

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-515749

(P2014-515749A)

(43) 公表日 平成26年7月3日(2014.7.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 16/00 ZNA	4C085
C40B 40/08 (2006.01)	C40B 40/08	4H045
A61K 39/00 (2006.01)	A61K 39/00 E	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 D	
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁)

(21) 出願番号	特願2014-505460 (P2014-505460)	(71) 出願人	510029999
(86) (22) 出願日	平成24年4月19日 (2012.4.19)		ガーバン インスティテュート オブ メ
(85) 翻訳文提出日	平成25年12月13日 (2013.12.13)		ディカル リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2012/000403		オーストラリア国 ニューサウスウェール
(87) 国際公開番号	W02012/142662		ズ2010 シドニー ダーリングハース
(87) 国際公開日	平成24年10月26日 (2012.10.26)		ト ヴィクトリアストリート384
(31) 優先権主張番号	2011901522	(74) 代理人	100092783
(32) 優先日	平成23年4月21日 (2011.4.21)		弁理士 小林 浩
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)	(74) 代理人	100120134
(31) 優先権主張番号	2011904856		弁理士 大森 規雄
(32) 優先日	平成23年11月21日 (2011.11.21)	(74) 代理人	100104282
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾された可変ドメイン分子及びその製造及び使用の方法B

(57) 【要約】

本開示は、K a b a tの番号付け方式に従う残基49～56の間に位置する少なくとも1つの負に荷電したアミノ酸を含む抗体の軽鎖可変ドメイン(V_L)を含む単離されたタンパク質を提供し、前記タンパク質は抗原に特異的に結合することが可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離されたタンパク質であって、K a b a t の番号付け方式に従う残基 4 9 ~ 5 6 の間での 2 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む抗体の軽鎖可変ドメイン (V _L) を含み、前記タンパク質が抗原に特異的に結合することが可能であるタンパク質。

【請求項 2】

K a b a t の番号付け方式に従う残基 4 9、5 0、5 1、5 2、5 3 及び 5 6 から成る群から選択される位置にて 2 以上の負に荷電したアミノ酸を含む請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 3】

単離されたタンパク質であって、

(i) K a b a t の番号付け方式に従う残基 4 9 ~ 5 6 の間での 1 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む抗体の軽鎖可変ドメイン (V _L) と

(i i) K a b a t の番号付け方式に従う残基 2 8、3 0、3 1、3 2、3 3 及び 3 5 から成る群から選択される 1 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む抗体の重鎖可変ドメイン (V _H) を含み、

前記タンパク質が抗原に特異的に結合することが可能であるタンパク質。

【請求項 4】

K a b a t の番号付け方式に従う V _L の残基 4 9 ~ 5 6 の間での 2 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む、又は K a b a t の番号付け方式に従う V _H の残基 2 8、3 0、3 1、3 2、3 3 及び 3 5 から成る群から選択される 2 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む請求項 3 に記載のタンパク質。

【請求項 5】

単離されたタンパク質であって、

(i) K a b a t の番号付け方式に従う残基 4 9 ~ 5 6 の間での 2 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む抗体の軽鎖可変ドメイン (V _L) と

(i i) K a b a t の番号付け方式に従う残基 2 8、3 0、3 1、3 2、3 3 及び 3 5 から成る群から選択される 2 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む抗体の重鎖可変ドメイン (V _H) を含み、

前記タンパク質が抗原に特異的に結合することが可能であるタンパク質。

【請求項 6】

V _L が、K a b a t の番号付け方式に従う残基 4 9、5 0、5 1、5 2、5 3 及び 5 6 から成る群から選択される 1 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む請求項 3 又は 4 に記載のタンパク質。

【請求項 7】

V _L がさらに C D R 1 にて 1 以上の負に荷電したアミノ酸を含み、及び / 又は V _H がさらに K a b a t の番号付け方式に従う残基 2 6、3 9、4 0、5 0、5 2、5 2 a 及び 5 3 から成る群から選択される 1 以上の残基で負に荷電したアミノ酸を含む請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 8】

タンパク質が 1 0 μ M を超える親和性で抗原に特異的に結合することが可能である請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の単離されたタンパク質。

【請求項 9】

負に荷電したアミノ酸を伴わないタンパク質に比べて凝集する傾向が低下した請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 10】

負に荷電したアミノ酸を伴わないタンパク質に比べて、少なくとも約 6 0 に加熱した後、凝集する傾向が低下した請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 11】

少なくとも約 6 0 に加熱した後、抗原に特異的に結合する能力を有する請求項 1 ~ 9

10

20

30

40

50

のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 1 2】

濃縮、及び任意で希釈又は再構成の後、凝集する傾向が低下した請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 1 3】

ヒトタンパク質に結合することが可能である請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 1 4】

ヒトの状態に関連する又はヒトの状態の原因となるタンパク質に結合することが可能である請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

10

【請求項 1 5】

負に荷電したアミノ酸がアスパラギン酸である請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 1 6】

ヒトのものである又はヒト化される又は脱免疫化される又はヒトのタンパク質又はその領域に融合される請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 1 7】

抗原に特異的に結合することが可能な修飾された抗体軽鎖可変ドメイン (V_L) を含むタンパク質であって、 V_L が、K a b a t の番号付け方式に従う残基 4 9、5 1、5 2、5 3 及び 5 6 から成る群から選択される 1 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含み、 V_L の未修飾の形態が負に荷電したアミノ酸を含まないタンパク質。

20

【請求項 1 8】

5 5 位にて負に荷電したアミノ酸をさらに含む請求項 1 7 に記載のタンパク質。

【請求項 1 9】

抗原に特異的に結合することが可能な修飾された抗体軽鎖可変ドメイン (V_L) を含むタンパク質であって、 V_L が、K a b a t の番号付け方式に従う残基 4 9 ~ 5 6 の間での 2 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含み、 V_L の未修飾の形態がその位置で 2 以上の負に荷電したアミノ酸を含まないタンパク質。

【請求項 2 0】

タンパク質であって、

30

(i) V_L の未修飾の形態がその位置にて負に荷電したアミノ酸を含まない、K a b a t の番号付け方式に従う残基 4 9 ~ 5 6 の間での位置にて負に荷電したアミノ酸を含む修飾された抗体軽鎖可変ドメイン (V_L) ; と

(i i) V_H の未修飾の形態がその位置にて負に荷電したアミノ酸を含まない、K a b a t の番号付け方式に従う残基 2 8、3 0、3 1、3 2、3 3 及び 3 5 から成る群から選択される 1 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む修飾された抗体重鎖可変ドメイン (V_H) を含み、

修飾されたタンパク質が抗原に特異的に結合することが可能であるタンパク質。

【請求項 2 1】

K a b a t の番号付け方式に従う V_L の残基 4 9、5 0、5 1、5 2、5 3 及び 5 6 から成る群から選択される 1 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む請求項 1 9 又は 2 0 に記載のタンパク質。

40

【請求項 2 2】

タンパク質が、

(i) 抗体 ;

(i i) 単一ドメイン抗体 ;

(i i i) 単鎖 F v (s c F v) を含有するタンパク質 ;

(i v) 二価抗体、三価抗体又は四価抗体 ;

(v) (i i) ~ (i v) のいずれか 1 つと抗体の F c ドメイン又はそのドメインを含む融合タンパク質 ; 及び

50

(v i) (i i) ~ (i v) のいずれか 1 つと免疫エフェクター細胞に結合することが可能であるタンパク質を含む融合タンパク質から成る群から選択される請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 2 3】

化合物に抱合される請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質と、薬学上許容可能なキャリアを含む組成物。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を複数含むライブラリ。

10

【請求項 2 6】

抗体の軽鎖可変ドメイン (V_L) を含むタンパク質を含むライブラリであって、 V_L が K a b a t の番号付け方式に従う残基 4 9 ~ 5 6 の間での 1 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むライブラリ。

【請求項 2 7】

V_L が 2 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む請求項 2 6 に記載のライブラリ。

【請求項 2 8】

抗体軽鎖可変ドメイン (V_L) 及び抗体重鎖可変ドメイン (V_H) を含むタンパク質を含むライブラリであって、前記タンパク質が

(a) K a b a t の番号付け方式に従う残基 4 9 ~ 5 6 の間での 1 以上の位置にて少なくとも 1 つの負に荷電したアミノ酸を含む V_L と、

20

(b) K a b a t の番号付け方式に従う残基 2 8、3 0、3 1、3 2、3 3 及び 3 5 から成る群から選択される 1 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む V_H を含むライブラリ。

【請求項 2 9】

タンパク質がライブラリの少なくとも 3 0 % を構成する請求項 2 6 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載のライブラリ。

【請求項 3 0】

請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を単離する方法であって、請求項 2 6 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載のライブラリを抗原に接触させることと、それに結合するタンパク質を単離することを含む方法。

30

【請求項 3 1】

抗体軽鎖可変ドメイン (V_L) を含むタンパク質の凝集耐性を高める方法であって、K a b a t の番号付け方式に従う残基 4 9、5 0、5 1、5 2、5 3 及び 5 6 から成る群から選択される 1 以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによって V_L を修飾することを含む方法。

【請求項 3 2】

抗体軽鎖可変ドメイン (V_L) を含むタンパク質の凝集耐性を高める方法であって、K a b a t の番号付け方式に従う残基 4 9 ~ 5 6 の間での 2 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むように V_L を修飾することを含み、未修飾のタンパク質が 2 以上の負に荷電したアミノ酸を含まない方法。

40

【請求項 3 3】

抗体軽鎖可変ドメイン (V_L) と抗体重鎖可変ドメイン (V_H) を含むタンパク質の凝集耐性を高める方法であって、前記方法は、前記タンパク質が、

(i) K a b a t の番号付け方式に従う V_L の残基 4 9 ~ 5 6 の間での 1 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸と、

(i i) K a b a t の番号付け方式に従う V_H の残基 2 8、3 0、3 1、3 2、3 3 及び 3 5 から成る群から選択される 1 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸

を含むように前記タンパク質を修飾することを含み、修飾前のタンパク質は、 V_L 及び V_H のその位置にて負に荷電したアミノ酸を含まない方法。

50

【請求項 34】

(i) K a b a t の番号付け方式に従う V_L の残基 49 ~ 56 の間での 1 以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによって V_L を修飾することと、
 (ii) K a b a t の番号付け方式に従う残基 28、30、31、32、33 及び 35 から成る群から選択される 1 以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによって V_H を修飾すること
 を含む請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

抗体軽鎖可変ドメイン (V_L) と抗体重鎖可変ドメイン (V_H) を含むタンパク質の凝集耐性を高める方法であって、前記方法は、前記タンパク質が、

(i) K a b a t の番号付け方式に従う V_L の残基 49 ~ 56 の間での 2 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸と、
 (ii) K a b a t の番号付け方式に従う V_H の残基 28、30、31、32、33 及び 35 から成る群から選択される 2 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸
 を含むように前記タンパク質を修飾することを含み、修飾前のタンパク質は、 V_L 及び V_H のその位置にて負に荷電したアミノ酸を含まない方法。

【請求項 36】

(i) K a b a t の番号付け方式に従う V_L の残基 49 ~ 56 の間での 2 以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによって V_L を修飾することと、
 (ii) K a b a t の番号付け方式に従う残基 28、30、31、32、33 及び 35 から成る群から選択される 2 以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによって V_H を修飾すること
 を含む請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

V_L がさらに C D R 1 にて 1 以上の負に荷電したアミノ酸を含み、及び / 又は V_H がさらに K a b a t の番号付け方式に従う残基 26、39、40、50、52、52 a 及び 53 から成る群から選択される 1 以上の残基で負に荷電したアミノ酸を含むようにタンパク質を修飾することをさらに含む請求項 33 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 38】

医療における請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のタンパク質又は請求項 24 に記載の組成物の使用。

【請求項 39】

対象における状態を治療する又は予防する方法であって、それを必要とする対象に請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のタンパク質又は請求項 24 に記載の組成物を投与することを含む方法。

【請求項 40】

化合物を細胞に送達する方法であって、前記細胞を請求項 23 に記載のタンパク質又は請求項 24 に記載の組成物に接触させることを含み、前記タンパク質は前記化合物に抱合される方法。

【請求項 41】

対象における状態を診断する又は予後予測する方法であって、タンパク質が抗原に結合し、複合体を形成するように対象に由来する試料を請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のタンパク質又は請求項 24 に記載の組成物に接触させること及び前記複合体を検出することを含み、前記複合体の検出が対象における状態の診断又は予後予測である方法。

【請求項 42】

複合体のレベルを決定することを含み、前記複合体の増強されたレベル又は軽減されたレベルが対象における状態の診断又は予後予測である請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

対象において抗原を局在化する又は検出する方法であって、対象にて請求項 23 に記載のタンパク質又は請求項 24 に記載の組成物を検出する又は局在化することを含み、前記

10

20

30

40

50

タンパク質が検出可能な標識に抱合される方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願

本出願は、「修飾された可変ドメイン分子及びその製造方法3」と題する2011年4月21日に提出されたオーストラリア特許出願第2011901522及び「修飾された可変ドメイン分子及びその製造方法4」と題する2011年11月21日に提出されたオーストラリア特許出願第2011904856の優先権を主張する。これらの出願の内容全体が参照によって本明細書に組み入れられる。

【0002】

配列表

本出願は電子形式にて配列表と共に提出される。配列表の内容全体が参照によって本明細書に組み入れられる。

20

【0003】

本開示は、凝集耐性の抗体可変ドメインを含むタンパク質及びその使用に関する。

【背景技術】

【0004】

抗体及び抗原結合ドメインを含むタンパク質は、研究試薬、診断/予後予測試薬、工業試薬及び治療剤として今や広く使用されている。この広い範囲にわたる適用性は、高度な特異性及び親和性で抗原を結合する抗体及びその抗原結合ドメインを含むタンパク質の能力から生じる。従って、抗体及びその抗原結合ドメインを含むタンパク質は試料中の抗原に特異的に結合することができ、検出、定量を可能にし、又は抗原を発現している細胞を殺傷し、治療上の有効負荷量を送達することを可能にする。しかしながら、それらの汎用性にもかかわらず、抗体のあるサブセットしか診断上/予後予測上/工業的な/治療上の応用に適する生物物理学的特性を有さない。たとえば、治療上又は生体内での診断上の抗体/タンパク質は所望の標的に蓄積するように対象にて長い血清半減期を必要とするので、それらは凝集に耐性でなければならない(Willuda et al., 1999)。工業的な応用は、長い半減期を有し、過酷な条件、たとえば、高温への暴露の後、凝集せずに機能することができる抗体/タンパク質を必要とすることが多い(Harris, 1999)。抗体の可変ドメインを含むタンパク質の凝集は、発現及び/又は精製の困難さ、免疫原性、毒性、分解、損傷した結合活性又は保存後の活性の喪失を招き得る。

30

【0005】

タンパク質の凝集は、折り畳み経路と競合する過程又は折り畳み経路における中間体から生じ得る過程であり、普通、折り畳まれないタンパク質又は部分的に折り畳まれないタンパク質の会合が関与する。凝集への耐性は、自然の状態を安定化する(すなわち、折り畳みがほどけることに抵抗する)ことによって、又はタンパク質の折り畳まれない又は部分的に折り畳まれた状態の凝集する傾向を減らすことによって達成することができる。自然の状態を安定化することの短所は、タンパク質が折り畳まない環境に暴露される可能性が高いことである。一般にタンパク質が変性する又は折り畳まない場合、通常タンパク質の内部で分子内接触に介在するアミノ酸残基が露出する。そのような露出によってタンパク質は分子間接触を形成し、凝集しやすくなる。折り畳みがほどけることに抵抗するタンパク質とは対照的に、折り畳まれない場合凝集する傾向が低いタンパク質はそのような環

40

50

境に暴露された後、生物活性のある非凝集状態に簡単に折り畳み直すであろう。

【0006】

抗体及びその抗原結合ドメインを含むタンパク質の凝集耐性又は凝集傾向は、その中に含有される最も凝集しやすいドメインによって、及び（存在するならば）周囲のドメインとの相互作用の強さによって普通限定される。これは、そのドメインの折り畳みがいったんほどけると、それが折り畳み直すことができなければ、同じタンパク質又は他のタンパク質の他のドメインと相互作用し、凝集を形成し得るからである。抗体の定常ドメインは一般に凝集せず、配列ではさほど変化しない（その名称によって示唆されるように）。従って、抗体の最も弱いドメインは抗体から抗体へと変化する領域、すなわち、可変ドメイン（たとえば、重鎖可変ドメイン（ V_H ）及び/又は軽鎖可変ドメイン（ V_L ））であると一般にみなされる（Ewert et al., 2003）。この点で、さもなければ安定な組換え抗体産物への凝集傾向にある s c F v 分子の組み入れは、新しい組換え設計にこれらの一般に望ましくない形質を付与することが多い。Ewertら、2008が言及したように、「合理的な操作によって準最適な抗体構築物を改善するには、「最弱なリンク」を特定し、改善しなければならない」。Ewertらもまた、可変ドメインが抗体又は抗体関連分子における一般に「最弱なリンク」であることを強調している。従って、可変ドメインを凝集耐性であるように操作することは、その可変ドメインを含むタンパク質全体を凝集耐性にする可能性が最も高い。

10

【0007】

種々の戦略、たとえば、凝集耐性のタンパク質の合理的な設計、相補性決定領域（CDR）の移植、又は可変ドメインへのジスルフィド結合の組み入れが可変ドメインの凝集を低減するために提案されている。

20

【0008】

凝集耐性のタンパク質の合理的な設計には一般に、タンパク質の凝集傾向に対する点突然変異の効果を予測するコンピュータ解析の使用が関与する。しかしながら、このアプローチには幾つかの困難さがある。たとえば、折り畳まれていないタンパク質の凝集を低減する可能性がある変異を単に特定することは十分ではない。むしろ、変異は折り畳まれたタンパク質の凝集を増やしてはならず、又は折り畳まれたタンパク質の機能に影響を及ぼしてはならない。さらに、合理的な設計は、改善される特定のタンパク質の詳細な構造解析を必要とするので、十分に性状分析されていないタンパク質と共に使用するのは難しく、種々の異なったタンパク質に容易には適用できない。

30

【0009】

CDR移植には、1つの可変ドメインから別の可変ドメインのフレームワーク領域（FR）へのCDRの移植が関与する。この戦略は、抗EGP-2のs c F vを安定化するのに有用であることが示された（Willuda et al., 1999）。しかしながら、この戦略は一般に、折り畳み構造がほどけることに抵抗する可変ドメインを作出するのに使用され、上記で議論したように、タンパク質の最も望ましい形態ではない。このアプローチの短所には、CDR移植に続いて生じ得る親和性の低下が挙げられる。親和性のこの喪失は、FRに変異を導入することによって克服することができるが、そのような変異はタンパク質にて免疫原性のエピトープを作出することができ、それによってタンパク質は治療の観点から望ましくなくなる。さらに、CDR移植は一般に移植への好適性を評価するドナーと受容体可変ドメインの結晶構造の解析又は相同性モデル化を必要とする。明らかに、そのようなアプローチは手間がかかり、特殊化した知識を必要とする。さらに、各可変ドメインは異なった構造を有するので、方法は種々の分子全体にわたって容易に適用されない。

40

【0010】

可変ドメインにジスルフィド結合を導入することが関与する方法については、結合はタンパク質が正しく折り畳み直すのを助け得る一方で、それはまた可変ドメインに硬性を導入する。そのような硬性は抗原に対する抗体の親和性を低減することができる。さらに、親和性を失うことなく又は免疫原性エピトープを導入することなく、ジスルフィド結合形成に必要なシステイン残基の導入を可変ドメインのすべてが支えることができるわけでは

50

ない。さらに、高いタンパク質濃度のもとでのジスルフィド結合の形成は、タンパク質の凝集を招き得るので、結合の可能性のある有益な効果を無効にしてしまう。

【0011】

前述のことから明らかなように、凝集耐性の可変ドメインを含有するタンパク質及びその製造方法に対する当該技術におけるニーズがある。好ましくは、方法は種々の異なる可変ドメインに容易に適用可能である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明に至る作業中、本発明者らは、たとえば、熱又は濃縮に暴露した後、凝集に対する耐性を付与する、抗体の可変ドメインにおけるアミノ酸残基を特定しようとした。そのような凝集耐性のタンパク質は種々の適用、たとえば、治療及び/又は診断/予後予測に有用である。(たとえば、凍結乾燥による)濃縮の間又は濃縮後の凝集を低減する能力はまた、たとえば、凍結乾燥されたタンパク質として操作され得る治療用タンパク質の製造及び/又は保存に利益を提供する。本発明者らは、負に荷電したアミノ酸をV_Lに導入し、凝集耐性を付与する多数の残基を特定した。本発明者らによって特定された残基は、V_Lの相補性決定領域2(CDR2)の中に又はそれに隣接して存在する。本発明者らは、V_LのCDR2における単一の負に荷電したアミノ酸残基が可変ドメインにて凝集耐性を付与することを確定した。本発明者らはさらに、V_LのCDR2における2以上の負に荷電したアミノ酸を含めることによって、それらが凝集耐性のレベルをさらに高め得ることを見出した。本発明者らはまた、それらが、凝集耐性を高めるように事前に存在するV_Lを修飾し、抗原に結合する能力を維持することができることを見出した。本発明者らはまた、V_L又はscFvの抗原への親和性を有意に低下させることなく、凝集耐性を高めるように事前に存在するV_L(単独で又はscFvにて)を修飾することができることを見出した。

10

20

【0013】

本発明者らは、CDR2にて又はそれに隣接する1以上の負に荷電したアミノ酸を伴ったV_Lと、Kabatの番号付け方式に従うアミノ酸28~35に及ぶ領域で1以上の負に荷電したアミノ酸を含む凝集耐性のV_Hを含むタンパク質を作出した。本発明者らは、これらのタンパク質が高い凝集耐性を示し、抗原に結合する能力を保持することを見出した。

30

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者らによって特定された残基の多くは抗体のCDRにあるので、様々な抗体間、たとえば、異なったフレームワーク領域を含む異なるクラス又はサブクラスの抗体間で容易に転移可能である。これは、抗体の可変ドメインがCDRにて配列の変異を収容するように選択されてきたのに対して、フレームワーク領域は一般にCDRループを提示するための足場を提供するので有意に変化しないからである。

【0015】

本発明者らによる知見は、凝集耐性である修飾されたV_Lを含有するタンパク質(又はV_L及びV_Hを含有するタンパク質)の基準及びその様々な使用を提供する。

40

【0016】

従って、本開示は、Kabatの番号付け方式に従う残基49と56の間での1以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むV_Lを含む単離されたタンパク質を提供し、該タンパク質は抗原に特異的に結合することが可能である。

【0017】

一例では、タンパク質はCDR1にて荷電した残基を含むV_Hをさらに含む。

【0018】

本開示はさらに又は代わりに、Kabatの番号付け方式に従う残基49と56の間での2以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むV_Lを含む単離されたタンパク質を提供

50

し、該タンパク質は抗原に特異的に結合することが可能である。

【0019】

一例では、タンパク質はCDR1にて荷電した残基を含むV_Hをさらに含む。

【0020】

本開示はさらに、

(i) Kabatの番号付け方式に従う残基49～56の間での1以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むV_Lと

(ii) Kabatの番号付け方式に従う残基28、30、31、32、33及び35から成る群から選択される1以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むV_H

を含む単離されたタンパク質を提供し、該タンパク質は抗原に特異的に結合することが可能である。

10

【0021】

一例では、タンパク質は、Kabatの番号付け方式に従う、V_Lの残基49～56の間での2以上の位置にて負に荷電したアミノ酸及びV_Hの残基28、30、31、32、33及び35から成る群から選択される2以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む。

【0022】

本開示はさらに、

(i) Kabatの番号付け方式に従う残基49～56の間での2以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むV_Lと

(ii) Kabatの番号付け方式に従う残基28、30、31、32、33及び35から成る群から選択される2以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むV_H

を含む単離されたタンパク質を提供し、該タンパク質は抗原に特異的に結合することが可能である。

20

【0023】

一例では、V_Lは、Kabatの番号付け方式に従う残基49、50、51、52、53、及び56から成る群から選択される1以上(又は2以上)の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む。

【0024】

一例では、V_Lは、Kabatの番号付け方式に従う残基49、50、51、52、及び53から成る群から選択される1以上(又は2以上)の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む。

30

【0025】

一例では、V_Lは、Kabatの番号付け方式に従うCDR2の中での1以上(又は2以上)の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む。

【0026】

負に荷電したアミノ酸が凝集耐性を付与するV_L内の例となる位置は、Kabatの番号付け方式に従う残基50、51、52、及び53及びそれらの組み合わせから成る群から選択される。

【0027】

負に荷電したアミノ酸が凝集耐性を付与するV_L内の位置の例となる組み合わせは、

(i) Kabatの番号付け方式に従う50と51；

(ii) Kabatの番号付け方式に従う50と52；

(iii) Kabatの番号付け方式に従う50と53；

(iv) Kabatの番号付け方式に従う51と52；

(v) Kabatの番号付け方式に従う52と53；

(vi) Kabatの番号付け方式に従う50と51と53；

(vii) Kabatの番号付け方式に従う51と52と53；

(viii) Kabatの番号付け方式に従う50と52と53；

(ix) Kabatの番号付け方式に従う50と51と52と53

から成る群から選択される。

40

50

【0028】

一例では、V_LはKabatの番号付け方式に従う50位と52位と53位にて負に荷電したアミノ酸を含む。

【0029】

一例では、V_LはさらにCDR1又はCDR2にて荷電した残基を含む。

【0030】

一例では、V_Lはさらに、Kabatの番号付け方式に従うCDR1における1以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む。例となる位置は、

(i) Kabatの番号付け方式に従う24位；

(ii) Kabatの番号付け方式に従う29位；

(iii) Kabatの番号付け方式に従う30位と31位；

(iv) Kabatの番号付け方式に従う31位と32位

から成る群から選択される。

【0031】

別の例では、タンパク質はさらに、Kabatの番号付け方式に従うV_Hの残基26、39、40、50、52、52a及び53から成る群から選択される1以上の残基にて負に荷電したアミノ酸を含む。

【0032】

追加の又は代替の例では、タンパク質は凝集耐性のV_Lと、任意で凝集耐性のV_Hを含む。

【0033】

一例では、負に荷電したアミノ酸残基は、本明細書に記載される領域内で表面に露出した残基である。この例によれば、タンパク質は、Kabatの番号付け方式に従うV_Lの54位で負に荷電したアミノ酸を含まない。

【0034】

一例では、負に荷電したアミノ酸残基は、抗原と直接相互作用しない、又は抗原との結合を形成しない、又は抗原と直接相互作用しない若しくは抗原との結合を形成しないと予測される残基に位置づけされる。相互作用又は結合形成を判定する方法は技量のある熟練者に明らかであろうし、それには、たとえば、分子モデル化又はX線結晶試験が挙げられる。

【0035】

一例では、タンパク質は、上記で議論した負に荷電したアミノ酸を伴わないタンパク質に比べて凝集する傾向が低下している。たとえば、タンパク質は、負に荷電したアミノ酸を伴わないタンパク質に比べて少なくとも約60 又は70 又は好ましくは80 に加熱した後、凝集する傾向が低い。

【0036】

一例では、タンパク質は、少なくとも約60 又は70 又は好ましくは80 に加熱した後、抗原に特異的に結合する能力を保持する。

【0037】

別の例では、タンパク質は、濃縮の後、たとえば、凍結乾燥又は透析濾過による濃縮の後、凝集する低い傾向を有する。一例では、濃縮は、乾燥を含む。別の例では、濃縮は、タンパク質が少なくとも50%又は60%又は70%又は80%又は85%含有される組成物の体積を減らすことを含む。

【0038】

たとえば、開示のタンパク質は、凍結乾燥及び再構成に続いて凝集する低い傾向を有する。たとえば、開示のタンパク質は、凍結乾燥及び再構成に続いて、負に荷電したアミノ酸を欠くタンパク質よりも10%又は20%又は30%又は40%又は50%又は60%又は70%又は80%又は90%少なく凝集し、その際、凝集は、濁度、たとえば、320nmでの吸収を測定することによって測定する。

【0039】

10

20

30

40

50

別の例では、開示のタンパク質は、透析濾過に続いて凝集する低い傾向を有する。たとえば、開示のタンパク質は、透析濾過に続いて、負に荷電したアミノ酸を欠くタンパク質よりも10%又は20%又は30%又は40%又は50%又は60%又は70%又は80%又は90%少なく凝集し、その際、凝集は、濁度、たとえば、320nmでの吸収を測定することによって測定する。

【0040】

一例では、タンパク質は、ヒトタンパク質に結合する（好ましくは特異的に結合する）ことが可能である。

【0041】

別の例では、タンパク質は、ヒトの状態に関連する又はヒトの状態の原因となるタンパク質に結合する（好ましくは特異的に結合する）ことが可能である。そのようなタンパク質は、ヒトのタンパク質又は、たとえば、病原性生物に由来するタンパク質であり得る。一例ではタンパク質は、ヒトのタンパク質であることができる。例となるタンパク質は、可溶性である及び/又は分泌されたタンパク質又は受容体（たとえば、受容体の細胞外ドメイン）又は膜結合性タンパク質（たとえば、膜結合性タンパク質の細胞外ドメイン）である。

10

【0042】

一例では、負に荷電したアミノ酸はグルタミン酸である。別の例では、負に荷電したアミノ酸はアスパラギン酸である。

【0043】

一例では、V_Lにおける負に荷電したアミノ酸はアスパラギン酸である。

20

【0044】

一例では、V_Hの28位及び/又は30位及び/又は31位及び/又は33位及び/又は35位における負に荷電したアミノ酸はアスパラギン酸である。

【0045】

一例では、V_Hの32位における負に荷電したアミノ酸はアスパラギン酸又はグルタミン酸である。

【0046】

例となる形態では、タンパク質は、Kabatの番号付け方式に従うV_Hの32位及び33位にて負に荷電したアミノ酸を含む。別の例となる形態では、タンパク質は、Kabatの番号付け方式に従うV_Hの31位及び32位及び33位にて負に荷電したアミノ酸を含む。

30

【0047】

例となる形態の1つでは、開示のタンパク質は、V_Lの52位及び/又は53位にて負に荷電したアミノ酸及びV_Hの30位にて負に荷電したアミノ酸を含む。一例では、負に荷電したアミノ酸はアスパラギン酸である。

【0048】

V_Hにおける負に荷電したアミノ酸の追加の例となる位置は、共所有され、同時係属である国際出願番号PCT/AU2010/001416に記載されており、その内容すべてが参照によって本明細書に組み入れられる。

40

【0049】

本開示はまた、改善された凝集耐性を有する既存のタンパク質の修飾された形態を製造するのにも有用である。従って、本開示はさらに、抗原に特異的に結合することが可能である修飾されたV_Lを含むタンパク質を提供し、その際、V_LはKabatの番号付け方式に従う残基49、50、51、52、53及び56から成る群から選択される1以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含み、V_Lの未修飾の形態は負に荷電したアミノ酸を含まない。

【0050】

本開示はさらに、抗原に特異的に結合することが可能である修飾されたV_Lを含むタンパク質を提供し、その際、V_LはKabatの番号付け方式に従う残基49~56の間で

50

の2以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含み、 V_L の未修飾の形態はその位置にて2以上の負に荷電したアミノ酸を含まない。

【0051】

本開示はさらに、

(i) V_L の未修飾の形態がその位置にて負に荷電したアミノ酸を含まない、Kabatの番号付け方式に従う残基49～56の間での1以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む修飾された V_L ；と

(ii) V_H の未修飾の形態がその位置にて負に荷電したアミノ酸を含まない、Kabatの番号付け方式に従う残基28、30、31、32、33及び35から成る群から選択される1以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む修飾された V_H を含むタンパク質を提供し、その際、修飾されたタンパク質は抗原に特異的に結合することが可能である。

10

【0052】

本開示はさらに、

(i) Kabatの番号付け方式に従う残基49～56の間での1以上の位置にて少なくとも1つの負に荷電したアミノ酸を含む V_L ；と

(ii) Kabatの番号付け方式に従う残基28、30、31、32、33及び35から成る群から選択される1以上の位置にて少なくとも1つの負に荷電したアミノ酸を含む V_H を含むように修飾されたタンパク質を提供し、その際、未修飾のタンパク質は、 V_L にて負に荷電したアミノ酸及び V_H にて負に荷電したアミノ酸を含まず、修飾されたタンパク質は抗原に特異的に結合することが可能である。

20

【0053】

一例では、未修飾のタンパク質は修飾されたタンパク質と同一の抗原（たとえば、同一のエピトープ）に結合する。

【0054】

一例では、抗原に結合する修飾されたタンパク質の親和性定数(KD)は、未修飾のタンパク質の約50%又は40%又は30%又は20%又は10%以内である。一例では、抗原に結合する修飾されたタンパク質の親和性定数(KD)は、未修飾のタンパク質の約5%以内である。

30

【0055】

一例では、抗原に結合する修飾されたタンパク質の会合速度(K_a)は未修飾のタンパク質の約50%又は40%又は30%又は20%又は10%以内である。一例では、抗原に結合する修飾されたタンパク質の会合速度(K_a)は未修飾のタンパク質の約5%以内である。

【0056】

一例では、抗原に結合する修飾されたタンパク質の解離速度(K_d)は未修飾のタンパク質の約50%又は40%又は30%又は20%又は10%以内である。一例では、抗原に結合する修飾されたタンパク質の解離速度(K_d)は未修飾のタンパク質の約5%以内である。

40

【0057】

一例では、タンパク質は、修飾された凝集耐性の V_L と、任意で修飾された凝集耐性の V_H を含む。

【0058】

そのようなタンパク質の例となる特徴（たとえば、負に荷電したアミノ酸及び/又は特定の負に荷電したアミノ酸についての追加の部位）は本明細書に記載され、開示の本形態に準用して適用されるように解釈されるべきである。

【0059】

一例では、タンパク質は抗体である。

【0060】

50

一例では、任意の実施例に従って本明細書に記載されるようなタンパク質は、たとえば、C D R 3 内にて C D R の範囲内でのジスルフィド結合、たとえば、C D R 内ジスルフィド結合を含まない。

【0061】

別の例では、任意の実施例に従って本明細書に記載されるようなタンパク質の中での可変ドメインは全体的に酸性の等電点を有さない。

【0062】

本開示の例となるタンパク質は、ヒトのタンパク質、ヒト化タンパク質、脱免疫化タンパク質又はヒトタンパク質若しくはその領域に融合されたタンパク質（たとえば、キメラ抗体）である。

【0063】

一例では、本開示のタンパク質は、単一ドメイン抗体（d A b）の形態又は別のタンパク質（たとえば、F c 領域又は免疫エフェクター細胞に結合することが可能であるタンパク質）に融合された d A b の形態である。

【0064】

代わりの例では、本開示のタンパク質は、V_L と V_H を含み、その際、V_H と V_L は会合して F v を形成する（たとえば、抗原結合部位を含む）。一例では、F v は抗原を特異的に結合することが可能である。

【0065】

一例では、V_H 及び V_L は異なるポリペプチド鎖に存在する。たとえば、タンパク質は、抗体、二価抗体、三価抗体、四価抗体又は F v の形態である。

【0066】

別の例では、V_H 及び V_L は同一のポリペプチド鎖に存在する。たとえば、タンパク質は、(s c F v)_n 又は (s c F v)_n を含む融合タンパク質の形態であり、n は、たとえば、1 ~ 10 の間の数である。

【0067】

一例では、タンパク質は、約 10 μ M 又は 5 μ M 未満、たとえば、1 μ M 未満、たとえば、500 n M 未満、たとえば、100 n M 未満のような 200 n M 未満、たとえば、1 n M 未満のような 10 n M 未満の親和性定数（K_D）にて標的抗原又はエピトープに特異的に結合する。

【0068】

代わりの又は追加の例では、本明細書で議論されるタンパク質は、100 p M のような、たとえば、1 p M のような 10 p M 未満の親和性定数（K_D）にて標的抗原又はエピトープに特異的に結合する。

【0069】

追加の又は代わりの例では、本開示のタンパク質は、300 n M 以下、300 n M ~ 5 p M、好ましくは 50 n M ~ 20 p M、又は 5 n M ~ 200 p M 又は 1 n M ~ 100 p M の K_D にて標的抗原から解離する。

【0070】

一例では、任意の実施例に従って本明細書に記載されるタンパク質は、残基 49 ~ 56 の間で少なくとも 1 又は 2 の負に荷電したアミノ酸又は少なくとも約 80 % それに同一である配列を含むように修飾された配列番号 1、3、7 又は 11（たとえば、7 又は 11）のいずれか 1 つで示される配列を含む V_L を含む。

【0071】

一例では、任意の実施例に従って本明細書に記載されるタンパク質は、配列番号 9 に示される配列を含む V_L 及び V_H を含み、その際、V_L は残基 49 ~ 56 の間で少なくとも 1 又は 2 の負に荷電したアミノ酸又は少なくとも約 80 % それに同一である配列を含むように修飾され、任意で V_H は、K a b a t の番号付け方式に従う V_H の残基 28、30、31、32、33 及び 35 から成る群から選択される 1 以上又は 2 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むように修飾される。

10

20

30

40

50

【0072】

一例では、任意の実施例に従って本明細書に記載されるタンパク質は、配列番号13に示される配列を含むV_L及びV_Hを含み、その際、V_Lは残基49～56の間で少なくとも1又は2の負に荷電したアミノ酸又は少なくとも約80%それに同一である配列を含むように修飾され、任意でV_Hは、Kabatの番号付け方式に従うV_Hの残基28、30、31、32、33及び35から成る群から選択される1以上又は2以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むように修飾される。

【0073】

任意で、前述の3つの段落にて記載されたタンパク質はV_LにおけるN末端のグルタミンについて置換されたアスパラギン酸を含む。

10

【0074】

一例では、任意の実施例に従って本明細書に記載されるタンパク質は、Kabatの番号付け方式に従う残基49～56の間で少なくとも1又は2の負に荷電したアミノ酸を含むように修飾された配列番号11に示される配列を含むV_Lを含み、該タンパク質はヒト表皮増殖因子受容体2(HER2)に特異的に結合する。

【0075】

一例では、タンパク質は、Kabatの番号付け方式に従う52位又は53位又は52位と53位双方にて負に荷電したアミノ酸を含む。

【0076】

一例では、タンパク質はさらに、Kabatの番号付け方式に従う残基28、30、31、32、33及び35から成る群から選択される1以上又は2以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むように修飾された配列番号13に示される配列を含むV_Hを含む。

20

【0077】

一例では、V_Hは30位にて負に荷電したアミノ酸を含む。

【0078】

本開示はまた、化合物に抱合された本開示のタンパク質を提供する。たとえば、化合物は、放射線同位元素、検出可能な標識、治療用化合物、コロイド、毒素、核酸、ペプチド、タンパク質、対象にて当該タンパク質の半減期を高める化合物及びそれらの混合物から成る群から選択される。

【0079】

本開示はまた、本開示のタンパク質及び薬学上許容可能なキャリアを含む組成物を提供する。

30

【0080】

本開示はさらに本開示のタンパク質をコードする核酸を提供する。一例では、核酸は発現構築物の中にあり、操作可能にプロモータに連結される。たとえば、発現構築物は発現ベクターである。

【0081】

本開示はまた、本開示のタンパク質を発現する細胞も提供する。たとえば、細胞は、本開示の核酸又は発現構築物を含む。例となる細胞には哺乳類細胞、植物細胞、真菌細胞及び原核細胞が挙げられる。

40

【0082】

本開示はまた、本開示のタンパク質を製造する方法も提供し、該方法は、コードされたタンパク質が産生されるのに十分な条件下(又は産生されるような条件下)にてある時間、本開示の発現構築物を維持することを含む。たとえば、方法は、本開示のタンパク質が産生されるのに十分な条件下(又は産生されるような条件下)にてある時間、本開示の細胞を培養することを含む。

【0083】

一例では、方法はさらに本開示のタンパク質を単離することを含む。一例では、方法はさらにタンパク質を単離する前、その間、又はその後、少なくとも約50 又は60 又は70 又は80 にタンパク質を加熱することを含む。たとえば、発現及び精製の過程

50

で自然に生じる二量体及び/又は三量体の量をそれによって減らすように加熱する。そのような方法は本開示のタンパク質の高いレベルの回収を円滑にする。

【0084】

任意で、方法はさらに、タンパク質を化合物に抱合する又は化合物を医薬組成物に製剤化することを含む。

【0085】

本開示はさらに、本開示のタンパク質を複数含むライブラリを提供する。

【0086】

本開示はまた、 V_L を含むタンパク質を含むライブラリも提供し、 V_L は、Kabatの番号付け方式に従う残基49～56の間での2以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む。

10

【0087】

本開示はさらに、抗体軽鎖可変ドメイン(V_L)及び抗体重鎖可変ドメイン(V_H)を含むタンパク質を含むライブラリを提供し、該タンパク質は、

(a) Kabatの番号付け方式に従う残基49～56の間での1以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む V_L と、

(b) Kabatの番号付け方式に従う残基28、30、31、32、33及び35から成る群から選択される1以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含む V_H を含む。

【0088】

一例では、ライブラリにおけるタンパク質の少なくとも30% (又は40%又は50%又は60%又は70%又は80%又は90%又は95%又は98%又は99%)が負に荷電したアミノ酸を含む。

20

【0089】

本開示はまた、 V_L を含むタンパク質を含むライブラリを提供し、 V_L の少なくとも30% (又は40%又は50%又は60%又は70%又は80%又は90%又は95%又は98%又は99%)は、本明細書に記載されるように負に荷電したアミノ酸を含む。タンパク質はさらに本明細書に記載される位置にて負に荷電したアミノ酸を含む V_H を含むことができる。

【0090】

一例では、タンパク質は粒子(たとえば、ファージ又はリボゾーム)又は細胞の表面で表示される。

30

【0091】

一例では、上記に記載されるように位置づけられる負に荷電したアミノ酸以外の V_L 及び V_H (存在すれば)のCDRにおける(たとえば、CDR3における、又はCDR1と3における、又はCDR1と2と3における)アミノ酸は無作為又は半無作為であり、又はヒト抗体に由来する。

【0092】

明らかに、本開示はライブラリをコードする核酸のライブラリも提供する。

【0093】

本開示はさらに、本開示のタンパク質を単離する方法を提供し、該方法は、タンパク質が抗原に結合するのに十分な条件下(結合するような条件下)である時間、本開示のライブラリを抗原に接触させること、及びタンパク質を単離することを含む。

40

【0094】

本開示はさらに、本開示のタンパク質を複数含むライブラリを製造する方法を提供し、該方法は、

(i) 上記で議論した位置にて負に荷電したアミノ酸を含む V_L を含む複数のタンパク質をコードするアミノ酸を入手すること又は作製することと;

(ii) 以下の操作可能に連結された核酸:

(a) プロモータ、

(b) (i)にて入手した又は作製した核酸、及び

50

(c) 細胞又は粒子にて V_L を含有するタンパク質の発現を円滑にするポリペプチドをコードする核酸を含む発現構築物を作製することと；

(iii) 細胞又は粒子にて発現されるように発現構築物によってコードされたタンパク質を発現することを含む。

【0095】

一例では、負に荷電したアミノ酸以外の V_L の CDR における（たとえば、CDR 3 における、又は CDR 1 と 3 における、又は CDR 1 と 2 と 3 における）アミノ酸は無作為又は半無作為であり、又はヒト抗体に由来する。

【0096】

一例では、方法はさらにタンパク質をコードする核酸を単離することを含む。そのような核酸は発現構築物に導入することができる。任意でタンパク質を発現させることができる。

【0097】

一例では、方法はさらに V_L を含むタンパク質を 1 つ又は複数、熱に暴露すること及び/又はタンパク質を濃縮することと、負に荷電したアミノ酸を欠く対照タンパク質に比べて凝集する傾向が低下しているタンパク質を選択することを含む。

【0098】

本開示はまた、たとえば、親和性成熟及び/又はヒト化及び/又は脱免疫化のような、単離されたタンパク質への修飾を熟考する。

【0099】

そのような単離されたタンパク質を使用して、たとえば、抗体を作出することができる。

【0100】

本開示はまた、既存の抗体又は V_L を含み、任意で V_H を含むタンパク質の凝集傾向を低下させること又は凝集耐性を高めることにも有用である。たとえば、本開示は、 V_L を含むタンパク質の凝集耐性を高める方法を提供し、方法は、Kabat の番号付け方式に従う残基 49、50、51、52、53 及び 56 から成る群から選択される 1 以上の位置におけるアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによって V_L を修飾することを含む。

【0101】

本開示はさらに、 V_L を含むタンパク質の凝集耐性を高める方法を提供し、方法は、Kabat の番号付け方式に従う残基 49 ~ 56 の間での 2 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むように V_L を修飾することを含み、その際、未修飾のタンパク質は、Kabat の番号付け方式に従う CDR 2 の中に 2 以上の負に荷電したアミノ酸を含まない。

【0102】

本開示はさらに、 V_L 及び V_H を含むタンパク質の凝集耐性を高める方法を提供し、方法は、

(i) Kabat の番号付け方式に従う V_L の残基 49 ~ 56 の間での 1 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸と、

(ii) Kabat の番号付け方式に従う V_H の残基 28、30、31、32、33 及び 35 から成る群から選択される 1 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むようにタンパク質を修飾することを含み、修飾前のタンパク質は、 V_L 及び V_H のその位置にて負に荷電したアミノ酸を含まない。

【0103】

一例では、方法は、

(i) Kabat の番号付け方式に従う V_L の残基 49 ~ 56 の間での 1 以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによって V_L を修飾することと、

(ii) Kabat の番号付け方式に従う残基 28、30、31、32、33 及び 35 から成る群から選択される 1 以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによって V_H を修飾すること

10

20

30

40

50

を含む。

【0104】

本開示はさらに、 V_L 及び V_H を含むタンパク質の凝集耐性を高める方法を提供し、方法は、

(i) K a b a t の番号付け方式に従う V_L の残基 49 ~ 56 の間での 2 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸と、

(ii) K a b a t の番号付け方式に従う V_H の残基 28、30、31、32、33 及び 35 から成る群から選択される 2 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むようにタンパク質を修飾することを含み、修飾前のタンパク質は、 V_L 及び V_H のその位置にて負に荷電したアミノ酸を含まない。

10

【0105】

たとえば、方法は、

(i) K a b a t の番号付け方式に従う V_L の残基 49 ~ 56 の間での 2 以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによって V_L を修飾することと、

(ii) K a b a t の番号付け方式に従う残基 28、30、31、32、33 及び 35 から成る群から選択される 2 以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによって V_H を修飾すること

を含む。

【0106】

一例では、方法はさらに、 V_L が C D R 1 にて 1 以上の負に荷電したアミノ酸をさらに含み、及び / 又は V_H が K a b a t の番号付け方式に従う残基 26、39、40、50、52、52 a 及び 53 から成る群から選択される 1 以上の残基にて負に荷電したアミノ酸をさらに含むようにタンパク質を修飾することを含む。

20

【0107】

修飾の追加の部位及び / 又は置換され得る特定のアミノ酸残基は、本明細書に記載され、本実施例に準用して適用されるように解釈されるべきである。

【0108】

一例では、方法は、タンパク質から V_L (及び任意で V_H) を単離することと、本開示の方法に従って V_L (及び任意で V_H) を修飾することと、 V_L (及び任意で V_H) を含むタンパク質を作出することを含む。たとえば、方法は、抗体から V_L (及び任意で V_H) を単離することと、本開示の方法に従って V_L (及び任意で V_H) を修飾することと、修飾された V_L (及び任意で V_H) を含む抗体を作出することを含む。

30

【0109】

一例では、方法はさらに修飾されたタンパク質の抗原に結合する能力を判定することを含む。一例では、方法はさらに、たとえば、未修飾のタンパク質に類似した(たとえば、約 10% 以内)親和性(たとえば、3/4、K a 及び / 又は 3/4)を持つ抗原に結合する修飾されたタンパク質を選択することを含む。

【0110】

一例では、本開示の方法はさらに、本開示に係る同一の以下の修飾を含む V_L (及び任意で V_H) 又はタンパク質を親和性成熟させること及び / 又はタンパク質を脱免疫化させること及び / 又はタンパク質をキメラ化させることを含む。

40

【0111】

一例では、方法はさらに、修飾されたタンパク質を熱に暴露すること及び / 又はタンパク質を濃縮することと、未修飾のタンパク質に比べて凝集する傾向が低いタンパク質を選択することを含む。

【0112】

一例では、本開示の方法は、 V_L (及び任意で V_H) に追加のアミノ酸を挿入する(置換することに対抗して)ことを含まない。

【0113】

上述の方法は、タンパク質の発現を高める及び / 又はわずかな凝集と共に高い濃度で保

50

存が可能なタンパク質を製造する及び/又はクロマトグラフィ樹脂からのタンパク質の回収を増やす又はクロマトグラフィ樹脂からタンパク質を回収することを必要とする溶液の体積を減らす方法を準用して適用されると解釈されるべきである。

【0114】

たとえば、本開示は、抗体V_Lを含む可溶性タンパク質の生産のレベルを高める方法を提供し、該方法は、K a b a tの番号付け方式に従う残基51、52及び53から成る群から選択される1以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによってV_Lを修飾することを含み、その際、産生される可溶性タンパク質のレベルは、負に荷電したアミノ酸を欠くタンパク質の産生レベルに比べて高められる。

【0115】

本開示はさらに抗体V_Lを含む可溶性タンパク質の産生のレベルを高める方法を提供し、該方法は、K a b a tの番号付け方式に従う残基49～56の間での2以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むようにV_Lを修飾することを含み、その際、未修飾のタンパク質はK a b a tの番号付け方式に従うC D R 2の中で2以上の負に荷電したアミノ酸を含まず、産生される可溶性タンパク質のレベルは、負に荷電したアミノ酸を欠くタンパク質の産生レベルに比べて高められる。

【0116】

本開示はさらに抗体V_L及びV_Hを含む可溶性タンパク質の産生のレベルを高める方法を提供し、方法は、

(i) K a b a tの番号付け方式に従うV_Lの残基49～56の間での1以上の位置にて負に荷電したアミノ酸と

(ii) K a b a tの番号付け方式に従うV_Hの残基28、30、31、32、33及び35から成る群から選択される1以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むようにタンパク質を修飾することを含み、その際、修飾前のタンパク質は、V_L及びV_Hのその位置にて負に荷電したアミノ酸を含まず、産生される可溶性タンパク質のレベルは、負に荷電したアミノ酸を欠くタンパク質の産生レベルに比べて高められる。

【0117】

一例では、方法は、

(i) K a b a tの番号付け方式に従うV_Lの残基49～56の間での1以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによってV_Lを修飾することと、

(ii) K a b a tの番号付け方式に従う残基28、30、31、32、33及び35から成る群から選択される1以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによってV_Hを修飾することを含む。

【0118】

本開示はまた、クロマトグラフィ樹脂からタンパク質を回収するのに必要とされる溶液の体積を減らす方法も提供し、該方法は、任意の実施例に従って本明細書に記載されるようにタンパク質又は修飾されたタンパク質でクロマトグラフィを実施することを含む。

【0119】

本開示はまた、クロマトグラフィ樹脂から抗体V_Lを含むタンパク質を回収するのに必要とされる溶液の体積を減らす方法も提供し、該方法は、K a b a tの番号付け方式に従う残基51、52及び53から成る群から選択される1以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによってタンパク質のV_Lを修飾することを含み、その際、クロマトグラフィ樹脂からタンパク質を回収するのに必要とされる溶液の体積のレベルは、負に荷電したアミノ酸を欠くタンパク質の体積と比べて低下する。

【0120】

本開示はまた、クロマトグラフィ樹脂から抗体V_Lを含むタンパク質を回収するのに必要とされる溶液の体積を減らす方法も提供し、該方法は、K a b a tの番号付け方式に従う残基49～56の間での2以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むようにV_Lを修飾すること、及びクロマトグラフィを実施することを含み、その際、未修飾のタンパク質

10

20

30

40

50

は K a b a t の番号付け方式に従う C D R 2 の中で 2 以上の負に荷電したアミノ酸を含まず、タンパク質を回収するのに必要とされる溶液の体積は、負に荷電したアミノ酸を欠くタンパク質の体積と比べて低下する。

【 0 1 2 1 】

本開示はさらに、クロマトグラフィ樹脂から抗体 V_L 及び V_H を含むタンパク質を回収するのに必要とされる溶液の体積を減らす方法を提供し、該方法は、

(i) K a b a t の番号付け方式に従う V_L の残基 4 9 ~ 5 6 の間での 1 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸と

(i i) K a b a t の番号付け方式に従う V_H の残基 2 8、3 0、3 1、3 2、3 3 及び 3 5 から成る群から選択される 1 以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を含むようにタンパク質を修飾すること、及びクロマトグラフィを実施することを含み、その際、修飾前のタンパク質は、 V_L 及び V_H のその位置にて負に荷電したアミノ酸を含まず、タンパク質を回収するのに必要とされる溶液の体積は、負に荷電したアミノ酸を欠くタンパク質の体積と比べて低下する。

10

【 0 1 2 2 】

一例では、方法は、

(i) K a b a t の番号付け方式に従う V_L の残基 4 9 ~ 5 6 の間での 1 以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによって V_L を修飾することと、

(i i) K a b a t の番号付け方式に従う残基 2 8、3 0、3 1、3 2、3 3 及び 3 5 から成る群から選択される 1 以上の位置でのアミノ酸を負に荷電したアミノ酸で置換することによって V_H を修飾すること

20

を含む。

【 0 1 2 3 】

一例では、クロマトグラフィはサイズ排除クロマトグラフィ又は結合溶出クロマトグラフィである。

【 0 1 2 4 】

本開示はまた医療における本開示のタンパク質又は本開示の組成物の使用を提供する。

【 0 1 2 5 】

本開示はまた対象における状態を治療する又は予防する方法も提供し、該方法は、それを必要とする対象に本開示のタンパク質又は組成物を投与することを含む。一例では、対象は癌及び / 又は炎症性疾患及び / 又は自己免疫疾患及び / 又は神経学的疾患を病んでいる。

30

【 0 1 2 6 】

本開示はまた、状態を治療する又は予防するための薬物の製造における本開示のタンパク質の使用も提供する。

【 0 1 2 7 】

本開示はまた、化合物を細胞に送達する方法も提供し、該方法は本開示のタンパク質又は組成物に細胞を接触させることを含む。

【 0 1 2 8 】

本開示はまた、対象における状態を診断する又は予後予測する方法を提供し、該方法は、タンパク質が抗原に結合し、複合体を形成するように対象に由来する試料を本開示のタンパク質又は組成物に接触させることと、該複合体を検出することを含み、その際、複合体の検出が対象における状態の診断又は予後予測である。一例では、方法は、複合体のレベルを測定することを含み、その際、前記複合体の増大したレベル又は低下したレベルが対象における状態の診断又は予後予測である。

40

【 0 1 2 9 】

本開示はさらに対象における抗原を局在化する又は検出する方法を提供し、前記方法は、

(i) タンパク質が抗原に結合するように本開示のタンパク質又は組成物を対象に投与することと、

50

(i i) 生体内で検出可能な標識を局在化する又は検出することを含み、タンパク質は検出可能な標識に抱合される。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 3 0 】

【図 1】 C D R 1 にて単一の負に荷電したアミノ酸の交換及びその組み合わせを含む D P K 9 由来の V_L の凝集耐性を示すグラフである。置換の位置取りは X 軸上で示す。Y 軸は、本明細書で例示されるファージでの「加熱/冷却」アッセイに供した場合の保持されたタンパク質 L の結合の比率を示す。D P K 9 は低レベルの凝集耐性を有する V_L の例である。

【図 2】 残基 4 9 ~ 5 6 の間で単一の負に荷電したアミノ酸（アスパラギン酸）の交換及びその組み合わせを含む D P K 9 由来の V_L の凝集耐性を示すグラフである。置換の位置取りは X 軸上で示す。Y 軸は、本明細書で例示されるファージでの「加熱/冷却」アッセイに供した場合の保持されたタンパク質 L の結合の比率を示す。

【図 3】 5 2 位及び 5 3 位にて負に荷電したアミノ酸を含む V_L のライブラリの個々のメンバーの凝集耐性を示すグラフである。野生型可変ドメイン（W T）の凝集耐性も示す。Y 軸は、未処理の対照に比したファージでの加熱した及び冷却した可変ドメインのタンパク質 L への結合の比率を示す。*** p < 0 . 0 0 1

【図 4 A】 8 5 に加熱した後の V_L の濁度を示すグラフである。負に荷電したアミノ酸を含まない V_L（D P K 9）、負に荷電したアミノ酸を 1 つ含む V_L（5 0 D、5 1 D、5 2 D 又は 5 3 D）、負に荷電したアミノ酸を 2 つ含む V_L（5 0 / 5 2 D D、5 0 / 5 3 D D、5 1 / 5 3 D D、5 2 / 5 3 D D）及び負に荷電したアミノ酸を 3 つ含む V_L（5 0 ~ 5 3 D A D D）及び負に荷電したアミノ酸を 4 つ含む V_L（5 0 ~ 5 3 D D D D）を用いて生成した結果を示す。X 軸は V_L が 8 5 で維持される時間を示す。Y 軸は 3 6 0 n m で測定した吸収を示す。

【図 4 B】 1 0 0 μ M の可溶性タンパク質として 8 5 に加熱した後、V_L の C D R 2 にて単一の負に荷電したアミノ酸の交換及びその組み合わせを含む D P K 9 に由来する V_L の凝集耐性を示すグラフである。V_L の凝集は濁度の測定として（Y 軸で示すように）3 2 0 n m での吸収によって判定する。D P K 9 は低レベルの凝集耐性を有する V_L の例である。

【図 5 A】 可溶性の発現レベルのような改善された生物物理学的特性を持つ負に荷電したアミノ酸を含む生殖細胞系列 V_L ドメイン D P K 9（5 A）、ゲル濾過カラムでの保持（5 B）及び加熱後の精製されたタンパク質の凝集耐性（5 B）を示す一連のグラフである。「1 x」は負に荷電したアミノ酸が 1 つ、「2 x」は負に荷電したアミノ酸が 2 つ、「3 x」は負に荷電したアミノ酸が 3 つである。

【図 5 B】 同上。

【図 5 C】 同上。

【図 6】 残基 5 0 ~ 5 3 の間で単一の負に荷電したアミノ酸の交換及びその組み合わせを含むアダリムマブ（H u m i r a）由来の V_L の凝集耐性を示すグラフである。置換の位置取りは X 軸上で示す。D P K 9 は低レベルの凝集耐性を有する V_L の例である。「W T」はアダリムマブの V_L である。

【図 7】 残基 5 0 ~ 5 3 の間で単一の負に荷電したアミノ酸の交換及びその組み合わせを含む抗体 4 D 5 由来の V_L の凝集耐性を示すグラフである。置換の位置取りは X 軸上で示す。D P K 9 は低レベルの凝集耐性を有する V_L の例である。「W T」は 4 D 5 の V_L である。

【図 8 A】 V_L の C D R 1 にて単一の負に荷電したアミノ酸の交換及びその組み合わせを含む抗体 4 D 5 由来の s c F v の凝集耐性を示すグラフである。置換の位置取りは X 軸上で示す。「W T」は 4 D 5 の s c F v である。

【図 8 B】 V_L の C D R 2 にて単一の負に荷電したアミノ酸の交換及びその組み合わせを含む抗体 4 D 5 由来の s c F v の凝集耐性を示すグラフである。置換の位置取りは X 軸上で示す。「W T」は 4 D 5 の s c F v である。

10

20

30

40

50

【図 9】(X 軸上で示すように) 残基 50 ~ 53 の間で単一の負に荷電したアミノ酸の交換及びその組み合わせを含む 4D5 由来の s c F v 及びその変異形態の Her 2 への結合を示すグラフである。Y 軸は 450 nm で測定した吸収を示す。「WT」は 4D5 の s c F v である。

【図 10】加熱前の結合レベルの比率としての、80 に加熱した後の残基 50 ~ 53 の間で単一の負に荷電したアミノ酸の交換及びその組み合わせを含む 4D5 由来の s c F v 及びその変異形態の Her 2 への結合を示すグラフである。「WT」は 4D5 の s c F v である。

【図 11】V_L の CDR 2 及び V_H の CDR 1 にて単一の負に荷電したアミノ酸の交換及びその組み合わせを含む 4D5 由来の s c F v の凝集耐性を示すグラフである。置換の位置取りは X 軸上で示す。「WT」は 4D5 の s c F v である。

10

【図 12】V_L の CDR 2 及び V_H の CDR 1 にて単一の負に荷電したアミノ酸の交換及びその組み合わせを含む 4D5 由来の s c F v の凝集耐性を示すグラフである。置換の位置取りは X 軸上で示す。「WT」は 4D5 の s c F v である。

【図 13】V_L の CDR 2 及び V_H の CDR 1 にて単一の負に荷電したアミノ酸の交換及びその組み合わせを含む 4D5 由来の s c F v の抗原への結合を示すグラフである。置換の位置取りは X 軸上で示す。Y 軸は 450 nm での吸収を示す。「WT」は 4D5 の s c F v である。

【図 14】V_L の CDR 2 及び V_H の CDR 1 にて単一の負に荷電したアミノ酸の交換及びその組み合わせを含む 4D5 由来の s c F v の 80 に加熱した後の抗原への結合を示すグラフである。置換の位置取りは X 軸上で示す。「WT」は 4D5 の s c F v である。

20

【図 15】4D5 から作出された s c F v の変異形態の凝集を示すグラフである。変異の位置は、上に記す V_H の変異及び下に記す V_L の変異によって各線について示す。「WT」は野生型 4D5 の配列を意味する。X 軸は時間(分)を表し、0 時間は 80 への加熱の開始である。Y 軸は濁度の測定として 360 nm で測定した吸収を表す。

【図 16 A】フローサイトメトリーで測定したときの V_H の CDR 1 及び V_L の CDR 2 にて変異を含有する完全な IgG としての 4D5 の SK - BR - 3 細胞への結合曲線を示すグラフである。

【図 16 B】4d5 (WT / WT) 及び V_H (30D / WT)、V_L (WT / 52D)、V_H と V_L (30D / 52D) にて負に荷電したアミノ酸を含有するその変異体又はアイソタイプ対照抗体による SK - BR - 3 細胞の増殖の阻害を示すグラフである。データはアイソタイプ対照の存在下での増殖比率として表す。

30

【図 17 A】サイズ排除クロマトグラフィで測定したときの、それぞれ CDR H 1 及び CDR L 2 にて負に荷電したアミノ酸を含有する生殖細胞系列 V_H 3DP 47 及び生殖細胞系列 V_L kDPK 9 を含むヒト IgG 1 の溶出特性を示す図である。X 軸は溶出容積全体を示す。Y 軸は 280 nm での吸収を示す。

【図 17 B】サイズ排除クロマトグラフィで測定したときの、CDR H 1 及び CDR L 2 にて負に荷電したアミノ酸を含有する IgG 全体としての 4D5 の溶出特性を示す図である。X 軸は溶出容積全体を示す。Y 軸は 280 nm での吸収を示す。

【図 17 C】サイズ排除クロマトグラフィで測定したときの、CDR L 2 にて負に荷電したアミノ酸を含有する(示すように単一又は三重)DPK 9 の V_L の溶出特性を示す図である。X 軸は溶出容積全体を示す。Y 軸は 280 nm での吸収を示す。

40

【0131】 配列表への鍵

配列番号 1 は DPK 9 の V_L のアミノ酸配列である。

配列番号 2 は DPK 9 の V_L をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号 3 は V_L kVL のアミノ酸配列である。

配列番号 4 は V_L kV_L をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号 5 は対照 s c F v のアミノ酸配列である。

配列番号 6 は対照 s c F v をコードするヌクレオチド配列である。

50

配列番号 7 はアダリムマブ由来の V_L のアミノ酸配列である。
 配列番号 8 はアダリムマブ由来の V_L をコードするヌクレオチド配列である。
 配列番号 9 はアダリムマブ由来の $s_c F v$ のアミノ酸配列である。
 配列番号 10 はアダリムマブ由来の $s_c F v$ をコードするヌクレオチド配列である。
 配列番号 11 は対照 4 D 5 由来の V_L のアミノ酸配列である。
 配列番号 12 は対照 4 D 5 由来の V_L をコードするヌクレオチド配列である。
 配列番号 13 は対照 4 D 5 由来の V_H のアミノ酸配列である。
 配列番号 14 は対照 4 D 5 由来の V_H をコードするヌクレオチド配列である。
 配列番号 15 は対照 4 D 5 由来の $s_c F v$ のアミノ酸配列である。
 配列番号 16 は対照 4 D 5 由来の $s_c F v$ を
 コードするヌクレオチド配列である。

10

【発明を実施するための形態】

【0132】

一般

この明細書全体を通して、具体的に言及されない限り又は文脈が要求しない限り、単一工程、内容の組成、工程の群又は内容の組成の群に対する参照は、それらの工程、内容の組成、工程の群又は内容の組成の群の 1 つ及び複数（すなわち、1 以上）を包含するように解釈されるべきである。

【0133】

当業者は、本開示が具体的に記載されたもの以外の変更及び改変を受け入れる余地があることを十分に理解するであろう。本開示がそのような変更及び改変を含むことが理解されるべきである。本開示はまた、本明細書を参照する又はそれに記載される工程、特徴、組成物及び化合物すべてを個々に又はまとめて含み、且つ前記工程又は特徴の任意の若しくはすべての組み合わせ又はそれらの 2 以上を含む。

20

【0134】

本開示は、例示のみを目的とすることが意図される本明細書で記載される具体的な例による範囲で限定されることはない。機能的に同等の生成物、組成物及び方法は明らかに本明細書で記載されるような本開示の範囲内にある。

【0135】

本明細書における開示の任意の実施例は、具体的に言及されない限り、開示の他の実施例を準用して適用されると解釈されるべきである。

30

【0136】

抗体の V_L を含むタンパク質又はその使用を指向する本明細書の任意の実施例は、免疫グロブリンの可変ドメイン及びその使用を準用して適用されると解釈されるべきである。

【0137】

具体的に定義されない限り、本明細書で使用される専門用語及び科学用語はすべて当業者（たとえば、細胞培養、分子遺伝学、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学及び生化学）によって一般に理解されるのと同じ意味を有すると解釈されるべきである。

【0138】

指示されない限り、本開示で利用される組換えタンパク質、細胞培養及び免疫学の技法は当業者に周知の常法である。そのような技法は、たとえば、J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T. A. Brown (編者), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, 第1及び2巻, IRL Press (1991), D. M. Glover及びB. D. Hames (編者), DNA Cloning: A Practical Approach, 第1-4巻, IRL Press (1995 及び1996), 並びにF. M. Ausubelら、(編者), Current Pro

40

50

tocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 現在までの改訂すべてを含む), Ed Harlow及びDavid Lane (編者) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), 並びにJ. E. Coliganら (編者) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (現在までの改訂すべてを含む)のような情報源における文献全体を通して記載され、説明されている。

【0139】

本明細書における可変ドメイン及びその一部、免疫グロブリン、抗体及びその断片の記載及び定義は、Kabata (1987及び/又は1991), Borkら、(1994)及び/又はChothia及びLesk (1987及び1989)又はAl-Lazikaniら (1997)における議論によってさらに明確化され得る。

10

【0140】

用語「及び/又は」、たとえば、「X及び/又はY」は、「X及びY」又は「X又はY」のいずれかを意味するように理解されるべきであり、双方の意味又はいずれかの意味に対する明確な支持を提供するように解釈されるべきである。

【0141】

本明細書の全体を通して、語句「comprise」又はたとえば、「comprises」若しくは「comprising」のようなその変異形は、言及される要素、整数又は工程、又は要素、整数又は工程の群の包含を意味するが、他の要素、整数又は工程、又は要素、整数又は工程の群の排除を意味しないように理解されるであろう。

20

【0142】

本明細書で使用されるとき、「に由来する」は、特定の整数が、必ずしもその供給源から直接得られるものではないが、特定の供給源から得られ得ることを指し示すように解釈されるべきである。

【0143】

アミノ酸の残基又は位置を参照する場合の用語「間」は、列記される最後の残基を含む。たとえば、「残基49～56の間」は、残基49、50、51、52、53、54、55及び56を含む。

30

【0144】

本開示の文脈にて、マーカッシュ群 (すなわち、「から成る群から選択される」) への参照は、「から成る群から個々に又はまとめて選択される」についての明確な支持を含み、提供するように理解されるであろう。

【0145】

「個々に」によって、開示は、言及される残基又は残基の群を別々に包含し、個々の残基又は残基の群が本明細書では別々に列記されないかもしれないにもかかわらず、添付のクレームはそのような残基又は残基の群を互いに別々に且つ分割可能に定義し得ることを意味する。

【0146】

「まとめて」によって、開示は、任意の数の又は組み合わせの言及される残基又は残基の群を包含し、そのような数の又は組み合わせの言及される残基又は残基の群が本明細書では具体的に列記されないかもしれないにもかかわらず、添付のクレームは、残基又は残基の群の他の組み合わせとは別に且つ分割可能にそのような組み合わせ又は下位組み合わせを定義し得ることを意味する。

40

【0147】

選択された定義

本明細書で使用されるとき、「凝集」は、自然の状態に又は非凝集状態にタンパク質を折り畳み直す剤でタンパク質を処理しないと元に戻せないタンパク質間の会合又はタンパク質の結合を意味する。そのような凝集は機能の喪失、自然の折り畳みの喪失、及び/又

50

は細胞傷害性若しくは免疫原性の獲得を招き得る。この定義には、生体内で形成される有害で非機能的なタンパク質の集合体及び生物医学研究及びバイオテクノロジーにて試験管内で形成される非機能的なタンパク質の集合体が含まれる。しかしながら、それには、等電点析出又は「塩析」析出は含まれず、そこでは、天然様の緩衝液条件に移すと構成しているタンパク質は直ちにその可溶性の天然の状態に戻る。

【0148】

「凝集耐性」によって、タンパク質を変性させる又はタンパク質若しくはそのドメインの凝集を誘導する若しくは促進する条件（たとえば、加熱又は長期保存（たとえば、少なくとも約1週間又は1ヵ月又は2ヵ月又は3ヵ月又は12ヵ月）のようなある期間の保存又は濃縮）に暴露した後、本開示のタンパク質が、本明細書に記載される負に荷電したアミノ酸を含まないタンパク質に比べて、凝集しない又は低下したレベル（たとえば、10%未満又は20%未満又は30%未満又は40%未満又は50%未満又は60%未満又は70%未満又は80%未満又は90%未満）で凝集する、及び/又は立体構造特異的に折り畳み直し、結合相手に結合することが可能であることを意味する。たとえば、条件に暴露した後、タンパク質は抗原及び/又は、たとえば、プロテインA又はプロテインLのようなスーパー抗原に特異的に結合することが可能である。一例では、部分的な又は完全な変性（又は折り畳み構造がほどけること）の後、タンパク質は抗原又はスーパー抗原への特異的な結合を可能にする立体構造に折り畳み直すことが可能である。例となるタンパク質は、タンパク質又はそのドメインを一般に変性させる条件（たとえば、熱）に暴露した後、有意に凝集しない。たとえば、複数の前記タンパク質を含む組成物における本開示のタンパク質の約10%又は20%又は30%又は40%又は50%又は60%又は70%又は80%又は90%又は95%を超えるものが、たとえば、60 又は70 又は80 での加熱に暴露した後、凝集しない。従って、本開示のタンパク質は加熱に対して折り畳み直し可能であるともみなされ得る。別の例では、タンパク質はたとえば、凍結乾燥及び/又は室温での濃縮によって濃縮された場合、凝集しない。たとえば、タンパク質は、凍結乾燥及び/又は室温での濃縮（たとえば、透析濾過による）の後、負に荷電したアミノ酸を欠くタンパク質よりも約10%又は20%又は30%又は40%又は50%又は60%又は70%又は80%又は90%少なく凝集する。

【0149】

本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、複数のポリペプチド鎖、たとえば、軽鎖可変ドメイン（ V_L ）及び重鎖可変ドメイン（ V_H ）で構成される可変ドメインを含むタンパク質を意味するように解釈されるべきである。抗体はまた一般に定常ドメインも含み、それは、定常領域又は定常断片又は結晶化可能断片（ F_c ）に配置され得る。抗体は1又は2、3の密接に関係する抗原に特異的に結合することができる。一般に、抗体はその基本単位として4鎖構造を含む。完全長の抗体は2つの軽鎖（各およそ23kD）に共有結合する2つの重鎖（各およそ50~70kD）を含む。軽鎖は一般に可変ドメインと定常ドメインを含み、哺乳類では軽鎖又は軽鎖のいずれかである。重鎖は一般に可変ドメインと、ヒンジ領域によって追加の定常ドメインに連結される1又は2の定常ドメインを含む。哺乳類の重鎖は以下の型、 μ 、 δ 、 γ 、 ϵ 、又は α の1つである。各軽鎖はまた重鎖の1つに共有結合する。たとえば、2つの重鎖と重鎖及び軽鎖は鎖間ジスルフィド結合及び非共有相互作用によって一緒に保持される。鎖間ジスルフィド結合の数は抗体の異なる型の間で異なり得る。各鎖は、N末端可変ドメイン（それぞれおよそ110アミノ酸の長さである V_H 又は V_L ）及びC末端における1以上の定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは（およそ110アミノ酸の長さである C_L ）は、重鎖の第1定常ドメイン（およそ330~440アミノ酸の長さである C_H ）と共に並び、それにジスルフィド結合する。軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと共に並ぶ。抗体の重鎖は2以上の追加の C_H ドメイン（たとえば、 C_H2 、 C_H3 等）を含むことができ、 C_H1 と C_H2 の定常ドメイン間で特定することができるヒンジ領域を含むことができる。抗体は、任意の型（たとえば、 IgG 、 IgE 、 IgM 、 IgD 、 IgA 及び IgY ）、クラス（たとえば、 IgG_1 、 IgG_2 、 IgG_3 、 IgG_4 、 IgA_1 及び IgA_2 ）又はサブクラスで

10

20

30

40

50

あることができる。一例では、抗体はIgG₃のようなIgGである。一例では、抗体はネズミ類（マウス又はラット）の抗体又は霊長類（たとえば、ヒト）の抗体である。用語「抗体」はまた、ヒト化抗体、霊長類化抗体、脱免疫化抗体、ヒト抗体及びキメラ抗体も包含する。この用語は、T細胞受容体のような抗体様の分子を包含せず、そのような分子は用語「免疫グロブリン」によって包含される。

【0150】

本明細書で使用されるとき、「可変ドメイン」は、CDR、すなわち、CDR1、CDR2及びCDR3並びにFRのアミノ酸配列を含む、本明細書で定義されるような抗体又は免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖の一部を指す。V_Hは重鎖の可変ドメインを指す。V_Lは軽鎖の可変ドメインを指す。本開示で使用される方法によれば、CDR及びFRに割り当てられるアミノ酸の部分はKabat（1987及び1991年）に従って定義され、Kabatの番号付け方式に従って番号が付けられる。技量のある熟練者は、本開示の実施における他の番号付け方式、たとえば、ClothiaとLesk（1987）及び/又はChothia（1989）及び/又はAl-Lazikanira（1997）の超可変ループ番号付け方式を容易に使用することができるであろう。たとえば、V_LのCDR2はKabat又はClothia及びLesk（1987）及び/又はChothia（1989）の番号付け方式を用いて同一位置にて定義される。

10

【0151】

本明細書で使用されるとき、「重鎖可変ドメイン」又は「V_H」は1以上の抗原に結合する、好ましくは1以上の抗原に特異的に結合する、且つCDR1を含むことが可能であるタンパク質を意味するように解釈されるべきである。好ましくは、重鎖は3つのCDRと一緒に3つ又は4つのFR（たとえば、FR1、FR2、FR3及び任意でFR4）を含む。一例では、重鎖は、Kabatの番号付け方式に従って番号付けられた以下のような残基1～30（FR1）、26～35又は31～35（又は35b）（CDR1）、36～49（FR2）、50～65（CDR2）、66～94（FR3）、95～102（CDR3）及び103～113（FR4）に位置づけられるFR及びCDRを含む。一例では、重鎖は、前記重鎖及び複数（好ましくは3又は4）の定常ドメインを含む抗体に由来し、又は定常断片（Fc）に連結される。

20

【0152】

本明細書で使用されるとき、「軽鎖可変ドメイン」又は「V_L」は、1以上の抗原に結合する、好ましくは1以上の抗原に特異的に結合する、且つCDR1を含むことが可能であるタンパク質を意味するように解釈されるべきである。好ましくは、軽鎖は3つのCDRと一緒に3つ又は4つのFR（たとえば、FR1、FR2、FR3及び任意でFR4）を含む。好ましくは、軽鎖は、Kabatの番号付け方式に従って番号付けられた以下のような残基1～23（FR1）、24～34（CDR1）、35～49（FR2）、50～56（CDR2）、57～88（FR3）、89～97（CDR3）及び98～107（FR4）に位置づけられるFR及びCDRを含む。一例では、軽鎖は定常ドメイン1つに連結される前記軽鎖を含む抗体に由来し、及び/又は定常断片（Fc）に連結されない。

30

【0153】

本開示の一部の例では、用語「フレームワーク領域」はCDRの残基以外の可変ドメインの残基を意味するように理解されるであろう。天然に存在する抗体の各可変ドメインは通常、FR1、FR2、FR3及びFR4として定義される4つのFRを有する。CDRがKabatに従って定義されるのであれば、例となる軽鎖FR（LCFR）残基は、残基1～23（LCFR1）、35～49（LCFR2）、57～88（LCFR3）及び98～107（LCFR4）にほぼ位置づけられる。LCFR1はKLCFRIに含まれる残基10を含まないことに留意のこと。例となる重鎖FR（HCFR）残基は、1～30（HCFR1）、36～49（HCFR2）、66～94（HCFR3）及び103～113（HCFR4）にほぼ位置づけられる。

40

【0154】

50

本明細書で使用されるとき、用語「相補性決定領域」(同義語 C D R ; すなわち、C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 又は超可変ドメイン)は、その存在が抗原結合に必要である抗体可変ドメインのアミノ酸残基を指す。各可変ドメインは通常、C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 として特定される3つの C D R を有する。各相補性決定領域は、K a b a t (1 9 8 7 又は 1 9 9 1 又は 1 9 9 2) によって定義されたような「相補性決定領域」に由来するアミノ酸残基を含み得る。本開示の一例では、重鎖可変ドメインでは、C D R H 1 は、K a b a t 番号付け方式に従う残基 2 6 ~ 3 5 (又は 3 5 b) の間、C D R H 2 は残基 5 0 ~ 6 5 の間、及び C D R H 3 は残基 9 5 ~ 1 0 2 の間にある。軽鎖では、C D R L 1 は K a b a t 番号付け方式に従う残基 2 4 ~ 3 4 の間、C D R L 2 は残基 5 0 ~ 5 6 の間、及び C D R L 3 は残基 8 9 ~ 9 7 の間にある。これらの C D R はまた、たとえば、K a b a t (1 9 8 7 又は 1 9 9 1 又は 1 9 9 2) にて記載されたように多数の挿入も含み得る。

10

【 0 1 5 5 】

本明細書で使用されるとき、用語「F v」は、複数のポリペプチドで構成されるように単一のポリペプチドで構成されようと、V_LとV_Hが会合し、抗原結合部位を有する、すなわち、抗原に特異的に結合することが可能である複合体を形成するタンパク質を意味するように解釈されるべきである。抗原結合部位を形成するV_H及びV_Lは単一のポリペプチド鎖又は異なるポリペプチド鎖にあることができる。さらに、本開示のF vは(本開示の任意のタンパク質と同様に)、同一の抗原に結合してもよい又はしなくてもよい複数の抗原結合部位を有し得る。この用語は、抗体に直接由来する断片と同様に組換え手段を用いて作製されるそのような断片に相当するタンパク質を包含するように理解されるべきである。一部の例では、V_Hは重鎖定常ドメイン(C_H)₁に連結されず、及び/又はV_Lは軽鎖定常ドメイン(C_L)に連結されない。例となるF vを含有するポリペプチド又はタンパク質には、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ') 断片、s c F v、二価抗体、三価抗体、四価抗体又はさらに高次の複合体、ドメイン抗体(たとえば、V_H)又は定常領域若しくはそのドメイン、たとえば、C_H2 又は C_H3 ドメインに連結される前述のいずれかが挙げられる。「F a b 断片」は、抗体の一価の抗原結合断片から成り、免疫グロブリン全体を酵素パインで消化し、未処理の軽鎖及び重鎖の一部から成る断片を得ることによって作製することができる、又は組換え手段によって作製することができる。抗体の「F a b ' 断片」は、抗体全体をペプシンで処理し、その後還元して未処理の軽鎖及び重鎖の一部から成る分子を得ることによって得ることができる。2つのF a b ' 断片がこの方法で処理した抗体当たり得られる。F a b ' 断片はまた組換え手段によっても作製することができる。抗体の「F (a b ') 2 断片」は2つのジスルフィド結合によって一緒に保持される2つのF a b ' 断片の二量体から成り、抗体全体を酵素ペプシンで処理し、その後還元しないことによって得られる。「F a b₂」断片は、たとえば、ロイシンジッパー又はC_H3 ドメインを用いて連結した2つのF a b 断片を含む組換え断片である。「単鎖F v」又は「s c F v」は、好適な自由度の高いポリペプチドリンカーによってV_LとV_Hが共有結合される抗体の可変ドメイン断片(F v)を含有する組換え分子である。この用語の範囲に入る例となるF vを含有するタンパク質の詳細な議論は本明細書にて以下で提供される。

20

30

40

【 0 1 5 6 】

本明細書で使用されるとき、用語「抗原結合部位」は、抗原に特異的に結合することが可能であるタンパク質によって形成される構造を意味するように解釈されるべきである。抗原結合部位は、一連の隣接したアミノ酸である必要はなく、さらに単一のポリペプチド鎖である必要はない。たとえば、2つの異なるポリペプチド鎖から作製されたF vでは、抗原結合部位は、抗原と相互作用し、各可変ドメインのC D R の1以上に一般にあるが、常にそうとは限らないV_L及びV_Hの一連の領域で構成される。一例では、抗原結合部位への本明細書での参照は、抗体のC D R 又はその可変領域への参照である。

【 0 1 5 7 】

「定常ドメイン」は、その配列が同一型、たとえば、I g G 又は I g M 又は I g E の抗

50

体にて高度に類似する抗体におけるドメインである。抗体の定常領域は一般に複数の定常ドメインを含み、たとえば、 κ 及び λ 重鎖の定常領域は3つの定常ドメインを含み、 δ 及び ϵ 重鎖のFcは2つの定常ドメインを含む。 μ 及び γ 重鎖の定常領域は4つの定常ドメインを含み、Fc領域は2つの定常ドメインを含む。

【0158】

用語「結晶化可能な断片」又は「Fc」は本明細書で使用されるとき、少なくとも1つの定常ドメインを含み、一般に（必ずしもではないが）グリコシル化され、1以上のFc受容体及び/又は補体カスケード（たとえば、エフェクター機能を付与する）の成分に結合する抗体の一部を指す。重鎖定常領域は、5つのアイソタイプ： κ 、 λ 、 δ 、 ϵ 、又は μ のいずれかから選択することができる。さらに、種々のサブクラス（たとえば、重鎖のIgGサブクラス）は異なるエフェクター機能に關与するので、所望の重鎖定常領域を選択することによって所望のエフェクター機能を持つタンパク質を作製することができる。好まれる重鎖定常領域は、ガンマ1（IgG1）、ガンマ2（IgG2）及びガンマ3（IgG3）である。

10

【0159】

「Kabattの番号付け方式」によって、Kabatt（1987及び/又は1991及び/又は1992）にて設定された方式に一致する方法での免疫グロブリンの可変ドメインにおける残基を番号付けする方式を意味する。

【0160】

用語「表面に露出した」は、タンパク質が存在する又は懸濁される溶媒と接触するのが可能なように折り畳まれる場合、アミノ酸の側鎖が表面にあることを意味するように理解されるべきである。 V_L の場合、表面に露出した残基は、たとえば、Kabattの番号付け方式に従う残基49、50、51、52、53及び55から成る群から選択される。Kabattの番号付け方式に従う V_L の54位は一般に表面に露出されない。アミノ酸が表面に露出されるかどうかを予測する方法は、当該技術で既知であり、たとえば、Holbrookら（1990）に記載されている。

20

【0161】

用語「タンパク質」は、単一のポリペプチド、すなわち、ペプチド結合によって連結される一連の隣接するアミノ酸又は互いに共有結合若しくは非共有結合で連結される一連のポリペプチド（すなわち、ポリペプチド複合体）を含むように解釈されるべきである。たとえば、一連のポリペプチドは好適な化学結合又はジスルフィド結合を用いて共有結合することができる。非共有結合の例には、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力、及び疎水性相互作用が挙げられる。本開示によって熟考される非共有結合は、たとえば、二価抗体又は三価抗体又は四価抗体又は抗体の一部の形態における V_H と V_L の間での相互作用である。

30

【0162】

用語「ポリペプチド」はペプチド結合によって連結される一連の隣接するアミノ酸を意味する前述の段落から意味するように理解されるであろう。

【0163】

本明細書で使用されるとき、用語「抗原」は、それに対して免疫グロブリン反応（たとえば、抗体反応）を生じることができる物質の任意の組成を意味するように理解されるべきである。例となる抗原には、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、リン酸基、ホスホル-ペプチド又はポリペプチド、グリコシル化されたペプチド又はペプチド等が挙げられる。

40

【0164】

本明細書で使用されるとき、用語「特異的に結合する」又は「特異的に結合する」は、本開示のタンパク質が、代わりにの抗原又は細胞よりも特定の抗原（単数）又は抗原（複数）又は細胞と頻繁に、迅速に、長い持続時間で及び/又は大きな親和性で反応する又は会合することを意味するように解釈されるべきである。たとえば、ある抗原に特異的に結合するタンパク質は、他の抗原に結合するよりも大きな親和性、結合活性で、容易に及び/

50

又は長い持続時間でその抗原に結合する。この定義を読むことによって、たとえば、第1の抗原に特異的に結合するタンパク質は、第2の抗原に特異的に結合してもよく、又はしなくてもよいことも理解される。そのようなものとして、「特異的な結合」は、別の抗原の排他的な結合又は検出できない結合を必ずしも必要としない。一般に、しかし必然的ではなく、結合への参照は特異的な結合を意味し、各用語は他の用語に対する明白な支持を提供するように理解されるべきである。

【0165】

本明細書で使用されるとき、 V_L （及び任意で V_H ）の文脈にて用語「修飾された」は、 V_L の配列が元々の（未修飾の） V_L に比べて変更されることを意味する。たとえば、残基49～56の間にて負に荷電したアミノ酸以外のアミノ酸を含む V_L は、これらのアミノ酸の1以上を負に荷電したアミノ酸で置換するように修飾される。たとえば、 V_L は残基49～56の間にて修飾されて、これらの位置にて負に荷電したアミノ酸の数を、たとえば、合計1又は2又は3又は4又は5以上に増やす。例となる形態の1つでは、言及された位置での負に荷電したアミノ酸の数は少なくとも2に増やされる。

【0166】

可変ドメインを含有するタンパク質

本開示は、1以上の抗原に特異的に又は選択的に結合し、任意の実施例に従って本明細書で記載されるように修飾される免疫グロブリンの軽鎖可変ドメインを含むタンパク質を熟考する。用語「免疫グロブリン」はKabattの番号付け方式に一致する免疫グロブリンスーパーファミリーのタンパク質を含むように技量のある熟練者によって理解されるであろう。免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーの例にはT細胞受容体が挙げられる。

【0167】

一例では、本開示は、たとえば、抗原結合部位に基づいて1以上の抗原に特異的に又は選択的に結合し、任意の実施例に従って本明細書で記載されるように修飾される抗体の V_L を含むタンパク質を熟考する。

【0168】

抗体の可変ドメイン

本明細書の記載に基づいて技量のある熟練者に明らかなように、本開示のタンパク質は、本明細書で記載される位置にて負に荷電したアミノ酸を含むように修飾された抗体の1以上の V_L （及び場合によっては、修飾することができるが、必ずしも本明細書で記載されるように修飾されない V_H ）を含むことができる。そのようなタンパク質には抗体（たとえば、全体としての又は完全長の抗体）が挙げられる。そのような抗体は、先ず当該抗原に対する抗体を作出し、その抗体を修飾する（たとえば、組換え手段を用いて）ことによって又は予め作出した抗体を修飾することによって作出され得る。或いは、本開示の V_L を含むタンパク質を作出し、次いでそのタンパク質を修飾して又は使用して抗体を作出する。

【0169】

抗体を作出する方法は当該技術で既知である。たとえば、ハイブリドーマ法のようなモノクローナル抗体を作出する方法は、Kohler及びMilstein（1975）によって記載されている。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適当な宿主動物を免疫原又は抗原又はそれを発現している細胞で免疫して免疫原又は抗体に特異的に結合する抗体を産生する又は産生することが可能であるリンパ球を導き出す。次いで免疫された動物に由来するリンパ球又は脾臓細胞を、たとえば、ポリエチレングリコールのような好適な融合剤を用いて不死化細胞株に融合させてハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, 1986）。好ましくは、未融合の不死化細胞の増殖又は生き残りを制限する1以上の物質を含有する好適な培養培地にて、得られたハイブリドーマ細胞を培養し得る。たとえば、親細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPR T又はHPR T）を欠くのであれば、ハイブリドーマ用の培養培地は通常、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含み（「HAT」培地）、それらの物質はHGPR T

10

20

30

40

50

欠損細胞の増殖を妨げる。たとえば、Largaespada(1990)又はWeissingerら(1991)によって一般的に詳細に記載されたABL-MYC法を用いた、抗体を産生する他の方法も本開示では熟考される。

【0170】

或いは、抗体又はそれをコードする配列は、当該抗体を発現する、予め作出された細胞、たとえば、ハイブリドーマ又はトランスフェクトーマから生成される。そのようなハイブリドーマ及び/又はトランスフェクトーマの種々の供給源は、技量のある熟練者には明らかであろうし、たとえば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)及び/又は細胞培養の欧州コレクション(ECCC)が挙げられる。V_Lをコードする配列を抗体から単離する又はそれを修飾する方法は、技量のある熟練者には明らかであり、及び/又は本明細書に記載される。本開示に従って修飾することができる例となる抗体には、ヒト化抗呼吸器合胞体ウイルス(RSV)モノクローナル抗体であるシナジス(登録商標)(パリビズマブ; MedImmune); ヒト化抗HER2モノクローナル抗体であるハーセプチン(登録商標)(トラスツズマブ; Genentech); キメラ抗TNFccモノクローナル抗体であるレミケード(登録商標)(インフリキシマブ; Centocor); 抗糖タンパク質Iib/IIIa受容体抗体であるレオプロ(登録商標)(アブシキマブ; Centocor); ヒト化抗CD25モノクローナル抗体であるゼナパックス(登録商標)(ダクリズマブ; Roche Pharmaceuticals); キメラ抗CD20IgG1抗体であるリツキサン(商標)/マプテラ(商標)(リツキシマブ)(IDEC Pharm/Genentech, Roche); キメラ抗IL-2Ra抗体であるスチムレクト(商標)(バシリミマブ; Novartis); キメラ抗EGFR抗体であるアービタックス(セツキシマブ; ImClone); ヒト化抗CD33抗体であるミロタルグ(商標)(ゲムツズマブ; Celltech/Wyeth); ヒト化抗CD52IgG1抗体であるキャンパス1H/LDP-03(アレムツズマブ; ILEX/Schering/Millennium); ヒト化抗IgE Fc抗体であるゾレア(商標)(オマリズマブ; Tanox/Genentech/Novartis); ヒト化抗VEGF抗体であるアバスチン(登録商標)(ベバシズマブ; Genentech); ヒト化抗CD11a抗体であるラプチバ(商標)(エファリズマブ; Genentech/Merck Serono); ヒト化抗VEGF-A抗体であるルセンチス(ラニビズマブ; Genentech/Novartis); ヒト化抗インテグリン4抗体であるタイサブリ(商標)(ナタリズマブ; Biogen Idec/Elan Pharmaceuticals); ヒト化抗補体タンパク質C5抗体であるソリリス(商標)(エクリズマブ; Alexion Pharmaceuticals); 完全なヒト抗EGFRモノクローナル抗体であるベクチピックス(登録商標)(パニツムマブ; Amgen); 完全なヒト抗TNFであるフミラ(登録商標)(アダリムマブ; Abbott/MedImmune Cambridge); シンボニー(登録商標)(ゴリムマブ抗-TNF; Centocor Ortho Biotech, Inc); アーゼラ(登録商標)(オフアツムマブ抗-CD20; Glaxo Group and GenMab AS); オムニターグ(登録商標)(パーツズマブ抗-Her2; Genentech, Inc)が挙げられるが、これらに限定されない。抗体のV_Lを含む他の抗体及びタンパク質が当該技術で既知であり、排除されない。

【0171】

既知の抗体のV_Lの配列は当業者によって容易に入手可能である。例となる配列には、アダリムマブのV_L(配列番号7)又は4D5のV_L(配列番号11)が挙げられる。これらの配列は本開示に従って容易に修飾される。

【0172】

抗体の作出及びそれをコードする配列の単離に続いて、たとえば、任意の実施例に従って本明細書に記載されるように、抗体又はそのV_Lを、必要な位置にて負に荷電したアミノ酸(たとえば、アスパラギン酸又はグルタミン酸)を含んで凝集耐性を付与するように修飾する。一般に、これは、V_L又は抗体をコードする核酸を単離することと、必要な位

置にてアスパラギン酸（すなわち、G A A又はG A G）又はグルタミン酸（すなわち、G A T又はG A C）をコードする1以上のコドンを含むように修飾することを含む。

【0173】

キメラのヒト化及びヒト抗体

本開示のタンパク質はヒト化抗体又はヒトの抗体又はそのV_Lであってもよい。用語「ヒト化抗体」は、一般に組換え法を用いて調製され、非ヒト種由来の抗体に由来する抗原結合部位及びヒト抗体の構造及び/又は配列に基づいた分子の残りの抗体構造を有するキメラタンパク質を指すように理解されるべきである。抗原結合部位は、ヒト抗体の可変ドメインにおける適当なFR（すなわち、CDR以外のV_Lにおける領域）に植え込まれた非ヒト抗体に由来するCDR及びヒト抗体に由来する残りの領域を含む。抗原結合部位は、野生型であってもよく又は1以上のアミノ酸置換によって修飾されてもよい。一部の例では、ヒト抗体のフレームワーク残基は相当する非ヒト残基によって置き換えられる。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体にも、受け入れたCDR又はフレームワークの配列にも見られない残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト抗体のCDR及びヒト抗体のFR領域又はそのコンセンサス配列のすべて又は実質的にすべてを含むであろう。非ヒト抗体をヒト化する方法は当該技術で既知である。ヒト化は、US 5 2 2 5 5 3 9、US 6 0 5 4 2 9 7又はUS 5 5 8 5 0 8 9の方法に従って実質的に実施することができる。抗体をヒト化する他の方法は排除されない。

10

【0174】

抗体及び結合部位と併せて本明細書で使用されるとき、用語「ヒト抗体」は、ヒト、たとえば、ヒトの生殖細胞又は体細胞に見られる配列に由来する又はそれに相当する可変及び任意で定常の抗体領域を有する抗体を指す。「ヒト」抗体は、ヒト配列によってコードされないアミノ酸残基、たとえば、試験管内での無作為の又は部位特異的な変異により導入される変異（特に抗体の少数の残基、たとえば、抗体の1、2、3、4又は5の残基、好ましくは、たとえば、抗体の1以上のCDRを構成する1、2、3、4又は5の残基における保存的な置換又は変異）、及び/又は本明細書に記載される位置での負に荷電したアミノ酸を含むことができる。例となるヒトの抗体又はタンパク質は、ヒトのフレームワーク領域（たとえば、ヒトの生殖細胞に由来する）及び負に荷電したアミノ酸が含まれる位置以外でCDRにおける無作為なアミノ酸を含む。これらの「ヒト抗体」は実際、ヒトによって産生される必要はなく、むしろ、組換え手段を用いて作出することができ、及び/又はヒト抗体の定常ドメイン及び/又は可変ドメインをコードする核酸を含むトランスジェニック動物（たとえば、マウス）から単離することができる。ヒト抗体又はその断片は、ファージディスプレイライブラリ（たとえば、Hoogenboom and Winter 1991; US5,885,793に記載されたように及び/又は以下に記載するように）を含む、又はヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニック動物を用いて（たとえば、WO2002/066630; Lonberg et al. (1994) or Jakobovits et al. (2007)に記載されたように）当該技術で既知の種々の技法を用いて作出することができる。

20

30

【0175】

一例では、本開示のタンパク質はヒトV_Lを含む。たとえば、タンパク質は完全なヒトフレームワーク領域を含む。

40

【0176】

一例では、タンパク質はヒト化されたV_Lを含まず、又はヒト化抗体に由来するV_Lを含まない。一例では、タンパク質は、たとえば、US 6 4 0 7 2 1 3に記載されたようなヒト化Fab4D5、たとえば、ヒトAb4D5-1のようなヒトAb4D5に由来するV_Lを含まない。

【0177】

一例では、本明細書に記載されるタンパク質は鶏卵リゾチームに結合しない。

【0178】

一例では、本明細書に記載されるようなタンパク質はヒト血管内皮増殖因子A（VEGF-A）及び/又はヒトher2/neuに結合しない。

50

【0179】

一例では、本開示のタンパク質はキメラ抗体である。用語「キメラ抗体」は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の種（たとえば、マウスのようなネズミ類）に由来する抗体における又は特定の抗体のクラス若しくはサブクラスに属する抗体における相当する配列に一致する又は相同である一方で、それらが所望の生物活性を呈する限り、鎖の残りが、別の種（たとえば、ヒトのような霊長類）に由来する抗体における又は別の抗体のクラス若しくはサブクラスに属する抗体における相当する配列に一致する又は相同である抗体を指す（US 4 8 1 6 5 6 7）。ヒトのドメインを優勢に持つ抗体を作出するために、通常、キメラ抗体は齧歯類又はウサギの変域ドメイン及びヒトの定常領域を利用する。たとえば、キメラ抗体はヒトの定常領域に融合させた、本開示に従って修飾したマウス抗体に由来する可変ドメインを含む。そのようなキメラ抗体の作出は当該技術で既知であり、標準的な手段（たとえば、US 5 8 0 7 7 1 5；US 4 8 1 6 5 6 7及びUS 4 8 1 6 3 9 7に記載されたように）によって達成され得る。

10

【0180】

V_Lを含有するタンパク質

単一ドメイン抗体

一例では、本開示のタンパク質は単一ドメイン抗体（用語「ドメイン抗体」又は「dAb」と相互交換可能に使用される）である。単一ドメイン抗体は、抗体の軽鎖可変ドメインのすべて又は一部を含む単一ポリペプチド鎖である。特定の例では、単一ドメイン抗体はヒトの単一ドメイン抗体である（Domantis, Inc., Waltham, MA; たとえば、US6,248,516; WO90/05144; WO2003/002609 and/or WO2004/058820を参照）。一例では、単一ドメイン抗体は、抗原に特異的に結合することが可能であり、本開示に従って修飾することが可能である抗体の軽鎖可変ドメインのすべて又は一部から成る。本開示はまた、別の分子、たとえば、別のドメイン抗体又はFc領域に融合されたドメイン抗体も熟考する。

20

【0181】

二価抗体、三価抗体、四価抗体

V_Lを含む例となるタンパク質は、WO 9 8 / 0 4 4 0 0 1及びWO 9 4 / 0 0 7 9 2 1に記載されたもののような二価抗体、三価抗体、四価抗体及びさらに高次のタンパク質複合体である。

30

【0182】

本明細書で使用されるとき、用語「二価抗体」は、2つの会合したポリペプチド鎖を意味し、各ポリペプチド鎖は構造V_L-X-V_H又はV_H-X-V_Lを含み、V_Lは抗体の軽鎖可変ドメインであり、V_Hは抗体の重鎖可変ドメインであり、Xは単一ポリペプチド鎖にてV_LとV_Hが会合する（又はFvを形成する）には不十分な残基を含み又は非存在であり、ポリペプチド鎖のV_Hがポリペプチド鎖のV_Lに結合して抗原結合部位を形成し、すなわち、1以上の抗原に特異的に結合することが可能であるFv分子を形成するように解釈されるべきである。V_L及びV_Hは各ポリペプチド鎖にて同一であることができ、又はV_L及びV_Hは二重特異性の二価抗体を形成するように各ポリペプチド鎖にて異なることができる（すなわち、異なる特異性を有する2つのFvを含む）。

40

【0183】

本明細書で使用されるとき、用語「三価抗体」は、3つの会合したポリペプチド鎖を含むタンパク質を意味し、各ポリペプチド鎖は二価抗体に関して上記で言及したような構造を含み、一方のポリペプチド鎖のV_Hが別のポリペプチド鎖のV_Lと会合し、それによって三量体タンパク質（三価抗体）を形成するように解釈されるべきである。

【0184】

本明細書で使用されるとき、用語「四価抗体」は、4つの会合したポリペプチド鎖を含むタンパク質を意味し、各ポリペプチド鎖は二価抗体に関して上記で言及したような構造を含み、一方のポリペプチド鎖のV_Hが別のポリペプチド鎖のV_Lと会合し、それによって四量体タンパク質（四価抗体）を形成するように解釈されるべきである。

50

【0185】

技量のある熟練者は、二価抗体、三価抗体、四価抗体及びそれらの作出方法に気付くであろう。 V_H 及び V_L は任意の順、すなわち、 $V_L - V_H$ 又は $V_H - V_L$ にて位置づけることができる。一般に、これらのタンパク質は、 V_H と V_L が直接連結される又は V_H と V_L が会合するには不十分な長さのリンカーを用いて連結されるポリペプチド鎖を含む。 V_H と V_L を含むタンパク質が会合して、リンカー（存在すれば）の長さ及び/又は V_H ドメインと V_L ドメインの順に応じて二価抗体、三価抗体及び/又は四価抗体を形成する。好ましくは、リンカーは12以下のアミノ酸を含む。たとえば、NからCの順に配置される以下の構造 $V_H - X - V_L$ を有するポリペプチド鎖の場合、Xはリンカーであり、3～12の残基を有するリンカーは一般に二価抗体の形成を生じ、1又は2の残基を有するリンカー又はリンカーが存在しない場合、一般に三価抗体の形成を生じる。NからCの順に配置される以下の構造 $V_L - X - V_H$ を有するポリペプチド鎖の場合、Xはリンカーであり、3～12の残基を有するリンカーは一般に二価抗体の形成を生じ、1又は2の残基を有するリンカーは一般に二価抗体、三価抗体及び四価抗体の形成を生じ、リンカーを欠くポリペプチドは一般に三価抗体又は四価抗体を形成する。

【0186】

単鎖Fv (scFv)

技量のある熟練者は、scFvが単一ポリペプチド鎖にて V_H と V_L の領域を含むことに気付くであろう。好ましくは、ポリペプチド鎖はさらに、scFvが抗体結合にとって所望の構造を形成するのを可能にする V_H と V_L の間でポリペプチドリンカーを含む（すなわち、単一ポリペプチド鎖の V_H と V_L が互いに会合してFvを形成できるように）。これは、異なるポリペプチド鎖に由来する可変ドメインが互いに会合する又は結合する二価抗体又はさらに高次の多量体とは異なる。たとえば、リンカーは12を超えるアミノ酸残基を含み、(Gly₄Ser)₃はscFvにとってさらに都合の良いリンカーの1つである。

【0187】

本開示はまた、ジスルフィドで安定化したFv（又はdiFv又はdsFv）も熟考し、その際、単一のシステイン残基が V_H のFR及び V_L のFRに導入され、システイン残基がジスルフィド結合で連結されて安定なFvを得る（たとえば、Brinkmann et al., 1993を参照）。

【0188】

代わりに又はさらに、本開示は二量体のscFv、すなわち、非共有結合又は共有結合によって連結された2つのscFv分子を含むタンパク質を提供する。そのような二量体のscFvの例には、ロイシンジッパードメイン（たとえば、Fos又はJunに由来する）に連結された2つのscFvが挙げられ、それによってロイシンジッパードメインが会合し二量体化合物を形成する（たとえば、Kostelny 1992又はKruif and Logtenberg, 1996を参照にこと）。或いは、たとえば、US 20060263367に記載されたように、2つのscFvは双方のscFvが形成し、抗原に結合するのに十分な長さのペプチドリンカーによって連結される。

【0189】

たとえば、US 6323322に記載されたように、グリコシル化を可能にするように修飾されたリンカーを含むscFvのようなscFvの修飾された形態も本開示によって熟考される。

【0190】

技量のある熟練者は、scFv又は本明細書の開示に基づいて本開示に従って好適な修飾された V_L を含むその修飾された形態を容易に作出することができるであろう。scFvの概説については、Pluckthun (1994)を参照のこと。scFvのさらなる記載は、たとえば、Birdら、1988にて見られるべきである。

【0191】

小型抗体

技量のある熟練者は、小型抗体が抗体の C_H2 及び/又は3/4 3ドメインに融合さ

10

20

30

40

50

れた抗体の V_H ドメイン及び V_L ドメインを含むことに気付くであろう。任意で、小型抗体は V_H と V_L の間のヒンジ領域及び $C_H 2$ 及び / 又は $C_H 3$ のドメインを含み、この立体構造は Flex 小型抗体と呼ばれることもある (Hu et al., 1996)。小型抗体は $C_H 1$ 又は C_L を含まない。好ましくは、 V_H 及び V_L のドメインは抗体のヒンジ領域及び $C_H 3$ ドメインに融合される。領域のそれぞれは、同一抗体に由来し得る。或いは、 V_H 及び V_L のドメインは1つの抗体に由来し、ヒンジ及び $C_H 2 / C_H 3$ は別の抗体に由来し、又はヒンジ及び $C_H 2 / C_H 3$ は異なる抗体に由来することもできる。本開示はまた、1つの抗体に由来する V_H と V_L 及び別の抗体に由来する V_H と V_L を含む多重特異性の小型抗体も熟考する。

【0192】

例となる小型抗体及びその作出方法は、たとえば、WO 94 / 09817 に記載されている。

【0193】

他の可変ドメインを含有するタンパク質

US 5731168 は、一对の Fv の界面を組換え細胞の培養から回収されるヘテロダイマーの比率を最大化するように操作し、それによって二重特異性のタンパク質を作出する分子を記載している。好まれる界面は $C_H 3$ ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1のタンパク質の界面に由来する1以上の小型アミノ酸鎖がさらに大きな側鎖 (たとえば、チロシン又はトリプトファン) で置き換えられる。大きなアミノ酸側鎖をさらに小さなもの (たとえば、アラニン又はスレオニン) で置き換えることによって第2のタンパク質の界面上に、大きな側鎖と同じ又は類似するサイズの代償性の「空洞」が創られる。

【0194】

可変ドメインを含む二重特異性のタンパク質は、架橋した又はヘテロ抱合体のタンパク質を含む。たとえば、ヘテロ抱合体におけるタンパク質の一方をアビジンに結合し、他方をビオチンに結合することができる。そのようなタンパク質は、たとえば、免疫系細胞を望ましくない細胞に向けるのに提案されている (US 4676980)。可変ドメインを含むヘテロ抱合体のタンパク質は好都合な架橋方法を用いて作製され得る。好適な架橋剤は当該技術で既知であり、多数の架橋法とともに US 4676980 に開示されている。

【0195】

可変ドメインを含む二重特異性のタンパク質は、化学結合を用いて調製することができる。Brennan (1985) は未処理の抗体をタンパク分解切断して $F(a b')$ 2断片を生成する手順を記載している。これらの断片はジチオール錯化剤、亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元して近隣のジチオールを安定化させ、分子間のジスルフィド形成を妨げる。次いで生成された $F a b'$ 断片をチオニトロベンゾエート (TNB) 誘導体に変換する。次いで $F a b' - TNB$ の一方をメルカプトエチルアミンによる還元によって $F a b' -$ チオールに再び変換し、等モル量の他方の $F a b' - TNB$ 誘導体と混合して二重特異性のタンパク質を形成する。

【0196】

追加の可変ドメインを含有するタンパク質には、たとえば、単鎖 $F a b$ (たとえば、Hust et al., 2007)、又は $F a b 3$ (たとえば、EP19930302894 に記載されたような) が挙げられる。

【0197】

定常ドメインの融合

本開示は、開示の修飾された V_L と定常領域 (たとえば、Fc) 又はそのドメイン、たとえば、 $C_H 2$ 及び / 又は $C_H 3$ ドメインを含むタンパク質を包含する。たとえば、本開示は、小型抗体 (上記で議論したような) 又はドメイン抗体 - Fc の融合又は $s c F v - F c$ の融合又は二価抗体 - Fc の融合又は三価抗体 - Fc の融合又は四価抗体 - Fc の融合又はドメイン抗体 - $C_H 2$ の融合又は SCFC - $C_H 2$ の融合又は二価抗体 - $C_H 2$ の融合又は三価抗体 - $C_n 2$ の融合又は四価抗体 - $C_H 2$ の融合又はドメイン抗体 - $C_H 3$ の融

10

20

30

40

50

合又はSCFV - C H 3 の融合又は二価抗体 - C H 3 の融合又は三価抗体 - C H 3 の融合又は四価抗体 - C H 3 の融合を提供する。これらのタンパク質のいずれかがリンカー、好ましくは可変ドメインと定常領域又は定常ドメインとの間での抗体のヒンジ領域を含み得る。好ましくは、そのような F c 融合タンパク質はエフェクター機能を有する。

【 0 1 9 8 】

本明細書で使用されるとき、用語「C H 2 ドメイン」は、K a b a t E U 番号付け方式 (Kabat 1991 or 1992 に開示されたように) に従ってほぼ 2 3 1 ~ 3 4 0 位の間から伸びる重鎖抗体分子の一部を含む。2 つの N 結合の糖鎖が未処理の天然の I g G 分子の 2 つの C H₂ ドメインの間に一般に介在する。一例では、本開示のタンパク質は I g G 1 分子 (たとえば、ヒトの I g G 1 分子) に由来する C H₂ ドメインを含む。一例では、本開示のタンパク質は I g G 4 分子 (たとえば、ヒトの I g G 4 分子) に由来する C H₂ ドメインを含む。

10

【 0 1 9 9 】

本明細書で使用されるとき、用語「C H 3 ドメイン」は、C H₂ ドメインの N 末端から、たとえば、ほぼ 1 1 0 残基、3 4 1 ~ 4 4 6 b 位 (K a b a t E U 番号付け方式) から伸びる重鎖抗体分子の一部を含む。C H₃ ドメインは通常、I g G 抗体の C 末端部分を形成する。しかしながら、一部の抗体では、追加のドメインが C 3 / 4₃ ドメインから伸びて分子の C 末端部分を形成する (たとえば、I g M の μ 鎖及び I g E の μ 鎖における C H₄ ドメイン)。一例では、本開示のタンパク質は I g G 1 分子 (たとえば、ヒトの I g G 1 分子) に由来する C H₃ ドメインを含む。別の例では、本開示のタンパク質は I g G 4 分子 (たとえば、ヒトの I g G 4 分子) に由来する C H₃ ドメインを含む。

20

【 0 2 0 0 】

本開示のタンパク質を作出するのに有用な定常領域の配列は多数の異なる供給源から入手され得る。好まれる例では、タンパク質の定常領域又はその一部はヒト抗体に由来する。しかしながら、定常領域又はその一部は、たとえば、齧歯類 (たとえば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット) 又は非ヒト霊長類 (たとえば、チンパンジー、アカゲザル) の種を含む別の哺乳類種の免疫グロブリン又は抗体に由来し得ることが理解される。さらに、定常領域ドメイン又はその一部は任意の抗体クラスに由来し得る。

【 0 2 0 1 】

本明細書で使用されるとき、用語「エフェクター機能」は、タンパク質及び / 又は免疫系の細胞に結合し、種々の生物効果に介在する F c 領域又はその一部 (たとえば、C H₂ ドメイン) の機能的能力を指す。エフェクター機能は、抗原依存性であってもよいし、抗原非依存性であってもよい。「抗原依存性のエフェクター機能」は、抗体の抗原への結合に続いて通常誘導されるエフェクター機能を指す。典型的な抗原依存性のエフェクター機能には、補体タンパク質 (たとえば、C 1 q) を結合する能力が挙げられる。たとえば、補体の C 1 成分の F c 領域への結合は、古典的な補体系を活性化し、オプソニン作用及び細胞病原体の溶解、補体依存性の細胞傷害性 (C D C) と呼ばれる過程をもたらす。補体の活性化はまた炎症性反応を刺激し、自己免疫性の過敏反応にも関与し得る。他の抗原依存性のエフェクター機能には、細胞上での F c 領域を介して特定の F c 受容体 (「F c R」) への抗体の結合が介在する。I g G (ガンマ受容体又は I g X R)、I g E (イプシロン受容体又は I g s R)、I g A (アルファ受容体又は I g a R) 及び I g M (ミュー受容体又は i ^ R) を含む、抗体の様々なクラスに特異的である多数の F c 受容体がある。細胞表面上での F c 受容体への抗体の結合は、免疫複合体のエンドサイトーシス、抗体を被覆した粒子又は微生物の貪食及び破壊 (抗体依存性の貪食又は A D C P と呼ばれる)、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体を被覆した標的細胞の溶解 (抗体依存性の細胞介在性細胞傷害性又は A D C C と呼ばれる)、炎症性メディエータの放出、免疫系の細胞活性化の調節、抗体産生の胎盤通過及び制御を含む多数の重要な且つ多様な生物反応を始動させる。

30

40

【 0 2 0 2 】

本明細書で使用されるとき、用語「抗原非依存性のエフェクター機能」は、抗体が相当

50

する抗原に結合しているか、していないかにかかわらず、抗体によって誘導され得るエフェクター機能を指す。典型的な抗原非依存性のエフェクター機能には、細胞性の輸送、抗体の循環半減期及びクリアランス速度、及び増殖の促進が挙げられる。構造的に独特のFc受容体である「新生児Fc受容体」又は「FcRn」はサルベージ受容体としても知られ、半減期及び細胞性の輸送を調節するのに重要な役割を担う。微生物（たとえば、ブドウ球菌タンパク質A又はG）から精製される他のFc受容体は、高親和性にてFc領域に結合することが可能であり、Fc含有のタンパク質の精製を円滑にするのに使用することができる。

【0203】

ポリマーゼ鎖反応及び当該ドメインを増幅するように選択されるプライマーを用いて定常領域のドメインをクローニングすることができる。抗体配列のクローニングは、たとえば、US5658570に記載されている。

10

【0204】

本開示のタンパク質は異なる種類の多数の定常領域/ドメインを含み得る。

【0205】

タンパク質の定常領域を構成する定常ドメイン又はその一部は異なる抗体分子に由来し得る。たとえば、タンパク質は、IgG1分子に由来するCH2ドメイン又はその一部及びIgG3分子に由来するCH3ドメイン又はその一部を含み得る。

【0206】

本開示の別の例では、本開示のタンパク質はFcRn結合を付与するのに十分なFcの少なくとも一領域を含む。たとえば、FcRnに結合するFcの一部は、Kabata E U番号付けに従ってIgG1のほぼ282~438のアミノ酸を含む。

20

【0207】

一例では、本開示の改変されたタンパク質は1以上の定常領域のドメインが部分的に又は全体として欠失する修飾された定常領域（「ドメイン欠失定常領域」）を含む。本開示はまた、変化した、たとえば、改善した又は軽減したエフェクター機能を有する修飾されたFc領域又はその一部も熟考する。多数のそのような修飾されたFc領域は当該技術で既知であり、たとえば、WO2005/035586、WO2005/063815又はWO2005/047327に記載されている。

【0208】

本開示はまたエフェクター機能を誘導することが可能である追加の領域を含むタンパク質も熟考する。たとえば、タンパク質は、T細胞（たとえば、BiTEのようなCD4に結合する）又はNK細胞（CD19に結合する）に結合することが可能な抗体の可変領域を含む。

30

【0209】

脱免疫化タンパク質

本開示はまた脱免疫化タンパク質も熟考する。脱免疫化タンパク質は1以上のエピトープ、たとえば、B細胞エピトープ又はT細胞エピトープを排除し（変異させ）、それによって対象がタンパク質に対する免疫応答を生じる可能性を減らす。脱免疫化タンパク質を作出する方法は当該技術で既知であり、たとえば、WO00/34317、WO2004/108158及びWO2004/064724に記載されている。たとえば、方法は、タンパク質にてエピトープを予測するコンピュータによる解析を行い、予測されたエピトープにおける1以上の残基を変異させ、それによってその免疫原性を低減することを含む。次いでコンピュータで又は試験管内で又は生体内でタンパク質を解析し、それが抗原に結合する能力を保持することを保証する。たとえば、変異が抗原結合を減らすことが疑わしい限り、CDR内の存在するエピトープは変異させない。エピトープを予測する方法は当該技術で既知であり、たとえば、Sahara（2004）に記載されている。

40

【0210】

好適な変異を導入し、得られたタンパク質を発現させ、解析する方法は、本明細書の記載に基づいて技量のある熟練者には明らかであろう。

50

【0211】

ライブラリ及びスクリーニング法

本開示はまた、本開示に従って修飾された複数の V_L （及び任意で V_H ）を含むタンパク質のライブラリも熟考し、たとえば、ライブラリは異なる結合特性を有する複数のタンパク質を含む。

【0212】

本開示の例には、天然のライブラリ、免疫したライブラリ又は合成したライブラリが挙げられる。天然のライブラリは、どんな免疫原にも感作されていないし、感染又は炎症に徴候を示していない好適な宿主のBリンパ球に由来する。免疫したライブラリは、好適に「免疫された」宿主、すなわち、免疫原にて感作されている宿主から得られたB細胞と形質細胞の混合物から作られる。一例では、当該技術で既知の方法（たとえば、オリゴdTプライマーと逆転写酵素）を用いてこれらの細胞に由来するmRNAをcDNAに翻訳する。代替の例では、宿主細胞に由来する抗体をコードする核酸（mRNA又はゲノムDNA）を好適なプライマーと共にPCRによって増幅する。そのような抗体遺伝子の増幅のためのプライマーは当該技術で既知である（たとえば、US6096551及びWO00/70023）。さらなる例では、宿主細胞由来のmRNAをcDNAに合成し、次いでこれらcDNAを抗体特異的なプライマーと共にPCR反応にて増幅する（たとえば、US6319690）。或いは、PCRを用いることなく、従来のcDNAクローニング法（Sambrook and Russell, eds, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed, vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001）によってレパトアをクローニングしてもよい。DNAは、クローニング中に又はその後で、必要な部位にて負に荷電したアミノ酸を含むように修飾される。

【0213】

別の例では、抗体配列が互いに並べられるヒト起源の公開された抗体配列のデータベースを確立する。データベースを用いてCDRループ（抗体構造の解析によって決定されるような）の配列及び標準折り畳みの双方にて高い程度の類似性を示す抗体配列の亜群を規定する。亜群のそれぞれについて、この亜群のメンバーを表すコンセンサス配列を推定し；従ってコンセンサス配列の完全な収集はヒト抗体の完全な構造的レパトアを表す。

【0214】

たとえば、全遺伝子合成によって又は合成遺伝子サブユニットの使用によって次いでこれらの人工的な遺伝子を構築する。これらの遺伝的なサブユニットはポリペプチドレベルで構造的な部分要素に相当する。DNAレベルでは、これらの遺伝的なサブユニットは、部分要素それぞれの開始と終了での切断部位によって定義され、それらはベクター系で独特である。コンセンサス配列の収集のメンバーである遺伝子すべては、それらが相当する遺伝的部分配列の類似パターンを含有するように構築される。たとえば、前記ポリペプチドは、HuCALコンセンサス遺伝子： V_L1 、 V_L2 、 V_L3 、 V_L4 、 V_L1 、 V_L2 、 V_L3 、 V_H1A 、 V_H1B 、 V_H2 、 V_H3 、 V_H4 、 V_H5 、 V_H6 、CK、C_{H1}又は前記HuCALコンセンサス遺伝子の任意の組み合わせである又はそれらに由来する。次いでDNA分子の収集を用いて、抗原に特異的に結合するタンパク質の供給源として使用され得る抗体、好ましくはFv、ジスルフィド結合したFv、単鎖Fv（scFv）、Fab断片又はFab'断片の「合成ライブラリ」を創る。US6,300,064は合成ライブラリを作る方法を開示している。そのような合成ライブラリは、本開示に従って負に荷電したアミノ酸を含むように修飾される。別の例では、定義されたV遺伝子の要素からの合成によって合成ヒト抗体が作られる。Winter（EP0368684）は、抗体の可変ドメインの遺伝子を増幅し（たとえば、PCRによって）、クローニングし、発現させる方法を提供している。これらの遺伝子で開始して、彼は重鎖及び/又は軽鎖のCDR3を無作為化することによって機能的な抗体断片のライブラリを創ることができた。この過程は、免疫系におけるB細胞の発生の間に生じるVJとVDJの組換えの天然の過程と機能的に同等である。たとえば、ヒト生殖細胞系列の V_H 遺伝子断片のレパトアは、5つの無作為なアミノ酸残基の合成「D断片」とJ断片を接合して8残基

10

20

30

40

50

の第3の合成した相補性決定領域(CDR)を創ることによって試験管内で再構成することができる。US5885793はそれらのような抗体ライブラリを作る方法を開示している。技量のある熟練者に明らかなように、本開示のタンパク質を含むライブラリは、増幅されたV領域が本明細書に記載される位置にて負に荷電したアミノ酸をコードするコドンを含むように作出される。

【0215】

本開示に係るタンパク質は可溶性の分泌タンパク質であってもよく、又は細胞又は粒子(たとえば、ファージ、又は他のウイルス、リボソーム又は孢子)の表面にて融合タンパク質として提示されてもよい。

【0216】

種々のディスプレイライブラリ構成が当該技術で既知であり、たとえば、Levin及びWeiss(2006)にて概説されている。たとえば、ライブラリは試験管内のディスプレイライブラリ(すなわち、宿主細胞の非存在下で前記ドメインが提示されるように発現させた核酸に発現ドメインを連結する試験管内ディスプレイを用いてタンパク質を表示させる)である。従って、試験管内でのディスプレイ法によって作出したライブラリは形質転換又は形質移入の効率によって限定されない。試験管内ディスプレイの例にはリボソームディスプレイ、共有結合ディスプレイ及びmRNAディスプレイが挙げられる。

【0217】

一例では、試験管内ディスプレイのライブラリはリボソームディスプレイのライブラリである。技量のある熟練者は、リボソームディスプレイのライブラリが、発現ライブラリによってコードされたmRNAを直接、それがコードするタンパク質に関連付けることに気付くであろう。リボソームディスプレイのライブラリを作出する手段は、適当なプロモータ配列と操作可能に併せてV_L(及び任意でV_H)を含むタンパク質をコードする核酸及びリボソーム結合配列を配置することを含む。好まれるプロモータ配列はバクテリオファージT3及びT7プロモータである。好ましくは、核酸は、スペーサー配列及び取り外されるターミネータコドンを伴ったターミネータ配列と操作可能に併せて配置される。本文脈で使用されるとき、用語「スペーサー配列」は、ペプチドに融合されるペプチドをコードする一連の核酸を意味するように理解されるべきである。スペーサー配列によってコードされるペプチドは翻訳後リボソームトンネルに止まる一方でV_L(及び任意でV_H)を含むタンパク質は自由に折り畳み、別のタンパク質又は核酸と相互作用することができるので、スペーサー配列を遺伝子構築物に組み入れる。好まれるスペーサー配列は、たとえば、フィラメント様ファージM13mp19の遺伝子IIIのアミノ酸211~299をコードする核酸である。

【0218】

当該技術で既知の及び/又は、たとえば、Ausubelら(1987)及びSambrookら(2001)にて記載された方法を用いて、ディスプレイライブラリを試験管内で転写し、翻訳する。試験管内の転写及び翻訳のための市販の方式の例には、たとえば、PromegaからのTNT試験管内転写及び翻訳方式が挙げられる。氷上で発現反応を冷却することが一般に翻訳を終結させる。たとえば、酢酸マグネシウム又はクロラムフェニコールのような試薬の添加によって、ペプチド及び又はそれをコードするmRNAからの解離に対してリボソーム複合体を安定化させる。そのような試験管内ディスプレイライブラリは本明細書に記載されるような種々の方法によってスクリーニングされる。

【0219】

別の例では、本開示のディスプレイライブラリはリボソーム不活化ディスプレイライブラリである。この例によれば、核酸は第1のスペーサー配列をコードする核酸に操作可能に連結される。このスペーサー配列は、それらにコードされるV_L(及び任意でV_H)を含むタンパク質が自由に折り畳み、標的抗原と相互作用するのを可能にするグリシン/セリンが豊富な配列であることが好まれる。第1のスペーサー配列はリボソームを不活化する毒素をコードする核酸に連結される。毒素は、リシンA鎖を含むことが好まれ、それは真核細胞のリボソームを不活化し、mRNA又はコードされたペプチドを放出することな

10

20

30

40

50

く翻訳複合体上でリボソームを引き止める。毒素をコードする核酸は第2のスペーサー配列をコードする別の核酸に連結される。第2のスペーサーは、リボソームのトンネルを占有し、ペプチドと毒素の双方が正しく折り畳み、活性化するのを可能にするアンカーである。そのようなスペーサー配列の例には、M13バクテリオファージの遺伝子IIIに由来する配列である。たとえば、Promegaから市販されているウサギの網状赤血球溶解系のような系を用いて、リボソーム不活化ディスプレイライブラリは一般に試験管内で転写され、翻訳される。毒素をコードするmRNAの翻訳及びこのタンパク質の正しい折り畳みの際、リボソームは、コードされたポリペプチド及びそれが翻訳されたmRNAに結合したままで不活化される。

【0220】

別の例では、ディスプレイライブラリはmRNAディスプレイライブラリである。この例によれば、核酸は、スペーサー配列、たとえば、本開示の発現ライブラリによってコードされた V_L （及び任意で V_H ）を含むタンパク質が自由に折り畳み、標的抗原と相互作用するのを可能にするグリシン/セリンが豊富な配列をコードする核酸に操作可能に連結される。スペーサー配列をコードする核酸は転写ターミネータに操作可能に連結される。mRNAディスプレイライブラリは一般に、たとえば、Promegaから市販されているHeLaScribe核抽出物試験管内転写方式のような当該技術で既知の方法を用いて試験管内で転写される。コードされたmRNAはその後、当該技術で既知の及びたとえば、Roberts及びSzostak(1997)にて記載されている技法を用いて、たとえば、ピューロマイシンのようなリボソームに結合する分子に共有結合するDNAオリゴヌクレオチドに共有結合させられる。好ましくは、オリゴヌクレオチドはソラレン部分に共有結合し、それによってオリゴヌクレオチドは、本開示の発現ライブラリによってコードされたmRNAに光架橋する。発現ライブラリから転写されたmRNAは次いで当該技術で既知の方法を用いて翻訳される。リボソームがmRNAとオリゴヌクレオチドの接合部に達すると、リボソームは停止し、ピューロマイシン部分はリボソームのホスホトランスフェラーゼ部位に入るので、コードされたポリペプチドをそれから発現したmRNAに共有結合する。

【0221】

さらに別の例では、ディスプレイライブラリは共有結合ディスプレイライブラリである。この例によれば、 V_L （及び任意で V_H ）を含むタンパク質をコードする核酸は、それがコードされたDNAと相互作用するタンパク質をコードする第2の核酸に共有結合する。それが相互作用するDNAと相互作用するタンパク質の例には大腸菌バクテリオファージP2ウイルスAタンパク質(P2A)及びファージ186、HP1及びPSP3から単離される同等のタンパク質が挙げられる。たとえば、Promegaから市販されているウサギの網状赤血球溶解系のような系を用いて、共有結合ディスプレイ遺伝子構築物は試験管内で転写され、翻訳される。 V_L （及び任意で V_H ）を含むタンパク質とP2Aタンパク質の融合物の翻訳の際、P2Aタンパク質は、それが結合し、それと共有結合を形成する核酸にニックを入れる。従って、核酸断片はそれがコードするペプチドに共有結合する。

【0222】

さらに別の例では、ディスプレイライブラリは、 V_L （及び任意で V_H ）を含む発現されたタンパク質が、たとえば、US5821047; US6248516及びUS6190908にて記載されたようにバクテリオファージの表面に表示されるファージディスプレイライブラリである。記載される基本原理は、 V_L （及び任意で V_H ）を含むタンパク質をコードする配列を含む第1の核酸の、たとえば、M13タンパク質-3、M13タンパク質-7又はM13タンパク質-8から選択されるファージコートタンパク質のようなファージコートタンパク質をコードする配列を含む第2の核酸への融合に関する。次いでこれらの配列を適当なベクター、すなわち、細菌細胞にて複製できるものに挿入する。次いで、たとえば、大腸菌のような好適な宿主細胞を組換えベクターで形質転換する。核酸断片が操作可能に連結されるコートタンパク質の未修飾形態をコードするヘルパーファ-

10

20

30

40

50

ジ粒子を前記宿主細胞に感染させる。形質転換し、感染させた宿主細胞を、粒子表面にて融合タンパク質の1を超えるコピーを含む組換えファージミド粒子を形成するのに好適な条件下で培養する。この系は、たとえば、ファージ、T4ファージ、M13ファージ、T7ファージ及びバキュロウイルスのようなウイルス粒子の生成に有効であることが示されている。そのようなファージディスプレイ粒子を次いでスクリーニングして標的抗原に結合するのに十分な立体構造を有する表示されたドメインを特定する。

【0223】

他のウイルスディスプレイライブラリには、US6297004にて記載されたように発現されたペプチド又はタンパク質のドメインがレトロウイルス粒子の表面にて表示されるレトロウイルスディスプレイライブラリが挙げられる。

10

【0224】

本開示はまた、たとえば、US5516637にて記載されたような細菌ディスプレイライブラリ、たとえば、US6423538にて記載されたような酵母ディスプレイライブラリ、又はStrenglinら、1988にて記載されたような哺乳類ディスプレイライブラリも熟考する。

【0225】

ディスプレイライブラリをスクリーニングする方法は当該技術で既知である。一例では、本開示のディスプレイライブラリはアフィニティ精製を用いてスクリーニングされる。アフィニティ精製法は、当該技術で既知であり、Scopes(1994)にて記載されている。アフィニティ精製の方法には通常、ライブラリによって表示された V_L (及び任意で V_H)を含むタンパク質を標的抗原及び/又はスーパー抗原(たとえば、タンパク質Aまたはタンパク質L)に接触させ、その後、洗浄し、抗原に結合したままであるドメインを溶出することが含まれる。抗原は好ましくは、別の分子、たとえば、プロテインG、セファロース、アガロース、ビオチン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)及びFLAGエピトープから成る群から選択される分子に結合して精製を容易にすることが可能である。従って、標的のタンパク質又は核酸は、遠心を介して、又は別の分子、たとえば、ストレプトアビジンへの結合を介して、又は特異抗体、たとえば、抗FLAG抗体若しくは抗GST抗体の結合を介して簡単に単離される。

20

【0226】

別の例では、本開示のディスプレイライブラリは、FACS解析を用いて結合したペプチドの特定を可能にするように発現される。FACS解析を用いたライブラリのスクリーニングはUS645563に記載されている。たとえば、試験管内ディスプレイライブラリはFACSソーティングによってスクリーニングされる。試験管内ディスプレイライブラリは、FACSソーティングに好適な粒子又はビーズ、たとえば、とりわけ、ガラス、ポリマー、たとえば、ポリスチレン、ラテックス、又は架橋デキストラン、たとえば、セファロース、セルロース、ナイロン、テフロン(登録商標)に共有結合される。粒子又はビーズに結合したディスプレイライブラリを、検出可能な標識、たとえば、蛍光分子、又は第2の蛍光分子によって検出される分子によって標識されている抗原又はスーパー抗原に加える。次いでビーズを洗浄し、FACSによるソーティングに供し、それは、蛍光標的のタンパク質又は核酸に結合していないビーズから、結合した蛍光抗原又はスーパー抗原を伴ったビーズが分離されるのを可能にする。

30

40

【0227】

或いは、バイオセンサーに基づくアッセイ、たとえば、Biacoreセンサーチップ法(英国、Biacore AB)を用いてライブラリをスクリーニングする。Biacoreセンサーチップは、カルボキシメチル化デキストランで修飾した金の薄層で被覆したガラス表面であり、その上に標的のタンパク質又は核酸が共有結合する。次いで本開示のライブラリは抗原を含むBiacoreセンサーチップに暴露される。

【0228】

タンパク質の精製
突然変異誘発

50

当該技術の常法を用いて、可変ドメインを含むタンパク質をコードするDNAを単離する。たとえば、当該領域に隣接する可変ドメイン内で保存された領域をアニーリングするようにプライマーを設計し、次いでそれらのプライマーを用いて、たとえば、PCRによって介在する核酸を増幅する。好適な方法及び/又はプライマーは当該技術で既知であり、たとえば、Borrebaeck(ed), 1995及び/又はFroyenら、1995にて記載されている。そのような増幅法のための鋳型DNAの好適な供給源は、たとえば、ハイブリドーマ、トランスフェクトーマ及び/又は本明細書に記載されるような可変ドメインを含むタンパク質を発現する細胞に由来する。

【0229】

単離に続いて、当該技術で既知の種々の方法のいずれかによって必要な位置にて負に荷電したアミノ酸をコードするコドンを含むようにDNAを修飾する。これらの方法には、部位特異的(オリゴヌクレオチド介在性)突然変異誘発、PCR突然変異誘発及びタンパク質をコードする以前調製したDNAのカセット突然変異誘発による調製が挙げられるが、これらに限定されない。組換えタンパク質の変異体は、制限断片の操作によって又は合成オリゴヌクレオチドによる重複伸長PCRによって構築され得る。変異誘発性プライマーは、負に荷電したアミノ酸をコードし、たとえば、負に荷電したアミノ酸、たとえば、アスパラギン酸(すなわち、GAA又はGAG)又はグルタミン酸(すなわち、GAT又はGAC)をコードするコドンを構成する残基を含む。標準の突然変異誘発法を採用してそのような変異DNAをコードするDNAを生成することができる。一般的な指針はSambrookら、1989;及び/又はAusubelら、1993にて見つけることができる。

10

20

【0230】

部位特異的な突然変異誘発は、置換変異、すなわち、変異体タンパク質を調製する方法の1つである。この方法は当該技術で既知である(たとえば、Carter et al 1985; or Ho et al 1989を参照)。手短には、DNAの部位特異的な突然変異誘発を実施することにおいて、所望の変異(たとえば、1以上の負に荷電したアミノ酸をコードするコドンの挿入)をコードするオリゴヌクレオチドを先ず、出発DNAの一本鎖とハイブリッド形成させることによってそのような出発DNAを改変する。ハイブリッド形成の後、ハイブリッド形成したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、出発DNAの一本鎖を鋳型としてDNAポリメラーゼを用いて第2の鎖全体を合成する。従って、所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドは得られた二本鎖DNAに組み入れられる。発現プラスミドにて変異誘発されるタンパク質を発現する遺伝子の中で部位特異的な突然変異誘発を行い、得られたプラスミドの配列を決定して所望の負に荷電したアミノ酸の置換変異の導入を確認し得る。部位特異的なプロトコール及び構成には、市販のキット、たとえば、QuickChange(登録商標)多重部位特異的突然変異誘発キット(カリフォルニア州、ラ・ホヤのStratagene)が挙げられる。

30

【0231】

PCR突然変異誘発も出発タンパク質のアミノ酸配列変異体を作製するのに好適である。Higuchi、1990; Itoら、1991を参照のこと。手短には、PCRにて少量の鋳型DNAを出発物質として使用する場合、鋳型DNAにおける相当する領域とは配列がやや異なるプライマーを使用して、プライマーが鋳型と異なる位置のみにて鋳型配列とは異なる特定のDNA断片を相対的に多量に生成することができる。

40

【0232】

変異体を調製する別の方法であるカセット突然変異誘発は、Wellら、1985によって記載された技法に基づく。出発物質は変異させる出発タンパク質のDNAを含むプラスミド(又は他のベクター)である。変異させる出発DNAにおけるコドンを特定する。特定された変異部位の各側には独特の制限エンドヌクレアーゼ部位があるはずである。そのような制限部位が存在しないのであれば、上述したオリゴヌクレオチドが介在する変異誘発法を用いて出発DNAの適当な位置にそれを導入することによってそれを生成してもよい。これらの部位でプラスミドDNAを切断してそれを直鎖化する。標準の手順を用い

50

て、制限部位間のDNAの配列をコードするが、所望の変異を含有する二本鎖オリゴヌクレオチドを合成し、その際、オリゴヌクレオチドの2本の鎖は別々に合成し、次いで常法を用いて一緒にハイブリッド形成させる。この二本鎖オリゴヌクレオチドをカセットと呼ぶ。このカセットは、直鎖化したプラスミドの末端に適合する5'及び3'の末端を有するように設計されるので、それを直接プラスミドに連結することができる。このプラスミドは今や変異したDNA配列を含有する。コードされた負に荷電したアミノ酸の置換を含有する変異体DNAはDNAの配列決定によって確認することができる。

【0233】

PCRに基づく変異誘発による二本鎖プラスミドDNAを鋳型としたオリゴヌクレオチド特異的変異誘発によって単一の変異を生成することもできる (Sambrook et al., 2001)。

10

【0234】

一例では、本開示のタンパク質が50位にてアスパラギン酸及び56位にてグルタミン酸を含むのであれば、以下の1以上が適用される：

- (i) 51位におけるアミノ酸はアラニンではない；
- (ii) 52位におけるアミノ酸はセリンではない；
- (iii) 53位におけるアミノ酸はアスパラギン又はセリンではない；
- (iv) 54位におけるアミノ酸はロイシンではない；及び/又は
- (v) 56位におけるアミノ酸はスレオニン又はセリンではない。

【0235】

一例では、本開示のタンパク質が50位にてアスパラギン酸及び53位にてアスパラギン酸を含むのであれば、以下の1以上が適用される：

- (i) 51位におけるアミノ酸はアラニンではない；
- (ii) 52位におけるアミノ酸はリジンではない；
- (iii) 54位におけるアミノ酸はロイシンではない；
- (iv) 55位におけるアミノ酸はヒスチジンではない；及び/又は
- (v) 56位におけるアミノ酸はスレオニン又はセリンではない。

20

【0236】

一例では、本開示のタンパク質が負に荷電したアミノ酸を1つ含み、それが50位又は55位であるならば、以下の1以上が適用される：

- (i) 51位におけるアミノ酸はアラニンではない；
- (ii) 52位におけるアミノ酸はリジンではない；
- (iii) 53位におけるアミノ酸はアスパラギン又はセリン又はスレオニンではない；
- (iv) 54位におけるアミノ酸はロイシン又はアルギニン又はトリプトファン又はリジンではない；及び/又は
- (v) 56位におけるアミノ酸はスレオニン又はセリン又はフェニルアラニンではない。

30

【0237】

一例では、本開示のタンパク質は1以上(たとえば、2又は3又は4)のFRを含まず、又はO8、O18、L18、L4、L12、L22、A2、DPK14、A17、A1、A11、L20、L6及びB3から成る群から選択されるヒト生殖細胞系列のvk断片に由来しないし、又は基づかない。

40

【0238】

一例では、2以上の負に荷電したアミノ酸を含む本開示のタンパク質は1以上(たとえば、2又は3又は4)のFRを含まず、又はO8、O18、L18、L4、L12及びL22から成る群から選択されるヒト生殖細胞系列のvk断片に由来しないし、又は基づかない。

【0239】

一例では、本開示のタンパク質はV_Lの完全なヒトCDR2を含まない。「V_Lの完全なヒトCDR2」によって、CDR2がヒト以外の種に由来し得る又は合成することができる又は、たとえば、アフィニティ変異によって作出されたヒトCDR2の変異形態であ

50

ることができることを意味するように理解されるであろう。

【0240】

組換え発現

組換えタンパク質の場合、それをコードする核酸は好ましくは発現ベクターに配置され、次いで宿主細胞、好ましくはジスルフィド架橋又はジスルフィド結合を作出できる細胞、たとえば、大腸菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、又はたとえば、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞若しくは免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髄腫細胞のような哺乳類細胞に形質移入して組換え宿主細胞にてタンパク質の合成を得る。抗体をコードするDNAの細菌における組換え発現に関する概説論文にはSkerraら（1993）及びPluckthun,（1992）が挙げられる。これらの目的を達成するための分子クローニング技法は当該技術で既知であり、たとえば、Ausubelら（1987）及びSambrookら（2001）にて記載されている。組換え核酸の構築には多種多様なクローニング及び試験管内での増幅の方法が好適である。組換え抗体を作出する方法も当該技術で既知である。US4816567を参照のこと。

10

【0241】

単離に続いて、本開示のタンパク質をコードする核酸は好ましくは、さらなるクローニング（DNAの増幅）又は無細胞系若しくは細胞における発現のために発現構築物又は複製可能なベクターに挿入される。好ましくは、核酸はプロモータに操作可能に連結される。

【0242】

本明細書で使用されるとき、用語「プロモータ」は、最も広い文脈で解釈されるべきであり、TATAボックス又は開始要素を含むゲノム遺伝子の転写調節配列を含み、それは、たとえば、発生上の及び/又は外部の刺激に応答して又は組織特異的に核酸の発現を変化させる追加の調節要素（たとえば、上流の活性化配列、転写因子結合部位、エンハンサ及びサイレンサ）と共に、又はそれを伴わずに実際の転写開始に必要とされる。本文脈では、用語「プロモータ」は、それが操作可能に連結される核酸の発現を付与する、活性化する又は高める組換えの、合成の又は融合の核酸又は誘導体を記載するのにも使用される。好まれるプロモータは、1以上の特定の調節要素の追加のコピーを含有して発現をさらに高めることができ、及び/又は前記核酸の空間的な発現及び/又は時間的な発現を変化させることができる。

20

30

【0243】

本明細書で使用されるとき、用語「操作可能に連結される」は、核酸の発現がプロモータによって制御されるように核酸に対してプロモータを位置づけることを意味する。

【0244】

無細胞発現系も本開示によって熟考される。たとえば、本開示のタンパク質をコードする核酸は好適なプロモータ、たとえば、T7プロモータに操作可能に連結され、得られた発現構築物は転写及び翻訳に十分な条件に暴露される。試験管内での発現又は無細胞での発現に典型的な発現ベクターは記載されており、TNNT7及びTNNT3系（Promega）、pEXP1-DEST及びpEXP2-DESTベクター（Invitrogen）が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0245】

細胞における発現について多数のベクターが利用可能である。ベクター成分には一般に、以下：シグナル配列、本開示のタンパク質をコードする配列（たとえば、本明細書で提供される情報に由来する）、エンハンサ要素、プロモータ及び転写終結配列の1以上が含まれるが、これらに限定されない。技量のある熟練者はタンパク質の発現に好適な配列に気付くであろう。たとえば、例となるシグナル配列には、原核細胞の分泌シグナル（たとえば、pelB、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ipp、又は熱安定性エンテロトキシンII）、酵母分泌シグナル（たとえば、インベルターゼリーダー、因子リーダー又は酸性ホスファターゼリーダー）又は哺乳類の分泌シグナル（たとえば、単純性ヘルペスgDシグナル）が挙げられる。

50

【0246】

例となるプロモータには、原核細胞にて活性があるもの（たとえば、*phoA*プロモータ、 β -ラクタマーゼ及びラクトースのプロモータ系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (*trp*) のプロモータ系、及びたとえば、*tac*プロモータのようなハイブリッドプロモータ) が挙げられる。これらのプロモータは、グラム陰性又はグラム陽性の生物のような真正細菌、たとえば、*Escherichia*、たとえば、*E. coli*、*Enterobacter*、*Erwinia*、*Klebsiella*、*Proteus*、*Salmonella*、たとえば、*Salmonella typhimurium*、*Serratia*、たとえば、*Serratia marcescans*、及び *Shigella* のような腸内細菌科、並びに *B. subtilis* 及び *B. licheniformis* のような桿菌、*P. aeruginosa* 及び *Streptomyces* のようなシュードモナス菌を含む原核生物における発現に有用である。好ましくは、宿主は大腸菌である。大腸菌 B, 大腸菌 X 1776 (ATCC 31, 537) 及び大腸菌 W 3110 (ATCC 27, 325)、DH5 又は DH10B のような他の株も好適であるが、好まれる大腸菌クローニング宿主の1つは大腸菌 294 (ATCC 31446) である。

10

【0247】

哺乳類細胞で活性のある例となるプロモータには、サイトメガロウイルス中早期プロモータ (CMV-IE)、ヒト伸長因子1-プロモータ (EF1)、小分子核RNAプロモータ (U1a 及び U1b)、ミオシン重鎖プロモータ、サルウイルス40プロモータ (SV40)、ラウス肉腫ウイルスプロモータ (RSV)、アデノウイルス主要後期プロモータ、 β -アクチンプロモータ、CMVエンハンサー/ β -アクチンプロモータを含むハイブリッド調節要素、又は免疫グロブリンプロモータ又はその活性断片が挙げられる。有用な哺乳類の宿主細胞株の例は、SV40で形質転換したサル腎臓CV1株 (COS-7、ATCC CRL 1651)；ヒト胚性腎臓細胞株 (293細胞又は浮遊培養における増殖用に継代された293細胞)；幼若ハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL 10)；又はチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) である。

20

【0248】

Pichia pastoris、*Saccharomyces cerevisiae* 及び *S. pombe* を含む群から選択される酵母細胞のような酵母細胞における発現に好適な典型的なプロモータには、ADH1プロモータ、GAL1プロモータ、GAL4プロモータ、CUP1プロモータ、PHO5プロモータ、*nmt*プロモータ、RPR1プロモータ、又はTEF1プロモータが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0249】

昆虫細胞における発現に好適な典型的なプロモータには、OPEI2プロモータ、*Bombyx mori* から単離された昆虫アクチンプロモータ、*Drosophila* sp. *Dsh* のプロモータ (Marsh et al., 2000)、及び誘導可能なメタロチオネインのプロモータが挙げられるが、これらに限定されない。組換えタンパク質の発現にとって好まれる昆虫細胞には、BT1-TN-5B1-4細胞及び *Spodoptera frugiperda* 細胞 (たとえば、sf19細胞、sf21細胞) が挙げられる。核酸断片の発現に好適な昆虫には *Drosophila* sp. が挙げられるが、これらに限定されない。*S. frugiperda* の使用も熟考される。

40

【0250】

単離された核酸分子又はそれを含む遺伝子構築物を発現のために細胞に導入する手段は当該技術で既知である。所与の細胞に使用される技法は既知の上手く行く技法に依存する。細胞に組換えDNAを導入する手段には、とりわけ、微量注入、DEAE/デキストランが介在する形質移入、リポフェクトアミン (米国、MDのGibco) 及び/又はセルフェクチン (米国、MDのGibco) を使用することによるようなりポソームが介在する形質移入、PEGが介在するDNAの取り込み、エレクトロポレーション及びDNAを被覆したタングステン又は金粒子を用いることによるような微粒子衝撃 (米国、WIのAgracetus社) が挙げられる。

50

【0251】

本開示のタンパク質を作出するのに使用される宿主細胞は、使用される細胞種に応じて様々な培地で培養され得る。たとえば、ハムのF10 (Sigma)、最少必須培地 (MEM) (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、及びダルベッコの改変イーグル培地 (DMEM)、Sigma)のような市販の培地は哺乳類細胞を培養するのに好適である。本明細書で議論される他の細胞種を培養する培地は当該技術で既知である。

【0252】

タンパク質の単離

本開示のタンパク質は好ましくは単離される。「単離される」によって、タンパク質がその天然に存在する環境から精製される又は取り出される、たとえば、不均質な環境にあることを意味する。「実質的に精製される」によってタンパク質が混入物質を実質的に含まない、たとえば、混入物質を少なくとも約70%又は75%又は80%又は85%又は90%又は95%又は96%又は97%又は98%又は99%含まないことを意味する。

10

【0253】

本開示のタンパク質を精製する方法は当該技術で既知であり、及び/又は本明細書で記載される。たとえば、結合が生じるのに十分な条件下である時間、それに結合することが可能である剤にタンパク質を接触させる。任意で、洗浄して未結合のタンパク質を取り除いた後、本開示のタンパク質を単離する、たとえば、溶出する。

20

【0254】

組換え法を使用する場合、本開示のタンパク質は、細胞周辺腔にて細胞内で産生され得、又は培地に直接分泌され得る。タンパク質が細胞内で産生されるのであれば、第1の工程として、粒子状の残渣、宿主細胞又は溶解断片を、たとえば、遠心又は限外濾過によって取り除く。Carterら(1992)は大腸菌の細胞周辺腔に分泌される抗体を単離する手順を記載している。手短には、酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTA及びフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)の存在下で約30分間、細胞ペーストを溶解する。遠心によって細胞残渣を取り除く。タンパク質が培地に分泌される場合、一般に先ず、市販のタンパク質濃縮フィルター、たとえば、Amicon又はMilliporeのPellicon限外濾過ユニットを用いて、そのような発現系の上清を濃縮する。PMSFのようなプロテアーゼ阻害剤を前述の工程のいずれかに含めてタンパク質分解を阻害し、抗生剤を含めて有害な混入物の増殖を妨げ得る。

30

【0255】

たとえば、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析及びアフィニティクロマトグラフィを用いて、細胞から調製されたタンパク質を精製することができ、アフィニティクロマトグラフィが好まれる精製法である。プロテインAのアフィニティリガンドとしての好適性は、タンパク質に存在する(とにかく存在すれば)抗体のFcドメインの種類及びアイソタイプに左右される。プロテインAを用いて、ヒト1、2又は4重鎖に基づく抗体を精製することができる(Lindmark et al. 1983)。マウスのアイソタイプすべて及びヒトの3についてはプロテインGが推奨される(Guss et al. 1986)。さもなければ、本開示のタンパク質における可変ドメインが結合する又は作られた抗原又はエピトープ性決定基を用いてアフィニティ精製を行うことができる。アフィニティリガンドが結合するマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他のマトリクスも利用可能である。制御された孔ガラス又はポリ(スチレンジビニル)ベンゼンのような機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるよりも速い流速及び短い処理時間を可能にする。たとえば、イオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上でのクロマトグラフィ、ヘパリンSEPHAROSE(商標)上でのクロマトグラフィ、アニオン又はカチオン交換樹脂(たとえば、ポリアスパラギン酸カラム)上でのクロマトグラフィ、クロマト分画、SDS-PAGE及び硫酸沈殿のようなタンパク質精製のための他の技法も回収されるタンパク質に応じて利用可能である。

40

【0256】

50

技量のある熟練者は、本開示のタンパク質が、タグ、たとえば、ポリヒスチジンタグ、たとえば、ヘキサヒスチジンタグ、又はインフルエンザウイルス血球凝集素（H A）タグ、又はサルウイルス5（V5）タグ、又はF L A Gタグ又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（G S T）タグを含んで精製又は検出を円滑にするように修飾され得ることに気付くであろう。好ましくは、タグはヘキサ-h i sタグである。次いで、得られたタンパク質をアフィニティ精製のような当該技術で既知の方法を用いて精製する。たとえば、ヘキサ-h i sタグを含むタンパク質は、タンパク質を含む試料を、固形又は半固形の支持体に不動化されたヘキサ-h i sタグを特異的に結合するニッケル/ニトリロ三酢酸（N i - N T A）に接触させ、試料を洗浄して未結合のタンパク質を取り除き、その後結合したタンパク質を溶出することによって精製される。代わりに、又はさらに、タグに結合するリガンド又は抗体をアフィニティ精製法にて使用する。

10

【0257】

予備精製工程に続いて、本開示のタンパク質と混入物を含む混合物を低pH疎水性相互作用クロマトグラフィに供してもよい。

【0258】

タンパク質の合成

たとえば、B O C又はF M O C化学法を用いた標準の技法を用いて、決定されたアミノ酸配列から本開示のタンパク質が容易に合成される。合成ペプチドは、固相、液相、又はペプチド縮合又はそれらの組み合わせの既知の技法を用いて調製され、天然及び/又は非天然のアミノ酸を含むことができる。ペプチド合成に使用されるアミノ酸は、M e r r i f i e l d, 1963の元々の固相法の脱保護、中和、結合及び洗浄のプロトコルを伴った標準B o c（N a - アミノ保護N c t - t - ブチルオキシカルボニル）アミノ酸樹脂、又はC a r p i n o及びH a n, 1972によって記載された塩基に不安定なN a - アミノ保護フルオレニルメトキシカルボニル（F m o c）アミノ酸であり得る。F m o c及びB o cのN a - アミノ保護アミノ酸は種々の商業的供給源、たとえば、F l u k a、B a c h e m、A d v a n c e d C h e m t e c h、S i g m a、C a m b r i d g e R e s e a r c h B i o c h e m i c a l、B a c h e m、又はP e n i n s u l a L a b sから入手することができる。

20

【0259】

タンパク質の凝集耐性を評価する方法

本開示のタンパク質又は組成物の凝集耐性は、当該技術で既知の方法を用いて解析することができる。当業者に許容可能な凝集耐性パラメータを採用し得る。例となるパラメータを以下でさらに詳細に記載する。一部の例では、熱による再折り畳み性を評価する。一部の例では、本開示のタンパク質の発現レベル（たとえば、%収率によって測定されるような）を評価する。他の例では、本開示のタンパク質の凝集レベルを評価する。特定の例では、本開示のタンパク質又は組成物の凝集耐性を好適な対照のそれと比較する。

30

【0260】

本開示のタンパク質の凝集耐性は当該技術で既知の多数の非限定の生物物理学的な又は生化学的な技法を用いて解析し得る。そのような技法の例は、たとえば、円偏光二色性（C D）分光分析法のような解析用分光分析法である。C D分光分析法は、上昇する温度の関数としてタンパク質の光学活性を測定する。円偏光二色性（C D）分光分析法は構造的な非対称性のために生じる右側の偏光に対する左側の偏光の吸収における差異を測定する。無秩序な又は折り畳みがほどけた構造は、秩序のある又は折り畳まれた構造とは非常に異なるC Dスペクトルを生じる。C Dスペクトルは、上昇する温度の変性効果に対するタンパク質の感度を反映するので、タンパク質の凝集耐性を示すことになる（van Mierlo and Steemsma, 2000を参照）。

40

【0261】

凝集耐性を測定するための別の例となる解析用分光分析法は、蛍光発光分光分析法（上記van Mierlo and Steemsma, supraを参照）である。凝集耐性を測定するためのさらに別の例となる解析用分光分析法は、核磁気共鳴（N M R）分光分析法（上記van Mierlo and

50

Steemsma, supraを参照)である。

【0262】

他の例では、本開示の組成物又はタンパク質の凝集耐性は生化学的に測定される。凝集耐性を評価するための例となる生化学的な方法は熱負荷アッセイである。「熱負荷アッセイ」では、本開示のタンパク質を一連の時間の間、ある範囲の上昇する温度に供する。たとえば、試験タンパク質をある範囲の上昇する温度に供する。次いで関連する生化学的なアッセイによってタンパク質の活性を評価する。たとえば、結合タンパク質の結合活性は機能的な又は定量的なELISAによって測定され得る。結合親和性を測定する別の方法は表面プラスモン共鳴を採用する。表面プラスモン共鳴は、たとえば、BIACORE方式(スウェーデンのウプサラ及びニュージャージー州、ピスカタウエイのPharmacia Biosensor AB)を用いたバイオセンサーマトリクス内でのタンパク質の濃度の変化を検出することによってリアルタイムの二重特異性の相互作用の解析を可能にする光学現象である。

10

【0263】

他の例では、本開示の組成物又はタンパク質の凝集耐性は凝集する傾向を測定することによって判定される。凝集は、多数の非限定の生化学的な又は生物物理学的な技法によって測定することができる。たとえば、本開示の組成物又はタンパク質の凝集は濁度の測定によって評価され得る。この目的で、320nm、又は代わりに330nm、340nm、又は350nmでの吸収がモニターされる。

【0264】

代わりに又はさらに、組成物又はタンパク質の凝集耐性は、クロマトグラフィ、たとえば、サイズ排除クロマトグラフィ(SEC)を用いて評価することができる。SECはサイズに基づいて分子を分離する。イオン及び小さな分子をその内部に収容するが、大きいものは収容しないポリマーゲルの半固形ビーズでカラムを満たす。タンパク質又は組成物をカラムの上に載せると、小型の折り畳まれたタンパク質(すなわち、非凝集タンパク質)は大きなタンパク質凝集体に利用可能なものよりも多量に溶媒を介して分布する。その結果、大きな凝集体はさらに迅速にカラムを移動し、このように混合物を分離することができ、又はその成分に分画することができる。それがゲルから溶出されるにつれて各分画を別々に(たとえば、光散乱によって)定量することができる。従って、本開示の組成物又はタンパク質の凝集比率は、ゲルに載せたタンパク質の総濃度に分画の濃度を比較することによって決定することができる。凝集耐性の組成物は本質的に単一分画としてカラムから溶出し、溶出特性又はクロマト図にて本質的に単一ピークとして見える。

20

【0265】

他の例では、本開示の組成物の凝集耐性は、タンパク質の発現(たとえば、組換え発現)に続いて回収されるタンパク質の量(本明細書では%収率)を測定することによって評価される。たとえば、%収率は、宿主の培養培地のmlごとに回収されるタンパク質のミリグラム(たとえば、タンパク質のmg/ml)を確定することによって測定することができる。好まれる例では、%収率は、哺乳類の宿主細胞(たとえば、CHO細胞)における発現に続いて評価される。

30

【0266】

さらに別の例では、本開示の組成物の凝集耐性は、定義された時間の間での保存に続いてある範囲の温度(たとえば、約25~約80)でのタンパク質の損失をモニターすることによって評価される。回収されたタンパク質の量又は濃度は当該技術で既知のタンパク質定量法を用いて測定し、タンパク質の当初の濃度と比較することができる。例となるタンパク質定量法にはSDS-PAGE解析又はBradfordアッセイが挙げられる。

40

【0267】

さらに他の例では、本開示のタンパク質の凝集耐性は、結合分子の変性部分又は折り畳みがほどけた部分への標識化合物の結合を定量することによって評価され得る。そのような分子は、通常天然のタンパク質の内部に埋もれるが、変性した又は折り畳みがほどけた

50

結合分子では露出されるアミノ酸の大きな疎水性の斑部と好ましくは結合する又は相互作用するので、好ましくは疎水性である。例となる標識される化合物は、疎水性蛍光色素、1 - アニリノ - 8 - ナフタリンスルホネート (ANS) である。

【0268】

他の例には、正しく折り畳まれた可変ドメインに結合するのみであるタンパク質の結合 (たとえば、プロテインAは正しく折り畳まれたIgG3のVHに結合する) を検出することが含まれる。

【0269】

抱合体

本開示はまた、別の化合物に抱合された本開示のタンパク質、たとえば、異なる部分、たとえば、直接又は間接的にタンパク質に結合する治療剤に抱合された本開示のタンパク質を含む抱合体 (免疫抱合体) も提供する。他の部分の例には、酵素、蛍光色素分子、細胞毒素、放射性同位元素 (たとえば、ヨウ素 - 131、イットリウム - 90又はインジウム - 111)、免疫調節剤、抗血管形成剤、抗血管新生、及び/又は他の血管新生剤、毒素、増殖抑制剤、アポトーシス促進剤、化学療法剤及び治療用核酸が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0270】

細胞毒素には細胞に有害な (たとえば、細胞を殺傷する) 剤が挙げられる。当該技術で既知のこれらの部類の薬剤の記載、及び作用のメカニズムについては、Goodmanら (1990) を参照のこと。抗体免疫毒素の調製に関する追加の技法は、たとえば、US 5,194,594 に提供されている。例となる毒素には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖 (*Pseudomonas aeruginosa* に由来の)、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、Aleuritesfordiiタンパク質、ジアンチンタンパク質、*Phytolacca americana* タンパク質 (PAPI、PAPII及びPAP-S)、ニガウリ阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコテセンが挙げられる。たとえば、WO93/21232を参照のこと。

20

【0271】

本開示の免疫抱合体を形成するのに好適な治療剤には、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトボシド、テノボシド、ピンクリスチン、ピンプラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1 - デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びピューロマイシン、代謝抑制剤 (たとえば、メソトレキセート、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5 - フルオロウラシル、デカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、クラドリピン)、アルキル化剤 (たとえば、メクロレタミン、チオエバ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン (BSNU)、ロムスチン (CCNU)、サイクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、デカルバジン (DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン及び他の白金誘導体、たとえば、カルボプラチン)、抗生剤 (たとえば、ダクチノマイシン (前のアクチノマイシン)、プレオマイシン、ダウノルピシン (前のダウノマイシン)、ドキシソルピシン、イダルピシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミオキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン (AMC)) が挙げられる。

30

40

【0272】

放射性抱合された抗体の作出には種々の放射性核種が利用可能である。例には ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 及び ^{186}Re が挙げられるが、これらに限定されない。

【0273】

別の例では、プレターゲティングで利用するためにタンパク質を「受容体」 (たとえば

50

、ストレプトアビジン)に抱合してもよく、その際、タンパク質/受容体の抱合体は患者に投与され、その後、清浄剤を用いて、次いで治療剤(たとえば、放射性核種)に抱合する「リガンド」(たとえば、アビジン)の投与を用いて循環から未結合の抱合体を取り除く。

【0274】

本開示のタンパク質は、当該技術で既知であり、容易に利用可能である追加の非タンパク様部分を含有するようにさらに修飾することができる。好ましくは、タンパク質の誘導体化に好適な部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定例には、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、デキストラン又はポリビニルアルコールが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0275】

タンパク質残基を化合物に抱合させる当該技術で既知の種々の方法が当該技術で既知であり、技量のある熟練者に明らかであろう。

【0276】

使用

本開示のタンパク質は、研究、診断/予後診断、工業及び治療への適用を含む種々の適用に有用である。タンパク質が結合する抗原に応じて、それは、化合物を細胞に送達するのに、たとえば、細胞を殺傷する又は増殖を抑制する及び/又は画像診断するのに及び/又は試験管内のアッセイに有用であり得る。一例では、タンパク質は画像診断する及び細胞傷害剤を細胞に送達することの双方に有用であり、すなわち、それは、検出可能な標識及び細胞傷害剤に抱合され、又は組成物はその一部が細胞傷害剤に抱合され、一部が検出可能な標識に抱合されるタンパク質の混合物を含む。

20

【0277】

本明細書に記載されるタンパク質はまた、拮抗剤として作用し、(a)受容体への結合(たとえば、リガンドの、阻害剤)、(b)受容体のシグナル伝達機能、及び/又は(c)刺激機能を阻害する(低減する又は抑制することができる)ことができる。受容体機能の拮抗剤として作用するタンパク質はリガンドの結合を直接又は間接的に(たとえば、立体構造の変化を起こすことによって)阻止することができる。

30

【0278】

本開示のタンパク質はまた、たとえば、(a)受容体への(リガンドの)結合を高める又は誘導する、(b)受容体のシグナル伝達機能高める又は誘導する、及び/又は(c)又は刺激機能を提供する受容体の作動薬であってもよい。

【0279】

抗原

本開示は、本明細書における任意の実施例、実施例又はクレームにて具体的に除外されるもの以外の抗原に特異的に結合することが可能である本開示に従って修飾された少なくとも1つの V_L (及び任意で V_H)を含むタンパク質を熟考し、すなわち、本開示の例は特定の抗原を要求することとは対照的に一般的である。

40

【0280】

一例では、本開示のタンパク質は微生物に由来する及び/又は鳥類に由来するタンパク質に結合しない。

【0281】

一例では、タンパク質は、リゾチーム(たとえば、鶏卵リゾチーム)及び/又は - ガラクトシダーゼ及び/又はアミラーゼ(たとえば、 - アミラーゼ)及び/又は脱水酵素(たとえば、炭酸脱水酵素)及び/又はB5R(たとえば、Vaccinia由来)に結合しない。一例では、タンパク質は、ヒトのアルブミンに結合しない。一例では、タンパク質は、ヒトのVEGFに結合しない。

【0282】

例となるタンパク質はヒトのタンパク質に特異的に結合し、ヒトのタンパク質に対して

50

生じた抗体に由来する。

【0283】

本開示の実施例は、疾患又は障害（すなわち、状態）に関連する、たとえば、癌細胞又は癌性／形質転換された細胞に関連する又はそれによって発現される及び／又は自己免疫疾患に関連する及び／又は炎症性の疾患又は状態に関連する及び／又は神経変性疾患に関連する及び／又は免疫不全障害に関連する抗原に特異的に結合するタンパク質を熟考する。

【0284】

本開示のタンパク質を作出することができる例となる抗原には、BMPRII（骨形成タンパク質受容体 - IB型；WO2004063362）；E16（LAT1、SLC7A5、WO2004048938）；STEAP1（前立腺の6回膜貫通上皮抗原、WO2004065577）；CA125（MUC16、WO2004045553）；MPF（MSLN、SMR、巨核球増殖因子、メソテリン、WO2003101283）；Nap13b（WO2004022778）；Sema5b（WO2004000997）；PSCA（US2003129192）；ETBR（WO2004045516）；MSG783（WO2003104275）；STEAP2（WO2003087306）；TrpM4（US2003143557）；CRIPTO（US2003224411）；CD21（WO2004045520）；CD79b（WO2004016225）；SPAP1B（WO2004016225）；HER2（WO2004048938）；NCA（WO2004063709）；MDP（WO2003016475）；IL-20R（EP1394274）；プレビカン（US2003186372）；EphB2R（WO2003042661）；ASLG659（US20040101899）；PSCA（WO2004022709）；GEDA（WO2003054152）；BAFF-R（WO2004058309）；CD22（WO2003072036）；CD79a（WO2003088808）；CXCR5（WO2004040000）；HLA-DOB（WO9958658）；P2X5（WO2004047749）；CD72（WO2004042346）；LY64（US2002193567）；FcRH1（WO2003077836）；IRTA2（WO2003077836）；TENB2（WO2004074320）；CD20（WO94/11026）；VEGF-A（Prestaら、1997）；p53；EGFR；プロゲステロン受容体；カテプシンD；Bcl-2；Eカドヘリン；CEA；Lewis X；Ki67；PCNA；CD3；CD4；CD5；CD7；CD11c；CD11d；c-Myc；tau；PrPSC；TNF；ソニックヘッジホッグ；肝細胞増殖因子；肝細胞増殖因子受容体；EPHA2；プロラクチン受容体；プロラクチン；IL-2；TNF-受容体；IL-21；IL-21受容体；CXCR7；FGFR2；FGF2又はA が挙げられる。

【0285】

別の例では、本開示のタンパク質は可溶性タンパク質、好ましくは生体内で分泌される可溶性タンパク質に結合する。例となる可溶性タンパク質にはサイトカインが挙げられる。用語「サイトカイン」は、細胞間メディエータとして別の細胞に作用する細胞の一集団から放出されるタンパク質又はペプチドに対する一般的な用語である。サイトカインの例には、リンホカイン、モノカイン、増殖因子、及び従来のポリペプチドホルモンが挙げられる。サイトカインに含められるのは、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン及びウシ成長ホルモンのような成長ホルモン；副甲状腺ホルモン、チロキシン、インスリン、レラキシン、プロレラキシン；卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）及び黄体形成ホルモン（LH）のような糖タンパク質ホルモン、肝細胞増殖因子、プロスタグランジン、線維芽細胞増殖因子、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、OBタンパク質、腫瘍壊死因子 - 及び - 、ミューラー管抑制物質、性腺刺激関連ペプチド、インヒピン、アクチピン、血管内皮増殖因子、インテグリン、トロンボポイエチン（TPO）、NGF-Bのような神経増殖因子、血小板増殖因子、TGF- 及び TGF- のような形質転換増殖因子（TGF）インスリン様増殖因子 - I又はII、エリスロポイ

10

20

30

40

50

エチン (EPO)、骨誘導因子、インターフェロン - α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ 、 ι 、 κ 、 λ 、 μ 、 ν 、 ξ 、 \omicron 、 π 、 ρ 、 σ 、 τ 、 υ 、 ϕ 、 χ 、 ψ 、 ω 、又は ω のようなインターフェロン、マクロファージ CSF (M-CSF)、顆粒球マクロファージ CSF (GM-CSF) 及び顆粒球 CSF (G-CSF) のようなコロニー刺激因子 (CSF)、たとえば、IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12; IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21 及び LIF のようなインターロイキンである。例となるサイトカインはインターロイキン 2、13 又は 21、TNF、TGF、BAFF 及び GM-CSF から成る群から選択される。

【0286】

別の例では、可溶性タンパク質はケモカインである。ケモカインは一般にケモカイン発現の部位に免疫エフェクター細胞を動員する化学誘引物質として作用する。ケモカインには RANTES、MCAF、MIP1- α 、 β 、又は MIP1- γ が挙げられるが、これらに限定されない。技量のある熟練者は、特定のサイトカインは化学誘引物質の効果も有し、用語ケモカインのもとで分類され得ることを認識するであろう。好まれるケモカインは RANTES である。

10

【0287】

別の例では、可溶性タンパク質はペプチドホルモンである。例となるペプチドホルモンにはインスリン、NPY、PYY、グルカゴン及びプロラクチンが挙げられる。

【0288】

さらなる例では、可溶性タンパク質はプロテアーゼである。例となるプロテアーゼには因子 X、因子 VII、因子 IX 又はカリクレインが挙げられる。

20

【0289】

別の例では、本開示のタンパク質は受容体又は膜関連タンパク質に結合する。例となる抗原には、Gタンパク質結合受容体 (たとえば、CXCR7、CXCR5、CXCR3、C5aR 又は β -2-アドレナリン作動性受容体) 又はイオンチャンネル (たとえば、ナトリウムチャンネル又はカリウムチャンネル又はカルシウムチャンネル、好ましくはニコチン酸アセチルコリン受容体) 又は膜1回貫通型タンパク質 (たとえば、T細胞受容体又はプロラクチン受容体又はサイトカイン受容体 (たとえば、IL-21受容体) 又は MHCクラス I 又は MHCクラス 2 又は CD4 又は CD8) が挙げられる。

30

【0290】

さらなる例では、本開示のタンパク質は、インターフェロン受容体 1 (IFNAR1)、アングイオエチン-2、IL-4R α 、IL-33、CXCL13、糖化最終産物の受容体 (RAGE)、ICOS、IgE、インターフェロン γ 、IL-6、IL-6受容体、EphB4、CD19、GM-CSF受容体、CD22、IL-22、EphA2、IL-13、高移動群タンパク質 1 (HMG1)、未分化リンパ腫キナーゼ (ALK)、インテグリン (たとえば、インテグリン α V β 3)、Eph受容体、IL-9、EphA4、PC-細胞由来の増殖因子 (PCDGF)、神経増殖因子 (NGF)、インスリン様増殖因子 (IGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR、たとえば、PDGFR α 又は PDGFR β) 又は IL-5 の 1 以上に結合する。

40

【0291】

本開示のタンパク質が由来することができる例となる抗体は技量のある熟練者には明らかであろうし、上文に列記されたものが含まれる。

【0292】

例となる二重特異性のタンパク質は当該抗原の 2 つの異なるエピトープに結合する。他のそのようなタンパク質は、1 つの抗原結合部位を別のタンパク質の結合部位に組み合わせ得る。或いは、当該領域の抗-抗原は、たとえば、T細胞受容体分子 (たとえば、CD3) 又はたとえば、FcRI (CD64)、FcRII (CD32) 及び / 又は FcRIII (CD16) のような IgG の Fc 受容体 (FcR) のような、当該抗原を発現する細胞に細胞性の防御機構を集中させ、局在させるように引き金を引く白血球上

50

の分子に結合する領域と組み合わせられ得る。二重特異性のタンパク質を用いて当該抗原を発現する細胞に細胞傷害剤を局在させ得る。これらのタンパク質は、当該抗原を結合する領域及び細胞傷害剤（たとえば、サポニン、抗インターフェロン、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メソトレキセート、又は放射性同位元素ハプテン）を結合する領域を持つ。WO 96 / 16673は二重特異性抗 - E r b B 2 / 抗 - F c R I I I 抗体を記載しており、米国特許第5,837,234号は二重特異性抗 - E r b B 2 / 抗 - F c R I 抗体を開示している。二重特異性抗 - E r b B 2 / F c 抗体はWO 98 / 02463にて示されている。米国特許第5,821,337号は二重特異性抗 - E r b B 2 / 抗 - C D 3 抗体を教示している。

【0293】

医薬組成物及び治療方法

本開示のタンパク質（同義語：有効成分）は、予防療法及び治療法のための非経口、外用、経口又は局所の投与、エアゾール投与又は経皮投与に有用である。医薬組成物は、投与方法に応じて種々の単位投与形態で投与することができる。たとえば、経口投与に好適な単位投与形態には、粉剤、錠剤、丸薬、カプセル、及びトローチが挙げられ、又は非経口投与による。本開示の医薬組成物は経口で投与される場合、消化から保護されるべきであることが認識される。このことは通常、組成物によってタンパク質を複雑にし、それを酸性及び酵素性の加水分解に耐性にすることによって、又はリポソームのような適宜耐性のキャリアに化合物を包み込むことによって達成される。消化からタンパク質を保護する手段は当該技術で既知である。

【0294】

通常、治療上有効な量のタンパク質を対象への投与のための組成物に製剤化する。語句「治療上有効な量」は、対象における治療又は他の治療効果を促進する、誘導する及び／又は向上させるのに十分な量を指す。明らかになるように、これらの製剤における本開示のタンパク質の濃度は広く変化することができ、主として、選択される投与の特定の方式及び患者の必要性に従って流体容積、粘度、体重等に基づいて選択されるであろう。疾患の種類及び重症度に応じて、たとえば、1以上の別々の投与によるのであろうと連続点滴によるのであろうと、治療上有効な量は約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ （たとえば、 $0.1 \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ ）のタンパク質である。典型的な毎日の投与量は約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 以上に及び得る。数日以上にわたる反復投与については、状態に応じて疾患の症状の所望の抑制が生じるまで治療が持続される。例となる投与計画は、約 $4 \text{mg} / \text{kg}$ の当初負荷用量、その後の約 $2 \text{mg} / \text{kg}$ のタンパク質の毎週の維持用量を含む。他の投与計画も有用となり得る。たとえば、リツキシマブのような抗CD20抗体は、約 $375 \text{mg} / \text{m}^2$ の用量で投与される。ベバシズマビスのような抗VEGF抗体は $5 \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ の用量で投与される。トラツズマブのような抗Her2/neu抗体は $4 \sim 8 \text{mg} / \text{kg}$ の負荷用量及び $2 \sim 6 \text{mg} / \text{kg}$ の毎週の / 2週ごとの維持用量で投与される。アダリムマブのような抗TNF抗体は関節リウマチを治療するには週当たり約 400mg の用量で、又は1週目には 160mg の負荷用量及び週当たり 40mg の維持用量で、又は乾癬には 80mg の負荷用量と週当たり 40mg の維持用量で投与される。従来の技法及びアッセイによって治療の進行が容易にモニターされる。

【0295】

本開示のタンパク質の好適な投与量は、特定のタンパク質、診断される / 治療される / 予防される状態及び / 又は治療される対象に応じて変化するのであろう。準最適な投与量で開始し、投与量を漸増して修正して最適な又は有用な投与量を決定することは技量のある内科医の能力の範囲内である。或いは、治療 / 予防のための適切な投与量を決定するには、培養アッセイ又は動物試験のデータを使用し、その際、好適な用量は、毒性がほとんどない又はない有効成分のED50を含む循環濃度の範囲内である。投与量は、採用される投与形態及び利用される投与経路に応じてこの範囲内で変化し得る。治療上 / 予防上有効な用量は最初に細胞培養アッセイから推定することができる。動物モデルにて用量を製剤化し、細胞培養で決定されるようなIC50（すなわち、症状の最大半分の抑制を達成す

10

20

30

40

50

る化合物の濃度)を含む循環血漿濃度範囲を達成する。そのような情報を用いてヒトにおける有用な用量をさらに正確に決定することができる。血漿におけるレベルは、たとえば、高速液体クロマトグラフィによって測定され得る。

【0296】

或いは、対象への投与に先立って治療上有効な量に希釈する濃縮された用量で本開示のタンパク質を製剤化する。

【0297】

本開示の組成物は、蠕動投与及び腫瘍又は疾患の部位への直接設置(腔内投与)を含む、たとえば、静脈内、筋肉内、皮下、経皮又は他の経路を介した注射用に製剤化された非経口投与に特に有用である。投与用の組成物は一般に薬学上許容可能なキャリア、好ましくは水性キャリアに溶解された本開示のタンパク質の溶液を含む。たとえば、緩衝化生理食塩水等のような種々の水性キャリアを使用することができる。他の例となるキャリアには水、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、及び5%のヒト血清アルブミンが挙げられる。混合した油とオレイン酸エチルのような非水性ビヒクルも使用され得る。リポソームもキャリアとして使用され得る。ビヒクルは、等張性及び化学的安定性を高める軽微な量の添加剤、たとえば、緩衝液及び保存剤を含有し得る。組成物は、生理的条件下に近似するのに必要とされる薬学上許容可能な補助物質、たとえば、pH調整剤及び緩衝化剤、毒性調整剤等、たとえば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等を含有し得る。

10

【0298】

医薬組成物を調製する技法は、RemingtonのPharmaceutical Sciences, 第16版、Mack Publishing Company, 1980によって例示されたように当該技術で一般に既知である。

20

【0299】

WO2002/080967は、たとえば、喘息の治療のためのタンパク質を含むエアゾール化組成物を投与するための組成物及び方法を記載しているが、それは本開示のタンパク質の投与にも好適である。

【0300】

本開示のタンパク質は、医薬的併用、製剤化、又は併用療法としての投与計画において第2の化合物と組み合わせられ得る。医薬的併用、製剤化又は投与計画の第2の化合物は好ましくは、それらが互いに有害に影響しないように併用のタンパク質に対して相補性の活性を有する。

30

【0301】

第2の化合物は、化学療法剤、細胞傷害剤、サイトカイン、増殖阻害剤、抗ホルモン剤、及び/又は心臓保護剤であり得る。そのような分子は意図する目的に有効な量で併用に好適に存在する。本開示のタンパク質を含有する医薬組成物はまた、治療上有効な量の化学療法剤、たとえば、チュープリン形成阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤又はDNA結合剤も有し得る。

【0302】

医薬の「徐放性」カプセル又は組成物も使用され得る。徐放性製剤は一般に長い時間にわたって薬剤の一定レベルを与えるように設計され、本開示の化合物を送達するのに使用され得る。

40

【0303】

本開示はまた対象における状態を治療する又は予防する方法を提供し、該方法はそれを必要とする対象に治療上有効な量の本開示のタンパク質を投与することを含む。

【0304】

本明細書で使用されるとき、用語「予防すること」、「予防する」又は「予防」は状態を予防する文脈で、特定された疾患又は状態の少なくとも1つの症状の進展を止める又は遅らせるのに十分な量の本明細書に記載されるタンパク質を投与することを含む。

【0305】

50

本明細書で使用されるとき、用語「治療すること」、「治療する」又は「治療」は、特定された疾患又は状態の少なくとも1つの症状を軽減する又は排除するのに十分な治療上有効な量の本明細書に記載される阻害剤及び/又は剤を投与することを含む。

【0306】

本明細書で使用されるとき、用語「対象」は、ヒトを含む任意の動物、好ましくは哺乳類を意味するように解釈されるべきである。例となる対象には、ヒト、霊長類、家畜（たとえば、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ブタ）、ペット動物（たとえば、イヌ、ネコ）、実験動物（たとえば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、ハムスター）、捕獲した野生動物（たとえば、キツネ、シカ）が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、哺乳類はヒト又は霊長類である。さらに好ましくは、哺乳類はヒトである。

10

【0307】

本明細書で使用されるとき、「状態」は正常機能の破壊又は妨害であり、特定の状態に限定されることはなく、疾患又は障害が含まれる。例では、状態は癌又は自己免疫疾患又は炎症性疾患である。

【0308】

例となる癌には、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病又はリンパ系の悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。そのような癌のさらに特定の例には、血液癌（たとえば、リンパ腫又は白血病）、扁平上皮癌（たとえば、上皮扁平上皮癌）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌及び肺の扁平上皮癌を含む肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、消化器癌を含む胃癌、膵臓癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーマ、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮の癌腫、唾液腺癌腫、腎臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、陰茎癌、並びに頭頸部の癌が挙げられる。たとえば、癌は乳癌又は肺癌又は卵巣癌又は前立腺癌である。

20

【0309】

炎症性又は自己免疫性状態は、免疫グロブリン又はT細胞受容体の抗原への反応によって生じる状態である。これらの状態には、自己免疫疾患及び過敏症反応（たとえば、I型：アナフィラキシー、蕁麻疹、食物アレルギー、喘息；II型：自己免疫性溶血性貧血、輸血反応；III型：血清病、壊死性血管炎、糸球体腎炎、関節リウマチ、ループス；IV型：接触性皮膚炎、移植片拒絶）が挙げられる。自己免疫疾患には、リウマチ性疾患（たとえば、関節リウマチ、シェーグレン症候群、強皮症、SLE及びループス性腎炎のようなループス、多発性筋炎/皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、抗リン脂質抗体症候群及び乾癬性関節炎）、変形性関節症、自己免疫性の消化管及び肝臓の疾患（たとえば、炎症性大腸疾患（たとえば、潰瘍性大腸炎及びクローン病）、自己免疫性胃炎及び悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、及びセリアック病）、血管炎（たとえば、チャグ・ストラウス血管炎、ウェゲナー肉芽腫症及び多発性関節炎を含むANCA関連の血管炎）、自己免疫性の神経疾患（たとえば、多発性硬化症、オプソクローヌス・ミオクローヌス症候群、重症筋無力症、視神経脊髄炎、多発性神経障害）、腎疾患（たとえば、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群及びベルガー病）、自己免疫性の皮膚疾患（たとえば、乾癬、蕁麻疹、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、及び皮膚エリテマトーデス）、血液疾患（たとえば、血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、輸血後紫斑病、及び自己免疫性溶血性貧血）、アテローム性硬化症、ブドウ膜炎、自己免疫性聴覚障害（たとえば、内耳疾患及び難聴）、ベーチェット病、レイノー症候群、臓器移植、及び自己免疫性内分泌疾患（たとえば、インスリン依存性糖尿病（IDDM）のような糖尿病関連の自己免疫疾患、アジソン病、及び自己免疫性甲状腺疾患（たとえば、グレーブズ病及び甲状腺炎）が挙げられる。さらに好まれるそのような疾患には、たとえば、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、ANCA関連の血管炎、ループス、多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレーブズ病、IDDM、悪性貧血、甲状腺炎及び糸球体腎炎が挙げられる。

30

40

【0310】

別の例では、炎症性状態は、好中球、単球、肥満細胞、好塩基球、好酸球、マクロフ

50

ァージが関与する状態であり、サイトカインの放出、ヒスタミンの放出、酸化的バースト、他の顆粒酵素の放出及び走化性が生じる。過敏性反応（上述した）も、補体の活性化及び好中球、肥満細胞、好塩基球等のような種々の白血球の動員／浸潤が関与することが多いので、炎症性疾患（急性又は慢性の）とみなすことができる。

【0311】

本開示の組成物は、投与製剤に適合するように、且つ治療上／予防上有効な量で投与されるであろう。製剤は、種々の方法、たとえば、摂取又は注射又は吸入によって容易に投与される。

【0312】

本開示のタンパク質の投与に他の治療計画を組み合わせ得る。併用療法は、同時計画又は順次計画として投与され得る。順次投与される場合、組み合わせは2回以上の投与にて投与される。併用投与には、別々の製剤を用いた同時投与、又は単一医薬製剤、及びいずれかの順での連続投与が挙げられ、好ましくは、双方（又はすべて）の活性剤が同時にその生物活性を発揮する間の時間が存在する。

10

【0313】

治療上の使用に先立って、本開示のタンパク質は好ましくは、たとえば、以下で記載されるように試験管内及び／又は生体内で調べられる。

【0314】

試験管内での試験

一例では、本開示のタンパク質は、化合物に抱合されていても抗原に結合する。すでに存在するタンパク質（たとえば、抗体）に由来するタンパク質の場合、本開示のタンパク質は、それが由来するタンパク質と少なくとも同様に抗原に結合し得る。或いは、本開示のタンパク質は、それが由来するタンパク質の又は負に荷電したアミノ酸を欠くタンパク質の形態の親和性又は結合活性の少なくとも10%又は20%又は30%又は40%又は50%又は60%又は70%又は80%又は90%で抗原に結合する。

20

【0315】

タンパク質の結合親和性を決定する例となる方法には、標的抗原への抗体を阻止するタンパク質の能力を示す単純な免疫アッセイ、たとえば、競合結合アッセイが挙げられる。競合結合は、試験下のタンパク質が共通する抗原への参照抗体の特異的な結合を阻害するアッセイで測定される。多数の種類競合結合アッセイ、たとえば、固相での直接又は間接の放射性免疫アッセイ（RIA）、固相での直接又は間接の酵素免疫アッセイ（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（Stahli et al., 1983を参照）；固相での直接ビオチン／アビジンEIA（Kirkland et al., 1986を参照）；固相での直接標識アッセイ、固相での直接標識サンドイッチアッセイ（Harlow and Lane, 1988を参照）；固相での直接ビオチン／アビジンEIA（Cheung et al., 1990）；又は直接標識RIA（Moldenhauer et al., 1990）が知られている。通常、そのようなアッセイには、固形表面に結合した精製抗原又はそれらのいずれかを担った細胞、非標識の試験タンパク質及び標識した参照タンパク質が含まれる。競合阻害は、試験タンパク質の存在下で固形表面又は細胞に結合した標識の量を確定することによって測定される。

30

【0316】

本開示はまた、本開示のタンパク質の活性を調べる方法も包含する。本開示のタンパク質の活性を試験管内で評価する種々のアッセイが利用可能である。たとえば、本開示のタンパク質を細胞又はその集団に投与して前記細胞に結合することができるかどうか及び／又は前記細胞によって内部に取り込まれ得るかどうかを判定する。そのようなアッセイは本開示のタンパク質を検出可能な標識で標識する（すなわち、抱合体を作製する）ことによって円滑にされるが、これは、本開示のタンパク質が標識されたタンパク質で検出することができるので必須ではない。そのようなアッセイは、本開示のタンパク質の化合物を細胞に送達する（すなわち、ペイロード）能力及び／又は画像診断におけるその有用性を評価するのに有用である。好ましくは、細胞は、本開示のタンパク質が結合する抗原を発現し、さらに好ましくは、検出される又は処理されることが望ましい細胞種の細胞株又は

40

50

一次細胞培養である。

【0317】

一般に、たとえば、細胞傷害性分子に抱合された本開示のタンパク質の細胞傷害性又は細胞増殖抑制性の活性は、本開示のタンパク質が結合する抗原を発現する細胞を本開示のタンパク質に暴露することと；タンパク質が生物効果を発揮するのに好適な時間、たとえば、約6時間～約5日間、細胞を培養することと；細胞の生存率、細胞傷害性及び/又は細胞死を測定することによって測定される。生存率（増殖）、細胞傷害性及び細胞死を測定するのに有用な細胞に基づく試験管内のアッセイは当該技術で既知である。

【0318】

たとえば、Cell Titer - Glo（登録商標）発光細胞生存率アッセイは市販の（ Wisconsin州、マジソンの Promega社）、甲虫ルシフェラーゼの組換え発現に基づく均質アッセイ法である（米国特許第5,583,024；5,674,713及び5,700,670号）。この細胞増殖アッセイは、代謝的に活性のある細胞の指標である、細胞に存在するATPの定量に基づいて培養における生細胞の数を決定する。或いは、細胞の生存率は非蛍光のレサズリンを用いてアッセイし、それは本開示のタンパク質の存在下で培養された細胞に添加される。生細胞は、レサズリンを、たとえば、顕微鏡又は蛍光プレートリーダーを用いて容易に検出可能な赤色蛍光のレソルフィンに還元する。細胞の生存率の解析のためのキットは、たとえば、米国、オレゴン州ユージーンの Molecular Probesから入手可能である。

10

【0319】

細胞の生存率のための他のアッセイには、合成される際の³H-チミジン又は⁴C-チミンのDNAへの取り込みを測定すること（すなわち、細胞分裂に関連するDNA合成を測定すること）が挙げられる。そのようなアッセイでは、標識したチミンの存在下で細胞分裂が起きるのに十分な時間、細胞をインキュベートする。洗浄して取り込まれなかったチミジンを取り除いた後、シンチレーションカウンタを用いて標識（たとえば、放射活性のある標識）を検出する。細胞増殖を測定する代わりにアッセイには、たとえば、BrdUの取り込みによるDNA合成の測定（Amersham Pharmacia Biotechから入手可能なキットであるELISA又は免疫組織化学による）が挙げられる。

20

【0320】

細胞死を検出するための例となるアッセイには、アポトーシス初期のAPOPTEST（Immunotechから入手可能）染色細胞が含まれ、細胞試料の固定を必要としない（Martin et al. 1994）。この方法はアネキシンV抗体を利用して、アポトーシスを受けている細胞に特徴的な細胞膜の再構成を検出する。この方法で染色されたアポトーシスを起こした細胞は、次いで、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）、ELISA又は不動化されたアネキシンV抗体を用いた接着とパンニングのいずれかによって仕分けすることができる。或いは、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ介在性のビオチン化UTPニック末端標識（TUNEL）アッセイを用いて細胞死のレベルを決定する。TUNELアッセイは、酵素、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用い、アポトーシス中に生成された3'-OH DNA末端をビオチン化ヌクレオチドで標識する。次いで検出可能なマーカーに抱合されたストレプトアビジンを用いてビオチン化ヌクレオチドを検出する。TUNEL染色のためのキットは、たとえば、ニューヨーク州、パーチェスのIntergen社から入手可能である。

30

40

【0321】

本開示のタンパク質を血清及び/又は細胞に暴露し、その後、たとえば、免疫親和性精製を用いて本開示のタンパク質を単離することによって、本開示のタンパク質の生体内での安定性を評価する、又は予測することもできる。回収された本開示のタンパク質の量の低下は、本開示のタンパク質が血清にて又は細胞に暴露された際、分解されることを示している。

【0322】

50

別の例では、リガンドの受容体への結合を阻止する本開示のタンパク質の能力は標準の放射性免疫アッセイ又は蛍光免疫アッセイを用いて評価される。

【0323】

受容体を刺激する又はそれに拮抗する本開示のタンパク質の能力はタンパク質の存在下又は非存在下にて受容体のシグナル伝達を測定することによって評価することもできる。

【0324】

生体内試験

本開示のタンパク質はまた生体内での安定性及び/又は有効性についても調べることができる。たとえば、本開示のタンパク質を対象に投与し、ELISAを用いて又はタンパク質に結合された検出可能な標識を検出することによって経時的にタンパク質の血清レベルを検出する。これによって本開示のタンパク質の生体内での安定性の判定が可能になる。

10

【0325】

本開示のタンパク質をヒト疾患の動物モデルに投与し、その症状に対する効果を判定することができる。技量のある熟練者は、本開示のタンパク質が結合する抗原に基づいて好適なモデルを容易に決定することができるであろう。たとえば、ヒト癌の例となるモデルは当該技術で既知である。たとえば、乳癌のマウスモデルには、線維芽細胞増殖因子3 (Muller et al., 1990); TGF- β (Matsui et al., 1990); erbB2 (Guy, et al., 1992)を過剰発現するマウス; 又はSCIDマウスへのヒト乳癌細胞の移植が挙げられる。卵巣癌のモデルには、マウスへの卵巣癌細胞の移植(たとえば、Roby et al., 2000に記載されたような); 黄体形成ホルモンを慢性的に分泌するトランスジェニックマウス (Risman et al., 1995); 又はWx/Wvマウスが挙げられる。前立腺癌のマウスモデルも当該技術で既知であり、たとえば、SV40早期遺伝子の強制発現で生じたモデルが挙げられる(最少ラットプロバシンプロモータを利用してSV40早期遺伝子を発現するTRAMPモデル、又は長いプロバシンプロモータを用いて「LADY」モデルと総称されるラージT抗原を発現するトランスジェニックマウス、又はc-myc若しくはBcl-2若しくはFgfSbを発現する又は優勢阻害のTGF β を発現するマウス(前立腺癌のトランスジェニックモデルの概説についてはMatusik et al., 2001を参照のこと))。

20

【0326】

本開示のタンパク質を癌以外の疾患の動物モデル、たとえば、NODに投与して糖尿病を抑制する、予防する、治療する又は遅らせることもでき(たとえば、Tang et al., 2004に記載されたように)、及び/又はGVHDのマウスモデル(たとえば、Trenado, 2002に記載されたように)及び/又は乾癬のマウスモデル(たとえば、Wang et al. 2008)及び/又は間接リウマチのモデル、たとえば、マウスのSKG系(Sakaguchi et al.)、ラットのII型コラーゲン関節炎モデル、マウスのII型コラーゲン関節炎モデル又は幾つかの種における抗原誘導性の関節炎モデル(Bendele, 2001)及び/又は多発性硬化症のモデル(たとえば、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE: Bradl and Linington, 1996))及び/又は炎症性気道疾患(たとえば、OVA感作又はゴキブリ抗原感作(Chen et al., 2007)及び/又は炎症性大腸疾患のモデル(たとえば、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性の大腸炎又は大腸炎のMuc2欠損マウスモデル(Van der Sluis et al., 2006)に投与することができる)。

30

40

【0327】

診断/予後予測の方法

一例では、本開示は状態を診断する又は予後予測する方法を提供する。

【0328】

本明細書で使用されるとき、用語「診断」及びたとえば、「診断する」、「診断された」、又は「診断すること」のような、しかし、これらに限定されないその変形は、臨床状態の一次診断又は再発疾患の診断を含む。

【0329】

「予後予測」、「予後予測すること」及びその変形は本明細書で使用されるとき、回復

50

又は再発の機会を含む疾患のありそうな転帰又は経過を指す。

【0330】

一例では、方法は、試料における抗原の量を決定することを含む。従って、本開示のタンパク質は、診断目的又は研究目的のためにセルソーティング（たとえば、フローサイトメトリー、蛍光活性化セルソーティング）のような適用にて有用性を有する。たとえば、抗原に結合し、複合体を形成するのに十分な時間及び条件下で試料を本開示のタンパク質に接触させ、次いで複合体を検出する又は複合体のレベルを決定する。これらの目的で、タンパク質を標識することができ、又は未標識であることができる。本明細書に記載される標識を用いてタンパク質を直接標識することができる。未標識の場合、たとえば、凝集アッセイのような好適な手段を用いてタンパク質を検出することができる。たとえば、タンパク質又は他の好適な試薬（たとえば、標識されたプロテインA）と反応性の標識抗体（たとえば、二次抗体）のような、タンパク質を検出するのに使用することができる別の（すなわち、1以上の）好適な試薬と組み合わせて未標識の抗体又は断片を使用することもできる。

10

【0331】

好ましくは、本開示のタンパク質を免疫アッセイで使用する。好ましくは、免疫組織化学、免疫蛍光、酵素結合免疫吸収アッセイ（ELISA）、蛍光結合免疫吸収アッセイ（FLISA）、ウエスタンブロット、RIA、バイオセンサーアッセイ、タンパク質チップアッセイ及び免疫染色アッセイ（たとえば、免疫蛍光）から成る群から選択されるアッセイを使用すること。

20

【0332】

種々の試料からタンパク質の濃度を決定するには標準の固相ELISA又はFLISAの形式が特に有用である。

【0333】

一例では、そのようなアッセイには、たとえば、ポリスチレン又はポリカーボネートのマイクロウェル又はディップスティック、膜又はガラス支持体（たとえば、ガラススライド）のような固形マトリクス上に生物試料を不動化することが含まれる。当該抗原に特異的に結合する本開示のタンパク質を不動化した試料に直接接触させ、タンパク質は前記試料に存在する標的抗原のいずれかと直接結合を形成する。本開示のこのタンパク質は一般に、検出可能なレポーター分子、たとえば、FLISAの場合、蛍光標識（たとえば、FITC又はテキサスレッド）又は蛍光半導体ナノ結晶（US6,306,610に記載されたような）、又はELISAの場合、酵素（たとえば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（AP）又は α -ガラクトシダーゼ）によって標識され、又は代わりに本開示のタンパク質に結合する標識抗体を使用することができる。洗浄して未結合のタンパク質を取り除いた後、標識は、蛍光標識の場合、直接検出され、又は酵素標識の場合、たとえば、過酸化水素、TMB、又はトルイジン、又は5-プロモ-4-クロロ-3-ヨード-D-ガラクトピラノシド（x-gal）のような基質の添加を介して検出される。そのようなELISA又はFLISAに基づく方式は、たとえば、単離した及び/又は組換えのタンパク質又はその免疫原性断片又はそのエピトープのようなタンパク質が結合するタンパク質標準の既知の量に対して検出方式を較正することによって試料におけるタンパク質の量を定量するのに特に好適である。

30

40

【0334】

別の形態では、ELISA又はFLISAは、当該抗原に結合する本開示のタンパク質又は抗体を、たとえば、膜、ポリスチレン又はポリカーボネートのマイクロウェル又はポリスチレン又はポリカーボネートのディップスティック又はガラス支持体に不動化することを含む。次いで試料は本開示のタンパク質又は抗体と直接接触し、前記化合物が結合するタンパク質が結合する又は「捕捉される」。次いで、同一抗原における異なるタンパク質又は異なる部位に結合する本開示の標識されたタンパク質を用いて、結合したタンパク質を検出する。或いは、第2の（検出する）タンパク質を結合する第3の標識抗体を使用することができる。

50

【 0 3 3 5 】

画像診断法

前述のことから技量のある熟練者には明らかなように、本開示はまた本開示のタンパク質を用いた画像診断法も熟考する。画像診断のために、本開示のタンパク質を検出可能な標識に抱合させ、それは、画像診断によって検出可能であるシグナルを放出することができる分子又は剤であることができる。たとえば、検出可能な標識は、タンパク質、放射性同位元素、蛍光色素分子、可視光放出蛍光色素分子、赤外光放出蛍光色素分子、金属、強磁性物質、電磁気放出物質、特定の磁気共鳴（MR）分光識別特性を持つ物質、X線を吸収する又は反射する物質、又は音響を変える物質であってもよい。

【 0 3 3 6 】

本開示のタンパク質は、画像診断処置に先立って、腫瘍、臓器、又は画像診断される組織に全身性に又は局所的に投与することができる。一般に、腫瘍、組織又は臓器の所望の最適な画像を達成するのに有効な用量でタンパク質が投与される。そのような用量は採用される特定のタンパク質、画像診断処置に供される腫瘍、組織又は臓器、使用される画像診断装置等に応じて広く変化し得る。

【 0 3 3 7 】

本開示の一部の例では、本開示のタンパク質は、腫瘍の画像診断、臓器の断層撮影画像診断、臓器の機能のモニタリング、冠状動脈血管造影、蛍光内視鏡、レーザーガイド手術、光音響及び音響蛍光の方法等を含むが、これら限定されない種々の生物医学上の適用にて組織及び臓器の生体内光学画像診断剤として使用される。例となる疾患、たとえば、本開示のタンパク質が画像診断に有用である癌は本明細書に記載されており、本開示の本実施例に準用して適用されると解釈されるべきである。一例では、本開示のタンパク質抱合体は、本開示の特定のタンパク質が対象にてどこに濃縮されるかをモニターすることによって腫瘍及びその他の異常の存在を検出するのに有用である。別の例では、本開示のタンパク質は、腹腔鏡検査の際、腫瘍の微小転移の検出のためのレーザー支援ガイド手術に有用である。さらに別の例では、本開示のタンパク質は、アテローム性硬化症のプラーク及び血液凝固の診断に有用である。

【 0 3 3 8 】

画像診断法の例には、磁気共鳴画像診断（MRI）、MR分光法、X線造影法、CT、超音波、平面ガンマカメラ画像診断、単光子放出コンピュータ断層撮影（SPECT）、ポジトロン放出コンピュータ断層撮影（PET）、他の核医学に基づく画像診断、可視光を用いた光学画像診断、ルシフェラーゼを用いた光学画像診断、蛍光色素分子を用いた光学画像診断、他の用いた光学画像診断、近赤外線を用いた画像診断、又は赤外線を用いた画像診断が挙げられる。

【 0 3 3 9 】

本開示の方法の特定の例は対象における手術処置の間に組織を画像診断することをさらに含む。

【 0 3 4 0 】

画像診断のための種々の技法が当業者に知られている。本開示の画像診断法の文脈にてこれらの技法のいずれかが適用されて検出可能な標識からのシグナルを測定することができる。たとえば、光学画像診断は、医学の特定の領域にて幅広い受容を得ている画像診断様式の1つである。例には、細胞成分の光学標識、及びフルオレセイン血管造影及びインドシアニングリーン血管造影のような血管造影が挙げられる。光学画像診断剤の例には、たとえば、フルオレセイン、フルオレセイン誘導体、インドシアニンググリーン、オレゴングリーン、オレゴングリーンの誘導体、ローダミンググリーン、ローダミンググリーンの誘導体、エオシン、エリスリロジン、テキサスレッド、テキサスレッドの誘導体、マラカイトグリーン、ナノゴールドスルホスクシンイミジルエステル、カスケードブルー、クマリン誘導体、ナフタレン、ピリジロキサゾール誘導体、カスケードイエロー色素、ダボキシル色素が挙げられる。

【 0 3 4 1 】

検出可能な標識に由来するシグナルを測定するのに利用することができる画像診断の方法としてガンマカメラ画像診断が熟考される。当業者は、ガンマカメラ画像診断の適用についての技法に精通しているであろう。一例では、シグナルを測定することには、 ^{111}In 又は $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 抱合体、特に ^{111}In -オクトレオチド又は $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ソマトスタチン類似体のガンマカメラ画像診断の使用が含まれる。

【0342】

本開示の文脈における画像診断様式としてコンピュータ断層撮影（CT）が熟考される。種々の角度からのX線を取り込み、次いでコンピュータソフトウェアを用いてそれを組み合わせることによって、CTは生体の任意の部分の三次元画像を構築することを可能にする。コンピュータは、任意の角度と任意の深さからの二次元断片を表示するようにプログラムされる。断片を組み合わせることで三次元の像を組み立て得る。

10

【0343】

CTでは、当初のCT走査が診断できない場合、当該抗原に結合する本開示のタンパク質に抱合されたX線不透過性の造影剤の静脈注射が組織塊（たとえば、軟組織塊）の特定及び描写に役立つことができる。同様に、造影剤は、軟組織病変の血管分布を評価するのに役立つ。たとえば、造影剤の使用は、腫瘍と隣接する血管構造の関係の描写に役立ち得る。

【0344】

CTの造影剤には、たとえば、ヨード造影媒体が挙げられる。これらの剤の例には、ヨータラム酸、イオヘキソール、ジアトリゾエート、イオパミドール、エチオドール及びイオパノエートが挙げられる。ガドリニウム剤、たとえば、ガドペンテートもCTの造影剤として使用されることが報告されている。

20

【0345】

磁気共鳴画像診断（MRI）は高い強度の磁気と高周波シグナルを用いて画像を作製する画像診断様式の1つである。MRIでは、画像診断される試料を強い静磁場に置き、高周波（RF）照射のパルスで励起して試料における正味の磁化を生成する。次いで種々の磁場勾配と他のRFパルスが作用して記録されたシグナルに空間情報をコードする。これらのシグナルを回収し、解析することによって、CT画像のように通常、二次元断片で表示される三次元画像を計算することが可能である。断片を組み合わせることで三次元の像を組み立て得る。

30

【0346】

MRI又はMR分光画像診断で使用される造影剤は、他の画像診断法で使用されるものとは異なる。MRI造影剤の例には、ガドリニウムキレート、マンガンキレート、クロムキレート、及び鉄キレートが挙げられる。たとえば、本開示のタンパク質は、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、徹、コバルト、ニッケル、銅、モリブデン、ルテニウム、セリウム、インジウム、プラセオジミウム、ネオジミウム、プロメチウム、サマリウム、ユーロリウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホリミウム、エルビウム、ツリウム、及びイッテルビウムから成る群から選択される常磁性金属のキレートを含む化合物に抱合される。本開示に有用な画像診断剤のさらなる例は、PFOBのような八口炭素に基づくナノ粒子、又はフッ素に基づくMRI剤である。CT及びMRI双方は組織の境界及び血管の構造を区別するのに役立つ解剖学的な情報を提供する。

40

【0347】

細胞レベルでの情報、たとえば、細胞の生存性に関する情報を提供する画像診断様式には、ポジトロン放出コンピュータ断層撮影（PET）及び単光子放出コンピュータ断層撮影（SPECT）が挙げられる。PETでは、患者はポジトロンを放出する放射活性物質を摂取し、又は注射され、それは生体を通して移動する物質としてモニターすることができる。

【0348】

PETとSPECTの間の主な差異は、ポジトロン放出物質の代わりに、SPECTは高エネルギーの光子を放出する放射活性トレーサを使用する。SPECTは冠状動脈疾患

50

を含む複数の病気を診断するのに有益であり、すでに約250万のSPECT心臓試験が毎年米国で実施されている。

【0349】

PETについては、本開示のタンパク質は一般に、たとえば、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{82}Rb 、 ^{62}Cu 、及び ^{68}Ga のようなポジトロン放射体によって標識される。本開示のタンパク質は、SPECTについては $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{201}Tl 及び ^{67}Ga 、 ^{111}In のようなポジトロン放射体によって標識される。

【0350】

動物及びヒトの非侵襲性の蛍光画像診断も生体内の診断情報を提供することができ、種々の臨床の専攻で使用することができる。たとえば、進んだ機器を用いた洗練された分光画像診断までの、蛍光色素分子のUV励起に続く単純な観察を含む技法が長年かけて開発されている（たとえば、Andersson-Engels et al, 1997を参照）。たとえば、蛍光色素分子又は蛍光タンパク質からの蛍光の生体内での検出のための当該技術で既知の具体的な装置又は方法には、生体内での近赤外線蛍光（たとえば、Frangioni, 2003を参照）、Maestro（商標）生体内の蛍光画像診断システム（Cambridge Research & Instrumentation, Inc.; Woburn, MA）、フライングスポットスキャナーを用いた生体内の蛍光画像診断システム（たとえば、Ramanujam et al, 2001を参照）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0351】

光学反応を検出するための他の方法又は装置には、限定しないで、視覚的検査、CCDカメラ、ビデオカメラ、写真フィルム、レーザー走査装置、蛍光計、光ダイオード、量子カウンタ、落射蛍光顕微鏡、走査顕微鏡、フローサイトメータ、蛍光マイクロプレートリーダー、又は光電子増倍管用いたシグナル増幅が挙げられる。

20

【0352】

一部の例では、ヒトにて使用する前に、たとえば、本明細書に記載されるモデルを用いた試験管内又は生体内のアッセイを用いて画像診断剤を調べる。

【0353】

製造物品

本開示はまた、本開示のタンパク質を含む製造物品又は「キット」も提供する。製造物品は、容器と、たとえば、任意の実施例に従って本明細書に記載される方法にて本開示のタンパク質を使用するための指示書を提供する、容器上の又は容器に伴ったラベル又は添付文書を含むことができる。好適な容器には、たとえば、ビン、バイアル、シリンジ、プリスターパック等が挙げられる。容器はたとえば、ガラス又はプラスチックのような種々の素材から形成され得る。容器は本開示の組成物のタンパク質を保持し、無菌のアクセスポートを有し得る（たとえば、容器は、静脈内溶液バッグ又は皮下注射用針による穴開け可能なストッパーを有するバイアルであり得る）。代わりに又はさらに、製造物品はさらに、たとえば、静菌注射用水（BWF I）、リン酸緩衝化生理食塩水、リンガー溶液及びデキストロース溶液のような薬学上許容可能な緩衝液を含む第2（又は第3）の容器を含み得る。それはさらに、他の緩衝液、希釈剤、充填剤、針及びシリンジを含む、商業的な及びユーザーの見地から望ましい他の物質を含み得る。キットはまた、又は代わりに本開示のタンパク質を検出するための及び/又は本開示のタンパク質を抱合するための試薬を含み得る。

30

40

【実施例】

【0354】

以下の非限定の実施例にて本開示をさらに説明する。

【0355】

実施例1：材料及び方法

1.1：変異V_L及びscFvの生成

Kunkelら（1987）によって導入された改変を伴ったZoller及びSmith（1987）によって記載されたような方法を用いてヒト可変ドメインの変異体を生

50

成した。この目的で、所望の変異をコードする合成オリゴヌクレオチドをウラシル含有の一本鎖鋳型DNA (dU-ssDNA) にアニーリングし、酵素的に伸長し、連結して共有結合で閉環した環状DNAを形成した。単一のヒト軽鎖可変 (V_L) ドメイン (DPK 9 : 配列番号 2) 又はアダリムマブの V_L (配列番号 8) 又は 4D5 の V_L (配列番号 12) をコードする DNA 断片を ApaI 及び NotI 部位を用いてファージディスプレイベクター FdMyc にクローニングすることによって鋳型を生成した。エレクトロポレーションによって ung⁺ 大腸菌株 TGI を共有結合で閉環した環状 DNA にて形質転換し、非変異の dU-ssDNA の優先的な破壊を生じた。構築した変異体の配列は DNA 配列の解析によって確認した。

【0356】

s c F v 変異体の生成のために、ApaI 及び SaiI クローニング部位を用いて、V_H ドメイン及び合成リンカー領域をコードする DNA 断片を相当する V_L - FdMyc 構築物にクローニングした。構築した変異体の配列は DNA 配列の解析によって確認した。対照の s c F v をコードする配列は配列番号 6 に示し、アダリムマブに由来する s c F v をコードする配列は配列番号 10 に示し、4D5 に由来する s c F v をコードする配列は配列番号 14 に示す。

【0357】

V_L が可溶性タンパク質として発現された場合、N末端のグルタミンはアスパラギン酸で置換した。V_H 又は s c F v が可溶性タンパク質として発現された場合、N末端のグルタミンはグルタミン酸で置換した。

【0358】

ヒト V_L ドメインのファージディスプレイレパトアは、VK1 / DPK 9 に基づいて生成した。レパトアは合成オリゴヌクレオチドが介在する多様化を用いて FdMyc にて構築した (Kunkel et al., 1987) (Kabata に従うアミノ酸の番号付け及び IUPAC - IUB に従うヌクレオチドのコード、Cornish-Bowden, 1985)。この目的で、28、30、31 及び 32 位にて縮重したコドン KMT (Y / A / D / S) をコードする合成オリゴヌクレオチドを用いて多様性を L1 に導入した。(20% Y ; 17% G ; 15% S ; 7% D / A ; 4% T / P / V / R / I / L ; 2% W / F / M / Q / N / H / K / E) をコードするトリヌクレオチドホスホロアミダイトオリゴヌクレオチド (Virnekas et al., 1994) を用いて 91、92、93、94 及び 96 位にて L3 多様性を導入した。L2 は、生殖細胞系列 VK1 / DPK 9 コンセンサス配列 (WT) 又は 52 位及び 53 位におけるアスパラギン酸 (52D / 53D) に拘束された。

【0359】

1.2 : 凝集耐性のためのファージ ELISA (「加熱 / 冷却アッセイ」)

ファージ ELISA 形式 (McCafferty et al., 1990; Jespers et al., 2004) にて加熱インキュベートの後のシグナルの保持を測定することによってクローンの凝集耐性を解析した。炭酸緩衝液 (pH 9.6) 中のプロテイン A、プロテイン L 又は標的抗原によって Nunc の Maxisorp 免疫プレートのウェルを一晚被覆した。プレートを PBS で 1 回洗浄し、PBS で希釈した約 4% の粉ミルク (MPBS) でブロックした。単一のコロニーを寒天プレートから取り出し、約 15 μg / ml のテトラサイクリンを補完した 2 x TY 培地 (約 16 g / l のトリプトン、約 10 g / l の酵母抽出物、約 5 g / l の NaCl を含有する、pH 7.0) にて一晚、約 30 で振盪しながら増殖させた。遠心によって細胞を取り除き、ピオチン - PEO₄ - N - ヒドロキシスクシンイミド (Pierce、約 50 μM の最終濃度) を加えることによって培養上清中でファージを直接ピオチン化した。100 mM のトリス HCl、pH 7.5 を用いて過剰のピオチン化剤を失活させた。加熱選抜については、上清を先ず約 80 で 10 分間インキュベートし、次いで約 4 で 10 分間インキュベートした。上清をブロックした ELISA のウェルに加えた。PBS で 3 回洗浄した後、エクストラビジン - HRP 抱合体 (Sigma) 及び 3,3',5,5' - テトラメチルベンジジン (TMB) 基質を用いて、結合したファージ粒子を検出した。450 nm 及び 650 nm での測定値を差し引くことによって吸収を算出した。

10

20

30

40

50

【0360】

標的抗原におけるクローンの凝集耐性は、ファージE L I S A形式 (McCafferty et al., 1990; Jespers et al., 2004) にて加熱インキュベートの後のシグナルの保持を測定することによって解析した。P B S 緩衝液におけるストレプトアビジンによってN u n c のM a x i s o r p 免疫プレートのウェルを一晩被覆した。プレートをP B S で1回洗浄し、P B S で希釈した約4%の粉ミルク (M P B S) でブロックした。次いでビオチン化抗原をプレートに加えた。単一のコロニーを寒天プレートから取り出し、約15 μg / ml のテトラサイクリンを補完した2 x T Y 培地 (約16 g / l のトリプトン、約10 g / l の酵母抽出物、約5 g / l のNaClを含有する、pH 7.0) にて一晩、約30で振盪しながら増殖させた。遠心によって細胞を取り除いた。100 mMのトリスHCl、pH 7.5を上清に加えた。加熱選抜については、上清を先ず約80で10分間インキュベートし、次いで約4で10分間インキュベートした。上清をブロックしたE L I S Aのウェルに加えた。P B S で3回洗浄した後、エクストラビジン-H R P 抱合体 (S i g m a) 及び3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (T M B) 基質を用いて、結合したファージ粒子を検出した。450 nm及び650 nmでの測定値を差し引くことによって吸収を算出した。

10

【0361】

1.3: V_Lドメインの発現及び精製

天然の及び変異体のV_Lの可溶性発現のレベルを確定するために実験を実施した。この目的で、S a i l 及びB a m H I 部位を用いて、ドメインをコードするD N A 断片を発現ベクターp E T 1 2 にクローニングした。大腸菌B L 2 1 - G o l d (クローンD E 3) をプラスミドで形質転換し、イソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド (I P T G ; 最終濃度1 mM) の添加によって可溶性タンパク質の発現を誘導した。次いで、24時間後再誘導工程と共に細胞を30にて48時間増殖させた。遠心によって細胞を取り除き、発現されたタンパク質を含有する上清を濾過した (0.22 μm)。V_Lドメインの上清をrプロテインL樹脂 (G e n s c r i p t) に加え、4で一晩インキュベートした。P B S で洗浄する前に上清が樹脂を通過できる重力カラムにプロテインL樹脂を加えた。0.1 Mのグリシン/HCl、pH 2.7を加えることによってV_Lドメインを溶出し、0.1 MトリスHCl、pH 8.0を加えることによって分画を中和した。P B S に対してドメインを透析し、濃縮した。4~12%のビス-トリスゲル (I n v i t r o g e n) 上でのS D S - P A G E によってタンパク質の純度を評価した。

20

30

【0362】

1.4: V_Tドメインの可溶性発現のレベルを決定すること

タンパク質LのE L I S Aを用いて各V_L変異体の可溶性発現のレベルを決定したが、その際、可溶性ドメインの濃度は同一精製タンパク質の検量線に対して測定した。この目的で、3つの別々のコロニーで新しく形質転換した大腸菌B L 2 1 - G o l dを上述のように増殖させ、48時間発現を誘導した。遠心によって細胞を取り除き、ビオチン-P E 0 4 - N - ヒドロキシスクシンイミド (P i e r c e, 最終濃度50 μM) を加えることによって培養上清にて断片を直接ビオチン化した。5 μg / ml のプロテインL (S i g m a) によって一晩被覆し、P B S 中の4% (w / v) の脱脂乳粉でブロックした96穴のM a c i s o r p 免疫プレート (N u n c) に、培養上清と既知濃度での同じ変異体のビオチン化した精製断片を加えた。P B S T で3回洗浄した後、エクストラビジン-H R P 抱合体 (S i g m a) 及びT M B 基質を用いて、結合した抗体断片を検出した。吸収は450 nm (参照650 nm) にて測定し、線形回帰解析を用いて検量線から各試料の濃度を推定した。

40

【0363】

1.5: サイズ排除クロマトグラフィ及び加熱後の再折り畳み性

サイズ排除クロマトグラフィによってV_Lの溶出体積及び加熱後の再折り畳み性の収率を決定した。この目的で、20 mMのP O₄ (pH 7.4) 中の100 μMでの精製V_L変異体を85で20分間加熱し、その後4で10分間置き、又は加熱しなかった。加

50

熱した及び非加熱の試料は双方とも16,000×gで10分間遠心し、その後、PBSで平衡化し、AKTA清浄器(GE Healthcare)に接続されたSuperdex-G75カラム(GE Healthcare)にて解析した。500μlの体積にて0.5ml/分の流速で試料を注入した。加熱試料の曲線下面積を測定することによって各変異体の回収を確定し、非加熱試料の比率として表した。

【0364】

サイズ排除クロマトグラフィによってIgG全分子の溶出体積も測定した。この目的で、CDR-H1(31~33DED)、CDR-L2(50、52~53DDD)又は双方一緒のドメイン(31~33DED/50、52~53DDD)のいずれかにてアスパラギン酸及び/又はグルタミン酸の置換と共に生殖細胞系列V_HドメインDP47及び生殖細胞系列V_LドメインDPK9を含有するヒトIgG1を、PBSで平衡化し、AKTA清浄器(GE Healthcare)に接続したSuperdex-S200カラム(GE Healthcare)にて解析した。100μlの体積で0.5ml/分の流速にてPBS中の0.5mg/mlの試料を注入した。同様に、CDR-H1(30位)、CDR-L2(52位)又は双方にてアスパラギン酸置換を含有する4D5のIgGの溶出体積を上述のようなサイズ排除クロマトグラフィによって評価した。

10

【0365】

1.6: 濁度の測定

加熱しながら、精製断片の360nmでの吸収を測定することによって、変異体生殖細胞系列V_L及びscFvの断片を含有する溶液の濁度の測定を実施した。各断片型の条件は以下のとおりだった: 生殖細胞系列V_L変異体は85にて20mMのPO₄(pH7.4)中100μMであり; scFv変異体は85にてリン酸緩衝化生理食塩水中で10μMだった。測定は、QS-24石英キュベットを用い、1cmのパス長さにてVarian Cary 50 Bio UV-Vis分光光度計(Agilent Technologies)にて行った。

20

【0366】

1.7: SK-BR-3細胞の結合アッセイ

SK-BR-3ヒト乳癌細胞株にて全IgGとして4D5変異体を用いた全細胞結合アッセイを行った。この目的で、CDR-H1(30位)、CDR-L2(52位)又はその双方に変異を含有するヒトIgG1としての4D5の様々な濃度を、氷上にて1時間2つ組の細胞(2.5×10⁴個/試料)に加えた。1%BSAを含有するPBSで洗浄した後、氷上にて30分間、二次抗体抗ヒトIgG-FITC(Sigma)を加えた。FACSCalibur(BD Biosciences)を用いて生細胞集団の蛍光強度を記録し、FlowJo 7.6.5ソフトウェア(Tree Star)を用いて解析した。

30

【0367】

1.8: SK-BR-3細胞の増殖アッセイ

SK-BR-3細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)で補完したRPMI-1640(カリフォルニア州、カールスバッドのInvitrogen)にて維持した。0.05%のトリプシン/EDTA(Invitrogen)を用いて細胞を剥がし、2×10⁴個/mlにて完全培地に浮遊させた。500μlのアリコートに48穴細胞培養プレート(マサチューセッツ州、ローエルのCorning)に加え、30分間附着させた後、最終濃度10μg/mlで4D5IgG変異体を加えた。7日後、細胞をRPMI培地(FBSなし)で洗浄し、剥がし(上記のように)、生細胞を数えた。IgGの非存在下で増殖した細胞の比率として細胞増殖のレベルを算出した。

40

【0368】

1.9: 親和性の測定

表面プラスモン共鳴(BIACore、GE Healthcare)を用いて4D5scFv変異体の結合親和性を測定した。ビオチン化したHER2の細胞外ドメインをストレプトアビジンセンサーチップに不動化した。各scFv変異体の連続希釈を流速20

50

μ l / 分で注入し、曲線を 1 : 1 のラングミュア結合モデルに適合させた。

【 0 3 6 9 】

実施例 2 : D P K 9 の C D R 1 変異体の凝集耐性

D P K 9 の C D R 1 に単一又は複数の負に荷電したアミノ酸を導入する効果を調べるために実験を実施した。上記で詳述した（材料及び方法の項を参照）ように変異体 V_L を構築し、凝集耐性について調べた。手短には、ファージで表示させた V_L を 80 で 10 分間加熱し、その後、4 で 10 分間冷却した。タンパク質 L の E L I S A によって正しく折り畳まれた V_L を捕捉し、処理した試料の吸収シグナルを未処理の試料の比率として算出した。

【 0 3 7 0 】

結果を図 1 に示す。要約すると、D P K 9 V_L の C D R 1 への負に荷電したアミノ酸の導入は、最高レベルの凝集耐性を付与する 2 4 位及び 2 9 位での置換によってわずかに凝集耐性を改善した。

【 0 3 7 1 】

実施例 3 : D P K 9 の F R 2 / C D R 2 の変異体の凝集耐性

D P K 9 の C D R 2 及び隣接する F R 2 残基に単一又は複数の負に荷電したアミノ酸を導入する効果を調べるために実験を実施した。

【 0 3 7 2 】

上記で詳述した（材料及び方法の項を参照）ように、D P K 9 V_L ドメインの C D R 2 及び隣接する F R 2 残基における単一アミノ酸の交換及び交換の組み合わせを構築し、凝集耐性について調べた。手短には、ファージで表示させた V_L を 80 で 10 分間加熱し、その後、4 で 10 分間冷却した。タンパク質 L の E L I S A によって正しく折り畳まれた V_H を捕捉し、処理した試料の吸収シグナルを未処理の試料の比率として算出した。

【 0 3 7 3 】

結果を図 2 に示す。要約すると、F R 2 の 4 9 位又は C D R 2 の 5 0、5 1、5 2 及び 5 3 位のいずれか 1 つにおける負に荷電したアミノ酸の導入は V_L ドメインのかなりの凝集耐性を生じた。さらに、2、3 又は 4 の変異の組み合わせは凝集耐性を生じ、これらの組み合わせの多くはほとんど 100 % の凝集耐性を達成した。

【 0 3 7 4 】

実施例 4 : 凝集耐性の可変ドメインのライブラリの作出

表面に露出した C D R 残基を無作為化し、抗体のレパトアにおける天然のアミノ酸分布を模倣することによって V_H 及び V_L の変異体のライブラリを作出した。 V_H の 3 2 位及び 3 3 位及び V_L の 5 2 位及び 5 3 位におけるアスパラギン酸塩の導入は、ライブラリの平均の凝集耐性を有意に高めた（図 3）。見られた効果が他の C D R 残基とは無関係に高かったということは、ホットスポットの位置での変異の優勢な効果を強調している。

【 0 3 7 5 】

実施例 5 : 溶液における凝集耐性の評価

代表的なタンパク質変異体を単一ドメインとして発現させて可溶性タンパク質としてその凝集傾向を評価した。生殖細胞系列の V_H 及び V_L ドメインは、その溶融温度を上回って加熱すると容易に凝集する。 V_L (5 0、5 1、5 2 又は 5 3 位を含む) 内での単一の負の電荷の導入は凝集に対する耐性を控えめに高めた（図 4）。5 0 ~ 5 3 位から選択した 2 以上の位置での電荷は凝集耐性をさらに高めた（図 4 A 及び 4 B）。負の電荷の導入数の増加も抗体可変ドメインの他の生物物理的特性の範囲を改善する（表 1 及び図 5）。変異の数がゼロから 3 に増えるにつれて発現レベルは V_L ドメインについて 2 倍に増加する。たとえば、ゲル濾過における溶出体積及び再折り畳み収率のような他の一般的な測定も顕著に改善する（表 1 及び図 5）。

【 0 3 7 6 】

（表 1） V_L における負に荷電した残基の効果

10

20

30

40

	変異			
	なし	単一	二重	三重
発現 (mg/l)				
V _L	50.0	50D=140.9 51D=50.6 52D=52.9 53D=69.8	50D/52D=164. 2 51D/53D=82.3 52D/53D=67.5	50-53DADD=10 4.6
平均	50	78.6	104.7	104.6
標準偏差		42.4	52.1	
溶出 (ml)				
V _L	13.5	50D=13.1 52D=13.5 53D=13.4	50D/52D=12.9 50D/53D=13 51D/53D=12.9 52D/53D=13.2	50-53DADD=12 .9
平均	13.5	13.3	13.0	12.9
標準偏差		0.2	0.1	
折り畳み直し (%)				
V _L	13.5	50D=13.1 52D=13.5 53D=13.4	50D/52D=12.9 50D/53D=13 51D/53D=12.9 52D/53D=13.2	50-53DADD=12 .9
平均	13.5	13.3	13.0	12.9
標準偏差		0.2	0.1	

10

20

30

40

【 0 3 7 7 】

実施例 6 : アダリムマブに由来する変異体 V_L の凝集耐性

50

上記で詳述した（材料及び方法の項を参照）ように、LCDR2の中での単一又は複数の位置にて負に荷電したアミノ酸を導入するようにアダリムマブのV_Lを変異させ、ファージの表面に発現させ、凝集耐性について調べた。手短には、ファージを80℃で10分間加熱し、その後、4℃で10分間冷却した。正しく折り畳まれたV_Lをタンパク質LのELISAによって捕捉し、処理した試料の吸収シグナルを未処理の試料の比率として算出した。タンパク質LのELISAの結果を図6に示す。手短には、調べた負に荷電したアミノ酸及びその組み合わせはすべて、野生型（非変異体）のV_Lに比べて加熱した後、タンパク質LへのV_Lの結合を高めた。50位と52位での負に荷電したアミノ酸の組み合わせは最高レベルの凝集耐性を提供した。

【0378】

実施例7：4D5に由来する変異体V_Lの凝集耐性

4D5のV_LのCDR2に単数又は複数の負に荷電したアミノ酸を導入する効果を調べるために実験を実施した。

【0379】

上記で詳述した（材料及び方法の項を参照）ように、4D5のV_LドメインのCDR2における単一アミノ酸の変化及び変化の組み合わせを構築し、凝集耐性について調べた。

【0380】

手短には、ファージで発現されたV_Lを80℃で10分間加熱し、その後、4℃で10分間冷却した。正しく折り畳まれたV_Lをタンパク質LのELISAによって捕捉し、処理した試料の吸収シグナルを未処理の試料の比率として算出した。

【0381】

タンパク質LのELISAの結果を図7に示す。要約すると、50～53位のいずれかでの負に荷電したアミノ酸の導入及び調べたそれらの組み合わせのいずれかは野生型（非変異体）のV_Lに比べてV_Lの凝集耐性を高めた。

【0382】

実施例8：4D5に由来する変異体scFvの凝集耐性

scFvの構成にてリンカーを介して4D5のV_L及びV_Hを対合させた（実験の詳細については材料及び方法の項を参照のこと）。さらに、CDR1又はCDR2の中の単一又は複数の位置にて負に荷電したアミノ酸を導入するようにV_Lを変異させた。上記で詳述したように（材料及び方法の項を参照のこと）、単鎖Fvをファージの表面に発現させ、凝集耐性について調べた。手短には、ファージを80℃で10分間加熱し、その後、4℃で10分間冷却した。正しく折り畳まれたscFvをタンパク質LのELISA又は不動態化したHer2を用いたELISAによって捕捉し、処理した試料の吸収シグナルを未処理の試料の比率として算出した。

【0383】

タンパク質LのELISAの結果を図8に示す。手短には、CDR2内での1以上の位置にて負に荷電したアミノ酸を導入することは、野生型（非変異体）scFvに比べてscFvの凝集耐性をかなり高めた。CDR1における負に荷電したアミノ酸も野生型scFvに比べて凝集耐性を高めたが（図8A）、CDR2における変異とは同等ではなかった（図8B）。最大の効果を提供するCDR1における位置は、29位及び30と31の組み合わせ及び31と32の組み合わせだった。

【0384】

図9は、4D5に由来するscFvのCDR2に負に荷電したアミノ酸を導入することがHer2へのscFvの結合を妨げないことを示す。幾つかの場合で、負に荷電したアミノ酸の導入が、野生型（非変異体）scFvで検出されるレベルに比べて検出された結合のレベルを実質的に変化させなかった。

【0385】

図10は、上述のような加熱及び冷却に続いて、50～53位の間での単一の負に荷電したアミノ酸又は52位と53位での負に荷電したアミノ酸の組み合わせが、加熱後のHer2抗原への結合によって測定されたように、野生型（非変異体）scFvに比べて凝

10

20

30

40

50

集耐性を高めたことを示す。

【0386】

実施例9：V_L及びV_Hにおける負に荷電したアミノ酸の組み合わせ

4D5のV_L及びV_Hをs c F vとして発現させた。V_LのCDR2内で1以上の負に荷電したアミノ酸及びV_HのCDR1内で1以上の負に荷電したアミノ酸を含有するこれらs c F vの変異体形態も作出した。上記で詳述したように(材料及び方法の項を参照のこと)、単鎖Fvをファージの表面に発現させ、凝集耐性について調べた。手短には、ファージを80℃で10分間加熱し、その後、4℃で10分間冷却した。正しく折り畳まれたs c F vをタンパク質AのELISA又はタンパク質LのELISA又は不動化した抗原を用いたELISAによって捕捉し、処理した試料の吸収シグナルを未処理の試料の比率として算出した。

10

【0387】

タンパク質AのELISAの結果を図11に示す。負に荷電したアミノ酸の組み合わせはすべて、野生型(非変異体の4D5に由来する)s c F vで見られたものを上回ってs c F vの凝集耐性のレベルを高めた。

【0388】

タンパク質LのELISAの結果を図12に示す。負に荷電したアミノ酸の組み合わせはすべて、野生型(非変異体)に相当するs c F vで見られたものを上回って変異体s c F vの凝集耐性のレベルを高めた。

【0389】

図13は、V_LのCDR2及びV_HのCDR1にて負に荷電したアミノ酸を伴ったとしても、s c F vは標的抗原に結合することが可能であり、一部の変異体s c F vの結合のレベルは相当する野生型(非変異体)s c F vで見られたレベルに匹敵したことを示す。

20

【0390】

図14は、加熱及び冷却に続いて、一部の変異体s c F vが野生型(非変異体)s c F vに比べて保持された抗原結合のレベルを高めたことを示す。調べた組み合わせはすべて野生型(非変異体)s c F vよりも良い成績をあげた。

【0391】

実施例10：V_L及びV_H又はV_Hにおける負に荷電したアミノ酸の組み合わせは生物活性を抑えない

30

モデル系としてHER2を結合する治療用抗体、4D5の変異体形態を検討した。4D5のHC DR1の30位及びV_H又はLC DR2の52位及びV_L又は53位のいずれか又は双方にて負に荷電したアミノ酸に置換し、抗体断片として発現させた。凝集に対する耐性を調べるために、4D5変異体を高濃度で加熱し、濁度を測定した。変異の数が増えるにつれて耐性は相当に改善し、単なる視覚的検査によってさえ明瞭な差異は明らかだった。この傾向は4D5のV_H及びV_Lドメインの双方で見られた。s c F v断片の構成にてドメイン間リンカーを介してドメインを対合させた場合も、単一ドメインの構成で見られたのに類似する結果が見られた(図15)。

【0392】

組換えHER2抗原に対する代表的な4D5変異体の結合親和性も測定した(表2)。s c F v断片の構成における親和性は、4D5についての約1nMから変異体の一部についての約500nMに及んだ。幾つかの位置での交換は上手く認容され、平衡結合親和性(K_D)の損失は認められなかった。さらに、V_H及びV_Lの中での交換を組み合わせた場合、K_Dの損失は認められなかった。高度に凝集耐性のs c F v二重変異体(4D5-d)の1つは、野生型(4D5)と類似の親和性でHER2に結合した(表2)。

40

【0393】

(表2) 4D5 s c F v変異体の親和性

クローン	変異		HER2 親和性		
	V _H	V _L	k _a (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (10 ⁻⁴ s ⁻¹)	K _D (nM)
4D5	-	-	1.3	4.9	3.8
4D5-a	30D	-	2.4	4.9	2.3
4D5-b	-	52D	1.2	9.1	7.6
4D5-c	-	53D	1.5	175	118
4D5-d	30D	52D	2.1	8.6	4.1
4D5-e	30D	52D-53D	0.4	192	472

10

【0394】

HCDR1 (30位) 及び/又はLCDR2 (52位) での負に荷電したアミノ酸の抗原結合に対する効果をさらに検討するために、免疫グロブリンG (ヒトIgG1) の構成で4D5変異体を発現させた。未処理の4D5IgGと比べた変異体の全細胞(SK-BR-3)の結合に対する負に荷電したアミノ酸の効果をフローサイトメトリーによって評価した(図16A)。これらの実験は4D5IgG変異体の結合曲線及びEC50値が非変異の4D5IgGと大幅には異なることはなかったことを明らかにしている(図16及び表3)。

20

【0395】

図16Bはまた、4D5変異体が野生型4D5と同程度にSK-BR-3細胞の増殖を阻害したことも示す。

【0396】

(表3) SK-BR-3結合アッセイで測定したときの負に荷電したアミノ酸置換を含有するヒトIgG1としての4D5のEC50値

30

	アイソタイプ				プ対照
	WT/WT	30D/WT	WT/52D	30D/52D	
EC ₅₀ (μg/ml)	0.6421	0.8267	0.9255	0.9779	-

40

【0397】

実施例11: 完全長抗体における負に荷電したアミノ酸の効果

完全長抗体の他の特性に対する負に荷電したアミノ酸の効果を検討するために、CDR-H1 (31~33DED)、CDR-L2 (50, 52~53DDD) 又は双方のドメイン一緒 (31~33DED/50, 52~53DDD) にてアスパラギン酸塩及び/又はグルタミン酸塩の置換を伴う生殖細胞系列V_HドメインDP47及び生殖細胞系列V_LドメインDPK9を含有するヒトIgG1分子をサイズ排除クロマトグラフィによって解析した。結果を図17Aに示す。溶出特性は、V_H及びV_Lドメインの双方にて(31~33DED/50, 52~53DDD) 3つの負に荷電したアミノ酸を含有するIgGが、V_H (31~33DED/WT) 又はV_L (WT/50, 52~53DDD) のみに三

50

重の変異を含有する I g G よりも少ない体積で溶出したが、それは、同様に負に荷電した変異を伴わない I g G (W T / W T) よりもはるかに少ない体積で溶出した。

【 0 3 9 8 】

同様に負に荷電したアミノ酸置換を含有する I g G としての 4 D 5 をサイズ排除クロマトグラフィによって評価した。結果を図 1 7 B に示す。溶出特性は、 V_H 及び V_L ドメインの双方： V_H の 3 0 位及び V_L の 5 2 位 (3 0 D / 5 2 D) にて負に荷電したアミノ酸置換を含有する 4 D 5 I g G が、単一ドメインのみで (3 0 D / W T 又は W T / 5 2 D) で負に荷電したアミノ酸置換を含有する 4 D 5 I g G と比べて少ない体積で溶出することを示した。これらは同様に、追加の負に荷電したアミノ酸置換を含有しない (W T / W T) 4 D 5 I g G よりも少ない体積で溶出した。

10

【 0 3 9 9 】

これらのデータは、J e s p e r s ら (2 0 0 4) によって記載されたように、H C D R 1 又は L C D R 2 の位置にて負に荷電したアミノ酸置換を含有する I g G はそのような変異のない I g G よりも非特異的相互作用が少なく、ゲル精製マトリクスとの「粘性」が少ないことを示している。これによって全 I g G の作出及び製造の間に高レベルの精製抗体が得られる。類似の結果は抗体断片、たとえば、D P K 9 の V_L でも得られた (図 1 7 C) 。

【 0 4 0 0 】

実施例 1 2 : 可溶性タンパク質の精製及び濁度の測定

D P K 9 又は 4 D 5 に由来する V_L の野生型及び変異形態を可溶性タンパク質として発現させ、プロテイン L 樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィによって精製した。図 4 B は、加熱し、冷却した後、5 1 位にて単一の負に荷電したアミノ酸又は 5 0 ~ 5 3 位にて複数の負に荷電したアミノ酸を含有する変異体 V_L が濁度によって測定したとき、野生型 (非変異体) V_L に比べて高い凝集耐性を有することを示す。5 0 ~ 5 3 位の間での負に荷電したアミノ酸の組み合わせは最高レベルの凝集耐性を提供した。

20

【 0 4 0 1 】

実施例 1 3 : 濃縮後の安定性に対する負に荷電したアミノ酸の効果

濃縮 (すなわち、凍結乾燥又は透析濾過) に続く凝集に対する耐性における負に荷電したアミノ酸の効果を検討するために、C D R - L 2 におけるアスパラギン酸塩の置換 (5 0 、 5 2 ~ 5 3 D D D) を伴う又は置換を伴わない (対照) D P K 9 に相当する V_L ドメインを解析した。

30

【 0 4 0 2 】

凍結乾燥実験については、2 0 m M のリン酸緩衝液、p H 7 . 4 中の 1 0 0 μ M (1 . 1 5 m g / m l) のタンパク質を先ず液体窒素でスナップ凍結し、次いで「室温条件」での 2 時間の乾燥のためにスピードバックに移した。凍結乾燥の後、タンパク質を水中で再構成し又は再懸濁し、分光光度計 (バイオフォトメータ、E p p e n d o r f) を用いて 3 2 0 n m にて吸収を測定することによって濁度を解析した。凍結乾燥に続いて、対照の D P K 9 の V_L は 2 . 4 4 4 の吸収を有したが、変異体の V_L は 0 . 0 2 3 の吸収を有した。

【 0 4 0 3 】

S u p e r d e x 7 5 を用いたゲル濾過後のタンパク質の回収も実質的に上記で記載したように解析した。この解析の結果は、約 6 9 % の対照 D P K 9 の V_L を回収することができるに対し、8 7 % の変異体 V_L を回収することができることを示した。

40

【 0 4 0 4 】

透析濾過実験については、P B S 緩衝液中 2 m g / m l の試料 2 0 0 μ l を A m i c o n U l t r a c e l (0 . 5 m l 、 1 0 K ; M i l l i p o r e) にて合計 2 0 分間、1 3 , 2 0 0 \times g で遠心した。3 0 μ l の残余分に 2 0 μ l の P B S を加え、分光光度計 (バイオフォトメータ、E p p e n d o r f) を用いて 3 2 0 n m にて吸収を測定した。透析濾過による濃縮に続いて、対照の D P K 9 の V_L は 0 . 5 8 0 の吸収を有したが、変異体の V_L は 0 . 0 6 4 の吸収を有した。

50

【 0 4 0 5 】

これらの結果はV_LのCDR2における負に荷電したアミノ酸が濃縮の後の可変ドメインの凝集を実質的に減らすことを示している。

【 0 4 0 6 】

(表4) 参考文献

- Al-Lazikani *et al.*, *J Mol Biol* 273, 927-948, 1997;
- Andersson-Engels *et al*, *Phys. Med. Biol*, 42:815-824, 1997;
- Arbabi-Ghahroudi *et al.*, *Prot. Eng., Des. & Sel.*, 22: 59-66, 2009;
- F.M. Ausubel *et al.* (editors), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present); 10
- Bendele *J Musculoskel Neuron Interact*; 7(3/4>):377-385, 2001;
- Borrebaeck (ed), *Antibody Engineering*, Oxford University Press, 1995 (ISBN0195091507);
- Bork *et al.*, *J Mol. Biol.* 242, 309-320, 1994;
- Bradl and Linington *Brain Pathol.*, 6:303-311, 1996; 20
- Brennan *et al*, *Science*, 229: 81-83, 1985;
- Brinkmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7538-7542, 1993;
- Carter *et al Nucleic Acids Res.* 13:4431- 4443, 1985;
- Carter *et al. Bio/Technology* 10: 163-167, 1992;
- Chen *et al. Nature*, 446:203-207, 2007; 30
- Cheung *et al.*, *Virology* 176:546, 1990;
- Chothia and Lesk *J. Mol Biol.* 196:901 -917, 1987;
- Chothia *et al. Nature* 342, 877-883, 1989;
- Cornish-Bowden, *Nucl. Acids Res.* 13: 3021, 1985;
- Dooley and Flajnik, *Dev Comp Immunol.* 30:43-56, 2006; 40
- Ewert *et al.*, *J. mol. Biol.*, 325: 531-553, 2003;
- Frangioni, *Curr. Opin. Chem. Biol*, 7:626-634, 2003;
- Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103;

- Goodman *et al.*, (editors) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed., Macmillan Publishing Co. (1990);
- Guss *et al.* *EMBO J.* 5: 1567-1575, 1986;
- Guy *et al.*, *Mol Cell Biol.* 12:954-61, 1992;
- Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1988; 10
- Harris *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 17: 290-296, 1999;
- Higuchi *et al.*, *Nucleic Acids Res* 16(15): 7351-7367, 1988;
- Higuchi, in *PCR Protocols*, pp.177-183, Academic Press, 1990;
- Ho *et al* *Gene (Amst.)* 77:51-59, 1989;
- Holbrook *et al.*, *Protein Eng.* 3 : 659-665, 1990; 20
- Holliger *et al* *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 90: 6444-6448, 1993;
- Hollinger and Hudson *Nature Biotechnology*, 23: 1126-1136, 2005;
- Hoogenboom and Winter *J Mol Biol*, 227:381, 1991;
- Hoyer *et al.*, *Biophys. Chem.*, 96: 273-284, 2002;
- Hu *et al.*, *Cancer Res.*, 56: 3055-3061, 1996;
- Hudson and Kortt *J. Immunol. Methods*, 231: 177-189, 1999; 30
- Hust *et al.*, *BMC Biotechnology* 7:14, 2007;
- Ito *et al* *Gene* 102:67-70, 1991;
- Jakobovits *et al.* *Nature Biotechnology* 25, 1134 - 1143, 2007;
- Jespers *et al.*, *J Mol Biol.*;337: 893-903, 2004;
- Kabat *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, 40
Bethesda, Md., 1987 and 1991;
- Kabat, E., Wu, T.T., Perry, H.M., Kay, S. and Gottesman, C.F. (1992) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5 ed. DIANE Publishing;
- Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614, 1986;

- Kohler and Milstein *Nature*, 25 (5):495-497, 1975;
- Kostelny *et al*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553, 1992;
- Kruif and Logtenberg *J. Biol. Chem.*, 271: 7630-7634, 1996;
- Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.*, 154: 367, 1987;
- Lee *et al.*, *Nat Protoc.*, 2: 3001-3008, 2007; 10
- Levin and Weiss, *Mol Biosyst.*, 2: 49-57, 2006;
- Lonberg, N. "Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies." *Handbook of Experimental Pharmacology 113*: 49-101, 1994;
- Largaespada *et al*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 166, 91-96, 1990;
- Lindmark *et al. J Immunol Meth.* 62: 1 -13, 1983; 20
- Marks *et al*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, 1991;
- Matsui *et al.*, *Cell*.61(6): 51-55, 1990;
- Matusik *et al.*, In: *Transgenics in Endocrinology*, ed. By MM Matzuk, CW Brown, and TR Kumar. The Humana Press Inc (Totowa, NJ) Chapter 19, pp 401-425, 2001
- McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552-554, 1990; 30
- Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:11, 1990;
- Muller *et al EMBO J.*9(3):907-13, 1990;
- Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188, 1992;
- Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer Verlag, New York, pp. 269-315, 1994; 40
- Presta *et al.*, *Cancer Res.*, 57: 4593-4599, 1997;
- Ramanujam *et al*, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 48:1034-1041, 2001;
- Risma *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*;92(5):1322-6, 1995;
- Roby *et al.*, *Carcinogenesis*. 21(4):585-9 , 2000;
- Roux *et al. J. Immunol.* 7(57):4083, 1998;

- Saha *et al.*, BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. *In* Nicosia, Cutello, Bentley and Timis (Eds.) ICARIS 2004, LNCS 3239, 197-204, Springer, 2004;
- Sakaguchi *et al.* *Nature*, 426: 454-460;
- Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989; 10
- Sanchez-Ruiz, *et al.*, *Biochemistry*, 27: 1648-52, 1988
- Scopes *In: Protein purification: principles and practice*, Third Edition, Springer Verlag, 1994;
- Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262, 1993; 20
- Stahl *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242, 1983;
- Strenglin *et al.* *EMBO J*, 7, 1053-1059, 1988;
- Tang *et al.* *J. Exp. Med.*, 199: 1455-1465, 2004;
- Trenado *et al.* *J. Clin. Invest.*, 112: 1688-1696, 2002;
- Van der Sluis *et al.* *Gastroenterology* 131: 117-129, 2006; 30
- van Mierlo and Steemsma, *J. Biotechnol.*, 7P:281-98, 2000;
- Virnekas *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 22: 5600, 1994;
- Wang *et al.* *J Clin Invest.* 118(7): 2629-2639, 2008;
- Weissinger *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88, 8735-8739, 1991;
- Wells *et al.* *Gene* 3⁶:315-323, 1985; 40
- Willuda *et al.*, *Cancer Res.*, 59: 5758-5767, 1999; and
- Zoller and Smith, *Methods Enzymol.*, 154: 329, 1987.

【 図 1 】

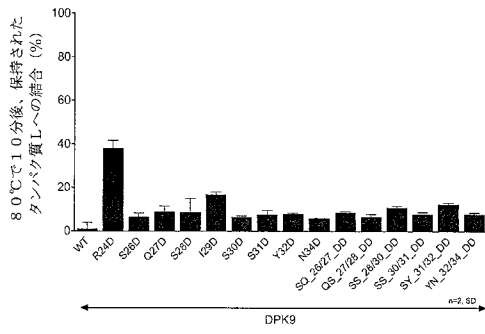


図 1

【 図 2 】

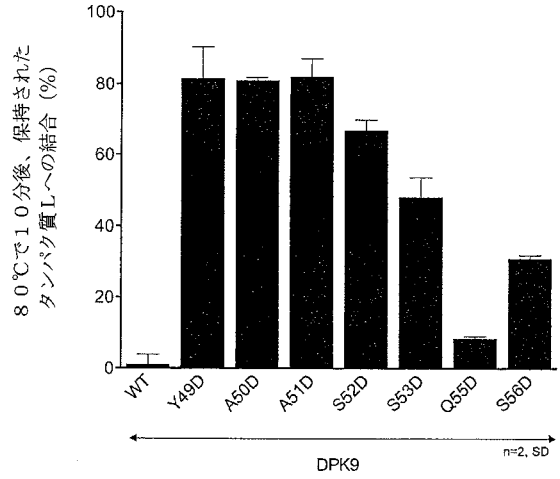


図 2

【 図 3 】

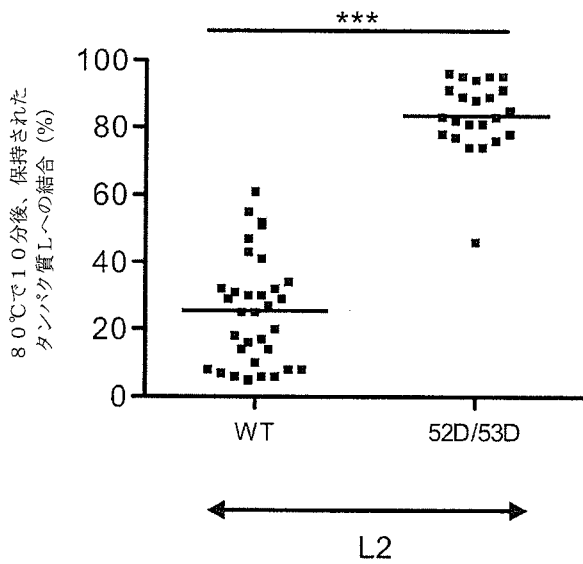


図 3

【 図 4 A 】

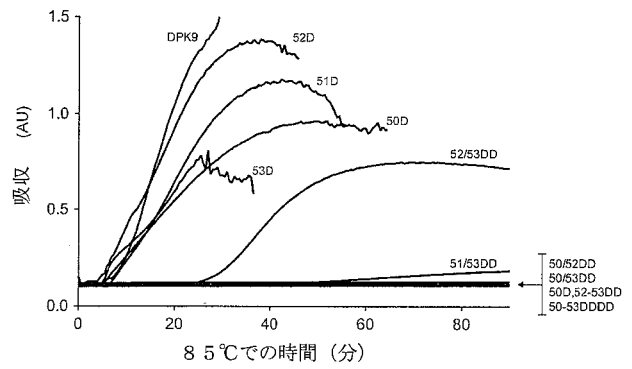


図 4 A

【 図 4 B 】

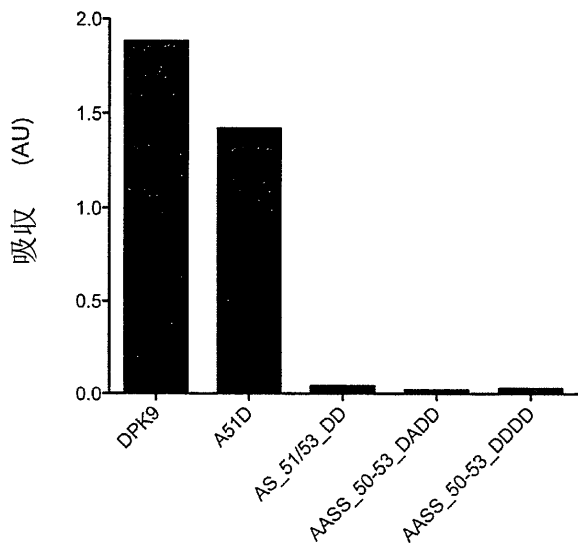
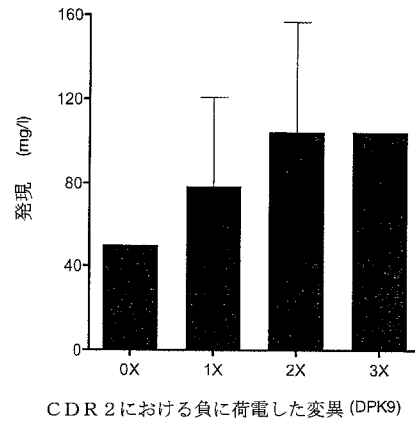


図 4 B

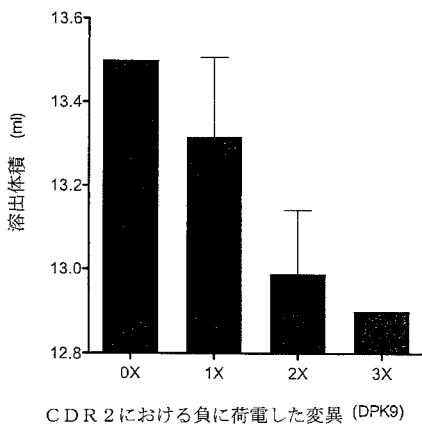
【 図 5 A 】



CDR 2における負に荷電した変異 (DPK9)

図 5 A

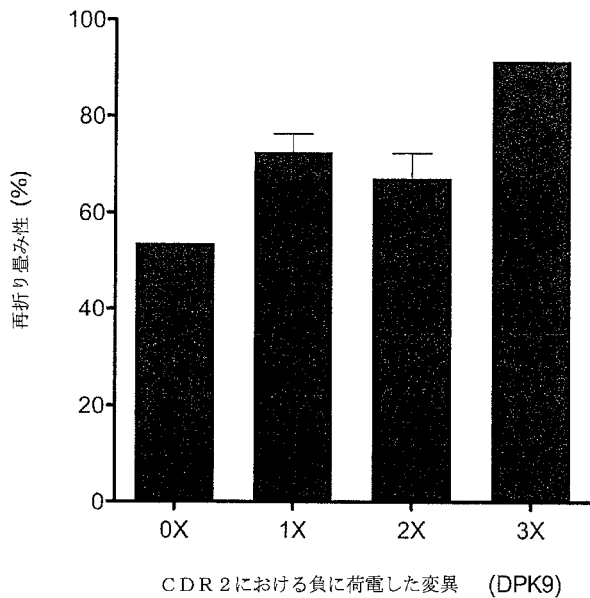
【 図 5 B 】



CDR 2における負に荷電した変異 (DPK9)

図 5 B

【 図 5 C 】



CDR 2における負に荷電した変異 (DPK9)

図 5 C

【 図 6 】

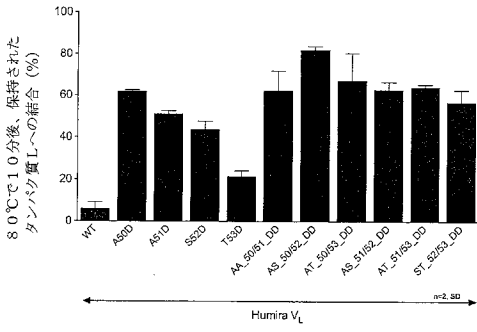


図 6

【 図 7 】

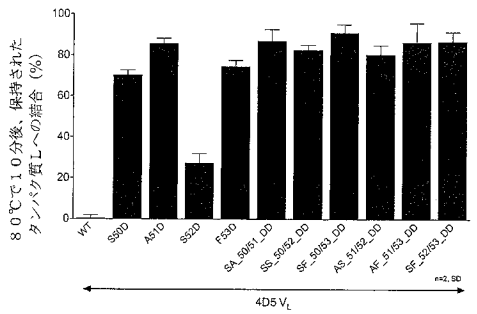


図 7

【 図 9 】

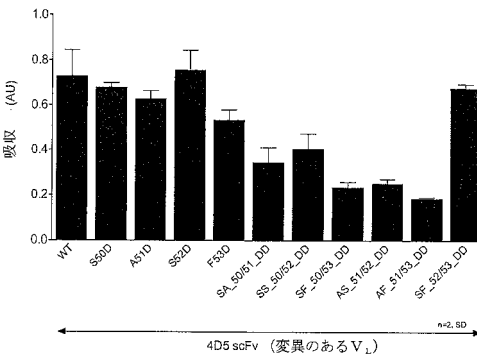


図 9

【 図 8 A 】

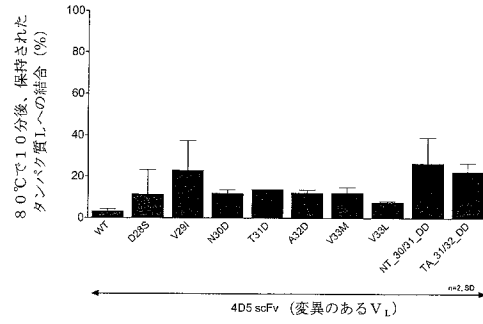


図 8 A

【 図 8 B 】

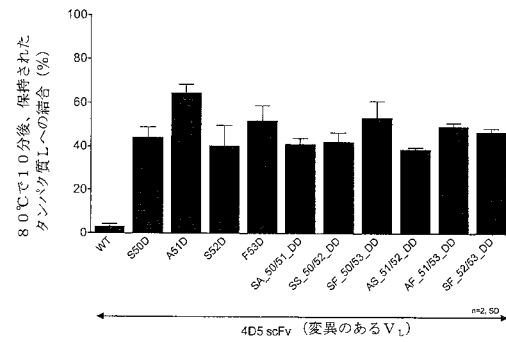


図 8 B

【 図 10 】

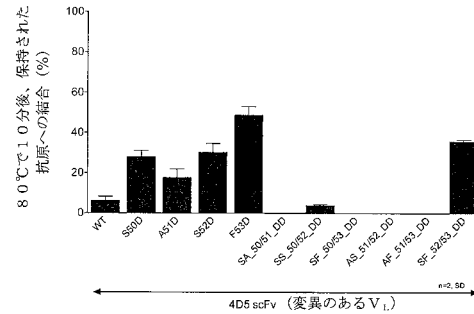


図 10

【 図 1 1 】

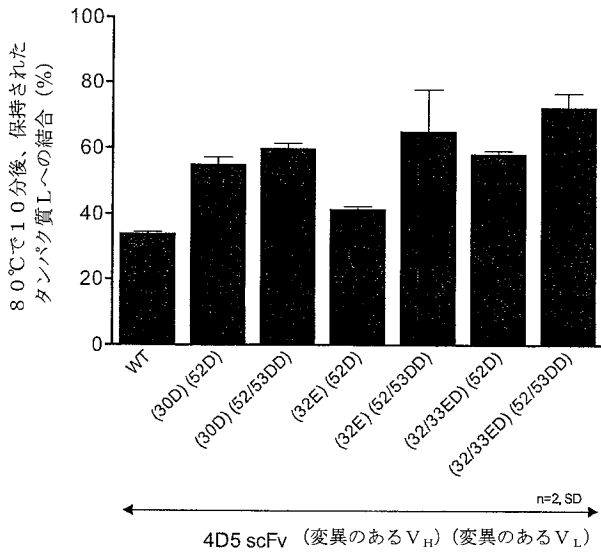


図 1 1

【 図 1 2 】

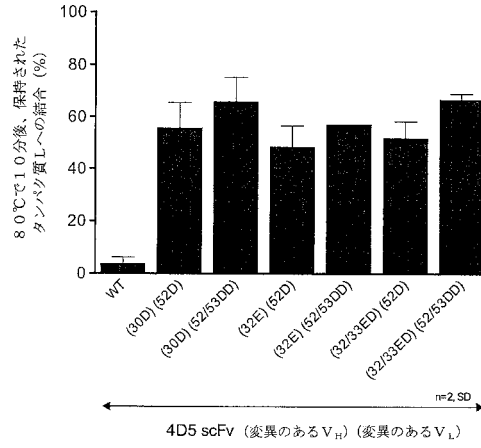


図 1 2

【 図 1 3 】

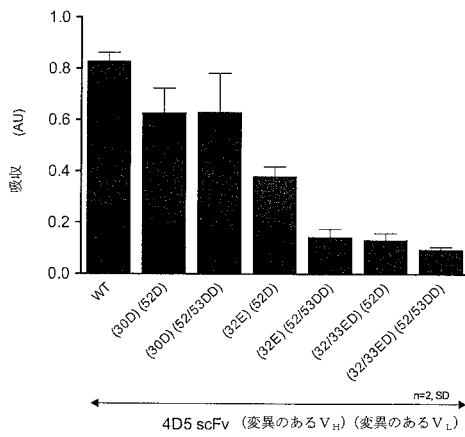


図 1 3

【 図 1 4 】

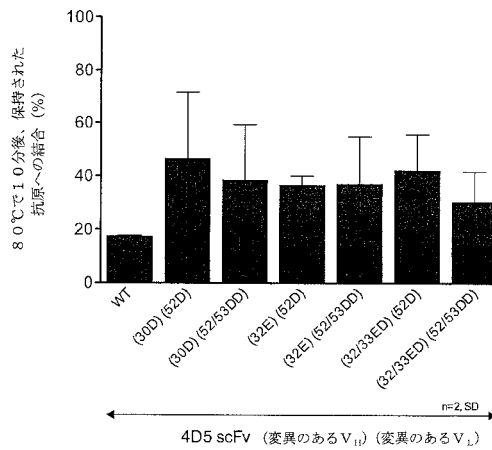


図 1 4

【 図 1 5 】

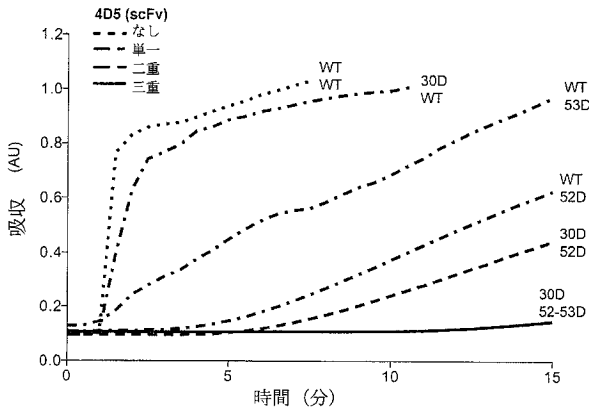


図 1 5

【 図 1 6 A 】

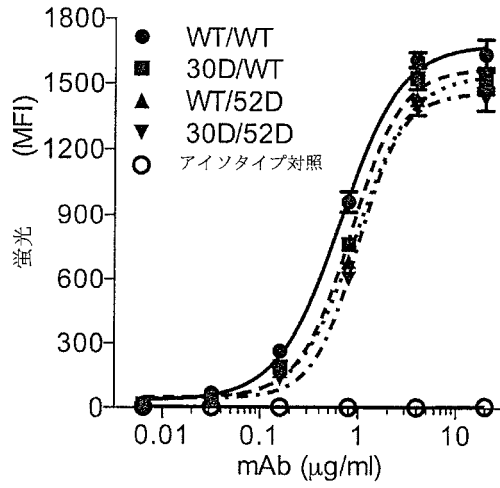


図 1 6 A

【 図 1 6 B 】

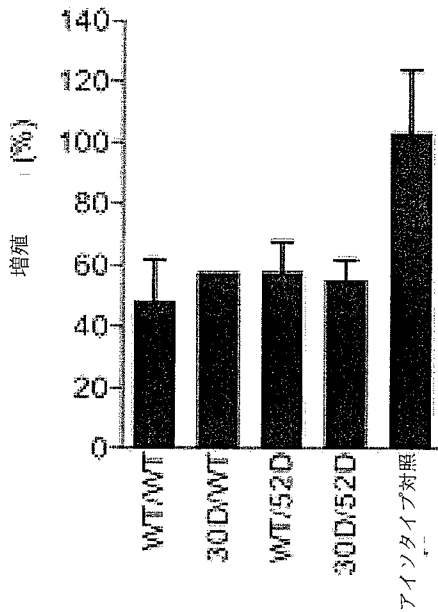


図 1 6 B

【 図 1 7 A 】

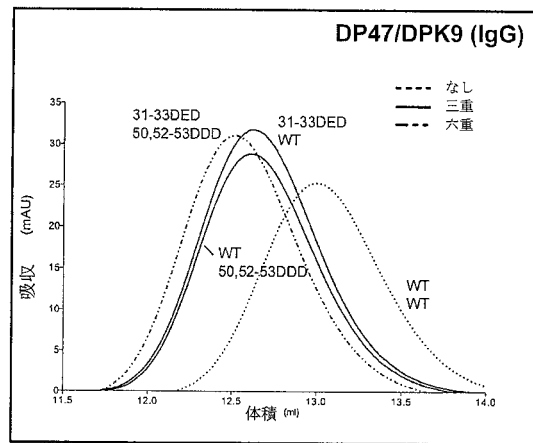


図 1 7 A

【 図 1 7 B 】

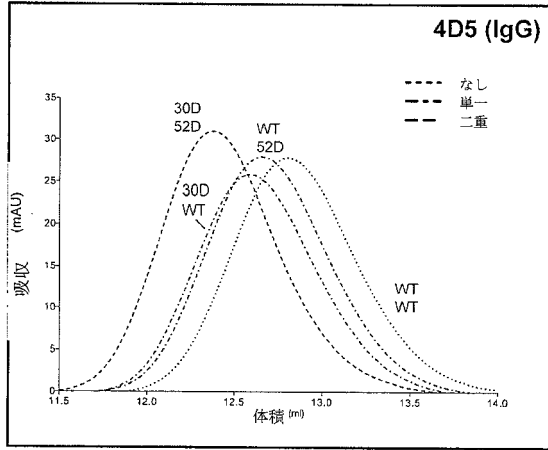


図 1 7 B

【 図 1 7 C 】

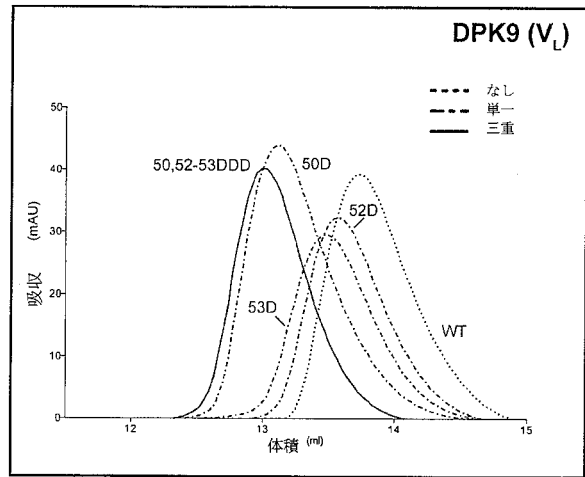


図 1 7 C

【 配 列 表 】

2014515749000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2012/000403
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/00 (OCT 2005) A61K 39/395 (OCT 2005) C12P 21/00 (OCT 2005)		
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)		
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) EPODOC, WPI, MEDLINE, HCA, BIOSIS, GENOMEQUEST (antibody, immunoglobulin, light chain, CDR, aggregation, resistance, reduction, negative charge, aspartic acid, glutamic acid).		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Documents are listed in the continuation of Box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" 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 "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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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 "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) "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 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "&" document member of the same patent family "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 28 June 2012		Date of mailing of the international search report 09 July 2012
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pat@ipaustralia.gov.au Facsimile No.: +61 2 6283 7999		Authorized officer Neal Dalton AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0399359615

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2012/000403
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/041643 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 02 April 2009 (see title, page 1 lines 5-10, page 9 lines 15-18 and 31-34, page 11 line 34 to page 12 line 4, page 193 line 34 to page 194 line 6, page 195 line 10 to page 196 line 1, SEQ ID NO's: 221-232)	31-34
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - on paper
 - in electronic form
 - b. (time)
 - in the international application as filed
 - together with the international application in electronic form
 - subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/AU2012/000403
--

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Box for Details

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2012/000403
Supplemental Box	
<p>Continuation of: Box III</p> <p>This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.</p> <p>This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Invention 1: Claims 1-30, 38-43 (all in part) are directed to proteins (and medicines compositions, libraries and methods therein) comprising: i) an antibody light chain variable domain comprising a negatively charged amino acid at two or more positions between residues 49 and 56 according to the numbering system of Kabat; and ii) an antibody heavy chain variable domain comprising a negatively charged amino acid at one or more of positions 28, 30, 31, 32, 33, 35 according to the numbering system of Kabat. The feature of two negatively charged amino acid at positions 49 and 50 of the light chain and one negatively charged amino acid at position 28 of the heavy chain is specific to this group of claims. • Inventions 2-46410: Claims 1-30, 38-43 (all in part) are directed to proteins (and medicines compositions, libraries and methods therein) comprising: i) an antibody light chain variable domain comprising a negatively charged amino acid at two or more positions between residues 49 and 56 according to the numbering system of Kabat; and ii) an antibody heavy chain variable domain comprising a negatively charged amino acid at one or more of positions 28, 30, 31, 32, 33, 35 according to the numbering system of Kabat. Two or more negatively charged amino acids can be arranged in 255 distinct ways between residues 49-56 of the light chain and one or more negatively charged amino acids can be arranged in 182 distinct ways at positions 28, 30, 31, 32, 33, 35 of the heavy chain. As such, 46410 discrete arrangements are possible. Therefore each of the other 46409 discrete arrangements is considered to be a group defining feature. • Invention 46411: Claims 31-35 as are directed to methods of increasing the aggregation-resistance of a protein comprising an antibody light chain variable domain, the method comprising modifying: i) the light chain variable domain by substituting an amino acid at two or more positions between residues 49 and 56 according to the numbering system of Kabat with a negatively charged amino acid; and ii) the heavy chain variable domain by substituting an amino acid at one or more of positions 28, 30, 31, 32, 33, 35 according to the numbering system of Kabat with a negatively charged amino acid. The feature of modifying variable domains by substituting with negatively charged amino acids is specific to this group of claims. <p>PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.</p> <p>When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.</p> <p>In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is a protein comprising: i) an antibody light chain variable domain comprising a negatively charged amino acid at two or more positions between residues 49 and 56 according to the</p> <p>Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2009)</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2012/000403
Supplemental Box	
<p>numbering system of Kabat; and ii) an antibody heavy chain variable domain comprising a negatively charged amino acid at one or more of positions 28, 30, 31, 32, 33, 35 according to the numbering system of Kabat.</p> <p>However this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in: WO 2009/041643 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 2 April 2009</p> <p>Therefore in the light of this document this common feature cannot be a special technical feature. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied <i>a posteriori</i>.</p> <p>Specifically, WO 2009/041643 discloses the anti-human IL-6 receptor antibody 6R_b_H2L3 which comprises aspartic acid at position 31 of the heavy chain and glutamic acid at positions 53 and 54 of the light chain (see page 195 lines 10-18, SEQ ID NO's: 228 and 231).</p> <p>Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2009)</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2012/000403	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2009/041643 A1	02 Apr 2009	AR 066172 A1	29 Jul 2009
		AR 068564 A1	18 Nov 2009
		AR 070633 A1	21 Apr 2010
		AR 070716 A1	28 Apr 2010
		AR 071003 A1	19 May 2010
		AU 2008304756 A1	02 Apr 2009
		AU 2008304778 A1	02 Apr 2009
		AU 2008305851 A1	02 Apr 2009
		AU 2009233301 A1	08 Oct 2009
		CA 2700498 A1	02 Apr 2009
		CA 2700701 A1	02 Apr 2009
		CA 2700986 A1	02 Apr 2009
		CA 2720359 A1	08 Oct 2009
		CN 101809162 A	18 Aug 2010
		CN 101874042 A	27 Oct 2010
		CN 101939425 A	05 Jan 2011
		CN 102046200 A	04 May 2011
		CO 6270266 A2	20 Apr 2011
		CO 6300964 A2	21 Jul 2011
		CR 11369 A	12 Aug 2010
		EC SP100589 A	30 Dec 2010
		EC SP10010135 A	30 Jul 2010
		EP 2196541 A1	16 Jun 2010
		EP 2202245 A1	30 Jun 2010
		EP 2206775 A1	14 Jul 2010
		EP 2275135 A1	19 Jan 2011
		JP 4535406 B2	01 Sep 2010
		JP 2010200768 A	16 Sep 2010
		JP 2011068682 A	07 Apr 2011
		KR 20100061748 A	08 Jun 2010
		KR 20100074220 A	01 Jul 2010
		KR 20100085067 A	28 Jul 2010
		KR 20100132060 A	16 Dec 2010
		MA 31780 B1	01 Oct 2010

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2012/000403	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		MA 32360 B1	01 Jun 2011
		MX 2010003158 A	14 Apr 2010
		MX 2010003329 A	27 Apr 2010
		MX 2010003443 A	21 Apr 2010
		NZ 584769 A	30 Sep 2011
		PE 02682010 A1	21 Apr 2010
		PE 12052009 A1	09 Sep 2009
		PE 12182009 A1	14 Aug 2009
		PE 16552009 A1	04 Nov 2009
		RU 2010125605 A	20 Dec 2011
		RU 2010116152 A	10 Nov 2011
		RU 2010116208 A	10 Nov 2011
		RU 2010116756 A	10 Nov 2011
		RU 2010145177 A	20 May 2012
		TW 200930404 A	16 Jul 2009
		TW 200930406 A	16 Jul 2009
		TW 200950804 A	16 Dec 2009
		TW 201012830 A	01 Apr 2010
		US 2010239577 A1	23 Sep 2010
		US 2011076275 A1	31 Mar 2011
		US 2011104157 A1	05 May 2011
		US 2011245473 A1	06 Oct 2011
		WO 2009041062 A1	02 Apr 2009
		WO 2009041621 A1	02 Apr 2009
		WO 2009041643 A1	02 Apr 2009
		WO 2009122667 A1	08 Oct 2009
End of Annex			
<p>Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)</p>			

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T
J, TM), EP(AL, 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, R
O, RS, 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, H
U, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN

(72)発明者 クリスト, ダニエル

オーストラリア国 2010 ニュー サウス ウェールズ州 ダーリンハースト, ヴィクトリア
ストリート 384, ガーバン インスティテュート オブ メディカル リサーチ内

(72)発明者 ダッジオン, キブ

オーストラリア国 2010 ニュー サウス ウェールズ州 ダーリンハースト, ヴィクトリア
ストリート 384, ガーバン インスティテュート オブ メディカル リサーチ内

(72)発明者 ルーエ, ロマン

オーストラリア国 2010 ニュー サウス ウェールズ州 ダーリンハースト, ヴィクトリア
ストリート 384, ガーバン インスティテュート オブ メディカル リサーチ内

Fターム(参考) 4C085 AA13 AA14 BB41 BB43 BB44 CC08 DD11 DD12 EE01

4H045 AA10 BA10 BA41 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	改性可变域分子及其制备和使用方法B.		
公开(公告)号	JP2014515749A	公开(公告)日	2014-07-03
申请号	JP2014505460	申请日	2012-04-19
申请(专利权)人(译)	医学研究の研究所格文		
[标]发明人	クリストダニエル ダッジオンキブ ルーエロマン		
发明人	クリスト,ダニエル ダッジオン,キブ ルーエ,ロマン		
IPC分类号	C07K16/00 C40B40/08 A61K39/00 G01N33/53 A61P35/00		
CPC分类号	A61P35/00 C07K16/241 C07K16/32 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/92 C07K2317/94 A61K49/0004 A61K49/0056 A61K49/0058 A61K49/04 A61K49/14 A61K49/16 A61K49/ /22 A61K51/088 A61K51/1096 C07K1/22 C07K16/18 C07K16/40 C07K2317/24 C07K2317/567 C07K2317/90 C12N15/1037 G01N33/5308 G01N33/54366 G01N33/57415 G01N2800/00		
FI分类号	C07K16/00.ZNA C40B40/08 A61K39/00.E G01N33/53.D A61P35/00		
F-TERM分类号	4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC08 4C085/DD11 4C085/ /DD12 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 浩 鈴木康仁		
优先权	2011901522 2011-04-21 AU 2011904856 2011-11-21 AU		
其他公开文献	JP6038121B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开提供了一种分离的蛋白质，其包含抗体轻链可变域（V_L大号），所述抗体轻链可变域包含根据Kabat编号系统位于残基49-56之间的至少一个带负电荷的氨基酸。提供，所述蛋白质能够与抗原特异性结合。

	変性			
	なし	単一	二重	三重
発現 (mg/l)				
V _L	50.0	50D=140.9 51D=50.6 52D=52.9 53D=69.8	50D/52D=164. 2 51D/53D=82.3 52D/53D=67.5	50-53DADD=10 4.6
平均	50	78.6	104.7	104.6
標準偏差		42.4	52.1	