b) 抗体軽鎖を含む、請求項 39 のポリヌクレオチド。

【請求項 41】

異種ポリペプチドが更に (c) Fc ポリペプチドを含む、請求項 30 のポリヌクレオチド。

20

【請求項 42】

異種ポリペプチドが抗体であり、ポリヌクレオチドが、(1) T I R が共翻訳原生生物分泌シグナル配列を含み、抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドに結合していてもよい第一の T I R；及び (2) 第二の T I R が共翻訳又は翻訳後原生生物分泌シグナル配列を含み、抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドに結合していてもよい第二の T I R を含み、これによって、宿主細胞中の抗体の発現において、重鎖と軽鎖が折りたたまれ、集合して生物学的に活性な抗体を形成する、請求項 35 のポリヌクレオチド。

【請求項 43】

Fc ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに結合していてもよい第三の T I R を更に含む、請求項 42 のポリヌクレオチド。

30

【請求項 44】

プロモーターを更に含む、請求項 35 から 43 の何れかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 45】

プロモーターが、phoA、tac、lpp、lac-lpp、lac、ara、及び T7 プロモーターからなる群から選択される原生生物プロモーターである、請求項 44 のポリヌクレオチド。

【請求項 46】

異種ポリペプチドがプロテアーゼ、イムノアドヘシン、又はレセプターの細胞外部ドメインである、請求項 35 のポリヌクレオチド。

【請求項 47】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 42 から 45 の何れか一項のポリヌクレオチド。

40

【請求項 48】

抗体がキメラ抗体、親和性成熟抗体、二重特異的抗体、ヒト化抗体、抗体断片又はヒト抗体である、請求項 42 から 45 の何れか一項のポリヌクレオチド。

【請求項 49】

抗体断片が一アーム抗体である、請求項 48 のポリヌクレオチド。

【請求項 50】

抗体が c-met に結合する、請求項 49 のポリヌクレオチド。

【請求項 51】

50

抗体が二重特異的抗体である、請求項 48 のポリヌクレオチド。

【請求項 52】

抗体重鎖が一又は複数の変異 T 3 6 6 A、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V 及び／又は T 3 6 6 W を含む、請求項 49 又は 51 のポリヌクレオチド。

【請求項 53】

F c ポリペプチドが一又は複数の変異 T 3 6 6 A、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V 及び／又は T 3 6 6 W を含む、請求項 49 のポリヌクレオチド。

【請求項 54】

請求項 1 から 34 の何れか一項の方法によって得られる抗体。

【請求項 55】

請求項 54 の抗体を含む薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願とのクロスリファレンス

この出願は、2009 年 11 月 5 日に提出された米国特許出願第 61 / 258565 号の優先権を主張するものであり、その内容は、参照によりここに援用する。

技術分野

本発明は、一般に、分子生物学及びタンパク質技術の分野に関する。より具体的には、本発明はバクテリアからの異種ポリペプチドの分泌のためのシグナル配列に関する。本発明はまた原核生物で産生された組換えポリペプチド及びその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

異種ポリペプチドの大腸菌及び他の原核生物のペリプラスム領域又はその培養物への分泌は、種々のパラメーターに従う。典型的には、関心のあるポリペプチドの分泌のためのベクターは、分泌シグナル配列をコードする DNA を関心のあるポリペプチドをコードする DNA の 5' 側に位置させるように改変される。

【0003】

近年、様々な疾患及び疾病の診断及び治療薬として異種ポリペプチド、例えば、抗体の使用が益々有望視されている。多くの研究及び臨床への応用には多量の機能性抗体又は抗体断片が必要であり、抗体を生産するためのスケールアップされているが経済的な系が求められている。特に有用なものは、大腸菌又は枯草菌のような原核生物から酵母、植物、昆虫細胞及び哺乳動物細胞までの範囲にわたる様々な発現宿主を使用する抗体の組換え生産である。Kipriyanov 及び Little (1999) Mol. Biotech. 12:173-201。

【0004】

他の抗体生産系と比較すると、細菌、特に大腸菌は多くの独特な利点を提供する。使用される原材料（つまり細菌細胞）が安価で成長させ易く、よって製品コストを低減させる。原核生物宿主は例えば哺乳動物細胞よりもかなり速く成長するので、遺伝子操作の迅速な解析が可能になる。生産時間が短くなりスケールアップが容易になると、細菌発酵が、多量のタンパク質を生産するための更に魅力的な手段になる。大腸菌を含む多くの細菌種のゲノム構造と生物学的活性は十分に研究されており、広範囲の適切なベクターが入手でき、所望の抗体の発現をより簡便に行わせることができる。真核生物と比較すると、組換え遺伝子の操作、複数コピーの宿主中への安定な形質転換、発現誘導及び産物の特徴付けを含み、製造プロセスに関与する工程は少ない。Pluckthun 及び Pack (1997) Immunotech 3:83-105。

【0005】

細菌中で組換え抗体を作製するために様々なアプローチ法が使用されている。組換えタンパク質は、細胞質中に発現された封入体のリフォールディングによるか、発現後の細菌細胞膜周辺への分泌によって、細菌から得ることができる。分泌とリフォールディングの選択は一般に幾つかの点を考慮することによって導かれる。分泌は、通常、抗体を生産す

10

20

30

40

50

るためのより速くより一般的に使用されている方策である。上掲のKipriyanov及びLittle (1999)。

【0006】

原核生物系中での抗体の発現は異なったスケールで実施することができる。振盪フラスコ培養（2－5リットルの範囲）は典型的には5mg／リットル未満の産物を生じる。Carter等（1992）Bio/Technology 10:12-16は、抗体断片の高レベルの発現（2g／リットルまで）が得られる高細胞密度発酵系を開発した。Carter等によって得られたFab'のリットル当たりのグラム力価は、主として、単純な振盪フラスコのものより正確に制御された環境の発酵槽から得られる高細胞密度による。その系は軽鎖及び重鎖断片を同時発現するように設計されたジシストロン性オペロンを含んでいる。ジシストロン性オペロンはホスフェート飢餓により誘導できる単一の大腸菌phoAプロモーターの調節下にある。各抗体鎖の前には細胞膜周辺腔への分泌を指令する大腸菌熱安定性エンテロトキシンI（stII）シグナル配列がある。

【0007】

大腸菌中での抗体の生産の総説については、Pluckthun及びPack（1997）Immunotech 3: 83-105；Pluckthun等（1996）ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH, pp203-252（Oxford Press）；Pluckthun（1994）HANDBOOK OF EXP PHARMCOL VOL 3: THE PHARMCOL OF MONOCLONAL ANTIBODIES, pp269-315（M. Rosenberg及びG.P. Moore；Springer-Verlag, Berlin）を参照のこと。

【0008】

多くの生物学的アッセイ（例えばX線構造結晶解析）及び臨床への応用（例えばタンパク質療法）には多量の抗体を必要とする。従って、適切に組み合わせられた可溶性で機能的な抗体のような異種ポリペプチドを製造するための高収量であるが単純な系に対する必要性が存在している。

【0009】

ここに引用された、特許出願及び出版物を含む、全ての引用文献の全内容は、出典明示によりここに援用される。

【発明の概要】

【0010】

本発明は、共翻訳分泌シグナルペプチド（共翻訳様式での転座を指示するシグナルペプチド）を含むTIR変異及び／又は翻訳後分泌シグナルペプチド（翻訳後様式での転座を指示するシグナルペプチド）を含むTIR変異を含む、新規の翻訳開始領域（TIR）変異の使用を含む異種タンパク質の産生の増加のための新規の方法を提供する。更に、ここで示されるのは、ピーク発現のための、共翻訳又は翻訳後分泌シグナルペプチドを含むTIRに作用可能に連結される抗体軽鎖と共翻訳分泌シグナルペプチドを含むTIRに作用可能に連結される抗体重鎖を含むベクターを用いた増加された抗体の産生である。新規のTIR変異体がまたここで提供される。

【0011】

一態様では、本発明は、翻訳開始領域を提供する。幾つかの実施態様では、変異体は変異翻訳開始領域（幾つかの実施態様では、原核生物翻訳後分泌シグナル配列又は原核生物共翻訳分泌シグナル配列）を含む。幾つかの実施態様では、変異体は、PhoA、MalE、DsbA又はSTIIのような分泌シグナル配列の核酸変異を含む。幾つかの実施態様では、変異体は更にMlaI、BssHII又はXbaI制限サイトを含む。幾つかの実施態様では、変異体は、表2に示す配列を含む翻訳開始領域変異を含む。

【0012】

一態様では、本発明は変異分泌シグナル配列を提供する。幾つかの実施態様では、分泌シグナル配列は原核生物翻訳後分泌シグナル配列又は原核生物共翻訳分泌シグナル配列である。幾つかの実施態様では、変異体はPhoA、MalE、DsbA又はSTII分泌シグナル配列の核酸変異体である。幾つかの実施態様では、変異体は表2に示す分泌シグナル配列を含む。本発明の変異分泌シグナル配列は、例えば、ここに開示する任意の方法

における使用に適している。

【0013】

別の態様では、本発明は本発明の翻訳開始領域を含むポリペプチドを提供する。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、表2に示す配列（例えば、配列番号1から42の一つ）を含む。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、配列番号1から14、16から24、26から39、41から42の一つを含む。ポリヌクレオチドは、例えば、ここに開示する任意の方法における使用に適している。

【0014】

別の態様では、本発明は、本発明の分泌シグナル配列を含むポリヌクレオチドを提供する。幾つかの実施態様では、分泌シグナル配列は、表2に示す配列を含む。（例えば、配列番号1から42の一つ）。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、配列番号1から14、16から24、26から39、41から42の一つを含む。ポリヌクレオチドは、例えば、ここに開示する任意の方法における使用に適している。

【0015】

別の態様では、本発明は、異種ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される本発明の翻訳開始領域を含むポリヌクレオチドであって、これによって、宿主（例えば、原核生物宿主細胞、例えば、大腸菌細胞）における異種ポリペプチドの発現において、異種ポリペプチドが折りたたまれ、集合して生物学的に活性な異種ポリペプチドを形成するポリヌクレオチドを提供する。異種ポリペプチドの例を更にここに開示する。幾つかの実施態様では、異種ポリペプチドは、抗体重鎖である。幾つかの実施態様では、異種ポリペプチドは、抗体軽鎖である。幾つかの実施態様では、異種ポリペプチドは、Fcポリペプチドである。幾つかの実施態様では、異種ポリペプチドは、多量体ポリペプチドである。幾つかの実施態様では、異種ポリペプチドは、異種多量体である。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、ここに開示する任意の翻訳開始領域、例えば、表2に示す配列を含む翻訳開始領域である。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、配列番号1から42の一つの配列を含む。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、配列番号1から14、36から39、41から42の一つの配列を含む。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、変異STII、DsbI、PhoA、又はMalEシグナル配列を含む。

【0016】

別の態様では、本発明は、（1）TIRが共翻訳原核生物シグナル配列を含む、第一の異種ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第一の翻訳開始領域（TIR）；及び、（2）第二のTIRが共翻訳又は翻訳後原核生物分泌シグナル配列を含む、第二の異種をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第二のTIRを含むポリヌクレオチドであって、これによって、宿主細胞中の抗体の発現において、第一と第二の異種ポリペプチドが生物学的に活性な抗体を形成するように折りたたまれ集合するポリヌクレオチドを提供する。

【0017】

別の態様では、本発明は、（1）抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される本発明の第一の翻訳開始領域、及び、（2）抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第二の翻訳開始領域を含むポリヌクレオチドであって、これによって、宿主細胞（例えば、原核生物宿主細胞、例えば、大腸菌宿主細胞）中の抗体の発現において、重鎖と軽鎖が生物学的に活性な抗体を形成するように折りたたまれ集合するポリヌクレオチドを提供する。

【0018】

幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域は、共翻訳原核生物分泌シグナル配列（例えば、シグナル認識ペプチドを介する翻訳を指示するシグナル配列）を含む。幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域は、STII又はDsbAシグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域はDsbAシグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域は、PhoA又はMalEシグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域は、配列番号：1から10及び36から29及び41及び

42の一つの配列を含む。幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域は、配列番号1から42の一つの配列を含む。幾つかの実施態様では、第一の翻訳開始領域は、配列番号1から14、16から24、26から39、41から42の一つの配列を含む。

【0019】

幾つかの実施態様では、第二の翻訳開始領域は(i)共翻訳原核生物分泌シグナル配列又は翻訳後原核生物分泌シグナル配列(例えば、sec経路を介する翻訳を指示するシグナル配列)を含む。幾つかの実施態様では、第二の翻訳開始領域は、StII、DsbA、MalE又はPhoAシグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第二の翻訳開始領域は、PhoA又はMalEシグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第二の翻訳開始領域は、配列番号1から42の一つの配列を含む。幾つかの実施態様では、第二の翻訳開始領域は、配列番号1から14、16から24、26から39、41から42の一つの配列を含む。

10

【0020】

幾つかの実施態様では、抗体をコードするポリヌクレオチドは、(3)Fcポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第三の翻訳開始領域を更に含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、STII、PhoA又はDsbAシグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、DsbAシグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、PhoAシグナル配列を含む。

【0021】

20

別の態様では、本発明は、(1)TIRが共翻訳原核生物分泌シグナル配列を含み、抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第一の翻訳開始領域(TIR)；及び(2)第二のTIRが共翻訳又は翻訳後原核生物分泌シグナル配列を含み、抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結された第二のTIRを含み、これにより、宿主細胞中の抗体発現において、重鎖及び軽鎖が折りたたまれ、集合して生物学的に活性な抗体を形成する、ポリヌクレオチドを提供する。

【0022】

別の態様では、本発明は、抗体断片(例えば、一価抗体断片)をコードするポリヌクレオチドを提供し、前記ポリヌクレオチドは(1)抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される本発明の第一の翻訳開始領域；(2)抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第二の翻訳開始領域；及び(3)Fcポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第三の翻訳開始領域を含み、これにより、宿主細胞(例えば、原核生物宿主細胞)中の抗体発現における、重鎖、軽鎖及びFcポリペプチドが折りたたまれ、集合して生物学的に活性な抗体(例えば、一アーム抗体)を形成する。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、共翻訳原核生物分泌シグナル配列又は翻訳後原核生物分泌シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域はSTII、PhoA、MalE、又はDsbAシグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、DsbAシグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、PhoAシグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、配列番号1から42の一つの配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、配列番号1から14、16から24、26から39、41から42の一つの配列を含む。

30

40

【0023】

別の態様では、本発明は、抗体をコードするポリヌクレオチドを提供し、前記ポリヌクレオチドは(1)第一の翻訳開始領域がSTII又はDsbAシグナル配列を含み、抗体重鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される本発明の第一の翻訳開始領域；(2)第二の翻訳開始領域がSTII、DsbA、MalE又はPhoAシグナル配列を含み、抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第二の翻訳開始領域を含み、これにより、宿主細胞(例えば、原核生物宿主細胞)中の抗体発現における、軽鎖及び重鎖が折りたたまれ、集合して生物学的に活性な抗体を形成する。幾つかの実

50

施態様では、第一の翻訳開始領域は D s b A シグナル配列を含み、第二のほんやくは、M a l E 又は P h o A シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、抗体をコードするポリヌクレオチドは更に (3) F c ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに作用可能に連結される第三の翻訳開始領域を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は S T I I、P h o A 又は D s b A シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、P h o A シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域は、D s b A シグナル配列を含む。

【0024】

幾つかの実施態様では、前記変異翻訳開始領域の翻訳強度は、野生型の翻訳開始領域の翻訳強度よりも小さい。幾つかの実施態様では、前記変異翻訳開始領域の翻訳強度は、野生型の翻訳開始領域の翻訳強度よりも大きい。幾つかの実施態様では、翻訳開始変異体のアミノ酸配列は、野生型のアミノ酸配列と比較して変化しない。幾つかの実施態様では、翻訳変異体のアミノ酸配列は、野生型のアミノ酸配列と比較して変化している。幾つかの実施態様では、翻訳開始領域は、原生生物分泌シグナル配列を含む。幾つかの実施態様では、第一及び第二の翻訳開始領域（及び幾つかの実施態様では、第三の翻訳開始領域）は、ほぼ等しい翻訳強度を示す。幾つかの実施態様では、相対翻訳強度は約 1 又は 2 である。幾つかの実施態様では、相対翻訳強度は、約 2 である。幾つかの実施態様では、相対翻訳強度は 1 及び／又は 2 である。幾つかの実施態様では、相対翻訳強度は約 3 又は 4 である。幾つかの実施態様では、相対翻訳強度は、1 又は 1、2、3、4、5、又はそれ以上から選択される（例えば、6 又は 7 以上）。

【0025】

幾つかの実施態様では、本発明のポリヌクレオチドは、異種ポリペプチドと作用可能に連結されるプロモーターを更に含む。幾つかの実施態様では、プロモーターは p h o A、t a c、l p p、l a c - l p p、l a c、a r a、t r p、及び T 7 プロモーターからなる群から選択される原核生物プロモーターである。幾つかの実施態様では、プロモーターは p h o A プロモーターである。抗体重鎖及び軽鎖の発現に関する幾つかの実施態様では、ポリヌクレオチドは更に (a) 第一のプロモーターが軽鎖と作用可能に連結される、第一のプロモーター及び (b) 第二のプロモーターが重鎖と作用可能に連結される、第二のプロモーターを含む。幾つかの実施態様では、第一及び第二のプロモーターは双方共に p h o A プロモーターである。抗体重鎖及び軽鎖と F c ポリペプチドの発現に関する幾つかの実施態様では、ポリヌクレオチドは (c) 第三のプロモーターが F c ポリペプチドと作用可能に連結される第三のプロモーターを更に含む。幾つかの実施態様では、第三のプロモーターは F c ポリペプチドである。

【0026】

一以上のポリペプチド（例えば、重鎖と軽鎖を含む抗体）を含むポリペプチドを発現する際、ポリペプチドの発現のためのポリヌクレオチドは、ポリシストロン性のポリヌクレオチド（即ち、単一のプロモーターの調節制御下の複数のシストロンを含み発現する単一のポリヌクレオチド）であり得る。ポリシストロン性ベクターの一般的な例は、1 個のプロモーターの制御下の 2 つの異なるポリペプチドを含み発現する「ジシストロン性」ベクターである。ジシストロン性又はポリシストロン性ベクターの発現において、複数コード領域（例えば、遺伝子）は最初に単一の転写ユニットとして転写され、次いで別々に翻訳される。シストロンは広義にはポリペプチド鎖と隣接する制御領域（例えば、T I R を含む）をコードするヌクレオチド配列を含む翻訳ユニットと同じ遺伝子要素である。他の実施態様では、ポリヌクレオチドは別個のシストロンを含み得、各シストロンがその固有のプロモーターの制御下にある、少なくとも 2 つの別個のプロモーター-シストロンペアを含む単一のポリヌクレオチドを意味する。別個のシストロン発現ベクターの発現において、異なる遺伝子の転写と翻訳過程は双方共に別個で独立している。更に別の実施態様では、ポリヌクレオチドはポリシストロン性の部位と別個のシストロン性部位を含み得る。

【0027】

更に別の態様では、本発明は本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。幾

つかの実施態様では、ベクターは発現ベクターである。

【0028】

更に別の態様では、本発明は本発明の一以上のポリヌクレオチドと担体を含む組成物を提供する。一実施態様では、担体は薬学的に許容可能である。

【0029】

一態様では、本発明は本発明のポリヌクレオチド又はベクターを含む宿主細胞を提供する。幾つかの実施態様では、宿主細胞は抗体（幾つかの実施態様では、二重特異的又は一アーム抗体）をコードする本発明のポリヌクレオチドを含む。宿主細胞は集合的に抗体をコードする一以上のポリヌクレオチドを含み得る。ベクターは任意の型、例えば、発現ベクターのような組換えベクターであり得る。種々の宿主細胞の任意のものを使用し得る。一実施態様では、宿主細胞は、原核生物細胞、例えば、大腸菌である。幾つかの実施態様では、大腸菌は内在性プロテアーゼ活性を欠損する株である。幾つかの実施態様では、大腸菌の遺伝子型は *degP* 及び *prc* 遺伝子を欠損し、変異 *spr* 遺伝子を有する。

【0030】

幾つかの実施態様では、宿主細胞は更に原核生物シャペロンタンパク質（例えば、*Dsb* タンパク質（*DsbA*、*DsbB*、*DsbC*、*DsbD*、*FkpA* 及び／又は *DsbG*））をコードするポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施態様では、シャペロンタンパク質は、宿主細胞中で過剰発現する。幾つかの実施態様では、シャペロンタンパク質は *DsbA* 及び／又は *DsbC* である。

【0031】

一態様では、宿主細胞は、集合的に一アーム抗体をコードする一以上のポリヌクレオチドを含む。一実施態様では、単一のポリヌクレオチドは（a）一アーム抗体の軽鎖及び重鎖成分、及び（b）*Fc* ポリペプチドをコードする。一実施態様では、単一のポリヌクレオチドは一アーム抗体の軽鎖及び *Fc* ポリペプチド成分をコードし、別個のポリヌクレオチドは重鎖ポリペプチドをコードする。一実施態様では、単一のポリヌクレオチドは一アーム抗体の重鎖及び *Fc* ポリペプチド成分をコードし、別個のポリヌクレオチドは一アーム抗体の軽鎖成分をコードする。一実施態様では、別個のポリヌクレオチドは、それぞれ、一アーム抗体の軽鎖成分、一アーム抗体の重鎖成分及び *Fc* ポリペプチドをコードする。

【0032】

異種ポリペプチドをここに記載する。幾つかの実施態様では、異種ポリペプチドは抗体である。幾つかの実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。他の実施態様では、抗体はポリクローナル抗体である。幾つかの実施態様では、抗体は、キメラ抗体、親和性成熟抗体、ヒト化抗体、及びヒト抗体からなる群から選択される。特定の実施態様では、抗体は二重特異的抗体である。特定の実施態様では、抗体は抗体断片である。幾つかの実施態様では、抗体は一価抗体である。幾つかの実施態様では、抗体は *Fab*、*Fab'*、*Fab'-SH*、*F(ab')₂*、又は *scFv* である。幾つかの実施態様では、抗体は *Fc* 領域を含む一アーム抗体（即ち、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは単一の抗原結合アームを形成する。）であり、*Fc* 領域は第一及び第二の *Fc* ポリペプチドを含み、第一及び第二の *Fc* ポリペプチドは複合体中に存在し、前記抗原結合アームを含む *Fab* 分子と比較して前記抗体断片の安定性を増加させる *Fc* 領域を形成する。

【0033】

幾つかの実施態様では、抗体は *c-met* に結合する（幾つかの実施態様では、特異的に結合する）。幾つかの実施態様では、抗 *c-met* 抗体は（a）配列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNSDTRFNP NFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGGLVTVSS

（配列番号：43）

を有する重鎖可変ドメイン、*CH1* 配列、及び第一の *Fc* ポリペプチドを含む第一のポリペプチド；（b）配列：

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K S S Q S L L Y T S S Q K N Y L A
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L
T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y A Y P W T F G Q G T K V E I K R

(配列番号：44)

を有する軽鎖可変ドメイン、及びC L配列を含む第二のポリペプチド；及び(c)第二のF cポリペプチドを含む第三のポリペプチドを含み、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは複合体として存在し、単一抗原結合アームを形成し、第一及び第二のF cポリペプチドは複合体中に存在し、前記抗原結合アームを含むF a b分子と比較して前記抗体断片の安定性を増加させるF c領域を形成する。幾つかの実施態様では、第一のポリペプチドは、図7(配列番号：68)中に記載されるF c配列を含み、第二のポリペプチドは図8(配列番号：47)に記載されるF c配列を含む。幾つかの実施態様では、第一のポリペプチドは、図8(配列番号：47)中に記載されるF c配列を含み、第二のポリペプチドは図7(配列番号：68)に記載されるF c配列を含む。

10

【0034】

幾つかの実施態様では、抗c-met抗体は(a)重鎖可変ドメインを含む第一のポリペプチドであって、前記ポリペプチドが配列：

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y T F T S Y W L H W V R Q A
P G K G L E W V G M I D P S N S D T R F N P N F K D R F T I S A D T S K N T A Y
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A T Y R S Y V T P L D Y W G Q G T L V T V S S A
S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W
N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y
I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P
S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E
Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M
T K N Q V S L S C A V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L
D S D G S F F L V S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q
K S L S L S P G K (配列番号：45)

20

を含むポリペプチド；(b)軽鎖可変ドメインを含む第二のポリペプチドであって、ポリペプチドが配列：

30

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K S S Q S L L Y T S S Q K N Y L A
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y A Y P W T F G Q G T K V E I K R T V A A P S
V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L
Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C
E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号：46)

を含むポリペプチド；及びF cポリペプチドを含む第三のポリペプチドであって、ポリペプチドが配列：

D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T
C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y
R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K
G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E
W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号：47)を含むポリペプチドを含み、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインが複合体として存在し、前記抗原結合アームを含むF a b分子と比較して前記抗体断片の安定性を増加させるF c領域を形成する。

40

【0035】

一実施態様では、抗c-met抗体は、図7(配列番号：52から53及び66)に記載の一以上のC D R 1-H C、C D R 2-H C及びC D R 3-H C配列を含む重鎖可変ド

50

メインを含む。幾つかの実施態様では、抗体は、図 7（配列番号：49 から 51）に記載の一以上の CDR1-LC、CDR2-LC 及び CDR3-LC 配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。幾つかの実施態様では、重鎖可変ドメインは、図 7（配列番号：62 から 65）に記載の FR1-HC、FR2-HC、FR3-HC 及び FR4-HC 配列を含む。幾つかの実施態様では、軽鎖可変ドメインは図 7（配列番号 57 から 60）に記載の FR1-LC、FR2-LC、FR3-LC 及び FR4-LC 配列を含む。

【0036】

幾つかの実施態様では、抗体は、抗体断片中の Fc 配列のホモ二量体化を最小化にする一方で、ヘテロ二量体化を促進する少なくとも 1 つの特性を含む。このような特性は、ここに記載の通り本発明の方法によって得られるイムノグロブリン集団の収量及び／又は純度及び／又は均一性を改善する。一実施態様では、第一の Fc ポリペプチド及び第二の Fc ポリペプチドはインターフェースで会合／相互作用する。第一及び第二の Fc ポリペプチドがインターフェースで会合する幾つかの実施態様では、第二の Fc ポリペプチド（配列）のインターフェースは、第一の Fc ポリペプチド（配列）のインターフェース中の孔（「ホール」とも呼ばれる）中に存在し得る突起（「ノブ」とも呼ばれる）を含む。一実施態様では、国際公開第 2005/063816 号に記載される通り、抗体は「ノブ」と「ホール」を構成する Fc 変異を含む。例えば、ホール変異は Fc ポリペプチド中の一以上の T366A、L368A 及び／又は Y407V であり、ノブ変異は T366W であり得る。

【0037】

本発明はまた本発明の変異 TIR 及びシグナル配列を用いた方法を提供する。ここに開示される変異 TIR、シグナル配列及びポリヌクレオチドは何れも、例えば、ここに開示される本発明の方法のような、方法における使用に適している。更なる態様では、本発明は本発明の異種ポリペプチドを作製する方法を提供する。例えば、本発明は異種ポリペプチド（例えば、ここに定義される通り、全長抗体及びその断片を含む抗体）を調製する方法を提供し、前記方法はポリヌクレオチドが発現するための、本発明のポリヌクレオチド（例えば、翻訳開始領域を含むポリヌクレオチド）を含む宿主細胞の培養を含み、これにより、宿主細胞（例えば、原核生物宿主細胞）中の前記ポリヌクレオチドの発現において、異種ポリペプチドが折りたたまれ、生物学的に活性な異種ポリペプチドを形成する。抗体の発現に関する実施態様では、宿主細胞中の前記ポリヌクレオチドの発現において、軽鎖及び重鎖が折りたたまれ、集合して生物学的に活性な抗体を形成する。幾つかの実施態様では、方法は更に宿主細胞培養からの異種ポリペプチド（例えば、抗体）の回収を含む。幾つかの実施態様では、異種ポリペプチドは宿主細胞培養から回収される。幾つかの実施態様では、発明は更に回収した異種ポリペプチド（例えば、抗体）と薬学的に許容可能な担体、賦形剤、又は異種ポリペプチド（例えば、抗体）を含む薬学的製剤を製造するための担体とを組み合わせることを含む。

【0038】

一態様では、本発明は細胞から関心のある異種ポリペプチドを分泌する方法を提供し、前記方法は、ポリヌクレオチドを発現し、異種ポリペプチドを分泌するために、本発明のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養することを含む。

【0039】

一態様では、本発明は細胞から関心のある異種ポリペプチドを転座する方法を提供し、前記方法は、ポリヌクレオチドを発現し、異種ポリペプチドを転座するために、本発明のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養することを含む。

【0040】

別の態様では、本発明は、翻訳開始領域のポリヌクレオチド変異のセットの制御下のポリペプチドの発現レベルの比較を含む細胞中の関心のある異種ポリペプチドの分泌の最適化し、ここで、変異体のセットは翻訳強度の範囲を示し、成熟ポリペプチド産生の最適な翻訳強度を決定する方法を提供する。幾つかの実施態様では、最適な翻訳強度は、野生型の翻訳開始領域の翻訳強度よりも小さい。幾つかの実施態様では、最適な翻訳強度は、野

生型の翻訳開始領域の翻訳強度よりも大きい。幾つかの実施態様では、変異体は分泌シグナル配列のポリヌクレオチド変異体を含む。幾つかの実施態様では、変異分泌シグナル配列は、s e c 経路シグナル配列及び／又は S P R 経路シグナル配列である。幾つかの実施態様では、変異分泌シグナル配列は、P h o A、M a l E、D s b A、又は S T I I 変異シグナル配列である。幾つかの実施態様では、変異は表 3 に示す一以上の変異である。幾つかの実施態様では、変異体は配列番号 1 から 1 4、3 6 から 3 9、4 1 から 4 2 の一つの配列を含む。

【0041】

一態様では、本発明はここに記載の通り本発明の方法によって得られる異種ポリペプチドを提供する。幾つかの実施態様では、異種ポリペプチドは抗体である。

10

【0042】

一態様では、本発明は、癌、腫瘍、細胞増殖性障害、及び／又は免疫（例えば、自己免疫）疾患のような疾患の治療及び／又は予防的治療のための医薬の調製における、本発明の方法を用いて得られた異種ポリペプチドの使用を提供する。異種ポリペプチドは、抗体、抗体断片、ポリペプチド（例えば、オリゴペプチド）、又はそれらの組み合わせを含む、ここに記載の任意の形態であり得る。

【0043】

一態様では、本発明は、癌、腫瘍、細胞増殖性疾患及び／又は免疫（例えば、自己免疫）疾患のような、疾患の治療及び／又は予防的治療のための医薬の調製における本発明のポリヌクレオチドの使用を提供する。

20

【0044】

一態様では、本発明は、癌、腫瘍、細胞増殖性疾患及び／又は免疫（例えば、自己免疫）疾患のような、疾患の治療及び／又は予防的治療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。

【0045】

一態様では、本発明は、癌、腫瘍、細胞増殖性疾患及び／又は免疫（例えば、自己免疫）疾患のような、疾患の治療及び／又は予防的治療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。

【0046】

一態様では、本発明は、癌、腫瘍、細胞増殖性疾患及び／又は免疫（例えば、自己免疫）疾患のような、疾患の治療及び／又は予防的治療のための医薬の調製における本発明の製品の使用を提供する。

30

【0047】

一態様では、本発明は、癌、腫瘍、細胞増殖性疾患及び／又は免疫（例えば、自己免疫）疾患のような、疾患の治療及び／又は予防的治療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。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図 1】大腸菌の内膜を透過する指示シグナルペプチドの転座。マルトース結合ペリプラズムタンパク質（M a l E）とアルカリフォスファターゼ（P h o A）シグナルペプチドは、分子モーター S e c A を用いて翻訳後様式で細胞質からペリプラズムへの転座を指示する。熱耐性エンテロトキシン I I （S t I I）とチオール：ジスルフィド交換タンパク質（D s b A）シグナルペプチドは、シグナル認識粒子（S R P）を用いた共翻訳様式で転座を指示する。

40

【図 2】シグナルペプチド変異体の相対転座開始領域強度。S T I I、M a l E、P h o A、又は D s b A シグナルペプチドの何れかと大腸菌アルカリフォスファターゼ（B A P）遺伝子の成熟ドメインとの融合を用いたベクターを有する 27C7 細胞の規格化基底アルカリフォスファターゼ活性。各バーは発色基質 P N P P と共にインキュベートした個々の培養を示し、酵素活性を空ベクター（p B R 3 2 2）を有する培養物の吸収よりも小さい 410nm の吸光度として決定した。活性は、プラスミド p P h o 4 1 を有する 27C

50

7細胞の基底活性まで規格化した。白バーは、開始コドンの第一塩基対と比較して－9の位置にあるB s s H I I制限サイトを有するシグナルペプチド変異体を示す。灰色又は縞のバーは、それぞれ－9位におけるM l u I又はX b a Iサイトを示す。全ての活性は、7から10回の反復実験の平均である。エラーバーは、95%信頼限界の平均の不確かさとして報告されている。隣接バー間の相対T I R強度の差異は、全て統計的に有意である（ $P < 0.001$ ）。バーは、クローンS H 1. 2、S H 2. 41、S H 3. 38、S H 4. 60、S H 5. 34、S H 6. 52、S H 8. 36、S L 1. 2、S L 2. 74、S L 3. 72、M H 1. 92、M H 2. 100、M L 1. 97、M L 2. 123、M X 1. w t、M X 2. 15、M X 3. 12、M X 5. 37、M X 6. 4、M X 7. 25、M X 8. 13、M X 11. 34、P H 1. 70、P H 2. 64、P H 3. w t、P H 4. 67、P H 5. 71、P H 6. 77、P L 1. 104、P X 2. 41、P X 3. w t、P X 5. 53、P X 6. 15、P X 8. 24、P X 10. 23、D H 1. 48、D H 2. w t、D H 3. 79、D H 7. 72、D L 1. w t、D L 2. 3、D L 3. 37を示す（左から右の順）。

【図3】重鎖シグナルペプチド操作を用いた抗体種の会合の観察。64B4細胞を25mLのC. R. A. P. リン酸制限培地で24時間培養し、可溶画分並びに光学密度（OD）で規格化した全タンパク質ペレットをS D S－P A G E解析のために調製した。（A）プラスミドp B R－S S－5 D 5－1. 1（S S 1. 1）、p B B R－M S－5 D 5－1. 1（M S 1. 1）、p B R－D S－5 D 5－1. 1（D S 1. 1）又はp B R－P S－5 D 5－1. 1（P S 1. 1）を有する細胞からのサンプルをS D S－P A G Eゲル電気泳動（左側にk D aで示す重量）で分離し、ニトロセルロースに移し、 α -F c特異抗体を用いて重鎖を含む種の存在を調べた。可溶サンプル（一番上のプロット）は、（一番上から一番下の順で）：全長抗体、重－重－軽（H H L）、重－軽（H L）又は遊離重鎖（重鎖モノマー）に相当する推定的に同定されたバンドからなる。規格化した、全タンパク質サンプル（一番上のプロット）は、0. 02MのD T Tで還元して、ジスルフィド結合構造を壊し、各個別のレーンは、約49D aの見かけの重量を有する単一のバンドまで移動した。（B）（A）からのサンプルは、別個のS D S－P A G Eゲル（右側のk D aで示す重量）で泳動し、ニトロセルロースに移し、 α - κ L c 特異抗体を用いて軽鎖を含む複合体を調べた。可溶サンプル（一番上のプロット）は、（一番上から一番下の順で）：全長抗体、H L、軽－軽（L L）ダイマー又は遊離軽鎖（軽鎖モノマー）に相当する推定的に同定されたバンドからなる。規格化した、全タンパク質サンプル（一番上のプロット）は、0. 2MのD T Tで還元し、各個別のレーンは、約25k D aの見かけの重量を有する単一のバンドまで移動した。略語：S＝シグナル配列S T I I M＝シグナル配列M a l E D＝シグナル配列D s b A P＝シグナル配列P h o A。X X #. #（例えば、D S 1. 1）は、実験で使用される重鎖シグナル配列、軽鎖シグナル配列、重鎖T I R、軽鎖T I Rを意味する。

【図4】軽鎖シグナルペプチド操作を用いた抗体種の会合の観察。64B4細胞を25mLのC. R. A. P. リン酸制限培地で24時間培養し、可溶画分並びに光学密度（OD）で規格化した全タンパク質ペレットをS D S－P A G E解析のために調製した。プラスミドp B R－D S－5 D 5－1. 1（D S 1. 1）、p B R－D S－5 D 5－1. 2（D S 1. 2）、p B R－D M－5 D 5－1. 1（D M 1. 1）、p B R－D M－5 D 5－1. 2（D M 1. 2）、p B R－D D－5 D 5－1. 1（D D 1. 1）、p B R－D D－5 D 5－1. 2（D D 1. 2）、p B R－D P－5 D 5－1. 1（D P 1. 1）、又はp B R－D P－5 D 5－1. 2を有する細胞からのサンプルをS D S－P A G Eゲル電気泳動（左側にk D aで示す重量）で分離し、ニトロセルロースに移し、画像の右側に添って示す通り、それぞれ、 α -F c又は α - κ L c 特異抗体を用いて重鎖又は軽鎖を含む種の存在を調べた。可溶サンプル（一番上のプロット）は、（一番上から一番下の順で）：全長抗体、重－重－軽（H H L）、重－軽（H L）又は遊離重鎖（重鎖モノマー）に相当する推定的に同定されたバンドからなる。規格化した、全タンパク質サンプル（中間のプロット、一番下）は、0. 2MのD T Tで還元して、ジスルフィド結合構造を壊し、各個別の

レーンは、 α -Fc抗体で調べた場合に、約49 kDaの見かけの重量を有する単一のバンドまで移動した。 α - κ Lc特異抗体で調べた場合、約25 kDa又は約27 kDa及び約25 kDaの見かけの重量を有する単一又は二重のバンドまで移動した。略語：S=シグナル配列STII M=シグナル配列MaIE D=シグナル配列DsBA P=シグナル配列PhoA。XX#. # (例えば、DS1. 1)は、実験で使用される重鎖シグナル配列、軽鎖シグナル配列、重鎖TIR、軽鎖TIRを意味する。

【図5】10L発酵からの時間をかけた抗体種の会合の観察。そこから可溶画分並びにSDS-PAGE解析のための光学密度(OD)で規格化した全タンパク質ペレットが調製されるサンプルを規定時間間隔で採りながら(播種後数時間の上記の各レーンから採った時間サンプル)、64B4細胞を、3日間、10Lの発酵で高細胞密度まで培養した。シャペロン含有プラスミドpJJ247を共発現するpBR-SS-5D5-1. 1(SS1. 1+シャペロン)、pJJ247を伴うpBR-DD-5D5-1. 1(DD1. 1+シャペロン)、pJJ247を伴うpBR-DS-5D5-1. 1(DM1. 1+シャペロン)、又はpJJ247を伴うpBR-DP-5D5-1. 1(DP1. 1+シャペロン)を有する細胞からのサンプルをSDS-PAGEゲル電気泳動(左側にkDaで示す重量)で分離し、ニトロセルロースに移し、画像の右側に添って示す通り、それぞれ、 α -Fc又は α - κ Lc特異抗体を用いて重鎖又は軽鎖を含む種の存在を調べた。可溶サンプル(一番上のプロット)は、(一番上から一番下の順で)：全長抗体、重-重-軽(HHL)、重-軽(HL)又は遊離重鎖(重鎖モノマー)に相当する推定的に同定されたバンドからなる。規格化した、全タンパク質サンプル(中間のプロット、一番下)は、0. 2 mMのDTTで還元して、ジスルフィド結合構造を壊し、各個別のレーンは、 α -Fc抗体で調べた場合に、約49 kDaの見かけの重量を有する単一のバンドまで移動した。 α - κ Lc特異抗体で調べた場合、全てのレーンが約25 kDaの見かけの重量を有する単一のバンドまで移動した。略語：S=シグナル配列STII M=シグナル配列MaIE D=シグナル配列DsBA P=シグナル配列PhoA。XX#. # (例えば、DS1. 1)は、実験で使用される重鎖シグナル配列、軽鎖シグナル配列、重鎖TIR、軽鎖TIRを意味する。

【図6】誘導条件における成熟PhoAの蓄積。27C7細胞を25 mLのC. R. A. P. リン酸制限培地で24時間培養し、可溶画分を光学強度(OD)で規格化し、SDS-PAGE解析で調製した。大腸菌phoA遺伝子の成熟ドメインを、指定のDsBA又はSTII(一番下)TIR変異体(一番上)に融合した。ゲルをタンパク質の存在についてクマシーブルーで可視化した。PhoA(右)の成熟ドメインに相当する推定的に同定したバンドは、約47 kDa(左側に示す重量)において出現した。

【図7】MetMAb(OA5D5v2)のフレームワーク(FR)、CDR、第1の定常ドメイン(CL又はCH1)及びFc領域(Fc)のアミノ酸配列を示す。図は出現する順で、それぞれ、配列番号57から60、49から51及び61としての軽鎖配列と、出現する順で、それぞれ、配列番号62から65、52から53及び66から68としての重鎖配列を開示する。示されたFc配列は、国際公開第2005/063816号に記載されているような、「ホール」(キャビティ)変異T366S、L368A及びY407Vを含む。

【図8】国際公開第2005/063816号に記載されているような、「ノブ」(隆起)変異T366Wを有するFcポリペプチドの配列(配列番号：47)を示す。一実施態様では、この配列を含むFcポリペプチドは、図7のFc配列を含むFcポリペプチドと複合体を形成し、Fc領域を産生する。

【発明を実施するための形態】

【0049】

一般技術

ここに記載され又は参照される技術及び手順は、一般によく理解され、例えばSambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M

10

20

30

40

50

．Ausubel 等編集 (2003))；シリーズMETHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames 及び G. R. Taylor 編集 (1995))、Harlow及びLane編 (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, 及びANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney編 (1987))に記載される広く利用されている方法のように、当業者によって常套的な方法を使用して一般的に用いられる。

【0050】

定義

ここで使用されているように、「ベクター」という用語は、その他の核酸を、それが連結している場所へ輸送することのできる核酸分子を指す。一つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、付加的なDNAセグメントをライゲーションすることができる環状二重鎖DNAループを指す。他のタイプのベクターはファージベクターである。その他の型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ヘライゲーションすることができる。所定のベクターは、それらが導入された宿主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、及びエピソード哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入によって宿主細胞のゲノムと一体化し、宿主ゲノムと共に複製する。さらに、所定のベクターは、それらが作用可能に連結している遺伝子の発現を方向づける。このようなベクターは、ここでは、「組換え発現ベクター」（あるいは単に「組換えベクター」）と呼ばれている。一般的に、組み換えDNA技術での用途の発現ベクターは、しばしばプラスミドの形をとる。本明細書では、プラスミドが最も広く使用されているベクターの形態であるので、「プラスミド」及び「ベクター」は相互交換可能に使用することができる。

【0051】

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。

【0052】

「ポリシストロン性」発現ベクターは、1つの単一プロモーターの調節コントロールのもとで多くのシストロンを含む及び発現する単一のベクターを指す。ポリシストロン性ベクターの一般的な例は、1つのプロモーターのコントロール条件で2つの異なるポリペプチドを含み、発現する「2シストロン性」ベクターである。2シストロン性又はポリシストロン性ベクターの発現において、多数の遺伝子がまず単一の転写単位として転写され、次いで別々に翻訳される。

【0053】

本発明に係る「個別シストロン性」発現ベクターとは、各シストロンがそれぞれのプロモーターの支配下にある、少なくとも2つの別々のプロモーター-シストロンの対を有する単一のベクターを意図する。個別シストロン性発現ベクターの発現では、別々の遺伝子の転写と翻訳の両段階が分離し、独立している。

【0054】

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。好ましくは、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、T I R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T I R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。

【0056】

「分泌シグナル配列」又は「シグナル配列」とは、細胞膜、通常は内側の膜又は原核生物の内側と外側の膜を通して、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。

【0057】

「作用可能に連結される」とは、そのように記載された成分が意図された様式で機能することを許容する関係にある、2以上の成分の並置を指す。例えば、連結された配列の翻訳制御又は調整のためにそれがシスで機能する場合、プロモーターはコーディング配列に作用可能に連結される。一般的に、必ずしもそうではないが、「作用可能に連結される」DNA配列は連続しており、2個のタンパク質コード配列を連結する必要があるか又は分泌リーダーの場合、連続的で且つ読取り枠内にある。しかしながら、作用可能なプロモーターは一般的にコード配列の上流に位置しているが、必ずしも連続しているというわけではない。作用可能なエンハンサーは、コード配列の上流の中及びプロモーターからかなりの距離の上流に位置し得る。連結は、当該分野で知られている組換え方法、例えば、PCR法を用いるか、アニーリングによるか、又は都合の良い制限サイトにおけるライゲーションによって達成される。都合の良い制限サイトが存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプタまたはリンカーが、慣用法に従って使用される。

【0058】

ここで使用される場合、「調節エレメント」は異種ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのポリペプチドへの転写と翻訳に必要なシスで存在するヌクレオチド配列を指す。転写調節エレメントは通常、発現される遺伝子配列の5'のプロモーター、転写開始及び停止部位、及びポリアデニル化シグナル配列を含む。「転写開始部位」なる用語は、転写第一産物、即ち、mRNA前駆体に組み込まれる第一の核酸に対応するコンストラクト中の核酸を意味する；転写開始部位は、プロモーター配列に重なり得る。

【0059】

「プロモーター」は、それが作用可能に連結した遺伝子又は配列の転写を制御するポリヌクレオチド配列を意味する。プロモーターは、RNAポリメラーゼ結合及び転写開始のシグナルを含む。使用されるプロモーターは、選択された配列の発現が考えられる宿主細胞の細胞型において機能し得る。様々な異なった供給源からの構成的、誘導性及び抑制性プロモーターを含む多数のプロモーターが当該分野においてよく知られており（またGenBankのようなデータベースにおいて同定され）、クローン化ポリヌクレオチドとして（例えばATCCのような寄託期間並びに他の商業的又は個人の供給源から）入手できる。誘導プロモーターでは、プロモーターの活性は、例えば誘導剤のようなシグナルに応答して増加又は減少する。

【0060】

ここで使用される「宿主細胞」（又は「組換え宿主細胞」）という用語は、遺伝的に変化した、又は外因性ポリヌクレオチド、例えば組換えプラスミド又はベクター等の挿入によって遺伝的に変化した細胞を呼ぶことを目的とする。この用語は、特定の対象細胞だけではなく、これらの細胞の子孫をも意味すると理解される。突然変異又は環境による影響のどちらかによって、ある種の修飾が次の世代で生じるため、実際は、このような子孫は親細胞と同一ではない可能性があるが、やはりここで使用されるような「宿主細胞」という用語の範囲に含まれる。

【0061】

「単離された」ポリペプチドは、その自然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は、ポリペプチド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。好ましい実施態様では、ポリペプチドは、(1)ローリー(Lowry)法により定量して、95重量%のポリペプチドより多くなるほど、最も好ましくは99重量%より多くなるまで、(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、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十分なまで、あるいは(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性が得られるように十分なまで精製される。ポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、単離されたポリペプチドには、組換え細胞内のインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一の精製工程により調製される。

【0062】

「単離された」核酸分子は、同定され、ポリペプチド核酸の天然供給源に通常付随している少なくとも一つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離された核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。故に、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在する核酸分子とは区別される。しかし、単離された核酸分子には、例えば、核酸分子が天然の細胞のものとは異なった染色体位置にある核酸を通常発現する細胞に含まれる核酸分子が含まれる。

【0063】

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る。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、例えば標識成分とのコンジュゲートによって合成後にさらに修飾されてよい。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、ペンダント部分、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、ply-L-リジン等)を含むもの、インターカレータ(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(例えば金属、放射性金属、ホウ素、酸化的金属等)を含むもの、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。更に、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担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有機キャップ基部分又はアミンで置換す

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。また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得、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」)、 $(O)NR_2$ (「アミダート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO又は CH_2 (「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

【0064】

本明細書中で用いられる「オリゴヌクレオチド」は一般に、必須ではないが一般におよそ200ヌクレオチド未満である、短い、一般に一本鎖の、一般に合成のポリヌクレオチドを指す。「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」なる用語は互いに矛盾しない。ポリヌクレオチドについての先の記載は等しく、オリゴヌクレオチドにも完全に適用できる。

20

【0065】

ここで用いられる場合、一般に、「ポリペプチド」は約10より多いアミノ酸を有する任意の細胞源由来のペプチド及びタンパク質を指す。「異種の」ポリペプチドは、大腸菌によって産生されるヒトタンパク質のような、利用される宿主細胞にとって外来のポリペプチドである。異種ポリペプチドは原核生物のものでも真核生物のものでもよいが、好ましくは真核生物のものであり、より好ましくは哺乳類、最も好ましくはヒトのものである。好ましくは、それは、組換えにより産生されるか、組換えポリペプチドである。

【0066】

哺乳類ポリペプチドの例は、例えば、レニン、ヒト成長ホルモンを含む成長ホルモン；ウシ成長ホルモン；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；1-アンチトリプシン；インスリンA鎖；インスリンB鎖；プロインスリン；トロネボポエチン；濾胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；因子VIIIC、因子IX、組織因子、及びフォン・ヴィレ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；肺界面活性剤；ウロキナーゼ又はヒト尿又は組織型プラスミノゲン活性化剤(t-PA)等のプラスミノゲン活性化因子；ボンベシン；トロネビン；造血性成長因子；腫瘍壊死因子-アルファ及びベータ；エンケファリナーゼ；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；ベーターラクタマーゼ等の微生物タンパク質；DNase；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；インテグリン；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)、ニューロトロフィン-3、-4、-5又は-6(NT-3、NT-4、NT-5、又はNT-6)などの栄養因子、又はNGF等の神経成長因子；カルジオトロフィン-1(CT-1)等のカルジオトロフィン(心臓肥大因子)；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；上皮成長因子(EGF)；TGF-1、TGF-2、TGF-3、TGF-4、又はTGF-5を含むTGF- α 及びTGF- β などのトランスフォーミング成長因子(TGF)；インスリン様成長因子-I及び-II(IGF-I及びIGF-II)；des(1-3)-IGF-I(脳IGF-I)、インスリン様成長因子結合タンパク質；CD-3、CD-4、CD-8、及びCD-19などのCDタンパ

30

40

50

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-α、-β、及び-γ等のインターフェロン；ヒト血清アルブミン（HSA）又はウシ血清アルブミン（BSA）などの血清アルブミン；コロニー刺激因子（CSF）、例えば、M-CSF、GM-CSF、及びG-CSF；インターロイキン（ILs）、例えば、IL-1からIL-10；抗HER-2抗体；スーパーオキシドジスムターゼ；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AIDS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；抗体；及び上に列挙した任意のポリペプチドの断片などの分子を含む。

【0067】

本発明に好ましいポリペプチドには、ヒト血清アルブミン（HSA）、2C4、組織因子、抗組織因子、抗CD20、抗HER-2、ヘレグリン、抗IgE、抗CD11a、抗CD18、VEGF及び、それらのレセプター及び抗体、例えばrhufab V2及びAVASTIN（登録商標）、成長ホルモンとその変異体、例えばhGH、成長ホルモンレセプター、成長ホルモン放出タンパク質（GHRP）、LIV-1（EP1,263,780）、TRAIL、腫瘍壊死因子（TNF）及びそれに対する抗体、TNFレセプター及びその抗体、TNFレセプターIgG、TNFレセプター関連因子（TRAFs）及びそのインヒビター、因子VIL-1、因子VIL-1 Bドメイン、インターフェロンγ等のインターフェロン、TGF-β等のトランスフォーミング成長因子（TGF）、抗TGF-β等の抗TGF、アクチビン、インヒビン、抗アクチビン、抗インヒビン、組織プラスミノゲン活性化因子及びt-PA、RETEPLASE（登録商標）、及びTNKase等のそれらの変異体、抗Fas抗体、Apo-2リガンド；Apo-2リガンドインヒビター；Apo-2レセプター、Apo-3、アポトーシス因子、Ced-4、DcR3、細胞死受容体及びアゴニスト抗体（DR4、DR5）、リンホトキシン（LT）、プロラクチン、プロラクチンレセプター、SOBタンパク質、WISP（wnt誘発性分泌タンパク質）、神経毒-3（NT-3）、神経成長因子（NGF）及び抗NGF、DNase、肝炎抗原、単純疱疹抗原、レプチン、IGF-1及びIGF-2等のインスリン様成長因子（IGF）、及びそれらの結合タンパク質及びIGFBP-1-IGFBP-6等のレセプター、インスリン、FGF-17等の繊維芽細胞成長因子（FGF）、Tollタンパク質、TIEリガンド、CD40及び抗CD40、イムノアドヘシン、サブチリシン、肝細胞成長因子（HGF）、トロンプオエチン（TPO）、IL-2、IL-12、IL-17、IL-22、IL-8、IL-9等のインターロイキン、及びそれらに対する抗体、及び前立腺特異性癌抗原（PSCA）が含まれる。

【0068】

特に好ましいポリペプチドは組換えポリペプチドであり、さらに好ましくはモノクローナル抗体及びヒト化抗体を含む抗体である。そのような抗体は完全長抗体又は抗体断片でもよい。より好ましくは、これらの抗体はヒト又はヒト化抗体である。更により好ましくは、抗体は、抗cmet、抗IgE、抗CD18、抗VEGF、抗組織因子、2C4、抗Her-2、抗CD20、抗CD40、又は抗CD11a抗体である。ポリペプチドの定義に含まれる抗体断片は軽鎖を有することが好ましく、さらに好ましくはκ軽鎖を有する。そのような好ましい断片には、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂-ロイシンジッパー（LZ）融合物、及び一腕抗体が含まれる。

【0069】

タンパク質「発現」は、遺伝子においてコード化された情報をメッセンジャーRNA（mRNA）、ついでタンパク質に転換することを意味する。

【0070】

「イムノコンジュゲート」（「抗体-薬剤コンジュゲート」又は「ADC」と交換可能に称される）は、一又は複数の細胞傷害剤、例えば化学療法剤、薬剤、成長阻害剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、又は動物由来の酵素的に活性な毒素、その断片）、又は放射性同位元素（すなわち、放射性コンジュゲート）にコンジュゲートした抗体

を意味する。

【0071】

「ブロッキング」抗体又は「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物学的活性度を阻害又は減少させるものである。幾つかの実施態様では、ブロッキング抗体又は、アンタゴニスト抗体は、完全に抗原の生物学的活性を阻害する。

【0072】

ここで使用される場合、「アゴニスト抗体」は、関心あ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(例えば、HGF)。

【0073】

一般的に「結合親和性」は、分子(例えば抗体)の単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Yに対する親和性は、解離定数(K_d)として表される。望ましくは、K_dは 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 5×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、 3×10^{-9} 、 5×10^{-9} 、又はさらに 1×10^{-10} 以上の強さである。親和性は、本明細書中に記載のものを含む当業者に公知の共通した方法によって測定することができる。低親和性抗体は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、高親和性抗体は抗原により密接により長く結合したままとなる。結合親和性の様々な測定方法が当分野で公知であり、それらの何れかを本発明のために用いることができる。以下に具体的な例示の実施態様を記載する。

【0074】

一実施態様では、本発明の「K_d」又は「K_d値」は、段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度の(125 I)-標識抗原にてFabを均衡化して、抗Fab抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって抗原に対するFabの溶液結合親和性を測定する以下のアッセイで示されるような(Chen, 等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881)、所望の抗体のFab型(バージョン)とその抗原を用いて実行される放射性標識した抗原結合アッセイ(RIA)で測定される。アッセイの条件を決めるために、マイクロタイタープレート(Dynex)を5 µg/mlの捕獲抗Fab抗体(Cappel Labs)を含む50 mM炭酸ナトリウム(pH 9.6)にて一晚コートして、その後2%(w/v)のウシ血清アルブミンを含むPBSにて室温(およそ23°C)で2~5時間、ブロックする。非吸着プレート(Nunc#269620)に、100 pM又は26 pMの(125 I)抗原を段階希釈した所望のFabと混合する(例えば、Presta等, (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599の抗VEGF抗体、Fab-12の評価と一致する)。ついで所望のFabを一晚インキュベートする;しかし、インキュベーションは確実に平衡状態に達するまでに長時間(例えば65時間)かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で(例えば1時間)インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを0.1%のTween 20を含むPBSにて8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 µl/ウェルの閃光物質(MicroScint-20; Packard)を加え、プレートをTopcount γ計測器(Packard)にて10分間計測する。最大結合の20%か又はそれ以下濃度のFabを選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。他の実施態様によると、~10反応単位(RU)の固定した抗原CM5チップを用いて25°CのBIAcore(商標)2000又はBIAcore(商標)-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)にて表面プラズモン共鳴アッセイを行ってK_d又はK_d値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシニミド(NHS)で活性化した。抗原を10 mM 酢酸ナトリウム(pH 4.8)で5 µg/ml(~0.2 µM)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(RU)がおよそ10になるように5 µl/分の流速で注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために1 Mのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2倍の段階希釈したFab(0.78 nMから500 nM)を25°C、およそ25 µl/分の流量で0.05% Tween 20(PBST)を含むPBSに注入した。いくつかの実施態様

では、表面プラスモン共鳴アッセイ法に以下の変更が用いられる：およそ400RUを達成するように抗体をCM5バイオセンサーチップに固定し、動態学的測定のために、標的タンパク質の2倍段階希釈物をおよそ30u1/分の流速で25℃のPBSTバッファに注入する。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度(K_{on})と解離速度(K_{off})を算出した。平衡解離定数(K_d)を K_{off}/K_{on} 比として算出した。例として、Chen, Y., 等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881を参照。上記の表面プラスモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 M^{-1} S^{-1}$ を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBST(pH7.2)、25℃の、20nMの抗抗原抗体(Fab型)の蛍光放出強度(励起=295nm; 放出=340nm、帯域通過=16nm)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

【0075】

また、本発明の「結合速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「 k_{on} 」は、~10反応単位(RU)の固定した抗原CM5チップを用いて25℃のBIAcore(商標)200又はBIAcore(商標)3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いた前述と同じ表面プラズモン共鳴アッセイにて測定される。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシニミド(NHS)で活性化した。抗原を10mM 酢酸ナトリウム(pH4.8)で5µg/ml(~0.2µM)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(RU)がおよそ10になるように5µl/分の流速で注入した。その後、反応しない群をブロックするために1Mのエタノールアミンを注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために1Mのエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、2倍の段階希釈したFab(0.78nMから500nM)を25℃、およそ25µl/分の流量で0.05%Tween20(PBST)を含むPBSTに注入した。いくつかの実施態様では、表面プラスモン共鳴アッセイ法に以下の変更が用いられる：およそ400RUを達成するように抗体をCM5バイオセンサーチップに固定し、動態学的測定のために、標的タンパク質の2倍段階希釈物をおよそ30u1/分の流速で25℃のPBSTバッファに注入する。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度(K_{on})と解離速度(K_{off})を算出した。平衡解離定数(K_d)を K_{off}/K_{on} 比として算出した。例として、Chen, Y., 等, (1999) J. Mol Biol 293:865-881を参照。しかし、上記の表面プラスモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 M^{-1} S^{-1}$ を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBST(pH7.2)、25℃の、20nMの抗抗原抗体(Fab型)の蛍光放出強度(励起=295nm; 放出=340nm、帯域通過=16nm)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定するのが好ましい。

【0076】

「ネイキッド抗体」は、異種性分子(例えば細胞障害性部分又は放射標識)にコンジュゲートしていない抗体である。

【0077】

指定された抗体の「生物学的特性」を有する抗体は同じ抗原に結合する他の抗体とは区別されるその抗体の生物学的特性の一又は複数を保有するものである。

【0078】

対象の抗体が結合する抗原上のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするために

、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載のものなどの常套的な交差遮断(cross-blocking)アッセイを行ってもよい。

【0079】

本発明のアミノ酸配列を含む抗体又はポリペプチドの半減期を増大させるために、例えば米国特許第5739277号に記載のように、抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープ接着させることができる。例えば、サルベージレセプター結合エピトープをコードする核酸分子は、操作した核酸分子によって発現される融合タンパク質が本発明のポリペプチド配列とサルベージレセプター結合エピトープを含むように、本発明のポリペプチド配列をコードする核酸のフレーム内に連結させることができる。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄)のFc領域のエピトープを意味する(例えば、Ghetie, V等, (2000) Ann. Rev. Immunol. 18:739-766, 表1)。Fc領域内に置換を有する抗体および血清半減期が増大した抗体については、国際公開00/42072、国際公開02/060919; Shields, R.L., ら, (2001) JBC 276(9):6591-6604; Hinton, P.R., (2004) JBC 279(8):6213-6216)にも記載されている。他の実施態様では、例えば他のポリペプチド配列に接着させることによって血清半減期が増大しうる。例えば、血清アルブミンが抗体又はポリペプチドに結合するように、抗体又は本発明の方法に有用な他のポリペプチドをFcRnレセプター又は血清アルブミン結合ペプチドに結合する血清アルブミン又は血清アルブミンの一部に接着させることができ、例としてこのようなポリペプチド配列は国際公開01/45746に開示されている。好適な実施態様では、接着した血清アルブミンペプチドはアミノ酸配列DICLPRWGCLW(配列番号:183)を含む。他の実施態様では、Fabの半減期はこれらの方法によって増大する。血清アルブミン結合ペプチド配列については、Dennis, M.S., ら, (2002) JBC 277(38):35035-35043も参照のこと。

【0080】

「断片」とは、好ましくは、参照核酸分子又はポリペプチドの全体の長さの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又はそれ以上を含むポリペプチド又は核酸分子の一部を意味する。断片は、10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は100、200、300、400、500、600又はそれ以上のヌクレオチド、ないしは10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、190、200アミノ酸又はそれ以上を含むうる。

【0081】

「抗体」及び「イムノグロブリン」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)を含み、(本明細書で更に詳細に記載される)特定の抗体断片をまた含み得る。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。

【0082】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の相補性決定領域(CDR)又は高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、βシート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つのCDRにより連結されたβシート配置を主にとる4つのFRをそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FRによって近接して結合され、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th

Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞性細胞毒性への抗体の関与を示す。

【0083】

抗体のパパイン消化は、「F a b」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「F c」断片と命名される。ペプシン処理はF (a b')₂断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

【0084】

「F v」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。二本鎖のF v種において、この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖の変域ドメインの二量体からなる。一本鎖F v種において、一つの重鎖及び一つの軽鎖の変域ドメインはフレキシブルなペプチドリンカーによって共有結合されて、軽鎖及び重鎖が「二量体」構造類似体内で二本鎖F v種内のものに結合しうる。この配置において、各変域ドメインの3つのCDRは相互に作用してV_H-V_L二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つのCDRが抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つのCDRのみを含むF vの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

【0085】

またF a b断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。F a b'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でF a b断片とは異なる。F a b'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が一つの遊離チオール基を担持しているF a b'に対するここでの命名である。F (a b')₂抗体断片は、間にヒンジシステインを有するF a b'断片の対として生産された。また、抗体断片の他の化学結合も知られている。

【0086】

任意の脊椎動物種からの抗体(イムノグロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

【0087】

イムノグロブリンの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、イムノグロブリンは異なるクラスが割り当てられる。イムノグロブリンには5つの主なクラスがある：Ig A、Ig D、Ig E、Ig G及びIg M、更にそれらは、Ig G₁、Ig G₂、Ig G₃、Ig G₄、Ig A₁、及びIg A₂等のサブクラス(アイソタイプ)に分かれる。イムノグロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれα、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。イムノグロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られている。「抗体断片」は完全な抗体の一部のみを含んでなるものであり、その一部は、完全な(インタクトな)抗体に存在する場合のその一部に通常関連する機能の少なくとも一、好ましくはその機能のほとんどないしはすべてを保持することが好ましい。抗体断片の例には、F a b、F a b'、F (a b')₂及びF v断片；ダイアボディ；線形抗体；単鎖抗体分子；及び、抗体断片から形成される多特異性抗体が含まれる。一実施態様では、抗体断片は完全な抗体の抗原結合部位を含んでなるために、抗原結合能を有する。他の実施態様では、抗体断片は、例えばFc領域を含んでなるものは、完全な抗体に存在する場合のFc領域に通常関連する生物学的な機能、例えばFcRn結合、抗体半減期の調節、ADCC機能及び補体結合の少なくとも一を保持する。一実施態様では、抗体断片は、完全な抗体と実質的に類似したインビボ半減期を有する一価性抗体である。例えば、このような抗体断片は、インビボ安定性を断片に与えることができるFc配列に結合した抗原結合アームを含んでもよい。

【0088】

本願明細書において、用いられる「高頻度可変領域」、「HVR」又は「HV」なる用

10

20

30

40

50

語は、配列中の高頻度に可変している及び／又は構造的に定義されたループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。通常、抗体は、VH(H1、H2、H3)の3つと、VL(L1、L2、L3)の3つの計6つの高頻度可変領域を含んでなる。多くの高頻度可変領域が描写されており、本願明細書において、包含される。Kabat相補性決定領域(CDR)は、配列多様性に基づいており、最も一般的に用いられるものである(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置を指す(Chothia 及びLesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM高頻度可変領域は、Kabat CDRとChothia構造ループとが組み合わさったものであり、Oxford Molecular's AbM抗体モデリングソフトウェアにより使用されている。「接触」高頻度可変領域は、利用できる複雑な結晶構造の分析に基づくものである。これら高頻度可変領域の残基を以下に示す。

【0089】

カバットループ	AbM	Chothia	接触
L1 L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2 L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3 L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1 H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(カバット番号付け)			
H1 H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia番号付け)			
H2 H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3 H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

【0090】

高頻度可変領域は、次のような「拡大高頻度可変領域」を含むことができる、即ち、VLの24-36又は24-34(L1)、46-56又は50-56(L2)及び89-97(L3)と、VHの26-35(H1)、50-65又は49-65(H2)及び93-102、94-102、又は95-102(H3)である。可変ドメイン残基には、これら各々を規定するために、上掲のKabat等に従って番号を付した。

【0091】

本願明細書において、定められるように、「フレームワーク」又は「FR」残基は高頻度可変領域残基以外のその可変ドメイン残基である。

【0092】

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、ウサギ又は非ヒト霊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)。

【0093】

「キメラ」抗体(免疫グロブリン)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相同であり、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あるい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相同である「キメラ」抗体、並びにそれが所望の生物活性を有する限りそれら抗体の断片を有する(アメリカ特許番号4,816,567、及び、Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。本明細書中で用いられるヒト化抗体は、キメラ抗体のサブセットである。

【0094】

「一本鎖 Fv」又は「scFv」抗体断片は、抗体の V_H 及び V_L ドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。一般的に、scFv ポリペプチドは V_H 及び V_L ドメイン間にポリペプチドリinker を更に含み、それは scFv が抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。scFv の概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg 及び Moore 編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) の Pluckthun を参照のこと。

【0095】

「抗原」は、抗体が選択的に結合しうる予め決められた抗原である。標的抗原は、ポリペプチド、炭水化物、核酸、脂質、ハプテン又は他の天然に生じる化合物ないしは合成化合物であってもよい。標的抗原はポリペプチドであることが望ましい。

【0096】

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖(V_H-V_L)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)が結合してなる。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成が可能であるリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディーは、例えば、EP 404, 097; WO 93/11161; 及び Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) に更に詳細に記載されている。

【0097】

「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。

【0098】

「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。親和性成熟抗体は、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、V_H ドメインと V_L ドメインのシャフリングによる親和性成熟を開示している。CDR 及び／又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); 及び Hawkins 他、J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992) に開示されている。

【0099】

「Fc レセプター」又は「FcR」は、抗体の Fc 領域に結合するレセプターを記載するものである。好適な FcR は天然配列ヒト FcR である。さらに好適な FcR は、IgG 抗体(ガンマレセプター)と結合するもので、FcγRI、FcγRII 及び FcγRIII 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、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。FcγRII レセプターには、FcγRIIA(「活性型レセプター」)及び FcγRIIB(「阻害型レセプター」)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。活性型レセプターFcγRIIAは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif ; ITAM)を含んでいる。阻害型レセプターFcγRIIBは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif ; ITIM)を含んでいる(Daeron, Annu. Rev. immunol. 15:203-234 (1997)を参照)。FcRsに関しては、 Ravetch and 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FcRsはここでの「FcR」という言葉によって包含される。また、該用語には、母性IgGの胎児への移送を担い(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976) Kim等, J. Immunol.24:249 (1994))、免疫グロブリンのホメオスタシスを調節する新生児性レセプターFcRnも含まれる。国際公開公報00/42072 (Presta) にFcRへの結合を向上又は減弱させた抗体変異型が述べられている。この特許公開の内容はここに出典明記により具体的に組み込まれる。Shields等, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)も参照のこと。

10

【0100】

FcRnへの結合の測定方法は公知である(例としてGhetie 1997, Hinton 2004を参照)。インビボでのヒトFcRnへの結合とヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えばヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウス又は形質転換されたヒト細胞株、又はFc変異形ポリペプチドを投与された霊長類動物においてアッセイすることができる。

20

【0101】

Fc領域アミノ酸配列を変更してC1q結合能力が増大又は減少したポリペプチド変異体は、米特許第6194551号B1及び国際公開公報99/51642に記述される。それらの特許文献の内容は、出典明記によって、特別に本願明細書に組み込まれるものとする。またIdusogie 等 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)を参照のこと。

【0102】

本明細書で使用される「Fc領域」なる用語は、概して、C末端ポリペプチド配列がインタクト抗体のパパイン消化によって取得されうる免疫グロブリン重鎖のC末端ポリペプチド配列を含んでなる二量体複合体を指す。Fc領域は、天然Fc配列又は変異Fc配列を含むことができる。免疫グロブリン重鎖のFc配列の境界は変化するが、通常、ヒトIgG重鎖Fc配列はおよそCys226の位置又はおよそPro230の位置のアミノ酸残基からFc配列のカルボキシル末端まで伸びると定義される。免疫グロブリンのFc配列は、通常、二つの定常ドメイン、即ちCH2ドメインとCH3ドメインとを含み、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。

30

40

【0103】

ここで用いる「抗体変異体」又は「抗体変異」は、抗体のアミノ酸配列変異体であってその種依存的抗体の一又は複数のアミノ酸残基が変更しているものを指す。このような変異体は、必然的に種依存的抗体と100%未満の配列同一性又は類似性がある。ある実施態様では、抗体変異体は、種依存性抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインの何れかのアミノ酸配列と、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列同一性又は類似性があるアミノ酸配列を有するであろう。この配列に対する同一性又は類似性は、配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入し最大の配列同一性パー

50

セントを達成した後に種依存的抗体残基と同一(つまり同じ残基)又は類似(つまり共通の側鎖特性に基づく同じグループのアミノ酸残基、下を参照)である候補配列におけるアミノ酸残基のパーセントとしてここで定義される。可変ドメインの外側の抗体配列中へのN末端、C末端、又は内部の伸展、欠失、又は挿入は何れも配列同一性又は類似性に影響を及ぼすものとはみなされない。

【0104】

「疾病」又は「疾患」は、本発明の物質／分子又は方法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；癌腫、芽腫及び肉腫が含まれる。

10

【0105】

「治療」は、治療的処置および予防又は防止的な手段の両方を指す。治療を必要とするものには、良性、前癌性又は非転移性の腫瘍を既に有しているもの、並びに癌の発生又は再発が予防されるべきものも含まれる。

【0106】

「治療上の有効量」なる用語は、哺乳動物の疾患又は疾病を治療又は予防するための治療薬の量を指す。癌の場合、薬剤の治療上の有効量は、癌細胞の数を減少；原発性腫瘍サイズを低減；周辺臓器への癌細胞浸潤の阻害(すなわち、ある程度の遅延及び好ましくは停止)；腫瘍転移の阻害(すなわち、ある程度の遅延及び好ましくは停止)；ある程度の腫瘍増殖の阻害；及び／又は疾患が関与する一又は複数の症状のある程度の軽減をしうる。ある程度、薬剤は、増殖を妨げ及び／又は現存の癌細胞を殺し得、細胞分裂停止性及び／又は細胞障害性である。癌治療に対しては、インビボにおける効力は、例えば生存期間、病状の進行時間(TTP)、応答速度(RR)、応答期間、及び／又は生活の質の評価により測定される。

20

【0107】

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(例えばクローン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；ランバート-イートン筋無力症候群；水疱性類天ぼうそう；ペンフィグス；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。

30

40

【0108】

「癌」及び「癌性」なる用語は、一般的に制御不能な細胞増殖に特徴がある哺乳動物の生理学的状態を指すか又は記述する。良性及び悪性の癌はこの定義に含まれる。「初期癌

50

」又は「初期腫瘍」とは、侵襲性あるいは転移性でないか、又はステージ 0、I、又は I I の癌として分類される癌を意味する。癌の例には、カルチノーマ、リンパ腫、芽細胞腫(髄芽細胞腫および網膜芽細胞腫を含む)、肉腫(脂肪肉腫および滑液細胞肉腫を含む)、神経内分泌腫瘍(カルチノイド腫瘍、ガストリノーマおよび膵島細胞癌を含む)、中皮腫、シュワン細胞腫(聴神経腫瘍を含む)、髄膜腫、腺癌、メラノーマおよび白血病又はリンパ性悪性腫瘍を含むが、これらに限定されるものではない。このような癌のより具体的な例には、扁平細胞癌(例えば上皮扁平細胞癌)、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌を含む肺癌、腹膜の癌、肝細胞性癌、消化系癌を含む胃(gastric、stomach)癌、膵癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝腫瘍、乳癌(転移性乳癌を含む)、大腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮カルチノーマ、唾液腺カルチノーマ、腎臓又は腎癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝臓癌、肛門部のカルチノーマ、陰茎カルチノーマ、精巣癌、食道癌、胆道の腫瘍、並びに頭頸部癌、及び多発性骨髄腫が含まれる。

【0109】

「前癌性」なる用語は、典型的に癌に進行する又は癌に発達する症状ないし成長を指す。「前癌性の」成長は、細胞周期調節、細胞性増殖又は分化のマーカーによって測定される、異常な細胞周期調節、増殖又は分化によって特徴が示される細胞を有する。

【0110】

「形成異常」は、組織、臓器又は細胞の任意の異常な成長ないしは発達を意味する。好ましくは、形成異常は高いグレードであるか、前癌性である。

【0111】

「転移」とは、その原発性部位から体の他の場所への癌の蔓延を意味する。癌細胞は、原発性腫瘍から切り離れ、リンパ管および血管へ浸透し、血流を循環し、身体の至る所の正常組織の離れた病巣で成長しうる(転移)。転移は局所又は遠位でありうる。転移は経時的な過程であり、原発性腫瘍から切り離れ、血流を駆けめぐり、遠位部位に止まる腫瘍細胞に付随するものである。新たな部位で、細胞は、血液供給を確立し、成長して生命を脅かす体積を形成しうる。

【0112】

腫瘍細胞内の刺激性分子および阻害性分子の経路はこの作用を制御するものであり、腫瘍細胞と遠位部位の宿主細胞との間の相互作用も有意である。

【0113】

「非転移性」とは、良性である癌、又は原発部位に止まり、リンパ管や血管系ないしは原発部位以外の組織に浸透しない癌を意味する。一般的に、非転移性癌は、ステージ 0、I 又は I I の癌、場合によってステージ I I I の癌のいずれかの癌である。

【0114】

「原発性腫瘍」又は「原発性癌」は元の癌を意味し、被検体の身体の他の組織、臓器又は部位に位置する転移性病巣を意味しない。

【0115】

「良性腫瘍」又は「良性癌」は、元の部位に限局したままである腫瘍を意味し、遠位の部位への浸潤、侵入又は転移の能力を有さない。

【0116】

「腫瘍量」は、体内の癌細胞の数、腫瘍のサイズ、又は癌の量を意味する。また、腫瘍量(tumor burden)は腫瘍負荷(tumor load)とも称される。

【0117】

「腫瘍数」は腫瘍の数を意味する。

【0118】

「被検体」は、哺乳類、例えば限定するものではないが、ヒト又はヒト以外の哺乳動物、例としてウシ、ウマ科、イヌ、ヒツジ又はネコを意味する。被検体はヒトであることが望ましい。

【0119】

「抗癌療法」なる用語は、癌を治療する際に有用な療法を指す。抗癌治療剤の例には、限定するものではないが、例えば、手術、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞障害剤、放射線療法に用いる薬剤、抗血管新生剤、アポトーシス剤、抗チューブリン薬剤、および癌を治療するための他の薬剤、抗CD20抗体、血小板由来増殖因子インヒビター(例えばGleevecTM(メシル酸イマチニブ))、COX-2インヒビター(例えばセレコキシブ)、インターフェロン、サイトカイン、以下の標的ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR-β、BlyS、APRIL、BCMA又はVEGFレセプター(一又は複数)、TRAIL/Apo2および他の生理活性かつ有機化学的薬剤などの一又は複数に結合するアンタゴニスト(例えば中和抗体)が含まれる。また、その組合せが本発明に包含される。

10

【0120】

ここで用いられる「細胞障害性剤」は、細胞の機能を阻害又は抑制し、および／又は細胞破壊を起こす物質を意味する。この用語は、放射性同位元素(例えば、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} および Re^{186})、化学治療薬、および細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素又はその断片を意味する。

【0121】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例には、癌の治療に有用な化学的化合物が含まれる。化学療法剤の例には、チオテパおよびシクロスホスファミド(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およびピボ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(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、およびウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、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(triethylenethiophosphaoramide)およびトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類およびメチラメラミン類；アセトゲニン(acetogenins)(特にブラタシン(bullatacin)およびブラタシノン(bullatacinone))；カンプトセシン(合成類似体トポテカン(topotecan)を含む)；プリオスタチン；カリスタチン(callystatin)；CC-1065(そのアドゼレシン(adozelesin)、カルゼレシン(carzelesin)およびバイゼレシン(bizelesin)合成類似体を含む)；クリプトフィシン(cryptophycin)(特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8)；ドラスタチン(dolastatin)；デュオカルマイシン(duocarmycin)(合成類似体、KW-2189およびCBI-TM1を含む)；エレトロビン(eleutherobin)；パンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコディクチン(sarcodictyin)；スポンジスタチン(spongistatin)；クロランブシル、クロルナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、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)、ウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード；ニトロスレアス(nitrosureas)、例えばカルムスチン(carmustine)、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン(lomustine)、ニムスチン、ラニムスチン；エネジイン(enediyne)抗生物質等の抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシガンマ1Iおよびカリケアマイシンオメガ1I、例えば、Agnew Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)を参照のこと；ダイネミシンA(dynemicinA)を含むダイネミシン(dynemicin)；クロドロネート(clodronate)などのビスホスホネート(bisphosphonates)；エスペラマイシン(esperamicin)；同様にネオカルチノスタチン発光団および関連色素蛋白エネジイン(enediyne)抗生物質発光団)、アクラシノマイシン(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(bleomycins)、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン(carminomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorubicin)、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(モルフォリノードキソルビシン、シアノモルフォ

20

30

40

50

リノ-ドキシソルビシン、2-ピロリノ-ドキシソルビシンおよびデオキシドキシソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン(esorubicin)、イダルビシン、マセロマイシン(marcel lomyacin)、マイトマイシンCなどのマイトマイシン(mitomycins)、マイコフェノール酸(m ycophenolic 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、クエラマイシン (quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、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(zor ubicin)；メトトレキセートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)のような抗-代謝産物； デノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメ トレキセート(trimetrexate)のような葉酸類似体；フルダラビン(fludarabine)、6-メル カプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリン類似体；アンシタビン、アザ シチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジ デオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)のようなピリミジン類似体；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) のようなアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎 剤；フロリン酸(frolinic acid)のような葉酸リプレニッシャー(replenisher)；アセグラ トン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；エニルウラシル(eniluracil) ；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ビスアントレン(bisantrene) ；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecol cine)；ジアジコン(diaziqune)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリブチニウ ム(elliptinium acetate)；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)；メイタンシン(maytans ine)およびアンサマイトシン(ansamitocin)のようなメイタンシノイド(maytansinoid)； 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(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルビシン；ポドフィリ ン酸(podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K(登録商標) 多糖類複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシ ン(rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニユアゾン酸(ten uazonic acid)；トリアジコン(triaziqune)；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン ；トリコテセン(trichothecenes)(特に、T-2トキシシン、ベラキュリンA(verracurin A) 、ロリデンA(roridin A)およびアングイデン(anguidine))；ウレタン；ビンデシン；ダ カルバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitol actol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えばタキソール(登録商標)パクリタ キセル、(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、A B R A X A N E^{T M} ク レモフォール(Cremophor)を含まない、アルブミン設計のナノ粒子形状のパクリタキセル(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)およびタキソテア(登録商 標)ドキセタキセル、(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；G E M Z A R(登録商標)ゲンシタビン(gemcitabine)；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メ トトレキセート；シスプラチンおよびカルボプラチンのようなプラチナ類似体；ビンブ ラスチン；プラチナ；エトポシド(V P-16)；ミトキサントン；ピンクリスチン；N A V E L B I N E(登録商標)ビノレルビン；ナベルビン(Navelbine)；ノバントロン(novantro ne)；テニポシド；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；キセローダ(xe loda)；イバンドロナート(ibandronate)；イリノテカン(カンプトサル(Camptosar)、C P T-11)(5-FUおよびリユーコボリンとのイリノテカンの治療処方を含む)；トポイソ メラーゼインヒビターR F S 2 0 0 0；ジフルオロメチロールニチン(D M F O)；レチノ イン酸などのレチノイド類；カペシタビン(capecitabine)；コンブレタスタチン(combret astatin)；V E L C A D E ボルテゾミブ；R E V L I M I D レナリドミド；リユーコボ リン(leucovorin)(L V)；オキサリプラチン(oxaliplatin)、オキサリプラチン治療処方(

10

20

30

40

50

FOLFOX)を含む；P K C- α のインヒビター、R a f、H-R a s、E G F R(例として、エルロチニブ(erlotinib)(T a r c e v a^{T M}))および細胞増殖を減少させるV E G F-A、並びに上述したものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0122】

また、この定義には、腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように働く抗ホルモン剤、抗エストロゲンおよび選択的エストロゲンレセプターモジュレーター(S E R M)など、例えばタモキシフェン(N O L V A D E X(登録商標)タモキシフェンを含む)、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)、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン(onapristone)、およびF A R E S T O N・トレミフェン(Fareston)；アロマターゼ酵素を阻害するアロマターゼ阻害物質、それらは副腎でのエストロゲン産生を調節するものであり、例えば4(5)-イミダゾール類、アミノグルテチミド、M E G A S E(登録商標)メゲストロールアセテート、A R O M A S I N(登録商標)エキセメスタン、ホルメスタイン(formestane)、ファドロゾール、R I V I S O R(登録商標)ゾロゾール(vorozole)、F E M A R A(登録商標)レトロゾールおよびA R I M I D E X(登録商標)アナストロゾール；；および抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリン；並びにトロキサシタビン(troxacitabine)(1,3-ジオキサランヌ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、特に不粘着性細胞増殖に関係するシグナル伝達経路の遺伝子の発現を抑制するもの、例えばP K C- α l p h a、ラルフおよびH-R a s；リボザイム、例えばV E G F発現インヒビター(例えばA N G I O Z Y M E(登録商標)リボザイム)およびH E R 2発現インヒビター；遺伝子治療ワクチン、例えばA L L O V E C T I N(登録商標)ワクチン、L E U V E C T I N(登録商標)ワクチンおよびV A X I D(登録商標)ワクチンなどのワクチン；P R O L E U K I N(登録商標)r I L-2；L U R T O T E C A N(登録商標)トボイソメラーゼ1インヒビター；A B A R E L I X(登録商標)rmRH；ビノレルビン(Vinorelbine)およびエスベラミシン(Esperamicins)(米国特許第4675187号を参照)並びに上記のものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0123】

この出願で用いられる用語「プロドラッグ」は、親薬剤に比較して腫瘍細胞に対する細胞障害性が低く、酵素的に活性化又はより活性な親形態に変換される製薬的活性物質の前駆体又は誘導体形態を意味する。例えば、Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」, Biochemical Society Transactions, 14, :375-382, 615th Meeting, Belfast (1986)、およびStella 等, 「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」, Directed Drug Delivery, Borchardt等(編), 247-267項, Humana Press (1985)参照。本発明のプロドラッグは、限定するものではないが、ホスファート含有プロドラッグ、チオホスファート含有プロドラッグ、スルファート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、 β -ラクタム含有プロドラッグ、任意に置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ又は任意に置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、より活性のある細胞毒のない薬剤に転換可能な5-フルオロシトシンおよび他の5-フルオロウリジンプロドラッグを含む。限定はしないが、本発明で使用されるプロドラッグ形態に誘導体化可能な細胞障害性剤の例には、前記の化学療法剤が含まれる。

【0124】

「放射線療法」とは、正常に機能する能力を制限するため又は全く細胞を破壊するために、細胞に十分な損傷を誘導する有向性の γ 線又は β 線の使用を意味する。治療の用量および治療期間を決定するためには公知の多くの方法があることは明らかであろう。典型的な治療は、1回の投与として、1日当たり10～200単位(グレイ)の典型的な用量として施される。

【0125】

「生物学的に活性な」又は「機能性の」ポリペプチド(異種ポリペプチドのような)と

は、構造的な、制御性の、生化学的な又は生物物理学的な現象において一以上のその本来の活性を発揮する能力のあるものである。

【0126】

「生物学的に活性な」又は「機能性の」抗体とは、構造的な、制御性の、生化学的な又は生物物理学的な現象において一以上のその本来の活性を発揮する能力のあるものである。例えば、生物学的に活性な抗体は、抗原に特異的に結合する能力を有し、その結合は、言い換えると、シグナル伝達又は酵素活性のような細胞の又は分子の現象を誘発あるいは変化させる。また、生物学的に活性な抗体は、レセプターのリガンド活性化を阻害したり、あるいはアゴニスト抗体として働いたりすることもある。一以上のその本質的な活性を発揮する全長抗体の能力は、ポリペプチド鎖の適切な折り畳みと構造化を含む、幾つかの要素に依存する。ここで使用されるように、開示される方法によって作成された生物学的に活性な免疫グロブリンは、典型的に、複数のジスルフィド結合によってつながり、適切に折り畳まれた、2つの同一のL鎖と2つの同一のH鎖を有するヘテロ四量体である。

10

【0127】

本発明の組成物とそれを用いた方法

一態様では、本発明はTIR変異体を提供する。したがって、所定のTIRについて、一連のアミノ酸又は核酸配列誘導体を、翻訳強度の範囲で製造し得、それによって、多数の異なるポリペプチドの最適な分泌のためのこの因子を調節するための簡便な方法を提供する。PhoAのようなこれらの変異体の制御下において発現するレポーター遺伝子の使用は、異なる翻訳開始領域の相対翻訳強度を定量するための方法を提供する。TIRの変異体又はミュータントは、プラスミドのバックグラウンドで提供され得、それにより、成熟ポリペプチドの最大発現の翻訳強度の最適範囲を確立するために、所望の遺伝子が挿入され得、その発現が測定され得るプラスミドのセットが提供される。

20

【0128】

ヌクレオチド配列のサイレント変化が好ましいが、TIRの変異導入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技術によってなされる。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」の産生である。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。この変異導入の方法はYansura等(1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158に詳細に記載されている。基本的に、シグナル配列と成熟ポリペプチドの始まりをコードするDNA断片は、最初の6から12のコドンのそれぞれの第三（及び、場合により、上に記載の通り、第一及び第二）の一が変化するように合成される。これらのコドンの下流の追加のヌクレオチドは、ボトム鎖を形成する際に使用する相補的なプライマーの結合サイトを提供する。DNAポリメラーゼI（クレノー）を用いたトップコーディング鎖とボトム鎖プライマーの処理は、ランダム化したコドンを含む二本鎖DNA断片のセットを生じるであろう。プライマーは、次いで適切なベクター中にDNA断片を挿入し、それによって、コドンバンクの増幅を可能とするために使用され得る有用なクローニングサイトを含むように設計される。代替の方法は、例えば、ランダム化したヌクレオチド（Wilson等, BioTechniques17:944-952 (1994)）、及びファージディスプレイライブラリー（例えば、Barbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.89:4457-4461 (1992); Garrard等, Genes128:103-109 (1993)を参照されたい）を伴う全rbsの交換を含む。

30

40

【0129】

細菌性のSecretransロカーゼは、原核生物におけるタンパク質輸送を容易にする。分泌タンパク質は、2つの異なる機構、即ち、共翻訳及び翻訳後標的化によってSecretransロカーゼに対して標的化され得る。後者において、分泌タンパク質を含むシグナル配列は、その合成時にリボソームから完了した状態で放出され、Secretransロカーゼ

50

に向けられる。種々のグラム陰性菌において、分泌タンパク質は、転移能を有し、折りたたまれていない状態のこれらのタンパク質を維持する分泌特異的シャペロン Sec B によって Sec トランスロカーゼに誘導される。共翻訳標的化の間、シグナル認識粒子 (SRP) は、それがリボソームから出現し、SRP/リボソーム/新生の分泌タンパク質鎖の全三元複合体が、Sec トランスロカーゼに標的化される一方で、分泌タンパク質のシグナル配列に結合する。

【0130】

例えば、マルトース結合ペリプラズムタンパク質 (Mal E) 及びアルカリフォスファターゼ (Pho A) シグナルペプチドは、分子モーター Sec A を用いて翻訳後様式で、細胞質からペリプラズムへの転座を指示する。翻訳後様式での転座を指示する他の例示的なシグナルペプチドは、dsb C、lol A、omp A、lamb、及び lpp である。耐熱性エンテロトキシン II (st II) とチオール：ジスルフィド交換タンパク質 (dsb A) シグナルペプチドは、シグナル認識粒子 (SRP) からの援助で共翻訳様式で転座を指示する。共翻訳様式での転座を指示する他の例示的なシグナルペプチドは、yra I、tort、tol B、sfm C、nik A、及び sfm C である。細菌細胞質膜を横断する Sec 及び Tat 媒介タンパク質発現の総説については、Natale 等を参照されたい。(Natale等(2008) Biochemica et Biophysica Acta 1778:1735-56。)

【0131】

我々は、大腸菌中の内膜透過の主要な分泌経路の2つを代表するシグナルペプチド (即ち、sec (Pho A、Mal E) 及び SRP (Dsb A、STII)) についての新規な変異翻訳開始領域 (TIR) シグナルペプチドライブラリー (図2、表2) を開発した。各ライブラリーは異なる翻訳強度の変異 TIR を含むベクターのパネルを含み、関心のあ

【0132】

典型的には、TIR 変異体は、関心のある遺伝子発現のための適切な要素を有するプラスミドベクター中で提供されるであろう。例えば、典型的なコンストラクトは、シグナル配列の5'のプロモーター、関心のある遺伝子又はレポーター遺伝子挿入のための、シグナル配列の3'の制限酵素認識サイト、及び得られたプラスミドで形質転換した細菌の選択及び/又は維持のための、薬剤耐性マーカーのような選択可能なマーカーを含むであろう。プラスミドベクターを更にここに記載し例示する。原核生物宿主と共に使用するための適切なプロモーターは、当該分野で知られており、幾つかをここに例示し記載する。

【0133】

使用し得る任意のレポーター遺伝子は、幾つかの様式で定量し得る。したがって、例えば、アルカリフォスファターゼ産生は、pho A 遺伝子産物の分泌レベルの測定として定量化し得る。他の例は、例えば、β-ラクタマーゼ遺伝子を含む。

【0134】

一般的に、1セットのベクターは、その中の各シストロンについて様々な TIR 強度で作製し得る。この限定セットにより各鎖の発現レベル、ならびに、種々の TIR 強度組み合わせの下での全長産物の産生量の比較が提供される。シモンズ (Simmons) ら米国特許第 5840523 号に詳細に記載されるように、TIR 強度はレポーター遺伝子の発現レベルを定量化することで決定すればよい。本発明の目的のために、ベクター内の TIR の特定の対についての翻訳強度の組み合わせは (N-軽、M-重) (ここで、N は軽鎖の相対 TIR 強度であり、M は重鎖の相対 TIR 強度である) で表される。例えば、(3-軽、7-重) はベクターが軽鎖発現について約3の相対 TIR 強度を提供し、かつ、重鎖発現について約7の相対 TIR 強度を提供することを意味する。翻訳強度比較を基に、本発明の発現ベクター構築物で組み合わせる所望の個々の TIR を選択する。ベクターは適切な宿主を形質転換するために使用し得る。好ましくは、宿主は原核生物の宿主である。より好ましくは、宿主は大腸菌である。

【0135】

ポリペプチドの分泌レベルは、例えば、関心のあるポリペプチドについて機能アッセイ

、利用可能であれば、放射免疫測定（R I A）、酵素結合免疫測定法（E L I S A）によるか、又はP A G Eと関心のあるポリペプチドの正しい分子量の可視化によって決定し得る。分泌ポリペプチドのレベルの決定方法は、当該分野でよく知られており、幾つかをここに例示する。

【0136】

抗体

本発明の抗体は好ましくはモノクローナルである。ここに提供される抗体のF a b、F a b'、F a b'-S H及びF（a b'）₂断片また本発明の範囲に含まれる。これらの抗体断片は、酵素切断のような伝統的な方法によって作製し得るか、又は組換え技術によって生成し得る。このような抗体断片は、キメラであるか、又はヒト化し得る。これらの断片は、診断及び後述する治療目的に有用である。

【0137】

従って、幾つかの態様では、抗c-met抗体は、Fc領域を含む一アーム抗体(すなわち、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインが単一の抗原結合アームを形成)であり、ここでFc領域は、第1及び第2のFcポリペプチドを含有し、第1及び第2のFcポリペプチドは複合体に存在し、該抗原結合アームを有するFab分子に対して、該抗体断片の安定性を増加させるFc領域を形成する。アンタゴニスト機能を必要とし、抗体が二価であることで、所望しないアゴニスト効果を生じる病理状態を治療するために、一アーム抗体(すなわち、単一の抗原結合アームを有する抗体)の一価特性により、標的分子に対する抗体の結合時に、アンタゴニスト機能が生じ及び／又は確実となる。更に、Fc領域を含む一アーム抗体は、類似した／実質的に同一の抗原結合特徴を有するFab形態と比較して、優れた薬物動態性状(例えば、インビボにおける半減期の向上及び／又はクリアランス速度の低減)により特徴付けられ、よって従来の一価のFab抗体の使用における主たる欠点が克服される。一アーム抗体は、例えば国際公開第2005/063816号；Martensら，Clin Cancer Res(2006)，12：6144に開示されている。幾つかの実施態様では、一アーム抗体は一価の抗体断片であり、抗体断片は軽鎖可変ドメインを含む第一のポリペプチド、重鎖可変ドメイン及び前記第一のFcポリペプチドを含む第二のポリペプチド、及び前記第二のFcポリペプチドを含む第三のポリペプチドを含み、これにより、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインは単一の抗原結合アームを形成し、これにより、第一及び第二のFcポリペプチドが、複合体中に存在し、前記抗原結合アームを含むFab分子と比較して前記抗体断片の安定性を増加させるFc領域を形成する。

【0138】

幾つかの実施態様では、抗体はc-metに結合する（幾つかの実施態様では、特異的に結合する）。幾つかの実施態様では、抗c-met抗体は（a）配列：

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y T F T S Y W L H W V R Q A
P G K G L E W V G M I D P S N S D T R F N P N F K D R F T I S A D T S K N T A Y
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A T Y R S Y V T P L D Y W G Q G T L V T V S S

（配列番号：43）

を有する重鎖可変ドメイン、CH1配列、及び第一のFcポリペプチドを含む第一のポリペプチド；（b）配列：

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K S S Q S L L Y T S S Q K N Y L A
W Y Q Q K P G K A P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y A Y P W T F G Q G T K V E I K R

（配列番号：44）

を有する軽鎖可変ドメイン、及びCL1配列を含む第二のポリペプチド；及び（c）第二のFcポリペプチドを含む第三のポリペプチドを含み、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインは複合体として存在し、単一の抗原結合アームを形成し、第一及び第二のFcポリペプチドは複合体中に存在し、前記抗原結合アームを含むFab分子に対して前記抗体断片の安定性を増加させるFc領域を形成する。幾つかの実施態様では、第一のポリペプチドは図7（配列番号：68）に記載のFc配列を含み、第二のポリペプチドは図8（配列番号

：４７）に記載のFc配列を含む。幾つかの実施態様では、第一のポリペプチドは図８（配列番号：４７）に記載のFc配列を含み、第二のポリペプチドは図７（配列番号：６８）に記載のFc配列を含む。

【０１３９】

幾つかの実施態様では、抗c-met抗体は、（a）重鎖可変ドメインを含む第一のポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、配列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNSDTRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGT LVT VSSASTKGP S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L S C A V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L V S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K （配列番号：４５）を含むポリペプチド；

（b）軽鎖可変ドメインを含む第二のポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、配列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYTSSQKNYLA WYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQG TKVEIKRTVAAPS VFI F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C （配列番号：４６）を含むポリペプチド；及びFc配列を含む第三のポリペプチドであって、ポリペプチドが、配列：

DKTHTCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTY R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K （配列番号：４７）を含むポリペプチドを含み、ここで、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインが複合体として存在し、単一抗原結合アームを形成し、第一及び第二のFcポリペプチドが複合体として存在し、前記抗原結合アームを含むFab分子と比較して前記抗体断片の安定性を増加させるFc領域を形成する。

【０１４０】

一態様では、抗c-met抗体は

（i）A1-A17がKSSQSLLYTSSQKNYLA（配列番号：４９）である、配列A1-A17を含むCDR-L1

（ii）B1-B17がWASTRES（配列番号：５０）である、配列B1-B7を含むCDR-L2

（iii）C1-C9がQQYYAYPWT（配列番号：５１）である、配列C1-C9を含むCDR-L3

（iv）D1-D10がGYTFSTSYWLH（配列番号：５２）である、配列D1-D10を含むCDR-H1

（v）E1-E18がGMIDPSNSDTRFNPNFKD（配列番号：５３）である、配列E1-E18を含むCDR-H2

（vi）F1-F11がT/SYGSYVSPLDY（配列番号：５４）である、配列

F 1 - F 1 1 を含む C D R - H 3 ;

からなる群から選択される (a) 少なくとも 1 、 2 、 3 、 4 、 又は 5 個の高度可変領域 (C D R) 配列

及び (b) 変異 C D R 配列が、 (i) - (v i) に記載される配列の少なくとも 1 個の残基の修飾を含む、少なくとも 1 個の変異 C D R を含む。一実施態様では、C D R - H 3 は T Y G S Y V S P L D Y (配列番号 : 5 5) を含む。一実施態様では、C D R - H 3 は S Y G S Y V S P L D Y (配列番号 : 5 6) を含む。一実施態様では、これらの配列 (ここに記載の通りの組み合わせの) を含む本発明の抗体は、ヒト化されるかヒトである。

【 0 1 4 1 】

一実施態様では、抗 c - m e t 抗体は、図 7 (配列番号 : 5 2 から 5 3 及び 6 6) に記載の一以上の C D R 1 - H C 、 C D R 2 - H C 及び C D R 3 - H C 配列を含む重鎖可変ドメインを含む。幾つかの実施態様では、抗体は図 7 (配列番号 : 4 9 から 5 1) に記載の一以上の C D R 1 - L C 、 C D R 2 - L C 及び C D R 3 - L C 配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。幾つかの実施態様では、重鎖可変ドメインは、図 7 (配列番号 : 6 2 から 6 5) に記載の F R 1 - H C 、 F R 2 - H C 、 F R 3 - H C 及び F R 4 - H C 配列を含む。幾つかの実施態様では、軽鎖可変ドメインは、図 7 (配列番号 : 5 7 から 6 0) に記載の F R 1 - L L C 、 F R 2 - L C 、 F R 3 - L C 及び F R 4 - L C 配列を含む。

【 0 1 4 2 】

本発明の抗 c - m e t 抗体の変異体 H V R は、H V R 内に一又は複数の残基の修飾を含有しうる。一実施態様では、H V R - L 2 変異体が、以下の位置 : B 1 (M 又は L) 、 B 2 (P 、 T 、 G 又は S) 、 B 3 (N 、 G 、 R 又は T) 、 B 4 (I 、 N 又は F) 、 B 5 (P 、 I 、 L 又は G) 、 B 6 (A 、 D 、 T 又は V) 及び B 7 (R 、 I 、 M 又は G) の何れかの組合せにおいて 1 ないし 5 (1 、 2 、 3 、 4 又は 5) の置換を含有する。一実施態様では、H V R - H 1 変異体が、以下の位置 : D 3 (N 、 P 、 L 、 S 、 A 、 I) 、 D 5 (I 、 S 又は Y) 、 D 6 (G 、 D 、 T 、 K 、 R) 、 D 7 (F 、 H 、 R 、 S 、 T 又は V) 及び D 9 (M 又は V) の何れかの組合せにおいて 1 ないし 5 (1 、 2 、 3 、 4 又は 5) の置換を含有する。一実施態様では、H V R - H 2 変異体が、以下の位置 : E 7 (Y) 、 E 9 (I) 、 E 1 0 (I) 、 E 1 4 (T 又は Q) 、 E 1 5 (D 、 K 、 S 、 T 又は V) 、 E 1 6 (L) 、 E 1 7 (E 、 H 、 N 又は D) および E 1 8 (Y 、 E 又は H) の何れかの組合せにおいて 1 ないし 4 (1 、 2 、 3 又は 4) の置換を含有する。一実施態様では、H V R - H 3 変異体が、以下の位置 : F 1 (T 、 S) 、 F 3 (R 、 S 、 H 、 T 、 A 、 K) 、 F 4 (G) 、 F 6 (R 、 F 、 M 、 T 、 E 、 K 、 A 、 L 、 W) 、 F 7 (L 、 I 、 T 、 R 、 K 、 V) 、 F 8 (S 、 A) 、 F 1 0 (Y 、 N) 及び F 1 1 (Q 、 S 、 H 、 F) の何れかの組合せにおいて 1 ないし 5 (1 、 2 、 3 、 4 又は 5) の置換を含有する。それぞれの位置の後の括弧内の文字は例示的置換 (すなわち置き換え) のアミノ酸を示すものであり、当分野の技術者に明らかなように、本明細書中の置換アミノ酸としての他のアミノ酸の適合性は、当分野で公知の技術及び / 又は本明細書中に記載の技術を用いて慣例的に評価することができる。一実施態様では、H V R - L 1 は配列番号 4 9 の配列を含有する。一実施態様では、変異体 H V R - H 3 の F 1 は T である。一実施態様では、変異体 H V R - H 3 の F 1 は S である。一実施態様では、変異体 H V R - H 3 の F 3 は R である。一実施態様では、変異体 H V R - H 3 の F 3 は S である。一実施態様では、変異体 H V R - H 3 の F 7 は T である。一実施態様では、本発明の抗体は変異体 H V R - H 3 を含有してなり、F 1 が T 又は S であり、F 3 が R 又は S であり、そして F 7 は T である。

【 0 1 4 3 】

一実施態様では、本発明の抗体は、F 1 が T であり、F 3 が R であり、F 7 が T である変異体 H V R - H 3 を含んでなる。一実施態様では、本発明の抗体は、F 1 が S である変異体 H V R - H 3 を含んでなる。一実施態様では、本発明の抗体は、F 1 が T であり、F 3 が R である変異体 H V R - H 3 を含んでなる。一実施態様では、本発明の抗体は、F 1 が S であり、F 3 が R であり、F 7 が T である変異体 H V R - H 3 を含んでなる。一実施態様では、本発明の抗体は、F 1 が T であり、F 3 が S であり、F 7 が T であり、F 8 が S である変異体 H V R - H 3 を含んでなる。一実施態様では、本発明の抗体は、F 1 が T

であり、F 3 が S であり、F 7 が T であり、F 8 が A である変異体 HVR-H 3 を含んでなる。いくつかの実施態様では、前記変異体 HVR-H 3 抗体が、HVR-L 1、HVR-L 2、HVR-L 3、HVR-H 1 及び HVR-H 2 をさらに含んでなり、各々は順に配列番号：49、50、51、52 及び 53 を含有する。いくつかの実施態様では、これらの抗体は、ヒトサブグループ III 重鎖フレームワークコンセンサス配列を更に含む。これらの抗体の一実施態様では、フレームワークコンセンサス配列は、位置 71、73 及び／又は 78 に置換を含む。これらの抗体のいくつかの実施態様では、位置 71 は A であり、73 は T であり、及び／又は 78 は A である。これらの抗体の一実施態様では、これらの抗体は、ヒト κ I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列を更に含む。

【0144】

一実施態様では、本発明の抗 c-m e t 抗体は、B 6 が V である変異体 HVR-L 2 を含んでなる。いくつかの実施態様では、前記変異体 HVR-L 2 抗体は HVR-L 1、HVR-L 3、HVR-H 1、HVR-H 2 及び HVR-H 3 を更に含んでなり、各々、順に、配列番号：49、51、52、53、54 に示す配列を含んでなる。いくつかの実施態様では、前記変異体 HVR-L 2 抗体は HVR-L 1、HVR-L 3、HVR-H 1、HVR-H 2 及び HVR-H 3 を更に含んでなり、各々、順に、配列番号：49、51、52、53、56 に示す配列を含んでなる。いくつかの実施態様では、これらの抗体は、ヒトサブグループ III 重鎖フレームワークコンセンサス配列を更に含む。これらの抗体の一実施態様では、フレームワークコンセンサス配列は、位置 71、73 及び／又は 78 に置換を含む。これらの抗体のいくつかの実施態様では、位置 71 が A であり、73 が T であり、及び／又は 78 が A である。これらの抗体の一実施態様では、これらの抗体は、ヒト κ I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列を更に含む。

【0145】

一実施態様では、本発明の抗体は、E 14 が T であり、E 15 が K であり、E 17 が E である変異体 HVR-H 2 を含んでなる。一実施態様では、本発明の抗体は、E 17 が E である変異体 HVR-H 2 を含んでなる。いくつかの実施態様では、前記変異体 HVR-H 3 抗体は HVR-L 1、HVR-L 2、HVR-L 3、HVR-H 1 及び HVR-H 3 を更に含んでなり、各々、順に、配列番号：49、50、51、52、54 に示す配列を含んでなる。いくつかの実施態様では、前記変異体 HVR-H 2 抗体は HVR-L 1、HVR-L 2、HVR-L 3、HVR-H 1 及び HVR-H 3 を更に含んでなり、各々、順に、配列番号：49、50、51、52、55 に示す配列を含んでなる。いくつかの実施態様では、これらの抗体は、ヒトサブグループ III 重鎖フレームワークコンセンサス配列を更に含む。これらの抗体の一実施態様では、フレームワークコンセンサス配列は、位置 71、73 及び／又は 78 に置換を含む。これらの抗体のいくつかの実施態様では、位置 71 が A であり、73 が T であり、及び／又は 78 が A である。これらの抗体の一実施態様では、これらの抗体は、ヒト κ I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列を更に含む。

【0146】

本発明の方法における使用に適切な他の抗 c-m e t 抗体は、当該分野で知られている。

【0147】

一態様では、抗 c-m e t 抗体は、抗体断片内の F c 配列の、ホモ二量体化を最小にしながらの、ヘテロ二量体化を促進させる少なくとも一の特性を含む。このような特性は、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、抗体は、国際公開第 2005/063816 号に記載されるような、「ノブ」及び「ホール」を構成する F c 変異を含む。例えば、ホール変異は、F c ポリペプチドに T 366 A、L 368 A 及び／又は Y 407 V の一又は複数であり得、ノブ変異は T 366 W でありうる。ノブとホール F c 変異をここで更に記載する。

【0148】

モノクローナル抗体は実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、わずかながら存在しうる天然に生じる突然変異体を除いて同一のものである。よって、「モノクローナル」との修飾詞は、別個の抗体の混合物ではなく、抗体の特性を示すものである。

【0149】

本明細書中に記載の抗原に対するモノクローナル抗体は、Kohler等、Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法、又は組換えDNA法(米国特許第4816567号)によって作成することができる。

【0150】

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを免疫化し、免疫化に用いられるタンパク質と特異的に結合する抗体を生産するか又は生産することのできるリンパ球を誘導する。抗原への抗体は、抗原とアジュバントを複数回皮下(s c)又は腹腔内(i p)に注射することにより動物内に生じる。抗原は当分野で公知の方法を用いて調製されうる。その方法のいくつかは本明細書中でさらに記載される。例えば、ヒト及びマウス抗原の組み換え産生は以下に記載される。一実施態様では、動物を、免疫グロブリン重鎖のFc部位に融合した抗原で免疫化する。好適な実施態様では、動物を、抗原-IgG1融合タンパク質で免疫化する。通常、動物は、一リン酸化リピドA(MPL)/トレハロースジクリノミコレート(trehalose dicrynomycolate)(TDM)(Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT)により免疫コンジュゲート又は抗原誘導体に対して免疫化され、該溶液は複数の部位の皮下に注射される。2週後に、動物を追加免疫する。7~14日後、動物から採血して、血清を抗体力価について検定する。力価がプラトーになるまで動物を追加免疫する。

【0151】

別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次に、リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

【0152】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髓腫細胞の増殖又は生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPR T)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。

【0153】

好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの生産を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髓腫株化細胞は、マウス骨髓腫系、例えば、ソーグ・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、San Diego, California USAから入手し得るMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、及びアメリカ培養細胞系統保存機関、Rockville, Maryland USAから入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されたものである。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

【0154】

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、EGFL7に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッ

セイ(R I A)又は酵素結合免疫吸着検定(E L I S A)によって測定する。

【0155】

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunsonほか, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のスキッチャード分析法によって測定することができる。

【0156】

所望の特異性、親和性、及び／又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、該クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地には、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地が包含される。加えて、該ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。

【0157】

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-SEPHAROSE、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、又はアフィニティークロマトグラフィーのような常套的な免疫グロブリン精製法により、培地、腹水、又は血清から好適に分離される。

【0158】

本発明の抗体は、所望される活性を有する合成抗体クローンをスクリーニングするために、コンビナトリアルライブラリを用いて同定することができる。原則として、合成抗体クローンを、ファージコートタンパク質と融合した抗体可変領域(Fv)の種々の断片を表示するファージを有するファージライブラリをスクリーニングすることによって選択される。このようなファージライブラリは、所望される抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによって選別される。所望される抗原と結合することができるFv断片を発現するクローンは抗原へ吸収され、それによって、ライブラリの非結合クローンから分離される。次いで、この結合クローンは、抗原から溶出させることが可能であり、抗原吸収／溶出の付加的サイクルによってさらに濃縮することができる。本発明のいくつかの抗体は、興味の対象であるファージクローンを選択するために適切な抗原スクリーニング手法を設計し、続いて、興味の対象であるファージクローンからのFv配列、及びKabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3に記載の適切な定常領域(Fc)配列を用いての抗体クローンの構築によって得ることができる。抗体を生成するための例示的な方法を実施例に記載する。

【0159】

抗体の抗原結合ドメインは、約110アミノ酸の2つの可変(V)領域である軽(VL)及び重(VH)鎖で形成され、その双方には、3つの超可変ループ又は相補鎖決定領域(CDR)が存在する。可変ドメインは、Winter等, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994)に記載のように、VH及びVLが短くて柔軟なペプチドを介して共有結合している一本鎖Fv(scFv)断片として、又は定常ドメインと融合して非共有的に相互作用しているFab断片のいずれかとしてファージ上に機能的に表示することができる。ここで用いられているように、scFvコード化ファージクローン、及びFabコード化ファージクローンは、総称して「Fvファージクローン」又は「Fvクローン」と呼ぶ。

【0160】

VH及びVL遺伝子のレパートリーを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって分離してクローンし、ファージライブラリにおいてランダムに組み換えられることが可能であり、それは、Winter等, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994)に記載のように抗原結合クローンについて探索することが可能である。免疫化したソースからのライブラリは、ハイブリドーマを構成する必要がなく、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、天然レパートリーをクローニングして、Griffiths等, EMBO J, 12: 725-734(1993)に記載のようにどんな免疫化もせずに、幅広い非自己及びまた自己抗原に対するヒト抗体の単一のソースを提供することが可能である。最終的には、天然ライブラリは、また、Hoogen

boom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)に記載のように、幹細胞からの再配列されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、及びランダム配列を有するPCRプライマーを利用して高度可変CDR3領域をコードし、インビトロでの再配列を完成させることによって合成的に作製することができる。

【0161】

繊維状ファージは、マイナーコートタンパク質pIIIへの融合によって、抗体断片を表示するのに用いられる。この抗体断片は、一本鎖Fv断片として表示することが可能であり、そのVH及びVLドメインは、例えば、Marks等, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)に記載のような、又は、例えば、Hoogenboom等, Nucl. Acids. Res., 19: 4133-4137(1991)に記載のような、1つの鎖はpIIIと融合し、もう一方の鎖は、幾つかの野生型コートタンパク質を置換することによってファージ表面上に表示されるようになるFabコートタンパク質構造のアセンブリがある細菌宿主細胞のペリプラズムへ分泌されるFab断片のように、柔軟なポリペプチドスパーサーによって同じポリペプチド鎖上に連結されている。

【0162】

一般的に、抗体遺伝子断片をコードする核酸は、ヒト又は動物から収集した免疫細胞から得られる。特定の抗原を標的化するクローンに有利になるように偏ったライブラリが望ましい場合には、個体を抗原で免疫化して抗体応答を生成させ、そして、脾臓細胞及び／又は他の末梢血リンパ球(PBL)である循環B細胞を、ライブラリ構築のために回収する。好ましい実施態様では、抗原免疫化により、抗原に対するヒト抗体を産生するB細胞が生じるように、抗原反応性クローンに有利になるように偏ったヒト抗体遺伝子断片ライブラリは、機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを有する(及び、機能的な内因性抗体産生系を欠く)トランスジェニックマウスにおける抗体応答を生成することによって得られる。ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの作製は以下に記載する。

【0163】

抗原反応性細胞集団のさらなる濃縮は、適切なスクリーニング手法を利用して抗原特異的膜結合抗体を発現するB細胞を単離すること、例えば、抗原アフィニティクロマトグラフィーによる細胞分離、又は蛍光色素標識抗原への細胞の吸着とその後の蛍光標示式細胞分取器(FACS)によって得ることができる。

【0164】

あるいは、非免疫化供与体からの脾臓細胞及び／又はB細胞又は他のPBLの利用によって可能性のある抗体レパートリーのより良い表示が提供され、また、抗原が免疫原ではない任意の動物(ヒト又は非ヒト)種を利用した抗体ライブラリの構築が可能となる。インビトロの抗体遺伝子コンストラクトを取り込むライブラリに関しては、幹細胞を個体から収集して非再配列の抗体遺伝子セグメントをコードする核酸を提供する。対象の免疫細胞は、種々の動物種、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ目、オオカミ、犬科、ネコ科、ブタ、ウシ、ウマ、及びトリ種等から得ることができる。

【0165】

抗体可変遺伝子セグメント(VH及びVLセグメントを含む)をコードする核酸を、興味の対象の細胞から回収して増幅した。再配列したVH及びVL遺伝子ライブラリの場合では、その所望するDNAは、Orlandiら, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837(1989)に記載されているように、リンパ球からのゲノムDNA又はmRNAを単離し、再配列したVH及びVL遺伝子の5'及び3'末端と一致するプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによって得ることが可能であり、よって発現のための多様なV遺伝子レパートリーを作製することができる。このV遺伝子は、Orlandi等, (1989)及びWardら, Nature, 341: 544-546(1989)に記載のように、成熟Vドメインをコードするエクソンの5'末端のバックプライマーとJセグメントに基づいた前方向プライマーにより、cDNA及びゲノムDNAから増幅することが可能である。しかしながら、cDNAからの増幅のためには、バックプライマーは、また、Jonesら, Biotechnol., 9:88-89(1991)に記載のようにリーダーエクソンに、前方向プライマーは、Sastryら, Proc. Natl. A

cad. Sci. (USA) 86:5728-5732(1989)に記載のように定常領域内に基づくことが可能である。相補性を最大にするために、Orlandiら(1989)又はSastryら(1989)に記載のように、縮重をプライマーへ取り込むことが可能である。好ましくは、例えば、Marksら, J. Mol. Biol., 222: 581-597(1991)の方法に記載のように、又はOrumら, Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498(1993)の方法に記載のように、免疫細胞の核酸試料に存在するすべての入手可能なVH及びVL配列を増幅するために、各V遺伝子ファミリーを標的にしたPCRプライマーを用いて、そのライブラリの多様性を最大にする。発現ベクターへの増幅DNAのクローニングに関しては、希な制限部位を、Orlandiら(1989)に記載のように、又はClacksonら, Nature, 352: 624-628(1991)に記載のようにタグ付加したプライマーによるさらなるPCR増幅によって、PCRプライマー内の1つの末端へタグとして導入することができる。

10

【0166】

合成的に再配列したV遺伝子のレパートリーは、V遺伝子セグメントからインビボで誘導することができる。殆どのヒトVH遺伝子セグメントはクローニング及び配列決定(Tomlinson等, J. Mol. Biol. 227: 776-798(1992)に報告されている)、そしてマッピングがされている(Matsudaら, Nature Genet., 3: 88-94(1993))；これらクローニングされたセグメント(H1及びH2ループのすべての主要なコンホメーションを含む)は、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)に記載のように、多様な配列と長さのH3ループをコードするPCRプライマーによる多様なVH遺伝子レパートリーを作製するのに用いられる。VHレパートリーは、また、Barbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461(1992)に記載されているように、単一の長さの長いH3ループに焦点を合わせたすべての配列多様性をともなって作製することができる。ヒトV κ 及びV λ セグメントはクローニング及び配列決定がなされ(Williams及びWinter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461(1993))、合成軽鎖レパートリーを作製するのに利用することができる。VH及びVLフォールドの範囲及びL3及びH3の長さに基づく合成的V遺伝子レパートリーは、相当に構造的多様性を有する抗体をコードする。DNAをコードするV遺伝子の増幅に続いて、生殖系のV遺伝子セグメントは、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)の方法に従ってインビトロで再配列することができる。

20

【0167】

抗体断片のレパートリーは、幾つかの方法でVH及びVL遺伝子レパートリーを共に組み合わせることによって構築することができる。各レパートリーを異なるベクターで作製し、そのベクターを、例えばHogrefe等, Gene, 128: 119-126(1993)に記載のようにインビトロで、又はコンビナトリアル・インフェクション、例えばWaterhouse等, Nucl. Acid Res., 21: 2265-2266(1993)に記載のloxP系によってインビボで作製することが可能である。このインビボの組み換え手法では、大腸菌の形質転換効率によって強いられるライブラリの大きさの限界を克服するために、二本鎖種のFabフラグメントが利用される。ナイーブのVH及びVLレパートリーは、1つはファージミドへ、そして他はファージベクターへと個別にクローニングされる。この2つのライブラリは、その後、各細胞が異なる組み合わせを有し、そのライブラリの大きさが、存在する細胞の数(約10¹²クローン)によってのみ限定されるように、ファージミド含有細菌のファージ感染によって組み合わせられる。双方のベクターは、VH及びVL遺伝子が単一のレプリコンへ組み換えられ、ファージビリオンへ共にパッケージされるように、インビボの組み換えシグナルを有する。これら巨大なライブラリは、良好な親和性(約10⁻⁸MのKd⁻¹)の多くの多様な抗体を提供する。

30

40

【0168】

別法として、このレパートリーは、例えばBarbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982(1991)に記載のように同じベクターへ連続してクローニング、又は、Clackson等, Nature, 352: 624-628(1991)に記載のようにPCR後に、クローニングすることでアセンブリすることができる。PCRアセンブリは、また、柔軟なペプチドスパーサーをコードしているDNAとVH及びVL DNAを連結させて、単鎖のFv(scFv)レパー

50

トリーを形成することに利用することができる。さらに他の技術では、「細胞内でのPCRアセンブリ」は、Embleton等, Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837(1992)に記載のように、PCRによってリンパ球内のVH及びVL遺伝子を組み合わせ、その後、連結した遺伝子のレポトリーをクローニングするのに利用される。

【0169】

ナイーブのライブラリ(天然又は合成のいずれか)によって産生された抗体は中度の親和性(約 $10^6 \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$ の Kd^{-1})である可能性があるが、Winterら(1994), 上掲に記載のように第二番目のライブラリから構築して遊離することによって、親和性成熟をもインビトロで模倣することが可能である。例えば、Hawkins等, J. Mol. Biol. 226: 889-896(1992)の方法、又はGram等, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580(1992)の方法においてエラー・プロンポリメラーゼ(Leung等, Technique, 1:11-15(1989)で報告されている)を利用することによって、突然変異をインビトロでランダムに導入することができる。さらには、1つ又はそれより多いCDRをランダムに変異させることによって、例えば、選択した個々のFvクローンにおいて、対象のCDRまで及ぶランダム配列を有するプライマーによるPCRを利用して、そしてより高い親和性クローンをスクリーニングすることで親和性成熟をおこなうことが可能である。国際公開第96/07754号(1996年3月14日に公開)は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域へ突然変異生成を誘導して軽鎖遺伝子のライブラリを作製する方法を記載している。その他の有効な手法は、Marks等, Biotechnol. 10: 779-783(1992)に記載のように、非免疫化供与体から得られた天然で発生するVドメイン変異体のレポトリーによるファージディスプレイによって選択されたVH又はVLドメインを組み換えること、及び数回のチェーン・シャッフリングにおいてより高い親和性についてスクリーニングすることである。この技術は、 10^{-9}M の範囲の親和性の抗体及び抗体断片の産生を可能にする。

【0170】

所望の標的抗原をコードする核酸配列は、抗原の所望の領域のアミノ酸配列を使用して設計されうる。

【0171】

抗原をコードする核酸は、当分野で公知の様々な方法によって調製できる。これらの方法には、Engels 等, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989)に記載の何れかの方法、例えばトリエステル、亜リン酸エステル、ホスホラミダイト及びH-ホスホン酸塩方法による化学的な合成法が含まれるがこれに限定されるものではない。一実施態様では、発現宿主細胞に好ましいコドンが、抗原をコードするDNAの設計に用いられる。その代わりに、抗原をコードするDNAは、ゲノムないしcDNAのライブラリから単離できる。

【0172】

抗原をコードするDNA分子の構築に続いて、そのDNA分子は、プラスミド等の発現ベクターの発現コントロール配列と作用可能に連結し、このコントロール配列は、そのベクターで形質転換した宿主細胞によって認識される。一般的に、プラスミドベクターは、その宿主細胞と適合する種から誘導された複製及びコントロール配列を有する。このベクターは、通常は、形質転換細胞で表現型の選択を提供することが可能なタンパク質をコードする配列だけでなく複製部位を有する。原核宿主細胞及び真核宿主細胞での発現に好適なベクターは当分野で公知であり、さらにそのいくつかを本明細書に記載する。酵母菌などの真核生物、又は哺乳動物などの多細胞生物由来の細胞が用いられうる。

【0173】

場合によっては、抗原をコードするDNAは宿主細胞によって培地中への発現産物の分泌を生じさせる分泌リーダー配列に作用可能に連結される。分泌リーダー配列の例には、stII、エコチン(ecotin)、lamB、ヘルペスGD、lpp、アルカリホスファターゼ、インペルターゼ、及びアルファ因子が含まれる。ここでの使用にまた適しているのはプロテインAの36アミノ酸リーダー配列である(Abrahmsen等, EMBO J., 4:3901(1985))。

【0174】

宿主細胞はこの発明の上述の発現又はクローニングベクターでトランスフェクトされ、好ましくは形質転換され、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する遺伝子を増幅するのに適するように変性された一般的な培養液中で培養される。

【0175】

トランスフェクションとは、実際に任意のコード化配列が発現するかどうか分からない宿主細胞による発現ベクターの取り込みを意味する。トランスフェクションの多くの方法は、通常の技能を有する技術者に知られており、例えば、CaPO₄沈降法及び電気穿孔法がある。一般に成功したトランスフェクションは、宿主細胞内で該ベクターの働きの兆候が現れた時に認識される。トランスフェクション法は、当該分野でよく知られており、幾つかについてはここに更に記載する。

10

【0176】

形質転換とは、DNAが染色体外成分として又は染色体組み込みによってのいずれかで複製可能となるように、生物にDNAを導入することを意味する。用いる宿主細胞によって、その細胞に適した基本的な技術を用いて形質転換は行われる。形質転換法は当分野で公知であり、そのいくつかをさらに本明細書中に記載する。

【0177】

抗原を産生するために用いる原核生物宿主細胞は、一般的に、上掲のSambrook等に記載のように培養することが可能である。

【0178】

抗原を産生するために使用される哺乳動物宿主細胞は、様々な培地で培養することができ、その培地は当分野で周知であり、そのいくつかを本明細書中に記載する。

20

【0179】

この開示で言及している宿主細胞には、宿主動物内の細胞だけでなくインビトロ培養物の細胞が含まれる。

【0180】

抗原の精製は、当分野で認識される方法を用いて実施され、そのいくつかを本明細書中に記載する。

【0181】

ファージディスプレイクロンのアフィニティークロマトグラフィー分離での利用のために、例えば、アガロースビーズ、アクリルアミドビーズ、ガラスビーズ、セルロース、種々のアクリルコポリマー、ヒドロキシメタクリルゲル、ポリアクリル及びポリメタクリルコポリマー、ナイロン、中性及びイオン性担体等の適切な基質へ精製した抗原を付着させることが可能である。基質へのタンパク質の付着は、Methods in Enzymology, 44巻(1976)に記載されている方法によって完遂することができる。アガロース、デキストラン又はセルロース等の多糖類基質へタンパク質リガンドを付着させるために広く用いられている技術には、ハロゲン化シアンによる担体の活性化、それに続く、活性化基質へのペプチドリガンドの第1級脂肪族又は芳香族アミンのカップリングが含まれる。

30

【0182】

あるいは、抗原は、吸収プレートのウェルをコーティングするために利用すること、吸収プレートへ付着させた宿主細胞上で発現させるか又はセルソーティングで利用すること、又はストレプトアビジンでコーティングしたビーズによる捕獲のためにビオチンとコンジュゲートすること、又はファージディスプレイライブラリをパニングするためのあらゆる他の当該分野の方法において利用することが可能である。

40

【0183】

吸着剤との少なくともファージ粒子の一部分の結合に適した条件下で、ファージライブラリの試料を固定化抗原と接触させる。通常は、pH、イオン強度、温度等を含む条件を選択して、生理学的条件を模倣する。固相と結合したファージを洗浄し、その後、例えばBarbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982(1991)に記載されているように酸で、又は例えばMarks等, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)に記載にされているよう

50

にアルカリで、又は例えばClackson等, Nature, 352: 624-628(1991)の抗原競合法に類似の手法である抗原競合によって溶出する。ファージは、1回目の選択で20～1,000倍に濃縮することが可能である。さらには、この濃縮したファージを細菌培養液で生育させ、さらなる回の選択に供することが可能である。

【0184】

選択の効率は多くの要因に依存し、それには、洗浄の間の解離の動力学、そして単一のファージ上の複数の抗体断片が同時に抗原と関われるかどうかということが含まれる。一次解離定数(及び弱い結合親和性)を有する抗体は、短い洗浄、多価ファージディスプレイ及び固相の抗原の高いコーティング密度の利用によって保持することが可能である。高い密度は、多価相互作用を介してファージを安定化するだけでなく、解離したファージの再結合に有利に作用する。遅い解離動力学(及び良好な結合親和性)を有する抗体の選択は、Bass等, Proteins, 8: 309-314(1990)及び国際公開第92/09690号に記載されているような長い洗浄と単価ファージディスプレイの利用、そしてMarks等, Biotechnol., 10: 779-783(1992)に記載されているような抗原の低度のコーティング密度によって促進することが可能である。

【0185】

親和性に僅かな違いがあったとしても、抗体に対する異なる親和性のファージ抗体の中で選択することは可能である。しかしながら、選択した抗体のランダム変異(例えば、上記の幾つかの親和性成熟の技術で行われているような)は、多くの変異を生じやすく、その殆どが抗原と結合し、僅かがより高い親和性である。抗体を限定すると、希な高い親和性のファージが競合して除かれることが可能である。すべてのより高い親和性の変異を保持するために、ファージは、過度のビオチン化抗体とインキュベートすることが可能であるが、抗体に対する標的モル濃度親和定数よりも低いモル濃度のビオチン化抗体とインキュベートできる。次いで、高親和性結合ファージをストレプトアビジンでコーティングした常磁性体ビーズによって捕獲することが可能である。そのような「平衡捕獲」は、結合の親和性に従い、親和性の低い過度のファージから、僅かに2倍高い親和性の変異体クローンの単離を可能にする感度で抗体を選択することを可能にする。固相と結合したファージを洗浄するのに用いる条件を操作して、解離定数を基礎として識別することも可能である。

【0186】

抗体クローンは活性選択されうる。このような抗体に対応するFvクローンは、(1) 上記のようなファージライブラリから抗体クローンを単離して、場合によって、好適な宿主細胞で個体集団を成長させることによって、ファージクローンの単離した母集団を増幅する、(2) 望ましいブロック活性及び非ブロック活性のそれぞれについて第二タンパク質と抗体を選択する、(3) 固定された抗体に抗抗体ファージクローンを吸着する、(4) 過剰量の第二タンパク質を用いて、第二タンパク質の結合決定基と共有するかオーバーラップする抗体-結合決定基を認識する任意の望ましくないクローンを溶出する、そして、(5) 工程(4)の後に吸着されたまま残ったクローンを溶出する、ことによって選別できる。場合によって、所望のブロック/非ブロック特性を有するクローンを、本明細書に記載の選別手順を一又は複数回繰り返すことによって、さらに濃縮できる。

【0187】

ハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体をコードするDNA又は本発明のファージディスプレイFvクローンは、常法を用いて(例えば、ハイブリドーマの対象の領域をコードする重鎖及び軽鎖又はファージDNA鋳型を特異的に増幅するように設定したオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより)即座に分離されて、配列決定される。ひとたび分離されたならば、DNAを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外では抗体タンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体をコードするDNAの細菌での組み換え発現に関する概説論文には、Skerra等, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-2

62(1993)及びPluckthun, Immunol. Revs. 130: 151-188(1992)が含まれる。

【0188】

本発明のFvクローンをコードするDNAは、重鎖及び／又は軽鎖定常領域をコードする公知のDNA配列(例えば好適なDNA配列は上掲のカバット等から得ることができる)と組み合わせて、完全長ないし一部の重鎖及び／又は軽鎖をコードするクローンを形成できる。このために、何れかのアイソタイプの定常領域、例えばIgG、IgM、IgA、IgD及びIgE定常領域を用いることができることが理解されるであろう。このような定常領域は任意のヒト又は動物種から得ることができる。ある動物(例えばヒト)種の変ドメインDNAから得て、次いで「ハイブリッド」である完全長重鎖及び／又は軽鎖のコード配列を形成するために他の動物種の定常領域DNAに融合したFvクローンは、本明細書で用いられる「キメラ」及び「ハイブリッド」抗体の定義に含まれる。好適な実施態様では、ヒト可変DNAから得たFvクローンをヒト定常領域DNAに融合して、すべてのヒト、完全長ないし一部の重鎖及び／又は軽鎖のコード配列を形成する。

10

【0189】

また、本発明のハイブリドーマ由来の抗体をコードするDNAは、例えば、ハイブリドーマクローン由来の相同的マウス配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列を置換すること(例えばMorrison等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:6851(1984)の方法)によって修飾することができる。ハイブリドーマ又はFvクローン由来の抗体ないし抗体断片をコードするDNAは、免疫グロブリンコード化配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード化配列の全て又は一部を共有結合させることによってさらに修飾することができる。そのように、「キメラ」又は「ハイブリッド」抗体は、本発明のFvクローン又はハイブリドーマクローン由来の抗体の結合特異性を有するように調製される。

20

【0190】

抗原特異性

本発明は任意の適切な抗原結合特異性を有する抗体に適用できる。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。本発明の抗体は、限定するものではないが、遮断用抗体、アゴニスト抗体、中和用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。

30

【0191】

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； α -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；VILIC因子、IX因子、組織因子(TF)、及びフォン・ウィルブラント因子等の凝固因子；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；肺界面活性物質；ウロキナーゼ又はヒト尿又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(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；プロレラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド； β -ラクタマーゼ等の微生物タンパク質；DNアーゼ；IgE；CTLA-4のような細胞毒性Tリンパ球関連抗原(CTLA)；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)、ニューロトロフィン-3、-4、-5又は-6(NT-3、NT-4、NT-

40

50

5、又はNT-6)、又はNGF- β 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- α 及びTGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、又はTGF- β 5を含む、TGF- β 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(IGF-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- α 、- β 、及び- γ 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(IL)、例えば、IL-1からIL-10；スーパーオキシドジスムターゼ；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AIDS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、CD118、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。

【0192】

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、 α 4/ β 7インテグリン及びその α 又は β 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 α v/ β 3インテグリン；成長因子、例えばVEGF；組織因子(TF)、及びTGF- β アルファインターフェロン(α -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；flk2/flt3レセプター；肥満(OB)レセプター；mplレセプター；CTLA-4；プロテインC等々が含まれる。一実施態様では、本発明の抗体はc-metに(幾つかの実施態様では、特異的に)結合する。

【0193】

抗体断片

本発明は抗体断片を包含する。特定の場合では、全抗体よりも抗体断片の利用に利点がある。より小さいサイズの断片によりクリアランスが速くなり、固形腫瘍へのアクセスが改善されうる。

【0194】

抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、完全な抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennan等, Science, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、Fab、Fv及びScFv抗体断片はすべて、大腸菌で発現され、分泌されるため、この断片の大規模生産が容易となる。抗体断片は上述において検討した抗体ファージライブラリーから分離することができる。別法として、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合してF(ab')₂断片を形成することができる(Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、F(ab')₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含有する、インビボ半減期が増加したFab及びF(ab')₂断片は米国特許第5869046号に記載される。抗体断片の生産のための他の方法は当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択抗体は単鎖Fv断片(s cFv)である。国際公開93/16185；米国特許第5571894号；及び米国特許第5587458号を参照のこと。Fv及びs cFvは、定常領域が欠けている完全な結合部を有する唯一の種である；したがって、それらは、インビボでの使用の間の非特異的結合を減らすために適する。s cFv融合タンパク質は、s cFvのアミノ末端又はカルボキシ

末端の何れかで、エフェクタータンパク質の融合物を得るために構築されうる。上掲の Antibody Engineering, ed. Borrebaeckを参照。また、抗体断片は、例えば米国特許第 5 6 4 1 8 7 0 号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。このような直鎖状の断片は単特異的又は二重特異的であってもよい。

【0195】

従って、幾つかの実施態様では、抗 c-m e t 抗体は、F c 領域を含む一アーム抗体(すなわち、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインが単一の結合アームを形成)であり、ここで F c 領域は第 1 及び第 2 の F c ポリペプチドを含み、第 1 及び第 2 の F c ポリペプチドは複合体に存在し、抗原結合アームを含む F a b 分子と比較して、上記抗体断片の安定性を増加させる F c 領域を形成する。一アーム抗体を更にここに記載する。

10

【0196】

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従来からよく知られている。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ほか, Nature, 321: 522-525 (1986)、Riechmannほか, Nature, 332:323-327 (1988)、Verhoeyenほか, Science, 239:1534-1536(1988))を使用して実施することができる。よって、このような「ヒト化」抗体は、完全な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 4 8 1 6 5 6 7 号)である。実際には、ヒト化抗体は、典型的にはいくつかの高頻度可変領域残基及び場合によってはいくらかの F R 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。

20

【0197】

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を生成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。「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領域として受け入れる(Sims等, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia等, J. Mol. Biol., 196:901 (1987))。他の方法では、軽鎖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領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:42 85 (1992); Presta等, J. Immunol., 151:2623(1993))。

30

【0198】

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、ある方法によって、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購入可能である。これら表示を見ることで、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が高まるといった、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。

40

【0199】

ヒト抗体

本発明のヒト抗 F G F R 3 抗体は、上記のように、ヒト由来のファージディスプレイライブラリから選択した F v クローン可変ドメイン配列を公知のヒト定常ドメイン配列と結合することによって構築することができる。あるいは、本発明のヒトモノクローナル抗 F

50

G F R 3 抗体は、ハイブリドーマ法によって作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の生産のためのヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株は、例えば、Kozbor, J. Immunol. 133, 3001(1984) ; Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) ; 及びBoerner 等, J. Immunol., 147: 86 (1991)によって記載されている。

【0200】

免疫化することで、内因性免疫グロブリンの生産なしに、ヒト抗体の完全なレパートリーを生産することが可能なトランスジェニック動物(例えばマウス)を生産することが現在では可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系変異体マウスでの抗体重鎖結合領域(JH)遺伝子のホモ接合体欠失は、内因性抗体の生産の完全な阻害をもたらすことが記載されている。そのような生殖細胞系変異体マウスでのヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子配列の転移は、抗原の挑戦によってヒト抗体の生産を引き起こす。例えば、Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-255(1993) ; Jakobovits等, Nature 362, 255-258(1993)を参照のこと。

【0201】

また、遺伝子シャフリングは、ヒト抗体が開始非ヒト、例えば齧歯類の抗体と類似した親和性及び特性を有している場合、非ヒト、例えば齧歯類の抗体からヒト抗体を得るために使用することもできる。「エピトープインプリンティング」とも呼ばれるこの方法により、上記のファージディスプレイ技術により得られた非ヒト抗体断片の重鎖可変領域遺伝子又は軽鎖可変領域遺伝子の何れかをヒトVドメイン遺伝子のレパートリーで置換し、非ヒト鎖/ヒト鎖s c F vないしF a bキメラの集団を作成する。抗原を選択することにより、ヒト鎖が初めのファージディスプレイクローンにおいて一致した非ヒト鎖の除去により破壊された抗原結合部位を回復する、非ヒト鎖/ヒト鎖キメラs c F vないしF a bが単離される、つまり、エピトープがヒト鎖のパートナーの選択をつかさどる(インプリントする)。残りの非ヒト鎖を置換するためにこの工程を繰り返すと、ヒト抗体が得られる(1993年4月1日公開のPCT特許出願WO93/06213を参照)。伝統的なCDR移植による非ヒト抗体のヒト化と異なり、この技術により、非ヒト起源のFR又はCDR残基を全く持たない完全なヒト抗体が得られる。

【0202】

二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒト抗体ないしヒト化抗体である。この場合、結合特異性の一つはF G F R 3に対するものであり、他方は任意の他の抗原に対するものである。例示的な二重特異性抗体は、F G F R 3の2つの異なるエピトープに結合しうる。また、二重特異性抗体はF G F R 3を発現する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用される。これらの抗体はF G F R 3結合アーム及び細胞障害剤(例えば、サポリン(saporin)、抗インターフェロン- α 、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片(例えばF(a b')₂二重特異性抗体)として調製することができる。

【0203】

二重特異性抗体を作製する方法は当該分野において既知である。二重特異性抗体の伝統的な組み換え産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの重鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が1993年5月13日に公開の国際公報93/08829及びTraunecker等, EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

【0204】

異なったより好適なアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、C_H2及びC_H3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C_H1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。これにより、コンストラクトに使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2又は3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

10

【0205】

このアプローチ法の好適な実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公報94/04690に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh等, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照されたい。

20

【0206】

他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

30

【0207】

二重特異性抗体とは架橋抗体や「ヘテロ抱合抗体」を含む。例えば、ヘテロ抱合体の一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合していても良い。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること(米国特許第4676980号)及びH1V感染の治療(国際公報91/00360、国際公報92/00373及び欧州特許第03089号)等の用途が提案されている。ヘテロ抱合抗体は適当な架橋方法によって生成できる。当技術分野においては、適切な架橋剤は周知であり、それらは複数の架橋法と共に米国特許第4676980号などに記されている。

【0208】

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。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。Brennan等, *Science*, 229:81 (1985)は完全な抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルヒド形成を防止する。産生されたF a b'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F a b'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF a b'-チオールに再転換し、他のF a b'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

40

【0209】

最近の進歩により大腸菌からF a b'-S H断片を直接回収することが容易となっており

50

、これにより化学的にカップリングされて二重特異性抗体にを形成する。Shalaby 等, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)は、完全なヒト化二重特異性抗体 F(a b') 2 分子の産生について記述している。各々の F a b' 断片は大腸菌から別々に分泌されて、インビトロで化学的にカップリングされて、二重特異性抗体を形成する。したがって、形成された二重特異性抗体は、H E R 2 を過剰発現する細胞及び正常ヒト T 細胞に結合するだけでなく、ヒト胸部腫瘍の標的に対するヒト細胞毒性リンパ球の溶解活性を引き起こすことができた。

【0210】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産された。Kostelny 等, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。F o s 及び J u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の F a b' 部分に結合させられた。抗体ホモダイマーはヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、ついで再酸化させて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の 2 つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V L)に重鎖可変ドメイン(V H)を結合してなる。従って、一つの断片の V H 及び V L ドメインは他の断片の相補的 V L 及び V H ドメインと強制的に対形成させられ、2 つの抗原結合部位を形成する。単鎖 F v (s F v) ダイマーを使用する他の二重特異性抗体断片製造方策もまた報告されている。Gruber 等, J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。

【0211】

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt 等, J. Immunol., 147:60(1991)。

【0212】

多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び／又は異化)されうる。本発明の抗体は、3 又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(I g M クラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと 3 又はそれ以上の抗原結合部位を有する。好ましい二量化ドメインは F c 領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体は F c 領域と、F c 領域のアミノ末端に 3 又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ここで、好ましい多価抗体は 3 ないし 8、好ましくは 4 の抗原結合部位を有する(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも 1 つのポリペプチド鎖(好ましくは 2 つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は 2 又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)は V D 1 -(X 1) n -V D 2 -(X 2) n -F c を有し、ここで V D 1 は第 1 の可変ドメインであり、V D 2 は第 2 の可変ドメインであり、F c は F c 領域のポリペプチド鎖の一つであり、X 1 及び X 2 はアミノ酸又はポリペプチドを表し、n は 0 又は 1 である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は：V H -C H 1 -柔軟なリンカー-V H -C H 1 -F c 領域鎖；又は V H -C H 1 -V H -C H 1 -F c 領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、好ましくは少なくとも 2 つ(好ましくは 4 つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有する。ここで多価抗体は、例えば約 2 ～約 8 の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によっては C L ドメインを更に有する。

【0213】

抗体変異体

いくつかの実施態様では、ここに開示する抗体のアミノ酸配列の修飾を考える。例えば、抗体の結合親和性及び／又は生物学的特性を向上することができれば望ましい。抗体の

アミノ酸配列変異体は、抗体の核酸に適切なヌクレオチド変化を導入して、又はペプチド合成により調製される。そのような修飾は、抗体のアミノ酸配列内の残基の、例えば、欠失型、又は挿入或いは置換を含む。最終構成物が所望する特徴を有していれば、欠失、挿入又は置換をどのように組合せてもよい。アミノ酸変化は、配列ができるときに被検体の抗体アミノ酸配列に導入されうる。

【0214】

突然変異誘発に好ましい位置である抗体の特定の残基又は領域の同定に有益な方法は、Cunningham及びWellsによりScience, 244:1081-1085 (1989年)に開示されているように、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的となる残基又は残基の組が同定され(例えば、arg、asp、his、lys、及びgluなどの荷電した残基)、中性の、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)で置換され、アミノ酸の抗原との相互作用に影響を与える。次いで、置換に対する機能的感受性を示しているそれらアミノ酸位置を、置換の部位において、又は置換の部位のために、さらなる、又は他の変異体を導入することにより精製する。このように、アミノ酸配列変異体を導入する部位は予め決定されるが、突然変異自体の性質は予め決定する必要は無い。例えば、任意の部位における突然変異の機能を分析するために、標的コドン又は領域においてa l a スキャニング又はランダム突然変異誘発を実行し、発現し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。

【0215】

アミノ酸配列挿入には、1残基から100以上の残基を有するポリペプチドまでの長さに亘るアミノ末端融合及び／又はカルボキシー末端融合、ならびに、単一又は多重アミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例には、N末端メチオニル残基を持つ抗体、又は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には、抗体の血清半減期を増加させるポリペプチド又は(例えばA D E P Tのための)酵素の抗体のN末端又はC末端への融合が含まれる。

【0216】

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N結合又はO結合の何れかである。N結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を意味する。アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン(ここでXはプロリンを除く任意のアミノ酸)のトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖への糖鎖部分の酵素的結合のための認識配列である。従って、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が作出される。O結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンに、糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの一つが結合することを意味するが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンもまた用いられる。

【0217】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を、それが一又は複数の上述したトリペプチド配列(N結合グリコシル化部位のもの)を含むように変化させることによって簡便に達成される。該変化は、元の抗体の配列への一又は複数のセリン又はスレオニン残基の付加、又はこれによる置換によってもなされる(O-結合グリコシル化部位の場合)。

【0218】

抗体がFc領域を含有する場合、それに接着する炭水化物を変更してもよい。例えば、抗体のFc領域に接着するフコースを欠損する成熟炭水化物構造の抗体は、米国公開特許第2003/0157108号(Presta, L.)に記載される。米国公開特許第2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)も参照のこと。抗体のFc領域に接着した炭水化物内のN-アセチルグルコサミン(G l c N A c)を二分する抗体は、国際公報第03/011878号、Jean-Mairet等、及び米国特許第6602684号、Umana等に参照されている。抗体のFc領域に接着するオリゴサッカライド内の少なくとも一のガラクトース残基を有する抗体は、国際公報第97/30087号、Patel等に報告される。また、抗体のFc領域に接着する変更された炭水化物を有する抗体については、国際公報

第 98/58964 号(Raju, S.)及び国際公報第 99/22764 号(Raju, S.)も参照のこと。また、修飾されたグリコシル化を有する抗原結合分子については、米国公開特許第 2005/0123546 号(Umana 等)を参照。

【0219】

本明細書中の好適なグリコシル化変異形は Fc 領域を含有し、Fc 領域に接着される炭水化物構造はフコースを欠いている。このような変異形は改善された ADC 機能を有する。場合によって、Fc 領域は、更に ADC を改善する一つ以上のアミノ酸置換、例えば Fc 領域の位置 298、333 及び／又は 334 の置換(Eu 残基番号付け)を更に含む。「脱フコース化」又は「フコース欠失」抗体に関する文献の例には以下のものを含む：米国公開番号 2003/0157108；国際公報 2000/61739；国際公報 2001/29246；米国公開番号 2003/0115614；米国公開番号 2002/0164328；米国公開番号 2004/0093621；米国公開番号 2004/0132140；米国公開番号 2004/0110704；米国公開番号 2004/0110282；米国公開番号 2004/0109865；国際公報 2003/085119；国際公報 2003/084570；国際公報 2005/035586；国際公報 2005/035778；；国際公報 2005/053742；Okazaki 等 J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；及び Yamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。脱フコース化抗体を産生する細胞株の例として、タンパク質フコース化欠失 Lec13 CHO 細胞(Ripka 等 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；米国公開番号 2003/0157108, Presta, L；及び国際公報 2004/056312, Adams 等, 特に実施例 11)、及びノックアウト細胞株、例として α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8,-ノックアウト CHO 細胞(Yamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004))などがある。

【0220】

一態様では、本発明は、抗体断片内の Fc 配列のホモ二量体化を最小化する一方、ヘテロ二量体化を促進する少なくとも一つの特徴を具備する抗体断片を提供する。本願明細書において記載されるように、このような特徴は本発明の方法によって入手できるイムノグロブリン集団の効率及び／又は精製度及び／又は均質性を改良する。一実施態様では、第一 Fc ポリペプチドと第二 Fc ポリペプチドは作用領域で会合／相互作用する。第一及び第二の Fc ポリペプチドが作用領域で会合するいくつかの実施態様において、第二 Fc ポリペプチド(配列)の作用領域は、第一 Fc ポリペプチド(配列)の作用領域内のキャビティ(「ホール」とも呼ばれる)に位置しうる隆起(「ノブ」とも呼ばれる)を具備する。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変更されているか、あるいは、第二 Fc ポリペプチドは隆起をコードする鋳型／元のポリペプチドから変更されているか、あるいはその両方である。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変更されており、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変更されている。一実施態様では、第二 Fc ポリペプチドの作用領域は第一 Fc ポリペプチドの作用領域内のキャビティに位置しうる隆起を具備し、キャビティ又は隆起又はその両方がそれぞれ第一及び第二の Fc ポリペプチドの作用領域に導入されている。第一 Fc ポリペプチドと第二 Fc ポリペプチドが作用領域で会合するいくつかの実施態様において、第一 Fc ポリペプチド(配列)の作用領域は、第二 Fc ポリペプチド(配列)の作用領域内のキャビティに位置しうる隆起を具備する。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変更されているか、あるいは、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変更されているか、あるいはその両方である。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変更されており、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変更されている。一実施態様では、第一 Fc ポリペプチドの作用領域は第二 Fc ポリペプチドの作用領域内のキャビティに位置しうる隆起を具備し、隆起又はキャビティ又はその両方がそれぞれ第一及

び第二のFcポリペプチドの作用領域に導入されている。

【0221】

一実施態様では、隆起及びキャビティは、それぞれ天然に生じるアミノ酸残基を具備する。一実施態様では、隆起を具備するFcポリペプチドは、鋳型／元のポリペプチドの作用領域の元の残基を元の残基より大きな側鎖容量を有する移入残基に置換することによって生成される。一実施態様では、隆起を具備するFcポリペプチドは、該ポリペプチドの作用領域の元の残基をコードする核酸が元のものより大きな側鎖容量を有する移入残基をコードする核酸に置換される工程を含んでなる方法によって生成される。一実施態様では、元の残基はスレオニンである。一実施態様では、元の残基はT366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／元のポリペプチド内の2以上の残基を置換することによって生成される。一実施態様では、隆起を具備するFcポリペプチドはカバット等のEU番号付けスキームによるアミノ酸番号366位のスレオニンのトリプトファンへの置換を具備する(Sequences of proteins of immunological interest, 第5版, 1号の688-696頁(1991; NIH, Bethesda, MD))。

【0222】

いくつかの実施態様では、キャビティを具備するFcポリペプチドは、鋳型／元のポリペプチドの作用領域内の元の残基を元の残基より小さな側鎖容量を有する移入残基に置換することによって生成される。例えば、キャビティを具備するFcポリペプチドは、該ポリペプチドの作用領域の元の残基をコードする核酸が元のものより小さな側鎖容量を有する移入残基をコードする核酸に置換される工程を含んでなる方法によって生成されてもよい。一実施態様では、元の残基はスレオニンである。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、移入残基はスレオニン(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つ以上の元の残基を置換することによって生成することができる。例えば、一実施態様では、キャビティを具備するFcポリペプチドは、スレオニン、ロイシン及びチロシンからなる群から選択される2以上の元のアミノ酸の置換を具備する。一実施態様では、キャビティを具備するFcポリペプチドは、アラニン、セリン、スレオニン及びバリンからなる群から選択される2以上の移入残基を具備する。いくつかの実施態様では、キャビティを具備するFcポリペプチドはスレオニン、ロイシン及びチロシンからなる群から選択される2以上の元のアミノ酸の置換を具備し、該元のアミノ酸はアラニン、セリン、ス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に置換されたものである。いくつかの実施態様では、置換される元のアミノ酸は、T366、L368及び／又はY407である。一実施態様では、キャビティを具備するFcポリペプチドは、上掲のカバット等のEU番号付けスキームによるアミノ酸番号366位のスレオニンのセリンへの置換を具備する。一実施態様では、キャビティを具備するFcポリペプチドは、上掲のカバット等のEU番号付けスキームによるアミノ酸番号368位のロイシンのアラニンへの置換を具備する。一実施態様では、キャビティを具備するFcポリペプチドは、上掲のカバット等のEU番号付けスキームによるアミノ酸番号407位のチロシンのバリンへの置換を具備する。一実施態様では、キャビティを具備するFcポリペプチドは、上掲のカバット等のEU番号付けスキームによるアミノ酸番号T366S、L368A及びY407Vからなる群から選択される2以上のアミノ酸置換を具備する。これらの抗体断片のいくつかの実施態様では、隆起を具備するFcポリペプチドは、上掲のカバット等のEU番号付けスキームによるアミノ酸番号366位のスレオニンのトリプトファンへの置換を具備する。

【0223】

一実施態様では、抗体は国際公開第2005/063816号に記載される通り、「ノ

ブ」と「ホール」を構成する F c 変異を含む。例えば、ホール変異は、F c ポリペプチド中の一以上の T 3 6 6 A、L 3 6 8 A 及び／又は Y 4 0 7 V であり得、ノブ変異は T 3 6 6 W であり得る。

【0224】

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、異なる残基によって置換された抗体分子に少なくとも一つのアミノ酸残基（少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ又はそれより多い）を有する。置換突然変異について最も対象となる部位は高度可変領域を含むが、F R 変化も考慮される。保存的置換は、「好ましい置換」と題して表 A に示す。これらの置換により生物学的活性に変化が生じる場合、表 A に「例示的置換」と称した又はアミノ酸の分類を参照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よい。

【0225】

表 A

元の残基	置換の例	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)	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)	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

10

20

30

40

50

【0226】

抗体の生物学的性質の更により実質的な修飾は、(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コンホメーション、(b)標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の嵩を維持して、それらの効果において有意に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループ分けすることができる：

- (1)疎水性：ノロイシン、met、ala、val、leu、ile；
- (2)中性の親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3)酸性：asp、glu；
- (4)塩基性：his、lys、arg；
- (5)鎖配向に影響を及ぼす残基：gly、pro；及び
- (6)芳香族：trp、tyr、phe

10

【0227】

非保存的置換は、これらのクラスの一つのメンバーを他のクラスに交換することを必要とするであろう。

【0228】

置換変異体の一種は、親抗体(例えばヒト化抗体又はヒト抗体)の一以上の高頻度可変領域残基を置換することを含む。一般に、更なる開発用に選択される得られた変異体は、それらが生産された親抗体に対して改善された生物学的特性を有しているであろう。このような置換変異体を生成する簡便な方法は、ファージディスプレイを用いた親和性変異を含む。簡単に述べると、幾つかの高頻度可変領域部位(例えば6～7の部位)を変異させることにより、各部位に可能な全てのアミノ酸置換を生じさせる。このようにして生成された抗体は、各粒子内にパッケージされたファージコートタンパク質(例えば、M13の遺伝子III産物)の少なくとも一部への融合物として、糸状のファージ粒子から表示される。ついで、ファージディスプレイされた変異体は、ここに記載される通り、その生物学的活性(例えば結合親和性)についてスクリーニングされる。修飾のための候補高頻度可変領域部位を同定するために、系統的変異導入法(例えばアラニンスキャニング)を行って、抗原結合に有意に貢献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、又は付加的に、抗原抗体複合体の結晶構造を分析することにより、抗体と抗原との接触点を同定することが有効である。このような接触残基及び隣接残基は、ここに説明する技術による置換の候補である。そのような変異体がひとたび生成されたら、ここに記載されるように変異体パネルのスクリーニングを行い、更なる開発のために一又は複数の関連アッセイで優れた特性を有する抗体を選択することができる。

20

30

【0229】

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は当該分野で知られている様々な方法により調製される。これらの方法は、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)又はオリゴヌクレオチド媒介性(又は部位特異的)突然変異による調製、PCR突然変異誘発、及び前もって調製された変異体又は抗体の非変異型のカセット変異導入法を含むが、これらに限定されない。

【0230】

本発明のイムノグロブリンポリペプチドのFc領域に一又は複数のアミノ酸修飾を導入することにより、Fc領域変異体を生成することが望ましい場合がある。Fc領域変異体は、ヒンジシステインのアミノ酸位置を含む一以上のアミノ酸位置に一のアミノ酸修飾(例えば置換)を含むヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域)を含みうる。

40

【0231】

本明細書及び従来技術の教示によれば、ある実施態様では、本発明の抗体は、対応する野生型の抗体と比較した場合、例えばFc領域内に、一又は複数の変更を有すると考えられる。それでも、これらの抗体は、その野生型の同等物と比較した場合、治療の有効性に必要なほぼ同一の特性を保持している。例えば、国際公開第99/51642号等に記載

50

されているように、Fc領域に、C1q結合及び／又は補体依存性細胞傷害性(CDC)に変化(つまり効果の改善又は低減)をもたらす特定の変更を実施することが考慮される。Fc領域の変異体の他の例に関し、Ducan及びWinter, Nature 322:738-40 (1998); 米国特許第5648260号; 同第5624821号; 及び国際公開第94/29351号も参照されたい。国際公開第00/42072号(Presta)及び国際公開第WO 2004/056312号(Lowman)はFcRへの結合が改善された又は低減された抗体変異体を記載している。これらの特許文献の内容は出典明示により特にここに援用される。またShields等, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)を参照のこと。増加した半減期と新生児型Fcレセプター(FcRn)への結合が改善された抗体は、母体IgGsの胎児への移動の原因であるが(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim等, J. Immunol. 24:249 (1994))、米国特許出願公開第2005/0014934A1号(Hinton等)に記載されている。これらの抗体はFcRnへのFc領域の結合を改善する一又は複数の置換を有するFc領域を含む。変更されたFc領域アミノ酸と増加又は減少したC1q結合能を有するポリペプチド変異体は、米国特許第6194551B1号、国際公開第99/51642号に記載されている。この特許文献の内容を出典明示により特にここに援用する。またIdusogie等, J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)も参照のこと。

10

【0232】

抗体誘導体

本発明の抗体は、さらに、当該技術分野で既知であり、容易に入手可能である付加的な非タンパク質様部分を含むよう修飾され得る。好ましくは、抗体の誘導体化のために適した部分は、水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：ポリエチレングリコール(PEG)、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、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリー1, 3-ジオキソラン、ポリー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(ホモポリマーまたはランダムコポリマー)、およびデキストランまたはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシド・コポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、ならびにその混合物。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造における利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量を有し得るし、分枝鎖または非分枝鎖であり得る。抗体に結合されるポリマーの数は変わり得るし、もし2つより多くのポリマーが結合される場合、それらは同一または異なる分子であり得る。概して、誘導体化のために用いられるポリマーの数および／または種類は、抗体誘導体が限定条件下で治療に用いられるか等にかかわらず、改良されるべき抗体の特定の特性または機能(これらに限定されない)を含めた考察に基づいて確定される。

20

30

【0233】

所望の性質を有する抗体のスクリーニング

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／化学的特性及び生物学的機能について特徴付けることができる(幾つかをここに開示する)。例えば、抗体は、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圧液体クロマトグラフィ(HPLC)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィ、及びパパイソ消化を含む一連のアッセイによってさらに特徴付けることができる。

40

【0234】

本発明の特定の実施態様では、本明細書で生産された免疫グロブリンは、その生物学的活性について分析される。いくつかの実施態様では、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、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(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

50

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用いた任意の直接的又は競合的結合アッセイが制限なく含まれる。実例となる抗原結合アッセイが下記の実施例セクションに提供されている。

【0235】

ベクター、宿主細胞及び組換え方法

異種ポリペプチド（例えば、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の増幅)又は発現のために複製ベクターに挿入する。ポリペプチド（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由来の細胞である。IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE定常領域を含め、任意のアイソタイプの定常領域がこの目的のために使われてもよく、このような定常領域はヒト又は動物種の何れかから得られうることは理解されるであろう。

【0236】

a. 原核生物の宿主細胞を用いた抗体生成

i. ベクターの構築

本発明のポリペプチド（例えば、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依拠して、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。

【0237】

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、宿主細胞に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5648237号に詳細に記載されている。

【0238】

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、λGEM.TM.-11のようなバクテリオファージを、大腸菌LE392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。

【0239】

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ー-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。

【0240】

様々な潜在的宿主細胞によって認識されるプロモータが非常にたくさん公知となっている。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。

【0241】

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、βガラクター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結合させることができる(Siebenlist等(1980) Cell 20:269)。

【0242】

本発明の一態様では、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ッシングされる(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ッ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、本発明のシグナルポリペプチド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。更に、ベクターは、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Lppあるいは熱安定性エンテロトキシンII(STII)リーダー、LamB、PhoE、PelB、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。

【0243】

本発明の一態様では、一以上のポリヌクレオチド(例えば、発現ベクター)は、集合的に一アーム抗体ををコードする。一実施態様では、単一ポリヌクレオチドは(a)一アーム抗体の軽鎖と重鎖成分、及び(b)Fcポリペプチドをコードする。一実施態様では、単一のポリヌクレオチドは、一アーム抗体の軽鎖及び重鎖成分をコードし、別のポリヌクレオチドはFcポリペプチドをコードする。一実施態様では、別のポリヌクレオチドは、それぞれ、一アーム抗体の軽鎖成分、一アーム抗体の重鎖成分及びFcポリペプチドをコードする。一アーム抗体の産生は、例えば、国際公開第2005063816号に記載される。

【0244】

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、シュールドモナス種(例えば緑膿菌)、ネズミチフス菌、霊菌(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 ΔfhuA (ΔtonA) ptr3

lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kanR を有する 3 3 D 3 株(米国特許第5,639,635号)を含むW3110株 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 1190-1219頁; ATCC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λ 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業者に公知であり、例として、Bass等, Proteins, 8:309-314 (1990)に記載されている。一般的に、細菌細胞中で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。p B R 3 2 2、p B R 3 2 5、p A C Y C 1 7 7、又はp K N 4 1 0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。

10

【0245】

i i. 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。

【0246】

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グリコール/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。

20

【0247】

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プ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。

30

【0248】

炭素、窒素及び無機リン酸源の他に任意の必要なサプリメントを、単独で、又は複合窒素源のような他のサプ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、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリトリ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一又は複数の還元剤を含むうる。

【0249】

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。

40

【0250】

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

50

る(例として、Simmons等, J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147を参照)。様々な他の誘導因子は用いるベクターコンストラクトに応じて当業者に知りうるように用いてよい。

【0251】

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)及びウェスタンブ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。

10

【0252】

本発明の一態様では、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る。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100000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。

20

【0253】

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。

【0254】

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ピルシス、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。幾つかの実施態様では、DsbAとCは、大腸菌宿主細胞で発現する。

30

40

【0255】

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。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、Omp T、Deg P、Tsp、プロテアーゼI、プロテアーゼMi、プロテアーゼV、プロテアーゼVI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) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2773-2777; Georgiou等, 米国特許第5264365号; Georgiou等, 米国特許第5508192号; Hara等(1996) Microbia

50

l Drug Resistance 2:63-72に記載されている。

【0256】

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。

【0257】

i i i . 抗体精製

当分野で公知の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化、エタノール沈降法、逆相HPLC、シリカ又はDEAEなどの陽性交換樹脂によるクロマトグラフィ、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈降法及び、例えばSephadex G-75を用いたゲル濾過法。

【0258】

一態様では、固形層に固定したプロテインAを本発明の完全長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Fc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41kD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を固定した固形層は、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。

【0259】

精製の初めの工程では、上記に記載のように細胞培養物からの調製物をプロテインA固定固形層に適応し、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、固形層を洗浄して、固形層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形層から除去する。

【0260】

イムノコンジュゲート

また、本発明は、化学療法剤、薬剤、成長阻害剤、毒素(例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)、又は放射性同位体(すなわち放射性コンジュゲート)などの細胞毒性剤にコンジュゲートした本明細書中に記載の何れかの抗体を含む、イムノコンジュゲート(「抗体-薬剤コンジュゲート」又は「ADC」と交換可能に称される)を提供する。

【0261】

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、すなわち癌治療において腫瘍細胞を殺すか又は阻害するための薬剤の局所デリバリーに抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)、つまり免疫複合体を用いると(Payne (2003) Cancer Cell 3:207-212; Syrigos及びEpenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz及びSpringer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172; 米国特許第4975278号)、腫瘍への薬剤成分の標的とするデリバリーとそこでの細胞内集積が可能となり、これら非コンジュゲート薬物作用剤の全身性投与により正常細胞並びに除去しようとする腫瘍細胞への毒性が容認できないレベルとなりうる(Baldwin等, (1986) Lancet (Mar. 15, 1986):pp603-05; Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」 MONOCLONAL ANTIBODIES '84: BIOLOGICAL AND CLINICAL APPLICATIONS, Pinchera等(編), pp. 475-506)。これによって、最小限の毒性で最大限の効果が求められる。ADCを設定して精密化するために、モノクローナル抗体(mAb)の選択性並びに薬剤結合特性及び薬剤放出特性に注目した。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は共にこれらの方策に有用であると報告されている(Rowland等, (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)。これらの方法に用いる薬物には、ダウノマイシン、ドキソルビジン、メトトレキセート及びビンデジンが含まれる(Rowland等, (1986) 上掲)。抗体-毒素コンジュゲートに用いる毒素には、ジフテリア毒素などの細菌性毒素、リシンなどの植物毒素、ゲルダナマイシン(Mandler等(2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler等(2

10

20

30

40

50

000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028 ; Mandler等(2002) Biocjugate Chem. 13:786-791)、メイタンシノイド (EP1391213 ; Liu等、(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン (Lode等 (1998) Cancer Res. 58:2928 ; Hinman等 (1993) Cancer Res. 53:3336-3342) などの小分子毒素が含まれる。毒素はチューブリン結合、DNA結合、又はトポイソメラーゼ阻害を含む機構による細胞毒性及び細胞静止効果に影響を及ぼし得る。幾つかの細胞毒性薬は、大きな抗体又はタンパク質レセプターリガンドにコンジュゲートした際に、不活性となるか又は活性が弱くなる傾向がある。

【0262】

ゼバリン(ZEVALIN)(登録商標)(イブリツモマブチウキセタン(ibrutumomab tiuxetan), Biogen/Idex)は正常及び悪性のBリンパ球の細胞表面上にみられるCD20抗原に対するマウスIgG1κモノクローナル抗体と¹¹¹In又は⁹⁰Y放射性同位体とがチオウレアリンカーキレート剤にて結合した抗体-放射性同位体コンジュゲートである(Wiseman等、(2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77 ; Wiseman等、(2002) Blood 99(12):4336-42 ; Witzig等、(2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63 ; Witzig等、(2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。ゼバリンはB細胞非ホジキン性リンパ球(NHL)に対して活性を有するが、投与によってほとんどの患者に重症で長期の血球減少を引き起こす。カリケアマイシンに連結したhuCD33抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるマイロターグ(MYLOTARG)(登録商標)(ゲムツズマブオゾガミシン(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals)は、急性骨髄性白血病の治療用注射剤として2000年に認可された(Drugs of the Future (2000) 25(7):686 ; 米国特許第4970198号 ; 同第5079233号 ; 同第5585089号 ; 同第5606040号 ; 同第5693762号 ; 同第5739116号 ; 同第5767285号 ; 同第5773001号)。ジスルフィドリンカーSPPを介してメイタンシノイド薬剤分子DM1と連結しているhuCD242抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるカンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)は、Cancerを発現する癌、例として大腸、膵臓、胃などの治療用に第I相試験へと進んでいる。メイタンシノイド薬剤分子DM1と連結している抗前立腺特異的膜抗原(PSMA)モノクローナル抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるMLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)は、前立腺癌の潜在的治療の開発段階にある。アウリスタチン(auristatin)ペプチド、アウリスタチンE(AE)及びモノメチルアウリスタチン(MMAE)、ドラスタチン(dolastatin)の合成類似体は、キメラモノクローナル抗体cBR96(癌細胞上のルイスYに特異的)及びcAC10(血液系悪性腫瘍上のCD30に特異的)(Doronina等、(2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)にコンジュゲートしており、治療的開発段階にある。

【0263】

免疫複合体(イムノコンジュゲート)の生成に有用な化学治療薬を本明細書中(例えば、上記)に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)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・アメリカナ(Phytolaca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、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(crocin)、サパオナリア・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(tricothecene)が含まれる。例として1993年10月28日に公開の国際公開公報93/21232を参照のこと。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y及び¹⁸⁶Reが含まれる。抗体及び細胞障害性薬の複合体は、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)プロピオナート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、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

ジルスベレート等)、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)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238: 1098 (1987)に記載されている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抱合のためのキレート剤の例である。国際公開94/11026参照。

【0264】

抗体のコンジュゲートと一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコセン(trichothene)及びCC1065、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。

【0265】

i. メイタンシン及びメイタンシノイド

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは一又は複数のメイタンシノイド分子と結合している本発明の抗体(完全長又は断片)を含んでなる。

【0266】

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4,137,230号;同4,248,870号;同4,256,746号;同4,260,608号;同4,265,814号;同4,294,757号;同4,307,016号;同4,308,268号;同4,308,269号;同4,309,428号;同4,313,946号;同4,315,929号;同4,317,821号;同4,322,348号;同4,331,598号;同4,361,650号;同4,364,866号;同4,424,219号;同4,450,254号;同4,362,663号;及び同4,371,533号に開示されている。

【0267】

メイタンシノイド薬剤成分は、(i)発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために相対的に利用可能である(ii)抗体に対する非ジスルフィドリンカーによる共役上好適な官能基による誘導体化に従う、(iii)血漿中で安定、そして(iv)様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体薬剤コンジュゲートの魅力的な薬剤成分である。

【0268】

メイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲート、その作製方法及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5,208,020号、同5,416,064号、欧州特許第0425235B1号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。Liu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に結合するDM1と命名されたメイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞障害性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等, Cancer Research, 52: 127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体A7、又はHER-2/neuオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体TA.1に結合しているイムノコンジュゲートが記載されている。TA.1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞障害性はヒト乳癌株化細胞SK-BR-3におけるインビトロで試験され、細胞当たり 3×10^5 HER-2表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、

10

20

30

40

50

抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。A 7-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞障害性を示した。

【0269】

抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合させることにより調製される。例えば、米国特許第5,208,020号(この開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)を参照。1分子の毒素/抗体は、裸抗体の使用において細胞障害性を高めることが予期されているが、抗体分子当たり、平均3-4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5,208,020号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

【0270】

例えば、米国特許第5,208,020号又は欧州特許第0425235 B1号、Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992)、及び2004年10月8日に出願の米国特許出願番号10/960,602(これらの開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)に開示されているもの等を含め、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。リンカー成分SMCCを含んでなる抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、2004年10月8日に出願の米国特許出願番号10/960,602に開示されるように調製されうる。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。更なる結合基を本願明細書中に記載し、例示する。

【0271】

抗体とメイタンシノイドと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)プロピオナート(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-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。特に好ましいカップリング剤には、ジスルフィド結合により提供されるN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノアート(SPP)及びN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)(Carlsson等, Biochem. J. 173:723-737[1978])が含まれる。

【0272】

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例えば、従来からのカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。反応はヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で生じる。好ましい実施形態において、結合はメイタンシノール又はメイタンシノールの類似体のC-3位で形成される。

【0273】

i i. アウリスタチン類及びドラスタチン類

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、ドラスタチン又はドロスタチンペ

10

20

30

40

50

プチジル類似体及び誘導体、アウリスタチン (auristatin) (米国特許第 5635483 号; 同第 5780588 号) にコンジュゲートした本発明の抗体を含んでなる。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、GTP 加水分解及び核と細胞の分割を妨げ(Woyke 等 (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584)、抗癌活性 (米国特許第 5663149 号) 及び抗真菌性活性(Pettit 等 (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)を有することが示されている。ドラスタチン又はアウリスタチン薬剤成分は、ペプチジル薬剤分子の N(アミノ)末端又は C(カルボキシル)末端により抗体に接着しうる (国際公開第 02/088172 号)。

【0274】

例示的なアウリスタチンの実施態様は、N末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤成分 DE 及び DF を含み、2004 年 11 月 5 日に出願の米国特許出願番号 10/983, 340 号の "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands" に開示され、この開示内容は出典明記によってその全体が明示的に組み込まれる。

【0275】

典型的に、ペプチドベースの薬剤成分は、2 以上のアミノ酸及び／又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知の液相合成方法に従って調製することができる (E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press を参照)。アウリスタチン／ドラスタチン薬剤成分は、米国特許第 5635483 号; 同第 5780588 号; Pettit 等 (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit 等 (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., 等 Synthesis, 1996, 719-725; 及び Pettit 等 (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863 の方法に従って調製されうる。また、Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", 2004 年 11 月 5 日に出願の米国特許出願番号第 10/983, 340 号も参照のこと。これらは出典明記によってその全体が本願明細書中に組み込まれる (例えば、リンカー及びモノメチルバリン化合物、例えば MMAE 及びリンカーにコンジュゲートした MMAF の調整方法を開示している)。

【0276】

i i i. カリケアマイシン

他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した本発明の抗体を含んでなる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖 DNA 破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第 5712374 号、同 5714586 号、同 5739116 号、同 5767285 号、同 5770701 号、同 5770710 号、同 5773001 号、同 5877296 号 (全て、American Cyanamid Company) を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-アセチル- γ_1^I 、PSAG 及び θ_1^I (Hinman 等, Cancer Research, 53:3336-3342(1993)、Lode 等 Cancer Research, 58:2925-2928(1998) 及び上述した American Cyanamid の米国特許) が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬である QFA である。カリケアマイシン及び QFA は双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

【0277】

i v. 他の細胞障害剤

本発明の抗体と結合可能な他の抗腫瘍剤には、BCNU、ストレプトゾイシン、ビンクリスチン及び 5-フルオロウラシル、米国特許第 5053394 号、同 5770710 号に記載されており、集合的に LL-E33288 複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン (esperamicine) (米国特許第 5877296 号) が含まれる。

【0278】

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(*Aleurites fordii*)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(*Phytolacca americana*)プロテイン(PAPI、PAPII及びPAP-S)、モモルディカ・キャランティア(*Momordica charantia*)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(*sapaonaria*)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンス(tricothecenes)が含まれる。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。

10

【0279】

本発明は、抗体と核酸分解活性を有する化合物(例えばリボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ；DNAアーゼ)との間に形成されるイムノコンジュゲートをさらに考察する。

【0280】

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗体を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及びLuの放射性同位体が含まれる。コンジュゲートが検出に使用される場合、それはシンチグラフィ研究用の放射性原子、例えば tC^{99m} 又は I^{123} 、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

20

【0281】

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば tC^{99m} 又は I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及びIn 111 は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-90はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker等(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57)は、ヨウ素-123の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「Monoclonal Antibodies in Immunoscinigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

30

【0282】

抗体と細胞障害剤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)プロピオナート(SPDP)、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-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-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)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992); 米国特許第5208020号)

40

50

。

【0283】

本発明の化合物は、限定するものではないが、架橋剤：市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aより)BMPSS、EMCSS、GMBSS、HBVSS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCSS、スルホ-GMBSS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、及びSVSB (スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)安息香酸塩)にて調製したADCが特に考えられる。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467-498頁を参照

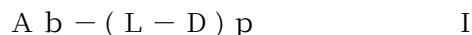
。

【0284】

v. 抗体薬剤コンジュゲートの調製

本発明の抗体薬剤コンジュゲート(ADC)において、抗体(Ab)を、リンカー(L)を介して、一つ以上の薬剤部分(D)、例えば抗体につき約1~約20の薬剤部分にコンジュゲートする。式IのADCはいくつかの手段、当業者に公知の有機化学反応、状態及び試薬を用いて調製されうる：(1)共有結合の後に薬剤部分Dと反応してAb-Lを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた抗体の求核基の反応；及び(2)共有結合の後に抗体の求核基と反応してD-Lを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた薬剤部分の求核基の反応、が含まれる。ADCを調製するための更なる方法は本願明細書中に記載される。

【0285】



リンカーは、一つ以上のリンカー成分から成ってもよい。例示的なリンカー成分は、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボンイル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SPP」)、N-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(「SMCC」)、及びN-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「SIAB」)を含む。更なるリンカー成分は当分野で公知であり、そのいくつかは本願明細書において、記述される。また、"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"、2004年11月5日に出願した米出願番号10/983,340を参照。その内容は出典明記により本願明細書に組み込まれる。

【0286】

いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸残基を含みうる。例示的なアミノ酸リンカー成分には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドなどがある。例示的なジペプチドは、バリン-シトルリン(vc又はval-cit)、アラニン-フェニルアラニン(af又はala-phe)を含む。例示的なトリペプチドは、グリシン-バリン-シトルリン(gly-val-cit)及びグリシン-グリシン-グリシン(gly-gly-gly)を含む。アミノ酸リンカー成分を含んでなるアミノ酸残基は、天然に生じるもの、並びに微量のアミノ酸及び非天然に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンを含む。アミノ酸リンカー成分は設定され、特に酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C及びD又はプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。

【0287】

抗体上の求核基には、限定するものでなく、以下のものを含む：(i) N末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、例えばリシン、(iii) 側鎖チオール基、例えばシステイン、及び(iv) 抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基。アミン、チオール及び水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分上の求電子性の群及びリンカー試薬により共有結合を形成することができる：(i) 活性エステル、例えばNHSエステル、HOBtエステル、ハロギ酸及び酸ハロゲン化物；(ii) アルキル及びベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド

群、が含まれる。特定の抗体は、還元しうる鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、還元剤、例えばD T T（ジチオトレイトール）による処置によって、リンカー試薬を用いたコンジュゲート反応を行ってもよい。ゆえに、各々のシステイン架橋は、理論的には、2の反応性のチオール求核基を形成する。チオールにアミンを転換させる2-イミノチオラン(トラウトの試薬)を用いてリシンを反応させることによって抗体に付加的な求核基を導入することができる。反応性のチオール基は、1、2、3、4又はそれ以上のシステイン残基を導入する(例えば、一又は複数の非天然のシステインアミノ酸残基を含んでなる変異体抗体を調製する)ことによって抗体に導入されてもよい。

【0288】

また、本発明の抗体薬剤コンジュゲートは、抗体を修飾して求電子性の部分を導入する(リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応させることができる)ことによって生成してもよい。グリコシル化された抗体の糖質を、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬剤部分のアミン基と反応するアルデヒド又はケトン基を形成させてもよい。生じたイミンシッフ塩基群が安定結合を形成するか、又は例えば安定アミン結合を形成させるホウ化水素試薬によって、還元してもよい。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の何れかによるグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により、薬剤(Hermanson, Bioconjugate Techniques)上の適当な基と反応することができるタンパク質のカルボニル(アルデヒド及びケトン)基が生じうる。他の実施態様では、N末端セリン又はスレオニン残基を含んでいるタンパク質はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩と反応して、第一のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成する(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; 米国特許第5362852号)。このようなアルデヒドは、薬剤部分又はリンカー求核基と反応することができる。

【0289】

同様に、薬剤部分上の求核基には、限定するものではないが、以下のものを含む：反応して、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子性の基と共有結合することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステル及びアリールヒドラジド基：(i) 活性エステル(例えばNHSESTER、HOBtエステル、ハロギ酸及び酸ハロゲン化物)；(ii) アルキル及びベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド基、が含まれる。

【0290】

別法として、抗体及び細胞障害剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。DNAの長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

【0291】

他の実施態様において、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)に抗体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個体に投与し、続いて清澄剤を使用し、循環から非結合コンジュゲートを除去し、細胞障害剤(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。

【0292】

薬剤的製剤

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と、場合によっては生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより(Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000))、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、シトレート、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(例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロ

リド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；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単糖類、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TWEEN（商標）、PLURONICS（商標）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。

10

【0293】

ここでの製剤は、治療される特定の徴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せられて存在する。

【0294】

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、マイクロエマルジョン、ナノ-粒子及びナノカプセル)に、あるいはマクロエマルジョンに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

20

【0295】

インビボ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。

【0296】

徐放性調合物を調製してもよい。徐放性調合物の好ましい例は、本発明の免疫グロブリンを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γ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 DEPOT（商標）(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。カプセル化された抗体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る。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。

30

40

【0297】

III. 用途

本発明の抗体は、例えば、それが認識する特定ポリペプチドを精製、検出、及び標識するのに使用され、インビトロ及びインビボの診断及び治療方法を含む。

【0298】

一態様では、本発明の抗体は、生物学的試料の特定抗原を質的及び量的に測定する免疫

50

測定法に使用することができる。抗原-抗体結合を検出するための通常の方法には、例えば酵素結合免疫吸着検定法（E L I S A）、放射免疫アッセイ（R I A）又は組織免疫組織化学を含む。多くの方法では、検出の目的で抗体に結合する標識を使用する。抗体とともに使用される標識は、抗体への結合を妨害しないあらゆる検出可能な機能性を有する。多くの標識が知られ、放射性同位体である ^{32}P 、 ^{32}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 及び ^{131}I 、希土類キレートなどのフルオロフォア、又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、アンベリフェロン（umbelliferone）、例えばホタルルシフェラーゼ及びバクテリアルシフェラーゼ（米国特許第4,737,456号）などのルシフェラーゼ、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）、アルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼなどのサッカライドオキシダーゼ、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなどのヘテロサイクリックオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ピオチン／アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定フリーラジカル、放射性核種の画像（例えばTechnocium）などである。

【0299】

これらの標識を共有結合的に異種ポリペプチドと結合させるためには、従来の方法が利用できる。例えば、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビス-イミデート、ビス-ジアゾ化ベンジジン、及びその類似物質などのカップリング剤が、上述の蛍光性、化学発光性、及び酵素的な標識で抗体をタグ化するのに用いられる。例えば、米国特許3,940,475号（蛍光定量法）及び3,645,090号（酵素法）；Hunter等, *Nature* 144:945 (1962)；David等, *Biochemistry* 13:1014-1021 (1974)；Pain等, *J. Immunol. Methods* 40:219-230 (1981)；及びNygren *Histochem. and Cytochem.* 30:407-412 (1982)を参照のこと。ここでの好ましい標識は、西洋わさびペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼ等の酵素である。酵素を含むこのような標識の抗体ポリペプチドへの結合は、イムノアッセイ技術分野における当業者にとって、標準的な操作可能な方法である。例えば、O'Sullivan等, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay", in *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Langone 及びH. Van Vunakis, Vol.73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp147-166を参照のこと。このような結合方法は、本発明の異種ポリペプチドとの使用に適している。

【0300】

抗体を標識する代わりに、抗原を生物学的流体において検出可能な物質を含む競合標識抗原標準と非標識抗体とを利用する競合イムノアッセイによってアッセイしてもよい。このアッセイでは、生物学的サンプル、標識抗原標準および抗体を結合させ、非標識抗体と結合した標識抗原標準の量を求める。生物学的サンプル中の試験した抗原の量は抗体と結合した標識抗原標準の量と反比例する。

【0301】

一態様では、本発明の異種ポリペプチド（抗体のような）はインビトロまたはインビボで特定の表面抗原発現を検出およびプロファイルするのに特に有用である。前記で論じたように、非グリコシル化された全長抗体はエフェクター機能（すなわち、A D C CまたはC D C活性）を発揮しない。従って、抗体が細胞表面抗原と結合する場合に、望ましくない細胞障害性現象を惹起しない。表面抗原は特定の細胞または組織種に特異的である場合があり、従って、細胞または組織種のマーカーとなる。表面抗原マーカーは特定の細胞または組織種の種々の分化ステージで異なって発現されるのが好ましい。従って、かかる表面抗原に対して向けられる全長抗体をマーカーを発現する細胞または組織集団のスクリーニングのために用いてもよい。例えば、本発明の抗体を用いて胚幹細胞、造血幹細胞および間葉幹細胞などの幹細胞をスクリーニングおよび単離してもよい。また、本発明の抗体を用いてH E R 2、H E R 3またはH E R 4受容体などの腫瘍関連表面抗原を発現する腫瘍細胞を検出してもよい。

【0302】

本発明の全長抗体をアフィニティー精製剤として用いてもよい。このプロセスでは、当技術分野で十分に知られている方法を用いて全長抗体をセファデックス樹脂またはフィルターペーパーなどの固相に固定化する。固定化抗体を精製される抗原を含有するサンプルと接触させ、その後支持体を、固定化全長抗体と結合している精製される抗原を除いてサンプル中の実質的にすべての物質を除去する好適な溶媒で洗浄する。最後に、支持体を抗原をポリペプチドから放出するグリシン緩衝液、pH 5.0などの別の好適な溶媒で洗浄する。

【0303】

一態様では、本発明は、癌、腫瘍、細胞増殖障害、及び／又は免疫（自己免疫のような）障害のような、疾患の治療のための医薬の調製及び／又は予防治療における本発明の方法を用いて得る異種ポリペプチドの使用を提供する。異種ポリペプチドは、抗体、抗体断片、ポリペプチド（例えば、オリゴペプチド）、又はそれらの組み合わせを含む、ここに記載の任意の形態であり得る。幾つかの実施態様では、抗原はヒトタンパク質分子であり、検体はヒト検体である。

【0304】

本発明の異種ポリペプチドを、一又は複数の抗原分子の異常な発現及び／又は活性に関連する疾患、障害ないし症状、限定されるものではないが、悪性及び良性腫瘍；非白血病及びリンパ性腫瘍；神経、グリア、アストロサイト、視床下部及び他の腺、マクロファージ、上皮、間質及び胚障害；及び炎症性、血管性及び免疫性障害を診断、治療、阻害又は予防するために用いることができる。

【0305】

特定の実施態様では、抗体を含むイムノコンジュゲートが患者に投与される。好ましくは、それが結合するイムノコンジュゲート及び／又は抗原が細胞によって内在化する。

【0306】

本発明の異種ポリペプチドは、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、異種ポリペプチドは、化学療法剤（一又は複数）（化学療法剤の混合を含む）、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／又は増殖阻害剤（一又は複数）と同時に投与してもよい。その代わりに、又は加えて、患者は組み合わせの放射線治療を受けてもよい（例えば、外部ビーム照射又は放射性標識剤、例えば抗体）。上記の併用治療には、併用投与（2以上の作用剤が同じか又は別の製剤に包含される）及び別々の投与が含まれ、別々の投与の場合には、本発明の抗体は補助治療（一又は複数）の前及び／又はその後投与することができる。

【0307】

異種ポリペプチド（及び場合によっては、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によって、好適な任意の方法投与することができる。

【0308】

本発明の異種ポリペプチド組成物は、医学的実用性に合わせた様式で調製し、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、薬剤の運搬部位、投与の方法、投与の日程計画、およ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または治療するために一般に用いられる一つ以上の作用剤と抗体とを調製する。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、疾患の型又は治療、及び上記の他の因子に依存する。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1～99%で用いる。

【0309】

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。抗体は一時的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 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 15 \text{mg}/\text{kg}$ （例えば $0.1 \text{mg}/\text{kg} \sim 10 \text{mg}/\text{kg}$ ）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 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \text{mg}/\text{kg}$ 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 $0.05 \text{mg}/\text{kg} \sim 10 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲であろう。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。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、従来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

【0310】

製造品

本発明の他の実施態様では、上記の疾患の治療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、ビン、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1個の活性剤は、本発明の抗体である。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が選択した症状、例えば癌の治療に使用されることを示す。また、製造品は、（a）組成物の中に収容し、その組成物が本発明の抗体を含む第一の容器と；（b）組成物の中に収容し、その組成物が更なる細胞傷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該製造品は、第一及び第二の抗体組成物が癌の治療に使用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（BWF I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロ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。

20

30

【0311】

以下の実施例は、本発明の実施を例証することだけを意図しており、限定を意図するものではない。ここで引用した全ての特許と科学文献を、その全体について出典明示によりここに援用する。

【実施例】

【0312】

材料と方法

細菌株と培地

40

本研究で使用する株とプラスミドを表1に記載する。振等フラスコ培養について、特に記載のない限り、全ての株をルリアーベルターニ（LB）又はC. R. A. プリン酸制限培地（1）中で30又は37℃で培養した。発酵培地は原則的に引用文献1に記載の通りである。抗生物質は、以下の濃度： $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ カルベニシリン、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシン、 $12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ クロラムフェニコール、又は $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ テトラサイクリンで添加した。

【0313】

相対TIRライブラリーの構築と評価

熱耐性エンテロトキシンII（stII）、マルトース結合ペリプラズムタンパク質（malE）、アルカリフォスファターゼ（phoA）、又はチオール：ジスルフィド交換

50

タンパク質 (dsbA) シグナルペプチドをPCR増幅し、開始コドンの9塩基対 (bps) 上流のBssHII、MluI、又はXbaI制限サイトを伴う親遺伝子の開始後の最初の6アミノ酸中のワブル塩基サイレントコドン変異(2)を導入した縮重プライマーを用いてphoAの成熟ドメインに融合した(表2を参照されたい)。各シグナル配列の野生型コドンコードするDNAをまた得た。これらのインサートは、次いで、pPho41(3)プラスミドのSpeI/NotI(New England Biolabs)に通常通りクローニングし、コンピテントJM109細胞(プロメガ)に形質転換し、1時間かけて回収し、16時間37℃でカベニシリンと共に200mLのLB中で継代培養し、次いでマキシプレップした(キアゲン)。各ライブラリーから回収した細胞のアリコート、ライブラリーサイズを決定するために選択LBアガープレート上に播いた;全てのライブラリーは理論的なライブラリーのサイズの約10から100倍の範囲を生成した。精製したDNAを次いでコンピテントの27C7細胞に形質転換し、次いで以前に記載した通りそれらの基底PhoA活性を試験した。簡潔には、コロニーを選択LB中で30℃で16時間培養し、新鮮な培地で1:100に希釈し、更に4時間30℃で培養した。培養を次いで光学密度(OD₅₅₀)に基づいて規格化し、絶対AP培地で再懸濁し(3)、次いで-20℃で終夜保存した。細胞を次いで融解し、トルエン(シグマ)処理(5)により部分的に透過し、37℃で1時間通気した。各培養の40マイクロリットルを次いで1MのTris-HClバッファー(pH8.0)中の1mMの4-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物(PNPP;プロメガ)を含む溶液に添加した。反応を100μLのリン酸ナトリウムバッファー(pH6.5)を添加して停止し、410nm(A410)の吸光度を20分以内に読んだ。相対TIR強度を最初にサンプルのA410から空ベクター(pBR322)を含む培養からのバックグラウンドの吸収を引き、次いでpPho41プラスミドを有する培養からの校正した吸収によって割ることにより計算した。全ての報告されたTIR値は、少なくとも7回の反復実験の結果である。

【0314】

抗体発現ベクターの構築

シグナルペプチドを通常通り、前述した2シストロン系(1)にクローニングした。重鎖シグナルペプチドは、関心のあるシグナルペプチドをスプライシングオーバーラップ伸長(SOE)PCRを介して関心のある重鎖に融合し、BssHII/HpaI(New England Biolabs)サイトにクローニングした。軽鎖シグナルペプチド誘導体はSOE-PCRを用いて同様に作製され、個々のTIR誘導体ヌクレオチド配列(表2)によって特定される通り、MluI/PacI(New England Biolabs)又はXbaI/PacI(New England Biolabs)サイトにクローニングされた。全てのコンストラクト配列は、SR S解析(ジェネンテック社)によって確認された。

【0315】

小スケール誘導と解析

細胞を5mMのリン酸ナトリウム(pH7.0)を追加した選択LB5mL中、30℃で16時間培養した。細胞の500μLのアリコートを次いで25mLの選択C.R.A.P.リン酸限定培地の25mL中で播種するために用い、24時間30℃で培養した。特に記載が無い限り、プラスミドpJJ247を有する細胞をイソプロピルβ-D-チオガラクトシド(IPTG)を用いて誘導し、細胞がOD₆₀₀が約200に達した際、最終濃度を1.0mMとした。全プロスサンプルを終点で回収し、溶解バッファー(10mM Tris pH6.8、5mMのEDTA、0.2mg/mLのリゾチーム(シグマ)、5mMのヨード酢酸(シグマ))中でOD₆₀₀が約3.0まで希釈し、氷上で10分間インキュベートした。サンプルを超音波にかけ、遠心して細胞のデブリスを除き、次いでSDS-PAGE解析(10%ビスTris、インビトロジェン)を用いて解析した。全てのレーンにサンプルを同体積搭載し、1:200,000希釈のヒト抗Fc(Southern Biotech)抗体又は1:200,000希釈のマウス抗κLc(Southern Biotech)抗体を用いて調べた。全ての抗体はHRPコンジュゲートであり、イムノプロットは、Western Lightning-ECL(パーキンエルマー)を用いて可視化され、膜をBiomax XARフィル

ム（コダック）に曝露した。タンパク質サンプルをまたクマシーブルー染色次いで標準の技術によって解析した。

【0316】

大スケール誘導

発酵は前述の通り実施した（1）。簡潔には、5 mLの選択LB培養からの50 μ Lの凍結保存した細胞を用いて500 mLの選択LBに播種し、30℃で16時間培養した。10 Lの発酵を次いで播種し（原則的には引用文献1に記載の通り）、細胞をコンピュータベースのアルゴリズムを用いて、発酵要求に基づき濃縮グルコースを与え、高密度まで培養した。特に記載の無い限り、プラスミド pJJ247 を有する細胞をイソプロピル β -D-チオガラクトシド（IPTG）を用いて誘導し、細胞がOD₅₅₀が約200に達する際に最終濃度を1.0 Mとした。全てのブロスと規格化したOD₅₅₀サンプルを一定の間隔で採り、全ての発酵を、2から3日間後に停止した。培養の適合性を通常通りオンラインとオフラインの測定パラメーターを用いて観察した。サンプルをSDS-PAGE解析を用いて上記の通り解析した。

10

【0317】

サンプルのHPLC解析

小又は大スケール誘導実験から得たサンプルを以前に開発した逆相HPLC解析技術（Lisa Wong、私信）を用いて全（不溶及び可溶）重鎖又は軽鎖濃度を解析した。サンプルを二重カラム、プロテイン-L逆相ベースHPLCアッセイ（Analytical Operations、ジェネンテック社）によって抗体種を含む軽鎖を解析した。抗体力価をクロマトグラムのピーク面積を関心のある分子の既知量を用いたブランクサンプルのスパイクにより得た標準曲線と比較することにより得た。

20

【0318】

表1：本研究で用いた株とプラスミド

株又はプラスミド	関連ジェノタイプ／フェノタイプ	参考文献又は供給源
<i>E. coli</i> 株		
27C7	$\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) $phoA\Delta E15$ $\Delta(argF-lac)169$ ptr3 $degP41$ kan ^R $ompT\Delta(nmpc-fepE)$	(3)
64B4	W3110 $\Delta fhuA$ $\Delta phoA$ $ilvG^+$ Δprc $spr43H1$ $\Delta degP$ $\Delta manA$ $lacI^q$ $\Delta ompT$	実験室ストック
JM109	e14 ⁻ (McrA ⁻) $recA1$ $endA1$ $gyrA96$ $thi-1$ $hsdR17$ ($r_K^- m_K^+$) $supE44$ $relA1$ $\Delta(lac-proAB)$ [F' $traD36$ $proAB$ $lacI^q\Delta MI5$]	プロメガ
プラスミド		
pPho41	Cb ^r	(3)
pBR322	Cb ^r , Tc ^r	実験室ストック
ph5D5	pBR322 にクローン化されるヒト化 5D5 抗体 (交換可能で 5D5.v2 抗体と呼ばれる)	実験室ストック
pJJ247	pACYC 誘導ベクター Km ^r 中の tac プロモーター の制御下の大腸菌 $dsbA$ 及び $dsbC$	実験室ストック
pBR-STIIHc1.0-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)PhoA$ に融合した 大腸菌 $BssHIII$ -ssSTII TIRv.1	本研究
pBR-STIIHc2.41-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)PhoA$ に融合した 大腸菌 $BssHIII$ -ssSTII TIRv.2	本研究

10

20

30

40

pBR-STIIHc3.38-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>BssHIII</i> -ssSTII TIRv.3	本研究
pBR-STIIHc4.60-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>BssHIII</i> -ssSTII TIRv.4	本研究
pBR-STIIHc5.34-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>BssHIII</i> -ssSTII TIRv.5	本研究
pBR-STIIHc6.52-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>BssHIII</i> -ssSTII TIRv.6	本研究

10

pBR-STIIHc8.36-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>BssHIII</i> -ssSTII TIRv.8	本研究
pBR-STIILc1.0-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>MluI</i> -ssSTII TIRv.1	本研究
pBR-STIILc2.74-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>MluI</i> -ssSTII TIRv.2	本研究
pBR-STIILc3.72-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>MluI</i> -ssSTII TIRv.3	本研究
pBR-DsbAHc1.48-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.1	本研究
pBR-DsbAHc2.WT-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.2	本研究
pBR-DsbAHc3.79-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.3	本研究
pBR-DsbAHc7.72-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した	本研究

20

30

40

	大腸菌 <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.7		
pBR-DsbALc1.WT-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した	本研究	
	大腸菌 <i>MluI</i> -ssDsbA TIRv.1		
pBR-DsbALc2.3-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した	本研究	
	大腸菌 <i>MluI</i> -ssDsbA TIRv.2		10
pBR-DsbALc3.37-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した	本研究	
	大腸菌 <i>MluI</i> -ssDsbA TIRv.3		
pBR-PhoAHc1.70-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した	本研究	
	大腸菌 <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.1		
pBR-PhoAHc2.64-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した	本研究	
	大腸菌 <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.2		20
pBR-PhoAHc3.WT-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した	本研究	
	大腸菌 <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.3		
pBR-PhoAHc4.67-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した	本研究	
	大腸菌 <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.4		
pBR-PhoAHc5.71-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した	本研究	
	大腸菌 <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.5		30
pBR-PhoAHc6.77-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した	本研究	
	大腸菌 <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.6		
pBR-PhoALc1.104-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した	本研究	
	大腸菌 <i>MluI</i> -ssPhoA TIRv.1		40
pBR-PhoAXb2.41-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した	本研究	
	大腸菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.2		

pBR-PhoAXb3.WT-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.3	本研究	10
pBR-PhoAXb5.53-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.5	本研究	
pBR-PhoAXb6.15-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.6	本研究	
pBR-PhoAXb7.1-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.7	本研究	
pBR-PhoAXb8.24-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.8	本研究	20
pBR-PhoAXb10.23-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.10	本研究	
pBR-MalEHc1.92-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>BssHII</i> -ssMalE TIRv.1	本研究	
pBR-MalEHc2.100-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>BssHII</i> -ssMalE TIRv.2	本研究	
pBR-MalELc1.97-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>MluI</i> -ssMalE TIRv.1	本研究	30
pBR-MalELc2.123-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>MluI</i> -ssMalE TIRv.2	本研究	
pBR-MalEXb1.WT-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.1	本研究	
pBR-MalEXb2.15-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.2	本研究	

pBR-MalEXb3.12-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.3	本研究	
pBR-MalEXb5.37-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.5	本研究	
pBR-MalEXb6.4-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.6	本研究	10
pBR-MalEXb7.25-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.7	本研究	
pBR-MalEXb8.13-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.8	本研究	20
pBR-MalEXb11.34-PhoA	pPho41 中の $\Delta(1-22)$ PhoA に融合した 大腸菌 <i>XbaI</i> -ssMalE TIRv.11	本研究	
pBR-SS-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した STII TIRv.1、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.1	本研究	
pBR-SS-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した STII TIRv.1、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.2	本研究	30
pBR-SS-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した STII TIRv.2、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.1	本研究	
pBR-SS-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した STII TIRv.2、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.2	本研究	
pBR-SM-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した STII TIRv.1、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.1	本研究	40
pBR-SM-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した STII TIRv.1、	本研究	

	5D5 Lc に融合した MalE TIRv.2		
pBR-SM-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した STII TIRv.2、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.1	本研究	
pBR-SM-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した STII TIRv.2、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.2	本研究	
pBR-SD-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した STII TIRv.1、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.1	本研究	10
pBR-SD-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した STII TIRv.1、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.2	本研究	
pBR-SD-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した STII TIRv.2、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.1	本研究	20
pBR-SD-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した STII TIRv.2、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.2	本研究	
pBR-SP-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した STII TIRv.1、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.1	本研究	
pBR-SP-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した STII TIRv.1、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.2	本研究	30
pBR-SP-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した STII TIRv.2、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.1	本研究	
pBR-SP-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した STII TIRv.2、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.2	本研究	
pBR-MS-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.1、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.1	本研究	40

pBR-MS-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.1、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.2	本研究	10
pBR-MS-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.2、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.1	本研究	
pBR-MS-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.2、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.2	本研究	
pBR-MM-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.1、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.1	本研究	
pBR-MM-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.1、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.2	本研究	20
pBR-MM-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.2、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.1	本研究	
pBR-MM-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.2、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.2	本研究	
pBR-MD-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.1、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.1	本研究	
pBR-MD-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.1、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.2	本研究	30
pBR-MD-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.2、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.1	本研究	
pBR-MD-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.2、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.2	本研究	
pBR-MP-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.1、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.1	本研究	

pBR-MP-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.1、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.2	本研究	10
pBR-MP-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.2、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.1	本研究	
pBR-MP-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した MalE TIRv.2、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.2	本研究	20
pBR-DS-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.1	本研究	
pBR-DS-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.2	本研究	30
pBR-DS-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.1	本研究	
pBR-DS-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.2	本研究	40
pBR-DM-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.1	本研究	
pBR-DM-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.2	本研究	40
pBR-DM-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.1	本研究	
pBR-DM-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.2	本研究	40
pBR-DD-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.1	本研究	

pBR-DD-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.2	本研究	10
pBR-DD-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.1	本研究	
pBR-DD-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.2	本研究	20
pBR-DP-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.1	本研究	
pBR-DP-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.2	本研究	30
pBR-DP-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.1	本研究	
pBR-DP-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した DsbA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.2	本研究	40
pBR-PS-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.1	本研究	
pBR-PS-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.2	本研究	40
pBR-PS-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.1	本研究	
pBR-PS-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した STII TIRv.2	本研究	40
pBR-PM-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.1	本研究	

pBR-PM-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.2	本研究	10
pBR-PM-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.1	本研究	
pBR-PM-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した MalE TIRv.2	本研究	
pBR-PD-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.1	本研究	20
pBR-PD-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.2	本研究	
pBR-PD-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.1	本研究	
pBR-PD-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した DsbA TIRv.2	本研究	30
pBR-PP-5D5-1.1	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.1	本研究	
pBR-PP-5D5-1.2	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.1、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.2	本研究	
pBR-PP-5D5-2.1	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.1	本研究	40
pBR-PP-5D5-2.2	5D5 Hc に融合した PhoA TIRv.2、 5D5 Lc に融合した PhoA TIRv.2	本研究	

H c = 重鎖

L c = 軽鎖

5 D 5 = 抗 c - m e t モノクローナル抗体クローン 5 D 5 . v 2 。 5 D 5 . v 2 重鎖と軽鎖配列を図 7 に示し、例えば、国際公開第 2 0 0 6 / 0 1 5 3 7 1 号；Jin等、Cancer Res (2008) 68:4360にも記載する。

【 0 3 1 9 】

表 2：シグナル配列誘導体

太斜体 = 変異した配列（即ち、開始コドン後の最初の 6 個のアミノ酸）

斜体 = B s s H I I、M l u I、又は X b a I 制限サイト

親遺伝子	クローン ID	関連ジェノタイプ／フェノタイプ	相対 TIR 強度	配列 ID 番号：
<i>stII</i>	SH1.2	<i>GCGCGCATTATGAAGAAAAACATCGCTT</i> <i>TT</i> CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCTAT T GCTACAAACGCTTACGCT	0.99 ± 0.07	1
	SH2.41	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAATATAGCGT</i> <i>T</i> <i>T</i> CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCTA TTGCTACAAACGCTTACGCT	1.94 ± 0.05	2
	SH3.38	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAACATTGCCT</i> <i>TTC</i> TTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCTATT GC TACAAACGCTTACGCT	2.9 ± 0.2	3
	SH4.60	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGAATTGCCT</i> <i>TT</i> CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCTAT T GCTACAAACGCTTACGCT	4.1 ± 0.1	4
	SH5.34	<i>GCGCGCATTATGAAGAAAAATATTGCAT</i> <i>TC</i> CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCTA	5.0 ± 0.2	5

10

20

30

40

		TTGCTACAAACGCTTACGCT		
	SH6.52	GCGCGCATTATG AAAAAAATATTGCAT TTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	5.9 ± 0.2	6
	SH8.36	GCGCGCATTATG AAAAAAATATTGCTT TTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	7.7 ± 0.1	7
	SL1.2	ACGCGTATTATG AAGAAAAACATCGCTT TTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	0.75 ± 0.07	8
	SL2.74	ACGCGTATTATG AAAAAGAATATCGCCT TTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	1.9 ± 0.2	9
	SL3.72	ACGCGTATTATG AAAAAAATATTGCTT TTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCT ATTGCTACAAACGCTTACGCT	2.9 ± 0.2	10
<i>malE</i>	MH1.92	GCGCGCATTATG AAAATTAAGACTGGAG CACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	1.1 ± 0.1	11
	MH2.100	GCGCGCATTATG AAGATTAAAACCGGAG CCCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	1.9 ± 0.1	12

10

20

30

40

	ML1.97	<i>ACGCGTATTATGAAGATCAAGACAGGCG</i> <i>CGCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC</i> GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	1.1 ± 0.1	13
	ML2.123	<i>ACGCGTATTATGAAGATCAAGACAGGGG</i> <i>CCCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC</i> GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	2.0 ± 0.1	14
	MX1.wt	<i>TCTAGAATTATGAAAATAAAAACAGGTG</i> <i>CACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC</i> GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	1.1 ± 0.1	15
	MX2.15	<i>TCTAGAATTATGAAAATTAAGACGGGGG</i> <i>CGCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC</i> GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	2.0 ± 0.1	16
	MX3.12	<i>TCTAGAATTATGAAAATCAAAACCGGCG</i> <i>CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC</i> GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	3.01 ± 0.09	17
	MX5.37	<i>TCTAGAATTATGAAGATCAAGACTGGAG</i> <i>CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC</i> GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	5.0 ± 0.2	18

10

20

30

40

	MX6.4	<i>TCTAGAATTATGAAAATAAAGACGGGAG</i> <i>CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC</i> GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	5.8 ± 0.3	19
	MX7.25	<i>TCTAGAATTATGAAGATAAAGACTGGTG</i> <i>CGCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC</i> GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	7.1 ± 0.2	20
	MX8.13	<i>TCTAGAATTATGAAAATTAAGACGGGAG</i> <i>CACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC</i> GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	8.2 ± 0.3	21
	MX11.34	<i>TCTAGAATTATGAAGATTAAAGACGGGCG</i> <i>CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC</i> GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC	10.8 ± 0.5	22
<i>phoA</i>	PH1.70	<i>GCGCGCATTATGAAACAATCCACGATTG</i> <i>CCCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	1.14 ± 0.05	23
	PH2.64	<i>GCGCGCATTATGAAACAGTCGACGATCG</i> <i>CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	1.93 ± 0.03	24
	PH3.wt	<i>GCGCGCATTATGAAACAAAGCACTATTG</i> <i>CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i>	2.8 ± 0.1	25

10

20

30

40

		CCCTGTGACAAAAGCC		
	PH4.67	<i>GCGCGCATTATGAAGCAATCTACTATCG</i> <i>CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	3.7 ± 0.1	26
	PH5.71	<i>GCGCGCATTATGAAGCAATCAACTATCG</i> <i>CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	5.1 ± 0.3	27
	PH6.77	<i>GCGCGCATTATGAAACAATCTACTATTG</i> <i>CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	6.0 ± 0.4	28
	PL1.104	<i>ACGCGTATTATGAAACAGTCTACTATCG</i> <i>CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	1.00 ± 0.07	29
	PX2.41	<i>TCTAGAATTATGAAGCAGAGTACGATTG</i> <i>CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	2.0 ± 0.1	30
	PX3.wt	<i>TCTAGAATTATGAAACAAAGCACTATTG</i> <i>CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	3.39 ± 0.09	31
	PX5.53	<i>TCTAGAATTATGAAGCAATCCACAATAG</i> <i>CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	4.9 ± 0.1	32
	PX6.15	<i>TCTAGAATTATGAAACAATCCACCATTGC</i> <i>CCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACC</i>	5.9 ± 0.2	33

10

20

30

40

		CCTGTGACAAAAGCC		
	PX8.24	<i>TCTAGAATTATGAAACAGTCTACTATCGC</i> <i>GCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACC</i> CCTGTGACAAAAGCC	8.0 ± 0.1	34
	PX10.23	<i>TCTAGAATTATGAAACAATCCACAATCG</i> <i>CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC</i> CCCTGTGACAAAAGCC	10.0 ± 0.4	35
<i>dsbA</i>	DH1.48	<i>GCGCGCATTATGAAAAAATTTGGCTCG</i> <i>CCCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG</i> CGCATCGGCG	0.80 ± 0.03	36
	DH2.wt	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATTTGGCTGG</i> <i>CGCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG</i> CGCATCGGCG	1.89 ± 0.09	37
	DH3.79	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATATGGCTGG</i> <i>CTCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG</i> CGCATCGGCG	2.92 ± 0.08	38
	DH7.72	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATATGGTTGG</i> <i>CTCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG</i> CGCATCGGCG	6.7 ± 0.2	39
	DL1.wt	<i>ACGCGTATTATGAAAAAGATTTGGCTGG</i> <i>CGCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG</i> CGCATCGGCG	1.0 ± 0.1	40
	DL2.3	<i>ACGCGTATTATGAAGAAGAAATTTGGTTGG</i> <i>CTCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG</i>	1.87 ± 0.09	41

		CGCATCGGCG		
	DL3.37	<i>ACGCGTATTATGAAGAAGATTTGGTTA</i> <i>GCACTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTA</i> GCGCATCGGCG	2.6 ± 0.1	42

10

20

30

40

50

説明文：クローン命名規則は以下の通りである：X Y. # = X はシグナル配列を指す（S = S T I I、P = P h o A 等）；Y は制限配列（H は B s s h 1 1 制限サイトを意味し、X は X b a I サイトを指し、L は M l u I 制限サイトを指す）を指し、# は T I R 強度（例えば、1 = 1 の T I R、7. 7 2 = 7. 7 2 の T I R）を指す。w t = 野生型 T I R 配列。

表 3：終点発酵力価

重鎖シグナル配列(TIR)/軽鎖シグナル 配列(TIR)	DsbA/C (+/-)	相対全長 A b 力価*
STII (1)/STII (1)	-	1.0
STII (1)/STII (1)	+	4.9
STII (1)/PhoA (1)	-	0.6
STII (1)/PhoA (1)	+	5.6
STII (2)/STII (2)	+	0.8
MalE (1)/STII (1)	-	0.4
MalE (1)/PhoA (1)	-	0.4
MalE (1)/PhoA (1)	+	1.5
DsbA (1)/STII (1)	-	1.4
DsbA (1)/STII (1)	+	3.3
DsbA (1)/STII (2)	+	3.6
DsbA (2)/STII (1)	-	0.9
DsbA (1)/MalE (1)	-	1.7
DsbA (1)/MalE (1)	+	10.1
DsbA (1)/DsbA (1)	-	1.9
DsbA (1)/DsbA (1)	+	12.7
DsbA (2)/DsbA (2)	+	10.6
DsbA (1)/PhoA (1)	-	1.9
DsbA (1)/PhoA (1)	+	10.0
DsbA (2)/PhoA (1)	-	1.5
DsbA (2)/PhoA (1)	+	6.7
PhoA (1)/STII (1)	-	0.3

* S T I I (1) / S T I I (1) サンプルの価数まで規格化された全てのサンプル、シヤペロン D s b A 及び D s b C の非存在下で発現する全長抗体を含んでいた。

結果／考察

10

20

30

40

50

【0320】

我々は大腸菌中の内膜透過輸送の2つの主要な分泌経路を代表するシグナルペプチドの新規な変異翻訳開始領域 (TIR) シグナルペプチドライブラリー (図2、表2) を開発した: sec (PhoA、MalE) 及びSRP (DsbA、STII)。各ライブラリーは、それにより関心のある所与のタンパク質の翻訳レベルを即時調節する手段を供給する、異なる翻訳強度の変異TIRを有するベクターのパネルを含む。マルトース結合ペリプラズムタンパク質 (MalE) 及びアルカリフォスファターゼ (PhoA) シグナルペプチドは、分子モーターSecAを用いた翻訳後様式で細胞質からペリプラズムへの転座を指示する。熱耐性エンテロトキシンII (stII) 及びチオール:ジスルフィド交換タンパク質は、シグナル認識粒子 (SRP) を用いて共翻訳の様式で転座を指示する (図1)。

【0321】

ライブラリーの構築の間、BssHII、MluI、又はXbaI制限サイトは、親遺伝子の開始コドンの9塩基対 (bps) 上流に挿入された。存在する制限サイトの型に依存して、異なる範囲のTIR強度が観察された (図2)。概して、BssHIIサイト上流は、MluIサイトを有する配列は、適度のTIR強度 (約1から8) であり、XbaIサイトは最高の範囲 (約1から11) であるのに対し、MluIサイトを有する配列は最小のTIR強度 (約1から3) の範囲を示した。最高のTIR変異体は、調べたシグナルペプチド/制限サイトの組み合わせの任意について存在し得ることを除外できない一方で、これらの結果は、調べた各シグナルペプチドライブラリーの平均TIR強度の代表的なものであろう。

【0322】

翻訳レベルと分泌におけるシグナルペプチドの効果を示すために一連のプラスミドを構築した。それぞれの場合、関心のある遺伝子をphoAプロモーター、trp Shine-Dalgarno及び異なる相対TIR強度を有するシグナル配列の下流に挿入した。振とうフラスコスケールでのphoAプロモーターの形質転換と誘導の後に、異種タンパク質を発現する全細胞の溶解物、抗c-met抗体クローン5D5、v2をSDS-PAGEで解析した。これらの実験において、各重鎖又は軽鎖TIRを、それぞれ対応する軽鎖又は重鎖と変えるか、不変のまま維持した。

【0323】

図3は重鎖シグナルペプチド操作の結果を示す。 α -Fc特異抗体を用いて調べた際、他のシグナルペプチド変異体 (図3A、一番上のプロット) よりも、ssDsbA重鎖TIR一変異体は、全長抗体 (FL-Ab)、並びに重鎖 (HL) 二量体及び重-重-軽 (HHL) 種の明確な増加を示した。これらのサンプルの全重鎖の試験により、調べた全てのシグナルペプチド間で比較的類似のレベルであることが明らかとなった (図3A、一番下のプロット)。軽鎖を α - κ Lc抗体で可視化した際、ssDsbA重鎖TIR一変異体を用いて、類似の結果が得られ、再度最高のFL-Abレベルを示した (図3B、一番上のプロット)。驚くべきことには、DsbA TIR一重鎖融合サンプルは、他のサンプルで観察されるより小さな種-予想される軽-軽 (LL) 二量体及び遊離軽鎖を欠いていた。概して、翻訳後シグナル (MalE、PhoA) が重鎖に融合している場合、共翻訳 (STII、DsbA) シグナルペプチド融合 (図3B、一番下のプロット) の場合よりも全軽鎖の発現が多いようである。概して、以下の階層が重鎖と融合したシグナルペプチドと全長抗体産生に関して観察された: DsbA > STII > MalE > PhoA。注目すべきことには、DsbA変異TIRは、相対TIR強度が変化しなかった場合でも (すなわち、双方のTIRが強度1であった)、STII変異TIRと比較して (例えば、全長抗体の) 発現が増加していた。

【0324】

図4は軽鎖シグナルペプチド操作の結果を示す。STII TIR一変異からPhoA TIR一又は二変異への軽鎖シグナルペプチドの変更によりFL-Ab力価の注目に値する増加が得られた (図4、一番上のプロット)。軽鎖に融合したシグナルペプチドの改

変は、発現する重鎖の全量に影響を与えなかったようであるが（図4、中段のプロット）、存在する軽鎖の総量を著しく変え、軽鎖に融合した2つのSTII又はDs b A TIR変異を伴うサンプル中に出現した、処理した軽鎖が最も蓄積していた（図4、一番下のプロット）。翻訳後シグナルペプチドに融合した場合、2つのバンドが全軽鎖サンプル中で観察され、未処理の軽鎖を示した。概して、以下の階層が軽鎖に融合したシグナルペプチドと全長抗体産生に関して観察された： $PhoA \geq MalE > STII > Ds b A$ 。

【0325】

10 L発酵から時間をかけた抗体種の会合の観察は、図3及び4に示す振とうフラスコの実験と類似の結果を示した。FL-A bの最大量が、重鎖に融合したDs b A由来のTIR変異及び軽鎖に融合したDs b A又はPho A由来のシグナルペプチドを有するサンプルで観察された（図5、一番上のプロット）。これらのサンプルはまたSTII TIR一重鎖融合より多いHHL及びHL二量体種を示した。更に、LL二量体と遊離軽鎖は、軽差に融合したPho A TIR一シグナルペプチドを伴うサンプル中で即時可視化された。減少した総タンパクサンプルの試験は、発酵の発現誘導条件下のSTII融合体よりも多い総重鎖を得た（図5、中段のプロット）。軽鎖ペプチド融合体と類似して、STII TIR一よりもDs b A TIR一シグナルペプチド融合体において、軽鎖のより大きな蓄積が観察された（図5、一番下のプロット）。しかし、軽鎖の最大の蓄積はPho A TIR一シグナルペプチド融合体において観察された。振とうフラスコから得た総軽鎖サンプルにおいて観察される2つのバンドは、発酵サンプルにおいて唯一のバンドとして出現し、10 L発酵においてより効率的に処理される軽鎖を示す。

【0326】

STII又はDs b A由来のTIR変異を融合し、誘導条件で振とうフラスコ培養中で発現させた際の軽鎖又は重鎖発現レベルの際を更に調べるために、我々は異なるシグナルペプチドを大腸菌pho A遺伝子（mPho A）の成熟ドメインに融合した（図6）。タンパク質発現が誘導された際、mPho Aの発現は、7のTIR強度（本研究で使用される最大のTIR強度）まで、Ds b Aシグナルペプチド融合体の増加したTIR強度と同時に増加を示した。6又は8のTIR強度に達するまで、TIR強度増加を伴うmPho A発現の類似増加がSTIIシグナルペプチド融合体について観察され、これによりSTII TIR三サンプルに存在するmPho Aと比較してmPho Aの量が減少しているようである。驚くべきことには、STII強度1 TIRを用いた場合よりも多くの重鎖及び軽鎖がDs b A強度1 TIRを用いて産生され、Pho AのSTII駆動転座は、Pho AのDb a駆動転座よりも低い総タンパク濃度で最大量に達した。また、STIIからDs b AへのTIR配列の変化は、TIR効果のダイナミックレンジを増加した。

【0327】

10 L発酵のサンプルは、タンパクーLーベースHPLCアッセイを用いた抗体価を解析した（表3）。HPLCデータはウェスタンブロット解析によって定性的な力価レベルとよく一致した（図3、4）。重鎖シグナル配列をSTII由来TIR変異からDs b由来TIR変異した場合、FL-A b力価は約40から90%まで増加した。Ds b A一重鎖融合体が、Ds b A、MalE、又はPho A TIR一シグナルペプチドと融合した軽鎖と対になった場合、最大の力価は得られる。最大の力価は軽鎖がMalE又はPho A TIRシグナルペプチドと融合した場合に得られる。

【0328】

対照的に、各々70%及び60%の下落を示すPho A TIR一及びMalE TIR一シグナルペプチド融合体を伴い、翻訳後シグナルペプチドが重鎖に融合した場合、FL-A b力価は下落した。我々は、共翻訳シグナル（例えば、Ds b A）を翻訳を駆動するために使用した場合に、重鎖発現が最適化されると結論付けた。

【0329】

我々はシャペロン過剰発現の効果を試験した。シャペロンDs b AとDs b C（ここでも場合によりDs b A/Cと呼ぶ）の過剰発現は、重鎖に融合したDs b Aシグナルペプチド及び軽鎖に融合したDs b A、Pho A、又はMalEシグナルの利益を増加した。重

鎖及び軽鎖（S S 1. 1 + シャペロン）に融合した S T I I T I R シグナルによって F L - A b の発現を比較した場合、M a l E、P h o A、又は D s b A T I R 一軽鎖融合体と一体になった D s b A T I R 一重鎖融合体において、F L - A B 力価における約 2 から 2. 5 倍の増加が観察された。

【0330】

我々は抗体の軽鎖重鎖に融合したシグナルペプチドと最終的な抗体力価の関係を調べた。完全会合抗体（F L - A b）力価は、共翻訳（例えば、D s b A 又は S T I I）シグナルペプチドが重鎖の N 末端に融合した場合に最高となり、D s b A 由来 T I R 変異が最大の観察された F L - A b 収量の結果となった。このように、D s b A T I R 変異は誘導条件下において S T I I T I R 変異よりも高いパッセンジャータンパク質の翻訳レベルを可能にし得、これにより、処理したパッセンジャータンパク質のより高い発現レベルの結果となった。対照的に、翻訳後シグナルペプチド（即ち、M a l E 又は P h o A）が重鎖に融合した場合に、抗体力価が劇的に下落した。この効果は、タンパク質分解を原因とし得るか又は重鎖によって続く異なるフォールディング経路を原因とし得る（6）。重鎖に融合した P h o A 又は M a l E T I R シグナルペプチドを発現するサンプルからの総重鎖レベルの試験は、潜在的には処理されない重鎖の存在によって、見かけ上の重量のわずかなシフトを示した（図 3 A、一番下のプロット）。

【0331】

軽鎖への翻訳後シグナルペプチド M a l E 由来又は P h o A 由来 T I R 変異体の融合は、10 L 発酵の間の S T I I 媒介転座を超える、処理した軽鎖の大きな蓄積及び抗体力価の増加の結果となった（図 5、一番下のプロット）。軽鎖並びに F L - A B の収量の増加は、S T I I T I R 変異体による軽鎖転座と比較して、D s b A T I R 変異体によって軽差が転座する場合にまた観察された。しかし、D s b A T I R 一変異体から発現される全軽鎖の量は、P h o A 又は M a l E T I R 一変異体から発現されるものより大きくなかった。興味深いことには、10 L の発酵から時間をかけて得たサンプルの解析は、M a l E、D s b A、又は P h o A T I R 変異体に融合した軽鎖を用いた試行からの F L - A b 力価は、S T I I T I R 変異への融合体がより低い最大力価に達するだけでなく、より早い時間点でその力価レベルに達成する一方で、時間をかけて上昇し続けた。このように、重鎖が最大発現のために共翻訳を必要とする一方で、共又は翻訳後様式で、効率的に転座し得ることを示唆する。

【0332】

一アーム抗 c - m e t 抗体：我々は一アーム抗体の軽鎖、重鎖及び F c に融合したシグナルペプチドと最終抗体力価の間の関係を評価した。プラスミドは、軽鎖、重鎖、及び F c ポリペプチドについて 1 の T I R を有する S T I I を用いて、軽鎖について 1 の T I R（配列番号：29）を有する P h o A シグナル配列を、重鎖と F c 断片について 1 の T I R（配列番号：40）を有する D s b シグナル配列を用いて；軽鎖と F c 断片について 1 の T I R を有する P h o シグナルを、H C について 1 の T I R を有する D s b A シグナル配列を用いて構築した。相対力価番号は試行サンプルの終点から得られ、上述のタンパク質 L 逆相 H P L C アッセイで測定された。相対力価値は、D s b A / C の共発現なしで、表 4 - S T I I シグナル配列及び L C、H C、及び F C について T I R = 1 の第一列の場合の力価まで規格化した。

【0333】

結果を表 4 に示す。一アーム抗体関連力価は、共翻訳（例えば、D s b A）シグナルペプチドが重鎖の N 末端に融合した場合、翻訳後（例えば、P h o A）シグナルペプチドが軽鎖の N 末端に融合した場合、及び翻訳後（例えば、P h o A）シグナルペプチドが F c 領域に融合した場合、及び発現が D s b A / C の存在下の場合、最高であった。概して、軽鎖、重鎖及び F c 断片に融合したシグナルに関し、以下の階層が観察された。P. D. D > P. D. P > S. S. S. D s b A / C の非存在下の発現レベルは、全ての試験したサンプルで類似であり、ペリプラズムに分泌された抗体の殆どが凝集していた。ジスルフィド結合シャペロンの共発現は、フォールドした抗体の産生を増加させ、従って、T I R

最適化によって認識される抗体発現の増加を明らかにした。

【0334】

表4：一価一アーム抗c-met抗体MetMAb

プラスミド	LC, HC, Fc	DsbA/C	相対力価
pxCM11H.v2.H.Fc.1.K.2192	Lc, Hc, 及び Fc についての STII TIR 1	-	1.0
pxCM11H.v2.H.Fc.1.K.2192	Lc, Hc, 及び Fc についての STII TIR 1	+	1.7
pPDD.111.MetMAb	Lc についての PhoA TIR 1、 Hc 及び Fc につ いての DsbA TIR 1	-	1.0
pPDD.111.MetMAb	Lc についての PhoA TIR 1、 Hc 及び Fc につ いての DsbA TIR 1	+	3.8
pPDP.111.MetMAb	Lc についての PhoA TIR 1、 Hc についての DsbA TIR 1、 Fc についての PhoA TIR	-	0.7
pPDP.111.MetMAb	Lc についての PhoA TIR 1、 Hc についての DsbA TIR 1、 Fc についての PhoA TIR	+	2.5

【0335】

略号：D＝シグナル配列 DsbA P＝シグナル配列 PhoA。XXX#. #. #（例えば、PDP. 111）は、実験で使用される軽鎖シグナル配列、重鎖シグナル配列、Fcシグナル配列、軽鎖TIR、重鎖TIR、FcTIR。

【0336】

概して、本技術は、TIR変異体の新規配列からの選択を介した軽鎖及び重鎖発現の操作を介し、更に軽鎖の共翻訳又は翻訳後シグナル配列及び重鎖の共翻訳シグナル配列の使用による、例えば、大腸菌における折りたたまれた抗体の収率を増加させるための新規の

10

20

30

40

50

方法を提供する。重鎖、軽鎖及びFc領域を含む一アーム抗体の改善された発現はまたここに開示した新規のTIR変異体を用いるか、更に軽鎖の共翻訳又は翻訳後シグナル配列、重鎖の共翻訳配列、及び得られたFcポリペプチドの共翻訳又は翻訳後シグナル配列の使用によって達成された。この方法の効用は、全体として、広範囲の抗体（例えば、knob及びホール変異を含む二重特異的抗体）、抗体誘導体、及び細菌ベースの組換えタンパク質産生に広く適用できるであろう。

【0337】

一部の参考文献リスト

1. Simmons, L. C., Reilly, D., Klimowski, L., Raju, T. S., Meng, G., Sims, P., Hong, K., Shields, R. L., Damico, L. A., Rancatore, P., and Yansura, D. G. (2002) *Journal of immunological methods* 263(1-2), 133-147
2. Stemmer, W. P., Morris, S. K., Kautzer, C. R., and Wilson, B. S. (1993) *Gene* 123(1), 1-7
3. Simmons, L. C., and Yansura, D. G. (1996) *Nature biotechnology* 14(5), 629-634
4. Le Calvez, H., Green, J. M., and Baty, D. (1996) *Gene* 170(1), 51-55
5. Jackson, R. W., and DeMoss, J. A. (1965) *Journal of bacteriology* 90(5), 1420-1425
6. Kadokura, H., and Beckwith, J. (2009) *Cell* 138(6), 1164-1173

【0338】

上記では特定の実施態様に言及したが、本発明はそのようには限定されないことは理解されるであろう。当業者であれば、本発明の全体の概念を変えずに開示された実施態様に様々な変更をなすことができるであろう。そのような変更は全て本発明の範囲内であることを意図する。

【図1】

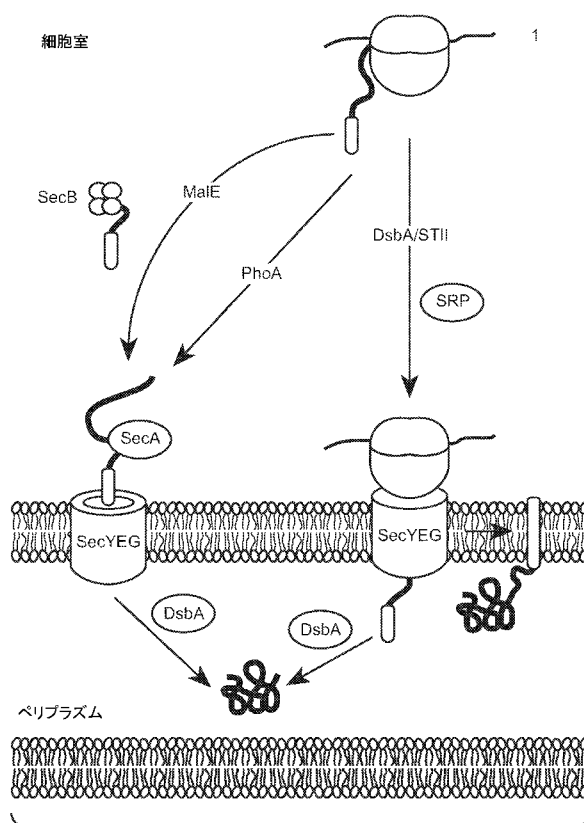


FIG. 1

【図2】

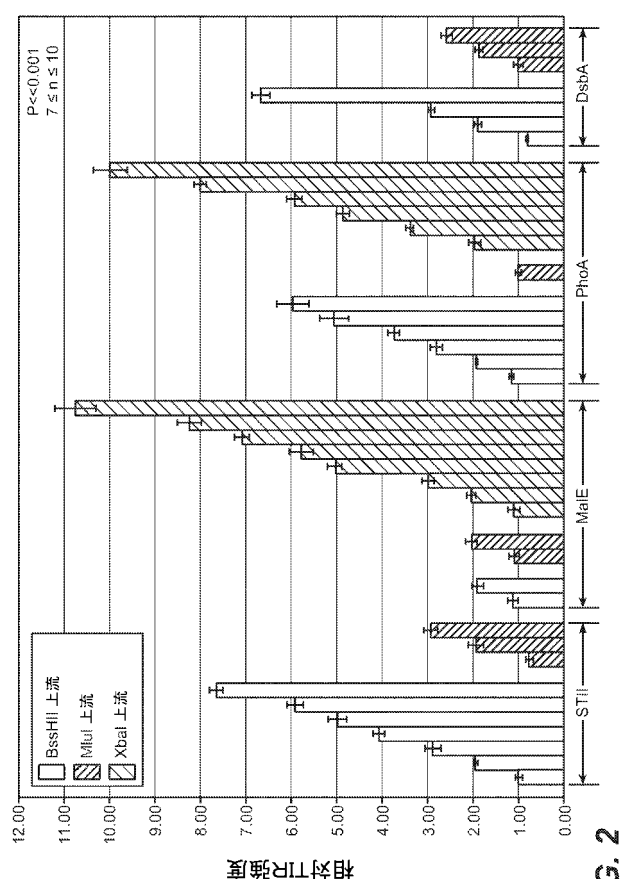
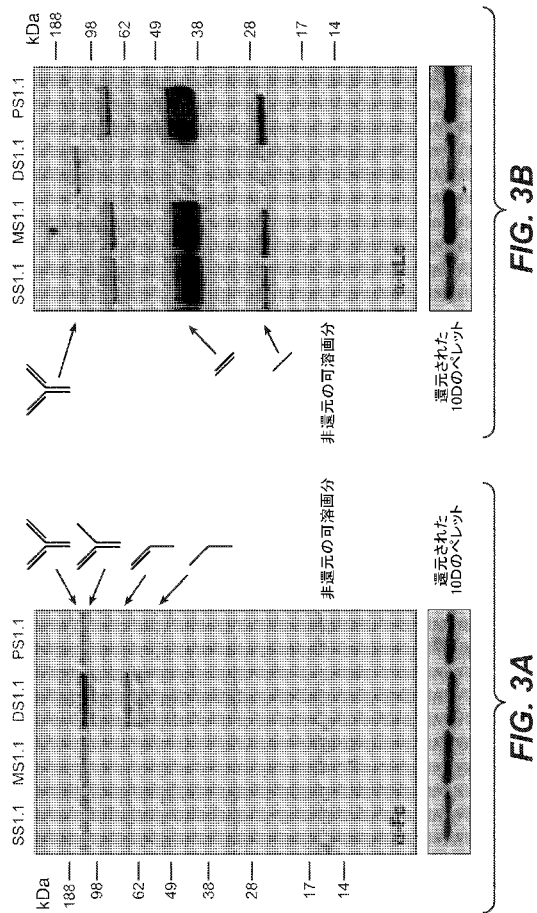
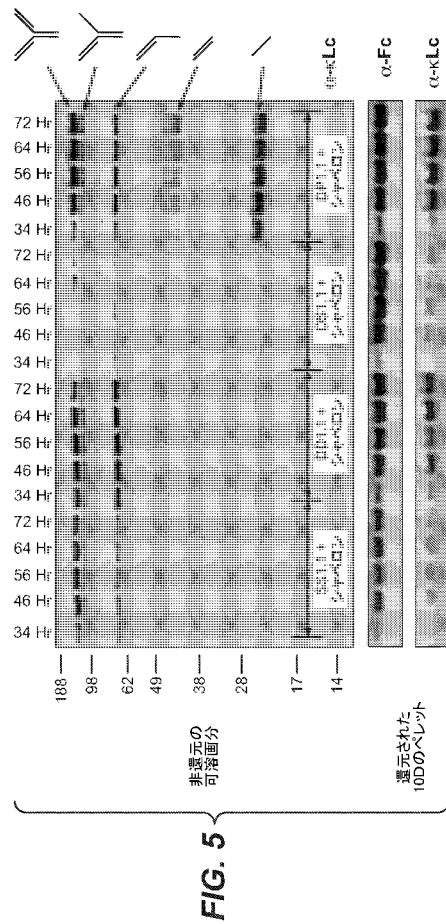


FIG. 2

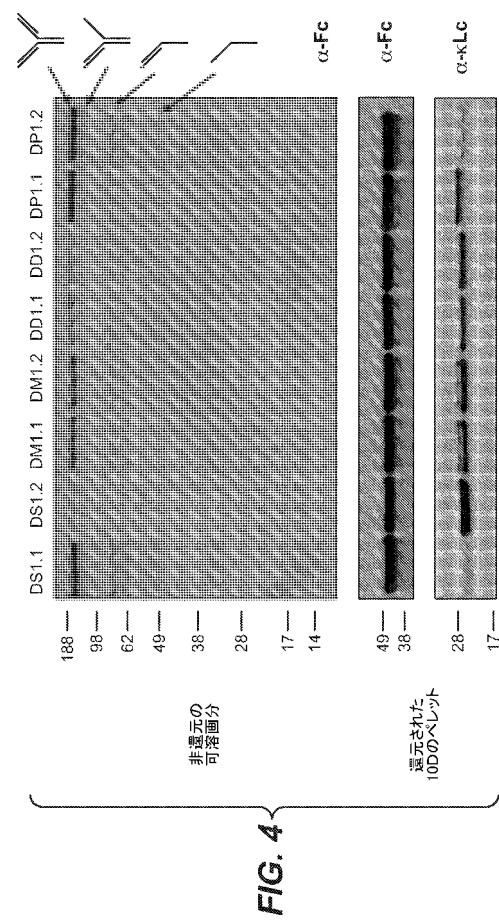
【図 3】



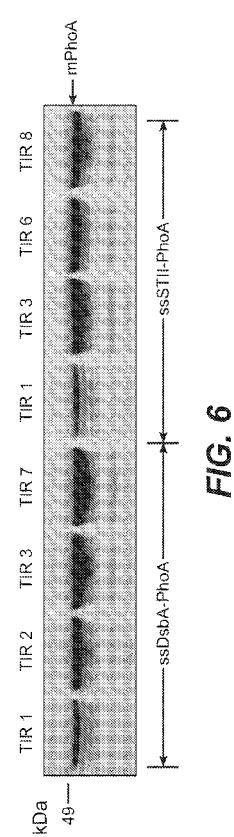
【図 5】



【図 4】



【図 6】



【 図 7 】

FIG. 7

5D5.v2 軽鎖

FR1-LC: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY
FR3-LC: GVPSTRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
FR4-LC: FGQGTKVEIKR
CDR1-LC: KSSQSLLYTSSQKNYLA
CDR2-LC: WASTRES
CDR3-LC: QQYAYPWT
CL1: TAAAPSVFIIPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5D5.v2 重鎖

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWV
FR3-HC: RFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYC
FR4-HC: WGQGLTVTVSS
CDR1-HC: GYFTSYWLH
CDR2-HC: GMDPSNDSITRFNPFKD
CDR3-HC: AITYRSYVITPLDY
CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHI
CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTSCAVAGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFL
VSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVAHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 図 8 】

FIG. 8

DKHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPGVYTLPPSREEMTKNQVSLWOL
VKGYFSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 配 列 表 】

2016152802000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平成28年3月8日 (2016.3.8)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

明 細 書 に 記 載 の 発 明。

フロントページの続き

(72)発明者 ライリー, ドロシア, イー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエ
ー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA53 CA02 CA04 CA07 DA05 DA06 EA04 FA02

FA17 FA18 HA01 HA03

4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 DA01

4C085 AA13 AA14 CC07 DD63 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74 GA20

【外国語明細書】
2016152802000001.pdf