

(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2013-508308

(P2013-508308A)

(43) 公表日 平成25年3月7日(2013.3.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/22 (2006.01)	C O 7 K 16/22 Z N A	2 G 0 8 8
C40B 40/10 (2006.01)	C 4 0 B 40/10	4 B 0 2 4
C12P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00 A	4 B 0 6 4
C12N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C 0 8 5
A61K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 V	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 87 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-534501 (P2012-534501)
 (86) (22) 出願日 平成22年10月25日 (2010.10.25)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年6月20日 (2012.6.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2010/001416
 (87) 国際公開番号 W02011/047442
 (87) 国際公開日 平成23年4月28日 (2011.4.28)
 (31) 優先権主張番号 61/254,460
 (32) 優先日 平成21年10月23日 (2009.10.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 2010904025
 (32) 優先日 平成22年9月7日 (2010.9.7)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 510029999
 ガーバン インスティテュート オブ メ
 ディカル リサーチ
 オーストラリア国 ニューサウスウェール
 ズ2010 シドニー ダーリングハース
 ト ヴィクトリアストリート384
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾可変ドメイン分子、ならびにその産生および使用方法

(57) 【要約】

本開示は、K a b a t 付番システムに従う28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位に負荷電アミノ酸を含有する抗体重鎖可変領域 (V_H) を含む、単離したタンパク質を提供し、本タンパク質は抗原に特異的に結合することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

K a b a t 付番システムに従う 2 8 位および / または 3 1 位および / または 3 2 位および / または 3 3 位および / または 3 5 位からなる群から選択される 2 つ以上の位置にて、負荷電アミノ酸を含有する抗体重鎖可変領域 (V_H) を含む単離したタンパク質であって、

前記タンパク質はニワトリリゾチーム、ガラクトシダーゼ、アミラーゼおよび B 5 R 以外の抗原に特異的に結合することができるか、または

(i) 前記タンパク質は、血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) に結合し、3 2 位および 3 3 位にてアスパラギン酸を含む場合、2 9 位と 3 5 位の間に少なくとも 1 つの負荷電アミノ酸を更に含有し、

(i i) 前記タンパク質は、ヒト V E G F に結合し、3 1 位および 3 3 位にてアスパラギン酸を含む場合、2 8 位と 3 5 位の間に少なくとも 1 つの負荷電アミノ酸を更に含有する単離したタンパク質。

10

【請求項 2】

K a b a t 付番システムに従う 2 8 位および / または 3 1 位および / または 3 2 位および / または 3 3 位および / または 3 5 位からなる群から選択される位置にて、2 つ以上の負荷電アミノ酸を含有する抗体重鎖可変領域 (V_H) を含む単離したタンパク質であって、

前記タンパク質は 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でき、

(i) 前記タンパク質は、血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) に結合し、3 2 位および 3 3 位にてアスパラギン酸を含む場合、2 9 位と 3 5 位の間に少なくとも 1 つの負荷電アミノ酸を更に含有し、

(i i) 前記タンパク質は、ヒト V E G F に結合し、3 1 位および 3 3 位にてアスパラギン酸を含む場合、2 8 位と 3 5 位の間に少なくとも 1 つの負荷電アミノ酸を更に含有する単離したタンパク質。

20

【請求項 3】

K a b a t 付番システムに従う 2 8 位、3 3 位および / または 3 5 位にて負荷電アミノ酸を含有する抗体重鎖可変領域 (V_H) を含む単離したタンパク質であって、

前記タンパク質はニワトリリゾチーム、ガラクトシダーゼ、アミラーゼおよび B 5 R 以外の抗原に特異的に結合することができるか、または

(i) 前記タンパク質は、血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) に結合し、3 2 位および 3 3 位にてアスパラギン酸を含む場合、2 9 位と 3 5 位の間に少なくとも 1 つの負荷電アミノ酸を更に含有し、

(i i) 前記タンパク質は、ヒト V E G F に結合し、3 1 位および 3 3 位にてアスパラギン酸を含む場合、2 8 位と 3 5 位の間に少なくとも 1 つの負荷電アミノ酸を更に含有する単離したタンパク質。

30

40

【請求項 4】

K a b a t 付番システムに従う 2 8 位、3 3 位および / または 3 5 位にて負荷電アミノ酸を含有する抗体重鎖可変領域 (V_H) を含む単離したタンパク質であって、

前記タンパク質は 1 0 μ M を超える親和性で抗原に特定に結合することができ、

(i) 前記タンパク質は、血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) に結合し、3 2 位および 3 3 位にてアスパラギン酸を含む場合、2 9 位と 3 5 位の間に少なくとも 1 つの負荷電アミノ酸を更に含有し、

(i i) 前記タンパク質は、ヒト V E G F に結合し、3 1 位および 3 3 位にてアスパラギン酸を含む場合、2 8 位と 3 5 位の間に少なくとも 1 つの負荷電アミノ酸を更に含有する単離したタンパク質。

50

【請求項 5】

前記タンパク質は 100 nM を超える親和性で抗原に特異的に結合することができる、請求項 2 または 4 のいずれかに記載の単離したタンパク質。

【請求項 6】

前記 K a b a t 付番システムに従う 28 位および / または 31 位および / または 32 位および / または 33 位および / または 35 位の負荷電アミノ酸無しのタンパク質と比較すると凝集する傾向が少ない、前記請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のタンパク質。

10

【請求項 7】

前記 K a b a t 付番システムに従う 28 位および / または 31 位および / または 32 位および / または 33 位および / または 35 位の負荷電アミノ酸無しのタンパク質と比較すると少なくとも約 60 °C まで加熱した後、凝集する傾向が少ない、前記請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 8】

少なくとも約 60 °C まで加熱した後、抗原に特異的に結合する能力を有する、前記請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のタンパク質。

20

【請求項 9】

少なくとも約 80 °C まで加熱した後、凝集する傾向が少ない、および / または抗原に特異的に結合する能力を有する、前記請求項 7 または 8 に記載のタンパク質。

【請求項 10】

ヒトタンパク質と結合することができる、前記請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 11】

ヒト疾患に関連する、またはその原因となるタンパク質と結合することができる、前記請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載のタンパク質。

30

【請求項 12】

前記 32 位の負荷電アミノ酸はグルタミン酸である、前記請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 13】

前記負荷電アミノ酸は、アスパラギン酸である、前記請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載のタンパク質。

40

【請求項 14】

K a b a t 付番システムに従う 26 位、30 位、39 位、40 位、50 位、52 位、52 a 位および 53 位からなる群から個別に、または集団として選択される、1 つ以上の残基にて負荷電アミノ酸を更に含む、前記請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 15】

負荷電アミノ酸はアスパラギン酸である、請求項 14 に記載のタンパク質。

【請求項 16】

K a b a t 付番システムに従う 31 位、32 位および 33 位にて負荷電アミノ酸を含む

50

、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 17】

(i) K a b a t 付番システムに従う 31 位にてアスパラギン酸と、
 (ii) K a b a t 付番システムに従う 32 位にてグルタミン酸またはアスパラギン酸と、
 (iii) K a b a t 付番システムに従う 33 位にてアスパラギン酸と
 を含む、請求項 16 に記載のタンパク質。

【請求項 18】

K a b a t 付番システムに従う 32 位および 33 位にて負荷電アミノ酸を含む、前記請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載のタンパク質。

10

【請求項 19】

(i) K a b a t 付番システムに従う 32 位にてグルタミン酸またはアスパラギン酸と、
 (ii) K a b a t 付番システムに従う 33 位にてアスパラギン酸と
 を含む、請求項 18 に記載のタンパク質。

【請求項 20】

28 位および / または 35 位にて負荷電アミノ酸を更に含む、請求項 16 ~ 19 のいずれかに記載のタンパク質。

20

【請求項 21】

前記 28 位および / または 35 位の負荷電アミノ酸はアスパラギン酸である、請求項 20 に記載のタンパク質。

【請求項 22】

K a b a t 付番システムに従う 28 位および / もしくは 31 位および / もしくは 32 位および / もしくは 33 位および / もしくは 35 位以外の位置にてヒトであるか、ヒト化されるか、または脱免疫化されるか、あるいはヒトタンパク質もしくはその領域に融合されたものである、請求項 1 ~ 21 のいずれかに記載のタンパク質。

30

【請求項 23】

抗原に特異的に結合することができる修飾された抗体重鎖可変領域 (V_H) を含み、前記 V_H は K a b a t 付番システムに従う 28 位、31 位、33 位および / または 35 位にて負荷電アミノ酸を含み、 V_H の未修飾形態は前記負荷電アミノ酸を含まない、タンパク質。

【請求項 24】

抗原に特異的に結合することができる修飾された抗体重鎖可変領域 (V_H) を含み、前記 V_H は K a b a t 付番システムに従う 28 位および / または 31 位および / または 32 位および / または 33 位および / または 35 位からなる群から選択される 2 つ以上の位置にてアミノ酸を含み、未修飾タンパク質は K a b a t 付番システムに従う 28 位および / または 31 位および / または 32 位および / または 33 位および / または 35 位にて前記 2 つ以上の負荷電アミノ酸を含まない、タンパク質。

40

【請求項 25】

(i) K a b a t 付番システムに従う 31 位にてアスパラギン酸および / または、
 (ii) K a b a t 付番システムに従う 32 位にてグルタミン酸および / または、
 (iii) K a b a t 付番システムに従う 33 位にてアスパラギン酸

50

を含む、請求項 2 3 または 2 4 に記載のタンパク質。

【請求項 2 6】

2 8 位および / または 3 5 位にて負荷電アミノ酸を更に含む、請求項 2 5 に記載のタンパク質。

【請求項 2 7】

前記 2 8 位および / または 3 5 位の負荷電アミノ酸はアスパラギン酸である、請求項 2 6 に記載のタンパク質。

10

【請求項 2 8】

前記タンパク質は、

(i) 抗体と、

(i i) 単ドメイン抗体と、

(i i i) 一本鎖 F v (s c F v) を含むタンパク質と、

(i v) 二重特異性抗体、三重特異性抗体または四重特異性抗体と、

(v) (i i) ~ (i v) のいずれかと抗体またはそのドメインの F c ドメインとを含む融合タンパク質と、

からなる群から選択される、請求項 1 ~ 2 7 のいずれかに記載のタンパク質。

20

【請求項 2 9】

化合物と結合した、請求項 1 ~ 2 8 のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項 3 0】

前記化合物は、放射性同位体、検出可能なラベル、治療化合物、コロイド、毒素、核酸、ペプチド、タンパク質、対象において前記タンパク質の半減期を増加させる化合物、およびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 2 9 に記載のタンパク質。

【請求項 3 1】

請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載のタンパク質および薬学的に許容可能な担体を含む、組成物。

30

【請求項 3 2】

多数の請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載の複数種類のタンパク質を含む、ライブラリ。

【請求項 3 3】

抗体重鎖可変領域 (V_H) を含むタンパク質を含み、V_H の少なくとも 3 0 % は、K a b a t 付番システムに従う 2 8 位および / または 3 1 位および / または 3 2 位および / または 3 3 位および / または 3 5 位から選択される 2 箇所以上にて負荷電アミノ酸を含む、ライブラリ。

40

【請求項 3 4】

請求項 1 ~ 2 8 のいずれかに記載のタンパク質を単離する方法であって、請求項 3 2 または 3 3 に記載のライブラリを抗原に接触させ、そこに結合するタンパク質を単離することを含む、方法。

【請求項 3 5】

抗体重鎖可変領域 (V_H) を含むタンパク質の凝集抵抗を増加させる方法であって、K a b a t 付番システムに従う 2 8 位、3 1 位、3 2 位、3 3 位および / または 3 5 位のアミノ酸を負荷電アミノ酸に置換することによって V_H を修飾することを含む、方法。

50

【請求項 36】

抗体重鎖可変領域 (V_H) を含むタンパク質の凝集抵抗を増加させる方法であって、K a b a t 付番システムに従う 28 位および / または 31 位および / または 32 位および / または 33 位および / または 35 位にて 2 つ以上のアミノ酸を負荷電アミノ酸に置換することによって V_H を修飾することを含み、未修飾タンパク質は置換位置にて負荷電アミノ酸を含まない、方法。

【請求項 37】

抗体重鎖可変領域 (V_H) を含むタンパク質の凝集抵抗を増加させる方法であって、K a b a t 付番システムに従う 28 位および / または 31 位および / または 32 位および / または 33 位および / または 35 位からなる群から選択される 2 つ以上の位置にて負荷電アミノ酸を含むように V_H を修飾することを含み、未修飾タンパク質は K a b a t 付番システムに従う 28 位および / または 31 位および / または 32 位および / または 33 位および / または 35 位にて前記 2 つ以上の負荷電アミノ酸を含まない、方法。

10

【請求項 38】

抗体重鎖可変領域 (V_H) を含む、可溶性タンパク質の生産率を増加させる方法であって、K a b a t 付番システムに従う 28 位および / または 31 位および / または 32 位および / または 33 位および / または 35 位にて 2 つ以上のアミノ酸を負荷電アミノ酸に置換することによって V_H を修飾することを含み、可溶性タンパク質の生産率が負荷電アミノ酸を欠くタンパク質の生産率と比較して増加する、方法。

20

【請求項 39】

抗体重鎖可変領域 (V_H) を含む、可溶性タンパク質の生産率を向上する方法であって、K a b a t 付番システムに従う 28 位および / または 31 位および / または 33 位および / または 35 位にてアミノ酸を負荷電アミノ酸に置換することによって V_H を修飾し、前記タンパク質を生成することを含み、可溶性タンパク質の生産率が負荷電アミノ酸を欠くタンパク質の生産率と比較して増加する、方法。

30

【請求項 40】

クロマトグラフィ樹脂からの抗体重鎖可変領域 (V_H) を含むタンパク質の回収率を増加させる、または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する溶液の体積を減少させる方法であって、K a b a t 付番システムに従う 28 位および / または 31 位および / または 32 位および / または 33 位および / または 35 位にて 2 つ以上のアミノ酸を負荷電アミノ酸に置換ることによって V_H を修飾することと、前記タンパク質をクロマトグラフィ樹脂に接触させることを含み、負荷電アミノ酸を欠くタンパク質と比較して、クロマトグラフィ樹脂から回収されたタンパク質の回収率が増加するか、または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する溶液の体積が減少する、方法。

40

【請求項 41】

クロマトグラフィ樹脂からの抗体重鎖可変領域 (V_H) を含むタンパク質の回収率を増加させる、または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する溶液の体積を減少させる方法であって、K a b a t 付番システムに従う 28 位、31 位、33 位および / または 35 位のアミノ酸を負荷電アミノ酸に置換することによって V_H を修飾することと、前記タンパク質をクロマトグラフィ樹脂に接触させることを含み、負荷電アミノ酸を欠くタンパク質と比較して、クロマトグラフィ樹脂から回収されたタンパク質の回収率が増加するか、または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する溶液の体積が減少する、方法。

50

【請求項 4 2】

医療における請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載のタンパク質、または請求項 3 1 に記載の組成物の使用。

【請求項 4 3】

対象において疾患を治療する、または予防する方法であって、それを必要とする対象に対して請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載のタンパク質、または請求項 3 1 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

10

【請求項 4 4】

細胞へ化合物を送達する方法であって、細胞を請求項 2 9 あるいは 3 0 に記載のタンパク質、または請求項 3 1 に記載の組成物と接触させることを含む、方法。

【請求項 4 5】

対象において疾患を診断する、または予後診断する方法であって、前記方法は、対象からの試料と、請求項 1 ~ 3 0 のいずれかに記載のタンパク質または請求項 3 1 に記載の組成物とを、前記タンパク質が抗原に結合し、複合体を形成するように接触させることと、前記複合体を検出することと、を含み、前記複合体の検出は前記対象の前記疾患の診断または予後診断となる、方法。

20

【請求項 4 6】

複合体のレベルを特定することを含み、前記複合体において増加したレベルまたは減少したレベルは、対象の疾患において診断または予後診断となる、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

対象において抗原の場所を特定するまたは検出する方法であって、
 (i) 請求項 2 9 または 3 0 に記載のタンパク質または請求項 3 1 に記載の組成物と、検出可能なラベルに結合された前記タンパク質が抗原に結合するように対象に投与することと、
 (i i) 生体内で検出可能なラベルを検出するか、またはその場所を特定することと、を含む、方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

参照による組み込み

【0002】

本出願は、2009年10月23日に出願された「Modified variable domain molecules and methods for producing and using same」と題するUS第61/254,460号、および2010年9月7日に出願された「Modified variable domain molecules and methods for producing and using same 2」と題する豪州仮特許出願第2010904025号からの優先権を主張するものであり、これらの内容全体は、参照することによって本明細書に組み込まれる。

40

【0003】

本開示は、凝集抵抗性抗体可変ドメインを含むタンパク質、およびその使用に関する。

50

【背景技術】

【0004】

抗原結合ドメインを含む抗体およびタンパク質は、現在、研究試薬、診断/予後診断試薬、産業用試薬、および治療薬剤として広範に使用されている。この広範に及ぶ適用性は、高度の特異性および親和性で、抗原に結合する、その抗原結合ドメインを含む抗体およびタンパク質の能力から生じる。したがって、その抗原結合ドメインを含む抗体およびタンパク質は、試料中の抗原に特異的に結合し、かつ抗原を発現する細胞を検出、定量化、もしくは殺滅する、または治療ペイロードを送達することができる。しなしながら、それらの多用性にもかかわらず、抗体のうちの一部のみが、診断/予後診断/産業/治療用途に適した生物物理学的特性を有する。例えば、治療または体内診断抗体/タンパク質は、所望の標的に蓄積するように、対象における長い血清半減期を必要とし、したがって、それらは、凝集に対して抵抗性でなければならない (Willuda et al., 1999)。産業用途は、しばしば、長い半減期を有するか、または凝集することなく、厳しい状態、例えば、高温への曝露後、機能することができる、抗体/タンパク質を必要とする (Harris, 1999)。抗体可変ドメインを含むタンパク質の凝集は、発現および/もしくは精製における困難性、免疫原性、毒性、劣化、親和性の低下、または保存後の活性の損失につながる可能性がある。

10

【0005】

タンパク質凝集は、折り畳み経路と競合する、または折り畳み経路において中間体から生じる可能性がある過程であり、通常、解きほどかれたタンパク質もしくは部分的に解きほどかれたタンパク質の会合を伴う。凝集への抵抗性は、天然状態を安定化させること (即ち、解きほどきに抵抗すること) によって、またはタンパク質の解きほどかれた、もしくは部分的に折り畳まれた状態が、凝集する傾向を低減することによって達成することができる。天然状態を安定化させることの不利点は、タンパク質が、それらが解きほどかれる環境に曝露される可能性が高いということである。一般的に、タンパク質が変性される、または解きほどかれる時、通常、タンパク質の内部において、分子内接触を媒介する、アミノ酸残基が曝露される。かかる曝露は、しばしば、タンパク質を、分子間接触および凝集体を形成しやすくする。解きほどきに抵抗するタンパク質とは対照的に、解きほどかれる時に、凝集する傾向が低減したタンパク質は、単に、かかる環境への曝露後、生物活性の非凝集状態に再折り畳みする。

20

30

【0006】

その抗原結合ドメインを含む抗体およびタンパク質の凝集抵抗性または凝集傾向は、通常、そこに含有される、最も凝集しやすいドメイン (複数を含む) によって、および周辺ドメイン (存在する場合) とのその相互作用の強度によって、制限される。これは、一度そのドメインが解きほどかれると、それが再折り畳みすることができない場合、それは、同じタンパク質または他のタンパク質における他のドメインと相互作用し、凝集体を形成し得るためである。抗体の定常ドメインは、一般的に、凝集せず、大幅には配列 (それらの名称によって示唆されるように) において変化しない。したがって、抗体の最も脆弱なドメインは、一般的に、1つの抗体から次の抗体へ変化する領域、即ち、可変領域 (例えば、重鎖可変領域 (V_H) および/または軽鎖可変領域 (V_L)) であるとされる (Ewert et al., 2003)。この点で、凝集しやすい scFv 分子を、それがなければ安定している組み換え抗体産物への組込むことは、しばしば、これらの概して望ましくない特質を、新しい組み換え設計に与える。Ewert et al., 2008 において記載されるように、「合理的な操作によって、任意の準最適な抗体構造体を改善するためには、「最も脆弱なリンク」を特定し、改善しなければならない」。Ewert et al. はまた、可変ドメインが、一般的に、抗体または抗体関連分子において、「最も脆弱なリンク」であるということを強調している。このため、凝集抵抗性にするように、可変ドメインを操作することは、可変ドメインを含むタンパク質全体を、凝集抵抗性にする可能性が最も高い。Hoyer et al., 2002 もまた、 V_H ドメインが、抗体可変ドメインを含むタンパク質の再折り畳みに、有意な効果を有するということを

40

50

立証した。筆者は、 V_H が、タンパク質を改善するために、修飾に対する主要な標的であるべきだということを結論付ける。

【0007】

可変ドメインの凝集を低減するために、種々の戦略、例えば、凝集抵抗性タンパク質の合理的な設計、相補性決定領域 (CDR) グラフティング、またはジスルフィド結合を可変ドメインに導入することが提唱されている。

【0008】

凝集抵抗性タンパク質の合理的な設計は、一般的に、タンパク質の凝集傾向への点変異の効果を予測するように、コンピュータによる分析の使用を含む。しなしながら、この手法に伴ういくつかの問題が存在する。例えば、解きほどかれたタンパク質の凝集を低減する可能性が高い、変異を単に同定するだけでは、十分ではない。むしろ、変異もまた、折り畳まれたタンパク質の凝集を増加させてはならないか、また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、改善されている特定のタンパク質の詳細な構造分析を必要とし、このため、完全に特性決定されていないタンパク質とともに使用することが困難であり、種々の異なるタンパク質に容易には適用できない。

10

【0009】

CDR グラフティングは、1つ可変ドメインからの CDR を、別の可変ドメインのフレームワーク領域 (FR) へ移植することを含む。この戦略は、抗 EGP-2 scFv を安定化させる上で有用であると示された (Willuda et al., 1999)。しなしながら、この戦略は、一般的に、解きほどきに抵抗する可変ドメインを生成するために使用され、これは、上で述べられるように、最も望ましい形態のタンパク質ではない。この手法の不利点は、CDR グラフティング後に生じる可能性がある、親和性の低減を含む。この親和性の損失は、変異を FR に導入することによって克服することができるが、しなしながら、かかる変異は、タンパク質において、免疫原性エピトープを生成する可能性があり、それによって、タンパク質を、治療的観点からは望ましくないものにする。さらに、CDR グラフティングは、一般的に、グラフティングのための好適性を評価するように、ドナーおよびアクセプタ可変領域の結晶構造の分析またはホモロジーモデリングを必要とする。明らかに、かかる手法は、難儀であり、専門知識を必要とする。さらに、各可変領域は、異なる構造を有するため、本方法は、種々の分子にわたって、容易には適用されない。

20

30

【0010】

ジスルフィド結合を可変領域に導入することを含む方法に関して、その結合は、タンパク質が正確に再折り畳みすることを支援することができる一方で、それはまた、剛性を可変ドメインに導入する。かかる剛性は、抗原に対する抗体の親和性を低減する可能性がある。さらに、全ての可変ドメインが、親和性の損失を伴うことなく、また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のための必要なシステイン残基の導入を支持することができるわけではない。さらに、高タンパク質濃度下のジスルフィド結合の形成は、タンパク質凝集につながる可能性があり、このため、結合のいかなる可能性のある正の効果も無効にする。

40

【0011】

前の考察から明らかであるように、凝集抵抗性可変ドメインを含有するタンパク質、およびそれらの生成のための過程に対する必要性が、当該技術分野において存在する。好ましくは、これらのプロセスは、種々の個別の可変領域に容易に適用可能である。

【発明の概要】

【0012】

本発明に至る研究において、本発明者は、例えば、熱への曝露後、凝集への抵抗性を付与した抗体の可変領域におけるアミノ酸残基の同定に努めた。かかる凝集抵抗性タンパク質は、種々の用途、例えば、療法および/または診断/予後診断に有用である。本発明者

50

は、 V_H を含む凝集抵抗性単ドメイン抗体の配列を、同じフレームワーク配列を有するが、凝集抵抗性ではない、生殖細胞系 V_H と比較した。最初に、本発明者は、凝集抵抗性 V_H の相補性決定領域において、多数のアミノ酸相違を同定した(図1に示されるとおり)。同定された多数の相違にもかかわらず、本発明者は、単一のアミノ酸変化が、凝集抵抗性を V_H に付与したこと、および数個の変化の組み合わせが、観察された凝集抵抗性の大部分を付与したことを発見した。これらの所見は、本発明者に、相補性決定領域における変化の効果のさらなる調査を促した。本発明者は、Kabat付番システムに従う28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位の負荷電アミノ酸が、相当な凝集抵抗性を、 V_H またはそれを含むタンパク質に付与するのに十分であることを断定した。

10

【0013】

本発明者は、さらに、上で述べられる位置で2つ以上の負荷電アミノ酸を含めることにより、負荷電残基を欠損するタンパク質、または1つの負荷電残基のみを含むタンパク質のうちのいずれかと比較して、 V_H を含むタンパク質の凝集抵抗性を劇的に改善したことを見出した。本明細書において例示されるように、本明細書において説明される位置での複数の負荷電アミノ酸の包含は、凝集抵抗性を、タンパク質に付与する(例えば、溶液中で、またはファージの表面上で提示される)。この効果は、可溶性タンパク質において目立つ(ファージの表面上で提示されることとは対照的に)。したがって、本発明者は、凝集抵抗性を付与する単一のアミノ酸残基を断定しただけでなく、本発明者は、さらに、それらの残基を組み合わせることによって、その抵抗性を大幅に改善することができることを断定した。この点で、本発明者は、単一の負荷電アミノ酸で観察されるものよりも、大きな程度の凝集抵抗性を付与する負荷電アミノ酸の多くの組み合わせを特定した。本発明者は、 V_H における、かかるわずかなアミノ酸残基の置換が、かかる程度の凝集抵抗性を付与することは予想しなかった。上で説明される位置での置換に加え、本発明者はまた、検出可能な凝集抵抗性を V_H に付与する、相補性決定領域における他の変化を同定した(例えば、Kabat付番システムに従う26位および/または30位および/または50位および/または52位および/または52a位および/または53位の負荷電アミノ酸)。

20

【0014】

本発明者によって同定された変異は、抗体の相補性決定領域(CDR)内であるため、それらは、異なる抗体間、例えば、異なるフレームワーク領域を含む、異なるクラスもしくはサブクラスの抗体間で、容易に移転可能である。これは、抗体可変ドメインが、CDRにおける配列変化に対応するように選択されているが、フレームワーク領域は、一般的に、それらが、CDRループを提示するための足場を提供するため、著しくは変動しないためである。

30

【0015】

凝集抵抗性を付与する、相補性決定領域における置換に加え、本発明者はまた、検出可能な凝集抵抗性を V_H に付与する、隣接するフレームワーク領域における変化を同定した(例えば、Kabat付番システムに従う39位および/または40位の負荷電アミノ酸)。

40

【0016】

これらの所見は、本発明者が、 V_H ドメインを含む新しいタンパク質を同定するようにスクリーニングするために有用、例えば、治療および/または診断的試薬として有用な、かかるタンパク質のライブラリに加え、抗原に特異的に結合することができる V_H を含むいくつかの凝集抵抗性タンパク質を産生することを可能にした。

【0017】

本発明者によって産生されたタンパク質はまた、負荷電アミノ酸(複数を含む)を欠損するタンパク質と比較して、組み換えシステムにおいて、より高いレベルで発現された。さらに、複数の負荷電アミノ酸を組み合わせることによって、本発明者は、負荷電アミノ酸を欠損する、または単一の負荷電アミノ酸残基を含有するタンパク質と比較して、可溶

50

性タンパク質のより高いレベルの発現を得ることができた。

【0018】

本発明者によって産生されたタンパク質はまた、精製の間クロマトグラフィ樹脂に捕捉される傾向の低減を示し、それによって、収率の増加を示した。この点で、本発明者は再び、本明細書において同定された単一の残基の包含が、かかる残基を欠損するタンパク質に勝る相当な利点を付与すること、および複数の負荷電残基の包含が、この効果をさらに改善することを示した。

【0019】

本発明者はまた、上で述べられるように、負荷電アミノ酸（複数を含む）を含むタンパク質が、かかる残基を欠損するタンパク質と比較して、凝集を伴うことなく、より高い程度の濃縮が可能であり、高濃度の組成物、例えば、薬学的組成物の保存および産生のための明らかな利点を提供することを見出した。

10

【0020】

本発明者によって産生されたタンパク質の凝集抵抗性はまた、タンパク質を、二量体/三量体の存在を低減するように加熱し、次いで、精製することができるため、精製の間、利点を提供する。これは、望ましくない形態のタンパク質の存在を低減するだけでなく、収率を増加させる可能性がある。

【0021】

本発明者は、さらに、凝集抵抗性タンパク質のライブラリを産生し、抗原に特異的に結合する、および/または高い親和性で抗原に結合するタンパク質を、そこから単離することができることを示した。ライブラリから単離されたタンパク質もまた、凝集抵抗性であることが示された。

20

【0022】

したがって、本開示は、K a b a tの付番システムに従う32位および/または33位に負荷電アミノ酸を含む、抗体V_Hを含む、単離されたタンパク質を提供し、本タンパク質は、鶏卵リゾチーム、ベータガラクトシダーゼ、アルファアミラーゼ、B5R以外の抗原に特異的に結合することができるか、または

(i) タンパク質が、ヒト血管内皮成長因子(VEGF)に結合し、32位および33位にアスパラギン酸を含む場合、それは、29位と35位との間に少なくとも1つの追加の負荷電アミノ酸を含み、

30

(ii) タンパク質が、ヒトVEGFに結合し、31位および33位にアスパラギン酸を含む場合、それは、28位と35位との間に少なくとも1つの追加の負荷電アミノ酸を含む。

【0023】

任意に、タンパク質は、さらに、K a b a tの付番システムに従う28位および/または31位および/または35位から成る群より選択される位置に負荷電アミノ酸を含む。一態様において、タンパク質は、さらに、K a b a tの付番システムに従う31位に負荷電アミノ酸を含む。

【0024】

追加の、または代替の実施例において、タンパク質は、凝集抵抗性V_Hを含む。

40

【0025】

一態様において、タンパク質は、HEL4ではない(即ち、配列番号1に記載される配列を含まない)。

【0026】

本開示はまた、K a b a tの付番システムに従う28位、33位、および/または35位に負荷電アミノ酸を含む抗体V_Hを含む、単離されたタンパク質を提供し、本タンパク質は、鶏卵リゾチーム、ベータガラクトシダーゼ、アルファアミラーゼ、B5R以外の抗原に特異的に結合することができるか、または

(i) タンパク質が、ヒトVEGFに結合し、32位および33位にアスパラギン酸を含む場合、それは、29位と35位との間に少なくとも1つの追加の負荷電アミノ酸

50

を含み、

(i i) タンパク質が、ヒト V E G F に結合し、31位および33位にアスパラギン酸を含む場合、それは、28位と35位との間に少なくとも1つの追加の負荷電アミノ酸を含む。

【0027】

本開示はまた、K a b a t の付番システムに従う28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位から成る群より選択される、2つ以上の位置に、負荷電アミノ酸を含む抗体 V_H を含む、単離されたタンパク質を提供し、本タンパク質は、鶏卵リゾチーム、ベータガラクトシダーゼ、アルファアミラーゼ、B5R以外の抗原に特異的に結合することができるか、または

(i) タンパク質が、ヒト V E G F に結合し、32位および33位にアスパラギン酸を含む場合、それは、29位と35位との間に少なくとも1つの追加の負荷電アミノ酸を含み、

(i i) タンパク質が、ヒト V E G F に結合し、31位および33位にアスパラギン酸を含む場合、それは、28位と35位との間に少なくとも1つの追加の負荷電アミノ酸を含む。

【0028】

一態様において、タンパク質は、凝集抵抗性 V_H を含む。

【0029】

本開示はまた、K a b a t の付番システムに従う28、33、および/または35位に負荷電アミノ酸を含む抗体 V_H を含む、単離されたタンパク質を提供し、本タンパク質は、10 μM または 5 μM または 1 μM を上回る、好ましくは 100 nM を上回る親和性で、抗原に特異的に結合することができ、

(i) タンパク質が、ヒト V E G F に結合し、32位および33位にアスパラギン酸を含む場合、それは、29位と35位との間に少なくとも1つの追加の負荷電アミノ酸を含み、

(i i) タンパク質が、ヒト V E G F に結合し、31位および33位にアスパラギン酸を含む場合、それは、28位と35位との間に少なくとも1つの追加の負荷電アミノ酸を含む。

【0030】

一態様において、タンパク質は、凝集抵抗性 V_H を含む。

【0031】

本開示はまた、K a b a t の付番システムに従う28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位から成る群より選択される2つ以上の位置に、負荷電アミノ酸を含む抗体 V_H を含む、単離されたタンパク質を提供し、本タンパク質は、10 μM または 5 μM または 1 μM を上回る、好ましくは 100 nM を上回る親和性で、抗原に特異的に結合することができ、

(i) タンパク質が、ヒト V E G F に結合し、32位および33位にアスパラギン酸を含む場合、それは、29位と35位との間に少なくとも1つの追加の負荷電アミノ酸を含み、

(i i) タンパク質が、ヒト V E G F に結合し、31位および33位にアスパラギン酸を含む場合、それは、28位と35位との間に少なくとも1つの追加の負荷電アミノ酸を含む。

【0032】

一態様において、タンパク質は、ベータガラクトシダーゼ、アルファアミラーゼ、B5R、ヒト V E G F、またはヒト腫瘍壊死因子 に結合しない。

【0033】

本開示はまた、抗原に特異的に結合することができる抗体 V_H を含む、タンパク質を提供し、V_H は、配列 X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ を含む隣接するアミノ酸の配列を含み、X₁ は、K a b a t の付番システムに従う28位に対応し、

10

20

30

40

50

X_1 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、および X_8 のうちの少なくとも2つは、負荷電アミノ酸であり、 $X_1 \sim X_8$ の残りのアミノ酸は、任意のアミノ酸であり、

タンパク質は、鶏卵リゾチームまたはベータガラクトシダーゼまたはB5Rに結合せず、
 (i) タンパク質が、ヒトVEGFに結合し、 X_5 位および X_6 位にアスパラギン酸を含む場合、それは、 X_2 位と X_8 位との間に少なくとも1つの追加の負荷電アミノ酸を含み、

(ii) タンパク質が、ヒトVEGFに結合し、 X_4 位および X_5 位にアスパラギン酸を含む場合、それは、 X_1 位と X_8 位との間に少なくとも1つの追加の負荷電アミノ酸を含む。

【0034】

一態様において、タンパク質は、上で述べられた負荷電アミノ酸を有しないタンパク質と比較して、低減された凝集傾向を有する。例えば、タンパク質は、負荷電アミノ酸を有しないタンパク質と比較して、少なくとも約60 または70 または好ましくは80 に加熱した後、低減された凝集傾向を有する。

【0035】

一態様において、タンパク質は、少なくとも約60 または70 または好ましくは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。

【0036】

一態様において、タンパク質は、ヒトタンパク質（適切な場合、ヒトVEGFまたはヒト腫瘍壊死因子 以外）に結合（好ましくは、特異的に結合）することができる。

【0037】

別の態様において、タンパク質は、ヒト状態に関連する、またはその原因となるタンパク質（適切な場合、VEGFまたはヒト腫瘍壊死因子 以外）に結合（好ましくは、特異的に結合）することができる。かかるタンパク質は、ヒトタンパク質、または、例えば、感染性生物からのタンパク質であり得る。好ましくは、タンパク質は、ヒトタンパク質（適切な場合、VEGFまたはヒト腫瘍壊死因子 以外）である。例示的なタンパク質は、可溶性および/もしくは分泌タンパク質または受容体（例えば、受容体の細胞外ドメイン）、あるいは膜結合タンパク質（例えば、膜結合タンパク質の細胞外ドメイン）である。

【0038】

一態様において、負荷電アミノ酸は、グルタミン酸である。別の態様において、負荷電アミノ酸は、アスパラギン酸である。

【0039】

一態様において、28位および/または31位および/または33位および/または35位の負荷電アミノ酸は、アスパラギン酸である。

【0040】

一態様において、32位の負荷電アミノ酸は、アスパラギン酸またはグルタミン酸である。

【0041】

例示的な形態において、タンパク質は、Kabatの付番システムに従う32位および33位に負荷電アミノ酸を含む。別の例示的な形態において、タンパク質は、Kabatの付番システムに従う31位および32位および33位に負荷電アミノ酸を含む。

【0042】

別の態様において、タンパク質は、さらに、Kabatの付番システムに従う26位、30位、39位、40位、50位、52位、52a位、および53位から成る群より個々にまたは一括して選択される1つ以上の残基に、負荷電アミノ酸を含む。好ましくは、負荷電アミノ酸は、30位にあり、例えば、この負荷電アミノ酸は、アスパラギン酸である。

【0043】

好ましくは、負荷電アミノ酸は、アスパラギン酸である。

【0044】

10

20

30

40

50

本明細書において説明される例示的なタンパク質は、以下を含む。

(i) K a b a t の付番システムに従う 2 8 位、3 1 位、3 2 位、3 3 位、および 3 5 位から成る群より個々にまたは一括して選択される 2 つ以上の残基に、負荷電アミノ酸、ならびに

(i i) 任意に、K a b a t の付番システムに従う 2 6 位、3 0 位、3 9 位、4 0 位、5 0 位、5 2 位、5 2 a 位、および 5 3 位から成る群より個々にまたは一括して選択される 1 つ以上の残基に、負荷電アミノ酸。

【 0 0 4 5 】

本明細書において説明される別の例示的なタンパク質は、以下を含む。

(i) K a b a t の付番システムに従う 3 2 位および 3 3 位に、負荷電アミノ酸、ならびに

(i i) 任意に、K a b a t の付番システムに従う 2 6 位、2 8 位、3 0 位、3 1 位、3 5 位、3 9 位、4 0 位、5 0 位、5 2 位、5 2 a 位、および 5 3 位から成る群より個々にまたは一括して選択される 1 つ以上の残基に、負荷電アミノ酸。

【 0 0 4 6 】

本開示の 1 つの例示的な形態において、タンパク質は、K a b a t の付番システムに従う 3 1 位および 3 2 位および 3 3 位に、負荷電アミノ酸を含む。

【 0 0 4 7 】

例えば、タンパク質は、

(i) K a b a t の付番システムに従う 3 2 位にグルタミン酸と、

(i i) K a b a t の付番システムに従う 3 3 位にアスパラギン酸とを含む。

【 0 0 4 8 】

例えば、タンパク質は、

(i) K a b a t の付番システムに従う 3 1 位にアスパラギン酸と、

(i i) K a b a t の付番システムに従う 3 2 位にグルタミン酸と、

(i i i) K a b a t の付番システムに従う 3 3 位にアスパラギン酸とを含む。

【 0 0 4 9 】

任意に、タンパク質は、さらに、K a b a t の付番システムに従う 2 8 位および / または 3 5 位に、負荷電アミノ酸 (例えば、アスパラギン酸) を含む。

【 0 0 5 0 】

一態様において、タンパク質は、2 8 位、3 2 位、および 3 3 位、または 2 8 位、3 1 位、3 2 位、および 3 3 位、または 3 2 位、3 3 位、および 3 5 位、または 3 1 位、3 2 位、3 3 位、および 3 5 位、または 2 8 位、3 1 位、3 2 位、3 3 位、および 2 5 位に、負荷電アミノ酸を含む。

【 0 0 5 1 】

本開示はまた、改善された凝集抵抗性を有する、既存のタンパク質の修飾形態を産生するのに有用である。したがって、本開示は、さらに、抗原に特異的に結合することができる、修飾抗体重鎖可変領域 (V_H) を含む、タンパク質を提供し、 V_H は、K a b a t の付番システムに従う 3 1 位および / または 3 3 位に負荷電アミノ酸を含み、 V_H の非修飾形態は、負荷電アミノ酸を含まない。

【 0 0 5 2 】

本開示は、さらに、抗原に特異的に結合することができる、修飾抗体 V_H を含む、タンパク質を提供し、 V_H は、K a b a t の付番システムに従う 2 8 位、3 1 位、3 3 位、および / または 3 5 位に負荷電アミノ酸を含み、 V_H の非修飾形態は、負荷電アミノ酸 (複数を含む) を含まない。好ましくは、 V_H の非修飾形態は、修飾 V_H と同じ抗原 (例えば、同じエピトープ) に結合する。

【 0 0 5 3 】

本開示は、さらに、抗原に特異的に結合することができる修飾 V_H を含む、タンパク質を提供し、 V_H は、K a b a t の付番システムに従う 2 8 位および / または 3 1 位および / または 3 2 位および / または 3 3 位および / または 3 5 位から成る群より選択される 2

10

20

30

40

50

つ以上の位置を含み、非修飾タンパク質は、K a b a tの付番システムに従う28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位に、2つ以上の負荷電アミノ酸を含まない。好ましくは、V_Hの非修飾形態は、修飾V_Hと同じ抗原（例えば、同じエピトープ）に結合する。

【0054】

本開示はまた、抗原に特異的に結合することができる修飾V_Hを含む、タンパク質を提供し、V_Hは、配列X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈を含む、隣接するアミノ酸の配列を含み、X₁は、K a b a tの付番システムに従う28位に対応し、X₁、X₄、X₅、X₆、およびX₈のうちの少なくとも2つは、負荷電アミノ酸であり、X₁~X₈の残りのアミノ酸は、任意のアミノ酸であり、非修飾タンパク質は、X₁、X₄、X₅、X₆、およびX₈位に、2つ以上の負荷電アミノ酸を含まない。

10

【0055】

一態様において、タンパク質は、修飾凝集抵抗性V_Hを含む。

【0056】

一態様において、タンパク質は、

(i) K a b a tの付番システムに従う31位にアスパラギン酸、および/または

(ii) K a b a tの付番システムに従う32位にグルタミン酸、および/または

(iii) K a b a tの付番システムに従う33位にアスパラギン酸を含む。

【0057】

任意に、タンパク質は、さらに、K a b a tの付番システムに従う28位および/または35位に、負荷電アミノ酸（例えば、アスパラギン酸）を含む。

20

【0058】

かかるタンパク質の例示的な特徴（例えば、負荷電アミノ酸および/または特定の負荷電アミノ酸に対する追加の部位）は、本明細書において説明され、本開示の本形態に準用して適用されるものとする。

【0059】

一態様において、タンパク質は、抗体である。

【0060】

一態様において、タンパク質または抗体は、鶏卵リゾチーム、ベータガラクトシダーゼ、アルファアミラーゼ、B5R（例えば、ワクシニアウイルスからの）に結合しないか、または

30

(i) タンパク質が、ヒトVEGFに結合し、32位および33位にアスパラギン酸を含む場合、それは、29位と35位との間に少なくとも1つの追加の負荷電アミノ酸を含み、

(ii) タンパク質が、ヒトVEGFに結合し、31位および33位にアスパラギン酸を含む場合、それは、28位と35位との間に少なくとも1つの追加の負荷電アミノ酸を含む。

【0061】

好ましくは、タンパク質は、ヒトタンパク質、例えば、疾病に関連する、またはその原因となるヒトタンパク質に結合する。

40

【0062】

別の態様において、任意の態様に従う、本明細書において説明されるタンパク質は、CDR、例えば、CDR3において、ジスルフィド結合を含まない。

【0063】

別の態様において、任意の態様に従う、本明細書において説明されるタンパク質内の可変領域は、全体的に酸性の等電点を有しない。

【0064】

本開示の例示的なタンパク質は、K a b a tの付番システムに従う28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位以外のアミノ

50

酸位置の、ヒト、ヒト化、または脱免疫化タンパク質であるか、またはヒトタンパク質もしくはその領域に融合されたものである（例えば、キメラ抗体である）。

【0065】

一態様において、本開示のタンパク質は、単ドメイン抗体（dAb）、または別のタンパク質（例えば、Fc領域）に融合されたdAbの形態である。

【0066】

代替の態様において、本開示のタンパク質は、さらに、軽鎖可変領域（V_L）を含み、V_HおよびV_Lは、会合して（例えば、抗原結合部位を含む）Fvを形成する。一態様において、Fvは、抗原に特異的に結合することができる。

【0067】

一態様において、V_HおよびV_Lは、異なるポリペプチド鎖にある。例えば、タンパク質は、抗体、ダイアボディ（二重特異性抗体）、トリアボディ（三重特異性抗体）、テトラボディ（四重特異性抗体）、またはFvの形態である。

【0068】

別の態様において、V_HおよびV_Lは、同じポリペプチド鎖にある。例えば、タンパク質は、（scFv）_n、または（scFv）_nを含む融合タンパク質の形態であり、nは、1～10の数である。

【0069】

代替の、または追加の態様において、特異的親和性を有するとして上で述べられるそれらのタンパク質以外に、タンパク質は、5 μM未満、好ましくは1 μM未満、好ましくは500 nM未満、好ましくは200 nM未満、およびより好ましくは1 nM未満といった10 nM未満の親和性で、標的抗原またはエピトープに特異的に結合する。

【0070】

代替の、または追加の態様において、本明細書において述べられる任意のタンパク質は、100 pM超、好ましくは10 pM超、好ましくは1 pM超の親和性で、標的抗原またはエピトープに特異的に結合する。

【0071】

追加の、または代替の態様において、本開示の任意のタンパク質は、300 nM以下、300 nMから5 pM、好ましくは50 nMから20 pM、または5 nMから200 pM、または1 nMから100 pMのK_Dで、その標的抗原（複数を含む）から解離する。

【0072】

一態様において、本開示のタンパク質は、28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35（および/または本明細書において説明される任意の追加の部位）に、1つの（または2つ以上の）負荷電アミノ酸（複数を含む）を含むように修飾される、配列番号2に記載される配列と、少なくとも約80%（または90%または95%または99%または100%）同一の配列を含む、タンパク質のCDR1を含む。一態様において、本開示のタンパク質は、配列番号5、6、7に記載される配列と、少なくとも約80%（または90%または95%または99%または100%）同一の配列を含むか、または前記タンパク質のCDR3（好ましくは、重鎖CDR3）を含む。本開示の一態様において、本開示のタンパク質は、任意の態様に従う、本明細書において説明される負荷電アミノ酸を含むように修飾される、配列番号10～13のうちのいずれか1つに記載される配列と、少なくとも約80%（または90%または95%または99%または100%）同一の配列を含む。本開示の一態様において、本開示のタンパク質は、28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位（および/または本明細書において説明される任意の追加の部位）に、1つの（または2つ以上の）負荷電アミノ酸（複数を含む）を含むように修飾される、配列番号10～13のうちのいずれか1つに記載される配列と、少なくとも約80%（または90%または95%または99%または100%）同一の配列を含む。

【0073】

本開示はまた、化合物に結合された、本開示のタンパク質を提供する。例えば、化合物

10

20

30

40

50

は、放射性同位体、検出可能な標識、治療化合物、コロイド、毒素、核酸、ペプチド、タンパク質、対象においてタンパク質の半減期を増加させる化合物、およびこれらの混合物から成る群より選択される。

【0074】

本開示はまた、本開示のタンパク質と、薬学的に許容可能な担体とを含む、組成物を提供する。

【0075】

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。一態様において、核酸は、発現構築体にあり、プロモータに動作可能に連結される。例えば、発現構築体は、発現ベクターである。

10

【0076】

本開示はまた、本開示のタンパク質を発現する細胞を提供する。例えば、細胞は、本開示の核酸または発現構築体を含む。例示的な細胞としては、哺乳類細胞、植物細胞、真菌細胞、および原核細胞が挙げられる。

【0077】

本開示はまた、本開示のタンパク質を産生するための方法を提供し、本方法は、本開示の発現構築体を、コードされたタンパク質が産生されるのに十分な時間および条件下で（またはコードされたタンパク質が産生されるように）維持することを含む。例えば、本方法は、本開示の細胞を、本開示のタンパク質が産生されるのに十分な時間および条件下で（または本開示のタンパク質が産生されるように）培養することを含む。

20

【0078】

一態様において、本方法は、さらに、本開示のタンパク質を単離することを含む。一態様において、本方法は、さらに、タンパク質を単離する前、間、または後に、タンパク質を、例えば、少なくとも約50 または60 または70 または80 に加熱することを含む。例えば、タンパク質は、発現および精製プロセスの間に自然発生する、二量体および/または三量体の量を低減するように加熱される。かかる方法は、本開示のタンパク質の増加したレベルの回収を容易にする。

【0079】

任意に、本方法は、さらに、タンパク質を化合物に結合させること、または化合物を薬学的組成物に製剤化することを含む。

30

【0080】

本開示は、さらに、本開示の複数のタンパク質を含む、ライブラリを提供する。

【0081】

本開示はまた、抗体 V_H を含むタンパク質を含む、ライブラリを提供し、 V_H のうちの少なくとも30%（または40%または50%または60%または70%または80%または90%または95%または98%または99%）は、Kabatの付番システムに従う28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位から成る群より選択される2つ以上の位置に、負荷電アミノ酸を含む。

【0082】

本開示はまた、抗体 V_H を含むタンパク質を含む、ライブラリを提供し、 V_H のうちの少なくとも30%（または40%または50%または60%または70%または80%または90%または95%または98%または99%）は、配列 $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ を含む、隣接するアミノ酸の配列を含み、 X_1 は、Kabatの付番システムに従う28位に対応し、 X_1 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、および X_8 のうちの少なくとも2つは、負荷電アミノ酸であり、 $X_1 \sim X_8$ の残りのアミノ酸は、任意のアミノ酸である。

40

【0083】

一態様において、負荷電アミノ酸を含む V_H は、32位および33位、または31位および32位および33位に残基を含む。

【0084】

50

負荷電アミノ酸に対する追加の部位、または含まれ得る特定の負荷電アミノ酸は、本明細書において説明され、本態様に準用して適用されるものとする。

【0085】

一態様において、タンパク質は、粒子（例えば、ファージもしくはリボソーム）、または細胞の表面上に呈示される。

【0086】

一態様において、32位および/または33位（および任意に31位）にあるもの以外のV_HドメインのCDR内（例えば、CDR3内、またはCDR2および3内、またはCDR1、2、および3内）のアミノ酸は、無作為もしくは半無作為であるか、またはヒト抗体に由来する。

10

【0087】

別の態様において、28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位にあるもの以外のV_HドメインのCDR内（例えば、CDR3内、またはCDR2および3内、またはCDR1、2、および3内）のアミノ酸は、無作為もしくは半無作為であるか、またはヒト抗体に由来する。

【0088】

明らかに、本開示はまた、前記ライブラリをコードする核酸のライブラリを提供する。

【0089】

本開示は、さらに、本開示のタンパク質を単離するための方法を提供し、本方法は、タンパク質が抗原に結合するのに十分な時間および条件下で（またはタンパク質が抗原に結合するように）本開示のライブラリを抗原と接触させることと、タンパク質を単離することを含む。

20

【0090】

本開示は、さらに、本開示の複数のタンパク質を含むライブラリを産生するための方法を提供し、本方法は、

(i) V_Hドメインを含む複数のタンパク質をコードする核酸を取得または産生することであって、V_Hドメインは、上で述べられる位置に負荷電アミノ酸を含む、取得または産生することと、

(ii) 以下の動作可能に連結された核酸

a) プロモータ、

b) (i) で取得または産生される核酸、および

c) 細胞もしくは粒子内/上での、V_H含有タンパク質の呈示を容易にする、ポリペプチドをコードする核酸

を含む、発現構築体のライブラリを産生することと、

(iii) 発現構築体によってコードされたタンパク質が細胞もしくは粒子内/上で呈示されるように、それらを発現することと、を含む。

30

【0091】

一態様において、32位および/または33位（および任意に31位）にあるもの以外のV_HドメインのCDR内（例えば、CDR3内、またはCDR2および3内、またはCDR1、2、および3内）のアミノ酸は、無作為もしくは半無作為であるか、またはヒト抗体に由来する。

40

【0092】

別の態様において、28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位にあるもの以外のV_HドメインのCDR内（例えば、CDR3内、またはCDR2および3内、またはCDR1、2、および3内）のアミノ酸は、無作為もしくは半無作為であるか、またはヒト抗体に由来する。

【0093】

一態様において、本方法は、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。かかる核酸は、発現構築体に導入することができる。任意に、タンパク質を発現することができる。

50

【0094】

本開示はまた、親和性成熟および/またはヒト化および/または脱免疫化といった、単離されたタンパク質への修飾を企図する。

【0095】

かかる単離されたタンパク質は、例えば、抗体を産生するために使用することができる。

【0096】

本開示はまた、凝集傾向を低減する、またはその V_H を含む既存の抗体もしくはタンパク質の凝集抵抗性を増加させるために有用である。例えば、本開示は、抗体重鎖可変領域(V_H)を含むタンパク質の凝集抵抗性を増加させるための方法を提供し、本方法は、それが、Kabatの付番システムに従う28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位から成る群より選択される2つ以上の位置に、負荷電アミノ酸を含むように、 V_H を修飾することを含み、非修飾タンパク質は、Kabatの付番システムに従う28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位に、2つ以上の負荷電アミノ酸を含まない。

10

【0097】

修飾の追加の部位および/置換することができる特定のアミノ酸残基は、本明細書において説明され、本態様に準用して適用されるものとする。

【0098】

一態様において、本方法は、 V_H をタンパク質から単離することと、本開示の方法に従って、その V_H を修飾することと、その V_H を含むタンパク質を産生することとを含む。例えば、本方法は、 V_H を抗体から単離することと、本開示の方法に従って、その V_H を修飾することと、その修飾 V_H を含む抗体を産生することとを含む。

20

【0099】

一態様において、本開示の方法は、さらに、本開示に従う修飾後、 V_H もしくはそれを含むタンパク質を親和性成熟させること、および/またはタンパク質を脱免疫化すること、および/またはタンパク質をヒト化すること、および/またはタンパク質をキメラ化することを含む。

【0100】

一態様において、本開示の方法は、任意の追加のアミノ酸残基を V_H に挿入すること(置換とは対照的に)を含まない。

30

【0101】

上に説明される方法は、タンパク質の発現を増加させるため、および/またはわずかな凝集を伴って、高濃度で保存することができるタンパク質を産生するため、および/またはクロマトグラフィ樹脂からのタンパク質の回収を増加させるため、またはクロマトグラフィ樹脂からタンパク質を回収するために必要とされる溶液の体積を低減するための方法に準用して適用されるものとする。

【0102】

例えば、本開示は、抗体 V_H を含む可溶性タンパク質の産生のレベルを増加させるための方法を提供し、本方法は、Kabatの付番システムに従う28位および/または31位および/または33位および/または35位のアミノ酸を、負荷電アミノ酸で置換することによって、 V_H を修飾することと、タンパク質を産生することとを含み、産生される可溶性タンパク質のレベルは、負荷電アミノ酸を欠損するタンパク質の産生のレベルと比較して、増加される。

40

【0103】

本開示はまた、抗体 V_H を含む可溶性タンパク質の産生のレベルを増加させるための方法を提供し、本方法は、Kabatの付番システムに従う28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位の2つ以上のアミノ酸を、負荷電アミノ酸で置換することによって、 V_H を修飾することと、タンパク質を、クロマトグラフィ樹脂と接触させることとを含み、産生される可溶性タンパク質のレベルは、

50

負荷電アミノ酸を欠損するタンパク質の産生のレベルと比較して、増加される。

【0104】

本開示はまた、クロマトグラフィ樹脂から、抗体重 V_H を含むタンパク質の回収のレベルを増加させるため、またはクロマトグラフィ樹脂からタンパク質を回収するために必要とされる溶液の体積を低減するための方法を提供し、本方法は、K a b a t の付番システムに従う28位、31位、33位および/または35位のアミノ酸を、負荷電アミノ酸で置換することによって、 V_H を修飾することと、タンパク質を、クロマトグラフィ樹脂と接触させることとを含み、負荷電アミノ酸を欠損するタンパク質と比較して、クロマトグラフィ樹脂から回収されるタンパク質の回収のレベルは、増加され、クロマトグラフィ樹脂からタンパク質を回収するために必要とされる溶液の体積は、低減される。

10

【0105】

本開示はまた、クロマトグラフィ樹脂からの抗体 V_H を含むタンパク質の回収のレベルを増加させるため、またはクロマトグラフィ樹脂からタンパク質を回収するために必要とされる溶液の体積を低減するために方法を提供し、本方法は、K a b a t の付番システムに従う28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位の2つ以上のアミノ酸を、負荷電アミノ酸で置換することによって、 V_H を修飾することと、タンパク質を、クロマトグラフィ樹脂に接触させることとを含み、負荷電アミノ酸を欠損するタンパク質と比較して、クロマトグラフィ樹脂から回収されるタンパク質の回収のレベルは、増加され、クロマトグラフィ樹脂からタンパク質を回収するために必要とされる溶液の体積は、低減される。

20

【0106】

本開示はまた、医薬における、本開示のタンパク質または本開示の組成物の使用を提供する。

【0107】

本開示はまた、対象における状態を治療または予防する方法を提供し、本方法は、本開示のタンパク質または組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。一態様において、対象は、癌および/または炎症性疾患および/または自己免疫疾患および/または神経学的状態に罹患する。

【0108】

本開示はまた、状態の治療または予防のための薬剤の製造における、本開示のタンパク質の使用を提供する。

30

【0109】

本開示はまた、化合物を細胞に送達するための方法を提供し、本方法は、細胞を、本開示のタンパク質または組成物と接触させることを含む。

【0110】

本開示はまた、対象における状態を診断または予後診断するための方法を提供し、本方法は、タンパク質が抗原に結合し、複合体を形成するように、対象からの試料を、本開示のタンパク質または組成物と接触させることと、複合体を検出することとを含み、複合体の検出は、対象における状態の診断的または予後診断的なものである。一態様において、本方法は、複合体のレベルを判定することとを含み、前記複合体の増強または低減したレベルは、対象における状態の診断的または予後診断的なものである。

40

【0111】

本開示は、さらに、対象において、抗原を位置特定または検出するための方法を提供し、前記方法は、

(i) タンパク質が抗原に結合するように、対象に、本開示のタンパク質または組成物を投与することとあって、タンパク質は、検出可能な標識に結合される、投与することと、

(ii) 体内で検出可能な標識を検出または位置特定することと、を含む。

【0112】

本開示の各態様は、任意に、本明細書において説明される別の部位と組み合わせて、K

50

a b a t の付番システムに従う 30 位に、負荷電アミノ酸を含む、抗体重鎖可変領域 (V_H) を含む、タンパク質であって、本タンパク質は、鶏卵リゾチーム、ベータガラクトシダーゼ、アルファアミラーゼ、B5R 以外の抗原に特異的に結合することができるか、または

(i) タンパク質がヒト腫瘍壊死因子 に結合し、30 位および 31 位にアスパラギン酸を含む場合、それは、28 位と 35 位との間に少なくとも 1 つの追加の負荷電アミノ酸を含み、

(ii) タンパク質がヒト腫瘍壊死因子 に結合し、30 位にグルタミン酸、および 32 位にアスパラギン酸を含む場合、それは、28 位と 35 位との間に少なくとも 1 つの追加の負荷電アミノ酸を含む、タンパク質に準用して適用されるものとする。

10

【図面の簡単な説明】

【0113】

【図 1】HEL4 (配列番号 1) および DP47 (配列番号 2) のアミノ酸配列アラインメントを示す図表示である。同一のアミノ酸は、アスタリスクで印が付けられている。本明細書で言及される CDR の位置も示される。

【図 2】DP47 / HEL4 CDR キメラ上での凝集抵抗実験の結果を示すグラフ表示である。DP47 への HEL4 CDR1 の導入が、 V_H ドメインを凝集抵抗性にする一方で、CDR2 および CDR3 の導入は、減少した効果を有する。

【図 3】凝集抵抗を与える HEL4 V_H ドメインの CDR1 における単一アミノ酸およびその組み合わせを同定する実験の結果を示すグラフ表示である。CDR1 の位置 31、32、または 33 において負荷電アミノ酸が V_H ドメインのかなりの凝集抵抗をもたらした一方で、他の変異は限定された効果を有した。31 ~ 33 での 3 重アミノ酸変化 (SYA31-33DED) は、凝集抵抗を大幅に増加させた。任意の置換の位置決めは、X 軸に示される。

20

【図 4】単一の負荷電アミノ酸変化およびそれらの組み合わせを有する V_H ドメインを含む scFv の凝集抵抗を示すグラフ表示である。CDR1 の位置 31、32、または 33 において負荷電アミノ酸が scFv ドメインのかなりの凝集抵抗をもたらした一方で、他の変異は限定された効果を有した。31 ~ 33 での 3 重アミノ酸変化 (SYA31-33DED) は、scFv の凝集抵抗を大幅に増加させた。任意の置換の位置決めは、X 軸に示される。

30

【図 5 A】HEL4 の CDR1 (したがって、位置 31、32、および 33 において負荷電アミノ酸) を含み、かつ多様性が HEL4 の CDR3 に導入された、Garvan-IA V_H ライブラリ由来の試験された未処理 (任意抽出) クローンの大半を示すグラフ表示であり、本明細書で例示される「加熱/冷却」アッセイに供した時に、かなりのレベルの凝集抵抗を示す。

【図 5 B】HEL4 の CDR1 (したがって、位置 31、32、および 33 において負荷電アミノ酸) を含み、かつ多様性が HEL4 の CDR3 に導入された、Garvan-IB V_H ライブラリ由来の試験された未処理 (任意抽出) クローンの大半を示すグラフ表示であり、本明細書で例示される「加熱/冷却」アッセイに供した時に、かなりのレベルの凝集抵抗を示す。

40

【図 6】クローン G07 抗 hTNF ドメイン抗体およびクローン G11 抗 mIL-21 ドメイン抗体の抗原結合の特異性を示す。ELISA を用いて、それぞれのクローンが (図に示される) 多種多様の抗原に結合する能力を決定した。「hTNF」はヒト腫瘍壊死因子であり、「mTNF」はマウス腫瘍壊死因子であり、「hIL21」はヒトインターロイキン 21 であり、「mIL21」はマウスインターロイキン 21 であり、「ベータ gal」はガラクトシダーゼであり、「hPRLR」はヒトプロラクチン受容体である。

【図 7】位置 26 ~ 40 の表面曝露残基において負荷電アミノ酸を含む DP47 の様々な変異体の凝集抵抗を示すグラフ表示である。提示される結果は、本明細書で例示される「

50

加熱/冷却」アッセイに供した後にファージ上に表示されるDP47単一変異体の凝集抵抗を示す。変異部位は、X軸に示される。

【図8】CDR2において負荷電アミノ酸を含むDP47の様々な変異体の凝集抵抗を示すグラフ表示である。提示される結果は、本明細書で例示される「加熱/冷却」アッセイに供した後にファージ上に表示されるDP47単一変異体の凝集抵抗を示す。変異部位は、X軸に示される。

【図9】CDR1において複数の負荷電アミノ酸を含むDP47の様々な変異体の凝集抵抗を示すグラフ表示である。提示される結果は、本明細書で例示される「加熱/冷却」アッセイに供した後にファージ上に表示されるDP47単一変異体の凝集抵抗を示す。変異部位は、X軸に示される。

【図10】任意でCDR1において負荷電アミノ酸と組み合わせられる、Kababの付番システムに従う28位および/または35位において負荷電アミノ酸を含むDP47の様々な変異体の凝集抵抗を示すグラフ表示である。提示される結果は、本明細書で例示される「加熱/冷却」アッセイに供した後にファージ上に表示されるDP47単一変異体の凝集抵抗を示す。変異部位は、X軸に示される。

【図11】CDR1において負荷電単一または複数のアミノ酸を含む可溶性のDP47変異体の発現レベルを示すグラフ表示である。提示される結果は、プロテインA酵素結合免疫アッセイ(ELISA)を用いて決定されるタンパク質レベル(培養物1リットル当たりのmg)を示す。変異部位は、X軸に示される。

【図12】サイズ排除クロマトグラフィ後のV_Hドメインの回収率を示すグラフ表示である。DP47の様々な変異体を80で10分間加熱し、その後、4で10分間冷却するか、あるいは処理せず、次に、サイズ排除クロマトグラフィに曝露させた。結果は、加熱されなかった試料の曲線下面積に対する割合(%)として示される、加熱された試料の曲線下面積として提示される。変異部位は、X軸に示される。

【図13A】DP47変異体の熱変性の円偏光二色性(CD)分析の結果を示す一連のグラフ表示である。試料をに加熱し、かつ加熱されたタンパク質を1/分で80から4に冷却することにより、それぞれの試料の凝集抵抗を試験した。試験したV_Hドメインが何であるかが示される。

【図13B】DP47変異体の熱変性の円偏光二色性(CD)分析の結果を示す一連のグラフ表示である。試料をに加熱し、かつ加熱されたタンパク質を1/分で80から4に冷却することにより、それぞれの試料の凝集抵抗を試験した。試験したV_Hドメインが何であるかが示される。配列表凡例配列番号1-HEL4 V_Hのアミノ酸配列配列番号2-DP47 V_Hのアミノ酸配列配列番号3-V_L領域のアミノ酸配列配列番号4-V_H領域とV_L領域との間のアミノ酸配列リンカー配列配列番号5-V_HhTNF__G07(抗hTNF V_H)のアミノ酸配列配列番号6-V_HmIL21__G11(抗mIL-21 V_H)のアミノ酸配列配列番号7-V_HPRLR__C02(抗hPRLR V_H)のアミノ酸配列配列番号8-V_HHEL__H04(抗HEL V_H)のアミノ酸配列配列番号9-V_HHEL__H08(抗HEL V_H)のアミノ酸配列配列番号10-(Humira(登録商標)として販売されている)アダリムマブのV_H領域のアミノ酸配列配列番号11-(Rituxan(登録商標)またはMabthera(登録商標)として販売されている)リツキシマブのV_H領域のアミノ酸配列配列番号12-(Herceptin(登録商標)として販売されている)トラスツズマブのV_H領域のアミノ酸配列配列番号13-(Avastin(登録商標)として販売されている)ベバシズマブのV_H領域のアミノ酸配列配列番号14-HEL4 V_Hをコードするヌクレオチド配列配列番号15-DP47 V_H領域をコードするヌクレオチド配列配列番号16-V_Hを増幅するためのオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列配列番号17-V_Hを増幅するためのオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列

【発明を実施するための形態】

【0114】

概要

10

20

30

40

50

本明細書は、Patent In Version 3.5を用いて作成されたヌクレオチドおよびアミノ酸配列情報を含み、該配列表は特許請求の範囲の後で本書に提供される。

【0115】

本明細書を通じて、明確に別段の定めをした場合または文脈上異なる解釈を要する場合を除き、単一のステップ、組成物、ステップ群または組成物群への参照は、これらのステップ、組成物、ステップ群、または組成物群のうちの1つおよび複数（即ち、1つ以上）を網羅するものと解釈されるものとする。

【0116】

当業者は、本開示に、明確に記載されたもの以外の変形および修正の影響を受け入れる余地があることを理解するであろう。本開示は、かかる全ての変形および修正を含むことが理解されるべきである。本開示はまた、本明細書において個々にまたは集成的に参照または示される全てのステップ、特徴、組成物、および化合物、ならびに該ステップまたは特徴のあらゆる組み合わせ、または任意の2つ以上を含む。

10

【0117】

本開示は、本明細書において説明される特定の実施形態による範囲に限定されるものではなく、それらの実施形態は、単に例示の目的のためであることが意図される。機能的に同等の製品、組成物、および方法は、本明細書中に説明されるように、明らかに本開示の範囲内に含まれる。

【0118】

本明細書におけるあらゆる実施形態は、明確に別段の定めをした場合を除き、あらゆる他の実施形態について準用すると解釈されるものとする。

20

【0119】

本明細書において、抗体の V_H を含有するタンパク質、またはその使用を対象とした任意の実施形態または例は、免疫グロブリンの V_H を含有するタンパク質またはその使用について準用されると解釈されるものとする。

【0120】

明確に別段の定めをした場合を除き、本明細書において使用される全ての技術的および科学的用語は、一般に当該技術分野（例えば、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、生化学）の技術者によって理解されるものと同様の意味を有すると解釈されるものとする。

30

【0121】

別段に指定のある場合を除き、本開示において利用される組み換えタンパク質、細胞培養、および免疫学的技術は、標準的な手順であり、当業者に周知である。かかる技術は、J. Perbal, A Practical Guide to 分子の Cloning, John Wiley and Sons (1984)、J. Sambrook et al. 分子の Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)、T. A. Brown (editor), Essential 分子の Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)、D. M. Glover and B. D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1 - 4, IRL Press (1995 and 1996)、および F. M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in 分子の Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988、現在までの全更新を含む)、Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988)、および J. 大腸菌 gan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (現在までの全更新を含む)等、に出典の

40

50

文献を通じて記載および説明される。

【0122】

本明細書における、可変領域とその部分、免疫グロブリン、抗体およびその断片についての説明および定義は、Kabata (1987および/または1991)、Bork et al (1994)および/またはChothia and Lesk (1987および1989)、またはAl-Lazikani et al (1997)における考察によってさらに明らかにされるであろう。

【0123】

「および/または」という用語、例えば「Xおよび/またはY」は、「XおよびY」または「XまたはY」を意味すると理解されるべきであり、双方の意味またはどちらか一方の意味に対して、明確な支持を提供すると解釈されるものとする。

10

【0124】

本明細書を通じて、「含む (comprise)」、または「含む (comprise s)」、「含んでいる (comprising)」等の変形という語は、明確に述べられた要素、完全体、またはステップ、あるいは要素群、完全体群、またはステップ群を含むが、しかし他の要素、完全体またはステップ、あるいは要素群、完全体群、またはステップ群の排除をするものではないと理解されるだろう。

【0125】

本明細書中で使用される「～に由来する (derived from)」という用語は、指定された完全体が、特定の源からではあるが、必ずしも直接的ではなく、得ることができることを示唆すると解釈されるものとする。

20

選択的定義

【0126】

本明細書において使用される「凝集」という用語は、タンパク質を天然のまたは非凝集の状態へと再び折り畳む薬剤でタンパク質を処理することなしでは可逆的ではない、タンパク質同士の会合、またはタンパク質の結合を意味する。かかる凝集は、機能損失、天然の折り畳みの損失、および/または、細胞毒性もしくは免疫原性の獲得をもたらし得る。本定義は、生体内で形成される有害で非機能性のタンパク質集合と、生物医学研究および生命工学において生体外で形成される非機能性のタンパク質集合とを含む。しかしながらこれは、未変性様緩衝液条件への移行に際して構成タンパク質が直ちに可溶性天然型に戻るような、等電点沈殿または「塩析」沈殿は含まない。

30

【0127】

「凝集抵抗性」という語は、タンパク質またはそのドメイン (例、熱) を変性させる条件への曝露の後に、本開示のタンパク質が、例えば該タンパク質を抗原および/または Protein A等の超抗原への特異的結合を可能にする配座へと再び折り畳むことができるような配座特定の方法で、再折り畳みおよび結合相手と結合することが可能である、ということの意味する。好ましくは、部分的または完全な変性 (または解きほだき) の後に、該プロテインは、抗原または超抗原への特異的結合を可能にする配座へ再び折り畳むことができる。好ましいタンパク質は、通常タンパク質またはそのドメイン (例、熱) を変性させる条件への曝露の後に、著しく凝集しない。例えば、本開示のタンパク質の約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、また95%より多くは、該タンパク質のうちの複数を含有する組成物において、例えば60%、70%、または80%といった熱へ曝露の後に、凝集しない。したがって、好ましいタンパク質は熱再折り畳みが可能であると見なすこともできる。

40

【0128】

本明細書において使用される「抗体」という用語は、軽鎖可変領域 (V_L) および重鎖可変領域 (V_H) といった複数のポリペプチド鎖から成る可変領域を含むタンパク質を意味すると解釈されるものとする。抗体はまた通常、定常ドメインを含み、それは定常領域または定常断片もしくは結晶化可能断片 (Fc) 内へと配置されることができる。抗体は

50

、1つまたは幾つかの密接に関連する抗原と特異的に結合することができる。通常、抗体はその基本単位として4本鎖構造を含む。全長抗体は、共有結合した2本の重鎖(約50~70kD)、および2本の軽鎖(それぞれ約23kD)を含む。軽鎖は通常、可変領域および定常ドメインを含み、哺乳動物においては軽鎖または軽鎖である。重鎖は通常、可変領域および、1つ、またはヒンジ領域によって付加的な定常ドメインに連結された2つ以上の、定常ドメインを含む。哺乳動物の重鎖は、 μ 鎖のうち1つである。各軽鎖もまた、重鎖のうち1つに共有結合される。例えば、2本の重鎖および重鎖と軽鎖は、鎖間ジスルフィド結合および非共有相互作用によって、結合される。鎖間ジスルフィド結合の数は、抗体の異なる型によって変化することができる。各鎖は、N末端可変領域(それぞれ長さ約110アミノ酸の V_H または V_L)および、C末端における1つ以上の定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメイン(約110アミノ酸長である C_L)は、重鎖(約330~440アミノ酸長である C_H)の第1の定常ドメインと整列し、ジスルフィド結合される。軽鎖可変領域は、重鎖の可変領域と整列する。抗体重鎖は、2つまたはそれ以上の付加的 C_H ドメイン(C_H2 、 C_H3 等)を含むことができ、 C_H1 定常ドメインと C_m 定常ドメインとの間に特定され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(例、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス(例、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁およびIgA₂)またはサブクラスのものであり得る。好ましくは、該抗体はIgG₃のようなIgGである。好ましくは、該抗体はマウス(マウスまたはラット)抗体、または霊長類(好ましくはヒト)抗体である。「抗体」という用語はまた、ヒト化抗体、霊長類化抗体、非免疫化抗体、ヒト抗体およびキメラ抗体を網羅する。本用語は、T細胞受容体のような抗体様分子は網羅せず、かかる分子は「免疫グロブリン」という用語によって網羅される。

10

20

【0129】

本明細書において使用される「可変領域」は、本細書において定義されるように例えばCDR1、CDR2およびCDR3といったCDR、およびFRのアミノ酸配列を含む抗体または免疫グロブリンの軽鎖および重鎖の部分を指す。 V_H は重鎖可変領域を指す。 V_L は軽鎖の可変領域を指す。本開示において使用される方法に従って、CDRおよびFRに割り当てられるアミノ酸の位置はKabatt(1987および1991)またはChothia(1989)に従い、Kabatt付番システムに従って付番される。当業者は本開示の実施において、他の付番システム、例えばClothia and Lesk(1987)および/またはChothia(1989)および/またはAl-Lazikani et al(1997)の超可変ループ付番システム、を容易に使用することができるだろう。

30

【0130】

本明細書において使用される「重鎖可変領域」または「 V_H 」という用語は、1つ以上の抗原に結合可能で、好ましくは、1つ以上の抗原に特異的に結合し少なくともCDR1を含むことができる、タンパク質を意味すると解釈されるものとする。好ましくは、重鎖は3つのCDRと共に3または4つのFR(例、FR1、FR2、FR3および任意でFR4)を含む。一態様において、重鎖は、Kabatt付番システムに従い付番された次のような残基、1位~25位または1位~30位(FR1)、26位~35位または3位1~35位(または35b)(CDR1)、36位~49位(FR2)、50位~65位(CDR2)、66位~94位(FR3)、95位~102位(CDR3)および103位~113位(FR4)、に位置するFRおよびCDRを含む。一態様において、重鎖は、該重鎖および複数の(好ましくは3または4つの)定常ドメインを含む、または定常断片(Fc)に連結する、免疫グロブリンに由来する。

40

【0131】

本明細書において使用される「軽鎖可変領域」または「 V_L 」という用語は、1つ以上の抗原に結合でき、好ましくは、1つ以上の抗原に特異的に結合することができ、少なくともCDR1を含む、タンパク質を意味すると解釈されるものとする。好ましくは、軽鎖

50

は3つのCDRと共に3または4つのFR(例、FR1、FR2、FR3および任意でFR4)を含む。好ましくは、軽鎖は、Kabat付番システムに従い付番された次のような残基、1位~23位(FR1)、24位~34位(CDR1)、35位~49位(FR2)、50位~56位(CDR2)、57位~88位(FR3)、89位~97位(CDR3)および98位~107位(FR4)のFRおよびCDRを含む。一態様において、軽鎖は、1つの定常ドメインに連結する該軽鎖を含む、および/または定常断片(Fc)に連結しない、免疫グロブリンに由来する。

【0132】

本開示の幾つかの態様において、「フレームワーク領域」という用語は、CDR残基以外のこれらの可変領域残基を意味すると理解されるだろう。自然発生抗体の各可変領域は通常、FR1、FR2、FR3、およびFR4として特定される4つのFRを有する。CDRがKabat付番システムに従い定義されると、例示的な軽鎖FR(LCFR)残基は、1位~23位(LCFR1)、35位~49位(LCFR2)、57位~88位(LCFR3)、および98位~107位(LCFR4)残基に、おおむね位置する。LCFR1は10位残基を含まず、LCFR1には含まれることに留意されたい。例示的な重鎖FR(HCFR)残基は、1位~25位または1位~30位(HCFR1)、36位~49位(HCFR2)、66位~94位(HCFR3)、および103位~113位(HCFR4)残基に、おおむね位置する。

【0133】

本明細書において使用される「相補性決定領域」(同義語、CDR、即ちCDR1、CDR2、およびCDR3、または超可変領域)という用語は、その存在が抗原結合にとって必須である抗体可変領域のアミノ酸残基を指す。各可変領域は通常、CDR1、CDR2、およびCDR3として特定される3つのCDR領域を有する。各相補性決定領域は、Kabat(1987または1991または1992)またはChotia(1989)によって定義される「相補性決定領域」からのアミノ酸残基を含んでもよい。本開示の1つの好ましい態様において、Kabat付番システムに従い、重鎖可変領域内でCDRH1は26位~35位(または35b)残基間にあり、CDRH2は50位~65位残基間にあり、CDRH3は95位~102位残基間にある。軽鎖内で、Kabat付番システムに従って、CDRL1は24位~34位残基間にあり、CDRL2は50位~56位残基間にあり、CDRL3は89位~97位残基間にある。これらのCDRはまた、Kabat(1987および/または1991および/または1992)に説明されるように、多数の挿入を含むことができる。

【0134】

本明細書において使用される「Fv」という用語は、多数のポリペプチドであっても単一のポリペプチドであっても、任意のタンパク質を意味すると解釈されるべきであり、そこでV_LとV_Hとが連合し、抗原結合部位を有する、即ち抗原に特異的に結合することができる複合体を形成する。抗原結合部位を形成するV_HおよびV_Lは、単一のポリペプチド鎖または異なるポリペプチド鎖内であってもよい。さらに、本開示のFv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、または結合しなくてもよい、多数の抗原結合部位を有してもよい。本用語は、組み換え手段を使用して産生されるような断片に相当するタンパク質と同様に、抗原に直接的に由来する断片を網羅すると理解されるべきである。幾つかの態様において、V_Hは重鎖定常ドメイン(C_H)1に連結せず、および/または、V_Lは軽鎖定常ドメイン(C_L)に連結しない。ポリペプチドまたはタンパク質を含む例示的なFvは、Fab断片、Fab'断片、F(ab')断片、scFv、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、または高次複合体、ドメイン抗体(例、V_H)、もしくは、定常領域またはC_H2あるいはC_H3ドメイン等そのドメインに連結する前述のものうちの任意のもの、を含む。「Fab断片」は、抗体の1価抗原結合断片で構成され、パイン酵素による全免疫グロブリンの消化によって無傷な軽鎖および重鎖の一部から構成される断片を産生して生成することができ、または、組み換え手法を用いて生成することができる。抗体の「Fab'断片」は、全抗体をペプシ

10

20

30

40

50

ンで処理し、続いて還元して、無傷な軽鎖および重鎖の一部分から構成される分子を産生することによって得ることができる。この方法において、処理される抗体1つにつき2つのFab'断片が得られる。Fab'断片はまた、組み換え手法によっても産生されることができる。抗体の「F(ab')₂」断片は、2つのジスルフィド結合により結びついた2つのFab'断片の2量体で構成され、その後還元を伴わずに全抗体をペプシン酵素で処理することによって得られる。「Fab₂」断片は、例えばロイシン・ジッパーまたはC_H3ドメインを用いて連結した、2つのFab断片を含む組み換え断片である。「単一鎖Fv」または「scFv」は、V_LとV_Hとが適切で柔軟なポリペプチドリンカーによって共有結合される抗体の変領域断片(Fv)を含む、組み換え分子である。本用語の範囲内にあるタンパク質を含む例示的なFvについての詳細な考察は、本明細書において後述される。

10

【0135】

本明細書において使用される「抗原結合部位」という用語は、抗原に特異的に結合することが可能なタンパク質によって形成される構造を意味すると解釈されるものとする。抗原結合部位は、一連の隣接するアミノ酸である必要はなく、また単一のポリペプチド鎖内のアミノ酸でさえなくてもよい。例えば、2つの異なるポリペプチド鎖から産生されるFvにおいて、抗原結合部位は、抗原と相互作用し、必ずしもではないが通常各可変領域内の1つ以上のCDRにあるV_LおよびV_Hの一連の領域から成る。

【0136】

「定常ドメイン」は抗体内のドメインであり、その配列はIgGまたはIgMまたはIgEといった同型の抗体において極めて類似している。抗体の定常領域は通常、複数の定常ドメインを含み、例えば、 κ および λ 重鎖の定常領域は3つの定常ドメインを含み、 μ および δ 重鎖のFcは2つの定常ドメインを含む。 μ および δ 重鎖の定常領域は4つの定常ドメインを含み、そのFc領域は2つの定常ドメインを含む。

20

【0137】

本明細書において使用される「結晶化可能断片(fragment crystallizable)」または「Fc」という用語は、少なくとも1つの定常ドメインを含み、通常(必ずしもではない)グリコシル化され、1つ以上のFc受容体および/または補体カスケードの成分(例、エフェクター機能を付与する)に結合する、抗体の部分を目指す。重鎖定常領域は、 κ 、 λ 、 μ の5つのアイソタイプのうちの任意のものから選択されることができる。さらに、種々のサブクラスの重鎖(例えば、IgGサブクラスの重鎖)は、異なるエフェクター機能に関与しており、したがって、所望の重鎖定常領域を選択することで、所望のエフェクター機能を持つタンパク質が産生することができる。好ましい重鎖定常領域は、ガンマ1(IgG1)、ガンマ2(IgG2)、およびガンマ3(IgG3)である。

30

【0138】

「Kabatt付番システム」は、Kabatt(1987および/または1991および/または1992)において見出される方式に合致した方法で、免疫グロブリンの変領域内の残基を付番する方式を意味する。

【0139】

「タンパク質」という用語は、単一のポリペプチド、即ちペプチド結合によって連結した一連の隣接するアミノ酸、または共有結合的または非共有結合的にお互いに連結した一連のポリペプチド(即ちポリペプチド複合体)、を含むと解釈されるものとする。例えば、一連のポリペプチドは、適切な化学薬品またはジスルフィド結合を用いて共有結合的に連結することができる。非共有結合の例は、水素結合、イオン結合、ファン・デル・ワールス力、および疎水性相互作用を含む。本開示で企図される非共有結合は、例えば二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、または抗体のうちの幾つかにおける、V_HとV_Lとの間の相互作用である。

40

【0140】

「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合によって連結した一連の隣接するアミノ

50

酸を意味すると、前述の段落より理解されるだろう。

【0141】

本明細書において使用される「抗原」という用語は、それに対して免疫グロブリン反応（例、抗体反応）が起きることができ、任意の組成物を意味すると理解されるべきである。例示的な抗原は、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、リン酸基、リンペプチドまたはポリペプチド、グリコシル化ペプチドまたはペプチド等を含む。

【0142】

本明細書において使用される「特異的に結合する (specifically binds)」または「特異的に結合する (binds specifically)」という用語は、本開示のタンパク質が、代替りの抗原または細胞と反応または結合するよりも、特定の1つの抗原、または複数の抗原、またはそれらを発現する細胞と、より頻繁に、より迅速に、より長い持続時間および/またはより高い親和性を持って、反応または結合することを意味すると解釈されるものとする。例えば、ある抗原と特異的に結合するタンパク質は、他の抗原と結合するときよりも、より高い親和性と結合力で、より敏速に、および/またはより長い持続時間で、該抗原と結合する。本定義を読むことによってまた、例えば第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、またしなくてもよいということが理解される。したがって「特異的結合」は、必ずしも別の抗原の排他的な結合または検出不能の結合を必要とはせず、かかる結合は「選択的結合」という用語によって表される。通常、しかし必ずではないが、結合への言及は特異的結合を意味し、各用語はその他の用語に対して明示的な支持を提供すると理解されるべきである。

10

20

【0143】

本明細書において使用される、 V_H に関連する「修飾された」という用語は、元の（または修飾されていない） V_H と比較して、該 V_H の配列が変えられたことを意味する。例えば、28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位の負荷電アミノ酸以外のアミノ酸を含む V_H は、負荷電アミノ酸でこれらのアミノ酸のうちの1つ以上の代替りとなるように修飾される。例えば、 V_H は28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位で、これらの位置の負荷電アミノ酸の数を、例えば計1または2または3または4または5またはそれ以上へ増大するように修飾される。1つの例示的な形態において、列挙された該位置において負荷電アミノ酸の数は少なくとも2まで増大される。

30

【0144】

「個別に」という語は、本開示は列挙された残基または残基群を別々に網羅することと、個別の残基または残基群が本明細書中で別々に記載されていないかもしれないにもかかわらず、付随する請求項はかかる残基または残基群を、別々におよび互いに分けることが出来る状態で定義してもよい、ということの意味する。

【0145】

「集合的に」という語は、本開示は列挙された残基または残基群のうちの任意の数または組み合わせを網羅することと、かかる残基または残基群のうちの複数または組み合わせは本明細書中で別々に記載されていないかもしれないにもかかわらず、付随する請求項はかかる組み合わせまたは部分的組み合わせを、別々におよび他の残基または残基群の組み合わせから分けることが出来る状態で定義してもよい、ということの意味する。

40

可変領域を含むタンパク質

【0146】

本開示は、1つ以上の抗原と特異的にまたは選択的に結合し、本明細書中に記載されたように任意の実施形態に従って修飾された免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、任意のタンパク質を企図する。「免疫グロブリン」という用語は、Kabat付番システムに従う免疫グロブリンスーパーファミリーの任意のタンパク質を含むことが、当業者によって理解されるだろう。免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーの例は、T細胞受容体を含

50

む。

【0147】

本開示は好ましくは、例えば抗原結合部位によって、特異的にまたは選択的に1つ以上の抗原に結合し、本明細書中に記載されたように任意の実施形態に従って修飾された抗体 V_H を含む、任意のタンパク質を企図する。

抗体可変領域

【0148】

本明細書中の記載に基づき当業者に明らかなように、本開示のタンパク質は、本明細書中で記載された位置における負荷電アミノ酸を含むように修飾された抗体からの、1つ以上の V_H を含むことができる。かかるタンパク質は抗体（例、全抗体または全長抗体）を含む。かかる抗体は、まず対象の抗原に対する抗体を産生し、該抗体を修飾する（例えば組み換え手法を用いて）ことによって、または予め産生された抗体を修飾することによって、産生されることが出来る。別法として、本開示の V_H を含むタンパク質が産生され、該タンパク質は次に抗体を産生するように修飾または使用される。

10

【0149】

抗体の産生方法は当分野において周知である。例えば、ハイブリドーマ技術といったモノクローナル抗体を産生する方法は、KohlerおよびMilstein（1975）によって説明される。ハイブリドーマ法において、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物は通常、免疫原または抗原またはそれらを発現する細胞で、該免疫原または抗原に特異的に結合する抗体を産生する、または産生することが可能なリンパ球を生じさせるように、免疫にされる。免疫にされた動物のリンパ球または脾臓細胞は次に、ハイブリドーマ細胞を形成するために、ポリエチレン・グリコールといった適切な融合剤を用いて不死化細胞株に融合される（Goding、1986）。得られたハイブリドーマ細胞は、好ましくは1つ以上の、非融合不死化細胞の成長また生存を抑制する物質を含む、適切な培地で培養されることが出来る。例えば、もし親細胞がヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRRT）酵素を欠いていれば、該ハイブリドーマに対する培地は通常ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含み（「HAT培地」）、その物質はHGPRT欠損細胞の成長を阻害する。抗体を産生する他の方法もまた本開示によって企図され、例えば、一般的にLargoespada（1990）またはWeissinger et al.（1991）において詳細に説明されるABL-MYC技術を使用する。

20

30

【0150】

別法として、抗体または抗体をコードする配列は、例えばハイブリドーマまたはトランスフェクトーマといった、対象の抗体を発現する予め産生された細胞から生成される。かかるハイブリドーマおよび/またはトランスフェクトーマの種々の源は、当業者にとって明白であり、例えば、American Type Culture Collection（ATCC）および/またはEuropean Collection of Cell Cultures（ECCACC）を含むだろう。抗体からの V_H をコードする配列を単離する、および/または修飾する方法は、当業者にとって明白であり、および/または本明細書中に説明される。本開示に従って修飾されることが出来る例示的な抗体は、ヒト化抗呼吸系発疹ウイルス（RSV）モノクローナル抗体であるSYNAGIS（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HERCEPTIN（登録商標）（トラスツズマブ；Genentech）；キメラ抗TNFモノクローナル抗体であるREMICADE（登録商標）（インフリキシマブ；Centocor）；抗糖タンパク質Iib/IIIIaレセプタ抗体であるREOPRO（登録商標）（アブキシマブ；Centocor）；ヒト化抗CD25モノクローナル抗体であるZENAPAX（登録商標）（ダクリズマブ；Roche 薬学的）；キメラ抗CD20IgG1抗体であるRITUXAN（登録商標）/MABTHERA（登録商標）（リツキシマブ）（IDEC Pharm/Genentech, Roche）；

40

50

キメラ抗IL-2R抗体であるSTIMULECT(登録商標)(バシリキシマブ; Novartis); キメラ抗EGFR抗体であるERBITUX(セツキシマブ; Imclone); ヒト化抗CD3抗体であるMYLOTARG(登録商標)(ゲムツズマブ; Celltech/Wyeth); ヒト化抗CD52 IgG抗体であるCampath 1H/LDP-03(アレムツズマブ; ILEX/Schering/Millenium); ヒト化抗IgE Fc抗体であるXOLAIR(登録商標)(オマリズマブ; Tanox/Genentech/Novartis); ヒト化抗VEGF抗体であるAVASTIN(登録商標)(ベバシズマブ; Genentech); ヒト化抗CD11a抗体であるRAPTIVA(登録商標)(エファリズマブ; Genentech/Merck Serono); ヒト化抗VEGF-A抗体であるLUCENTIS(ラニビズマブ; Genentech/Novartis); ヒト化抗インテグリン-4抗体であるTYSABRI(登録商標)(ナタリズマブ; Biogen Idec/Elan 薬学的s); ヒト化抗補体タンパク質C5抗体であるSOLIRIS(登録商標)(エクリズマブ; Alexion 薬学的s); 完全ヒト抗EGFRモノクローナル抗体であるVECTIBIX(登録商標)(パニツムマブ; Amgen); または、完全ヒト抗TNF抗体であるHUMIRA(登録商標)(アダリムマブ; Abbott/MedImmune Cambridge)を含み、しかしこれらに限定されない。その他の抗体および抗体のV_Hを含むタンパク質は、当分野において周知であり、除外されない。

【0151】

既知の抗体のV_Hの配列は、当業者によって容易に獲得可能であろう。例示的な配列は、アダリムマブのV_H(配列番号10)、またはリツキシマブのV_H(配列番号11)、またはトラスツズマブのV_H(配列番号12)、またはベバシズマブのV_H(配列番号13)を含む。これらの配列は本開示に従って容易に修飾される。

【0152】

抗体産生および/または抗体をコードする配列の単離の後に、該抗体またはそのV_Hは、例えば本明細書中で任意の実施形態に従って説明されるように、凝集抵抗性を付与するような位置において、負荷電アミノ酸(例、アスパラギン酸またはグルタミン酸)を含むように修飾される。一般に、これは、V_Hまたは抗体をコードする核酸を単離することと、その配列をアスパラギン酸(即ち、GAAまたはGAG)またはグルタミン酸(即ちGATまたはGAC)をその必須部位においてコードする1つ以上のコドンを含むように修飾すること、を含む。

キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体

【0153】

本開示のタンパク質は、ヒト化抗体もしくはヒト抗体、またはそれらに由来するV_Hに由来してもよく、またはそれらであってもよい。「ヒト化抗体」という用語は、キメラ分子を指すことが理解されるべきであり、通常、組み換え技術を用いて調製され、ヒト以外の種から生じた抗原結合部位と、ヒト抗体の構造および/または配列に基づく分子の残りの抗体構造とを有する。該抗原結合部位は好ましくは、ヒト抗体の可変領域内で適切なFR(即ち、V_H内のCDR以外の領域)上に移植された非ヒト抗体からのCDR、およびヒト抗体からの残りの残基を含む。抗原結合部位は、野生型であるかまたは、1つ以上のアミノ酸置換によって修飾されることができる。幾つかの態様において、ヒト抗体のフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、受容側の抗体にも取り込まれたCDRまたはフレームワーク配列にも見出されない残基を含むことがある。通常ヒト化抗体は、少なくとも1つ、通常2つの可変領域のうちの全てを実質的に含み、全てのまたは実質的に全てのCDR領域は、非ヒト抗体のCDR領域と一致し、全てのまたは実質的に全てのFR領域は、ヒト抗体共通配列のFR領域である。非ヒト抗体をヒト化する方法は、当分野において周知である。ヒト化は、米国特許第5225539号、米国特許第6054297号、または米国特許第5585089号の方法に従って、基本的に実行されることができる。抗体をヒト化する他の方法は除外されない。

【0154】

本明細書中で抗体および結合タンパク質に関連して使用される「ヒト抗体」という用語は、可変抗体領域と、任意で、ヒトにおいて、例えばヒト生殖細胞系または体細胞において見出される配列に由来するまたはそれに一致する定常抗体領域と、を有する抗体を指す。「ヒト」抗体は、ヒト配列によって、例えば無作為なまたは部位特異的な変異によって、導入される生体外での（該抗体の少数の残基、例えば1、2、3、4または5つの抗体残基での、好ましくは、例えば抗体の1つ以上のCDRを構成する1、2、3、4または5つの残基での、保存的置換または変異を含む、特定の変異における）変異等によってコードされないアミノ酸残基、および/または、本明細書中で説明される位置における負荷電アミノ酸、を含むことができる。例示的なヒト抗体またはタンパク質は、（例えばヒト生殖細胞系からの）ヒトフレームワーク領域、および、負荷電アミノ酸は含まれる位置以外におけるCDR内の無作為なアミノ酸を含む。これらの「ヒト抗体」は、実際にヒトから産生される必要はなく、むしろ、組み換え手法を使用して産生されることができ、および/または、ヒト抗体定常および/または可変領域をコードする核酸を含むトランスジェニック動物（例、マウス等）から単離されることができ、ヒト抗体またはその断片は、当分野において周知の種々の技術を使用して産生されることができ、（例えば、HooogenboomおよびWinter 1991；米国特許第5,885,793号に説明される、および/または、後述されるように）ファージディスプレイライブラリを含み、または、（例えば、国際公開公報WO2002/066630、Lonberg et al. (1994)、またはJakobovits et al. (2007)に説明されるように）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使用する。

10

20

【0155】

一態様において、本発明のタンパク質はヒト V_H 、即ち、Kabatt付番システムに従う28位および/または31位および/または32位および/または33位および/または35位以外を含む。例えば、該タンパク質はヒトフレームワーク領域を完全に含む。

【0156】

一態様において、タンパク質はヒト化 V_H を含まないか、または、ヒト化抗体由来の V_H を含まない。例えば、該タンパク質は1つ以上のフレームワーク領域でネズミアミノ酸を含まない。一態様において、例えば米国特許第6407213号に説明されるように、タンパク質はヒト化Fab4D5由来の V_H を含まない。

30

【0157】

一態様において、本開示のタンパク質はキメラ抗体である。「キメラ抗体」という用語は、該鎖の残部は別の種（例、ヒト等の霊長類）に由来する抗体内の相当する配列と同一または同種であるか、別の抗体クラスまたはサブクラスに属するのに対し、重鎖および/または軽鎖のタンパク質は特定の種（例、マウス等のネズミ）に由来する抗体内の相当する配列と同一または同種であるか、特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体を指し、所望の生物活性を示す限り、かかる抗体の断片も同様である（米国特許第4,816,567号）。典型的には、キメラ抗体は、大部分はヒトドメインを伴う抗体を産生するために、げっ歯動物またはウサギ可変領域、およびヒト定常領域を利用する。例えば、キメラ抗体は、本開示の任意の実施形態に従って修飾されたヒト定常領域に融合したマウス由来の可変領域を含む。かかるキメラ抗体の産生は当技術分野において周知であり、（例えば米国特許第5,807,715号、米国特許第4,816,567号、および米局特許第4,816,397号において説明されるように）標準的な手法で得ることができる。

40

 V_H 含有タンパク質

単一ドメイン抗体

【0158】

一部の実施形態において、本開示のタンパク質は、単一ドメイン抗体（「ドメイン抗体」または「dAb」という用語と同義的に使用される）である。単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインのうちの全てまたは一部を含む、単一ポリペプチド鎖である。ある

50

実施形態において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である (Domantis, Inc., Waltham, MA、例えば、US第6,248,516号、WO第90/05144号、WO第2003/002609号、および/またはWO第2004/058820号を参照されたい)。一態様において、単ドメイン抗体は、抗原に特異的に結合することができる、および本開示に従って修飾することができる、抗体の重鎖可変ドメインのうちの全てまたは一部から成る。本開示はまた、別の分子、例えば、別のドメイン抗体またはFc領域に融合されたドメイン抗体も網羅する。

【0159】

例示的なドメイン抗体は、配列番号5~9のうちのいずれか1つに記載される配列を含む。

10

ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ

【0160】

V_H を含む例示的なタンパク質は、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ならびにWO第98/044001号およびWO第94/007921号に記載されるものといった、より高次のタンパク質複合体である。

【0161】

本明細書において使用される際、「ダイアボディ(二重特異性抗体)」という用語は、2つの会合するポリペプチド鎖を含むタンパク質を意味するものとし、各ポリペプチド鎖は、構造 $V_L - X - V_H$ または $V_H - X - V_L$ を含み、 V_L は、抗体軽鎖可変領域であり、 V_H は、抗体重鎖可変領域であり、 X は、単一ポリペプチド鎖内の V_H および V_L が会合する(もしくはFvを形成する)ことを可能にするには不十分な残基を含む、リンカーであるか、または存在せず、一方のポリペプチド鎖の V_H は、他方のポリペプチド鎖の V_L に結合して、抗原結合部位を形成する、即ち、1つ以上の抗原に特異的に結合することができるFv分子を形成する。 V_L および V_H は、各ポリペプチド鎖において同じであることが可能である、または V_L および V_H は、二重特異性ダイアボディ(即ち、異なる特異性を有する2つのFvを含む)を形成するように、各ポリペプチド鎖において異なることが可能である。

20

【0162】

本明細書において使用される際、「トリアボディ(三重特異性抗体)」という用語は、3つの会合するポリペプチド鎖を含むタンパク質を意味するものとし、各ポリペプチド鎖は、ダイアボディに関して上で示される構造を含み、1つのポリペプチド鎖の V_H は、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(トリアボディ)を形成する。

30

【0163】

本明細書において使用される際、「テトラボディ(四重特異性抗体)」という用語は、4つの会合するポリペプチド鎖を含むタンパク質を意味するものとし、各ポリペプチド鎖は、ダイアボディに関して上で示される構造を含み、1つのポリペプチド鎖の V_H は、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(テトラボディ)を形成する。

40

【0164】

当業者は、ダイアボディ、トリアボディ、および/またはテトラボディ、ならびにそれらの産生のための方法を認識するであろう。 V_H および V_L は、任意の順序、即ち、 $V_L - V_H$ または $V_H - V_L$ に位置付けることができる。一般的に、これらのタンパク質は、 V_H および V_L が、直接、または V_H および V_L が会合することを可能にするには不十分な長さのリンカーを使用して連結される、ポリペプチド鎖を含む。 V_H および V_L を含むタンパク質は会合して、リンカー(存在する場合)の長さ、ならびに/または V_H および V_L ドメインの順序に依存して、ダイアボディ、トリアボディ、および/またはテトラボディを形成する。好ましくは、リンカーは、12以下のアミノ酸を含む。例えば、NからCの順序で配置される以下の構造 $V_H - X - V_L$ (X はリンカーである)を有するポリペ

50

プチド鎖の場合、3～12個の残基を有するリンカーは、一般的に、ダイアボディの形成をもたらし、1もしくは2個の残基を有するリンカー、またはリンカーが存在しない場合は、一般的に、トリアボディの形成をもたらす。NからCの順序で配置される以下の構造 $V_L - X - V_H$ (Xはリンカーである)を有するポリペプチド鎖の場合、3～12個の残基を有するリンカーは、一般的に、ダイアボディの形成をもたらし、1もしくは2個の残基を有するリンカーは、一般的に、ダイアボディ、トリアボディ、およびテトラボディの形成をもたらし、リンカーを欠損するポリペプチドは、一般的に、トリアボディもしくはテトラボディを形成する。

【0165】

ダイアボディ、トリアボディ、および/またはテトラボディを説明する例示的な公開文献としては、WO第94/07921号、WO第98/44001号、Holliger et al (1993)、Hudson and Kortt (1999)、Hollinger and Hudson (2005)、ならびにそれらにおいて引用される参考文献が挙げられる。

10

単一鎖 $Fv(s c F v)$

【0166】

当業者は、 $s c F v$ が、単一ポリペプチド鎖において、 V_H および V_L 領域を含むことを認識するであろう。好ましくは、ポリペプチド鎖は、さらに、 $s c F v$ が、抗原結合に対して所望の構造を形成する(即ち、単一ポリペプチド鎖の V_H および V_L が相互に会合して、 Fv を形成する)ことを可能にする、 V_H と V_L との間のポリペプチドリンカーを含む。これは、異なるポリペプチド鎖からの可変領域が、相互に会合または結合する、ダイアボディまたは高次多量体とは違う。例えば、リンカーは、 $s c F v$ に対してより好ましいリンカーのうちの一つである($Gly_4 Ser$)₃を有する、12個を上回るアミノ酸残基を含む。

20

【0167】

本開示はまた、単一のシステイン残基が、 V_H のFRおよび V_L のFRに導入され、システイン残基が、ジスルフィド結合によって連結され、安定した Fv をもたらす、ジスルフィド安定化 Fv (または $d i F v$ もしくは $d s F v$)を企図する(例えば、Brinkmann et al., 1993を参照されたい)。

30

【0168】

代替として、または加えて、本開示は、二量体 $s c F v$ 、即ち、非共有結合または共有結合による連結によって連結される2つの $s c F v$ 分子を含むタンパク質を提供する。かかる二量体 $s c F v$ の例としては、例えば、ロイシンジッパードメインに連結される2つの $s c F v$ (例えば、FosもしくはJunに由来する)が挙げられ、それによって、ロイシンジッパードメインは会合して、二量体化合物を形成する(例えば、Kostelný 1992、またはKruif and Logtenberg, 1996を参照されたい)。代替として、例えば、US第20060263367号に説明されるように、2つの $s c F v$ は、両方の $s c F v$ が、抗原を形成およびそれに結合することを可能に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。

40

【0169】

$s c F v$ の修飾形態、例えば、US第6,323,322号において説明されるように、例えば、グリコシル化を可能にするように修飾される、リンカーを含む $s c F v$ もまた、本開示によって企図される。

【0170】

当業者は、本明細書における本開示に基づき、本開示に従う好適な修飾 V_H を含む、 $s c F v$ またはその修飾形態を容易に産生することができるであろう。 $s c F v$ の確認には、Pluckthun (1994)を参照されたい。 $s c F v$ の追加の説明は、例えば、Bird et al., 1988において見出される。

50

ミニボディ

【0171】

当業者は、ミニボディは、抗体の C_H2 および/または C_H3 ドメインに融合された、抗体の V_H および V_L ドメインを含むということを認識するであろう。任意に、ミニボディは、 V_H および V_L 、ならびに C_H2 および/または C_H3 ドメイン間のヒンジ領域を含み、この配座は、フレックスミニボディ (Flex Minibody) と称されることもある (Hu et al., 1996)。ミニボディは、 C_H1 または C_L を含まない。好ましくは、 V_H および V_L ドメインは、抗体のヒンジ領域および C_H3 ドメインに融合される。領域の各々は、同じ抗体に由来してもよい。代替として、 V_H および V_L ドメインは、1つの抗体、ならびに別のものからのヒンジおよび C_H2/C_H3 に由来することができるか、またはヒンジおよび C_H2/C_H3 はまた、異なる抗体に由来することができる。本開示はまた、1つの抗体からの V_H および V_L 、ならびに別の抗体からの V_H および V_L を含む、多重特異性ミニボディを企図する。

10

【0172】

例示的なミニボディ、およびそれらの産生のための方法は、例えば、WO第94/09817号において、説明されている。

他の可変領域含有タンパク質

【0173】

US第5,731,168号は、一对のFv間の界面が、組み換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の割合を最小化するように操作され、それによって、二重特異性タンパク質を産生する、分子を説明する。好ましい界面は、少なくとも C_H3 ドメインの一部を含む。この方法において、第1のタンパク質の界面からの1つ以上の小さなアミノ酸側鎖は、より大きな側鎖 (例えば、チロシンまたはトリプトファン) で置き換えられる。大きなアミノ酸側鎖を、より小さなもの (例えば、アラニンまたはトレオニン) で置き換えることによって、大きな側鎖 (複数を含む) と同一または同様のサイズの代償的「空洞」が、第2のタンパク質の界面上に創出される。

20

【0174】

可変領域を含む二重特異性タンパク質としては、架橋または「ヘテロ結合体」タンパク質が挙げられる。例えば、ヘテロ結合体のタンパク質のうちの一方を、アビジンに、他方はビオチンに結合することができる。かかるタンパク質は、例えば、標的免疫系細胞を望ましくない細胞に標的化させるために提唱されている (US第4,676,980号)。可変領域を含むヘテロ結合体タンパク質は、任意の好都合な架橋方法を使用して作製されてもよい。好適な架橋剤は、当該技術分野において既知であり、いくつかの架橋技術とともに、US第4,676,980号において開示されている。

30

【0175】

可変領域を含む二重特異性タンパク質はまた、化学結合を使用して調製することができる。Brennan (1985) は、無傷抗体が、F(ab')₂フラグメントを生成するように、タンパク質分解的に開裂される、手順を説明する。これらのフラグメントは、隣接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止するように、ジチオール錯化剤である、亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元される。次いで、生成されたF(ab')₂フラグメントが、チオニトロ安息香酸 (TNB) 誘導体に変換される。次いで、F(ab')₂-TNB誘導体のうちの一方を、メルカプトエチルアミンでの還元によって、F(ab')₂-チオールに再変換し、等モル量の他方のF(ab')₂-TNB誘導体と混合して、二重特異性タンパク質を形成する。

40

【0176】

追加の可変領域含有タンパク質としては、例えば、単一鎖Fab (例えば、Hust et al., 2007)、またはFab₃ (例えば、EP第19930302894号において説明される) が挙げられる。

50

定常ドメイン融合

【0177】

本開示は、本開示の修飾 V_H 、および定常領域（例、 F_c ）または C_H2 および/または C_H3 ドメインといったそのドメインを含むタンパク質を網羅する。例えば、本開示は（前述されるような）ミニボディ、またはドメイン抗体 F_c 融合、または $scFv-F_c$ 融合、または二重特異性抗体- F_c 融合、または三重特異性抗体- F_c 融合、または四重特異性抗体- F_c 融合、またはドメイン抗体- C_H2 融合、 $scFc-C_H2$ 融合、または二重特異性抗体- C_H2 融合、または三重特異性抗体- C_H2 融合、または四重特異性抗体- C_H2 融合、またはドメイン抗体- C_H3 融合、または $scFv-C_H3$ 融合、または二重特異性抗体- C_H3 融合、または三重特異性抗体- C_H3 融合、または四重特性抗体- C_H3 融合、含む。これらのタンパク質のうちのいずれも、リンカー、好ましくは可変領域と定常領域または定常ドメインとの間の抗体ヒンジ領域を含むことができる。好ましくは、かかる F_c 融合タンパク質はエフェクター機能を有する。

10

【0178】

本明細書において使用される「 C_H2 ドメイン」という用語は、例えばKabab E U付番システム（Kabab 1991または1992において開示される）に従って約231~340位の間から、延在する重鎖抗体分子の部分を含む。2つのN-連結炭水化物側鎖は、通常、無傷な天然IgG分子の2つの C_H2 ドメイン間に挿入される。一実施形態において、本開示のタンパク質はIgG1分子（例、ヒトIgG1分子）由来の C_H2 ドメインを含む。別の実施形態において、本開示のタンパク質はIgG4分子（例、ヒトIgG4分子）由来の C_H2 ドメインを含む。

20

【0179】

本明細書において使用される「 C_H3 ドメイン」という用語は、該 C_H2 ドメインのN末端、例えば約341~446b位（Kabab E U付番システム）から、約110残基延在する重鎖抗体分子のタンパク質を含む。該 C_H3 ドメインは通常、IgG抗体のC末端部分を形成する。幾つかの抗体においては、しかしながら、付加ドメインが該分子のC末端部分を形成するように C_H3 ドメインから延在することができる（例、IgMの μ 鎖およびIgEのe鎖における、 C_H4 ドメイン）。一態様において、本開示のタンパク質はIgG1分子（例、ヒトIgG1分子）由来の C_H3 ドメインを含む。別の実施形態において、本開示のタンパク質はIgG4分子（例、ヒトIgG4分子）由来の C_H3 ドメインを含む。

30

【0180】

本開示のタンパク質の産生に有用な定常領域配列は、多数の異なる源から得ることができる。好ましい態様において、タンパク質の定常領域またはその一部はヒト抗体由来である。しかしながら、定常領域またはその一部は、例えばげっ歯動物（例、マウス、ラット、ウサギ、モルモット）、または非ヒト霊長類（例、チンパンジー、マカク）種を含む別の哺乳類種の免疫グロブリンまたは抗体に由来してもよいことは理解されるだろう。さらに、定常領域ドメインまたはその一部は、任意の抗体クラスに由来してもよい。

【0181】

本明細書において使用される「エフェクター機能」という用語は、タンパク質および/または免疫系細胞と結合し、種々の生物学的効果を媒介する、 F_c 領域またはその一部（例、 C_H2 ドメイン）の機能的能力を指す。エフェクター機能は、抗原依存性または抗原非依存性であり得る。「抗原依存性エフェクター機能」とは、抗体の抗原への結合に続いて通常誘発されるエフェクター機能を指す。代表的な抗原依存性エフェクター機能は、補体タンパク質（例、C1q）と結合する能力を含む。例えば、補体成分C1の F_c 領域への結合は、補体依存性細胞毒性（CDC）といわれる処理である、オプソニン化および細胞病原体の溶解につながる古典的補体系を活性化することができる。補体の活性化はまた炎症反応を促進し、また自己免疫過敏性に関与することができる。他の抗原依存性エフェクター機能は、抗体の、その F_c 領域を介する細胞上の特定の F_c 受容体（「 F_cRs 」）へ結合によって媒介される。抗体の異なるクラスに特異的な複数の F_c 受容体があり、

40

50

IgG (ガンマ受容体、またはIgRs)、IgE (エプシロン受容体、またはIgRs)、IgA (アルファ受容体、またはIgRs)、およびIgM (μ 受容体、またはIg μ Rs)を含む。細胞表面上のFc受容体への抗体の結合は、免疫複合体の細胞内取り込み、抗体被覆粒子または微生物の抱込みおよび破壊 (抗体依存性貪食、またはADCPともいわれる)、免疫複合体の排除、キラー細胞による抗体被覆標的細胞の溶解 (抗体依存性細胞媒介細胞毒性、またはADCCという)、炎症性媒介物質の放出、免疫系細胞活性の調節、胎盤通過、および抗体産生の制御を含む、多数の重要で多様な生物学的反応を引き起こす。

【0182】

本明細書で使用される「抗原非依存性エフェクター機能」という用語は、抗体によって、該抗体が対応する抗原に結合しているかどうかにかかわらず、誘発されるエフェクター機能を指す。代表的な抗原非依存性エフェクター機能は、細胞輸送、抗体の循環半減期および排除率、ならびに精製の促進を含む。構造的に独特なFc受容体である「新生児Fc受容体」または「FcRn」は、サルベージ受容体としても知られ、半減期および細胞輸送の調整において決定的な役割を果たす。微生物細胞 (例、ブドウ球菌タンパク質AまたはG) から精製される他のFc受容体は、高い親和性を伴ってFc領域への結合することができ、Fc含有タンパク質の精製を促進するために使用されることができる。

10

【0183】

定常領域ドメインは、例えばポリメラーゼ連鎖反応および対象のドメインを増幅するために選択されるプライマーを用いて、クローン化することができる。抗体配列のクローン作成は、例えば米国特許第5,658,570号において説明される。

20

【0184】

本開示のタンパク質は、異なる型の任意の数の定常領域/ドメインを含むことができる。

【0185】

タンパク質の定常領域を構成する定常ドメインまたはその一部は、異なる抗体分子に由来することができる。例えばタンパク質は、IgG1分子に由来するC_H2ドメインまたはその一部、および、IgG3分子に由来するC_H3領域またはその一部を含んでもよい。

30

【0186】

本開示の別の態様において、本開示のタンパク質は、FcRn結合を付与するのに十分なFcのうち少なくとも1つの領域を含む。例えば、FcRnに結合するFc領域の部分は、Kabata EU付番に従って、IgG1の約282位~438位のアミノ酸を含む。

【0187】

一態様において、本開示の変性タンパク質は、1つ以上の定常領域ドメインが部分的にまたは全体的に欠失した、修飾定常領域 (「ドメイン欠失定常領域」) を含む。本開示はまた、変更された、例えば向上または低減されたエフェクター機能を有する修飾Fc領域、またはその部分を包含する。多くのかかる修飾Fc領域は当分野において周知であり、例えば国際公開公報WO第2005/035586号、国際公開公報WO第2005/063815号、または国際公開公報WO第2005/047327号において説明される。

40

脱免疫化タンパク質

【0188】

本開示はまた、脱免疫化タンパク質を企図する。脱免疫化タンパク質は、例えばB細胞エピトープ、またはT細胞エピトープといった、1つ以上のエピトープを除去され (即ち、変異され)、それによって対象が該タンパク質に対する免疫反応を起こす可能性を低減する。脱免疫化タンパク質を産生する方法は当分野において周知であり、例えば、国際公開公報WO第00/34317号、国際公開公報WO第2004/108158号、お

50

よび国際公開公報WO第2004/064724号において説明される。例えば、該方法は、タンパク質内のエピトープを予測するためのコンピュータによる分析の実行、および、該予測されたエピトープ内の1つ以上の残基を、それによってその免疫原性を低減するように変異させること、を含む。該タンパク質は次に、抗原へ結合する能力を維持していることを確かめるために、例えばコンピュータによって、または体外で、または体内で、分析される。好ましくは、CDR内で発生するエピトープは、該変異が抗原結合を低減する可能性が低い場合を除き、変異されない。エピトープを予測する方法は当分野において周知であり、例えば、Saha(2004)において説明される。

【0189】

好適な変異を導入し、発現し、得られるタンパク質を分析する方法は、本明細書における説明に基づき、当業者にとって明白であろう。

10

ライブラリおよびスクリーニング方法

【0190】

本開示はまた、本開示に従って修飾される複数の V_H を含む、タンパク質のライブラリを包含し、例えば、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。

【0191】

本開示の態様には、ナイーブライブラリ、免疫化ライブラリ、または合成ライブラリが含まれる。ナイーブライブラリは、いかなる免疫原も接種されておらず、感染または炎症のいずれの症状も呈していない、好適な宿主のBリンパ球に由来する。免疫化ライブラリは、好適に「免疫化された」宿主、即ち、ある免疫原を接種された宿主から得られる、B細胞および形質細胞の混合物から作製される。一態様において、これらの細胞からのmRNAは、当該技術分野において既知の方法(例えば、オリゴ-dTプライマーおよび逆転写酵素)を使用して、cDNAに翻訳される。代替の態様において、宿主細胞からの抗体をコードする核酸(mRNAまたはゲノムDNA)は、好適なプライマーを用いたPCRによって増幅される。かかる抗体遺伝子増幅のためのプライマーは、当該技術分野において既知である(例えば、US第6,096,551号、およびWO第00/70023号)。さらなる態様において、宿主細胞からのmRNAは、cDNAに合成され、次いで、これらのcDNAは、抗体特異的プライマーを用いたPCR反応において増幅される(例えば、US第6,319,690号)。代替として、レパートリは、PCRを使用することなく、従来のcDNAクローン化技術によってクローン化されてもよい(Sambrook and Russell, eds, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed, vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)。DNAは、クローン化の間または後のいずれかで、必要な部位に負荷電アミノ酸(複数を含む)を含むように修飾される。

20

30

【0192】

別の態様において、抗体配列が、相互に整合されるヒト由来の公開された抗体配列のデータベースが確立される。データベースは、CDRループの配列およびカノニカルな折り畳み(抗体構造の分析によって判定されるように)の両方において、高度の類似性を示す、抗体配列のサブグループを定義するために使用される。サブグループの各々に関して、そのサブグループの成員を表すコンセンサス配列が導き出され、したがって、コンセンサス配列の完全な集合体は、ヒト抗体の完全な構造レパートリを表す。

40

【0193】

次いで、これらの人工遺伝子は、例えば、全遺伝子合成によって、または合成遺伝的サブユニットの使用によって、構築される。これらの遺伝的サブユニットは、ポリペプチドレベルで構造的サブ要素に対応する。DNAレベルでは、これらの遺伝的サブユニットは、サブ要素の各々の開始および端部での開裂部位によって定義され、これは、ベクター系において固有のものである。コンセンサス配列の集合体の成員である、全ての遺伝子は、それらが、対応する遺伝的サブ配列の類似のパターンを含有するように、構築される。例

50

えば、前記ポリペプチドは、H u C A L コンセンサス遺伝子：V₁、V₂、V₃、V₄、V₁、V₂、V₃、V_{H1A}、V_{H1B}、V_{H2}、V_{H3}、V_{H4}、V_{H5}、V_{H6}、C₁、C₂、C_{H1}、または前記H u C A L コンセンサス遺伝子の任意の組み合わせであるか、これらに由来する。次いで、DNA分子のこの集合体は、抗体、好ましくは、抗原に特異的に結合するタンパク質源として使用され得る、Fv、ジスルフィド結合Fv、単一鎖Fv (s c Fv)、Fabフラグメント、またはFab'フラグメントの「合成ライブラリ」を創出するために使用することができる。US第6,300,064号は、合成ライブラリを作製するための方法を開示する。かかる合成ライブラリは、本開示に従う、負荷電アミノ酸を含むように修飾される。別の態様において、合成ヒト抗体は、定義されたV遺伝子要素からの合成によって作製される。Winter (EP第0368684号)は、抗体可変領域遺伝子を増幅する(例えば、PCRによって)、クローン化する、および発現するための方法を提供している。これらの遺伝子から開始して、Winterは、重鎖および/または軽鎖のCDR3を無作為化することによって、機能的抗体フラグメントのライブラリを創出することができた。このプロセスは、免疫系におけるB細胞の発達の中に生じる、V_HおよびV_D組み合わせの天然プロセスと機能的に同等である。例えば、ヒト生殖細胞系V_H遺伝子セグメントのレパートリは、5つの無作為なアミノ酸残基の合成「Dセグメント」、およびJセグメントに接合することによって、体外で再配置され、8つの残基の合成の第3の相補性決定領域(CDR)を創出することができる。US第5,885,793号は、これらのようなかかる抗体ライブラリを作製する方法を開示する。当業者には明らかであるように、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、本明細書において説明される位置で、負荷電アミノ酸をコードするコドンを含むように、産生される。

10

20

【0194】

本開示に従うタンパク質は、可溶性分泌タンパク質であってもよく、または細胞、または粒子(例えば、ファージ、または他のウイルス、リボソーム、もしくは孢子)の表面上の融合タンパク質として提示されてもよい。

【0195】

種々のディスプレイライブラリの形式は、当該技術分野において既知であり、例えば、Levin and Weiss (2006)において考察されている。例えば、ライブラリは、体外ディスプレイライブラリである(即ち、タンパク質が、体外ディスプレイを使用して呈示され、発現されたドメインが、前記ドメインが、宿主細胞の非存在下において提示されるように、それが発現される、核酸に結合される)。したがって、体外ディスプレイ技術によって産生されるライブラリは、形質転換またはトランスフェクション効率によって制限されない。体外ディスプレイの方法の例としては、リボソームディスプレイ、共有結合ディスプレイ、およびmRNAディスプレイが挙げられる。

30

【0196】

一態様において、体外ディスプレイライブラリは、リボソームディスプレイライブラリである。当業者は、リボソームディスプレイライブラリが、発現ライブラリによってコードされるmRNAを、それがコードするタンパク質に直接リンクすることを認識するであろう。リボソームディスプレイライブラリを産生するための手段は、V_Hを含むタンパク質をコードする核酸を、適切なプロモータ配列およびリボソーム結合配列と動作可能な接続に配置することを含む。好ましいプロモータ配列は、バクテリオファージT3およびT7プロモータである。好ましくは、核酸は、スペーサ配列、および終結コドンが除去された修飾された終結配列と動作可能な接続に配置される。本文脈において使用される際、「スペーサ配列」という用語は、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ことが理解されるものとする。スペーサ配列によってコードされるペプチドが、V_Hを含むタンパク質が自由に折り畳み、別のタンパク質または核酸と相互作用することを可能にしつつ、翻訳後、リボソームトンネル内にある際、スペーサ配列は、遺伝子構築体に組み込まれる。好ましいスペーサ配列は、例えば、線状ファージM13 mp19の遺伝子IIIのアミノ酸211~299をコードする核酸である。

40

50

【0197】

ディスプレイライブラリは、当該技術分野において既知の、ならびに/または例えば、Ausubel et al (1987) および Sambrook et al (2001) において説明されている方法を使用して、体外で転写および翻訳される。体外転写および翻訳に商業的に入手可能な系の例としては、例えば、PromegaからのTNT体外転写および翻訳系が挙げられる。氷上での発現反応物の冷却は、一般的に、翻訳を終結させる。リボソーム複合体は、例えば、酢酸マグネシウムもしくはクロラムフェニコールといった、試薬の添加によって、ペプチドおよび/またはそのコードmRNAからの解離に対して安定化される。かかる体外ディスプレイライブラリは、本明細書において説明されるように、種々の方法によってスクリーニングされる。

10

【0198】

別の態様において、本開示のディスプレイライブラリは、リボソーム不活性化ディスプレイライブラリである。本態様によると、核酸は、第1のスペース配列をコードする核酸に動作可能に連結される。このスペース配列は、そこからコードされる 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ことを可能にする、グリシン/セリンに富む配列であることが好ましい。第1のスペース配列は、リボソームを不活性化する毒素をコードする核酸に連結される。毒素が、真核細胞リボソームを不活性化し、mRNAまたはコードされたペプチドの放出を伴うことなく、翻訳複合体上にリボソームを引き止める、リシンA鎖を含むことが好ましい。毒素をコードする核酸は、第2のスペース配列をコードする別の核酸に連結される。第2のスペースは、リボソームのトンネルを占有するアンカーであり、ペプチドおよび毒素の両方が、正確に折り畳まれ、活性になることを可能にする。かかるスペース配列の例は、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。リボソーム不活性化ディスプレイライブラリは、一般的に、Promegaから入手可能なウサギ網状赤血球溶解系といった系を使用して、体外転写および翻訳される。毒素をコードするmRNAの翻訳、およびこのタンパク質の正確な折り畳み後、リボソームは、コードされたポリペプチド、およびそれが翻訳されるmRNAの両方に依然として結合したまま、不活性化される。

20

【0199】

別の態様において、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。本実施形態によると、核酸は、本開示の発現ライブラリによってコードされる、 V_H を含むタンパク質が、自由に折り畳まれ、標的抗原と相互作用することを可能にする、グリシン/セリンに富む配列といった、スペース配列をコードする核酸に、動作可能に連結される。スペース配列をコードする核酸は、転写終結因子に動作可能に連結される。mRNAディスプレイライブラリは、一般的に、例えば、Promegaから入手可能なHeLa Scribe Nuclear Extract In Vitro Transcription Systemといった、当該技術分野において既知の方法を使用して、体外で転写される。コードされたmRNAは、その後、当該技術分野において既知であり、かつ例えば、Roberts and Szostak (1997) において説明される技術を使用して、例えば、ピューロマイシンといった、リボソームに結合する分子に共有結合で連結されるDNAオリゴヌクレオチドに、共有結合で連結される。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で連結され、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るmRNAに光架橋される。次いで、発現ライブラリから転写されるmRNAは、当該技術分野において既知の方法を使用して翻訳される。リボソームが、mRNAおよびオリゴヌクレオチドの接合部に到達する時、リボソームは留まり、ピューロマイシン部分は、リボソームのホストランスマフェラーゼ部位に進入し、このため、コードされたポリペプチドを、それが発現されるmRNAに共有結合で連結する。

30

40

【0200】

なお別の態様において、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。本態様によると、 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

50

たDNAと相互作用するタンパク質をコードする、第2の核酸に動作可能に連結される。それが相互作用するDNAと相互作用するタンパク質の例としては、大腸菌バクテリオファージP2ウイルスAタンパク質(P2A)、ならびにファージ186、HP1、およびPSP3から単離される同等のタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。共有結合ディスプレイ遺伝子構築体は、Promegaから入手可能なウサギ網状赤血球溶解系といった系を使用して、体外で転写および翻訳される。V_Hを含むタンパク質およびP2Aタンパク質の融合の翻訳後、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。したがって、核酸フラグメントは、それがコードするペプチドに共有結合で連結される。

【0201】

なお別の態様において、ディスプレイライブラリは、ファージディスプレイライブラリであり、V_Hを含む発現されたタンパク質は、例えば、US第5,821,047号、US第6,248,516号、およびUS第6,190,908号において説明されるように、バクテリオファージの表面上に提示される。説明される基本原理は、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、例えば、M13タンパク質3、M13タンパク質7、またはM13タンパク質8の群より選択される、ファージコートタンパク質といった、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、これらの配列は、適切なベクター、即ち、細菌性細胞内で複製することができるものに挿入される。次いで、例えば、大腸菌といった、好適な宿主細胞を、組み換えベクターを用いて形質転換する。前記宿主細胞をまた、核酸フラグメントが動作可能に連結される、コートタンパク質の非修飾形態をコードする、ヘルパーファージ粒子に感染させる。形質転換された、感染された宿主細胞を、粒子の表面上に、融合タンパク質の2つ以上のコピーを含む、組み換えファージミッド粒子を形成するために好適な条件下で培養する。この系は、ファージ、T4ファージ、M13ファージ、T7ファージ、およびバキュロウイルスといった、ウイルス粒子の生成において効果的であることが示されている。次いで、かかるファージディスプレイ粒子をスクリーニングして、標的抗原に結合するのに十分な配座を有する提示されたドメインを同定する。

【0202】

他のウイルスディスプレイライブラリとしては、レトロウイルスディスプレイライブラリが挙げられ、発現されたペプチドまたはタンパク質ドメインは、例えば、US第6,297,004号において説明されるように、レトロウイルス粒子の表面上に提示される。

【0203】

本開示はまた、例えば、US第5,516,637号において説明されるような細菌ディスプレイライブラリ、例えば、US第6,423,538号において説明されるような酵母ディスプレイライブラリ、または例えば、Strenglin et al 1988において説明されるような哺乳類ディスプレイライブラリを企図する。

【0204】

ディスプレイライブラリをスクリーニングするための方法は、当該技術分野において既知である。一態様において、本開示のディスプレイライブラリは、親和性精製を使用してスクリーニングされる。親和性精製技術は、当該技術分野において既知であり、例えば、Scopes(1994)において説明されている。親和性精製の方法は、典型的に、ライブラリによって提示される、V_Hを含むタンパク質を、標的抗原および/または超抗原(例えば、プロテインA)と接触させ、その後、洗浄し、抗原に結合したままのそれらのドメインを溶離することを含む。抗原は、好ましくは、精製を容易にすることを可能にするように、例えば、タンパク質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)、およびFLAGエピトープから成る群より選択される分子といった、別の分子に結合される。したがって、標的タンパク質または核酸は、単に、遠心分離によって、または別の分子、例えば、ストレプトアビジンに結合させることによって、または特定の抗体、例えば、抗FLAG抗体、もしくは抗GST抗体の結合によって、単離される。

10

20

30

40

50

【0205】

別の態様において、本開示のディスプレイライブラリは、FACS分析を使用した、結合ペプチドの同定を可能にするように、発現される。FACS分析を使用した、ライブラリのスクリーニングは、US第6,455,63号において説明されている。好ましくは、体外ディスプレイライブラリは、FACS分類によってスクリーニングされる。体外ディスプレイタンパク質は、粒子、または例えば、ガラス、例えば、ポリスチレン、ラテックス、またはとりわけセファロース、セルロース、ナイロン、テフロン（登録商標）といった、架橋デキストランといった、ポリマーといった、FACS分類に好適なビーズに共有結合で連結される。粒子またはビーズに結合される、提示されたライブラリは、例えば、蛍光分子、または第2の蛍光分子によって検出される分子といった、検出可能な標識で標識化されている、抗原または超抗原に添加される。次いで、ビーズを洗浄し、FACSによる分類に供し、結合された蛍光抗原または超抗原を伴うビーズが、蛍光標的タンパク質または核酸に結合されていないビーズから分離されることを可能にする。

10

【0206】

代替として、ライブラリは、例えば、Biacoreセンサチップ技術（Biacore AB, UK）といった、バイオセンサによるアッセイを使用してスクリーニングされる。Biacoreセンサチップは、カルボキシメチル化デキストランで修飾された金の薄層で被覆されるガラス表面であり、そこに、標的タンパク質または核酸が、共有結合で付着される。次いで、本開示のライブラリを、抗原を含む、Biacoreセンサチップに曝露させる。

20

タンパク質産生
変異生成

【0207】

可変領域を含むタンパク質をコードするDNAは、当技術分野における標準的な方法を用いて単離される。例えば、プライマーは、対象の領域に隣接する可変領域内の保存領域ヘアニールするように設計され、該プライマーは次に、例えばPCRによって、介在核酸を増幅するために使用される。好適な方法および/またはプライマーは当技術分野において周知であり、および/または、例えばBorrebaeck(ed), 1995および/またはFroyen et al., 1995において説明される。かかる増幅方法への鑄型DNAの好適な源は、例えば、ハイブリドーマ、トランスフェクトーマ、および/または、例えば本明細書に説明されるように可変領域を含むタンパク質を発現する細胞に由来する。

30

【0208】

単離後、DNAは、当技術分野において周知の種々の方法のうちの任意によって、必要な位置における負荷電アミノ酸をコードするコドンを含むように修飾される。これらの方法は、部位特異的な（または、オリゴヌクレオチド媒介の）変異生成による調整、PCR変異生成、および、予め調整された、タンパク質をコードするDNAのカセット変異生成を含むが、それらに限定されない。組み換えタンパク質の変異は、制限断片操作によって、または合成オリゴヌクレオチドを伴う重複伸長PCRによってもまた構築することができる。変異原性プライマーは負荷電アミノ酸をコードし、例えば、アスパラギン酸（即ち、GAAまたはGAG）またはグルタミン酸（即ち、GATまたはGAC）等の負荷電アミノ酸ををコードするコドンを構成する残基を含む。標準的な変異生成技術は、かかる変異DNAをコードするDNAを生成するために使用されることができる。一般的な手引きは、Sambrook et al 1989、および/またはAusubel et al 1993に見出すことができる。

40

【0209】

部位特異的な変異生成は、代替変形、即ち変異タンパク質を調製する1つの方法である。この技術は当技術分野において周知である（例えば、Carter et al 1985またはHo et al 1989を参照のこと）。手短に説明すると、DNAの部

50

位特異的な変異生成の実行において、出発DNAはまず、所望の変異（例、コドンをコードする1つ以上の負荷電アミノ酸の挿入）をコードするオリゴヌクレオチドを、かかる出発DNAの単一鎖へハイブリッド形成することによって、変質される。ハイブリダイゼーション後、DNAポリメラーゼが、該ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用し、および該出発DNAの単一鎖を鋳型として使用して、2本目の鎖全体を合成するために使用される。そのようにして、所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドが、得られる2本鎖DNAへ組み込まれる。部位特異的な変異生成は、発現プラスミド内で変異するようにタンパク質を発現する遺伝子内で実行されてもよく、得られるプラスミドは、所望の負荷電アミノ酸置換変異の導入を確認するように配列されてもよい。部位特異的手順および方式は、例えばQuick Change（登録商標）Multi Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene、La Jolla、カナダ）等の、市販のキットを含む。

【0210】

PCR変異生成も、出発タンパク質のアミノ酸配列変異体を作成するのに好適である。Higuchi, 1990、Ito et al 1991を参照されたい。簡単に説明すると、PCR内で少量の鋳型DNAが出発材料として使用される時、鋳型DNA内の対応する領域と配列が僅かに異なるプライマーを、該プライマーと該鋳型とが異なる位置においてのみ該鋳型配列と異なる相対的に多量の特異的DNA断片を生成するために、使用することができる。

【0211】

変異体を調製するための別の方法である、カセット変異生成は、Wells et al, 1985において説明される技術に基づく。出発材料は、変異される出発タンパク質DNAを含むプラスミド（または他のベクター）である。変異される出発DNA内のコドンが特定される。特定された変異部位の両側には、独特の制限エンドヌクレアーゼ部位が存在しなくてはならない。かかる制限部位が存在しない場合には、前述のオリゴヌクレオチド媒介変異生成方法を使用して、該出発DNA内の適切な位置に導入するように生成されてもよい。プラスミドDNAは、線形化するためにこれらの部位で切断される。該制限部位間のDNA配列をコードするが、所望の変異を含む、2本鎖オリゴヌクレオチドは、標準的手法を用いて合成され、オリゴヌクレオチドの2本鎖は別々に合成され、次に標準的な技術を用いて一緒にハイブリッド形成される。この2本鎖オリゴヌクレオチドは、カセットといわれる。このカセットは、プラスミドと直接連結され得るように、線形化されたプラスミドの両端と適合する5'および3'末端を有するように設計される。プラスミドはこのようにして、変異DNA配列を含む。コードされた負荷電アミノ酸置換を含む変異DNAは、DNA配列決定によって確認されることができる。

【0212】

単一変異はまた、PCRに基づく変異生成（Sambrook et al., 2001）によって、2本鎖プラスミドDNAを鋳型として使用したオリゴヌクレオチド特異変異生成によって、生成される。

組み換え発現

【0213】

組み換えタンパク質の場合においては、組み換えタンパク質をコードする核酸は、好ましくは発現ベクター内へと導入され、それは次に、組み換え宿主細胞内のタンパク質の合成を得るために、宿主細胞へと、好ましくは、大腸菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、あるいは、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髓腫細胞等の哺乳動物細胞といった、ジスルフィド架橋または結合を産生し得る、さもなくば免疫グロブリンタンパク質を産生しない、細胞へと移入される。抗体をコードするDNAの細菌における組み換え発現についての総説は、Skerra et al (1993)およびPluckthun, (1992)を含む。これらの結果を得るための分子クローン作成技術は、当技術分野において周知であり、例えば、Ausubel et al (198

7) および Sambrook et al (2001) において説明される。クローン作成および生体内増幅方法の多様な変形が、組み換え核酸の構築に好適である。組み換え抗体を産生する方法は当技術分野において周知である。米国特許第 4, 816, 567 号を参照されたい。

【0214】

単離後、本開示のタンパク質をコードする核酸は好ましくは、更なるクローン作成 (DNA の増幅) のために、あるいは、無細胞系または細胞内における発現のために、発現構築物または複製可能ベクターへと挿入される。好ましくは、核酸はプロモータに作動可能に連結される。

【0215】

本明細書において使用される「プロモータ」という用語は、その最も広い文脈において用いられ、ゲノム遺伝子の転写性制御配列を含み、例えば、発生的なおよび/または外部刺激へ反応して、または組織特異的な方法で核酸の発現を変質させる付加的な制御要素 (例えば、上流活性化配列、転写因子結合部位、転写促進因子、およびサイレンサー) を伴ってまたは伴わないで、精密な転写開始に必要とされる TATA ボックスまたはイニシエータを含むものと解釈されるものとする。本文脈において、「プロモータ」という用語はまた、組み換え、合成、または融合核酸、またはそれが作動可能に連結される核酸の発現を付与、活性化、または強化する派生物、を説明するために使用される。好ましいプロモータは、該核酸の発現をさらに強化し、および/または、その空間的発現および/または時間的発現を変更するように、1つ以上の特異的制御要素の付加的な複製物を含むことができる。

【0216】

本明細書において使用される「作動可能に連結される」という用語は、核酸の発現がプロモータによって制御されるように、プロモータを核酸に関連して位置付けることを意味する。

【0217】

無細胞発現系もまた、本開示によって企図される。例えば、本開示のタンパク質をコードする核酸は、例えば T7 プロモータといった好適なプロモータに作動可能に連結され、得られた発現構築物は転写および翻訳に十分な条件へ曝露される。生体外発現または無細胞発現への代表的な発現ベクターは説明されており、TNT T7 および TNT T3 システム (Promega)、pEXP1-DEST および pEXP2-DEST ベクター (Invitrogen) を含むが、それらに限定されない。

【0218】

細胞内発現のための多数のベクターが入手可能である。ベクター成分は通常、次のうちの1つ以上を含むが、それらに限定されない; シグナル配列、本開示のタンパク質をコードする配列 (例、本明細書中で提供される情報から導かれる)、促進因子要素、プロモータ、および、転写終止配列。当業者は、タンパク質の発現に好適な配列を承知しているであろう。例えば例示的なシグナル配列は、原核生物分泌シグナル (例、pelB、アルカリ性ホスホリパーゼ、ペニシリナーゼ、Ipp、熱安定性腸毒素 II)、酵母分泌シグナル (例、インペルターゼリーダー、因子リーダー、または酸性ホスファターゼリーダー)、または哺乳動物分泌シグナル (例、単純ヘルペス gD シグナル) を含む。

【0219】

例示的なプロモータは、原核生物内で活性であるプロモータ (例として、phoA プロモータ、 λ -ラクターゼおよびラクトースプロモータ系、アルカリ性ホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモータ系、および tac プロモータといったハイブリッドプロモータ) を含む。これらのプロモータは、グラム陰性またはグラム陽性の有機体等の真正細菌、例えば、大腸菌といったエシェリキア属等の腸内細菌科、エンテロバクター属、エルビニア菌属、クレブシエラ属、プロテウス属、ネズミチフス菌等のサルモネラ属、霊菌等のセラチア属、および赤痢菌、同様に、枯草菌およびリケニホルミス菌等のバシラ

10

20

30

40

50

ス属、緑膿菌等のシュードモナス菌、およびストレプトミセス、を含む原核生物内の発現に有用である。好ましくは、宿主は大腸菌である。1つの好ましい大腸菌クローン作成宿主は、大腸菌294(ATCC31,446)であり、大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC31,537)、および大腸菌W3110(ATCC27,325)、DH5、またはDH10Bといった他の菌株も好適である。

【0220】

哺乳動物細胞内で活性な例示的プロモータは、サイトメガロウイルス即時早期プロモータ(CMV-IE)、ヒト伸長因子1-プロモータ(EF1)、低分子核RNAプロモータ(U1aおよびU1b)、 α -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)、アデノウイルスメジャー後期プロモータ、 β -アクチンプロモータ;CMV促進因子/ β -アクチンプロモータまたは免疫グロブリンプロモータまたはその活性断片を含む、ハイブリッド制御要素、を含む。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7、ATCC CRL1651)、ヒト胚腎臓株(浮遊培養で成長のためにサブクロニングされた293または293細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK、ATCC CCL10)、またはチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)である。

10

【0221】

酵母細胞、例えばピキア・パストリス、出芽酵母、および分裂酵母を含む群から選択される酵母細胞内における発現に好適な代表的なプロモータは、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、またはTEF1プロモータを含むが、それらに限定されない。

20

【0222】

昆虫細胞における発現に好適な代表的なプロモータは、OPEI2プロモータ、カイコガから単離された昆虫アクチノプロモータ、ショウジョウバエDshプロモータ(Marshall et al 2000)、および誘発性メタロチオネインプロモータを含むが、それらに限定されない。組み替えタンパク質の発現に好ましい昆虫細胞は、BT1-TN-5B1-4細胞およびヨトウガ細胞(例、sf19細胞sf21細胞)を含む群から選択される昆虫細胞を含む。核酸断片の発現に好適な昆虫は、ショウジョウバエを含むが、それらに限定されない。スポドプテラ・フルジベルダの使用も企図される。

30

【0223】

単離された核酸分子、または同一のものを含む遺伝子構築物を、発現のために細胞内へと導入する方法は、当業者に周知である。形成される細胞に使用される技術は、既知の成功した技術に依存する。組み換えDNAを細胞内へと導入する手段は、微量注入法、DEAE-デキストラン媒介の形質移入、例えばlipofectamine(Gibco, MD、米国)および/またはcellfectin(Gibco, MD、米国)の使用による、リポソーム媒介の形質移入、PEG媒介DNA摂取、電気穿孔法、および、特にDNA被覆タングステンまたは金粒子(Agracetis Inc., WI、米国)の使用による、微粒子照射等を含む。

40

【0224】

本開示のタンパク質を産生するために使用される宿主細胞は、使用される細胞の型に応じて、種々の培地で培養される。Ham's F10(Sigma)、Minimal Essential Medium(MEM)、(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、およびDulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)、Sigma)等の市販の培地が、哺乳動物細胞の培養に好適である。本明細書内で論じられる他の細胞型の培養に対する培地は、当技術分野において周知である。

タンパク質の単離

【0225】

50

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」という語は、該タンパク質は、実質的に精製される、またはその自然発生的環境、例えば非相同環境から除去されることを意味する。「実質的に精製される」という語は、該タンパク質は実質的に汚染物質を含まない、例えば、少なくとも汚染物質を約70%または75%または80%または85%または90%または95%または96%または97%または98%または99%含まないことを意味する。

【0226】

本開示のタンパク質を精製する方法は、当技術分野において周知であり、および/または本明細書において説明される。例えばタンパク質は、結合が発生するのに十分な時間および条件下で、該タンパク質に結合可能な薬剤と接触する。任意で、非結合タンパク質を除去するための洗浄に続き、本開示のタンパク質は単離される、例えば溶出される。

10

【0227】

組み換え技術を使用する時、本開示のタンパク質は、細胞周辺腔内または直接的に培地へと分泌され、細胞内で産生されることができる。タンパク質が細胞内で産生される場合、第1のステップとして、宿主細胞または溶解断片のいずれかである微粒子残屑は、例えば遠心分離または限外ろ過によって除去される。Carter et al. (1992)は、大腸菌の細胞周辺腔へ分泌された抗体を単離する手順を説明している。簡単に説明すると、細胞ペーストは、酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTA、およびフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)の存在下で、約30分かけて解凍される。細胞残屑は遠心分離によって除去することができる。タンパク質が培地へと分泌される場合は、かかる発現系からの上清は通常、まず、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon限外ろ過装置といった市販のタンパク質濃縮フィルターを用いて濃縮される。PMSF等のプロテアーゼ阻害剤は、蛋白質加水分解を阻害するために前述のステップのうちの任意に含まれてもよく、抗生物質は偶発的汚染菌の成長を防止するために含まれてもよい。

20

【0228】

細胞から調製されたタンパク質は、例えば、好ましい精製技術である親和性クロマトグラフィとともに、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、および親和性クロマトグラフィ等を用いて精製することができる。親和性リガンドとしてのプロテインAの適合性は、種および該タンパク質内に(仮にあったとして)存在する任意の抗体Fcドメインのアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト1、2、または4重鎖に基づく抗体を精製するために使用することができる(Lindmark et al. 1983)。タンパク質Gは、全てのマウスアイソタイプおよびヒト3に対して推奨される(Guss et al. 1986)。別の方法として親和性精製は、抗原または、本開示のタンパク質内の可変領域が結合するまたは生じたエピトープ決定基を用いて調製することができる。親和性リガンドが付着される充填材はほとんどの場合アガロースであるが、他の充填材も利用可能である。調整された細孔ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定した充填材は、アガロースを用いて得られる場合と比較して、より速い流速およびより短い処理時間を可能にする。イオン交換カラム上での分別、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上のクロマトグラフィ、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラム等)上のヘパリンSEPHAROSE(登録商標)クロマトグラフィ上のクロマトグラフィ、等電点電気泳動、SDS-PAGE、および硫酸アンモニウム沈殿といった、タンパク質精製の他の技術もまた、回収されるタンパク質に応じて利用できる。

30

40

【0229】

当業者はまた、本開示のタンパク質は、精製または検出を促進するためのタグ、例えばヘキサヒスチジンタグといったポリヒスチジンタグ、またはインフルエンザウイルス血球凝集素(HA)タグ、またはサルウイルス5(V5)タグ、またはFLAGタグ、またはグルタチオン-S-転移酵素(GST)タグ等を含むように修飾され得るということを承知しているであろう。好ましくは、タグはヘキサヒスタグである。得られたタンパク質は

50

次に、親和性精製といった当技術分野に周知の方法を用いて精製される。例えばヘキサヒスタグを含むタンパク質は、タンパク質を含む試料を、固体または半固体支持体上に固定化されたヘキサヒスタグを特異的に結合するニッケルニトリロ三酢酸 (Ni-NTA) に接触させ、非結合タンパク質を除去するために該試料を洗浄し、次いで結合タンパク質を溶出することによって、精製される。別法としてまたは追加として、リガンドまたはタグへ結合する抗体が親和性精製法において使用される。

【0230】

任意の予備的精製ステップの後、本開示のタンパク質と汚染物とを含む混合物は、低 pH 疎水性相互作用クロマトグラフィを受けてもよい。

10

タンパク質合成

【0231】

本開示のタンパク質は、例えば BOC または FMOC 化学といった標準的技術を用いて、その決定されたアミノ酸配列から、容易に合成される。合成ペプチドは、固相、液相の既知の技術、またはペプチド縮合、またはそれらのうちの任意の組合せを用いて調製され、天然および/または非天然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、Merrifield, 1963 の初代固相手順の、脱保護、中和、結合、および洗浄プロトコルによる標準 Boc (N-アミノ保護 N-t-ブチルオキシカルボニル) アミノ酸樹脂、または、Carpino and Han, 1972 に説明される塩基不安定 N-アミノ保護 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基 (Fmoc) アミノ酸であってよい。Fmoc および Boc N-アミノ保護アミノ酸のどちらも、例えば Fluka、Bachem、Advanced Chemtech、Sigma、Cambridge Research Biochemical、Bachem、または Peninsula Labs といった、種々の商業的供給源から入手することができる。

20

タンパク質凝集抵抗性の評価方法

【0232】

本開示のタンパク質または組成物の凝集抵抗性は、当技術分野において周知の方法を用いて分析することができる。当業者が許容可能な凝集抵抗性パラメータが使用されてよい。例示的なパラメータは、下記により詳細に説明される。例示的な実施形態において、熱再折り畳み性が評価される。幾つかの態様において、本開示のタンパク質の発現レベル (例、収率%によって測定される) が評価される。他の態様においては、本開示のタンパク質の凝集レベルが評価される。ある態様においては、開示のタンパク質または組成物の凝集抵抗性は、好適な対照のそれと比較される。

30

【0233】

本開示のタンパク質の凝集抵抗性は、当技術分野において周知の多数の非限定的な生物物理学的または生化学的技術を用いて分析することができる。かかる技術の例は、円偏光二色性 (CD) 分光法等の分析的分光法である。CD 分光法は、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 (CD) 分光法は、構造的な非対称に起因して起こる、右旋円偏光と左旋円偏光の吸収の差異を測定する。無秩序なまたは解きほかれた構造は、整列または折り置かれた構造のそれとは大きく異なる CD スペクトルになる。該 CD 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しており、したがって、タンパク質の凝集抵抗性を示す (van Mierlo and Steemsmma, 2000 を参照)。

40

【0234】

凝集抵抗性を測定する別の例示的な分析的分光法は、蛍光放射分光法である (前述の van Mierlo and Steemsmma を参照)。凝集抵抗性を測定するまた別の例示的な分析的分光法は、核次期共鳴 (NMR) 分光法である (前述の van Mierlo and Steemsmma を参照)。

50

【0235】

他の実施形態において、本開示の組成物またはタンパク質の凝集抵抗性は、生化学的に測定される。凝集抵抗性を評価する例示的な生化学的方法は、熱曝露分析である。「熱曝露分析」において、本開示のタンパク質は様々な範囲の昇温を一定期間受ける。例えば、テストタンパク質または組成物は一定範囲の温度上昇を受ける。該タンパク質の活量は次に、関連した生化学的分析によって分析される。例えば、結合するタンパク質の結合活量は、機能的または定量的ELISAによって決定することができる。結合親和性を決定する別の方法は、表面プラズモン共鳴を用いる。表面プラズモン共鳴は、例えばBIACore system (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, ニュージャージー州)を用いて、バイオセンサ充填材内のタンパク質濃度における変質の検出によって、実時間二重特異性相互作用の分析を可能にする光学現象である。

10

【0236】

他の態様において、本開示の組成物またはタンパク質の凝集抵抗性は、その凝集傾向の測定によって決定される。凝集は、多数の非限定的な生化学的または生物物理学的技術によって測定することができる。例えば、本開示の組成物またはタンパク質の凝集は、クロマトグラフィ、例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は分子を大きさに基づいて分離する。カラムは、イオンおよび小さい分子を内部へ取り込み、しかし大きいものは取り込まない高分子ゲルの半固体ビーズで充填されている。タンパク質または組成物が該カラムの最上部に塗布されると、小型の折り畳みタンパク質(即ち、非凝集タンパク質)は、大きいタンパク質凝集体の場合より大量の溶媒中で分散される。その結果、大きい凝集体はカラム中をより迅速に動き、これによって混合物はその要素へと分離または画分化することができる。各画分は、ゲルから溶出する際に別々に(例えば、光錯乱によって)定量化することができる。したがって、本開示のタンパク質または組成物の凝集百分率は、画分の濃度をゲルに適用されたタンパク質の合計濃度と比較することによって決定することができる。凝集抵抗性組成物は、原則的に単一画分としてカラムから溶出し、溶出プロフィールまたはクロマトグラムにおいて原則的に単一ピークとして現れる。

20

【0237】

他の態様において、本開示の組成物の凝集抵抗性は、タンパク質の発現(例、組み換え発現)の後に回収されたタンパク質の量(本明細書中では「収率%」)を測定することによって評価される。例えば、収率%は、宿主培地1mlあたりの回収されたタンパク質のミリグラム(例、mg/mlタンパク質)を決定することによって、測定することができる。好ましい態様において、収率%は哺乳動物宿主細胞(例、CHO細胞)内での発現の後に評価される。

30

【0238】

別の態様において、本開示の組成物の凝集抵抗性は、所定の時間の保存後に一定範囲の温度(例、約25 から約80)におけるタンパク質の損失を観察することによって評価される。回収タンパク質の量または濃度は、当技術分野において周知の任意のタンパク質定量化方法を用いて、初めのタンパク質濃度と比較することによって、決定することができる。例示的なタンパク質定量化方法は、SDS-PAGE分析またはBradford分析を含む。

40

【0239】

他の実施形態において、本開示のタンパク質の凝集抵抗性は、結合分子の変性されたまたは解きほかれた部分への、標識化合物の結合を定量化することによって、評価することができる。かかる分子は、標準的に天然タンパク質の内部に埋め込まれた、しかし変性されたまたは解きほかれた結合分子においては曝露される、アミノ酸の大きい疎水性パッチと好ましくは結合または相互作用するように、好ましくは疎水性である。例示的な標識化合物は、疎水性蛍光色素、1-アニリノ-8-ナフタリンスルホン酸(ANS)である。

50

【0240】

他の態様は、正確に折り畳まれた可変領域にのみ結合するタンパク質の結合（例、プロテイン A は正確に折り畳まれた I g G 3 V_H に結合する）を検出することを含む。

複合体

【0241】

本開示は、別の化合物、例えば、はっきりと異なる部分に結合した本開示のタンパク質を含む複合体（免疫複合体）、例えば、タンパク質に直接的または間接的に結合される治療薬剤に結合した本開示のタンパク質も提供する。他の部分の例として、酵素、蛍光体、細胞毒素、放射性同位体（例えば、ヨウ素 - 131、イットリウム - 90、もしくはインジウム - 111）、免疫調節薬、抗血管形成剤、抗新血管形成および/または他の血管新生剤、毒素、抗増殖剤、アポトーシス促進剤、化学療法剤、ならびに治療用核酸が挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0242】

細胞毒素は、細胞に対して有害な（例えば、死滅させる）任意の作用物質を含む。当技術分野で既知のこれらの薬物のクラスの記述およびそれらの作用機序については、Goodman et al. (1990) を参照されたい。抗体免疫毒素の調製に関するさらなる技術は、例えば、米国第 5,194,594 号に提供される。例示的な毒素には、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、活性フラグメント毒素 A 鎖（緑膿菌由来）、リシン A 鎖、アプリン A 鎖、モデシン A 鎖、サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンチンタンパク質、アメリカヤマゴボウタンパク質（PAPI、PAPII、および 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、ミトジリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、ならびにトリコセセンが含まれる。例えば、国際公開公報 WO 第 93/21232 号を参照されたい。

20

【0243】

本開示の免疫複合体を形成するのに好適な治療薬剤には、タクソール、サイトカラシン B、グラミシジン D、エチジウムプロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ピンクリスチン、ピンラスチン、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、ミトキサントロン、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、およびピューロマイシン、アンチメタボライト（メトトレキサート、6-メトトレキサート、6-チオグアニン、シタラピン、フルダラピン、5-フルオロウラシル、ダカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタピン、クラドリピン等）、アルキル化剤（メクロレタミン、チオテパ、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）、シクロホスファミド、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、ダカルバジン（DTIC）、プロカルバジン、マイトマイシン C、シスプラチン等、およびカルボプラチン等の他の白金誘導体）、抗生物質（ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、プレオマイシン、ダウノルピシン（以前のダウノマイシン）、ドキシソルピシン、イダルピシン、ミトキサントロン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン（AMC）等）が含まれる。

30

40

【0244】

多種多様の放射性核種が放射接合抗体の産生で使用可能である。例として、²¹²Bi、¹³¹I、⁹⁰Y、および ¹⁸⁶Re が挙げられるが、それらに限定されない。

【0245】

別の実施形態において、タンパク質は、予標的化で利用するために「受容体」（ストレプトアビジン等）に結合することができ、タンパク質-受容体複合体が患者に投与され、続いて、洗浄剤を用いて非結合複合体を血中から除去し、次に、治療薬剤（例えば、放射性ヌクレオチド）に結合している「配位子」（例えば、アビジン）を投与する。

50

【0246】

本開示のタンパク質を、当技術分野で既知であり、かつ容易に入手可能な追加の非タンパク質性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的な例には、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ウロース、デキストラン、またはポリビニル・アルコールが挙げられるが、それらに限定されない。

【0247】

化合物をタンパク質残基に結合させるための様々な方法が当技術分野で既知であり、かつ当業者に明らかである。

10

使用

【0248】

本開示のタンパク質は、研究、診断/予後診断適用、業務用途、および治療適用を含む多種多様の適用において有用である。タンパク質が結合する抗原に応じて、例えば、細胞を死滅させるか、あるいは増殖を阻止するために化合物を細胞に送達するのに、ならびに/または画像化に、および/もしくは生体外アッセイに有用であり得る。一例において、タンパク質は、画像化および細胞への細胞毒性薬の送達の両方に有用であり、即ち、タンパク質は検出可能な標識および細胞毒性薬に結合され、または組成物が、一部が細胞毒性薬に結合され、一部が検出可能な標識に結合されるタンパク質の混合物を含む。

20

【0249】

本明細書に記載のタンパク質は、(a)受容体への結合（例えば、配位子の結合、阻害剤）(b)受容体シグナル伝達機能、および/または(c)刺激性機能を抑制するために（低減するか、あるいは阻止することができる）拮抗剤として働くこともできる。受容体機能の拮抗剤として働くタンパク質は、配位子結合を直接的、または（例えば、立体配座の変化を引き起こすことにより）間接的に阻害することができる。

【0250】

本開示のタンパク質は、例えば、(a)受容体への（例えば、配位子の）結合を強化もしくは誘導する、(b)受容体シグナル伝達機能を強化もしくは誘導する、および/または(c)刺激性機能を提供する受容体の作用薬であってもよい。

30

抗原

【0251】

本開示は、本明細書の任意の実施形態、態様、または特許請求の範囲において具体的に除外された抗原以外の任意の1個または複数個の抗原に特異的に結合することができる本開示に従って修飾された V_H を含むタンパク質を企図し、即ち、特異的抗原を必要とするのではなく、本開示の例は一般的である。

【0252】

一例において、本開示のタンパク質は、微生物および/またはトリ由来のタンパク質に結合しない。

40

【0253】

一例において、タンパク質は、リゾチーム（例えば、ニワトリリゾチーム）および/またはベータガラクトシダーゼおよび/またはアミラーゼ（例えば、アルファアミラーゼ）および/またはアンヒドラーゼ（例えば、カルボニックアンヒドラーゼ）および/またはB5R（例えば、ワクシニア由来）に結合しない。一例において、タンパク質は、ヒトアルブミンに結合しない。一例において、タンパク質は、ヒトVEGFに結合しない。

【0254】

好ましいタンパク質は、ヒトタンパク質に特異的に結合するか、あるいはヒトタンパク質に対する抗体から得られる。

【0255】

50

本開示の例は、疾病または障害（即ち、状態）に関連する、例えば、癌もしくは癌性/形質転換細胞に関連するか、あるいはそれにより発現される、および/または自己免疫疾患に関連する、および/または炎症性疾患もしくは状態に関連する、および/または神経変性病に関連する、および/または免疫不全疾患に関連する抗原に特異的に結合するタンパク質を企図する。

【0256】

産生することができる本開示のタンパク質に対する例示的な抗原には、BMPRII（骨形態形成タンパク質受容体IB型、国際公開WO第2004063362号）、E16（LAT1、SLC7A5、国際公開WO第2004048938号）、STEAP1（前立腺の6回の膜貫通上皮抗原、国際公開WO第2004065577号）、CA125（MUC16、国際公開WO第2004045553号）、MPF（MSLN、SMR、巨核球増強因子、メソテリン、国際公開WO第2003101283号）、Napi3b（国際公開WO第2004022778号）、Sema5b（国際公開WO第2004000997号）、PSCA（US2003129192号）、ETBR（国際公開WO第2004045516号）、MSG783（国際公開WO第2003104275号）、STEAP2（国際公開WO第2003087306号）、TrpM4（US2003143557号）、CRIPTO（US2003224411号）、CD21（国際公開WO第2004045520号）、CD79b（国際公開WO第2004016225号）、SPAP1B（国際公開WO第2004016225号）、HER2（国際公開WO第2004048938号）、NCA（国際公開WO第2004063709号）、MDP（国際公開WO第2003016475号）、IL-20R（EP1394274）、Brevican（US2003186372号）、EphB2R（国際公開WO第2003042661号）、ASLG659（US20040101899号）、PSCA（国際公開WO第2004022709号）、GEDA（国際公開WO第2003054152号）、BAFF-R（国際公開WO第2004058309号）、CD22（国際公開WO第2003072036号）、CD79a（国際公開WO第2003088808号）、CXCR5（国際公開WO第2004040000号）、HLA-DOB（国際公開WO第9958658号）、P2X5（国際公開WO第2004047749号）、CD72（国際公開WO第2004042346号）、LY64（US2002193567号）、FcRH1（国際公開WO第2003077836号）、IRTA2（国際公開WO第2003077836号）、TENB2（国際公開WO第2004074320号）、CD20（国際公開WO第94/11026号）、VEGF-A（Prestalet al., 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、ルイス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、またはAが含まれる。

【0257】

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。例示的な可溶性タンパク質には、サイトカインが含まれる。「サイトカイン」という用語は、別の細胞上で細胞内メディエーターとして働く1個の細胞集団により放出されるタンパク質またはペプチドの一般名である。サイトカインの例には、リンホカイ、モノカイン、増殖因子、および従来のポリペプチドホルモンが挙げられる。サイトカインには、ヒト増殖ホルモン、N-メチオニルヒト増殖ホルモン、およびウシ成長ホルモン等の増殖ホルモン；副甲状腺ホルモン、サイロキシン、インスリン、プロインスリン、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）、および黄体形成ホルモン（LH）等の糖タンパク質ホルモン、肝臓増殖因子；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 - および - ；ミューラー管抑制物質、ゴナドトロ

10

20

30

40

50

ピン関連ペプチド、インヒピン、アクチピン、血管内皮増殖因子、インテグリン、トロンボポエチン(TPO)、NGF-B等の神経成長因子、血小板増殖因子、TGF- α およびTGF- β 等のトランスフォーミング増殖因子(TGF)、インスリン様成長因子-Iもしくは-II、エリスロポエチン(EPO)、骨誘導因子、インターフェロン- α 、 β 、 γ 、もしくは- δ 等のインターフェロン；マクロファージ-CSF(M-CSF)、顆粒球マクロファージ-CSF(GM-CSF)等のコロニー刺激因子(CSF)；ならびに顆粒球-CSF(G-CSF)、IL-1、IL-1 β 、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、およびLIF等のインターロイキン(IL)が含まれる。好ましいサイトカインは、インターロイキン2、13、または21、TNFアルファ、TGFベータ、BAFF、およびGM-CSFから成る群から選択される。

10

【0258】

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、概して、免疫エフェクター細胞をケモカイン発現の部位に動員する化学誘引物質として働く。ケモカインには、RANTES、MCAF、MIP1- α 、またはMIP1- β が含まれるが、それらに限定されない。当業者であれば、ある特定のサイトカインが化学誘引物質作用を有することでも既知であり、ケモカインの用語下に分類することもできることを認識する。好ましいケモカインはRANTESである。

【0259】

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。例示的なペプチドホルモンには、インスリン、NPY、PYY、グルカゴン、およびプロラクチンが含まれる。

20

【0260】

さらなる例において、可溶性タンパク質は、プロテアーゼである。例示的なプロテアーゼには、因子X、因子VII、因子IX、またはカリクレインが含まれる。

【0261】

別の例では、本開示タンパク質は、受容体または膜結合性タンパク質に結合する。例示的な抗原には、G-タンパク質結合受容体(CXCR7、CXCR5、CXCR3、CSaR、もしくはベータ-2-アドレナリン受容体等)またはイオン・チャネル連結型受容体(ナトリウム・チャネルもしくはカリウム・チャネルもしくはカルシウム・チャネル、好ましくは、ニコチン性アセチルコリン受容体等)または1回の膜貫通タンパク質(T細胞受容体もしくはプロラクチン受容体もしくはサイトカイン受容体(例えば、IL-21-受容体)またはMHCクラス1もしくはMHCクラス2またはCD4もしくはCD8等)が含まれる。

30

【0262】

さらなる例において、本開示のタンパク質は、インターフェロンアルファ受容体1(IFNAR1)、アンジオポエチン-2、IL-4R α 、IL-33、CXCL13、糖化最終産物受容体(RAGE)、ICOS、IgE、インターフェロン- α 、IL-6、IL-6受容体、EphB4、CD19、GM-CSF受容体、CD22、IL-22、EphA2、IL-13、高移動度群タンパク質1(HMG1)、未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)、インテグリン(例えば、インテグリン α V β 3)、Eph受容体、IL-9、EphA4、PC細胞由来増殖因子(PCDGF)、神経成長因子(NGF)、インスリン様成長因子(IGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、血小板由来成長因子受容体(PDGFR、例えば、PDGFR α もしくはPDGFR β)、またはIL-5のうちの1つ以上に結合する。

40

【0263】

本開示のタンパク質を誘導することができる例示的な抗体は、当業者には明らかであり、上の本明細書で列記される抗体を含む。

【0264】

例示的な二重特異性抗体タンパク質は、関心の抗原の2つの異なるエピトープに結合し

50

得る。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と組み合わせることができる。あるいは、関心の領域の抗原は、細胞防御機構に焦点を合わせ、かつそれを関心の抗原を発現する細胞に局在化するように、T細胞受容体分子（例えば、CD3）等の白血球上の誘発分子、またはFcRI(CD64)、FcRII(CD32)、および/もしくはFcRIII(CD16)等のIgGのFc受容体(FcR)に結合する領域と組み合わせることができる。二重特異性抗体タンパク質を用いて、細胞毒性薬を、関心の抗原を発現する細胞に局在化することもできる。これらのタンパク質は、関心の抗原に結合する領域、および細胞毒性薬（例えば、サボリン、抗インターフェロン- γ 、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキサート、または放射性同位体ハプテン）に結合する領域を有する。国際公開WO第96/16673号は二重特異性抗Erbb2/抗FcRIII抗体を説明し、米国特許第5,837,234号は二重特異性抗Erbb2/抗FcRI抗体を開示する。二重特異性抗Erbb2/FcRIII抗体は、国際公開WO第98/02463号に示される。米国第5,821,337号は、二重特異性抗Erbb2/抗CD3抗体を教示する。

10

薬学的組成物および治療法

【0265】

本開示のタンパク質（同義語、有効成分）は、予防または治療処置のための非経口、局所、経口、もしくは局所投与、エアロゾル投与、または経皮投与に有用である。薬学的組成物を、投与法に依存して、多種多様の単位剤形で投与することができる。例えば、経口投与に好適な単位剤形には、粉末剤、タブレット剤、錠剤、カプセル剤、およびトローチ剤が含まれるか、あるいは非経口投与による。本開示の薬学的組成物が経口投与される時、消化から保護されるべきであると認識される。これは、典型的には、タンパク質を組成物と複合体形成させて、酸加水分解および酵素加水分解に対して耐性にさせることによって、または化合物をリポソーム等の適切に耐性を示す担体内に包装することによってのいずれかで達成される。タンパク質を消化から保護する手段は当技術分野で既知である。

20

【0266】

典型的には、治療的に有効な量のタンパク質が製剤化されて対象への投与のための組成物となる。「治療的に有効な量」という表現は、対象における治療または他の治療効果を促進、誘導、および/または強化するのに十分な量を指す。明らかであるように、これらの製剤中の本開示のタンパク質の濃度は幅広く変化し得、選択される特定の投与方法および患者の要求に従って、主に液量、粘度、体重等に基づいて選択される。疾病の種類および重症度に応じて、治療的に有効な量は、例えば、1回以上の別々の投与によるか、あるいは持続注入により、約 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 100\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1 \sim 10\text{mg}/\text{kg}$ ）のタンパク質であり得る。典型的な1日投与量は、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、状態に応じて、治療は病徴の所望の抑制が起こるまで持続される。例示的な投与計画には、約 $4\text{mg}/\text{kg}$ の初回負荷量のタンパク質、その後、約 $2\text{mg}/\text{kg}$ の週1回の維持量のタンパク質の投与が含まれる。他の投与計画が有用であり得る。例えば、リツキシマブ等の抗CD20抗体は、約 $375\text{mg}/\text{m}^2$ の用量で投与される。ベバシズマブ等の抗VEGF抗体は、 $5 \sim 10\text{mg}/\text{kg}$ の用量で投与される。トラスツズマブ等の抗Her2/neu抗体は、 $4 \sim 8\text{mg}/\text{kg}$ の負荷量および $2 \sim 6\text{mg}/\text{kg}$ の週1回/2週間に1回の維持量で投与される。アダリムマブ等の抗TNF抗体は、関節リウマチを治療するために、1週間当たり約 400mg の用量、または第一週に 160mg の負荷量および1週間当たり 40mg の維持量、あるいは乾癬を治療するために、 80mg の負荷量および1週間当たり 40mg の維持量で投与される。治療の経過は、従来技術およびアッセイにより容易に監視される。

30

40

【0267】

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/治療/予防される状態、および/または治療される対象により変化する。例えば、最適または有用な投与量を決定するために、準最適な投与量で開始し、徐々に投与量を修正しながら好適な投与量を

50

決定することは、熟練医師の能力の範囲内である。あるいは、治療/予防のための適切な投与量を決定するために、細胞培養アッセイまたは動物研究のデータが使用され、好適な用量は、ほとんどまたは全く毒性を有さない活性化合物のED50を含む血中濃度の範囲内である。投与量は、採用される剤形および利用される投与経路に応じて、この範囲内で異なり得る。治療的/予防的に有効な用量を、最初に細胞培養アッセイから推定することができる。細胞培養において決定して、IC50を含む循環血漿濃度の範囲（即ち、症状の半最大抑制を達成する化合物の濃度）を達成するように、動物モデルにおいて用量を処方することができる。そのような情報を用いて、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿のレベルを、例えば、高速液体クロマトグラフィにより測定することができる。

10

【0268】

あるいは、本開示のタンパク質は、対象への投与前に治療的に有効な用量に希釈される濃縮された用量で製剤化される。

【0269】

本開示の組成物は、特に非経口投与に有用であり、例えば、静脈、筋肉内、皮下、経皮、または腫瘍もしくは疾病部位への蠕動投与および直接滴下（腔内投与）を含む他のそのような経路を介する注入のために製剤化される。投与のための組成物は、一般に、薬学的に許容される担体、好ましくは、水溶性担体中に溶解される本開示のタンパク質の溶液を含む。例えば、緩衝食塩水等の多種多様の水性の担体を用いることができる。他の例示的な担体には、水、食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが含まれる。混合油およびオレイン酸エチル等の非水性ビヒクルを用いることもできる。リポソームを担体として用いることもできる。ビヒクルは、等張性および化学安定性を強化する少量の添加物、例えば、緩衝液および防腐剤を含有し得る。組成物は、pH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤、例えば、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、乳酸ナトリウム等の生理学的状態に近づけるのに必要とされる薬学的に許容される補助剤を含有し得る。

20

【0270】

薬学的組成物を調製するための技術は、概して、レミントンの薬学、16th Ed. Mack Publishing Company, 1980により例示されるように、当技術分野で既知である。

30

【0271】

国際公開WO第2002/080967号は、組成物、および本開示のタンパク質の投与にも好適である、例えば、喘息の治療のためのタンパク質を含むエアロゾル化された組成物を投与するための方法を説明する。

【0272】

本開示のタンパク質を、第2の化合物との併用療法として、薬学的組み合わせ、製剤、または投与計画において組み合わせることができる。薬学的組み合わせ、製剤、または投与計画の第2の化合物は、好ましくは、それらが相互に悪影響を及ぼさないように、組み合わせのタンパク質への相補的活性を有する。

【0273】

第2の化合物は、化学療法剤、細胞毒性薬、サイトカイン、増殖阻害剤、抗ホルモン剤、および/または心臓保護であり得る。そのような分子は、意図される目的に有効な量の組み合わせにおいて適切に存在する。本開示のタンパク質を含有する薬学的組成物は、チューブリン形成阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、またはDNA結合剤等の治療的に有効な量の化学療法剤も有し得る。

40

【0274】

薬学的「徐放」カプセル剤または組成物を使用することもできる。徐放製剤は、概して、長期間にわたって一定の薬物レベルを与えるよう設計されており、本開示の化合物を送達するために使用することができる。

【0275】

50

本開示は、対象における状態を治療または予防する方法も提供し、本方法は、治療的に有効な量の本開示のタンパク質を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【0276】

状態を予防するという文脈において、本明細書で使用される「予防」、「予防する」、もしくは「予防」という用語は、特定の疾病または状態のうちの少なくとも1つの症状の発症を停止または妨害するのに十分な本明細書に記載のタンパク質の量を投与することを含む。

【0277】

本明細書で使用される「治療」、「治療する」、もしくは「治療」という用語は、特定の疾病または状態のうちの少なくとも1つの症状を軽減または排除するのに十分な本明細書に記載の治療的に有効な量の阻害剤および/または作用物質を投与することを含む。

10

【0278】

本明細書で使用される「対象」という用語は、ヒトを含む任意の動物、好ましくは、哺乳動物を意味するよう用いられる。例示的な対象には、ヒト、霊長類、家畜（例えば、ヒツジ、ウシ、ウマ、ロバ、ブタ）、ペット（例えば、イヌ、ネコ）、実験室での試験用動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、テングネズミ、ハムスター）、捕獲野生動物（例えば、キツネ、シカ）が含まれるが、それらに限定されない。好ましくは、哺乳動物は、ヒトまたは霊長類である。より好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0279】

本明細書で使用される「状態」は、正常機能の攪乱または正常機能妨害であり、任意の特定の状態に限定されず、疾病または障害を含む。一例として、本状態は、癌または自己免疫もしくは炎症性疾患である。

20

【0280】

例示的な癌には、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病またはリンパ系悪性腫瘍が含まれるが、それらに限定されない。そのような癌のより具体的な例には、扁平上皮癌（例えば、上皮扁平上皮癌）、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌を含む肺癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化管癌を含む胃癌（*g a s t r i c c a n c e r*）もしくは胃癌（*s t o m a c h c a n c e r*）、膵臓癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、大腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜もしくは子宮癌、唾液腺癌腫、腎臓もしくは腎細胞癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、ならびに頭頸部癌が挙げられる。好ましくは、癌は、乳癌または肺癌または卵巣癌または前立腺癌である。

30

【0281】

炎症状態もしくは自己免疫状態は、抗原への免疫グロブリンまたはT細胞受容体の反応により引き起こされる状態である。これらの状態には、自己免疫疾患および過敏反応（例えば、I型：過敏症、蕁麻疹、食物アレルギー、喘息、II型：自己免疫溶血性貧血、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、狼瘡、IV型：接触性皮膚炎、組織不適合性）が含まれる。自己免疫疾患には、リウマチ性疾患（例えば、関節リウマチ、シェーグレン症候群、強皮症、SLEおよびループス腎炎等の狼瘡、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、ならびに乾癬性関節炎等）、変形性関節症、自己免疫胃腸および肝疾患（例えば、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎およびクローン病）、自己免疫性胃炎および悪性貧血、自己免疫肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、ならびにセリアック病等）、血管炎（例えば、チャグ-ストラウス血管炎を含むANCA関連血管炎、ウェゲナー肉芽腫症、および多発性関節炎等）、自己免疫神経疾患（例えば、多発性硬化症、オブソクローヌス・ミオクローヌス症候群、重症筋無力症、視神経脊髄炎、および自己免疫性多発等）、腎障害（例えば、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、およびパーカー病等）、自己免疫性皮膚疾患（例えば、乾癬、蕁麻疹（*u r t i c a r i a*）、蕁麻疹（*h i v e s*）、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、および皮膚エリテマトーデス等）、血液疾患（例えば、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、および自己免疫性溶血性貧血等）、

40

50

アテローム性動脈硬化、ブドウ膜炎、自己免疫性難聴疾患（例えば、内耳疾患および難聴等）、ベーチェット病、レイノー症候群、臓器移植、および自己免疫性内分泌疾患（例えば、インスリン依存性糖尿病（IDDM）等の糖尿病関連自己免疫疾患、アディソン病、および自己免疫性甲状腺疾患（例えば、グレーブス病および甲状腺炎）等）が含まれる。より好ましいそのような疾病には、例えば、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、ANCA関連血管炎、狼瘡、多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレーブス病、IDDM、悪性貧血、甲状腺炎、および糸球体腎炎が含まれる。

【0282】

別の例では、炎症状態は、サイトカイン遊離、ヒスタミン遊離、酸化バースト、貪食、他の顆粒酵素の放出、および走化性が起こる、好中球、単球、肥満細胞、好塩基球、好酸球、マクロファージが関与する状態である。（上述の）過敏反応が補体活性化および好中球、肥満細胞、好塩基球等の様々な白血球の動員/浸潤を伴うため、炎症性疾患（急性または慢性）と見なすことができる。

10

【0283】

本開示の組成物は、投与製剤に適合した方法で、治療的/予防的に有効な量を投与される。製剤は、多種多様の方法で、例えば、摂取または注射または吸入により容易に投与される。

【0284】

他の治療計画を、本開示のタンパク質の投与と併用することができる。併用療法を、同時または順次療法として投与することができる。順次的に投与される時、併用療法を2回以上の投与で投与してもよい。併用投与には、個々の製剤または単一の薬学的製剤を用いる同時投与、およびいずれかの順序での逐次的投与が含まれ、好ましくは、両方の（または全ての）活性薬剤が同時にそれらの生物学的活性を及ぼす間の期間が存在する。

20

【0285】

治療上の使用前に、本開示のタンパク質は、好ましくは、例えば、以下に説明されるように、生体外および/または生体内で試験される。

生体外試験

【0286】

一例において、本開示のタンパク質は、化合物に結合する場合でも抗原に結合する。既存のタンパク質（例えば、抗体）に由来するタンパク質について、本開示のタンパク質は、それに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。あるいは、本開示のタンパク質は、それに由来するか、あるいは負荷電残基を欠如するタンパク質の形態であるタンパク質の少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、もしくは90%の親和性または結合活性で抗原に結合する。

30

【0287】

タンパク質の結合親和性を決定するための例示的な方法には、標的抗原に対する抗体を阻害するタンパク質の能力を示す単純な免疫アッセイ、例えば、競合結合アッセイが含まれる。競合結合は、試験中のタンパク質が共通の抗原への参照タンパク質の特異的結合を阻害するアッセイにおいて決定される。多数の種類競合結合アッセイ、例えば、直接固相もしくは間接固相ラジオイムノアッセイ（RIA）、直接固相もしくは間接酵素イムノアッセイ（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（Stahli et al., 1983を参照のこと）、直接固相ピオチンアビジンEIA（Kirkland et al., 1986を参照のこと）、直接固相標識アッセイ、直接固相標識サンドイッチアッセイ（Harlow and Lane, 1988を参照のこと）、直接固相ピオチンアビジンEIA（Cheung et al., 1990）、または直接標識RIA（Moldenhauer et al., 1990）が既知である。典型的には、そのようなアッセイは、固体表面または細胞のいずれかを担持する、それらに結合した精製された抗原、即ち非標識試験タンパク質および標識参照タンパク質の使用を伴う。競合阻害は、試験タンパク質の存在下で、固体表面または細胞に結合される標識の量を決定することにより測

40

50

定される。

【0288】

本開示は、本開示のタンパク質の活性を試験するための方法も包含する。生体外で本開示のタンパク質の活性を評価する様々なアッセイが利用可能である。例えば、本開示のタンパク質は、それが該細胞に結合することができるか否か、および/またはそれを該細胞により内部移行することができるか否かを決定するために、細胞もしくはその集団に投与される。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化する（即ち、複合体を産生する）ことにより促進されるが、標識タンパク質を用いて本開示のタンパク質を検出することもできるため、必須ではない。そのようなアッセイは、化合物を細胞に送達する本開示のタンパク質の能力（即ち、ペイロード）、および/または画像化におけるその実用性を評価するのに有用である。好ましくは、本細胞は、本開示のタンパク質が結合する抗原を発現し、より好ましくは、検出もしくは治療されることを所望する細胞型の細胞株または初代細胞培養である。

10

【0289】

概して、例えば、細胞毒性分子に結合する本開示のタンパク質の細胞毒性または細胞増殖抑制作用は、抗原を発現する細胞を、本開示のタンパク質に結合する本開示のタンパク質に曝露させること、タンパク質が生物学的効果を及ぼすのに好適な期間、例えば、約6時間～約5日間細胞を培養すること、ならびに細胞の生存、細胞毒性、および/または細胞死を測定することにより測定される。生存（増殖）、細胞毒性、および細胞死を測定するのに有用な細胞に基づく生体外アッセイは当技術分野で既知である。

20

【0290】

例えば、Cell Titer - Glo（登録商標）Luminescent Cell Viability Assayは、甲虫ルシフェラーゼの組み換え発現（米国特許第5583024号、同第5674713号、および同第5700670号）に基づく商用の（Promega Corp., Madison, WI）均質アッセイ法である。本細胞増殖アッセイは、代謝的に活性な細胞の指標である細胞中に存在するATPの定量化に基づいて、培養中の生存能力のある細胞の数を決定する。あるいは、細胞生存能は、本開示のタンパク質の存在下で培養される細胞に添加される非蛍光性レザズリンを用いてアッセイされる。生存能力のある細胞は、例えば、レザズリンを、顕微鏡また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レゾルフィンに還元する。細胞生存能の分析用キットは、例えば、Molecular Probes, Eugene, OR, USAから入手可能である。

30

【0291】

細胞生存能のための他のアッセイには、DNAが合成される際のDNAへの³H-チミジンまたは¹⁴C-チミジンの取り込みの決定（即ち、細胞分裂に関連したDNA合成の決定）が含まれる。そのようなアッセイにおいて、細胞は、細胞分裂が起こるのに十分な時間、標識チミジンの存在下でインキュベートされる。任意の取り込まれていないチミジンを除去するために洗浄した後、標識（例えば、放射性標識）は、例えば、シンチレーションカウンターを用いて検出される。細胞増殖を決定するための代替アッセイには、例えば、BrdU取り込み（キットはAmersham Pharmacia Biotechから入手可能である、ELISAまたは免疫組織化学）によるDNA合成の測定が含まれる。

40

【0292】

細胞死を検出するための例示的なアッセイは、アポトーシス初期に細胞を染色するAPOPTEST（Immunotechから入手可能）を含み、細胞試料の固定化を必要としない（Martin et al., 1994）。本方法は、アポトーシスを経る細胞の特徴である細胞膜再構成を検出するためにアネキシンV抗体を利用する。次に、この方法で染色されるアポトーシス細胞を、蛍光活性化セルソーター（FACS）、ELISA、または固定化したアネキシンV抗体を用いた付着およびパニングのいずれかで選別することができる。あるいは、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介UT

50

P ビオチンニック末端ラベリング (T U N E L) アッセイを用いて、細胞死のレベルを決定する。T U N E L アッセイは、アポトーシス中に発生する 3' - O H DNA 末端をビオチン化ヌクレオチドで標識化するために、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素を用いる。次に、ビオチン化ヌクレオチドは、検出可能なマーカーに結合されているストレプトアビジンを用いることにより検出される。T U N E L 染色用のキットは、例えば、I n t e r g e n C o m p a n y , P u r c h a s e , N Y から入手可能である。

【 0 2 9 3 】

本開示のタンパク質を血清および/もしくは細胞に曝露させ、その後、例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り、本開示のタンパク質の生体内安定性を評価または予想することもできる。回収された本開示のタンパク質の減少量は、本開示のタンパク質が血清中で、または細胞に曝露される時に分解されることを示唆する。

10

【 0 2 9 4 】

別の例では、受容体への配位子の結合を阻害する本開示のタンパク質の能力は、標準ラジオイムノアッセイまたは蛍光性免疫アッセイを用いて評価される。

【 0 2 9 5 】

受容体を刺激または拮抗する本開示のタンパク質の能力を、タンパク質の存在または不在下において、受容体のシグナル伝達を決定することにより評価することもできる。

20

生体内試験

【 0 2 9 6 】

本開示のタンパク質を、生体内でのその安定および/または有効性について試験することもできる。例えば、本開示のタンパク質が対象に投与され、例えば、E L I S A を用いて、またはタンパク質に結合される検出可能な標識を検出することにより、タンパク質の血中濃度が長期間にわたって検出される。これにより、本開示のタンパク質の生体内安定性の決定を可能にする。

【 0 2 9 7 】

本開示のタンパク質をヒト疾病の動物モデルに投与し、その症状へのその効果を決定することもできる。当業者であれば、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。例えば、ヒト癌の例示的なモデルが当技術分野で既知である。例えば、乳癌のマウスモデルには、線維芽細胞増殖因子 3 (M u l l e r e t a l . , 1 9 9 0)、T G F - アルファ (M a t s u i e t a l , 1 9 9 0)、e r b B 2 (G u y , e t a l . , 1 9 9 2) を過剰発現するマウス、または S C I D マウスへのヒト乳癌細胞の移植が含まれる。卵巣癌のモデルには、(例えば、R o b y e t a l . , 2 0 0 0 に記載される) マウスへの卵巣癌細胞の移植、黄体形成ホルモンを慢性的に分泌する遺伝子導入マウス (R i s m a e t a l . , 1 9 9 5)、または W x / W v マウスが含まれる。前立腺癌のマウスモデルも当技術分野で既知であり、例えば、S V 4 0 初期遺伝子の強制発現から得られるモデル (例えば、S V 4 0 初期遺伝子を発現するのに最小のラットプロバシンプロモーターを利用する T R A M P モデル、あるいは「L A D Y」モデルと集合的に称される、ラージ T 抗原を発現するのに長いプロバシンプロモーターを用いる遺伝子導入マウス、あるいは c - m y c または B c l - 2 もしくは F g f 8 b を発現するか、あるいは優性阻害の T G F を発現するマウス) が含まれる (前立腺癌のトランスジェニックモデルの総説については、M a t u s i k e t a l . , 2 0 0 1 を参照のこと)。

30

40

【 0 2 9 8 】

本開示のタンパク質を、癌以外の疾病の動物モデル、例えば、(例えば、T a n g e t a l . , 2 0 0 4 に記載される) 糖尿病を抑制、予防、治療、または遅延させるそれらの能力を試験するための N O D マウス、ならびに/または (例えば、T r e n a d o , 2 0 0 2 に記載される) G V H D マウスモデル、ならびに/または乾癬マウスモデル (例

50

えば、Wang et al. 2008)、ならびに/または関節リウマチのモデル、例えば、SKG株マウス(Sakaguchi et al.)、ラットII型コラーゲン関節炎モデル、マウスII型コラーゲン関節炎モデル、もしくはいくつかの種における抗原誘導性関節炎モデル(Bendele, 2001)、ならびに/または多発性硬化症モデル(例えば、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE、Bradland Linington, 1996))、ならびに/または炎症性気道疾患(例えば、OVAチャレンジもしくはゴキブリ抗原チャレンジ(Chen et al. 2007))および/もしくは炎症性腸疾患モデル(例えば、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性大腸炎もしくは大腸炎のMuc2欠乏マウスモデル(Vander Sluis et al. 2006))に投与することもできる。

10

診断法 / 予後診断法

【0299】

一例において、本開示は、状態を診断または予知するための方法を提供する。

【0300】

本明細書で使用される「診断」という用語または「診断する」、「診断される」、もしくは「診断」等であるがそれらに限定されないその変形は、病態の任意の一次診断または再発病の診断を含む。

【0301】

本明細書で使用される「予後」、「予知する」、およびその変形は、回収もしくは再発の可能性を含む、起こり得る疾病の結果または経過を指す。

20

【0302】

一例において、本方法は、試料中の抗原の量を決定することを含む。したがって、本開示のタンパク質は、診断目的または研究目的のために、細胞選別(例えば、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別)等の適用において実用性を有する。例えば、試料は、本開示のタンパク質が抗原と結合し、複合体を形成するのに十分な期間および条件下で、本開示のタンパク質と接触させられ、次に、その複合体が検出されるか、あるいは複合体のレベルが決定される。これらの目的のために、本タンパク質を標識化するか、あるいは非標識とすることができる。本タンパク質を、例えば本明細書に記載の標識を用いて、直接標識化することができる。非標識の場合、本タンパク質を、例えば、凝集アッセイにおいて好適な手段を用いて検出することができる。非標識抗体またはフラグメントを、タンパク質と反応する標識抗体(例えば、二次抗体)または他の好適な試薬(例えば、標識プロテインA)等のタンパク質を検出するために用いることができる別の(即ち、1つ以上の)好適な試薬との併用で用いることもできる。

30

【0303】

好ましくは、本開示のタンパク質は、免疫アッセイで使用される。好ましくは、免疫組織化学、免疫蛍光、酵素免疫測定(ELISA)、固相蛍光免疫検定法(FLISA)、ウエスタンブロット法、RIA、バイオセンサアッセイ、プロテインチップアッセイ、および免疫染色法(例えば、免疫蛍光)から成る群から選択されるアッセイを用いる。

【0304】

標準の固相ELISAまたはFLISA形式は、多様な試料由来のタンパク質の濃度を決定するのに特に有用である。

40

【0305】

一形態において、そのようなアッセイは、生体サンプルを固体マトリクス上、例えば、ポリスチレンもしくはポリカーボネートマイクロまたはオイルゲージ、膜、あるいはガラス支持材(例えば、スライドガラス)等に固定することを含む。関心の抗原に特異的に結合する本開示のタンパク質は、固定された試料と直接接触させられ、該試料中に存在するその標的抗原のうちのいずれかとの直接結合を形成する。本開示のタンパク質は、概して、FLISAの場合において、例えば、蛍光標識(例えば、FITCもしくはテキサスレッド)または(米国第6,306,610号に記載の)蛍光半導体ナノ結晶等の検出可能

50

なレポーター分子で、あるいはE L I S Aの場合において、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）、アルカリホスファターゼ（A P）、もしくは - ガラクトシダーゼ）で標識化されるか、またはあるいは本開示のタンパク質に結合する標識抗体を用いることができる。任意の非結合タンパク質を除去するために洗浄した後、標識は、蛍光標識の場合において直接、あるいは酵素標識の場合において、例えば、過酸化水素、T M B、トルイジン、または5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドール - ベータ - D - ガラクトピラノシド（x - g a l）等の基質の添加を介してのいずれかで検出される。そのようなE L I S AまたはF L I S Aに基づくシステムは、例えば、単離および/もしくは組み換えタンパク質またはその免疫原性フラグメントもしくはそのエピトープ等のタンパク質が結合する既知の量のタンパク質標準物質に対する検出システムの較正により、試料中のタンパク質の量の定量化に特に好適である。

10

【0306】

別の形態において、E L I S AまたはF L I S Aは、関心の抗原に結合する本開示のタンパク質または抗体を、例えば、膜、ポリスチレンもしくはポリカーボネートマイクロ、ポリスチレンもしくはポリカーボネートオイルゲージ、またはガラス支持材等の固体マトリクス上に固定することを含む。次に、試料は、該本開示のタンパク質または抗体と物理的接触させられ、該化合物が結合するタンパク質が結合または「捕捉」される。次に、結合されたタンパク質は、異なるタンパク質または同一の抗原の異なる部位に結合する本開示の標識タンパク質を用いて検出される。あるいは、第2（検出）のタンパク質に結合する第3の標識抗体を用いることもできる。

20

画像化法

【0307】

当業者には上述から明らかであるように、本開示は、本開示のタンパク質を用いる画像化法も企図する。画像化について、本開示のタンパク質は、画像化により検出可能なシグナルを放出することができる任意の分子または作用物質であり得る、検出可能な標識に結合される。例えば、検出可能な標識は、タンパク質、放射性同位体、蛍光体、可視光発光蛍光体、赤外線発光蛍光体、金属、強磁性体、特定の磁気共鳴（M R）分光学的特徴を有する物質である電磁放射物質、X線吸収もしくは反射物質、または音変化物質であり得る。

30

【0308】

本開示のタンパク質を、撮像法の前に、全身的または局所的のいずれかで、腫瘍、臓器、または画像化される組織に投与することができる。概して、腫瘍、組織、または臓器の所望の光学画像を達成するのに効果のある用量の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、撮像法に供される腫瘍、組織、または臓器、使用される画像化装置等により幅広く変化する。

【0309】

本開示のいくつかの実施形態では、本開示のタンパク質は、腫瘍の画像化、臓器の断層画像化、臓器機能の監視、冠動脈造影、蛍光内視鏡検査、レーザ誘導手術、光音響および音蛍光法等を含むが、それらに限定されない、様々な生物医学的応用において、組織および臓器の生体内光学造影剤として使用される。本開示のタンパク質が画像化に有用である例示的な疾病、例えば、癌が本明細書で説明され、必要な変更を加えて、本開示の本態様に適用される。一例において、本開示のタンパク質複合体は、特定のタンパク質が対象のどこで濃縮されているかを監視することにより、腫瘍および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、腹腔鏡検査時の腫瘍の微小転移の検出のためのレーザ誘導手術に有用である。さらに別の例では、本開示のタンパク質は、アテローム斑および血液凝固の診断に有用である。

40

【0310】

画像化法の例として、磁気共鳴映像法（M R I）、M Rスペクトロスコピー、X線写真術、C T、超音波、平面ガンマカメラ画像法、単光子放射型コンピュータ断層撮影法（S

50

P E C T)、陽電子放射形コンピュータ断層撮影法 (P E T)、他の核医学に基づく画像化、可視光を用いた光学画像化、発光酵素を用いた光学画像化、蛍光体を用いた光学画像化、他の光学画像化、近赤外線を用いた画像化、または赤外線を用いた画像化が挙げられる。

【 0 3 1 1 】

本開示の方法のある特定の例として、対象の外科手術中の組織の画像化がさらに挙げられる。

【 0 3 1 2 】

画像化のための多種多様の技術は当業者には既知である。これらの技術のうちのいずれをも、本開示の画像化法に照らして、検出可能な標識からシグナルを測定するために適用することができる。例えば、光学画像化は、医学の特定領域において幅広い支持を得ている一画像診断法である。例として、細胞成分の光標識化、ならびに蛍光眼底血管造影およびインドシアニングリーン蛍光眼底血管造影等の血管造影が挙げられる。光学造影剤の例には、例えば、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、オレゴングリーン誘導体、ローダミンググリーン、ローダミンググリーン誘導体、エオシン、エリスロシン、テキサスレッド、テキサスレッド誘導体、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、ピリジルオキサゾール誘導体、カスケードイエロー染料、ダボキシル染料が挙げられる。

10

【 0 3 1 3 】

ガンマカメラ画像化は、検出可能な標識に由来するシグナルを測定ために利用することができる画像化法として企図される。当業者であれば、ガンマカメラ画像化を適用する技術に精通しているであろう。一実施形態において、シグナルの測定は、 ^{111}In または $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 複合体、具体的には ^{111}In -オクトレオチドまたは $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ソマトスタチン類似体のガンマカメラ画像化の使用を含み得る。

20

【 0 3 1 4 】

コンピュータ断層撮影 (C T) は、本開示の文脈において画像診断法として企図される。一連の X 線を様々な角度から撮り、次に、コンピュータソフトウェアを用いてそれらを合わせるにより、C T は、身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、任意の角度から任意の深さで二次元スライスを表示するようプログラミングされる。このスライスを合わせて、三次元表示を構築することができる。

30

【 0 3 1 5 】

C T において、関心の抗原に結合する、本開示のタンパク質に結合する X 線造影剤の静脈注射は、初期 C T スキャンが症状を示さない時に、組織塊 (例えば、軟部組織塊) の同定および描写を支援し得る。同様に、造影剤は、軟部組織病変の血管分布の評価に役立つ。例えば、造影剤の使用は、腫瘍と隣接の血管構造の関係の描写を支援し得る。

【 0 3 1 6 】

C T 造影剤には、例えば、ヨード造影剤が含まれる。これらの作用物質の例として、ヨータラム酸、イオヘキソール、ダイアトリゾエート、イオパミドール、エチオドール、およびイオパネートが挙げられる。ガドリニウム造影剤は、C T 造影剤として役立つことも報告されており、例えば、ガドペンテート (g a d o p e n t a t e) が挙げられる。

40

【 0 3 1 7 】

磁気共鳴映像法 (M R I) は、画像を産生するために強力な磁石および高周波信号を使用する画像診断法である。M R I において、画像化される試料は、試料中に正味の磁化を産生するために、強力な静磁場に設置され、高周波 (R F) 放射線のパルスで励起させる。次に、様々な傾斜磁場および他の R F パルスは、空間的情報を記録された信号にコード化する働きをする。これらの信号を収集および分析することにより、C T 画像と同様に、通常二次元スライスで表示される三次元画像をコンピュータ化することが可能になる。このスライスを合わせて、三次元表示を構築することができる。

50

【0318】

MRIまたはMRスペクトロスコピー画像化で使用される造影剤は、他の画像化技術で使用される造影剤とは異なる。MRI造影剤の例として、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、および鉄粒子が挙げられる。例えば、本開示のタンパク質は、スカンジウム、チタニウム、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、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、プラセオジウム、ネオジウム、プロメチウム、サマリウム、ユウロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウム、ツリウム、およ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結合される。本開示に有用な造影剤のさらなる例は、PFOB等のハロカーボンベースのナノ粒子または他のフッ素ベースのMRI剤である。CTおよびMRIの両方はともに、組織境界と血管構造の識別を支援する解剖学的情報を提供する。

10

【0319】

細胞生存能等の細胞レベルの情報に関連する情報を提供する画像診断法には、陽電子放射形コンピュータ断層撮影法(PET)および単光子放射型コンピュータ断層撮影法(SPECT)が含まれる。PETにおいて、患者は、陽電子を放出する放射性物質を摂取するか、あるいはそれを注入され、その物質を身体を移動する時に監視することができる。

【0320】

PETとSPECTとの間の主要な違いは、陽電子放出物質の代わりに、SPECTは、高エネルギー光子を放出する放射性トレーサーを用いる。SPECTは、冠動脈疾患を含む複数の疾患を診断するのに役立ち、すでに米国で毎年250万件のSPECT心疾患研究が行われている。

20

【0321】

PETについて、本開示のタンパク質は、一般的に、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{82}Rb 、 ^{62}Cu 、および ^{68}Ga 等の陽電子放射体で標識化される。SPECTについて、本開示のタンパク質は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{201}Tl 、および ^{67}Ga 、 ^{111}In 等の陽電子放射体で標識化される。

【0322】

動物およびヒトの非侵襲的蛍光画像は、生体内診断情報を提供することもでき、多種多様の臨床専門において使用することができる。例えば、蛍光体のUV励起に続く単純な観察から、高機能機器を用いた高性能の分光画像化(例えば、Andersson-Engels et al, 1997を参照のこと)に至る技術が長年にわたって開発されてきた。当技術分野において、例えば、蛍光体または蛍光性タンパク質からの蛍光の生体内検出で既知の特定のデバイスまたは方法には、生体内近赤外蛍光(例えば、Frangiوني, 2003を参照のこと)、Maestro(商標)生体内蛍光画像化システム(Cambridge Research & Instrumentation, Inc., Woburn, MA)、フライングスポットスキャナを用いた生体内蛍光画像化(例えば、Ramanuja et al, 2001を参照のこと)等が含まれるが、それらに限定されない。

30

【0323】

光応答を検出するための他の方法もしくはデバイスには、制限なく、目視検査、CCDカメラ、ビデオカメラ、写真フィルム、レーザ走査デバイス、蛍光光度計、フォトダイオード、量子カウンタ、落射蛍光顕微鏡、走査型顕微鏡、フローサイトメーター、蛍光マイクロプレートリーダー、または光電子増倍管を用いたシグナル増幅が含まれる。

40

【0324】

いくつかの例において、造影剤は、例えば、本明細書に記載のモデルを使用して、ヒトにおける使用前に生体外または生体内アッセイを用いて試験される。

製品

【0325】

50

本開示はまた、本開示のタンパク質を含む製品または「キット」を提供する。製品は、容器と、該容器に差し込まれたまたは付属した、例えば任意の実施形態に従って本明細書に説明された方法で本開示のタンパク質を使用するための説明書を提供するラベルまたは包装とを含むことができる。好適な容器は例えば、瓶、バイアル瓶、注射器、プリスターパック等を含む。容器はガラスやプラスチックといった種々の材料で形成されてもよい。容器は本開示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てもよい（例えば容器は、静脈注射用溶液バッグ、または皮下注射針で穴を開けることができる栓を有するバイアル瓶であってよい）。別法としてまたは追加で、製品はさらに、注射用静菌水（B W F I）、リン酸緩衝塩類溶液、リンガー溶液、およびブドウ糖溶液といった薬学的に許容な緩衝液を含む第2（または第3）の容器を含んでもよい。製品はさらに、他の緩衝液、希釈液、フィルター、針、および注射器を含む、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料を含んでもよい。

キットは同様に、または代わりに、本開示のタンパク質の検出、および/または本開示のタンパク質と結合するための試薬を含んでもよい。

【0326】

本開示は、下記の非限定的な実施例においてさらに説明される。

実施例1：材料および方法

【0327】

HEL4V_Hドメインに基づき、Jespers et al., 2004に説明されるように、変異の手法がこのドメイン凝集抵抗性をもたらす変異を同定するために使用された。該手法は、HEL4とDP47（HEL4が由来する凝集傾向生殖細胞系列V_H）との間のキメラ生成に基づいた。

1.1 変異V_HおよびscFvの生成

【0328】

ヒト可変ドメインの変異体が、Zoller and Smith (1987)に説明される方法を用いて、Kunkel et al. (1987)に紹介される修正を伴い、生成された。この目的のために、所望の変異をコードする合成オリゴヌクレオチドは、ウラシル含有単鎖型DNA (dU-ssDNA)へアニールされ、酵素的に延長され、共有結合閉環状DNAを形成するために連結された。鑄型は、ApaIおよびNotI部位を使用して、ファージディスプレイベクター、FdMyc内への、単一ヒト重鎖可変(V_H)ドメイン(V3-23/DP-47)をコードするDNA断片のクローン作成によって、生成された。共有結合閉環状DNAは、ung⁺大腸菌株TG1へと電気穿孔し、非変異dU-ssDNAの優先破壊を引き起こすことによって、形質転換された。構築された変異体の配列は、DNA配列分析によって確認された。

【0329】

scFv変異体の生成のために、単一V_Hドメイン(配列番号3)および合成リンカー領域(配列番号4)をコードするDNA断片が、XhoIおよびNotIクローニングサイトを使用して、対応するFdMyc構築物内へとクローン作成された。構築された変異体の配列は、DNA配列分析によって確認された。

1.2 凝集抵抗性に対するファージELISA(「加熱/冷却分析」)

【0330】

クローンの凝集抵抗性は、ファージELISA法(McCafferty et al., 1990; Jespers et al., 2004)で加熱培養後のシグナルの保持を測定することによって分析された。Nunc Maxisorp Immuno-plateのウェルを、リン酸緩衝塩類溶液(PBS)中の約5 μg/ml濃度のプロテインAで1晩被覆した。該プレートはPBSで1度洗浄され、PBS内で約4%(w/v)に希釈された粉乳でブロックされた。単一コロニーが寒天板から採取され、約15 μg/mlテトラサイクリンが補充された2xTY培地(約16 g/Lトリプトン、約10 g/L

10

20

30

40

50

L酵母抽出物、pH 7.0の約5g/L NaCl、を含有する)で1晩、約30で振とう培養された。細胞は遠心分離によって除去され、ファージは、ピオチン-PEO₄-N-ヒドロキシスクシンイミド(Pierce; 約50μM最終濃度)を添加することによって、培養上清内で直接ピオチニル化された。熟選択のために、上清はまず約80で約10分間培養され、次に約4で約10分間培養された。上清はブロックされたELISAウエルへ添加された。PBSで3回洗浄した後、結合ファージ粒子を、Extravidin-HRP conjugate(Sigma)および3,3',5,5'-テトラメチルベンジン(TMB)基質を用いて検出した。吸収度が450および650nmで減算測定によって算出された。

10

1.3 V_Hライブラリ、「Garvan-IA」および「IB」の生成 【0331】

Zoller and Smith, 1987において説明される方法を用いて、Kunkel et al., 1987によって紹介される修正を伴い、HEL4V_HクロンのCDR3が無作為化される2つのV_Hライブラリが構築された。この目的のために、所望の変異をコードする合成オリゴヌクレオチドを、ウラシル含有単鎖鋳型DNA(dU-ssDNA)ヘアニールし、酵素的に延長し、共有結合閉環状DNAを形成するために連結した。鋳型は、ApaIおよびNotI部位を使用して、ファージディスプレイベクター、FdMyc内への、単一ヒトV_Hドメイン(HEL4)をコードするDNA断片のクローン作成によって、生成した。共有結合閉環状DNAは、ung⁺大腸菌株TG1への電気穿孔し、非変異dU-ssDNAの優先破壊を引き起こすことによって、形質転換された。「Garvan-IA」ライブラリは、96位、97位、98位、99位、100位、100a位、および100b位(Kabat et al., 1992に従い付番)において、7位置全てにおける縮重DVKコドンを用いて、7アミノ酸残基の無作為化によって、生成された。同様に、「Garvan-IB」ライブラリは、95位、96位、97位、98位、99位、100位、100a位、100b位、および100c位で無作為化され、95位および100c位はコード核酸内の縮重NNKコドンを用いて無作為化され、残りの位置はコード核酸内の縮重DVKコードを用いて無作為化された。得られたライブラリサイズは、Garvan-IAに対しては約1.1×10⁹コロニー、Garvan-IBに対しては約2.2×10⁹コロニーであった。

20

30

1.4 坑hTNFおよび坑mIL-21 V_Hクロンのファージディスプレイ選択 【0332】

未処理のGarvan-IAおよびIBライブラリからのファージ(FdMycベクターにおける)は、原則的に先に説明された通り(Lee et al., 2007)、ピオチン化組み換えhTNF(ヒト腫瘍壊死因子; Peprotech)またはmIL-21に対して、選択を2ラウンド行った。選択を2ラウンド行った後、V_Hドメインをコードする領域を、プライマー、5'-ACGCGTCGACGCGAGGTGCAGCTGTGTGG-3'(配列番号16)および5'-CTGTTAGGATCCGCTCGAGACGGTGACCAAG-3'(配列番号17)を用いて、ファージDNA調製物からPCR増幅した。PCR産物は、SalIおよびBamHI制限酵素で消化され、c-MycおよびHis₆タグをコードする修飾pET12a発現プラスミド(New England Biolabs)の対応する部位へとクローン化された。得られた連結反応は大腸菌株BL21-Gold(Stratagene)へと形質転換され、各抗原選択の192コロニーは、約4%ブドウ糖およびアンピシリン(約100μg/mL)が補充された2×TY培養液内で、約18時間、約37で、250rpmで振とう培養された。1晩の培養が約0.1%のブドウ糖およびアンピシリン(約100μg/mL)が補充された新鮮な2×TY培地を植菌するために使用され、約0.5のOD_{600nm}まで培養し、イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)が、可溶性V_H発現を誘発するために約1mMの最終濃度へ添加した。培養物は、約18時間、約30で、約

40

50

250 rpmで振とう培養された。細胞は遠心分離によって除去され、培養上清を抗原結合に対してELISAによって検査した。

【0333】

ELISAのために、Nunc Maxisorp Immuno-plateのウエルをPBS内の約5 µg/ml濃度の抗原で1晩被覆した。該プレートはPBSで1度洗浄し、PBS内で希釈された約4% (w/v) 粉乳でブロックした。上清をブロックされたELISAウエルへ添加した。PBSで3度洗浄した後、結合抗体ドメインは、hTNF選択のためにビオチン化ニワトリ抗c Myc抗体 (Immunology Consultants Laboratory)、またはmIL-21選択のためにビオチン化マウス抗c Myc (Sigma, clone 9E10) を用いた後に、Extravidin-HRP conjugate (Sigma) および3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジン (TMB) 基質を用いて、検出した。吸収度を450および650 nmにおける演算測定によって算出した。

10

1.5 単離されたV_Hクローンの特異性ELISA

【0334】

単離されたV_Hクローン、G07 (抗hTNF; 配列番号5) およびG11 (抗mIL-21; 配列番号6)、の特異性を、ELISAによって決定した。Nunc Maxisorp Immuno-plateのウエルを、約5 µg/mlの、組み換えヒトTNF、マウスTNF、ヒトIL-21、マウスIL-21、ベータガラクトシダーゼ、ヒトプロラクチン受容体、ストレプトアビジン、およびニュートラアビジンのいずれかで1晩被覆した。該プレートをPBSで1度洗浄し、PBS緩衝液内で希釈された約4% (w/v) 粉乳でブロックした。精製されたG07およびG11を、該プレートに10 µg/mlで添加し、PBS内で希釈し、室温で約1時間培養した。PBSで3度洗浄した後、V_Hを、ビオチン化ニワトリ抗c myc抗体 (G07に対して)、またはビオチン化マウス抗-c-myc (G11に対して) のどちらかを用い、その後、Extravidin-HRPおよび3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジン (TMB) 基質の添加によって、検出した。吸収度を450および650 nmにおける演算測定によって算出した。

20

1.6 抗hTNFおよび抗mIL-21 V_Hクローンの親和性測定

30

【0335】

V_HクローンG07 (抗hTNF; 配列番号5) およびG11 (抗mIL-21; 配列番号6) の親和性を、表面プラズモン共鳴 (Biacore machine; GE Healthcare、を用いた) を用いて測定した。この目的のために、PBS内で希釈されたビオチン化抗原を、ストレプトアビジン (SA) センサチップ (Biacore AB) 上に注入した。精製されたV_Hの (約0.125から4 µMの範囲の濃度での) 段階希釈を、対応する標識抗原を含むフローセル上で約20 µl/分の流速において注入した。平衡解離定数を、BIAevaluation 4.1 software package (Biacore AB) を用いて算出した。

40

1.7 V_Hの可溶性発現レベルの決定

【0336】

各V_Hドメインの可溶性発現レベルを、該V_Hの可溶性V_Hの濃度が、同一の精製されたV_Hの標準曲線と比較して測定される、プロテインA ELISAを用いて決定した。DP47、HEL4および変異V_Hを、BL21-GOLD大腸菌 (Stratagene) 内のpET12a (New England Biolabs) ベクターから発現させた。42時間後、細胞を遠心分離によって除去し、V_Hはビオチン-PEO₄-N-ヒドロキシスクシンイミド (Pierce; 50 µM最終濃度) を添加することによって、培養上清内で直接ビオチン化された。培養上清、および同一の変異体の既知の濃度でビオチン化精製されたV_Hを、5 µg/mlのProtein A (Sigma) で1晩被覆

50

したNunc 96-well Maxisorp immunoplateへ添加し、4%MPBSでブロックした。PBSTで3度洗浄した後、結合抗体ドメインをExtravidin-HRP conjugate (Sigma)およびTMB基質を用いて検出した。吸収度を450および650nmにおける減算測定によって算出し、各試料の濃度を標準曲線から推定した。

1.8 サイズ排除クロマトグラフィによる凝集抵抗性の決定

【0337】

PBS内の10 μ Mにおいて精製されたV_Hは、80℃まで10分間加熱された後に4℃で10分間冷却されたか、または処理されなかったかのどちらかであった。加熱および非加熱試料のどちらも、16,000x gで10分間遠心分離した後、各々の500 μ lを、125mMのNaClを含有した25mMリン酸ナトリウム(pH7.4)と平衡させたSuperdex-G75 column (Pharmacia)上で分析した。タンパク質を、500 μ lの体積で流速0.5ml/分で挿入した。各V_H変異体の回収を、非加熱試料のパーセンテージとして表される、加熱試料の曲線下の面積を測定することによって決定した。

10

1.9 円偏光二色性を用いた凝集抵抗性の決定

【0338】

熱解きほどこきV_Hドメインをクォーツキュベット(1mm経路長)内でJ-815 spectrometer (Jasco)を用いた円偏光二色性(CD)によって測定した。タンパク質試料は、PBS(pH7.2)内で最終濃度20 μ Mであり、融解曲線を該溶液を20℃から80℃まで1℃/分で加熱しながら、1nm帯域幅および1s積分時間で235nmにおけるCD信号を記録することによって得た。各試料の凝集抵抗性は、加熱タンパク質を80℃から4℃まで1℃/分で冷却することによって検査した。

20

1.10 サイズ排除カラムによるV_Hドメイン保持の測定

【0339】

CDR1に変異を含むDP47V_Hドメインを発現させ、先に説明された通りに精製した。各タンパク質試料を、PBS内で5 μ Mにおいて、80℃まで10分間加熱し、次に4℃で10分間冷却した。加熱試料を、16,000x gで10分間、遠心分離した後、各500 μ lを125mMのNaClを含む25mMのリン酸ナトリウム(pH7.4)と平衡されたSuperdex-G75 column (Pharmacia)上で分析した。タンパク質を、流速0.5ml/分で500 μ lの体積で注入した。

30

1.11 V_Hライブラリ「Garvan-2」の生成

【0340】

Zoller and Smith, 1987において説明される方法を用いて、Kunkel et al., 1987によって紹介される修正を伴い、HEL4V_Hクローンの複数のCDR残基が無作為化されるV_Hライブラリを構築された。この目的のために、所望の変異体をコードする合成オリゴヌクレオチドを、ウラシル含有単鎖型DNA(dU-ssDNA)へアニールし、酵素的に延長し、共有結合閉環状DNAを形成するために連結した。鑄型を、ファージディスプレイベクター、pHEN1への、単一ヒトV_HドメインをコードするDNA断片のクローン作成によって、生成した。共有結合閉環状DNAは、ung⁺大腸菌株TG1へ電気穿孔し、非変異dU-ssDNAの優先破壊を引き起こすことによって、形質転換した。ライブラリは、縮重KMTコドンを用いて、CDR1内の30位および31位(Kabat et al., 1992に従い付番)の2つのアミノ酸残基を無作為化することにより生成した。同様にCDR2を、50位、52位、55位で縮重KMTコドンを用いて、52a位で縮重RRTコドンを用いて、および53位で縮重SMTコドンを用いて、無作為化した。さらに、HEL4ドメインの29位

40

50

、94位、100x位(xはC末端縮重位置に続く位置を示す)、101位、および102位を、対応するDP47残基へ変異させた。95位~100a位、または代わりに、95位~100c位は次に、原則的に先に説明された通り、SOE-PCR変異生成を用いてさらに無作為化した(Higuchi, Krummel et al., 1988)。CDR3設計内でコードされたアミノ酸残基は、全19の自然発生アミノ酸を含んだが、システインおよび停止コドンは除外した。共有結合閉環状DNAを、大腸菌株TG1への電気穿孔によって形質転換した。得られたライブラリサイズは、約 4×10^9 コロニーを含んだ。Garvan-2ライブラリは2つ以上の負荷電をコードし、そのうちの2つは32位および33位にある。

10

1.12 坑hPRLRおよび坑HEL_{V_H}クローンのファージディスプレイ選択 【0341】

未処理のGarvan-2ライブラリからのファージは、原則的に先に説明された通り、多数の選択周期を通して循環された(Lee et al., 2007)。選択後、各抗原選択から得られたコロニーを、約4%のブドウ糖およびアンピシリン(約100μg/mL)が補充された2xTY培養液内で、約18時間、約37℃で、約250rpmで振とう培養した。1晩の培養を約0.1%のブドウ糖およびアンピシリン(約100μg/mL)が補充された新鮮な2xTY培地を植菌するために使用し、約0.5のOD_{600nm}まで培養し、その時点でイソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を、可溶性V_H発現を誘発するために約1mMの最終濃度へ添加した。培養物を、約18時間、約30℃で、約250rpmで振とう培養した。細胞を遠心分離によって除去し、培養上清を抗原結合についてELISAによって検査した。

20

【0342】

ELISAのために、Nunc Maxisorp Immuno-plateのウェルをPBS内の約5μg/mL濃度の抗原で1晩被覆した。該プレートをPBSで1度洗浄し、PBS内で希釈された約4%(w/v)粉乳でブロックした。上清をブロックされたELISAウェルへ添加した。PBSで3度洗浄した後、結合抗体ドメインを、ビオチン化ニワトリ抗cMyc抗体(Immunology Consultants Laboratory)またはビオチン化マウス抗cMyc(Sigma, clone 9E10)を用いた後に、Extravidin-HRP conjugate(Sigma)および3,3',5,5'-テトラメチルベンジン(TMB)基質を用いて、検出した。吸収度を450および650nmにおける演算測定によって算出した。

30

1.14 坑hPRLRおよび坑HEL_{V_H}クローンの親和性測定

【0343】

V_Hクローンの親和性を、表面プラズモン共鳴(Biacore 2000 instrument; GE Healthcare、を用いた)を用いて測定した。この目的のために、PBS内で希釈されたビオチン化抗原を、ストレプトアビジン(SA)センサチップ(Biacore AB)上に注入した。精製されたV_Hの段階希釈を、対応する標識抗原を含むフローセル上に注入した。平衡解離定数を、BIAevaluation 4.1 software package(Biacore AB)を用いて算出した。

40

実施例2: HEL4/DP47 CDRキメラの凝集抵抗性

【0344】

単一のHEL4 CDR(CDR1またはCDR2またはCDR3)をDP47へ導入することの効果を試験するために実験を行った。HEL4/DP47 CDRキメラを構築し、前述の通り、凝集抵抗性に対して検査した(材料および方法の項を参照されたい)。

【0345】

簡単に説明すると、ファージディスプレイV_Hを80℃まで10分間加熱し、次に4

50

で10分間冷却した。正確に折り畳まれたV_HをプロテインA ELISAによって捕捉し、処理された試料の吸収信号を未処理試料のパーセンテージとして算出した。

【0346】

結果を表1および図2に示す。要約すると、HEL4-CDR1の導入は、DP47 V_Hドメイン上に相当の凝集抵抗性を付与した。一方、DP47へのHEL4-CDR2またはHEL4-CDR3の導入は、V_Hドメインの凝集抵抗性に対して限定された効果を有した。

【表1】

DP47/HEL4 CDRキメラの凝集抵抗性

V _H	DP47	HEL4	HEL4-CDR1	HEL4-CDR2	HEL4-CDR3
保持されたプロテインAへの結合	2%	88%	81%	4%	3%

10

実施例3：CDR1のマッピング DP47 CDR1変異体の凝集抵抗性

【0347】

DP47 V_Hドメイン上の凝集抵抗性の付与に關与するCDR1の領域をさらに同定するための実験が行われた。

【0348】

DP47 V_HドメインのCDR1領域内の単一アミノ酸変化、およびその組み合わせを、前述の通り、構築され凝集抵抗性に対して検査した(材料および方法の項を参照されたい)。手短かに言うと、ファージディスプレイされたV_Hを、80℃で10分間加熱し、次に4℃で10分間冷却した。正確に折り畳まれたV_HをプロテインA ELISAによって捕捉し、処理された試料の吸収信号を未処理の試料のパーセンテージとして算出した。

20

【0349】

結果を表2および図3に示す。要約すると、CDR1の31位または32位または33位で負荷電アミノ酸の導入は、V_Hドメインの相当の凝集抵抗性をもたらすという結果になった。さらに、31位~33位での三重アミノ酸変異(SYA31-33DED)は、単一アミノ酸変化の場合に観察されるよりも大きい凝集抵抗性という結果になった。28位および35位での他の変異(T28R、S35G)は、凝集抵抗性にさほど効果を有さなかった。これらの前述の変異は、負荷電アミノ酸を含まない。

30

【表2】

DP47-CDR1変異体の凝集抵抗性

V _H	T28R	S31D	Y32E	A33D	S35G	SYA31-33DED	5X mut
保持されたプロテインAへの結合	2%	31%	41%	26%	4%	67%	75%

40

実施例4：(scFvとして)共通V_L鎖と対になった時の、DP47-CDR1変異体およびその組み合わせの凝集抵抗性

【0350】

前述のDP47-CDR1変異体を、リンカー(配列番号4)を介して、scFv形態で、共通単一可変軽鎖(V_L;配列番号3)と対にした(実験の全詳細については、材料および方法の項を参照されたい)。簡単に説明すると、ファージディスプレイされたV_Hを80℃まで10分間加熱し、次に4℃で10分間冷却した。正確に折り畳まれたscFvをプロテインA ELISAによって捕捉し、処理された試料の吸収信号を未処理試料

50

のパーセンテージとして算出した。

【0351】

結果を表3および図4に示す。要約すると、scFv形態でのDP47-CDR1変異体は、V_H形態におけるのと類似の凝集抵抗性の向上を示した(表2および図3を参照されたい)。結果は、CDR1の31位または32位または33位での負荷電アミノ酸の導入は、共通V_L鎖と対になった時に(scFvとして)、V_Hの凝集抵抗性を向上するというを示す。さらに、31位~33位での三重アミノ酸変異体(SYA31-33DED)は、単一アミノ酸変化の場合に観察されるよりも大きい凝集抵抗性という結果になった。28位および35位での他の変異(T28R、S35G)は、凝集抵抗性にさほど効果を有さなかった。これらの前述の変異は、負荷電アミノ酸を含まない。

【表3】

リンカーを介してscFv形態で単一可変軽鎖(V_L)と組み合わされたDP47-CDR1変異体(V_H)の凝集抵抗性

scFv	DP47	HEL4	HEL4-CDR1	T28R	S31D	Y32E	A33D	S35G	SYA31-33DED	5X mut
保持されたプロテインAへの結合	8%	56%	66%	4%	29%	27%	22%	5%	45%	41%

実施例5：CDR1内の二重変異を含むDP47 V_H構築物の生成

【0352】

V_HのCDR1領域内の二重変異は実質的に、前述の実施例において単一および多数のDP47-CDR1変異体について説明されたように、構築される。例えば、V_HのCDR1の32位および33位での二重変異が導入される。別法として、V_HのCDR1の31位および32位での二重変異が導入される。別法として、V_HのCDR1の31位および33位での二重変異が導入される。

【0353】

V_HのCDR1領域内の二重変異の前述の実施例において、アスパラギン酸(D)および/またはグルタミン酸(E)といった負荷電アミノ酸が、CDR1の、32位および33位、または31位および32位、または31位および33位で、導入される。二重変異体DP47 V_Hドメインの凝集抵抗性を、前述の材料および方法の項で説明された通り、ファージ「加熱/冷却」分析を用いて測定する。簡単に説明すると、ファージディスプレイされた抗体を、約80まで10分間加熱し、次に約4で約10分間冷却する。正確に折り畳まれたV_HをプロテインA ELISAによって捕捉し、処理された試料の吸収信号を未処理試料のパーセンテージとして算出する。

【0354】

幾つかの実施例において、二重変異V_H構築物を、変異のscFv凝集抵抗性への効果を決定するために、軽鎖(V_L)と対にする。変異scFvの凝集抵抗性は、前述の材料および方法の項で説明されたように、ファージ「加熱/冷却」分析を用いて測定される。簡単に説明すると、ファージディスプレイされた抗体を、約80まで約10分間加熱し、次に約4で約10分間冷却する。正確に折り畳まれたscFvをプロテインA ELISAによって捕捉し、処理された試料の吸収信号を未処理試料のパーセンテージとして算出する。

実施例6：精製されたタンパク質としてのCDR1変異体の凝集抵抗性

【0355】

前述の実施例において説明された一連のCDR1変異体の凝集抵抗性を、精製されたV_HまたはV_H-V_L組み合わせとという状況で評価する(即ち、ファージ上にディスプレイされない)。これらの実験のために、変異V_H(またはV_H-V_L)ドメインを、材料および方法の項で前述された通り、発現させ、実質的に精製する。熱誘導凝集に対する抵抗を、円偏光二色性(CD)、および/またはサイズ排除クロマトグラフィ、および/または濁度分析によって試験する。熱力学的安定性を、円偏光二色性および/または蛍光分光法によって決定する。

10

20

30

40

50

実施例 7 : CDR 1 変異を導入するための既存抗体の変異

【 0 3 5 6 】

既知の既存モノクローナル抗体、例えば、Humira (当技術分野においてアダリムマブとしても知られる。配列番号 10 に記載される V_H 配列)、および/または Rituxan (当技術分野において Mabthera または リツキシマブとしても知られる。配列番号 11)、および/または Herceptin (当技術分野において トラスツズマブとしても知られる。配列番号 12)、および/または Avastin (当技術分野において ペバシズマブとしても知られる。配列番号 13) 等を、28 位および/または 30 位および/または 31 位および/または 32 位および/または 33 位および/または 35 位で負荷電アミノ酸を導入することによって修飾する。加えて、負荷電アミノ酸を、26 位および/または 39 位および/または 40 位および/または 50 位および/または 52 位および/または 52 a 位および/または 53 位で導入することができる。これらの修飾抗体の性質決定は V_H ドメインまたは scFv 単独として (IgG 全体ではなく) 行われ、材料および方法の項で前述されたような「加熱/冷却」分析、および/または、実施例 6 において説明された分析のうちの任意の 1 つ以上を含む。

10

実施例 8 : IgG の状況での V_H 変異体の分析

【 0 3 5 7 】

V_H 変異体の検査を IgG 全体という状況で行う。この目的のために、変異 IgG を発現させ精製する。凝集に対する抵抗は、円偏光二色性 (CD)、および/またはサイズ排除クロマトグラフィ、および/または濁度分析によって試験する。

20

実施例 9 : Garvan - IA および IB ライブラリの凝集抵抗性

【 0 3 5 8 】

Garvan - IA および IB ライブラリを、前述の通りに構築され単離した (材料と方法の項を参照されたい)。Garvan - IA および IB ヒト V_H ライブラリからの未処理のクローンの凝集抵抗性を試験した。簡単に説明すると、ファージディスプレイされた抗体を、約 80 まで約 10 分間加熱し、次に約 4 で約 10 分間冷却した。正確に折り畳まれた V_H をプロテイン A ELISA によって捕捉し、処理された試料の吸収信号を未処理試料のパーセンテージとして算出した。

30

【 0 3 5 9 】

これらの凝集抵抗性実験の結果を図 5 A および 5 B に示す。要約すると、HEL4 の CDR 3 に多様性を導入した Garvan - IA または - IB V_H ライブラリの未処理 (選択されていない) クローンの大半は、「加熱/冷却」分析を受けた時に相当な凝集抵抗性を示した。多様性は、(IA および IB それぞれ) 7 位か 9 位かのアミノ酸残基での HEL4 母核のみの CDR 3 に限られた。

実施例 10 : G07 および G11 クローンの単離および特性決定

【 0 3 6 0 】

ヒト腫瘍壊死因子 (hTNF) またはマウスインターロイキン 21 (mIL - 21) への結合のために選択された 2 つのクローンを、前述の通り、Garvan - I ライブラリから単離した (材料および方法の項を参照されたい)。結合は ELISA によって示される通り、抗原特異的であった。抗ヒト TNF クローン G07 (配列番号 5) および抗マウス IL - 21 クローン G11 (配列番号 6) の Biacore 親和性測定が行われた。各々の精製されたタンパク質の段階希釈は、4 μM で開始し、ピオチン化 hTNF で被覆された、および mIL - 21 で被覆された ストレプトアビジン (SA) チップ上で、それぞれに行われた。Biacore ソフトウェア分析は、G07 および G11 に対して、それぞれ、1.86 μM および 4.07 μM の親和性を推定した。

40

50

【0361】

次に抗原結合の特異性を、各V_Hに対して試験した。精製されたc-Myc標識抗体ドメインを、Nunc Maxisorb ELISA plate上へ固定されたhTNF、mIL-21、および様々な関係のない抗原への結合に対して試験した。結合抗体ドメインを、抗c-Myc抗体を用いて検出した。結果を図6に示す。要約すると、両クローンともその同種抗原へ特異的に結合した。G11はまた、mIL-21のホモログであるヒトIL-21(hIL-21)へも結合することが分かった。

実施例11：抗原結合性抗hTNFクローンG07および抗mIL-21クローンG11の凝集抵抗性

10

【0362】

抗原結合性抗hTNFクローンG07および抗mIL-21クローンG11の凝集抵抗性を、ファージ上で検査する。また、これらのクローンのCDR3を、抗原結合および凝集抵抗性への点変異の効果を試験するために、本明細書中で前述のDP47-CDR1変異体のうちの1つ以上へと組み込む。変異体、抗原結合性V_Hの凝集抵抗性は、材料および方法の項で前述された通り、ファージ「加熱/冷却」分析を用いて測定する。加えて、CDR1変異の抗原結合への効果を評価するために、抗原への結合をELISAによって試験する。

実施例12：凝集抵抗性を付与するさらなる変異の同定

20

【0363】

V_H上に凝集抵抗性を付与するCDR1内のさらなる残基を同定するために、26位から35位(Kabat付番システムに従い付番)の間のDP47の表面が露出した残基が、アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)と置換された。39位および40位でのフレームワーク残基もまた、アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)と置換された。これらの変異体V_Hはファージ上にディスプレイされ、実施例1.2に説明される通り、「加熱/冷却」分析を受けた。この分析の結果を表4および図7に示す。簡単に説明すると、ファージディスプレイされたV_Hを、80℃まで10分間加熱し、次に4℃で10分間冷却した。正確に折り畳まれたV_HをプロテインA ELISAによって捕捉し、処理された試料の吸収信号を未処理試料のパーセンテージとして算出した。

30

【表 4】

V_H変異体の凝集抵抗性。80℃まで10分間加熱後4℃で10分間冷却しプロテインAにより捕捉された、ファージ上にディスプレイされたDP47単一変異体の、保持されたプロテインA結合(%)

	保持されたプロテイン Aへの結合(%)	標準偏差(n=2)
HEL4	80.2	1.45
DP47 (変異なし)	1.1	0.08
G26D	6.1	0.3
G26E	1.8	0.17
T28D	25.1	1.12
T28E	6.5	0.03
S30D	21.8	0.73
S30E	2.1	0.99
S31D	21.3	0.04
S31E	6.1	0.45
Y32D	41.8	2.28
Y32E	24.8	1.10
A33D	10.0	0.22
A33E	2.0	0.11
S35D	12.8	0.53
S35E	4.5	0.45
Q39D	3.7	0.14
Q39E	2.5	0.25
A40D	2.8	0.48
A40E	1.9	0.15

10

20

【0364】

データは、28位、30位、31位、32位、33位、または35位での置換がDP47の凝集抵抗性を大幅に増大させたことを示した。他の位置(26位、39位、および40位)での置換(アスパラギン酸またはグルタミン酸)もまた、DP47の凝集抵抗性を検出可能に増大させた。

30

【0365】

データはまた、アスパラギン酸置換はグルタミン酸置換よりも凝集抵抗性を増大することを示した。この効果は、前述の位置の各々において観察された。

実施例13：凝集抵抗性を付与するCDR2内の変異の同定

【0366】

V_H含有タンパク質に凝集抵抗性を付与するCDR2内の残基を同定するために、アスパラギン酸(D)が、DP47 V_Hの推定CDR2内において、アスパラギン酸(50位、52位、52a位、53位、54位)で、表面が露出した残基と置換された。これらの変異体V_Hはファージ上にディスプレイされ、実施例1.2に説明される通り、「加熱/冷却」分析を受けた。この分析の結果を、表5および図8に示す。

40

【表 5】

V_H変異体の凝集抵抗性。80℃まで10分間加熱後4℃で10分間冷却しプロテインAにより捕捉された、ファージ上にディスプレイされたDP47単一変異体の、保持されたプロテインA結合 (%)

	保持されたプロテインA への結合(%)	標準偏差(n=3)
HEL4	80.8	8.6
DP47 (変異なし)	1.4	0.3
A50D	2.9	0.9
S52D	3.9	1.3
G52aD	2.1	0.3
S53D	3.8	0.0
G54D	1.3	0.2

10

【0367】

これらのデータは、DP47 V_Hの50位、52位、52a位、または53位での負荷電アミノ酸の導入が、凝集抵抗性を検出可能に増加させたことを示した。

実施例14：31位および/または32位および/または33位の負荷電アミノ酸の異なる組み合わせの効果

【0368】

V_Hドメインが、表6に示されるように31位および/または32位および/または33位での負荷電アミノ酸の異なる組み合わせを含んで、産生された。V_Hドメインの凝集抵抗性を、実施例1.2に説明される通り、「加熱/冷却」分析を用いて評価した。結果を表6および図9に示す。

20

【表 6】

ファージ上の加熱/冷却によって決定された、31位および/または32位および/または33位のDP47の二重または三重負荷電変異体の凝集抵抗性

	保持されたプロ テインAへ の結合(%)	標準偏差 (n=2)
HEL4	80	1
DP47 (変異なし)	1	0
SY_31/32_DD	62	2
SY_31/32_DE	50	1
SA_31/33_DD	52	0
YA_32/33_DD	64	1
YA_32/33_ED	59	1
SYA_31-33_DDD	66	1
SYA_31-33_DED	69	2

30

【0369】

これらのデータは、検査された負荷電アミノ酸の全組み合わせが、V_Hドメイン上に相当な凝集抵抗性を付与することを示す。データはまた、一般的に、負荷電アミノ酸としてアスパラギン酸のみを含む組み合わせの方が、グルタミン酸を含む組み合わせよりも大きい凝集抵抗性を付与することを示す。さらにこれらのデータは、複数の負荷電アミノ酸は、任意の単一の負荷電アミノ酸の場合に観察されるよりも大きい凝集抵抗性を付与することを示す(図7および表4を参照されたい)。

40

実施例15：V_H含有タンパク質上に凝集抵抗性を付与する、CDR1内の28位および/または35位、および他の部位での変異組み合わせ

50

【 0 3 7 0 】

V_Hドメインが、表7に示されるようにDP47のCDR1内の28位および/または35位、および少なくとも1つの他の位置で負荷電アミノ酸を含んで、産生された。V_Hドメインの凝集抵抗性を、実施例1.2に説明される通り、「加熱/冷却」分析を用いて評価した。結果を表7および図10に示す。

【表7】

少なくとも28位および/または35位で負荷電アミノ酸を含むV_Hドメインの凝集抵抗性

	保持されたプロテインAへ標準偏差(n=2)の結合 (%)	
HEL4	87.7	3.5
DP47 (変異なし)	1.8	0.3
T28D+S30D	39.4	3.9
T28D+S31D	44.8	2.8
T28D+Y32D	64.7	4.8
T28D+A33D	62.0	2.3
T28D+YA_32/33_DD	76.1	1.2
T28D+SYA_31-33_DDD	74.9	2.4
T28D+S35D	45.8	3.9
S35D+S30D	43.5	2.9
S35D+S31D	48.3	3.2
S35D+Y32D	61.0	0.4
S35D+A33D	40.3	3.8
S35D+YA_32/33_DD	70.4	
S35D+SYA_31-33_DDD	76.7	0.0
T28D+SYA_31-33_DDD+S35D	78.6	0.3

10

20

【 0 3 7 1 】

これらのデータは、28位または35位で負荷電アミノ酸を付加的な負荷電アミノ酸と組み合わせることは、これらの位置における単一負荷電アミノ酸の場合に観察されるよりも、高い凝集抵抗性を付与することを示す。

30

実施例16：可溶性タンパク質の高い発現レベルを付与するCDR1内の負荷電アミノ酸

【 0 3 7 2 】

V_Hドメインの可溶性発現レベルを、実施例1.7に説明される手順を用いて評価した。試験したV_Hドメインは、DP47、HEL4、およびDP47のCDR1内の負荷電アミノ酸の組み合わせを含んだ。結果を表8および図11に示す。

【表 8】

30°Cにおける42時間の誘導後プロテインA ELISAによって測定された、DP47-CDR1 V_H変異体の可溶性発現レベル (mg/l)

	可溶性発現(mg/l)			
	#1	#2	平均	標準偏差
HEL4	15.0	12.4	13.7	1.8
DP47 (変異なし)	1.4	1.9	1.7	0.4
T28R	1.5	1.3	1.4	0.1
S31D	4.8	5.5	5.2	0.5
Y32E	7.7	6.0	6.9	1.2
A33D	1.4	2.7	2.1	0.9
S35G	1.2	1.4	1.3	0.1
SY_31/32_DE	7.0	9.5	8.3	1.8
SA_31/33_DD	3.5	4.7	4.1	0.8
YA_32/33_ED	20.4	34.9	27.7	10.3
SYA_31-33_DED	13.5	8.6	11.1	3.5

10

【0373】

発現レベルが、31位から33位での2つ以上の負荷電残基を含むDP47変異体に対して、大幅に増大された。単一変異体もまた、DP47発現レベルを適度に上回る向上を示したが、二重または三重変異体に対する場合よりも低かった。

20

実施例17：サイズ排除クロマトグラフィによって測定した、可溶性V_Hタンパク質としてのCDR1変異体の凝集抵抗性

【0374】

精製されたV_Hドメインの凝集抵抗性を、サイズ排除クロマトグラフィを用いて試験した。試験したV_Hドメインは、DP47、HEL4、およびDP47のCDR1内の負荷電アミノ酸の組み合わせを含んだ。結果を表9および図12に示す。

【表 9】

80°Cでの10分間の加熱後に、Superdex-G75サイズ排除カラム上の溶出タンパク質によって測定された、CDR1変異を伴う可溶性DP47 V_Hの10 μM溶液の回収率

30

	加熱後の回収率
	(%)
HEL4	93.7
DP47 (変異なし)	3.4
T28R	34.7
S31D	69.4
Y32E	85.7
A33D	55.8
S35G	2.2
SY_31/32_DE	80.6
SA_31/33_DD	83.9
YA_32/33_ED	83.7
SYA_31-33_DED	87.6

40

【0375】

これらのデータは、31位および/または32位および/または33位の負荷電アミノ酸は、特に2つ以上の置換を含む変異体に対して、ヒトV_Hドメインの凝集抵抗性を増大させることを示す。

実施例19：円偏光二色性によって測定された、可溶性タンパク質としてのCDR1変異

50

体の凝集抵抗性

【0376】

精製されたV_Hドメインの凝集抵抗性を、CDを使用して試験した。試験したV_Hドメインには、DP47、HEL4、およびDP47のCDR1における負荷電アミノ酸の組み合わせが含まれた。結果を、図13AおよびBに示す。

【0377】

融解曲線は、各タンパク質に対する二状態遷移と一致していた。HEL4は、80まで加熱した後、完全な凝集抵抗性を呈したが、DP47は、熱変性後に凝集し、再折り畳みすることができなかった。単一の負荷電変異体(S31D、Y32E、A33D)は、これらの条件下で、再折り畳みのごくわずかな兆候を示した。このため、31位および/または32位および/または33位での二重の負の置換の導入のみが、ドメインの凝集抵抗性を検出可能に改善し、31位、32位、および33位での三重変異体が、最も大きな効果を提供した。これは、複数の負荷電置換が、溶液中における凝集抵抗性を付与することを実証する。

10

実施例19：CDR1変異は、サイズ排除カラムにおいて、可溶性V_Hの保持を低減する

【0378】

サイズ排除カラムにおけるV_Hドメインの保持を分析した。試験したV_Hドメインには、DP47、HEL4、およびCDR1における負荷電アミノ酸の種々の組み合わせが含まれた。結果を表10に示す。

20

【表10】

Superdex-G75サイズ排除カラムからの、CDR1変異体を含む可溶性DP47V_Hのモノマー溶出体積

	モノマー溶出 体積 (ml)
HEL4	15.7
DP47 (変異なし)	24.9
T28R	25.8
S31D	23.2
Y32E	23.4
A33D	22.5
S35G	22.9
SY_31/32_DE	22.0
SA_31/33_DD	21.2
YA_32/33_ED	20.7
SYA_31-33_DED	19.7

30

【0379】

複数の負荷電置換を含む変異体の溶出体積は、DP47または単一の変異体よりも大幅に低かったことが観察された。これらのデータは、31位、32位、および/または33位の複数の負荷電置換が、サイズ排除カラムにおいて、ヒトV_Hドメインの保持を低減することを実証する。これは、かかるV_Hドメインを含むタンパク質の精製を容易にする限りにおいて、利点を提供する。さらに、これらのV_Hドメインの凝集抵抗性はまた、それらのドメインを含有するタンパク質が、凝集体および/または二量体/三量体の発生を低減するように加熱され、次いで、サイズ排除クロマトグラフィを使用して分離され、それによって、精製されたタンパク質を産生することができることを意味する。かかる方法は、有用な生成物のより多くの回収を容易にする。

40

実施例20：抗原特異的V_Hドメインの凝集抵抗性

【0380】

50

抗原特異的 V_H ドメインを、組み換えタンパク質抗原に対する、ファージディスプレイによって、Garvan-2 ライブラリから選択した。選択後、ドメインを、実施例 1 . 2 において説明される「加熱/冷却」分析を使用して、凝集抵抗性、ならびにプロテイン A 超抗原および/または組み換え抗原のいずれかへの結合に関して評価した。結果を表 1 1 に示す。

【表 1 1】

ファージ上の「加熱/冷却」分析によって判定された抗原特異性 V_H ドメインの凝集抵抗性

	超抗原/ 抗原	保持されたプロ テイン A への結 合(%)	標準偏差(n=2)
HEL4	プロテイン A	88.1	4.2
DP47	プロテイン A	1.4	0.1
V _H PRLR_C02	プロテイン A	98.8	2.9
V _H PRLR_C02	hPRLR	63.8	19.0
V _H HEL_H04	プロテイン A	87.8	2.3
V _H HEL_H04	HEL	61.0	5.0
V _H HEL_G08	プロテイン A	83.8	0.6
V _H HEL_G08	HEL	68.1	5.1

10

20

【0381】

この分析は、選択された抗原特異的 V_H ドメイン (V_HPRLR_C02 : 抗 PRLR (プロラクチン受容体 ; 配列番号 7)、V_HHEL_H04 : 抗ニワトリリゾチーム、配列番号 8、V_HHEL_H08 : 抗ニワトリリゾチーム、配列番号 9) が、ファージ上で、相当な凝集抵抗性を提示したことを明らかにした (表 1 1)。選択された結合体のうちの全てが、3 1 位および/または 3 2 位および/または 3 3 位に 2 つ以上の負荷電アミノ酸を含有した。

【0382】

抗原特異的 V_H ドメインを発現および精製した。親和性測定を、Biacore 2000 計器上での表面プラズモン共鳴によって行った。これは、標的抗原への高い親和性結合を明らかにした (表 1 2)。

30

【表 1 2】

精製された抗原特異的 V_H ドメインの親和性

	親和性(K _D)
V _H PRLR_C02	< 100nM
V _H HEL_H04	28 nM
V _H HEL_G08	65 nM

40

【0383】

精製されたタンパク質を、凝集抵抗性に関しても分析した。この分析のために、PBS 中の 10 μM の精製された V_H ドメイン含有試料を、80 °C まで 10 分間加熱し、その後、4 °C で 10 分間冷却したか、または処理しなかった。加熱および非加熱試料の両方を、16,000 × g で 10 分間遠心分離した後、各々の 500 μl を 125 mM の NaCl を含有する 25 mM のリン酸ナトリウム (pH 7.4) で平衡化された、Superdex-G75 カラム (Pharmacia) 上で分析した。タンパク質を、500 μl の体積で、0.5 ml / 分の流速で、注入した。各 V_H 変異体の回収を、非加熱試料の

50

割合(%)で表される、加熱された試料の曲線下面積を測定することによって判定した。これは、精製された抗原特異的V_Hドメインが、相当な凝集抵抗性を提示したことを明らかにした(表13)。

【0384】

抗原特異的V_Hドメインの全てが、31位および/または32位および/または33位に、2つ以上の負荷電アミノ酸を含有した。

【表13】

精製抗原特異V_Hドメインの凝集抵抗性

加熱後の回収(%)	
V _H PRLR_C02	92
V _H HEL_H04	102
V _H HEL_G08	91

10

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; 20
- 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);
- Bendele J Musculoskel Neuron Interact;1(4):377-385, 2001;
- Borrebaeck (ed), Antibody Engineering, Oxford University Press, 1995 (ISBN019509 1507);
- Bork et al., J Mol. Biol. 242, 309-320, 1994;
- Bradl and Linington Brain Pathol., 6:303-311, 1996;
- Brennan et al, Science, 229: 81-83, 1985;
- Brinkmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7538-7542, 1993; 30
- 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;
- 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;
- Dooley and Flajnik, Dev Comp Immunol. 30:43-56, 2006;
- 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) p 40
p. 59-103;
- Goodman et al., (editors) Goodman and Gilman 's The Pharmacological Basis of The rapeutics, 8th Ed., Macmillan Publishing Co. (1990);
- Guss et al.EMBO J. 5: 1567-1575, 1986;
- Guy et al., Mol Cell Biol. 12(3):954-61, 1992;
- Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1988 ;
- Harris et al., Trends Biotechnol., 17: 290-296, 1999;
- Higuchi et al., Nucleic Acids Res16(15): 7351-7367, 1988;
- Higuchi, in PCR Protocols, pp.177-183, Academic Press, 1990; 50

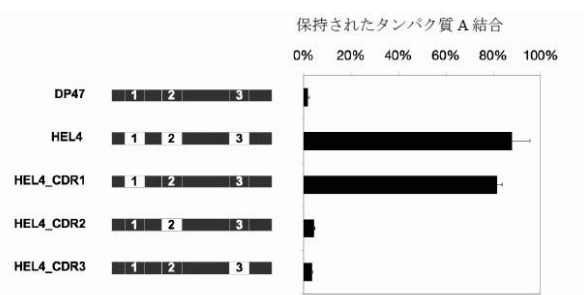
- Ho et al *Gene (Amst.)* 77:51-59, 1989;
- Holliger et al *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 90: 6444-6448, 1993;
- Hollinger and Hudson *Nature Biotechnology*, 23: 1126-1136, 2005;
- Hoogenboom and Winter *J Mol Biol*, 227:381, 1991;
- Hoyer et al., *Biophys. Chem.*, 96: 273-284, 2002;
- Hu et al., *Cancer Res.*, 56: 3055-3061, 1996;
- Hudson and Kortt *J. Immunol. Methods*, 231: 177-189, 1999;
- 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; 10
- Jespersen et al., *J Mol Biol.*;337: 893-903, 2004;
- Kabat *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, 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*, 256:495-497, 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; 20
- Lee et al., *Nat Protoc.*, 2: 3001-3008, 2007;
- 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;
- Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, 1991;
- Matsui et al., *Cell*.61(6):1147-55, 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 30
- McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554, 1990;
- Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77, 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;
- 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; 40
- Roby et al., *Carcinogenesis*. 21(4):585-91, 2000;
- Roux et al. *J. Immunol.* 161:4083, 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;
- Sanchez-Ruiz, et al., *Biochemistry*, 27: 1648-52, 1988
- Scopes In: *Protein purification: principles and practice*, Third Edition, Springer 50

r Verlag, 1994;
 Skerra et al, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262, 1993;
 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;
 van Mierlo and Steemsma, J. Biotechnol, 79:281-98, 2000
 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 34:315-323, 1985;
 Willuda et al., Cancer Res., 59: 5758-5767, 1999;and
 Zoller and Smith, Methods Enzymol., 154: 329, 1987.

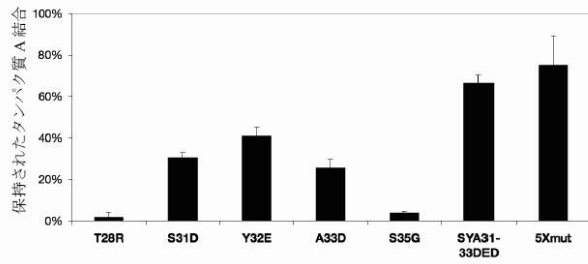
【 図 1 】



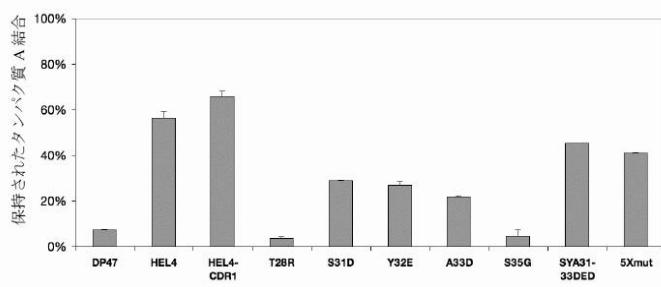
【 図 2 】



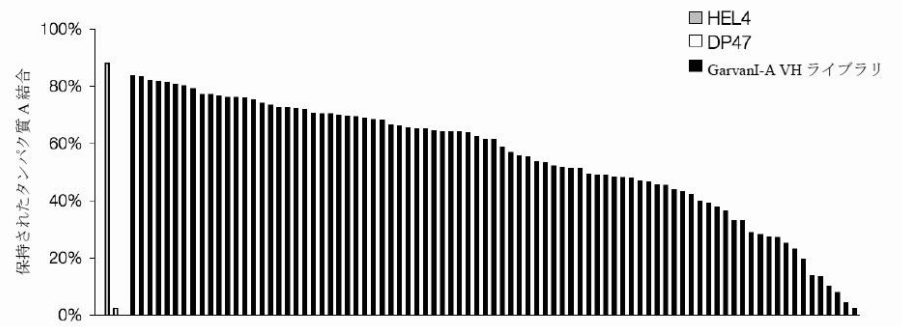
【 図 3 】



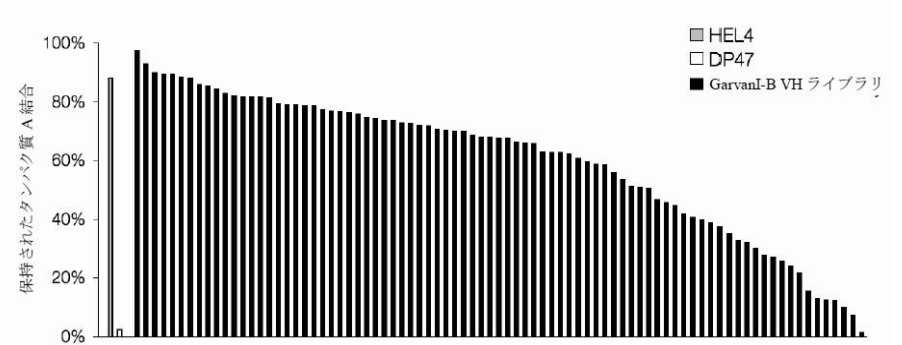
【 図 4 】



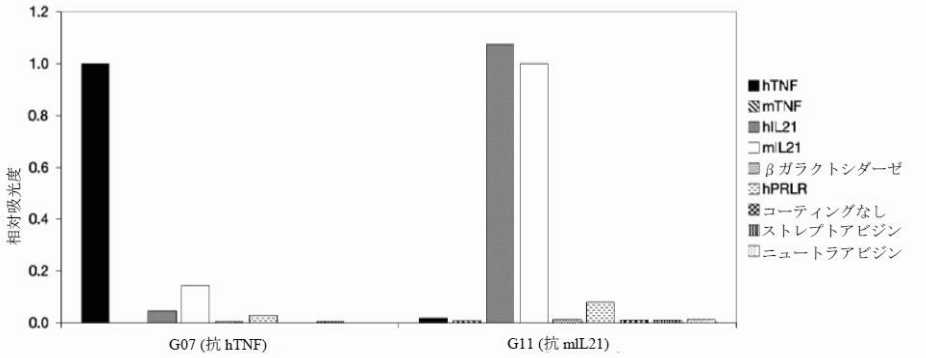
【 図 5 A 】



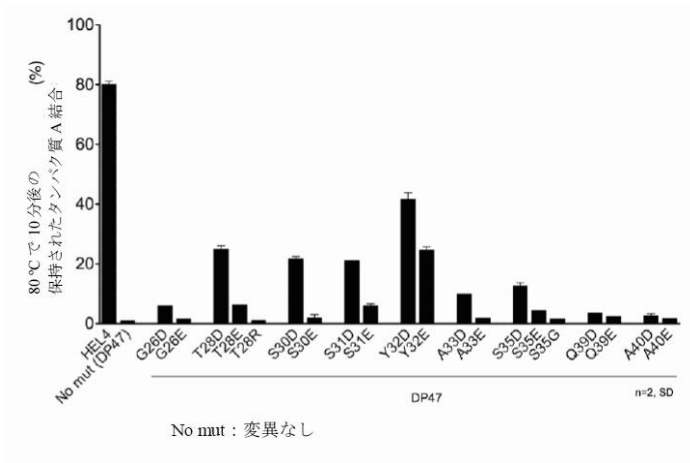
【 図 5 B 】



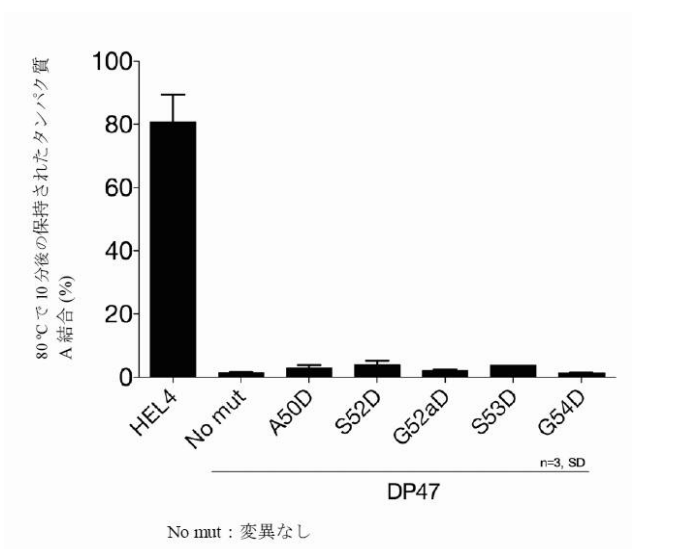
【 図 6 】



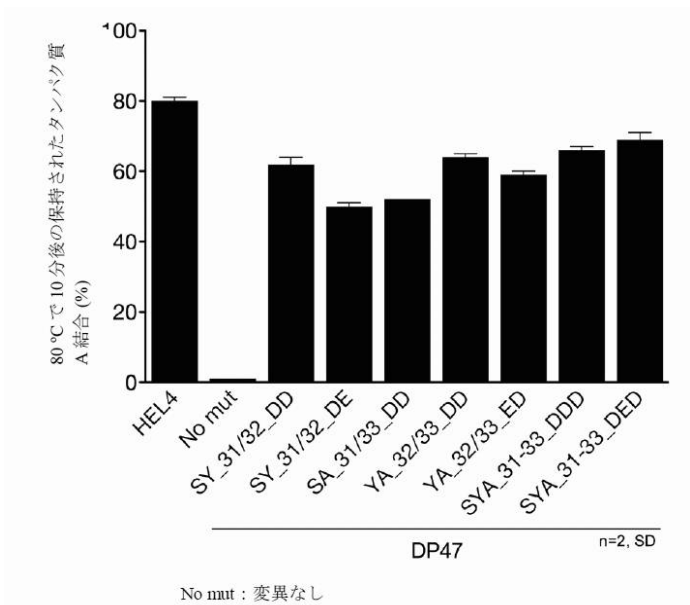
【 図 7 】



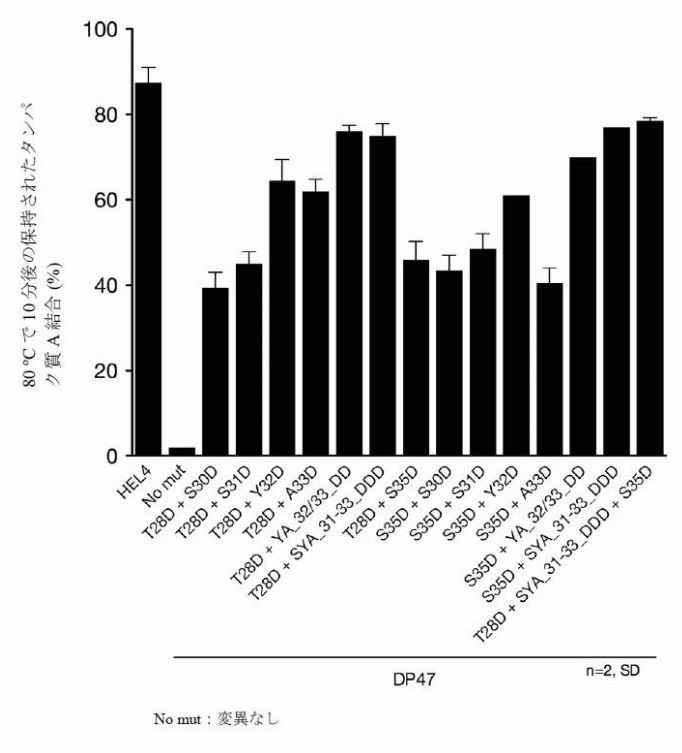
【 図 8 】



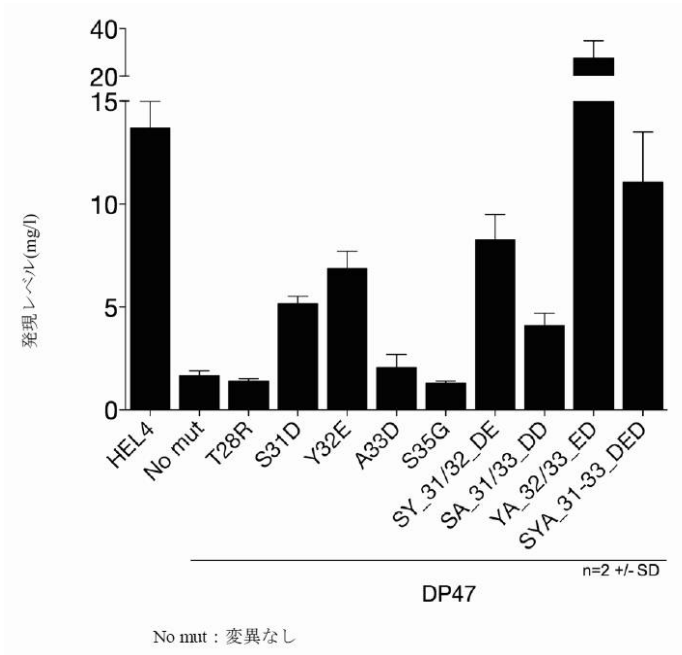
【 図 9 】



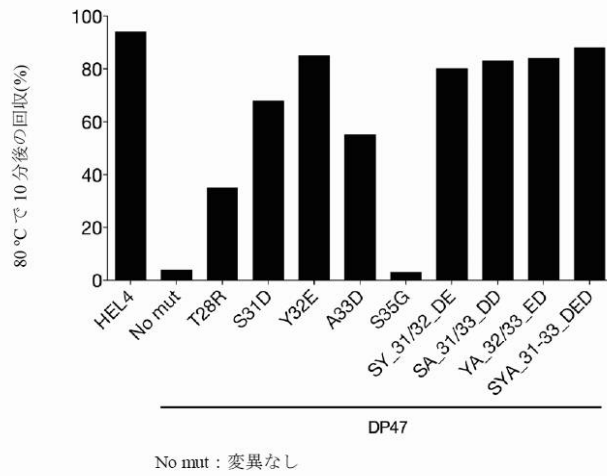
【 図 1 0 】



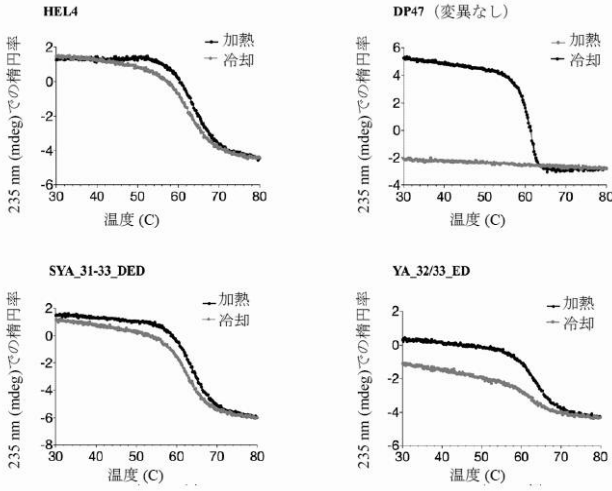
【 図 1 1 】



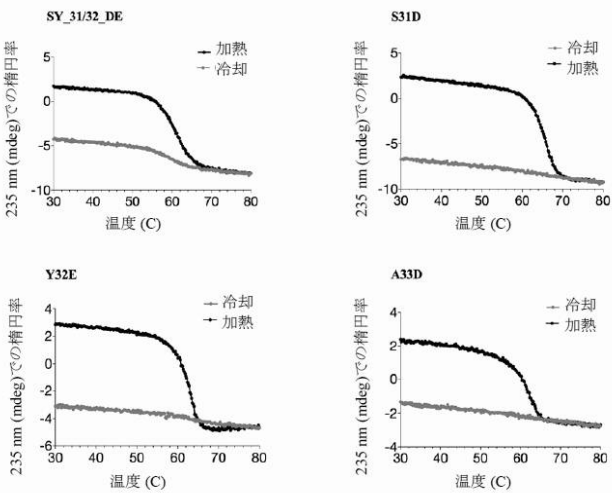
【 図 1 2 】



【 図 1 3 A 】



【 図 1 3 B 】



【 配列表 】

2013508308000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2010/001416
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) C40B 40/10 (2006.01) 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) GenomeQuest, CAlplus (searched for any sequence with two negative amino acids in CDR1) Medline, EPODOC, DWPI (heavy chain variable, VH, CDR1, aggregation-resistance, negative charge, negative residue, negative amino acid)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/069872 A1 (NOVOZYMES AS) 19 August 2004 abstract, page 1 and 13, SEQ ID NO 1	1-5, 10, 11, 13-15, 22, 28, 31-34, 42-44
X	JESPER, L et al., "Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation", Nature Biotechnology, 2004, Vol.22, No.9, pages 1161-1165 Abstract, Clone H26, Table 1, page 1163	23, 28, 31-35, 39
X	WO 2004/101790 A1 (DOMANTIS LTD) 25 November 2004 Section 16 and 17, pages 132-140, pages 53-55, 87 and 88	1-47
<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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 7 December 2010		Date of mailing of the international search report 16 DEC 2010
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer SARAH HENDERSON AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : +61 2 6283 2614

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2010/001416

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/079793 A1 (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA) 2 July 2009 Abstract, page 3, 22-24, and example 7	1-47
A	DUDGEON, K et al, "Sequence determinants of protein aggregation in human VH domains", Protein Engineering: Design & Selection, 2009, Vol. 22, No. 3, pages 217-220	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2010/001416

This Annex lists the known "A" publication level 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 Cited in Search Report		Patent Family Member			
WO 2004069872	AU 2004208860	BR PI0407108	CA 2514834		
	CN 1756767	EP 1592711	US 2006234340		
	ZA 200506117				
WO 2004101790	AU 2004239065	CA 2525120	CN 1823164		
	CN 101333243	EP 1627062	US 2009005257		
WO 2009079793	CA 2708074	EP 2254909			

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		D
G 0 1 T 1/161 (2006.01)		G 0 1 T 1/161		E

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

(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, セント ヴィンセンツ ホスピタル内

(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, セント ヴィンセンツ ホスピタル内

Fターム(参考) 2G088 EE02

4B024 AA01 BA44 BA61 CA04 DA06 EA03 GA11 HA01

4B064 AG26 CC30 CE09 CE10 DA01

4C085 AA14 AA16 AA19 AA34 CC02 CC22 DD32 DD36 DD62 DD63

EE01 GG01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA75 EA22 EA28 FA20

专利名称(译)	修饰的可变结构域分子及其制备和使用方法		
公开(公告)号	JP2013508308A	公开(公告)日	2013-03-07
申请号	JP2012534501	申请日	2010-10-25
申请(专利权)人(译)	医学研究的研究所格文		
[标]发明人	クリストダニエル ダッジオンキブ		
发明人	クリスト,ダニエル ダッジオン,キブ		
IPC分类号	C07K16/22 C40B40/10 C12P21/00 C12N15/09 A61K39/395 G01N33/53 G01T1/161		
CPC分类号	C07K16/22 A61K47/6845 A61K49/0002 C07K16/241 C07K16/244 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/569 C07K2317/622 C07K2317/626 C07K2317/92 C07K2317 /94 C07K2319/00 G01N33/6893 G01N2800/52		
FI分类号	C07K16/22.ZNA C40B40/10 C12P21/00.A C12N15/00.A A61K39/395.V G01N33/53.D G01T1/161.E		
F-TERM分类号	2G088/EE02 4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024 /GA11 4B024/HA01 4B064/AG26 4B064/CC30 4B064/CE09 4B064/CE10 4B064/DA01 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA19 4C085/AA34 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/DD32 4C085/DD36 4C085 /DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/FA20		
代理人(译)	小林 浩 鈴木康仁		
优先权	61/254460 2009-10-23 US 2010904025 2010-09-07 AU		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开提供了抗体重链可变区 (V<H提供了分离的蛋白质，其中蛋白质能够特异性结合抗原。

DP47-CDR1変異体の凝集抵抗性

V _H	T28R	S31D	Y32E	A33D	S35G	SYA31- 33DED	5X.mnt
保持されたプロテインAへの結合	2%	31%	41%	26%	4%	67%	75%