

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-51331

(P2010-51331A)

(43) 公開日 平成22年3月11日(2010.3.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
<b>C O 7 K 16/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/00 Z N A	4 B O 6 4
<b>C 1 2 P 21/02 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/02 C	4 H O 4 5
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 D	
<b>C O 7 K 16/46 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/46	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 64 頁)

(21) 出願番号	特願2009-281051 (P2009-281051)	(71) 出願人	508018141
(22) 出願日	平成21年12月10日 (2009.12.10)		エンゾン ファーマシューティカルズ、
(62) 分割の表示	特願2008-8563 (P2008-8563)		インコーポレイテッド
原出願日	平成10年4月30日 (1998.4.30)		アメリカ合衆国 ニュージャージー 08
(31) 優先権主張番号	60/044, 449		807,ブリッジウォーター, ルート
(32) 優先日	平成9年4月30日 (1997.4.30)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/050, 472	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成9年6月23日 (1997.6.23)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	60/063, 074		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成9年10月27日 (1997.10.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリアルキレンオキシド修飾された単鎖ポリペプチド

## (57) 【要約】

【課題】本発明は、ポリ(エチレングリコール)PEGおよび類似のポリ(アルキレンオキシド)の鎖の、抗体の可変領域の三次元折り畳み、従って抗体の可変領域の結合能力および特異性を有する単鎖ポリペプチド結合分子への共有結合による単鎖ポリペプチドの化学修飾に関する。

【解決手段】修飾された単鎖ポリペプチド結合分子のこのような調製物は、親のポリペプチドと比較して、減少した免疫原性および抗原性を有し、そして血流においてより長い半減期を有する。修飾された単鎖ポリペプチド結合分子のこれらの利益のある特性によって、これらの分子は、種々の治療的適用において非常に有用となる。本発明はまた、PEG化をし得る多価抗原結合分子に関する。PEG化抗原結合タンパク質の組成物、遺伝的構築物、使用方法、および産生する方法が開示される。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

明細書に記載の単鎖ポリペプチド。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

発明の背景

## 1. 発明の分野

本発明は、抗体の可変領域の三次元折り畳み、従って抗体の可変領域の結合能および特異性を有する単鎖ポリペプチド結合分子への、ポリ(エチレングリコール)PEGおよび類似のポリ(アルキレンオキシド)の鎖の共有結合による単鎖ポリペプチドの化学的修飾に関する。修飾された単鎖ポリペプチド結合分子のこのような調製物は、親のポリペプチドと比較して、減少した免疫原性および抗原性を有し、そして血流においてより長い半減期を有する。修飾された単鎖ポリペプチド結合分子のこれらの有益な特性によって、これらの分子は、種々の治療的適用において有用となる。本発明はまた、PEG化をし得る多価抗原結合分子に関する。PEG化抗原結合タンパク質の組成物、遺伝的構築物、使用方法、および産生する方法が開示される。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

## 2. 関連分野の説明

抗体は、侵入する分子(抗原という)と複合体化し得る特定の分子を提供する免疫系によって生成されるタンパク質である。天然の抗体は、2つの同一の抗原結合部位を有し、この両方は、特定の抗原に特異的である。抗体分子は、抗原の領域(エピトープという)とその抗原結合部位とを複合体化させることによって抗原を「認識」する。エピトープは、抗体の抗原結合部位のコンホメーション構造に適合し、それによって、抗体が、抗原と結合することが可能になる。

20

## 【0003】

抗体分子は、2つの同一の重いポリペプチド鎖および2つの同一の軽いポリペプチド鎖からなり、これらは、鎖間のジスルフィド結合によってともに保持されている。抗体についての残りの説明は、軽鎖/重鎖の1対のみを言及する。なぜなら、各軽鎖/重鎖対は同一であるからである。各個々の軽鎖および重鎖は、およそ110アミノ酸の領域へと折り畳まれ、保存された三次元コンホメーションをとる。軽鎖は、1つの可変領域( $V_L$ )および1つの定常領域( $C_L$ )を含むが、重鎖は、1つの可変領域( $V_H$ )および3つの定常領域( $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 、および $C_{H3}$ )を含む。領域の対が会合して、異なる構造を形成する。特に、軽鎖および重鎖の可変領域が会合して、抗原結合部位を含む「Fv」領域を形成する。定常領域は、抗原結合には必要ではなく、そしていくつかの場合において、タンパク質加水分解によって抗体分子から分離され得、それによって軽鎖の半分および重鎖の4分の1からなる、生物学的に活性な(すなわち結合性の)可変領域を得る。

30

## 【0004】

さらに、特定のクラスのすべての抗体およびそれらのFabフラグメント(すなわち、 $V_L$ 、 $C_L$ 、 $V_H$ 、および $C_{H1}$ からなるフラグメント)(これらの構造は、X線結晶学によって決定された)は、異なる動物種由来でさえも、超可変セグメントの配列における大きな差異にもかかわらず、同様の可変領域構造を示す。免疫グロブリン可変領域は、抗原結合ループにおける変異に対して耐性であるようである。従って、超可変領域以外において、抗体の、ほとんどのいわゆる「可変」領域(これは、重鎖および軽鎖の両方で規定される)は、実際に、それらの三次元配置において非常に安定している。例えば、Huber、R. Science 233:702-703(1986)を参照のこと。

40

## 【0005】

免疫学、組換えDNA技術、およびコンピューター科学における最近の進歩は、抗原を結合する単一のポリペプチド鎖分子の作製を可能にした。これらの抗原結合単鎖分子(「

50

SCA) または抗体の単鎖可変フラグメント (「sFv」) は、リンカーポリペプチドを組み込んで、個々の可変領域  $V_L$  および  $V_H$  を架橋して、単一のポリペプチド鎖へとす。抗原結合単鎖タンパク質の理論および産生についての説明は、Ladnerら、特許文献1、特許文献2、特許文献3、および特許文献4に見られる。この米国特許において引用されるプロセスで産生される抗原結合単鎖タンパク質は、Fabフラグメントに対応するものに実質的に類似する結合特異性および親和性を有する。リンカー設計のためのコンピューター補助方法は、より詳細には、Ladnerら、特許文献5および特許文献6ならびに特許文献7に記載されている。

#### 【0006】

sFv (SCA) ポリペプチドのインビボ特性は、MAbおよび抗体フラグメントとは異なる。それらの小さなサイズに起因して、sFv (SCA) ポリペプチドは、血流からより迅速に消失し、そして組織へとより迅速に浸透する (Milenic, D. E. ら、Cancer Research 51: 6363 - 6371 (1991); Colcherら、J. Natl. Cancer Inst. 82: 1191 (1990); Yokotaら、Cancer Research 52: 3402 (1992))。定常領域が欠失していることに起因して、sFv (SCA) ポリペプチドは、肝臓および腎臓のような組織において保持されない。迅速なクリアランスおよび定常領域の欠失に起因して、sFv (SCA) ポリペプチドは、低い免疫原性を有する。従って、sFv (SCA) ポリペプチドは、ガン診断および治療において適用を有する。ここで、迅速な組織浸透およびクリアランスならびに微生物産生の容易さが有利である。

#### 【0007】

多価抗原結合タンパク質は、1つより多くの抗原結合部位を有する。多価抗原結合タンパク質は、2以上の単鎖タンパク質分子を含む。増強された結合活性、二以上の特異的結合および多価抗原結合タンパク質の他の新規の使用が実証されている。Whitlow、M. ら、Protein Engng. 7: 1017 - 1026 (1994); Hoogenboom、H. R. Nature Biotech 15: 125 - 126 (1997); およびWO93/11161を参照のこと。

#### 【0008】

Ladnerらはまた、抗原結合単鎖分子の、診断、治療、インビボおよびインビトロ画像化、精製、ならびにバイオセンサーにおける使用を開示する。抗原結合単鎖分子の、固定化形態または検出可能に標識された形態での使用もまた開示され、そしてヒト患者のような動物における特定の部位へ送達するための、抗原結合単鎖分子と治療薬剤 (例えば、薬物または特定の毒素) との結合体もまた開示されている。

#### 【0009】

Whitlowら (Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2(2): 97 - 105 (1991年6月)) は、抗原結合単鎖分子の技術の良好な総説を提供し、そしてそれらを作製するプロセスを記載する。

#### 【0010】

特許文献8において、Hustonらは、予め選択した抗原に対する親和性を有する合成タンパク質のファミリーを開示する。特許文献8の内容は、本明細書において参考として援用する。このタンパク質は、生合成抗体結合部位 (BABS) として挙動する領域を構成する1以上のアミノ酸配列によって特徴付けられる。この部位は、(1) 非共有結合的に会合しているかまたはジスルフィド結合している合成  $V_H$  および  $V_L$  領域、(2)  $V_H - V_L$  または  $V_L - V_H$  単鎖、ここで  $V_H$  および  $V_L$  がポリペプチドリンカーに結合している、または(3) 個々の  $V_H$  または  $V_L$  ドメインを含む。結合ドメインは、フレームワーク領域 (FR) に連結した相補性決定領域 (CDR) を含み、これは、別個の免疫グロブリンに由来し得る。

#### 【0011】

特許文献8はまた、ネイティブ免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の各々の可変ドメインの3つのサブ領域 (CDR) が、総合して、抗原認識および結合を担うことを開示す

10

20

30

40

50

る。これらのCDRは、超可変領域またはループの1つおよびその特定の超可変領域に隣接するフレームワーク領域に位置する選択されたアミノ酸またはアミノ酸配列からなる。多様な種由来のフレームワーク領域が、生合成タンパク質において真正の免疫化学的な結合特性を達成するために、適切なコンホメーションの多様な他の種由来のCDRを維持するに有効であるといわれている。

#### 【0012】

特許文献8は、完全な抗体結合部位を含む単鎖複合ポリペプチドであるキメラポリペプチドの記載を含む。この単鎖複合ポリペプチドは、アミノ酸配列を介して一方のアミノ末端に結合した他方のカルボキシ末端を有する、縦列のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインに倣ってパターン化された構造を有することが記載されている。従って、免疫グロブリン軽鎖(V<sub>L</sub>)の可変領域の一部分と相同である第二のアミノ酸配列に結合した、免疫グロブリン重鎖(V<sub>H</sub>)ペプチドの可変領域の一部分と相同であるアミノ酸配列を含む。

10

#### 【0013】

ポリアルキレングリコールの鎖の、ポリペプチド分子への共有結合は、Davisらの特許文献9、ならびにAbuchowskiおよびDavis「Enzymes as Drugs」、HolcenbergおよびRoberts編、367~383頁、John Wiley and Sons、New York(1981)に開示される。これらの参考文献は、ポリエチレングリコールを用いて修飾されたタンパク質および酵素が、親の化合物と比較して低減した免疫原性および抗原性を有し、そして血流でより長い寿命を有することを開示する。化学修飾された結合体の、得られた有利な特性は、種々の治療適用において非常に有用である。

20

#### 【0014】

上記に記載される単鎖ポリペプチドのようなアミノ酸配列、およびそれらの融合タンパク質は、哺乳動物において有意な抗原性とは相関付けられていないが、循環する寿命を延長し、そして抗原性応答の可能性をさらにより低減することが所望されてきた。しかし、ポリペプチドの比較的小さなサイズおよびそれらの精緻な構造/活性関係は、ポリエチレングリコール修飾を困難かつ予測不可能なものにしていた。最も重要なことに、PEGのようなポリマーとの結合体化の後にポリペプチドの保持された活性を調節する方法は未知であった。

#### 【0015】

ポリエチレングリコール(PEG)またはポリアルキレン(polyalkylene)オキシドの、タンパク質への共有結合を達成するために、ポリマーのヒドロキシル末端基がまず、反応性の官能基へと変換されねばならない。このプロセスは、しばしば、「活性化」といわれ、そして産物は、「活性化PEG」または活性化ポリアルキレンオキシドと呼ばれる。官能基で一方の端をキャップ化され、タンパク質分子上のアミンに対して反応性である、メトキシポリ(エチレングリコール)(mPEG)がほとんどの場合使用される。

30

#### 【0016】

活性化されたポリマーは、結合部位として作用する求核性官能基を有する治療薬剤と反応する。結合部位として一般に使用される1つの求核性官能基は、リジンの-アミノ基である。遊離のカルボン酸基、適切に活性化されたカルボニル基、酸化炭水化物部分およびメルカプト基もまた、結合部位として使用されている。

40

#### 【0017】

PEGのヒドロキシル基は、塩化シアヌルで活性化され、次いで得られた化合物をタンパク質と結合する(Abuchowskiら、J. Biol. Chem. 252:3578(1977); AbuchowskiおよびDavis、前出(1981))。しかし、この方法を使用する際には不利な点(例えば、塩化シアヌルの毒性、およびアミン以外の官能基(例えば、遊離の必須システインまたはチロシン残基)を有するタンパク質についてのその非特異的な反応性)がある。

#### 【0018】

50

これらおよび他の不利な点を克服するために、別の活性化PEG（例えば、PEGのスクシンイミジルスクシネート誘導体（「SS-PEG」））が導入された（Abuchowskiら、Cancer Biochem. Biophys. 7:175-186（1984））。SS-PEGは、穏和な条件下でタンパク質と迅速に（30分間）反応して、活性であるが、非常に修飾された結合体を生じる。

【0019】

Zalipskyは、特許文献10において、ポリ（エチレングリコール）-N-スクシンイミドカーボネートおよびその調製を開示する。この形態のポリマーはタンパク質のアミノ基、ならびに遊離のアミノ基を含む低分子量ペプチドおよび他の物質と容易に反応すると言われている。

10

【0020】

タンパク質のアミノ基とPEGとの間の他の連結もまた、当該分野において公知であり、例えば、ウレタン連結（Veroneseら、Appl. Biochem. Biotechnol. 11:141-152（1985））カルバメート連結（Beauchampら、Analyt. Biochem. 131:25-33（1983））などがある。

【0021】

Suzukiら（Biochimica et Biophysica Acta、788:248-255（1984））は、免疫グロブリンG（IgG）を、それまでに塩化シアヌルで活性化したポリ（エチレングリコール）に共有結合している。結合したIgGを、分子構造、サイズ排除クロマトグラフィー挙動、表面活性、界面凝集性、非特異的な補体活性化を誘導する加熱凝集性、および抗原結合活性のような物理化学的特性および生物学的特性について研究した。IgGへのポリ（エチレングリコール）結合は、見かけ上のIgGのストークス径および表面活性を増大させ、そして加熱および/または界面への曝露に対してIgGを安定化したが、IgGの構造変性は観察されなかった。抑制した非特異的な凝集性は、修飾されたIgG分子間の会合における困難さによって主に解釈された。これらの結果は、静脈内調製物としてポリ（エチレングリコール）結合したIgG、およびまた静脈内での使用のためのインタクトなIgGを安定化する添加剤としての使用を示唆した。

20

【0022】

Sharpら（Analytical Biochemistry 154:110-117（1986））は、細胞表面抗原に基づく2つのポリマー水相系において細胞を分離するための生体特異的な親和性リガンドを生成する可能性を調べた。ウサギ抗ヒト赤血球IgGを、塩化シアヌル活性化モノメチルポリ（エチレングリコール）画分（分子量約200、1900、および5000）と、PEG対タンパク質リジン基の種々のモル比で反応させた。デキストラン/PEG二相系におけるタンパク質の分配係数は、修飾の程度の上昇およびPEG分子量の上昇とともに増加する。ヒト赤血球を凝集させる能力が同時に欠失した。

30

【0023】

Tullisは、特許文献11において、オリゴヌクレオチドが疎水性部分（これは、ポリアルキレンオキシ基であり得る）に連結アームを介して結合された、オリゴヌクレオチド結合体を記載する。得られる結合体は、膜を横切り、そして転写系を有効に調節し得るように、膜輸送においてより効率的であるといわれている。このように、組成物は、細胞プロセスの研究、病原体から哺乳動物宿主を保護することなどのために、インビトロおよびインビボで使用され得る。

40

【0024】

しかし、過剰量のポリマー結合体および/または治療的部分の活性部位（ここで、生物活性と関連する基が見出されている）を含む結合体は、しばしば、活性の欠失をもたらす。従って、治療的有用性の欠失をもたらす。これは、しばしば、生物活性と関連しない結合部位をほとんど有しない、より低分子量のペプチドの場合に当てはまる。例えば、Benharら、（Bioconjugate Chem. 5:321-326）（1994

50

) ) は、組換え単鎖免疫毒素の P E G 化が、免疫毒素の特定の標的免疫反応性の欠失をもたらすことを観察した。免疫毒素の活性の欠失は、免疫毒素の抗体結合領域内での 2 つのリジン残基での P E G の結合の結果である。この問題を克服するために、Benharらは、これらの 2 つのリジン残基をアルギニン残基で置換し、そして誘導体化による不活化に 3 倍より耐性である活性な免疫毒素を入手し得た。

#### 【 0 0 2 5 】

上記で議論したこれらの問題を克服するための別の示唆は、より長く、より高分子量のポリマーを使用することである。しかし、これらの物質は、調製するのが困難で、そして使用するには高価である。さらに、これらは、より容易に入手可能なポリマーよりもほとんど改良を提供しない。

示唆される別の選択肢は、タンパク質のアミノ基ヘトリアジン環を介してポリマーの 2 つの鎖を結合することである。例えば、Enzyme 26 ; 49 - 53 ( 1981 ) および Proc . Soc . Exper . Biol . Med . , 188 : 364 - 369 ( 1988 ) を参照のこと。しかし、トリアジンは、毒性物質であり、この毒性物質は、結合体化後に受容可能なレベルにまで低減させることが困難である。したがって、トリアジンには基づかない活性化されたポリマーは、当該分野に対し、実質的な利益を提供する。

#### 【 先行技術文献 】

#### 【 特許文献 】

#### 【 0 0 2 6 】

- 【 特許文献 1 】 米国特許第 4 , 9 4 6 , 7 7 8 号明細書
- 【 特許文献 2 】 米国特許第 5 , 2 6 0 , 2 0 3 号明細書
- 【 特許文献 3 】 米国特許第 5 , 4 5 5 , 0 3 0 号明細書
- 【 特許文献 4 】 米国特許第 5 , 5 1 8 , 8 8 9 号明細書
- 【 特許文献 5 】 米国特許第 4 , 7 0 4 , 6 9 2 号明細書
- 【 特許文献 6 】 米国特許第 4 , 8 8 1 , 1 7 5 号明細書
- 【 特許文献 7 】 国際公開第 9 4 / 1 2 5 2 0 号パンフレット
- 【 特許文献 8 】 米国特許第 5 , 0 9 1 , 5 1 3 号明細書
- 【 特許文献 9 】 米国特許第 4 , 1 7 9 , 3 3 7 号明細書
- 【 特許文献 1 0 】 米国特許第 5 , 1 2 2 , 6 1 4 号明細書
- 【 特許文献 1 1 】 米国特許第 4 , 9 0 4 , 5 8 2 号明細書

#### 【 発明の概要 】

#### 【 課題を解決するための手段 】

#### 【 0 0 2 7 】

#### 発明の要旨

本発明は、ポリアルキレンオキシド / アミノ酸配列結合体およびそれらを調製するためのプロセスに関する。適切なアミノ酸配列は、例えば、抗原に対して結合親和性を有する単鎖ポリペプチドのようなペプチド ( 例えば、Ladnerら、米国特許第 4 , 9 4 6 , 7 7 8 号、およびHustonら、米国特許第 5 , 0 9 1 , 5 1 3 号に記載されるペプチド ) である。

#### 【 0 0 2 8 】

より詳細には、本発明は、抗原に対して結合親和性を有する、単鎖ポリペプチドに結合した少なくとも 1 つのポリアルキレンオキシド鎖を含む、生理学的に活性な実質的に非疫原性のポリペプチド結合体に関する。単鎖ポリペプチドは、以下：

- ( a ) 抗体の軽鎖可変領域の結合部分を含む第一のポリペプチド；
- ( b ) 抗体の重鎖可変領域の結合部分を含む第二のポリペプチド；および
- ( c ) この第一のポリペプチド ( a ) およびこの第二のポリペプチド ( b ) を連結して、抗原に対する結合親和性を有するこの単鎖ポリペプチドにする少なくとも 1 つのペプチドリンカーを含む。

#### 【 0 0 2 9 】

別の局面において、本発明は、生理学的に活性な、実質的に非免疫原性のポリペプチド組成物を調製するためのプロセスに関する。このプロセスは、上記の特性を有する単鎖ポリペプチドへポリアルキレンオキシドを結合する工程を含む。好ましくは、本明細書において使用されるポリ(アルキレンオキシド)は、標的ポリペプチドに結合するために活性化されたポリ(エチレングリコール)である。

**【0030】**

本発明はまた、抗原結合単鎖ポリペプチド - - ポリアルキレンオキシド結合体に関し、この結合体は、以下：

- (a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；
- (b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに
- (c) この第一のポリペプチド(a)およびこの第二のポリペプチド(b)を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリンカー

を含み

ここで、この抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体は、そのネイティブな、結合体化されていない形態のこの抗原結合単鎖ポリペプチドの抗原結合親和性の約1倍～約10倍の範囲にある抗原結合親和性を有する。

**【0031】**

本発明はまた、抗原結合単鎖ポリペプチド - - ポリアルキレンオキシド結合体に関し、この結合体は、以下：

- (a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；
- (b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに
- (c) この第一のポリペプチド(a)およびこの第二のポリペプチド(b)を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリンカー

を含む抗原結合単鎖ポリペプチド、を含む結合体であって、

ここで、この抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体は、そのネイティブな、結合体化されていない形態のこの抗原結合単鎖ポリペプチドの抗原結合親和性の約10倍以内の抗原結合親和性を有する。

**【0032】**

本発明はまた、抗原結合単鎖ポリペプチド - - ポリアルキレンオキシド結合体に関し、この結合体は、以下：

- (a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；
- (b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部位を含む第二のポリペプチド；ならびに
- (c) この第一のポリペプチド(a)およびこの第二のポリペプチド(b)を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリンカー

を含み

ここで、この抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体は、そのネイティブな、結合体化されていない形態のこの抗原結合単鎖ポリペプチドの抗原結合親和性の約5倍以内の抗原結合親和性を有する。

**【0033】**

本発明はまた、抗原結合単鎖ポリペプチド - - ポリアルキレンオキシド結合体に関し、この結合体は、以下：

- (a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；
- (b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに
- (c) この第一のポリペプチド(a)およびこの第二のポリペプチド(b)を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリンカー

を含み

10

20

30

40

50

ここで、この抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体は、そのネイティブな、結合体化されていない形態のこの抗原結合単鎖ポリペプチドの抗原結合親和性の約2倍以内の抗原結合親和性を有する。

【0034】

本発明はまた、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドに関し、このポリペプチドは、以下：

(a) 抗体の重鎖または軽鎖の変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

(b) 抗体の重鎖または軽鎖の変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

(c) この第一のポリペプチド(a)およびこの第二のポリペプチド(b)を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリンカーを含み

10

ここで、この抗原結合単鎖ポリペプチドは、少なくとも1つのCys残基を有し、ここで、このCys残基は、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得、そしてこのCys残基は、(i)この軽鎖変領域のアミノ酸11位、12位、13位、14位、または15位；(ii)この軽鎖変領域のアミノ酸77位、78位、または79位；(iii)この重鎖変領域のアミノ酸11位、12位、13位、14位、または15位；(iv)この重鎖変領域のアミノ酸82B位、82C位、または83位；(v)このペプチドリンカーの任意のアミノ酸位置；(vi)ポリペプチド(a)または(b)のC末端の近傍；および(vii)それらの組合せ、

20

からなる群から選択される位置に位置し、ここで、このポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドは、抗原に結合し得る。

【0035】

本発明はまた、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドに関し、このポリペプチドは、以下：

(a) 抗体の重鎖または軽鎖の変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

(b) 抗体の重鎖または軽鎖の変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

(c) この第一のポリペプチド(a)およびこの第二のポリペプチド(b)を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリンカーを含み、

30

ここで、この抗原結合単鎖ポリペプチドは、少なくとも3つの連続するLys残基を有し、ここで、この連続するLys残基は、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得、そしてこの連続するLys残基のうちの任意の1つは、(i)このペプチドリンカーの任意のアミノ酸位置、(ii)ポリペプチド(a)または(b)のC末端の近傍(adjacent to C-terminus)；および(iii)それらの組合せからなる群から選択される位置に位置し、ここで、このポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドは、抗原に結合し得る。sFv(SCA)タンパク質(すなわち、オリゴリジンsFv)におけるこれらの連続するリジン残基は、ポリアルキレンオキシド結合体化のための「ホットスポット」を生成する。

40

【0036】

本発明はまた、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドに関し、このポリペプチドは、以下：

(a) 抗体の重鎖または軽鎖の変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

(b) 抗体の重鎖または軽鎖の変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

(c) この第一のポリペプチド(a)およびこの第二のポリペプチド(b)を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリンカーを含み、

ここで、この抗原結合単鎖ポリペプチドが、少なくとも2つの連続するCys残基を有し

50



、ここで、この連続するCys残基は、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得、そしてこの連続するCys残基の任意の1つは、(i)このペプチドリンカーの任意のアミノ酸位置、(ii)ポリペプチド(a)または(b)のC末端の近傍；および(iii)それらの組合せからなる群から選択される位置に位置し、ここで、このポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドは抗原に結合し得る。sFv(SCA)タンパク質(すなわち、オリゴシステインsFv)におけるこれらの連続するシステイン残基は、ポリアルキレンオキシド結合体化のための「ホットスポット」を生成する。

【0037】

本発明はさらに、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドをコードする遺伝的配列に関し、この遺伝的配列は、以下：

- (a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；
- (b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに
- (c) この第一のポリペプチド(a)およびこの第二のポリペプチド(b)を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリンカーを含み、

ここで、この抗原結合単鎖ポリペプチドが、少なくとも1つのCys残基を有し、ここで、このCys残基は、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得、そしてこのCys残基は、(i)この軽鎖可変領域のアミノ酸11位、12位、13位、14位、または15位；(ii)この軽鎖可変領域のアミノ酸77位、78位、または79位；(iii)この重鎖可変領域のアミノ酸11位、12位、13位、14位、または15位；(iv)この重鎖可変領域のアミノ酸82B位、82C位、または83位；(v)このペプチドリンカーの任意のアミノ酸位置；(vi)ポリペプチド(a)または(b)のC末端の近傍；および(vii)それらの組合せ、からなる群から選択される位置に位置し、ここで、このポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドは、抗原に結合し得る。

【0038】

本発明はさらに、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドをコードする遺伝的配列に関し、この遺伝的配列は、以下：

- (a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；
- (b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに
- (c) この第一のポリペプチド(a)およびこの第二のポリペプチド(b)を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリンカーを含み、

ここで、この抗原結合単鎖ポリペプチドは、少なくとも3つの連続するLys残基を有し、ここで、この連続するLys残基は、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得、そしてこの連続するLys残基の任意の1つは、(i)このペプチドリンカーの任意のアミノ酸位置、(ii)ポリペプチド(a)または(b)のC末端の近傍；および(iii)それらの組合せからなる群から選択される位置に位置し、ここで、このポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドは、抗原に結合し得る。sFv(SCA)タンパク質(すなわち、オリゴリジンsFv)におけるこれらの連続するリジン残基は、ポリアルキレンオキシド結合体化のための「ホットスポット」を生成する。

【0039】

本発明はさらに、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドをコードする遺伝的配列に関し、この遺伝的配列は、以下：

- (a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；
- (b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに
- (c) この第一のポリペプチド(a)およびこの第二のポリペプチド(b)を連結して

、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリッカーを含み、

ここで、この抗原結合単鎖ポリペプチドは、少なくとも2つの連続するCys残基を有し、ここで、この連続するCys残基は、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得、そしてこの連続するCys残基の任意の1つは、(i)このペプチドリッカーの任意のアミノ酸位置、(ii)ポリペプチド(a)または(b)のC末端の近傍；および(iii)それらの組合せからなる群から選択される位置に位置し、ここで、このポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドは抗原に結合し得る。sFv(SCA)タンパク質(すなわち、オリゴシステインsFv)におけるこれらの連続するシステイン残基は、ポリアルキレンオキシド結合体化のための「ホットスポット」を生成する。

10

【0040】

遺伝的配列は、DNAまたはRNAであり得る。

【0041】

本発明は、上記のDNA配列を含む、複製可能なクローニングまたは発現ベヒクルに関する。本発明はまた、プラスミドであるこのようなベヒクルに関する。本発明はさらに、上記のDNAで形質転換した宿主細胞に関する。宿主細胞は、細菌細胞、酵母細胞もしくは他の真菌細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞株であり得る。好ましい宿主は、*Pichia pastoris*である。

【0042】

本発明は、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドを産生する方法に関し、この方法は、以下の工程：

20

(a)抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチドをコードする第一の遺伝的配列を提供する工程；

(b)抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチドをコードする第二の遺伝的配列を提供する工程；ならびに

(c)この第一の遺伝的配列(a)およびこの第二の遺伝的配列(b)を、ペプチドリッカーをコードする第三の遺伝的配列と連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドをコードする第四の遺伝的配列にする工程であって、

ここで、この抗原結合単鎖ポリペプチドは少なくとも1つのCys残基を有し、ここで、このCys残基は、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得、そしてこのCys残基は、(i)この軽鎖可変領域のアミノ酸11位、12位、13位、14位、または15位；(ii)この軽鎖可変領域のアミノ酸77位、78位、または79位；(iii)この重鎖可変領域のアミノ酸11位、12位、13位、14位、または15位；(iv)この重鎖可変領域のアミノ酸82B位、82C位、または83位；(v)このペプチドリッカーの任意のアミノ酸位置；(vi)ポリペプチド(a)または(b)のC末端の近傍；および(vii)それらの組合せからなる群から選択される位置に位置し、ここで、このポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドは抗原に結合し得る、工程；

30

(d)工程(c)のこの抗原結合単鎖ポリペプチドをコードするこの第四の遺伝的配列で宿主細胞を形質転換する工程；ならびに

40

(e)工程(c)のこの抗原結合単鎖ポリペプチドをこの宿主において発現させて、それにより、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドを産生する工程、を包含する。

【0043】

本発明はさらに、2以上の抗原結合単鎖ポリペプチドを含む多価抗原結合単鎖タンパク質に関し、この抗原結合単鎖ポリペプチドの各々は以下：

(a)抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

(b)抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

(c)この第一のポリペプチド(a)およびこの第二のポリペプチド(b)を連結して

50

、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリッカーを含み、

ここで、この抗原結合単鎖ポリペプチドは、少なくとも1つのCys残基を有し、ここで、このCys残基は、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得、そしてこのCys残基は、(i)この軽鎖可変領域のアミノ酸11位、12位、13位、14位、または15位；(ii)この軽鎖可変領域のアミノ酸77位、78位、または79位；(iii)この重鎖可変領域のアミノ酸11位、12位、13位、14位、または15位；(iv)この重鎖可変領域のアミノ酸82B位、82C位、または83位；(v)このペプチドリッカーの任意のアミノ酸位置；(vi)ポリペプチド(a)または(b)のC末端の近傍；および(vii)それらの組合せ、からなる群から選択される位置に位置し、ここで、このポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドは、抗原に結合し得る。

10

#### 【0044】

本発明の上記に記載の実施態様において、Cysポリアルキレンオキシド結合体化配列は、ポリアルキレンオキシド部分を結合し得、そしてCys残基は、(i')この軽鎖可変領域のアミノ酸77位；(ii')この重鎖可変領域のアミノ酸82B位；(iii')このペプチドリッカーのアミノ酸3位；(iv')このポリペプチド(a)または(b)のC末端の近傍；(v')N末端およびC末端；ならびに(vi')それらの組合せからなる群から選択される位置に位置し、ここで、ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドは、抗原を結合し得る。

20

#### 【0045】

本発明の上記の実施態様において、オリゴLysポリアルキレンオキシド結合体配列は、タンパク質のC末端に近接して位置するオリゴLys残基でポリアルキレンオキシド部分を結合し得、ここで、ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドは、抗原に結合し得る。

#### 【0046】

本発明の上記の実施態様において、第二のポリペプチド(b)のC末端は、ネイティブなC末端であり得る。第二のポリペプチド(b)のC末端は、この第二のポリペプチドの残りのN末端アミノ酸残基がこのポリアルキレンオキシド結合体化されたポリペプチドが抗原を結合し得るのに十分であるように、1または複数のアミノ酸残基の欠失を含み得る。第二のポリペプチドのC末端は、ポリアルキレンオキシド結合体化されたポリペプチドが抗原を結合し得るよう、1または複数のアミノ酸残基の付加を含み得る。

30

#### 【0047】

本発明の好ましい実施態様において、第一のポリペプチド(a)は、抗体軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含み得、そして第二のポリペプチド(b)は、抗体重鎖の可変領域の抗原結合部分を含み得る。

#### 【0048】

本発明はまた、サンプル中に存在すると疑われる抗原を検出する方法に関し、この方法は、以下の工程：

(a)本発明のポリアルキレンオキシド結合体化されたポリペプチドまたはタンパク質とこのサンプルを接触させる工程であって、ここで、このポリアルキレンオキシド結合体化されたポリペプチドは、1または複数の検出可能な標識分子と結合体化されているか、またはキャリアと結合体化されており、このキャリアは、このキャリアに結合した1または複数の検出可能な標識分子を有する、工程；および

40

(b)このポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドがこの抗原に結合したか否かを検出する工程、を包含する。

#### 【0049】

本発明はさらに、動物の内部構造を画像化する方法に関し、この方法は、この動物に、本発明のポリアルキレンオキシド結合体化されたポリペプチドまたはタンパク質の有効量

50

を投与する工程であって、ここで、このポリアルキレンオキシド結合体化されたポリペプチドは、1または複数の検出可能な標識分子またはキレート剤分子と結合体化されているか、またはキャリアと結合体化されており、このキャリアは、このキャリアに結合した1または複数の検出可能な標識分子またはキレート剤分子を有する、工程；およびこの動物に関連する検出可能な放射線を測定する工程、を包含する、方法に関する。動物は、ヒトおよび非ヒトを含む。

【0050】

本発明はまた、標的化された疾患を処置するための方法に関し、この方法は、本発明のポリアルキレンオキシド結合体化されたポリペプチドまたはタンパク質および薬学的に受容可能なキャリアビヒクルを含む組成物の有効量を投与する工程であって、ここで、このポリアルキレンオキシド結合体化されたポリペプチドは、1または複数の生理活性分子（例えば、ペプチド、脂質、核酸（すなわち、リン酸リジン複合体）、薬物、毒素、ハウ素付加物（addend）または放射性同位体分子）に結合体化されているか、またはキャリアに結合体化されており、このキャリアは、このキャリアに結合した、1または複数の、ペプチド、脂質、核酸（すなわち、リン酸リジン複合体）、薬物、毒素、ハウ素付加物または放射性同位体分子を有する、工程を包含する。

【0051】

したがって、本発明は以下を提供する。

1．抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体であって、以下：

（a）抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

（b）抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

（c）該第一のポリペプチド（a）および該第二のポリペプチド（b）を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリッカー

を含む抗原結合単鎖ポリペプチド、を含む結合体であって、

ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチドがポリアルキレンオキシドと結合体化され、そして、ここで該抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体が、その結合体化されていない形態における該抗原結合単鎖ポリペプチドの抗原結合親和性の約1倍～約10倍の範囲にある抗原結合親和性を有する、結合体。

2．抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体であって、以下：

（a）抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

（b）抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

（c）該第一のポリペプチド（a）および該第二のポリペプチド（b）を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリッカー

を含む抗原結合単鎖ポリペプチド、を含む結合体であって、

ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチドがポリアルキレンオキシドと結合体化され、そして、ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体が、その結合体化されていない形態における該抗原結合単鎖ポリペプチドの抗原結合親和性の約10倍以内の抗原結合親和性を有する、結合体。

3．抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体であって、以下：

（a）抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

（b）抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

（c）該第一のポリペプチド（a）および該第二のポリペプチド（b）を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリッカー

を含む抗原結合単鎖ポリペプチド、を含む結合体であって、

ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチドがポリアルキレンオキシドと結合体化され、そし

て、ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体が、その結合体化されていない形態における該抗原結合単鎖ポリペプチドの抗原結合親和性の約 5 倍以内の抗原結合親和性を有する、結合体。

4. 抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体であって、以下：

(a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

(b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

(c) 該第一のポリペプチド (a) および該第二のポリペプチド (b) を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリンカー

を含む抗原結合単鎖ポリペプチド、を含む結合体であって、

ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチドがポリアルキレンオキシドと結合体化され、そして、ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体が、その結合体化されていない形態における該抗原結合単鎖ポリペプチドの抗原結合親和性の約 2 倍以内の抗原結合親和性を有する、結合体。

5. ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドであって、以下：

(a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

(b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

(c) 該第一のポリペプチド (a) および該第二のポリペプチド (b) を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリンカー

を含む抗原結合単鎖ポリペプチドであって、

ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチドが、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る少なくとも 1 つの Cys 残基を有し、ここで、該 Cys 残基が以下：

(i) 該軽鎖可変領域のアミノ酸 11 位、12 位、13 位、14 位、または 15 位；

(ii) 該軽鎖可変領域のアミノ酸 77 位、78 位、または 79 位；

(iii) 該重鎖可変領域のアミノ酸 11 位、12 位、13 位、14 位、または 15 位；

(iv) 該重鎖可変領域のアミノ酸 82B 位、82C 位、または 83 位；

(v) 該ペプチドリンカーの任意のアミノ酸位置；

(vi) ポリペプチド (a) またはポリペプチド (b) の C 末端の近傍；および

(vii) それらの組合せ、

からなる群から選択される位置に位置し、

ここで、該ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原に結合し得る、ポリペプチド。

6. 前記ポリアルキレン結合体化をし得る Cys 残基が以下：

(i') 前記軽鎖可変領域のアミノ酸 77 位；

(ii') 前記重鎖可変領域のアミノ酸 82B 位；

(iii') 前記ペプチドリンカーのアミノ酸 3 位；

(iv') 前記ポリペプチド (a) または前記ポリペプチド (b) の C 末端の近傍；および

(v') それらの組合せ、

からなる群から選択される位置に位置する、

項目 5 に記載の抗原結合単鎖ポリペプチド。

7. 前記第一のポリペプチド (a) が抗体軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含み、そして前記第二のポリペプチド (b) が抗体重鎖の可変領域の抗原結合部分を含む、項目 5 に記載の抗原結合単鎖ポリペプチド。

10

20

30

40

50

8. 前記第二のポリペプチド (b) の C 末端がネイティブな C 末端である、項目 5 に記載の抗原結合単鎖ポリペプチド。

9. 前記第二のポリペプチド (b) の C 末端は、該第二のポリペプチドの残りの N 末端アミノ酸残基が、前記ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原を結合し得るのに十分であるように、1 または複数のアミノ酸残基の欠失を含む、項目 5 に記載の抗原結合単鎖ポリペプチド。

10. 前記第二のポリペプチド (b) の C 末端は、前記ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原を結合し得るように、1 または複数のアミノ酸残基の付加を含む、項目 5 に記載の抗原結合単鎖ポリペプチド。

11. 前記ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る Cys 残基がポリアルキレンオキシド部分に結合している、項目 5 に記載の抗原結合単鎖ポリペプチド。

12. 前記ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが、1 または複数の、ペプチド、脂質、核酸、薬物、毒素、キレート剤、ホウ素付加物または検出可能な標識分子に結合体化されている、項目 11 に記載のポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチド。

13. 前記ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが、キャリアに結合体化されており、該キャリアが、該キャリアに結合した、1 または複数の、ペプチド、脂質、核酸、薬物、毒素、キレート剤、ホウ素付加物または検出可能な標識分子を有する、項目 11 に記載のポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチド。

14. ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列であって、以下：

(a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

(b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

(c) 該第一のポリペプチド (a) および該第二のポリペプチド (b) を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリッカーを含む、ポリヌクレオチド配列であって、

ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチドが、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る少なくとも 1 つの Cys 残基を有し、ここで、該 Cys 残基が以下：

(i) 該軽鎖可変領域のアミノ酸 11 位、12 位、13 位、14 位、または 15 位；

(ii) 該軽鎖可変領域のアミノ酸 77 位、78 位、または 79 位；

(iii) 該重鎖可変領域のアミノ酸 11 位、12 位、13 位、14 位、または 15 位；

；

(iv) 該重鎖可変領域のアミノ酸 82 B 位、82 C 位、または 83 位；

(v) 該ペプチドリッカーの任意のアミノ酸位置；

(vi) 該ポリペプチド (a) または該ポリペプチド (b) の C 末端の近傍；および

(vii) それらの組合せ、

からなる群から選択される位置に位置し、そして

ここで、該ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原に結合し得る、ポリヌクレオチド配列。

15. 前記ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る Cys 残基が以下：

(i') 前記軽鎖可変領域のアミノ酸 77 位；

(ii') 前記重鎖可変領域のアミノ酸 82 B 位；

(iii') 前記ペプチドリッカーのアミノ酸 3 位；

(iv') 前記ポリペプチド (a) または前記ポリペプチド (b) の C 末端の近傍；および

(v') それらの組合せ、

からなる群から選択される位置に位置する、

10

20

30

40

50

項目 14 に記載のポリヌクレオチド配列。

16. 項目 14 に記載のポリヌクレオチド配列を含む、複製可能なクローニングまたは発現ビヒクル。

17. プラスミドである、項目 16 に記載のビヒクル。

18. 項目 17 に記載のポリヌクレオチドで形質転換した、宿主細胞。

19. 細菌細胞、酵母細胞もしくは他の真菌細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞株である、項目 18 に記載の宿主細胞。

20. *Pichia pastoris* である、項目 19 に記載の宿主細胞。

21. 抗原結合単鎖ポリペプチドを含む、抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体を産生する方法であって、以下の工程：

(a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチドをコードする第一の遺伝的配列を提供する工程；

(b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチドをコードする第二の遺伝的配列を提供する工程；ならびに

(c) 該第一の遺伝的配列 (a) および該第二の遺伝的配列 (b) を、リンカーをコードする第三の遺伝的配列と連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドをコードする第四の遺伝的配列にする工程、

を包含し、

ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチドは、ポリアルキレンオキシド結合体化がされ得、そして、

ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体が、その結合体化されていない形態における該抗原結合単鎖ポリペプチドの抗原結合親和性の約 1 倍 ~ 約 10 倍の範囲にある抗原結合親和性を保持する、方法。

22. ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドを産生する方法であって、以下の工程：

(a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチドをコードする第一の遺伝的配列を提供する工程；

(b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチドをコードする第二の遺伝的配列を提供する工程；ならびに

(c) 該第一の遺伝的配列 (a) および該第二の遺伝的配列 (b) を、ペプチドリッカーをコードする第三の遺伝的配列と連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドをコードする第四の遺伝的配列にする工程であって、

ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチドがポリアルキレンオキシド結合体化をし得る少なくとも 1 つの Cys 残基を有し、ここで、該 Cys 残基が以下：

(i) 該軽鎖可変領域のアミノ酸 11 位、12 位、13 位、14 位、または 15 位；

(ii) 該軽鎖可変領域のアミノ酸 77 位、78 位、または 79 位；

(iii) 該重鎖可変領域のアミノ酸 11 位、12 位、13 位、14 位、または 15 位；

；

(iv) 該重鎖可変領域のアミノ酸 82 B 位、82 C 位、または 83 位；

(v) 該ペプチドリッカーの任意のアミノ酸位置；

(vi) 該ポリペプチド (a) または該ポリペプチド (b) の C 末端の近傍；および

(vii) それらの組合せ、

からなる群から選択される位置に位置し、そして

ここで、該ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原に結合し得る、工程；

(d) 工程 (c) の該抗原結合単鎖ポリペプチドをコードする該第四の遺伝的配列で宿主細胞を形質転換する工程；ならびに

(e) 工程 (c) の該抗原結合単鎖ポリペプチドを該宿主において発現させて、それにより、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドを産生する工

10

20

30

40

50

程、

を包含する、方法。

23. 前記ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る C y s 残基が以下：

( i ' ) 前記軽鎖可変領域のアミノ酸 77 位；

( i i ' ) 前記重鎖可変領域のアミノ酸 82 B 位；

( i i i ' ) 前記ペプチドリンカーのアミノ酸 3 位；

( i v ' ) 前記ポリペプチド ( a ) または前記ポリペプチド ( b ) の C 末端の近傍；および

( v ' ) それらの組合せ、

からなる群から選択される位置に位置する、

項目 22 に記載の方法。

24. 第一のポリペプチド ( a ) をコードする前記第一の遺伝的配列が、抗体軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含み、そして前記第二のポリペプチド ( b ) をコードする第二の遺伝的配列が、抗体重鎖の可変領域の抗原結合部分を含む、項目 22 に記載の方法。

25. 前記第二のポリペプチド ( b ) の C 末端がネイティブな C 末端である、項目 22 に記載の方法。

26. 前記第二のポリペプチド ( b ) の C 末端は、該第二のポリペプチドの残りの N 末端アミノ酸残基が、前記ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原を結合し得るのに十分であるように、1 または複数のアミノ酸残基の欠失を含む、項目 22 に記載の方法。

27. 前記第二のポリペプチド ( b ) の C 末端は、前記ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原を結合し得るように、1 または複数のアミノ酸残基の付加を含む、項目 22 に記載の方法。

28. 2 以上の抗原結合単鎖ポリペプチドを含む多価抗原結合単鎖ポリペプチドポリアルキレンオキシド結合体であって、該抗原結合単鎖ポリペプチドの各々が以下：

( a ) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

( b ) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

( c ) 該第一のポリペプチド ( a ) および該第二のポリペプチド ( b ) を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリンカー

を含み、

ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチドがポリアルキレンオキシドと結合体化され、そして、ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチド - ポリアルキレンオキシド結合体が、その結合体化されていない形態における該抗原結合単鎖ポリペプチドの抗原結合親和性の約 1 倍 ~ 約 10 倍の範囲にある抗原結合親和性を保持する、結合体。

29. 2 以上の抗原結合単鎖ポリペプチドを含む多価抗原結合単鎖タンパク質であって、該抗原結合単鎖ポリペプチドの各々が以下：

( a ) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

( b ) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

( c ) 該第一のポリペプチドおよび該第二のポリペプチドを連結するペプチドリンカーを含み、

ここで、2 つのうちの 1 つの抗原結合単鎖ポリペプチドが、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る少なくとも 1 つの C y s 残基を有し、ここで、該 C y s 残基が以下：

( i ) 該軽鎖可変領域のアミノ酸 11 位、12 位、13 位、14 位、または 15 位；

( i i ) 該軽鎖可変領域のアミノ酸 77 位、78 位、または 79 位；

( i i i ) 該重鎖可変領域のアミノ酸 11 位、12 位、13 位、14 位、または 15 位；

；

( i v ) 該重鎖可変領域のアミノ酸 82 B 位、82 C 位、または 83 位；

10

20

30

40

50



- (v) 該ペプチドリンカーの任意のアミノ酸位置；
- (v i) 該ポリペプチド(a)または該ポリペプチド(b)のC末端の近傍；および
- (v i i) それらの組合せ、

からなる群から選択される位置に位置し、そして

ここで、該ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原に結合し得る、

多価タンパク質。

30. 前記ポリアルキレンオキシド結合体化をし得るCys残基が以下：

- (i') 前記軽鎖可変領域のアミノ酸77位；
- (i i') 前記重鎖可変領域のアミノ酸82B位；
- (i i i') 前記ペプチドリンカーのアミノ酸3位；
- (i v') 前記ポリペプチド(a)または前記ポリペプチド(b)のC末端の近傍；および

10

- (v') それらの組合せ、

からなる群から選択される位置に位置する、

項目29に記載の多価タンパク質。

31. 前記第一のポリペプチド(a)が、抗体軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含み、そして前記第二のポリペプチド(b)が、抗体重鎖の可変領域の抗原結合部分を含む、項目29に記載の多価タンパク質。

32. 前記第二のポリペプチド(b)のC末端がネイティブなC末端である、項目29に記載の多価タンパク質。

20

33. 前記第二のポリペプチド(b)のC末端は、該第二のポリペプチドの残りのN末端アミノ酸残基が、前記ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原を結合し得るのに十分であるように、1または複数のアミノ酸残基の欠失を含む、項目29に記載の多価タンパク質。

34. 前記第二のポリペプチドのC末端は、前記ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原を結合し得るように、1または複数のアミノ酸残基の付加を含む、項目29に記載の多価タンパク質。

35. 前記ポリアルキレンオキシド結合体化をし得るCys残基が、ポリアルキレンオキシド部分に結合している、項目29に記載の多価タンパク質。

30

36. 前記ポリアルキレンオキシド結合体化された多価タンパク質が、1または複数の、ペプチド、脂質、核酸、薬物、毒素、キレート剤、ホウ素付加物または検出可能な標識分子に結合体化されている、項目35に記載のポリアルキレンオキシド結合体化された多価タンパク質。

37. サンプル中に存在すると疑われる抗原を検出する方法であって、以下の工程：

(a) 項目1または11に記載のポリアルキレンオキシド結合体化されたポリペプチドまたはタンパク質と該サンプルとを接触させる工程であって、ここで、該ポリアルキレンオキシド結合体化されたポリペプチドまたはタンパク質は、1もしくは複数の検出可能な標識分子と結合体化されているか、またはキャリアと結合体化されており、該キャリアは、該キャリアに結合した1または複数の検出可能な標識分子を有する、工程；ならびに

40

(b) 該ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドまたはタンパク質が該抗原に結合したか否かを検出する工程、

を包含する方法。

38. 動物の内部構造を画像化する方法であって、以下の工程：

該動物に、項目1または11に記載のポリアルキレンオキシド結合体化されたポリペプチドまたはタンパク質の有効量を投与する工程であって、ここで、該ポリアルキレンオキシド結合体化されたポリペプチドまたはタンパク質は、1もしくは複数の検出可能な標識分子またはキレート剤分子と結合体化されているか、またはキャリアと結合体化されており、該キャリアは、該キャリアに結合した1または複数の検出可能な標識分子またはキレート剤分子を有する、工程；および

50

該動物に関連する検出可能な放射線を測定する工程、  
を包含する、方法。

39．前記動物がヒトを含む、項目38に記載の方法。

40．標的化された疾患を処置するための方法であって、以下の工程：

項目1または11に記載のポリアルキレンオキシド結合体化されたポリペプチドまたはタンパク質および薬学的に受容可能なキャリアビヒクルを含む組成物の有効量を投与する工程であって、ここで、該ポリアルキレンオキシド結合体化されたポリペプチドまたはタンパク質は、1または複数の、ペプチド、脂質、核酸、薬物、毒素、ホウ素付加物または放射性同位体分子に結合体化されているか、またはキャリアと結合体化されており、該キャリアが、該キャリアに結合した、1または複数の、ペプチド、脂質、核酸、薬物、毒素、ホウ素付加物または放射性同位体分子を有する、工程、  
を包含する方法。

10

41．ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドであって、以下：

(a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

(b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

(c) 該第一のポリペプチド(a)および該第二のポリペプチド(b)を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリinker  
を含み、

20

ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチドが、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る少なくとも3つの連続するLys残基を有し、そしてここで、該連続するLys残基の任意の1つが以下：

(i) 該ペプチドリinkerの任意のアミノ酸位置；

(ii) 該第二のポリペプチド(b)のC末端の近傍；および

(iii) それらの組合せ、

からなる群から選択される位置に位置し、

ここで、該ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原に結合し得る、  
ポリペプチド。

30

42．ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列であって、以下：

(a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

(b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

(c) 該第一のポリペプチド(a)および該第二のポリペプチド(b)を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリinker  
を含み、

ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチドが、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る少なくとも3つの連続するLys残基を有し、そしてここで、該連続するLys残基のうちの任意の1つが以下：

40

(i) 該ペプチドリinkerの任意のアミノ酸位置；

(ii) 該第二のポリペプチド(b)のC末端の近傍；および

(iii) それらの組合せ、

からなる群から選択される位置に位置し、

ここで、該ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原に結合し得る、  
ポリヌクレオチド配列。

43．項目42に記載のポリヌクレオチド配列を含む、複製可能なクローニングまたは発現ビヒクル。

50

44．プラスミドである、項目43に記載のビヒクル。

45．項目42に記載のポリヌクレオチドで形質転換した、宿主細胞。

46．細菌細胞、酵母細胞もしくは他の真菌細胞、昆虫細胞、もしくは哺乳動物細胞株である、項目39に記載の宿主細胞。

47．*Pichia pastoris*である、項目46に記載の宿主細胞。

48．ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドを産生する方法であって、該ポリペプチドが以下：

(a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

(b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

(c) 該第一のポリペプチド(a)および該第二のポリペプチド(b)を連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドにするペプチドリッカーを含み、

ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチドが、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る少なくとも3つの連続するLys残基を有し、そしてここで、該連続するLys残基のうちの任意の1つが以下：

(i) 該ペプチドリッカーの任意のアミノ酸位置；

(ii) 該第二のポリペプチド(b)のC末端の近傍；および

(iii) それらの組合せ、

からなる群から選択される位置に位置し、

ここで、該ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原に結合し得る、方法。

49．前記ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る連続するLys残基のうちの任意の1つが、ポリアルキレンオキシド部分に結合している、項目41に記載の抗原結合単鎖ポリペプチド。

50．前記ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが、1または複数の、ペプチド、脂質、核酸、薬物、毒素、キレート剤、ホウ素付加物または検出可能な標識分子に結合体化されている、項目49に記載のポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチド。

51．前記ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが、キャリアに結合体化されており、該キャリアが、該キャリアに結合した、1または複数の、ペプチド、脂質、核酸、薬物、毒素、キレート剤、ホウ素付加物または検出可能な標識分子を有する、項目49に記載のポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチド。

52．ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドを産生する方法であって、以下の工程：

(a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチドをコードする第一の遺伝的配列を提供する工程；

(b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチドをコードする第二の遺伝的配列を提供する工程；ならびに

(c) 該第一の遺伝的配列(a)および該第二の遺伝的配列(b)を、ペプチドリッカーをコードする第三の遺伝的配列と連結して、抗原結合部位を有する単鎖ポリペプチドをコードする第四の遺伝的配列にする工程であって、

ここで、該抗原結合単鎖ポリペプチドが、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る少なくとも3つの連続するLys残基を有し、そしてここで、該連続するLys残基のうちの任意の1つが以下：

(i) 該ペプチドリッカーの任意のアミノ酸位置；

(ii) 該第二のポリペプチド(b)のC末端の近傍；および

(iii) それらの組合せ、

10

20

30

40

50

からなる群から選択される位置に位置し、

ここで、該ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原に結合し得る、工程；

(d) 工程(c)の該抗原結合単鎖ポリペプチドをコードする該第四の遺伝的配列で宿主細胞を形質転換する工程；ならびに

(e) 工程(c)の該抗原結合単鎖ポリペプチドを該宿主において発現させて、それにより、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る抗原結合単鎖ポリペプチドを産生する工程、

を包含する、方法。

53. 第一のポリペプチド(a)をコードする前記第一の遺伝的配列が、抗体軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含み、そして第二のポリペプチド(b)をコードする前記第二の遺伝的配列が、抗体重鎖の可変領域の抗原結合部分を含む、項目52に記載の方法。

54. 前記第二のポリペプチド(b)のC末端がネイティブなC末端である、項目52に記載の方法。

55. 前記第二のポリペプチド(b)のC末端は、該第二のポリペプチドの残りのN末端アミノ酸残基が、前記ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原を結合し得るのに十分であるように、1または複数のアミノ酸残基の欠失を含む、項目52に記載の方法。

56. 前記第二のポリペプチド(b)のC末端は、前記ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原を結合し得るように、1または複数のアミノ酸残基の付加を含む、項目52に記載の方法。

57. 2以上の抗原結合単鎖ポリペプチドを含む多価抗原結合単鎖タンパク質であって、該抗原結合単鎖ポリペプチドの各々が以下：

(a) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第一のポリペプチド；

(b) 抗体の重鎖または軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含む第二のポリペプチド；ならびに

(c) 該第一のポリペプチド(a)および該第二のポリペプチド(b)を連結するペプチドリッカー

を含み、

ここで、2つのうちの1つの抗原結合単鎖ポリペプチドが、ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る少なくとも3つの連続するLys残基を有し、そしてここで、該連続するLys残基のうちの任意の1つが以下：

(i) 該ペプチドリッカーの任意のアミノ酸位置；

(ii) 該第二のポリペプチド(b)のC末端の近傍；および

(iii) それらの組合せ、

からなる群から選択される位置に位置し、

ここで、該ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原に結合し得る、

多価タンパク質。

58. 前記第一のポリペプチド(a)が、抗体軽鎖の可変領域の抗原結合部分を含み、そして前記第二のポリペプチド(b)が、抗体重鎖の可変領域の抗原結合部分を含む、項目57に記載の多価タンパク質。

59. 前記第二のポリペプチド(b)のC末端がネイティブなC末端である、項目57に記載の多価タンパク質。

60. 前記第二のポリペプチド(b)のC末端は、該第二のポリペプチドの残りのN末端アミノ酸残基が、前記ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原を結合し得るのに十分であるように、1または複数のアミノ酸残基の欠失を含む、項目57に記載の多価タンパク質。

61. 前記第二のポリペプチドのC末端は、前記ポリアルキレンオキシド結合体化された抗原結合単鎖ポリペプチドが抗原を結合し得るように、1または複数のアミノ酸残基の付

10

20

30

40

50

加を含む、項目57に記載の多価タンパク質。

62. ポリアルキレンオキシド結合体化をし得る前記連続するLys残基の任意の1つが、ポリアルキレンオキシド部分に結合している、項目57に記載の多価タンパク質。

63. 前記ポリアルキレンオキシド結合体化された多価タンパク質が、1または複数の、ペプチド、脂質、核酸、薬物、毒素、キレート剤、ホウ素付加物または検出可能な標識分子に結合体化されている、項目62に記載のポリアルキレンオキシド結合体化された多価タンパク質。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】図1は、ヒト乳ガン抽出物におけるTAG-72抗原への結合について、非標識PEG修飾CC49/212SCA（黒四角）、CC49/212SCA（白四角）、CC49IgG（白丸）、およびMOPC-211gG(+)が<sup>125</sup>Iで放射標識したCC49 IgGに対して競合した3つの競合ELISAのグラフ表記である。 10

【図2A】図2は、下線を付されたコドンにより示される位置、および星印により印を付けられたコドンにより示される位置で4つの操作されたシステイン残基を有するCC49/212SCAのDNA配列およびタンパク質配列を示す。また、CDR配列（二重下線）および218リンカー（下線および表示）が強調されている。さらに、2つのジスルフィド結合に關与するタンパク質中の4つの天然のシステイン残基が存在する。これらは、下線を付されていない。4つの操作されたシステイン残基は、現在のところ4つの異なる変異体において独立的に生じるが、この図に示される正確な4つの変異コドンのバージョンにおいて、組み合 20

【図2B】図2は、下線を付されたコドンにより示される位置、および星印により印を付けられたコドンにより示される位置で4つの操作されたシステイン残基を有するCC49/212SCAのDNA配列およびタンパク質配列を示す。また、CDR配列（二重下線）および218リンカー（下線および表示）が強調されている。さらに、2つのジスルフィド結合に關与するタンパク質中の4つの天然のシステイン残基が存在する。これらは、下線を付されていない。4つの操作されたシステイン残基は、現在のところ4つの異なる変異体において独立的に生じるが、この図に示される正確な4つの変異コドンのバージョンにおいて、組み合

【図3A】図3は、操作されたオリゴ-リジンC末端テイルセグメントを有するCC49/218SCAのDNA配列およびタンパク質配列を示す。8個の新しいリジン残基は、BstEII部位で遺伝子操作されており、下線を付され、そして星印で印を付けて示されている。また、CDR配列（二重下線）、218リンカー（下線および表示）および選択された制限部位が強調されている。 30

【図3B】図3は、操作されたオリゴ-リジンC末端テイルセグメントを有するCC49/218SCAのDNA配列およびタンパク質配列を示す。8個の新しいリジン残基は、BstEII部位で遺伝子操作されており、下線を付され、そして星印で印を付けて示されている。また、CDR配列（二重下線）、218リンカー（下線および表示）および選択された制限部位が強調されている。

【図4】図4は、ヒト乳ガン抽出物におけるTAG-72抗原への結合について、非標識SC-PEG未反応CC49/218SCA（黒四角）、CC49/218SCA（白四角）、非標識XUS-PEG未反応CC49/218SCA（白丸）、SC-PEG修飾CC49/218SCA（黒丸）、XUG-PEG修飾CC49/218SCA（白三角）、CC49 IgG（黒三角）、抗FITCSCA（破線）またはBL-3 IgG（点線）が<sup>125</sup>Iで放射標識したCC49 IgGに対して競合された3つの競合ELISAのグラフ表記である。 40

【図5】図5は、SCAおよびPEG-SCAの血漿保持の薬物動態学を示す。実験の詳細は、実施例13に記載されている。

【図6】図6は、PEG5000により架橋された精製CC49多量体の、還元条件下でのSDS-PAGEを示す。実験の詳細は、実施例14に記載されている。ゲルのレーンは、以下を含む：1) 三量体形態；2) 二量体形態；3) 二量体形態；4) 混合集団（mixed population）；5) ネイティブのCC49；6) PEG-CC49単量体；7) PEG-CC49単量体；8) 空；9) 空；お 50

よび10)分子量標準。

【図7】図7は、モノ-PEG-CC49、ジ-PEG-CC49、トリ-PEG-CC49の結合速度論を示す。実験の詳細は、実施例14に示されている。ネイティブのCC49は、黒四角により表されている。PEG-モノ-CC49は、白四角により表されている。PEG-ジ-CC49は、黒ひし形により表されている。PEG-トリ-CC49は、白ひし形により表されている。

【図8】図8は、実施例16で行われた競合アッセイの結果を示す。Natは、ネイティブのC49-SCAであり、C2はPEGSC2000-CC49-SCAであり;GCは、グリコ-CC49-SCAであり; B<sup>\*</sup>はビオチン化CC49-SCAであり; C12は、PEG-SC12,000-CC49-SCAであり;F5は、PEG-Flan-5000-C49-SCAであり;そしてC20は、PEG-SC20000-CC49-SCAである。

【発明を実施するための形態】

10

【0053】

実施態様の説明

本発明は、ポリアルキレングリコール (polyalkylene glycol) と抗原に対して結合親和性を有する単鎖ポリペプチドとの新規の組み合わせ、ポリアルキレングリコールならびにポリペプチド (好ましくは、結合剤により共に結合されている) に関する。

単鎖ポリペプチド

本発明は、PEG化されたSCAタンパク質のようなポリアルキレンオキシド結合単鎖抗原結合タンパク質 (「SCA」) または抗体の単鎖可変フラグメント (「sFv」) が、非PEG化単鎖抗原結合タンパク質の有用性を超える有意な有用性を有するという発見に関する。抗原結合部位の維持に加えて、PEG化SCAタンパク質は、血流における抗原性を減少させ、そして修飾されたポリペプチドの半減期を増加させるPEG部分を有する。従って、本発明は、PEG化の可能な一価および多価のSCAタンパク質、一価および多価のPEG化SCAタンパク質の組成物、一価および多価のPEG化SCAタンパク質の作製方法および精製方法、ならびにPEG化SCAタンパク質の使用に関する。本発明はまた、システイン連結PEG化ポリペプチドまたはオリゴ-リジン連結PEG化ポリペプチドに、共有結合された診断剤、または治療剤を有するPEG化SCAタンパク質にも関する。

20

【0054】

用語「単鎖抗原結合分子」(SCA) または「単鎖Fv」(sFv) は、互換的に使用される。それらは、抗体の可変領域 $V_H$  (または、 $V_L$ ) 由来の第2のポリペプチド結合部分に結合された、抗体の可変領域 $V_L$  (または、 $V_H$ ) 由来の第1のポリペプチド結合部分 (その2つのポリペプチドは、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを1本のポリペプチド鎖に連結させるペプチドリンカーにより結合されている) を含むものとして構造的に定義され、その結果、第1のポリペプチドはリンカーに対してN末端側であり、そして第2のポリペプチドは、第1のポリペプチドおよびリンカーに対してC末端側である。従って、1本のポリペプチド鎖は、ポリペプチドリンカーにより結合された可変領域の対を含む。領域が、適切に対になった相補性決定領域 (CDR) を有する軽鎖可変領域と重鎖可変領域との対を含む場合と同様に、その領域は、機能的な抗原結合部位を形成するために結合され得る。この場合、単鎖タンパク質は、「単鎖抗原結合タンパク質」または「単鎖抗原結合分子」と呼ばれる。

30

【0055】

単鎖Fvは、いくつかの方法において構築され得、そして構築されている。 $V_L$  が、リンカーおよび $V_H$  の続くN末端ドメイン ( $V_L$ -リンカー- $V_H$  構築物) であるか、または $V_H$  が、リンカーおよび $V_L$  の続くN末端ドメイン ( $V_H$ -リンカー- $V_L$  構築物) であるかのいずれかである。好ましい実施態様は、N末端ドメインに $V_L$  を含む (Anand, N.N. ら、J. Biol. Chem. 266:21874-21879(1991) を参照のこと)。あるいは、多価リンカーもまた使用されている。いくつかのタイプのsFv (SCA) タンパク質は、首尾良く構築され、精製されており、そして結合親和性およびそれらが由来した抗体と同様の特異性が示されている。

40

【0056】

単鎖抗原結合タンパク質の理論および生成の記載は、Ladner ら、米国特許第4,946,778号、同第5,260,203号、同第5,455,030号、および同第5,518,889号に、ならびにHustonら

50

、米国特許第5,091,513号(「生合成抗体結合部位」(BABS))において見出され、全てが本明細書に参考として援用されている。上記の特許に記載されたプロセス下で生成された単鎖抗原結合タンパク質は、結合特異性および対応するFabフラグメントの親和性と実質的に同様の親和性を有する。

【0057】

代表的に、Fvドメインは、以下の文献において、その略名(26-10、MOPC315、741F8、520C9、McPC603、D1.3、マウスphOx、ヒトphOx、RFL3.8sTCR、1A6、Se155-4、18-2-3、4-4-20、7A4-1、B6.2、CC49、3C2、2c、MA-15C5/K<sub>12</sub>G<sub>0</sub>、Oxなど)により公知のモノクローナル抗体の群から選択されている。Huston J.S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883(1988); Huston J.S.ら、SIM News38(4)(補遺):11(1988); McCartney, J.ら、ICSU Short Reports 10:114(1990); McCartney, J.E.ら、公開されていない結果(1990); Nedelman, M.A.ら、J. Nuclear Med. 32(補遺):1005(1991); Huston J.S.ら、「Molecular Design and Modeling Concepts and Applications」, B部, J.J. Langone編, Methods in Enzymology 203:46-88(1991); Huston, J.S.ら、Advances in the Applications of Monoclonal Antibodies in Clinical Oncology, Epenetos, A.A.(編), London, Chapman & Hall(1993); Bird, R.E.ら、Science 242:423-426(1988); Bedzyk, W.D.ら、J. Biol. Chem. 265:18615-18620(1990); Colcher D.ら、J. Nat. Cancer Inst. 82:1191-1197(1990); Gibbs R.A.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4001-4004(1991); Milenic, D.E.ら、Cancer Research 51:6363-6371(1991); Pantoliano, M.W.ら、Biochemistry 30:10117-10125(1991); Chaudhary, V.K.ら、Nature 339:394-397(1989); Chaudhary, V.K.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1066-1070(1990); Batra, J.K.ら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 171:1-6(1990); Batra, J.K.ら、J. Biol. Chem. 265:15198-15202(1990); Chaudhary, V.K.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9491-9494(1990); Batra, J.K.ら、Mol. Cell. Biol. 11:2200-2205(1991); Brinkmann, U.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8616-8620(1991); Seetharam, S.ら、J. Biol. Chem. 266:17376-17381(1991); Brinkmann, U.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3075-3079(1992); Glockshuber, R.ら、Biochemistry 29:1362-1367(1990); Skerra, A.ら、Bio/Technol. 9:273-278(1991); Pack, P.ら、Biochemistry 31:1579-1584(1992); Clackson, T.ら、Nature 352:624-628(1991); Marks, J.D.ら、J. Mol. Biol. 222:581-597(1991); Iverson, B.L.ら、Science 249:659-662(1990); Roberts, V.A.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6654-6658(1990); Condra, J.H.ら、J. Biol. Chem. 265:2292-2295(1990); Laroche, Y.ら、J. Biol. Chem. 266:16343-16349(1991); Holvoet, P.ら、J. Biol. Chem. 266:19717-19724(1991); Anand, N.N.ら、J. Biol. Chem. 266:21874-21879(1991); Fuchs, P.ら、Bio/Technol. 9:1369-1372(1991); Breitling, F.ら、Gene 104:104-153(1991); Seehaus, T.ら、Gene 114:235-237(1992); Takkinen, K.ら、Protein Engng 4:837-841(1991); Dreher, M.L.ら、J. Immunol. Methods 139:197-205(1991); Mottez, E.ら、Eur. J. Immunol. 21:467-471(1991); Traunecker, A.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8646-8650(1991); Traunecker, A.ら、EMBO J. 10:3655-3659(1991); Hoo, W.F.S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4759-4763(1993)を参照のこと。

【0058】

sFv(SCA)ポリペプチドを構築するために使用される本発明のリンカーは、V<sub>L</sub>のC末端(または、その近傍部位)とV<sub>H</sub>のN末端(または、その近傍部位)とを、すなわちV<sub>H</sub>のC末端とV<sub>L</sub>のN末端との間を架橋するために設計される。ペプチドリンカーの好ましい長さは、2~約50アミノ酸であるべきである。それぞれの特定の場において、好ましい長さは、連結されるポリペプチドの性質、および連結により生じる連結された融合ポリペプチドの所望の活性に依存する。一般的に、リンカーは、得られる連結された融合ポリペプチドを、所望の生物学的活性を提供する立体配座に適切に折りたたむことを可能にするのに十分長いべきである。立体配座の情報が利用可能な場合、以下に議論されるsFv(SCA)ポリペプチドの場合のように、適切なリンカーの長さは、置換ポリペプチドの3次元立体配座および得られる連結された融合ポリペプチドの所望の立体配座を考慮することにより推定され得る。このような情報が利用可能でない場合、適切なリンカーの長さは、種々の長

さのリンカーを有する一連の連結された融合ポリペプチドを所望の生物学的活性について試験することにより、経験的に決定され得る。このようなリンカーは、WO94/12520において詳細に記載され、これは本明細書に参考として援用される。

【0059】

sFv (SCA) ポリペプチドを構築するために使用される好ましいリンカーは、10と30の間のアミノ酸残基を有する。このリンカーは、フレキシブルとなるよう設計されており、そしてGlyとSer残基が交互の基礎配列が使用されることが推奨されている。リンカーおよびその結合単鎖Fvタンパク質の溶解性を増強するために、3つ荷電した残基(2つの正に荷電したリジン残基(K)および1つの負に荷電したグルタミン酸残基(E))が含まれ得る。好ましくは、リンカーとV<sub>H</sub>とのペプチド結合を形成する場合に失われた正荷電を置換するために、リジン残基の1つが、V<sub>H</sub>のN末端に近接して配置される。このようなリンカーは、1994年4月7日に出願された米国特許出願S.N.08/224,591において詳細に記載され、これは本明細書に参考として援用される。Whitlow, M.ら、Protein Engng.7:1017-1026(1994)もまた参照のこと。

10

【0060】

多価sFv (SCA) については、2つ以上のsFv (SCA) の結合がその形成に必要である。多価sFv (SCA) は、25残基と同じくらいの長さのリンカーを用いてsFv (SCA) から生成され得るが、それらは不安定である傾向がある。Holliger, P.ら、Proc.Natl.Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)は、最近、0から15残基長のリンカーが2価のFvsの形成を容易にすることを示した。Whitlow, M.ら、Protein Engng. 7:1017-1026(1994); Hoogenboom, H.R., Nature Biotech.15:125-126(1997); およびWO93/11161を参照のこと。

20

【0061】

本発明の目的は、ネイティブの単鎖抗原結合ポリペプチドの抗原結合親和性の約2倍~約10倍の範囲内の抗原結合性親和性を保持する、単鎖抗原結合ポリペプチド-ポリアルキレンオキシド結合体を生成することである。

【0062】

本発明の別の目的は、1つ以上のCys残基を有するsFv (SCA) を生成することであり、その結果、Cys残基はPEGと結合され得、そしてPEG化ポリペプチドは抗原に結合可能である(すなわち、抗原に結合するPEG化ポリペプチドの能力は、破壊されない)。本発明のさらなる目的は、3つ以上の連続したリジン残基を有するsFv (SCA) を生成することであり、その結果、Lys残基はPEGと結合され得、そしてPEG化ポリペプチドは抗原に結合可能である(すなわち、抗原に結合するPEG化ポリペプチドの能力は、破壊されない)。これらの新規のsFv (SCA) タンパク質は、活性化されたポリエチレングリコール(PEG)と結合され得、その結果PEGの修飾は、特別に操作された部位でのみ(または、優先的に)生じる。活性化されたPEG分子は、例えば、当該分野で周知のチオール反応性またはアミン反応性のポリマーである。設計された変化は、抗体のFvドメインの公知の3次元モデルから推定されるような抗原結合部位から空間的に十分に離れている、sFv (SCA) 表面上のアミノ酸残基に対応する。

30

【0063】

本発明のさらなる目的は、1つ以上のCys PEG結合配列を有する一価および多価のsFv (SCA) を生成することである。本発明のさらなる目的は、3つ以上の連続したLys(すなわち、オリゴ-Lys) PEG結合配列を有する一価および多価のsFv (SCA) を生成することである。多価のsFv (SCA) については、2つ以上のsFv (SCA) の結合が、その形成のために必要である。例えば、多価sFv (SCA) は、C末端システイン残基を有する2つのsFv (SCA) を化学的に架橋することにより(Cumberら、J. Immunol.149:120-126(1992))、および二量体Fv (SCA) を形成するために第3のポリペプチドを用いて2つのsFv (SCA) を連結することにより(Georgeら、J.Cell.Biochem. 15E:127(1991))生成され得る。凝集により多価のsFv (SCA) を生成するための詳細は、Whitlow, M.ら、Protein Engng.7:1017-1026(1994)において記載されている。本発明の多価の抗原結合融合タンパク質は、任意のプロセスにより作製され得るが、好ましくは、本明細書に参考として援用されるWO93/11161に

40

50



示されている多価の抗原結合タンパク質の作製プロセスに従って作製され得る。

【0064】

部位特異的PEG化配列の同定および合成

本発明において、CysPEG化部位は、ポリペプチド ( $V_L$ 、 $V_H$ 、またはその隣接部位) のC末端、ポリペプチド ( $V_L$ 、 $V_H$ 、またはその隣接部位) のN末端、第1のポリペプチド領域と第2のポリペプチド領域との間のリンカーの近傍で、 $V_L$ および $V_H$ 領域において生じ得るか、またはこれらの領域の組み合わせにおいて生じ得る。本発明において、オリゴ-Lys PEG化部位は、ポリペプチドリンカーにおいて生じ得るか、またはポリペプチドのC末端において、もしくはそのポリペプチドのC末端の近傍で生じ得る。タンパク質におけるPEG結合部位の設計は、タンパク質および抗原結合に關与するそのタンパク質における残基

10

【0065】

Cys PEG化部位またはオリゴ-LysPEG化部位は、(1) ネイティブの $V_L$  (または $V_H$ ) のC末端、(2)  $V_L$  (または $V_H$ ) のC末端 (ここでこのC末端は1つまたは複数のアミノ酸残基の欠失を有し、その結果、そのペプチドの残りのN末端アミノ酸残基は、PEG化されたポリペプチドが抗原に結合し得るのに十分である)、または(3)  $V_L$  (または $V_H$ ) のC末端 (ここでこのC末端はアミノ酸残基の1つまたは複数の付加を有し、その結果、そのペプチドの残りのN末端アミノ酸残基は、PEG化されたポリペプチドが抗原に結合し得るのに十分である)。「ネイティブ」によって、天然に存在する免疫グロブリン (第1または第2のポリペプチド) のC末端が意図される。「C末端」によって、ポリペプチドの最初のN末端アミノ酸残基を除く、ポリペプチドのアミノ酸残基の全てに至るまで含み得る、ポリペプチドのC末端アミノ酸残基またはC末端領域が意図されるものとして、当該分野において十分に理解される。しかし、本発明において、「C末端」は、他に示されるか、または意図されない限り、上記の3つのタイプのC末端 (1、2、または3) のC末端アミノ酸残基として意図される。

20

【0066】

PEG化部位は、抗原結合部位に対して正反対であるsFv (SCA) 領域におけるループ部位内の残基で同定され、そして操作された。グリコシル化の好ましい部位として選択された5つのループ領域およびC末端伸長は、結合部位から空間的に離れた最も遠い領域にある。

30

【0067】

抗原結合部位から最も遠いsFv (SCA) の6つの部分は、以下である：

- 1) 軽鎖における残基11~15で構成されるループ；
- 2) 軽鎖における残基77~79で構成されるループ；
- 3) リンカーのN末端；
- 4) 重鎖における残基11~15で構成されるループ；
- 5) 重鎖における残基82B、82C、および83で構成されるループ；および
- 6) sFv (または、SCA) のC末端。

残基は、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, US. Dept. Health and Human Services, Bethesda, MD (1991) によるように同定される。これらの可能なPEG化部位は、4-4-20マウスFab構造を調べることにより決定された (参考として本明細書に援用される、Whitlow, M.ら、Protein Engng. 8:749-761 (1995) を参照のこと)。

40

【0068】

抗原結合部位から最も遠いループを同定した後、それぞれのループの核酸配列およびアミノ酸配列が、ループ領域へと操作され得る可能なCys PEG化部位について調べられる。これら同定された6つの領域におけるいずれかの場所でCys残基の操作された配置が、sFv (SCA) PEG化のための好ましい部位を生成し得る。リンカー、sFv (SCA) のC末端および/またはsFv (SCA) のC末端の近傍における操作されたオリゴ-Lys残基の位置は、sFvのPEG化のための好ましい部位を生成し得る。

50

## 【 0 0 6 9 】

上記の設計アプローチは、CC49/218 SCAに使用されている。図 2 は、以下の生成設計物を示す：CC49/218SCAの軽鎖において設計されたPEG化部位番号 1；CC49/218SCAのリンカーの N 末端において設計されたPEG化部位番号 2；CC49/218 SCAの重鎖において設計されたPEG化部位番号 3；CC49/218SCAの C 末端で設計されたPEG化部位番号 4。図 3 は、以下の生成設計物を示す：CC49/218SCAの C 末端で設計されたオリゴ-Lys「ホットスポット (hotspot)」PEG化部位。これらの部位の任意の組み合わせが、使用され得る。

## 【 0 0 7 0 】

Cys PEG化部位またはオリゴ-LysPEG化部位を、種々の位置に導入するために使用される特定のヌクレオチド配列は、天然に存在するヌクレオチド配列に依存する。最も好ましい部位は、PEG化部位の生成のために最小数の変化を要する部位である。もちろん、遺伝コードの重複性に基づいて特定のアミノ酸が複数のヌクレオチド配列によりコードされ得る。

10

## 【 0 0 7 1 】

部位特異的変異誘発が、ネイティブのタンパク質配列をPEG化のためのCys残基またはオリゴ-Lys残基を組み込む配列に変化するために使用される。変異タンパク質の遺伝子は、発現系（例えば、細菌細胞、酵母細胞、もしくは他の真菌細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞）に配置される。変異タンパク質は、標準的な精製方法により精製され得る。

## 【 0 0 7 2 】

Cys PEG化部位またはオリゴ-LysPEG化部位を生成するためのオリゴヌクレオチド特異的変異誘発法、およびクローン化されたDNAの変異誘発のための関連技術は、当該分野で周知である。Sambrookら、MOLECULARCLONING:A LABORATORY MANUAL, 第2版, Cold Spring HarborLaboratory, Cold SpringHarbor, N.Y.(1989); Ausubelら(編)、CURRENT PROTOCOLS INMOLECULAR BIOLOGY, JohnWileyおよびSons(1987)(両方が、本明細書に参考として援用される)を参照のこと。本発明のための好ましい、オリゴヌクレオチド特異的変異誘発法は、Hoら、Gene77:51-59(1989)に従っており、これは本明細書に参考として援用される。

20

## 【 0 0 7 3 】

宿主およびベクター

sFv(SCA)のヌクレオチド配列を変異させた後、変異型DNAは、さらなる分析のためのクローニングベクター（例えば、DNA配列の確認のためのクローニングベクター）に挿入され得る。変異型DNA配列によってコードされるポリペプチドを発現させるため、DNA配列は、転写発現を制御する調節配列に作動可能に連結され、そして原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞のいずれかに導入される。

30

## 【 0 0 7 4 】

sFv(SCA)は、代表的には原核生物宿主細胞によって産生されるが、真核生物宿主細胞は好ましい宿主細胞である。好ましい宿主細胞は、酵母もしくは他の真菌細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞を含む。標準的なタンパク質精製法は、これらの変異タンパク質を精製するために使用され得る。ネイティブのタンパク質精製スキームにほんのわずかの改変が必要とされ得る。

40

## 【 0 0 7 5 】

また、本発明によって、PEG結合し得る操作されたCys残基および/またはオリゴ-Lys残基を有する本発明のsFv(SCA)をコードするDNA分子（例えば、精製された遺伝子配列またはプラスミドもしくはベクター）が提供される。PEG化sFv(SCA)ポリペプチドについてのDNA配列は、原核生物、酵母もしくは他の真菌細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞のような生物体における産生を最適化するために選択され得る。

## 【 0 0 7 6 】

PEG結合のためのCys残基および/またはオリゴ-Lys残基を有するsFv(SCA)をコードするDNA分子は、操作されたsFv(SCA)タンパク質の宿主細胞による発現を可能にするために、発現ベクターに作動可能に連結され、そして宿主細胞に導入され得る。CysPEG化部位およ

50

び / またはオリゴ-LysPEG化部位を有するsFv(SCA)をコードするDNA配列は、従来技術に従ってベクターDNAで組換えられ得る。本発明の単鎖タンパク質を産生するための、組換え宿主およびそれを使用する方法もまた、本明細書中に提供される。

【0077】

本発明のそのようなsFv(SCA)タンパク質の発現は、原核生物細胞において達成され得る。好ましい原核生物宿主は、Neisseria、Mycobacteria、Streptococci、Chlamydia、およびE.coliのような細菌を含むが、これらに限定されない。

【0078】

本発明のそのようなsFv(SCA)タンパク質のクローニングおよび発現のための真核生物宿主は、インビボまたは組織培養のいずれかにおいて、昆虫細胞、酵母、真菌、および哺乳動物細胞（例えば、ヒトまたは霊長類細胞）を含む。本発明に好ましい宿主は、Pichiapastorisである。

10

【0079】

一価、多価、および融合形態タンパク質（特に、sFv(SCA)ポリペプチド）の、産生、単離、および精製の、適切なDNA分子、宿主、方法は、先行技術に十分に記載されている（例えば、米国特許第4,946,778号、これは、本明細書中において参考として十分に援用される）。

【0080】

PEG結合のためのCys残基および / またはオリゴ-Lys残基を有するsFv(SCA)コード配列、ならびに作動可能に連結されたプロモーターは、非複製DNA（またはRNA）分子（線状分子、またはより好ましくは共有結合閉環分子のいずれかであり得る）のいずれかとしてレシピエント原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。そのような分子は、自律的複製し得ないので、所望のsFv(SCA)タンパク質の発現は、導入された配列の一過性発現を介して生じ得る。あるいは、恒久的な発現は、導入されたsFv(SCA)配列の、宿主染色体への組み込みを介して生じ得る。

20

【0081】

1つの実施態様において、sFv(SCA)配列は、宿主細胞染色体へ組み込まれ得る。導入DNAをそれらの染色体に安定に組み込んだ細胞は、またsFv(SCA)配列およびマーカーを含む宿主細胞の選択を可能にする、1つ以上のマーカーを導入することによって選択され得る。マーカーは、宿主における栄養要求性（例えば、his4、leu2、またはura3、これらは、共通の酵母栄養要求性マーカーである）、殺生耐性（例えば、抗生物質）、または重金属（例えば、銅）に対する耐性などを補充し得る。選択マーカー遺伝子は、発現されるべきsFv(SCA)DNA配列に直接連結されるか、または同時トランスフェクションによって同じ細胞に導入されるかのいずれかであり得る。

30

【0082】

別の実施態様において、導入された配列は、レシピエント宿主細胞において自律的複製をし得るプラスミドベクターに取り込まれる。広範な種々の任意のベクターは、この目的のために使用され得る。特定のプラスミドまたはウイルスベクターを選択する際に重要な因子は、以下を含む：ベクターを含むレシピエント細胞が認識され、そしてベクターを含まないそれらのレシピエント細胞から選択され得る容易さ；特定の宿主において所望されるベクターのコピー数；および異なる種の宿主細胞間でベクターを「シャトル」し得ることが望ましいか否か。

40

【0083】

任意の一連の酵母ベクター系が利用され得る。そのような発現ベクターの例は、酵母2-ミクロン環、発現プラスミドYEP13、YCP、およびYRPなど、またはそれらの誘導體を含む。そのようなプラスミドは、当該分野において周知である（Botsteinら、MiamiWntr. Symp. 19: 265-274(1982); Broach, J.R., The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 445-470頁(1981); Broach, J.R., Cell 28: 203-204 (1982))。

【0084】

50

哺乳動物宿主について、いくつかの可能なベクター系が発現のために利用可能である。1つのクラスのベクターは、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、またはSV40ウイルスのような動物のウイルス由来の、自律的複製染色体外プラスミドを提供するDNAエレメントを利用する。第2のクラスのベクターは、宿主染色体への所望の遺伝子配列の組み込みに依存する。導入されたDNAをそれらの染色体へ安定に組み込んだ細胞は、また発現ベクターを含む宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカーを導入することによって選択され得る。マーカーは、栄養要求性宿主に対する原栄養性、殺生性耐性（例えば、抗生物質）、または重金属（例えば、銅）に対する耐性などを提供し得る。選択マーカー遺伝子は、発現されるべきDNA配列に直接的に連結され得るか、または同時形質転換によって同じ細胞に導入され得る。さらなるエレメントはまた、mRNAの最適な合成に必要とされ得る。これらのエレメントは、スプライスシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、および終結シグナルを含み得る。そのようなエレメントを取り込むcDNA発現ベクターは、Okayama, H., Mol. Cell. Biol. 3: 280 (1983)などによって記載されるものを含む。

10

## 【0085】

細菌における使用のために好ましいベクターには、pQE70、pQE60、およびpQE-9 (Qiagenから入手可能)；pBSベクター、Phagescriptベクター、Bluescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A (Stratageneから入手可能)；およびptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmaciaから入手可能)が挙げられる。好ましい真核生物ベクターには、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、およびpSG (Stratageneから入手可能)；およびpSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVL (Pharmaciaから入手可能)がある。Pichiaにおける発現のために好ましいベクターは、pHIL-S1 (InvitrogenCorp.) およびpPIC9 (InvitrogenCorp.) である。他の適切なベクターは、当業者に容易に明らかである。

20

## 【0086】

一旦、構築物を含むベクターまたはDNA配列が発現のために調製されると、DNA構築物は、適切な宿主に導入または形質転換され得る。種々の技術（例えば、形質転換、トランスフェクション、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈降法、エレクトロポレーション、または他の従来技術）が使用され得る。細胞が、組換えDNA（またはRNA）分子で形質転換された後、細胞は、培地において増殖され、そして適切な活性についてスクリーニングされる。配列の発現は、本発明のPEG結合のための変異sFv(SCA)の産生を生じる。

30

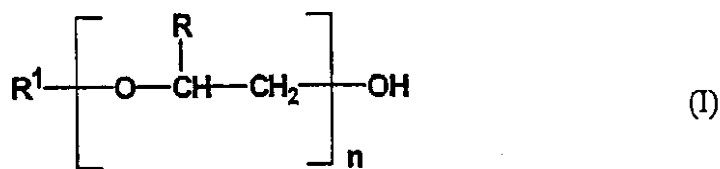
## 【0087】

直鎖ポリマー

本発明の実施において使用される直鎖ポリアルキレングリコールは、以下の構造式である：

## 【0088】

【化1】



40

## 【0089】

ここで、Rは、水素、低級アルキル、およびその混合物からなる群から選択され、R<sup>1</sup>は、水素および低級アルキルからなる群から選択され、nは、正の整数である。「低級アルキル」は、1～4つの炭素原子を有するアルキル基（すなわち、メチル、エチル、プロピル、ブチル）、および前述のアイソマーを意味する。Rは、好ましくは、水素、メチル、およびその混合物からなる群から選択され、R<sup>1</sup>は、好ましくは水素およびメチルからなる群から選択され、そしてnは、好ましくは500以下の正の整数である。Rは、最も好ましくは水素であり、R<sup>1</sup>は、最も好ましくはメチルであり、そしてnは最も好ましくは7～150の整数である。本発明の実施において使用される好ましいポリ（アルキレングリ

50

コール)が、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(プロピレングリコール)、それらの混合物、およびポリ(エチレングリコール)およびポリ(プロピレングリコール)のコポリマーであり、ここでポリマーの末端のヒドロキシル基の一方が、低級アルキル基で置換され得ることは、当業者には容易に明らかである。本発明における使用のために好ましいポリアルキレングリコールは、ポリ(エチレングリコール)-ヒドラジンである。本発明における使用のために最も好ましいポリアルキレングリコールは、メトキシポリ(エチレングリコール)である。

【0090】

本明細書中以後、簡便のために、本発明の実施において使用されるポリアルキレングリコールは、PAGと命名され、その用語は、 $R^1$ が水素である化合物、および $R^1$ がアルキルである化合物の両方を含むことが意図される。PEGは、ポリ(エチレングリコール)をいい、mPEGはメトキシポリ(エチレングリコール)をいう。

10

【0091】

PAGは、特定の分子量である必要はないが、好ましくは分子量は約500~約40,000の間であり；より好ましくは約2,000~約20,000の間である。PAGの分子量の選択は、使用される特定のポリペプチドの性質(例えば、修飾のためにポリペプチド上で利用可能なアミノ基または他の基の数)に基づいてなされる。約10,000および約20,000の分子量が最も好ましい。

【0092】

1部分あたり2つの末端ヒドロキシル基を含むPAGが他のポリマー(例えば、タンパク質)を架橋し得ることは、当該分野において周知である。よくあることであるが、架橋が望ましくないと考えられる場合、そのような架橋は、当該分野において公知の手段によって最小化または妨害され得る。例えば、Davisら、米国特許第4,179,337号は、架橋を妨害するために好ましい手段が、市販のメトキシポリ(エチレングリコール)において行われるような、PAGの一方の末端をあらかじめブロックすることであることを指摘した。

20

【0093】

本発明の実施において使用されるPAGは、好ましくは、適切なカップリング剤によってポリペプチドにカップリングされる。本発明の実施において使用され得るカップリング剤の数の有用な概説は、Dreborgら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 6(4):315-365 (1990) (特に317-320頁を参照のこと)に見られる。

30

【0094】

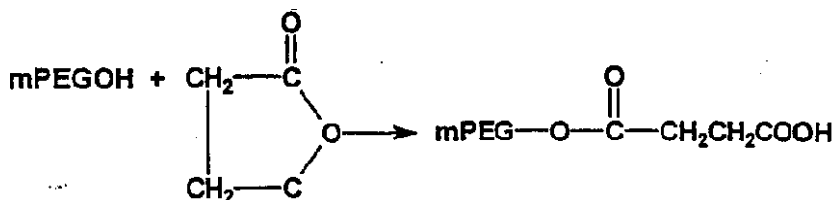
おそらく、この目的のために最も優れた公知のカップリング剤は、塩化シアヌルである。塩化シアヌルの使用は、多くの参考文献に記載されている(例えば、Abuchowskiら、J. Biol. Chem. 252(11): 3578-3581 (1977年6月10日)を参照のこと)。

【0095】

Zalipskyら、Eur. Pol. J. 19 (12): 1177-1183(1983)は、とりわけ、メトキシポリ(エチレングリコール)と無水コハク酸との反応を記載している：

【0096】

【化2】



40

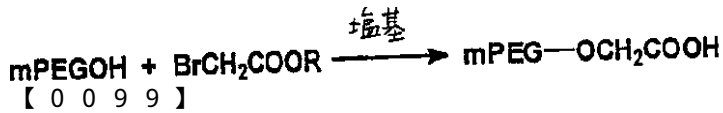
【0097】

塩基(例えば、第3級ブタノール中のK-tertiaryブトキシド、テトラヒドロフラン中のNa-ナフタレン、またはベンゼン中のブチルリチウム)の存在下で、mPEGをエチルプロモアセテートでアルキル化することもまた公知である：

【0098】

50

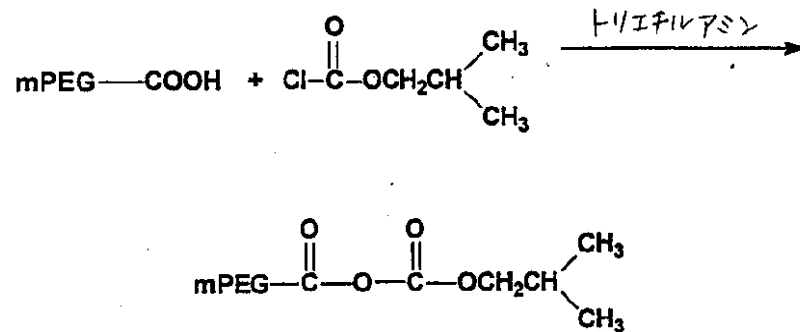
【化3】



PEGの末端ヒドロキシル基は、アミン基、カルボキシル基、またはヘキサメチルイソシアネート基に転換され得る。例えば、Zalipskyら、1983、前出を参照のこと。カルボキシル化mPEGの混合無水物誘導体は、トリエチルアミンの存在化で調製され、次いでタンパク質と反応され得る：

【0100】

【化4】



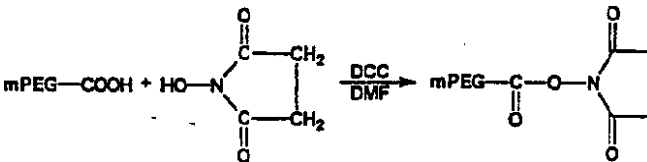
10

【0101】

カルボキシル化mPEGはまた、タンパク質との反応のためのジシクロヘキシルカルボジイミドおよびジメチルホルムアミドの存在下で、ヒドロキスクシンイミドと反応され得る：

【0102】

【化5】



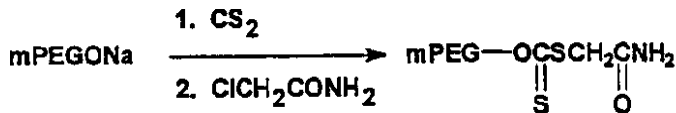
30

【0103】

KingおよびWeiner (Int.J. Peptide Protein Res.16: 147 (1980)) は、mPEGのジチオカーボネートを記載している：

【0104】

【化6】



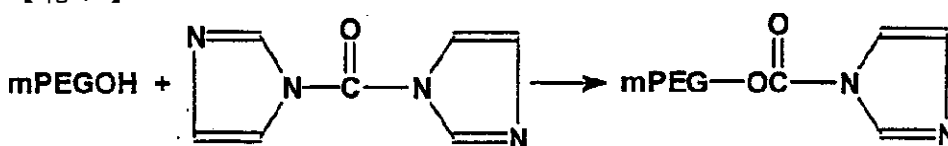
【0105】

Beauchampら、Analytical Biochem. 131: 25-33(1983)は、1,1'-カルボニルジイミダゾールでのPEGの活性化を記載している。この誘導体のペプチドとの反応は、カルバメート結合を生じる：

40

【0106】

【化7】



【0107】

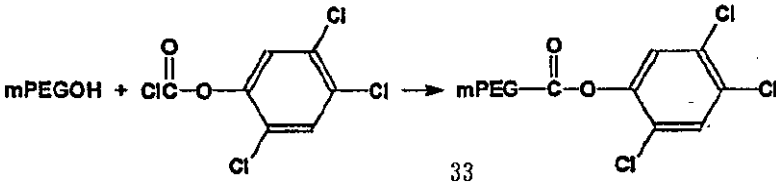
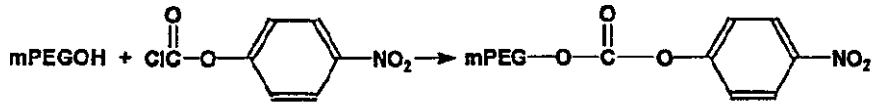
Veroneseら、Appl. Biochem. & Biotechnol. 11:141-152 (1985)は、フェニルクロロ

50

ホルメート（例えば、2,4,5,-トリクロロフェニルクロロホルメートまたはp-ニトロフェニルクロロホルメート）でのメトキシポリ（エチレングリコール）の活性化を記載している。これらの誘導体は、ウレタン結合によってペプチドに結合される：

【0108】

【化8】



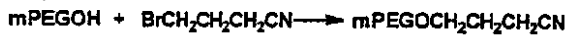
10

【0109】

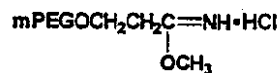
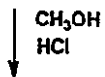
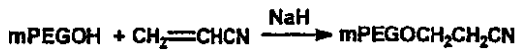
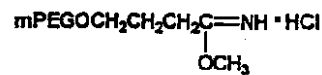
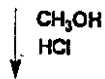
Uenoら（欧州特許出願第87103259.5号）は、脱水低級アルコールの存在下での乾燥塩化水素との反応によって、対応するニトリルからmPEGイミドエステルを形成している。

【0110】

【化9】



20



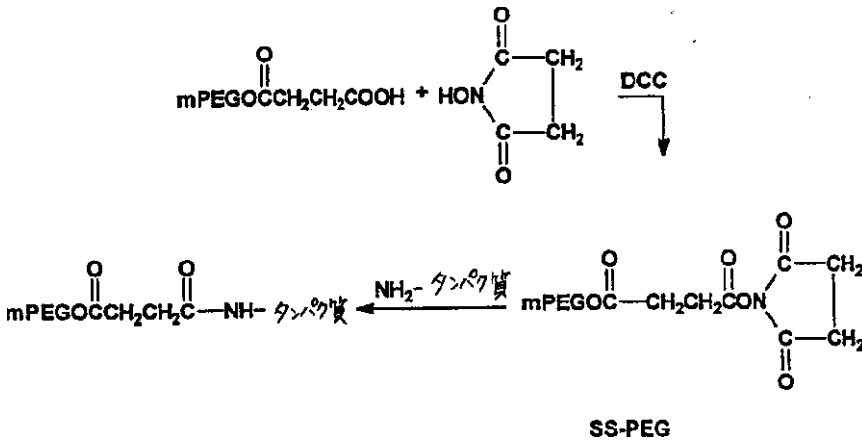
30

【0111】

Abuchowskiら、CancerBiochem. Biophys. 7: 175-186(1984)は、上記のようにmPEGスクシネートを形成し、次いでジシクロヘキシルカルボジイミドの存在下でのヒドロキシスクシンイミドとの反応によってメトキシポリエチレングリコリルスクシンイミジルスクシネート（「SS-PEG」）を形成することを記載している。

【0112】

【化10】



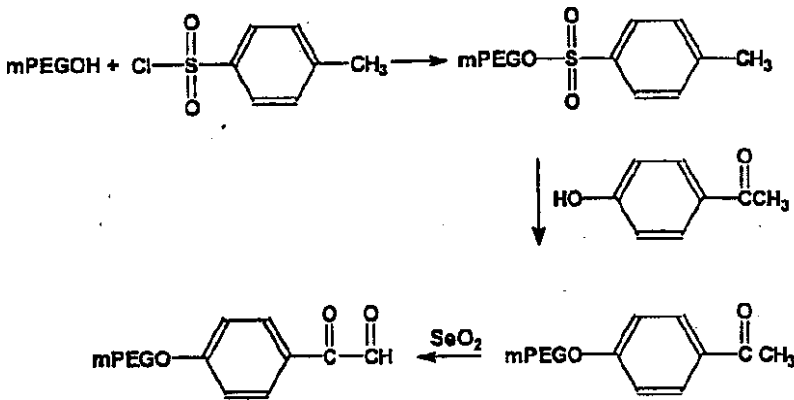
10

【0113】

Sanoら（欧州特許出願番号89107960.0）は、ペプチドにおけるグアニジノ基を修飾し得る、メトキシポリ（エチレングリコール）のフェニルグリオキサール誘導体を開示している：

【0114】

【化11】



20

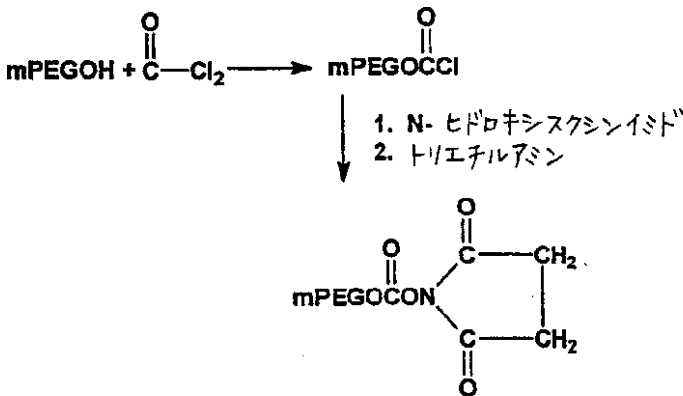
30

【0115】

Zalipsky（米国特許第5,122,614号）は、そのN-スクシンイミドカーボネート誘導体（「SC-PEG」）への変換によるPEGの活性化を記載している：

【0116】

【化12】



40

メトキシポリ（エチレングリコール）-スクシニルカーボネート

**SC-PEG**

【0117】

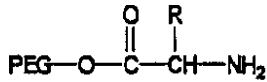
50



Zalipskyら、J. Macromol. Sci. Chem. A21:839は、メトキシポリ(エチレングリコール)のアミノ酸エステル誘導体を開示している：

【0118】

【化13】

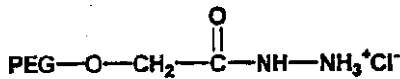


【0119】

Davisら(米国特許第4,179,337号)は、アルデヒドおよびケトンならびに他の官能基を修飾し得る、メトキシポリ(エチレングリコール)のヒドラジド誘導体を開示している：

【0120】

【化14】



**HZ-PEG**

【0121】

PEGの二官能誘導体(すなわち、ポリエチレングリコール-ビス-スクシニジル(succinidy)l)カーボネート(「BSC-PEG」)が類似の手段によって調製され得ることが、さらに開示されている。次いで、SC-PEGおよびBSC-PEG化合物は、タンパク質中のアミン基と反応され、そしてウレタン(カルバメート)結合を介して結合される。

【0122】

他の活性化PAGもまた、本発明の実施において使用され得ることは、当業者に容易に明らかである。本発明の実施における使用のために好ましい活性化PAGは、SS-PEGおよびSC-PEGからなる群から選択される。SC-PEGの使用が最も好ましい。

【0123】

分岐ポリマー

本発明は、以下の式に対応するsFv(SCA)タンパク質のポリアルキレンオキシド結合体について実質的に非抗原性の分岐ポリマーの使用をさらに提供する：



ここで(R)は、水溶性非抗原性ポリマーを含む；

(n)=2または3；

(L)は、それぞれの(R)に共有結合した脂肪族の結合部分である；そして

(A)は、求核置換を起こし得る活性化官能基を表す。例えば、(A)は、生物学的に活性な求核剤を結合できる基であり得、または同じ事を行い得る部分で有り得る。

【0124】

本発明の特に好ましい局面においては、(R)は、ポリ(エチレングリコール)PRGまたはmPEGのようなポリ(アルキレンオキシド)PAOを含む。それぞれの鎖は、約200ダルトンと約12,000ダルトンとの間の分子量を有することが好まれ、そして好ましくは、約1,000ダルトンと約10,000ダルトンとの間の分子量を有する。

分子量約5,000ダルトンは、最も好ましい。

【0125】

式IIに示すように、本明細書に(R)と命名した2または3のポリマー鎖は、脂肪族の結合部分(L)に結合している。適切な脂肪族は、置換アルキルジアミンおよびトリアミン、リジンエステルおよびマロン酸エステル誘導体を含む。結合部分は、好ましくは非平面であり、故にポリマー鎖は、強固に固定されていない。結合部分(L)はまた、複数のポリマー鎖、すなわち「分岐」を(A)に結合するための手段であり、この部分を介してポリマーが、sFv(SCA)タンパク質に結合する。

【0126】

(L)は、好ましくは、18までより好ましくは1~10炭素原子を含む多官能基化されたアルキル(alkyl)基を含む。窒素、酸素、イオウのようなヘテロ原子は、アルキル鎖中に含ま

10

20

30

40

50

れ得る。アルキル鎖はまた、炭素原子または窒素原子にて分岐され得る。本発明の別の局面において、(L)は、単一の窒素原子である。

【0127】

(L)および(R)を、好ましくは、(R)および(L)の両方の求核官能基間の反応によって結合する。それぞれの(R)は、(L)と求核置換および結合を起こすために適切に官能基化される。このようなポリマーの官能基化は、当業者において容易に明白である。

【0128】

広範囲で種々の(R)と(L)との結合が、意図される。ウレタン(カルバメート)結合が好ましい。結合は、例えば、米国特許第5,122,614号に記載されるようにメトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルカーボネートで1,3-ジアミノ-2-プロパノールのようなアミノ基を反応させることによって形成し得る。塩化アシル官能基でメトキシポリエチレングリコールアミン(mPEGアミン)のようなアミノ末端化非抗原性ポリマーと反応させることによって形成し得るアミド結合。それらのエーテル、アミン、尿素、およびチオおよびチオールアナログを含む他のこのような結合、ならびにウレタンおよびアミド結合のチオおよびチオールアナログの例は上記に記載される。

10

【0129】

式IIの部分(A)は、生物学的に活性な物質との結合体化のために本発明の分岐ポリマーを「活性化する」基を示す。(A)は、以下から選択される部分であり得る：

1. 以下のようなアミノ基と反応し得る官能基：
  - a) p-ニトロフェニルまたはスクシンイミジルのようなカーボネート；
  - b) カルボニルイミダゾール；
  - c) アズラクトン；
  - d) 環状イミドチオン；または
  - e) イソシアネートもしくは、イソチオシアネート。
2. カルボニル酸基と反応し得、そして以下のようなカルボニル基と反応性の官能基：
  - a) 一級アミン；または
  - b) アシルヒドラジド、カルバゼート、セミカルバメート、チオカルバゼートなどのようなヒドラジンおよびヒドラジド官能基。
3. フェニルグリオキサールのようなメルカプトまたはスルフヒドリル基と反応し得る官能基；例えば、米国特許第5,093,531号を参照のこと。
4. 求電子性中心と反応し得る他の求核基。非限定リストは、例えば、ヒドロキシル基、アミノ基、カルボキシル基、チオール基、活性メチレンなどを含む。

20

30

【0130】

部分(A)はまた、脂肪族結合部分(L)に近位に位置するスペーサー部分を含み得る。スペーサー部分は、18炭素原子まで、またはさらなるポリマー鎖でさえも含む、ヘテロアルキル、アルコキシル、アルキルであり得る。スペーサー部分は、標準的な合成技術を使用して付加し得る。

【0131】

分岐ポリマー、一般的にU-PAOポリマーまたはU-PEGポリマーは、当業者に公知の通常の反応技術を使用して形成される。

40

【0132】

本発明のこれらの傘状に分岐したポリマー(U-PAOポリマーまたはU-PEGポリマー)は、生物学的に活性な求核基と反応させての結合体を形成する。ポリマー接着の点は、官能基(A)に依存する。例えば、(A)は、スクシンイミジルスクシネートまたはカルボネートであり得、そして -アミノリジンと反応し得る。分岐ポリマーはまた、生物学的に活性なポリペプチドに見られる任意の一級または二級のアミノ基、メルカプト基、カルボン酸基、反応性カルボニル基などと連結するために活性化され得る。他の基は、当業者にとって明白である。

【0133】

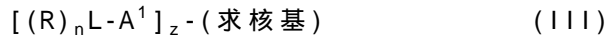
分岐ポリマーの使用の主な利点の1つは、分岐が、ポリマーと結合体化する物質対して

50

に傘様の三次元の保護カバーを与えることである。これは、上記に議論した直鎖ポリマーの列様の構造と対照的である分岐ポリマーのさらなる利点は、ポリマーのいくつかの鎖とsFvタンパク質へと結合することに関連する利点を提供するが、実質的により少ない結合部位を必要とすることである。PEG化の所望の特性を、実現し、そして生物活性の欠失は、最小化する。

【0134】

1つ以上の活性化分岐ポリマーは、標準的な化学反応により、sFvタンパク質のような生物学的に活性な求核剤と結合し得る。その結合体は、以下の式によって表される：



10

ここで(R)は、水溶性の実質的に非抗原性のポリマーである；n=2または3；(L)は、脂肪族の結合部分である；(A<sup>1</sup>)は、(L)および求核基との間の結合を表し、そして(z)は、≥1の整数であり、これは生物学的に活性な求核基と結合体化したポリマーの数を表す。(z)についての上限を、利用可能な求核基結合部位の数によって決め、および当業者によって探求されるポリマー結合の程度によって決めた。結合体化の程度は、周知の技術を使用して、反応化学量論を変えることによって改変し得る。求核基と結合体化した1つより多くのポリマーは、求核基で活性化ポリマーの化学量論的な過剰量と反応することによって得られ得る。

【0135】

20

sFvタンパク質の精製

一般的なプロトコル12の異なる単鎖抗原結合分子を産生するために開発され、そして使用されている。このプロトコルは、細胞溶解および洗浄、変性溶媒における可溶化、希釈による再折り畳み、および2つのイオン交換HPLCクロマトグラフィー工程を含む。このような単離したsFv(SCA)は、本発明によるPAG結合化され得る。

【0136】

sFv産生E.coli株の発酵は、カゼイン消化物グルコース塩培地を使用して、32℃で実施する。600nmでの18~20の光学密度において、sFv発現を、1時間42℃の温度ショックによって誘導する。発酵物を10℃へ冷やした後、その細胞を、10分間7000gで遠心することによって、採集する。次に湿細胞ペーストを、-20℃で冷凍保存する。約200g~300gの湿細胞ペーストを、通常1つの10リットル発酵より回収する。

30

【0137】

タンパク質回収について、3回の10リットルの発酵からの細胞ペースト(600~900g)を、一晚4℃で解凍し、そして50mM Tris-HCl, 1.0mM EDTA, 100mM KCl, 0.1mM フェニルメチルスルホニルクロリド(PMSF), pH8.0(溶解緩衝液)中にキログラムの湿細胞ペーストあたり溶解緩衝液の10リットルを使用して、4℃で穏やかに再懸濁する。完全に再懸濁した場合、冷やした混合物を、Manton-Gaulin細胞ホモジナイザーを、3度通して十分に細胞を溶解する。細胞ホモジナイザーが細胞溶解物の温度を25±5℃に上げるので、細胞溶解物を、各回の通過後、Lauda/Brinkman冷却コイルで5±2℃に冷やす。完全な溶解物を、顕微鏡下で、可視検査によって確認する。

40

【0138】

細胞溶解物をSorvall IRC-5B遠心分離機を使用して6℃で30分間24,300gで遠心分離する。ペレットは、不溶性のsFvを含み、そして上清を、捨てる。ペレットを遠心分離ビンよりそれを穏やかに掻くこと、および湿細胞ペースト1kgあたり5リットルの溶解緩衝液中でそれを再懸濁することによって洗浄する。得られた3.0~4.5リットルの懸濁液を、再び30分間6℃で24,300gで遠心分離し、そして上清を捨てる。この細胞ペレットの洗浄は、可溶性E.coliタンパク質を取り除き、そして5回まで繰り返し得る。この洗浄手順の間の任意の時点で、物質を、-20℃で冷凍ペレットとして保存し得る。洗浄工程における実質的な時間節約は、0.22µmの細孔フィルターを備えたPellicon接線流動装置を利用して達成され得る。

50

## 【 0 1 3 9 】

洗浄した細胞ペレットを、新たに調製した6M塩酸グアニジン、50mM Tris-HCl、10mM CaCl<sub>2</sub>、50mM KCl、pH8.0(変性緩衝液)中に、6ml/gペレットを使用して4 で可溶化する。必要であれば、HeatSystemsUltrasonics組織ホモジナイザーからの数回の速いパルスを使用して、可溶化を完了し得る。得られた懸濁液を、45分間6 で24,300gで遠心分離し、そしてペレットを捨てる。上清の光学密度を、280nmで決定し、そしてOD<sub>280</sub>が30より大きい場合、さらなる変性緩衝液を加えて、約25のOD<sub>280</sub>を得る。

## 【 0 1 4 0 】

上清を、1:10から1:100希釈(最終容量70~120リットル)になるまで冷(4~7 )再折り畳み緩衝液(50mMTris-HCl,10mM CaCl<sub>2</sub>,50mM KCl,0.1mM PMSF,pH8.0)にゆっくりと希釈する。再折り畳み緩衝液は、少なくとも使用1日前に調製してそれを十分な時間4 に冷却させるべきである。上清を、穏やかに混合しながら2時間の期間にわたって、再折り畳み緩衝液にゆっくりと添加する場合、最も良い結果が得られる。その溶液は、少なくとも20時間静置しておき、次に4 で4~6の0.45 μmの細孔膜(HVLP000C5)を用いて、Millipore Pellicon 接線流動装置を通して濾過する。濾過物を、再び4 で、4~6の10,000NMWLカセット(SK1PA156A4)を有するPellicon装置を使用して1~2リットルに濃縮する。

## 【 0 1 4 1 】

濃縮した粗sFvサンプルを、4~6の10,000NMWLカセットを備えたPellicon限外濾過装置を使用して、4 で20mM2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸(Mes),0.3mM CaCl<sub>2</sub>,pH6.0と緩衝液交換する。次に、サンプルを、WatersAccell Plus CM イオン交換(RCM)カラム(4.7×30.0cm)でクロマトグラフィー分離する。HPLCにロードする前に、この物質を、0.22 μmフィルターを通して濾過し、そしてAccelカラムを、緩衝液A(40mMMes,1mM CaCl<sub>2</sub>,pH 6.0)で平衡化する。サンプルをロードした後、Accelカラムを、緩衝液Aおよび緩衝液B(40mMMes,100mM CaCl<sub>2</sub>,pH7.0)の直線勾配で55分間にわたって溶出する。(表1を参照のこと)。

## 【 0 1 4 2 】

## 【表 1】

時間(分)	流量(ml/分)	緩衝液 <sup>a</sup>		
		%A	%B	%C
開始時	40.0	100	0	0
55.0	40.0	0	100	0
58.0	40.0	0	100	0
60.0	40.0	0	0	100
62.0	40.0	100	0	0

a 直線の勾配を、それぞれの時点の間で行なう。

b 緩衝液A、40mM Mes,1mM CaCl<sub>2</sub>, pH6.0;緩衝液B、40mM Mes、100mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.0;緩衝液C、40mM Mes、20%エタノール、pH7.5。

## 【 0 1 4 3 】

Accel Plus CMカラムは、約3gの容量を有し、従って全ての粗sFvサンプルを1回の実行において正常にロードし得る。画分を、4~20%Novex SDS-PAGEゲルを使用して分析し、そしてピーク画分をプールする。通常、sFv溶出物は、勾配において、かなり早くAccelイオン交換カラムから溶出する。特定のsFvタンパク質の分離を増強するために、勾配にお

いて保持実行し得る。

【0144】

Accel HPLC精製からのプールした画分を、伝導率が緩衝液D(40mM3-[N-モルホリノ]プロパンスルホン酸(Mops), 0.5mM 酢酸Ca, pH 6.0)のものに低くなるまで緩衝液Dに対して透析する。次に、サンプルを21.5 × 150mmポリアスパラギン酸PolyCATAカラムにロードする。60mgより多くが、このカラムにロードされる場合、分離が劣化し始める；従って、Accel HPLC精製からのプールした画分は、しばしばいくつかのPolyCATAの実行に分割しなければならない。たいていのsFvタンパク質は、280nmで約2.0mgml<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>の吸光計数を有し、そして、これを使用して、タンパク質濃度を決定し得る。sFvサンプルを、緩衝液Dと緩衝液E(40mM Mops, 10mM 酢酸Ca、pH8.0)との50分の直線勾配を用いてPolyCAT Aカラムより溶出する。表2を参照のこと。

10

【0145】

【表2】

時間(分)	流量(ml/分)	緩衝液		
		%D	%E	%F
開マ台	15.0	100	0	0
50.0	15.0	0	100	0
55.0	15.0	0	100	0
60.0	15.0	0	0	100
63.0	15.0	0	0	100
64.0	15.0	100	0	0
67.0	15.0	100	0	0

20

a 直線の勾配は、それぞれの時間点で行なう。

30

【0146】

【表2A】

b 緩衝液D、40mM Mops, 0.5mM 酢酸Ca、pH6.0; 緩衝液E、40mM Mops、10mM 酢酸Ca、pH8.0; 緩衝液F、40mM Mops、100mM CaCl<sub>2</sub>、pH7.5。

【0147】

sFvタンパク質は、この勾配を使用する場合、20分26分との間でしばしば溶出する。これは、約70%の緩衝液Dおよび30%緩衝液Eの溶出溶媒組成に対応する。

40

【0148】

この精製手順は、SDS-PAGEおよびScatchard分析によって試験する場合、95%よりも高い純度であるsFvタンパク質を得る。上記の手順の改変は、しばしば8.0と9.3との間である、精製される特定のsFvの等電点によって決定され得る。

【0149】

本発明の実施において使用されるポリアルキレングリコール(PAG)は、上記に示すように、好ましくは連結剤との反応によって活性化し、単鎖抗原結合分子の鎖に結合して存在し得るいくつかの基(例えば、鎖の末端または鎖に沿って位置する、末端カルボキシル基、チオール基、フェノールヒドロキシル基、または一級アミノ基)のいずれとも反応し得る。一級アミン基と、特にペプチド鎖に沿って存在する一級アミン基と、活性化PAGとを

50

反応させることが好ましい。活性化PAGを、ポリペプチドにおけるリジン残基ならびにシステイン残基のアミノ基と結合することが、最も好ましい。

#### 【0150】

PAGと単鎖ポリペプチドとの間の反応を、通常溶液(好ましくは、約6~約10であり、好ましくは、約7~約9であり、最も好ましくは、約7~約8の範囲のpHを提供する水性緩衝液溶液)中で実行する。25 でこれらの範囲のpHを提供する緩衝液溶液の例は、以下に列挙されるものであり得る：

50mlの0.1Mリン酸二水素カリウムおよび5.6~46.1mlの0.1MNaOHを100mlに希釈する

50mlの0.025Mホウ酸および2.0~20.5mlの0.1MHClを100mlに希釈する

50mlの0.025Mホウ酸および0.9~18.3mlの0.1MNaOHを100mlに希釈する

50mlの0.05M炭酸水素ナトリウムおよび5.0~10.7mlの0.1MNaOHを100mlに希釈する

特別に所望されるpHを提供するのに使用される酸または塩基の量の正確な調整は、当業者によって容易に決定される。

#### 【0151】

所定の実施例において、生物学的緩衝液の使用が必要とされる場合、下記の1つを、利用し得る：

3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)

3-(N-モルホリノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(MOPSO)

ピペラジン-N,N'-ビス(2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)(POPSO)

PAGと単鎖ポリペプチドとの間の反応は通常、変性を生じさせない条件、例えば、穏やかな温度および必要以上に攪拌しない条件下で行なう。その反応は、好ましくは、約4~約25 の範囲における温度で行なう。より好ましくは、反応は、室温、すなわち約20~約25 で行う。

#### 【0152】

単鎖ポリペプチドの量に関して使用したPAGの量が反応産物の所望の性質に依存することを当業者は容易に理解する。例えば、ポリペプチド鎖に沿って各リジン残基とPAGとを反応することが所望される場合、リジン濃度と少なくとも等モルの量のPAGが必要である。可能ならば、反応速度および完全反応の確率を増加するために、過剰量のPAGを使用することは、有利である。明らかに、ポリペプチド鎖に沿った、全てより少ない潜在的な反応部位を誘導体化する場合、対応して、より少ないPAGが使用される。しかし、一般的に、過剰モルのPAGを使用する場合、2~100のオーダーの過剰モルPAGを使用し得；2~10の過剰モルが好ましいことが決定されている。

#### 【0153】

反応に必要な時間は、多数の要因(例えば、反応温度、反応物の濃度、および完全反応または部分反応が望まれるか)に依存する。反応の経過は、従来手段(例えば、サイズ排除クロマトグラフィーまたはゲル電気泳動による定期的なサンプルの分析)によってモニターされ得る。反応は、過剰PAGを除去するために、第1級アミン基を有する化合物(例えば、グリシン)を付加することによって、望まれた時に都合よく終結され得る。代表的には、約15分~120分の反応時間が、室温で単鎖ポリペプチドのリジン残基の第1級アミン基とPAGとを完全に反応させるために必要である。当業者は、結合体化のための時間、ならびにPAGの量およびタイプが、利用されるポリペプチドを失活するようなものでなくてよいことを理解する。

#### 【0154】

PAG/単鎖ポリペプチド反応産物の精製は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、限外濾過、透析などのような、当業者によって一般に利用される手段によって行われ得る。反応産物の溶液は、望むならば、回転式蒸発装置で濃縮し得、凍結乾燥によって乾燥状態で得られ得る。

#### 【0155】

選択した特定の単鎖抗原結合分子およびPAGと反応する程度に依存して、得られた付加物は、診断上および治療上の両方に有用であることが期待され、受容可能な活性水準を維

10

20

30

40

50

持する一方、未反応単鎖ポリペプチドと比較して、減少した免疫原性、増大した循環半減期(circulating life)、および増大した安定性を示す。

【0156】

単鎖抗原結合ポリペプチドは、求核試薬のpH要求に依存して、緩衝化され得る水性反応媒体において、上記に示した活性化分岐ポリエチレングリコールポリマーと反応し得る。反応のための至適pHは、一般的にポリペプチドについて、約6.5および約8.0の間、好ましくは約7.4である。sFv安定性のための至適反応条件、反応効率などは、当業者の水準範囲内である。好ましい温度範囲は、4 および37 の間である。反応温度は、求核試薬が変性するかまたは分解し得る温度を超え得ない。求核試薬は過剰の活性化分岐ポリマーと反応することが好ましい。反応後、結合体は、例えば、ダイアフィльтраーション、カラムクロマトグラフィー、その組合わせなどによって、回収され、そして精製される。

10

【0157】

結合体

本発明のポリアルキレンオキシド結合体化sFv(SCA)の生成において、ポリアルキレンオキシド結合体化sFvは、ポリアルキレンオキシド結合体化sFvに診断剤または治療剤を結合することによってさらに修飾され得る。本発明による抗体結合を調製する一般的な方法は、Shih, L.B.ら、Cancer Res. 51:4192(1991); Shih, L.B., およびD.M. Goldenberg, Cancer Immunol. Immunother. 31:197(1990); Shih, L.B.ら、Int'l. J. Cancer 46:1101(1990); Shih, L.B.ら、Int'l. J. Cancer 41:832(1988)(これら全ては本明細書に参考として援用される)に記載される。間接的な方法は、抗体(またはsFv)(それらのポリアルキレンオキシドは官能基を有する)と、1つまたは複数の生物活性分子(例えば、ペプチド、脂質、核酸(すなわちリン酸リジン複合体)、薬物、毒素、キレート剤、ホウ素付加物、または検出可能標識分子)を負荷したキャリアポリマーとの反応を包含する。

20

【0158】

あるいは、ポリアルキレンオキシド結合体化sFvは、直接的に診断剤または治療剤に結合し得る。一般的な手順は、診断剤または治療剤が、直接的に酸化型sFv成分に結合することを除いて、結合体化の間接的な方法と類似している。Hansenら、米国特許第5,443,953号(本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。

【0159】

ポリアルキレンオキシド結合体化sFvは、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DC C)またはその水溶性改変体を使用して、中間の付加体を形成するように従来の手段によって調製された、活性化形態の負荷されるべき特定の薬物、毒素、キレート剤、ホウ素付加物、または標識化の誘導体、好ましくは、カルボキシル活性化誘導体に付着され得る。

30

【0160】

上記に示した特定の説明に加えて、ヒトに感染し、そして病巣を生じ得る腫瘍細胞または微生物に対して細胞傷害効果を有する多くの薬物および毒素が、知られている。それらは、Merck Indexなどのような薬物および毒素の要約(compendia)に見られる。任意のそのような薬物は、当該分野において周知の従来の手段によって、キャリアに、または直接的にポリアルキレンオキシド結合体化sFvに負荷され得、そして上記に対する類推によって説明される。

40

【0161】

放射性金属または磁気共鳴エンハンサーのためのキレート剤もまた、当該分野において周知である。代表的なものは、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)およびジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)の誘導体である。これらは、代表的には、キレート剤がキャリアと付着し得るか、または直接的にポリアルキレンオキシド結合体化sFv上に付着し得る側鎖上の基を有する。このような基は、例えば、DTPAまたはEDTAがsFvの反応基にカップリングされ得る、ベンジルイソチオシアネートを含む。

【0162】

ラジオアイソトープ、酵素、蛍光化合物、電子移動薬剤などのような標識もまた、当該分野に周知の通常の方法によって、キャリアに結合し得るか、または直接的にポリアルキ

50

レンオキシド結合体化sFv上に結合し得る。これらの標識およびそれから調製されたsFv結合体は、sFvに標識を直接的に付着させることによって調製されたsFv結合体の多くと同様に、免疫アッセイのためにおよび免疫組織学のために使用され得る。しかし、複数の標識を本発明の結合体に負荷することは、標的抗原へのsFvの低い程度のみでの結合が達成される場合、アッセイまたは組織学的手順の感度を増加し得る。

#### 【0163】

ホウ素付加物(例えば、カルボラン)は、単鎖抗原結合分子に付着し、そして病巣に標的化される時、熱中性子照射によって活性化され、そして放射によって減衰する放射性原子に転換されて、高度の細胞傷害性短範囲効果を生じ得る。ホウ素付加物、および磁気共鳴増強イオンの高度な負荷は、これらの効果を増強することにおいて大いに重要である。カルボランは、当該分野で周知のように、ペンダント側鎖上にカルボキシル官能基を有して作製され得る。

10

#### 【0164】

キャリアにおける薬物の負荷は、1度その標的に到達すると、薬物の効力、sFv標的化の効率、および結合体の効力に依存する。ほとんどの場合において、それは、キャリア上に、少なくとも20、好ましくは50、およびしばしば100以上の薬物分子を負荷することが望ましい。本発明による結合体として部分的または完全に薬物を解毒する能力は、それが循環している間、薬物の全身性副作用を減少し得、そして非結合体化薬物の全身性投与が受け入れられない時その使用を可能にし得る。本発明に従って、薬物のより多くの分子を、しかし、キャリア上のsFvに結合させて投与することは、全身性毒性を和らげながらの治療を可能にする。

20

#### 【0165】

毒素は、しばしば薬物より濃密に負荷されないが、キャリア上に、少なくとも5、好ましくは10、およびいくつかの場合には20以上の毒素分子を負荷し、そして標的化送達のためのsFv上に少なくとも1つのキャリア鎖を負荷することがなお利点となる。

#### 【0166】

##### 用途

本発明のポリアルキレンオキシド結合体化sFv(SCA)ポリペプチド結合体は、より長い循環半減期を有し、そしてインビボにおいて減少した免疫原性を有することが期待される。これは、いくつかのsFvタンパク質の非常に速い血液クリアランスに関連する潜在的な制限を解決し得る。それはまた、そうでなければ患者において免疫応答を刺激し得る治療的sFvの反復投与についての懸念を減少させるか、または取り除く。特定のシステインおよび/またはオリゴ-リジン変異組合わせの選択により、特定のポリアルキレンオキシド結合体化sFv改変体ポリペプチドに依存してかなりの範囲にわたる循環半減期(circulation life)を達成することを可能にし得る。これにより、sFvが選択の治療使用のために投与されることを可能にする。

30

#### 【0167】

診断剤または治療剤は、抗体に結合体化され、そして診断のためにまたは治療のために有用である分子または原子である。抗体の免疫反応性は保持される。診断剤または治療剤は、薬物、毒素、キレート剤、ホウ素化合物および検出可能な標識を含む。さらに詳細には前述の「結合体」セクションを参照のこと。

40

#### 【0168】

診断剤または治療剤は、核酸、化合物、タンパク質、要素、脂質、抗体、糖類、同位元素、炭水化物、造影剤、リポタンパク質、糖タンパク質、酵素、検出可能プローブ、またはそれらの任意の組合せから選択される少なくとも1つであり得るが、それらに限定されず、それは、本明細書に記載のように、抗体を標識するためと同様に検出可能に標識化し得る。このような標識は、酵素的標識、ラジオアイソトープまたは放射性化合物または要素、蛍光化合物または金属、化学発光化合物および生物発光化合物を含むが、それらに限定されない。あるいは、任意の他の公知の診断剤または治療剤が、本発明の方法において使用され得る。

50



## 【0169】

本発明において使用される治療剤は、標的細胞において治療効果を有し得、この効果は、欠陥遺伝子またはタンパク質の修正、薬物作用、毒性効果、成長刺激効果、成長阻害効果、代謝効果、異化効果、タンパク質同化効果、抗ウイルス効果、抗菌性効果、ホルモン効果、神経液性効果、細胞分化刺激効果、細胞分化阻害効果、神経調節効果、抗新生物効果、抗腫瘍効果、インスリン刺激効果または阻害効果、骨髄刺激効果、多能性幹細胞刺激効果、免疫系刺激効果、および本発明による送達系を介して細胞に送達される治療剤によって提供され得る任意の他の公知の治療効果から選択されるがそれらに限定されない。

## 【0170】

本発明のsFv結合体は、感染または疾患の防御、抑制または治療のために使用され得る。本明細書に使用されるような、用語、感染または疾患からの「防御」は、「予防」、「抑制」または「処置」を意図する。「予防」は、疾患の誘発の前のグリコシル化sFv結合体の投与を含む。「抑制」は、疾患の臨床的な出現の前の組成物の投与を含む。

10

## 【0171】

「処置」は、疾患の出現後の防御化合物の投与を含む。医学および獣医学においては、「予防」と「抑制」との間を区別することが常に可能であるわけではないことが理解される。これは、最終的な誘発事象(単数または複数)が、未知であり、不顕性であるか、または患者が、その事象(単数または複数)の出現の十分後になるまで確認されないためである。それ故に、本明細書に定義するように「予防」および「抑制」の両方を包含するために、「処置」とは異なるような用語「予防(prophylaxis)」を使用することが一般的である。

20

## 【0172】

本発明の治療剤または組成物をさらに含み得るこのようなさらなる治療剤は、抗生物質、ステロイド、細胞傷害性薬剤、血管作用性薬物、抗体および他の治療様式を含む公知および新規な化合物および組成物から選択され得るが、それらに限定されない。このような薬剤の非限定な例は、ゲンタマイシン、トブラマイシン、ナフシリン、非経口セファロスポリンなどのような、細菌ショックの処置において使用される抗生物質を含み；メチルプレドニゾロンのような、副腎性コルチコステロイドおよびそのアナログは、内毒素によって生じる細胞傷害性を和らげ；レセプターブロッキング剤(例えば、フェノキシベンザミン)、レセプターアゴニスト(例えばイソプロテレノール)、およびドーパミンのような血管作用性薬物は、敗血性ショックを処置するために適切な薬剤である。

30

## 【0173】

本発明のポリアルキレンオキシド結合体化sFvはまた、疾患の診断のため、および治療応答をモニターするために使用され得る。ポリアルキレンオキシド結合体化sFvタンパク質の他の用途は、腫瘍細胞および酵素についての特異性を有する二重特異的分子によって、腫瘍細胞にプロドラッグ活性化酵素の特異的標的化である。ポリアルキレンオキシド結合体化sFvは、腫瘍のようなインビボ標的における薬物の特異的な送達、腫瘍放射免疫診断または放射免疫治療(Goldenberg, D.M., AmJ. Med. 94:297(1993))のための放射性金属、ホウ素/ウラン-中性子捕獲治療(Ranadive, G.N.ら、Nucl. Med. Biol. 20:1(1993); Barth, R.F.ら、Bioconjug. Chem. 5:58(1994))および核磁気共鳴画像診断(Sieving, P.F.ら、Bioconjug. Chem. 1:65(1990))のような適用における非放射性金属の送達に使用し得る。この列挙は、説明のみである。

40

## 【0174】

本発明はまた、精製およびバイオセンサーにおけるポリアルキレンオキシド結合体化sFvタンパク質のための使用にまで拡張される。アフィニティー精製は、支持体にポリアルキレンオキシド結合体化sFvタンパク質を固定することによって可能になり、リガンド分子に曝露され、これと接触した抗原結合部位が分離され、そして従って精製される。バイオセンサーは、抗原結合分子への特異的抗原の結合の際に検出可能なシグナルを発生し、続いてそのシグナルを加工する。ポリアルキレンオキシド結合体化sFvタンパク質は、バイオセンサーにおいて抗原結合分子として使用する時、結合の際にコンフォメーションを

50

変化し得、従って検出され得るシグナルを発生する。

【0175】

本発明はまた、標識化されるポリアルキレンオキシド結合体化sFvとサンプルとを接触させることによって、サンプル中に存在すると推測された抗原を検出する方法に関する。1つのサンプルは、少なくとも1つの化合物、混合物、表面、溶液、乳濁液、懸濁液、混合物、細胞培養物、発酵培養物、細胞、組織、分泌物および/またはその誘導物または抽出物を含み得る。

【0176】

このようなサンプルはまた、例えば、動物組織(例えば、血液、リンパ液、脳脊髄液(CNS)、骨髄、胃腸内容物、ならびに、皮膚、心臓、肺および呼吸系、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、胆嚢、胃腸管、平滑筋、骨格筋または心筋、循環系、生殖器官、聴覚系、自律神経系および中枢神経系の部分、細胞または内部および外側の分泌物)およびその抽出物または細胞培養物を含み得る。このようなサンプルは、インビトロ、インビボ、およびインサイチュにおいて、本発明の方法を使用して測定され得る。

10

【0177】

このようなサンプルはまた、土壌、大気または水のサンプルのような環境サンプル、ならびに、化合物、混合物、表面、水性化学溶液、乳濁液、懸濁液または混合物のような工業的または商業的サンプルを含み得る。

【0178】

さらに、本発明の方法において使用され得るサンプルは、細菌、酵母、哺乳動物細胞、植物細胞および昆虫細胞のような原核生物または真核生物の細胞および/または組織の増殖のために使用される細胞培養物および発酵培地を含む。

20

【0179】

先行技術によって想起される、モノクローナルまたはポリクローナル抗体またはそのフラグメントの用途の本質的に全てが、本発明のポリアルキレンオキシド結合体化sFvタンパク質によって取り組まれ得る。これらの用途は、ポリアルキレンオキシド結合体化sFvタンパク質の検出可能な標識化形態を含む。標識のタイプは、当業者に周知である。それらは、放射標識化、化学蛍光標識化、蛍光色素標識化、および発色団標識化を含む。他の用途は、ポリアルキレンオキシド結合体化sFvタンパク質の標識化形態の有効量を投与し、そして動物に関連した検出可能放射を測定することによって、動物(ヒトを含む)の内部構造を画像化することを含む。それらはまた、標識化抗体が本発明のPEG化sFvタンパク質によって置き換えられ得る、サンドイッチ免疫アッセイ、競合免疫アッセイ、および他の免疫アッセイを含む、改善免疫アッセイを含む。例えば、Kohlerら、Nature256:495(1975);Kohlerら、Eur.J.Immunol.6:511(1976);Kohlerら、Eur.J.Immunol.6:292(1976);Hammerlingら、MonoclonalAntibodiesand T-Cell Hybridomas,563-681頁,Elsevier,N(1981);Sambrookら、MolecularCloning-ALaboratory Manual,2版,Cold Spring Harbor Laboratory(1989)を参照のこと。

30

【0180】

投与

インビボ診断および治療適用のための本発明のポリアルキレンオキシド結合体化sFv結合体の投与は、sFv(ここで、診断または治療原理がsFvへ直接連結されるか、またはロードされたキャリアが非部位特異的様式でsFvのアミノ酸残基上のアミノ基またはカルボキシル基にランダムに結合することによって連結される)と類似の方法によってなされる。

40

【0181】

本発明の結合体(免疫結合体)は、薬学的に有用な組成物を調製するための公知の方法に従って(例えば、薬学的に受容可能なキャリアビヒクルとの混合によって)処方され得る。適切なビヒクルおよびそれらの処方、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、Osol,A.編、Mack,Easton PA(1990)に記載される。有効な投与のために適切な薬学的に受容可能な組成物を形成するために、このような組成物は、単独でまたは適切な量のキャリアビヒクルと共に、治療的に有効な量の免疫結合体を含む。

50

## 【0182】

さらなる薬学的方法は、作用の持続時間を制御するために使用され得る。制御された放出調製物は、本発明の免疫結合体を複合体化または吸収するためのポリマーの使用によって達成され得る。制御された送達は、適切な高分子（例えば、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニルピロリドン、エチレンビニルアセテート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、または硫酸プロタミン）を選択することによって行われ得る。薬物放出の速度はまた、このような高分子の濃度を変化させることによって制御され得る。作用の持続を制御するための別の可能性のある方法は、ポリエステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリ（乳酸）またはエチレンビニルアセテート共重合体のような重合体物質の粒子への治療剤の組み込みを含む。あるいは、例えば、コロイド脱混合現象技術、または界面重合（例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルもしくはポリ（メチルメタクリル酸）マイクロカプセルの使用によって）によって（調製されたマイクロカプセル中）、またはコロイドドラッグデリバリーシステム（例えば、リポソーム、アルブミン微粒子、マイクロエマルジョン、ナノパーティクル、ナノカプセル、または巨大エマルジョンにおいて）において、本発明の免疫結合体を包括することは可能である。このような教示は、Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Osol, A. 編、Mack, Easton PA (1990) に開示される。

10

## 【0183】

免疫結合体は、当該分野で周知の手段によって患者に提供され得る。このような導入の手段は、経口手段、経鼻手段、皮下手段、筋内手段、静脈内手段、動脈内手段、または非経口的手段を含む。静脈内投与、動脈内投与、または胸膜内投与は、通常、肺腫瘍、乳房腫瘍、および白血病性腫瘍に対して使用される。腹腔内投与は、卵巣腫瘍に勧められる。くも膜下腔内投与は、脳腫瘍および白血病に勧められる。皮下投与は、ホジキン病、リンパ腫および乳癌に対して勧められる。カテーテル灌流は、転移性肺、乳房または肝臓の胚細胞癌のために有用である。病巣内投与は、肺および乳房病巣のために有用である。

20

## 【0184】

治療的または診断的適用のために、本発明による組成物は、従来の注射用液体キャリア（例えば、滅菌無発熱物質水、滅菌無ペルオキシドエチルオレート、脱水アルコール、またはポリピレングリコール）と組み合わせて非経口的に投与され得る。安定化剤、可溶化剤および緩衝液（例えば、エタノール、エチレンジアミン四酢酸のような錯体形成剤、酒石酸およびクエン酸緩衝液）ならびに粘性調節のためのポリエチレンオキシドのような高分子量ポリマーのような注射用溶液の従来の薬学的アジュバント添加され得る。このような組成物は、筋肉内、腹腔内、または静脈内に注射され得る。

30

## 【0185】

キャリアおよび希釈物のさらなる非制限的な例は、アルブミンおよび/または他の血漿タンパク質成分（例えば、低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質およびこれらの血清タンパク質と結合する脂質）を含む。これらの脂質は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、およびトリグリセリドのような中性脂質を含む。脂質キャリアはまた、トコフェロールを含むが制限されない。

40

## 【0186】

本発明による治療剤に連結された少なくとも1つのポリアルキレンオキシド結合sFvは、これらの意図される目的、例えば種々の症状（例えば、細胞炎症、アレルギー、組織損傷または他の関連する症状）を処置することを達成する任意の手段によって投与され得る。

## 【0187】

種々の症状を予防すること、抑制すること、または処置することのための代表的な療法は、1日または何日もの間（1週間までおよび1週間と約24ヶ月との間を含む）にわたって投与された、有効な量のsFv結合体の投与を含む。

## 【0188】

インビボまたはインビトロにおいて投与された本発明の用量は、受容者の年齢、性別、

50

健康、および体重、併用処置の種類、もしあるなら、処置の度合い、および所望される効果の性質に依存されることが理解される。以下に提供される有効な用量の範囲は、本発明を制限されることを意図されず、そして好ましい用量範囲である。しかし、最も好ましい用量は、過度の実験なく当業者によって理解されそして決定され得るように、個々の被験体に合わせて変更される。例えば、Berkowら編、Merck Manual、第16版、Merck and Co.、Rahway, N.J.(1992); Goodmanら編、Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics、第8版、Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y.(1990); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics、第3版、ADIS Press, LTD., WilliamsおよびWilkins, Baltimore, MD. (1987), Ebadi, Pharmacology, Little, Brown and Co., Boston (1985), Katzung, Basic and Clinical Pharmacology, Appleton and Lange, Norwalk, Conn.(1992) (これらの参考文献および本明細書中で引用される参考文献は、本明細書中で参考として全体的に援用される)を参照のこと。

10

## 【0189】

各処置に必要な総用量が、複数回用量によってまたは単回用量で投与され得る。本発明の診断的/薬学的化合物または組成物の有効な量は、2時間～5年の期間について4～72時間の間隔で投与された(投与された約0.001 μg～約100mg/kg体重)、またはそれらの任意の範囲または値(例えば、1～4、6～12、12～24および24～72時間の間隔で、0.01～1.0、1.0～10、10～50および50～100mg/kg、0.5、1.0～2.0、2.0～4.0および4.0～7.0日または1、1～2、2～4、4～52またはさらなる週、または1、2、3～10、10～20、20～60またはさらなる年の期間、またはそれらの任意の範囲または値)である。

20

## 【0190】

非経口的投与のための調製物は、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液、およびエマルジョンを含む(これらは、当該分野で公知である補助的な試薬または賦形剤を含み得る)。錠剤およびカプセルのような薬学的組成物はまた、日常的な方法によって処方され得る。例えば、Berker(前出) Goodman(前出) Avery(前出)およびEbadi、前出(これらは、その全体において本明細書で参考(そこに引用された全ての文献を含む)として援用される)を参照のこと。

## 【0191】

本発明のsFv結合体の少なくとも1つの型、または本発明のsFv結合体の1型、2型、3型、4型、5型、6型、7型、8型、9型または10型を含む薬学的組成物は、その意図される目的を達成するために有効な量で含まれ得る。少なくとも1つのsFv結合体に加えて、薬学的組成物は、適切な薬学的に受容可能なキャリア(例えば、薬学的に使用される処方物への活性化化合物のプロセッシングを容易にする賦形剤、キャリアおよび/または補助装置)を含み得る。

30

## 【0192】

薬学的組成物はまた、静脈内投与、皮下投与、経皮投与、経口投与、粘膜投与、または直腸投与のために適切な溶液を含み、そして賦形剤と共に、約0.01～99%、好ましくは約20～75%の活性成分(すなわちsFv)を含む。経口投与のための薬学的組成物は、錠剤およびカプセルを含む。直腸的に投与され得る組成物は座剤を含む。例えば、Berker(前出)、Goodman(前出)、Avery(前出)、およびEbadi(前出)を参照のこと。本明細書中に含まれ得るさらなる脂質およびリポタンパク質ドラッグデリバリーシステムは、Annals N.Y. Acad.Sci. 507:775-88、98-103、および252-271(この開示は本明細書中で参考として援用される)でより十分に記載される。

40

## 【0193】

組成物はまた、1つ以上の生理学的に適合性のキャリアまたは賦形剤を含む経口投与可能な組成物に処方され得、そして固体形態または液体形態であり得る。これらの組成物は、所望される場合、結合剤(例えば、シロップ、アカシア、ゼラチン、ソルビトール、トラガカントまたはポリビニルピロリドン); 賦形剤(例えば、ラクトース、マンニトール、デンプン、カルシウム、リン酸、ソルビトール、シクロデキストラン、またはメチルセルロース); 潤滑剤(例えば、マグネシウムステアリン酸エステル、ポリエチレングリコ

50

ールのような高分子量ポリマー、ステアリン酸またはシリカのような高分子量脂肪酸；デンプンのような崩壊剤；例えばラウリル硫酸ナトリウムのような受容可能な保湿剤）のような従来の成分を含む。

#### 【0194】

経口組成物は、任意の従来の形態（例えば、錠剤、カプセル、トローチ剤、水溶性または油性懸濁液、エマルジョン、あるいは使用前に水または他の液体培地との再構成するために適切な乾燥産物）を仮定し得る。当然、液体経口形態は、香料、甘味料、メチルまたはプロピル p - ヒドロキシベンゾエートのような防腐剤；ソルビトール、グルコースまたは他の糖シロップ、メチル、ヒドロキシメチル、またはカルボキシメチルセルロースあるいはゼラチンのような懸濁剤；レシチンまたはソルビタンモノオレイン酸のような乳化剤、あるいは濃厚剤を含む。非水溶性組成物もまた処方され、これは例えば、魚肝臓または植物油のような食用油を含む。これらの液体組成物は、例えば単位投薬量で都合良くゼラチンカプセルに封入される。

10

#### 【0195】

本発明による薬学的組成物はまた、適切な場合、エアロゾルのように局所的またはクリームまたは軟膏のような従来の基剤で処方されるかのどちらかで投与される。

#### 【0196】

本発明の薬学的組成物はまた、リポソームのようなコロイド性キャリアに活性成分を組み込むことによって投与され得る。リポソーム技術は当該分野で周知であり、Allisonら、Nature252:252-254 (1974)、およびDancyら、J. Immunol.120:1109-1113(1978)によって記載されている。

20

#### 【0197】

今や本発明に一般的に記載されるように、本発明は、目的の特定の実施例を参照することにより、より良く理解されるが、これらは例示の目的で提供され、そして他に特定化されない限りは限定として意図されない。

#### 【実施例】

#### 【0198】

##### 実施例

実施例1 メトキシポリ(エチレングリコール)-サクシンイミジルカーボネート(SC-PEG)の調製

30

60gのメトキシポリ(エチレングリコール)(MW=5,000)を200mlの3/1トルエン/ジクロロメタンに溶解し、そしてホスゲンのトルエン溶液(30ml、57mmol)で一晩処理する。溶液をエバポレートして乾燥させ、そして減圧下で残りのホスゲンを除去する。150mlの2/1トルエン/ジクロロメタンで残留物を再溶解する。得られる溶液を、2.1g(18mmol)の固体N-ヒドロキシサクシンイミド、続いて1.7ml(12mmol)のトリエチルアミンで処置する。3時間この溶液を静置し、次いでろ過し、そしてエバポレートして乾燥させる。残留物を600mlの温かい(50℃)酢酸エチルで再溶解し、この溶液をろ過し、そしてポリマーの沈殿を促進するために冷却する。ろ過によって産物を回収し、次いで酢酸エチルで再結晶化し、そしてP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>中、減圧下で乾燥させる。

#### 【0199】

40

##### 実施例2 CC49/212SCAの調製

一価または多価抗原結合タンパク質の産生において、以前の単鎖抗原結合タンパク質産生のために使用した同じ組換えE.coli産生系を使用した。Birdら、Science 242:423(1988)を参照のこと。この産生系は、単鎖抗原結合タンパク質である総E.coliタンパク質の2%と20%との間で産生した。タンパク質回収のために、3つの10リットル発酵物(600~900g)由来の凍結細胞ペーストを4℃で一晩解凍し、そして各キログラムの湿細胞ペーストのために、10リットルの溶解緩衝液を使用して、50mMTris-HCl、1.0mMEDTA、100mM KCl、0.1mMPMSF、pH8.0(溶解緩衝液)中で4℃にておだやかに再懸濁した。徹底的に再懸濁した場合、細胞を全て溶解するために、冷却された混合物をManton-Gaulin細胞ホモジナイザーによって3度通過させた。細胞ホモジナイザーは細胞溶解物の温度を25±5℃まで上昇

50

させるので、各経過後に、細胞溶解物をLauda/Brinkman冷却コイルによって $5 \pm 2$  まで冷却した。完全な溶解物を、顕微鏡下での視覚的検査によって確認した。

#### 【0200】

細胞溶解物を、SorvallRC-5B遠心分離機を使用して、6 にて30分間24,300 gで遠心分離した。不溶性単鎖抗原結合タンパク質を含むペレットを残し、そして上清を廃棄した。ペレットを、遠心管から穏やかにこすり落とすことによって洗浄し、そして5リットルの溶解緩衝液/kgの湿細胞ペースト中で再懸濁した。生じる3.0~4.5リットルの懸濁液を再び、6 で30分間24,300gで遠心分離し、そして上清を廃棄した。このペレットの洗浄は可溶性E.coliタンパク質を除去し、そして5回ほど繰り返され得る。この洗浄工程の間の任意の時間で、材料を-20 で凍結ペレットとして保存し得る。洗浄工程における実質的な時間節約は、遠心分離機のかわりに、0.22 $\mu$ mマイクロポラスフィルターを備えたPellicontangentialflow apparatusを使用することによって達成され得る。

10

#### 【0201】

洗浄したペレットを、9 ml/gのペレットを使用して、新しく調製した6 M塩酸グアニジン、50mMTris-HCl、10mM $\text{CaCl}_2$ 、50mM KCl、pH8.0 (解離緩衝液) 中にて4 で溶解させた。必要な場合、HeatSystemsUltrasonics組織ホモジナイザーからの2~3の鋭いパルスを使用して溶解を完全し得る。得られた懸濁液を6 で45分間24,300gで遠心分離し、そしてペレットを廃棄した。上清の光学密度を280nmで決定し、そして $\text{OD}_{280}$ が30を超える場合、約25の $\text{OD}_{280}$ が得られるように、さらなる解離緩衝液を添加した。

20

#### 【0202】

上清を、1:10希釈に達するまで(最終容積10~20リットル)、冷却(4~7 )再折り畳み緩衝液(50mMTris-HCl、10mM $\text{CaCl}_2$ 、50mM KCl、pH8.0)へゆっくりと希釈した。これらの条件下で、再折り畳みは約18時間に渡って生じる。GuHCl抽出物を、穏やかな混合によって、2時間の期間に渡って再折り畳み緩衝液にゆっくりと添加する場合、最も良い結果が得られる。溶液を0.2 $\mu$ mのMilliporeMillipak 200を通してろ過した。このろ過工程は遠心分離工程によって、任意に進められ得る。ろ過を、4 で再び、10,000 MWCOカートリッジを有するAmiconspiral カートリッジを使用して1~2リットルまで濃縮した。

#### 【0203】

濃縮した粗抗原結合タンパク質サンプルを、その伝導度が緩衝液G(60mM MOPS、0.5mM Caアセテート、pH6.0~6.4)のものよりも低くなるまで、緩衝液Gに対して透析した。次いで、サンプルを、Columbia,MarylandのPolyLCによって製造された21.5x250mmポリアスパラギン酸PolyCATAカラムにロードした。60mgを超えるタンパク質をこのカラムへロードする場合、分解能が悪化し始める;従って、濃縮した粗サンプルは、しばしばいくつかのポリCATA実行に分けなければならない。ほとんどの抗原結合タンパク質は、280nmにおいて約2.0 $\text{mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ の吸光係数を有し、そしてこれがタンパク質の濃度を決定するために使用され得る。抗原結合タンパク質サンプルを、緩衝液Gから緩衝液H(60mM MOPS、20mM Caアセテート、pH7.5~8.0)への50分間の直線的な勾配によってポリCATAカラムから溶出した。この勾配を使用する場合、ほとんどの単鎖タンパク質は20分~26分に溶出する。これは、約70%緩衝液Gおよび30%緩衝液Hの溶出溶媒組成に対応する。ほとんどの二価抗原結合タンパク質は、45分よりも後で溶出し、これは90%を超える緩衝液Hに対応する。

30

40

#### 【0204】

実施例3 CC49/212単鎖抗原結合分子SC-PEGでの修飾

$\text{KPO}_4/\text{NaCl}$ 緩衝液(pH7.2)に溶解したCC49/212単鎖抗原結合分子(MW=27000)のサンプルを、実施例2に記載されるように得た。このタンパク質は、SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)およびサイズ排除クロマトグラフィーを使用して純粋であることが見出された。タンパク質の濃度は0.79mg/mlであった。10,000ダルトン呼び寸法カットオフ(すなわち、10Kを超える任意のものが保持される)を有するAmiconconcentratorを使用して、このタンパク質を少なくとも2mg/mlまでさらに濃縮した。

50

## 【0205】

修飾反応（すなわち、CC49/212へのSC-PEGのカップリング）を、50mMKPO<sub>4</sub>、150mM NaCl緩衝液中（これは、タンパク質が満たされる保存用緩衝液である）で実施した。pHを7.2から7.5へ引き上げた。SC-PEG（MW5,000）を、タンパク質に対して50倍モル過剰添加した。特定の時間間隔で、50倍モル過剰のグリシンの添加によってカップリング反応を終了し、そして、DuPontZorbax250カラムを使用するサイズ排除クロマトグラフィおよびSDS-PAGEの両方を使用して、時間の関数として、カップリング反応の程度および進行をチェックした。

## 【0206】

サンプル中に残る遊離SC-PEGを、Amicon Centricon 10における、大規模な透析によって除去した。

10

## 【0207】

サンプルを、サイズ排除クロマトグラフィーによって修飾の程度についてチェックした。サンプルの濃縮後、タンパク質における残留アミン濃度を、トリニトロベンゼンスルホネートで滴定することによって決定し、そしてSC-PEGと反応したアミン基のパーセンテージ（「%修飾」）を、結果から計算した。

## 【0208】

天然の単鎖抗原結合分子(CC49/201)およびヘモグロビンのダンシル誘導体、PEGSCAおよびヘモグロビン、ならびにN-アセチルリジンを調製した。次いで、これらのサンプルを、アミノ酸について分析した。この実験の結果を表3に示す。

20

## 【0209】

## 【表3】

表 3			
反応時間(分)	タンパク質 (mg/ml)	% 修飾	分子量 (キロダルトン)
0	0.74148	0	27
15	1.3569	52	84
30	1.3587	62	156
60	1.2706	63	
80			224
90			247
120	0.78	63	

分子量を標準に対する校正後のサイズ排除クロマトグラフィーによって決定した。

30

## 【0210】

## 実施例 4 競合ELISA

CC49モノクローナル抗体は、JeffreySchlom博士のグループ（Laboratory of Tumor Immunology and Biology, National Cancer Institute）によって開発された。これは、全癌腫瘍抗原TAG-72に特異的に結合する。Murano, Rら、Cancer Research 48: 4588-4596 (1988)。

40

## 【0211】

図1は、3つの競合ELISAのグラフ的表示であり、ここで、未標識PEG修飾CC49/212単鎖Fv（黒四角）、CC49/212単鎖Fv（白四角）、CC49IgG（白丸）、およびMOPC-21 IgG(+)は、<sup>125</sup>Iで放射標識したCC49IgGに対して、ヒト乳房黒色腫抽出物におけるTAG-72抗原への結合について競合した。MOPC-21は、TAG-72抗原に結合しないコントロール抗体である。この実験において、<sup>125</sup>I-CC49IgG結合の50%競合は、約200 nMのCC49IgG、約550 nMのCC49/212sFV、および約3000 nMのPEG修飾CC49/212sFVを必要とした。

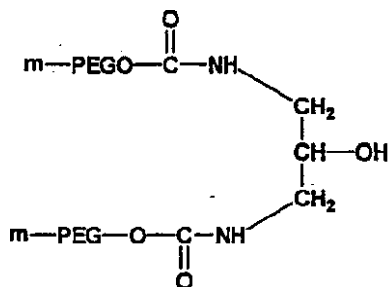
50

【 0 2 1 2 】

実施例 5 U-PEG-OHの調製

【 0 2 1 3 】

【 化 1 5 】



10

【 0 2 1 4 】

材料

メトキシポリ(エチレングリコール)(m-PEG)を、Union Carbideから得た。溶媒を、Milwaukee, WisconsinのAldrich Chemicalから得た。メトキシポリ(エチレングリコール)-N-スクシンイミジルカルボネート(SC-PEG)を、米国特許第5,122,614号に記載のように、約5,000の分子量を有するm-PEGを用いて調製した。実施例5~10において調製した生成物の各々を、炭素13NMRによって構造的に確認した。

【 0 2 1 5 】

20

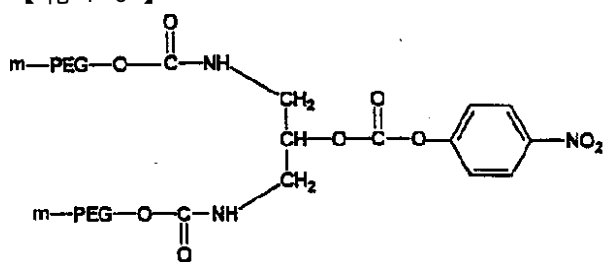
分岐ポリマーであるU-PEG-OHを、100mg(1.1mmol)の1,3-ジアミノ-2-プロパノールを50mLの塩化メチレン中10.0g(2mmol)のSC-PEGの溶液に添加することによって調製した。混合物を、18時間室温にて攪拌し、次いでろ過した。過剰の溶媒を、減圧下での蒸留によって除去した。残留物を、2-プロパノールから再結晶させて、7.1gの生成物を得た(70%の収率)。

【 0 2 1 6 】

実施例 6 U-PNP-PEGの調製

【 0 2 1 7 】

【 化 1 6 】



30

【 0 2 1 8 】

実施例5の化合物を、p-ニトロフェニルクロロホルメートで活性化した。まず、5.0g(0.5mmol)のU-PEG-OHを、75mLのトルエン中で2時間還流することによって、共沸乾燥させ、25mLの溶媒/水を除去させた。反応混合物を、30℃まで冷却し、続いて、120mg(0.6mmol)のp-ニトロフェニルクロロホルメートおよび50mg(0.6mmol)のピリジンを添加した。得られた混合物を、2時間45℃にて攪拌し、続いて一晩室温にて攪拌した。

40

【 0 2 1 9 】

次いで、反応混合物を、CELITE™を通してろ過し、続いてろ過物から減圧下での蒸留によって溶媒を除去した。残留物を、2-プロパノールから再結晶させ、4.2gの生成物を得た(81%の収率)。

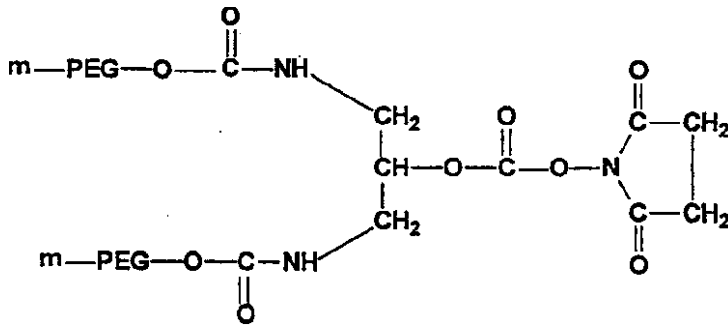
【 0 2 2 0 】

実施例 7 US-PEGの調製

【 0 2 2 1 】



【化17】



10

【0222】

この実施例において、実施例6のU-PNP-PEGを、N-ヒドロキシスクシンイミドと反応させて、U-PEGのスクシンイミジル炭酸エステルを形成させた。40mlの塩化メチレン中、5.0g(0.5mmol)のU-PNP-PEG、0.6g(5mmol)のN-ヒドロキシスクシンイミド、および0.13g(1mmol)のジイソプロピルエチルアミンを含む溶液を、18時間還流した。次いで、溶媒を、減圧下での蒸留によって除去し、そして残留物を、2-プロパノールから再結晶させて、4.2gのスクシンイミジル炭酸エステルを得た(82%の収率)。

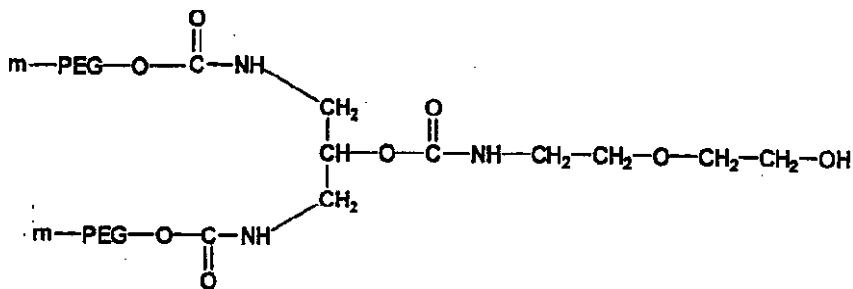
【0223】

実施例8 XU-PEG-OHの調製

【0224】

20

【化18】



【0225】

30

この分岐ポリマーを、実施例6のU-PNP-PEGを2-(2-アミノエトキシ)エタノールと反応させることによって調製した(すなわち、アミノアルコールを、p-ニトロフェニルカルボネートと反応させた)。再結晶化生成物の収率は、86%であった。

【0226】

実施例9 XU-PNP-PEGの調製

実施例8の化合物を、実施例6のように、p-ニトロフェニルカルボネートで官能基化した。再結晶化した生成物の収率は83%であった。

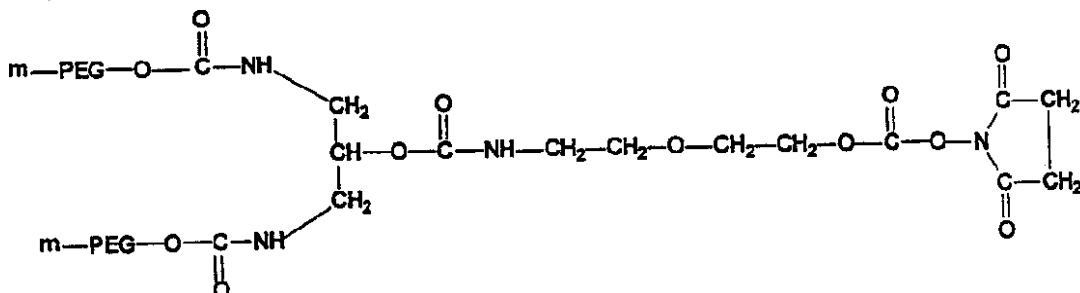
【0227】

実施例10 XUS-PEGの調製

【0228】

40

【化19】



【0229】

50

この実施例において、実施例 8 で調製した化合物のスクシンイミジルカルボネート誘導体を、実施例 7 に記載のプロセスに従って、N-ヒドロキシスクシンイミドを実施例 9 の p-ニトロフェニルカルボネート誘導体と反応させることによって調製した。回収した生成物の収率は、84%であった。

【0230】

実施例11 CC49/218のSC-PEGまたはXUS-PEGでの修飾

CC49/218を含むサンプルを、PD-10カラムにおいて、0.1Mリン酸ナトリウム (pH8.0) からなる緩衝液中で脱塩した。等モル量のSC-PEGまたはXUS-PEGを添加し、そして反応物を 4 にて一晩インキュベートした。反応物を、過剰のグリシンでクエンチした。修飾CC49/218結合体を、GPC精製し、次いでセントリコン10で濃縮した。

10

【0231】

GPC積分に基づく収率は、SC-PEG修飾CC49/218について約50%およびXUS-PEG修飾CC49/218について約40%であった。GPCプロフィールは、反応をpH9.0、室温で行った場合に得られたものと、ほとんど同一であった。SDS-PAGEは、適切な誘導体が作製されたことを明らかにした。

【0232】

実施例12 競合ELISA

アッセイを、上記の実施例 4 のように、SC-PEG修飾CC49/218およびXUS-PEG修飾CC49/218を適切なコントロールとともに用いて行った。結果を、図 4 および以下の表 4 に示す。

20

【0233】

【表 4】

サンプル	50%阻害 (nM)
CC49IgG	10
CC49/218 sFv	80
SC未反応#049301	300
SC反応#049304	650
XUS未反応#049302	280
XUS反応#049303	320

30

【0234】

従って、SC-PEG修飾CC49-SCAの親和性は、ネイティブなCC49-SCAの約 8 ~ 10 倍の範囲内であり、そしてXUS-PEG修飾CC49-SCAの親和性は、ネイティブのCC49-SCAの約 4 ~ 5 倍の範囲内であった。

【0235】

サンプル#049304および#049303をPEG修飾し、一方サンプル#04901および#049302は反応混合物から単離したCC49/218を修飾しなかった。

【0236】

実施例13 sFvおよびPEG-sFVの血漿滞留の薬物動態

60 μgのCC49/218sFvタンパク質または60 μgのPEG修飾sFvタンパク質を、時間 0 で、ICR (CD-1) メスマウス (Harlan-25g、7 ~ 8 週齢) に静脈内注射した。マウスを、図 5 に示した時点で出血させた。結晶中の滞留割合を、ELISA法によって定量した。PEG修飾結合体について、CC49/218sFvを、分子量20,000のSC-PEGと結合体化した (プロトコールは、米国特許第5,122,614号 (この開示を、本明細書中に参考として援用する) に記載される) 。試験したPEG-sFv結合体における平均PEG:sFvモル比は、約1:1であった。

40

【0237】

実施例14 PEG化マルチマー単鎖抗体

二官能性PEGを用いて、CC49-SCAの二量体および三量体を作製した。CC49-SCAを、二官

50

能性PEGを用いて、以下のように修飾した：1.5mg/mlの濃度にて、リン酸緩衝化生理食塩水（25mMリン酸ナトリウム（pH7.3）、0.15MNaCl）中2mlのCC49-SCAを以下のように修飾した。二官能性PEG（両末端で反応性SCを有するポリエチレングリコール）1.887mg（粉末）を、pH7.3で緩衝化した0.1mlのMOPS（3-[N-モルホリノ]-プロパン）-スルホン酸）に溶解させた。このPEG溶液を、溶解後10秒以内に、CC49-SCA溶液に添加した。次いで、混合物を、24 にて1時間攪拌した。反応の終了時に、非共有結合したCC49-SCAを破壊させるために固体グアニジンHClを、6Mの最終濃度まで反応混合物に添加した。この材料を、50mMTris（pH7.3）中60mMのグアニジンHCl、1mM $\text{CaCl}_2$ 、0.1mMPMSF（フェニルメチルスルホニルフルオリド（flouride））、および50mMKClから構成される緩衝液で予め平衡化されたサイズ排除カラム（2cm×60cm、Superdex-75）に直ちにアプライした。次いで、異なる分子量のマルチマーを、カラムから分画した。

10

【0238】

これらのマルチマーは、長いストレッチ（stretch）のPEG（5000MW、約226炭素長）によって分離したCC49-SCAであり、そして改めて再び折りたたまれており、従って凝集から生じるとは考えられない。CC49-SCAの自己会合の結果として形成された完全体（diabody）または多価SCAはあまり存在しない。さらなる証拠を、ごく少量のネイティブCC49-SCAが変性SDS-PAGEプロフィールに存在するという事実によって示した。

【0239】

二量体CC49-SCA、三量体CC49-SCA、PEG-CC49-SCA、およびネイティブCC49-SCAについての還元条件下でのSDS-PAGE電気泳動パターンを、図6に示す。

20

【0240】

マルチマーを、結合親和性について、以下のアッセイ（これは、B Friquetら、J.of ImmunologyMethods, 77:305-319(1985)に記載される方法を改変した）を用いてアッセイした。手短には、種々の量の所定の修飾単鎖抗体を、PBS（リン酸緩衝化生理食塩水）中の種々の量の抗原ムチンと混合した。結合反応を、少なくとも24時間4 にて平衡を達成させた。反応の終わりに、非結合CC49-SCA画分を、ELISAによってアッセイし、一方結合画分を洗い流した。全量の遊離CC49-SCAを、抗原ムチンの非存在下で事前にインキュベートしたCC49-SCAサンプルを用いてELISAによって決定した。結合抗体を、ELISAによって決定したように、全量から遊離（非結合）量を引くことによって決定した。全量のCC49-SCAは公知であるので、それ自身の標準曲線としても使用した。各タイプのCC49-SCAは、それ自身の参照コントロールを有することに注意のこと。本質的に、プロトコールは、抗原への結合の結果としての、PEG-CC49-SCAの特定のバージョンの非結合量を測定した。PEGは、ELISAにおいて検出試薬に影響し得るが、これは、標準参照に十分含まれた。それゆえ、測定した量は、PEG-CC49-SCAの種々のバージョンにおける種々のPEGの差異に起因しなかった。

30

【0241】

要するに、この研究において、CC49-SCAタンパク質の濃度の増加は、固定量の抗原に結合することを可能にした。最大レベルの50%に結合する量は、親和性の良い指標である。このデータは、PEG-Di-CC49-SCAおよびPEG-Tri-CC49-SCAの親和性が、ネイティブCC49-SCAの親和性に非常に類似することを示す。しかし、PEG修飾CC49-SCAモノマーは、非常に低親和性であった。結合データを図7に示す。

40

【0242】

実施例15 PEG-CC49-SCAの薬物動態

種々の形態のPEG-CC49-SCAの薬物動態研究を、上記の実施例13のように行った。

【0243】

この研究から得られたデータを以下に示す：

PEGのサイズが増加するにつれて、循環半減期がより長くなる傾向にあった。より多くのPEGがタンパク質に結合するにつれて、循環時間は増加する。しかし、いくつかの鎖の高分子量PEGが結合することは、複数の鎖の低分子量PEGが結合することよりも、循環半減期をより増加させる。

50

## 【 0 2 4 4 】

CC49-SCA-U-PEG（実施例7で調製したUS-PEGで作製した）の循環半減期は、CC49-SCA-PEG-12000のものと同様であった。それゆえ、PEGの形状は、循環半減期に影響しない。

## 【 0 2 4 5 】

リンカーはSC結合、Flan結合、ヒドラジン結合、またはTPCであるが、循環半減期における有意な変化はなかった。それゆえ、リンカーの化学結合は、放出可能でない場合、循環半減期に影響を与えない。さらに、PEGは、観察可能な時間、タンパク質に結合したままである。

## 【 0 2 4 6 】

循環半減期は、炭水化物によって短縮した。しかし、PEGが炭水化物に結合された場合、循環を約10倍増加させる。しかし、これは、CC49-SCAのほかの部位で、等しい数のPEGを結合させることよりは良好ではない。

## 【 0 2 4 7 】

研究の結果を、以下の表に示す：

## 【 0 2 4 8 】

【表5】

SCAおよびPEG-SCAの薬物動態データ

使用したペプチド	PEG		SCAあたりのPEG数	循環半減期 (時間)		曲線下の面積 (μg/ml-時間)		平均滞留時間 (時間)	
	リンカー	標識物		平均	標準誤差	平均	標準誤差	平均	標準誤差
ペプチド <sup>1</sup> CC49/218			0	0.69	0.41	54	27	1	0.59
2,000	SC		2.1	3.41	0.38	135.91	13.02	4.92	0.55
3,400	NHS	ビオチン	2	2.52	0.45	95.03	14.48	3.64	0.65
5,000	Flan		1	1.81	0.44	67.41	13.98	2.61	0.63
5,000	SC		1.7	4.15	1.08	147.96	32.7	5.98	1.56
5,000	TPC		1.4	3.48	0.95	120.56	28.05	5.02	1.37
5,000	Hz		4.8	9.81	1.61	395.33	56.32	14.15	2.32
10,000	U	ビオチン	1.5	10.42	1.36	415.86	47.21	15.03	1.96
12,000	Flan		1.2	13.98	1.76	583.19	64.47	20.17	2.53
12,000	SC		1.3	13.27	1.5	586.05	58.08	19.15	2.16
20,000	SC		1	12.86	0.73	1,111	56	18.55	1.05
ペプチド <sup>2</sup> gCC49/3			0	0.39	0.01	36	1	0.56	0.02
5,000	Hz		4.2	3.84	0.46	305	31	5.54	0.66

記:

- A. PKモデリングは、1つの区画、i.v.大量投与モデルに従った。
- B. 観察された相関関係対予想した相関関係は95%を超える。
- C. 循環半減期は、平衡に達した後(約2分)に1/2に減少する、血清中の薬物濃度についての時間である。
- D. AUC=曲線下の面積は、0から最終測定までの時間における薬物血液レベルの積分であり、そして吸収された薬物および体内の薬物の質の測定である。
- E. 平均滞留時間は、区画中の時間薬物滞留の平均量である。
- F. リンカーについてのコードは以下のとおりである:  
 SC = スクシンイミジルカーボネート  
 NHS = N-ヒドロキシスクシンイミド  
 Hz = ヒドラジド  
 TPC = トリクロロフェニルカーボネート  
 Flan = チアゾリジンチオン酸エステル (thiazolidine thione ester)  
 U = PEGの中間のSC

10  
20  
30  
40  
50

【0249】

実施例16 競合結合アッセイ

ビオチン化CC49-SCAの種々のPEG化CC49-SCAタンパク質との競合結合アッセイを、ストレプトアビジンと結合体化した西洋ワサビペルオキシダーゼ (SAV-HRP)によって検出されるようなビオチン化CC49-SCAのELISAを用いて行った。アッセイにおいて、ビオチン化CC49-SCAおよびPEG-CC49-SCAサンプルを、表面で抗原ムチンへの結合の競合について種々の

濃度で混合した。次いで、抗原に結合するビオチン化CC49-SCAの量を、SAV-HRP（これは、PEG修飾CC49-SCAを検出しない）によって測定した。PEG-CC49-SCAの競合に起因するビオチン化CC49-SCAの結合の減少は、抗原についてのCC49-SCAの2つの形態の相対親和性を反映する。その最大結合レベルの半分までビオチン-CC49-SCAの減少を引き起こすPEG-CC49-SCAのレベル（IC50）を、親和定数Kdの決定のためのCheng-Prussoff式において、以下のように使用した：ビオチン-CC49-SCAレベルが[s]であり、そしてその親和性がKsとして公知であり、次いでPEG-CC49-SCAについての親和性が $Kd = IC50 / (1 + [s] / Ks)$ であると仮定する。PEG-CC49-SCAは直接測定されず、そしてPEGは異なる分子上にあるので、ビオチン結合には影響しなかったことに注意のこと。次いで、推定Kdをコントロール（CC49-SCA）の割合として表した。

10

## 【0250】

得られた親和性順位は以下のようであった：

CC49 = SC2 > GC = Bio.CC49 = CC12 > C20 = F5 > HZ > PG

ここで、SC2はPEGSC2000-CC49-SCAであり；GCはグリコ-CC49-SCAであり；Bio.CC49-SCAはビオチン化CC49-SCAであり；CC12はPEG-SC12,000-CC49-SCAであり；F5はPEG-Flan-5000-CC49-SCAであり；HZはカルボキシル基においてMW5000ヒドラジンPEGで高度にPEG化されたCC49-CAであり；PGはPEG-グリコ-CC49-SCAであり、そして炭水化物においてMW5000ヒドラジンPEGで高度にPEG化されており；そしてC20はPEG-SC20000-CC49-SCAである。図8に示した全てのPEG修飾CC49-SCAについての親和性は、ネイティブCC49-SCAの約2倍以内であった。実施例15のデータ（表を参照のこと）をまとめると、結果は、SCAがより少数のPEG分子で修飾された場合、得られるSCAの親和性は、SCAがより多数のPEG分子で修飾された場合よりもよいことを示す。

20

## 【0251】

前述は特定の好ましい実施態様を言及するが、本発明は限定されないと理解される。当業者には、種々の改変が、開示された実施態様になされ得、そしてこのような改変は、本発明の範囲内であると意図されると考えられる。

## 【0252】

（配列表）

## 【0253】

## 【表 7】

## 配列表

## (1) 一般的情報：

(i) 出願人：エンゾン，インコーポレイテッド  
 キングスブリッジ ロード 20  
 ピスカタウェイ，ニュージャージー 08854-3963  
 アメリカ合衆国

出願人／発明者：ホワイトロウ，マーク  
 ショアー，ロバート ジー．エル．  
 フィルブラ，デイビッド アール．  
 リー，リーシン エス．

10

(ii) 発明の名称：ポリアルキレンオキシド修飾された単鎖ポリペプチド

(iii) 配列数：4

(iv) 連絡住所：

(A) 名称：スターン，ケスラー，ゴールドスタイン アンド フォックス  
 ピー．エル．エル．シー．  
 (B) 番地：ニューヨーク アベニュー 1100，スイート 600  
 (C) 市：ワシントン  
 (D) 州：ディーンシー  
 (E) 国：アメリカ合衆国  
 (F) 郵便番号：20005

20

(v) コンピューター読み出し形態：

(A) 媒体型：フロッピー ディスク  
 (B) コンピューター：IBM PC 互換用  
 (C) OS：PC-DOS/MS-DOS  
 (D) ソフトウェア：パテントイン リリース #1.0，バージョン #1.30

30

(vi) 現在の出願データ：

(A) 出願番号：未指定  
 (B) 出願日：同日  
 (C) 分類：

(vii) 先願データ：

(A) 出願番号：US 60/044,449  
 (B) 出願日：1997年4月30日

40

【 0 2 5 4 】

## 【表 8】

- (vii) 先願データ：  
 (A) 出願番号：US 60/050,472  
 (B) 出願日：1997年6月23日
- (vii) 先願データ：  
 (A) 出願番号：US 60/063,074  
 (B) 出願日：1997年10月27日
- (vii) 先願データ： 10  
 (A) 出願番号：US 60/067,341  
 (B) 出願日：1997年12月2日
- (viii) 代理人／事務所情報：  
 (A) 氏名：ジョージ エイ. ゴールドスタイン  
 (B) 登録番号：29,021  
 (C) 照会／記録番号：0977.184PC02
- (ix) 電話回線情報： 20  
 (A) 電話：202-371-2600  
 (B) テレファックス：202-371-2540
- (2) 配列番号1の情報：  
 (i) 配列の特徴：  
 (A) 長さ：749塩基対  
 (B) 型：核酸  
 (C) 鎖の数：二本鎖  
 (D) トポロジー：両形態
- (ii) 配列の種類：cDNA
- (ix) 配列の特徴： 30  
 (A) 特徴を表す記号：CDS  
 (B) 存在位置：1..738
- (xi) 配列：配列番号1：
- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GAC | GTC | GTG | ATG | TCA | CAG | TCT | CCA | TCC | TCC | CTA | CCT | GTG | TCA | GTT | GGC | 48  |
| Asp | Val | Val | Met | Ser | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Pro | Val | Ser | Val | Gly |     |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| GAG | AAG | GTT | ACT | TTG | AGC | TGC | AAG | TCC | AGT | CAG | AGC | CTT | TTA | TAT | AGT | 96  |
| Glu | Lys | Val | Thr | Leu | Ser | Cys | Lys | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Leu | Tyr | Ser |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| GGT | AAT | CAA | AAG | AAC | TAC | TTG | GCC | TGG | TAC | CAG | CAG | AAA | CCA | GGG | CAG | 144 |
| Gly | Asn | Gln | Lys | Asn | Tyr | Leu | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln |     |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |

【 0 2 5 5 】



## 【表 9】

TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC	192	
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val		
50 55 60		
CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC	240	
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser		
65 70 75 80		
ATC AGC TGT GTG AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG	288	
Ile Ser Cys Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln		
85 90 95		
TAT TAT AGC TAT CCC CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTT GTG CTG	336	10
Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu		
100 105 110		
AAA GGC TCT TGT TCC GGT AGC GGC AAA CCC GGG AGT GGT GAA GGT AGC	384	
Lys Gly Ser Cys Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser		
115 120 125		
ACT AAA GGT CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA	432	
Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys		
130 135 140		
CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC	480	20
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
145 150 155 160		
ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG	528	
Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu		
165 170 175		
GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT	576	
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn		
180 185 190		
GAG AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC	624	
Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser		
195 200 205		
ACT GCC TAC GTG CAG CTC AAC TGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG	672	30
Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Cys Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val		
210 215 220		
TAT TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC	720	
Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
225 230 235 240		
TCA GTC ACC GTC TCC TGC TAATAGGATC C	744	
Ser Val Thr Val Ser Cys		
245		

## (2) 配列番号 2 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 246 アミノ酸

【 0 2 5 6 】

## 【表 1 0】

(B)型：アミノ酸

(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：タンパク質

(xi)配列：配列番号2：

Asp	Val	Val	Met	Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Val	Gly	
1				5				10						15		
Glu	Lys	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser	10
			20				25						30			
Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	
		35					40					45				
Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Ala	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	
	50				55						60					
Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	
65					70					75					80	
Ile	Ser	Cys	Val	Lys	Thr	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	
				85					90					95		
Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Val	Leu	20
			100					105					110			
Lys	Gly	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser	
		115					120					125				
Thr	Lys	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Asp	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	
	130					135					140					
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	
145					150					155					160	
Thr	Asp	His	Ala	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Asn	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	
			165						170					175		
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Phe	Ser	Pro	Gly	Asn	Asp	Asp	Phe	Lys	Tyr	Asn	30
			180					185					190			
Glu	Arg	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	
		195					200					205				
Thr	Ala	Tyr	Val	Gln	Leu	Asn	Cys	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	
	210					215					220					
Tyr	Phe	Cys	Thr	Arg	Ser	Leu	Asn	Met	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
225					230					235					240	
Ser	Val	Thr	Val	Ser	Cys											40
				245												

(2)配列番号3の情報：

(i)配列の特徴：

【 0 2 5 7 】

## 【表 1 1】

- (A)長さ：782塩基対  
 (B)型：核酸  
 (C)鎖の数：両形態  
 (D)トポロジー：両形態

(ii)配列の種類：cDNA

(ix)配列の特徴：

(A)特徴を表す記号：CDS

(B)存在位置：1..771

(xi)配列：配列番号3：

GAC	GTC	GTC	ATG	TCA	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTA	CCT	GTG	TCA	GTT	GGC	48
Asp	Val	Val	Met	Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Val	Gly	
			250					255					250			
GAG	AAG	GTT	ACT	TTG	AGC	TGC	AAG	TCC	AGT	CAG	AGC	CTT	TTA	TAT	AGT	96
Glu	Lys	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser	
		265					270					275				
GGT	AAT	CAA	AAG	AAC	TAC	TTG	GCC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAA	CCA	GGG	CAG	144
Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	
	280					285					290					
TCT	CCT	AAA	CTG	CTG	ATT	TAC	TGG	GCA	TCC	GCT	AGG	GAA	TCT	GGG	GTC	192
Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Ala	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	
295					300					305					310	
CCT	GAT	CGC	TTC	ACA	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACA	GAT	TTC	ACT	CTC	TCC	240
Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	
			315					320						325		
ATC	AGC	AST	GTG	AAG	ACT	GAA	GAC	CTG	GCA	GTT	TAT	TAC	TGT	CAG	CAG	288
Ile	Ser	Ser	Val	Lys	Thr	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	
			330					335					340			
TAT	TAT	AGC	TAT	CCC	CTC	ACG	TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTT	GTG	CTG	336
Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Val	Leu	
		345					350					355				
AAA	GGC	TCT	ACT	TCC	GGT	AGC	GGC	AAA	CCC	GGG	AGT	GGT	GAA	GGT	AGC	384
Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser	
	360					365					370					
ACT	AAA	GGT	CAG	GTT	CAG	CTG	CAG	CAG	TCT	GAC	GCT	GAG	TTG	GTG	AAA	432
Thr	Lys	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Asp	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	
375					380					385					390	
CCT	GGG	GCT	TCA	GTG	AAG	ATT	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	TTC	480
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	
				395					400					405		
ACT	GAC	CAT	GCA	ATT	CAC	TGG	GTG	AAA	CAG	AAC	CCT	GAA	CAG	GGC	CTG	528
Thr	Asp	His	Ala	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Asn	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	
			410					415					420			

【 0 2 5 8 】

## 【表 1 2】

GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT	576
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn	
425 430 435	
GAG AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC	624
Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser	
440 445 450	
ACT GCC TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG	672
Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
455 460 465 470	
TAT TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC	720
Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
475 480 485	
TCG GTC ACC GTC TCC AAA AAG AAG AAA AAA AAG AAA AAG GTC ACC GTC	768
Ser Val Thr Val Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Val Thr Val	
490 495 500	
TCC TAAIAGGATC C	782
Ser	

10

## (2) 配列番号 4 の情報 :

## (i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 257 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列の種類 : タンパク質

20

## (xi) 配列 : 配列番号 4 :

Asp Val Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly	
1 5 10 15	
Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser	
20 25 30	
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
35 40 45	
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val	
50 55 60	
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser	
65 70 75 80	
Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln	
85 90 95	
Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu	
100 105 110	
Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser	
115 120 125	

30

40

【 0 2 5 9 】

【表 1 3】

Thr	Lys	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Asp	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	
	130					135					140					
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	
145					150					155					160	
Thr	Asp	His	Ala	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Asn	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	
				165					170					175		
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Phe	Ser	Pro	Gly	Asn	Asp	Asp	Phe	Lys	Tyr	Asn	
			180					185					190			
Glu	Arg	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	
		195					200					205				
Thr	Ala	Tyr	Val	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	
	210					215					220					
Tyr	Phe	Cys	Thr	Arg	Ser	Leu	Asn	Met	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
225					230					235					240	
Ser	Val	Thr	Val	Ser	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Val	Thr	Val	
				245				250						255		

Ser

10

【図 1】

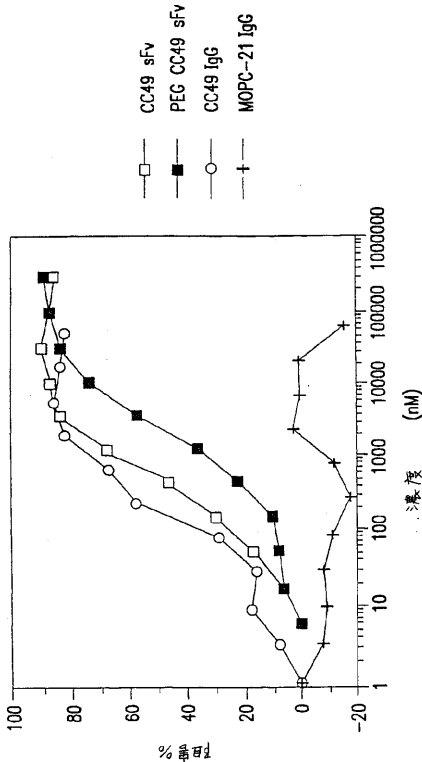


FIG.1

【図 2 A】

```

CC49 VL 12 15
D V V W S Q S P S S L P V S Y
GAC GTC GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA GTT
Aat II

G E K V T L S C K S S Q S L L
GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC CTT TTA

Y S G N Q K N Y L A W Y Q Q K
TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA

P G Q S P K L L I Y W A S A R
CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG GCA TCC GCT AGG

E S G V P D R F T G S G S G T
GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA

D F T L S I S C V K T E D L A
GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC TGT GTG AAG ACT GAA GAC CTG GCA

V Y Y C Q Q Y Y S Y P L T F G
GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC AGC TTC GGT

A G T K L V L K G S C S G S G
GCT GGG ACC AAG CTT GTG CTG AAA GGC TCT TGT TCC GGT AGC GGC
Hind III

K P G S G E G S T K G Q V Q L
AAA CCC GGG AGT GGT GAA GGT AGC ACT AAA GGT CAG GTT CAG CTG
Sma I PvuII

Q Q S D A E L V K P G A S V K
CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT GGG GCT TCA GTG AAG

I S C K A S G Y T F T D H A I
ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT

H W V K Q N P E Q G L E W I G
CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA

```

FIG.2A

【 2 B 】

Y F S P G N D D F K Y N E R F 63  
 TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC  
 78  
 K G K A T L T A D K S S S T A  
 AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC  
 82B  
 Y V Q L N C L T S E D S A V Y 90  
 TAC GTG CAG CTC AAC TGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT  
 \*  
 F C T R S L N M A Y W G Q G T 107  
 TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC  
 112  
 S V T V S C  
 TCA GTC ACC GTC TCC TGC TAA TAGGATCC  
 \* BamHI

FIG.2B

【 3 A 】

CC49 VL 12 15  
 D V V M S Q S P S S L P V S V  
 GAC GTC GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA GTT  
 Aat II  
 G E K V T L S C K S S Q S L L 27C  
 GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC CTT TTA  
 39  
 Y S G N Q K N Y L A W Y Q Q K  
 TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA  
 54  
 P G Q S P K L L I Y W A S A R  
 CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG GCA TCC GCT AGG  
 69  
 E S G V P D R F T G S G S G T  
 GAA TCT GGG GTC CCT GAT GTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA  
 84  
 D F T L S I S S V K T E D L A  
 GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT GAA GAG CTG GCA  
 99  
 V Y Y C Q Q Y Y S Y P L T F G  
 GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC AGC TTC GGT  
 21B 11>カ-  
 A G T K L V L K G S T S G S G  
 GCT GGG ACC AAG CTT GTG CTG AAA GGC TCT ACT TCC GGT AGC GGC  
 Hind III  
 CC49 VH 4  
 K P G S G E G S T K G Q V Q L  
 AAA CCC GGC AGT GGT GAA GGT AGC ACT AAA GST CAG GTT CAG CTG  
 Sma I Pvu II  
 Q Q S D A E L V K P G A S V K 13  
 CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT GGG GCT TCA GTG AAG  
 34  
 I S C K A S G Y T F T D H A I  
 ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT  
 49  
 H W V K Q N P E Q G L E W I G  
 CAG TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA  
 63  
 Y F S P G N D D F K Y N E R F  
 TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC

FIG.3A

【 3 B 】

K G K A T L T A D K S S S T A 78  
 AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC  
 82B  
 Y V Q L N S L T S E D S A V Y 90  
 TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT  
 107  
 F C T R S L N M A Y W G Q G T  
 TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC  
 112  
 S V T V S K K K K K K K K V T  
 TCC GTC ACC GTC TCC AAA AAG AAG AAA AAA AAG AAA AAG GTC ACC  
 BstEII \* \* \* \* \*  
 V S  
 GTC TCC TAA TAGGATCC  
 BamHI

FIG.3B

【 4 】

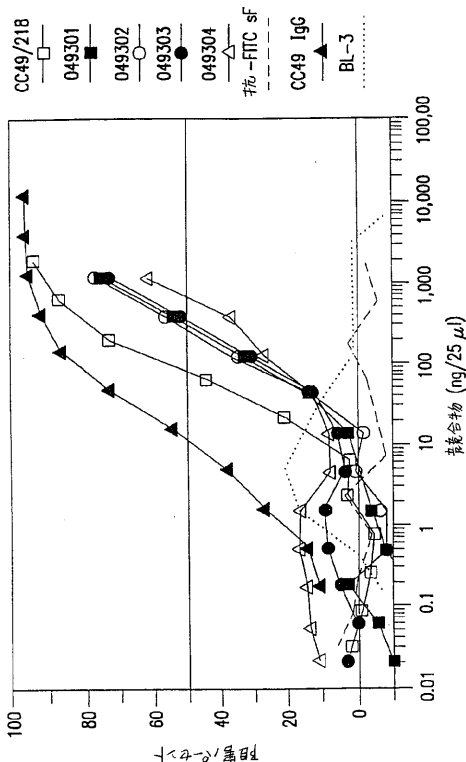


FIG.4

【 図 5 】

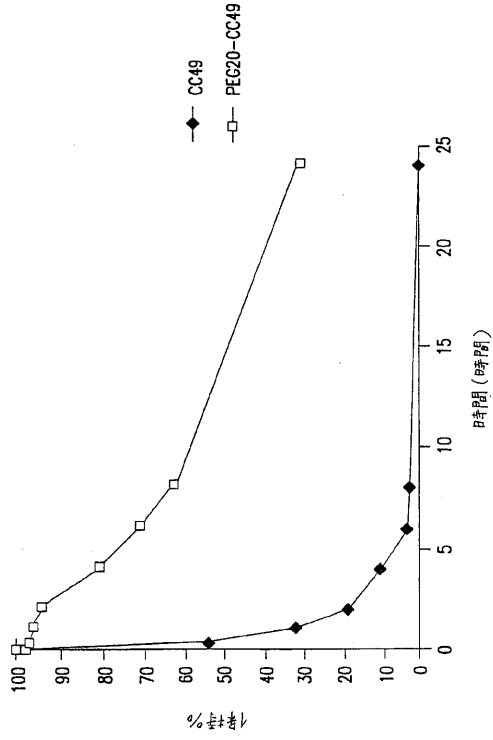


FIG.5

【 図 6 】

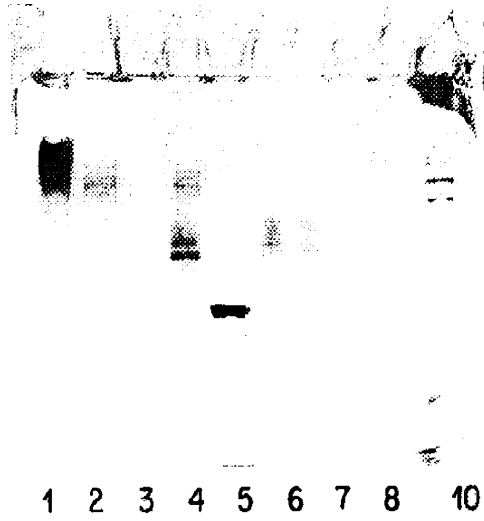


FIG.6

【 図 7 】

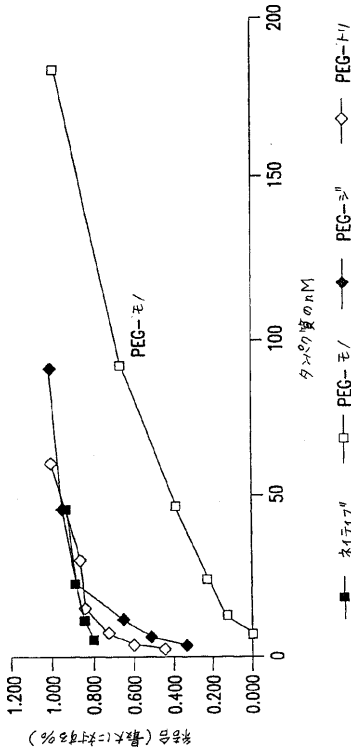


FIG.7

【 図 8 】

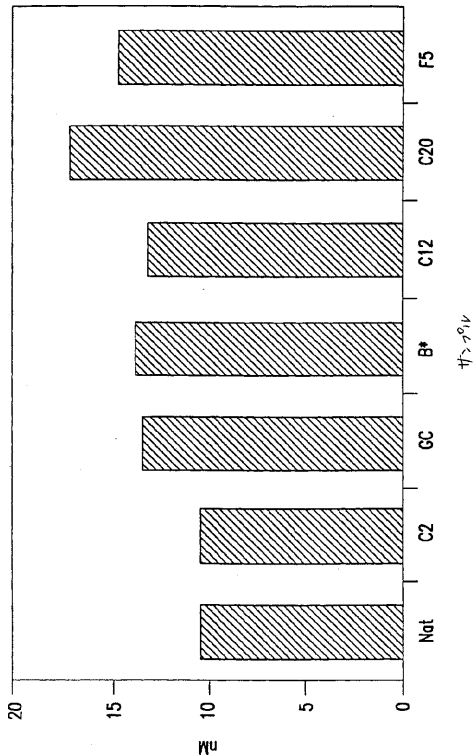


FIG.8

## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/067,341

(32)優先日 平成9年12月2日(1997.12.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 マーク ホワイトロウ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94803, エル ソプラント, メイ ロード 3675

(72)発明者 ロバート ジー.エル. ショアー

アメリカ合衆国 ニュージャージー 08817, エジソン, ブルックフォール ロード 28

(72)発明者 デイビッド アール. フィルブラ

アメリカ合衆国 ニュージャージー 08854, ピスカタウェイ, カルトン クラブ ドライブ 269

(72)発明者 リーシン エス. リー

アメリカ合衆国 ニュージャージー 08550, プリンストン ジャンクション, パン ウィック ドライブ 22

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 CA01 DA02 DA05 DA12 EA02 EA04 GA11  
4B064 AG27 CA02 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 BA57 CA40 DA76 EA28 EA50 FA74



专利名称(译)	聚环氧烷改性的单链多肽		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010051331A</a>	公开(公告)日	2010-03-11
申请号	JP2009281051	申请日	2009-12-10
[标]申请(专利权)人(译)	恩佐下来制药公司		
申请(专利权)人(译)	ENZON制药公司		
[标]发明人	マークホワイトロウ ロバートジーエルショアー デイビッドアールフィルプラ リーシンエスリー		
发明人	マーク ホワイトロウ ロバート ジー.エル. ショアー デイビッド アール. フィルプラ リーシン エス. リー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/00 C12P21/02 G01N33/53 C07K16/46 A61K39/38 A61K47/48 A61P35/00 C07H21/04 C07K14/00 C07K14/715 C07K16/30 C07K16/44 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12R1/84 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6857 A61K47/60 A61K2039/505 C07K16/30 C07K19/00 C07K2317/41 C07K2317/622 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/00.ZNA C12P21/02.C G01N33/53.D C07K16/46		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/BA57 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/044449 1997-04-30 US 60/050472 1997-06-23 US 60/063074 1997-10-27 US 60/067341 1997-12-02 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：通过聚(乙二醇) PEG和类似的聚(氧化烯)链的共价键对具有三维折叠的单链多肽结合分子提供单链多肽的化学修饰，因此，抗体可变区的结合能力和特异性。解决方案：与亲本多肽相比，这种修饰的单链多肽结合分子的制剂具有降低的免疫原性和抗原性以及血流中更长的半衰期。由于修饰的单链多肽结合分子的有益特性，这些分子在各种治疗应用中非常有用。还提供了能够PEG化的多价抗原结合分子。还公开了其组合物，遗传构建体，使用方法和产生PEG化抗原结合蛋白的方法。Z

【0088】

【化1】

