

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-541940

(P2013-541940A)

(43) 公表日 平成25年11月21日 (2013. 11. 21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G 0 4 5
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	4 C 0 8 4
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 37/00 1 O 2	4 C 0 8 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 H 0 4 5
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 108 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-528300 (P2013-528300)	(71) 出願人	509136415 ハロザイム インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン ディエゴ ソレント バレー ロード 1 1 3 8 8
(86) (22) 出願日	平成23年9月8日 (2011. 9. 8)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成25年4月24日 (2013. 4. 24)	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/050891	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(87) 国際公開番号	W02012/033953	(74) 代理人	100170520 弁理士 澤本 真奈美
(87) 国際公開日	平成24年3月15日 (2012. 3. 15)		
(31) 優先権主張番号	61/402, 979		
(32) 優先日	平成22年9月8日 (2010. 9. 8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 条件的活性治療用タンパク質を評価および同定する、または発展させる方法

(57) 【要約】

有害な副作用が低減した治療用タンパク質を発展させるかまたは選択する方法および得られたタンパク質が提供される。例えば、あるインビボ環境内で、別のインビボ環境と比較して良好な活性を示す条件的活性治療用タンパク質を同定するためのインビトロアッセイが本明細書において提供される。方法は、a) 正常または増大した活性が望まれる条件下で、タンパク質の活性を試験する工程と、b) 正常と比較して低減した活性が望まれる条件下でタンパク質の活性を試験する工程と、c) a) における活性をb) と比較し、b) と比較してa) においてより大きな活性を有するタンパク質を選択/同定する工程とを含む。選択/同定されたタンパク質は、条件的活性タンパク質である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

腫瘍を治療し、中性 pH よりも低 pH で活性である治療用タンパク質を同定 / 選択する方法であって、

- a) 低 pH を含む条件下でタンパク質の活性を試験することと、
- b) 中性 pH を含む条件下でタンパク質の活性を試験することと、
- c) a) における活性を、b) における活性と比較することと、
- d) b) と比較して、a) においてより大きな活性を有するタンパク質を選択 / 同定し、それによって、高 pH よりも低 pH で活性であるタンパク質を同定することとを含む方法。

10

【請求項 2】

低 pH が、7.4 未満である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

低 pH が、5.8 ~ 6.8 の間またはほぼ 5.8 ~ 6.8 の間である、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

中性 pH が、7.2 ~ 7.6 の間またはほぼ 7.2 ~ 7.6 の間である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

中性 pH が、約 7.4 であるかまたは 7.4 である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 6】

a) における条件が、乳酸濃度の上昇、ピルビン酸濃度の上昇および低酸素の中から選択される 1 つまたは複数の条件を含む、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

a) における条件が、10 mM ~ 20 mM の乳酸または 15 mM ~ 18 mM の乳酸または少なくとも約 16 mM、16.5 mM もしくは 17 mM の乳酸または少なくとも 16 mM、16.5 mM もしくは 17 mM の乳酸の中から選択される乳酸濃度の上昇を含み、かつ / または

b) における条件が、0.5 ~ 5 mM もしくは 0.2 mM ~ 4 mM の乳酸または 0.5、1、2、3、4 もしくは 5 mM の乳酸または約 0.5、1、2、3、4 もしくは 5 mM の乳酸の中から選択される乳酸濃度を含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 8】

非腫瘍微小環境においてよりも腫瘍微小環境においてより活性である治療用タンパク質を同定 / 選択する方法であって、

a) 腫瘍微小環境において存在するが、活性が望まれる非腫瘍環境には存在しない条件下でタンパク質の活性を試験することと、

b) 非腫瘍微小環境において存在する条件下でタンパク質の活性を試験することと、

c) a) における活性を、b) における活性と比較することと、

d) b) と比較して、a) において大きな活性を有するタンパク質を選択 / 同定し、それによって、非腫瘍微小環境においてよりも腫瘍微小環境においてより活性であるタンパク質を同定することと

40

を含む方法。

【請求項 9】

非腫瘍微小環境が、全身微小環境である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

非腫瘍微小環境が、健常組織である、請求項 8 または請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

健常組織が、消化 (GI) 管、皮膚、脈管構造、血液または細胞外マトリックスである、請求項 8 から 10 のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 12】

a) および b) の各々を、腫瘍微小環境において存在するが非腫瘍微小環境においては存在しない条件 (単数または複数) を除いて、同一条件下で実施する、請求項 8 から 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

腫瘍微小環境において存在する条件が、血管新生の増大、低酸素、pH の低下、乳酸濃度の上昇、ビルビン酸濃度の上昇、間質液圧の増大および代謝産物の変更または腫瘍を示す代謝の中から選択される 1 つまたは複数の特性を含む、請求項 8 から 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

腫瘍微小環境において存在する条件が、中性より低い pH または非腫瘍微小環境よりも低い pH を含む、請求項 8 から 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

腫瘍微小環境において存在する条件が、7.4 未満の pH を含む、請求項 8 から 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

腫瘍の pH が、ほぼ 5.8 ~ 6.8 (5.8 および 6.8 を含む) または 5.8 ~ 6.8 (5.8 および 6.8 を含む) であり、腫瘍微小環境において存在する条件が、5.8 ~ 6.8 の間またはほぼ 5.8 ~ 6.8 の間の pH を含む、請求項 8 から 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

腫瘍微小環境において存在する条件が、非腫瘍微小環境において存在する条件と比較して、乳酸濃度の上昇および / またはビルビン酸の上昇を含む、請求項 8 から 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

a) の条件が、中性より低い pH および b) における条件と比較して乳酸濃度の上昇を含む、請求項 8 から 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

pH が、5.8 ~ 6.8 の間 (5.8 および 6.8 を含む) または 5.8 および 6.5 (5.8 および 6.5 を含む) である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

a) における条件が、10 mM ~ 20 mM の乳酸または 15 mM ~ 18 mM の乳酸または少なくとも約 16 mM、16.5 mM もしくは 17 mM の乳酸または 16 mM、16.5 mM もしくは 17 mM の乳酸の中から選択される乳酸濃度の上昇を含み、かつ / または b) における条件が、0.5 ~ 5 mM もしくは 0.2 mM ~ 4 mM の乳酸または 0.5、1、2、3、4 もしくは 5 mM の乳酸または約 0.5、1、2、3、4 もしくは 5 mM の乳酸の中から選択される乳酸濃度を含む、請求項 8 から 19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

タンパク質が、腫瘍を治療する治療用タンパク質である、請求項 8 から 20 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

インビトロで実施する、請求項 1 から 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

治療用タンパク質が、抗体、酵素、ホルモン、サイトカインまたはその活性部分であり、ここで、抗体への言及が、抗体またはその抗原結合断片を指す、請求項 1 から 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

治療用タンパク質が、標的受容体のリガンドである、請求項 1 から 23 のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

10

20

30

40

50

腫瘍を治療する治療用タンパク質が、抗腫瘍抗体である、請求項 1 から 24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

抗腫瘍抗体が、セツキシマブ（アービタックス（登録商標））、トラスツズマブ（ヘルセプチン（登録商標））、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））、マブセラ（登録商標））、ベバシズマブ（アバスチン（登録商標））、アレムツズマブ（キャンパス（登録商標））、パニツムマブ（ベクティビックス（登録商標））、ラニビズマブ（ルセンティス（登録商標））、イブリットモマブ、イブリットモマブチウキセタン（ゼバリン（登録商標））、トシットモマブ、ヨウ素 I 131 トシットモマブ（ベキサール（登録商標））、カツマキソマブ（レモバブ（登録商標））、ゲムツズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン（マイロ
10 ターグ（登録商標））、アパタセプト（CTLA4-Ig、オレンシア（登録商標））、ベラタセプト（L104EA29YIg；LEA29Y；LEA）、イビリムマブ（MDX-010、MDX-101）、トレメリムマブ（チシリムマブ、CP-675,206）、PRS-010、PRS-050、アフリベルセプト（VEGF Trap、AVE005）、ボロキシマブ（M200）、F200、MORAb-009、SS1P（CAT-5001）、シクスツムマブ（IMC-A12）、マツズマブ（EMD72000）、ニモツズマブ（h-R3）、ザルツムマブ（HuMax-EGFR）、ネシツムマブ IMC-11F8、mAb806/ch806、Sym004 および mAb-425 の中から選択される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

抗腫瘍抗体が、セツキシマブ（アービタックス（登録商標））である、請求項 25 または請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

複数のタンパク質を、a) および b) の各々において試験し、
各タンパク質を、a) および b) の各々において試験し、
b) と比較して、a) においてより大きな活性を有する任意のタンパク質を選択する、
請求項 1 から 27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

複数のタンパク質が、治療用タンパク質の修飾された変異体を含むか、または治療用タンパク質の修飾された変異体であり、変異体の収集物を、a) および b) の各々において試験する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

治療用タンパク質が、多量体化ドメインを含む、請求項 1 から 29 のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

多量体化ドメインが、Fc ドメインまたは修飾された Fc ドメインを含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

治療用タンパク質が、抗体、酵素、ホルモンまたはサイトカインである、請求項 1 から 31 のいずれかに記載の方法。

【請求項 33】

治療用タンパク質が、抗体である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

治療用タンパク質が、抗腫瘍抗体である、請求項 1 から 33 のいずれかに記載の方法。

【請求項 35】

抗腫瘍抗体が、セツキシマブ（アービタックス（登録商標））、トラスツズマブ（ヘルセプチン（登録商標））、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））、マブセラ（登録商標））、ベバシズマブ（アバスチン（登録商標））、アレムツズマブ（キャンパス（登録商標））、パニツムマブ（ベクティビックス（登録商標））、ラニビズマブ（ルセンティス（登録商標））、イブリットモマブ、イブリットモマブチウキセタン（ゼバリン（登録商標））

10

20

30

40

50

)、トシツモマブ、ヨウ素 I 1 3 1 トシツモマブ (ベキサール (登録商標))、カツムキソマブ (レモバブ (登録商標))、ゲムツズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン (マイロターゲット (登録商標))、アパタセプト (CTL A 4 - I g、オレンシア (登録商標))、ベラタセプト (L 1 0 4 E A 2 9 Y I g ; L E A 2 9 Y ; L E A)、イピリムマブ (MDX - 0 1 0、MDX - 1 0 1)、トレメリムマブ (チシリムマブ、CP - 6 7 5 , 2 0 6)、PRS - 0 1 0、PRS - 0 5 0、アフリベルセプト (VEGF Trap、AVE 0 0 5)、ボロシキシマブ (M 2 0 0)、F 2 0 0、MORAb - 0 0 9、SS 1 P (CAT - 5 0 0 1)、シクスツムマブ (IMC - A 1 2)、マツズマブ (EMD 7 2 0 0 0)、ニモツズマブ (h - R 3)、ザルツムマブ (HuMax - EGFR)、ネシツムマブ IMC - 1 1 F 8、mAb 8 0 6 / ch 8 0 6、Sym 0 0 4 および mAb - 4 2 5 の中から選択される、請求項 3 4 に記載の方法。

10

【請求項 3 6】

修飾された変異体が、治療用タンパク質の修飾されていない形態と比較して、アミノ酸残基 (単数または複数) のアミノ酸置換、挿入および / または欠失を含有する、請求項 2 9 から 3 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 7】

試験されるタンパク質が、抗体の修飾されていない形態と比較して、相補性決定領域 (CDR) 中に 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含む変異型抗体である、請求項 1 から 3 6 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 3 8】

各変異型タンパク質が、治療用タンパク質の修飾されていない形態と比較して、単一アミノ酸置換を含有する、請求項 2 9 から 3 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 9】

各変異型タンパク質が、治療用抗体の修飾されていない形態と比較して、2、3、4、5、6、7、8、9 またはそれ以上のアミノ酸置換を含有する、請求項 2 9 から 3 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 0】

収集物中で、変化している位置各々のアミノ酸が、その位置の元のアミノ酸以外の最大 1 ~ 1 9 種のアミノ酸で置換され、

治療用タンパク質またはその選択された部分の長さに沿ってどのアミノ酸も置換される、請求項 2 9 から 3 9 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 4 1】

置換アミノ酸が、治療用タンパク質中の対応する位置のアミノ酸とは異なるという条件で、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr および Val の中から選択される、請求項 2 9 から 4 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 2】

ヒスチジンが、置換アミノ酸であるか、またはタンパク質中のヒスチジンが、非塩基性もしくは非荷電アミノ酸で置換される、請求項 2 9 から 4 1 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 4 3】

修飾が、Arg、Asp、Glu、His および Lys の中から選択されるアミノ酸と、アミノ酸置換を含む、請求項 2 9 から 4 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 4】

修飾が、His とのアミノ酸置換を含む、請求項 2 9 から 4 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 5】

タンパク質が、抗体であり、修飾される選択された部分が、CDR である、請求項 2 9 から 4 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 6】

収集物中の各変異型タンパク質を、個々に試験する、請求項 2 9 から 4 5 のいずれかに

50

記載の方法。

【請求項 47】

各変異型タンパク質を、アレイにおいて試験する、請求項 29 から 46 のいずれかに記載の方法。

【請求項 48】

試験される各変異型タンパク質が、アドレス可能である、請求項 29 から 46 のいずれかに記載の方法。

【請求項 49】

試験される活性が、治療用タンパク質の標的タンパク質との結合である、請求項 1 から 48 のいずれかに記載の方法。

【請求項 50】

結合が、イムノアッセイによって評価される、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

イムノアッセイが、ELISAを含む、請求項 49 または請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

イムノアッセイが、不均一であり、
固体支持体上に標的タンパク質を固定化することと、
検出可能に標識される治療用タンパク質を、標的タンパク質と接触させることと、
結合していない治療用タンパク質を除去することと、
標識された治療用タンパク質の、標的タンパク質との結合を検出または測定することと
を含む、請求項 50 または請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

イムノアッセイが均一であり、
検出可能に標識される治療用タンパク質を、標的タンパク質と接触させることと、
標識された治療用タンパク質の、標的タンパク質との結合を検出または測定することと
を含む、請求項 50 または請求項 51 に記載の方法。

【請求項 54】

結合活性が、表面上に治療用タンパク質を発現する細胞（単数または複数）を含む細胞表面発現系を使用して評価される、請求項 1 から 53 のいずれかに記載の方法。

【請求項 55】

治療用タンパク質を、細胞の表面に発現させ、
標的タンパク質を、細胞集団と接触させ、
標的タンパク質と結合する細胞（単数または複数）を同定し、それによって、結合活性を示す治療用タンパク質を同定する、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

標的タンパク質が、検出可能に標識されるか、または検出され得る、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

標的タンパク質が、蛍光標識されるか、または蛍光標識されている二次試薬によって検出される、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

結合を検出または測定することが、蛍光活性化細胞選別（FACS）による、請求項 49 から 57 のいずれかに記載の方法。

【請求項 59】

結合活性を、治療用タンパク質を発現する細胞を含む細胞表面発現系を使用して、条件 b) 下で最初に試験し、それによって、標的タンパク質と結合する細胞（単数または複数）を選択し、標的タンパク質と結合しない細胞（単数または複数）を選択し、
標的タンパク質と結合しない、選択された細胞（単数または複数）を単離し、細胞培養培地中で増殖させて、表面上に治療用タンパク質を発現する第 2 の細胞集団を作製し、
結合活性を、条件 a) 下で試験し、それによって第 2 の細胞集団に由来する細胞を、標

10

20

30

40

50

的タンパク質と接触させ、

標的タンパク質と結合する細胞（単数または複数）を同定し、それによって、条件 a）下で結合活性を示すが、条件 b）下では示さない治療用タンパク質を同定する、請求項 1 から 58 のいずれかに記載の方法。

【請求項 60】

結合活性を、治療用タンパク質を発現する細胞集団を含む細胞表面発現系を使用して、条件 a）下で最初に試験し、それによって、標的タンパク質と結合する細胞（単数または複数）を選択し、標的タンパク質と結合しない細胞（単数または複数）を選択し、

標的タンパク質と結合する、選択された細胞（単数または複数）を単離し、細胞培養培地中で増殖させて、第 2 の細胞集団を作製し、

結合活性を、条件 b）下で試験し、それによって、第 2 の細胞集団に由来する細胞を、標的タンパク質と接触させ、

標的タンパク質と結合しない細胞（単数または複数）を同定し、標的タンパク質と結合する細胞（単数または複数）を同定し、

標的タンパク質と結合しない細胞（単数または複数）を選択し、それによって、結合活性を示す治療用タンパク質を同定する、請求項 1 から 58 のいずれかに記載の方法。

【請求項 61】

治療用タンパク質の対象への投与が、1 種または複数の有害な副作用を伴う、請求項 1 から 60 のいずれかに記載の方法。

【請求項 62】

a）と比較して、b）におけるタンパク質の活性の低減が、有害な副作用を改善または予防する、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

ヒト血清の存在下で、a）および b）において治療用タンパク質の活性を試験する、請求項 1 から 62 のいずれかに記載の方法。

【請求項 64】

生理学的環境において存在する量のヒト血清の存在下で、a）および b）において治療用タンパク質の活性を試験し、a）における血清濃度が、b）における血清濃度と等しい、請求項 1 から 63 のいずれかに記載の方法。

【請求項 65】

a）および b）を、3 容量%～30 容量%（3 容量%と 30 容量%を含む）、5 容量%～30 容量%（5 容量%と 30 容量%を含む）、5 容量%～25 容量%（5 容量%と 25 容量%を含む）、10 容量%～30 容量%（10 容量%と 30 容量%を含む）、15 容量%～30 容量%（15 容量%と 30 容量%を含む）および 15 容量%～25 容量%（15 容量%と 25 容量%を含む）の中から選択される少なくともほぼその間またはその間のヒト血清の存在下で実施する、請求項 1 から 64 のいずれかに記載の方法。

【請求項 66】

ヒト血清の濃度が、25 容量%または約 25 容量%（ $\pm 10\%$ ）または 15 容量%～35 容量%である、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

治療用タンパク質の標的タンパク質が、リガンドと結合する受容体またはその一部である、請求項 1 から 66 のいずれかに記載の方法。

【請求項 68】

治療用タンパク質の標的タンパク質が、腫瘍抗原である受容体である、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

治療用タンパク質の標的タンパク質が、Her ファミリーの受容体のメンバーである、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 70】

治療用タンパク質の標的タンパク質が、EGFR 受容体またはその細胞外ドメインであ

10

20

30

40

50

る、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

a) における活性が、b) においてよりも、所定の量または割合だけ大きい、請求項 1 から 70 のいずれかに記載の方法。

【請求項 72】

活性が、少なくとも 1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50 もしくはそれ以上または 1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50 もしくはそれ以上の割合だけ大きい、請求項 71 に記載の方法。

10

【請求項 73】

a) における活性が、b) における活性よりも、少なくとも 5%、10%、15%、20%、25%、35%、50%、100%、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍またはそれ以上大きい、請求項 1 から 72 のいずれかに記載の方法。

【請求項 74】

抗腫瘍抗体の投与が、1 種または複数の有害な副作用を伴う、請求項 1 から 73 のいずれかに記載の方法。

【請求項 75】

抗体が、抗 EGF R 抗体または抗 CTLA 4 抗体である、請求項 74 に記載の方法。

20

【請求項 76】

ハイスループット形式で実施される、請求項 1 から 75 のいずれかに記載の方法。

【請求項 77】

方法が自動化されている、請求項 1 から 76 のいずれかに記載の方法。

【請求項 78】

選択されたタンパク質が、条件的に活性であり、その結果、非腫瘍環境と比較して、腫瘍微小環境においてより大きな活性を有する、請求項 1 から 77 のいずれかに記載の方法。

【請求項 79】

複数回反復し、各反復において、選択されたタンパク質（単数または複数）のさらなる変異体を作製し、試験し、それによって、治療用タンパク質が、非腫瘍環境においてよりも腫瘍環境において活性の増大を示すよう発展(evolved)し、それによって、毒性の低減または有害な副作用の低減を示す、請求項 1 から 78 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 80】

治療用タンパク質が、抗 EGF R 抗体であり、有害な副作用の低減が、抗体への全身曝露に伴う経皮毒性の低減を含む、請求項 61 から 79 のいずれかに記載の方法。

【請求項 81】

選択されるタンパク質が、7.3 ~ 7.4 の正常な生理学的 pH および 12 mM 未満の正常な乳酸濃度の b) の条件下と比較して、5.8 ~ 6.8 の低下した pH および約 12 ~ 20 mM の乳酸濃度の腫瘍微小環境内の a) の条件下で EGF R と優先的に結合する抗 EGF R 抗体変異体である、請求項 1 から 80 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 82】

工程 a) ~ d) に先立って、

e) pH 7.4 または約 pH 7.4 の pH を含むバッファー中で、第 1 の固体支持体および第 2 の 2 連の固体支持体を、EGF R または EGF R 細胞外ドメイン (ECD) と接触させることと、

f) 第 1 および第 2 の支持体を、pH 7.4 または約 pH 7.4 の pH を含むバッファーで洗浄することと、

g) 25% または約 25% のヒト血清を含むバッファーを、第 1 および第 2 の固体支持体に添加することであって、

50

i) 第1の固体支持体へ添加されるバッファの条件が、pH 6.0または約pH 6.0で約12~20 mMの乳酸を含み、

ii) 第2の固体支持体へ添加されるバッファの条件が、pH 7.4または約pH 7.4で1 mMまたは約1 mMの乳酸を含むことと、

h) 工程c)において添加されたバッファを、固体支持体から除去することとを含み、工程e)~h)を実施した後に、工程a)~d)を実施し、

工程a)は、

12~20 mMの乳酸、25%ヒト血清、pH 6.0を含む結合バッファ中で、検出可能に標識された修飾された抗EGFR抗体を、第1の支持体に添加することと、

第1の支持体を、pH 6.0または約pH 6.0で12~20 mMの乳酸を含むバッファで洗浄することと、

試薬を第1の固体支持体に添加して、結合している修飾された抗EGFRを検出し、第1の固体支持体上で、修飾されたタンパク質の、EGFRまたはEGFR ECDとの結合を検出することと

を含み、

工程b)は、

1 mMの乳酸、25%ヒト血清、pH 7.4を含む結合バッファ中で、検出可能に標識された修飾された抗EGFR抗体を、第2の支持体に添加することと、

第2の支持体を、pH 7.4または約pH 7.4で1 mMまたは約1 mMの乳酸を含むバッファで洗浄することと、

試薬を第2の固体支持体に添加して、結合している修飾された抗EGFRを検出し、第2の固体支持体上で、修飾されたタンパク質の、EGFRまたはEGFR ECDとの結合を検出することと

を含む、請求項1から81のいずれかに記載の方法。

【請求項83】

抗EGFR抗体が、抗FLAG-タグ酵素試薬を用いる検出を促進するFLAG-タグを含有する、請求項82に記載の方法。

【請求項84】

結合を検出することが、分光光度的測定を含む、請求項82または請求項83に記載の方法。

【請求項85】

第2の条件セットにおいてよりも第1の条件セットにおいてより活性である治療用タンパク質を同定/選択する方法であって、

第1の条件セットが、低pH、乳酸濃度の上昇、ビルビン酸濃度の上昇および低酸素の中から選択される、非腫瘍微小環境と比較して腫瘍微小環境において存在する1種または複数の条件を含み、

第2の条件セットが、非腫瘍微小環境において存在する対応する条件を含み、方法が、

a) 複数のタンパク質を、第1および第2の条件セット下で活性について試験することであって、

複数のタンパク質が、治療用タンパク質の修飾された変異体を含むか、または治療用タンパク質の修飾された変異体であり、

変異体の第1の収集物が、第1および第2の条件セットの各々において試験されることと、

b) 修飾されていない治療用タンパク質と比較して、第1の条件セット下で低減した活性と、

修飾されていない治療用タンパク質と比較して、第2の条件セット下で低減した活性とを有するタンパク質を選択/同定することと、

c) 工程b)において選択/同定されたタンパク質を分析して、修飾されるアミノ酸位置を同定し、それによって、重大なアミノ酸位置としてアミノ酸を同定することと、

10

20

30

40

50

d) 重大なアミノ酸位置に隣接するかまたはその付近のアミノ酸残基の、置換アミノ酸との置換を含む変異型タンパク質の第2の収集物を作製することであって、ライブラリーの各メンバーが、治療用タンパク質と比較して単一アミノ酸置換を含むことと、

e) 第1の条件セット下および第2の条件セット下で、修飾されたタンパク質の第2の収集物のメンバーの活性を試験し、第2の条件セット下と比較して、大きな、またはほぼ等しい活性を示す第2の収集物のメンバーを選択/同定することと、

f) e) において選択/同定されたタンパク質を分析して、置換されたアミノ酸位置を同定することであって、同定された位置が、重要な残基位置と呼ばれることと、

g) 変異型タンパク質の第3の収集物を作製することであって、各メンバーが、1個または複数の重要な残基位置の、置換アミノ酸との置換を含むことと、

h) コンビナトリアルライブラリーのメンバーの活性を、第1の条件セット下および第2の条件セット下で試験し、第2の条件セットと比較して、第1の条件セット下でより大きな活性を有する第2のライブラリーのメンバーを選択/同定し、それによって、第2の条件セットにおいてよりも、第1の条件セットにおいてより活性である治療用タンパク質を同定することと

を含む方法。

【請求項86】

工程h)が、

1) 第1の条件セット下で第3の収集物のメンバーの活性を試験し、所定の活性より大きな活性を有するタンパク質を選択/同定することと、

2) 第2の条件セット下で、工程1)において選択/同定されたタンパク質の活性を試験し、所定の活性より小さい活性を有するタンパク質を選択/同定することとを含む、請求項85に記載の方法。

【請求項87】

工程h)が、

1) 第2の条件セット下で第3の収集物ライブラリーのメンバーの活性を試験し、所定の活性より小さい活性を有するタンパク質を選択/同定することと、

2) 第1の条件セット下で工程1)において選択/同定されたタンパク質の活性を試験し、所定の活性より大きい活性を有するタンパク質を選択/同定することとを含む、請求項85に記載の方法。

【請求項88】

工程g)を、複数回反復し、各反復において、選択/同定されたタンパク質を試験する、請求項85から87のいずれかに記載の方法。

【請求項89】

工程g)を、1、2、3または4回反復する、請求項88に記載の方法。

【請求項90】

治療用タンパク質が、抗体、酵素、ホルモン、サイトカインまたはその活性部分であり、ここで、抗体への言及が、抗体またはその抗原結合断片を指す、請求項85から89のいずれかに記載の方法。

【請求項91】

治療用タンパク質が、標的受容体のリガンドである、請求項85から90のいずれかに記載の方法。

【請求項92】

治療用タンパク質が、腫瘍を治療するタンパク質である、請求項85から91のいずれかに記載の方法。

【請求項93】

腫瘍を治療する治療用タンパク質が、抗腫瘍抗体である、請求項92に記載の方法。

【請求項94】

抗腫瘍抗体が、セツキシマブ(アービタックス(登録商標))、トラスツズマブ(ヘルセプチン(登録商標))、リツキシマブ(リツキサン(登録商標))、マブセラ(登録商標)

10

20

30

40

50

))、ベバシズマブ(アバスチン(登録商標))、アレムツズマブ(キャンパス(登録商標))、パニツムマブ(ベクティビックス(登録商標))、ラニビズマブ(ルセンチス(登録商標))、イブリットマブ、イブリットマブチウキセタン(ゼバリン(登録商標))、トシットマブ、ヨウ素I 131トシットマブ(ベキサール(登録商標))、カツマキソマブ(レモバブ(登録商標))、ゲムツズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン(マイロターゲット(登録商標))、アパタセプト(CTLA4-Ig、オレンシア(登録商標))、ベラタセプト(L104EA29YIg; LEA29Y; LEA)、イビリムマブ(MDX-010、MDX-101)、トレメリムマブ(チシリムマブ、CP-675,206)、PRS-010、PRS-050、アフリベルセプト(VEGF Trap、AVE005)、ボロシキシマブ(M200)、F200、MORAb-009、SS1P(CAT-5001)、シクスツムマブ(IMC-A12)、マツズマブ(EMD72000)、ニモツズマブ(h-R3)、ザルツムマブ(HuMax-EGFR)、ネシツムマブIMC-11F8、mAb806/ch806、Sym004およびmAb-425の中から選択される、請求項93に記載の方法。

【請求項95】

抗腫瘍抗体が、セツキシマブ(アービタックス(登録商標))である、請求項93または請求項94に記載の方法。

【請求項96】

試験される活性が、標的タンパク質との結合である、請求項85から95のいずれかに記載の方法。

【請求項97】

結合活性が、イムノアッセイによって試験される、請求項96に記載の方法。

【請求項98】

イムノアッセイが、ELISAを含む、請求項97に記載の方法。

【請求項99】

結合活性が、細胞ベースのアッセイにおいて試験される、請求項85から98のいずれかに記載の方法。

【請求項100】

結合活性が、細胞表面発現系において試験される、請求項85から99のいずれかに記載の方法。

【請求項101】

第2のライブラリーのメンバーを、細胞の表面に発現させ、

標的タンパク質を、細胞集団と接触させ、

標的タンパク質と結合する細胞(単数または複数)を同定し、それによって、結合活性を示すタンパク質を同定する、請求項85から100のいずれかに記載の方法。

【請求項102】

細胞が、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である、請求項99から101のいずれかに記載の方法。

【請求項103】

細胞ベースのアッセイが、蛍光活性化細胞選別(FACS)である、請求項99から102のいずれかに記載の方法。

【請求項104】

標的タンパク質が、検出可能に標識されるか、または検出され得る、請求項96から103のいずれかに記載の方法。

【請求項105】

標的タンパク質が、蛍光標識されるか、または蛍光標識されている二次試薬によって検出される、請求項96から104のいずれかに記載の方法。

【請求項106】

結合を検出または測定することが、蛍光活性化細胞選別(FACS)による、請求項96から105のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 107】

標的タンパク質が、Herファミリーの受容体のメンバーである、請求項96から106のいずれかに記載の方法。

【請求項 108】

標的タンパク質が、EGFR受容体またはその細胞外ドメインである、請求項96から107のいずれかに記載の方法。

【請求項 109】

第1の条件セットが、7.4未満の低pHを含み、
重大なアミノ酸が、荷電残基からなるアミノ酸置換を含むタンパク質変異体から選択される、請求項85から108のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 110】

荷電残基が、Arg、Asp、Glu、HisおよびLysの中から選択される、請求項109に記載の方法。

【請求項 111】

第2および第3の収集物中のアミノ酸置換が、アミノ酸のHisとの置換である、請求項85から110のいずれかに記載の方法。

【請求項 112】

第1の条件セットが、ほぼ5.8~6.8(5.8および6.8を含む)または5.8~6.8(5.8および6.8を含む)であるpHを含む、請求項85から111のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 113】

第1の条件セットが、中性より低いpHおよび第2の条件セットと比較して乳酸濃度の上昇を含む、請求項85から112のいずれかに記載の方法。

【請求項 114】

第1の条件セットが、pH6.0または約pH6.0で約12~20mMの乳酸を含み、
第2の条件セットが、pH7.4または約pH7.4で、1mMまたは約1mMの乳酸を含む、請求項85から113のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

Lalitha Kodandapani、Philip Lee Sheridan、Harold Michael Shepard、Louis H. BookbinderおよびGregory I. Frostの2010年9月8日に出願された「METHODS FOR ASSESSING AND IDENTIFYING OR EVOLVING CONDITIONALLY ACTIVE THERAPEUTIC PROTEINS AND CONDITIONALLY ACTIVE THERAPEUTIC PROTEINS」と題された米国仮出願第61/402,979号の優先権の利益が主張される。

【0002】

有害な副作用が低減した治療用タンパク質を発展させる(evolving)かまたは選択する方法および得られたタンパク質が提供される。

【背景技術】

40

【0003】

タンパク質は、癌、血友病、貧血および糖尿病などの広範なヒト疾患の治療のための、医薬品または治療薬としての役割を有しており、いくつかの疾患については、唯一の有効な治療である。そのようなものとして、活性または特性が変更されたかまたは改善されたタンパク質治療薬を同定する必要がある。このようなタンパク質を同定または作製する方法を提供することが本明細書における目的である。

【発明の概要】

【0004】

条件的活性タンパク質を同定/選択する方法が提供される。本方法では、タンパク質の活性が、正常または増大した活性が望まれる条件下で試験され、また、タンパク質の活性

50

が、正常と比較して低減した活性が望まれる条件下で試験される。正常または増大した活性が望まれる条件下でのタンパク質の活性を、正常と比較して低減した活性が望まれる条件下でのタンパク質の活性と比較することができる。正常と比較して低減した活性が望まれる条件と比較して、正常または増大した活性が望まれる条件下で、より大きな活性を有するタンパク質を選択および/または同定することができる。

【0005】

本方法では、正常と比較して低減した活性が望まれる条件下でのタンパク質の活性を、正常と比較して低減することができる。本方法では、正常または増大した活性が望まれる条件および正常と比較して低減した活性が望まれる条件は、タンパク質を条件的に活性にする条件（単数または複数）を除いて同一であり得る。本明細書における方法では、試験される活性は、タンパク質の標的との結合であり得る。標的は、固体支持体上に固定化されている場合もある。本明細書における方法では、結合は、イムノアッセイによって評価できる。イムノアッセイは、ELISAイムノアッセイ、不均一イムノアッセイおよび均一イムノアッセイを含む。

10

【0006】

本明細書における方法では、タンパク質の正常または増大した活性が望まれる条件は、疾患微小環境をシミュレートでき、正常と比較して低減した活性が望まれる条件は、健常組織環境をシミュレートできる。健常組織環境の例示として、全身環境または健常組織などの非腫瘍組織環境がある。健常組織の例示として、消化管、皮膚、脈管構造、血液および細胞外マトリックスがある。病変微小環境の例示として、腫瘍微小環境がある。腫瘍または疾患微小環境は、中性より低いpHまたは健常組織微小環境より低いpHを有し得る。腫瘍または疾患微小環境は、血管新生の増加、低酸素、pHの低下、間質液圧の増大、代謝産物の変更または腫瘍もしくはその他の疾患を示す代謝のうち1つまたは複数を含み得る。例えば、腫瘍またはその他の疾患微小環境は、健常微小環境と比較して、乳酸濃度の上昇および/またはピルビン酸の上昇を有し得る。

20

【0007】

また、タンパク質の正常または増大した活性が望まれる条件が、中性より低いpHおよび正常と比較して低減した活性が望まれる条件と比較して、乳酸の上昇を含み得る方法も本明細書において提供される。

【0008】

本明細書における方法では、試験されるタンパク質は、治療用タンパク質および/または健常組織において望ましくない副作用が示されるタンパク質であり得る。本明細書における方法では、正常と比較して低減した活性が望まれる条件下でタンパク質の活性を低減することは、望ましくない副作用を改善または予防し得る。

30

【0009】

本明細書において提供される方法では、タンパク質の活性は、ヒト血清の存在下で試験され得る。ヒト血清は、生理的条件をシミュレートする量で存在し得、正常または増大した活性が望まれる条件下で存在する血清の量は、正常と比較して低減した活性が望まれる条件下で存在する血清の量と同一であり得る。例えば、本明細書において提供される方法は、少なくともほぼ3容量%~30容量%（3容量%および30容量%を含む）または5容量%~30容量%（5容量%と30容量%を含む）または5容量%~25容量%（5容量%と25容量%を含む）、10容量%~30容量%（10容量%と30容量%を含む）または15容量%~30容量%（15容量%と30容量%を含む）または15容量%~25容量%（15容量%と25容量%を含む）またはそのいずれかのヒト血清、例えば、25容量%または約25容量%（ $\pm 10\%$ ）のヒト血清の存在下で実施され得る。

40

【0010】

本明細書において提供される方法では、複数のタンパク質が、正常または増大した活性が望まれる条件下でおよび正常と比較して低減した活性が望まれる条件下で試験され得る。この特定の方法では、各タンパク質は、両条件下で試験され、正常と比較して低減した活性が望まれる条件下よりも、正常または増大した活性が望まれる条件下でより大きな活

50

性を有する任意のタンパク質が選択され得る。一部の例では、活性は、所定の量または比だけ大きい。例えば、活性は、少なくとも 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、35 %、50 %、100 %、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍またはそれ以上増大される。

【0011】

本明細書において提供される方法では、標的タンパク質は、リガンドと結合する受容体またはその一部であり得る。標的タンパク質の例示として、腫瘍抗原である受容体がある。例えば、標的タンパク質は、Herファミリーの受容体のメンバーであり、または標的タンパク質は、EGFR 受容体もしくはその細胞外ドメインである。本明細書において提供される方法では、その活性が試験されるタンパク質（試験されるタンパク質）は、腫瘍またはその他の疾患を治療する治療用タンパク質であり得る。一部の例では、治療用タンパク質は、抗体、酵素、ホルモン、サイトカインまたはその活性部分であり、本明細書において抗体への言及は、抗体またはその抗原結合断片を指す。本明細書において提供される方法のその他の例では、タンパク質は、治療用タンパク質の修飾された変異体であり得る。治療用タンパク質の例示として、標的受容体のリガンドがある。本明細書において提供される方法の一部の例では、タンパク質は、多量体化ドメイン、例えば、Fcドメインまたは修飾されたFcドメインを含有する多量体化ドメインなどを含有する。例示的方法では、治療用タンパク質は、抗体、酵素、ホルモンまたはサイトカインである。例えば、治療用タンパク質は、抗体である。

10

【0012】

本明細書において提供される方法では、本方法において試験されるタンパク質は、表 5（例示的抗腫瘍抗体を列挙する本明細書中の表）中に列挙されるものの中から選択される抗腫瘍抗体であり得る。一部の例では、抗腫瘍抗体は、健常組織において望ましくない副作用を示す。例えば、抗体は、健常組織において望ましくない副作用を示す抗EGFR抗体または抗CTLA4抗体である。

20

【0013】

本明細書において提供される方法のその他の例では、タンパク質は、治療用タンパク質の修飾された変異体であり得る。修飾された変異体は、アミノ酸置換、挿入および/または欠失を含有し得る。一部の例では、変異体の収集物が試験される。一部の例では、各変異体は、野生型または修飾されていないタンパク質およびすべてのその他の変異体と、単一アミノ酸で異なる。その他の例では、各変異体は、2、3、4、5、6、7、8、9 個またはそれ以上の、修飾されていないタンパク質または野生型タンパク質と異なるアミノ酸を含有する。本明細書において提供される方法では、変異体の収集物において、変化している位置各々のアミノ酸が、元のアミノ酸以外の最大 1 ~ 19 種のアミノ酸で置換される。その他の例では、ヒスチジンが置換アミノ酸であるか、またはタンパク質中のヒスチジンが、非塩基性または非荷電アミノ酸で置換される。各変異型タンパク質は、個々に試験され得る。例えば、各変異型タンパク質は、ハイスループット形式または自動化法で試験され得る。

30

【0014】

本明細書において提供される方法では、選択されたタンパク質は、条件的に活性であり得、その結果、非腫瘍環境と比較して、腫瘍またはその他の疾患微小環境においてより大きな活性を有する。本明細書において提供される方法は、複数回反復することができ、各反復において、選択されたタンパク質（単数または複数）のさらなる変異体を試験し、それによって、治療用タンパク質は、低減した毒性または有害な副作用を示すよう発展する。本明細書において提供される方法では、変異型タンパク質は、変異型タンパク質をコードする核酸分子を含有するベクターからの発現によって製造され得る。

40

【0015】

本明細書において提供される方法の一部の例では、試験されるタンパク質は、CDR中に 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含有する変異型抗体である。特定の例では、タンパク質またはその選択された部分の長さに沿ってどのアミノ酸も、最大 19 種のその他のアミノ酸で 1 個ずつ置換される。その他の例では、タンパク質は、抗体であり、選択された部

50

分は、C D Rである。

【0016】

一例では、治療用タンパク質は、抗EGFR抗体であり、有害な副作用の低減は、抗体に対する全身曝露に伴う経皮毒性の低減である。本明細書において提供される方法の一部の例では、腫瘍またはその他の疾患微小環境のpHは、ほぼ5.8~6.8(5.8と6.8を含む)または5.8~6.8(5.8と6.8を含む)である。その他の例では、選択されたタンパク質は、7.3~7.4の正常な生理学的pHおよび12mM未満の正常乳酸濃度と比較して、5.8~6.8の低下したpHおよび約12~20mMの乳酸濃度の腫瘍微小環境内でEGFRと優先的に結合する抗EGFR抗体である。

【0017】

条件的活性タンパク質を同定する方法が、本明細書において提供され、本方法は、EGFRまたはEGFR ECDでコーティングされた固体支持体を、1mMの乳酸および約25%ヒト血清を含有する約pH7.3~7.4のバッファーと接触させること、第2の2連の支持体を、12~20mM、例えば、16.6mMの乳酸および約25%ヒト血清を含有する約pH6のバッファーと接触させることと、支持体に対応するバッファー(pH6.0またはpH7.4)で洗浄することと、乳酸およびヒト血清を含むpH7.4バッファーまたは乳酸およびヒト血清を含むpH6.0バッファーのいずれか中の、抗EGFRタグ付き、例えば、FLAGタグ付き標準を、対応する支持体と結合させることと、対応するバッファー中のヤギ抗タグ酵素、例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)および酵素基質を添加することによって、抗EGFRのEGFRとの結合を検出して、抗EGFRの各支持体との結合を検出または定量することによって実施される。

【0018】

また、本明細書において提供される方法のいずれかによって選択/同定または発展する治療用タンパク質も本明細書において提供される。また、修飾されていない抗体と比較して、低減された経皮毒性を示す変異型抗腫瘍抗体も本明細書において提供される。また、アービタックスと比較して低減された経皮毒性を示す抗EGFR抗体も本明細書において提供される。

【0019】

腫瘍を治療し、中性pHよりも低pHで活性である治療用タンパク質を同定/選択する方法が提供される。本方法では、タンパク質の活性が、低pHを含む条件下で試験され、またタンパク質の活性が、中性pHを含む条件下で試験される。低pHを含む条件下でのタンパク質の活性を、中性pHを含む条件下でのタンパク質の活性と比較できる。高pHよりも低pHでより活性であるタンパク質を、選択および/または同定できる。低pHは、7.4未満である任意のpH、例えば、5.8~6.8の間またはほぼ5.8~6.8の間であり得る。中性pHはまた、7.2~7.6の間またはほぼ7.2~7.6の間である任意のpH、例えば、7.4であり得る。

【0020】

本方法では、低pHを含む条件は、乳酸濃度の上昇、ビルビン酸濃度の上昇および低酸素の中から選択される1つまたは複数の条件を含み得る。例えば、低pHを含む条件は、10mM~20mMの乳酸または15mM~18mMの乳酸または少なくとも約16mM、16.5mMもしくは17mMまたは16mM、16.5mMもしくは17mMの乳酸の中から選択される乳酸濃度の上昇を含み得る。本方法では、中性pHを含む条件は、0.5~5mMまたは0.2mM~4mMの乳酸または0.5、1、2、3、4もしくは5mMもしくは約0.5、1、2、3、4もしくは5mMの乳酸の中から選択される乳酸濃度を含み得る。

【0021】

また、非腫瘍微小環境においてよりも腫瘍微小環境において、より活性である治療用タンパク質を同定/選択する方法も本明細書において提供される。本方法では、腫瘍微小環境において存在するが、活性が望ましい非腫瘍環境では存在しない条件下で、タンパク質の活性が試験され、また、非腫瘍微小環境において存在する条件下で、タンパク質の活性

が試験される。腫瘍微小環境において存在する条件下でのタンパク質の活性を、非腫瘍微小環境において存在する条件下でのタンパク質の活性と比較できる。非腫瘍微小環境において存在する条件下と比較して、腫瘍微小環境において存在する条件下でより大きな活性を有するタンパク質を、選択および/または同定し、それによって、非腫瘍微小環境においてよりも腫瘍微小環境においてより活性であるタンパク質を同定できる。非腫瘍微小環境は、全身微小環境および/または消化（GI）管、皮膚、脈管構造、血液または細胞外マトリックスなどの健常組織であり得る。

【0022】

低pHを含む条件下で、および中性pHを含む条件下でタンパク質の活性を試験することは、腫瘍微小環境において存在するが非腫瘍微小環境においては存在しない条件（単数または複数）を除いて、同一条件下で実施できる。腫瘍微小環境において存在する条件の例示として、血管新生の増大、低酸素、pHの低下、乳酸濃度の上昇、ビルビン酸濃度の上昇、間質液圧の増大および代謝産物の変更または腫瘍を示す代謝などの1つまたは複数の特性が挙げられる。

10

【0023】

腫瘍微小環境において存在する条件は、中性より低いpHまたは非腫瘍微小環境よりも低いpHを含み得る。例えば、腫瘍微小環境において存在する条件は、7.4未満のpHであり得る。一部の例では、腫瘍のpHは、ほぼ5.8~6.8（5.8と6.8を含む）または5.8~6.8（5.8と6.8を含む）であり、腫瘍微小環境において存在する条件は、5.8~6.8の間またはほぼ5.8~6.8の間のpHである。腫瘍微小環境において存在する条件は、非腫瘍微小環境において存在する条件と比較して、乳酸濃度の上昇および/またはビルビン酸の上昇を含み得る。

20

【0024】

腫瘍微小環境において存在するが、活性が望まれる非腫瘍環境では存在しないタンパク質が試験される条件は、非腫瘍微小環境において存在する条件を含むタンパク質が試験される条件と比較して、中性より低いpHおよび乳酸濃度の上昇を含み得る。例えば、中性より低いpHは、5.8~6.8の間（5.8と6.8を含む）または5.8および6.5（5.8と6.5を含む）であり得る。腫瘍微小環境において存在するが、活性が望まれる非腫瘍環境では存在しないタンパク質が試験される条件は、10mM~20mMの乳酸または15mM~18mMの乳酸または少なくとも約16mM、16.5mMもしくは17mMまたは16mM、16.5mMもしくは17mMの乳酸の中から選択される乳酸濃度の上昇を含み得る。非腫瘍微小環境において存在するタンパク質が試験される条件は、0.5~5mMまたは0.2mM~4mMの乳酸または0.5、1、2、3、4もしくは5mMまたは約0.5、1、2、3、4もしくは5mMの乳酸の中から選択される乳酸濃度を含み得る。本方法の一部の例では、タンパク質は、腫瘍を治療する治療用タンパク質である。一部の例では、治療用タンパク質は、抗体、酵素、ホルモン、サイトカインまたはその活性部分である。本明細書において抗体とは、抗体またはその抗原結合断片を含む。一部の例では、治療用タンパク質は、標的受容体のリガンドおよび/または抗腫瘍抗体である。

30

【0025】

本明細書において提供される方法において使用するための抗腫瘍抗体として、セツキシマブ（アービタックス（登録商標））、トラスツズマブ（ヘルセプチン（登録商標））、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））、マブセラ（登録商標）、ペバシズマブ（アバスチン（登録商標））、アレムツズマブ（キャンパス（登録商標））、パニツムマブ（ベクティビックス（登録商標））、ラニビズマブ（ルセンティス（登録商標））、イブリツモマブ、イブリツモマブチウキセタン（ゼパリン（登録商標））、トシツモマブ、ヨウ素I131トシツモマブ（ベキサール（登録商標））、カツマキシマブ（レモバブ（登録商標））、ゲムツズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン（マイロターゲット（登録商標））、アバタセプト（CTLA4-Ig、オレンシア（登録商標））、ベラタセプト（L104EA29YIg；LEA29Y；LEA）、イビリムマブ（MDX-010、MDX-10

40

50

1)、トレメリムマブ(チシリムマブ、CP-675,206)、PRS-010、PRS-050、アフリベルセプト(VEGF Trap、AVE005)、ボロシキシマブ(M200)、F200、MORAb-009、SS1P(CAT-5001)、シクストムマブ(Cixutumumab)(IMC-A12)、マツズマブ(EMD7200)、ニモツズマブ(Nimotuzumab)(h-R3)、ザルツムマブ(HuMaxx-EGFR)、ネシツムマブIMC-11F8、mAb806/ch806、Sym004およびmAb-425が挙げられる。一部の例では、抗腫瘍抗体は、セツキシマブ(アービタックス(登録商標))である。

【0026】

本明細書において提供される方法は、インビトロ(in vitro)またはインビボ(in vivo)で実施できる。

【0027】

提供される方法では、複数のタンパク質を試験でき、中性pHと比較して、低pH条件でより大きな活性を有するタンパク質を選択できる。提供される方法では、複数のタンパク質を試験でき、腫瘍微小環境において存在するが、非腫瘍微小環境では存在しない条件下でより大きな活性を有するタンパク質を選択できる。複数のタンパク質は、治療用タンパク質の修飾された変異体を含むことができ、変異体の収集物を試験できる。

【0028】

治療用タンパク質は、多量体化ドメインを含むことができ、多量体化ドメインは、Fcドメインまたは修飾されたFcドメインを含み得る。治療用タンパク質は、抗体(抗腫瘍抗体を含めた)、酵素、ホルモンまたはサイトカインであり得る。提供される方法では、抗腫瘍抗体は、セツキシマブ(アービタックス(登録商標))、トラスツズマブ(ヘルセプチン(登録商標))、リツキシマブ(リツキサン(登録商標))、マブセラ(登録商標)、ベバシズマブ(アバスタチン(登録商標))、アレムツズマブ(キャンパス(登録商標))、パニツムマブ(ベクティビックス(登録商標))、ラニビズマブ(ルセンティス(登録商標))、イブリツモマブ、イブリツモマブチウキセタン(ゼバリン(登録商標))、トシツモマブ、ヨウ素I131トシツモマブ(ベキサール(登録商標))、カツマキシマブ(レモパブ(登録商標))、ゲムツズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン(マイロターゲ(登録商標))、アパタセプト(CTLA4-Ig、オレンシア(登録商標))、ベラタセプト(L104EA29YIg;LEA29Y;LEA)、イピリムマブ(MDX-010、MDX-101)、トレメリムマブ(チシリムマブ、CP-675,206)、PRS-010、PRS-050、アフリベルセプト(VEGF Trap、AVE005)、ボロシキシマブ(M200)、F200、MORAb-009、SS1P(CAT-5001)、シクストムマブ(IMC-A12)、マツズマブ(EMD72000)、ニモツズマブ(h-R3)、ザルツムマブ(HuMaxx-EGFR)、ネシツムマブIMC-11F8、mAb806/ch806、Sym004およびmAb-425の中から選択され得る。

【0029】

治療用タンパク質または複数の治療用タンパク質の修飾された変異体は、治療用タンパク質の修飾されていない形態と比較して、アミノ酸残基(単数または複数)のアミノ酸置換、挿入および/または欠失を含み得る。例えば、各変異型タンパク質は、治療用タンパク質の修飾されていない形態と比較して、単一アミノ酸置換を含有し得る。各変異型タンパク質は、治療用抗体などの変異型タンパク質の修飾されていない形態と比較して、2、3、4、5、6、7、8、9またはそれ以上のアミノ酸置換を含有し得る。

【0030】

一部の例では、試験されるタンパク質は、抗体の修飾されていない形態と比較して、相補性決定領域(CDR)中に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む変異型抗体である。

【0031】

提供される方法では、その位置の元のアミノ酸以外の最大1~19種のアミノ酸による変化している位置各々のアミノ酸の置換を含む治療用タンパク質の変異体を試験でき、治

10

20

30

40

50

療用タンパク質またはその選択された部分の長さに沿ってどのアミノ酸も置換され得る。修飾されたタンパク質が抗体であり、修飾される選択された部分がCDRである方法が提供される。

【0032】

置換アミノ酸は、置換アミノ酸は、治療用タンパク質中の対応する位置のアミノ酸とは異なるという条件で、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrおよびValの中から選択され得る。置換アミノ酸の一例として、ヒスチジンがある。一部の例では、タンパク質中のヒスチジンが、非塩基性または非荷電アミノ酸で置換される。一部の方法では、修飾は、Arg、Asp、Glu、HisおよびLysの中から選択されるアミノ酸でのアミノ酸置換を含み、一部の例では、Hisとの置換を含む。

10

【0033】

提供される方法では、収集物中の変異型タンパク質などの各変異型タンパク質を、例えば、アドレス可能な (addressible) アレイを含めたアレイなどにおいて、個々に試験できる。

【0034】

提供される方法では、試験される活性は、治療用タンパク質の標的タンパク質との結合であり得る。結合は、イムノアッセイ、例えば、ELISAなどによって評価できる。イムノアッセイの例として、標的タンパク質を固体支持体上に固定化することと、検出可能に標識されている治療用タンパク質を、標的タンパク質と接触させることと、結合していない治療用タンパク質を除去することと、標識された治療用タンパク質と標的タンパク質との結合を検出または測定することとを含み得る不均一イムノアッセイがある。イムノアッセイは均一であり得、検出可能に標識されている治療用タンパク質を標的タンパク質と接触させることと、標識された治療用タンパク質と標的タンパク質との結合を検出または測定することとを含む。

20

【0035】

表面上に治療用タンパク質を発現する細胞 (単数または複数) を含む細胞表面発現系を使用して結合活性が評価される方法が提供される。治療用タンパク質を、細胞の表面上に発現させることができ、標的タンパク質を、細胞集団と接触させることができ、標的タンパク質と結合する細胞 (単数または複数) を同定し、それによって結合活性を示す治療用タンパク質を同定できる。標的タンパク質は、検出可能に標識でき、検出できる。標的タンパク質は、蛍光標識でき、または蛍光標識されている二次試薬によって検出できる。

30

【0036】

結合は、蛍光活性化細胞選別 (FACS) によって検出または測定できる。

【0037】

結合活性は、治療用タンパク質を発現する細胞を含む細胞表面発現系を使用する方法において試験でき、標的タンパク質と結合する細胞 (単数または複数) を選択でき、標的タンパク質と結合しない細胞 (単数または複数) を選択できる。標的タンパク質と結合しない、選択された細胞 (単数または複数) を単離し、細胞培養培地中で増殖させて、表面上に治療用タンパク質を発現する第2の細胞集団を作製できる。一部の例では、第2の細胞集団に由来する細胞が標的タンパク質と接触する条件下で結合活性が試験され、標的タンパク質と結合する細胞 (単数または複数) が同定される。

40

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】モノクローナル抗体アービタックス (登録商標) の配列。図1は、アービタックス (登録商標) の配列 (配列番号1および2) を表す。図1Aは、重鎖の配列を表す。図1Bは、軽鎖の配列を表す。可変鎖には下線が引かれており、修飾のために選択された残基はボールド体、イタリック体である。

【発明を実施するための形態】

50

【 0 0 3 9 】

概要

A . 定義

B . 方法の概略

C . インビトロ生理学的高感度法

1 . 支持体が標的タンパク質を含有すること

2 . シミュレートされた結合条件下で結合する生体分子を接触させること

a . 変異型タンパク質の作製

b . 抗体変異体

例示的抗体結合分子：抗 E G F R 抗体

3 . 腫瘍特異的結合分子の検出および同定

D . タンパク質を発現させる方法

1 . ベクター

2 . 細胞および発現系

a . 原核生物発現

b . 酵母

c . 昆虫

d . 哺乳類細胞

e . 植物

3 . 精製

E . 実施例

10

20

【 0 0 4 0 】

A . 定義

別段の定義のない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明の属する技術分野において当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を有する。本明細書における全開示内容を通じて参照される、すべての特許、特許出願、公開された出願および刊行物、Genbank配列、データベース、ウェブサイトおよびその他の公開された材料は、別段の記述のない限り、その全文が参照により組み込まれる。本明細書における用語に対して複数の定義がある場合には、この節におけるものが優先する。URLまたはその他のこのような識別子またはアドレスが参照される場合には、このような識別子は変わり得ることおよびインターネットに関する特定の情報は移り変わる場合があるが、インターネットを検索することによって同等の情報を見出すことができることは理解される。このような情報の利用の可能性および一般への普及は、参照することによって証明される。

30

【 0 0 4 1 】

本明細書において、条件的活性タンパク質は、ある環境、特に、あるインビボ環境において、第2の環境と比較して、より活性である。例えば、条件的活性タンパク質は、皮膚、消化管における非腫瘍環境またはその他の非腫瘍環境などの非腫瘍環境においてよりも、腫瘍環境においてより活性であり得る。

40

【 0 0 4 2 】

本明細書において、治療用タンパク質は、疾患または状態を有する対象を治療するための治療のために使用されてきた、治療のために使用され得る、または治療のための候補であるタンパク質である。例えば、治療のための候補は、治療のために使用されてきた治療用タンパク質の変異体（例えば、アミノ酸修飾を含有する）である。本明細書における目的のために、治療のために使用されてきたタンパク質を含めた治療用タンパク質は、治療のために使用してもよく、治療のための候補であり、本明細書における方法の実施において、ある条件下で別のものよりも大きい活性を示し、従って、条件的に活性である治療用タンパク質を同定するための試験タンパク質として使用してもよい。

【 0 0 4 3 】

本明細書において、「試験タンパク質」、「試験されたタンパク質」、「結合分子」、

50

「結合タンパク質」またはその他のそれらの変形とは、本明細書における方法において使用される分子またはタンパク質を指す。条件的に活性であり、非病変微小環境において存在する条件（単数または複数）と比較して、病変微小環境（例えば、腫瘍微小環境）において存在する条件（単数または複数）下で活性を示すタンパク質を同定するために、本明細書における方法において、任意の分子またはタンパク質を使用できる。試験されるタンパク質の例示として、条件的に活性である治療薬を発展させるための治療用タンパク質がある。例示的な試験されるタンパク質を、表3に示す。

【0044】

本明細書において、抗体とは、天然であろうと、組換えによって製造されるなどの、部分的もしくは全体的に合成であろうと、免疫グロブリンおよび免疫グロブリンの一部、例えば、抗原結合部位を形成するのに十分である免疫グロブリン分子の可変領域の少なくとも一部を含有するその任意の部分（部分）を指す。したがって、抗体またはその一部は、免疫グロブリン抗原結合部位と相同である、または実質的に相同である結合ドメインを有する任意のタンパク質を含む。例えば、抗体とは、2つの重鎖（ H および H' と表され得る）および2つの軽鎖（ L および L' と表され得る）を含有する抗体を指し、これでは、各重鎖は、全長免疫グロブリン重鎖または抗原結合部位を形成するのに十分であるその一部であり得る（例えば、重鎖は、それだけには限らないが、 V_H 鎖、 $V_H - C_H1$ 鎖および $V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3$ 鎖を含み）、各軽鎖は、全長軽鎖または抗原結合部位を形成するのに十分であるその一部であり得る（例えば、軽鎖は、それだけには限らないが、 V_L 鎖および $V_L - C_L$ 鎖を含む）。各重鎖（ H および H' ）は、1つの軽鎖（それぞれ、 L および L' ）と対を形成する。通常、抗体は、重鎖可変（ V_H ）鎖および/または軽鎖可変（ V_L ）鎖のすべてまたは少なくとも一部を最小限に含む。抗体はまた、定常領域のすべてまたは一部を含み得る。

【0045】

本明細書における目的上、用語抗体は、全長抗体およびそれだけには限らないが、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、一本鎖 Fvs （ $scFv$ ）、 Fv 、 $dsFv$ 、ダイアボディー、 Fd および Fd' 断片、 Fab 断片、 Fd 断片および $scFv$ 断片などの抗体断片を含めたその一部を含む。その他の公知の断片として、それだけには限らないが、 $scFv$ 断片（Hust et al., BMC Biotechnology (2007), 7:14）が挙げられる。抗体は、 IgG 、 IgM 、 IgA 、 IgD および IgE を含めた任意の免疫グロブリンクラスのメンバーを含む。

【0046】

本明細書において、全長抗体とは、2つの全長重鎖（例えば、 $V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3$ または $V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 - C_H4$ ）および2つの全長軽鎖（ $V_L - C_L$ ）およびヒンジ領域を有する抗体、例えば、抗体分泌B細胞によって産生されるヒト抗体および合成によって製造される同ドメインを有する抗体である。

【0047】

本明細書において、抗体の「その一部」または「その断片」に関連して抗体断片または抗体部分とは、全長未満であるが、抗原結合部位を形成するのに十分である抗体の可変領域の少なくとも一部（例えば、1つまたは複数のCDR）を含有し、したがって、全長抗体の結合特異性および/または活性を保持する全長抗体の任意の部分（部分）を指す。抗体断片は、全長抗体の酵素処理によって製造された抗体誘導体、ならびに合成によって、例えば、組換えによって製造された誘導体を含む。抗体断片の例として、それだけには限らないが、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、一本鎖 Fvs （ $scFv$ ）、 Fv 、 $dsFv$ 、ダイアボディー、 Fd および Fd' 断片（例えば、Methods in Molecular Biology, Vol 207: Recombinant Antibodies for Cancer Therapy Methods and Protocols (2003); Chapter 1; p 3-25、Kipriyanov参照のこと）が挙げられる。断片は、ジスルフィド橋によって、および/またはペプチドリンカーなどによって一緒に連結している複数の鎖を含み得る。抗体断片は、一般に、少なくとも約50個のアミノ酸および、通常、少なくとも200個のアミノ酸を含有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 8 】

したがって、「抗体または抗原結合部位を形成するのに十分であるその一部」への言及は、抗体またはその一部が、6つすべてのCDRを含有する対応する全長抗体の結合特異性の少なくとも一部を保持するのに十分である V_H および V_L の少なくとも1つまたは2つ、通常、3つ、4つ、5つまたは6つすべてのCDRを含有することを意味する。一般に、十分な抗原結合部位は、重鎖のCDR3 (CDRH3) を少なくとも必要とする。通常、軽鎖のCDR3 (CDRL3) をさらに必要とする。本明細書において記載されるように、当業者は、カバット (Kabat) またはコチア (Chothia) 番号付けを承知しており、それに基づいてCDRを同定できる (例えば、Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242およびChothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917参照のこと)。

10

【 0 0 4 9 】

本明細書において、相補性決定領域 (CDR; 超可変領域とも呼ばれる) は、特異的抗原に対するタンパク質の親和性および特異性を決定する抗体内の領域である。したがって、CDRは、抗原決定基と結合する抗体の可変領域内の限定された領域である。抗体のCDRは、公知であるか、または、当業者に公知のように、カバットまたはコチア番号付けに基づいて決定することができる。

【 0 0 5 0 】

本明細書において、「抗原結合部位」とは、1つまたは複数の相補性決定領域によって形成される界面を指す (CDR; 超可変領域とも呼ばれる)。各抗原結合部位は、重鎖可変領域に由来する3つのCDRおよび軽鎖可変領域に由来する3つのCDRを含有する。抗体分子は、2つの抗原組合せ部位を有し、各々は、重鎖可変領域の一部および軽鎖可変領域の一部を含有する。抗原組合せ部位は、CDRに加えて可変領域ドメインのその他の部分を含む得る。

20

【 0 0 5 1 】

本明細書において、 F_v 抗体断片は、非共有結合相互作用によって連結している1つの重鎖可変ドメイン (V_H) および1つの軽鎖可変 (V_L) ドメインからなる。

【 0 0 5 2 】

本明細書において、 $d s F_v$ とは、 $V_H - V_L$ 対を安定化する、操作された分子間ジスルフィド結合を有する F_v を指す。

30

【 0 0 5 3 】

本明細書において、 F_d 断片とは、抗体重鎖の可変ドメイン (V_H) および1つの定常領域ドメイン (C_H1) を含有する抗体の断片である。

【 0 0 5 4 】

本明細書において、「 Fab 断片」とは、全長免疫グロブリンをパパインで消化した結果得られる全長抗体の一部を含有する抗体断片または合成によって、例えば、組換えによって製造される同一構造を有する断片である。 Fab 断片は、軽鎖 (V_L および C_L 部分を含有する) および重鎖 (V_H) の可変ドメインと重鎖の1つの定常領域ドメイン部分 (C_H1) を含有する別の鎖を含むし、組換えによって製造され得る。

40

【 0 0 5 5 】

本明細書において、 $F(ab')_2$ 断片は、 $pH 4.0 \sim 4.5$ での免疫グロブリンのペプシンでの消化の結果得られる抗体断片、または同一構造を有する、合成によって、例えば、組換えによって製造された抗体である。 $F(ab')_2$ 断片は、2つの Fab 断片を含有するが、各重鎖部分が、2つの断片を接続するジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含めた追加の数個のアミノ酸を含有し、組換えによって製造され得る。

【 0 0 5 6 】

Fab' 断片は、 $F(ab')_2$ 断片の2分の1 (1つの重鎖および1つの軽鎖) を含有する断片である。

【 0 0 5 7 】

50

本明細書において、F d '断片は、F (a b ')₂断片の1つの重鎖部分を含有する抗体の断片である。

【0058】

本明細書において、F v '断片とは、抗体分子のV_HおよびV_Lドメインのみを含有する断片である。

【0059】

本明細書において、s c F v断片とは、任意の順序でポリペプチドリinkerによって共有結合によって結合している軽鎖可変鎖(V_L)および重鎖可変鎖(V_H)を含有する抗体断片を指す。リンカーは、2つの可変ドメインが、実質的な干渉を伴うことなく架橋されるような長さのものである。例示的リンカーとして、溶解度を高めるよう全体に分散されたいくつかのG l uまたはL y s残基を有する(G l y - S e r)_n残基がある。

【0060】

本明細書において、ダイアボディーとは、二量体のs c F vであり；ダイアボディーは、通常、s c F vよりも短いペプチドリinkerを有し、優先的に二量体化する。

【0061】

本明細書において、h s F vは、普通、F a b断片中に存在する定常ドメインが、ヘテロ二量体コイルドコイルドメインで置換されている抗体断片を指す(例えば、Arndt et al. (2001) J Mol Biol. 7:312:221-228参照のこと)。

【0062】

本明細書において、抗体に関連して「可変ドメイン」とは、種々の抗体間で異なるアミノ酸の配列を含有する抗体重鎖または軽鎖の特定のI gドメインである。各軽鎖および各重鎖は、1つの可変領域ドメイン(V_LおよびV_H)を有する。可変ドメインは、抗原特異性を提供し、したがって、抗原認識に関与する。各可変領域は、抗原結合部位ドメインおよびフレームワーク領域(F R)の一部であるC D Rを含有する。

【0063】

本明細書において、重鎖可変(V_H)鎖または軽鎖可変(V_L)鎖(V_HドメインまたはV_Lドメインとも呼ばれる)への言及は、抗体の可変ドメインを構成するポリペプチド鎖を指す。

【0064】

本明細書において、フレームワーク領域(F R)とは、シート内に位置する抗体可変領域ドメイン内の領域であり、F R領域は、そのアミノ酸配列の点で、超可変領域よりも比較的より保存されている。

【0065】

本明細書において、定常ドメインとは、可変領域ドメインよりも、抗体の中で比較的より保存されたアミノ酸の配列を含有する、抗体重鎖または軽鎖中のドメインである。各軽鎖は、単一軽鎖定常領域(C_L)ドメインを有し、各重鎖は、C_H1、C_H2、C_H3およびC_H4を含む、1つまたは複数の重鎖定常領域(C_H)ドメインを含有する。全長I g A、I g DおよびI g Gアイソタイプが、C_H1、C_H2、C_H3およびヒンジ領域を含有する一方で、I g EおよびI g Mは、C_H1、C_H2、C_H3およびC_H4を含有する。C_H1およびC_Lドメインは、抗体分子のF a bアームを延長し、従って、抗原との相互作用および抗体アームの回転に関与している。抗体定常領域は、それだけには限らないが、例えば、種々の細胞、生体分子および組織との相互作用による、抗体が特異的に結合する抗原、病原体および毒素のクリアランスなどのエフェクター機能を果たし得る。

【0066】

本明細書において、抗体の形態とは、抗体の特定の構造を指す。本明細書において抗体は、全長抗体および例えば、F a b断片またはその他の抗体断片などのその一部を含む。したがって、F a bは、抗体の特定の形態である。

【0067】

本明細書において、抗体の「対応する形態」への言及は、2種の抗体の特性または活性を比較する場合に、同一形態の抗体を使用して特性が比較されることを意味する。例えば

10

20

30

40

50

、抗体が、第1の抗体の対応する形態の活性と比較して少ない活性しか有しないと記載される場合には、その抗体のF a bなどの特定の形態が、第1の抗体のF a b形態と比較して少ない活性しか有さないことを意味する。

【0068】

本明細書において、対応する残基、例えば、「に対応するアミノ酸残基」に関連して、対応するとは、関連する配列（例えば、対立遺伝子変異体、同一ファミリーの遺伝子、種変異体）である2種のポリペプチドの間またはそれらの間で比較される残基を指す。当業者ならば、ポリペプチド間またはその間に対応する残基を容易に同定できる。例えば、当業者ならば、2種の配列を整列させることによって、ガイドとして保存されたアミノ酸および同一アミノ酸を使用して対応する残基を同定できる。当業者ならば、配列を手作業によって整列してもよく、または利用可能な多数のアラインメントプログラムのうちいずれか（例えば、BLAST）を使用してもよい。したがって、互いに対応するアミノ酸残基または位置は、特定の参照ポリペプチドと配列および/または構造アラインメントに基づいて互いに対応すると決定される残基である。

10

【0069】

本明細書において、「リンカー」または「スペーサー」ペプチドとは、2つのポリペプチド配列（またはこのようなアミノ酸配列をコードする核酸）をつなぐアミノ酸の短い配列を指す。「ペプチドリンカー」とは、2つのポリペプチド配列をつなぐアミノ酸の短い配列を指す。ポリペプチドリンカーの例示として、ペプチド形質導入ドメインを抗体とつなぐリンカーまたは2つの抗体鎖をs c F v断片などの合成抗体断片につなぐリンカーがある。リンカーは、周知であり、提供される方法において任意の公知のリンカーを使用してよい。ポリペプチドリンカーの例示として、溶解度を高めるよう全体に分散されたいくつかのG l uまたはL y s残基を有する（G l y - S e r）_nアミノ酸配列がある。その他の例示的リンカーが本明細書に記載され、これらおよびその他の公知のリンカーのいずれも、提供される組成物および方法とともに使用してよい。

20

【0070】

本明細書において、「ヒト血清」とは、輸血により感染可能な任意の疾患が見られない人から得た凝固した全血のほぼ等量の液体部分をプールすることによって得ることができる正常血清を指す。

【0071】

本明細書において、「検出可能な」または「検出可能に標識された」への言及は、原子、分子または組成物の存在が直接または間接的に測定され得る、原子、分子または組成物を指す。検出可能な標識を使用して、本明細書において提供される方法において1種または複数のタンパク質を同定できる。検出可能な標識は、本明細書において提供される方法のいずれにおいても使用できる。検出可能な標識として、例えば、化学発光部分、生物発光部分、蛍光部分、放射性核種および金属が挙げられる。標識を検出する方法は、当技術分野で周知である。このような標識は、例えば、目視検査によって、蛍光分光法によって、反射率測定によって、およびフローサイトメトリーによって検出され得る。間接検出とは、検出可能な標識と直接的または間接的に結合する原子、分子もしくは組成物のエネルギーまたは粒子放出または吸収などの、検出可能な標識と直接的または間接的に結合する原子、分子もしくは組成物の物理的現象の測定を指す。間接検出の限定されない例では、検出可能な標識として、アビジンとの結合によって検出され得るビオチンがあり得る。したがって、原子、分子または組成物の存在が、別の原子、分子もしくは組成物との標識または部分の結合の結果として検出され得る原子、分子または組成物を指す、結合可能な標識または結合可能な部分が、検出可能な標識または検出可能な部分の範囲内に含まれる。

30

40

【0072】

本明細書において、標識は、分子に直接的もしくは間接的に付着もしくは連結され得る、またはそれと会合され得る検出可能なマーカーである。検出法は、当技術分野で公知の任意の方法であり得る。

50

【 0 0 7 3 】

本明細書において、「スクリーニング」とは、抗体またはその一部の活性または特性の決定に基づいた、抗体および/またはその一部の収集物またはライブラリーなどの複数の抗体からの、抗体またはその一部などのタンパク質の同定または選択を指す。スクリーニングは、種々の方法のいずれで実施してもよく、一般に、収集物のメンバーを標的タンパク質または抗原と接触させることと、特性または活性を、例えば、抗体の標的タンパク質との直接結合(例えば、結合親和性)を評価するアッセイによって、または標的タンパク質の活性の調節を評価する機能アッセイによって評価することを含む。

【 0 0 7 4 】

本明細書において、用語「評価すること」または「試験すること」は、抗体またはその一部の標的タンパク質との結合および/または抗体またはその一部による標的タンパク質の活性の調節の絶対値を得る、また結合または活性のレベルを示す指数、割合、パーセンテージ、視覚的またはその他の価値を得るという意味での定量的および定性的決定を含むものとする。評価は、直接である場合も、間接である場合もある。例えば、結合は、抗体もしくはその一部を検出可能な標識で直接的に標識することによって、および/または自身が標識されている二次抗体を使用することによって決定され得る。さらに、機能的活性は、当業者に公知の種々のアッセイのいずれか、例えば、中和アッセイおよび本明細書に記載されるようなその他のものを使用し、抗体またはその一部の存在下対不在下での膜結合性抗原(例えば、ウイルスなどの細胞)の活性を比較して決定され得る。

【 0 0 7 5 】

本明細書において、「ハイスループット」とは、多数の分子または化合物、一般に、数十種から数百種から数千種の化合物の操作を可能にする大規模法またはプロセスを指す。例えば、精製およびスクリーニング法は、ハイスループットにすることができる。ハイスループット法は、手作業で実施できる。しかし、一般には、ハイスループット法は、自動化、ロボット工学またはソフトウェアを含む。

【 0 0 7 6 】

本明細書において、「標的タンパク質」または「タンパク質の標的」とは、試験分子またはタンパク質と結合または相互作用できるタンパク質、抗原または基質である。

【 0 0 7 7 】

本明細書において、「疾患」とは、それだけには限らないが、感染、後天性の状態、遺伝的状态を含めた原因または状態に起因し、同定可能な症状を特徴とする生物における病状を指す。疾患は、癌および腫瘍を含む。本明細書において、「病変微小環境」とは、正常組織と比較して疾患組織において変更されているまたは変化している特定の微小環境における特定の条件を指す。これらの条件として、例えば、変更されたまたは増大しているまたは変化している血管新生、低酸素、変更されたpH、補助因子、間質液圧および変更されている乳酸またはピルビン酸レベルなどの変更されている代謝生成物レベルが挙げられる。

【 0 0 7 8 】

本明細書において、「非病変微小環境」または「健常組織環境」の条件とは、正常な生理学的条件下で存在する条件を指す。例えば、正常な生理学的条件下では、非病変組織などの非病変微小環境のpHは、中性であり得る。

【 0 0 7 9 】

本明細書において、病変または非病変微小環境を「シミュレートする条件」とは、インビボで環境中に存在する条件(単数または複数)と対応するインビトロまたはインビボアッセイ条件を指す。例えば、微小環境が低pHを特徴とする場合には、微小環境をシミュレートする条件として、低pHを有するバッファーまたはアッセイ条件が挙げられる。

【 0 0 8 0 】

本明細書において、腫瘍微小環境において存在する条件は、非腫瘍微小環境(例えば、健常なまたは非病変細胞または組織)と比較して、そこに存在する条件を含む。腫瘍微小環境において存在する条件として、血管新生の増大、低酸素、低pH、乳酸濃度の上昇、

10

20

30

40

50

ピルビン酸濃度の上昇、間質液圧の増大および代謝産物の変更または腫瘍を示す代謝が挙げられる。例えば、腫瘍微小環境において存在する条件は、7.4未満、通常、5.6～6.8の間またはほぼ5.6～6.8の間、例えば、pH 5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7もしくは6.8未満または約pH 5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7もしくは6.8またはpH 5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7もしくは6.8である低pHである。別の例では、腫瘍微小環境(microenvironment)において存在する条件は、5 mM～20 mMの間の乳酸またはほぼ5 mM～20 mMの間の乳酸、例えば、15 mM～18 mMなどの10 mM～20 mMのM乳酸、特に、少なくとも16 mM、16.5 mMもしくは17 mMの乳酸または少なくとも約16 mM、16.5 mMもしくは17 mMの乳酸または16 mM、16.5 mMもしくは17 mMの乳酸の高乳酸濃度である。

10

20

30

40

50

【0081】

本明細書において、非腫瘍微小環境において存在する条件は、腫瘍微小環境では存在しない条件(単数または複数)を含む。本明細書における目的上、条件(単数または複数)とは、pH、乳酸濃度またはピルビン酸濃度などの腫瘍微小環境および非腫瘍環境において存在するが、2つの微小環境間で異なる対応する特性または特徴である。非腫瘍微小環境において存在する条件は、約7.0～約7.8、例えば、少なくともpH 7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7もしくは7.8または約pH 7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7もしくは7.8またはpH 7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7もしくは7.8のpH(例えば、米国特許第7781405号参照のこと)、一部の例では、pH 7.4である。非腫瘍微小環境において存在する条件は、0.5～5 mMの乳酸、例えば、0.2 mM～4 mMの乳酸など、0.5、1、2、3、4または5 mMの乳酸などである乳酸濃度である。

【0082】

本明細書において、「タンパク質の収集物」または「抗体の収集物」とは、少なくとも10種の異なるタンパク質および/またはその活性部分を含有する、一般に、少なくとも50、100、500、1000、 10^4 、 10^5 種またはそれ以上のメンバーを含有する収集物を指す。収集物は、通常、活性についてスクリーニングされる予定のタンパク質を含有する。天然に存在するタンパク質(またはその活性部分)および/または修飾されたタンパク質、特に、抗体変異体またはその活性断片が収集物中に含まれる。修飾は、タンパク質の長さに沿ったランダム突然変異および/または標的とされた領域もしくは選択された領域における修飾(すなわち、集中的な突然変異)を含む。修飾は、コンビナトリアルである場合も、特定の遺伝子座もしくはすべての遺伝子座のすべてのアミノ酸の置換またはそれらのサブセットによるすべての順列を含む場合もある。収集物は、全長のタンパク質またはより短いタンパク質を含み得る。収集物および特定の収集物の大きさは、ユーザーによって決定される。本明細書において用語収集物は、用語「ライブラリー」と同義的に使用され、同じことを意味する。

【0083】

本明細書において、「鑄型タンパク質」または「突然変異を含有しないタンパク質」とは、突然変異誘発に使用されるアミノ酸の配列を有するタンパク質を指す。鑄型タンパク質は、野生型タンパク質の配列であってもよく、さらなる突然変異が行われる変異型タンパク質の配列であってもよい。

【0084】

本明細書において、「選択する」またはその文法的変化は、タンパク質の1つまたは複数の活性に基づいて、タンパク質を選び取ることまたは選ぶことを指す。選択は、タンパク質の絶対活性に基づく場合もあり、または選択は、異なる条件下での別のタンパク質、異なる条件下での同一タンパク質または異なる条件下での異なるタンパク質と比較した、タンパク質の相対活性の比較に基づく場合もある。

【0085】

本明細書において、「同定する」およびその文法的変化は、所望の条件下で定義された活性を有するタンパク質を認識することまたは知ることを指す。通常、本明細書における方法では、タンパク質は、非病変または正常生理学的環境と比較して、病変環境をシミュレートする条件下での、その優先的結合によって同定される。

【0086】

本明細書において、検出または分離のために標識される分子とは、抗体またはタンパク質などの分子が、フルオロフォアなどの検出可能な標識と会合されることまたは精製もしくは単離もしくは分離などのためのタグもしくはその他の部分と会合されることを意味する。検出可能に標識されたとは、検出または分離のために標識されている分子を指す。

10

【0087】

本明細書において、エピトープタグとは、エピトープに対応するアミノ酸残基の短いストレッチを指し、エピトープタグがつけられたタンパク質またはペプチドのその後の生化学的および免疫学的分析を促進する。エピトープタグをつけることは、適当な発現ベクター中にエピトープタグの配列をタンパク質をコードする配列に付加することによって達成され得る。エピトープタグが付けられたタンパク質は、タグに対して作製された高度に特異的な抗体を使用して親和性精製できる。

【0088】

本明細書において、反応混合物に関連して均一なとは、反応物が、溶液または懸濁液としてを含めて混合物として液相にあることを意味する。

20

【0089】

本明細書において、反応混合物に関連して不均一なとは、反応物が固相にある、または溶液もしくは懸濁液としてを含めて混合物として液相にあることを意味する。不均一反応混合物の一例として、ELISAアッセイがある。

【0090】

本明細書において、「変異タンパク質」「修飾されたタンパク質」または「ムテイン」またはその変化とは、野生型または鋳型タンパク質と比較して、一次配列中に1つまたは複数の修飾を有するポリペプチド（タンパク質）を意味する。1つまたは複数の突然変異は、1つまたは複数のアミノ酸置換（*replacements*）（置換（*substitutions*））、挿入、欠失およびそれらの任意の組合せであり得る。修飾されたタンパク質ポリペプチドとして、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上の修飾された位置を有するものが挙げられる。修飾されたタンパク質は、全長抗体などの全長タンパク質である場合も、その抗体断片である場合もある。修飾されたタンパク質は、通常、突然変異を含有しない野生型またはスキファールドタンパク質のアミノ酸の対応する配列に対して、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有する。

30

【0091】

本明細書において、「重大なアミノ酸残基」への言及は、変化している（例えば、アミノ酸置換によって）場合に、タンパク質の活性を低減または除去するタンパク質中の残基を指す。通常、活性は、変化しているアミノ酸または置換されたアミノ酸を含有しない修飾されていないタンパク質の活性よりも70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%未満またはそれ以下低減する。

40

【0092】

本明細書において、「重要な残基」への言及は、重大なアミノ酸位置に近い、またはそれに隣接する、変化している（例えば、アミノ酸置換によって）場合に、望ましくないまたは所定の活性または状態を示すタンパク質をもたらさない、例えば、望ましくない条件下で、タンパク質または活性の発現が低減されたまたはタンパク質または活性の発現がない（例えば、pH 7.4では活性であるが、pH 6.0では活性でない）残基を指す。したがって、重要な残基とは、変化している場合に発現され、所望の活性を示す残基である

50

。

【0093】

本明細書において、活性とは、全長（完全）タンパク質と関連する、ポリペプチドまたはその一部の機能活性（単数または複数）を指す。機能的活性として、それだけには限らないが、生物活性、触媒または酵素活性、抗原性（ポリペプチドと結合または抗ポリペプチド抗体との結合について競合する能力）、免疫原性、多量体を形成する能力および、ポリペプチドの受容体またはリガンドと特異的に結合する能力が挙げられる。

【0094】

本明細書において、結合活性とは、1種または複数の結合パートナーと結合するか否か、どのように結合するかに関連する分子、例えば、ポリペプチドの特徴を指す。結合活性は、結合パートナー（複数可）と結合する能力、結合パートナーと結合する親和性（例えば、高親和性）、結合パートナーと結合するアビディティ、結合パートナーとの結合の強度および結合パートナーとの結合の特異性を含む。

【0095】

本明細書において、「結合する」、「結合された」またはその文法的変化とは、2種の分子が互いに近接している安定な会合をもたらす別の分子との任意の誘引性相互作用における分子の参加を指す。結合は、それだけには限らないが、非共有結合、共有結合（可逆性および不可逆性共有結合など）を含み、それだけには限らないが、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質および薬物を含めた化学物質などの小分子などの分子間の相互作用を含む。結合の例示として、抗体-抗原相互作用および受容体-リガンド相互作用がある。抗体が特定の抗原と「結合する」場合には、結合とは、抗体結合部位でのコグネイト抗体-抗原相互作用を介した、抗体による抗原の特異的認識を指す。結合はまた、ジスルフィド結合を介して相互作用する抗体鎖などのポリペプチドの複数の鎖の会合を含み得る。

【0096】

本明細書において、抗体またはその抗原結合断片に関して「特異的に結合する」または「免疫特異的に結合する」とは、本明細書において同義的に使用され、抗体の抗体結合部位（複数可）および抗原間の非共有結合相互作用による、抗体またはその抗原結合断片の、コグネイト抗原と1つまたは複数の非共有結合を形成する能力を指す。通常、抗原と免疫特異的に結合する（または特異的に結合する）抗体は、抗原と約 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ もしくは $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ もしくはそれ以上または $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ もしくは $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ もしくはそれ以上の親和性定数 K_a （または $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ もしくは $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 以下の解離定数（ K_d ））で結合するものである。親和性定数は、抗体反応の標準動力学方法論、例えば、イムノアッセイ、表面プラズモン共鳴（SPR）（Rich and Myszka (2000) Curr. Opin. Biotechnol. 11:54; Englebienne (1998) Analyst. 123:1599）、等温滴定量測定法（ITC）または当技術分野で公知のその他の動力学相互作用アッセイ（例えば、Paul, ed., Fundamental Immunology, 2nd ed., Raven Press, New York, pages 332-336 (1989) 参照のこと；また、例示的 SPR および ITC 法の説明については米国特許第 7, 229, 619 号も参照のこと）によって決定できる。結合速度のリアルタイム検出およびモニタリングのための機器使用および方法は公知であり、市販されている（例えば、BiaCore 2000、Biacore AB, Uppsala, Sweden および GE Healthcare Life Sciences; Malmqvist (2000) Biochem. Soc. Trans. 27:335）。

【0097】

本明細書において、本明細書において提供されるポリペプチドまたは抗体に関連して、用語「選択的に結合する（bind selectively）」または「選択的に結合する（selectively binds）」とは、ポリペプチドまたは抗体が、エピトープ、抗原または基質と、別のエピトープ、抗原または基質と実質的に結合することなく結合することを意味する。一般に、選択されたエピトープと選択的に結合する抗体またはその断片は、エピトープと、約 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ もしくは $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ もしくはそれ以上または $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ もしくは $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ もしくはそれ以上の親和性定数

などで特異的に結合する。

【0098】

本明細書において、「親和性」または「結合親和性」とは、抗体分子またはその一部が標的タンパク質または抗原上のエピトープと結合する強度を指す。親和性は、平衡会合定数 (K_A) または平衡解離定数 (K_D) によって測定されることが多い。低親和性抗体 - 抗原相互作用は弱く、分子は迅速に解離する傾向がある一方、高親和性抗体 - 抗原結合は強く、分子は、より長い時間結合しているままである。高抗体親和性とは、抗体が、約 $10^6 M^{-1}$ を超えるまたはそれに匹敵する、約 $10^7 M^{-1}$ を超えるまたはそれに匹敵する、約 $10^8 M^{-1}$ を超えるまたはそれに匹敵する、または約 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ もしくは $10^{12} M^{-1}$ を超えるまたはそれに匹敵する平衡会合定数 (K_A) で標的タンパク質と特異的に結合することを意味する。抗体はまた、平衡解離定数 (K_D) $10^{-4} M$ 、 $10^{-6} M$ から $10^{-7} M$ または $10^{-8} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $10^{-11} M$ もしくは $10^{-12} M$ 以下を特徴とする場合もある。一般に、ナノモルまたはナノモル未満の解離定数を有する抗体が、高親和性抗体であると見なされる。このような親和性は、平衡透析によって、BIAcore 2000 機器を製造業者によって概説された一般的な手順を使用して使用することによって、放射標識された標的抗原を使用してラジオイムノアッセイによって、または当業者に公知の別の方法によってなど、従来技術を使用して容易に決定できる。親和性データは、例えば、Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949) の方法によって分析できる。

10

20

【0099】

本明細書において、「アドレス可能な」とは、メンバーが、同定可能であるまたは推測的に公知である、例えば、そのアドレス、マイクロタイタープレートのウェルなどの空間アレイ中の、もしくは固相支持体上の位置によって、または同定可能なもしくは検出可能な標識によって、例えば、色、蛍光、電子信号（すなわち、RF、マイクロ波もしくは対象とする分子の相互作用を実質的に変更しないその他の周波数）、バーコードもしくはその他の記号、化学的もしくはその他のこのような標識によって同定可能であることを意味する。

【0100】

本明細書において、アドレス可能なアレイとは、アレイのメンバーが、固相の表面上の同定可能な場所にある、または同定可能な標識と直接的もしくは間接的に連結しているもしくはその他の形で会合している、例えば、マイクロスフェアまたはその他の微粒子支持体（本明細書においてビーズと呼ばれる）に取り付けられている、溶液中に懸濁されている、または表面上に広がっているものである。

30

【0101】

本明細書において、蛍光 (fluorescence) 活性化細胞選別 (FACS) とは、蛍光に基づいて細胞を同定または選別する方法を指す。例えば、FACS では、細胞は1種または複数の蛍光マーカーで染色されるまたはそれを発現する。この方法では、細胞は、マーカー（複数可）からの蛍光を励起し、検出する装置を通過する。細胞によるスペクトルの所与の部分において蛍光を検出すると、FACS 装置は、その細胞をその蛍光スペクトルを発現しないものから分離することができる。

40

【0102】

本明細書において、「細胞表面発現系」または「細胞表面ディスプレイ系」への言及は、細胞の表面での、タンパク質またはその一部のディスプレイまたは発現を指す。通常、細胞表面タンパク質と融合している対象とするタンパク質を発現する細胞を作製する。例えば、タンパク質は、膜貫通ドメインとの融合タンパク質として発現される。

【0103】

本明細書において、「多量体化ドメイン」とは、ポリペプチド分子の、1種または複数の追加のポリペプチド分子との安定な相互作用を促進するアミノ酸の配列を指し、各々は、第1のドメインと安定な多量体を形成するために同一または異なる多量体化ドメインであり得る相補的多量体化ドメインを含有する。一般に、ポリペプチドは、多量体化ドメイ

50

ンと直接的または間接的につながっている。例示的多量体化ドメインとして、免疫グロブリン配列またはその一部、ロイシンジッパー、疎水性領域、親水性領域および適合性タンパク質 - タンパク質相互作用ドメインが挙げられる。多量体化ドメインは、例えば、免疫グロブリン定常領域または例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3またはI g G 4サブタイプを含めたI g Gに由来するFcドメインもしくはその一部、I g A、I g E、I g DおよびI g Mおよびそれらの修飾された形態などのドメインであり得る。

【0104】

本明細書において、ヒトタンパク質とは、すべての対立遺伝子変異体およびそれらの保存的变化を含めたヒトのゲノム中に存在するDNAなどの核酸分子によってコードされるものである。タンパク質の変異体または修飾は、修飾がヒトタンパク質の野生型または顕著な配列に基づく場合には、ヒトタンパク質である。

10

【0105】

本明細書において、天然に存在する - アミノ酸の残基とは、ヒトにおいて、そのコグネイトmRNAコドンを用いる荷電tRNA分子の特異的認識によってタンパク質中に組み込まれる天然に見られる20種の - アミノ酸の残基である。

【0106】

本明細書において、天然に存在しないアミノ酸とは、遺伝的にコードされないアミノ酸を指す。

【0107】

本明細書において、核酸は、DNA、RNAならびにペプチド核酸(PNA)およびその混合物を含めたその類似体を含む。核酸は、一本鎖であっても、二本鎖であってもよい。所望により、蛍光または放射標識などの検出可能な標識などで標識されていてもよいプローブまたはプライマーを指す場合には、一本鎖分子が考慮される。このような分子は、通常、その標的が、統計的に独特であるような長さのものであるか、ライブラリーをプロービングまたはプライミングするために低コピー数(通常、5未満、一般に、3未満)のものである。一般に、プローブまたはプライマーは、対象とする遺伝子と相補的であるかまたは同一である少なくとも14、16または30個の連続するヌクレオチドの配列を含有する。プローブおよびプライマーは、10、20、30、50、100またはそれ以上の核酸長であり得る。

20

【0108】

本明細書において、ペプチドとは、2~40個のアミノ酸の長さであるポリペプチドを指す。

30

【0109】

本明細書において、本明細書において提供されるアミノ酸の種々の配列中に生じるアミノ酸は、その公知の3文字または1文字略語に従って同定される(表1)。種々の核酸断片中に生じるヌクレオチドは、当技術分野で日常的に使用される標準1文字指定を用いて指定される。

【0110】

本明細書において、「アミノ酸」とは、アミノ基およびカルボン酸基を含有する有機化合物である。ポリペプチドは、2個以上のアミノ酸を含有する。本明細書における目的上、アミノ酸は、20種の天然に存在するアミノ酸、非天然アミノ酸およびアミノ酸類似体(すなわち、 - 炭素が側鎖を有するアミノ酸)を含む。

40

【0111】

本明細書において、「アミノ酸残基」とは、ポリペプチドのそのペプチド結合での化学的消化(加水分解)の際に形成されるアミノ酸を指す。本明細書において記載されるアミノ酸残基は、「L」異性体の形態であると推定される。そのように指定される「D」異性体の形態の残基は、ポリペプチドによって所望の機能特性が保持される限り、任意のL - アミノ酸残基と置換され得る。NH₂とは、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基を指す。COOHとは、ポリペプチドのカルボキシル末端に存在する遊離カルボキシ基を指す。J. Biol. Chem., 243:3557-3559 (1968)に記載され、37C. F. R. § §

50

1.821 - 1.822 に採用された標準ポリペプチド命名法を踏まえて、アミノ酸残基の略語は、表 1 に示されている。

【 0 1 1 2 】

【 表 1 】

表1-対応表

記号		
1文字	3文字	アミノ酸
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	トレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リシン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
Z	Glx	Gluおよび/またはGln
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
B	Asx	Asnおよび/またはAsp
C	Cys	システイン
X	Xaa	未知またはその他

10

20

30

40

50

【 0 1 1 3 】

式によって本明細書において表されるすべてのアミノ酸残基配列は、アミノ末端からカルボキシル末端の従来方向に左から右の配向を有するということは、留意しなくてはならない。さらに、語句「アミノ酸残基」は、対応表（表 1）に列挙されるアミノ酸および 37 C . F . R . § § 1 . 8 2 1 - 1 . 8 2 2 に参照され、本明細書において参照により組み込まれるものなどの修飾されたアミノ酸および普通でないアミノ酸を含むよう広く定義される。さらに、アミノ酸残基配列の始めまたは最後のダッシュ記号は、1 個または複数のアミノ酸残基のさらなる配列との、NH₂ などのアミノ末端基との、またはCOOH などのカルボキシル末端基とのペプチド結合を示すことは留意されなければならない。

【 0 1 1 4 】

本明細書において、「天然に存在するアミノ酸」とは、ポリペプチド中に生じる 20 種の L - アミノ酸を指す。

【 0 1 1 5 】

本明細書において、「非天然アミノ酸」とは、天然アミノ酸と類似の構造を有するが、天然アミノ酸の構造および反応性を模倣するよう構造的に修飾されている有機化合物を指

す。したがって、天然に存在しないアミノ酸は、例えば、アミノ酸または20種の天然に存在するアミノ酸以外のアミノ酸の類似体を含み、それだけには限らないが、アミノ酸のD-イソステレオマーを含む。例示的非天然アミノ酸は、本明細書に記載されており、当業者に公知である。

【0116】

本明細書において、等速性混合物とは、アミノ酸のモル比が、その報告された反応速度に基づいて調整されているものである（例えば、Ostresh et al., (1994) Biopolymers 34:1681参照のこと）。

【0117】

本明細書において、修飾は、ポリペプチドのアミノ酸の配列または核酸分子中のヌクレオチドの配列の修飾に関連しており、それぞれ、アミノ酸およびヌクレオチドの欠失、挿入および置換を含む。組換えDNA法を使用することなどによってポリペプチドを修飾する方法は、当業者には日常的なものである。

10

【0118】

本明細書において、アミノ酸の適した保存的置換は、当業者に公知であり、一般に、得られる分子の生物活性を変更することなく行うことができる。当業者ならば、一般に、ポリペプチドの非必須領域中の単一アミノ酸置換は、生物活性を実質的に変更しないということは認識している（例えば、Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224参照のこと）。このような置換は、以下の表2に示されるものに従って行うことができる。

20

【0119】

【表2】

表2

元の残基	例示的保存的置換
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

30

40

その他の置換も許容され、経験的にまたは公知の保存的置換に従って決定され得る。

【0120】

本明細書において、DNAコンストラクトは、天然には見られない方法で組み合わされた、および並置されたDNAのセグメントを含有する一本鎖または二本鎖、直鎖または環

50

状DNA分子である。DNAコンストラクトは、ヒトの操作の結果として存在し、操作された分子のクローンおよびその他のコピーを含む。

【0121】

本明細書において、DNAセグメントとは、特定の特質を有する大きなDNA分子の一部である。例えば、特定のポリペプチドをコードするDNAセグメントは、プラスミドまたはプラスミド断片などのより長いDNA分子の一部であり、5'から3'方向に読まれる場合に、特定のポリペプチドのアミノ酸の配列をコードする。

【0122】

本明細書において、用語ポリヌクレオチドとは、5'から3'末端に読まれるデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本鎖または二本鎖ポリマーを意味する。ポリヌクレオチドは、RNAおよびDNAを含み、天然の供給源から単離される場合も、インビトロ合成される場合も、天然および合成分子の組合せから調製される場合もある。ポリヌクレオチド分子の長さは、ヌクレオチドを単位として(「nt」と略される)または塩基対を単位として(「bp」と略される)本明細書では与えられている。用語ヌクレオチドは、文脈が許す場合には、一本鎖および二本鎖分子のために使用される。この用語が二本鎖分子に適用される場合には、長さ全体を表すよう使用され、用語塩基対と同等であると理解される。当業者ならば、二本鎖ポリヌクレオチドの2つの鎖が、長さがわずかに異なっている場合もあることおよびその末端がねじれ型である場合もあり、したがって、二本鎖ポリヌクレオチド分子内のすべてのヌクレオチドが対を形成していない場合もあるということは認識されよう。このような対を形成していない末端は、一般に、20ヌクレオチドの長さを超えない。

【0123】

本明細書において、2種のタンパク質または核酸間の「類似性」とは、タンパク質のアミノ酸の配列または核酸のヌクレオチド配列間の関連性を指す。類似性は、残基の配列およびそれに含有される残基の同一性および/または相同性の程度に基づき得る。タンパク質または核酸間の類似性の程度を評価する方法は、当業者に公知である。例えば、配列類似性を評価する一方法では、2種のアミノ酸またはヌクレオチド配列が、配列間で最大レベルの同一性を生じる方法でアラインされる。「同一性」とは、アミノ酸またはヌクレオチド配列が不変である程度を指す。アミノ酸配列のアラインメントおよびある程度はヌクレオチド配列のアラインメントは、アミノ酸(またはヌクレオチド)の保存的相違および/または高頻度の置換も考慮できる。保存的相違とは、関与する残基の物理-化学的特性を保つものである。アラインメントは、グローバル(配列の全長にわたる、すべての残基を含む比較される配列のアラインメント)である場合も、ローカル(最も類似した領域(単数または複数)のみを含む配列の一部のアラインメント)である場合もある。

【0124】

「同一性」は、それ自体、技術分野で認識された意味を有し、公開された技術を使用して算出できる。(例えば:Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991参照のこと)。2種のポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の同一性を測定するためのいくつかの方法が存在するが、用語「同一性」は、当業者には周知である(Carrillo, H. & Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988))。

【0125】

本明細書において、相同である(核酸および/またはアミノ酸配列に関して)とは、およそ25%を超えるまたはそれに匹敵する配列相同性、通常、25%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%を超えるまたはそれに匹敵する配列相同性を意味し、正確なパーセンテージは必要に応じて指定できる。本明細書におけ

る目的上、用語「相同性」および「同一性」は、文脈によって別段の指示のない限り、同義的に使用されることが多い。一般に、相同性または同一性パーセンテージの決定には、最高次のマッチが得られるよう配列をアラインする（例えば:Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073参照のこと）。配列相同性によって、標準アラインメントアルゴリズムプログラムによって保存されたアミノ酸の数を決定し、各供給者によって確立されたデフォルトギャップペナルティを用いて使用できる。実質的に相同な核酸分子は、対象とする核酸の長さすべてに沿って、通常、中程度のストリンジェンシーで、または高ストリンジェンシーでハイブリダイズする。また、核酸分子のハイブリダイズにおいては、コドンの代わりに縮重コドンを含む核酸分子も考慮される。

10

【0126】

任意の2種の分子が、少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の「同一である」または「相同である」ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を有するかどうかは、例えば、Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444におけるようなデフォルトパラメータを使用する「FASTA」プログラムなどの既知コンピュータアルゴリズムを使用して決定できる（その他のプログラムとして、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J. et al., Nucleic Acids Research 12(1):387(1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Altschul, S.F. et al., J. Molec Biol 215:403(1990)) ; Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994およびCarrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073が挙げられる）。例えば、National Center for Biotechnology InformationデータベースのBLAST関数を使用して同一性を決定できる。その他の市販の、または公的に入手可能なプログラムとして、DNASTar「MegAlign」プログラム (Madison, WI) および University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG)「Gap」プログラム (Madison WI) が挙げられる。タンパク質および/または核酸分子の相同性または同一性パーセントは、例えば、GAPコンピュータプログラム（例えば、Smith and Waterman((1981) Adv. Appl. Math. 2:482によって修正されたようなNeedleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48:443)を使用して配列情報を比較することによって決定できる。手短には、GAPプログラムは、2種の配列のうち短いほうの記号の総数によって除された、類似であるアラインされた記号（すなわち、ヌクレオチドまたはアミノ酸）の数として類似性を規定する。GAPプログラムのデフォルトパラメータは：（1）単項比較マトリックス（同一性に対して1および非同源性に対して0の値を含む）およびSchwartz and Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)によって記載される、Gribskov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:6745の加重比較マトリックス；（2）各ギャップに対して3.0のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対してさらなる0.10のペナルティ；および（3）末端ギャップに対するペナルティなしを含む。

20

30

40

【0127】

したがって、本明細書において、用語「同一性」または「相同性」とは、試験および参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチド間の比較を表す。本明細書において、用語少なくとも「90%同一である」とは、参照核酸またはポリペプチドのアミノ酸配列に対して、90~99.99%の同一性パーセントを指す。90%以上のレベルの同一性は、例示目的で、100個のアミノ酸の試験および参照ポリペプチドの長さが比較されると仮定して

50

、試験ポリペプチド中のアミノ酸の10%（すなわち、100個のうち10個）以下が参照ポリペプチドのものとは異なっているという事実を示す。試験および参照ポリヌクレオチド間で同様の比較を行うことができる。このような相違は、ポリペプチドの全長にわたって無作為に分配された点突然変異として表される場合もあり、または最大の許容可能な、例えば、10/100のアミノ酸の相違（およそ90%の同一性）までの変動する長さの1つまたは複数の位置に密集している場合もある。相違は、核酸またはアミノ酸置換、挿入または欠失として定義される。約85～90%を上回る相同性または同一性のレベルでは、結果は、プログラムおよびギャップパラメータセットとは無関係であるはずである。このような高レベルの同一性は、多くの場合、ソフトウェアに頼らない手作業によるアラインメントによって容易に評価できる。

10

【0128】

本明細書において、アラインされた配列とは、ヌクレオチドまたはアミノ酸の配列中の対応する位置をアラインするための相同性（類似性および/または同一性）の使用を指す。一般に、50%以上の同一性によって関連している2種以上の配列がアラインされる。アラインされた配列のセットとは、対応する位置でアラインされている2種以上の配列を指し、ゲノムDNA配列とアラインされる、ESTおよびその他のcDNAなどのRNAに由来するアラインする配列を含み得る。

【0129】

本明細書において、「プライマー」とは、適当なバッファー中の適当な条件下（例えば、4種の異なるヌクレオシド三リン酸およびDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼまたは逆転写酵素などの重合剤の存在下で）、適した温度で、鋳型による（*template-directed*）DNA合成の開始点として作用し得る核酸分子を指す。当然のことではあるが、特定の核酸分子は、「プローブ」として、および「プライマー」として役立ち得る。しかし、プライマーは、伸長のための3'ヒドロキシル基を有する。プライマーは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写酵素（RT）-PCR、RNA PCR、LCR、マルチプレックスPCR、パンハンドルPCR、キャプチャーPCR、発現PCR、3'および5'RACE、*in situ* PCR、ライゲーション介在PCRおよびその他の増幅プロトコルをはじめとする種々の方法で使用できる。

20

【0130】

本明細書において、「プライマー対」とは、増幅される（例えば、PCRによって）配列の5'末端とハイブリダイズする5'（上流）プライマーおよび増幅される配列の3'末端の相補体とハイブリダイズする3'（下流）プライマーを含むプライマーのセットを指す。

30

【0131】

本明細書において、「特異的にハイブリダイズする」とは、核酸分子（例えば、オリゴヌクレオチド）の、標的核酸分子との相補的塩基対形成によるアニーリングを指す。当業者ならば、個々の分子の長さおよび組成などの特定のハイブリダイゼーションに影響を及ぼすインビトロおよびインビボパラメータに精通している。インビトロハイブリダイゼーションに特に関連しているパラメータとして、さらに、アニーリングおよび洗浄温度、バッファー組成および塩濃度が挙げられる。高ストリンジェンシーで非特異的に結合している核酸分子を除去するための例示的洗浄条件として、0.1×SSPE、0.1% SDS、65℃があり、中程度のストリンジェンシーでは、0.2×SSPE、0.1% SDS、50℃がある。同等のストリンジェンシー条件は、当技術分野で公知である。当業者ならば、これらのパラメータを、核酸分子の、特定の適用にとって適当な標的核酸分子との特異的ハイブリダイゼーションを達成するよう容易に調整できる。

40

【0132】

本明細書において、製剤に対して実質的に同一とは、製剤の代わりに実質的に同一の製剤を使用することができるよう、対象とする特性が十分に不変であるよう十分に類似していることを意味する。

【0133】

50

本明細書において、用語「実質的に同一」または「類似している」は、関連技術分野の当業者によって理解されるように文脈に応じて変わるということも理解される。

【0134】

本明細書において、対立遺伝子変異体または対立遺伝子変動とは、同じ染色体遺伝子座を占める遺伝子の2種以上の代替形態のいずれかに言及する。対立遺伝子変動は、突然変異によって天然に起こり、集団内に表現型多型をもたらし得る。遺伝子突然変異は、サイレント（コードされるポリペプチドには変化がない）である場合も、変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする場合もある。用語「対立遺伝子変異体」はまた、本明細書では、遺伝子の対立遺伝子変異体によってコードされるタンパク質を示すために使用される。通常、遺伝子の参照形態は、種の集団または単一参照メンバーから得たポリペプチドの野生型形態および/または優勢な形態をコードする。通常、種間および種の中で変異体を含む対立遺伝子変異体は、通常、同一種に由来する野生型および/または優勢な形態と少なくとも80%、90%またはそれ以上のアミノ酸同一性を有し、同一性の程度は、遺伝子および比較が種間であるか、種内であるかに応じて変わる。一般に、種内対立遺伝子変異体は、野生型および/または優勢な形態と少なくとも約80%、85%、90%または95%の同一性またはそれ以上、例えば、ポリペプチドの野生型および/または優勢な形態と96%、97%、98%、99%またはそれ以上の同一性を有する。本明細書において、対立遺伝子変異体への言及は、一般に、同一種のメンバー間のタンパク質における変動を指す。

10

【0135】

本明細書において、本明細書において、「対立遺伝子変異体」と同義的に使用される「対立遺伝子」とは、遺伝子またはその一部の代替形態を指す。対立遺伝子は、相同染色体上の同じ遺伝子座または位置を占める。対象が遺伝子の2つの同一の対立遺伝子を有する場合には、対象は、その遺伝子または対立遺伝子についてホモ接合性であるといわれる。対象が、遺伝子の2種の異なる対立遺伝子を有する場合には、対象は、その遺伝子についてヘテロ接合性であるといわれる。特定の遺伝子の対立遺伝子は、単一ヌクレオチドまたはいくつかのヌクレオチドで互いに異なる場合があり、ヌクレオチドの置換、欠失および挿入を含み得る。遺伝子の対立遺伝子はまた、突然変異を含有する遺伝子の形態であり得る。

20

【0136】

本明細書において、種変異体とは、マウスおよびヒトなどの異なる哺乳類種を含めた異なる種間でのポリペプチドにおける変異体を指す。

30

【0137】

本明細書において、スプライス変異体とは、2種以上のmRNAをもたらす、ゲノムDNAの一次転写物の異なるプロセッシングによって生じた変異体を指す。

【0138】

本明細書において、ペプチドミメティックは、個々のペプチドの生物学的に活性な形態のコンホメーションおよび特定の立体化学的特徴を模倣する化合物である。一般に、ペプチドミメティックは、化合物の特定の望ましい特性は模倣するが、生物学的に活性なコンホメーションの喪失および結合分解につながる可動性などの望ましくない特性は模倣しないよう設計される。ペプチドミメティックは、望ましくない特性に貢献している特定の基または結合を、生物学的等価体(bioisosteres)で置換することによって生物学的に活性な化合物から調製できる。生物学的等価体は、当業者には公知である。例えば、メチレン生物学的等価体 CH_2S は、エンケファリン類似体におけるアミド置換として使用されてきた(例えば、Spatola (1983) pp. 267-357 in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Weinstein, Ed. volume 7, Marcel Dekker, New York参照のこと)。経口投与できるモルヒネは、ペプチドエンドルフィンのペプチドミメティックである化合物である。本明細書における目的上、1つまたは複数のペプチド結合がミミックによって置換されるポリペプチドと同様に、ペプチドミメティックの中に環状ペプチドが含まれる。

40

50

【 0 1 3 9 】

本明細書において、指定のパーセンテージの参照ポリペプチド中に示されるアミノ酸を含むポリペプチドとは、ポリペプチドおよび参照ポリペプチド間で共有される連続する同一アミノ酸の割合を指す。例えば、147個のアミノ酸を列挙する配列番号XXに示されるアミノ酸の配列を有する参照ポリペプチドに示されるアミノ酸の70%を含むイソ型とは、参照ポリペプチドが、配列番号XXのアミノ酸配列に示される少なくとも103個の連続するアミノ酸を含有することを意味する。

【 0 1 4 0 】

本明細書において、用語プロモーターとは、RNAポリメラーゼの結合および転写の開始を提供するDNA配列を含有する遺伝子の一部を意味する。プロモーター配列は、一般に、常にはではないが、遺伝子の5'非コード領域中に見られる。

10

【 0 1 4 1 】

本明細書において、単離されたまたは精製されたポリペプチドまたはタンパク質またはその生物学的に活性な部分は、タンパク質が導かれる細胞または組織に由来する細胞性物質またはその他の混入タンパク質を実質的に含まない、または化学的に合成される場合には、化学的前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まない。調製物は、このような純度を評価するために当業者によって使用される、薄層クロマトグラフィー(TLC)、ゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)などの分析の標準法によって決定されるように、容易に検出可能な不純物を含まないとされる場合には、実質的に含まない、またはさらなる精製が、物質の酵素活性および生物活性などの物理的および化学的特性を検出可能に変更しないよう十分に純粋であると決定できる。実質的に化学的に純粋な化合物を製造するために化合物を精製する方法は、当業者に公知である。しかし、実質的に化学的に純粋な化合物は、立体異性体の混合物であってもよい。このような例では、さらなる精製は、化合物の特定の活性を増大し得る。

20

【 0 1 4 2 】

用語細胞性物質を実質的に含まないとは、それから単離されるか、組換えによって製造される細胞の細胞成分からタンパク質が分離されるタンパク質の調製物を含む。一実施形態では、用語細胞性物質を実質的に含まないとは、約30%未満(乾重で)の非プロテアーゼタンパク質(本明細書において混入タンパク質とも呼ばれる)、一般に、約20%未満の非プロテアーゼタンパク質または10%の非プロテアーゼタンパク質または約5%未満の非プロテアーゼタンパク質を有するプロテアーゼタンパク質の調製物を含む。プロテアーゼタンパク質またはその活性部分が組換えによって製造される場合には、培養培地も実質的に含まない、すなわち、培養培地は、プロテアーゼタンパク質調製物の容量の約20%、10%もしくは5%未満または20%、10%もしくは5%に相当する。

30

【 0 1 4 3 】

本明細書において、用語化学的前駆体またはその他の化学物質を実質的に含まないとは、タンパク質が、タンパク質の合成に関与している化学的前駆体またはその他の化学物質から分離されるプロテアーゼタンパク質の調製物を含む。この用語は、約30%(乾重で)20%、10%、5%未満またはそれ以下の化学的前駆体または非プロテアーゼ化学物質または成分を有するプロテアーゼタンパク質の調製物を含む。

40

【 0 1 4 4 】

本明細書において、例えば、合成核酸分子または合成遺伝子または合成ペプチドに関連して合成とは、組換え法によって、および/または化学合成法によって製造される核酸分子またはポリペプチド分子を指す。

【 0 1 4 5 】

本明細書において、組換えDNA法を使用することによる組換え手段による製造とは、クローニングされたDNAによってコードされるタンパク質を発現させるための分子生物学の周知の方法の使用を意味する。

【 0 1 4 6 】

本明細書において、ベクター(またはプラスミド)とは、異種核酸をその発現または複

50

製いずれかのために細胞中に導入するために使用される別個のエレメントを指す。通常、ベクターは、エピソームのままであるが、遺伝子またはそのタンパク質のゲノムの染色体への組み込みを達成するように設計できる。また、酵母人工染色体および哺乳類人工染色体などの人工染色体であるベクターも考慮される。このような媒体の選択および使用は、当業者には周知である。

【0147】

本明細書において、発現ベクターは、このようなDNA断片の発現を達成できるプロモーター領域などの調節配列と作動可能に連結されているDNAを発現できるベクターを含む。このようなさらなるセグメントは、プロモーターおよびターミネーター配列を含む場合もあり、所望により、1つまたは複数の複製起点、1種または複数の選択マーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルなどを含む場合もある。発現ベクターは、一般に、プラスミドまたはウイルスDNAから誘導され、または両方のエレメントを含有する場合もある。したがって、発現ベクターとは、プラスミド、ファージ、組換えウイルスまたは適当な宿主細胞に導入すると、クローニングされたDNAの発現をもたらすその他のベクターなどの組換えDNAまたはRNAコンストラクトを指す。適当な発現ベクターは、当業者には周知であり、真核細胞および/または原核細胞において複製可能であるものおよびエピソームのままであるものまたは宿主細胞ゲノム中に組み込まれるものを含む。

10

【0148】

本明細書において、ベクターはまた、「ウイルスベクター(virus vector)」または「ウイルスベクター(viral vector)」を含む。ウイルスベクター(viral vector)とは、外因性遺伝子を細胞中に移すための(媒体またはシャトルとして)、外因性遺伝子と作動可能に連結されている操作されたウイルスである。

20

【0149】

本明細書において、アデノウイルスとは、ヒトにおいて結膜炎および上気道感染を引き起こすDNA含有ウイルスの群のいずれかを指す。本明細書において、裸のDNAとは、ワクチンおよび遺伝子療法に使用できるヒストンを含まないDNAを指す。裸のDNAとは、形質転換と呼ばれる処理される遺伝子導入の際に細胞から細胞へ通過される遺伝物質である。形質転換では、精製されたまたは裸のDNAが、レシピエント細胞によって取り込まれ、これがレシピエント細胞に新規特徴または表現型を与える。

30

【0150】

本明細書において、DNAセグメントに関して作動可能に(operably)または作動可能に(operatively)連結されたとは、セグメントが、それらが意図される目的に呼応して機能するように配置されることを意味する。例えば、転写は、プロモーターにおいて開始し、コーディングセグメントを通して、ターミネーターに進む。

【0151】

本明細書において、タンパク質結合配列とは、その他のタンパク質またはペプチド配列との、一般に、一連のタンパク質もしくはペプチド配列との、または特定のタンパク質もしくはペプチド配列との特異的結合を可能にするタンパク質またはペプチド配列を指す。

【0152】

本明細書において、用語評価することとは、タンパク質の活性の絶対値を得るという意味で、また活性のレベルを示す指数、割合、パーセンテージ、視覚的価値またはその他の価値を得るという意味で定量的および定性的決定を含むものとする。評価は、直接的である場合も間接的である場合もあり、実際に検出される化学種はもちろん、活性生成物自体である必要はなく、例えば、その誘導体または何らかのさらなる物質であってもよい。

40

【0153】

本明細書において、対照とは、試験パラメータで処理されないという点を除いて、試験サンプルと実質的に同一であるサンプルを指す。または、サンプル血漿サンプルである場合には、対象とする状態を患っていない正常なボランティアから得たものである場合もある。対照はまた、内部対照である場合もある。

50

【0154】

本明細書において、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈上別段の明確な指示のない限り、複数形の指示対象を含む。したがって、例えば、「細胞外ドメイン」を含む化合物への言及は、1種または複数の細胞外ドメインを有する化合物を含む。

【0155】

本明細書において、範囲および量は、「約」特定の値または範囲として表現され得る。約はまた、正確な量も含む。したがって、「約5塩基」とは、「約5塩基」および「5塩基」も意味する。

【0156】

本明細書において、「任意選択の」または「所望により」とは、続いて記載される事象または状況が起こるか起こらないことおよび記載が前記事象または状況が起こる場合および起こらない場合を含むことを意味する。例えば、所望により置換されていてよい基とは、基が非置換であるか、置換されていることを意味する。

【0157】

本明細書において、任意の保護基、アミノ酸およびその他の化合物の略語は、別段の指示のない限り、その一般的な使用、認識されている略語または生化学命名法に関するIUPAC-IUB委員会(IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature)((1972) Biochem. 11:1726参照のこと)を踏まえる。

【0158】

B. 条件的活性分子を同定する方法

正常組織微小環境よりも病変微小環境においてより活性である、またはその逆である治療用タンパク質などの条件的活性分子を同定または選択する方法が、本明細書において提供される。特に、本方法は、正常微小環境においてよりも腫瘍微小環境においてより活性である、またはその逆である治療用タンパク質などの分子を同定するためのものである。本方法では、治療用タンパク質などの分子の活性を、第1の条件セット下で試験し、分子の活性を、第1の条件セット下の活性と比較して低減された活性が望まれる第2の条件セット下で試験する。第2の条件セット下よりも第1の条件セット下で、活性であるまたはより活性であるタンパク質などの分子が同定され得、その結果、所定の条件セット下で条件的に活性である分子が同定される。一般に、本方法では、第1の条件セットは、腫瘍微小環境などの病変微小環境においてインビボで存在する条件を模倣またはシミュレートする。第2の条件セットは、正常な組織または細胞における生理学的条件を模倣またはシミュレートする。

【0159】

したがって、本明細書における方法は、病変微小環境および正常組織微小環境において存在する所定の条件をシミュレートまたは模倣するよう設計されているインビトロアッセイにおいて実施される。所定の条件は、例えば、pH、温度、O₂濃度および乳酸濃度などの条件を含む。例えば、所定の第1の条件セットが、腫瘍微小環境において存在する条件を含むことができ、第2の条件セットが、正常環境において存在する条件を含むことができる。したがって、周囲の正常組織においてよりも腫瘍などの病変環境においてより大きな活性を示す、治療用タンパク質などの生物学的有効性を有する分子が同定され得る。したがって、本明細書において提供される方法は、一定の条件セット下で条件的活性を有する治療用タンパク質などの修飾された分子を同定するために使用できる。

【0160】

これは、局所および全身性副作用を含めた副作用を低減または予防するために、治療を腫瘍組織などの病変組織のみにターゲティングすることによって有利であり得る。同定された治療用タンパク質は、全身曝露に伴う副作用を低減しながら癌治療薬として使用できる。低減された副作用を伴う治療用タンパク質は、高投薬計画で使用でき、改善された有効性および安全性を有し得る。低減され得る副作用として、悪心、嘔吐、胸部絞扼感、

10

20

30

40

50

頭痛ならびに血圧不安定性および動脈収縮などの関連する心血管効果、経皮毒性、骨髄抑制、心毒性、脱毛、腎機能障害、口内炎、貧血、てんかん発作、急性アナフィラキシーなどの免疫反応、血清の病的状態、抗体の生成、感染、癌、自己免疫疾患および心毒性などの任意の望ましくない (undesirable) 非治療的效果が挙げられる。

【0161】

方法の第1の工程では、1種または複数の分子またはタンパク質が、本明細書において提供される方法において試験されるように選択される。分子(複数可)は、小分子、ペプチド、タンパク質、酵素、抗体またはその他の生体分子を含めた、生物学的有効性を有する任意の分子(複数可)または生物学的有効性を有する任意の修飾された分子であり得る。分子(複数可)は、修飾されていないものである場合も、本明細書に記載された任意の修飾を含む場合もある。一部の例では、修飾された分子のライブラリーが調製される。試験分子を調製する方法は、当業者に公知である。節Dには、抗体を含めたタンパク質をクローニング、修飾および調製する方法を記載している。さらに、標準的な組換えDNA技術を使用して、ライブラリーまたは変異型分子の収集物を突然変異誘発および作製する方法が本明細書に記載されており、当業者に公知である。

10

【0162】

タンパク質(単数または複数)などの分子(単数または複数)は、選択および調製された後、それらは、第1の条件セット下および異なる第2の条件セット下で活性または特性について試験またはスクリーニングされる。第1および第2の条件セットとは、それぞれ、病変または正常組織または微小環境において生理学的に存在するものをシミュレートまたは模倣する条件である。例えば、病変組織または病変微小環境条件は、腫瘍微小環境において存在するものであり得る。このような条件の例示として、例えば、pHなどの化学的条件および O_2 または乳酸の濃度などの化学的濃度ならびに温度および圧力などの物理的条件が挙げられる。したがって、第1および第2の条件は、pH、濃度または O_2 もしくは乳酸のレベルまたはその他の化学的条件、温度および/または圧力のうちいずれか1種または複数において異なり得る。

20

【0163】

分子の試験は、試験される分子またはタンパク質の活性または特性を検出または区別できる任意のインビトロまたはインビボ法を使用して実施できる。通常、試験は、インビトロで実施される。使用される特定のアッセイは、試験される分子またはタンパク質に応じて変わる。方法の例として、本明細書に記載されたかまたは当業者に公知である任意の方法が挙げられ、生化学的アッセイおよび/または細胞ベースのアッセイが挙げられる。

30

【0164】

一例では、試験される分子は、プールおよびスクリーニングされ得る。別の例では、試験される分子は、アドレス可能なアレイなどのアレイに形式を合わせることによって、物理的に分離され、個々にスクリーニングされ得る。また、第2の条件セット下での分子(複数可)の試験は、第1の条件セット下でのスクリーニングの前、後またはそれと同時に進めてもよい。例えば、分子を、第1の条件セットおよび第2の条件セット下で同時にスクリーニングおよび/または選択してもよく、または分子を、第1の条件セット下でスクリーニングおよび/または選択してもよく、次いで、第2の条件セット下でスクリーニングおよび/または選択してもよい。

40

【0165】

分子を両条件セット下で試験した後に、一方または両方の条件下での分子の活性を評価して、第2の条件よりも第1の条件下でより活性である得られた分子を同定する。活性は、例えば、発光、酵素活性またはコグネイト生体分子との結合などの分子の相互作用などの任意の観察可能な生物学的、生化学的または生物物理的現象を含み得る。活性の比較は、定性的である場合も定量的である場合もある。

【0166】

一例では、分子を両条件セット下で試験した後に、両条件セット下での各分子の活性を比較して、第2の条件よりも第1の条件下でより活性である(すなわち、条件的に活性で

50

ある)分子を同定する。

【0167】

その他の例では、条件的活性分子は、工程において2つの異なる条件下でのスクリーニングおよび/または選択することによって同定される。例えば、条件的活性分子は、まず、第1の条件セット下で活性である分子を選択することおよび/または第1の条件セット下で不活性である分子を排除することによって同定され得る(ポジティブ選択)。スクリーニングのその後のラウンドは、第2の条件セット下で実施でき、第2の条件セットよりも第1の条件セット下でより大きな活性を示す分子が同定される。別の例では、条件的活性分子は、まず、第2の条件セット下で活性である分子を排除することによって同定され得る(ネガティブ選択)。ネガティブ選択の一例では、活性の閾値を上回るまたは下回るなどの特定の判定基準を満たさない分子が、スクリーニングおよび/または選択のその後のラウンドから排除される。スクリーニングのその後のラウンドは、第1の条件セット下で実施できる。したがって、第1の条件セット下でのみ活性を示す分子が同定される。したがって、第1および/または第2の条件セット下でスクリーニングされる分子は、その他の条件セット下でスクリーニングされる分子のすべてまたはサブセットを含み得る。ポジティブおよびネガティブ選択は、所定の条件的活性を有する分子が同定されるまで反復してもよい。

10

【0168】

本方法は、複数回実施してもよく、それによって、方法の工程が1、2、3、4または5回反復される。例えば、試験分子、例えば、第2の条件セットと比較して第1の条件セット下で増大した活性を示すと同定されるタンパク質変異体を再スクリーニングし、活性を確認することができる。本明細書において提供される方法はまた、反復性である。一例では、方法を実施した後、任意の同定された条件的活性分子を、条件的活性を増大または最適化するために修飾またはさらに修飾してもよい。例えば、最初に同定された条件的活性タンパク質に追加の修飾を導入することによって二次ライブラリーを作製してもよい。例えば、条件的活性を増大すると同定された修飾を組み合わせてもよい。二次ライブラリーは、本明細書に記載されたアッセイおよび方法を使用して試験できる。本方法の反復性態様の別の例では、第1の条件セット下で活性ではないかまたは増大した活性を有さないような条件的活性を示さないと同定されている分子を、さらに修飾し、条件的活性について再試験できる。追加の修飾は、分子の活性および/または安定性と関連している特定の領域(例えば、特定のアミノ酸残基)付近を標的にできる。

20

30

【0169】

本方法の工程および本方法の成分の説明は、以下の小区分において提供される。

【0170】

1. 治療用タンパク質

条件的活性分子を同定するための本方法の実施において使用するための試験される分子は、1種または複数の特定の疾患または状態を治療または改善すると知られているタンパク質である治療用タンパク質であり得る。例えば、治療用タンパク質は、腫瘍または癌を治療または改善すると知られているタンパク質である。一部の例では、試験される分子は、アミノ酸置換(複数可)、挿入(複数可)または欠失(複数可)などの1つまたは複数の修飾を含む治療用タンパク質の変異体である。したがって、本方法を使用して、正常組織または細胞と比較して、腫瘍環境などの病変微小環境において条件的に活性である変異型治療用タンパク質を同定できる。例示的治療用タンパク質は、腫瘍または癌治療薬であり、その結果、本方法を使用して、正常な微小環境よりも腫瘍微小環境においてより活性である条件的活性治療薬を同定できる。

40

【0171】

本方法の一部の例では、本方法は、正常な生理学的条件下と比較して腫瘍微小環境において変更されている活性を示す分子を同定するためのハイスループットスクリーニング法である。したがって、本方法を使用して、治療用タンパク質の活性、例えば、結合活性を発展させることができる。特に、本方法を使用して、腫瘍の疾患微小環境において優先的

50

に活性であるが、正常組織では活性ではないものを同定するために、既存の治療用タンパク質の変異体をスクリーニングできる。例えば、既知毒性を伴う治療用タンパク質を、突然変異誘発し、本明細書において提供されたアッセイにおいてスクリーニングし、突然変異を含有しない治療薬と比較して、腫瘍微小環境のみにおける優先的活性によって副作用が低減した変異型タンパク質を同定できる。したがって、本方法を使用して、条件的活性生物製剤（C A B）を同定できる。得られた同定されたC A Bは、候補癌治療薬であり得る。

【0172】

a. 腫瘍または癌治療薬

一部の例では、試験分子は、既知の臨床候補癌治療薬の、または既存の癌治療薬の変異体である治療用タンパク質である。公知の癌治療用タンパク質の変異体は、正常環境においてよりも、腫瘍微小環境などの病変微小環境においてより高く活性を示す発展した治療用タンパク質を同定するために、本明細書において提供される方法においてスクリーニングできる。例えば、活性が結合活性である場合は、本明細書において提供される方法を使用して、正常微小環境と比較して、腫瘍または癌微小環境において優先的に結合する条件的活性癌治療用タンパク質を同定できる。

10

【0173】

例えば、試験分子として、または変異体を作製するためのスキャフォールドとして使用される治療用タンパク質は、腫瘍または癌の治療における介入点である標的タンパク質と相互作用するタンパク質であり得る。このような癌を促進する標的タンパク質として、任意のリガンド、受容体、酵素または癌細胞および腫瘍の増殖、血管新生または細胞成長特性と関連しているその他の薬剤が挙げられる。標的タンパク質は、治療的介入の既知標的に基づいて選択できる。標的は、治療用タンパク質のコグネイト結合パートナーまたは代替タンパク質抗原であり得る。既知癌治療薬の標的は公知である。このような標的タンパク質の例示として、それだけには限らないが、EGFR、HER2、CD20、VEGF-A、EpCAM、CD3、CD33、CD80、CTLA-4、5 α 1インテグリン、メソテリンまたはIGF-1Rを含めて、表中に示されるいずれかがある。例えば、例示的治療用分子は、EGFRと相互作用するかまたはEGFRとの相互作用と関連している治療効果を有する分子またはタンパク質である。

20

【0174】

修飾されたタンパク質を作製するために使用され、本明細書におけるアッセイにおいてスクリーニングされ得る例示的腫瘍または癌治療用タンパク質が、表3に示されている。表はまた、癌治療薬のコグネイトまたは代替タンパク質抗原などの標的タンパク質も示す。したがって、本明細書において提供される方法において、癌治療用タンパク質または修飾された癌治療用タンパク質（複数可）を、代替タンパク質リガンドなどのそのコグネイト標的タンパク質との結合についてスクリーニングでき、および/または標的タンパク質の活性の変更を達成することについてスクリーニングできる。腫瘍微小環境において条件的に活性である同定されるかまたは選択される突然変異型タンパク質などのタンパク質とは、正常な生理学的条件と比較して、腫瘍微小環境をシミュレートするインビトロ条件下で優先的結合活性および/またはその他の活性を示すものである。一部の例では、修飾されていないタンパク質、例えば、突然変異を含有しない治療用抗体または親対照抗体と比較して、腫瘍微小環境において増大した活性を示す修飾されたタンパク質も同定できる。

30

40

【0175】

【表 3 - 1】

表3					
治療薬				リガンド	
名称	形式	可変ドメイン (配列番号)	全長 (配列番号)	タンパク質	配列番号
セツキシマブ (IMC-C225;アー ビタックス(登録 商標))	マウス/ヒトキメラIg G1		HC: 2 LC: 1	EGFR(細胞外ドメ イン)	50
トラスツズマブ (ヘルセプチン(登録商標))	ヒト化IgG4	HC: 29 LC: 30	HC: 74 LC: 75	HER2/Neu(細胞外 ドメイン)	51
リツキシマブ (リツキサン(登 録商標);マブセ ラ登録商標))	マウス/ヒトキメラIg G1	HC: 31 LC: 32	HC: 76 LC: 77	CD20(大細胞外ル ープ)	52
ベバシズマブ (アバスチン(登 録商標))	ヒト化IgG1	HC: 33 LC: 34	HC: 78 LC: 79	VEGF-A	53
アレムツズマブ (キャンパス(登 録商標);キャン パス-1H(登録商 標);マブキャン パス(登録商標))	ヒト化IgG1	HC: 35 LC: 36	HC: 80 LC: 81	CD52(細胞外ドメ イン)	54
パニツムマブ (ABX-EGF;ベク ティピックス(登 録商標))	ヒトIgG2	HC: 37 LC: 38	HC: 82 LC: 83	EGFR(細胞外ドメ イン)	50

10

20

30

【表 3 - 2】

ラニビズマブ (ルセンティス(登録商標))	ヒト化IgG1 Fab	HC: 39 LC: 40	HC: 84 LC: 85	VEGF-A	53
イブリツモマブ	マウスIgG1		HC: 41 LC: 42	CD20(大細胞外ループ)	52
イブリツモマブ チウキセタン (ゼバリン(登録商標))	チウキセタンとカップリングしているマウスIgG1		HC: 41 LC: 42	CD20(大細胞外ループ)	52
トシツモマブ	マウスIgG2a		HC: 43 LC: 44	CD20(大細胞外ループ)	52
ヨウ素I131トシツモマブ (ベキサール(登録商標))	ヨウ素-131とカップリングしているマウスIgG2a		HC: 43 LC: 44	CD20(大細胞外ループ)	52
カツマキソマブ (レモバブ(登録商標))	ハイブリッドAb: マウスIgG2a ラットIgG2b			EpCAM(細胞外ドメイン)	55
				CD3(細胞外ドメイン): γ 鎖	56
				ζ 鎖	57
				ϵ 鎖	58
ゲムツズマブ	ヒト化IgG4			CD33(細胞外ドメイン)	59

10

20

【表 3 - 3】

ゲムツズマブオ ゾガマイシン (マイロターゲット (登録商標))	カリケアマイシンと カップリングしてい るヒト化IgG4			CD33(細胞外ドメ イン)	59
アバタセプト (CTLA4-Ig;オレ ンシア(登録商標)	可溶性融合タンパク 質:修飾されたFcヒト IgG1と連結している ヒトCTLA-4の細胞外 ドメイン		68	CD80(細胞外ドメ イン) CD86(細胞外ドメ イン)	60 61
ベラタセプト (L104EA29YIg;L EA29Y;LEA)	可溶性融合タンパク 質:修飾されたFcヒト IgG1と連結している ヒトCTLA-4の細胞外 ドメイン		69	CD80(細胞外ドメ イン) CD86(細胞外ドメ イン)	60 61
イピリムマブ (MDX-010;MDX- 101)	ヒトIgG1			CTLA-4(細胞外ド メイン)	62
トレメリムマブ (チシリムマブ;C P-675,206)	ヒトIgG4			CTLA-4(細胞外ド メイン)	62
PRS-010	操作されたヒトリポ カリンタンパク質 (US20090042785)			CTLA-4(細胞外ド メイン)	62
PRS-050	操作されたヒトリポ カリンタンパク質 (US7585940; US2009 0305982)			VEGF-A	53
アフリベルセプ ト (VEGF Trap、AV E005)	可溶性融合タンパク 質:VEGFR-1およびV EGFR-2のヒト細胞外 ドメインとヒトIgG Fc (Holash <i>et al.</i> , (2002) <i>PNAS</i> 99:11393-1139 8)			VEGF-A PLGF	53 63
ボロシキシマブ (M200)	キメラ(82%ヒト、18 %マウス)IgG4		HC: 45 LC: 46	$\alpha 5 \beta 1$ インテグリ ン (細胞外ドメイン): $\alpha 5$ $\beta 1$	64 65
F200	ボロシキシマブ(M20 0)のキメラ(ヒト/マウ ス)IgG4Fab断片		HC: 47 LC: 46	$\alpha 5 \beta 1$ インテグリ ン (細胞外ドメイン): $\alpha 5$ $\beta 1$	64 65

10

20

30

40

【表 3 - 4】

MORAb-009	マウス/ヒトキメラIgG1 (US20050054048)			メソテリン(細胞外ドメイン)	66
SSIP(CAT-5001)	可溶性融合タンパク質:末端切断型シュードモナス外毒素Aと連結している抗メソテリンFv (US20070189962)			メソテリン(細胞外ドメイン)	66
シクツムマブ (IMC-A12)	ヒトIgG1		HC: 48 LC: 49	IGF-1R(細胞外ドメイン)	67
マツズマブ (EMD72000)	ヒト化IgG1 (Kim (2005) <i>Curr Opin Mol Ther</i> 6:96-103)			EGFR(細胞外ドメイン)	
ニモツズマブ (h-R3)	ヒト化IgG2a (Spicer (2005) <i>Curr Opin Mol Ther</i> 7:182-191)			EGFR(細胞外ドメイン)	
ザルツムマブ (HuMax-EGFR)	ヒトIgG1 (Lammerts van Bueren <i>et al.</i> (2008) <i>PNAS</i> 105:6109-14)			EGFR(細胞外ドメイン)	
ネシツムマブIMC-11F8	ヒトIgG1 (Li <i>et al.</i> (2008) <i>Structure</i> 16:216-227)			EGFR(細胞外ドメイン)	
mAb806 / ch806	IgG1 (Li <i>et al.</i> , (2007) <i>J Clin Invest</i> 117:346-352)			EGFR(細胞外ドメイン)	
Sym004	キメラ/ヒト化IgG1 (Pederson <i>et al.</i> 2010 <i>Cancer Res</i> 70:588-597)			EGFR(細胞外ドメイン)	
mAb-425	IgG2a			EGFR(細胞外ドメイン)	

10

20

30

40

【 0 1 7 6 】

b. 修飾されたタンパク質のライブラリーの作製

本方法において使用される治療用タンパク質は、既存の治療薬である非修飾タンパク質であり得る。既存の治療薬のライブラリーまたは収集物もスクリーニングされ得る。その他の例では、治療用タンパク質は、修飾されたペプチド、修飾された酵素、修飾された抗体またはその他の修飾されたポリペプチドなどの修飾されたタンパク質を含む。修飾され

50

た治療薬が、方法の実施において使用される例では、陽性対照として非修飾タンパク質を使用するか、または修飾されたタンパク質を用いて実施されたアッセイから得た結果と比較するためにアッセイを実施できる。

【0177】

治療用タンパク質は、タンパク質の構造を変更し得る当業者に公知の任意のプロセスによって修飾され得る。修飾の例として、修飾された治療用タンパク質のライブラリーまたは収集物を形成するためのタンパク質の1個または複数のアミノ酸の置換、付加および欠失が挙げられる。ライブラリーまたは収集物は、条件的活性治療用タンパク質を同定するために、病変微小環境および正常な微小環境をシミュレートする条件下で、本明細書において提供されたアッセイにおいてスクリーニングされ得る。

10

【0178】

本明細書における方法において使用するために修飾されたタンパク質または変異型タンパク質を作製することは、当業者のレベル内である。突然変異を誘発する方法は、当技術分野で周知であり、例えば、Quick Change (Stratagene)などの位置指定突然変異誘発または飽和突然変異誘発が挙げられる。突然変異誘発法として、それだけには限らないが、部位媒介性突然変異誘発、PCR突然変異誘発、カセット突然変異誘発、位置指定突然変異誘発、ランダム点突然変異誘発、ウラシル含有鋳型を使用する突然変異誘発、オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発、ホスホロチオエート修飾されたDNA突然変異誘発、ギャップのある二本鎖DNAを使用する突然変異誘発、点ミスマッチ修復、修復欠損宿主株を使用する突然変異誘発、制限選択および制限精製、欠失突然変異誘発、全遺伝子合成による突然変異誘発、二本鎖分解修復および当業者に公知の多数のその他のものが挙げられる。本明細書における方法では、突然変異誘発は、タンパク質の全長中で、またはタンパク質の領域内で行うことができる。突然変異は、合理的にまたはランダムになすことができる。

20

【0179】

試験分子がタンパク質である場合は、修飾は、タンパク質の1個または複数のアミノ酸の置換を含み得る。一部の例では、修飾は、無作為に選択される。一部の例では、修飾は、条件的活性を有する分子をもたらすよう選択される。例えば、合理的な突然変異誘発は、当技術分野で公知のまたは治療用タンパク質の活性および/または構造的安定性にとって重要であると同定されたアミノ酸の突然変異を含む。重要であるとわかっている残基の例として、例えば、活性部位残基または結合ポケット中のアミノ酸がある。例えば、治療用タンパク質の活性または構造的安定性にとって重要であるアミノ酸は、条件的活性治療用タンパク質を同定するためにスクリーニングされ得る修飾された治療用タンパク質のライブラリーを形成するよう置換されるよう選択され得る。また、突然変異させるための残基は、位置指定突然変異誘発、アラニンスキャニング、構造/機能関係、相同性モデリング、理論的モデリングおよび本明細書に記載された任意のアッセイを含めた当業者に公知の任意の方法によって経験的に同定され得る。さらに、ライブラリーは、置換されるアミノ酸を無作為に選択することによって形成され得る。突然変異型タンパク質のライブラリーまたは収集物は、本明細書における方法において作製および試験またはスクリーニングできる。

30

40

【0180】

疾患条件、例えば、腫瘍環境において存在する酸性条件下でより活性である条件的活性タンパク質を同定するために、修飾される予定のタンパク質中の1個または複数のアミノ酸を、2つのpH条件間でプロトン化状態を変更できるイオン化できる基を有するアミノ酸で独立に置換してもよい。アミノ酸の特定の選択は、条件的活性について試験されている特定のpH条件に応じて変わる。当業者ならば、2つの異なるpH値間でイオン化状態を変更できるイオン化できる基を含む1個または複数の置換アミノ酸を選択できる。例えば、ヘンダーソン・ハッセルバルヒ方程式($\text{pH} = \text{pK}_a + \log([A^-]/[HA])$)を使用して、側鎖 pK_a の関数としてアミノ酸のプロトン化された側鎖と非プロトン化された側鎖の割合を決定でき、これは、当業者に公知の任意の方法(例えば、滴定曲線お

50

よび/または核磁気共鳴)を用いて測定でき、または、分子動態モデリング(例えば、Li et al. (2005), Proteins, 61:704-721; Bas et al. (2008), Proteins, 73:765-783)またはポアソン・ボルツマン方程式(Fogolari et al. (2002) J. Mol. Recognit. 15(6):377-392)などの当業者に公知の任意の方法を使用して算出できる(Davies et al. (2006), BMC Biochem. 7:18; Juffer (1998), Biochem. Cell Biol. 76(2-3):198-209; Sham et al. (1997), J. Phys. Chem. B 101(22):4458-4472; Nielsen (2007) J. Mol. Graph. Model. 25(5):691-699; Bas et al. (2008), Proteins 73(3):765-783)。一部の例では、アミノ酸の pK_a は、アミノ酸側鎖のモデル値を使用して決定される(例えば、Nielsen (2001), Proteins 43(4):403-12参照のこと。タンパク質中のイオン化できる残基のプロトン化状態は、 pH 依存的に、タンパク質の1つまたは複数の活性(親和性、触媒活性、溶解度、電荷および安定性など)を変更できる。(Rostkowski et al. (2011), BMC Struct. Biol. 11:6)。このような残基の例示として、Asp、Glu、Lys、ArgおよびHisがある。

10

【0181】

特に、本明細書において提供される方法の目的上、低 pH 腫瘍微小環境において活性が変更されているタンパク質を同定するために、治療用分子のアミノ酸残基をヒスチジンに変化させてもよい。例えば、ヒスチジン側鎖は、 $pH 7.0$ と比較して $pH 6.0$ で抗体の pH 依存性親和性に関与していると同定されている(例えば、Raghavan et al. (1995) Biochemistry, 34:14649-14657参照のこと)。

【0182】

一部の例では、本明細書において提供される方法は、タンパク質が試験される前に、各突然変異型タンパク質の正体が推測的に公知であるように実施される。例えば、アドレス可能である本明細書において提供される方法は、突然変異誘発およびスクリーニングまたは試験方法の助けとなり得る。これは、二重比較アッセイ法において病変微小環境および正常な微小環境をシミュレートする結合アッセイ条件などの活性測定法条件間の比較の容易性を可能にし得る。例えば、位置指定突然変異誘発法を使用して、突然変異型タンパク質を個々に作製できる。突然変異誘発は、特定の標的位置での単一アミノ酸残基の1個ずつの置換によって実施でき、その結果、作製された個々の突然変異体は各々、各単一突然変異誘発反応の単一の生成物である。突然変異型DNA分子は、突然変異誘発によって設計、作製することができ、アドレス可能なアレイなどにおいて個々にクローニングでき、その結果、互いに物理的に分離され、各々が独立した突然変異誘発反応の単一の生成物である。最適化されている特定のタンパク質上の標的位置を置換するために選択されるアミノ酸は、残りの19種のアミノ酸のいずれかすべて、または選択されたアミノ酸のみを含有するより制限された群であり得る。本明細書において提供される一部の方法では、置換される各アミノ酸は、19種の残りのアミノ酸によって、または19種未満の残りのアミノ酸、例えば、10、11、12、13、14、15、16、17もしくは18種の残りのアミノ酸によって独立に置換される。

20

30

【0183】

突然変異型DNA分子の収集物に由来する突然変異型タンパク質分子などの修飾されたタンパク質は、アドレス可能なアレイなどのアレイに形式を合わせることによって、互いに、物理的に分離できる。したがって、複数の、突然変異型タンパク質分子などの修飾されたタンパク質分子を製造できる。例えば、本明細書において提供される方法において使用される修飾されたタンパク質は、標的位置に単一アミノ酸置換を含有し得る。本明細書において提供される方法は、本明細書に記載される1種または複数のアッセイ条件下で、各修飾されたタンパク質で実施できる。病変微小環境において優先的活性を示す単一突然変異を含有する修飾されたタンパク質が同定されると、単一アミノ酸突然変異の順列の一部またはすべて、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20以上の突然変異を含有する組合せ突然変異体を作製できる。

40

【0184】

50

(a) 修飾された治療用抗体

一部の例では、アッセイは、修飾された治療用抗体である修飾された治療用タンパク質を使用して実施される。本明細書において提供される方法において使用するための抗体は、通常、重鎖可変鎖および軽鎖可変鎖または抗原結合部位を形成するのに十分であるその一部を含有する。しかし、抗体はまた、定常重鎖（例えば、1つまたは複数の C_H ドメイン、例えば、 C_H1 、 C_H2 、 C_H3 および C_H4 、および/または定常軽鎖（ C_L ））のすべてまたは一部を含み得るということは理解される。したがって、抗体は、全長抗体であるものを含む場合も、また例えば、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、一本鎖 $Fvs(scFv)$ 、 Fv 、 $dsFv$ 、ダイアボディー、 Fd および Fd' 断片、 Fab 断片、 $scFv$ 断片および $scFab$ 断片を含めたその断片もしくは一部を含む場合もある。得られた修飾された抗体は、全長抗体または Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、一本鎖 $Fvs(scFv)$ 、 Fv 、 $dsFv$ 、ダイアボディー、 Fd および Fd' 断片、 Fab 断片、 $scFv$ 断片および $scFab$ 断片などのその断片として製造され得るということは理解される。さらに、任意のアイソタイプの定常領域を、全長または IgG 、 IgM 、 IgA 、 IgD および IgE 定常領域を含めた部分抗体断片の作製において使用できる。このような定常領域は、任意のヒトまたは動物種から得ることができる。活性および結合親和性は、抗体の構造に応じて異なり得るということは理解される。例えば、一般に、二価抗体、例えば、二価 $F(ab')_2$ 断片または全長 IgG は、一価 Fab 抗体よりも良好な結合親和性を有する。結果として、 Fab が、特定の標的に対して指定の結合親和性を有する場合には、結合親和性は、二価である全長 IgG に対してさらに大きいことが予想される。したがって、抗体間の結合親和性の比較は、通常、同一構造を有する抗体間、例えば、 Fab と比較される Fab で行われる。

【0185】

本明細書において提供される方法において、抗体変異体を、作製し、スクリーニングできる。特に、既存の抗体癌治療薬の変異体、例えば、抗EGFR抗体の突然変異体、例えば、アービタックス(*Erbitrux*)の突然変異体を作製できる。一部の例では、本方法は、抗体中の任意の位置に位置する1つまたは複数のアミノ酸修飾を含有する修飾された抗体を用いて実施される。本明細書において提供される方法の一部の例では、修飾は、抗体の重鎖可変鎖および/または軽鎖可変鎖中で行われる。

【0186】

通常、アミノ酸突然変異は、 CDR の1つまたは複数において抗体中に導入する。例えば、アミノ酸突然変異は、重鎖および/または軽鎖可変領域の $CDR1$ 、 $CDR2$ および/または $CDR3$ 領域をコードする配列内に導入できる。一部の例では、突然変異は、抗体のフレームワーク領域(FR)において、特に、抗原との接触に関与していると分かっている FR 残基において行うことができる。当業者ならば、 CDR および FR を承知しており、カバット(*Kabat*)またはコチア(*Chothia*)番号付けに基づいて同定できる（例えば、*Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, and Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917*参照のこと）。例えば、カバット番号付けに基づいて、 $CDR-L1$ は、残基 $L24 \sim L34$ に対応し、 $CDR-L2$ は、残基 $L50 \sim L56$ に対応し、 $CDR-L3$ は、残基 $L89 \sim L97$ に対応し、 $CDR-H1$ は、長さに応じて残基 $H31 \sim H35$ 、 $35a$ または $35b$ に対応し、 $CDR-H2$ は、残基 $H50 \sim H65$ に対応し、 $CDR-H3$ は、残基 $H95 \sim H102$ に対応する。例えば、カバット番号付けに基づいて、 $FR-L1$ は、残基 $L1 \sim L23$ に対応し、 $FR-L2$ は、残基 $L35 \sim L49$ に対応し、 $FR-L3$ は、残基 $L57 \sim L88$ に対応し、 $FR-L4$ は、残基 $L98 \sim L109$ に対応し、 $FR-H1$ は、残基 $H1 \sim H30$ に対応し、 $FR-H2$ は、残基 $H36 \sim H49$ に対応し、 $FR-H3$ は、残基 $H66 \sim H94$ に対応し、 $FR-H4$ は、残基 $H103 \sim H113$ に対応する。

【0187】

10

20

30

40

50

突然変異を含有する抗体ライブラリーを作製する方法は、当業者に周知であり、例えば、鑄型として公知の抗体を使用し、エラープローンPCRを使用してインビトロで突然変異を無作為に導入すること（Zhou et al., (1991) *Nucleic Acids Research* 19(21):6052 ; およびUS 2004 / 0110294）、1つまたは複数のCDRまたはFRを無作為に突然変異すること（例えば、WO 96 / 07754 ; Barbas et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:3809-3813; Cumbers et al. (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20:1129-1134; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.*, 226:889-896; Jackson et al., (1995) *J. Immunol.*, 154:3310-3319; Wu et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 6037-6042; McCall et al. (1999) *Molecular Immunology*, 36:433-445参照のこと）、オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発（Rosok et al., (1998) *The Journal of Immunology*, 160:2353 -2359）、コドンカセット突然変異誘発（Kegler-Ebo et al., (1994) *Nucleic Acids Research*, 22(9):1593-1599）、2工程PCRおよびオーバーラップPCRを含めた縮重プライマーPCR（米国特許第5,545,142号、同6,248,516号および同7,189,841号; Higuchi et al., (1988) *Nucleic Acids Research* 16(15):7351-7367; およびDubreuil et al., (2005) *The Journal of Biological Chemistry* 280(26):24880-24887）、Marks et al., *Biotechnology*, 10: 779-783(1992)に記載されるような、未免疫のドナーから得られた天然に存在するVドメイン変異体のレパートリーを用いて、ファージディスプレイによって選択されたV_HまたはV_Lドメインを組換えることによるドメインシャッフリングおよび数ラウンドの鎖リシャッフリングにおいて高親和性についてスクリーニングすることを含む。例えば、上記で論じられるように、CDRまたはFR中の残基の突然変異誘発は、アドレス可能な形式で1個ずつ行うことができ、それによって、本明細書における二重アッセイ法において容易にスクリーニングされ得る個々の突然変異体を作製できる。

【0188】

i. 修飾された抗EGFR治療薬

本明細書において提供される方法の一部の例では、本明細書における方法において使用するための修飾されている治療用タンパク質は、上皮成長因子受容体（EGFR）のすべてまたは一部と相互作用するものである。したがって、例えば、本明細書における方法における突然変異誘発およびスクリーニングのための治療用タンパク質は、EGFRの細胞外ドメイン、EGFRの細胞質ドメインと、またはEGFRの内部チロシンキナーゼドメインと相互作用するものである。一部の例では、非修飾治療用タンパク質は、EGFR媒介性シグナル変換を阻害するものである。例えば、タンパク質のEGFRとの相互作用は、EGFRが、例えば、EGF、TGF- α 、アンフィレギュリン、ヘパリン結合性EGF（HB-EGF）およびベータセルリンを含めたEGFRの1つまたは複数のリガンドと相互作用するのを妨げ得る。特定の例では、EGFRに対する治療用タンパク質は、EGFRがEGFおよび/またはTGF- α と相互作用するのを妨げる。治療用タンパク質は、EGFRと相互作用し、その他のEGFR受容体サブユニットとのEGFR二量体化（すなわち、EGFRホモ二量体）またはその他の増殖因子受容体（例えば、HER2）とのヘテロ二量体化を阻害し得る。

【0189】

一部の例では、EGFRと相互作用するタンパク質は、抗EGFR抗体である。抗EGFR抗体は、ヒト化抗EGFR抗体であり得る。したがって、本明細書において提供される方法において使用するための、本明細書において提供された抗体変異体などの修飾されたタンパク質の例示として、修飾された抗EGFR抗体がある。突然変異誘発に付され、本明細書において提供される方法において使用され得る抗EGFR抗体の例として、Zhu（WO 2005 / 090407）によって11F8と表される抗体、EMD 72000（マツズマブ）、ベクティビックス（商標）（パニツムマブ；ABX-EGF）、TheracIM（ニモツズマブ）およびHu-Max-EGFR（ザルツムマブ）および本明細書に記載される任意の抗EGFR抗体が挙げられる。特に、抗EGFR抗体アービタックス（登録商標）の変異体が、正常環境よりも腫瘍微小環境においてより活性である条件的

活性タンパク質のために、本明細書における方法におけるスクリーニングに提供される。

【0190】

抗EGFR抗体、ならびに小分子は、正常および腫瘍両細胞上のEGF受容体と特異的に結合し、上皮成長因子(EGF)のそのコグネイト受容体との結合を競合的に阻害できる。遮断によって、受容体リン酸化および受容体関連キナーゼ活性の活性化、細胞死につながる受容体媒介性細胞シグナル伝達を最終的にとめることを防ぐことができる。具体的に言えば、抗EGFR抗体アービタックス(登録商標)(セツキシマブまたはC225)(配列番号1および2)は、結腸直腸癌腫および扁平上皮癌の治療のために使用されるEGFRに対するキメラ抗体である。アービタックス(登録商標)は、EGFRの細胞外ドメインと結合し、リガンド結合を遮断できるヒト-マウスキメラモノクローナルEGFR 10
アンタゴニスト抗体である。EGFRとのアービタックス(登録商標)結合は、二量体化を阻害し、最終的に、腫瘍増殖および転移を阻害する(Blick et al., (2007) *Drugs* 67(17):2585-2607)。アービタックス(登録商標)はまた、血管新生の阻害によって抗腫瘍効果を誘導し得る。アービタックス(登録商標)は、高転移性ヒトTCC 253JB-V細胞においてVEGF、IL-8およびbFGFの発現を用量依存的に阻害し、微小血管密度を低下させる(Perrotte et al. (1999), *Clin. Cancer Res.*, 5:257-264)。アービタックス(登録商標)は、インビトロおよびインビボで、腫瘍細胞においてVEGF発現を下方制御できる(Petit et al. (1997), *Am. J. Pathol.*, 151:1523-1530; Prewett et al. (1998), *Clin. Cancer Res.* 4:2957-2966)。

【0191】

米国では、アービタックス(登録商標)は、世界で癌死の第6の主な原因である頭頸部の扁平上皮癌(SCCHN)を治療するために単独かまたは放射線療法と組み合わせて使用するために承認されている。SCCHNの患者のおよそ40%が、転移性疾患を示し、ある研究では、5年生存率は、ステージI疾患については91%、ステージIIについては77%、ステージIIIについては61%、ステージIVaについては32%、ステージIVbについては25%、ステージIVc疾患については4%未満であった(Lefebvre (2005) *Ann. Oncol.* 16(Suppl 6):vi7-vi12)。イリノテカンと組み合わせたセツキシマブは、イリノテカンベースとする治療に対して抵抗性であるEGFR発現性腫瘍を有する患者において、転移性結腸直腸癌(mCRC)を治療するために承認されている(Blick et al., (2007) *Drugs* 67(17):2585-2607)。

【0192】

抗体アービタックス(登録商標)などの抗EGFR剤は、皮膚毒性および消化妨害(悪心、嘔吐、下痢を含めた)などの重大な、特徴的な有害事象を伴い、これが投薬の中断および治療の中止につながることが多い。アービタックスは、皮膚EGFRリガンドが未分化ケラチノサイト上の受容体と結合するのを妨げ、未分化細胞の蓄積および表皮を補充するための成熟細胞の欠如につながり得る。これは、ざ瘡様皮膚発疹をもたらし得る(Eng C (2009) *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6:207-18)。副作用の結果として、患者の76%が投薬中断、60%が用量低減、32%が用量中止を伴う。アービタックス(登録商標)のその他のあり得る副作用として、深静脈および動脈血栓症、ざ瘡、呼吸困難、疲労、腹痛、無力症および心房細動が挙げられる(Fakih and Vincent, (2010) *Curr. Oncol.* 17(S1): S18-S30)。一部の例では、副作用が、患者がセツキシマブを用いるさらなる治療を受けるのを妨げることもある。したがって、最小化されたかまたは限定された全身性副作用しか示さないが、腫瘍微小環境内でその標的結合の活性を保持する治療用タンパク質などの治療用分子が必要である。

【0193】

抗EGFR抗体の抗体変異体は、病変および正常微小環境をシミュレートするために実施される二重アッセイなどの本明細書に提供されたアッセイにおいて作製し、スクリーニングできる。抗EGFR抗体アービタックス(登録商標)の可変重鎖および軽鎖において単一アミノ酸置換を含有する抗EGFR抗体の抗体変異体の収集物が本明細書において提供される(例えば、実施例8および図1参照のこと)。特に、EGFRとの接触と関連し 50

ている、CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2およびCDRH3中およびフレームワーク残基中の100個の残基の各々は、最大19種のその他のアミノ酸、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18または19種のアミノ酸、特に、少なくともまたは約少なくとも15種のその他のアミノ酸残基で独立に置換され得る。抗EGFR抗体アービタックスでは、CDR-H1は、配列番号2のアミノ酸26～35または31～35に対応し、CDR-H2は、配列番号2のアミノ酸50～65に対応し、CDR-H3は、配列番号2のアミノ酸98～108に対応し、CDR-L1は、配列番号1のアミノ酸24～34に対応し、CDR-L2は、配列番号1のアミノ酸50～56に対応し、CDR-L3は、配列番号1のアミノ酸89～97に対応する。修飾のために選択されるアミノ酸として、配列番号2の重鎖残基23～37、50～77、93～94および96～112および配列番号1の軽鎖残基1～5、24～34、48～56、86～87および89～100が挙げられる(図1参照のこと)。変異型抗EGFR抗体の収集物では、親アービタックス抗体中にヒスチジンが存在する位置を除く収集物中のすべての位置が、ヒスチジンへのアミノ酸置換を含有し得る。抗EGFR抗体の収集物は、アドレス可能なアレイ中で提供され得る。

10

【0194】

抗EGFR抗体の抗体変異体、例えば、変異型アービタックス抗体は、癌の治療のために、改善された変異型抗EGFR類似体を同定するために、本明細書における二重アッセイにおいて作製し、スクリーニングできる。例えば、本明細書において提供される方法を使用して、抗EGFR変異型抗体、例えば、変異型アービタックス抗体を試験し、pHが低下し、乳酸濃度が上昇している腫瘍微小環境内でEGFRと結合するが、正常生理学的pHでは結合しない変異体(単数または複数)を同定できる。

20

【0195】

2. 条件的活性についての、2種の異なる生理学的条件下での活性のスクリーニングまたは試験

本明細書において提供される方法では、上記のいずれかなどの1種または複数の分子の活性、例えば、病変微小環境および非病変微小環境の正常生理学的条件などの2つの異なる生理学的環境における条件(単数または複数)をシミュレートする2つの異なる条件セット下でスクリーニングまたは試験される。通常、条件は、インビトロでシミュレートまたは再現され得る条件である。条件セットは、疾病と関連している微小環境をシミュレートする1つまたは複数の条件を含み得る。疾患は、細胞内および細胞外ホメオスタシスを変更し得る。例えば、病変微小環境は、腫瘍微小環境または癌微小環境における1つまたは複数の条件をシミュレートし得る。通常、2つの条件セット下での活性の相違(単数または複数)は、分子の条件的活性をもたらし得る。したがって、第2の条件セット(例えば、正常または非病変環境における条件をシミュレートする)と比較して、第1の条件セット(例えば、腫瘍微小環境における条件をシミュレートする)下でより大きな活性を示す分子が、条件的活性である候補分子として同定される。

30

【0196】

2つの条件セットは、それだけには限らないが、化学的條件、生物学的条件または物理的條件を含めて本明細書に記載されたものまたは当業者に公知のものなどの2つの生理学的環境において異なる1つまたは複数のパラメータによって異なるよう選択され得る。2つの条件セット間で異なり得るパラメータとして、圧力、温度、pH、イオン強度、濁度、光(UV、赤外光または可視光を含めた)に対する曝露、1種または複数の電解質などの溶質の濃度、乳酸の濃度、O₂の濃度および酸化体または還元体の存在の中から選択される1種または複数の条件が挙げられ得る。校正溶液中の電解質およびバッファー系を変化させることによって、pH、緩衝能、イオン環境、温度、グルコース濃度およびイオン強度などの生理的條件をシミュレートされる生物学的環境のものに調整することができる。正常な生理学的環境をシミュレートする条件セットは、腫瘍微小環境などの病変微小環境をシミュレートする条件セットとは、本明細書に記載された1つまたは複数の条件によ

40

50

って異なるよう選択され得る。

【0197】

例えば、以下に論じられるように、腫瘍微小環境の、それだけには限らないが、酸素濃度、圧力、補助因子の存在、pH、乳酸濃度およびビルビン酸濃度を含めた種々のパラメータが、非腫瘍微小環境と比較して異なる。これらのパラメータのいずれも、非腫瘍または正常環境において存在する条件と比較して、腫瘍または癌環境において存在する1つまたは複数の条件をシミュレートするためにインビトロで再現され得る。シミュレートされ得る正常な生理学的条件として、消化管、皮膚、脈管構造、血液および細胞外マトリックスなどの身体の任意の位置での健常または非病変組織において見られる環境が挙げられる。

10

【0198】

通常、本明細書におけるアッセイでは、生理学的条件が、タンパク質の活性を評価するために使用されるバッファの選択によってインビトロでシミュレートされ得る。例えば、病変微小環境（腫瘍微小環境など）および非病変環境の任意の1つまたは複数の条件が、アッセイにおいて活性を評価するために使用されるアッセイバッファにおける相違によってシミュレートされ得る。したがって、条件的活性タンパク質を同定するための本明細書における方法では、アッセイバッファの成分（単数または複数）または特徴（単数または複数）が、第1の条件下で活性を試験するための第1のアッセイにおいておよび第2の条件下で活性を試験するための第2のアッセイにおいて異なるよう変更されているかまたは製造されている。例えば、本明細書において論じられるように、腫瘍微小環境の、それだけには限らないが、酸素、圧力、補助因子の存在、pH、乳酸濃度（増大したかまたは低減した乳酸濃度など）およびビルビン酸濃度（増大したかまたは低減したビルビン酸濃度を含めた）を含めた種々のパラメータは、非腫瘍環境と比較して異なる。これらの条件の任意の1つまたは複数は、特定のアッセイバッファの選択によってインビトロでシミュレートされ得る。

20

【0199】

病変微小環境をシミュレートするアッセイバッファの組成は、病変微小環境において変更されていると公知であるかまたは本明細書に記載される1つまたは複数の条件を除いて、正常環境をシミュレートするアッセイバッファの組成と同一であるよう選択され得る。さらに、2つの異なる条件セット下での1種または複数の試験分子の活性のスクリーニングまたは同定では、一般に、アッセイにおいて変化している唯一の条件は、インビトロ微小環境をシミュレートするバッファ条件に関する。時間、温度およびインキュベーション条件などのアッセイのその他の条件は、両条件セットについて同一であり得る。

30

【0200】

通常、病変微小環境をシミュレートする条件および正常微小環境をシミュレートする条件のセットでは同一基本バッファが使用されるが、バッファ組成の設計は、pH、酸素、圧力、補助因子の存在、pH、乳酸濃度（増大したかまたは低減した乳酸濃度など）および/またはビルビン酸濃度（増大したかまたは低減したビルビン酸濃度を含めた）などの1種または複数のパラメータにおいて異なるよう行われ得る。病変微小環境をシミュレートする条件および正常微小環境をシミュレートする条件において、TAPS（（N-トリス[ヒドロキシメチル]メチル-3-アミノプロパンスルホン酸））、トリス（トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミン）、トリシン（N-トリス（ヒドロキシメチル）メチルグリシン）、TAPSO（3-[N-トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸、HEPES（4-2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジンエタンスルホン酸）、TES（2-（[トリス（ヒドロキシメチル）メチル]アミノ）エタンスルホン酸）、MOPS（3-（N-モルホリノ）プロパンスルホン酸）、PIPES（ピペラジン-N,N'-ビス（2-エタンスルホン酸））、カコジル酸（ジメチルアルシン酸）、SSC（クエン酸ナトリウム生理食塩水）、MES（2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸）およびグッドバッファ（MES、ADA、PIPES、ACES、コラミン塩酸、BES、TES、HEPES、アセトアミドグリシン、トリセン（

40

50

Tricene)、グリシンアミドおよびピシン(Bicine)(N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン)のいずれかを含めた、使用できる当業者に公知の任意の塩基バッファー。

【0201】

当業者ならば、バッファー pK_a 、溶解度、膜不透過性、最小の塩効果、バッファー解離に対する培地のバッファー濃度、温度およびイオン組成の最小の影響、安定性、低い光学的吸収(例えば、Good et al., (1966) Biochemistry 5(2):467-477参照のこと)などの適当な因子を考慮することによって適当なバッファーを選択できる。使用されるバッファーの選択は、シミュレートされている特定のパラメータ(単数または複数)に応じて当業者によって経験的に決定され得る。アッセイにおいて使用できるバッファーとして、pH 範囲に対して適当な緩衝能を有する任意のバッファーが挙げられる。通常、イオン強度またはバッファーの濃度が高いほど、緩衝能が高い。一般に、バッファーは、生理学的環境を反映するよう選択される。生理学的バッファーの例示として、それだけには限らないが、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、ハanks緩衝塩溶液(HBSS)、リンガーまたはクレブスが挙げられる。

10

【0202】

さらに、本明細書に記載された任意の条件において、生理学的環境をシミュレートするためにヒト血清が、生理的条件をシミュレートする濃度、例えば、1~40%のヒト血清、一部の例では、5~30%のヒト血清、一部の例では、5%、10%、15%、20%、25%または30%のヒト血清で添加され得る。

20

【0203】

a. 腫瘍微小環境

アッセイにおける条件セットは、非腫瘍環境または正常生理学的条件と比較して、例えば、腫瘍微小環境内の細胞外および/または細胞内条件(腫瘍微小環境内の細胞外マトリックスにおいて見られる条件など)をシミュレートするよう選択され得る。一部の例では、アッセイにおいて使用される条件セットは、腫瘍に関連しているか、または腫瘍に特有である条件の存在などによって腫瘍微小環境の条件をシミュレートする。例えば、癌は、pHの変更および酸化能の増大、血管新生の変更、低酸素、細胞外および細胞pH、間質液圧(IFP)の上昇、酸素レベル、圧力、乳酸濃度およびビルビン酸濃度ならびに補助因子の誘導(以下の表4参照のこと)を含めた多数のバイオマーカーと関連している(Auri et al. (2009), Adv. Drug. Deliv. Rev. 61(11):940-952; Gerweck and Seetharaman (1996), Cancer Res. 56(6):1194-1198; Cook et al. (2004), Semin. Radiat. Oncol. 14(3):259-266; Schafer and Buettner (2001); Free Radic. Biol. Med. 30(11):1191-1212)。アッセイでは、これらの条件のいずれか1種または複数が、シミュレートされ得る。

30

【0204】

【表 4】

表4.疾患微小環境	
微小環境	原因および結果
血管新生	● 正常組織の pH は、高く調節され、良好に維持される(7.3~7.4)
pHの変更	● 腫瘍組織における細胞外 pH は、酸性約 5.6~7.2 である
間質液圧 (IFP)	● 細胞内 pH は、約 7.4 に積極的に維持される
低酸素	● 正常 O ₂ レベルは、80mmHg(毛細血管の静脈(venus)の末端)である
補助因子 (疾患関連)	● 高解糖性腫瘍は、酸性腫瘍 ECM(ワールブルグ効果)をもたらす
代謝欠陥	● LDH および H ⁺ イオンは、ECM 中に活発に輸送される
	● 無秩序な血管(vascular)が、低酸素微小領域(micro-gegens)を引き起こす
	● 低酸素(Hypoxia)が、毛細血管漏出および非効率的な O ₂ 拡散を引き起こす
	● 血管(vasculal)漏出による IFP の増大が、低酸素状態を引き起こす
	● 毛細血管漏出および ECM の収縮性特徴の喪失による IFP
	● 炎症が、酸性 pH(約 6.5~7.2)をもたらす
	● 抵抗性アポトーシス性シグナルを有する細胞の選択
	● 薬物抵抗性、放射線抵抗性および転移を誘導する(O ₂ が放射線増感剤である)
	● コラゲナーゼ、uPA、カテプシン、VEGF、EGF、TNF α 、IL-2、LOX の上方制御(Upregulation)
	● ECM 分解および転移
	● アスパラギンシンターゼ欠乏症

10

20

【 0 2 0 5 】

(1) pH

腫瘍微小環境をシミュレートするための条件セットの一部の例では、1種または複数のバッファの pH が、腫瘍の微小環境をシミュレートするよう調整される。変更された pH 微小環境は、腫瘍微小環境などの病状において見られる最も一般的な微小環境であり、低酸素などのその他の特性と比較して、疾患微小環境内で最も不変である（例えば、Fogh Andersen et al. (1995) Clin. Chem., 41:1522-1525; Bhujwalla et al. (2002) NMR Biomed., 15:114-119; Helmlinger et al. (1997) Nature Med., 3:177; Gerweck and Sentharaman (1996), Cancer Res. 56(6):1194-1198参照のこと）。例えば、多数の腫瘍では、「ワールブルグ効果」が、5.6~6.8 の範囲の pH を有する微小環境を作り出す。本明細書に記載された条件は、正常な生理学的 pH 環境と比較して、低い pH 細胞外微小環境 (ECM) をシミュレートする条件を含む。したがって、活性を低 pH をシミュレートする条件下で、また正常な生理学的 pH (例えば、中性 pH) をシミュレートする条件下で測定するアッセイを使用して、腫瘍微小環境において条件的に活性である生物学的有効性を有する分子を同定できる。

30

40

【 0 2 0 6 】

例えば、正常な微小環境条件の pH は、生理学的条件下で存在する任意の pH、例えば、約 7.0~約 7.8 の任意の pH、例えば、少なくとも pH 7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7 もしくは 7.8 または約 pH 7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7 もしくは 7.8 または pH 7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7 もしくは 7.8 (例えば、米国特許第 7 7 8 1 4 0 5 号を参照のこと)、一部の例では、pH 7.4 であり得る。

【 0 2 0 7 】

50

腫瘍微小環境のpHは、正常微小環境からより酸性であるpH、例えば、約5.6～6.8の任意のpH、例えば、pH5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7もしくは6.8未満または約pH5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7または6.8未満またはpH5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7または6.8未満を有するよう選択される。したがって、正常微小環境をシミュレートする条件セットのpHは、腫瘍条件よりも塩基性であり得る。当業者に公知の、または本明細書に記載された任意のバッファを、所望のpHに調整できる。

【0208】

一部の例では、腫瘍のpH環境は、アッセイに使用されるバッファのpHを変更することによってアッセイにおいてシミュレートされる。pHおよび緩衝能は、アッセイ条件の関数であり、当業者によって経験的に決定または選択され得る。当業者に公知の、または本明細書に記載された任意のバッファを、所望のpHに調整し、本明細書に記載されたアッセイにおいて使用できる。当業者ならば、HClなどの酸またはNaOHなどの塩基を添加することによってバッファのpHを調整できる。通常、バッファは、アッセイ条件の温度を平衡化でき、バッファのpHは、使用前に必要な応じて、確認され、調整される。

【0209】

例えば、クレブス - リンガー重炭酸バッファ (KRB) などの生理学的バッファは、5.6～6.8の間またはほぼ5.6～6.8の間、例えば、6.0～6.5、例えば、6.0または約6.0である低pHに調整され得る。一部の例では、生理学的バッファ、例えば、KRBは、7.4または約7.4であるpHに調整され得る。KRBバッファは、確立された細胞株およびヒト一次細胞の構造的完全性を維持し得る平衡塩溶液である。さらに、重炭酸緩衝システムは、哺乳類血液のpHを維持するために使用され、粘膜保護および管腔緩衝関与している主要な緩衝システムの1つである (Kaunitz and Akiba (2006), Ailment Pharmacol. Ther. 24(S4):169-176)。したがって、KRBバッファとは、身体内に見られる条件をシミュレートできる生理学的バッファである。表5は、PBSと比較されるような、クレブス - リンガー重炭酸バッファのバッファ成分を示す。バッファは、1N HClを用いて最終pHに調整され得る。

【0210】

【表5】

表5.KRBバッファおよび1×PBSの1リットルあたりの成分				
化学物質	KRB			PBS
	MW	量	濃度	1X
D-グルコース	180.16	1.8 g	10 mM	
MgCl ₂	95.21	0.0468 g	0.5 mM	
KCl	74.55	0.34 g	4.5 mM	2.7 mM
NaCl	58.44	7 g	120 mM	137 mM
Na ₂ HPO ₄ (二塩基性)	141.96	0.1 g	0.7 mM	10 mM
NaH ₂ PO ₄ (一塩基性)	199.98	0.18 g	1.5 mM	
NaHCO ₃	84.01	1.26 g	15 mM	
KH ₂ PO ₄				1.76 mM

【0211】

(2) 乳酸濃度

正常環境および腫瘍環境などの病変環境間で異なり得る条件として、乳酸の濃度を挙げ

10

20

30

40

50

ることができる。乳酸は、肝臓の糖新生基質であることに加え (Gladden, (2008), Med. Sci. Sports Exerc. 40(3):477-485)、創傷修復、再生、有酸素代謝を含めた多数の生化学的プロセスにおける重要な中間体である (Gladden (2004), J. Physiol. 558(Pt 1):5-30)。当業者ならば、身体中の健常組織における乳酸の産生および維持の機序について (例えば、Brooks (2010) J. Appl. Physiol. 108(6):1450-1451参照のこと)、また健常および病変両組織における例示的乳酸濃度について (例えば、Soliman and Vincent (2010), Acta Clin. Belg. 65(3):176-181; Friedman et al. (1995), Crit. Care. Med 23(7):1184-1193; Myburgh et al. (2001), Med. Sci. Sports Exer. 33(1):152-156) 精通している。

【0212】

多数の腫瘍では、「ワールブルグ効果」が、10 ~ 15 mMの間の乳酸濃度を有する微小環境を作り出す。乳酸レベルの上昇は、それだけには限らないが、頭頸部、転移性結腸直腸癌、子宮頸癌および扁平上皮癌を含めた種々の腫瘍と関連して見られている (例えば、Correlation of High Lactate Levels in Head and Neck Tumors with Incidence of Metastasis. Stefan Walenta, Ahmad Salameh, Heidi Lyng, Jan F. Evensen, Margarethe Mitze, Einar K. Rofstad, and Wolfgang Mueller-Klieser. (1997) American Journal of Pathology 150(2): 409-415; Correlation of High Lactate Levels in Human Cervical Cancer with Incidence of Metastasis. Georg Schwickert, Stefan Walenta, Kolbein Suiulfor. Einar K. Rofstad, and Wolfgang Mueller-Klieser. (1995) Cancer Research 55: 4757-4759; High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases, Tumor Recurrence, and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers. Stefan Walenta, Michael Wetterling, Michael Lehrke, Georg Schwickert, Kolbein Sundfor, Einar K. Rofstad, and Wolfgang Mueller-Klieser. (2000) Cancer Research 60: 916-921; In vitro Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Lactate and Choline Measurements, 18F-FDG Uptake, and Prognosis in Patients with Lung Adenocarcinoma. JianFei Guo, Kotaro Higashi, Hajime Yokota, Yosinobu Nagao, Yoshimichi Ueda, Yuko Kodama, Manabu Oguchi, Suzuka Taki, Hisao Tonami, and Itaru Yamamoto. (2004) J Nucl Med 45: 1334-1339; Lactate and malignant tumors: A therapeutic target at the end stage of glycolysis. Saroj P. Mathupala, Chaim B. Colen, Prahlad Parajuli, Andrew E. Sloan (2007) J Bioenerg Biomembr 39: 73-77; Lactate Metabolism in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. Christopher P. Holroyde, Rita S. Axelrod, Charles L. Skutches, Agnes C. Haff, Pavle Paul, and George A. Reichard. (1979) Cancer Research 39: 4900-4904; Lactate, not pyruvate, is neuronal aerobic glycolysis end product: an in vitro electrophysiological study. A Schurr and R.S. Payne. (2007) Neuroscience 147: 613-619; Tumor Lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. Verena Quennet, Ala Yarominab, Daniel Zipsb, Andrea Rosnerb, Stefan Walentaa, Michael Baumannb, Wolfgang Mueller-Kliesera. (2006) Radiotherapy and Oncology 81: 130-135 参照のこと)。

【0213】

腫瘍微小環境をシミュレートする本明細書に記載された条件セットは、1種または複数のバッファーにおいて増大したレベルの乳酸を含み得る。腫瘍の乳酸濃度は、1種または複数のバッファーにおいて乳酸の濃度を調整することによって、アッセイにおいてシミュレートされ得る。例えば、アッセイは、5 mM ~ 20 mMの間の乳酸またはほぼ5 mM ~ 20 mMの間の乳酸、例えば、15 mM ~ 18 mMなどの10 mM ~ 20 mMの乳酸、特に、少なくとも16 mM、16.5 mMもしくは17 mMの乳酸または少なくとも約16 mM、16.5 mMもしくは17 mMの乳酸または16 mM、16.5 mMもしくは17 mMの乳酸を含有し得る1種または複数のバッファーを使用して実施され得る。一部の例では、本明細書において提供されるアッセイにおいて使用するための正常環境をシミュレートする1種または複数のバッファーの乳酸濃度は、0.5 ~ 5 mMの間の乳酸またはほ

10

20

30

40

50

ば 0.5 ~ 5 mM の間の乳酸、例えば、0.2 mM ~ 4 mM の乳酸など、例えば、0.5、1、2、3、4 もしくは 5 mM の乳酸であるよう調整される。

【0214】

(3) 低酸素

正常環境および腫瘍環境などの病変環境間で異なり得る条件セットの別の例として、低酸素を挙げることができる。低酸素、酸素の入手可能性の低下は、ほとんどの固形腫瘍の特徴であり、乳癌 (Favaro et al., *Genome Med.* (2011), 3(8):55) を含めたいくつかの癌の種類において、化学療法抵抗性、放射線抵抗性、血管新生、脈管形成、侵襲性、転移、細胞死に対する抵抗性、代謝の変更およびゲノム不安定性への貢献のために予後不良と関連している (Wilson and Hay (2011), *Nat. Rev. Cancer* 11(6):393-410)。低酸素および予後不良間の相関に關与している因子は、転写因子低酸素誘導因子 (HIF) であり、これは、低酸素に応じて活性化され、細胞増殖および生存、pH および遊走、細胞不死化および脱分化、幹細胞維持、遺伝的不安定性、グルコース取り込みおよび代謝、自己分泌増殖 / 生存、血管新生、浸潤 / 転移および化学療法に対する抵抗性を調節する遺伝子を活性化し得る (Semenza (2009), *Curr. Pharm. Des.* 15(33):3839-3843; Patiar and Harris (2006), *Endocr. Relat Cancer* S1:S61-75)。低酸素は、攻撃性および遠隔転移の増大と関連しており (Hashimoto et al., (2011) *Pathobiology*, 78(4):181-192)、腫瘍において抵抗性および血管新生を促進する (Facciabene et al. (2011), *Nature* 475(7355):226-230)。腫瘍低酸素は、不適切な血液供給および混乱した腫瘍脈管構造および酸素の送達の障害に起因し得る (Carroll and Ashcroft (2005), *Expert. Rev. Mol. Med.* 7(6):1-16)。

【0215】

低酸素条件は、バッファ脱気を含めた当業者に公知の任意の方法によってアッセイにおいてシミュレートされ得る。例えば、使用前に、不活性ガスをバッファに通してバブリングさせてもよい (例えば、Nayler et al., (1979), 11(10):1053-1071 参照のこと)。低酸素条件は、 $N_2 : CO_2$ (19 : 1 vol / vol) の混合物を用いてバッファをバブリングさせることによってシミュレートされ得る (Martou et al., (2006) *J. Appl. Physiol.* 101(5):1335-1342)。さらに、低酸素条件は、大気酸素より低い酸素 (O_2) 濃度、例えば、21% 未満の O_2 を有する雰囲気中で反応を実施することによって (McCord et al. (2009), *Mol. Cancer Res.* 7:489-497) または 21% 未満の O_2 を有する空気を反応物中にバブリングすることによって、アッセイの間、維持され得る。低酸素条件は、酸素濃度が、大気曝露からの酸素の平衡濃度未満である任意の条件を含み、例えば、0 ~ 10% の酸素、例えば、0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10% または 15% の酸素を含めた 0 ~ 20% の酸素を含み得る。

【0216】

さらに、正常微小環境をシミュレートする条件は、通常、生理学的条件下で見られる O_2 濃度に対応する O_2 濃度を含み得る。例えば、健常な環境をシミュレートする条件下で実施されるアッセイは、空気 (およそ 21% の気相酸素) に曝露されている反応において実施され得る。これらの条件下で、細胞は、200 μM 以下の溶存酸素濃度に曝露され得る。しかし、細胞は、200 μM を上回るかまたは下回る酸素濃度、例えば、40 μM ~ 400 μM などで増殖し得る。したがって、正常微小環境をシミュレートする条件は、40 μM ~ 400 μM の間またはほぼ 40 μM ~ 400 μM の間、一部の例では、40 μM ~ 200 μM 、一部の例では、40 μM ~ 140 μM の範囲内の酸素濃度を含み得る。必要に応じて、溶存酸素濃度は、大気または空気 / 酸素混合物のいずれかを用いて通気することによって増大できる (例えば、Oller et al. (1989), *J. Cell Sci.* 94:43-49 参照のこと)。

【0217】

3. 条件的に活性である修飾されたタンパク質の検出および同定

本方法では、条件 (単数または複数) を選択した後、治療用タンパク質または修飾された治療用タンパク質、例えば、修飾された抗 EGF R 抗体などの試験分子が、第 1 の条件

および第2の条件下での活性について評価される。分子またはタンパク質の活性を評価するための種々のアッセイは、当業者に公知であり、特定の分子またはタンパク質に応じて変わる。例えば、アッセイは、結合アッセイまたは機能アッセイを含む。例示的アッセイは、以下の節Cに記載されている。例えば、抗EGFR抗体の活性を評価するために、EGFRとの結合が評価され得る。

【0218】

次いで、各条件下で得られた活性を比較する。通常、腫瘍環境において存在するなどの病変条件をシミュレートするかまたは再現する条件である第1の条件セット下でより大きな活性を示す分子またはタンパク質が同定され、選択される。例えば、腫瘍微小環境をシミュレートする条件下での活性（例えば、結合活性）を、非腫瘍または正常な生理学的環境をシミュレートする条件下での同一活性（例えば、結合活性）と比較する。比較のために、活性は、第1の条件セット（例えば、非病変正常微小環境の条件）下と比較した、第2の条件（例えば、疾患微小環境の条件）下での活性の割合として表され得る。例えば、第1および第2の条件間で異なるパラメータが、pHである場合には、活性は、酸性pH対より中性のpHで観察される活性の割合、例えば、pH6.0/7.4での活性の割合として表され得る。1より大きい割合を示し、その結果、分子が、病変または腫瘍微小環境においてより大きな活性を示す、治療用タンパク質または修飾された治療用タンパク質、例えば、抗体または変異型抗体、例えば、修飾された抗EGFR抗体などの試験分子が同定され、選択される。例えば、割合は、1.5~100の間またはほぼ1.5~100の間、例えば、2~50、例えば、5~30以上である。したがって、本方法では、条件的に活性であるタンパク質または変異体が同定され得る。

10

20

【0219】

さらに、活性を、突然変異を含有しないタンパク質などの対照と比較して、突然変異（単数または複数）を含有しないタンパク質と比較して、病変または腫瘍微小環境において増大した活性を示すタンパク質を同定できる。一部の例では、修飾されたタンパク質の活性は、非修飾タンパク質の活性に対して正規化できる。したがって、修飾されたタンパク質の条件的活性は、正規化された活性に基づいて決定され得る。例示的な例として、非修飾タンパク質が、それぞれ、正常微小環境および病変微小環境において10および1の活性を有し、修飾されたタンパク質が、それぞれ、正常微小環境および病変微小環境において2および1の活性を有する場合に、正常および病変環境における修飾されたタンパク質の正規化された活性は、それぞれ、0.2（2/10）および1（1/1）である。したがって、この仮説上の例では、修飾されたタンパク質は、正常微小環境において、病変微小環境においての2倍活性であるが、病変環境における修飾されたタンパク質の正規化された活性が、正常環境における正規化された活性の5倍（1/0.2=5）であるので、病変微小環境について条件的に活性であり得る。したがって、本明細書において提供される方法を使用して、修飾されたタンパク質の正規化された活性の割合を変更し得る修飾を同定できる。

30

【0220】

4. 反復法

一例では、本明細書を実施した後に、任意の同定された条件的活性分子を、条件的活性を増大するまたは最適化するために修飾またはさらに修飾できる。例えば、同定された治療用タンパク質または変異体を鋳型として使用し、最初に同定された条件的活性タンパク質にさらなる修飾を導入することによって二次ライブラリーを作製できる。例えば、条件的活性を増大すると同定された修飾を組み合わせることができる。二次ライブラリーは、本明細書に記載されたアッセイおよび方法を使用して試験できる。

40

【0221】

本方法の反復性態様の別の例では、所望により、活性ではないかまたは第1の条件セット下で増大した活性を有さないような条件的活性を示さないと同定される分子を、さらに修飾し、条件的活性について再試験してもよい。さらなる修飾は、分子の活性および/または安定性と関連している特定の領域（例えば、特定のアミノ酸残基）付近にターゲット

50

ィングできる。例えば、分子の活性および/または安定性と関連している残基は、一般に、重大な残基であり、構造的フォールディングまたは結合などの分子のその他の活性に関与している。

【0222】

重大な残基は、突然変異されると、タンパク質の正常な活性が取り除かれるかまたは減少するので、同定できる。例えば、突然変異されると、治療用タンパク質のそのコグネイト結合パートナーとの減少した結合活性かまたは取り除かれた結合活性を示す重大な残基が同定できる。重大な残基は、結合ポケット中にある残基を含み得る。特に、本明細書における目的上、条件的活性が、pHの相違（例えば、腫瘍環境の酸性pH環境）に依存している場合には、荷電アミノ酸残基（例えば、Asp、Glu、Lys、ArgおよびHis）に突然変異されると、コグネイト結合パートナーとの結合が取り除かれるかまたは減少する重大な残基を同定することによって、タンパク質相互作用に対する荷電効果を決定することができる。次いで、重大な残基は、それらが活性にとって必要であるので、条件的活性タンパク質を作製するための突然変異誘発の標的とされてはならない残基として同定される。それにもかかわらず、同定された重大な残基に隣接するかまたはその付近の残基は、変化され得る、結合などの特定の活性に影響を及ぼし得る特定の標的であり得る。例えば、隣接する残基の突然変異は、結合のポケットに影響を及ぼし、それによって結合活性を変更し得る。

10

【0223】

したがって、本方法の任意選択の工程の一例では、本明細書において重大な残基と呼ばれる、タンパク質活性および/または安定性、および特に、結合（例えば、酸性pHでの）にとって重要であるアミノ酸残基を同定できる。次いで、同定された重大なアミノ酸残基の付近を標的とする、例えば、同定された重大なアミノ酸残基に隣接するアミノ酸突然変異を用いて修飾されたタンパク質のさらなるライブラリーを作製できる。一部の例では、突然変異は、隣接する位置での最大19種のその他のアミノ酸残基のうちの任意のその他のものへのアミノ酸置換であり得る。その他の例では、突然変異は、例えば、発展している特定の条件付き活性に応じて合理的にかまたは経験的に行うことができる。例えば、pH条件下での条件的活性が発展している場合には、重大な残基の付近のまたはそれに隣接するアミノ酸残基の突然変異は、荷電残基へ、特に、弱く荷電しており、6.5~6.8あたりのpKを有するヒスチジン（H）残基へであり得る。例えば、各々、重大なアミノ酸残基に隣接するかまたはその付近のアミノ酸残基でのヒスチジンへの単一アミノ酸置換を含有する複数の突然変異体または変異型タンパク質が作製される、タンパク質突然変異体のライブラリーを作製できる。

20

30

【0224】

重大な残基に隣接する残基で突然変異を含有する新しい複数の突然変異体各々の活性を、評価または決定できる。例えば、さらなるライブラリーの各メンバーは、個々に発現させ、上記で本明細書において記載されるように、第1の条件および第2の条件で活性について個々に試験できる。両条件下で試験した後、第2の条件（例えば、正常組織の生理学的環境または中性pH環境などの望ましくない環境）下で、発現されないかまたは優先的結合を示すタンパク質変異体を排除する。したがって、いずれの条件下でも同様の活性を示す（すなわち、結合などの活性に影響を及ぼさない）および/または第1の条件で優先的活性を示す変異体のみを選択する。突然変異された残基の正体を決定でき、重要な残基と呼ばれる。

40

【0225】

次いで、重要な残基位置での突然変異の組合せを含むさらなるコンビナトリアルライブラリーを作製する。重要な残基での突然変異は、19種のその他のアミノ酸残基のうち任意のその他のものへのアミノ酸置換であり得る。その他の例では、突然変異は、発展している特定の条件付き活性に応じて合理的にかまたは経験的に行うことができる。例えば、pH条件下での条件的活性が発展している場合には、重要なアミノ酸残基での突然変異は、荷電残基へ、特に、ヒスチジン（H）残基へであり得る。例えば、11個の重要な残基

50

が同定されている場合には、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個または11個すべての残基が変化しているタンパク質変異体を、任意の組合せで含有するコンビナトリアルライブラリーを作製することができる。例として、重要な残基のみがヒスチジン(H)残基に突然変異されているコンビナトリアルライブラリーが作製される場合には、各位置は、野生型アミノ酸またはヒスチジンであり得、突然変異され得る11部位があり、組み合わせられるので、ライブラリー中の突然変異体の数(ライブラリーの大きさ)は、 2^{11} 個のメンバーまたは2048の組合せの突然変異体として算出できる。野生型および11種の単一His突然変異(上記ですでに試験された)を排除すると、ライブラリーは、2036の組合せを含有するということは理解される。ライブラリーの大きさは、同定された重要な残基の数および重要な残基位置各々で行われるアミノ酸置換の数に応じて増大または減少し得るということも理解される。次いで、本明細書に上記に記載される方法においてさらなるライブラリーをスクリーニングして、非腫瘍または健常環境よりも腫瘍環境において増大した活性などの、所定の条件で条件的活性タンパク質を同定できる。

10

20

30

40

50

【0226】

例えば、正常微小環境(例えば、pH7.4)と比較して、腫瘍微小環境(例えば、pH6.0)をシミュレートする条件下で増大した活性を有する、条件的活性の修飾された、治療用抗体、例えば、アービタックスなどの治療用タンパク質を選択するために、治療用タンパク質中のアミノ酸を突然変異させて、単一アミノ酸が修飾された治療用タンパク質のライブラリーを形成してもよい。このライブラリーを、腫瘍微小環境および正常環境をシミュレートするインビトロアッセイ条件下でアッセイして、突然変異されると、両条件下で活性の喪失をもたらす重大な残基を同定することができる。例えば、ライブラリーの1種または複数のメンバーとして、2つのpH条件間でプロトン化状態を変更し得るイオン化できる基を有するアミノ酸(例えば、Asp、Glu、Lys、Arg、Hisなど)で独立に置換され得る修飾されたタンパク質が挙げられる。タンパク質中のイオン化できる残基のプロトン化状態は、タンパク質の1つまたは複数の活性(親和性、触媒活性、溶解度、電荷および安定性など)をpH依存的に変更し得る(Rostkowski et al. (2011), BMC Struct. Biol. 11:6)。重大な残基は、荷電アミノ酸に突然変異されると、両条件下で活性がなくなるアミノ酸位置として定義され得る。したがって、残基は、結合ポケット中にある、および/または、その他の形でそのコグネイト結合パートナーとの結合への荷電効果と関連しているものである。ELISAスクリーニングなどの活性スクリーニングから、pH6.0および7.4で、荷電残基に突然変異されると、結合を失う重大な残基が同定され得る。

【0227】

第2の工程では、重大な残基を同定した後に、重大な残基に隣接するアミノ酸の置換を含有するタンパク質変異体の活性を、決定または評価できる。置換アミノ酸は、すべての可能性あるアミノ酸から、またはすべての可能性あるアミノ酸のサブセットから無作為に選択され得る。例えば、置換アミノ酸は、帯電しているアミノ酸残基などの、上記で論じたように腫瘍および正常状態間でイオン化状態を変更し得るアミノ酸を含み得る。特定の例では、隣接する残基で置換されるアミノ酸がヒスチジンである。重大な残基に隣接する残基で突然変異を含有する新規の複数の突然変異体各々の活性は、腫瘍環境の条件(例えば、酸性pHおよび/または高乳酸の条件)を模倣またはシミュレートする第1の条件で、また非腫瘍環境を模倣またはシミュレートする第2の条件(例えば、中性pH7.4および/または低乳酸濃度の条件)で評価または決定できる。いずれの条件下でも同様の活性を示し(すなわち、結合などの活性に影響を及ぼさない)、発現され、および/または第1の条件で優先的活性を示す変異体が選択される。選択された突然変異体の突然変異された残基の正体が決定され、重要な残基と呼ばれる。

【0228】

次いで、最終工程として、同定された重要な残基位置での突然変異体のすべての組合せを含有するさらなるコンビナトリアルライブラリーを作製する。正常微小環境(例えば、pH7.4)と比較して、腫瘍微小環境(例えば、pH6.0)をシミュレートする条件

下で増大した活性を有する、条件的活性の修飾された、治療用抗体、例えば、アービタックス (Erbitrux) などの治療用タンパク質を選択するために、置換アミノ酸は、2つのpH条件間でプロトン化状態を変更し得るイオン化できる基を有するもの (例えば、Asp、Glu、Lys、Arg、Hisなど) である。例えば、各重要な残基での置換アミノ酸がヒスチジンであるコンビナトリアルライブラリーを作製する。コンビナトリアルライブラリーの各メンバーの活性は、腫瘍環境の条件 (例えば、pH 6.0などの酸性pHおよび/または高乳酸の条件) を模倣またはシミュレートする第1の条件で、また非腫瘍環境を模倣またはシミュレートする第2の条件 (例えば、中性pH 7.4および/または低乳酸濃度の条件) で評価または決定できる。第1の条件で増大した活性を示す変異体が、条件的活性タンパク質として同定されるかまたは選択される。

10

【0229】

C. 条件的活性分子を同定するためのアッセイ

条件的に活性である治療用分子、例えば、抗体治療薬 (例えば、変異型アービタックス (Erbitrux) 抗体などの変異型抗EGFR抗体) などの治療用タンパク質を選択または同定するための上記の節Bに提供される方法の工程は、生理学的環境と関連している1つまたは複数の条件パラメータを変化させることまたは変更することに適している任意のインビトロまたはインビボアッセイにおいて実施できる。通常、アッセイは、インビトロアッセイである。アッセイは、検出可能な方法またはその他測定可能な方法で治療用分子の活性を試験または評価でき、その結果、第1の条件下で決定される活性と第2の条件下で決定される活性を比較できる任意のアッセイであり得る。したがって、アッセイまたは方法は2回 (すなわち、二重形式で) 実施し、それによって、第1の反復および第2の反復でのアッセイの唯一の相違が、第2の条件 (非病変または正常生理学的環境) と比較して第1の条件 (例えば、病変または腫瘍環境) 間で異なるパラメータまたは条件となる。例えば、活性が、腫瘍環境において存在するような酸性pHおよび/または高乳酸濃度で評価される第1のアッセイを実施でき、活性が非腫瘍または正常生理学的環境において存在するような高pH (例えば、中性pH) および/または低乳酸濃度で評価される点を除いて、第1のアッセイと同一である第2のアッセイを実施する。

20

【0230】

ある環境において別の環境よりも活性であるタンパク質を作製および同定するために、タンパク質の活性を評価するために本明細書に記載された任意のアッセイを使用できる。例えば、例示的アッセイとは、治療用分子のそのコグネイト結合パートナーとの結合活性または治療用分子の機能活性を測定するものである。本明細書において提供されたアッセイは、多数の試験分子、例えば、タンパク質変異体の活性を一度に二重形式で評価するためにハイスループット形式で開発してもよい。本明細書において提供される方法において使用できる例示的アッセイが、本明細書において提供される。アッセイは、制限であるという意味するものではない。結合を検出するアッセイおよび機能アッセイを含めた、当業者に公知である任意のアッセイが、本明細書において提供される方法において使用するために考慮される。

30

【0231】

1. 結合を検出するアッセイ

一部の例では、本明細書において提供される方法において使用するためのアッセイは、治療用タンパク質またはその変異体、例えば、抗体変異体 (例えば、抗EGFR) などの試験分子の、受容体、リガンドまたは抗原などのコグネイト結合パートナーとの結合を測定する。したがって、2種の異なる生理学的微小環境間のリガンド-結合対の結合活性などの活性を同定および区別するためのインビトロ生理学的高感度法が、本明細書において提供される。方法は、別の環境よりもある環境で、高い活性、例えば、結合活性を示すタンパク質を同定するための競合法である。例えば、本明細書において提供されたインビトロアッセイは、1) 腫瘍微小環境内の細胞外マトリックスにおいて見られる結合条件をシミュレートする、2) 非病変部位で見られるものなどの生理学的結合条件をシミュレートする条件下で、別個に (例えば、並行して、または逐次) 実施される結合アッセイである

40

50

。方法は、皮膚、消化管またはその他の組織において存在するような非腫瘍微小環境の正常な生理学的条件と比較して、腫瘍微小環境の病的状態下で、そのリガンドまたは受容体と優先的に結合する任意の試験分子を同定するために使用できる。方法は、2つの異なる結合条件下で、コグネイト結合パートナー（例えば、標的抗原またはリガンド）を、試験分子と別個に接触させる二重アッセイ競合法である。

【0232】

アッセイでは、各結合分子（例えば、治療用タンパク質または変異体）は、そのコグネイト（c o n g n a t e）結合パートナー（例えば、標的抗原）との結合について、両方のシミュレートされた条件下で、個々に、および別個にスクリーニングされる。例えば、治療用タンパク質を、標的抗原などのコグネイト結合パートナーと接触させることができ、治療用タンパク質のコグネイト結合パートナーに対する結合活性を評価し、比較することができる。結合を測定するアッセイの例として、溶液結合アッセイおよび表面プラズモン共鳴などの固体支持体結合アッセイおよびE L I S Aなどのイムノアッセイが挙げられる。

10

【0233】

本明細書に記載された結合アッセイにおいて使用するための例示的コグネイト結合パートナーとして、小分子、ペプチド、タンパク質、酵素、抗体またはその他の生体分子が挙げられる。一部の例では、癌細胞および腫瘍の増殖、血管新生または細胞増殖特性と関連している任意のリガンド、受容体、酵素またはその他のタンパク質などのコグネイト結合パートナーは、腫瘍または癌の治療における介入点である。したがって、コグネイト結合パートナーおよび標的タンパク質への言及は、同義的に使用される。標的タンパク質は、治療介入の公知の標的に基づいて選択できる。例えば、公知の癌治療薬の代替標的は、本明細書における方法において標的タンパク質として選択できる。本明細書における結合アッセイにおいて使用される標的タンパク質の選択は、スクリーニングされる試験分子標的タンパク質に応じて変わるということは理解される。表3は、例示的治療用タンパク質のコグネイト結合パートナーまたは標的タンパク質を示す。このような標的タンパク質の例は、上記の表3に示されており、これとして、例えば、E G F R（全長タンパク質または細胞外ドメインを含む）、H E R 2 / N e u、C D 2 0（全長または大きな細胞外ループ）、V E G F - A、C D 5 2（全長または細胞外ドメイン）、E p C A M（全長または細胞外ドメイン）C D 3（全長、細胞外ドメイン、鎖、鎖または鎖）、C D 3 3（全長または細胞外ドメイン）、C D 8 0（全長または細胞外ドメイン）、C D 8 6（全長または細胞外ドメイン）、C T L A - 4（全長または細胞外ドメイン）、P L G F、5 1 インテグリン（全長、細胞外ドメイン、5または1）、メソテリン（全長または細胞外ドメイン）およびI G F - 1 R（全長または細胞外ドメイン）が挙げられる。

20

30

【0234】

さらに、本明細書において提供されるアッセイにおいて、標的タンパク質の断片を使用してもよい。例えば、標的抗原などの標的タンパク質を、可溶性タンパク質として発現させてもよい。例えば、標的タンパク質として使用するための可溶性E G F Rとして、可溶性E G F受容体細胞外ドメイン（s E C D）がある。コグネイト結合パートナーとしてまた、細胞外ドメインおよび/または細胞内ドメインを含む本明細書に記載された任意のコグネイト結合パートナーの細胞外ドメインまたは細胞内ドメインが挙げられる。

40

【0235】

本明細書において提供される方法の一部の例では、試験分子は、抗E G F R抗体またはその変異体であり、コグネイト結合パートナーは、リガンドまたは例えば、可溶性E G F R受容体などのその可溶性断片である。上皮成長因子受容体（E G F R、H E R 1、c - E r b B - 1；配列番号10）は、種々の癌の介入および治療のための標的である。E G F Rは、E G F R、H E R 2、H E R 3およびH E R 4を含めた、I型受容体チロシンキナーゼのサブファミリーのメンバーである膜貫通糖タンパク質である。E G F Rは、皮膚および毛包を含めた多数の正常上皮組織において構成的に発現される。E G F Rは、上皮起源のいくつかの癌では過剰発現される。E G F Rの発現は、頭頸部、結腸および直腸の

50

ものを含めた多数のヒト癌において検出される。例えば、頭頸部の扁平上皮癌腫は、E G F Rの過剰発現を伴う (Parikh et al., (2011) Indian J Cancer 48:145-147)。E G F Rは、患者の予後不良および細胞傷害性化学療法に対する抵抗性と関連している (Ryan and Chabner (2000), Clin. Cancer Res. 6:4607-4609; Fox et al., (1994) Breast Res. Treat., 29:41-49; Rubin Grandis et al., (1998) J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda), 90: 824-832; Uhlman et al. (1995) Clin. Cancer Res., 1:913-920; Neal et al., (1990) Cancer (Phila.), 65:1619-1625)。E G F Rは、上皮腫瘍において頻繁に過剰発現され、E G F R発現は、細胞傷害性薬剤および化学療法に対する腫瘍の抵抗性と相関する可能性がある (Ryan and Chabner (2000), Clin. Cancer Res. 6:4607-4609)。

【 0 2 3 6 】

リガンドのE G F Rの細胞外ドメインとの結合は、二量体化を促進し、内部チロシンキナーゼドメインを活性化し得、例えば、b c l - 2をリン酸化し得るプロテインキナーゼAを含めたいくつかの下流シグナルを活性化し得る (Ryan and Chabner (2000), Clin. Cancer Res. 6:4607-4609; Ciardiello and Tortora (1998), Clin Cancer Res. 4:821-828)。

【 0 2 3 7 】

本明細書における特定の例では、抗E G F R抗体またはその変異体のE G F Rまたは可溶性E G F Rとの結合活性を、低p H (< 7 . 4) および高乳酸濃度の条件下および約7 . 3 ~ 7 . 4 の生理学的p Hおよび低乳酸濃度の条件下で評価できる。さらに、天然環境をさらに模倣するために結合アッセイにヒト血清を含めてもよい。結合活性を、2種の条件間で比較して、正常生理学的条件下と比較して、腫瘍微小環境条件下でより大きな結合活性を示す生体分子結合剤を同定できる。正常な生理学的条件をシミュレートする条件と比較して、腫瘍微小環境をシミュレートする条件下で、そのE G F Rコグネイト結合パートナーに対してより大きな結合を示す抗E G F R抗体を同定できる。

【 0 2 3 8 】

通常、試験分子またはコグネイト結合パートナーは、検出可能に標識され、その結果、結合活性を評価および決定できる。例えば、結合を検出するために、治療用タンパク質、例えば、抗体変異体 (例えば、抗E G F R抗体変異体) などの試験分子を、検出可能な部分またはタグで標識して、検出を容易にすることができる。当業者ならば、アッセイ条件にとって適当な検出可能な部分またはタグを選択できる。例えば、抗I g抗体などの一部の二次試薬は、ヒト血清を含有する溶液中の抗体である修飾されたタンパク質の結合を検出するためには使用できない。さらに、抗I g G抗体は、抗体である生体分子の結合を検出するためには使用できない。

【 0 2 3 9 】

任意の検出可能な部分または検出または同定され得る当業者に公知のその他の部分を使用してよい。部分またはタグは、治療用タンパク質または抗体などの試験分子と、直接的に連結されても、例えば、リンカーを使用して間接的に連結されてもよい。連結は、治療用抗体のN末端であっても、C末端であってもよい。本明細書における方法において使用できる例示的タグおよび部分として、それだけには限らないが、表6に示される任意のものが挙げられる。

【 0 2 4 0 】

10

20

30

40

【表 6】

表6				
名称	配列	残基の 数	大きさ (Da)	配列番号
c-Myc	EQKLISEEDL	10	1200	5
FLAG	DYKDDDDK	8	1012	3
HA	YPYDVPDYA	9	1102	15
VSV-G	YTDIEMNRLGK	11	1339	16
HSV	QPELAPEDPED	11	1239	17
V5	GKPIPNPLLGLDST	14	1421	18
Poly Arg	RRRRR	5-6	800	19
Strep-tag-II	WSHPQFEK	8	1200	20
S-	KETAAAKFERQHMDs	15	1750	21
3x FLAG	DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK	22	2730	22
HAT-	KDHLIHNvhKEfHAHAHNK	19	2310	23
SBP-	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRRL EHHPQGQREP	38	4306	24

10

20

【 0 2 4 1 】

検出可能な部分を、本明細書に記載された治療用抗体と連結できる当業者に公知である任意のリンカーを使用してよい。例示的リンカーとして、グリシンリッチ可動性リンカー（ $-G_4S-$ ）_n（式中、nは、1（配列番号4）、2（配列番号70）、3（配列番号71）、4（配列番号72）、5（配列番号73）またはそれ以上などの正の整数である）が挙げられる。

【 0 2 4 2 】

結合アッセイは、溶液中で実施しても、試験分子もしくはコグネイト結合パートナーを固体支持体に取り付けることによって実施してもよい。一部の例では、コグネイト結合分子または試験分子を、細胞から発現させることができ、結合は細胞ベースのアッセイにおいて評価できる。

30

【 0 2 4 3 】

a) 固体支持体結合アッセイ

本明細書において提供される方法において使用するためのアッセイとして、治療標的タンパク質またはその変異体などの試験分子の、コグネイト結合パートナーとの結合が、一方または両方が固体支持体と結合している条件下で測定される結合アッセイが挙げられる。例えば、溶液中のコグネイト結合パートナーは、固体支持体上に固定化されている試験分子と相互作用し得る、または溶液中の試験分子は、固体支持体上に固定化されているコグネイト結合パートナーと相互作用し得る。固体支持体結合アッセイは、固相上への固定が、結合していないタンパク質から結合しているタンパク質を分離することを容易にし得るので、溶液結合アッセイと比較して有利であり得る。表面プラズモン共鳴およびELISAを含めた、当業者に公知の任意の固体支持体結合アッセイが、本明細書において提供される方法において使用するために考慮される。

40

【 0 2 4 4 】

例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）を使用して、サンプル中の分析物分子の、固定された分子との分子結合の際に生じる屈折率の変化を測定することによって、高感度アッセイにおいて標識されていない分子の結合を検出できる（Piliarik et al., (2009) Meth

50

ods Mol Biol. 503:65-88)。S P Rは、金属中の電子の集団振動である表面プラズモン波が、金属/誘電体界面で励起されると生じる。S P Rは、角度および波長の特定の組合せで反射光強度を低減する。分子結合は、金属膜上の極薄有機（誘電）層の屈折率および厚みを変化させ得、これがS P R共鳴条件を変化させる。コグネイト結合パートナーを有する溶液を、固定化された治療用タンパク質上に通過させてもよく、または治療用タンパク質を有する溶液を、固定化されたコグネイト結合パートナー上に通過させてもよい。時間の関数としてS P Rシグナルを測定することによって会合速度を測定できる。会合後、ブランク溶液を、固定化された治療用タンパク質またはコグネイト結合パートナー上に通過させてもよく、解離速度を時間の関数として測定できる。会合および解離速度から、平衡結合定数を算出できる（Jecklin et al. (2009), J. Mol. Recognit. 22(4):319-29; Nguyen et al. (2007) Methods. 42(2):150-61; Tanious et al. (2008), Methods Cell Biol. 84:53-77)。したがって、S P Rを使用して、治療用タンパク質およびコグネイト結合パートナー間の相互作用の動力学および熱力学を測定できる。

10

【0245】

別の例では、治療用タンパク質およびコグネイト結合パートナー間の結合は、酵素結合免疫測定法（Enzyme-linked immunosorbent Assay）（ELISA）によって検出され得る。ELISAは、抗体/抗原相互作用などのタンパク質/リガンド相互作用を検出するために使用できる免疫学的アッセイである。通常、ELISAでは、抗体/抗原複合体と直接的または間接的に連結している酵素マーカーからのシグナルを測定することによって、抗体/抗原相互作用が検出される。いくつかのELISA法が当業者に公知であり、直接ELISAおよび間接ELISAを含めた、当業者に公知の、または本明細書に記載された任意のELISA法を使用してよい。直接ELISAでは、固定化された分子と相互作用する標識された一次抗体が検出される。直接ELISAは、1) 固相を、抗体などの試験分子のコグネイト結合パートナー（すなわち、リガンドまたは抗原）と接触させる工程；2) 固相を、ブロッキング試薬とともにインキュベートして、固相上の非特異的結合部位をブロッキングする工程；3) 固相を、コグネイト結合パートナーと結合する検出可能な試験分子とともにインキュベートする工程；および4) 結合している検出可能な試験分子を検出する工程を含み得る。間接ELISAでは、一次抗体と相互作用する標識された二次抗体が検出される。間接ELISAは、1) 固相を、抗体などの試験分子のコグネイト結合パートナー（すなわち、リガンドまたは抗原）でコーティングする工程；2) 固相を、ブロッキング試薬とともにインキュベートして、固相上の非特異的結合部位をブロッキングする工程；3) 固相を、コグネイト結合パートナーと結合する試験分子とともにインキュベートする工程；4) 治療抗体と結合できる、試験分子を検出できるが、アッセイバッファー中に含有されるヒト血清成分は検出できない標識された二次抗体などの二次検出剤とともにインキュベートする工程；および5) 二次検出剤を検出する工程を含み得る。さらに、直接または間接ELISA法に、方法の任意の工程間に1回以上の洗浄工程（例えば、1、2、3、4回またはそれ以上の洗浄工程）を含めてもよい。

20

30

【0246】

スクリーニングされているコグネイト結合タンパク質および生体分子に応じて正確なアッセイまたはアッセイ条件を経験的に決定することは当業者のレベル内である。固体支持体結合アッセイにおいて実施される方法の工程は、1) コグネイト結合タンパク質を固体支持体に固定化すること；2) 試験分子（単数または複数）（例えば、抗体変異体）を、コグネイト結合タンパク質と接触させること；および3) コグネイト結合タンパク質との結合活性を示す結合している試験分子を検出および同定することを含む。方法の工程は、試験分子が固体支持体に固定化され、コグネイト結合分子がそれと接触するように実施され得ることは理解される。工程のいずれも、2種のインビボ生理学的条件をシミュレートする条件下で実施され得る。例えば、アッセイがELISAである場合には、コーティング、ブロッキング、試験分子（例えば、治療用抗体またはその変異体）とともにインキュベーションまたは検出などのELISAの工程のいずれも、腫瘍微小環境（例えば、pH

40

50

6.0)をシミュレートする条件または正常微小環境(例えば、pH 7.4)をシミュレートする条件下などの本明細書に記載された条件下または当業者に公知のその他の適した条件で実施され得る。

【0247】

一般的なアッセイ法の説明を、イムノアッセイベースの形式に関連して以下に提供する。当業者ならば、表面プラズモン共鳴などによるその他の固体支持体形式で結合アッセイを実施するために、工程(単数または複数)を適応させることができる。上記の節Bにおいて記載された治療用タンパク質または変異体などの任意の試験分子は、本明細書に記載されたように、そのコグネイト結合タンパク質に対する結合活性について試験され得る。特に、抗EGFR抗体の抗体変異体、例えば、変異型アービタックス抗体を、二重アッセイにおいて作製し、スクリーニングし、低pHおよび高乳酸濃度の腫瘍微小環境内でEGFRと結合するが、正常な生理学的pHでは結合しない、癌の治療のための改良された変異型抗EGFR類似体を同定できる。

10

【0248】

1) 固体支持体への固定化

本方法の第1の工程として、対象とするコグネイト結合タンパク質(例えば、リガンドまたは抗原)を、結合している分子の検出または同定が後に達成され得るよう、結合している分子の捕獲を促進するために使用するために適合させる。捕獲を促進するために、スクリーニングのためのコグネイト結合タンパク質は、溶液中、懸濁液中で提供されてもよいし、アッセイ法の必要に応じて固体支持体に結合されてもよい。例えば、コグネイト結合タンパク質が、固体支持体に固定化される。あるいは、またはさらに、捕獲を促進するために試験分子が修飾されてもよい。例えば、試験分子は、固体支持体に固定化し、またはその他の形で検出可能に標識することができる。一般に、結合アッセイは、固体支持体上で行われる。

20

【0249】

本明細書において提供された結合アッセイにおいて使用できる固体支持体として、分子、例えば、試験分子またはリガンド、受容体または抗原などのタンパク質のコグネイト結合パートナーが取り付けられ得る任意の担体が挙げられる。通常、変異型試験分子(例えば、抗EGFR抗体変異体などの抗体変異体のライブラリーまたは収集物)のハイスループットスクリーニングを促進するために、コグネイト結合パートナーが固体支持体に取り付けられる。本明細書において提供された方法において固体支持体として使用するための担体の例として、それだけには限らないが、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然および修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよび磁性固体支持体、例えば、マグネタイトを含む固体支持体が挙げられる。固体支持体は、1種または複数のビーズまたは粒子、マイクロスフェア、試験管またはプレートの表面、フィルターメンブレンおよび当技術分野で公知のその他の固体支持体であり得る。例示的固体支持体システムは、それだけには限らないが、マルチウェルプレートまたはメンブレンを含めた、例えば、ガラス、シリコン、金属、ナイロン、セルロース、プラスチックまたは合成物で構成される平坦な表面を含むか、またはシリカゲル、コントロールドポアガラス(controlled pore glass)、磁性(ダイナビーズ)またはセルロースビーズなどのビーズの形態であり得る。さらに、このような方法を、懸濁液における、またはカラムの形態での使用に適合させることができる。

30

40

【0250】

特定のアッセイ条件に応じて適した固体支持体を選択することは当業者のレベル内である。例えば、バッファーpHが、Niコーティングとの抗原コーティングに影響を及ぼし得るが、ハイバインド(high-bind)プレートには影響を及ぼさないもので、ニッケルコーティングされたマイクロプレートが、Hisタグを付けられたタンパク質の結合にはあまり適していない場合がある。固体支持体が、変動するpH条件を用いる使用に適しているかどうかを決定することは当業者のレベル内である。

50

【0251】

試験分子またはコグネイト結合パートナーは、当業者に公知の任意の方法によって固体支持体に固定化され得る。結合のために共有結合または非共有結合法を使用できる。通常、試験分子またはコグネイト結合パートナー（リガンドまたは抗原など）は、水性媒体からの吸着によって固定化される。一部の例では、吸着は、病変微小環境（腫瘍または癌微小環境など）をシミュレートする条件下で、正常微小環境をシミュレートする条件下で、または当業者に公知の標準条件下で実施され得る。例えば、吸着は、6.0～7.4の間またはほぼ6.0～7.4の間のpH範囲、一部の例では、pH 7.4または約pH 7.4を有するバッファーを使用して実施され得る。特に、吸着を達成するために、高結合性マイクロプレート（固体支持体として使用してもよい。高結合性プレートは、当業者に公知であり、種々の製造業者から容易に入手可能である（例えば、eBioScience, San Diego, CA、カタログ番号44-2404-21から入手可能なNunc Maxisorp平底プレート；Costar 96ウェルEIA/RIA Stripwellプレート、Costar 2592）。

10

【0252】

共有結合カップリングまたは固体マトリックスへの標的タンパク質の取り付けのその他の周知の方法などのその他の取り付け様式も使用できる。治療用タンパク質および/またはコグネイト結合パートナーの付着の共有結合法として、化学的架橋法が挙げられる。反応試薬は、支持体とタンパク質またはコグネイト結合パートナー上の官能基間の共有結合を作り出すことができる。化学的に反応され得る官能基の例として、アミノ、チオールおよびカルボキシル基がある。N-エチルマレイミド、ヨードアセトアミド、N-ヒドロスクシンイミドおよびグルタルアルデヒドは、官能基と反応する試薬の例である。その他の例では、試験分子および/またはコグネイト結合パートナーを、それだけには限らないが、免疫親和性またはリガンド-受容体相互作用（例えば、ビオチン-スト렙トアビジンまたはグルタチオンS-トランスフェラーゼ-グルタチオン）などの方法によって固体支持体と間接的に結合させることができる。例えば、試験分子を、ELISAプレートまたはその他の同様のアドレス可能なアレイにコーティングしてもよい。

20

【0253】

一例では、マイクロプレートのウェルなどの固体支持体を、試験分子またはコグネイト結合パートナーと結合し、捕獲する親和性捕獲剤でコーティングして、それを固体支持体に取り付けてもよい。試験分子および/またはコグネイト結合パートナーを、任意の選択された親和性捕獲剤と適合するタグを含有するよう修飾してもよい。本明細書におけるアッセイにおいて使用できる例示的タグまたは部分として、それだけには限らないが、His、T7、Myc、HA、VSV-GまたはFlagタグ（例えば、配列番号3、5、7、15～16、25）が挙げられる。このようなタグは、当業者に周知である。例えば、ビオチン化抗His抗体を、スト렙トアビジンを含有するプレート上にコーティングし、His-タグを含有するコグネイト結合パートナーまたは試験分子タンパク質の捕獲を容易にできる。スト렙トアビジンおよび親和性捕獲剤でコーティングされたプレートは、製造業者から入手可能であるか（例えば、Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL；カタログ番号15500参照のこと）または当業者によって調製できる。上記のように、吸着または固定化技術の選択は、一般に、変動するpH環境と適合するよう選択される。

30

40

【0254】

コグネイト結合パートナーが固体支持体に取り付けられる本明細書における例では、コグネイト結合パートナー（例えば、sEGFR）の固体支持体との結合は、スクリーニングされた試験分子または試験分子のライブラリーとの接触の前、その間、またはそれに続いてのいずれで実施してもよい。例えば、1種または複数のコグネイト結合パートナーを、クロマトグラフィーカラムまたはマイクロプレートのウェルなどの固体支持体に事前に吸収（pre-absorbed）させ、その後、試験分子とともにインキュベートしてもよい。その他の例では、コグネイト結合パートナーおよび試験分子を、溶液中で接触

50

させ、その後、固体支持体上にコグネイト結合パートナーを捕獲する。

【0255】

二重形式または二連アッセイでは、固定化された物質、通常、コグネイト結合パートナーを、同一である標準条件下で固定化する。通常、両条件下での吸着または固定化を容易にするために使用されるバッファーは、中性または生理学的バッファーである。生理学的バッファーの例示として、それだけには限らないが、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、ハンクス平衡塩溶液 (HBSS)、リンガーまたはクレブスが挙げられる。pHおよび緩衝能は、アッセイ条件の関数であり、当業者によって経験的に決定または選択され得る。生理学的バッファーの例示として、クレブス-リンガー重炭酸 (KRB) バッファー (Sigma Aldrich、カタログ番号 K4002) がある。さらに、固体支持体への固定化される物質、通常、コグネイト結合パートナーの吸着または固定化は、ヒト血清を含有しないバッファー中で行われるが、これは、ヒト血清が、天然環境条件をシミュレートするために接触工程またはスクリーニングにおいて使用されるからである。

10

【0256】

例えば、KRB バッファーまたはその他の同様の生理学的バッファー中の変動する濃度の、抗原などのコグネイト結合パートナーを固体支持体上に吸着させてもよい。例えば、KRB バッファーまたはその他の同様の生理学的バッファー中、1 ~ 50 nM の間またはほぼ 1 ~ 50 nM の間、例えば、3 ~ 30 nM、例えば、5 ~ 20 nM、例えば、3、6、9、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40 もしくは 50 nM または約 3、6、9、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40 もしくは 50 nM のコグネイト結合パートナー (例えば、sEGFR などの抗原) を吸着させてもよい。吸着される標的抗原の量は、結合剤の関数であり、標的抗原と結合することがわかっている対照を使用することなどによって経験的に決定できる。吸着は、コグネイト結合タンパク質が固体支持体上の結合部位と結合するのを可能にするよう、任意の所望の時間および温度で進めることができる。例えば、吸着は、通常、4 ~ 37 で、例えば、4、室温 (すなわち、22) または 37 で実施される。吸着の時間は、通常、30 分 ~ 48 時間またはそれ以上であり、温度の関数として変わり得る。例えば、コグネイト結合タンパク質は、高結合性マイクロウェルプレートなどの固体支持体に、4 で 6 時間 ~ 48 時間、例えば、12 時間 ~ 36 時間、通常、一晚、例えば、12 時間 ~ 24 時間吸着され得る。別の例では、コグネイト結合タンパク質は、高結合性マイクロウェルプレートなどの固体支持体に、室温で、30 分 ~ 4 時間、例えば、1 時間 ~ 2 時間、特に、2 時間吸着される。固体支持体は、結合していない標的抗原を除去するために、吸着に使用される同一バッファーで 1 回または複数回、例えば、1、2、3、4 回またはそれ以上洗浄され得る。

20

30

【0257】

2) シミュレートされた条件下での接触

アッセイでは、結合パートナーおよび結合剤の結合は、2つの異なる生理学的条件、病変微小環境および非病変微小環境の正常な生理学的条件をシミュレートする条件下で行われる。例えば、病変微小環境は、腫瘍微小環境における条件をシミュレートし得る。したがって、標的抗原を支持体に取り付けた後、方法のその後の工程は、一般に、2種の別個のアッセイとして実施される。したがって、各標的抗原について、2連の固体支持体上に、上記のように、抗原が吸着され、結合されるかまたは固定化される。続いて、2連の支持体が、一方が、腫瘍微小環境をシミュレートし、もう一方が、正常な生理学的環境をシミュレートする2つの変化に富んだアッセイ条件下での結合アッセイの実施のために別個に処理される。このような条件は、節Bにおいて上記で記載されている。節Bにおいて上記で論じられるように、別個のアッセイの実施において、変更される唯一の条件は、インビボ微小環境をシミュレートするバッファー条件に関するということは理解される。時間および温度インキュベーション条件は、一般に、並行アッセイ間で同一である。

40

【0258】

例えば、本明細書に提供された方法では、2種の別個のアッセイにおいて試験分子をコ

50

グネイト結合タンパク質と接触させて、結合活性について試験する。ーアッセイでは、上記の腫瘍微小環境をシミュレートするバッファの存在下で、試験分子を、コグネイト結合タンパク質と接触させるかまたはそれとともにインキュベートする。第2のアッセイでは、上記の正常な生理学的条件をシミュレートするバッファの存在下で、試験結合分子を、コグネイト結合タンパク質と接触させるかまたはそれとともにインキュベートする。通常、インキュベーション反応は、試験分子またはタンパク質がコグネイト結合パートナー（例えば、抗原）と結合するのを可能にするよう、任意の所望の時間および温度で進めることができる。例えば、結合は、一般に、4 ～ 37 で、例えば、4 、室温または37 で実施される。結合の時間は、一般に、30分～48時間またはそれ以上であり、温度の関数であり得る。通常、結合分子またはタンパク質の結合は、室温で、30分～4時間の間またはほぼ30分～4時間の間、例えば、1時間～2時間、例えば、約1時間である。固体支持体は、任意の結合していない標的抗原を除去するために、結合に使用される同一バッファで洗浄され得る。

10

【0259】

例えば、接触することは、非腫瘍または微小環境をシミュレートするために、1 mM 乳酸、pH 7.4 および 25 % ヒト血清を用いて実施できる。それとは別に、接触工程は、腫瘍微小環境をシミュレートするために、16.5 mM 乳酸、pH 6.0、25 % ヒト血清を用いて実施される。各接触反応において、接触は、室温（すなわち、22 ）で1時間であり得る。

20

【0260】

したがって、各アッセイ条件では、治療用抗体または抗体変異体（例えば、抗EGFR抗体変異体）などの試験分子を、標的抗原などのコグネイト結合パートナーとともに、結合が、必要なバッファ条件（例えば、病変または正常微小環境）の存在下で起こることを可能にするよう、適当な時間および温度でインキュベートしてもよい。微小環境をシミュレートするバッファ条件を除いて、アッセイ条件（時間および温度）は、同一である。アッセイは、変動する濃度の試験分子の存在下で実施できる。コグネイト結合タンパク質（例えば、抗原）と接触される試験分子の量は、例えば、コグネイト結合タンパク質および試験分子（例えば、EGFR および抗EGFR または変異体）および特定の結合条件の関数であり、経験的に決定できる。一般に、変動する濃度が、段階希釈で試験される。全上清、希釈された上清または精製タンパク質を試験できる。上記で論じたように、試験分子は、結合している抗原結合性分子複合体の検出を促進して、結合活性を評価するために、検出可能な部分またはタグを用いて標識される。

30

【0261】

一部の例では、試験分子（例えば、修飾された治療用タンパク質）をコグネイト結合タンパク質（例えば、標的抗原）と接触させる前に、固相支持体表面上の非特異的タンパク質結合部位が、通常、ブロッキングされる。したがって、治療用抗体またはその変異体（例えば、抗EGFR変異体）およびコグネイト結合パートナー（例えば、EGFR または sEGFR）を接触させる工程は、通常、ブロッキング工程の後に実施され得る。固体支持体のブロッキングは、固体支持体との非特異的結合を低減し、バックグラウンドシグナルを低減し、吸着されたタンパク質との非特異的結合を低減し、吸着されたタンパク質を安定化し得る。ブロッキングの条件の選択は、当業者の能力の範囲内である。当技術分野で記載された任意のブロッキング条件を、本明細書において提供される方法において使用してよい。

40

【0262】

したがって、例えば、固相の、標的抗原などの結合されるコグネイト結合パートナーの吸着後に、アッセイを干渉しないタンパク質の水溶液を固相と混合して、抗原分子によって占有されていない表面上のタンパク質結合部位で、抗原を含有する固体支持体表面上に混合されたタンパク質を吸着できる。例えば、ブロッキング溶液として、ヒト、ウシ、ウマまたはその他の血清アルブミンを含有するものが挙げられる。一般に、ブロッキング溶液は、ヒト血清を含有する。プレートなどの固体支持体のブロッキングは、1種または複

50

数のブロッキングブロッキング剤が添加されている結合アッセイバッファーを使用して実施できる。例示的ブロッキング剤として、1～5%ウシ血清アルブミン、1～5%脱脂粉乳および25%ヒト血清が挙げられる。Tween-20などの界面活性剤およびチメリソール(thimerisol)などの保存料をブロッキング溶液に添加してもよい。結合アッセイバッファーは、すなわち、腫瘍微小環境バッファーまたは正常な生理学的バッファーを含む。水性タンパク質溶液-固体支持体混合物は、通常、30分、1時間またはそれ以上の時間維持され、温度の関数として変わり得る。ブロッキング反応は、任意の温度で実施され得、一般に、4～37で、例えば、4、室温(すなわち、22)または37で実施され得る。一部の例では、反応は、約4～37の温度で少なくとも1時間進めることが可能である。例えば、ブロッキングは、室温で1時間達成され得る。インキュベーションおよびブロッキング後に、得られた固相を、その後、すすいで、結合していないタンパク質を除去し、その後、試験分子(例えば、治療用タンパク質または抗体またはその変異体)と接触させてもよい。

10

20

30

40

50

【0263】

3) 条件的に活性である試験分子の検出および同定

コグネイト結合パートナーと特異的に結合する、治療用タンパク質、例えば、抗体変異体(例えば、抗EGFR抗体)などの試験分子を、選択または同定できる。結合していないタンパク質を洗浄除去した後に、当業者に公知の任意のアッセイまたは方法を使用して治療用タンパク質を検出できる。例えば、検出は、蛍光、放射活性またはその他の検出可能な部分の存在によって容易にされ得る。通常、試験分子(例えば、抗体変異体などの治療用タンパク質)にタグが付けられるので、検出は、抗タグ試薬を使用して行われる。抗タグ試薬の選択は、結合分子またはタンパク質とともに使用されるタグの関数である。さらに、アッセイにおいて使用される環境条件(例えば、pH)と適合する抗タグ試薬が選択される。このような試薬を同定または選択し、そのアッセイ条件との適合性を調べることは、当業者のレベル内である。例えば、実施例は、このような手順を例示する。

【0264】

抗タグ試薬は、市販の供給源またはその他の供給源などから容易に入手可能である。本明細書における方法において検出のために使用できる例示的抗タグ試薬として、それだけには限らないが、抗FLAG抗体または抗Myc抗体(Abcam, Cambridge, MA; GeneTex, Irvine, CA)などのベンダーから入手可能)が挙げられる。

【0265】

通常、本明細書における方法では、結合している複合体の検出の方法は、活性のレベルが評価され得るような定量化され得るものである。例えば、標識は、比色シグナル、化学発光シグナル、化学蛍光シグナルまたは放射活性シグナルなどのシグナルを生じ得る。標識の性質に応じて、標識の検出または検出および定量的ために種々の技術を使用できる。例えば、定量化の方法として、それだけには限らないが、分光光度法、蛍光法および放射活性法が挙げられる。

【0266】

酵素標識の例として、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよび-D-ガラクトシダーゼが挙げられる。シグナルを作り出すために添加できる酵素基質の例として、PNPP(p-ニトロフェニルホスフェート、二ナトリウム塩)、ABTS(2,2'-アジノビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸]-二アンモニウム塩)、OPD(o-フェニレンジアミンジヒドロクロリド)およびSureblue TMBマイクロウェルペルオキシダーゼ基質1-成分(KPL、番号52-00-03)を含めたTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)(SOMALabs, Romeo, Mich.)が挙げられる。反応は、停止試薬(例えば、TMB停止溶液)を添加することによって停止できる。適した波長(すなわち、450nm)での吸光度を求めることができる。

【0267】

蛍光には、多数の蛍光光度計が利用可能である。セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）などの化学発光物質（chemiluminescers）には、ルミノメーターまたはフィルムが利用可能である。酵素を用いて、蛍光、化学発光または着色生成物を、蛍光定量的に、発光定量的に、分光光度的にまたは視覚的に決定または測定してもよい。例えば、抗タグ試薬を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）またはその他の検出可能な薬剤とコンジュゲートしてもよい。

【0268】

通常、インキュベーション反応は、結合分子またはタンパク質の検出を可能にするよう、任意の所望の時間および温度で進めることができる。例えば、検出は、一般に、4 ~ 37 で、例えば、4 、室温（すなわち、22 ）または37 で実施される。結合の時間は、一般に、30分~48時間またはそれ以上であり、温度の関数である。通常、結合分子またはタンパク質の結合は、室温で、30分~4時間の間またはほぼ30分~4時間の間、例えば、1時間~2時間、例えば、約1時間である。固体支持体は、任意の結合していない標的抗原を除去するために、結合に使用される同一バッファーで洗浄され得る。

10

【0269】

各アッセイ条件下で結合活性が決定されると、上記の節B.3に記載されるように、第1の条件（例えば、病変環境、例えば、腫瘍環境）および第2の条件（例えば、非病変または正常環境）下での結合活性を比較する。第2の条件よりも第1の条件下でより大きな活性、例えば、1.5~100の間またはほぼ1.5~100の間、例えば、2~50、例えば、5~30またはそれ以上である活性の割合を示す条件的活性分子が同定される。

20

【0270】

b. 溶液結合アッセイ

本明細書において提供される方法において使用するためのアッセイとして、治療用タンパク質の、コグネイト結合パートナーとの結合が、溶液中で測定されるアッセイが挙げられる。当業者ならば、本明細書において提供される方法において使用するための溶液結合アッセイを選択できる。以下は、本明細書において提供される方法において使用できる例示的溶液結合アッセイの簡単な説明である。しかし、これらは、制限を意味するものではなく、本明細書において提供される方法において使用するために、平衡透析、競合結合アッセイ（例えば、Myers et al., (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72(9):3683-3686）、放射標識結合アッセイ（例えば、Feau et al., (2009) J. Biomol. Screen. 14(1):43-48）、熱量測定法（等温滴定熱量測定法（ITC）および示唆走査熱量測定法（例えば、Perozzo et al., (2004) J. Recept. Signal. Transduct. Res. 24(1-2):1-52; Holdgate (2001) Biotechniques 31(1):164-166, 168, 170), Celej et al. (2006) Anal. Biochem. 350(2):277-284)を含めた）および蛍光共鳴エネルギー移動アッセイを含めた分光学的蛍光アッセイを含めた、当業者に公知の任意の溶液結合アッセイが考慮される。結合活性が溶液中で決定される本明細書における方法の条件は、本明細書における説明に基づいて当業者によって決定できる。例えば、条件は、固体支持体上で実施される結合アッセイについて上記で論じた条件から適応させることができる。

30

【0271】

1) 等温滴定熱量測定法（ITC）

ITCでは、一方の結合パートナーが、もう一方の結合パートナーを含有する溶液中に滴定され、それによって熱が発生するかまたは吸収され、これが熱量計によって定量化される。ITCを使用して、反応物からの熱効果をナノモル以下の量で検出できる。例えば、等温滴定熱量測定アッセイを実施して、治療用タンパク質の、コグネイト結合パートナーとの結合に関与する、結合の自由エネルギー（ G ）、結合のエンタルピー（ H ）およびエントロピー（ S ）および熱容量変化（ C_p ）を含めたすべての熱力学的パラメータを測定できる。これらの特徴の分析は、治療用タンパク質およびコグネイト結合パートナー間の結合の機序および熱力学的パラメータを解明するのに役立ち得る（Perozzo et al., (2004) J. Recept. Signal. Transduct. Res. 24(1-2):1-52）。

40

50

【 0 2 7 2 】

2) 分光学的アッセイ

本明細書において提供される方法では、当業者に公知の任意の分光学的アッセイを使用して、治療用タンパク質の結合が検出できる。修飾されたタンパク質およびコグネイト結合パートナー間の相互作用は、UV-vis 分光学的技術、蛍光共鳴エネルギー移動アッセイおよび蛍光消光アッセイなどの蛍光アッセイを含めた、当業者に公知の任意の分光学的アッセイによって検出できる (Wu (2007), J. Pharm. Biomed. Anal. 44(3):796-801)。例えば、固有の蛍光の消光 (quenching) などの、コグネイト結合パートナーとの治療用タンパク質結合の結果としての、蛍光または UV / vis 吸収の変化を検出できる。一部の例では、治療用タンパク質および / またはコグネイト結合パートナーを、蛍光標識または UV / vis 標識を用いて標識できる。分光学的シグナルを測定した後、観察された結合定数を算出できる (例えば、Zhang et al. (2009) Spectrochim Acta A Biomol. Spectrosc. 72(3):621-626)。

10

【 0 2 7 3 】

c. 細胞ベースのアッセイ

治療用タンパク質の、コグネイト結合パートナーとの結合を検出するために、本明細書において提供される方法において使用するためのアッセイとして、細胞ベースのアッセイ、特に、哺乳類細胞表面ディスプレイ系などの細胞表面ディスプレイ系を使用して実施されるアッセイが挙げられる。例示的方法では、治療用タンパク質または修飾された治療用タンパク質のライブラリーを含めた変異型治療用タンパク質のライブラリーをコードする核酸が、哺乳類細胞などの細胞における発現に適したベクターに導入され得る。次いで、細胞がベクターを用いてトランスフェクトされ、治療用タンパク質 (複数可) が細胞によって発現される。表面に発現された治療用タンパク質を含有する細胞のライブラリーが、可溶性または表面と結合しているコグネイト結合パートナーを含有する溶液と接触され得る。結合活性は、細胞の表面との結合を検出できる任意のアッセイを使用して検出され得る。活性はまた、試験分子または治療用タンパク質の機能活性を評価することによって評価され得る。本明細書において提供される方法において使用するために、細胞増殖アッセイ、細胞死アッセイ、フローサイトメトリー、細胞分離技術、蛍光活性化細胞選別 (FACS)、位相差顕微鏡法、蛍光顕微鏡法、受容体結合アッセイ、細胞シグナル伝達アッセイ、免疫細胞化学およびリポーター遺伝子アッセイを含めた当業者に公知の任意の細胞ベースのアッセイが考慮される。一部の例では、アッセイは、蛍光活性化細胞選別 (FACS) アッセイである。

20

30

【 0 2 7 4 】

タンパク質を、分泌型、可溶性分子、細胞表面分子または細胞内抗体として、哺乳類細胞によって発現させることができる。例示的方法では、細胞のほとんどまたはすべてが、細胞表面上に固定されたタンパク質ライブラリーのメンバーをディスプレイする条件下で、細胞を、タンパク質のライブラリーを用いてトランスフェクトできる。所望により、哺乳類細胞トランスフェクタントのほとんどが、そのゲノム中に組み込まれた1つのプラスミドのみを有する発現系が使用され得る。したがって、トランスフェクタントのほとんど (すなわち、少なくとも約70%または約80%または約90%) が、1種の治療用タンパク質の1つまたは複数の分子を発現する。これは、例えば、個々のトランスフェクタントを単離および培養すること、発現された配列を増幅し、配列決定することによって確認され、それらが単一の配列を有するかどうかを調べることができる。

40

【 0 2 7 5 】

本明細書において提供される方法の一部の例では、治療用タンパク質は、哺乳類細胞の表面上にディスプレイされる抗体である。全長抗体、二価抗体、IgG抗体などの機能的抗体を含めた本明細書に記載された任意の抗体を、哺乳類細胞の表面上に発現させることができる。抗体は断片、例えば、Fab断片またはscFv断片であってもよい。抗体は、scFv-FcなどのFc領域または2つの重鎖および2つの軽鎖を含む全長抗体を含み得る。当業者ならば、適した抗体断片を選択できる。例えば、哺乳類細胞において製造

50

された S c F v - F c および全長抗体は、その多量体性およびその長いインビボ半減期、抗原に対する高親和性および凝集体を形成する低い傾向を含めて、s c F v または F a b 断片を上回るいくつかの利点を有し得る。例えば、抗 E G F R 変異型抗体を、細胞の表面上にディスプレイし、コグネイト結合パートナー（例えば、および E G F R または可溶性 E G F R ）に対する活性を評価する。

【 0 2 7 6 】

（ a ）試験分子の細胞表面発現

治療用タンパク質、例えば、抗体変異体（例えば、抗 E G F R 抗体変異体）などの試験分子を、細胞の表面上に発現させることができる。治療用タンパク質などの試験分子をコードする核酸を、本明細書に記載されたベクターなどの適したベクター中に挿入し、細胞をトランスフェクトするために使用できる。使用できる細胞株として、当技術分野で記載されたか、または American Type Culture Collection などのリポジトリから得ることができる任意の細胞株が挙げられる。当業者ならば、所望の特性を有する細胞株を選択できる。例えば、哺乳類細胞において製造された抗体は、適切にフォールディングされ、グリコシル化される可能性が、原核細胞において製造されたものよりも高い。一部の例では、治療用タンパク質は、チャイニーズハムスター卵巣（C H O ）細胞などの哺乳類細胞において発現される。

【 0 2 7 7 】

抗体などのタンパク質を哺乳類細胞の表面上にディスプレイするための当技術分野で公知の任意のベクターを、本明細書において提供される方法において使用できる（例えば、Zhou et al. (2010), MAbs 2(5):508-518 参照のこと）。例えば、ベクターは、治療用タンパク質をコードする核酸を、分泌タンパク質、可溶性タンパク質として、または細胞表面タンパク質として発現できる。所望により、ベクターは、哺乳類トランスフェクションのために、適切な純度および量の核酸を製造する目的上、細胞中での発現に適している。これらの細胞は、例えば、大腸菌（E s c h e r i c h i a c o l i ）もしくはバチルス・サブチルス（B a c i l l u s s u b t i l u s ）などの細菌細胞またはサッカロミセス・セレビシエ（S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e ）などの真菌細胞であり得る。宿主細胞によって、形質転換されたライブラリーから 1 種類のみの治療用タンパク質が発現されるよう、ベクターを選択できる。細胞のトランスフェクションの方法は、当業者に公知であり（例えば、Hahn and Scanlan (2010) Top. Curr. Chem. 296 :1-13）、例えば、ポリカチオンシクロデキストリンベクター（例えば、Cryan et al, (2004) Eur J Pharm Sci. 21(5):625-33）およびカチオン性リボソームを含めたりリボソーム複合体（例えば、Gao and Huang (1995) Gene Ther. 2(10):710-722）などの化学的方法が挙げられる。使用できる例示的カチオン性リボソームとして、3 - [N - (N ' , N ' - ジメチル - アミノエタン) - 1 - カルバモイル] - コレステロール（D C - C h o l ）、1 , 2 - ビス（オレオイルオキシ - 3 - トリメチルアンモニオ - プロパン（D O T A P ）（例えば、W O 9 8 / 0 7 4 0 8 参照のこと）、リジニルホスファチジルエタノールアミン（L - P E ）、リボスベルミンなどのリボポリアミン、N - (2 - ヒドロキシエチル) - N , N - d - ジメチル - 2 , 3 - ビス（ドデシルオキシ）1 - プロパンアミニウムプロミド、ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド（D D A B ）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（D O P E ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（D O P C ）、N (1 , 2 , 3 - ジオレイルオキシ) プロピル - N , N , N - トリエチルアンモニウム（D O T M A ）、D O S P A 、D M R I E 、G L - 6 7 、G L - 8 9 、リボフェクチンおよびリボフェクタミン（Thiery, et al. Gene Ther. (1997); Felgner, et al., Annals N.Y. Acad. Sci. (1995); Eastman, et al., Hum. Gene Ther. (1997)）を含めて、U S 7 9 8 9 6 0 6 に記載されるものが挙げられる。トランスフェクションの方法としてまた、エレクトロポレーション（Chu et al. (1987), Nucl. Acid. Res. 15(3) 1311-1326.）、ソノポレーション（sonoporation）（例えば、Kumon, et al (2009), Ultrasound Med Biol. 35(3):494-506）、遺伝子銃（例えば、O'Brien and Lummis (2004) Methods 33(2):121-125）およびウイルス形質導入（例えば、Flotte and Carter

10

20

30

40

50

(1995), Gene Ther. 2(6):357-362)などの非化学的方法も挙げられる。

【0278】

一部の例では、トランスフェクタントは、治療用タンパク質を細胞表面タンパク質として発現し得る。当業者ならば、本明細書に記載された修飾されたタンパク質を発現させるためにベクターを選択できる。例えば、哺乳類細胞株のゲノム中の特定の部位に組み込まれるベクターを使用できる。使用できるベクターの一例として、F L P - I N (商標)ベクター (Invitrogen) があり、これは、部位特異的染色体組み込みにとって適当な部位を含有する細胞中にトランスフェクトされ得る。F L P - I N (商標)ベクターは、サッカロミセス・セレピシエのF L Pリコンビナーゼを使用してF L P組換え標的 (F R T) 部位を含有するよう遺伝子操作されている哺乳類細胞株のゲノム中の特定の部位中に組み込まれ得る (例えば、米国特許第5,654,182号、同5,677,177号、同5,885,836号、同6,956,146号および同7,884,054号およびO'Gorman et al. (1991), Science 251:1351-1355参照のこと)。使用できるその他のベクター系として、C r e - L o x P系 (Trinh and Morrison (2000), J. Immunol. Methods 244:185-193) がある。C r eリコンビナーゼは、2つのL o x P部位間の組換えを触媒し得る。一部の実施形態では、わずかに異なる配列を有する2つのL o x P部位 (2つの異なる部位間の組換えが、C r eリコンビナーゼによって触媒され得ないような) が、同じ2つの異なるL o x P部位がそれぞれ両端に位置する修飾された抗体をコードする配列でトランスフェクトされる哺乳類細胞中に存在し得る。この状況では、抗体をコードする配列を、C r eリコンビナーゼによって同様に切除される可能性を伴わずに、2つの異なるL o x P部位間に導入できる。その他の実施形態では、L o x P部位は同一であり得る。別の態様では、C r eリコンビナーゼの発現または活性は、条件的に制御可能であり得る。

【0279】

ベクター中に使用される調節配列は、通常、哺乳類、微生物、ウイルスおよび/または昆虫遺伝子に由来する。調節配列の例として、転写プロモーター、オペレーターおよびエンハンサー、リボソーム結合部位 (例えば、Kozak (1991), J. Biol. Chem. 266:19867-19870参照のこと)、配列内リボソーム進入部位、転写および翻訳開始および終結を制御するための適当な配列、ポリアデニル化シグナル (例えば、McLauchlan et al. (1988), Nucleic Acids Res. 16:5323-5333参照のこと) ならびにマトリックスおよびスキャフォールド付着部位 (Phi-Van et al. (1988), Mol. Cell. Biol. 10:2302-2307; Stief et al. (1989), Nature 341:343-345; Bonifer et al. (1990), EMBO J. 9:2843-2848参照のこと) が挙げられる。ヌクレオチド配列は、調節配列がポリペプチドコード配列と機能的に関連する場合に作動可能に連結される。したがって、プロモーターヌクレオチド配列は、プロモーターヌクレオチド配列が、コード配列の転写を制御する場合に、ポリペプチドコード配列と作動可能に連結され得る。

【0280】

発現ベクターは、通常、治療用タンパク質をコードする核酸と作動可能に連結された、哺乳類細胞において転写を指示できるプロモーターを含む。高レベルの転写が可能となることが多い。結合を検出するために高レベルの発現が必要である状況では、F L P - I N (商標)型ベクターと比較して、発現ベクターが有利であり得る。このようなプロモーターの例として、C M VおよびS V 40ウイルスプロモーター、哺乳類アクチンプロモーター、ラウス肉腫ウイルスの3'側の長い末端反復配列内に含有されるプロモーター、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーターまたはメタロチオネイン遺伝子のプロモーターが挙げられる。例えば、前初期遺伝子1のヒトC M Vプロモーター/エンハンサーを使用してもよい (例えば、Paterson et al. (1994), Applied Microbiol. Biotechnol. 40:691-698参照のこと)。哺乳類宿主細胞において構造遺伝子配列を発現するためのその他の遺伝子エレメントを提供するために、S V 40ウイルスゲノムに由来するD N A配列、例えば、S V 40起源の、初期および後期プロモーター、エンハンサー、スプライスおよびポリアデニル化部位を使用できる。ウイルス初期および後期プロモーターは、両者とも、ウイル

スゲノムから、ウイルス複製起点も含有し得る断片として容易に得られるので特に有用である (Fiers et al. (1978), Nature 273:113; Kaufman (1990), Meth. in Enzymol. 185:487-511)。SV40 ウイルス複製起点部位中に位置する Hind III 部位から Bgl I 部位に向けて伸びるおよそ 250 bp の配列が含まれるという条件で、小または大 SV40 断片も使用できる。

【0281】

その他の高度に発現される哺乳類遺伝子に由来するプロモーターも使用できる。発現ベクターはまた、通常、細菌の DNA 複製起点、細菌において正に選択され得る遺伝子産物をコードする配列、ポリアデニル化部位、リボソーム結合部位および所望により、ハイグロマイシン、ネオマイシンまたは G418 に対する抵抗性を付与する配列などの哺乳類細胞において正に選択され得る遺伝子産物をコードする配列も含む。発現ベクターの一例として、pDC302 (Mosley et al. (1989), Cell 59:335-348) がある。発現ベクターのその他の例として、pTriE (商標) - 4 Ek/LIC ベクター (Novagen, Wis., USA) または pGEN ベクター (Promega, Wis., USA) などの市販のベクターが挙げられる。

10

【0282】

一部の例では、膜貫通ドメインの、タンパク質の N 末端および / または C 末端への付着などによって、細胞の表面上にディスプレイするための 1 つまたは複数の膜貫通ドメインを有する治療用タンパク質が発現される。本明細書において提供される方法において膜会合配列として使用できる膜貫通ドメインとして、本明細書に記載された、当技術分野で公知の、または予測され得る、任意の膜貫通ドメインが挙げられる (例えば、Kahsay et al. (2005) Bioinformatics 21(9):1853-1858 参照のこと)。例示的膜会合配列は、当業者に公知の、膜貫通ドメインおよびグリコホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー配列を含む (例えば、Udenfriend and Kodukula (1995), Methods Enzymol. 250:571-582 参照のこと)。膜貫通ドメインを治療用タンパク質に付着できる例示的ベクターとして、ベクター FVTM が挙げられる (Zhou et al. (2010), MAbs 2(5):508-518)。

20

【0283】

当業者ならば、治療用タンパク質の発現を提供するその他の発現系を選択できる。例えば、治療用タンパク質が抗体である場合、抗体の発現に適しているベクターを選択できる。細胞の表面上での抗体の哺乳類発現のための多数のベクターが、当業者に公知である。例えば、重鎖および軽鎖コード配列が、別個に転写および翻訳され得るベクターを選択してもよいし、または重鎖および軽鎖コード配列が一緒に転写および翻訳され得るベクターを選択してもよい。膜貫通ドメインなどの膜会合配列は、重鎖に、もしくは軽鎖に付着されてもよく、または膜貫通ドメインは、重鎖および軽鎖に付着されてもよい。膜会合配列は、重鎖および / または軽鎖の N 末端または C 末端に付着されてもよい。

30

【0284】

(b) 結合および蛍光活性化細胞選別 (FACS) による検出

蛍光活性化細胞選別 (FACS) は、蛍光細胞を非蛍光細胞と区別する細胞分離技術である (Current Protocols in Cytometry, Robinson et al., eds., John Wiley & Sons (2004); Edidin (1989), Methods in Cell Biology 29:87-102; Herzenberg et al., (1976) Sci. Am. 234(3):108-117、米国特許第 5,968,738 号および同 5,804,387 号)。フローソーターは、多数の個々の、ライブラリーインサートを含む細胞を迅速に調べることができる (例えば、1 時間当たり 1 千万個 ~ 1 億個の細胞) (Shapiro et al., Practical Flow Cytometry, 1995)。手短には、懸濁液中の細胞を、各々単細胞を含む液滴でレーザーの前に通す。液的に電荷を加え、静電偏向システムが、適当な収集試験管中に荷電液滴を集める (Basu et al. (2010), J. Vis. Exp (41):1546)。生体細胞を選別し、調べるためのフローサイトメーターは、当技術分野で周知である。公知のフローサイトメーターは、例えば、米国特許第 4,347,935 号; 同 5,464,581 号; 同 5,483,469 号; 同 5,602,039 号; 同 5,643,796 号および同 6,211,477 号に記載されている。その他の公知のフローサイトメーター

40

50

として、Becton Dickinson and Companyによって製造されたFACS Vantage (商標) システムおよびUnion Biometricaによって製造されたCOPAS (商標) システムがある。

【0285】

FACSを使用して、望ましい(desireable)結合特性を有するタンパク質をディスプレイする細胞を選択できる。本明細書において提供される方法では、タンパク質などの条件的に活性である試験分子を、異なる条件下でタンパク質をコグネイト結合パートナーとの結合についてスクリーニングすることによって、FACSアッセイによって同定できる。例示的方法では、細胞を、細胞表面上にディスプレイされるタンパク質をコードするベクターを用いてトランスフェクトする。次いで、細胞をコグネイト結合パートナーと接触させる。細胞表面上にディスプレイされたタンパク質の、コグネイト結合パートナーとの結合は、細胞が関連している蛍光をもたらし得る。蛍光細胞を非蛍光細胞から分離し、コグネイト結合パートナーと結合する活性タンパク質を、コグネイト結合パートナーと結合しないタンパク質をディスプレイする細胞からこのように分離する。活性および/または不活性タンパク質をコードする核酸を単離し、配列決定して、コグネイト結合パートナーと相互作用するタンパク質を同定できる。さらに、分離された細胞を、さらなるFACSアッセイを含めた、本明細書に記載されたアッセイなどのさらなるアッセイに付すことができる。

10

【0286】

通常、コグネイト結合パートナーは、検出において助けとなるよう検出可能に標識される。あるいは、コグネイト結合パートナーは標識されないが、二次物質の使用によって検出され得る。二次試薬のコグネイト結合パートナーの標識として、蛍光標識(例えば、Francisco et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10444-10448)または蛍光二次標識と相互作用する標識が挙げられる。当業者に公知の任意のフルオロフォアを、例えば、コグネイト結合パートナー上の蛍光標識または二次標識などの蛍光標識として使用できる。例示的フルオロフォアとして、フルオレセイン、ローダミンまたはテキサスレッド、FLUOR X (登録商標)、ALEXA FLUOR、OREGON GREEN、TMR (テトラメチルローダミン)、ROX (X-ローダミン)、BODIPY 630/650およびCy5 (Amersham Pharmacia Biotech of Piscataway, N. J. からかまたはMolecular Probes Inc. of Eugene, Oreg. から入手可能) または当業者に公知の任意のその他の蛍光標識が挙げられる(例えば、Giepmans et al. (2006), Science Apr 14;312(5771):217-24参照のこと)。蛍光サンプルを分析する時点で検討する判定基準は、Alexey et al. (1996) The PCT International Society of Optical Engineering 2705/63によってまとめられている。

20

30

【0287】

さらなる例では、二次試薬との相互作用において助けとなるように、コグネイト結合パートナーは、蛍光二次標識と相互作用する標識を含み得る。コグネイト結合パートナー上の標識と相互作用する任意の二次標識を使用できる。一部の例では、EGFRまたはEGFR sECDなどのコグネイト結合パートナーを、当業者に公知の、または本明細書に記載されたリンカーを有するビオチンで標識し、細胞をストレプトアビジンなどのビオチンと相互作用する分子に付着された蛍光二次標識と混合する。一部の例では、二次標識は、フルオレセインに付着されたストレプトアビジンである。

40

【0288】

一例では、FACS分析を、同時にかまたは並行して実施される、異なる条件セット下での2つの別個のアッセイとして実施できる。一例では、アッセイを並行して実施し、試験分子または治療用タンパク質を発現する細胞集団を、2つの集団に分割する。活性が望まれる第1の条件(例えば、病変微小環境または腫瘍環境)をシミュレートするアッセイバッファー中で1つの集団を試験分子または治療用タンパク質と接触させる。第2の集団を、活性が望まれない条件(例えば、生理学的に正常な環境)をシミュレートするアッセ

50

イバッファー中で試験分子と接触させる。FACSアッセイでは、接触させることなどの工程のいずれも、腫瘍などの病変微小環境をシミュレートする条件または正常な微小環境をシミュレートする条件下で実施できる。腫瘍微小環境をシミュレートする例示的条件として、16.5 mM 乳酸、pH 6.0、25% ヒト血清などの条件セットがある。正常な微小環境をシミュレートする例示的条件セットとして、非腫瘍または微小環境をシミュレートするための1 mM 乳酸、pH 7.4 および25% ヒト血清などの条件セットがある。

【0289】

例えば、治療用タンパク質を発現する細胞を、例えば、コグネイト結合パートナーを含有する溶液またはバッファーと混合することによって、標識されたコグネイト結合パートナーと接触させることができ、ここで、結合バッファーは、所望の条件（本明細書に記載されたような第1の条件または第2の条件のいずれか）を模倣またはシミュレートするものである。別個に（同時に、または本明細書に記載されるようなポジティブもしくはネガティブ選択後に反復工程として実施される）、アッセイされる治療用タンパク質を発現する第2の同一細胞集団を、例えば、コグネイト結合パートナーを含有する溶液またはバッファーと混合することによって、標識されたコグネイト結合パートナーと接触させることができ、ここで、結合バッファーは、もう一方の条件を模倣またはシミュレートするものである。各工程では、接触工程は、特定の結合バッファーまたは溶液を除いて同一である。接触工程は、細胞表面タンパク質がコグネイト結合パートナー（例えば、抗原）と結合することを可能にするよう、任意の所望の時間および温度で実施できる。例えば、結合は、一般に、4 ~ 37 で、例えば、4、室温または37 で実施される。結合の時間は、一般に、30分 ~ 48時間またはそれ以上であり、温度の関数であり得る。通常、結合分子またはタンパク質の結合は、室温で、30分 ~ 4時間の間またはほぼ30分 ~ 4時間の間、例えば、1時間 ~ 2時間、例えば、約1時間である。細胞は、任意の結合していないコグネイト結合パートナーを除去するために、結合に使用される同一バッファーで洗浄され得る。さらに、最適化のために変えることができる特定のパラメータとして、それだけには限らないが、コグネイト結合パートナーの濃度、動力学的競合時間およびFACSストリンジェンシーが挙げられる。さらに、FACSスクリーニングは、平衡条件または动力学条件下で実施できる。

【0290】

検出工程において、二次試薬が使用される場合には、細胞を洗浄して結合していないコグネイト結合パートナーを除去した後に、細胞を適当な二次試薬と接触させる。このさらなる接触工程は、二次試薬がコグネイト結合タンパク質と結合するのを可能にするよう、任意の所望の時間および温度で実施できる。例えば、結合は、一般に、4 ~ 37 で、例えば、4、室温または37 で実施される。結合の時間は、一般に、5分 ~ 2時間またはそれ以上であり、温度の関数であり得る。一般に、二次試薬および細胞の結合は、室温で、30分 ~ 4時間の間またはほぼ30分 ~ 4時間の間、例えば、1時間 ~ 2時間、例えば、約1時間である。細胞は、任意の結合していない二次試薬を除去するために、結合に使用される同一バッファーで洗浄され得る。

【0291】

蛍光細胞は非蛍光細胞から分離し、コグネイト結合パートナーと結合するタンパク質をディスプレイする細胞を、コグネイト結合パートナーと結合しないタンパク質をディスプレイする細胞から分離できる。核酸を、分離された蛍光細胞および非蛍光細胞から単離でき、核酸を、配列決定して、発現された、コグネイト結合パートナーと相互作用するかまたは相互作用しないタンパク質を同定できる。

【0292】

通常、結合アッセイは、まずポジティブまたはネガティブ選択工程を実施することによって実施する。フローソーターは、特定の蛍光特性を有する細胞を集めるかまたは選別することができる。この特徴を使用して、望まれる特定の結合特徴に応じて、結合を示すおよび/または結合を示さないと同定される第1の細胞集団を選択または排除できる。例えば、ポジティブ選択工程では、接触させることおよび結合反応を、上記のように実施し、

細胞を分離して、条件セット下でコグネイト結合パートナーと結合するタンパク質をディスプレイする細胞を濃縮する。通常、ポジティブ選択工程では、接触させること、標識することおよび選別することを、タンパク質の活性が望まれる生理的条件をシミュレートする条件セット下で実施する。ポジティブ選択工程のための条件の例として、腫瘍微小環境の生理的条件をシミュレートする条件がある。ネガティブ選択工程では、細胞を分離して、条件セット下でコグネイト結合パートナーとほとんど結合しないかまたは全く結合しないタンパク質をディスプレイする細胞を分離および/または濃縮する。通常、ネガティブ選択工程では、接触させること、標識することおよび選別することを、タンパク質の活性が望まれない生理的条件をシミュレートする条件セット下で実施する。ネガティブ選択工程のための条件の例として、正常な微小環境の生理的条件をシミュレートする条件がある。

10

【0293】

選択工程または一連の代替選択工程は、1回または複数回、例えば、少なくとも約2、3、4、5、6または7回実施できる。必要に応じて、2種以上の異なる選択工程を、同時にまたは連続して(in succession)実施できる。例えば、ポジティブ選択工程に、ネガティブ選択工程を続けてもよく、ポジティブ選択工程およびネガティブ選択工程の組合せを、条件的に活性であるタンパク質をディスプレイする細胞を単離するために必要な回数反復してもよい。一部の例では、当業者に公知の、または本明細書に記載された任意のFACS選択パラメータを、選択のストリンジェンシーを増大または減少するよう適合させることができる。例えば、選択のストリンジェンシーは、細胞が、条件的に活性であるタンパク質をディスプレイする細胞集団で濃縮されるようになるので、選択の最初のラウンドでは低いものであり、後のラウンドで高めることができる。ソートゲートは、コグネイト結合パートナーに対して最高の親和性または最低の親和性を示す細胞を選択するよう確立できる。ソートゲートは、当業者によって経験的に確立できる。さらに、ライブラリーは、稀なクローンを単離する可能性を改善するために少なくとも10倍オーバーサンプリングされ得る。

20

【0294】

各選択ラウンドの間に、細胞を再増殖させるおよび/または細胞が回復できるよう誘導するおよび/または細胞表面上でのタンパク質発現を増大させることができる。特定の作用様式によって束縛されるものではないが、この反復プロセスが、条件的に活性であるタンパク質を発現する細胞の集団を濃縮するのに役立つ。

30

【0295】

D. タンパク質を発現する方法

本明細書におけるスクリーニングアッセイにおいて使用するための試験分子、特に、治療用タンパク質または抗体は、標準細胞培養および当技術分野で公知のその他の発現系を使用して発現させることができる。スクリーニング法において使用する前に、タンパク質を精製してもよい。あるいは、全上清または希釈上清を、本明細書における二重アッセイにおいてスクリーニングできる。

【0296】

本明細書における方法において使用される結合分子、タンパク質および標的抗原は、組換えによって製造でき、または商業的ベンダーから購入できる。例えば、抗体などの結合分子は、当業者の範囲内にある組換えDNA法によって製造できる。対象とするタンパク質をコードするDNAは、合成によって製造できるか、または従来の手順を使用して(例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)容易に単離し、配列決定できる。例えば、対象とするタンパク質または抗体を製造または発現するとわかっている任意の細胞供給源は、このようなDNAの好ましい供給源として役立ち得る。別の例では、抗体をコードするDNAの配列を決定すると、遺伝子合成技術を使用して核酸配列を構築できる。

40

【0297】

さらにまた、突然変異誘発技術を使用して、任意のタンパク質の変異体の形態を作製で

50

きる。DNAはまた、修飾することもできる。例えば、遺伝子合成または日常的な分子生物学技術を使用して、ヌクレオチドの挿入、欠失、付加または置換を達成できる。例えば、さらなるヌクレオチド配列を核酸配列につなぐことができる。一例では、合成遺伝子をベクター、例えば、タンパク質発現ベクター中にクローニングする目的のために、制限エンドヌクレアーゼ部位を含有する配列などのリンカー配列を加えることができる。さらに、機能的DNAエレメントを規定するさらなるヌクレオチド配列を、核酸分子に作動可能に連結してもよい。このような配列の例として、それだけには限らないが、細胞内タンパク質発現を促進するよう設計されるプロモーター配列およびタンパク質分泌を促進するよう設計されるリーダーペプチド配列が挙げられる。

【0298】

抗体などのタンパク質を、全長タンパク質または全長未満のタンパク質として発現させることができる。例えば、抗体断片を発現させることができる。本明細書において提供される核酸分子およびタンパク質は、当業者に公知の任意の方法によって作製できる。このような手順は日常的なものであり、当業者に周知である。それらとして、遺伝子合成、PCR、連結、クローニング、トランスフェクションおよび精製技術を含めた、日常的な分子生物学技術が挙げられる。このような手順の説明は、以下に提供される。

【0299】

DNAは単離されると、発現ベクター中に入れることができ、次いで、これを宿主細胞中にトランスフェクトする。ベクターの選択は、所望の適用に応じて変わり得る。例えば、核酸の挿入後、例えば、タンパク質遺伝子を、その複製および/または発現のために増幅するために、通常、ベクターを使用して、宿主細胞を形質転換する。このような例では、高レベル発現に適したベクターが使用される。

【0300】

抗体の発現のために、一般に、抗体の重鎖をコードする核酸を、ベクター中にクローニングし、抗体の軽鎖をコードする核酸をベクター中にクローニングする。遺伝子は、その二重発現のために単一ベクター中にクローニングしてもよく、別個のベクター中にクローニングしてもよい。必要に応じて、ベクターはまた、その他の抗体の形態を作製するために、さらなる定常領域（複数可）またはヒンジ領域をコードするさらなる配列を含有し得る。ベクターを、宿主細胞にトランスフェクトし、発現させることができる。発現は、当業者に公知の任意の細胞発現系においてであり得る。例えば、宿主細胞として、本来なら組換え宿主細胞において合成抗体を得るための免疫グロブリンタンパク質を産生しない細胞が挙げられる。例えば、宿主細胞として、それだけには限らないが、サルCOS細胞、チャニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、293FS細胞、HEK293-6E細胞、NSO細胞またはその他の骨髓腫細胞が挙げられる。その他の発現ベクターおよび宿主細胞は以下に記載される。

【0301】

一例では、抗体の重鎖をコードする核酸を第1の発現ベクター中にライゲーションし、抗体の軽鎖をコードする核酸を第2の発現ベクター中にライゲーションする。発現ベクターは同一であっても異なってもよいが、一般に、それらは、それからのタンパク質（重鎖および軽鎖）の匹敵する発現を可能にするよう十分に適合している。一般に、第1および第2の発現ベクターを、通常、1:1の割合で宿主細胞中に同時トランスフェクトする。ベクターの例示として、それだけには限らないが、p1HCおよびpLCが挙げられる（Tiller et al. (2008) J Immunol. Methods, 329:112-24）。その他の発現ベクターとして、軽鎖発現ベクターpAG4622および重鎖発現ベクターpAH4604が挙げられる（Coloma et al. (1992) J Immunol. Methods, 152:89-104）。pAG4622ベクターは、ヒトL鎖のC領域ドメインおよびgpT選択マーカーをコードするゲノム配列を含有する。pAH4604ベクターは、hisd選択マーカーおよびヒトH鎖1C領域ドメインをコードする配列を含有する。別の例では、重鎖および軽鎖を、重鎖および軽鎖両方の発現カセットを有する単一ベクター中にクローニングできる。

【0302】

したがって、本明細書において提供された抗体は、全長抗体としてまたはそれだけには限らないが、F a b、F a b ヒンジ断片、s c F v 断片、s c F v タンデム断片および s c F v ヒンジおよび s c F v ヒンジ (E) 断片を含めた、全長未満である抗体として作製または発現できる。抗体断片の製造のために、種々の技術が開発されている。伝統的に、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク質分解消化によって誘導された (例えば、Mori moto et al. (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117; B rennan et al. (1985) Science, 229:81)。断片はまた、組換え宿主細胞によって直接的に製造できる。F a b、F v および s c F v 抗体断片はすべて、大腸菌 (E . c o l i) などの宿主細胞において発現させることができ、それから分泌させることができ、このようにして、多量のこれらの断片の容易な製造が可能となる。また、F a b ' - S H 断片を化学的にカップリングして、F (a b ')₂ 断片を形成してもよい (Carter et al. (1992) Bio/Technology, 10:163-167)。別のアプローチによれば、F (a b ')₂ 断片を、組換え宿主細胞培養物から直接単離できる。その他の例では、最適な抗体は、一本鎖 F v 断片 (s c F v) である (例えば、W O 9 3 / 1 6 1 8 5 ; 米国特許第 5 , 5 7 1 , 8 9 4 号および同 5 , 5 8 7 , 4 5 8 号参照のこと)。F v および s F v は、定常領域を欠く無傷の結合部位を有する唯一の種であり、したがって、それらはインビボ使用の際の非特異的結合の低減に適している。s F v 融合タンパク質を構築して、s F v のアミノまたはカルボキシ末端いずれかでのエフェクタータンパク質の融合物を得ることができる。抗体断片はまた、直鎖抗体であり得る (例えば、米国特許第 5 , 6 4 1 , 8 7 0 号参照のこと)。このような直鎖抗体断片は、単一特異性である場合も、二重特異性である場合もある。抗体断片を製造するためのその他の技術は、当業者に公知である。

10

20

【0303】

例えば、抗体重鎖および軽鎖は、発現の際に、ジスルフィド結合によって対を形成して、全長抗体またはその断片を形成する。例えば、全長 I g の発現には、V_H - C_H 1 - ヒンジ - C_H 2 - C_H 3 をコードする配列を、第 1 の発現ベクター中にクローニングでき、V_L - C_L ドメインをコードする配列を第 2 の発現ベクター中にクローニングできる。V_L - C_L ドメインをコードする第 2 の発現ベクターとの同時発現の際に、全長抗体が発現される。F a b を作製する別の例では、V_H - C_H 1 をコードする配列を、第 1 の発現ベクター中にクローニングでき、V_L - C_L ドメインをコードする配列を、第 2 の発現ベクター中にクローニングできる。重鎖は、軽鎖と対を形成し、F a b モノマーが生じる。種々の I g G サブタイプの C_H 1、ヒンジ、C_H 2 および / または C_H 3 の配列は、当業者に公知である (例えば、米国公開出願第 2 0 0 8 0 2 4 8 0 2 8 号参照のこと)。同様に、C_L、または の配列も公知である (例えば、米国公開出願第 2 0 0 8 0 2 4 8 0 2 8 号参照のこと)。

30

【0304】

全抗体および抗体断片の発現のためにベクター中に挿入できる例示的配列として、表 3 に提供される抗体断片の配列が挙げられる。例えば、アービタックス (登録商標) (セツキシマブ) の重鎖および軽鎖配列 (それぞれ、配列番号 2 および 1) または任意のその他の抗体の重鎖および軽鎖配列 (すなわち、それぞれ、配列番号 7 4 および 7 5 (ヘルセプチン (登録商標)) ; それぞれ、配列番号 7 6 および 7 7 (リツキサン (登録商標)) ; それぞれ、配列番号 7 8 および 7 9 (アバスチン (登録商標)) ; それぞれ、配列番号 8 0 および 8 1 (セムパス (C e m p a t h) (登録商標)) ; それぞれ、配列番号 8 2 および 8 3 (ベクティビックス (登録商標)) ; それぞれ、配列番号 4 1 および 4 2 (イブリツモマブ (登録商標)) ; それぞれ、配列番号 4 3 および 4 4 (トシツモマブ (登録商標)) ; それぞれ、配列番号 4 5 および 4 6 (ボロキシマブ) ; それぞれ、配列番号 4 7 および 4 6 (F 2 0 0) ; またはそれぞれ、配列番号 4 8 および 4 9 (シクスツムマブ) を、I g G 抗体の発現のために、本明細書に記載された、または当業者に公知の適した発現ベクター中に挿入できる。さらに、それぞれ、配列番号 8 4 および 8 5 などの V_H - C_H 1 および V_L - C_L 配列 (ルセンティス (登録商標)) を、F a b 分子の発現のために、適した発現ベクター中に挿入してもよい。抗体の重鎖可変鎖および軽鎖可変鎖ドメイ

40

50

ン（すなわち、それぞれ、配列番号 29 および 30（ヘルセプチン（登録商標））；それぞれ、配列番号 31 および 32（リツキシリン（R i t u x i n）（登録商標））；それぞれ、配列番号 33 および 34（アバスチン（登録商標））；それぞれ、配列番号 35 および 36（キャンパス（登録商標））；それぞれ、配列番号 37 および 38（ベクティビックス（登録商標））；ならびにそれぞれ、配列番号 39 および 40（ルセンチス（登録商標））も、重鎖可変鎖および軽鎖可変鎖間にリンカーをコードするベクターなどの適した発現ベクターにおいて発現させることができる。例示的リンカーとして、グリシンリッチ可動性リンカー（ $-G_4S-$ ）_n（式中、n は、正の整数、例えば、1（配列番号 4）、2（配列番号 70）、3（配列番号 71）、4（配列番号 72）、5（配列番号 73）またはそれ以上である）が挙げられる。

10

【0305】

1. ベクター

ベクターの選択は、所望の適用に応じて変わり得る。組み換えられた抗体またはその一部の発現のために、多数の発現ベクターが利用可能であり、当業者に公知である。発現ベクターの選択は、宿主発現系の選択によって影響を受ける。このような選択は、十分に、当業者の技術レベルの範囲内である。一般に、発現ベクターは、転写プロモーターおよび所望により、エンハンサー、翻訳シグナルおよび転写および翻訳終結シグナルを含み得る。安定な形質転換のために使用される発現ベクターは、通常、形質転換された細胞の選択および維持を可能にする選択マーカーを有する。一部の場合には、複製起点を使用して、細胞中のベクターのコピー数を増幅できる。ベクターはまた、一般に、ライゲーションされる核酸分子と作動可能に連結されるさらなるヌクレオチド配列を含有し得る（例えば、H i s タグ、F l a g タグ）。抗体を用いる適用には、ベクターは、一般に、定常領域をコードする配列を含む。したがって、抗体またはその一部を、タンパク質融合物として発現させることもできる。例えば、ポリペプチドにさらなる機能性を付与するために、融合物を作製できる。融合タンパク質の例として、それだけには限らないが、シグナル配列、局在性などのためのエピトープタグ、例えば、h i s₆ タグまたは m y c タグまたは精製のためのタグ、例えば、G S T 融合物およびタンパク質分泌および / または膜会合を指示するための配列の融合物が挙げられる。

20

【0306】

例えば、タンパク質の発現は、当技術分野で公知の任意のプロモーター / エンハンサーによって制御され得る。適した細菌プロモーターは、当技術分野で周知であり、本明細書において以下に記載される。哺乳類細胞、酵母細胞および昆虫細胞のためのその他の適したプロモーターは、当技術分野で周知であり、一部を以下に例示する。異種核酸の発現を指示するために使用されるプロモーターの選択は、特定の適用に応じて変わる。使用できるプロモーターとして、それだけには限らないが、S V 40 初期プロモーターを含有する真核細胞の発現ベクター（Bernoist and Chambon, Nature 290:304-310 (1981)）、ラウス肉腫ウイルスの 3' 側の長い末端反復配列中に含有されるプロモーター（Yamamoto et al., Cell 22:787-797 (1980)）、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445 (1981)）、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinster et al., Nature 296:39-42 (1982)）、 γ -ラクタマーゼプロモーターなどの原核生物の発現ベクター（Jay et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5543）または t a c プロモーター（DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983)）；Scientific American 242:79-94 (1980) 中の「Useful Proteins from Recombinant Bacteria」も参照のこと、ノパリンシンセターゼプロモーターを含有する植物発現ベクター（Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213 (1984)）またはカリフラワームザイクウイルス 35 S R N A プロモーター（Gardner et al., Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981)）および光合成酵素リブローズ二リン酸脱炭酸酵素のプロモーター（Herrera-Estrella et al., Nature 310:115-120 (1984)）、G a l 4 プロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、アルカリホスファターゼプロモーターなどの酵母およびその他の真菌由来のプロモーターエレメント

30

40

50

および組織特異性を示し、トランスジェニック動物において使用されてきた以下の動物転写制御領域、膵腺房細胞において活性であるエラスターゼⅠ遺伝子制御領域 (Swift et al., Cell 38:639-646 (1984); Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7:425-515 (1987))、膵臓細胞において活性であるインスリン遺伝子制御領域 (Hanahan et al., Nature 315:115-122 (1985))、リンパ球系細胞において活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域 (Grosschedl et al., Cell 38:647-658 (1984); Adams et al., Nature 318:533-538 (1985); Alexander et al., Mol. Cell Biol. 7:1436-1444 (1987))、精巣、乳房、リンパ球系細胞および肥満細胞において活性であるマウス乳癌ウイルス制御領域 (Leder et al., Cell 45:485-495 (1986))、肝臓において活性であるアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkert et al., Genes and Devel. 1:268-276 (1987))、肝臓において活性であるフェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlauf et al., Mol. Cell Biol. 5:1639-1648 (1985); Hammer et al., Science 235:53-58 (1987))、肝臓において活性である α -1アンチトリプシン遺伝子制御領域 (Kelsey et al., Genes and Devel. 1:161-171 (1987))、骨髄系細胞において活性であるグロビン遺伝子制御領域 (Magram et al., Nature 315:338-340 (1985); Kollias et al., Cell 46:89-94 (1986))、脳の乏突起神経膠細胞において活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readhead et al., Cell 48:703-712 (1987))、骨格筋において活性であるミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域 (Shani, Nature 314:283-286 (1985)) および視床下部の性腺刺激ホルモン分泌細胞において活性である性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域 (Mason et al., Science 234:1372-1378 (1986)) が挙げられる。

10

20

【0307】

発現ベクターは、通常、プロモーターに加えて、宿主細胞において抗体またはその一部を発現するのに必要なすべてのさらなるエレメントを含有する、転写ユニットまたは発現カセットを含有する。通常、発現カセットは、タンパク質をコードする核酸配列と作動可能に連結されたプロモーターおよび転写物の効率的なポリアダニル化に必要なシグナル、リボソーム結合部位および翻訳終結を含有する。カセットのさらなるエレメントは、エンハンサーを含み得る。さらに、カセットは、通常、効率的な終結を提供するために構造遺伝子の下流に転写終結領域を含有する。終結領域は、プロモーター配列と同一遺伝子から得てもよく、異なる遺伝子から得てもよい。

30

【0308】

一部の発現系は、チミジンキナーゼおよびジヒドロ葉酸レダクターゼなどの遺伝子増幅を提供するマーカーを有する。あるいは、多角体プロモーターまたはその他の強力なバキュロウイルスプロモーターの指示の下でタンパク質をコードする核酸配列を用い、昆虫細胞において、バキュロウイルスベクターを使用するといった遺伝子増幅を含まない高収率発現系も適している。

【0309】

抗体または抗体変異体の発現に関して本明細書における目的上、抗体の r 可変領域をコードする核酸配列と作動可能に連結された抗体の定常領域をコードするヌクレオチドの配列を含有するベクターが提供される。ベクターは、 C_H1 、 C_H2 、ヒンジ、 C_H3 または C_H4 および/または C_L のうち1種またはすべての配列を含み得る。一般に、ベクターは、Fabの発現などのためには、 C_H1 または C_L (または軽鎖) の配列を含有する。定常領域またはヒンジ領域の配列は、当業者に公知である (例えば、米国公開出願第20080248028号参照のこと)。

40

【0310】

例示的発現ベクターとして、例えば、pCMVなどの任意の哺乳類発現ベクターが挙げられる。細菌発現のためには、このようなベクターとして、pBR322、pUC、pSKF、pET23DならびにMBP、GSTおよびlacZなどの融合ベクターが挙げられる。その他の真核細胞ベクター、例えば、真核細胞のウイルス由来の調節エレメントを含有する任意のものを、真核細胞の発現ベクターとして使用してもよい。これらとして、

50

例えば、SV40ベクター、パピローマウイルスベクターおよびエプスタイン・バーウイルスに由来するベクターが挙げられる。その他の例示的真核細胞ベクターとして、pMSG、pAV009/A+、pMT010/A+、pMAMneo-5、バキュロウイルスpDSC EおよびCMVプロモーター、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳癌ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、多面体プロモーターもしくは真核生物における発現にとって有効であるとわかっているその他のプロモーターの指示の下でタンパク質の発現を可能にする任意のその他のベクターが挙げられる。

【0311】

DNA断片をベクター中に挿入するための当業者に公知の任意の方法を使用して、タンパク質または抗体鎖をコードする核酸を含有する発現ベクターを構築できる。これらの方法は、インビトロ組換えDNAおよび合成技術ならびにインビボ組換え体（遺伝子組換え）を含み得る。クローニングベクターへの挿入は、例えば、DNA断片を、相補的な付着末端を有するクローニングベクター中にライゲーションすることによって達成できる。DNAを断片化するために使用される相補的な制限部位が、クローニングベクター中に存在しない場合には、DNA分子の末端を酵素的に修飾してもよい。あるいは、ヌクレオチド配列（リンカー）をDNA末端にライゲーションすることによって望ましい任意の部位を製造でき、これらのライゲーションされたリンカーは、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする特定の化学的に合成された核酸を含有し得る。

【0312】

2. 細胞および発現系

ベクターを含有する細胞も提供される。一般に、異種DNAを発現するよう操作でき、分泌経路を有する任意の細胞種が適している。発現宿主として、細菌細胞（例えば、大腸菌）、酵母細胞、真菌細胞、古細菌、植物細胞、昆虫細胞およびヒト細胞を含めた動物細胞などの原核生物および真核生物が挙げられる。発現宿主は、そのタンパク質製造レベルならびに発現されたタンパク質に存在する翻訳後修飾の種類において異なり得る。さらに、発現宿主の選択は、使用されるベクターならびに転写および翻訳エレメントの選択に関連することが多い。例えば、発現宿主の選択は、利用される前駆体配列の選択に応じて異なることが多いが、常にではない。例えば、多数の異種シグナル配列は、同一種の宿主細胞においてのみ発現させることができる（すなわち、昆虫細胞シグナル配列は、昆虫細胞において最適に発現される）。対照的に、例えば、酵母、昆虫または哺乳類宿主細胞において良好に作動するヒト血清アルブミン（hHSA）シグナル配列および昆虫および哺乳類細胞において機能的であると実証されている組織プラスミノゲン活性化因子プロ配列などのその他のシグナル配列は、異種宿主において使用できる（Tan et al., (2002) Protein Eng. 15:337）。発現宿主の選択は、これらおよび調節および安全性の検討、製造費用および精製の必要および方法などのその他の因子に基づいて行うことができる。したがって、ベクター系は、使用される宿主細胞適合しなくてはならない。

【0313】

真核細胞宿主における発現として、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）およびピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）などの酵母、ショウジョウバエ（*Drosophila*）細胞および鱗翅目細胞などの昆虫細胞、タバコ、トウモロコシ、コメ、藻類およびアオウキクサなどの植物および植物細胞における発現を挙げることができる。発現のための真核細胞としてまた、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはベビーハムスター腎臓（BHK）細胞などの哺乳類細胞株が挙げられる。真核細胞の発現宿主はまた、例えば、血清、乳および卵における製造を含めた、トランスジェニック動物における製造を含む。

【0314】

組換え分子は、例えば、形質転換、トランスフェクション、感染、エレクトロポレーションおよびソノポレーションによって宿主細胞中に導入でき、その結果、遺伝子配列の多数のコピーが作製される。一般に、多量の抗体鎖を発現する細菌、哺乳類、酵母または昆

10

20

30

40

50

虫細胞株を製造するために、標準トランスフェクション法が使用され、次いで、それらを標準技術を使用して精製する（例えば、Colley et al. (1989) J. Biol. Chem., 264:17619-17622; Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, vol. 182 (Deutscher, ed.), 1990参照のこと）。真核細胞および原核細胞の形質転換は、標準技術にしたがって実施される（例えば、Morrison (1977) J. Bact. 132:349-351; Clark-Curtiss and Curtiss (1983) Methods in Enzymology, 101, 347-362参照のこと）。例えば、外来ヌクレオチド配列を宿主細胞中に導入するための周知の手順のいずれも使用できる。これらは、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリプレソ、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、微粒子銃、リポソーム、マイクロインジェクション、プラズマベクター、ウイルスベクターおよびクローニングされたゲノムDNA、cDNA、合成DNAまたはその他の外来遺伝物質を宿主細胞中に導入するための任意のその他の周知の方法の使用を含む。一般に、抗体を発現させる目的のために、宿主細胞を少なくともV_H鎖をコードする第1のベクターおよび少なくともV_L鎖をコードする第2のベクターでトランスフェクトする。したがって、使用される特定の遺伝子工学手順が、少なくとも両遺伝子を、抗体ポリペプチドまたはその修飾された形態を発現できる宿主細胞中に成功裏に導入できることは唯一必要である。

10

20

30

40

50

【0315】

宿主細胞を、cDNAを組み込む組換えDNA分子または合成DNA配列で形質転換することによって、遺伝子のマルチプルコピーを作製できる。したがって、形質転換体を増殖させること、形質転換体から組換えDNA分子を単離することおよび必要に応じて、単離された組換えDNAから挿入された遺伝子を回収することによって遺伝子を多量に得ることができる。

【0316】

抗体およびその一部を含めたタンパク質は、例えば、タンパク質をコードする核酸分子を宿主細胞または宿主動物に導入することおよびインビトロで組み換えられた抗体をコードする核酸分子から発現させることなどのインビトロおよびインビボ法を含めた、タンパク質製造のための当技術分野で公知の任意の方法によって、ハイスループットアプローチを使用して製造できる。原核生物、特に、大腸菌は、多量の組み換えられた抗体またはその一部を製造するための系を提供し、タンパク質のハイスループット発現および精製の適用においては特に望ましい。大腸菌の形質転換は、当業者に周知の簡単な、迅速な技術である。ハイスループット発現のための大腸菌宿主株として、それだけには限らないが、BL21 (EMD Biosciences) およびLMG194 (ATCC) が挙げられる。このような大腸菌宿主株の例示として、BL21がある。ハイスループット発現のためのベクターとして、それだけには限らないが、pBR322およびpUCベクターが挙げられる。

【0317】

a. 原核生物発現

原核生物、特に、大腸菌は、多量の組み換えられた抗体またはその一部を製造するための系を提供する。大腸菌の形質転換は、当業者に周知の簡単な、迅速な技術である。大腸菌の発現ベクターは、高レベルのタンパク質発現を誘導するために、また宿主細胞に対して幾分かの毒性を示すタンパク質を発現させるために有用である誘導プロモーターを含有し得る。誘導プロモーターの例として、lacプロモーター、trpプロモーター、ハイブリッドtacプロモーター、T7およびSP6 RNAプロモーターならびに温度によって調節されるP_Lプロモーターが挙げられる。

【0318】

抗体またはその一部を含めたタンパク質は、大腸菌の細胞質環境中で発現させることができる。細胞質は、還元環境であり、一部の分子にとっては、これは不溶性封入体の形成をもたらし得る。ジチオトレイトールおよびβ-メルカプトエタノールおよび変性剤（例えば、グアニジン-HClおよび尿素など）などの還元剤を使用して、タンパク質を再可溶化できる。例示的代替アプローチは、酸化環境およびシャペロニン様およびジスルフィ

ドイソメラーゼを提供する細菌の細胞膜周辺腔における組み換えられた抗体またはその断片の発現であり、可溶性タンパク質の製造につながる。通常、リーダー配列は、タンパク質を周辺質に向ける発現されるタンパク質に融合される。次いで、リーダーが、周辺質の内側で、シグナルペプチダーゼによって除去される。発現されたタンパク質を周辺質中に移動させる3つの主要な経路、すなわち、Sec経路、SRP経路およびTAT経路がある。周辺質を標的とするリーダー配列の例として、ペクチン酸リアーゼ遺伝子に由来するpelBリーダー、SttIIリーダー配列およびDsbAリーダー配列が挙げられる。例示的リーダー配列として、DsbAリーダー配列がある。一部の場合には、周辺質発現によって、発現されたタンパク質の培養培地への漏出が可能となる。タンパク質の分泌によって、培養上清からの迅速な、簡単な精製が可能になる。分泌されないタンパク質は、浸透圧溶解によって周辺質から得ることができる。細胞質発現と同様に、一部の場合には、タンパク質は不溶性になることがあり、変性剤および還元剤を使用して、可溶化および再折りたたみを促進できる。誘導および増殖の温度はまた、発現レベルおよび溶解度に影響を及ぼし得る。一般に、25 ~ 37 の間の温度が使用される。また、突然変異を使用して、発現されたタンパク質の溶解度を高めることもできる。通常、細菌は、グリコシル化されていないタンパク質を産生する。したがって、タンパク質が、機能のためにグリコシル化を必要とする場合には、宿主細胞から精製した後にインビトロでグリコシル化を付与できる。

【0319】

b. 酵母

サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、クロイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*) およびピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などの酵母は、組み換えられた抗体またはその一部の有用な発現宿主である。酵母は、エピソード複製ベクターを用いて、または相同組換えによる安定な染色体組込みによって形質転換できる。通常、遺伝子発現を調節するために誘導プロモーターが使用される。このようなプロモーターの例として、AOX1、GAL1、GAL7 および GAL5 ならびに CUP1 などのメタロチオネインプロモーターが挙げられる。発現ベクターは、形質転換されたDNAの選択および維持のためにLEU2、TRP1、HIS3 および URA3 などの選択マーカーを含むことが多い。酵母において発現されたタンパク質は、可溶性であることが多い。Bipなどのシャペロニンおよびタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを用いる同時発現は、発現レベルおよび溶解度を改善し得る。さらに、酵母において発現されたタンパク質は、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の酵母交配型 - 因子分泌シグナルなどの分泌シグナルペプチド融合および Aga2p 交配接着受容体またはアークスラ・アデニニボランス (*Arxula adeninivorans*) グルコアミラーゼなどの酵母細胞表面タンパク質との融合を使用して分泌に向けることができる。Kex-2 プロテアーゼのものなどのプロテアーゼ切断部位を、分泌経路を出るときに発現されたポリペプチドから融合された配列を除去するよう操作することができる。酵母はまた、Asn-X-Ser/Thrモチーフでグリコシル化できる。

【0320】

c. 昆虫

特に、バキュロウイルス発現を使用する昆虫細胞は、抗体またはその一部を発現させるのに有用である。昆虫細胞は、高レベルのタンパク質を発現し、高等真核生物によって使用される翻訳後修飾のほとんどが可能である。バキュロウイルスは、真核細胞発現の安全性を改善し、規制上の懸念を低減する制限的宿主域を有する。通常、発現ベクターは、バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターおよび p10 プロモーターなどの高レベル発現のためのプロモーターを使用する。よく使用されるバキュロウイルス系として、オートグラファ・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多核体

病ウイルス (AcNPV) およびボンビックス・モリ (Bombyx mori) 核多核体病ウイルス (BmNPV) などのバキュロウイルスならびにスポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) 由来 Sf9 およびトリコプルシア・ニ (Trichoplusia ni) 由来の TN などの昆虫細胞株が挙げられる。高レベル発現のためには、発現される分子のヌクレオチド配列を、ウイルスのポリヘドリン開始コドンのすぐ下流に融合する。ヒト抗体を発現できるバキュロウイルス組換え体を作製するために、pAcUW51 (PharMingen) などの二重発現トランスファー (dual-expression transfer) が利用される。哺乳類分泌シグナルは、昆虫細胞において正確にプロセッシングされ、発現されたタンパク質を培養培地中に分泌するために使用できる。

10

【0321】

昆虫細胞における代替発現系は、安定に形質転換された細胞の使用である。スポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) 由来 Sf9 およびトリコプルシア・ニ (Trichoplusia ni) 由来の TN などの細胞株を発現のために使用できる。バキュロウイルス前初期遺伝子プロモーター IE1 を使用して、一貫した発現レベルを誘導できる。通常の発現ベクターとして、pIE1-3 および pI31-4 トランスファーベクター (Novagen) が挙げられる。発現ベクターは、通常、ネオマイシンおよびハイグロマイシンなどの選択マーカーの使用によって維持される。

【0322】

d. 哺乳類細胞

20

哺乳類発現系を使用して、抗体またはその一部を含めた修飾されたタンパク質を発現させることができる。発現コンストラクトを、アデノウイルスなどのウイルス感染によって、またはリポソーム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランなどの直接 DNA トランスファーによって、またエレクトロポレーションおよびマイクロインジェクションなどの物理的手段によって哺乳類細胞に移すことができる。哺乳類細胞の発現ベクターは、通常、mRNA キャップ部位、TATA ボックス、翻訳開始配列 (コザックコンセンサス配列) およびポリアデニル化エレメントを含む。このようなベクターは、高レベル発現のための転写プロモーター-エンハンサー、例えば、SV40 プロモーター-エンハンサー、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターおよびラウス肉腫ウイルス (RSV) の長い末端反復配列を含むことが多い。これらのプロモーター-エンハンサーは、多数の細胞種において活性である。組織および細胞種プロモーターおよびエンハンサー領域も、発現のために使用できる。例示的プロモーター/エンハンサー領域として、それだけには限らないが、エラストーゼ I、インスリン、免疫グロブリン、マウス乳癌ウイルス、アルブミン、フェトプロテイン、 α 1 アンチトリプシン、グロビン、ミエリン塩基性タンパク質、ミオシン軽鎖 2 および性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御などの遺伝子に由来するものが挙げられる。選択マーカーを使用して、発現コンストラクトを有する細胞を選択および維持できる。選択マーカー遺伝子の例として、それだけには限らないが、ハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ、アデノシンデアミナーゼ、キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼおよびチミジンキナーゼが挙げられる。抗体は、通常、NEO (登録商標) / G418 系、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 系またはグルタミンシンセターゼ (GS) 系を使用して製造される。GS 系は、pEE12 / pEE6 などの関節発現ベクターを使用して、重鎖および軽鎖の両方を発現する。TCR- および Fc RI- などの細胞表面シグナル伝達分子との融合によって、細胞表面で活性な状態でタンパク質の発現を指示できる。

30

40

【0323】

哺乳類発現には、マウス、ラット、ヒト、サル、ニワトリおよびハムスター細胞を含めて多数の細胞株が利用可能である。例示的細胞株として、それだけには限らないが、CHO、Balb/3T3、HeLa、MT2、マウス NS0 (非分泌) およびその他の骨髓腫細胞株、ハイブリドーマおよびヘテロハイブリドーマ細胞株、リンパ球、線維芽細胞、

50

S p 2 / 0、C O S、N I H 3 T 3、H E K 2 9 3、2 9 3 S、2 B 8 および H K B 細胞が挙げられる。細胞培養培地からの分泌タンパク質の精製を促進する血清不含培地に適応された細胞株もまた、利用可能である。このような一例として、血清不含 E B N A - 1 細胞株がある (Pham et al., (2003) Biotechnol. Bioeng. 84:332-42.)。

【 0 3 2 4 】

e . 植物

トランスジェニック植物細胞および植物を使用して、本明細書に記載された任意の抗体またはその一部などのタンパク質を発現させることができる。発現コンストラクトは、通常、微粒子銃などの直接 D N A 導入およびプロトプラストへの P E G 媒介性導入を使用して、またアグロバクテリウム媒介性形質転換を用いて植物に移される。発現ベクターは、プロモーターおよびエンハンサー配列、転写終結エレメントおよび翻訳制御エレメントを含み得る。発現ベクターおよび形質転換技術は、普通、シロイヌナズナおよびタバコなどの双子葉植物宿主とトウモロコシおよびコメなどの単子葉植物宿主間でわけられる。発現に使用される植物プロモーターの例として、カリフラワーモザイクウイルス C a M V 3 5 S プロモーター、ノパリンシンターゼプロモーター、リボースビスホスフェートカルボキシラーゼプロモーターおよびトウモロコシユビキチン - 1 (u b i - 1) プロモータープロモーターが挙げられる。形質転換された細胞の選択および維持を促進するために、ハイグロマイシン、ホスホマンノースイソメラーゼおよびネオマイシンホスホトランスフェラーゼなどの選択マーカーが使用されることが多い。形質転換された植物細胞は細胞、凝集体 (カルス組織) として培養物中で維持してもよく、または全植物体に再生してもよい。トランスジェニック植物細胞としてまた、プロテアーゼまたは修飾されたプロテアーゼを産生するよう操作された藻類を挙げることができる (例えば、Mayfield et al. (2003) PNAS 100:438-442を参照のこと)。植物は、哺乳類細胞とは異なるグリコシル化パターンを有するので、これは、これらの宿主において産生されるタンパク質の選択に影響を及ぼし得る。

【 0 3 2 5 】

3 . 精製

抗体およびその抗原結合部分を含めたタンパク質は、当業者に公知の任意の手順によって精製される。タンパク質は、それだけには限らないが、S D S - P A G E、サイズ分画およびサイズ排除クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿、キレートクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーまたはカラムクロマトグラフィーを含めた、当技術分野で公知の標準タンパク質精製技術を使用して実質的に純粋に精製できる。例えば、抗体をカラムクロマトグラフィーによって精製できる。抗体を精製する方法の例示として、固体支持体カラム材料が、免疫グロブリンと高親和性で結合するプロテイン G、連鎖球菌に由来する細胞表面会合型タンパク質と連結されているカラムクロマトグラフィーを使用することによるものがある。抗体は、6 0 %、7 0 %、8 0 %の純度、通常、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %または 9 9 %の純度に精製できる。純度は、S D S - P A G E およびクマシー染色などの標準法によって評価できる。

【 0 3 2 6 】

抗体またはその一部を含めたタンパク質を宿主細胞から精製する方法は、選択された宿主細胞および発現系に応じて変わる。分泌された分子について、タンパク質は、一般に、細胞を除去した後に培養培地から精製される。細胞内発現については、細胞を溶解し、抽出物からタンパク質を精製することができる。トランスジェニック植物および動物などのトランスジェニック生物が、発現に使用される場合、組織または臓器を、溶解細胞抽出物を作製するための出発材料として使用することができる。さらに、トランスジェニック動物製造は、乳または卵におけるポリペプチドの製造を含む場合があり、これは集めることができ、必要に応じて、さらに、当技術分野における標準方法を使用して、タンパク質を抽出し、さらに精製できる。

【 0 3 2 7 】

タンパク質が、形質転換された細菌によって多量に発現される場合には、発現は構成的であり得るが、通常、プロモーター誘導後に、ポリペプチドが不溶性凝集体を形成し得る。当業者に公知の、ポリペプチド封入体の精製に適しているいくつかのプロトコールがある。当業者には、多数の変法が明らかである。

【0328】

例えば、一方法では、細胞懸濁液を、一般に、遠心分離し、封入体を含有するペレットを、封入体を溶解しないが洗浄するバッファー、例えば、20 mM トリス - HCl (pH 7.2)、1 mM EDTA、150 mM NaCl および 2% Triton-X 100、非イオン性界面活性剤に再懸濁する。できる限り多くの細胞破片を除去するために洗浄工程を反復することが必要である場合もある。残存する封入体のペレットを、適当なバッファー（例えば、20 mM リン酸ナトリウム、pH 6.8、150 mM NaCl）に再懸濁できる。その他の適当なバッファーは、当業者に明らかである。

10

【0329】

あるいは、タンパク質を細菌周辺質から精製してもよい。ポリペプチドが、細菌の周辺質中に運ばれる場合には、細菌の周辺質画分を、当業者に公知のその他の方法に加えて冷浸透圧ショックによって単離できる。例えば、一方法では、周辺質から組換えポリペプチドを単離するために、細菌細胞を遠心分離してペレットを形成する。ペレットを、20% スクロースを含有するバッファーに再懸濁する。細胞を溶解するために、細菌を遠心分離し、ペレットを、氷冷 5 mM MgSO₄ に再懸濁し、氷浴中におよそ 10 分間維持する。細胞懸濁液を遠心分離し、上清をデカントし、保存する。上清中に存在する組換えポリペプチドは、当業者に周知の標準分離技術によって宿主タンパク質から分離できる。これらの方法は、それだけには限らないが、以下の工程：溶解度分画、サイズ分画濾過 (size differential filtration) およびカラムクロマトグラフィーを含む。

20

【実施例】

【0330】

E. 実施例

以下の実施例は、単に例示目的で含まれ、本発明の範囲を制限するものではない。

【実施例 1】

【0331】

30

ベクターおよび発現プラスミド

この実施例は、CHO 哺乳類細胞における EGF 受容体抗原の製造および CHO 哺乳類細胞におけるアービタックス（登録商標）抗 EGF R 抗体の製造を可能にするための発現コンストラクトを作製した。CHO 細胞の使用によって、μg/mL 量の抗体の製造および関連する翻訳後修飾（例えば、グリコシル化）が可能となる。

【0332】

EGFR 抗原（配列番号 10）を、完全 ECD（N 末端の 640 個のアミノ酸、配列番号 13、配列番号 12 に示される DNA）を包含する可溶性細胞外ドメイン（sECD）として製造した。精製を可能にするために、ヒスチジントグ（His-タグ、配列番号 7）を C 末端ドメインに組み込んだ。プラスミドは、天然（配列番号 11）または IgG HC（配列番号 6）リーダー配列のいずれか、コザックコンセンサス配列および所望により、EGFR 細胞外ドメインおよびタグ間の Gly₄ Ser リンカー（配列番号 4）をさらに含有する。

40

【0333】

親和性タグ（c-Myc、配列番号 5 または FLAG、配列番号 3）がアービタックス（登録商標）抗 EGF R 抗体の Fc ドメインの C 末端に連結されている、アービタックス（登録商標）抗 EGF R 抗体（配列番号 1 および 2、配列番号 9 および 8 に示される DNA、それぞれ、軽鎖および重鎖）プラスミドを作製した。プラスミドは、発現時に、IgG 抗体が製造されるよう、重鎖および軽鎖両方の遺伝子を含む。プラスミドは、所望により、Fc ドメインおよび親和性タグ間に Gly₄ Ser リンカー（配列番号 4）を

50

含有する。プラスミドの説明を、以下の表 7 に示す。

【 0 3 3 4 】

【 表 7 】

表7. EGFR sECDおよびアービタックスプラスミド	
プラスミドの説明	親和性タグ
His-タグを有するEGFR細胞外ドメイン(aa1~640;天然リーダー)	His
Gly ₄ SerリンカーおよびHis-タグを有するEGFR細胞外ドメイン(aa1~640;天然リーダー)	His
His-タグを有するEGFR細胞外ドメイン(aa25~640;IgG HCリーダー)	His
Gly ₄ SerリンカーおよびHis-タグを有するEGFR細胞外ドメイン(aa25~640;IgG HCリーダー)	His
C末端FLAG-タグを有するアービタックス(登録商標)抗EGFR抗体	FLAG
C末端Gly ₄ SerリンカーおよびFLAG-タグを有するアービタックス(登録商標)抗EGFR抗体	FLAG
C末端cMyc-タグを有するアービタックス(登録商標)抗EGFR抗体	cMyc
C末端Gly ₄ SerリンカーおよびcMyc-タグを有するアービタックス(登録商標)抗EGFR抗体	cMyc

10

【 実施例 2 】

20

【 0 3 3 5 】

結合アッセイ開発

この実施例では、E L I S A アッセイを、市販の試薬を使用する予備的結合アッセイとして開発した。このアッセイでは、可溶性 E G F R 受容体を 9 6 ウェルプレートに結合させ、アービタックス（登録商標）抗 E G F R 抗体を加え、結合させ、ウサギ抗ヒト - F c - H R P コンジュゲート二次抗体を使用して結合を検出した。バッファー pH を、1）可溶性 E G F R 受容体の、ハイバインドまたは N i でコーティングされたプレートのいずれかとの結合、2）二次抗体結合および 3）可溶性 E G F R 受容体 - アービタックス（登録商標）抗 E G F R 抗体結合に対するその効果について評価した。

【 0 3 3 6 】

30

市販の試薬を使用する標準直接 E L I S A プロトコル：

9 6 ウェルハイバインドプレート（H i b i n d、C o s t a r 番号 2 5 9 2）を、P B S 中、1 2 n M（1 . 3 2 μ g / m L）の s E G F R - H 6 抗原（S i n o B i o l o g i c s、C a t 番号 1 0 0 0 1 - H 0 8 H）1 0 0 μ L を用いて 4 で一晩コーティングした。次いで、プレートを 2 5 0 μ L / ウェルの P B S で 3 回洗浄し、続いて、2 5 0 μ L の P B S / B S A（P B S、p H 7 . 4、5 m g / m L B S A）を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。アービタックス（登録商標）抗 E G F R 抗体の段階希釈（3 x、出発濃度 5 0 0 n g / m L、それに続く 1 : 3 希釈）を P B S / B S A で調製し、ウェルあたり 1 0 0 μ L を添加し、プレートを室温で 1 時間インキュベートした。次いで、プレートを 2 5 0 μ L / ウェルの P B S / B S A で 3 回洗浄した。各ウェルに、1 0 0 μ L / ウェルのウサギ抗ヒト - F c - H R P コンジュゲート二次抗体（P B S / B S A で 1 : 5 0 0 0 希釈した）を添加し、プレートを室温で 1 時間インキュベートした。次いで、プレートを 2 5 0 μ L / ウェルの P B S / B S A で 3 回洗浄した。最後に、各ウェルに 1 0 0 μ L の H R P 基質を添加し、プレートを室温で 1 5 分間発色させた（光から離して）。各ウェルに 1 0 0 μ L の停止溶液を添加することによって反応を停止させ、マイクロプレート分光光度計（M o l e c u l a r D e v i c e s、S p e c t r a M a x M 2）を使用して、プレートを O D₄₅₀ n M で 3 0 分以内の間読み取った。ダイナミックレンジは、約 3 l o g であり、感度は、約 5 0 p g であった（5 m g / m L B S A を有する P B S、p H 7 . 4 中）。

40

【 0 3 3 7 】

50

E G F R s E C D - H 6 抗原の 9 6 ウェルプレートへのコーティングに対するバッファ- p H の効果

上記のアッセイを、以下の修飾を用いて実施した：(1) ハイバインドまたは N i でコーティングされたプレートのいずれかを使用した；(2) s E G F R - H 6 抗原を、P B S または K R B (クレブス - リンガー重炭酸バッファ)、p H 7 . 4 のいずれか中、3、6、1 2 および 2 4 n M でコーティングした；(3) プレートを、P B S または K R B、p H 7 . 4、6 . 5 また 6 . 0 中、5 m g / m L B S A を用いてブロッキングした；および(4) P B S または K R B、p H 7 . 4 中、5 m g / m L B S A 中、2 5 0 n g / m L でアービタックス (登録商標) 抗 E G F R 抗体を添加した。

【 0 3 3 8 】

10

結果は、バッファ- p H は、E G F R s E C D - H 6 の、ハイバインドプレートと結合する能力に対して効果がなかったが、H i s タグ (H 6) を介したニッケルプレートとの結合には影響を与えたことを示す。

【 0 3 3 9 】

二次抗体検出に対するバッファ- p H の効果

二次抗体結合に対するバッファ- p H の効果を、アービタックス (登録商標) 抗 E G F R 抗体を、ハイバインドプレート上に直接コーティングし、次いで、二次抗体結合を、P B S、p H 7 . 4 または K R B、p H 7 . 4、6 . 5 または 6 . 0 を用いる 5 m g / m L B S A の存在下で評価した、上記のものから修飾されたアッセイにおいて評価した。結果は、アービタックス (登録商標) 抗 E G F R 抗体の二次抗体検出は、p H 6 . 0 ~ 7 . 4 で影響を受けなかったことを示した。

20

【 0 3 4 0 】

E G F R s E C D - アービタックス (登録商標) 抗 E G F R 抗体結合のバッファ- p H の効果

E G F R s E C D - アービタックス (登録商標) 抗 E G F R 抗体結合のバッファ- p H の効果を評価するために、アッセイにおけるアービタックス (登録商標) 抗 E G F R 抗体の濃度ならびにバッファ- p H を変化させた。上記のアッセイでは、1 0 0 n g / m L で出発する、K R B、p H 7 . 4、6 . 5 または 6 . 0 でのアービタックス (登録商標) 抗 E G F R 抗体の 3 回 (3 x) 段階希釈を使用した。結果は、高アービタックス (登録商標) 抗 E G F R 抗体濃度 (すなわち、3 n g / m L 超) では、各 p H について結合の変動が起こり、p H 7 . 4 が、p H 6 . 0 よりも良好な結合を有することを示す。

30

【 実施例 3 】

【 0 3 4 1 】

E L I S A に対するヒト血清の添加の効果

この実施例では、E L I S A 結合アッセイに対するヒト血清の添加の効果を決定した。腫瘍微小環境を模倣するために、ヒト血清を添加した。E L I S A を、上記の実施例 2 に記載されたように実施した。正常ヒト血清を、バッファ- の 5 % のレベルで添加した。I g G を枯渇させたヒト血清を、バッファ- の 1 % または 5 % で添加した。対照として 5 (5) m g / m L B S A を添加した。すべての実験は、K R B、p H 7 . 4 中で実施した。

40

【 0 3 4 2 】

結果は、正常または I g G を枯渇させたヒト血清の添加は、E L I S A アッセイに十分に影響を及ぼすことを示した。5 % ヒト血清の添加は、ヒト血清が I g G を含有し、したがって、ヤギ抗ヒト - F c - H R P コンジュゲート二次抗体が、血清ならびにアービタックス (登録商標) 抗 E G F R 抗体と結合するので、K _D の増大をもたらした。I g G を枯渇させたヒト血清の添加は、アッセイのダイナミックレンジの 3 0 % 低減をもたらした。

【 実施例 4 】

【 0 3 4 3 】

抗マウス F a b 二次抗体の使用の効果

この実施例では、6 種の異なる抗マウス F a b 抗体を、上記の実施例 2 に記載されたア

50

ッセイにおける二次抗体としての使用について評価した。アービタックス（登録商標）抗 E G F R 抗体は、最初はマウスにおいて作製されたキメラ抗体である。これらの二次抗体を、ヒト血清がアッセイにおいて使用される場合に、ヤギ抗ヒト - F c 二次の相互作用を避けるために、異なる二次抗体を使用できるかどうかを調べるために評価した。

【 0 3 4 4 】

E L I S A アッセイにおいて、どの抗マウス二次抗体も、アービタックス（登録商標）抗 E G F R 抗体を認識しないことが観察された。

【実施例 5】

【 0 3 4 5 】

タグ付き代替タンパク質間接 E L I S A

この実施例では、タグ付き代替タンパク質間接 E L I S A アッセイを、エピトープ - タグ特異的間接 E L I S A の開発のためのモデルとして使用した。アッセイにおける試薬 / バッファーとしてのヒト血清の使用を可能にするために、エピトープ - タグ特異的間接 E L I S A の使用を評価した。ヒト血清は、抗体を含有し、したがって、抗ヒト - F c 二次抗体の使用は、抗体、すなわち、アービタックス、ならびに血清との結合に起因するシグナルをもたらす。このアッセイでは、アービタックス（登録商標）抗 E G F R 抗体を、タンパク質タグとその C 末端で直接的にコンジュゲートし、アービタックス（登録商標）抗 E G F R 抗体上のタグと結合する抗エピトープタグ抗体を、二次抗体として使用した。一般的なタンパク質エピトープタグを以下の表 8 に示す。アッセイ試薬および条件、すなわち、バッファー pH および実現可能性を評価した。

【 0 3 4 6 】

【表 8】

表8.一般的なタンパク質エピトープタグ				
名称	配列	残基数	大きさ (Da)	配列番号
c-Myc	EQKLISEEDL	10	1200	5
FLAG	DYKDDDDK	8	1012	3
HA	YPYDVPDYA	9	1102	15
VSV-G	YTDIEMNRLGK	11	1339	16
HSV	QPELAPEDPED	11	1239	17
V5	GKPIPNPLLGLDST	14	1421	18
Poly Arg	RRRRR	5-6	800	19
Strep-tag-II	WSHPQFEK	8	1200	20
S-	KETAAAKFERQHMDs	15	1750	21
3x FLAG	DYKDDHDGDYKDHDIDYKDDDDK	22	2730	22
HAT-	KDHLIHNvHKEFHAAHANK	19	2310	23
SBP-	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP	38	4306	24

【 0 3 4 7 】

96 ウェルプレートに、タグ付き代替タンパク質で直接的にコーティングし、二次抗タグ抗体の、タグ付き代替タンパク質との結合を検出した、簡易化したタグ付き代替タンパク質間接 E L I S A を使用して、アッセイ試薬および条件を評価した。3 種のエピトープタグ付き代替タンパク質を使用した（以下の表 9 参照のこと）。抗 myc 抗体（GenScript、番号 A 0 0 1 7 3、Abcam、番号 a b 1 3 2 6 または Abcam、番号 1 2 6 1）、抗 F L A G 抗体（GenScript、番号 A 0 1 4 2 8）、抗 H A 抗体（GenScript、番号 A 0 0 1 6 9）および抗 V S V - G 抗体（GenScript、番号 A 0 0 8 7 2）を含めた市販の抗タグ抗体を使用して 6 種のエピトープタグを評価

した。

【 0 3 4 8 】

【 表 9 】

表9.代替タグ付きタンパク質			
タンパク質	タグ(複数可)	Alpha Diagnostic カタログ番号	ELISAの濃度
Multifusionタグ付きマー カー	His、T7、Myc、HAおよび VSV-G	MFPM20-C	10 µg/mL
Myc-タグマーカー	Myc	Myc15-R	5 µg/mL
FLAG-タグマーカー	FLAG	FLAG15-R	5 µg/mL

10

【 0 3 4 9 】

タグ検出抗体の試験

抗タグ抗体による検出を試験するために、ハイバインド 9 6 ウェルプレート を、上記の表 8 に従って、P B S で希釈された代替タグ付きタンパク質でコーティングした。プレートを、5 m g / m L B S A を用いてブロッキングした。次いで、5 m g / m L B S A を有する P B S で、1 0 0 0、5 0 0、2 5 0、1 2 0 および 0 n g / m L の濃度に希釈した抗タグ抗体を用いてエピトープタグを検出した。

【 0 3 5 0 】

結果は、抗 H A および抗 F L A G 抗体は、抗 M y c 抗体よりも高いシグナルを生じることを実証した。

20

【 0 3 5 1 】

ハイバインドプレートにタグ付きタンパク質をコーティングすることに対するバッファー p H の効果

ハイバインドプレートにタグ付きタンパク質をコーティングすることに対するバッファー p H の効果を試験するために、c - M y c -、F L A G およびマルチフュージョン (m u l t i f u s i o n) タグ付きタンパク質を、P B S、p H 7 . 4 またはクレブス - リンガーバッファ (K R B)、p H 7 . 4 いずれか中、1 0、5、2 . 5 および 1 µ g / m L の濃度でコーティングした。次いで、プレートを、P B S または K R B、p H 7 . 4、6 . 5 および 6 . 0 いずれか中、5 m g / m L B S A を用いてブロッキングした。エピトープタグを、P B S または K R B、p H 7 . 4 で希釈した、抗タグ A b (5 0 0 n g / m L および 5 m g / m L B S A) を用いて検出した。

30

【 0 3 5 2 】

結果は、p H 7 . 4、6 . 5 または 6 . 0 の P B S または K R B でブロッキングされたプレート間で相違が観察されなかったので、バッファー p H は、ハイバインドプレートへのタグ付きタンパク質のコーティング安定性に対して効果がないことを実証した。

【 0 3 5 3 】

ハイバインドプレートでのタグ付きタンパク質の検出に対するバッファー p H の効果

タグ付きタンパク質の検出に対するバッファー p H の効果を試験するために、ハイバインドプレートを、P B S または K R B、p H 7 . 4 中、1 0 µ g / m L の出発濃度で、2 × 段階希釈した、c - M y c - および F L A G - タグ付きタンパク質を用いてコーティングした。プレートを、P B S または K R B、p H 7 . 4、6 . 5 および 6 . 0 いずれか中、5 m g / m L B S A を用いてブロッキングした。エピトープタグを、P B S または K R B、p H 7 . 4、6 . 5 および 6 . 0 で希釈した抗タグ A b (抗 c - M y c - タグ A b について 1 µ g / m L、抗 F L A G - タグ A b について 0 . 5 µ g / m L、5 m g / m L B S A を含む) を用いて検出した。

40

【 0 3 5 4 】

結果は、バッファー p H は、結合が、p H 6 . 5 および 6 . 0 と比較して、p H 7 . 4 でわずかに低減するので、抗 F L A G - タグ抗体によるエピトープタグ検出に対してわず

50

かな効果を有することを実証した。抗 c - M y c - タグ抗体について、同様の全体的な効果が観察された。

【 0 3 5 5 】

抗 M y c - タグ抗体の p H 感受性

3 種の抗 M y c - タグ抗体 (G e n S c r i p t 、 番号 A 0 0 1 7 3 、 A b c a m 、 番号 a b 1 3 2 6 または A b c a m 、 番号 1 2 6 1) を、その p H 感受性についてさらに評価した。ハイバインドプレートを、マルチフュージョンタグタンパク質を、P B S または K R B 、 p H 7 . 4 いずれか中、2 5 0 n g / m L の濃度で出発する 4 x 段階希釈で用いてコーティングした。プレートを、P B S または K R B 、 p H 7 . 4 、 6 . 5 および 6 . 0 いずれか中、5 m g / m L B S A を用いてブロッキングした。タグ付きタンパク質を、P B S または K R B 、 p H 7 . 4 、 6 . 5 および 6 . 0 いずれか中の、ヤギまたはウサギ抗 c - M y c タグ A b (2 0 0 または 5 0 0 n g / m L) を用いて検出した。

10

【 0 3 5 6 】

結果は、A b c a m 抗体は、G e n S c r i p t 抗体よりも感受性であることを示す。さらに、バッファー p H は、A b c a m 製のヤギまたはウサギ抗 c - m y c 抗体によるエピトープタグ検出に対して最小の効果しか有していなかった。

【 0 3 5 7 】

抗 M y c - タグ抗体に対するバッファー p H の効果

バッファー p H を、A b c a m 抗 M y c - タグ抗体 (A b c a m 、 番号 a b 1 3 2 6 または A b c a m 、 番号 1 2 6 1) の結合に対するその効果についてさらに評価した。ハイバインドプレートを、マルチフュージョンタグタンパク質を、P B S 、 p H 7 . 4 中、2 5 0 n g / m L の濃度で出発する 3 x 段階希釈で用いてコーティングした。プレートを、K R B 、 p H 7 . 4 、 6 . 5 および 6 . 0 中、5 m g / m L B S A を用いてブロッキングした。タグ付きタンパク質を、K R B 、 p H 7 . 4 、 6 . 5 および 6 . 0 中、ヤギまたはウサギ抗 c - M y c タグ A b (2 5 0 または 5 0 0 n g / m L) を用いて検出した。

20

【 0 3 5 8 】

結果は、バッファー p H は、A b c a m 製のヤギまたはウサギ抗 c - m y c 抗体によるエピトープタグ検出に対して最小の効果しか有さないことを実証した。

【 0 3 5 9 】

さらなる抗 M y c - タグ抗体の評価

これらのさらなる抗 M y c - タグ抗体を評価し、A b c a m 抗 M y c - タグ抗体 (A b c a m 、 番号 a b 1 3 2 6 または A b c a m 、 番号 1 2 6 1) と、また抗 V S V - G 抗体 (G e n s c r i p t 、 番号 A 0 0 8 7 2) と比較した。抗体は、ヤギ抗 c - M y c タグ A b (G e n e T e x 、 カタログ番号 G T X 2 1 2 6 1) 、ウサギ抗 c - M y c タグ A b (G e n e T e x 、 カタログ番号 G T X 1 9 3 1 2) およびヤギ抗 c - M y c タグ A b (A l p h a D i a g n o s t i c s 、 カタログ番号 M Y C 1 3 - H R P) とした。ハイバインドプレートを、マルチフュージョンタグタンパク質を、P B S 、 p H 7 . 4 中、2 5 0 n g / m L の濃度で用いてコーティングした。プレートを、P B S p H 7 . 4 中、5 m g / m L B S A を用いてブロッキングした。タグ付きタンパク質を、P B S p H 7 . 4 中、ヤギまたはウサギ抗 c - M y c タグ A b (段階希釈、2 5 0 n g / m L で出発) を用いて検出した。

30

40

【 0 3 6 0 】

結果は、A b c a m 抗体および G e n e T e x 製のヤギ抗 c - M y c タグ A b はすべて、マルチフュージョンタグタンパク質と同様の親和性で結合し、G e n e T e x 製のウサギ抗 c - M y c タグ A b はわずかに低い親和性を有することを実証した。A l p h a D i a g n o s t i c s 製の抗 V S V - G 抗体およびヤギ抗 c - M y c タグ A b は両方とも、試験されたその他の抗体よりも約 5 倍低い親和性を有する。

【 0 3 6 1 】

抗 c - M y c 対抗 H A 抗体に対するブロッキング剤としてのヒト血清の効果

5 種の抗 c - m y c 抗体 (上記参照のこと) を、5 % ヒト血清の存在下での結合につい

50

て抗H A - タグ抗体 (G e n S c r i p t、番号A 0 0 1 6 9) と比較した。ハイバインドプレートを、マルチフュージョンタグ付きマーカータンパク質を、P B S、p H 7 . 4 中、2 5 0 n g / m L の濃度で出発する3 × 段階希釈で用いてコーティングした。プレートを、K R B、p H 7 . 4 中、5 % ヒト血清を用いてブロッキングした。タグ付きタンパク質は、K R B、p H 7 . 4 中、ヤギまたはウサギ抗 c - M y c タグ A b またはヤギ抗 H A 抗体 (3 × 段階希釈、2 5 0 n g / m L で出発) を用いて検出した。

【 0 3 6 2 】

結果は、抗H A 抗体ならびに抗 c - M y c 抗体は、5 % ヒト血清の存在下で結合しないということを示した。A b c a m および G e n e T e x 抗 c - m y c 抗体はすべて、同様の親和性を有していた。結果はまた、ヒト血清は、二次抗体によるタグ付きタンパク質の検出を干渉しないことも示した。

10

【 0 3 6 3 】

2 5 % ヒト血清の存在下でのタグ付きタンパク質検出

抗 F L A G 抗体 (A b c a m、a b 1 2 3 8) を、その K R B バッファー、p H 6 . 0 および 7 . 4 中、2 5 % ヒト血清の存在下での F L A G - タグタンパク質の検出について評価した。p H 7 . 4 での K_D は、およそ 2 2 4 n g / m L であったのに対し、p H 6 . 0 での K_D は、およそ 1 3 5 n g / m L であった。

【 0 3 6 4 】

抗 m y c 抗体 (A b c a m、a b 1 3 2 6) もまた、その、K R B バッファー、p H 6 . 0 および 7 . 4 中、2 5 % ヒト血清の存在下での m y c - タグタンパク質の検出について評価した。p H 7 . 4 での K_D は、およそ 7 . 9 8 n g / m L であるのに対し、p H 6 . 0 での K_D は、およそ 7 . 7 3 n g / m L であった。

20

【 0 3 6 5 】

抗 M y c 抗体 (A b c a m、a b 1 3 2 6) は、その、K R B バッファー、p H 7 . 4 中、2 5 % ヒト血清の存在下でのマルチフュージョンタグタンパク質の検出について評価した。 K_D は、およそ 2 0 n g / m L であった。

【実施例 6】

【 0 3 6 6 】

抗 E G F R - F L M A b p H 感受性 E L I S A に対するヒト血清の効果

この実施例では、ヒト血清の量を増大する効果を、F L A G タグ付きアービタックス (登録商標) 抗 E G F R 抗体およびヤギ抗 F L A G - H R P コンジュゲート二次抗体を使用して評価した。実験は、5 % または 2 5 % ヒト血清のいずれかおよび異なる量の乳酸 (以下の表 9 参照のこと) を含む、p H 7 . 4 または 6 . 0 のいずれかの K R B を使用して実施した。ヒト血清および乳酸は、腫瘍微小環境を模倣するために添加した。

30

【 0 3 6 7 】

手短には、9 6 ウェルハイバインドプレート (C o s t a r 番号 2 5 9 2) を、K R B、p H 7 . 4 中、1 2 n M (1 . 3 2 μ g / m L) の s E G F R - H G 抗原 (S i n o B i o l o g i c s、カタログ番号 1 0 0 0 1 - H 0 8 H) 1 0 0 μ L を用いて 4 で一晚コーティングした。次いで、プレートを 2 5 0 μ L / ウェルの K R B、p H 7 . 4 で 3 回洗浄し、続いて、p H 7 . 4 および 6 . 0 でヒト血清および乳酸を含む (以下の表 9 に示される) K R B 2 5 0 μ L を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。F L A G - E G F R M A b 標準または試験標準の段階希釈 (3 ×、出発濃度 1 0 0 n g / m L、それに続く 1 : 3 希釈) を、p H 7 . 4 および 6 . 0 でヒト血清および乳酸を含む K R B で調製し、ウェルあたり 1 0 0 μ L を添加し、プレートを室温で 1 時間インキュベートした。次いで、プレートを、2 5 0 μ L / ウェルの p H 7 . 4 および 6 . 0 でヒト血清および乳酸を含む K R B で 3 回洗浄した。1 0 0 μ L / ウェルのヤギ抗 F L A G - H R P コンジュゲート二次抗体 (p H 7 . 4 および 6 . 0 で 2 5 % ヒト血清および乳酸を含む K R B で 1 : 2 0 0 0 希釈した) を、各ウェルに添加し、プレートを室温で 1 時間インキュベートした。次いで、プレートを、2 5 0 μ L / ウェルの p H 7 . 4 および 6 . 0 でヒト血清および乳酸を含む K R B で 3 回洗浄した。最後に、1 0 0 μ L の S u r e b l u e T M B マイク

40

50

ロウエルペルオキシダーゼ基質 1 - 成分 (KPL、番号 52 - 00 - 03) 溶液を各ウェルに添加し、プレートを室温で 15 ~ 20 分間発色させた (光から離して)。各ウェルに 100 μ L の TMB 停止溶液 (KPL、番号 50 - 85 - 06) を添加することによって反応を停止させ、マイクロプレート分光光度計 (Molecular Devices、Spectra Max M2) を使用して、プレートを OD₄₅₀ nm で 30 分以内の間読み取った。

【0368】

【表 10】

表10.ELISAアッセイバッファー条件			
バッファー	乳酸	ヒト血清	pH
KRB	11 mM	5 %	7.4
KRB	16.5 mM	5 %	6.0
KRB	1 mM	25 %	7.4
KRB	16.5 mM	25 %	6.0

10

【0369】

結果は、ヒト血清濃度にかかわらず、各試験された pH について一致していた。例えば、25 % ヒト血清、pH 6.0 における抗 EGFR 抗体の結合の K_D は、2.21 ng / mL であったのに対し、5 % ヒト血清、pH 6.0 を利用するアッセイの K_D は、2.12 ng / mL であった。同様の効果が、pH 7.4 についても観察された。結果は、3 人の異なるオペレーターによって各々行われた 3 実験について確認された。結果が、ヒト血清の 2 つのパーセンテージ間に相違がないと示し、25 % が、生理的条件をより厳密に模倣するので、さらなる実験には 25 % を選択した。5 % および 25 % ヒト血清両方の頑強性についての適合性判定基準を以下の表 11 ~ 12 に示す。

20

【0370】

【表 11】

表11.頑強性についての適合性判定基準-5%ヒト血清					
バッファーpH	バッファー成分	LLOQ	ULOQ	K_D	S/N比
7.4	11mM 乳酸、5%ヒト血清	2.7 pM	74 pM	15.4 pM \pm 30 %	\geq 20
6.8	16.5mM 乳酸、5%ヒト血清	2.7 pM	74 pM	11.1 pM \pm 30 %	\geq 20

30

(-EGFR-FLAG 抗体) の濃度の変化 1.0Log は、OD の変化約 2.5 に相当する。

【0371】

【表 12】

表12.頑強性についての適合性判定基準-25%ヒト血清					
バッファーpH	バッファー成分	LLOQ	ULOQ	K_D	S/N比
7.4	1mM 乳酸、25%ヒト血清	2.7 pM	74 pM	16.6 pM \pm 30 %	\geq 20
6.8	16.5mM 乳酸、25%ヒト血清	2.7 pM	74 pM	10.1 pM \pm 30 %	\geq 20

40

LLOQ: 定量化の下限; ULOQ: 定量化の上限; (-EGFR-FLAG 抗体) の濃度の変化 1.0Log は、OD の変化約 2.5 に相当する。

【実施例 7】

【0372】

50

腫瘍微小環境および正常な生理的条件をシミュレートする E L I S A

この実施例では、並行する、ハイスループット pH 感受性間接 E L I S A を開発し、これを使用して、腫瘍微小環境内の細胞外マトリックスにおける結合条件をシミュレートする結合条件、例えば、低 pH ($\text{pH} < 7.4$ 、例えば、 6.0)、高乳酸濃度 ($12 \sim 20 \text{ mM}$) およびヒト血清の存在を試験した。同時に、正常な生理学をシミュレートする条件 (例えば、 $\text{pH} 7.4$ 、 1 mM 乳酸、 25% ヒト血清) も試験した。この方法では、正常な生理的条件よりも腫瘍微小環境を表す条件において標的タンパク質と優先的に結合する、別の場所および以下の実施例 8 において記載された方法を使用して製造された変異型抗体などの抗体を同定できる。

【0373】

生理学的バッファーを最も厳密に反映するので、クレブス - リンガー重炭酸バッファーをスクリーニングのために選択した。アッセイバッファー中に、乳酸を指定の濃度で含め、バッファーの pH を、 1 N の HCl を使用して 7.4 または 6.0 のいずれかに調整した。さらに、ヒト血清をスクリーニングに使用したので、標準的な、容易に入手可能な抗ヒト IgG 1 Fc 抗体は、ヒト血清中に見られる IgG の量のために使用できない (上記の実施例 3 を参照のこと)。したがって、FLAG - タグ付き抗 EGF R 親抗体を、アッセイにおける標準として使用した。

【0374】

手短には、EGF 受容体 (EGF R s E C D) の細胞外ドメインを、 96 ウェルプレート上に固定化した。この抗原コーティング工程は、 $\text{pH} 7.4$ バッファーを使用して実施する。次いで、結合している抗原を、FLAG - タグ付き抗 EGF R 抗体変異体を含む細胞培養上清の所定の希釈物とともにインキュベートした。タグ付き抗体変異体を、HRP コンジュゲート抗 FLAG 抗体の結合後に検出した。最初のプロッキング、FLAG - 抗体変異体の結合、洗浄およびコンジュゲート抗 FLAG 二次抗体による検出は、以下に記載されるように $\text{pH} 7.4$ または $\text{pH} 6.0$ バッファーを用いる並行条件下で実施した。

【0375】

アッセイ：

96 ウェルハイバインドプレート (Costar 番号 2592) を、バッファー A (クレブス - リンガーバッファー (KRB、Sigma Aldrich、番号 K4002)、 $\text{pH} 7.4$ 、ヒト血清不含) 中、 12 nM ($1.32 \mu\text{g} / \text{mL}$) の EGF R s E C D - H6 抗原 (実施例 1 に記載されるように調製された、または s E G F R - H6 (Sino Biologicals、カタログ番号 10001-H08H)) $100 \mu\text{L}$ を用いて、 4°C で一晩または室温 (RT) で 2 時間コーティングする。次いで、プレートを、 $250 \mu\text{L}$ / ウェルのバッファー A で 3 回洗浄し、続いて、 $250 \mu\text{L}$ の $\text{pH} 7.4$ バッファー B (1 mM 乳酸 / 25% ヒト血清) または $\text{pH} 6.0$ バッファー C (16.6 mM 乳酸 / 25% ヒト血清) を用い、覆いをして室温で 1 時間プロッキングした。 $\text{pH} 7.4$ バッファー B (KRB、 $\text{pH} 7.4$ 、 1 mM 乳酸 / 25% ヒト血清) または $\text{pH} 6.0$ バッファー C (KRB、 $\text{pH} 6.0$ 、 16.6 mM 乳酸 / 25% ヒト血清) のいずれかで、抗 EGF R - FLAG 抗体標準の段階希釈 ($3 \times$ 、出発濃度 $100 \text{ ng} / \text{mL}$ 、それに続く $1:3$ 希釈) を調製し、ウェルあたり $100 \mu\text{L}$ を添加した。希釈後、抗 EGF R - FLAG 抗体の濃度は、 666.67 pM ($100 \text{ ng} / \text{mL}$)、 222.22 pM ($33.33 \text{ ng} / \text{mL}$)、 74.07 pM ($11.11 \text{ ng} / \text{mL}$)、 24.69 pM ($3.70 \text{ ng} / \text{mL}$)、 8.23 pM ($1.23 \text{ ng} / \text{mL}$)、 2.74 pM ($0.41 \text{ ng} / \text{mL}$)、 0.91 pM ($0.137 \text{ ng} / \text{mL}$) および 0 であった。試験サンプル希釈物を、抗体標準について上記に記載したように調製し、ウェルあたり $100 \mu\text{L}$ を添加した。抗 EGF R - FLAG 抗体標準および試験サンプルに覆いをし、室温で 1 時間インキュベートした。次いで、プレートを、 $250 \mu\text{L}$ / ウェルの $\text{pH} 7.4$ バッファー B または $\text{pH} 6.0$ バッファー C のいずれかで 3 回洗浄した。 $100 \mu\text{L}$ / ウェルの、 $\text{pH} 7.4$ バッファー B または $\text{pH} 6.0$ バッファー C いずれか中、 $500 \text{ ng} / \text{mL}$ のヤギ抗 FLAG

10

20

30

40

50

- HRP 検出抗体 (Abcam、番号 ab1238) を各ウェルに添加し、プレートに覆いをし、室温で 1 時間インキュベートした。次いで、プレートを、pH 7.4 バッファー B または pH 6.0 バッファー C いずれかの 250 μ L / ウェルで 3 回洗浄した。最後に、各ウェルに、100 μ L の SureBlue TMB マイクロウェルペルオキシダーゼ基質 1 - 成分 (KPL、番号 52-00-03) 溶液を添加し、プレートを室温で 15 ~ 20 分間発色させた (光から離して)。各ウェルに 100 μ L の TMB 停止溶液 (KPL、番号 50-85-06) を添加することによって反応を停止させ、マイクロプレート分光光度計 (Molecular Devices、Spectra Max M2) を使用して、プレートを OD₄₅₀ nm で 30 分以内の間読み取った。

【0376】

各プレートは、抗 EGFR - FLAG 抗体標準、陽性対照 (親抗体) および陰性対照トランスフェクションを含んでいた。ELISA は 3 連で実施した。

【0377】

正常な生理的条件よりも腫瘍微小環境をシミュレートする条件において標的タンパク質と優先的に結合する、変異型抗体などの抗体を同定するための選択判定基準は、pH 6.0 / 7.4 での抗体変異体結合の割合および親の対照抗体を上回る指定の増大倍数として決定した。タグ付きアービタックス (登録商標) 抗 EGFR 抗体対照抗体などの親の対照抗体と比較して、pH 6.0 で強力な結合活性を有し、中性 pH 7.4 で結合が減少する、変異型抗体などの抗体が、対象とする抗体である。

【実施例 8】

【0378】

抗 EGFR 抗体突然変異体の作製

この実施例では、アービタックス (登録商標) 抗 EGFR 抗体の単一点突然変異の包括的ポジショナルエボリューション (comprehensive positional evolution) (CPE) ライブラリーを構築し、作製した。CPE ライブラリー構築の位置は、アービタックス (登録商標) 抗 EGFR 抗体の軽鎖および重鎖の可変領域 CDR 中に集中しており、抗原認識において役割を果たし得るさらなるアミノ酸を含めた。アービタックス (登録商標) の重鎖または軽鎖 (それぞれ、配列番号 2 および 1) の可変領域内の 100 のアミノ酸位置の各々で、少なくとも 15 種のアミノ酸変異体を含む単一点変異体のライブラリーを作製した (図 1 参照のこと)。各位置の 15 種の変異体の中にはアミノ酸ヒスチジンを含めた。ライブラリーのメンバーのグリセロールストックを調製し、-80 で保存した。

【0379】

ライブラリーの各メンバーを配列決定し、IgG 抗体として CHO 細胞において発現させ、96 ウェルプレート中のアドレス可能なアレイに配置し、実施例 7 に記載されるように、腫瘍微小環境をシミュレートする条件下で、また、正常な生理的条件をシミュレートする条件下で EGFR 抗原の可溶性細胞外ドメインとの結合について ELISA によって試験して、6.0 の低い pH で結合活性を有し、親のタグ付きアービタックス (登録商標) 抗 EGFR 対照抗体と比較して pH 7.4 で結合活性が減少する抗体を同定した。

【0380】

さらに、SEAP または定量的アッセイが使用される。このアッセイでは、細胞培養上清中の分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) の活性が測定される。SEAP 活性 / 抗体タンパク質濃度を使用して、トランスフェクション / 発現効率の変動を補正し、抗体変異体結合活性を野生型に対して正規化する。CPE スクリーニングから同定された陽性クローンは、低 pH (6.0) 条件下で EGFR sECD との結合が増大したムテインについてスクリーニングするための CPS ライブラリーの構築によるさらなる発展のために考慮される。

【実施例 9】

【0381】

抗 EGFR 抗体突然変異体の条件的活性

10

20

30

40

50

実施例 8 に記載されたアービタックス（登録商標）抗 E G F R 抗体の単一点突然変異体の C P E ライブラリーのメンバーを、p H 6 . 0 および p H 7 . 4 での E G F R s E C D - H 6 抗原との結合を測定するために E L I S A によって評価し、実施例 7 に記載されるような条件的に活性である突然変異体を同定した。結果を、表 1 3 に示す。試験された 1 5 0 1 種のアービタックス（登録商標）突然変異体のうち、2 4 8 種の突然変異体が、条件的に活性であった（p H 7 . 4 で正規化された比活性 > 0 . 4 および p H 6 . 0 で < 0 . 4 を有する 2 0 9 種の突然変異体、ならびに p H 6 . 0 で正規化された比活性 > 0 . 4 および p H 7 . 4 で < 0 . 4 を有する 3 9 種の突然変異体）。残りの突然変異体のうち、2 8 3 種は、低い発現レベル（< 2 0 n g / m l ）を有しており、1 4 9 種は、p H 6 . 0 または p H 7 . 4 で結合活性を有さず、7 3 7 種の突然変異体は、p H 6 . 0 および p H 7 . 4 で正規化された比活性 > 0 . 4 を有していた。

10

【 0 3 8 2 】

【表 1 3 】

表13					
カテゴリー	判定基準	クローン数			総クロー ンの%
		合計	軽鎖	重鎖	
低発現	発現レベル<20ng/ml	283	78	205	18.9
非活性クロー ーン	pH6.0またはpH7.4で 結合活性なし	149	43	106	10.0
pH6.0および 7.4で活性	pH6.0およびpH7.4で 正規化された比活性 >0.4	737	315	422	49.1
pH7.4のみで 活性	pH7.4で正規化され た比活性>0.4および pH6.0で<0.4	209	134	75	13.9
pH6.0のみで 活性	pH6.0で正規化され た比活性>0.4および pH7.4で<0.4	39	3	36	2.6
その他		84	12	72	5.5

20

30

【 0 3 8 3 】

改変は、当業者には明らかであるので、本発明は添付の特許請求の範囲の範囲によってのみ制限されると意図される。

【図 1】

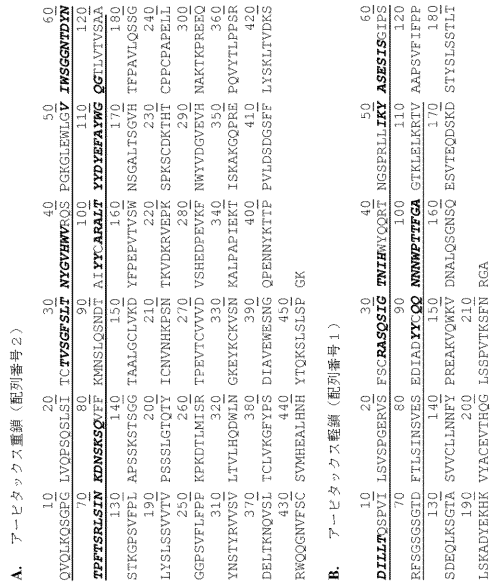


FIGURE 1

【配列表】

2013541940000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年9月3日(2013.9.3)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍を治療し、非腫瘍環境と比較して腫瘍微小環境においてより大きな活性を有し、中性 pH よりも低 pH で高い活性である修飾された治療用タンパク質を同定 / 選択するインビトロでの方法であって、

a) 腫瘍環境において存在する条件 a) 下および非腫瘍微小環境において存在する条件 b) 下で複数の修飾された治療用タンパク質の活性を試験すること、

ここで、a) における条件は、7.4 未満である低 pH およびヒト血清を含み、

b) における条件は、中性 pH およびヒト血清を含み、

a) における血清濃度は、b) における血清濃度と等しく、生理学的環境において存在する濃度であり、

それぞれの修飾された治療用タンパク質は、治療用タンパク質の修飾されていない形態と比較して、アミノ酸残基のアミノ酸置換、挿入および / または欠失を含有し、

それぞれの修飾されたタンパク質は、a) および b) のそれぞれにおいて試験される、および、

b) b) と比較して、a) においてより大きな活性を有する修飾された治療用タンパク

質を選択／同定し、それによって、条件的に活性であり、その結果、非腫瘍環境と比較して、腫瘍微小環境においてより大きな活性を有するタンパク質を同定することを含む方法。

【請求項 2】

低 pH が、5.8 ～ 6.8 の間である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

中性 pH が、7.2 ～ 7.6 の間である、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

a) における条件が、乳酸濃度の上昇、ピルビン酸濃度の上昇および低酸素の中から選択される 1 つまたは複数の条件を含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

a) における条件が、10 mM ～ 20 mM の乳酸の中から選択される乳酸濃度を含み、かつ／または

b) における条件が、0.5 ～ 5 mM もしくは 0.2 mM ～ 4 mM の乳酸の中から選択される乳酸濃度を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

治療用タンパク質が、抗体、酵素、ホルモン、サイトカインまたはその活性部分、標的受容体のリガンドであり、ここで、抗体への言及が、抗体またはその抗原結合断片を指す、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

治療用タンパク質が、多量体化ドメインを含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

多量体化ドメインが、Fc ドメインまたは修飾された Fc ドメインを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

治療用タンパク質が、セツキシマブ、トラスツズマブ、リツキシマブ、ベバシズマブ、アレムツズマブ、パニツムマブ、ラニビズマブ、イブリツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、トシツモマブ、ヨウ素 I 131 トシツモマブ、カツマキシマブ、ゲムツズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン（マイロターゲット（登録商標））、アバタセプト（CTLA4-Ig）、ベラタセプト（LEA29YIg；LEA29Y；LEA）、イビリムマブ（MDX-010、MDX-101）、トレメリムマブ（チシリムマブ、CP-675,206）、PRS-010、PRS-050、アフリベルセプト（VEGF Trap、AVE005）、ボロキシマブ（M200）、F200、MORAb-009、SS1P（CAT-5001）、シクスツムマブ（IMC-A12）、マツズマブ（EMD72000）、ニモツズマブ（h-R3）、ザルツムマブ（HuMax-EGFR）、ネシツムマブ IMC-11F8、mAb806/ch806、Sym004 および mAb-425 の中から選択される、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

抗体が、抗 EGFR 抗体または抗 CTLA4 抗体である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

抗体が、セツキシマブである抗腫瘍抗体である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 12】

修飾されたタンパク質が、抗体の修飾されていない形態と比較して、相補性決定領域（CDR）中に 1 つまたは複数のアミノ酸置換を含む修飾された抗体である、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

複数のタンパク質が、治療用タンパク質と比較して修飾されており、治療用タンパク質またはその選択された部分の長さに沿ってどのアミノ酸も修飾され、各タンパク質が単一アミノ酸修飾を含有し、そして

修飾されている位置各々のアミノ酸が、その位置の元のアミノ酸以外の最大1～19種のアミノ酸で置換され、置換アミノ酸が、修飾されていない治療用タンパク質中の対応する位置のアミノ酸とは異なるという条件で、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrおよびValの中から選択される、
請求項1から12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】

アミノ酸置換が、Arg、Asp、Glu、HisおよびLysの中から選択されるアミノ酸との置換であるか、または
アミノ酸置換が、Hisとの置換であるか、またはタンパク質中のヒスチジンが、非塩基性もしくは非荷電アミノ酸で置換される、請求項1から13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

試験される活性が、治療用タンパク質の標的タンパク質との結合である、請求項1から14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】

ヒト血清が、反応混合物の容量に対して、3容量%～30容量%(3容量%と30容量%を含む)、5容量%～30容量%(5容量%と30容量%を含む)、5容量%～25容量%(5容量%と25容量%を含む)、10容量%～30容量%(10容量%と30容量%を含む)、15容量%～30容量%(15容量%と30容量%を含む)および15容量%～25容量%(15容量%と25容量%を含む)の中から選択される、請求項1から15のいずれかに記載の方法。

【請求項17】

ヒト血清の濃度が、25容量%(±10%)または15容量%～35容量%である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

a)における活性が、b)における活性よりも、少なくとも1.2または少なくとも2倍大きい、請求項1から17のいずれかに記載の方法。

【請求項19】

複数回反復し、各反復において、選択された修飾されたタンパク質(単数または複数)のさらなる修飾されたタンパク質を作製し、試験し、それによって、治療用タンパク質が、非腫瘍環境においてよりも腫瘍環境において活性の増大を示すよう発展(evolved)し、それによって、毒性の低減または有害な副作用の低減を示す、請求項1から18のいずれかに記載の方法。

【請求項20】

選択されるタンパク質が、修飾された抗EGFR抗体であり、腫瘍微小環境において存在するa)の条件が、ヒト血清、5.8～6.8のpHおよび12～20mMの乳酸濃度を含み、
非腫瘍微小環境において存在するb)の条件が、ヒト血清、7.3～7.4のpHおよび12mM未満の乳酸濃度を含む、請求項1から19のいずれかに記載の方法。

【請求項21】

第2の条件セットにおいてよりも第1の条件セットにおいてより活性である治療用タンパク質を同定/選択する方法であって、

第1の条件セットが、低pH、乳酸濃度の上昇、ビルビン酸濃度の上昇および低酸素の中から選択される、非腫瘍微小環境と比較して腫瘍微小環境において存在する1種または複数の条件を含み、

第2の条件セットが、非腫瘍微小環境において存在する対応する条件を含み、
方法が、

a)複数のタンパク質を、第1および第2の条件セット下で活性について試験することであって、

複数のタンパク質が、治療用タンパク質の修飾された変異体を含むか、または治療用タ

ンパク質の修飾された変異体であり、

変異体の第 1 の収集物が、第 1 および第 2 の条件セットの各々において試験されることと、

b) 修飾されていない治療用タンパク質と比較して、第 1 の条件セット下で低減した活性と、

修飾されていない治療用タンパク質と比較して、第 2 の条件セット下で低減した活性とを有するタンパク質を選択 / 同定することと、

c) 工程 b) において選択 / 同定されたタンパク質を分析して、修飾されるアミノ酸位置を同定し、それによって、重大なアミノ酸位置としてアミノ酸を同定することと、

d) 同定された重大なアミノ酸位置に隣接するかまたはその付近のアミノ酸残基の、置換アミノ酸との置換を含む修飾されたタンパク質の第 2 の収集物を作製することとあって、ライブラリーの各メンバーが、治療用タンパク質と比較して単一アミノ酸置換を含むことと、

e) 第 1 の条件セット下および第 2 の条件セット下で、修飾されたタンパク質の第 2 の収集物のメンバーの活性を試験し、第 2 の条件セット下と比較して、第 1 の条件セット下で大きな、または等しい活性を示す第 2 の収集物のメンバーを選択 / 同定することと、

f) e) において選択 / 同定されたタンパク質を分析して、置換されたアミノ酸位置を同定することとあって、同定された位置が、重要な残基位置と呼ばれることと、

g) 修飾されたタンパク質の第 3 の収集物を作製することとあって、各メンバーが、1 個または複数の重要な残基位置の、置換アミノ酸との置換を含むことと、

h) 修飾されたタンパク質の第 3 の収集物のメンバーの活性を、第 1 の条件セット下および第 2 の条件セット下で試験し、第 2 の条件セットと比較して、第 1 の条件セット下でより大きな活性を有する第 3 の収集物のメンバーを選択 / 同定し、それによって、第 2 の条件セットにおいてよりも、第 1 の条件セットにおいてより活性である治療用タンパク質を同定することとを含む方法。

【請求項 2 2】

治療用タンパク質が、抗体、酵素、ホルモン、サイトカイン、標的受容体のリガンドまたはその活性部分であり、ここで、抗体への言及が、抗体またはその抗原結合断片を指す、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

治療用タンパク質が、腫瘍を治療するタンパク質である、請求項 2 1 または請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

腫瘍を治療する治療用タンパク質が、抗腫瘍抗体である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

治療用タンパク質が、セツキシマブ、トラスツズマブ、リツキシマブ、ベバシズマブ、アレムツズマブ、パニツムマブ、ラニビズマブ、イブリットモマブ、イブリットモマブチウキセタン、トシツモマブ、ヨウ素 I 131 トシツモマブ、カツマキシマブ、ゲムツズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、アバタセプト (CTLA4-Ig)、ベラタセプト (L104EA29YIg; LEA29Y; LEA)、イピリムマブ (MDX-010、MDX-101)、トレメリムマブ (チシリムマブ、CP-675, 206)、PRS-010、PRS-050、アフリベルセプト (VEGF Trap、AVE005)、ボロキシマブ (M200)、F200、MORAb-009、SS1P (CAT-5001)、シクスツムマブ (IMC-A12)、マツズマブ (EMD72000)、ニモツズマブ (h-R3)、ザルツムマブ (HuMax-EGFR)、ネシツムマブ IMC-11F8、mAb806 / ch806、Sym004 および mAb-425 の中から選択される、請求項 2 3 または請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

抗腫瘍抗体が、セツキシマブである、請求項 2 4 または請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 27】

試験される活性が、標的タンパク質との結合である、請求項 21 から 26 のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】

第1の条件セットが、7.4未満の低pHを含み、

重大なアミノ酸が、荷電残基からなるアミノ酸置換を含むタンパク質変異体から選択される、請求項 21 から 27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

荷電残基が、Arg、Asp、Glu、HisおよびLysの中から選択される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

第2および第3の収集物中のアミノ酸置換が、アミノ酸のHisとの置換である、請求項 21 から 28 のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

第1の条件セットが、5.8 ~ 6.8 (5.8および6.8を含む)であるpHを含む、請求項 21 から 30 のいずれかに記載の方法。

【請求項 32】

第1の条件セットが、中性より低いpHおよび第2の条件セットと比較して乳酸濃度の上昇を含む、請求項 21 から 31 のいずれかに記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/050891

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/30 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/68
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/105757 A2 (GENENCOR INT [US]; SCHELLENBERGER VOLKER [US]; TRESSLER ROBERT J [US];) 24 December 2003 (2003-12-24)	1-5, 8-10, 12-16, 21-24, 28-34, 36,49-57
Y	page 4, line 16 - line 23; claims 1-5; examples 4,5 page 18, paragraph 3 page 29, line 2 page 34, line 20 - line 22 ----- -/--	6,7,12, 17-20, 25-27, 34, 37-48, 58-114

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 February 2012

Date of mailing of the international search report

17/02/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wiesner, Martina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/050891

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/260711 A1 (DATTA DEEPSHIKHA [US] ET AL) 24 November 2005 (2005-11-24)	1-6, 8-36, 49-58,74
Y	paragraphs [0134], [0137], [0365], [0376], [0377]; claims 22-25; example IV	7,37-48, 59-73, 75-114

X	WO 2006/031370 A2 (GENENTECH INC [US]; LOWMAN HENRY B [US]; ADAMS CAMELLIA W [US]; MARVIN) 23 March 2006 (2006-03-23)	1-6, 8-36, 49-58,74
Y	page 28, paragraph 2; claims 1,2,37; example 1	7,37-48, 59-73, 75-114

X	JUNG SANG TAEK ET AL: "Aglycosylated IgG variants expressed in bacteria that selectively bind Fc gamma RI potentiate tumor cell killing by monocyte-dendritic cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC; US, vol. 107, no. 2, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 604-609, XP009143225, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0908590107	1-5, 8-10, 12-16, 21-24, 28-34, 36,49-57
Y	the whole document	6,7,12, 17-20, 25-27, 34, 37-48, 58-114

Y	US 2008/044854 A1 (WANG PIN [US] ET AL) 21 February 2008 (2008-02-21)	6,7,12, 17-20, 25-27, 34, 37-48, 58-114
	paragraph [0345] - paragraph [0356]	

A	WO 2005/058236 A2 (GENENCOR INT [US]; FOX JUDITH A [US]; HARDING FIONA A [US]; SCHELLENBE) 30 June 2005 (2005-06-30)	1-114
	examples 1,2	

A	EP 1 975 178 A1 (STAR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHU [AT]) 1 October 2008 (2008-10-01)	1-114
	page 12, line 5 page 15, paragraph 0149 - page 16, paragraph 0152 claims 5-8,14,16	

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/050891

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DALL'ACQUA W F ET AL: "Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 169, no. 9, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 5171-5180, XP002384463, ISSN: 0022-1767 the whole document -----	1-114
A	R. DENG ET AL: "Pharmacokinetics of Humanized Monoclonal Anti-Tumor Necrosis Factor- Antibody and Its Neonatal Fc Receptor Variants in Mice and Cynomolgus Monkeys", DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, vol. 38, no. 4, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 600-605, XP55019071, ISSN: 0090-9556, DOI: 10.1124/dmd.109.031310 the whole document -----	1-114
A	SV KOZIN ET AL: "Cytotoxicity of weak electrolytes after the adaptation of cells to low pH: role of the transmembrane pH gradient", BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 77, no. 10, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 1580-1585, XP55019075, ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/bjc.1998.260 the whole document -----	1-114
A	O. TREDAN ET AL: "Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment", JNCI JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, vol. 99, no. 19, 25 September 2007 (2007-09-25), pages 1441-1454, XP55019083, ISSN: 0027-8874, DOI: 10.1093/jnci/djm135 page 1443, right-hand column, paragraph 2 - page 1444, left-hand column, paragraph 1 -----	1-114

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/050891

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03105757	A2	24-12-2003	AU 2003256266 A1 CA 2488836 A1 EP 1511861 A2 WO 03105757 A2	31-12-2003 24-12-2003 09-03-2005 24-12-2003
US 2005260711	A1	24-11-2005	US 2005260711 A1 US 2009035836 A1	24-11-2005 05-02-2009
WO 2006031370	A2	23-03-2006	AU 2005285347 A1 BR PI0515230 A CA 2577133 A1 CN 101052654 A EP 1778728 A2 JP 2008510466 A KR 20070057839 A KR 20080080675 A RU 2367667 C2 WO 2006031370 A2 ZA 200701715 A	23-03-2006 15-07-2008 23-03-2006 10-10-2007 02-05-2007 10-04-2008 07-06-2007 04-09-2008 20-09-2009 23-03-2006 30-07-2008
US 2008044854	A1	21-02-2008	AU 2007224019 A1 CA 2644474 A1 EP 1999259 A2 JP 2009528824 A US 2008044854 A1 WO 2007103307 A2	13-09-2007 13-09-2007 10-12-2008 13-08-2009 21-02-2008 13-09-2007
WO 2005058236	A2	30-06-2005	EP 1691763 A2 JP 2007516709 A US 2011160440 A1 WO 2005058236 A2	23-08-2006 28-06-2007 30-06-2011 30-06-2005
EP 1975178	A1	01-10-2008	AR 066204 A1 EP 1975178 A1 WO 2008119096 A1	05-08-2009 01-10-2008 09-10-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 5 A
G 0 1 N 33/536 (2006.01)	G 0 1 N 33/536	D
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 9 7
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 3
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	
	C 0 7 K 14/705	
	A 6 1 K 39/395	T
	A 6 1 K 37/02	

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

(72)発明者 ラリサ・コダングパニ

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州サンディエゴ、ダンデライオン・ウェイ 6 5 7 8 番

(72)発明者 ルイス・ハワード・ブックバインダー

アメリカ合衆国 9 2 1 2 8 カリフォルニア州サンディエゴ、ゲイブル・リッジ・ロード 1 4 8 2 3 番

(72)発明者 グレゴリー・イアン・フロスト

アメリカ合衆国 9 2 0 1 4 カリフォルニア州デル・マー、メルカード・ドライブ 1 3 6 6 2 番

(72)発明者 フィリップ・リー・シェリダン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州サンディエゴ、ディア・キャニオン・ブレイス 1 3 2 8 9 番

(72)発明者 ハロルド・マイケル・シェパード

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州サンディエゴ、モントロース・ウェイ 8 1 2 4 番

(72)発明者 グァ・ウェイ

アメリカ合衆国 9 2 1 3 1 カリフォルニア州サンディエゴ、ミロ・サークル 1 1 5 3 0 番

(72)発明者 ホアン・レイ

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州サンディエゴ、カミニート・カーメル・ランディング 3 6 8 3 番

F ターム(参考) 2G045 BB20 CB01 DA36 DA37 DA78 FA37 FB03 FB13

4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS33 QS38 QX02

4C084 AA01 BA44 CA70 DA27 NA05 NA06 ZA53 ZA55 ZB26 ZC35

4C085 AA14 CC01 DD90 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 CA41 DA50 DA76 EA51 FA71

FA74 GA26

专利名称(译)	评估和鉴定或开发条件活性治疗性蛋白质的方法		
公开(公告)号	JP2013541940A	公开(公告)日	2013-11-21
申请号	JP2013528300	申请日	2011-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	哈洛齐梅公司		
申请(专利权)人(译)	Harozaimu公司		
[标]发明人	ラリサコダンドパニ ルイスハワードブックバインダー グレゴリーイアンフロスト フィリップリーシェリダン ハロルドマイケルシェパード グァウエイ ホアンレイ		
发明人	ラリサ・コダンドパニ ルイス・ハワード・ブックバインダー グレゴリー・イアン・フロスト フィリップ・リー・シェリダン ハロルド・マイケル・シェパード グァ・ウェイ ホアン・レイ		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N37/00 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/536 G01N33/574 C07K16/30 C07K14/705 A61K39/395 A61K38/00		
CPC分类号	A61P35/00 C07K16/2863 C07K16/30 C07K16/44 C07K2317/34 G01N33/5011 G01N33/5014 G01N33/5088 G01N2333/71 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/68		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N37/00.102 G01N33/53.D G01N33/543.545.A G01N33/536.D G01N33/543.597 G01N37/00.103 G01N33/53.N G01N33/574.A C07K16/30 C07K14/705 A61K39/395.T A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA78 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB13 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS38 4B063/QX02 4C084/AA01 4C084/BA44 4C084/CA70 4C084/DA27 4C084/NA05 4C084/NA06 4C084/ZA53 4C084/ZA55 4C084/ZB26 4C084/ZC35 4C085/AA14 4C085/CC01 4C085/DD90 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/CA41 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/FA71 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	61/402979 2010-09-08 US		
其他公开文献	JP6121904B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于进化或选择或产生表现出降低的不良副作用的治疗性蛋白质的方法和所得蛋白质。例如，本文提供了体外测定法，以鉴定与另一种体内环境相比在一种体内环境中表现出更好活性的条件活性治疗性蛋白质。该方法包括以下步骤：a) 在需要正常或增加活性的条件下测试蛋白质的活性；b) 在需要与正常相比活性降低的条件下测试蛋白质的活性；c) 将a) 中的活性与b) 进行比较，

并选择/鉴定a) 中与b) 相比具有更高活性的蛋白质。选择/鉴定的蛋白质是条件活性蛋白质。

記号		
1文字	3文字	アミノ酸
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	トレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リシン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
Z	Glx	Gluおよび/またはGln
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
B	Asx	Asnおよび/またはAsp
C	Cys	システイン
X	Xaa	未知またはその他