

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/095455

発行日 平成24年8月23日 (2012.8.23)

(43) 国際公開日 平成22年8月26日 (2010.8.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 14/195 (2006.01)	C07K 14/195	4C076
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4C084
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 16/00	4C085
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	4H045
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 26 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2011-500525 (P2011-500525)	(71) 出願人	504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/001100	(71) 出願人	503196776 株式会社ベルセウスプロテオミクス 東京都目黒区駒場四丁目7番6号 パークビル
(22) 国際出願日	平成22年2月19日 (2010.2.19)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(31) 優先権主張番号	特願2009-37750 (P2009-37750)	(72) 発明者	児玉 龍彦 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
(32) 優先日	平成21年2月20日 (2009.2.20)	(72) 発明者	浜窪 隆雄 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低免疫原性ストレプトアビジンおよびその利用

(57) 【要約】

本発明の課題は、ストレプトアビジンがもつ哺乳動物に対する免疫原性（抗原性）を低減させたストレプトアビジン変異体を提供することである。本発明によれば、配列番号2に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において、(a) 72番目のアミノ酸残基のアルギニンが他のアミノ酸に置換しており、かつ(b) 10番目のアミノ酸残基のチロシン、71番目のアミノ酸残基のチロシン、89番目のアミノ酸残基のグルタミン酸、91番目のアミノ酸残基のアルギニン、及び104番目のアミノ酸残基のグルタミン酸の何れか一つ以上が他のアミノ酸に置換しているアミノ酸配列を含み、野生型ストレプトアビジンと比較して免疫原性が低下している、ストレプトアビジン変異体が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において、(a) 72 番目のアミノ酸残基のアルギニンが他のアミノ酸に置換しており、かつ (b) 10 番目のアミノ酸残基のチロシン、71 番目のアミノ酸残基のチロシン、89 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸、91 番目のアミノ酸残基のアルギニン、及び 104 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸の何れか一つ以上が他のアミノ酸に置換しているアミノ酸配列を含み、野生型ストレプトアビジンと比較して免疫原性が低下している、ストレプトアビジン変異体。

【請求項 2】

配列番号 2 に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において、(a) 71 番目のアミノ酸残基のチロシン及び 72 番目のアミノ酸残基のアルギニンが他のアミノ酸に置換しており、かつ (b) 10 番目のアミノ酸残基のチロシン、89 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸、91 番目のアミノ酸残基のアルギニン、104 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸の何れか一つ以上が他のアミノ酸に置換しているアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のストレプトアビジン変異体。

10

【請求項 3】

配列番号 2 に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において以下の何れか 1 以上の変異を有する、請求項 1 又は 2 に記載のストレプトアビジン変異体

- (1) 10 番目のアミノ酸残基のチロシンがセリン又はトレオニンに置換している変異；
- (2) 71 番目のアミノ酸残基のチロシンがアラニン又はセリンに置換している変異；
- (3) 72 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異；
- (4) 89 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換している変異；
- (5) 91 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異；
- (6) 104 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がグルタミン又はアスパラギンに置換している変異；

20

【請求項 4】

配列番号 2 に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において以下の何れか 1 以上の変異を有するアミノ酸配列を含み、野生型ストレプトアビジンと比較して免疫原性が低下している、ストレプトアビジン変異体。

- (1) 10 番目のアミノ酸残基のチロシンがセリン又はトレオニンに置換している変異；
- (2) 71 番目のアミノ酸残基のチロシンがアラニン又はセリンに置換している変異；
- (3) 72 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異；
- (4) 89 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換している変異；
- (5) 91 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異；
- (6) 104 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がグルタミン又はアスパラギンに置換している変異；

30

【請求項 5】

配列番号 2 に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において以下の変異を有するアミノ酸配列を含み、野生型ストレプトアビジンと比較して免疫原性が低下している、ストレプトアビジン変異体。

- (2) 71 番目のアミノ酸残基のチロシンがアラニン又はセリンに置換している変異；
- (3) 72 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異；
- (4) 89 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換している変異；
- (6) 104 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がグルタミン又はアスパラギンに置換している変異；

40

【請求項 6】

さらに以下の変異を有する、請求項 5 に記載のストレプトアビジン変異体。

- (1) 10 番目のアミノ酸残基のチロシンがセリン又はトレオニンに置換している変異；
- (5) 91 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異；

【請求項 7】

50

配列番号 2 に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において以下の変異の全てを有する、ストレプトアビジン変異体

- (1) 10 番目のアミノ酸残基のチロシンがセリンに置換している変異；
- (2) 71 番目のアミノ酸残基のチロシンがセリンに置換している変異；
- (3) 72 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異；
- (4) 89 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換している変異；
- (5) 91 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異；及び
- (6) 104 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がグルタミン又はアスパラギンに置換している変異；

【請求項 8】

請求項 1 から 7 の何れかに記載のストレプトアビジン変異体をコードする DNA。

【請求項 9】

請求項 1 から 7 の何れかに記載のストレプトアビジン変異体に抗体を結合させることにより得られる、ストレプトアビジン変異体 抗体結合物。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のストレプトアビジン変異体 抗体結合物を含む、治療剤又は診断剤。

【請求項 11】

(a) 請求項 9 に記載のストレプトアビジン変異体 抗体結合物；及び (b) ストレプトアビジンに親和性を有するビオチン又はその誘導体で標識した診断用又は治療用物質；を含む治療又は診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫原性を低下させたストレプトアビジン変異体およびその利用に関する。より詳細には、本発明は、アミノ酸に変異を導入することにより免疫原性を低下させたストレプトアビジン変異体およびその利用に関する。

【背景技術】

【0002】

アビジンとビオチン、あるいはストレプトアビジンとビオチンの間の親和性は非常に高く ($K_d=10^{-15}$ から $10^{-14}M$)、生体二分子間の相互作用としては、最も強い相互作用の一つである。現在、アビジン/ストレプトアビジン - ビオチン相互作用は、生化学、分子生物学、あるいは医学の分野で広く応用されている (Green, (1975), Adv. Protein Chem., 29: 85-133; Green, (1990), Methods Enzymol., 184: 51-67)。アビジンは卵白由来の塩基性糖タンパクで、等電点は 10 を超える。一方、ストレプトアビジンは放線菌 (*Streptomyces avidinii*) 由来で、等電点は中性付近で糖鎖は含まない。両タンパク質とも、4 量体を形成し、1つのサブユニット当たり1分子のビオチンと結合する。分子量は60kDa程度である。

【0003】

近年このアビジン/ストレプトアビジンとビオチンの高い結合能と抗体分子とを組合わせたドラッグデリバリーの方法、プレターゲット法が考案されている (Hnatowich, (1987), J. Nucl. Med., 28, 1294-1302)。しかしながら、ニワトリ由来のアビジンや微生物由来のストレプトアビジンは人体に対し高い免疫原性を示すため、人体に投与後、早期に抗アビジン/ストレプトアビジン抗体が産生されることが問題となりプレターゲット法の実用化を妨げている原因の一つとなっている (Paganelli, (1991), Cancer Res., 51, 5960-5966)。

【0004】

上記の問題を解決する為、過去にストレプトアビジンの低免疫原性化について述べた論文が発表されているが (Subramanian, (1998), Bioch. and Mol. biol. Int., 43, 357-82)、ストレプトアビジンの人体に対する免疫原性の問題は未だ解決に至っていない。

【先行技術文献】

10

20

30

40

50

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許第5,672,691号

【特許文献2】米国特許第6,022,951号

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Green, (1975), Adv. Protein Chem., 29: 85-133;

【非特許文献2】Green, (1990), Methods Enzymol., 184: 51-67

【非特許文献3】Hnатовich, (1987), J. Nucl. Med., 28, 1294-1302

【非特許文献4】Paganelli, (1991), Cancer Res., 51, 5960-5966)。

10

【非特許文献5】Mapping the common antigenic determinants in avidin and streptavidin. Subramanian, N et al. Biochemistry and Molecular biology International.1997, 43, 357-82

【非特許文献6】Reduced antibody response to streptavidin through site-directed mutagenesis Meyer, DL et al. Protein Science. 2001, 10, 491-503

【非特許文献7】Biotin Reagents for Antibody Pretargeting. 4. Wilbur DS et al. Bioconjugate Chemistry. 2000, 11(4), 569-583

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

20

本発明は、微生物に属する *Streptomyces avidinii* 由来蛋白質であるストレプトアビジンがもつ哺乳動物に対する免疫原性（抗原性）を低減させ、動物体内での抗ストレプトアビジン抗体産生を抑制し、かつビオチンに対する結合能は維持した、医薬およびその他の工業での種々の目的に使用することを可能にするストレプトアビジン変異体（低免疫原性ストレプトアビジン）を提供することを解決すべき課題とした。更に本発明は、上記ストレプトアビジン変異体を用いた診断薬・治療薬、上記ストレプトアビジン変異体を用いた診断キット・治療キットを提供することを解決すべき課題とした。

【課題を解決するための手段】

【0008】

30

本発明者は上記課題を解決するために鋭意検討し、ストレプトアビジンの立体構造およびペプチド出現頻度解析からヒト体内において抗原部位となるアミノ酸を選び、低免疫原性化となる低免疫原性化候補アミノ酸を選び出した。次に、野生型ストレプトアビジンを鋳型とした遺伝子配列に点変異を入れ低免疫原性化候補アミノ酸への変換を行い蛋白質発現を実施し蛋白精製を実施した。さらに、これらの変異体ストレプトアビジンに対し、野生型ストレプトアビジンをカニクイサルに免疫を行い、調製を実施した抗ストレプトアビジン抗血清を用い反応性を解析したところ、抗血清の反応性が野生型ストレプトアビジンに比べ約40%以上の低下を認める変異体ストレプトアビジンを同定し、本発明を完成するに至った。

【0009】

40

即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) 配列番号2に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において、(a)72番目のアミノ酸残基のアルギニンが他のアミノ酸に置換しており、かつ(b)10番目のアミノ酸残基のチロシン、71番目のアミノ酸残基のチロシン、89番目のアミノ酸残基のグルタミン酸、91番目のアミノ酸残基のアルギニン、及び104番目のアミノ酸残基のグルタミン酸の何れか一つ以上が他のアミノ酸に置換しているアミノ酸配列を含み、野生型ストレプトアビジンと比較して免疫原性が低下している、ストレプトアビジン変異体。

【0010】

(2) 配列番号2に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において、(a)71番目のアミノ酸残基のチロシン及び72番目のアミノ酸残基のアルギニンが他のアミノ

50

酸に置換しており、かつ (b) 10 番目のアミノ酸残基のチロシン、89 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸、91 番目のアミノ酸残基のアルギニン、104 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸の何れか一つが他のアミノ酸に置換しているアミノ酸配列を含む、(1) に記載のストレプトアビジン変異体。

【 0 0 1 1 】

(3) 配列番号 2 に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において以下の何れか 1 以上の変異を有する、(1) 又は (2) に記載のストレプトアビジン変異体

- (1) 10 番目のアミノ酸残基のチロシンがセリン又はトレオニンに置換している変異：
- (2) 71 番目のアミノ酸残基のチロシンがアラニン又はセリンに置換している変異：
- (3) 72 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：
- (4) 89 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換している変異：
- (5) 91 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：
- (6) 104 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がグルタミン又はアスパラギンに置換している変異：

10

【 0 0 1 2 】

(4) 配列番号 2 に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において以下の何れか 1 以上の変異を有するアミノ酸配列を含み、野生型ストレプトアビジンと比較して免疫原性が低下している、ストレプトアビジン変異体。

- (1) 10 番目のアミノ酸残基のチロシンがセリン又はトレオニンに置換している変異：
- (2) 71 番目のアミノ酸残基のチロシンがアラニン又はセリンに置換している変異：
- (3) 72 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：
- (4) 89 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換している変異：
- (5) 91 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：
- (6) 104 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がグルタミン又はアスパラギンに置換している変異：

20

【 0 0 1 3 】

(5) 配列番号 2 に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において以下の変異を有するアミノ酸配列を含み、野生型ストレプトアビジンと比較して免疫原性が低下している、ストレプトアビジン変異体。

- (2) 71 番目のアミノ酸残基のチロシンがアラニン又はセリンに置換している変異：
- (3) 72 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：
- (4) 89 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換している変異：
- (6) 104 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がグルタミン又はアスパラギンに置換している変異：

30

【 0 0 1 4 】

(6) さらに以下の変異を有する、(5) に記載のストレプトアビジン変異体。

- (1) 10 番目のアミノ酸残基のチロシンがセリン又はトレオニンに置換している変異：
- (5) 91 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：

(7) 配列番号 2 に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において以下の変異の全てを有する、ストレプトアビジン変異体

- (1) 10 番目のアミノ酸残基のチロシンがセリンに置換している変異：
- (2) 71 番目のアミノ酸残基のチロシンがセリンに置換している変異：
- (3) 72 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：
- (4) 89 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換している変異：
- (5) 91 番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：及び
- (6) 104 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がグルタミン又はアスパラギンに置換している変異：

40

【 0 0 1 5 】

(8) (1) から (7) の何れかに記載のストレプトアビジン変異体をコードする DNA。

50

(9) (1) から (7) の何れかに記載のストレプトアビジン変異体に抗体を結合させることにより得られる、抗体で標識したストレプトアビジン変異体。

(1 0) (9) に記載の抗体で標識したストレプトアビジン変異体を含む、治療剤又は診断剤。

(1 1) (a) (9) に記載の抗体で標識したストレプトアビジン変異体；及び (b) ストレプトアビジンに親和性を有するビオチン又はその誘導体で標識した診断用又は治療用物質：を含む治療又は診断キット。

【発明の効果】

【 0 0 1 6 】

本発明の変異体ストレプトアビジンは、ビオチンに対する結合能は維持しつつ、哺乳動物に対する免疫原性（抗原性）が低下していることを特徴とするため、動物体内での抗ストレプトアビジン抗体産生が抑制される。本発明の変異体ストレプトアビジンは、医薬およびその他の工業での種々の目的に使用することが可能である。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 7 】

【図 1】図 1 は、ピアコア解析におけるセンサーグラムを示す。

【図 2】図 2 は、変異体ストレプトアビジンに対する抗血清の反応性を示す。

【図 3】図 3 は、天然型ストレプトアビジン、mcSA040、mcSA072、mcSA314、mcSA414 のサーマルシフトアッセイの結果を示す。

【図 4】図 4 は、B5209B mouse scFv-mcSA414 (SA) の発現ベクターの構造を示す。

20

【図 5】図 5 は、B5209B scFv-mcSA414 を Ni²⁺アフィニティカラムにより精製した結果を示す。

【図 6】図 6 は、サイズ排除クロマトグラフィーにより B5209B scFv-mcSA414 を最終精製した結果を示す。

【図 7】図 7 は、B5209B scFv-mcSA414 と ROBO1 との等温滴定型熱量測定 (ITC) の結果を示す。

【図 8】図 8 は、B5209B scFv-mcSA414 と Biotin との等温滴定型熱量測定 (ITC) の結果を示す。

【図 9】図 9 は、B5209B scFv-mcSA414 の示差走査型熱量測定 (DSC) の結果を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 8 】

以下、本発明について更に詳細に説明する。

本発明のストレプトアビジン変異体は、配列番号 2 に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において、所定のアミノ酸の変異を有し、野生型ストレプトアビジンと比較して免疫原性が低下していることを特徴とする。

【 0 0 1 9 】

野生型（天然）のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列を配列表の配列番号 2 に示し、これをコードする塩基配列を配列表の配列番号 1 に示す。

【 0 0 2 0 】

第一の態様によれば、本発明のストレプトアビジン変異体は、配列番号 2 に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において、(a) 7 2 番目のアミノ酸残基のアルギニンが他のアミノ酸に置換しており、かつ (b) 1 0 番目のアミノ酸残基のチロシン、7 1 番目のアミノ酸残基のチロシン、8 9 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸、9 1 番目のアミノ酸残基のアルギニン、及び 1 0 4 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸の何れか一つ以上が他のアミノ酸に置換しているアミノ酸配列を含む。

40

【 0 0 2 1 】

第二の態様によれば、本発明のストレプトアビジン変異体は、配列番号 2 に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において以下の何れか 1 以上の変異を有するアミノ酸配列を含む。

(1) 1 0 番目のアミノ酸残基のチロシンがセリン又はトレオニンに置換している変異：

50

- (2) 71番目のアミノ酸残基のチロシンがアラニン又はセリンに置換している変異：
- (3) 72番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：
- (4) 89番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換している変異：
- (5) 91番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：
- (6) 104番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がグルタミン又はアスパラギンに置換している変異：

【0022】

10番目のアミノ酸残基のチロシンが他のアミノ酸に置換している場合、他のアミノ酸の具体例としては、グリシン、セリン又はトレオニンが挙げられ、特に好ましくはセリン又はトレオニンが挙げられる。

10

【0023】

71番目のアミノ酸残基のチロシンが他のアミノ酸に置換している場合、他のアミノ酸の具体例としては、グリシン、アラニン又はセリンが挙げられ、特に好ましくはアラニン又はセリンが挙げられる。

【0024】

72番目のアミノ酸残基のアルギニンが他のアミノ酸に置換している場合、他のアミノ酸の具体例としては、グリシン、又はリジンが挙げられ、特に好ましくはリジンが挙げられる。

【0025】

89番目のアミノ酸残基のグルタミン酸が他のアミノ酸に置換している場合、他のアミノ酸の具体例としては、グリシン、アラニン、又はアスパラギン酸が挙げられ、特に好ましくはアスパラギン酸が挙げられる。

20

【0026】

91番目のアミノ酸残基のアルギニンが他のアミノ酸に置換している場合、他のアミノ酸の具体例としては、グリシン、又はリジンが挙げられ、特に好ましくはリジンが挙げられる。

【0027】

104番目のアミノ酸残基のグルタミン酸が他のアミノ酸に置換している場合、他のアミノ酸の具体例としては、セリン、グルタミン又はアスパラギンが挙げられ、特に好ましくはグルタミン又はアスパラギンが挙げられる。

30

【0028】

本発明で言う、野生型ストレプトアビジンと比較して免疫原性が低下しているとは、ストレプトアビジン変異体をヒトなどの哺乳動物に投与した場合における免疫原性が低下していることを言う。免疫原性が低下していることは、例えば、以下の方法で確認することができる。即ち、本発明の変異体ストレプトアビジンについて、野生型ストレプトアビジンをカニクイサルに免疫して取得した抗ストレプトアビジン抗血清に対する反応性を解析し、上記の抗ストレプトアビジン抗血清に対する反応性が野生型ストレプトアビジンに比べて低下していれば、野生型ストレプトアビジンと比較して免疫原性が低下していると判断することができる。上記した方法で免疫原性の低下を判断した場合、本発明のストレプトアビジン変異体は、野生型ストレプトアビジンと比較して、免疫原性が好ましくは80%以下、さらに好ましくは60%以下、さらに好ましくは20%以下、さらに好ましくは15%以下、さらに好ましくは10%以下、特に好ましくは5%以下に低下している。

40

【0029】

本発明によればさらに、上記した本発明のストレプトアビジン変異体をコードするDNAが提供される。本発明のDNAは、野生型(天然)のストレプトアビジンをコードするDNAに対して部位特異的変異誘発により作製することができる。

【0030】

上記した本発明のストレプトアビジン変異体をコードするDNAは、ベクターに組み込んで使用することができる。特に、本発明のストレプトアビジン変異体を製造するためには、本発明のストレプトアビジン変異体をコードするDNAを発現ベクターに組み込み、

50

この発現ベクターを宿主に形質転換することによって、本発明のストレプトアビジン変異体を発現させることができる。

【0031】

大腸菌を宿主とする場合には、本発明で用いるベクターとしては、複製起点(ori)を有し、さらに形質転換された宿主を選択するための遺伝子(例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン又はクロラムフェニコールなどの薬剤に対する薬剤耐性遺伝子など)を有していることが好ましい。また、発現ベクターの場合には、宿主において本発明のストレプトアビジン変異体を効率よく発現させることができるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーターまたはT7プロモーターなどを持っていることが好ましい。このようなベクターとしては、ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pB R322、pBluescript、pCR-Script、pGEX-5X-1(ファルマシア)、「QIAexpress system」(キアゲン)、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているB L21を使用することが好ましい)などが挙げられる。また、ベクターには、本発明のストレプトアビジン変異体の収量をあげるためのシグナル配列などを付加することもできる。

10

【0032】

宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。また、可溶性を向上させるためのタグ、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼやチオレドキシン、マルトース結合蛋白質をコードする配列が付加されていてもよい。また、精製を容易にすることを目的とした設計されたタグ、例えばポリヒスチジンタグ、Mycエピトープ、ヘマグルチニン(HA)エピトープ、T7エピトープ、XpressタグやFLAGペプチドタグ、その他の既知のタグ配列をコードする配列が付加されていてもよい。

20

【0033】

大腸菌以外にも、哺乳動物由来の発現ベクター(例えば、pcDNA3(インビトロゲン社製)や、pEGF-BOS(Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター(例えば「Bac-to-BAC baculovairus expression system」(ギブコBRL社製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター(例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター(例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター(例えば、pZIPneo)、酵母由来の発現ベクター(例えば、「Pichia Expression Kit」(インビトロゲン社製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター(例えば、pPL608、pKTH50)が挙げられる。

30

【0034】

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター(Mulliganら、Nature (1979) 277, 108)、MMLV-LTRプロモーター、EF1プロモーター(Mizushimaら、Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子(例えば、薬剤(ネオマイシン、G418など)により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

40

【0035】

ベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、原核生物および真核生物のいずれでもよい。例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。

【0036】

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO細胞、COS細胞、3T3細胞、HeLa細胞、Vero細胞、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5などを用いることができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリポソームDOTAP(ベーリンガーマンハイム社製)を用いた方法、エレクトロポレー

50

ション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

【0037】

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が蛋白質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

【0038】

原核細胞を使用する場合は、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5、HB101等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

【0039】

これらの細胞を、本発明のDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより本発明のストレプトアビジン変異体を得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6~8であるのが好ましい。培養は、通常、約30~40で約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。また、細胞の増殖を促進するための成長因子の添加を行ってもよい。

【0040】

さらに本発明によれば、本発明のストレプトアビジン変異体に抗体を結合させることにより得られる、ストレプトアビジン変異体抗体結合物、並びにストレプトアビジン変異体抗体結合物を含む治療剤又は診断剤が提供される。さらに、上記したストレプトアビジン変異体抗体結合物は、ストレプトアビジンに親和性を有するビオチン又はその誘導体で標識した診断用又は治療用物質と組み合わせて、治療又は診断キットとして提供することができる。

【0041】

即ち、本発明においては、癌抗原特異的抗体分子と本発明のストレプトアビジン変異体との融合体を調製し、患者に投与することで、癌細胞に特異的に本発明のストレプトアビジン変異体を集積することができる。次に、ストレプトアビジンに親和性を有するビオチン又はその誘導体に結合させた診断用もしくは治療用物質 (放射性同位元素、低分子化合物、タンパク質など) を患者に投与することによって、癌細胞への確に物質を集積させることが可能になる。本発明においては、低免疫原性化により抗体産生が抑制され、抗体による早期の体内からのクリアランス、アナフィラキシーなどのショックを防ぐことができる。

【0042】

ストレプトアビジン変異体に結合させる抗体は種々の分子を用いることができる。ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体はどちらも使用することができる。抗体のサブクラスは特に問わないが、好ましくはIgG、特にIgG₁が好適に用いられる。また、「抗体」は改変抗体および抗体断片の全てを含む。ヒト化抗体、ヒト型抗体、ヒト抗体、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、サル等の各種動物由来抗体、ヒト抗体と各種動物由来抗体とのキメラ抗体、*diabody*、*scFv*、*Fd*、*Fab*、*Fab'*、*F(ab)₂*が挙げられるが、これらに限らない。

【0043】

ストレプトアビジン変異体と抗体の結合物は、当業者に公知の方法を用いて得ることができる。例えば、化学的結合方法 (US5,608,060) によって得ることもできるし、ストレプトアビジン変異体をコードするDNAと抗体をコードするDNAを連結し、発現ベクター等を用いて宿主細胞に発現させることにより、融合タンパクとして得ることもできる。ストレプトアビジン変異体をコードするDNAと抗体をコードするDNAとの連結は、リンカーと呼ばれる適当なペプチドをコードするDNAを介しても良い。ストレプトアビジン変異体抗体結合物は、抗体と標的分子との特異的結合力を残して作製されることが望

10

20

30

40

50

ましい。

【 0 0 4 4 】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【 実施例 】

【 0 0 4 5 】

実施例 1：低免疫原性ストレプトアビジンの設計

配列番号 1 及び 2 に記載のコアストレプトアビジンの遺伝子配列及びアミノ酸配列を元に、以下の条件を満たすような変異を有する変異体ストレプトアビジンの配列を検討し、表 1 に記載の変異を有する変異体ストレプトアビジンを設計した。

(1) 抗体との融合タンパク質が、人体内において免疫原性を可能な限り少なくすると予測される配列であること。

(2) ビオチン分子に対する高いアフィニティーを可能な限り維持している配列であること。

【 0 0 4 6 】

【 表 1 】

表 1：変異一覧表

Name	Mutation 1	Mutation 2	Mutation 3	Mutation 4	Mutation 5	Mutation 6
mcSA010		Y83A	R84K			E116N
mcSA020		Y83A	R84K			E116Q
mcSA030		Y83S	R84K			E116N
mcSA040		Y83S	R84K			E116Q
mcSA114	Y22S	Y83A	R84K	E101D	R103K	E116N
mcSA124	Y22T	Y83A	R84K	E101D	R103K	E116N
mcSA214	Y22S	Y83A	R84K	E101D	R103K	E116Q
mcSA224	Y22T	Y83A	R84K	E101D	R103K	E116Q
mcSA314	Y22S	Y83S	R84K	E101D	R103K	E116N
mcSA324	Y22T	Y83S	R84K	E101D	R103K	E116N
mcSA414	Y22S	Y83S	R84K	E101D	R103K	E116Q
mcSA424	Y22T	Y83S	R84K	E101D	R103K	E116Q
mcSA001			R84K			
mcSA002		Y83A				E116N
mcSA003		Y83A				E116Q
mcSA004		Y83S				E116N
mcSA005		Y83S				E116Q
mcSA083						E116N
mcSA091						E116Q
mcSA101		Y83A	R84K			
mcSA111		Y83S	R84K			

【 0 0 4 7 】

表 1 における Y 2 2 は、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列における 1 0 番目のアミノ酸残基のチロシンに対応する。表 1 における Y 2 2 S は、上記チロシンからセリンへの置換を示し、表 1 における Y 2 2 T は、上記チロシンからトレオニンへの置換を示す。

表 1 における Y 8 3 は、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列における 7 1 番目のアミノ酸残基のチロシンに対応する。表 1 における Y 8 3 A は、上記チロシンからアラニ

ンへの置換を示し、表 1 における Y 8 3 S は、上記チロシンからセリンへの置換を示す。

【 0 0 4 8 】

表 1 における R 8 4 は、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列における 7 2 番目のアミノ酸残基のアルギニンに対応する。表 1 における R 8 4 K は、上記アルギニンからリジンへの置換を示す。

表 1 における E 1 0 1 は、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列における 8 9 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸に対応する。表 1 における E 1 0 1 D は、上記グルタミン酸からアスパラギン酸への置換を示す。

【 0 0 4 9 】

表 1 における R 1 0 3 は、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列における 9 1 番目のアミノ酸残基のアルギニンに対応する。表 1 における R 1 0 3 K は、上記アルギニンからリジンへの置換を示す。

表 1 における E 1 1 6 は、配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列における 1 0 4 番目のアミノ酸残基のグルタミン酸に対応する。表 1 における E 1 1 6 N は、上記グルタミン酸からアスパラギンへの置換を示し、表 1 における E 1 1 6 Q は、上記グルタミン酸からグルタミンへの置換を示す。

【 0 0 5 0 】

実施例 2 : 変異体ストレプトアビジンの製造

(1) ワイルドタイプコアストレプトアビジンの塩基配列の合成

配列表の配列番号 1 に示すコアストレプトアビジンをコードする遺伝子の塩基配列は、人工遺伝子合成 (Integrated DNA Technologies 社) のサービスを使用した。

【 0 0 5 1 】

(2) 発現ベクターの構築

上記の配列を鋳型にし、5' 端側に Hind III サイト、3' 端側に Eco RI サイトを PCR により付加する下記のプライマー 1 及び 2 を用い、PCR 後、制限酵素 Hind III、Eco RI にて処理を行った。

【 0 0 5 2 】

プライマー 1 : GCTCTTCAAAGCTTTGGCCGAAGCTGGTATCACTG (配列番号 3)

プライマー 2 : CTCGAGGAATTCTTAGCTAGCAGCAGAAGGCTTAAC (配列番号 4)

【 0 0 5 3 】

制限酵素処理をしたサンプルは電気泳動の後、ゲル精製を行った。同様に pPAL7 ベクター (BIO - RAD 社製) も酵素処理を実施し、ゲル精製を行った。精製したベクターおよび PCR 産物は 2xRapid Ligation Buffer と T4 DNA Polymerase (共に Promega 社) を用いて指定の方法でライゲーションを実施した。大腸菌のトランスフォーメーションは 50 マイクロリットルの DH5 コンピテントセル (TOYOBO 社製) に対し、2 マイクロリットルのライゲーション産物を添加し実施した。プラスミドの抽出は Miniprep Kit (QIAGEN 社製) を用いて実施し、得られたプラスミドについてシーケンス解析により配列の確認を実施した。

【 0 0 5 4 】

(3) 変異株の作成

上記のワイルドタイプストレプトアビジン発現ベクターを鋳型とし、Site-Directed Mutagenesis 法により塩基配列の置換によるコドン配列の変更を行いアミノ酸配列の変換を行った。すなわち、変更する塩基配列が、ほぼ中心に来るように長さ 28 ~ 30 ベースの相補的プライマーを設計し、野生型ストレプトアビジン発現ベクターを鋳型として PCR 法を実施した。その後、制限酵素 Dpn I にて鋳型プラスミドを切断し、大腸菌の形質転換を行った。

【 0 0 5 5 】

プライマー :

Y22S Fw: CACTGGCACCTGGTCGAACCAACTGGGGTC (配列番号 5)

10

20

30

40

50

Y22T Fw: CACTGGCACCTGGACTAACCAACTGGGGTC (配列番号6)
 E101D FW: CGTTGGCGGTGCTGATGCTCGTATCAACAC (配列番号7)
 R103K FW: GGTGCTGATGCTAAGATCAACACTCAGTGG (配列番号8)
 Y83A FW: GGAAAAACAACGCCCGTAATGCGCACAGCG (配列番号9)
 Y83S FW: GGAAAAACAACCTCGCGTAATGCGCACAGCG (配列番号10)
 R84K FW: GAAAAACAACATAAGAATGCGCACAGCG (配列番号11)
 E116N FW: CATCCGGCACTACCAATGCGAATGCATGG (配列番号12)
 E160Q FW: CATCCGGCACTACCCAAGCGAATGCATGG (配列番号13)

【0056】

(4) 組換えタンパク質の発現

野生型ストレプトアビジンおよび変異体ストレプトアビジンの遺伝子配列を組み込んだ pPAL7 発現ベクターを大腸菌 BL21 (BIO-RAD 社) に常法に従いトランスフェクションを行った。各タンパク質の発現は以下のように実施した。すなわち、大腸菌培養液の細胞密度が OD (600nm) 0.5 - 0.7 となるまで 37 度にて培養を行い、最終濃度 1mM になるように IPTG (isopropyl - D-thiogalactopyranoside) を添加し、タンパク質発現を誘導し、20 度にて 24 時間の培養を行った。24 時間の培養の後、菌体を遠心分離により細胞を集め、タンパク質精製までマイナス 20 度で保存した。

【0057】

(5) 組換えタンパク質の精製

組換えタンパク質の精製は、Profinity exact Protein Purification System (BIO-RAD 社製) の方法を用い実施した。Bug Buster (Novagen 社) を培養容量の 1/20 添加し細胞の溶解を行った。遠心分離後上清を総可溶性タンパク質とした。回収した可溶性画分は、Profinity exact Mini Spin Columns (BIO-RAD) の用法容量に従い処理を行った。総可溶性タンパク質、カラム通過画分、洗浄画分、溶出画分を 10 - 20% レディーゲル J (BIO-RAD 社製) を用いて SDS-PAGE 電気泳動した。泳動後、タンパク質を Simply Blue SafeStain (Invitrogen 社製) で染色し精製純度の確認を実施した。

【0058】

実施例 3: カニクイサル抗ストレプトアビジン抗血清の作製

カニクイサルに対し、一回につき 1 ミリグラムのリコンビナントストレプトアビジン (PIERCE 社製) を 2 週間おきに 3 回の投与を実施した。投与前採血を Day 1 とし Day 8、15、29、36、50、57 に実施した (イナリサーチ株式会社)。

【0059】

実施例 4: タンパク質とビオチンとの結合性の解析

(1) ビアコアバイオセンサーを用いたタンパク質とビオチンとの相互作用のカイネティクス分析

ビアコア (登録商標) のバイオセンサーのリガンド (センサーチップへ貼り付ける物質) は、抗マウス IgG 抗体 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) とした。一方、アナライト (流路系に流す物質) としてビオチン化されたマウス抗体と各種ストレプトアビジン変異体を調製し、Biacore (登録商標) 3000 (表面プラズモン共鳴を原理としたバイオセンサー、GEヘルスケアバイオサイエンス社製) による分子間相互作用の解析を行った。抗マウス IgG 抗体は、アミンカップリング法によって CM5 センサーチップの全てのフローセルに固定化した。各フローセルの固定化量は 8000 RU であった。次にリファレンス用として非ビオチン化マウス抗体をフローセル 1 と 3 へキャプチャーさせ、ビオチン化マウス抗体をフローセル 2 と 4 へキャプチャーさせた。各種ストレプトアビジンは 1 と 2 または 3 と 4 に、流速 20 マイクロリットル / 分で 2 分間、ランニングバッファー (HBS-EP、GEヘルスケアバイオサイエンス社製) 中にロードした。その後、7 分間、サンプルの解離をモニターした。その後、10 mM グリシン塩酸バッファー

10

20

30

40

50

、pH 1.7 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)にて再生操作を行い繰り返し測定を実施した。得られたセンサーグラムから、解析ソフトウェアBIAevaluation ver. 4.1を用い、1:1結合モデルを用いて、反応速度論的解析を行い、結合速度定数(k_a)と解離速度定数(k_d)を計算した。解離定数(K_d)は、 k_d/k_a から求めた。

【0060】

組み換えストレプトアビジンとビオチンとのBiacore(登録商標)3000(表面プラズモン共鳴を原理としたバイオセンサー、GEヘルスケアバイオサイエンス社製)による分子間相互作用のカイネティクス分析結果は表2の通りである。

【0061】

【表2】

表2：ストレプトアビジン改変体とビオチンとの相互作用カイネティクス

Protein	Molecular mass (kDa)	結合速度定数 k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	解離速度定数 k_d (s^{-1})	解離定数 K_d (M)
cSA_WT	60	2.81×10^5	6.32×10^{-5}	2.25×10^{-10}
mcSA_W120A	60	2.81×10^5	7.49×10^{-4}	3.53×10^{-9}
mcSA10	60	2.81×10^5	8.96×10^{-5}	2.25×10^{-10}
mcSA114	60	3.61×10^5	9.92×10^{-5}	2.74×10^{-10}
mcSA124	60	3.06×10^5	5.38×10^{-5}	1.76×10^{-10}
mcSA20	60	2.81×10^5	1.60×10^{-4}	4.27×10^{-10}
mcSA214	60	2.64×10^5	1.21×10^{-4}	4.59×10^{-10}
mcSA224	60	2.11×10^5	1.01×10^{-4}	4.81×10^{-10}
mcSA30	60	2.81×10^5	1.55×10^{-4}	3.99×10^{-10}
mcSA314	60	5.99×10^5	1.58×10^{-4}	2.64×10^{-10}
mcSA324	60	3.26×10^5	7.18×10^{-5}	2.20×10^{-10}
mcSA40	60	2.81×10^5	1.69×10^{-4}	2.57×10^{-10}
mcSA414	60	2.31×10^5	5.18×10^{-5}	2.43×10^{-10}
mcSA424	60	1.32×10^5	1.12×10^{-4}	8.45×10^{-10}

【0062】

得られたストレプトアビジン改変体の解離定数は、 10^{-10} Mのオーダーで、今回我々の測定したワイルドタイプストレプトアビジンの解離定数と同じオーダーであった。この結果によって、ストレプトアビジン改変体はワイルドタイプと同様にビオチンと非常に高い親和性をもつタンパク質であることが明らかとなった。現在広く応用されているストレプトアビジン・ビオチン技術に応用が可能であると考えられる。

【0063】

(2) ピアコアバイオセンサーを用いたタンパク質とカニクイサル抗血清との相互作用分析

ピアコア(登録商標)のバイオセンサーのリガンド(センサーチップへ貼り付ける物質)は、Amine-PEG₃-Biotin (Thermo SCIENTIFIC)と各種ストレプトアビジン改変体とした。一方、アナライト(流路系に流す物質)として、ランニングバッファー(HBS-EP、GEヘルスケアバイオサイエンス社製)にて20倍希釈したカニクイサル抗血清を調製し、Biacore(登録商標)3000(表面プラズモン共鳴を原理としたバイオセンサー、GEヘルスケアバイオサイエンス社製)による分子間相互作用の分析を行った。Amine-PEG₃-Biotin (Thermo SCIENTIFIC)はアミンカップリング法によってCM5センサーチップの全てのフローセルに固定化した。各フローセルの固定化量の平均は160RUであった。次に、フローセル2はワイルドタイプストレプトアビジン、フローセル3、4それぞれに各種2種類のストレプトアビジン改変体を流し、ビオチンとの結合反応により固

10

20

30

40

50

定化を行った。フローセル 1 はリファレンスとした。

【 0 0 6 4 】

希釈したカニクイサル抗血清は、測定温度 37 度に設定し、5 マイクロリットル / 分にて 2 分間、ランニングバッファー (HBS - EP、GEヘルスケアバイオサイエンス社製) 中にロードした。その後、7 分間、サンプルの解離をモニターした。その後、10 mM グリシン塩酸バッファー、pH 1.7 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) にて再生操作を行い繰り返し測定を実施した。得られたセンサーグラム (図 1) から、解析ソフトウェア BIA evaluation ver. 4.1 を用い、ストレプトアビジン改変体の結合量、抗血清の反応量を導きだし、各フローセルに結合したストレプトアビジンの量で標準化を行い抗血清の反応を比較した。すなわち、(抗血清の反応後の値 - 反応前の値) / ストレプトアビジンの結合量、という式で数値を出しグラフ化を行った (図 2)。

10

【 0 0 6 5 】

実施例 5 : インシリコでのストレプトアビジンの免疫原性の解析

Epibase T-cell epitope profiling サービス (Algonomics社) を利用し、野生型ストレプトアビジン、mcSA072、mcSA040、mcSA314、mcSA414 についてインシリコベースで免疫原性 (immunogenicity) の解析を実施した (Desmet, (2005), Proteins, 58, 53-69; E S126528)。予測で使用するアロタイプは、Caucasian、Oriental、Indo-European、Afro-American plus West African、Austronesian、Mestizoにおいて出現頻度が 30% 以上のものを選択した。それぞれのアロタイプについて結晶構造もしくは結晶構造に基づいてモデル化した最も近い構造を用い独自の側鎖の配置方法を含む方法を使用した (Desmet, (2002), Proteins, 48, 31-34)。次に、レセプターとターゲットペプチドとの結合自由エネルギーの計算を実施し、その結合力の強さに基づき抗原性の強さの分類を行った (Kapoerchan, (2009), Mol. Immunol. 47(5), 1091-1097)。

20

【 0 0 6 6 】

37 種類の DRB1、8 種類の DRB3/4/5、23 種類の DQ、10 種類の DP、合計 78 種類の HLA class II レセプターについてアロタイプレベルのプロファイリングを行った結果を表 3、表 4 に示す。決定的なエピトープの数を表している表 3 から、野生型ストレプトアビジンは DRB1 エピトープが最も少ないが、DRB3/4/5 エピトープは最も多く、一方、mcSA314、mcSA414 は DP エピトープが消失しているが、DQ エピトープが増えていることが示された。

影響を及ぼすアロタイプをまとめた表 4 からは mcSA314、mcSA414 は他のタンパク質に比べエピトープの数が減少していることが示された。これらの結果から免疫原性の予測結果は mcSA314 < mcSA414 < 野生型ストレプトアビジン という順番になった (左のほうが免疫原性が低い)。

30

【 0 0 6 7 】

【表 3】

表 3 : in silico による T-Cell Epitope assay (Epibase) の結果

	DRB1	DRB3/4/5	DQ	DP
Control Core Streptavidin	45	12	4	1
mcSA040	48	11	4	1
mcSA072	47	11	4	1
mcSA314	47	10	5	0
mcSA414	46	10	5	0

40

【 0 0 6 8 】

【表 4】

表 4 : in silico による T-Cell Epitope assay (Epibase) の結果

Allele	Serotype	Frequency	Streptavidin critical binders	mcSA040 critical binders	mcSA072 critical binders	mcSA314 critical binders	mcSA414 critical binders
DPA1*0103/DPB1*0401	DPw4	65%	1	1	1	0	0
DRB4*0101	DR53	46%	2	2	2	1	1
DRB3*0202	DR52	30%	3	3	3	2	2
DRB1*0701	DR7	25%	6	6	6	6	6
DQA1*0501/DQB1*0201	DQ2	25%	0	0	0	1	1
DPA1*0103/DPB1*0402	DPw4	24%	1	1	1	0	0
DRB1*1501	DR15(2)	23%	7	6	6	5	5
DRB3*0101	DR52	23%	1	1	1	1	1
DRB1*0301	DR17(3)	22%	0	1	0	0	1
DQA1*0501/DQB1*0301	DQ7(3)	21%	1	1	1	1	1
DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2	20%	1	1	1	0	0
DRB5*0101	DR51	19%	5	4	4	3	3
DRB1*0101	DR1	15%	11	10	10	9	9
DRB1*0401	DR4	14%	5	7	6	7	7
DRB1*1101	DR11(5)	12%	4	4	4	4	4
DRB1*1301	DR13(6)	11%	4	6	5	6	6
DRB3*0201	DR52	10%	1	1	1	1	1

10

20

【 0 0 6 9 】

実施例 6 : ストレプトアビジンタンパク質の熱安定性の評価

実施例 2 に従って精製された次の 5 種類のタンパク質、天然型ストレプトアビジン、mcSA040、mcSA072、mcSA314、mcSA414 についてサーマルシフトアッセイを実施した (Vedadi, (2006), Proc Natl Sci USA., 103(43), 15835-15840)。リアルタイムPCR用チューブ (PCR Tube Strip, Flat Cap Strip, BIO-RAD社製) に各試料の最終濃度が次ようになるようにサンプルを調製した。SYPRO Orangeは5000倍希釈、各タンパク質は10 μM、バッファは 1 × PBS となるようにした。また、タンパク質の熱変性を加速化させる目的で、グアニジン塩酸溶液の濃度が終濃度 0 M, 0.5 M, 1 M, 2 M になるように調製した。反応ボリュームは20 μlで行った。測定装置はCFX96リアルタイムPCR検出システム (BIO-RAD社製) を用いた。CFX96リアルタイムPCR検出システムのプログラムモードはFRET検出用を使用し、温度上昇は10秒ごとに 0.5 °C づつ上昇させるプログラムで反応および検出を行った。

30

【 0 0 7 0 】

サーマルシフトアッセイの結果を解析した結果、改変したストレプトアビジン、mcSA040、mcSA072、mcSA314、mcSA414は天然型ストレプトアビジンと同等の熱安定性を100 °C において示した (図 3)。このことから前述したミューテーションは免疫原性を低下させるが、熱安定性には影響を及ぼさないことが示唆された。

40

【 0 0 7 1 】

実施例 7 : 改変モノクローナル抗体の作製

(1) ハイブリドーマ細胞から total RNA の調製

モノクローナル抗体 B5209B (IgG2b) 産生ハイブリドーマ細胞として、特開 2008-290996 号公報に記載されているモノクローナル抗体 B5209B を産生するハイブリドーマを用いた。このモノクローナル抗体 B5209B を産生するハイブリドーマは、受託番号 FERMP-21238 として、2007 年 (平成 19 年) 3 月 2 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東一丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566)) に寄託されており、さらに受託番号 FERMBP-10921 として、2007 年 (平成 19 年) 10 月 16 日付けで国際寄

50

託に移管された。

【 0 0 7 2 】

上記のモノクローナル抗体 B 5 2 0 9 B (IgG2b) 産生ハイブリドーマ細胞 1×10^7 個を phosphate buffered saline (PBS) で一回洗浄後、細胞沈殿に Trizol 液 (Invitrogen 社製) 1 m l を加えて可溶化した。抽出液を 2 0 G 注射針に 2 回通し D N A をせん断した後、Trizol 液付属の説明書に従ってクロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿、8 0 % エタノール洗浄により total RNA を精製し、ジエチルピロカーボネート含有滅菌蒸留水に溶解した。得られた total RNA は、アガロースゲル電気泳動により、分解していないことを確認した。

【 0 0 7 3 】

(2) IgG heavy chain V region (VH) cDNA の合成とクローニング

B5209B total RNA 5 μ g を鋳型として、3' -Primer としてマウス IgG2b heavy chain C 領域 5' 端の cDNA 配列に基づく primer (5' -ccaagcttaggggccagtgatagactg-3') (配列番号 1 4) を用い、SuperScript cDNA 合成キット (Invitrogen 社製) を使用してキットの説明書に従い、1st strand cDNA を合成した。得られた 1st strand cDNA に Novagen 社 Mouse Ig-Primer Set の MulgVH5' -A primer を加えて、Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics 社製) を用いて 2 本鎖 cDNA を増幅した。得られた 2 本鎖 cDNA を TA クローニング法により pGEM-T vector (Promega 社製) にサブクローンし、大腸菌 DH5 に導入してプラスミド含有ベクターを得た。6 クローンに関してプラスミド DNA を Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen 社製) で精製し、常法に従って、DNA 塩基配列を決定した。抗体の重鎖可変領域 (VH) のアミノ酸配列は、配列番号 1 6 に記載のアミノ酸配列のうち 1 番目から 1 2 2 番目までのアミノ酸配列であることが判明した。

【 0 0 7 4 】

(3) 抗 ROBO1 モノクローナル抗体 B5209B の IgG light chain N 末端アミノ酸配列の決定

モノクローナル抗体 B5209B (IgG2b) を含むハイブリドーマ無血清培養上清から Protein G カラム (GE Healthcare 社製) を用いて、付属の説明書に従って抗体の精製を行った。精製したモノクローナル抗体 B5209B を SDS-PAGE を用いて電気泳動を行った。電気泳動ゲルは PVDF 膜に転写した後、クマシー染色を行った。染色された IgG light chain のバンドを切り出しエドマン分解法により N 末端アミノ酸配列 (DIQMT) を決定した。

【 0 0 7 5 】

(4) B5209B mouse-scFv-mcSA414 の発現ベクターの構築 (図 4)

図 4 に記載の構造を有する B5209B mouse-scFv-mcSA414 の発現ベクターを構築した。当該発現ベクター中の B5209B mouse-scFv-SA の塩基配列を配列番号 1 5 に記載し、アミノ酸配列を配列番号 1 6 に記載する。抗体の重鎖可変領域 (VH) のアミノ酸配列は、配列番号 1 6 のうちの 1 番目から 1 2 2 番目のアミノ酸配列に対応し、抗体の軽鎖可変領域 (VL) のアミノ酸配列は、配列番号 1 6 に記載のアミノ酸配列のうちの 1 4 2 番目から 2 4 8 番目のアミノ酸配列に対応する。

【 0 0 7 6 】

(5) B5209B mouse-scFv-mcSA414 培養法

大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換し、アンピシリン 50 μ g/ml 含有 LB プレート培地にて 28 条件下で 20 時間程度培養をした。プレートから単一コロニーを釣菌し、アンピシリンアンピシリン 50 μ g/ml 含有 LB 試験培地 (3mL) に植菌後、28 にて 18 時間程度振盪培養 (140 rpm 程度) を行った。続いて、アンピシリン 50 μ g/ml 含有 2 x YT 培地 (1L) 前培養液の全量を植え継ぎ、28 にて振盪培養 (125 rpm) した。OD600 = 0.8 の時点で終濃度 0.5mM の IPTG を添加することで発現誘導を行い、引続き一晩培養をした。

【 0 0 7 7 】

(6) B5209B mouse-scFv-mcSA414 調整法

菌体内可用性画分から目的タンパク質を回収し、Ni²⁺アフィニティーカラム Δ HisTrap HP (GE Healthcare 社製) によって粗精製を行った。このとき、50mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0 緩衝液を移動相に用い、50mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 500mM イミダゾール,

10

20

30

40

50

pH 8.0 緩衝液を用いて段階的に溶出させた（図5）。目的タンパク質溶出画分を回収し、50mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0 緩衝液にて透析後、サイズ排除クロマトグラフィーにより最終精製を行った。使用したカラムはHiLoad 26/60 Superdex 200（GE Healthcare）、移動相には 50mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0 緩衝液を用いた。最終精製産物について、SDS-PAGEにより確認した。サイズ排除クロマトグラフィーによる最終精製とSDS-PAGEの結果を図6に示す。

【0078】

実施例8：B5209B mouse-scFv-mcSA414 の活性評価

(1) ROBO1との結合性

等温滴定型熱量測定（ITC）により、B5209B mouse-scFv-mcSA414とのROBO1との相互作用に関する熱力学的解析を行った。図7には、溶媒にPBSを用い、25条件下にてB5209B mouse-scFv-mcSA414（3.7 μM）に対し、ROBO1を一定量づつ滴下した時の測定結果を示す。

【0079】

ここから算出された解離定数は 3.3×10^{-8} (1/M)、エンタルピー変化量（ ΔH ）は-16.1 kJ/mol、またエントロピー変化量（ ΔS ）は-22 J/mol・Kであった。scFvと比較すると、 ΔH は顕著な変化は認められなかった。一方、 ΔS は1/40程度低下しており、親和性ではおよそ一桁程度の低下が認められた。さらに、結合比では、B5209B mouse-scFv-mcSA414 4量体に対しROBO1が2分子結合することが示唆され、4量体のうち隣接した2つの抗原結合部位は立体障害のため片方しかROBO1を認識できない可能性があると考えられる。

【0080】

(2) mouse-scFv-mcSA414 と Biotin との結合性評価

等温滴定型熱量測定（ITC）により、B5209B mouse-scFv-mcSA414とのBiotinに対する結合活性評価を行った。図8には、溶媒にPBSを用い、25条件下にてB5209B mouse-scFv-SA（9 μM）に対し、Biotin（90 μM）を一定量づつ滴下した時の測定結果を示す。

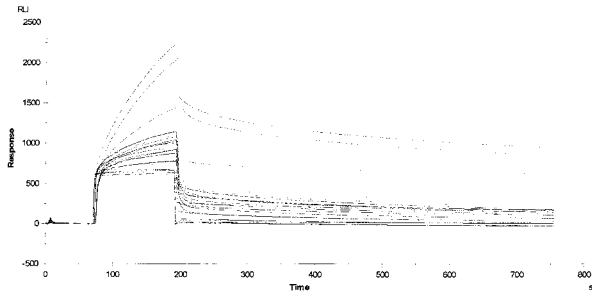
ここから算出された解離定数は 5.6×10^{-8} (1/M)、エンタルピー変化量（ ΔH ）は-25.5 kJ/mol、またエントロピー変化量（ ΔS ）は検出限界以下であった。

【0081】

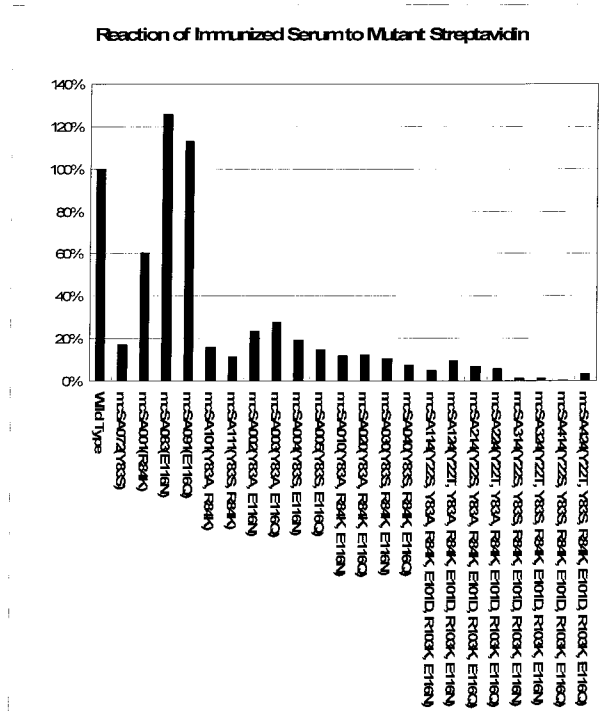
(3) mouse-scFv-mcSA414 の熱安定性評価

示差走査型熱量測定（DSC）により、B5209B mouse-scFv-mcSA414の熱安定性を評価した。そのときの結果を図9に示す。溶媒には、PBSを用いた。B5209B mouse-scFvの熱安定性は50付近であることから、B5209B mouse-scFv-SAのscFvドメインの変性温度は T_m 51.4、1分子の完全変性温度は T_m 108であると推察される。また、Streptavidinドメイン4量体解離温度は検出されないことから途中4量体の解離をせずに完全変性にいたっていると推察される。

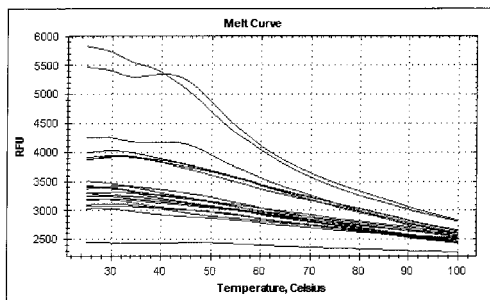
【 図 1 】



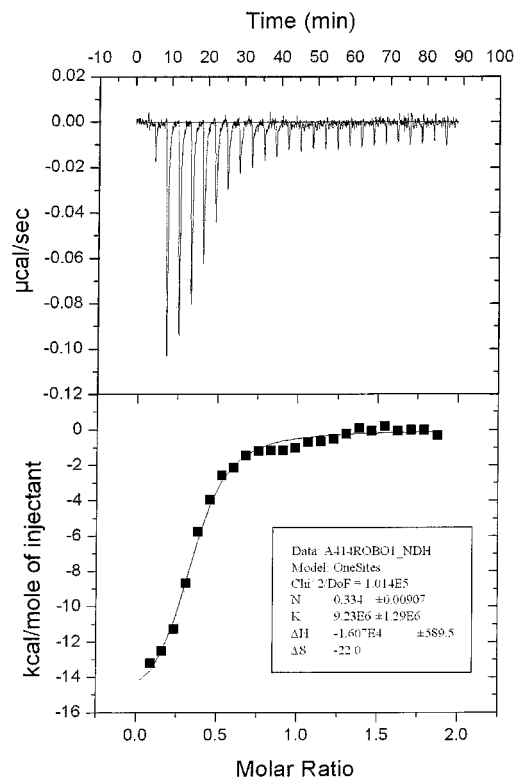
【 図 2 】



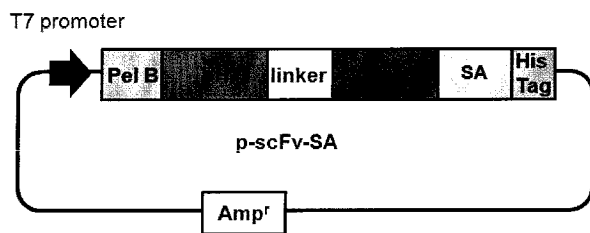
【 図 3 】



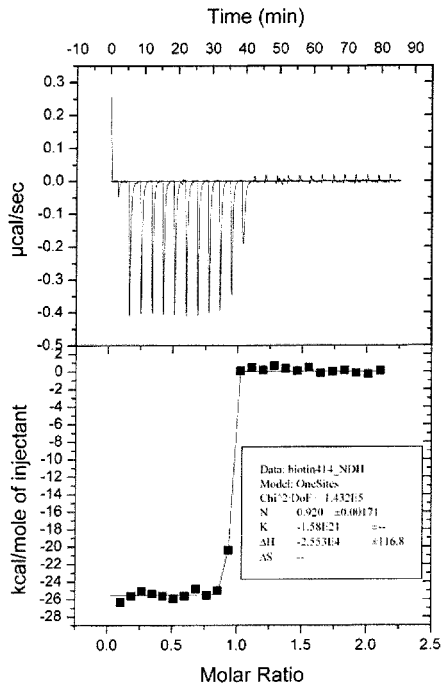
【 図 7 】



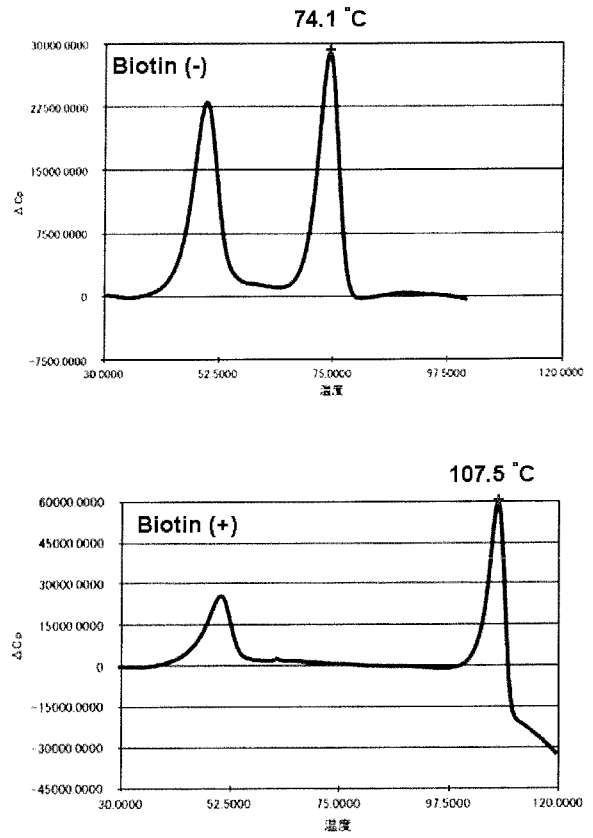
【 図 4 】



【 8 】

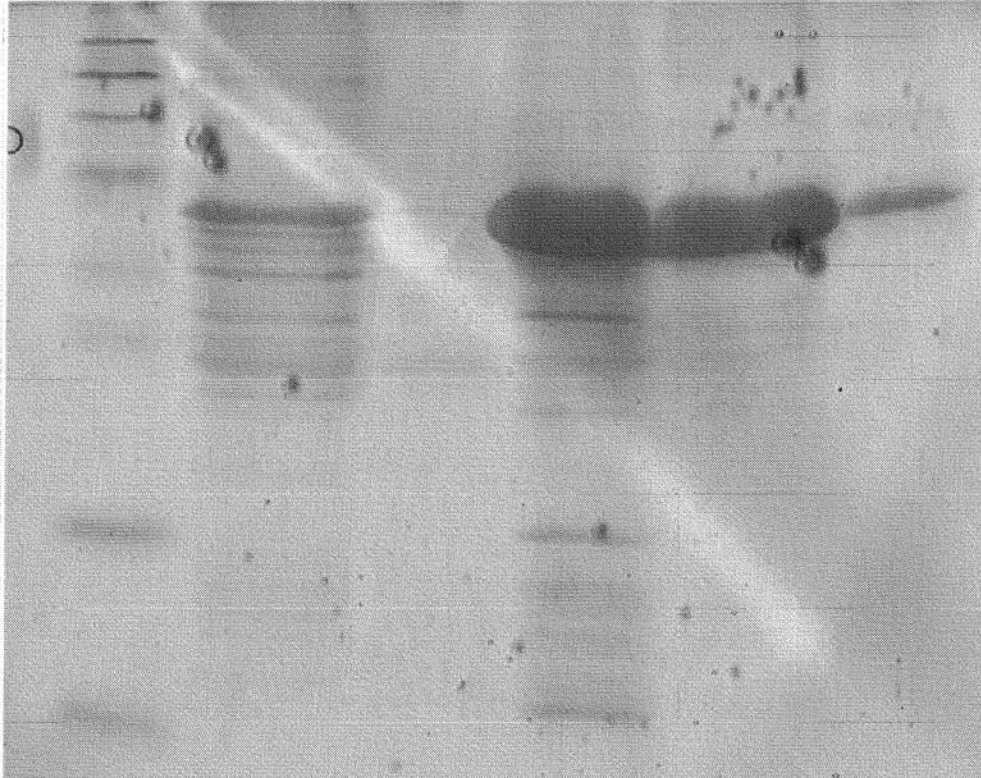


【 9 】

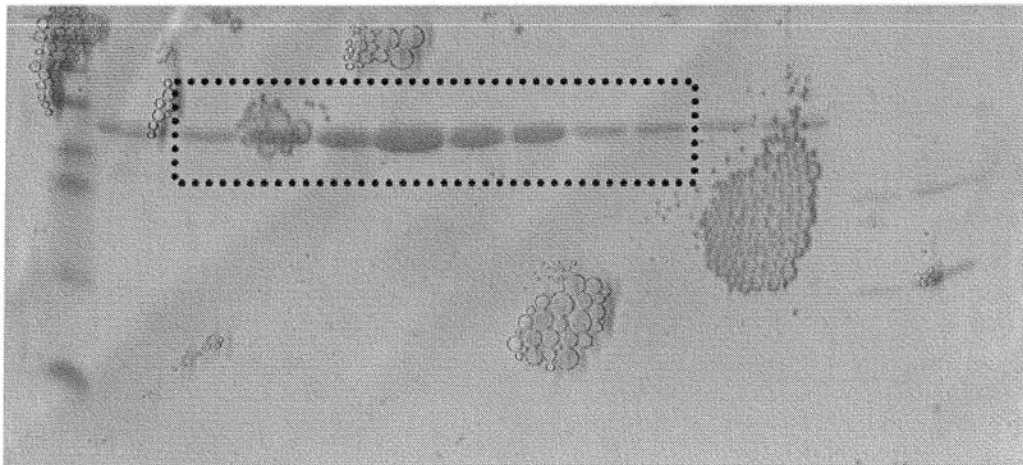
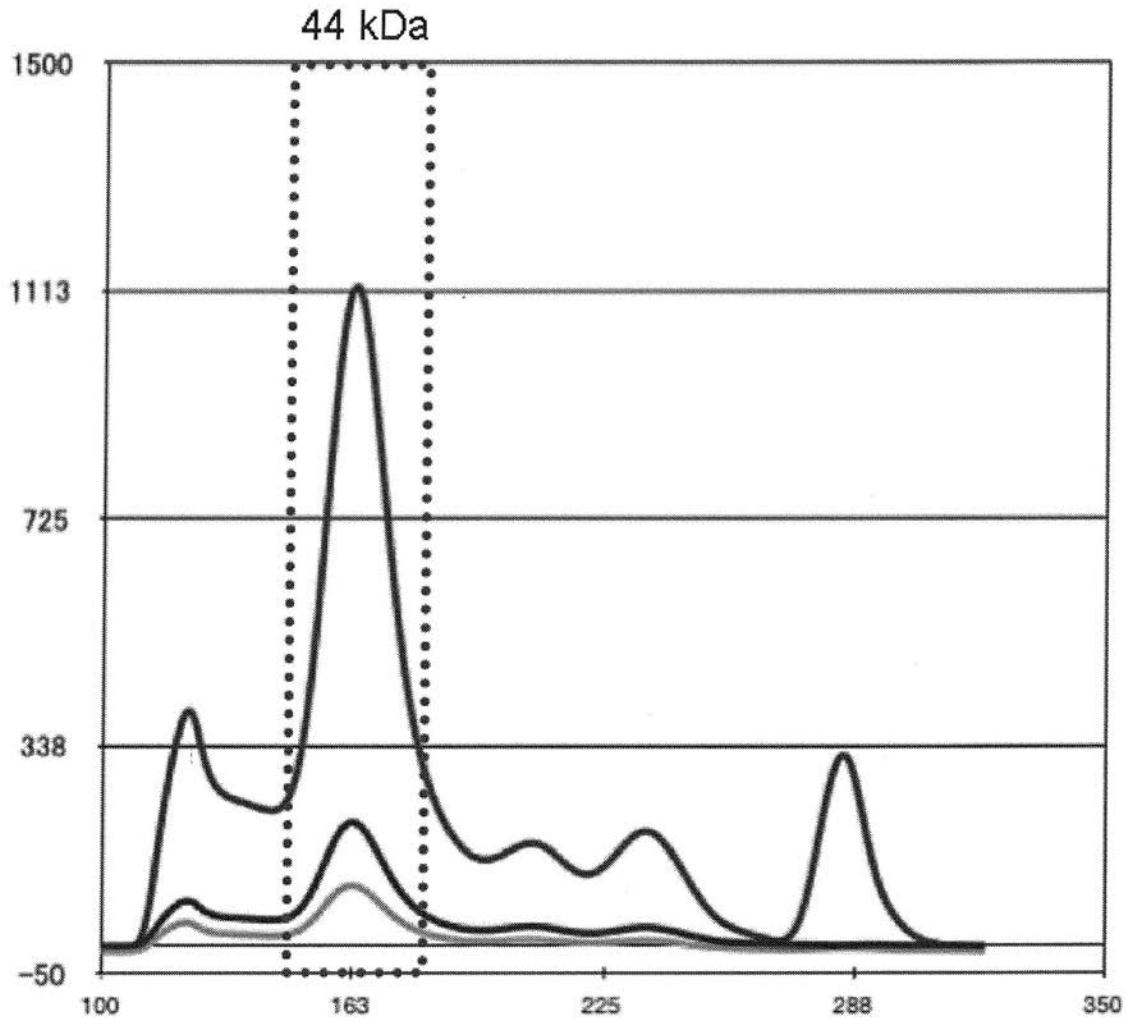


【 図 5 】

Imidazole Elution
60mM 200mM 500mM



【 図 6 】



【 配 列 表 】

[2010095455000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/001100
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A61K31/4188(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, C07K14/195(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, A61K31/4188, A61K38/00, A61K39/395, A61P37/06, C07K14/195, C07K16/00, C07K19/00, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MEYER DL., et al., Reduced antibody response to streptavidin through site-directed mutagenesis, Protein Sci., 2001, vol.10, no.3, p.491-503	1-11
Y	SUBRAMANIAN N., et al., Mapping the common antigenic determinants in avidin and streptavidin, Biochem. Mol. Biol. Int., 1997, vol.43, no.2, p.375-382	1-11
Y	JP 2003-501096 A (Neorx Corp.), 14 January 2003 (14.01.2003), & WO 2000/075333 A1 & EP 1190061 A1 & US 2003/0143233 A1	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 April, 2010 (14.04.10)		Date of mailing of the international search report 27 April, 2010 (27.04.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/001100

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SHULTZ J., et al., A tetravalent single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted lymphoma therapy, Cancer Res., 2000, vol.60, no.23, p.6663-6669	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/001100	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K31/4188(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, C07K14/195(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, A61K31/4188, A61K38/00, A61K39/395, A61P37/06, C07K14/195, C07K16/00, C07K19/00, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/WPI (DIALOG)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)、UniProt/GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	MEYER DL., et al., Reduced antibody response to streptavidin through site-directed mutagenesis, Protein Sci., 2001, vol.10, no.3, p.491-503	1-11	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 14.04.2010		国際調査報告の発送日 27.04.2010	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 池上 文緒	4B 3765
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 0 / 0 0 1 1 0 0
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	SUBRAMANIAN N., et al., Mapping the common antigenic determinants in avidin and streptavidin, Biochem. Mol. Biol. Int., 1997, vol.43, no.2, p.375-382	1 - 1 1
Y	JP 2003-501096 A (ネオルクス コーポレイション) 2003.01.14 & WO 2000/075333 A1 & EP 1190061 A1 & US 2003/0143233 A1	1 - 1 1
Y	SHULTZ J., et al., A tetravalent single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted lymphoma therapy, Cancer Res., 2000, vol.60, no.23, p.6663-6669	1 - 1 1

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/42	(2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 49/00	(2006.01)	A 6 1 K 49/00	A
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	U

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

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成18年度~22年度 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構「新機能抗体創製技術開発事業」委託研究、平成17年度 独立行政法人医薬基盤研究所、保険医療分野における基礎研究推進事業、産業技術力強化法第19条の適用を受けるもの)

(72) 発明者 土居 洋文

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72) 発明者 杉山 暁

東京都目黒区駒場四丁目7番6号 パークビル 株式会社ペルセウスプロテオミクス内

(72) 発明者 津本 浩平

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA06 EA04 FA02 GA11 HA03 HA11
 4C076 AA95 CC29 CC41 EE41 EE59 FF67
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA21 BA41 BA44 CA53 MA05 NA13
 ZB26
 4C085 HH03 KA03 KA04 KA29 KB57 LL18
 4H045 AA20 AA30 BA09 BA41 CA11 EA20 EA50 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	低免疫原性链霉抗生物素蛋白及其用途		
公开(公告)号	JPWO2010095455A1	公开(公告)日	2012-08-23
申请号	JP2011500525	申请日	2010-02-19
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人 东京大学 株式会社英仙蛋白质科学		
申请(专利权)人(译)	东京大学 英仙座蛋白质组学公司		
[标]发明人	兒玉龍彦 浜窪隆雄 土居洋文 杉山暁 津本浩平		
发明人	兒玉 龍彦 浜窪 隆雄 土居 洋文 杉山 暁 津本 浩平		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/195 C07K19/00 C07K16/00 A61K38/00 A61K47/42 A61P35/00 A61K49/00 G01N33/53		
CPC分类号	B82Y5/00 A61K47/6898 C07K14/36 C07K16/14 C07K2317/56 C07K2317/622 C07K2317/92		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/195 C07K19/00 C07K16/00 A61K37/02 A61K47/42 A61P35/00 A61K49/00. A G01N33/53.U		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024 /GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4C076/AA95 4C076/CC29 4C076/CC41 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF67 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA41 4C084 /BA44 4C084/CA53 4C084/MA05 4C084/NA13 4C084/ZB26 4C085/HH03 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KA29 4C085/KB57 4C085/LL18 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045 /CA11 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2009037750 2009-02-20 JP		
其他公开文献	JP5472754B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种突变的抗生蛋白链霉菌素，其中在抗生蛋白链霉菌素的哺乳动物中的免疫原性（抗原性）降低。本发明提供了一种突变型抗生蛋白链霉菌素，其包含一个氨基酸序列，其中（a）第72位的精氨酸残基被另一个氨基酸残基取代，和（b）第10位的任何一个或多个酪氨酸残基，相对于如图所示的核心链霉亲和素的氨基酸序列，第71位的酪氨酸残基，第89位的谷氨酸残基，第91位的精氨酸残基和第104位的谷氨酸残基被其他氨基酸残基取代。与野生型链霉亲和素相比，它具有降低的免疫原性。

Name	Mutation 1	Mutation 2	Mutation 3	Mutation 4	Mutation 5	Mutation 6
mcSA010		Y83A	R84K			E116N
mcSA020		Y83A	R84K			E116Q
mcSA030		Y83S	R84K			E116N
mcSA040		Y83S	R84K			E116Q
mcSA114	Y22S	Y83A	R84K	E101D	R103K	E116N
mcSA124	Y22T	Y83A	R84K	E101D	R103K	E116N
mcSA214	Y22S	Y83A	R84K	E101D	R103K	E116Q
mcSA224	Y22T	Y83A	R84K	E101D	R103K	E116Q
mcSA314	Y22S	Y83S	R84K	E101D	R103K	E116N
mcSA324	Y22T	Y83S	R84K	E101D	R103K	E116N
mcSA414	Y22S	Y83S	R84K	E101D	R103K	E116Q
mcSA424	Y22T	Y83S	R84K	E101D	R103K	E116Q
mcSA001			R84K			
mcSA002		Y83A				E116N
mcSA003		Y83A				E116Q
mcSA004		Y83S				E116N
mcSA005		Y83S				E116Q
mcSA083						E116N
mcSA091						E116Q
mcSA101		Y83A	R84K			
mcSA111		Y83S	R84K			