(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2010-528588
(P2010-528588A)
(43)公表日　平成22年8月26日(2010.8.26)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B024
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	ZNA	4B064
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00		4B065
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02		4C084
A61P 25/00	(2006.01)	A61P	25/00		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 135 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-508431 (P2010-508431)
(86)(22)出願日　平成20年5月14日 (2008.5.14)
(85)翻訳文提出日　平成22年1月12日 (2010.1.12)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/006260
(87)国際公開番号　WO2008/143954
(87)国際公開日　平成20年11月27日 (2008.11.27)
(31)優先権主張番号　60/930,227
(32)優先日　平成19年5月14日 (2007.5.14)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　592221528
バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４２，ケンブリッジ，ケンブリッジ　センター　１４
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】一本鎖ＦＣ（ＳｃＦｃ）領域、それを含む結合ポリペプチド、およびそれに関連する方法

(57)【要約】
本発明は、とりわけ、遺伝的に融合したＦｃ部分を含むＦｃ領域を含むポリペプチドを特徴とする。さらに、本発明は、例えば、本発明の結合ポリペプチドを対象に投与することによって、対象における疾病または疾患を治療または予防するための方法を提供する。ある実施形態においては、ｓｃＦｃの成分Ｆｃ部分は、Ｆｃ部分の間に挿入されるポリペプチドリンカー（例えば、Ｆｃ接続ペプチド）を介して直列に遺伝的に融合される。そのため、本発明のｓｃＦｃポリペプチドは、１つの隣接ヌクレオチド配列の一部として単一のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）においてコードされる単一の隣接アミノ酸配列によって形成されるｓｃＦｃ領域を含む。

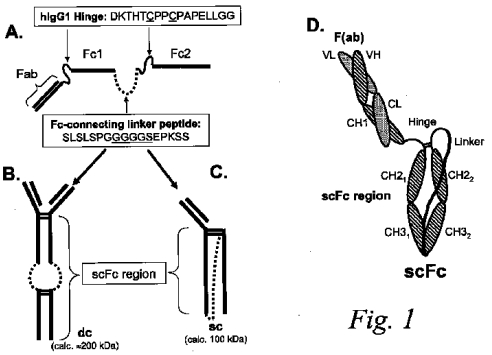


Fig. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ｉ）第１の結合部位、および（ｉｉ）単一の隣接遺伝子配列においてコードされる第１のＦｃ領域を含む結合ポリペプチドであって、
ａ．該Ｆｃ領域は、少なくとも２つのＦｃ部分を含み、
ｂ．該Ｆｃ領域は、該Ｆｃ部分の間に介入するポリペプチドリンカー配列を介して融合され、
ｃ．該Ｆｃ領域は、少なくとも１つのエフェクタ機能を該結合ポリペプチドに与える、
結合ポリペプチド。
【請求項２】
前記Ｆｃ領域は、ＦｃＲｎ結合部分、ＦｃγＲ結合部分、補体結合部分、プロテインＧ結合部分、およびプロテインＡ結合部分から成る群より選択されるドメインを含む、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項３】
前記Ｆｃ領域は、ヘテロマーＦｃ領域である、請求項１または２に記載の結合ポリペプチド。
【請求項４】
前記ヘテロマーＦｃ領域は、ヘミグリコシル化される、請求項３に記載の結合ポリペプチド。
【請求項５】
前記Ｆｃ領域は、ホモマーＦｃ領域である、請求項１または２に記載の結合ポリペプチド。
【請求項６】
前記Ｆｃ領域は、完全にグリコシル化される、請求項１または２に記載の結合ポリペプチド。
【請求項７】
前記Ｆｃ領域は、グリコシル化されていない、請求項１または２に記載の結合ポリペプチド。
【請求項８】
前記Ｆｃ領域は、フコシル化されていない、請求項１または２に記載の結合ポリペプチド。
【請求項９】
前記Ｆｃ領域は、キメラＦｃ領域である、請求項１～８のいずれかに記載の結合ポリペプチド。
【請求項１０】
前記Ｆｃ領域は、ＩｇＧ２分子からのＣＨ２ドメイン、およびＩｇＧ４分子からのＣＨ３ドメインを含む、請求項９に記載の結合ポリペプチド。
【請求項１１】
前記Ｆｃ領域は、ＩｇＧ２分子からのＣＨ２部分、およびＩｇＧ４分子からのＣＨ２部分を含む、請求項９に記載の結合ポリペプチド。
【請求項１２】
修飾ヒンジ領域を含む、請求項９に記載の結合ポリペプチド。
【請求項１３】
ＩｇＧ４分子からの中部ヒンジ領域、ならびにＩｇＧ１分子からの上部および下部ヒンジ領域を含む、請求項９に記載の結合ポリペプチド。
【請求項１４】
前記ヒンジ領域の１つまたはそれ以上のシステイン残基は、セリン残基で置換される、請求項９に記載の結合ポリペプチド。
【請求項１５】
前記Ｆｃ領域は、２つ以上のＦｃ部分を含む、請求項１に記載の結合ポリペプチド。

【請求項１６】
前記Ｆｃ領域は、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、およびヒンジドメインから成る群より選択される部分を欠くＦｃドメインを含む、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項１７】
前記Ｆｃ部分のうちの少なくとも１つは、少なくとも１つのアミノ酸突然変異を含む、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項１８】
前記Ｆｃ部分のうちの２つ以上は、アミノ酸突然変異を含む、請求項１７に記載の結合ポリペプチド。
【請求項１９】
前記突然変異は、ＥＵ付番指標による、２３４、２３６、２３９、２４１、２４６～２５２、２５４～２５６、２７５、２７７～２８８、２９４、２９６～２９８、３０１、３０３～３０７、３０９、３１０、３１２、３１３、３１５、３２８、３３２、３３４、３３８、３４２、３４３、３５０、３５５、３５９、３６０、３６１、３７４、３７６、３７８、３８１～３８５、３８７、３８９、４１３、４１５、４１８、４２２、４２６、４２８、４３０～４３２、４３４、４３５、４３８、および４４１～４４６から成る群に示されるＦｃアミノ酸位置に対応する１つまたはそれ以上の位置にある、請求項１７または１８に記載の結合ポリペプチド。
【請求項２０】
前記突然変異は、ＣＨ２ドメインに位置する、請求項１７または１８に記載の結合ポリペプチド。
【請求項２１】
前記突然変異は、ＣＨ３ドメインに位置する、請求項１７または１８に記載の結合ポリペプチド。
【請求項２２】
前記ＣＨ３ドメインは、ＥＵ付番指標による、３５０、３５５、３６１、３８９、４１５、４４１、４４３、および４４６ｂから成る群より選択されるＦｃアミノ酸位置に対応する１つまたはそれ以上のアミノ酸位置に操作システイン、またはそのチオール含有類似体を含む、請求項２１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項２３】
ＥＵ位置２９７に低いグリコシル化を有する、請求項１７に記載の結合ポリペプチド。
【請求項２４】
ＥＵ位置２９７でフコシル化されていない、請求項２３に記載の結合ポリペプチド。
【請求項２５】
前記ポリペプチドリンカーは、約５０～約５００のアミノ酸の長さを有する、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項２６】
前記ポリペプチドリンカーは、約５０～約２００のアミノ酸の長さを有する、請求項２５に記載の結合ポリペプチド。
【請求項２７】
前記ポリペプチドリンカーは、約１～約５０のアミノ酸の長さを有する、請求項２６に記載の結合ポリペプチド。
【請求項２８】
前記ポリペプチドリンカーは、約１０～約２０のアミノ酸の長さを有する、請求項２７に記載の結合ポリペプチド。
【請求項２９】
前記ポリペプチドリンカーは、ヒンジ領域、またはその部分を含む、請求項２８に記載の結合ポリペプチド。
【請求項３０】
前記ヒンジ領域は、キメラヒンジ領域である、請求項２９に記載の結合ポリペプチド。

【請求項３１】
前記ポリペプチドリンカーは、ｇｌｙ／ｓｅｒペプチドを含む、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項３２】
前記ｇｌｙ／ｓｅｒペプチドは、式（$Ｇｌｙ_4Ｓｅｒ$）ｎのものであり、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、および１０から成る群より選択される正の整数である、請求項３１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項３３】
前記（$Ｇｌｙ_4Ｓｅｒ$）ｎリンカーは、（$Ｇｌｙ_4Ｓｅｒ$）３である、請求項３１に記載のいずれか１つの結合ポリペプチド。
【請求項３４】
前記第１の結合部位は、前記Ｆｃ領域のＮ末端と遺伝的に融合される、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項３５】
前記第１の結合部位は、前記Ｆｃ領域のＣ末端と遺伝的に融合される、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項３６】
前記第１の結合部位は、前記Ｆｃ領域のＦｃ部分に重ねられる、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項３７】
前記ポリペプチドリンカーは、前記第１の結合部位を含む、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項３８】
前記結合部位は、前記Ｆｃ領域の１つまたはそれ以上のＦｃ部分に組み込まれる、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項３９】
第２の結合部位をさらに含む、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項４０】
前記第２の結合部位は、前記Ｆｃ領域の前記Ｎ末端に機能的に連結される、請求項３９に記載の結合ポリペプチド。
【請求項４１】
前記第２の結合部位は、前記Ｆｃ領域の前記Ｃ末端に機能的に連結される、請求項３９に記載の結合ポリペプチド。
【請求項４２】
少なくとも３つの結合部位を含む、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項４３】
少なくとも４つの結合部位を含む、請求項４２に記載の結合ポリペプチド。
【請求項４４】
前記ポリペプチドリンカーは、生体関連ペプチド、またはその部分を含む、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項４５】
前記生体関連ポリペプチドは、抗拒絶反応性または抗炎症性ペプチドである、請求項４４に記載の結合ポリペプチド。
【請求項４６】
前記生体関連ポリペプチドは、サイトカイン阻害性ペプチド、細胞接着阻害性ペプチド、トロンビン阻害性ペプチド、および血小板阻害性ペプチドから成る群より選択される、請求項４４に記載の結合ポリペプチド。
【請求項４７】
前記サイトカイン阻害性ペプチドは、ＩＬ－１阻害性ペプチドである、請求項４６に記載の結合ポリペプチド。

【請求項４８】
少なくとも１つの結合部位は、抗原結合部位、受容体のリガンド結合部分、およびリガンドの受容体結合部分から成る群より選択される、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項４９】
前記結合部位は、抗体に由来する抗原結合部位である、請求項４８のいずれかに記載の結合ポリペプチド。
【請求項５０】
前記抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、およびヒト化抗体から成る群より選択される、請求項４９に記載の結合ポリペプチド。
【請求項５１】
前記結合部位は、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、ナノボディ、カメリド、およびＤａｂから成る群より選択される修飾抗体に由来する、請求項５０に記載の結合ポリペプチド。
【請求項５２】
前記結合部位は、非免疫グロブリン結合分子に由来する、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項５３】
前記非免疫グロブリン結合分子は、アドネクチン、アフィボディ、ＤＡＲＰｉｎ、およびアンチカリンから成る群より選択される、請求項５２に記載の結合ポリペプチド。
【請求項５４】
少なくとも１つの結合部位は、リツキシマブ、ダクリズマブ、ガリキシマブ、ＣＢ６、Ｌｉ３３、５ｃ８、ＣＢＥ１１、ＢＤＡ８、１４Ａ２、Ｂ３Ｆ６、２Ｂ８、Ｌｙｍ１、Ｌｙｍ２、ＬＬ２、Ｈｅｒ２、５Ｅ８、Ｂ１、ＭＢ１、ＢＨ３、Ｂ４、Ｂ７２．３、ＣＣ４９、および５Ｅ１０からなる群より選択される抗体からの６つのＣＤＲ、可変重および可変軽領域、または抗原結合部位を含む、請求項１～５３のいずれかに記載の結合ポリペプチド。
【請求項５５】
前記受容体のリガンド結合部分は、免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーの受容体、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーの受容体、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーの受容体、チロシンキナーゼ（ＴＫ）受容体スーパーファミリーの受容体、リガンド開口型（ＬＧ）スーパーファミリーの受容体、ケモカイン受容体スーパーファミリーの受容体、ＩＬ－１／トール様受容体（ＴＬＲ）スーパーファミリー、グリアのグリア由来の神経栄養因子（ＧＤＮＦ）受容体ファミリーの受容体、およびサイトカイン受容体スーパーファミリーから成る群より選択される受容体に由来する、請求項４８に記載の結合ポリペプチド。
【請求項５６】
前記ＴＮＦ受容体スーパーファミリーの受容体は、ＬＴβＲである、請求項５５に記載の結合ポリペプチド。
【請求項５７】
前記ＴＮＦ受容体スーパーファミリーの受容体は、ＴＮＦαに結合する、請求項５５に記載の結合ポリペプチド。
【請求項５８】
前記ＧＤＮＦ受容体ファミリーの受容体は、ＧＦＲα３である、請求項５５に記載の結合ポリペプチド。
【請求項５９】
前記リガンドの受容体結合部分は、阻害性リガンドに由来する、請求項４５に記載の結合ポリペプチド。
【請求項６０】
前記リガンドの受容体結合部分は、活性化リガンドに由来する、請求項４８に記載の結合ポリペプチド。

【請求項６１】
前記リガンドは、免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーの受容体、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーの受容体、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーの受容体、チロシンキナーゼ（ＴＫ）受容体スーパーファミリーの受容体、リガンド開口型（ＬＧ）スーパーファミリーの受容体、ケモカイン受容体スーパーファミリーの受容体、ＩＬ－１／トール様受容体（ＴＬＲ）スーパーファミリー、およびサイトカイン受容体スーパーファミリーから成る群より選択される受容体に結合する、請求項５９または６０に記載の結合ポリペプチド。
【請求項６２】
前記サイトカイン受容体スーパーファミリーの受容体に結合するリガンドは、β－インターフェロンである、請求項６１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項６３】
前記第１および第２の結合部位は、異なる結合特異性を有する、請求項２８に記載の結合ポリペプチド。
【請求項６４】
前記第１および第２の結合部位は、同じ結合特異性を有する、請求項２８に記載の結合ポリペプチド。
【請求項６５】
結合分子は、２つ以上の遺伝的に融合したＦｃ領域を含む、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項６６】
少なくとも１つの機能的な部分に結合体化される、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項６７】
前記機能的な部分は、遮断部分、検出可能な部分、診断部分、および治療部分から成る群より選択される、請求項６６に記載の結合ポリペプチド。
【請求項６８】
前記遮断部分は、システイン付加物、混合ジスルフィド、ポリエチレングリコール、およびポリエチレングリコールマレイミドから成る群より選択される、請求項６７に記載の結合ポリペプチド。
【請求項６９】
前記検出可能な部分は、蛍光部分および同位体部分から成る群より選択される、請求項６７に記載の結合ポリペプチド。
【請求項７０】
前記診断部分は、疾病または疾患の存在を明らかにすることが可能である、請求項６７に記載の結合ポリペプチド。
【請求項７１】
前記治療部分は、抗炎症剤、抗癌剤、抗神経変性剤、および抗感染症剤から成る群より選択される、請求項６７に記載の結合ポリペプチド。
【請求項７２】
前記機能的な部分は、前記ポリペプチドリンカーに結合体化される、請求項６６に記載のいずれか１つの結合ポリペプチド。
【請求項７３】
前記機能的な部分は、ジスルフィド結合を介して結合体化される、請求項６６に記載のいずれか１つの結合ポリペプチド。
【請求項７４】
前記機能的な部分は、ヘテロ二官能性リンカーを介して結合体化される、請求項６６に記載のいずれか１つの結合ポリペプチド。
【請求項７５】
第２のポリペプチドをさらに含み、多量体である、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項７６】

前記第２のポリペプチドは、（ｉ）少なくとも第２の結合部位、および（ｉｉ）少なくとも第２の遺伝的に融合したＦｃ領域を含む、結合ポリペプチドであって、該第２の遺伝的に融合したＦｃ領域は、少なくとも２つのＦｃ部分を含み、少なくとも１つのエフェクタ機能を該結合ポリペプチドに与える、請求項７５に記載の結合ポリペプチド。
【請求項７７】
二量体の結合ポリペプチドである、請求項７６に記載の結合ポリペプチド。
【請求項７８】
前記第１または第２の結合部位は、免疫細胞または腫瘍細胞に存在する抗原に結合する、請求項７７に記載の結合ポリペプチド。
【請求項７９】
少なくとも１つのＦｃ部分は、ＩｇＧイソタイプのものである、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項８０】
前記ＩｇＧイソタイプは、ＩｇＧ１サブクラスのものである、請求項７９に記載の結合ポリペプチド。
【請求項８１】
少なくとも１つのＦｃ部分は、ヒト抗体に由来する、請求項１に記載の結合ポリペプチド。
【請求項８２】
請求項１に記載のポリペプチドを含む、医薬組成物。
【請求項８３】
請求項１に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。
【請求項８４】
発現ベクターにある、請求項８３に記載の核酸分子。
【請求項８５】
請求項８４に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。
【請求項８６】
結合ポリペプチドを生成するための方法であって、該結合ポリペプチドが生成されるように、培養物中で請求項８５に記載の宿主細胞を培養するステップを含む、方法。
【請求項８７】
対象における疾病または疾患を治療または予防するための方法であって、請求項８６に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。
【請求項８８】
前記疾病または疾患は、神経系疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、および腫瘍性疾患から成る群より選択される、請求項８７に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、２００７年５月１４日出願の米国暫定出願第６０／９３０，２２７号、代理人整理番号ＢＧＮ－Ａ２４７－１、名称「ＢＩＮＤＩＮＧ　ＰＯＬＹＰＥＰＴＩＤＥＳ　ＣＯＮＴＡＩＮＩＮＧ　ＧＥＮＥＴＩＣＡＬＬＹ－ＦＵＳＥＤ　ＦＣ　ＲＥＧＩＯＮＳ　ＡＮＤ　ＭＥＴＨＯＤＳ　ＲＥＬＡＴＥＤ　ＴＨＥＲＥＴＯ（遺伝的に融合したＦＣ領域を含有する結合ポリペプチド、およびそれに関連する方法）」に対する優先権を主張するものであり、この内容は、参照することにより、その全体として本明細書に組み込まれる。さらに、本明細書を通して引用されるいかなる特許、特許出願、および参考文献の内容も、参照することにより、その全体として本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
免疫グロブリンのＦｃ領域は、２つのカテゴリに区分されているエフェクタ機能を媒介

する。第１は、抗原結合とは無関係に生じる機能であり、これらの機能は、循環の持続性およびトランスサイトーシスによって細胞の障壁を横切って移動する能力を与える（非特許文献１、Ｃａｐｏｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　１９８９参照）。免疫グロブリンのＩｇＧサブクラスの循環半減期は、新生児Ｆｃ受容体またはＦｃＲｎに対するＦｃ領域の親和性によって調節される（非特許文献２、非特許文献３、非特許文献４を参照）。エフェクタ機能の第２の一般的カテゴリは、免疫グロブリンが抗原に結合した後に機能するものを含む。ＩｇＧの場合、これらの機能は、補体カスケードまたはＦｃガンマ受容体（ＦｃγＲ）担持細胞の関与を含む。Ｆｃ領域のＦｃγＲへの結合は、ある種の免疫効果、例えば、免疫複合体のエンドサイトーシス、免疫グロブリンで被覆された粒子または微生物の貪食および破壊（抗体依存性食作用、すなわちＡＤＣＰとも称される）、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による免疫グロブリンで被覆された標的細胞の溶解（抗体依存性細胞媒介細胞毒性、すなわちＡＤＣＣと称される）、炎症性メディエータの放出、免疫系細胞活性化の調節、および免疫グロブリン産生の調節を引き起こす。

【０００３】

ある操作された結合ポリペプチド（例えば、抗体変異体（例えば、ｓｃＦｖ）または抗体断片（例えば、Ｆａｂ断片））は、それらの分子サイズが小さいこと、および／または一価性のために有利である一方、機能的なＦｃ領域の非存在に起因するいくつかの欠点がある。例えば、Ｆａｂ断片は、ＦｃＲｎ結合に必要なＦｃ領域を欠き、それらのサイズが小さいために腎臓によって血液から迅速にろ過されるため、体内における半減期が短い。一価のＦｃ含有結合ポリペプチドを生成することは可能であるが、現在の方法は、二量体Ｆｃ領域の２つの重鎖部分の共発現、または結合部位（例えば、Ｆａｂドメイン）との二量体Ｆｃ領域の化学的結合体化のいずれかを必要とする。これらの方法は、共発現が、凝集体および不活性タンパク質に加えて、出発物質のあらゆる可能な対合を示す複合混合物である生成物を産生するため、非効率的である。結果として、所望の機能的な結合ポリペプチドの収率は低い。さらに、従来技術方法を使用して、ヘテロマーＦｃ領域（すなわち、二量体Ｆｃ領域の重鎖部分が、配列において異なる）を有する結合分子を効率的に産生することは不可能であった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００４】

【非特許文献１】ＷａｒｄおよびＧｈｅｔｉｅ，Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（１９９５）２：７７－９４

【非特許文献２】Ｇｈｅｔｉｅら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（１９９７）１５：６３７－６４０

【非特許文献３】Ｋｉｍら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（１９９４）２４：５４２－５４８

【非特許文献４】Ｄａｌｌ’Ａｃｑｕａら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（２００２）１６９：５１７１－５１８０

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

したがって、所望のＦｃエフェクタ機能を保持しながら、効率的かつ確実に産生することができるＦｃ含有結合ポリペプチドの必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

本発明は、とりわけ、１つまたはそれ以上の遺伝的に融合したＦｃ領域を含むＦｃポリペプチド（例えば、Ｆｃ結合ポリペプチド）を特徴とする。特に、本発明のポリペプチドは、一本鎖Ｆｃ領域（「ｓｃＦｃ」）を含み、成分Ｆｃ部分は、それらが機能的な二量体Ｆｃ領域を形成するように、単一のポリペプチド鎖で遺伝的に融合される。ある実施形態においては、ｓｃＦｃの成分Ｆｃ部分は、Ｆｃ部分の間に挿入されるポリペプチドリンカ

ー（例えば、Ｆｃ接続ペプチド）を介して直列に遺伝的に融合される。そのため、本発明のｓｃＦｃポリペプチドは、１つの隣接ヌクレオチド配列の一部として単一のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）においてコードされる単一の隣接アミノ酸配列によって形成されるｓｃＦｃ領域を含む。対照的に、従来のＦｃポリペプチド（例えば、従来の免疫グロブリン）のＦｃ領域は、翻訳後に二量化するが、直列に共有結合されない別々のポリペプチド鎖における、別々の（すなわち、結合していない）Ｆｃドメインまたは部分を含む偏性ホモ二量体である。

【０００７】

本発明の一本鎖Ｆｃ（ｓｃＦｃ）ポリペプチドは、従来のＦｃポリペプチドに優るいくつかの利点を提供する。ある態様においては、ｓｃＦｃポリペプチドの遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）は、結合ポリペプチドの結合部位（例えば、抗原結合断片（例えば、Ｆａｂ）またはｓｃＦｖ分子への）に機能的に連結され、ｓｃＦｃ結合ポリペプチドを形成することができ、それによって、結合ポリペプチドにエフェクタ機能を与えるか、または既存のエフェクタ機能を変化させる。本発明のｓｃＦｃ結合ポリペプチドは、単量体または多量体（例えば、二量体）であり得る。本発明の新規のｓｃＦｃ結合ポリペプチドは、一価結合ポリペプチドの利点（例えば、不適切な細胞シグナリングおよび／またはエンドサイトーシスにつながる可能性がある細胞表面受容体架橋を欠くこと）を、少なくとも一実施形態においては、Ｆｃ媒介のエフェクタ機能の利点（例えば、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、およびＦｃγＲＩＩＩ結合および補体活性化を与える、ＦｃＲｎによる結合による半減期の増加）、および一実施形態においては、そのようなエフェクタ機能を微調整することが可能である利点と組み合わせる。さらに、本発明のｓｃＦｃ結合ポリペプチドは、高収率製造のために容易に拡大される高度に均質な調製物において容易に発現することができる。例えば、１つまたはそれ以上の標的結合部位（例えば、１つまたはそれ以上のｓｃＦｖまたはＦａｂ断片等の抗原結合部位）を含む結合ポリペプチドは、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）のＮまたはＣ末端の片方または両方に連結され得、そして単一の遺伝的構造体にコードされ得、それによって、２つ以上の鎖の共発現から生じる分子の複合混合物を避ける。

【０００８】

本発明のｓｃＦｃポリペプチドは、高度に均質な調製物においてヘテロマーｓｃＦｃ領域を有する分子を産生する機会も提供する。現在、従来のＦｃ領域を構成する２つのＦｃ部分が互いに異なる、例えば、２つのＦｃ部分の一方のみがアミノ酸修飾（例えば、単一ＣＨ２および／またはＣＨ３ドメイン内における単一の点突然変異）を含む、ヘテロマーＦｃ含有分子を作製および精製することは非常に困難である。本出願の教示を踏まえると、ｓｃＦｃ領域のＦｃ部分の全てよりも少数のものが突然変異を含むヘテロマーｓｃＦｃ結合ポリペプチドは、ここで、単一の遺伝的構造体から容易に得ることができる。そのような分子は、製造のために容易に拡大される。

【０００９】

一態様においては、本発明は、（ｉ）第１の標的結合部位、および（ｉｉ）少なくとも２つの遺伝的に融合したＦｃ部分を含む第１の一本鎖Ｆｃ（ｓｃＦｃ）領域を含むｓｃＦｃ結合ポリペプチドを対象とし、ｓｃＦｃ領域のＦｃ部分は、該Ｆｃ部分の間に挿入されるポリペプチドリンカー配列を介して遺伝的に融合され、ｓｃＦｃ領域は、少なくとも１つのエフェクタ機能を該結合ポリペプチドに与える。

【００１０】

一実施形態においては、本発明は、ｓｃＦｃ領域を含むｓｃＦｃ結合ポリペプチドをさらに対象とし、該ｓｃＦｃ領域は、ＦｃＲｎ結合部分、ＦｃγＲ結合部分、および補体結合部分から成る群より選択されるドメイン（例えば、エフェクタドメイン）を含む。別の実施形態においては、ドメインは、プロテインＡまたはプロテインＧ結合部分である。

【００１１】

ある実施形態においては、該ｓｃＦｃ領域は、ヘテロマーｓｃＦｃ領域である。一実施形態においては、該ヘテロマーＦｃ領域は、ヘミグリコシル化される。

【００１２】
一実施形態においては、ｓｃＦｃ領域は、ヘテロマーｓｃＦｃ領域である。別の実施形態においては、ｓｃＦｃ領域は、ホモマーｓｃＦｃ領域である。
【００１３】
一実施形態においては、ｓｃＦｃ領域は、完全にグリコシル化される。別の実施形態においては、ｓｃＦｃ領域は、グリコシル化されていない。さらに別の実施形態においては、該ｓｃＦｃ領域は、フコシル化されていない。
【００１４】
ある実施形態においては、該ポリペプチドのｓｃＦｃ領域は、キメラＦｃ領域である。例えば、ｓｃＦｃ領域は、ＩｇＧ２分子からのＣＨ２ドメイン、およびＩｇＧ４分子からのＣＨ３ドメインを含むことができる。他の実施形態においては、該ｓｃＦｃ領域は、ＩｇＧ２分子からのＣＨ２部分、およびＩｇＧ４分子からのＣＨ２部分を含むことができる。さらに他の実施形態においては、該ｓｃＦｃは、修飾またはキメラヒンジ領域を含むことができ、例えば、キメラヒンジは、ＩｇＧ４分子からの中部ヒンジ領域、ならびにＩｇＧ１分子からの上部および下部ヒンジ領域を含む。他の実施形態においては、ヒンジ領域の１つまたはそれ以上のシステイン残基は、セリン残基で置換される。
【００１５】
一実施形態においては、ｓｃＦｃ領域は、２つ以上のＦｃドメインまたは部分を含む。
【００１６】
一実施形態においては、該Ｆｃ部分の１つまたはそれ以上は、ＣＨ２ドメイン欠失Ｆｃ部分、ＣＨ３ドメイン欠失Ｆｃ部分、およびヒンジ欠失Ｆｃ部分から成る群より選択されるドメイン欠失Ｆｃ部分である。
【００１７】
一実施形態においては、該Ｆｃ部分の少なくとも１つは、該Ｆｃ部分内において、ＥＵ慣例（ＥＵ　ｃｏｎｖｅｎｔｉｏｎ）アミノ酸位置に、少なくとも１つのＦｃ突然変異を含む。
【００１８】
別の実施形態においては、該Ｆｃ部分の２つ以上は、該Ｆｃ部分内においてＥＵ慣例アミノ酸位置に、１つまたはそれ以上のＦｃ突然変異を含む。
【００１９】
一実施形態においては、２３４、２３６、２３９、２４１、２４６～２５２、２５４～２５６、２７５、２７７～２８８、２９４、２９６～２９８、３０１、３０３～３０７、３０９、３１０、３１２、３１３、３１５、３２８、３３２、３３４、３３８、３４２、３４３、３５０、３５５、３５９、３６０、３６１、３７４、３７６、３７８、３８１～３８５、３８７、３８９、４１３、４１５、４１８、４２２、４２６、４２８、４３０～４３２、４３４、４３５、４３８、および４４１～４４６（ＥＵ付番慣例）から成る群より選択される少なくとも１つのアミノ酸位置は、結合分子の少なくとも１つのＦｃ部分において突然変異される。
【００２０】
一実施形態においては、少なくとも１つのＦｃ突然変異は、結合分子の少なくとも１つのＦｃ部分のヒンジドメインに位置する。別の実施形態においては、少なくとも１つのＦｃ突然変異は、ＣＨ２ドメインに位置する。別の実施形態においては、少なくとも１つのＦｃ突然変異は、ＣＨ３ドメインに位置する。
【００２１】
一実施形態においては、ＣＨ３ドメインは、結合分子の少なくとも１つのＦｃ部分の、ＥＵ付番指標による、３５０、３５５、３６１、３８９、４１５、４４１、４４３、および４４６ｂから成る群より独立して選択される１つまたはそれ以上のアミノ酸位置に、操作システイン、またはそのチオール含有類似体を含む。
【００２２】
一実施形態においては、本発明の結合分子は、少なくとも１つのＦｃ部分のＥＵ位置２

９７に、グリコシル化の低下を有する。別の実施形態においては、結合ポリペプチドは、ＥＵ位置２９７でフコシル化されていない。

【００２３】

一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、約５０～約５００のアミノ酸の長さを有する。別の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、約５０～約２００のアミノ酸の長さを有する。別の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、約１～約５０のアミノ酸の長さを有する。さらに別の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、約１０～約２０のアミノ酸の長さを有する。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ヒンジ領域、またはその一部を含む。一実施形態においては、ヒンジ領域は、キメラヒンジ領域である。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ｇｌｙ／ｓｅｒペプチドを含む。一実施形態においては、ｇｌｙ／ｓｅｒペプチドは、式（Gly_4Ser）ｎのものであり、ｎは、１、２、３、４、５、６、７、８、９および１０から成る群より選択される正の整数である。

【００２４】

一実施形態においては、（Gly_4Ser）ｎのｓｃＦｃリンカーは、（Gly_4Ser）４である。別の実施形態においては、（Gly_4Ser）ｎのｓｃＦｃリンカーは、（Gly_4Ser）３である。

【００２５】

一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、前記第１の標的結合部位を含む。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、生体関連ペプチド、またはその一部を含む。一実施形態においては、生体関連ポリペプチドは、抗拒絶反応性（ａｎｔｉ－ｒｅｊｅｃｔｉｏｎ）または抗炎症性ペプチドである。別の実施形態においては、生体関連ポリペプチドは、サイトカイン阻害性ペプチド、細胞接着阻害性ペプチド、トロンビン阻害性ペプチド、および血小板阻害性ペプチドから成る群より選択される。別の実施形態においては、サイトカイン阻害性ペプチドは、ＩＬ－１阻害性ペプチドである。

【００２６】

一実施形態においては、第１の結合部位は、ｓｃＦｃ領域のＮ末端と遺伝的に融合される。別の実施形態においては、第１の結合部位は、ｓｃＦｃ領域のＣ末端と遺伝的に融合される。

【００２７】

一実施形態においては、本発明の結合分子は、第２の標的結合部位をさらに含む。一実施形態においては、第２の標的結合部位は、ｓｃＦｃ領域のＮ末端と機能的に結合する。別の実施形態においては、第２の標的結合部位は、ｓｃＦｃ領域のＣ末端と機能的に結合する。別の実施形態においては、結合部位は、ｓｃＦｃ領域のＦｃ部分（例えば、１つ、２つ、またはそれ以上のＣＨ２ドメインおよび／または１つ、２つ、またはそれ以上のＣＨ３ドメイン）に重ねられる（ｖｅｎｅｅｒｅｄ）。

【００２８】

一実施形態においては、少なくとも１つの標的結合部位は、抗原結合部位、受容体のリガンド結合部分、およびリガンドの受容体結合部分から成る群より選択される。

【００２９】

一実施形態においては、抗原結合部位は、抗体に由来する。一実施形態においては、抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、およびヒト化抗体から成る群より選択される。別の実施形態においては、抗原結合部位は、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、ミニボディ（ｍｉｎｉｂｏｄｙ）、ダイアボディ（ｄｉａｂｏｄｙ）、トリアボディ（ｔｒｉａｂｏｄｙ）、ナノボディ（ｎａｎｏｂｏｄｙ）、カメリド（ｃａｍｅｌｉｄ）、およびＤａｂから成る群より選択される抗体変異体に由来する。別の実施形態においては、結合部位は、非免疫グロブリン結合分子に由来し、例えば、非免疫グロブリン結合分子は、アドネクチン（ａｄｎｅｃｔｉｎ）、アフィボディ（ａｆｆｉｂｏｄｙ）、ＤＡＲＰｉｎ、およびアンチカリン（ａｎｔｉｃａｌｉｎ）から成る群より選択される。

【００３０】

一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、リツキシマブ、ダクリズマブ（Ｄａｃｌｉｚｕｍａｂ）、ガリキシマブ（Ｇａｌｉｘｉｍａｂ）、ＣＢ６、Ｌｉ３３、５ｃ８、ＣＢＥ１１、ＢＤＡ８、１４Ａ２、Ｂ３Ｆ６、２Ｂ８、Ｌｙｍ１、Ｌｙｍ２、ＬＬ２、Ｈｅｒ２、５Ｅ８、Ｂ１、ＭＢ１、ＢＨ３、Ｂ４、Ｂ７２．３、ＣＣ４９、および５Ｅ１０から成る群より選択される抗体からの少なくとも１つのＣＤＲ、可変領域、または抗原結合部位を含む、少なくとも１つの結合部位を含む。

【００３１】

一実施形態においては、受容体のリガンド結合部分は、免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーの受容体、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーの受容体、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーの受容体、チロシンキナーゼ（ＴＫ）受容体スーパーファミリーの受容体、リガンド開口型（ｌｉｇａｎｄ　ｇａｔｅｄ）（ＬＧ）スーパーファミリーの受容体、ケモカイン受容体スーパーファミリーの受容体、ＩＬ－１／トール様受容体（ＴＬＲ）スーパーファミリー、グリアのグリア由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）受容体ファミリーの受容体、およびサイトカイン受容体スーパーファミリーから成る群より選択される受容体に由来する。一実施形態においては、前記ＴＮＦ受容体スーパーファミリーの受容体は、ＬＴβＲである。別の実施形態においては、前記ＴＮＦ受容体スーパーファミリーの受容体は、ＴＮＦαに結合する。さらに別の実施形態においては、前記ＧＤＮＦ受容体ファミリーの受容体は、ＧＦＲα３である。

【００３２】

一実施形態においては、リガンドの受容体結合部分は、阻害性リガンドに由来する。一実施形態においては、リガンドの受容体結合部分は、活性化リガンドに由来する。一実施形態においては、リガンドは、免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーの受容体、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーの受容体、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーの受容体、チロシンキナーゼ（ＴＫ）受容体スーパーファミリーの受容体、リガンド開口型（ＬＧ）スーパーファミリーの受容体、ケモカイン受容体スーパーファミリーの受容体、ＩＬ－１／トール様受容体（ＴＬＲ）スーパーファミリー、およびサイトカイン受容体スーパーファミリーから成る群より選択される受容体に結合する。一実施形態においては、サイトカイン受容体スーパーファミリーの受容体に結合するリガンドは、β－インターフェロンである。

【００３３】

一実施形態においては、第１および第２の標的結合部位は、異なる結合特異性を有する。別の実施形態においては、第１および第２の標的結合部位は、同じ結合特異性を有する。

【００３４】

一実施形態においては、本発明の結合分子は、２つ以上のｓｃＦｃ領域をさらに含む。

【００３５】

一実施形態においては、本発明の結合分子は、少なくとも１つの機能的な部分に結合体化する。

【００３６】

一実施形態においては、機能的な部分は、遮断部分、検出可能な部分、診断部分、および治療部分から成る群より選択される。

【００３７】

一実施形態においては、遮断部分は、システイン付加物、混合ジスルフィド、ポリエチレングリコール、およびポリエチレングリコールマレイミドから成る群より選択される。

【００３８】

一実施形態においては、検出可能な部分は、蛍光部分および同位体部分から成る群より選択される。

【００３９】

一実施形態においては、診断部分は、疾病または疾患の存在を明らかにすることが可能である。

【００４０】
一実施形態においては、治療部分は、抗炎症剤、抗癌剤、抗神経変性剤、および抗感染症剤から成る群より選択される。
【００４１】
一実施形態においては、機能的な部分は、該ポリペプチドリンカーに結合体化する。
【００４２】
一実施形態においては、機能的な部分は、ジスルフィド結合を介して結合体化する。別の実施形態においては、機能的な部分は、ヘテロ二官能性リンカーを介して結合体化する。
【００４３】
一実施形態においては、本発明は、本発明のｓｃＦｃ結合ポリペプチドおよび第２のポリペプチドを含む多量体の結合ポリペプチドを対象とする。
【００４４】
一実施形態においては、第２のポリペプチドは、結合ポリペプチド（例えば、ｓｃＦｃ結合ポリペプチド）である。一実施形態においては、第２の結合ポリペプチドは、（ｉ）少なくとも第１の抗原結合部分、および（ｉｉ）少なくとも第１のｓｃＦｃ領域を含み、該ｓｃＦｃ領域は少なくとも２つのＦｃ部分を含み、該ｓｃＦｃ領域は少なくとも１つのエフェクタ機能を該結合ポリペプチドに与える。一実施形態においては、第２の結合ポリペプチドのｓｃＦｃ領域は、ｓｃＦｃ領域の２つのＦｃ部分の間に挿入されるリンカーポリペプチド（例えば、Ｆｃ接続ポリペプチド）を含む。
【００４５】
一実施形態においては、多量体の結合ポリペプチドは、二量体の結合ポリペプチドである。
【００４６】
一実施形態においては、本発明の結合分子の第１または第２の結合部分は、免疫細胞または腫瘍細胞上に存在する抗原に結合する。
【００４７】
一実施形態においては、本発明の結合分子の少なくとも１つのＦｃ部分は、ＩｇＧイソタイプである。
【００４８】
一実施形態においては、ＩｇＧイソタイプは、ＩｇＧ１サブクラスのものである。
【００４９】
一実施形態においては、本発明の結合分子の少なくとも１つのＦｃ部分は、ヒト抗体に由来する。
【００５０】
一態様においては、本発明は、本発明の結合分子を含む医薬組成物に関連する。
【００５１】
別の態様においては、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子に関連する。
【００５２】
一実施形態においては、核酸分子は、発現ベクターである。
【００５３】
一実施形態においては、本発明は、本発明の核酸分子を含む発現ベクターを含む宿主細胞に関連する。
【００５４】
一実施形態においては、本発明は、宿主細胞を培養するステップを含む、結合ポリペプチドを産生するための方法に関連する。
【００５５】
別の態様においては、本発明は、本発明の結合分子を投与するステップを含む、対象における疾病または疾患を治療または予防するための方法に関連する。

【００５６】
一実施形態においては、疾病または疾患は、炎症性疾患、神経系疾患、自己免疫疾患、および腫瘍性疾患から成る群より選択される。
【図面の簡単な説明】
【００５７】
【図１】図１Ａ～Ｄは、本発明の例示的なｓｃＦｃ結合ポリペプチドの概略図である。結合ポリペプチドは、ポリペプチドリンカーを介して結合される２つのＦｃ部分から成る遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、一本鎖Ｆｃまたは「ｓｃＦｃ」領域）に（例えば、ヒトＩｇＧ１ヒンジによって）結合する抗原結合部位（例えば、Ｆａｂ領域）を含む（図１Ａ）。Ｆａｂ領域、ヒトＩｇＧ１ヒンジ、およびｓｃＦｃ領域は、単一の隣接遺伝子または遺伝的構造体においてすべてコードされる。構造体の発現は、ｓｃＦｃ結合ポリペプチドの二量体型（「ｄｃ」、図１Ｂ）または単量体（「ｓｃ」、図１Ｃ）型の両方をもたらすことができる。単量体ｓｃＦｃを含む重鎖または軽鎖のドメイン構成を１Ｄに示す。
【図２Ａ】図２Ａ～Ｄは、ｓｃＦｃ結合ポリペプチドの単量体（「ｓｃ」）および二量体型（「ｄｃ」）を分離するための二段階精製工程の結果を示す。精製工程は、親和性クロマトグラフィ、その後のゲルろ過クロマトグラフィを使用する。図２Ａは、低いｐＨでプロテインＡ親和性カラムから溶出した画分の吸光度プロファイルを示す。図２Ｂは、非還元条件下で、結合ポリペプチドの二量体（「ｄｃ」）および単量体（「ｓｃ」）型の両方を含有するそれらの溶出画分の対応するＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を示す。単量体および二量体型の両方は、プロテインＡカラムから、本質的に単一ピークとして溶出した。図２Ｃは、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００ゲルろ過カラムでの、プールされたプロテインＡ溶離剤のサイズ排除クロマトグラフィは、この混合物を２つの異なるピークに分解することを示す。図２Ｄは、ゲルろ過画分の対応する非還元ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を示す。ピークは、それぞれ、精製された単量体（「ｓｃ」）および二量体（「ｄｃ」）型を示す。
【図２Ｂ】図２Ａ～Ｄは、ｓｃＦｃ結合ポリペプチドの単量体（「ｓｃ」）および二量体型（「ｄｃ」）を分離するための二段階精製工程の結果を示す。精製工程は、親和性クロマトグラフィ、その後のゲルろ過クロマトグラフィを使用する。図２Ａは、低いｐＨでプロテインＡ親和性カラムから溶出した画分の吸光度プロファイルを示す。図２Ｂは、非還元条件下で、結合ポリペプチドの二量体（「ｄｃ」）および単量体（「ｓｃ」）型の両方を含有するそれらの溶出画分の対応するＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を示す。単量体および二量体型の両方は、プロテインＡカラムから、本質的に単一ピークとして溶出した。図２Ｃは、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００ゲルろ過カラムでの、プールされたプロテインＡ溶離剤のサイズ排除クロマトグラフィは、この混合物を２つの異なるピークに分解することを示す。図２Ｄは、ゲルろ過画分の対応する非還元ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を示す。ピークは、それぞれ、精製された単量体（「ｓｃ」）および二量体（「ｄｃ」）型を示す。
【図２Ｃ】図２Ａ～Ｄは、ｓｃＦｃ結合ポリペプチドの単量体（「ｓｃ」）および二量体型（「ｄｃ」）を分離するための二段階精製工程の結果を示す。精製工程は、親和性クロマトグラフィ、その後のゲルろ過クロマトグラフィを使用する。図２Ａは、低いｐＨでプロテインＡ親和性カラムから溶出した画分の吸光度プロファイルを示す。図２Ｂは、非還元条件下で、結合ポリペプチドの二量体（「ｄｃ」）および単量体（「ｓｃ」）型の両方を含有するそれらの溶出画分の対応するＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を示す。単量体および二量体型の両方は、プロテインＡカラムから、本質的に単一ピークとして溶出した。図２Ｃは、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００ゲルろ過カラムでの、プールされたプロテインＡ溶離剤のサイズ排除クロマトグラフィは、この混合物を２つの異なるピークに分解することを示す。図２Ｄは、ゲルろ過画分の対応する非還元ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を示す。ピークは、それぞれ、精製された単量体（「ｓｃ」）および二量体（「ｄｃ」）型を示す。
【図２Ｄ】図２Ａ～Ｄは、ｓｃＦｃ結合ポリペプチドの単量体（「ｓｃ」）および二量体型（「ｄｃ」）を分離するための二段階精製工程の結果を示す。精製工程は、親和性クロマトグラフィ、その後のゲルろ過クロマトグラフィを使用する。図２Ａは、低いｐＨでプロテインＡ親和性カラムから溶出した画分の吸光度プロファイルを示す。図２Ｂは、非還

元条件下で、結合ポリペプチドの二量体（「ｄｃ」）および単量体（「ｓｃ」）型の両方を含有するそれらの溶出画分の対応するＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を示す。単量体および二量体型の両方は、プロテインＡカラムから、本質的に単一ピークとして溶出した。図２Ｃは、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００ゲルろ過カラムでの、プールされたプロテインＡ溶離剤のサイズ排除クロマトグラフィは、この混合物を２つの異なるピークに分解することを示す。図２Ｄは、ゲルろ過画分の対応する非還元ＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を示す。ピークは、それぞれ、精製された単量体（「ｓｃ」）および二量体（「ｄｃ」）型を示す。

【図３】図３は、非還元（パネルＡ）および還元（パネルＢ）条件下、調製規模で、ｓｃＦｃ結合ポリペプチドの精製された二量体（「ｄｃ」）および単量体（「ｓｃ」）型のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。各パネルに関して、レーン１およびレーン２は、それぞれ、二量体型（「ｄｓ」、２０５ｋＤａ）および単量体（「ｓｃ」、１０５ｋＤａ）型を含有する。レーン３は、対照ヒトＩｇＧ１抗体（Ｈｕ５ｃ８、１５０ｋＤａ）を含有する。

【図４】図４Ａ～Ｂは、ホモ三量体ｓｈＣＤ４０Ｌ抗原に結合する単量体（ｓｃ）または二量体（ｄｃ）ｓｃＦｃポリペプチドの複合体の特性解析を示す。図４Ａは、それぞれの個々の成分の分子量および形成されたそれぞれの複合体を決定するために行われたＳＥＣ－ＬＳ実験に対して得られた、サイズ排除クロマトグラムの合成画を示す。図４Ｂは、ＳＥＣ－ＬＳによって得られた個々の質量、および複合体のそれぞれの計算された分子量に基づいて、単量体（ｉ）または二量体（ｉｉ）ｓｃＦｃポリペプチドのｓｈＣＤ４０Ｌへの結合後に形成される予測複合体の概略図をそれぞれ示す。

【図５】図５は、単量体（「ｓｃ」）ｓｃＦｃポリペプチドまたは従来のヒトＩｇＧ１抗ＣＤ４０ＬｍＡｂ、ｈｕ５Ｃ８のいずれかの存在下において形成される複合体を含むｓｈＣＤ４０Ｌの溶出プロファイルの合成画を示す。分子量は、オンラインＬＳによって測定され、複合体に対して得られた各ピークの上に示される。単量体ｓｃＦｃ（「ｓｃ」）、５Ｃ８ＩｇＧ１、およびｓｈＣＤ４０Ｌに対して測定された分子量は、それぞれ、１０１．５ｋＤａ、１５０ｋＤａ、および５１ｋＤａである。

【図６】図６は、プレート上に被覆された抗原ｓｈＣＤ４０Ｌに対する、単量体ｓｃＦｃ（ｓｃ）、二量体ｓｃＦｃ（ｄｃ）、および従来のヒトＩｇＧ１抗ＣＤ４０Ｌ抗体（Ｈｕ５Ｃ８）の見掛けの結合親和性を比較するＥＬＩＳＡ結合アッセイの結果を示す。一価ｓｃＦｃは、二価的にリガンドに結合する能力による有意な結合力の利点を有するＷＴｍＡｂの、約２分の１のＥＣ５０を有する。

【図７Ａ】図７Ａは、ｓｃＦｃ結合ポリペプチドの二量体（「ｄｃ」）および単量体（「ｓｃ」）型の見掛けのＦｃＲｎ結合親和性と、従来のＩｇＧ１抗体（Ｈｕ５Ｃ８）の見掛けのＦｃＲｎ結合親和性を比較するＥＬＩＳＡ結合アッセイの結果を示す。ＦｃＲｎ結合は、ヒトおよびラットＦｃＲｎ－Ｆｃ融合構造体の両方のビオチン化型を使用して測定された。このアッセイでは、各Ｆｃ含有構造体をプレートに被覆し、ビオチン化ラットまたはヒトＦｃＲｎ－Ｆｃ構造体の結合を、ストレプトアビジンＨＲＰで検出した。ヒトＦｃＲｎ－Ｆｃ（ラットＦｃＲｎ－Ｆｃではない）の単量体ｓｃＦｃポリペプチド（「ｓｃ」）への結合に対する測定されたｃ値は、Ｈｕ５Ｃ８または二量体（「ｄｃ」）ｓｃＦｃポリペプチドの値の３分の１～４分の１であった。

【図７Ｂ】図７Ｂは、ラットＦｃＲｎ－Ｆｃ（「ｒＦｃＲｎ－Ｆｃ」）、ヘミグリコシル化された（「Ｈｅｍｉｇｌｙ　ｓｃＦｃ」）、および完全にグリコシル化された（「完全ｇｌｙ　ｓｃＦｃ」）５ｃ８ｓｃＦｃ、およびラットＦｃＲｎ－ＦｃとｓｃＦｃの混合時に形成された複合体に対する分析ＳＥＣ溶出プロファイルを示す。光散乱解析を使用して、ピーク内に含まれる個々の成分、および複合体のそれぞれの分子量を測定した。得られた複合体に対して測定された分子量は、各ｓｃＦｃの両方のＦｃＲｎ結合部位が機能的であり、かつ示されるように２ＦｃＲｎＦｃ：２ｓｃＦｃを含む複合体を形成すると予測されることを示す。

【図８】図８は、リンカー領域によって直列に結合された２つのＦｃ部分を含むｓｃＦｃ結合ポリペプチドの例示的な単量体型（ｓｃ）の分子モデルを示す。モデルは、ヘテロマーｓｃＦｃ領域の例を提供する。ｓｃＦｃ結合ポリペプチドは、１つのＦｃ部分（「Ｆｃ

部分＃２」）における脱グリコシル化、および第２のＦｃ部分（「Ｆｃ部分＃１」）のＣＨ２ドメインにおけるグリコシル化（「糖＃１」）を引き起こす単一の部位特異的Ｆｃ突然変異を含有する。

【図９】図９は、３Å分解能に分解されたｓｃＦｃの結晶構造の正面および側面図の杆状図を示す。結晶は、Ｆ（ａｂ）ドメインの非存在下で、ｓｃＦｃ領域に対して得られた。ｓｃＦｃは、フコシル化ＩｇＧ１Ｆｃ（ｐｄｂコード　２ＤＴＱ、黒）に重ねられた灰色で示される。重ね合わせは、４１７のアルファ－炭素原子に対して、０．４８９Ａ　ｒｍｓｄの偏差を示し、それは本質的に同一の骨格構造である。唯一の有意差は、ｓｃＦｃが、部分的に規則正しい（ｐａｒｔｉａｌｌｙ　ｏｒｄｅｒｅｄ）ヒンジ領域、およびフコシル化ＩｇＧ１Ｆｃ構造に存在しないｓｃＦｃの半分上の付加的ガラクトースを有することである。ｓｃＦｃ構造は、３５％のＲｆｅｅおよび２５％のＲ因子で３．０Å分解能に分解された。

【図１０】二重特異性抗体機能をスクリーニングする際の、本発明のｓｃＦｃポリペプチドを使用することの利点を示す。ｓｃＦｃ領域は、結合ドメインの好ましくない異質性の組み合わせを防ぐ。そのような異質性は、二重特異性抗体に固有の活性をスクリーニングするように設計されるアッセイを複雑にする。「経路１」は、通常、３つの遺伝子が、二重特異性抗体を形成するために真核細胞系において共発現する場合に生じる異質性の結合ドメインの組み合わせの例であり、（Ａ）ＦｃドメインのＮ末端と融合した一本鎖Ｆ（ａｃ）であるｓｃＦ（ａｂ）、（Ｂ）ＦｃのＣＨ３のＣ末端と融合したＦ（ａｂ）断片、（Ｃ）ＣＬおよびＶＬドメインを含む軽鎖である。「経路２」は、挿入リンカー配列を使用して、（Ａ）および（Ｂ）を単一の隣接遺伝的構造体に融合することによって、ｓｃＦｃポリペプチド（Ｄ）を形成するために遺伝的に融合する２つのＦｃ部分をもたらす方法の例を示す。（Ｃ）および（Ｄ）の共発現は、単一の二重特異性ｍＡｂの均質な発現を引き起こす。

【図１１】図１１Ａ～Ｉは、本発明の例示的なｓｃＦｃ結合ポリペプチドの概略図である。図１１Ａは、Ｎ末端に結合部位を含むｓｃＦｃ結合ポリペプチドの概略図である。図１１Ｂは、Ｃ末端に結合部位を含むｓｃＦｃ結合ポリペプチドの概略図である。図１１Ｃは、Ｎ末端ＣＨ２－ＣＨ３ドメイン間領域に結合部位を含むｓｃＦｃ結合ポリペプチドの概略図である。図１１Ｄは、Ｃ末端ＣＨ２－ＣＨ３ドメイン間領域に結合部位を含むｓｃＦｃ結合ポリペプチドの概略図である。図１１Ｅは、リンカーポリペプチドにおいて結合部位を含むｓｃＦｃ結合ポリペプチドの概略図である。図１１Ｆは、Ｎ末端ＣＨ２ドメインに重ねられた結合部位を含むｓｃＦｃ結合ポリペプチドの概略図である。図１１Ｇは、Ｎ末端ＣＨ３ドメインに重ねられた結合部位を含むｓｃＦｃ結合ポリペプチドの概略図である。図１０Ｈは、Ｃ末端ＣＨ２ドメインに重ねられた結合部位を含むｓｃＦｃ結合ポリペプチドの概略図である。図１１Ｉは、Ｃ末端ＣＨ３ドメインに重ねられた結合部位を含むｓｃＦｃ結合ポリペプチドの概略図である。本発明のｓｃＦｃ結合ポリペプチドが図１１Ａ－Ｉに示される特色の任意の組み合わせを含むことができることは、当業者によって認識される。

【図１２Ａ】図１２は、２つの異なる長さ（１×Ｇ４Ｓ対３×Ｇ４Ｓ、すなわち、５対１５のアミノ酸）のＧ４Ｓリンカーを含有するｓｃＦｃに対して得られたタンパク質発現プロファイルの比較を示す。リンカーの長さは、より長いリンカーを含む構造体から発現するタンパク質が、ｄｃＦｃに対してｓｃＦｃの有意に大きな量を産生するように、ｓｃＦｃ収率と直接的に相関することが明らかとなった。

【図１２Ｂ】図１２は、２つの異なる長さ（１×Ｇ４Ｓ対３×Ｇ４Ｓ、すなわち、５対１５のアミノ酸）のＧ４Ｓリンカーを含有するｓｃＦｃに対して得られたタンパク質発現プロファイルの比較を示す。リンカーの長さは、より長いリンカーを含む構造体から発現するタンパク質が、ｄｃＦｃに対してｓｃＦｃの有意に大きな量を産生するように、ｓｃＦｃ収率と直接的に相関することが明らかとなった。

【図１２Ｃ】図１２は、２つの異なる長さ（１×Ｇ４Ｓ対３×Ｇ４Ｓ、すなわち、５対１５のアミノ酸）のＧ４Ｓリンカーを含有するｓｃＦｃに対して得られたタンパク質発現プ

ロファイルの比較を示す。リンカーの長さは、より長いリンカーを含む構造体から発現するタンパク質が、ｄｃＦｃに対してｓｃＦｃの有意に大きな量を産生するように、ｓｃＦｃ収率と直接的に相関することが明らかとなった。

【図１３】図１３は、２週間の期間に亘ってラットにおいて測定された、野生型ヒトＩｇＧ１抗体（ｈｕ５ｃ８）に対する、１×Ｇ４Ｓおよび３×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃポリペプチドの血清濃度を示す。３×Ｇ４Ｓ　ｓｃＦｃは、ＷＴ　ＩｇＧ１（１４日間）と同様の長いβ相半減期（１２日間）を有する。

【図１４】図１４Ａ～Ｂは、ｓｃＦｃポリペプチドのＦｃγＲ結合活性を評価するために行われたアルファスクリーンアッセイの結果を示す。示された、ヒトおよびカニクイザルＦｃγ受容体へのヘミグリコシル化された５ｃ８ｓｃＦｃおよび完全にグリコシル化された５ｃ８ｓｃＦｃの結合は、ＷＴおよびグリコシル化されていない５ｃ８ＩｇＧ１と比較された。インビトロでのこれらの受容体へのｓｃＦｃおよびＷＴ　ＩｇＧ１の結合は非常に似ており、ｓｃＦｃが、同様に、体内でＦｃｇ受容体と結合することができるということを示唆する。

【図１５－１】図１５は、タンパク質の脱グリコシル化のための、ＰＮＧａｓｅＦ処理前およびＰＮＧａｓｅＦ処理後の、３×Ｇ４Ｓ結合ヘミグリコシル化ｓｃＦｃに対して得られたデコンボリューション処理をした質量スペクトルを示す。スペクトルは、脱グリコシル化の前（図１５Ａ）および後（図１５Ｂ）にｓｃＦｃ軽鎖に対して生成された。脱グリコシル化された軽鎖の測定された質量は、２３，８５４Ｄａである。図１５ＣおよびＤは、脱グリコシル化の前（図１５Ｃ）および後（図１５Ｄ）のｓｃＦｃ重鎖のスペクトルを示す。脱グリコシル化されたｓｃＦｃ重鎖の測定された質量は、７５，７０３Ｄａである。

【図１５－２】図１５は、タンパク質の脱グリコシル化のための、ＰＮＧａｓｅＦ処理前およびＰＮＧａｓｅＦ処理後の、３×Ｇ４Ｓ結合ヘミグリコシル化ｓｃＦｃに対して得られたデコンボリューション処理をした質量スペクトルを示す。スペクトルは、脱グリコシル化の前（図１５Ａ）および後（図１５Ｂ）にｓｃＦｃ軽鎖に対して生成された。脱グリコシル化された軽鎖の測定された質量は、２３，８５４Ｄａである。図１５ＣおよびＤは、脱グリコシル化の前（図１５Ｃ）および後（図１５Ｄ）のｓｃＦｃ重鎖のスペクトルを示す。脱グリコシル化されたｓｃＦｃ重鎖の測定された質量は、７５，７０３Ｄａである。

【図１６】図１６は、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）によって測定された、ＷＴ　ｈｕＩｇＧ１ｍＡｂおよびＦｃと比較したｓｃＦｃ分子の比較熱安定性を示す。完全にグリコシル化されたｓｃＦｃ（ＡＳＫ０４８）のＣＨ２ドメインの安定性は、ＷＴ　ＩｇＧ１と同様である。ヘミグリコシル化されたｓｃＦｃは、恐らく、第２のＦｃ部分のグリコシル化されていないＣＨ２によって生じるドメイン柔軟性の増加により、幾分低い安定性を有する。

【図１７】図１７は、（Ｇ４Ｓ）１結合ヘミグリコシル化５Ｃ８ｓｃＦｃＩｇＧ１抗体構造体の重鎖アミノ酸配列を示す（ｐＥＡＧ２０６６、配列番号１）。構造体は、一般構造ＶＨ－ＣＨ１－ヒンジドメイン－ＣＨ２（１）－ＣＨ３（１）－Ｇ４Ｓリンカー－ヒンジドメイン－ＣＨ２（２）－ＣＨ３（２）を有する。第１のよりＮ末端側のＦｃ部分（残基２２２－４４７、配列番号２）は、そのグリコシル化パターンに関して野生型であるが、第２のよりＣ末端側のＦｃ部分（残基４５８－６８３、配列番号３）は、グリコシル化されていないＦｃを産生するアミノ酸置換（Ｔ２９９Ａ、ＥＵ付番）を含有する。さらに、ｓｃＦｃは、ヒンジドメインにおいてＣ２２０Ｓ置換（ＥＵ付番）含有する。Ｔ２９９ＡおよびＣ２２０Ｓ突然変異の位置は、太字で示される。ヒンジドメインは、イタリック体であり、ＣＨ１およびＣＨ３定常ドメインは、配列において下線が引かれている。

【図１８】図１８は、図１７におけるｐＥＡＧ２０６６の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号４）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。

【図１９】図１９Ａは、例示的な５Ｃ８抗体構造体の軽鎖アミノ酸配列を示す（ｐＥＡＧ２０２７、配列番号５）。図１９Ｂは、対応するヌクレオチド配列（配列番号６）を示す

。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。
【図２０】図２０は、Ｎ末端（残基２２～４４７）およびＣ末端（残基４５８～６８３）Ｆｃ部分の両方がグリコシル化されたホモマーｓｃＦｃ領域を含む、例示的な完全グリコシル化１×Ｇ４Ｓ結合５Ｃ８ＩｇＧ１ｓｃＦｃ抗体構造体の重鎖アミノ酸配列（ｐＥＡＧ２１４６、配列番号７）を示す。構造体の成分Ｆｃ部分は、図１７と同様に注釈される。
【図２１】図２１は、図１７におけるｐＥＡＧ２１４６の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号８）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。
【図２２】図２２は、ヘミグリコシル化１×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的なｓｃＦｃｈｕ５Ｃ８ＩｇＧ１抗体構造体の重鎖アミノ酸配列（ｐＥＡＧ２１４７、配列番号９）を示し、第２のよりＣ末端側のＦｃ部分（残基４５８～６８３、配列番号１０）は、変化したヒンジドメイン（ＧＳＥＰＫＳＳＤＫＴＨＴＳＰＰＳＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦ、配列番号１１）を含み、ヒンジシステイン残基は、セリンによって置換されている。配列は、図１７と同様に注釈される。
【図２３】図２３は、図２２におけるｐＥＡＧ２１４７の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号１２）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。
【図２４】図２４は、ヒトＩｇＧ１ｍＡｂ、５Ｃ８との関係においてヘミグリコシル化（Ｇ４Ｓ）$_3$結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的なｓｃＦｃ抗体構造体の重鎖アミノ酸配列（ｐＡＳＫ０４３、配列番号１３）を示す。構造体の成分ドメインは、別々の配列識別子によって図において注釈される。
【図２５】図２５は、図２４におけるｐＡＳＫ０４３の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号１４）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。
【図２６】図２６は、両方のＦｃ部分がグリコシル化される、完全にグリコシル化された（Ｇ４Ｓ）$_3$結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的なｓｃＦｃ５Ｃ８ＩｇＧ１抗体構造体の重鎖アミノ酸配列（ＡＳＫ０４８、配列番号１５）を示す。構造体の成分ドメインは、別々の配列識別子によって図において注釈される。
【図２７】図２７は、図２６におけるＡＳＫ０４８の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号１６）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。
【図２８】図２８は、グリコシル化されていない（Ｇ４Ｓ）$_3$結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的なｓｃＦｃ５Ｃ８ＩｇＧ１抗体構造体の重鎖アミノ酸配列（ＡＳＫ０５２、配列番号１７）を示す。構造体の成分ドメインは、別々の配列識別子によって図において注釈される。
【図２９】図２９は、図２８におけるＡＳＫ０５２の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号１８）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。
【図３０】図３０は、グリコシル化されていない（Ｇ４Ｓ）$_1$結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的なｓｃＦｃ５Ｃ８ＩｇＧ１抗体構造体の重鎖アミノ酸配列（ｐＡＳＫ０５３、配列番号１９）を示す。構造体の成分ドメインは、別々の配列識別子によって図において注釈される。
【図３１】図３１は、図３０におけるｐＡＳＫ０５３の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号２０）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。
【図３２】図３２は、ヒト抗ＬＩＮＧＯＩｇＧ１ｍＡｂ、Ｌｉ３３との関係においてヘミグリコシル化１×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的な抗ＬＩＮＧＯｓｃＦｃ抗体構造体の重鎖アミノ酸配列を示す（ｐＥＡＧ２１４８、配列番号２１）。第１のよりＮ末端側のＦｃ部分（残基２２３～４４８）は、そのグリコシル化パターンに関して野生型であるが、第２のよりＣ末端側のＦｃ部分（残基５４９～６８４）は、グリコシル化されていないＦｃを産生するアミノ酸置換を含有する。構造体の成分ドメインは、図１７と同様に注釈される。
【図３３】図３３は、図３２におけるｐＥＡＧ２１４８の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号２２）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。
【図３４】図３４Ａは、例示的なＬｉ３３ｓｃＦｃ抗体構造体の軽鎖アミノ酸配列を示す（ｐＸＷ４３５、配列番号２３）。図３４Ｂは、対応するヌクレオチド配列（配列番号２

４）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。
【図３５】図３５は、ヒト抗ＬＩＮＧＯＩｇＧ１ｍＡｂ、Ｌｉ３３との関係においてグリコシル化されていない３×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的な抗ＬＩＮＧＯｓｃＦｃ抗体構造体の重鎖アミノ酸配列を示す（ＡＳＫ０５０、配列番号２５）。
【図３６】図３６は、図３５におけるＡＳＫ０５０の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号２６）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。
【図３７】図３７は、ヒト抗ＬＩＮＧＯＩｇＧ１ｍＡｂ、Ｌｉ３３との関係においてグリコシル化されていない１×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的な抗ＬＩＮＧＯｓｃＦｃ抗体構造体の重鎖アミノ酸配列を示す（ＡＳＫ０５１、配列番号２７）。
【図３８】図３８は、図３７におけるＡＳＫ０５１の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号２８）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。
【図３９】図３９は、抗ＬＩＮＧＯ、ｓｃＦｃ抗体分子（ＥＡＧ２１４８）のタンパク質濃度依存性溶解度特性の改善を示す。
【図４０】図４０Ａは、抗ＣＤ２、キメラＩｇＧ１ｍＡｂ、ＣＢ６との関係において完全グリコシル化３×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的な抗ＣＤ２、キメラＣＢ６ｓｃＦｃ　ＩｇＧ１抗体構造体の重鎖アミノ酸配列を示す（ＡＳＫ０５８、配列番号２９）。図４０Ｂは、ＣＢ６ｓｃＦｃＩｇＧ１抗体構造体の軽鎖アミノ酸配列を示す（ＥＡＧ２２７６、配列番号５６）。
【図４１】図４１は、図４０におけるＡＳＫ０５８の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号３０）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。図４１ｂは、図４０ＢにおけるＥＡＧ２２７６の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号　）を示す。
【図４２】図４２は、抗ＣＤ２、キメラＩｇＧ１ｍＡｂ、ＣＢ６との関係において完全グリコシル化４×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的な抗ＣＤ２、キメラＣＢ６ｓｃＦｃ　ＩｇＧ１抗体構造体の重鎖アミノ酸配列を示す（ＡＳＫ０６２、配列番号３１）。
【図４３】図４３は、図４２におけるＡＳＫ０６２の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号３２）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。
【図４４】図４４は、抗ＣＤ２、キメラＩｇＧ１ｍＡｂ、ＣＢ６との関係において完全グリコシル化５×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的な抗ＣＤ２、キメラＣＢ６ｓｃＦｃＩｇＧ１抗体構造体の重鎖アミノ酸配列を示す（ＡＳＫ０６３、配列番号３３）。
【図４５】図４５は、図４４におけるＡＳＫ０６３の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号３４）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。
【図４６】図４６は、抗ＣＤ２、キメラＩｇＧ１ｍＡｂ、ＣＢ６との関係において完全グリコシル化６×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的な抗ＣＤ２、キメラＣＢ６ｓｃＦｃＩｇＧ１抗体構造体の重鎖アミノ酸配列を示す（ＡＳＫ０６４、配列番号３５）。
【図４７】図４７は、図４６におけるＡＳＫ０６４の重鎖配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号３６）を示す。抗体シグナル配列には、下線が引かれている。
【図４８】図４８は、ニューブラスチン受容体ＧＦＲα３の細胞外ドメインと融合した（Ｇ４Ｓ）３結合完全グリコシル化ｓｃＦｃ領域を含む例示的なＧＦＲα３イムノアドヘシンタンパク質のアミノ酸配列を示す（ＡＳＫ－０５７、配列番号３７）。
【図４９】図４９は、図４８におけるＡＳＫ－０５７のアミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号３８）を示す。シグナル配列には、下線が引かれている。
【図５０】図５０は、二段階精製後に得られたＧＦＲα３：ｓｃＦｃ融合タンパク質の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよび分析ＳＥＣ－ＬＳ特性解析を示す。
【図５１】図５１は、インターフェロン－β（残基１～６７）と融合したヘミグリコシル化１×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的なインターフェロン－βイムノアドヘシン構造体のアミノ酸配列を示す（ｐＥＡＧ２１４９、配列番号３９）。第１のよりＮ末端側のＦｃ部分（残基１６８～３９３）は、そのグリコシル化パターンに関して野生型であるが、第２のよりＣ末端側のＦｃ部分（残基４０４～６２９）は、グリコシル化されていないＦｃを産生するアミノ酸置換を含有する。構造体の成分ドメインは、図１７と同様に注釈

される。
【図５２】図５２は、図５１におけるｐＥＡＧ２１４９の配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号４０）を示す。シグナル配列には、下線が引かれている。
【図５３】図５３は、ＬＴβＲと融合したヘミグリコシル化３×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的なＬＴβＲイムノアドヘシン構造体のアミノ酸配列を示す（ＥＡＧ２１９０、配列番号４１）。
【図５４】図５４は、図５３におけるＥＡＧ２１９０の配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号４２）を示す。シグナル配列には、下線が引かれている。
【図５５】図５５は、ＬＴβＲと融合したヘミグリコシル化３×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ領域を含む例示的なＬＴβＲイムノアドヘシン構造体のアミノ酸配列を示す（ＥＡＧ２１９１、配列番号４３）。
【図５６】図５６は、図５５におけるＥＡＧ２１９１の配列に対応するヌクレオチド配列（配列番号４４）を示す。シグナル配列には、下線が引かれている。
【図５７】図５７は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（図５８Ａ）および分析ゲルろ過（図５８Ｂ）によるＬＴβＲ：ｓｃＦｃ融合ポリペプチド（ＥＡＧ２１９０）の特性解析を示す。図５８Ａのレーン１および２は、非還元であり、１および２μｇのタンパク質を含有するが、レーン４および５は、還元剤、およびそれぞれ２および１μｇのＬＩ３３ｓｃＦｃを含有する。レーン３は、関連する基準の質量を示す分子量基準を含む。
【図５８】図５８は、Ｎ－脱グリコシル化還元ＬＴβＲ：ｓｃＦｃの質量分析（ＭＳ）を示す。
【図５９】図５９は、ＬＴａ１ｂ２への単量体ＬＴβＲ：ｓｃＦｃの結合親和性を評価するＥＬＩＳＡ（図５９Ａ）およびＦＡＣＳ分析（図５９Ｂ）の結果を示す。
【図６０】図６０は、本発明の例示的なヘミグリコシル化１×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ領域（ＥＡＧ２１８１）のアミノ酸配列（図６０Ａ、配列番号４５）およびヌクレオチド配列（図６０Ｂ、配列番号４６）を示す。ｓｃＦｃ領域のＮおよび／またはＣ末端は、任意の当該技術分野において認識される結合部位と融合することができる。
【図６１】図６１は、本発明の例示的な完全グリコシル化３×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ領域（ＡＳＫ０５４）のアミノ酸配列（図６１Ａ、配列番号４７）およびヌクレオチド配列（図６１Ｂ、配列番号４８）を示す。ｓｃＦｃ領域のＮおよび／またはＣ末端は、任意の当該技術分野において認識される結合部位と融合することができる。
【図６２】図６２は、本発明の例示的な完全グリコシル化１×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ領域（ＡＳＫ０５５）のアミノ酸配列（図６２Ａ、配列番号４９）およびヌクレオチド配列（図６２Ｂ、配列番号５０）を示す。ｓｃＦｃ領域のＮおよび／またはＣ末端は、任意の当該技術分野において認識される結合部位と融合することができる。
【図６３】図６３は、例示的な抗ＬＴβＲ抗体（ＢＤＡ８）の重鎖（ＡＳＫ０１６）のアミノ酸配列（図６３Ａ、配列番号５１）およびヌクレオチド配列（図６３Ｂ、配列番号５２）を示す。ある実施形態においては、本発明のｓｃＦｃ結合ポリペプチドは、ＢＤＡ８の結合部位を含む。
【図６４】図６４は、ＦＤＡに認可された抗体または他の抗体の一覧表を示す。ある実施形態においては、本発明のｓｃＦｃ結合ポリペプチドは、示される抗体の１つに由来する抗原結合部位を含むことができる。
【発明を実施するための形態】
【００５８】
本発明は、例えば、（ｉ）少なくとも１つの結合部位または結合ドメイン、および（ｉｉ）少なくとも１つの遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、一本鎖Ｆｃ（「ｓｃＦｃ」）領域）を含む、例えば、結合ポリペプチドを提供することによって、当技術分野を進展させる。好ましい実施形態においては、ｓｃＦｃ領域は、Ｆｃ部分の間に介入するリンカーポリペプチド（例えば、Ｆｃ結合ペプチド）を介して遺伝的に融合される少なくとも２つのＦｃ部分を含む。一実施形態においては、結合部位は、（例えば、ＦａｂまたはｓｃＦｖのＶＨまたはＶＬのいずれかを介して）ｓｃＦｃ領域のＮおよびＣ末端のいずれか、

または両方と融合される抗体分子（例えば、Ｆ（ａｂ）またはｓｃＦｖ）の抗原結合断片を含むことができる。別の実施形態においては、結合ドメインは、遺伝的に融合したＦｃ領域のＮおよびＣ末端のいずれか、または両方と融合される受容体融合タンパク質を含むことができる。そのような融合は、所望の結合部位と、Ｃ末端またはＮ末端のいずれかで行うことができる。

【００５９】

単一の隣接遺伝的構造体からの本発明の結合ポリペプチドの発現は、従来のタンパク質発現に優る多数の利点を有する。従来のタンパク質発現は、２つの遺伝子の共発現が関与し、１つは、第１のＦｃドメインを発現し、別個の第２の遺伝子は、２つのポリペプチド鎖に結合させるジスルフィド結合により第２のＦｃドメインと融合される結合部位から成る。そのような従来の構造体の問題は、得られた分子の集団内における著しい異質性を含み、所望の分子を好ましくない分子から精製する必要があり、それによって、所望の分子の全収率における低下がもたらされる。伝統的なＦｃ領域を使用するか、またはそのような領域を欠く他の分子と比較した、本発明のポリペプチドの利点は、抗体分子、またはその例示的な断片を使用して以下で説明され、以下について示される。

【００６０】

ｓｃＦｃと融合される結合ドメインの発現の際のスクランブリング欠如：１つのＦ（ａｂ）アームのみを有する抗体、または１つの融合機能性ポリペプチドのみを有するＦｃ融合タンパク質を構築することは困難である。現在の方法は、２つの遺伝子の共発現を必要とし、１つは、第１のＦｃ部分（Ｆｃ１、例えば、ＶＨ、ＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３ドメイン）を含むＡｂの１つの重鎖をコードし、第２の遺伝子は、所望の分子を得るために、第２のＦｃ部分（Ｆｃ２、例えば、ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３ドメイン）をコードする。共発現は、Ｆｃ１＋Ｆｃ１：Ｆｃ１＋Ｆｃ２：Ｆｃ２＋Ｆｃ２の１：２：１混合物となると予測される好ましくない複合混合物につながるが、比率は、この理論上の予測から大幅に異なり得、所望のタンパク質の最適以下の収率をもたらす。従来の二量体Ｆｃと結合される単一融合分子を有する一価融合タンパク質の発現は、２つの同一の分子がごく接近して折り畳まれる場合に起こり得る不適切な折り畳みイベントを防止することにおいて、特に重要となり得る。これらの誤って折り畳まれたＦｃ融合タンパク質は、適切に折り畳まれた二価のＦｃタンパク質から分離させることは困難な場合があり、それは、それらの間の唯一の相違が、しばしば、異種の誤った折り畳みイベントであるからである。対象のｓｃＦｃ融合タンパク質は、この構造体が、折り畳み工程中に分子を互いにごく接近させて固定しないため、タンパク質ドメインのスクランブリングを行うことができない。

【００６１】

ＦｃＲｎ結合の付加を介する抗体断片（例えば、Ｆ（ａｂ））半減期の強化：抗体断片（例えば、Ｆ（ａｂ））の治療的適用は、標的受容体の架橋なしで、したがって、例えば、二価の抗体による受容体連結後に起こり得る、後に生じる好ましくないシグナル伝達なしで、細胞表面受容体の遮断を可能にするため、しばしば好ましい。表面受容体のそのような架橋は、受容体のクラスタリング、および細胞表面からの標的受容体のダウンレギュレーションを引き起こし得る。Ｆ（ａｂ）構造体は、本質的に一価であるため、受容体架橋またはクラスタリングを引き起こすことはあり得ない。

【００６２】

体内におけるＦ（ａｂ）等の抗体断片の用途に対する重大な欠点の１つは、それらの低い血清持続性または半減期である。Ｆ（ａｂ）断片へのＦｃ領域の付加は、完全なｍＡｂと同様の薬物動態半減期をもたらす。通常、Ｆ（ａｂ）の半減期は、Ｆ（ａｂ）の調製および精製後の、特定のチオールへのＰＥＧ部分の化学的付加によって延長される。ペグ化反応は、生成物の調製に著しい複雑性を追加する。ペグ化化学は、各Ｆ（ａｂ）に対して最適化されなければならず、生成物収率を低下させる。ペグ化は、ペグ化された材料が異種の分子量であるため、最終の生成物分析を複雑にもする。

【００６３】

抗体断片（例えば、Ｆ（ａｂ））へのＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩおよびＦｃγＲＩＩＩ機能性の追加：Ｆ（ａｂ）およびペグ化Ｆ（ａｂ）等の抗体断片は、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、およびＦｃγＲＩＩＩと相互作用する能力に欠く。Ｆｃ受容体の関与は、ある特定の状況において好ましい。例えば、抗ＣＤ２０抗体は、好ましくない癌性Ｂ細胞のＡＤＣＣ依存性枯渇に対するＦｃ機能に依存する。さらに、一価Ｆ（ａｂ）は、抗体による受容体の架橋が受容体内在化につながる場合、二価のｍＡｂより好ましい。そのような内在化は、薬物の有効性が、Ｆｃ依存性ＡＤＣＣ枯渇メカニズムに依存する場合、好ましくないはずである。したがって、本発明のｓｃＦｃポリペプチドに結合されるＦ（ａｂ）断片は、一価性およびＦｃγ受容体連結の所望の特性を包含するため、最適な構造体を表す。

【００６４】

ＳｃＦｃ分子は、異種Ｆｃ領域の産生を可能にする。Ｆｃ領域内における部位特異性変異は、改善されたＦｃ機能性を有するＦｃ変異ｍＡｂを作製する際、有用となっている。例として、例えば、様々なＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩおよび／またはＦｃγＲＩＩＩへの親和性を強化する変異がある。本発明の一本鎖Ｆｃ（ｓｃＦｃ）分子を使用して、１つのＦｃ部分のみにおける特定の点変異、またはｓｃＦｃ領域の両方の部分における点変異の異なる組み合わせを含む異種ｓｃＦｃ領域を作製することができる。例として、２つのＦｃ部分の１つのみにおいてＡｓｎ２９７グリコシル化を含むｓｃＦｃ構造体の発現である。この分子は、幾分低下したＦｃＲ親和性を示すが、ＦｃγＲＩＩＩ結合において不活性ではない。

【００６５】

明細書および請求項の明確な理解を提供するために、以下の定義を、便宜上、提供する。

【００６６】

Ｉ．定義

本明細書において使用される「ポリペプチド」という用語は、天然アミノ酸または非天然アミノ酸の２つまたそれ以上のポリマーを指す。

【００６７】

「アミノ酸」という用語は、アラニン（ＡｌａまたはＡ）、アルギニン（ＡｒｇまたはＲ）、アスパラギン（ＡｓｎまたはＮ）、アスパラギン酸（ＡｓｐまたはＤ）、システイン（ＣｙｓまたはＣ）、グルタミン（ＧｌｎまたはＱ）、グルタミン酸（ＧｌｕまたはＥ）、グリシン（ＧｌｙまたはＧ）、ヒスチジン（ＨｉｓまたはＨ）、イソロイシン（ＩｌｅまたはＩ）、ロイシン（ＬｅｕまたはＬ）、リジン（ＬｙｓまたはＫ）、メチオニン（ＭｅｔまたはＭ）、フェニルアラニン（ＰｈｅまたはＦ）、プロリン（ＰｒｏまたはＰ）、セリン（ＳｅｒまたはＳ）、トレオニン（ＴｈｒまたはＴ）、トリプトファン（ＴｒｐまたはＷ）、チロシン（ＴｙｒまたはＹ）、およびバリン（ＶａｌまたはＶ）を含む。非伝統的なアミノ酸も、本発明の範囲内であり、ノルロイシン、オミチン、ノルバリン、ホモセリン、およびＥｌｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍ．２０２：３０１－３３６（１９９１）に記載されるもの等の他のアミノ酸残基類似体を含む。そのような非天然のアミノ酸残基を生成するために、上記のＮｏｒｅｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ２４４：１８２（１９８９）およびＥｌｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．の手順を使用することができる。つまり、これらの手順は、非天然のアミノ酸残基によるサプレッサｔＲＮＡを化学的に活性化し、その後、ＲＮＡのインビトロ転写および翻訳を行うステップを伴う。非伝統的なアミノ酸の導入は、当技術分野で周知のペプチド化学を使用して得ることもできる。本明細書において使用される「極性アミノ酸」という用語は、正味ゼロ電荷を有するが、それらの側鎖（例えば、Ｍ、Ｆ、Ｗ、Ｓ、Ｙ、Ｎ、Ｑ、Ｃ）の異なる部分に非ゼロ部分電荷を有するアミノ酸を含む。これらのアミノ酸は、疎水性相互作用および静電相互作用に関与する場合がある。本明細書において使用される「荷電アミノ酸」という用語は、それらの側鎖（例えば、Ｒ、Ｋ、Ｈ、Ｅ、Ｄ）に非ゼロ正味荷電を有することができるアミノ酸を含む。これらのアミノ酸は、疎水性相互作用および静電相互作用に関与する場合がある。本明細書において使用される「十分な立体容積を有するアミノ酸」という用語

は、大きな三次元空間を占める側鎖を有するそれらのアミノ酸を含む。十分な立体容積の側鎖化学を有する例示的なアミノ酸としては、チロシン、トリプトファン、アルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、グルタミン、およびメチオニン、またはその類似体もしくは模倣剤を含む。

【００６８】

「アミノ酸置換」は、第２の異なる「置換」アミノ酸残基による、所定のアミノ酸配列（出発ポリペプチドのアミノ酸配列）における少なくとも１つの既存のアミノ酸残基の置換を指す。「アミノ酸挿入」は、所定のアミノ酸配列への少なくとも１つの付加的アミノ酸の組み込みを指す。挿入は、通常、１つまたは２つのアミノ酸残基の挿入から成るが、この大きな「ペプチド挿入」、例えば、約３～約５または最大約１０、１５、もしくは２０のアミノ酸残基の挿入を行うことができる。挿入された残基は、上記において開示されるように、天然または非天然であり得る。「アミノ酸欠失」は、所定のアミノ酸配列からの少なくとも１つのアミノ酸残基の除去を指す。

【００６９】

本明細書において使用される「タンパク質」という用語は、ポリペプチド、または２つ以上のポリペプチドを含む組成物を指す。したがって、タンパク質は、モノマーまたは多量体のいずれかであり得る。例えば、一実施形態においては、本発明の結合タンパク質は、二量体である。一実施形態においては、本発明の二量体は、ホモ二量体であり、２つの同一の単量体サブユニットまたはポリペプチド（例えば、２つの同一のｓｃＦｃポリペプチド）を含む。別の実施形態においては、本発明の二量体は、ヘテロ二量体であり、２つ非同一の単量体サブユニットまたはポリペプチド（例えば、２つ非同一のｓｃＦｃポリペプチド）を含む。二量体のサブユニットは、１つまたはそれ以上のポリペプチド鎖（例えば、ｓｃＦｃ分子を含む標的結合鎖）を含むことができる。例えば、一実施形態においては、二量体は、少なくとも２つのポリペプチド鎖（例えば、少なくとも２つのｓｃＦｃポリペプチド鎖）を含む。一実施形態においては、二量体は、２つのポリペプチド鎖を含む。別の実施形態においては、二量体は、３つのポリペプチド鎖を含む。別の実施形態においては、二量体は、４つのポリペプチド鎖を含む。

【００７０】

ある好ましい実施形態においては、本発明のポリペプチドは、ｓｃＦｃポリペプチドである。本明細書において使用されるｓｃＦｃポリペプチドという用語は、一本鎖Ｆｃ（ｓｃＦｃ）領域を含むポリペプチドを指す。

【００７１】

他の好ましい実施形態においては、本発明のポリペプチドは、結合ポリペプチドである。本明細書において使用される「結合ポリペプチド」という用語は、標的分子（抗原または結合パートナー等）と特異的に結合する少なくとも１つの標的結合部位または結合ドメインを含むポリペプチドを指す。例えば、一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、免疫グロブリン抗原結合部位、またはリガンド結合に関与する受容体分子の一部、または受容体結合に関与するリガンド分子の一部を含む。本発明の結合ポリペプチドは、好ましくは、１つまたはそれ以上の免疫グロブリン（Ｉｇ）分子に由来する少なくとも２つのＦｃ部分も含む。例えば、好ましい実施形態においては、結合ポリペプチドは、遺伝的に融合される少なくとも２つのＦｃ部分を含むｓｃＦｃポリペプチドである。一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、付加的修飾を含む。例示的な修飾は、以下においてより詳述される。例えば、ある好ましい実施形態においては、本発明のポリペプチドは、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）の少なくとも２つのＦｃ部分の間に介入する柔軟なポリペプチドリンカーを任意で含み得る。別の実施形態においては、結合ポリペプチドは、機能的な部分（例えば、ＰＥＧ、薬物、または標識）を付加するために修飾することができる。

【００７２】

本発明の結合ポリペプチドは、少なくとも１つの結合部位を含む。一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、少なくとも２つの結合部位を含む。一実施形態におい

ては、結合ポリペプチドは、２つの結合部位を含む。別の実施形態においては、結合ポリペプチドは、３つの結合部位を含む。別の実施形態においては、結合ポリペプチドは、４つの結合部位を含む。一実施形態においては、結合部位は、直列に互いに結合される。他の実施形態においては、結合部位は、結合ポリペプチドの異なる位置に位置する。例えば、１つまたはそれ以上の結合部位は、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、一本鎖Ｆｃ（ｓｃＦｃ）領域）の片方または両方の端部に結合することができる。

【００７３】

本明細書において使用される「結合ドメイン」または「結合部位」という用語は、標的分子（例えば、抗原、リガンド、受容体、基質、または阻害剤）への特定の結合を媒介する結合ポリペプチドの部分、領域、または部位を指す。例示的な結合ドメインとしては、抗原結合部位、リガンドの受容体結合ドメイン、受容体のリガンド結合ドメイン、または酵素的ドメインが含まれる。本明細書において使用される「リガンド結合ドメイン」という用語は、少なくとも質的リガンド結合能、および好ましくは対応する天然受容体の生物活性を保持する、天然受容体（例えば、細胞表面受容体）もしくは領域、またはそれらの誘導体を指す。本明細書において使用される「受容体結合ドメイン」という用語は、少なくとも質的受容体結合能、および好ましくは対応する天然リガンドの生物活性を保持する、天然リガンドもしくは領域、またはそれらの誘導体を指す。一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、例えば、細胞表面抗原または可溶性抗原等、減少または排除のために標的とされる分子に対して特異的な少なくとも１つの結合ドメインを有する。好ましい実施形態においては、結合ドメインは、抗原結合部位（例えば、可変重鎖配列および可変軽鎖配列を含む）または代替のフレームワーク領域（例えば、１つまたはそれ以上のアミノ酸置換を任意で含むヒトフレームワーク）に配置される抗体からの６つのＣＤＲを含むか、またはそれらから成る。

【００７４】

本明細書において使用される「結合親和性」という用語は、結合相互作用の強度を、したがって実際の結合親和性および見掛けの結合親和性の両方を含む。実際の結合親和性は、会合速度の解離速度に対する比率である。したがって、結合親和性を与えるか、最適化することは、結合親和性の所望のレベルに到達するために、これらの要素の片方または両方を変化させることを含む。見掛けの親和性は、例えば、相互作用の結合力を含み得る。

【００７５】

本明細書において使用される「結合自由エネルギー」または「結合の自由エネルギー」という用語は、その当該技術分野において承認されている意味、および、特に、溶媒における結合部位－リガンドまたはＦｃ－ＦｃＲ相互作用に適用される際の意味を含む。結合自由エネルギーの低下は、親和性を強化するが、結合自由エネルギーの増加は、親和性を低下させる。

【００７６】

「特異性」という用語は、既定の標的に特異的に結合する（例えば、免疫反応する）可能性のある結合部位の数を含む。結合ポリペプチドは、単一特異性であり、同じ標的（例えば、同じエピトープ）に特異的に結合する１つまたはそれ以上の結合部位を含有することができるか、または結合ポリペプチドは、多特異性であり、同じ標的の異なる領域（例えば、異なるエピトープ）または異なる標的に特異的に結合する２つまたそれ以上の結合部位を含有することができる。一実施形態においては、２つ以上の標的分子（例えば、２つ以上の抗原、または同じ抗原上の２つ以上のエピトープ）に対して結合特異性を有する多特異性結合ポリペプチド（例えば、二重特異性ポリペプチド）を作製することができる。別の実施形態においては、多特異性結合ポリペプチドは、減少または排除に対して標的される分子に対して特異的な少なくとも１つの結合ドメイン、および細胞上の標的分子に対して特異的な少なくとも１つの結合ドメインを有する。別の実施形態においては、多特異性結合ポリペプチドは、減少または排除に対して標的される分子に対して特異的な少なくとも１つの結合ドメイン、および薬物に対して特異的な少なくとも１つの結合ドメインを有する。さらに別の実施形態においては、多特異性結合ポリペプチドは、減少または排

除に対して標的される分子に対して特異的な少なくとも１つの結合ドメイン、およびプロドラッグに対して特異的な少なくとも１つの結合ドメインを有する。さらに別の実施形態においては、多特異性結合ポリペプチドは、１つの標的分子に対して特異的な２つの結合ドメイン、および第２の標的分子に対して特異的な２つの結合部位を有する四価抗体である。

【００７７】

本明細書において使用される「価数」という用語は、結合ポリペプチドまたはタンパク質における潜在的結合ドメインの数を指す。各結合ドメインは、１つの標的分子に特異的に結合する。結合ポリペプチドが２つ以上の結合ドメインを含む場合、各結合ドメインは、同じまたは異なる分子に特異的に結合することができる（例えば、異なるリガンドもしくは異なる抗原、または同じ抗原上の異なるエピトープに結合することができる）。一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、一価である。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、多価である。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、二価である。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、三価である。さらに別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、四価である。

【００７８】

ある態様においては、本発明の結合ポリペプチドは、ポリペプチドリンカーを使用する。本明細書において使用される「ポリペプチドリンカー」という用語は、ポリペプチド鎖の直鎖状アミノ酸配列における２つのドメインを接続するペプチドまたはポリペプチド配列（例えば、合成ペプチドまたはポリペプチド配列）を指す。例えば、ポリペプチドリンカーを使用して、結合部位を遺伝的に融合したＦｃ領域に接続することができる。好ましくは、そのようなポリペプチドリンカーは、柔軟性をポリペプチド分子に提供する。例えば、一実施形態においては、ＶＨドメインまたはＶＬドメインは、ポリペプチドリンカーを介して遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）と融合または結合される（ポリペプチドリンカーのＮまたはＣ末端は、遺伝的に融合したＦｃ領域のＣまたはＮ末端に付着し、ポリペプチドリンカーのＮ末端は、ＶＨまたはＶＬドメインのＮまたはＣ末端に付着する）。

【００７９】

ある実施形態においては、ポリペプチドリンカーを使用して、２つのＦｃ部分またはドメインを接続（例えば、遺伝的に融合）する。そのようなポリペプチドリンカーは、本明細書において、Ｆｃ結合ポリペプチドとも称される。本明細書において使用される「Ｆｃ結合ポリペプチド」という用語は、特に、２つのＦｃ部分またはドメインを接続（例えば、遺伝的に融合）する結合ポリペプチドを指す。

【００８０】

本発明の結合分子は、２つ以上のペプチドリンカーを含むことができる。

【００８１】

本明細書において使用される「正確に折り畳まれたポリペプチド」という用語は、ポリペプチドを含む機能ドメインのすべてが明白に活性を有するポリペプチド（例えば、本発明の結合ポリペプチド）を含む。本明細書において使用される「不正確に折り畳まれたポリペプチド」という用語は、ポリペプチドの機能ドメインの少なくとも１つが活性を有さないポリペプチドを含む。本明細書において使用される「正確に折り畳まれたＦｃポリペプチド」または「正確に折り畳まれたＦｃ領域」は、得られたｓｃＦｃ領域が少なくとも１つのエフェクタ機能を含むように、少なくとも２つの成分Ｆｃ部分が正確に折り畳まれた遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）を含む。

【００８２】

指定されたポリペプチドまたはタンパク質に「由来する」ポリペプチドまたはアミノ酸配列は、ポリペプチドの起源を指す。好ましくは、特定の配列に由来するポリペプチドまたはアミノ酸配列は、その配列、またはその一部と本質的に同一のアミノ酸配列を有し、該一部は、少なくとも１０～２０のアミノ酸、好ましくは少なくとも２０～３０のアミノ酸、より好ましくは少なくとも３０～５０のアミノ酸から成るか、そうでなければ、配列

においてその起源を有するという理由で、当業者にとって識別可能である。

【００８３】

別のペプチドに由来するポリペプチドは、出発ポリペプチドに対する１つまたはそれ以上の変異、例えば、別のアミノ酸残基で置換されているか、または１つもしくはそれ以上のアミノ酸残基挿入もしくは欠失を有する１つまたはそれ以上のアミノ酸残基を有する場合がある。好ましくは、ポリペプチドは、天然に存在しないアミノ酸配列を含む。そのような変異体は、出発抗体との１００％未満の配列同一性または類似性を必ず有する。好ましい実施形態においては、変異体は、出発ポリペプチドのアミノ酸配列との約７５％～１００％未満のアミノ酸配列同一性または類似性、より好ましくは約８０％～１００％未満、より好ましくは約８５％～１００％未満、より好ましくは約９０％～１００％未満（例えば、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％）、最も好ましくは約９５％～１００％未満の同一性または類似性を、例えば、変異分子の長さにわたって有するアミノ酸配列を有する。一実施形態においては、出発ポリペプチド配列とそれに由来する配列との間に１つのアミノ酸の相違がある。この配列に対する同一性または類似性は、最大の割合（％）の配列同一性を得るために、必要に応じて、配列を整列し、ギャップを導入した後の、出発アミノ酸残基と同一（すなわち、同じ残基）である候補配列におけるアミノ酸残基の割合（％）として本明細書において定義される。

【００８４】

本発明の好ましい結合ポリペプチドは、ヒト免疫グロブリン配列に由来するアミノ酸配列（例えば、少なくとも１つのＦｃ部分またはドメイン）を含む。しかしながら、ポリペプチドは、別の哺乳類種からの１つまたはそれ以上のアミノ酸を含む場合がある。例えば、霊長類Ｆｃドメインまたは結合部位が、対象ポリペプチドに含まれる場合がある。代替として、１つまたはそれ以上のマウスアミノ酸が、ポリペプチドに存在する場合がある。本発明の好ましいポリペプチドは、免疫原性ではない。

【００８５】

当業者にとって当然のことながら、本発明の結合ポリペプチドは、天然ポリペプチドの所望の活性を保持しながら、それらが由来する天然に存在するまたは天然ポリペプチドとアミノ酸配列において異なるように、変化させることができる。例えば、「非必須」アミノ酸残基での同類置換または変化につながるヌクレオチドまたはアミノ酸置換が行われる場合がある。免疫グロブリン（例えば、Ｆｃドメイン、部分、または抗原結合部位）に由来する結合ポリペプチドの非天然変異体をコードする単離核酸分子は、１つまたはそれ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失がコードされたタンパク質に導入されるように、１つまたはそれ以上のヌクレオチド置換、付加または欠失を免疫グロブリンのヌクレオチド配列に導入することによって作製することができる。変異は、部位特異的変異生成およびＰＣＲ媒介変異生成等の標準の手法によって導入することができる。

【００８６】

本発明の結合ポリペプチドは、１つまたはそれ以上のアミノ酸残基、例えば、必須または非必須アミノ酸残基での同類アミノ酸置換を含む場合がある。「同類アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される置換である。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義され、塩基側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン，ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。したがって、結合ポリペプチドにおける非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置換される。別の実施形態においては、アミノ酸の鎖は、順序が異なる構造的に同様の鎖および／または側鎖ファミリーメンバーの組成物で置換することができる。代替として、別の実施形態においては、変異は、飽和変異誘発等によって、コード配列

のすべてまたは一部に沿って無作為に導入することができ、結果として得られる変異体は、本発明の結合ポリペプチドに組み込まれ、所望の標的に結合するそれらの能力をスクリーニングすることができる。

【００８７】

ポリペプチドとの関連において、「直鎖状配列」または「配列」は、配列において互いに隣接する残基が、ポリペプチドの一次構造において隣接するアミノからカルボキシル末端への方向のポリペプチドにおけるアミノ酸の順序である。

【００８８】

本明細書において使用される「結合した」、「融合した」、または「融合」という用語は、ほとんど同じ意味で使用される。これらの用語は、化学的共役または組み換え手段を含む、あらゆる手段によって、２つまたはそれ以上の要素または成分を合わせて接合することを指す。化学的共役（例えば、ヘテロ二官能性架橋剤を使用する）の方法は、当技術分野で周知である。

【００８９】

本明細書において使用されるように、「遺伝的に融合した」または「遺伝的融合」という用語は、タンパク質、ポリペプチド、または断片をコードする単一のポリヌクレオチド分子の遺伝子発現による、それらの個々のペプチド骨格を介する２つまたそれ以上のタンパク質、ポリペプチド、またはそれらの断片の共線的共有結合または付着を指す。そのような遺伝的融合は、単一の隣接遺伝子配列の発現を引き起こす。好ましい遺伝的融合は、フレーム内にあり、すなわち、２つまたそれ以上のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）は、本来のＯＲＦの正確なリーディングフレームを維持する方法で、連続的なより長いＯＲＦを形成するように融合される。したがって、得られる組み換え融合タンパク質は、本来のＯＲＦ（天然では、断片は、通常それほど接合されていない）によってコードされるポリペプチドに対応する２つまたそれ以上のタンパク質断片を含有する一本鎖ポリペプチドである。リーディングフレームは、そのために融合遺伝断片全体に連続して作製されるが、タンパク質断片は、例えば、インフレームポリペプチドリンカーによって物理的または空間的に分離される場合がある。

【００９０】

本明細書において使用される「Ｆｃ領域」という用語は、天然免疫グロブリンの２つの重鎖のそれぞれのＦｃドメイン（またはＦｃ部分）によって形成される天然免疫グロブリンの一部として定義される。天然Ｆｃ領域は、ホモ二量体である。対照的に、本明細書において使用される「遺伝的に融合したＦｃ領域」または「一本鎖Ｆｃ領域」（ｓｃＦｃ領域）という用語は、一本のポリペプチド鎖（すなわち、単一の隣接遺伝子配列においてコードされる）内において遺伝的に連鎖しているＦｃドメイン（またはＦｃ部分）から成る合成Ｆｃ領域を指す。したがって、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）は、単量体である。

【００９１】

本明細書において使用される「Ｆｃドメイン」という用語は、パパイン切断部位（すなわち、１１４となる重鎖定常領域の第１の残基を取る、ＩｇＧにおける残基２１６）のちょうど上流にあるヒンジ領域で開始し、抗体のＣ末端で終止する単一免疫グロブリン重鎖の一部を指す。したがって、完全Ｆｃドメインは、少なくともヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを含む。

【００９２】

本明細書において使用される「Ｆｃドメイン部分」または「Ｆｃ部分」という用語は、ＦｃドメインのまたはＦｃドメインに由来するアミノ酸配列を含む。ある実施形態においては、Ｆｃ部分は、ヒンジ（例えば、上部、中部、および／または下部ヒンジ領域）ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、ＣＨ４ドメイン、またはそれらの変異体、部分、もしくは断片のうちの少なくとも１つを含む。他の実施形態においては、Ｆｃ部分は、完全Ｆｃドメイン（すなわち、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメイン）を含む。一実施形態においては、Ｆｃ部分は、ＣＨ３ドメイン（またはその一部）と

融合するヒンジドメイン（またはその一部）を含む。別の実施形態においては、Ｆｃ部分は、ＣＨ３ドメイン（またはその一部）と融合するＣＨ２ドメイン（またはその一部）を含む。別の実施形態においては、Ｆｃ部分は、ＣＨ３ドメインまたはその一部から成る。別の実施形態においては、Ｆｃ部分は、ヒンジドメイン（またはその一部）およびＣＨ３ドメイン（またはその一部）から成る。別の実施形態においては、Ｆｃ部分は、ＣＨ２ドメイン（またはその一部）およびＣＨ３ドメインから成る。別の実施形態においては、Ｆｃ部分は、ヒンジドメイン（またはその一部）およびＣＨ２ドメイン（またはその一部）から成る。一実施形態においては、Ｆｃ部分は、ＣＨ２ドメイン（例えば、ＣＨ２ドメインのすべてまたは一部）の少なくとも一部を欠く。一実施形態においては、本発明のＦｃ領域（ｓｃＦｃ領域）は、ＦｃＲｎ結合に必要とされる当技術分野で周知のＦｃ分子の少なくとも一部を含む。別の実施形態においては、本発明のＦｃ領域（ｓｃＦｃ領域）は、ＦｃγＲ結合に必要とされる当技術分野で周知のＦｃ分子の少なくとも一部を含む。一実施形態においては、本発明のＦｃ領域（ｓｃＦｃ領域）は、プロテインＡ結合に必要とされる当技術分野で周知のＦｃ分子の少なくとも一部を含む。一実施形態においては、本発明のＦｃ領域（ｓｃＦｃ領域）は、プロテインＧ結合に必要とされる当技術分野で周知のＦｃ分子の少なくとも一部を含む。

【００９３】

本明細書において説明されるように、当業者にとって当然のことながら、いずれのＦｃドメインも、天然に存在する免疫グロブリン分子の天然Ｆｃドメインとアミノ酸配列において異なるように、修飾することができる。ある例示的な実施形態においては、Ｆｃ部分は、エフェクタ機能（例えば、ＦｃγＲ結合）を保持する。

【００９４】

本発明のポリペプチドのＦｃドメインまたは部分は、異なる免疫グロブリン分子に由来する場合がある。例えば、ポリペプチドのＦｃドメインまたは部分は、ＩｇＧ１分子に由来するＣＨ２および／またはＣＨ３ドメイン、およびＩｇＧ３分子に由来するヒンジ領域を含む場合がある。別の例においては、Ｆｃドメインまたは部分は、一部においてＩｇＧ１分子、および一部においてＩｇＧ３分子に由来するキメラヒンジ領域を含む場合がある。別の例においては、Ｆｃドメインまたは部分は、一部においてＩｇＧ１分子、および一部においてＩｇＧ４分子に由来するキメラヒンジを含むことができる。

【００９５】

本明細書において使用される「免疫グロブリン」という用語は、ポリペプチドが任意の関連する特定の免疫反応性を有するかどうかに関わらず、２つの重鎖および２つの軽鎖の組み合わせを有するポリペプチドを含む。本明細書において使用される「抗体」という用語は、対象の抗原に対する有意な周知の特定の免疫反応活性を有するような集合体（例えば、その無傷抗体分子、抗体断片、または変異体）を指す。抗体および免疫グロブリンは、軽鎖および重鎖を含み、その間に鎖間共有結合が有る場合もあれば無い場合もある。脊椎動物系における塩基免疫グロブリン構造は、比較的よく理解されている。

【００９６】

以下でより詳述されるように、一般名称「抗体」は、生化学的に区別することができる抗体の５つの明確に異なるクラスを含む。抗体の各クラスのＦｃ部分は、明らかに本発明の範囲内にあり、以下の考察は、概して、免疫グロブリン分子のＩｇＧクラスを対象とする。ＩｇＧに関して、免疫グロブリンは、分子量約２３，０００ダルトンの２つの同一の軽いポリペプチド鎖、および分子量５３，０００～７０，０００の２つの同一の重鎖を含む。４つの鎖は、「Ｙ」構成において、ジスルフィド結合によって接合され、軽鎖は、「Ｙ」の開口部で開始し、可変ドメインを通して連続して、重鎖を支える。

【００９７】

免疫グロブリンの軽鎖は、カッパまたはラムダ（k、l）のいずれかとして分類される。各重鎖クラスは、カッパまたはラムダ軽鎖のいずれかと結合することができる。一般的に、軽鎖および重鎖は、互いに共有結合され、２つの重鎖の「尾」部分は、免疫グロブリンが、ハイブリドーマ、Ｂ細胞、または遺伝子組み換えの宿主細胞のいずれかによって生成

される場合、共有ジスルフィド結合または非共有結合によって互いに結合する。重鎖においては、アミノ酸配列は、Ｙ構成のフォーク状端部にあるＮ末端から、各鎖の下部にあるＣ末端にまで及ぶ。当業者は、重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはエプシロン（γ、μ、α、δ、ε）のクラスとして分類され、その中でいくつかのサブクラス（例えば、γ１～γ４）に分類されることを認識する。それが、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ　ＩｇＧ、またはＩｇＥそれぞれの抗体の「クラス」を決定するこの鎖の性質である。免疫グロブリンサブクラス（イソタイプ）、例えば、IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1等は、よく特徴付けられ、機能上の特性を与えることが周知である。これらのクラスおよびイソタイプのそれぞれの修飾版は、本開示を考慮して、当業者にとって容易に識別可能であり、したがって、本発明の範囲内にある。

【００９８】

軽鎖および重鎖の両方は、構造的および機能的相同性の領域に分けられる。「領域」という用語は、単一の免疫グロブリンの部分または一部（「Ｆｃ領域」という用語の場合のように）、または単一の抗体鎖を指し、定常領域または可変領域、および該ドメインのより個別的部分または一部を含む。例えば、軽鎖可変ドメインは、本明細書において定義される「フレームワーク領域」または「ＦＲ」の間に散在される「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」を含む。

【００９９】

免疫グロブリンのある領域は、「定常」（Ｃ）領域または「可変」（Ｖ）領域として定義することができる。これは、「定常領域」の場合では、様々なクラスのメンバーの領域内の配列変異の相対的欠如、または「可変領域」の場合では、様々なクラスのメンバの領域内の著しい変異に基づく。「定常領域」および「可変領域」という用語は、機能を表すように使用することもできる。この点において、免疫グロブリンまたは抗体の可変領域は、抗原認識および特異性を決定することが認識される。反対に、免疫グロブリンまたは抗体の定常領域は、分泌、経胎盤可動性、Ｆｃ受容体結合、補体結合等の重要なエフェクタ機能を与える。様々な免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造および三次元構成は、周知である。

【０１００】

免疫グロブリン重鎖または軽鎖の定常および可変領域は、ドメインに折り畳まれる。「ドメイン」という用語は、例えば、β－プリーツシートおよび／または鎖内ジスルフィド結合によって安定化されるペプチドループを含む（例えば、３～４つのペプチドループを含む）重鎖または軽鎖ポリペプチドの独立折り畳み球状領域を指す。免疫グロブリンの軽鎖上の定常領域ドメインは、ほとんど同じ意味で、「軽鎖定常領域ドメイン」、「ＣＬ領域」または「ＣＬドメイン」と称される。重鎖（例えば、ヒンジ、ＣＨ１、ＣＨ２、またはＣＨ３ドメイン）上の定常ドメインは、ほとんど同じ意味で「重鎖定常領域ドメイン」、「ＣＨ」領域ドメイン、または「ＣＨドメイン」と称される。軽鎖上の可変ドメインは、ほとんど同じ意味で、「軽鎖可変領域ドメイン」、「ＶＬ領域ドメイン」または「ＶＬドメイン」と称される。重鎖上の可変ドメインは、ほとんど同じ意味で、「重鎖可変領域ドメイン」、「ＶＨ領域ドメイン」、または「ＶＨドメイン」と称される。

【０１０１】

慣例により、可変および定常領域ドメインの番号は、それらが免疫グロブリンまたは抗体の抗原結合部位またはアミノ末端からより遠位になるにつれて増加する。各重および軽免疫グロブリン鎖のＮ末端は、可変領域であり、Ｃ末端は、定常領域であり、ＣＨ３およびＣＬドメインは、実際には、それぞれ、重鎖および軽鎖のカルボキシ末端を含む。したがって、軽鎖免疫グロブリンのドメインは、ＶＬ－ＣＬの方向に配置されるが、重鎖のドメインは、ＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３の方向に配置される。

【０１０２】

ＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、およびＣＨ３ドメインにおけるアミノ酸位置を含む、重鎖定常領域におけるアミノ酸位置は、本明細書において、ＥＵ指標付番方式（米国保健社会福祉省、第５版、１９９１の「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍ

ｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」におけるＫａｂａｔ ｅｔ ａｌ．参照）に従って付番される。対照的に、軽鎖定常領域（例えば、ＣＬドメイン）におけるアミノ酸部分は、本明細書において、カバット指標付番方式（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，前掲書参照）に従って付番される。

【０１０３】

カバット指標付番方式に従い、本明細書において使用される「V_Hドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインを含み、「V_Lドメイン」という用語は、免疫グロブリン軽鎖のアミノ末端可変ドメインを含む。

【０１０４】

本明細書において使用される「ＣＨ１ドメイン」という用語は、例えば、約ＥＵ位置１１８～２１５から伸展する免疫グロブリン重鎖の第１の（アミノ最末端）定常領域ドメインを含む。ＣＨ１ドメインは、免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域までV_Hドメインおよびアミノ末端に隣接し、免疫グロブリン重鎖のＦｃ領域の一部を形成しない。一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖分子（例えば、ヒトＩｇＧ１またはＩｇＧ４分子）に由来するＣＨ１ドメインを含む。

【０１０５】

本明細書において使用される「ヒンジ領域」という用語は、ＣＨ１ドメインをＣＨ２ドメインに接合する重鎖分子の部分を含む。このヒンジ領域は、約２５の残基を含み、柔軟であるため、２つのＮ末端抗原結合領域を独立して移動させることができる。ヒンジ領域は、上部、中部、および下部ヒンジドメインという、３つの明確に異なるドメインにさらに分けることができる（Ｒｏｕｘ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９８，１６１：４０８３）。

【０１０６】

本明細書において使用される「ＣＨ２ドメイン」という用語は、例えば、約ＥＵ位置２３１～３４０から伸展する重鎖免疫グロブリン分子の部分を含む。ＣＨ２ドメインは、別のドメインと密接に対を成さないという点において特有である。むしろ、２つのＮ結合分枝炭水化物鎖は、完全な天然ＩｇＧ分子の２つのＣＨ２ドメインの間に挿入される。一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＩｇＧ１分子（例えば、ヒトＩｇＧ１分子）に由来するＣＨ２ドメインを含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＩｇＧ４分子（例えば、ヒトＩｇＧ４分子）に由来するＣＨ２ドメインを含む。例示的な実施形態においては、本発明のポリペプチドは、ＣＨ２ドメイン（ＥＵ位置２３１～３４０）またはその一部を含む。

【０１０７】

本明細書において使用される「ＣＨ３ドメイン」という用語は、ＣＨ２ドメインのＮ末端から約１１０残基伸展する重鎖免疫グロブリン分子の部分（例えば、約位置３４１～４４６ｂ（ＥＵ付番方式））を含む。ＣＨ３ドメインは、通常、抗体のＣ末端部分を形成する。しかしながら、一部の免疫グロブリンにおいては、付加的ドメインが、分子のＣ末端部分を形成するためにＣＨ３ドメインから伸展することができる（例えば、ＩｇＭのμ鎖およびＩｇＥのε鎖におけるＣＨ４ドメイン）。一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＩｇＧ１分子（例えば、ヒトＩｇＧ１分子）に由来するＣＨ３ドメインを含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＩｇＧ４分子（例えば、ヒトＩｇＧ４分子）に由来するＣＨ３ドメインを含む。

【０１０８】

本明細書において使用される「ＣＬドメイン」という用語は、例えば、約カバット位置１０７Ａ～２１６に伸展する免疫グロブリン軽鎖の第１の（アミノ最末端）定常領域ドメインを含む。ＣＬドメインは、V_Lドメインに隣接する。一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、カッパ軽鎖（例えば、ヒトカッパ軽鎖）に由来するＣＬドメインを含む。

【０１０９】

本明細書において使用される「エフェクタ機能」という用語は、タンパク質および／ま

たは免疫系の細胞に結合し、様々な生物学的効果を媒介する、Ｆｃ領域、またはその一部の機能的能力を指す。エフェクタ機能は、抗原依存性または抗原非依存性であり得る。エフェクタ機能の低下は、抗体（またはその断片）の可変領域の抗原結合活性を維持しながらの１つまたはそれ以上のエフェクタ機能の低下を示す。例えば、Ｆｃ受容体または補体タンパク質へのＦｃ結合のエフェクタ機能の増減は、倍率変化（例えば、１倍、２倍等による変化）を単位として表現することができ、例えば、当技術分野で周知のアッセイを使用して判定される結合活性の変化率（％）に基づいて計算することができる。

【０１１０】

本明細書において使用される「抗原依存性エフェクタ機能」という用語は、通常、対応する抗原への抗体の結合の後に誘導されるエフェクタ機能を指す。典型的な抗原依存性エフェクタ機能は、補体タンパク質（例えば、Ｃ１ｑ）に結合する能力を含む。例えば、Ｆｃ領域への補体のＣ１成分の結合は、古典的補体系を活性化することができ、補体依存性細胞毒性（ＣＤＣＣ）と称される過程である細胞病原体のオプソニン化および溶解につながる。補体の活性化は、炎症性反応も刺激し、自己免疫過敏性にも関与する可能性がある。

【０１１１】

他の抗原依存性エフェクタ機能は、抗体のＦｃ領域を介する、細胞上のあるＦｃ受容体（「ＦｃＲ」）への抗体の結合によって媒介される。ＩｇＧ（ガンマ受容体、すなわちＩｇγＲ）、ＩｇＥ（エプシロン受容体、すなわちＩｇεＲ）、ＩｇＡ（アルファ受容体、すなわちＩｇαＲ）、およびＩｇＭ（ミュー受容体、すなわちＩｇμＲ）を含む、抗体の異なるクラスに対する特異的な多くのＦｃ受容体が存在する。細胞表面上のＦｃ受容体への抗体の結合は、免疫複合体のエンドサイトーシス、抗体で被覆された粒子または微生物の貪食および破壊（抗体依存性食作用、すなわちＡＤＣＰとも称される）、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体で被覆された標的細胞の溶解（抗体依存性細胞媒介細胞毒性、すなわちＡＤＣＣと称される）、炎症性メディエータの放出、免疫系細胞活性化の調節、胎盤通過および免疫グロブリン産生の制御を含む、多くの重要で多様な生物学的反応を誘引する。

【０１１２】

ある種のＦｃ受容体であるＦｃガンマ受容体（ＦｃγＲ）は、免疫増強を無効にするか、または強化するかのいずれかにおいて重要な役割を果たす。ＦｃγＲは、白血球上で発現し、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、およびＦｃγＲＩＩＩの３つの明確に異なるクラスから成る（Ｇｅｓｓｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｈｅｍａｔｏｌ．，（１９９８），７６：２３１－４８）。構造的には、ＦｃγＲは、すべて、２つまたは３ついずれかのＩｇ様ドメインから成る細胞外部分を有するＩｇＧ－結合α－鎖を有する、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。ヒトＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）は、ヒト単球上で発現し、単量体ＩｇＧ１、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４に対して高親和性結合（$Ka = 10^{8} \sim 10^{9} M^{-1}$）を示す。ヒトＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）およびＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）は、ＩｇＧ１およびＩｇＧ３に対して低い親和性（$Ka < 10^{7} M^{-1}$）を有し、これらのＩｇＧイソタイプの複合体またはポリマー型のみに結合することができる。さらに、ＦｃγＲＩＩおよびＦｃγＲＩＩＩクラスは、「Ａ」および「Ｂ」型の両方を含む。ＦｃγＲＩＩａ（ＣＤ３２ａ）およびＦｃγＲＩＩＩａ（ＣＤ１６ａ）は、膜透過ドメインによってマクロファージ、ＮＫ細胞、および一部のＴ細胞の表面に結合するが、ＦｃγＲＩＩｂ（ＣＤ３２ｂ）およびＦｃγＲＩＩＩｂ（ＣＤ１６ｂ）は、ホスファチジルイノシトールグリカン（ＧＰＩ）アンカーを介して顆粒球（例えば、好中球）の細胞表面に選択的に結合する。ヒトＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩ、およびＦｃγＲＩＩＩのそれぞれのマウス同族体は、ＦｃγＲＩＩａ、ＦｃγＲＩＩｂ／１、およびＦｃγＲｌｏである。

【０１１３】

本明細書において使用される「抗原非依存性エフェクタ機能」という用語は、抗体がその対応する抗原に結合しているかどうかにかかわらず、抗体によって誘導することができるエフェクタ機能を指す。典型的な抗原非依存性エフェクタ機能は、免疫グロブリンの細

胞輸送、循環半減期、およびクリアランス率、ならびに精製の促進を含む。回収受容体としても周知の、構造的に特有のＦｃ受容体である「新生児Ｆｃ受容体」または「ＦｃＲｎ」は、半減期および細胞輸送の調節において重要な役割を果たす。微生物細胞（例えば、ブドウ球菌プロテインＡまたはＧ）から精製される他のＦｃ受容体は、高い親和性でＦｃ領域に結合することが可能であり、Ｆｃ含有ポリペプチドの精製を容易にするために使用することができる。

【０１１４】

免疫グロブリンスーパーファミリーに属するＦｃγＲとは異なり、ヒトＦｃＲｎは、構造的に主要組織適合抗原（ＭＨＣ）クラスＩのポリペプチドと類似する（Ｇｈｅｔｉｅ ａｎｄ Ｗａｒｄ，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ，（１９９７），１８（１２）：５９２－８）。ＦｃＲｎは、通常、可溶性βまたは軽鎖（β２ミクログロブリン）と複合体を形成した膜透過αまたは重鎖から成るヘテロ二量体として発現する。ＦｃＲｎは、クラスＩ ＭＨＣ分子と２２～２９％の配列同一性を共有し、非機能版のＭＨＣペプチド結合溝を有する（Ｓｉｍｉｓｔｅｒ ａｎｄ Ｍｏｓｔｏｖ，Ｎａｔｕｒｅ，（１９８９），３３７：１８４－７）。ＭＨＣと同様に、ＦｃＲｎのα鎖は、３つの細胞外ドメイン（α１、α２、α３）から成り、短い細胞質内尾部が、タンパク質を細胞表面に固定する。α１およびα２ドメインは、抗体のＦｃ領域におけるＦｃＲ結合部位と相互作用する（Ｒａｇｈａｖａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ，（１９９４），１：３０３－１５）。ＦｃＲｎは、哺乳類の胎盤子宮部または卵黄嚢において発現され、母親から胎児へのＩｇＧの移動に関与する。ＦｃＲｎは、げっ歯類の新生児の小腸においても発現され、摂取された初乳またはミルクからの母体ＩｇＧの刷子縁上皮全体への移動に関与する。ＦｃＲｎは、多数の種に渡り多数の他の組織において、および様々な内皮細胞株においても発現される。ヒト成人の血管内皮、筋血管系、および肝類洞においても発現される。ＦｃＲｎは、ＩｇＧを血清に結合および再循環することによって、ＩｇＧの循環半減期または血清レベルの維持において付加的役割を果たすと考えられる。ＩｇＧ分子のＦｃＲｎの結合は、厳密にｐＨ依存性であり、７．０未満のｐＨで最適結合となる。

【０１１５】

本明細書において使用される「半減期」という用語は、体内における特定の結合ポリペプチドの生物学的半減期を指す。半減期は、対象に投与される量の半分が循環および／または動物における他の組織から除去されるのに必要な時間によって表すことができる。既定の結合ポリペプチドのクリアランス曲線が、時間の関数として構築される場合。曲線は、通常、急速なα相およびより長いβ相を有する二相性である。α相は、通常、血管内および血管外空の間の投与されたＦｃポリペプチドの平衡を表し、部分的に、ポリペプチドの大きさによって決定される。β相は、通常、血管内空間における結合ポリペプチドの異化を表す。したがって、好ましい実施形態においては、本明細書において使用される半減期という用語は、β相における結合ポリペプチドの半減期を指す。ヒトにおけるヒト抗体の典型的なβ相半減期は、２１日である。

【０１１６】

上記のように、抗体の可変領域により、抗体は、抗原上のエピトープを選択的に認識し、特異的に結合することができる。つまり、抗体のV_LドメインおよびV_Hドメインは、組み合わされて、三次元抗原結合部位を画定する可変領域（Ｆｖ）を形成する。この四次抗体構造は、Ｙの各アームに存在する抗原結合部位を形成する。より具体的には、抗原結合部位は、各重鎖または軽鎖可変領域上の３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）によって画定される。

【０１１７】

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、細胞表面または可溶性抗原等の抗原に特異的に結合する（と免疫反応する）部位を含む。一実施形態においては、結合部位は、免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域を含み、これらの可変領域によって形成される結合部位は、抗体の特異性を決定する。抗原結合部位は、ポリペプチドごとに異なる可変領域によって形成される。一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチド

は、抗体分子の少なくとも１つの重鎖ＣＤＲまたは軽鎖ＣＤＲ（例えば、当技術分野で周知であるか、または本明細書において記載されるものの配列）を含む抗原結合部位を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、１つまたはそれ以上の抗体分子からの少なくとも２つのＣＤＲを含む抗原結合部位を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、１つまたはそれ以上の抗体分子からの少なくとも３つのＣＤＲを含む抗原結合部位を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、１つまたはそれ以上の抗体分子からの少なくとも４つのＣＤＲを含む抗原結合部位を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、１つまたはそれ以上の抗体分子からの少なくとも５つのＣＤＲを含む抗原結合部位を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、抗体分子からの６つのＣＤＲを含む抗原結合部位を含む。対象結合ポリペプチドに含むことができる少なくとも１つのＣＤＲを含む例示的な抗体分子は、当技術分野で周知であり、例示的な分子は、本明細書において記載される。

【０１１８】

本明細書において使用される「ＣＤＲ」または「相補性決定領域」という用語は、重鎖または軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内において見られる非隣接抗原結合部位を意味する。これらの特定の領域は、Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５２，６６０９－６６１６（１９７７）およびＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｏｆ　ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　ｉｎｔｅｒｅｓｔ．（１９９１）、およびＣｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７）、およびＭａｃＣａｌｌｕｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２－７４５（１９９６）によって記載され、定義は、互いに比較される場合、アミノ酸残基の重複またはサブセットを含む。上記に記載される各参考文献によって定義されるＣＤＲを包含するアミノ酸残基は、比較のために説明される。好ましくは、「ＣＤＲ」という用語は、配列比較に基づくカバットによって定義されるＣＤＲである。

【０１１９】

【化１】

	CDR Definitions		
	Kabat[1]	Chothia[2]	MacCallum[3]
V_H CDR1	31-35	26-32	30-35
V_H CDR2	50-65	53-55	47-58

【化２】

V_H CDR3	95-102	96-101	93-101
V_L CDR1	24-34	26-32	30-36
V_L CDR2	50-56	50-52	46-55
V_L CDR3	89-97	91-96	89-96

[1] 残基付番は、上記のＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．の命名法に従う。
[2] 残基付番は、上記のＣｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．の命名法に従う。
[3] 残基付番は、上記のＭａｃＣａｌｌｕｍ　ｅｔ　ａｌ．の命名法に従う。

【０１２０】

本明細書において使用される「フレームワーク領域」または「ＦＲ領域」という用語は、可変領域の一部であるが、ＣＤＲの一部ではないアミノ酸残基を含む（例えば、ＣＤＲのカバット定義を使用して）。したがって、可変領域フレームワークは、約１００～１２０のアミノ酸の長さであるが、ＣＤＲの外部にあるそれらのアミノ酸のみを含む。重鎖可変領域の具体例およびＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．によって定義されるＣＤＲに関して、フレームワーク領域１は、アミノ酸１～３０を包含する可変領域のドメインに対応し、フレ

ームワーク領域２は、アミノ酸３６～４９を包含する可変領域のドメインに対応し、フレームワーク領域３は、アミノ酸６６～９４を包含する可変領域のドメインに対応し、フレームワーク領域４は、アミノ酸１０３から可変領域の端部までの可変領域のドメインに対応する。軽鎖に対するフレームワーク領域は、各軽鎖可変領域ＣＤＲによって同様に分離される。同様に、Ｃｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．またはＭｃＣａｌｌｕｍ　ｅｔ　ａｌ．によるＣＤＲの定義を使用して、フレームワーク領域境界は、上述のようなそれぞれのＣＤＲ末端によって分離される。好ましい実施形態においては、ＣＤＲは、カバットによって定義される。

【０１２１】

天然に存在する抗体においては、各単量体抗体上に存在する６つのＣＤＲは、抗体が、水性環境においてその三次元配置を担うため、抗原結合部位を形成するために特異的に位置するアミノ酸の短い非隣接配列である。重および軽可変ドメインの残余は、アミノ酸配列においてより少ない分子間変動性を示し、フレームワーク領域と称される。フレームワーク領域は、β－シート配座を該して採用し、ＣＤＲは、β－シート構造を接続し、場合によっては、その一部を形成するループを形成する。したがって、これらのフレームワーク領域は、鎖間非共有相互作用によって正確な方向に６つのＣＤＲを位置付けるための骨格を形成するように作用する。位置付けられたＣＤＲによって形成される抗原結合部位は、免疫反応性抗原上のエピトープに補完的な表面を画定する。この補完的表面は、免疫反応性抗原エピトープへの抗体の非共有結合を促進する。ＣＤＲの位置は、当業者によって容易に認識することができる。

【０１２２】

ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、選択された抗原との結合ポリペプチドのつながりを提供する少なくとも２つの抗原結合ドメイン（例えば、同じ結合ポリペプチド内における（例えば、一本鎖ポリペプチドのＮおよびＣ末端の両方で）か、または本発明の多重結合タンパク質の各成分結合ポリペプチドに結合される）を含む。抗原結合ドメインは、同じ免疫グロブリン分子に由来する必要はない。この点において、可変領域は、所望の抗原に対して体液性反応を引き起こし、免疫グロブリンを生成するように誘導することができる、任意の種類の動物に由来することができるか、またはしなくてもよい。したがって、可変領域は、例えば、哺乳類由来であり得、例えば、ヒト、マウス、非ヒト霊長類（カニクイザル、マカク等）、オオカミ、ラクダ科の動物（例えば、ラクダ、ラマ、および関連種からの）である場合がある。

【０１２３】

「抗体変異体」または「修飾抗体」という用語は、天然に存在しない、少なくとも１つのアミノ酸または本明細書において記載されるアミノ酸修飾によって天然由来の抗体のものとは異なるアミノ酸配列またはアミノ酸側鎖化学を有する抗体を含む。本明細書において使用される「抗体変異体」という用語は、天然に存在するものとならないように変化される抗体の合成型を含み、例えば、少なくとも２つの重鎖部分を含むが、２つの完全重鎖を含まない抗体（ドメイン欠失抗体またはミニボディ等）、２つまたそれ以上の異なる抗原または単抗原上の異なるエピトープに結合するように変化される多特異性型の抗体（例えば、二重特異性、三重特異性等）、ｓｃＦｖ分子に接合する重鎖分子、一本鎖抗体、ジアボディ、トリアボディ、および変化したエフェクタ機能を有する抗体等がある。

【０１２４】

本明細書において使用される「ｓｃＦｖ分子」という用語は、１つの軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、またはその一部、および１つの重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、またはその一部から成る結合分子を含み、各可変ドメイン（またはその一部）は、同じまたは異なる抗体に由来する。ｓｃＦｖ分子は、好ましくは、ＶＨドメインとＶＬドメインとの間に介入するｓｃＦｃリンカーを含む。ＳｃＦｖ分子は、当技術分野で周知であり、例えば、米国特許第５，８９２，０１９号、Ｈｏ　ｅｔ　ａｌ．１９８９．Ｇｅｎｅ　７７：５１、Ｂｉｒｄ　ｅｔ　ａｌ．１９８８　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３、Ｐａｎｔｏｌｉａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．１９９１．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３０：１０１１７、Ｍｉｌｅｎｉｃ

ｅｔ ａｌ．１９９１．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５１：６３６３、Ｔａｋｋｉｎｅｎ ｅｔ ａｌ．１９９１．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ４：８３７において記載される。

【０１２５】

本明細書において使用される「ｓｃＦｖリンカー」は、ｓｃＦｖのＶＬおよびＶＨドメインとの間に介入する部分を指す。ｓｃＦｖリンカーは、好ましくは、抗原結合配座におけるｓｃＦｖ分子を維持する。一実施形態においては、ｓｃＦｖリンカーは、ｓｃＦｖリンカーペプチドを含むか、またはそれから成る。ある実施形態においては、ｓｃＦｖリンカーペプチドは、ｇｌｙ－ｓｅｒポリペプチドリンカーを含むか、またはそれから成る。他の実施形態においては、ｓｃＦｖリンカーは、ジスルフィド結合を含む。

【０１２６】

本明細書において使用される「ｇｌｙ－ｓｅｒポリペプチドリンカー」という用語は、グリシンおよびセリン残基から成るペプチドを指す。例示的なｇｌｙ／ｓｅｒポリペプチドリンカーは、アミノ酸配列（Gly_4Ser）ｎを含む。一実施形態においては、ｎ＝１である。一実施形態においては、ｎ＝２である。別の実施形態においては、ｎ＝３、すなわち、（Gly_4Ser）$_3$である。別の実施形態においては、ｎ＝４、すなわち、（Gly_4Ser）$_4$である。別の実施形態においては、ｎ＝５である。さらに別の実施形態においては、ｎ＝６である。別の実施形態においては、ｎ＝７である。さらに別の実施形態においては、ｎ＝８である。別の実施形態においては、ｎ＝９である。さらに別の実施形態においては、ｎ＝１０である。別の例示的なｇｌｙ／ｓｅｒポリペプチドリンカーは、アミノ酸配列Ｓｅｒ（Gly_4Ser）ｎを含む。一実施形態においては、ｎ＝１である。一実施形態においては、ｎ＝２である。好ましい実施形態においては、ｎ＝３である。別の実施形態においては、ｎ＝４である。別の実施形態においては、ｎ＝５である。さらに別の実施形態においては、ｎ＝６である。

【０１２７】

本明細書において使用される「タンパク質安定性」という用語は、環境条件（例えば、温度の上昇または低下）に応じたタンパク質の１つまたはそれ以上の物理的特性の維持の当該技術分野において承認されている尺度を指す。一実施形態においては、物理的特性は、タンパク質の共有結合構造の維持である（例えば、タンパク質分解的切断、好ましくない酸化、または脱アミドの非存在）。別の実施形態においては、物理的特性は、正確に折り畳まれた状態のタンパク質の存在である（例えば、可溶性または不溶性凝集体または沈殿物の非存在）。

【０１２８】

「グリコシル化」という用語は、ポリペプチドへの１つまたはそれ以上の炭水化物の共有結合を指す。通常、グリコシル化は、細胞またはそれからの抽出物の細胞内環境内において生じる場合がある翻訳後のイベントである。グリコシル化という用語は、例えば、Ｎ－結合グリコシル化（１つまたはそれ以上の糖類が、アスパラギン残基に結合される）および／またはＯ－結合グリコシル化（１つまたはそれ以上の糖類が、ヒドロキシル基を有するアミノ酸残基に結合される（例えば、セリンまたはトレオニン）を含む。

【０１２９】

本明細書において使用される「天然システイン」という用語は、ポリペプチドの特定のアミノ酸部分で天然に存在する、人工的に修飾、導入、または変化されていないシステインアミノ酸を指す。「操作システイン残基、またはその類似体」または「操作システイン、またはその類似体」という用語は、システイン残基、またはその類似体をその位置に天然に含有しないポリペプチドのアミノ酸部分に、合成の手段（例えば、組み換え手法、インビトロペプチド合成、ペプチドの酵素的または化学的結合、またはこれらの手法のいくつかの組み合わせ）で導入される、非天然のシステイン残基またはシステイン類似体（例えば、チアゾリン－４－カルボン酸およびチアゾリジン－４－カルボン酸（チオプロリン、Ｔｈ）等のチオール含有類似体）を指す。

【０１３０】

本明細書において使用される「ジスルフィド結合」という用語は、２つの硫黄原子の間に形成される共有結合を含む。アミノ酸システインは、ジスルフィド結合を形成するか、第２のチオール基に架橋することができるチオール基を含む。大半の天然に存在するＩｇＧ分子では、ＣＨ１およびＣＬ領域は、天然ジスルフィド結合によって結合され、２つの重鎖は、カバット付番方式を使用すると２３９および２４２（ＥＵ付番方式では位置２２６または２２９）に対応する位置で２つの天然ジスルフィド結合によって結合される。

【０１３１】

本明細書において使用される「結合システイン」という用語は、第２の天然もしくは操作システイン、または同じもしくは異なるポリペプチド内に存在する他の残基とのジスルフィド結合または他の共有結合を形成するポリペプチド内における天然または操作システイン残基を指す。「鎖内結合システイン」は、同じポリペプチド内に存在する第２のシステインに共有結合（すなわち、鎖内ジスルフィド結合）される結合システインを指す。「鎖間結合システイン」は、異なるポリペプチド内に存在する第２のシステインに共有結合（すなわち、鎖間ジスルフィド結合）される結合システインを指す。

【０１３２】

本明細書において使用される「遊離システイン」という用語は、大幅に縮小した形で存在するポリペプチド配列（および類似体、またはその模倣剤、例えば、チアゾリン－４－カルボン酸およびチアゾリジン－４カルボン酸（チオプロリン、Ｔｈ））内における天然または操作システインアミノ酸残基を指す。遊離システインは、好ましくは、本発明のエフェクタ部分で修飾することが可能である。

【０１３３】

「チオール修飾試薬」という用語は、結合ポリペプチド（例えば、結合ポリペプチドのポリペプチドリンカー内）にいて操作システイン残基、またはその類似体のチオール基と選択的に反応することができ、それによって、結合ポリペプチドへのエフェクタ部分の部位特異的化学付加または架橋のための手段を提供し、それによって修飾結合ポリペプチドを形成する化学物質を指す。好ましくは、チオール修飾試薬は、遊離システイン残基に存在するチオールまたはスルフヒドリル官能基を活用する。例示的なチオール修飾試薬としては、マレイミド、ハロゲン化アルキルおよびハロゲン化アリール、α－ハロアシル、およびピリジルジスルフィドを含む。

【０１３４】

「機能的な部分」という用語は、好ましくは、所望の機能を結合ポリペプチドに添加する部分を含む。好ましくは、機能は、ポリペプチドの内因性の所望の活性、例えば、分子の抗原結合活性を有意に変化させずに付加される。本発明の結合ポリペプチドは、同じまたは異なり得る１つまたはそれ以上の機能的な部分を含むことができる。有用な機能的な部分の例としては、これらに限定されないが、エフェクタ部分、親和性部分、および遮断部分を含む。

【０１３５】

例示的な遮断部分は、グリコシル化の低下が、例えば、ポリペプチドをグリコシル化するグリコシダーゼの能力を遮断することによって生じるように、十分な立体容積および／または電荷の部分を含む。遮断部分は、例えば、受容体または補体タンパク質に結合するＦｃ領域の能力を阻害することによって、エフェクタ機能をさらに、または代替として低下させることができる。好ましい遮断部分としては、システイン付加物、シスチン、混合ジスルフィド付加物、およびＰＥＧ部分を含む。例示的な検出可能な部分としては、蛍光部分、放射性同位体部分、Ｘ線不透過性部分等を含む。

【０１３６】

化学部分の共役に関して、「結合部分」という用語は、結合ポリペプチドの残余に機能的な部分を結合させることが可能な部分である。結合部分は、それが開裂可能または非開裂可能となるように選択することができる。開裂不可能な結合部分は、概して、高い系統的安定性を有するが、好ましくない薬物動態も有する場合がある。

【０１３７】

「スペーサ部分」という用語は、空間を分子に導入するよう設計される非タンパク質部分である。一実施形態においては、スペーサ部分は、炭素、酸素、窒素、硫黄等から選択される０～１００の原子の任意で置換された鎖であり得る。一実施形態においては、スペーサ部分は、それが水溶性となるように選択される。別の実施形態においては、スペーサ部分は、ポリアルキレングリコール、例えば、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールである。

【０１３８】

「ペグ化部分」または「ＰＥＧ部分」という用語は、カップリング剤、またはカップリングまたは活性化部分（例えば、チオール、トリフラート、トレシレート、アジリジン、オキシラン、または好ましくは、マレイミド部分、例えば、ＰＥＧ－マレイミド）を有する誘導体化を伴なう、又は伴なわない、ポリアルキレングリコール化合物、またはその誘導体を含む。他の適切なポリアルキレングリコール化合物としては、マレイミドモノメトキシＰＥＧ、活性ＰＥＧポリプロピレングリコールが含まれるが、以下の荷電または中性ポリマーも含む：デキストラン、コロミン酸、または他の炭水化物ベースのポリマー、アミノ酸のポリマー、およびビオチン誘導体。

【０１３９】

本明細書において使用される「エフェクタ部分」（Ｅ）という用語は、生物学的または他の機能活性を有する診断用および治療薬（例えば、タンパク質、核酸、脂質、薬物部分、およびそれらの断片）を含むことができる。例えば、結合ポリペプチドに共役されるエフェクタ部分を含む結合ポリペプチドは、非共役ポリペプチドと比較して、少なくとも１つの付加的機能または特性を有する。例えば、結合ポリペプチドへの細胞毒性薬物部分（例えば、エフェクタ部分）の（例えば、そのポリペプチドリンカーを介する）共役は、第２の機能として、（すなわち、抗原結合に加えて）薬剤細胞毒性を有する修飾ポリペプチドの形成をもたらす。別の例においては、第１の結合ポリペプチドへの第２の結合ポリペプチドの共役は、付加的結合特性を与えることができる。

【０１４０】

エフェクタ部分が、遺伝的にコードされた治療用もしくは診断用タンパク質または核酸である一態様においては、エフェクタ部分は、当技術分野で周知のペプチド合成または組み換えＤＮＡ方法のいずれかによって合成または発現することができる。エフェクタ部分が、非遺伝的にコードされたペプチド、または薬物部分である別の態様においては、エフェクタ部分は、人工的に合成するか、または天然源から精製することができる。

【０１４１】

本明細書において使用される「薬物部分」という用語は、抗炎症性、抗癌性、抗感染性（例えば、抗真菌性、抗菌性、駆虫性、抗ウイルス性等）、および麻酔性治療薬を含む。さらなる実施形態においては、薬物部分は、抗癌性または細胞毒性薬である。適合性薬物部分は、プロドラッグも含むことができる。

【０１４２】

本明細書において使用される「プロドラッグ」という用語は、親薬物と比較して活性、反応性、あるいは副作用を起こす傾向が低く、酵素的に活性化されるか、またはそうでなければ体内においてより活性を有する型に変換されることが可能な薬学的活性薬剤の前駆体または誘導体型を指す。本発明に適合するプロドラッグとしては、これらに限定されないが、リン酸塩含有プロドラッグ、アミノ酸含有プロドラッグ、チオリン酸塩含有プロドラッグ、硫酸塩含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、β－ラクタム含有プロドラッグ、任意で置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグまたは任意で置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、５－フルオロシトシン、およびより活性を有する細胞毒性遊離薬物に変換することができる他の５－フルオロウリジンプロドラッグを含む。当業者は、化合物の反応を、本発明の修飾結合タンパク質を調製する目的に対してより便利にするために、所望の薬物部分またはそのプロドラッグに対して化学修飾を行うことができる。薬物部分としては、本明細書において記載される薬物部分の誘導体、薬学的に許容される塩、エステル、アミド、およびエーテルも含まれる。誘導体は、特定の

薬物の所望の治療活性を改善するか、または有意に低下させない、本明細書において認識される薬剤に対する修飾を含む。

【０１４３】

本明細書において使用される「抗癌剤」という用語は、腫瘍性または腫瘍細胞の成長および／または増殖に悪影響をもたらし、悪性腫瘍を減少、阻害、または破壊するように作用する場合がある薬剤を含む。そのような薬剤の例としては、これらに限定されないが、細胞増殖抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、細胞毒性ヌクレオシド、チューブリン結合剤、ホルモンおよびホルモン拮抗剤等が含まれる。免疫反応性細胞または悪性細胞の成長を遅延または減速させるように作用するいかなる薬剤も、本発明の範囲内にある。

【０１４４】

「親和性タグ」または「親和性部分」は、結合ポリペプチド、ポリペプチドリンカー、またはエフェクタ部分の１つまたはそれ以上に付着する化学部分であり、精製手順の間、他の成分からのその分離を容易にする。例示的な親和性ドメインとしては、Ｈｉｓタグ、キチン結合ドメイン、マルトース結合ドメイン、ビオチン等が含まれる。

【０１４５】

「親和性樹脂」は、反応混合物の他の成分から親和性ドメインに結合したタンパク質の分離を容易にするために、高い親和性を有する親和性ドメインに結合することが可能な化学的表面である。親和性樹脂は、固体支持体、またはその一部の表面に被覆することができる。代替として、親和性樹脂は、固体支持体を含むことができる。そのような固体支持体としては、適切に修飾されたクロマトグラフィカラム、マイクロタイタープレート、ビーズ、または生体素子（例えば、ガラスウェハ）を含めることができる。例示的な親和性樹脂は、ニッケル、キチン、アミラーゼ等から成る。

【０１４６】

本明細書において使用される「ベクター」または「発現ベクター」は、所望のポリヌクレオチドを導入し、細胞において所望のポリヌクレオチドを発現するための賦形剤として、本発明に従って使用されるベクターを意味する。当業者に周知のように、そのようなベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルス、およびレトロウイルから成る群より容易に選択することができる。一般的に、本発明に適合するベクターは、選択マーカ、所望の遺伝子のクローン作成を容易にする適切な制限部位、および真核または原核細胞に侵入および／または複製する能力を含む。

【０１４７】

本発明の目的に対し、多数の発現ベクター系を使用することができる。例えば、ベクターの１つのクラスは、ウシ乳頭腫ウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（ＲＳＶ、ＭＭＴＶまたはＭＯＭＬＶ）、またはＳＶ４０ウイルス等の動物ウイルスに由来するＤＮＡ要素を使用する。他は、内部リボソーム結合部位を有するポリシストロン系の使用を含む。例示的なベクターとしては、米国特許第６，１５９，７３０号および同第６，４１３，７７７号、および米国特許出願第２００３０１５７６４１Ａ１号に記載されるものが挙げられる。さらに、ＤＮＡを染色体に統合した細胞は、トランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする１つまたはそれ以上のマーカを導入することによって選択することができる。マーカは、栄養要求性宿主への原栄養性、殺生物剤耐性（例えば、抗生物質）、または銅等の重金属に対する耐性を提供することができる。選択可能なマーカ遺伝子は、発現されるＤＮＡ配列に直接結合されるか、または同時形質転換によって同じ細胞に導入することができる。一実施形態においては、誘導性発現系を使用することができる。付加的要素も、ｍＲＮＡの最適な合成に必要となる場合がある。これらの要素は、シグナル配列、接合シグナル、および転写プロモータ、エンハンサ、および終結シグナルを含むことができる。一実施形態においては、分泌シグナル、例えば、いくつかのよく特徴付けられた細菌性リーダーペプチド（例えば、ｐｅｌＢ、ｐｈｏＡ、またはｏｍｐＡ）のいずれか１つは、ポリペプチドの最適な分泌を得るために、本発明のポリペプチドのＮ末端とインフレームで融合することができる（Ｌｅｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８），Ｎａｔｕｒｅ，３３１：５４３、Ｂｅｔ

ｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４０：１０４１、Ｍｕｌｌｉｎａｘ ｅｔ ａｌ．，（１９９０）．ＰＮＡＳ，８７：８０９５）。

【０１４８】

「宿主細胞」という用語は、組み換えＤＮＡ手法を使用して構築され、少なくとも１つの異種遺伝子をコードするベクターによって形質転換された細胞を指す。組み換え宿主からのタンパク質の単離のための過程の説明において、「細胞」または「細胞培養」は、他に明確に特定されない限り、ほとんど同じ意味で使用され、タンパク質源を意味する。つまり、「細胞」からのタンパク質の回収は、遠心沈殿した全細胞または培地および細胞浮遊液の両方を含有する細胞培養からのいずれかを意味し得る。タンパク質発現に対して使用される宿主細胞株は、最も好ましくは、哺乳類由来のものであり、当業者は、その中で発現される所望の遺伝子産物に対して最適な特定の宿主細胞株を選択的に判定する能力を有すると考えられる。例示的な宿主細胞株しては、これらに限定されないが、ＤＧ４４およびＤＵＸＢ１１（チャイニーズハムスター卵巣株、ＤＨＦＲマイナス）、ＨＥＬＡ（ヒト子宮頸癌）、ＣＶＩ（サル腎臓株）、ＣＯＳ（ＳＶ４０Ｔ抗原を有するＣＶＩの誘導体）、Ｒ１６１０（チャイニーズハムスター線維芽細胞）ＢＡＬＢＣ／３Ｔ３（マウス線維芽細胞）、ＨＡＫ（ハムスター腎臓株）、ＳＰ２／Ｏ（マウス骨髄腫）、Ｐ３ｘ６３－Ａｇ３．６５３（マウス骨髄腫）、ＢＦＡ－１ｃ１ＢＰＴ（ウシ内皮細胞）、ＲＡＪＩ（ヒトリンパ球）、および２９３（ヒト腎臓）を含む。ＣＨＯ細胞が、特に好ましい。宿主細胞株は、通常、商業サービスであるＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、または既刊文献から入手可能である。本発明のポリペプチドは、細菌もしくは酵母等の非哺乳類細胞、または植物細胞においても発現することができる。この点において、当然のことながら、細菌等の様々な単細胞性非哺乳類微生物、すなわち、培養または発酵において成長することが可能なそれらも形質転換することができる。細菌は、形質転換を起こしやすいが、大腸菌またはサルモネラ菌の株、枯草菌等のバシラス科、肺炎球菌、連鎖球菌、およびインフルエンザ菌等の腸内細菌科のメンバーを含む。細菌において発現する場合、ポリペプチドは、通常、封入体の一部となることがさらに認識される。ポリペプチドは、単離、精製、その後、機能分子に集合されなければならない。

【０１４９】

原核生物に加えて、真核微生物を使用することもできる。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、すなわち一般的なパン酵母は、真核微生物の間で最も一般的に使用されるが、Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｒｉｓを含む、多数の他の株が、一般に入手可能である。サッカロミセスにおける発現に対して、例えば、プラスミドＹＲｐ７が、（Ｓｔｉｎｃｈｃｏｍｂ ｅｔ ａｌ．，（１９７９），Ｎａｔｕｒｅ，２８２：３９、Ｋｉｎｇｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（１９７９），Ｇｅｎｅ，７：１４１、Ｔｓｃｈｅｍｐｅｒ ｅｔ ａｌ．，（１９８０），Ｇｅｎｅ，１０：１５７）一般的に使用される。このプラスミドは、例えば、ＡＴＣＣ番号４４０７６またはＰＥＰ４－１（Ｊｏｎｅｓ，（１９７７），Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，８５：１２）等の、トリプトファンにおいて成長する能力を欠く酵母の変異株に対する選択マーカを提供するＴＲＰ１遺伝子を既に含有する。そして、酵母宿主細胞ゲノムの特性としてのｔｒｐ１病変の存在は、トリプトファンの非存在下における成長による形質転換を検出するための効果的な環境を提供する。

【０１５０】

インビトロは、大量の本発明の所望の変化した結合ポリペプチドを得るための規模拡大を可能にする。組織培養条件下での哺乳類細胞培養のための方法は、当技術分野で周知であり、例えば、エアリフト反応器または継続的撹拌式反応器における同種浮遊培養、または例えば、中空糸、マイクロカプセル中、アガロースマイクロビーズまたはセラミックカートリッジ上での固定化または封入細胞培養を含む。必要および／または好ましい場合、ポリペプチドの溶液は、通常のクロマトグラフィ方法、例えば、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ（ＨＩＣ）、ＤＥＡＥ－セルロース上でのクロマトグラフィ、または親和性クロマトグラフィによって精製することができる。

【０１５１】

本明細書において使用される「腫瘍関連抗原」は、概して、腫瘍細胞と関連する、すなわち、正常細胞と比較して同じまたはそれ以上の程度で生じる任意の抗原を意味する。より一般的に、腫瘍関連抗原は、非悪性細胞上でのその発現に関係なく、腫瘍性細胞での免疫反応性抗体の局在化を提供する任意の抗原を含む。そのような抗原は、比較的腫瘍特異的であり、それらの発現において、悪性細胞の表面に限られる可能性がある。代替として、そのような抗原は、悪性および非悪性細胞の両方の上で見出すことがある。ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、好ましくは、腫瘍関連抗原に結合する。したがって、本発明の結合ポリペプチドは、腫瘍関連分子と反応する多くの抗体のいずれか１つから得、生成され、または加工することができる。

【０１５２】

本明細書において使用される「悪性腫瘍」という用語は、非良性腫瘍または癌を指す。本明細書において使用される「癌」という用語は、無秩序または無制御な細胞成長によって特徴付けられる悪性腫瘍を含む。例示的な癌としては、癌腫、肉腫、白血病、およびリンパ腫を含む。「癌」という用語は、原発性悪性腫瘍（例えば、細胞が、本来の腫瘍の部位以外に対象の体における部位に移動していないもの）および二次性悪性腫瘍（例えば、本来の腫瘍の部位と異なる二次部位への腫瘍細胞の移動である転移から生じるもの）を含む。

【０１５３】

本明細書において使用される「結合ポリペプチドの投与が有効である対象」という語句は、例えば、本発明の結合ポリペプチドによって認識される抗原の検出（例えば、診断法）に使用される結合ポリペプチドの投与、および／または結合ポリペプチドによって認識される標的を減少または排除するための結合ポリペプチドでの治療が有効である、哺乳類の対象等の対象を含む。例えば、一実施形態においては、対象は、循環または血清からの可溶性または微粒子分子の減少または排除（例えば、毒素または病原体）、または標的を発現する細胞（例えば、腫瘍細胞）の集団の減少または排除が有効であり得る。上記のように、結合ポリペプチドは、非共役型で使用することができるか、または該対象に投与するための修飾結合ポリペプチドを形成するために、例えば、薬物、プロドラッグ、または同位体に共役することができる。

【０１５４】

ＩＩ．一本鎖Ｆｃ（「ｓｃＦｃ」）領域を含む結合ポリペプチド

ある態様においては、本発明は、一本鎖ポリペプチド内において、少なくとも１つの遺伝的に融合したＦｃ領域、またはその一部を含む結合ポリペプチド（すなわち、一本鎖Ｆｃ（ｓｃＦｃ）領域を含む結合ポリペプチド）を提供する。本発明の好ましいポリペプチドは、少なくとも２つのＦｃ部分（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、またはそれ以上のＦｃ部分）、または同じ直鎖状ポリペプチド鎖内にＦｃ部分を含む。好ましくは、Ｆｃ部分の少なくとも２つ（より好ましくはすべて）は、エフェクタ機能をポリペプチドに与える少なくとも１つの機能的ｓｃＦｃ領域を形成するために折り畳む（例えば、分子内または分子間折り畳み）ことが可能である。例えば、一好ましい実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、免疫エフェクタ機能（例えば、抗体依存性細胞毒性（ＡＤＣＣ）、食作用、または補体依存性細胞毒性（ＣＤＣＣ））を誘引するために、そのｓｃＦｃ領域を介して、Ｆｃ受容体（例えば、ＦｃＲｎ、ＦｃγＲ受容体（例えば、ＦｃγＲＩＩＩ）、または補体タンパク質（例えば、Ｃ１ｑ））に結合することが可能である。

【０１５５】

ある実施形態においては、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）のＦｃ部分の少なくとも２つは、第１のＦｃ部分のＣ末端と第２のＦｃ部分のＮ末端の間に介在アミノ酸またはペプチドが存在しないように、アミノ酸の隣接直鎖状配列において互いに直接融合される。しかしながら、より好ましい実施形態においては、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）のＦｃ部分の少なくとも２つ（より好ましくはすべて）は、少なくとも２つのＦｃ部分の間に介入するポリペプチドリンカー（例えば、合成

リンカー）を介して遺伝的に融合される。ポリペプチドリンカーは、ｓｃＦｃ領域が、Ｆｃ受容体に対する適切な親和性によって結合することが可能となるように、少なくとも２つのＦｃ部分の最適な折り畳み、配置、および／または並置を確実にし、それによって、エフェクタ機能を誘引する。例えば、ある実施形態においては、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）は、分子内において折り畳むことが可能であるが（例えば、図１の単量体（「ｓｃ」）ｓｃＦｃ構造体を参照）、他の実施形態においては、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）は、二量体ｓｃＦｃ構造体を形成することが可能である。ある実施形態においては、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）は、少なくとも10^{-7}Ｍ（例えば、少なくとも10^{-8}Ｍ、少なくとも10^{-9}Ｍ、少なくとも10^{-10}Ｍ、少なくとも10^{-11}Ｍ、または少なくとも10^{-12}Ｍ）の結合親和性でＦｃ受容体に結合することが可能である。

【０１５６】

ある実施形態においては、本発明のポリペプチドは、同じ、または本質的に同じ配列組成のＦｃ部分を含むｓｃＦｃ領域（本明細書において「ホモマーｓｃＦｃ領域」と称される）を含むことができる。他の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、異なる配列組成である少なくとも２つのＦｃ部分を含むｓｃＦｃ領域（すなわち、本明細書において「ヘテロマーｓｃＦｃ領域」と称される）を含むことができる。ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、少なくとも１つの挿入またはアミノ酸置換を含むｓｃＦｃ領域を含む。例示的な一実施形態においては、ヘテロマーｓｃＦｃ領域は、第１のＦｃ部分においてアミノ酸置換（例えば、ＥＵ位置２９７でのアスパラギンのアミノ酸置換）を含むが、第２のＦｃ部分には含まない。

【０１５７】

ある実施形態においては、ｓｃＦｃ領域は、ヘミグリコシル化される。例えば、ヘテロマーｓｃＦｃ領域は、第１のグリコシル化されたＦｃ部分（例えば、グリコシル化されたＣＨ２領域）および第２のグリコシル化されていないＦｃ部分（例えば、グリコシル化されていないＣＨ２領域）を含むことができ、リンカーは、グリコシル化されたＦｃ部分とグリコシル化されていないＦｃ部分との間に介入する。他の実施形態においては、ｓｃＦｃ領域は、完全にグリコシル化され、すなわち、Ｆｃ部分の全てがグリコシル化される。さらなる実施形態においては、ｓｃＦｃ領域は、グリコシル化されていない場合があり、すなわち、Ｆｃ部分で、グリコシル化されるものはない。

【０１５８】

本発明の結合ポリペプチドは、共に集合させ、または他のポリペプチドと集合させて、多重結合ポリペプチドまたはタンパク質（本明細書において「多量体」とも称される）を形成することができる。本発明の多重結合ポリペプチドまたはタンパク質は、本発明の少なくとも１つの結合ポリペプチドを含む。したがって、本発明は、単量体および多量体（例えば、二量体、三量体、四量体、および六量体）結合ポリペプチドまたはタンパク質等を限定することなく対象とする。ある実施形態においては、該多量体の構成結合ポリペプチドは、同じである（すなわち、ホモマー多量体、例えば、ホモ二量体、ホモ三量体、ホモ四量体）。他の実施形態においては、本発明の多量体タンパク質の少なくとも２つの構成ポリペプチドは、異なる（すなわち、異種多量体、例えば、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体、ヘテロ四量体）。

【０１５９】

ある実施形態においては、本発明の少なくとも２つの結合ポリペプチドは、二量体を形成することが可能である。例えば、ある実施形態においては、結合ポリペプチドの遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）は、その構成Ｆｃ部分が、互いにではなく、別の結合ポリペプチドにおける対応するＦｃ部分と関連するように、折り畳まれていない状態に留まる（例えば、図１Ｂの二量体（「ｄｃ」）ｓｃＦｃ構造体を参照）。

【０１６０】

代替の設計の様々な結合ポリペプチドも、本発明の範囲内にある。例えば、１つまたはそれ以上の結合部位は、複数の方向で、本発明のｓｃＦｃ領域と融合、結合、または組み

込む（例えば、重ねる）ことができる。図１１は、そのようなｓｃＦｃ結合ポリペプチドの様々な限定されない例を示す。例示的な一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ｓｃＦｃ領域のＮ末端と融合される結合部位を含む（図１１Ａ）。別の例示的な実施形態においては、結合ポリペプチドは、ｓｃＦｃ領域のＣ末端での結合部位を含む（図１１Ｂ）。本発明の結合ポリペプチドは、ｓｃＦｃ領域のＣ末端およびＮ末端の両方での結合部位を含むことができる。さらに他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ｓｃのＦｃ領域Ｎ末端および／またはＣ末端ドメイン間領域における結合部位（例えば、第１のＮ末端、Ｆｃ部分（図１１Ｃ）または第２のＣ末端Ｆｃ部分（図１１Ｄ）のＣＨ２とＣＨ３ドメインとの間）を含むことができる。代替として、結合部位は、Ｆｃ部分のヒンジとＣＨ２ドメインとの間のドメイン間領域に取り込むことができる。他の実施形態においては、結合ポリペプチドは、ｓｃＦｃ領域のリンカーポリペプチド内において１つまたはそれ以上の結合部位を含むことができる（図１１Ｅ）。

【０１６１】

さらなる実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ｓｃＦｃ領域のＦｃ部分に組み込まれる結合部位を含む。例えば、結合部位は、Ｎ末端ＣＨ２ドメイン（図１Ｆ）、Ｎ末端ＣＨ３ドメイン（図１Ｇ）、Ｃ末端ＣＨ２ドメイン（図１Ｈ）、および／またはＣ末端ＣＨ３ドメイン（図１Ｉ）に重ねることができる。一実施形態においては、抗体のＣＤＲループは、ｓｃＦｃ領域の片方または両方のＣＨ３ドメインに重ねられる。ＣＤＲループおよび他の結合部分をＦｃ領域のＣＨ２および／またはＣＨ３ドメインに重ねるための方法は、例えば、国際公開第ＷＯ０８／００３１１６号において開示され、この内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。

【０１６２】

本発明のｓｃＦｃ結合ポリペプチドは、図１１Ａ－Ｉに示される方向の任意の組み合わせを使用して、本発明のｓｃＦｃ領域に結合、融合、または統一（例えば、重ねられる）される２つまたそれ以上の結合部位（例えば、２つ、３つ、４つ、またはそれ以上の結合部位）を含むことができることが、当業者によって認識される。

【０１６３】

Ａ．Ｆｃ部分

本発明の結合ポリペプチドを産生するために有用なＦｃ部分は、多数の異なる源から得ることができる。好ましい実施形態においては、結合ポリペプチドのＦｃ部分は、ヒト免疫グロブリンに由来する。しかしながら、当然のことながら、Ｆｃ部分は、例えば、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット）または非ヒト霊長類（例えば、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に由来することができる。さらに、結合ポリペプチドＦｃドメイン、またはその一部は、ＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、およびＩｇＥを含む、任意の免疫グロブリンクラス、およびＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４を含む、任意の免疫グロブリンイソタイプに由来することができる。好ましい実施形態においては、ヒトイソタイプＩｇＧ１が使用される。

【０１６４】

様々なＦｃ部分遺伝子配列（例えば、ヒト定常領域遺伝子配列）は、公的にアクセス可能な寄託の形で入手可能である。特定のエフェクタ機能を有するか（または特定のエフェクタ機能を欠く）、または免疫原性を低下させる特定の修飾を有するＦｃ部分配列を含む定常領域ドメインを選択することができる。抗体および抗体コード遺伝子の多くの配列は公表され、適切なＦｃ部分配列（例えば、ヒンジ、ＣＨ２、および／またはＣＨ３配列、またはそれらの一部）は、当該技術分野において承認されている手法を使用してこれらの配列から導くことができる。前述の方法のいずれかを使用して得られた遺伝物質は、次いで、本発明のポリペプチドを得るために変化または合成することができる。本発明の範囲は、定常領域ＤＮＡ配列の対立遺伝子、変異体、および変異体を包含することがさらに認識される。

【０１６５】

Ｆｃ部分配列は、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よう選択されるプライマーを使用してクローン化することができる。抗体からＦｃ部分配列をクローン化するためには、ｍＲＮＡが、ハイブリドーマ、脾臓、またはリンパ細胞から単離され、ＤＮＡへ逆転写され、抗体遺伝子はＰＣＲによって増幅することができる。ＰＣＲ増幅方法は、米国特許第４，６８３，１９５号、同第４，６８３，２０２号、同第４，８００，１５９号、同第４，９６５，１８８号、および例えば、「ＰＣＲ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」Ｉｎｎｉｓ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ（１９９０）、Ｈｏ ｅｔ ａｌ．１９８９．Ｇｅｎｅ ７７：５１、Ｈｏｒｔｏｎ ｅｔ ａｌ．１９９３．Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．２１７：２７０において詳述される。ＰＣＲは、コンセンサス定常領域プライマー、または公表された重鎖または軽鎖ＤＮＡおよびアミノ酸配列に基づくより特異的なプライマーによって開始することができる。上記のように、ＰＣＲを使用して、抗体軽鎖および重鎖をコードするＤＮＡクローンを単離することもできる。この場合、ライブラリは、コンセンサスプライマー、またはマウス定常領域プローブ等のより大きい同種プローブによってスクリーニングすることができる。抗体遺伝子の増幅に適切な多数のプライマーセットが、当技術分野で周知である（例えば、精製抗体のＮ末端配列に基づく５′プライマー（Ｂｅｎｈａｒ ａｎｄ Ｐａｓｔａｎ．１９９４．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ７：１５０９）、ｃＤＮＡ端部の迅速増幅（Ｒｕｂｅｒｔｉ，Ｆ．ｅｔ ａｌ．１９９４．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １７３：３３）、抗体リーダー配列（Ｌａｒｒｉｃｋ ｅｔ ａｌ．１９８９ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．１６０：１２５０））。抗体配列のクローン作成は、Ｎｅｗｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９９５年１月２５日出願の米国特許第５，６５８，５７０号においてさらに記載され、この内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。

【０１６６】

本発明の結合ポリペプチドは、２つまたそれ以上のＦｃ部分（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、またはそれ以上のＦｃ部分）を含むことができる。これらの２つまたそれ以上のＦｃ部分は、Ｆｃ領域を形成することができる。一実施形態においては、Ｆｃ部分は、異なる型のものであり得る。一実施形態においては、結合ポリペプチドに存在する少なくとも１つのＦｃ部分は、ヒンジドメイン、またはその一部を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、少なくとも１つのＣＨ２ドメイン、またはその一部を含む少なくとも１つのＦｃ部分を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、少なくとも１つのＣＨ３ドメイン、またはその一部を含む少なくとも１つのＦｃ部分を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、少なくとも１つのＣＨ４ドメイン、またはその一部を含む少なくとも１つのＦｃ部分を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、少なくとも１つのヒンジドメイン、またはその一部、および少なくとも１つのＣＨ２ドメイン、またはその一部（例えば、ヒンジ－ＣＨ２の方向における）を含む少なくとも１つのＦｃ部分を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、少なくとも１つのＣＨ２ドメイン、またはその一部、および少なくとも１つのＣＨ３ドメイン、またはその一部（例えば、ＣＨ２－ＣＨ３の方向における）を含む少なくとも１つのＦｃ部分を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、例えば、ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３、ヒンジ－ＣＨ３－ＣＨ２、またはＣＨ２－ＣＨ３－ヒンジの方向における、少なくとも１つのヒンジドメイン、またはその一部、少なくとも１つのＣＨ２ドメイン、またはその一部、および少なくとも１つのＣＨ３ドメイン、またはその一部を含む少なくとも１つのＦｃ部分を含む。

【０１６７】

ある実施形態においては、結合ポリペプチドは、１つまたはそれ以上の免疫グロブリン重鎖に由来する少なくとも１つの完全Ｆｃ領域を含む（例えば、ヒンジ、ＣＨ２、およびＣＨ３ドメインを含む、Ｆｃドメインであるが、これらは同じ抗体に由来する必要はない

）。他の実施形態においては、結合ポリペプチドは、１つまたはそれ以上の免疫グロブリン重鎖に由来する少なくとも２つの完全Ｆｃ領域を含む。好ましい実施形態においては、完全Ｆｃ部分は、ヒトＩｇＧ免疫グロブリン重鎖（例えば、ヒトＩｇＧ１）に由来する。

【０１６８】

別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、完全ＣＨ３ドメイン（ＥＵ付番による抗体Ｆｃ領域のアミノ酸約３４１～４３８）を含む少なくとも１つのＦｃ部分を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、完全ＣＨ２ドメイン（ＥＵ付番による抗体Ｆｃ領域のアミノ酸約２３１～３４０）を含む少なくとも１つのＦｃ部分を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＣＨ３ドメイン、およびヒンジ領域（ＥＵ付番による抗体Ｆｃ領域のアミノ酸約２１６～２３０）の少なくとも１つ、およびＣＨ２ドメインを含む少なくとも１つのＦｃ部分を含む。一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ヒンジおよびＣＨ３ドメインを含む少なくとも１つのＦｃ部分を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ヒンジ、CH_2、およびCH_3ドメインを含む少なくとも１つのＦｃ部分を含む。好ましい実施形態においては、Ｆｃ部分は、ヒトＩｇＧ免疫グロブリン重鎖（例えば、ヒトＩｇＧ１）に由来する。

【０１６９】

本発明の結合ポリペプチドのＦｃ部分を構成する定常領域ドメイン、またはその一部は、異なる免疫グロブリン分子に由来することができる。例えば、本発明のポリペプチドは、ＩｇＧ１分子に由来するＣＨ２ドメイン、またはその一部、およびＩｇＧ３分子に由来するＣＨ３領域、またはその一部を含むことができる。別の例においては、結合ポリペプチドは、部分的にＩｇＧ１分子に、部分的にＩｇＧ３分子に由来するヒンジドメインを含むＦｃ部分を含むことができる。本明細書において説明されるように、当業者にとって当然のことながら、Ｆｃ部分は、アミノ酸配列において、天然に存在する抗体分子と異なるように、変化させることができる。

【０１７０】

別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、切断しているがＦｃ受容体（ＦｃＲ）結合特性をＦｃ領域に与えるために十分な１つまたはそれ以上の切断Ｆｃ部分を含むｓｃＦｃ領域を含む。例えば、ＦｃＲｎに結合するＦｃドメインの部分（すなわち、ＦｃＲｎ結合部分）は、ＥＵ付番で、ＩｇＧ１のアミノ酸約２８２～４３８を含む。したがって、本発明の結合ポリペプチドのＦｃ部分は、ＦｃＲｎ結合部分を含むか、またはそれから成ることができる。ＦｃＲｎ結合部分は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４を含む、任意のイソタイプの重鎖に由来することができる。一実施形態においては、ヒトイソタイプＩｇＧ１の抗体からのＦｃＲｎ結合部分を使用する。別の実施形態においては、ヒトイソタイプＩｇＧ４の抗体からのＦｃＲｎ結合部分を使用する。

【０１７１】

一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、完全Ｆｃ領域の１つまたはそれ以上の定常領域ドメインを欠き、すなわち、それらは、部分的または全体的に欠失される。ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＣＨ２ドメイン全体を欠く（ΔＣＨ２構造体）。当業者は、そのような構造体が、抗体の異化率に対するＣＨ２ドメインの調節特性のため、好ましい場合があることを認識する。ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、IgG_1ヒト定常領域ドメインをコードするベクター（例えば、ＩＤＥＣ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ）に由来するＣＨ２ドメイン欠失Ｆｃ領域を含む（例えば、国際公開第ＷＯ０２／０６０９５５Ａ２号および同第ＷＯ０２／０９６９４８Ａ２号を参照）。この例示的なベクターは、ＣＨ２ドメインを欠失させ、ドメイン欠失IgG_1定常領域を発現する合成ベクターを提供するために操作される。これらの例示的な構造体は、好ましくは、結合ＣＨ３ドメインをそれぞれのＦｃドメインのヒンジ領域と直接融合するように操作されることに注意する。

【０１７２】

他の構造体では、１つまたはそれ以上の構成Ｆｃ部分の間にペプチドスペーサを提供す

ることが好ましい場合がある。例えば、ペプチドスペーサは、ヒンジ領域とＣＨ２ドメインとの間および／またはＣＨ２とＣＨ３ドメインとの間に配置することができる。例えば、ＣＨ２ドメインが削除され、残りのＣＨ３ドメイン（合成または非合成）が５～２０のアミノ酸ペプチド空間によってヒンジ領域に接合する適合性構造体を発現することができる。そのようなペプチドスペーサは、例えば、定常領域ドメインの調節要素が遊離しており、およびアクセス可能な状態に留まり、または、ヒンジ領域が柔軟なままとなることを確実にするために付加することができる。好ましくは、本発明に適合する任意のリンカーペプチドは、比較的非免疫原性であり、ｓｃＦｃ領域の適切な折り畳みを妨げない。

【０１７３】

ｉ）Ｆｃアミノ酸の変更

ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドにおいて使用されるＦｃ部分は、例えば、アミノ酸変異（例えば、付加、欠失、または置換）によって変化する。本明細書において使用される「Ｆｃ部分変異体」という用語は、Ｆｃ部分が、それが由来する野生型Ｆｃと比較して、少なくとも１つのアミノ酸置換を有するＦｃ部分を指す。例えば、Ｆｃ部分がヒトＩｇＧ１抗体に由来する場合、変異体は、ヒトＩｇＧ１Ｆｃ領域の対応する位置にある野生型アミノ酸と比較して、少なくとも１つのアミノ酸変異（例えば、置換）を含む。

【０１７４】

Ｆｃ変異体のアミノ酸置換は、その残基が、抗体におけるＦｃ領域において与えられる位置番号（ＥＵ付番変換を使用して記載の）に対応すると見なされるＦｃ部分内の位置に位置することができる。当業者は、Ｆｃ部分における位置に対応するＥＵ番号を判定するために配置を容易に作成することができる。

【０１７５】

一実施形態においては、Ｆｃ変異体は、ヒンジドメイン、またはその一部に位置するアミノ酸部分に置換を含む。別の実施形態においては、Ｆｃ変異体は、ＣＨ２ドメイン、またはその一部に位置するアミノ酸部分に置換を含む。別の実施形態においては、Ｆｃ変異体は、ＣＨ３ドメイン、またはその一部に位置するアミノ酸部分に置換を含む。別の実施形態においては、Ｆｃ変異体は、ＣＨ４ドメイン、またはその一部に位置するアミノ酸部分に置換を含む。

ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、２つ以上のアミノ酸置換を含むＦｃ変異体を含む。本発明の結合ポリペプチドは、例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、またはそれ以上のアミノ酸置換を含むことができる。好ましくは、アミノ酸置換は、少なくとも１アミノ酸部分、またはそれ以上、例えば、少なくとも２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、または１０のアミノ酸部分、またはそれ以上の間隔で互いに空間的に位置する。より好ましくは、操作アミノ酸は、少なくとも５、１０、１５、２０、または２５のアミノ酸部分、またはそれ以上の間隔で互いに離れて空間的に位置する。

【０１７６】

ある実施形態においては、Ｆｃ変異体は、該野生型Ｆｃドメインを含むＦｃ領域によって与えられた少なくとも１つのエフェクタ機能において改善を与える（例えば、Ｆｃ受容体（例えば、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、またはＦｃγＲＩＩＩ）もしくは補体タンパク質（例えば、Ｃ１ｑ）に結合する、または抗体依存性細胞毒性（ＡＤＣＣ）、食作用、もしくは補体依存性細胞毒性（ＣＤＣＣ）を誘引するＦｃ領域の能力における改善）。他の実施形態においては、Ｆｃ変異体は、操作システイン残基を提供する。

【０１７７】

本発明の結合ポリペプチドは、エフェクタ機能および／またはＦｃＲ結合における改善を与えることが周知の当該技術分野において承認されているＦｃ変異体を使用することができる。具体的に、本発明の結合分子は、例えば、国際ＰＣＴ公開第ＷＯ８８／０７０８９Ａ１号、同第ＷＯ９６／１４３３９Ａ１号、同第ＷＯ９８／０５７８７Ａ１号、同第ＷＯ９８／２３２８９Ａ１号、同第ＷＯ９９／５１６４２Ａ１号、同第ＷＯ９９／５８５７

２Ａ１号、同第ＷＯ００／０９５６０Ａ２号、同第ＷＯ００／３２７６７Ａ１号、同第ＷＯ００／４２０７２Ａ２号、同第ＷＯ０２／４４２１５Ａ２号、同第ＷＯ０２／０６０９１９Ａ２号、同第ＷＯ０３／０７４５６９Ａ２号、同第ＷＯ０４／０１６７５０Ａ２号、同第ＷＯ０４／０２９２０７Ａ２、ＷＯ０４／０３５７５２Ａ２、ＷＯ０４／０６３３５１Ａ２号、同第ＷＯ０４／０７４４５５Ａ２号、同第ＷＯ０４／０９９２４９Ａ２号、同第ＷＯ０５／０４０２１７Ａ２号、同第ＷＯ０４／０４４８５９号、同第ＷＯ０５／０７０９６３Ａ１号、同第ＷＯ０５／０７７９８１Ａ２号、同第ＷＯ０５／０９２９２５Ａ２号、同第ＷＯ０５／１２３７８０Ａ２号、同第ＷＯ０６／０１９４４７Ａ１号、同第ＷＯ０６／０４７３５０Ａ２号、同第およびＷＯ０６／０８５９６７Ａ２号、米国特許公開第ＵＳ２００７／０２３１３２９号、同第ＵＳ２００７／０２３１３２９号、同第ＵＳ２００７／０２３７７６５号、同第ＵＳ２００７／０２３７７６６号、同第ＵＳ２００７／０２３７７６７号、同第ＵＳ２００７／０２４３１８８号、同第ＵＳ２００７０２４８６０３号、同第ＵＳ２００７０２８６８５９号、同第ＵＳ２００８００５７０５６号、または米国特許第５，６４８，２６０号、同第５，７３９，２７７号、同第５，８３４，２５０号、同第５，８６９，０４６号、同第６，０９６，８７１号、同第６，１２１，０２２号、同第６，１９４，５５１号、同第６，２４２，１９５号、同第６，２７７，３７５号、同第６，５２８，６２４号、同第６，５３８，１２４号、同第６，７３７，０５６号、同第６，８２１，５０５号、同第６，９９８，２５３号、同第７，０８３，７８４号、および同第７，３１７，０９１号において開示されるアミノ酸部分の１つまたはそれ以上の変化（例えば、置換）を含むことができ、それぞれの内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。一実施形態においては、特定の変化（例えば、当技術分野において開示される１つまたはそれ以上のアミノ酸の特定の置換）は、開示されるアミノ酸部分の１つまたはそれ以上で行われる場合がある。別の実施形態においては、開示されるアミノ酸部分の１つまたはそれ以上における異なる変化（例えば、当技術分野において開示される１つまたはそれ以上のアミノ酸部分の異なる置換）が行われる場合がある。

【０１７８】

好ましい実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、Ｆｃ部分の「１５オングストローム接触帯」内にあるＥＵアミノ酸位置に対応するアミノ酸位置にアミノ酸置換を含むＦｃ部分変異体を含むことができる。１５オングストローム帯は、完全長野生型Ｆｃ部分のＥＵ位置２４３～２６１、２７５～２８０、２８２～２９３、３０２～３１９、３３６～３４８、３６７、３６９、３７２～３８９、３９１、３９３、４０８、および４２４～４４０に位置する残基を含む。

【０１７９】

ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、抗体の抗原非依存性エフェクタ機能、特に、抗体の循環半減期を変化させるＦｃ部分に対するアミノ酸置換を含む。そのような結合ポリペプチドは、これらの置換を欠く結合ポリペプチドと比較した場合、ＦｃＲｎへのより高いまたは低い結合のいずれかを示し、したがってそれぞれ血清における増加または低下した半減期を有する。ＦｃＲｎに対する改善された親和性を有するＦｃ変異体は、より長い血清半減期を有することが見込まれ、そのような分子は、例えば、慢性疾病または疾患を治療するために、投与されたポリペプチドの長い半減期が好ましい場合の哺乳類を治療するための方法において有用な用途を有する。対照的に、ＦｃＲｎ結合親和性が低いＦｃ変異体は、より短い半減期を有することが見込まれ、そのような分子も、例えば、インビボ画像診断、あるいは出発ポリペプチドが、長期に渡って循環に存在する場合に毒性副作用を有する状況など、短い循環時間が有利である可能性がある場合の哺乳類への投与において有用である。ＦｃＲｎ結合親和性が低いＦｃ変異体は、胎盤を通過する可能性もより低くなるため、妊婦における疾病または疾患の治療においても有用である。さらに、低いＦｃＲｎ結合親和性が好ましい可能性がある他の用途は、脳、腎臓および／または肝臓における局所化が好ましい場合の用途を含む。例示的な一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、血管系から腎臓糸球体の上皮に渡って運搬の低下を示す。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、脳から血液脳関門（ＢＢＢ

）を渡る脈管性間隙への運搬の低下を示す。一実施形態においては、変化したＦｃＲｎ結合を有する結合ポリペプチドは、Ｆｃ部分の「ＦｃＲｎ結合ループ」内に１つまたはそれ以上のアミノ酸置換を有する少なくとも１つのＦｃ部分（例えば、１つまたは２つのＦｃ部分）を含む。ＦｃＲｎ結合ループは、野生型完全長Ｆｃ部分のアミノ酸残基２８０～２９９（ＥＵ付番による）から構成される。他の実施形態においては、変化したＦｃＲｎ結合親和性を有する本発明の結合ポリペプチドは、１５ÅＦｃＲｎ「接触帯」に１つまたはそれ以上のアミノ酸置換を有する少なくとも１つのＦｃ部分（例えば、１つまたは２つのＦｃ部分）を含む。本明細書において使用される１５ÅＦｃＲｎ「接触帯」という用語は、以下の位置の野生型完全長Ｆｃ部分にある残基を含む。２４３～２６１、２７５～２８０、２８２～２９３、３０２～３１９、３３６～３４８、３６７、３６９、３７２～３８９、３９１、３９３、４０８、４２４、４２５～４４０（ＥＵ付番）。好ましい実施形態においては、変化したＦｃＲｎ結合親和性を有する本発明の結合ポリペプチドは、以下のＥＵ位置のいずれか１つに対応するアミノ酸部分に１つまたはそれ以上のアミノ酸置換を有する少なくとも１つのＦｃ部分（例えば、１つまたは２つのＦｃ部分）を含む。２５６、２７７～２８１、２８３～２８８、３０３～３０９、３１３、３３８、３４２、３７６、３８１、３８４、３８５、３８７、４３４（例えば、Ｎ４３４ＡまたはＮ４３４Ｋ）、および４３８。ＦｃＲｎ結合活性を変化させる例示的なアミノ酸置換は、国際公開第ＷＯ０５／０４７３２７号に開示され、この内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。

【０１８０】

他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、例えば、野生型Ｆｃ領域と比較して、ポリペプチドの抗原依存性エフェクタ機能、特に、ＡＤＣＣまたは補体活性化を変化させるアミノ酸置換を含むＦｃ変異を含む。例示的な実施形態においては、該結合ポリペプチドは、Ｆｃガンマ受容体（例えば、ＣＤ１６）への変化した結合を示す。そのような結合ポリペプチドは、野生型ポリペプチドと比較した場合、ＦｃＲガンマへのより高いまたは低い結合のいずれかを示し、したがって、それぞれ、エフェクタ機能の強化または低下を媒介する。ＦｃγＲに対する改善された親和性を有するＦｃ変異体は、エフェクタ機能を強化することが見込まれ、そのような分子は、標的分子破壊が、好ましい場合（例えば、腫瘍治療における場合）の哺乳類を治療する方法において有用な用途を有する。対照的に、低いＦｃγＲ結合親和性を有するＦｃ変異体は、エフェクタ機能を低下させることが見込まれ、そのような分子も、標的細胞破壊が好ましくない状態、例えば、正常細胞が標的分子を発現する場合、またはポリペプチドの慢性投与によって好ましくない免疫系活性化が引き起こされる可能性がある場合の治療に有用である。一実施形態においては、ｓｃＦｃを含むポリペプチドは、野生型Ｆｃ領域を含むポリペプチドと比較して、オプソニン化、食作用、補体依存性細胞毒性、抗体依存性細胞毒性（ＡＤＣＣ）、またはエフェクタ細胞改変から成る群より選択される少なくとも１つの変化した抗原依存性エフェクタ機能を示す。一実施形態においては、結合ポリペプチドは、活性化ＦｃγＲ（例えば、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩａ、またはＦｃγＲＩＩＩａ）への変化した結合を示す。別の実施形態においては、結合ポリペプチドは、阻害性ＦｃγＲ（例えば、ＦｃγＲＩＩｂ）への変化した結合親和性を示す。他の実施形態においては、高いＦｃγＲ結合親和性（例えば、高いＦｃγＲＩＩＩａ結合親和性）を有する本発明の結合ポリペプチドは、以下の位置の１つまたはそれ以上に対応するアミノ酸部分にアミノ酸置換を有する少なくとも１つのＦｃ部分（例えば、１つまたは２つのＦｃ部分）を含む。２３９、２６８、２９８、３３２、３３４、および３７８（ＥＵ付番）。他の実施形態においては、低いＦｃγＲ結合親和性（例えば、低いＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、またはＦｃγＲＩＩＩａ結合親和性）を有する本発明の結合ポリペプチドは、以下の位置の１つまたはそれ以上に対応するアミノ酸部分にアミノ酸置換を有する少なくとも１つのＦｃ部分（例えば、１つまたは２つのＦｃ部分）を含む。２３４、２３６、２３９、２４１、２５１、２５２、２６１、２６５、２６８、２９３、２９４、２９６、２９８、２９９、３０１、３２６、３２８、３３２、３３４、３３８、３７６、３７８、および４３５（ＥＵ付番）。他の実施形態におい

ては、高い補体結合親和性（例えば、高いＣ１ｑ結合親和性）を有する本発明の結合ポリペプチドは、以下の位置の１つまたはそれ以上に対応するアミノ酸部分にアミノ酸置換を有するＦｃ部分（例えば、１つまたは２つのＦｃ部分）を含む。２５１、３３４、３７８、および４３５（ＥＵ付番）。他の実施形態においては、低い補体結合親和性（例えば、低いＣ１ｑ結合親和性）を有する本発明の結合ポリペプチドは、次の位置の１つまたはそれ以上に対応するアミノ酸部分にアミノ酸置換を有するＦｃ部分（例えば、１つまたは２つのＦｃ部分）を含む。２３９、２９４、２９６、３０１、３２８、３３３、および３７６（ＥＵ付番）。ＦｃγＲまたは補体結合活性を変化させる例示的なアミノ酸置換は、国際公開第ＷＯ０５／０６３８１５号において開示され、この内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。ある好ましい実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、以下の特定の置換の１つまたはそれ以上を含むことができる。Ｓ２３９Ｄ、Ｓ２３９Ｅ、Ｍ２５２Ｔ、Ｈ２６８Ｄ、Ｈ２６８Ｅ、Ｉ３３２Ｄ、Ｉ３３２Ｅ、Ｎ４３４Ａ、およびＮ４３４Ｋ（すなわち、抗体Ｆｃ領域におけるこれらのＥＵ付番位置の１つまたはそれ以上に対応するアミノ酸部分にあるこれらの置換の１つまたはそれ以上）。

【０１８１】

本発明の結合ポリペプチドは、結合ポリペプチドのグリコシル化を変化させるアミノ酸置換も含むことができる。例えば、結合ポリペプチドのｓｃＦｃ領域は、低いグリコシル化（例えば、Ｎ－またはＯ－結合グリコシル化）につながる変異を有するＦｃ部分を含むことができるか、または野生型Ｆｃ部分の変化した糖型（例えば、低フコースまたはフコースを有さないグリカン）を含むことができる。例示的な実施形態においては、Ｆｃ部分は、通常、アミノ酸部分２９７（ＥＵ付番）で見られるＮ－結合グリカンの低いグリコシル化を含む。別の例示的な実施形態においては、Ｆｃ部分は、アミノ酸部分２９７（ＥＵ付番）に低フコースまたはフコースを有さないグリカンを含む。別の実施形態においては、結合ポリペプチドは、グリコシル化されたモチーフ、例えば、アミノ酸配列ＮＸＴまたはＮＸＳを含有するＮ－結合グリコシル化されたモチーフの付近、またはその中にアミノ酸置換を有する。特定の実施形態においては、結合ポリペプチドは、Ｆｃの２９９に（ＥＵ付番）対応するアミノ酸部分にアミノ酸置換を含む。グリコシル化を低下または変化させる例示的なアミノ酸置換は、国際公開第ＷＯ０５／０１８５７２号および米国特許公開第２００７／０１１１２８１号において開示され、この内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。

【０１８２】

他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、溶媒に曝される表面に位置する操作システイン残基、またはその類似体を有する少なくとも１つのＦｃ部分を含む。好ましくは、操作システイン残基、またはその類似体は、ｓｃＦｃ領域によって与えられるエフェクタ機能に干渉しない。より好ましくは、変化は、Ｆｃ受容体（例えば、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、またはＦｃγＲＩＩＩ）もしくは補体タンパク質（例えば、Ｃ１ｑ）に結合する、または免疫エフェクタ機能（例えば、抗体依存性細胞毒性（ＡＤＣＣ）、食作用、または補体依存性細胞毒性（ＣＤＣＣ））を誘引するｓｃＦｃ領域の能力に干渉しない。好ましい実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、第２のシステイン残基へのジスルフィド結合を本質的に有さない少なくとも１つの操作された遊離システイン残基、またはその類似体を含むＦｃ部分を含む。好ましい実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＣＨ３ドメインにおける以下の位置の１つまたはそれ以上に操作システイン残基、またはその類似体を有するＦｃ部分を含むことができる。３４９～３７１、３９０、３９２、３９４～４２３、４４１～４４６、および４４６ｂ（ＥＵ付番）。より好ましい実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、以下の位置のいずれか１つに操作システイン残基、またはその類似体を有するＦｃ変異体を含む。３５０、３５５、３５９、３６０、３６１、３８９、４１３、４１５、４１８、４２２、４４１、４４３、およびＥＵ位置４４６ｂ（ＥＵ付番）。上記の操作システイン残基、またはその類似体のいずれも、その後、当該技術分野において承認されている手法を使用して機能的な部分に結合体化することができる（例えば、チオール反応性ヘテロ二官能性リンカーへの結合

体化）。

【０１８３】

一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、本明細書において記載されるＦｃ部分から独立して選択されるその構成Ｆｃ部分の２つまたそれ以上を有する遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）を含むことができる。一実施形態においては、Ｆｃ部分は同じである。別の実施形態においては、Ｆｃ部分の少なくとも２つは、異なる。例えば、本発明の結合ポリペプチドのＦｃ部分は、同じ数のアミノ酸残基を含むか、またはそれらは、１つまたはそれ以上のアミノ酸残基（例えば、約５つのアミノ酸残基（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つのアミノ酸残基）、約１０の残基、約１５の残基、約２０の残基、約３０の残基、約４０の残基、または約５０の残基）の長さにおいて異なり得る。さらに他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドのＦｃ部分は、１つまたはそれ以上のアミノ酸位置において、配列が異なり得る。例えば、Ｆｃ部分の少なくとも２つは、約５アミノ酸位置（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つのアミノ酸部分）、約１０の位置、約１５の位置、約２０の位置、約３０の位置、約４０の位置、または約５０の位置）で異なり得る。

【０１８４】

Ｂ．ポリペプチドリンカー

ある態様においては、本発明の結合ポリペプチドのｓｃＦｃ領域の２つまたそれ以上のＦｃドメインまたは部分を遺伝的に融合するためにポリペプチドリンカーを使用することが好ましい。そのようなポリペプチドリンカーは、本明細書において「Ｆｃ結合ポリペプチド」と称される。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、合成である。ポリペプチドリンカーに対して本明細書において使用される「合成」という用語は、本来は自然に結合されない配列（天然に存在する場合としない場合がある）（例えば、Ｆｃ部分配列）に、アミノ酸の直鎖状配列において結合されるアミノ酸配列（天然に存在する場合としない場合がある）を含むペプチド（またはポリペプチド）を含む。例えば、該ポリペプチドリンカーは、天然に存在するポリペプチドの修飾型（例えば、付加、置換、または欠失等の突然変異を含む）であるか、または第１のアミノ酸配列（天然に存在する場合としない場合がある）を含む非天然に存在するポリペプチドを含むことができる。本発明のポリペプチドリンカーは、例えば、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）のＦｃ部分またはドメインが、機能的ｓｃＦｃ領域の適切な折り畳みおよび形成を確実にするために並置されることを確実にするために使用することができる。好ましくは、本発明に適合するポリペプチドリンカーは、比較的非免疫原性であり、結合タンパク質のモノマーサブユニットの間のいかなる非共有関連性も阻害しない。

【０１８５】

ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ポリペプチドリンカーを使用して、一本鎖ポリペプチドにおいてインフレームの任意の２つまたそれ以上のＦｃ部分またはドメインを接合する。一実施形態においては、２つまたそれ以上のＦｃ部分またはドメインは、上記のＡ項において記載されるＦｃ部分のいずれかから独立して選択することができる。例えば、ある実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、同一のＦｃ部分を融合し、それによって、ホモマーｓｃＦｃ領域を形成するために使用することができる。他の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、異なるＦｃ部分（例えば、野生型Ｆｃ部分およびＦｃ部分変異体）を融合し、それによって、ヘテロマーｓｃＦｃ領域を形成するために使用することができる。他の実施形態においては、本発明のポリペプチドリンカーは、第１のＦｃ部分（例えば、ヒンジドメイン、またはその一部、ＣＨ２ドメイン、またはその一部、完全ＣＨ３ドメイン、またはその一部、ＦｃＲｎ結合部分、ＦｃγＲ結合部分、補体結合部分、またはそれらの一部）のＣ末端を、第２のＦｃ部分（例えば、完全Ｆｃドメイン）のＮ末端に、遺伝的に融合するために使用することができる。

【０１８６】

一実施形態においては、合成ポリペプチドリンカーは、Ｆｃ部分の一部を含む。例えば、一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、お

よび／またはＩｇＧ４抗体の免疫グロブリンヒンジドメインを含むことができる。別の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、および／またはＩｇＧ４抗体のＣＨ２ドメインを含むことができる。他の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、および／またはＩｇＧ４抗体のＣＨ３ドメインを含むことができる。免疫グロブリン（例えば、ヒト免疫グロブリン）の他の部分も、使用することができる。例えば、ポリペプチドリンカーは、ＣＨ１ドメインまたはその一部、ＣＬドメイン、もしくはその一部、ＶＨドメイン、もしくはその一部、またはＶＬドメイン、もしくはその一部を含むことができる。該部分は、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３および／またはＩｇＧ４抗体を含む、任意の免疫グロブリンに由来することができる。

【０１８７】

例示的な実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、免疫グロブリンヒンジ領域の少なくとも一部を含むことができる。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、上部ヒンジドメイン（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４上部ヒンジドメイン）を含む。別の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、中部ヒンジドメイン（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４中部ヒンジドメイン）を含む。別の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、下部ヒンジドメイン（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４下部ヒンジドメイン）を含む。例示的なヒンジドメイン部分は、以下の表１に記載される。さらに、これらの例示的なヒンジの任意のサブ部分を使用することができる（例えば、ＩｇＧ３中間領域の反復部分（すなわち、ＥＰＫＳＣＤＴＰＰＰＣＰＲＣＰ）。

【０１８８】

表１：ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４ヒンジドメイン

【０１８９】

【表１】

IgG	上部ヒンジ	中部ヒンジ	下部ヒンジ
IgG1	EPKSCDKTHT	CPPCP	APELLGGP
	(配列番号15)	(配列番号16)	(配列番号17)
IgG2	ERKCCVE	CPPCP	APPVAGP
	(配列番号82)	(配列番号16)	(配列番号83)
IgG3	ELKTPLGDTTHT	CPRCP $(EPKSCDTPPPCPRCP)_3$	APELLGGP
	(配列番号18)	(配列番号19)	(配列番号20)
IgG4	ESKYGPP	CPSCP	APEFLGGP
	(配列番号21)	(配列番号22)	(配列番号23)

他の実施形態においては、同じまたは異なる抗体イソタイプに由来するヒンジ要素を組み合わせるポリペプチドリンカーを構築することができる。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ＩｇＧ１ヒンジ領域の少なくとも一部、およびＩｇＧ２ヒンジ領域の少なくとも一部を含むキメラヒンジを含む。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ＩｇＧ１ヒンジ領域の少なくとも一部、およびＩｇＧ３ヒンジ領域の少なくとも一部を含むキメラヒンジを含む。別の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ＩｇＧ１ヒンジ領域の少なくとも一部、およびＩｇＧ４ヒンジ領域の少なくとも一部を含むキメラヒンジを含む。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ＩｇＧ２ヒンジ領域の少なくとも一部、およびＩｇＧ３ヒンジ領域の少なくとも一部を含むキメラヒンジを含む。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ＩｇＧ２ヒンジ領域の少なくとも一部、およびＩｇＧ４ヒンジ領域の少なくとも一部を含むキメラヒンジを含む。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ＩｇＧ１ヒンジ領域の少なくとも一部、ＩｇＧ２ヒンジ領域の少なくとも一部、およびＩｇＧ４ヒンジ領域の少なくとも一部を含む

キメラヒンジを含む。別の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ＩｇＧ１上部および中部ヒンジ、および単一のＩｇＧ３中部ヒンジ反復モチーフを含むことができる。別の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ＩｇＧ４上部ヒンジ、ＩｇＧ１中部ヒンジ、およびＩｇＧ２下部ヒンジを含むことができる。

【０１９０】

別の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ｇｌｙ－ｓｅｒリンカーを含むか、それから成る。本明細書において使用される「ｇｌｙ－ｓｅｒリンカー」という用語は、グリシンおよびセリン残基から成るペプチドを指す。例示的なｇｌｙ／ｓｅｒリンカーは、式（$Ｇｌｙ_{4}Ｓｅｒ$）ｎのアミノ酸配列を含み、ｎは、正の整数（例えば、１、２、３、４、または５）である。好ましいｇｌｙ／ｓｅｒリンカーは、（$Ｇｌｙ_{4}Ｓｅｒ$）４である。別の好ましいｇｌｙ／ｓｅｒリンカーは、（$Ｇｌｙ_{4}Ｓｅｒ$）３である。別の例示的なｇｌｙ－ｓｅｒリンカーは、ＧＧＧＳＳＧＧＧＳＧ（配列番号２４）である。ある実施形態においては、該ｇｌｙ－ｓｅｒリンカーは、ポリペプチドリンカーの２つの他の配列（例えば、本明細書において記載されるポリペプチドリンカー配列のいずれか）の間に挿入することができる。他の実施形態においては、ｇｌｙ－ｓｅｒリンカーは、ポリペプチドリンカーの別の配列（例えば、本明細書において記載されるポリペプチドリンカー配列のいずれか）の片方または両方の端部に付着する。さらに他の実施形態においては、２つまたはそれ以上のｇｌｙ－ｓｅｒリンカーは、ポリペプチドリンカー中に連続して組み込まれる。一実施形態においては、本発明のポリペプチドリンカーは、上部ヒンジ領域（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４分子に由来する）の少なくとも一部、中部ヒンジ領域（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４分子に由来する）の少なくとも一部、および一連のｇｌｙ／ｓｅｒアミノ酸残基（例えば、（$Ｇｌｙ_{4}Ｓｅｒ$）ｎ等のｇｌｙ／ｓｅｒリンカー）を含む。

【０１９１】

別の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、国際公開第ＷＯ０２／０６０９５５号に記載されるもの等のアミノ酸配列を含む。別の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、アミノ酸配列ＩＧＫＴＩＳＫＫＡＫを含む。別の例示的なポリペプチドリンカーは、配列（$Ｇ４Ｓ）_{4}ＧＧＧＡＳ$を含む。

【０１９２】

特に好ましいポリペプチドリンカーは、アミノ酸配列ＳＬＳＬＳＰＧＧＧＧＧＳＥＰＫＳＳを含む。別の好ましいポリペプチドリンカーは、ヒトＩｇＧ１ヒンジ配列、例えば、ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧを含む。さらに別の好ましいポリペプチドリンカーは、両方の配列を含む。

【０１９３】

一実施形態においては、本発明のポリペプチドリンカーは、天然に存在しない免疫グロブリンヒンジ領域ドメイン、例えば、ヒンジ領域ドメインを含むポリペプチドにおいて本来は見られないヒンジ領域ドメイン、および／または天然に存在する免疫グロブリンヒンジ領域ドメインとアミノ酸配列において異なるように変化しているヒンジ領域ドメインを含む。一実施形態においては、変異を、本発明のポリペプチドリンカーを作製するためにヒンジ領域ドメインに対して作製することができる。一実施形態においては、本発明のポリペプチドリンカーは、天然に存在する数のシステインを含まないヒンジドメインを含み、すなわち、ポリペプチドリンカーは、天然に存在するヒンジ分子より少ないシステインまたは多いシステインのいずれかを含む。本発明の一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、アミノ酸位置２３０（ＥＵ付番方式）に対応するアミノ酸部分にプロリン残基を含むヒンジ領域ドメインを含む。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、位置２３１（ＥＵ付番方式）に対応するアミノ酸部分にアラニン残基を含む。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドリンカーは、位置２３２（ＥＵ付番方式）に対応するアミノ酸部分にプロリン残基を含む。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、位置２２６（ＥＵ付番方式）に対応するアミノ酸部分にシステイン残基を含む。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、位置２２６（ＥＵ付番方式）に対応するアミ

ノ酸部分にセリン残基を含む。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、位置２２９（ＥＵ付番方式）に対応するアミノ酸部分にシステイン残基を含む。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、位置２２９（ＥＵ付番方式）に対応するアミノ酸部分にセリン残基を含む。

【０１９４】

他の実施形態においては、本発明のポリペプチドリンカーは、生体関連ペプチド配列、またはその配列部分を含む。例えば、生体関連ペプチド配列は、これらに限定されないが、抗拒絶反応性または抗炎症性ペプチドに由来する配列を含むことができる。該抗拒絶反応性または抗炎症性ペプチドは、サイトカイン阻害性ペプチド、細胞接着阻害性ペプチド、トロンビン阻害性ペプチド、および血小板阻害性ペプチドから成る群より選択することができる。一好ましい実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ＩＬ－１阻害または拮抗ペプチド配列、エリスロポエチン（ＥＰＯ）模倣ペプチド配列、トロンボポエチン（ＴＰＯ）模倣ペプチド配列、Ｇ－ＣＳＦ模倣ペプチド配列、ＴＮＦ拮抗ペプチド配列、インテグリン結合ペプチド配列、セレクチン拮抗ペプチド配列、抗病原体ペプチド配列、血管作動性腸管ペプチド（ＶＩＰ）模倣ペプチド配列、カルモジュリン拮抗ペプチド配列、マスト細胞拮抗剤、ＳＨ３拮抗ペプチド配列、ウロキナーゼ受容体（ＵＫＲ）拮抗ペプチド配列、ソマトスタチンまたはコルチスタチン模倣ペプチド配列、およびマクロファージおよび／またはＴ細胞阻害ペプチド配列から成る群より選択されるペプチド配列を含む。いずれもポリペプチドリンカーとして使用されることができる、例示的なペプチド配列は、米国特許第６，６６０，８４３号において開示され、その内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。

【０１９５】

他の実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、以下に記載される結合部のいずれか１つの１つまたはそれ以上を含む（例えば、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ分子、リガンドの受容体結合部分、受容体のリガンド結合部分等）。

【０１９６】

当然のことながら、これらの例示的なポリペプチドリンカーの変異型は、１つまたはそれ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失が、ポリペプチドリンカーに導入されるように、ポリペプチドリンカーをコードするヌクレオチド配列に、１つまたはそれ以上のヌクレオチド置換、付加、または欠失を導入することによって作製することができる。例えば、変異は、部位特異的変異誘発およびＰＣＲ媒介変異誘発等の標準の手法によって導入することができる。「同類アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される置換である。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベーター分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含み、当技術分野において定義されている。したがって、免疫グロブリンポリペプチドにおける非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置換される。別の実施形態においては、アミノ酸の鎖は、順番が異なる構造的に同様の鎖および／または側鎖ファミリーメンバの組成物で置換することができる。

【０１９７】

本発明のポリペプチドリンカーは、少なくとも１つのアミノ酸の長さであり、様々な長さであり得る。一実施形態においては、本発明のポリペプチドリンカーは、約１～約５０のアミノ酸の長さである。これに関連して使用される約という用語は、＋／－２つのアミノ酸残基を示す。リンカーの長さは、正の整数でなければならないため、約１～約５０のアミノ酸の長さという長さは、１から４８～５２のアミノ酸長という長さを意味する。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドリンカーは、約１０～２０のアミノ酸の長

さである。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドリンカーは、約１５～約５０のアミノ酸の長さである。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドリンカーは、約２０～約４５のアミノ酸の長さである。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドリンカーは、約１５～約２５のアミノ酸の長さである。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドリンカーは、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、４０、５０、または６０のアミノ酸の長さである。

【０１９８】

ポリペプチドリンカーは、当技術分野で周知の手法を使用してポリペプチド配列に導入することができる。修飾は、ＤＮＡ配列分析によって確認することができる。プラスミドＤＮＡは、産生されるポリペプチドの安定した産生のために宿主細胞を形質転換するために使用することができる。

【０１９９】

Ｃ．標的結合部位

ある態様においては、本発明の結合ポリペプチドは、少なくとも１つの標的結合部位を含む。したがって、本発明の結合ポリペプチドは、通常、少なくとも１つの結合部位、および少なくとも１つの遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）を含む。

【０２００】

一実施形態においては、結合部位は、遺伝的に融合したＦｃ領域のＮ末端に機能的に連結される（例えば、化学的に結合体化されるか、または遺伝的に融合される（例えば、直接またはポリペプチドリンカーを介してのいずれか））。別の実施形態においては、結合部位は、遺伝的に融合したＦｃ領域のＣ末端に機能的に連結される（例えば、化学的に結合体化されるか、または遺伝的に融合される（例えば、直接またはポリペプチドリンカーを介してのいずれか））。他の実施形態においては、結合部位は、遺伝的に融合したＦｃ領域のアミノ酸側鎖を介して機能的に連結される（例えば、化学的に結合体化されるか、または遺伝的に融合される（例えば、直接またはポリペプチドリンカーを介してのいずれか））。ある例示的な実施形態においては、結合部位は、ヒト免疫グロブリンヒンジドメイン、またはその一部（例えば、ヒトＩｇＧ１配列、例えば、ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧ（配列番号８１））を介して遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）と融合される。

【０２０１】

ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、２つの結合部位、および少なくとも１つの遺伝的に融合したＦｃ領域を含む。例えば、結合部位は、単一の遺伝的に融合したＦｃ領域のＮ末端およびＣ末端の両方に機能的に連結することができる。他の例示的な実施形態においては、結合部位は、連続して共に結合されて遺伝的に融合したＦｃ領域の縦列整列を形成する複数の遺伝的に融合したＦｃ領域（例えば、２つ、３つ、４つ、５つ、またはそれ以上のｓｃＦｃ領域）のＮおよびＣ端末側終端に機能的に連結することができる。

【０２０２】

他の実施形態においては、２つまたそれ以上の結合部位は、（例えば、ポリペプチドリンカーを介して）連続して互いに結合され、結合部位の縦列整列は、単一の遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、単一のｓｃＦｃ領域）または遺伝的に融合したＦｃ領域の縦列整列（すなわち、縦列ｓｃＦｃ領域）のＣ末端またはＮ末端のいずれかに機能的に連結される（例えば、化学的に結合体化されるか、または遺伝的に融合される（例えば、直接またはポリペプチドリンカーを介してのいずれか））。他の実施形態においては、結合部位の縦列整列は、単一の遺伝的に融合したＦｃ領域、または遺伝的に融合したＦｃ領域の縦列整列のＣ末端およびＮ末端の両方に機能的に連結される。

【０２０３】

他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、３つの結合部位を含む三価結合ポリペプチドである。本発明の例示的な三価結合ポリペプチドは、二重特異性または三

重特異性である。例えば、三価結合ポリペプチドは、１つの特異性に対して二価（すなわち、２つの結合部位を有する）であり、第２の特異性に対して一価であり得る。

【０２０４】

さらに他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、４つの結合部位を含む四価結合ポリペプチドである。本発明の例示的な四価結合ポリペプチドは、二重特異性である。例えば、四価結合ポリペプチドは、各特異性に対して二価（すなわち、２つの結合部位を有する）であり得る。

【０２０５】

上記のように、他の実施形態においては、１つまたはそれ以上の結合部位は、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）の２つのＦｃ部分の間に挿入することができる。例えば、１つまたはそれ以上の結合部位は、本発明の結合ポリペプチドのポリペプチドリンカーの全部または一部を形成することができる。

【０２０６】

本発明の好ましい結合ポリペプチドは、抗原結合部位（例えば、抗体、抗体変異体、または抗体断片の抗原結合部位）、リガンドの受容体結合部分、または受容体のリガンド結合部分のうちの少なくとも１つを含む。

【０２０７】

他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、上述の生体関連ペプチドのいずれか１つの１つまたはそれ以上を含む少なくとも１つの結合部位を含む。

【０２０８】

ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、生物学的効果を媒介する標的分子に対して特異的な少なくとも１つの結合部位を有する。一実施形態においては、結合部位は、細胞活性化または阻害を調整する（例えば、細胞表面受容体に結合し、活性化または阻害シグナルの伝達を引き起こすことによって）。一実施形態においては、結合部位は、細胞の死をもたらす（例えば、細胞シグナル誘導性経路、結合分子上に存在するペイロード（例えば、毒性ペイロード）への補体の固定化または暴露によって）か、または対象において疾病または疾患を調整する（例えば、細胞死滅を媒介または促進する、フィブリン塊の溶解を促進するか、または血栓形成を促進する、または生物学的に利用可能な物質の量を調整することによって（例えば、対象におけるＴＮＦα等のリガンドの量を増加または減少させることによる））シグナルの変換を開始することが可能である。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、少なくとも１つの遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）と合わせて、減少または排除を標的とする抗原、例えば、細胞表面抗原または可溶性抗原に対して特異的な少なくとも１つの結合部位を有する。

【０２０９】

別の実施形態においては、標的分子（例えば、抗原）への本発明の結合ポリペプチドの結合は、例えば、組織または循環からの標的分子の減少または排除を引き起こす。別の実施形態においては、結合ポリペプチドは、標的分子の存在を検出する（例えば、汚染物質を検出または病状または疾患を診断する）ために使用することができる標的分子に対して特異的な少なくとも１つの結合部位を有する。さらに別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、対象における特定の部位（例えば、腫瘍細胞、免疫細胞、または血栓）へこの分子を向けさせる少なくとも１つの結合部位を含む。

【０２１０】

ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、２つまたそれ以上の結合部位を含むことができる。一実施形態においては、結合部位は、同一である。別の実施形態においては、結合部位は、異なる。

【０２１１】

他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、共に集合させ、または他のポリペプチドと集合させて、２つまたそれ以上のポリペプチドを有する結合タンパク質（「結合タンパク質」または「多量体」）を形成することができ、多量体の少なくとも１つのポリペプチドは、本発明の結合ポリペプチドである。例示的な多量体の型としては、二量

体、三量体、四量体、および六量体の変化した結合タンパク質等を含む。一実施形態においては、結合タンパク質のポリペプチドは、同じである（すなわち、ホモマーの変化した結合タンパク質、例えば、ホモ二量体、ホモ四量体）。別の実施形態においては、結合タンパク質のポリペプチドは、異なる（例えば、ヘテロマー）。

【０２１２】

ｉ．抗原結合部位

（ａ）抗体

ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、抗体の少なくとも１つの抗原結合部位を含む。本発明の結合ポリペプチドは、当該技術分野において承認されているプロトコルを使用して、抗体から得られた可変領域、またはその一部（例えば、ＶＬおよび／またはＶＨドメイン）を含むことができる。例えば、可変ドメインは、抗原、またはその断片で哺乳類に免疫を与えることによって、非ヒト哺乳類、例えば、マウス、モルモット、霊長類、ウサギ、またはラットにおいて産生される抗体に由来することができる。すべての目的に対して参照することにより組み込まれる、上記のＨａｒｌｏｗ＆Ｌａｎｅを参照。免疫グロブリンは、関連抗原（例えば、精製腫瘍関連抗原、またはそのような抗原を含む細胞または細胞抽出物）およびアジュバントの複数の皮下または腹腔内注入によって生成することができる。この免疫付与は、通常、活性化脾細胞またはリンパ球からの抗原反応性抗体の産生を含む免疫反応を引き出す。

【０２１３】

可変領域は、免疫性を与えられた哺乳類の血清から採取されるポリクローナル抗体に由来することができるが、しばしば、所望の可変領域が由来するモノクローナル抗体（ＭＡｂ）の同種の調製物を提供するために、脾臓、リンパ節、または末梢血から個々のリンパ球を単離することが好ましい。ウサギまたはモルモットは、通常、ポリクローナル抗体を作製するために使用される。マウスは、通常、モノクローナル抗体を作製するために使用される。モノクローナル抗体は、抗原断片をマウスに注入し、「ハイブリドーマ」を調製し、抗原に特異的に結合する抗体に対してハイブリドーマをスクリーニングすることによって、断片に対して調製することができる。この周知の過程（Ｋｏｈｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（１９７５），Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５）において、抗原を注入されたマウスの比較的短命か、または臨終のリンパ球は、不死の腫瘍細胞株（例えば、骨髄腫細胞株）と融合されるため、したがって、不死であり、Ｂ細胞によって遺伝的にコードされる抗体を産生することが可能なハイブリッド細胞または「ハイブリドーマ」を産生する。得られたハイブリッドは、単一抗体の形成のための特定の遺伝子を含む個々の株による選択、希釈、および再成長によって、単一の遺伝株に分離される。それらは、所望の抗原に対して同種であり、それらの純粋な遺伝的血統に関して「モノクローナル」と称される抗体を産生する。

【０２１４】

このようにして調製されるハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合親骨髄腫細胞の成長または生存を阻害する１つまたはそれ以上の物質を含有する適切な培地において播種され、成長する。当業者は、ハイブリドーマの形成、選択、および成長のための試薬、細胞株、および培地が、多数の供給源より市販され、標準的プロトコルが、十分に確立していることを認識する。概して、ハイブリドーマ細胞が成長している培養培地は、所望の抗原に対するモノクローナル抗体の産生に対して試験される。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降、またはラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）または酵素結合免疫吸着剤アッセイ（ＥＬＩＳＡ）等のインビトロアッセイによって測定される。所望の特異性、親和性および／または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が特定されると、クローンは、希釈手順を制限することによってサブクローン化され、標準方法によって成長させることができる（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ，ｐｐ５９－１０３（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，１９８６））。サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、親和性クロマトグラフィ（例えば、

プロテイン－Ａ、プロテイン－Ａ、またはプロテイン－Ｌ親和性クロマトグラフィ）、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、または透析等の従来の精製手順によって、培地、腹水、または血清から分離することができることはさらに認識される。

【０２１５】

任意で、抗体は、抗原の他の非重複断片に結合せずに、抗原の特定の領域または所望の断片に結合するためにスクリーニングすることができる。後者のスクリーニングは、抗原の欠失変異体の集合への抗体の結合を判定し、どの欠失変異体が抗体に結合するかを判定することによって達成することができる。結合は、例えば、ウエスタンブロット法またはＥＬＩＳＡによって評価することができる。抗体への特定の結合を示す最小の断片が、抗体のエピトープを定義する。代替として、エピトープ特異性は、被検および参照抗体が抗原への結合に対して競合する競合アッセイによって判定することができる。被検および参照抗体が競合する場合、それらは、同じエピトープ、または１つの抗体の結合が他の抗体の結合に干渉するように、十分近接するエピトープに結合する。

【０２１６】

所望のモノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、定常領域ドメイン配列の単離のための上述の従来の手順のいずれかを使用して（例えば、マウス抗体の重鎖または軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して）、容易に単離および配列決定することができる。単離され、サブクローン化されたハイブリドーマ細胞は、そのようなＤＮＡの好ましい源として作用する。より詳しくは、単離ＤＮＡ（本明細書において記載されるように合成することができる）は、本発明の結合ポリペプチドへの組み込みのための所望の可変領域配列をクローン化するために使用することができる。

【０２１７】

他の実施形態においては、結合部位は、完全ヒト抗体に由来する。ヒトまたは実質的なヒト抗体は、内因性免疫グロブリン産生が不可能な遺伝子導入動物（例えば、マウス）において生成することができる（例えば、米国特許第６，０７５，１８１号、同第５，９３９，５９８号、同第５，５９１，６６９号および同第５，５８９，３６９号を参照されたく、それぞれの内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる）。例えば、キメラおよび構造遺伝子変異マウスにおける抗体重鎖結合領域のホモ接合体欠失は、内因性抗体産生の完全阻害を引き起こすことが記載されている。そのような構造遺伝子変異マウスへのヒト免疫グロブリン遺伝子アレイの移動は、抗原チャレンジの際にヒト抗体の産生を引き起こす。ＳＣＩＤマウスを使用するヒト抗体を生成するための別の好ましい手段は、米国特許第５，８１１，５２４号において開示され、この内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。これらのヒト抗体に関連する遺伝物質は、本明細書において記載されるように単離し、操作することもできることが認識される。

【０２１８】

組み換え抗体を生成するためのさらに別の効率の高い手段は、Ｎｅｗｍａｎ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：１４５５－１４６０（１９９２）によって開示される。具体的に、この手法は、サル可変ドメインおよびヒト定常配列を含有する霊長類化抗体の生成を引き起こす。この文献は、参照することにより、その全体として本明細書に組み込まれる。また、この手法は、同一出願人による米国特許第５，６５８，５７０号，同第５，６９３，７８０号、および同第５，７５６，０９６号においても記載され、それぞれの内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。

【０２１９】

別の実施形態においては、リンパ球は、顕微操作で選択することができ、可変遺伝子を単離することができる。例えば、末梢血単核細胞は、免疫性を与えられた哺乳類から単離し、インビトロで約７日間培養することができる。培養物は、スクリーニング基準を満たす特定のＩｇＧに対してスクリーニングすることができる。陽性ウェルからの細胞は、単離することができる。個々のＩｇ産生Ｂ細胞は、ＦＡＣＳ、または補体媒介溶血プラークアッセイにおいてそれらを同定することによって単離することができる。Ｉｇ産生Ｂ細胞

は、チューブへ顕微操作することができ、ＶＨおよびＶＬ遺伝子は、例えば、ＲＴ－ＰＣＲを使用して増幅することができる。ＶＨおよびＶＬ遺伝子は、発現のために、抗体発現ベクターにクローン化し、細胞（例えば、真核または原核細胞）にトランスフェクトすることができる。

【０２２０】

代替として、可変（Ｖ）ドメインは、最適な動物からの可変遺伝子配列のライブラリから得ることができる。ドメインの無作為な組み合わせ、例えば、V_HおよびV_Lドメインを発現するライブラリは、所望の結合特性を有する要素を特定するために所望の抗原によってスクリーニングすることができる。そのようなスクリーニングの方法は、当技術分野で周知である。例えば、抗体遺伝子レパートリは、λバクテリオファージ発現ベクターにクローン化することができる（Ｈｕｓｅ，ＷＤ ｅｔ ａｌ．（１９８９）．Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４７６：１２７５）。さらに、表面に抗体を発現する細胞（Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ ｅｔ ａｌ．（１９９４），ＰＮＡＳ，９０：１０４４４、Ｇｅｏｒｇｉｏｕ ｅｔ ａｌ．（１９９７），Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．，１５：２９、Ｂｏｄｅｒ ａｎｄ Ｗｉｔｔｒｕｐ（１９９７）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１５：５５３、Ｂｏｄｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０００），ＰＮＡＳ，９７：１０７０１、Ｄａｕｇｔｈｅｒｔｙ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ．２４３：２１１）、またはウイルス（例えば、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ，ＨＲ．（１９９８），Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ４：１、Ｗｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９４）．Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２：４３３、Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ，ＡＤ．（１９９８）．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．９：１０２）をスクリーニングすることができる。

【０２２１】

当業者は、抗体可変ドメインをコードするＤＮＡを、当技術分野で周知の方法を使用して、ファージ、酵母、または細菌において発現される抗体ライブラリから得ることができることも認識する。例示的な方法が、例えば、欧州特許第ＥＰ３６８ ６８４Ｂ１号、米国特許第５，９６９，１０８号、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ．，（２０００）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ ２１：３７１、Ｎａｇｙ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｎａｔ．Ｍｅｄ．８：８０１、Ｈｕｉｅ ｅｔ ａｌ．（２００１），ＰＮＡＳ，９８：２６８２、Ｌｕｉ ｅｔ ａｌ．（２００２），Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３１５：１０６３において説明され、それぞれの内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。いくつかの出版物（例えば、Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．（１９９２），Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：７７９－７８３）は、鎖シャッフリングによる高親和性ヒト抗体の産生、および大きいファージライブラリを構築するための戦略として、組み合わせ感染およびインビボ組み換えを記載している。別の実施形態においては、リボゾーム提示法を、提示基盤としてバクテリオファージを置換するために使用することができる（例えば、Ｈａｎｅｓ，ｅｔ ａｌ．（１９９８），ＰＮＡＳ ９５：１４１３０、Ｈａｎｅｓ ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ．（１９９９），Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４３：１０７、Ｈｅ ａｎｄ Ｔａｕｓｓｉｇ．（１９９７），Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２５：５１３２、Ｈａｎｅｓ ｅｔ ａｌ．（２０００），Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１８：１２８７、Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（２００１），ＰＮＡＳ，９８：３７５０、またはＩｒｖｉｎｇ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２４８：３１）。

【０２２２】

スクリーニングするための好ましいライブラリは、ヒト可変遺伝子ライブラリである。非ヒト源からのV_LおよびV_Hドメインを使用することもできる。ライブラリは、未感作、免疫性を与えられた対象からのもの、または準合成であり得る（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ａｎｄ Ｗｉｎｔｅｒ．（１９９２）．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：３８１、Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ．（１９９５）ＥＭＢＯ Ｊ．１３：３２４５、ｄｅ Ｋｒｕｉｆ ｅｔ ａｌ．（１９９５）．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４８：９７、Ｂａｒｂａ

ｓ ｅｔ ａｌ．（１９９２），ＰＮＡＳ，８９：４４５７）。一実施形態においては、変異は、より高い異質性を有する核酸分子のライブラリを作成するために免疫グロブリンドメインに対して作製することができる（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９６），Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２５６：７７、Ｌａｍｍｉｎｍａｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９９９），Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９１：５８９、Ｃａｌｄｗｅｌｌ ａｎｄ Ｊｏｙｃｅ．（１９９２），ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌ．２：２８、Ｃａｌｄｗｅｌｌ ａｎｄ Ｊｏｙｃｅ．（１９９４）、ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌ．３：Ｓ１３６）。標準的スクリーニング手順を、高親和性変異体を選択するために使用することができる。別の実施形態においては、V_HおよびV_L配列の変更は、例えば、当技術分野で周知の手法を使用して結晶構造から得られた情報を使用して、抗体結合力を増加させるために行うことができる。

【０２２３】

また、本発明の結合ポリペプチドを産生するために有用な可変領域配列は、多くの異なる源から得ることができる。例えば、上述のように、様々なヒト遺伝子配列は、公的にアクセス可能な寄託の形で入手可能である。抗体および抗体コード遺伝子の多くの配列が、公表され、適切な可変領域配列（例えば、ＶＬおよびＶＨ配列）を、当該技術分野において承認されている手法を使用して、これらの配列から化学的に合成することができる。

【０２２４】

別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドに存在する少なくとも１つの可変領域ドメインは、触媒として機能する（Ｓｈｏｋａｔ ａｎｄ Ｓｃｈｕｌｔｚ．（１９９０）．Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．８：３３５）。触媒結合特異性を有する可変領域ドメインは、当該技術分野において承認されている手法を使用して行うことができる（例えば、米国特許第６，５９０，０８０号、米国特許第５，６５８，７５３号を参照）。触媒結合特異性は、遷移状態を安定化させる酵素に対して特定されるものと同様の多数の基本的メカニズムによって作用することができ、それによって、活性化の自由エネルギーを低下させる。例えば、一般的な酸性および塩基性残基は、触媒活性部位内における触媒作用への参加のために最適に配置することができ、共有結合酵素基質中間体を形成することができ、触媒抗体は、反応のための適切な方向にもあり、少なくとも７桁、反応物の有効濃度を増加させることができ（Ｆｅｒｓｈｔ ｅｔ ａｌ．，（１９６８），Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．９０：５８３３）、それによって、化学反応のエントロピーを大幅に低減させる。最後に、触媒抗体は、反応を促進するために、遷移状態の中間体の基質結合および／またはその後に行われる安定化の際に得られるエネルギーを変換することができる。

【０２２５】

酸性または塩基性残基は、免疫原として補完的に荷電した分子を使用することによって、抗原結合部位に組み込むことができる。この手法は、正電荷を持つアンモニウムイオンを含有するハプテンによる抗体の誘出に対して成功を収めた（Ｓｈｏｋａｔ，ｅｔ ａｌ．，（１９８８），Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．２７：２６９－２７１）。別の方法では、抗体は、所望の反応の遷移状態の中間体の大きさ、形状、および電荷が類似する安定化合物（すなわち、遷移状態の類似体）へと誘出することができる。動物に免疫性を与える遷移状態の類似体の使用、および触媒抗体の産生を記載する米国特許第４，７９２，４４６号および米国特許第４，９６３，３５５号を参照されたい。これらの特許の両方は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。そのような分子は、例えば、ＫＬＨ等の免疫原性の担体分子を有する免疫抱合体の一部として投与することができる。

【０２２６】

別の実施形態においては、本発明の変化した抗体の可変領域ドメインは、V_L鎖の非存在下において安定する、例えば、カメリドに由来するV_Hドメインから成る（Ｈａｍｅｒｓ－Ｃａｓｔｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．（１９９３）．Ｎａｔｕｒｅ，３６３：４４６、Ｄｅｓｍｙｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９６）．Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．３：８０３、Ｄｅｃａｎｎｉｅｒｅ ｅｔ ａｌ．（１９９９）．Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，７：

３６１、Ｄａｖｉｅｓ ｅｔ ａｌ．（１９９６）．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．，９：５３１、Ｋｏｒｔｔ ｅｔ ａｌ．（１９９５）．Ｊ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｈｅｍ．，１４：１６７）。

【０２２７】

さらに、本発明の結合ポリペプチドは、完全マウス、完全ヒト、キメラ、ヒト化、非ヒト霊長類、または霊長類化抗体に由来する可変ドメインまたはＣＤＲを含むことができる。非ヒト抗体、またはその断片またはドメインは、当該技術分野において承認されている手法を使用して、それらの免疫原性を低下させるために変化させることができる。ヒト化抗体は、非ヒト抗体に由来する抗体であり、親抗体の結合特性を保持または本質的に保持するように修飾されているが、親非ヒト抗体ほどヒトにおいて免疫原性ではない。ヒト化標的抗体の場合、これは、（ａ）全非ヒト可変ドメインをヒト定常領域上に接合して、キメラ標的抗体を生成する、（ｂ）重要なフレームワーク残基を保持、また保持せずに、非ヒト相補性決定領域（ＣＤＲ）の１つまたはそれ以上の少なくとも一部をヒトフレームワークおよび定常領域に接合する、（ｃ）全非ヒト可変ドメインを移植するが、表面残基の置換によってヒト様部分でそれらを「覆い隠す（ｃｌｏａｋ）」、等を含む、様々な方法で得ることができる。そのような方法は、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，（１９８４），ＰＮＡＳ．８１：６８５１－５、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，（１９８８），Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４４：６５－９２、Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ．，（１９８８），Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４－１５３６、Ｐａｄｌａｎ，（１９９１），Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎ．２８：４８９－４９８、Ｐａｄｌａｎ，（１９９４），Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎ．３１：１６９－２１７、および米国特許第５，５８５，０８９号、同第５，６９３，７６１号、および同第５，６９３，７６２号において開示され、それら全ての内容は、参照することにより、その全体として本明細書に組み込まれる。

【０２２８】

脱免疫化も、本発明の結合ポリペプチドの免疫原性を低下させるために使用することができる。本明細書において使用される「脱免疫化」という用語は、Ｔ細胞エピトープの修飾を含む（例えば、国際公開第ＷＯ９８５２９７６Ａ１号、同第ＷＯ００３４３１７Ａ２号を参照）。例えば、ＶＨおよびＶＬ配列は分析され、配列内における相補性決定領域（ＣＤＲ）および他の主要残基に関してエピトープの位置を示す各Ｖ領域からのヒトＴ細胞エピトープ「地図」が生成される。Ｔ細胞エピトープ地図からの個々のＴ細胞エピトープは、最終抗体の活性を変化させる低いリスクを有する代替のアミノ酸置換を特定するために分析される。アミノ酸置換の組み合わせを含む、種々の代替のＶＨおよびＶＬ配列が設計され、これらの配列は、その後、機能に対して試験される種々の本発明のポリペプチドに組み込まれる。通常、１２～２４の変異抗体が生成され、試験される。その後、修飾ＶおよびヒトＣ領域を含む完全重鎖または軽鎖遺伝子は、発現ベクターにクローン化され、その後のプラスミドは、全抗体の産生のために細胞株に導入される。その後、抗体は、適切な生化学的および生物学的アッセイにおいて比較され、最適な変異体が特定される。

【０２２９】

一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドにおいて使用される可変ドメインは、１つまたはそれ以上のＣＤＲの少なくとも部分的置換によって改変される。別の実施形態においては、可変ドメインは、例えば、部分的フレームワーク領域置換および配列変化によって、任意で改変することができる。ヒト化可変領域を作製する際、ＣＤＲは、フレームワーク領域が由来する抗体と同じクラスまたはさらにサブクラスの抗体から得ることができるが、ＣＤＲは、異なるクラスの抗体、好ましくは異なる種からの抗体に由来することが想定される。１つの可変ドメインの抗原結合能を別の可変ドメインへ移動させるために、ドナー可変領域からの完全ＣＤＲでＣＤＲのすべてを置換することは不必要である場合がある。むしろ、結合ドメインの活性を維持する必要があるそれらの残基を移動させることのみが必要である場合がある。米国特許第５，５８５，０８９号、同第５，６９３，７６１号、および同第５，６９３，７６２号に記載される説明を踏まえると、低減した免疫原性を有する機能的な抗原結合部位を得ることは、日常の実験を行うか、または誤差

の試験のいずれかにより、十分当業者の能力内にある。

【０２３０】

一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、所望の標的を認識する抗体からの少なくとも１つのＣＤＲを含む。別の実施形態においては、本発明の変化した抗体は、所望の標的を認識する抗体からの少なくとも２つのＣＤＲを含む。別の実施形態においては、本発明の変化した抗体は、所望の標的を認識する抗体からの少なくとも３つのＣＤＲを含む。別の実施形態においては、本発明の変化した抗体は、所望の標的を認識する抗体からの少なくとも４つのＣＤＲを含む。別の実施形態においては、本発明の変化した抗体は、所望の標的を認識する抗体からの少なくとも５つのＣＤＲを含む。別の実施形態においては、本発明の変化した抗体は、所望の標的を認識する抗体からの少なくとも６つのＣＤＲを含む。

【０２３１】

本発明の結合分子における使用のための、結合部位が由来することができる例示的な抗体は、当技術分野で周知である。例えば、現在ＦＤＡによって認可されている抗体を、結合部位を得るために使用することができる。例示的なそのような抗体は、図６４に記載される。

【０２３２】

一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドにおいて使用される抗原結合部位は、１つまたはそれ以上の腫瘍関連抗原に対して免疫反応性であり得る。例えば、癌または新形成を治療するために、結合ポリペプチドの抗原結合ドメインは、好ましくは、選択された腫瘍関連抗原に結合する。新形成に関連する報告された抗原の数、および関連抗体の数を踏まえると、当業者は、本発明の結合ポリペプチドが、多数の全抗体のいずれか１つに由来する可変領域配列、またはその一部を含むことができることを認識する。より一般的に、そのような可変領域配列は、選択された状態に関連する抗原またはマーカと反応する任意の抗体（文献において以前に報告されたものを含む）から得られるか、または引き出すことができる。本発明の結合ポリペプチドによって結合する例示的な腫瘍関連抗原としては、例えば、ｐａｎＢ抗原（例えば、非ホジキンリンパ腫におけるもの等の悪性および非悪性の両方のＢ細胞の表面上に見られるＣＤ２０）およびｐａｎＴ細胞抗原（例えば、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ５、ＣＤ６、ＣＤ７）が挙げられる。他の例示的な腫瘍関連抗原は、これらに限定されないが、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－３、ＭＵＣ－Ｉ、ＨＰＶ１６、ＨＰＶ　Ｅ６＆Ｅ７、ＴＡＧ－７２、ＣＥＡ、α－Ｌｅｗｉｓ^{y}、Ｌ６－抗原、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２５、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ４４、ＣＤ５２、ＣＤ５６、ＣＤ８０、メソテリン、ＰＳＭＡ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＥＧＦ受容体、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦ受容体、クリプト抗原、およびＨＥＲ２受容体を含む。

【０２３３】

他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、腫瘍関連抗原と反応すると過去に報告されている抗体からの完全抗原結合部位（またはその可変領域もしくはＣＤＲ配列）を含むことができる。腫瘍関連抗原と反応することが可能な例示的な抗体としては、２Ｂ８、Ｌｙｍ１、Ｌｙｍ２、ＬＬ２、Ｈｅｒ２、Ｂ１、ＢＲ９６、ＭＢ１、ＢＨ３、Ｂ４、Ｂ７２．３、５Ｅ８、Ｂ３Ｆ６、５Ｅ１０、α－ＣＤ３３、α－ＣａｎＡｇ、α－ＣＤ５６、α－ＣＤ４４ｖ６、α－Ｌｅｗｉｓ、およびα－ＣＤ３０が含まれる。より具体的に、これらの例示的な抗体としては、これらに限定されないが、２Ｂ８およびＣ２Ｂ８（Ｚｅｖａｌｉｎ（登録商標）およびＲｉｔｕｘａｎ（登録商標）、Ｂｉｏｇｅｎ　Ｉｄｅｃ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ）、Ｌｙｍ１およびＬｙｍ２（Ｔｅｃｈｎｉｃｌｏｎｅ）、ＬＬ２（Ｉｍｍｕｎｏｍｅｄｉｃｓ　Ｃｏｒｐ．、Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ）、トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ　Ｉｎｃ．、Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ）、トシツモマブ（Ｂｅｘｘａｒ（登録商標）、Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｐｈａｒｍ．、Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ）、アレムツズマブ（Ｃａｍｐａｔｈ（登録商標）、Ｍｉｌｌｅｎｎｉｕｍ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ）、ゲムツズマブオゾガマイシン（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（登録商標）、Ｗｙｅｔｈ－Ａ

ｙｅｒｓｔ、Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ）、アバゴボマブ（Ｍｅｎａｒｉｎｉ、Ｉｔａｌｙ）、ＣＥＡ－Ｓｃａｎ（登録商標）（Ｉｍｍｕｎｏｍｅｄｉｃｓ、Ｍｏｒｒｉｓ Ｐｌａｉｎｓ、ＮＪ）、カプロマブ（Ｐｒｏｓｔａｓｃｉｎｔ（登録商標）、Ｃｙｔｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．）、エドレコロマブ（Ｐａｎｏｒｅｘ（登録商標）、Ｊｏｈｎｓｏｎ＆Ｊｏｈｎｓｏｎ、Ｎｅｗ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ、ＮＪ）、イゴボマブ（ＣＩＳ Ｂｉｏ Ｉｎｔｌ．、Ｆｒａｎｃｅ）、ミツモマブ（ＢＥＣ２、Ｉｍｃｌｏｎｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｓｏｍｅｒｖｉｌｌｅ、ＮＪ）、ノフェツモマブ（Ｖｅｒｌｕｍａ（登録商標）、Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｉｎｇｌｅｈｅｉｍ、Ｒｉｄｇｅｆｉｅｌｄ、ＣＴ）、ＯｖａＲｅｘ（Ａｌｔａｒｅｘ Ｃｏｒｐ．、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）、サツモマブ（Ｏｎｏｓｃｉｎｔ（登録商標）、Ｃｙｔｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．）、アポリズマブ（ＲＥＭＩＴＯＧＥＮ（登録商標）、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｅｓｉｇｎ Ｌａｂｓ、Ｆｒｅｍｏｎｔ、ＣＡ）、ラベツズマブ（Ｌａｂｅｔｕｚｕｍａｂ）（ＣＥＡＣＩＤＥ（登録商標）、Ｉｍｍｕｎｏｍｅｄｉｃｓ Ｉｎｃ．、Ｍｏｒｒｉｓ Ｐｌａｉｎｓ、ＮＪ）、パーツズマブ（ＯＭＮＩＴＡＲＧ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ Ｉｎｃ．、Ｓ．Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）、パニツムマブ（Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（登録商標）、Ａｍｇｅｎ、Ｔｈｏｕｓａｎｄ Ｏａｋｓ、ＣＡ）、セツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標）、Ｉｍｃｌｏｎｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）、ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ Ｉｎｃ．、Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ）、ＢＲ９６、ＢＬ２２、ＬＭＢ９、ＬＭＢ２、ＭＢ１、ＢＨ３、Ｂ４、Ｂ７２．３（Ｃｙｔｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．）、ＳＳ１（ＮｅｏＰｈａｒｍ）、ＣＣ４９（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）、カンツズマブメルタンシン（ＩｍｍｕｎｏＧｅｎ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ）、ＭＮＬ２７０４（Ｍｉｌｌｅｎｅｕｍ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ）、ビバツズマブメルタンシン（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｉｎｇｅｌｈｅｉｍ、Ｇｅｒｍａｎｙ）、トラスツズマブ－ＤＭ１（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ、Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ）、Ｍｙ９－６－ＤＭ１（ＩｍｍｕｎｏＧｅｎ、Ｃａｂｒｉｄｇｅ）、ＳＧＮ－１０、－１５、－２５、および－３５（Ｓｅａｔｔｌｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、Ｓｅａｔｔｌｅ）、および５Ｅ１０（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｉｏｗａ）が挙げられる。さらに他の実施形態においては、結合ポリペプチドは、抗ＣＤ２３抗体（例えば、ルミリキシマブ）、抗ＣＤ８０抗体（例えば、ガリキシマブ）、または抗ＶＬ５／α５β１－インテグリン抗体（例えば、ボロシキシマブ）の結合部位を含むことができる。他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、上記に列挙される抗体と同じ腫瘍関連抗原に結合する。特に好ましい実施形態においては、ポリペプチドは、Ｙ２Ｂ８、Ｃ２Ｂ８、ＣＣ４９、およびＣ５Ｅ１０と同じ抗原に由来するか、または結合する。

【０２３４】

対象の結合分子に組み込むことができる他の結合部位は、オルソクローンＯＫＴ３（抗ＣＤ３）（Ｊｏｈｎｓｏｎ＆Ｊｏｈｎｓｏｎ、Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ、ＮＪ）、ＲｅｏＰｒｏ（登録商標）（抗ＧｐＩＩｂ／ｇＩＩａ）（Ｃｅｎｔｏｃｏｒ、Ｈｏｒｓｈａｍ、ＰＡ）、Ｚｅｎａｐａｘ（登録商標）（抗ＣＤ２５）（Ｒｏｃｈｅ、Ｂａｓｅｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）、Ｒｅｍｉｃａｄｅ（登録商標）（抗ＴＮＦα）（Ｃｅｎｔｏｃｏｒ、Ｈｏｒｓｈａｍ、ＰＡ）、Ｓｉｍｕｌｅｃｔ（登録商標）（抗ＣＤ２５）（Ｎｏｖａｒｔｉｓ、Ｂａｓｅｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）、Ｓｙｎａｇｉｓ（登録商標）（抗ＲＳＶ）（Ｍｅｄｉｍｍｕｎｅ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）、Ｈｕｍｉｒａ（登録商標）（抗ＴＮＦα）（Ａｂｂｏｔｔ、Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ、ＩＬ）、Ｘｏｌａｉｒ（登録商標）（抗ＩｇＥ）（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ、Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）、Ｒａｐｔｉｖａ（登録商標）（抗ＣＤ１１ａ）（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、Ｔｙｓａｂｒｉ（登録商標）（ＢｉｏｇｅｎＩｄｅｃ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）、Ｌｕｃｅｎｔｉｓ（登録商標）（抗ＶＥＧＦ）（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、およびＳｏｌｉｒｉｓ（登録商標）（Ａｌｅｘｉｏｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｃｈｅｓｈｉｒｅ、ＣＴ）において見られるものを含む。

【０２３５】
一実施形態においては、本発明の結合分子は、次の抗体の１つまたはそれ以上に由来する１つまたはそれ以上の結合部位を含むことができる。トシツモマブ（ＢＥＸＸＡＲ（登録商標））、ムロモナブ（ＯＲＴＨＯＣＬＯＮＥ（登録商標））およびイブリツモマブ（ＺＥＶＡＬＩＮ（登録商標））、セツキシマブ（ＥＲＢＩＴＵＸ（登録商標））、リツキシマブ（ＭＡＢＴＨＥＲＡ（登録商標）／ＲＩＴＵＸＡＮ（登録商標））、インフリキシマブ（ＲＥＭＩＣＡＤＥ（登録商標））、アブシキシマブ（ＲＥＯＰＲＯ（登録商標））およびバシリキシマブ（ＳＩＭＵＬＥＣＴ（登録商標））、エファリズマブ（ＲＡＰＴＩＶＡ（登録商標）、ベバシズマブ（ＡＶＡＳＴＩＮ（登録商標））、アレムツズマブ（ＣＡＭＰＡＴＨ（登録商標））、トラスツズマブ（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標））、ゲムツズマブ（ＭＹＬＯＴＡＲＧ（登録商標））、パリビズマブ（ＳＹＮＡＧＩＳ（登録商標））、オマリズマブ（ＸＯＬＡＩＲ（登録商標））、ダクリズマブ（ＺＥＮＡＰＡＸ（登録商標））、ナタリズマブ（ＴＹＳＡＢＲＩ（登録商標））およびラニビズマブ（ＬＵＶＥＮＴＩＳ（登録商標））、アダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（登録商標））およびパニツムマブ（ＶＥＣＴＩＢＩＸ（登録商標））。

【０２３６】
一実施形態においては、結合ポリペプチドは、Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標）と同じ腫瘍関連抗原に結合する。Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標）（リツキシマブ、ＩＤＥＣ－Ｃ２Ｂ８およびＣ２Ｂ８としても称される）は、ヒトＢ細胞リンパ腫の治療に対する第１のＦＤＡに認可されたモノクローナル抗体である（米国特許第５，８４３，４３９号、同第５，７７６，４５６号、および同第５，７３６，１３７号を参照されたく、それぞれの内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる）。Ｙ２Ｂ８（９０Ｙ標識２Ｂ８、Ｚｅｖａｌｉｎ（登録商標）、イブリツモマブチウキセタン）は、Ｃ２Ｂ８のマウス親抗体である。Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標）は、成長阻害性であり、インビトロの化学療法剤によるアポトーシスに対してある種のリンパ腫細胞株を感作すると報告されるキメラ抗ＣＤ２０モノクローナル抗体である。該抗体は、ヒト補体に効率的に結合し、強いＦｃＲ結合を有し、補体依存性（ＣＤＣ）および抗体依存性（ＡＤＣＣ）メカニズムを介して、インビトロでヒトリンパ球を効率的に死滅させることができる（Ｒｅｆｆ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　８３：４３５－４４５（１９９４））。当業者は、本発明の結合ポリペプチドが、ＣＤ２０＋悪性腫瘍を提示する患者を治療する際にさらにより効果的な結合ポリペプチドを提供するために、Ｃ２Ｂ８または２Ｂ８の可変領域またはＣＤＲを含むことができることを認識する。

【０２３７】
本発明の他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＣＣ４９と同じ腫瘍関連抗原に結合する。ＣＣ４９は、ヒト由来のある腫瘍細胞の表面、特に、ＬＳ１７４Ｔ腫瘍細胞株に関連するヒト腫瘍関連抗原ＴＡＧ－７２に結合する。ＬＳ１７４Ｔは、ＬＳ１８０結腸腺癌株の変異体である。

【０２３８】
本発明の結合ポリペプチドは、成熟した多数のマウスモノクローナル抗体に由来し、ＴＡＧ－７２に対する結合特異性を有する抗原結合部位を含むことができる。Ｂ７２．３と命名された、これらのモノクローナル抗体の１つは、ハイブリドーマＢ７２．３によって産生されるマウスＩｇＧ１である。Ｂ７２．３は、免疫原としてヒト乳癌抽出物を使用して成熟した第一世代モノクローナル抗体である（ＣｏｌｃｈｅＲ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ），７８：３１９９－３２０３（１９８１）、ならびに米国特許第４，５２２，９１８号および同第４，６１２，２８２号を参照されたく、それぞれの内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる）。ＴＡＧ－７２を対象にする他のモノクローナル抗体は、「ＣＣ」（結腸癌に対する）と命名される。Ｓｃｈｌｏｍ　ｅｔ　ａｌ．（米国特許第５，５１２，４４３号、この内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる）によって記載されるように、ＣＣモノクローナル抗体は、Ｂ７２．３で精製されたＴＡＧ－７２を使用して調製された第二世代マウスモノ

クローナル抗体のファミリーである。ＴＡＧ－７２へのそれらの比較的良い結合親和性のため、次のＣＣ抗体が好ましい。ＣＣ４９、ＣＣ８３、ＣＣ４６、ＣＣ９２、ＣＣ３０、ＣＣ１１、およびＣＣ１５。Ｓｃｈｌｏｍ ｅｔ ａｌ．は、ＰＣＴ／ＵＳ９９／２５５５２号において開示されるヒト化ＣＣ４９抗体の変異体、および米国特許第５，８９２，０１９号において開示される一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｃ）構造体も産生し、これらの内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。当業者は、前述の抗体、構造体、または組み換え型、およびそれらの変異体が、合成であり、本発明による結合ポリペプチドの産生に対して結合部位を提供するために使用することができることを認識する。

【０２３９】

上述の抗ＴＡＧ－７２抗体に加えて、様々なグループも、ドメイン欠失ＣＣ４９およびＢ７２．３抗体の構造体および部分的特性解析を報告している（例えば、Ｃａｌｖｏ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ，８（１）：９５－１０９（１９９３），Ｓｌａｖｉｎ－Ｃｈｉｏｒｉｎｉ ｅｔ ａｌ．Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ５３：９７－１０３（１９９３）、およびＳｌａｖｉｎ－Ｃｈｉｏｒｉｎｉ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ．Ｒｅｓ．５５：５９５７－５９６７（１９９５））。したがって、結合ポリペプチドは、これらの抗体に由来する抗原結合部位、可変領域、またはＣＤＲをも含むことができる。

【０２４０】

一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＣＤ２３抗原に結合する抗原結合部位を含む（米国特許第６，０１１，１３８号）。好ましい実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、５Ｅ８抗体と同じエピトープに結合する。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、抗ＣＤ２３抗体、例えば、５Ｅ８抗体（例えば、ルミリキシマブ）からの少なくとも１つのＣＤＲ（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲ）を含む。

【０２４１】

一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＣＲＩＰＴＯ－Ｉ抗原に結合する（国際公開第ＷＯ０２／０８８１７０Ａ２号または国際公開第ＷＯ０３／０８３０４１Ａ２号）。より好ましい実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、Ｂ３Ｆ６抗体と同じエピトープに結合する。さらに別の実施形態においては、本発明の変化した抗体は、ＣＲＩＰＴＯ－Ｉ抗原、例えば、Ｂ３Ｆ６抗体からの少なくとも１つのＣＤＲ（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲ）または可変領域を含む。

【０２４２】

別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、受容体のＴＮＦスーパーファミリー（「ＴＮＦＲ」）のメンバである抗原に結合する。別の実施形態においては、本発明の結合分子は、例えば、ＴＮＦファミリー受容体等の細胞表面受容体に結合することにより、シグナルを細胞に変換する少なくとも１つの標的に結合する。「シグナルを変換する」ことは、細胞に結合することによって、結合分子が、例えば、シグナル変換経路を調節することによって、細胞表面受容体に対する細胞外影響を細胞性応答に変換することを意味する。「ＴＮＦ受容体」または「ＴＮＦ受容体ファミリーメンバ」という用語は、受容体の腫瘍壊死因子（「ＴＮＦ」）スーパーファミリーに属する任意の受容体を指す。ＴＮＦ受容体スーパーファミリー（「ＴＮＦＲＳＦ」）のメンバは、システインノットとして配列される２つまたそれ以上のシステインリッチドメイン（それぞれ約４０のアミノ酸）を有する細胞外領域によって特徴付けられる（Ｄｅｍｐｓｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ Ｒｅｖ．（２００３）．１４（３－４）：１９３－２０９）。それらの同族ＴＮＦリガンドに結合する際、ＴＮＦ受容体は、ＴＲＡＦ（ＴＮＦ受容体関連因子）として周知の細胞質アダプタタンパク質と直接または間接的に相互作用することによってシグナルを変換する。ＴＲＡＦは、ＮＦ－カッパＢ、ＪＮＫ、ＥＲＫ、ｐ３８、およびＰＩ３Ｋ等のシグナル変換経路の活性化に最終的につながるいくつかのキナーゼカスケードの活性化を変換することができ、それが、次いで、免疫機能および組織分化からアポトーシスに渡る細胞過程を調節する。いくつかのＴＮＦ受容体ファ

ミリーメンバのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、当技術分野で周知であり、少なくとも以下の２９のヒト遺伝子を含む。ＴＮＦＲＳＦ１Ａ（ＴＮＦＲ１、またＤＲ１、ＣＤ１２０ａ、ＴＮＦ－Ｒ－Ｉｐ５５、ＴＮＦ－Ｒ、ＴＮＦＲＩ、ＴＮＦＡＲ、ＴＮＦ－Ｒ５５、ｐ５５ＴＮＦＲ、ｐ５５Ｒ、またはＴＮＦＲ６０としても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号４５０７５７５、米国特許第ＵＳ５，３９５，７６０号も参照））、ＴＮＦＲＳＦ１Ｂ（ＣＤ１２０ｂ、またｐ７５、ＴＮＦ－Ｒ、ＴＮＦ－Ｒ－ＩＩ、ＴＮＦＲ８０、ＴＮＦＲ２、ＴＮＦ－Ｒ７５、ＴＮＦＢＲ、またはｐ７５ＴＮＦＲとしても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号４５０７５７７）、ＴＮＦＲＳＦ３（リンホトキシンベータ受容体（ＬＴβＲ）、またＴＮＦＲ２－ＲＰ、ＣＤ１８、ＴＮＦＲ－ＲＰ、ＴＮＦＣＲ、またはＴＮＦ－Ｒ－ＩＩＩとしても周知、ＧＩ番号４５０５０３８および２００７２２１２）、ＴＮＦＲＳＦ４（ＯＸ４０、またＡＣＴ３５、ＴＸＧＰ１Ｌ、またはＣＤ１３４抗原としても周知、ＧＩ番号４５０７５７９および８９２６７０２）、ＴＮＦＲＳＦ５（ＣＤ４０、またｐ５０、またはＢｐ５０としても周知、ＧＩ番号４５０７５８１および２３３１２３７１）、ＴＮＦＲＳＦ６（ＦＡＳ、またＦＡＳ－Ｒ、ＤｃＲ－２、ＤＲ２、ＣＤ９５、ＡＰＯ－１、またはＡＰＴ１としても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号４５０７５８３、２３５１０４２１、２３５１０４２３、２３５１０４２５、２３５１０４２７、２３５１０４２９、２３５１０４３１、および２３５１０４３４））、ＴＮＦＲＳＦ６Ｂ（ＤｃＲ３、ＤＲ３、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号４５０７５６９、２３２０００２１、２３２０００２３、２３２０００２５、２３２０００２７、２３２０００２９、２３２０００３１、２３２０００３３、２３２０００３５、２３２０００３７、および２３２０００３９）、ＴＮＦＲＳＦ７（ＣＤ２７、またＴｐ５５またはＳ１５２としても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号４５０７５８７）、ＴＮＦＲＳＦ８（ＣＤ３０、またＫｉ－１またはＤ１Ｓ１６６Ｅとしても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号４５０７５８９および２３５１０４３７）、ＴＮＦＲＳＦ９（４－１－ＢＢ、またＣＤ１３７またはＩＬＡとしても周知、ＧＩ番号５７３００９５および７２８７３８）、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ（ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、またＤＲ４またはＡｐｏ２としても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号２１３６１０８６）、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ（ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、またＤＲ５、ＫＩＬＬＥＲ、ＴＲＩＣＫ２Ａ、またはＴＲＩＣＫＢとしても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号２２５４７１１６および２２５４７１１９）、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｃ（ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、またＤｃＲ１、ＬＩＴ、またはＴＲＩＤとしても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号２２５４７１２１）、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｄ（ＴＲＡＩＬ－Ｒ４、またＤｃＲ２またはＴＲＵＮＤＤとしても周知）、ＴＮＦＲＳＦ１１Ａ（ＲＡＮＫ、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号４５０７５６５、米国特許第６，５６２，９４８号、同第６，５３７，７６３号、同第６，５２８，４８２号、同第６，４７９，６３５号、同第６，２７１，３４９号、同第６，０１７，７２９号を参照）、ＴＮＦＲＳＦ１１Ｂ（オステオプロテジェリン（ＯＰＧ）、またＯＣＩＦまたはＴＲ１としても周知、ＧＩ番号３８５３０１１６、２２５４７１２２および３３８７８０５６）、ＴＮＦＲＳＦ１２（輸送鎖関連膜タンパク質（ＴＲＡＭＰ）、またＤＲ３、ＷＳＬ－１、ＬＡＲＤ、ＷＳＬ－ＬＲ、ＤＤＲ３、ＴＲ３、ＡＰＯ－３、Ｆｎ１４、またはＴＷＥＡＫＲとしても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号７７０６１８６、米国特許出願公開第２００４／００３３２２５Ａ１号）、ＴＮＦＲＳＦ１２Ｌ（ＤＲ３Ｌ）、ＴＮＦＲＳＦ１３Ｂ（ＴＡＣＩ、ＧＩ番号６９１２６９４）、ＴＮＦＲＳＦ１３Ｃ（ＢＡＦＦＲ、ＧＩ番号１６４４５０２７）、ＴＮＦＲＳＦ１４（ヘルペスウイルス侵入メディエータ（ＨＶＥＭ）、またＡＴＡＲ、ＴＲ２、ＬＩＧＨＴＲ、またはＨＶＥＡとしても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号２３２００４１、１２８０３８９５、および３８７８８２１）、ＴＮＦＲＳＦ１６（低親和性神経成長因子受容体（ＬＮＧＦＲ）、またニューロトロフィン受容体またはｐ７５（ＮＴＲ）としても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号１２８１５６および４５０５３９３）、ＴＮＦＲＳＦ１７（ＢＣＭ、またＢＣＭＡとしても周知、ＧＩ番号２３２３８１９２）、ＴＮＦＲＳＦ１８（ＡＩＴＲ、またＧＩＴＲとしても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号４７５９２４６、２３２３８１９４および２３２３８１９７）、ＴＮＦＲＳＦ１９（Ｔｒｏｙ／Ｔｒａｄｅ、またＴＡＪとしても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号２３２３８２０２およ

び２３２３８２０４）、ＴＮＦＲＳＦ２０（ＲＥＬＴ、またＦＬＪ１４９９３としても周知、ＧＩ番号２１３６１８７３および２３２３８２００）、ＴＮＦＲＳＦ２１（ＤＲ６）、ＴＮＦＲＳＦ２２（ＳＯＢａ、またＴｎｆｒｈ２または２８１００２８Ｋ０６Ｒｉｋとしても周知）、およびＴＮＦＲＳＦ２３（ｍＳＯＢ、またＴｎｆｒｈ１としても周知）。他のＴＮＦファミリーメンバとしては、ＥＤＡＲ１（エクトジスプラシンＡ受容体、またＤｏｗｎｌｅｓｓ（ＤＬ）、ＥＤ３、ＥＤ５、ＥＤ１Ｒ、ＥＤＡ３、ＥＤＡ１Ｒ、ＥＤＡ－Ａ１Ｒとしても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号１１６４１２３１、米国特許第６，３５５，７８２号）、ＸＥＤＡＲ（ＥＤＡ－Ａ２Ｒとしても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号１１１４０８２３）、およびＣＤ３９（ＧＩ番号２１３５５８０および７６５２５６）が含まれる。別の実施形態においては、本発明の変化した抗体は、死ドメインを欠くＴＮＦ受容体ファミリーメンバに結合する。一実施形態においては、死ドメインを欠くＴＮＦ受容体は、組織分化に関与する。より具体的な実施形態においては、組織分化に関与するＴＮＦ受容体は、ＬＴβＲ、ＲＡＮＫ、ＥＤＡＲ１、ＸＥＤＡＲ、Ｆｎ１４、Ｔｒｏｙ／Ｔｒａｄｅ、およびＮＧＦＲから成る群より選択される。別の実施形態においては、死ドメインを欠くＴＮＦ受容体は、免疫調節に関与する。より具体的な実施形態においては、免疫調節に関与するＴＮＦ受容体ファミリーメンバは、ＴＮＦＲ２、ＨＶＥＭ、ＣＤ２７、ＣＤ３０、ＣＤ４０、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、およびＧＩＴＲから成る群より選択される。

【０２４３】

別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＴＮＦリガンドスーパーファミリーに属するＴＮＦリガンドに結合する。ＴＮＦリガンドは、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーの明確に他とは異なる受容体に結合し、互いに１５～２５％のアミノ酸配列相同性を示す（Ｇａｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．（２００３），６６（８）：１４０３－８）。いくつかのＴＮＦ受容体（リガンド）スーパーファミリー（「ＴＮＦＳＦ」）メンバのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、当技術分野で周知であり、少なくとも以下の１６のヒト遺伝子を含む。ＴＮＦＳＦ１（リンホトキシン－α（ＬＴＡ）、ＴＮＦβまたはＬＴとしても周知、ＧＩ番号：３４４４４および６８０６８９３）、ＴＮＦＳＦ２（ＴＮＦ、ＴＮＦα、またはＤＩＦとしても周知、ＧＩ番号２５９５２１１１）、ＴＮＦＳＦ３（リンホトキシン－β（ＬＴＢ）、ＴＮＦＣ、またはｐ３３としても周知）、ＴＮＦＳＦ４（ＯＸ－４０Ｌ、ｇｐ３４、ＣＤ１３４Ｌ、またはｔａｘ転写活性化糖タンパク質１，３４ｋＤ（ＴＸＧＰ１）としても周知、ＧＩ番号４５０７６０３）、ＴＮＦＳＦ５（ＣＤ４０ＬＧ、ＩＭＤ３、ＨＩＧＭ１、ＣＤ４０Ｌ、ｈＣＤ４０Ｌ、ＴＲＡＰ、ＣＤ１５４、またはｇｐ３９としても周知、ＧＩ番号４５５７４３３）、ＴＮＦＳＦ６（ＦａｓＬまたはＡＰＴ１ＬＧ１としても周知、ＧｅｎＢａｎｋ　ＧＩ番号４５５７３２９）、ＴＮＦＳＦ７（ＣＤ７０、ＣＤ２７Ｌ、またはＣＤ２７ＬＧとしても周知、ＧＩ番号４５０７６０５）、ＴＮＦＳＦ８（ＣＤ３０ＬＧ、ＣＤ３０Ｌ、またはＣＤ１５３としても周知、ＧＩ番号４５０７６０７）、ＴＮＦＳＦ９（４－１ＢＢ－ＬまたはＩＬＡリガンドとしても周知、ＧＩ番号４５０７６０９）、ＴＮＦＳＦ１０（ＴＲＡＩＬ、Ａｐｏ－２Ｌ、またはＴＬ２としても周知、ＧＩ番号４５０７５９３）、ＴＮＦＳＦ１１（ＴＲＡＮＣＥ、ＲＡＮＫＬ、ＯＰＧＬ、またはＯＤＦとしても周知、ＧＩ番号４５０７５９５および１４７９０１５２）、ＴＮＦＳＦ１２（Ｆｎ１４Ｌ、ＴＷＥＡＫ、ＤＲ３ＬＧ、またはＡＰＯ３Ｌとしても周知、ＧＩ番号４５０７５９７および２３５１０４４１）、ＴＮＦＳＦ１３（ＡＰＲＩＬとしても周知）、ＴＮＦＳＦ１４（ＬＩＧＨＴ、ＬＴｇ、またはＨＶＥＭ－Ｌとしても周知、ＧＩ番号２５９５２１４４および２５９５２１４７）、ＴＮＦＳＦ１５（ＴＬ１またはＶＥＧＩとしても周知）、またはＴＮＦＳＦ１６（ＡＩＴＲＬ、ＴＬ６、ｈＧＩＴＲＬ、またはＧＩＴＲＬとしても周知、ＧＩ番号４８２７０３４）。他のＴＮＦリガンドファミリーメンバとしては、ＥＤＡＲ１＆ＸＥＤＡＲリガンド（ＥＤ１、ＧＩ番号４５０３４４９、Ｍｏｎｒｅａｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ａｍ　Ｊ　Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅｔ．６３：３８０）、Ｔｒｏｙ／Ｔｒａｄｅリガンド、ＢＡＦＦ（ＴＡＬＬ１としても周知、ＧＩ番号５７３００９７）、およびＮＧＦリガンド（例え

ば、ＮＧＦ－β（ＧＩ番号４５０５３９１）、ＮＧＦ－２／ＮＴＦ３、ＧＩ番号４５０５４６９）、ＮＴＦ５（ＧＩ番号５４５３８０８））、ＢＤＮＦ（ＧＩ番号２５３０６２６７、２５３０６２３５、２５３０６２５３、２５３０６２５７、２５３０６２６１、２５３０６２６４、ＩＦＲＤ１（ＧＩ番号４５０４６０７））が含まれる。

【０２４４】

一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＬＴβＲ抗体に結合する（例えば、ＣＢＥ１１またはＢＤＡ８抗体と同じエピトープに（すなわち、競合する））。例示的な抗ＬＴβＲ抗体は、国際公開第ＷＯ９８／０１７３１３号および同第ＷＯ０２／３０９８６号において説明され、これらの内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。さらに別の実施形態においては、本発明の変化した抗体は、抗ＬＴβＲ抗体、例えば、ＣＢＥ１１抗体またはＢＤＡ８抗体からの少なくとも１つのＣＤＲ（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲ）を含む。

【０２４５】

別の好ましい実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２に結合する（例えば、１４Ａ２抗体と同じエピトープに（すなわち、競合する））。さらに別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、抗ＴＲＡＩＬ－Ｒ２抗体、例えば、１４Ａ２抗体からの少なくとも１つのＣＤＲ（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲ）を含む。

【０２４６】

さらに別の好ましい実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、抗ＣＤ２抗体（例えば、キメラＣＢ６（「ｃｈＢ６」）抗体）と同じエピトープに結合する。本発明の結合ポリペプチドが由来することができる例示的な抗ＣＤ２抗体は、マウス抗体ＣＢ６、およびそのキメラ版、例えば、実施例において開示されるＩｇＧ１ｃｈＣＢ６抗体を含む。特定の実施形態においては、本発明の抗ＣＤ２結合ポリペプチドは、配列番号２９（ＡＳＫ０５８）、配列番号３１（ＡＳＫ０６２）、配列番号３３（ＡＳＫ０６３）、および配列番号３５（ＡＳＫ０６４）から成る群より選択される重鎖配列を含む。

【０２４７】

本発明のさらに他の実施形態は、Ｃ５Ｅ１０と同じ腫瘍関連抗原に由来するか、または結合する変化した抗体を含む。同時係属出願０９／１０４，７１７号において説明されるように、Ｃ５Ｅ１０は、前立腺腫瘍細胞株（例えば、ＤＵ１４５、ＰＣ３、またはＮＤ１）に対して特異的と考えられる、１１５ｋＤａの糖タンパク質決定因子を認識する抗体である。したがって、本発明と関連して、Ｃ５Ｅ１０抗体によって認識される同じ腫瘍関連抗原に特異的に結合するポリペプチドは、単独で使用するか、または本発明の方法によってエフェクタ部分に結合体化することができ、それによって、腫瘍性疾患の利用の改善に有用な修飾ポリペプチドを提供する。特に好ましい実施形態においては、出発ポリペプチドは、ＡＴＣＣ受入番号ＰＴＡ－８６５を有するハイブリドーマ細胞株から分泌されるＣ５Ｅ１０抗体の抗原結合領域の全部または一部に由来するか、または含む。その後、得られたポリペプチドは、以下に記載される治療用エフェクタ部分に結合体化し、本明細書における方法に従って、前立腺癌を患う患者に投与することができる。

【０２４８】

さらに他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、自己免疫または炎症性疾病または疾患を治療する際に有用な分子に結合する。例えば、結合ポリペプチドは、自己免疫疾病または疾患に関与する免疫細胞（例えば、ＢまたはＴ細胞）または自己抗原上に存在する抗原に結合することができる。自己免疫または炎症性疾患に関連する抗原は、上述の腫瘍関連抗原であり得る。そのため、腫瘍関連抗原も、自己免疫または炎症性関連疾患であり得る。本明細書において使用される「自己免疫疾病または疾患」という用語は、免疫系が、体の自己の細胞を攻撃し、組織破壊を引き起こす、対象における疾患または病状を指す。自己免疫疾病は、自己免疫反応が、多数の組織において同時に発生する一般的な自己免疫疾病、または自己免疫反応が単一の臓器を標的とする臓器特異的自己免疫疾病を含む。本発明の方法および組成物によって診断、予防、または治療することができる

自己免疫疾病の例としては、これらに限定されないが、クローン病、炎症性大腸炎（ＩＢＤ）、全身性エリテマトーデス、潰瘍性大腸炎、リウマチ性関節炎、グッドパスチャー症候群、グレーブス病疾病、橋本甲状腺炎、尋常性天疱瘡、重症筋無力症、硬皮症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、多発性筋炎および皮膚筋炎、悪性貧血、シェーグレン症候群、強直性脊椎炎、血管炎、１型糖尿病、神経系疾患、多発性硬化症、および自己免疫疾病の結果として生じる二次疾患が挙げられる。

【０２４９】

他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、炎症性疾病または疾患に関連する標的分子に結合する。本明細書において使用され「炎症性疾病または疾患」という用語は、炎症によって、少なくとも部分的に引き起こされるか、または悪化する疾病または疾患、例えば、例えば、血流量増大、浮腫、および免疫細胞の活性化（例えば、増殖、サイトカイン産生、または食作用の強化）を含む。例えば、本発明の結合ポリペプチドは、異常な量、例えば、対象の利益となるように変化させることが有利と成り得る量で、一部位に関与または存在する炎症性因子（例えば、マトリクスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、ＴＮＦα、インターロイキン、血漿タンパク質、サイトカイン、脂質代謝産物、プロテアーゼ、毒性ラジカル、ミトコンドリアタンパク質、アポトーシスタンパク質、接着分子等）に結合することができる。炎症過程は、損傷への生体組織の反応である。炎症の原因は、物理的損傷、化学物質、微生物、組織壊死、癌、または他の薬剤のためであり得る。急性炎症は、例えば、数日間のみ持続する短時間型である。しかしながら、それが持続する場合、それは慢性炎症と称され得る。

【０２５０】

炎症性疾患は、急性炎症性疾患、慢性炎症性疾患、および再発性炎症性疾患を含む。急性炎症性疾患は、概して、比較的短期間であり、約数分間から約１～２日間持続するが、それらは、数週間持続する場合がある。急性炎症性疾患の主要な特性は、血流量増大、液状および血漿タンパク質の滲出（浮腫）、および好中球等の白血球の移動を含む。慢性炎症性疾患は、概して、長期間、例えば、数週、数ヶ月、数年、またはそれ以上であり、リンパ球およびマクロファージの存在、および血管および結合組織の増殖に組織学的に関連する。再発性炎症性疾患は、ある期間後に再発するか、または定期的な症状の出現を有する疾患を含む。再発性炎症性疾患の例としては、ぜんそくおよび多発性硬化症を含む。一部の疾患は、１つまたはそれ以上のカテゴリに該当し得る。炎症性疾患は、概して、熱、発赤、腫脹、疼痛および機能低下によって特徴付けられる。炎症性疾患の原因の例としては、これらに限定されないが、細菌感染（例えば、細菌、ウイルス、真菌感染症）、物理的変化を生じさせるもの（例えば、火傷、放射線、および外傷）、化学物質（例えば、毒素および腐食性物質）、組織壊死、および様々な種類の免疫学的反応が含まれる。炎症性疾患の例としては、これらに限定されないが、変形性関節症、リウマチ性関節炎、急性および慢性感染（細菌、ウイルス、真菌）、風邪を含む、急性および慢性気管支炎、副鼻腔炎、および他の呼吸器感染、急性および慢性胃腸炎および結腸炎、急性および慢性膀胱炎ならびに尿道炎、急性呼吸窮迫症候群、嚢胞性線維症、急性および慢性皮膚炎、急性および慢性結膜炎、急性および慢性漿膜炎（心膜炎、腹膜炎、滑膜炎、胸膜炎、および腱炎）、尿毒性心膜炎、急性および慢性胆嚢炎、急性および慢性膣炎、急性および慢性ブドウ膜炎、薬物反応、および火傷（熱的、化学的、および電気的）が含まれる。

【０２５１】

一好ましい実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＣＤ４０Ｌ抗体（例えば、５Ｃ８抗体と同じエピトープに（すなわち、競合する））に結合する。さらに別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、抗ＣＤ４０Ｌ抗体（例えば、５Ｃ８抗体）からの少なくとも１つの抗原結合部位、１つまたはそれ以上のＣＤＲ（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲ）、または１つまたはそれ以上の可変領域（ＶＨまたはＶＬ）を含む。膜貫通タンパク質であるＣＤ４０Ｌ（ＣＤ１５４、ｇｐ３９）は、活性化ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、マスト細胞、好塩基球、好酸球、天然キラー（ＮＫ）細胞、および活性化血小板上で発現される。ＣＤ４０Ｌは、Ｔ細胞依存性Ｂ細胞反応に対して重

要である。ＣＤ４０Ｌの顕著な機能であるイソタイプ切り替えは、ＣＤ４０Ｌが先天的に欠損している高免疫グロブリンＭ（ＩｇＭ）症候群によって示される。ＣＤ４０Ｌ－ＣＤ４０の相互作用（樹枝状細胞等の抗原提示細胞に対する）は、Ｔ細胞プライミングおよびＴ細胞依存性体液性免疫反応に不可欠である。したがって、抗ＣＤ４０Ｌモノクローナル抗体（ｍＡｂ）によるＣＤ４０－ＣＤ４０Ｌ相互作用の遮断は、上記の情報および動物における研究に基づいて、ヒト自己免疫疾病における可能な治療方針と考えられている。本発明の結合ポリペプチドが由来し得る例示的な抗ＣＤ４０Ｌ抗体は、米国特許第５，４７４，７７１号において記載され、この内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれるマウス抗体５Ｃ８、およびそのヒト化版、例えば、実施例において開示されるＩｇＧ１　Ｈｕ５Ｃ８抗体を含む。他の抗ＣＤ４０Ｌ抗体は、当技術分野で周知である（例えば、米国特許第５，９６１，９７４号および国際公開第ＷＯ９６／２３０７１号を参照）。特定の実施形態においては、本発明の抗ＣＤ４０Ｌ結合ポリペプチドは、配列番号１（ＥＡＧ２０６６）、配列番号７（ＥＡＧ２１４６）、配列番号９（ＥＡＧ２１４７）、配列番号１３（ＡＳＫ０４３）、配列番号１５（ＡＳＫ０４８）、配列番号１７（ＡＳＫ０５２）、および配列番号１９（ＡＳＫ０５３）から成る群より選択される重鎖配列を含む。

【０２５２】

さらに他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、神経系疾病または疾患を治療する際に有用な分子に結合する。例えば、結合ポリペプチドは、神経系細胞（例えば、ニューロン、グリア細胞、またはａ）上に存在する抗原に結合することができる。ある実施形態においては、神経系疾患に関連する抗原は、上述の自己免疫または炎症性疾患であり得る。本明細書において使用される「神経系疾病または疾患」という用語は、神経系が変質している（例えば、神経変性疾患、および神経系が適切に発達しない疾患）か、または後の外傷（例えば、脊髄損傷）を再生することができない、対象における疾患または病状を含む。本発明の方法および組成物によって診断、予防、または治療することができる神経系疾患の例としては、これらに限定されないが、多発性硬化症、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、神経因性疼痛、外傷性脳損傷、ギランバレー症候群、および慢性炎症性脱髄性多発神経障害（ＣＩＤＰ）が含まれる。

【０２５３】

一つの好ましい実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、抗ＬＩＮＧＯ抗体（例えば、Ｌｉ３３抗体）と同じエピトープに結合する。さらに別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、抗ＬＩＮＧＯ抗体（例えば、Ｌｉ３３抗体）からの少なくとも１つの抗原結合部位、１つまたはそれ以上のＣＤＲ、または１つまたはそれ以上の可変領域（ＶＨまたはＶＬ）を含む。特定の実施形態においては、本発明の抗ＬＩＮＧＯ結合ポリペプチドは、配列番号２１（ＥＡＧ２１４８）、配列番号２２（ＡＳＫ０５０）、および配列番号２３（ＡＳＫ０５１）より選択される重鎖配列を含む。

【０２５４】

（ｂ）抗原結合断片

他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドの結合部位は抗原結合断片を含むことができる。「抗原結合断片」という用語は、抗原に結合するか、または抗原結合（すなわち、特異的結合）のために無傷抗体（すなわち、それらが由来する無傷抗体）と競合する免疫グロブリン、抗体、または抗体変異体のポリペプチド断片を指す。例えば、該抗原結合断片は、上述の抗体または抗体変異体のいずれにも由来することができる。抗原結合断片は、当技術分野で周知の組み換え、または生化学的方法によって産生することができる。例示的な抗原結合断片としては、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、および（Ｆａｂ’）$_2$を含む。

【０２５５】

例示的な実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）のＣ末端および／またはＮ末端に機能的に連結される（例えば、化学的に結合体化されるか、または遺伝的に融合される（例えば、直接融合されるか、またはポリペプチドリンカーを介して融合される））少なくとも１つの抗原結合断片

を含む。例示的な一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ヒンジドメイン、またはその一部（例えば、ＩｇＧ１ヒンジ、またはその一部、例えば、ヒトＩｇＧ１ヒンジ）を介して少なくとも１つの遺伝的に融合したＦｃ領域のＮ末端（またはＣ末端）に機能的に連結される抗原結合断片（例えば、Ｆａｂ）を含む。例示的なヒンジドメイン部分は、配列ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧを含む。

【０２５６】

（ｃ）一本鎖結合分子

他の実施形態においては、本発明の結合分子は、一本鎖結合分子（例えば、一本鎖可変領域またはｓｃＦｃ）からの結合部位を含むことができる。一本鎖抗体の産生に関して記載される手法（米国特許第４，６９４，７７８号、Ｂｉｒｄ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４４２（１９８８）、Ｈｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：５８７９－５８８３（１９８８）、およびＷａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３４：５４４－５５４（１９８９））は、一本鎖結合分子を産生するために適合させることができる。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してＦｖ領域の重または軽鎖断片を結合させることによって形成され、一本鎖抗体が得られる。Ｅ Ｃｏｌｉにおける機能Ｆｖ断片の集合のための手法も、使用することができる（Ｓｋｅｒｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：１０３８－１０４１（１９８８））。

【０２５７】

ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、一本鎖可変領域配列（ｓｃＦｃ）を含むか、またはそれから成る１つ以上の結合部位または領域を含む。一本鎖可変領域配列は、１つ以上の抗原結合部位、例えば、柔軟リンカーによってV_Hドメインに結合されるV_Lドメインを有する一本鎖ポリペプチドを含む。ＶＬおよび／またはＶＨドメインは、上述の抗体または抗体変異体のいずれにも由来することができる。ＳｃＦｖ分子は、V_H－リンカー－V_L方向またはV_L－リンカー－V_H方向で構築することができる。抗原結合部位を作製するV_LおよびV_Hドメインを結合する柔軟リンカーは、好ましくは、約１０～約５０のアミノ酸残基を含む。一実施形態においては、ポリペプチドリンカーは、ｇｌｙ－ｓｅｒポリペプチドリンカーである。例示的なｇｌｙ／ｓｅｒポリペプチドリンカーは、式（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）ｎのものであり、ｎは、正の整数（例えば、１、２、３、４、５、または６）である。他のポリペプチドリンカーは、当技術分野で周知である。一本鎖可変領域配列（例えば、一本鎖Ｆｖ抗体）を有する抗体および該一本鎖抗体を作製するための方法は、当技術分野で周知である（例えば、Ｈｏ ｅｔ ａｌ．１９８９．Ｇｅｎｅ ７７：５１、Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．１９８８ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３、Ｐａｎｔｏｌｉａｎｏ ｅｔ ａｌ．１９９１．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３０：１０１１７、Ｍｉｌｅｎｉｃ ｅｔ ａｌ．１９９１．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５１：６３６３、Ｔａｋｋｉｎｅｎ ｅｔ ａｌ．１９９１．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ４：８３７を参照）。

【０２５８】

ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドにおいて使用されるｓｃＦｖ分子は、安定化ｓｃＦｖ分子である。一実施形態においては、安定化ｃＦｖ分子は、V_HドメインとV_Lドメインとの間に介入するｓｃＦｖリンカーを含むことができ、V_HおよびV_Lドメインは、V_Hにおけるアミノ酸とV_Lドメインにおけるアミノ酸との間のジスルフィド結合によって結合される。他の実施形態においては、安定化ｓｃＦｖ分子は、最適化された長さまたは組成物を有するｓｃＦｖリンカーを含むことができる。さらに他の実施形態においては、安定化ｓｃＦｖ分子は、少なくとも１つの安定化アミノ酸置換を有するV_HまたはV_Lドメインを含むことができる。さらに別の実施形態においては、安定化ｓｃＦｖ分子は、上記に掲載された安定化特色の少なくとも２つを有することができる。安定化ｓｃＦｖ分子は、改善されたタンパク質安定性を有するか、またはそれが機能的に連結される結合ポリペプチドに改善されたタンパク質安定性を与える。本発明の好ましいｓｃＦｖリンカーは、従来の結合ポリペプチドと比較して、本発明の結合ポリペプチドの熱安定性を少なくとも約２℃または３℃改善する。例えば、本発明のｓｃＦｖ分子の間で比

較を行うことができる。ある好ましい実施形態においては、安定化ｓｃＦｖ分子は、（Ｇｌｙ$_4$Ｓｅｒ）$_4$ｓｃＦｖリンカー、および$Ｖ_H$アミノ酸４４と$Ｖ_L$アミノ酸１００を結合させるジスルフィド結合を含む。本発明の結合ポリペプチドにおいて使用することができる他の例示的な安定化ｓｃＦｖ分子は、２００６年１２月８日出願の米国暫定特許出願第６０／８７３，９９６号、または２００７年３月１９日出願の米国特許出願第１１／７２５，９７０号において記載され、これらの内容は、参照することにより、それらの全体として本明細書に組み込まれる。

【０２５９】

ある例示的な実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）のＣ末端および／またはＮ末端に機能的に連結される（例えば、化学的に結合体化されるか、または遺伝的に融合される（例えば、直接融合されるか、またはポリペプチドリンカーを介して融合される）少なくとも１つのｓｃＦｖ分子を含む。例示的な一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ヒンジドメイン、またはその一部（例えば、ＩｇＧ１ヒンジ、またはその一部、例えば、ヒトＩｇＧ１ヒンジ）を介して、少なくとも１つの遺伝的に融合したＦｃ領域のＮ末端（またはＣ末端）に機能的に連結される少なくとも１つのｓｃＦｖ分子（例えば、１つ以上の安定化ｓｃＦｖ分子）を含む。例示的なヒンジドメイン部分は、配列ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧを含む。

【０２６０】

ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、連続して２つ以上のｓｃＦｖ分子を融合することによって形成される四価結合部位または領域を含む。例えば、一実施形態においては、ｓｃＦｖ分子は、第１のｓｃＦｖ分子が、同じまたは異なる結合特異性を有する少なくとも１つの付加的ｓｃＦｖ分子に、そのＮ末端で（例えば、ポリペプチドリンカー（例えば、ｇｌｙ／ｓｅｒポリペプチドリンカー）を介して）機能的に連結されるように、組み合わされる。ｓｃＦｖ分子の縦列整列は、少なくとも１つの遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）のＮ末端および／またはＣ末端に機能的に連結され、本発明の結合ポリペプチドを形成する。

【０２６１】

別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ｓｃＦｖ分子を（例えば、ポリペプチドリンカーを介して）抗原結合断片（例えば、Ｆａｂ断片）に機能的に結合することによって形成される四価結合部位または領域を含む。該四価結合部位または領域は、少なくとも１つの遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）のＮ末端および／またはＣ末端に機能的に連結され、本発明の結合ポリペプチドを形成する。

【０２６２】

（ｄ）修飾抗体

他の態様においては、本発明の結合ポリペプチドは、抗体の修飾型に由来する抗原結合部位、またはその一部を含むことができる。例示的なそのような型としては、例えば、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、ナノボディ、カメリド、Ｄａｂ、四価抗体、イントラダイアボディ（例えば、Ｊｅｎｄｒｅｙｋｏ ｅｔ ａｌ．２００３．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７８：４７８１３）、融合タンパク質（例えば、抗体サイトカイン融合タンパク質、Ｆｃ受容体の少なくとも一部と融合されるタンパク質）、および二重特異性抗体が含まれる。他の修飾抗体は、米国特許第４，７４５，０５５号、欧州特許第ＥＰ２５６，６５４号、Ｆａｕｌｋｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ２９８：２８６（１９８２）、欧州特許第ＥＰ１２０，６９４号、欧州特許第ＥＰ１２５，０２３号、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎ．１２３：７９３（１９７９）、Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：２１９７（１９８０）、Ｒａｓｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．４１：２０７３（１９８１）、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：２３９（１９８４）、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：１２０２（１９８５）、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：６８５１（１

９８４）、欧州特許第ＥＰ２５５，６９４号、欧州特許第ＥＰ２６６，６６３号、および国際公開第ＷＯ８８／０３５５９号において記載される。再分類された免疫グロブリン鎖も、周知である。例えば、米国特許第４，４４４，８７８号、国際公開第ＷＯ８８／０３５６５号、および欧州特許第ＥＰ６８，７６３号、および本明細書において記載される参考文献を参照されたい。

【０２６３】

一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ミニボディである抗原結合部位もしくは領域、またはそれから由来する抗原結合部位を含む。ミニボディは、２つのポリペプチド鎖から作製される二量体分子であり、それぞれ、ポリペプチドリンカーを介してＣＨ３ドメイン、またはその一部と融合されるｓｃＦｖ分子を含む。ミニボディは、当技術分野において説明される方法を使用して、ｓｃＦｃ成分とポリペプチドリンカー－ＣＨ３成分を結合することによって作製することができる（例えば、米国特許第５，８３７，８２１号または国際公開第ＷＯ９４／０９８１７Ａ１号を参照）。これらの成分は、制限断片として別々のプラスミドから単離し、その後、結合し、適切なベクター（例えば、発現ベクター）に再クローンすることができる。適切な（例えば、単量体ミニボディポリペプチド鎖をコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）の）集合は、制限消化およびＤＮＡ配列分析によって検証することができる。一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、少なくとも１つの遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）に機能的に連結されるミニボディのｓｃＦｖ成分を含む。別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、結合部位または領域として四価ミニボディを含む。四価ミニボディは、２つのｓｃＦｖ分子がポリペプチドリンカーを使用して結合されることを除き、ミニボディと同じ方法で構築することができる。その後、結合されたｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ構造体は、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域に）に機能的に連結され、本発明の結合ポリペプチドを形成する。

【０２６４】

別の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ジアボディである抗原結合部位もしくは領域、またはそれに由来する抗原結合部位を含む。ジアボディは、二量体四価分子であり、それぞれ、ｓｃＦｖ分子と同様のポリペプチドを有するが、同じポリペプチド鎖上のV_LおよびV_Hドメインが、相互作用できないように、通常、可変ドメインの両方に接続する短い（例えば、１０未満、好ましくは１～５）アミノ酸残基リンカーを有する。その代わりに、１つのポリペプチド鎖のV_LおよびV_Hドメインは、第２のポリペプチド鎖上のV_HおよびV_Lドメイン（それぞれ）を相互作用する（例えば、国際公開第ＷＯ０２／０２７８１号を参照）。一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、少なくとも１つの遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）のＮ末端および／またはＣ末端に機能的にに連結されるジアボディを含む。

【０２６５】

ある実施形態においては、結合分子は、ｓｃＦｃに結合される単一ドメイン結合分子（例えば、単一ドメイン抗体）を含む。例示的な単一ドメイン分子は、軽鎖可変ドメインを有さない、抗体の単離重鎖可変ドメイン（V_H）、すなわち、重鎖可変ドメイン、および重鎖可変ドメインを有さない、単離した抗体の軽鎖可変ドメイン（V_L）、すなわち、軽鎖可変ドメインを含む。本発明の結合分子における例示的な単一ドメイン抗体としては、例えば、Ｈａｍｅｒｓ－Ｃａｓｔｅｒｍａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３６３：４４６－４４８（１９９３）、およびＤｕｍｏｕｌｉｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ １１：５００－５１５（２００２）に記載されるカメリド重鎖可変ドメイン（約１１８～１３６のアミノ酸残基）が挙げられる。他の例示的な単一ドメイン抗体としては、Ｄａｂｓ（登録商標）（Ｄｏｍａｎｔｉｓ Ｌｔｄ．、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）としても周知の単一ＶＨまたはＶＬドメインが含まれる。さらに他の単一ドメイン抗体は、サメ抗体（例えば、サメＩｇ－ＮＡＲ）を含む。サメＩｇ－ＮＡＲは、１つの可変ドメイン（Ｖ－ＮＡＲ）および５つのＣ様定常ドメイン（Ｃ－ＮＡＲ）のホモ二量体を含み、多様性は、長さが５～２３残基と異なる伸長ＣＤＲ３領域において集中する。カメ

リド種（例えば、ラマ）においては、ＶＨＨと称される重鎖可変領域は、全抗原－結合ドメインを形成する。カメリドＶＨＨ可変領域と従来の抗体（ＶＨ）に由来する領域との間の主な違いは、（ａ）ＶＨＨにおける対応する領域と比較して、ＶＨの軽鎖接触表面におけるより多い疎水性のアミノ酸、（ｂ）ＶＨＨにおけるより長いＣＤＲ３、および（ｃ）ＶＨＨにおけるＣＤＲ１とＣＤＲ３との間のジスルフィド結合の頻発、を含む。単一ドメイン結合分子を作製するための方法は、米国特許第６，００５，０７９号および同第６，７６５，０８７号において記載され、両方の内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。ＶＨＨドメインを含む例示的な単一ドメイン抗体としては、Ｎａｎｏｂｏｄｉｅｓ（登録商標）（Ａｂｌｙｎｘ　ＮＶ、Ｇｈｅｎｔ、Ｂｅｌｇｉｕｍ）が含まれる。

【０２６６】

（ｅ）非免疫グロブリン結合分子

ある他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、非免疫グロブリン結合分子に由来する１つ以上の結合部位を含む。本明細書において使用される「非免疫グロブリン結合分子」という用語は、免疫グロブリン以外のポリペプチドに由来するが、所望の結合特異性を与えるために操作する（例えば、突然変異を起こさせる）ことができる部分（例えば、骨格またはフレームワーク）を、結合部位が含む結合分子である。

【０２６７】

抗体分子に由来しない結合部位を含む結合分子の他の例としては、以下でより詳細に記載される受容体結合部位およびリガンド結合部位が含まれる。

【０２６８】

非免疫グロブリン結合分子は、免疫グロブリンではない免疫グロブリンスーパーファミリー（例えば、Ｔ細胞受容体または細胞接着タンパク質（例えば、ＣＴＬＡ－４、Ｎ－ＣＡＭ、テロキン））に由来する結合部位部分を含むことができる。そのような結合分子は、免疫グロブリン折り畳みの配座を保持し、ＩＧＦ１－Ｒエピトープに特異的に結合することが可能な結合部位部分を含む。他の実施形態においては、本発明の非免疫グロブリン結合分子は、免疫グロブリン折り畳みに基づかないタンパク質トポロジー（例えば、アンキリン反復タンパク質またはフィブロネクチン等）を有するが、それでも、標的（例えば、ＩＧＦ－１Ｒエピトープ）に特異的に結合することが可能な結合部位も含む。

【０２６９】

非免疫グロブリン結合分子は、人工的に多様化された結合部位を有する結合分子のライブラリからの標的結合変異体の選択または単離によって特定することができる。多様化されたライブラリは、完全に無作為の方法（例えば、誤りがちなＰＣＲ、エクソンシャッフリング、または指向進化）を使用して生成するか、または当該技術分野において承認されている設計方針によって促進することができる。例えば、結合部位が、その同族標的分子と相互作用する場合に、通常、関与するアミノ酸位置は、結合部位をコードする核酸内における対応する位置での縮重コドン、トリヌクレオチド、無作為ペプチド、またはループ全体の挿入によって無作為化することができる（例えば、米国公開第２００４０１３２０２８号を参照）。アミノ酸位置の場所は、標的分子を有する複合体における結合部位の結晶構造の調査によって特定することができる。無作為化の候補位置は、結合部位のループ、平面、螺旋、および結合孔を含む。ある実施形態においては、多様化に対して候補になる可能性が高い結合部位内におけるアミノ酸は、免疫グロブリン折り畳みとのそれらの相同性によって特定することができる。例えば、フィブロネクチンのＣＤＲ様ループ内における残基は、フィブロネクチン結合分子のライブラリを生成するために無作為化することができる（例えば、Ｋｏｉｄｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２８４：１１４１－１１５１（１９９８）を参照）。無作為化することができる結合部位の他の部分は、平面を含む。無作為化後、多様化されたライブラリは、所望の結合特性例えば、上述のＩＧＦ－１Ｒエピトープへの特異的結合を有する結合分子を得るために、選択またはスクリーニング手順に供することができる。例えば、選択は、ファージ提示法、酵母提示法、またはリボソーム提示法等の当該技術分野において承認されている方法によって達成することができる。

【０２７０】
一実施形態においては、本発明の結合分子は、フィブロネクチン結合分子からの結合部位を含む。フィブロネクチン結合分子（例えば、フィブロネクチンＩ、ＩＩ、またはＩＩＩ型ドメインを含む分子）は、免疫グロブリンとは対照的に、鎖内ジスルフィド結合に依存しないＣＤＲ様ループを提示する。フィブロネクチン結合ポリペプチドを作製するための方法は、例えば、国際公開第ＷＯ０１／６４９４２号、および米国特許第６，６７３，９０１号、同第６，７０３，１９９号、同第７，０７８，４９０号、および同第７，１１９，１７１号において記載され、これらの内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。例示的な一実施形態においては、フィブロネクチン結合ポリペプチドをＡｄＮｅｃｔｉｎ（登録商標）（Ａｄｎｅｘｕｓ　Ｔｈｅｒｐａｅｕｔｉｃｓ、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）とする。

【０２７１】
別の実施形態においては、本発明の結合分子は、Ａｆｆｉｂｏｄｙ（登録商標）（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）からの結合部位を含む。アフィボディは、ブドウ球菌プロテインＡ（ＳＰＡ）の免疫グロブリン結合ドメインに由来する（例えば、Ｎｏｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１５：７７２－７７７（１９９７）を参照）。本発明において使用されるアフィボディ結合部位は、ＳＰＡのドメイン（例えば、ドメインＢ）に由来するＳＰＡ関連タンパク質（例えば、タンパク質Ｚ）に変異をおこさせ、ＩＧＦ－１Ｒエピトープに対する結合親和性を有する変異ＳＰＡ関連ポリペプチドを選択することによって合成することができる。アフィボディ結合部位を作製するための方法は、米国特許第６，７４０，７３４号および同第６，６０２，９７７号、ならびに国際公開第ＷＯ００／６３２４３号におい記載され、それぞれに内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。

【０２７２】
別の実施形態においては、本発明の結合分子は、Ａｎｔｉｃａｌｉｎ（登録商標）（Ｐｉｅｒｉｓ　ＡＧ、Ｆｒｉｅｓｉｎｇ、Ｇｅｒｍａｎｙ）からの結合部位を含む。アンチカリン（リポカリンとしても周知）は、多様なβ－バレルタンパク質ファミリーのメンバであり、その機能は、それらのバレル／ループ領域における標的分子に結合することである。リポカリン結合部位は、バレルの鎖を接続するループ配列を無作為化することによって、ＩＧＦ－１Ｒエピトープに結合するように操作することができる（例えば、Ｓｃｈｌｅｈｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｒｕｇ　Ｄｉｓｃｏｖ．Ｔｏｄａｙ，１０：２３－３３（２００５）、Ｂｅｓｔｅ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，９６：１８９８－１９０３（１９９９）を参照）。本発明の結合分子において使用されるアンチカリン結合部位は、モンシロチョウ（Ｐｉｅｒｉｓ　ｂｒａｓｓｉｃａ）のビリン結合タンパク質（ＢＢＰ）のアミノ酸位置２８～４５、５８～６９、８６～９９、および１１４～１２９を含む直鎖状ポリペプチド配列の配列位置に対応する４つの断片において変異されるリポカリンファミリーのポリペプチドから始めて取得可能であり得る。アンチカリン結合部位を作製するための他の方法は、国際公開第ＷＯ９９／１６８７３号および同第ＷＯ０５／０１９２５４号において記載され、それぞれの内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。

【０２７３】
別の実施形態においては、本発明の結合分子は、高システインポリペプチドからの結合部位を含む。本発明の実践において使用される高システインドメインは、通常、α－螺旋、βシート、またはβ－バレル構造を形成しない。通常、ジスルフィド結合は、三次元構造へのドメインの折り畳みを促進する。通常、高システインドメインは、少なくとも２つのジスルフィド結合、より典型的には、少なくとも３つのジスルフィド結合を有する。例示的な高システインポリペプチドは、Ａドメインタンパク質である。Ａドメイン（時折、「相補型反復」と称される）は、約３０～５０または３０～６５のアミノ酸を含有する。一部の実施形態においては、ドメインは、約３５～４５のアミノ酸、場合によっては、約４０のアミノ酸を含む。３０～５０のアミノ酸内に、約６つのシステイン残基がある。６つのシステインのうち、ジスルフィド結合は、通常、以下のシステインの間で見られる。

Ｃ１とＣ３、Ｃ２とＣ５、Ｃ４とＣ６。Ａドメインは、リガンド結合部分を構成する。ドメインのシステイン残基は、ジスルフィド結合され、小型の安定した機能的に独立した部分を形成する。これらの反復のクラスタは、リガンド結合ドメインを形成し、異なるクラスタリングは、リガンド結合に対して特異性を与えることができる。Ａドメインを含有する例示的なタンパク質としては、例えば、補体成分（例えば、Ｃ６、Ｃ７、Ｃ８、Ｃ９、および因子Ｉ）、セリンプロテアーゼ（例えば、エンテロペプチダーゼ、マトリプターゼ、およびコリン）、膜貫通タンパク質（例えば、ＳＴ７、ＬＲＰ３、ＬＲＰ５、およびＬＲＰ６）、およびエンドサイトーシス受容体（例えば、ソルチリン関連受容体、ＬＤＬ－受容体、ＶＬＤＬＲ、ＬＲＰ１、ＬＲＰ２、およびＡｐｏＥＲ２）が含まれる。所望の結合特異性のＡドメインタンパク質を作製するための方法は、例えば、国際公開第ＷＯ０２／０８８１７１号および国際公開第ＷＯ０４／０４４０１１号において開示され、それぞれの内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。

【０２７４】

他の実施形態においては、本発明の結合分子は、反復タンパク質からの結合部位を含む。反復タンパク質は、互いに積み重なって隣接ドメインを形成する、小さい（例えば、約２０～約４０のアミノ酸残基）構造単位または反復の連続複製を含有するタンパク質である。反復タンパク質は、タンパク質における反復数を調整することによって特定の標的結合部位に適するように修飾することができる。例示的な反復タンパク質としては、設計アンキリン反復タンパク質（すなわち、ＤＡＲＰｉｎｓ（登録商標）、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐａｒｔｎｅｒｓ、Ｚｕｒｉｃｈ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）（例えば、Ｂｉｎｚ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２２：５７５－５８２（２００４）を参照）または高ロイシン反復タンパク質（すなわち、ＬＲＲＰ）（例えば、Ｐａｎｃｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，４３０：１７４－１８０（２００４）を参照）が挙げられる。これまで決定された、すべてのアンキリン反復単位の三次構造は、βヘアピンおよび後続の２つの逆平行α－螺旋から成り、反復単位を次の単位と接続するループで終了する特性を共有する。アンキリン反復単位で構築されるドメインは、反復単位を、拡張および湾曲構造に積み重ねることによって形成される。ＬＲＲＰ結合部位は、ウミヤツメおよび他の無顎類の適応免疫系の一部を形成し、それらは、リンパ球熟成期の間に、一連の高ロイシン反復遺伝子の組み換えによって形成されるという意味で、抗体に類似する。ＤＡＲＰｉｎまたはＬＲＲＰ結合部位を作製する方法は、国際公開第ＷＯ０２／２０５６５号および国際公開第ＷＯ０６／０８３２７５号において記載され、それぞれの内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。

【０２７５】

本発明の結合分子において使用することができる他の非免疫グロブリン結合部位は、Ｓｒｃ相同性ドメイン（例えば、ＳＨ２またはＳＨ３ドメイン）、ＰＤＺドメイン、ベーターラクタマーゼ、高親和性プロテアーゼ阻害剤、またはサソリ毒等の小ジスルフィド結合タンパク質骨格に由来する結合部位を含む。これらの分子に由来する結合部位を作製するための方法は、当技術分野において開示され、例えば、Ｓｉｌｖｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２３（１２）：１４９３－４（２００５）、Ｐａｎｎｉ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７７：２１６６６－２１６７４（２００２）、Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１７：１７０－１７５（１９９９）、Ｌｅｇｅｎｄｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ．，１１：１５０６－１５１８（２００２）、Ｓｔｏｏｐ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２１：１０６３－１０６８（２００３）、およびＶｉｔａ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ，９２：６４０４－６４０８（１９９５）を参照されたい。さらに他の結合部位は、ＥＧＦ様ドメイン、クリングルドメイン、ＰＡＮドメイン、Ｇｌａドメイン、ＳＲＣＲドメイン、クニッツ／ウシトリプシン阻害物質ドメイン、カザール型セリンプロテアーゼ阻害剤ドメイン、トレフォイル（Ｐ型）ドメイン、フォンヴィレブランド因子Ｃ型ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、ＣＵＢドメイン、チログロブリンＩ型反復、ＬＤＬ－受容体クラスＡドメイン、スシドメイン、リンクドメイン、トロンボス

ポンジンＩ型ドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、Ｃ型レクチンドメイン、ＭＡＭドメイン、フォンヴィレブランド因子Ａ型ドメイン、ソマトメジンＢドメイン、ＷＡＰ型四ジスルフィドコアドメイン、Ｆ５／８Ｃ型ドメイン、ヘモペキシンドメイン、ラミニン型ＥＧＦ様ドメイン、Ｃ２ドメイン、ＣＴＬＡ－４ドメイン、および当業者に公知の他のそのようなドメイン、およびそれらの誘導体および／または変異体から成る群より選択される結合ドメインに由来することができる。付加的非免疫グロブリン結合ポリペプチドは、Ａｖｉｍｅｒｓ（登録商標）（Ａｖｉｄｉａ，Ｉｎｃ．、Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ、ＣＡ、国際ＰＣＴ公開第ＷＯ０６／０５５６８９号および米国特許公開第２００６／０２３４２９９号を参照）、Ｔｅｌｏｂｏｄｉｅｓ（登録商標）（Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｓｔｕｄｉｏ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）、Ｅｖｉｂｏｄｉｅｓ（登録商標）（Ｅｖｏｇｅｎｉｘ、Ｓｙｄｎｅｙ、Ａｕｓｔｒａｌｉａ、米国特許第７，１６６，６９７号を参照）、およびＭｉｃｒｏｂｏｄｉｅｓ（登録商標）（Ｎａｓｃａｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｍｕｎｉｃｈ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を含む。

【０２７６】

ｉｉ．受容体およびリガンドの結合部分

他の態様においては、本発明の結合ポリペプチドは、少なくとも１つの遺伝的に融合したＦｃ領域に機能的に連結される受容体のリガンド結合部位および／またはリガンドの受容体結合部分を含む。

【０２７７】

ある実施形態においては、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）との、結合ポリペプチドは、受容体のリガンド結合部分および／またはリガンドの受容体結合部分の融合である。リガンド結合受容体のいずれの膜貫通領域または脂質もしくはリン脂質アンカ認識配列も、好ましくは、融合前に不活性化または削除される。リガンドまたはリガンド結合パートナーをコードするＤＮＡは、所望のＯＲＦ断片をコードするＤＮＡの５′および３′末端においてか、またはその近位で制限酵素によって開裂される。その後、得られたＤＮＡ断片は、遺伝的に融合したＦｃ領域をコードするＤＮＡに容易に挿入される（例えば、インフレームでの結合）。融合が行われる正確な部位は、可溶性融合タンパク質の分泌または結合特性を最適化するために実験的に選択することができる。その後、融合タンパク質をコードするＤＮＡは、適切な発現ベクターへサブクローンされ、その後、発現のために宿主細胞へトランスフェクトすることができる。

【０２７８】

一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、リガンドまたは受容体（例えば、受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ））の結合部位を、少なくとも１つの遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）と組み合わせる。一実施形態においては、リガンドまたは受容体ドメインの結合ドメインは、遺伝的に融合したＦｃ領域のＣ末端に機能的に連結される（例えば、ポリペプチドリンカーを介して融合される）。Ｎ末端融合も、可能である。例示的な実施形態においては、融合は、遺伝的に融合したＦｃ領域のＣ末端、または即座に、遺伝的に融合したＦｃ領域のヒンジドメインへのＮ末端と行われる。

【０２７９】

ある実施形態においては、受容体のリガンド結合部分の結合部位またはドメインは、上述の抗体または抗体変異体によって結合される受容体に由来することができる。他の実施形態においては、受容体のリガンド結合部分は、免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーの受容体（例えば、可溶性Ｔ細胞受容体、例えば、ｍＴＣＲ（登録商標）（Ｍｅｄｉｇｅｎｅ ＡＧ、Ｍｕｎｉｃｈ、Ｇｅｒｍａｎｙ）、上述のＴＮＦ受容体スーパーファミリーの受容体（例えば、イムノアドヘシンの可溶性ＴＮＦα受容体、例えば、Ｅｎｂｒｅｌ（登録商標）（Ｗｙｅｔｈ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＮＪ））、グリア細胞由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）受容体ファミリー（例えば、ＧＦＲα３）の受容体、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーの受容体、チロシンキナーゼ（ＴＫ）受容体スーパーファミリーの受容体、リガンド開口型（ＬＧ）スーパーファミリーの受容体、ケモカイン受容体スーパーファミリーの受容体、ＩＬ－１／トール様受容体（ＴＬＲ）スーパーファ

ミリー、およびサイトカイン受容体スーパーファミリーから成る群より選択される受容体に由来する。

【０２８０】

他の実施形態においては、リガンドの受容体結合部分の結合部位またはドメインは、上述の抗体または抗体変異体によって結合されるリガンドに由来することができる。例えば、リガンドは、免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリーの受容体、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーの受容体、Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）スーパーファミリーの受容体、チロシンキナーゼ（ＴＫ）受容体スーパーファミリーの受容体、リガンド開口型（ＬＧ）スーパーファミリーの受容体、ケモカイン受容体スーパーファミリーの受容体、ＩＬ－１／トール様受容体（ＴＬＲ）スーパーファミリー、およびサイトカイン受容体スーパーファミリーから成る群より選択される受容体に結合することができる。例示的な一実施形態においては、リガンドの受容体結合部分の結合部位は、上述のＴＮＦリガンドスーパーファミリーに属するリガンドに由来する（例えば、ＣＤ４０Ｌ）。

【０２８１】

他の例示的な実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、以下のタンパク質の１つ以上に由来する１つ以上のリガンド結合ドメインまたは受容体結合ドメインを含むことができる。

【０２８２】

１．サイトカインおよびサイトカイン受容体

サイトカインは、リンパ球の増殖、分化、および機能活性化に対する多面発現効果を有する。様々なサイトカイン、またはそれらの受容体結合部分は、本発明の融合タンパク質において使用することができる。例示的なサイトカインとしては、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、およびＩＬ－１８）、コロニー刺激因子（ＣＳＦ）（例えば、顆粒球ＣＳＦ（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージＣＳＦ（ＧＭ－ＣＳＦ）、および単球マクロファージＣＳＦ（Ｍ－ＣＳＦ））、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）アルファおよびベータ、細胞毒性Ｔリンパ球抗原４（ＣＴＬＡ－４）、およびインターフェロン－α、β、またはγ等のインターフェロンが挙げられる（米国特許第４，９２５，７９３号および同第４，９２９，５５４号）。

【０２８３】

サイトカイン受容体は、通常、リガンド特異性アルファ鎖および共通ベータ鎖から成る。例示的なサイトカイン受容体としては、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－３（米国特許第５，６３９，６０５号）、ＩＬ－４（米国特許第５，５９９，９０５号）、ＩＬ－５（米国特許第５，４５３，４９１号）、ＩＬ１０受容体、ＩＦＮγ（欧州特許第ＥＰ０２４０９７５号）、および受容体のＴＮＦファミリー（例えば、ＴＮＦα（例えば、ＴＮＦＲ－１（欧州特許第ＥＰ４１７，５６３号）、ＴＮＦＲ－２（欧州特許第ＥＰ４１７，０１４号）リンホトキシンベータ受容体）に対するサイトカイン受容体が挙げられる。

【０２８４】

２．接着タンパク質

接着分子は、細胞が互いに相互作用することを可能にする膜結合型タンパク質である。白血球ホーミング受容体および細胞接着分子、またはそれらの受容体結合部分を含む、様々な接着タンパク質は、本発明の融合タンパク質に組み込むことができる。白血球ホーミング受容体は、炎症中の白血球細胞表面上に発現され、細胞外基質成分への結合を媒介するβ－１インテグリン（例えば、ＶＬＡ－１、２、３、４、５、および６）、および血管内皮上の細胞接着分子（ＣＡＭ）に結合するβ２－インテグリン（例えば、ＬＦＡ－Ｉ、ＬＰＡＭ－１、ＣＲ３、およびＣＲ４）を含む。例示的なＣＡＭとしては、ＩＣＡＭ－１、ＩＣＡＭ－２、ＶＣＡＭ－１、およびＭＡｄＣＡＭ－１を含む。他のＣＡＭとしては、Ｅ－セレクチン、Ｌ－セレクチン、およびＰ－セレクチンを含む、セレクチンファミリーのＣＡＭが含まれる。

【０２８５】

３．ケモカイン

感染症の部位への白血球の移動を刺激する走化性タンパク質であるケモカインも、本発明の融合タンパク質に組み込むことができる。例示的なケモカインとしては、マクロファージ炎症性タンパク質（ＭＩＰ－１－αおよびＭＩＰ－１－β）、好中球走化性因子、およびＲＡＮＴＥＳ（通常、Ｔ細胞発現および分泌される活性化に対して調節される）が挙げられる。

【０２８６】

４．成長因子および成長因子受容体

成長因子、またはそれらの受容体（または受容体結合、もしくはそのリガンド結合部分）は、本発明の融合タンパク質に組み込むことができる。例示的な成長因子としては、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）およびそのイソフォーム（米国特許第５，１９４，５９６号）、ＦＧＦおよびｂＦＧＦを含む、線維芽成長因子（ＦＧＦ）、心房性ナトリウム利尿因子（ＡＮＦ）、肝成長因子（ＨＧＦ、米国特許第５，２２７，１５８号および同第６，０９９，８４１号）、骨由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）等の神経栄養因子、グリア細胞由来神経栄養因子リガンド（例えば、ＧＤＮＦ、ニューツリン、アルテミン、およびパーセフィン）、ニューロトロフィン－３、－４、－５、または－６（ＮＴ－３、ＮＴ－４、ＮＴ－５、またはＮＴ－６）、またはＮＧＦ－β血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）等の神経成長因子（米国特許第４，８８９，９１９号、同第４，８４５，０７５号、同第５，９１０，５７４号、および同第５，８７７，０１６号）、ＴＧＦ－アルファおよびＴＧＦ－ベータ等の形質転換成長因子（ＴＧＦ）（国際公開第ＷＯ９０／１４３５９号）、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）を含む骨誘導因子、インスリン様成長因子－ＩおよびＩＩ（ＩＧＦ－ＩおよびＩＧＦ－Ｉ、米国特許第６，４０３，７６４号および同第６，５０６，８７４号）、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ、幹細胞因子（ＳＣＦ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ、ｃ－Ｍｐｌリガンド）、およびＷｎｔポリペプチド（米国特許第６，１５９，４６２号）が含まれる。

【０２８７】

本発明の標的受容体ドメインとして使用することができる例示的な成長因子受容体としては、ＥＧＦ受容体、ＶＥＧＦ受容体（例えば、Ｆｌｔ１またはＦｌｋ１／ＫＤＲ）、ＰＤＧＦ受容体（国際公開第ＷＯ９０／１４４２５号）、ＨＧＦ受容体（米国特許第５，６４８，２７３号、および同第５，６８６，２９２号）、ならびにＮＧＦ、ＢＤＮＦ、およびＮＴ－３に結合するｐ７５^{NTR}またはｐ７５としても称される低親和性受容体（ＬＮＧＦＲ）、および受容体チロシンキナーのｔｒｋファミリーのメンバ（例えば、ｔｒｋＡ、ｔｒｋＢ（欧州特許第ＥＰ４５５，４６０号）、ｔｒｋＣ（欧州特許第ＥＰ５２２，５３０号））である高親和性受容体を含む、神経栄養因子受容体が挙げられる。

【０２８８】

５．ホルモン

本発明の融合タンパク質における標的薬剤としての使用のための例示的な成長ホルモンとしては、レニン、ヒト成長ホルモン（ＨＧＨ、米国特許第５，８３４，５９８号）、Ｎ－メチオニルヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、成長ホルモン放出因子、副甲状腺ホルモン（ＰＴＨ）、甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）、チロキシン、プロインスリンおよびインスリン（米国特許第５，１５７，０２１号および同第６，５７６，６０８号）、卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、カルシトニン、黄体形成ホルモン（ＬＨ）、レプチン、グルカゴン、ボンベシン、ソマトロピン、ミュラー管抑制物質、レラキシンおよびプロレラキシン、ゴナドトロピン関連ペプチド、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、ＯＢタンパク質、またはミュラー管抑制物質が挙げられる。

【０２８９】

６．凝固因子

本発明の融合タンパク質における標的薬剤としての使用のための例示的な血液凝固因子としては、凝固因子（例えば、因子Ｖ、ＶＩＩ、ＶＩＩＩ、ＩＸ、Ｘ、ＸＩ、ＸＩＩ、およびＸＩＩＩ、フォンヴィレブランド因子）、組織因子（米国特許第５，３４６，９９１

号、同第５，３４９，９９１号、同第５，７２６，１４７号、および同第６，５９６，８４号）、トロンビンおよびプロトロンビン、フィブリンおよびフィブリノーゲン、プラスミンおよびプラスミノゲン、ウロキナーゼまたはヒト尿もしくは組織型プラスミノゲン活性化因子（ｔ－ＰＡ）等のプラスミノゲン活性化因子が挙げられる。

【０２９０】

例示的な一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、可溶性ＬＴβＲ受容体およびｓｃＦｃ領域を含む融合タンパク質またはイムノアドヘシンである。例えば、結合ポリペプチドは、配列番号３７（ＡＳＫ０５７）の重鎖配列を含むことができる。

【０２９１】

別の例示的な実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、インターフェロン（例えば、β－インターフェロン）およびｓｃＦｃ領域を含む融合タンパク質またはイムノアドヘシンである。例えば、結合ポリペプチドは、配列番号３９（ＥＡＧ２１４９）の重鎖配列を含むことができる。

【０２９２】

別の例示的な実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、可溶性ＬＴβＲ受容体およびｓｃＦｃ領域を含む融合タンパク質またはイムノアドヘシンである。例えば、結合ポリペプチドは、配列番号４１（ＥＡＧ２１９０）または配列番号４３（ＥＡＧ２１９１）の重鎖配列を含むことができる。

【０２９３】

ＩＩＩ．多特異性結合ポリペプチド

ある特定の態様においては、本発明の結合ポリペプチドは、多特異性であり、すなわち、分子の第１の分子またはエピトープに結合する少なくとも１つの結合部位、および第２の分子または第１の分子の第２のエピトープに結合する少なくとも１つの第２の結合部位を有する。本発明の多特異性結合分子は、少なくとも２つの結合部位を含むことができ、結合部位の少なくとも１つは、上述の結合分子の１つからの結合部位に由来するか、またはそれを含む。ある実施形態においては、本発明の多特異性結合分子の少なくとも１つの結合部位は、抗体の抗原結合領域、またはその抗原結合断片（例えば、上述の抗体または抗原結合断片）である。

【０２９４】

（ａ）二重特異性分子

一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、二重特異性である。二重特異性結合ポリペプチドは、例えば、同じ標的分子または異なる標的分子上の２つの異なる標的部位に結合することができる。例えば、本発明の結合ポリペプチドの場合、その二重特異性変異は、例えば、同じ抗原または２つの異なる抗原上の２つの異なるエピトープに結合することができる。二重特異性結合ポリペプチドは、例えば、診断的および治療的用途において使用することができる。例えば、それらは、免疫アッセイにおける使用で酵素を固定するために使用することができる。それらは、例えば、腫瘍関連分子および検出可能なマーカ（例えば、放射性核種に強固に結合するキレート剤）の両方に結合することによって、癌の診断および治療においても使用することができる。二重特異性結合ポリペプチドは、例えば、細胞毒性を特定の標的へ誘導することによって（例えば、病原体または腫瘍細胞、およびＴ細胞受容体またはＦｃγ受容体等の細胞毒性誘引分子に結合することによって）、ヒトの治療のために使用することもできる。二重特異性結合ポリペプチドは、例えば、線維素溶解剤またはワクチンアジュバントとして使用することもできる。

【０２９５】

二重特異性結合ポリペプチドの例としては、異なる腫瘍細胞抗原に対する少なくとも２つのアームを有する二重特異性結合ポリペプチド、腫瘍細胞抗原に対する少なくとも１つのアーム、および細胞毒性誘引分子に対する少なくとも１つのアームを有する二重特異性の変化した結合タンパク質（抗Ｆｃ．ガンマ．ＲＩ／抗ＣＤ１５、抗ｐ１８５．ＳＵＰ．ＨＥＲ２／Ｆｃ．ガンマ．ＲＩＩＩ（ＣＤ１６）、抗ＣＤ３／抗悪性Ｂ細胞（１Ｄ１０）、抗ＣＤ３／抗ｐ１８５．ｓｕｐ．ＨＥＲ２、抗ＣＤ３／抗ｐ９７、抗ＣＤ３／抗腎細胞

癌、抗ＣＤ３／抗ＯＶＣＡＲ－３、抗ＣＤ３／Ｌ－Ｄ１（抗結腸癌）、抗ＣＤ３／抗メラニン細胞刺激ホルモン類似体、抗ＥＧＦ受容体／抗ＣＤ３、抗ＣＤ３／抗ＣＡＭＡ１、抗ＣＤ３／抗ＣＤ１９、抗ＣＤ３／ＭｏＶ１８、抗神経系細胞接着分子（ＮＣＡＭ）／抗ＣＤ３、抗葉酸塩結合タンパク質（ＦＢＰ）／抗ＣＤ３、抗膵臓癌関連抗原（ＡＭＯＣ－３１）／抗ＣＤ３等）、腫瘍抗原に特異的に結合する少なくとも１つのアーム、および毒素に結合する少なくとも１つのアームを有する二重特異性結合ポリペプチド（抗サポリン／抗Ｉｄ－１、抗ＣＤ２２／抗サポリン、抗ＣＤ７／抗サポリン、抗ＣＤ３８／抗サポリン、抗ＣＥＡ／抗リシンＡ鎖、抗インターフェロン－．アルファ．（ＩＦＮ－．アルファ．）／抗ハイブリドーマイディオタイプ、抗ＣＥＡ／抗ビンカアルカロイド等）、酵素活性プロドラッグを変換するための二重特異性結合ポリペプチド（抗ＣＤ３０／抗アルカリホスファターゼ（マイトマイシンアルコールへのマイトマイシンリン酸塩プロドラッグの変換を触媒する）等）、線維素溶解剤として使用することができる二重特異性結合ポリペプチド（抗フィブリン／抗組織プラスミノゲン活性化因子（ｔＰＡ）、抗フィブリン／抗ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子（ｕＰＡ）等）、細胞表面受容体への免疫複合体を標的とするための二重特異性結合ポリペプチド（抗低比重リポタンパク質（ＬＤＬ）／抗Ｆｃ受容体（例えば、Ｆｃ．ガンマ．ＲＩ、Ｆｃ．ガンマ．ＲＩＩ、またはＦｃ．ガンマ．ＲＩＩＩ）等）、感染病の治療において使用するための二重特異性結合ポリペプチド（抗ＣＤ３／抗単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、抗Ｔ細胞受容体：ＣＤ３複合体／抗インフルエンザ、抗Ｆｃ．ガンマ．Ｒ／抗ＨＩＶ等）、体外または体内における腫瘍検出のための二重特異性結合ポリペプチド（抗ＣＥＡ／抗ＥＯＴＵＢＥ、抗ＣＥＡ／抗ＤＰＴＡ、抗ｐ１８５ＨＥＲ２／抗ハプテン）、ワクチンアジュバントとしての二重特異性結合ポリペプチド（上記のＦａｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．を参照）、および診断ツールとしての二重特異性結合ポリペプチド（抗ウサギＩｇＧ／抗フェリチン、抗西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）／抗ホルモン、抗ソマトスタチン／抗サブスタンスＰ、抗ＨＲＰ／抗ＦＩＴＣ、抗ＣＥＡ／抗．ベータ．－ガラクトシダーゼ（上記のＮｏｌａｎ　ｅｔ　ａｌ．を参照）等）が挙げられる。三重特異性ポリペプチドの例としては、抗ＣＤ３／抗ＣＤ４／抗ＣＤ３７、抗ＣＤ３／抗ＣＤ５／抗ＣＤ３７、および抗ＣＤ３／抗ＣＤ８／抗ＣＤ３７が挙げられる。

【０２９６】

好ましい実施形態においては、本発明の二重特異性結合ポリペプチドは、ＣＲＩＰＴＯ－Ｉに結合する１つのアームを有する。別の好ましい実施形態においては、本発明の二重特異性結合ポリペプチドは、ＬＴβＲに結合する１つのアームを有する。別の好ましい実施形態においては、本発明の二重特異性結合ポリペプチドは、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２に結合する１つのアームを有する。別の好ましい実施形態においては、本発明の二重特異性結合ポリペプチドは、ＬＴβＲに結合する１つのアーム、およびＴＲＡＩＬ－Ｒ２に結合する１つのアームを有する。

【０２９７】

本発明の多特異性結合ポリペプチドは、各特異性に対して一価であるか、各特異性に対して多価であり得る。例えば、本発明の結合ポリペプチドは、第１の標的分子と反応する１つの結合部位、および第２の標的分子と反応する１つの結合部位を含むことができるか、または第１の標的分子と反応する２つの結合部位および第２の標的分子と反応する２つの結合部位を含むことができる。

【０２９８】

本発明の結合ポリペプチドは、リガンドまたは受容体の２つ以上の結合ドメインからの少なくとも２つの結合特異性を有する場合がある。それらは、国際公開第ＷＯ８９／０２９２２号（１９８９年４月６日公開）、欧州特許第ＥＰ３１４，３１７号（１９８９年５月３日公開）、および１９９２年５月２日発行の米国特許第５，１１６，９６４号において開示されるように、本質的にヘテロ二量体、ヘテロ三量体、またはヘテロ四量体として集合することができる。例としては、ＣＤ４－ＩｇＧ／ＴＮＦ受容体－ＩｇＧ、およびＣＤ４－ＩｇＧ／Ｌ－セレクチン－ＩｇＧが挙げられる。最後に記載された分子は、リンパ

球ホーミング受容体（ＬＨＲ、Ｌ－セレクチン）のリンパ節結合機能とＣＤ４のＨＩＶ結合機能を組み合わせ、ＨＩＶ感染症、関連する病状の予防もしくは治療におけるか、または診断手段としての潜在的な用途を見出す。

【０２９９】

（ｂ）ｓｃＦｖ含有多特異性結合分子

一実施形態においては、本発明の多特異性結合分子は、少なくとも１つのｓｃＦｖ分子、例えば、上述のｓｃＦｖ分子を含む多特異性結合分子である。他の実施形態においては、本発明の多特異性結合分子は、２つのｓｃＦｖ分子、例えば、二重特異性ｓｃＦｖ（ビス－ｓｃＦｖ）を含む。ある実施形態においては、ｓｃＦｖ分子は、従来のｓｃＦｖ分子である。他の実施形態においては、ｓｃＦｖ分子は、上述の安定化ｓｃＦｖ分子である。ある実施形態においては、多特異性結合分子は、ｓｃＦｖ分子（例えば、安定化ｓｃＦｖ分子）を、ｓｃＦｃ分子を含む結合分子骨格に結合することによって作製することができる。一実施形態においては、出発分子は、上述の結合分子より選択され、ｓｃＦｖ分子および出発結合分子は、異なる結合部位を有する。例えば、本発明の結合分子は、第２の結合特異性を与える、第２のｓｃＦｖ分子または非ｓｃＦｖ結合分子に結合される第１の結合特異性を有するｓｃＦｖ分子を含むことができる。一実施形態においては、本発明の結合分子は、安定化ｓｃＦｖ分子が融合されている自然発生の抗体である。

【０３００】

安定化ｓｃＦｖが、親結合分子に結合される場合、安定化ｓｃＦｖ分子の結合は、好ましくは、結合分子の熱安定性を少なくとも約２℃または３℃改善する。一実施形態においては、本発明のｓｃＦｖ含有結合分子は、従来の結合分子と比較して、１℃改善された熱安定性を有する。別の実施形態においては、本発明の結合分子は、従来の結合分子と比較して、２℃改善された熱安定性を有する。別の実施形態においては、本発明の結合分子は、従来の結合分子と比較して、４、５、６℃改善された熱安定性を有する。

【０３０１】

一実施形態においては、本発明の多特異性結合分子は、少なくとも１つのｓｃＦｖ（例えば、２、３、または４つのｓｃＦｖ、例えば、安定化ｓｃＦｖ）を含む。ｓｃＦｖ分子に関する詳細は、米国特許出願第１１／７２５，９７０号において見られ、この内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。

【０３０２】

一実施形態においては、本発明の結合分子は、第１の結合特異性を有する少なくとも１つのｓｃＦｖ断片、および第２の結合特異性を有する少なくとも１つのｓｃＦｖを有する多特異性多価結合分子である。好ましい実施形態においては、ｓｃＦｖ分子の少なくとも１つは、安定化される。

【０３０３】

別の実施形態においては、本発明の結合分子は、ｓｃＦｖ四価結合分子である。好ましい実施形態においては、ｓｃＦｖ分子の少なくとも１つは、安定化される。

【０３０４】

（ｃ）多特異性結合分子断片

ある実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、多特異性結合分子断片からの結合部位を含むことができる。多特異性結合分子断片は、二重特異性Ｆａｂ２または多特異性（例えば、三重特異性）Ｆａｂ３分子を含む。例えば、多特異性結合分子断片は、異なる特異性を有するＦａｂまたはｓｃＦｖ分子の化学的に結合体化された多量体（例えば、二量体、三量体、または四量体）を含むことができる。

【０３０５】

（ｄ）タンデム可変ドメイン結合分子

他の実施形態においては、本発明の多特異性結合分子は、タンデム抗原結合部位を含む結合分子を含むことができる。例えば、可変ドメインは、連続して直接的に融合または結合される少なくとも２つの（例えば、２つ、３つ、４つ以上）可変重ドメイン（ＶＨドメイン）を含むように操作される抗体重鎖、および連続して直接的に融合または結合される

少なくとも２つの（例えば、２つ、３つ、４つ以上）可変軽ドメイン（ＶＬドメイン）を含むように操作される抗体軽鎖を含むことができる。ＶＨドメインは、対応するＶＬドメインと相互作用して一連の抗原結合部位を形成し、結合部位の少なくとも２つは、異なるエピトープに結合する。タンデム可変ドメイン結合分子は、重または軽鎖の２つまたそれ以上を含むことができ、高次価数（例えば、二価または四価）のものである。タンデム可変ドメイン結合分子を作製するための方法は、当技術分野で公知であり、例えば、国際公開第ＷＯ２００７／０２４７１５号を参照されたい。

【０３０６】

（ｅ）二重特異性結合分子

他の実施形態においては、本発明の多特異性結合分子は、二重結合特異性を含む単一の結合部位を含むことができる。例えば、本発明の二重特異性結合分子は、２つのエピトープと交差反応する結合部位を含むことができる。二重特異性結合分子を産生するための当該技術分野において承認されている方法は、当技術分野で公知である。例えば、二重特異性結合分子は、第１のエピトープに結合する結合分子をスクリーニングし、第２のエピトープに結合する能力に対して単離結合分子を逆スクリーニングすることによって単離することができる。

【０３０７】

（ｆ）多特異性融合タンパク質

別の実施形態においては、本発明の多特異性結合分子は、多特異性融合タンパク質である。本明細書において使用される「多特異性融合タンパク質」という語句は、少なくとも２つの結合特異性を有し、さらにｓｃＦｃを含む融合タンパク質（上記で定義される）を指定する。多特異性融合タンパク質は、本質的に国際公開第ＷＯ８９／０２９２２号（１９８９年４月６日公開）、欧州特許第ＥＰ３１４，３１７号（１９８９年５月３日公開）、および１９９２年５月２日発行の米国特許第５，１１６，９６４号において開示されるように、例えば、ヘテロ二量体、ヘテロ三量体、またはヘテロ四量体として集合することができる。好ましい多特異性融合タンパク質は、二重特異性である。ある実施形態においては、多特異性融合タンパク質の結合特異性の少なくとも１つは、ｓｃＦｖ、例えば、安定化ｓｃＦｖを含む。

【０３０８】

様々な他の多価抗体構造体は、例えば、ＰＣＴ国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ８６／０２２６９号、欧州特許出願第１８４，１８７号、欧州特許出願第１７１，４９６号、欧州特許出願第１７３，４９４号、ＰＣＴ国際公開第ＷＯ８６／０１５３３号、米国特許第４，８１６，５６７号、欧州特許出願第１２５，０２３号、Ｂｅｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１０４１－１０４３、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：３４３９－３４４３、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３９：３５２１－３５２６、Ｓｕｎ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：２１４－２１８、Ｎｉｓｈｉｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．４７：９９９－１００５、Ｗｏｏｄ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ ３１４：４４６－４４９、Ｓｈａｗ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．８０：１５５３－１５５９）、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：１２０２－１２０７、Ｏｉ ｅｔ ａｌ．（１９８６）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４：２１４、米国特許第５，２２５，５３９、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５５２－５２５、Ｖｅｒｈｏｅｙａｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４、Ｂｅｉｄｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４１：４０５３－４０６０、およびＷｉｎｔｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ，３４９，ｐｐ．２９３－９９（１９９１））において開示される日常の組み換えＤＮＡ手法を使用して、当業者によって開発することができる。好ましくは、非ヒト抗体は、非ヒト抗原結合ドメインをヒト定常ドメインと結合することによって「ヒト化」される（例えば、Ｃａｂｉｌｌｙ ｅｔ ａｌ．、米国特許第４，８１６

，５６７号、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，８１，ｐｐ．６８５１－５５（１９８４））。

【０３０９】

多価抗体構造体を調製するために使用することができる他の方法は、以下の出版物において記載される。Ｇｈｅｔｉｅ，Ｍａｒｉａ－Ａｎａ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｂｌｏｏｄ ９７：１３９２－１３９８、Ｗｏｌｆｆ，Ｅｄｉｔｈ Ａ．ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５３：２５６０－２５６５、Ｇｈｅｔｉｅ，Ｍａｒｉａ－Ａｎａ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９４：７５０９－７５１４、Ｋｉｍ，Ｊ．Ｃ．ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ９７（４）：５４２－５４７、Ｔｏｄｏｒｏｖｓｋａ，Ａｎｅｔａ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２４８：４７－６６、Ｃｏｌｏｍａ Ｍ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １５：１５９－１６３、Ｚｕｏ，Ｚｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（Ｓｕｐｐｌ．）１３（５）：３６１－３６７、Ｓａｎｔｏｓ Ａ．Ｄ．，ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５：３１１８ｓ－３１２３ｓ、Ｐｒｅｓｔａ，Ｌｅｏｎａｒｄ Ｇ．（２００２）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３：２３７－２５６、ｖａｎ Ｓｐｒｉｅｌ，Ａｎｎｅｍｉｅｋ ｅｔ ａｌ．，（２０００）Ｒｅｖｉｅｗ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ ２１（８）３９１－３９７。

【０３１０】

ＩＶ．結合ポリペプチドの調製

ｓｃＦｃ骨格への組み込みのための結合部位を選択すると、本発明の結合分子を産生するための様々な方法が利用可能である。抗体または他の分子に由来するかにかかわらず、所望の標的結合部位をｓｃＦｃ骨格に結合するための方法は、当技術分野で公知である。

【０３１１】

当然のことながら、コードの縮退のため、様々な核酸配列が、結合ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする。所望のポリヌクレオチドは、デボノ固相ＤＮＡ合成によってか、または標的ポリペプチドをコードする早期に調製されたポリヌクレオチドのＰＣＲ変異誘発によって産生することができる。

【０３１２】

オリゴヌクレオチド媒介変異誘発は、アミノ酸置換をコードするコドンを（例えば、Ｆｃ変異部分に）導入するための置換、インフレーム挿入、または変化（例えば、変化したコドン）を調製するための１つの方法である。例えば、出発ポリペプチドＤＮＡは、所望の突然変異をコードするオリゴヌクレオチドを一本鎖ＤＮＡ鋳型にハイブリダイズすることによって変化させる。ハイブリダイゼーション後、ＤＮＡポリメラーゼを使用して、オリゴヌクレオチドプライマーを組み込む鋳型の第２の相補的鎖の全体を合成する。一実施形態においては、遺伝子操作、例えば、プライマーベースのＰＣＲ変異誘発は、本発明の結合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを産生するための、本明細書において定義される変化を組み込むために十分である。

【０３１３】

その後、結合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、適切な発現ベクターに挿入し、そうでなければ、該タンパク質を産生しないＥ．ｃｏｌｉ細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、または骨髄腫細胞等の原核または真核宿主細胞に、組み換え発現のためにトランスフェクトすることができる。

【０３１４】

本発明の目的のために、多数の発現ベクター系を使用することができる。これらの発現ベクターは、通常、エピソームまたは宿主染色体ＤＮＡの不可欠な部分のいずれかとして宿主生物において複製可能である。発現ベクターは、これらに限定されないが、プロモータ（例えば、自然に関連する、または異種プロモータ）、エンハンサ、シグナル配列、接

合シグナル、エンハンサ要素、および転写終止配列を含む、発現制御配列を含むことができる。好ましくは、発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすることが可能なベクターにおける真核プロモータ系である。発現ベクターは、ウシ乳頭腫ウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクチニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（ＲＳＶ、ＭＭＴＶ、またはＭＯＭＬＶ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、またはＳＶ４０ウイルス等の動物ウイルスに由来するＤＮＡ要素も使用することができる。他は、内部リボソーム結合部位内におけるポリシストロン系の使用が関与する。

【０３１５】

一般的に、発現ベクターは、所望のＤＮＡ配列によって形質転換されるそれらの細胞の検出を可能にする選択マーカ（例えば、アンピシリン耐性、ハイグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、またはネオマイシン耐性）を含む（例えば、Ｉｔａｋｕｒａ ｅｔ ａｌ．、米国特許第４，７０４，３６２号を参照）。ＤＮＡをそれらの染色体に組み入れた細胞は、トランスフェクト宿主細胞の選択を可能にする１つ以上のマーカを導入することによって選択することができる。マーカは、原栄養性を栄養要求性宿主に、またはバイオサイド耐性（例えば、抗生物質）もしくは銅等の重金属に耐性を提供することができる。選択可能なマーカ遺伝子は、発現されるＤＮＡ配列に直接結合するか、または同時形質転換によって同じ細胞に導入することができるかのいずれかである。

【０３１６】

好ましい発現ベクターは、ＮＥＯＳＰＬＡ（米国特許第６，１５９，７３０号）である。このベクターは、サイトメガロウイルスプロモータ／エンハンサ、マウスベータグロビン主要プロモータ、ＳＶ４０複製起点、ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼエクソン１およびエクソン２、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、およびリーダー配列を含有する。このベクターは、可変および定常領域遺伝子の組み込み後の抗体に非常に高レベルの発現、ＣＨＯ細胞におけるトランスフェクション、その後に行われるＧ４１８含有培地における選択およびメトトレキサート増幅を引き起こすことが発見されている。ベクター系は、米国特許第５，７３６，１３７号および同第５，６５８，５７０号においても教示され、それぞれの内容は、参照することにより、その全体として本明細書に組み込まれる。この系統は、例えば、＞３０ｐｇ／細胞／日の高い発現レベルを提供する。他の例示的なベクター系は、例えば、米国特許第６，４１３，７７７号において開示される。

【０３１７】

本発明の結合ポリペプチドが、抗体の抗原結合部位を含む場合、任意で遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）に結合された、付加的な軽および重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを、同じ、または異なる発現ベクターに挿入することができる。免疫グロブリン鎖をコードするＤＮＡ断片は、免疫グロブリンポリペプチドの発現を確実にする発現ベクターにおける制御配列に機能的に連結される。

【０３１８】

他の好ましい実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、多シストロン性構造体を使用して発現することができる。これらの発現系においては、多量体結合タンパク質の複数の結合ポリペプチド等の、対象の複数の遺伝子産物は、単一の多シストロン性構造体から産生することができる。これらの系統は、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）を有利に使用して、真核宿主細胞において比較的高濃度の本発明のポリペプチドを提供する。適合性するＩＲＥＳ配列は、米国特許第６，１９３，９８０号において開示され、この内容も、本明細書に組み込まれる。当業者は、そのような発現系が、本出願において開示される、あらゆる種類のポリペプチドを効率的に産生するために使用することができることを認識する。

【０３１９】

より一般的に、結合ポリペプチドをコードするベクターまたはＤＮＡ配列が、調製されると、発現ベクターは、適切な宿主細胞に導入することができる。すなわち、宿主細胞を

形質転換することができる。宿主細胞へのプラスミドの導入は、当業者に周知の様々な手法によって遂行することができる。それらの手法には、限定されないが、トランスフェクション（電気泳動および電気穿孔を含む）、原形質融合、リン酸カルシウム沈殿、使用したＤＮＡによる細胞融合、顕微注入、および無傷ウイルスの感染が挙げられる。Ｒｉｄｇｗａｙ，Ａ．Ａ．Ｇ．「Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｖｅｃｔｏｒｓ」Ｃｈａｐｅｔｅｒ ２４．２，ｐｐ．４７０－４７２ Ｖｅｃｔｏｒｓ，Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ ａｎｄ Ｄｅｎｈａｒｄｔ，Ｅｄｓ．（Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ，Ｂｏｓｔｏｎ，Ｍａｓｓ．１９８８）を参照されたい。最も好ましくは、宿主へのプラスミド導入は、電気穿孔によって行われる。形質転換細胞は、軽鎖および重鎖の産生に適切な条件下において増殖し、重および／または軽鎖タンパク質合成に対して試験される。例示的なアッセイ手法としては、酵素結合免疫吸着剤アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、または蛍光標識細胞分取分析（ＦＡＣＳ）、免疫組織化学等が挙げられる。

【０３２０】

本明細書において使用される「形質転換」という用語は、遺伝子型を変化させ、結果として受容細胞の変化をもたらす受容宿主細胞へのＤＮＡの導入を指すように広い意味で使用される。

【０３２１】

同様の方針で、「宿主細胞」は、組み換えＤＮＡ手法を使用して構築され、少なくとも１つの異種遺伝子をコードするベクターによって形質転換された細胞を指す。組み換え宿主からの結合ポリペプチドの単離のための過程の説明において、「細胞」および「細胞培養」という用語は、ほとんど同じ意味で使用され、他に明確な定めのない限り、結合ポリペプチドの源を意味する。つまり、「細胞」からのポリペプチドの回収は、遠心沈殿した全細胞または培地および細胞浮遊液の両方を含有する細胞培養からのいずれかを意味する場合がある。

【０３２２】

タンパク質発現のために使用される宿主細胞株は、最も好ましくは、哺乳類起源のものであり、当業者は、そこで発現される所望の遺伝子産物に最も適切な特定の宿主細胞株を選択的に判定する能力を有すると考えられる。例示的な宿主細胞株としては、これらに限定されないが、ＤＧ４４およびＤＵＸＢ１１（チャイニーズハムスター卵巣株、ＤＨＦＲマイナス）、ＨＥＬＡ（ヒト子宮頸癌）、ＣＶＩ（サル腎臓株）、ＣＯＳ（ＳＶ４０Ｔ抗原を有するＣＶＩの誘導体）、Ｒ１６１０（チャイニーズハムスター線維芽細胞）ＢＡＬＢＣ／３Ｔ３（マウス線維芽細胞）、ＨＡＫ（ハムスター腎臓株）、ＳＰ２／Ｏ（マウス骨髄腫）、Ｐ３．ｔｉｍｅｓ．６３－Ａｇ３．６５３（マウス骨髄腫）、ＢＦＡ－１ｃ１ＢＰＴ（ウシ内皮細胞）、ＲＡＪＩ（ヒトリンパ球）、および２９３（ヒト腎臓）を含む。ＣＨＯ細胞は、特に好ましい。宿主細胞株は、通常、商業サービスであるＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、または既刊文献から入手可能である。

【０３２３】

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子は、非細菌もしくは酵母等の非哺乳類細胞、または植物細胞においても発現することができる。この点において、当然のことながら、細菌等の様々な単細胞性非哺乳類微生物も形質転換することができ、すなわち、培養または発酵において増殖することが可能である。形質転換を起こしやすい細菌としては、大腸菌またはサルモネラ菌の株等の腸内細菌科のメンバ、枯草菌等のバシラス科、肺炎球菌、連鎖球菌、およびインフルエンザ菌が挙げられる。細菌において発現される場合、ポリペプチドは、通常、封入体の一部となることがさらに認識される。ポリペプチドは、単離、精製、その後、機能分子に集合されなければならない。

【０３２４】

原核生物に加えて、真核微生物を使用することもできる。サッカロマイセスセレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、つまり一般的なパン酵母は、真核微生物の間で最も一般的に使用されるが、多数の他の株が一般に入手可能である。

サッカロミセスにおける発現に対して、例えば、プラスミドＹＲｐ７が、（Ｓｔｉｎｃｈｃｏｍｂ　ｅｔ　ａｌ．，（１９７９），Ｎａｔｕｒｅ，２８２：３９、Ｋｉｎｇｓｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９７９），Ｇｅｎｅ，７：１４１、Ｔｓｃｈｅｍｐｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８０），Ｇｅｎｅ，１０：１５７）一般的に使用される。このプラスミドは、例えば、ＡＴＣＣ番号４４０７６またはＰＥＰ４－１などのトリプトファンにおいて成長する能力を欠く酵母の変異株に対する選択マーカを提供するＴＲＰ１遺伝子を既に含有する（Ｊｏｎｅｓ，（１９７７），Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，８５：１２）。そして、酵母宿主細胞ゲノムの特性としてのｔｒｐ１傷害の存在は、トリプトファンの非存在下における成長による形質転換を検出するための効果的な環境を提供する。ピキア（Ｐｉｃｈｉａ）属等の他の酵母宿主も使用することができる。発現制御配列（例えば、プロモータ）、複製起点、終止配列等を有する酵母発現ベクターが好ましい。典型的なプロモータとしては、３－ホスホグリセリン酸キナーゼ、および他の糖分解酵素が挙げられる。誘導酵母プロモータとしては、とりわけ、アルコール脱水素酵素、イソチトクロムＣ、およびメタノール、マルトース、およびガラクトースの使用に関与する酵素からのプロモータを含む。

【０３２５】

代替として、ポリペプチドコードヌクレオチド配列は、トランスジェニック動物のゲノムへの導入、およびその後に行われる遺伝子導入動物のミルクにおける発現のためにトランス遺伝子に組み込むことができる（例えば、Ｄｅｂｏｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、米国特許第ＵＳ５，７４１，９５７号、Ｒｏｓｅｎ、米国特許第ＵＳ５，３０４，４８９号、およびＭｅａｄｅ　ｅｔ　ａｌ．、米国特許第ＵＳ５，８４９，９９２号を参照）。適切なトランス遺伝子は、カゼインまたはベータラクトグロブリン等の、乳腺特異的遺伝子からのプロモータおよびエンハンサへの操作可能な結合における結合ポリペプチドに対するコード配列を含む。

【０３２６】

インビトロ産生は、大量の所望のポリペプチドを得るための規模拡大可能にする。組織培養条件下での哺乳類細胞培養のための方法は、当技術分野で公知であり、例えば、エアリフト反応器または継続的撹拌式反応器における同種浮遊培養、または例えば、中空糸、マイクロカプセル中、アガロースマイクロビーズまたはセラミックカートリッジ上での固定化または封入細胞培養を含む。必要および／または好ましい場合、ポリペプチドの溶液は、通常のクロマトグラフィ方法、例えば、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィ、ＤＥＡＥ－セルロース上でのクロマトグラフィ、または（免疫）親和性クロマトグラフィによって、例えば、合成ヒンジ領域ポリペプチドの選択的生合成後、または本明細書において記載されるＨＩＣクロマトグラフィステップの前または後に精製することができる。親和性タグ配列（例えば、Ｈｉｓ（６）タグ）は、下流精製を容易にするためにポリペプチド配列内に任意で付着するか、または含むことができる。

【０３２７】

本発明の結合ポリペプチドが、多量体タンパク質または多量体（例えば、二量体結合ポリペプチド）を形成する場合、多量体タンパク質は、単一のベクターまたは２つのベクターを使用して発現することができる。結合ポリペプチドが、別々の発現ベクター上でクローン化される場合、ベクターは、無傷の総タンパク質の発現および集合を得るために同時遺伝子導入される。発現されると、総タンパク質、それらの二量体、個々のポリペプチド（例えば、結合ポリペプチド）、または他の形は、硫安分画、親和性カラムクロマトグラフィ、ＨＰＬＣ精製、ゲル電気泳動等を含む、当技術分野の標準的手順に従って精製することができる（概して、Ｓｃｏｐｅｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎ．Ｙ．（１９８２）を参照）。製薬学的用途に対しては、少なくとも約９０～９５％の均質性の実質上純粋なタンパク質が好ましく、９８～９９％以上の均質性が、最も好ましい。

【０３２８】

Ｖ．結合分子の精製

一実施形態においては、本発明は、遺伝的に融合したＦｃ領域を含む一本鎖（すなわち

、モノマー）ｓｃＦｃ結合分子から離れて、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）を含む二本鎖（すなわち、二量体）ｓｃＦｃ結合分子として発現される本発明の結合分子の精製方法に関する。他の実施形態においては、本発明は、一本鎖ｓｃＦｃ結合分子から離れて、二本鎖ｓｃＦｃ結合分子を精製するための方法を提供する。

【０３２９】

一実施形態においては、一本および二本鎖ｓｃＦｃタンパク質の両方を有する集団は、サイズ排除クロマトグラフィによって精製することができる。例えば、一本鎖ｓｃＦｃ結合分子は、例えばＳｕｐｅｒｄｅｘ２００ゲルろ過カラムを使用して凝集体および二本鎖ｓｃＦｃ分子から分離することができる。ゲルろ過画分は、例えば、還元および非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、および一本および二本鎖Ｆｃ集団の同種プールを得るために組み合わされる適切な画分によって分析することができる。これらのプールは、例えば、オンライン光散乱解析による分析ＳＥＣ（ＴＳＫ－ゲルＧ３０００ＳＷ$_{XL}$カラム）によって、分子の均質性および分子量を判定するためにさらに特徴付けることができる。本発明は、また、遺伝的に融合したＦｃドメイン（すなわち、二量体ｓｃＦｃ結合分子）を含む二本鎖ｓｃＦｃ結合分子の精製された集団、および遺伝的に融合したＦｃドメイン（すなわち、単量体ｓｃＦｃ結合分子）を含む一本鎖ｓｃＦｃ結合分子の精製された集団にも関する。

【０３３０】

ＶＩ．機能的な部分の標識化または結合体化

本発明の結合ポリペプチドは、例えば、標的検出を容易にするか、または患者の画像または治療のために、非結合体化型で使用することができるか、または様々な機能的な部分の少なくとも１つに結合体化することができる。本発明のポリペプチドは、精製が行われる場合、精製の前または後のいずれかに標識化または結合体化することができる。特に、本発明のポリペプチドは、（例えば、操作システイン残基を介して）機能的な部分に結合体化することができる。機能的な部分は、好ましくは、結合部位以外の結合ポリペプチドの部分に付着する（例えば、遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）のポリペプチドリンカーまたはＦｃ部分）。

【０３３１】

例示的な機能的な部分は、親和性部分およびエフェクタ部分を含む。例示的なエフェクタ部分は、細胞毒素（放射性同位体、細胞毒性薬物、または毒素等）治療薬、細胞増殖抑制剤、生体毒素、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生物学的反応修飾因子、医薬品、免疫学的活性リガンド（例えば、リンホカイン、または得られた分子が腫瘍性細胞およびＴ細胞等のエフェクタ細胞の両方に結合する他の抗体）、ＰＥＧ、または画像化において有用な検出可能な分子を含む。別の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、腫瘍の血管新生を低下させる分子に結合することができる。他の実施形態においては、開示される組成物は、薬物またはプロドラッグに連結する本発明のポリペプチドを含むことができる。本発明のさらに他の実施形態は、リシン、ゲロニン、緑膿菌外毒素、またはジフテリア毒素等の特定の生物毒素、またはそれらの細胞毒性断片に結合体化される本発明のポリペプチドの使用を含む。どの結合体化または非結合体化ポリペプチドを使用するかの選択は、癌型および段階、補助治療の使用（例えば、化学療法または外部放射線）、および患者の状態に依存する。当業者は、本明細書における教示を考慮して、そのような選択を容易に行うことができることが認識される。

【０３３２】

過去の研究において、同位体で標識される抗腫瘍抗体は、動物モデル、および、場合によっては、ヒトにおいて、固形腫瘍、ならびにリンパ腫／白血病において細胞を破壊するために成功裏に使用されていることが認識される。例示的な放射性同位体としては、^{90}Ｙ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{123}Ｉ、^{111}Ｉｎ、^{105}Ｒｈ、^{153}Ｓｍ、^{67}Ｃｕ、^{67}Ｇａ、^{166}Ｈｏ、^{177}Ｌｕ、^{186}Ｒｅ、および^{188}Ｒｅが挙げられる。放射性核種は、核ＤＮＡにおいて複数の鎖切断を引き起こす電離放射線を産生することによって作用し、細胞死につながる。治療用複合体を産生するために使用される同位体は、通常、短い路長を有する高エネルギーα－またはβ－粒子を産生する。そのような放射性核種

は、それらの付近にある細胞、例えば、複合体が付着したか、または侵入した腫瘍性細胞を死滅させる。それらは、非局所細胞に対してほとんど作用を有さないか、または作用を有さない。放射性核種は、本質的に非免疫原性である。

【０３３３】

本発明に関連する放射性標識複合体の使用に関して、本発明の結合ポリペプチドは、（ヨード化などによって）直接的に標識化することができるか、またはキレート剤の使用によって間接的に標識化することができる。本明細書において使用される「間接的標識化」および「間接的標識化方法」という語句は両方とも、キレート剤が結合ポリペプチドに共有結合し、少なくとも１つの放射性核種が、キレート剤に関連していることを意味する。そのようなキレート剤は、通常、それらがポリペプチドおよび放射性同位体の両方に結合するため、二官能性キレート剤と称される。特に好ましいキレート剤は、１－イソチオシクマトベンジル（ｉｓｏｔｈｉｏｃｙｃｍａｔｏｂｅｎｚｙｌ）－３－メチルジオテレントリアミン五酢酸（「ＭＸ－ＤＴＰＡ」）およびシクロヘキシルジエチレントリアミン五酢酸（「ＣＨＸ－ＤＴＰＡ」）誘導体を含む。他のキレート剤は、Ｐ－ＤＯＴＡおよびＥＤＴＡ誘導体を含む。間接的標識化のための特に好ましい放射性核種としては、^{111}Ｉｎおよび^{90}Ｙが挙げられる。

【０３３４】

本明細書において使用される「直接的標化」および「直接的標化方法」という語句は両方とも、放射性核種が、（通常、アミノ酸残基を介して）直接的にポリペプチドに共有結合することを意味する。より具体的には、これらの結合技術としては、無作為標識化および部位特異的標識化を含む。後者の場合、標識化は、複合体のＦｃドメインのみに存在するＮ－結合糖残基等、ポリペプチド上の特定の部位を対象とする。さらに、様々な直接的標化手法およびプロトコルが、本発明に適合する。例えば、テクネチウム－９９ｍ標識化ポリペプチドは、リガンド交換工程、過テクネチウム酸塩（TcO_4^-）をスズイオン溶液で還元し、還元テクネチウムをＳｅｐｈａｄｅｘカラム上でキレート化し、ポリペプチドをこのカラムに適用することによってか、または例えば、過テクネチウム酸塩、$SnCl_2$等の還元剤、フタル酸カリウムナトリウム溶液等の緩衝液、および抗体を培養することによるバッチ標識化法によって調製することができる。いずれにしても、抗体を直接的に標識化するための好ましい放射性核種は、当技術分野で周知であり、直接的標化のための特に好ましい放射性核種は、チロシン残基を介して共有結合される^{131}Ｉである。本発明によるポリペプチドは、例えば、放射性ヨウ化ナトリウムまたはカリウム、および次亜塩素酸ナトリウム、クロラミンＴ等の化学的酸化剤、またはラクトペルオキシダーゼ、ブドウ糖酸化酵素およびブドウ糖等の酵素的酸化剤によって得ることができる。しかしながら、本発明の目的のため、間接的標識化方法が特に好ましい。

【０３３５】

キレート剤およびキレート剤複合体に関する特許は、当技術分野で公知である。例えば、Ｇａｎｓｏｗの米国特許第４，８３１，１７５号は、多置換ジエチレントリアミン五酢酸キレート、およびそれを含有するタンパク質複合体、ならびにそれらの調製のための方法を対象とする。Ｇａｎｓｏｗの米国特許第５，０９９，０６９号、同第５，２４６，６９２号、同第５，２８６，８５０号、同第５，４３４，２８７号、および同第５，１２４，４７１号も、また、多置換ＤＴＰＡキレートに関する。これらの特許は、参照することにより、その全体として本明細書に組み込まれる。適合性金属キレート剤の他の例としては、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＰＴＡ）、１，４，８，１１－テトラアザテトラデカン、１，４，８，１１－テトラアザテトラデカン－１，４，８，１１－四酢酸、１－オキサ－４，７，１２，１５－テトラアザヘプタデカン－４，７，１２，１５－四酢酸等がある。シクロヘキシル－ＤＴＰＡまたはＣＨＸ－ＤＴＰＡは、特に好ましく、以下に広範囲に渡って例示される。未だに発見されていないものを含む、さらに他の適合性キレート剤は、当業者によって容易に識別することができ、明らかに本発明の範囲内である。

【０３３６】

同時係属出願第０８／４７５，８１３号、同第０８／４７５，８１５号、および同第０８／４７８，９６７号における、キレート化を促進させるために使用される特定の二官能性キレート剤を含む適合性キレート剤は、好ましくは、三価金属に対する高い親和性を提供するために選択され、高い腫瘍対非腫瘍比率および低い骨取り込み、ならびに標的部位、すなわち、Ｂ細胞リンパ腫腫瘍部位における放射性核種のより多くの体内保持を示す。しかしながら、これらの特性の全てを有するか、または有しない可能性がある他の二官能性キレート剤は、当技術分野で公知であり、腫瘍治療においても有利である場合がある。

【０３３７】

本明細書における教示によると、結合ポリペプチドは、診断的および治療的目的のための異なる放射性標識に結合体化することができることも認識される。この目的を達成するために、参照することにより、その全体として本明細書に組み込まれる前述の同時係属出願は、治療抗体の投与前の腫瘍の「画像」診断のための放射性標識化された治療用複合体を開示する。「Ｉｎ２Ｂ８」複合体は、二官能性キレート剤、すなわち、１－イソチオシアナトベンジル－３－メチル－ＤＴＰＡと１－メチル－３－イソチオシアナトベンジル－ＤＴＰＡの１：１の混合物であるＭＸ－ＤＴＰＡ（ジエチレントリアミン５酢酸）を介して^{111}Ｉｎに付着するヒトＣＤ２０抗原に特異的なマウスモノクローナル抗体２Ｂ８を含む。^{111}Ｉｎは、約１～約１０ｍＣｉを検出可能な毒性なしに安全に投与することができ、画像データは、概して、後の^{90}Ｙ標識抗体の分布を予測するため、診断的放射性核種として特に好ましい。ほとんどの画像研究で、５ｍＣｉの^{111}Ｉｎ標識抗体が使用されるのは、この用量が安全であり、より低い用量と比較して高い画像効率も有し、抗体投与後３～６日で最適な画像が得られるからである。例えば、Ｍｕｒｒａｙ，Ｊ．Ｎｕｃ．Ｍｅｄ．２６：３３２８（１９８５）およびＣａｒｒａｇｕｉｌｌｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｎｕｃ．Ｍｅｄ．２６：６７（１９８５）を参照されたい。

【０３３８】

前述の通り、様々な放射性核種が本発明に適用可能であり、当業者は、どの放射性核種が、様々な状況において最も適切であるかを容易に判定することができる。例えば、^{131}Ｉは、標的免疫療法に使用される周知の放射性核種である。しかしながら、^{131}Ｉの臨床有用性は、８日の物理的半減期、血液および腫瘍部位の両方におけるヨウ化抗体の脱ハロゲン化、および腫瘍における局部的用量の沈殿に準最適であり得る放射特性（例えば、大きいガンマ成分）を含む、いくつかの要因によって制限される場合がある。優れたキレート剤の出現により、タンパク質に金属キレート群を付着させるための機会は、^{111}Ｉｎおよび^{90}Ｙ等の他の放射性核種を使用する機会を増加させた。^{90}Ｙは、ラジオイムノ治療のための用途における使用に対するいくつかの利点を提供する。^{90}Ｙの６４時間という半減期は、腫瘍による抗体蓄積を可能にするために十分長く、例えば、^{131}Ｉとは異なり、^{90}Ｙは、１００～１，０００細胞直径の組織における範囲での、その崩壊においてガンマ線照射を伴なわない、高エネルギーの純粋なベータ放射体である。さらに、最低量の透過性放射線で、^{90}Ｙ標識抗体の外来投与が可能になる。さらに、標識抗体の内在化は、細胞死滅に対して必要なく、電離放射線の局所放出は、標的分子に欠く隣接する腫瘍細胞に対して致死的であるべきである。

【０３３９】

当業者は、これらの非放射性複合体は、結合体化される選択された薬剤に依存して、様々な手法を使用して構築することもできることを認識する。例えば、ビオチンを有する複合体は、例えば、ポリペプチドを、ビオチンＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステル等のビオチンの活性化エステルと反応させることによって調製される。同様に、蛍光マーカを有する複合体は、カップリング剤、例えば、上記に記載されるものの存在下においてか、またはイソチオシアネート、好ましくはフルオレセインイソチオシアネートと反応させることによって調製することができる。細胞増殖抑制性／細胞毒性物質および金属キレートを有する本発明のポリペプチドの複合体は、同様な方法で調製される。

【０３４０】

多くのエフェクタ分子は、結合ポリペプチドが結合することができる適切な官能基に欠

く。一実施形態においては、エフェクタ分子、例えば、薬物またはプロドラッグは、結合分子によって結合ポリペプチドに付着する。一実施形態においては、結合分子は、特定の部位において細胞毒性の活性化を可能にする化学結合を含有する。適切な化学結合は、当技術分野で周知であり、ジスルフィド結合、酸に不安定な結合、光解離性結合、ペプチダーゼに不安定な結合、スルフヒドリル基とマレイミド基との間に形成されるチオエーテル結合、およびエステラーゼに不安定な結合を含む。最も好ましくは、結合分子は、ジスルフィド結合またはチオエーテル結合を含む。本発明によると、結合分子は、好ましくは、反応性化学基を含む。特に好ましい反応性化学基は、Ｎ－スクシンイミジルエステルおよびＮ－スルホスクシンイミジルエステルである。好ましい実施形態においては、反応性化学基は、チオール基の間のジスルフィド結合を介してエフェクタに共有結合することができる。一実施形態においては、エフェクタ分子は、チオール基を含むように修飾される。当業者は、チオール基が、水素原子に結合した硫黄原子を含有し、通常、「－－ＳＨ」または「ＲＳＨ」で示すことができるスルフヒドリル基としても当技術分野において称されることを認識する。

【０３４１】

一実施形態においては、結合分子は、エフェクタ分子を本発明の結合ポリペプチドに接合するために使用することができる。結合分子は、開裂可能または非開裂可能であり得る。一実施形態においては、開裂可能な結合分子は、結合分子が、細胞質等の、レドックス電位がより低い環境、および遊離スルフヒドリル基を有する分子の濃度がより高い他の領域において開裂可能なであるように、レドックス開裂可能な結合分子である。レドックス電位の変化により開裂する場合がある結合分子の例としては、ジスルフィドを含有するものを含む。開裂刺激は、細胞質のより低いレドックス電位が結合分子の開裂を促進する、本発明の結合タンパク質の細胞内取り込み後に提供される場合がある。別の実施形態においては、ｐＨの低下が、標的細胞へのマイタンシノイドカーゴの放出を誘引する。ｐＨの低下は、エンドソーム輸送、腫瘍成長、炎症、および心筋虚血等の多くの生理学的および病理学的過程に関係付けられている。ｐＨは、エンドソームにおいて生理学的な７．４から５～６に、またはリソソームにおいて４～５に低下する。癌細胞のリソソームまたはエンドソームを標的とするために使用することができる酸に敏感な結合分子の例としては、アセタール、ケタール、オルトエステル、ヒドラゾン、トリチル、シス－アコニチル、またはチオカルバモイルにおいて見られるもの等の酸開裂可能な結合を有するものが挙げられる（例えば、Ｗｉｌｌｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，（１９９３），Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．，４：５２１－７、米国特許第４，５６９，７８９号、同第４，６３１，１９０号、同第５，３０６，８０９号、および同第５，６６５，３５８号）。他の例示的な酸に敏感な結合分子は、ジペプチド配列Ｐｈｅ－ＬｙｓおよびＶａｌ－Ｌｙｓを含む（Ｋｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，（２００２），Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，４５：４３３６－４３）。開裂刺激は、低いｐＨのエンドソーム区画（例えば、リソソーム）への細胞内取り込み輸送後に提供される場合がある。他の例示的な酸開裂可能な結合分子は、２つ以上のマイタンシノイドの付着のための２つまたそれ以上の酸開裂可能な結合を含有する分子である（Ｋｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，（１９９９），Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．，１０：２７９－８８、国際公開第ＷＯ９８／１９７０５号）。

【０３４２】

開裂可能な結合分子は、特定の標的細胞、例えば、リソソームまたは腫瘍関連酵素に関連する生物学的に供給された開裂剤に敏感であり得る。酵素的に開裂することができる結合分子の例としては、これらに限定されないが、ペプチドおよびエステルが挙げられる。例示的な酵素開裂可能結合分子は、カテプシンＢまたはプラスミン等の腫瘍関連プロテアーゼに敏感なものを含む（Ｄｕｂｏｗｃｈｉｋ ｅｔ ａｌ．，（１９９９）、Ｐｈａｒｍ．Ｔｈｅｒ．，８３：６７－１２３、Ｄｕｂｏｗｃｈｉｋ ｅｔ ａｌ．，（１９９８），Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．，８：３３４１－５２、ｄｅ Ｇｒｏｏｔ ｅｔ ａｌ．，（２０００），Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，４３：３０９３－１０２、ｄｅ Ｇｒｏｏｔ ｅｔ ａｌ．，（１９９９）ｍ４２：５２７７－８３）。カテプシ

ンＢ開裂可能な部位は、ジペプチド配列であるバリン－シトルリンおよびフェニルアラニン－リジンを含む（Ｄｏｒｏｎｉｎａ ｅｔ ａｌ．，（２００３），Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．，２１（７）：７７８－８４）、Ｄｕｂｏｗｃｈｉｋ ｅｔ ａｌ．，（２００２），Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅｍ．，１３：８５５－６９）。他の例示的な酵素開裂可能な部位としては、好中球マクロファージ、および他の顆粒球によって選択的に放出される酵素であるチメットオリゴペプチダーゼ（ＴＯＰ）等のトラウス（ｔｒｏｕｓｅ）プロテアーゼによって認識される４～１６のアミノ酸のオリゴペプチド配列（例えば、Ｓｕｃ－β－Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ）によって形成されるものが含まれる。

【０３４３】

さらなる実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、次の式の結合分子と反応し、

Ｘ－Ｙ－Ｚ

式中、

Ｘは、付着分子であり、

Ｙは、スペーサ分子であり、

Ｚは、エフェクタ付着部分である。

【０３４４】

「付着分子」という用語は、本発明の結合ポリペプチドへの結合分子の共有結合を可能にする分子を含む。付着分子は、例えば、１～６０の炭素、酸素、窒素、硫黄原子の共有結合鎖を含むことができ、水素原子、および結合分子がその目的とする機能を行うことを可能にする他の置換基によって任意で置換される。付着分子は、ペプチド、エステル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、エーテル、チオエーテル等の官能基を含むことができる。好ましくは、付着分子は、少なくとも１つの抗原結合部位を含むポリペプチド上の反応性官能基と反応して、、本発明の結合分子を形成することが可能となるように、選択される。付着分子の例としては、例えば、アミノ、カルボン酸塩、およびチオール付着分子を含む。

【０３４５】

アミノ付着分子は、修飾ポリペプチドが形成されるように、結合ポリペプチド上のアミノ基と反応する分子を含む。アミノ付着分子は、当技術分野で公知である。アミノ付着分子の例としては、活性化カルバミド（例えば、結合分子上のアミノ基と反応して尿素基を含む結合分子を形成することができる）、アルデヒド（例えば、結合分子上のアミノ基と反応することができる）、および活性化イソシアネート（結合ポリペプチド上のアミノ基と反応して尿素基を含む結合分子を形成することができる）を含む。アミノ付着分子の例としては、これらに限定されないが、Ｎ－スクシンイミジル、Ｎ－スルホスクシンイミジル、Ｎ－フタルイミジル、Ｎ－スルホフタルイミジル、２－ニトロフェニル、４－ニトロフェニル、２，４－ジニトロフェニル、３－スルホニル－４－ニトロフェニル、または３－カルボキシ－４－ニトロフェニル分子が挙げられる。

【０３４６】

カルボン酸塩付着分子は、本発明の修飾結合ポリペプチドが形成されるように、結合ポリペプチド上のカルボン酸基と反応する分子を含む。カルボン酸塩付着分子は、当技術分野で公知である。カルボン酸塩付着分子は、これらに限定されないが、結合ポリペプチド上のＣＯＯＨ基と反応してエステル、チオエステル、またはアミド基を含む結合分子を形成することができる活性化エステル中間体および活性化カルボニル中間体を含む。

【０３４７】

チオール付着分子は、本発明の結合分子が形成されるように、ポリペプチド上に存在するチオール基と反応する分子を含む。チオール付着分子は、当技術分野で公知である。チオール付着分子の例としては、活性化アシル基（結合分子上のスルフヒドリルと反応してチオエステルを含む結合分子を形成することができる）、活性化アルキル基（結合分子上のスルフヒドリルと反応してチオエステル分子を含む結合分子を形成することができる）、マレイミドまたはアクリル基等のマイケルアクセプタ（結合分子上のスルフヒドリルと

反応してマイケル型付加生成物を形成することができる）、レドックス反応を介してスルフヒドリル基と反応する基、活性化ジスルフィド基（結合分子上のスルフヒドリルと反応して例えば、ジスルフィド分子を含む結合分子を形成することができる）が挙げられる。他のチオール付着分子は、アクリルアミド、アルファーヨードアセトアミド、およびシクロプロパン－１，１－ジカルボニル化合物を含む。さらに、チオール付着分子は、結合分子上のチオールを修飾して結合分子が、本発明の結合分子を形成するために付着することができる別の反応種を形成する分子を含むことができる。

【０３４８】

スペーサ分子であるＹは、共有結合であるか、または１つ以上のアミノ酸残基を含有することができる原子の共有結合鎖である。それは、０～６０の炭素、酸素、硫黄または窒素原子も含むことができ、水素、または得られた結合分子がその目的とする機能を行うことを可能にする他の置換基で任意で置換される。一実施形態においては、Ｙは、アルキル、アルケニル、アルキニル、エステル、エーテル、カルボニル、またはアミド分子を含む。

【０３４９】

別の実施形態においては、結合ポリペプチドのチオール基は、ケトンまたはアルデヒド等の反応性カルボニル基等の反応基に変換される。その後、付着分子は、ケトンまたはアルデヒドと反応して修飾結合ポリペプチドを形成する。カルボニル反応性付着分子の例としては、これらに限定されないが、ヒドラジン、ヒドラジド、Ｏ－置換ヒドロキシルアミン、アルファ－ベーター不飽和ケトン、およびＨ２Ｃ＝ＣＨ－ＣＯ－ＮＨ－ＮＨ２が挙げられる。修飾結合ポリペプチドを形成するために使用することができる付着分子の他の例およびチオール分子を修飾するための方法は、Ｐｒａｔｔ，Ｍ．Ｌ．ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ａｍ　Ｃｈｅｍ　Ｓｏｃ．２００３　Ｍａｙ　２１；１２５（２０）：６１４９－５９、およびＳａｘｏｎ，Ｅ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０００　Ｍａｙ　１７；２８７（５４６０）：２００７－１０に記載される。

【０３５０】

結合分子は、エフェクタ分子、またはその誘導体と反応して本発明の結合分子を形成することが可能な分子であり得る。例えば、エフェクタ分子は、ジスルフィド結合によって分子の残存部分に結合することができる。そのような場合、結合分子は、エフェクタ分子が本発明の結合ポリペプチドに付着するように、適切なエフェクタ部分の誘導体と反応することが可能となるように選択される。

【０３５１】

本発明における使用のための好ましい細胞毒性エフェクタ分子は、細胞毒性薬物、特に、癌治療のために使用されるものである。本明細書において使用される「細胞毒素または細胞毒性薬」は、細胞の成長および増殖に悪影響をもたらし、細胞または悪性腫瘍を低下、阻害、または破壊するように作用することができる任意の薬剤を意味する。例示的な細胞毒素としては、これらに限定されないが、放射性核種、生物毒素、酵素的に活性な毒素、細胞増殖抑制性または細胞毒性治療薬、プロドラッグ、免疫学的に活性なリガンド、およびサイトカイン等の生物学的反応修飾因子が含まれる。免疫反応性細胞または悪性細胞の成長を遅延または減速させるように作用するいかなる薬剤も、本発明の範囲内にある。

【０３５２】

例示的な細胞毒素としては、一般的に、細胞増殖抑制剤、アルキル化剤、抗代謝産物、抗増殖剤、チューブリン結合剤、ホルモンおよびホルモン拮抗剤等が挙げられる。本発明に適合する例示的な細胞増殖抑制剤としては、メクロレタミン、トリエチレンホスホラミド、シクロホスファミド、イホスファミド、クロラムブシル、ブスルファン、メルファラン、またはトリアジコン等のアルキル化物質、また、カルムスチン、ロムスチン、またはセムスチン等のニトロソウレア化合物が挙げられる。

【０３５３】

結合体化のための例示的な分子は、マイタンシノイドである。マイタンシノイドは、元来、メイテナス（Ｍａｙｔｅｎｕｓ）属に属する東アフリカの低木から単離されたが、後

に、アクチノシンネマプレチオスム（Ａｃｔｉｎｏｓｙｎｎｅｍａ　ｐｒｅｔｉｏｓｕｍ）等の土壌細菌の代謝産物であるという発見もされた（例えば、米国特許第３，８９６，１１１号を参照）。マイタンシノイドは、マイタンシン、マイタンシノール、マイタンシノールのＣ－３エステル、および他のマイタンシノール類似体および誘導体をむことが当技術分野で公知である（例えば、米国特許第５，２０８，０２０号および同第６，４４１，１６３号を参照）。マイタンシノールのＣ－３エステルは、自然発生的または合成的に由来する場合がある。さらに、自然発生および合成Ｃ－３マイタンシノールエステルは両方とも、単純カルボン酸を有するＣ－３エステル、またはＮ－メチル－Ｌ－アラニンの誘導体を有するＣ－３エステルに分類することができ、後者は、前者よりさらに細胞毒性が強い。合成マイタンシノイド類似体も当技術分野で公知であり、例えば、Ｋｕｐｃｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，２１，３１－３７（１９７８）において記載される。マイタンシノールおよび類似体、ならびにその誘導体を生成するための方法は、例えば、米国特許第４，１５１，０４２号に記載される。

【０３５４】

複合体としての使用のための適切なマイタンシノイドは、当技術分野で公知の方法を使用して、合成的に産生されるか、または準合成的に産生される天然源から単離することができる。さらに、マイタンシノイドは、十分な細胞毒性が最終的な結合分子に保存される限り、任意の適切な方法で修飾することができる。

【０３５５】

反応性化学基を含有する結合分子を含む特に好ましいマイタンシノイドは、マイタンシノールのＣ－３エステルおよびその類似体であり、結合分子は、ジスルフィド結合を含み、付着分子は、Ｎ－スクシンイミジルまたはＮ－スルホスクシンイミジルエステルを含む。マイタンシノイド上の多くの位置は、例えば、エフェクタ付着分子によって、結合分子を化学的に結合するための位置として作用することができる。例えば、ヒドロキシル基を有するＣ－３位置、ヒドロキシメチルで修飾されるＣ－１４位置、ヒドロキシで修飾されるＣ－１５位置、およびヒドロキシ基を有するＣ－２０位置は、全て有用である。結合分子は、最も好ましくは、マイタンシノールのＣ－３位置に結合される。最も好ましくは、本発明の組成物に関連して使用されるマイタンシノイドは、Ｎ．ｓｕｐ．２′－デアセチル－Ｎ．ｓｕｐ．２′－（－３－メルカプト－１－オキソプロピル）－マイタンシン（ＤＭ１）またはＮ．ｓｕｐ．２′－デアセチル－Ｎ．ｓｕｐ．２′－（４－－メルカプト－４－メチル－１－オキソペンチル）－マイタンシン（ＤＭ４）である。

【０３５６】

他の化学結合を有する結合分子も、他のマイタンシノイドが可能なように、本発明との関係において使用することができる。結合分子に組み込むことができる他の化学結合の特定の例としては、例えば、酸に不安定な結合、チオエーテル結合、光解離性結合、ペプチダーゼに不安定な結合、およびエステラーゼに不安定な結合等、上述のものを含む。結合分子および／またはエフェクタ付着分子を有するマイタンシノイドを産生するための方法は、例えば、米国特許第５，２０８，０２０号、同第５，４１６，０６４号、および同第６，３３３，４１０号において記載される。

【０３５７】

マイタンシノイドの結合分子（および／またはエフェクタ付着分子）は、通常、好ましくは、結合ポリペプチドをマイタンシノイドに接合するために使用されるより大きなペプチド分子の一部である。いかなる適切なペプチド分子も、結合分子がマイタンシノイドおよび抗体それぞれの細胞毒性および標的特性の保持を提供する限り、本発明に関連して使用することができる。結合分子は、マイタンシノイドおよび結合ポリペプチドが、互いに化学的に結合される（例えば、共有結合する）ように、化学結合（上述のような）によってマイタンシノイドを結合ポリペプチドに接合する。望ましくは、結合分子は、ジスルフィド結合またはチオエーテル結合によってマイタンシノイドを結合ポリペプチドに化学的に結合する。最も好ましくは、結合ポリペプチドは、ジスルフィド結合を介してマイタンシノイドに化学的に結合される。

【０３５８】
細胞毒性薬の他の好ましいクラスは、例えば、薬物のアントラサイクリンファミリー、ビンカ薬物、マイトマイシン、ブレオマイシン、細胞毒性ヌクレオシド、薬物のプテリジンファミリー、ジイネン、およびポドフィロ毒素を含む。それらのクラスの特に有用なメンバは、例えば、アドリアマイシン、カルミノマイシン、ダウノルビシン（ダウノマイシン）、ドキソルビシン、アミノプテリン、メトトレキサート、メトプテリン、ミトラマイシン、ストレプトニグリン、ジクロロメトトレキサート、マイトマイシンＣ、アクチノマイシン－Ｄ、ポルフィロマイシン、５－フルオロウラシル、フロクスウリジン、フトラフール、６－メルカプトプリン、シタラビン、シトシンアラビノシド、ポドフィロトキシン、またはエトポシドもしくはエトポシドリン酸塩等のポドフィロトキシン誘導体、メルファラン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ロイロシジン、ビンデシン、ロイロシン等を含む。本明細書における教示に適合するさらなる他の細胞毒素は、タクソール、タキサン、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、エチジウムブロマイド、エメチン、テノポシド、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン（ｄｉｈｙｄｒｏｘｙ　ａｎｔｈｒａｃｉｎ　ｄｉｏｎｅ）、ミトキサントロン、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、ならびにそれらの類似体または同族体を含む。コルチコステロイド、例えば、プレドニゾン等のホルモンおよびホルモン拮抗剤、プロゲスチン、例えば、ヒドロキシプロゲステロンまたはメドロプロゲステロン、エストロゲン、例えば、ジエチルスチルベストロール、抗エストロゲン、例えば、タモキシフェン、およびアンドロゲン、例えば、テストステロン、およびアロマターゼ阻害剤、例えば、アミノグルテチミドも、本明細書における教示に適合する。前述されるように、当業者は、本発明の複合体を調製する目的のため、その化合物の反応をより便利にするために、所望の化合物に化学修飾を行うことができる。

【０３５９】
他の例示的な細胞毒素は、カリケアマイシン、エスペラミシン、またはジネミシンを含む、抗腫瘍抗生物質のエンジインファミリーのメンバまたは誘導体を含む。これらの毒素は、極度に強く、核ＤＮＡを開裂することによって作用し、細胞死をもたらす。多くの不活性であるが、体内で開裂することができ免疫原性のポリペプチド断片を与えるタンパク質毒素と異なり、カリケアマイシン、エスペラミシンおよび他のエンジイン等の毒素は、本質的に非免疫原性である小分子である。これらの非ペプチド毒素は、モノクローナル抗体および他の分子を標識化するために以前から使用されている手法によって二量体または四量体に化学的に結合される。これらの結合技術は、本発明の結合ポリペプチドのＦｃ部分上に存在するＮ－結合糖残基を介する部位特異的結合を含む。そのような部位特異的結合方法は、構造体の結合特性に対する結合の可能な効果を低減させる利点を有する。

【０３６０】
他の細胞毒素の間で、当然のことながら、ポリペプチドは、リシンサブユニットＡ、アブリン、ジフテリア毒素、ボツリヌス菌、シアンジノシン、サキシトキシン、志賀毒素、破傷風、テトロドトキシン、トリコテセン、ベルコロゲン（ｖｅｒｒｕｃｏｌｏｇｅｎ）、または毒性酵素等の生物毒素と結びつけることもできる。好ましくは、そのような構造体は、抗体－毒素構造体の直接的発現を可能にする遺伝子操作法を使用して作製される。本発明のポリペプチドと結びつけることのできる他の生物学的反応修飾因子は、リンホカインおよびインターフェロン等のサイトカインを含む。本開示を考慮して、当業者は、従来の手法を使用してそのような構造体を容易に形成することができることが提示される。

【０３６１】
開示されるポリペプチドに関連して使用することができる適合性細胞毒素の別のクラスは、腫瘍または免疫反応性細胞を効果的に対象とすることができる放射線増感剤である。そのような薬物は、電離放射線に対する感度を強化し、それによって、放射線治療の有効性を増加させる。腫瘍細胞が内在化する結合ポリペプチド複合体は、放射線増感が最大となる核のより近くに放射線増感剤を送達する。本発明の非結合性放射線増感剤に結合したポリペプチドは、血液から迅速に除去され、標的腫瘍に残存する放射線増感剤を局在させ

、正常組織における最小限の取り込みを提供する。血液からの迅速な除去の後、補助の放射線治療が、以下の３つの方法の１つで投与される。１）腫瘍に特異的に向けられる外部ビーム放射線、２）腫瘍に直接埋め込まれる放射能、または３）同じ標的抗体での全身的ラジオイムノ療法。この方法の潜在的に魅力的な変形は、放射線増感された免疫抱合体への治療用放射性同位体の付着であり、それによって、患者に単一の薬剤を投与する利便性を提供する。

【０３６２】

一実施形態においては、ポリペプチドの安定性または有効性を強化する分子を結合体化することができる。例えば、一実施形態においては、ＰＥＧは、本発明のポリペプチドに結合体化し、体内でのそれらの半減期を増加させることができる。Ｌｅｏｎｇ，Ｓ．Ｒ．，ｅｔ　ａｌ．２００１．Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　１６：１０６；２００２；Ａｄｖ．ｉｎ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．５４：５３１、またはＷｅｉｒ　ｅｔ　ａｌ．２００２．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓａｃｔｉｏｎｓ　３０：５１２。

【０３６３】

上記で触れたように、適合性細胞毒素は、プロドラッグを含むことができる。本明細書において使用される「プロドラッグ」という用語は、親薬物と比較して、腫瘍細胞に対する細胞毒性が少なく、より活性な親型へ酵素的に活性化されるか、または変換されることが可能な薬学的に活性な物質の前駆体または誘導体型を指す。本発明に適合するプロドラッグは、これらに限定されないが、リン酸塩含有プロドラッグ、チオリン酸塩含有プロドラッグ、硫酸塩含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、β－ラクタム含有プロドラッグ、任意で置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグまたは任意で置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、５－フルオロシトシン、およびより活性な細胞毒性遊離薬物に変換することができる他の５－フルオロウリジンプロドラッグを含む。一実施形態においては、マイタンシノイド等の細胞毒性薬は、ジスルフィド結合の加水分解によって放出されるプロドラッグとして投与される。本発明における使用のためのプロドラッグ型に誘導体化することができる細胞毒性薬物のさらなる例としては、上述の化学療法剤を含む。

【０３６４】

ＶＩ．本発明のポリペプチドの使用法

本発明のポリペプチドは、例えば、スクリーニングアッセイ、および診断的または治療的目的のために、多数の用途において使用することができる。本発明の好ましい実施形態は、疾患、例えば、そのような治療を必要とする哺乳類の対象における腫瘍性疾患の診断および／または治療のためのキットおよび方法を提供する。好ましくは、対象はヒトである。

【０３６５】

Ａ．スクリーニング方法

対象の結合分子は、スクリーニング方法においても有用である。二重特異性分子として合成される場合、対象の結合分子は、スクリーニングアッセイにおける使用のための薬剤としての利点を含む、従来技術の二重特異性分子に勝る多数の利点を有する。図９は、従来の二重特異性抗体の使用と比較した、二重特異性抗体機能をスクリーニングする際の本発明のｓｃＦｃ結合分子を使用することの利点を示す。ｓｃＦｃ領域の使用は、結合ドメインの好ましくない異質性を防止する。そのような異質性は、二重特異性抗体に固有の活性をスクリーニングするように設計されるアッセイを複雑にする。「経路１」は、通常、３つの遺伝子が、真核細胞系において共発現されて二重特異性抗体を形成する場合に生じる異質性の結合タンパク質の組み合わせの例である：（Ａ）ＦｃのＮ末端と融合されたｓｃＦ（ａｂ）、（Ｂ）ＦｃのＣＨ３ドメインのＣ末端と融合されたＦ（ａｂ）重鎖、および（Ｃ）ＣＬおよびＶＬドメインを含む軽鎖。「経路２」は、２つの遺伝子（（Ａ）および（Ｂ））を単一の遺伝的構造体に融合することによって、ポリペプチドリンカーによって結合されているＦｃ部分であるｓｃＦｃ（Ｄ）をもたらす方法の例を示す。（Ｃ）および（Ｄ）の共発現は、単一の二重特異性ｍＡｂの均質な発現を引き起こす。したがって、

本発明の結合分子は、例えば、当技術分野で公知の方法を使用して、例えば、二重特異性抗体の、その標的の１つまたはそれ以上に結合する能力をスクリーニングする場合の利点を提示する。

【０３６６】

別の態様においては、本発明は、標的タンパク質の活性化を活性させるか、または阻害する多特異性結合タンパク質（例えば、二重特異性抗体等の二重特異性結合タンパク質）をスクリーニングするための過程を提供する。特に、第１の結合特異性を有する本発明の結合ポリペプチドは、多特異性結合タンパク質を形成するために、異なる特異性の１つまたはそれ以上のポリペプチドと共に発現するか、または共有結合することができる。特に好ましい実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、ＮおよびＣ末端に異なる特異性の結合部位（例えば、ｓｃＦｖまたはＦａｂ）を有する遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、ｓｃＦｃ領域）を含む単一の遺伝的構造体として発現することができる。結合タンパク質は、対象の１つまたはそれ以上の標的タンパク質に対する相対活性を測定するアッセイ（例えば、細胞に基づいたアッセイ）においてスクリーニングすることができる。一般的に、そのようなスクリーニング手順は、機能的反応の結合、刺激、または阻害を観察するために、本発明の多特異性結合ポリペプチドを標的タンパク質に接触させるステップを含む。多特異性結合タンパク質は、対応する単一特異性結合ポリペプチドに対する刺激または阻害を示す場合に選択することができる。

【０３６７】

標的タンパク質の活性（例えば、生化学的または生物活性）を測定するために適切な当該技術分野において認識されているアッセイを使用することができる。例えば、標的タンパク質がキナーゼである場合、適切なアッセイは、キナーゼの基質のリン酸化反応状態の阻害または活性化を測定するステップを含むことができる。標的タンパク質がＧタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）である他の例示的な実施形態においては、適切なアッセイは、多特異性結合ポリペプチドが受容体を活性化させるか、または阻害するかを判定するために細胞外ｐＨ変化を測定することができる。標的タンパク質が受容体である場合、スクリーニングアッセイは、表面上に受容体を有する細胞への標識リガンドの相対結合を判定するステップを含み得る。リガンドは、例えば、放射能によって標識することができる。受容体に結合した標識リガンドの量は、例えば、受容体の放射能を測定することによって測定される。化合物が、受容体に結合する標識リガンドの低下によって判定される受容体に結合する場合、受容体への標識リガンドの結合は阻害される。

【０３６８】

例示的な一実施形態においては、アッセイは、ＬＴβＲタンパク質（例えば、ＬＴα１β２タンパク質）の阻害を含む。ＬＴβＲ分子は、３つの裂隙によって分離される３つの非同一のサブユニットから成る三量体であるため、ＬＴβＲ活性を最適に不活性化させるために３つの裂隙のうち２つ以上を遮断することが好ましい。例えば、ＬＴβＲの第１の裂隙に対する第１の特異性、およびＬＴβＲの第２の裂隙に対する第２の特異性を有する多特異性結合ポリペプチドを得ることが好ましい。したがって、ＬＴβＲに対して２つ以上の結合特異性を有する多特異性結合タンパク質は、対応する単一特異性抗体に対して活性の改善を示すかどうかを判定するために、ＬＴβＲ活性のアッセイにおいてスクリーニングすることができる。

【０３６９】

Ｂ．抗腫瘍療法

本発明のポリペプチドは、多数の異なる用途において有用である。例えば、一実施形態においては、対象の結合ポリペプチドは、結合ポリペプチドによって認識されるエピトープを担持する細胞を減少または排除するために有用であるはずである。別の実施形態においては、対象の結合ポリペプチドは、循環における可溶性抗原の濃度を低減させるか、可溶性抗原を排除する際に有効である。

【０３７０】

一実施形態においては、腫瘍関連抗原を認識する本発明の結合ポリペプチドは、腫瘍の

大きさを減少させ、腫瘍成長を阻害し、および／または腫瘍担持動物の生存期間を延長することができる。したがって、本発明は、また、該結合ポリペプチドの有効かつ毒性のない量をそのようなヒトまたは動物に投与することによって、ヒトまたは他の動物における腫瘍を治療する方法にも関する。当業者は、日常の実験によって、修飾結合ポリペプチドのどの有効かつ毒性のない量が悪性腫瘍を治療する目的のためになるかどうかを判断することができる。例えば、結合ポリペプチドの治療上の活性な量は、病期（例えば、第Ｉ期対第ＩＶ期）、年齢、性別、医学的合併症（例えば、免疫抑制状態または疾病）、および対象の体重等の要因、ならびに結合ポリペプチドの対象において所望の反応を導く能力によって異なり得る。投薬レジメンは、最適な治療反応を提供するために調整することができる。例えば、いくつかの分割用量は、毎日投与することができるか、または用量は、治療状況の危急によって示されるように、比例的に減少することができる。しかしながら、概して、有効投与量は、１日、体重１キログラムにつき約０．０５～１００ミリグラム、より好ましくは１日、体重１キログラムにつき約０．５～１０ミリグラムの範囲であると予期される。

【０３７１】

一般的に、本発明のポリペプチドは、修飾抗体によって癌性細胞の標的化を可能とする抗原マーカを含む任意の新生物を予防的または治療的に治療するために使用することができる。治療することができる例示的な癌としては、これらに限定されないが、前立腺、胃、結腸、皮膚、乳癌、卵巣、肺、および膵臓などの癌腫が挙げられる。より具体的に、本発明の結合ポリペプチドは、カポジ肉腫、ＣＮＳ新形成（毛細血管芽腫、髄膜腫、および脳転移）、黒色腫、胃腸および腎臓の肉腫、横紋筋肉腫、グリア芽腫（好ましくは多形性膠芽腫）、平滑筋肉腫、網膜芽細胞腫、卵巣の乳頭状嚢胞腺癌、ウィルムス腫瘍、または小細胞肺癌を治療するために使用することができる。適切な標的結合ポリペプチドを、本開示を考慮して、必要以上の実験をせずに前述の新形成のそれぞれに関する腫瘍関連抗原に対して得ることができることが認識される。

【０３７２】

開示される本発明による治療の影響を受けやすい例示的な血液学的悪性腫瘍としては、ＡＬＬ－Ｌ３（バーキット型白血病）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、および単球細胞白血病を含む、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫ならびに白血病が挙げられる。本発明の化合物および方法は、低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、細胞リンパ腫（ｃｅｌｌ　ｌｙｍｐｈｏｍａ）（ＦＣＣ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、びまん性大細胞型リンパ腫（ＤＬＣＬ）、小リンパ球性（ＳＬ）ＮＨＬ、中悪性度／濾胞性ＮＨＬ、中悪性度びまん性ＮＨＬ、高悪性度免疫芽球性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度小型非切れ込み細胞性ＮＨＬ、巨大病変（ｂｕｌｋｙ　ｄｉｓｅａｓｅ）ＮＨＬ、およびヴァルデンストレームマクログロブリン血症を含む、様々なＢ細胞リンパ腫を標的とする際に特に有効である。これらのリンパ腫が、しばしば、分類システムの変更のため、異なる名称を有すること、および異なる名称で分類されるリンパ腫を有する患者が、本発明の組み合わされた治療レジメンの恩恵も受ける場合があることは、当業者にとって明らかなはずである。前述の腫瘍性疾患に加えて、当然のことながら、本発明のポリペプチドは、適合性腫瘍関連抗原を担持するそれ以外の悪性腫瘍を治療するために有利に使用することができる。

【０３７３】

Ｃ．免疫疾患療法

腫瘍性疾患に加えて、本発明のポリペプチドは、自己免疫疾患または異常免疫反応の治療において特に有効である。この点において、当然のことながら、本発明のポリペプチドは、外部または自己抗原の両方に対する好ましくない免疫反応を制御、抑制、調節、または排除するために使用することができる。例えば、一実施形態においては、抗原は、自己抗原である。別の実施形態においては、抗原はアレルゲンである。さらに他の実施形態においては、抗原は同種抗原または異種抗原である。同種抗原および異種抗原に対する免疫反応を低下させるための本発明の結合ポリペプチドの使用は、例えば、ドナーの移植片、

例えば、組織もしくは臓器の移植片の移植レシピエント、または骨髄移植による拒絶を阻害するために、移植における特定の使用である。さらに、骨髄移植片におけるドナーのＴ細胞の抑制または排除は、移植片対宿主病を阻害するために有用である。

【０３７４】

さらに他の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、これらに限定されないが、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、アレルギー性鼻炎、自己免疫性溶血性貧血、黒色表皮症、アレルギー性接触皮膚炎、アジソン病、アトピー性皮膚炎、円形脱毛症、全身性脱毛症、アミロイドーシス、アナフィラキシー様紫斑病、アナフィラキシー様反応、無形成貧血、遺伝性血管性浮腫、突発性血管性浮腫、強直性脊椎炎、頭蓋動脈炎、巨細胞性動脈炎、高安動脈炎、側頭動脈炎、喘息、毛細血管拡張性運動失調症、自己免疫性卵巣炎、自己免疫性精巣炎、自己免疫性多内分泌不全、ベーチェット病、バージャー病、バーガー病、気管支炎、水疱性天疱瘡、慢性粘膜皮膚カンジダ症、カプラン症候群、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、心臓炎、セリアック病、シャーガス病、チェディアック－東症候群、チャーグ－ストラウス病、コーガン症候群、寒冷血球凝集素症、ＣＲＥＳＴ症候群、クローン病、クリオグロブリン血症、特発性線維化肺胞炎、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、ダイアモンド－ブラックファン症候群、ディジョージ症候群、円板状エリテマトーデス、好酸球性筋膜炎、上強膜炎、持久性隆起性紅斑、辺縁紅斑、多形性紅斑、結節性紅斑、家族性地中海熱、フェルティ症候群、肺線維症、アナフィラキシー様糸球体腎炎、自己免疫糸球体腎炎、連鎖球菌感染後糸球体腎炎（ｇｌｏｍｅｒｕｌｏｎｅｐｈｒｉｔｉｓ，ｐｏｓｔ－ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃａｌ）、移植後糸球体腎炎、膜性糸球体症、グッドパスチャー症候群、免疫介在性顆粒球減少症、環状肉芽腫、アレルギー性肉芽腫症、肉芽腫性筋炎、グレーブス病、橋本甲状腺炎、新生児溶血性疾患、特発性ヘモクロマトーシス、ヘノッホ－シェーンライン紫斑病、慢性活動性肝炎および慢性進行性肝炎、ヒスチオサイトーシスＸ、好酸球増加症候群、特発性血小板減少性紫斑病、ヨブ症候群、若年性皮膚筋炎、若年性関節リウマチ（若年性慢性関節炎）、川崎病、角膜炎、乾性角結膜炎、ランドリー－ギラン－バール－シュトロール症候群、らい腫らい、レフレル症候群、狼瘡、ライエル症候群、ライム病、リンパ腫様肉芽腫症、全身性肥満細胞症、混合性結合組織病、多発単神経炎、マックル－ウェルズ症候群、皮膚粘膜リンパ節症候群、皮膚粘膜リンパ節症候群、多中心性細網組織球症、多発性硬化症、重症筋無力症、菌状息肉腫、全身性壊死性血管炎、ネフローゼ症候群、重複症候群（ｏｖｅｒｌａｐ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、皮下脂肪織炎、発作性寒冷血色素尿症、発作性夜間血色素尿症、類天疱瘡、天疱瘡、紅斑性天疱瘡、落葉状天疱瘡、尋常性天疱瘡、鳩飼病（ｐｉｇｅｏｎ　ｂｒｅｅｄｅｒ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ）、過敏性肺炎、結節性多発動脈炎、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎、特発性多発性神経炎、ポルトガル家族性多発ニューロパチー、子癇前症／子癇、原発性胆汁性肝硬変、進行性全身性硬化症（硬皮症）、乾癬、乾癬性関節炎、肺胞タンパク症、肺線維症、レイノー現象／症候群、リーデル甲状腺炎、ライター症候群、再発性多発軟骨炎、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強膜炎、硬化性胆管炎、血清病、セザリー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンス－ジョンソン症候群、スティル病、亜急性硬化性全脳炎、交感性眼炎、全身性エリテマトーデス、移植片拒絶反応、潰瘍性結腸炎、未分化結合組織病、慢性蕁麻疹、寒冷蕁麻疹、ブドウ膜炎、白斑、ウェーバー－クリスチャン病、ウェゲナー肉芽腫症、およびウィスコット－アルドリッチ症候群を含む免疫疾患を治療するために使用することができる。

【０３７５】

Ｄ．抗炎症療法

さらに他の実施形態においては、本発明のポリペプチドは、例えば、血流量増大、浮腫、免疫細胞の活性化（例えば、増殖、サイトカイン産生、または食作用の強化）によって、少なくとも一部において引き起こされるか、または悪化する炎症性疾患を治療するために使用することができる。例示的な炎症性疾患としては、炎症または炎症性因子（例えば、マトリクスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、一酸化窒素（ＮＯ）、ＴＮＦ、インターロイキン、血漿タンパク質、細胞防御系、サイトカイン、脂質代謝産物、プロテアーゼ、毒

性ラジカル、ミトコンドリア、アポトーシス、接着分子等）が、ある領域に、異常な量、例えば、対象に有益になるように変化することが有利であり得る量で、関与または存在するものを含む。炎症過程は、損傷に対する生体組織の反応である。炎症の原因は、物理的損傷、化学物質、微生物、組織壊死、癌、または他の薬剤に起因し得る。急性炎症は、数日間のみ持続する短時間型である。しかしながら、それが持続する場合、それは慢性炎症と称される場合がある。

【０３７６】

炎症性疾患は、急性炎症性疾患、慢性炎症性疾患、および再発性炎症性疾患を含む。急性炎症性疾患は、概して、比較的短期間であり、約数分間から約１～２日間持続するが、それらは、数週間持続する場合がある。急性炎症性疾患の主要な特性は、血流量増大、流体および血漿タンパク質の滲出（浮腫）、および好中球等の白血球の移動を含む。慢性炎症性疾患は、概して、長期間、例えば、数週、数ヶ月、数年、またはそれ以上であり、リンパ球およびマクロファージの存在、および血管および結合組織の増殖に組織学的に関連する。再発性炎症性疾患は、ある期間後に再発するか、または定期的なエピソードを有する疾患を含む。再発性炎症性疾患の例としては、ぜんそくおよび多発性硬化症が挙げられる。一部の疾患は、１つまたはそれ以上のカテゴリに該当する場合がある。

【０３７７】

炎症性疾患は、概して、熱、発赤、腫脹、疼痛および機能低下によって特徴付けられる。炎症性疾患の原因の例としては、これらに限定されないが、細菌感染（例えば、細菌、ウイルス、真菌感染症）、物理的な動因（例えば、火傷、放射線、および外傷）、化学物質（例えば、毒素および苛性物質）、組織壊死、および様々な種類の免疫学的反応が挙げられる。炎症性疾患の例としては、これらに限定されないが、変形性関節症、関節リウマチ、急性および慢性感染（細菌、ウイルス、真菌）、風邪を含む、急性および慢性気管支炎、副鼻腔炎、および他の呼吸器感染、急性および慢性胃腸炎および結腸炎、急性および慢性膀胱炎ならびに尿道炎、急性呼吸促迫症候群、嚢胞性線維症、急性および慢性皮膚炎、急性および慢性結膜炎、急性および慢性漿膜炎（心膜炎、腹膜炎、滑膜炎、胸膜炎、および腱炎）、尿毒症性心膜炎、急性および慢性胆嚢炎、急性および慢性膣炎、急性および慢性ブドウ膜炎、薬物反応、および火傷（熱的、化学的、および電気的）が挙げられる。

【０３７８】

Ｅ．神経障害

さらに他の実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、神経系疾病または疾患を治療する際に有用である。例えば、上記で説明されるように、結合ポリペプチドは、神経細胞（例えば、ニューロンまたはグリア細胞）上に存在する抗原に結合することができる。ある実施形態においては、神経系疾患に関連する抗原は、上述の自己免疫または炎症性疾患であり得る。本明細書において使用される「神経系疾病または疾患」という用語は、神経系が変質している対象における疾患または病状（例えば、神経変性疾患）および神経系が適切に発達しないかまたは外傷（例えば、脊髄損傷）の後に再生しない疾患を含む。本発明の方法および組成物によって診断、予防、または治療することができる神経系疾患の例としては、これらに限定されないが、多発性硬化症、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、神経因性疼痛、外傷性脳損傷、ギランバレー症候群、および慢性炎症性脱髄性多発神経障害（ＣＩＤＰ）、脳血管疾患、および脳炎が挙げられる。

【０３７９】

ＶＩＩＩ．本発明のポリペプチドを投与する方法

本発明のポリペプチドを調製し、対象に投与する方法は、当業者によって周知であるか、または容易に決定される。本発明のポリペプチドの投与経路は、吸入または局所によって経口、非経口であり得る。本明細書において使用される非経口という用語は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋内、皮下、直腸、または膣内投与を含む。非経口投与の静脈内、動脈内、皮下、および筋内型は、概して、好ましい。投与のすべてのこれらの型は、明らかに本発明の範囲内であると意図されるが、投与型は、注入、特に、静脈内または動脈内注入または点滴のための溶液である。通常、注入のための適切な医薬組成物は、緩衝液（例え

ば、酢酸塩、リン酸塩、またはクエン酸塩緩衝剤）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート）、任意で、安定剤（例えば、ヒトアルブミン）等を含むことができる。しかしながら、本明細書における教示に適合する他の方法では、ポリペプチドは、有害な細胞集団の部位に直接送達することができ、それによって、病変組織の治療薬への曝露を増加させる。

【０３８０】

非経口投与のための調製物は、滅菌水溶液または非水性の溶液、懸濁液、および乳液を含む。非水性の溶媒の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油等の植物油、およびオレイン酸エチル等の注入可能な有機エステルがある。水性担体は、生理食塩水および緩衝媒体を含む、水、アルコール／水溶液、乳液または懸濁液を含む。本発明においては、薬学的に許容される担体は、これらに限定されないが、０．０１～０．１Ｍ、好ましくは０．０５Ｍリン酸塩緩衝液、または０．８％生理食塩水を含む。他の一般的な非経口賦形剤は、リン酸ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンガー液、または不揮発性油を含む。静脈内賦形剤は、リンゲルデキストロース等に基づくもの等の栄養補充物（ｎｕｔｒｉｅｎｔ　ｒｅｐｌｅｎｉｓｈｅｒ）、電解質補給物を含む。例えば、抗菌剤、酸化防止剤、キレート剤、および不活性ガス等の保存料および他の添加剤も存在する場合がある。

【０３８１】

より具体的に、注入可能な使用に適切な医薬組成物は、滅菌水溶液（水溶性の場合）、または滅菌した注入可能な溶液または分散液の即席調製物のための分散液および滅菌粉末を含む。そのような場合、組成物は、滅菌されていなければならず、容易な注入可能性が存在する程度まで流動性であるべきである。それは、製造および保存の条件化で安定であるべきであり、好ましくは、細菌および真菌等の微生物の汚染作用から保護されるべきである。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコール等）、およびそれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性が、例えば、レシチンなどの被覆の使用によって、分散液の場合では必要とされる粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。

【０３８２】

微生物作用からの保護は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサール等の様々な抗菌性および抗真菌薬によって達成され得ることができる。多くの場合、等張剤、例えば、マンニトール、ソルビトール等の糖類、多価アルコール、または塩化ナトリウムを組成物に含むことが好ましい。注入可能な組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含むことによってもたらすことができる。

【０３８３】

いずれの場合においても、滅菌した注入可能な溶液は、本明細書において列挙される成分１つか、または組み合わせた適切な溶媒に、必要量の活性化合物（例えば、単独または他の活性薬剤と組み合わせた結合ポリペプチド）を組み込み、その後、必要に応じてろ過滅菌を行うことによって調製することができる。概して、分散液は、塩基性分散媒体、および上記に列挙されるものからの必要な他の成分を含有する滅菌賦形剤に活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌した注入可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、活性成分の粉末、さらにその前もって滅菌したろ過溶液からの任意の付加的な所望の成分を産出する。注入のための調製物は、処理され、アンプル、バッグ、瓶、シリンジ、またはバイアル等の容器に充填され、当技術分野で公知の方法に従って、無菌状態で密封される。さらに、調製物は、包装され、それぞれの内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる同時係属米国特許第ＵＳＳＮ０９／２５９，３３７号および同第ＵＳＳＮ０９／２５９，３３８号において記載されるもの等のキットの形で販売することができる。そのような製造品は、好ましくは、関連組成物は、自己免疫または腫瘍性疾患を患うか、またはかかりやすい対象を治療するために有用であることを示すラベルまたは添付文書を有する。

【０３８４】
上述の状態の治療に対する、本発明の組成物の有効量は、投与手段、標的部位、患者の生理的状態、患者がヒトであるか、または動物であるか、投与される他の薬物、および治療が予防的であるか、または治療的であるか、を含む、多くの異なる要因によって異なる。通常、患者はヒトであるが、トランスジェニック哺乳類を含む非ヒト哺乳類も治療することができる。治療用投与量は、安全性および有効性を最適化するために、当業者に公知の日常の方法を使用して増量することができる。
【０３８５】
結合ポリペプチドによる受動免疫法に対して、投与量は、例えば、宿主の体重の約０．０００１～１００ｍｇ／ｋｇ、およびより通常は、０．０１～５ｍｇ／ｋｇ（例えば、０．０２ｍｇ／ｋｇ、０．２５ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、０．７５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ等）の範囲であり得る。例えば、投与量は、１ｍｇ／ｋｇ体重もしくは１０ｍｇ／ｋｇ体重、または１～１０ｍｇ／ｋｇの範囲内、好ましくは、少なくとも１ｍｇ／ｋｇであり得る。上記の範囲の中間の用量も、本発明の範囲内であることを意図する。対象は、そのような用量を、毎日、１日おき、毎週、または実験による分析によって判断される任意の他の予定に従って投与することができる。例示的な治療は、長期、例えば、少なくとも６ヶ月に渡る複数の投与量での投与を伴う。付加的な例示的治療レジメンは、２週間に１回、または１ヶ月に１回、または３～６ヶ月に１回の投与を伴う。例示的な投与予定は、連日の１～１０ｍｇ／ｋｇまたは１５ｍｇ／ｋｇ、１日おきに３０ｍｇ／ｋｇまたは毎週６０ｍｇ／ｋｇを含む。いくつかの方法では、異なる結合特異性を有する２つ以上の結合ポリペプチドは、同時に投与され、その場合、投与される各結合ポリペプチドの投与量は、指示される範囲内にある。
【０３８６】
本発明のポリペプチドは、複数回投与することができる。１回の投与量の間の間隔は、週ごと、月ごと、または年ごとであり得る。間隔は、患者における修飾結合ポリペプチドまたは抗原の血液濃度を測定することによって示されるように不定期であってもよい。いくつかの方法では、投与量は、１～１０００μｇ／ｍｌの血漿中の修飾結合ポリペプチド濃度に到達するように調節され、いくつかの方法では、２５～３００μｇ／ｍｌである。代替として、ポリペプチドは、徐放性製剤として投与することができ、その場合、低頻度投与しか必要とされない。投与量および頻度は、患者におけるポリペプチドの半減期によって異なる。
【０３８７】
投与量および投与頻度は、治療が予防的または治療的であるかどうかによって異なり得る。予防的用途においては、本発明のポリペプチドまたは、そのカクテルを含有する組成物は、患者の耐性を強化するために、まだ病状を有さない患者に投与される。そのような量は、「予防的有効用量」と定義される。この使用において、ここでも、正確な量は、患者の健康状態および全身免疫に依存するが、概して、用量当たり０．１～２５ｍｇ、特に、用量当たり０．５～２．５ｍｇの範囲である。比較的低い投与量は、長期に渡って比較的頻繁ではない間隔で投与される。一部の患者は、一生治療を受け続ける。
【０３８８】
治療的用途においては、時として、比較的短い間隔での比較的高い投与量（例えば、用量当たり約１～４００ｍｇ／ｋｇの結合ポリペプチド、放射性免疫結合体に対してより一般的に使用される５～２５ｍｇの投与量、および細胞毒素－薬物修飾結合ポリペプチドに対するより高い用量）が、疾病の進行が低下または終了するまで、および好ましくは、患者が、疾病の症状の部分的または完全な改善を示すまで、必要とされる。その後、患者は、予防的に投与され得る。
【０３８９】
本発明のポリペプチドは、任意で、治療（例えば、予防的または治療的）を必要する疾患または病状を治療する際に有効である他の薬剤と組み合わせて、投与することができる。

【０３９０】
本発明の^{90}Ｙ標識修飾結合ポリペプチドの有効な１回の治療投与量（すなわち、治療上の有効量）は、約５～約７５ｍＣｉ、より好ましくは、約１０～約４０ｍＣｉの範囲である。^{131}Ｉ修飾抗体の有効な１回の治療の非骨髄破壊的投与量は、約５～約７０ｍＣｉ、より好ましくは、約５～約４０ｍＣｉの範囲である。^{131}Ｉ標識抗体の有効な１回の治療の破壊的投与量（すなわち、自己骨髄移植を必要とする可能性がある）は、約３０～約６００ｍＣｉ、より好ましくは、約５０～約５００ｍＣｉ未満の範囲である。キメラ抗体と併用する場合、マウス抗体と比較してより長い循環半減期のため、ヨウ素－１３１標識キメラ抗体の有効な１回の治療の非骨髄破壊的投与量は、約５～約４０ｍＣｉの範囲であり、より好ましくは約３０ｍＣｉ未満である。例えば、^{111}Ｉｎ標識の画像化基準は、通常、約５ｍＣｉ未満である。

【０３９１】
本発明のポリペプチドは、直上に記載されるように投与することができるが、他の実施形態においては、ポリペプチドは、一次治療として健康な患者にも投与することができることを強調しなければならない。そのような実施形態においては、ポリペプチドは、正常または平均的な赤色骨髄予備能を有する患者、および／または過去に受けていなく、現在受けていない患者に投与することができる。本明細書において使用されるように、補助療法と併用して、またはそれと組み合わせた本発明のポリペプチドの投与は、療法および開示される結合ポリペプチドの連続的、同時、同じような広がりでの（ｃｏｅｘｔｅｎｓｉｖｅ）、併用、付随、または同時期投与もしくは適用を意味する。当業者は、組み合わされた治療レジメンの様々な成分の投与および適用を、治療の全般的有効性を強化させるように時間調整することができることを認識する。例えば、化学療法剤または生物剤は、対象の結合分子と併用して治療の標準的、周知の治療方針で投与することができる。当業者（例えば、医師）は、選択された補助療法および本明細書の教示に基づいて、必要以上の実験をせずに有効な組み合わされた治療レジメンを容易に見定める。

【０３９２】
この点において、当然のことながら、治療的有用性を患者に提供するポリペプチドおよび薬剤の組み合わせは、任意の順序で任意の期間内に投与することができる。つまり、薬剤および結合ポリペプチドは、任意の順序で、または一斉に投与することができる。選択された実施形態においては、本発明のポリペプチドは、過去に化学療法を受けたことがある患者に投与する。さらに他の実施形態においては、結合ポリペプチドおよび化学療法は、本質的に同時または一斉に投与する。例えば、患者は、化学療法を受けている間に結合ポリペプチドを受けることができる。好ましい実施形態においては、結合ポリペプチドは、任意の薬剤または治療から１年以内に投与する。他の好ましい実施形態においては、結合ポリペプチドは、任意の薬剤または治療から１０、８、６、４、または２ヶ月以内に投与する。さらに他の好ましい実施形態においては、結合ポリペプチドは、任意の薬剤または治療から４、３、２、または１週間以内に投与する。さらに他の実施形態においては、結合ポリペプチドは、任意の選択された薬剤または治療から５、４、３、２、または１日以内に投与する。２つの薬剤または治療は、数時間または数分以内に（すなわち、実質上同時に）患者に投与することができることが認識される。

【０３９３】
本発明のポリペプチドは、体内での腫瘍性細胞の成長を排除、低減、阻害、または制御する任意の薬剤または複数の薬剤（例えば、組み合わせた治療レジメンを与えるため）と併用または組み合わせて使用することができることが、さらに認識される。本発明に適合する例示的な化学療法剤としては、アルキル化剤、ビンカアルカロイド（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）、プロカルバジン、メトトレキサートおよびプレドニゾンが挙げられる。４つの薬物を組み合わせであるＭＯＰＰ（メクレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ビンクリスチン（オンコビン）、プロカルバジンおよびプレドニゾン）は、様々な種類のリンパ腫を治療する際に非常に有効であり、本発明の好ましい実施形態を成す。ＭＯＰＰ耐性患者においては、ＡＢＶＤ（例えば、アドリアマイシン、ブレオマ

イシン、ビンブラスチン、およびダカルバジン）、ＣｈｌＶＰＰ（クロラムブシル、ビンブラスチン、プロカルバジン、およびプレドニゾン）、ＣＡＢＳ（ロムスチン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、およびストレプトゾトシン）、ＭＯＰＰ、さらにＡＢＶＤ、ＭＯＰＰ、さらにＡＢＶ（ドキソルビシン、ブレオマイシン、およびビンブラスチン）、またはＢＣＶＰＰ（カルムスチン、シクロホスファミド、ビンブラスチン、プロカルバジン、およびプレドニゾン）の組み合わせを使用することができる。ＨＡＲＲＩＳＯＮ’ＳＰＲＩＮＣＩＰＬＥＳ　ＯＦ　ＩＮＴＥＲＮＡＬ　ＭＥＤＩＣＩＮＥ　１７７４－１７７８（Ｋｕｒｔ　Ｊ．Ｉｓｓｅｌｂａｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ．，１３ｔｈｅｄ．１９９４）におけるＡｒｎｏｌｄ　Ｓ．Ｆｒｅｅｄｍａｎ　ａｎｄ　Ｌｅｅ　Ｍ．Ｎａｄｌｅｒ，Ｍａｌｉｇｎａｎｔ　Ｌｙｍｐｈｏｍａｓ、およびＶ．Ｔ．ＤｅＶｉｔａ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９７）、ならびに本明細書において挙げられる標準投薬および予定に関する参考文献。これらの療法は、本明細書において記載される本発明の１つまたはそれ以上のポリペプチドと組み合わせて、変更せずに、または特定の患者に対して必要であれば変化させて使用することができる。

【０３９４】

本発明との関係において有用な付加的なレジメンは、シクロホスファミドまたはクロラムブシル等の単一のアルキル化剤、またはＣＶＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチン、およびプレドニゾン）、ＣＨＯＰ（ＣＶＰおよびドキソルビシン）、Ｃ－ＭＯＰＰ（シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン、およびプロカルバジン）、ＣＡＰ－ＢＯＰ（ＣＨＯＰ、さらにプロカルバジンおよびブレオマイシン）、ｍ－ＢＡＣＯＤ（ＣＨＯＰ、さらにメトトレキサート、ブレオマイシン、およびロイコボリン）、ＰｒｏＭＡＣＥ－ＭＯＰＰ（プレドニゾン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、およびロイコボリン、さらに標準ＭＯＰＰ）、ＰｒｏＭＡＣＥ－ＣｙｔａＢＯＭ（プレドニゾン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、シタラビン、ブレオマイシン、ビンクリスチン、メトトレキサート、およびロイコボリン）、およびＭＡＣＯＰ－Ｂ（メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、固定用量プレドニゾン、ブレオマイシン、およびロイコボリン）等のまたは組み合わせの使用を含む。当業者は、これらのレジメンのそれぞれに対する標準的投与量および予定を容易に判断することができる。ＣＨＯＰも、ブレオマイシン、メトトレキサート、プロカルバジン、ナイトロジェンマスタード、シトシンアラビノシド、およびエトポシドと組み合わされている。他の適合性化学療法剤は、これらに限定されないが、２－クロロデオキシアデノシン（２－ＣＤＡ）、２’－デオキシコホルマイシン、およびフルダラビンを含む。

【０３９５】

緩和しないか、または再発する中悪性度および高悪性度のＮＨＬを有する患者に対して、救助療法が使用される。救助療法は、単独または組み合わせて与えられる、シトシンアラビノシド、カルボプラチン、シスプラチン、エトポシド、およびイホスファミド等の薬剤を使用する。腫瘍性疾患の再発または攻撃的型においては、次のプロトコルが、しばしば使用される。ＩＭＶＰ－１６（イホスファミド、メトトレキサート、およびエトポシド）、ＭＩＭＥ（メチル－ｇａｇ、イホスファミド、メトトレキサート、およびエトポシド）、ＤＨＡＰ（デキサメタゾン、高用量シタラビン、およびシスプラチン）、ＥＳＨＡＰ（エトポシド、チルプレドニゾロン、ＨＤシタラビン、シスプラチン）、ＣＥＰＰ（Ｂ）（シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニゾン、およびブレオマイシン）、およびＣＡＭＰ（ロムスチン、ミトキサントロン、シタラビン、およびプレドニゾン）であり、それぞれ、周知の投与速度および予定がある。

【０３９６】

一実施形態においては、本発明の結合ポリペプチドは、生物製剤と組み合わせて投与することができる。「生物製剤」または「生物剤」という用語は、医薬品としての使用を意図する、生体および／またはそれらの生成物から作製される任意の薬学的活性薬剤を指す。本発明の一実施形態においては、ｓｃＦｃを含む結合分子と組み合わせて使用すること

ができる生物剤は、これらに限定されないが、例えば、抗体、核酸分子、例えば、アンチセンス核酸分子、ポリペプチド、またはタンパク質を含む。そのような生物製剤は、例えば、結合分子の投与前に、結合分子と同時に、または結合分子の後に、生物剤の投与によって結合分子と組み合わせて投与することができる。

【０３９７】

本発明のポリペプチドと組み合わせて使用される薬剤の量は、対象によって異なり得るか、または当技術分野で周知のものに従って投与することができる。例えば、ＧＯＯＤＭＡＮ＆ＧＩＬＭＡＮ’Ｓ ＴＨＥ ＰＨＡＲＭＡＣＯＬＯＧＩＣＡＬ ＢＡＳＩＳ ＯＦ ＴＨＥＲＡＰＥＵＴＩＣＳ １２３３－１２８７（（Ｊｏｅｌ Ｇ．Ｈａｒｄｍａｎ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，９ｔｈ ｅｄ．１９９６）におけるＢｒｕｃｅ Ａ Ｃｈａｂｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｎｅｏｐｌａｓｔｉｃ Ａｇｅｎｔｓを参照。別の実施形態においては、標準的治療に一致するそのような薬剤の量が投与される。

【０３９８】

前述のように、本発明のポリペプチドは、哺乳類の疾患の体内治療に対して、薬学的有効量で投与することができる。この点において、当然のことながら、本発明のポリペプチドは、投与を容易にし、活性薬剤の安定性を促進するために形成することができる。好ましくは、本発明による医薬組成物は、生理食塩水、非毒性緩衝液、保存料等の薬学的に許容される非毒性滅菌担体を含む。本出願の目的に対して、治療薬に結合体化されているか、または結合体化されていない本発明のポリペプチドの薬学的有効量は、抗原への効果的な結合を得、例えば、疾病または疾患の症状を改善するか、または物質または細胞を検出するための利点を得るために十分な量を意味する。腫瘍細胞の場合、ポリペプチドは、好ましくは、腫瘍性または免疫反応性細胞上の選択された免疫反応性抗原と相互作用することが可能であり、それらの細胞死を増加させる。当然、本発明の医薬組成物は、ポリペプチドの薬学的有効量を提供するために、単回投与または複数回投与で投与することができる。

【０３９９】

本開示の範囲内に沿って、本発明のポリペプチドは、治療的または予防的効果を産生するために十分な量で、治療の前述の方法に従って、ヒトまたは他の動物に投与することができる。本発明のポリペプチドは、周知の手法に従って、ポリペプチドを従来の薬学的に許容される担体または希釈剤と組み合わせることによって調製される従来の剤形で、そのようなヒトまたは他の動物に投与することができる。薬学的に許容される担体または希釈剤の型および特性が、それが組み合わせされる活性成分の量、投与経路、および他の周知の変化するものによって左右されることは、当業者によって認識される。当業者は、本発明のポリペプチドの１つまたはそれ以上の種を含むカクテルが、特に有効であることが判明する可能性があることをさらに認識する。

【０４００】

本発明を、限定と見なされるべきではない以下の実施例によってさらに説明する。本明細書を通して引用されるすべての参考文献、特許、および公開特許出願の内容は、参照することにより、本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【０４０１】

実施例を通して、特に明記しない限り、以下の材料および方法を使用した。

【０４０２】

一般材料および方法

一般的に、本発明の実施は、特に示さない限り、化学、生物物理学、分子生物学、組み換えＤＮＡ技術、免疫学（特に、例えば、抗体テクノロジー）の従来の手法、および電気泳動における標準の手法を使用する。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ，ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）、Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌ

ａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ），５１０，Ｐａｕｌ，Ｓ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒ（１９９６）、Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ Ｓｅｒｉｅｓ、１６９），ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ，Ｅｄ．，Ｉｒｌ Ｐｒ（１９９６）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，Ｃ．Ｓ．Ｈ．Ｌ．Ｐｒｅｓｓ，Ｐｕｂ．（１９９９）、およびＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｅｄｓ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（１９９２）を参照。

【０４０３】

実施例１．ｓｃＦｃの発現および精製

遺伝的に融合したＦｃ領域（すなわち、一本鎖（ｓｃＦｃ）領域）を含むヒト５Ｃ８ＩｇＧ１抗体を、前述の方法に従って、ＤＧ４４ＣＨＯ細胞において発現させた。得られた組み換え発現した一本および二本鎖ｓｃＦｃタンパク質を親和性精製するために（概略図に関しては図１を参照）、ＣＨＯ細胞発酵培地（１Ｌ）をｐＨ７．０に調整し、タンパク質を、結合緩衝液（１００ｍＭのＮａＰＯ$_4$、ｐＨ７、１５０ｍＭのＮａＣｌ）において前もって平衡化させた５ｍｌのＨｉＴｒａｐ ｒＰｒｏｔｅｉｎＡ ＦＦカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）上で親和性捕捉した。カラムを、Ａ２８０トレースがベースラインに到達するまで、結合緩衝液で洗浄し、結合したタンパク質を、２５ｍＭのグリシン、ｐＨ２．８、１００ｍＭの塩化ナトリウムにおいて溶出した。画分は、０．１体積の１Ｍ Ｔｒｉｓ緩衝液、ｐＨ８を添加することによって直ちに中和した。Ａ２８０を吸収する画分中のタンパク質を、還元および非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析し、プールし、サイズ排除クロマトグラフィによるさらなる精製のために濃縮した。一本鎖（すなわち、単量体）ｓｃＦｃポリペプチドを、ＰＢＳ、ｐＨ７におけるＳｕｐｅｒｄｅｘ２００ゲルろ過カラム上で凝集体および二本鎖（すなわち、二量体）ｓｃＦｃポリペプチドから分離した。ゲルろ過画分を、還元および非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析し、適切な画分を組み合わせ、一本および二本鎖ｓｃＦｃ抗体集団の均質なプールを得た。これらのプールは、オンライン光散乱解析による分析ＳＥＣ（ＴＳＫ－Ｇｅｌ Ｇ３０００ＳＷ$_{XL}$カラム）によって、タンパク質の均質性および分子量を決定するために、さらに特性化した。無傷質量測定ならびに鎖間および鎖内ジスルフィド結合のマッピングを、非還元脱グリコシル化ｓｃ－およびｄｃ－Ｆｃプールに対して、質量分析によって作成した。

【０４０４】

図２Ａ～Ｄは、単量体（「ｓｃ」）および二量体（「ｄｃ」）ｓｃＦｃタンパク質を分離するための二段階精製工程の結果を示す。精製工程は、親和性クロマトグラフィ、その後、ゲルろ過クロマトグラフィを使用した。図２Ａは、プロテインＡ親和性カラムから低いｐＨで溶出されたカラム画分の吸光度プロファイルを示す。図２Ｂは、ｓｃＦｃ結合ポリペプチドの二量体（「ｄｃ」）および単量体（「ｓｃ」）型の両方を含有するそれらの溶出画分の対応するＳＤ－ＰＡＧＥ分析を示す。単量体および二量体型の両方は、プロテインＡカラムから本質的に単一ピークとして溶出した。図２Ｃは、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００ゲルろ過カラム溶離剤が、この混合物を２つの明確に異なるピークに分離することができることを示す。図２Ｄは、ゲルろ過溶出液の対応するＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。ピークは、ヒト５Ｃ８ｓｃＦｃＩｇＧ１抗体の精製された単量体（「ｓｃ」）および二量体（「ｄｃ」）型をそれぞれ表す。

【０４０５】

図３は、非還元（パネルＡ）および還元（パネルＢ）条件下、調製規模で、ｓｃＦｃ結合ポリペプチドの二量体（「ｄｃ」）および単量体（「ｓｃ」）型のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。各パネルに対して、レーン１および２は、それぞれの二量体型（「ｄｃ」、２０５ｋＤａ）および単量体（「ｓｃ」、１０５ｋＤａ）型をそれぞれ含有する。レーン３は、対照ヒト５Ｃ８ＩｇＧ１抗体（５Ｃ８、１５０ｋＤａ）を含有する。

【０４０６】

実施例２．単量体および二量体ｓｃＦｃ抗体の機能的相互作用を決定するためのアッセ

イ

（ａ）ｓｈＣＤ４０Ｌ結合アッセイ

単量体（「ｓｃ」）および二量体（「ｄｃ」）ｓｃＦｃ抗体の直接抗原結合を検出するために、可溶性ヒトＣＤ４０Ｌ（ＣＤ１５４）を、１ウェルにつき１００μＬのＰＢＳ、ｐＨ７中２μｇ／ｍｌで、Ｎｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ９６ウェルプレート上に４℃、ＯＮで被覆した。ＩｇＧ溶液を、プレートの外へ振り出し、ウェルを、１０ｍＭ　ＮａＰｉ、０．３６２Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０、０．１％カゼイン、５％ＦＢＳ、ｐＨ７を含有するブロッキング緩衝液（１ウェルにつき３００μＬ）において、室温で２時間ブロックした。プレートを空にし、ビオチン化ＷＴ５ｃ８ｈＩｇＧ１、ｓｃまたはｄｃ　ｓｃＦｃを、１ウェルにつき１００μＬのブロッキング緩衝液において、プレートを横切って、１：３で希釈した１μｇ／ｍｌから増量した。室温で２時間のインキュベーション後、プレートをＰＢＳ、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で４回洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジンをブロッキング緩衝液で１：１０，０００に希釈し、１ウェルにつき１００μＬを、結合ビオチン化ｓｃＦｃを検出するために、室温で１時間プレートに添加した。プレートを洗浄し、基質テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ、１ウェルにつき１００μＬ）の存在下において、約５分間、顕色（ｃｏｌｏｒ　ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ）を進行させた。反応を、１ウェルにつき１００μＬの０．５Ｍ H_2SO_4 を添加することによって停止し、４５０ｎｍでの吸光度を読み取った。図６は、単量体（「ｓｃ」）ｓｃＦｃ抗体、二量体（「ｄｃ」）ｓｃＦｃ抗体、および従来のＩｇＧ１抗体（Ｈｕ５Ｃ８）の抗原結合親和性を比較するＥＬＩＳＡ結合アッセイの結果を示す。

【０４０７】

抗原ＣＤ４０Ｌへの５ｃ８ＩｇＧ１二価ｍＡｂ、一価ＦａｂおよびＧ４Ｓ結合ヘミグリコシル化ｓｃＦｃの結合に対して、Ｂｉａｃｏｒｅによって測定された親和性および解離速度（ｏｆｆ－ｒａｔｅ）を決定するために、Ｂｉａｃｏｒｅ分析も行った（表２を参照）。その標的抗原に対するｓｃＦｃの親和性は、ｍＡｂより弱いが、Ｆａｂの親和性と同等であることが判明した。

【０４０８】

【表２】

分子	KD(pM)	kd (x10-4. s-1)
5C8 mAb	<46	0.8
5C8 F(ab)	560	4.5
5C8 scFc	200	3.6

（ｂ）ＦｃＲｎ結合ＥＬＩＳＡ

ヒトおよびラットＦｃＲｎへの直接結合を検出するために、野生型（ＷＴ）５Ｃ８ｈＩｇＧ１、ならびに単量体（「ｓｃ」）および二量体（「ｄｃ」）ｓｃＦｃ抗体を、ＰＢＳ、ｐＨ６中５μｇ／ｍｌで、Ｎｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ９６ウェルプレート上に４℃、ＯＮで被覆した。ＩｇＧ溶液をプレートの外へ振り出し、ウェルを、０．１Ｍリン酸ナトリウム、０．１Ｍ塩化ナトリウム、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０、および０．１％ゼラチン、ｐＨ６を含有するブロッキング緩衝液において、室温で２時間ブロックした。プレートをＰＢＳ、ｐＨ６において洗浄し、ブロッキング緩衝液中のビオチン化ヒトまたはラットＦｃＲｎ－Ｆｃを、１μｇ／ｍｌの開始濃度からプレートへ増量し、連続的に１：３に希釈した。室温で２時間のインキュベーション後、プレートをＰＢＳ、ｐＨ６で洗浄し、ブロッキング緩衝液で１：１０，０００に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジンを、結合ビオチン化ＦｃＲｎ－Ｆｃを検出するために、室温で１．５時間ウェルに添加した。プレートを洗浄し、基質テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）の存在下において、約１５分間、顕色を進行させた。反応を、０．５Ｍ H_2SO_4 を添加することによって停止し、プレートを４５０ｎｍで読み取った。

【０４０９】
図７は、ｓｃＦｃ結合ポリペプチドの二量体および単量体型のＦｃＲｎ結合親和性を、従来のＩｇＧ１抗体（Ｈｕ５Ｃ８）のＦｃＲｎ結合親和性と比較するＦｃＲｎ結合アッセイの結果を示す。ＦｃＲｎ結合は、ヒトおよびラットＦｃＲｎ－Ｆｃ構造体の両方のビオチン化型を使用して測定した。このアッセイにおいては、各Ｆｃ含有構造体をプレート上で被覆し、ビオチン化ラットまたはヒトＦｃＲｎ－Ｆｃ構造体の結合は、ストレプトアビジンＨＲＰで検出した。ヒトＦｃＲｎへの単量体ｓｃＦｃの結合（ラットＦｃＲｎへではない）に対する測定されたｃ値は、Ｈｕ５Ｃ８または二量体ｓｃＦｃ抗体の値の約４分の１であった。

【０４１０】
（ｃ）ＦｃγＲ結合アッセイ
ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）へのＷＴ５Ｃ８ｈＩｇＧ１抗体、ならびに単量体（「ｓｃ」）および二量体（「ｄｃ」）ｓｃＦｃ抗体の結合を、以前に説明されている細胞ベースの結合アッセイ（ｂｒｉｄｇｉｎｇ　ａｓｓａｙ）において測定した（Ｆｅｒｒａｎｔ　ＪＬ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２００４）。ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）結合アッセイは、被検抗体を捕捉するために１０μｇ／ｍｌのヒト組み換え可溶性ＣＤ４０Ｌ（ＣＤ１５４）で被覆した９６ウェルのＭａｘｉｓｏｒｂ　ＥＬＩＳＡプレート（Ｎａｌｇｅ－Ｎｕｎｃ、Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ、ＮＹ、ＵＳＡ）上で行った。被検抗体を、ウェルに１μｇ／ｍｌから増量し、プレートへ連続的に１：３に希釈した。蛍光標識ＣＤ６４$^{+}$ＣＤ３２$^{+}$Ｕ９３７細胞（ＡＴＣＣ）の抗体依存性結合をｅｘ．４８５ｎｍ／ｅｍ．５３０ｎｍで測定した。

【０４１１】
ＧＧＧＧＳ（「１×－Ｇ４Ｓ」）または（ＧＧＧＳ）３（「３×－Ｇ４Ｓ」）リンカーを含むｓｃＦｃ抗体の、Ｆｃγ受容体に結合する能力も、増幅ルミネッセンス近接ホモジニアスアッセイ（Ａｌｐｈａｓｃｒｅｅｎ（登録商標）、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）において評価した。ドナービーズのレーザー励起（６８０ｎｍ）は、アクセプタビーズにごく接近する場合、最終的に５２０～６２０ｎｍでの蛍光放射につながる事象のカスケード（ｃａｓｃａｓｅ）を開始する一重項酸素を生成する。リガンドおよび受容体タンパク質のそれぞれで修飾されるドナーおよびアクセプタビーズは、受容体およびリガンドが機能的に結合する場合に限り、所望の近傍へもたらされる。

【０４１２】
Ａｌｐｈａｓｃｒｅｅｎ（登録商標）アッセイは、被検抗体（ＷＴ　ＩｇＧ１またはｓｃＦｃ）の一連の希釈物が、９６ウェルの白色プレートにおいて、４℃で一晩、ヒトＦｃγＲＩＩＩ－ＧＳＴ（ＣＤ１６ａ、Ｖ１５８）および抗ＧＳＴアクセプタビーズと共にインキュベートした競合様式で行った。ストレプトアビジンドナービーズおよびビオチン化野生型ＩｇＧ１も、別々のチューブにおいて４℃で一晩インキュベートし、次の日にアッセイプレートに添加した。静かに振とうしながら室温で２時間インキュベートした後、プレートをＥｎｖｉｓｉｏｎ（登録商標）プレート読み取り器（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）で読み取った。完全グリコシル化ＷＴヒトＩｇＧ１と比較して、ヘミグリコシル化３×－および１×－Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃは、それぞれ、低親和性ヒトＦｃγＲＩＩＩの高親和性変異体（Ｖ１５８）の、約４分の１および５７分の１の親和性を有することが示された（図１４Ａを参照）。

【０４１３】
野生型ヒトＩｇＧ１抗体（５ｃ８）、およびＦｃγ受容体への有意に減弱した結合を示すと予期されるヒトＩｇＧ１の操作されたグリコシル化されていない変異体（「Ａｇｌｙ５ｃ８ｓｃＦｃ」）のＦｃγＲ結合活性に対する、ヘミグリコシル化または完全グリコシル化ｓｃＦｃポリペプチドのＦｃγＲ結合活性を評価するために、アルファスクリーンアッセイを行った。ヒトおよびカニクイザルＦｃγＲＩＩａ（ＣＤ３２ａ）、ＩＩｂ（ＣＤ３２ｂ）およびＩＩＩ（ＣＤ１６ａ）への結合を、このアッセイにおいて測定した。ヘミグリコシル化および完全グリコシル化３×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ変異体は両方とも、ＷＴ

ＩｇＧ１と同程度の見掛けの親和性で受容体に結合したが、ＦｃγＲＩＩＩへの１×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃの結合は、ＷＴ　ＩｇＧ１に対して測定された結合の約６０分の１であった（図１４Ｂを参照）。

【０４１４】

（ｄ）ヒトＣＤ４０Ｌを有するｓｃＦｃ抗体複合体のＳＥＣ－ＬＳ

一本鎖（「ｓｃ」、すなわち、単量体）または二本鎖（「ｄｃ」、すなわち、二量体）ｓｃＦｃ抗体および三量体リガンド、ＣＤ４０Ｌが、様々なモル比で混合される場合に形成される複合体の大きさおよび化学量論を決定するために、オンライン光散乱解析実験による非平衡分析ゲルろ過を設定した。これらの研究において、ＷＴヒトＩｇＧ１抗ヒトＣＤ４０ＬｍＡｂ（５Ｃ８）を対照分子として使用した。各ｓｃＦｃ抗体を、リガンドと混合し、結合部位のほぼ等モル比（１：１）、および三量体リガンドが３倍過剰に存在する比率（１：３）を得た。タンパク質を混合し、ＰＢＳ中の最終体積を作製し、４時間以上平衡化させた。可溶性ヒトＣＤ４０Ｌ濃度は、等モル結合部位を表す混合物に対して３μＭを保ち、３倍過剰なリガンドの結合部位を表す混合物へ６μＭで添加した。複合体は、０．６ｍｌ／分で４０μＬの体積におけるＴＳＫ－ＧＥＬ　Ｇ４０００ＳＷ$_{ＸＬ}$カラム（７．８ｍｍ×３０ｃｍ、Ｔｏｓｏｈ）上へ注入した。これらの研究に使用したＨＰＬＣシステム（Ｗａｔｅｒｓ２６９０）は、複合体の分子量および化学量論を容易に測定できるように、オンラインＵＶ光散乱解析（ＰＤ２０００ＤＬＳ、Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｄｅｔｅｃｔｏｒｓ）およびＲＩ検出器を装備した。

【０４１５】

図４Ａ～Ｂは、ホモ三量体ｓｈＣＤ４０Ｌ抗原に結合した一本鎖（「ｓｃ」）または二本鎖（「ｄｃ」）ｓｃＦｃ抗体の複合体の特性解析を示す。図４Ａは、各複合体の分子量を決定するために行ったＳＥＣ－ＬＳ実験に対して得られたサイズ排除クロマトグラムの合成図を示す。図４Ｂは、ｓｈＣＤ４０Ｌへのそれぞれ（ｉ）一本鎖（「ｓｃ」）および（ｉｉ）二本鎖（「ｄｃ」）ｓｃＦｃ抗体の結合時に形成された予測複合体の概略図、およびそれらの複合体の理論上の分子量を示す。

【０４１６】

図５は、一本鎖（「ｓｃ」）ｓｃＦｃ抗体または従来のヒトＩｇＧ１抗ＣＤ４０ＬｍＡｂ（５Ｃ８）のいずれかの存在下において形成されたｓｈＣＤ４０Ｌ含有複合体の比較を示す。各複合体の測定された分子量は各ピークの上部に示す。一本鎖（「ｓｃ」）ｓｃＦｃ、５Ｃ８、およびｓｈＣＤ４０Ｌの予測分子量は、それぞれ、１０５ｋＤａ、１５０ｋＤａ、および５１ｋＤａであった。

【０４１７】

実施例３．特定のポリペプチドリンカーを有するｓｃＦｃポリペプチドの発現の強化

特定のポリペプチドリンカーの使用は、一本鎖（すなわち、単量体）または二本鎖（すなわち、二量体）ｓｃＦｃ構造体のいずれかの優先的発現を選択するために使用することができる。図１２は、プロテインＡ親和性精製ｓｃＦｃ構造体の特性化を示し、これらの構造体は、それらのｓｃＦｃ領域の構成成分Ｆｃ部分の間に挿入される１×Ｇ４Ｓまたは３×Ｇ４Ｓリンカーのいずれかを含有する。１×Ｇ４Ｓ（図１２Ａ）および３×Ｇ４Ｓ（図１２Ｂ）ｓｃＦｃに対して得られたプロテインＡプールの調製規模のサイズ排除クロマトグラフィは、リンカー長さの増大と、単量体（「ｓｃ」）対二量体（「ｄｃ」）ｓｃＦｃとして示されるタンパク質パーセントとの間に明らかな相関を示す。溶出された物質中に含有されるｓｃ－およびｄｃ－ｓｃＦｃ集団は、指示された画分のＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。１×Ｇ４Ｓまたは３×Ｇ４Ｓリンカーのいずれかを含むプロテインＡ親和性精製ｓｃＦｃ構造体に対して得られた分析サイズ排除クロマトグラフィのトレースの重ね合わせも、１×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ構造体が、所望の単量体ｓｃＦｃ（「ｓｃ」）に加えて、相当量の二量体ｓｃＦｃポリペプチド（「ｄｃ」）を有する混合集団を含むが、３×Ｇ４Ｓリンカー構造体は、単量体ｓｃＦｃ集団が有意に豊富であることを示す（図１２Ｃｉおよびｉｉ）。二段階精製プロトコルの後に得られた１×および３×Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃタンパク質の分析ＳＥＣ－ＬＳ分析は、両方のｓｃＦｃタンパク質が、均質にまで

調製することができ、調製物は、予期された分子量（１００ｋＤａ）の物質を含むことを示す。したがって、１×Ｇ４Ｓリンカーによって遺伝的に融合したＦｃ部分を含むｓｃＦｃポリペプチドは、所望の一本鎖（「ｓｃ」）ｓｃＦｃポリペプチドに加えて、相当量の二本鎖（「ｄｃ」）ｓｃＦｃポリペプチドを有する分子の混合集団を含む。対照的に、３×－Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃ構造体は、一本鎖（「ｓｃ」）ｓｃＦｃポリペプチド集団が有意に豊富である。

【０４１８】

実施例４．ｓｃＦｃポリペプチドの薬物動態（ＰＫ）特性の決定

ＷＴヒトＩｇＧ１（５Ｃ８）、ならびに１×－および３×－Ｇ４Ｓリンカーを含むｓｃＦｃの終末半減期を、ラットにおいて測定した。各構造体は、ｐＨ７のＰＢＳ中２．５ｍｇ／ｋｇで３匹の動物に静脈投与した。血清サンプルは、所定の時点で採取し、分析のために－８０℃で凍結保存した。各構造体の血清濃度についての時間経過は、ＥＬＩＳＡで決定した。簡潔に述べると、組み換え可溶性ヒトＣＤ４０Ｌ（ＣＤ１５４）を、ＰＢＳ、ｐＨ７中５μｇ／ｍｌで、Ｎｕｎｃ　ＭａｘｉＳｏｒｐ（登録商標）９６ウェルプレート上に、４℃、ＯＮで被覆した。プレートを、ブロッキング緩衝液（１０ｍＭ　ＰＢＳ、ｐＨ７中の１％カゼイン加水分解物、ＲＴで２時間、３００μＬ／ウェル）でブロックした。様々な時点で得られた血清サンプルの一連の希釈物を、１０ｍＭ　ＰＢＳ、ｐＨ７、０．３６２Ｍ　ＮａＣｌ、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０、０．１％カゼイン、５％ＦＢＳ中で調製し、室温で２時間、適切なウェルに加えた。プレートを、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳで４回洗浄し、捕捉したＩｇＧおよびｓｃＦｃポリペプチドを、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化ロバ抗ヒトＩｇＧ二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ　７０９－０３５－１４９）と共に２時間インキュベートした後、４５０ｎｍで検出した。ＷＴおよびｓｃＦｃポリペプチドの血清濃度における時間依存的な変化は、ＷｉｎＮｏｎＬｉｎ（登録商標）ソフトウェアパッケージを使用して分析した。ＷＴヒトＩｇＧ１および３×－Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃポリペプチドは、それぞれ、１４日および１２日の同様のβ相半減期を示した。１×－Ｇ４Ｓ結合ｓｃＦｃの半減期は、４．２日であり、ＷＴｍＡｂより有意に短い（図１３を参照）。

【０４１９】

実施例５．ヘミグリコシル化ｓｃＦｃポリペプチドの調製

本発明の例示的なｓｃＦｃポリペプチドは、そのｓｃＦｃ領域の２つのＦｃ部分の１つに単一のグリカンを有する３×Ｇ４Ｓ結合ヘミグリコシル化５ｃ８ｓｃＦｃポリペプチドである。ヘミグリコシル化が生じたことを確認するために、ｓｃＦｃポリペプチドを、ヘミグリカンの酵素的除去の前後の両方にデコンボリューション処理をした質量分析（ＭＳ）に供した。図１５は、タンパク質のＰＮＧａｓｅＦ脱グリコシル化前後に得られたデコンボリューション処理をした質量スペクトルを示す。ｓｃＦｃポリペプチドの脱グリコシル化（および還元）重および軽鎖に対して測定された質量は、それぞれ、７５，７０３Ｄａおよび２３，８５４Ｄａである。したがって、無傷脱グリコシル化分子は、９９，５５７Ｄａの質量を有するはずであり、それは、計算された質量の１００ｋＤａと良い一致を示す。したがって、脱グリコシル化ｓｃＦｃポリペプチドの分子量は、ヘミグリコシル化と一致する。

【０４２０】

実施例６．ｓｃＦｃポリペプチドの生物物理学的解析

本発明のｓｃＦｃポリペプチドは、好ましくは、従来のポリペプチドと同程度の生物物理学的特性（例えば、熱安定性）を有する。５ｃ８ｓｃＦｃポリペプチドの熱安定性を、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）によって、ＷＴ　ｈｕＩｇＧ１ｍＡｂおよびＦｃの熱安定性と比較した。ｓｃＦｃのＦａｂおよびＣＨ３ドメインについての融解曲線は、ＩｇＧ１のｍＡｂおよびＦｃ断片に対して得られるものと十分一致することが判明した（図１６を参照）。特に、ヘミグリコシル化ｓｃＦｃ（ＡＳＫ０４３）のＣＨ２ドメインは、グリコシル化されていないＩｇＧ１のものと同様のＴｍを有するが（それぞれ、６１．９℃対６１℃）、完全グリコシル化ｓｃＦｃ（ＡＳＫ０４８）は、ＷＴ　ＩｇＧ１のＣＨ２ドメイン

に対して測定されたものと同程度の改善された安定性を有する。

【０４２１】

実施例７．改善された可溶性を有する抗ＬＩＮＧＯｓｃＦｃ抗体

ＬＩＮＧＯ－１は、ＮｇＲ１／ｐ７５およびＮｇＲ１／ＴＡＪ（ＴＲＯＹ）と合わせて、ミエリン阻害剤に結合するシグナル伝達複合体を形成し、軸索成長を媒介するＣＮＳ特異的な膜関連糖タンパク質である。ＬＩＮＧＯ－１結合に拮抗する可溶性ＬＩＮＧＯ－１（ＬＩＮＧＯ－１－Ｆｃ）は、脊髄路損傷モデルにおいて機能回復を有意に改善することができる。

【０４２２】

いくつかの抗ＬＩＮＧＯｓｃＦｃ抗体を、本発明の方法に従って合成した。例示的な抗ＬＩＮＧＯ抗体（ＥＡＧ２１４８）の重鎖のアミノ酸およびヌクレオチド配列を図３２、３３、および図３５～３８に示す。各抗体の軽鎖のアミノ酸およびヌクレオチド配列を図３４に示す。図３９は、分析ＳＥＣ（Ａ＆Ｂ）および超遠心分離法（Ｃ）によって決定された抗Ｌｉｎｇｏ　ｓｃＦｃ抗体分子のタンパク質濃度依存性溶解度特性の分析を示す。抗ＬＩＮＧＯヒトＩｇＧ１抗体であるＬｉ３３は、凝集しやすいため、より可溶性の高いヒトＩｇＧ２型が生成された。しかしながら、より可溶性の高いＩｇＧ２構造体（Ｂ）との比較においても、１×Ｇ４Ｓ結合ヘミグリコシル化Ｌｉ３３ｓｃＦｃ（Ａ）は、有意に良好な溶解度特性を示す。なぜなら、タンパク質濃度の増加によって、濃度曲線下面積が、ＩｇＧ２単量体ピークに関して低下するが、ｓｃＦｃに関しては低下しないからである。（Ｃ）０．７ｍｇ／ｍｌでの２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ８における抗ＬＩＮＧＯＬｉ３３ｓｃＦｃの均質性を、沈降速度測定を使用する分析超遠心分離法によって評価した。わずかに１％の凝集した物質が、この濃度のＬｉ３３ｓｃＦｃ調製物において検出可能だったが、ＰＢＳ、ｐＨ７中、０．３ｍｇ／ｍｌもの低濃度のＬｉ３３ＩｇＧ２ｍＡｂ調製物は、４％～１６％の凝集タンパク質を含んだ。

【０４２３】

実施例８．抗ＣＤ２ｓｃＦｃ抗体

ＣＤ２は、ある種の自己免疫疾患（例えば、移植片対宿主病、乾癬、腎移植）およびＴ細胞癌（例えば、非ホジキンリンパ腫）を含む、多数のＴ細胞関連疾患に関連する、Ｔ細胞およびナチュラルキラー（ＮＫ）細胞上で見られる腫瘍関連の汎Ｔ細胞抗原である。例示的な抗ＣＤ２ｓｃＦｃ抗体を、本発明の方法に従って合成することができる。ｃｈＣＢ６は、ヒトＣＤ２特異性キメラモノクローナル抗体（ＩｇＧ１、カッパ）である。３×Ｇ４Ｓ、４×Ｇ４Ｓ、５×Ｇ４Ｓ、または６×Ｇ４Ｓリンカーを含む完全グリコシル化ｃｈＣＢ６キメラｓｃＦｃ抗体を、本発明に従って合成した。例示的な重鎖アミノ酸およびヌクレオチド配列を図４０～４７に示す。

【０４２４】

実施例９．抗ＬＴβＲｓｃＦｃ抗体

リンホトキシンβ受容体（ＬＴβＲ）は、受容体の腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）ファミリーのメンバであり、アポトーシスおよび癌に関係付けられている。例示的な抗ＬＴβＲｓｃＦｃ抗体を、本発明の方法に従って合成することができる。例えば、ＢＤＡ８の結合部位は、本発明のｓｃＦｃ領域と融合することができる。ＢＤＡ８抗体の例示的な重鎖アミノ酸およびヌクレオチド配列を図６４に示す。

【０４２５】

実施例１０．ＧＦＲα３：ｓｃＦｃ融合ポリペプチド

ＧＦＲα３は、グリア由来の神経栄養因子（ＧＤＮＦ）受容体のファミリーのメンバである。それらの生理学的役割のため、可溶性神経栄養因子は、様々な神経変性病において生じる神経細胞の変性および分化した機能の損失を治療する際に有用であり得る。例えば、リガンド結合、好ましくは、ＧＤＮＦ結合、および受容体シグナル伝達機能（Ｒｅｔ受容体チロシンキナーゼを介して）の両方を保持する可溶性ＧＤＮＦＲαは、ニューロンまたは他の細胞に対するＧＤＮＦＲα－リガンド（好ましくは、ＧＤＮＦ）反応性を与えるか、修復するか、または強化するために使用することができる。

【０４２６】
例示的なＧＦＲα３：ｓｃＦｃ融合タンパク質（ＡＳＫ０５７）を、本発明の方法に従って合成した。ＡＳＫ０５７のアミノ酸およびヌクレオチド配列を図４８および図４９に示す。図５０は、融合タンパク質の発現後の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよび分析的ＳＥＣ－ＬＳ特性化を示す。プロテインＡカラムから溶出した物質をプールし（Ｌ）、単量体（ｓｃ）および二量体（ｄｃ）ｓｃＦｃ集団（ゲルのレーン１）の分離のために、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００ゲルろ過カラム上にロードし、レーン２における分子量基準が続いた（Ｍ）。ＧＦＲα３：ｓｃＦｃに関してプールしたＳＥＣ画分は、２本の点線の間に囲まれる。二段階精製後に得られたＧＦＲα３：ｓｃＦｃのＳＥＣ－ＬＳ分析は、１１４．８ｋＤａの分子量を有する均質な調製物を示した。ホモ二量体ニューブラスチンへのＧＦＲα３：ｓｃＦｃ結合の化学量論は、溶液相Ｂｉａｃｏｒｅ実験によって、２ＧＦＲα３：ｓｃＦｃ：１ニューブラスチン二量体であることが決定された。

【０４２７】
実施例１１．ＩＦＮ－β：ｓｃＦｃ融合ポリペプチド
インターフェロンベーター１ａ（例えば、ＡＶＯＮＥＸ（登録商標））は、多発性硬化症の治療に有用である。例示的なＩＦＮ－β：ｓｃＦｃイムノアドヘシン（ＥＡＧ２１４９）を、本発明の方法に従って合成した。ＥＡＧ２１４９分子は、１×Ｇ４Ｓリンカーを含有し、ヘミグリコシル化を促進するために修飾した。ＡＳＫ０５７のアミノ酸およびヌクレオチド配列を図５１および図５２に示す。

【０４２８】
実施例１２．ＬＴβＲ：ｓｃＦｃ融合ポリペプチド
例示的なＬＴβＲ：ｓｃＦｃイムノアドヘシン（ＥＡＧ２１９０およびＥＡＧ２１９１）を、本発明の方法に従って合成した。ＥＡＧ２１９０分子は、３×Ｇ４Ｓリンカーを含有し、ヘミグリコシル化を促進するために修飾した。これらの分子のアミノ酸およびヌクレオチド配列を図５３～５６に示す。精製されたＬＴβＲ：ｓｃＦｃ融合タンパク質の４～１２％勾配ＳＤＳ－ＰＡＧＥを行い、ＤＬＩ３３ｓｃＦｃについて予期された分子量である７５ｋＤに対応する単一のバンドが明らかとなった。精製タンパク質の分析的ゲルろ過を、０．５ｍＬ／分で２０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．２、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ（ＰＢＳ）におけるＰｈｅｎｏｍｏｎｅｘ　Ｂｉｏｓｅｐ－Ｓ－３０００カラム上で行った。溶離剤は、２８０ｎＭでモニタした。その後、精製されたＬＴβＲ：ｓｃＦｃを、均質性および公知のリガンドＬＴα１β２への結合活性について特性化した。精製ＬＴβＲｓｃＦｃの還元および非還元ＳＤＳ　ＰＡＧＥを図５７Ａに示す。分析的サイズ排除クロマトグラフィは、精製ＬＴβＲ：ｓｃＦｃに対して高い均質性の単一ピークを示す（図５７Ｂ）。

【０４２９】
ＬＴβＲ：ｓｃＦｃを、ＤＴＴでの還元および室温での１２時間のインキュベーションによるＰＮＧａｓｅＦでの脱グリコシル化の後、ＬＣＺ質量分析計での質量分析によって分析した（図５８を参照）。還元Ｎ－脱グリコシル化分子の質量分析は、理論上の分子量である７３，８４４．５が、測定値である７３，８４６と一致することを示した。Ｎ末端タンパク質分解異質性が、発現ＬＴβＲ：ｓｃＦｃの最初の４つのアミノ酸において見られ、Ｎ－１およびＮ－３成分の両方の第１の残基は、ピログルタミン酸である。低レベルのＯ－グリコシル化が、質量分析において、７４７２６および７４８２０におけるピークに反映されて見られた。

【０４３０】
図５９Ａは、ＬＴα１β２への単量体ＬＴβＲ：ｓｃＦｃの結合親和性を評価するＥＬＩＳＡの結果を示す。ＥＬＩＳＡプレートを、ＰＢＳ中の５μｇ／ｍｌのＬＴα１β２で、４℃で一晩被覆した。その後、プレートを、１０ｍＭ　ＰＢＳ、ｐＨ７．０中の１％カゼインでブロックし、１０ｍＭ　ＰＢＳ、ｐＨ７．０、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０（洗浄緩衝液）で３回洗浄した。ＬＴβＲ：ＩｇＧまたはＬＴＢβ：ｓｃＦｃを連続的に１０ｍＭ　ＰＢＳ、３６２ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０５５Ｔｗｅｅｎ－２０、０．１％カゼイン、５

％ＦＢＳ、ｐＨ７．０（アッセイ希釈剤）で希釈し、１時間インキュベートし、その後、洗浄緩衝液で洗浄した。各ウェルに、６０分間アッセイ希釈剤において１：５０００で希釈したロバ抗ヒト重および軽特異的ＨＲＰ（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｓ）結合体化二次抗体を添加し、その後、ＰＢＳで洗浄した。ＨＲＰは、数分後、１００ｍＭ　酢酸Ｎａ、ｐＨ４．０中のテトラメチルベンジジンおよび過酸化水素を使用して顕色させ、アッセイを、１００μＬの１Ｎ硫酸を添加することによって停止し、サンプル吸光度を４５０ｎＭで読み出した。ＥＬＩＳＡ分析は、ＬＴβＲ：ｓｃＦｃが、ＬＴβＲ：ＩｇＧと比較して低下した結合親和性を有することを示す。この結果は、二量体ＬＴβＲ：ＩｇＧに対して、単量体ＬＴβＲ：ｓｃＦｃの結合力の低下を反映する。二量体ＬＴβＲＩｇＧのＫｄ値（＜０．１０ｎＭ）および単量体ＬＴβＲのＫｄ値（４０ｎＭ）は、４００倍を超えて異なることが以前に示された（Ｅｌｄｒｅｄｇｅ，Ｂｅｒｋｏｗｉｔｚ　ｅｔ　ａｌ．２００６）。

【０４３１】

単量体ＬＴβＲ：ｓｃＦｃの結合親和性も、ＦＡＣＳ分析によって評価した（図５９Ｂ）。ＦＡＣＳは、Ｅｌｄｒｅｄｇｅ　ｅｔ　ａｌ．の方法に従って、ＩＩ－２３細胞に対して行った（Ｅｌｄｒｅｄｇｅ，Ｂｅｒｋｏｗｉｔｚ　ｅｔ　ａｌ．２００６）。フローサイトメトリを使用するＦＡＣＳ結合アッセイを、前述の方法に従って行った（Ｆｏｒｃｅ，Ｗａｌｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．１９９５）。簡潔に述べると、直接結合アッセイにおいては、ヒトＬＴα１β２は、ＬＴβＲＩｇＧまたはビオチン化ＬＴβＲＩｇＧ（ｂＬＴβＲＩｇＧ）のいずれかの様々な濃度を有するＦＡＣＳ緩衝液中の酢酸ミリスチン酸ホルボール活性化ＩＩ－２３細胞（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）上で検出された。細胞は、１～２時間、氷上でインキュベートし、その後、ＰＢＳで洗浄し、遠心分離器にかけた。ＦＡＣＳ緩衝液において二次的に標識化した適切なストレプトアビジンフィコエリトリンまたは抗ｈＦｃフィコエリトリン（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ、Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）を添加し、さらに１時間細胞と共にインキュベートし、再度洗浄した。ＩＩ－２３細胞上の細胞結合ＬＴβＲＩｇＧの蛍光染色を、ＦＡＣＳによる平均チャネル蛍光を測定することによって定量化した。ＦＡＣＳおよびＥＬＩＳＡは両方とも、ＬＴβＲｓｃＦｃが、ＬＴβＲＩｇＧと比較して低下した結合親和性を有することを示した。この結果は、単量体タンパク質がＬＴβＲＩｇＧの結合力を欠くため、予期されたものである。二量体ＬＴβＲＩｇＧのＫｄ値（＜０．１０ｎＭ）および単量体ＬＴβＲのＫｄ値（４０ｎＭ）は、４００倍を超えて異なることが以前に示された（Ｅｌｄｒｅｄｇｅ，Ｂｅｒｋｏｗｉｔｚ　ｅｔ　ａｌ．２００６）。

【図１】

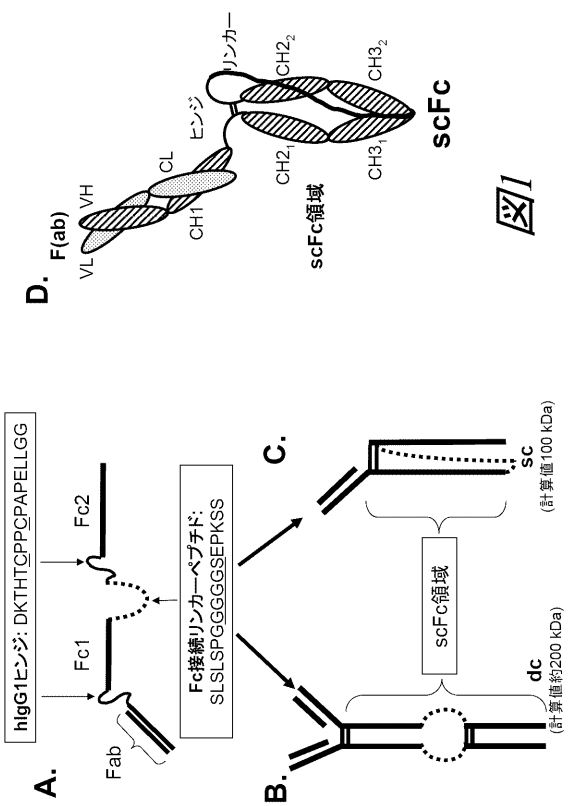


図1

【図２Ａ】

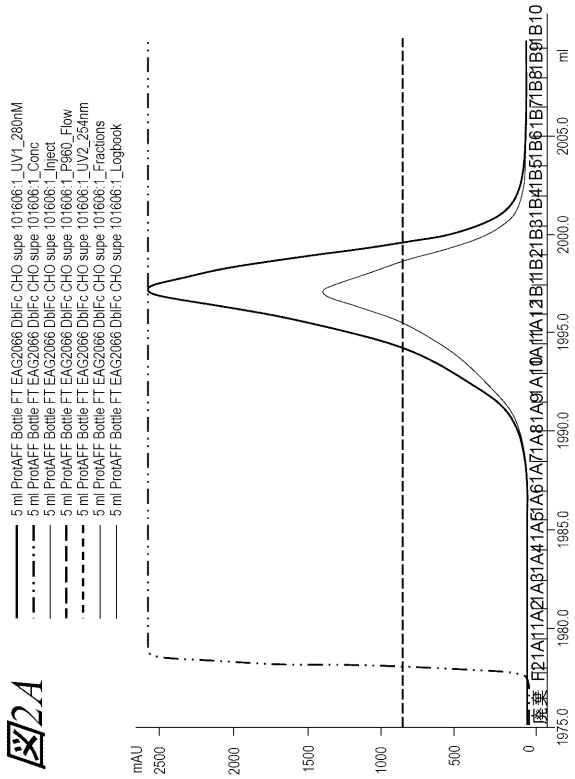


図2A

【図２Ｂ】

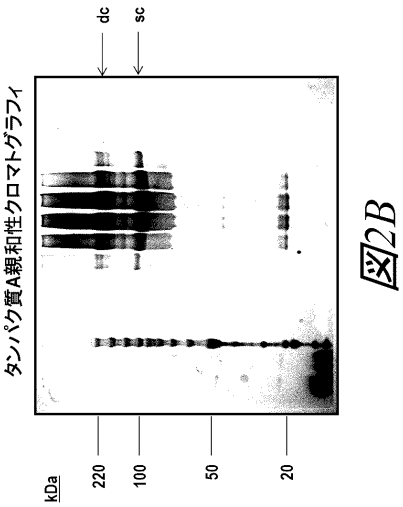


図2B

【図２Ｃ】

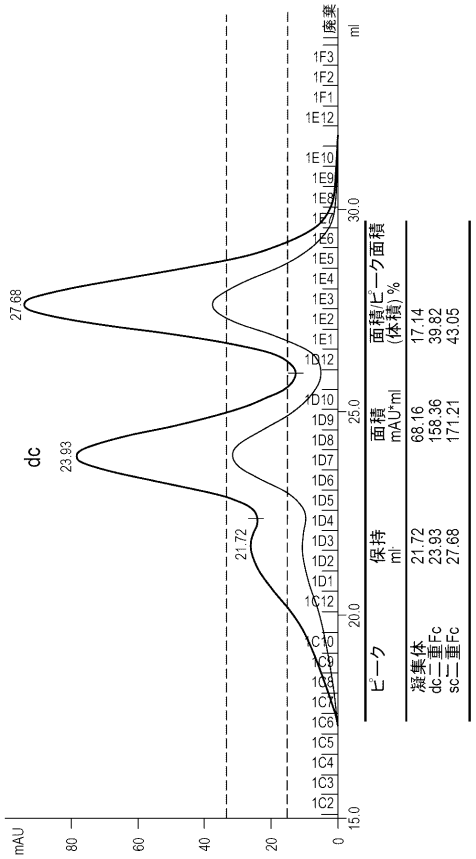


図2C

【図２Ｄ】

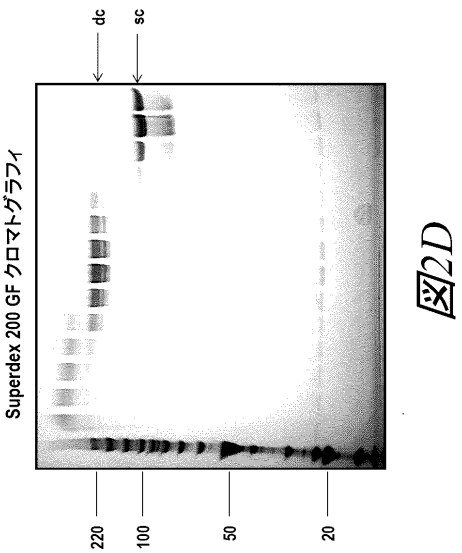


図2D

【図３】

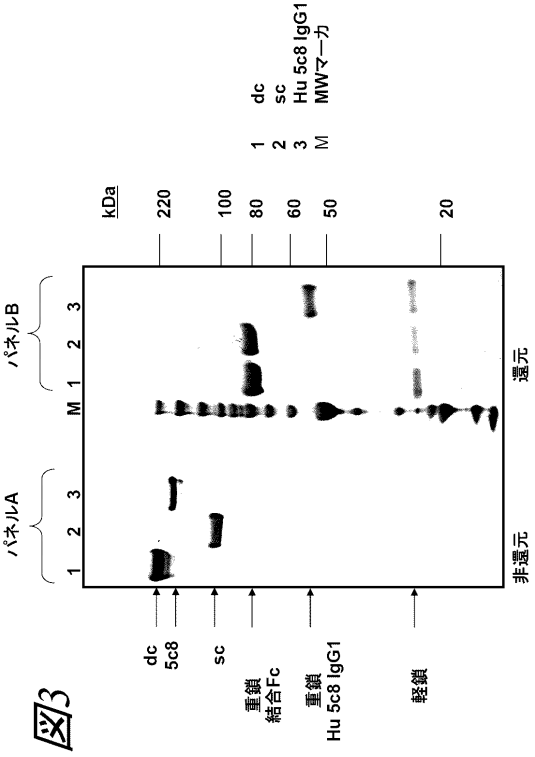


図3

【図４】

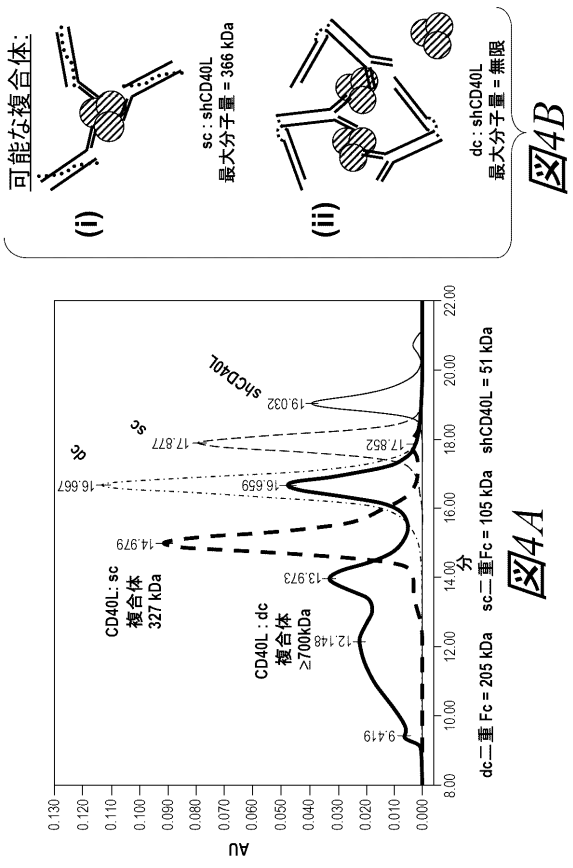


図4A

図4B

【図５】

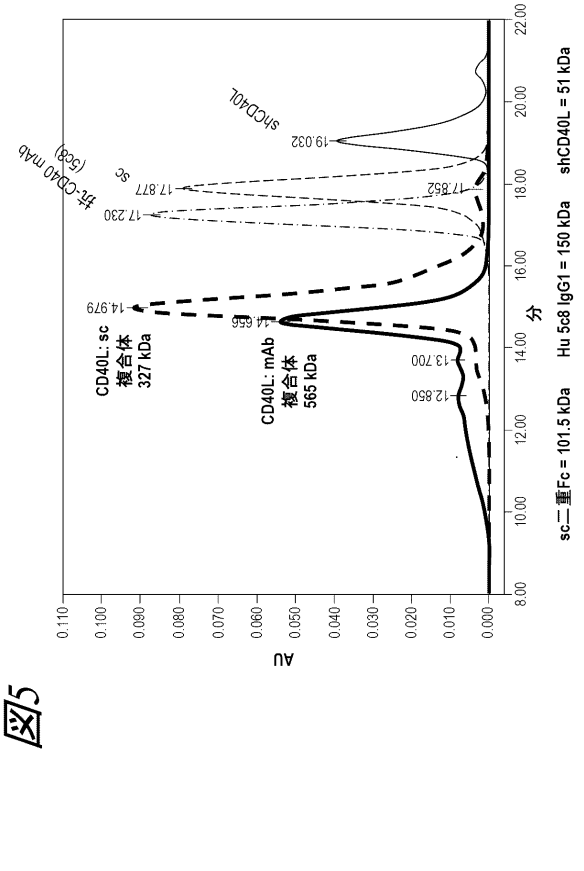


図5

【図６】

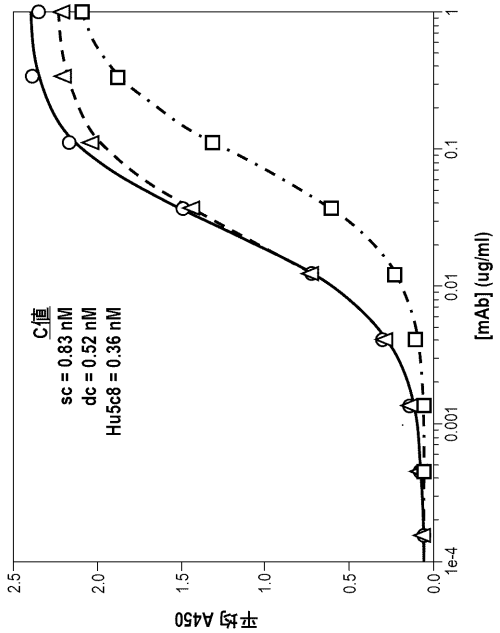


図6

【図７Ａ】

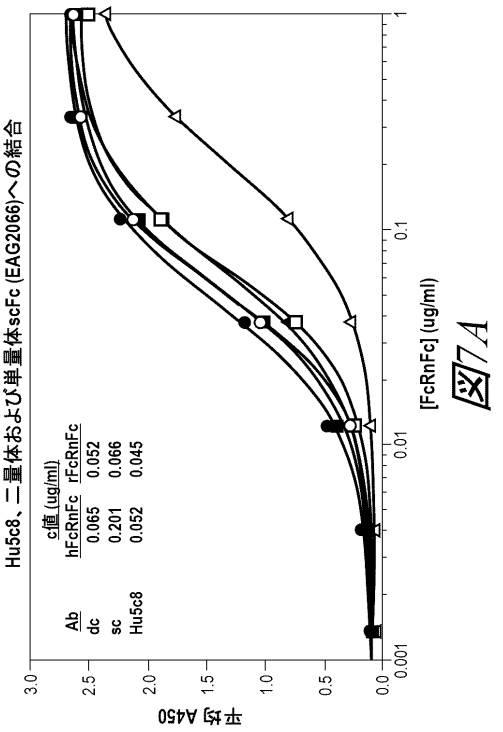


図7A

【図７Ｂ】

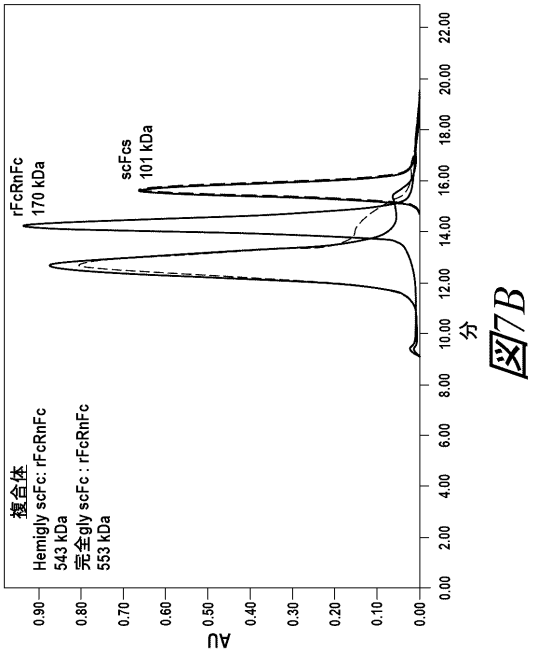


図7B

【図１０】

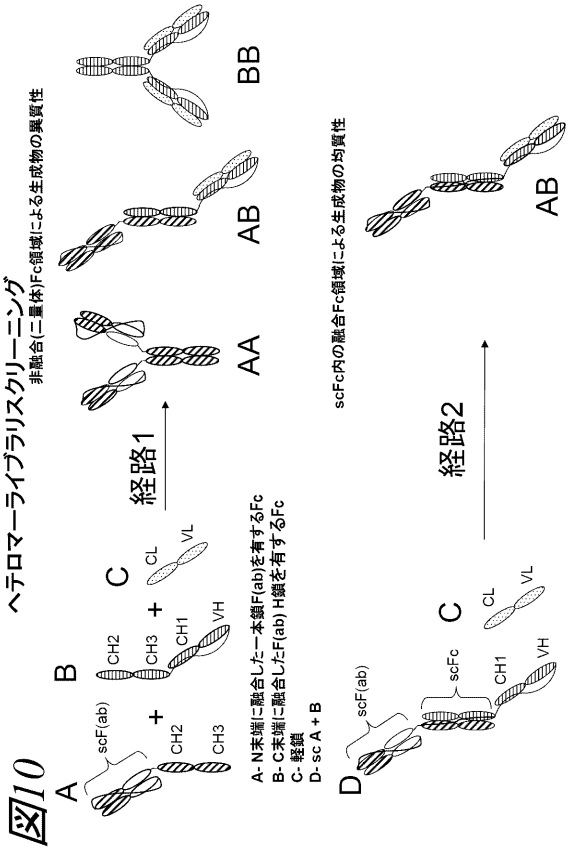


図10

【図１１】

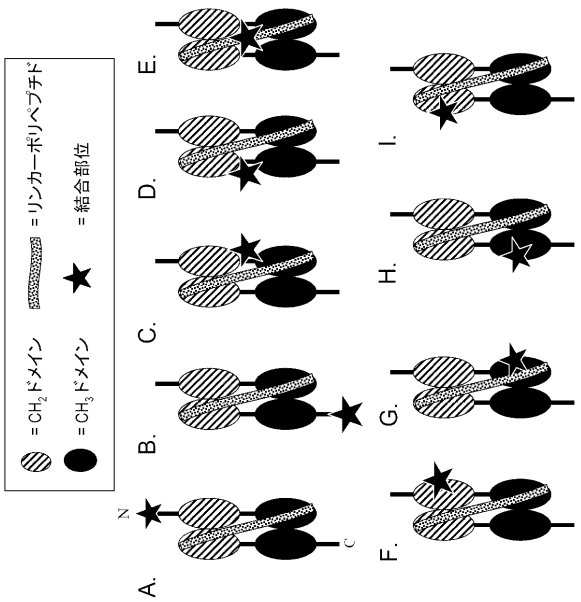


図11

【図１２Ａ】

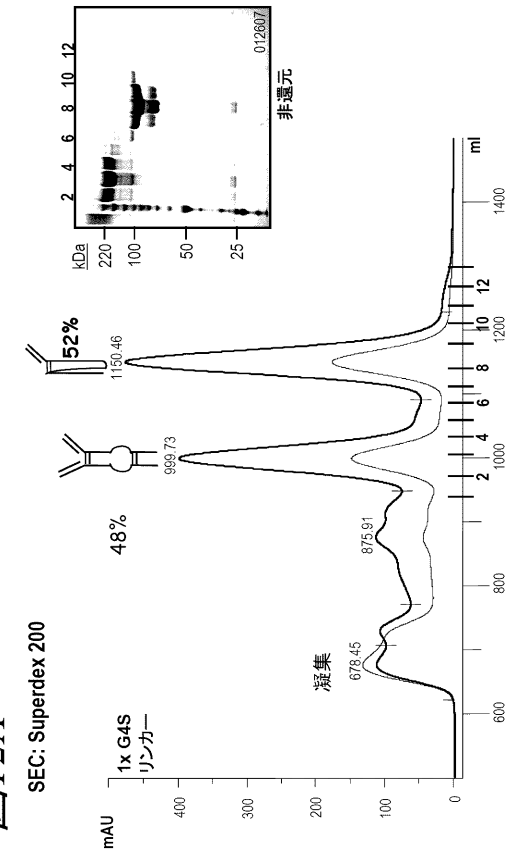


図12A

【図１２Ｂ】

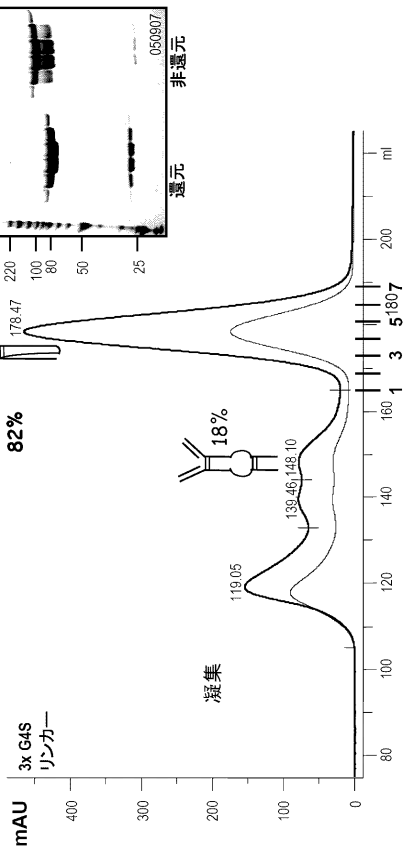


図12B

【図１２Ｃ】

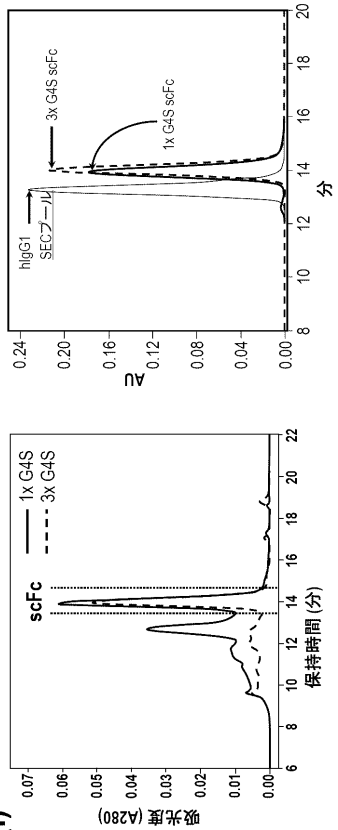


図12C

【図１３】

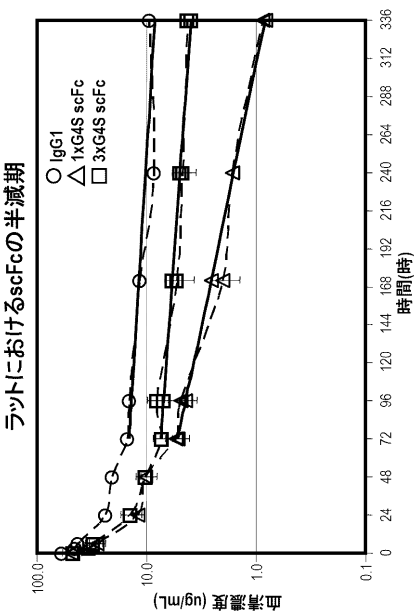


図13

mAb	$t_{1/2}$ (d)	$C_{最大}$ (ug/ml)	$AUC_{最終}$ (hr.ug/ml)
IgG1	14	59.6	4699
1x G4S scFc	4	48.4	1614
3x G4S scFc	12	46.5	2533

【図１４】

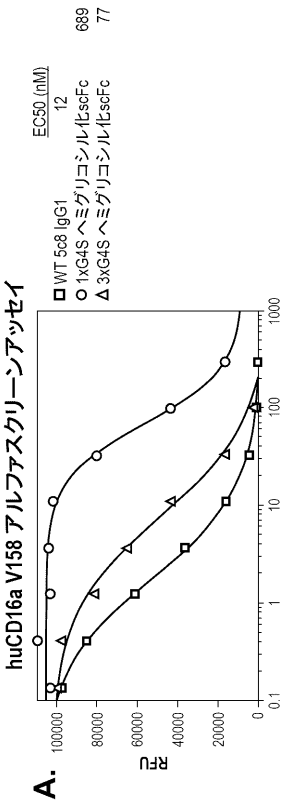


図14

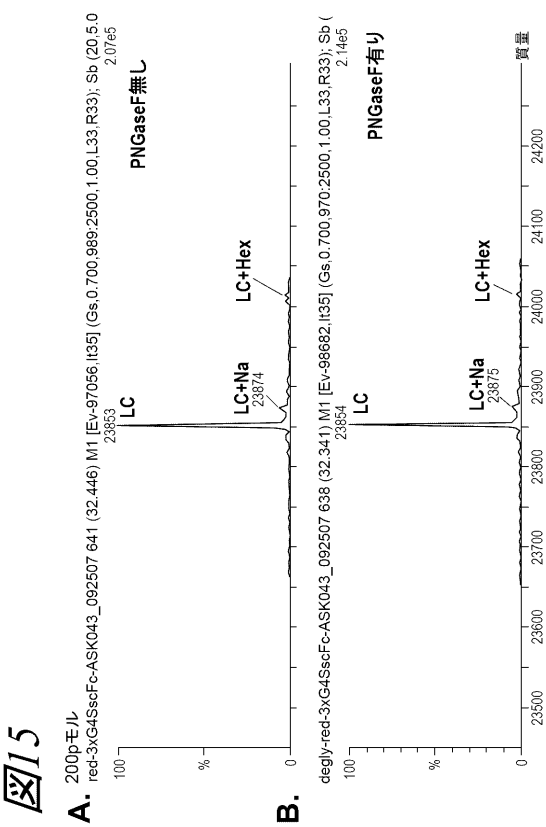
B.

	ヒトFc CD32a (R)	γR, EC50 (nM) CD32b	CD16a	カニクイザル Fc γR, EC50 (nM) CD32a (R)	CD32b	CD16a
WT 5c8 IgG1	511	292	22	359	52	37
Agly 5c8 IgG1	WB	WB	1843	1166	WB	2315
へミグリコシル化5c8 scFc	949	552	59	221	72	89
完全グリコシル化5c8 scFc	304	183	18	206	17	32

EC50 (nM): 12, 689, 77

WB: 弱結合、検出限界を下回る

【図１５－１】



【図１５－２】

【図１８】

図18

ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTCTGCTTGCTGGCTGTAGCACCAGGTGCCCACTCCCAGGTCCAACTGGTGCAGTCAG
GGGCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCACCAGTTATTATAT
GTACTGGGTGAAGCAGGCGCCCGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAGCAATGGTGATACTAACTTC
AATGAGAAGTTCAAGAGTAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCGCCAGCACAGCATACATGGAGCTCAGCAGCCTGA
GGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTACAAGATCGGACGGTAGAAATGATATGGACTCCTGGGGCCAAGGGACCCT
GGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA
GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG
CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
AAATCTTGTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA
CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
CACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTGGAGGTGGCGGATCCGAGCCCAAA
TCTTCTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCGCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT
CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC
CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCT
CCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA

(pEAG2066、配列番号4)

【図１９】

図19

A.

```
1   DIVLTQSPAT LSVSPGERAT ISCRASQRVS SSTYSYMHWY QQKPGQPPKL
51  LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SVEPEDFATY YCQHSWEIPP
101 TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
151 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV
201 THQGLSSPVT KSFNRGEC
```

(pEAG2027、配列番号5)

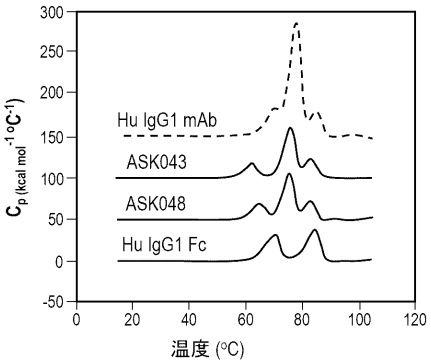
B.

ATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGG
TGACATTGTACTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTGTATCTCCGGGAGAGAGGGCCA
CCATCTCATGCAGGGCCAGCCAACGTGTCAGTTCATCTACCTATAGTTATATGCACTGG
TACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCAAGTATGCATCCAACCTAGA
ATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACTGACTTCACCCTCACCA
TCTCTTCTGTGGAGCCGGAGGATTTTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATT
CCTCCGACGTTCggtggagggaccaagctggagatcaaacgaactgtggctgcaccatc
tgtcttcatcttccCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGT
GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC
CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA
CAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAgggga
gagtgttag

(pEAG2027、配列番号6)

【図１６】

図16



試料	T_M (ΔH_{cal}:ΔH_{vH}) C_H2	T_M (ΔH_{cal}:ΔH_{vH}) C_H3	T_M (ΔH_{cal}:ΔH_{vH}) Fab
FcG1 (WT、グリコシル)	69.9 (235:115)	84.2 (225:170)	-
5C8 IgG1	70.1 (200:170)	85.2 (115:255)	77.4 (720:180)
ASK043 1回目	62.2 (105:120)	83.5 (105:210)	75.8 (340:170)
ASK043 2回目	61.6 (105:125)	83.2 (95:225)	75.3 (330:170)
ASK048 1回目	64.8 (135:125)	82.9 (100:220)	75.2 (310:175)
ASK048 2回目	64.6 (125:130)	82.8 (95:230)	75.0 (300:175)

【図１７】

図17

```
  1  QVQLVQSGAE VVKPGASVKL SCKASGYIFT SYYMYWVKQA PGQGLEWIGE     VH
 51  INPSNGDTNF NEKFKSKATL TVDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCTRSD
101  GRNDMDSWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY     CH1
151  FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
201  CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD     CH2
251  TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
301  YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY     CH3
351  TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
401  SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGGGG     G4S
451  GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV     CH2
501  VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSAYRVV SVLTVLHQDW
551  LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV     CH3
601  SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD
651  KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG
```

(pEAG2066、配列番号1)

【図２２】

図22

```
  1  QVQLVQSGAE VVKPGASVKL SCKASGYIFT SYYMYWVKQA PGQGLEWIGE
 51  INPSNGDTNF NEKFKSKATL TVDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCTRSD
101  GRNDMDSWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
151  FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
201  CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
251  TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
301  YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
351  TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
401  SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGGGG
451  GSEPKSSDKT HTSPPSPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
501  VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSAYRVV SVLTVLHQDW
551  LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
601  SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD
651  KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG
```

(pEAG2147、配列番号9)

【図２０】

図20

```
  1  QVQLVQSGAE VVKPGASVKL SCKASGYIFT SYYMYWVKQA PGQGLEWIGE
 51  INPSNGDTNF NEKFKSKATL TVDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCTRSD
101  GRNDMDSWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
151  FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
201  CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
251  TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
301  YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
351  TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
401  SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGGGG
451  GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
501  VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
551  LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
601  SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD
651  KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG
```

(pEAG2146、配列番号7)

【図２３】

図23

```
GCAGTCAGGGGCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATC
TTCACCAGTTATTATATGTACTGGGTGAAGCAGGCGCCCGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTA
ATCCTAGCAATGGTGATACTAACTTCAATGAGAAGTTCAAGAGTAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATC
CGCCAGCACAGCATACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTACAAGA
TCGGACGGTAGAAATGATATGGACTCCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCA
AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG
CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA
AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA
CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC
CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC
CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTGGA
GGTGGCGGATCCGAGCCCAAATCTTCTGACAAGACTCACACATCACCCCCGAGCCCAGCACCTGAACTCC
TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCGCGTACCGTGTGGTCAGCG
TCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT
CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CCGGTTGAG
```

(pEAG2147、配列番号12)

【図２１】

図21

```
ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTCTGCTTGCTGGCTGTAGCACCAGGTGCCCACTCCCAGGTCCAACTGGTGCAGT
CAGGGGCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCACCAGTTA
TTATATGTACTGGGTGAAGCAGGCGCCCGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAGCAATGGTGAT
ACTAACTTCAATGAGAAGTTCAAGAGTAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCGCCAGCACAGCATACATGGAGC
TCAGCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTACAAGATCGGACGGTAGAAATGATATGGACTCCTG
GGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC
AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT
GGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC
TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC
ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG
AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTGGAGGTGGCGGATCCGAGCCCAAATCTTCTGACAAGACTCACACAT
GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT
CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG
TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC
CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTC
CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGagccTCTCCCTGTCTCCCGGTTGAG
```

(pEAG2146、配列番号8)

図26

【図26】

```
  1  QVQLVQSGAE VVKPGASVKL SCKASGYIFT SYYMYWVKQA PGQGLEWIGE
 51  INPSNGDTNF NEKFKSKATL TVDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCTRSD
101  GRNDMDSWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
151  FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
201  CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
251  TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
301  YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
351  TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
401  SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGGGG
451  GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
501  SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
551  SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
601  SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
651  FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG
```

(pASK048、配列番号15)

図24

【図24】

```
  1  QVQLVQSGAE VVKPGASVKL SCKASGYIFT SYYMYWVKQA PGQGLEWIGE
 51   INPSNGDTNF NEKFKSKATL TVDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCTRSD
101  GRNDMDSWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
151  FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
201  CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
251  TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
301  YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
351  TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
401  SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGGGG
451  GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
501  SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSAYRVV
551  SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
601  SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
651  FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG
```

(pASK043、配列番号13)

図27

【図27】

```
ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTCTGCTTGCTGGCTGTAGCACCAGGTGCCCACTCCCAGGTCCAACTGG
TGCAGTCAGGGGCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAT
CTTCACCAGTTATTATATGTACTGGGTGAAGCAGGCGCCCGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATT
AATCCTAGCAATGGTGATACTAACTTCAATGAGAAGTTCAAGAGTAAGGCCACACTGACTGTAGACAAAT
CCGCCAGCACAGCATACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTACAAG
ATCGGACGGTAGAAATGATATGGACTCCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC
AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG
ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG
TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT
CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT
CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTGG
AGGTGGCGGATCCGGAGGCGGTGGATCAGGAGGTGGCGGATCTGAGCCCAAATCTTCTGACAAGACTCAC
ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCA
AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA
```

(pASK048、配列番号16)

図25

【図25】

```
atggactggacctggagggtcttctgcttgctggctgtagcaccaggtgcccactccaggtccaactgg
tgcagtcaggggctgaagtggtgaagcctgggggcttcagtgaagttgtcctgcaaggcttctggctacat
cttcaccagttattatatgtactgggtgaagcaggcgcccggacaagggccttgagtggattggagagatt
aatcctagcaatggtgatactaacttcaatgagaagttcaagagtaaggccacactgactgtagacaaat
ccgccagcacagcatacatggagctcagcagcctgaggtctgaggacactgcggtctattactgtacaag
atcggacggtagaaatgatatggactcctggggccaagggaccctggtcaccgtctcctcagcctccacc
aagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggcacagcggccctgggct
gcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgt
gcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctcc
agcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaaga
aagttgagcccaaatcttgtgacaagactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggg
accgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcaca
tgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggagg
tgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcac
cgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccat
cccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacat
cgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgttggactcc
gacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttct
catgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctcccggtgg
aggtggcggatccggaggcggtggatcaggaggtggcggatctgagcccaaatcttctgacaagactcac
acatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaa
aggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccc
tgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggag
cagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaagg
agtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagg
gcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgg
agaacaactacaagaccacgcctcccgtgttggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcac
cgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaac
cactacacgcagaagagcctctccctgtctcccggttga
```

(pASK043、配列番号14)

図30

【図30】

```
  1  QVQLVQSGAE VVKPGASVKL SCKASGYIFT SYYMYWVKQA PGQGLEWIGE
 51  INPSNGDTNF NEKFKSKATL TVDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCTRSD
101  GRNDMDSWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
151  FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
201  CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
251  TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNSA
301  YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
351  TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
401  SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGGGG
451  GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
501  VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSAYRVV SVLTVLHQDW
551  LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
601  SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD
651  KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG*
```

(pASK053、配列番号19)

図28

【図28】

```
  1  QVQLVQSGAE VVKPGASVKL SCKASGYIFT SYYMYWVKQA PGQGLEWIGE
 51  INPSNGDTNF NEKFKSKATL TVDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCTRSD
101  GRNDMDSWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
151  FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
201  CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
251  TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNSA
301  YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
351  TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
401  SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGGGG
451  GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
501  SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSAYRVV
551  SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
601  SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
651  FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG*
```

(pASK052、配列番号17)

図31

【図31】

```
ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTCTGCTTGCTGGCTGTAGCACCAGGTGCCCACTCCCAGGTCCAACTGGTGCAGTCA
GGGGCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCACCAGTTATTAT
ATGTACTGGGTGAAGCAGGCGCCCGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAGCAATGGTGATACTAAC
TTCAATGAGAAGTTCAAGAGTAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCGCCAGCACAGCATACATGGAGCTCAGCAGC
CTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTACAAGATCGGACGGTAGAAATGATATGGACTCCTGGGGCCAAGGG
ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCC
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA
GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC
TTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
GAGGAGCAGTACAACAGCGCTTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG
TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC
GTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC
TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTGGAGGT
GGCGGATCCGAGCCCAAATCTTCTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG
TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCGCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGT
TGA
```

(pASK053、配列番号20)

図29

【図29】

```
ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTCTGCTTGCTGGCTGTAGCACCAGGTGCCCACTCCCAGGTCCAACTGG
TGCAGTCAGGGGCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAT
CTTCACCAGTTATTATATGTACTGGGTGAAGCAGGCGCCCGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATT
AATCCTAGCAATGGTGATACTAACTTCAATGAGAAGTTCAAGAGTAAGGCCACACTGACTGTAGACAAAT
CCGCCAGCACAGCATACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTACAAG
ATCGGACGGTAGAAATGATATGGACTCCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC
AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG
ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG
TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCGCTTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT
CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT
CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTGG
AGGTGGCGGATCCGGAGGCGGTGGATCAGGAGGTGGCGGATCTGAGCCCAAATCTTCTGACAAGACTCAC
ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCA
AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
CAGTACAACAGCGCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA
```

(pASK052、配列番号18)

【図34】

図34

A.

```
  1  DIQMTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
 51  ASNRATGIPA RFSGSGSGTE FTLTISSLQS EDFAVYYCQQ YDKWPLTFGG
101  GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151  DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201  LSSPVTKSFN RGEC
```

(pXW435、配列番号23)

B.

ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCCAGATGTG
ATATCCAGATGACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCT
CTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGC
CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGT
TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAGGA
TTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATGATAAGTGGCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACC
AAGGTGGAGATCAAACGTACGgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatg
agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagaga
ggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtc
acagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaag
cagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcc
cgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttagggatccC

(pXW435、配列番号24)

【図35】

図35

```
  1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYPMFWVRQA PGKGLEWVSW
 51  IGPSGGITKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TATYYCAREG
101  HNDWYFDLWG RGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
151  YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY
201  ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK
251  DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
301  AYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
351  YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
401  DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGGG
451  GGSGGGGSGG GGSEPKSSDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM
501  ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSAYRV
551  VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP
601  PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG
651  SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPG*
```

(ASK050、配列番号25)

【図32】

図32

```
  1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYPMFWVRQA PGKGLEWVSW
 51  IGPSGGITKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TATYYCAREG
101  HNDWYFDLWG RGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
151  YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY
201  ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK
251  DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
301  TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
351  YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
401  DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGGG
451  GGSEPKSSDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
501  VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSAYRV VSVLTVLHQD
551  WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ
601  VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
651  DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPG
```

(pEAG2148、配列番号21)

【図33】

図33

ATGGACTGGACCTGGAGggtcTTCTGCTTGCTGGCTGTAGCACCAGGTGCCCACTCCGAAGTACAATTGTTAGAGTCTG
GTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTTCTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTATTTACCCTAT
GTTTTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTGGATCGGTCCTTCTGGTGGCATTACTAAGTAT
GCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAA
GGGCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCGAGAGAGGGGCATAACGACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCAC
CCTGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGA
CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG
CCCAAATCTTGTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT
TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT
GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT
GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTGGAGGTGGCGGATCCGAGCCC
AAATCTTCTGACAAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA
CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
AACAGCGCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
CACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGAGCGGCCG

(pEAG-2148、配列番号22)

【図38】

図38

ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTCTGCTTGCTGGCTGTAGCACCAGGTGCCCACTCCGAAGTACAATTGTTAGAGTCTGGTG
GCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTTCTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTATTTACCCTATGTTTTG
GGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTGGATCGGTCCTTCTGGTGGCATTACTAAGTATGCTGACTCC
GTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACA
CAGCCACATATTACTGTGCGAGAGAGGGGCATAACGACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCTGGTCACCGTCTC
AAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC
TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA
CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAGACTCACACA
TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGA
TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA
CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCGCTTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA
CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT
GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
TCCCGGTGGAGGTGGCGGATCCGAGCCCAAATCTTCTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCGCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT
CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA

(ASK051、配列番号28)

【図36】

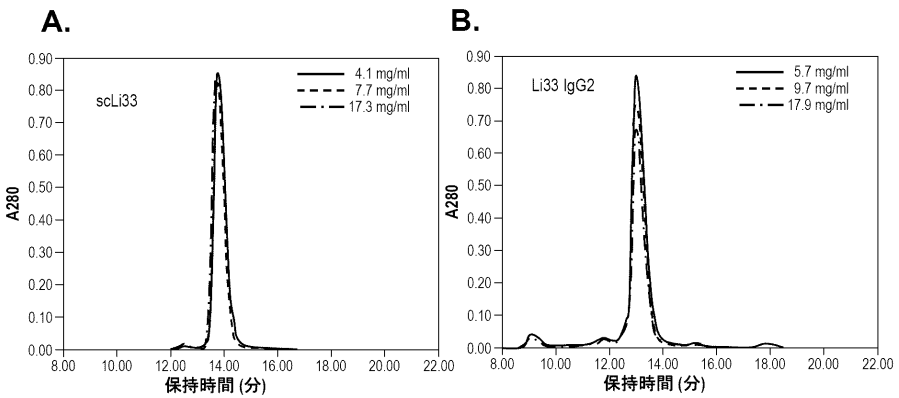
図36

ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTCTGCTTGCTGGCTGTAGCACCAGGTGCCCACTCCGAAGTACAATTGTTAGAGTCTG
GTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTTCTTTACGTCTTTCTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTATTTACCCTAT
GTTTTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTGGATCGGTCCTTCTGGTGGCATTACTAAGTAT
GCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAACTCTAAGAATACTCTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAA
GGGCTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCGAGAGAGGGGCATAACGACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCAC
CCTGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGA
CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG
CCCAAATCTTGTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT
TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TACAACAGCGCTTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT
GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT
GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTGGAGGTGGCGGATCCGGAGGC
GGTGGATCAGGAGGTGGCGGATCTGAGCCCAAATCTTCTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC
TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT
GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCGCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT
GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC
CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA
AGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
CCCGGTTGA

(ASK050、配列番号26)

【図39】

図39



【図37】

図37

```
   1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS IYPMFWVRQA PGKGLEWVSW
  51  IGPSGGITKY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TATYYCAREG
 101  HNDWYFDLWG RGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
 151  YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY
 201  ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK
 251  DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
 301  AYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
 351  YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
 401  DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGGG
 451  GGSEPKSSDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
 501  VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSAYRV VSVLTVLHQD
 551  WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ
 601  VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
 651  DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPG*
```

(ASK051、配列番号27)

JP 2010-528588 A 2010.8.26

【図40】

図40

A.

```
  1  QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PEQGLEWIGR
 51  IDPHDSETHY RQKFKDMAIL TVDKSSRTAY MQLSSLTSED SAVYYCARGT
101  MLDGMDYWGQ GTSVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
151  FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
201  CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
251  TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
301  YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
351  TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
401  SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGGGG
451  GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
501  SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
551  SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
601  SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
651  FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG
```

(ASK-058、配列番号29)

B.

```
  1  QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCRASSSVS HMHWYQQKSG TSPKRWIYDT
 51  SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSVEAE DAATYYCQQW SSNPLTFGAG
101  TKLELKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD
151  NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL
201  SSPVTKSFNR GEC*
```

(EAG2276、配列番号53)

【図41】

図41

ATGGGATGGAGCTGTGTAATGCTCTTCTTGTTAGCAACAGCCACATGTGTCCACTCCCAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGG
CTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACGTTCACCAGCTACTGGATGAACTG
GGTTAAGCAGAGGCCTGAGCAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTCACGATAGTGAGACTCACTACCGTCAAAAG
TTCAAGGACATGGCCATTTTGACTGTGGACAAATCCTCCAGGACAGCCTACATGCAACTTAGCAGCCTGACATCTGAGGACT
CTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGGACTATGCTTGATGGTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTC
AGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC
CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG
CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAGACTCACACATGC
CCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT
CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC
CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
TACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC
GGTTGA

(ASK-058、配列番号30)

【図42】

図42

```
  1  QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PEQGLEWIGR
 51  IDPHDSETHY RQKFKDMAIL TVDKSSRTAY MQLSSLTSED SAVYYCARGT
101  MLDGMDYWGQ GTSVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
151  FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
201  CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
251  TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
301  YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
351  TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
401  SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGGGG
451  GSGGGGSGGG GSGGGGSEPK SSDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK
501  DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
551  AYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
601  YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
651  DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG
```

(ASK-062、配列番号31)

【図43】

図43

ATGGGATGGAGCTGTGTAATGCTCTTCTTGTTAGCAACAGCCACATGTGTCCACTCCCAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTG
GTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACGTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTTAAGCAGAGGCCT
GAGCAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTCACGATAGTGAGACTCACTACCGTCAAAAGTTCAAGGACATGGCCATTTTGACT
GTGGACAAATCCTCCAGGACAGCCTACATGCAACTTAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGGACTATG
CTTGATGGTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC
TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCA
GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC
AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
GACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC
CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC
CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTGGAGGTGGCGGATCCGGGGGAGGGGGCAGCGGAGGGGGAGGA
TCTGGGGGCGGAGGATCTGAGCCCAAGAGCAGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCATGCCCAGCTCCAGAGCTCCTGGGCGGACCCAGC
GTGTTCCTGTTCCCTCCCAAGCCCAAAGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTCACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAG
GACCCAGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCGCC
TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCA
GCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC
AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA

(ASK-062、配列番号32)

JP 2010-528588 A 2010.8.26

【図44】

図44

```
  1  QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PEQGLEWIGR
 51  IDPHDSETHY RQKFKDMAIL TVDKSSRTAY MQLSSLTSED SAVYYCARGT
101  MLDGMDYWGQ GTSVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
151  FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
201  CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
251  TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
301  YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
351  TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
401  SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGGGG
451  GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF
501  PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
551  EQYNSAYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
601  REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
651  TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
701  SPG
```

(ASK-063、配列番号33)

【図45】

図45

```
ATGGGATGGAGCTGTGTAATGCTCTTCTTGTTAGCAACAGCCACATGTGTCCACTCCCAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAG
CTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACGTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTTAAGCAG
AGGCCTGAGCAAGGCTTGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTCACGATAGTGAGACTCACTACCGTCAAAAGTTCAAGGACATGGCC
ATTTTGACTGTGGACAAATCCTCCAGGACAGCCTACATGCAACTTAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCA
AGAGGGACTATGCTTGATGGTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC
TTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
ACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC
CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG
CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
CCCGGTGGAGGTGGCGGATCCGGCGGCGGAGGAAGCGGGGGAGGGGGCAGCGGAGGGGGAGGATCTGGGGGCGGAGGATCTGAGCCC
AAGAGCAGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCATGCCCAGCTCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCCAAG
CCCAAAGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTCACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTCAAGTTC
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCGCCTACAGGGTGGTGTCC
GTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAG
AAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG
GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC
AAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA
```

(ASK-063、配列番号34)

【図46】

図46

```
  1  QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PEQGLEWIGR
 51  IDPHDSETHY RQKFKDMAIL TVDKSSRTAY MQLSSLTSED SAVYYCARGT
101  MLDGMDYWGQ GTSVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
151  FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
201  CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
251  TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
301  YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
351  TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
401  SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGGGG
451  GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSEPK SSDKTHTCPP CPAPELLGGP
501  SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
551  TKPREEQYNS AYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
601  AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
651  NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ
701  KSLSLSPG
```

(ASK-064、配列番号35)

【図47】

図47

```
ATGGGATGGAGCTGTGTAATGCTCTTCTTGTTAGCAACAGCCACATGTGTCCACTCCCAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTG
GTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACGTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTTAAGCAGAGGCCT
GAGCAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTCACGATAGTGAGACTCACTACCGTCAAAAGTTCAAGGACATGGCCATTTTGACT
GTGGACAAATCCTCCAGGACAGCCTACATGCAACTTAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGGACTATG
CTTGATGGTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC
TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCA
GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC
AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
GACAAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC
CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC
CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTGGAGGTGGCGGATCCGGCGGAGGGGGCTCTGGCGGCGGAGGA
AGCGGGGGAGGGGGCAGCGGAGGGGGAGGATCTGGGGGCGGAGGATCTGAGCCCAAGAGCAGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCATGC
CCAGCTCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCCAAGCCCAAAGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTC
ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTCAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCGCCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTAC
ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG
CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA
```

(ASK-064、配列番号36)

【図４８】

図48

```
   1 DPLPTESRLM NSCLQARRKC QADPTCSAAY HHLDSCTSSI STPLPSEEPS
  51 VPADCLEAAQ QLRNSSLIGC MCHRRMNQQV ACLDIYWTYH RARSLGNYEL
 101 DVSPYEDTVT SKPWKWNLSK LNMLKPDSDL CLKFAMLCTL NDKCDRLRKA
 151 YGEACSGPHC QRHVCLRQLL TFPEKAAEPH AQGLLLCPCA ENDRGCGERR
 201 RNTIAPNCAL PPVAPNCLEL RRLCFSDPLC RSRLVDFQTH CHPMDILGTC
 251 ATEQSRCLRA YLGLIGTAMT PNFVSNVNTS VALSCTCRGS GNLQEECEML
 301 EGFFSHNPCL TEAIAAKMRF HSQLFSQPWP HPTFAVMAHQ NEVDKTHTCP
 351 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
 401 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
 451 LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
 501 AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
 551 MHEALHNHYT QKSLSLSPGG GGGSGGGGSG GGGSEPKSSD KTHTCPPCPA
 601 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
 651 VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP
 701 IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW
 751 ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
 801 LHNHYTQKSL SLSPG
```

(ASK-057、配列番号37)

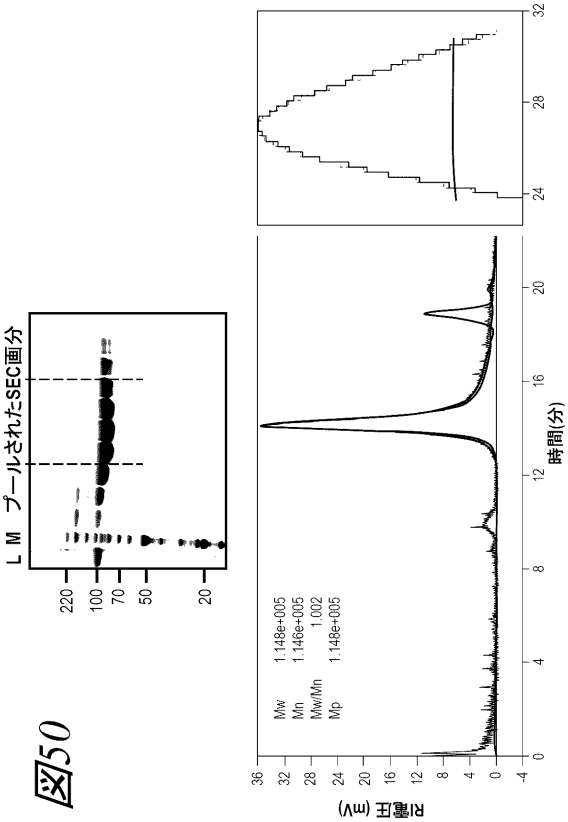
【図４９】

図49

```
ATGGTGGCGCCCCTGAACCGCGGACCGGCTGCCGCCCGTAGTTGTTGATGTTCTGATGTTGTGTGCTGCCGGCTGCCTCTCGCAGCCG
GAGACCCCTTCCCACAGAAAGCGGACTCATGAACAGCTGTCTCCAGGCCAGGAGGAAGTGCCAGGCTGATCCCACCTGCAGTGCTGCCTA
CCACCACCTGGATTCCTGCACCTCTAGCATAAGCACCCCACTGCCTCAGAGGAGCCTTGGTGCTCCTGCTGACTGCCTGTGAGGCAGCAG
CAACTCAGGAACAGCTCTCTGATAGGCTGCATGTGCCACCGGCGCATGAAGAACCAGGTTGCCTGCTTGGACATCTATTGACCGTTCACC
GTGCCCGCAGCCTTGTTAACTATGAGCTGGATGTCTCCCCTATGAACACAGTGACCAGCAAACCCTGTGAAAATGAATCTCAGCAAACT
GAACATGCTCAAACCAGACTCAGACCTCTGCCTCAAGTTTGCCATGCTGTACTCTCAATGACAAGTCTGACGCGCTGCGCAAGGCCTAC
GGGGAGGCGTGCTCCGGGCCCACTGCCAGCGCCACGTCTGCCTCAGGCAGCTGCTCACTTTCTTGAGAAGGCCGCCGACGCCCACGCGC
AGGGCCTGCTACTGTGCCCATGTGCCCCAACGACCGGGGCTGCGGGGAGCGCGCGCAACACCATCGCCCCCAACTGCGCGCTGCCGCC
TGTGGCCCCCAACTGCCTGGAGGTGCGGCGCCTTGTTCCGACCCGCTTTGCAGATCACGCCTGTGGTGGATTTCCAGACCCACTGCCAT
CCCATGGACATCCTAGGAACTTGTGCAACAGAGCAGTCCAGATGTCTACGAGCATACCTGGGGCTGATTGGGACTGCCATGACCCCCAACT
TTGTCAGCAATGTCAACACCAGTGTTGCCTTAAGCTGCACCTGCCGAGGCAGTGGCAAACCTGCAGGAGGAGTGTGAAATGCTGGAAGGTT
CTTCTCCCACAACCCTGCCTCAGGAGGCCATTGCAGCTAAGATGCGTTTCACAGCCAACTCTTCTCCCAGGACTGGCCACACCCTACC
TTTGCTGTGATGGCACACCAGAATGAAGTCGACAAGATCACACATGCCCACGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT
TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CGGTGGATCAGGAGGTGGCGGATCTGAGCGCCAAATCTTCTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA
CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTAAGCC
ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA
CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
(ASK-057、配列番号38)
```

【図５０】

図50



【図５１】

図51

```
   1 MSYNLLGFLQ RSSNFQCQKL LWQLNGRLEY CLKDRMNFDI PEEIKQLQQF
  51 QKEDRAALTIY EMLQNIFAIF RQDSSSTGWN ETIVENLLAN VVHQINHLKT
 101 VLEEKLEKED FTRGKLMSSL HLKRYYGRIL HYLKAKEYSH CAWTIVRVEI
 151 LRNFYFINRL TGYLRNVDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
 201 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
 251 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
 301 SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
 351 FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGGGGSGGG
 401 KSSDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
 451 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN SAYRVVSVLT VLHQDWLNGK
 501 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
 551 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 601 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
```

(pEAG2149、配列番号39)

【図５２】

図52

atgaccaacaagtgtctcCTCCAAATTGCTCTCCTGTTGTGCTTCTCCACTACAGCTCTTTCCATGAGCTACAACTTGCTTGGATTCCTAC
AAAGAAGCAGCAATTTTCAGTGTCAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGATGAACTTTGACAT
CCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGCCGCATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTC
AGACAAGATTCATCTAGCACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCTATCATCAGATAAACCATCTGAAGACAG
TCCTGGAAGAAAAACTGGAGAAAGAAGATTTCACCAGGGGAAAACTCATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCA
TTACCTGAAGGCCAAGGAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGAACTTTTACTTCATTAACAGACTTAca
ggttacctccgaaacGTCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA
TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC
CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC
GTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTGGAGGTGGCGGATCCGAGCCCAAATCTTCTGA
CAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCGCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA
CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCGTGTTGGACTCCGACGGCTC
CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGAGCGGCC

(pEAG2149、配列番号40)

【図５３】

図53

1	SQPQAVPPYA	SENQTCRDQE	KEYYEPQHRI	CCSRCPPGTY	VSAKCSRIRD
51	TVCATCAENS	YNEHWNYLTI	CQLCRPCDPV	MGLEEIAPCT	SKRKTQCRCQ
101	PGMFCAAWAL	ECTHCELLSD	CPPGTEAELK	DEVGKGNNHC	VPCKAGHFQN
151	TSSPSARCQP	HTRCENQGLV	EAAPGTAQSD	TTCKNPLEPL	PPEMSGTMVD
201	KTHTCPPCPA	PELLGGPSVF	LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVVDVSHEDP
251	EVKFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQYNSTYR	VVSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC
301	KVSNKALPAP	IEKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSRDELTKN	QVSLTCLVKG
351	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTPPVLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN
401	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGGGGGS	EPKSSDKTHT	CPPCPAPELL
451	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH
501	NAKTKPREEQ	YNSAYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT
551	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG
601	QPENNYKTTP	PVLDSDGSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH
651	YTQKSLSLSP	G*			

(EAG2190、配列番号41)

【図５４】

図54

ATGCTCCTGCCTTGGGCCACCTCTGCCCCCGGCCTGGCCTGGGGGCCTCTGGTGCTGGGCCTCTTCGGGCTCCTGGCAGCATCGCAGCCCCA
GGCGGTGCCTCCATATGCGTCGGAGAACCAGACCTGCAGGGACCAGGAAAAGGAATACTATGAGCCCCAGCACCGCATCTGCTGCTCCGCT
GCCCGCCAGGCACCTATGTCTCAGCTAAATGTAGCCGCATCCGGGACACAGTTTGTGCCACATGTGCCGAGAATTCCTACAACGAGCACTGG
AACTACCTGACCATCTGCCAGCTGTGCCGCCCCTGTGACCCAGTGATGGGCCTCGAGGAGATTGCCCCCTGCACAAGCAAACGGAAGACCCA
GTGCCGCTGCCAGCCGGGAATGTTCTGTGCTGCCTGGGCCCTCGAGTGTACACACTGCGAGCTACTTTCTGACTGCCCGCCTGGCACTGAAG
CCGAGCTCAAAGATGAAGTTGGGAAGGGTAACAACCACTGCGTCCCCTGCAAGGCAGGGCACTTCCAGAATACCTCCTCCCCCAGCGCCCGC
TGCCAGCCCCACACCAGGTGTGAGAACCAAGGTCTGGTGGAGGCAGCTCCAGGCACTGCCCAGTCCGACACAACCTGCAAAAATCCATTAGA
GCCACTGCCCCCAGAGATGTCAGGAACCATGGTCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG
TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG
TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCA
TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG
GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC
CACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA

(EAG2190、配列番号42)

【図５５】

図55

1	SQPQAVPPYA	SENQTCRDQE	KEYYEPQHRI	CCSRCPPGTY	VSAKCSRIRD
51	TVCATCAENS	YNEHWNYLTI	CQLCRPCDPV	MGLEEIAPCT	SKRKTQCRCQ
101	PGMFCAAWAL	ECTHCELLSD	CPPGTEAELK	DEVGKGNNHC	VPCKAGHFQN
151	TSSPSARCQP	HTRCENQGLV	EAAPGTAQSD	TTCKNPLEPL	PPEMSGTMVD
201	KTHTCPPCPA	PELLGGPSVF	LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVVDVSHEDP
251	EVKFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQYNSTYR	VVSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC
301	KVSNKALPAP	IEKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSRDELTKN	QVSLTCLVKG
351	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTPPVLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN
401	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGGGGGS	EPKSSDKTHT	CPPCPAPELL
451	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH
501	NAKTKPREEQ	YNSAYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT
551	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG
601	QPENNYKTTP	PVLDSDGSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH
651	YTQKSLSLSP	G*			

(EAG2191、配列番号43)

JP 2010-528588 A 2010.8.26

【図５６】

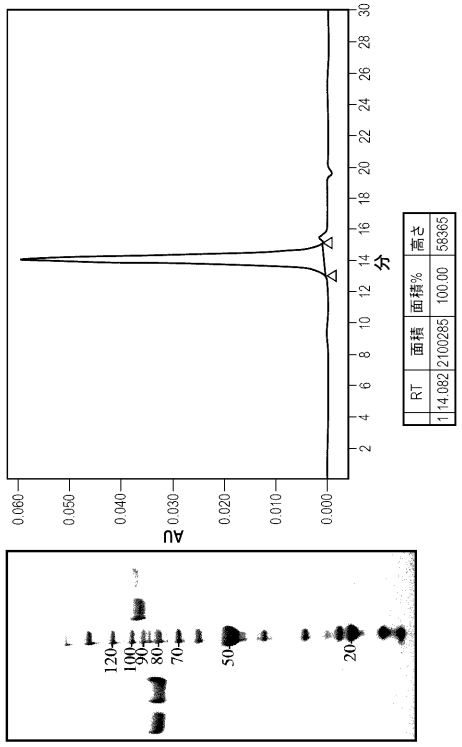
図56

```
ATGCTCCTGCCTTGGGCCACCTCTGCCCCCGGGCCTGGGGCCTCTTGGGCCTCCTTCGGGCCTCCTGGCGACGATCGCAGCCC
CAGGCGGTGCCTCCATATGCGTCGAGAACCAGACCTGCAGGGACCAGGAAAAGGAATACTATGAGCCCCAGCACCGCATCTGCTCC
CGCTGCCCGCCAGGCACCTATGTCTCAGCTAAATGTAGCCGCATCCGGGACACATGTTTGTGCCACATGTGCCGAGAATTCCTACAACGAG
CACTGGAACTACCTGGACCATCTGCCAGCTGTGCCGCCCCTGTGACCCAGTGATGGGCCTCGAGGAGATTGCCCCCTGCACAAGCAAACGG
AAGACCCAGTGGCCGCTGCCAGCCGGGAATGTTCTGTGCCTGGGCCCTCGAGTGTACACACTGCGAGCTACTTTCTGACTGCCCGCCT
GGCACTGAAGCCGAGCTCAAAGATGAAGTTGGGAAGGGTAACAACCACTGCGCCCCTGCAAGGCAGGGCACTTCCAGAATACCTCCTCC
CCCAGGGCCGCTGCCAGCCCACACCAGGTGTGAGAACCAAGGTCTGGCTGAATGGCAACTGCCCAGCACTGCCCAGCACAACCTGC
AAAAATCCATTAGAGCCACTGCCCCCAGAGATGTCAGGAACCATGTCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTC
CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
CCCGGTAAATGA
TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC
GCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCGGGATGAGCTG
ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG
CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
```

(EAG2191、配列番号44)

【図５７】

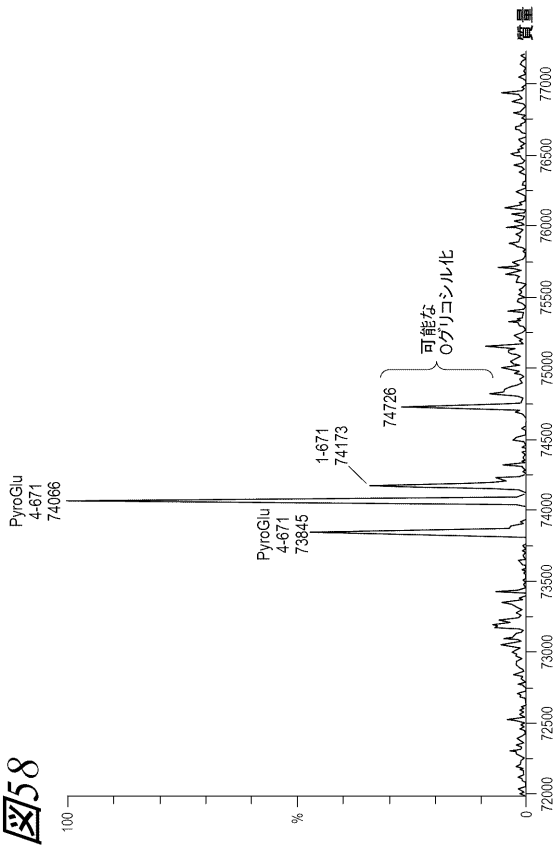
図57



	RT	面積	面積%	高さ
1	14.082	2100285	100.00	58365

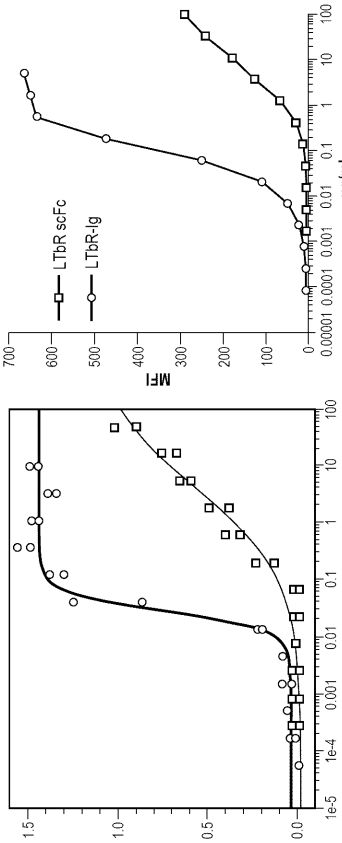
【図５８】

図58



【図５９】

図59



y = ((A - D) / (1 + (x/C)^B)) + D:

	A	B	C	D	R^2
LTBRIgG (LTBRIgG: 濃度対値)	0.034	2.55	0.028	1.436	0.988
LTBRscFc (LTBRscFc: 濃度対値)	-0.024	0.553	4.035	1.147	0.972

図62

【図62】

A. ASK055、配列番号49

```
  1  EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 51  VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
101  GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL
151  TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
201  RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GGGGGSEPKS SDKTHTCPPC
251  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
301  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
351  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
401  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
451  EALHNHYTQK SLSLSPG*
```

B. ASK055、配列番号50

```
ATGAAGCTCCCCGTCAGGCTTCTCGTGCTCATGTTCTGGATTCCGGCGTCGTCAAGTGAGCCCAAATCTAGTGACAAGACTCACACATGCCC
ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG
AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA
CCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCCGGTGGAGGTGGCGGATCCGAGCCCAAATCTTCTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
GCGCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAGCCCCATCCAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA
```

図63

【図63】

A. ASK016、配列番号51

```
  1  DVQLQQSGAE LARPGASIKM SCKASGYTFT SYTIHWVKKR PGQGLEWIGY
 51  ITPNIDYTKY NQKFKDRATL TADKSSSTAY IQLSSLTSED SAVYYCARNG
101  YYVMDYWGQG TSVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF
151  PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC
201  NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT
251  LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
301  RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
351  LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
401  DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG*
```

B. ASK016、配列番号52

```
ATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGA
ACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAATAAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTATACCTTTACTAGCTACACAATTCACTGGGTAAAAAAGA
GGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTACTCCTAACATTGATTATACTAAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAGGGCCACA
TTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATACAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGAAA
TGGTTACTACGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG
CACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGG
AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT
GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA
AATCTTGTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC
AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATC
TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC
CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC
CCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA
```

図60

【図60】

A. EAG2181、配列番号45

```
  1  EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 51  VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
101  GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL
151  TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
201  RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GGGGGSEPKS SDKTHTCPPC
251  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
301  DGVEVHNAKT KPREEQYNSA YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
351  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
401  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
451  EALHNHYTQK SLSLSPG
```

B. EAG2181、配列番号46

```
ATGAAGCTCCCCGTCAGGCTTCTCGTGCTCATGTTCTGGATTCCGGCGTCGTCAAGTGAGCCCAAATCTAGTGACAAGACTCACACATGCCC
ACCGTGCCCAGCACCTGAACTGCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG
AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA
CCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCCGGTGGAGGTGGCGGATCCGAGCCCAAATCTTCTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
GCGCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAGCCCCATCCAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA
```

図61

【図61】

A. ASK054、配列番号47

```
  1  EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 51  VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
101  GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL
151  TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
201  RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GGGGGSGGGG SGGGGSEPKS
251  SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
301  DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
351  KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV
401  KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
451  GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG
```

B. ASK054、配列番号48

```
ATGAAGCTCCCCGTCAGGCTTCTCGTGCTCATGTTCTGGATTCCGGCGTCGTCAAGTGAGCCCAAATCTAGTGACAAGACTCACACATGCCC
ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG
AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA
CCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCCGGTGGAGGTGGCGGATCCGAGCCCAAATCTTCTGACAAGACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
GCGCGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAGCCCCATCCAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGTTGA
```

【図６４】

図64

薬剤/企業	種類	標的	適応	認可年
Orthoclone OKT3 J & J	マウス mAb	CD3	急性移植拒絶反応	1986
ReoPro Centocor/Lilly	キメラ Fab	血小板 GPIIb/IIIa	急性冠症候群	1994
Rituxan BIIB/Genentech	キメラ Fab	CD20	非ホジキンリンパ腫	1997
Simulect Novartis	キメラ Fab	CD25	急性移植拒絶反応	1997
Remicade Centocor/J & J	キメラ Fab	TNFα	クローン病 関節リウマチ	1997 1998
Zenapax Roche	ヒト化 mAb	CD25	腎移植拒絶反応	1997
Synagis MedImmune	ヒト化 mAb	RSV F タンパク質	呼吸器合胞体ウイルス感染の予防	1998
Herceptin Genentech	ヒト化 mAb	HER2	HER2陽性転移性乳癌	1998
Mylotarg Celltech/Wyeth	ヒト化 mAb	CD33	急性骨髄性白血病	2000
Campath Millennium/ILEX	ヒト化 mAb	CD52	B細胞慢性リンパ性白血病	2001
Zevalin BIIB/CTI	放射性標識マウスmAb	CD20	非ホジキンリンパ腫	2002
Humira Abbott	ファージ提示ヒト mAb	TNFα	関節リウマチ	2002
Xolair Genentech/Novartis	ヒト化 mab	IgE CH3	持続性ぜんそく	2003
Bexxar Corixa/GSK	放射性標識マウスmAb	CD20	非ホジキンリンパ腫	2003
Raptiva Genentech	ヒト化 mAb	CD11a	慢性の中度～重度の乾癬	2003
Erbitux ImClone/BMS	キメラ Fab	EGFR	結腸直腸癌	2004
Avastin Genentech	ヒト化 mAb	VEGF	転移性肺および結腸直腸癌	2004
Tysabri BIIB/Elan	ヒト化 mAb	VLA4	多発性硬化症	2004
Lucentis Genentech	ヒト化 Fab	VEGF	加齢性黄斑変性	2006
Vectibix Amgen/Abgenix	遺伝子導入ヒト mAb	EGFR	結腸直腸癌	2006
Solinis Alexion	ヒト化 mAb	C5	発作性夜間血色素尿症	2007

【図８】

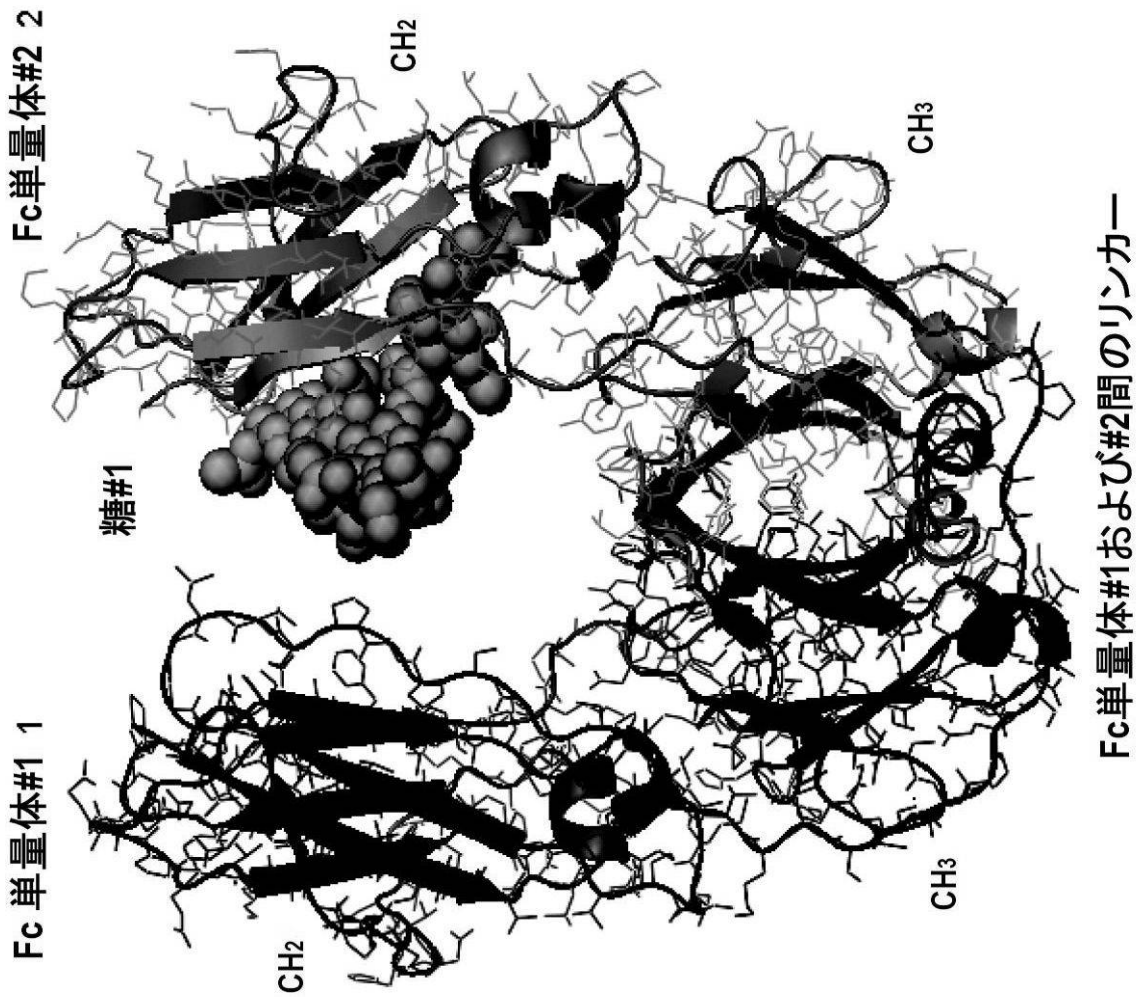
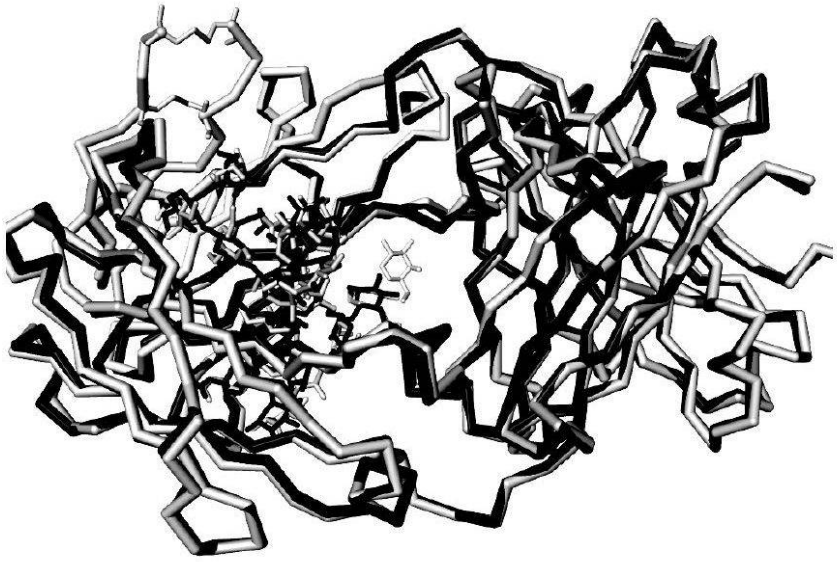


図8

【図９】



側面図

前面図

図9

【配列表】

2010528588000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/006260

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/13 A61K39/395 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00
C07K16/00

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)
C12N A61P A61K C07K

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 practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/077981 A (XENCOR INC [US]; LAZAR GREGORY ALAN [US]) 25 August 2005 (2005-08-25)	1-88
X	page 66, paragraph 163; claim 1	1-88
X	paragraph [0066]	2
X	paragraph [0069]	3,5
X	paragraph [0093]	4,6-8
X	paragraph [0072]	9-11, 79-81
X	paragraph [0081]	12-14
X	paragraph [0080]	15-24
X	paragraph [0099]	25-33
X	paragraphs [0075], [0076]	34-43, 48-64,78
X	paragraphs [0094] - [0098]	44-47, 65-77

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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 document 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	Date of mailing of the international search report
3 December 2008	28/01/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Perez, Franck

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/006260

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GREENWOOD J ET AL: "ENGINEERING MULTIPLE-DOMAIN FORMS OF THE THERAPEUTIC ANTIBODY CAMPATH-1H: EFFECTS ON COMPLEMENT LYSIS" THERAPEUTIC IMMUNOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBL. LONDON, GB, vol. 1, no. 5, 1 October 1994 (1994-10-01), pages 247-255, XP009059035 ISSN: 0967-0149 figure 1	1-88
P,X	WO 2008/012543 A (UCB PHARMA SA [BE]; LAWSON ALASTAIR DAVID GRIFFITH [GB]; STEPHENS PAUL) 31 January 2008 (2008-01-31) claim 4	1-88
E	WO 2008/131242 A (ZYMOGENETICS INC [US]; MOORE MARGARET D [US]; SNAVELY MARSHALL D [US];) 30 October 2008 (2008-10-30) claim 1	1-88
P,X	NAGASHIMA H ET AL: "Tandemly repeated Fc domain augments binding avidities of antibodies for Fcgamma receptors, resulting in enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity" MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 45, no. 10, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 2752-2763, XP022605994 ISSN: 0161-5890 [retrieved on 2008-03-18] figure 1	1-88
A	MARSHALL SHANNON A ET AL: "Rational design and engineering of therapeutic proteins" DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US, vol. 8, no. 5, 1 March 2003 (2003-03-01), pages 212-221, XP002295833 ISSN: 1359-6446 the whole document	1-88

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/006260

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005077981 A	25-08-2005	EP 1697520 A2	06-09-2006
WO 2008012543 A	31-01-2008	NONE	
WO 2008131242 A	30-10-2008	US 2008260738 A1	23-10-2008

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 29/00		
Ａ６１Ｐ 37/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 37/06		
Ａ６１Ｐ 35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ｇ０１Ｎ 33/53	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｃ１２Ｐ 21/02	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ	
Ｃ１２Ｎ 1/15	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/19	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/21	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 5/10	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ 5/00	１０１	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,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,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ファーリントン, グラハム ケー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１７２０, アクトン, アルゴンキン ロード １
(72)発明者 サエード－コス, アムナ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３２, ウエスト ロックスバリー, ウェルド ストリート ５４２
(72)発明者 ガーバー, エレン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３８－１３５２, ケンブリッジ, コーネル ストリート １４
(72)発明者 ルゴフスコイ, アレクセイ アレクサンドロビッチ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１８０１, ウォーバーン, センター ストリート ２４

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 BA80 CA02 CA07 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA11 HA03
4B064 AG01 AG26 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01 DA08
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 BA01 NA14 ZA012 ZB082 ZB112 ZB262
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA75 DA76 EA28 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2010528588A5	公开(公告)日	2012-06-28
申请号	JP2010508431	申请日	2008-05-14
申请(专利权)人(译)	Biogen Idec公司，Emuei公司		
[标]发明人	ファーリントングラハムケー サエードコスアムナ ガーバーエレン ルゴフスコイアレクセイアレクサンドロビッチ		
发明人	ファーリントン, グラハム ケー. サエード-コス, アムナ ガーバー, エレン ルゴフスコイ, アレクセイ アレクサンドロビッチ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K19/00 C07K16/00 A61K38/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P35/00 G01N33/53 C12P21/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10		
CPC分类号	A61K47/65 A61K47/6835 A61K47/6881 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/565 C07K16/2875 C07K2317/41 C07K2317/52 C07K2317/622 C07K2318/10 C07K2319/30		
FI分类号	C12N15/00.A C07K19/00.ZNA C07K16/00 A61K37/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P35/00 G01N33/53.D C12P21/02.C C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA08 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB262 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/930227 2007-05-14 US		
其他公开文献	JP5398703B2 JP2010528588A		

摘要(译)

本发明的特征在于包含含有遗传融合的Fc部分的Fc区的多肽。此外，本发明提供了例如通过向所述受试者施用本发明的结合多肽来治疗或预防受试者的疾病或病症的方法。