(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-122084
(P2017-122084A)
(43)公開日　平成29年7月13日(2017.7.13)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18	ZNA	4B065
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4C076
C07K 16/22	(2006.01)	C07K	16/22		4C084
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4H045
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		

審査請求 有　請求項の数 53　ＯＬ　外国語出願　（全 127 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-559 (P2017-559)
(22)出願日　平成29年1月5日 (2017.1.5)
(62)分割の表示　特願2012-545018 (P2012-545018)の分割
原出願日　平成22年12月23日 (2010.12.23)
(31)優先権主張番号　61/289,497
(32)優先日　平成21年12月23日 (2009.12.23)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　512001854
アビペップ　ピーティーワイ　リミテッド
オーストラリア国　ヴィクトリア　３０５２，パークビレ，ロイヤル　パレイド　３４３
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木　康仁
(72)発明者　ハドソン，ピーター，ジョン
オーストラリア国　ヴィクトリア　３１３０，ブラックバーン，フクシア　ストリート　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２

(57)【要約】　（修正有）
【課題】免疫グロブリン可変領域を含むタンパク質であって、該タンパク質に対する化合物の結合を促進するように修飾された又は該タンパク質に結合した化合物を有するタンパク質の提供。
【解決手段】フレームワーク領域（ＦＲ）２内に位置する少なくとも２つのシステイン残基及び／又はフレームワーク領域（ＦＲ３）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タンパク質であって、ＦＲ２及び／又はＦＲ３のシステイン残基の少なくとも２つが化合物に結合しない場合に、フレームワーク内ジスルフィド結合がシステイン残基間に形成可能であるタンパク質。好ましくは、前記タンパク質は免疫グロブリン重鎖可変領域（V_H）及び免疫グロブリン軽鎖可変領域（V_L）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。また、前記タンパク質は別の化合物とも結合する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ｉ）フレームワーク領域（ＦＲ）２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、ＦＲ２のシステイン残基の少なくとも２つが化合物に結合しない場合にジスルフィド結合がＦＲ２のシステイン残基間に形成可能である残基；および／または
（ｉｉ）フレームワーク領域（ＦＲ）３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、ＦＲ３のシステイン残基の少なくとも２つが化合物に結合しない場合にジスルフィド結合がＦＲ３のシステイン残基間に形成可能である残基
を含む免疫グロブリン可変領域を含む単離タンパク質。
【請求項２】
免疫グロブリン重鎖可変領域（V_H）および免疫グロブリン軽鎖可変領域（V_L）を含む単離タンパク質であって、可変領域の少なくとも１つが、
（ｉ）フレームワーク領域（ＦＲ）２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、ＦＲ２のシステイン残基の少なくとも２つが化合物に結合しない場合にジスルフィド結合がＦＲ２のシステイン残基間に形成可能である残基；および／または
（ｉｉ）フレームワーク領域（ＦＲ）３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、ＦＲ３のシステイン残基の少なくとも２つが化合物に結合しない場合にジスルフィド結合がＦＲ３のシステイン残基間に形成可能である残基
を含むタンパク質。
【請求項３】
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】
ＦＲ２内のシステイン残基がＣＤＲ１とＣＤＲ２間に位置し、および／またはＦＲ３内のシステイン残基がＣＤＲ２とＣＤＲ３間に位置する、請求項１から３のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項５】
システイン残基がV_H内にあり、ＦＲ２内のシステイン残基がカバット付番方式に従って付番された残基３６から４９の間に位置し、および／またはＦＲ３内のシステイン残基がカバット付番方式に従って付番された残基６６から９４の間に位置する、請求項２から４のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項６】
ＦＲ２内のシステイン残基がカバット付番方式に従って付番された残基３９から４５の間に位置し、および／またはＦＲ３内のシステイン残基がカバット付番方式により付番された残基６８から８６の間に位置する、請求項５に記載のタンパク質。
【請求項７】
ＦＲ２内のシステイン残基がカバット付番方式に従って付番された残基３９から４５の間に位置し、および／またはＦＲ３内のシステイン残基がカバット付番方式により付番された残基６８から８１の間に位置する、請求項５または６に記載のタンパク質。
【請求項８】
システイン残基がＦＲ３内でカバット付番方式に従って付番された残基６８から８１の間に位置する、請求項５から７のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項９】
システイン残基が、
（ｉ）カバット付番方式に従って付番されたＦＲ２の３９から４３の位置；
（ｉｉ）カバット付番方式に従って付番されたＦＲ２の３９から４５の位置；
（ｉｉｉ）カバット付番方式に従って付番されたＦＲ３の７０から７９の位置；および／または
（ｉｖ）カバット付番方式に従って付番されたＦＲ３の７２から７５の位置
に位置する、請求項５から８のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１０】

システイン残基がV_L内にあり、ＦＲ２内のシステイン残基がカバット付番方式に従って付番された残基３５から４９の間に位置し、および／またはＦＲ３内に位置するシステイン残基がカバット付番方式により付番された残基５７から８８の間に位置する、請求項２から４のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項１１】

ＦＲ２内のシステイン残基がカバット付番方式に従って付番された残基３８から４４の間に位置し、および／またはＦＲ３内のシステイン残基がカバット付番方式により付番された残基６３から８２の間に位置する、請求項１０に記載のタンパク質。

【請求項１２】

ＦＲ３内のシステイン残基がカバット付番方式に従って付番された残基６３から７４の間に位置する、請求項１０または１１に記載のタンパク質。

【請求項１３】

システイン残基がＦＲ３内でカバット付番方式に従って付番された残基６３から７４の間に位置する、請求項１０から１２のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項１４】

システイン残基が、

（ｉ）カバット付番方式に従って付番されたＦＲ２の３８から４２の位置；

（ｉｉ）カバット付番方式に従って付番されたＦＲ２の３８から４４の位置；および／または

（ｉｉｉ）カバット付番方式に従って付番されたＦＲ３の６５から７２の位置；に位置する、請求項１０から１３のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項１５】

ヒト上皮成長因子（Ｈｅｒ）２、腫瘍関連糖タンパク質ＴＡＧ７２、ＭＵＣ１または前立腺特異膜抗原（ＰＳＭＡ）に特異的に結合する請求項１から請求項１４のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項１６】

タンパク質が配列番号：５９、６１、６３または６５の１以上に示されるV_HおよびV_L配列に少なくとも約８０％同一の配列を含むV_HおよびV_Lを含み、ＦＲ２および／またはＦＲ３内に位置する２以上のシステイン残基を含むように改変される、請求項１から請求項１５のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項１７】

配列番号：１０１，　１０３，　１０５，　１０７，　１０９，　１１１，　１１３，　１１５，　１１７，　１１９，　１２１，　１２３，　１２５，　１２７，　１２９，　１３１，　１３３，　１３５，　１３７，　１３９，　１４１，　１４３，　１４５，　１４７または１４９の１またはそれ以上に示される配列に少なくとも約８０％同一の配列を含み、任意でＮ－末端セリン残基を含む、請求項１６に記載のタンパク質。

【請求項１８】

請求項２から１７のいずれか一項に記載の少なくとも１つのタンパク質を含むＦｖを含む単離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１９】

抗原結合部位を形成するV_LおよびV_Hが単一のポリペプチド鎖にある、請求項１８に記載のタンパク質。

【請求項２０】

（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_H）２及び／又はC_H３に連結した（ｉ）及び／又は（ｉｉ）の少なくとも１つである、請求項１９に記載のタンパク質。

【請求項２１】

抗原結合部位を形成するV_LおよびV_Hが異なるポリペプチド鎖にある、請求項１８に

記載のタンパク質。
【請求項２２】
（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２１に記載のタンパク質。
【請求項２３】
免疫グロブリンである、請求項２１に記載のタンパク質。
【請求項２４】
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から２３のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２５】
システイン残基の少なくとも１つに結合した化合物を含み、化合物の結合がタンパク質の抗原への結合を妨げない請求項１から２３のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２６】
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、被験体でタンパク質の半減期を延長す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】
少なくとも１つのＮ－末端スレオニンまたはセリン残基をさらに含む、請求項１から請求項２６のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２８】
スレオニンまたはセリン残基に結合した化合物を含み、化合物の結合がタンパク質の抗原への結合を妨げない請求項２７に記載のタンパク質。
【請求項２９】
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、被験体でタンパク質の半減期を延長する化合物、およびこれらの混合物からなる群から選択される、請求項２８に記載のタンパク質。
【請求項３０】
ＦＲ２および／またはＦＲ３のシステイン残基の少なくとも１つに結合した第１化合物、およびスレオニン残基又はセリン残基に結合した第２化合物を含み、第２化合物が第１化合物と異なる、請求項２８又は２９に記載のタンパク質。
【請求項３１】
化合物がポリエチレングリコール（ＰＥＧ）である、請求項２５、２６または２８から３０のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項３２】
ＰＥＧが単分散ＰＥＧである、請求項３１に記載のタンパク質。
【請求項３３】
単分散ＰＥＧが４８未満のエチレングリコール単位を有する、請求項３２に記載のタンパク質。
【請求項３４】
単分散ＰＥＧが約２４エチレングリコール単位を有する、請求項３２又は３３に記載のタンパク質。
【請求項３５】
請求項１から請求項３４のいずれか一項に記載のタンパク質および薬学的に許容できる担体を含む組成物。
【請求項３６】
請求項１から請求項２３または請求項２７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３７】
プロモーターに操作可能に連結される請求項３８記載の核酸を含む発現構築物。

【請求項３８】
請求項３６に記載の外来核酸および／または請求項３７の発現構築物を含む単離細胞であって、タンパク質を発現する細胞。
【請求項３９】
細胞が細菌細胞、酵母細胞、哺乳類細胞または昆虫細胞である、請求項３８記載の細胞。
【請求項４０】
請求項１から２３または２７のいずれか一項に記載のタンパク質の産生方法であって、コードするタンパク質を産生するのに十分な条件下で請求項３７に記載の発現構築物を維持する工程を含む方法。
【請求項４１】
コードするタンパク質を産生するのに十分な条件下で請求項３８または３９に記載の細胞を培養する工程を含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
タンパク質を単離する工程を含む、請求項４０又は４１に記載の方法。
【請求項４３】
請求項２５、２６または２８から３４のいずれか一項に記載のタンパク質の産生方法であって、
（ｉ）請求項１から２３又は２７のいずれか一項に記載のタンパク質を得る工程；および
（ｉｉ）タンパク質のＦＲ２および／またはＦＲ３のシステイン残基の少なくとも１つに化合物を結合することにより、タンパク質を産生する工程を含む方法。
【請求項４４】
（ｉ）で得られたタンパク質のＦＲ２および／またはＦＲ３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、化合物をシステイン残基に結合する前にジスルフィド結合を還元する工程又は他の方法で分解する工程をさらに含む、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
ジスルフィド結合を還元する工程又は他の方法で分解する工程によりタンパク質に遊離チオール基が生成され、化合物がタンパク質への化合物の結合を可能にするチオール反応基を有する、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
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、化合物をセリン残基又はスレオニン残基に結合する工程をさらに含む、請求項４３から４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
医薬における、請求項１から３４のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項３５に記載の組成物の使用。
【請求項４８】
被験体における状態の治療方法又は予防方法であって、請求項１から３４のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項３５に記載の組成物をその必要性がある被験体に投与する工程を含む方法。
【請求項４９】
細胞への化合物の送達方法であって、請求項２５、２６または２８から３４のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項３５に記載の組成物に細胞を接触させる工程を含む方法。
【請求項５０】
被験体へのタンパク質又は組成物の投与により細胞を接触させる、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
被験体で抗原の局在を特定する方法又は抗原を検出する方法であって、
（ｉ）タンパク質が抗原に結合するのに十分な時間および条件下で、請求項２５、２６ま

たは２８から３４のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項３５に記載の組成物を被験体に投与する工程であって、タンパク質が検出可能な標識と結合する工程、ならびに（ｉｉ）検出可能な標識をインビボで検出又は局在を特定する工程、を含む方法。

【請求項５２】

被験体における状態の診断方法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および条件下で、被験体からの試料を請求項１から３４のいずれか一項に記載のタンパク質又は請求項３５に記載の組成物に接触させる工程、ならびに複合体を検出する工程を含み、複合体の検出が被験体の状態の診断又は予後判定である方法。

【請求項５３】

複合体のレベルを測定する工程を含み、該複合体のレベルの増強又は低減が被験体の状態の診断又は予後判定である、請求項５２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１２月２３日に出願された「Ｉｍｍｕｎｏ－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ　ａｎｄ　ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　ｐｒｏｄｕｃｉｎｇ　ｔｈｅｍ　２」と題する米国特許出願第６１／２８９４９７号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、該タンパク質に対する化合物の結合を促進するように修飾された又は該タンパク質に結合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（ＩｇＮＡＲ））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、例えば薬物と結合することができる（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体内で、全身的にではなく、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結合することにより、対象体内での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。

【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の手段は、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結合させることで、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。結合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当である。

【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結合は、例えば化合物が抗原結合に必要な領域に結合される場合に、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結合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結合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以上の炭水化物は、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シッフ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結合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の場合には、すなわち化合物の結合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。

【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結合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。

【発明の概要】

【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結合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２（ＦＲ２）および／またはフレームワーク領域３（ＦＲ３）内に、結合に利用可能であり、且つ可変領域の抗原結合部位から十分に外れていて、そこに結合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、ＦＲ２および／またはＦＲ３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、化合物に結合しない場合、それらの間にジスルフィド結合も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／又は異常に折り畳ま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結合が可能となる。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を含め、これらのタンパク質に対する多数の化合物の結合が、可変領域の抗原との結合を妨害しないことも実証した。

【００１０】

一例において、本発明は、

（ｉ）フレームワーク領域（ＦＲ）２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、ＦＲ２のシステイン残基の少なくとも２つが化合物に結合しない場合にＦＲ２の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残基；および／または

（ｉｉ）ＦＲ３および相補性決定領域（ＣＤＲ）２を含む領域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、該領域のシステイン残基の少なくとも２つが化合物に結合しない場合に該領域の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残基

を含む免疫グロブリン可変領域を含む単離タンパク質を提供する。

【００１１】

代替例または追加例において、本発明は、

（ｉ）フレームワーク領域（ＦＲ）２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、ＦＲ２のシステイン残基の少なくとも２つが化合物に結合しない場合にＦＲ２の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残基；および／または

（ｉｉ）ＦＲ３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、ＦＲ３のシステイン残基の少なくとも２つが化合物に結合しない場合にＦＲ３の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残基

を含む免疫グロブリン可変領域を含む単離タンパク質を提供する。

【００１２】

代替的又は追加例において、本発明は、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）とを含む単離タンパク質であって、可変領域の少なくとも１つが、

（ｉ）フレームワーク領域（ＦＲ）２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、ＦＲ２のシステイン残基の少なくとも２つが化合物に結合しない場合にＦＲ２の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残基；および／または

（ｉｉ）ＦＲ３および相補性決定領域（ＣＤＲ）２を含む領域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、該領域のシステイン残基の少なくとも２つが化合物に結合

しない場合に該領域の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残基
を含むタンパク質を提供する。
【００１３】
代替例又は追加例において、本発明は、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）とを含む単離タンパク質であって、可変領域の少なくとも１つが、
（ｉ）フレームワーク領域（ＦＲ）２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、ＦＲ２のシステイン残基の少なくとも２つが化合物に結合しない場合にＦＲ２の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残基；および／または
（ｉｉ）ＦＲ３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、ＦＲ３のシステイン残基の少なくとも２つが化合物に結合しない場合にＦＲ３の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残基
を含むタンパク質を提供する。
【００１４】
好ましくは、ＦＲ３のシステイン残基は、ＦＲ３の保存システイン残基に追加され、例えば、カバット付番方式によるV_Lの８８番目またはカバット付番方式によるV_Hの９２番目のシステイン残基に追加される。好ましくは、システイン残基は保存システイン残基とジスルフィド結合を形成しない。
【００１５】
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_Lと少なくとも１つのV_Hとを含む。
【００１６】
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。
【００１７】
好ましくは、システイン残基は、残基がジスルフィド結合により連結しない場合、化合物が該残基の少なくとも１つに結合できるように位置する。
【００１８】
好ましくは、ＦＲ２内のシステイン残基は、ＣＤＲ１とＣＤＲ２との間に位置し、ならびに／またはＦＲ３のシステイン残基はＣＤＲ２とＣＤＲ３との間に位置する。
【００１９】
一例において、システイン残基はＦＲ２および／またはＦＲ３の１以上のループ領域内に位置する。
【００２０】
代替例又は追加例において、システイン残基はV_H内にある。例えば、ＦＲ２内のシステイン残基はカバット付番方式に従って付番して残基３６から４９の間に位置し、ならびに／またはＦＲ３内のシステイン残基はカバット付番方式に従って残基６６から９４の間に位置する。好ましくは、ＦＲ２内のシステイン残基は、カバット付番方式に従って付番して残基３９から４５の間に位置し、ならびに／またはＦＲ３内のシステイン残基はカバット付番方式に従って付番して残基６８から８６の間に位置する。
【００２１】
一例において、ＦＲ２内のシステイン残基はカバット付番方式に従って付番して残基３９から４５の間に位置し、ならびに／またはＦＲ３内のシステイン残基はカバット付番方式に従って付番して残基６８から８１の間に位置する。一例において、ＦＲ３内のシステイン残基はカバット付番方式に従って付番して残基８２Ｃから８６の間に位置する。一例において、システイン残基はカバット付番方式に従って付番して残基６８から８１の間のＦＲ３内に位置する。
【００２２】
システイン残基の例示位置は、
（ｉ）カバット付番方式に従って付番してＦＲ２の３９および４３の位置；

（ｉｉ）カバット付番方式に従って付番してＦＲ２の３９および４５の位置；
（ｉｉｉ）カバット付番方式に従って付番してＦＲ３の７０および７９の位置；および／または
（ｉｖ）カバット付番方式に従って付番してＦＲ３の７２および７５の位置
である。

【００２３】
一例において、ＣＤＲ２およびＦＲ３を含む領域内のシステイン残基は、カバット付番方式に従って付番して残基５９から８６の間に位置する。例えば、該領域内のシステイン残基は、カバット付番方式に従って付番して残基５９から６３および／または６５から６８および／または８２Ｃから８６の間に位置する。

【００２４】
代替例又は追加例において、システイン残基はV_L内にある。好ましくは、ＦＲ２内のシステイン残基はカバット付番方式に従って付番して残基３５から４９の間に位置し、ならびに／またはＦＲ３内に位置するシステイン残基はカバット付番方式に従って付番して残基５７から８８の間に位置する。一例において、ＦＲ２内のシステイン残基は、カバット付番方式に従って付番して残基３８から４４の間に位置し、ならびに／またはＦＲ３内のシステイン残基はカバット付番方式に従って付番して残基６３から８２の間に位置する。

【００２５】
一例において、ＦＲ３内のシステイン残基は、カバット付番方式に従って付番して残基６３から７４の間に位置する。一例において、ＦＲ３内のシステイン残基は、カバット付番方式に従って付番して残基７８から８２の間に位置する。

【００２６】
一例において、システイン残基は、カバット付番方式に従って付番して残基６３から７４の間でＦＲ３内に位置する。

【００２７】
システイン残基の例示位置は、
（ｉ）カバット付番方式に従って付番してＦＲ２の３８および４２の位置；
（ｉｉ）カバット付番方式に従って付番してＦＲ２の３８および４４の位置；および／または
（ｉｉｉ）カバット付番方式に従って付番してＦＲ３の６５および７２の位置
である。

【００２８】
一例において、ＣＤＲ２およびＦＲ３を含む領域内のシステイン残基は、カバット付番方式に従って付番して残基５４から８２の間に位置する。代替例または追加例において、該領域内のシステイン残基はカバット付番方式に従って付番して残基５４から５８および／または６０から６３および／または７８から８２の間に位置する。

【００２９】
本発明は、可変領域内のさらなる残基又はそれを含むタンパク質の改変を明確に企図する。例えば、本発明は、システイン残基間に位置する残基の置換あるいはＣＤＲ内に天然に存在するシステイン残基の置換をさらに意図する。

【００３０】
一例において、本明細書に記載するタンパク質は、ヒト上皮増殖因子ＨＥＲ２、腫瘍関連糖タンパク質ＴＡＧ７２、ＭＵＣ１または前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）に特異的に結合する。他のタンパク質は、複数の抗原、例えば先に列挙した抗原に交差反応により結合し、またはタンパク質は多特異的なタンパク質である。

【００３１】
一例において、タンパク質は、配列番号：５９、６１、６３または６５のいずれか１以上に記載するV_HおよびV_L配列に少なくとも約８０％同一な配列を含み、ＦＲ２および／またはＦＲ３内に位置する２以上のシステイン残基を含むよう改変されたV_HおよびV

$_{L}$を含む。
【００３２】
一例において、タンパク質は、配列番号：１０１，１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、１３５、１３７、１３９、１４１、１４３、１４５、１４７または１４９のいずれか１以上に記載する配列に少なくとも約８０％同一な配列であって、任意でＮ－末端セリン残基を含む配列を含む。
【００３３】
本発明は、Ｆｖを含む単離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$Ｖ_{H}$に結合して抗原結合部位を形成する本発明の少なくとも１つのタンパク質を含む単離タンパク質も提供する。
【００３４】
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（ｓｃＦｖ）；
（ｉｉ）二量体ｓｃＦｖ（ｄｉ－ｓｃＦｖ）；又は
（ｉｉｉ）Ｆｃ又は重鎖定常ドメイン（$Ｃ_{H}$）２及び／又は$Ｃ_{H}$３に連結された（ｉ）及び／又は（ｉｉ）の少なくとも１つ
である。
【００３５】
或いは、タンパク質は、異なるポリペプチド鎖にある、抗原結合部位を形成する$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
である。
【００３６】
この明細書において、アヴィボディまたはアヴィボディズという用語は、ＷＯ９８／０４４００１号および／またはＷＯ９４／００７９２１号に記載されるものなど、任意のダイアボディ（ダイアボディズ）、トリアボディ（トリアボディズ）およびテトラボディ（テトラボディズ）を含むアヴィボディ（商標）製品のいずれかの形態を含む。
【００３７】
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。
【００３８】
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つに結合した化合物を含み、ここで化合物の結合は、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、対象体内での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以上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。
【００３９】
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をさらに含み、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しない場合、ジスルフィド結合はＦＲ１のシステイン残基間に形成可能

である。本発明に適応でき、ＦＲ１にシステイン残基を含むタンパク質を含む例示の可変領域は、同時係属の国際出願第ＰＣＴ／ＡＵ２０１０／０００８４７号に開示されており、この全ての内容は参照により組み入れられる。

【００４０】

一例において、システイン残基は、ジスルフィド結合が非還元条件下で存在するように位置する。

【００４１】

一例において、ＦＲ１のシステイン残基は、カバット付番方式に従って付番される残基２とＣＤＲ１との間に位置する。

【００４２】

一例において、システイン残基はＦＲ１の１以上のループ領域内に位置する。

【００４３】

代替例または追加例において、システイン残基は、V_H内にあり、カバット付番方式に従って付番される残基２から３０の間に位置する。好ましくは、システイン残基は、カバット付番方式に従って付番される残基７－２０および／または残基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、カバット付番方式に従って付番される残基６－１６の間に位置する。さらなる例において、残基は、カバット付番方式に従って付番される残基７－１６の間に位置する。

【００４４】

代替例または追加例において、システイン残基は、V_L内にあり、カバット付番方式に従って付番される残基２から２２の間に位置する。好ましくは、システイン残基は、カバット付番方式に従って付番される残基７－２０の間に位置する。さらなる例において、残基は、カバット付番方式に従って付番される残基７－１９の間に位置する。さらなる例において、残基は、カバット付番方式に従って付番される残基７－１７の間に位置する。

【００４５】

本発明の例示形態において、システイン残基はV_Hおよび／またはV_Lに保存されたシステイン残基に追加される。当業者は、保存システイン残基が少なくとも天然に存在する抗体の大部分でカバット付番方式に従って付番されるV_Lの残基２３および／またはV_Hの残基２２にあることを知っているであろう。

【００４６】

本発明の好ましい一形態において、該システイン残基は保存システイン残基に対してＮ末端に位置する。好ましくは、システイン残基は下記の１以上に位置する：

（ｉ）カバット付番方式に従って付番されるκV_Lの残基８および残基１１；

（ｉｉ）カバット付番方式に従って付番されるκV_Lの残基１４および残基１７；

（ｉｉｉ）カバット付番方式に従って付番されるλV_Lの残基７および残基１１；

（ｉｖ）カバット付番方式に従って付番されるλV_Lの残基１４および残基１７；

（ｖ）カバット付番方式に従って付番されるλV_Lの残基８および残基１２；

（ｖｉ）カバット付番方式に従って付番されるV_Hの残基７および残基１０；ならびに／または

（ｖｉｉ）カバット付番方式に従って付番されるV_Hの残基１３および残基１６。

【００４７】

本発明の他の好ましい例において、システイン残基は下記の１以上に位置する：

（ｉ）カバット付番方式に従って付番されるκV_Lの残基１３および残基１９；

（ｉｉ）カバット付番方式に従って付番されるλV_Lの残基１３および残基１９；

（ｉｉｉ）カバット付番方式に従って付番されるV_Hの残基６および残基９；ならびに／または

（ｉｖ）カバット付番方式に従って付番されるV_Hの残基１２および残基１８。

【００４８】

いずれかの例による本明細書に記載のタンパク質は、１以上、好ましくは１０または５または４または３または２未満の置換、好ましくは保存アミノ酸の置換または欠失または

挿入を含む。列挙する配列への例示的な変化は、Ｎ－末端セリンを欠失すること、または他のアミノ酸残基をセリンに置換すること（好ましくは、保存アミノ酸の置換）、ならびに／またはＣ末端リシンおよび／もしくはアルギニンを欠失もしくは置換することを含む。

【００４９】

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結合が可能となる。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結合することのできるタンパク質を作製した。

【００５０】

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、ここで化合物の結合はタンパク質の抗原への結合を妨げない。

【００５１】

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つに結合した第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。

【００５２】

一例において、いずれかの例による本明細書に記載のタンパク質は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）に結合する。一例において、ＰＥＧは単分散ＰＥＧである。一例において、単分散ＰＥＧは、４８以下のエチレングリコール単位、例えば約２４エチレングリコール単位を有する。

【００５３】

本発明のタンパク質の例は、ＦＲ２および／または３内に位置する２以上を含むように改変された配列番号５９、６１、６３、又は６５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、配列番号８３、８５、８７、または８９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％同一の配列であって、任意でＮ－末端セリン残基を含む配列を含む。

【００５４】

一例において、タンパク質ＴＡＧ７２は、配列番号：１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７または１１９に示される配列と少なくとも約８０％同一な配列を含むV_HおよびV_Lを含む。

【００５５】

別の例において、タンパク質は、Ｈｅｒ２に結合し、配列番号：１２７、１２９、１４１、１４３、１４５、１４７または１４９の１以上に示される配列と少なくとも約８０％同一な配列を含むV_HおよびV_Lを含む。

【００５６】

他の例において、該タンパク質はＭＵＣ１に結合し、配列番号：１３１，１３３、１３５、１３７または１３９の１以上に示される配列と少なくとも約８０％同一な配列を含むV_HおよびV_Lを含む。

【００５７】

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。
【００５８】
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。
【００５９】
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。例示核酸としては、コードされたタンパク質のＦＲ２およびＦＲ３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改変され、Ｎ末端セリン残基若しくはスレオニン残基を任意で含む配列番号：５８、６０、６２又は６４の任意の１以上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：８２、８４、８６または８８の任意の１つ以上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。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。
【００６０】
本発明の核酸をプロモーターに作動可能に連結し、それにより発現構築物を作製することができる。好ましくはかかる発現構築物又は核酸は、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。
【００６１】
本発明はまた、本発明の外因性核酸又は発現構築物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。
【００６２】
本発明により提供される核酸及び／又は発現構築物及び／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、本発明の発現構築物を、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。
【００６３】
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）ＦＲ２および／またはＦＲ３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つに化合物を結合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。
【００６４】
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以上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。

【００６５】
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結合される。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結合が起こる。
【００６６】
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結合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結合される化合物は、１以上のシステイン残基に結合される化合物とは異なる。
【００６７】
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結合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を提供する。
【００６８】
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。
【００６９】
上記に基づけば当業者には、本発明者らが、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。
【００７０】
従って、本発明はまた、医学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。
【００７１】
本発明は、細胞への化合物の送達方法であって、化合物に結合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対象に投与することによって接触させられる。
【００７２】
本発明はまた、対象体内の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結合される、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。
【００７３】
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。
【００７４】

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結合され、標識の検出が複合体の指標となる。

【００７５】

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。

【００７６】

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酸のライブラリも提供する。

【００７７】

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。

【００７８】

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、ＦＲ２および／またはＦＲ３内に位置する少なくとも２つのシステイン残基、ならびに任意でＮ－末端スレオニンまた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

を含む発現構築物のライブラリを作製するステップと、

（ｉｉｉ）発現構築物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。

【００７９】

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。

【００８０】

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。

【００８１】

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。かかる核酸は発現構築物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。

【図面の簡単な説明】

【００８２】

【図１Ａ】図１Ａは、V_Lフレームワーク１のアミノ酸がカバット残基８および１１（黒色塗り潰し）でシステインに（コンピュータ上で）変換されたＡＶＰ０４－５０について

作成された分子モデルを示す図表示である。
【図１Ｂ】図１Ｂは、抗原結合ドメイン（陰影付き）を示す図表示であり、ダイアボディＡＶＰ０４－５０のV_Lフレームワーク１カバット残基８および１１（黒色塗り潰し）におけるシステイン置換変異は空間で互いに離れている。
【図２Ａ】図２Ａは、ＡＶＰ０４－５０Ｈｉｓ－Ｔａｇアフィニティー・クロマトグラフィー精製の２８０ｎｍクロマトグラフを示すグラフ表示である。矢印は対象の溶出ピークを示す。
【図２Ｂ】図２Ｂは、ＡＶＰ０４－５０の陽イオン精製の結果を示すグラフ表示である。矢印は対象の溶出ピークを示す。
【図２Ｃ】図２Ｃは、ＡＶＰ０４－５０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示である。矢印は対象の溶出ピークを示す。点線は対象の画分を描く。
【図２Ｄ】図２Ｄは、ＡＶＰ０４－５０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示である。矢印は対象の溶出ピークを示す。
【図２Ｅ】図２Ｅは、還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果を示す写真表示のコピーであり、精製後のＡＶＰ０４－５０の純度を示す。ＭＷ．マーカー。矢印はＡＶＰ０４－０７タンパク質のバンドを示す。
【図３Ａ】図３Ａは、ＡＶＰ０４－０７（点線）およびその抗原であるウシ顎下腺ムチン（ＢＳＭ）と複合体形成したＡＶＰ０４－０７（ＴＡＧ７２を含む）（黒線）のカラム・シフト・アッセイの結果を示すグラフ表示である。
【図３Ｂ】図３Ｂは、ＡＶＰ０４－５０（点線）およびその抗原ＢＳＭと複合体形成したＡＶＰ０４－５０（ＴＡＧ７２を含む）（黒線）のカラム・シフト・アッセイの結果を示すグラフ表示である。
【図３Ｃ】図３Ｃは、ＡＶＰ０７－１７（点線）およびその抗原ＨＥＲ２（組み換えＨＥＲ２外部ドメイン）と複合体形成したＡＶＰ０７－１７（黒線）のカラム・シフト・アッセイの結果を示すグラフ表示である。
【図３Ｄ】図３Ｄは、ＡＶＰ０７－６３（点線）およびその抗原ＨＥＲ２（組み換えＨＥＲ２外部ドメイン）と複合体したＡＶＰ０７－６３（黒線）のカラム・シフト・アッセイの結果を示すグラフ表示である。
【図４】図４Ａは、部位特異的にユーロピウム標識されたＡＶＰ０４－５０およびその抗原ＢＳＭ（ＴＡＧ７２を含む）と複合体形成したＡＶＰ４－５０のカラム・シフト・アッセイの結果を示すグラフ表示である。ユーロピウムはピークシフトを測定するために各画分で追跡され、Ｅｕ－ＡＶＰ０４－５０／ＴＡＧ７２複合体は１４分で溶出する。
【図５Ａ】図５Ａは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを用いて分離されたペグ化ＡＶＰ０４－５０を示す写真表示のコピーである。ＭＷ．マーカー、１．裸ＡＶＰ０４－５０、２．ＡＶＰ０４－５０－ＰＥＧ２０００－ＮＨ２。
【図５Ｂ】図５Ｂは、ＡＶＰ０４－５０－ＰＥＧ２０００（黒線）のゲル濾過溶出の結果を示すグラフ表示である。
【図５Ｃ】図５Ｃは、ＡＶＰ０４－５０－ＰＥＧ２０００（点線）およびその抗原ＢＳＭ（ＴＡＧ２を含む）と複合体形成したＡＶＰ０４－５０－ＰＥＧ２０００（黒線）のカラム・シフト・アッセイの結果を示すグラフ表示である。
【図６Ａ】図６Ａは、本発明の幾つかの例によるフレームワーク領域ＦＲ２におけるシステイン残基の位置決定の図表示である。円で囲まれた「Ｓ」は、大半の哺乳類抗体可変（Ｖ）－ドメインに存在する１以上の保存システイン残基を表すが、円で囲まれていない「Ｓ」はＦＲ２における本発明のシステイン残基を表す。
【図６Ｂ】図６Ｂは、本発明の幾つかの例によるＦＲ３へのシステイン残基の幾らかの修飾および挿入を示す図表示である。円で囲まれた「Ｓ」は、大半の哺乳類抗体Ｖ－ドメインに存在する１以上の保存システイン残基を表すが、円で囲まれていない「Ｓ」は本発明のシステイン残基を表す。一例において、Ｃ２で描かれる状況は本発明に包含されない。
【図７】図７は、コンピュータ上でのホモロジーモデリングによる非変異ＡＶＰ０４－０７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）を示す図表示

である。変異用に同定された潜在ジスルフィド挿入残基は矢印で示す。
【図８】図８は、コンピュータ上でのホモロジーモデリングによる非変異ＡＶＰ０７－１７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）を示す図表示である。変異用に同定された潜在ジスルフィド挿入残基は矢印で示す。
【図９】図９は、コンピュータ上でのホモロジーモデリングによる非変異ＡＶＰ０２－６０ダイアボディ（配列番号６３に示される配列を含むポリペプチドを含む）を示す図表示である。変異用に同定された潜在ジスルフィド挿入残基は矢印で示す。
【図１０Ａ】図１０Ａは、ａ）フレームワーク領域により整列する最小二乗が示されるＡＶＰ０４－ｘｘダイアボディ・モデル（ＡＶＰ０４－０７、モデリング変異ｃ５を含むＡＶＰ０４－ｘｘおよびモデリング変異ｃ６を含むＡＶＰ０４－ｘｘ）のそれぞれのＦｖを示す一連の図表示である。全てのＦＲ２システイン変異の側鎖は球棒として示される。ｂ）Ａでモデリングされたアヴィボディについてのみを表す。ｃ）比較用にV_H　ＦＲ２領域およびそれらの変異を並べて表す。ｄ）比較用にV_L　ＦＲ２領域およびそれらの変異を並べて表す。ｃ）およびｄ）は参考のためカバット残基番号およびモデリング変異番号（ｃ５、ｃ６）でも表示される。
【図１０Ｂ】図１０Ｂは、ａ）フレームワーク領域により整列する最小二乗が示されるＡＶＰ０４－ｘｘダイアボディ・モデル（ＡＶＰ０４－０７、モデリング変異ｃ４を含むＡＶＰ０４－ｘｘ、モデリング変異ｃ８を含むＡＶＰ０４－ｘｘおよびモデリング変異ｃ９を含むＡＶＰ０４－ｘｘ）のそれぞれのＦｖ、ならびに球棒として示されるシステイン変異の側鎖を示す一連の図表示である。ｂ）ａでモデリングされたアヴィボディのみのＦＲ３領域を表す。ｃ）比較用にV_HＦＲ３領域およびそれらの変異を並べて表す。ｄ）比較用にV_LＦＲ３領域およびそれらの変異を並べて表す。ｃ）およびｄ）は参考のためカバット残基番号およびモデリング変異番号（ｃ４、ｃ８、ｃ９）でも表示される。
【図１１】図１１は、システイン置換がV_H－V_L方向におけるＡＶＰ０４－ｘｘダイアボディのモデル（各系列の第１列）、ａ－１残基リンカーをもつV_H－V_L方向のＡＶＰ０４－ｘｘトリアボディ（各系列の第２列）、ゼロ残基リンカーをもつV_H－V_L方向のＡＶＰ０４－ｘｘトリアボディ（各系列の第３列）、１ＬＭＫダイアボディでモデリングされたＦｖ空間的定位でV_L－V_H方向のＡＶＰ０４－ｘｘダイアボディ（各系列の第４列）、１ＭＯＥダイアボディでモデリングされたＦｖ空間的定位でV_L－V_H方向のＡＶＰ０４－ｘｘダイアボディ（各系列の第５列）、１残基リンカーをもつV_L－V_H方向のＡＶＰ０４－ｘｘトリアボディ（各系列の第６列）および２残基リンカーをもつV_L－V_H方向のＡＶＰ０４－ｘｘトリアボディ（各系列の第７列および最後列）に照らして表示された個々の候補についての接触可能表面積（ＡＳＡ）値のグラフ表示である。ｃ６により設計されるモデリング変異は、Ｈ３９－Ｈ４３およびＬ３８－Ｌ４２ジスルフィド変異を含み、同様にｃ５についてはＨ３９－Ｈ４５／Ｌ３８－Ｌ４４、ｃ８についてはＨ７０－Ｈ７９／Ｌ６５－Ｌ７２、ｃ９についてはＨ７２－Ｈ７５およびｃ４についてはＨ８２Ｃ－Ｈ８６／Ｌ７８－Ｌ８２を含む。エラー・バーはＡＳＡ値の標準偏差を示し、ダイアボディについてはｎ＝２０、トリアボディについてはｎ＝３０である。
【図１２Ａ】図１２Ａは、Ａ）フレームワーク領域により整列する最小二乗が示されるＡＶＰ０２－ｘｘダイアボディ・モデル（ＡＶＰ０２－６０、モデリング変異ｃ５を含むＡＶＰ０２－ｘｘ、およびモデリング変異ｃ６を含むＡＶＰ０２－ｘｘ）のそれぞれのＦｖを示す一連の図表示である。全てのＦＲ２システイン変異の側鎖は球棒として示される。Ｂ）Ａでモデリングされたアヴィボディのみを表す。Ｃ）比較用にV_HＦＲ２領域およびそれらの変異を並べて表す。Ｄ）比較用にV_LＦＲ２領域およびそれらの変異を並べて表す。Ｃ）およびＤ）は参考のためカバット残基番号およびモデリング変異番号（ｃ５、ｃ６）でも表示される。
【図１２Ｂ】図１２Ｂは、フレームワーク領域により整列する最小二乗が示されるＡＶＰ０２－ｘｘダイアボディ・モデル（ＡＶＰ０２－６０、モデリング変異ｃ４を含むＡＶＰ０２－ｘｘ、モデリング変異ｃ８を含むＡＶＰ０２－ｘｘおよびモデリング変異ｃ９を含むＡＶＰ０２－ｘｘ）のそれぞれのＦｖ、ならびに球棒として示されるシステイン変異の

側鎖を示す一連の図表示である。Ｂ）ＡでモデリングされたアヴィボディのみのＦＲ３領域を表す。Ｃ）比較用にV_HＦＲ３領域およびそれらの変異を並べて表す。Ｄ）比較用にV_LＦＲ３領域およびそれらの変異を並べて表す。Ｃ）およびＤ）は参考のためカバット残基番号およびモデリング変異番号（ｃ４、ｃ８、ｃ９）でも表示される。

【図１３Ａ】図１３Ａは、Ａ）フレームワーク領域により整列する最小二乗が示されるＡＶＰ０７－ｘｘダイアボディ・モデル（ＡＶＰ０７－１７、モデリング変異ｃ５を含むＡＶＰ０７－ｘｘ、およびモデリング変異ｃ６を含むＡＶＰ０７－ｘｘ）のそれぞれのＦｖを示す一連の図表示である。全てのＦＲ２システイン変異の側鎖は球棒として示される。Ｂ）Ａでモデリングされたアヴィボディのみを表す。Ｃ）比較用にV_HＦＲ２領域およびそれらの変異を並べて表す。Ｄ）比較用にV_LＦＲ２領域およびそれらの変異を並べて表す。Ｃ）およびＤ）は参考のためカバット残基番号およびモデリング変異番号（ｃ５、ｃ６）でも表示される。

【図１３Ｂ】図１３Ｂは、フレームワーク領域により整列する最小二乗が示されるＡＶＰ０７－ｘｘダイアボディ・モデル（ＡＶＰ０７－１７、モデリング変異ｃ４を含むＡＶＰ０７－ｘｘ、モデリング変異ｃ８を含むＡＶＰ０７－ｘｘおよびモデリング変異ｃ９を含むＡＶＰ０７－ｘｘ）のそれぞれのＦｖ、ならびに球棒として示されるシステイン変異の側鎖を示す一連の図表示である。Ｂ）ＡでモデリングされたアヴィボディのみのＦＲ３領域を表す。Ｃ）比較用にV_HＦＲ３領域およびそれらの変異を並べて表す。Ｄ）比較用にV_LＦＲ３領域およびそれらの変異を並べて表す。Ｃ）およびＤ）は参考のためカバット残基番号およびモデリング変異番号（ｃ４、ｃ８、ｃ９）でも表示される。

【図１４】図１４は、システイン置換がV_H－V_L方向におけるＡＶＰ０２－ｘｘダイアボディのモデル（各系列の第１列）、ａ－１残基リンカーをもつV_H－V_L方向のＡＶＰ０２－ｘｘトリアボディ（各系列の第２列）、ゼロ残基リンカーをもつV_H－V_L方向のＡＶＰ０２－ｘｘトリアボディ（各系列の第３列）、１ＬＭＫダイアボディでモデリングされたＦｖ空間的定位でV_L－V_H方向のＡＶＰ０２－ｘｘダイアボディ（各系列の第４列）、１ＭＯＥダイアボディでモデリングされたＦｖ空間的定位でV_L－V_H方向のＡＶＰ０２－ｘｘダイアボディ（各系列の第５列）、１残基リンカーをもつV_L－V_H方向のＡＶＰ０２－ｘｘトリアボディ（各系列の第６列）および２残基リンカーをもつV_L－V_H方向のＡＶＰ０２－ｘｘトリアボディ（各系列の第７および最後列）に照らして表示された個々の候補についての接触可能表面積（ＡＳＡ）値を示すグラフ表示である。ｃ６により設計されるモデリング変異は、Ｈ３９－Ｈ４３およびＬ３８－Ｌ４２ジスルフィド変異を含み、同様にｃ５についてはＨ３９－Ｈ４５／Ｌ３８－Ｌ４４、ｃ８についてはＨ７０－Ｈ７９／Ｌ６５－Ｌ７２、ｃ９についてはＨ７２－Ｈ７５およびｃ４についてはＨ８２Ｃ－Ｈ８６／Ｌ７８－Ｌ８２を含む。エラー・バーはＡＳＡ値の標準偏差を示し、ダイアボディについてはｎ＝２０、トリアボディについてはｎ＝３０である。

【図１５】図１５は、システイン置換がV_H－V_L方向におけるＡＶＰ０７－ｘｘダイアボディのモデル（各系列の第１列）に照らして表示された個々の候補についての接触可能表面積（ＡＳＡ）値を示すグラフ表示である。ａ－１残基リンカーをもつV_H－V_L方向のＡＶＰ０７－ｘｘトリアボディ（各系列の第２列）、ゼロ残基リンカーをもつV_H－V_L方向のＡＶＰ０７－ｘｘトリアボディ（各系列の第３列）、１ＬＭＫダイアボディでモデリングされたＦｖ空間的定位でV_L－V_H方向のＡＶＰ０７－ｘｘダイアボディ（各系列の第４列）、１ＭＯＥダイアボディでモデリングされたＦｖ空間的定位でV_L－V_H方向のＡＶＰ０７－ｘｘダイアボディ（各系列の第５列）、１残基リンカーをもつV_L－V_H方向のＡＶＰ０７－ｘｘトリアボディ（各系列の第６列）および２残基リンカーをもつV_L－V_H方向のＡＶＰ０７－ｘｘトリアボディ（各系列の第７列および最後列）。ｃ６により設計されるモデリング変異は、Ｈ３９－Ｈ４３およびＬ３８－Ｌ４２ジスルフィド変異を含み、同様にｃ５についてはＨ３９－Ｈ４５／Ｌ３８－Ｌ４４、ｃ８についてはＨ７０－Ｈ７９／Ｌ６５－Ｌ７２、ｃ９についてはＨ７２－Ｈ７５およびｃ４についてはＨ８２Ｃ－Ｈ８６／Ｌ７８－Ｌ８２を含む。エラー・バーはＡＳＡ値の標準偏差を示し、ダイアボディについてはｎ＝２０、トリアボディについてはｎ＝３０である。

【図１６】図１６は、アヴィボディモデルの天然Ｖドメインおよびシステイン変異Ｖドメインについての二乗平均平方根偏差（ＲＭＳＤｓ）のグラフ表示であり、ＨまたはＬ－ＶＨＶＬＤ５、ＨまたはＬ－ＶＨＶＬＴ－１、ＨまたはＬ－ＶＨＶＬＴ０、ＨまたはＬ－ＶＬＶＨＤ　ｌｍｋ５、ＨまたはＬ－ＶＬＶＨＤ　ｍｏｅ５、ＨまたはＬ－ＶＬＶＨＴ１およびＨまたはＬ－ＶＬＶＨＴ２は、実施例９．８に定義記載される構築物群モデルからのＶＨまたはＶＬドメインである。全てのアヴィボディモデルは、全ての他の天然（非チオール化）アヴィボディモデル（各構築物群の第１列）と比較し、続いてモデリング変異ｃ６（Ｈ３９－Ｈ４３およびＬ３８－Ｌ４２、各構築物群の第２列）、モデリング変異ｃ５（Ｈ３９－Ｈ４５／Ｌ３８－Ｌ４４、各構築物群の第３列）、モデリング変異ｃ８（Ｈ７０－Ｈ７９／Ｌ６５－Ｌ７２、各構築物群の第４列）、モデリング変異ｃ９（Ｈ７２－Ｈ７５、各構築物群の第５列）およびモデリング変異ｃ４（Ｈ８２Ｃ－Ｈ８６／Ｌ７８－Ｌ８２、各構築物群の第６列および最後列）の全作成モデルと比較した。エラー・バーはＲＭＳＤ値の標準偏差を示し、ダイアボディについてはｎ＝４０、トリアボディについてはｎ＝９０である。

【図１７Ａ】図１７Ａは、ＡＶＰ０４－１１１（配列番号：１０７）のＨｉｓ－ｔａｇ固定化金属アフィニティー・クロマトグラフィー精製の２８０ｎｍクロマトグラフを示すグラフ図表である。矢印は対象の溶出ピークを示す。点線は溶出緩衝液の割合を示す。

【図１７Ｂ】図１７Ｂは、ＡＶＰ０４－１２０（配列番号：１１３）のＨｉｓ－ｔａｇ固定化金属アフィニティー・クロマトグラフィー精製の２８０ｎｍクロマトグラフを示すグラフ図表である。矢印は対象の溶出ピークを示す。点線は溶出緩衝液の割合を示す。

【図１７Ｃ】図１７Ｃは、ＡＶＰ０４－１２１（配列番号：１１５）のＨｉｓ－ｔａｇ固定化金属アフィニティー・クロマトグラフィー精製の２８０ｎｍクロマトグラフを示すグラフ図表である。矢印は対象の溶出ピークを示す。点線は溶出緩衝液の割合を示す。

【図１８Ａ】図１８Ａは、ＡＶＰ０４－１１１（配列番号：１０７）の陰イオン交換クロマトグラフィー精製の２８０ｎｍクロマトグラフを示すグラフ図表である。矢印は対象の溶出ピークを示す。点線は溶出緩衝液の割合を示す。

【図１８Ｂ】図１８Ｂは、ＡＶＰ０４－１２０（配列番号：１１３）の陰イオン交換クロマトグラフィー精製の２８０ｎｍクロマトグラフを示すグラフ図表である。矢印は対象の溶出ピークを示す。点線は溶出緩衝液の割合を示す。

【図１８Ｃ】図１８Ｃは、ＡＶＰ０４－１２１（配列番号：１１５）の陰イオン交換クロマトグラフィー精製の２８０ｎｍクロマトグラフを示すグラフ図表である。矢印は対象の溶出ピークを示す。点線は溶出緩衝液の割合を示す。

【図１９Ａ】図１９Ａは、ＡＶＰ０４－１１１（配列番号：１０７）のゲル濾過クロマトグラフィー精製の２８０ｎｍクロマトグラフを示すグラフ図表である。矢印は対象の溶出ピークを示す。

【図１９Ｂ】図１９Ｂは、ＡＶＰ０４－１２０（配列番号：１１３）のゲル濾過クロマトグラフィー精製の２８０ｎｍクロマトグラフを示すグラフ図表である。矢印は対象の溶出ピークを示す。

【図１９Ｃ】図１９Ｃは、ＡＶＰ０４－１２１（配列番号：１１５）のゲル濾過クロマトグラフィー精製の２８０ｎｍクロマトグラフを示すグラフ図表である。矢印は対象の溶出ピークを示す。

【図２０Ａ】図２０Ａは、ＡＶＰ０４－１１１（配列番号：１０７）のサイズ排除クロマトグラフィー分析の２８０ｎｍクロマトグラフを示すグラフ図表である。矢印は対象の溶出ピークを示す。

【図２０Ｂ】図２０Ｂは、ＡＶＰ０４－１２０（配列番号：１１３）のサイズ排除クロマトグラフィー分析の２８０ｎｍクロマトグラフを示すグラフ図表である。矢印は対象の溶出ピークを示す。

【図２０Ｃ】図２０Ｃは、ＡＶＰ０４－１２１（配列番号：１１５）のサイズ排除クロマトグラフィー分析の２８０ｎｍクロマトグラフを示すグラフ図表である。矢印は対象の溶出ピークを示す。

【図２１Ａ】図２１Ａは、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アヴィボディ（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）の一連のグラフ表示を含む。
【図２１Ｂ】図２１Ｂは、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アヴィボディ（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）の一連のグラフ表示を含む。
【図２２Ａ】図２２Ａは、本明細書に記載されるアヴィボディ（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一連のグラフ表示を含む。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アヴィボディの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２２Ｂ】図２２Ｂは、本明細書に記載されるアヴィボディ（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一連のグラフ表示を含む。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アヴィボディの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２３Ａ】図２３Ａは、Ａ）対照アヴィボディタンパク質および無傷ＩｇＧならびにＢ）操作システイン置換変異を保有するアヴィボディタンパク質について、エルマンアッセイによるタンパク質のチオール反応性についての一連のグラフ表示である。黒色の横線はＴＣＥＰによる還元前後の１：１比のチオール反応性を表す。
【図２３Ｂ】図２３Ｂは、Ａ）対照アヴィボディタンパク質および無傷ＩｇＧならびにＢ）操作システイン置換変異を保有するアヴィボディタンパク質について、エルマンアッセイによるタンパク質のチオール反応性についての一連のグラフ表示である。黒色の横線はＴＣＥＰによる還元前後の１：１比のチオール反応性を表す。
【図２４】図２４は、ペグ化試料（ＡＶＰ０４－１１１（配列番号：１０７）、ＡＶＰ０４－１２０（配列番号：１１３）およびＡＶＰ０４－１２１（配列番号：１１５））のエレクトロスプレイ・イオン化質量分析後のＭＳスペクトル例のグラフ表示である。
【図２５Ａ】図２５Ｂは、本明細書に記載されるＰＥＧ化アヴィボディタンパク質（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を示す一連のグラフ表示である。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されたアヴィボディ－ＰＥＧ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２５Ｂ】図２５Ｂは、本明細書に記載されるＰＥＧ化アヴィボディタンパク質（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を示す一連のグラフ表示である。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されたアヴィボディ－ＰＥＧ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。
【００８３】
配列表への鍵
配列番号１－ヒト抗体重鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号２－ヒト抗体重鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号３－ヒト抗体重鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号４－ヒト抗体重鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号５－ヒト抗体重鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号６－ヒト抗体重鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号７－ヒト抗体重鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号８－ヒト抗体重鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号９－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；

配列番号１０－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号１１－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号１２－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号１３－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号１４－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号１５－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号１６－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号１７－ヒト抗体λ軽鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号１８－ヒト抗体λ軽鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号１９－ヒト抗体λ軽鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号２０－ヒト抗体λ軽鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号２１－ヒト抗体λ軽鎖のＦＲ２のアミノ酸配列；
配列番号２２－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号２３－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号２４－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号２５－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号２６－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号２７－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号２８－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号２９－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号３０－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号３１－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号３２－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号３３－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号３４－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号３５－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号３６－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号３６－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号３７－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号３８－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号３９－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号４０－ヒト抗体重鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号４１－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号４２－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号４３－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号４４－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号４５－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号４６－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号４７－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号４８－ヒト抗体κ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号４９－ヒト抗体λ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号５０－ヒト抗体λ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号５１－ヒト抗体λ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号５２－ヒト抗体λ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号５３－ヒト抗体λ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号５４－ヒト抗体λ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号５５－ヒト抗体λ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号５６－ヒト抗体λ軽鎖のＦＲ３のアミノ酸配列；
配列番号５７－リンカーのアミノ酸配列；
配列番号５８－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５９－ＡＶＰ０４－０７抗ＴＡＧ７２ダイアボディのアミノ酸配列；
配列番号６０－ＡＶＰ０７－１７抗Ｈｅｒ２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－ＡＶＰ０７－１７抗Ｈｅｒ２ダイアボディのアミノ酸配列；
配列番号６２－ＡＶＰ０２－６０抗ＭｕｃＩ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－ＡＶＰ０２－６０抗ＭｕｃＩダイアボディのアミノ酸配列；
配列番号６４－ＣＤＲ３Ｈシステイン残基のＣｙｓ１０４（カバット付番Ｈ１００）およびＣｙｓ１０９（Ｈ１００Ｅ）をアラニンで置換し且つＮ－末端セリンを含み、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；
配列番号６５－ＣＤＲ３Ｈシステイン残基のＣｙｓ１０４（カバット付番Ｈ１００）およびＣｙｓ１０９（Ｈ１００Ｅ）をアラニンで置換し且つＮ－末端セリンを含み、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６６－ＡＶＰ０４－０７においてＮ末端Ｇｌｎ残基をＳｅｒ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－ＡＶＰ０４－０７においてＮ末端Ｇｌｎ残基をＳｅｒ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６８－ＡＶＰ０４－０７のV_LＦＲ２において３８および４２の位置にシステイン残基置換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６９－ＡＶＰ０４－０７のV_LＦＲ２において３８および４２の位置にシステイン残基置換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７０－ＡＶＰ０４－０７のV_LＦＲ２において３８および４４の位置にシステイン残基置換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
７１－ＡＶＰ０４－０７のV_LＦＲ２において３８および４４の位置にシステイン残基置換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
７２－ＡＶＰ０４－０７のV_LＦＲ３において７８および８２の位置にシステイン残基置換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７３－ＡＶＰ０４－０７のV_LＦＲ３において７８および８２の位置にシステイン残基置換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７４－ＡＶＰ０４－０７のV_HＦＲ２において３９および４３の位置にシステイン残基置換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７５－ＡＶＰ０４－０７のV_HＦＲ２において３９および４３の位置にシステイン残基置換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７６－ＡＶＰ０４－０７のV_HＦＲ２において３９および４５の位置にシステイン残基置換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７７－ＡＶＰ０４－０７のV_HＦＲ２において３９および４５の位置にシステイン残基置換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７８－ＡＶＰ０４－０７のV_HＦＲ３において８２Ｃおよび８６の位置にシステイン残基置換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７９－ＡＶＰ０４－０７のV_HＦＲ３において８２Ｃおよび８６の位置にシステイン残基置換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８０－ＡＶＰ０４－０７のV_HＦＲ３において７０および７９の位置にシステイン残基置換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８１－ＡＶＰ０４－０７のV_HＦＲ３において７０および７９の位置にシステイン残基置換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８２－ＡＶＰ０４－０７のV_HＦＲ３において７２および７５の位置にシステイン残基置換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８３－ＡＶＰ０４－０７のV_HＦＲ３において７２および７５の位置にシステイ

ン残基置換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８４－ＡＶＰ０４－０７のV_LＦＲ３において６５および７２の位置にシステイン残基置換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８５－ＡＶＰ０４－０７のV_LＦＲ３において６５および７２の位置にシステイン残基置換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８６－ｓｃＦｖ発現用にＡＶＰ０４－７９のリンカー残基を修飾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８７－ｓｃＦｖ発現用にＡＶＰ０４－７９のリンカー残基を修飾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８８－トリアボディ発現用にＡＶＰ０４－７９のリンカー残基を修飾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８９－トリアボディ発現用にＡＶＰ０４－７９のリンカー残基を修飾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９０－ＣＤＲ３Ｈシステイン残基をアラニンで置換し、ＡＶＰ０７－８９と命名される、ＡＶＰ０７－１７抗ＨＥＲ２ダイアボディ用の変異原性プライマーのヌクレオチド配列
配列番号９１－ＣＤＲ３Ｈシステイン残基をアラニンで置換し、ＡＶＰ０７－８６と命名される、ＡＶＰ０７－１７抗ＨＥＲ２ダイアボディ用の変異原性プライマーのヌクレオチド配列
配列番号９２－ＡＶＰ０２－６０のV_LＦＲ２において３８および４２の位置にシステイン残基置換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９３－ＡＶＰ０２－６０のV_LＦＲ２において３８および４２の位置にシステイン残基置換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９４－ＡＶＰ０２－６０のV_HＦＲ２において３９および４３の位置にシステイン残基置換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９５－ＡＶＰ０２－６０のV_HＦＲ２において３９および４３の位置にシステイン残基置換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９６－ＡＶＰ０７－８６のV_LＦＲ２において３８および４２の位置にシステイン残基置換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９７－ＡＶＰ０７－８６のV_LＦＲ２において３８および４２の位置にシステイン残基置換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９８－ＡＶＰ０７－８６のV_HＦＲ２において３９および４３の位置にシステイン残基置換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９９－ＡＶＰ０７－８６のV_HＦＲ２において３９および４３の位置にシステイン残基置換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１００－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－７９と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのヌクレオチド配列
配列番号１０１－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－７９と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのアミノ酸配列
配列番号１０２－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４４にシステイン置換変異を含む抗ＴＡＧ７２ダイアボディのヌクレオチド配列はＡＶＰ０４－８０と命名される。
配列番号１０３－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４４にシステイン置換変異を含む抗ＴＡＧ７２ダイアボディのアミノ酸配列はＡＶＰ０４－８０と命名される。
配列番号１０４－V_LＦＲ３カバット位置の７８および８２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－８３と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１０５－V_LＦＲ３カバット位置の７８および８２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－８３と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１０６－V_HＦＲ２カバット位置の３９および４３にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１１１と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１０７－V_HＦＲ２カバット位置の３９および４３にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１１１と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのアミノ酸配列。

配列番号１０８－V_HＦＲ２カバット位置の３９および４５にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１１２と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１０９－V_HＦＲ２カバット位置の３９および４５にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１１２と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１１０－V_HＦＲ３カバット位置の８２Ｃおよび８６にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１１４と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１１１－V_HＦＲ３カバット位置の８２Ｃおよび８６にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１１４と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１１２－V_HＦＲ３カバット位置の７０および７９にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１２０と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１１３－V_HＦＲ３カバット位置の７０および７９にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１２０と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１１４－V_HＦＲ３カバット位置の７２および７５にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１２１と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１１５－V_HＦＲ３カバット位置の７２および７５にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１２１と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１１６－V_LＦＲ３カバット位置の６５および７２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１２３と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１１７－V_LＦＲ３カバット位置の６５および７２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１２３と命名される抗ＴＡＧ７２ダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１１８－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１２４と命名される抗ＴＡＧ７２ｓｃＦｖのヌクレオチド配列。
配列番号１１９－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１２４と命名される抗ＴＡＧ７２ｓｃＦｖのアミノ酸配列。
配列番号１２０－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１２５と命名される抗ＴＡＧ７２トリアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１２１－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０４－１２５と命名される抗ＴＡＧ７２トリアボディのアミノ酸配列。
配列番号１２２－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０２－１１５と命名される抗ＭｕｃＩダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１２３－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０２－１１５と命名される抗ＭｕｃＩダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１２４－V_HＦＲ２カバット位置の３９および４３にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０２－１１６と命名される抗ＭｕｃＩダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１２５－V_HＦＲ２カバット位置の３９および４３にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０２－１１６と命名される抗ＭｕｃＩダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１２６－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０７－１１７と命名される抗Ｈｅｒ２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１２７－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０７－１１７と命名される抗Ｈｅｒ２ダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１２８－V_HＦＲ２カバット位置の３９および４３にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０７－１１８と命名される抗Ｈｅｒ２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１２９－V_HＦＲ２カバット位置の３９および４３にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０７－１１８と命名される抗Ｈｅｒ２ダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１３０－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４４にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０２－１２６と命名される抗ＭｕｃＩダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１３１－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４４にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０２－１２６と命名される抗ＭｕｃＩダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１３２－V_HＦＲ２カバット位置の３９および４５にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０２－１２７と命名される抗ＭｕｃＩダイアボディのヌクレオチド配列。

配列番号１３３－V_HＦＲ２カバット位置の３９および４５にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０２－１２７と命名される抗ＭｕｃＩダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１３４－V_LＦＲ３カバット位置の６５および７２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０２－１２８と命名される抗ＭｕｃＩダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１３５－V_LＦＲ３カバット位置の６５および７２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０２－１２８と命名される抗ＭｕｃＩダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１３６－V_HＦＲ３カバット位置の７０および７９にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０２－１２９と命名される抗ＭｕｃＩダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１３７－V_HＦＲ３カバット位置の７０および７９にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０２－１２９と命名される抗ＭｕｃＩダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１３８－V_HＦＲ３カバット位置の７２および７５にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０２－１３０と命名される抗ＭｕｃＩダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１３９－V_HＦＲ３カバット位置の７２および７５にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０２－１３０と命名される抗ＭｕｃＩダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１４０－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４４にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０７－１３１と命名される抗Ｈｅｒ２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１４１－V_LＦＲ２カバット位置の３８および４４にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０７－１３１と命名されるＨｅｒ２ダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１４２－V_HＦＲ２カバット位置の３９および４５にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０７－１３２と命名される抗Ｈｅｒ２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１４３－V_HＦＲ２カバット位置の３９および４５にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０７－１３２と命名される抗Ｈｅｒ２ダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１４４－V_LＦＲ３カバット位置の６５および７２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０７－１３３と命名される抗Ｈｅｒ２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１４５－V_LＦＲ３カバット位置の６５および７２にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０７－１３３と命名される抗Ｈｅｒ２ダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１４６－V_HＦＲ３カバット位置の７０および７９にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０７－１３４と命名される抗Ｈｅｒ２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１４７－V_HＦＲ３カバット位置の７０および７９にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０７－１３４と命名される抗Ｈｅｒ２ダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１４８－V_HＦＲ３カバット位置の７２および７５にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０７－１３５と命名される抗Ｈｅｒ２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１４９－V_HＦＲ３カバット位置の７２および７５にシステイン置換変異を含み、ＡＶＰ０７－１３５と命名される抗Ｈｅｒ２ダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１５０－ヒトＨＥＲ２のアミノ酸配列。
配列番号１５１－ヒトＰＳＭＡのアミノ酸配列。
配列番号１５２－ヒトＭＵＣ１イソ型のアミノ酸配列。
配列番号１５３－幾つかの癌形態で発現するヒトＭＵＣ１イソ型のアミノ酸配列。
配列番号１５４－ＡＶＰ０４－５０と命名される抗ＨＥＲ２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１５５－ＡＶＰ０４－５０と命名される抗ＨＥＲ２ダイアボディのアミノ酸配列。
配列番号１５６－ＡＶＰ０７－１７と命名される抗ＨＥＲ２ダイアボディのヌクレオチド配列。
配列番号１５７－ＡＶＰ０７－１７と命名される抗ＨＥＲ２ダイアボディのアミノ酸配列。

【発明を実施するための形態】
【００８４】
好ましい実施形態の詳細な説明概要
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。

【００８５】

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。

【００８６】

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。

【００８７】

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。

【００８８】

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。

【００８９】

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。

【００９０】

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、カバット（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。

【００９１】

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ず、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。

【００９２】

本明細書で使用されるように、特定の位置番号（例えば、カバット付番システムに従う）に基づくアミノ酸残基又はヌクレオチド残基の位置の定義に即して、「～の間」という用語は、列挙する２残基と列挙する２残基との間に位置する任意の残基を意味すると解釈するべきである。例えば、「残基３８～４２の間」という用語は、残基３８、３９、４０、４１および４２を含むと理解されるべきである。

【００９３】

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。

【００９４】

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。

【００９５】

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κ軽鎖又はλ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以上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α、δ、ε、γ、又はμ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以上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_H2、C_H3など）を含むことができ、定常ドメインC_H1とＣｍとの間に特定され得るヒンジ領域を含むことができる。抗体は任意の種類（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（例えば、IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1及びIgA_2）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（ＩｇＮＡＲ））が含まれる。概して、ラクダ科動物抗体及びＩｇＮＡＲは、V_Hを含むがV_L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、ＦＲ２および／またはＦＲ３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。

【００９６】

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、ＣＤＲ、すなわちＣＤＲｌ、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３、並びにＦＲのアミノ酸配列を含む部分を指す。ＩｇＮＡＲの場合、用語「可変領域」にはＣＤＲ２の存在は必要でない。V_Hは重鎖の可変領域を指す。V_L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、ＣＤＲ及びＦＲに割り当てられるアミノ酸位置はカバット（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Ｃｈｏｔｈｉａ及びＬｅｓｋ（１９８７年及び／又は１９８９年及び／又はＡｌ－Ｌａｚｉｋａｎｉら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。

【００９７】

本明細書で使用されるように、用語「重鎖可変領域」又は「V_H」は、１以上の抗原と結合でき、好ましくは１以上の抗原と特異的に結合でき、且つ少なくともＦＲ２および／またはＦＲ３を含むタンパク質を意味すると解釈するべきである。重鎖の例示的ＦＲ２および／またはＦＲ３の配列を本明細書に提供する（例えば、配列番号１から８または２２から４０を参照）。好ましくは、重鎖は３つ又は４つのＦＲ（例えば、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及び場合によりＦＲ４）を、３つのＣＤＲと共に含む。好ましくは、重鎖は以下の通りに位置するＦＲ及びＣＤＲを含む：カバット付番方式に従って付番して、残基１～３０（ＦＲ１）、３１～２５（ＣＤＲ１）、３６～４９（ＦＲ２）、５０～６５（ＣＤＲ２）、６６～９４（ＦＲ３）、９５～１０２（ＣＤＲ３）及び１０３～１１３（ＦＲ４）。一例において、重鎖は、前記重鎖及び複数の（好ましくは３又は４の）定常ドメインを含み、又は定常断片（Ｆｃ）に連結された免疫グロブリンに由来する。

【００９８】

本明細書で使用されるとき、用語「軽鎖可変領域」又は「V_L」は、１以上の抗原と結合でき、好ましくは１以上の抗原と特異的に結合でき、且つ少なくともＦＲ２および／またはＦＲ３を含むタンパク質を意味すると解釈するべきである。軽鎖の例示的ＦＲ２および／またはＦＲ３の配列を本明細書に提供する（例えば、配列番号９から２１または４１から５６を参照）。好ましくは、軽鎖は３又は４のＦＲ（例えば、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及び場合によりＦＲ４）を、３つのＣＤＲと共に含む。好ましくは、軽鎖は以下のとおり位置するＦＲ及びＣＤＲを含む：カバット付番方式に従って付番して、残基１～２３（ＦＲｌ）、２４～３４（ＣＤＲ１）、３５～４９（ＦＲ２）、５０～５６（ＣＤＲ２）、５７～８８（ＦＲ３）、８９～９７（ＣＤＲ３）及び９８～１０７（ＦＲ４）。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（Ｆｃ）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。

【００９９】

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、ＣＤＲ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、ＦＲｌ、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４として特定される４つのＦＲを有する。ＣＤＲをカバット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。λＬＣＦＲ１は、κＬＣＦＲ１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（ＨＣＦＲｌ）、３６～４９（ＨＣＦＲ２）、６６～９４（ＨＣＦＲ３）、及び１０３～１１３（ＨＣＦＲ４）に位置する。

【０１００】

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２」（ＦＲ２

）は、ＣＤＲ１とＣＤＲ２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）カバット（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、十分に確立されたカバット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。カバット付番システムに従って、ＦＲ２はV_Hの残基３６から４９およびV_Lの３５から４９に位置付けられる。

【０１０１】

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３」（ＦＲ３）はＣＤＲ２とＣＤＲ３間の残基として定義される。ＦＲ２と同様に、これらの残基は、１）Ｋａｂａｔ（１９８７年および／または２００１年）ならびに２）Ｃｈｏｔｈｉａ及びＬｅｓｋ（１９８７年、１９８９年およびＡｌ－Ｌａｚｉｋａｎｉら１９９７年）である少なくとも２つの命名法により付番されている。カバット付番システムに従って、ＦＲ３はV_Hの残基６６から９４およびV_Lの５７から８８に位置付けられる。

【０１０２】

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－末端残基と第１相補性決定領域（ＣＤＲ１）の開始部との間の残基として定義される。ＦＲ２およびＦＲ３と同様に、これらの残基は、１）Ｋａｂａｔ（１９８７年および／または２００１年）ならびに２）Ｃｈｏｔｈｉａ及びＬｅｓｋ（１９８７年、１９８９年およびＡｌ－Ｌａｚｉｋａｎｉら１９９７年）である少なくとも２つの命名法により付番されている。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。κ及びλ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カバット２３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カバット８８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、インデル、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１、２又は３アミノ酸の概して人工的なインデルを企図する。

【０１０３】

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、不変のカバット２２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こと、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。

【０１０４】

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、ＣＤＲｌ、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、ＣＤＲｌ、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、カバット（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、例えばカバット（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。

【０１０５】

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分であって、概して（必須ではないが）グリコシル化され、且つ１以上の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：α、δ、ε、γ、又はμ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関与し、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、γ１（ＩｇＧ１）、γ２（ＩｇＧ２）及びγ３（ＩｇＧ３）である。

【０１０６】

「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、γ、α及びδ重鎖の定常領域は３つの定常ドメインを含み、γ、α及びδ重鎖のＦｃは２つの定常ドメインを含む。μ及びε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。

【０１０７】

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も、又は異なるポリペプチド鎖にあってもよい。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}$３ドメインに連結された前述のもののいずれかが挙げられる。「Ｆａｂ断片」は免疫グロブリンの一価の抗原結合性断片からなり、全免疫グロブリンを酵素パパインで消化することにより作製することができ、それによりインタクトな軽鎖と重鎖の一部分とからなる断片が得られ、又は組換え手段を用いて作製することができる。免疫グロブリンの「Ｆａｂ’断片」は、全免疫グロブリンをペプシンで処理し、続いて還元することにより得ることができ、それによりインタクトな軽鎖と重鎖の一部分とからなる分子が得られる。このように処理した免疫グロブリンにつき２つのＦａｂ’断片が得られる。Ｆａｂ’断片はまた、組換え手段によっても作製することができる。免疫グロブリンの「Ｆ（ａｂ’）２断片」は、２つのＦａｂ’断片が２つのジスルフィド結合により一体に保持される二量体からなり、全免疫グロブリン分子を酵素ペプシンで、続く還元はなしに処理することにより得られる。「$Ｆａｂ_{2}$」断片は、例えばロイシンジッパー又は$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。

【０１０８】

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。

【０１０９】

「カバット付番方式」は、カバット（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。

【０１１０】

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ボディ又はトリアボディ又はテトラボディにおけるV_HとV_Lとの間の相互作用である。

【０１１１】

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。

【０１１２】

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、ＳＳ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、シスチンを生じる。

【０１１３】

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。

【０１１４】

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（ｇｌｙｓｃｏｓｙｌａｔｅｄ）ペプチド又はペプチド等が挙げられる。

【０１１５】

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以上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。

【０１１６】

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。

【０１１７】

可変領域を含むタンパク質

本発明は、１以上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_Hと少なくとも１つのV_L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。

【０１１８】

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なとおり、本発明のタンパク質は、本明細書に記載のＦＲ２および／またはＦＲ３における少なくとも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以上の可変領域を含むことができる。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。

【０１１９】

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以上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（ＨＧＰＲＴ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ＨＧＰＲＴ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Ｌａｒｇａｅｓｐａｄａ（１９９０年）又はＷｅｉｓｓｉｎｇｅｒ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。

【０１２０】

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（ＥＣＡＣＣ）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。

【０１２１】

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、本明細書に記載のＦＲ２および／またはＦＲ３において任意の実施形態により本明細書に記載される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本明細書に記載のＦＲ２および／またはＦＲ３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。
【０１２２】
例示のヒト抗体重鎖ＦＲ２配列は、ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＳ（配列番号：１）；ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＧ（配列番号：２）；ＷＶＲＱＡＰＧＱＬＥＷＭＧ（配列番号：３）；ＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＭＧ（配列番号：４）；ＷＩＲＱＰＰＧＫＧＬＥＷＩＧ（配列番号：５）；ＷＩＲＱＰＰＧＫＡＬＥＷＬＧ（配列番号：６）；ＷＶＲＱＭＰＧＫＧＬＥＷＭＧ（配列番号：７）；およびＷＩＲＱＳＰＳＲＧＬＥＷＬＧ（配列番号：８）からなる群から選択される配列を含む。
【０１２３】
例示のヒト抗体κ軽鎖ＦＲ２配列は、ＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹ（配列番号：９）；ＷＹＱＱＫＰＧＱＡＰＲＬＬＩＹ（配列番号：１０）；ＷＹＱＱＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＹ（配列番号：１１）；ＷＹＬＱＫＰＧＱＳＰＱＬＬＩＹ（配列番号：１２）；ＷＹＱＱＫＰＣＱＡＰＲＬＬＩＹ（配列番号：１３）；ＷＦＱＱＫＰＧＫＡＰＫＳＬＩＹ（配列番号：１４）；ＷＹＱＱＫＰＡＫＡＰＫＬＦＩＹ（配列番号：１５）；およびＷＹＬＱＫＰＧＱＰＰＱＬＬＩＹ（配列番号：１６）からなる群から選択される配列を含む。
【０１２４】
例示のヒト抗体λ軽鎖ＦＲ２配列は、ＷＹＱＱＬＰＧＴＡＰＫＬＬＩＹ（配列番号：１７）；ＷＹＱＱＨＰＧＫＡＰＫＬＭＩＹ（配列番号：１８）；ＷＹＱＱＫＰＧＱＡＰＶＬＶＩＹ（配列番号：１９）；ＷＹＱＱＫＰＧＱＳＰＶＬＶＩＹ（配列番号：２０）；およびＷＨＱＱＱＰＥＫＧＰＲＹＬＭＹ（配列番号：２１）からなる群から選択される配列を含む。
【０１２５】
例示のヒト抗体重鎖ＦＲ３配列は、
ＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＳＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲ（配列番号：２２）；
ＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＨＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＫＲ（配列番号：２３）；
ＲＦＴＩＳＲＤＤＳＫＮＴＡＹＬＱＭＮＳＬＫＴＥＤＴＡＶＹＹＣＴＲ（配列番号：２４）；
ＲＶＴＩＳＶＤＴＳＫＮＱＦＳＬＫＬＳＳＶＴＡＡＤＴＡＶＹＹＣＡＲ（配列番号：２５）；
ＲＬＴＩＳＫＤＴＳＫＮＱＶＶＬＴＭＴＮＭＤＰＶＤＴＡＴＹＹＣＡＲ（配列番号：２６）；
ＲＦＶＦＳＬＤＴＳＶＳＴＡＹＬＱＭＳＳＬＫＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲ（配列番号：２７）；
ＲＶＴＩＳＡＤＫＳＩＳＴＡＹＬＱＷＳＳＬＫＡＳＤＴＡＭＹＹＣＡＲ（配列番号：２８）；
ＲＶＴＩＴＡＤＫＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲ（配列番号：２９）；
ＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＳＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＬＹＹＣＡＫＤ（配列番号：３０）；
ＲＶＴＩＴＡＤＥＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲ（配列番号：３１）；
ＲＶＴＭＴＲＮＴＳＩＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲ（配列番号：３２）；
ＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＨＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＫＫ（配列番号：３３）；
ＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＳＬＹＬＱＭＮＳＬＲＴＥＤＴＡＬＹＹＣＡＫＤ（配列番号：３４）；
ＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲ（配列番号：３５

）；
ＲＬＴＩＳＫＤＴＳＫＮＱＶＶＬＴＭＴＮＭＤＰＶＤＴＡＴＹＹＣＡＲＩ（配列番号：３６）；
ＲＦＶＦＳＬＤＴＳＶＳＴＡＹＬＱＩＣＳＬＫＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲ（配列番号：３７）；
ＲＩＴＩＮＰＤＴＳＫＮＱＦＳＬＱＬＮＳＶＴＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲ（配列番号：３８）；
ＨＶＴＩＳＡＤＫＳＩＳＴＡＹＬＱＷＳＳＬＫＡＳＤＴＡＭＹＹＣＡＲ（配列番号：３９）；
および
ＲＶＴＭＴＲＤＴＳＴＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲ（配列番号：４０）からなる群から選択される配列を含む。

【０１２６】

例示のヒト抗体κ軽鎖ＦＲ３配列は、
ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣ（配列番号：４１）；
ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＦＴＩＳＳＬＱＰＥＤＩＡＴＹＹＣ（配列番号：４２）；
ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＤＤＦＡＴＹＹＣ（配列番号：４３）；
ＧＩＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＳＥＤＦＡＶＹＹＣ（配列番号：４４）；
ＧＩＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＥＰＥＤＦＡＶＹＹＣ（配列番号：４５）；
ＧＩＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＲＬＥＰＥＤＦＡＶＹＹＣ（配列番号：４６）；
ＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＡＥＤＶＡＶＹＹＣ（配列番号：４７）；
および
ＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＫＩＳＲＶＥＡＥＤＶＧＶＹＹＣ（配列番号：４８）からなる群から選択される配列を含む。

【０１２７】

例示のヒト抗体λ軽鎖ＦＲ３配列は、
ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＣＬＱＳＥＤＦＡＴＹＹＣ（配列番号：４９）；
ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣ（配列番号：５０）；
ＧＩＰＡＲＦＳＧＳＧＰＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＥＰＥＤＦＡＶＹＹＣ（配列番号：５１）；
ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＮＳＬＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣ（配列番号：５２）；
ＧＩＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＶＹＹＣ（配列番号：５３）；
ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＦＴＩＳＳＬＥＡＥＤＡＡＴＹＹＣ（配列番号：５４）；
ＧＩＰＰＲＦＳＧＳＧＹＧＴＤＦＴＬＴＩＮＮＩＥＳＥＤＡＡＹＹＦＣ（配列番号：５５）；
および
ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＶＡＴＹＹＣ（配列番号：５６）からなる群から選択される配列を含む。

【０１２８】
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リストではない。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／又は例えばカバット（１９８７年及び／又は２００１年）の開示に基づき、さらなるＦＲ２および／またはＦＲ３の配列を決定することは、当業者の能力の範囲内である。
【０１２９】
ＦＲ２および／またはＦＲ３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。
【０１３０】
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、ＦＲ２および／またはＦＲ３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。
【０１３１】
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以上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。
【０１３２】
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用されるとき、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ビトロで導入された変異（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。

【０１３３】

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／又は軽鎖の一部分が、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以上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、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）。

【０１３４】

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以上のエピトープ、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以上の残基を変異させ、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くない限り行わない。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の例示エピトープは、下記の位置：配列番号：５９の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。

【０１３５】

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。

【０１３６】

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、従来の４本鎖抗体に存在する重鎖可変領域（「V_Hドメイン」と称される）及び従来の４本鎖抗体に存在する軽鎖可変領域（「V_L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_{HH}ドメイン」、及びＩｇＮＡＲにおいてＶ－ＮＡＲと称される。

【０１３７】

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_H及びV_Lの双方のドメインを含むいくつかの従来の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。

【０１３８】

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方法及び／又は単離方法及び／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９７／４９８０５；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ及びＭｕｙｌｄｅｒｍａｎｓ（１９９９年）、及びＮｇｕｙｅｎら（２００１年）に見出される。

【０１３９】

軟骨魚類由来の重鎖免疫グロブリン及びそれらの可変領域並びにそれらの作製方法及び／又は単離方法及び／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；Ｓｈａｏら（２００７年）；および／またはＤｏｏｌｅｙ及びＦｌａｊｎｉｋ（２００６年）に見出される。

【０１４０】

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。本明細書において、「アヴィボディ」または「アヴィボディズ」という用語は、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任意のダイアボディ（ダイアボディズ）、トリアボディ（トリアボディズ）およびテトラボディ（テトラボディズ）を含むアヴィボディ（商標）製品の任意の形態を含む。

【０１４１】

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ず、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以上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２価のダイアボディを形成する（即ち、同じ特異性の２つのＦｖを含む）ように各ポリペプチド鎖で同一であり、又はV_L及びV_Hは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）を形成するように各ポリペプチド鎖で相違し得る。

【０１４２】

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ず、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以上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形成する可能性がある。

【０１４３】

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ず、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以上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あるタイプで、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。

【０１４４】

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以上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。

【０１４５】

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し、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し、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し、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。

【０１４６】

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。

【０１４７】

αヘリックス構造又はβ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好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、β－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。

【０１４８】

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。

【０１４９】

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。

【０１５０】

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）。

【０１５１】

好ましいリンカーは、Ｇ；ＧＧ；ＧＧＧ；ＧＧＧＧ；ＧＧＧＧＳ（配列番号：５７）；Ｓ；ＳＧ；ＳＧＧ；及びＳＧＧＧからなる群から選択される配列を含む。

【０１５２】

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。

【０１５３】

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：

（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

（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。

【０１５４】

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。

【０１５５】

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。

【０１５６】

ダイアボディズ、トリアボディズおよび／またはテトラボディズを記載する例示刊行物は、国際公開第９４／０７９２１号パンフレット； 国際公開第９８／４４００１号パンフレット；Ｈｏｌｌｉｇｅｒら（１９９３年）；Ｋｏｒｔｔら（１９９７年）；Ｈｕｄｓｏｎ及びＫｏｒｔｔ（１９９９年）；Ｌｅ Ｇａｌｌら（１９９９年）；Ｔｏｄｏｒｏｖｓｋａら（２００１年）；Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ及びＨｕｄｓｏｎ（２００５年）；およびそれらで引用される参照文献を含む。

【０１５７】

例示のダイアボディズ、トリアボディズ及び／又はテトラボディズは、配列番号５９のアミノ酸１～１１５又は配列番号６１のアミノ酸１～１２９又は配列番号６３のアミノ酸１～１２９又は配列番号６５のアミノ酸１～１２９に示されるV_H配列を含み、これらは本明細書に記載のＦＲ２および／またはＦＲ３における２以上のシステイン残基を任意でＮ－末端スレオニン／セリン残基とともに含むように修飾される。

【０１５８】

例示のダイアボディズ、トリアボディズ及び／又はテトラボディズは、配列番号５９のアミノ酸１２１～２３９又は配列番号６１のアミノ酸１３５～２６２又は配列番号６３のアミノ酸１２６～２３７又は配列番号６５のアミノ酸１３５～２６２に示されるV_L配列を含み、これらはＦＲ２および／またはＦＲ３に２以上のシステイン残基を任意でＮ－末端スレオニン／セリン残基とともに含むように修飾される。例えば、V_Lは、

（ｉ）配列番号１０１のアミノ酸１２１～２３９；
（ｉｉ）配列番号１０３のアミノ酸１２１～２３９；
（ｉｉｉ）配列番号１０５のアミノ酸１２１～２３９；
（ｉｖ）配列番号１１７のアミノ酸１２１～２３９；
（ｖ）配列番号１１９のアミノ酸１３６～２５４；
（ｖｉ）配列番号１２１のアミノ酸１１５～２３３；
（ｖｉｉ）配列番号１２３のアミノ酸１２６～２３７；
（ｖｉｉｉ）配列番号１２７のアミノ酸１３５～２６２；
（ｉｘ）配列番号１３１のアミノ酸１２６～２３７；
（ｘ）配列番号１３５のアミノ酸１２６～２３７；
（ｘｉ）配列番号１４１のアミノ酸１３５～２６２；および／または
（ｘｉｉ）配列番号１４５のアミノ酸１３５～２６２に示される配列を含む。

【０１５９】

例示のダイアボディズ、トリアボディズ及び／又はテトラボディズは、配列番号５９のアミノ酸１～１１５又は配列番号６１のアミノ酸１～１２９又は配列番号６３のアミノ酸１～１２０又は配列番号６５のアミノ酸１～１２９に示されるV_H配列を含み、これらは本明細書に記載のＦＲ２および／またはＦＲ３に２以上のシステイン残基を任意でＮ－末端スレオニン／セリン残基とともに含むように修飾される。例えば、V_Hは、

（ｉ）配列番号１０７のアミノ酸１～１１５；
（ｉｉ）配列番号１０９のアミノ酸１～１１５；
（ｉｉｉ）配列番号１１１のアミノ酸１～１１５；
（ｉｖ）配列番号１１３のアミノ酸１～１１５；
（ｖ）配列番号１１５のアミノ酸１～１１５；

（ｖｉ）配列番号１２５のアミノ酸１～１２０；
（ｖｉｉ）配列番号１２９のアミノ酸１～１２９；
（ｖｉｉｉ）配列番号１３３のアミノ酸１～１２０；
（ｉｘ）配列番号１３７のアミノ酸１～１２０；
（ｘ）配列番号１３９のアミノ酸１～１２０；
（ｘｉ）配列番号１４３のアミノ酸１～１２９；
（ｘｉｉ）配列番号１４７のアミノ酸１～１２９；および／または
（ｘｉｉｉ）配列番号１４９のアミノ酸１～１２９に示される配列を含む。

【０１６０】

上記段落に記載されるV_H及びV_L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。ダイアボディについては、リンカーは好ましくは配列ＧＧＧＧＳ（配列番号：５７）を含む。トリアボディ又はテトラボディについては、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。

【０１６１】

一例において、ダイアボディはＴＡＧ７２に結合し、ＦＲ２および／またはＦＲ３に２以上のシステイン残基を任意でＮ末端スレオニン／セリン残基とともに含むように修飾される配列番号５９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、ダイアボディは、配列番号１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７または１１９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。

【０１６２】

一例において、トリアボディはＴＡＧ７２に結合し、配列番号１２１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。

【０１６３】

別の例において、ダイアボディはＨｅｒ２に結合し、ＦＲ２および／またはＦＲ３に２以上のシステイン残基ならびに任意で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６１または６４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、ダイアボディは、配列番号１２７、１２９、１４１、１４３、１４５、１４７または１４９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。

【０１６４】

別の例において、ダイアボディはＭＵＣ１に結合し、ＦＲ１および／またはＦＲ２に２以上のシステイン残基ならびに任意で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６３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、ダイアボディは、配列番号１３１、１３３、１３５、１３７または１３９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。

【０１６５】

単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）断片

当業者は、ｓｃＦｖが単一のポリペプチド鎖にV_H及びV_L領域を含むことを認識するであろう。好ましくは、ポリペプチド鎖はV_HとV_L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ｓｃＦｖ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_HとV_Lとが互いに会合してＦｖ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ボ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ｓｃＦｖに好適なリンカーの１つである$(Gly_4Ser)_3$を有する過剰の１２アミノ酸残基を含む。

【０１６６】
例示のｓｃＦｖは、ダイアボディズ、トリアボディズおよびテトラボディズに関して上記のＶＨおよびＶＬを含む。一例において、ｓｃｆｖはＴＡＧ７２に結合する。一例において、ｓｃＦｖは、配列番号：１１９に示される配列を含む。
【０１６７】
本発明はまた、ジスルフィド安定化Ｆｖ（又はｄｉＦｖ又はｄｓＦｖ）も企図し、ここでは単一のシステイン残基がV_HのＦＲ及びV_LのＦＲ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Ｆｖをもたらす（例えば、Ｂｒｉｎｋｍａｎｎら、１９９３年を参照のこと）。
【０１６８】
それに代えて又は加えて、本発明は、二量体ｓｃＦｖ、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ｓｃＦｖ分子を含むタンパク質を提供する。かかる二量体ｓｃＦｖの例としては、例えば、ロイシンジッパードメイン（例えば、Ｆｏｓ又はＪｕｎに由来する）に連結された２つのｓｃＦｖ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、Ｋｏｓｔｅｌｎｙ　１９９２年又はＫｒｕｉｆ及びＬｏｇｔｅｎｂｅｒｇ、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ｓｃＦｖは、双方のｓｃＦｖ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Ａｌｂｒｅｃｈｔら（２００４年）に記載されるとおり、各ｓｃＦｖ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ｓｃＦｖがジスルフィド結合によって連結される。
【０１６９】
本発明はまた、修飾された形態のｓｃＦｖ、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ｓｃＦｖも企図する。
【０１７０】
当業者は、本明細書における開示に基づきｓｃＦｖ又は本発明に係る好適な修飾V_H及び／又はV_L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_H及び／又はV_L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。
【０１７１】
ｓｃＦｖｍの概説については、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ（１９９４年）を参照せよ。ｓｃＦｖ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。
【０１７２】
ミニボディ
当業者は、ミニボディが、免疫グロブリンのC_H2及び／又はC_H3ドメインに融合した免疫グロブリンのV_H及びV_L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_HとV_L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（Ｆｌｅｘ　Ｍｉｎｉｂｏｄｙ）（Ｈｕら、１９９６年）と称される。ミニボディはC_H1又はＣＬを含まない。好ましくは、V_H及びV_Lドメインは免疫グロブリンのヒンジ領域とC_H3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_H及びV_L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_H2／C_H3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_H2／C_H3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_H及びV_Lと、別の免疫グロブリン由来のV_H及びV_L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１つは、本明細書に記載のＦＲ２および／またはＦＲ３にシステイン残基を含む。
【０１７３】
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。
【０１７４】
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_H3ドメイン（又はC_H2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。
【０１７５】
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。
【０１７６】
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、一対のＦｖ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_H3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以上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以上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。
【０１７７】
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。
【０１７８】
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’）２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。
【０１７９】
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$F(ab')_2$分子の作製について記載している。各Ｆａｂ’断片を大腸菌から別個に分泌させ、インビ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。
【０１８０】
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_3（例えば、欧州特許第１９９３０３

０２８９４号明細書に記載されるとおり）が挙げられる。
定常ドメイン融合物
【０１８１】
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_H２及び／又はC_H３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_H２融合物又はダイアボディ－C_H２融合物又はトリアボディ－C_H２融合物又はテトラボディ－C_H２融合物又はｓｃＦｖ－C_H３融合物又はダイアボディ－C_H３融合物又はトリアボディ－C_H３融合物又はテトラボディ－C_H３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。
【０１８２】
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分を含む。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）。
【０１８３】
本明細書で使用されるとき、用語「C_H２ドメイン」は、例えば、カバット　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分を含む。概してインタクトな天然ＩｇＧ分子の２つの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。
【０１８４】
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（カバット　ＥＵ付番方式）に延在する重鎖免疫グロブリン分子の一部分を含む。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μ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。
【０１８５】
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。
【０１８６】
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。

【０１８７】

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（γ受容体、又はＩｇλＲ）、ＩｇＥ（ε受容体、又はＩｇεＲ）、ＩｇＡ（α受容体、又はＩｇαＲ）及びＩｇＭ（μ受容体、又はＩｇμＲｓ）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。

【０１８８】

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「ＦｃＲｎ」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。

【０１８９】

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。

【０１９０】

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。

【０１９１】

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_H2ドメイン又はその一部分と、ＩｇＧ３分子に由来するC_H3領域又はその一部分とを含み得る。

【０１９２】

本発明の別の例において、本発明のタンパク質は、ＦｃＲｎ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、ＦｃＲｎに結合するＦｃ領域の一部分は、カバット付番によるＩｇＧ１のアミノ酸約２８２～４３８を含む。

【０１９３】

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；又は国際公開第２００５／０４７３２７号パンフレット；米国特許出願公開第２００９００４１７７０号明細書（半減期の向上）；また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。

【０１９４】

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以上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（ｈｙｄｒｏｐａｔｈｉｃｉｔｙ）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。

【０１９５】

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。

【０１９６】

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）、β－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。

【０１９７】

本発明はまた、本明細書に示される配列と比較して１以上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。

【０１９８】

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ＦＲ２および／またはＦＲ３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。本発明により意図される例示システイン残基は図６Ａおよび６Ｂに示される。

【０１９９】

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つの結合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つが化合物と結合しない場合、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。

【０２００】

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、システイン残基が、化合物との残基の少なくとも１つの結合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つが化合物と結合しない場合、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。

【０２０１】
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_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、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、システイン残基が、化合物との残基の少なくとも１つの結合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つが別の化合物と結合しない場合、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。
【０２０２】
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_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、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、システイン残基が、化合物との残基の少なくとも１つの結合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つが別の化合物と結合しない場合、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。
【０２０３】
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、化合物との結合が可能であるように位置することが好ましい。
【０２０４】
本発明の一例において、システイン残基はＦＲ２および／またはＦＲ３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「ループ領域」は、ＦＲ２またはＦＲ３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、βシート内の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ＦＲ２またはＦＲ３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。ＦＲ２および／またはＦＲ３のループ領域はＣＤＲ１またはＣＤＲ３の一部ではない。
【０２０５】
別の例において、ＦＲ２および／またはＦＲ３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。
【０２０６】
「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６～７Å又は互いの２～９Å、例えば互いの約６～７Åまたは互いの約３．５～６．８Å、例えば、互いの約４Å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。
【０２０７】
従って一例において、本発明のタンパク質は、ＦＲ２および／またはＦＲ３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２～９Å以内、好ましくは、互いの約６～７Å以内にあるシステイン残基を含む。
【０２０８】
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ＬＣＰＯ法が挙げられる。
【０２０９】
従って別の例において、本発明のタンパク質は、ＦＲ２および／またはＦＲ３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。

【０２１０】
「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結合することができる。
【０２１１】
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Ｃα炭素原子が互いの約６～７Åにあるように位置する。
【０２１２】
従って、本発明のタンパク質（本発明の任意の１以上の例により本明細書に記載される）は、ＦＲ２および／またはＦＲ３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、ＦＲ２および／またはＦＲ３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結合のために還元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、フレームワーク領域（ＦＲ１および／またはＦＲ２および／またはＦＲ３）内にジスルフィド結合を形成できるフレームワーク領域（ＦＲ１および／またはＦＲ２および／またはＦＲ３）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結合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、ばらつきのある結合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個の薬物）、及び潜在的に＞１００種を有する（Ｊｕｎｕｔｕｌａら、２００８年）。
【０２１３】
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 Ｍｏｄｅｌｉｎｇ 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）のウェブサイトで利用可能な適切なソフトウェアを使用して決定される。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。
【０２１４】
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。
【０２１５】
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、本明細書に記載される免疫グロブリンのＦＲ２および／またはＦＲ３領域に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。

【０２１６】

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」（Ｂｏｗｉｅら、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構造スキャ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、候補構造鋳型（例えば、本明細書に記載されるＦｖ又はＦａｂ又はＦＲ２および／またはＦＲ３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。

【０２１７】

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　ｒｅｓｉｄｅｓ）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。

【０２１８】

好ましくは、本発明のタンパク質は非還元条件下でＦＲ２および／またはＦＲ３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。

【０２１９】

本発明の一例において、システイン残基は、化合物に結合しない場合、フレームワーク内ジスルフィド結合が該残基間で形成できるように位置付けられる。「フレームワーク内ジスルフィド結合」という用語は、ジスルフィド結合が単一のフレームワーク領域内に形成されることを意味すると解釈されるべきである。例えば、２つのシステイン残基がＦＲ２内に位置付けられる場合、鎖内ジスルフィド結合はＦＲ２内に形成する。

【０２２０】

タンパク質の作製

変異誘発

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鋳型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。

【０２２１】

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）変異誘発、ＰＣＲ変異誘発、及びカセット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以上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年に見ることができる。

【０２２２】

部位特異的変異誘発は、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；Ｈｏ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以上のコドンの挿入）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ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）多部位特異的変異誘発キット（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）が含まれる。

【０２２３】

ＰＣＲ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。

【０２２４】

別の変異型調製方法であるカセット変異誘発は、Ｗｅｌｌｓ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以上のコドンが同定される。同定された１以上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以上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。

【０２２５】

単一の変異はまた、二本鎖プラスミドＤＮＡをＰＣＲベースの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変異誘発によっても生成される（Ｓａｍｂｒｏｏｋ及びＲｕｓｓｅｌ、２００１年；Ｚｏｌｌｅｒら　１９８３年；Ｚｏｌｌｅｒ及びＳｍｉｔｈ、１９８２年）。

【０２２６】

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、Ｓｋｅｒｒａら、（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５２２５５３９号明細書、米国特許第６０５４２９７号明細書、米国特許第７５６６７７１号明細書又は米国特許第５５８５０８９号明細書を参照のこと。

【０２２７】

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、発現構築物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。

【０２２８】

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し、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以上の特定の制御エレメントのさらなるコピーを含み得る。

【０２２９】

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。

【０２３０】

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

た発現構築物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。

【０２３１】

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、α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。

【０２３２】

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、β－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．スブチリス（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）及びＢ．リケニフォルミス（Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）などのバチルス属（Ｂａｃｉｌｌｉ）、Ｐ．エルギノーサ（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）、ＤＨ５α又はＤＨ１０Ｂなどの他の株も好適である。

【０２３３】

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－αプロモーター（ＥＦ１）、核内低分子ＲＮＡプロモーター（Ｕ１ａ及びＵ１ｂ）、α－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、β－アクチンプロモーター；ＣＭＶエンハンサー／β－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。

【０２３４】

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・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）及びＳ．

ポンベ（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。

【０２３５】

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、ボンビックス・ムリ（Ｂｏｍｂｙｘ　ｍｕｒｉ）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．フルギペルダ（Ｓ．ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）の使用もまた企図される。

【０２３６】

単離核酸分子又はそれを含む遺伝子構築物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。

【０２３７】

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）、ＲＰＭｌ－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。

【０２３８】

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。

【０２３９】

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。

【０２４０】

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１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（ｐＨ３．５）、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。

【０２４１】

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γ１、γ２、又はγ４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γ３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付くマトリックスは、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。

【０２４２】

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。

【０２４３】

１以上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。

【０２４４】

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（Ｎα－アミノ保護Ｎα－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Ｎα－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Ｎα－アミノ保護アミノ酸とも、例えば、Ｆｌ

ｕｋａ、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。

【０２４５】

結合

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結合も提供する。タンパク質を結合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、被験体内での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。

【０２４６】

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。免疫グロブリン－免疫毒素結合の調製に関するさらなる技法が、例えばＶｉｔｅｔｔａ（１９９３年）及び米国特許第５，１９４，５９４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、アブリンＡ鎖、モデシンＡ鎖、αサルシン、アリューリテス・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（Ｐｈｙｔｏｌａｃａ　ａｍｅｒｉｃａｎａ）タンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、及びＰＡＰ－Ｓ）、モモルディカ・カランティア（ｍｏｍｏｒｄｉｃａ　ｃｈａｒａｎｔｉａ）阻害薬、クルシン、クロチン、サパオナリア・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９３／２１２３２号パンフレットを参照のこと。

【０２４７】

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、アウリスタチンおよびメイタンシン、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）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、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、及びピューロマイシン、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、クラドリビンなど）、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（ＢＳＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン（ＤＴＩＣ）、プロカルバジン、マイトマイシンＣ、シスプラチン及びその他の、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）、ブレオマイシン、ダウノルビシン（旧ダウノマイシン）、ドキソルビシン、イダルビシン、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（ＡＭＣ）など）が挙げられる。

【０２４８】

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、ＢＡＹ　１２－９５６６、ＡＧ　３３４０、ＢＭＳ－２７５２９１及び同様の薬剤など）、内皮細胞の遊走及び増殖阻害薬（ＴＮＰ－４７０、スクアラミン、２－メトキシエストラジオール、コンブレタスタチン、エンドスタチン、アンジオスタチン、ペニシラミン、ＳＣＨ６６３３６（Ｓｃｈｅｒｉｎｇ－Ｐｌｏｕｇｈ　Ｃｏｒｐ、Ｍａｄｉｓｏｎ，ＮＪ）、Ｒ１１５７７７（Ｊａｎｓｓｅｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａ，Ｉｎｃ、Ｔｉｔｕｓｖｉｌｌｅ，ＮＪ）及び同様の薬剤など）、血管形成成長因子の拮抗薬（ＺＤ６４７４、ＳＵ６６６８、血管形成剤に対する抗体及び／又はその受容体（ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ、及びアンギオポエチン－１など）、サリドマイド、サリドマイド類似体（ＣＣ　５０１３など）、Ｓｕｇｅｎ　５４１６、ＳＵ５４０２、抗血管形成リボザイム（アンギオザイムなど）、インターフェロンα（インターフェロンα２ａなど）、スラミン及び同様の薬剤など）、ＶＥＧＦ－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（ＳＵ０１１２４８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（ＣＡＩ）、ＡＢＴ－６２７、ＣＭ１０１、インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）、ＩＭ８６２、ＰＮＵ１４５１５６Ｅ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－ＶＥＧＦ－ｃＤＮＡ、アンジオスタチンをコードするｃＤＮＡ、ｐ５３をコードするｃＤＮＡ及び欠損ＶＥＧＦ受容体－２をコードするｃＤＮＡ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ＩＩＩ（ｈｅｐｅｒｉｎａｓｅ　ＩＩＩ））、テモゾロミド、ＮＫ４、マクロファージ遊走阻害因子（ＭＩＦ）、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、テコガランナトリウム、ダルテパリン、タムスタチン、トロンボスポンジン、ＮＭ－３、コンブレスタチン（ｃｏｍｂｒｅｓｔａｔｉｎ）、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α－ｖ／β－３インテグリン及び抗キニノスタチンｍＡｂｓなど）及び同様の薬剤である。

【０２４９】

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、別のタンパク質に結合又は連結される。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。

【０２５０】

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（ＦＳＨ）、甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）及び黄体形成ホルモン（ＬＨ）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、ＯＢタンパク質、腫瘍壊死因子－α及び－β；ミュラー管抑制物質、ゴナドトロピン関連ペプチド、インヒビン、アクチビン、血管内皮増殖因子、インテグリン、トロンボポエチン（ＴＰＯ）、ＮＧＦ－Ｂなどの神経成長因子、血小板成長因

子、ＴＧＦ－α及びＴＧＦ－βなどの形質転換成長因子（ＴＧＦ）、インスリン様成長因子－Ｉ又は－ＩＩ、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、骨誘導因子、インターフェロン－α、－β、又は－γなどのインターフェロン；コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、例えば、マクロファージ－ＣＳＦ（Ｍ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージ－ＣＳＦ（ＧＭ－ＣＳＦ）；及び顆粒球－ＣＳＦ（Ｇ－ＣＳＦ）、インターロイキン（ＩＬ）、例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－１α、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２；ＩＬ－１３、ＩＬ－１４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＬＩＦなどが含まれる。

【０２５１】

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、ＲＡＮＴＥＳ、ＭＣＡＦ、Ｍ１Ｐ１－アルファ又はＭＩＰ１－ベータが挙げられる。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。

【０２５２】

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２００６０２２８３６４号明細書又は米国特許出願公開第２００８０２６０７５７号明細書に記載される。

【０２５３】

放射性結合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}Ｃ、^{15}Ｎ、^{2}Ｈ、^{125}Ｉ、^{123}Ｉ、^{99}Ｔｃ、^{43}Ｋ、^{52}Ｆｅ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{111}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、γ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}Ｉ、^{131}Ｉ、^{123}Ｉ、^{111}Ｉｎ、^{105}Ｒｈ、^{153}Ｓｍ、^{67}Ｃｕ、^{67}Ｇａ、^{166}Ｈｏ、^{177}Ｌｕ、^{186}Ｒｅ及び^{188}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α粒子又はβ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、例えば結合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（Ｇｕａｎら、１９９８年）。

【０２５４】

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）に結合され、ここでは結合が患者に投与され、続いて未結合の結合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）に結合した「リガンド」（例えば、アビジン）が投与される。

【０２５５】

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－ジオキソラン、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（ｐｒｏｐｒｏｐｙｌｅｎｅ　ｇｌｙｃｏｌ）（ＰＰＧ）ホモポリマー、プロリプロピレンオキシド（ｐｒｏｌｙｐｒｏｐｙｌｅｎｅ　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。

【０２５６】

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。

【０２５７】

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等を増加させるため、一般にタンパク質に結合される。

【０２５８】

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。

【０２５９】

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（Ｍｗ／Ｍｎ）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－タンパク質結合の多く、特に１ＫＤより大きいＰＥＧに結合したものは、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１．５～３．０ＫＤの範囲に分布し、多分散性指数は１．０３６である。

【０２６０】

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。

【０２６１】

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

【０２６２】

好ましくは、ＰＥＧは単分散であり、約５００Ｄａの分子量を有する。好ましくは、ＰＥＧは約１．５ｋＤａの分子量を有する。好ましくは、ＰＥＧは約２ｋＤａの分子量を有する。

【０２６３】

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$_{24}$－マレイミドである。

【０２６４】

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。

【０２６５】

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。ポリマーはＰＥＧであることが好ましい。

【０２６６】

当業者は、タンパク質との結合に先立ち、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。

【０２６７】

本発明のタンパク質との結合に特に好ましい化合物を表１に示す。

【０２６８】

【表１】

表1:結合に好ましい化合物

群	詳細
放射性同位元素 **（直接的または間接的）**	• ^{123}I、^{125}I、^{130}I、^{133}I、^{135}I、^{47}Sc、^{72}As、^{72}Sc、^{90}Y、^{88}Y、^{97}Ru、^{100}Pd、^{101m}Rh、^{101m}Rh、^{119}Sb、^{128}Ba、^{197}Hg、^{211}At、^{212}Bi、^{153}Sm、^{169}Eu、^{212}Pb、^{109}Pd、^{111}In、^{67}Gu、^{68}Gu、^{67}Cu、^{75}Br、^{76}Br、^{77}Br、^{99m}Tc、^{11}C、^{13}N、^{15}O、^{18}I、^{188}Rc、^{203}Pb、^{64}Cu、^{105}Rh、^{198}Au、^{199}Agまたは^{177}Lu
半減期延長剤	• ポリエチレングリコール • グリセロール • グルコース
蛍光プローブ	• フィコエリトリン（PE） • アロフィコシアニン（APC） • Alexa Fluor 488 • Cy5.5
生物製剤	• ウミシイタケルシフェラーゼ、GFPなどの蛍光タンパク質 • 免疫調節物質 • 毒素 • 免疫グロブリン • アルブミンなどの半減期延長剤
化学療法薬	• タキソール • 5－FU • ドキソルビシン • イダルビシン

【０２６９】

本発明の一例では、化合物と、それが結合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、結合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。

【０２７０】
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ペーサー部分はジペプチド配列Ｐｈｅ－Ｌｙｓ及びＶａｌ－Ｌｙｓを含む。
【０２７１】
切断可能なスペーサー部分は、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、ジペプチド配列バリン－シトルリン、フェニルアラニン－リジンおよび／またはバリン－アラニンが挙げられる。
【０２７２】
結合方法
システイン（チオール）との結合
化合物をシステイン残基に結合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。かかる結合用の試薬は、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なとおり、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以上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。
【０２７３】
様々なタンパク質及び化合物（及びリンカー）を使用して、本発明の結合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、ＮＨＳエステル、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、及びアリールヒドラジン基が挙げられる。
【０２７４】

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。

【０２７５】

メイタンシンが、例えばＭａｙ－ＳＳＣＨ$_3$に変換されてもよく、これを遊離チオールのＭａｙ－ＳＨ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（Ｃｈａｒｉら、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。

【０２７６】

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、一段階で結合を形成してもよい。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、及びアリー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。

【０２７７】

さらなる結合方法としては、例えば、マレイミド、ヨードアセトアミド（ｉｏｄｏａｃｅｔｉｍｉｄｅ）又はハロゲン化ハロアセチル／アルキル、アジリジン（ａｚｉｒｉｄｎｅ）、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、Ｓｃｈｅｌｔｅら、２００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（ｉｏｄａｃｅｔａｍｉｄｅ）の使用）；Ｅｉｓｅｎら、１９５３年（２，４－ジニトロベンゼンスルホン酸（ｄｉｎｉｔｒｏｂｅｎｚｅｎｅｕｌｆｏｎｉｃ 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結合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。

【０２７８】

放射標識結合の使用に関して、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　ｔｒｉａｍｉｎｅｐｅｎｔａａｃｅｔｉｃ　ａｃｉｄ）（「ＭＸ－ＤＴＰＡ」）及びシクロヘキシルジエチレントリアミン五酢酸（「ＣＨＸ－ＤＴＰＡ」）誘導体、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）。

【０２７９】

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、リンカー試薬との結合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（$CuSO_4$）との連結に必要の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。

【０２８０】

スレオニン／セリンとの結合

化合物をスレオニン残基又はセリン残基と結合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－アミノチオ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。

【０２８１】

本発明の一例において、スペーサー部分は該化合物と該化合物が結合するタンパク質との間に含まれる。本発明のスペーサー部分は、切断可能または切断不可能でありうる。例えば、切断可能なスペーサー部分は、スペーサー部分がより低い酸化還元電位の環境で、例えば細胞質および遊離スルフヒドリル基をもつ高濃度の分子を含む他の領域などで切断できるような酸化還元で切断可能なスペーサー部分である。酸化還元電位の変化により切断されうるスペーサー部分の例は、ジスルフィドを含むものを含む。切断刺激は、細胞質のより低い酸化還元電位がスペーサー部分の切断を促進する結合タンパク質の細胞内取り込み時に提供され得る。

【０２８２】
他の例において、ｐＨの低下はスペーサーの切断を引き起こし、それにより該化合物が標的細胞に放出される。ｐＨの低下は、エンドソーム輸送、腫瘍増殖、炎症および心筋虚血などの多数の生理的過程および病理的過程で示される。ｐＨは生理的な７．４からエンドソームの５～６またはリソソームの４～５に低下する。癌細胞のリソソームまたはエンドソームを標的にするために使用されうる酸感受性スペーサー部分の例は、アセタール、ケタール、オルトエステル、ヒドラゾン、トリチル、シス－アコニチル、またはチオカルバモイルで見出されるものなど、酸で切断可能な結合をもつものを含む（米国特許第４，５６９，７８９号、第４，６３１，１９０号、第５，３０６，８０９号および第５，６６５，３５８号を参照）。他の例示の酸感受性スペーサー部分はジペプチド配列のＰｈｅ－ＬｙｓおよびＶａｌ－Ｌｙｓを含む。

【０２８３】
切断可能なスペーサー部分は、特定の標的細胞、例えばリソソーム酵素または腫瘍関連酵素に関連する生物学的に供給される切断剤に感受性がありうる。酵素切断できる連結部分の例はペプチドおよびエステルを含むが、これらに限定されない。例示の酵素切断可能な連結部分は、カテプシンＢまたはプラスミンなどの腫瘍関連プロテアーゼに感受性があるものを含む。カテプシンＢで切断可能な部位はジペプチド配列のバリン－シトルリンおよびフェニルアラニン－リシンを含む。

【０２８４】
ペグ化方法
化合物、例えばＰＥＧを、ＰＥＧが結合するタンパク質に結合させ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。本発明のスペーサー部分は、切断可能または切断不可能でありうる。例えば、切断可能なスペーサー部分は、スペーサー部分がより低い酸化還元電位の環境で、例えば細胞質および遊離スルフヒドリル基をもつ高濃度の分子を含む他の領域などで切断できるような酸化還元で切断可能なスペーサー部分である。酸化還元電位の変化により切断されうるスペーサー部分の例は、ジスルフィドを含むものを含む。切断刺激は、細胞質のより低い酸化還元電位がスペーサー部分の切断を促進する結合タンパク質の細胞内取り込み時に提供され得る。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され得る。

【０２８５】
他の例において、ｐＨの低下はスペーサーの切断を引き起こし、それにより該化合物が標的細胞に放出される。ｐＨの低下は、エンドソーム輸送、腫瘍増殖、炎症および心筋虚血などの多数の生理的過程および病理的過程で示される。ｐＨは生理的な７．４からエンドソームの５～６またはリソソームの４～５に低下する。癌細胞のリソソームまたはエンドソームを標的にするために使用されうる酸感受性スペーサー部分の例は、アセタール、ケタール、オルトエステル、ヒドラゾン、トリチル、シス－アコニチル、またはチオカルバモイルで見出されるものなど、酸で切断可能な結合をもつものを含む（米国特許第４，５６９，７８９号、第４，６３１，１９０号、第５，３０６，８０９号および第５，６６５，３５８号を参照）。他の例示の酸感受性スペーサー部分はジペプチド配列のＰｈｅ－ＬｙｓおよびＶａｌ－Ｌｙｓを含む。

【０２８６】
切断可能なスペーサー部分は、特定の標的細胞、例えばリソソーム酵素または腫瘍関連酵素に関連する生物学的に供給される切断剤に感受性がありうる。酵素切断できる連結部分の例はペプチドおよびエステルを含むが、これらに限定されない。例示の酵素切断可能な連結部分は、カテプシンＢまたはプラスミンなどの腫瘍関連プロテアーゼに感受性があるものを含む。カテプシンＢで切断可能な部位はジペプチド配列のバリン－シトルリンおよびフェニルアラニン－リシンを含む。

【０２８７】
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結合する（Ｍｕｔｓｕｓｈｉｍａら、１９８０年）。

【０２８８】

タンパク質との結合に使用される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。

【０２８９】

タンパク質との結合に有用な別の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α－アミンについて選択的であり、従って非特異的な結合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）。

【０２９０】

ＰＥＧカルボン酸の活性エステルは、おそらくタンパク質結合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１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α－分枝部分を導入することにより低減することができる。

【０２９１】

タンパク質中の遊離システイン残基のペグ化は、部位特異的結合（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。システイン結合用の例示的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結合方法は、Ｇｏｏｄｓｏｎ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結合方法は、例えばＬｉら（２００６年）に記載される。

【０２９２】

米国特許第５９８５２６３号明細書は、ヒスチジンの、ｐＫａが第１級アミンより低い第２級アミン基に対してＰＥＧを結合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（ｈｉｓｔｉｄｎｅ）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、結合は徐放製剤又はプロドラッグとして振舞う）。

【０２９３】

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結合されている（例えば、Ｇａｅｒｔｎｅｒ及びＯｆｆｏｒｄ、１９９６年）

。
【０２９４】
ＰＥＧはまた、炭水化物基に結合することもできる。
【０２９５】
本発明はまた、可逆的ペグ化戦略の使用も包含する。
【０２９６】
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結合し、且つ一部が検出可能標識に結合しているタンパク質の混合物を含む組成物に結合される。
【０２９７】
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。
【０２９８】
抗原
本発明は、任意の１以上の抗原との特異的な結合能を有するＦＲ２および／またはＦＲ３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。
【０２９９】
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。
【０３００】
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、Ｄｉｊｋｅら、１９９４年、国際公開第２００４０６３３６２号パンフレット）；Ｅ１６（ＬＡＴ１、ＳＬＣ７Ａ５、Ｇａｕｇｉｔｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ　１９９２；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；Ｈｕｂｅｒｔ，ｅｔ　ａｌ，１９９９；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、Ｙａｍａｇｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ，１９９４，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；Ｆｅｉｌｄ　ｅｔ　ａｌ，１９９９；国際公開第２００４０２２７７８号パンフレット）；Ｓｅｍａ５ｂ（ＦＬＪ１０３７２、ＫＩＡＡ１４４５、ＳＥＭＡ５Ｂ、ＳＥＭＡＧ、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、Ｎａｇａｓｅ　ｅｔ　ａｌ，２０００；国際公開第２００４０００９９７号パンフレット）；ＰＳＣＡ（Ｒｏｓｓ　ｅｔ　ａｌ，２００２；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、Ｎａｋａｍｕｔａ．，ｅｔ　ａｌ，３４－３９，１９９１；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）；ＳＴＥＡ

Ｐ２（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、Ｘｕ　ｅｔ　ａｌ，２００１，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、Ｃｉｃｃｏｄｉｃｏｌａ，ｅｔ　ａｌ，１９８９；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）Ｆｕｊｉｓａｋｕ　ｅｔ　ａｌ，１９８９；国際公開第２００４０４５５２０号パンフレット）；ＣＤ７９ｂ（ＣＤ７９Ｂ、ＣＤ７９β、ＩＧｂ（免疫グロブリン関連β）、Ｂ２９、Ｍｕｌｌｅｒ，１９９２；国際公開第２００４０１６２２５号パンフレット）；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、Ｘｕ，ｅｔ　ａｌ，２００１；国際公開第２００４０１６２２５号パンフレット）；ＨＥＲ２（ＥｒｂＢ２、Ｃｏｕｓｓｅｎｓ　ｅｔ　ａｌ，１９８５；国際公開第２００４０４８９３８号パンフレット）；ＮＣＡ（ＣＥＡＣＡＭ６、Ｂａｒｎｅｔｔ　ｅｔ　ａｌ，１９８８；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）；ＩＬ２０Ｒα（ＩＬ２０Ｒａ、ＺＣＹＴＯＲ７、Ｃｌａｒｋ，ｅｔ　ａｌ，２００３；欧州特許第１３９４２７４号明細書）；ブレビカン（ＢＣＡＮ、ＢＥＨＡＢ、Ｇａｒｙ　ｅｔ　ａｌ，２０００；米国特許出願公開第２００３１８６３７２号明細書）；ＥｐｈＢ２Ｒ（ＤＲＴ、ＥＲＫ、Ｈｅｋ５、ＥＰＨＴ３、Ｔｙｒｏ５、Ｃｈａｎ　ａｎｄ　Ｗａｔｔ，１９９１；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、Ｒｅｉｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ，１７３５－１７４０，１９９８；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、Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，ｅｔ　ａｌ，２００１；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、Ｗｉｌｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ，１９９１；国際公開第２００３０７２０３６号パンフレット）；ＣＤ７９ａ（ＣＤ７９Ａ、ＣＤ７９α、免疫グロブリン関連α、Ｉｇβ（ＣＤ７９Ｂ）と共有結合的に相互作用して表面上にＩｇＭ分子との複合体を形成し、Ｂ細胞分化に関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（バ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βサブユニット；Ｔｏｎｎｅｌｌｅ　ｅｔ　ａｌ，１９８５；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ネル５、細胞外ＡＴＰによりゲート開閉されるイオンチャネルであり、シナプス伝達及び神経形成に関わり得る。欠損は特発性排尿筋不安定の病態生理に関与し得る；Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ，１９９８；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関連する；米国特許出願公開第２００２１９３５６７号明細書）；ＦｃＲＨｌ（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関連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；Ｎａｋａｙａｍａ　ｅｔ　ａｌ，２０００；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関連する；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（Ｐｒｅｓｔａら、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；τ；ＰｒＰＳＣ；又はＡβが挙げられる。

【０３０１】

好ましくは、本発明のタンパク質は、ＨＥＲ２（例えば、配列番号１５０に示される配列を含む）、ＭＵＣ１（例えば、配列番号１５２又は１５３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１５１に示される配列を含む）に特異的に結合する。例えば、本発明のタンパク質はＨｅｒ２に特異的に結合する。例えば、本発明のタンパク質はＭＵＣ１に特異的に結合する。例えば、本発明のタンパク質はＴＡＧ７２に特異的に結合する。例えば、本発明のタンパク質はＰＳＭＡに特異的に結合する。

【０３０２】

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（Ｃ２Ｂ８；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；Ｐｒｅｓｔａら、１９９７年））が挙げられる。

【０３０３】

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、ＣＤ３）などの、白血球上のトリガー分子、又はＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）及び／又はＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）などの、ＩｇＧに対するＦｃ受容体（ＦｃγＲ）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－α、ビンカアルカロイド、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ＥｒｂＢ２／抗ＦｃγＲＩＩＩ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ＥｒｂＢ２／抗ＦｃγＲＩ抗体を開示する。二重特異性抗ＥｒｂＢ２／Ｆｃα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ＥｒｂＢ２／抗ＣＤ３抗体を教示する。

【０３０４】

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。

【０３０５】

典型的には、治療有効量のタンパク質が、被験体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、被験体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。明らかなとおり、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、体重などに基づ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以上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１μｇ／ｋｇ～１５ｍｇ／ｋｇ（例えば０．１～２０ｍｇ／ｋｇ）の分子であり得る。典型的な１日投薬量は約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ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１０ｍｇ／ｋｇ（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４ｍｇ／ｋｇの初回負荷用量と、その後の約２ｍｇ／ｋｇ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、従来の技術及びアッセイにより容易にモニタリングされる。

【０３０６】

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

【０３０７】

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、デキストロース溶液、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。

【０３０８】

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。

【０３０９】

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。

【０３１０】

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／又は治療される被験体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の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。

【０３１１】

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されてもよい。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。

【０３１２】

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されて存在する。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。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。

【０３１３】

本発明はまた、被験体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、それを必要とする被験体に投与するステップを含む方法も提供する。

【０３１４】

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。

【０３１５】

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以上の阻害薬及び／又は１以上の薬剤を、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。

【０３１６】

本明細書で使用されるとき、用語「被験体」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。例示的被験体としては、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。

【０３１７】

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。

【０３１８】

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（ｇａｓｔｒｉｃ　ｃａｎｃｅｒ）又は胃癌（ｓｔｏｍａｃｈ　ｃａｎｃｅｒ）、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（ｋｉｄｎｅｙ　ｃａｎｃｅｒ）又は腎癌（ｒｅｎａｌ　ｃａｎｃｅｒ）、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。

【０３１９】

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。

【０３２０】

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。

【０３２１】

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。

【０３２２】

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のグリコフォームを発現する。例示的癌はとしては、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。

【０３２３】

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、被験体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、チャーグーストラウス血管炎、ウェゲナー肉芽腫症、及び多発性動脈炎（ｐｏｌｙａｒｔｅｒｉｉｔｉｓ）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、グレーブス病及び甲状腺炎）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、グレーブス病、ＩＤＤＭ、悪性貧血、甲状腺炎、及び糸球体腎炎が挙げられる。

【０３２４】

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。

【０３２５】

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。

【０３２６】

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されてもよい。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。

【０３２７】

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。

インビトロ試験

【０３２８】

一例において、本発明のタンパク質は、化合物に結合されていてもなお、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結合は、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／又は化合物を結合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。

【０３２９】

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結合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（Ｓｔａｈｌｉ ｅｔ ａｌ．，１９８３；Ｋｉｍ，ｅｔ ａｌ．，１９８９を参照）；固相直接ビオチン－アビジンＥＩＡ（Ｋｉｒｋｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．，１９８６を参照）；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（Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，１９８８を参照）；^{125}Ｉ標識を用いる固相直接標識ＲＩＡ（Ｍｏｒｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９８８を参照）；固相直接ビオチン－アビジンＥＩＡ（Ｃｈｅｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９９０）；又は直接標識ＲＩＡ（Ｍｏｌｄｅｎｈａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９０）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。

【０３３０】

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、結合を作製する）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。

【０３３１】

概して、例えば細胞傷害性分子に結合された、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。

【０３３２】

例えば、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－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５７００６７０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（Ｃｒｏｕｃｈ ｅｔ ａｌ １９９３；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れる。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、^{3}Ｈ－チミジン又は^{14}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結合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。

【０３３３】

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。

【０３３４】
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。
【０３３５】
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被験体に投与され、タンパク質の血清レベルが、例えばＥＬＩＳＡを用いて、又はタンパク質に結合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。
【０３３６】
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－α（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、Ｒｏｂｙら、２０００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（Ｒｉｓｍａら、１９９５年）；又はＷｘ／Ｗｖ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、ＳＶ４０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（ｍｉｎｉｍａｌ　ｒａｔ　ｐｒｏｂａｓｉｎ　ｐｒｏｍｏｔｅｒ）を利用してＳＶ４０初期遺伝子を発現させるＴＲＡＭＰモデル、又はロングプロバシンプロモーター（ｌｏｎｇ　ｐｒｏｂａｓｉｎ　ｐｒｏｍｏｔｅｒ）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「ＬＡＤＹ」モデルと称されるもの、又はｃ－ｍｙｃ又はＢｃｌ－２又はＦｇｆ８ｂを発現するか、又はドミナントネガティブＴＧＦβ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、Ｍａｔｕｓｉｋら、２００１年を参照のこと）。
【０３３７】
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ＮＯＤ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、Ｔａｎｇら（２００４年）に記載されるとおり）、及び／又はＧＶＨＤのマウスモデルに（例えば、Ｔｒｅｎａｄｏ（２００２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、Ｗａｎｇら　２００８年）及び／又は関節リウマチのモデル、例えばＳＫＧ株のマウス（Ｓａｋａｇｕｃｈｉら）、ラットＩＩ型コラーゲン関節炎モデル、マウスＩＩ型コラーゲン関節炎モデル又はいくつかの種における抗原誘導性関節炎モデル（Ｂｅｎｄｅｌｅ、２００１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（ＥＡＥ；Ｂｒａｄｌ及びＬｉｎｉｎｇｔｏｎ、１９９６年））及び／又は炎症性気道疾患（例えば、ＯＶＡチャレンジ又はゴキブリ抗原チャレンジ（Ｃｈｅｎら　２００７年；Ｌｕｋａｃｓら　２００１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（ＤＳＳ）誘導性大腸炎モデル又は大腸炎のＭｕｃ２欠損マウスモデル（Ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｓｌｕｉｓら　２００６年）に投与することもできる。
【０３３８】
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。
【０３３９】
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。
【０３４０】
「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。
【０３４１】
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以上の）好適な試薬と組み合わせて使用することもできる。
【０３４２】
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（ＥＬＩＳＡ）、蛍光結合免疫吸着測定法（ＦＬＩＳＡ）　ウエスタンブロッティング、ＲＩＡ、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。
【０３４３】
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ＥＬＩＳＡ又はＦＬＩＳＡフォーマットが特に有用である。
【０３４４】
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、ＦＬＩＳＡの場合には蛍光標識（例えばＦＩＴＣ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ＥＬＩＳＡの場合には酵素（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）又はβ－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、ＴＭＢ、若しくはトルイジン、又は５－ブロモ－４－クロロ－３－インドール－β－Ｄ－ガラクトピラノシド（ｇａｌａｏｔｏｐｙｒａｎｏｓｉｄｅ）（ｘ－ｇａｌ）などを加えることにより検出される。かかるＥＬＩＳＡ又はＦＬＩＳＡ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。
【０３４５】
別の形態では、ＥＬＩＳＡ又はＦＬＩＳＡ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。

【０３４６】

イメージング方法

当業者には上記から明らかなとおり、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結合され、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ＭＲ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もよい。

【０３４７】

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、使用されるイメージング機器などによって幅広く異なり得る。

【０３４８】

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、光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結合は、被験体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。

【０３４９】

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。

【０３５０】

本発明の方法の特定の例は、被験体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。

【０３５１】

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、ローダミングリーン、ローダミングリーンの誘導体、エオシン、エリトリロシン（ｅｒｙｔｌ

ｉｒｏｓｉｎ）、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　ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｅｓｔｅｒ）、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。

【０３５２】

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}Ｉｎ又は^{99m}Ｔｃコンジュゲート、特に^{111}Ｉｎ－オクトレオチド又は^{99m}Ｔｃ－ソマトスタチン類似体のγカメライメージングの使用を含み得る。

【０３５３】

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。

【０３５４】

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結合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。

【０３５５】

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。

【０３５６】

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。

【０３５７】

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、プラセオジム、ネオジム、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結合される。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。

【０３５８】

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。

【０３５９】

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。

【０３６０】

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}Ｃ、^{13}Ｎ、^{15}Ｏ、^{18}Ｆ、^{82}Ｒｂ、^{62}Ｃｕ、及び^{68}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９９ｍＴｃ、^{201}Ｔｌ、及び^{67}Ｇａ、^{111}Ｉｎで標識される。

【０３６１】

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、Ａｎｄｅｒｓｓｏｎ－Ｅｎｇｅｌｓ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。

【０３６２】

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。

【０３６３】

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。

【０３６４】

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、ブ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（ＢＷＦＩ）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液及びデキストロー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。

【０３６５】

以下の非限定的な例において本発明をさらに説明する。

【０３６６】

実施例

下記の実施例において、実施例１～８は、抗体可変領域を含み、ＦＲ１内に２以上のシステイン残基を含むタンパク質の産生、ならびに該タンパク質への化合物の結合を記載する。これらの実験は、本発明者らがジスルフィド結合を形成できるまたは抗原へのタンパク質の結合を妨げることのない結合の位置を提供できるシステイン残基の位置を予測する方法を生み出したことを証明するためのモデルとして用いられる。これらの方法を用いて、本発明者らはＦＲ２内および／またはＦＲ３およびシステイン残基が導入され得るＣＤＲ２を含む領域内の位置も同定した。実施例９～１５は、ＦＲ２および／またはＦＲ３内のシステイン残基の位置決定ならびに該残基への化合物のに結合に関する実験を記載する。

【０３６７】

実施例１－材料および方法

１．１　システイン置換変異を操作する位置としてのフレームワーク１の分子モデリングおよび同定

多数のダイアボディ配列のV_H／V_L界面がモデリングされ、下記の基準を満たす残基が同定された：

・ドメインおよびドメイン－ドメイン界面の構造統合性に関与しない；
・他のアミノ酸との疎水性相互作用に関与しない；
・ＣＤＲに存在しない；
・ランダムコイルである可能性があり、そのため、骨格は二次構造モチーフに関与しない；
・必ずではないが、表面（例えば、ＣＤＲ外の非構造ループの中央）でランダムコイル残基に両側を囲まれているのが好ましい。

【０３６８】

この一部の残基から、ジスルフィド結合は、２つの天然残基をシステインで置換することにより、操作された。

【０３６９】

１．２　配列付番

抗体残基はカバット（１９８７および／または１９９１）に従って付番される。

【０３７０】

１．３　抗体のV_LおよびV_HドメインをコードするＤＮＡの合成

ＴＡＧ７２（配列番号：５８）に特異的なマウスｍＡｂおよびＨＥＲ２（配列番号：６０）に特異的なヒトｍＡｂのＶ領域を含むダイアボディをコードするＤＮＡ構築物は、適切な制限部位を用いて合成し、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ社のｐＵＣ５７にクローニングした。Ｖ領域は、V_H－Gly_4Ser－V_LまたはV_L－Gly_4Ser－V_Hとして配列した。

【０３７１】

１．４　一般的なクローニング手法

全てのＤＮＡ操作は、標準的なプロトコルに従って、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓから購入した試薬を用いて実施した。ダイアボディをコードするＤＮＡ構築物は、適切な制限酵素を用いてｐＵＣ５７から切り出し、１％（ｗ／ｖ）アガロースゲルで分離し、ならびにＱｉａｑｕｉｃｋゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いてゲルから精製した。構築物は、同様に調製したｐＥＴ２２ｂ発現ベクターに連結し、連結混合物は電気穿孔法により大腸菌ＸＬ１－Ｂｌｕｅ細胞に形質転換した。ミニプレップＤＮＡは形質転換体からＱｉａｇｅｎミニプレップ・スピン・キットを用いて抽出し、組み換えクローンはＴ７プロモーターおよびターミネータ・プライマーとともにＡｍｐｌｉＴａｑを含むダイ・ターミネータ・サイクル・シークエンシング・キットを用いた配列決定により同定した。V_H－Gly_4Ser－V_Lの方向で抗－ＴＡＧ７２ｍＡｂのＶ領域を含むクローンは、ＡＶＰ０４－０７（配列番号：５８）と命名された。V_H－Gly_4Ser－V_L方向で抗－ＨＥＲ２ｍＡｂのＶ領域を含むクローンは、ＡＶＰ０７－１７（配列番号：６０

）と命名された。このクローニング法により、カルボキシ末端６ｘＨＩＳタグを挿入できた。このタグは、下流精製法を効率化するために日常的に使用し、活性に中性であることが知られている。

【０３７２】

１．５　変異誘発によるシステイン残基およびＮ－末端セリンの導入

システイン残基は、残基８および１１または８および１２をコードするヌクレオチド配列を改変することにより、各V_LドメインのＦＲ１領域のＡＶＰ０４－０７のアミノ酸位置８および１１ならびにＡＶＰ０７－８６のアミノ酸位置８および１２に導入された。図のように、アミノ酸配列$Pro_8Ser_9Ser_{10}Leu_{11}$はＡＶＰ０４－０７の$V_L$領域のＦＲ１配列で見出される。位置８のプロリン残基はＣＣＧ配列によりコードされ、位置１１のロイシン残基はＣＴＧ配列によりコードされる。変異誘発技術はこれらのヌクレオチド配列をＴＧＣに変えるために用いられ、ＴＧＣはシステインをコードする。

【０３７３】

同様の技術は、タンパク質の天然Ｎ－末端残基をセリン残基に置換するために用いた。これはシステイン残基の導入前または導入後のいずれかに行った。

【０３７４】

ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）部位特異的変異誘発法（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）はシステイン残基を導入しＮ－末端を修飾するために用いた。このＰＣＲに基づく方法は、二重鎖変異ＰＣＲ産物を合成するために、所望する変異を含む２つの相補的な合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、プラスミドＤＮＡを鋳型として使用する。次いで、鋳型プラスミドを除去するためにＤｐｎＩ消化を適用し、変異誘発効率を増大させる。簡潔には、ＰＣＲは、１５ｎｇの鋳型ならびに各１２５ｎｇの順方向変異プライマーおよび逆方向変異プライマーを含む５０μｌの反応混合物を用いて、製造業者の取扱説明書に従って実施する。

【０３７５】

一例として、天然Ｎ－末端グルタミン残基をセリン残基で置換するために、ＡＶＰ０４－０７（配列番号：５８）を鋳型として、順方向プライマーとしての５’ - ＣＣ ＣＡＧ ＣＣＧ ＧＣＣ ＡＴＧ ＧＣＧ ＡＧＣ ＧＴＧ ＣＡＧ ＣＴＧ ＣＡＧ ＣＡＧ ＡＧＣ Ｇ - ３’（配列番号：６６）および逆方向プライマーとしての５’ - Ｃ ＧＣＴ ＣＴＧ ＣＴＧ ＣＡＧ ＣＴＧ ＣＡＣ ＧＣＴ ＣＧＣ ＣＡＴ ＧＧＣ ＣＧＧ ＣＴＧ ＧＧ - ３’（配列番号：６７）（Ｇｅｎｅｗｏｒｋｓ，　Ａｄｅｌａｉｄｅ，　ＳＡ）とともに使用した。得られる構築物は、部位特異的変異誘発を用いてV_L鎖のＦＲ１領域の位置８および１１にシステイン残基を導入するために、鋳型として使用した。増幅は下記の条件を用いて順に実施した：９５°Ｃ３０秒；９５°Ｃ３０秒、５５°Ｃ３０秒および６８°１３分から成る１８サイクル；６８°Ｃ７分の最終伸長。鋳型は３７℃で１時間ＤｐｎＩで消化した。形質転換体は、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社により提供されるプロトコルを用いて得られ、少量調製ＤＮＡを抽出し、ＤＮＡ配列は上記のように確認した。同様の変異誘発アプローチを用いて、本明細書で例示する全てのダイアボディズを作製した。

【０３７６】

V_L　ＦＲ１にシステイン置換変異および操作Ｎ－末端セリン残基を含む抗－ＴＡＧ７２ダイアボディはＡＶＰ０４－５０と命名された。V_L　ＦＲ１にシステイン置換変異および操作Ｎ－末端セリン残基を含む抗－ＨＥＲ２ダイアボディはＡＶＰ０７－６３と命名された。

【０３７７】

１．６　大量細菌培養を用いたダイアボディの発現

ダイアボディをコードするＤＮＡは化学コンピテント大腸菌ＢＬ２１細胞に標準的なプロトコルを用いて形質転換された。単一の形質転換体は、１％Ｄ－グルコースおよび１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含む５００ｍｌの２ｘＹＴに植菌し、３７℃で一晩、２２０ｒｐｍで振動しながらインキュベーションした。１８Ｌの同一培地に一晩の培養物を０．

１の最終OD_{600}まで播種し、OD_{600}が約０．６～０．８になるまで３０℃でインキュベーションした。培養は１２℃に移し、誘導温度に達するまで振動し続けた。タンパク質の発現は０．２ｍＭ　ＩＰＴＧの添加で誘導し、培養物は１２℃で１５時間インキュベーションした。細菌ペレットは１０，０００ｇの遠心分離により調製し、収集し、重量測定し、－２０℃で一晩保存した。

【０３７８】

１．７　大腸菌で発現したダイアボディの精製

細菌ペレット（約１５０～３００ｇ）は溶菌し、タンパク質抽出し、続いて精製した。５ｍＬ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リン酸塩、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、０．０２５％リゾチーム（ｗ／ｖ）、１ｍＭ　ＰＭＳＦ、２５０Ｕ／μＬ　Ｂｅｎｚｏｎａｓｅ、ｐＨ　７．４）は、各１グラムの細菌ペレットについて溶菌プロトコルで使用した。細菌ペレットは機械的均質化により溶菌緩衝液に再懸濁した後、超音波破砕した（氷上で６ｘ３０秒パルス）。細菌溶解物は続いて、遠心分離（１０，０００ｇ、３０分）および濾過（０．４５μｍフィルター膜）に先立って、３７℃３０分間インキュベーションした。

【０３７９】

ＡＫＴＡ　Ｐｕｒｉｆｉｅｒ１０（ＧＥ　ＬｉｆｅＳｃｉｅｎｃｅｓ）を使用するＨｉｓ－Ｔａｇアフィニティー・クロマトグラフィー精製が次いで濾過細菌溶解物からダイアボディを精製するために用いられた。２から４の５ｍＬ　ＨｉｓＴｒａｐ（商標）（ＧＥ　ＬｉｆｅＳｃｉｅｎｃｅｓ）Ｃｒｕｄｅ　ＦＦカラムは精製用に直列で使用した。溶解物は外付けＰ９６０ポンプを経てニッケルカラムを通過した。ＨｉｓＴｒａｐ（商標）カラムは１０カラム容積のＨｉｓ－Ｔａｇアフィニティー・クロマトグラフィー抽出緩衝液（２０ｍＭリン酸塩、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール）で洗浄した。精製タンパク質は５０％Ｈｉｓ－Ｔａｇアフィニティー・クロマトグラフィー溶出緩衝液（５００ｍＭリン酸塩、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール）および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イミダゾール最終濃度）に溶出された。溶出タンパク質を含む画分（ＡＫＴＡ　Ｕｎｉｃｏｒｎプログラムで２８０ｍＭ吸光度により測定）は、収集し、プールし、タンパク質濃度測定し、適切なイオン交換緩衝液に透析した。

【０３８０】

タンパク質は、タンパク質のｐＩより１．０～１．５ｐＨ単位高い（陽イオン交換用）またはタンパク質のｐＩより１．０～１．５ｐＨ単位低い（陰イオン交換用）緩衝液で透析した。通常、７．０～８．０のｐＩをもつダイアボディはＭＥＳ緩衝液（５０ｍＭ　ＭＥＳ、ｐＨ６．０、陽イオン交換用）で透析し、８．０～９．０のｐＩをもつダイアボディはリン酸緩衝液（５０ｍＭリン酸塩、ｐＨ７．０、陽イオン交換用）で透析し、ならびに５．０～６．５のｐＩをもつダイアボディはＴｒｉｓ緩衝液（２０ｍＭ、ｐＨ７．５、陰イオン交換用）で透析する。大半のダイアボディのｐＩは前記範囲内に収まる。ダイアボディは、少なくとも４時間おいて３回同一の緩衝液で交換しながら、２００ｘ容積の緩衝液に透析した。透析は１０Ｋカットオフ透析チュービングを用いて４℃で実施した。

【０３８１】

透析後、タンパク質試料は３２２０ｘｇで１０分間遠心分離し、変性した不溶性物質をペレット状にした後、イオン交換した。イオン交換はＡＫＴＡ　ｐｕｒｉｆｉｅｒ１０を用いて実施し、２ｘ５ｍＬ　ＨｉＴｒａｐ（商標）ＳＰ　ＨＰカラム流出を直列で用いて、透明な透析物質をＰ９６０外付けポンプを介してカラムに通過させた。この段階後、カラムは、１０カラム容積のイオン交換緩衝液で洗浄した後、タンパク質をカラムから溶出するための直線緩衝液勾配（塩勾配）を開始した。この工程において、イオン交換緩衝液は直線勾配にわたって同一の緩衝液で置換し、ＮａＣｌを１Ｍの最終濃度まで添加した。溶出勾配は３００ｍＬに対して６００ｍＭ　ＮａＣｌの最終濃度で実施した。

【０３８２】

溶出したダイアボディ（Ｕｎｉｃｏｒｎで２８０ｎｍ吸光度プロファイルにより決定）

に対応する画分をプールし、定量化した。イオン交換カラムから溶出した主要タンパク質種は通常ダイアボディの二量体形である。イオン交換後、溶出されたタンパク質物質は、透析膜（１０Ｋカットオフ）に据え、膜をポチエチレングリコール製品（Ａｑｕａｃｉｄｅ ＩＩ，Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）に曝すことにより４℃で約３ｍｇ／ｍＬまで濃縮した。その後、濃縮タンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィー（ゲル濾過）前に、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）（２００ｘ容積、４℃で最短４時間）で一度透析した。サイズ排除クロマトグラフィーは、Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ａｍｅｒｓｈａｍ（ＧＥ ＬｉｆｅＳｃｉｅｎｃｅｓ） Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）７５ ２６／６０調製等級カラムを用いてＰＢＳ中ＡＫＴＡ Ｐｕｒｉｆｉｅｒ１０で実施した。２８０ｎｍクロマトグラフの単一ピークに対応する溶出ダイアボディは定量化し、約３ｍｇ／ｍＬまでさらに濃縮し、前に概説したようにＰＢＳで透析し、－２０℃で保存した。ダイアボディはＳＤＳ－ＰＡＧＥ（１０％ Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）により常に監視した。タンパク質（０．５－５０μｇ）は、１００ｍＭ ＤＴＴの存在下または不在下のいずれかで１５０Ｖで９０分間電気泳動し、Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ Ｂｌｕｅ Ｒ－２５０染色により可視化した。

【０３８３】

１．８ ダイアボディの免疫活性を測定するための試験

可溶性抗原への結合活性はカラムシフトにより確立された。ＡＶＰ０４－０７およびＡＶＰ０４－５０ダイアボディの可溶性抗原はＴＡＧ７２であり、ウシ顎下腺ムチン（ＢＳＭ）（Ｓｉｇｍａ）から可溶性形態で入手できる。ＡＶＰ０７－１７およびＡＶＰ０７－６３のダイアボディについては、可溶性抗原は組み換えＨＥＲ２外部ドメインである。カラムシフト試験において、ダイアボディに対して少なくとも２倍モル過剰な可溶性抗原は外気温で１時間インキュベーションした。結合活性は、得られるダイアボディ／抗原複合体のピークを遊離ダイアボディのピークと比較することにより測定した。ダイアボディまたはダイアボディ／抗原複合体の溶出プロファイルは２８０ｎｍの吸光度により直接観測し、またはダイアボディがユーロピウム標識された場合、溶出画分はＶｉｃｔｏｒ時間分解蛍光光度計でＶｉｃｔｏｒマルチラベル・プログラム・ウィザードのユーロピウム様式を用いて測定した。

【０３８４】

１．９ ランダム面リシンへのユーロピウム標識

約３ｍｇ／ｍＬのダイアボディは解離を強化する時間分解蛍光分光試験用に遊離アミノ基にユーロピウム（ＤＥＬＦＩＡ Ｅｕ－Ｎ１ ＩＴＣ Ｃｈｅｌａｔｅ，Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）で標識した。ダイアボディは１ｎｍｏｌタンパク質に対して２０ｎｍｏｌユーロピウムの比率でユーロピウム試薬を用いて標識された。これは、１００ｍＭ重炭酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ９．０～９．３）の存在下で４８．５μＬの最終体積で４０ｎｍｏｌユーロピウム試薬に対して１００μｇのタンパク質を添加することにより達成した。反応は小さな磁性攪拌フリアを含むＲｅａｃｔｉ Ｖｉａｌ（Ｐｉｅｒｃｅ）で実施した。反応は４℃で一晩暗闇で行った。トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ，５０ ｍｍｏｌ／Ｌ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ ７．８）をインキュベーション（２００μｌ）後に反応に添加し、多量の遊離アミノ基を導入することにより過剰のユーロピウム試薬を急冷した。ユーロピウム反応はＳｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）２００ １０／３００カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いたゲル濾過および精製ダイアボディに対応する０．５ｍｌ画分の収集により精製した。画分のＥｕ濃度は、ＤＥＬＦＩＡ強化溶液の１：１００希釈をＬｕｍｉＴｒａｃ ６００ ９６ウェル・プレート上に作製することにより測定した。画分はＶｉｃｔｏｒ時間分解蛍光光度計でＶｉｃｔｏｒマルチラベル・プログラム・ウィザードのユーロピウム様式を用いて測定した。蛍光プロファイルは、ゲル濾過２８０ｎｍクロマトグラムに対してプロットし、ダイアボディ溶出プロファイルと相関する画分（２８０ｎｍ吸光度により測定）および蛍光のピークは収集しプールした。タンパク質は定量し、標識タンパク質のEu^{3+}濃度は、製造業者の取扱説明書に従って、キットとともに提供されるユーロピウム基準を用いて算出し、それ

により、反応Ｅｕ－Ｎ１　ＩＴＣキレートのモル吸光係数は２８０ｎｍで８０００である（１μｍｏｌ／Ｌ反応キレートは２８０ｎｍで０．００８の吸光度である）。保存前に、７．５％のＢＳＡを含むＴｒｉｓ－ＨＣｌ（極めて純粋、ＤＥＬＦＩＡユーロピウム標識キットに同梱）をユーロピウム標識ダイアボディに０．１％（ｗ／ｖ）の最終濃度まで添加した。

【０３８５】

１．１０　チオール化ダイアボディの還元

チオール化ダイアボディ（ＦＲ１内にシステイン置換変異を含むダイアボディを同定するために本明細書で用いる用語）は、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）と共にＰＢＳで２５分間室温でインキュベートした。還元後、ＴＣＥＰは１００ｍＭリン酸緩衝液＋１ｍＭのＥＤＴＡで予め平衡化したＰＤ１０脱塩カラムで除去され、０．５ｍＬの画分を回収し、ピークタンパク質画分をプールした。

【０３８６】

１．１１　チオールに特異的なユーロピウム標識

結合への遊離チオールの利用率を測定するために、チオール化ダイアボディは還元し、１－（ｐ－ヨードアセタミドベンジル）ジエチレントリアミン－Ｎ^{1}－Ｎ^{1}，Ｎ^{2}，Ｎ^{3}，Ｎ^{3}－５酢酸（ＤＴＰＡ）（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ，Ｔｕｒｋｕ，Ｆｉｎｌａｎｄ）のＥｕ$^{3+}$キレートで標識した。ヨードアセタミド基はダイアボディの遊離スルフヒドリル基と反応し、安定な共有チオエーテル結合を形成する。標識は製造業者の取扱説明書に従って実施した。簡潔には、タンパク質は、５０－１００ｍＭ炭酸水素ナトリウム緩衝液＋４ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ　８．５で３ｍｇ／ｍｌまで濃縮した。Ｅｕ－ＤＴＰＡは３０倍（Ｅｕ－ＤＴＰＡ：タンパク質）モル過剰に添加し、ＡＶＰ０４－５０を還元した。反応は４℃で３～１６時間後に完了した。未反応Ｅｕ－ＤＴＰＡは、Ｔｒｉｓ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カラムのゲル濾過によりタンパク質から分離した。それぞれ得られる画分は、Ｅｎｈａｎｃｅｍｅｎｔ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ，Ｔｕｒｋｕ，Ｆｉｎｌａｎｄ）で希釈し、Ｖｉｃｔｏｒ時間分解蛍光光度計を用いてユーロピウム計数用に試験した。ピークのタンパク質画分に対応するピークのユーロピウム計数はプールし、０．１％の極めて純粋なＢＳＡで安定化し、４℃で保存し、光から保護した。取り込まれたＥｕ－ＤＰＴＡの濃度は、キットに同梱された１００ｎＭ　Ｅｕ基準と比較して試料のＥｕ数を算出することにより測定した。

【０３８７】

１．１２　遊離スルフヒドリルの定量化

還元チオール化ダイアボディは、Ｍｉｃｒｏｃｏｎ遠心濃縮器（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＭＡ）を用いて少なくとも２ｍｇ／ｍｌまで濃縮した。反応性チオールを試験するため、２５μｌの還元タンパク質は、２５０μｌの１００ｍＭ　リン酸緩衝液＋１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ８．０および５μｌの４ｍｇ／ｍＬ　エルマン試薬（ＤＴＮＢ）（Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌ）と混合した。反応を周囲温度で１５分間進行させた。遊離スルフヒドリル濃度はモル吸光係数により定量化し、この緩衝系における４１２ｎｍでのＴＮＢのモル吸光係数は１４，１５０Ｍ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$と推測した。ダイアボディ当たりのスルフヒドリル基の概算値は、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得られた。

【０３８８】

１．１３　ダイアボディのチオール部位特異的ペグ化

ヘテロ二機能性単分散マレイミド－ＰＥＧ２０００－ＮＨ２は、ＪｅｎＫｅｍ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、米国（多分散性Ｑ－値＜１．０４）から購入した。使用前に少量のＰＥＧを水でもどし、１００ｍＭリン酸緩衝液＋１ｍＭ　ＥＤＴＡ　ｐＨ７．０で２０倍モル過剰に還元チオール化ダイアボディに添加した。反応は絶えず攪拌しながら３～１６時間４℃で進行させた。インキュベーション後、全試料をＳｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）２０

０　１０／３００カラムに適応した。

【０３８９】

実施例２－システイン置換変異を操作するための適切な位置としてのフレームワーク１の分子モデリングおよび同定

コンピュータによる可変鎖の分子モデリングは常に実施例１で概説した基準を満たすフレームワーク１（ＦＲ１）の残基を示した。ＡＶＰ０４－０７（配列番号：５９）を含むマウス・カッパ可変軽鎖に照らして、８から１１のV_L残基はシステイン置換変異（図１Ａ）に構造的に最適であると示された。さらに、コンピュータによる分子モデリングは、V_Lフレームワーク１に導入されたシステイン置換変異が３次元空間でダイアボディの既知の抗原結合部位から離れていることも示した（図１Ｂ）。

【０３９０】

残基８から１２のシステイン置換変異が、コンピュータ上、ＨＥＲ２に特異的なＡＶＰ０７－１７ダイアボディ（配列番号：６１）を含むヒト・ラムダ可変鎖に含まれる場合、分子モデリングから同様な結果が観察された。

【０３９１】

実施例３－チオール化ダイアボディ遺伝構築物の作製

ＡＶＰ０４－０７（配列番号：５８）およびＡＶＰ０７－１７（配列番号：６０）に照らしてコンピュータ上規定されるシステイン置換変異を導入する前に、天然Ｎ－末端残基をコードするコドンがいずれの場合にもセリン残基をコードするコドンと置換され、新規な遺伝構築物を形成した。これらの新規な遺伝構築物から、システイン置換変異がＡＶＰ０４－０７に導入され、配列番号：１５４に示される遺伝構築物を形成した。ＡＶＰ０７－１７の場合、システイン置換変異を挿入する前にさらなる修飾が為され（配列番号：６４）、配列番号：１５６に示される配列を含む構築物を形成した。全構築物の遺伝配列は実施例１で概説するように確認した後、下流処理用に、例えば、発現および／または精製および／または分析用に、ＢＬ２１発現細菌株へサブクローニングした。

【０３９２】

実施例４－ダイアボディの精製

全てのダイアボディは実施例１で概説する中核技術後に精製した。ＴＡＧ７２に特異的なＡＶＰ０４－５０（配列番号：１５５）ダイアボディにより例示される通常の精製戦略が本明細書で報告される。

【０３９３】

細菌ペレット由来のＡＶＰ０４－５０の第１段階精製は、Ｈｉｓ－Ｔａｇアフィニティー・クロマトグラフィーを利用した。処理された材料は、直列に設置された複数の５ｍＬ　ＨｉｓＴｒａｐ（商標）Ｃｒｕｄｅ　ＦＦカラムから溶出され、得られる２８０ｎｍクロマトグラフ溶出プロファイルは図２Ａに表示する。２６０ｍＭイミダゾールを含む２８０ｎｍの最高吸光度で溶出した画分（図２Ａの矢印）は、プールし、５０ｍＭ　ＭＥＳ、ｐＨ６．０（２００ｘ体積の緩衝液３回交換）に透析した後、陽イオン交換した。陽イオン交換は、前に概説したように、直列の２ｘＨｉＴｒａｐ（商標）ＳＰ　ＨＰカラムで実施した。１ｍＳ／ｃｍから約８０ｍＳ／ｃｍの伝導度にわたる直線塩勾配の下、ＡＶＰ０４－５０ダイアボディは通常約３０ｍＳ／ｃｍで溶出した。図２Ｂは、２８０ｎｍの吸光度をたどる典型的な陽イオン交換溶出プロファイルを表し、ＡＶＰ０４－５０の主な二量体イソ型（矢印）が他の望ましくないＡＶＰ０４－５０イソ型またはタンパク質から容易に分離できた。対象の主なイソ型を含む溶出画分（図２Ｂの矢印で規定）は下流精製用にプールした。

【０３９４】

陽イオン交換後、ＡＶＰ０４－５０二量体は濃縮し、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）７５　２６／６０調製等級カラムを通過した。実施例１で概説した溶出設定下、ＡＶＰ０４－５０二量体は投入後約５３．５分に溶出した（図２Ｃ）。溶出したＡＶＰ０４－５０二量体に対応する図２Ｃで概説した限界内の画分は、プールし、１．５～３ｍｇ／ｍｌに濃縮した。精製産物の最終純度は、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）２００　１０／３００カ

ラムでのゲル濾過クロマトグラフィーおよびＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動により、算定した。採用される精製法は通常産物の純度を戻し、ゲル濾過では単一のクリーンな溶出ピークをもたらし（図２Ｄ）、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動では単一の規定種をもたらした（図２Ｅ）。精製および得られる純度のプロファイルは、ＡＶＰ０４－０７、ＡＶＰ０４－５０、ＡＶＰ０７－１７およびＡＶＰ０７－６３を含む試験ダイアボディのいずれとも有意差がなかった。さらに、ダイアボディ（ＡＶＰ０４－０７およびＡＶＰ０７－１７）のいずれか、ならびに操作されたＮ－末端セリン残基およびシステイン置換変異を含むそれぞれのダイアボディ（ＡＶＰ０４－５０およびＡＶＰ０７－６３）で、収率への有意な変化は観察されなかった。

【０３９５】

実施例５－ダイアボディのインビトロ免疫活性評価

精製ダイアボディ（ＡＶＰ０４－０７、ＡＶＰ０４－５０、ＡＶＰ０７－１７およびＡＶＰ０７－６３）の免疫活性は、実施例１で概説した中核方法の後にカラムシフト試験によりインビトロで試験した。ＡＶＰ０４－０７およびＡＶＰ０４－５０は、それらの抗原ＢＳＭ（ＴＡＧ７２を含む）と予め複合体形成させた後、ゲル濾過し、ダイアボディ単独と比べた場合に溶出時間の有意な短縮が観察された（図３Ａ、３Ｂ）。同様に、ＡＶＰ０７－１７およびＡＶＰ０７－６３も、ゲル濾過の溶出時間の有意な短縮から明らかなように、それらの抗原と複合体形成を示した（図３Ｃ、３Ｄ）。ダイアボディが無関係な抗原とインキュベーションした場合、または無相関な抗原がダイアボディとインキュベーションされた場合に、複合体形成は観察されなかった。これらの結果は、システイン置換変異がダイアボディの抗原への結合を抑止しないことを示唆する。

【０３９６】

実施例６－システイン置換変異によるダイアボディの遊離スルフヒドリルの定量化

V_Lフレームワーク１のシステイン置換変異が選択的還元に利用可能か否かを決定するために、チオール化ダイアボディ（ＡＶＰ０４－５０）はＴＣＥＰで還元し、反応性チオールは、エルマン試薬を用いて定量した。無傷ＩｇＧおよびV_Lフレームワーク１にシステイン置換変異を含まないダイアボディ（例えば、いずれかのＡＶＰ０４－０７）は標準対照として使用した。実施例１で概説した還元条件下で、天然および無傷のＩｇＧは還元に利用できる８の反応性チオールを有し、ＡＶＰ０４－０７のようなダイアボディは遊離の反応性チオールを有しない。これらの条件下、可変軽鎖の不変カバット位置２３から８８および可変重鎖のカバット位置２２から９２にジスルフィド結合を形成する保存システインは反応せず、結合に利用できない。

【０３９７】

遊離スルフヒドリルの定量は、無傷ＩｇＧおよびシステイン置換変異を含まないダイアボディ対照におけるシステインの正確な数がそれぞれ８およびゼロであると反応性があることを示した（表２）。２つの同一な単量体鎖から成るダイアボディであるＡＶＰ０４－５０では、各鎖はV_Lフレームワーク１に２つのシステイン置換変異を含み、平均４システインがＴＣＥＰによる還元に自由に到達可能であり、少なくとも４つの遊離反応性チオールを形成した（表２）。示すデータは３回の個別実験を代表するものである。

【０３９８】

【表２】

表2:モル吸光係数によるAVP04－50の反応性チオールの定量化

ダイアボディ	タンパク質 [mg／mL]	タンパク質 [mol／L]	OD412nm (cm)	[S－H] mol／L	[S－H]／[タンパク質]
IgG	1.9	1.32E－05	0.16＋／－0.01	1.3E－04	8
AVP04－50	2.5	4.5E－05	0.28＋／－0.01	2.2E－04	4
対照 ダイアボディ	3.24	5.9E－05	0.03＋／－0.01	2.4E－04	0

【０３９９】

実施例７－反応性チオールへの結合後のダイアボディのインビトロ免疫活性評価

V_Lフレームワーク１のシステイン置換変異への小ペイロードの付着がダイアボディの結合活性を抑止しないことを立証することは重要であった。このために、ダイアボディは還元状態にかけられ、次いで実施例１で概説したようにチオールに特異的なユーロピウム標識に使用した。免疫活性はカラムシフトにより結合後に評価した。

【０４００】

ＡＶＰ０４－５０のV_Lフレームワーク１のシステイン置換変異はユーロピウムを装填したＤＴＰＡキレートで標識した後、実施例１で概説したように免疫活性試験をした。ユーロピウム－ＡＶＰ０４－５０は、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）２００　１０／３００カラムでのゲル濾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なように、その抗原ＢＳＭ（ＴＡＧを含む）と複合体を形成できることを示した。溶出時間は約２７分（Ｅｕ－ＡＶＰ０４－５０）から約１４分（Ｅｕ－ＡＶＰ０４－５０－ＴＡＧ７２複合体）に短縮された（図４）。

【０４０１】

これらの結果は、小さなペイロードが、結合活性およびその抗原への特異性を抑止することなく、システイン置換変異によりダイアボディに結合できることを示す。

【０４０２】

実施例８－反応性チオールへのＰＥＧの結合後のダイアボディのインビトロ免疫活性評価

システイン置換変異を含むダイアボディが発現し、精製され、ならびに天然状態でまたはシステイン置換変異が選択的に還元され小さなペイロードに結合した場合に免疫活性があると示せることが明らかになり、ＰＥＧなどのインビボ半減期延長剤も免疫活性を抑止することなく反応性システイン置換変異体に特異的に結合できることを示すことは重要であった。このために、ヘテロ二機能性単分散ＰＥＧは、上記および実施例１で概説したように、システイン置換変異によりＡＶＰ０４－５０（配列番号：１５５）と部位特異的に結合した。ＰＥＧ化タンパク質（ＡＶＰ０４－５０－ＰＥＧ２０００）は非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で分離し（図５Ａ）、ＡＶＰ０４－５０単量体鎖につき１０ｋＤａの平均分子量変化が観察された。この分子量変化は、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）２００　１０／３００カラムのゲル濾過クロマトグラフィーにおいてタンパク質溶出時間の変化によっても確認された。実施例１で概説したゲル濾過条件下で、天然状態のＡＶＰ０４－５０はこのカラムから約３０分で溶出した。ＰＥＧがＡＶＰ０４－５０に部位特異的に結合した際、主なイソ型の溶出時間は約２４分まで有意に短縮され（図５Ｂ）、見かけ分子量の増加を示唆し、故にダイアボディはうまくＰＥＧ化された。

【０４０３】

ＡＶＰ０４－５０－ＰＥＧ２０００が依然抗原に結合できることを確認するために、カラムシフト結合試験を実施例１に概説するように実施した。標準条件下で、ＡＶＰ０４－５０－ＰＥＧ２０００はＳｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）２００　１０／３００カラムから約２４分で溶出した（図５Ｃの点線）。ＡＶＰ０４－５０－ＰＥＧ２０００がその抗原のＢＳＭ（ＴＡＧ７２を含む）と複合体を形成した場合、２８０ｎｍの吸光度をたどることにより１５分まで溶出時間の短縮が観察され、ＡＶＰ０４－５０－ＰＥＧ２０００／ＴＡＧ７２複合体の形成を明瞭に示した（図５Ｃ）。

【０４０４】

総合すれば、これらのデータは、抗原への結合を抑止することなく、部位特異的にＡＶＰ０４－５０をシステイン置換変異体にＰＥＧ化することが可能であることを示唆する。これらのデータは、抗原への結合を抑止することなく、大化合物をチオール化ダイアボディに結合することが可能であることも示している。

【０４０５】

実施例９－分子モデリング

９．１　アヴィボディの分子モデル作成

アヴィボディは、抗体の可変ドメインを含む組換えタンパク質である。アヴィボディ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。これらのアヴィボディは、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。

【０４０６】

モデル化するアヴィボディの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、モデル化されたアヴィボディの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。

【０４０７】

アヴィボディダイアボディ及びトリアボディについては、空間における鋳型Ｆｖの配置の設定に四次鋳型を使用し、これらのアヴィボディのモデリングを可能にした。ダイアボディについては１ＬＭＫ（Ｐｅｒｉｓｉｃら、１９９４年）又は１ＭＯＥ（Ｃａｒｍｉｃｈａｅｌら、２００３年）を様々に使用し、トリアボディについては１ＮＱＢ（Ｐｅｉら、１９９７年）を使用して、モデリングのため四次空間に鋳型を配置した。

【０４０８】

四次配置については、ＦｖドメインについてＩｓｒａｅｌ　Ｇｅｌｆａｎｄにより作成されたコア座標セット（Ｇｅｌｆａｎｄら、１９９８年ａ）の複数部を四次鋳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。各アヴィボディについて選択されたＦｖ鋳型を、次にこの「核」ホモ二量体又はホモ三量体中の各Ｆｖと最小二乗法でアラインメントして鋳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、様々なアヴィボディのモデリングに必要な連結性を反映させた。

【０４０９】

いずれの場合にも、最終モデリングの実行におけるＦｖ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。

【０４１０】

ソフトウェアに組み込まれたＭＯＤＥＬＬＥＲアルゴリズム（Ｓａｌｉ及びＢｌｕｎｄｅｌｌ、１９９３年）を用いるＤｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｔｕｄｉｏ（ＤＳ）ソフトウェア（ｖ２．５、Ａｃｃｅｌｒｙｓ、ＣＡ，米国）を使用してアヴィボディ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ＭＯＤＥＬＬＥＲ作成の確率密度関数（ＰＤＦ）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（ＤＯＰＥ）スコアに基づき最良のモデルを選択した（Ｓｈｅｎら、２００６年）。さらなる解析のため、選択されたモデルをｐｄｂファイルに書き出した。得られたモデルの画像もまたＤＳを使用して作成した。

【０４１１】

それぞれ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変異残基の溶媒露出表面積（ＡＳＡ）の計算が含まれた。

【０４１２】

ＡＳＡは、モデル化ジスルフィド変異体をコンジュゲーションに利用できる能力の評価として本発明で用いられた。各構築物について、１０モデルを作製し、各モデル化Ｖドメインの各変異残基について平均ＡＳＡを決定し、次いで標準偏差を計算した。この分析において、高い標準偏差は特定残基の表面露出がモデルに応じて変化することを示し、モデル化ジスルフィドの可変性を示し、故に還元および／または結合に到達しにくい可能性がある。

【０４１３】

それぞれ選択されたモデルのさらなる解析は各構築物の各Ｖドメインについても含み、平均ＲＭＳＤ（Ｙａｓａｒａにおける）は上述の最良天然モデルのＶドメインにおけるカ

バット指定フレームワーク残基と他のモデル化Ｖドメイン全てのＶドメインにおけるカバット指定フレームワーク残基間で非変異および変異の両方で計算された。再度、各構築物について、標準偏差を算出し、ここで、第１に天然Ｖドメイン・フレームワーク領域間で、第２に天然Ｖドメイン・フレームワーク領域と変異Ｖドメイン・フレームワーク領域間で、構造的可変性を示す。この分析は、変異ＲＭＳＤ値を特定構築物について非変異ＲＭＳＤ値と比較した場合、チオール変異体の構造衝撃の指標を与える。

【０４１４】

９．２　ＡＶＰ０４－０７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

ＡＶＰ０４－０７　アヴィボディ（配列番号５９）は、理論的ｐＩ／Ｍｗ：８．０／５１ｋＤａの、V_Lκ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。ＡＶＰ０４－０７は腫瘍関連抗原ＴＡＧ７２を認識する。このアヴィボディの改変版は本明細書でＡＶＰ０４－ｘｘと呼ばれ、ここで、「ｘｘ」はアヴィボディの異なる形態を指定する数である。

【０４１５】

このアヴィボディはネズミ科動物モノクローナル抗体ＣＣ４９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。ＣＣ４９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（Ｒｏｂｅｒｇｅら、２００６年）。

【０４１６】

ＡＶＰ０４－０７のV_H及びV_Lドメイン配列でＰＤＢを検索すると、ＰＤＢの１つの抗体、１ＺＡ６が浮上し（Ｌａｒｓｏｎら、２００５年）、これはギャップなしアラインメントでV_H及びV_Lの双方のドメインにおいてＡＶＰ０４－０７と８２％の同一性マッチを有した。

【０４１７】

１ＺＡ６鋳型は、抗腫瘍ＣＨ２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、ＴＡＧ７２抗原を認識する。

【０４１８】

１ＺＡ６　ｐｄｂファイル中のＦｖ構造を使用してＡＶＰ０４－０７ダイアボディのＦｖドメインをモデル化した。上記に記載される１ＬＭＫを鋳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ＡＶＰ０４－０７ダイアボディを形成した。選択された最高スコアのＡＶＰ０４－０７ダイアボディモデルをチオール変異の標的とされる位置（９．６節）とともに図７に示し、これはこのアヴィボディ二量体の「非変異の」立体配置に相当する。

【０４１９】

９．３　ＡＶＰ０７－１７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

ＡＶＰ０７－１７　アヴィボディ（配列番号６１）は、理論的ｐＩ／Ｍｗ：６．４／５５ｋＤａの、極めて長いＣＤＲＨ３ループ、V_Lλ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。ＡＶＰ０７－１７は腫瘍関連抗原ＨＥＲ２を認識する。このアヴィボディの改変版は本明細書でＡＶＰ０７－ｘｘと呼ばれ、ここで、「ｘｘ」はアヴィボディの異なる形態を指定する数である。

【０４２０】

ＡＶＰ０７－１７は、標準的なＦＡＳＴＡ及びＢＬＡＳＴ検索を使用するとき、ＡＶＰ０４－０７と比較してＲＣＳＢ　ｐｄｂで利用可能な構造との同一性が低い。ＡＶＰ０４－０７について得られた結果と比較したとき、それほど高いＡＶＰ０７－１７との同一性を示したＶＬ及びＶＨのＦｖ対はなかった。

【０４２１】

Ｆｖドメイン全体についての鋳型選択を改良するＰＤＢの別の検索方法を試験した。ＭＡＴＲＡＳサーバー（Ｋａｗａｂａｔａ　２００３年、Ｋａｗａｂａｔａら　２０００年）は、ＢＬＡＳＴプログラムを用いた現行のＰＤＢ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鋳型選択を支援する。この方法から２つの良好な鋳型が明らかとなり、いずれもV_L及びV_Hの双方のドメインにおいて６４％超の配列同一性を有した。

【０４２２】

選択されたＦｖ鋳型は、ａ）２Ｂ１Ｈ（Ｓｔａｎｆｉｅｌｄら、２００６年）（これはリンカー残基及びＣＤＲＨ３を除きＡＶＰ０７－１７と８０．６％の同一性を有した）、及びｂ）３Ｇ０４（Ｓａｎｄｅｒｓら、２００７年）（これはリンカー残基及びＣＤＲＨ３を除きＡＶＰ０７－１７と７３．５％の同一性を有した）のｐｄｂファイルに含まれた。

【０４２３】

上記に記載される１ＬＭＫダイアボディを鋳型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ＡＶＰ０７－１７（「非変異の」）ダイアボディを形成した。モデリングでは、ＡＶＰ０７－１７の長いＣＤＲＨ３ループ長さもまた、鋳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。これらは鋳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。ここに提示するいずれの場合にも、ループがアヴィボディ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。

【０４２４】

ＡＶＰ０７－１７ダイアボディの選択された高スコアモデルをチオール変異（９．６節）の標的とされる位置とともに図８に示し、このアヴィボディ二量体の「非変異」立体配置を表す。

【０４２５】

９．４　ＡＶＰ０２－６０ダイアボディの分子モデルの作成

ＡＶＰ０２－６０　アヴィボディ（配列番号６３）は、理論的ｐＩ／Ｍｗ：８．４７／５０．１ｋＤａの、V_L鎖κ及びサブグループＩＩＩ　V_H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）。これはムチンのタンパク質コア内のエピトープＲＰＡＰ（配列中で約４０回反復するモチーフ）を認識する。このアヴィボディの改変版は本明細書でＡＶＰ０２－ｘｘと呼ばれ、ここで、「ｘｘ」はアヴィボディの異なる形態を指定する数である。

【０４２６】

V_L又はV_HによるＢＬＡＳＴ及びＦＡＳＴＡ検索から、V_L及びV_H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鋳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_Hを有する鋳型は１つのみであった。従ってV_H及びV_Lモデリング用に２つの鋳型を選択した一方、１つの追加的な鋳型をV_Hのみのモデリング用に選択した。選択された鋳型は、ａ）１ＭＨＰ　V_H及びV_L（８６．９％の同一性、８９．６％の相同性；Ｋａｒｐｕｓａｓら、２００３年）、ｂ）２Ｂ２Ｘ　V_H及びV_L（８５．７％の同一性、８８．３％の相同性；Ｃｌａｒｋら、２００６年）及びｃ）２ＡＤＧ　V_H：（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鋳型であった、このＦｖのV_Lドメインはモデリングでは使用しなかった）であった。

【０４２７】

概して、鋳型およびＡＶＰ０２－６０は８８．４％の同一性及び９１．１％の相同性を有する。上記に記載される１ＬＭＫダイアボディを鋳型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（「非変異の」）ダイアボディを形成した。

【０４２８】

ＡＶＰ０２－６０ダイアボディの選択された最高スコアモデルをチオール変異の標的と

される位置（９．６節）とともに図９に示し、このアヴィボディ二量体の「非変異」立体配置を表す。

【０４２９】

９．５　置換システイン変異を操作するためのフレームワーク２および３のジスルフィド挿入位置の同定及びその分子モデリング　抗体のV_L及びV_Hドメインは、第１に、古典的には２つのシートに７～１０個のβ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２に、ドメイン軸の範囲内でβシートの対称性を示すVタイプ免疫グロブリン（ｉｍｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ）のメンバーである（Ｈａｌａｂｙ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／ＩＥｎｔｒｙ？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_H（１～４型）、$V_L\kappa$、$V_L\lambda$ドメインに分けられる。

【０４３０】

十分に定義された構造的類似性は、V_H（１～４型）、$V_L\kappa$、および$V_L\lambda$のドメイン間に存在する。これらの既知で容認される構造類似性により、任意のV_Lドメインで同定されたフレームワーク内システイン置換変異の大部分も任意の他のV_Hドメインにおける同一の構造的位置に移転可能であるはずと仮定することは妥当である。この仮定は、V_Lの同一の位置に高い信頼性で構造的に適合し得ないＦＲ３V_Hを明らかな１つの例外として、以下で真実であることが示される（以下のモデリング変異ｃ９を参照）。

【０４３１】

操作されたシステイン置換の好ましい残基は、ＡＶＰ０４－０７ダイアボディのV_Lドメインの目視検査により選択される。好ましい残基は、一般に互いに向けられた側鎖、一般に溶媒に曝される側鎖原子、および約６～７ÅのＣα炭素原子間の距離を含む特定構造上の必要条件を満たす場合に同定された。係る基準を満たす操作システイン置換は、制御された還元で選択的に分解されペイロードに結合するために使用できるフレームワーク内ジスルフィド架橋置換を形成する変異の良い候補とみなされた。次いで、これらのコンピュータ上での位置は最小二乗アラインメントにより同一ＦｖのＶ$_H$ドメインに移され、このドメインはさらなる潜在部位について調査した。

【０４３２】

次に、ＡＶＰ０４－０７のV_LおよびV_Hドメインにおける全ての同定部位は、最小二乗アラインメントおよびそれらのモデリングにより、ＡＶＰ０２－ｘｘおよびＡＶＰ０７－ｘｘファミリーＦｖｓに移されうる。

【０４３３】

免疫グロブリンVドメイン構造のフレームワーク２（ＦＲ２）は、システイン置換を操作するための候補である。ＦＲ２はカバットにより３５から４９までのV_L残基および３６から４９までのV_H残基として定義される。これは、ＣＤＲ１からＣＤＲ２に戻るループ／折り返しまで伸びる免疫グロブリンβシートの'およびＣ‘鎖を含む。Ｃ鎖はＣＤＣ’ＦＧシートの一部であり、Ｃ’およびＦの両鎖と相互作用を有する。Ｃ’鎖はシートの端にあり、カバットＣＤＲ３およびＦＲ４のＣ末端部分に埋没した反対ドメインとの相互作用によりＦｖのV_HおよびV_Lドメイン間の接触面を一部含む。

【０４３４】

２つの位置はV_Lドメインのシステイン置換を操作するための候補として同定された。これらの位置は、カバット残基Ｌ３８～Ｌ４４（モデル化変異ｃ５として標識される）およびＬ３８～Ｌ４２（モデル化変異ｃ６として標識される）であった。

【０４３５】

抗体のV_HおよびV_Lドメイン間の構造的類似性が知られ容認されているため、V_Lの

システイン置換を操作する候補はV_Hドメインの同一の構造位置に容易に位置付けされうる。V_Hにおけるモデル化変異体ｃ５およびモデル化変異ｃ６の構造類似体はカバット残基Ｈ３９～Ｈ４５（モデル化変異ｃ５）およびＨ３９～Ｈ４３（モデル化変異ｃ６）であった。

【０４３６】

免疫グロブリンＶドメイン構造のフレームワーク３（ＦＲ３）も、システイン置換を操作する良い候補である。ＦＲ３はカバットにより５７から８８までのV_L残基および６６から９４までのV_H残基として定義される。これは、Ｃ’’、Ｄ、ＥおよびＦ鎖ならびにそれらの接続するループ／折り返しを含む。ＦＲ３内で、ＶＬのカバット位置６３～７４間およびＶＨのカバット位置６８～８１間の領域はシステイン置換を操作するのに適した領域として同定された。各領域内の２つの位置はシステイン置換を操作するのに適した候補として同定された。これらの候補は、V_Hのカバット残基Ｈ７０～Ｌ７９（モデル化変異ｃ８として標識される）およびＨ７２～Ｈ７５（モデル化変異ｃ９として標識される）であった。上記に概説したように、抗体のV_HおよびV_Lドメイン間の構造的類似性により、ＦＲ３領域のモデル化変異体ｃ８は、V_Lドメインの同一の構造位置に残基Ｌ６５～Ｌ７２で容易に位置付けされうる。対照的に、モデル化変異ｃ９（即ち、カバット残基V_HＨ７２～Ｈ７５）の構造類似体はV_Lドメインに存在せず、なぜなら、このループはV_Hドメイン内で高度に保存されているが、V_Lドメイン・ループは２残基短いため、モデル化変異ｃ９はジスルフィドをV_Lドメインに導入する標的には不十分だからである。

【０４３７】

システイン置換を操作する候補の評価において、対象の特定部位はＦＲ３カバット残基Ｈ８２Ｃ～Ｈ８６／Ｌ７８～Ｌ８２（モデル化変異ｃ４として標識される）であった。これらの残基は、比較的少ない溶媒露出を除いて、システイン置換を操作する構造的必要条件の全てを満たした。モデル化変異残基はさらに小さい接触可能表面積を示した。モデル化変異ｃ４を含む変異体（カバットＬ７８～Ｌ８２、ＡＶＰ０４－８３、配列番号：１０５およびカバットＨ８２Ｃ～Ｈ８６、ＡＶＰ０４－１１４、配列番号：１１１）は、操作システイン置換の導入が安定性および／または免疫活性を抑止しないことを立証するために設計、発現、試験および使用されたが、その後の制御ジスルフィド結合還元およびペイロードの結合は高い接触表面積に依存した。

【０４３８】

操作システイン置換を含む全てのアヴィボディは本明細書で「チオール化」アヴィボディと呼ばれる。

【０４３９】

９．６　ＡＶＰ０４－ｘｘアヴィボディ・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２およびフレームワーク３のシステイン挿入位置及び分子モデリング　非変異ＡＶＰ０４－０７モデルは、フレームワーク内ジスルフィド結合を形成できる上記のフレームワーク２（ＦＲ２）およびフレームワーク３（ＦＲ３）操作システイン置換を位置付ける出発点であった。同定位置は天然ＡＶＰ０４－０７ダイアボディ・モデルについて図７に示す。

【０４４０】

フレームワーク２の操作システイン置換の例示位置は下記の通りに同定された：　・カバット残基Ｌ３８およびＬ４２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１０１）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－７９ダイアボディ核酸配列（配列番号：１００）。　・カバット残基Ｌ３８およびＬ４４で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１０３）、本明細書でモデル化変異番号ｃ５とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－８０ダイアボディ核酸配列（配列番号：１０２）。

・カバット残基Ｈ３９およびＨ４３で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１０７）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１１１ダイアボディ核酸配列（配列番号：１０６）。

・カバット残基Ｈ３９およびＨ４５で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１０

９）、本明細書でモデル化変異番号ｃ５とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１１２ダイアボディ核酸配列（配列番号：１０８）。

・カバット残基Ｌ３８およびＬ４２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１１９）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１２４ｓｃＦｖ核酸配列（配列番号：１１８）。

・カバット残基Ｌ３８およびＬ４２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１２１）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１２５トリアボディ核酸配列（配列番号：１２０）。

【０４４１】

フレームワーク３の操作システイン置換の例示位置は下記の通りに同定された：　・カバット残基Ｈ７０およびＨ７９で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１１３）、本明細書でモデル化変異番号ｃ８とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１２０ダイアボディ核酸配列（配列番号：１１２）。

・カバット残基Ｌ６５およびＬ７２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１１７）、本明細書でモデル化変異番号ｃ８とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１２３ダイアボディ核酸配列（配列番号：１１６）。

・カバット残基Ｈ７２およびＨ７５で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１１５）、本明細書でモデル化変異番号ｃ９とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１２１ダイアボディ核酸配列（配列番号：１１４）。

【０４４２】

上記に概説したように、操作システイン置換（モデル化変異ｃ９）のＨ７２～Ｈ７５候補はＤ鎖とＥ鎖間のループ／折り返しで生じる。このループはV_Hドメイン内で高度に保存されているが、V_Lドメイン・ループは２残基短いため、V_Lドメインにおける同一の構造位置は操作システイン置換に不十分な標的と思われる。これは、V_Lドメイン内にマッピングされた操作システイン置換がV_Hドメイン内の同一の構造位置に容易にマッピングされうるという本明細書の記載に対して唯一確認された例外とみなされる。

【０４４３】

ＡＶＰ０４－０７モデル（実施例９．２）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およびジスルフィド結合の指定を除いて、同一の入力パラメータを使用して上記変異体のモデリングを反復した。モデル評価もまたＡＶＰ０４－０７モデルと同様に行った。操作システイン置換の各候補をモデリングに供し、１つのV_Lシステインペア変異及びその類似V_Hシステインペア変異を各モデリング実行に含めた。ＡＶＰ０４－０７　ＦＲ２／ＦＲ３構造に対するシステイン置換モデリングの結果を図１０Ａ～Ｂに示す。図１０Ａ～Ｂは、システイン置換間のフレームワーク内ジスルフィド結合がコンピュータ上で規定された場合にも、操作されたＦＲ２／ＦＲ３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。

【０４４４】

制御還元及びその後のペイロードとの結合に利用可能であり得る変異可能な残基ペアの定義を目的として、候補のシステイン置換対は、「表面露出」でなければならず、従って溶媒に露出なければならないと推定された。候補となるシステイン置換の溶媒露出表面積（ＡＳＡ）値は、上記で作製されたモデルから算出された（図１１）。図１１において、各候補のシステイン置換のＡＳＡ値は、V_H～V_L方向のＡＶＰ０４－ｘｘ（ｘｘは本件のクローン番号を表す）ダイアボディ（各列の第１列）、ａ－１残基リンカーを備えたV_H～V_L方向のＡＶＰ０４－ｘｘトリアボディ（各列の第２列）、ゼロ残基リンカーを備えたV_H～V_L方向のＡＶＰ０４－ｘｘトリアボディ（各列の第３列）、１ＬＭＫダイアボディでモデル化されたＦｖ空間的定位でV_L～V_H方向のＡＶＰ０４－ｘｘダイアボディ（各列の第４列）、１ＭＯＥダイアボディでモデル化されたＦｖ空間的定位でV_L～V_H方向のＡＶＰ０４－ｘｘダイアボディ（各列の第５列）、１残基リンカーを備えたV_L～V_H方向のＡＶＰ０４－ｘｘトリアボディ（各列の第６列）、および２残基リンカーを備えたV_L～V_H方向のＡＶＰ０４－ｘｘトリアボディ（各列の第７および最後列）のモ

デルに照らしてプロットされた。ｃ６により指定されるモデル化変異は、Ｈ３９～Ｈ４３およびＬ３８～Ｌ４２のジスルフィド変異を含み、同様にｃ５についてはＨ３９～Ｈ４５／Ｌ３８～Ｌ４４、ｃ８についてはＨ７０～Ｈ７９／Ｌ６５～Ｌ７２、ｃ９についてはＨ７２～Ｈ７５、ならびにｃ４についてはＨ８２Ｃ～Ｈ８６／Ｌ７８～Ｌ８２を含んだ。エラー・バーはＡＳＡ値の標準偏差を示し、ダイアボディではｎ＝２０であり、トリアボディではｎ＝３０である。

【０４４５】

いずれの場合でも、候補のシステイン置換対のＡＳＡ値は高度に保存されているが構造的に埋もれたシステイン対Ｈ２２－Ｈ９２及びＬ２３－Ｌ８８のＡＳＡ値より有意に高く、平均で０．０２５のＡＳＡ値であった。事実、候補のシステイン置換対のＡＳＡ値は構造上露出したＣＤＲ残基のＡＳＡ値により近似であった。

【０４４６】

制御されたジスルフィド結合の還元およびペイロードの結合に照らして構造的位置付けおよび溶媒への「表面」露出の好ましさを立証するために、追加のＦＲ３候補システイン置換挿入を含むことにした。この候補は、

・カバット残基Ｈ７８およびＬ８２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１０５）、本明細書でモデル化変異番号ｃ４とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－８３ダイアボディ核酸配列（配列番号：１０４）。

・カバット残基Ｈ８２ＣおよびＨ８６で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１１１）、本明細書でモデル化変異番号ｃ４とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１１４ダイアボディ核酸配列（配列番号：１１０）であった。

【０４４７】

モデル化変異ｃ４を含む変異体は操作システイン置換を操作するための構造的必要条件の全てを満たしたが、変異残基は非常に小さい接触可能表面積を示した（図１１を参照）。モデル化変異ｃ４を含む変異体は、操作システイン置換の導入が安定性および免疫活性を抑止しないことを明瞭に立証するために使用されたが、モデル化変異ｃ４の変異体に欠く特徴である残基が溶媒に「表面露出」することは、その後の制御ジスルフィド結合還元およびペイロードの結合に好ましい。

【０４４８】

９．７　ＡＶＰ０２－ｘｘ及びＡＶＰ０７－ｘｘのアヴィボディ・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２および３のシステイン挿入位置及び分子モデリング　抗体ファミリーにわたるV_H（１～４型）、$V_L\kappa$、$V_L\lambda$ドメインの間の構造的類似性は公知であり、容認されている。この構造的類似性のため、これらの抗体のフレームワーク領域の最小二乗アラインメントにより、ＡＶＰ０４－０７のモデルからコンピュータ上で同定されたシステイン挿入位置をＡＶＰ０２－ｘｘ及びＡＶＰ０７－ｘｘシステイン挿入アヴィボディモデルに構造的に移した。

【０４４９】

いずれの場合にも、上記で考察されるように、ＦＲ２およびＦＲ３操作システイン挿入に適合すると同定された好ましい位置は全て、実施例９．５に概説した主要なモデリング制約を満たした。

【０４５０】

ＡＶＰ０２－ｘｘフレームワーク２またはフレームワーク３のシステイン挿入に好ましい位置は、下記の通りに同定された：

・カバット残基Ｌ３８およびＬ４２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１２３）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０２－１１５ダイアボディ核酸配列（配列番号：１２２）。

・カバット残基Ｈ３９およびＨ４３で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１２５）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０２－１１６ダイアボディ核酸配列（配列番号：１２４）。

・カバット残基Ｌ３８およびＬ４４で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１３

１）、本明細書でモデル化変異番号ｃ５とも呼ばれる、ＡＶＰ０２－１２６ダイアボディ核酸配列（配列番号：１３０）。
・カバット残基Ｈ３９およびＨ４５で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１３３）、本明細書でモデル化変異番号ｃ５とも呼ばれる、ＡＶＰ０２－１２７ダイアボディ核酸配列（配列番号：１３２）。
・カバット残基Ｌ６５およびＬ７２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１３５）、本明細書でモデル化変異番号ｃ８とも呼ばれる、ＡＶＰ０２－１２８ダイアボディ核酸配列（配列番号：１３４）。
・カバット残基Ｈ７０およびＨ７９で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１３７）、本明細書でモデル化変異番号ｃ８とも呼ばれる、ＡＶＰ０２－１２９ダイアボディ核酸配列（配列番号：１３６）。
・カバット残基Ｈ７２およびＨ７５で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１３９）、本明細書でモデル化変異番号ｃ９とも呼ばれる、ＡＶＰ０２－１３０ダイアボディ核酸配列（配列番号：１３８）。

【０４５１】

ＡＶＰ０７－ｘｘフレームワーク２またはフレームワーク３のシステイン挿入に好ましい位置は、下記の通りに同定された：
・カバット残基Ｌ３８およびＬ４２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１２７）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０７－１１７ダイアボディ核酸配列（配列番号：１２６）。
・カバット残基Ｈ３９およびＨ４３で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１２９）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０７－１１８ダイアボディ核酸配列（配列番号：１２８）。
・カバット残基Ｌ３８およびＬ４４で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１４１）、本明細書でモデル化変異番号ｃ５とも呼ばれる、ＡＶＰ０７－１３１ダイアボディ核酸配列（配列番号：１４０）。
・カバット残基Ｈ３９およびＨ４５で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１４３）、本明細書でモデル化変異番号ｃ５とも呼ばれる、ＡＶＰ０７－１３２ダイアボディ核酸配列（配列番号：１４２）。
・カバット残基Ｌ６５およびＬ７２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１４５）、本明細書でモデル化変異番号ｃ８とも呼ばれる、ＡＶＰ０７－１３３ダイアボディ核酸配列（配列番号：１４４）。
・カバット残基Ｈ７０およびＨ７９で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１４７）、本明細書でモデル化変異番号ｃ８とも呼ばれる、ＡＶＰ０７－１３４ダイアボディ核酸配列（配列番号：１４６）。
・カバット残基Ｈ７２およびＨ７５で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１４９）、本明細書でモデル化変異番号ｃ９とも呼ばれる、ＡＶＰ０７－１３５ダイアボディ核酸配列（配列番号：１４８）。

【０４５２】

ＡＶＰ０２－ｘｘ構造へのシステイン挿入モデリングの結果は図１２Ａ～Ｂに、ＡＶＰ０７－ｘｘ構造については図１３Ａ～Ｂに示す。

【０４５３】

ＡＶＰ０４で概説した候補の操作システイン位置について完了すると、ＡＶＰ０２－ｘｘおよびＡＶＰ０７－ｘｘにおける候補システイン置換の溶媒接触表面積（ＡＳＡ）値を上記の作製モデルから算出した。図１４はＡＶＰ０２－ｘｘモデルのＡＳＡ計算値を概説し、図１５はＡＶＰ０７－ｘｘモデルのＡＳＡ計算値を概説する。図１４および図１５の両方において、各候補のシステイン置換のＡＳＡ値は、$Ｖ_{Ｈ}$～$Ｖ_{Ｌ}$方向のＡＶＰ０２－ｘｘまたはＡＶＰ０７－ｘｘダイアボディ（各列の第１列）、ａ－１残基リンカーを備えた$Ｖ_{Ｈ}$～$Ｖ_{Ｌ}$方向のＡＶＰ０２－ｘｘまたはＡＶＰ０７－ｘｘトリアボディ（各列の第２列）、ゼロ残基リンカーを備えた$Ｖ_{Ｈ}$～$Ｖ_{Ｌ}$方向のＡＶＰ０２－ｘｘまたはＡＶＰ０７－ｘ

ｘトリアボディ（各列の第３列）、１ＬＭＫダイアボディでモデル化されたＦｖ空間的定位でV_L～V_H方向のＡＶＰ０２－ｘｘまたはＡＶＰ０７－ｘｘダイアボディ（各列の第４列）、１ＭＯＥダイアボディでモデル化されたＦｖ空間的定位でV_L～V_H方向のＡＶＰ０２－ｘｘまたはＡＶＰ０７－ｘｘダイアボディ（各列の第５列）、１残基リンカーを備えたV_L～V_H方向のＡＶＰ０２－ｘｘまたはＡＶＰ０７－ｘｘトリアボディ（各列の第６列）、および２残基リンカーを備えたV_L～V_H方向のＡＶＰ０２－ｘｘまたはＡＶＰ０７－ｘｘトリアボディ（各列の第７列および最後列）のモデルに照らしてプロットされた。ｃ６により指定されるモデル化変異は、Ｈ３９～Ｈ４３およびＬ３８～Ｌ４２のジスルフィド変異を含み、同様にｃ５についてはＨ３９～Ｈ４５／Ｌ３８～Ｌ４４、ｃ８についてはＨ７０～Ｈ７９／Ｌ６５～Ｌ７２、ｃ９についてはＨ７２～Ｈ７５、ならびにｃ４についてはＨ８２Ｃ～Ｈ８６／Ｌ７８～Ｌ８２を含んだ。エラー・バーはＡＳＡ値の標準偏差を示し、ダイアボディではｎ＝２０であり、トリアボディではｎ＝３０である。ＡＶＰ０４モデルに関して、例外は、ＡＶＰ０２－ｘｘおよびＡＶＰ０７－ｘｘの両方で低いＡＳＡ値を再び示したモデル化変異ｃ４（Ｈ８２Ｃ～Ｈ８６／Ｌ７８～Ｌ８２）であった。

【０４５４】

図１１、１４および１５で報告されるように、ＡＶＰ０２－ｘｘ、ＡＶＰ０４－ｘｘおよびＡＶＰ０７－ｘｘのモデルにわたる候補の操作システイン位置のＡＳＡ値の類似性は、異なる配列および特異性の抗体のV_H型Ｉ－ＩＶ、V_LκおよびV_Lλのフレームワーク領域において知られ容認される構造的類似性を示唆する。この容認される構造的類似性は、同様に、各候補の操作システイン位置が存在するＶドメイン型に関わらず、類似のＡＳＡを示す可能性が高いことを示唆する。これは、候補の操作システイン位置が異なる配列および特異性の抗体の同じ構造的位置に容易に移動できることを更に示唆する。知られ容認されるこの類似性のため、本明細書において、本発明者達は、インビトロ操作システイン位置が選択的に還元されペイロードと結合し得る溶媒露出ジスルフィド架橋を形成することを一般に証明するためのモデルとして一部のチオール化アヴィボディを使用する。

【０４５５】

９．８　構造摂動に及ぼす操作システイン置換変異の効果

ＡＶＰ０２－ｘｘ、ＡＶＰ０４－ｘｘおよびＡＶＰ０７－ｘｘ　Ｆｖへの候補の操作システイン変異のモデリングは、一般に互いに向けられた側鎖、一般に溶媒に露出する側鎖原子、および約６～７ÅのＣα炭素原子間の距離を含む規定の構造必要条件一式を考慮に入れる。これらのモデルの作成および評価から得た予想外の所見は、候補の操作システイン変異が表面露出したジスルフィド架橋としてコンピュータ上のモデルに挿入された場合、野生型（非チオール化）アヴィボディ構造に関してほとんどまたは全く構造摂動は検出されなかったという事実であった。

【０４５６】

図１６は、アヴィボディ構築物モデル由来の天然およびシステイン変異Ｖドメインについての標準偏差（ＲＭＳＤ）を示す。ＲＭＳＤ値は、操作システインジスルフィド変異のコンピュータ上の挿入により惹起されるＶドメインの摂動を測定するために用いられた。ＲＭＳＤはそれぞれの構築物群について最高得点のモデル化天然構造に対する変異モデル化Ｖドメインのアラインメントにより得られた。図１６は下記の通りに標識された１４の構築物群を示す：

・Ｈ－ＶＨＶＬＤ　５：コンピュータ上でジスルフィド結合を形成するよう規定されたV_H操作システイン置換対を含む５残基リンカーを備えたV_H～V_L方向のダイアボディ由来のV_Hドメイン。

・Ｈ－ＶＨＶＬＴ－１：コンピュータ上でジスルフィド結合を形成するよう規定されたV_H操作システイン置換対を含むａ－１残基リンカーを備えたV_H～V_L方向のトリアボディ由来のV_Hドメイン。

・Ｈ－ＶＨＶＬＴ０：コンピュータ上でジスルフィド結合を形成するよう規定されたV_H操作システイン置換対を含むゼロ残基リンカーを備えたV_H～V_L方向のトリアボディ

由来のＶ$_{H}$ドメイン。
・Ｈ－ＶＬＶＨＤ　ｌｍｋ５：コンピュータ上でジスルフィド結合を形成するよう規定されたＶ$_{H}$操作システイン置換対を含む５残基リンカーを備え、１ＬＭＫダイアボディをモデルにしたＦｖ空間的定位でＶ$_{L}$～Ｖ$_{H}$方向のダイアボディ由来のＶ$_{H}$ドメイン。
・Ｈ－ＶＬＶＨＤ　ｍｏｅ５：コンピュータ上でジスルフィド結合を形成するよう規定されたＶ$_{H}$操作システイン置換対を含む５残基リンカーを備え、１ＭＯＥダイアボディをモデルにしたＦｖ空間的定位でＶ$_{L}$～Ｖ$_{H}$方向のダイアボディ由来のＶ$_{H}$ドメイン。
・Ｈ－ＶＬＶＨＴ１：コンピュータ上でジスルフィド結合を形成するよう規定されたＶ$_{H}$操作システイン置換対を含む１残基リンカーを備えたＶ$_{L}$～Ｖ$_{H}$方向のトリアボディ由来のＶ$_{H}$ドメイン。
・Ｈ－ＶＬＶＨＴ２：コンピュータ上でジスルフィド結合を形成するよう規定されたＶ$_{H}$操作システイン置換対を含む２残基リンカーを備えたＶ$_{L}$～Ｖ$_{H}$方向のダイアボディ・トリアボディ由来のＶ$_{H}$ドメイン。
・Ｌ－ＶＨＶＬＤ５：コンピュータ上でジスルフィド結合を形成するよう規定されたＶ$_{L}$操作システイン置換対を含む５残基リンカーを備えたＶ$_{H}$～Ｖ$_{L}$方向のダイアボディ由来のＶ$_{L}$ドメイン。
・Ｌ－ＶＨＶＬＴ－１：コンピュータ上でジスルフィド結合を形成するよう規定されたＶ$_{L}$操作システイン置換対を含むａ－１残基リンカーを備えたＶ$_{H}$～Ｖ$_{L}$方向のトリアボディ由来のＶ$_{L}$ドメイン。
・Ｌ－ＶＨＶＬＴ　０：コンピュータ上でジスルフィド結合を形成するよう規定されたＶ$_{L}$操作システイン置換対を含むゼロ残基リンカーを備えたＶ$_{H}$～Ｖ$_{L}$方向のトリアボディ由来のＶ$_{L}$ドメイン。
・Ｌ－ＶＬＶＨＤ　ｌｍｋ５：コンピュータ上でジスルフィド結合を形成するよう規定されたＶ$_{L}$操作システイン置換対を含む５残基リンカーを備え、１ＬＭＫダイアボディをモデルにしたＦｖ空間的定位でＶ$_{L}$～Ｖ$_{H}$方向のダイアボディ由来のＶ$_{L}$ドメイン。
・Ｌ－ＶＬＶＨＤ　ｍｏｅ５：コンピュータ上でジスルフィド結合を形成するよう規定されたＶ$_{L}$操作システイン置換対を含む５残基リンカーを備え、１ＭＯＥダイアボディをモデルにしたＦｖ空間的定位でＶ$_{L}$～Ｖ$_{H}$方向のダイアボディ由来のＶ$_{L}$ドメイン。
・Ｌ－ＶＬＶＨＴ　１：コンピュータ上でジスルフィド結合を形成するよう規定されたＶ$_{L}$操作システイン置換対を含む１残基リンカーを備えたＶ$_{L}$～Ｖ$_{H}$方向のトリアボディ由来のＶ$_{L}$ドメイン。
・Ｌ－ＶＬＶＨＴ　２：コンピュータ上でジスルフィド結合を形成するよう規定されたＶ$_{L}$操作システイン置換対を含む２残基リンカーを備えたＶ$_{L}$～Ｖ$_{H}$方向のトリアボディ由来のＶ$_{L}$ドメイン。

【０４５７】

上記の構築物群は、方向、Ｆｖ数および空間的定位のあらゆる可能なＦｖ置換を網羅するためにモデル化された。各構築物群について、最良の天然（非チオール化）アヴィボディ・モデルを他のあらゆる天然（非チオール化）アヴィボディ・モデル（各構築物群の第１列）と比較し、続いてモデリング変異ｃ６（Ｈ３９－Ｈ４３／Ｌ３８－Ｌ４２、各構築物群の第２バー）、モデリング変異ｃ５（Ｈ３９－Ｈ４５／Ｌ３８－Ｌ４４、各構築物群の第３バー）、モデリング変異ｃ８（Ｈ７０－Ｈ７９／Ｌ６５－Ｌ７２、各構築物群の第４バー）、モデリング変異ｃ９（Ｈ７２－Ｈ７５、各構築物群の第５バー）およびモデリング変異ｃ４（Ｈ８２Ｃ－Ｈ８６／Ｌ７８－Ｌ８２、各構築物群の第６および最終バー）の全作製モデルと比較した。エラー・バーは、ＲＭＳＤ値の標準偏差を示し、ダイアボディについてはｎ＝４０、トリアボディについてはｎ＝９０である。

【０４５８】

いずれの場合においても、関連する構造変異が天然（非チオール化）モデル（各構築物群の第１列）とチオール化アヴィボディ型（各構築物群の２～６列）のいずれにもほとんど観察されなかった。全てのモデル化抗体配列にわたる全構築物置換で予想外の低いＲＭＳＤ値は、いずれのＶ$_{H}$型Ｉ－ＩＶ、Ｖ$_{L}$κおよびＶ$_{L}$λに照らしてＦＲ２およびＦＲ３

領域が、Ａ）一般に表面露出ジスルフィドを形成するための操作システイン変異の挿入により摂動されないこと、ならびにＢ）これらの領域内の操作システイン変異が異なる配列、種および特異性の抗体において同じ構造位置に容易に移動され得ることを示唆する。

【０４５９】

全てのモデル化抗体配列にわたる全構築物置換についての一般に低いＲＭＳＤ値から、本発明者達は本発明で一般にインビトロの操作システイン位置が選択的に還元されペイロードと結合できる溶媒露出ジスルフィド架橋を形成することを立証するためのモデルとしてあらゆるチオール化アヴィボディの一部を用いる。

【０４６０】

実施例１０．　アヴィボディ構築物の合成

１０．１　フレームワーク内ジスルフィド挿入を操作しない「非変異」アヴィボディの合成　ＴＡＧ７２に特異的なマウスｍＡｂ（配列番号５８）、ＨＥＲ２に特異的なヒトｍＡｂ（配列番号６０）及びＭＵＣ１に特異的なマウスｍＡｂ（配列番号６２）のV_H及びV_L領域をコードするＤＮＡ構築物は適切な制限部位で合成し、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ，米国）によりｐＵＣ５７にクローニングした。アヴィボディはＶ領域のいずれの向きでも、すなわちV_H－リンカー－V_LでもV_L－リンカー－V_H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構築物はV_H－リンカー－V_Lとして並べた。

【０４６１】

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い行った。ダイアボディをコードするＤＮＡ構築物を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。構築物を、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ミニプレップスピン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_H－Gly_4Ser－V_Lの向きの抗ＴＡＧ７２ｍＡｂのＶ領域を含むクローンをＡＶＰ０４－０７と命名した（配列番号５８）。V_H－Gly_4Ser－V_L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６０）。V_H－Gly_4Ser－V_L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６２）。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アヴィボディ変異およびチオール化アヴィボディを誘導した。

【０４６２】

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$(His)_6$タグ又はカルボキシ末端Ｍｙｃ＋$(His)_6$タグのいずれかの挿入を可能にする。$(His)_6$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。

【０４６３】

１０．２　アヴィボディ構築物の配列修飾

記載されるＤＮＡ配列に対する全ての修飾には、当業者に公知の標準的な分子生物学的技術を用いた。アヴィボディ配列が、超可変ＣＤＲ領域にモデリングデータにより示唆されるような表面露出する可能性の高い位置で、「天然の」システイン残基を含んだ場合、それらの残基は、本質的に上述の部位特異的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。一例として、ＡＶＰ０７－ｘｘファミリーの親クローンであるＡＶＰ０７－１７は、V_HＣＤＲ３領域内に２つのかかるシステイン残基、すなわちＣｙｓ１０４（カバット付番Ｈ１００）及びＣｙｓ１０９（Ｈ１００Ｅ）を含んだ。これらの残基を

、変異原性プライマー配列番号９０及び配列番号９１を使用する標準的なＱｕｉｋｃｈａｎｇｅ（登録商標）部位特異的変異誘発を用いてアラニンに置換し、ＡＶＰ０７－８６（配列番号６４）を形成した。全てのＡＶＰ０７－ｘｘチオール化アヴィボディはV_H ＣＤＲ３のこの追加的な修飾を含み、ＡＶＰ０７－ｘｘファミリーがフレームワーク２内またはフレームワーク３内操作システイン置換戦略に適合させる。

【０４６４】

ｓｃＦｖのチオール化版又はトリアボディを生成するため、リンカー長さを改変したチオール化アヴィボディも作製された。抗体分野の既刊の文献から、リンカーの組成及び長さを改変すると、アヴィボディ多量体の形成に影響し得ることが周知である（Ｋｏｒｔｔら　１９９７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ＧＧＧＧＳ（配列番号５７）から１５残基のＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳまたは２０残基のＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳに修飾し、正確な配列用に得られるＤＮＡクローンを配列決定することにより、ｓｃＦｖ形成の促進を操作した。例えば、ＡＶＰ０４－１２４アヴィボディ（配列番号：１１８）をコードする核酸はｓｃＦｖをコードする。

【０４６５】

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、ＡＶＰ０４－１２５アヴィボディ（配列番号１２０）をコードする核酸は、リンカー領域の代わりに残基「ＶＴＶＳ－ＤＩＶＭ」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変異誘発により、親ＡＶＰ０４－０７から操作した。

【０４６６】

２．３　フレームワーク２内またはフレームワーク３内の操作システインの導入および部位指定変異誘発によるＮ－末端セリン置換

作成されたモデリング・データに基づいて、フレームワーク２内またはフレームワーク３内の操作システイン挿入変異は、ＡＶＰ０４－ｘｘ、ＡＶＰ０７－ｘｘおよびＡＶＰ０２－ｘｘファミリーのアヴィボディ配列に導入され、下記のチオール化アヴィボディを形成した。

【０４６７】

ＡＶＰ０４－ｘｘファミリー鋳型配列（ＴＡＧ７２に特異的）

・カバット残基Ｌ３８およびＬ４２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１０１）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－７９ダイアボディ核酸配列（配列番号：１００）。

・カバット残基Ｌ３８およびＬ４４で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１０３）、本明細書でモデル化変異番号ｃ５とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－８０ダイアボディ核酸配列（配列番号：１０２）。

・カバット残基Ｌ７８およびＬ８２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１０５）、本明細書でモデル化変異番号ｃ４とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－８３ダイアボディ核酸配列（配列番号：１０４）。

・カバット残基Ｈ３９およびＨ４３で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１０７）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１１１ダイアボディ核酸配列（配列番号：１０６）。

・カバット残基Ｈ３９およびＨ４５で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１０９）、本明細書でモデル化変異番号ｃ５とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１１２ダイアボディ核酸配列（配列番号：１０８）。

・カバット残基Ｈ８２ＣおよびＨ８６で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１１１）、本明細書でモデル化変異番号ｃ４とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１１４ダイアボディ核酸配列（配列番号：１１０）。

・カバット残基Ｈ７０およびＨ７９で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１１

３）、本明細書でモデル化変異番号ｃ８とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１２０ダイアボディ核酸配列（配列番号：１１２）。

・カバット残基Ｈ７２およびＨ７５で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１１５）、本明細書でモデル化変異番号ｃ９とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１２１ダイアボディ核酸配列（配列番号：１１４）。

・カバット残基Ｌ６５およびＬ７２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１１７）、本明細書でモデル化変異番号ｃ８とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１２３ダイアボディ核酸配列（配列番号：１１６）。

・カバット残基Ｌ３８およびＬ４２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１１９）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１２４ｓｃＦｖ核酸配列（配列番号：１１８）。

・カバット残基Ｌ３８およびＬ４２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１２１）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０４－１２５トリアボディ核酸配列（配列番号：１２０）。

【０４６８】

ＡＶＰ０２－ｘｘファミリー鋳型配列（ＭＵＣ１に特異的）

・カバット残基Ｌ３８およびＬ４２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１２３）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０２－１１５ダイアボディ核酸配列（配列番号：１２２）。

・カバット残基Ｈ３９およびＨ４３で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１２５）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０２－１１６ダイアボディ核酸配列（配列番号：１２４）。

・カバット残基Ｌ３８およびＬ４４で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１３１）、本明細書でモデル化変異番号ｃ５とも呼ばれる、ＡＶＰ０２－１２６ダイアボディ核酸配列（配列番号：１３０）。

・カバット残基Ｈ３９およびＨ４５で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１３３）、本明細書でモデル化変異番号ｃ５とも呼ばれる、ＡＶＰ０２－１２７ダイアボディ核酸配列（配列番号：１３２）。

【０４６９】

ＡＶＰ０７－ｘｘファミリー鋳型配列（ＨＥＲ２に特異的）

・カバット残基Ｌ３８およびＬ４２で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１２７）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０７－１１７ダイアボディ核酸配列（配列番号：１２６）。

・カバット残基Ｈ３９およびＨ４３で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１２９）、本明細書でモデル化変異番号ｃ６とも呼ばれる、ＡＶＰ０７－１１８ダイアボディ核酸配列（配列番号：１２８）。

・カバット残基Ｌ３８およびＬ４４で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１４１）、本明細書でモデル化変異番号ｃ５とも呼ばれる、ＡＶＰ０７－１３１ダイアボディ核酸配列（配列番号：１４０）。

・カバット残基Ｈ３９およびＨ４５で変異したアヴィボディを形成し（配列番号：１４３）、本明細書でモデル化変異番号ｃ５とも呼ばれる、ＡＶＰ０７－１３２ダイアボディ核酸配列（配列番号：１４２）。

【０４７０】

これらのチオール化アヴィボディは、好ましいフレームワーク２またはフレームワーク３の操作システイン挿入変異が、ａ）V_LおよびV_Hドメインとそれらの異なるサブタイプ間で機能的に移転可能であること、ならびにｂ）単一（ｓｃＦｖ）または複数の（ダイアボディ／トリアボディ）Ｆｖドメインを含むタンパク質（例えば、アヴィボディ）と適合可能であることを証明するために本明細書で（コンピュータ上またはインビトロのいずれかで）実証した。

【０４７１】

あらゆる場合において、システイン残基は、取扱説明書の通りにＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）部位指定変異誘発法（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いて対象の特定アミノ酸をコードするヌクレオチド配列を改変することにより導入された。実例としてＡＶＰ０４－０７アヴィボディを用いて、カバット位置Ｌ３８およびＬ４２（ＦＲ２　$Ｖ_{Ｌ}$領域）のグルタミン残基は両方ともＣＡＧヌクレオチド配列によりコードされる。ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）部位指定変異誘発技術は、配列番号：６８および配列番号：６９に記載されるＤＮＡプライマーに照らして、これらのヌクレオチド配列コドンの両方をＴＧＣ（システインをコードする）に変えるために用いた。これらの改変は、チオール化アヴィボディＡＶＰ０４－７９（配列番号：１００）の核酸配列を形成した。

【０４７２】

ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）部位指定変異誘発ＰＣＲに基づく方法は、プライマーとして所望の変異を含む２つの相補的合成オリゴヌクレオチド、および二本鎖変異ＰＣＲ産物を合成するための鋳型としてプラスミドＤＮＡを用いる。上記例を用いて、ＡＶＰ０４－０７における$Ｖ_{Ｌ}$鎖のＦＲ２領域のカバット位置Ｌ３８およびＬ４２にシステイン残基を導入するために、下記の配列５’ - ＣＡＧ　ＡＡＡ　ＡＡＣ　ＴＡＴ　ＣＴＧ　ＧＣＧ　ＴＧＧ　ＴＡＴ　ＣＡＧ　ＴＧＣ　ＡＡＡ　ＣＣＧ　ＧＧＴ　ＴＧＣ　ＡＧＣ　ＣＣＧ　ＡＡＡ　ＣＴＧ　ＣＴＧ　ＡＴＴ　ＴＡＴ　ＴＧＧ - ３’（配列番号：６８）は、順方向プライマーとして使用し、５’ - ＣＣＡ　ＡＴＡ　ＡＡＴ　ＣＡＧ　ＣＡＧ　ＴＴＴ　ＣＧＧ　ＧＣＴ　ＧＣＡ　ＡＣＣ　ＣＧＧ　ＴＴＴ　ＧＣＡ　ＣＴＧ　ＡＴＡ　ＣＣＡ　ＣＧＣ　ＣＡＧ　ＡＴＡ　ＧＴＴ　ＴＴＴ　ＣＴＧ - ３’（配列番号：６９）は逆方向プライマーとして使用した。増幅は下記の条件を順に用いて実施した：９５°Ｃ３０秒；９５°Ｃ３０秒、５５°Ｃ３０秒および６８°Ｃ１３分から成る１８サイクル；６８°Ｃ７分の最終伸長。鋳型はＤｐｎＩで３７°Ｃで１時間消化した。形質転換体は製造業者の取扱説明書に従って得られ、上記のようにＤＮＡ配列決定により同定した。

【０４７３】

フレームワーク２内またはフレームワーク３内のシステイン残基を含むチオール化アヴィボディの他のあらゆる例は、配列番号：７０－８５、９２－９９で概説したヌクレオチド・プライマーに即して、同一技術を用いて作製された。

【０４７４】

同様の変異誘発アプローチがタンパク質の天然Ｎ－末端残基をセリン残基と置換するために用いられた。Ｎ－末端セリン置換は、フレームワーク内ジスルフィド変異の導入前後に実施した。

【０４７５】

実施例１１．細菌発現を用いた「非変異」アヴィボディ及びチオール化アヴィボディの発現及び精製

製造者の標準的なプロトコル（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いて、個々のアヴィボディ構築物のＤＮＡを化学的にコンピテントな大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＢＬ２１細胞に形質転換した。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＢＬ２１発現株は、例示する全てのアヴィボディ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アヴィボディタンパク質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示された。

【０４７６】

１１．１　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１００μｇ／ｍｌアンピシリンに接種し、２２０ｒｐｍで振盪しながら３７℃で一晩インキュベートした。９Ｌの同じ培地に一晩培養物を最終$ＯＤ_{６００}$が０．１となるよう播種し、$ＯＤ_{６００}$が約０．６～０．８となるまで３０℃でインキュベートした。培養物を１２℃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℃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℃で保存した。

【０４７７】

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。

【０４７８】

１１．２　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℃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_2PO_4、１０．６４ｇ；$(NH_4)_2HPO_4$、４．０ｇ；及びクエン酸一水和物、１．７ｇ；グルコース　２５ｇ；$MgSO_4.7H_2O$、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）、$CuSO_4.5H_2O$、２．０ｇ；ＮａＩ、０．０８ｇ；$MnSO_4.H_2O$、３．０ｇ；$NaMoO_4.2H_2O$、０．２ｇ；H_3BO_3、０．０２ｇ；$CoCl_2.6H_2O$、０．５ｇ；$ZnCl_2$、７．０ｇ；$FeSO_4.7H_2O$、２２．０ｇ；$CaSO_4.2H_2O$、０．５ｇ；H_2SO_4、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℃で３０分間滅菌した。

【０４７９】

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、撹拌速度を５００～１，２００ｒｐｍで、及び曝気速度（５％酸素を給気）を０．３～１．５Ｌ分$^{-1}$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_3PO_4又は１０％（ｖ／ｖ）NH_3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℃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。

【０４８０】

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$MgSO_4.7H_2O$　２２．４ｇ（１Ｌ当たり）を含む栄養液（フィード）を４０ｍＬ時$^{-1}$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℃まで２．５時間の時間をかけて徐々に低下させ（６．８℃時間$^{-1}$）、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$^{-1}$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１１０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。

【０４８１】

１１．３　大腸菌で発現したアヴィボディの精製

実施した発現手法に関わりなく、アヴィボディ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。

【０４８２】

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技法により精製した。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　ＤＮＡｓｅＩ、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６×３０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回通すことによって溶解させた。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（１６，０００×ｇ、３０分間）及びろ過（０．４５μｍフィルター膜）を行った。

【０４８３】

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ボディを精製した。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ＡＶＰ０４－１１１（配列番号１０７）、ＡＶＰ０４－１２０（配列番号１１３）およびＡＶＰ０４－１２１（配列番号１１５）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１７Ａ－Ｃに示す。本明細書に記載されるアヴィボディは全て、同様の溶出プロファイルを示した。

【０４８４】

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、部分的に精製したアヴィボディを透析した。典型的には、７．０～８．０のｐＩのアヴィボディは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のアヴィボディはリン酸緩衝液（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のアヴィボディはトリス緩衝液（２０ｍＭトリス－ＨＣｌ、陰イオン交換についてｐＨ８）に透析した。アヴィボディのｐＩ値は全て、これらの範囲内に収まった。アヴィボディは２００×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。

【０４８５】

透析後、タンパク質試料を３２２０×ｇ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　ＨｉＴｒａｐ（商標）ＳＰ　ＨＰカラムを直列で用いて、清澄化した透析材料を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。

【０４８６】

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。ＴＡＧ７２に特異的なＡＶＰ０４－１１１（配列番号：１０７）、ＡＶＰ０４－１２０（配列番号：１１３）およびＡＶＰ０４－１２１（配列番号：１１５）を用いた典型的なイオン交換溶出プロファ

イルは図１８Ａ－Ｃに提示する。全てのダイアボディは、約３７ｍＳ／ｃｍ又は３２％Ｂの塩濃度でルーチン的に溶出し、ここで主要な二量体アイソフォーム（矢印により指定）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。ダイアボディクローンは、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的に溶出された。ある場合には、１×ＰＢＳ緩衝液（１３７ｍＭ　ＮａＣｌ、２．７ｍＭ　ＫＣｌ、８．１ｍＭ　Na_2HPO_4、１．４７ｍＭ　KH_2PO_4、ｐＨ７．４）中でのキャリブレートされたＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００　１０／３００カラム（ＧＥ　ＬｉｆｅＳｃｉｅｎｃｅｓ）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。

【０４８７】

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　ＬｉｆｅＳｃｉｅｎｃｅｓ）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ＴＡＧ７２に特異的なＡＶＰ０４－１１１（配列番号：１０７）、ＡＶＰ０４－１２０（配列番号：１１３）およびＡＶＰ０４－１２１（配列番号：１１５）ダイアボディを用いて、タンパク質は注入後約１５０ｍｌで溶出した（図１９Ａ－Ｃ）。ダイアボディ変異体は、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的に溶出した。二量体に対応する画分（図１９Ａ－Ｃに矢印で示す）をプールし、１０Ｋ　ＭＷＣＯを備えたＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａｆｒｅｅスピンコンセントレータ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，米国）を３２００×ｇ、４℃で使用して０．５～３ｍｇ／ｍｌに濃縮した。

【０４８８】

精製産物の最終純度を、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（登録商標）２００　１０／３００カラムでのサイズ排除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的に評価した。例として、ＴＡＧ７２に特異的なＡＶＰ０４－１１１（配列番号：１０７）、ＡＶＰ０４－１２０（配列番号：１１３）およびＡＶＰ０４－１２１（配列番号：１１５）を用いる精製方法では、サイズ排除クロマトグラフィー（図２０Ａ－Ｃ）で単一のクリーンな溶出ピークを生じる純度のタンパク質がルーチンに回収された。

【０４８９】

試験されたアヴィボディのいずれの間にも、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２１Ａ～図２１Ｂは、本明細書に記載され、及び図に示されるとおりのアヴィボディ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、アヴィボディファミリー内及び異なるアヴィボディファミリー間の双方における僅かな差異は別として、アヴィボディ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（ＡＶＰ０４－１２５、配列番号：１２１）はダイアボディより早く溶出し、ダイアボディはｓｃＦｖ（ＡＶＰ０４－１２４、配列番号：１１９）より遅く溶出した。

【０４９０】

本明細書に記載されるアヴィボディは全て、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２内またはフレームワーク３内のシステイン置換変異の存在が、アヴィボディ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、チオール化アヴィボディのフレームワーク２内またはフレームワーク３内に操作的システインを置くことが、アヴィボディ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（図１６を参照）が、部分的に確認された。

【０４９１】

実施例１２－ダイアボディのインビトロ免疫活性評価

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　アヴィボディに対する抗原は、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　アヴィボディについては、可溶性抗原は組換えＨＥＲ２エクトドメインである。ＡＶＰ０２－ｘｘ　アヴィボディについては、可溶性抗原は組換え完全長ＭＵＣ１である。アヴィボディ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。

【０４９２】

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。得られたアヴィボディ－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アヴィボディに対応するピークの減少、及び／又はアヴィボディ－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。アヴィボディ又はアヴィボディ－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。本明細書で、本発明者達はＢＳＭ抗原を用いたＡＶＰ０４－ｘｘチオール化アヴィボディについてのカラムシフト免疫活性試験を報告する。

【０４９３】

いずれの場合にも、アヴィボディ単独では２８～３３分に溶出し、トリアボディ（ＡＶＰ０４－１２５、配列番号：１２１）は、ｓｃＦｖ（ＡＶＰ０４－１２４、配列番号：１１９）より遅く溶出したダイアボディより早く溶出する。いずれの場合にも、アヴィボディ－抗原複合体は１０～２５分に溶出した。アヴィボディを無関係の抗原とインキュベーションした場合に複合体の形成は観察されず、特異的結合の相互作用が生じたことを示している。

【０４９４】

上記のプロトコルを用いて本明細書に記載される全てのアヴィボディの免疫活性を評価し、結果を図２２Ａ～図２２Ｂ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／又は未結合のアヴィボディ量の減少から明らかなように、アヴィボディ－抗原複合体の形成が観察され、アヴィボディが免疫反応性であることが示される。V_HまたはV_Lドメインで、ダイアボディ、トリアボディズおよびｓｃＦｖ型で代替可能な操作システイン置換を含むチオール化アヴィボディについては免疫活性が観察された。

【０４９５】

チオール化アヴィボディにおけるフレームワーク２内またはフレームワーク３内システイン置換変異の存在又は不在が結合を抑止することはなかったことから、フレームワーク２内またはフレームワーク３内のシステイン置換変異部位が、アヴィボディの結合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。

【０４９６】

実施例１３－制御還元後のチオール化アヴィボディにおける遊離スルフヒドリルの検出

チオール化アヴィボディ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、機能的に活性であることを示した。フレームワーク・システイン置換が、ペイロード・結合と適合できる遊離スルフヒドリルを放出するために選択的に分解され得るジスルフィド結合を形成したことを立証するために、簡単な比色分析を考案した。

【０４９７】

チオール化アヴィボディを、３．８ｍＭまでの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中室温で２５分間インキュベートした。還元後、１００ｍＭリン酸緩衝液＋１ｍＭのＥＤＴＡ　ｐＨ６．５で予め平衡化したＰＤ１０脱塩カラムによりＴＣＥＰを除去し、０．５ｍＬの画分を回収した。ピークタンパク質画分を２８０ｎｍでＵＶ分光法により特定し、プールした。

【０４９８】

反応性チオールを試験するため、５０～７５μｇの還元タンパク質を、５μｌの４ｍｇ／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１００ｍＭ リン酸ナトリウム緩衝液、１ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ８．０に希釈した。反応を周囲温度で１５分間進行させた。入手可能なチオールはＤＴＮＢと反応し、ジスルフィド結合を開裂し、２－ニトロ－５－チオベンゾエート（ＮＴＢ$^{-}$）を生じ、これは中性またはアルカリ緩衝液でＮＴＢ$^{2-}$２価陰イオン（黄色）にイオン化する。得られる黄色着色は分光法により定量化し、この緩衝系における４１２ｎｍでのＮＴＢ$^{2-}$２価陰イオンのモル吸光係数は１４，１５０Ｍ$^{-1}$ｃｍ$^{-1}$と仮定した。入手可能な反応性スルフヒドリル基は、ＴＣＥＰによる制御還元前後にＤＴＮＢとの反応性量を比較することにより測定した。チオール反応性は還元前に対する還元後のチオール反応性比としてプロットし、示される１単位の値では、還元試料と非還元試料の間でＤＴＮＢに対する反応性に差異はなかったため、表面露出ジスルフィド架橋が還元時に分解されず、続いて遊離のスルフヒドリル基を生成したことを示している。１単位より大きいチオール反応性比は、ＴＣＥＰを用いた制御還元により、ＤＴＮＢ基質と反応できる表面露出した遊離スルフヒドリル基の数が増加したことを示した。チオール反応性比の増加は、より多くの遊離スルフヒドリル基が還元時に利用でき、ならびに／または利用可能性が高いほど試験の経過中にＤＴＮＢと反応することを示した。

【０４９９】

上記の検出法は、フレームワーク・システイン置換が選択的に分解されうるジスルフィド結合を形成し遊離スルフヒドリルを形成することを示せるほど精度が高いことを立証するために、全ＩｇＧ（４つのジスルフィド結合に８つの表面露出したシステインを含む）およびＡＶＰ０７－１７（配列番号：６１、V_H超可変ＣＤＲ３領域内に表面露出したジスルフィド結合を形成する２つの天然システイン残基を含む）を陽性対照として用いた（図２３Ａ）。これらの両陽性対照において、チオール反応性比は８ユニットを上回る高さであった。この結果から、これらのジスルフィド露出したタンパク質がＴＣＥＰによる処理に反応することが示された。還元剤は、存在する表面露出ジスルフィド結合を還元し、遊離チオールを生じ、それらの遊離スルフヒドリル基をＤＴＮＢと反応させた。逆に、表面露出したチオールを欠く非チオール化（「野生型」）ＡＶＰ０４－０７アヴィボディ（配列番号：５９）は、この試験において陰性対照として用いられ、１ユニットより少し上のチオール反応性比に戻り、ＴＣＥＰによる処理でほとんど変化を示さなかった。ＴＣＥＰによる制御還元後に４１２ｎｍでごく僅かに吸光度が増加すること（図２３Ａ）、即ち還元後のＤＴＮＢへの反応性の欠如は、タンパク質のコア構造内に埋没し表面に露出しないことが知られている非変異カバット位置Ｌ２３からＬ８８および非変異カバット位置Ｈ２２からＨ９２の保存された構造ジスルフィド結合が本発明で用いられる条件下の還元に利用できないことを示している。

【０５００】

ＡＶＰ０４－０７陰性対照と同様に、モデリング変異ｃ４を含む構築物（カバット残基Ｌ７８からＬ８２に挿入されるシステイン、配列番号：１０５）のＡＶＰ０４－８３も陰性対照として使用した。ＡＶＰ０４－８３を形成するために挿入される操作システインはシステイン置換を操作するための構造必要条件全てを満たすが（実施例９．５および図１０Ｂを参照）、操作されるシステインはモデリングにより非常に低い溶媒接触表面積を有することを示し（図１１を参照）、ひいては還元に利用できるとは見込まれなかったため、ＤＴＮＢと反応するチオールを形成しなかった。ＴＣＥＰによる還元前後で４１２ｎｍの吸光度に有意な差異は観察されず、これはＡＶＰ０４－８３で操作されるシステインがモデリングにより示されたように実際に構造のコア内に埋没していることを示している。これは、システイン変異が安定性または免疫活性を抑止することなく保存フレームワーク残基内に挿入され得るが、ジスルフィド架橋還元との適合性およびその後のペイロード・結合が構造評価／表面位置決めにより測定されることが好ましいことを証明した。この結果はさらに分子モデリングがインビトロ機能性の優れた予測因子であることを証明した。

【０５０１】

モデリングおよび初期のインビトロ評価は、ＦＲ２またはＦＲ３操作システイン置換が一般にコアタンパク質構造を掻き乱さないこと、ならびにこれらの操作システイン置換が

異なる配列、種および特異性のＦｖにおける同一の構造位置に容易に移動され得ることを示唆したため、ジスルフィド架橋がフレームワーク内操作システイン対間に形成されうること、このジスルフィド架橋が選択的還元時に分解され遊離スルフヒドリル基を放出することを証明するために、代表的な一部のチオール化アヴィボディ・タンパク質が試験された。図１７Ｂに例示される代表的なアヴィボディは、下記を含む：

・ダイアボディ型アヴィボディのV_LＦＲ２にモデリング変異ｃ６（ＡＶＰ０４－７９、配列番号：１０１）、ダイアボディ型アヴィボディのV_H ＦＲ２にモデリング変異ｃ６（ＡＶＰ０４－１１１、配列番号：１０７）、ｓｃＦｖ型アヴィボディのV_L ＦＲ２にモデリング変異ｃ６（ＡＶＰ０４－１２４、配列番号：１１９）、トリアボディ型アヴィボディのV_L ＦＲ２にモデリング変異ｃ６（ＡＶＰ０４－１２５、配列番号：１２１）、他の抗体クラス／ファミリー／種のダイアボディ型アヴィボディのV_L ＦＲ２にモデリング変異ｃ６（ＡＶＰ０７－１１７、配列番号：１２７）を含むチオール化アヴィボディ。

・V_L ＦＲ３（ＡＶＰ０４－１２３、配列番号：１１７）およびV_H ＣＤ３（ＡＶＰ０４－１２０、配列番号：１１３）の両方にモデリング変異ｃ８を含むチオール化アヴィボディ。

・構造類似体がV_L ＦＲ３に存在しないため、V_H ＦＲ３（ＡＶＰ０４－１２１、配列番号：１１５）のみにモデリング変異ｃ９を含むチオール化アヴィボディ。

【０５０２】

いずれの場合でも、チオール反応性比は１ユニットより大きく、これはＴＣＥＰによる還元が天然（非還元）状態で存在するジスルフィド結合を分解したことを示し、遊離のスルフヒドリル基がＤＴＮＢと反応できた。制御還元後のチオール反応性の相違は、実験の時間枠内でＤＴＮＢとの反応へのスルフヒドリル基の生体利用率の尺度である。

【０５０３】

これらの結果は、選択的に還元できる表面露出ジスルフィド架橋を形成するように好ましい操作システイン置換変異が設計されうることを示す。操作システイン置換変異は、異なる配列、種および特異性のＦｖにおけるV_HおよびV_Lの両ドメインの同一の構造位置に容易に移動されうる。

【０５０４】

実施例１４－チオール化アヴィボディにおける還元された操作ジスルフィドとのペイロード・結合

チオール化アヴィボディにおけるＦＲ２またはＦＲ３の操作ジスルフィド架橋の制御還元への利用可能性から、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結合可能であることが示された。

【０５０５】

この能力を実証するため、マレイミド－PEG_{24}－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ＦＲ２またはＦＲ３操作システインと結合した。

【０５０６】

チオール化アヴィボディを還元し、還元剤を除去した後、過剰のマレイミド－PEG_{24}－メトキシ（ｍａｌ－PEG_{24}－ＯＭｅ）（Ｑｕａｎｔａ Ｂｉｏｄｅｓｉｇｎ、ＯＨ，米国）をアヴィボディ当たり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負荷の評価を質量分析により判断した。

【０５０７】

質量分光分析については、ＭａｓｓＰＲＥＰ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化アヴィボディの質量スペクトルを記録した。このシステムは５％のCH_3CN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化アヴィボディは、典型的には７分に溶出した。ＭａｓｓＨｕｎｔｅｒ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アヴィボディ質量を要約する。ＰＥＧ$_{24}$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結合を示す。

【０５０８】

ＴＣＥＰによる制御還元後に遊離スルフヒドリル基を有することが示された全てのアヴィボディ（実施例５を参照）は、ペイロード、この場合、マレイミド－ＰＥＧ２４－メトキシへのチオール媒介結合に使用した。表３に示されるように、下記のアヴィボディを、ＴＣＥＰによる遊離スルフヒドリルへの還元後に、少なくとも１つのペイロードを操作フレームワーク・システインに部位特異的に結合させた：

・ダイアボディ型アヴィボディのV_L　ＦＲ２にモデリング変異ｃ６（ＡＶＰ０４－７９、配列番号：１０１）、ダイアボディ型アヴィボディのV_H　ＦＲ２にモデリング変異ｃ６（ＡＶＰ０４－１１１、配列番号：１０７）、ｓｃＦｖ型アヴィボディのV_L　ＦＲ２にモデリング変異ｃ６（ＡＶＰ０４－１２４、配列番号：１１９）、他の抗体クラス／ファミリー／種のダイアボディ型アヴィボディのV_L　ＦＲ２にモデリング変異ｃ６（ＡＶＰ０７－１１７、配列番号：１２７）を含むチオール化アヴィボディ。

・V_L　ＦＲ３（ＡＶＰ０４－１２３、配列番号：１１７）およびV_H　ＣＤ３（ＡＶＰ０４－１２０、配列番号：１１３）の両方にモデリング変異ｃ８を含むチオール化アヴィボディ。

・構造類似体がV_L　ＦＲ３に存在しないため、V_H　ＦＲ３（ＡＶＰ０４－１２１、配列番号：１１５）のみにモデリング変異ｃ９を含むチオール化アヴィボディ。

【０５０９】

【表３】

表3:質量分析により測定されるチオール化アヴィボディへのPEGローディング

構築物	平均質量（kDa）	PEG化質量（kDa）	質量増加（kDa）	ローディングされたPEG
FR2クローン				
AVP04－79	26775. 86	28018. 53	1242. 67	1
AVP04－111	26776. 02	29256. 97	2480. 95	2
AVP04－124	27722. 12	28963. 33	1241. 21	1
AVP07－117	28506. 04	30986. 40	2480. 36	2
FR3クローン				
AVP04－123	26844. 40	29325. 37	2480. 97	2
AVP04－120	26768. 49	29249. 40	2480. 91	2
AVP04－121	26830. 81	29311. 34	2480. 53	2
AVP04－83　－ve	26832. 10	未観察	0	0

【０５１０】

先に概説したように、モデリング変異ｃ４を含む構築物のＡＶＰ０４－８３（カバット残基Ｌ７８からＬ８２に挿入されるシステイン、配列番号：１０５）は、陰性対照として用いた。この構築物において、ＡＶＰ０４－８３を形成するよう挿入された操作システインはシステイン置換を操作するための構造的必要条件の全てを満たし（実施例９．５および図１０Ｂを参照）、しかしながら、操作システインはモデリングにより非常に低い溶媒接触表面積を有することを示すが（図１１を参照）、ＴＣＥＰによる制御還元後にＤＴＮＢとの反応に利用できず（図２３Ａを参照）、続いてペイロードはアヴィボディに結合できなかった（表３を参照）。これは、システイン変異が安定性または免疫活性を抑止することなく保存フレームワーク残基内に挿入され得るが、ジスルフィド架橋還元との適合性

およびその後のペイロード・結合が規定の構造／表面位置決めに関わることが好ましいことを証明した。この結果はさらに分子モデリングがインビトロ機能性の優れた予測因子であることを証明する。

【０５１１】

ＴＡＧ７２に特異的なＡＶＰ０４－１１１（配列番号：１０７）、ＡＶＰ０４－１２０（配列番号：１１３）およびＡＶＰ０４－１２１（配列番号：１１５）についての典型的な質量スペクトルの例は図２４に示し、ＴＣＥＰによる遊離スルフヒドリルへの還元後に少なくとも１つのペイロードが操作フレームワーク内システインに特異的に結合しうることを示す。

【０５１２】

この結果により、ＴＣＥＰによる遊離スルフヒドリルへの還元後に制御された部位特異的な様式で、チオール化アヴィボディに、具体的には操作フレームワークシステインにペイロードを結合させる能力を立証する。この結果はさらに、同じＦＲ２またはＦＲ３の操作システイン挿入変異が、ａ）V_LおよびV_Hドメインならびにそれらの異なるサブタイプ間に機能的に移動可能であったこと、ｂ）異なる型にＦｖドメインを含むタンパク質（例えばアヴィボディ）と適合可能であったこと、ならびにｃ）モデリング相で測定されインビトロで実証される特徴として、制御されたジスルフィド結合還元およびペイロードの結合が好ましくは溶媒に「表面露出」する非常に特異的な残基に依存することを証明する。

【０５１３】

実施例１５－ペイロードを結合したチオール化アヴィボディのインビトロ免疫活性評価

チオール化アヴィボディを発現し精製でき、それらの天然（結合されていない）状態で免疫活性であることが示された。上記に報告されるデータは、操作システインとの化学量論的に定義された結合が起こっていたことを示す。

【０５１４】

ＦＲ２またはＦＲ３システイン置換変異への部位特異的結合後に免疫活性が無効でないことを示すため、モデリング変異ｃ６、ｃ８およびｃ９により規定される操作システイン変異を含むアヴィボディのＡＶＰ０４－ｘｘサブセットは、実施例１２に概説したサイズ排除クロマトグラフィーを用いたカラムシフト検定により免疫活性について試験した。

【０５１５】

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とおりの、アヴィボディ－抗原複合体形成（実施例１２に記載した通り）が観察された（図２５Ａ～Ｂ）。いずれの場合にも、アヴィボディ単独では２８～３３分間で溶出し、アヴィボディ－抗原複合体は１０～２５分で溶出した。予想どおり、アヴィボディ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。

【０５１６】

この結果は、ＴＣＥＰによる遊離スルフヒドリルへの還元後にチオール化アヴィボディが少なくとも１つのペイロードを操作フレームワーク内システインに部位特異的に結合させたこと、ならびに制御された部位特異的な結合事象が結合を抑止しないことを示した。

参考文献

【０５１７】

【数１】

- Abuchowski *et al., J. Biol. Chem., 252*: 3582-3586, 1977;
- 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);
- Axworthy *et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4)*: 1802-1807, 2000;
- Barnett *et al, Genomics* 3: 59-66, 1988;
- Bateman *et al Genomics 3*, 59-66, 1988., *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);

【数２】

- Bowie *et al., Science, 253*:164-70, 1991;
- Bradl and Linington *Brain Pathol., 6*:303-311, 1996
- Brennan *et al, Science, 229*: 81-83, 1985;
- Brinkmann *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90*: 7538-7542, 1993;
- Brown T.A. (Editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press, 1991;
- 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;
- Carter *et al. Bio/Technology 10*: 163-167, 1992;
- Chan *et al, Oncogene*, 6: 1057-1061, 1991;
- Chari *et al Cancer Research 52*:127-131, 1992;
- Chen *et al. Nature*, 446:203-207, 2007;
- Cheung *et al., Virology 176*:546, 1990;
- Chothia and Lesk *J. Mol Biol. 196*:901 -917, 1987;
- Chothia *et al. Nature 342*, 877-883, 1989;
- 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;
- Chou *et al., Biophys. J. 26*:367-84, 1979;
- Ciccodicola *et al, EMBO J* 8: 1987-1991, 1989;
- Clark, *et al Genome Res. 13*, 2265-2270, 2003;
- Clark et al., Protein Sci. 15: 949-960, 2006;
- Coligan *et al.* (Editors), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, including all updates until present.
- Coussens *et al Science 230(4730)*: 1132-1139, 1985;
- Crouch *et al, J Immunol Methods,* 160: 81-88, 1993;
- Dijke *et al., J Biol Chem,* 269: 16985-16988
- Dooley *et al., Dev Comp Immunol,* 30:43-56
- 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;
- Fujisaku *et al, J Biol Chem* 264: 2118-2125, 1989;
- Gaertner and Offord, *Bioconj. Chem. 264 (4)*:2118-2125, 1989., *7*: 38-44, 1996

【数３】

- Garman, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, 1997;
- Gary *et al, Gene* 256: 139-147, 2000;
- 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;
- D.M. Glover and B.D. Hames (Editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press, 1995 and 1996;
- Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103;
- Goodman *et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed., Macmillan Publishing Co.,* 1990
- 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;
- 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;
- 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;

【数４】

- Johnson *et al, Cancer Res*, 46: 850-857, 1986;
- Jakobovits *et al. Nature Biotechnology 25,* 1134 – 1143, 2007;
- Jones, *Curr. Opin. Struct. Biol. 6*:210-216, 1996;
- Johnson and Wu, *Nucleic acids research 28*: 214-218, 2000;
- 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;
- Kawabata *et al., Proteins 41:* 108-122, 2000
- Kawabata, *Nucleic Acids Res. 31*: 3367-3369, 2003;
- Kim. *et al., Mol Cancer Ther. 7*: 2486-2497, 2008;
- Kim, *et al., Infect. Immun. 57*:944, 1989;
- King *et al., Biochemistry, 17*: 1499-1506, 1978;
- Kirkland *et al, J Immunol,* 137: 3614-3619, 1986;
- 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;
- 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;
- Le Gall *et al FEBS Lett, 453*: 164-168, 1999;
- Lee *et al FEBS Lett. 418(1-2)*:195-199, 1998;
- Lewis *et al Bioconj. Chem. 9*:72-86, 1998;
- Li *et al., Bioconjug Chem 17*: 68-76, 2006;
- 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

【数５】

- Merrifield, *J. Am. Chem. Soc., 85*:2149-2154, 1963;
- Moldenhauer *et al, Scand J Immunol,* 32: 77-82, 1990;
- Morel *et al, Curr Stud Hematol Blood Transfus,* 55: 53-63, 1988;
- Moult, *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;
- Mutsushima *et al., Chem. Lett.,* 773-776, 1980;
- Nakamuta., *et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 177*, 34-39, 1991;
- Nakayama *et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):*124- 127, 2000;
- Nagase *et al DNA Res. 7 (2)*: 143-150, 2000;
- Nguyen *et al., Adv Immunol,* 79:261-296
- Panchenko *et al. J. Mol. Biol. 296*: 1319-1331, 2000;
- Pei *et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 94*: 9637-9642, 1997;
- Perbal et al. A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons, 1984;
- Perisic *et al., Structure. 2*:1217-1226, 1994;
- Plückthun, *Immunol. Revs., 130*:151-188, 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;
- Roberge, *et al., Protein Eng Des Sel 19*: 141-145, 2006;
- Ross et al., Cancer Res, 62: 2546-2553, 2002;
- Reddy *et al., Synthesis Stutgart:* 999-1002, 1988;
- Reiter *et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95*, 1735-1740, 1998;
- Riechmann *et al. J Immunol Methods, 231*:25-38, 1999;
- Risma *et al., Proc Natl Acad Sci U S A.;92(5)*:1322-6, 1995;
- 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;

【数６】

- Sali and Blundell, *J. Mol. Biol. 234*, 779-815, 1993;
- 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;
- Shalaby *et al, J. Exp. Med., 175*: 217-225, 1992;
- Shao *et al., Mol Immunol*, 44: 656-665
- Shen *et al., Protein Sci. 15*: 2507- 2524, 2006;
- Sirk *et al., Bioconjug Chem.* 19: 2527–2534, 2008;
- Skerra *et al, Curr. Opinion in Immunol., 5*:256-262, 1993;
- Stahli *et al, Methods Enzymol,* 92: 242-253, 1983;
- Stanfield *et al., J Virol. 80:*6093-6105, 2006;
- Tang *et al. J. Exp. Med., 199*: 1455-1465, 2004;
- Thompson *et al, Science,* 293: 2108-2111, 2001;
- Todorovska *et al., J. Immunol. Methods, 248*: 47-66, 2001;
- Tonnelle *et al, EMBO J,* 4: 2839-2847, 1985;
- Trenado *et al. J. Clin.Invest., 112*: 1688-1696, 2002;
- Vallette *et al Nuc. Acids Res. 17*:723-733, 1989;
- Van der Sluis *et al. Gastroenterology 131*: 117–129, 2006;
- Vitetta et al., Immunol Today, 14: 252-259, 1993;
- 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;
- Wilson *et al, J Exp Med,* 173: 137-146, 1991;
- Xu and Xu *Proteins: Structure, Function, and Genetics 40*: 343-354, 2000;
- Xu *et al, Proc Natl Acad Sci U S A,* 98: 10692-10697, 2001;
- Yamaguchi *et al Biol. Chem. 269 (2)*, 805-808, 1994;
- 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;
- Zoller *et al Methods Enzymol. 100*:468-500, 1983;
- Zoller and Smith. *Nucl. Acids Res. 10*:6487-6500, 1982; and
- Zhou et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 14575-14580, 2005.

【図１Ａ】

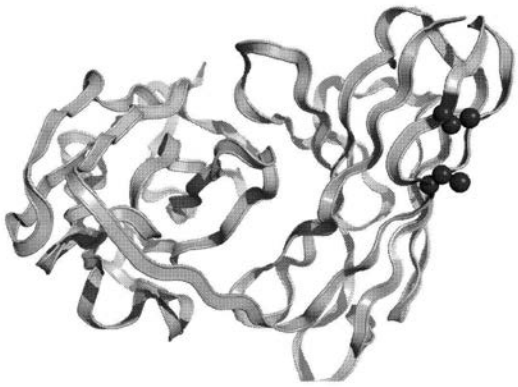

図１Ａ

【図１Ｂ】

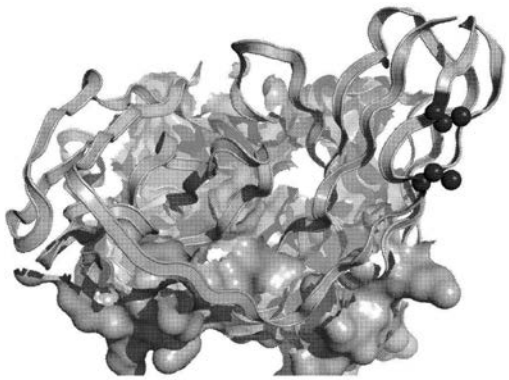

図１Ｂ

【図２Ａ】

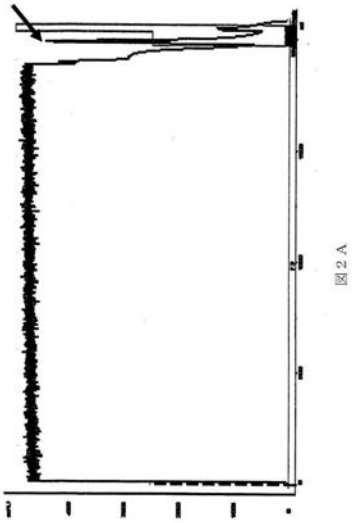

図２Ａ

【図２Ｂ】

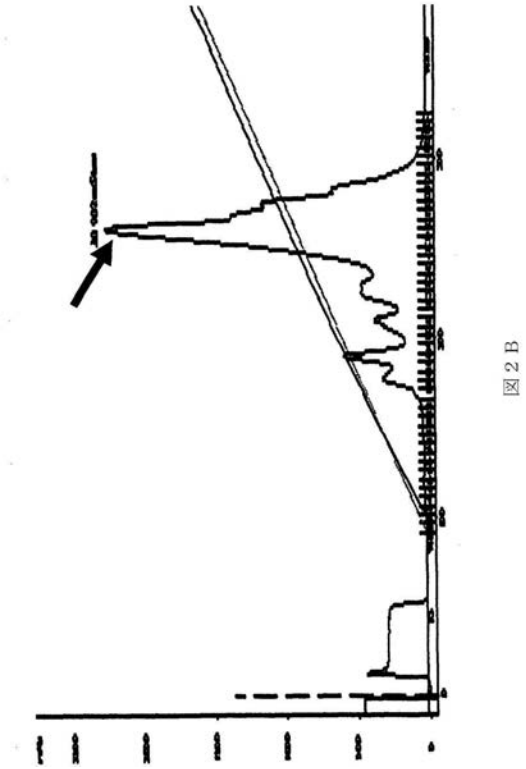

図２Ｂ

【図２Ｃ】

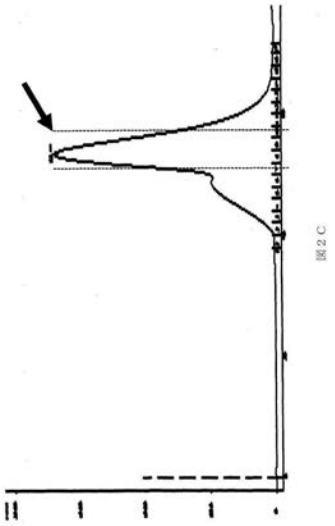

図２Ｃ

【図２Ｄ】

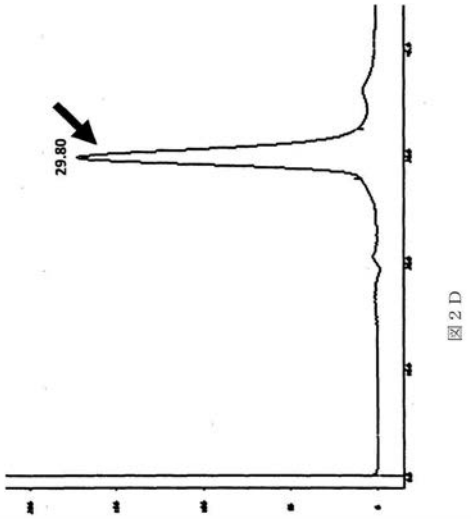

図２Ｄ

【図２Ｅ】

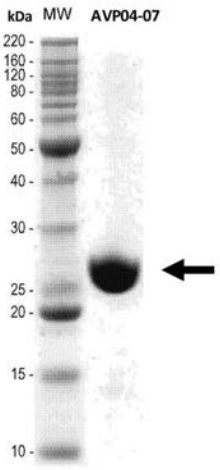

図２Ｅ

【図３Ａ】

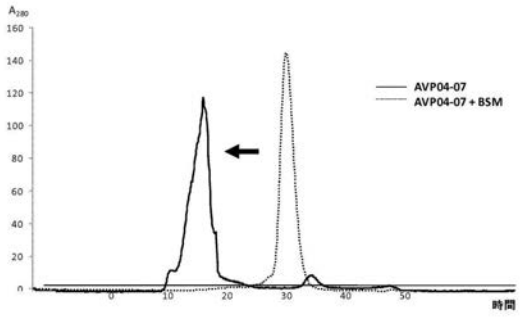

図３Ａ

【図３Ｂ】

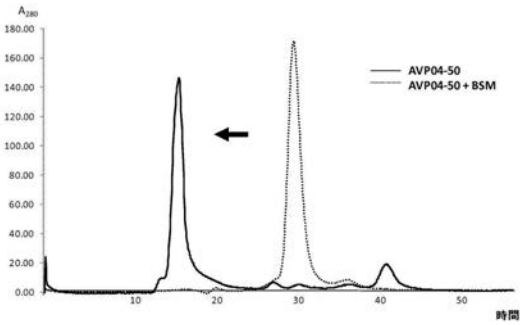

図3B

【図３Ｃ】

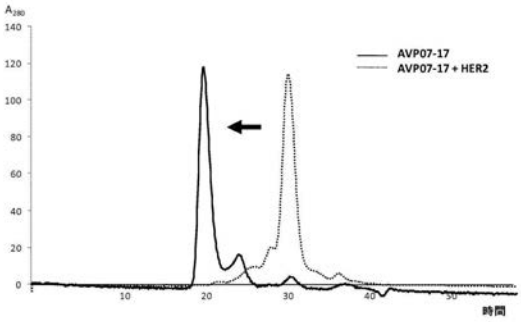

図３Ｃ

【図３Ｄ】

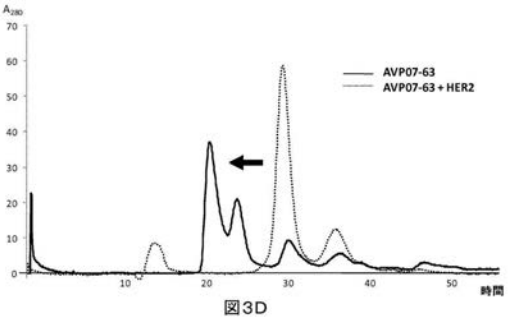

図3D

【図４】

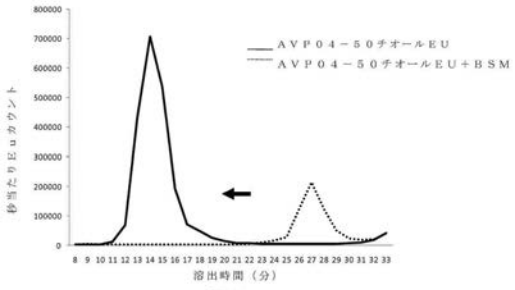

図４

【図５Ａ】

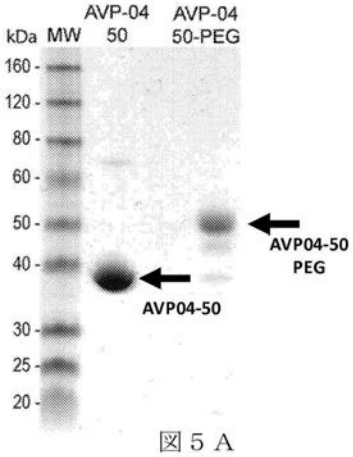

図５Ａ

【図５Ｂ】

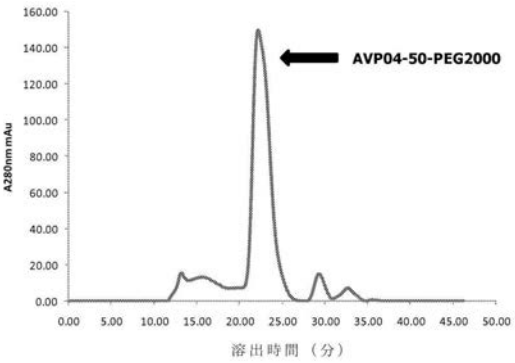

図5B

【図５Ｃ】

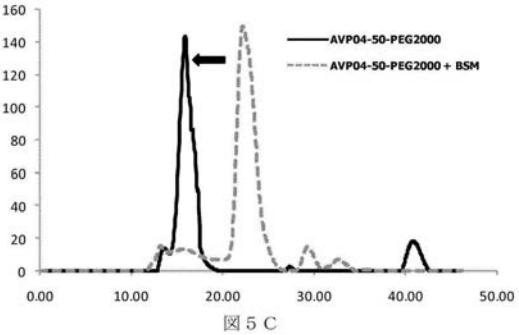

図５Ｃ

【図６Ａ】

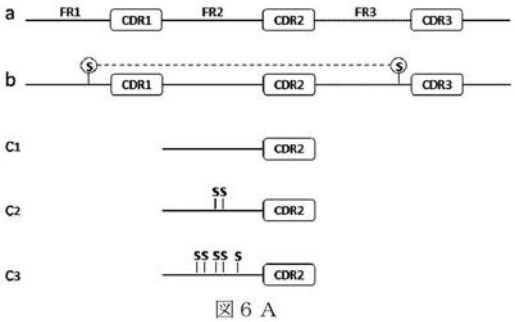

図６Ａ

【図６Ｂ】

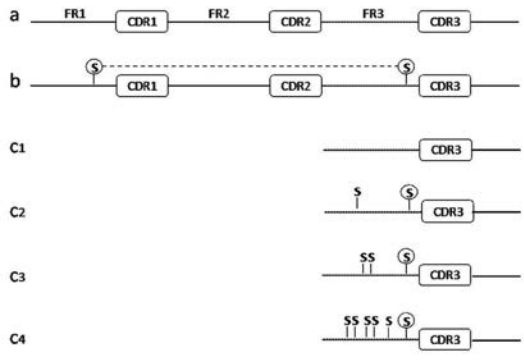

図6B

【図７】

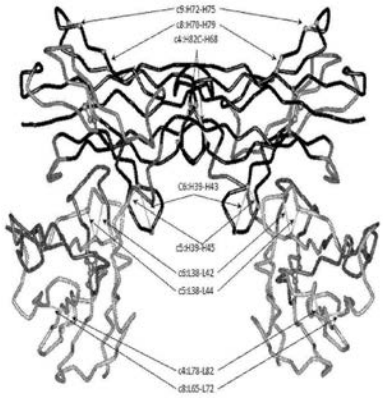

図７

【図８】

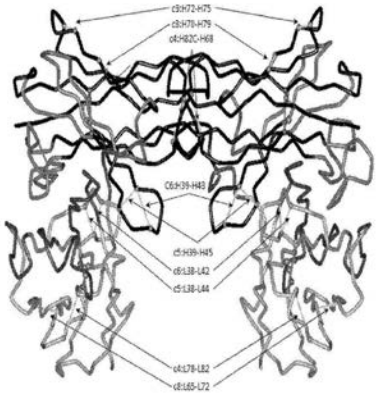

図８

【図９】

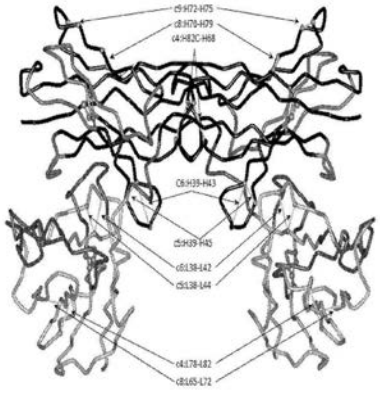

図９

【図１０Ａ】

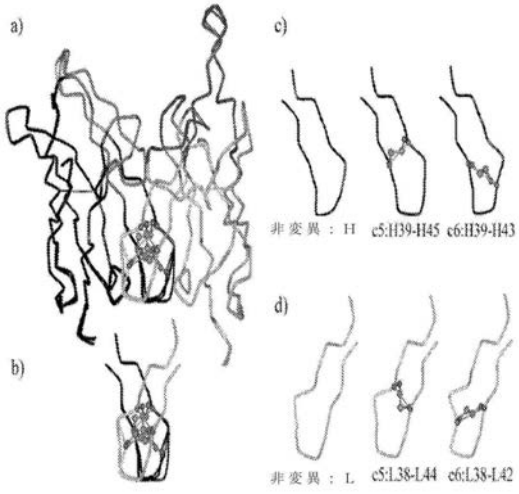

図10A

【図１０Ｂ】

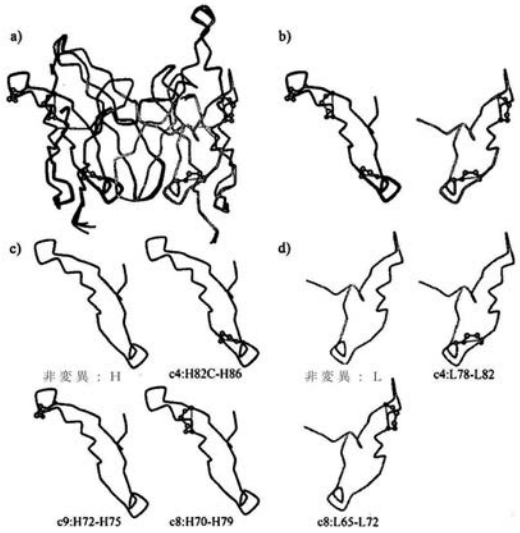

図１０Ｂ

【図１１】

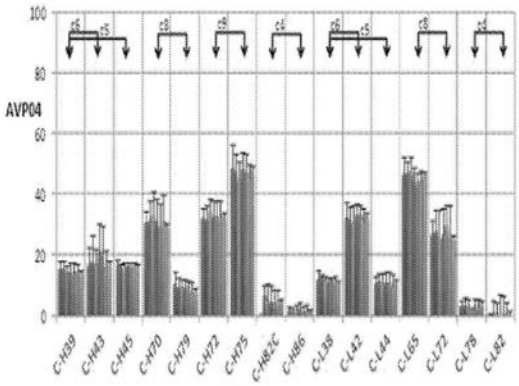

図１１

【図１２Ａ】

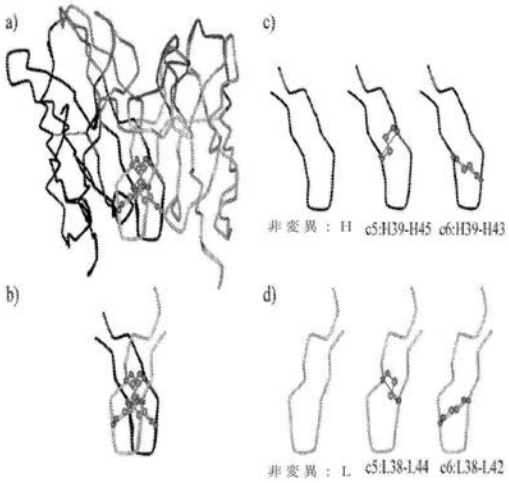

図１２Ａ

【図１２Ｂ】

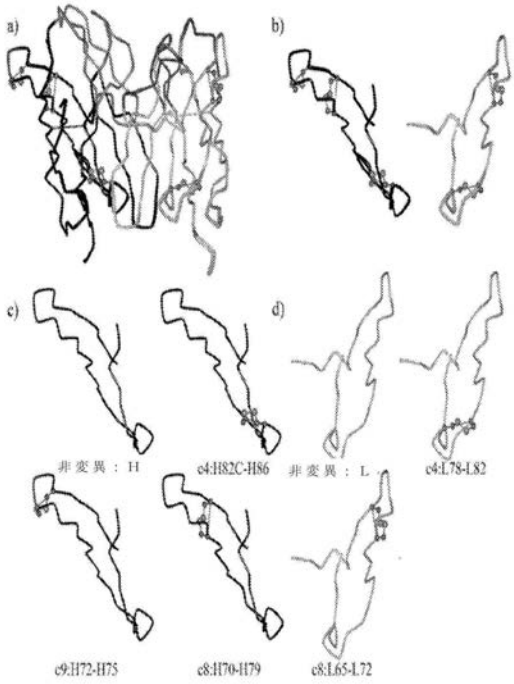

図１２Ｂ

【図１３Ａ】

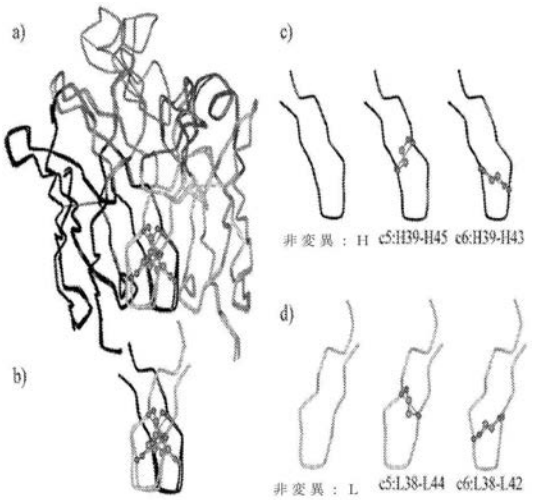

図１３Ａ

【図１３Ｂ】

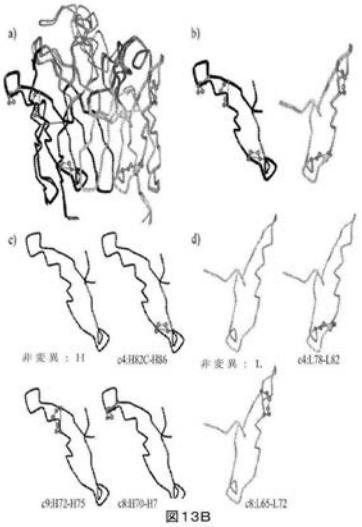

図13B

【図１４】

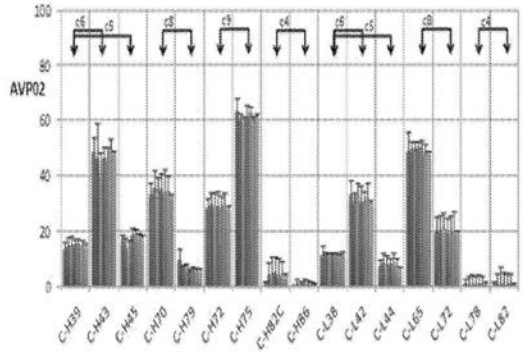

図１４

【図１５】

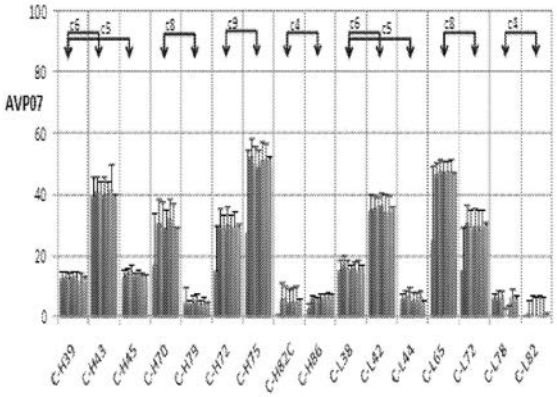

図１５

【図１６】

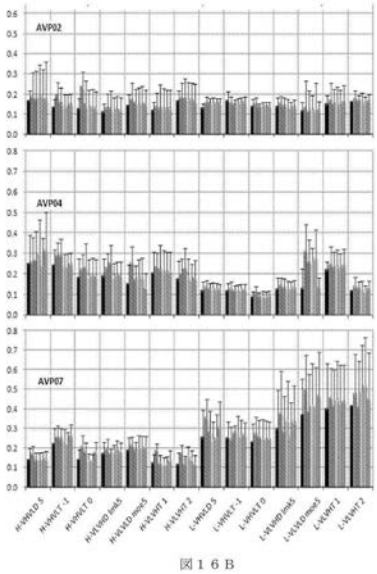

図１６Ｂ

【図１７Ａ】

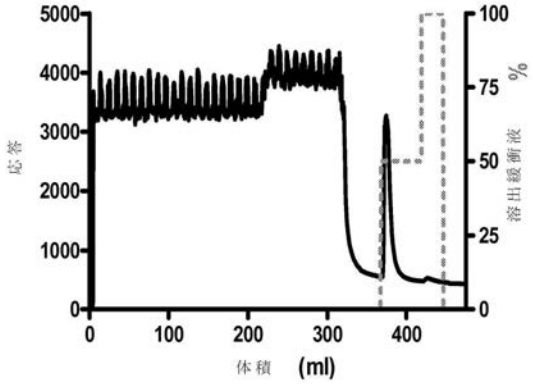

図１７Ａ

【図１７Ｂ】

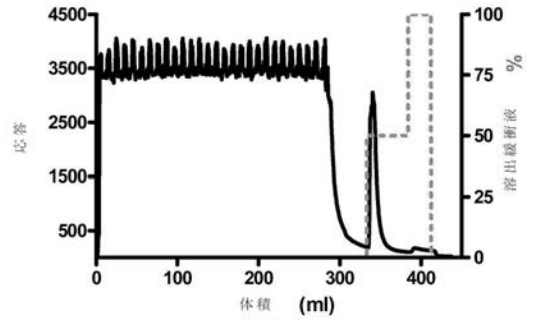

図１７Ｂ

【図１７Ｃ】

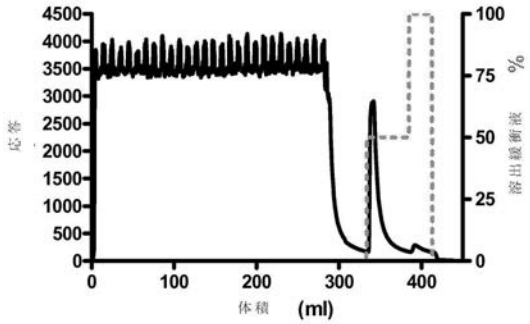

図１７Ｃ

【図１８Ａ】

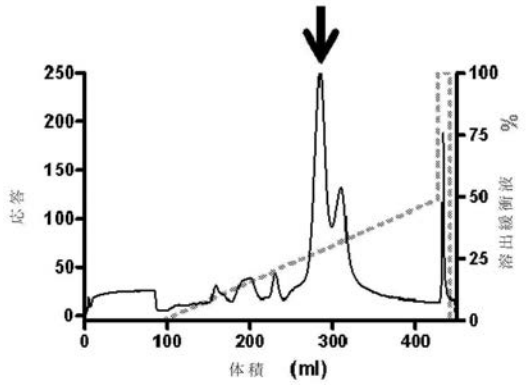

図１８Ａ

【図１８Ｂ】

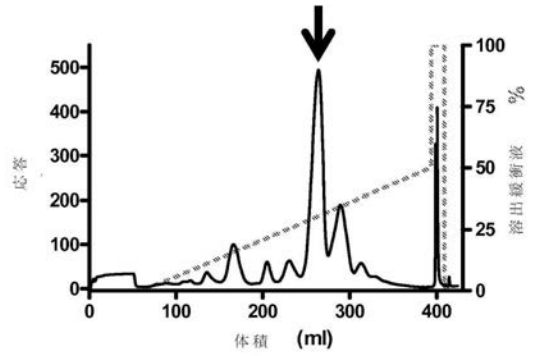

図１８Ｂ

【図１８Ｃ】

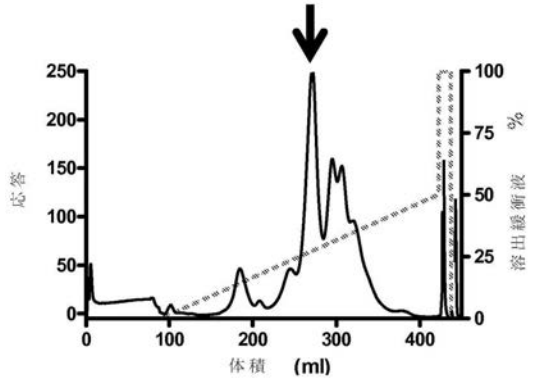

図１８Ｃ

【図１９Ａ】

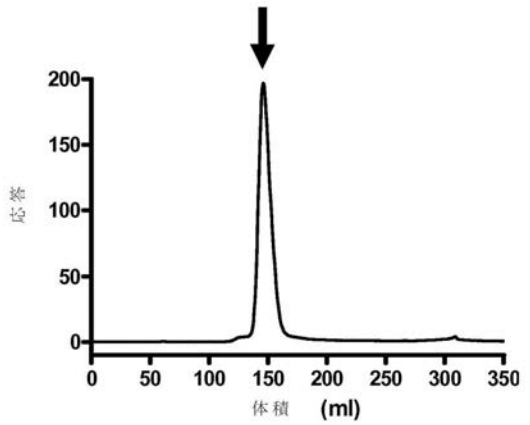

図１９Ａ

【図１９Ｂ】

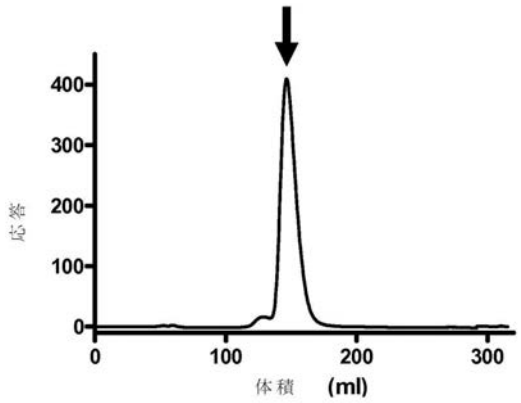

図１９Ｂ

【図１９Ｃ】

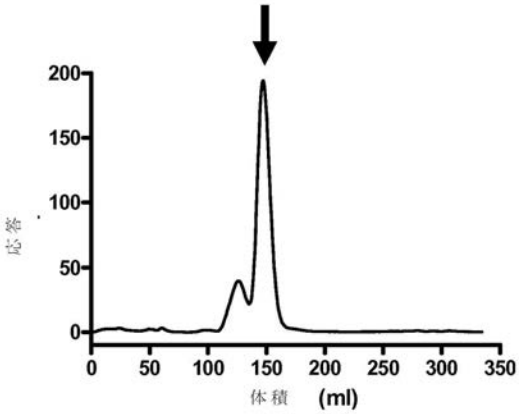

図１９Ｃ

【図２０Ａ】

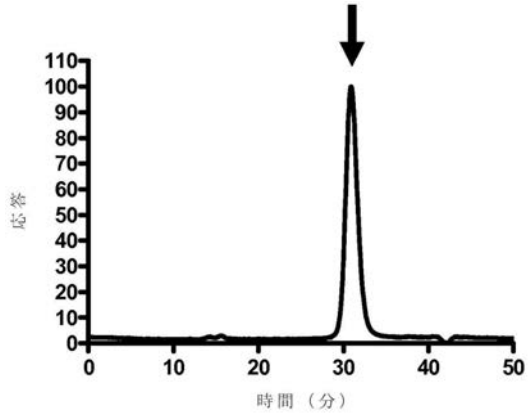

図２０Ａ

【図２０Ｂ】

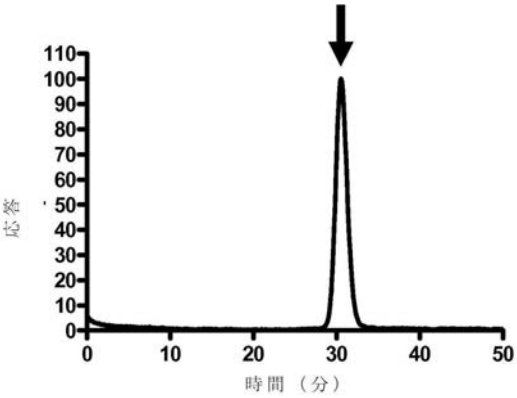

図２０Ｂ

【図２０Ｃ】

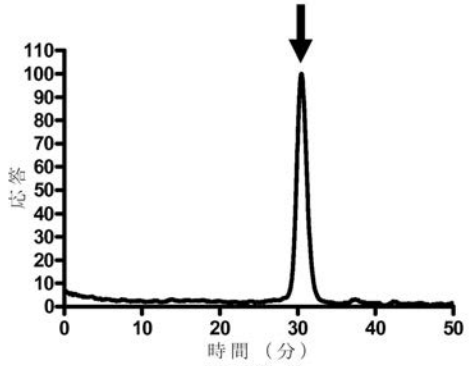

図２０Ｃ

【図２１Ａ】

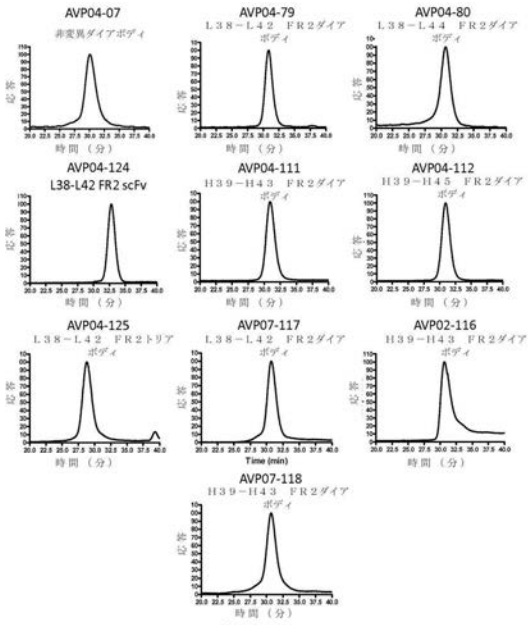

図２１Ａ

【図２１Ｂ】

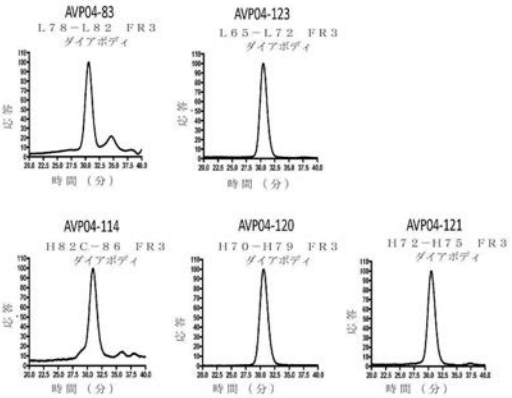

図２１Ｂ

【図２２Ａ】

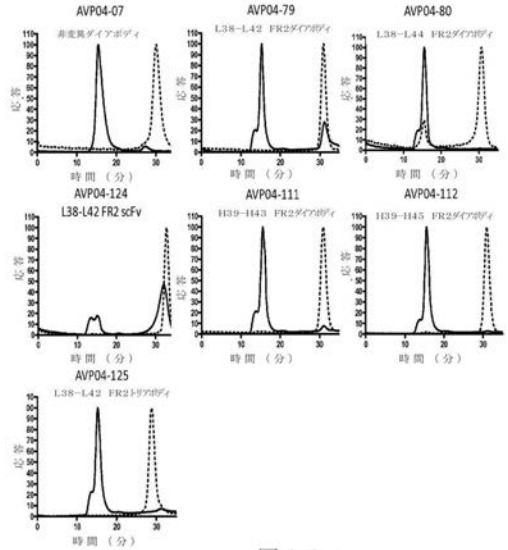

図２２Ａ

【図２２Ｂ】

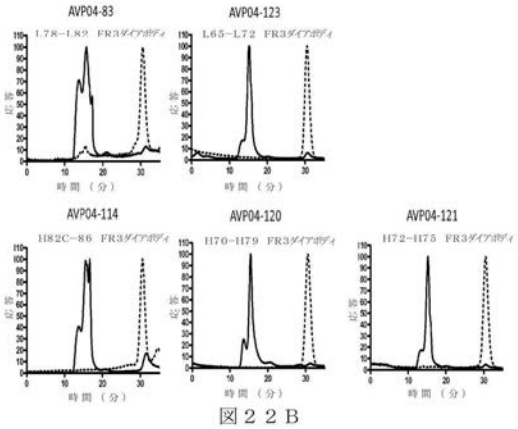

図２２Ｂ

【図２３Ａ】

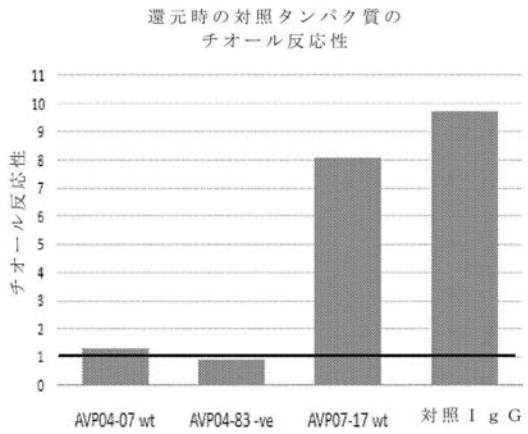

図２３Ａ

【図２３Ｂ】

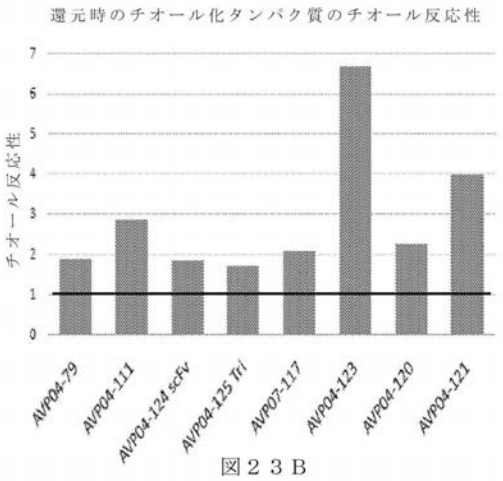

図２３Ｂ

【図２４】

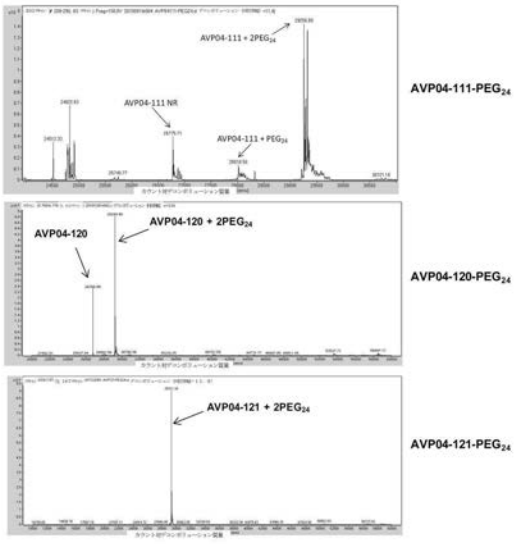

図２４

【図２５Ａ】

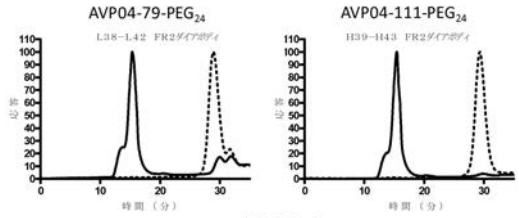

図２５Ａ

【図２５Ｂ】

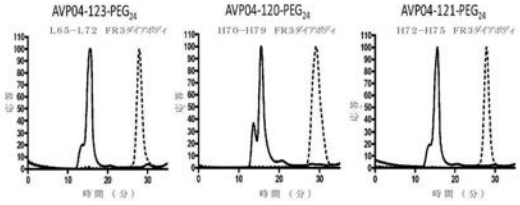

図25B

【配列表】
2017122084000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12N 1/19	*(2006.01)*	C12N	1/19	
C12N 1/21	*(2006.01)*	C12N	1/21	
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N	5/10	
A61K 38/00	*(2006.01)*	A61K	37/02	
A61K 47/50	*(2017.01)*	A61K	47/48	
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	35/00	
A61P 35/02	*(2006.01)*	A61P	35/02	
A61P 37/02	*(2006.01)*	A61P	37/02	
A61P 37/06	*(2006.01)*	A61P	37/06	
G01N 33/53	*(2006.01)*	G01N	33/53	D

(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　３１２４，キャンバーウェル，ハゼル　ストリート　１／１５
(72)発明者　ホイートクロフト，マイケル，ポール
オーストラリア国　ヴィクトリア　３００６，サウスバンク，ウェルズ　ストリート　２／６８
(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　３００８，ドックランド，ハーバー　エスプラネード　１００，ユニット　１４１１

Ｆターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AA99X AB01 AC14 BA02 CA25
CA44 CA46
4C076 EE23 EE59
4C084 AA02 AA07 BA02 BA37 NA14 ZB072 ZB082 ZB262 ZB272
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA50 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74
GA21 GA26

【外国語明細書】
2017122084000001.pdf

专利名称(译)	免疫偶联物及其制备方法2		
公开(公告)号	JP2017122084A	公开(公告)日	2017-07-13
申请号	JP2017000559	申请日	2017-01-05
[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 タムバキスデブラ ホイートクロフトマイケルポール ツラティファビオ		
发明人	ハドソン,ピーター,ジョン タムバキス,デブラ ホイートクロフト,マイケル,ポール ツラティ,ファビオ		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/09 C07K16/22 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K38/00 A61K47/50 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/30 A61K47/60 A61K49/0002 C07K16/3092 C07K16/32 C07K2317/21 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/622 C07K2317/624 C07K2317/626 C07K2319/21		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N15/00.A C07K16/22 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K37/02 A61K47/48 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 G01N33/53.D A61K38/00 A61K38/02 A61K39/395.J A61K39/395.M A61K39/395.N A61K47/60 A61K47/68 A61K51/10.100 C12N15/13 C12N15/62.Z C12N15/85.Z C12P21/08 G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AA99X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/EE23 4C076/EE59 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA02 4C084/BA37 4C084/NA14 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA21 4H045/GA26		
代理人(译)	小林 浩 铃木康仁		
优先权	61/289497 2009-12-23 US		
其他公开文献	JP6484259B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了包含免疫球蛋白可变区的蛋白质，其具有结合到修饰的或蛋白的化合物的蛋白的提供，以促进化合物与蛋白质的结合。 一个框架区（FR）分离包含免疫球蛋白可变区包括位于位于内2中的至少两个半胱氨酸残基和/或框架区中的至少两个半胱氨酸残基（FR3）的蛋白质，FR2和/或当不结合到至少两个所述FR3的半胱氨酸残基的化合物中，可以半胱氨酸残基之间形成的蛋白质框架二硫键。优选地，所述蛋白包含免疫球蛋白重链可变区（VH）和免疫球蛋白轻链可变区（V→），至少一个可变区它含有两个半胱氨酸残基。蛋白质也与另一种化合物结合。 【选择图】无

(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-122084
(P2017-122084A)
(43)公開日　平成29年7月13日(2017.7.13)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/18	***(2006.01)***	C07K	16/18	ZNA	4B065
C12N 15/09	***(2006.01)***	C12N	15/00	A	4C076
C07K 16/22	***(2006.01)***	C07K	16/22		4C084
C07K 16/28	***(2006.01)***	C07K	16/28		4H045
C12N 1/15	***(2006.01)***	C12N	1/15		

審査請求 有　請求項の数 53　ＯＬ　外国語出願　（全 127 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-559 (P2017-559)
(22)出願日　平成29年1月5日 (2017.1.5)
(62)分割の表示　特願2012-545018 (P2012-545018)の分割
原出願日　平成22年12月23日 (2010.12.23)
(31)優先権主張番号　61/289,497
(32)優先日　平成21年12月23日 (2009.12.23)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　512001854
アビペップ　ピーティーワイ　リミテッド
オーストラリア国　ヴィクトリア　３０５２，パークビレ，ロイヤル　パレイド　３４３
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木　康仁
(72)発明者　ハドソン，ピーター，ジョン
オーストラリア国　ヴィクトリア　３１３０，ブラックバーン，フクシア　ストリート　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２