

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7448638号  
(P7448638)

(45)発行日 令和6年3月12日(2024.3.12)

(24)登録日 令和6年3月4日(2024.3.4)

(51)国際特許分類	F I		
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	Z N A	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46		
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D	
A 6 1 K 31/282 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N	
請求項の数 20 (全25頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2022-510797(P2022-510797)	(73)特許権者	504122398 沈陽薬科大学 中華人民共和国遼寧省沈陽市沈河区文化路103号
(86)(22)出願日	令和2年8月11日(2020.8.11)	(73)特許権者	522061556 北京斯普瑞格生物技术 有限公司 BEIJING SIPURUIGE BIOTECH CORPORATION 中華人民共和国北京市北京 經濟 技術 開 発 区中和街14号1幢4層B-409室
(65)公表番号	特表2022-545207(P2022-545207A)	(74)代理人	110001508 弁理士法人 津国
(43)公表日	令和4年10月26日(2022.10.26)	(72)発明者	馬 寧 寧 中華人民共和国 遼 寧 省沈 陽 最終頁に続く
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/108434		
(87)国際公開番号	WO2021/031930		
(87)国際公開日	令和3年2月25日(2021.2.25)		
審査請求日	令和4年4月13日(2022.4.13)		
(31)優先権主張番号	201910766943.8		
(32)優先日	令和1年8月19日(2019.8.19)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		

(54)【発明の名称】 抗体の変異体及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：1のアミノ酸配列の重鎖と、配列番号：7のアミノ酸配列の軽鎖とを含むか、配列番号：9のアミノ酸配列の重鎖と、配列番号：13のアミノ酸配列の軽鎖とを含むか、又は、配列番号：17のアミノ酸配列の重鎖と、配列番号：21のアミノ酸配列の軽鎖とを含む、抗体又はその抗原結合断片であって、前記抗原結合断片が、Fab断片、Fab'断片又はFab(ab')<sub>2</sub>断片である、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項2】

前記Fab断片の重鎖アミノ酸配列が配列番号：25の配列であり、前記Fab断片の軽鎖アミノ酸配列が配列番号：29の配列である、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の抗体又はその抗原結合断片を含む、二重特異性抗体又は融合タンパク質。

【請求項4】

請求項1又は2に記載の抗体又はその抗原結合断片を含む、コンジュゲート。

【請求項5】

ポリエチレングリコール、細胞障害性薬剤、活性ペプチド、ナノボディ、単ドメイン抗体、Fab断片、Fab'断片、scFv、低分子薬、化学療法剤又は放射線療法剤からなる群から選ばれる別の機能性分子を、さらに含む、請求項4に記載のコンジュゲート。

【請求項6】

前記活性ペプチドがAng2中和活性ペプチドである、請求項5に記載のコンジュゲート。  
【請求項7】

前記活性ペプチドが配列番号:33のAng2中和活性ペプチドである、請求項5に記載のコンジュゲート。

【請求項8】

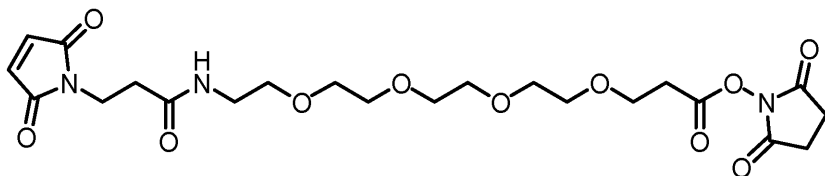
前記Ang2中和活性ペプチドが、リンカーを介して抗体にコンジュゲートしており、前記抗体が、配列番号:1のアミノ酸配列の重鎖と、配列番号:7のアミノ酸配列の軽鎖とを含む、請求項6又は7に記載のコンジュゲート。

【請求項9】

前記リンカーがアミド結合を有し、具体的には下記式I

10

【化1】



NHS-PEG<sub>4</sub>-maleimide

式I

で示される構造を有するホルムアミド-PEG4-NHSである、請求項8に記載のコンジュゲート。

20

【請求項10】

前記ポリエチレングリコールが、モノメトキシポリエチレングリコールである、請求項5に記載のコンジュゲート。

【請求項11】

前記ポリエチレングリコールが、mPEG2000、mPEG5000、又はmPEG10000である、請求項5に記載のコンジュゲート。

【請求項12】

前記ポリエチレングリコールがさらに薬物分子とコンジュゲートしている、請求項5～11のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

【請求項13】

前記ポリエチレングリコールが直鎖状二官能基化ポリエチレングリコール、直鎖状ヘテロ官能基化ポリエチレングリコール又はMulti-Arm官能基化PEGである、請求項5～12のいずれか1項に記載のコンジュゲート。

30

【請求項14】

請求項1又は2に記載の抗体又はその抗原結合断片、請求項3に記載の二重特異性抗体又は融合タンパク質、又は請求項4～13のいずれか1項に記載のコンジュゲートを含み、任意選択的に、薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項15】

請求項1又は2に記載の抗体又はその抗原結合断片、請求項3に記載の二重特異性抗体又は融合タンパク質、請求項4～13のいずれか1項に記載のコンジュゲート、又は請求項14に記載の医薬組成物の、癌を治療するための医薬品又はキットの製造における、使用。

40

【請求項16】

前記癌が、非小細胞肺癌、結腸直腸癌、乳がん、悪性神経膠腫、又は腎細胞がんである、請求項15に記載の使用。

【請求項17】

前記癌が、進行期、転移性又は再発性非扁平上皮非小細胞肺癌又は転移性結腸直腸癌である、請求項15に記載の使用。

【請求項18】

請求項1又は2に記載の抗体又はその抗原結合断片、請求項3に記載の二重特異性抗体又は融合タンパク質、請求項4～13のいずれか1項に記載のコンジュゲート、又は請求項

50

1.4に記載の医薬組成物を含むキット。

【請求項19】

さらに、前記抗体又はその抗原結合断片と併用する薬剤を含む、請求項1.8に記載キット。

【請求項20】

前記薬剤が、カルボプラチン又はシスプラチンである、請求項1.9に記載キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体分野に属する。具体的に、抗体の変異体、それを含む組成物および/または  
10 はコンジュゲート、およびそれらの用途に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体-薬物コンジュゲート (Antibody-drug conjugates, ADC) は、標的治療薬の一  
類であり、抗体の特異性と細胞傷害性治療剤の細胞傷害性を組み合わせたものである。AD  
Cは主としてさまざまな癌を治療する候補と見なされている。ADCには、治療薬と連結  
されている抗体が含まれている。また、二重特異性抗体は、両つの既存の抗体を用いて、  
化学コンジュゲート方法によって迅速に、大量に合成されてもよい。例えば、両つのIgG  
分子あるいは両つのFab断片が、コンジュゲート試薬で連結されている。また、抗体酵素  
20 を利用してCovX-Bodies<sup>[1]</sup>を調製することが報告され、一つのIgG分子の両つのFabア  
ームに対して、それぞれ、標的部位中和作用を有する両つのポリペプチドが接続された。  
よって、サイト特定カップリング (Site-specific coupling) テクノロジーは、新規二重  
特異性抗体の調製にも応用できる<sup>[1]</sup>。

【0003】

抗体分子には、架橋の修飾に使える基、例えばアミノ基とカルボキシ基が多く含まれる  
。一方、これらの基は抗体分子において大量に存在しているため、抗体のカップリング部  
位にランダム性を付与されている。また、抗体分子のジスルフィド結合による方法もたく  
さんあり、その数が限られており、位置も固定であり、薬物にコンジュゲートされた後、  
抗原結合部位が遮断されていない。これらの特徴によって、抗体のジスルフィド結合は、  
抗体のコンジュゲートに適している部位の一つになる。しかし、これらの内在性ジスル  
30 フィド結合の還元は非特異的であり、すなわち、ヒンジ領域のジスルフィド結合、及び重鎖  
と軽鎖の間のジスルフィド結合がすべて還元され、その結果、コンジュゲート生成物はさ  
まざまな成分の混合物になる<sup>[2,3]</sup>。

【0004】

システインチオールは、中性pHにおいて反応性であり、これは、pH7に近い場合でプロ  
トン化と求核性が低下するアミン類の大部分とは異なる。遊離のチオール(スルフヒドリル  
基)は相対的な反応性を有するので、システイン残基を持っているタンパク質は、一般、そ  
のジスルフィド-連結されたオリゴマーの酸化形として存在し、又は内部で架橋されたジサ  
ルファイド基を持つ。抗体中のシステインスルフヒドリル基は、一般、抗体アミン又はヒ  
ドロキシ基に対する反応性と比較して、求電子カップリング反応剤に対する反応性がより  
40 高く、すなわち、もっと求核性を有している。したがって、抗体のアミノ酸残基をシステ  
インに改変させ、その後、該システインを利用してコンジュゲート反応を行うことができ  
る。Junutulaら<sup>[4]</sup>は、PHESELECTOR(phage ELISA for selection of reactive th  
iols)という技術を開発した。さらに、前記技術によりスクリーニングして、反応性Cysを  
有するIgG変異体であるTHIOMABが得られ、それと薬物とのコンジュゲート生成物は、T  
DC (THIOMAB-drug conjugates) と呼ばれる。従来のADCと比べて、PHESELECTOR  
技術により得られる対応するTDCは、より良い治療効果を示したが、下記欠点もある：全  
長抗体を哺乳動物細胞で発現する場合、導入されたCysは、培地中の、グルタチオン又は  
他のカプチル基含有物質とジスルフィド結合を形成可能であるので、コンジュゲートの進  
50 行には、それを遊離フォームに還元される必要がある。しかし、その同時、抗体の鎖間ジ

スルフィド結合も開かれ、完全な抗体に回復するために再度酸化される必要がある。また、この追加導入されたスルフヒドリル基は、THIOMAB形成の全過程で、抗体の2つのFabの間に誤ってジスルフィド結合を形成する可能性もある〔5-7〕。

【0005】

適切な部位を選択してシステイン変異を作ると、その変異によって得られたシステインのスルフヒドリル基が、発現・精製の過程でそのまま遊離状態を保持し、何の前処理もせずに、下流のコンジュゲート反応に直接適用することができる。そのため、出願人は、システインのスルフヒドリル基が遊離状態を維持しやすく、高い反応性を有する、合理的なシステイン変異部位を開発した。その後、抗体は、マレイミドを含むリンカーを介して、別の機能性分子（抗体断片、ポリペプチド又は低分子薬）とコンジュゲートした。

10

【発明の概要】

【0006】

本発明は、特に、システインに変異可能な抗体定常領域の部位を提供し、前記変異は、抗体、断片または誘導体を有効担持物とコンジュゲートすることを可能にするように、選択された部位特異的コンジュゲート部位を導入され、1つまたは複数の前記変異は、Kabatナンバリングによる軽鎖位置の166位の変異を含む。また、本発明は、抗血管新生機能を有する二重特異性抗体の独立構造を提供する。

その結果、本発明は以下を提供する。

【0007】

1. 抗体又はその断片の変異体であって、Kabatナンバリングで166で表される位置のアミノ酸からシステインへの変異を有する軽鎖定常領域を含み、好ましくは、ヒト化抗体、キメラ抗体であり、より好ましくは、IgG抗体である、抗体又はその断片の変異体。

20

【0008】

2. 前記軽鎖が 又は 型である、前記項1に記載の抗体又はその断片の変異体。

【0009】

3. 前記変異体が、配列番号：1のアミノ酸配列の重鎖と、配列番号：7のアミノ酸配列の軽鎖とを含み；配列番号：9のアミノ酸配列の重鎖と、配列番号：13のアミノ酸配列の軽鎖とを含み；又は、配列番号：17のアミノ酸配列の重鎖と、配列番号：21のアミノ酸配列の軽鎖とを含む、前記項1又は2に記載の抗体又はその断片の変異体。

【0010】

4. 前記断片が、Fab断片、Fab'断片又はF(ab)<sub>2</sub>断片であり、好ましくは、前記Fab断片の重鎖アミノ酸配列が配列番号：25の配列であり、前記Fab断片の軽鎖アミノ酸配列が配列番号：29の配列である、前記項1～3のいずれか1項に記載の抗体又はその断片の変異体。

30

【0011】

5. 前記項1～4のいずれか1項に記載の抗体又はその断片の変異体を含む、二重特異性抗体又は融合タンパク質。

【0012】

6. 前記項1～4のいずれか1項に記載の抗体又はその断片の変異体を含む、コンジュゲート。

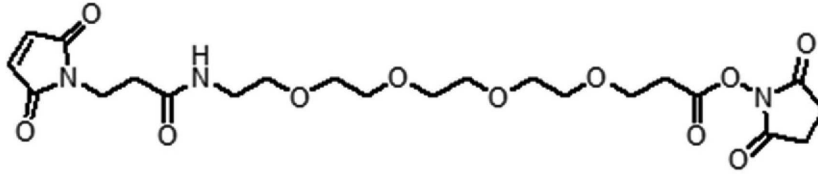
40

【0013】

7. 前記コンジュゲートが、ポリエチレングリコール、細胞障害性薬剤、活性ペプチド、ナノボディ、単一ドメイン抗体、Fab断片、Fab'断片、scFv、低分子薬、化学療法剤又は放射線療法剤からなる群から選ばれ、好ましくは、前記活性ペプチドが、Ang2活性ペプチドであり、より好ましくは配列番号：33のAng2活性ペプチドであり、さらに好ましくは、前記Ang2活性ペプチドがリンカーを介して本発明のペバシズマブ変異体にコンジュゲートしており、なお好ましくは、前記リンカーがアミド結合を有し、具体的には下記式I

50

## 【化1】

NHS-PEG<sub>4</sub>-maleimide

で示される構造を有するホルムアミド-PEG<sub>4</sub>-NHSである、前記項6に記載のコンジュゲート。

10

## 【0014】

8. 前記ポリエチレングリコールが、モノメトキシポリエチレングリコール (Methoxy PEG) であり、好ましくは、mPEG2000、mPEG5000、又はmPEG10000である、前記項6に記載のコンジュゲート。

## 【0015】

9. 前記ポリエチレングリコールがさらに薬物分子とコンジュゲートしており、好ましくは、前記ポリエチレングリコールが直鎖状二官能基化ポリエチレングリコール、直鎖状ヘテロ官能基化ポリエチレングリコール又はMulti-Arm官能基化PEGである、前記項7又は8に記載のコンジュゲート。

## 【0016】

10. 前記項1~4のいずれか1項に記載の抗体又はその断片の変異体、前記項5に記載の二重特異性抗体又は融合タンパク質、又は前記項6~9のいずれか1項に記載のコンジュゲートを含み、任意選択的に、薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

20

## 【0017】

11. 前記項1~4のいずれか1項に記載の抗体又はその断片の変異体、前記項5に記載の二重特異性抗体又は融合タンパク質、前記項6~9のいずれか1項に記載のコンジュゲート、又は前記項10に記載の医薬組成物を投与することを含む、癌(好ましくは、進行期、転移性又は再発性非扁平上皮非小細胞肺癌のような非小細胞肺癌、転移性結腸直腸癌のような結腸直腸癌、乳がん、悪性神経膠腫、腎細胞がん、多形性膠芽腫)の治療方法。

## 【0018】

12. 前記項1~4のいずれか1項に記載の抗体又はその断片の変異体、前記項5に記載の二重特異性抗体/融合タンパク質又は前記項6~9のいずれか1つしたコンジュゲート、又は前記項10に記載の医薬組成物の、癌(好ましくは、進行期、転移性又は再発性非扁平上皮非小細胞肺癌のような非小細胞肺癌、転移性結腸直腸癌のような結腸直腸癌、乳がん、悪性神経膠腫、腎細胞がん、多形性膠芽腫)を治療するための医薬品又はキットの製造における、使用。

30

## 【0019】

13. 前記項1~4のいずれか1項に記載の抗体又はその断片の変異体、前記項5に記載の二重特異性抗体/融合タンパク質又は前記項6~9のいずれか1項に記載のコンジュゲート、又は前記項10に記載の医薬組成物を含むキットであって、好ましくは、前記キットが、さらに、前記抗体又はその断片と併用する薬剤、例えばカルボプラチン又はシスプラチンを含む、キット。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0020】

【図1】図1は、野生型(WT、本発明で「抗VEGF抗体」とも称される)抗体、166変異抗体(166C)、124変異抗体(124C)の還元状態と非還元状態でのSDS-PAGE電気泳動図を示す。

【図2】抗VEGF野生型抗体/変異体とmPEG2000-MALとのコンジュゲートのSDS-PAGE電気泳動図。上記図から、166Cと124C両方を、mPEG2000にコンジュゲートすることができることがわかる。

50

【図3】抗VEGF野生型抗体/変異体とDC（ポリペプチド-リンカー）とのコンジュゲートのSDS-PAGE電気泳動図。グレースケール解析では、166Cの85%がDCにコンジュゲートされているのに対し、124Cの75%のみがDCにコンジュゲートされている。このことから、166C抗体変異体は、同じ条件でより優れたコンジュゲート効率を示したことがわかる。

【図4】抗CD20野生型抗体/変異体とmPEG2000-MALとのコンジュゲートのSDS-PAGE電気泳動図。

【図5】抗CD20野生型抗体/変異体とDC（ポリペプチド-リンカー）とのコンジュゲートのSDS-PAGE電気泳動図。

【図6】抗HER2野生型抗体/変異体とmPEG2000-MALとのコンジュゲートのSDS-PAGE電気泳動図。

10

【図7】抗HER2野生型抗体/変異体とDC（ポリペプチド-リンカー）とのコンジュゲートのSDS-PAGE電気泳動図。

【図8】抗VEGF抗体Fab断片の野生型/変異体とDC（ポリペプチド-リンカー）とのコンジュゲートのSDS-PAGE電気泳動図。

【図9】抗VEGF抗体Fab断片の野生型/変異体とmPEG2000-MALとのコンジュゲートのSDS-PAGE電気泳動図。

【図10】コンジュゲートする前の変異体166CのLC/MSスペクトル。

【図11】DCとのコンジュゲートする後の変異体166CのLC/MSスペクトル。

【図12】コンジュゲートする前の変異体124CのLC/MSスペクトル。

【図13】DCとのコンジュゲートする後の変異体124CのLC/MSスペクトル。

20

【図14】野生型抗体（WT）、変異体（124Cと166C）およびコンジュゲート（124ADCと166ADC）による、内皮細胞HUVECの増殖（VEGF刺激による増殖）に対する抑制作用。上記図から、抗体変異体は、選択された部位のシステイン変異により活性が変化しなかったことが分かり、選択された部位が抗体の生物学的活性に影響を与えていないことがわかる。同様に、DCをカップリングした後に生じたコンジュゲートは、細胞増殖を抑制する抗体の活性に影響を与えなかった。

【0021】

[発明の詳細な説明]

本発明の目的、技術構成および利点を明確にするために、以下具体的な実施例を示して、本発明をより詳細に説明する。一般当業者が理解できるように、以下の実施形態は例示を目的とするものであり、本発明の保護範囲は、後述する請求項の範囲に基づくものである。

30

【0022】

実施例で使用した制限エンドヌクレアーゼは、Thermo Fisher Scientific (China) Co., Ltd.から購入し、以下の実施例で使用した試薬又は材料は、由来が明確に記載されない場合、当技術分野で日常的に入手可能なものである。CHO-K1細胞の培地は、Sigma会社から購入した。

【0023】

実施例1. システイン変異細胞株のスクリーニングと発現

(1) 抗VEGF抗体、変異体の発現ベクターの構築

40

本文に記載された抗体（その対応する野生型配列は、USP Medicines Compendiumから得られたものであり、具体的には、重鎖配列は配列番号:1に示され、軽鎖配列は配列番号:2に示され；これを基に、本発明の変異体166Cは、kabatナンバリングによる軽鎖166位のアミノ酸をシステインに置換して得られたものであり、コントロール抗体124Cは、軽鎖124位のアミノ酸をシステインに置換して得られたものである）をコードするDNAは、化学合成した（GENEWIZ, Inc. Genomics Suzhou, China）。その後、抗体の重鎖遺伝子をBstBIとPacIで二重消化し、軽鎖遺伝子をHindIIIとEcoRIで二重消化した。重鎖遺伝子は、T4リガーゼにて、BstBIとPacIで処理した真核発現ベクターであるpCGS3（Bio vector NTCC Inc.）にライゲーションし、ライゲーションした後、HindIIIとEcoRIで二重消化して、T4リガーゼで軽鎖遺伝子を挿入し、重鎖と軽鎖の両方を含む発現ベクター

50

の構築した。

【 0 0 2 4 】

【 表 1 】

	WTババシズマブ	166C	124C
重鎖配列のコーディング配列	配列番号:3	配列番号:3	配列番号:3
軽鎖配列のコーディング配列	配列番号:4	配列番号:5	配列番号:6
重鎖のアミノ酸配列	配列番号:1	配列番号:1	配列番号:1
軽鎖のアミノ酸配列	配列番号:2	配列番号:7	配列番号:8

【 0 0 2 5 】

(2) 抗VEGF抗体、変異体の発現ベクターのスクリーニングと精製

構築した発現ベクターをDH5 コンピテントエシェリヒア・コリ菌株に形質転換した。形質転換されたDH5 株は、BstBIとPacIの2種の酵素とHindIIIとEcoRIの2種の酵素でそれぞれ二重消化して、シーケンス解析して確認した。ポジティブクローンは選択した。得られたエシェリヒア・コリは、プラスミド抽出キット (CW BIO, Beijing, Chinaから購入) を用いて、溶解してプラスミドを抽出して、重鎖と軽鎖の両方を含む発現ベクターを得た。

【 0 0 2 6 】

(3) CHO細胞での抗VEGF抗体、変異体の発現

精製した発現ベクターは、電気穿孔法でCHO-K1細胞 (ATCCから購入) にトランスフェクションし、96ウェルプレートに播種した。15日間培養した後、モノクロナールをピックアップし、ELISAにて細胞の抗体生産量を測定し、ベストの20%の株をピックアップして24ウェルプレートに播種した。7日間培養した後、細胞の抗体生産量を測定し、ベストの5つ~6つの株をピックアップしてローラーボトルに移して培養した。CHO-K1細胞での抗VEGF抗体の発現を達成した。無血清培養が安定した後、7日間の連続培養後に細胞を採取し、精製して後続実験に使用した。

【 0 0 2 7 】

(4) 抗CD20抗体、変異体の発現ベクターの構築

本文に記載された抗体 (その対応する野生型配列は、USP Medicines Compendiumから得られたものであり、具体的には、重鎖配列は配列番号:9に示され、軽鎖配列は配列番号:10に示され;これを基に、本発明の変異体166Cは、kabatナンバリングによる軽鎖166位のアミノ酸をシステインに置換して得られたものであり、コントロール抗体124Cは、軽鎖124位のアミノ酸をシステインに置換して得られたものである) をコードするDNAは、化学合成した (GENEWIZ, Inc. Genomics Suzhou, China)。その後、抗体の重鎖遺伝子をBstBIとPacIで二重消化し、軽鎖遺伝子をHindIIIとEcoRIで二重消化した。重鎖遺伝子は、T4リガーゼにて、BstBIとPacIで処理した真核発現ベクターであるpCGS3 (Bio vector NTCC Inc.) にライゲーションし、ライゲーションした後、HindIIIとEcoRIで二重消化して、T4リガーゼで軽鎖遺伝子を挿入し、重鎖と軽鎖の両方を含む発現ベクターの構築した。

【 0 0 2 8 】

【 表 2 】

	WTリツキシマブ	166C	124C
重鎖配列のコーディング配列	配列番号:11	配列番号:11	配列番号:11
軽鎖配列のコーディング配列	配列番号:12	配列番号:14	配列番号:16
重鎖のアミノ酸配列	配列番号:9	配列番号:9	配列番号:9
軽鎖のアミノ酸配列	配列番号:10	配列番号:13	配列番号:15

【 0 0 2 9 】

(5) 抗CD20抗体、変異体の発現ベクターのスクリーニングと精製

構築した発現ベクターをDH5 コンピテントエシェリヒア・コリ菌株に形質転換した。形

10

20

30

40

50

質転換されたDH5 株は、BstBIとPacIの2種の酵素とHindIIIとEcoRIの2種の酵素でそれぞれ二重消化して、シーケンス解析して確認した。ポジティブクローンは選択した。得られたエシェリヒア・コリは、プラスミド抽出キット（CW BIO, Beijing, Chinaから購入）を用いて、溶解してプラスミドを抽出して、重鎖と軽鎖の両方を含む発現ベクターを得た。

#### 【0030】

##### (6) CHO細胞での抗CD20抗体、変異体の発現

精製した発現ベクターは、電気穿孔法でCHO-K1細胞（ATCCから購入）にトランスフェクションし、96ウェルプレートに播種した。15日間培養した後、モノクロナールをピックアップし、ELISAにて細胞の抗体生産量を測定し、ベストの20%の株をピックアップして24ウェルプレートに播種した。7日間培養した後、細胞の抗体生産量を測定し、ベストの5つ～6つの株をピックアップしてローラーボトルに移して培養した。CHO-K1細胞での抗CD20抗体の発現を達成した。無血清培養が安定した後、7日間の連続培養後に細胞を採取し、精製して後続実験に使用した。

#### 【0031】

##### (7) 抗HER2抗体、変異体の発現ベクターの構築

本文に記載された抗体（その対応する野生型配列は、USP Medicines Compendiumから得られたものであり、具体的には、重鎖配列は配列番号:17に示され、軽鎖配列は配列番号:19に示され；これを基に、本発明の変異体166Cは、kabatナンバリングによる軽鎖166位のアミノ酸をシステインに置換して得られたものであり、コントロール抗体124Cは、軽鎖124位のアミノ酸をシステインに置換して得られたものである）をコードするDNAは、化学合成した（GENEWIZ, Inc. Genomics Suzhou, China）。その後、抗体の重鎖遺伝子をBstBIとPacIで二重消化し、軽鎖遺伝子をHindIIIとEcoRIで二重消化した。重鎖遺伝子は、T4リガーゼにて、BstBIとPacIで処理した真核発現ベクターであるpCGS3（Bio vector NTCC Inc.）にライゲーションし、ライゲーションした後、HindIIIとEcoRIで二重消化して、T4リガーゼで軽鎖遺伝子を挿入し、重鎖と軽鎖の両方を含む発現ベクターの構築した。

#### 【0032】

##### 【表3】

	WT トラスツズマブ	166C	124C
重鎖配列のコーディング配列	配列番号:18	配列番号:18	配列番号:18
軽鎖配列のコーディング配列	配列番号:20	配列番号:22	配列番号:24
重鎖のアミノ酸配列	配列番号:17	配列番号:17	配列番号:17
軽鎖のアミノ酸配列	配列番号:19	配列番号:21	配列番号:23

#### 【0033】

##### (8) 抗HER2抗体、変異体の発現ベクターのスクリーニングと精製

構築した発現ベクターをDH5 コンピテントエシェリヒア・コリ菌株に形質転換した。形質転換されたDH5 株は、BstBIとPacIの2種の酵素とHindIIIとEcoRIの2種の酵素でそれぞれ二重消化して、シーケンス解析して確認した。ポジティブクローンは選択した。得られたエシェリヒア・コリは、プラスミド抽出キット（CW BIO, Beijing, Chinaから購入）を用いて、溶解してプラスミドを抽出して、重鎖と軽鎖の両方を含む発現ベクターを得た。

#### 【0034】

##### (9) CHO細胞での抗HER2抗体、変異体の発現

精製した発現ベクターは、電気穿孔法でCHO-K1細胞（ATCCから購入）にトランスフェクションし、96ウェルプレートに播種した。15日間培養した後、モノクロナールをピックアップし、ELISAにて細胞の抗体生産量を測定し、ベストの20%の株をピックアップして24ウェルプレートに播種した。7日間培養した後、細胞の抗体生産量を測定し、ベストの5つ～6つの株をピックアップしてローラーボトルに移して培養した。CHO-K1細胞で

の抗HER2抗体の発現を達成した。無血清培養が安定した後、7日間の連続培養後に細胞を採取し、精製して後続実験に使用した。

【0035】

(10) 抗VEGF抗体Fab断片および変異体の発現ベクターの構築

本文に記載された抗VEGF抗体Fab断片(その対応する野生型配列は、USP Medicines Compendiumから得られたものであり、具体的には、Fab断片の重鎖配列は配列番号:25に示され、Fab断片の軽鎖配列は配列番号:26に示され;これを基に、本発明の変異体166Cは、kabatナンバリングによるFab断片の軽鎖166位のアミノ酸をシステインに置換して得られたものであり、コントロール抗体124Cは、Fab断片の軽鎖124位のアミノ酸をシステインに置換して得られたものである)をコードするDNAは、化学合成した(GENEWIZ, Inc. Genomics Suzhou, China)。その後、Fab断片の重鎖遺伝子をBstBIとPacIで二重消化し、Fab断片の軽鎖遺伝子をHindIIIとEcoRIで二重消化した。重鎖遺伝子は、T4リガーゼにて、BstBIとPacIで処理した真核発現ベクターであるpCGS3(Biovector NTC C Inc.)にライゲーションし、ライゲーションした後、HindIIIとEcoRIで二重消化して、T4リガーゼでFab断片の軽鎖遺伝子を挿入し、重鎖と軽鎖の両方を含むFab断片発現ベクターの構築した。

【0036】

【表4】

	WT Fab (ベバシズマブ)	166C	124C
Fab断片の重鎖配列のコーディング配列	配列番号:27	配列番号:27	配列番号:27
Fab断片の軽鎖配列のコーディング配列	配列番号:28	配列番号:30	配列番号:32
Fab断片の重鎖のアミノ酸配列	配列番号:25	配列番号:25	配列番号:25
Fab断片の軽鎖のアミノ酸配列	配列番号:26	配列番号:29	配列番号:31

【0037】

(11) 抗VEGF抗体Fab断片および変異体の発現ベクターのスクリーニングと精製

構築した発現ベクターをDH5 コンピテントエシェリヒア・コリ菌株に形質転換した。形質転換されたDH5 株は、BstBIとPacIの2種の酵素とHindIIIとEcoRIの2種の酵素でそれぞれ二重消化して、シーケンス解析して確認した。ポジティブクローンは選択した。得られたエシェリヒア・コリは、プラスミド抽出キット(CWBIO, Beijing, Chinaから購入)を用いて、溶解してプラスミドを抽出して、重鎖と軽鎖の両方を含む発現ベクターを得た。

【0038】

(12) CHO細胞での抗VEGF抗体Fab断片および変異体の発現

精製した発現ベクターは、電気穿孔法でCHO-K1細胞(ATCCから購入)にトランスフェクションし、96ウェルプレートに播種した。15日間培養した後、モノクロナールをピックアップし、SDS-PAGEにて細胞の抗体生産量を測定し、ベストの20%の株をピックアップして24ウェルプレートに播種した。7日間培養した後、細胞の抗体生産量を測定し、ベストの5つ~6つの株をピックアップしてローラーボトルに移して培養した。CHO-K1細胞での抗抗体の発現を達成した。無血清培養が安定した後、7日間の連続培養後に細胞を採取し、Niアフィニティークロマトグラフィーカラムで精製して後続実験に使用した。

【0039】

実施例2. Pro Aアフィニティークロマトグラフィーカラムでの(HiTrap FF)精製

細胞と培地を50 mL遠心チューブに移して、高速凍結遠心機にセットし、8000rで15 min遠心した。上清を回収し、細胞デブリを捨てた。培地を0.22 μmのマイクロポアろ過膜で一回ろ過し、ろ液を回収して使用まで予備した。ポンプ、シリンジ及び精製カラムは、カラムボリューム10倍の超純水、PBSで洗浄し、ローディングを待った。ローディング; 0.1 M Gly-HClで溶出して、精製した抗体蛋白液をエッペンチューブに引取り、1.5 M Tris-HClでpHを7~8に調整し、2-8 で保存した。結果を図1に示した。

## 【 0 0 4 0 】

## 実施例3．抗体の遊離スルフヒドリル基（free thiol）の割合の解析

本発明は、Ellmanの方法（Thermo Fisher Scientific (China) Co, Ltd.）を用いて、抗体製品における遊離スルフヒドリル基の含有率を検出することにより、さらなるコンジュゲーションに適した細胞株を選択した。0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液、DTNB(10 mM)溶液、システイン標準溶液を終濃度0.0059M～0.375Mになるように調製した。同時、濃度5 mg/mLの被検抗体サンプルを準備した。システイン標準溶液または被検サンプルを入れた1.5 mLエッペンチューブに、それぞれ、0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ を250  $\mu\text{L}$ 、DTNB溶液を5  $\mu\text{L}$ 加え、vortexしてよく混ぜた。避光して室温で5 minインキュベートした。波長412 nmのOD値を測定した。OD値をもとに標準曲線を作成し、サンプルのスルフヒドリル基の含有率を算出した。

10

## 【 0 0 4 1 】

## 【表5】

表1. Ellmanの方法にて検出したVEGF抗体製品（WT、166Cと124C）における遊離スルフヒドリル基の含有率。この中、WTには、遊離スルフヒドリル基がほぼ含まないのに対し、166Cと124Cにはスルフヒドリル基の約100%が遊離していた。

サンプル	遊離スルフヒドリル基%
WT	8.05%
166C	106.14%
124C	122.78%

20

## 【 0 0 4 2 】

## 【表6】

表2. Ellmanの方法にて検出したCD20抗体製品（WT、166Cと124C）における遊離スルフヒドリル基の含有率。この中、WTには、遊離スルフヒドリル基がほぼ含まないのに対し、166Cと124Cにはスルフヒドリル基の約100%が遊離していた。

30

サンプル	スルフヒドリル基%
WT	10.21%
166C	100.32%
124C	98.98%

40

## 【 0 0 4 3 】

50

## 【表 7】

表3. Ellmanの方法にて検出したHER2抗体製品 (WT、166Cと124C) における遊離スルフヒドрил基の含有率。この中、WTには、遊離スルフヒドрил基がほぼ含まないのに対し、166Cと124Cにはスルフヒドрил基の約100%が遊離していた。

サンプル	遊離スルフヒドрил基%
WT	6.11%
166C	110.28%
124C	105.38%

10

## 【0044】

## 【表 8】

表4. Ellmanの方法にて検出した抗VEGF抗体Fab断片製品 (WT、166Cと124C) における遊離スルフヒドрил基の含有率。この中、WTには、遊離スルフヒドрил基がほぼ含まないのに対し、166Cと124Cにはスルフヒドрил基の約50%が遊離していた。

20

サンプル	遊離スルフヒドрил基%
WT	3.22%
166C	60.68%
124C	40.59%

30

## 【0045】

## 実施例4. 抗体のコンジュゲートとアッセイ

抗体とコンジュゲートのコンジュゲート反応の条件は、抗体：コンジュゲート（ポリペプチド又はmPEG2000-MAL）=1：30（モル比）、反応温度37℃、反応時間3～4h。反応バッファーはPBS（pH 7.2）であった。抗VEGF抗体とmPEG2000-MAL（化学試薬会社から購入、例えば、SHANGHAI ZZBIO CO., LTD、製品認識ナンバリングZZP-MPEG-MAL-2K-01）とコンジュゲートした後のSDS-PAGE電気泳動図は、図2に示した。

## 【0046】

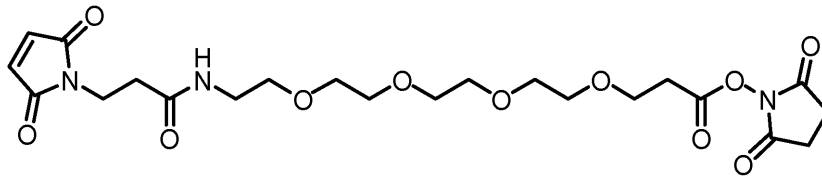
抗VEGF抗体とDC（ポリペプチド-リンカー）とコンジュゲートした（反応は、下記の式IIを参照、166C変異体とDCとコンジュゲートすると166ADC、124C変異体とDCとコンジュゲートすると124ADCが得られた）後のSDS-PAGE電気泳動図は、図3に示した。その結果、166Cでは85%がDCにコンジュゲートされているのに対し、124Cでは75%のみDCにコンジュゲートされていることが、Image J（NIH）によるグレースケール解析から分かる。このことから、166C抗体変異体は、同じ条件でより優れたコンジュゲート効率を示したことがわかる。なお、DC（ポリペプチド-リンカー）の構築情報は以下であった：ポリペプチドは、Ang2中和作用を有する活性ポリペプチドであり、配列はGln-Lys(Ac)-Tyr-Gln-Pro-Leu-Asp-Glu-Lys(Ac)-Asp-Lys-Thr-Leu-Tyr-Asp-Gln-Phe-Met-Leu-Gln-Gln-Gly-CONH2（配列番号:33）（参考文献のHanhua Huang, Jing-Yu Lai, Janet Do, Dingguo Liu, Lingna Li, Joselyn Del Rosario. Specifically Targeting Angio

40

50

poietin-2 Inhibits Angiogenesis, Tie2-Expressing Monocyte Infiltration, and Tumor Growth. Clin Cancer Res; 17(5) March 1, 2011, 1001-1011参照)であり、リンカーと接続するためのLysは下線で示した。前記リンカーはホルムアミド-PEG4-NHSであり、構造式は下記式Iに示した：

【化2】

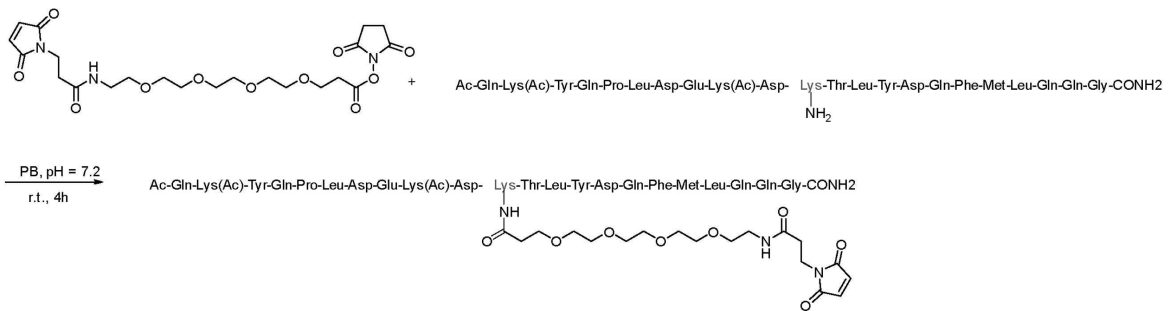


NHS-PEG<sub>4</sub>-maleimide

10

活性ペプチドとリンカーとの反応経路は以下の通りであった。

【化3】



20

抗CD20抗体 (WT、124C、166C) とmPEG2000-MALとのコンジュゲートは、図4に示した。

抗CD20抗体 (WT、124C、166C) とDC (ポリペプチド-リンカー) とのコンジュゲートは、図5に示した。

抗HER2抗体 (WT、124C、166C) とmPEG2000-MALとのコンジュゲートは、図6に示した。

抗HER2抗体 (WT、124C、166C) とDC (ポリペプチド-リンカー) とのコンジュゲートは、図7に示した。

30

抗VEGF Fab抗体 (WT、124C、166C) とmPEG2000-MALとのコンジュゲートは、図8に示した。

抗VEGF Fab抗体 (WT、124C、166C) とDC (ポリペプチド-リンカー) とのコンジュゲートは、図9に示した。

【0047】

マスマスペクトル解析：

サンプルは、限外ろ過チューブで前処理して、2回蒸留水 (DDW) に溶解した。得られたサンプルは、マスマスペクトル解析をした。マスマスペクトルシステムとしては、高性能タンデム質量分析Triple TOF 4600 LC/MS/MSシステム (SCIEX China)、エレクトロスプレーイオン化源を用いて、ポジティブイオンモードで解析した。マスマスペクトルパラメータ：GS1：55；GS2：55；CUR：35；スキャンレンジ：100-2000 Da；ネブライジング電圧 (ISVF)：5500 V；ネブライジング温度：350；デクラスタリング電圧 (DP)：150 V；衝突エネルギー (CE)：10 eV。結果は図10-13に示した。図10と図11から、DCとコンジュゲートした後、変異体166Cは、メインピークが右に6478.8 Da (両分子のDCの分子量に相当) 分シフトしたことがわかる。これは、166Cの両方のスルフヒドリル基はDCにコンジュゲートしたことを証明した。

40

図12~13から、DCとコンジュゲート反応した後、変異体124Cは、それぞれ、0分子のDCとのコンジュゲート、1分子のDCとのコンジュゲート、2分子のDCとのコンジュゲートのピークが生じ、コンジュゲートの均一性と効率性の両方が166Cより低いことがわかる。

50

## 【0048】

## 実施例5．抗VEGF抗体と抗原とのアフィニティーアッセイ

バイオフィルム干渉技術（BLI）、Pro A probe（ForteBio）を用いて、野生型抗体、抗体変異体、抗体ポリペプチドコンジュゲートの、VEGFとのアフィニティーを測定した。抗体サンプルはPBSに溶解して、作業濃度10 µg/mLとした。VEGF-165（Sino Biological Inc.）はPBSに溶解して、それぞれ50nM、75 nM、100 nM、150 nM、200 nM濃度にグラジエント希釈した。作業容量はすべて200 µLとした。

バイオフィルム干渉技術（BLI）、Pro A probeを用いて、野生型抗体、抗体変異体、抗体ポリペプチドコンジュゲートの、Ang2とのアフィニティーを測定した。抗体サンプルはPBSに溶解して、作業濃度20 µg/mLとした。Ang2（Sino Biological Inc.）はPBS（0.02% tween-20,0.1% BSA）に溶解して、それぞれ25nM、50 nM、75 nM、100 nM、200nM濃度にグラジエント希釈した。作業容量はすべて200 µLとした。

OCTETシステムとデータ処理ソフトウェアでデータ図をフィッティングし、ソフトにて抗体などとVEGF又はAng2との分子間力を算出し、KD値で表し、その結果を表5に示した。

## 【0049】

## 【表9】

表5. 野生型抗体、変異体およびコンジュゲートは、VEGF-165との結合力がほとんど差がなかった。コンジュゲートとAng2との結合力も、抗体の中和作用結合力の合理的な範囲内でした。

表5 サンプルの活性テスト

サンプル	抗体の抗原とのK <sub>D</sub> (10 <sup>-9</sup> )	
	VEGF-165	Ang2
WT	1.65	N. A.
166	1.51	N. A.
124	0.99	N. A.
166ADC	1.96	2.20
124ADC	0.87	4.64

## 【0050】

## 実施例7．抗VEGF抗体による細胞増殖活性のアッセイ

抗体によるVEGF165中和作用は、HUVEC細胞（ScienCell Research Laboratories, Inc.）で検出した。96ウェルプレートに、4000細胞/50 µL/ウェルの接種密度で細胞を接種した。ブランクコントロールウェルを設定した。コントロールウェルは6つ以上であった。グラジエント希釈方法により、グラジエント濃度の抗体サンプル（0.001 µg/mL、0.01 µg/mL、0.05 µg/mL、0.1 µg/mL、0.5 µg/mL、1 µg/mL、5 µg/mL、10 µg/mL）を調製した。VEGF165を、試験培地で110 ng/mLの濃度になるように希釈した。調製したVEGF165試薬は、VEGF165の終濃度が10 ng/mLになるように、グラジエント濃度のサンプルと混合した。96ウェルプレートをCO2インキュベーターに入れて、48 hキュベーションした後、CCK-8カウントした。サンプル及びそのコントロールのOD値から、増殖率を算出した。結果は図14に示し、野生型抗体（WT）、変異体（

124Cと166C) およびコンジュゲート(124ADCと166ADC)は、内皮細胞であるHUVECの増殖(VEGF刺激による増殖)に対する抑制効果を示した。上記図から、抗体変異体は、選択された部位のシステイン変異により活性が変化しなかったことが分かり、選択された部位が抗体の生物的活性に影響を与えていないことが証明した。同様に、DCにコンジュゲートすることで生じたコンジュゲートも、抗体の細胞増殖に対する抑制活性に影響を与えなかった。

【0051】

実施例8．抗CD20抗体活性のアッセイ

バイオフィルム干渉技術(BLI)、Pro A probe (ForteBio)を用いて、野生型抗体、抗体変異体の、CD20とのアフィニティーを測定した。抗体サンプルはPBSに溶解して、作業濃度10 µg/mLとした。CD20(Sino Biological Inc.)はPBSに溶解して、それぞれ25nM、50 nM、100 nM、150 nM、200 nM濃度にグラジエント希釈した。作業容量はすべて200 µLとした。

10

OCTETシステムとデータ処理ソフトウェアでデータ図をフィッティングし、ソフトにて抗体などとCD20との分子間力を算出し、 $K_D$ 値で表し、その結果を表6に示した。

【表10】

表6. 野生型抗体・抗体変異体とCD20とのアフィニティー

サンプル	抗体と抗原との $K_D$ ( $10^{-9}$ )
WT	5.35
166C	4.86
124C	8.97

20

【0052】

実施例9．抗HER2抗体活性のアッセイ

バイオフィルム干渉技術(BLI)、Pro A probe (ForteBio)を用いて、野生型抗体、抗体変異体、抗体ポリペプチドコンジュゲートの、HER-FCとのアフィニティーを測定した。HER-FC(Sino Biological Inc.)はPBS溶解して、作業濃度10 µg/mLとした。抗体はPBS2に溶解して、それぞれ25nM、50 nM、75 nM、150 nM、300nM濃度にグラジエント希釈した。作業容量はすべて200 µLとした。

30

OCTETシステムとデータ処理ソフトウェアでデータ図をフィッティングし、ソフトにて抗体などとHER2との分子間力を算出し、 $K_D$ 値で表し、その結果を表7に示した。

【0053】

【表11】

表7. 野生型抗体、抗体変異体のHER2とのアフィニティー

サンプル	抗体の抗原との $K_D$ ( $10^{-9}$ )
WT	3.58
166C	6.87
124C	5.46

40

【0054】

REFERENCES

1. Doppalapudi VR, Huang J, Liu D, Jin P, Liu B, Li L, Chemical generation of bispecific antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A. (2010) 107:22611-22616.
2. Allen, T. M., Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy, Nat. Rev. Cancer, (2002) 2:750-763.
3. Hamblett, K. J., Effects of Drug Loading on the Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Drug Conjugate, Clin. Cancer Res.,(2004) 10:7063-7070.
4. Junutula J R, Bhakta S, Raab H, et al. Rapid identification of reactive cyst

50

eine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs. J Immunol Methods, (2008) 332: 41-52.

5. Junutula J R, Flagella K M, Graham R A, et al. Engineered thiotrastuzumab-DM1 conjugate with an improved therapeutic index to target human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. Clin Cancer Res, (2010) 16: 4769-4778.

6. Junutula J R, Raab H, Clark S, et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. Nat Biotechnol, (2008) 26: 925-932.

7. Kung Sutherland M S, Walter R B, Jeffrey S C, et al. SGN-CD33A: a novel CD33-targeting antibody-drug conjugate using a pyrrolobenzodiazepine dimer is active in models of drug-resistant AML. Blood, (2013) 122: 1455-1463.

10

【 0 0 5 5 】

配列

配列番号:1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGVWINTYTGEPTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

【 0 0 5 6 】

配列番号:2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 0 5 7 】

配列番号:3

gaagtgcagctggtggaatcaggaggaggactggtgcagccaggaggatctctgagactgtcttgctgcttccgatacactttaccaactacggaatgaattgggtgagacaggctccaggaaaaggactggagtggtggtggttgattaacacctataccggagagcctacatacctgcccattcaagagaaggttcacctcagcctggataccttaagtctaccgcttacctgcagatgaactctctgagagcagaggataaccgccgtgtattattgcgctaa gtacctcactactacggctcctcccattggtactttgacgtctggggacagggaactggtgacagtgtcttccgcttctacaaaaggaccttccgtgttccctctggctccttcttctaagtctacctcaggaggaacagcagctctgggtgtctggtgaaggattacttcccagagccagtgacagtgcttggaaactccggagctctgacatccggagtgacatacttccagcagtgctccagcttccggactgtattctctgtcttccgtggtgacagtgcttcttcttctctggaacacagacctacatctgcaacgtgaaccacaagcctccaacaccaagggtggataagaagggtggagcctaagtcttgcgacaagaccatacttgcctccttgtccagctccagaactgctgggaggaccatcagtggttctgtttcctcctaagcctaaggacacctgatgatctccagaacaccagaagtgacttgcgtggtggtggatgtgtctcacgaagatccagaggtgaagttcaattggtacgtggacggagtggaagtgcacaacgctaaaacc aagcctagagaggagcagtagaactccacctatagagtggtgtccgtgctgacagtgctgcatcaggattgctgaacggaaaggagtacaagtgaaggtgtccaacaaagctctgccagctcctatcgagaagacaatctcaaggctaagggacagcctagagaacctcaggtgtatacactgcctccttctagagaggagatgaccaagaatc aggtgtctctgacttgcctggtgaagggctttacccttctgacatcgagtcgagtgggaaatctaaccggacagccagagaacaactacaagaccacacctcagtgctggattccgacggatcttcttctgtactccaagctgac cgtggaataagtctcgttggcagcagggtaacgtgtttcttctgtagcgtgatgcacgaagctctgcataatcact acaccagaagctctgtctctgtctcctggaaagtga

30

40

50



VLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAP  
ELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  
LPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL  
TVDKSR WQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 0 6 4 】

配列番号:10

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFFQQKPGSSPKPWYIATSNLASGVPVRF  
SGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK  
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

【 0 0 6 5 】

配列番号:11

caagtgcaactgcagcagcccggcgccgaactggggaagcccggcgctagcgtcaagatgagctgtaaggct  
tccggctacactttcactagctacaacatgcactgggtcaagcagacacccggaaggggactggaatggatcg  
gcgctatctaccccggcaacggagacacaagctacaacaaaagtcaagggcaaggccactctcactgctg  
ataagagcagctccactgcctacatgcaactgagctctctgactagcgaagattccgccgtgtactactgcgcc  
agaagcacatactacggcgcgactgggtattcaacgtctggggcgccggcacaacagtgacagtgagcgct  
gccagcactaagggaccatccgtgtttcctctcgccccaaagctccaagagcacttccggaggcactgccgctc  
tgggctgtctggtaaggactacttcccagagccagtgacagtcagctggaatagcggagctctgacaagcg  
gctccatacattcccagccgtgctgcagtccagcggactgtactctctgagctccgtcgtgactgtgccaagc  
agctctctgggcacacagacatacatctgcaatgtcaaccacaagcctagcaacacaaaaggtggacaagaag  
gccgaaccaaagagctgcaacaagacacacacatgccctccttgtccagccccagagctgctcggaggacca  
agcgtcttctcttcccacctaagcctaaggacacactgatgatctctaggactccagaggtgacatgcgctgt  
cgtcgtatgtgtcccacgaggatccagaggtgaagttcaactgggtacgtggacggcgctgaagtgacaatgc  
caagactaagccaagggaggagcagtagaactccacttacagagtcgtgtccgtcctcacagtgtccacca  
gattggctgaatggcaaggagtataagtgtaaggtctccaataaagctctgccagctcctatcgagaagactat  
cagcaaagctaagggccagccaagagagccacaagtgtacactctgcctccatctagggatgagctgactaa  
gaaccaagtgtctctgacttgcctcgtgaagggcttctatcctagcgacatcgccgtcgagtgaggagccaacg  
gccaaccagaaaacaactacaagactactcctccagtgtctgcacagcgatggctccttcttctgactccaag  
ctgacagtggaagaagtcagatggcagcaaggcaacgtcttcagctgtagcgtgatgcatgaggctctgcaca  
accactacactcagaagtctctgtctctgagccccggcaag

20

30

【 0 0 6 6 】

配列番号:12

Cagatcgtcctcagccagagcccagccattctgagcgcagccccggcgagaaggtgactatgacatgcaga  
gcctccagctccgtgagctacatccactgggtccagcagaagcccggctcctcccctaagccttggatctacgc  
tacaagcaatctggcctccggagtcccagtgaggtcagcggcagcggatccggcacttccactctctgaca  
atttctaggggtggaggctgaggacgctgccacatactactgccagcagtgactagcaaccctcctacattcg  
gaggagggcacaagctggagatcaagaggactgtggccgctcctagcgtgttcattctcctccttccgatga  
gcagctgaagagcggcactgccagcgtggctgtctgctgaacaacttctaccctagggaggccaaggtgca  
atggaaggtggacaatgctctgcagtcggcaattccaagagtcctgcacagagcaagattccaaggacag  
cacatactccctctccagcacactgacactgagcaaggctgactacgagaagcacaaggtgtacgcttgtgag  
gtgactcatcaaggactgagcagcccagtgactaagagcttcaatagggggcgagtg

40

【 0 0 6 7 】

配列番号:13

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFFQQKPGSSPKPWYIATSNLASGVPVRF  
FSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS D  
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTECDSDKDSTYSLSSTLTLSK  
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 0 6 8 】

50

配列番号:14

Cagatcgtcctcagccagagcccagccattctgagcgccagccccggcgagaagggtgactatgacatgcaga  
gcctccagctccgtgagctacatccactggttccagcagaagccccggctcctcccctaagccttggatctacgc  
tacaagcaatctggcctccggagtcccagtgaggttcagcggcagcggatccggcacttcctactctctgaca  
atcttagggtggaggctgaggacgctgccacatactactgccagcagtgaggactagcaaccctcctacattcg  
gcgaggcacaagctggagatcaagaggactgtggccgctcctagcgtgttcatcttccctccttccgatga  
gcagctgaagagcggcactgccagcgtggtctgtctgctgaacaacttctaccctagggaggccaagggtgca  
atggaagggtggacaatgctctgcagctccggcaattcccaagagtccgtcacagagtggtgattccaaggacagc  
acatactccctctccagcacactgacactgagcaaggctgactacgagaagcacaagggtgacgcttgtgagg  
tgactcatcaaggactgagcagcccagtgactaagagcttcaataggggagtggt

10

【 0 0 6 9 】

配列番号:15

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFFQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRF  
SGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
CLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK  
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 0 7 0 】

配列番号:16

Cagatcgtcctcagccagagcccagccattctgagcgccagccccggcgagaagggtgactatgacatgcaga  
gcctccagctccgtgagctacatccactggttccagcagaagccccggctcctcccctaagccttggatctacgc  
tacaagcaatctggcctccggagtcccagtgaggttcagcggcagcggatccggcacttcctactctctgaca  
atcttagggtggaggctgaggacgctgccacatactactgccagcagtgaggactagcaaccctcctacattcg  
gcgaggcacaagctggagatcaagaggactgtggccgctcctagcgtgttcatcttccctccttccgatga  
gtgtctgaagagcggcactgccagcgtggtctgtctgctgaacaacttctaccctagggaggccaagggtgcaa  
tgggaagggtggacaatgctctgcagctccggcaattcccaagagtccgtcacagagcaagattccaaggacagc  
acatactccctctccagcacactgacactgagcaaggctgactacgagaagcacaagggtgacgcttgtgagg  
tgactcatcaaggactgagcagcccagtgactaagagcttcaataggggagtggt

20

【 0 0 7 1 】

配列番号:17

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY  
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTV  
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLG  
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

【 0 0 7 2 】

配列番号:18

gaagtgcaactggtggagtccggaggcggactggtccaaccggcggtctctgagactgagctgtgctgcc  
agcggctcaacatcaaggacacttacatccattgggtgaggcaagccccggcaaaggactggaatgggtg  
gctaggatctaccctaactaacggctacactaggatgccgacagcgtcaaggggaaggttactatctccgccg  
acacaagcaagaacactgcctatctgcagatgaactctctgagggctgaggacacagctgtgtattactgctct  
agggtggggcggagatggcttctacgctatggactactggggacaaggcacactcgtgacagtgagcagcgt  
agcactaaaggcccttccgtgttcccactcggccctagctccaaaagcactagcggcgggaacagctgctctgg  
gctgtctcgtgaaggactattcccagagccagtgactgtgagctggaatagcggcgtctgacaagcggagt  
gcacactttccagccgtgctgcagagcagcggactgtattctctgtccagcgtcgtcactgtgcctagctcctc  
tctgggcacacagacttacatctgtaacgtgaatcataagccaagcaacactaaggctcacaagaaggctcgag  
ccaaagagctgtgacaagacacacacatgccaccatgtccagccccagagctcctcggaggacctagcgtg  
ttcctcttcccctaagccaaaggacactctcatgatctctaggacaccagaggtcacttgcgtggtggtcgat

40

50

gtcagccacgaggaccagaggtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca  
 aagcctagggaggagcagtacaacagcacttacagagtggtctccgctcctcacagtgtgcaccaagattggc  
 tcaacggcaaggagtacaagtgaaggtgtccaacaaggccctcccagcccctatcgagaagactatctcca  
 agccaagggccagccaagagaacctcaagtgtacacactgcctccatctagggaggagatgacaaagaac  
 caagtgtctctgacatgtctggtgaaaggcttctacccaagcgacatcgccgtggagtgggaaagcaacggcc  
 agccagagaacaactacaagactacacctccagtgtggactccgacggcagcttcttctctactccaagctc  
 actgtggataagtctaggtggcagcaaggcaatgtgttcagctgttccgtgatgcacgaggctctgcacaacc  
 actacactcagaagtctctgagcctctccccggcaaa

【 0 0 7 3 】

配列番号:19

10

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS  
 RFGSRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD  
 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT L  
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 0 7 4 】

配列番号:20

20

Gacatccagatgacacagtcccccttctctctgagcgttagcgtcggcgatagggtgacaatcactttaggg  
 ccagccaagatgtcaacacagccgtggcttggtagcagagaagcccggcaaggcccctaagctgctcatct  
 atagcgcagcttctgtacagcggcgtccctagcagatttccggaagcagatccggcactgacttcacactg  
 actatcagcagcctccagccagaggatttcgccacatactactgccagcagcactacactactccacctacttt  
 cggccaaggcactaagggtggagattaagaggactgtcgtgccccaaagcgttctcatcttcccacctagcgt  
 gaacagctcaagagcggcacagctagcgtcgtgtgtctgctgaacaacttctaccctagggaggccaaggtcc  
 agtggaaagtggataacgctctgcagagcggcaattccaagagagcgtcacagagcaagatagcaaagac  
 agcacttactctctgagcagcactgactctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtctatgcttgtga  
 ggtcactcaccaaggactgtccagcccagtcactaagagcttcaataggggagagtg

【 0 0 7 5 】

配列番号:21

30

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS  
 RFGSRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD  
 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTECDISKDYSLSTLT L  
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 0 7 6 】

配列番号:22

40

Gacatccagatgacacagtcccccttctctctgagcgttagcgtcggcgatagggtgacaatcactttaggg  
 ccagccaagatgtcaacacagccgtggcttggtagcagagaagcccggcaaggcccctaagctgctcatct  
 atagcgcagcttctgtacagcggcgtccctagcagatttccggaagcagatccggcactgacttcacactg  
 actatcagcagcctccagccagaggatttcgccacatactactgccagcagcactacactactccacctacttt  
 cggccaaggcactaagggtggagattaagaggactgtcgtgccccaaagcgttctcatcttcccacctagcgt  
 gaacagctcaagagcggcacagctagcgtcgtgtgtctgctgaacaacttctaccctagggaggccaaggtcc  
 agtggaaagtggataacgctctgcagagcggcaattccaagagagcgtcacagagtgcgatagcaaagac  
 agcacttactctctgagcagcactgactctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtctatgcttgtga  
 ggtcactcaccaaggactgtccagcccagtcactaagagcttcaataggggagagtg

【 0 0 7 7 】

配列番号:23

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS  
 RFGSRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD  
 ECLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT L  
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 0 7 8 】

配列番号:24

50



配列番号:30

gatatccagatgacacagtccccttctctctgagcgctagcgtggcgatagggtgacaattactttagcgc  
cagccaagatatcagcaactatctgaactggtaccagcagaagcccggcaaggcccaaggctcctcatctac  
ttcactagcagcctccacagcggcgtcccattccagatttagcggcagcggcagcggaaactgacttcacactga  
caatcagctctctgcagccagaggatttcgccacttactactgccagcagtactccacagtcccttggacatttg  
gccaaggcactaagggtggagatcaagagaacagtgggccgcccctagcgtcttcatcttcccaccttccgatga  
gcagctgaagagcggaacagcttccgtggctgtctgctgaacaacttctacccaagagaggccaagggtcca  
gtggaaagtggaacaacgctctgcagagcggcaattcccaagagtccgtcacagagtgcgattccaaggacag  
cacatactctctgagcagcactgactctgagcaaggccgactacgagaagcacaaggtctacgcttgtgag  
gtcactcaccaaggactgagcagcccagtgactaagtccctcaataggggcgagtgctga

10

【 0 0 8 4 】

配列番号:31

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSR  
FSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD  
ECLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS  
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 0 8 5 】

配列番号:32

gatatccagatgaccagctccttctctctgtcagcttcagtgaggatagagtgacaatcacctgttccgct  
tctcaggatatctccaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggctcctaagggtgctgatctactt  
cacctcttctctgcattccggagtgcttcttagatttagcggctccggctccggcacagattcacactgacat  
ctcttctctgcagccagaagatttcgccacctactattgccagcagtactctaccgtgccttggacatttggaca  
gggaaccaagggtggagatcaagagaacagtgggctgctccttccgtgtttatcttctccttctgacgaatgtct  
gaaatccggaacagcttcagtcgtctgcctgctgaacaacttctaccctagagaggccaaagtccagtgga  
gtggataacgctctgcagtcggaaattctcaggaatccgtgaccgagcaggattctaaggattctacctactc  
cctgtcttctaccctgacactgtctaaggccgattacgagaagcacaaggtgtacgcttgcgaagtgacacatc  
agggactgtcttctccagtgaccaagtccttcaacagaggcgagtg

20

配列番号:33

Gln-Lys(Ac)-Tyr-Gln-Pro-Leu-Asp-Glu-Lys(Ac)-Asp-Lys-Thr-Leu-Tyr-Asp-Gln-Ph  
e-Met-Leu-Gln-Gln-Gly-CONH<sub>2</sub>

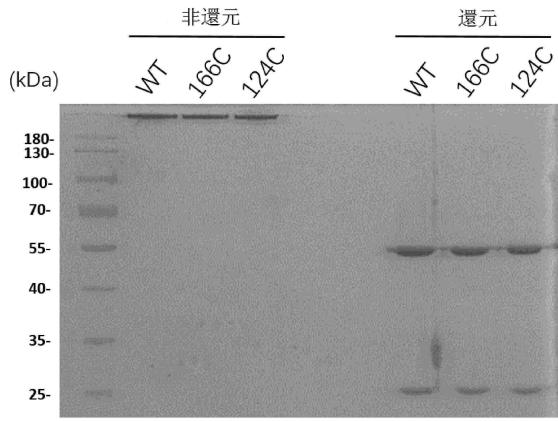
30

40

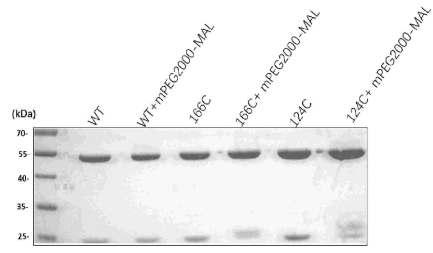
50

【 図面 】

【 図 1 】

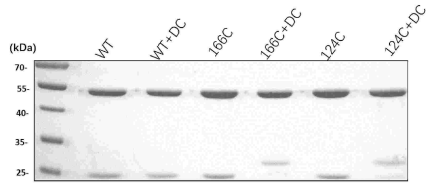


【 図 2 】

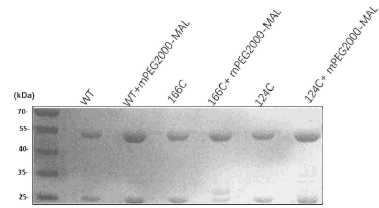


10

【 図 3 】

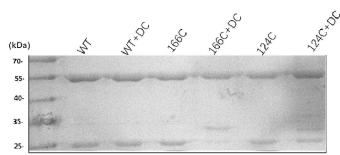


【 図 4 】

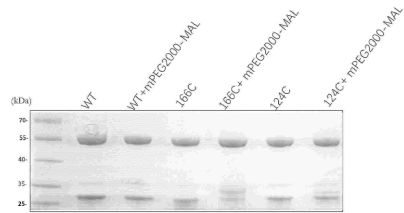


20

【 図 5 】



【 図 6 】

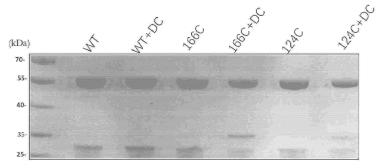


30

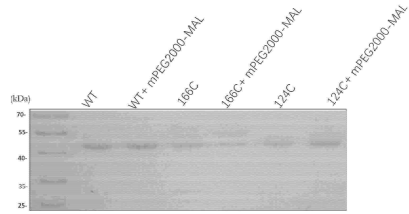
40

50

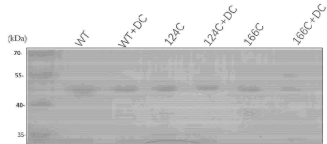
【 図 7 】



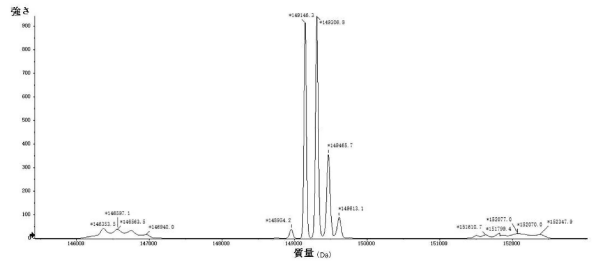
【 図 8 】



【 図 9 】

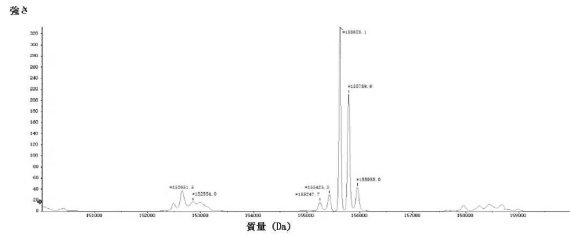


【 図 10 】

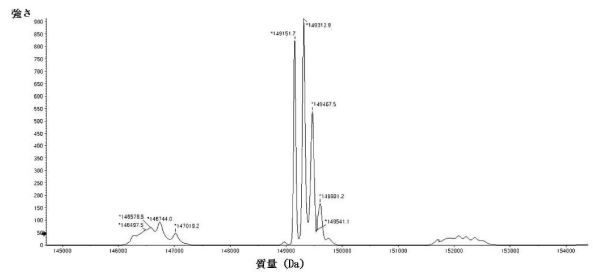


10

【 図 11 】



【 図 12 】



20

30

40

50



## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 6 1 P	35/00 (2006.01)	F I	A 6 1 K	31/282	
A 6 1 P	35/04 (2006.01)		A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)		A 6 1 P	35/04	
A 6 1 K	33/243 (2019.01)		A 6 1 P	43/00	1 2 1
C 1 2 P	21/08 (2006.01)		A 6 1 K	33/243	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)		C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)		C 1 2 N	15/13	
			C 1 2 N	15/62	Z

市沈河区文化路103号

## (72)発明者

汪琳

中華人民共和国 遼 寧 省沈 陽 市沈河区文化路103号

## (72)発明者

宋春雨

中華人民共和国北京市北京 經 濟 技 術 開 発 区科 創 十四街11号院4号楼3層

## (72)発明者

李明 瑩

中華人民共和国 遼 寧 省本 溪 市 溪 湖区石 橋 子街道 創 新 園 工-1

## (72)発明者

薛世平

中華人民共和国山西省大同市第五人民医院

## (72)発明者

劉 永祥

中華人民共和国 遼 寧 省沈 陽 市沈河区文化路103号

## (72)発明者

徐 偉 偉

中華人民共和国北京市北京 經 濟 技 術 開 発 区科 創 十四街11号院4号楼3層

## (72)発明者

朱立峰

中華人民共和国河北省石家庄黄河大道226号

審査官 菅原 洋平

## (56)参考文献

特表2017-531620(JP,A)

特開2017-128590(JP,A)

特表2013-519375(JP,A)

特表2013-523896(JP,A)

特開2017-122084(JP,A)

特表2013-534535(JP,A)

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

C 0 7 K

A 6 1 K

A 6 1 P

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q