

(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2012-531212

(P2012-531212A)

(43) 公表日 平成24年12月10日(2012.12.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 5
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 H O 4 5
<b>C O 7 K 16/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 179 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-517983 (P2012-517983)	(71) 出願人	512001854
(86) (22) 出願日	平成22年7月2日 (2010.7.2)		アビベップ ピーティーワイ リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成24年2月27日 (2012.2.27)		オーストラリア国 ヴィクトリア 305
(86) 国際出願番号	PCT/AU2010/000847		2, パークビル, ロイヤル パレイド 3
(87) 国際公開番号	W02011/000054		4 3
(87) 国際公開日	平成23年1月6日 (2011.1.6)	(74) 代理人	100092783
(31) 優先権主張番号	2009903127		弁理士 小林 浩
(32) 優先日	平成21年7月3日 (2009.7.3)	(74) 代理人	100120134
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		弁理士 大森 規雄
(31) 優先権主張番号	61/223, 353	(74) 代理人	100104282
(32) 優先日	平成21年7月6日 (2009.7.6)		弁理士 鈴木 康仁
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ハドソン, ピーター, ジョン
(31) 優先権主張番号	61/256, 703		オーストラリア国 ヴィクトリア 313
(32) 優先日	平成21年10月30日 (2009.10.30)		0, ブラックバーン, フクシア ストリー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ト 36

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イムノコンジュゲート及びその作製方法

## (57) 【要約】

本発明は、フレームワーク領域 1 内に位置する少なくとも 2 つのシステイン残基を含む免疫グロブリン可変領域を含む単離されたタンパク質であって、システイン残基の少なくとも 2 つが別の化合物にコンジュゲートされない場合にシステイン残基間にジスルフィド結合が形成されるタンパク質を提供する。好ましくはタンパク質は免疫グロブリン重鎖可変領域と免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含み、可変領域の少なくとも 1 つが 2 つのシステイン残基を含む。本発明はまた、TAG72 に結合したタンパク質も提供する。本発明はまた、タンパク質と別の化合物とのコンジュゲートも提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

フレームワーク領域 (FR) 1 内に位置する少なくとも 2 つのシステイン残基を含む免疫グロブリン可変領域を含む単離されたタンパク質であって、前記システイン残基の少なくとも 2 つが化合物にコンジュゲートされない場合に、前記システイン残基間にジスルフィド結合が形成可能である、タンパク質。

## 【請求項 2】

免疫グロブリン重鎖可変領域 ( $V_H$ ) と免疫グロブリン軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) とを含む単離されたタンパク質であって、前記可変領域の少なくとも 1 つがフレームワーク領域 (FR) 1 内に位置する少なくとも 2 つのシステイン残基を含み、前記システイン残基の少なくとも 2 つが別の化合物にコンジュゲートされない場合に前記システイン残基間にジスルフィド結合が形成可能である、タンパク質。

10

## 【請求項 3】

前記ジスルフィド結合が非還元条件下で存在する、請求項 1 又は 2 に記載のタンパク質。

## 【請求項 4】

前記システイン残基が、K a b a t 付番方式により付番して残基 2 と相補性決定領域 (CDR) 1 との間に位置する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 5】

前記システイン残基が  $V_H$  内にあり、且つ K a b a t 付番方式による残基 2 から 30 の間に位置する、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載のタンパク質。

20

## 【請求項 6】

前記システイン残基が、K a b a t 付番方式により付番して残基 7 から 20 の間及び / 又は残基 24 から 30 の間に位置する、請求項 5 に記載のタンパク質。

## 【請求項 7】

前記システイン残基が、K a b a t 付番方式により付番して残基 7 から 20 の間に位置する、請求項 6 に記載のタンパク質。

## 【請求項 8】

前記システイン残基が  $V_L$  内にあり、且つ K a b a t 付番方式により付番して残基 2 から 22 の間に位置する、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載のタンパク質。

30

## 【請求項 9】

前記システイン残基が、K a b a t 付番方式により付番して残基 7 から 20 の間に位置する、請求項 8 に記載のタンパク質。

## 【請求項 10】

前記システイン残基が、前記可変領域の前記保存されたシステイン残基に対して追加的なものである、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 11】

前記保存されたシステイン残基が、K a b a t 付番方式により付番して、前記  $V_L$  において残基 23 にあり及び / 又は前記  $V_H$  において残基 22 にある、請求項 10 に記載のタンパク質。

40

## 【請求項 12】

前記システイン残基が、前記保存されたシステイン残基に対して N 末端側に位置する、請求項 10 又は 11 に記載のタンパク質。

## 【請求項 13】

前記システイン残基が、以下：

- (i) K a b a t 付番方式により付番して  $V_L$  の残基 8 及び残基 11；
- (ii) K a b a t 付番方式により付番して  $V_L$  の残基 14 及び残基 17；
- (iii) K a b a t 付番方式により付番して  $V_L$  の残基 7 及び残基 11；
- (iv) K a b a t 付番方式により付番して  $V_L$  の残基 14 及び残基 17；
- (v) K a b a t 付番方式により付番して  $V_L$  の残基 8 及び残基 12；

50

(v i) K a b a t 付番方式により付番して  $V_H$  の残基 7 及び残基 10 ;  
 (v i i) K a b a t 付番方式により付番して  $V_H$  の残基 13 及び残基 16  
 の 1 つ又は複数に位置する、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 14】

前記システイン残基が、以下：

(i) K a b a t 付番方式により付番して  $V_L$  の残基 13 及び残基 19 ;  
 (i i) K a b a t 付番方式により付番して  $V_L$  の残基 13 及び残基 19 ;  
 (v i) K a b a t 付番方式により付番して  $V_H$  の残基 6 及び残基 9 ; 及び / 又は  
 (v i i) K a b a t 付番方式により付番して  $V_H$  の残基 12 及び残基 18  
 の 1 つ又は複数に位置する、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のタンパク質。

10

【請求項 15】

少なくとも 1 つの請求項 2 ~ 14 のいずれか一項に記載のタンパク質を含む F v を含む単離されたタンパク質であって、少なくとも 1 つの  $V_L$  が少なくとも 1 つの  $V_H$  と結合して抗原結合部位を形成する、タンパク質。

【請求項 16】

前記抗原結合部位を形成する前記  $V_L$  と前記  $V_H$  とが単一のポリペプチド鎖にある、請求項 15 に記載のタンパク質。

【請求項 17】

(i) 単鎖 F v 断片 (s c F v) ;  
 (i i) 二量体 s c F v (d i - s c F v) ; 又は  
 (i i i) F c 又は重鎖定常ドメイン ( $C_H$ ) 2 及び / 又は  $C_H$  3 に連結された (i) 及び / 又は (i i) の少なくとも 1 つ  
 である、請求項 16 に記載のタンパク質。

20

【請求項 18】

前記抗原結合部位を形成する前記  $V_L$  と  $V_H$  とが異なるポリペプチド鎖にある、請求項 15 に記載のタンパク質。

【請求項 19】

(i) ダイアボディ ;  
 (i i) トリアボディ ; 又は  
 (i i i) テトラボディ  
 である、請求項 18 に記載のタンパク質。

30

【請求項 20】

免疫グロブリンである、請求項 18 に記載のタンパク質。

【請求項 21】

前記システイン残基がジスルフィド結合によって連結される、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 22】

前記システイン残基の少なくとも 1 つにコンジュゲートした化合物を含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載のタンパク質であって、前記化合物のコンジュゲーションが前記タンパク質の抗原との結合を妨害しない、タンパク質。

40

【請求項 23】

前記化合物が、放射性同位体、検出可能標識、治療化合物、コロイド、毒素、核酸、ペプチド、タンパク質、対象における前記タンパク質の半減期を増加させる化合物及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 22 に記載のタンパク質。

【請求項 24】

少なくとも 1 つの N 末端スレオニン残基又はセリン残基をさらに含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 25】

前記スレオニン残基又はセリン残基にコンジュゲートした化合物を含む、請求項 24 に記載のタンパク質。

50

## 【請求項 26】

前記化合物が、放射性同位体、検出可能標識、治療化合物、コロイド、毒素、核酸、ペプチド、タンパク質、対象における前記タンパク質の半減期を増加させる化合物及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 25 に記載のタンパク質。

## 【請求項 27】

前記システイン残基の少なくとも 1 つにコンジュゲートした第 1 の化合物と、前記スレオニン残基又はセリン残基にコンジュゲートした第 2 の化合物であって、前記第 1 の化合物と異なる第 2 の化合物とを含む、請求項 25 又は 26 に記載のタンパク質。

## 【請求項 28】

前記タンパク質が、配列番号 57 に示される配列と少なくとも約 80% 同一の配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチドを含み、前記化合物が単分散 PEG である、請求項 22 に記載のタンパク質。

10

## 【請求項 29】

前記単分散 PEG が 48 個以下のエチレングリコール単位を有する、請求項 28 に記載のタンパク質。

## 【請求項 30】

前記単分散 PEG が約 24 個のエチレングリコール単位を有する、請求項 28 又は 29 に記載のタンパク質。

## 【請求項 31】

ヒト上皮成長因子 (Her) 2、腫瘍関連糖タンパク質 TAG72、MUC1 又は前立腺特異的膜抗原 (PSMA) に特異的に結合する、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載のタンパク質。

20

## 【請求項 32】

フレームワーク領域 (FR) 1 内に位置する 2 つ以上のシステイン残基を含むように修飾された、配列番号 55、59、61 又は 109 のいずれか 1 つに示される配列と少なくとも約 80% 同一の配列を含む、請求項 31 に記載のタンパク質。

## 【請求項 33】

配列番号 57、63、65、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103 又は 105、119、121、123、125、127、129、131 又は 133 のいずれか 1 つ又は複数に示される配列と少なくとも約 80% 同一の配列を含む、請求項 32 に記載のタンパク質。

30

## 【請求項 34】

免疫グロブリン重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) と免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>) とを含む単離されたタンパク質であって、前記可変領域の少なくとも 1 つが N 末端スレオニン残基又はセリン残基を含む、タンパク質。

## 【請求項 35】

少なくとも 1 つの請求項 31 に記載のタンパク質を含む Fv を含む単離されたタンパク質であって、少なくとも 1 つの V<sub>L</sub> が少なくとも 1 つの V<sub>H</sub> と結合して抗原結合部位を形成する、タンパク質。

## 【請求項 36】

前記抗原結合部位を形成する前記 V<sub>L</sub> と前記 V<sub>H</sub> とが単一のポリペプチド鎖にある、請求項 35 に記載のタンパク質。

40

## 【請求項 37】

(i) 単鎖 Fv 断片 (scFv) ;  
 (ii) 二量体 scFv (di-scFv) ; 又は  
 (iii) Fc 又は重鎖定常ドメイン (C<sub>H</sub>) 2 及び / 又は C<sub>H</sub> 3 に連結された (i) 及び / 又は (ii) の少なくとも 1 つ  
 である、請求項 36 に記載のタンパク質。

## 【請求項 38】

前記抗原結合部位を形成する前記 V<sub>L</sub> と前記 V<sub>H</sub> とが異なるポリペプチド鎖にある、請

50

求項 35 に記載のタンパク質。

【請求項 39】

- (i) ダイアボディ；
- (ii) トリアボディ；又は
- (iii) テトラボディ

である、請求項 38 に記載のタンパク質。

【請求項 40】

免疫グロブリンである、請求項 38 に記載のタンパク質。

【請求項 41】

前記スレオニン残基又はセリン残基にコンジュゲートした化合物をさらに含む、請求項 34 ~ 40 のいずれか一項に記載のタンパク質。

10

【請求項 42】

前記化合物が、放射性同位体、検出可能標識、治療化合物、コロイド、毒素、核酸、ペプチド、タンパク質、対象における前記タンパク質の半減期を増加させる化合物及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 41 に記載のタンパク質。

【請求項 43】

前記 N 末端スレオニン残基又はセリン残基を含むように修飾された、配列番号 55、59、61 又は 109 のいずれか 1 つに示される配列と少なくとも約 80% 同一の配列を含む、請求項 34 ~ 43 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 44】

請求項 1 ~ 43 のいずれか一項に記載のタンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含む組成物。

20

【請求項 45】

請求項 1 ~ 21、24、31 ~ 40 又は 43 のいずれか一項に記載のタンパク質をコードする単離核酸。

【請求項 46】

プロモーターに作動可能に連結された請求項 45 に記載の核酸を含む発現コンストラクト。

【請求項 47】

請求項 45 に記載の外因性核酸及び / 又は請求項 46 に記載の発現コンストラクトを含む単離細胞であって、前記タンパク質を発現する細胞。

30

【請求項 48】

細菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞又は昆虫細胞である、請求項 47 に記載の細胞。

【請求項 49】

請求項 1 ~ 21、24、31 ~ 40 又は 43 のいずれか一項に記載のタンパク質の作製方法であって、請求項 46 に記載の発現コンストラクトを、前記コードされたタンパク質が作製されるのに十分な条件下に維持するステップを含む方法。

【請求項 50】

前記コードされたタンパク質が作製されるのに十分な (sufficient the encoded for the protein to be produced) 条件下で請求項 47 又は 48 に記載の細胞を培養するステップを含む、請求項 49 に記載の方法。

40

【請求項 51】

前記タンパク質を単離するステップを含む、請求項 49 又は 50 に記載の方法。

【請求項 52】

請求項 22 ~ 30 のいずれか一項に記載のタンパク質の作製方法であって、  
 (i) 請求項 1 ~ 21、24 又は 31 ~ 33 のいずれか一項に記載のタンパク質を得るステップと、  
 (ii) 前記タンパク質の FR 1 における前記システイン残基の少なくとも 1 つに化合物をコンジュゲートするステップであって、それにより前記タンパク質を作製するステップと、

50

を含む方法。

【請求項 5 3】

( i ) で得られた前記タンパク質における前記システイン残基がジスルフィド結合によって連結され、及び前記方法が、前記化合物を 1 つ又は複数の前記システイン残基にコンジュゲートする前に、前記ジスルフィド結合を還元するか又はその他の分解するステップをさらに含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記ジスルフィド結合を還元するか又はその他の分解するステップにより前記タンパク質に遊離チオール基が生成され、及び前記化合物が、前記化合物の前記タンパク質とのコンジュゲーションを可能にするチオール反応基を有する、請求項 5 3 に記載の方法。

10

【請求項 5 5】

前記タンパク質が少なくとも 1 つの N 末端セリン残基又はスレオニン残基を含み、及び前記方法が、化合物を前記セリン残基又はスレオニン残基にコンジュゲートするステップをさらに含む、請求項 5 2 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

請求項 2 6、2 7 又は 4 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載のタンパク質の作製方法であって、

( i ) 請求項 2 4 又は 3 4 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のタンパク質を得るステップと、  
( i i ) 前記タンパク質の前記 N 末端にある少なくとも 1 つのセリン残基又はスレオニン残基に化合物をコンジュゲートするステップであって、それにより前記タンパク質を作製するステップと、  
を含む方法。

20

【請求項 5 7】

医薬における請求項 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項 4 4 に記載の組成物の使用。

【請求項 5 8】

対象における病態の治療又は予防方法であって、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項 4 4 に記載の組成物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 5 9】

細胞への化合物の送達方法であって、請求項 2 2 ~ 3 0、4 1 又は 4 2 のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項 4 4 に記載の組成物に前記細胞を接触させるステップを含む方法。

30

【請求項 6 0】

対象に前記タンパク質又は組成物を投与することによって前記細胞を接触させる、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

対象における抗原を位置特定又は検出する方法であって、

( i ) 請求項 2 2 ~ 3 0、4 1 又は 4 2 のいずれか一項に記載のタンパク質が抗原に結合するのに十分な時間にわたり、且つそのような条件下で、前記タンパク質又は請求項 4 4 に記載の組成物を対象に投与するステップであって、前記タンパク質が検出可能標識にコンジュゲートされる、ステップと、

40

( i i ) 前記検出可能標識をインビボで検出又は位置特定するステップと、  
を含む方法。

【請求項 6 2】

対象における病態の診断又は予後判定方法であって、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載のタンパク質が抗原に結合して複合体を形成するのに十分な時間にわたり、且つそのような条件下で、前記対象からの試料を前記タンパク質又は請求項 4 4 に記載の組成物と接触させるステップと、前記複合体を検出するステップであって、前記複合体の検出が前記対象における前記病態の診断又は予後判定をもたらすステップとを含む方法。

50

## 【請求項 63】

前記複合体のレベルを測定するステップであって、前記複合体のレベルの亢進又は低下が、前記対象における前記病態の診断又は予後判定をもたらすステップを含む、請求項 62 に記載の方法。

## 【請求項 64】

免疫グロブリン重鎖可変領域 ( $V_H$ ) と免疫グロブリン軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) との互いの会合を可能にするには不十分な数のアミノ酸を含む領域によって連結された前記  $V_H$  と前記  $V_L$  とを各々が含む複数のポリペプチドを含む単離されたタンパク質であって、

(i) 前記ポリペプチドの少なくとも 1 つが、配列番号 111 に示される配列又はそれと少なくとも約 60% 同一の配列を含む  $V_H$  を含み；及び

(ii) 少なくとも別の前記ポリペプチドが、配列番号 113 に示される配列又はそれと少なくとも約 60% 同一の配列を含む  $V_L$  を含み、

(i) における前記ポリペプチドの前記  $V_H$  と (ii) における前記ポリペプチドの前記  $V_L$  とが会合して、腫瘍抗原 TAG-72 との特異的な結合能を有する Fv を形成する、タンパク質。

## 【請求項 65】

前記  $V_H$  と前記  $V_L$  とを連結する前記領域が 6 個以下のアミノ酸を含む、請求項 64 に記載のタンパク質。

## 【請求項 66】

前記  $V_L$  が、K a b a t 付番方式により付番して 5 位にスレオニン及び / 又は K a b a t 付番方式による 53 位にスレオニン及び / 又は K a b a t 付番方式により付番して 79 位にグルタミン酸を含む、請求項 64 又は 65 に記載のタンパク質。

## 【請求項 67】

前記  $V_H$  が、K a b a t 付番方式により付番して 80 位にロイシンを含む、請求項 64 ~ 66 のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 68】

(i) 配列番号 111 に示される配列又はそれと少なくとも約 60% 同一の配列を含む  $V_H$  と、

(ii) 配列番号 113 に示される配列又はそれと少なくとも約 60% 同一の配列を含む  $V_L$  と、

を各々が含む少なくとも 2 つのポリペプチドを含む、請求項 64 ~ 67 のいずれか一項に記載のタンパク質であって、

一つのポリペプチドの前記  $V_H$  と別のポリペプチドの前記  $V_L$  とが会合して、TAG72 との特異的な結合能を有する Fv を形成する、タンパク質。

## 【請求項 69】

ダイアボディ、トリアボディ又はテトラボディである、請求項 64 ~ 68 のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 70】

(i) 前記ポリペプチドの少なくとも 1 つが、配列番号 111 に示される配列を含む  $V_H$  の相補性決定領域 (CDR) を含む  $V_H$  を含み；及び

(ii) 少なくとも別の前記ポリペプチドが、配列番号 113 に示される配列を含む  $V_L$  の CDR を含む  $V_L$  を含む、

請求項 64 ~ 69 のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 71】

(i) 配列番号 111 に示される配列又はそのヒト化若しくは脱免疫化 (deimmunized) 形態を含む  $V_H$  と、

(ii) 配列番号 113 に示される配列又はそのヒト化若しくは脱免疫化形態を含む  $V_L$  と、

を双方が含む少なくとも 2 つのポリペプチドを含む、請求項 64 ~ 70 のいずれか一項に記載のタンパク質。

10

20

30

40

50

## 【請求項 7 2】

配列番号 5 5 に示される配列と少なくとも 8 0 % 同一の配列を各々が含む少なくとも 2 つのポリペプチドを含む、請求項 6 4 ~ 7 1 のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 7 3】

前記ポリペプチドの少なくとも 1 つが、フレームワーク領域 ( F R ) 1 内に位置する少なくとも 2 つのシステイン残基を含み、前記システイン残基の少なくとも 2 つが化合物にコンジュゲートされない場合に、前記システイン残基間にジスルフィド結合が形成可能である、請求項 6 4 ~ 7 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 7 4】

前記ポリペプチドの少なくとも 1 つが N 末端セリン残基及び / 又はスレオニン残基を含む、請求項 6 4 ~ 7 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。 10

## 【請求項 7 5】

配列番号 5 7、6 3、7 5、7 7、9 9、1 0 1、1 0 3、1 1 9、1 2 1、1 2 3、1 2 5、1 2 7、1 2 9、1 3 1 又は 1 3 3 のいずれか 1 つ又は複数に示される配列を含む、請求項 7 3 又は 7 4 に記載のタンパク質。

## 【請求項 7 6】

それにコンジュゲートした化合物を含む、請求項 6 4 ~ 7 5 のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 7 7】

前記化合物が、前記ポリペプチドの少なくとも 1 つにおけるシステイン残基又はセリン残基又はリジン残基にコンジュゲートされる、請求項 7 6 に記載のタンパク質。 20

## 【請求項 7 8】

前記ポリペプチドの少なくとも 1 つが、フレームワーク領域 ( F R ) 1 内に位置する少なくとも 2 つのシステイン残基を、前記システイン残基の少なくとも 2 つが化合物にコンジュゲートされない場合に前記システイン残基間にジスルフィド結合が形成可能であるように位置して含み、及び / 又は、前記ポリペプチドの少なくとも 1 つが N 末端セリン残基及び / 又はスレオニン残基を含み、及び前記化合物が前記システイン残基の少なくとも 1 つ及び / 又は前記セリン残基にコンジュゲートされる、請求項 7 6 又は 7 7 に記載のタンパク質。

## 【請求項 7 9】

前記ポリペプチドが前記システイン残基及び前記 N 末端セリン残基及び / 又はスレオニン残基を含み、及び前記化合物が前記システイン残基の少なくとも 1 つにコンジュゲートされ、場合により異なる化合物が前記セリン残基にコンジュゲートされる、請求項 7 8 に記載のタンパク質。 30

## 【請求項 8 0】

前記化合物が、放射性同位体、検出可能標識、治療化合物、コロイド、毒素、核酸、ペプチド、タンパク質、対象における前記タンパク質の半減期を増加させる化合物及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 7 6 ~ 7 9 のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 8 1】

前記化合物が生理学的に許容可能なポリマーである、請求項 7 6 ~ 8 0 のいずれか一項に記載のタンパク質。 40

## 【請求項 8 2】

前記化合物がポリエチレングリコール ( P E G ) である、請求項 7 6 ~ 8 1 のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 8 3】

前記 P E G が単分散 P E G である、請求項 8 2 に記載のタンパク質。

## 【請求項 8 4】

前記 P E G が 4 0 0 0 D a 以下の分子量を有する、請求項 8 2 又は 8 3 に記載のタンパク質。 50

## 【請求項 85】

前記 PEG が 2000 Da 以下の分子量を有する、請求項 82 ~ 84 に記載のタンパク質。

## 【請求項 86】

前記 PEG が 1,500 Da 以下の分子量を有する、請求項 82 ~ 85 に記載のタンパク質。

## 【請求項 87】

請求項 64 ~ 86 のいずれか一項に記載のタンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含む組成物。

## 【請求項 88】

請求項 64 ~ 75 のいずれか一項に記載のタンパク質における前記ポリペプチドの 1 つ又は複数をコードする単離核酸。

## 【請求項 89】

プロモーターに作動可能に連結された請求項 88 に記載の核酸を含む発現コンストラクト。

## 【請求項 90】

請求項 64 ~ 75 のいずれか一項に記載のタンパク質を発現する単離細胞。

## 【請求項 91】

請求項 88 に記載の核酸及び / 又は請求項 89 に記載の発現コンストラクトを含む、請求項 90 に記載の細胞。

## 【請求項 92】

請求項 64 ~ 75 のいずれか一項に記載のタンパク質の作製方法であって、請求項 89 に記載の発現コンストラクトを、前記コードされたポリペプチド及び前記タンパク質が作製されるように維持するステップを含む方法。

## 【請求項 93】

前記コードされたタンパク質が作製されるのに十分な (sufficient the encoded for the protein to be produced) 条件下で請求項 90 又は 91 に記載の細胞を培養するステップを含む、請求項 92 に記載の方法。

## 【請求項 94】

前記システイン残基の少なくとも 1 つにコンジュゲートした化合物を含む請求項 76 ~ 86 のいずれか一項に記載のタンパク質の作製方法であって、  
(i) 請求項 73 又は 75 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を得るステップと、  
(ii) 1 つ又は複数の前記ポリペプチドの FR1 における前記システイン残基の少なくとも 1 つに化合物をコンジュゲートするステップであって、それにより前記タンパク質を作製するステップと、  
を含む方法。

## 【請求項 95】

N 末端セリン残基又はスレオニン残基にコンジュゲートした化合物を含む請求項 78 又は 79 に記載のタンパク質の作製方法であって、

(i) 請求項 74 又は 75 に記載のタンパク質を得るステップと、  
(ii) 前記ポリペプチドの N 末端にある少なくとも 1 つのセリン残基又はスレオニン残基に化合物をコンジュゲートするステップであって、それにより前記タンパク質を作製するステップと、  
を含む方法。

## 【請求項 96】

前記化合物がポリエチレングリコール (PEG) である、請求項 94 又は 95 に記載の方法。

## 【請求項 97】

対象における癌を位置特定及び / 又は検出及び / 又は診断及び / 又は予後判定する方法であって、

10

20

30

40

50

( i ) 請求項 6 4 ~ 8 6 のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項 8 7 に記載の組成物を、前記タンパク質が存在する場合には腫瘍抗原 T A G - 7 2 に結合するように、対象に投与するステップと、

( i i ) 前記 T A G 7 2 に結合した前記タンパク質をインビボで検出するステップであって、前記結合したタンパク質の検出により前記癌が位置特定及び / 又は検出及び / 又は診断及び / 又は予後判定されるステップと、

を含む方法。

【請求項 9 8】

対象における癌の診断又は予後判定方法であって、

( i ) 前記対象からの試料を請求項 6 4 ~ 8 6 のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項 8 7 に記載の組成物と、前記タンパク質が存在する場合には腫瘍抗原 T A G - 7 2 に結合するように接触させるステップと、

( i i ) 前記 T A G 7 2 に結合した前記タンパク質を検出するステップであって、前記結合したタンパク質の検出が前記癌の診断又は予後判定をもたらすステップと、

を含む方法。

【請求項 9 9】

前記タンパク質が検出可能標識にコンジュゲートされ、及び前記方法が、T A G 7 2 に結合した前記タンパク質を検出するために前記標識を検出するステップを含む、請求項 9 7 又は 9 8 に記載の方法。

【請求項 10 0】

癌の治療方法であって、請求項 6 4 ~ 8 6 のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項 8 7 に記載の組成物を、それが癌細胞上の腫瘍抗原 T A G - 7 2 に結合して前記癌を治療するように投与するステップを含む方法。

【請求項 10 1】

前記タンパク質又はそれにコンジュゲートした化合物が前記癌細胞の死滅を誘導する、請求項 10 0 に記載の方法。

【請求項 10 2】

前記タンパク質が、前記癌細胞の死滅を誘導する化合物にコンジュゲートされる、請求項 10 0 又は 10 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2009年7月3日に出願された「Immuno-conjugates and methods for producing them」と題されるオーストラリア国特許第2009903127号明細書；2009年7月6日に出願された「Immuno-conjugates and methods for producing them」と題される米国仮特許出願第61/223353号明細書；及び2009年10月30日に出願された「Variable domain molecules and methods of use」と題される米国仮特許出願第61/256703号明細書からの優先権を主張し、これらの内容は全て参照により援用される。

【0002】

本発明は、免疫グロブリン可変領域を含むタンパク質であって、それに対する化合物のコンジュゲーションを促進するように修飾された、又はそれにコンジュゲートした化合物を有するタンパク質に関する。

【背景技術】

【0003】

免疫グロブリン、例えば、抗体及び抗体様分子（例えば、ラクダ科動物の免疫グロブリン又は軟骨魚類由来の免疫グロブリン新規抗原受容体（I g N A R））又はその抗原結合ドメインを含むタンパク質は、その高度に特異的な結合性により、対象の特定の標的に分

10

20

30

40

50

子を送達するのに特に好適である。例えば、免疫グロブリン又はその抗原結合ドメインを含むタンパク質は、腫瘍細胞などの細胞を死滅させたり、又はその増殖を阻害したりする細胞傷害性化合物又は細胞増殖抑制化合物、例えば薬物とコンジュゲートすることができる(Lambert、2005年)。かかるコンジュゲートは、免疫グロブリン又は断片が結合する抗原を発現する細胞への細胞傷害性化合物又は細胞増殖抑制化合物の、対象の全身にわたる非特異的な送達ではない、標的化された送達を促進する。かかるコンジュゲートにより、毒性レベルの化合物が対象において、全身的にはではなく、必要とされる部位に送達されることが確実となり、対象にとって概して毒性である化合物の使用が可能となり得る。さらに、抗体又はその抗原結合ドメインを含むタンパク質をフルオロフォア又は放射性同位元素などの検出可能な化合物とコンジュゲートすることにより、対象における標的分子の検出が促進され、例えば、癌細胞などの罹患細胞の検出が、例えば生体内イメージングに基づく方法を用いて促進される。

10

20

30

40

50

#### 【0004】

化合物を抗体又は抗原結合ドメインを含むタンパク質に連結する従来手段は、概して、化合物が抗体上の多くの部位に結び付く異種分子混合物をもたらす。例えば、化合物は典型的には抗体又はその抗原結合ドメインを含むタンパク質に対し、抗体又は抗原結合ドメイン中の、多くの場合に多数あるリジン残基を介してコンジュゲートさせることで、異種抗体-化合物コンジュゲート混合物が生成されている。用いられる反応条件に応じて、異種混合物は典型的には、0個から約8個に至る、又はそれ以上の化合物が結び付いたコンジュゲートの分布を含む。加えて、化合物が抗体又はタンパク質に対して特定の整数比を有する一部のコンジュゲートの各々の中に、化合物が抗体又はタンパク質上の様々な部位に結び付いた潜在的に異種の混合物がある。コンジュゲーション反応によって生じた異種混合物の中の様々なコンジュゲート種を分離して特徴付けるには、分析的及び調製的方法は不適當である。

#### 【0005】

さらに、抗体又はその抗原結合ドメインを含むタンパク質との化合物の非特異的コンジュゲーションは、例えば化合物が抗原結合に必要な領域にコンジュゲートされる場合に、抗体/タンパク質の抗原との結合を低減し、又は完全に妨害し得る。インタクトな抗体と比べてはるかに小さい抗原結合ドメインを含み、抗原結合にとって重要でないコンジュゲーションに好適な残基がほとんどないこともあるタンパク質では、このリスクは増加する。例えば、抗体の抗原結合ドメイン程度しか含まないタンパク質は、抗原結合を低減又は妨害することなしに化合物がコンジュゲートすることのできる部位をほとんど有しない。

#### 【0006】

抗体のFc領域上の1つ又は複数の炭水化物は、化合物を結び付ける天然の部位である。概して、炭水化物は過ヨウ素酸酸化により修飾されて反応性アルデヒドを生成し、次にそれを用いて反応性アミンを含有する化合物を Schiff 塩基の形成により結び付けることができる。アルデヒドはアミン基と反応し得るため反応は低pHで行われ、従って抗体又は抗原結合ドメイン中のリジン残基はプロトン化され、非反応性である。生成されたアルデヒドと結び付けるにはヒドラジド基が最も好適であり、これはヒドラジド基が低pHで反応性を有し、ヒドラゾン連結鎖を形成するためである。この連結鎖は、次にシアノ水素化ホウ素ナトリウムで還元することによりヒドラジン連結鎖を形成してさらに安定化させることができる(Rodwellら、1986年)。この手法の欠点としては、連結に必要な条件が厳しく、一部の抗体分子に損傷を与え、及びそれらを凝集させ得ることが挙げられる。例えば、一部の抗体可変領域中に存在するメチオニン残基は過ヨウ素酸による酸化を特に受け易い可能性があり、これは抗原結合アビディティの消失につながり得る。ヒスチジン残基及び/又はトリプトファン残基もまた酸化され易い。さらに、抗体の抗原結合ドメインを含むタンパク質の多くはFc領域を含むとは限らず、つまりそうしたタンパク質は前述の方法では化合物とコンジュゲートすることができない。

#### 【0007】

pH7前後ではプロトン化されて求核性が低い多くのアミンと異なり、システインチオ

ールは中性 pH で反応性を有する。遊離チオール基は比較的反応性が高いため、システイン残基を有するタンパク質は多くの場合にジスルフィドで連結されたオリゴマーとしてその酸化された形態で存在するか、又は内部架橋されたジスルフィド基を有する。細胞外タンパク質は、概して遊離チオールを有しない (Garman, 1997 年)。システイン残基は遺伝子工学技術によってタンパク質に導入されており、リガンドとの共有結合が形成され、又は新規の分子内ジスルフィド結合が形成されている。しかしながら、システインチオール基のタンパク質への挿入又は置換は、特に反応又は酸化に比較的利用し易いもの場合には、すなわち化合物のコンジュゲーションに有用な部位に位置する場合には、潜在的に問題がある。これは、タンパク質の濃縮溶液中では、大腸菌 (*Escherichia coli*) のペリプラズム中であろうと、培養上清中であろうと、又は部分的若しくは完全に精製されたタンパク質中であろうと、タンパク質の表面上のシステイン残基が対形成して酸化し、分子間ジスルフィド、ひいてはタンパク質凝集体を形成し得るためである。かかるタンパク質凝集は、例えば所望の生物活性を有する有用な形態の単離タンパク質の収率低下につながることが多い。さらに、酸化的にタンパク質は、新規に操作されたシステインと既存のシステイン残基との間に分子内ジスルフィド結合を形成することがあり、これによるミスフォールディング又は三次構造の消失によりタンパク質が不活性又は非特異的になり得る。前述の問題の各々は、正しいフォールディング及び安定性、並びに結果として抗原結合活性を確保するよう互いに結合するいくつかのシステイン残基を概して含む抗体及びその抗原結合ドメインを含むタンパク質では悪化する。

10

20

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0008】

上記から、当業者には、免疫グロブリンの抗原結合ドメインを含み、それとの化合物の単純なコンジュゲーションを可能にするように修飾されたタンパク質が当該技術分野において必要とされていることは明らかであろう。好ましいタンパク質は、様々な系における組換え作製を、好ましくは分子間結合により連結された著しいレベルの多量体凝集体を生じることなく促進し得る。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

本発明に至るまでの研究において、本発明者らは、免疫グロブリン、例えば抗体の可変領域内の部位であって、可変領域の抗原との結合を妨害することなく化合物をコンジュゲートすることが可能な部位を特定しようと努めた。本明細書において例証するとおり、本発明者らは、可変領域のフレームワーク領域 1 (FR1) 内に、コンジュゲーションに利用可能であり、且つ可変領域の抗原結合部位から十分に外れていて、そこにコンジュゲートされる化合物が抗原結合を抑制又は妨害する可能性が低い多数の部位を決定した。これらの部位は重鎖可変領域 ( $V_H$ ) 及び軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) の双方に保存されている。この決定に基づき、本発明者らは、FR1 に 2 つのシステイン残基が挿入された変異可変領域を含む様々なタンパク質を作製した。これらのシステイン残基は、それらの間にジスルフィド結合が形成され得るような位置に置かれる。組換え作製及び / 又は精製の間、システイン残基はジスルフィド結合により連結され、そのためそれらの残基が同じタンパク質内の、或いは別のタンパク質における他のシステイン残基と結合することが低減又は妨害される。これにより、連結した多量体及び / 又は異常に折り置かれた可変領域が作製される可能性が低下し、機能タンパク質の作製及び / 又は単離が可能となる。単離後、システイン残基は還元されるか、又は他の方法で分解され、化合物のタンパク質とのコンジュゲーションが可能となる。本発明者らはまた、ポリエチレングリコール (PEG) などの嵩高い化合物及び放射性同位元素などのイメージング用化合物を含め、これらのタンパク質に対する多数の化合物のコンジュゲーションが、可変領域の抗原との結合を妨害しないことも実証した。

30

40

#### 【0010】

一例において、本発明は、フレームワーク領域 (FR) 1 内に位置する少なくとも 2 つ

50

のシステイン残基を含む免疫グロブリン可変領域を含む単離されたタンパク質であって、システイン残基の少なくとも1つが化合物にコンジュゲートされない場合にシステイン残基間にジスルフィド結合が形成可能であるタンパク質を提供する。

【0011】

別の例において、本発明は、フレームワーク領域(FR)1内に位置する少なくとも2つのシステイン残基を含む免疫グロブリン可変領域を含む単離されたタンパク質であって、システイン残基の少なくとも2つが化合物にコンジュゲートされない場合にシステイン残基間にジスルフィド結合が形成可能であるタンパク質を提供する。

【0012】

代替的又は追加的な例において、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)と免疫グロブリン軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)とを含む単離されたタンパク質であって、可変領域の少なくとも1つが、フレームワーク領域(FR)1内に位置する少なくとも2つのシステイン残基を含み、システイン残基の少なくとも1つが別の化合物にコンジュゲートされない場合にシステイン残基間にジスルフィド結合が形成可能であるタンパク質を提供する。

10

【0013】

代替的又は追加的な例において、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)と免疫グロブリン軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)とを含む単離されたタンパク質であって、可変領域の少なくとも1つが、フレームワーク領域(FR)1内に位置する少なくとも2つのシステイン残基を含み、システイン残基の少なくとも2つが別の化合物にコンジュゲートされない場合にシステイン残基間にジスルフィド結合が形成可能であるタンパク質を提供する。

20

【0014】

好ましくは、タンパク質は、単一のポリペプチド鎖に少なくとも1つのV<sub>L</sub>と少なくとも1つのV<sub>H</sub>とを含む。

【0015】

好ましくは、システイン残基は、非還元条件下でジスルフィド結合が存在するように位置する。

【0016】

好ましくは、システイン残基は、K a b a t付番方式により付番して残基2と相補性決定領域(CDR)1との間に位置する。

【0017】

一例において、システイン残基はFR1の1つ又は複数のループ領域内に位置する。

30

【0018】

代替的又は追加的な例において、システイン残基はV<sub>H</sub>内にあり、K a b a t付番方式により付番して残基2から30の間に位置する。好ましくは、システイン残基は、K a b a t付番方式により付番して残基7~20及び/又は残基24~30の間に位置し、より好ましくは残基7~20の間に位置する。さらなる例において、残基は、K a b a t付番方式により付番して残基6~16の間に位置する。さらなる例において、残基は、K a b a t付番方式により付番して残基7~16の間に位置する。

【0019】

代替的又は追加的な例において、システイン残基はV<sub>L</sub>内にあり、K a b a t付番方式により付番して残基2から22の間に位置する。好ましくは、システイン残基は、K a b a t付番方式により付番して残基7~20の間に位置する。さらなる例において、残基は、K a b a t付番方式により付番して残基7~19の間に位置する。さらなる例において、残基は、K a b a t付番方式により付番して残基7~17の間に位置する。

40

【0020】

本発明の例示的形態において、システイン残基は、V<sub>H</sub>及び/又はV<sub>L</sub>の保存されたシステイン残基に対して追加的なものである。当業者は、天然に存在する抗体の少なくとも大多数において、保存されたシステイン残基がK a b a t付番方式により付番してV<sub>L</sub>では残基23にあり、及び/又はV<sub>H</sub>では残基22にあることを認識するであろう。

【0021】

50

本発明の一つの好ましい形態において、システイン残基は保存されたシステイン残基に対してN末端側に位置する。好ましくは、システイン残基は以下の1つ又は複数に位置する：

- (i) K a b a t 付番方式により付番して  $V_L$  の残基 8 及び残基 11 ；
- (ii) K a b a t 付番方式により付番して  $V_L$  の残基 14 及び残基 17 ；
- (iii) K a b a t 付番方式により付番して  $V_L$  の残基 7 及び残基 11 ；
- (iv) K a b a t 付番方式により付番して  $V_L$  の残基 14 及び残基 17 ；
- (v) K a b a t 付番方式により付番して  $V_L$  の残基 8 及び残基 12 ；
- (vi) K a b a t 付番方式により付番して  $V_H$  の残基 7 及び残基 10 ；及び / 又は
- (vii) K a b a t 付番方式により付番して  $V_H$  の残基 13 及び残基 16 。

10

【0022】

本発明の別の好ましい例において、システイン残基は以下の1つ又は複数に位置する：

- (i) K a b a t 付番方式により付番して  $V_L$  の残基 13 及び残基 19 ；
- (ii) K a b a t 付番方式により付番して  $V_L$  の残基 13 及び残基 19 ；
- (iii) K a b a t 付番方式により付番して  $V_H$  の残基 6 及び残基 9 ；及び / 又は
- (iv) K a b a t 付番方式により付番して  $V_H$  の残基 12 及び残基 18 。

【0023】

本発明は、可変領域内のさらなる残基の修飾又はそれを含むタンパク質を明確に企図する。例えば、本発明者らは、システイン残基間に位置する残基の置換が、又はさらにはCDR内に天然に存在するシステイン残基を置き換えても、本発明のタンパク質の抗原との結合を妨害しないことを明確に実証している。

20

【0024】

本発明はまた、少なくとも1つの本発明のタンパク質を含むFvを含む単離されたタンパク質であって、少なくとも1つの $V_L$ が少なくとも1つの $V_H$ と結合して抗原結合部位を形成するタンパク質も提供する。

【0025】

タンパク質の一形態は、単一のポリペプチド鎖にある、抗原結合部位を形成する $V_L$ 及び $V_H$ を含む。例えば、タンパク質は、

- (i) 単鎖Fv断片(s c F v) ；
- (ii) 二量体s c F v (d i - s c F v) ；又は
- (iii) Fc又は重鎖定常ドメイン( $C_H$ )<sub>2</sub>及び/又は $C_H$ <sub>3</sub>に連結された(i)及び/又は(ii)の少なくとも1つ

30

である。

【0026】

或いは、タンパク質は、異なるポリペプチド鎖にある、抗原結合部位を形成する $V_L$ 及び $V_H$ を含む。一例において、タンパク質の各ポリペプチド鎖が $V_L$ と $V_H$ とを含む。好ましくは、かかるタンパク質は、

- (i) ダイアボディ ；
- (ii) トリアボディ ；又は
- (iii) テトラボディ

40

である。

【0027】

別の例において、本発明のタンパク質は免疫グロブリンであり、好ましくは抗体である。免疫グロブリンの例示的形態が本明細書に記載され、それらは本発明のこの例に準用されると解釈されるべきである。

【0028】

本発明のいくつかの例において、本発明のタンパク質は、ジスルフィド結合により連結されたシステイン残基を含む。或いは、本発明のタンパク質は、システイン残基の少なくとも1つにコンジュゲートした化合物を含み、ここで化合物のコンジュゲーションは、タンパク質の抗原との結合を妨害しない。例示的化合物としては、放射性同位体、検出可能

50

標識、治療化合物、コロイド、毒素、核酸、ペプチド、タンパク質、対象におけるタンパク質の半減期を増加させる化合物及びそれらの混合物からなる群から選択される化合物が挙げられる。当業者は、タンパク質という用語が、1つ又は複数の免疫グロブリン可変領域を含むタンパク質、例えば、本明細書に記載されるものなどのFv含有タンパク質を含む抗体又はその断片を包含することを理解するであろう。

【0029】

一例において、本発明のタンパク質はポリエチレングリコール(PEG)にコンジュゲートされる。例えば、PEGは単分散PEGである。

【0030】

一例において、PEGは約4000Da以下の分子量、例えば、約2000Da以下の分子量、約1,500Da以下などの分子量を有する。一例において、PEGは1,000Da以下の分子量、900Da以下など、例えば、800Da以下、600Da以下などの分子量を有する。一例において、PEGは約550Da~約1,000Daの分子量を有する。

10

【0031】

別の例において、PEGは約70個又は75個又は77個以下のエチレングリコール単位を有する。例えば、PEGは約50個以下のエチレングリコール単位を有する。好ましくは、PEGは48個以下のエチレングリコール単位を有する。例えば、PEGは約40個以下のエチレングリコール単位を有する。例えば、PEGは約30個以下のエチレングリコール単位を有する。例えば、PEGは約27個以下のエチレングリコール単位を有する。例えば、PEGは約24個以下のエチレングリコール単位を有する。例えば、PEGは約15個以下のエチレングリコール単位を有する。例えば、PEGは約12個以下のエチレングリコール単位を有する。好ましくは、PEGは約12~27個のエチレングリコール単位を含む。

20

【0032】

一例において、本発明のタンパク質は、配列番号57に示される配列と少なくとも約80%又は90%又は95%又は96%又は97%又は98%又は99%又は100%同一の配列を含み、且つFR1におけるシステイン残基の少なくとも1つにコンジュゲートされた短鎖単分散PEGを有する少なくとも1つのポリペプチドを含む。好ましくは、PEGは15~30個のエチレングリコール単位、好ましくは24個のエチレングリコール単位を含む。タンパク質は1個以上の、及び好ましくは10個又は5個又は4個又は3個又は2個未満の置換、好ましくは保存的アミノ酸置換又は欠失又は挿入を含むことができる。記載される配列に対する例示的な変化としては、N末端セリンの欠失、又はセリンによる別のアミノ酸残基の置換(好ましくは保存的アミノ酸置換)及び/又はC末端リジン及び/又はアルギニンの欠失若しくは置換が挙げられる。

30

【0033】

本発明者らはまた、可変領域を含むタンパク質を、N末端にセリン残基又はスレオニン残基を含むように修飾した。この残基により、それとの化合物の部位特異的コンジュゲーションが可能となる。N末端セリン/スレオニン変異を上記で考察されるシステイン変異と組み合わせることにより、本発明者らは、少なくとも2つの異なる化合物を部位特異的にコンジュゲートすることのできるタンパク質を作製した。

40

【0034】

従って、本発明の例は、少なくとも1つのN末端スレオニン残基又はセリン残基をさらに含む本発明のタンパク質を提供する。セリン残基又はスレオニン残基はタンパク質のN末端に付加され得る(すなわち、タンパク質の配列に対して追加的なものである)。好ましくは、セリン残基又はスレオニン残基はタンパク質のN末端に天然に存在するアミノ酸残基に置き換わり、すなわち置換変異の結果である。場合により、スレオニン残基又はセリン残基は化合物、例えば上記に記載される化合物に連結される。

【0035】

一例において、本発明のタンパク質は、システイン残基の少なくとも1つにコンジュゲ

50

ートした第1の化合物と、スレオニン残基又はセリン残基にコンジュゲートした第2の化合物であって、第1の化合物と異なる第2の化合物とを含む。

【0036】

本発明は、任意の抗原に特異的に結合することのできるタンパク質を企図する。本発明の好ましいタンパク質は、ヒト上皮成長因子(Her)2、腫瘍関連糖タンパク質Tag72、MUC1又は前立腺特異的膜抗原(PSMA)からなる群から選択される抗原に特異的に結合する。他のタンパク質は交差反応性のため、又はタンパク質が多重特異性であるため、抗原、例えば上記に挙げた抗原の複数に結合する。

【0037】

本発明のタンパク質の例は、FR1内に位置する2つ以上を含むように修飾された、配列番号55、59、61、109、115又は117のいずれか1つに示される配列と80%又は90%又は95%又は96%又は97%又は98%又は99%又は100%同一の配列を含む。修飾に好適な部位が本明細書に記載され、それらは本発明のこの例に準用されると解釈されるべきである。例えば、タンパク質は、そのタンパク質がFR1にシステイン残基を含むことを条件として、配列番号57、63、65、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103又は105、119、121、123、125、127、129、131又は133のいずれか1つに示される配列と少なくとも約80%又は90%又は95%又は96%又は97%又は98%又は99%又は100%同一の配列を含む。

10

【0038】

上記に考察されるとおり、本発明者らはまた、N末端スレオニン残基又はセリン残基を含むタンパク質も作製した。この部位はまた、FR1にシステイン残基が存在しない場合であっても、化合物のコンジュゲーションに有用である。

20

【0039】

従って、本発明はまた、免疫グロブリン重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)と免疫グロブリン軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)とを含む単離されたタンパク質であって、可変領域の少なくとも1つがN末端スレオニン残基又はセリン残基を含むタンパク質も提供する。セリン残基又はスレオニン残基は、タンパク質のN末端に付加され得る。好ましくは、セリン残基又はスレオニン残基はタンパク質のN末端に天然に存在するアミノ酸残基に置き換わり、すなわち置換変異の結果である。

30

【0040】

好ましいタンパク質は、N末端スレオニン残基又はセリン残基を含む本発明の少なくとも1つのタンパク質を含むFvを含み、ここでは少なくとも1つのV<sub>L</sub>が少なくとも1つのV<sub>H</sub>と結合して抗原結合部位を形成する。

【0041】

一例において、抗原結合部位を形成するV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>は単一のポリペプチド鎖にある。

例えば、タンパク質は、

(i) 単鎖FcFv断片(scFv)；

(ii) 二量体scFv(di-scFv)；又は

(iii) Fc又は重鎖定常ドメイン(C<sub>H</sub>)<sub>2</sub>及び/又はC<sub>H</sub><sub>3</sub>に連結された(i)及び/又は(ii)の少なくとも1つ

40

である。

【0042】

或いは、抗原結合部位を形成するV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>は異なるポリペプチド鎖にある。一例において、タンパク質の各ポリペプチド鎖がV<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>とを含む。好ましくは、かかるタンパク質は、

(i) ダイアボディ；

(ii) トリアボディ；又は

(iii) テトラボディ

である。

50

## 【0043】

別の例において、本発明のタンパク質は免疫グロブリンであり、好ましくは抗体である。免疫グロブリンの例示的形態が本明細書に記載され、それらは本発明のこの例に準用されると解釈されるべきである。

## 【0044】

一例において、タンパク質は、スレオニン残基又はセリン残基にコンジュゲートした化合物をさらに含む。例示的化合物が本明細書に記載され、それらは本発明のこの例に準用されると解釈されるべきである。

## 【0045】

一例において、タンパク質は、N末端スレオニン残基又はセリン残基を含むように修飾された、配列番号55、59、61、109、115又は117のいずれか1つに示される配列と少なくとも約80%又は90%又は95%又は96%又は97%又は98%又は99%又は100%同一の配列を含む。例えば、タンパク質は、タンパク質がN末端スレオニン残基又はセリン残基を含むことを条件として、配列番号57、63、65、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、119、121、123、125、127、129、131又は133のいずれか1つに示される配列と少なくとも約80%又は90%又は95%又は96%又は97%又は98%又は99%又は100%同一の配列を含む。

10

## 【0046】

本発明はまた、フレームワーク領域(FR)1内に位置する少なくとも2つのシステイン残基及び/又はN末端スレオニン残基若しくはセリン残基を含む修飾された免疫グロブリン可変領域を含むタンパク質を本発明がさらに提供することもまた提供し、ここで未修飾形態の可変領域は、システイン残基の少なくとも1つ(好ましくはシステイン残基の少なくとも2つ又はその全て)及び/又はスレオニン残基若しくはセリン残基を含まない。システイン残基及び/又はスレオニン残基若しくはセリン残基が位置するのに好適な部位が本明細書に記載され、それらは本発明のこの例に準用されると解釈されるべきである。

20

## 【0047】

一例において、本発明のタンパク質は、ヒトのもの、ヒト化されたもの、脱免疫化されたもの、又はキメラのものである。

## 【0048】

本発明はまた、本発明のタンパク質と薬学的に許容可能な担体とを含む組成物も提供する。

30

## 【0049】

本発明はまた、本発明のタンパク質をコードする単離核酸も包含する。例示的核酸としては、コードされたタンパク質のFR1における少なくとも2つのシステイン残基をコードするコドンを含むように、及び/又はN末端セリン残基若しくはスレオニン残基を含むように改変された、配列番号54、58、60、108、114又は116の任意の1つ又は複数に示される配列と少なくとも約80%又は90%又は95%又は96%又は97%又は98%又は99%又は100%同一の配列を有するものが挙げられる。一例において、本発明の核酸は、配列番号56、62、64、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、118、120、122、124、126、128、130、132の任意の1つ又は複数に示される配列と少なくとも約80%又は90%又は95%又は96%又は97%又は98%又は99%又は100%同一の配列を含み、但しその配列がFR1における少なくとも2つのシステイン残基及び/又はN末端セリン残基若しくはスレオニン残基を含むタンパク質をコードすることを条件とする。当業者は、コドン使用の縮重に起因して、数多くのヌクレオチド配列が本発明のタンパク質をコードし得ることを認識するであろう。かかるヌクレオチド配列は全て本発明により包含される。例えば、コドン最適化された核酸を作製して、特定の細胞型又は生物における発現を促進することができる。

40

## 【0050】

50

本発明の核酸をプロモーターに作動可能に連結し、それにより発現コンストラクトを作製することができる。好ましくはかかる発現コンストラクト又は核酸は、ベクター、好ましくは細胞において複製可能なベクター、例えばプラスミド又はファージミド又はコスミド又は人工染色体に含まれる。

【0051】

本発明はまた、本発明の外因性核酸又は発現コンストラクトを含む単離細胞であって、好ましくは本発明のタンパク質を発現する細胞も提供する。例示的細胞としては、限定はされないが、細菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞又は昆虫細胞が挙げられる。

【0052】

本発明により提供される核酸及び/又は発現コンストラクト及び/又は細胞はまた、本発明のタンパク質の作製方法の基盤も提供する。従って、本発明はまた、本発明のタンパク質の作製方法も提供し、この方法は、本発明の発現コンストラクトを、コードされたタンパク質が作製されるのに十分な条件下に維持するステップを含む。例えば、この方法は、コードされたタンパク質が作製されるのに十分な (sufficient the encoded for the protein to be produced) 条件下で本発明の細胞を培養するステップを含む。一例において、この方法は、タンパク質を単離するステップをさらに含む。この方法は、タンパク質を、例えば結合活性又はアフィニティについて試験するステップをさらに含むことができる。この方法は、タンパク質を医薬組成物に製剤化するステップをさらに含むことができる。

10

【0053】

本発明はまた、本発明のタンパク質を含むコンジュゲートの作製方法であって、  
(i) フレームワーク領域 (FR) 1 内に位置する少なくとも2つのシステイン残基を含む本発明のタンパク質を得るステップと、  
(ii) システイン残基の少なくとも1つに化合物をコンジュゲートするステップであって、それによりコンジュゲートを作製するステップと、  
を含む方法も提供する。

20

【0054】

一例において、(i) で得られるタンパク質のシステイン残基はジスルフィド結合により連結され、及びこの方法は、化合物を1つ又は複数のシステイン残基に連結する前にジスルフィド結合を還元するか、又は他の方法で分解するステップをさらに含む。好ましくは、ジスルフィド結合を還元するか、又は他の方法で分解するステップによりタンパク質に遊離チオール基が生成され、及び化合物はチオール反応基を有する。チオール反応基を有する化合物を反応させることにより、コンジュゲートが作製される。

30

【0055】

一例において、化合物は、マレイミドを使用してタンパク質にコンジュゲートされる。例えば、タンパク質を、マレイミド官能基を含む化合物と接触させることでコンジュゲーションが起こる。

【0056】

本発明のさらなる例において、タンパク質は少なくとも1つのN末端セリン残基又はスレオニン残基をさらに含み、及びこの方法は、化合物をセリン残基又はスレオニン残基にコンジュゲートするステップをさらに含む。好ましくは、セリン残基又はスレオニン残基にコンジュゲートされる化合物は、1つ又は複数のシステイン残基にコンジュゲートされる化合物とは異なる。

40

【0057】

本発明は、本発明のタンパク質を含むコンジュゲートの代替的な作製方法であって、  
(i) N末端スレオニン残基又はセリン残基を含む本発明のタンパク質を得るステップと、  
(ii) タンパク質のN末端にある少なくとも1つのセリン残基又はスレオニン残基に化合物をコンジュゲートするステップであって、それによりコンジュゲートを作製するステップと、

50

を含む方法を提供する。

【0058】

場合により、本発明のコンジュゲート作製方法は、コンジュゲートを単離するステップ及び/又はコンジュゲートを医薬組成物に製剤化するステップをさらに含む。

【0059】

上記に基づけば当業者には、本発明者が、罹患細胞、組織又は臓器（例えば、癌）に対する毒性化合物又は放射性同位体の送達及び/又は生体内イメージング及び/又はタンパク質の安定性向上を含めた、様々な用途に有用な試薬を作製したことは明らかであろう。

【0060】

従って、本発明はまた、医薬における本発明のタンパク質又は組成物の使用も提供する。例えば、本発明は、病態の治療用又は予防用薬剤の製造における本発明のタンパク質の使用を提供する。本発明はまた、対象における病態の治療又は予防方法であって、本発明のタンパク質又は組成物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む方法も提供する。例示的病態が本明細書に記載され、それらは本発明のこの例に準用されると解釈されるべきである。さらに本発明のタンパク質の例示的なコンジュゲート形態が本明細書に記載され、それらは本発明のこの例に準用されると解釈されなければならない。

【0061】

本発明は、細胞への化合物の送達方法であって、化合物にコンジュゲートされた本発明のタンパク質又はそれを含む組成物に細胞を接触させるステップを含む方法をさらに提供する。一例において、細胞は、タンパク質又は組成物を投与することによって対象に接触させられる。

【0062】

本発明はまた、対象における抗原を位置特定又は検出する方法などの、イメージング方法であって、

(i) タンパク質が抗原に結合するのに十分な時間にわたり、且つそのような条件下で、対象に本発明のタンパク質を投与するステップであって、タンパク質が検出可能標識にコンジュゲートされる、ステップと、

(ii) 検出可能標識をインビボで位置特定又は検出するステップと、を含む方法も提供する。

【0063】

当業者は、前述の方法が、抗原を発現する細胞、細胞群、例えば腫瘍、組織及び臓器など、又はその一部を位置特定又は検出するのに有用であることを認識するであろう。例示的抗原が本明細書全体を通じて記載され、それらは本発明のこの例に準用されると解釈されるべきである。

【0064】

本発明はまた、対象における病態の診断又は予後判定方法であって、タンパク質が抗原に結合して複合体を形成するのに十分な時間にわたり、且つそのような条件下で、対象からの試料を本発明のタンパク質又は組成物と接触させるステップと、複合体を検出するステップであって、複合体の検出が病態の診断又は予後判定をもたらすステップとを含む方法も提供する。好ましくは、タンパク質は検出可能標識にコンジュゲートされ、標識の検出が複合体の指標となる。

【0065】

一例において、この方法は複合体のレベルを測定するステップであって、対照試料と比較した前記複合体のレベルの亢進又は低下が病態の診断又は予後判定をもたらすステップを含む。

【0066】

本発明は、本発明のタンパク質を複数含むライブラリをさらに提供する。一例において、タンパク質は粒子（例えば、ファージ又はリボソーム）又は細胞の表面に提示される。明らかに、本発明はまた、本発明のタンパク質を複数含む前記ライブラリをコードする核

10

20

30

40

50

酸のライブラリも提供する。

【0067】

本発明は、本発明のタンパク質の単離方法であって、タンパク質が抗原に結合するのに十分な（又は結合するような）時間にわたり、且つそのような条件下で、本発明のライブラリを抗原と接触させるステップと、タンパク質を単離するステップとを含む方法をさらに提供する。

【0068】

本発明は、本発明のタンパク質を複数含むライブラリの作製方法であって、  
(i) 免疫グロブリン可変領域を含む複数のタンパク質をコードする核酸を得る、又は作製するステップであって、可変領域が、フレームワーク領域（FR）1内に位置する少なくとも2つのシステイン残基及び/又はN末端スレオニン残基若しくはセリン残基を含む、ステップと、

(ii) 以下の作動可能に連結された核酸：

a) プロモーター；

b) (i) で得られた、又は作製された核酸；及び

c) 可変領域を含むタンパク質の細胞又は粒子における/その上への提示を促進するポリペプチドをコードする核酸

を含む発現コンストラクトのライブラリを作製するステップと、

(iii) 発現コンストラクトによりコードされたタンパク質を、それらが細胞又は粒子において/その上に提示されるように発現させるステップと、

を含む方法をさらに提供する。

【0069】

システイン残基及び/又はスレオニン残基若しくはセリン残基が位置するのに好適な部位が本明細書に記載され、それらは本発明のこの例に準用されると解釈されるべきである。

【0070】

一例において、タンパク質のCDR中のアミノ酸はランダム若しくはセミランダムであるか、又はヒト抗体に由来する。

【0071】

一例において、この方法は、タンパク質をコードする核酸を単離するステップをさらに含む。かかる核酸は発現コンストラクトに導入することができる。場合により、タンパク質を発現させてもよい。

【0072】

本発明者らはまた、腫瘍抗原TAG72との特異的な結合能を有する免疫グロブリン可変領域を含むタンパク質も作製した。本発明者らは、このタンパク質が生体内で安定であることを見出した。

【0073】

従って、本発明は、 $V_H$ と $V_L$ との互いの会合を可能にするには不十分な数のアミノ酸を含む領域によって連結された免疫グロブリン $V_H$ と免疫グロブリン $V_L$ とを各々が含む複数のポリペプチドを含む単離されたタンパク質であって、

(i) ポリペプチドの少なくとも1つが、配列番号111に示される配列又はそれと少なくとも約60%同一の配列を含む $V_H$ を含み；及び

(ii) 少なくとも別のポリペプチドが、配列番号113に示される配列又はそれと少なくとも約60%同一の配列を含む $V_L$ を含み、

(i)におけるポリペプチドの $V_H$ と(ii)におけるポリペプチドの $V_L$ とが会合して、腫瘍抗原TAG72との特異的な結合能を有するFvを形成するタンパク質をさらに提供する。本明細書の記載では、このタンパク質は抗TAG72タンパク質と称される。しかしながら、文脈上特に指示されない限り、「本発明のタンパク質」を参照する本明細書の任意の記載が、このタンパク質に等しく適用される。

【0074】

本発明は、本発明のタンパク質を複数含むライブラリの作製方法であって、

(i) 免疫グロブリン可変領域を含む複数のタンパク質をコードする核酸を得る、又は作製するステップであって、可変領域が、フレームワーク領域（FR）1内に位置する少なくとも2つのシステイン残基及び/又はN末端スレオニン残基若しくはセリン残基を含む、ステップと、

(ii) 以下の作動可能に連結された核酸：

a) プロモーター；

b) (i) で得られた、又は作製された核酸；及び

c) 可変領域を含むタンパク質の細胞又は粒子における/その上への提示を促進するポリペプチドをコードする核酸

を含む発現コンストラクトのライブラリを作製するステップと、

(iii) 発現コンストラクトによりコードされたタンパク質を、それらが細胞又は粒子において/その上に提示されるように発現させるステップと、

を含む方法をさらに提供する。

一例において、抗TAG72タンパク質は、6個以下のアミノ酸、例えば5個以下のアミノ酸、4個以下のアミノ酸など、例えば、3個以下のアミノ酸、2個以下のアミノ酸など、例えば、1個又は0個のアミノ酸を有するV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>とを連結する領域を含む。

【0075】

一例において、本発明の抗TAG72タンパク質は、Kabata付番方式により付番して5位にスレオニン及び/又はKabata付番方式による53位にスレオニン及び/又はKabata付番方式により付番して79位にグルタミン酸を含むV<sub>L</sub>を含む。

【0076】

代替的又は追加的な実施形態において、本発明の抗TAG72タンパク質は、Kabata付番方式により付番して80位にロイシンを含むV<sub>H</sub>を含む。

10

【0077】

一例において、抗TAG72タンパク質は、

(i) 配列番号111に示される配列又はそれと少なくとも約60%同一の配列を含むV<sub>H</sub>と、

(ii) 配列番号113に示される配列又はそれと少なくとも約60%同一の配列を含むV<sub>L</sub>と、

を各々が含む少なくとも2つのポリペプチドであって、

1つのポリペプチドのV<sub>H</sub>と別のポリペプチドのV<sub>L</sub>とが会合して、TAG72との特異的な結合能を有するFvを形成するポリペプチドを含む。

【0078】

20

例示的な抗TAG72タンパク質は、ダイアボディ、トリアボディ又はテトラボディである。

【0079】

本発明の一例において、

(i) ポリペプチドの少なくとも1つは、配列番号111に示される配列を含むV<sub>H</sub>の相補性決定領域(CDR)を含むV<sub>H</sub>を含み；及び

(ii) 少なくとも別のポリペプチドは、配列番号113に示される配列を含むV<sub>L</sub>のCDRを含むV<sub>L</sub>を含む。

【0080】

例示的CDRは以下のとおりである：

30

(i) 配列番号111のアミノ酸31～35に示される配列を含むCDRH1；

(ii) 配列番号111のアミノ酸50～66に示される配列を含むCDRH2；

(iii) 配列番号111のアミノ酸99～104に示される配列を含むCDRH3；

(iv) 配列番号113のアミノ酸24～40に示される配列を含むCDRL1；

(v) 配列番号113のアミノ酸56～62に示される配列を含むCDRL2；及び

(vi) 配列番号113のアミノ酸95～103に示される配列を含むCDRL3。

【0081】

一例において、本発明の抗TAG72タンパク質は、

(i) 配列番号111に示される配列又はそのヒト化若しくは脱免疫化形態を含むV<sub>H</sub>と、

40

(ii) 配列番号113に示される配列又はそのヒト化若しくは脱免疫化形態を含むV<sub>L</sub>と、

を双方が含む少なくとも2つのポリペプチドを含む。

【0082】

本発明の例は、配列番号55、115又は117に示される配列を各々が含む少なくとも2つのポリペプチドを含む抗TAG72タンパク質を提供する。

【0083】

一例において、抗TAG72タンパク質におけるポリペプチドの少なくとも1つは、以上に記載されるとおりのフレームワーク領域(FR)1内に位置する少なくとも2つのシステイン残基を含む。例示的配列は上記に示される。例えば、配列は、配列番号57、6

50

3、75、77、99、103、119、121、123、125、127、129、131又は133の任意の1つ又は複数に示される配列と少なくとも約80%又は90%又は95%又は96%又は97%又は98%又は99%又は100%同一であり、且つシステイン残基を含む。好ましくは、配列は、配列番号57に示される配列と少なくとも約80%又は90%又は95%又は96%又は97%又は98%又は99%又は100%同一であり、且つシステイン残基を含む。

【0084】

一例において、タンパク質は単一のポリペプチドを含み、且つ配列番号101に示される配列と少なくとも約80%又は90%又は95%又は96%又は97%又は98%又は99%又は100%同一の配列を含む。

10

【0085】

一例において、本発明の抗TAG72タンパク質は、それにコンジュゲートした化合物を含む。例えば、化合物は、タンパク質におけるポリペプチドの少なくとも1つのシステイン残基又はセリン残基又はリジン残基にコンジュゲートされる。

【0086】

一例において、抗TAG72タンパク質におけるポリペプチドの少なくとも1つは、FR1内に位置する少なくとも2つのシステイン残基を含み、システイン残基の少なくとも2つが化合物にコンジュゲートされない場合に、システイン残基及び/又はN末端セリン残基及び/又はスレオニン残基の間にジスルフィド結合が形成可能であり、及び化合物はシステイン残基の少なくとも1つ及び/又はセリン残基にコンジュゲートされる。例えば、ポリペプチドはシステイン残基とN末端セリン残基及び/又はスレオニン残基とを含み、及び化合物はシステイン残基の少なくとも1つにコンジュゲートされ、及び異なる化合物がセリン残基にコンジュゲートされる。

20

【0087】

例示的化合物は、放射性同位体、検出可能標識、治療化合物、コロイド、毒素、核酸、ペプチド、タンパク質、対象におけるタンパク質の半減期を増加させる化合物及びそれらの混合物からなる群から選択される。

【0088】

本発明者らは、ポリエチレングリコール(PEG)を本発明のタンパク質にコンジュゲートすることにより、その安定性及び腫瘍取り込みが実質的に増加することを見出した。本発明者らは、単分散PEG及び/又は低分子量を有するPEGが、より高分子量のPEGと実質的に同程度まで安定性及び/又は腫瘍取り込みを増加させることを見出した。概して大きい分子は小さい分子と比べて対象からのクリアランスが遅いため、これは直感に反するように思われる。概して大きいPEGほど様々な分子量の分子の混合物を含むため、より小さい、及び/又は単分散のPEGの使用は、それが分子レベルで同様のタンパク質コンジュゲートの作製を促進する限りは、利点を提供する。かかるコンジュゲートは生体内用途に望ましい。

30

【0089】

従って、一例において、本発明の抗TAG72タンパク質はポリエチレングリコール(PEG)にコンジュゲートされる。例えば、PEGは単分散PEGである。

40

【0090】

一例において、PEGは約4000Da以下の分子量、例えば、約2000Da以下の分子量、約1,500Da以下の分子量などを有する。一例において、PEGは、1,000Da以下、900Da以下など、例えば、800Da以下、600Da以下などの分子量を有する。一例において、PEGは約550Da~約1,000Daの分子量を有する。

【0091】

別の例において、PEGは約70個又は75個又は77個以下のエチレングリコール単位を有する。例えば、PEGは約50個以下のエチレングリコール単位を有する。好ましくは、PEGは48個以下のエチレングリコール単位を有する。例えば、PEGは約40

50

個以下のエチレングリコール単位を有する。例えば、PEGは約30個以下のエチレングリコール単位を有する。例えば、PEGは約27個以下のエチレングリコール単位を有する。例えば、PEGは約24個以下のエチレングリコール単位を有する。例えば、PEGは約15個以下のエチレングリコール単位を有する。例えば、PEGは約12個以下のエチレングリコール単位を有する。好ましくは、PEGは約12~27個のエチレングリコール単位を含む。

【0092】

一例において、PEGはキレート剤などのさらなる化合物、例えば、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸(DOTA)などの大環状キレート剤にコンジュゲートされる。

10

【0093】

本発明はまた、本発明の抗TAG72タンパク質及び薬学的に許容可能な担体も提供する。

【0094】

本発明は、本発明の抗TAG72タンパク質におけるポリペプチドの1つ又は複数にコードする単離核酸をさらに提供する。

【0095】

本発明は、本発明の抗TAG72タンパク質又はそれに由来するポリペプチドをコードする核酸を含む発現コンストラクトをさらに提供する。

20

【0096】

本発明は、本発明の抗TAG72タンパク質を発現する単離細胞をさらに提供する。例えば、細胞は、本発明の抗TAG72タンパク質又はそれに由来するポリペプチドをコードする核酸及び/又はそれを含む発現コンストラクトを含む。

【0097】

本発明は、本発明の抗TAG72タンパク質の作製方法であって、それをコードする発現コンストラクトを、コードされたポリペプチド及びタンパク質が作製されるように維持するステップを含む方法をさらに提供する。

【0098】

一例において、この方法は、コードされたタンパク質が作製されるのに十分な(sufficiently encoded for the protein to be produced)条件下で細胞を培養するステップを含む。

30

【0099】

一例において、この方法は、タンパク質を単離するステップをさらに含む。

【0100】

本発明は、システイン残基の少なくとも1つにコンジュゲートした化合物を含む本発明の抗TAG72タンパク質の作製方法であって、

(i) FR1にシステイン残基を含む本発明の抗TAG72タンパク質を得るステップと、

(ii) 1つ又は複数のポリペプチドのFR1におけるシステイン残基の少なくとも1つに化合物をコンジュゲートするステップであって、それによりタンパク質を作製するステップと、

40

を含む方法をさらに提供する。

【0101】

一例において、(i)で得られるタンパク質における1つ又は複数のポリペプチド中のシステイン残基はジスルフィド結合によって連結され、及びこの方法は、化合物を1つ又は複数のシステイン残基にコンジュゲートする前に、ジスルフィド結合を還元するか、又は他の方法で分解するステップをさらに含む。例えば、ジスルフィド結合を還元するか、又は他の方法で分解するステップによりタンパク質に遊離チオール基が生成され、及び化合物は、化合物のタンパク質とのコンジュゲーションを可能にするチオール反応基を有する。

50

## 【0102】

一例において、タンパク質における少なくとも1つのポリペプチドは少なくとも1つのN末端セリン残基又はスレオニン残基を含み、及びこの方法は、化合物をセリン残基又はスレオニン残基にコンジュゲートするステップをさらに含む。

## 【0103】

別の例において、本発明は、N末端セリン残基又はスレオニン残基にコンジュゲートした化合物を含む本発明の抗TAG72タンパク質の作製方法であって、

(i) N末端セリン残基及び/又はスレオニン残基を含む本発明の抗TAG72タンパク質を得るステップと、

(ii) ポリペプチドのN末端にある少なくとも1つのセリン残基又はスレオニン残基に化合物をコンジュゲートするステップであって、それによりタンパク質を作製するステップと、

を含む方法を提供する。

10

## 【0104】

一例において、化合物とコンジュゲートしたタンパク質の作製方法は、タンパク質をPEGにコンジュゲートするステップを含む。

## 【0105】

本発明は、対象において癌を位置特定及び/又は検出及び/又は診断及び/又は予後判定する方法であって、

(i) 本発明の抗TAG72タンパク質又はそれを含む組成物を、それが、存在する場合には腫瘍抗原TAG72に結合するように、対象に投与するステップと、

(ii) TAG72に結合したタンパク質をインビボで検出するステップであって、結合したタンパク質の検出により癌が位置特定及び/又は検出及び/又は診断及び/又は予後判定される、ステップと、

を含む方法をさらに提供する。

20

## 【0106】

本発明は、対象における癌の診断又は予後判定方法であって、

(i) 対象からの試料を本発明の抗TAG72タンパク質又はそれを含む組成物と、それが、存在する場合には腫瘍抗原TAG72に結合するように接触させるステップと、

(ii) TAG72に結合したタンパク質を検出するステップであって、結合したタンパク質の検出が癌の診断又は予後判定をもたらす、ステップと、

を含む方法をさらに提供する。

30

## 【0107】

先述の2つの例のいずれかの一例において、タンパク質は検出可能標識にコンジュゲートされ、及びこの方法は、TAG72に結合したタンパク質を検出するため標識を検出するステップを含む。

## 【0108】

本発明は、癌の治療方法であって、本発明の抗TAG72タンパク質又はそれを含む組成物を、それが癌細胞上の腫瘍抗原TAG72に結合して癌を治療するように投与するステップを含む方法をさらに提供する。

40

## 【0109】

一例において、タンパク質又はそれにコンジュゲートした化合物は癌細胞の死滅を誘導する。

## 【0110】

一例において、タンパク質は、癌細胞の死滅を誘導する化合物にコンジュゲートされる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0111】

【図1】インシリコでのホモロジーモデリングによる未変異AVP04-07ダイアボディ(配列番号57に示される配列を含むポリペプチドを含む)を示す図表現である。フレ

50

ームワーク残基が灰色で示され、CDR残基が黒色で示され、変異のため特定されるジスルフィド挿入残基候補が白色で示される。矢印はFvの1つにおける残基を、K a b a t付番を伴い特定する。

【図2】インシリコでのホモロジーモデリングによる未変異AVP07-17ダイアボディ（配列番号59に示される配列を含むポリペプチドを含む）を示す図表現である。フレームワーク残基が灰色で示され、CDR残基が黒色で示され、変異のため特定されるジスルフィド挿入残基候補が白色で示される。矢印はFvの1つにおける残基を、K a b a t付番を伴い特定する。

【図3】インシリコでのホモロジーモデリングによる未変異AVP02-60ダイアボディ（配列番号61に示される配列を含むポリペプチドを含む）を示す図表現である。フレームワーク残基が灰色で示され、CDR残基が黒色で示され、変異のため特定されるジスルフィド挿入残基候補が白色で示される。矢印はFvの1つにおける残基を、K a b a t付番を伴い特定する。

【図4A】インシリコでのホモロジーモデリングによるAVP04-07ダイアボディ（配列番号57に示される配列を含むポリペプチドを含む）のV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>におけるフレームワーク1内ジスルフィド挿入変異を示す図表現である。重鎖が黒色で示され、軽鎖が灰色で示され、インシリコで変異させたジスルフィド挿入変異側鎖が球棒で示される。左側：未変異ダイアボディモデル及び2つのジスルフィド挿入変異ダイアボディモデルからアラインメントしたFv。中央：左側に同じ、但しFR1のみを示す。右側 中央に同じ、但し横軸を中心に100°回転させている。

【図4B】インシリコでのホモロジーモデリングによるAVP04-07ダイアボディ（配列番号57に示される配列を含むポリペプチドを含む）のV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>におけるフレームワーク1内ジスルフィド挿入変異を示す図表現である。示されるとおりの様々な変異を含むFR1のモデルを表す。H = 重鎖。L = 軽鎖。数字はシステイン残基（存在する場合）の位置を示す。未変異FR1 H / 未変異FR1 L = AVP04-07、H7-H10 = AVP04-84、L8-L11 = AVP04-50、H13-H16 = AVP04-85、L14-L17 = AVP04-78。

【図5】AVP04-xx A v i b o d yのCDR基及びジスルフィドについての残基当たり平均溶媒露出表面積（ASA）のグラフであり、V<sub>H</sub>から得られたカラムが灰色で示され、V<sub>L</sub>から得られたカラムが白色で示される。CDR基における残基、保存されたシート間ジスルフィド残基（H22-H92及びL23-L88）及びジスルフィド挿入変異残基について残基当たり平均ASAとして示され、誤差バーは標準偏差を示す。H = 重鎖。L = 軽鎖。数字はシステイン残基（存在する場合）の位置を示し、H7-H10 = AVP04-84、L8-L11 = AVP04-50、H13-H16 = AVP04-85、L14-L17 = AVP04-78である。

【図6A】インシリコでのホモロジーモデリングによるAVP02-60ダイアボディ（配列番号61に示される配列を含むポリペプチドを含む）のV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>におけるフレームワーク1内ジスルフィド挿入変異を示す図表現である。重鎖が黒色で示され、軽鎖が灰色で示され、インシリコで変異させたジスルフィド挿入変異側鎖が球棒で示される。左側：未変異ダイアボディモデル及び2つのジスルフィド挿入変異ダイアボディモデルからアラインメントしたFv。中央：左側に同じ、但しFR1のみを示す。右側 中央に同じ、但し横軸を中心に100°回転させている。

【図6B】インシリコでのホモロジーモデリングによるAVP02-60ダイアボディ（配列番号61に示される配列を含むポリペプチドを含む）のV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>におけるフレームワーク1内ジスルフィド挿入変異を示す図表現である。示されるとおりの様々な変異を含むFR1のモデルを表す。H = 重鎖。L = 軽鎖。数字はシステイン残基（存在する場合）の位置を示す。未変異FR1 H / 未変異FR1 L = AVP02-60、H7-H10 = AVP02-104、L8-L11 = AVP02-101、H13-H16 = AVP02-105、L14-L17 = AVP02-102。

【図7A】インシリコでのホモロジーモデリングによるAVP07-17ダイアボディ（

10

20

30

40

50

配列番号 59 に示される配列を含むポリペプチドを含む) の  $V_L$  及び  $V_H$  におけるフレームワーク 1 内ジスルフィド挿入変異を示す図表現である。重鎖が黒色で示され、軽鎖が灰色で示され、インシリコで変異させたジスルフィド挿入変異側鎖が球棒で示される。左側：未変異ダイアボディモデル及び 2 つのジスルフィド挿入変異ダイアボディモデルからアラインメントした  $F_v$ 。中央：左側に同じ、但し  $FR1$  のみを示す。右側 中央に同じ、但し横軸を中心に  $100^\circ$  回転させている。

【図 7 B】インシリコでのホモロジーモデリングによる  $AVP07-17$  ダイアボディ (配列番号 59 に示される配列を含むポリペプチドを含む) の  $V_L$  及び  $V_H$  におけるフレームワーク 1 内ジスルフィド挿入変異を示す図表現である。示されるとおりの様々な変異を含む  $FR1$  のモデルを表す。H = 重鎖。L = 軽鎖。数字はシステイン残基 (存在する場合) の位置を示す。未変異  $FR1$  H / 未変異  $FR1$  L =  $AVP07-17$ 、 $H7-H10 = AVP07-90$ 、 $L7-L11 = AVP07-88$ 、 $H13-H16 = AVP07-91$ 、 $L14-L17 = AVP07-89$ 。

【図 8】 $AVP02-xx$  *Avi body* の CDR 基及びジスルフィドについての残基当たり平均溶媒  $ASA$  のグラフであり、 $V_H$  から得られたカラムが灰色で示され、 $V_L$  から得られたカラムが白色で示される。CDR 基における残基、保存されたシート間ジスルフィド残基及びジスルフィド挿入変異残基についての残基当たり平均  $ASA$  として示され、誤差バーは標準偏差を示す。H = 重鎖。L = 軽鎖。数字はシステイン残基 (存在する場合) の位置を示し、 $H7-H10 = AVP02-104$ 、 $L8-L11 = AVP02-101$ 、 $H13-H16 = AVP02-105$ 、 $L14-L17 = AVP02-102$  である。

【図 9】 $AVP07-xx$  *Avi body* の CDR 基及びジスルフィドについての残基当たり平均溶媒  $ASA$  のグラフであり、 $V_H$  から得られたカラムが灰色で示され、 $V_L$  から得られたカラムが白色で示される。CDR 基における残基、保存されたシート間ジスルフィド残基及びジスルフィド挿入変異残基についての残基当たり平均  $ASA$  として示され、誤差バーは標準偏差を示す。H = 重鎖。L = 軽鎖。数字はシステイン残基 (存在する場合) の位置を示し、 $H7-H10 = AVP07-90$ 、 $L7-L11 = AVP07-88$ 、 $H13-H16 = AVP07-91$ 、 $L14-L17 = AVP07-89$  である。

【図 10 A】 $AVP04-50$  (配列番号 57 に示される配列を含むポリペプチドを含む) *His-Tag* アフィニティークロマトグラフィー精製の  $280\text{nm}$  クロマトグラフを示すグラフ表現である。矢印は対象となる溶出ピークを示す。点線は溶出緩衝液の割合を示す。

【図 10 B】 $AVP04-50$  (配列番号 57 に示される配列を含むポリペプチドを含む) の陽イオン精製の結果を示すグラフ表現である。矢印は対象となる溶出ピークを示す。点線は溶出緩衝液の割合を示す。

【図 10 C】 $AVP04-50$  (配列番号 57 に示される配列を含むポリペプチドを含む) のサイズ排除クロマトグラフィーの結果を示すグラフ表現である。矢印は対象となる溶出ピークを示す。点線は対象となる画分の輪郭を示す。

【図 10 D】 $AVP04-50$  (配列番号 57 に示される配列を含むポリペプチドを含む) の精製後サイズ排除クロマトグラフィーの結果を示すグラフ表現である。矢印は対象となる溶出ピークを示す。

【図 10 E】精製後の  $AVP04-50$  (配列番号 57 に示される配列を含むポリペプチドを含む) の純度を示す還元  $SDS-PAGE$  ゲルの結果を示す写真表現である。レーン 1: *Invitrogen Benchmark* 着色済み分子量マーカー、レーン 2:  $AVP04-50$  タンパク質バンド。

【図 11 A】サイズ排除クロマトグラフィー後の本明細書に記載される精製 *Avi body* (示されるとおり、命名は、本文全体を通じて、及び配列表において使用されるものと一致する) のグラフ表現を含む。

【図 11 B】サイズ排除クロマトグラフィー後の本明細書に記載される精製 *Avi body* (示されるとおり、命名は、本文全体を通じて、及び配列表において使用されるものと

10

20

30

40

50

一致する)のグラフ表現を含む。

【図11C】サイズ排除クロマトグラフィー後の本明細書に記載される精製 *Avibody* (示されるとおり、命名は、本文全体を通じて、及び配列表において使用されるものと一致する)のグラフ表現を含む。

【図12A】本明細書に記載される *Avibody* (示されるとおり、命名は、本文全体を通じて、及び配列表において使用されるものと一致する)の免疫活性を測定するために使用されるカラムシフトアッセイのグラフ表現を含む。各グラフは、抗原の存在下(実線)又は不在下(点線)のいずれかでインキュベートした *Avibody* の2つを重ね合わせたサイズ排除クロマトグラフィープロファイルを含む。

【図12B】本明細書に記載される *Avibody* (示されるとおり、命名は、本文全体を通じて、及び配列表において使用されるものと一致する)の免疫活性を測定するために使用されるカラムシフトアッセイのグラフ表現を含む。各グラフは、抗原の存在下(実線)又は不在下(点線)のいずれかでインキュベートした *Avibody* の2つを重ね合わせたサイズ排除クロマトグラフィープロファイルを含む。

【図12C】本明細書に記載される *Avibody* (示されるとおり、命名は、本文全体を通じて、及び配列表において使用されるものと一致する)の免疫活性を測定するために使用されるカラムシフトアッセイのグラフ表現を含む。各グラフは、抗原の存在下(実線)又は不在下(点線)のいずれかでインキュベートした *Avibody* の2つを重ね合わせたサイズ排除クロマトグラフィープロファイルを含む。

【図13A】*mal-PEG<sub>24</sub>-MeOH*との *Avibody* コンジュゲーションの結果を示す写真表現を含み、SDS-PAGEによるペグ化されていない対照(「ネイキッド」) *Avibody* に対する分子量の増加を示す。レーン1及び10: Benchmark 着色済み分子量スタンダード、レーン2及び3:それぞれネイキッド AVP07-71及び AVP07-71-PEG<sub>24</sub>。レーン4及び5:それぞれネイキッド AVP07-88及び AVP07-88-PEG<sub>24</sub>。レーン6及び7:それぞれネイキッド AVP02-101及び AVP02-101-PEG<sub>24</sub>。レーン8及び9:それぞれネイキッド AVP04-50及び AVP04-50-PEG<sub>24</sub>。

【図13B】*mal-PEG<sub>24</sub>-MeOH*との *Avibody* コンジュゲーションの結果を示す写真表現を含み、SDS-PAGEによるペグ化されていない対照(「ネイキッド」) *Avibody* に対する分子量の増加を示す。レーン1: Benchmark 着色済み分子量スタンダード、レーン2及び3:それぞれネイキッド AVP04-70及び AVP04-70-PEG<sub>24</sub>。レーン4及び5:それぞれネイキッド AVP04-84及び AVP04-84-PEG<sub>24</sub>。

【図13C】SDS-PAGEによる *mal-PEG<sub>24</sub>-MeOH*との *Avibody* コンジュゲーションの結果を示す写真表現を含む。レーン1: Benchmark 着色済み分子量スタンダード、レーン2: AVP04-74-PEG<sub>24</sub> コンジュゲート。レーン3: AVP04-78-PEG<sub>24</sub> コンジュゲート。

【図14A】抗HER2 scFv AVP07-71(配列番号105)の原子質量単位(AMU)のグラフ表現を含み、タンパク質+コンジュゲーション後のPEG<sub>24</sub>の2個の分子の追加分に比例する質量(30078.36 amu)を示す。

【図14B】抗TAG72 AVP04-50(配列番号57)のAMUのグラフ表現を含み、タンパク質+コンジュゲーション後のPEG<sub>24</sub>の2個の分子の追加分に比例する単量体鎖当たり質量(28166.84 amu)を示す。

【図14C】抗HER2ダイアボディ AVP07-88(配列番号87)のAMUのグラフ表現を含み、タンパク質+コンジュゲーション後のPEG<sub>24</sub>の2個の分子の追加分に比例する単量体鎖当たり質量(29196.72 amu)である。

【図14D】抗MUC1ダイアボディ AVP02-101(配列番号79)のAMUのグラフ表現を含み、単量体鎖当たりのコンジュゲートされるPEG<sub>24</sub>の分子1個(24749.05 amu)を示す。

【図15A】本明細書に記載されるPEG化された *Avibody* (示されるとおり、命

10

20

30

40

50

名は、本文全体を通じて、及び配列表において使用されるものと一致する)の免疫活性を測定するために使用されるカラムシフトアッセイのグラフ表現を含む。各グラフは、抗原の存在下(実線)又は不在下(点線)のいずれかにおけるA v i b o d y - P E Gコンジュゲートの2つを重ね合わせたサイズ排除クロマトグラフィープロファイルを含む。

【図15B】本明細書に記載されるPEG化されたA v i b o d y (示されるとおり、命名は、本文全体を通じて、及び配列表において使用されるものと一致する)の免疫活性を測定するために使用されるカラムシフトアッセイのグラフ表現を含む。各グラフは、抗原の存在下(実線)又は不在下(点線)のいずれかにおけるA v i b o d y - P E Gコンジュゲートの2つを重ね合わせたサイズ排除クロマトグラフィープロファイルを含む。

【図15C】本明細書に記載されるPEG化されたA v i b o d y (示されるとおり、命名は、本文全体を通じて、及び配列表において使用されるものと一致する)の免疫活性を測定するために使用されるカラムシフトアッセイのグラフ表現を含む。各グラフは、抗原の存在下(実線)又は不在下(点線)のいずれかにおけるA v i b o d y - P E Gコンジュゲートの2つを重ね合わせたサイズ排除クロマトグラフィープロファイルを含む。

【図16】ユウロピウムコンジュゲート化A V P 0 4 - 5 0 (配列番号57) A v i b o d yの免疫活性を測定するために使用されるカラムシフトアッセイのグラフ表現を含む。この表現は、抗原の存在下(点線)又は不在下(実線)のいずれかにおけるA v i b o d y - ユウロピウムコンジュゲートの2つを重ね合わせたサイズ排除クロマトグラフィープロファイルを含む。

【図17】抗原陽性細胞系(L S 1 7 4 T、実線)及び陰性細胞系(S K - O V - 3、点線)に対する細胞結合アッセイにより測定するときのユウロピウムコンジュゲート化A V P 0 4 - 5 0 (配列番号57)の免疫活性のグラフ表現を含む。

【図18A】確立されたL S - 1 7 4 T異種移植マウスにおける<sup>1</sup><sup>2</sup><sup>5</sup>I及び<sup>1</sup><sup>1</sup><sup>1</sup>I n標識A V P 0 4 - 0 7 (配列番号55に示される配列を含むポリペプチドを含む)の生体分布を示すグラフである。矢先が開いた矢印=腫瘍取り込み曲線、矢先が黒三角の矢印=腎取り込み曲線、矢先が黒丸の矢印=血中クリアランス曲線。

【図18B】確立されたL S - 1 7 4 T異種移植マウスにおける<sup>1</sup><sup>2</sup><sup>5</sup>I及び<sup>1</sup><sup>1</sup><sup>1</sup>I n標識A V P 0 4 - 5 0 (配列番号57に示される配列を含むポリペプチドを含む)の生体分布を示すグラフである。矢先が開いた矢印=腫瘍取り込み曲線、矢先が黒三角の矢印=腎取り込み曲線、矢先が黒丸の矢印=血中クリアランス曲線。

【図19】確立されたS K O V 3異種移植マウスにおける<sup>1</sup><sup>2</sup><sup>5</sup>I標識したA V P 0 7 - 1 7 (配列番号59に示される配列を含むポリペプチドを含む)及びA V P 0 7 - 6 3 (配列番号65に示される配列を含むポリペプチドを含む)の生体分布を示すグラフである。濃い灰色のバー=A V P 0 7 - 6 3、白抜きのバー=A V P 0 7 - 1 7。

【図20】確立されたL S - 1 7 4 T異種移植マウスにおける、パネルA:ランダムな表面リジンにPEG 3 4 0 0によりコンジュゲートされた<sup>1</sup><sup>1</sup><sup>1</sup>I n標識A V P 0 4 - 0 7 (配列番号55に示される配列を含むポリペプチドを含む)、及びパネルB:操作的フレームワーク1内ジスルフィド変異にコンジュゲートされたサイズ単分散PEG<sub>4.8</sub>によりコンジュゲートされた<sup>1</sup><sup>1</sup><sup>1</sup>I n標識A V P 0 4 - 5 0 (配列番号57に示される配列を含むポリペプチドを含む)の生体分布を示すグラフである。矢先が開いた矢印=腫瘍取り込み曲線、矢先が黒三角の矢印=腎取り込み曲線、矢先が黒丸の矢印=血中クリアランス曲線。

【図21A】確立されたL S - 1 7 4 T異種移植マウスにおける、ランダムな表面リジンにサイズ単分散PEG<sub>2.7</sub>によりコンジュゲートされた、<sup>6</sup><sup>4</sup>C u標識した非ペグ化A V P 0 4 - 0 7 (配列番号55に示される配列を含むポリペプチドを含む)A V P 0 4 - 0 7のPET生体分布を示す画像表現である。上向きの矢印=腫瘍の位置、下向きの矢印=腎臓の位置。

【図21B】確立されたL S - 1 7 4 T異種移植マウスにおける、操作的フレームワーク1内ジスルフィド変異にコンジュゲートされたサイズ単分散PEG<sub>4.8</sub>によりコンジュゲートされたA V P 0 4 - 5 0 (配列番号57に示される配列を含むポリペプチドを含む)

10

20

30

40

50

のPET生体分布を示す画像表現である。上向きの矢印 = 腫瘍の位置、下向きの矢印 = 腎臓の位置。

【図22A】LS174T異種移植片を有するヌードマウスにおける $^{111}\text{In}$ 標識したインタクトなAVP04-07ダイアボディの生体分布を示すグラフ表現である。矢先が開いた矢印 = 腫瘍取り込み曲線、矢先が黒三角の矢印 = 腎取り込み曲線、矢先が黒丸の矢印 = 血中クリアランス曲線。

【図22B】LS174T異種移植片を有するヌードマウスにおける $^{125}\text{I}$ 標識したインタクトなAVP04-07ダイアボディの生体分布を示すグラフ表現である。矢先が開いた矢印 = 腫瘍取り込み曲線、矢先が黒三角の矢印 = 腎取り込み曲線、矢先が黒丸の矢印 = 血中クリアランス曲線。

【図22C】LS174T異種移植片を有するヌードマウスにおけるPEG3400にコンジュゲートされた $^{111}\text{In}$ 標識AVP04-07ダイアボディの生体分布を示すグラフ表現である。矢先が開いた矢印 = 腫瘍取り込み曲線、矢先が黒三角の矢印 = 腎取り込み曲線、矢先が黒丸の矢印 = 血中クリアランス曲線。

【図23A】1、インタクトAVP04-07ダイアボディ；2、AVP04-07-PEG<sub>27</sub>コンジュゲート；3、AVP04-07-PEG<sub>12</sub>コンジュゲート（20：1比）；4、AVP04-07-PEG<sub>12</sub>コンジュゲート（50：1比）；5、AVP04-07-PEG3400コンジュゲートの等電点分離の結果を示す写真表現である。

【図23B】1、インタクトAVP04-07ダイアボディ；2、AVP04-07-PEG<sub>27</sub>コンジュゲート；3、AVP04-07-PEG<sub>12</sub>コンジュゲート（20：1比）；4、AVP04-07-PEG<sub>12</sub>コンジュゲート（50：1比）；5、AVP04-07-PEG3400コンジュゲートのSDSゲル電気泳動の結果を示す写真表現である。

【図24】 $^{111}\text{In}$ 放射標識インタクトAVP04-07ダイアボディ及びPEGコンジュゲートのサイズ排除クロマトグラフィーの結果を示すグラフ表現である（放射活性は任意単位として示す）。ピーク（右から左に向かって）：符号1番：DOTAインタクトダイアボディ、2番：DOTA-PEG<sub>12</sub>-Cys-VS-ダイアボディコンジュゲート、3番：DOTA-PEG<sub>27</sub>-Cys-VS-ダイアボディコンジュゲート、4番：DOTA-Cys-VS-PEG3400-ダイアボディコンジュゲート。

【図25】DOTA-PEG-Cys-VSの合成スキームの図表現である。標準的な活性化化学（DCC/HOBt）を用いてFMOC-アミド-PEG-酸をWang樹脂上でS-t-ブチルシステインにコンジュゲートした。FMOCをピペリジンで除去し、標準的な活性化化学（DCC/HOBt）を用いてDO3AtBuAcにコンジュゲートした。生成物をTFAによって樹脂から取り出し、逆相HPLCにより精製し、DMF中の過剰ビニルスルホンと反応させて、逆相HPLCにより再度精製した。

【図26A】LS174T異種移植片を有するヌードマウスにおける $^{111}\text{In}$ 標識したPEG<sub>27</sub>コンジュゲート化AVP04-07ダイアボディの生体分布を示すグラフ表現である。

【図26B】LS174T異種移植片を有するヌードマウスにおける $^{125}\text{I}$ 標識したPEG<sub>27</sub>コンジュゲート化AVP04-07ダイアボディの生体分布を示すグラフ表現である。

【図26C】LS174T異種移植片を有するヌードマウスにおける $^{111}\text{In}$ 標識したPEG<sub>12</sub>コンジュゲート化AVP04-07ダイアボディの生体分布を示すグラフ表現である。

【図26D】LS174T異種移植片を有するヌードマウスにおける $^{125}\text{I}$ 標識したPEG<sub>12</sub>コンジュゲート化AVP04-07ダイアボディの生体分布を示すグラフ表現である。

【図27A】注入後1時間目、4時間目、2時間目及び46時間目における $^{64}\text{Cu}$ 標識したインタクトAVP04-07ダイアボディを注入した単一のマウスについてのイメージングの経時的なPET像を示す画像表現である。

10

20

30

40

50

【図27B】<sup>64</sup>Cu標識したPEG<sub>27</sub> AVP04-07ダイアボディを注入した単一のマウスについてのイメージングの経時的なPET像を示す画像表現である。

【図27C】<sup>64</sup>Cu標識したPEG<sub>12</sub> AVP04-07ダイアボディを注入した単一のマウスについてのイメージングの経時的なPET像を示す画像表現である。

【発明を実施するための形態】

【0112】

配列表の凡例

- 配列番号1 - ヒト抗体重鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号2 - ヒト抗体重鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号3 - ヒト抗体重鎖のFR1のアミノ酸配列； 10
- 配列番号4 - ヒト抗体重鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号5 - ヒト抗体重鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号6 - ヒト抗体重鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号7 - ヒト抗体重鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号8 - ヒト抗体重鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号9 - ヒト抗体重鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号10 - ヒト抗体重鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号11 - ヒト抗体重鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号12 - ヒト抗体重鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号13 - ヒト抗体重鎖のFR1のアミノ酸配列； 20
- 配列番号14 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号15 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号16 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号17 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号18 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号19 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号20 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号21 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号22 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号23 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列； 30
- 配列番号24 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号25 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号26 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号27 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号28 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号29 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号30 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号31 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号32 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号33 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列； 40
- 配列番号34 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号35 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号36 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号36 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号37 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号38 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号39 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号40 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号41 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列；
- 配列番号42 - ヒト抗体軽鎖のFR1のアミノ酸配列； 50

- 配列番号 43 - ヒト抗体 軽鎖の F R 1 のアミノ酸配列 ;
- 配列番号 44 - ラクダ科動物免疫グロブリンの F R 1 のアミノ酸配列 ;
- 配列番号 45 - ラクダ科動物免疫グロブリンの F R 1 のアミノ酸配列 ;
- 配列番号 46 - ラクダ科動物免疫グロブリンの F R 1 のアミノ酸配列 ;
- 配列番号 47 - ラクダ科動物免疫グロブリンの F R 1 のアミノ酸配列 ;
- 配列番号 48 - ラクダ科動物免疫グロブリンの F R 1 のアミノ酸配列 ;
- 配列番号 49 - ラクダ科動物免疫グロブリンの F R 1 のアミノ酸配列 ;
- 配列番号 50 - ラクダ科動物免疫グロブリンの F R 1 のアミノ酸配列 ;
- 配列番号 51 - アブラツノザメ I g N A R の F R 1 のアミノ酸配列 ;
- 配列番号 52 - テンジクザメ I g N A R の F R 1 のアミノ酸配列 ; 10
- 配列番号 53 - リンカーのアミノ酸配列 ;
- 配列番号 54 - A V P 0 4 - 0 7 抗 T A G 7 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列 ;
- 配列番号 55 - A V P 0 4 - 0 7 抗 T A G 7 2 ダイアボディのアミノ酸配列 ;
- 配列番号 56 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 4 - 5 0 と命名される修飾 A V P 0 4 - 0 7 抗 T A G 7 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列 ;
- 配列番号 57 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 4 - 5 0 と命名される修飾 A V P 0 4 - 0 7 抗 T A G 7 2 ダイアボディのアミノ酸配列 ;
- 配列番号 58 - A V P 0 7 - 1 7 抗 H e r 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列 ; 20
- 配列番号 59 - A V P 0 7 - 1 7 抗 H e r 2 ダイアボディのアミノ酸配列 ;
- 配列番号 60 - A V P 0 2 - 6 0 抗 M U C 1 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列 ;
- 配列番号 61 - A V P 0 2 - 6 0 抗 M U C 1 ダイアボディのアミノ酸配列 ;
- 配列番号 62 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 4 - 8 4 と命名される修飾 A V P 0 4 - 0 7 抗 T A G 7 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列 ;
- 配列番号 63 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 4 - 8 4 と命名される修飾 A V P 0 4 - 0 7 抗 T A G 7 2 ダイアボディのアミノ酸配列 ; 30
- 配列番号 64 - F R 1 あるシステイン残基と、C D R 3 H 中のシステイン残基の除去と、N 末端セリンとを含む A V P 0 7 - 6 3 と命名される修飾 A V P 0 7 - 1 7 抗 H e r 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列 ;
- 配列番号 65 - F R 1 におけるシステイン残基と、C D R 3 H 中のシステイン残基の除去と、N 末端セリンとを含む A V P 0 7 - 6 3 と命名される修飾 A V P 0 7 - 1 7 抗 H e r 2 ダイアボディのアミノ酸配列 ;
- 配列番号 66 - A V P 0 4 - 0 7 において N 末端 G l n 残基を S e r 残基と置換するための変異原性プライマーのヌクレオチド配列 ;
- 配列番号 67 - A V P 0 4 - 0 7 において N 末端 G l n 残基を S e r 残基と置換するための変異原性プライマーのヌクレオチド配列 ; 40
- 配列番号 68 - A V P 0 7 - 1 7 においてアラニン残基をシステインに置き換えるための変異原性プライマーのヌクレオチド配列 ;
- 配列番号 69 - A V P 0 7 - 1 7 においてアラニン残基をシステインに置き換えるための変異原性プライマーのヌクレオチド配列 ;
- 配列番号 70 - ヒト H e r 2 のアミノ酸配列 ;
- 配列番号 71 - ヒト P S M A のアミノ酸配列 ;
- 配列番号 72 - ヒト M U C 1 のアイソフォームのアミノ酸配列 ; 及び
- 配列番号 73 - いくつかの型の癌で発現するヒト M U C 1 のアイソフォームのアミノ酸配列 ;
- 配列番号 74 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 4 - 8 5 50

と命名される修飾 A V P 0 4 - 0 7 抗 T A G 7 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 7 5 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 4 - 8 5 と命名される修飾 A V P 0 4 - 0 7 抗 T A G 7 2 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 7 6 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 4 - 7 8 と命名される修飾 A V P 0 4 - 0 7 抗 T A G 7 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 7 7 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 4 - 7 8 と命名される修飾 A V P 0 4 - 0 7 抗 T A G 7 2 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 7 8 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 2 - 1 0 1 と命名される修飾 A V P 0 2 - 6 0 抗 M U C 1 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 7 9 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 2 - 1 0 1 と命名される修飾 A V P 0 2 - 6 0 抗 M U C 1 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 8 0 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 2 - 1 0 4 と命名される修飾 A V P 0 2 - 6 0 抗 M U C 1 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 8 1 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 2 - 1 0 4 と命名される修飾 A V P 0 2 - 6 0 抗 M U C 1 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 8 2 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 2 - 1 0 2 と命名される修飾 A V P 0 2 - 6 0 抗 M U C 1 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 8 3 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 2 - 1 0 2 と命名される修飾 A V P 0 2 - 6 0 抗 M U C 1 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 8 4 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 2 - 1 0 5 と命名される修飾 A V P 0 2 - 6 0 抗 M U C 1 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 8 5 - F R 1 におけるシステイン残基と N 末端セリンとを含む A V P 0 2 - 1 0 5 と命名される修飾 A V P 0 2 - 6 0 抗 M U C 1 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 8 6 - F R 1 におけるシステイン残基と、 C D R 3 H 中のシステイン残基の除去と、 N 末端セリンとを含む A V P 0 7 - 8 8 と命名される修飾 A V P 0 7 - 1 7 抗 H E R 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 8 7 - F R 1 におけるシステイン残基と、 C D R 3 H 中のシステイン残基の除去と、 N 末端セリンとを含む A V P 0 7 - 8 8 と命名される修飾 A V P 0 7 - 1 7 抗 H E R 2 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 8 8 - F R 1 におけるシステイン残基と、 C D R 3 H 中のシステイン残基の除去と、 N 末端セリンとを含む A V P 0 7 - 9 0 と命名される修飾 A V P 0 7 - 1 7 抗 H E R 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 8 9 - F R 1 におけるシステイン残基と、 C D R 3 H 中のシステイン残基の除去と、 N 末端セリンとを含む A V P 0 7 - 9 0 と命名される修飾 A V P 0 7 - 1 7 抗 H E R 2 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 9 0 - F R 1 におけるシステイン残基と、 C D R 3 H 中のシステイン残基の除去と、 N 末端セリンとを含む A V P 0 7 - 8 9 と命名される修飾 A V P 0 7 - 1 7 抗 H E R 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 9 1 - F R 1 におけるシステイン残基と、 C D R 3 H 中のシステイン残基の除去と、 N 末端セリンとを含む A V P 0 7 - 8 9 と命名される修飾 A V P 0 7 - 1 7 抗 H E R 2 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 9 2 - F R 1 におけるシステイン残基と、 C D R 3 H 中のシステイン残基の除去と、 N 末端セリンとを含む A V P 0 7 - 9 1 と命名される修飾 A V P 0 7 - 1 7 抗 H E R 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

10

20

30

40

50

- 配列番号 93 - FR1におけるシステイン残基と、CDR3H中のシステイン残基の除去と、N末端セリンとを含むAVP07-91と命名される修飾AVP07-17抗HER2ダイアボディのアミノ酸配列；
- 配列番号 94 - FR1におけるシステイン残基とN末端セリンとを含むAVP02-103と命名される修飾AVP02-60抗MUC1ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；
- 配列番号 95 - FR1におけるシステイン残基とN末端セリンとを含むAVP02-103と命名される修飾AVP02-60抗MUC1ダイアボディのアミノ酸配列；
- 配列番号 96 - FR1におけるシステイン残基と、CDR3H中のシステイン残基の除去と、N末端セリンとを含むAVP07-68と命名される修飾AVP07-17抗HER2ダイアボディをコードするヌクレオチド配列； 10
- 配列番号 97 - FR1におけるシステイン残基と、CDR3H中のシステイン残基の除去と、N末端セリンとを含むAVP07-68と命名される修飾AVP07-17抗HER2ダイアボディのアミノ酸配列；
- 配列番号 98 - FR1におけるシステイン残基とN末端セリンとを含むAVP04-51と命名される修飾AVP04-07抗TAG72ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；
- 配列番号 99 - FR1におけるシステイン残基とN末端セリンとを含むAVP04-51と命名される修飾AVP04-07抗TAG72ダイアボディのアミノ酸配列；
- 配列番号 100 - FR1におけるシステイン残基とN末端セリンとを含むAVP04-70と命名される修飾AVP04-07抗TAG72 scFvをコードするヌクレオチド配列； 20
- 配列番号 101 - FR1におけるシステイン残基とN末端セリンとを含むAVP04-70と命名される修飾AVP04-07抗TAG72 scFvのアミノ酸配列；
- 配列番号 102 - FR1におけるシステイン残基とN末端セリンとを含むAVP04-74と命名される修飾AVP04-07抗TAG72トリアボディをコードするヌクレオチド配列；
- 配列番号 103 - FR1におけるシステイン残基とN末端セリンとを含むAVP04-74と命名される修飾AVP04-07抗TAG72トリアボディのアミノ酸配列；
- 配列番号 104 - FR1におけるシステイン残基と、CDR3H中のシステイン残基の除去と、N末端セリンとを含むAVP07-71と命名される修飾AVP07-17抗HER2 scFvをコードするヌクレオチド配列； 30
- 配列番号 105 - FR1におけるシステイン残基と、CDR3H中のシステイン残基の除去と、N末端セリンとを含むAVP07-71と命名される修飾AVP07-17抗HER2 scFvのアミノ酸配列；
- 配列番号 106 - AVP04-07におけるVL鎖のFR1領域のKabata位置L8及びL11にシステイン残基を導入するための変異原性プライマーのヌクレオチド配列；
- 配列番号 107 - AVP04-07におけるVL鎖のFR1領域のKabata位置L8及びL11にシステイン残基を導入するための変異原性プライマーのヌクレオチド配列；
- 配列番号 108 - CDR3Hシステイン残基Cys104 (Kabata付番H100) 及びCys109 (H100E) をアラニンに置き換え、且つN末端セリンを含むAVP07-86と命名される修飾AVP07-17抗HER2ダイアボディをコードするヌクレオチド配列； 40
- 配列番号 109 - CDR3Hシステイン残基Cys104 (Kabata付番H100) 及びCys109 (H100E) をアラニンに置き換え、且つN末端セリンを含むAVP07-86と命名される修飾AVP07-17抗HER2ダイアボディのアミノ酸配列；
- 配列番号 110 - AVP04-07抗TAG72ダイアボディのV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列；
- 配列番号 111 - AVP04-07抗TAG72ダイアボディのV<sub>H</sub>のアミノ酸配列；
- 配列番号 112 - AVP04-07抗TAG72ダイアボディのV<sub>L</sub>をコードするヌクレ 50

オチド配列；

配列番号 113 - AV P 04 - 07 抗 T A G 7 2 ダイアボディの V<sub>L</sub> のアミノ酸配列；

配列番号 114 - リンカー配列を欠く AV P 04 - 07 抗 T A G 7 2 ダイアボディ ( AV P 04 - 69 と命名される ) をコードするヌクレオチド配列；

配列番号 115 - リンカー配列を欠く AV P 04 - 07 抗 T A G 7 2 ダイアボディ ( AV P 04 - 69 と命名される ) のアミノ酸配列；

配列番号 116 - リンカー配列及び V<sub>H</sub> 中のリンカーに対して N 末端側のアミノ酸を欠く AV P 04 - 07 抗 T A G 7 2 ダイアボディ ( AV P 04 - 09 と命名される ) をコードするヌクレオチド配列；

配列番号 117 - リンカー配列及び V<sub>H</sub> 中のリンカーに対して N 末端側のアミノ酸を欠く AV P 04 - 07 抗 T A G 7 2 ダイアボディ ( AV P 04 - 09 と命名される ) のアミノ酸配列；

配列番号 118 - V<sub>L</sub> の FR 1 にシステイン残基を含む AV P 04 - 50 と命名される修飾 AV P 04 - 07 抗 T A G 7 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 119 - V<sub>L</sub> の FR 1 にシステイン残基を含む AV P 04 - 50 と命名される修飾 AV P 04 - 07 抗 T A G 7 2 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 120 - V<sub>L</sub> の FR 1 にシステイン残基を含み、且つリンカー配列を欠く AV P 04 - 50 と命名される修飾 AV P 04 - 69 抗 T A G 7 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 121 - V<sub>L</sub> の FR 1 にシステイン残基を含み、且つリンカー配列を欠く AV P 04 - 50 と命名される修飾 AV P 04 - 69 抗 T A G 7 2 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 122 - V<sub>L</sub> の FR 1 にシステイン残基を含み、且つリンカー配列及び V<sub>H</sub> 中のリンカーに対して N 末端側のアミノ酸を欠く AV P 04 - 50 と命名される修飾 AV P 04 - 09 抗 T A G 7 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 123 - FR 1 にシステイン残基を含み、且つリンカー配列及び V<sub>H</sub> 中のリンカーに対して N 末端側のアミノ酸を欠く AV P 04 - 50 と命名される修飾 AV P 04 - 09 抗 T A G 7 2 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 124 - V<sub>H</sub> に N 末端セリン残基を含む修飾 AV P 04 - 07 抗 T A G 7 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 125 - V<sub>H</sub> に N 末端セリン残基を含む修飾 AV P 04 - 07 抗 T A G 7 2 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 126 - リンカー配列を欠き、且つ V<sub>H</sub> に N 末端セリン残基を含む修飾 AV P 04 - 69 抗 T A G 7 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 127 - リンカー配列を欠き、且つ V<sub>H</sub> に N 末端セリン残基を含む修飾 AV P 04 - 69 抗 T A G 7 2 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 128 - リンカー配列及び V<sub>H</sub> 中のリンカーに対して N 末端側のアミノ酸を欠き、且つ V<sub>H</sub> に N 末端セリン残基を含む修飾 AV P 04 - 09 抗 T A G 7 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 129 - リンカー配列及び V<sub>H</sub> 中のリンカーに対して N 末端側のアミノ酸を欠き、且つ V<sub>H</sub> に N 末端セリン残基を含む修飾 AV P 04 - 09 抗 T A G 7 2 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 130 - V<sub>L</sub> の FR 1 にシステイン残基及び V<sub>H</sub> に N 末端セリン残基を含み、且つリンカー配列を欠く修飾 AV P 04 - 50 抗 T A G 7 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

配列番号 131 - V<sub>L</sub> の FR 1 にシステイン残基及び V<sub>H</sub> に N 末端セリン残基を含み、且つリンカー配列を欠く修飾 AV P 04 - 50 抗 T A G 7 2 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 132 - V<sub>L</sub> の FR 1 にシステイン残基及び V<sub>H</sub> に N 末端セリン残基を含み、且つリンカー配列及び V<sub>H</sub> 中のリンカーに対して N 末端側のアミノ酸を欠く修飾 AV P 04 - 50 抗 T A G 7 2 ダイアボディをコードするヌクレオチド配列；

10

20

30

40

50

配列番号 133 - V<sub>L</sub> の FR1 にシステイン残基及び V<sub>H</sub> に N 末端セリン残基を含み、且つリンカー配列及び V<sub>H</sub> 中のリンカーに対して N 末端側のアミノ酸を欠く修飾 AVP04 - 50 抗 TAG72 ダイアボディのアミノ酸配列；

配列番号 134 はリンカーのアミノ酸配列であり；及び

配列番号 135 はリンカーのアミノ酸配列である。

【0113】

概要

本明細書全体を通じて、特に具体的に明記しない限り、又は特に文脈上必要でない限り、単一のステップ、組成物、一群のステップ又は一群の組成物に対する参照は、1つ及び複数（すなわち1つ以上）のそれらのステップ、組成物、一群のステップ又は一群の組成物を包含すると解釈されるべきである。

10

【0114】

当業者は、本明細書に記載される発明が、具体的に記載されるもの以外の変形例及び改良例を受け入れる余地を有することを理解するであろう。本発明はかかる変形例及び改良例を全て含むことが理解されるべきである。本発明はまた、本明細書において参照され、又は指示される全てのステップ、特徴、組成物及び化合物も、個別に、又はまとめて含み、及び前記ステップ又は特徴のあらゆる組み合わせ又は任意の2つ以上も含む。

【0115】

本発明は、本明細書に記載される具体的な実施形態により範囲が限定されることはなく、それらの実施形態は、あくまでも例示目的を意図しているに過ぎない。機能的に均等な生成物、組成物及び方法は、本明細書に記載されるとおり、明らかに本発明の範囲内に含まれる。

20

【0116】

本明細書のいずれの実施形態も、特に具体的に明記されない限り、任意の他の実施形態に準用されると解釈されなければならない。

【0117】

特に具体的に定義されない限り、本明細書で使用される科学技術用語は全て、当該技術分野（例えば、細胞培養、分子遺伝学、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学、生化学及びホモロジーモデリング）の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有すると解釈されなければならない。

30

【0118】

特に指示されない限り、本発明で利用される組換えタンパク質、細胞培養、及び免疫学的技術は、当業者に周知の標準的手順である。かかる技術は、J. Perbal、「A Practical Guide to Molecular Cloning」、John Wiley and Sons（1984年）、J. Sambrookら「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbour Laboratory Press（1989年）、T. A. Brown（編者）、「Essential Molecular Biology: A Practical Approach」、第1及び2巻、IRL Press（1991年）、D. M. Glover及びB. D. Hames（編者）、「DNA Cloning: A Practical Approach」、第1～4巻、IRL Press（1995年及び1996年）、及びF. M. Ausubelら（編者）、「Current Protocols in Molecular Biology」、Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience（1988年、現在までの改訂版を全て含む）、Ed Harlow及びDavid Lane（編者）「Antibodies: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbour Laboratory、（1988年）、及びJ. E. Coliganら（編者）「Current Protocols in Immunology」、John Wiley & Sons（現在までの改訂版を全て含む）などの資料において文献の各所に記載及び説明されている。

40

50

## 【0119】

本明細書における可変領域及びその一部、免疫グロブリン、抗体及びその断片の記載及び定義は、例えば、Kabata(1987年及び/又は1991年)、Borkら(1994年)及び/又はChothia及びLesk(1987年及び1989年)又はAl-Lazikaniら(1997年)における論考によりさらに明確となり得る。

## 【0120】

用語「及び/又は」、例えば「X及び/又はY」は、「X及びY」又は「X又はY」のいずれも意味するものと理解されなければならない、及び双方の意味又は一方の意味の明示的な支持を提供するものと解釈されなければならない。

## 【0121】

本明細書で使用されるとき、アミノ酸残基又はヌクレオチド残基の位置の定義との関連における用語「～の間」は、挙げられる2つの残基の間に位置する任意の残基及び挙げられる2つの残基を意味するものと解釈されなければならない。例えば、用語「残基8～11の間」は、 $V_L$ 又は $V_H$ との関連においては残基8、9、10及び11を含むものと理解されなければならない、及び/又は $V_L$ との関連における用語「残基8～12の間」は、 $V_L$ がKabata付番方式の残基10を含まないため、残基8、9、11及び12を意味するものと理解されなければならない。

## 【0122】

本明細書全体を通じて語句「～を含む(comprise)」、又は「～を含む(comprises)」若しくは「～を含んでいる(comprising)」などのその変形は、記載される要素、完全体(integer)若しくはステップ、又は一群の要素、完全体若しくはステップが包含され、しかし任意の他の要素、完全体若しくはステップ、又は一群の要素、完全体若しくはステップを除外するものではないことを含意するものと理解され得る。

## 【0123】

本明細書で使用されるとき用語「～に由来する」は、特定の供給源から具体的な完全体が、そのソースから、直接得る必要はないものの、得られ得ることを示すものと解釈されなければならない。

## 【0124】

定義の抜粋

本明細書で使用されるとき、用語「免疫グロブリン」は、抗体又は任意の抗体関連タンパク質を意味するものと解釈されなければならない。当業者は、抗体が、複数のポリペプチド鎖から構成される可変領域、例えば軽鎖可変領域( $V_L$ )及び重鎖可変領域( $V_H$ )を含むタンパク質であると概して見なされることを認識するであろう。抗体はまた、概して、定常領域又は定常断片若しくは結晶性断片(Fc)として配列され得る定常ドメインも含む。抗体は、1個又は数個の密接に関連する抗原に特異的に結合することができる。概して、抗体は、その基本単位として4本の鎖からなる構造を含む。完全長抗体は、共有結合で連結された2本の重鎖(約50～70kD)と2本の軽鎖(各約23kD)とを含む。軽鎖は、概して可変領域と定常ドメインとを含み、及び哺乳動物では軽鎖又は軽鎖のいずれかである。重鎖は、概して可変領域と、ヒンジ領域によって別の1つ又は複数の定常ドメインに連結された1つ又は2つの定常ドメインとを含む。哺乳動物の重鎖は以下の種類、すなわち、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、又は $\mu$ のうちの一つである。各軽鎖はまた、重鎖の一方に共有結合で連結されている。例えば、2本の重鎖及び重鎖と軽鎖とは、鎖間ジスルフィド結合及び非共有結合性の相互作用により一体に保持される。鎖間ジスルフィド結合の数は、抗体の種類によって異なり得る。各鎖は、N末端可変領域( $V_H$ 又は $V_L$ 、各々が約110アミノ酸長である)と、C末端における1つ又は複数の定常ドメインとを有する。軽鎖の定常ドメイン( $C_L$ 、約110アミノ酸長)は重鎖の第1の定常ドメイン( $C_H$ 、約330～440アミノ酸長)と整列し、それにジスルフィド結合している。軽鎖可変領域は重鎖の可変領域と整列する。抗体重鎖は2つ以上のさらなる $C_H$ ドメイン( $C_H$ 2、 $C_H$ 3など)を含むことができ、定常ドメイン $C_H$ 1と $C_m$ との間に特定され得るヒ

10

20

30

40

50

ンジ領域を含むことができる。抗体は任意の種類（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、及びI g Y）、クラス（例えば、I g G<sub>1</sub>、I g G<sub>2</sub>、I g G<sub>3</sub>、I g G<sub>4</sub>、I g A<sub>1</sub>及びI g A<sub>2</sub>）又はサブクラスであり得る。好ましくは、抗体はネズミ科動物（マウス又はラット）抗体又は霊長類（好ましくはヒト）抗体である。用語「抗体」はまた、ヒト化抗体、霊長類化抗体、ヒト抗体及びキメラ抗体も包含する。抗体に関連する、ひいては用語「免疫グロブリン」に包含されるタンパク質には、ドメイン抗体、ラクダ科動物抗体及び軟骨魚類由来の抗体（すなわち、免疫グロブリン新規抗原受容体（I g N A R））が含まれる。概して、ラクダ科動物抗体及びI g N A Rは、V<sub>H</sub>を含むがV<sub>L</sub>を欠き、重鎖免疫グロブリンと称されることが多い。本明細書で使用されるとき、用語「免疫グロブリン」には、例えば可変領域を含む抗原結合部位を理由として、T細胞受容体及び抗原との結合能を有しないタンパク質を含む他の免疫グロブリン様ドメインは包含されない。さらに、用語「免疫グロブリン」には、F R 1を含まない免疫グロブリンドメインを含むタンパク質は、かかるタンパク質によっては本発明を実施できないため、包含されない。

10

20

30

40

50

#### 【0125】

本明細書で使用されるとき、「可変領域」は、本明細書に定義されるとおりの抗体又は免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖のなかで、C D R、すなわちC D R 1、C D R 2、及びC D R 3、並びにF Rのアミノ酸配列を含む部分を指す。I g N A Rの場合、用語「可変領域」にはC D R 2の存在は必要でない。V<sub>H</sub>は重鎖の可変領域を指す。V<sub>L</sub>は軽鎖の可変領域を指す。本発明で用いられる方法によれば、C D R及びF Rに割り当てられるアミノ酸位置はK a b a t（1987年及び1991年）に従い定義される。当業者は、本発明の実施において他の付番方式、例えばC h o t h i a及びL e s k（1987年及び/又は1989年）及び/又はA l - L a z i k a n i r a（1997年）の超可変ループ付番方式を使用することが容易に可能であろう。

#### 【0126】

本明細書で使用されるとき、用語「重鎖可変領域」又は「V<sub>H</sub>」は、1つ又は複数の抗原との結合能、好ましくは1つ又は複数の抗原との特異的結合能を有し、且つ少なくとも約30アミノ酸を含むF R 1を少なくとも含むタンパク質を意味するものと解釈されなければならない。重鎖の例示的F R 1の配列を本明細書に提供する（例えば、配列番号1～13を参照）。好ましくは、重鎖は3つ又は4つのF R（例えば、F R 1、F R 2、F R 3及び場合によりF R 4）を、3つのC D Rと共に含む。好ましくは、重鎖は以下のとおり位置するF R及びC D Rを含む：K a b a t付番方式により付番して、残基1～25又は1～30（F R 1）、31～25（C D R 1）、36～49（F R 2）、50～65（C D R 2）、66～94（F R 3）、95～102（C D R 3）及び103～113（F R 4）。一例において、重鎖は、前記重鎖及び複数の（好ましくは3つ又は4つの）定常ドメインを含むか、又は定常断片（F c）に連結された免疫グロブリンに由来する。

#### 【0127】

本明細書で使用されるとき、用語「軽鎖可変領域」又は「V<sub>L</sub>」は、1つ又は複数の抗原との結合能、好ましくは1つ又は複数の抗原との特異的結合能を有し、且つ約23アミノ酸を含むF R 1を少なくとも含むタンパク質を意味するものと解釈されなければならない。軽鎖の例示的F R 1の配列を本明細書に提供する（例えば、配列番号14～43を参照）。好ましくは、軽鎖は3つ又は4つのF R（例えば、F R 1、F R 2、F R 3及び場合によりF R 4）を、3つのC D Rと共に含む。好ましくは、軽鎖は以下のとおり位置するF R及びC D Rを含む：K a b a t付番方式により付番して、残基1～23（F R 1）、24～34（C D R 1）、35～49（F R 2）、50～56（C D R 2）、57～88（F R 3）、89～97（C D R 3）及び98～107（F R 4）。一例において、軽鎖は、1つの定常ドメインに連結された、及び/又は定常断片（F c）に連結されない前記軽鎖を含む免疫グロブリンに由来する。

#### 【0128】

本発明のいくつかの例において、用語「フレームワーク領域」は、C D R残基以外の可

変領域残基を意味するものと理解される。天然に存在する免疫グロブリン（例えば、抗体）の各可変領域は、典型的には、FR1、FR2、FR3及びFR4として特定される4つのFRを有する。CDRをKabatにより定義する場合、例示的軽鎖FR（LCFR）残基はおよそ残基1～23（LCFR1）、35～49（LCFR2）、57～88（LCFR3）、及び98～107（LCFR4）に位置する。LCFR1は、LCFR1には含まれる残基10を含まないことに留意されたい。例示的重鎖FR（HCFR）残基はおよそ残基1～30（HCFR1）、36～49（HCFR2）、66～94（HCFR3）、及び103～113（HCFR4）に位置する。

#### 【0129】

本発明の全ての免疫グロブリン可変領域について、「フレームワーク領域1」（FR1）は、天然N末端残基と相補性決定領域1（CDR1）の始点との間の残基として定義される。これらの残基は、少なくとも2つの命名法、1）Kabat（1987年及び/又は2001年）及び2）Chothia及びLesk（1987年、1989年及びAl-Lazikaniら1997年）により付番されている。Chothia及びLesk付番方式は、十分に確立されたKabat方式をベースとして、免疫グロブリン可変領域における軽鎖CDR1及び重鎖CDR1の配列長のばらつきについて、三次元構造におけるそれらの実際の位置により良く適合するように付番し直すことを試みたものである。Chothia及びLeskにより採用されたCDRに特化した付番は、その後1989年に修正されたが、次に1997年に元に戻された。これらの付番方式の間には、CDRループ内に存在する残基を取り扱う際に僅かな違いがある。

#### 【0130】

当業者は理解するであろうとおり、フレームワーク領域1内に、ひいてはCDR1に先行して、単一の高度に保存されたシステイン残基（Cys）が概して存在する。及び可変軽鎖の双方の中に、この保存されたシステインは不変的にKabat23位にあり、CDR2とCDR3との間のフレームワーク領域3として定義される領域内に不変的にKabat88位にある別の高度に保存されたシステイン残基とジスルフィド結合を形成する。しかしながら本発明は、FR1の他のアミノ酸に対する保存システインの位置を変化させ得るインデル、例えば1個、2個又は3個のアミノ酸の、概して人工的なインデルを企図する。

#### 【0131】

高度に保存されたシステインの対形成は可変重鎖では少し異なり、不変のKabat22位（FR1内）及び92位（FR3内）の保存されたシステイン間に起こる。しかしながら、この対形成は全ての免疫グロブリンでほぼ完全に保存されており、このジスルフィド結合がおそらくIgループ多様化の開始時に既に存在したと、及び選択圧下に維持されたことが示唆される。ジスルフィド結合のほぼ完全な保存は、それがIgループの安定性に大きく寄与することをさらに示唆する。

#### 【0132】

本明細書で使用されるとき、用語「相補性決定領域」（同義語CDR；すなわち、CDR1、CDR2、及びCDR3又は超可変領域）は、その存在が抗原結合に必要な、免疫グロブリン可変領域のアミノ酸残基を指す。各可変領域は典型的には、CDR1、CDR2及びCDR3として特定される3つのCDR領域を有する。各CDRは、Kabat（1987年及び/又は1991年）により定義されるとおりの「相補性決定領域」のアミノ酸残基を含み得る。例えば、重鎖可変領域では、CDRH1は残基31～35の間にあり、CDRH2は残基50～65の間にあり、及びCDRH3は残基95～102の間にある。軽鎖では、CDRL1は残基24～34の間にあり、CDRL2は残基50～56の間にあり、及びCDRL3は残基89～97の間にある。これらのCDRはまた、例えばKabat（1987年及び/又は1991年）に記載されるとおりの、多数の挿入も含み得る。

#### 【0133】

用語「定常領域」（同義語CR又は結晶性断片又はFc）は、本明細書で使用されると

10

20

30

40

50

き、少なくとも1つの定常ドメインを含む免疫グロブリンの一部であって、概して（必須ではないが）グリコシル化され、且つ1つ又は複数のF受容体及び/又は補体カスケードの成分に結合する（例えば、エフェクター機能をもたらす）部分を指す。重鎖定常領域は、5種のアイソタイプ： $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、又は $\alpha$ のいずれかから選択され得る。さらに、様々なサブクラスの重鎖（重鎖のIgGサブクラスなど）が、種々のエフェクター機能に關与し、従って所望の重鎖定常領域を選択することにより、所望のエフェクター機能を有するタンパク質を作製することができる。好ましい重鎖定常領域は、 $\gamma 1$ （IgG1）、 $\gamma 2$ （IgG2）及び $\gamma 3$ （IgG3）である。

#### 【0134】

「定常ドメイン」は、免疫グロブリンにおけるドメインであって、その配列が同種の免疫グロブリン/抗体、例えばIgG又はIgM又はIgEにおいて極めて類似しているドメインである。免疫グロブリンの定常領域は、概して複数の定常ドメインを含み、例えば、 $\gamma 1$ 及び $\gamma 2$ 重鎖の定常領域は3つの定常ドメインを含み、 $\gamma 3$ 及び $\gamma 4$ 重鎖のFcは2つの定常ドメインを含む。 $\mu$ 及び $\delta$ 重鎖の定常領域は4つの定常ドメインを含み、Fc領域は2つの定常ドメインを含む。

#### 【0135】

本明細書で使用されるとき、用語「Fv」は、複数のポリペプチドから構成されるか、又は単一のポリペプチドから構成されるかに関わらず、 $V_L$ と $V_H$ とが会合することにより、抗原結合部位を有する、すなわち抗原との特異的な結合能を有する複合体を形成する任意のタンパク質を意味するものと解釈されなければならない。抗原結合部位を形成する $V_H$ 及び $V_L$ は単一のポリペプチド鎖にあって、又は異なるポリペプチド鎖にあってよい。さらに本発明のFv（並びに本発明の任意のタンパク質）は、同じ抗原を結合しても、又はしなくてもよい複数の抗原結合部位を有し得る。この用語は、免疫グロブリンに直接由来する断片も、並びに組換え手段を用いて作製されたかかる断片に対応するタンパク質も包含するものと理解されなければならない。いくつかの例では、 $V_H$ は重鎖定常ドメイン（ $C_H$ ）1に連結されず、及び/又は $V_L$ は軽鎖定常ドメイン（ $C_L$ ）に連結されない。ポリペプチド又はタンパク質を含む例示的なFvとしては、Fab断片、Fab'断片、F(ab')断片、scFv、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ又は高次複合体、又は定常領域若しくはそのドメイン、例えば $C_H 2$ 若しくは $C_H 3$ ドメインに連結された前述のもののいずれかが挙げられる。「Fab断片」は免疫グロブリンの一価の抗原結合性断片からなり、全免疫グロブリンを酵素パインで消化することにより作製することができ、それによりインタクトな軽鎖と重鎖の一部とからなる断片が得られ、又は組換え手段を用いて作製することができる。免疫グロブリンの「Fab'断片」は、全免疫グロブリンをペプシンで処理し、続いて還元することにより得ることができ、それによりインタクトな軽鎖と重鎖の一部とからなる分子が得られる。このように処理した免疫グロブリンにつき2つのFab'断片が得られる。Fab'断片はまた、組換え手段によっても作製することができる。免疫グロブリンの「F(ab')<sub>2</sub>断片」は、2つのFab'断片が2つのジスルフィド結合により一体に保持される二量体からなり、全免疫グロブリン分子を酵素ペプシンで、続く還元はなしに処理することにより得られる。「Fab<sub>2</sub>」断片は、例えばロイシンジッパー又は $C_H 3$ ドメインを用いて連結される2つのFab断片を含む組換え断片である。「単鎖Fv」又は「scFv」は、軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域とが好適な柔軟性のあるポリペプチドリンカーにより共有結合で連結されている免疫グロブリンの可変領域断片（Fv）を含む組換え分子である。この用語の範囲内に含まれる例示的Fv含有タンパク質の詳細な考察は、本明細書で以下に提供される。

#### 【0136】

本明細書で使用されるとき、用語「抗原結合部位」は、抗原との特異的な結合能を有するタンパク質により形成される構造を意味するものと解釈されなければならない。抗原結合部位は一連の連続するアミノ酸でなくてもよく、又はさらには単一のポリペプチド鎖にあるアミノ酸でなくてもよい。例えば、2つの異なるポリペプチド鎖から作製されるFv

において、抗原結合部位は、抗原と相互作用する  $V_L$  及び  $V_H$  の一連の領域から構成されるが、しかしながら概して各可変領域で CDR の 1 つ又は複数にあるとは限らない。

【0137】

「Kabat 付番方式」は、Kabat (1987 年及び / 又は 1991 年) に提示されるとおりの免疫グロブリンの可変領域における FR 及び CDR の位置を決定する付番方式を意味する。

【0138】

用語「タンパク質」は、単一のポリペプチド鎖、すなわちペプチド結合によって連結された一連の連続するアミノ酸、又は互いに共有結合的に若しくは非共有結合的に連結された一連のポリペプチド鎖 (すなわち、ポリペプチド複合体) を含むものと解釈されなければならない。例えば、一連のポリペプチド鎖は、好適な化学結合又はジスルフィド結合を用いて共有結合的に連結されてもよい。非共有結合の例としては、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力、及び疎水性相互作用が挙げられる。本発明により企図される非共有結合は、例えば何らかの形態のダイアポディ又はトリアポディ又はテトラポディにおける  $V_H$  と  $V_L$  との間の相互作用である。

10

【0139】

用語「ポリペプチド鎖」は、前段落から、ペプチド結合により連結された一連の連続するアミノ酸を意味するように意味するものと理解されるだろう。

【0140】

当業者は、「ジスルフィド結合」がチオール基のカップリングにより形成される共有結合であることを認識するであろう。この結合は、S-S 結合又はジスルフィド架橋とも称される。タンパク質では、ジスルフィド結合は概して 2 つのシステイン残基のチオール基間で起こり、システンを生じる。

20

【0141】

当業者はまた、用語「非還元条件」が、タンパク質のスルフヒドリル (-SH) 基の酸化に十分な、例えばジスルフィド結合の形成を許容する条件を含むことを認識するであろう。

【0142】

本明細書で使用されるとき、用語「抗原」は、免疫グロブリン反応 (例えば、抗体反応) を引き起こし得る任意の組成物を意味するものと理解されなければならない。例示的抗原としては、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、リン酸基、蛍光ペプチド又はポリペプチド、グリコシル化 (glycosylated) ペプチド又はペプチド等が挙げられる。

30

【0143】

本明細書で使用されるとき、用語「特異的に結合する」は、本発明のタンパク質が特定の 1 つ又は複数の抗原又はそれを発現する細胞と、別の抗原又は細胞との反応又は会合と比べてより高い頻度で、より高速に、より長い持続時間で及び / 又はより高いアフィニティで反応又は会合することを意味するものと解釈されなければならない。例えば、抗原に特異的に結合するタンパク質は当該の抗原を、他の抗原との結合と比べてより高いアフィニティ、アビディティで、より容易に、及び / 又はより長い持続時間で結合する。また、この定義を読むことで、例えば第 1 の抗原に特異的に結合するタンパク質が第 2 の抗原に特異的に結合しても、又はしなくてもよいことが理解される。従って、「特異的な結合」は、必ずしも用語「選択的な結合性」によって意味されるように結合が排他的であること、又は別の抗原の結合が検出不可能であることを要求するものではない。必須ではないが、概して結合と言うとき、それは特異的な結合を意味し、及び各用語は他の用語の明示的な支持を提供するものと理解されなければならない。

40

【0144】

本発明のタンパク質の抗原に対する結合との関連における用語「妨害している」、「妨害する」又は「妨害」は、抗原との結合の完全な抑止又は完全な阻害を意味するものと解釈されなければならない。

50

## 【0145】

## 可変領域を含むタンパク質

本発明は、1つ又は複数の抗原に特異的又は選択的に結合し、且つ本明細書において任意の実施形態により記載されるとおり修飾される免疫グロブリン可変領域を含む任意のタンパク質を企図する。好ましいタンパク質は、少なくとも1つのV<sub>H</sub>と少なくとも1つのV<sub>L</sub>とを含む。例示的免疫グロブリン可変領域は、抗体及びその修飾された形態（例えば、ヒト化抗体）並びにラクダ科動物免疫グロブリン及びIgNARなどの重鎖抗体由来の可変領域である。

## 【0146】

## 免疫グロブリン可変領域

## 抗体可変領域

本明細書の記載に基づけば当業者には明らかとあり、本発明のタンパク質は、FR1に少なくとも2つのシステイン残基を含むように修飾された抗体由来の1つ又は複数の可変領域を含む。本発明はまた抗体分子も提供する。かかる抗体は、初めに目的の抗原に対する抗体を作製し、その抗体を（例えば組換え手段を用いて）修飾することによるか、又は既に作製されている抗体を修飾することにより作製されてもよい。

## 【0147】

抗体の作製方法は当該技術分野において公知である。例えば、ハイブリドーマ技術などのモノクローナル抗体の作製方法が、Kohler及びMilstein、（1975年）による。ハイブリドーマ法では、典型的には、マウス、ハムスター、又は他の適切な宿主動物を免疫原又は抗原又はそれを発現する細胞で免疫し、その免疫原又は抗原に特異的に結合し得る抗体を産生する、又は産生する能力を有するリンパ球を生じさせる。次に、ポリエチレングリコールなどの好適な融剤を用いて免疫化動物のリンパ球又は脾臓細胞を不死化細胞系と融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding、1986年）。得られたハイブリドーマ細胞は、融合しなかった不死化細胞の成長又は生存を阻害する1つ又は複数の物質を好ましくは含有する好適な培養培地で培養してもよい。例えば、親細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPR T又はHPRT）を欠く場合、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的にはヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含み（「HAT培地」）、これらの物質がHGPR T欠損細胞の成長を妨げる。本明細書はまた、例えば、一般的にLargoespada（1990年）又はWeisingerら（1991年）に詳細に記載されるABL-MYC技術を用いる他の抗体作製方法も企図する。

## 【0148】

或いは、抗体、又はそれをコードする配列は、目的の抗体を発現する既に作製されている細胞、例えばハイブリドーマ又はトランスフェクトーマから生成される。かかるハイブリドーマ及び/又はトランスフェクトーマの様々な供給源は当業者には明らかで、例えばAmerican Type Culture Collection（ATCC）及び/又はEuropean Collection of Cell Cultures（ECCACC）が挙げられる。抗体の可変領域をコードする配列を単離及び/又は修飾する方法は当業者には明らかで、及び/又は本明細書に記載される。

## 【0149】

抗体の作製及び/又はそれをコードする配列の単離後、抗体は、FR1において本明細書において任意の実施形態により記載されるとおりの部位にシステイン残基を含むように修飾される。概してこれは、抗体をコードする核酸を単離すること、領域をコードし、且つ修飾された抗体を発現するFR1の必要な部位に、システイン残基をコードするコドン（すなわち、TGT又はTGC）を含むようにその配列を修飾することを伴う。

## 【0150】

例示的ヒト抗体重鎖FR1配列は、QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTF T（配列番号1）；QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKVSGYTLT（配列番号2）；QMQLVQSGAEVKKTGSSVKV SCKASGY

10

20

30

40

50

TFT (配列番号3); QMQLVQSGPEVKKPGT SVKVSCKASGFTFT  
 T (配列番号4); QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS (配列番号5); QVT LKESGPV LVKPTETLT LTCTVSGFSL S (配列番号6); QIT LKESGPTLVKPTQT LTLTCTFSGFSL S (配列番号7); QVT LRESGPA LVKPTQT LTLTCTFSGFSL S (配列番号8); QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS (配列番号9); EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFS (配列番号10); EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS (配列番号11); EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFD (配列番号12); 及びEVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFS (配列番号13) からなる群から選択される配列を含む。

10

## 【0151】

例示的ヒト抗体 軽鎖FR1配列は、DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (配列番号14); DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC (配列番号15); EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC (配列番号16); EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (配列番号17); EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC (配列番号18); DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (配列番号19); DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC (配列番号20); DIVMTQSPSSLSASVGDRTITC (配列番号21); EIVMTQSPATLSLSPGERATLSC (配列番号22); DIQMTQSPDFLAVSLGERATINC (配列番号23); EIVLTQSPSSLSASVGDRTITC (配列番号24); DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC (配列番号25); DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC (配列番号26); EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC (配列番号27); ETTLTQSPA FMSATPGDKVNISC (配列番号28); AIRMTQSPFSLASVGDRTITC (配列番号29); AIQLTQSPSSLSASVGDRTITC (配列番号30); NIQMTQSPSAMSASVGDRTITC (配列番号31); DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC (配列番号32); DIVMTQTPLSSPVT LGQPASISC (配列番号33); DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITC (配列番号34); VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISC (配列番号35); 及びAIRMTQSPSSFSA STGDRVTITC (配列番号36) からなる群から選択される配列を含む。

20

30

## 【0152】

例示的ヒト抗体 軽鎖FR1配列は、QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC (配列番号37); QSVLTQPPSASGTPGQRTVITC (配列番号38); QSALTQPASVSGSPGQSITISC (配列番号39); QSALTQPRSVSGSPGQSVTISC (配列番号40); SYVLTQPPSVSVAPGKTARITC (配列番号41); SYELTQPPSVSVSPGQTASITC (配列番号42); 及びQLVLTQSPSASASLGASVKLTC (配列番号43) からなる群から選択される配列を含む。

40

## 【0153】

前述の配列は単に本発明の実施に用いられ得る配列の例示であり、かかる配列の網羅的なりすとではない。これらの例は、本発明を限定するのではなく、本発明を説明する目的で提供される。公知の方法を用いて、及び/又は例えばKabata (1987年及び/又は2001年)の開示に基づき、さらなるFR1の配列を決定することは、当業者の能力の範囲内である。

## 【0154】

FR1領域の前述の例は、本明細書において任意の例又は実施形態に記載されるとおりの位置に2つ以上のシステイン残基を含むように容易に修飾される。

## 【0155】

50

当業者は、当該技術分野における知識及び/又は本明細書に示される配列に基づき、FR1をコードする核酸の配列を決定することが容易に可能であろう。

【0156】

キメラ抗体、脱免疫化抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体

本発明のタンパク質は、ヒト化抗体又はヒト抗体又はそれに由来する可変領域に由来してもよく、又はそれであってもよい。用語「ヒト化抗体」は、キメラ分子であって、概して組換え技術を用いて調製され、非ヒト種の抗体に由来する抗原結合部位を有し、及びその分子の残りの抗体構造がヒト抗体の構造及び/又は配列に基づくキメラ分子を指すものと理解されなければならない。抗原結合部位は、好ましくは、ヒト抗体の可変領域における適切なFRにグラフトされた非ヒト抗体のCDRと、ヒト抗体の残りの領域とを含む。抗原結合部位は野生型であってもよく、又は1つ又は複数のアミノ酸置換により修飾されてもよい。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク残基が対応する非ヒト残基に置き換えられる。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体にも、又は移入されたCDR若しくはフレームワーク配列にも存在しない残基を含んでもよい。一般に、ヒト化抗体は、CDR領域の全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである少なくとも1つ、典型的には2つの可変領域の実質的に全てを含み得る。非ヒト抗体をヒト化する方法は当該技術分野において公知である。ヒト化は、本質的に、米国特許第5225539号明細書、米国特許第6054297号明細書又は米国特許第5585089号明細書の方法に従い実施することができる。他の抗体のヒト化方法が除外されることはない。当業者は、完全抗体でない本発明のタンパク質もまたヒト化することができ、例えば、可変ドメインがヒト化されてもよいことを理解するであろう。

10

20

【0157】

用語「ヒト抗体」は、抗体分子及び結合タンパク質との関連において本明細書で使われるとき、ヒト、例えばヒト生殖細胞系列又は体細胞に存在する配列に由来する、又はそれに対応する可変抗体領域、及び場合により定常抗体領域を有する抗体を指す。「ヒト」抗体は、ヒト配列によりコードされないアミノ酸残基、例えばランダム又は部位特異的変異によりインピットで導入された変異（特に保存的置換が関与する変異又は抗体の少数の残基における変異、例えば抗体の残基の1、2、3、4又は5個における変異、好ましくは例えば抗体のCDRの1つ又は複数を構成する残基の1、2、3、4又は5個における変異）を含み得る。これらの「ヒト抗体」は、実際にヒトによって産生される必要はなく、むしろ、組換え手段を用いて作製されても、及び/又はヒト抗体定常領域及び/又は可変領域をコードする核酸を含むトランスジェニック動物（例えば、マウス）から単離されてもよい。ヒト抗体又はその断片は、ファージディスプレイライブラリ（例えば、米国特許第6300064号明細書；米国特許第5885793号明細書；米国特許第6204023号明細書；米国特許第6291158号明細書；又は米国特許第6248516号明細書に記載されるとおり）を含めた、当該技術分野において公知の様々な技術を用いて、又はヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニック動物を使用して（例えば、国際公開第2002/066630号パンフレット；Lonbergら（1994年）又はJakobovitsら（2007年）に記載されるとおり）作製することができる。

30

40

【0158】

一例において本発明のタンパク質はキメラ抗体又はその一部、例えばFab断片である。用語「キメラ抗体」は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種（例えば、マウスなどのネズミ科動物）に由来するか、又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同であり、一方、1つ又は複数の鎖の残りの部分が、別の種（例えば、ヒトなどの霊長類）に由来するか、又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同である抗体、並びにかかる抗体の断片を、それらが所望の生物活性を呈する限りにおいて指す（米国特許第4,816,567号明細書）。典型的には、キメラ抗体は、主にヒトドメインを有する抗体を作製するために

50

、げっ歯類又はウサギ可変領域とヒト定常領域とを利用する。例えば、キメラ抗体は、ヒト定常ドメイン及び/又はヒト定常領域に融合した本発明の任意の実施形態により修飾されたマウス抗体の可変領域を含む。かかるキメラの抗体の作製は当該技術分野において公知であり、標準的な手段によって実現され得る（例えば、米国特許第5,807,715号明細書；米国特許第4,816,567号明細書及び米国特許第4,816,397号明細書に記載のとおり）。

【0159】

本発明はまた、脱免疫化タンパク質も企図する。脱免疫化タンパク質は、対象がそのタンパク質に対して免疫応答を生じる可能性を低減するため除去された（すなわち変異させた）1つ又は複数のエピトープ、例えばB細胞エピトープ又はT細胞エピトープを有する。脱免疫化タンパク質の作製方法は当該技術分野において公知であり、例えば、国際公開第00/34317号パンフレット、国際公開第2004/108158号パンフレット及び国際公開第2004/064724号パンフレットに記載される。例えば、この方法は、タンパク質におけるエピトープを予測するためインシリコ解析を実施するステップと、予測されたエピトープにおける1つ又は複数の残基を変異させ、それによりその免疫原性を低下させるステップとを含む。次にタンパク質が、例えばインシリコ又はインビトロ又はインビボで分析され、抗原に結合するその能力を維持していることが確認される。好ましくはCDR内に存在するエピトープを変異させることは、その変異が抗原結合性を低下させる可能性が低い限り行わない。抗原の予測方法は当該技術分野において公知であり、例えばSaha（2004年）に記載される。AVP04-07における例示的な候補エピトープは、配列番号55の以下の位置：35～41；68～77；84～90；109～119；122～128；160～169；及び185～194に存在する。免疫原性が潜在的に低下するように変異させ得る残基としては、K38、T71、A72、K74、T87、T112、V113、S114、S115、G116、T125、Q163、Q164、P166、F188、T189、G190又はS191が挙げられる。

【0160】

重鎖免疫グロブリン

重鎖免疫グロブリンは、それが重鎖を含み、しかし軽鎖を含まない限りにおいて、構造的に多くの他の形態の免疫グロブリン（例えば、抗体）と異なる。従って、このような免疫グロブリンは「重鎖のみの抗体（heavy chain only antibody）」とも称される。重鎖免疫グロブリンは、例えばラクダ科動物及び軟骨魚類（IgNARとも称される）に見られる。

【0161】

天然に存在する重鎖免疫グロブリンに存在する可変領域は、従来4本鎖抗体に存在する重鎖可変領域（「V<sub>H</sub>ドメイン」と称される）及び従来4本鎖抗体に存在する軽鎖可変領域（「V<sub>L</sub>ドメイン」と称される）と区別するため、概してラクダ科動物Igにおいて「V<sub>H</sub>Hドメイン」、及びIgNARにおいてV-NARと称される。

【0162】

重鎖免疫グロブリンは、関連抗原との高アフィニティ且つ高特異性での結合に軽鎖の存在を必要としない。この特徴によって重鎖免疫グロブリンは、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>の双方のドメインを含むいくつかの従来4本鎖抗体と区別される。これは、単一のドメイン結合断片が重鎖免疫グロブリンに由来できることを意味し、重鎖免疫グロブリンは発現し易く、概して安定的で可溶性である。重鎖免疫グロブリン及びその可変領域ドメインであって、それに由来するドメインはまた、長い表面ループ（特にCDR3）も含むことができ、これは、酵素などの抗原に、並びに感染症の原因となるウイルス及び病原体のタンパク質の表面上に多く見られる空洞の貫通及びそれに対する結合を促進する。

【0163】

ラクダ科動物由来の重鎖免疫グロブリン及びその可変領域並びにその作製及び/又は単離及び/又は使用方法についての概要は、特に以下の参考文献、国際公開第94/04678号パンフレット、国際公開第97/49805号パンフレット及び国際公開第97/

10

20

30

40

50

49805号パンフレットに見出される。

【0164】

ラクダ科動物由来の重鎖免疫グロブリンからのフレームワーク1ドメインの例示的配列としては、以下のもの、すなわちGGSVQTGGSLRLSCEISGLTFD(配列番号44);GGSVQTGGSLRLSCAVSGFSFS(配列番号45);GGSEQGGGSLRLSCAISGYTYG(配列番号46);GGSVQPGGSLTLLSCTVSGATYS(配列番号47);GGSVQAGGSLRLSCTGSGFPYS(配列番号48);GGSVQAGGSLRLSCVAGFGTSS(配列番号49);及びGGSVQAGGSLRLSCVSPSS(配列番号50)が挙げられる。

【0165】

軟骨魚類由来の重鎖免疫グロブリン及びその可変領域並びにその作製及び/又は単離及び/又は使用方法についての概要は、特に国際公開第2005/118629号パンフレットに見出される。3型アブラツノザメIgNARFR1の例示的コンセンサス配列は、配列AWVEQTPRTAKETGESLTINCVLT(配列番号51)を含む。3型テンジクザメIgNARFR1の例示的コンセンサス配列は、配列ARVDQTPKTTITKETGESLTINCVLS(配列番号52)を含む。

【0166】

可変領域を含むタンパク質

ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ

免疫グロブリン可変領域を含む例示的な好ましいタンパク質は、国際公開第98/044001号パンフレット及び国際公開第94/007921号パンフレットに記載されるものなどの、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ及び高次タンパク質複合体である。

【0167】

本明細書で使用されるとき、用語「ダイアボディ」は、2つの会合したポリペプチド鎖であって、各々が構造 $V_L - X - V_H$ 又は $V_H - X - V_L$ を含むポリペプチド鎖を含むタンパク質を意味するものと解釈されなければならない、式中、 $V_L$ は免疫グロブリン軽鎖可変領域であり、 $V_H$ は免疫グロブリン重鎖可変領域であり、 $X$ は、単一のポリペプチド鎖内の $V_H$ と $V_L$ との会合(又はFvの形成)を可能にするには不十分な残基を含むリンカーであるか、又は存在せず、及び一方のポリペプチド鎖の $V_H$ が他方のポリペプチド鎖の $V_L$ に結合して抗原結合部位を形成し、すなわち、1つ又は複数の抗原との特異的な結合能を有するFv分子を形成する。 $V_L$ 及び $V_H$ は各ポリペプチド鎖で同じである可能性があり、又は $V_L$ 及び $V_H$ は各ポリペプチド鎖で異なり、二重特異性ダイアボディ(すなわち、異なる特異性を有する2つのFvを含む)を形成する可能性がある。

【0168】

本明細書で使用されるとき、用語「トリアボディ」は、3つの会合したポリペプチド鎖であって、各々が構造 $V_L - X - V_H$ 又は $V_H - X - V_L$ を含むポリペプチド鎖を含むタンパク質を意味するものと解釈されなければならない、式中、 $V_L$ は免疫グロブリン軽鎖可変領域であり、 $V_H$ は免疫グロブリン重鎖可変領域であり、 $X$ は、単一のポリペプチド鎖内の $V_H$ と $V_L$ との会合(又はFvの形成)を可能にするには不十分な残基を含むリンカーであるか、又は存在せず、及び一つのポリペプチド鎖の $V_H$ が別のポリペプチド鎖の $V_L$ と会合し、それにより三量体タンパク質(トリアボディ)を形成する。例えば、第1のポリペプチド鎖の $V_H$ が第2のポリペプチド鎖の $V_L$ と会合し、第2のポリペプチド鎖の $V_H$ が第3のポリペプチド鎖の $V_L$ と会合し、及び第3のポリペプチド鎖の $V_H$ が第1のポリペプチド鎖の $V_L$ と会合する。 $V_L$ と $V_H$ とが会合することにより、抗原結合部位、すなわち1つ又は複数の抗原との特異的な結合能を有するFvが形成される。 $V_L$ 及び $V_H$ は各ポリペプチド鎖で同じである可能性があり(すなわち、単一特異性トリアボディが生じる)、又は $V_L$ のうちの2つ及び $V_H$ のうちの2つが同じで、且つ各々における第3のものが第3のポリペプチド鎖において異なることで二重特異性タンパク質を生じる可能性があり、又は各ポリペプチド鎖で $V_L$ 及び $V_H$ が異なり、それにより三価のタンパク質を

10

20

30

40

50

形成する可能性がある。

【0169】

本明細書で使用されるとき、用語「テトラボディ」は、4つの会合したポリペプチド鎖であって、各々が構造 $V_L - X - V_H$ 又は $V_H - X - V_L$ を含むポリペプチド鎖を含むタンパク質を意味するものと解釈されなければならない。式中、 $V_L$ は免疫グロブリン軽鎖可変領域であり、 $V_H$ は免疫グロブリン重鎖可変領域であり、 $X$ は、単一のポリペプチド鎖内の $V_H$ と $V_L$ との会合（又はFvの形成）を可能にするには不十分な残基を含むリンカーであるか、又は存在せず、及び一つのポリペプチド鎖の $V_H$ が別のポリペプチド鎖の $V_L$ と会合し、それにより四量体タンパク質（テトラボディ）を形成する。 $V_L$ と $V_H$ とが会合することにより、抗原結合部位、すなわち1つ又は複数の抗原との特異的な結合能を有するFvが形成される。例えば、第1のポリペプチド鎖の $V_H$ が第2のポリペプチド鎖の $V_L$ と会合し、第2のポリペプチド鎖の $V_H$ が第3のポリペプチド鎖の $V_L$ と会合し、第3のポリペプチド鎖の $V_H$ が第4のポリペプチド鎖の $V_L$ と会合し、及び第4のポリペプチド鎖の $V_H$ が第1のポリペプチド鎖の $V_L$ と会合する。 $V_L$ 及び $V_H$ は各ポリペプチド鎖で同じである可能性があり（すなわち、単一特異性テトラボディが生じる）、又は $V_L$ 及び $V_H$ は2本のポリペプチド鎖において異なるタイプで、且つ他の2本のポリペプチド鎖において異なるタイプであって、二重特異性テトラボディを生じる可能性があり、又は $V_L$ 及び $V_H$ は各ポリペプチド鎖で異なり、それにより四重特異性テトラボディを形成する可能性がある。

10

【0170】

当業者は、ダイアボディ、トリアボディ及び/又はテトラボディ並びにそれらの作製方法を認識しているであろう。概してこれらのタンパク質は、 $V_H$ と $V_L$ とが直接連結された、又は $V_H$ と $V_L$ との会合を可能にするには不十分な長さのリンカーを用いて連結されたポリペプチド鎖を含む。 $V_H$ 及び $V_L$ は任意の順序で、すなわち $V_L - V_H$ 又は $V_H - V_L$ で位置することができる。 $V_H$ 及び $V_L$ は、例えば、それらのポリペプチド鎖をコードする核酸を、目的の1つ又は複数の可変領域を含む免疫グロブリン（抗体又はキメラ抗体又はヒト化抗体又はヒト抗体を含む）を発現する細胞から、又は $V_H$ 及び $V_L$ ポリペプチド鎖を発現する組換えライブラリ（例えば、scFvライブラリ、例えば、欧州特許第0239400号明細書又は米国特許第4946778号明細書に記載のとおり）から単離することにより容易に得られる。次に $V_H$ 及び/又は $V_L$ は、本明細書において任意の実施形態により記載されるとおりの必要なシステイン残基を含むように容易に修飾することができる。

20

30

【0171】

$V_H$ 及び $V_L$ を含むタンパク質は会合し、リンカー（存在する場合）の長さ及び/又は $V_H$ 及び $V_L$ ドメインの順序に応じてダイアボディ、トリアボディ及び/又はテトラボディを形成する。好ましくは、リンカーは12個以下のアミノ酸を含む。例えば、NからCの順序に並んだ以下の構造 $V_H - X - V_L$ （式中、 $X$ はリンカーである）を有するポリペプチド鎖の場合、3～12残基を有するリンカーは、概してダイアボディの形成をもたらす、1又は2残基を有するリンカーは、又はリンカーが存在しない場合、概してトリアボディの形成をもたらす。NからCの順序で並んだ以下の構造 $V_L - X - V_H$ （式中、 $X$ はリンカーである）を有するポリペプチド鎖の場合、3～12残基を有するリンカーは、概してダイアボディの形成をもたらす、1又は2残基を有するリンカーは、概してダイアボディ、トリアボディ及びテトラボディの形成をもたらす、及びリンカーを欠くポリペプチドは、概してトリアボディ又はテトラボディを形成する。

40

【0172】

融合タンパク質において使用されるリンカーは当該技術分野において公知である。リンカー配列組成物は、融合タンパク質のフォールディングの安定性に影響し得る。融合タンパク質と無関係なリンカーを介したタンパク質の間接的な融合により、2つのタンパク質間の立体障害が回避され、連結の自由度が達成される。

【0173】

50

ヘリックス構造又は ストランド構造をとる傾向が強いリンカー配列を有することは好ましくないことが多く、これらの構造はタンパク質の柔軟性、及び結果的にその機能的活性を制限し得る。むしろ、より望ましいリンカーは、拡がったコンホメーションを選択的にとる配列である。実際、ごく最近に設計されたリンカー配列は、リンカーに強制的にループコンホメーションをとらせる高含量のグリシン残基を有する。概して設計リンカーではグリシンが使用され、これは、 $\beta$ -炭素がないことにより、ポリペプチド骨格が、他のアミノ酸にはエネルギー的に禁じられた二面角にアクセス可能となるためである。

【0174】

一実施形態において、リンカーはグリシンリッチリンカーである。好ましくは、リンカーは、アラニン及び/又はセリンをさらに含むグリシンリンカーである。かかるリンカーは柔軟性を提供し、親水性を高め、及び比較的プロテアーゼ耐性が高い。例えば、Korttら、2001年を参照のこと。

10

【0175】

グリシンによって付与されるコンホメーション上の柔軟性は、タンパク質のC末端とリンカーのN末端との間の接合部に重要であり得る。従って、タンパク質のC末端に隣接する領域にグリシンを含むリンカーが好ましい。これに関連して、これはリンカーの第1のアミノ酸残基がグリシンでなければならないという要件を付与するものではない。

【0176】

プロリン残基をリンカーに組み込み、リンカーによる有意な二次構造要素の形成を妨げることができる。例えば、リンカーは配列  $Gly_n - Pro - Gly_n$  を含む(式中、 $n$  は約1~約5の数字である)。

20

【0177】

好ましいリンカーは、G; GG; GGG; GGGG (配列番号134); GGGGS (配列番号135); S; SG; SGG; 及びSGGGからなる群から選択される配列を含む。

【0178】

ダイアボディ及び高次多量体はまた、例えば、国際公開第2006/113665号パンフレットに記載されるとおり、例えばタンパク質間のジスルフィド結合による、共有結合で連結されたタンパク質も含むことができる。

【0179】

多重特異性ダイアボディ及び高次多量体は、短鎖リンカーによってある免疫グロブリンの $V_L$ ドメインに接続する別の免疫グロブリンからの $V_H$ ドメインを含む2つの単鎖融合産物を非共有結合的に会合させて、それにより各々が異なる免疫グロブリン由来の2つのFvを形成することにより作製することができる。例えば、Hudson及びKortt(1999年)を参照のこと。同様に、多重特異性トリアボディは、3つの単鎖融合タンパク質を以下のとおり非共有結合的に会合させることにより作製することができる:

30

(i) 短鎖リンカーにより第2の免疫グロブリンの $V_L$ ドメインに接続する第1の免疫グロブリンからの $V_H$ ドメインを含む第1のタンパク質;

(ii) 短鎖リンカーにより第3の免疫グロブリンの $V_L$ ドメインに接続する第2の免疫グロブリンからの $V_H$ ドメインを含む第2のタンパク質; 及び

40

(iii) 短鎖リンカーにより第1の免疫グロブリンの $V_L$ ドメインに接続する第3の免疫グロブリンからの $V_H$ ドメインを含む第3のタンパク質。

【0180】

当業者は、二重特異性トリアボディ、二重特異性テトラボディ、三重特異性テトラボディ及び四重特異性テトラボディを作製するための上記に対する好適な修飾を判断することが容易に可能であろう。

【0181】

本発明は、任意の抗原又はそれらの組み合わせに対するダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ又は高次多量体を企図し、特定の抗原に結合するものに限定されると解釈されてはならない。例示的抗原が、限定ではなく、例示を目的として本明細書に記載される

50

。

## 【0182】

例示的ダイアポディ、トリアポディ及び/又はテトラポディは、配列番号55のアミノ酸1~115又は配列番号59のアミノ酸1~129又は配列番号61のアミノ酸1~120又は配列番号109のアミノ酸1~129に示されるV<sub>H</sub>配列であって、FR1における2つ以上のシステイン残基及び/又はN末端スレオニン/セリン残基を含むように修飾されるV<sub>H</sub>配列を含む。例えば、V<sub>H</sub>は、

- (i) 配列番号57のアミノ酸1~115;
- (ii) 配列番号63のアミノ酸1~115;
- (iii) 配列番号75のアミノ酸1~115;
- (iv) 配列番号77のアミノ酸1~115;
- (v) 配列番号99のアミノ酸1~115;
- (vi) 配列番号65のアミノ酸1~129;
- (vii) 配列番号87のアミノ酸1~129;
- (viii) 配列番号89のアミノ酸1~129;
- (ix) 配列番号91のアミノ酸1~129;
- (x) 配列番号93のアミノ酸1~129;
- (xi) 配列番号97のアミノ酸1~129;
- (xii) 配列番号79のアミノ酸1~120;
- (xiii) 配列番号81のアミノ酸1~120;
- (xiv) 配列番号83のアミノ酸1~120;
- (xv) 配列番号85のアミノ酸1~120;及び/又は
- (xvi) 配列番号95のアミノ酸1~120

に示される配列を含む。

## 【0183】

ダイアポディ、トリアポディ及び/又はテトラポディは、配列番号55のアミノ酸121~234又は配列番号59のアミノ酸135~245又は配列番号61のアミノ酸126~232又は配列番号109のアミノ酸135~245に示されるV<sub>L</sub>配列であって、FR1における2つ以上のシステイン残基及び/又はN末端スレオニン/セリン残基を含むように修飾されるV<sub>L</sub>配列を含む。例えば、V<sub>L</sub>は、

- (i) 配列番号57のアミノ酸121~234;
- (ii) 配列番号63のアミノ酸121~234;
- (iii) 配列番号75のアミノ酸121~234;
- (iv) 配列番号77のアミノ酸121~234;
- (v) 配列番号99のアミノ酸121~234;
- (vi) 配列番号65のアミノ酸135~245;
- (vii) 配列番号87のアミノ酸135~245;
- (viii) 配列番号89のアミノ酸135~245;
- (ix) 配列番号91のアミノ酸135~245;
- (x) 配列番号93のアミノ酸135~245;
- (xi) 配列番号97のアミノ酸135~245;
- (xii) 配列番号79のアミノ酸126~232;
- (xiii) 配列番号81のアミノ酸126~232;
- (xiv) 配列番号83のアミノ酸126~232;
- (xv) 配列番号85のアミノ酸126~232;及び/又は
- (xvi) 配列番号95のアミノ酸126~232

に示される配列を含む。

## 【0184】

上記段落に記載されるV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>は任意の順序で並び、本明細書に記載されるとおりの好適なリンカーにより連結されることができる。ダイアポディについては、リンカーは

好ましくは配列 G G G S を含む。トリアポディ又はテトラポディについては、好ましくはリンカーはないか、又は単一のグリシン残基である。

【 0 1 8 5 】

一例において、ダイアポディは T A G 7 2 に結合し、F R 1 における 2 つ以上のシステイン残基及び / 又は N 末端スレオニン / セリン残基を含むように修飾される配列番号 5 5 に示される配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチド鎖 ( 及び好ましくは各々がそのような配列を含む 2 つのポリペプチド鎖 ) を含む。例えば、ダイアポディは、配列番号 5 7、6 3、7 5、7 7 又は 7 9 の 1 つ又は複数に示される配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチド鎖 ( 及び好ましくは各々がそのような配列を含む 2 つのポリペプチド鎖 ) を含む。

【 0 1 8 6 】

一例において、トリアポディは T A G 7 2 に結合し、配列番号 1 0 2 に示される配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチド鎖 ( 及び好ましくは各々がそのような配列を含む 2 つ又は 3 つのポリペプチド鎖 ) を含む。

【 0 1 8 7 】

別の例において、ダイアポディは H e r 2 に結合し、F R 1 における 2 つ以上のシステイン残基及び / 又は N 末端スレオニン / セリン残基を含むように修飾される配列番号 1 0 9 に示される配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチド鎖 ( 及び好ましくは各々がそのような配列を含む 2 つのポリペプチド鎖 ) を含む。例えば、ダイアポディは、配列番号 6 5、8 7、8 9、9 1、9 3 又は 9 7 の 1 つ又は複数に示される配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチド鎖 ( 及び好ましくは各々がそのような配列を含む 2 つのポリペプチド鎖 ) を含む。

【 0 1 8 8 】

別の例において、ダイアポディは M U C 1 に結合し、F R 1 における 2 つ以上のシステイン残基及び / 又は N 末端スレオニン / セリン残基を含むように修飾される配列番号 6 1 に示される配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチド鎖 ( 及び好ましくは各々がそのような配列を含む 2 つのポリペプチド鎖 ) を含む。例えば、ダイアポディは、配列番号 7 9、8 1、8 3、8 5 又は 9 5 の 1 つ又は複数に示される配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチド鎖 ( 及び好ましくは各々がそのような配列を含む 2 つのポリペプチド鎖 ) を含む。

【 0 1 8 9 】

単鎖 F v ( s c F v ) 断片

当業者は、s c F v が単一のポリペプチド鎖に V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域を含むことを認識するであろう。好ましくは、ポリペプチド鎖は V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> との間にポリペプチドリンカーをさらに含み、それにより s c F v が抗原結合に望ましい構造を形成する ( すなわち、単一のポリペプチド鎖の V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> とが互いに会合して F v を形成する ) ことが可能となる。これは、異なるポリペプチド鎖からの可変領域が互いに会合又は結合するダイアポディ又は高次多量体とは区別される。例えば、リンカーは、より s c F v に好適なリンカーの 1 つである ( G l y<sub>4</sub> S e r )<sub>3</sub> ( すなわち G G G G S G G G G S G G G G S ( 配列番号 5 3 ) ) を有する過剰の 1 2 アミノ酸残基を含む。

【 0 1 9 0 】

例示的 s c F v は、配列番号 5 5 のアミノ酸 1 ~ 1 1 5 又は配列番号 5 9 のアミノ酸 1 ~ 1 2 9 又は配列番号 6 1 のアミノ酸 1 ~ 1 2 0 又は配列番号 1 0 9 のアミノ酸 1 ~ 1 2 9 に示される V<sub>H</sub> 配列であって、F R 1 における 2 つ以上のシステイン残基及び / 又は N 末端スレオニン / セリン残基を含むように修飾される V<sub>H</sub> 配列を含む。一例において、s c F v は T A G 7 2 に結合し、V<sub>H</sub> は、

- ( i ) 配列番号 5 7 のアミノ酸 1 ~ 1 1 5 ;
  - ( i i ) 配列番号 6 3 のアミノ酸 1 ~ 1 1 5 ;
  - ( i i i ) 配列番号 7 5 のアミノ酸 1 ~ 1 1 5 ;
  - ( i v ) 配列番号 7 7 のアミノ酸 1 ~ 1 1 5 ; 又は
  - ( v ) 配列番号 9 9 のアミノ酸 1 ~ 1 1 5 ;
- の 1 つに示される配列を含み、及び V<sub>L</sub> は、

10

20

30

40

50

( i ) 配列番号 57 のアミノ酸 121 ~ 234 ;  
 ( i i ) 配列番号 63 のアミノ酸 121 ~ 234 ;  
 ( i i i ) 配列番号 75 のアミノ酸 121 ~ 234 ;  
 ( i v ) 配列番号 77 のアミノ酸 121 ~ 234 ; 又は  
 ( v ) 配列番号 99 のアミノ酸 121 ~ 234  
 の 1 つに示される配列を含む。

## 【 0 1 9 1 】

一例において、s c F v は T A G 7 2 に結合し、配列番号 1 0 1 に示される配列を含む。

## 【 0 1 9 2 】

別の例において、s c F v は H e r 2 に結合し、V<sub>H</sub> は、

( i ) 配列番号 65 のアミノ酸 1 ~ 129 ;  
 ( i i ) 配列番号 87 のアミノ酸 1 ~ 129 ;  
 ( i i i ) 配列番号 89 のアミノ酸 1 ~ 129 ;  
 ( i v ) 配列番号 91 のアミノ酸 1 ~ 129 ;  
 ( v ) 配列番号 93 のアミノ酸 1 ~ 129 ; 又は  
 ( v i ) 配列番号 97 のアミノ酸 1 ~ 129

の 1 つに示される配列を含み、及び V<sub>L</sub> は、

( i ) 配列番号 65 のアミノ酸 135 ~ 245 ;  
 ( i i ) 配列番号 87 のアミノ酸 135 ~ 245 ;  
 ( i i i ) 配列番号 89 のアミノ酸 135 ~ 245 ;  
 ( i v ) 配列番号 91 のアミノ酸 135 ~ 245 ;  
 ( v ) 配列番号 93 のアミノ酸 135 ~ 245 ; 又は  
 ( v i ) 配列番号 97 のアミノ酸 135 ~ 245

の 1 つに示される配列を含む。

## 【 0 1 9 3 】

別の例において、s c F v は H E R 2 に結合し、配列番号 1 0 5 に示される配列を含む。

## 【 0 1 9 4 】

さらなる例において、s c F v は M U C 1 に結合し、V<sub>H</sub> は、

( i ) 配列番号 79 のアミノ酸 1 ~ 120 ;  
 ( i i ) 配列番号 81 のアミノ酸 1 ~ 120 ;  
 ( i i i ) 配列番号 83 のアミノ酸 1 ~ 120 ;  
 ( i v ) 配列番号 85 のアミノ酸 1 ~ 120 ; 又は  
 ( v ) 配列番号 95 のアミノ酸 1 ~ 120

の 1 つに示される配列を含み、及び V<sub>L</sub> は、

( i ) 配列番号 79 のアミノ酸 126 ~ 232 ;  
 ( i i ) 配列番号 81 のアミノ酸 126 ~ 232 ;  
 ( i i i ) 配列番号 83 のアミノ酸 126 ~ 232 ;  
 ( i v ) 配列番号 85 のアミノ酸 126 ~ 232 ; 又は  
 ( v ) 配列番号 95 のアミノ酸 126 ~ 232

の 1 つに示される配列を含む。

## 【 0 1 9 5 】

本発明はまた、ジスルフィド安定化 F v ( 又は d i F v 又は d s F v ) も企図し、ここでは単一のシステイン残基が V<sub>H</sub> の F R 及び V<sub>L</sub> の F R に導入され、及びそれらのシステイン残基がジスルフィド結合によって連結され、安定的な F v をもたらず ( 例えば、B r i n k m a n n ら、1993 年を参照のこと ) 。

## 【 0 1 9 6 】

それに代えて又は加えて、本発明は、二量体 s c F v 、すなわち非共有結合性又は共有結合性の連結鎖によって連結された 2 つの s c F v 分子を含むタンパク質を提供する。か

10

20

30

40

50

かる二量体 s c F v の例としては、例えば、ロイシンジッパードメイン（例えば、F o s 又は J u n に由来する）に連結された 2 つの s c F v であって、それによりロイシンジッパードメインが会合して二量体化合物を形成するものが挙げられる（例えば、K o s t e l n y 1992 年又は K r u i f 及び L o g t e n b e r g、1996 年を参照のこと）。或いは、例えば米国特許出願公開第 20060263367 号明細書に記載されるとおり、2 つの s c F v は、双方の s c F v の形成及び抗原との結合を可能にするのに十分な長さのペプチドリンカーによって連結される。さらなる例において、例えば A l b r e c h t ら（2004 年）に記載されるとおり、各 s c F v がシステイン残基を例えばリンカー領域に、又は末端に含むように修飾され、それらの s c F v がジスルフィド結合によって連結される。

10

## 【0197】

本発明はまた、修飾された形態の s c F v、例えば米国特許第 623322 号明細書に記載されるとおりの、例えばグリコシル化が可能であるように修飾されたリンカーを含む s c F v も企図する。

## 【0198】

当業者は、本明細書における開示に基づき s c F v 又は本発明に係る好適な修飾 V<sub>H</sub> 及び / 又は V<sub>L</sub> を含むその修飾された形態を作製することが容易に可能であろう。V<sub>H</sub> 及び / 又は V<sub>L</sub> の例示的配列が本明細書に記載され、それらは本発明のこの実施形態に準用されるものと解釈されるべきである。

20

## 【0199】

s c F v についてのさらなる説明は、例えば米国特許第 5260203 号明細書に見出される。

## 【0200】

## ミニボディ

当業者は、ミニボディが、免疫グロブリンの C<sub>H</sub>2 及び / 又は C<sub>H</sub>3 ドメインに融合した免疫グロブリンの V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメインを含むことを認識するであろう。場合により、ミニボディは V<sub>H</sub> と V<sub>L</sub> との間にヒンジ領域を含み、時にこのコンホメーションはフレックスミニボディ (F l e x M i n i b o d y) (H u r a、1996 年) と称される。ミニボディは C<sub>H</sub>1 又は C<sub>L</sub> を含まない。好ましくは、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメインは免疫グロブリンのヒンジ領域と C<sub>H</sub>3 ドメインとに融合する。領域の各々は、同じ免疫グロブリンに由来してもよい。或いは、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメインが一つの免疫グロブリンに由来し、ヒンジ及び C<sub>H</sub>2 / C<sub>H</sub>3 が別の免疫グロブリンに由来する可能性があり、又はさらにヒンジと C<sub>H</sub>2 / C<sub>H</sub>3 とが異なる免疫グロブリンに由来する可能性がある。本発明はまた、一つの免疫グロブリン由来の V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> と、別の免疫グロブリン由来の V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> とを含む多重特異性ミニボディも企図する。前記ミニボディの可変領域の少なくとも一つは、本明細書に記載されるとおり F R 1 にシステイン残基を含む。

30

## 【0201】

当業者は、当該技術分野において公知の方法を、本明細書に提供される教示と併せて用いることにより、本発明のミニボディを作製することが容易に可能であろう。

## 【0202】

上記に基づけば、当業者は、ミニボディが、抗原結合領域と、二価分子となる構築を可能にする C<sub>H</sub>3 ドメイン（又は C<sub>H</sub>2 ドメイン）と、ジスルフィド結合による二量体化に適応する免疫グロブリンヒンジとを保持する単一のタンパク質鎖においてコードされる全免疫グロブリンの小型版であることを理解するであろう。

40

## 【0203】

例示的ミニボディ及びその作製方法は、例えば国際公開第 94 / 09817 号パンフレットに記載されている。

## 【0204】

その他の可変領域を含むタンパク質

米国特許第 5,731,168 号明細書は、組換え細胞培養物から回収され、それによ

50

り二重特異性タンパク質を生じるヘテロ二量体の割合が最大化されるように、一对のF<sub>v</sub>間の接合部分が操作された分子について記載している。好ましい接合部分は、C<sub>H</sub>3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1のタンパク質の接合部分の1つ又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きい側鎖〔例えば、チロシン又はトリプトファン〕に置き換えられる。第2のタンパク質の接合部分に対しては、大きいアミノ酸側鎖がより小さい側鎖（例えば、アラニン又はスレオニン）に置き換えられることにより、1つ又は複数の大きい側鎖と同じ又は類似したサイズの補償的な「キャビティ」が設けられる。

#### 【0205】

可変領域を含む二重特異性タンパク質は、架橋された、又は「ヘテロコンジュゲート」タンパク質を含む。例えば、ヘテロコンジュゲート中のタンパク質の一方をアビジンとカップリングし、他方をビオチンとカップリングすることができる。かかるタンパク質は、例えば、免疫系細胞を望ましくない細胞に標的化するために提案されている（米国特許第4,676,980号明細書）。可変領域を含むヘテロコンジュゲートタンパク質は、任意の好都合な架橋方法を用いて作製され得る。好適な架橋剤は当該技術分野において公知であり、数多くの架橋技法と共に、米国特許第4,676,980号明細書に記載されている。

10

#### 【0206】

可変領域を含む二重特異性タンパク質はまた、化学的連結を用いて調製することもできる。Brennan（1985年）は、インタクトな抗体をタンパク質分解により切断してF(ab')<sub>2</sub>断片を生成する手順を記載する。これらの断片をジチオール錯生成剤の亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元すると、隣接ジチオールが安定化し、分子間ジスルフィドの形成が抑制される。次に生成されたFab'断片がチオニトロ安息香酸（TNB）誘導体に変換される。次にFab'-TNB誘導体の一つをメルカプトエチルアミンで還元することによりFab'-チオールに再度変換し、等モル量の他のFab'-TNB誘導体と混合することで、二重特異性タンパク質が形成される。

20

#### 【0207】

進歩により、大腸菌（E.coli）からのFab'-SH断片の直接回収が容易になり、これを化学的にカップリングして、可変領域を含む二重特異性タンパク質を形成することができる。Shalaby（1992年）は、完全ヒト化二重特異性F(ab')<sub>2</sub>分子の作製について記載している。各Fab'断片を大腸菌（E.coli）から別個に分泌させ、インピトロで特異的な化学カップリングに供することにより、可変領域を含む二重特異性タンパク質を形成した。このように形成された二重特異性タンパク質は、関連抗原を発現する細胞及び正常ヒトT細胞に結合することが可能であったとともに、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を惹起する。

30

#### 【0208】

さらなる可変領域を含むタンパク質としては、例えば、ドメイン抗体（dAb）及びその融合物（例えば、米国特許第6248516号明細書に記載されるとおり）、単鎖Fab（例えば、Hustら、2007年）又はFab<sub>3</sub>（例えば、欧州特許第19930302894号明細書に記載されるとおり）が挙げられる。

#### 【0209】

##### 定常ドメイン融合物

本発明は、可変領域と定常領域（例えばFc）又はそのドメイン、例えばC<sub>H</sub>2及び/又はC<sub>H</sub>3ドメインとを含むタンパク質を包含する。例えば、本発明は、ミニボディ（上記に考察されるとおり）又はscFv-Fc融合物又はダイアボディ-Fc融合物又はトリアボディ-Fc融合物又はテトラボディ-Fc融合物又はscFc-C<sub>H</sub>2融合物又はダイアボディ-C<sub>H</sub>2融合物又はトリアボディ-C<sub>H</sub>2融合物又はテトラボディ-C<sub>H</sub>2融合物又はscFv-C<sub>H</sub>3融合物又はダイアボディ-C<sub>H</sub>3融合物又はトリアボディ-C<sub>H</sub>3融合物又はテトラボディ-C<sub>H</sub>3融合物を提供する。これらのタンパク質のいずれも、可変領域と定常領域又は定常ドメインとの間にリンカー、好ましくは免疫グロブリンヒンジ領域を含み得る。

40

50

## 【0210】

本明細書で使用されるとき、用語「ヒンジ領域」は、 $C_H1$ ドメインを $C_H2$ ドメインにつなぎ合わせる重鎖分子の一部を含む。このヒンジ領域は約25残基を含み、及び柔軟性を有するため、2つのN末端抗原結合領域が独立して動くことが可能となる。ヒンジ領域は、3つの異なるドメイン、すなわち上部、中央、及び下部ヒンジドメインにさらに分けることができる(Rouxら 1998年)。

## 【0211】

本明細書で使用されるとき、用語「 $C_H2$ ドメイン」は、例えば、Kabata EU付番方式による約231~340位に延在する重鎖免疫グロブリン分子の一部を含む。概してインタクトな天然IgG分子の2つ $C_H2$ ドメインの間には、2つのN連結分枝状炭水化物鎖が間置される。一実施形態において、本発明のタンパク質は、IgG1分子(例えばヒトIgG1分子)に由来する $C_H2$ ドメインを含む。別の実施形態において、本発明のタンパク質は、IgG4分子(例えば、ヒトIgG4分子)に由来する $C_H2$ ドメインを含む。

10

## 【0212】

本明細書で使用されるとき、用語「 $C_H3$ ドメイン」は、 $C_H2$ ドメインのN末端から約110残基、例えば約341~446b位(Kabata EU付番方式)に延在する重鎖免疫グロブリン分子の一部を含む。 $C_H3$ ドメインは、典型的には免疫グロブリンのC末端部分を形成する。しかしながら、いくつかの免疫グロブリンでは、さらなるドメインが $C_H3$ ドメインから延在して分子のC末端部分を形成し得る(例えば、IgMの $\mu$ 鎖及びIgEのe鎖における $C_H4$ ドメイン)。一実施形態において、本発明のタンパク質は、IgG1分子(例えば、ヒトIgG1分子)に由来する $C_H3$ ドメインを含む。別の実施形態において、本発明のタンパク質は、IgG4分子(例えば、ヒトIgG4分子)に由来する $C_H3$ ドメインを含む。

20

## 【0213】

本発明のタンパク質の作製に有用な定常ドメイン配列は、数多くの異なる供給源から得られ得る。好ましい実施形態において、タンパク質の定常領域ドメイン又はその一部分はヒト免疫グロブリンに由来する。しかしながら、定常領域ドメイン又はその一部分は、例えば、げっ歯類種(例えばマウス、ラット、ウサギ、モルモット)又は非ヒト霊長類種(例えばチンパンジー、マカク)を含めた別の哺乳類種の免疫グロブリンに由来してもよいことが理解される。さらに、定常領域ドメイン又はその一部分は、IgM、IgG、IgD、IgA及びIgEを含めた任意の免疫グロブリンクラス、及びIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を含めた任意の免疫グロブリンアイソタイプに由来してもよい。好ましい例において、ヒトアイソタイプIgG1が使用される。

30

## 【0214】

様々な定常領域遺伝子配列(例えばヒト定常領域遺伝子配列)が、公的にアクセス可能な寄託物の形態で利用可能であり、又はその配列を公的に利用可能なデータベースから入手することができる。特定のエフェクター機能を有する(若しくは特定のエフェクター機能を欠く)、又は特定の修飾を備えて免疫原性を低減する定常領域ドメインを選択することができる。

40

## 【0215】

本明細書で使用されるとき、用語「エフェクター機能」は、免疫系のタンパク質及び/又は細胞を結合し、且つ様々な生物学的作用を媒介するFc領域又はその一部分(例えば $C_H2$ ドメイン)の機能上の能力を指す。エフェクター機能は抗原依存性であっても、又は抗原非依存性であってもよい。「抗原依存性エフェクター機能」は、免疫グロブリンの対応する抗原との結合後に通常誘導されるエフェクター機能を指す。典型的な抗原依存性エフェクター機能としては、補体タンパク質(例えばC1q)を結合する能力が挙げられる。例えば、補体のC1成分のFc領域との結合は古典的補体系を活性化し、補体依存性細胞傷害(CDC)と称される過程である細胞病原体のオプソニン化及び溶解をもたらすことができる。補体の活性化はまた炎症反応も刺激し、また自己免疫性の過敏症にも関

50

与し得る。他の抗原依存性エフェクター機能はまた、免疫グロブリンの、そのFc領域を介した、細胞上の特定のFc受容体（「FcR」）との結合により媒介される。種々のクラスの免疫グロブリンに特異的なFc受容体が、IgG（受容体、又はIgR）、IgE（受容体、又はIgR）、IgA（受容体、又はIgR）及びIgM（ $\mu$ 受容体、又はIg $\mu$ R<sub>s</sub>）を含め、数多くある。細胞表面上のFc受容体に対する免疫グロブリンの結合は、免疫複合体のエンドサイトーシス、免疫グロブリンで被覆された粒子又は微生物の貪食及び破壊（抗体依存性食作用、又はADCPとも称される）、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体で被覆された標的細胞の溶解（抗体依存性細胞媒介性細胞傷害、又はADCCと称される）、炎症性メディエーターの放出、免疫系細胞活性化の調節、胎盤通過及び免疫グロブリン産生の制御を含めた、数多くの重要且つ多様な生物学的反応を引き起こす。

10

【0216】

本明細書で使用されるとき、用語「抗原非依存性エフェクター機能」は、その対応する抗原を結合しているかどうかに関わらず、免疫グロブリンにより誘導され得るエフェクター機能を指す。典型的な抗原非依存性エフェクター機能としては、細胞輸送、免疫グロブリンの循環半減期及びクリアランス速度、及び精製の促進が挙げられる。サルベージ受容体としても知られる構造的に固有のFc受容体の「新生児Fc受容体」又は「FcR<sub>n</sub>」が、半減期及び細胞輸送の制御に重要な役割を果たす。微生物細胞（例えばブドウ球菌プロテインA又はG）から精製された他のFc受容体は、Fc領域との高アフィニティでの結合能を有し、Fc含有タンパク質の精製の促進に使用することができる。

20

【0217】

定常領域ドメインは、例えばポリメラーゼ連鎖反応及び目的のドメインを増幅するよう選択されるプライマーを使用して、クローニングすることができる。免疫グロブリン配列のクローニングは、例えば米国特許第5,658,570号明細書に記載される。

【0218】

本発明のタンパク質は、異なる種類の定常領域ドメインをいくつでも含んでよい。

【0219】

タンパク質の定常領域を構成する定常領域ドメイン又はその一部分は、異なる免疫グロブリン分子に由来してもよい。例えば、タンパク質は、IgG1分子に由来するC<sub>H</sub>2ドメイン又はその一部分と、IgG3分子に由来するC<sub>H</sub>3領域又はその一部分とを含み得る。

30

【0220】

本発明の別の例において、本発明のタンパク質は、FcR<sub>n</sub>結合をもたらすのに十分なFcの少なくともある領域を含む。例えば、FcR<sub>n</sub>に結合するFc領域の一部分は、Kabata付番によるIgG1のアミノ酸約282~438を含む。

【0221】

一例において、本発明のタンパク質は、又は複数の定常領域ドメインを部分的に又は完全に欠失させた改変合成定常領域（「ドメイン欠失定常領域」）を含む。本発明はまた、エフェクター機能が改変された、例えば向上した、又は低減した修飾Fc領域又はその一部も包含する。多くのかかる修飾Fc領域が当該技術分野において公知であり、例えば、米国特許第7217797号明細書；米国特許第7217798号明細書；又は米国特許出願公開第20090041770号明細書（半減期の向上）又は米国特許出願公開第2005037000号明細書（ADCCの増加）に記載される。

40

【0222】

タンパク質に対する変異

本発明は、本発明のタンパク質の変異型の使用を企図する。例えば、かかる変異ポリペプチドは、本明細書に示される配列と比較して1つ又は複数の保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの例では、ポリペプチドは10個以下、例えば、9個又は8個又は7個又は6個又は5個又は4個又は3個又は2個の保存的アミノ酸置換を含む。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、同様の側鎖及び/又はヒドロパシー性（hydrophaticity）

50

c i t y ) 及び / 又は親水性を有するアミノ酸残基に置き換わる置換である。

【 0 2 2 3 】

好ましい例において、変異タンパク質は、天然に存在するタンパク質と比較したとき、1 個又は 2 個又は 3 個又は 4 個のみの、又はそれ以下の保存的アミノ酸変化を有する。保存的アミノ酸変化の詳細は以下に提供される。当業者は認識しているであろうとおり、かかる小さい変化は、組換え細胞中で発現させたときポリペプチドの活性を変化させることがないと合理的に予想することができる。

【 0 2 2 4 】

同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該技術分野において定義されており、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 $\beta$ -分枝状側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。

10

【 0 2 2 5 】

本発明はまた、本明細書に示される配列と比較して 1 つ又は複数の挿入又は欠失も企図する。いくつかの例において、ポリペプチドは 10 個以下、例えば、9 個又は 8 個又は 7 個又は 6 個又は 5 個又は 4 個又は 3 個又は 2 個の挿入及び / 又は欠失を含む。

20

【 0 2 2 6 】

システイン残基の位置

本発明は、本明細書において任意の実施形態又は例に記載されるとおりの F R 1 内の任意の部位におけるシステイン残基の位置を企図する。

【 0 2 2 7 】

一例において、本発明は、フレームワーク領域（F R）1 内に位置する少なくとも 2 つのシステイン残基を含む免疫グロブリン可変領域を含む単離されたタンパク質であって、システイン残基が、化合物との残基の少なくとも 1 つのコンジュゲーションが可能であるように位置し、及びシステイン残基の少なくとも 1 つが化合物とコンジュゲートしない場合、システイン残基間にジスルフィド結合が形成可能である、タンパク質を提供する。

30

【 0 2 2 8 】

別の例において、本発明は、フレームワーク領域（F R）1 内に位置する少なくとも 2 つのシステイン残基を含む免疫グロブリン可変領域を含む単離されたタンパク質であって、システイン残基が、化合物との残基の少なくとも 1 つのコンジュゲーションが可能であるように位置し、及びシステイン残基の少なくとも 2 つが化合物とコンジュゲートしない場合、システイン残基間にジスルフィド結合が形成可能である、タンパク質を提供する。

【 0 2 2 9 】

代替的又は追加的な例において、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）と免疫グロブリン軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）とを含む単離されたタンパク質であって、可変領域の少なくとも 1 つがフレームワーク領域（F R）1 内に位置する少なくとも 2 つのシステイン残基を含み、システイン残基が、化合物との残基の少なくとも 1 つのコンジュゲーションが可能であるように位置し、及びシステイン残基の少なくとも 1 つが別の化合物とコンジュゲートしない場合、システイン残基間にジスルフィド結合が形成可能である、タンパク質を提供する。

40

【 0 2 3 0 】

代替的又は追加的な例において、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）と免疫グロブリン軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）とを含む単離されたタンパク質であって、可変領域の少なくとも 1 つがフレームワーク領域（F R）1 内に位置する少なくとも 2 つのシステイン残基を含み、システイン残基が、化合物との残基の少なくとも 1 つのコンジュゲーションが可能であるように位置し、及びシステイン残基の少なくとも 2 つが別の化合物とコン

50

ジュゲートしない場合、システイン残基間にジスルフィド結合が形成可能である、タンパク質を提供する。

【0231】

本発明の上記の例の各々において、少なくとも2つの、又はその少なくとも2つのシステイン残基は、化合物とのコンジュゲーションが可能であるように位置することが好ましい。

【0232】

本発明の一例において、システイン残基はFR1のループ領域内に位置する。本明細書で使用されるとき、用語「FR1のループ領域」は、FR1の2つの領域及び/又は2つのアミノ酸が互いに会合又は結合（例えば、水素結合により）する柔軟性を提供する、例えば、シート状の2つのアミノ酸が互いに会合又は結合するのに十分な柔軟性を提供するFR1内のアミノ酸の配列を意味するものと解釈されなければならない。FR1のループ領域はCDR1の一部ではない。

10

【0233】

別の例において、FR1におけるシステイン残基は、残基間でのジスルフィド結合の形成を可能にするように位置する。

【0234】

「ジスルフィド結合の形成を可能にするように位置する」とは、タンパク質内で2つのシステイン残基が、タンパク質が折り畳まれたときに残基間にジスルフィド結合が形成されるのに十分に近接するように位置することを意味するものと理解されなければならない。例えば、2つのシステイン残基における2つの炭素原子間の距離は、互いの約6~7又は互いの2~9、例えば互いの約3.5~6.8、例えば、互いの約4以内であってもよい。タンパク質における残基の近接性を予測する方法及び/又はジスルフィド結合が形成される可能性を予測する方法は、当業者には明らかで、及び/又は本明細書に記載される。

20

【0235】

従って一例において、本発明のタンパク質は、フレームワーク領域(FR)1内に位置する少なくとも2つのシステイン残基であって、互いの約2~9以内、好ましくは、互いの約6~7以内にあるシステイン残基を含む。

【0236】

別の例において、システイン残基は、タンパク質においてそれらの側鎖が溶媒に露出され得る残基に位置する。溶媒露出又は溶媒露出表面積の決定方法は当該技術分野において公知であり、例えば、Shrake-Rupleyアルゴリズム又はLCP法が挙げられる。

30

【0237】

従って別の例において、本発明のタンパク質は、フレームワーク領域(FR)1内に位置する少なくとも2つのシステイン残基であって、それらの側鎖(好ましくはそのチオール基)が溶媒に露出されるように位置するシステイン残基を含む。

【0238】

「溶媒に露出される」とは、システイン残基の側鎖が折り畳まれたときのタンパク質の表面上にあり、従ってタンパク質が存在する、又は懸濁される溶媒と接触可能であることを意味するものと理解されなければならない。好ましくは、側鎖の少なくとも1つ(又は一方又は双方)が溶媒に十分に露出し、従ってそこに化合物がコンジュゲートすることができる。

40

【0239】

好ましくは、本発明のタンパク質は、以下の1つ又は複数、好ましくは2つ以上、好ましくは全てに位置する少なくとも2つのシステイン残基を含む：

(i) それらの側鎖が互いに向かって傾くように位置する；

(ii) それらの側鎖原子が溶媒に露出されるように位置する；及び/又は

(iii) それらのC炭素原子が互いの約6~7にあるように位置する。

50

## 【0240】

従って本発明のタンパク質（本明細書において本発明の任意の1つ又は複数の例により記載されるとおりの）は、フレームワーク領域1（FR1）内に位置する少なくとも2つのシステイン残基であって、FR1内にジスルフィド結合を形成することができ、或いは化合物の化学量論的コンジュゲーションのために還元することができるシステイン残基を提供する。本発明のこれらの生成物は、FR1内にジスルフィド結合を形成することのできるフレームワーク領域（FR）1内に位置する少なくとも2つのシステイン残基を提供しない他のシステインコンジュゲーション戦略と比べて利点を有する。これらの先行する非効率な戦略としては、単一のシステイン残基（Kimら、2008年）、C末端システイン残基（Sirkら、2008年）及びインタクトな抗体における単一のシステイン残基（Junutulaら、2008年）が挙げられ、そのいずれもが、低い発現収率、ばらつきのあるコンジュゲーション及び大規模処理に伴う複雑さをもたらす。さらに、鎖間ジスルフィド結合の部分的な還元によりシステイン残基にコンジュゲートされた抗体は化学量論にばらつきがあり（抗体当たり0個から8個に至る薬物）、及び潜在的に100種超が生じる（Junutulaら、2008年）。

10

## 【0241】

折り畳まれたタンパク質内のループ及び/又は残基位置を予測する方法は、当業者には明らかで、インシリコ法が挙げられる。例えば、タンパク質の構造的特徴は、X線結晶構造解析及び/又はNMR分光法を用いて決定される三次元生体分子構造を含め、例えばNCBI Molecules Modelling Database（MMDB）によるなどの、National Institutes of Health、8600 Rockville Pike, Bethesda MD 20894のNational Center for Biotechnology Information（NCBI）のウェブサイトを利用して決定される。NCBI保存ドメインデータベース（CDD）は既知のSmart及びPhamコレクションからのドメインを含み、3D構造ビューアー（Cn3D）へのリンクを有する。NCBI保存ドメイン構造検索ツール（Conserved Domain Architecture Retrieval Tool：CDART）は、隣接タンパク質に対してそのドメイン構造により事前に計算されたドメイン割り当てを使用する。

20

## 【0242】

タンパク質又はペプチド二次構造を予測する別の方法が当該技術分野において公知であり、及び/又は、例えば、Moult、1996年；Chouら、1974年；Chouら、1974年；Chouら、1978年；Chouら、1978年；又はChouら、1979年に記載されている。

30

## 【0243】

加えて、タンパク質又はペプチドの二次構造の予測を補助するコンピュータプログラムが現在利用可能である。一つのかかる二次構造予測方法は、ホモロジーモデリングに基づく。例えば、30%より高い配列同一性、又は40%より高い類似性を有する2つのタンパク質は、多くの場合に同様の構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース（PDB）の最近の拡大により、タンパク質の構造内にある潜在的な折り畳みの数を含め、二次構造の予測性の向上がもたらされている（Holmら、1999年）。例えば、タンパク質の構造の決定方法は、例えば米国特許出願公開第20020150906号明細書に記載され、又はコンピュータプログラム若しくはアルゴリズム、例えば、MODELLERを使用することである（Sali及びBlundell、1993年）。これらの技法は、そのタンパク質の配列を、特徴付けられた構造を有するタンパク質の配列とアラインメントすることによる。かかるアラインメントアルゴリズムは当該技術分野において公知であり、例えばNCBIのBLASTなどのソフトウェアパッケージを通じて利用可能である。次に、既に特徴付けられているタンパク質又はペプチドにおけるアラインメントされた配列又は部分配列に対応する構造情報に基づき、問い合わせるタンパク質の構造情報、すなわち三次元構造が予測される。このようにして、免疫グロブリンのFR1領域に

40

50

対応するタンパク質の三次元構造のライブラリを作成することが可能である。

【0244】

二次構造のさらなる予測方法としては、例えば、「スレッディング」(Jones、1996年)、「プロファイル解析」(Bowyer、1991年; Gribskovら、1990年; Gribskovら、1989年)、及び「進化リンケージ(evolutionary linkage)」が挙げられる。従来のタンパク質配列スレッディングは、タンパク質の3D構造スキュフォールドの予測に使用される。典型的には、スレッディングは、タンパク質の折り畳みを、その配列並びに二次構造及び溶媒露出などのローカルパラメータを組み込むスコアリング関数を用いることにより、候補構造鑄型(例えば、Fv又はFab又はFR1の既知の構造)のライブラリに対してその配列をスレッディング(又は比較)することにより割り当てる方法である(Rostら 1997年; Xu及びXu 2000年; 及びPanchenkoら 2000年)。例えば、スレッディング法は、問い合わせ配列の各残基についてのアミノ酸配列の二次構造及び溶媒露出度を予測することから始まる。得られた予測構造の一次元(1D)プロファイルが、既知の3D構造のライブラリの各メンバーにスレッディングされる。各配列-構造対について、動的計画法を用いて最適なスレッディングが得られる。総合的に最良の配列-構造対が、その問い合わせ配列についての予測3D構造となる。二次構造が解かれた免疫グロブリンのFv及びFab断片の数に起因して、ここでの場合にスレッディングは比較的単純となる。

10

【0245】

2つより多いシステイン残基を含むタンパク質の場合、偶数のシステイン残基(cysteine residues)が含まれ、例えば4個又は6個又は8個又は10個のシステイン残基が含まれることが好ましい。例えばシステイン残基は対になり、すなわち2個の残基の組み合わせが、それらの間にジスルフィド結合が形成され得るように並べられる。

20

【0246】

好ましくは、本発明のタンパク質は非還元条件下でFR1に遊離チオールを含まず、及び/又は非還元条件下で別のシステイン残基又は化合物に連結しないシステイン残基を含まない。

【0247】

タンパク質の作製  
突然変異誘発

30

可変領域を含むタンパク質をコードするDNAは、当該技術分野の標準的方法を用いて単離される。例えば、目的の領域に隣接する可変領域内の保存領域にアニールするプライマーが設計され、次にそれらのプライマーを用いて介在核酸が、例えばPCRによって増幅される。好適な方法及び/又はプライマーは当該技術分野において公知であり、及び/又は例えばBorrebaeck(編)、1995年及び/又はFroyenら、1995年に記載される。かかる増幅方法に好適な鑄型DNA源は、例えば、例えば本明細書に記載されるとおりの可変領域を含むタンパク質を発現するハイブリドーマ、トランスフェクトーマ及び/又は細胞に由来する。

【0248】

40

単離後、DNAが必要な場所にシステイン残基を含むように、当該技術分野において公知の様々な方法のいずれかにより修飾される。そのような方法としては、限定はされないが、タンパク質をコードする予め調製済みのDNAの部位特異的(又はオリゴヌクレオチド媒介性)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製が挙げられる。組換えタンパク質の変異型はまた、制限酵素断片操作又は合成オリゴヌクレオチドとのオーバーラップ伸長PCRにより構築されてもよい。変異原性プライマーは1つ又は複数のシステインコドン置換をコードし、例えばシステインをコードするコドン(すなわち、TGT又はTGC)を構成する残基を含む。標準的な突然変異誘発技法を用いてかかる変異DNAをコードするDNAを生成することができる。一般的な手引きは、Sambrookら 1989年; 及び/又はAusubelら 1993年に見ることが

50

できる。

【0249】

部位特異的突然変異誘発は、置換変異型、すなわち変異タンパク質を調製する一つの方法である。この技法は当該技術分野において公知である（例えば、Carterら 1985年；Hōら 1989年；及びKunkel 1987年を参照のこと）。簡潔には、DNAの部位特異的突然変異誘発の実施では、初めに出発DNAを、所望の変異（例えば、システインをコードする1つ又は複数のコドンの挿入）をコードするオリゴヌクレオチドをかかると出発DNAの一本鎖とハイブリダイズすることにより変化させる。ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、且つ出発DNAの一本鎖を鋳型として用いて、DNAポリメラーゼを使用して第2の鎖全体を合成する。このように、所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドが、得られた二本鎖DNAに組み込まれる。発現プラスミドにおいて変異が誘発されるタンパク質を発現する遺伝子内で部位特異的突然変異誘発を実施してもよく、得られたプラスミドを配列決定し、所望のシステイン置換変異の組み込みを確認してもよい。部位特異的プロトコル及びフォーマットには、市販のキット、例えばQuickChange（登録商標）多部位特異的突然変異誘発キット（Stratagene、La Jolla, CA）が含まれる。

10

【0250】

PCR突然変異誘発もまた、出発タンパク質のアミノ酸配列変異型の作製に好適である。Higuchi、1990年；Itoら 1991年；Bernhardら 1994年；及びValletteら 1989年を参照のこと。簡潔には、少量の鋳型DNAをPCRにおける出発物質として使用するとき、鋳型DNAの対応する領域と配列が僅かに異なるプライマーを用いて、プライマーが鋳型と異なる位置においてのみ鋳型配列と異なる特定のDNA断片を比較的多量に生成することができる。

20

【0251】

別の変異型調製方法であるカセット突然変異誘発は、Wellersら、1985年により記載される技法に基づく。出発物質は、変異させる出発タンパク質DNAを含むプラスミド（又は他のベクター）である。変異させる出発DNA中の1つ又は複数のコドンが同定される。同定された1つ又は複数の変異部位の両側に固有の制限エンドヌクレアーゼ部位がなければならない。かかる制限部位が存在しない場合、制限部位を上述のオリゴヌクレオチド媒介性突然変異誘発法を用いて出発DNAにおける適切な位置に導入することで生成してもよい。それらの部位でプラスミドDNAを切断し、直鎖化する。制限部位間のDNAの配列をコードするが、但し所望の1つ又は複数の変異を含む二本鎖オリゴヌクレオチドが、標準的手順を用いて合成され、ここでオリゴヌクレオチドの2本の鎖は別個に合成され、次に標準的技術を用いて共にハイブリダイズされる。この二本鎖オリゴヌクレオチドはカセットと称される。このカセットは、直鎖化されたプラスミドの末端と適合する5'及び3'末端を有するように設計され、従ってこれはプラスミドに直接ライゲートすることができる。以上でこのプラスミドは変異DNA配列を含む。コードされたシステイン置換を含む変異DNAは、DNA配列決定により確認することができる。

30

【0252】

単一の変異はまた、二本鎖プラスミドDNAをPCRベースの突然変異誘発による鋳型として用いるオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発によっても生成される（Sambrook及びRussell、2001年；Zollerら 1983年；Zoller及びSmith、1982年）。

40

【0253】

組換え発現

組換えタンパク質の場合、それをコードする核酸が好ましくは発現ベクター内に置かれ、次に発現ベクターが、本来免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞、好ましくはジスルフィド架橋又は結合を生じることのできる細胞、例えば、大腸菌（E. coli）細胞、酵母細胞、昆虫細胞、又は哺乳動物細胞、例えば、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、又は骨髄腫細胞にトランスフェクトされることで、組

50

換え宿主細胞においてタンパク質の合成が達成される。免疫グロブリンをコードするDNAの細菌における組換え発現に関するレビュー論文としては、Skerrara、(1993年)及びPlueckthun、(1992年)が挙げられる。これらの目的を達成する分子クローニング技術は当該技術分野において公知であり、例えばAusubel又はSambrookに記載される。多岐にわたるクローニング及びインビトロ増幅方法が組換え核酸の構築に好適である。組換え免疫グロブリンの作製方法もまた、当該技術分野において公知である。米国特許第4,816,567号明細書；米国特許第5,225,539号明細書、米国特許第6,054,297号明細書、米国特許第7,566,771号明細書又は米国特許第5,585,089号明細書を参照のこと。

【0254】

単離後、本発明のタンパク質をコードする核酸は好ましくは、さらなるクローニング(DNAの増幅)のため、又は無細胞系若しくは細胞中での発現のため、発現コンストラクト又は複製可能ベクターに挿入される。好ましくは、核酸はプロモーターに作動可能に連結される。

【0255】

本明細書で使用されるとき、用語「プロモーター」はその広義の文脈で解釈されるべきであり、TATAボックス又はイニシエーターエレメントを含めた正確な転写開始に必要なゲノム遺伝子の転写制御配列を含み、例えば発生刺激及び/又は外部刺激に応答して、又は組織特異的な形で核酸の発現を変化させるさらなる制御エレメント(例えば、上流活性化配列、転写因子結合部位、エンハンサー及びサイレンサー)は含まれても、又は含まれなくてもよい。ここでの文脈では、用語「プロモーター」はまた、それが作動可能に連結される核酸の発現をもたらす、活性化し、又は亢進させる、組換え、合成若しくは融合核酸、又は誘導体を記載するためにも用いられる。好ましいプロモーターは、発現をさらに亢進させ、及び/又は前記核酸の空間的な発現及び/又は時間的な発現を変化させる1つ又は複数の特定の制御エレメントのさらなるコピーを含み得る。

【0256】

本明細書で使用されるとき、用語「~に作動可能に連結された」は、核酸に対してプロモーターが、そのプロモーターにより核酸の発現が制御されるような位置に置かれることを意味する。

【0257】

無細胞発現系もまた本発明により企図される。例えば、本発明のタンパク質をコードする核酸が、好適なプロモーター、例えばT7プロモーターに作動可能に連結され、得られた発現コンストラクトが転写及び翻訳に十分な条件に曝露される。インビトロ発現又は無細胞発現に典型的な発現ベクターについては記載がなされており、限定はされないが、TNT T7系及びTNT T3系(Promega)、pEXP1-DESTベクター及びpEXP2-DESTベクター(Invitrogen)が挙げられる。

【0258】

細胞中での発現には多くのベクターを利用可能である。概してベクター成分としては、限定はされないが、以下の1つ又は複数が挙げられる：シグナル配列、本発明のタンパク質をコードする配列(例えば、本明細書に提供される情報から得られる)、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列。当業者は、タンパク質の発現に好適な配列を認識しているであろう。例えば、例示的シグナル配列としては、原核生物分泌シグナル(例えば、pelB、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ipp、又は耐熱性エンテロトキシンII)、酵母分泌シグナル(例えば、インベルターゼリーダー、因子リーダー、又は酸性ホスファターゼリーダー)又は哺乳動物分泌シグナル(例えば、単純ヘルペスgDシグナル)が挙げられる。

【0259】

例示的プロモーターとしては、原核生物において活性であるもの(例えば、phoAプロモーター、-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系、及びtacプロモーターなどのハイブリッ

10

20

30

40

50

ドプロモーター)が挙げられる。これらのプロモーターは、グラム陰性又はグラム陽性微生物などの真正細菌、例えば、腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*)、例えば、エシェリキア属 (*Escherichia*)、例えば大腸菌 (*E. coli*)、エンテロバクター属 (*Enterobacter*)、エルウィニア属 (*Erwinia*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、プロテウス属 (*Proteus*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、例えばサルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)、セラチア属 (*Serratia*)、例えばセラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescans*)、及び赤痢菌属 (*Shigella*)、並びに *B. subtilis* 及び *B. licheniformis* などのバチルス属 (*Bacilli*)、*P. aeruginosa* などのシュードモナス属 (*Pseudomonas*)、及びストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) を含めた、原核生物での発現に有用である。好ましくは、宿主は大腸菌 (*E. coli*) である。一つの好ましい大腸菌 (*E. coli*) クローニング宿主は大腸菌 (*E. coli*) 294 (ATCC 31, 446) であるが、大腸菌 (*E. coli*) B、大腸菌 (*E. coli*) X 1776 (ATCC 31, 537)、及び大腸菌 (*E. coli*) W3110 (ATCC 27, 325)、DH5 又は DH10B などの他の株も好適である。

10

#### 【0260】

哺乳動物細胞中で活性を有する例示的プロモーターとしては、サイトメガロウイルス前初期プロモーター (CMV-IE)、ヒト伸長因子1-プロモーター (EF1)、核内低分子RNAプロモーター (U1a及びU1b)、 $\alpha$ -ミオシン重鎖プロモーター、シミアンウイルス40プロモーター (SV40)、ラウス肉腫ウイルスプロモーター (RSV)、アデノウイルス主要後期プロモーター、 $\alpha$ -アクチンプロモーター；CMVエンハンサー/ $\alpha$ -アクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター又はその活性断片を含むハイブリッド制御エレメントが挙げられる。有用な哺乳動物宿主細胞系の例は、SV40により形質転換されたサル腎臓CV1系統 (COS-7、ATCC CRL 1651)；ヒト胎児由来腎臓系統 (293細胞又は懸濁培養で成長させるためサブクローニングした293細胞；ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL 10)；又はチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) である。

20

#### 【0261】

酵母細胞中、例えばピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 及び *S. pombe* を含む群から選択される酵母細胞中での発現に好適な典型的なプロモーターとしては、限定はされないが、ADH1プロモーター、GAL1プロモーター、GAL4プロモーター、CUP1プロモーター、PHO5プロモーター、nmtプロモーター、RPR1プロモーター、又はTEF1プロモーターが挙げられる。

30

#### 【0262】

昆虫細胞中での発現に好適な典型的なプロモーターとしては、限定はされないが、OPEI2プロモーター、ボンビクス・ムリ (*Bombyx mori*) から単離された昆虫アクチンプロモーター、ドロソフィラ・エスピー (*Drosophila sp.*) dshプロモーター (Marshら 2000年) 及び誘導性メタロチオネインプロモーターが挙げられる。組換えタンパク質の発現に好ましい昆虫細胞としては、BT1-TN-5B1-4細胞、及びスポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞 (例えば、sf19細胞、sf21細胞) を含む群から選択される昆虫細胞が挙げられる。核酸断片の発現に好適な昆虫としては、限定はされないが、ドロソフィラ・エスピー (*Drosophila sp.*) が挙げられる。*S. frugiperda* の使用もまた企図される。

40

#### 【0263】

単離核酸分子又はそれを含む遺伝子コンストラクトを発現用細胞に導入する手段は、当業者に公知である。所与の細胞に用いられる技法は、成功を収めている公知の技法に依存

50

する。組換えDNAの細胞への導入手段としては、とりわけ、マイクロインジェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクタミン (lipofectamine) (Gibco、MD、米国) 及び/又はセルフェクチン (cellfectin) (Gibco、MD、米国) の使用によるなどのリポソーム媒介性トランスフェクション、PEG媒介性DNA取り込み、電気穿孔及びDNAがコーティングされたタングステン又は金粒子の使用によるなどの微粒子銃 (Agracetus Inc.、WI、米国) が挙げられる。

#### 【0264】

本発明のタンパク質の作製に使用される宿主細胞は、用いられる細胞型に応じて様々な培地で培養され得る。Ham Fl0 (Sigma)、最小必須培地 (MEM)、(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、及びダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、Sigma) などの市販の培地が、哺乳動物細胞の培養に好適である。本明細書で考察される他の細胞型の培養用培地は、当該技術分野において公知である。

10

#### 【0265】

##### タンパク質の単離

本発明のタンパク質は、好ましくは単離される。「単離される」とは、タンパク質が実質的に精製され、又はその天然に存在する環境から取り出されて、例えば異種環境中にあることを意味する。「実質的に精製される」とは、タンパク質が夾雑物質を実質的に含まない、例えば、夾雑物質を少なくとも約70%又は75%又は80%又は85%又は90%又は95%又は96%又は97%又は98%又は99%含まないことを意味する。

20

#### 【0266】

本発明のタンパク質の精製方法は当該技術分野において公知であり、及び/又は本明細書に記載される。

#### 【0267】

組換え技術を用いるとき、本発明のタンパク質は、細胞内で産生するか、細胞膜周辺腔で産生するか、又は培地中に直接分泌させることができる。タンパク質が細胞内産生される場合、第一段階として、粒子状残屑が、宿主細胞又は溶解断片のいずれも、例えば遠心又は限外ろ過により取り除かれる。Carterら (1992年) は、大腸菌 (E. coli) の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離する手順について記載している。簡潔には、酢酸ナトリウム (pH 3.5)、EDTA、及びフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) の存在下で細胞ペーストを約30分間解凍する。遠心により細胞残屑を取り除くことができる。タンパク質が培地中に分泌される場合、概して初めにかかる発現系からの上清が、市販のタンパク質濃縮フィルタ、例えばAmicon又はMillipore Pellicon限外ろ過ユニットを使用して濃縮される。タンパク質分解を抑制するため、PMSFなどのプロテアーゼ阻害薬を前述のステップのいずれかに含めてもよく、及び外来性の夾雑物の増加を防ぐため、抗生物質を含めてもよい。

30

#### 【0268】

細胞から調製されるタンパク質は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製することができ、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技法である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は、タンパク質中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメイン (仮に存在する場合) の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAを使用して、ヒト 1、2、又は4重鎖に基づく免疫グロブリンを精製することができる (Lindmarkら 1983年)。プロテインGは、あらゆるマウスアイソタイプ及びヒト 3に推奨される (Gussら 1986年)。他の場合には、本発明のタンパク質における可変領域が結合する、又はそれを生じさせた抗原又はエピトープ決定基を使用してアフィニティ精製を実施することができる。アフィニティリガンドが結びつくマトリックスは、ほとんどの場合アガロースであるが、他のマトリックスも利用可能である。コントロールド・ポア・グラス (controlled pore glass) 又はポリ (スチレンジビニル) ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは、アガロースで実現

40

50

できるものと比べてより高い流量及びより短い処理時間が可能である。回収されるタンパク質に応じて、イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE（商標）でのクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン交換樹脂（ポリアスパラギン酸カラムなど）でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿などの他のタンパク質精製技法もまた利用可能である。

#### 【0269】

当業者はまた、本発明のタンパク質が、精製又は検出を促進するタグ、例えば、ポリヒスチジンタグ、例えば、ヘキサヒスチジンタグ、又はインフルエンザウイルス赤血球凝集素（HA）タグ、又はシミアンウイルス5（V5）タグ、又はFLAGタグ、又はグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）タグを含むように修飾され得ることも認識するであろう。好ましくは、タグはヘキサ-hisタグである。得られるタンパク質は、次にアフィニティ精製などの当該技術分野において公知の方法を用いて精製される。例えば、ヘキサ-hisタグを含むタンパク質の精製は、タンパク質を含む試料を、固体又は半固体担体上に固定化されたヘキサ-hisタグを特異的に結合するニッケル-ニトリロ三酢酸（Ni-NTA）と接触させ、試料を洗浄して未結合のタンパク質を除去し、続いて結合したタンパク質を溶離させることにより行われる。それに代えて又は加えて、アフィニティ精製法ではタグに結合するリガンド又は抗体が用いられる。

10

#### 【0270】

1つ又は複数の任意の予備的な精製ステップの後、本発明のタンパク質及び夾雑物を含む混合物は、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーに供してもよい。

20

#### 【0271】

##### タンパク質の合成

本発明のタンパク質は、その決定されたアミノ酸配列から標準的な技術を用いて、例えば、BOC又はFMOC化学を用いて容易に合成される。合成ペプチドは、固相、液相、又はペプチド縮合の公知の技法、又はそれらの任意の組み合わせを用いて調製され、及び天然及び/又は非天然アミノ酸を含むことができる。ペプチド合成に使用されるアミノ酸は、Merrifield、1963年の当初の固相手順の脱保護、中和、カップリング及び洗浄プロトコルを伴う標準的なBoc（N-アミノ保護N-t-ブチルオキシカルボニル）アミノ酸樹脂、又はCarpino及びHan、1972年により記載される塩基不安定N-アミノ保護9-フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）アミノ酸であり得る。Fmoc及びBocの双方のN-アミノ保護アミノ酸とも、例えば、Fluka、Bachem、Advanced Chemtech、Sigma、Cambridge Research Biochemical、Bachem、又はPeninsula Labsなどの様々な商業的供給元から入手することができる。

30

#### 【0272】

##### コンジュゲート

本発明はまた、本明細書において任意の実施形態により記載されるタンパク質のコンジュゲートも提供する。タンパク質をコンジュゲートすることのできる化合物の例は、放射性同位体、検出可能標識、治療化合物、コロイド、毒素、核酸、ペプチド、タンパク質、対象におけるタンパク質の半減期を増加させる化合物及びそれらの混合物からなる群から選択される化合物である。例示的治療剤としては、限定はされないが、抗血管形成剤、新血管新生及び/又は他の血管新生の阻害剤、抗増殖剤、アポトーシス促進剤、化学療法剤又は治療用核酸が挙げられる。

40

#### 【0273】

毒素としては、細胞にとって有害な（例えば、それを死滅させる）任意の薬剤が挙げられる。当該技術分野において公知のそれらの薬物クラス、及びその作用機序についての説明は、Goodmanら、「Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics」、第8版、Macmillan Publishing Co.、1990年を参照のこと。免疫

50

グロブリン - 免疫毒素コンジュゲートの調製に関するさらなる技法が、例えば V i t e t t a ( 1 9 9 3 年 ) 及び米国特許第 5 , 1 9 4 , 5 9 4 号明細書に提供される。例示的毒素としては、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の非結合性の活性断片、外毒素 A 鎖 ( シュードモナス・エルギノーサ ( *Pseudomonas aeruginosa* ) 由来 )、リシン A 鎖、アプリン A 鎖、モデシン A 鎖、サルシン、アリュールテス・フォルディイ ( *Aleurites fordii* ) タンパク質、ジアンチン ( *dianthin* ) タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ ( *Phytolacca americana* ) タンパク質 ( P A P I、P A P I I、及び P A P - S )、モモルディカ・カラントニア ( *momordica charantia* ) 阻害薬、クルシン、クロチン、サバオナリア・オフィシナリス ( *sapaonaria officinalis* ) 阻害薬、ゲロニン、ミトゲリン ( *mitogellin* )、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコテセン ( *tricothecene* ) が挙げられる。例えば、国際公開第 9 3 / 2 1 2 3 2 号パンフレットを参照のこと。

10

## 【 0 2 7 4 】

本発明のイムノコンジュゲートの形成に好適な化学療法剤としては、タキソール、サイトカラシン B、グラミシジン D、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド ( *tenoposide* )、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシン D、1 - デ - ヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びビューロマイシン、代謝拮抗薬 ( メトトレキサート、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5 - フルオロウラシル、デカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、クラドリピンなど )、アルキル化剤 ( メクロレタミン、チオエパ ( *thioepa* )、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン ( B S N U )、ロムスチン ( C C N U )、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン ( D T I C )、プロカルバジン、マイトマイシン C、シスプラチン及びその他の、カルボプラチンなどの白金誘導体など )、抗生物質 ( ダクチノマイシン ( 旧アクチノマイシン )、プレオマイシン、ダウノルピシン ( 旧ダウノマイシン )、ドキシソルピシン、イダルピシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン ( A M C ) など ) が挙げられる。

20

30

## 【 0 2 7 5 】

好適な血管形成阻害薬 ( 抗血管形成剤 ) の例としては、限定はされないが、ウロキナーゼ阻害薬、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害薬 ( マリマスタット、ノバスタット、B A Y 1 2 - 9 5 6 6、A G 3 3 4 0、B M S - 2 7 5 2 9 1 及び同様の薬剤など )、内皮細胞の遊走及び増殖阻害薬 ( T N P - 4 7 0、スクアラミン、2 - メトキシエストラジオール、コンプレタスタチン、エンドスタチン、アンジオスタチン、ペニシラミン、S C H 6 6 3 3 6 ( S c h e r i n g - P l o u g h C o r p、M a d i s o n、N J )、R 1 1 5 7 7 7 ( J a n s s e n P h a r m a c e u t i c a、I n c、T i t u s v i l l e、N J ) 及び同様の薬剤など )、血管形成成長因子の拮抗薬 ( Z D 6 4 7 4、S U 6 6 6 8、血管形成剤に対する抗体及び / 又はその受容体 ( V E G F、b F G F、及びアンジオポエチン - 1 など )、サリドマイド、サリドマイド類似体 ( C C 5 0 1 3 など )、S u g e n 5 4 1 6、S U 5 4 0 2、抗血管形成リボザイム ( アンジオザイムなど )、インターフェロン ( インターフェロン 2 a など )、スラミン及び同様の薬剤など )、V E G F - R キナーゼ阻害薬及びその他の抗血管形成チロシンキナーゼ阻害薬 ( S U 0 1 1 2 4 8 など )、内皮特異的インテグリン / 生存シグナル伝達の阻害薬 ( ビタキシン及び同様の薬剤など )、銅アンタゴニスト / キレート剤 ( テトラチオモリブデート、カプトプリル及び同様の薬剤など )、カルボキシアミドトリアゾール ( C A I )、A B T - 6 2 7、C M 1 0 1、インターロイキン - 1 2 ( I L - 1 2 )、I M 8 6 2、P N U 1 4 5 1 5 6 E 並びに血管形成を阻害するヌクレオチド分子 ( アンチセンス - V E G F - c D N A、アンジオスタチンをコードする c D N A、p 5 3 をコードする c D N A 及び欠損 V

40

50

E G F 受容体 - 2 をコードする c D N A など) 及び同様の薬剤が挙げられる。血管形成、新血管新生、及び / 又は他の血管新生の阻害薬の他の例は、抗血管形成ヘパリン誘導体及び関連分子 (例えば、ヘペリナーゼ I I I ( h e p e r i n a s e I I I ) )、テモゾロミド、N K 4、マクロファージ遊走阻害因子 ( M I F )、シクロオキシゲナーゼ - 2 阻害薬、低酸素誘導因子 1 の阻害薬、抗血管形成大豆イソフラボン、オルチプラズ、フマギリン及びその類似体、ソマトスタチン類似体、ペントサンポリサルフェート、テコガラナトリウム、ダルテパリン、タムスタチン、トロンボスポンジン、N M - 3、コンブレスタチン ( c o m b r e s t a t i n )、カンスタチン、アバスタチン、他の関連標的に対する抗体 (抗 - v / - 3 インテグリン及び抗キニノスタチン m A b s など) 及び同様の薬剤である。

10

## 【 0 2 7 6 】

一例において、本明細書において任意の実施形態により記載されるとおりのタンパク質は、例えば本明細書に記載されるとおりの、免疫グロブリン又はそれに由来するタンパク質などの、本発明の別のタンパク質又は免疫グロブリン可変領域を含むタンパク質を含めた、別のタンパク質にコンジュゲート又は連結される。他のタンパク質が除外されることはない。さらなるタンパク質は当業者に明らかで、例えば、とりわけ免疫調節薬又は半減期を延長するタンパク質若しくはペプチド又は血清アルブミンに結合する他のタンパク質が挙げられる。

## 【 0 2 7 7 】

例示的免疫調節薬としてはサイトカイン及びケモカインが挙げられる。用語「サイトカイン」は、ある細胞集団により放出されるタンパク質又はペプチドであって、別の細胞に対して細胞間メディエーターとして作用するタンパク質又はペプチドの総称である。サイトカインの例としては、リンホカイン、モノカイン、成長因子及び従来のポリペプチドホルモンが挙げられる。サイトカインの中には、ヒト成長ホルモン、N - メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン；副甲状腺ホルモン、サイロキシン、インスリン、プロインスリン、リラキシン、プロリラキシン、糖タンパク質ホルモン、例えば、卵胞刺激ホルモン ( F S H )、甲状腺刺激ホルモン ( T S H ) 及び黄体形成ホルモン ( L H ) など、肝成長因子；プロスタグランジン、線維芽細胞成長因子、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、O B タンパク質、腫瘍壊死因子 - 及び - ；ミューラー管抑制物質、ゴナドトロピン関連ペプチド、インヒピン、アクチピン、血管内皮増殖因子、インテグリン、トロンボポエチン ( T P O )、N G F - B などの神経成長因子、血小板成長因子、T G F - 及び T G F - などの形質転換成長因子 ( T G F )、インスリン様成長因子 - I 又は - I I、エリスロポエチン ( E P O )、骨誘導因子、インターフェロン - 、 - 、又は - などのインターフェロン；コロニー刺激因子 ( C S F )、例えば、マクロファージ - C S F ( M - C S F )、顆粒球マクロファージ - C S F ( G M - C S F )；及び顆粒球 - C S F ( G - C S F )、インターロイキン ( I L )、例えば、I L - 1、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - I O 5 I L - I 1、I L - 1 2；I L - 1 3、I L - 1 4、I L - 1 5、I L - 1 6、I L - 1 7、I L - 1 8、I L - 2 1 及び L I F などが含まれる。

20

30

## 【 0 2 7 8 】

ケモカインは、概して化学誘引物質として作用し、免疫エフェクター細胞をケモカイン発現部位に動員する。ケモカインとしては、限定はされないが、R A N T E S、M C A F、M 1 P 1 - 又は M I P 1 - が挙げられる。当業者は、特定のサイトカインが化学走化作用を有することでも知られ、それらもまた用語ケモカインに分類され得ることを認識するであろう。

40

## 【 0 2 7 9 】

例示的な血清アルブミン結合ペプチド又はタンパク質は、米国特許出願公開第 2 0 0 6 0 2 2 8 3 6 4 号明細書又は米国特許出願公開第 2 0 0 8 0 2 6 0 7 5 7 号明細書に記載される。

## 【 0 2 8 0 】

50

放射性コンジュゲート化タンパク質の作製には、様々な放射性核種を利用することが可能である。例としては、限定はされないが、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^2\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{99\text{Tc}}$ 、 $^{43}\text{K}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{111}\text{In}$ などの、低エネルギー放射性核種（例えば診断目的に好適）が挙げられる。好ましくは放射性核種は、投与とイメージング部位への局在化との間の経過時間後に活性又は検出を可能にするのに好適な半減期を有する、 $\alpha$ 線、光子、又は陽電子放出放射性核種である。本発明はまた、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 及び $^{188}\text{Re}$ などの高エネルギー放射性核種（例えば治療目的としての）も包含する。これらの同位体は、典型的には短い経路長を有する高エネルギー粒子又は $\alpha$ 粒子を生じる。かかる放射性核種は、それらが近接する細胞、例えばコンジュゲートが結合又は侵入した腫瘍性細胞を死滅させる。放射性核種は局在化していない細胞には影響をほとんど又は全く与えず、本質的に非免疫原性である。或いは、高エネルギー同位体は、例えばホウ素中性子捕捉療法の場合のように、本来安定的な同位体の熱照射により生成されてもよい（Guanaら、1998年）。

10

#### 【0281】

別の実施形態において、タンパク質は、プレターゲティングに利用される「受容体」（ストレプトアビジンなど）にコンジュゲートされ、ここではコンジュゲートが患者に投与され、続いて未結合のコンジュゲートが除去剤を使用して循環中から除去され、次に治療剤（例えば、ラジオヌクレオチド）にコンジュゲートした「リガンド」（例えば、アビジン）が投与される。

20

#### 【0282】

本発明のタンパク質は、当該技術分野において公知の、且つ容易に入手可能なさらなる非タンパク様部分を含むように修飾することができる。好ましくは、タンパク質の誘導体化に好適な部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、限定はされないが、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、エチレングリコール/プロピレングリコール共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキサラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸（ホモポリマー又はランダムコポリマーのいずれか）、及びデキストラン又はポリ（*n*-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコール（propylene glycol）（PPG）ホモポリマー、プロリプロピレンオキシド（polypropylene oxide）/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチレン化ポリオール（例えば、グリセロール；POG）、ポリビニルアルコール、及びその混合物が挙げられる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドが、水中でのその安定性により、製造において利点を有し得る。

30

#### 【0283】

ポリマー分子は、典型的には、例えば約2～約1000個、又は約2～約300個の反復単位を有するものとして特徴付けられる。

#### 【0284】

例えば水溶性ポリマーとしては、限定はされないが、PEG、ポリ（エチレンオキシド）（PEO）、ポリオキシエチレン（POE）、ポリビニルアルコール、ヒドロキシエチルセルロース、又はデキストランが挙げられ、これらはタンパク質の安定性又はサイズを増加させるため、一般にタンパク質にコンジュゲートされる。

40

#### 【0285】

PEG、PEO又はPOEはエチレンオキシドのオリゴマー又はポリマーを指す。PEGの場合、これらのオリゴマー又はポリマーは、例えば、水酸化物イオンのエポキシド環に対する求核攻撃により惹起されるエチレンオキシドのアニオン開環重合により生成される。タンパク質修飾に最も有用な形態のPEGのうちの一つは、モノメトキシPEG（mPEG）である。

#### 【0286】

50

好ましい PEG は単分散又は多分散であり、好ましくは単分散である。当業者は、PEG が多分散であっても、又は単分散であってもよいことを認識するであろう。多分散 PEG は、異なる分子量を有する PEG の混合物を含む。多分散 PEG の場合、特定の分子量に対する参照は、その混合物中の PEG の数平均分子量を指すと理解され得る。サイズ分布はその重量平均分子量 (MW) 及びその数平均分子量 (Mn) により統計的に特徴付けられ、それらの分子量の比は多分散性指数 ( $M_w / M_n$ ) と称される。MW 及び Mn は、特定の態様では質量分析により計測される。PEG - タンパク質コンジュゲートの多く、特に 1 KD より大きい PEG にコンジュゲートしたものは、親 PEG 分子の多分散性に起因して様々な範囲の分子量を呈する。例えば、mPEG2K (Sunbright ME-020HS、NOF) の場合、実際の分子質量は 1.5 ~ 3.0 KD の範囲に分布し、多分散性指数は 1.036 である。

10

## 【0287】

上記に基づき当業者は、単分散 PEG が、実質的に同じ分子量を含む PEG の混合物を含むことを認識するであろう。単分散 PEG は、例えば Polypure AS、ノルウェーから市販されている。

## 【0288】

PEG の平均分子量又は好ましい分子量は約 500 Da ~ 約 200 kDa の範囲であり得る。例えば、PEG の分子量は約 1 ~ 約 100 kDa、約 1.5 ~ 約 50 kDa、約 1.5 ~ 約 10 kDa、約 1.5 kDa ~ 約 5 kDa、約 1.5 kDa ~ 約 kDa、約 1.5 ~ 約 2 kDa である。

20

## 【0289】

好ましくは、PEG は単分散であり、約 500 Da の分子量を有する。好ましくは、PEG は約 1.5 kDa の分子量を有する。好ましくは、PEG は約 2 kDa の分子量を有する。

## 【0290】

好ましくは、PEG は、マレイミド基などの反応基を含む。好ましくは、PEG は PEG<sub>24</sub> - マレイミドである。

## 【0291】

生理学的に許容可能なポリマー分子は特定の構造に限定されるものではなく、様々な態様において、直鎖状 (例えばアルコキシ PEG 又は二官能性 PEG)、分枝鎖状又はマルチアーム状 (例えばフォーク型 PEG 又はポリオールコアに結合した PEG)、樹枝状 (dendritic) であるか、又は分解性連結を含む。さらに、ポリマー分子の内部構造は種々のパターンのいずれかに組織化され、ホモポリマー、交互コポリマー、ランダムコポリマー、ブロックコポリマー、交互トリポリマー、ランダムトリポリマー、及びブロックトリポリマーからなる群から選択される。

30

## 【0292】

タンパク質に結合するポリマーの数は様々であってよく、及び 1 つより多いポリマーが結び付く場合に、ポリマーは同じ分子であっても、又は異なる分子であってもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び / 又は種類は、限定はされないが、改良されるタンパク質の特定の特性又は機能、タンパク質誘導体が限定条件下での治療に使用されることになるかどうか等を含む考慮事項に基づき決定することができる。

40

## 【0293】

当業者は、タンパク質とのコンジュゲーションに先立ち、一方又は双方の末端に官能基を有する誘導体を調製することにより、ポリマー (例えば、PEG) を活性化させる必要があり得ることを認識するであろう。

## 【0294】

本発明のタンパク質とのコンジュゲーションに特に好ましい化合物を表 1 に示す。

## 【0295】

【表 1】

表 1: コンジュゲーションに好ましい化合物

分類	詳細
放射性同位元素 (直接的又は間接的に)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>^{123}\text{I}</math>, <math>^{125}\text{I}</math>, <math>^{130}\text{I}</math>, <math>^{133}\text{I}</math>, <math>^{135}\text{I}</math>, <math>^{47}\text{Sc}</math>, <math>^{72}\text{As}</math>, <math>^{72}\text{Sc}</math>, <math>^{90}\text{Y}</math>, <math>^{88}\text{Y}</math>, <math>^{97}\text{Ru}</math>, <math>^{100}\text{Pd}</math>, <math>^{101\text{m}}\text{Rh}</math>, <math>^{101\text{m}}\text{Rh}</math>, <math>^{119}\text{Sb}</math>, <math>^{128}\text{Ba}</math>, <math>^{197}\text{Hg}</math>, <math>^{211}\text{At}</math>, <math>^{212}\text{Bi}</math>, <math>^{153}\text{Sm}</math>, <math>^{169}\text{Eu}</math>, <math>^{212}\text{Pb}</math>, <math>^{109}\text{Pd}</math>, <math>^{111}\text{In}</math>, <math>^{67}\text{Ga}</math>, <math>^{68}\text{Ga}</math>, <math>^{67}\text{Cu}</math>, <math>^{75}\text{Br}</math>, <math>^{76}\text{Br}</math>, <math>^{77}\text{Br}</math>, <math>^{99\text{m}}\text{Tc}</math>, <math>^{11}\text{C}</math>, <math>^{13}\text{N}</math>, <math>^{15}\text{O}</math>, <math>^{18}\text{F}</math>, <math>^{188}\text{Re}</math>, <math>^{203}\text{Pb}</math>, <math>^{64}\text{Cu}</math>, <math>^{105}\text{Rh}</math>, <math>^{198}\text{Au}</math>, <math>^{199}\text{Ag}</math> 又は <math>^{177}\text{Lu}</math></li> </ul>
半減期延長剤	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ポリエチレングリコール</li> <li>• グリセロール</li> <li>• グルコース</li> </ul>
蛍光プローブ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• フィコエリトリン (PE)</li> <li>• アロフィコシアニン (APC)</li> <li>• Alexa Fluor 488</li> <li>• Cy5.5</li> </ul>
生物製剤	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ウミシイタケルシフェラーゼ、GFPなどの蛍光タンパク質</li> <li>• 免疫調節物質</li> <li>• 毒素</li> <li>• 免疫グロブリン</li> <li>• アルブミンなどの半減期延長剤</li> </ul>
化学療法薬	<ul style="list-style-type: none"> <li>• タキソール</li> <li>• 5-FU</li> <li>• ドキソルピシン</li> <li>• イダルピシン</li> </ul>

10

20

30

## 【0296】

本発明の一例では、化合物と、それがコンジュゲートされるタンパク質との間に、スペーサー部分が含まれる。本発明のスペーサー部分は切断可能であっても、又は切断不可能であってもよい。例えば、切断可能なスペーサー部分はレドックス切断可能なスペーサー部分であり、従ってスペーサー部分は、細胞質などの、酸化還元ポテンシャルがより低い環境中及び遊離スルフヒドリル基を含む分子の濃度がより高い他の領域において切断可能である。酸化還元ポテンシャルの変化により切断され得るスペーサー部分の例としては、ジスルフィドを含むものが挙げられ得る。切断刺激は、コンジュゲートタンパク質が細胞内に取り込まれた時に提供されることができ、そこではより低い酸化還元ポテンシャルの細胞質がスペーサー部分の切断を促進する。

40

## 【0297】

別の例では、pHの低下によってスペーサーの切断が引き起こされ、それにより化合物が標的細胞中に放出される。pHの低下は、エンドソーム輸送、腫瘍増殖、炎症、及び心筋虚血などの、多くの生理学的及び病理学的過程に関与する。pHは生理学的な7.4からエンドソームにおいて5~6に、又はリソソームにおいて4~5に降下する。癌細胞のリソソーム又はエンドソームの標的化に用いられ得る酸感受性スペーサー部分の例としては、アセタール、ケタール、オルトエステル、ヒドラゾン、トリチル、cis-アコニチル、又はチオカルバモイルに見られるものなどの、酸切断可能な結合を有するものが挙げ

50

られる（例えば、米国特許第4,569,789号明細書、同第4,631,190号明細書、同第5,306,809号明細書、及び同第5,665,358号明細書を参照のこと）。他の例示的な酸感受性スパーサー部分はジペプチド配列 P h e - L y s 及び V a l - L y s を含む。

#### 【0298】

切断可能なスパーサー部分は、特定の標的細胞に関連する生物学的起源の切断剤、例えば、リソソーム酵素又は腫瘍関連酵素に対して感受性を有し得る。酵素切断することのできる連結部分の例としては、限定はされないが、ペプチド及びエステルが挙げられる。例示的な酵素切断可能な連結部分としては、カテプシンB又はプラスミンなどの腫瘍関連プロテアーゼに対して感受性を有するものが挙げられる。カテプシンBにより切断可能な部位としては、ジペプチド配列パリン-シトルリン及びフェニルアラニン-リジンが挙げられる。

10

#### 【0299】

##### コンジュゲーション方法

##### システイン（チオール）とのコンジュゲーション

化合物をシステイン残基にコンジュゲートするための様々な方法が当該技術分野において公知であり、当業者には明らかであろう。かかるコンジュゲーション用の試薬は、典型的には反応性の官能基を有し、それが（i）システインのシステインチオールと直接反応して標識タンパク質を形成し得るか、（ii）リンカー試薬と反応してリンカー-標識中間体を形成し得るか、又は（iii）リンカータンパク質と反応して標識タンパク質を形成し得る。リンカーの場合、有機化学反応、条件、及び試薬を用いるいくつかの経路が当業者に公知であり、それらとしては（1）本発明のタンパク質のシステイン基をリンカー試薬と反応させ、それにより共有結合を介したタンパク質-リンカー中間体を形成し、続いて活性化化合物と反応させること；及び（2）化合物の求核基をリンカー試薬と反応させ、それにより共有結合を介した化合物-リンカー中間体を形成し、続いて本発明のタンパク質のシステイン基と反応させることが挙げられる。上記から当業者には明らかとなり、本発明では二官能性リンカーが有用である。例えば、二官能性リンカーは、1つ又は複数のシステイン残基と共有結合で連結するためのチオール修飾基と、化合物と共有結合的又は非共有結合的に連結するための少なくとも1つの結合部分（例えば、第2のチオール修飾部分）とを含む。

20

30

#### 【0300】

様々なタンパク質及び化合物（及びリンカー）を使用して、本発明のコンジュゲートを調製することができる。システインチオール基は求核性であり、（i）活性エステル、例えば、NHSEステル、HOBTエステル、ハロホルメート、及び酸ハロゲン化物；（ii）ハロアセトアミドなどのハロゲン化アルキル及びベンジル；（iii）アルデヒド基、ケトン基、カルボキシル基、及びマレイミド基；及び（iv）スルフィド交換を介した、ピリジルジスルフィドを含むジスルフィドを含む、リンカー試薬又は化合物-リンカー中間体又は薬物上の求電子基と反応することにより共有結合を形成することが可能である。化合物又はリンカー上の求核基としては、限定はされないが、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と反応することにより共有結合を形成することが可能な、アミン基、チオール基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、オキシム基、ヒドラジン基、チオセミカルバゾン基、ヒドラジンカルボキシレート基、及びアリアルヒドラジン基が挙げられる。

40

#### 【0301】

好ましい標識試薬としては、マレイミド、ハロアセチル、ヨードアセトアミドスクシンイミジルエステル、イソチオシアネート、スルホニルクロリド、2,6-ジクロロトリアジニル、ペンタフルオロフェニルエステル、及びホスホラミダイトが挙げられるが、他の官能基もまた用いることができる。

#### 【0302】

メイタンシンが、例えばM a y - S S C H<sub>3</sub>に変換されてもよく、これを遊離チオールのM a y - S Hに還元して本発明のタンパク質と反応させることができ（C h a r iら、

50

1992年)、それによりジスルフィドリンカーを含むメイタンシノイド-イムノコンジュゲートが得られる。ジスルフィドリンカーを含むメイタンシノイドコンジュゲートは報告されている(国際公開第04/016801号パンフレット;米国特許第6884874号明細書;及び国際公開第03/068144号パンフレット)。ジスルフィドリンカーSPPは、リンカー試薬N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエートを含んで構成される。

#### 【0303】

別の例示的な反応性官能基は、化合物、例えばビオチン又は蛍光色素又は毒素又はタンパク質のカルボキシル基置換基のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(NHS)である。化合物のNHSエステルは、予め形成し、単離し、精製し、及び/又は特徴付けてもよく、又はインサイチュで形成してタンパク質の求核基と反応させてもよい。典型的には、カルボキシル型の化合物は、何らかの組み合わせのカルボジイミド試薬、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、又はウロニウム試薬、例えばTSTU(O-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロホウ酸、HBTU(O-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート)、又はHATU(O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート)、アクチベータ、例えば1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、及びN-ヒドロキシスクシンイミドと反応させることにより活性化され、化合物のNHSエステルが得られる。ある場合には、化合物とタンパク質とを化合物のインサイチュでの活性化及びタンパク質との反応によりカップリングして、一段階でコンジュゲートを形成してもよい。他の活性化及びカップリング試薬としては、TBTU(2-(1H-ベンゾトリアゾ-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート)、TFFH(N,N',N',N'-テトラメチルウロニウム2-フルオロ-ヘキサフルオロホスファート)、PyBOP(ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスファート)、EEDQ(2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロ-キノリン)、DCC(ジシクロヘキシルカルボジイミド);DIPCDI(ジイソプロピルカルボジイミド)、MSNT(1-(メシチレン-2-スルホニル)-3-ニトロ-1H-1,2,4-トリアゾール、及びアリアルスルホニルハライド、例えばトリイソプロピルベンゼンスルホニルクロリドが挙げられる。

#### 【0304】

さらなるコンジュゲーション方法としては、例えば、マレイミド、ヨードアセトアミド(iodoacetamide)又はハロゲン化ハロアセチル/アルキル、アジリジン(aziridine)、アクリロイル誘導体を使用してシステインのチオールと反応させ、化合物との反応性を有するチオエーテルを作製することが挙げられる(例えば、Scheltersら、2000年(マレイミドの使用);Reddyら、1988年(マレイミド誘導体の使用);Ramseier及びChang、1994年(ヨードアセトアミド(iodoacetamide)の使用);Eisenら、1953年(2,4-ジニトロベンゼンスルホン酸(dinitrobenzenesulfonic acid)の使用);Grossmanら、1981年(アジリジンの使用);又はYemら、1992年(アクリロイル誘導体の使用)。遊離チオールの活性化ピリジルジスルフィドとのジスルフィド交換もまたコンジュゲートの作製に有用である(Kingら、1978年及びそこで引用される参考文献、例えば、5-チオ-2-ニトロ安息香(TNB)酸の使用)。好ましくは、マレイミドが使用される。

#### 【0305】

放射標識コンジュゲートの使用に関して、本発明のタンパク質は直接標識されてもよく(ヨウ素化によるなど)、又はキレート剤の使用によって間接的に標識されてもよい。本明細書で使用されるとき、語句「間接的に標識する」及び「間接的な標識手法」は双方とも、キレート剤がタンパク質に共有結合で結び付き、且つ少なくとも1つの放射性核種が

10

20

30

40

50

そのキレート剤と会合することを意味する。かかるキレート剤は、タンパク質及び放射性同位体の双方に結合するため、典型的には二官能性キレート剤と称される。例示的なキレート剤は、1-イソチオシクマトベンジル(isothiocycmatobenzyl)-3-メチルジオテレントリアミン五酢酸(methyldiothelene triaminepentaaetic acid) (「MX-DTPA」)及びシクロヘキシルジエレントリアミン五酢酸(「CHX-DTPA」)誘導体、又はDOTAを含む。DOTA-マレイミド(4-マレイミドブチルアミドベンジル-DOTA)などのリンカー試薬は、Axworthyら(2000年)の手順に従い、アミノベンジル-DOTAを、クロロギ酸イソプロピル(Aldrich)により活性化されたA-マレイミド酪酸(Fluka)と反応させることにより調製することができる。DOTA-マレイミド試薬は本発明のタンパク質の遊離システインアミノ酸と反応し、そこに金属錯体リガンドを提供する(Lewisら、1998年)。DOTA-NHS(1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸モノ(N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)などのキレート化リンカー標識試薬が市販されている(Macrocyclics, Dallas, TX)。

#### 【0306】

連結前に、本発明のタンパク質をDTT(クレランド試薬のジチオスレイトール)又はTCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩; Getzら、1999年; Soltec Ventures, Beverly, MA)などの還元剤で処理することにより、リンカー試薬とのコンジュゲーション用に反応性にすることが好ましい。室温での希薄(200nM)水性硫酸銅(CuSO<sub>4</sub>)との連結に必要なないシステイン残基間に、ジスルフィド結合を再び確立することができる。当該技術分野において公知の他のオキシダント、すなわち酸化剤、及び酸化条件が用いられてもよい。周囲空気酸化もまた有効である。この穏やかな部分的再酸化ステップにより、鎖内ジスルフィドが高忠実度で効率的に形成される。

#### 【0307】

##### スレオニン/セリンとのコンジュゲーション

化合物をスレオニン残基又はセリン残基とコンジュゲートするための方法もまた、当該技術分野において公知である。例えば、Zhang及びTam(1996年)は、セリン又はスレオニンの1,2-アミノアルコールからカルボニル前駆体を誘導し、これを過ヨウ素酸酸化により選択的に、且つ高速でアルデヒド型に変換することができる方法を記載している。本発明のタンパク質に結合させる化合物中のシステインの1,2-アミノアルコールとアルデヒドを反応させると、安定なチアゾリジン生成物が形成される。この方法は、N末端セリン残基又はスレオニン残基のタンパク質の標識に特に有用である。

#### 【0308】

##### ペグ化方法

化合物、例えばPEGをタンパク質とコンジュゲートするための様々な方法が当該技術分野において公知である。PEGの場合、分子は、アミン又はイミダゾール、カルボン酸基、ヒドロキシル基又はスルフヒドリル基とのその結合を促進するように活性化することができる。

#### 【0309】

例えば、Abuchowskiら(1977年)は、塩化シアヌルを使用してPEGを活性化し、PEGジクロロトリアジン誘導体を作製した。この誘導体は、リジン、セリン、チロシン、システイン及びヒスチジンなどの複数の機能的求核性官能基と反応することができる。このプロトコルの改良版によりPEG-クロロトリアジンが作製されており、これは反応性がより低く、リジン残基又はシステイン残基とより選択的にコンジュゲートする(Mutsushimara、1980年)。

#### 【0310】

タンパク質とのコンジュゲーションに使用されるPEGのなかで広く用いられている2つの形態は、スクシンイミジルカーボネートPEG(SC-PEG; Zalipskyら

、1992年)及びベンゾトリアゾールカーボネートPEG(BTC-PEG;米国特許第5,560,234号明細書)である。これらの化合物の双方とも、リジン残基と選択的に反応してカルバメート連結を形成するが、しかしながらヒスチジン及びチロシンと反応することも知られている。SC-PEGは、BTC-PEGと比べて加水分解に対する抵抗性が若干高い。

#### 【0311】

タンパク質とのコンジュゲーションに有用な別のPEGは、PEG-プロピオンアルデヒドである(米国特許第5,252,714号明細書)。この化学の利点は、酸性条件下(約pH5)では大部分がN末端-アミンについて選択的であり、従って非特異的なコンジュゲーションに関する潜在的な問題が回避される。PEG-プロピオンアルデヒドのアセタール誘導体、すなわちPEG-アセタールアルデヒドは、それがPEG-プロピオンアルデヒドより長い貯蔵を提供する限りにおいてさらなる利益を提供する(米国特許第5,990,237号明細書)。

10

#### 【0312】

PEGカルボン酸の活性エステルは、おそらくタンパク質コンジュゲーションに最も用いられているアシル化剤の一つである。活性エステルはほぼ生理学的条件で第一級アミンと反応して安定なアミドを形成する。PEG-カルボン酸のスクシンイミジル活性エステルへの活性化は、PEG-カルボン酸をN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS又はHOSu)及びカルボジイミドと反応させることにより達成される。PEGの例示的カルボン酸誘導体としては、カルボキシメチル化PEG(CM-PEG;Zalipskyら、1990年)、ブタン酸誘導体及びプロピオン酸誘導体(米国特許第5,672,662号明細書)が挙げられる。メチレン単位の付加により活性エステルとPEG骨格との間の距離を変化させると、水及びアミンに対する反応性に劇的な影響を(例えば、加水分解の減少により)及ぼすことができる。それに代えて又は加えて、加水分解は、カルボン酸に対して-分枝部分を導入することにより低減することができる。

20

#### 【0313】

タンパク質中の遊離システイン残基のペグ化は、部位特異的コンジュゲーション(例えば、本明細書に記載されるとおりのシステイン残基を含むように修飾されたタンパク質を使用する)に有用である。システインコンジュゲーション用の例示的PEG誘導体としては、PEG-マレイミド、PEG-ビニルスルホン、PEG-ヨードアセトアミド及びPEG-オルトピリジルジスルフィドが挙げられる。PEGのシステイン残基との例示的なコンジュゲーション方法は、Goodsen及びKatre(1990)及び/又は上記に記載される。PEG-ビニルスルホンを使用した例示的コンジュゲーション方法は、例えばLiら(2006年)に記載される。

30

#### 【0314】

米国特許第5985263号明細書は、ヒスチジンの、pKaが第一級アミンより低い第二級アミン基に対してPEGをコンジュゲートする方法について記載する。この手法の利点は、アシル-ヒスチジン(histidine)結合が安定でない、つまりタンパク質が徐々に放出されることである(すなわち、コンジュゲートは徐放製剤又はプロドラッグとして振舞う)。

40

#### 【0315】

別のペグ化手法は、上記に考察されるとおりの過ヨウ素酸塩に変換することのできるN末端セリン又はスレオニンを利用するものである。この手法を用いてPEGが生理活性タンパク質にコンジュゲートされている(例えば、Gaertner及びOfford、1996年)。

#### 【0316】

PEGはまた、炭水化物基にコンジュゲートすることもできる。

#### 【0317】

本発明はまた、可逆的ペグ化戦略の使用も包含する。

#### 【0318】

50

## 使用

本発明のタンパク質は、研究、診断及び治療における用途を含め、様々な用途に有用である。タンパク質が結合する抗原によっては、例えば細胞を死滅させたり、又は増殖を抑えたりするための、細胞への化合物の送達、及び/又はイメージング、及び/又はインビトロアッセイに有用であり得る。一例において、タンパク質は、イメージング及び細胞傷害剤の細胞への送達の双方に有用であり、すなわち検出可能標識と細胞傷害剤とに、又は一部が細胞傷害剤にコンジュゲートし、且つ一部が検出可能標識にコンジュゲートしているタンパク質の混合物を含む組成物にコンジュゲートされる。

## 【0319】

本明細書に記載されるタンパク質はまた、(a)受容体に対する(例えば、リガンド、阻害因子の)結合、(b)受容体シグナル伝達機能、及び/又は(c)刺激機能を阻害する(低減又は抑制することのできる)阻害薬としても作用することができる。受容体機能の阻害薬として作用するタンパク質は、リガンド結合を直接的又は間接的に(例えば、コンホメーション変化を引き起こすことにより)阻止することができる。

## 【0320】

## 抗原

本発明は、任意の1つ又は複数の抗原との特異的な結合能を有するFR1に少なくとも2つのシステイン残基を含む少なくとも1つの可変領域を含むタンパク質を企図し、すなわち、本発明の例は、特定の抗原を要件とすることに対比して汎用的である。

## 【0321】

本発明の例は、疾患又は障害(すなわち、病態)に関連する、例えば、癌又は癌性/癌化細胞に関連する、又はそれにより発現される、及び/又は自己免疫疾患に関連する、及び/又は炎症性疾患又は病態に関連する、及び/又は神経変性疾患に関連する、及び/又は免疫不全障害に関連する抗原に特異的に結合するタンパク質を企図する。

## 【0322】

本発明のタンパク質を作製する対象となり得る例示的抗原としては、BMPR1B(骨形成タンパク質受容体IB型、Dijkers 1994年、国際公開第2004063362号パンフレット); E16(LAT1、SLC7A5、国際公開第2004048938号パンフレット); STEAP1(前立腺の6回膜貫通上皮抗原; 国際公開第2004065577号パンフレット); CA125(MUC16、国際公開第2004045553号パンフレット); MPF(MSLN、SMR、巨核球増強因子、メソテリン、国際公開第2003101283号パンフレット); Napi3b(NAPI-3B、NPTIIB、SLC34A2、溶質輸送体ファミリー34; 国際公開第2004022778号パンフレット); Sema5b(FLJ10372、KIAA1445、SEMA5B、SEMA5G、セマフォリン5b、セマドメイン、7トロンボスポンジンリピート(1型及びHike型)、膜貫通ドメイン(TM)及び短い細胞質ドメイン、(セマフォリン)5B、国際公開第2004000997号パンフレット); PSCA(米国特許出願公開第2003129192号明細書); ETBR(エンドセリンB型受容体、国際公開第2004045516号パンフレット); MSG783(RNF124、国際公開第2003104275号パンフレット); STEAP2(HGNC\_8639、IPCA-I、PCANAP1、STAMP1、STEAP2、STMP、前立腺癌関連遺伝子1、前立腺癌関連タンパク質1、前立腺の6回膜貫通上皮抗原2、6回膜貫通前立腺タンパク質、国際公開第2003087306号パンフレット); TrpM4(BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B、一過性受容器電位陽イオンチャネル、サブファミリーM、メンバー4、米国特許出願公開第2003143557号明細書); CRIPTO(CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、テラトカルシノーマ由来成長因子、米国特許出願公開第2003224411号明細書); CD21(CR2(補体受容体T)又はC3DR(C3d/エプスタイン・バーウイルス受容体)国際公開第2004045520号パンフレット); CD79b(CD79B、CD79、IGb(免疫グロブリン関連)、B29、国際公開第2004016225号パンフレット

10

20

30

40

50

); FcRH2 (DFGP4、IRTA4、SPAP1A (SH2ドメイン含有ホスファターゼアンカータンパク質Ia)、SPAP1B、SPAP1C、国際公開第2004016225号パンフレット); HER2 (ErbB2、国際公開第2004048938号パンフレット); NCA (CEACAM6、国際公開第2004063709号パンフレット); MDP (DPEP1、国際公開第2003016475号パンフレット); IL20R (IL20Ra、ZCYTOR7、欧州特許第1394274号明細書); プレビカン (BCAN、BEHAB、米国特許出願公開第2003186372号明細書); EphB2R (DRT、ERK、Hek5、EPHT3、Tyro5、国際公開第2003042661号パンフレット); ASLG659 (B7h、米国特許出願公開第20040101899号明細書); PSCA (前立腺幹細胞抗原前駆体、国際公開第2004022709号パンフレット); GEDA (脂肪腫HMGIC融合パートナー様タンパク質 国際公開第2003054152号パンフレット); BAFF-R (B細胞活性化因子受容体、BlyS受容体3、BR3、国際公開第2004058309号パンフレット); CD22 (B細胞受容体CD22-Bアイソフォーム、BL-CAM、Lyb-8、Lyb8、SIGLEC-2、FLJ22814、国際公開第2003072036号パンフレット); CD79a (CD79A、CD79、免疫グロブリン関連、Ig (CD79B)と共有結合的に相互作用して表面上にIg M分子との複合体を形成し、B細胞分化に關与するシグナルを伝達するB細胞特異的タンパク質である; 国際公開第2003088808号パンフレット); CXCR5 (パーキットリンパ腫受容体1、CXCL13ケモカインにより活性化され、リンパ球遊走及び体液性防御において機能し、HIV-2感染並びにおそらくはAIDS、リンパ腫、骨髄腫及び白血病の発症において役割を果たすGタンパク質共役受容体である 国際公開第2004040000号パンフレット); HLA-DOB (ペプチドを結合し、それらをCD4+Tリンパ球に提示するMHCクラスII分子 (Ia抗原)のサブユニット; 国際公開第9958658号パンフレット); P2X5 (プリン受容体P2Xリガンド開口型イオンチャンネル5、細胞外ATPによりゲート開閉されるイオンチャンネルであり、シナプス伝達及び神経形成に關わり得る。欠損は特発性排尿筋不安定の病態生理に關与し得る; 国際公開第2004047749号パンフレット); CD72 (B細胞分化抗原CD72、Lyb-2; 国際公開第2004042346号パンフレット); LY64 (リンパ球抗原64 (RP 105)、ロイシンリッチリピート (LRR)ファミリーのI型膜タンパク質であり、B細胞活性化及びアポトーシスを制御し、機能喪失は全身性エリテマトーデス患者における疾患活性の上昇に關連する; 米国特許出願公開第2002193567号明細書); FcRH1 (Fc受容体様タンパク質1、C2型Ig様ドメイン及びITAMドメインを含む免疫グロブリンFcドメインについての推定受容体であり、Bリンパ球分化において役割を有し得る 国際公開第2003077836号パンフレット); IRTA2 (免疫グロブリンスーパーファミリー受容体転座關連2、B細胞発生及びリンパ腫形成において役割を有する可能性のある推定免疫受容体である; 一部のB細胞悪性腫瘍では転座による遺伝子の調節解除が起こる; 国際公開第2003077836号パンフレット); TENB2 (TMEFF2、トモレギュリン、TPEF、HPP1、TR、推定膜貫通プロテオグリカンであり、EGF/ヘレグリン成長因子ファミリー及びフォリスタチンに關連する; 国際公開第2004074320号パンフレット); CD20 (国際公開第94/11026号パンフレット); VEGF-A (Prestara、1997年); p53; EGFR; プロゲステロン受容体; カテプシンD; Bcl-2; Eカドヘリン; CEA; ルイスX; Ki67; PCNA; CD3; CD4; CD5; CD7; CD11c; CD11d; c-Myc; ; PrPSC; 又はA が挙げられる。

### 【0323】

好ましくは、本発明のタンパク質は、Her2 (例えば、配列番号70に示される配列を含む)、MUC1 (例えば、配列番号72又は73に示される配列を含む)、TAG72 (例えば、Johnsonら、1986年に記載されるとおりの高分子量ムチン様タンパク質) 又はPSMA (例えば、配列番号71に示される配列を含む) に特異的に結合す

10

20

30

40

50

る。例えば、本発明のタンパク質はH e r 2に特異的に結合する。例えば、本発明のタンパク質はM U C 1に特異的に結合する。例えば、本発明のタンパク質はT A G 7 2に特異的に結合する。例えば、本発明のタンパク質はP S M Aに特異的に結合する。

#### 【0324】

本発明のタンパク質が由来し得る他の例示的抗体は当業者に明らかで、例えば、リツキシマブ(C 2 B 8 ; 国際公開第94 / 11026号パンフレット) ; 又はベバシズマブ(ヒト化A . 4 . 6 . 1 ; P r e s t a ら、1997年) が挙げられる。

#### 【0325】

例示的な二重特異性タンパク質は、目的の抗原の2つの異なるエピトープに結合し得る。他のかかるタンパク質は、ある抗原結合部位を別のタンパク質の結合部位と組み合わせ得る。或いは、目的の抗-抗原領域を、T細胞受容体分子(例えば、C D 3)などの、白血球上のトリガー分子、又はF c R I (C D 6 4)、F c R I I (C D 3 2)及び/又はF c R I I I (C D 1 6)などの、I g Gに対するF c受容体(F c R)に結合する領域と組み合わせ、それにより目的の抗原を発現する細胞に細胞防御機構を集中させ、局在化させてもよい。二重特異性タンパク質はまた、目的の抗原を発現する細胞に細胞傷害剤を局在化させるためにも用いられ得る。これらのタンパク質は、目的の抗原を結合する領域と、細胞傷害剤(例えば、サポリン、抗インターフェロン-、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキサート又は放射性同位体ハプテン)を結合する領域とを有する。国際公開第96 / 16673号パンフレットは二重特異性抗E r b B 2 / 抗F c R I I I 抗体を記載し、及び米国特許第5, 837, 234号明細書は二重特異性抗E r b B 2 / 抗F c R I 抗体を開示する。二重特異性抗E r b B 2 / F c 抗体が国際公開第98 / 02463号パンフレットに示される。米国特許第5, 821, 337号明細書は二重特異性抗E r b B 2 / 抗C D 3 抗体を教示する。

#### 【0326】

##### 医薬組成物及び治療方法

本発明のタンパク質(同義語、有効成分)は、予防的処置又は治療的処置のための非経口、局所、経口、若しくは局在投与、エアロゾル投与、又は経皮投与に有用である。医薬組成物は、投与方法に応じた様々な単位剤形で投与することができる。例えば、経口投与に好適な単位剤形としては、粉末、錠剤、丸薬、カプセル及びロゼンジが挙げられ、さもなければ非経口投与による。本発明の医薬組成物が経口投与されるときには、消化から保護されなければならないことが認識される。これは、典型的には、タンパク質を組成物と複合体化して、それを酸及び酵素の加水分解に対して耐性にするか、或いは化合物をリポソームなどの適切な抵抗性を有する担体にパッケージングすることにより達成される。タンパク質を消化から保護する手段は当該技術分野において公知である。

#### 【0327】

典型的には、治療有効量のタンパク質が、対象に投与するための組成物中に製剤化される。語句「治療有効量」は、対象における処置又は他の治療効果を促進し、誘発し、及び/又は亢進するのに十分な量を指す。明らかなどおり、これらの製剤中における本発明のタンパク質の濃度は幅広く異なり得るとともに、選択された特定の投与方式及び患者の必要性に従い、主として液量、粘度、体重などに基き選択されることになる。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば1つ又は複数の別個の投与による場合であっても、或いは持続注入による場合であっても、治療有効量は約1  $\mu$  g / k g ~ 15 m g / k g (例えば0 . 1 ~ 20 m g / k g) の分子であり得る。典型的な1日投薬量は約1  $\mu$  g / k g ~ 100 m g / k g 又はそれ以上の範囲となる可能性がある。患者に投与されるタンパク質の例示的投薬量は、約0 . 1 ~ 約10 m g / k g (患者体重)の範囲である。数日間又はそれ以上にわたる反復投与については、病態に応じて、処置は疾患症状の所望の抑制が起こるまで続けられる。例示的投与レジメンは、約4 m g / k g の初回負荷用量と、その後の約2 m g / k g のタンパク質の週1回維持用量の投与を含む。他の投薬量レジメンが有用であり得る。この治療の経過は、従来技術及びアッセイにより容易にモニタリングされる。

## 【0328】

或いは、本発明のタンパク質は、対象への投与前に治療有効用量に希釈される濃縮用量 (doses) で製剤化される。

## 【0329】

本発明の医薬組成物は非経口投与に特に有用であり、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、又は蠕動投与及び腫瘍若しくは疾患部位への直接注入（腔内投与）を含む他のかかる経路を介した注射用に製剤化される。投与される組成物は、一般に、薬学的に許容可能な担体、好ましくは水性担体中に溶解した本発明のタンパク質の溶液を含み得る。例えば緩衝生理食塩水など、様々な水性担体を使用することができる。他の例示的担体としては、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロス溶液、及び5%ヒト血清アルブミンが挙げられる。混合油及びオレイン酸エチルなどの非水性媒体もまた用いられ得る。リポソームもまた担体として用いられ得る。媒体は、等張性及び化学的安定性を亢進する少量の添加剤、例えば緩衝剤及び防腐剤を含有してもよい。組成物は、pH調整剤及び緩衝剤、毒性調整剤など、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどの、生理学的条件に近似させる必要に応じた薬学的に許容可能な補助物質を含有してもよい。

10

## 【0330】

医薬組成物の調製技法は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第16版 Mack Publishing Company、1980年に例示されるとおり、概して当該技術分野において公知である。

20

## 【0331】

国際公開第2002/080967号パンフレットは、例えば喘息の治療用タンパク質を含むエアロゾル化された組成物を投与するための組成物及び方法について記載し、これは本発明のタンパク質の投与にも好適である。

## 【0332】

本発明の化合物の好適な投薬量は、特異性タンパク質、診断/治療/予防される病態及び/又は治療される対象によって異なり得る。好適な投薬量の決定は技能を有する医師の能力の範囲内であり、例えば、最適以下の投薬量で開始し、投薬量を漸増させながら変更して最適又は有効な投薬量を決定することによる。或いは、治療/予防に適切な投薬量を決定するため、細胞培養アッセイ又は動物試験のデータが使用され、ここで好適な用量は、毒性をほとんど又は全く伴わない活性化合物のED50を含む循環濃度の範囲内である。投薬量は、用いられる剤形及び利用される投与経路によってこの範囲内で異なり得る。治療的に/予防的に有効な用量は、初めは細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養で決定されるときにIC50（すなわち、最大半量の症状抑制を実現する化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を実現するように調整され得る。かかる情報を使用して、ヒトにおける有効用量をより正確に決定することができる。血漿中レベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーにより計測されてもよい。

30

## 【0333】

本発明のタンパク質は、医薬複合製剤中で、又は併用療法としての投与レジメンにおいて、第2の化合物と組み合わせられてもよい。医薬複合製剤又は投与レジメンの第2の化合物は、好ましくは組み合わせのタンパク質に対して、それらが互いに悪影響を及ぼし合うことがないよう補足的な活性を有する。

40

## 【0334】

第2の化合物は、化学療法剤、細胞傷害剤、サイトカイン、増殖抑制剤、抗ホルモン剤、及び/又は心保護薬であってもよい。かかる分子は好適には、意図する目的に有効な量で組み合わせられて存在する。本発明のタンパク質を含有する医薬組成物はまた、チューブリン形成阻害薬、トポイソメラーゼ阻害薬、又はDNA結合剤などの、治療有効量の化学療法剤も有し得る。

## 【0335】

医薬「徐放」カプセル又は組成物もまた用いられ得る。徐放製剤は、概して長期間にわ

50

たり一定の薬物濃度をもたらすように設計され、本発明の化合物の送達に使用することができる。

【0336】

本発明はまた、対象における病態の治療又は予防方法であって、治療有効量の本発明のタンパク質をそれを必要とする対象に投与するステップを含む方法も提供する。

【0337】

本明細書で使用されるとき、病態の予防との関連における用語「予防している」、「予防する」又は「予防」は、特定の疾患又は病態の少なくとも1つの症状の発症を止め、又は妨げるのに十分な量の本明細書に記載されるタンパク質を投与することを含む。

【0338】

本明細書で使用されるとき、用語「治療している」、「治療する」又は「治療」は、本明細書に記載される1つ又は複数の阻害薬及び/又は1つ又は複数の薬剤を、特定の疾患又は病態の少なくとも1つの症状を軽減又は解消するのに十分な治療有効量で投与することを含む。

【0339】

本明細書で使用されるとき、用語「対象」は、ヒトを含む任意の動物、好ましくは哺乳動物を意味するものと解釈されなければならない。例示的对象としては、限定はされないが、ヒト、霊長類、家畜（例えば、ヒツジ、雌ウシ、ウマ、ロバ、ブタ）、コンパニオン動物（例えば、イヌ、ネコ）、実験室試験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、ハムスター）、捕獲野生動物（例えば、キツネ、シカ）が挙げられる。好ましくは哺乳動物はヒト又は霊長類である。より好ましくは哺乳動物はヒトである。

【0340】

本明細書で使用されるとき、「病態」は正常な機能が乱されたり、又は妨げられたりすることであり、いかなる特定の病態にも限定されるものではなく、疾患又は障害を含み得る。一例では、病態は癌又は免疫病理学的障害である。

【0341】

例示的癌としては、限定はされないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病又はリンパ性悪性腫瘍が挙げられる。かかる癌のより詳細な例としては、有棘細胞癌（例えば上皮有棘細胞癌）、肺癌、例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌及び肺の扁平上皮癌腫、腹膜の癌、肝細胞癌、消化管癌を含む胃癌（*g a s t r i c c a n c e r*）又は胃癌（*s t o m a c h c a n c e r*）、膵癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、ヘパトーマ、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌腫又は子宮癌腫、唾液腺癌腫、腎癌（*k i d n e y c a n c e r*）又は腎癌（*r e n a l c a n c e r*）、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、陰茎癌腫、並びに頭頸部癌が挙げられる。好ましくは癌は乳癌又は卵巣癌又は前立腺癌である。

【0342】

本発明の一例において、癌はHer2を発現する。例示的癌としては、乳癌、卵巣癌、胃癌又は子宮癌、好ましくは乳癌が挙げられる。かかる癌は、例えばHer2に結合する本発明のタンパク質により治療することができる。

【0343】

本発明の別の例において、癌はPSMAを発現する。例示的癌としては前立腺癌が挙げられる。かかる癌は、例えばPSMAに結合する本発明のタンパク質により治療することができる。

【0344】

本発明のさらなる例において、癌はTag72を発現する。例示的癌としては、結腸直腸癌、胃癌、膵癌、卵巣癌、子宮内膜癌、乳癌、非小細胞肺癌、及び前立腺癌などの癌腫が挙げられる。かかる癌は、例えばTag72に結合する本発明のタンパク質により治療することができる。

【0345】

本発明のさらなる例において、癌はMUC1、好ましくは癌に関連するMUC1のグリ

10

20

30

40

50

コフォームを発現する。例示的癌としては、結腸直腸癌、胃癌、膵癌、乳癌、肺癌、及び膀胱癌などの癌腫が挙げられる。かかる癌は、例えばMUC1に結合する本発明のタンパク質により治療することができる。

【0346】

免疫病理学は免疫学的原因を有する疾患の研究であり、免疫性疾患は、免疫グロブリンの抗原との反応により引き起こされる任意の病態である。従って、「免疫病理学的障害」は、対象の免疫系が抗原と反応することにより生じる障害と定義することができる。免疫病理学的障害としては、自己免疫疾患及び過敏性反応（例えばI型：アナフィラキシー、じんま疹、食物アレルギー、喘息；II型：自己免疫性溶血性貧血、輸血反応；III型：血清病、壊死性血管炎、糸球体腎炎、関節リウマチ、ループス；IV型：接触性皮膚炎、移植片拒絶反応）が挙げられる。自己免疫疾患としては、リウマチ性障害（例えば、関節リウマチ、シェーグレン症候群、強皮症、SLE及びループス腎炎などのループス、多発筋炎/皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、抗リン脂質抗体症候群、及び乾癬性関節炎など）、変形性関節症、自己免疫性胃腸及び肝障害（例えば、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎及びクローン病）、自己免疫性胃炎及び悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、及びセリアック病など）、血管炎（例えば、チャージ-ストラウス血管炎、ウェゲナー肉芽腫症、及び多発性動脈炎（polyarteritis）を含むANCA関連血管炎など）、自己免疫性神経障害（例えば、多発性硬化症、オプソクローヌス・ミオクローヌス症候群、重症筋無力症、視神経脊髄炎、及び自己免疫性多発ニューロパチー）、腎障害（例えば、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、及びベルジェ病など）、自己免疫性皮膚障害（例えば、乾癬、蕁麻疹、じんま疹、尋常性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、及び皮膚エリテマトーデスなど）、血液障害（例えば、血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、輸血後紫斑病、及び自己免疫性溶血性貧血など）、アテローム性動脈硬化症、ブドウ膜炎、自己免疫性聴覚疾患（例えば、内耳疾患及び難聴など）、ベーチェット病、レイノー症候群、臓器移植、及び自己免疫性内分泌障害（例えば、インスリン依存性真性糖尿病（IDDM）などの糖尿病関連自己免疫疾患、アジソン病、及び自己免疫性甲状腺疾患（例えば、グレース病及び甲状腺炎）など）が挙げられる。より好ましいかかる疾患としては、例えば、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、ANCA関連血管炎、ループス、多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレース病、IDDM、悪性貧血、甲状腺炎、及び糸球体腎炎が挙げられる。

10

20

30

【0347】

別の実施形態において、障害は炎症性疾患である。炎症は刺激作用又は外傷に対する生体組織の防御反応であり、急性であることも、又は慢性であることもある。従って、炎症性障害は、好中球、単球、マスト細胞、好塩基球、好酸球、マクロファージが関与する疾患であって、サイトカイン放出、ヒスタミン放出、酸化的バースト、食作用、他の顆粒酵素の放出及び走化性が生じる疾患を含む。過敏性反応（上記の免疫病理学的障害のなかで定義される）はまた、多くの場合に補体活性化、及び好中球、マスト細胞、好塩基球等の様々な白血球の動員/浸潤が関わるため、炎症性疾患（急性又は慢性）と見なすこともできる。

40

【0348】

本発明の組成物は、投薬製剤と適合する方法で、且つ治療的に/予防的に有効となるような量で投与され得る。製剤は、様々な方法で、例えば摂取又は注射又は吸入により、容易に投与される。

【0349】

他の治療レジメンが本発明のタンパク質の投与と組み合わせられてもよい。併用療法は、同時的又は逐次的なレジメンとして投与され得る。逐次的に投与される場合、その組み合わせは2回以上の投与で投与され得る。組み合わせ投与は、別個の製剤又は単一の医薬製剤を使用した同時投与、及びいずれかの順序による連続投与であって、好ましくは、双方の（又は全ての）活性薬剤が同時にその生物活性を及ぼす期間が存在する連続投与を含む。

50

## 【0350】

治療での使用に先立ち、本発明のタンパク質は好ましくは、例えば以下に記載されるとおり、インビトロ及び/又はインビボで試験される。

## 【0351】

## インビトロ試験

一例において、本発明のタンパク質は、化合物にコンジュゲートされていてもなお、抗原に結合する。本タンパク質は、それが由来するタンパク質と少なくとも同程度に抗原に結合し得る。或いは、タンパク質又はそれを含むコンジュゲートは、それが由来するタンパク質の、又はシステイン残基を欠く、及び/又は化合物をコンジュゲートしていない形態のタンパク質の少なくとも約10%又は20%又は30%又は40%又は50%又は60%又は70%又は80%又は90%のアフィニティ又はアビディティで抗原に結合する。

10

## 【0352】

タンパク質の結合のアフィニティを測定する例示的方法としては、未修飾のタンパク質又はコンジュゲートされていないタンパク質の標的抗原との結合を阻止するタンパク質の能力を示す単純な免疫測定法、例えば競合的結合アッセイが挙げられる。競合的結合は、被験タンパク質が基準タンパク質の一般的な抗原との特異的結合を阻害するアッセイで測定される。数多くのタイプの競合的結合アッセイ、例えば、固相直接又は間接放射免疫測定法(RIA)、固相直接又は間接酵素免疫測定法(EIA)、サンドイッチ競合アッセイ；固相直接ビオチン-アビジンEIA；固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ；<sup>125</sup>I標識を用いる固相直接標識RIA；固相直接ビオチン-アビジンEIA；又は直接標識RIAが公知である(例えば、Harlow及びLane、1988年を参照のこと)。典型的にかかるアッセイには、未標識の試験タンパク質と、標識された基準タンパク質と、そのいずれかを有する細胞又は固体表面に結合した精製抗原との使用が関わる。試験タンパク質の存在下で固体表面又は細胞に結合した標識の量を決定することにより、競合的阻害が計測される。

20

## 【0353】

本発明はまた、本発明のタンパク質の活性の試験方法も包含する。本発明のタンパク質の活性をインビトロで評価するために、様々なアッセイを利用することができる。例えば、本発明のタンパク質が細胞又はその集合に投与され、それが前記細胞に結合できるか否か、及び/又は前記細胞により内部に取り込まれるか否かが決定される。かかるアッセイは、本発明のタンパク質を検出可能標識で標識する(すなわち、コンジュゲートを作製することにより促進されるが、しかしながら本発明のタンパク質は標識タンパク質によっても検出することができるため、これは必須ではない。かかるアッセイは、本発明のタンパク質が細胞に化合物を送達する能力(すなわち、ペイロード)及び/又はイメージングにおけるその有用性の評価に有用である。好ましくは細胞は、本発明のタンパク質が結合する抗原を発現し、より好ましくは検出又は治療が所望される細胞型の細胞系又は初代細胞培養物である。

30

## 【0354】

概して、例えば細胞傷害性分子にコンジュゲートされた、本発明のタンパク質の細胞傷害活性又は細胞増殖抑制活性の計測は、本発明のタンパク質が結合する抗原を発現する細胞を本発明のタンパク質に曝露し；タンパク質が生物学的作用をもたらすのに好適な期間、例えば約6時間～約5日間にわたり細胞を培養し；及び細胞生存度、細胞毒性及び/又は細胞死を計測することにより行われる。生存度(増殖)、細胞毒性、及び細胞死の計測に有用な細胞ベースのインビトロアッセイは当該技術分野において公知である。

40

## 【0355】

例えば、Cell Titer - Glo(登録商標)ルミネッセント細胞生存度アッセイ(Promega Corp.、Madison, WI)が市販されており、これは鞘翅目(Coleoptera)ルシフェラーゼの組換え発現に基づく均一アッセイ方法である(米国特許第5583024号明細書；同第5674713号明細書及び同第5700

50

670号明細書)。この細胞増殖アッセイは、代謝活性を有する細胞の指標となる、細胞中に存在するATPの定量化に基づき培養物中の生細胞数を決定する(米国特許第6602677号明細書)。或いは、細胞生存度は、非蛍光性レサズリンを使用してアッセイされ、レサズリンが本発明のタンパク質の存在下で培養される細胞に加えらる。生細胞によりレサズリンが赤色蛍光レゾルフィンに還元され、例えば顕微鏡法又は蛍光プレートリーダーを使用して、容易に検出可能となる。細胞生存度の解析キットが、例えばMolecular Probes、Eugene, OR, 米国から利用可能である。他の細胞生存度アッセイとしては、<sup>3</sup>H-チミジン又は<sup>14</sup>C-チミジンの、DNAの合成に伴うDNAへの取り込みの測定が挙げられ、これは細胞分裂に関連するDNA合成についてのアッセイである。かかるアッセイでは、細胞が標識チミジンの存在下で、細胞分裂が生じるのに十分な時間にわたりインキュベートされる。組み込まれなかった全てのチミジンが洗浄により取り除かれた後、標識(例えば放射性標識)が、例えばシンチレーションカウンタを使用して検出される。細胞増殖を測定する別のアッセイとしては、例えばBrdU取り込みによるDNA合成の計測(ELISA又は免疫組織化学、Amersham Pharmacia Biotechからキットを入手可能)が挙げられる。細胞死を検出する例示的アッセイとしては、APOPTEST(Immunotechから入手可能)によるアポトーシス初期の細胞の染色が挙げられ、これは細胞試料の固定が不要である。この方法は、アネキシンV抗体を利用してアポトーシスを受けている細胞に特有の細胞膜再構成を検出する。このように染色されたアポトーシス細胞は、次に固定化されたアネキシンV抗体を使用して、蛍光活性化細胞分離法(FACS)、ELISA、又は付着及びパニングのいずれかにより選別され得る。或いは、末端デオキシヌクレオチド転換酵素媒介性ビオチン化UTPニック末端標識(TUNEL)アッセイを用いて細胞死レベルが決定される。TUNELアッセイは酵素の末端デオキシヌクレオチド転換酵素を使用して、アポトーシス中に生成される3'-OH DNA末端をビオチン化ヌクレオチドで標識する。次に、検出可能なマーカーにコンジュゲートされたストレプトアビジンを使用してビオチン化ヌクレオチドが検出される。TUNEL染色用のキットは、例えばIntergen Company、Purchase, NYから入手可能である。

#### 【0356】

本発明のタンパク質の安定性もまた、本発明のタンパク質を血清及び/又は細胞に曝露し、続いて本発明のタンパク質を、例えばイムノアフィニティー精製を用いて単離することにより評価することができる。本発明のタンパク質の回収量の低下が、血清中での、又は細胞に対する曝露時の、本発明のタンパク質の分解を示す。

#### 【0357】

別の例では、リガンドの受容体との結合を阻止する本発明のタンパク質の能力が、標準的な放射性免疫測定法又は蛍光免疫測定法を用いて評価される。

#### 【0358】

##### インビボ試験

本発明のタンパク質はまた、その安定性及び/又は効力についてインビボで試験することもできる。例えば、本発明のタンパク質が対象に投与され、タンパク質の血清レベルが、例えばELISAを用いて、又はタンパク質にコンジュゲートした検出可能標識の検出により、経時的に検出される。これにより本発明のタンパク質の生体内安定性を判断することが可能となる。

#### 【0359】

本発明のタンパク質はまた、ヒト疾患の動物モデルに投与することもできる。当業者は、本発明のタンパク質が結合する抗原に基づき好適なモデルを決定することが容易に可能であろう。例示的なモデル、例えばヒト癌のモデルは、当該技術分野において公知である。例えば乳癌のマウスモデルは、線維芽細胞成長因子3(Mullerら、1990年); TGF- (Matsuiら、1990年); erbB2(Guyら、1992年); RET-1(Iwamotoら、1990年)を過剰発現するマウス又はヒト乳癌細胞のSCIDマウスへの移植を含む。卵巣癌のモデルは、卵巣癌細胞のマウスへの移植(例え

ば、R o b y ら、2 0 0 0 年に記載されるとおり) ; 黄体形成ホルモンを慢性的に分泌するトランスジェニックマウス ( R i s m a ら、1 9 9 5 年) ; 又は W x / W v マウスを含む。前立腺癌のマウスモデルもまた当該技術分野において公知であり、例えば、S V 4 0 初期遺伝子の強制発現から得られるモデルを含む ( 例えば、ミニマルラットプロバシンプロモーター ( m i n i m a l r a t p r o b a s i n p r o m o t e r ) を利用して S V 4 0 初期遺伝子を発現させる T R A M P モデル、又はロングプロバシンプロモーター ( l o n g p r o b a s i n p r o m o t e r ) を使用してラージ T 抗原を発現させるトランスジェニックマウス、まとめて「L A D Y」モデルと称されるもの、又は c - m y c 又は B c l - 2 又は F g f 8 b を発現するか、又はドミナントネガティブ T G F を発現するマウス ( 前立腺癌のトランスジェニックモデルのレビューについては、M a t u s i k ら、2 0 0 1 年を参照のこと) 。

10

## 【0360】

本発明のタンパク質はまた、癌以外の疾患の動物モデル、例えば N O D マウスに投与して、糖尿病を抑制し、予防し、治療し、又は遅延させるその能力を試験することもでき ( 例えば、T a n g ら ( 2 0 0 4 年) に記載されるとおり) 、及び / 又は G V H D のマウスモデルに ( 例えば、T r e n a d o ( 2 0 0 2 年) に記載されるとおり) 及び / 又は乾癬のマウスモデルに ( 例えば、W a n g ら 2 0 0 8 年) 及び / 又は関節リウマチのモデル、例えば S K G 株のマウス ( S a k a g u c h i ら) 、ラット I I 型コラーゲン関節炎モデル、マウス I I 型コラーゲン関節炎モデル又はいくつかの種における抗原誘導性関節炎モデル ( B e n d e l e 、2 0 0 1 年) ) 及び / 又は多発性硬化症 ( 例えば、実験的自己免疫性脳脊髄炎 ( E A E ; B r a d l 及び L i n i n g t o n 、1 9 9 6 年) ) 及び / 又は炎症性気道疾患 ( 例えば、O V A チャレンジ又はゴキブリ抗原チャレンジ ( C h e n ら 2 0 0 7 年 ; L u k a c s ら 2 0 0 1 年) ) のモデル及び / 又は炎症性腸疾患のモデル ( 例えば、デキストラン硫酸ナトリウム ( D S S ) 誘導性大腸炎モデル又は大腸炎の M u c 2 欠損マウスモデル ( V a n d e r S l u i s ら 2 0 0 6 年) に投与することもできる。

20

## 【0361】

診断 / 予後判定方法

一例において、本発明は病態の診断又は予後判定方法を提供する。

## 【0362】

本明細書で使用されるとき、用語「診断」、及びその変形、例えば限定はされないが「診断する」、「診断される」又は「診断の」などは、臨床状態の任意の一次診断又は再発性疾患の診断を含む。

30

## 【0363】

「予後判定」、「予後判定の」及びその変形は、本明細書で使用されるとき、回復又は再発の可能性を含め、疾患の起こり得る転帰又は進行を指す。

## 【0364】

一例において、この方法は、試料中の抗原の量を測定することを含む。従って、本発明のタンパク質は、診断又は研究目的での、細胞ソーティング ( 例えば、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞分離法) などの用途に有用性がある。例えば、試料を本発明のタンパク質と、それが抗原に結合して複合体を形成するのに十分な時間にわたり、且つそのような条件下で接触させ、次に複合体を検出するか、又は複合体のレベルを測定する。このために、タンパク質は標識されても、又は標識されなくてもよい。タンパク質は、例えば本明細書に記載される方法を用いて、直接標識することができる。標識されない場合、タンパク質は、例えば凝集アッセイにあるような、好適な手段を用いて検出することができる。未標識抗体又は断片はまた、タンパク質、例えばタンパク質と反応性を有する標識抗体 ( 例えば、第 2 の抗体) 又は他の好適な試薬 ( 例えば、標識プロテイン A ) の検出に使用することのできる別の ( すなわち、1 つ又は複数の) 好適な試薬と組み合わせて使用することもできる。

40

## 【0365】

50

好ましくは、本発明のタンパク質は免疫測定法において使用される。好ましくは、免疫組織化学法、免疫蛍光法、酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）、蛍光結合免疫吸着測定法（F L I S A） ウエスタンブロッティング、R I A、バイオセンサーアッセイ、タンパク質チップアッセイ及び免疫染色アッセイ（例えば免疫蛍光法）からなる群から選択されるアッセイを用いること。

**【0366】**

様々な試料からのタンパク質の濃度測定では、標準的な固相E L I S A又はF L I S Aフォーマットが特に有用である。

**【0367】**

一形態では、かかるアッセイは、生体試料を固体マトリックス、例えばポリスチレン又はポリカーボネート製マイクロウェル又はディップスティック、膜、又はガラス担体（例えばスライドガラス）などの上に固定化することを含む。目的の抗原に特異的に結合する本発明のタンパク質を固定化された試料と直接接触させ、前記試料中に存在するその標的抗原のいずれかと直接的な結合を形成する。この本発明のタンパク質は、概して検出可能なレポーター分子、例えば、F L I S Aの場合には蛍光標識（例えばF I T C又はテキサスレッド）又は蛍光性半導体ナノ結晶（米国特許第6,306,610号明細書に記載されるとおり）で、又はE L I S Aの場合には酵素（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）、アルカリホスファターゼ（A P）又は - ガラクトシダーゼ）で標識され、或いは本発明のタンパク質に結合する標識抗体を使用することができる。未結合のタンパク質を全て洗浄により取り除いた後、標識が、蛍光標識の場合には直接、或いは酵素標識の場合には、基質、例えば、過酸化水素、T M B、若しくはトルイジン、又は5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドール - D - ガラクトピラノシド（g a l a o t o p y r a n o s i d e）（x - g a l）などを加えることにより検出される。かかるE L I S A又はF L I S Aに基づくシステムは、タンパク質が結合する既知量のタンパク質標準、例えば、単離された、及び/又は組換えのタンパク質又はその免疫原性断片若しくはそのエピートープに対して検出システムを較正することにより、試料中のタンパク質量の定量化に特に好適となる。

**【0368】**

別の形態では、E L I S A又はF L I S Aは、本発明のタンパク質又は目的の抗原に結合する抗体を固体マトリックス、例えば、膜、ポリスチレン若しくはポリカーボネート製マイクロウェル、ポリスチレン若しくはポリカーボネート製ディップスティック又はガラス担体の上に固定化することから構成される。次に試料は、前記本発明のタンパク質と物理的に関係付けられ、前記化合物が結合するタンパク質を結合し、又は「捕捉」する。次に、異なるタンパク質又は同じタンパク質の異なる部位に結合する標識された本発明のタンパク質を使用して、結合したタンパク質が検出される。或いは、第2の（検出する）抗体を結合する第3の標識抗体を使用することができる。

**【0369】****イメージング方法**

当業者には上記から明らかとなっており、本発明はまた、本発明のタンパク質を使用したイメージング方法も企図する。イメージングのため、本発明のタンパク質が検出可能標識にコンジュゲートされ、検出可能標識は、イメージングにより検出可能なシグナルを放出することのできる任意の分子又は薬剤であってよい。例えば検出可能標識は、タンパク質、放射性同位体、フルオロフォア、可視光発光フルオロフォア、赤外光発光フルオロフォア、金属、強磁性物質、電磁気放出物質 特定のM R分光シグネチャを有する物質、X線吸収若しくは反射物質、又は音響変調物質であってよい。

**【0370】**

本発明のタンパク質は、イメージング手技に先立ち、全身投与されても、又は画像化される腫瘍、臓器、若しくは組織に局所投与されてもよい。概してタンパク質は、腫瘍、組織、又は臓器の所望の光学像を実現するのに有効な用量で投与される。かかる用量は、用いられる特定のタンパク質、イメージング手技に供される腫瘍、組織、又は臓器、使用さ

10

20

30

40

50

れるイメージング機器などによって幅広く異なり得る。

【0371】

本発明のいくつかの実施形態において、本発明のタンパク質は、限定はされないが、腫瘍のイメージング、臓器の断層イメージング、臓器機能のモニタリング、冠動脈造影、蛍光内視鏡検査、レーザーガイド手術、超音響法及び超音波蛍光法などを含めた、様々な生物医学的応用における組織及び臓器の生体内光学イメージング造影剤として使用される。本発明のタンパク質がイメージングに有用な例示的疾患、例えば癌が本明細書に記載され、それらは本発明の本実施形態に準用されるものと解釈されなければならない。一例において、本発明のタンパク質コンジュゲートは、対象において本発明の特定のタンパク質が集中しているところをモニタリングすることによる腫瘍及び他の異常の存在の検出に有用である。別の実施形態において、本発明のタンパク質は、腹腔鏡検査時に腫瘍の微小転移を検出するためのレーザー応用ガイド手術に有用である。さらに別の実施形態において、本発明のタンパク質は、動脈硬化性プラーク及び血餅の診断において有用である。

10

【0372】

イメージング方法の例としては、磁気共鳴映像法(MRI)、MR分光法、X線撮影、CT、超音波、平面ガンマカメライメージング、単一光子放射型コンピュータ断層撮影法(SPECT)、陽電子放射断層撮影法(PET)、他の核医学に基づくイメージング、可視光を使用する光学イメージング、ルシフェラーゼを使用する光学イメージング、フルオロフォアを使用する光学イメージング、他の光学イメージング、近赤外光を使用するイメージング、又は赤外光を使用するイメージングが挙げられる。

20

【0373】

本発明の方法の特定の例は、対象に対する外科手技中に組織をイメージングすることをさらに含む。

【0374】

様々なイメージング技法が当業者に公知である。本発明のイメージング方法との関連において検出可能標識からのシグナルを計測するために、それらの技法のいずれかを適用することができる。例えば、光学イメージングは、特定の医学分野で幅広い支持を受けているイメージングモダリティの一つである。例としては、細胞成分の光学標識、並びにフルオレセイン血管造影及びインドシアニングリーン血管造影などの血管造影が挙げられる。光学イメージング造影剤の例としては、例えば、フルオレセイン、フルオレセイン誘導体、インドシアニンググリーン、オレゴングリーン、オレゴングリーン誘導体の誘導体、ローダミンググリーン、ローダミンググリーンの誘導体、エオシン、エリトリロシン(erythrosin)、テキサスレッド、テキサスレッドの誘導体、マラカイトグリーン、ナノゴールドスルホスクシンイミジルエステル(nanogold sulfosuccinimidylester)、カスケードブルー、クマリン誘導体、ナフタレン、ピリジルオキサゾール(pyridyloxazole)誘導体、カスケードイエロー色素、ダポキシル(dapoxyl)色素が挙げられる。

30

【0375】

検出可能標識から得られるシグナルの計測に利用することのできるイメージング方法として、ガンマカメライメージングが企図される。当業者は、ガンマカメライメージングの応用技術に精通しているであろう。一実施形態において、シグナルの計測は、 $^{111}\text{In}$ 又は $^{99\text{m}}\text{Tc}$ コンジュゲート、特に $^{111}\text{In}$ -オクトレオチド又は $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ソマトスタチン類似体のカメライメージングの使用を含み得る。

40

【0376】

本発明との関連におけるイメージングモダリティとして、コンピュータ断層撮影法(CT)が企図される。CTは、様々な角度から一連のX線写真を撮影し、次にそれらをコンピュータで合成することにより、身体の任意の部分の三次元画像の構築を可能にする。コンピュータは、任意の角度からの、及び任意の深さの二次元スライスを表示するようにプログラムされる。スライスを合成して三次元表現を構築してもよい。

【0377】

50

CTでは、最初のCTスキャンで診断が下されない場合、目的の抗原に結合する本発明のタンパク質にコンジュゲートした放射線不透過性造影剤を静脈注射することが、軟部組織塊の特定及び描写に役立ち得る。同様に、造影剤は軟部組織病変の血管分布の評価にも役立つ。例えば、造影剤の使用は、腫瘍と隣接する血管構造との関係の描写に役立ち得る。

#### 【0378】

CT造影剤としては、例えばヨウ化造影剤が挙げられる。これらの作用剤の例としては、イオタラム酸、イオヘキソール、ジアトリゾ酸、イオパミドール、エチオドール、及びイオパノ酸が挙げられる。ガドリニウム剤、例えばガドペンテート (gadopentate) もまた、CT造影剤として有用であることが報告されている。

10

#### 【0379】

磁気共鳴映像法 (MRI) は、高強度磁石及び高周波信号を使用して画像を生成するイメージングモダリティである。MRIでは、画像化される試料を強静磁場中に置き、高周波 (RF) 放射パルスで励起することにより、試料において正味の磁化を生じさせる。次に様々な磁場勾配及び他のRFパルスが、空間情報を記録信号に符号化するように働く。それらの信号を収集して分析することにより三次元画像を計算することが可能となり、この画像は、CT像と同じく、通常は二次元スライスで表示される。スライスを合成して三次元表現を構築してもよい。

#### 【0380】

MRI又はMR分光イメージングに使用される造影剤は、他のイメージング技法で使用されるものと異なる。MRI造影剤の例としては、ガドリニウムキレート、マンガンキレート、クロムキレート、及び鉄粒子が挙げられる。例えば、本発明のタンパク質は、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、モリブデン、ルテニウム、セリウム、インジウム、プラセオジウム、ネオジウム、プロメチウム、サマリウム、ユウロピウム、ガドリニウム、テルビウム、ジスプロシウム、ホルミウム、エルビウム、ツリウム、及びイッテルビウムからなる群から選択される常磁性金属のキレートを含む化合物にコンジュゲートされる。本発明に有用な造影剤のさらなる例は、ハロカーボンベースのナノ粒子、例えばPFOB又は他のフッ素ベースのMRI剤である。CT及びMRIの双方とも、組織境界及び血管構造を識別するのに役立つ解剖学的情報を提供する。

20

30

#### 【0381】

細胞生存度などの細胞レベルの情報に関する情報を提供するイメージングモダリティとしては、陽電子放射断層撮影法 (PET) 及び単一光子放射型コンピュータ断層撮影法 (SPECT) が挙げられる。PETでは、患者が陽電子を放射する放射性物質を摂取するか、又はそれを注入され、それらの陽電子が体内を移動する物質としてモニタリングされ得る。

#### 【0382】

PETと近い関係にあるのが、単一光子放射型コンピュータ断層撮影法、すなわちSPECTである。両者の主な違いは、陽電子を放射する物質の代わりに、SPECTは高エネルギー光子を放射する放射性トレーサーを使用することである。SPECTは、冠動脈疾患を含めた複数の病気の診断に役立ち、米国では、既に毎年約250万件のSPECT心臓検査が行われている。

40

#### 【0383】

PETについて、本発明のタンパク質は一般に陽電子放射体、例えば、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{82}\text{Rb}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、及び $^{68}\text{Ga}$ で標識される。本発明のタンパク質はSPECTに対しては、陽電子放射体、例えば $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{201}\text{Tl}$ 、及び $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{111}\text{In}$ で標識される。

#### 【0384】

動物及びヒトの非観血的蛍光イメージングもまた生体内診断情報を提供し、幅広い臨床専門領域において使用することができる。例えば、フルオロフォアの紫外線励起後の単純

50

な観察から、先進的な機器を使用する高度な分光イメージングに至るまで、長年にわたり技術開発が行われてきた（例えば、Ander sson - Eng e l s ら、1997年を参照のこと）。蛍光、例えばフルオロフォア又は蛍光タンパク質からの蛍光をインビボ検出するための当該技術分野において公知の具体的な装置又は方法としては、限定はされないが、生体内近赤外蛍光（例えば、Frangioni、2003年を参照のこと）、Maestro（商標）生体内蛍光イメージングシステム（Cambridge Research & Instrumentation, Inc.; Woburn, MA）、フライングスポットスキャナを使用した生体内蛍光イメージング（例えば、Ramanujamら、2001年を参照のこと）などが挙げられる。

#### 【0385】

光学的応答を検出するための他の方法又は装置としては、限定なしに、目視検査、CCDカメラ、ビデオカメラ、写真フィルム、レーザー走査装置、蛍光光度計、フォトダイオード、量子カウンター、落射蛍光顕微鏡、走査型顕微鏡、フローサイトメーター、蛍光マイクロプレートリーダー、又は光電子増倍管を使用したシグナル増幅が挙げられる。

#### 【0386】

いくつかの例において、造影剤は、ヒトにおける使用前にインビトロ又はインビボアッセイを用いて、例えば本明細書に記載されるモデルを使用して試験される。

#### 【0387】

##### 製品

本発明はまた、本発明のタンパク質を含む製品、又は「キット」も提供する。製品は、場合により、容器と、例えば、本明細書において任意の実施形態により記載される方法における本発明のタンパク質の使用についての説明を提供する容器上の、又は容器に関連付けられたラベル又は添付文書とを含む。好適な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、プリスターパック等が挙げられる。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な材料で形成され得る。容器は本発明のタンパク質組成物を保持するとともに、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば容器は、皮下注射針により穿孔可能な栓を有する静注用溶液の袋又はバイアルであってもよい）。それに代えて、又は加えて、製品は、注射用静菌水（BWF I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液及びデキストロス溶液などの薬学的に許容可能な緩衝液を含む第2の（又は第3の）容器をさらに含んでもよい。さらに製品は、他の緩衝剤、希釈剤、フィルタ、針、及びシリンジを含めた、商業的な及び使用者の観点から望ましい他の材料を含み得る。

#### 【0388】

以下の非限定的な例において本発明をさらに説明する。

#### 【実施例】

#### 【0389】

##### 実施例1 - 分子モデリング

##### 1.1 Avibodyの分子モデル作成

Avibodyは、抗体の可変ドメインを含む組換えタンパク質である。Avibodyはモノクローナル抗体の可変ドメインを、 $V_H$ から $V_L$ への又は $V_L$ から $V_H$ へのいずれかの向きで短鎖リンカー領域により分散して単一のポリペプチド鎖に融合することにより利用する。これらのAvibodyは、リンカー長さに応じて、1、2、3又は4個の機能的結合部位をそれぞれ含む安定的で生物学的に活性なモノボディ（scFv）、ダイアボディ、トリアボディ又はテトラボディを形成するように設計される。

#### 【0390】

モデル化するAvibodyの $V_H$ 及び $V_L$ ドメイン配列を用いて、BLAST及び/又はFASTAの双方の検索を使用したRCSB PDBデータバンク（www.pdb.org）の検索を行った。最高の配列同一性、分解能及び完全性を有する構造ヒットを選択し、モデル化されたAvibodyのFvドメインの鋳型として用いた。pdbファイルの非対称ユニットが1つより多い鋳型モデルを含んだ場合、全ての鋳型を使用し、同等に取り扱った。

10

20

30

40

50

## 【0391】

A v i b o d y ダイアボディ及びトリアボディについては、空間における鑄型 F v の配置の設定に四次鑄型を使用し、これらの A v i b o d y のモデリングを可能にした。ダイアボディについては 1 L M K ( P e r i s i c ら、1994年)又は 1 M O E ( C a r m i c h a e l ら、2003年)を様々に使用し、トリアボディについては 1 N Q B ( P e i ら、1997年)を使用して、モデリングのため四次空間に鑄型を配置した。

## 【0392】

四次配置については、F v ドメインについて I s r a e l G e l f a n d により作成されたコア座標セット ( G e l f a n d ら、1998年 a ) の複数部を四次鑄型と最小二乗法でアラインメントし、「コア」ホモ二量体又はホモ三量体を形成した。各 A v i b o d y について選択された F v 鑄型を、次にこの「核」ホモ二量体又はホモ三量体中の各 F v と最小二乗法でアラインメントして鑄型ホモ二量体又はホモ三量体を形成した。続いてこれらのファイルを編集し、様々な A v i b o d y のモデリングに必要な連結性を反映させた。

10

## 【0393】

いずれの場合にも、最終モデリングの実行における F v ドメインモデリングには「コア」四次モデルを使用せず、連結残基は「アブイニシオ」でループとしてモデル化した。

## 【0394】

ソフトウェアに組み込まれた M O D E L L E R アルゴリズム ( S a l i 及び B l u n d e l l 、1993年)を用いる D i s c o v e r y S t u d i o ( D S ) ソフトウェア ( v 2 . 5 、 A c c e l r y s 、 C A , 米国)を使用して A v i b o d y の分子モデルを作成し、ソフトウェアに含まれるスコアリング関数を用いて評価した。全物理的エネルギーについての M O D E L L E R 作成の確率密度関数 ( P D F ) の各々における高位ランキングスコアの存在及び離散最適化タンパク質エネルギー ( D O P E ) スコアに基づき最良のモデルを選択した ( S h e n ら、2006年)。さらなる解析のため、選択されたモデルを p d b ファイルに書き出した。得られたモデルの画像もまた D S を使用して作成した。

20

## 【0395】

各選択されたモデルのさらなる解析には、画像ワークステーション上での目視検査及び関連する残基の溶媒露出表面積 ( A S A ) の計算が含まれた。A S A は、本明細書では、モデル化されたジスルフィド変異体のコンジュゲーションへの利用可能性の能力の評価として使用される。次に A S A 平均値からの標準偏差 ( E x c e l で計算)を、ジスルフィドにおけるシステイン残基の双方若しくは一方又は残基 (すなわち、C D R ) の他の基が同様に露出していたかどうかに関する指標として用いた。例えば、大きい標準偏差は、ジスルフィド中の残基の一つについて、還元及び / 又はコンジュゲーションのための露出が少ない可能性があることを示す。C D R については残基当たり平均の平均 A S A もまた含め、概して露出している残基の基とのジスルフィドの比較を促進する。シート内で保存されたジスルフィドの平均 A S A を使用して、ほぼ埋もれている、又は到達不可能な残基の基とのジスルフィドの比較を促進した。

30

## 【0396】

ここに提示される研究において、単量体コンジュゲーションか、二量体コンジュゲーションか、若しくは三量体コンジュゲーションであったのか、又はそれぞれの s c F v が  $V_H$  から  $V_L$  への向きにあったのか、若しくは  $V_L$  から  $V_H$  への向きにあったのかに関わらず、コンジュゲーション確率の指標としての A S A に関して、モデル化されたジスルフィド変異体の露出度に有意な差は認められなかった。

40

## 【0397】

1 . 2 A V P 0 4 - 0 7 ダイアボディの  $V_H$  から  $V_L$  に連結された分子モデルの作成  
A V P 0 4 - 0 7 A v i b o d y ( 配列番号 5 5 ) は、理論的 p I / M w : 8 . 0 / 5 1 k D a の、 $V_L$  軽鎖及びサブグループ I  $V_H$  鎖を有する組換えダイアボディである。A V P 0 4 - 0 7 は腫瘍関連抗原 T A G 7 2 を認識する。

50

## 【0398】

このA v i b o d yはネズミ科動物モノクローナル抗体C C 4 9の可変領域を利用し、それらを配列に融合して、2つの機能的結合部位を含む安定した生物学的に活性のダイアボディを形成する。C C 4 9の可変ドメインは、極めて優れたインビトロ及びインビボ特性を有する高発現で高度に安定した組換え分子を実現するため、アミノ酸配列が修飾されている(R o b e r g e ら、2006年)。

## 【0399】

A V P 0 4 - 0 7のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメイン配列でP D Bを検索すると、P D Bの1つの抗体、1 Z A 6が浮上し(L a r s o n ら、2005年)、これはギャップなしアラインメントでV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>の双方のドメインにおいてA V P 0 4 - 0 7と82%の同一性マッチを有した。

10

## 【0400】

1 Z A 6 鑄型は、抗腫瘍性C H 2ドメイン欠失ヒト化抗体の構造をコードする。この組換えヒト化抗体もまた、T A G 7 2 抗原を認識する。

## 【0401】

1 Z A 6 p d bファイル中のF v構造を使用してA V P 0 4 - 0 7ダイアボディのF vドメインをモデル化した。上記に記載される1 L M Kを鑄型の四次空間アラインメントに使用して、上記に記載される方法でA V P 0 4 - 0 7ダイアボディを形成した。選択された最高スコアのA V P 0 4 - 0 7ダイアボディモデルを図1に示し、これはこのA v i b o d y二量体の「未変異の」立体配置に相当する。

20

## 【0402】

1.3 A V P 0 7 - 1 7ダイアボディのV<sub>H</sub>からV<sub>L</sub>に連結された分子モデルの作成  
A V P 0 7 - 1 7 A v i b o d y (配列番号59)は、理論的p I / M w : 6.4 / 55 k D aの、極めて長いC D R H 3ループ、V<sub>L</sub>軽鎖及びサブグループI V<sub>H</sub>鎖を有する組換えダイアボディである。A V P 0 7 - 1 7は腫瘍関連抗原H E R 2を認識する。

## 【0403】

A V P 0 7 - 1 7は、標準的なF a s t a及びB l a s t検索を使用するとき、A V P 0 4 - 0 7と比較してR C S B p d bで利用可能な構造との同一性が低い。A V P 0 4 - 0 7について得られた結果と比較したとき、それほど高いA V P 0 7 - 1 7との同一性を示したV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>のF v対はなかった。

30

## 【0404】

F vドメイン全体についての鑄型選択を改良するP D Bの別の検索方法を試験した。M A T R A Sサーバー(K a w a b a t a 2003年、K a w a b a t a ら 2000年)は、B L A S Tプログラムを用いた現行のP D Bに対する標準的な配列相同性検索を使用し、アラインメント領域のグラフ表現を備えて鑄型選択を支援する。この方法から2つの良好な鑄型が明らかとなり、いずれもV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>の双方のドメインにおいて64%超の配列同一性を有した。

## 【0405】

選択されたF v鑄型は、a) 2 B 1 H (S t a n f i e l d ら、2006年)(これはリンカー残基及びC D R H 3を除きA V P 0 7 - 1 7と80.6%の同一性を有した)、及びb) 3 G 0 4 (S a n d e r s ら、2007年)(これはリンカー残基及びC D R H 3を除きA V P 0 7 - 1 7と73.5%の同一性を有した)のp d bファイルに含まれた。

40

## 【0406】

上記に記載される1 L M Kダイアボディを鑄型F vの四次空間アラインメントに使用して、上記に記載される方法でA V P 0 7 - 1 7(「未変異の」)ダイアボディを形成した。モデリングでは、A V P 0 7 - 1 7の長いC D R H 3ループ長さもまた、鑄型として使用する相同構造が認められなかったため問題となった。これらは鑄型制約なしにループとして(本質的にアブイニシオで)モデル化し、モデル化後に構造上の違反を評価した。こ

50

ここに提示するいずれの場合にも、ループが *Avibody* の全体的な構造又はフレームワーク領域に影響を及ぼすことはないと考えられたため、CDR3ループは低い信頼水準でモデル化し、及び一部の分析には含めない。

【0407】

選択された高スコアの AVP07 - 17 ダイアボディモデルを図2に示し、これはこの *Avibody* 二量体の「未変異の」立体配置に相当する。

【0408】

1.4 AVP02 - 60 ダイアボディの分子モデルの作成

AVP02 - 60 *Avibody* (配列番号61) は、理論的 pI / Mw : 8.47 / 50.1 kDa の、V<sub>L</sub>鎖及びサブグループ I I I V<sub>H</sub>鎖を有する組換えダイアボディである。これは MUC1 遺伝子によりコードされる乳癌関連ムチンを認識する一次マウスモノクローナル C595 抗体である CD227 に基づく (Gendler ら、1990 年)。これはムチンのタンパク質コア内のエピトープ R P A P (配列中で約 40 回反復するモチーフ) を認識する。

【0409】

V<sub>L</sub> 又は V<sub>H</sub> による Blast 及び Fast a 検索から、V<sub>L</sub> 及び V<sub>H</sub> の双方のドメインを含んだ高い同一性スコアを有するいくつかの鑄型が明らかとなった。しかしながら、CDRH3 をモデル化するのに配列の同一性及び長さが十分な V<sub>H</sub> を有する鑄型は1つのみであった。従って V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> モデリング用に2つの鑄型を選択した一方、1つの追加的な鑄型を V<sub>H</sub> のみのモデリング用に選択した。選択された鑄型は、a) 1 M H P V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> (86.9% の同一性、89.6% の相同性; Karpusas ら、2003 年)、b) 2 B 2 X V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> (85.7% の同一性、88.3% の相同性; Clark ら、2006 年) 及び c) 2 A D G V<sub>H</sub> : (86.8% の同一性、96.5% の相同性; Zhou ら、2005 年) (これは CDRH3 用のギャップなしアラインメントでの唯一の鑄型であった、この Fv の V<sub>L</sub> ドメインはモデリングでは使用しなかった) であった。

【0410】

全ての鑄型に関して、AVP02 - 60 は 88.4% の同一性及び 91.1% の相同性を有した。上記に記載される 1 L M K ダイアボディを鑄型 Fv の四次空間アラインメントに使用して、上記に記載される方法で AVP02 - 60 (「未変異の」) ダイアボディを形成した。

【0411】

選択された最高スコアの AVP02 - 60 ダイアボディモデルを図3に示し、これはこの *Avibody* 二量体の「未変異の」立体配置に相当する。

【0412】

1.5 置換システイン変異を操作するためのフレームワーク1システイン挿入位置の同定及びその分子モデリング

免疫グロブリン V ドメインの構造におけるフレームワーク1 (FR1) は、2つのシートの一方の縁端に位置し、そのため、保存されたドメイン間ジスルフィド結合に隣接する残基を除いては概して溶媒に十分に露出しているため、システイン置換の操作に好ましい候補である。従ってこの領域は、ジスルフィドを含有するコンストラクトとのコンジュゲーション化学に自由に利用可能なはずである。

【0413】

操作的フレームワーク1内システイン置換を含む *Avibody* は、本明細書では「チオール化 *Avibody*」と称する。

【0414】

抗体の V<sub>L</sub> 及び V<sub>H</sub> ドメインは、第一に、古典的には2つのシートに7~10個の鎖を典型的トポロジー及び連結度で含む免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。これらのドメインは、第二に、ドメイン軸の範囲内でBシートの対称性を示すVタイプ免疫グロブリン (immunoglobulin) のメンバーである (Halaby

10

20

30

40

50

ら、1999年)。抗体Vタイプ又はVセットドメインは、SCOP (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/data/scop.b.c.b.b.b.html>、Murzinら、1995年)、InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/Entry?ac=IPR013106>、Hunterら、2009年)及びPfam (<http://pfam.sbc.su.se/family/PF07686>、Batemanら、2004年)などのオンラインデータベースではV<sub>H</sub>(1~4型)、V<sub>L</sub>、V<sub>L</sub>ドメインに分けられる。

#### 【0415】

これらの十分に定義された類似性を所与とすれば、AVP04-07 V<sub>L</sub>ドメインにおいて同定されるフレームワーク1内システインペア置換変異の全ての候補をV<sub>H</sub>(1~4型)ドメイン及びV<sub>L</sub>ドメインの双方に構造的に移すことが可能なはずであると仮定することは妥当である。

10

#### 【0416】

システインに変異させ得るとともにフレームワーク1内ジスルフィド架橋を形成可能で、且つ還元及び続くペイロードとのコンジュゲーションに利用可能である残基ペアについて、作成されたAVP04-07のモデルのV<sub>L</sub>ドメインを画像ワークステーションで調べた。FR1における残基ペアであって、概して互いに向かって傾いた側鎖を有し、概して溶媒に露出した側鎖原子を有し、且つ約6~7離れたC炭素原子を有するペアが、ジスルフィド結合を形成可能なフレームワーク1内システイン挿入に好ましい候補と考えられた。

20

#### 【0417】

V<sub>H</sub>ドメインに移すため、Gelfandコア座標のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインの構造アラインメント(Gelfandら、1998年a; Gelfandら、1998年b)を生成した。続いてこれらのアラインメントしたV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>コアを使用して、各未変異FvドメインモデルからのV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインをアラインメントした。この構造アラインメントを、同定されたシステイン変異ペアのV<sub>L</sub>からV<sub>H</sub>配列へのマッピングに使用し、次にそれをV<sub>H</sub>ドメインシステイン挿入変異のモデリングに使用した。いずれの場合も、単一のモデリング実行を用いて、V<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>ドメインの各々に単一の類似したシステイン変異ペアを含む二重システイン挿入変異モデルを作成した。

30

#### 【0418】

1.6 AVP04 Avibodyダイアボディにおけるシステイン置換変異を操作するために同定されたフレームワーク1システイン挿入位置及び分子モデリング

未変異AVP04-07モデルを、上記のとおりフレームワーク1内システイン挿入変異をマッピングするための出発点とした。このマッピングから、同定されたV<sub>L</sub>システイン挿入位置が、実際にV<sub>H</sub>ドメインに対して構造的に容易にマッピングされ得たこと、及びこれらの残基がジスルフィド結合を形成する可能性が高いことが示された。

#### 【0419】

AVP04-07のフレームワーク1 V<sub>L</sub>(Kabata残基1から23を含む)及びフレームワーク1 V<sub>H</sub>(Kabata残基1から30を含む)において、フレームワーク1内システイン挿入に好ましい位置を以下のとおり同定した:

40

- ・軽鎖フレームワーク1 Kabata残基L8及びL11(AVP04-50、配列番号57)

- ・重鎖フレームワーク1 Kabata残基H7-H10(AVP04-84、配列番号63)

- ・軽鎖フレームワーク1 Kabata残基L14及びL17(AVP04-78、配列番号77)

- ・重鎖フレームワーク1 Kabata残基H13-H16(AVP04-85、配列番号75)

#### 【0420】

50

AVP04-07モデル(実施例1.2)について概説した方法を用いて、上記の望ましい変異を反映した配列入力を除き同じ入力パラメータを使用してモデリングを繰り返した。モデル評価もまたAVP04-07モデルと同様に行った。

#### 【0421】

各システイン挿入をモデリングに供し、1つのV<sub>L</sub>システインペア変異及びその類似V<sub>H</sub>システインペア変異を各モデリング実行に含めた。AVP04-07 FR1構造に対するシステイン挿入モデリングの結果を図4A及び図4Bに示す。図4Bは、ジスルフィド結合が形成された場合にも、操作的フレームワーク1内システイン変異の近傍に構造の変化がほとんどないことを示している。

#### 【0422】

予想どおり、還元及び続くペイロードとのコンジュゲーションに利用可能であり得る変異可能な残基ペアを定義する目的において、各システイン変異ペアについての溶媒露出表面積(ASA)の値は、高度に保存された、且つ構造的に埋もれたシステインペアH22-H92及びL23-L88より著しく高く、構造的に露出したCDR残基と同程度であったことが示された(図5)。

#### 【0423】

1.7 AVP07-xx及びAVP02-xx Avibodyダイアボディにおけるシステイン置換変異を操作するために同定されたフレームワーク1システイン挿入位置及び分子モデリング

上記に概説されるとおり、全抗体ファミリーにわたるVH(1~4型)、V<sub>L</sub>、V<sub>L</sub>ドメインの間の構造的類似性は公知であり、認められている。この構造的類似性によって、AVP04-07のモデルから同定されたシステイン挿入位置をAVP02-xx及びAVP07-xxシステイン挿入Avibodyモデルに構造的に移した。

#### 【0424】

AVP02-60の場合、システイン挿入に好ましいKabab位置はAVP04-07の位置と同じであり、すなわち以下のとおりであった：

- ・軽鎖フレームワーク1 Kabab残基L8及びL11(AVP02-101、配列番号79)
- ・重鎖フレームワーク1 Kabab残基H7-H10(AVP02-104、配列番号81)
- ・軽鎖フレームワーク1 Kabab残基L14及びL17(AVP02-102、配列番号83)
- ・重鎖フレームワーク1 Kabab残基H13-H16(AVP02-105、配列番号85)

#### 【0425】

AVP02-60モデルは、Kabab H7-H10の領域において、AVP04-07及びAVP07-17のV<sub>H</sub> I型ドメインと構造的に少し異なるV<sub>H</sub> III型ドメインを有する。しかしながら、a) H7及びH10のC位置が極めて類似していた、及びb)間にあるH8及びH9残基位置は異なっていたものの、それらの残基の双方ともが、他のアミノ酸と比べて小さく、且つ柔軟性がより高い残基であるGlyであったため、AVP04-07システイン挿入の構造移動はなお実現することができた。オンライン免疫遺伝学データベース；IMGT(<http://imgt.cines.fr>)により提供されるV遺伝子生殖細胞系列配列に基づけば、ヒト配列の98%がH8にGlyを有し、48%がH9にGlyを有する。この柔軟性により、H7-H10ジスルフィドをAVP04-84からAVP02-104に構造的に移すことが可能であった。AVP02-60 FR1構造に対するフレームワーク1内システイン挿入/ジスルフィド結合形成モデリングの結果を図6A及び図6Bに示す。

#### 【0426】

AVP07-xx Avibodyの場合、このコンストラクトはV<sub>L</sub>鎖を含むため、V<sub>L</sub>を含むAVP04-50 Avibody及びAVP02-101 Avibo

10

20

30

40

50

d y の双方に見られる K a b a t 位置 L 8 - L 1 1 でのシステイン挿入は、構造的に L 7 - L 1 1 に移る。従って A V P 0 7 では、好ましいフレームワーク 1 内システイン挿入位置は以下のとおり同定された：

- ・軽鎖フレームワーク 1 K a b a t 残基 L 7 及び L 1 1 ( A V P 0 7 - 8 8 、 配列番号 8 7 )

- ・重鎖フレームワーク 1 K a b a t 残基 H 7 - H 1 0 ( A V P 0 7 - 9 0 、 配列番号 8 9 )

- ・軽鎖フレームワーク 1 K a b a t 残基 L 1 4 及び L 1 7 ( A V P 0 7 - 8 9 、 配列番号 9 1 )

- ・重鎖フレームワーク 1 K a b a t 残基 H 1 3 - H 1 6 ( A V P 0 7 - 9 1 、 配列番号 9 3 )

#### 【 0 4 2 7 】

K a b a t 付番方式における  $V_L$  は L 1 0 配列位置が欠損しており ( J o h n s o n 及び W u 、 2 0 0 0 年 ) 、 上述のとおり付番し直す必要があった。しかしながら構造的には、本発明との関連において、 $V_L$  L 8 - L 1 1 は  $V_L$  L 7 - L 1 1 と等価であり、残基の欠損はない。これは、図 4 の A V P 0 4 - 0 7  $V_L$  F R 1 と図 7 の A V P 0 7 - 1 7  $V_L$  F R 1 とのモデルを比較すると明確に認めることができ、これらの特定の場合に配列における残基の欠失は N 末端のシステイン挿入である。

#### 【 0 4 2 8 】

A V P 0 4 - 0 7 について概説したシステイン挿入位置に関して認められる傾向を受けて、A V P 0 2 A v i b o d y ( 図 8 ) 及び A V P 0 7 A v i b o d y ( 図 9 ) における各好ましいシステイン挿入についての露出表面積 ( A S A ) の値が、高度に保存された、且つ構造的に埋もれた / 到達不可能なシステインペア H 2 2 - H 9 2 及び L 2 3 - L 8 8 と比べて著しく高く、構造的に露出した C D R 残基と同程度であることが示された。

#### 【 0 4 2 9 】

抗体の V ドメイン (  $V_H$  及び  $V_L$  ) は、長年、配列上及び構造上のサブタイプ、例えば  $V_H$  I ~ I V 型及び  $V_L$  及び  $V_L$  に細分化されていた。これらのサブタイプは主としてそれらのドメインの F R 1 配列及び構造の違いに基づく ( L e f r a n c 、 2 0 0 1 年 a ; L e f r a n c 、 2 0 0 1 年 b ; P a l l a r e s 、 1 9 9 9 年 ) 。本研究は、この細区分にも関わらず、好ましいジスルフィド挿入位置を、未変異モデルのフレームワークを大幅に歪めることなく様々なこれらのサブタイプのモデルに容易に移すことができることを示している。

#### 【 0 4 3 0 】

しかしながら、本発明者らは、未変異の構造モデルを画像上で調べる間、いくつかの  $V_L$  /  $V_H$  サブタイプが、概して上記に概説した好ましいジスルフィド挿入位置を 1 ~ 2 残基だけ N 末端側に ( 例えば A V P 0 2 - 1 0 3 、 F R 1 H 6 - H 9 変異を含む、配列番号 9 5 ) 又は 1 ~ 2 残基だけポリペプチド鎖の C 末端側に ( 例えば対応するクローン A V P 0 7 - 6 3 ( 配列番号 6 5 ) 及び A V P 0 7 - 6 8 ( 配列番号 9 7 ) 、 F R 1 L 8 - L 1 2 を含む ) シフトさせることによりフレームワーク 1 内システイン挿入を置くことのできる追加的な ( 代替的な ) 位置を含んだことを注記する。

#### 【 0 4 3 1 】

しかしながら、上記で考察されるいずれの場合にも、フレームワーク 1 内ジスルフィド挿入に適合すると特定された好ましい及び / 又は代替となる位置は全て、実施例 1 . 5 に概説した主要なモデリング制約を満たした。

#### 【 0 4 3 2 】

##### 2 A v i b o d y コンストラクトの合成

##### 2 . 1 フレームワーク 1 内ジスルフィド挿入を操作しない「未変異の」A v i b o d y の合成

T A G 7 2 に特異的なマウス m A b ( 配列番号 5 4 ) 、 H E R 2 に特異的なヒト m A b ( 配列番号 5 8 ) 及び M U C 1 に特異的なネズミ科動物 m A b ( 配列番号 6 0 ) の  $V_H$  及

10

20

30

40

50

びV<sub>L</sub>領域をコードするDNAコンストラクトを適切な制限部位と合成し、GenScript (Piscataway, NJ, 米国)によりpUC57にクローニングした。AvibodyはV領域のいずれの向きでも、すなわちV<sub>H</sub>-リンカー-V<sub>L</sub>でも、及びV<sub>L</sub>-リンカー-V<sub>H</sub>でも単離されているが(Carmichaelら、2003年)、本明細書に記載される全てのコンストラクトはV<sub>H</sub>-リンカー-V<sub>L</sub>として並べた。

#### 【0433】

全てのDNA操作は、New England Biolabs (Ipswich, MA, 米国)から購入した試薬による標準的なプロトコルに従って行った。ダイアボディをコードするDNAコンストラクトをpUC57から適切な制限酵素で切り取り、1%(w/v)アガロースゲル上で解像し、Qiaquickゲル抽出キット(Qiagen)を使用してゲルから精製した。コンストラクトを、同様に調製したpET22b発現ベクターにライゲートし、ライゲーション混合物を電気穿孔法により大腸菌(E. coli)XL1-Blue細胞に形質転換した。Qiagenミニプレップスピニングキットを使用して形質転換体からミニプレップDNAを抽出し、ダイターミネーターサイクルシーケンシングキットをAmpliTaqと用いてT7プロモーター及びターミネータープライマーで配列決定することにより、組換えクローンを同定した。V<sub>H</sub>-Gly<sub>4</sub>Ser-V<sub>L</sub>の向きの抗TAG72 mAbのV領域を含むクローンをAVP04-07と命名した(配列番号54)。V<sub>H</sub>-Gly<sub>4</sub>Ser-V<sub>L</sub>の向きの抗HER2 mAbのV領域を含むクローンをAVP07-17と命名した(配列番号58)。V<sub>H</sub>-Gly<sub>4</sub>Ser-V<sub>L</sub>の向きの抗MUC1 mAbのV領域を含むクローンをAVP02-60と命名した(配列番号60)。これらの3つのクローンが基本となる親配列を形成し、これらから他の全てのチオール化Avibodyを誘導した。

#### 【0434】

このクローニング方法は、標的タンパク質をペリプラズム発現させるためのアミノ末端pelBリーダー配列、及びカルボキシ末端(His)<sub>6</sub>タグ又はカルボキシ末端Myc+(His)<sub>6</sub>タグのいずれかの挿入を可能にする。(His)<sub>6</sub>などのアフィニティータグの付加をルーチン的に用いて下流精製プロセスを能率化した。この付加は生物活性上中立的であることが知られている。

#### 【0435】

ある場合には、同一のV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> Avibody配列を、カルボキシ末端(His)<sub>6</sub>タグ及びカルボキシ末端Myc+(His)<sub>6</sub>の双方のバージョンで構築した。この一例は、Myc+(His)<sub>6</sub>タグを含むAVP07-63(配列番号64)、及び(His)<sub>6</sub>タグのみを含むAVP07-68(配列番号96)である。これらの2つのAvibodyは異なるカルボキシ末端タグを有したが、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>配列は完全に同じで、従ってこれらの2つのコンストラクトは互換的に使用した。

#### 【0436】

2.2 部位特異的突然変異誘発によるフレームワーク1内操作的システインの導入及びN末端セリン置換

作成したモデリングデータに基づき、フレームワーク1内操作的システイン挿入変異をAVP04-07、AVP07-17及びAVP02-60の未変異Avibody配列に導入し、以下のチオール化Avibodyを形成した：

AVP04-x xファミリー鑄型配列(TAG72特異的)：

本明細書において考察されるとおり、Avibody名との関連における記号「x x」の使用は、同じ系列のAvibodyが多数存在し、記載が当該の系列中の全てのAvibodyに関連することを示す。「x x」が特定の数字に置き換えられると、記載がその数を有するAvibody(本明細書で使用される命名法に基づく)を参照することを示す。

・AVP04-50ダイアボディ核酸配列(配列番号56)、Kabata残基L8及びL11が変異したAvibody(配列番号57)を形成する。

・AVP04-51ダイアボディ核酸配列(配列番号98)、Kabata残基L13及

び L 1 9 が変異した A v i b o d y ( 配列番号 9 9 ) を形成する。

・ A V P 0 4 - 7 8 ダイアボディ核酸配列 ( 配列番号 7 6 )、K a b a t 残基 L 1 4 及び L 1 7 が変異した A v i b o d y ( 配列番号 7 7 ) を形成する。

・ A V P 0 4 - 8 4 ダイアボディ核酸配列 ( 配列番号 6 2 )、K a b a t 残基 H 7 及び H 1 0 が変異した A v i b o d y ( 配列番号 6 3 ) を形成する。

・ A V P 0 4 - 8 5 ダイアボディ核酸配列 ( 配列番号 7 4 )、K a b a t 残基 H 1 3 及び H 1 6 が変異した A v i b o d y ( 配列番号 7 5 ) を形成する。

・ A V P 0 4 - 7 0 s c F v 核酸配列 ( 配列番号 1 0 0 )、K a b a t 残基 L 8 及び L 1 1 が変異した A v i b o d y ( 配列番号 1 0 1 ) を形成する。

・ A V P 0 4 - 7 4 トリアボディ核酸配列 ( 配列番号 1 0 2 )、K a b a t 残基 L 8 及び L 1 1 が変異した A v i b o d y ( 配列番号 1 0 3 ) を形成する。

A V P 0 7 - x x ファミリー鑄型配列 ( H E R 2 特異的 ) :

・ A V P 0 7 - 8 8 ダイアボディ核酸配列 ( 配列番号 8 6 )、K a b a t 残基 L 7 及び L 1 1 が変異した A v i b o d y ( 配列番号 8 7 ) を形成する。

・ A V P 0 7 - 7 1 s c F v 核酸配列 ( 配列番号 1 0 4 )、K a b a t 残基 L 8 及び L 1 2 が変異した A v i b o d y ( 配列番号 1 0 5 ) を形成する。

・ A V P 0 7 - 6 3 ダイアボディ核酸配列 ( 配列番号 6 4 )、K a b a t 残基 L 8 及び L 1 2 が変異した A v i b o d y ( 配列番号 6 5 ) を形成する。

・ A V P 0 7 - 6 3 と同じだが、カルボキシ末端 ( H i s )<sub>6</sub> タグを含み、且つカルボキシ末端 M y c + ( H i s )<sub>6</sub> タグを含まない A V P 0 7 - 6 8 ダイアボディ核酸配列 ( 配列番号 9 6 )、K a b a t 残基 L 8 及び L 1 2 が変異した A v i b o d y ( 配列番号 9 7 ) を形成する。

A V P 0 2 - x x ファミリー鑄型配列 ( M U C 1 特異的 ) :

・ A V P 0 2 - 1 0 1 ダイアボディ核酸配列 ( 配列番号 7 8 )、K a b a t 残基 L 8 及び L 1 1 が変異した A v i b o d y ( 配列番号 7 9 ) を形成する。

#### 【 0 4 3 7 】

これらのチオール化 A v i b o d y について、本明細書では、モデリングにより実現可能と示唆されるとおり ( 実施例 1 . 7 を参照のこと )、好ましいフレームワーク 1 内操作的システイン挿入変異が、a) V<sub>L</sub> 及び V<sub>H</sub> ドメイン及びその異なるサブタイプの間で機能的に移すことが可能であり、b) 単一の ( s c F v ) 又は複数の ( ダイアボディ / トリアボディ ) F v ドメインを含むタンパク質 ( 例えば、A v i b o d y ) と適合し、且つ c) 好ましいフレームワーク 1 内ジスルフィド位置のいずれの側への ( 例えば、+ / - 1 ~ 2 残基の ) 移動も、機能を無効にすることなく可能にするのに十分なロバスト性を有することを示すことを例証した。

#### 【 0 4 3 8 】

いずれの場合にも、Q u i k C h a n g e ( 登録商標 ) 部位特異的突然変異誘発法 ( S t r a t a g e n e ) を指示どおりに用いて目的の特定のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を変化させることによりシステイン残基を導入した。例として A V P 0 4 - 0 7

A v i b o d y を用いると、K a b a t L 8 位 ( F R 1 V L 領域 ) のプロリン残基が配列 C C G によりコードされ、K a b a t L 1 1 位 ( F R 1 V L 領域 ) のロイシン残基が配列 C T G によりコードされる。Q u i k C h a n g e ( 登録商標 ) 部位特異的突然変異誘発技法を用いて、これらのヌクレオチド配列を、システインをコードする T G C に変えた。

#### 【 0 4 3 9 】

Q u i k C h a n g e ( 登録商標 ) 部位特異的突然変異誘発 P C R ベース方法は、プライマーとしての所望の変異と鑄型としてのプラスミド D N A とを含む 2 つの相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用して二本鎖変異 P C R 産物を合成する。上記の例を用いると、システイン残基を A V P 0 4 - 0 7 における V L 鎖の F R 1 領域の K a b a t L 8 位及び L 1 1 位に導入するため、以下の配列 5' - G A T A T C G T G A T G A C C C A G A G C T G C A G C A G C T G C C C G G T G A G C G T G

10

20

30

40

50

G G C G A A A A A G - 3 ' ( 配列番号 1 0 6 ) をフォワードプライマーとして使用し、5 ' - C T T T T T C G C C C A C G C T C A C C G G G C A G C T G C T G C A G C T C T G G G T C A T C A C G A T A T C - 3 ' ( 配列番号 1 0 7 ) をリバースプライマーとして使用した。配列において以下の条件を用いて増幅を行った：95 で30秒間；95 で30秒間、55 で30秒間及び68 で13分間からなるサイクルを18回；68 で7分間の最終伸長。鋳型を37で1時間、D p n I で消化した。製造者の指示に従い形質転換体を得て、上記のと通りのDNA配列決定により同定した。

#### 【0440】

同様の突然変異誘発手法を利用して全てのチオール化A v i b o d y を作製し、又はその手法を用いてタンパク質の天然のN末端残基をセリン残基に置き換えた。N末端セリン置換は、フレームワーク1内ジスルフィド変異の導入前又は導入後のいずれかに実施した。A V P 0 4 - 0 7 のN末端G l n のS e r 残基との置換に使用した例示的なヌクレオチド配列は、配列番号66及び配列番号67に示される。

#### 【0441】

##### 2.3 A v i b o d y コンストラクトの配列修飾

記載されるDNA配列に対する他の全ての修飾には、当業者に公知の標準的な分子生物学的技術を用いた。A v i b o d y 配列が、超可変CDR領域の、モデリングデータ(図5、図8及び図9を参照)により示唆されるとき表面露出する可能性の高い位置に「天然の」システイン残基を含んだ場合、それらの残基は、本質的に上記のと通りの部位特異的突然変異誘発により代替的な非チオール含有アミノ酸に変異させた。例として、A V P 0 7 ファミリーの親クローンであるA V P 0 7 - 1 7 は、V<sub>H</sub> CDR3領域内に2つのかかるシステイン残基、すなわちC y s 1 0 4 ( K a b a t 付番H 1 0 0 ) 及びC y s 1 0 9 ( H 1 0 0 E ) を含んだ。これらの残基を、変異原性プライマー配列番号68及び配列番号69を使用した標準的なQ u i k c h a n g e ( 登録商標 ) 部位特異的突然変異誘発を用いてアラニンに置換し、A V P 0 7 - 8 6 ( 配列番号109 ) を形成した。全てのA V P 0 7 - x x チオール化A v i b o d y はV<sub>H</sub> CDR3のこの追加的な修飾を含み、これによりA V P 0 7 - x x ファミリーがフレームワーク1内ジスルフィド変異戦略に適合する。

#### 【0442】

チオール化A v i b o d y はまた、チオール化型のs c F v 又はトリアボディを生成するため、リンカー長さの修飾を伴い生成された。抗体分野の既刊の文献から、リンカーの組成及び長さを修飾すると、A v i b o d y 多量体の形成に影響し得ることが周知されている(K o r t t ら 1 9 9 7 年)。追加の残基をコードする変異原性プライマーを用いて、ダイアボディ親のリンカー長さを、5残基、典型的にはG G G G S ( 配列番号135 ) から15残基、G G G G S G G G G S G G G G S ( 配列番号53 ) に修飾することにより、s c F v 形成の促進を操作した。

#### 【0443】

同様に、そのリンカー残基を除去することにより、及びある場合には、さらに先行する可変ドメインの最大2残基を除去することにより、トリアボディ形成を促進した。例えば、A V P 0 4 - 7 4 A v i b o d y ( 配列番号102 ) をコードする核酸は、リンカー領域の代わりに残基「V T V S S - D I V M」を有するトリアボディをコードする。このクローンは、上記の所望の配列をコードする変異原性プライマーを用いた欠失突然変異誘発により、親A V P 0 4 - 5 0 から操作した。

#### 【0444】

3 細菌発現を用いた「未変異の」A v i b o d y 及びチオール化A v i b o d y の発現及び精製

製造者の標準的なプロトコル(S t r a t a g e n e ) を用いて、個々のA v i b o d y コンストラクトのDNAを化学的にコンピテントな大腸菌(E . c o l i ) B L 2 1 細胞に形質転換した。大腸菌(E . c o l i ) B L 2 1 発現株は、例示する全てのA v i b

10

20

30

40

50

o d y についての主要な発現株として機能した。発現には、見込まれる収率要件に応じて2つの互換的な手法、すなわち細菌振盪フラスコ発現又は細菌流加発酵のいずれかを用いた。いずれかの方法によるタンパク質 A v i b o d y に対する品質評価から、2つの方法が相互に代替可能で、タンパク質品質及び特性は同程度であることが明確に示された。

#### 【0445】

##### 3.1 細菌振盪フラスコ発現

単一の形質転換体コロニーを500mlの2×YT含有1% D - グルコース及び100 μg/mlアンピシリンに接種し、220rpmで振盪しながら37 °Cで一晩インキュベートした。18Lの同じ培地に一晚培養物を最終OD<sub>600</sub>が0.1となるよう播種し、OD<sub>600</sub>が約0.6~0.8となるまで30 °Cでインキュベートした。培養物を12 °Cに移し、誘導温度に達するまで振盪を続けた。0.2mMのIPTGを添加してタンパク質発現を誘導し、培養物を12 °Cで15時間インキュベートした。10,000×gで遠心することにより細菌ペレットを調製し、回収して計量し、-20 °Cで保存した。

10

#### 【0446】

この発現系からの発現したタンパク質を含む細菌ペレットは、平均約6g/L(培養培地)であった。

#### 【0447】

##### 3.2 細菌流加発酵

500mLの複合培地を含む2Lバッフル付き三角フラスコ中で種培養物を成長させ、200rpmで振盪しながら16時間、37 °Cでインキュベートした；複合培地は(1L当たり)、トリプトン、16g；酵母エキス、5g；NaCl、5g；アンピシリン、200mgを含有した。タンパク質発現には限定培地を使用し、この培地は(1L当たり)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10.64g；(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、4.0g；及びクエン酸一水和物、1.7g；グルコース 25g；MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、1.25g；PTM4微量塩( trace salt)、5mL；アンピシリン、200mg；チアミン-HCl、4.4mgを含有した。PTM4微量塩は(1L当たり)、CuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O、2.0g；NaI、0.08g；MnSO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O、3.0g；NaMoO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O、0.2g；H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、0.02g；CoCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O、0.5g；ZnCl<sub>2</sub>、7.0g；FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、22.0g；CaSO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O、0.5g；H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1mLを含有した。全ての培地及び添加剤は、ろ過滅菌したPTM4微量塩、塩酸チアミン及びアンピシリンを除き、オートクレーブ処理により121 °Cで30分間滅菌した。

20

30

#### 【0448】

1.6Lの限定培地を含む2Lのガラス製Biostat Bバイオリアクター(Sartorius Stedim Biotech, 独国)の中でタンパク質発現を完了させた。溶存酸素濃度は、攪拌速度を500~1,200rpmで、及び曝気速度(5%酸素を給気)を0.3~1.5L分<sup>-1</sup>で自動的に変えることにより、20%に維持した。必要に応じて空気流の酸素補給量を手動で増加させた。培養物のpHは、10%(v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>又は10%(v/v)NH<sub>3</sub>溶液を自動的に添加することにより7.0に制御し、及び泡は、消泡剤[10%(v/v)ポリプロピレン2025]を自動的に添加することにより制御した。特に指定のない限り、容器温度は37 °Cに維持した。0.25の出発光学濃度(600nmで計測)に達するよう、バイオリアクターに種培養物を接種した。

40

#### 【0449】

培地に添加されたグルコースが全て利用された後、グルコース、600g；及びMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 22.4g(1L当たり)を含む栄養液(フィード)を40mL時<sup>-1</sup>の流量でバイオリアクターに圧送した。フィードの開始2時間後、容器温度を20 °Cまで2.5時間の時間をかけて徐々に低下させ(6.8 時間<sup>-1</sup>)、その後0.2mMのIPTGを添加することによりタンパク質発現を誘導し、供給速度を6mL時間<sup>-1</sup>に下げた。誘導12時間後に培養物を回収し、典型的には光学濃度(600nmで計測)は11

50

0に達し、及び各2L培養物から約330gの湿った細胞ペーストが回収された。

【0450】

3.3 大腸菌(E. coli)で発現したAvibodyの精製

実施した発現手法に関わりなく、Avibodyタンパク質はいずれも、本質的に以下に概説するとおり精製した。

【0451】

発現培養物から回収した細菌ペレット(発現方法に応じて約50~400g)を溶解させて、タンパク質を抽出し、続いて標準的なクロマトグラフィにより精製した。細菌ペレット1グラムにつき5mLのHis-Tagアフィニティークロマトグラフィー溶解緩衝液(20mM リン酸、500mM NaCl、20mM イミダゾール、0.25mg/ml リゾチーム、1mM PMSF、50ug/ml DNase I、pH7.4)を用いて細胞ペレットを再懸濁した後、機械的に均質化し、次に超音波処理(氷上での6x30秒パルス)することによるか、或いはEmulsiflex-C5細胞破壊器(AVESTIN Inc.、カナダ)に3回通すことにより溶解させた。続いて細菌ライセートを室温で1時間インキュベートした後、遠心(16,000xg、30分間)及びろ過(0.45µmフィルター膜)を行った。

10

【0452】

次にAKTA精製装置10(GE Lifesciences)を使用したHis-Tagアフィニティークロマトグラフィー精製を用いてろ過した細菌ライセートからダイアポディを精製した。精製の規模に応じて1~4本の5mL HisTrap(商標)(GE Lifesciences)粗精製FFカラムを精製のため直列で用いた。ライセートを外部P960ポンプを介してHisTrap(商標)カラムに通した。HisTrap(商標)カラムを10カラム容量のHis-Tagアフィニティークロマトグラフィー抽出緩衝液(20mM リン酸ナトリウム、500mM NaCl、20mM イミダゾール、pH7.4)で洗浄した。精製したタンパク質を、50%His-Tagアフィニティークロマトグラフィー溶出緩衝液(20mM リン酸ナトリウム、500mM NaCl、500mM イミダゾール、pH7.4)及び50%His-Tagアフィニティークロマトグラフィー抽出緩衝液(260mM イミダゾールの最終濃度)で溶出させた。溶出したタンパク質を含む画分(AKTA Unicornソフトウェアで280mM吸光度により決定されるとおり)を回収し、プールし、タンパク質濃度を決定し、及び適切なイオン交換緩衝液で透析した。TAG72特異的AVP04-50(配列番号57)ダイアポディを使用した典型的なHis-Tagアフィニティークロマトグラフィー溶出プロファイルを図10Aに示す。本明細書に記載されるAvibodyは全て、同様の溶出プロファイルを示した。

20

30

【0453】

続いて、タンパク質のpI計算値より1.0~1.5pH単位低い(陽イオン交換について)又はタンパク質のpIより1.0~1.5pH単位高い(陰イオン交換について)緩衝液に、部分的に精製したAvibodyを透析した。典型的には、7.0~8.0のpIのAvibodyはMES緩衝液(50mM MES、陽イオン交換についてpH6.0)に透析し、8.0~9.0のpIのAvibodyはリン酸緩衝液(50mM リン酸、陽イオン交換についてpH7.0)に透析し、及び5.0~6.5のpIのAvibodyはトリス緩衝液(20mMトリス-HCl、陰イオン交換についてpH8)に透析した。AvibodyのpI値は全て、これらの範囲内に収まった。Avibodyは200x超の容量の緩衝液に、2時間以上を空けることなく緩衝液を3回交換して透析した。透析は、Spectrapor 6-8000Da MWカットオフ透析管を使用して4で実施した。

40

【0454】

透析後、タンパク質試料を3220xgで10分間遠心し、変性した不溶性材料をペレット状にした後イオン交換を行った。イオン交換の実施にはAKTA精製装置10を使用し、最大2本の5mL HisTrap(商標)SP HPカラムを直列で用いて、清澄化

50

した透析材料をP960外部ポンプを介してカラムに通過させた。このステップの後、カラムを10カラム容量のイオン交換緩衝液で洗浄してから線形緩衝液勾配（塩勾配）を開始し、カラムからタンパク質を溶出させた。このプロセスでイオン交換緩衝液は、線形勾配にわたり同じ緩衝液で交換し、NaClを1Mの最終濃度まで添加した。300mLに対して600mM NaClの最終濃度で溶出勾配を実施した。

#### 【0455】

溶出したダイアボディ（Unicornソフトウェアで280nm吸光度プロファイルにより決定されるとき）に対応する画分をプールし、定量化した。AVP04-50についての典型的なイオン交換溶出プロファイルを図10Bに提供する。AVP04-50ダイアボディは、約37mS/cm又は32%Bの塩濃度でルーチンのように溶出し、ここでAVP04-50の主要な二量体アイソフォーム（矢印）は、電荷及びサイズの変異型と容易に分離することができた。ダイアボディクロンは、異なるファミリー由来のものであっても、塩勾配における同様の時点でルーチンのように溶出された。ある場合には、1xPBS緩衝液（137mM NaCl、2.7mM KCl、8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.4）中でのキャリブレートされたSuperdex 200 10/300カラム（GE Life Sciences）を使用した分析的サイズ排除法を実施して、特定の画分の所望の種又は組成のピークアイデンティティをプールする前に確認した。目的とする主要なアイソフォームを含む溶出画分を、下流精製のためプールした。

10

#### 【0456】

イオン交換後、溶出したタンパク質材料は、ゲルろ過前に4で約3mg/mLに濃縮した。ゲルろ過は、AKTA精製装置10でPBS中のPharmacia Amersham（GE Life Sciences）Superdex（登録商標）75 26/60プレップグレードカラムを使用して実施した。例としてAVP04-50ダイアボディを用いると、ダイアボディは注入後約140mL（又は53.5分間）で溶出した（図10C）。ダイアボディ変異型は、AVP04ファミリー内のものも、他のものも、分子量が約54kDaの任意の球状タンパク質についての予想どおり同様の溶出容量でルーチンのように溶出された。溶出したAVP04-50二量体に対応する、図10Cに輪郭が示される範囲内の画分をプールし、10K MWC0を備えたAmicon Ultrafree スピンコンセントレータ（Millipore, 米国）を3200xg、4で使用して0.5~3mg/mLに濃縮した。

20

30

#### 【0457】

精製産物の最終純度を、Superdex（登録商標）200 10/300カラムでのゲルろ過クロマトグラフィー法及びSDS-PAGE電気泳動法によりルーチンのように評価した。例として、AVP04-50の精製方法では、ゲルろ過で単一のクリーンな溶出ピーク（図10D）を、及びSDS-PAGE電気泳動法で単一の定義された種（図10E）を生じる純度を有するタンパク質がルーチンのように回収された。

#### 【0458】

試験されたAvibodyのいずれの間にも、精製戦略及び得られる純度プロファイルに大きい違いはなかった。図11A~図11Cは、本明細書に記載され、及び図に示されるとおりのAvibodyの最終的なサイズ排除クロマトグラフィープロファイルを取り上げる。予想どおり、Avibodyファミリー内及び異なるAvibodyファミリー間の双方における僅かな差異は別として、Avibodyの溶出時間は予想される分子サイズと十分に対応した；トリアボディはダイアボディより早く溶出し、ダイアボディはscFvより遅く溶出した。本明細書に記載されるAvibodyは全て、機能的に発現させて、実質的に均質となるよう精製することができた。フレームワーク1内システイン置換変異の存在が、Avibodyを機能的に発現させて実質的に均質となるよう精製する能力に影響を与えなかったことから、チオール化Avibodyのフレームワーク1内に操作的システインを置くことが、Avibodyの不安定化につながる有害な構造的コンホメーション上の変化を引き起こさなかったことを示唆するモデリングデータが、部分的

40

50

に確認された。

【0459】

実施例4 - ダイアボディのインビトロ免疫反応性評価

可溶性抗原に対する結合活性を、サイズ排除クロマトグラフィーを用いたカラムシフトアッセイにより確立した。AVP04-xx Avibodyに対する抗原は、ウシ顎下腺ムチン(BSM)(Sigma)から可溶形態で利用可能なTAG72である。AVP07-xx Avibodyについては、可溶性抗原は組換えHER2エクドメインである。AVP02-xx Avibodyについては、可溶性抗原は組換え完全長MUC1である。Avibody又は抗原に関わりなく、カラムシフトアッセイは本質的に以下に記載するとおり実施した。

10

【0460】

ダイアボディに対する少なくとも2倍モル過剰の可溶性抗原をPBS緩衝液中、周囲温度で1時間インキュベートした。得られたAvibody-抗原複合体ピークを遊離ダイアボディピークと比較することにより、結合活性を決定した。インキュベーション後の遊離Avibodyに対応するピークの減少、及び/又はAvibody-抗原複合体に対応するピークのサイズ増加を陽性の結合結果と見なした。Avibody又はAvibody-抗原複合体の溶出プロファイルを、280nmの吸光度によりモニタリングした。いずれの場合にも、Avibody単独では28~33分に溶出し、Avibody-抗原複合体は10~25分に溶出した。

20

【0461】

上記に記載されるプロトコルを用いて本明細書に記載される全てのAvibodyの免疫活性を評価し、結果を図12A~図12Cに示した。いずれの場合にも、ゲルろ過における溶出時間の大幅な短縮、及び/又は未結合のAvibodyの量の減少から明らかなおりの、Avibody-抗原複合体の形成が観察されたことから、Avibodyが免疫反応性であることが示される。scFv Avibodyは各分子に結合部位を1つのみを有し、そのため複数の結合部位を有することで活発な結合性を呈するダイアボディ及びトリアボディと比べて弱い結合特性を呈するものと予想される。予想どおり、異なるSECプロファイルにより明らかなおり、AVP04-70 scFvはダイアボディ又はトリアボディクローンと比べて安定性が低いAvibody:抗原複合体を形成する。しかしながら、「未結合の」AVP04-70ピークの減少及びAvibody:抗原複合体ピークの形成はプロファイル上明らかで、それが免疫反応性であることが示される。

30

【0462】

Avibodyを無関係の抗原と共にインキュベートしたとき、複合体形成は認められなかったことから、特異的な結合相互作用が生じたことが示される。

【0463】

チオール化Avibodyにおけるフレームワーク1内システイン置換変異の存在又は不在が結合を無効にすることはなかったことから、フレームワーク1内システイン置換変異部位が、Avibodyの機能特性に影響をほとんど又は全く与えない適切な位置で操作されたことがさらに示される。

40

【0464】

実施例5 - チオール化Avibodyにおける遊離スルフヒドリルの定量化

チオール化Avibodyをルーチン的に発現させ、実質的に均質になるよう精製し、及び機能的に活性を有することを示した。チオール化Avibodyにおける操作的フレームワーク1内ジスルフィド架橋の存在、及びその還元に対する利用可能性を、比色アッセイにより評価した。

【0465】

チオール化Avibodyを、3.8mMのTCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩)(Pierce, Rockford, IL, 米国)と共にPBS室温で25分間インキュベートした。還元後、100mMリン酸緩衝液+1mMのEDT

50

A pH 6.5 で予め平衡化した PD10 脱塩カラムにより TCEP を除去し、0.5 mL の画分を回収した。ピークタンパク質画分を UV 分光法により特定し、プールした。

【0466】

反応性チオールを試験するため、50~75  $\mu\text{g}$  の還元タンパク質を、5  $\mu\text{l}$  の 4 mg/mL エルマン試薬 (5, 5'-ジチオ-ビス(2-ニトロ安息香酸); DTNB) (Pierce, Rockford, IL) を含む 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液、1 mM EDTA、pH 8.0 に希釈した。反応を周囲温度で 15 分間進めた。反応性スルフヒドリル濃度を分光法により定量化し、この緩衝系における 412 nm での TNB のモル吸光係数は 14,150  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  と仮定した。スルフヒドリルのモル濃度をダイアボディのモル濃度で除すことにより、ダイアボディ当たりの反応性スルフヒドリル基の推定値を得た。インタクトな IgG 及びフレームワーク 1 内システイン置換変異を含まない非チオール化 Avibody (AVP04-07 又は AVP02-60 のいずれかと同義) を標準化対照として使用した。

10

【0467】

これらの還元条件下では、予想どおり、不変の Kabat L23 位と L88 位との間及び不変の Kabat H22 位と H92 位との間の保存されたジスルフィド結合は反応性を示さず、コンジュゲーションには利用できない。

【0468】

上記に概説する還元条件を用いると、インタクトな IgG 対照は、配列分析から予想されたとおり(データは示さず)、還元後に平均して 8 個の反応性チオールを示した。対照的に、AVP04-07 及び AVP02-60 などの対照 Avibody は、一貫して遊離又は反応性チオールを示さなかった。

20

【0469】

表 2 は、V<sub>L</sub> L8-L11 (又は V<sub>L</sub> を含む AVP07-xx ファミリーの場合、L7-L11) にフレームワーク 1 内システイン置換変異を有する AVP04-xx、AVP02-xx 及び AVP07-xx チオール化 Avibody の一部を示す。いずれの場合にも、フレームワーク 1 内システイン置換変異を含む非還元 Avibody が表面上に有する反応性チオールは 0.5 個未満であると見られたことから、フレームワーク 1 内システイン置換変異が、還元されていない状態では、確かにジスルフィド架橋を形成したことを明確に示している。

30

【0470】

このジスルフィド架橋は、記載のとおり容易に還元でき、コンジュゲーションに利用可能であった。還元された状態では、フレームワーク 1 内システイン置換変異を含む全ての Avibody が平均 4 個の反応性チオールを呈した。

【0471】

## 【表 2】

表 2: モル吸光率による反応性チオールの定量化

試料	タンパク質濃度 (mol/L)	濃度 S-H (mol/L)	平均反応性 チオール数
AVP04-50 未変性	1.838E-05	7.915E-06	0.4
AVP04-50 還元	1.268E-05	5.853E-05	4.6

AVP2-101 未変性	1.179E-05	5.497E-06	0.5
AVP2-101 還元	6.369E-05	2.869E-04	4.5

AVP07-88 未変性	8.758E-06	1.187E-05	1.4
AVP07-88 還元	7.532E-06	3.769E-05	5.0

10

20

## 【0472】

実施例 6 - チオール化 Avibody における還元した操作的ジスルフィドとのペイロードコンジュゲーション

チオール化 Avibody における操作的フレームワーク 1 内ジスルフィド架橋の還元に対する利用可能性から、多数のチオール反応性ペイロードのいずれかを、露出していて、且つ還元されているシステインとコンジュゲート可能であることが示された。

## 【0473】

この能力を実証するため、マレイミド - PEG<sub>24</sub> - メトキシペイロードを、本質的に本明細書に記載されるとおりの還元した操作的フレームワーク 1 内システインとコンジュゲートした。

30

## 【0474】

チオール化 Avibody を還元し、還元剤を除去した後、過剰のマレイミド - PEG<sub>24</sub> - メトキシ (mal - PEG<sub>24</sub> - OMe) (Quanta Bioscience, OH, 米国) を Avibody 当たり 20 当量で添加し、4 で一晩反応させた。ペグ化後、反応しなかった PEG を十分な透析により除去し、PEG 負荷の成功を SDS - PAGE 及び質量分析により判断した。

## 【0475】

SDS - PAGE 分析については、ウェル当たり 2 µg の総タンパク量を負荷し、MES - SDS 緩衝液 (Invitrogen) 中の NuPAGE 4 ~ 12 % ビス - トリスゲルを用いて解像した。得られたタンパク質バンドを、クマシーブルー染色を用いて可視化した。成功したペグ化は、単量体鎖当たり 5 kDa の近似質量増加を再現性のある形で示した (図 13A ~ 図 13C)。

40

## 【0476】

質量分光分析については、Mass PREP オンライン脱塩カートリッジ (Waters Corporation, 米国) を備えた Agilent esiTOF 質量分析器を使用して PEG 化 Avibody の質量スペクトルを記録した。このシステムは 5 % の CH<sub>3</sub>CN で 1 分間平衡化し、続いて 5 ~ 95 % のアセトニトリルの溶出勾配を 9 分間にわたり行った。PEG 化 Avibody は、典型的には 7 分に溶出した。Mass Hun

50

terソフトウェアを使用して、生成された関連m/z電荷ピークのデコンボリューションにより試料の平均質量を決定した。データを表3に報告し、これは質量スペクトルのデコンボリューション後に得られた平均単量体鎖Avibody質量を要約する。PEG<sub>24</sub>の式量は1239.44g/molと報告され、従って少なくとも2478.88質量単位の増加が、操作的システインとの完全なコンジュゲーションを示す。AVP07-71、AVP04-50、AVP07-88及びAVP02-101についての典型的な質量スペクトルの例を、それぞれ図14A～図14Dに示す。

【0477】

【表3】

表3：質量分析により測定したときのチオール化Avibodyに対するPEG負荷

コンストラクト	測定質量 (Da.)	PEG化質量 (Da.)	質量増加 (Da.)	負荷されたPEG
AVP04-50	25685.99	28166.84	2480.85	2
AVP04-70	27453.01	29933.96	2480.95	2
AVP04-74	26506.93	28987.58	2480.65	2
AVP04-78	26816.32	29296.94	2480.62	2
AVP04-84	26816.32	29297.16	2480.84	2
AVP07-68	54564.88	57046.4	2481.52	2
AVP07-71	27597.92	30078.36	2480.44	2
AVP07-88	26780.09	29196.72	2416.63	2
AVP07-89	26343.95	28824.74	2480.79	2
AVP02-101	23509.78	24749.05	1239.27	1

10

20

30

40

50

【0478】

実施例7 - ペイロードをコンジュゲートしたチオール化Avibodyのインビトロ免疫反応性評価

チオール化Avibodyを発現させて精製することができ、その未変性の（コンジュゲートされていない）状態で免疫反応性であることが示された。上記に報告されるデータは、操作的システインとの化学量論的に定義されたコンジュゲーションが高効率で起こっていたことを明確に示した。以下のデータは、フレームワーク1内システイン置換変異を選択的に還元して小さいチオール反応性ペイロードをコンジュゲートしたとき、免疫活性が無効にならなかったことを示す。

【0479】

このため、マレイミド-PEG<sub>24</sub>-メトキシ（実施例6）のペイロードを負荷したチオール化Avibodyについて、本質的に実施例4に記載のとおり免疫活性を評価した。

【0480】

いずれの場合にも、ゲルろ過における溶出時間の大幅な短縮により明らかなおりの、Avibody-抗原複合体形成が観察された（図15A～図15C）。いずれの場合にも、Avibody単独では28～33分間で溶出し、Avibody-抗原複合体は10～25分で溶出した。予想どおり、Avibodyを無関係な抗原と共にインキュベートしたときには、複合体形成は観察されなかった。この結果から、チオール化Avibodyの還元したフレームワーク1内システイン置換変異に対する比較的小さいペイロードのコンジュゲーションが、結合性を無効にしないことが示された。

## 【0481】

しかしながら、操作的フレームワーク1内システイン置換変異に対するペイロードの負荷は、PEG又はPEG様分子に限定されるものではない。

## 【0482】

チオール化Avibodyが、ここでも結合性を無効にすることなく、上記に例示されるPEGコンジュゲートと大きく異なるペイロードとコンジュゲートし得ることを示すため、AVP04-50に検出可能標識ユウロピウムのペイロードを負荷した。

## 【0483】

1-(p-ヨードアセトアミドベンジル)ジエチレントリアミン-N<sup>1</sup>-N<sup>1</sup>, N<sup>2</sup>, N<sup>3</sup>, N<sup>3</sup>-ペンタ酢酸(DTPA)(PerkinElmer、Turku、フィンランド)のEu<sup>3+</sup>キレートを使用して、製造者の指示に従いAVP04-50の還元したフレームワーク1内システイン置換変異とコンジュゲートした。簡潔には、タンパク質を50~100mMの炭酸水素ナトリウム緩衝液+4mMのEDTA、pH8.5中、3mg/mlに濃縮した。Eu-DTPAを30倍(Eu-DTPA:タンパク質)モル過剰で添加してAVP04-50を還元した。4で3~16時間後、反応を完了した。未反応のEu-DTPAを、トリス-緩衝生理食塩水、pH7.4で予め平衡化したSuperdex(登録商標)200 10/300カラムでのゲルろ過によりタンパク質と分離した。得られた画分の各々をエンハンスメント溶液(PerkinElmer、Turku、フィンランド)に希釈し、ユウロピウムカウントについてVictor時間分解蛍光度計(flurometer)を使用して評価した。ピークタンパク質画分に対応するピークユウロピウムカウントをプールし、0.1%の高純度BSAで安定化させ、及び4で遮光保存した。キットにより供給された100nMのEu標準に対する試料のEuカウントを計算することにより、組み込まれたEu-DTPAの濃度を測定した。

10

20

## 【0484】

Eu<sup>3+</sup>-DTPAをコンジュゲートしたAVP04-50は、本質的に実施例4に記載のとおりにより、免疫反応性であることが示された。Eu<sup>3+</sup>-DTPAをコンジュゲートしたAVP04-50は、抗原:Avibody複合体の形成により示されるとおり、BSMに対する特異性を示した。この複合体形成は、Superdex(登録商標)200 10/300カラムでのゲルろ過クロマトグラフィーにおけるタンパク質溶出時間の短縮から明らかであった(図16)。

30

## 【0485】

Eu<sup>3+</sup>-DTPAをコンジュゲートしたAVP04-50の免疫活性を、細胞結合アッセイにより測定した。標識したAvibodyをTAG72陽性細胞系(LS174T)及び陰性細胞系(SK-OV-3)と共にインキュベートした。インキュベーション期間後(1時間、周囲温度)、細胞を十分に洗浄し、ユウロピウム活性についてアッセイした。ユウロピウム標識したAVP04-50は、SK-OV3(TAG72陰性)細胞系と比較してLS174T(TAG72陽性)に関する蛍光強度の大幅な増加により示されるとおり、インタクトな免疫活性及び抗原特異性を示した(図17)。

## 【0486】

まとめると、これらのデータは、抗原に対する結合性を無効にすることなくペイロードをチオール化Avibodyにおける操作的フレームワーク1内システイン置換変異に部位特異的にコンジュゲートすることが可能であることを示唆している。

40

## 【0487】

実施例8-放射標識AVP04-xx Avibodyの生体内効力

チオール化Avibody AVP04-50をマウス異種移植モデルにおいてインビボで使用して、チオール化Avibodyのフレームワーク1内操作システイン変異が生体内安定性又は効力に影響を与えないことを示した。AVP04-50の(<sup>125</sup>I又は<sup>111</sup>In)を用いた生体分布を、「未変異の」親AVP04-07のものと比較した。

## 【0488】

8.1 <sup>125</sup>IによるAvibodyの放射標識

50

標準的なヨードジェン法 (Yazakiら、2001年) を用いて、AVP04-07 及び AVP-04-50 Avibody の  $^{125}\text{I}$  (Perkin Elmer) による放射性ヨウ素化を実施した。所要量 (5~10  $\mu\text{L}$ ) の  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (26 mBq) を、20  $\mu\text{g}$  のヨードジェン (Pierce) により予めコーティングした試験管中の 200  $\mu\text{g}$  の Avibody に添加した。室温で3分間インキュベートした後、上記のとおり FPLC により Superdex-75 又は 200 カラムを使用して標識材料を精製した。カラム溶出物を分画して計数し、その後ピーク画分をプールしてインビトロ及びインビボ試験に使用した。放射標識収率は、典型的には 80~100% であった。

#### 【0489】

8.2 NHS-DOTA の Avibody とのコンジュゲーション及び  $^{111}\text{In}$  による放射標識

AVP04-07 を NHS-DOTA [1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸モノ (N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)] とコンジュゲートした。AVP04-07 及び AVP04-50 を、Amicon Centrifuge YM-10 (10 kDa MWC0) 遠心ろ過装置 (Millipore Corp, Bedford, MA, 米国) を使用して、4, 4, 000 rpm で遠心することにより (Allegra X15R, SX4750 ローター, Beckman Coulter)、3~6 mg/mL に濃縮した。金属夾雑物を取り除くため、タンパク質 (0.4 mL) を、Biomax 限外ろ過膜 (Millipore, PBQK02510) を備えた改良型限外ろ過セルを使用して、14 容量のコンジュゲーション緩衝液 (0.1 M 重炭酸ナトリウム、5 mM の 9 ジエチレントリアミン五酢酸 (diethylenetriamine pentaacetate) (DTPA)、pH 8.5) で 2 時間透析した。プラスグレードの水 (plasma grade water) (Fisher Scientific, Waltham, MA, 米国) の中で 10 mg/mL (0.19 mg、250 nモル) の 19  $\mu\text{L}$  の NHS-DOTA (B-280; Macrocylics, Dallas, TX, 米国) を、限外ろ過セル中の 5 倍モル過剰の Avibody (2.5 mg、48 nモル) に添加し、室温で 1 時間攪拌した。続いてタンパク質を 14 容量の 250 mM 酢酸ナトリウム、pH 7.2 で透析し、4 で保存した。

#### 【0490】

$^{111}\text{InCl}_2$  (Trace Life 11 Sciences, Denton, TX, 米国) を使用して、DOTA コンジュゲート化 Avibody (AVP04-07-DOTA 及び AVP04-50-DOTA) の放射性金属標識を実施した。典型的な実験では、19 mBq の  $^{111}\text{InCl}_2$  をさらなる 0.1 M の HCl により希釈し、0.25 M の酢酸アンモニウム pH 7.0 (最終 pH は 5.5 に調整) 中の 125  $\mu\text{g}$  の DOTA コンジュゲート化 AVP04-07 に添加した。43 で 45 分間インキュベートした後、溶液を 0.1 mM DTPA に調整して任意の残存  $^{111}\text{In}$  を結合させ、室温でさらに 10 分間インキュベートした。放射標識収率は、典型的には 70~90% であった。次に Superdex-75 又は 200 カラムを使用して標識した材料を HPLC により精製し、カラム溶出物を分画して計数した。

#### 【0491】

8.3 LS-174T 異種移植片を使用したインビボ生体分布

マウス異種移植モデルのため、6~8 週齢の雌性無胸腺 nu/nu マウス (Charles River Laboratories) に対して LS-174T 細胞 (ATCC) (10<sup>6</sup> 個) を側腹部に皮下注射し、腫瘍を試験前の約 10 日間成長させた。生体分布試験のため、LS-174T 異種移植片を有するマウスに対し、370 kBq の  $^{125}\text{I}$  標識及び 150 kBq の  $^{111}\text{In}$  標識 AVP04-07 又は AVP04-50 (2~6  $\mu\text{g}$  の総タンパク量) の混合物 (200  $\mu\text{l}$ ) を静脈内注射した。様々な時間点でマウス (4~6 匹のマウス/群) を安楽死させ、腫瘍、血液及び主要臓器を採取し、計量及び計数した。カウントは、 $^{125}\text{I}$  チャネルにおける  $^{111}\text{In}$  カウントの重複について補正した。放射性核種ごとに組織のグラム当たりの注射量の割合 (% ID/g) を計算した。

## 【0492】

## 8.4 Avibodyのインビボ生体分布

LS-174T異種移植片を有する無胸腺マウスにおいて<sup>125</sup>I-及び<sup>111</sup>In-DOTA標識Avibodyの生体分布を計測した。

## 【0493】

AVP04-07及びAVP04-50 Avibodyの生体内効力は完全に同程度であったことから、モデリングにより定義されるフレームワーク1内ジスルフィド架橋がAvibody効力を不安定化させることも、又はそれに負の影響を及ぼしたりすることもなかったことが示唆される(図18A及び図18B)。

## 【0494】

2つの放射性トレーサー(<sup>125</sup>I-及び<sup>111</sup>In)は同様の方法で血液中から除去し、AVP04-50とAVP04-07とのクリアランスには僅かな差しか認められなかった。注入後1時間までに約50%が除去され、4時間目で循環中になお約6~12%が残存した。このサイズのタンパク質について予想されるとおり、<sup>111</sup>In標識Avibodyについては相当量の腎取り込み(24時間目で>100%ID/g)があったが、<sup>125</sup>I標識Avibodyについてはなく、腎臓がクリアランスの主要な経路であったことを実証している。

## 【0495】

<sup>111</sup>In-AVP04-07については腫瘍で多量に取り込まれ、注射後4時間ほどの早い段階で25%ID/g超が観察され、48時間目にも20%ID/gより多く腫瘍に残存した。<sup>111</sup>In-AVP04-50の腫瘍取り込みは、注射後0~4時間の期間では<sup>111</sup>In-AVP04-07の取り込みと一致したが、その後<sup>111</sup>In-AVP04-07の取り込みを超え、24時間目に最大腫瘍取り込みの30%ID/g超に達した。腫瘍取り込みは、<sup>111</sup>In-AVP04-07及び<sup>111</sup>In-AVP04-50の双方について注射後48時間目で同程度のままであった。<sup>111</sup>In-AVP04-07の腫瘍対血液比は24時間目に>50:1であった。<sup>111</sup>In-AVP04-50の場合、腫瘍対血液比は24時間目に>60:1に上昇した。ヨウ素125標識Avibodyはいくらも低い腫瘍対血液比及び腫瘍取り込みを示した(AVP04-07について4時間目及び48時間目にそれぞれ約17%及び10%ID/g、及びAVP04-50について4時間目及び48時間目にそれぞれ19%及び10%ID/g)。予想どおり、一部の<sup>111</sup>Inは脾臓、肝臓及びカーカス(carcass)に貯留し、一方<sup>125</sup>I標識Avibodyはこれらの組織には貯留しなかった。

## 【0496】

AVP04-07及びAVP04-50の生体分布に加え、チオール化されたHER2特異的AvibodyであるAVP07-63(配列番号65)もまた、その非チオール化親AVP07-17と同程度に生体内で有効であることが示された。

## 【0497】

これらの生体内実験では、AVP07-17及びAVP07-63は、本質的に記載されるとおり(Adamsら 1993年)、クロラミンT法(<sup>125</sup>I:タンパク質比、1:10)を用いて<sup>125</sup>Iで放射標識した。放射性医薬品の品質及び免疫活性は、記載されるとおり(Adamsら 1993年)、SDS-PAGEにより、及び生細胞結合アッセイで評価した。6~8週齢のCB.17 Icr scidマウスに対し、SKOV3細胞(2.5×10<sup>6</sup>個)を腹部に皮下移植した。腫瘍が50~200mgのサイズに達したとき(約8週)、その飲用水にルゴール液を入れて放射性ヨウ素の甲状腺蓄積を阻止し、生体分布試験を開始した。各マウスに対し、20マイクログラム(100ml)の放射性ヨウ素化AVP07-17又はAVP07-63を尾静脈注射により静脈内投与した。注射後24時間目に、<sup>125</sup>I-Avibodyを投与されたコホートの5匹のマウスを犠牲にした。組織中(%ID/g)及び血液中(%ID/ml)における各放射性医薬品の残留の平均値及びSEMを、記載されるとおり(Adamsら 1993年)、崩壊補正したカウントから決定した。

10

20

30

40

50

## 【0498】

24時間生体分布の結果から、AVP04-17及びAVP07-63の腫瘍取り込みは、3.0~3.6% ID/gの範囲で(図19)、極めて類似していることが示された。チオール化Avibody及び非チオール化Avibodyの腫瘍取り込みは極めて類似していたが、他の全ての組織では、24時間目のAVP07-63取り込みは有利には、親の非チオール化AVP07-17の取り込みより少なかった。

## 【0499】

これらの結果は、フレームワーク1内ジスルフィド挿入を受け入れる際に生体内効力、安定性又は機能に負の影響を及ぼすことのないフレームワーク1領域のロバスト性を明確に示している。さらに、好ましいフレームワーク1内ジスルフィド挿入の追加(AVP04-50の場合など)は、コアモデリング制約をなお満たす限り、Avibodyの効力又はジスルフィド形成に影響することなく1~2残基だけ僅かにシフトさせることができる(AVP07-63の場合など)。

10

## 【0500】

実施例9-ペイロードコンジュゲート化チオールAvibodyの生体内効力は非「未変異」Avibodyより優れている。

Fv含有タンパク質との部位特異的な、且つ化学量論的に定義されたペイロードコンジュゲーションを可能にするようにジスルフィド挿入変異を設計した。操作的なフレームワーク1内ジスルフィド架橋の挿入は、インビトロ及びインビボの双方でチオール化Avibodyの効力に影響しないことが示された。

20

## 【0501】

Avibodyの表面上の操作的フレームワーク1内ジスルフィド挿入変異に対する部位特異的及び化学量論的に定義されたペイロードコンジュゲーションが、リジンなどの他のAvibody表面残基に対するペイロードのランダムコンジュゲーションと比べてインビボで利点を提供したことを示すため、48-PEGリピートのサイズ単分散ポリエチレングリコール(dPEG<sub>48</sub>、Quanta Biodesign Ltd、OH、米国)を、操作的フレームワーク1内部位を介してAVP04-50にコンジュゲートした。この試薬(PEG<sub>48</sub>-AVP04-50)の生体分布を、PEGが表面リジンにコンジュゲートされたAVP04-07のPEGコンジュゲート(PEG3400-AVP04-07)で観察されたインビボ生体分布の結果と比較した。

30

## 【0502】

9.1 AVP04-07 AvibodyのDOTA-Cys-VS-PEG3400コンジュゲートの生成

NHS-PEG3400-VSを、これまでに記載されるとおり(Liら 2008年)15:1のモル比及びpH6.0でAVP04-07ダイアボディにコンジュゲートした。簡潔には、NHSPEG3400-VS(3.1mg、800nモル)を1mLのpH7.5 PBS中の2.75mg(50nモル)のダイアボディ(52,500ダルトンの二量体分子量に基づく)と混合し、0.1MのNaOHでpHを6.0に調整し、混合物を室温で2時間反応させた。SDSゲルにより反応をモニタすると、2時間までに70%超が完了しているものと思われた。2時間後、反応混合物全体をSuperdex 75カラムに加え、16.3分に溶出したコンジュゲートを回収した。コンジュゲート(8mL)を10,000kDaカットオフVivaspin(Sartorius Stedim Biotech、独国)において0.35mlに濃縮し、1.4mg(2.76µモル)のシステインアミド-DOTAと混合し(Lewisら 1998年)、pHを8.5に調整し、試料ロータにおいて混合物を室温で17時間反応させた。試料を0.25Mの酢酸アンモニウムで透析し、10,000kDaカットオフVivaspinで1~3mg/Lに濃縮し、無菌ろ過した。得られたコンジュゲートを、本質的に実施例8.2に記載するとおり111Inで放射標識した。

40

## 【0503】

9.2 AVP04-50 AvibodyのDOTA-PEG<sub>48</sub>コンジュゲートの生

50

成

N-FMOC-アミド-PEG<sub>48</sub>-酸(0.1 mモル)を、N-メチルピロリジン/ジクロロメタン中のDCC/HOBtにより室温で90分間活性化し、DCUをろ去し、活性化N-FMOC-PEG<sub>48</sub>-酸をCys-ポリスチレンWang樹脂(0.3 mモルcys/g樹脂)と75 で3分間カップリングした。FMOC基をエタノール/DMF(13:200、v/v)中の0.5 Mピペラジンにより65 で3分間除去し、DMF、エタノール、及びDCMで洗浄し、次に上記のとおりトリ-t-ブチル-DOTAの活性エステル(0.5 mモル)とカップリングした。樹脂を5 mLのTFA(5%水、5%トリイソプロピルシラン、5%エタンジチオール)により40 で60分間処理した。粗生成物をDCM/ヘキサン(5 mL、2:5 v/v、5x)で抽出し、-20 の10 mLのt-ブチルメチルエーテルで沈澱させ、PRP-1カラム(Hamilton、Renno、NV、10x250 mm)において、100% A(0.1 TFA、94.9水、5 MeCN)から100% B(0.1 TFA、29.9水、70 MeCN)への勾配を用いて15分間にわたり8 mL/分の流量でクロマトグラフ処理した。DMF中のDOTA-PEG<sub>48</sub>-Cysにビニルスルホン及びトリエチルアミンを添加し、反応混合物をアルゴン下室温で23時間攪拌した。溶媒を蒸発させた後、残留物を再度水中に溶解し、Gemini C18カラム(Phenomenex、CA)における逆相HPLCにより精製し、凍結乾燥した。DOTA-PEG<sub>48</sub>-Cys-VSをダイアポディと20:1~50:1のモル比でコンジュゲートした。簡潔には、AVP04-50をDOTA-PEG<sub>48</sub>-Cys-VSに対して記載される比で添加し、0.1 NaOHでpHを9.0に調整した。ロータにおいて混合物を室温で18時間反応させた。試料を0.25 Mの酢酸アンモニウムで透析し、10,000 kDaカットオフVivaspin(Sartorius Stedim Biotech、独国)において1~4 mg/mLに濃縮し、無菌ろ過した。アリコートを取り出し、SDS及びIEFゲル電気泳動並びに質量分析法によりコンジュゲーションを確認した。

【0504】

9.3 AVP04-07-PEG3400及びAVP04-50-PEG<sub>48</sub>の比較生体分布

PEG3400を使用した生体分布では、非PEG化AVP04-07と比較して腎取り込みが大幅に低減した。PEG3400-AVP04-07は24時間目に約8.4% ID/gの腎取り込みを示した(図20パネルA)。ペグ化による腎取り込みの大幅な低減は、24時間目に22% ID/gから46% ID/gへの腫瘍取り込みの増加(図18に示されるとおりの非PEG化AVP04-07と比べたとき)を伴った。腫瘍貯留の増加は、明らかにPEG化ダイアポディの血中クリアランス(t1/2b、36時間)が非PEG化ダイアポディ(t1/2b、18時間)と比べて長いことに起因する。

【0505】

PEG<sub>48</sub>-AVP04-50の生体分布(操作的フレームワーク1内システイン置換変異に対するPEG化)は、PEG3400-AVP04-07と比べて腫瘍取り込みのさらなる全般的な向上、より速い血中クリアランス及びより高い腫瘍対血液比を示した(図20パネルB)。PEG<sub>48</sub>-AVP04-50の腫瘍取り込みは70% ID/gまでさらに上昇し、腫瘍対血液比は24時間目に11:1となり、48時間目には19:1の高さにまで上昇した。

【0506】

PEG3400-AVP04-07などのリジンを対象としたコンジュゲートと比べて、PEG<sub>48</sub>-AVP04-50については腫瘍対血液比の向上、より高い腫瘍取り込み及び許容できる非特異的な腎取り込みが観察されたことから、操作的フレームワーク1内システイン置換変異に対するペイロードのコンジュゲーションが生体内効力又は機能に影響しないことが明らかに示された。

【0507】

9.4 AVP04-07-PEG3400及びAVP04-50-PEG<sub>48</sub>の比較P

## E Tイメージング

本質的に他に記載されるとおり (L i ら 2008年)、比較PETイメージングを実施した。要約すれば、腫瘍を有するマウスに対し、 $^{64}\text{Cu}$  標識AVP04-07又はAVP04-07ダイアボディ-PEGコンジュゲート(リジンにコンジュゲートした)又はAVP04-50ダイアボディ-PEGコンジュゲート(操作的フレームワーク1内システム置換変異にコンジュゲートした)を静脈内注射し、1、4、21~22、及び45~46時間目に小動物用PETスキャナ(microPETモデルR4; Siemens/CTIMI)で画像化した。マウスはイソフルランで麻酔し、1時間目及び4時間目の時間点では20分間; 21~22時間目には45分間、及び45~46時間目には60分間走査した。データはフーリエリビンング法を用いて2次元サイノグラムに並べ替え、走査内放射性崩壊、検出器の不均一性、及び偶発同時ノイズについて補正した。画像は、反復的オーダードサブセット期待値最大化法(4反復、16サブセット)により再構成した。

10

## 【0508】

未修飾及び非コンジュゲート化AVP04-07から得られたPET像は、このサイズのタンパク質について予想されるとおりの著しい腎取り込みを示した(図21A)。これは、上記の図18に報告されるAVP04-07の $^{111}\text{In}$ 生体分布と同等である。27残基のサイズ単分散PEG(可能な最良のインビボ生体分布を提供するよう最適化したサイズ)をランダム表面AVP04-07リジンに付加すると、腫瘍取り込みが増加し、且つ腎取り込みが大幅に低下した(図21A)ことによって、全体的な生体分布が劇的に向上した。

20

## 【0509】

AVP04-50の操作的フレームワーク1内システム置換変異に対するサイズ単分散PEGの部位特異的且つ化学量論的に定義された付加はまた、非PEG化AVP04-07と比べた生体分布も改良し(図21B)、望ましくない腎取り込みの大幅な低減及び腫瘍特異的取り込みの全般的な増加を実証した。リジンにPEG化されたAVP04-07と操作的チオールにPEG化されたAVP04-50とは、生成されたPET像が極めて類似していたが、操作的フレームワーク1内システム置換変異に対する再現性のある形での部位が定義され、且つ化学量論的に定義されたコンジュゲーションは生体内効力に負の影響を及ぼすことなくロバスタな臨床的利点を提供する。

30

## 【0510】

実施例10-抗TAG72ダイアボディコンジュゲート及びイメージングへのその使用

## 10.1 実験手順

## 材料、放射標識、質量分析法

ATCCからLS-174T細胞を入手し、10%熱失活ウシ胎仔血清(FBS)(Omega Scientific, Tarzana, CA, 米国)、1%L-グルタミン、10mMピルビン酸ナトリウム及び0.1mM非必須アミノ酸を補足したイーグル最小必須培地1x(EMEM)(Cellgro, Herndon, VA, 米国)からなる無菌成長培地に維持した。Macrocyclics, Inc., Dallas, TXから1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-1, 4, 7-トリス(酢酸t-ブチル)-10-酢酸を入手した。Nektar(San Carlos, CA)からNHS-PEG3400-VS(カタログ番号4M5B0F02)を購入した。Novabiochem(EMD Biosciences, San Diego, CA)からN-FMOC-アミド-dPEG-27酸を入手し、Quanta Biodesign Ltd(Powell, OH)からN-FMOC-アミド-dPEG-12酸を購入した。キレートコンジュゲート化抗体を、実質的にこれまでに記載されるとおり(Lewisら、1994年) $^{111}\text{In}$ 塩化物(Amersham、2~9mCi/mgのタンパク質)若しくは $^{64}\text{Cu}$ (Washington University School of Medicine、10mCi/mgの抗体)で、又はヨードジェン法(実質的にYazakiら、2001年に記載されるとおり)により $^{125}\text{I}$ (Perkin Elmer、3

40

50

~ 9 mCi / mg の抗体) で放射標識した。標識化率は I T L C 又はサイズ排除クロマトグラフィー ( S E C ) により Superdex 75 又は 200 カラム ( 1 × 30 cm、GE Healthcare ) で決定した。放射標識抗体を S E C により同じカラムで精製した ( 生理食塩水中、流量 0.5 mL / 分、画分サイズは 0.5 mL であった )。Agilent 6520 四重極飛行時間型液体クロマトグラフィー質量分析装置で質量スペクトルを記録した。

#### 【0511】

抗TAG72 ダイアボディの構築、クローニング、発現、及び精製

抗TAG72 ダイアボディをコードする配列を、CC49 モノクローナル抗体をコードする配列から誘導し、大腸菌 ( E . coli ) 発現用にコドン最適化した。Vドメインの向き ( V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub> ) が保存され、且つ 5 残基リンカー ( G<sub>4</sub>S ) により連結された DNA コンストラクトを設計した。DNA 配列を適切な制限部位 ( NcoI 及び NotI ) と合成し、GenScript Corp ( Piscataway, NJ, 米国 ) によって pUC57 にクローニングした。配列を NcoI 及び NotI により pUC57 から切り取り ( New England Biolabs, Ipswich, MA, 米国 )、精製し、pET22b (+) 発現ベクター ( Novagen, Madison, WI, 米国 ) にクローニングし、及び大腸菌 ( E . coli ) XL1 - Blue ( recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [ F' proAB lacI<sup>q</sup> Z M15 Tn10 ( Tet<sup>r</sup> ) ] ) ( Stratagene, La Jolla, CA, 米国 ) に電気穿孔処理した。配列決定により陽性クローンを同定し、AVP04 - 07 と命名した ( このダイアボディをコードする配列は配列番号 54 に示す )。

10

20

#### 【0512】

AVP04 - 07 の細菌産生及び精製

標準的なプロトコルを用いて AVP04 - 07 を大腸菌 ( E . coli ) BL21 ( DE3 ) ( F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> ( r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup> ) gal dcm ( DE3 ) ) ( Novagen ) にサブクローニングした。単一コロニーを使用して 1% ( v / v ) D - グルコースと 100 mg / mL アンピシリンとを含有する 500 mL の 2 × YT に接種し、振盪しながら 37 °C で一晩インキュベートした。18 リットルの同じ培地 ( グルコースは 0.1% に低減 ) に、最終 A<sub>600nm</sub> が 0.1 となるよう一晩培養物を播種し、30 °C でインキュベートして OD<sub>600</sub> が 0.6 ~ 0.8 になった時点で培養物を 12 °C に移した。0.2 mM イソプロピル - b - D - チオガラクトピラノシド ( IPTG ) ( Promega, Madison, WI, 米国 ) を添加して AVP04 - 07 発現を誘導し、培養物を 12 °C で一晩インキュベートした。細菌ペレットを遠心により回収し、計量し、精製まで - 20 °C で保存した。

30

#### 【0513】

精製の開始に当たり、発現した細菌ペレットは解凍し、0.25 mg / mL リゾチーム ( Sigma Aldrich, St Louis, MO, 米国 ) と 1 mM PMSF ( Sigma ) と 25 U Benzonase ( Merck, Darmstadt, 独国 ) とを含有する HisTrap 抽出緩衝液 ( 20 mM リン酸塩、500 mM NaCl、20 mM イミダゾール、pH 7.4 ) 中に再懸濁し、Misonix S - 4000 ソニケーター ( Misonix, Farmingdale, NY, 米国 ) を使用した音波処理により 4 °C で溶解した。細菌ライセートを 37 °C で 30 分間インキュベートした後、遠心 ( 16,000 × g、30 分間 ) 及び 0.45 μm のろ過により清澄化した。発現した AVP04 - 07 を含有する清澄化ライセートを、AKTA 精製装置 10 ( GE Healthcare, Uppsala, スウェーデン ) を使用した三段階精製法により精製した。

40

#### 【0514】

AVP04 - 07 を含有する清澄化ライセートを、予め平衡化した HisTrap 粗精製 FF カラム ( 2 × 5 mL ) ( GE Healthcare ) に負荷した。未結合のタンパク質を HisTrap 抽出緩衝液による洗浄で取り除いた後、HisTrap 溶出緩

50

衝液 (20 mM リン酸、500 mM NaCl、260 mM イミダゾール) 中でカラムから AVP04-07 を溶出した。溶出した AVP04-07 を 4 の 50 mM MES、pH 6.0 で透析し、遠心により全ての沈澱物を除去した。透析した AVP04-07 を、50 mM MES、pH 6.0 中の予め平衡化した HiTrap SP HP カラム (2 x 5 mL) (GE Healthcare) に負荷した。カラムを 50 mM MES、pH 6.0 中で洗浄することにより未結合のタンパク質を除去した後、線形的に増加する NaCl 勾配下 (0 ~ 600 mM NaCl) で 50 mM MES、pH 6.0 中の結合した AVP04-07 を溶出した。溶出した AVP04-07 ダイアボディを含有する画分をプールし、定量化し、濃縮した後、PBS pH 7.2 中で Superdex 75 (26/60 プレップ等級) カラム (GE Healthcare) を使用してサイズ排除クロマトグラフィーに供した。280 nm の単一ピークに対応する画分をプールし、定量化し、約 3 mg/mL に濃縮し、PBS で透析して 4 で保存した。

10

#### 【0515】

分析的超遠心法による AVP04-07 アイソフォームの確認

精製した AVP04-07 について、分析的超遠心法により二量体であることを確認した。Beckman モデル XL-I 分析的超遠心機 (Fullerton, CA, 米国) を使用して 20 で沈降速度実験を行った。精製した AVP04-07 を 20 mM トリス、150 mM NaCl、pH 7.4 で透析し、ダブルセクタ石英セルに負荷し、Beckman 4 穴 An-60 Ti ロータに装着した。AVP04-07 及び参照溶液を 40,000 rpm のロータ回転数で遠心し、300 秒間の時間間隔及び 0.003 cm の刻み幅を用いて連続モードで  $A_{290nm}$  のデータを収集し、平均化は行わなかった。溶媒密度 (20 で 1.00499 g/mL)、溶媒粘度 (1.0214 cp) の推定値、並びに AVP04-07 の偏比容の推定値を、プログラム SEDNTERP を使用して計算した。複数の時間点における沈降速度データを、プログラム SEDFIT を使用して連続サイズ分布モデルにフィットさせた。

20

#### 【0516】

免疫活性のインビトロ評価

ウシ顎下腺ムチン (BSM, Aldrich-Sigma (St. Louis, MO)) に存在する可溶性抗原 TAG72 を結合する AVP04-07 の能力を、カラムシフトアッセイにより評価した。2つのモル過剰の BSM を 55 に 5 分間加熱し、遠心により清澄化してから AVP04-07 ダイアボディを添加し、室温で 1 時間インキュベートした。試料を Superdex 200 カラムにおけるゲルろ過により直ちに解像した。溶出プロファイルに関連する対照と比較することにより、ダイアボディ-抗原複合体の形成を判断した。

30

#### 【0517】

AVP04-07 の NHS-DOXA とのコンジュゲーション

AVP04-07 を NHS-DOXA [1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸モノ (N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)] にコンジュゲートした。AVP04-07 は、Amicon Centricon YM-10 (10 kDa MWCO) 遠心ろ過装置 (Millipore Corp, Bedford, MA, 米国) を使用して、4、4,000 rpm で遠心することにより (Allegria X15R, SX4750 ロータ, Beckman Coulter)、5.8 mg/mL に濃縮した。金属夾雑物を除去するため、タンパク質 (0.5 mL) を、Biomax 限外ろ過膜 (Millipore, PBQK02510) を備えた改良型限外ろ過セルを使用して 14 容量のコンジュゲーション緩衝液 (0.1 M 重炭酸ナトリウム、5 mM ジエチレントリアミン五酢酸 (diethylenetriamine pentaacetate) (DTPA)、pH 8.5) で 2 時間透析した。プラスグレードの水 (Fisher Scientific, Waltham, MA, 米国) の中で 10 mg/mL の NHS-DOXA (B-280; Macrocylics, Dallas, TX, 米国) を、限外ろ過セル中の 15 倍モル過剰の AVP04-07 に添加し、室温で 1 時間

40

50

攪拌した。続いてタンパク質を14容量の250 mM酢酸ナトリウム、pH 7.2で透析し、カセットから取り出し、4 で保存した。

【0518】

AVP04-07のDOTA-PEGとのコンジュゲーション

DOTA-Cys-VS-PEG3400-ダイアボディ。NHS-PEG3400-VSを、これまでに記載されるとおり(Lira、2008年)、AVP04-07ダイアボディに30:1のモル比及びpH 6.0でコンジュゲートした。簡潔には、NHS-PEG3400-VS(3.1 mg、800 nモル)を1 mLのpH 7.5 PBS中の2.75 mg(50 nモル)のダイアボディと混合し、pHを0.1 MのNaOHで6.0に調整し、混合物を室温で2時間反応させた。反応をSDSゲルによりモニタすると、2時間経った時点で70%超が完了したと思われる。2時間経った時点で全ての反応混合物をSuperdex 75カラム(1×30 cm、0.5 ml/分、Pharmacia)に加え、16.3分に溶出したコンジュゲートを回収した。コンジュゲート(8 mL)を10,000 kDaカットオフVivaspin(Sartorius Stedim Biotech、独国)において0.35 mlに濃縮し、1.4 mg(2.76 μモル)のシステインアミド-DOTAと混合し、pHを8.5に調整し、試料ロータで混合物を室温で17時間反応させた。試料を0.25 M酢酸アンモニウムで透析し、10,000 kDaカットオフVivaspinで1~3 mg/Lに濃縮し、無菌ろ過した。コンジュゲートをSDS及びIEFゲル電気泳動により特性決定した。

10

【0519】

DOTA-PEG<sub>27</sub>-Cys-VS-ダイアボディ。N-FMOC-アミド-PEG<sub>27</sub>-酸(0.1 mモル)を、N-メチルピロリジン/ジクロロメタン中のDCC/HOBtにより室温で90分間活性化し、DCUをろ去し、及び活性化N-FMOC-PEG酸をCys-ポリスチレンWang樹脂(0.3 mモルcys/g樹脂)と75 で3分間カップリングした。FMOC基を上記のとおりエタノール/DMF(13:200、v/v)中の0.5 Mピペラジンにより65 で3分間除去し、DMF、エタノール、及びDCMにより洗浄し、次にトリ-t-ブチル-DOTA(0.5 mモル)の活性エステルとカップリングした。樹脂を5 mLのTFA(5%水、5%トリ-イソプロピルシラン、5%エタンジチオール)により40 で60分間処理した。DCM/ヘキサン(5 mL、2:5 v/v、5×)で粗生成物を抽出し、-20 で10 mLのt-ブチルメチルエーテルにより沈澱させ、PRP-1カラム(10×250 mm)において100%A(0.1 TFA、94.9水、5 MeCN)から100%B(0.1 TFA、29.9水、70 MeCN)への勾配を使用して15分間、8 mL/分の流量でクロマトグラフ処理した。DMF中の200 μLのDOTA-PEG<sub>27</sub>-Cys(30 mg、16.6 μmol)に対し、ビニルスルホン(12 μL、116 μmol)及びトリエチルアミン(6 μL、43 μmol)を添加し、反応混合物をアルゴン下に室温で23時間攪拌した。溶媒を蒸発させた後、残基を再び300 μLの水に溶解させ、逆相HPLCによりGemini C18カラム(Phenomenex、CA)で精製し、凍結乾燥した(収率55%)。DOTA-PEG<sub>27</sub>-Cys-VSをダイアボディに50:1のモル比でコンジュゲートした。簡潔には、2 mg(38 nモル)のダイアボディ(PBS中2.75 mg/mL)を22 μLのDOTA-PEG<sub>27</sub>-Cys-VS(水中0.175 mg/mL、2 μモル)に添加し、pHを0.1 NaOHで9.0に調整し、混合物をロータにおいて室温で18時間反応させた。試料を0.25 M酢酸アンモニウムで透析し、10,000 kDaカットオフVivaspin(Sartorius stedim biotech、独国)において1~4 mg/mLに濃縮し、無菌ろ過した。アリコートを取り出し、SDS及びIEFゲル電気泳動及び質量分析法によりコンジュゲーションを確認した。

20

30

40

【0520】

ダイアボディ-VSC-PEG<sub>12</sub>-DOTA。DOTA-PEG<sub>12</sub>-Cys-VSのダイアボディとの20:1及び50:1のモル比での合成及びコンジュゲーションを、上記のとおり実施した。

50

## 【0521】

## AVP04 - 07コンジュゲートの等電点分離

IEFプレキャストゲル(pH3~10)(Novex)又はPharmacia PhastGelのいずれかにおいて製造者の指示どおりに等電点ゲル電気泳動法を実行した。

## 【0522】

## AVP04 - 07及びそのコンジュゲートの放射標識

標準的なヨードジェン法(Yazakiら、2001年)を用いてAVP04 - 07及びそのコンジュゲートの $^{125}\text{I}$ (Perkin Elmer)による放射性ヨウ素化を実施した。所要量(5~10 $\mu\text{L}$ )の $\text{Na }^{125}\text{I}$ (26mBq)を、20 $\mu\text{g}$ のヨードジェン(Pierce)で予めコーティングした試験管内の200 $\mu\text{g}$ のAVP04 - 07に添加した。室温で3分間インキュベートした後、標識された材料をHPLCによりSuperdex - 75又は200 10/300 GL FPLCカラム(GE Healthcare)を使用して精製した。カラム溶出物を分画して計数し、その後ピーク画分をプールしてインビトロ及びインビボ試験に使用した。放射標識収率は、典型的には80~100%であった。

10

## 【0523】

$^{111}\text{InCl}_2$ (Trace Life Sciences, Denton, TX, 米国)又は $^{64}\text{CuCl}_2$ (Washington University, St. Louis, MO.)を使用してDOTA - AVP04 - 07の放射性金属標識を実施した。典型的な実験では、19mBqの $^{111}\text{InCl}_2$ をさらなる0.1M HClにより希釈し、0.25Mの酢酸アンモニウム(ammonium acetate) pH7.0(最終pHは5.5に調整)中の125 $\mu\text{g}$ のDOTAコンジュゲート化AVP04 - 07に添加した。43で45分間インキュベートした後、溶液を0.1mM DTPAに調整して任意の残存 $^{111}\text{In}$ を結合させ、室温でさらに10分間インキュベートした。 $^{64}\text{Cu}$ 標識も同じように実施した。放射標識収率は、典型的には70~90%であった。次に標識された材料をHPLCによりSuperdex - 75又は200 10/300 GL FPLCカラムを使用して精製し、カラム溶出物を分画して計数した。

20

## 【0524】

放射標識産物の純度について、HPLC - SECによりSuperose - 6 10/300 GLカラム(GE Healthcare)を使用して分析した。放射標識タンパク質(4kBq)を1%HSA/PBSに希釈し、カラムに0.5ml/分で注入した。フロースルー検出器を使用して放射活性及びUV吸光度を検出した。

30

## 【0525】

## LS - 174T異種移植モデル

6~8週齢の雌性無胸腺nu/nuマウス(Charles River Laboratories)に対し、LS - 174T細胞(ATCC)( $10^6$ 個)を側腹部に皮下注射し、試験前の約10日間、腫瘍を成長させた。生体分布試験のため、LS - 174T異種移植片を有するマウスに対し370kBqの $^{125}\text{I}$ 標識AVP04 - 07と150kBqの $^{111}\text{In}$ 標識AVP04 - 07との混合物(200 $\mu\text{l}$ )(2~6 $\mu\text{g}$ の総タンパク量)を静脈内注射した。様々な時間点でマウスを犠牲にし、腫瘍、血液及び主要臓器を採取し、計量及び計数した。カウントは、バックグラウンド及び $^{125}\text{I}$ チャンネルに含まれる $^{111}\text{In}$ カウントについて補正した。放射性核種ごとに組織1グラム当たりの注入量の割合(%ID/g)を計算した。

40

## 【0526】

## PETイメージング

腫瘍を有するマウス(21~25g)に $^{64}\text{Cu}$ 標識ダイアボディ又はダイアボディ - PEGコンジュゲートを静脈内注射し、小動物用PETスキャナ(microPETモデルR4; Siemens/CTIMI, Knoxville, TN)で1.0時間目から始まり、4時間目、21~22時間目及び45~46時間目に画像化した。注入した活

50

性及びタンパク質負荷は、それぞれ63～169 kBq/g及び0.4～0.7 µg/gの範囲であった。走査の少し前に、マウスをイソフルランで麻酔し、腹臥位に保定し、機器の視野の中心に置いた。走査時間は、1時間及び4時間の時間点について20分間、21～22時間の時間点について45分間、及び45～46時間の時間点について60分間とした。各走査において、microPETのレーザー位置合わせツールを使用して尾の基部を8.0 cm長の視野の軸方向中心から約4.0 cmのところに位置決めした。

#### 【0527】

最後の走査を完了した直後、心穿刺により血液試料(0.2 cc)を採取し、マウスを犠牲にし、腫瘍及び様々な主要な臓器を切除し、計量し、及び計数した。計測した活性は注射後の放射性崩壊について補正し、各標本について%ID/gを計算した。犠牲時の腫瘍重量は107～275 mgの範囲であった。

10

#### 【0528】

標準的なmicroPETソフトウェアにより画像処理を実施した。走査データはフーリエリビンギング法を用いて二次元サイノグラムに並べ替え、走査内放射性崩壊、検出器の不均一性及び偶発同時ノイズについて補正した。画像は、反復的オーダーサブセット期待値最大化(OSEM)法(4反復、16サブセット)により再構成した。

#### 【0529】

### 10.2 結果

#### AVP04-07ダイアボディの構築、発現及び特性決定

大腸菌(E. coli) BL21 (DE3)においてAVP04-07を可溶性タンパク質として産生し、三段階精製法により精製した。精製した産物は、Superdex 200ゲルろ過カラムから単一種として溶出した。連続質量c(M)分布分析からは、残留物のランダムな分布及びベストフィットの結果となる統計的パラメータ(すなわち、全てのrmsd値<0.0054及びRuns検定Z値<14.4)により表されるとおり、優れたフィットが得られた。AVP04-07のc(M)分布分析からは、それが、見かけの分子質量が52.5 kDaの、単分散二量体(すなわちダイアボディ)として存在することが示唆される。

20

#### 【0530】

精製したAVP04-07は、Superdex 200カラムでのカラムシフトアッセイにより、インビトロで可溶性抗原を結合することが示された。BSMとの関連においてその抗原と複合体化したとき、AVP04-07の溶出プロファイルは、AVP04-07単独の溶出プロファイルから大幅に変化した。主要タンパク質ピークは、精製したAVP04-07単独での予想される31分の溶出時間と比較して、約16分にカラムから溶出した。ダイアボディ-抗原複体の形成を示す同様の溶出時間の短縮は、関連のないダイアボディ又は関連のない抗原では認められなかった。

30

#### 【0531】

ヌードマウスLS174T異種移植モデルにおける<sup>111</sup>In-DOTA-及び<sup>125</sup>I-AVP04-07の生体分布及びイメージング

<sup>125</sup>I-又は<sup>111</sup>In-DOTA-AVP04-07を注入したLS174T異種移植片を有する無胸腺マウスにおいて生体分布を計測した。2つの放射性トレーサーは同様の方法で血液中から除去し、注入後1時間までに約50%が除去され、4時間目で循環中になお約10%が残存した(図22A及び図22B)。このサイズのタンパク質について予想されるとおり、<sup>111</sup>In標識ダイアボディについては相当量の腎取り込み(24時間目に100%ID/g)があったが、<sup>125</sup>I標識ダイアボディについてはなく、腎臓が主要なクリアランス経路であったことを実証している。

40

#### 【0532】

<sup>111</sup>In-AVP04-07については腫瘍で多量に取り込まれ、注射後4時間ほどの早い段階で25%ID/g超が観察され、48時間目にもなお20%ID/gより多く腫瘍に残存した。<sup>111</sup>In-AVP04-07の腫瘍対血液比は24時間目に>50:1であった。ヨウ素<sup>125</sup>I標識AVP04-07はいくらも低い腫瘍対血液比及び腫瘍取

50

り込みを示した(4時間目及び48時間目にそれぞれ約17%及び10% ID/g)。予想どおり、一部の $^{111}\text{In}$ は脾臓、肝臓及びカーカスに貯留し、一方 $^{125}\text{I}$ -AVP 04-07はこれらの組織には貯留しなかった。

#### 【0533】

DOTA-Cys-VS-PEG3400-AVP04-07の生成及び生体分布試験  
AVP04-07を、本質的にこれまでに記載されるとおり(Liら、2006年)、DOTA-Cys-VS-PEG3400-NHSにコンジュゲートした。VS-PEG3400-NHSは、初めにタンパク質の表面リジンに(活性エステルを介して)コンジュゲートし、次に反応性チオールを有する試薬と(ビニルスルホンを介して)反応させることのできるヘテロ二官能性ペグ化剤である。チオール型のDOTA、すなわちDOTA-Cys(Lewisら、1998年)をVS-PEG3400-AVP04-07にコンジュゲートし、そのコンジュゲートをIEF及びSDSゲル電気泳動により分析した(図23)。結果は、酸性DOTAが加わったことによるより低いpIへのシフト(IEFゲル、図23A)と、PEG3400が加わったことによるより大きい見かけの分子サイズへのシフト(SDSゲル、図23B)とを示す。コンジュゲートを $^{111}\text{In}$ で放射標識し、Superdex 75でクロマトグラフ処理し、コンジュゲート化していないAVP04-07と比較した(図23A~図23B)。コンジュゲート化していないダイアボディの50kDaと比較して、PEG3400誘導体の見かけの分子サイズは80kDaであった。見かけの分子サイズの増加は、ペグ化がタンパク質のストークス半径に影響を及ぼしたことに起因し得る。

#### 【0534】

$^{111}\text{In}$ 放射標識AVP04-07についての生体分布試験の結果を図22Cに示す。腎取り込みは、未修飾ダイアボディについて24時間目で98% ID/g(図7A)であり、及びPEG化ダイアボディについて24時間目で8.4% ID/g(図22C)であった。この腎取り込みの大幅な低減は、24時間目における腫瘍取り込みの23%から47% ID/gへの増加及び腫瘍/血液比の低下(24時間目に>46:1から2:1)を伴った。腫瘍貯留の増加は、明らかに、PEG化ダイアボディの血中クリアランス( $t_{1/2} = 36$ 時間)が未コンジュゲート化ダイアボディ( $t_{1/2} = 18$ 時間)と比べて長いことに起因する。意外にも、腎取り込みの低下は、 $^{111}\text{In}$ -DOTA-Cys-VS-PEG3400抗CEA-ダイアボディ(Liら、2006年)で既に認められているもの(Liら、2006年)よりはるかに大きい。

#### 【0535】

単分散PEG<sub>27</sub>-AVP04-07コンジュゲートの生成及び生体分布試験

AVP04-07のPEG3400部分とのコンジュゲーションにより所望の腎取り込みの低下が実現されたが、PEG3400は固有の多分散性を有し、結果として化学的に容易に特徴付けられる製品を製造できないため、臨床用生成物としては欠点を有し得る。この点で、ペプチド合成法を用いてヘテロ二官能性試薬に変換することのできるいくつかの単分散PEG構成要素が市販されている。このカテゴリーで利用可能な最大のPEGの一つである市販の単分散PEG-FMOC-NH-PEG<sub>27</sub>-酸を使用して、ヘテロ二官能性単分散ペグ化剤を生成した。初めに標準的なペプチド合成プロトコルによりこのPEG誘導体の活性エステルをCys-ポリスチレンWang樹脂にカップリングし、FMOCを除去し、市販のトリ-t-ブチル保護モノ酸誘導体を使用してDOTAにカップリングした。DOTA-PEG<sub>27</sub>-CysをTFAで樹脂から切断し、精製し、過剰のビニルスルホンと反応させ、逆相HPLCを用いて再度精製した。生成物の合成を図10に示す。DOTA-PEG<sub>27</sub>-Cys-VSは予想分子量がPEG3400のほぼ半分の1928.6であるため、さらなる分子サイズが腎クリアランスにおいて低下をもたらすのに十分かどうかは明確ではなかった。それにもかかわらず、それをダイアボディの表面リジンにpH9.5及び50:1のモル比でコンジュゲートした。コンジュゲートをIEF及びSDSゲル電気泳動により特性決定すると(図8)、pI及び分子サイズの予想されたシフトが観察された。 $^{111}\text{In}$ 及び $^{125}\text{I}$ 二重放射標識生成物をSuperde

x 75でクロマトグラフ処理し(図24)、主要ピークを補正し、生体分布試験を実施した。クロマトグラムを調べ、コンジュゲート化していないダイアボディと比較することにより、PEG3400-ダイアボディ誘導体と同等の見かけの分子サイズのシフトが明らかである。

#### 【0536】

生体分布試験の結果を図26A~図26Bに示す。PEG<sub>27</sub>誘導体はPEG3400誘導体と比較して分子サイズが低いにもかかわらず、ほぼ同等の結果が得られた。24時間目、<sup>111</sup>In標識コンジュゲートの腎取り込みは8.3%ID/g、腫瘍取り込みは49%ID/g、及び腫瘍対血液比は4.2:1であった。PEG<sub>27</sub>誘導体の意外な好結果をふまえてPEG<sub>12</sub>誘導体を作製した。

10

#### 【0537】

単分散PEG<sub>12</sub> AVP04-07の生成及び生体分布試験

上記と同じ化学(図25)によりFMOC-NH-PEG<sub>12</sub>-カルボキシルをDOTA-PEG<sub>12</sub>-Cys-VSに変換し、pH9.0で20:1及び50:1のモル比を用いてAVP04-07にコンジュゲートした。高解像度ナノスプレー質量分析法により未修飾及び2つのコンジュゲートを分析し、それらの置換度を決定した。未修飾ダイアボディからは、デコンポリューション処理したときにアミノ酸配列からの予測と良好に一致する質量である26,869の質量計算値が得られる一連のm/z種が得られた。DOTA-PEG<sub>12</sub>-Cys-VSに20:1のモル比でコンジュゲートすると、一連のデコンポリューション後ピークが得られ、それらのピークは全て、DOTA-PEG<sub>12</sub>-Cys-VSの予想質量である1225質量単位だけ異なった。同様に、質量の差は50:1モル比のコンジュゲーションについても同じであるが、より高い置換度のほうにシフトする。この種の反応については予想ガウス分布が得られるため、ピーク高さが、存在する各種の実際の量に対応すると仮定することは妥当である。ピーク高さを推定値として用いると、20:1コンジュゲートについてダイアボディ当たり平均1.7PEG、及び50:1コンジュゲートについてコンジュゲート当たり平均3.0PEGと推定された。各コンジュゲートを<sup>111</sup>In(178mBq/mg)で試験標識したとき、20:1コンジュゲートは8.3%の放射標識取り込み、及び50:1は92%の取り込みを示した。これらの結果は、より高い置換度が得られるより高いモル比ほど、放射標識について優れた結果をもたらすことを示している。

20

30

#### 【0538】

<sup>111</sup>In及び<sup>125</sup>I二重標識DOTA-PEG<sub>12</sub>-Cys-VS-AVP04-07で生体分布試験を実施した。総じて、腫瘍取り込み及び腎取り込み、血中クリアランス、及び腫瘍対血液比は、PEG3400誘導体及びPEG<sub>27</sub>誘導体と同等であった(図26B)。特に腎取り込みは、最初はPEG<sub>12</sub>においてPEG<sub>27</sub>コンジュゲートより高かったが(13.4%ID/g)、96時間までにより低いレベル(6.1%ID/g)に低下した。しかしながら、腫瘍取り込みレベル及び血中クリアランス曲線は2つのコンジュゲート間でほぼ同じであった。

#### 【0539】

DOTA-PEGコンジュゲートAVP04-07の<sup>64</sup>Cu PETイメージング  
半減期が13時間の陽電子放射体である<sup>64</sup>Cuは、PEG化AVP04-07の血中クリアランス動態( $t_{1/2} = 1.8$ 時間)と良好に適合する。AVP04-07のDOTA-PEGコンジュゲートに対するPETイメージング特性をLS174T異種移植モデルを使用して評価した。図27Aに示される非PEG化ダイアボディについての結果から、2日間のイメージング実験の時間経過にわたる比較的少量の腫瘍取り込み及び極めて高い腎取り込みが実証される。対照的に、PEG<sub>12</sub>及び27コンジュゲートは、全体を通じて比較的少ない腎取り込み及び21~22時間の早い段階での高い腫瘍取り込みを示した。PEG<sub>27</sub>コンジュゲートで計測された腫瘍取り込みは、46時間目の腫瘍について45.1%ID/gで、腫瘍対血液比が7.9:1であり(図27B)、PEG<sub>12</sub>についての計測された腫瘍取り込みは、46時間目の腫瘍について49±3%ID/gで、

40

50

腫瘍対血液比は  $(9 \pm 4) : 1$  であった (値は平均値  $\pm$  SD である、 $n = 2$ ) (図 27C)。これらの結果は、 $^{111}\text{In}$  標識コンジュゲートについての生体分布の結果と緊密に一致し、放射性金属の選択は生体分布にほとんど影響を与えないことが示唆される。

【0540】

### 10.3 考察

理想的な放射標識抗体ベースの造影剤の探求では、抗体断片の急速な血中クリアランスがインタクトな IgG と比べてより早い段階での腫瘍対血液比の改善につながるため、抗体断片に焦点が置かれた。しかしながら、血中クリアランスを増加させる通常の機序は腎臓を介した排泄であり、放射性金属標識断片の場合、腎中の正味蓄積量によりその主要な利点が消失する。さらに、血中クリアランスの経過が過度に急速であると、腫瘍を標的化するのに十分な時間がなく、従って十分な画像を得るために高用量の放射標識の投与が必要となる。ペグ化は魅力的な腎蓄積低減方法である。Yazaki ら (2001 年) は、比較的大きい多分散 PEG 3400 を抗 CEA ダイアポディにコンジュゲートすることにより、24 時間目の腎取り込みを  $200\% \text{ ID/g}$  から  $50\% \text{ ID/g}$  に低下させることができたことを示している。この低下は、大きいものではあるが、なお容認できない腎取り込みをもたらす。ここでは、ダイアポディをより小さい単分散 PEG と PEG 化して、24 ~ 48 時間目に  $12\% \text{ ID/g}$  を下回るレベルまで腎取り込みを低下させることが可能であることを初めて実証する。この結果は、いずれの PEG 化コンジュゲートも未修飾ダイアポディより優れていることを実証している。インビボで得られた結果から、以下の順序のインビボ改良を結論付けることができる： $\text{インタクト} < \text{PEG 3400} < \text{PEG 27} < \text{PEG 12}$ 。

【0541】

参考文献

10

20

## References

- Abuchowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 252: 3582-3586, 1977;
- Adams *et al.*, *Cancer Res* 53:4026-4034, 1993;
- Al-Lazikani *et al.*, *J Mol Biol* 273, 927-948, 1997;
- Albrecht *et al.*, *Bioconjug Chem.* 15:16-26, 2004;
- Andersson-Engels *et al*, *Phys. Med. Biol*, 42:815-824, 1997;
- F.M. Ausubel *et al.* (editors), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present); 10
- Axworthy *et al* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4): 1802-1807, 2000;
- Bateman *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 32: D138-41, 2004;
- Bendele *J Musculoskel Neuron Interact*; 1(4):377-385, 2001;
- Bernhard *et al* *Bioconjugate Chem.* 5:126-132, 1994;
- Bork *et al.*, *J Mol. Biol.* 242, 309-320, 1994;
- Borrebaeck (ed), *Antibody Engineering*, Oxford University Press, 1995 (ISBN0195091507); 20
- Bowie *et al.*, *Science*, 253:164-70, 1991;
- Bradl and Linington *Brain Pathol.*, 6:303-311, 1996
- Bradley, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98:14819-14824, 2001;
- Brennan *et al*, *Science*, 229: 81-83, 1985;
- Brinkmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7538-7542, 1993;
- Carmichael *et al. J. Mol. Biol.* 326: 341- 351, 2003;
- Carpino and Han, *J. Org. Chem.*, 37:3403-3409, 1972;
- Carter *et al Nucleic Acids Res.* 13:4431- 4443, 1985; 30
- Carter *et al. Bio/Technology* 10: 163-167, 1992;
- Chari *et al Cancer Research* 52:127-131, 1992;

- Chen *et al.* *Nature*, 446:203-207, 2007;
- Chothia and Lesk *J. Mol Biol.* 196:901 -917, 1987;
- Chothia *et al.* *Nature* 342, 877-883, 1989;
- Chou *et al.*, *Biochemistry* 13:222-45, 1974;
- Chou *et al.*, *Biochemistry* 13:211-22, 1974;
- Chou *et al.*, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-48, 1978;
- Chou *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276, 1978; 10
- Chou *et al.*, *Biophys. J.* 26:367-84, 1979;
- Clark, *et al* *Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003;
- Clark *et al.*, *Protein Sci.* 15: 949-960, 2006;
- Coussens *et al* *Science* 230(4730): 1132-1139, 1985;
- Eisen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 75: 4583-4585, 1953;
- Feild *et al* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258 (3):578-582, 1999;
- Frangioni, *Curr. Opin. Chem. Biol*, 7:626-634, 2003;
- Froyen *et al.*, *Mol. Immunol.*, 37: 515-521, 1995; 20
- Gaertner and Offord, *Bioconj. Chem.*, 7: 38-44, 1996;
- Garman, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London, 1997;
- Gaugitsch *et al.* *J. Biol. Chem.* 267 (16):1 1267-1273, 1992;
- Gelfand *et al.* *Protein Eng.* 11: 1015-1025, 1998a;
- Gelfand *et al.*, *Journal of computational biology* 5: 467-477, 1998b;
- Gendler *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265: 15286-15293, 1990;
- Getz *et al* *Anal. Biochem.* 273:73-80, 1999;
- Gillies *et al.*, *J. Immunol. Methods* 125:191-202, 1989; 30
- Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103;
- Goodson and Katre, *Biotechnology*, 8: 227-231, 1990;
- Gribskov *et al.*, *Methods Enzymol.* 183:146-59, 1990;
- Gribskov *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4355-58, 1989;
- Grossman *et al.*, *Biochemistry*, 21: 6122-6128, 1981;
- Guan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 13206-10, 1998;
- Guss *et al.* *EMBO J.* 5: 1567-1575, 1986; 40
- Guy *et al.*, *Mol Cell Biol.* 12(3):954-61, 1992;
- Halaby *et al.*, *Protein Engineering* 12: 563-571, 1999;
- Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1988;

- Higuchi, in *PCR Protocols*, pp.177-183, Academic Press, 1990;
- Ito *et al Gene* 102:67-70, 1991;
- Ho *et al Gene (Amst.)* 77:51-59, 1989;
- Holliger *et al Proc. Natl. Acad Sci. USA* 90: 6444-6448, 1993;
- Hollinger and Hudson *Nature Biotechnology*, 23: 1126-1136, 2005;
- Holm *et al., Nucleic Acids Res.* 27:244-47, 1999;
- Hu *et al., Cancer Res.*, 56: 3055-3061, 1996;
- Hubert, *et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 14523-14528, 1999; 10
- Hudson and Kortt *J. Immunol. Methods*, 231: 177-189, 1999;
- Hunter *et al., Nucleic Acids Research* 37: D211-D215, 2009;
- Hust *et al., BMC Biotechnology* 7:14, 2007;
- Iwamoto *et al., Oncogene.* 5(4):535-42, 1990;
- Johnson and Wu, *Nucleic acids research* 28: 214-218, 2000;
- Jakobovits *et al. Nature Biotechnology* 25, 1134 – 1143, 2007
- Jones *et al. Nature*, 321:522-525, 1989;
- Jones, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87, 1997; 20
- Jones, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87, 1997;
- Junutula *et al., Nature Biotechnology* 26: 925-932, 2008;
- Kabat *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991;
- Karpusas *et al., J Mol Biol.* 327:1031-1041, 2003;
- Kam *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605, 2005;
- Kawabata *et al., Proteins* 41: 108-122, 2000;
- Kawabata, *Nucleic Acids Res.* 31: 3367-3369, 2003; 30
- Kim. *et al., Mol Cancer Ther.* 7: 2486-2497, 2008;
- King *et al., Biochemistry*, 17: 1499-1506, 1978;
- Kohler and Milstein *Nature*, 256:495-497, 1975;
- Kortt *et al Protein Eng.* 10: 423-433, 1997;
- Kortt *et al., Biomol. Eng.*, 18: 95-108, 2001;
- Kostelny *et al, J. Immunol.*, 148(5):1547-1553, 1992;
- Kruif and Logtenberg *J. Biol. Chem.*, 271: 7630-7634, 1996;
- Kunkel *et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488, 1987; 40
- Lambert *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549, 2005;
- Largaespada *et al, Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 166, 91-96, 1990;
- Larson *et al., J. Mol. Biol.* 348: 1177-1190, 2005;

- Laue *et al.*, *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science* 1992:90–125, 1992;
- Le Gall *et al* *FEBS Lett*, 453: 164-168, 1999;
- Lefranc, *Exp Clin Immunogenet* 18: 242-254, 2001a;
- Lefranc, *Exp Clin Immunogenet* 18: 161-174, 2001b;
- Lewis *et al* *Bioconj. Chem.* 9:72-86, 1998;
- Li *et al.*, *Bioconjug Chem* 17: 68-76, 2006;
- Li *et al.*, *Bioconjug Chem.* 19: 89-96, 2008; 10
- Lindmark *et al.* *J Immunol Meth.* 62: 1 -13, 1983;
- Lonberg, N. "Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies." *Handbook of Experimental Pharmacology 113*: 49-101, 1994;
- Lukacs *et al.* *J. Exp. Med.*, 194: 551-555, 2001;
- Marsh *et al* *Hum. Mol. Genet.* 9, 13-25, 2000;
- Matsui *et al.*, *Cell.*61(6):1147-55, 1990;
- Matusik *et al.*, Transgenic mouse models of prostate cancer. In: *Transgenics in Endocrinology*, ed. by MM Matzuk, CW Brown, and TR Kumar. The Humana Press Inc (Totowa, NJ) Chapter 19, pp 401-425, 2001 20
- Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963;
- Morrison *et al.* *Proc. Natl Acad. Sci USA* 81:6851-6855, 1984;
- Morrison, *Science* 229:1202, 1985;
- Moults, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:422-27, 1996;
- Muller *et al* *Eur. J. Immunol.* 22 (6): 1621-1625, 1992;
- Muller *et al* *EMBO J.*9(3):907-13, 1990;
- Murzin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 247: 536-540, 1995; 30
- Mutsushima *et al.*, *Chem. Lett.*, 773-776, 1980;
- Nakayama *et al* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277(1):124- 127, 2000;
- Oi *et al*, *BioTechniques* 4:214, 1986;
- Pallares *et al.*, *Exp Clin Immunogenet* 16: 36-60, 1999;
- Panchenko *et al.* *J. Mol. Biol.* 296: 1319-1331, 2000;
- Pei *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 9637-9642, 1997;
- Perisic *et al.* *Structure* 2: 1217-1226, (1994);
- Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188, 1992; 40
- Presta *Curr Op Struct Biol*, 2:593-59, 1992;
- Presta *et al.*, *Cancer Res.*, 57: 4593-4599, 1997
- Ramseier and Chang *Analyt. Biochem.*, 221: 231-233, 1994;

- Ramanujam *et al*, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 48:1034-1041, 2001;
- Reddy *et al.*, *Synthesis Stuttgart*: 999-1002, 1988;
- Reiter *et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1735-1740, 1998;
- Riechmann *et al. Nature*, 332:323-329, 1988;
- Risma *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*;92(5):1322-6, 1995;
- Roberge *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* 19: 141-145, 2006; 10
- Roby *et al.*, *Carcinogenesis*. 21(4):585-91, 2000;
- Rodwell *et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2632-2636, 1986;
- Rost *et al.* 270: 471-480, 1997;
- Roux *et al. J. Immunol.* 161:4083, 1998;
- Saha *et al.*, BcePred:Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. *In* Nicosia, Cutello, Bentley and Timis (Eds.) ICARIS 2004, LNCS 3239, 197-204, Springer,2004;
- Sakaguchi *et al. Nature*, 426: 454-460;
- Sali and Blundell, *J. Mol. Biol.* 234, 779-815, 1993; 20
- Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989;
- Sanders *et al.*, *Thyroid* 17: 395-410, 2007;
- Schelte *et al.*, *Bioconj. Chem.* 11: 118-123, 2000;
- Schuck *Biophys J*; 78:1606-19, 2000;
- Shalaby *et al, J. Exp. Med.*, 175: 217-225, 1992;
- Shen *et al.*, *Protein Sci.* 15: 2507- 2524, 2006;
- Sippl *et al.*, *Structure* 4:15-19, 1996; 30
- Sirk *et al.*, *Bioconjug Chem.* 19: 2527–2534, 2008;
- Skerra *et al, Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262, 1993;
- Solovyev and Salamov *Computer Applications in the Biosciences*,10,661-669, 1994;
- Stanfield *et al.*, *J Virol.* 80:6093-6105, 2006;
- Tang *et al. J. Exp. Med.*, 199: 1455-1465, 2004;
- Todorovska *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 248: 47-66, 2001;
- Trenado *et al. J. Clin.Invest.*, 112: 1688-1696, 2002; 40
- Vallette *et al Nuc. Acids Res.* 17:723-733, 1989;
- Van der Sluis *et al. Gastroenterology* 131: 117–129, 2006;
- Verhoeyen *et al. Science*, 239:1534-1536, 1988;
- Wang *et al. J Clin Invest.* 118(7): 2629–2639, 2008;

- Weissinger *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88, 8735-8739, 1991;
- Wells *et al* *Gene* 34:315-323, 1985;
- Xu and Xu *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 40: 343-354, 2000;
- Yazaki *et al.*, *Bioconjug Chem* 12: 220-228, 2001;
- Yem *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267: 3122-3128, 1992;
- Zalipsky *et al.*, *J. Bioact. Compat. Polym.*, 5: 227-231, 1990
- Zalipsky *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 15: 100-114, 1992;
- Zhang and Tam, *Anal. Biochem.* 233: 87-93, 1996;
- Zhou *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 14575-14580, 2005;
- Zoller *et al* *Methods Enzymol.* 100:468-500, 1983; and
- Zoller and Smith. *Nucl. Acids Res.* 10:6487-6500, 1982.

【 図 1 】

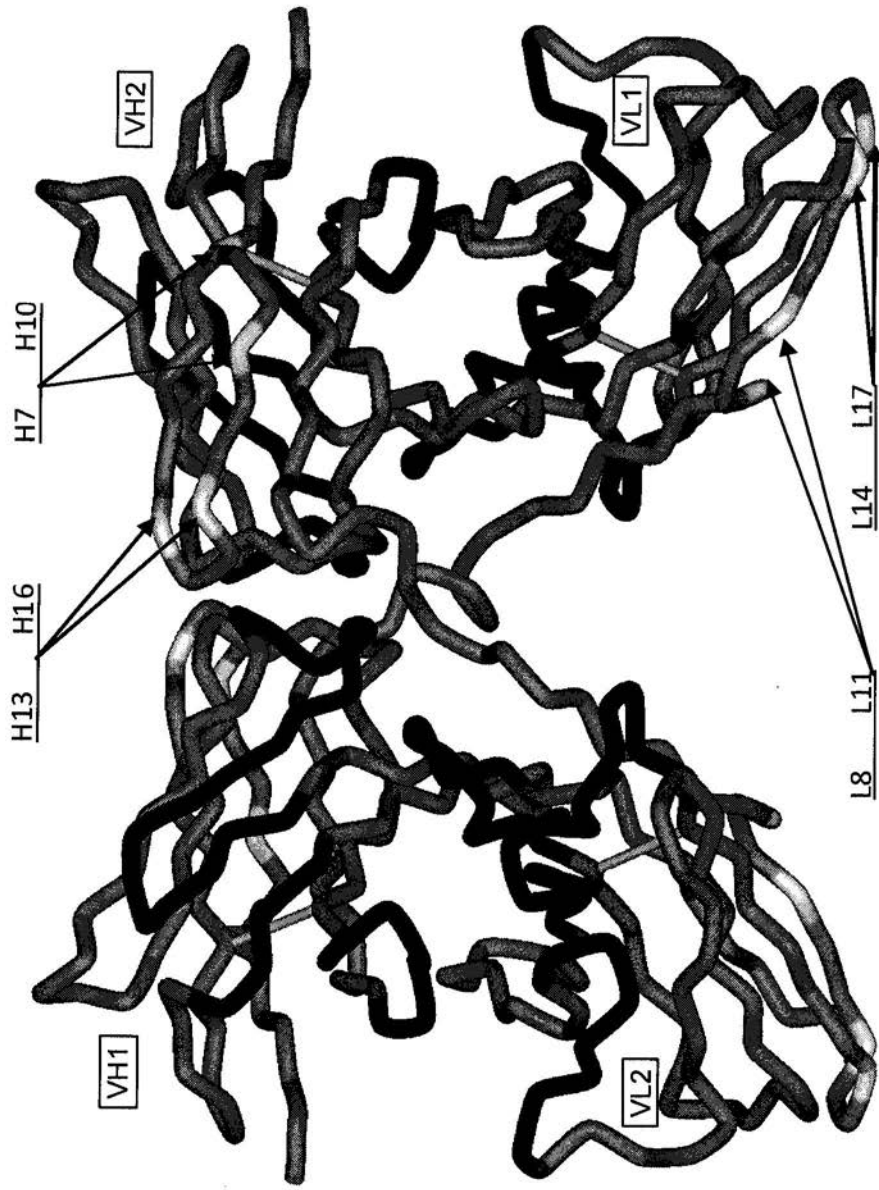


Figure 1

【 図 2 】

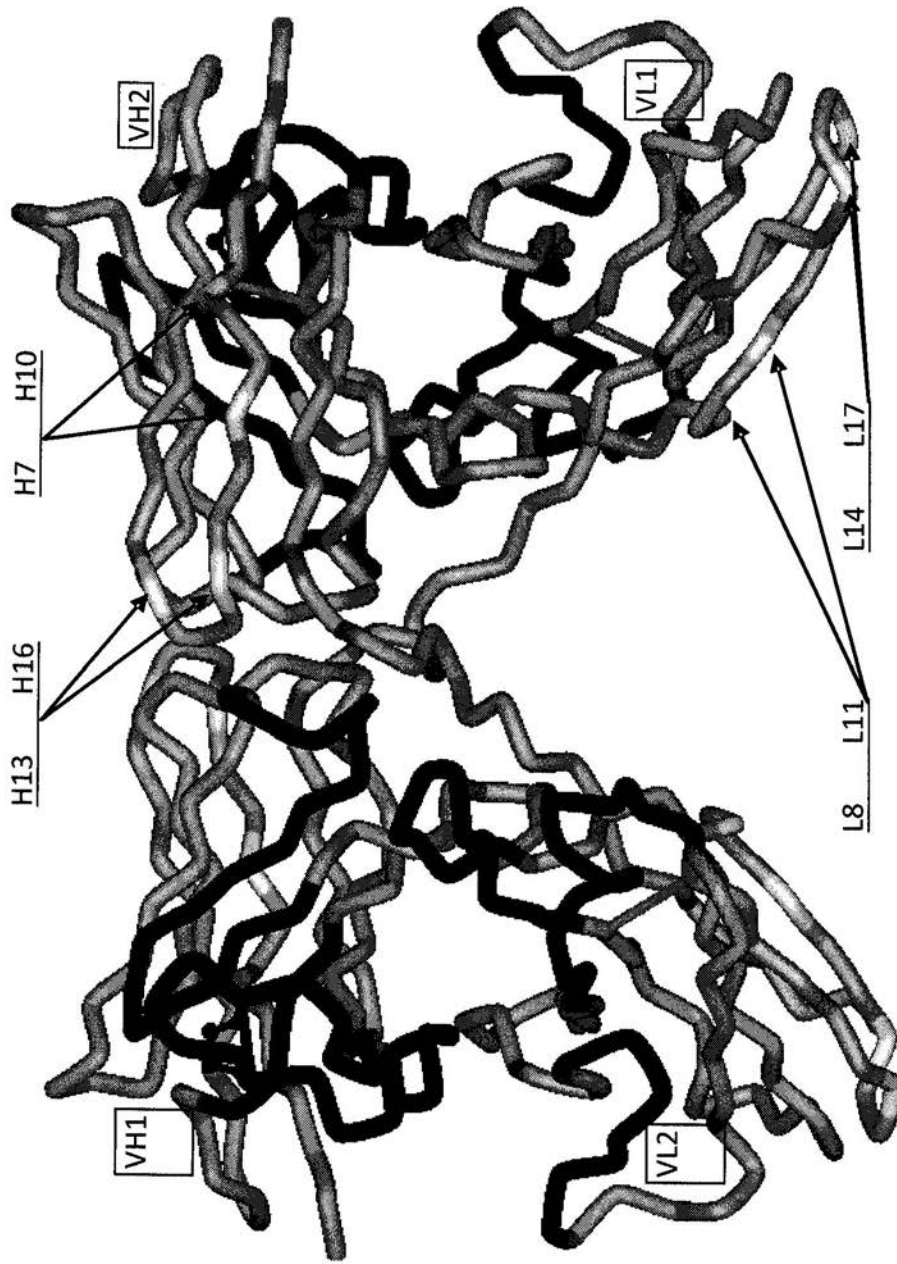


Figure 2

【 図 3 】

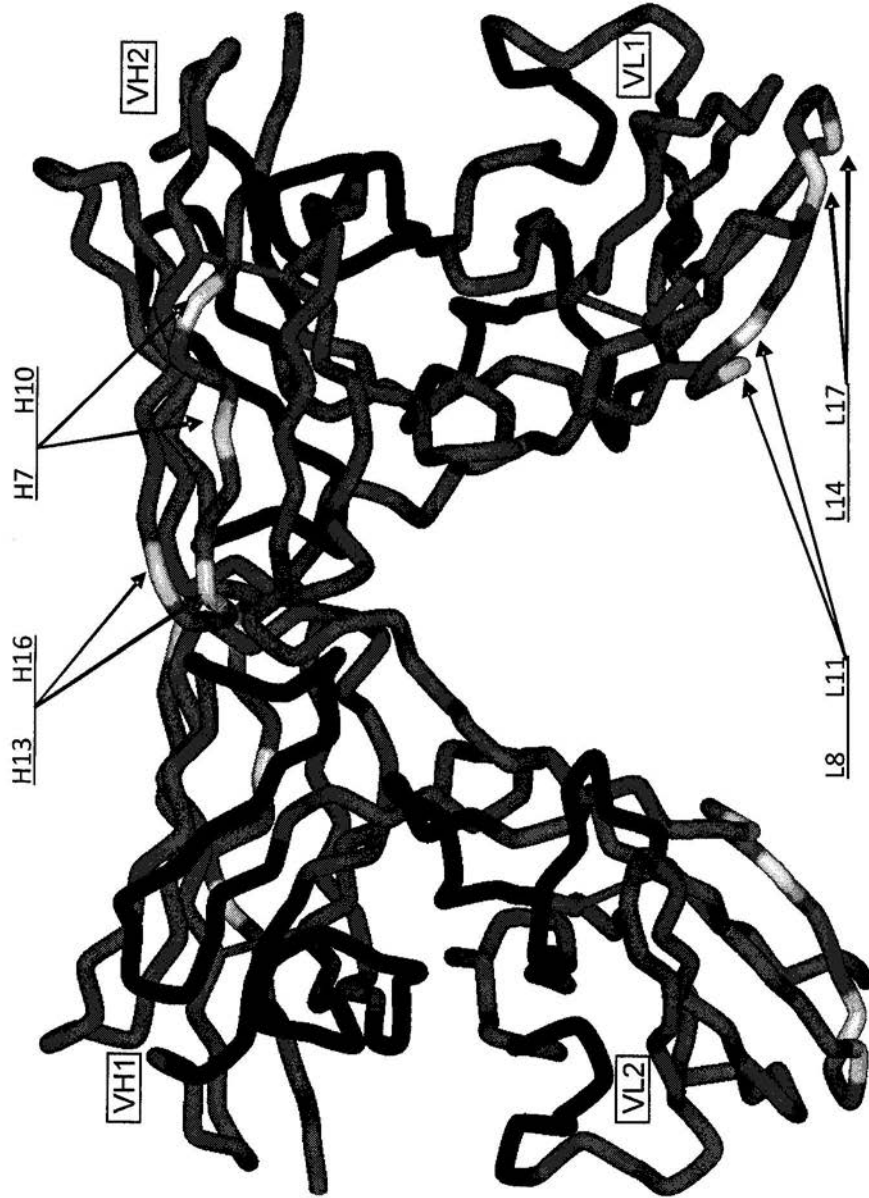


Figure 3

【 図 4 A 】

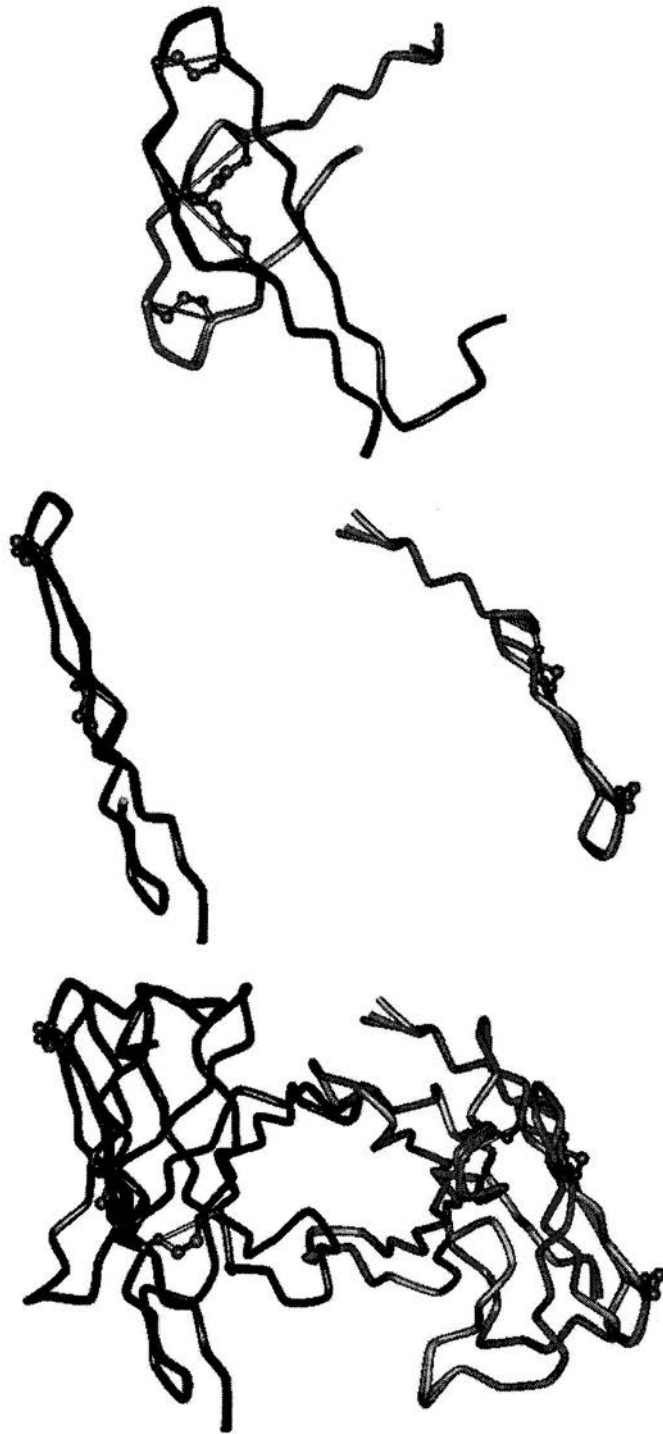


Figure 4A

【 図 4 B 】

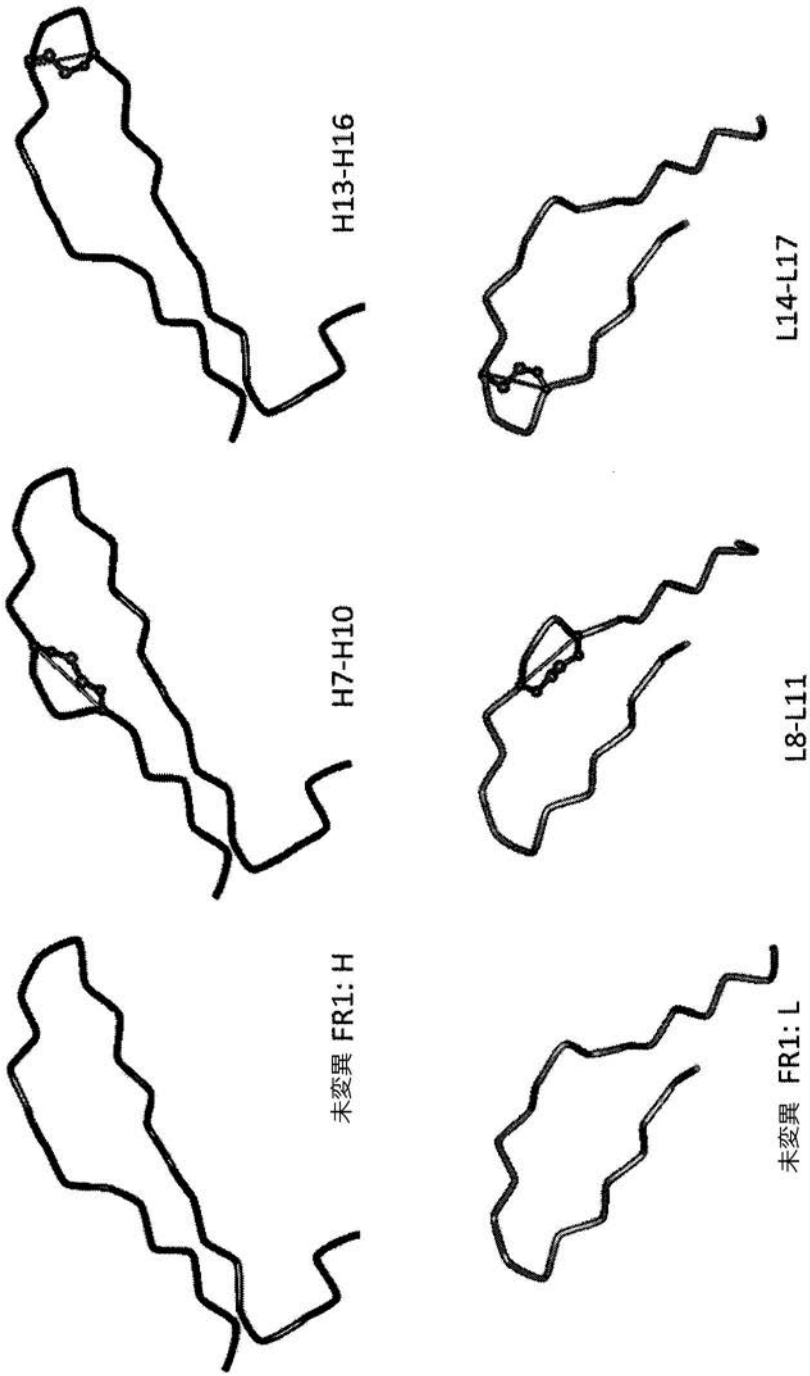


Figure 4B

【 図 5 】

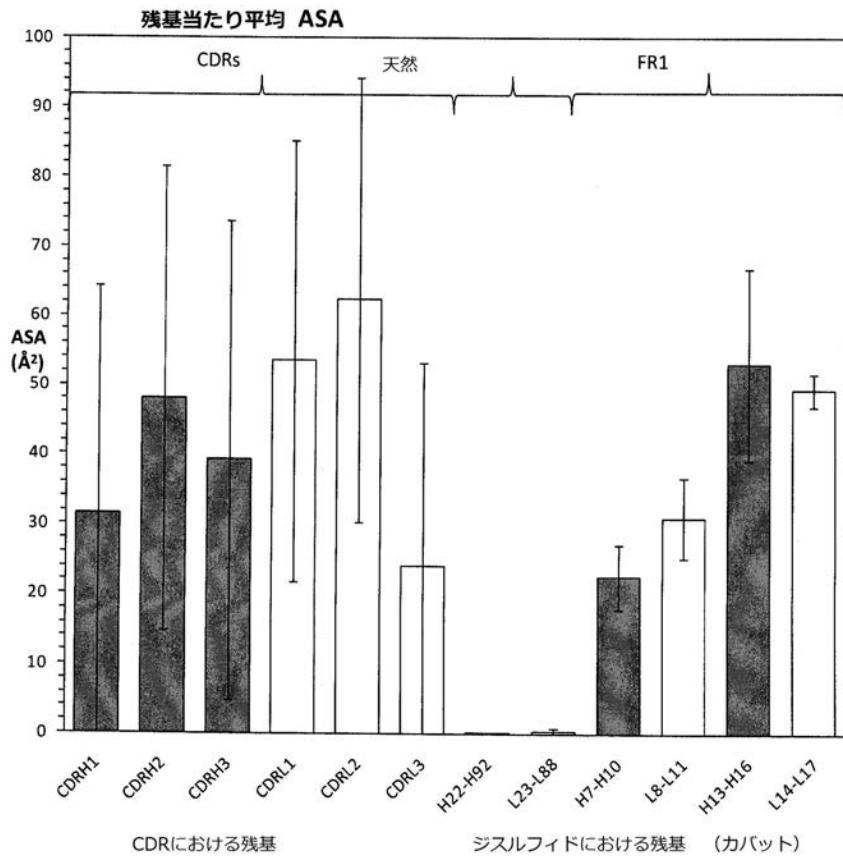


Figure 5

【 図 6 A 】

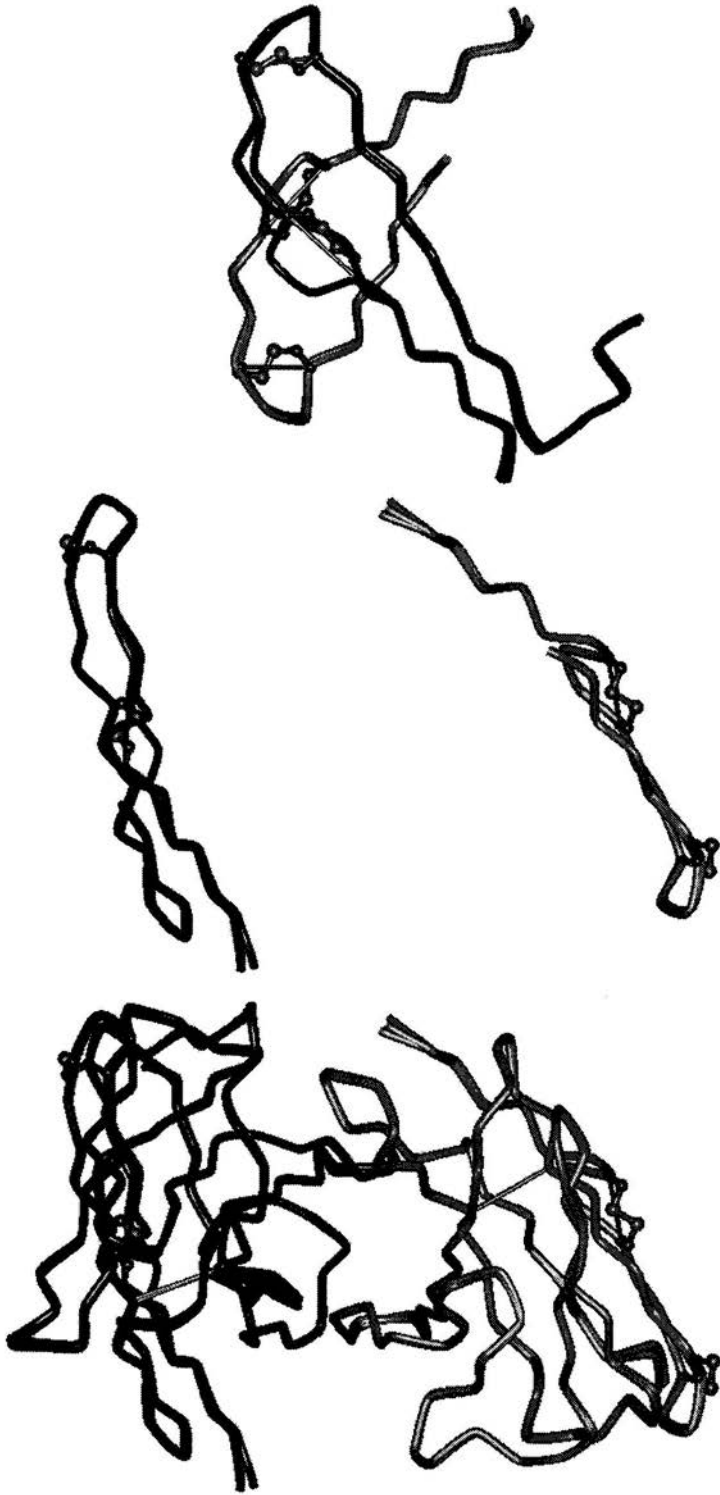


Figure 6A

【 図 6 B 】

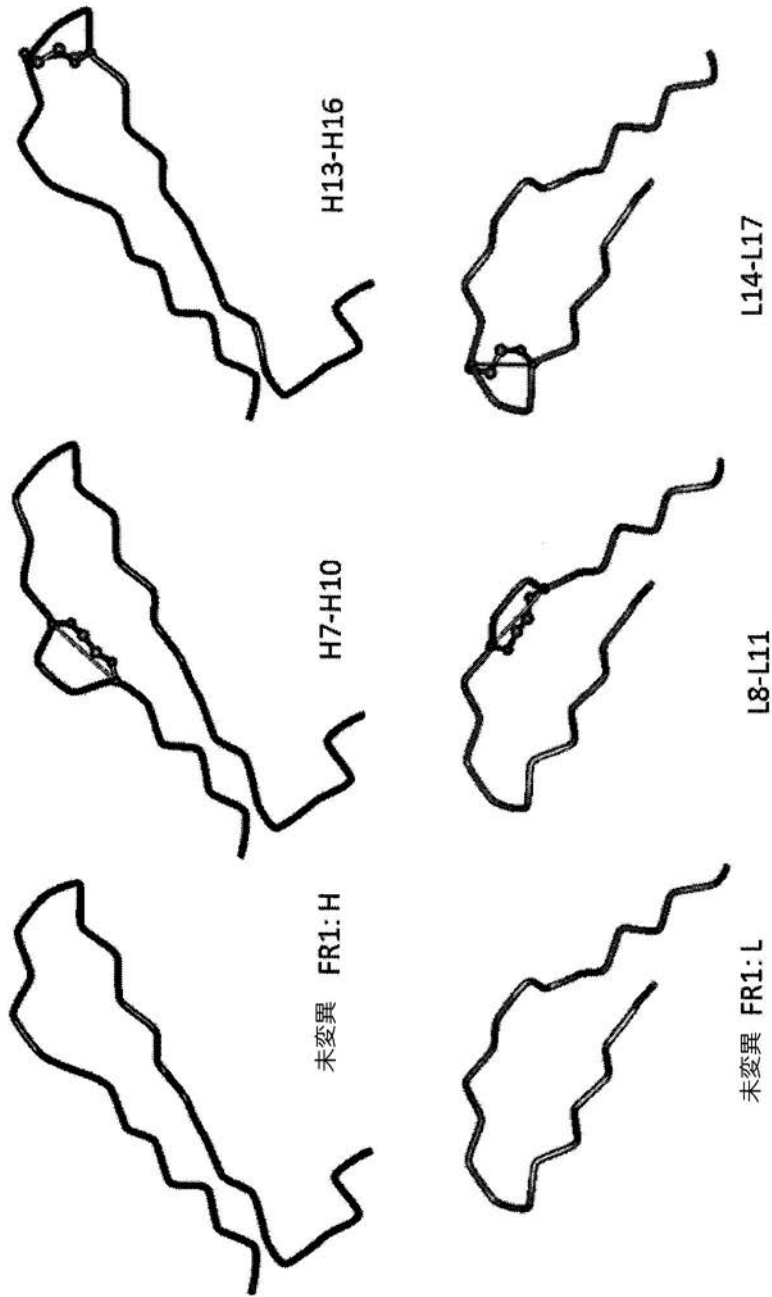


Figure 6B

【 図 7 A 】

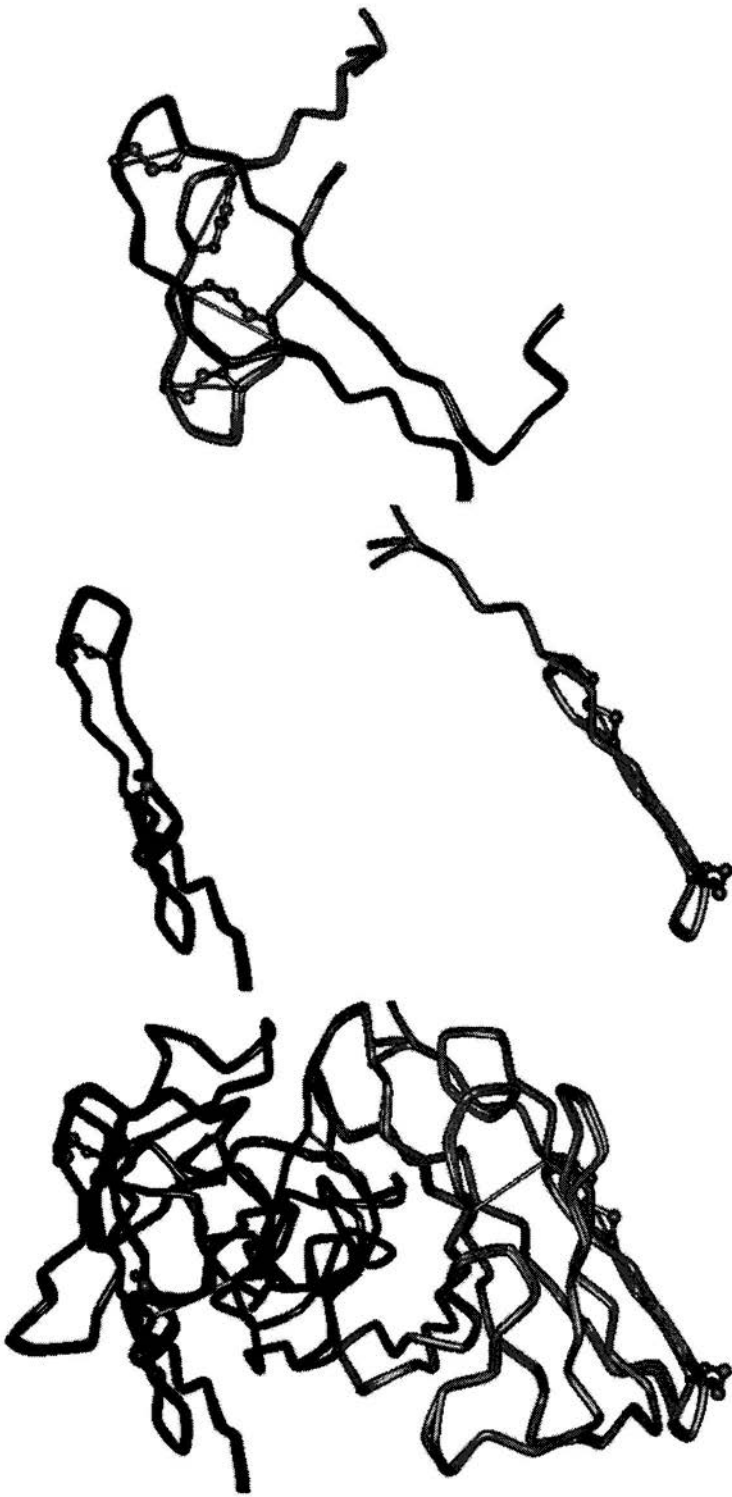


Figure 7A

【 図 7 B 】

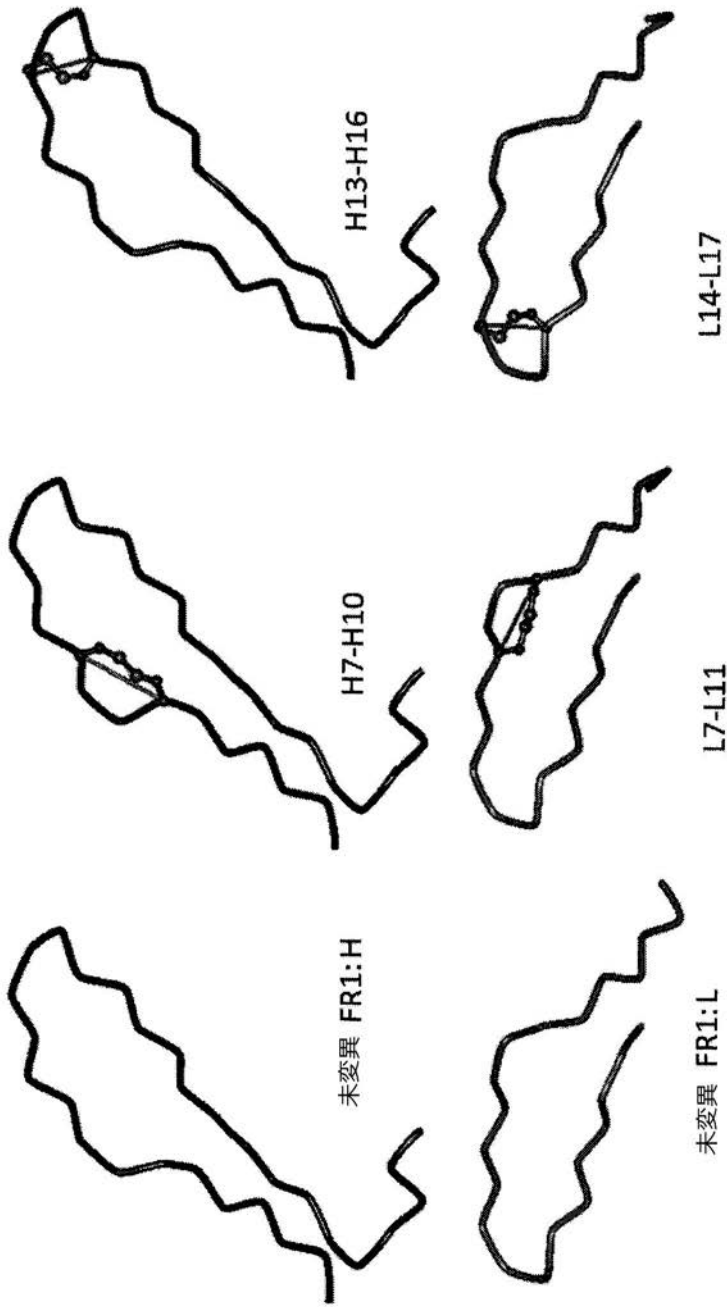


Figure 7B





【 図 1 0 A 】

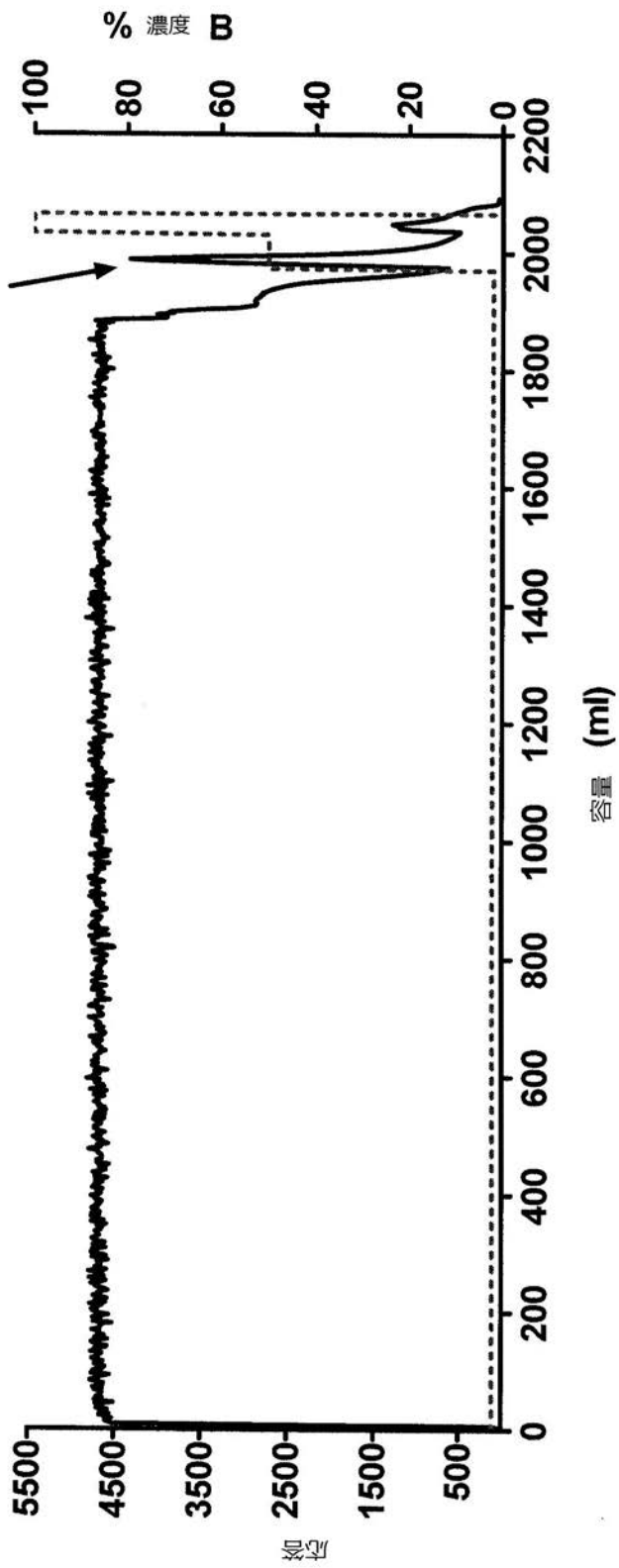


Figure 10A

【 図 1 0 B 】

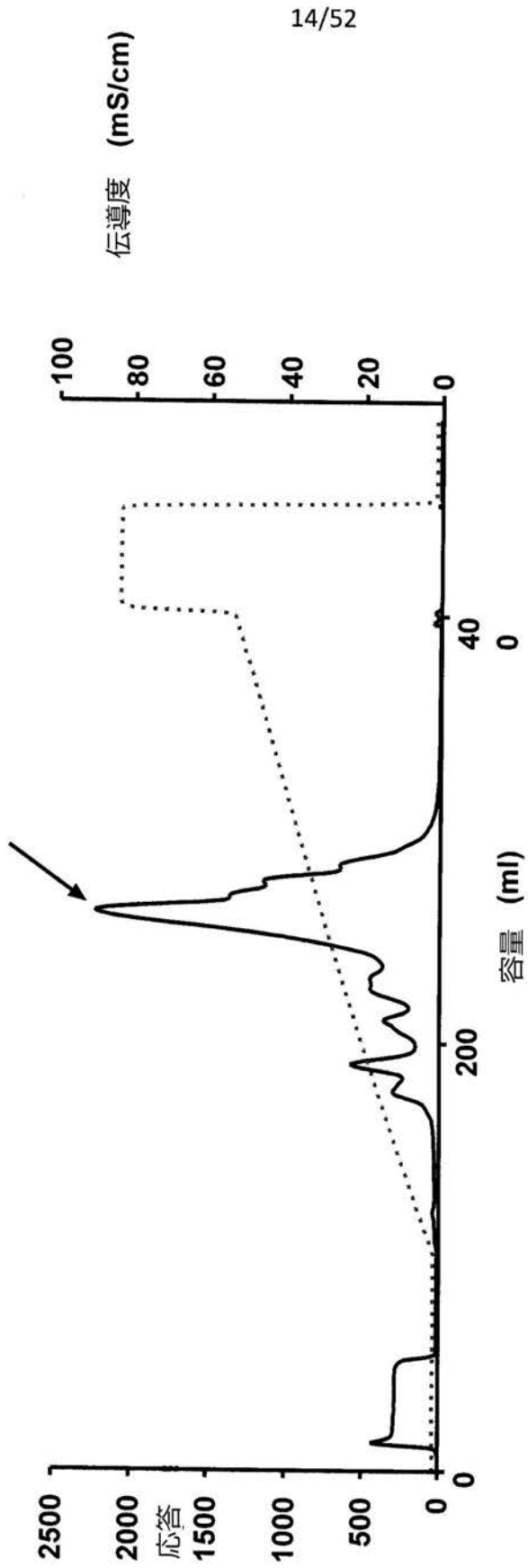


Figure 10B

【 図 1 0 C 】

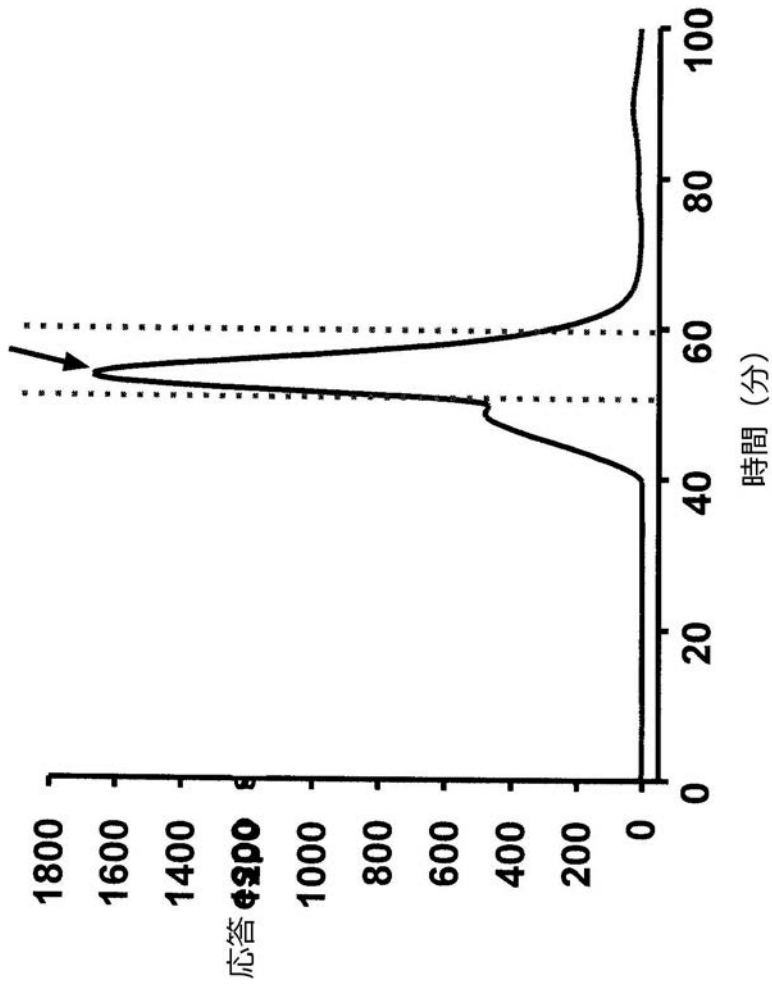


Figure 10C

【図10D】

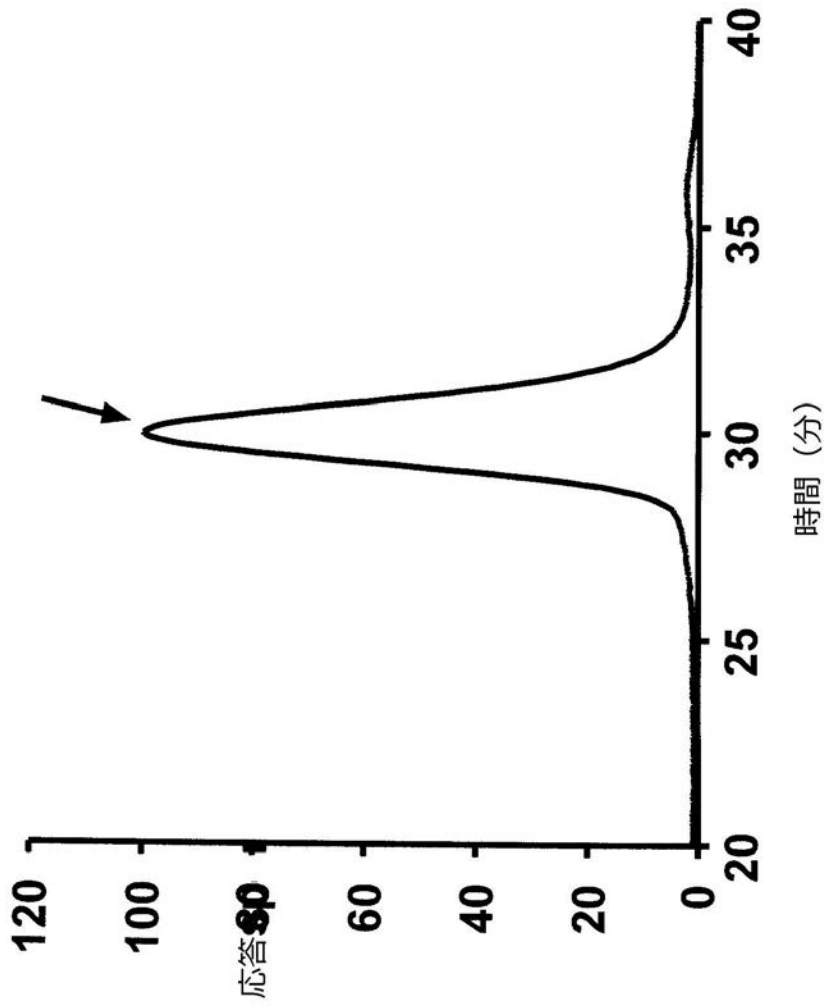


Figure 10D

【図10E】

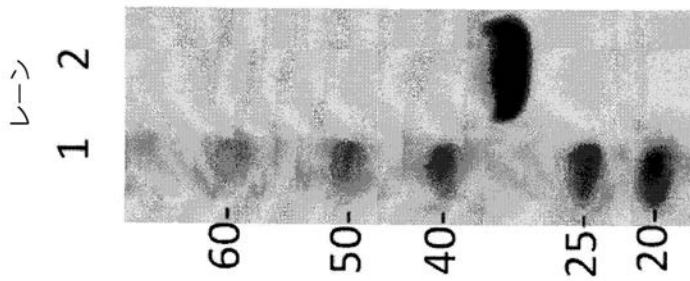


Figure 10E

【 図 1 1 A 】

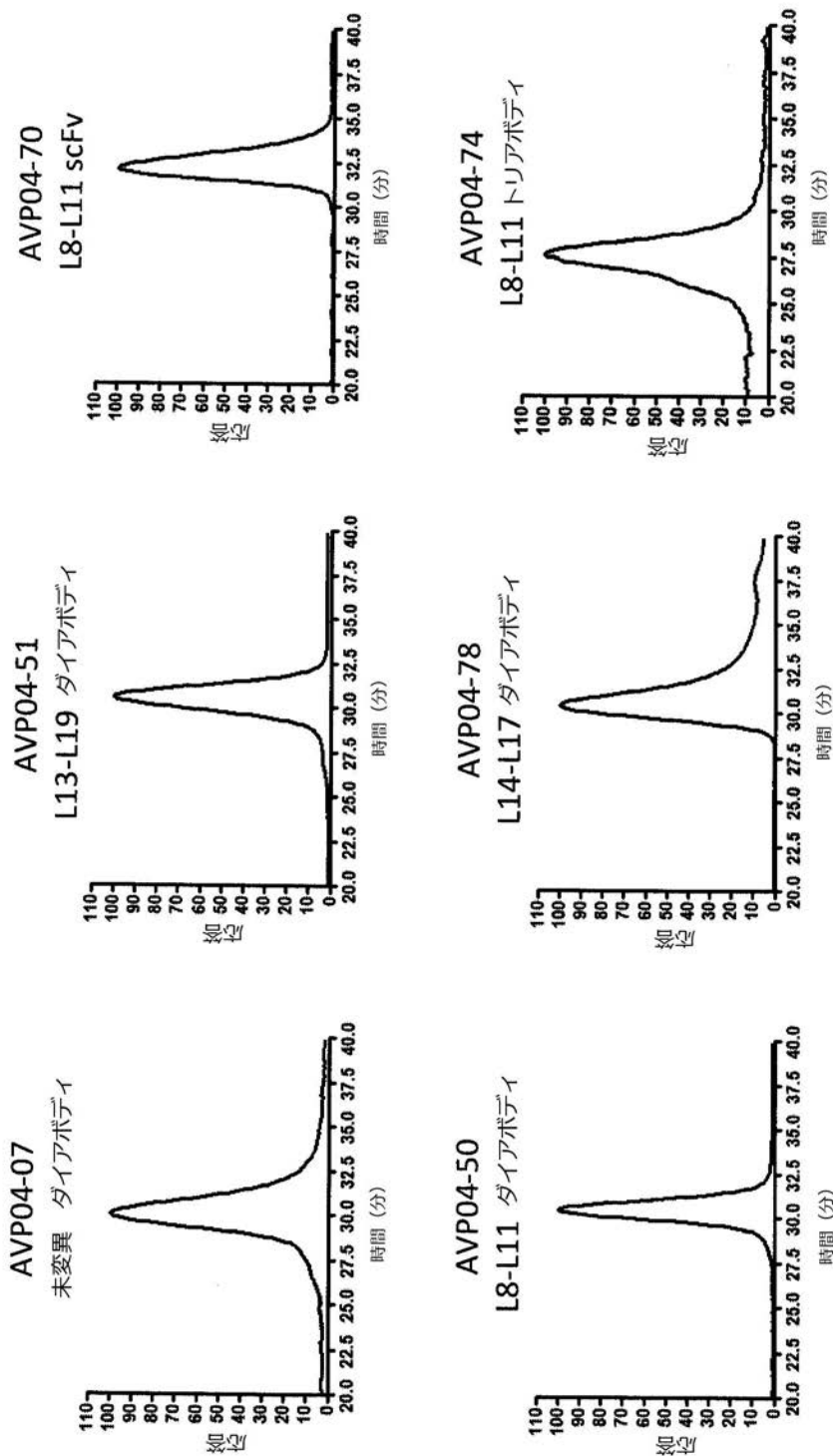


Figure 11A

【 図 1 1 B 】

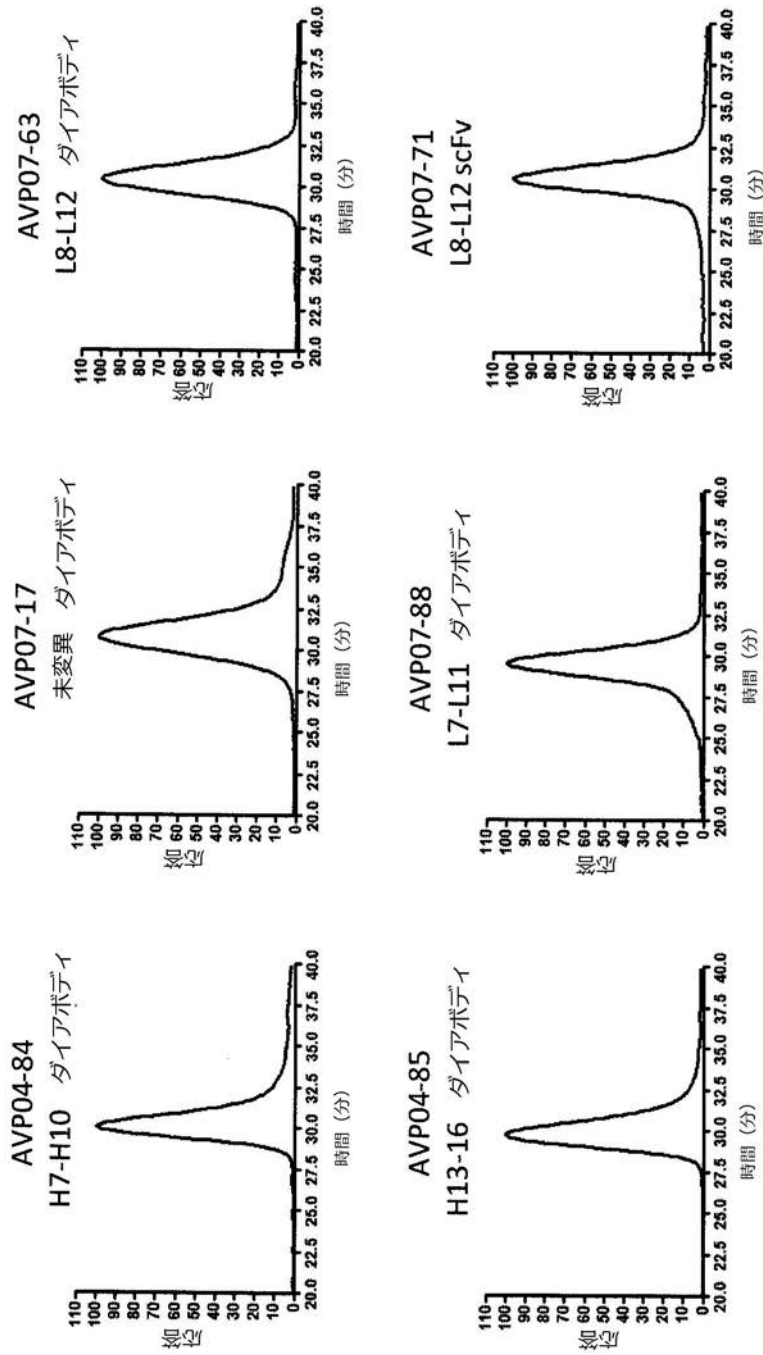


Figure 11B

【 図 1 1 C 】

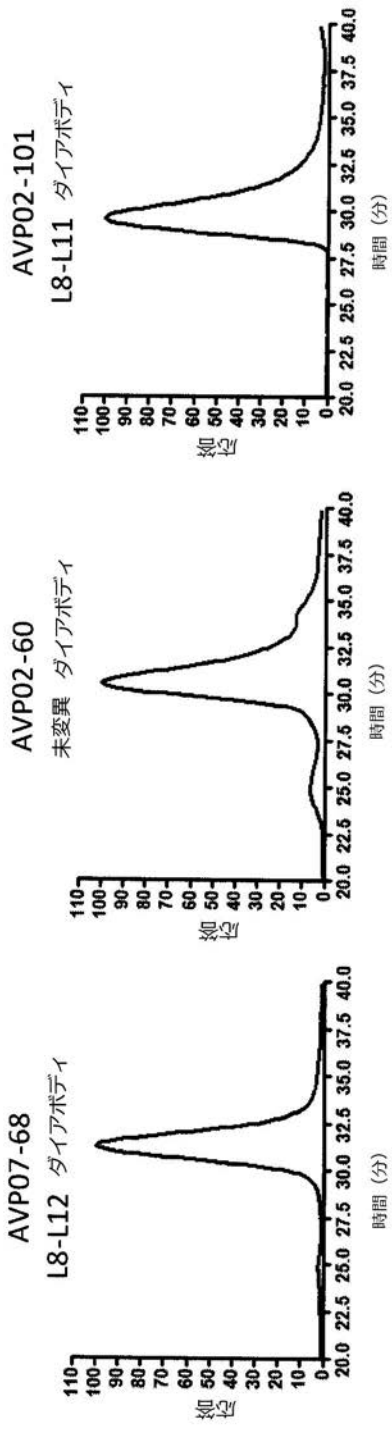


Figure 11C

【 図 1 2 A 】

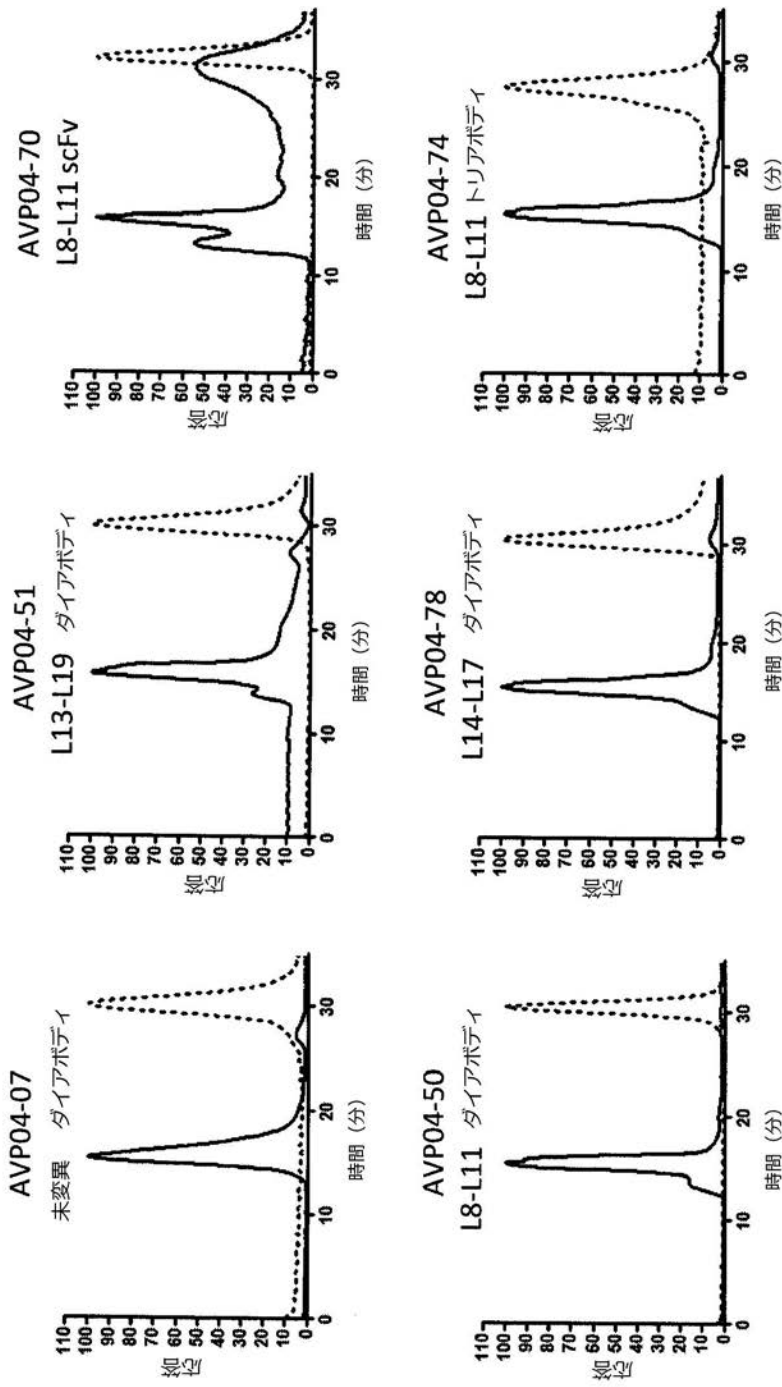


Figure 12A

【 図 1 2 B 】

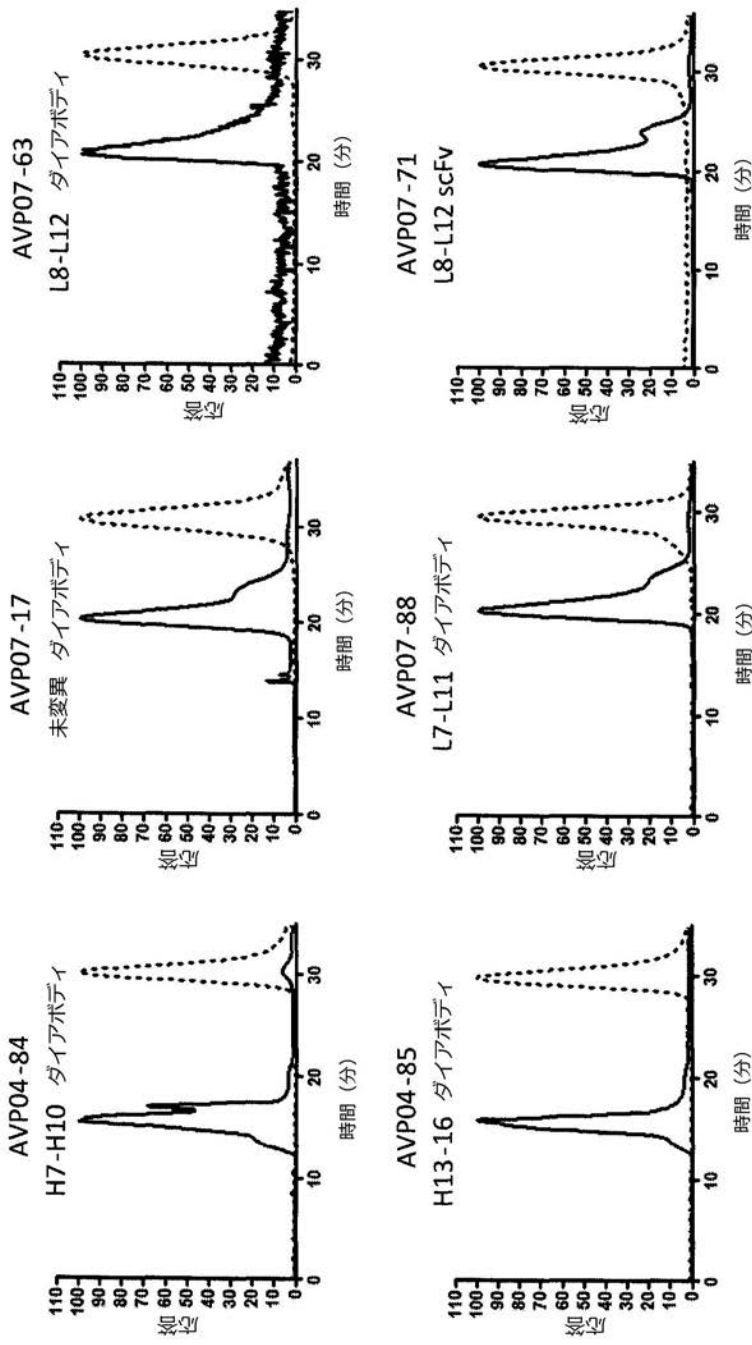


Figure 12B

【 図 1 2 C 】

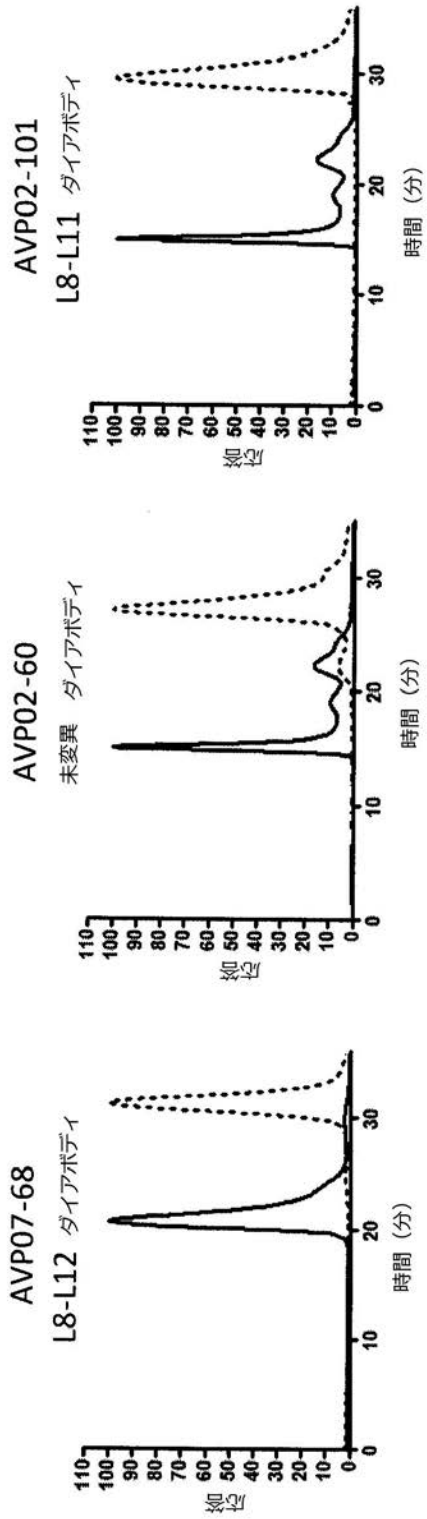


Figure 12C

【 図 13 A 】

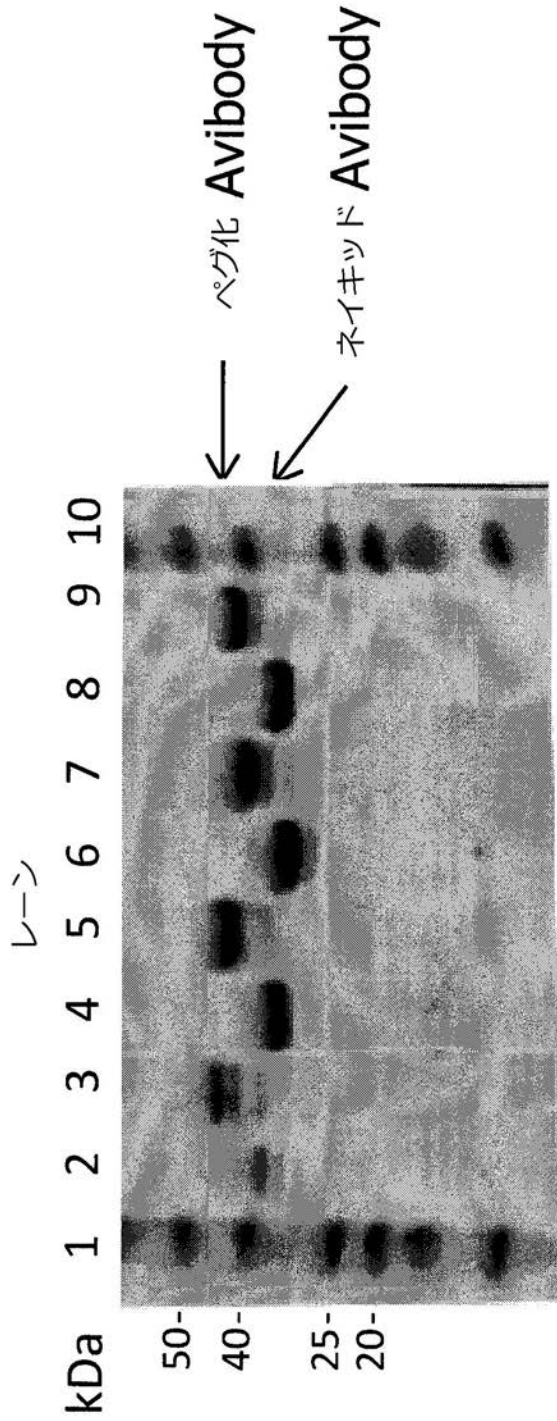


Figure 13A

【 図 1 3 B 】

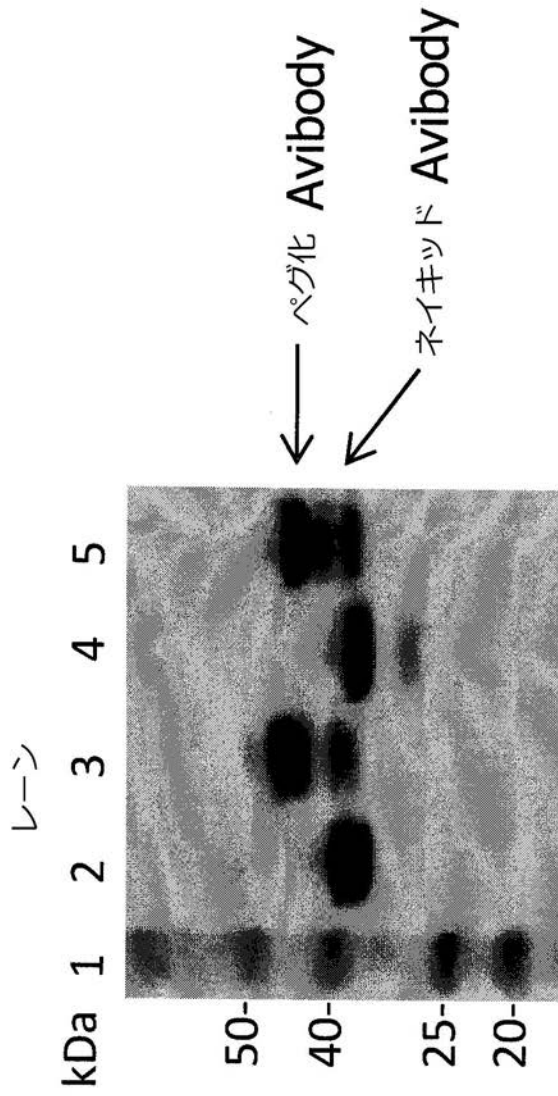


Figure 13B

【 図 13 C 】

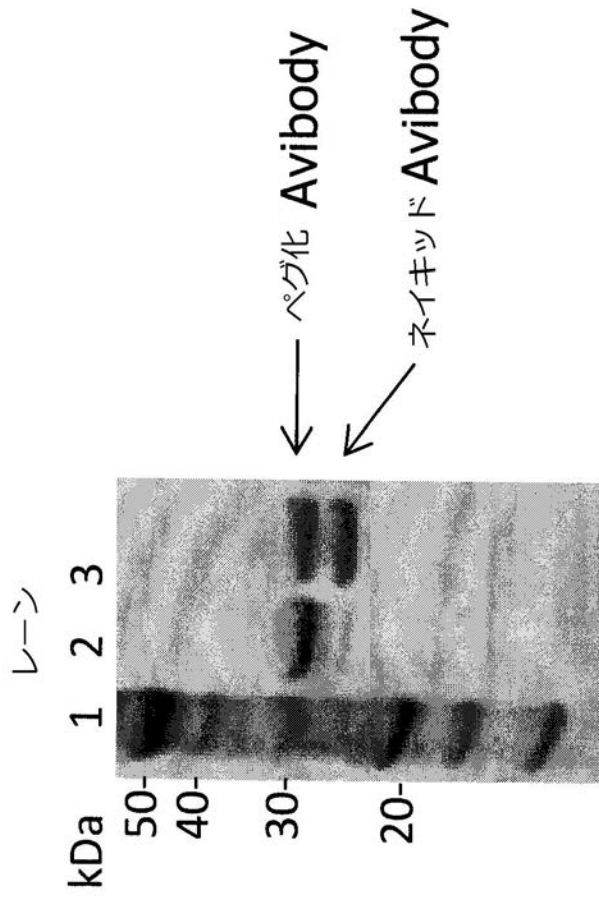


Figure 13C

【 図 1 4 A 】

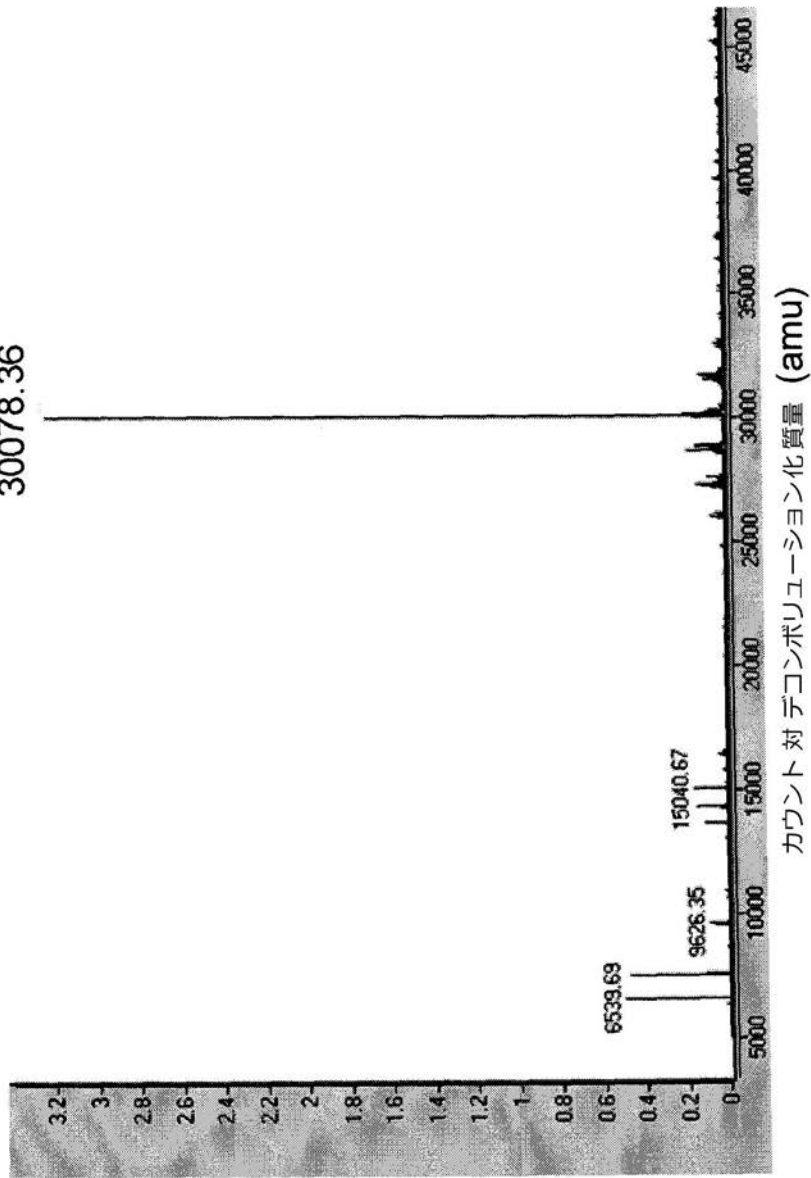


Figure 14A

【 図 1 4 B 】

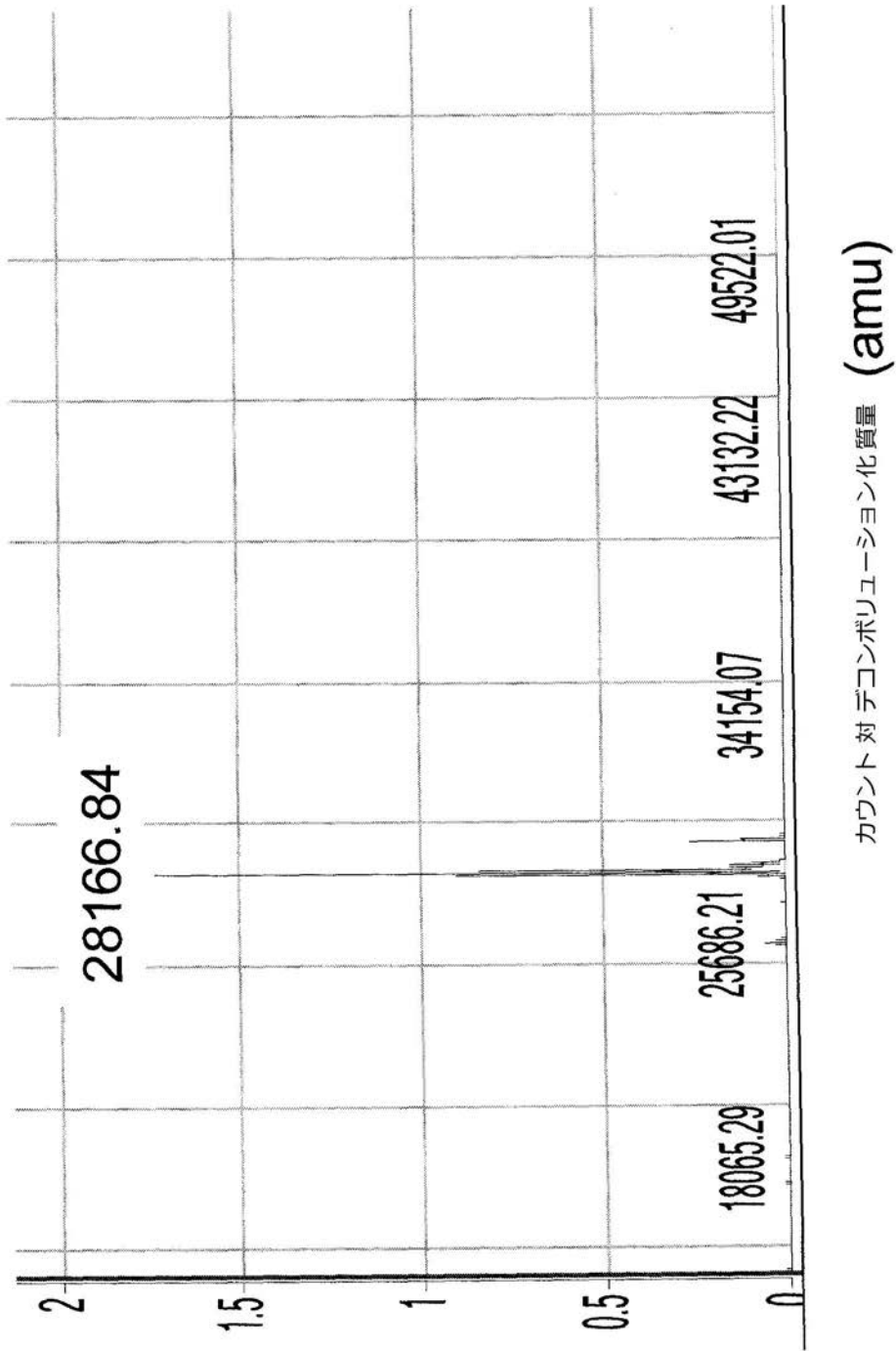


Figure 14B

【 図 1 4 C 】

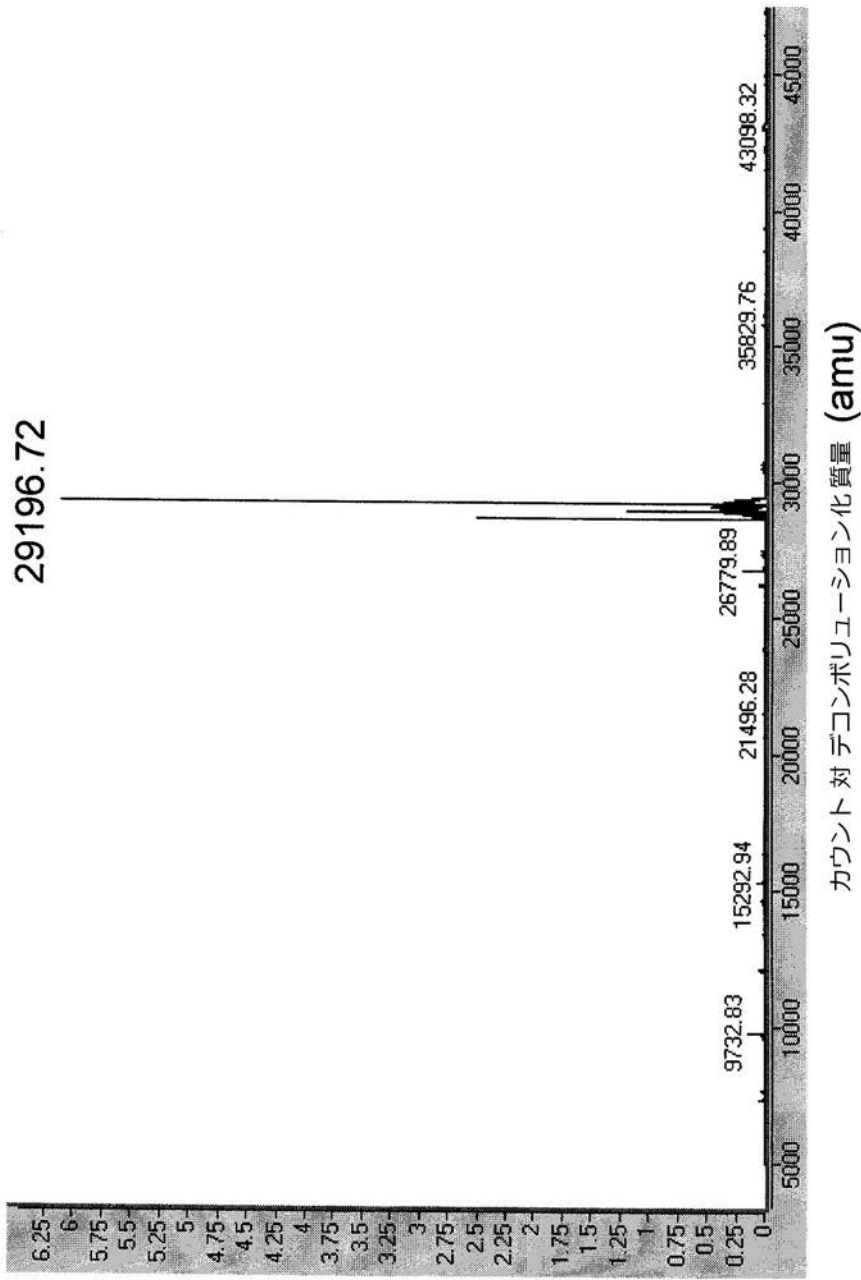


Figure 14C

【 図 1 4 D 】

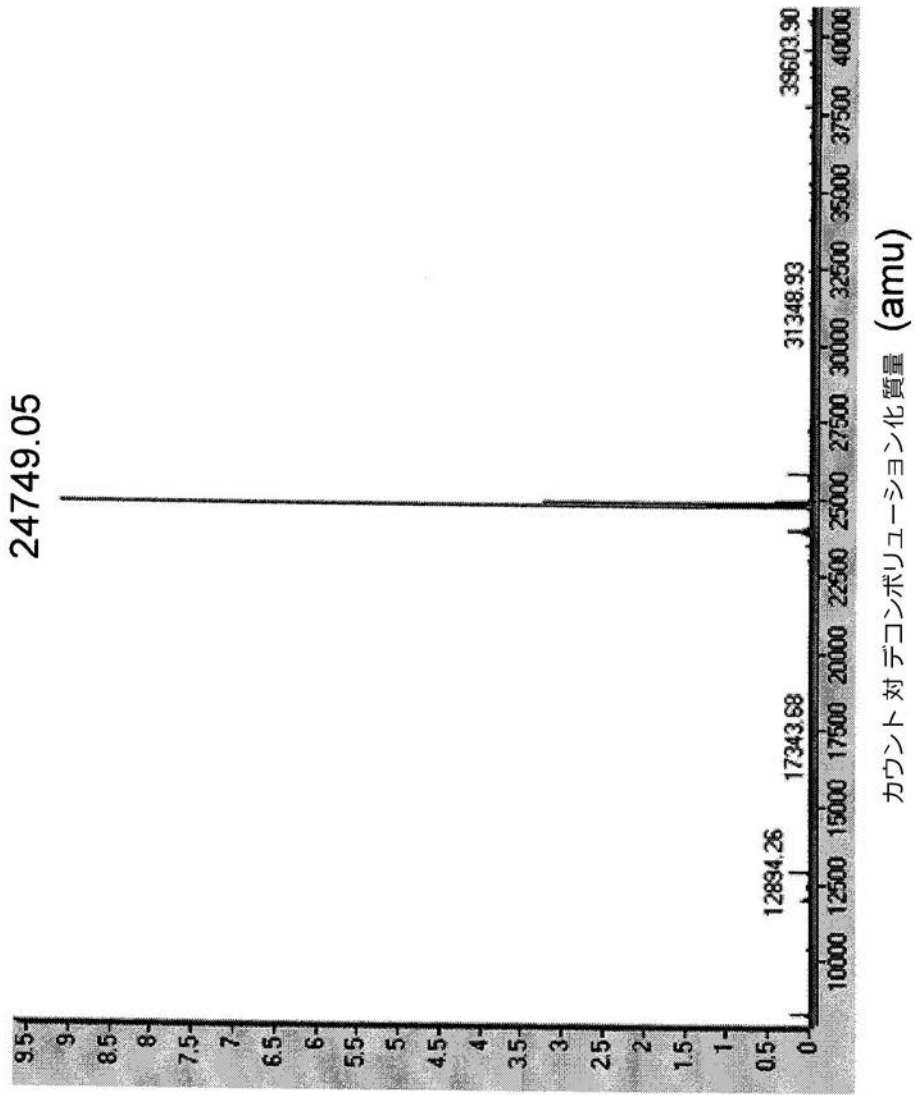


Figure 14D

【 図 1 5 A 】

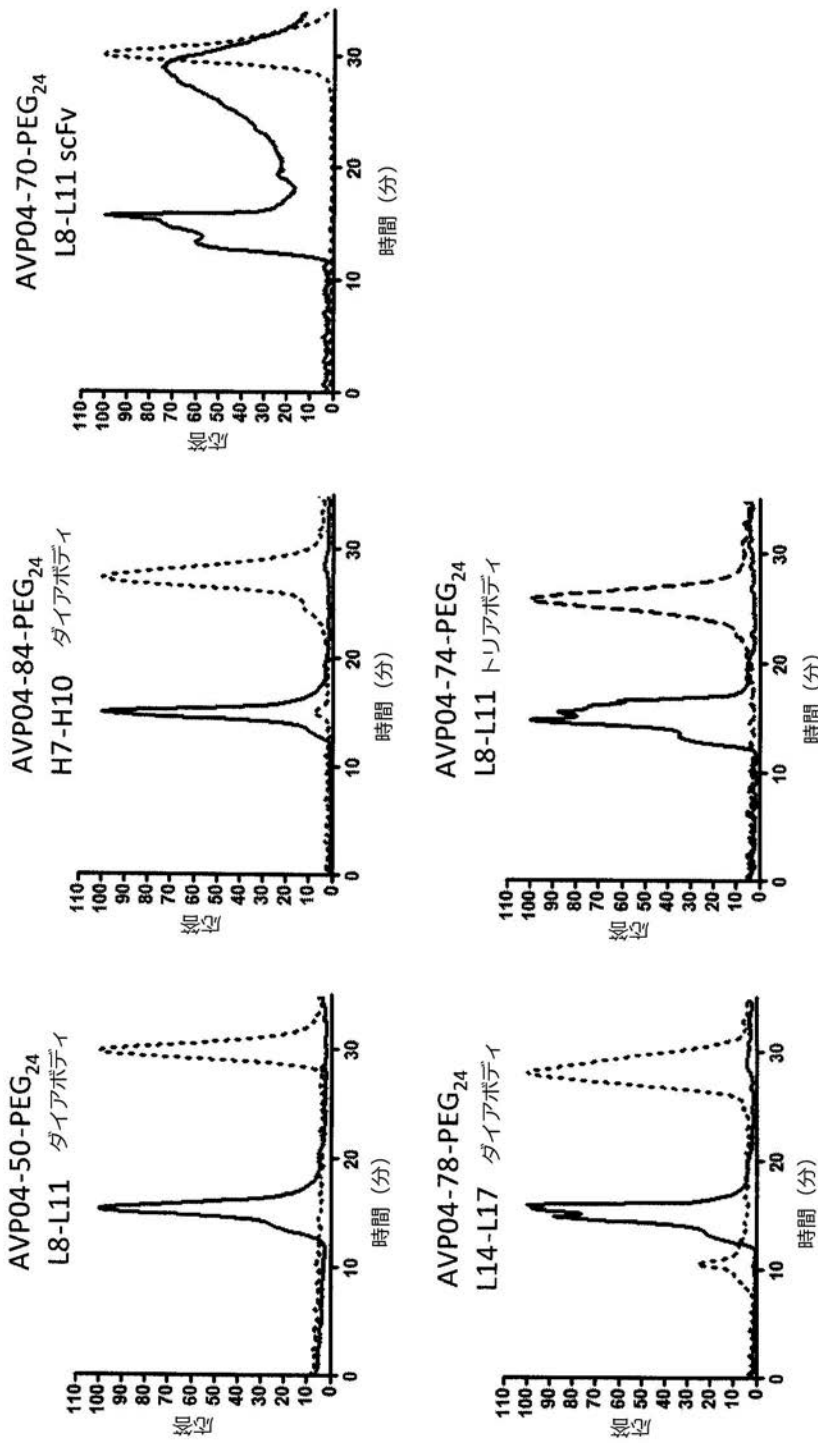


Figure 15A

【 図 1 5 B 】

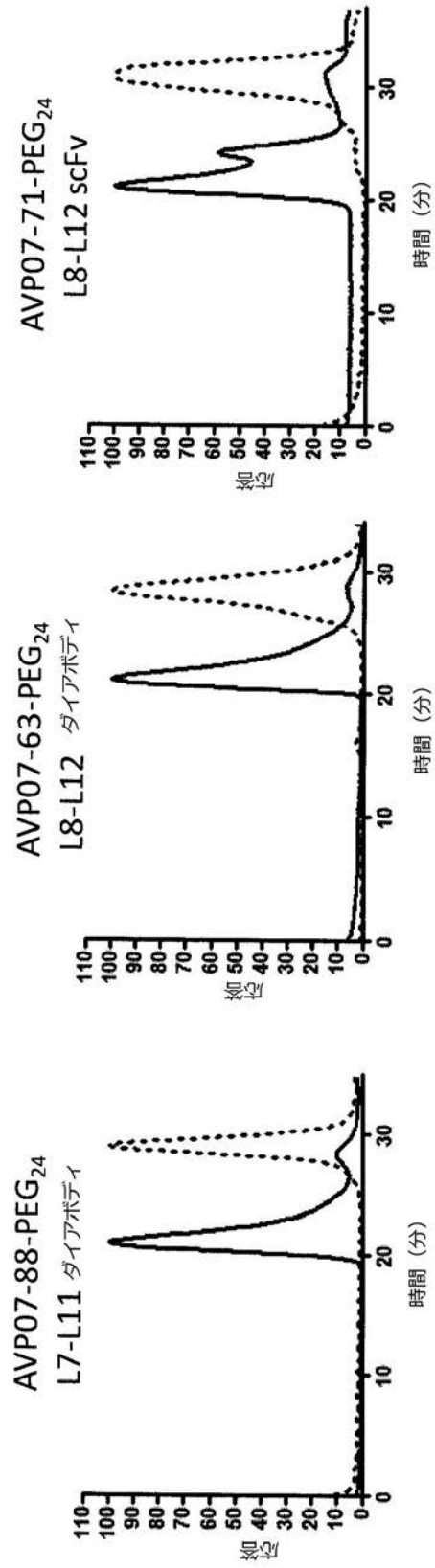


Figure 15B

【 図 1 5 C 】

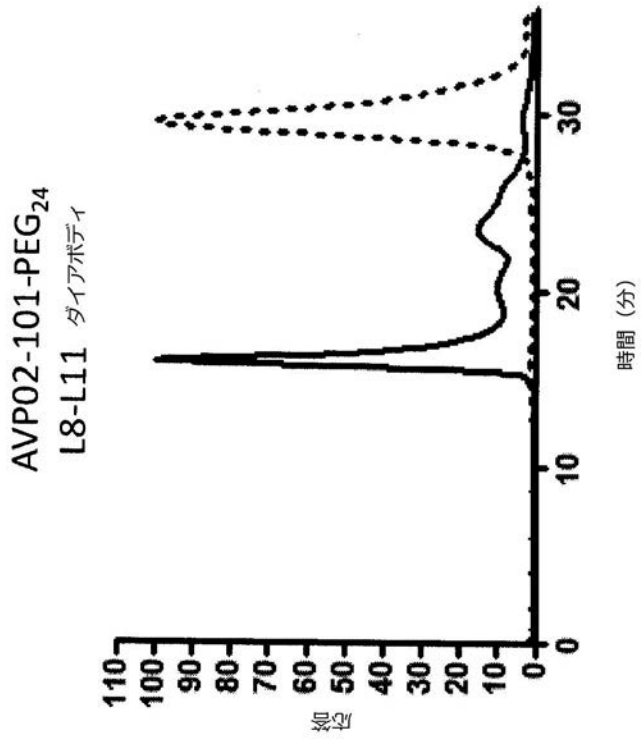


Figure 15C

【 図 16 】

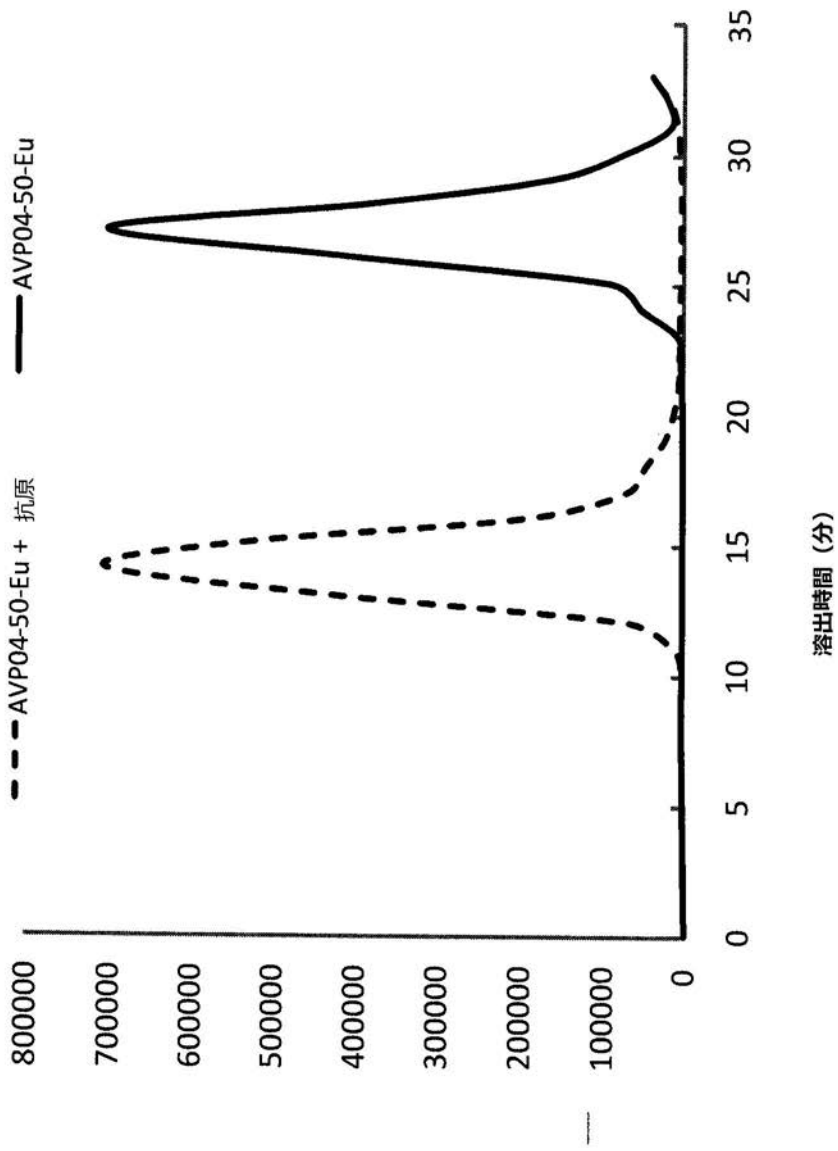


Figure 16

【 図 17 】

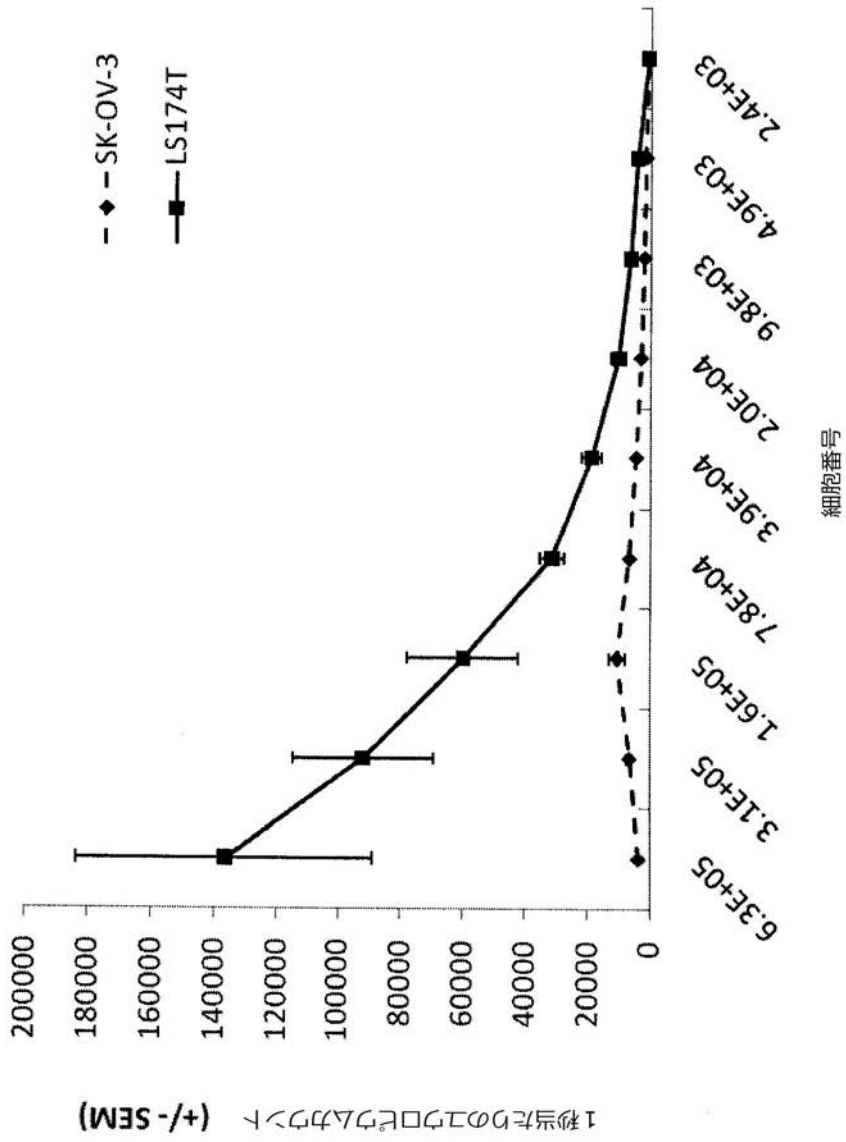


Figure 17

【 図 1 8 A 】

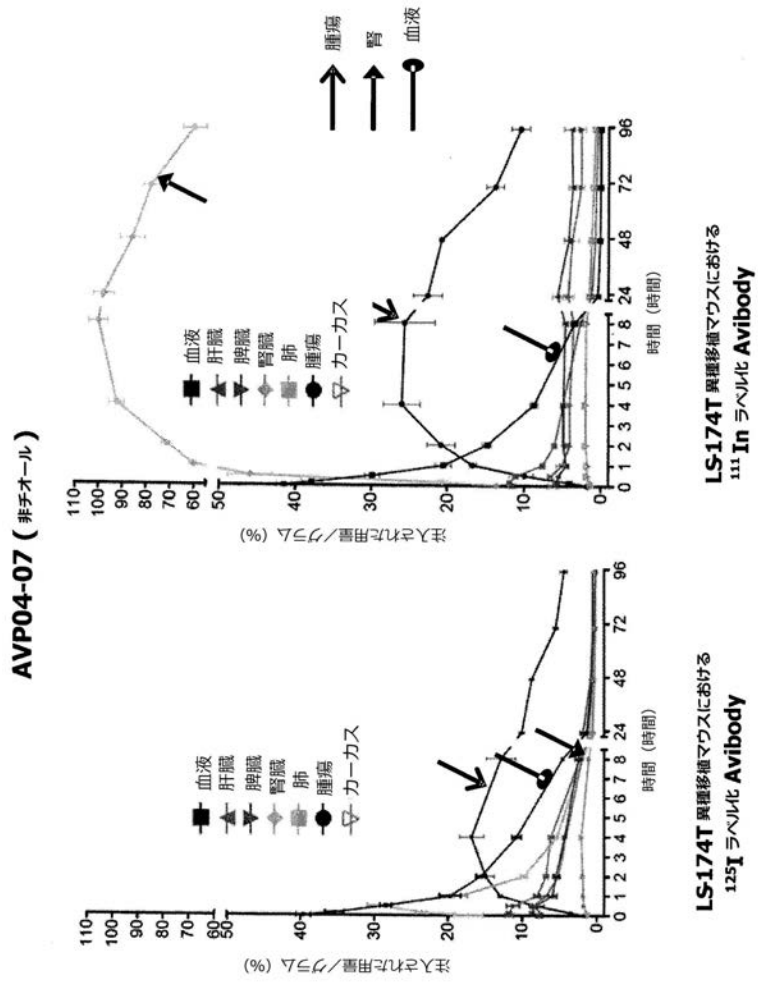


Figure 18A

【 図 1 8 B 】

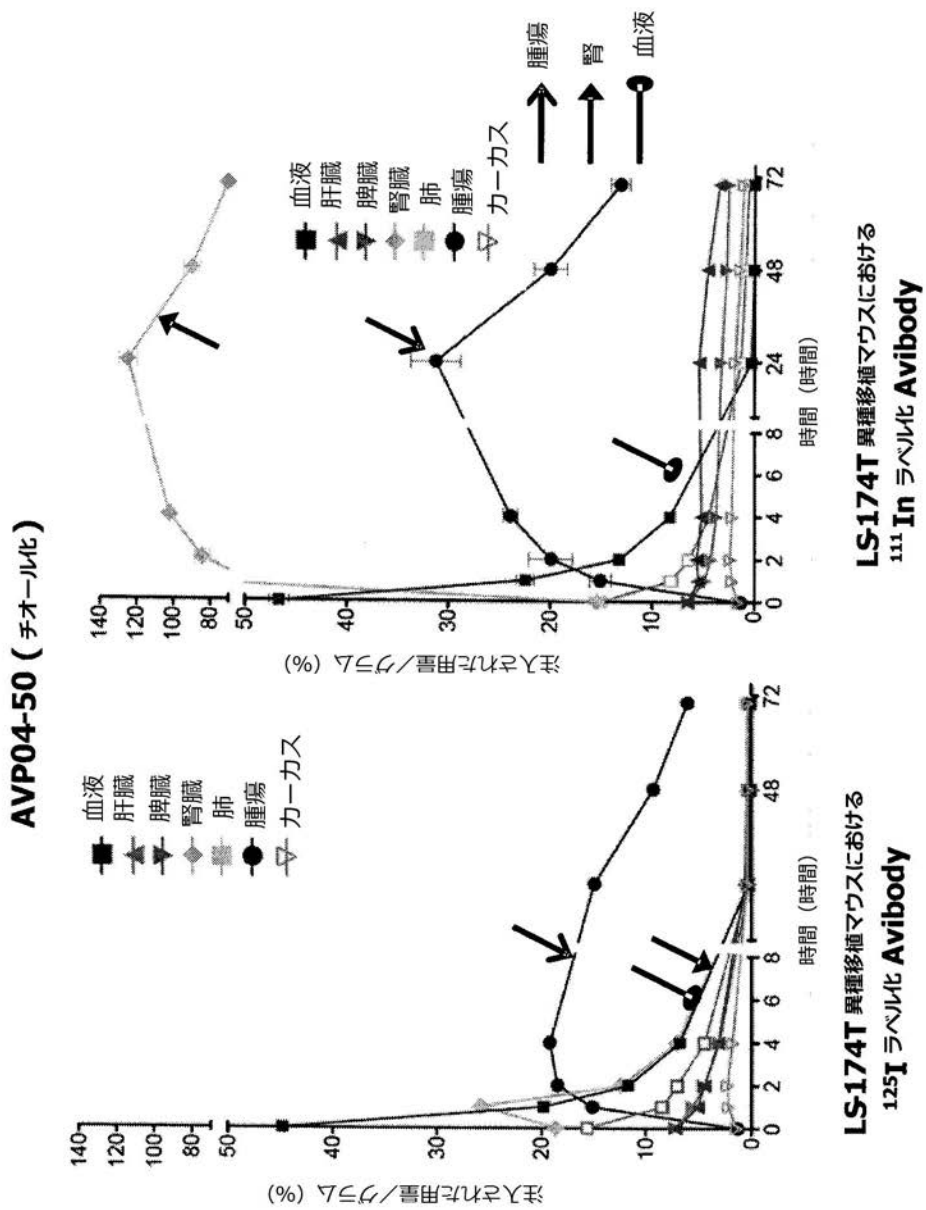


Figure 18B

【 図 19 】

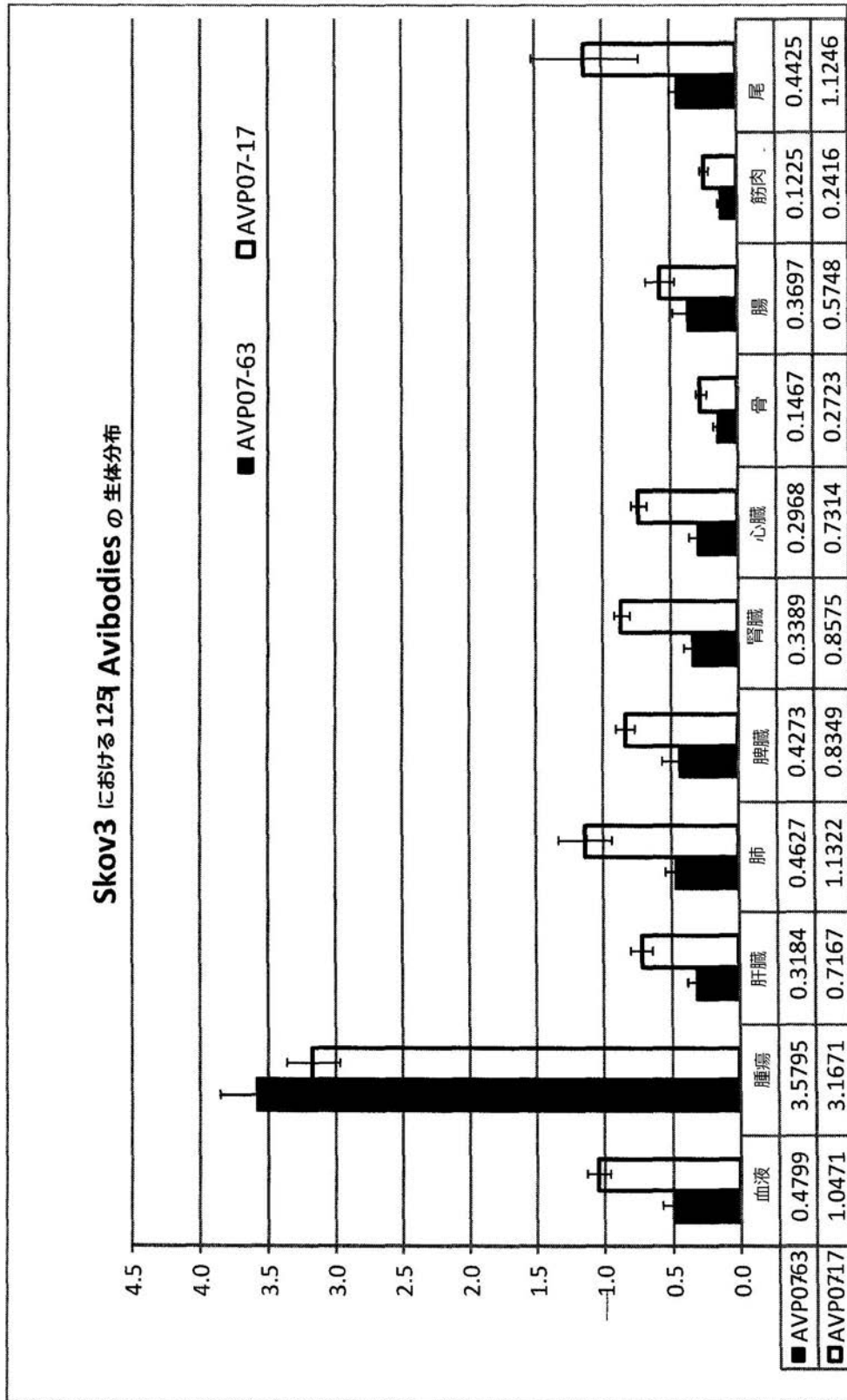


Figure 19

【 図 20 】

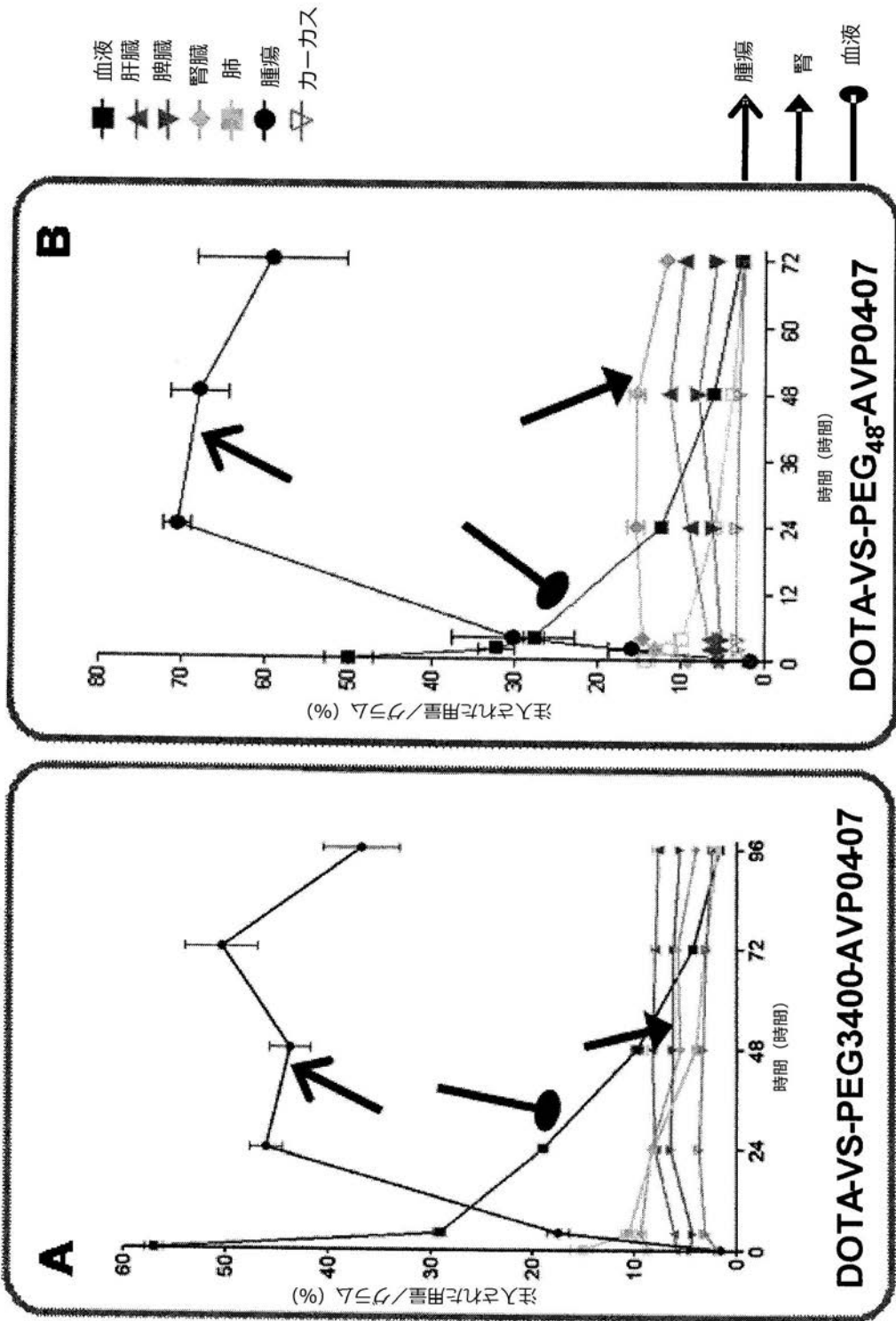
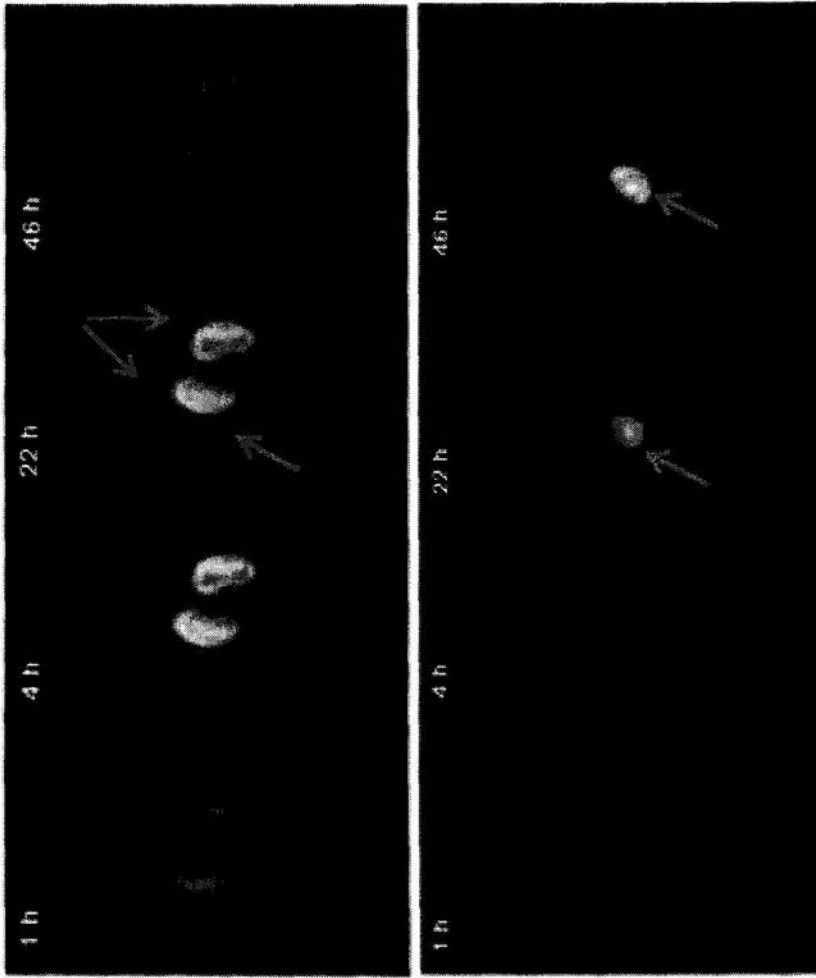


Figure 20

【 図 2 1 A 】

AVP04-07 (非子オール)



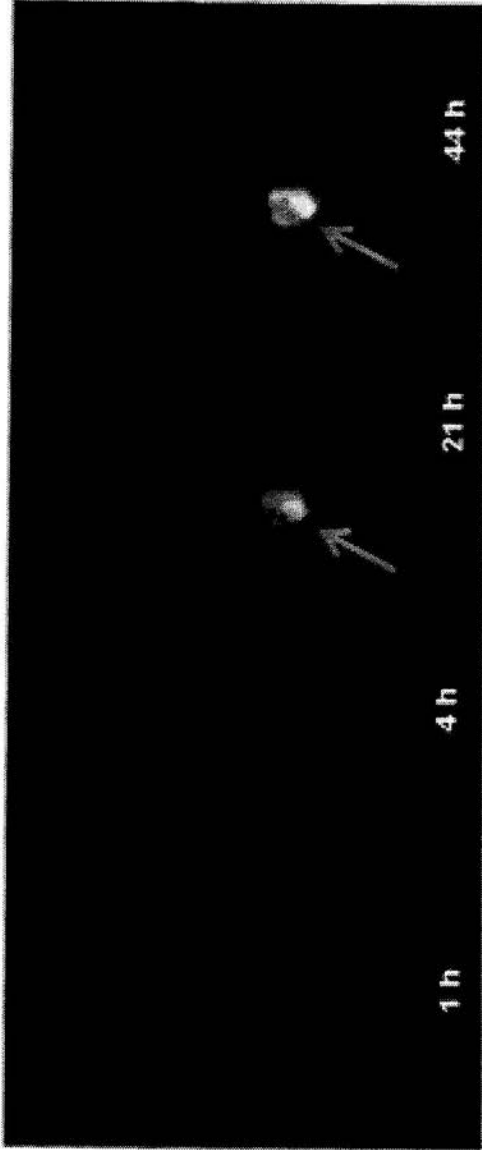
非-ペグ化

ランダムな表面リジン  
へのペグ化

Figure 21A

【 図 2 1 B 】

AVP04-50 (チオール化)

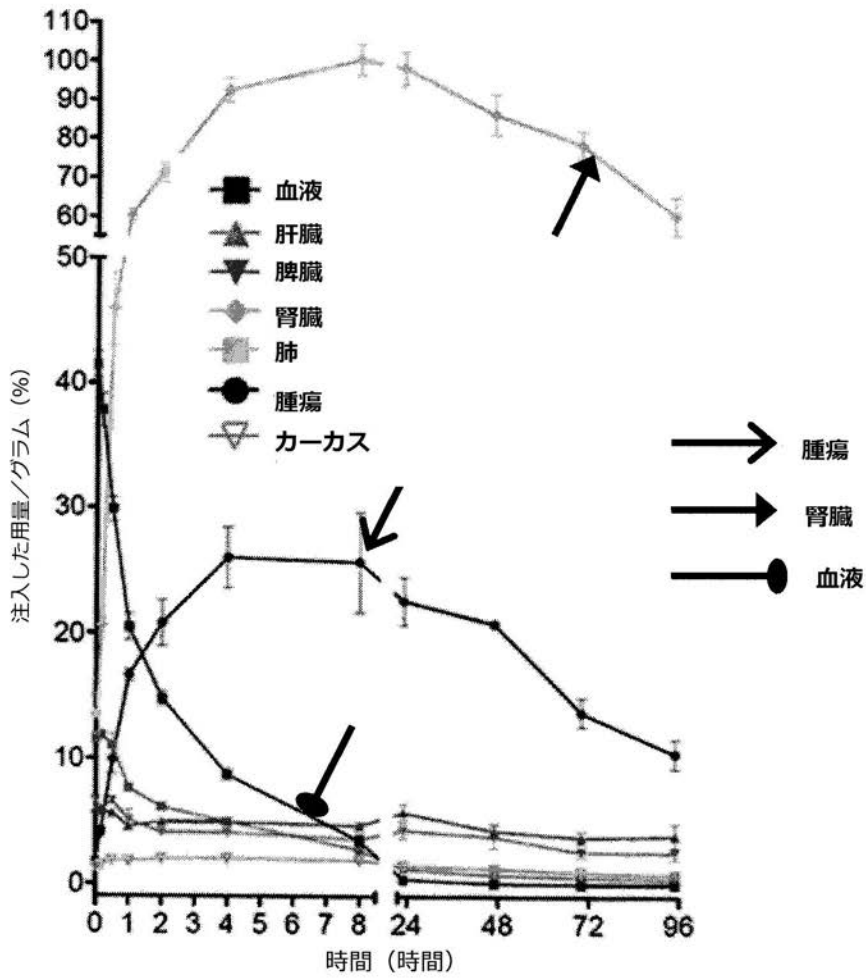


部位特異的なベグ化

Figure 21B

【 図 2 2 A 】

### AVP04-07 (非チオール)

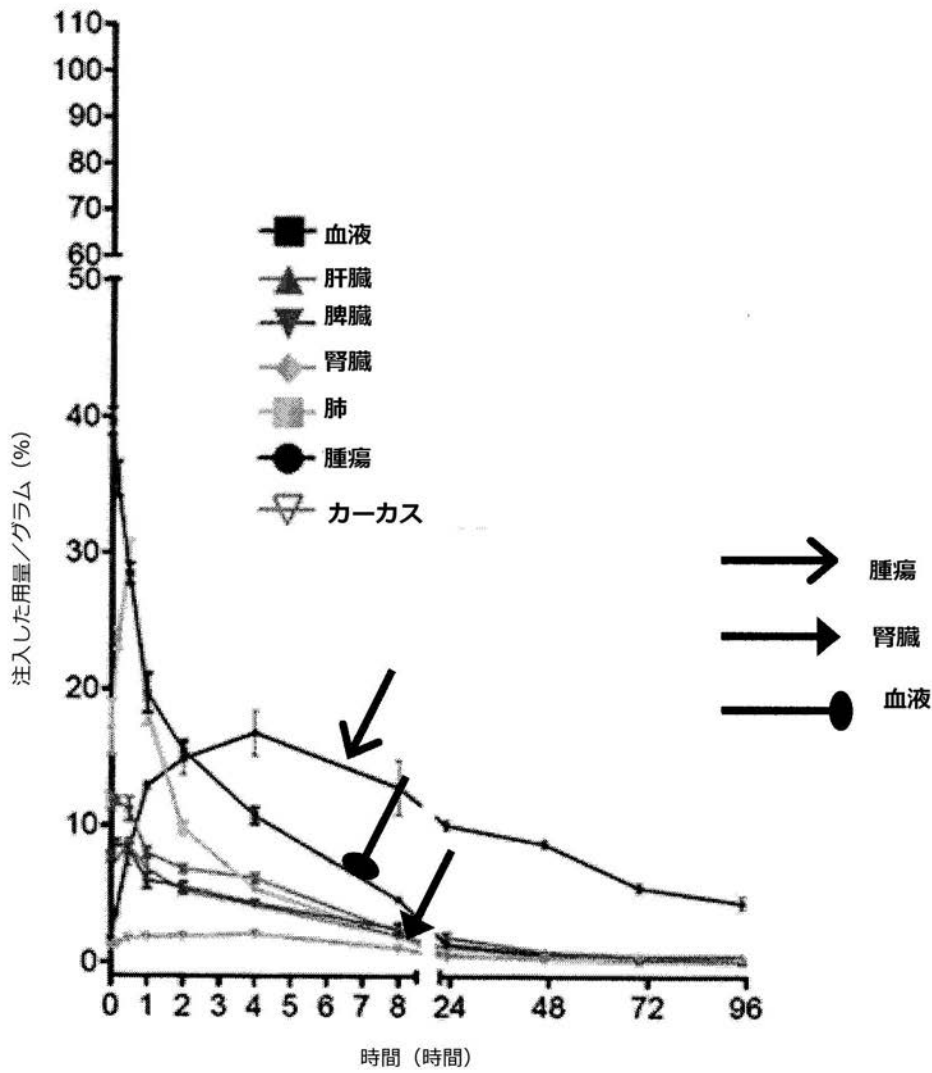


LS-174T 異種移植マウス における  
<sup>111</sup>In ラベル化 Avibody

Figure 22A

【 図 2 2 B 】

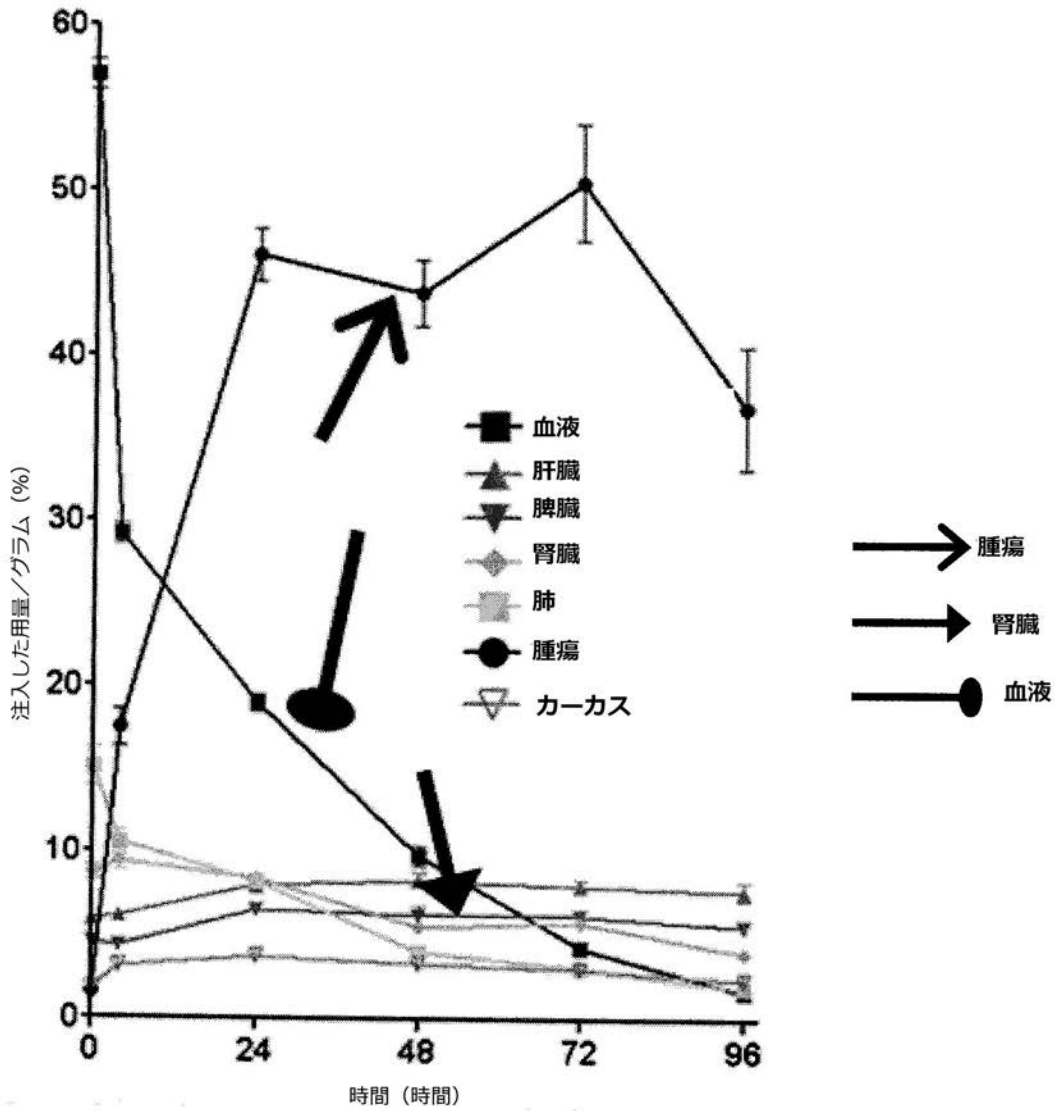
### AVP04-07 (非チオール)



LS-174T 異種移植マウスにおける  
<sup>125</sup>I ラベル化 Avibody

Figure 22B

【 図 2 2 C 】



LS-174T 異種移植マウスにおける  
<sup>111</sup>In ラベル化 DOTA-VS-  
PEG3400-AVP04-07 Avibody

Figure 22C

【 図 2 3 A 】

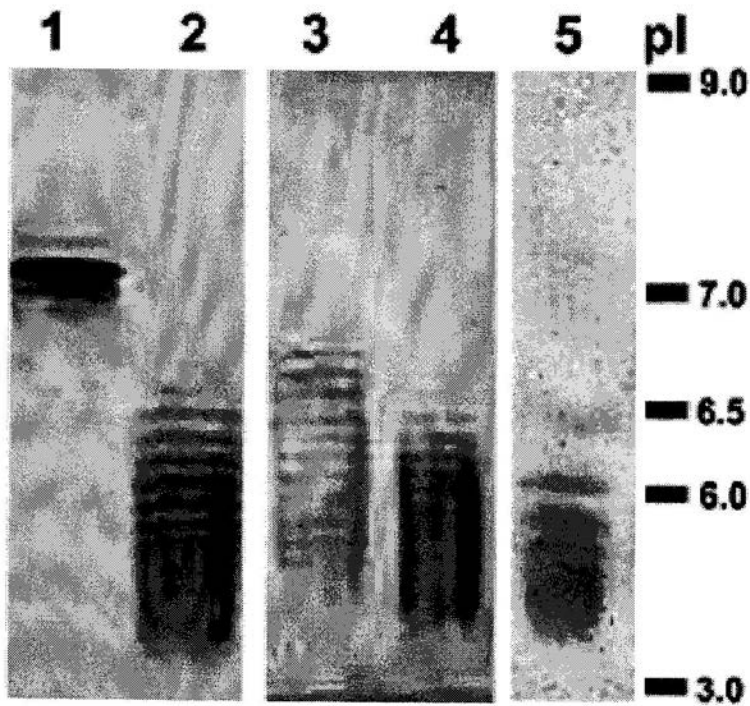


Figure 23A

【 図 2 3 B 】

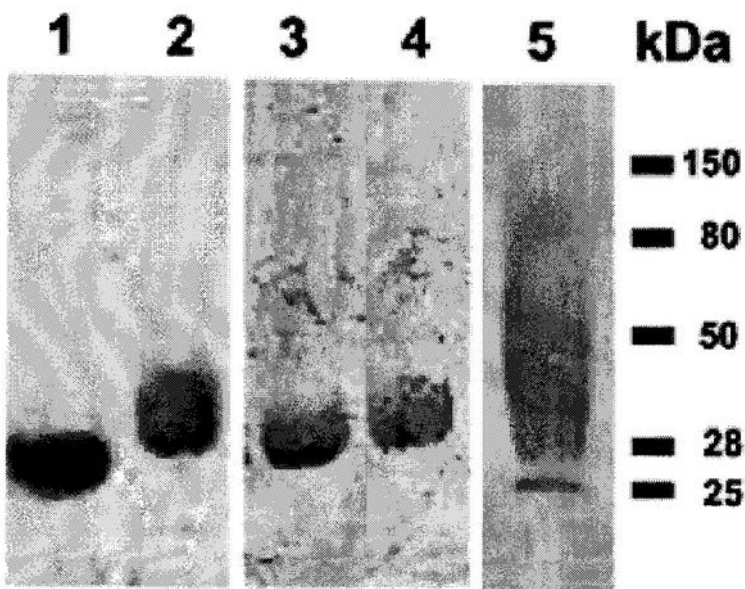


Figure 23B

【 図 2 4 】

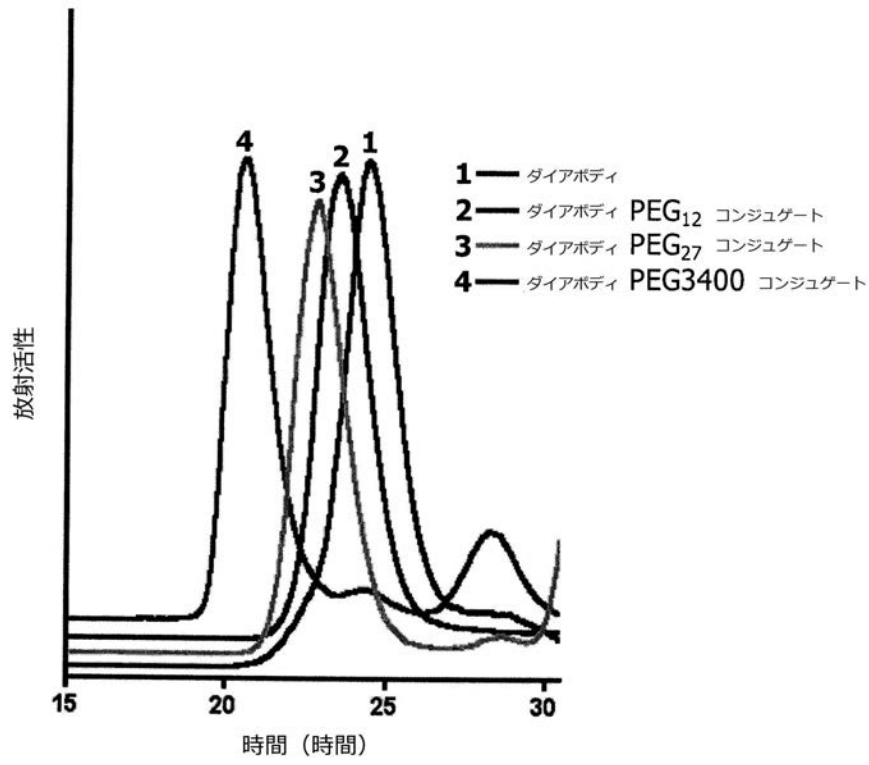


Figure 24

【 図 2 5 】

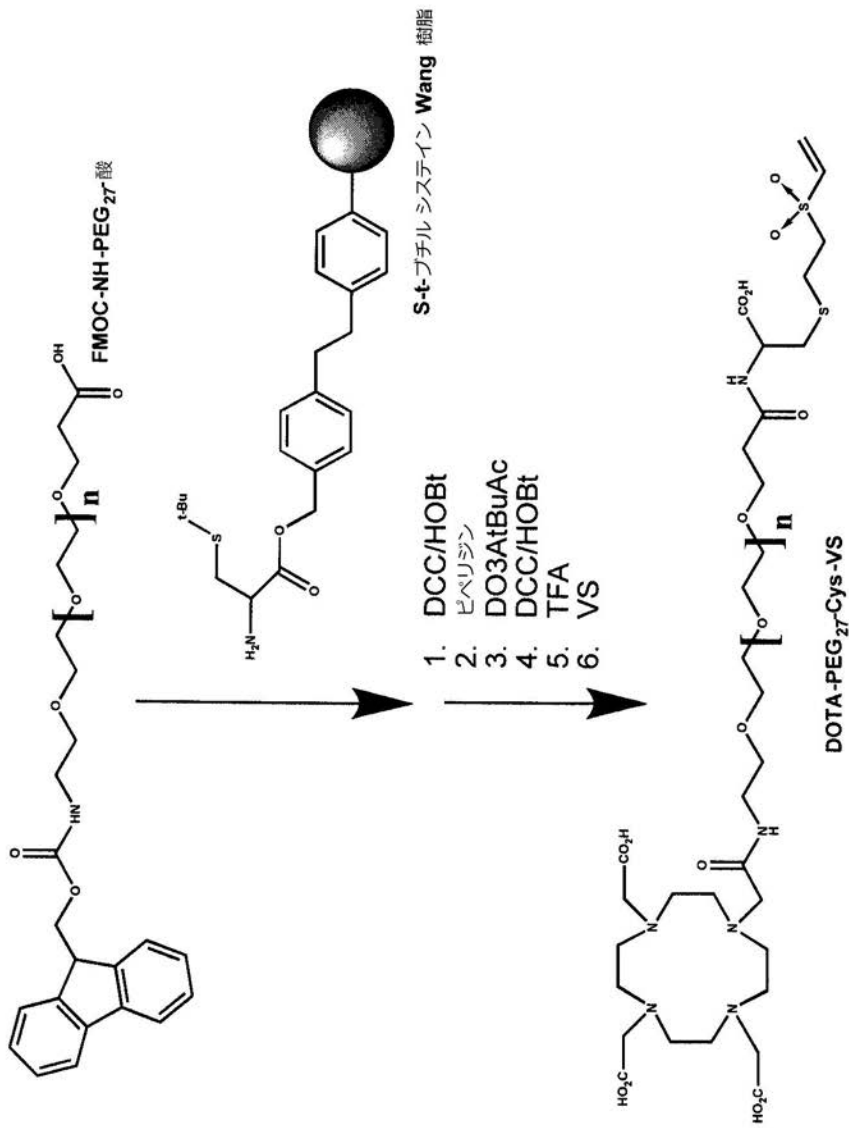


Figure 25

【 図 2 6 A 】

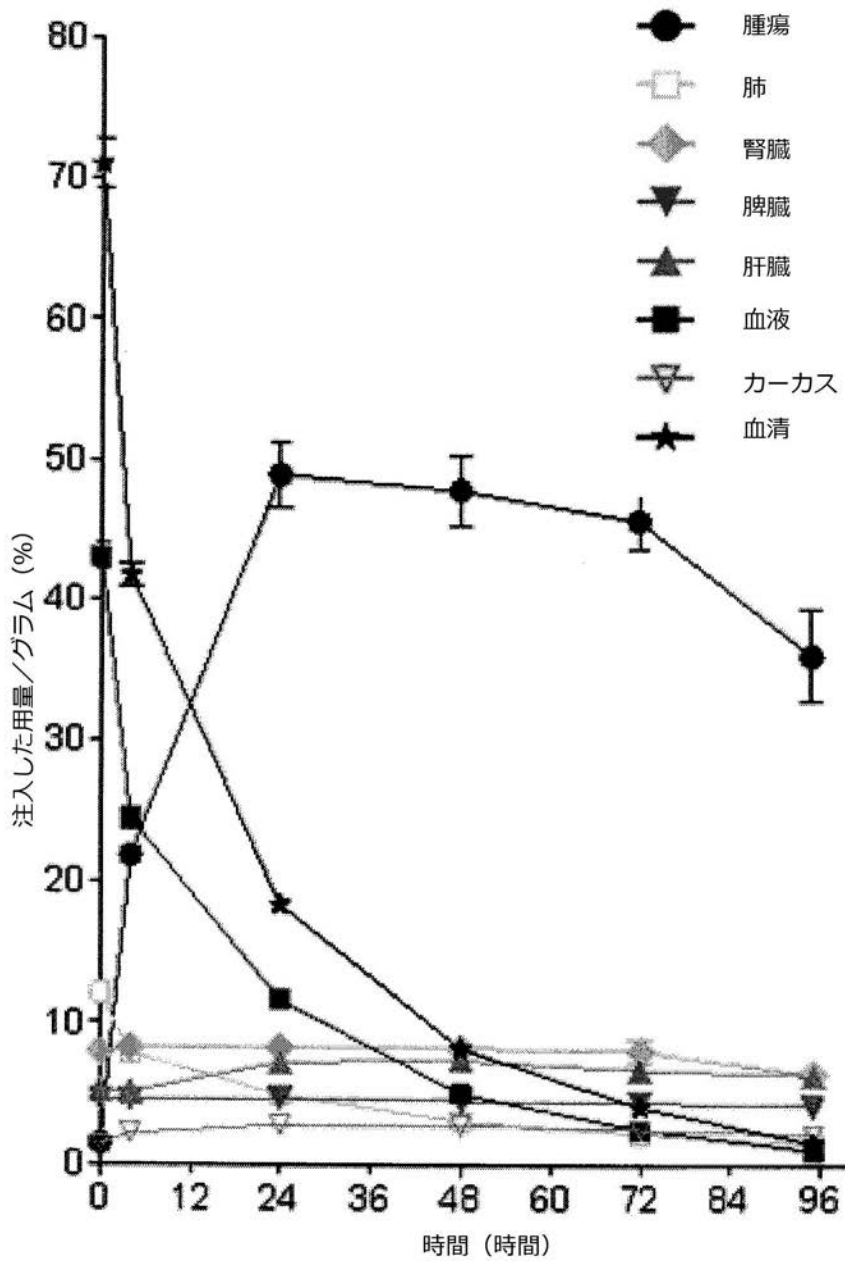


Figure 26A

【 図 2 6 B 】

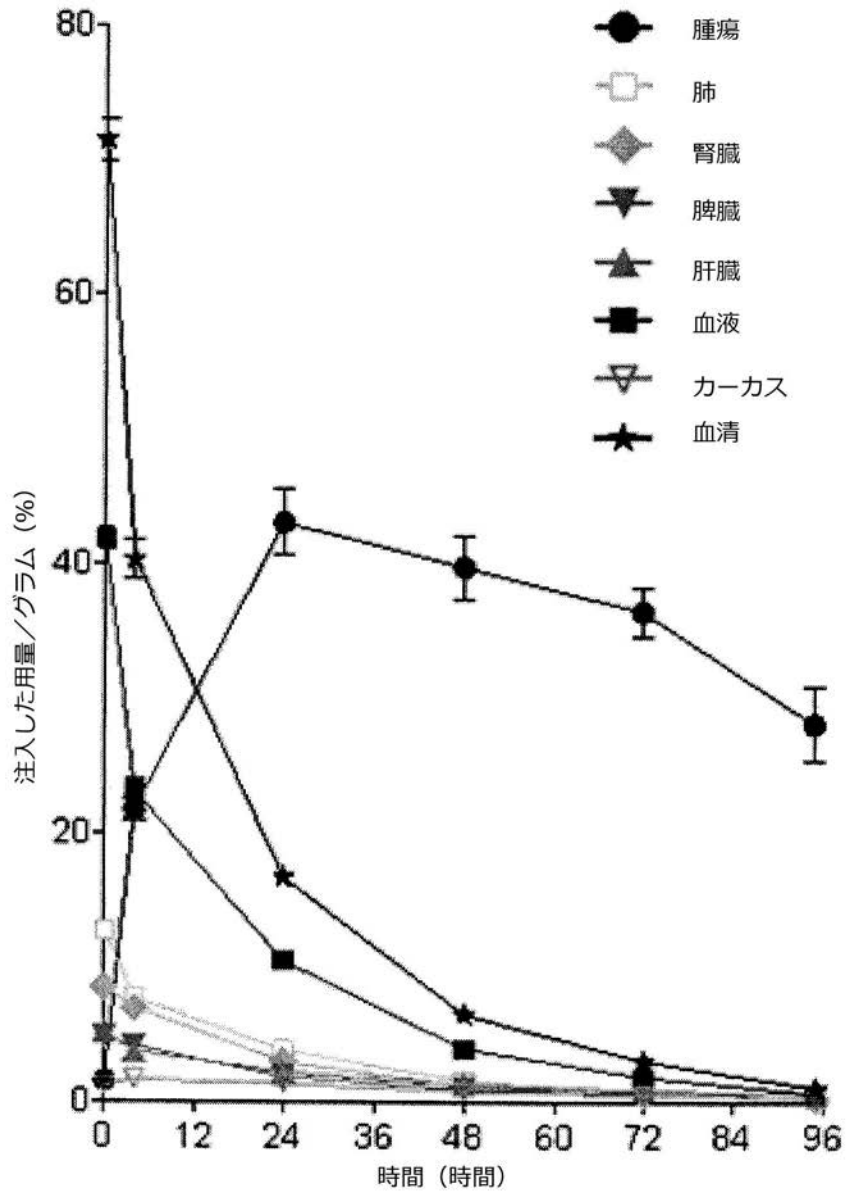


Figure 26B

【 図 2 6 C 】

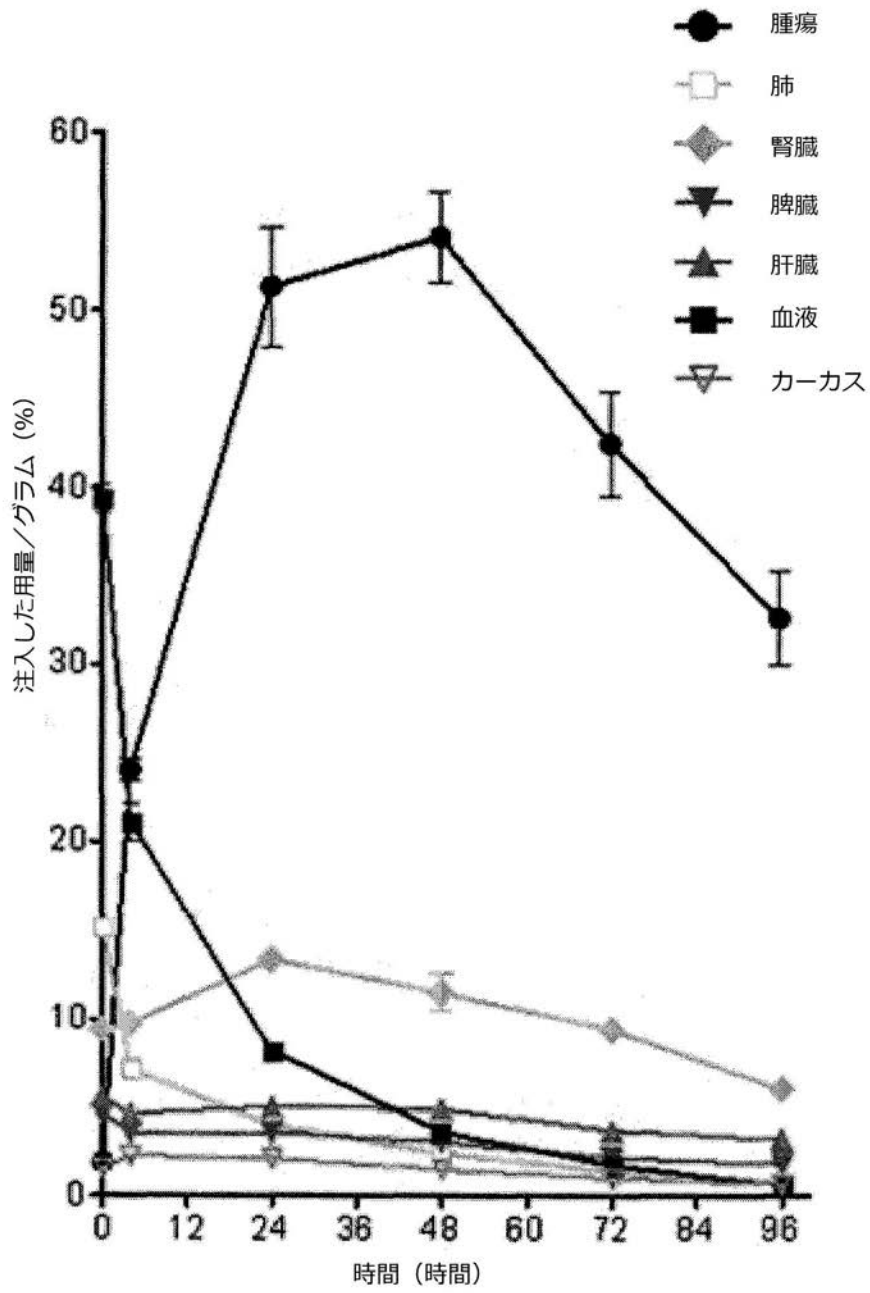


Figure 26C

【 図 2 6 D 】

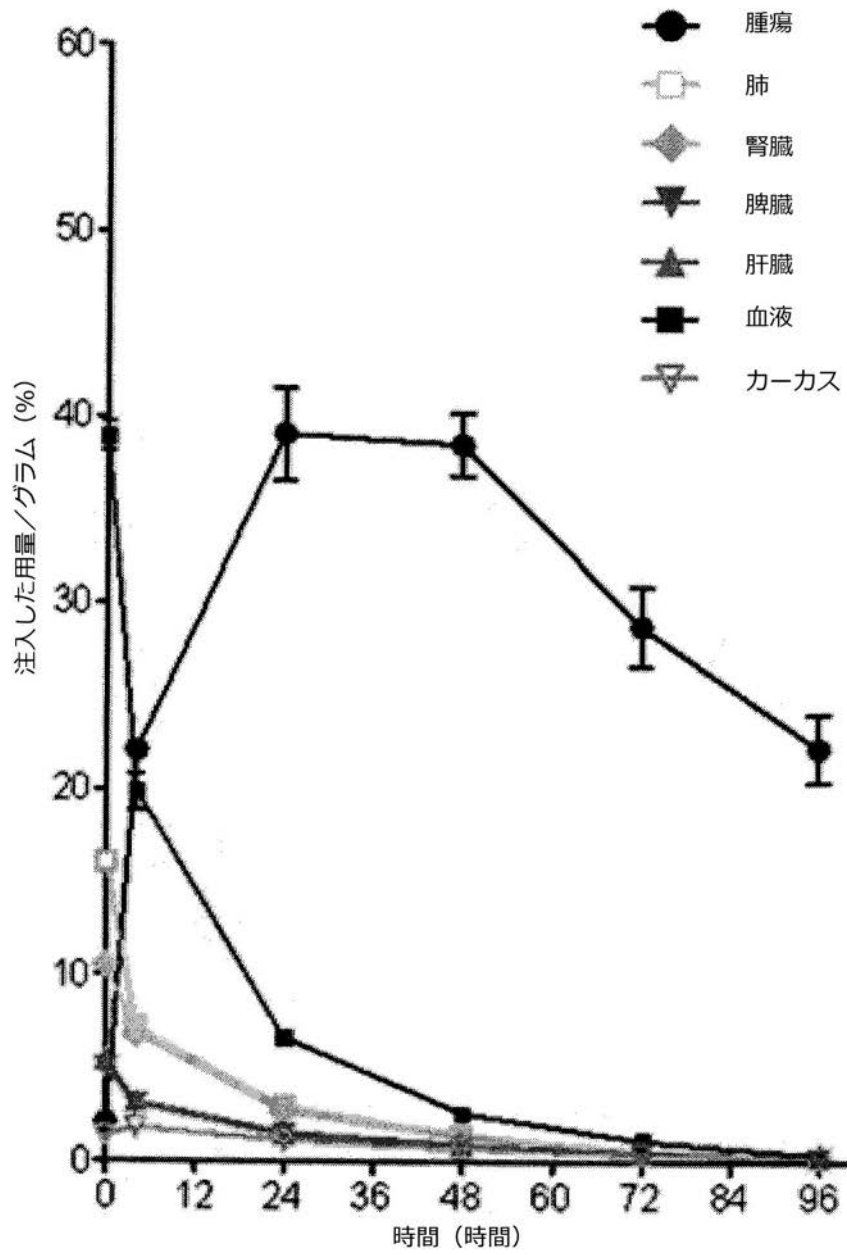


Figure 26D

【 図 2 7 A 】

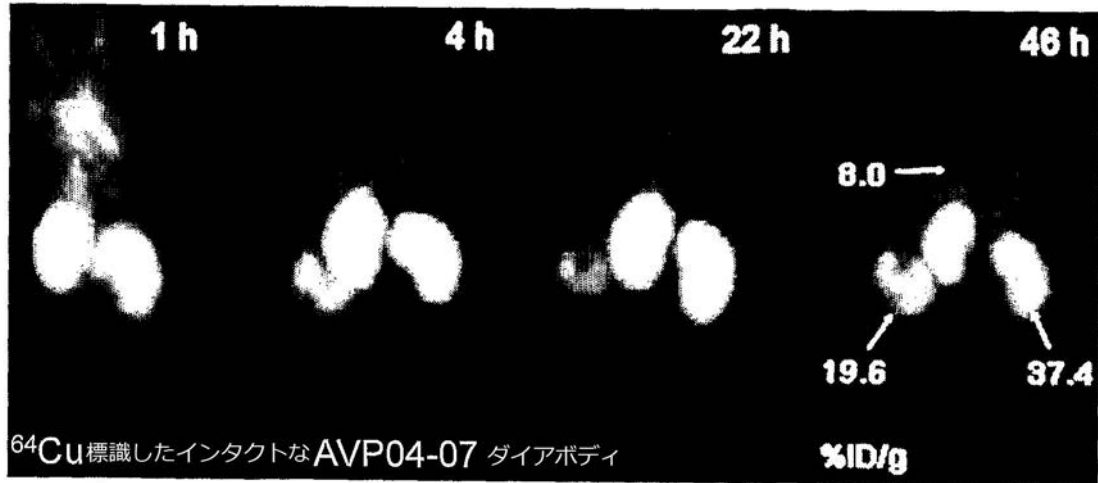


Figure 27A

【 図 2 7 B 】

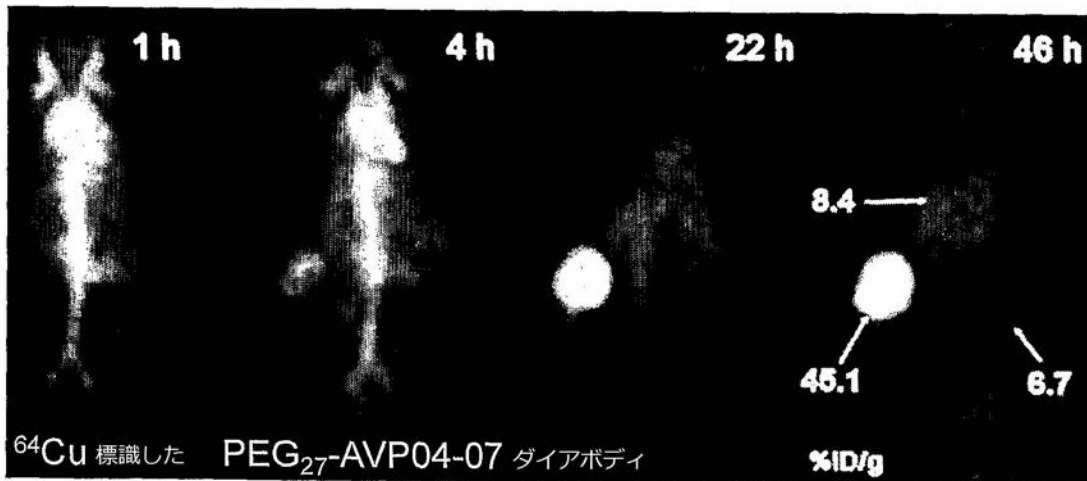


Figure 27B

【図 27 C】

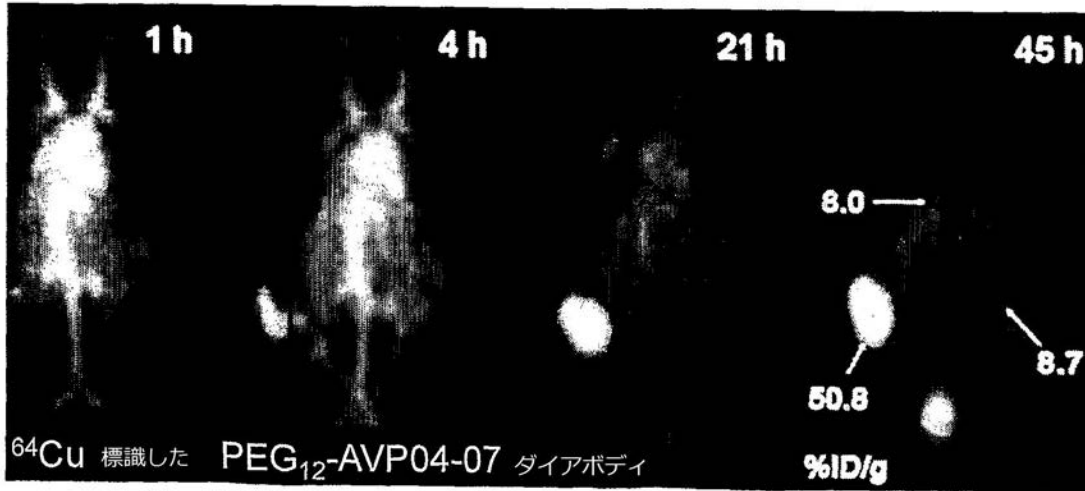


Figure 27C

【配列表】

2012531212000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2010/000847
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. Cl. <b>C07K 16/00 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)</b> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPODOC, WPIDS, MEDLINE (Keywords; Antibody, immunoglobulin, Framework Region 1, Cysteine, Disulfide, Conjugate, Label, Colloid, Toxin, PEG, TAG, polyethylene glycol, and like terms); GENOMEQUEST (Sequence Search; Seq ID's 55, 57, 59, 61, 63, 65, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 109, 111, 113, 119, 121, 123, 131 and 133)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEBBER, K.O. et al. Preparation and Characterization of a Disulfide-Stabilized Fv Fragment of the Anti-TAC Antibody: Comparison with its Single-Chain Analog. Molecular Immunology. 1995, Vol.32 (4), pages 249-258. See Fig. 1 and Fig. 3	1, 44-51 and 57-63
X	US 2009/0028856 A1 (CHEN et al.) 29 January 2009 See Fig 15 and paragraphs [0406] to [0409], [0419] and [0866]	1, 44-51 and 57-63
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 August 2010		Date of mailing of the international search report 2 SEP 2010
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer JAMES SUNG AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : +61 2 6283 2747

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/AU2010/000847

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/116076 A2 (GENENCOR INTERNATIONAL, INC.) 2 November 2006 See abstract, Fig 1H (TAB 2.5), examples 5, 13 and 16	1, 31, 35-40, 44-51, 57-73, 76, 77, 80-93 and 97-102

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application  
PCT/AU2010/000847**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

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

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

**Invention 1:** Claims 1-33, 35-40, 52-55 (Fully) and claims 41-51, 56-63, 73-102 (Partially) are directed to an isolated protein comprising an immunoglobulin variable region comprising at least two cysteine residues positioned within the framework region (FR) I, wherein said cysteine residues are capable of forming a disulphide bond when they are not conjugated to a compound.

**Invention 2:** Claim 34 (fully) and claims 41-51, 56-63, 66-102 (Partially) are directed to an isolated protein comprising an immunoglobulin heavy chain variable region (V<sub>H</sub>) and light chain variable region (V<sub>L</sub>) wherein at least one of the variable regions comprises a N-terminal threonine residue or serine residue.

**Invention 3:** Claims 64, 65 (fully) and claims 66-102 (Partially) are directed to an isolated protein comprising an immunoglobulin heavy chain variable region which is at least 60% identical to SEQ ID 111 and light chain variable region which is at least 60% identical to SEQ ID 113, wherein at least one of the variable regions comprises a N-terminal threonine residue or serine residue heavy chain variable region (V<sub>H</sub>) and light chain variable region (V<sub>L</sub>) associate to form a Fv capable of specifically binding to tumour antigen TAG-72.

(Continued on Supplemental Box I)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-33, 35-40, 52-55, 64, 65 (Fully) and 41-51, 56-63, 66-102 (Partially)
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2010/000847

**Supplemental Box I**

(To be used when the space in any of Boxes I to IV is not sufficient)

**Continuation of Box No: III**

PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.

The only common feature to inventions 1-3 is that they are isolated proteins comprising immunoglobulin variable regions. Inventions 2 and 3 further comprise the immunoglobulin heavy and light chain variable regions. However immunoglobulins comprising the heavy and light chain variable regions are not novel in the light of the following document:

D1: SKERRA, A. et al. Assembly of a Functional Immunoglobulin Fv Fragment in *Escherichia coli*. Science, 1998, vol.240, pages 1038-1041.

D1 discloses immunoglobulins comprising the variable region which comprises the heavy chain variable region (V<sub>H</sub>) and light chain variable region (V<sub>L</sub>).

This means that the common feature can not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, since it makes no contribution over the prior art.

Because the common feature does not satisfy the requirement for being a special technical feature it follows that it cannot provide the necessary technical relationship between the identified inventions. Therefore the claims do not satisfy the requirement of unity of invention *a posteriori*.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application  
**PCT/AU2010/000847**

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
US	2009028856	AR	067544	AR	070168	AU	2008276140
		CA	2693255	CR	11216	CR	11274
		EC	SP109878	EP	2176296	KR	20100041833
		PE	09432009	PE	13182009	WO	2009012268
		WO	2009099728				
WO	2006116076	EP	1877102	US	2009203104		
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.							
END OF ANNEX							

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/534 (2006.01)	G 0 1 N 33/534	
G 0 1 N 33/532 (2006.01)	G 0 1 N 33/532	A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A

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

- (72) 発明者 サンダーズ, ポール, ロバート  
オーストラリア国 ヴィクトリア 3 0 3 9, ムーニー ボンズ, マレー ストリート 2 エー
- (72) 発明者 タムバキス, デブラ  
オーストラリア国 ヴィクトリア 3 1 2 4, キャンバーウェル, ハゼル ストリート 1 / 1 5
- (72) 発明者 ツラティ, ファビオ  
オーストラリア国 ヴィクトリア 3 0 0 8, ドックランド, ハーバー エスプラネード ユニッ  
ト 1 4 1 1 / 1 0 0
- (72) 発明者 ホイトクロフト, マイケル, ポール  
オーストラリア国 ヴィクトリア 3 0 0 6, サウスバンク, ウェルズ ストリート 2 / 6 8
- (72) 発明者 レオン, デイビット  
オーストラリア国 ヴィクトリア 3 0 0 6, プレストン, オバンド ストリート 2 / 2 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 DA05 DA12 EA04  
GA11 HA01 HA11  
4B065 AA01X AA72X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44  
4C085 AA34 CC22 DD11 DD51  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA50 BA57 CA40 DA75 EA20 FA74

专利名称(译)	免疫偶联物及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012531212A</a>	公开(公告)日	2012-12-10
申请号	JP2012517983	申请日	2010-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	阿维佩普私人有限公司		
申请(专利权)人(译)	Abipeppu私人有限公司		
[标]发明人	ハドソンピータージョン サンダースポールロバート タムバキスデブラ ツラティファビオ ホイトクロフトマイケルポール レオンデイビット		
发明人	ハドソン,ピーター,ジョン サンダース,ポール,ロバート タムバキス,デブラ ツラティ,ファビオ ホイトクロフト,マイケル,ポール レオン,デイビット		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/00 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/534 G01N33/532 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61K47/6879 A61K51/10 A61K51/1093 A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/00 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/10 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K16/30 C07K16/3092 C07K16/32 C07K2317/21 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/622 C07K2317/624 C07K2317/626 C07K2319/31		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C07K16/00 A61K39/395.Y A61P35/00 G01N33/534 G01N33/532.A G01N33/53.D G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B065/AA01X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4C085/AA34 4C085/CC22 4C085/DD11 4C085/DD51 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/BA57 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 浩 鈴木康仁		
优先权	2009903127 2009-07-03 AU 61/223353 2009-07-06 US 61/256703 2009-10-30 US		
其他公开文献	JP2012531212A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

本発明提供一种分离的蛋白质，其包含免疫球蛋白可变区，所述免疫球蛋白可变区包含位于框架区1内的至少两个半胱氨酸残基，其中至少两个半胱氨酸残基不与另一个化合物缀合。在半胱氨酸残基之间形成二硫键。优选地，蛋白质包含免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区，并且至少一个可变区包含两个半胱氨酸残基。本发还提供了与TAG 72结合的蛋白质。本发还提供了蛋白质和另一种化合物的缀合物。

表1: コンジュゲーションに好ましい化合物

分類	詳細
放射性同位元素 (直接的又は間接的に)	<ul style="list-style-type: none"> <li><math>^{123}\text{I}</math>, <math>^{125}\text{I}</math>, <math>^{130}\text{I}</math>, <math>^{133}\text{I}</math>, <math>^{135}\text{I}</math>, <math>^{47}\text{Sc}</math>, <math>^{72}\text{As}</math>, <math>^{72}\text{Sc}</math>, <math>^{90}\text{Y}</math>, <math>^{88}\text{Y}</math>, <math>^{97}\text{Ru}</math>, <math>^{100}\text{Pd}</math>, <math>^{101\text{m}}\text{Rh}</math>, <math>^{101\text{m}}\text{Rh}</math>, <math>^{119}\text{Sb}</math>, <math>^{128}\text{Ba}</math>, <math>^{197}\text{Hg}</math>, <math>^{211}\text{At}</math>, <math>^{212}\text{Bi}</math>, <math>^{153}\text{Sm}</math>, <math>^{169}\text{Eu}</math>, <math>^{212}\text{Pb}</math>, <math>^{109}\text{Pd}</math>, <math>^{111}\text{In}</math>, <math>^{67}\text{Ga}</math>, <math>^{67}\text{Cu}</math>, <math>^{75}\text{Br}</math>, <math>^{76}\text{Br}</math>, <math>^{77}\text{Br}</math>, <math>^{99\text{m}}\text{Tc}</math>, <math>^{11}\text{C}</math>, <math>^{13}\text{N}</math>, <math>^{15}\text{O}</math>, <math>^{18}\text{F}</math>, <math>^{188}\text{Re}</math>, <math>^{203}\text{Pb}</math>, <math>^{64}\text{Cu}</math>, <math>^{103}\text{Rh}</math>, <math>^{198}\text{Au}</math>, <math>^{199}\text{Ag}</math> 又は <math>^{177}\text{Lu}</math></li> </ul>
半減期延長剤	<ul style="list-style-type: none"> <li>ポリエチレングリコール</li> <li>グリセロール</li> <li>グルコース</li> </ul>
蛍光プローブ	<ul style="list-style-type: none"> <li>フィコエトリン (PE)</li> <li>アロファコシアニン (APC)</li> <li>Alexa Fluor 488</li> <li>Cy5.5</li> </ul>
生物製剤	<ul style="list-style-type: none"> <li>ウミシタケルシフェラーゼ、GFPなどの蛍光タンパク質</li> <li>免疫調節物質</li> <li>毒素</li> <li>免疫グロブリン</li> <li>アルブミンなどの半減期延長剤</li> </ul>
化学療法薬	<ul style="list-style-type: none"> <li>タキソール</li> <li>5-FU</li> <li>ドキシルピシシ</li> <li>イタルピシシ</li> </ul>