

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5485152号
(P5485152)

(45) 発行日 平成26年5月7日(2014.5.7)

(24) 登録日 平成26年2月28日(2014.2.28)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
C 07 K 16/00	(2006.01) C 07 K 16/00
C 07 K 19/00	(2006.01) C 07 K 19/00
A 61 K 39/395	(2006.01) A 61 K 39/395 T
A 61 P 35/00	(2006.01) A 61 K 39/395 R

請求項の数 20 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-520502 (P2010-520502)
(86) (22) 出願日	平成20年8月16日 (2008.8.16)
(65) 公表番号	特表2010-535832 (P2010-535832A)
(43) 公表日	平成22年11月25日 (2010.11.25)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/006750
(87) 国際公開番号	W02009/021754
(87) 国際公開日	平成21年2月19日 (2009.2.19)
審査請求日	平成23年8月11日 (2011.8.11)
(31) 優先権主張番号	60/955,913
(32) 優先日	平成19年8月15日 (2007.8.15)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	512137348 バイエル・インテレクチュアル・プロパティ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング Bayer Intellectual Property GmbH ドイツ40789モンハイム、アルフレートノーベルーシュトラーセ10番
(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単一特異性および多特異性抗体ならびに使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

重鎖および軽鎖を含み、重鎖および軽鎖のそれぞれが1つまたはそれ以上の可変領域を含むものである抗体であって、抗原またはエピトープに結合可能であり、1つまたはそれ以上のプロテアーゼ切断部位を含むアミノ酸リンカーを含み、該プロテアーゼ切断部位が配列番号：26、27、28、29、30、31および32からなる群より選択されるものであり、重鎖および軽鎖が下記のa)～h)：

a) 重鎖： NH₂-V_H1-リンカー-V_H2-CH1-CH2-CH3-COOH 軽鎖： NH₂-V_L1-リンカー-V_L2-CL-COOH、b) 重鎖： NH₂-V_H1-リンカー-V_L2-CH1-CH2-CH3-COOH 軽鎖： NH₂-V_L1-リンカー-V_H2-CL-COOH、c) 重鎖： NH₂-V_L1-リンカー-V_H2-CH1-CH2-CH3-COOH 軽鎖： NH₂-V_H1-リンカー-V_H2-CL-COOH、d) 重鎖： NH₂-V_L1-リンカー-V_H2-CH1-COOH 軽鎖： NH₂-V_H1-リンカー-V_L2-CL-COOH、e) 重鎖： NH₂-V_H1-リンカー-V_L2-CH1-COOH 軽鎖： NH₂-V_L1-リンカー-V_H2-CL-COOH、f) 重鎖： NH₂-V_L1-リンカー-V_H2-CH1-COOH 軽鎖： NH₂-V_H1-リンカー-V_H2-CL-COOH、g) 重鎖： NH₂-V_H1-リンカー-V_H2-CH1-COOH

10

20

軽鎖：NH₂-V_L1-リンカー-V_L2-CL-COOH、および
h)重鎖：NH₂-V_H1-リンカー-V_H2-CH1-CH2-CH3-COOH

軽鎖：NH₂-V_L1-リンカー-V_L2-CL-COOH
からなる群より選択されるものである、抗体。

【請求項 2】

抗体が2つの異なる抗原または2つの異なるエピトープに同時に結合する請求項1の抗体。

【請求項 3】

抗体がプロテアーゼ-依存様式で2つの抗原に逐次的に結合する請求項1または2の抗体。
10

【請求項 4】

抗体がプロテアーゼ消化の後に抗原に結合する請求項1-3のいずれかの抗体。

【請求項 5】

配列番号33-120からなる群から選択される請求項1-4のいずれかの抗体。

【請求項 6】

該抗体が治療物質または細胞毒性物質と複合体化している請求項1-5のいずれかの抗体。
。

【請求項 7】

該抗体が以下からなる群から選択される薬剤と複合体化している請求項6の抗体：モノメチルアクリリスタチン-E (MMAE)、アブリジン、アザリビン、アナストロゾール、アザシチジン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブリオスタチン-1、ブルファン、カリケアマイシン、カンプトテシン、10-ヒドロキシカンプトテシン、カルムスチン、セレブレックス、クロラムブシル、シスプラチン、イリノテカン (CPT-11)、SN-38、カルボプラチン、クラドリビン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ドセタキセル、ダクチノマイシン、ダウノマイシングルクロニド、ダウノルビシン、デキサメタゾン、ジエチルスチルベストロール、ドキソルビシン、ドキソルビシングルクロニド、エビルビシングルクロニド、エチニルエストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エトポシドグルクロニド、エトポシドホスフェート、フロクスウリジン (FUdR)、3',5'-オジオレオイル-FudR (FUdR-dO)、フルダラビン、フルタミド、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、ゲムシタビン、ヒドロキシプログステロンカプロエート、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、L-アスパラギナーゼ、ロイコボリン、ロムスチン、メクロレタミン、メドロプロゲステロンアセテート、酢酸メゲストロール、メルファン、メルカブトプリン、6-メルカブトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトタン、フェニルブチレート、ブレドニゾン、プロカルバジン、パクリタキセル、ペントスタチン、PSI-341、セムスチン、ストレブトゾシン、タモキシフェン、タキサン系抗癌剤、タキソール、プロピオン酸テストステロン、サリドマイド、チオグアニン、チオテバ、テニポシド、トポテカン、ウラシル・マスターード、ベルケイド、ビンプラスチン、ビノレルビン、ビンクリスチン、リシン、アブリン、リボミクレーゼ、オンコナーゼ、rapLRI、DNase I、ブドウ球菌エンテロトキシン-A、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素、および緑膿菌内毒素。
30

【請求項 8】

治療上有効量の請求項1から7のいずれかの抗体を医薬上許容される担体と組み合わせて含む医薬組成物。

【請求項 9】

治療上有効量の請求項1から7のいずれかの抗体を医薬上許容される担体および1以上の医薬品と組み合わせて含む医薬組成物。

【請求項 10】

有効量の請求項1から7のいずれかの抗体または請求項8または9の医薬組成物を含む、癌、感染症、または自己免疫疾患の処置のための医薬組成物。
40

【請求項 1 1】

癌が、乳房、気道、脳、生殖器、消化管、尿路、眼、肝臓、皮膚、頭頸部、甲状腺、副甲状腺の癌、リンパ腫、肉腫、および白血病から選択される請求項 10の医薬組成物。

【請求項 1 2】

自己免疫疾患が、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、狼瘡、I型糖尿病、クローン病、自己免疫溶血性貧血、自己免疫肝炎、糸球体腎炎、炎症性腸疾患、心筋炎、乾癬、甲状腺炎、潰瘍性大腸炎、およびグレーブス病から選択される請求項 10の医薬組成物。

【請求項 1 3】

感染症が、HIV/AIDS、下気道感染、下痢症、結核、マラリア、麻疹、百日咳、破傷風、10
髓膜炎、梅毒、B型肝炎および熱帯病から選択される請求項 10の医薬組成物。

【請求項 1 4】

癌、感染症、および自己免疫疾患からなる疾患の群から選択される疾患の処置のための医薬の製造における請求項1から7のいずれかの抗体の使用。

【請求項 1 5】

疾患の診断のための、請求項1から7のいずれかの抗体を含む診断組成物。

【請求項 1 6】

疾患が、癌、感染症および自己免疫疾患からなる疾患の群から選択される請求項 15の診断組成物。

【請求項 1 7】

以下の工程を含む患者における疾患を検出するための試験方法:

20

- (a) 対照集団の個体から採取された対照サンプルにおける疾患と関連するタンパク質のレベルを、請求項1-7のいずれかの抗体を用いて免疫学的に検出および定量する工程;
- (b) 患者から経時的に採取された患者サンプルのサンプルにおけるタンパク質の変化を、請求項1-7のいずれかの抗体を用いて免疫学的に検出および定量する工程;および、
- (c) 患者サンプルにおけるタンパク質のレベルと対照サンプルにおけるタンパク質のレベルとを比較する工程;

ここで、患者サンプルにおけるタンパク質のレベルが対照サンプルにおけるタンパク質のレベルを上回る場合、患者における疾患の存在が示される、方法。

【請求項 1 8】

患者における疾患の状態をモニターする方法、および/または、該疾患を患う患者がどのように治療に応答するかをモニターする方法であって、経時的に採取された患者サンプルにおける疾患と関連するタンパク質のレベルの変化を、請求項1-7のいずれかの抗体を用いて免疫学的に検出および定量する工程を含み、ここで、経時的なタンパク質のレベルの上昇は、疾患の進行または該治療に対する負の応答を示し、経時的なタンパク質のレベルの低下は、疾患の寛解または該治療に対する正の応答を示す、方法。

30

【請求項 1 9】

請求項1-7のいずれかの抗体を含むキット。

【請求項 2 0】

細胞を懸濁または固定するための溶液、検出可能な標識、抗体の結合に対してポリペプチドを感受性にさせる溶液、細胞を溶解する溶液、および/またはポリペプチドの精製のための溶液をさらに含む請求項 19のキット。

40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本出願は、2007年8月15日出願の米国仮出願第60/955,912号および 2007年8月15日出願の米国仮出願第60/955,913号の利益を主張し、その内容は引用により全体が本明細書に包含される。

【0 0 0 2】**発明の分野**

本発明は、様々な疾患の診断および処置のために利用し得る单一特異性(monospecific)

50

抗体および多特異性(multispecific)抗体に関する。さらに、これらの抗体はプロテアーゼ切断によって改変され得る。プロテアーゼ制御または調節は、例えばリンカー中に位置するプロテアーゼ部位によって提供され得る。これらのプロテアーゼに調節される抗体も、様々な疾患の診断および処置のために利用することができる。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

抗体は、1以上の異なる抗原に対して、または同じ抗原上の1以上の異なるエピトープに対して向けることができる。例えば、二特異性抗体は、2つの異なる抗原に対して、または同じ抗原上の2つの異なるエピトープに対して向ける。二特異性抗体は2つの別個の標的に同時に結合することができるため、これらの抗体は、抗体に基づく診断に関してならびに様々な疾患および障害、例えば癌、感染症、自己免疫疾患および血液疾患の処置に関して大きな可能性を有する。例えば、二特異性抗体は、Tリンパ球を選択的に刺激および拡張(expand)することができ(Wong, et al., J. Immunol. 139:1369-1374, 1987; Wong, et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 58:236-250, 1991)、免疫細胞または毒性物質を、腫瘍細胞を殺すように向けることができ(Lum, et al., Exp. Hematol. 34:1-6, 2006; Wolf, et al., Drug Discov. Today 10:1237-1244, 2005; Cao, et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 55:171-197, 2003; Talac, et al., J. Biol. Regul. Homeost. Agents 14:175-181, 2000)、2つの受容体を同時にブロックすることができる(Lu, et al., J. Biol. Chem. 279:2856-2565, 2004)。さらに、二特異性抗体は、酵素反応を増強するため(米国特許出願第2007/0041978号)または心筋梗塞を有する患者における傷害の部位へ幹細胞を向けるため(Lum, et al., Blood Cells Mol. Dis. 32:82-87, 2004)に、第VII因子の基質の代わりとして用いることができる。

【0004】

腫瘍に関連する抗原および毒性物質を標的とする二特異性抗体は、癌治療において用いることができる。例えば、この技術を用いて、二特異性抗体の一方の腕は腫瘍に関連する抗原、例えばHer2、EGF受容体、CD20、CD22、CD30、CD33、CD52およびCA-125に対して向けることができ、該二特異性抗体の他方の腕は毒素、薬物またはサイトカインを標的とすることができます。つまり、二特異性抗体は、毒性物質を選択的に腫瘍細胞へと向けることができ、治療抗体の有効性を増強し、全身毒性を減少させる。毒素/薬物の例は、カリチアマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、メトトレキサート、リシンA、サボリン、ゲロニンおよびビンカアルカロイドを含み、サイトカインの例は、腫瘍壊死因子アルファ(TNF-アルファ)およびIL-2を含む。

【0005】

生物学的に重要なエフェクタタンパク質中の定義された部位のプロテアーゼによる特異的切断は、細胞のおよび細胞外の生理学的過程の自然な制御のための周知の方法である。例として、プロテアーゼによる凝固カスケードの活性化および阻害(Butenas, et al., Biochemistry 67:3-12, 2002; Esmon, Chest, 124:26S-32S, 2003)、プロテアーゼ活性化可能(protease-activatable)受容体のプロテアーゼによる活性化(Coughlin, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18:514-518, 1998)、プロテアーゼによる膜結合型サイトカインの放出(Amour, et al., FEBS Lett. 435:39-44, 1998)、プロテアーゼによる分泌小胞中におけるプロホルモンのプロセシング(Moore, et al., Arch. Physiol. Biochem. 110:16-25, 2002)、およびプロテアーゼによる分泌の間ににおけるプロタンパク質のプロセシング(Scamuffa, et al., FASEB J. 20:1954-1963, 2006)が挙げられる。プロテアーゼは、組織特異的または腫瘍特異的に発現または位置するが多く、例として、心臓組織における膜セリンプロテアーゼであるコリン(corin)(Yan, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8525-8529, 2000)、前立腺組織、前立腺癌および精液における前立腺特異的抗原(PSA)であるカリクレインというセリンプロテアーゼ(Veveris-Lowe, et al., Semin. Thromb. Hemost. 33:87-99, 2007)、肝臓組織および腫瘍における膜セリンプロテアーゼであるヘプシン(Xuan, et al., Cancer Res. 66:3611-3619, 2006)、肝臓において発

10

20

30

40

50

現し、血液中へ分泌される凝固プロテアーゼである第 X 因子 (Miao, et al., J. Biol. Chem. 267:7395-7401, 1992)、および膵臓において発現し、十二指腸へ放出される消化性プロテアーゼ (Belorgey, et al., Biochem. J. 313:555-560, 1996) が挙げられる。ヒトプロテアーゼによるアミノ酸配列の特異的切断は、トロンビン (Chang, Eur. J. Biochem. 151:217-224, 1985)、第 Xa 因子 (Nagai, et al., Methods Enzymol. 153:461-481, 1987)、フューリン (Brennan, et al., FEBS Lett. 347:80-84, 1994)、スプチリシン様プロホルモン変換酵素 (Lipkind, et al., J. Biol. Chem. 270:13277-13284, 1995) およびマトリックスメタロプロテイナーゼ (Minod, et al., J. Biol. Chem. 281:38302-38313, 2006) を包含する。特異的プロテアーゼをコードする遺伝子は腫瘍組織において上方制御され得、表 2 は癌組織と関連するプロテアーゼを示す。

10

【0006】

プロテアーゼによる切断は、組換えタンパク質からタンパク質もしくはペプチドのタグを特異的に除去するため、あるいはハイブリッドの組換えタンパク質をプロセシングするために、インビトロの研究において広く用いられる。例えば、ヒトライノウイルス 3C プロテアーゼ、トロンビンまたは第 Xa 因子は、グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)タグを除去するために用いられており(Dian, et al., Life Sciences News - Amersham Biosciences 10:1-5, 2002)、第 Xa 因子はハイブリッドタンパク質をプロセシングするために用いられている(Nagai, et al., 1987)。プロテアーゼは、生物学的過程を調節するための手段として、薬物の標的であることが多い; 例として、第 Xa 因子 (Phillips, et al., J. Med. Chem. 41:3557-3562, 1998)、トロンビン (Riester, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:8597-8602, 2005)、ウロキナーゼ (Killeen, et al., Br. J. Cancer 96:262-268, 2007) および第 VIIa 因子 (Kohrt, et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 15:4752-4756, 2005) が挙げられる。最後に、生物学的薬物として開発されたタンパク質は、プロテアーゼによる切断を妨げるため、およびインビトロまたはインビボでの安定性を改善するために改変され得る (Light, et al., Eur. J. Biochem. 262:522-533, 1999; Saenko, et al., Haemophilia 12:42-51, 2006)。

20

【0007】

細胞内プロテアーゼによるプロテアーゼ特異的な毒素の放出を可能にするため、特異的プロテアーゼの切断部位が、毒素分子を標的化(targeting)抗体へ結合させるリンカーの中に組み込まれた (Trail, et al., Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337, 2003)。さらに、標的化抗体は様々な形式(format)で作成されている。例えば、二特異性抗体は、単一の抗体分子による、2つの異なる抗原へのまたは1つの抗原の2つの異なるエピトープへの結合を可能にするよう開発された (Segal, et al., Curr. Opin. Immunol. 11:558-562, 1999; Tomlinson, et al., Methods Enzymol. 326:461-479, 2000; Wu, et al., Nat Biotechnol. 25:1290-1297, 2007)。2つの受容体を遮断する能力 (Lu, et al., J. Biol. Chem. 279:2856-2865, 2004) ならびに癌細胞および腫瘍組織を攻撃する免疫細胞を動員(recruit)する能力 (Loffler, et al., Leukemia 17:900-909, 2003; Lum, et al., Exp. Hematol. 34:1-6, 2006) を有する他の二特異性分子が作成されている。

30

【発明の概要】

【0008】

本発明は、新規な抗体形式、例えば、单一特異性および多特異性抗体に関する。本発明の抗体はまた、2つの異なる重鎖(H)可変領域ドメイン(V_H)と2つの異なる軽鎖(L)可変領域ドメイン(V_L)との直列連結によって構築し得る。重鎖および軽鎖は、定常(C)領域間のジスルフィド結合を介して、Fab 様または IgG 様の分子を形成し得る。多特異性抗体は、2より多くの抗体可変ドメインを連結することによって作成し得る。

40

【0009】

本発明の抗体は、プロテアーゼ切断によって改変し得る。これらのプロテアーゼに調節される抗体は、例えば Fab 様または IgG 様の形式のいずれかにおける、例えば单一特異性抗体、二特異性抗体、またはプロテアーゼ消化によって逐次的(sequential)結合活性を有する抗体であり得る。プロテアーゼによる制御または調節は、例えばリンカー中に位置

50

するプロテアーゼ部位によって提供され得る。これらのプロテアーゼに調節される抗体は、様々な疾患の診断および処置のために利用することができ、治療適用または診断適用のための生物学的薬物のためのさらなるレベルの制御を提供し得る。

【図面の簡単な説明】

【0010】

図面の説明

【図1】可変ドメインとFcドメインとの間にプロテアーゼ部位を含有するリンカーを有する、プロテアーゼに調節される単一特異性抗体の模式図(“タイプ1”)。

【図2】1つの抗原結合部位の除去を可能にするプロテアーゼ切断配列を含有するリンカーを有する、プロテアーゼに調節される二特異性抗体の模式図(“タイプ2”)。 10

【図3】1つの抗原結合部位の除去を可能にするプロテアーゼ切断配列を含有するリンカーを有する、別の、プロテアーゼに調節される二特異性抗体の模式図(“タイプ2”)。

【図4】2つの異なる抗原と同時に結合する、プロテアーゼに調節される二特異性抗体の適用の模式図。

【図5】2つの異なる抗原に同時に結合することができない、プロテアーゼに調節される抗体の模式図(“タイプ3”)。

【図6】2つの異なる抗原に同時に結合することができない、プロテアーゼに調節される抗体の適用の模式図。

【図7】不活性なブロッキング抗体ドメインを除去するためのプロテアーゼによる活性化の後でのみ抗原に結合することができる、プロテアーゼに調節される単一特異性抗体‘ブロドラッグ’の模式図(“タイプ4”)。 20

【図8】IgG様二特異性抗体のための発現ベクターのマップ。シグナルP: シグナルペプチド；VLam3E10: 3E10 ラムダ鎖の可変領域；V_k19G9: 19G9 カッパー鎖の可変領域；Cカッパー: カッパー鎖の定常領域；DHFR: ジヒドロ葉酸レダクターゼ；V_H: 重鎖の可変領域；Neo: ネオマイシン耐性遺伝子；3E10VH: 3E10 重鎖の可変領域；19G9VH: 19G9 重鎖の可変領域；CH: 重鎖の定常領域；Amp: アンピシリン耐性遺伝子。

【図9】Fab様二特異性抗体の発現ベクターのマップ。LacZ、lac Z プロモーター；ompA および pho A、シグナルペプチド；VL-link1-VK、組織因子および RG1 に対する二特異性抗体の軽鎖の可変領域；CL-カッパー、カッパー鎖の定常領域；リンカーを有する VH、組織因子および RG1 に対する二特異性抗体の重鎖の可変領域；CH1、IgG 重鎖の第1の定常領域；cat、クロラムフェニコール耐性遺伝子。 30

【図10】TF-結合 ELISA。4つの二特異性抗体および親抗体を、TFへの結合について解析した。HRPと複合体化した抗ヒト IgG を用いて、抗体を検出した。データの曲線適合を、Microsoft Excel の Solver 機能を用いて4パラメータ方程式によって実行した。陽性対照 抗-TF IgG 3E10x: IC₅₀ = 2.0 nM (黒ひし形、実線)；リンカー1(配列番号1) IgG 様二特異性抗体: IC₅₀ = 0.78 nM (黒三角、長鎖破線)；リンカー2(配列番号2) IgG 様二特異性抗体: IC₅₀ = 0.93 nM (白三角、短鎖破線)；リンカー3(配列番号3) IgG 様二特異性抗体: IC₅₀ = 1.06 nM (黒四角、長鎖短鎖交互の破線)；リンカー4(配列番号4) IgG 様二特異性抗体: IC₅₀ = 1.01 nM (白四角、二長鎖一短鎖破線)；陰性対照 抗-RG1 IgG 19G9: 結合無し (白ひし形、実線)。 40

【図11】RG1-結合 ELISA。リンカー1を含有する二特異性抗体、抗-RG1 抗体 19G9 およびポリクローナル非免疫性対照 ヒト IgG カッパーを、RG-1への結合について解析した。データの曲線適合を、Microsoft Excel の Solver 機能を用いて4-パラメータ方程式によって実行した。陽性対照 抗-RG1 IgG 19G9: IC₅₀ = 1.4 nM (黒ひし形、実線)；リンカー1(配列番号1) IgG 様二特異性抗体: IC₅₀ = 1.1 nM (黒三角、長鎖破線)；陰性対照 非免疫性ポリクローナルヒト IgG カッパー: 結合なし (白三角、短鎖破線)。

【図12】サンドイッチ抗原結合 ELISA を用いる、プロテアーゼに調節される二特異性抗体の抗原結合活性の測定。この抗体のリンカーは、エンテロキナーゼの切断部位を含有した。

【図13】プロテアーゼに調節される抗体 3E10-タイプ1-Fab および 19G9-タイプ1-Fab

10

20

30

40

50

の抗原結合活性の測定。対照は、3E10-Reg-Fab、19G9-Reg-Fab および HuFab とした。

【図 14】エンテロキナーゼの非存在下および存在下における、プロテアーゼに調節される Fab 様抗体 H1L1、H1L4、H1L7、H4L7 および H5L5 (タイプ 2) の抗原結合活性の測定。親抗体 3E10 および 19G9、ならびにポリクローナルヒト Fab を対照として用いた。

【図 15】エンテロキナーゼの非存在下および存在下における、プロテアーゼに調節される Fab 様抗体 H2L1、H2L2 および H2L8 (タイプ 3) ならびに H3L1、H3L4 および H5L4 (タイプ 4) の抗原結合活性の測定。親抗体 3E10 および 19G9、ならびにポリクローナルヒト Fab を対照として用いた。

【図 16】抗-Myc 抗体(A)または抗-カッパー鎖抗体(B)を用いて検出される、プロテアーゼに調節される抗体 3E10-タイプ1-Fab のウエスタンプロット。レーン 1 および 2: それぞれエンテロキナーゼ消化を伴わないまたは伴う、3E10-タイプ1-Fab。レーン 3 および 4: それぞれエンテロキナーゼ消化を伴わないまたは伴う、3E10-Reg-Fab。10

【図 17】エンテロキナーゼの非存在下および存在下における、プロテアーゼに調節される Fab 様抗体 H1L1、H1L7 および H5L5 (タイプ 2) のウエスタンプロット。抗体を、抗 IgG(H+L) 抗体を用いて検出した。レーン 1 および 2: それぞれエンテロキナーゼ消化を伴わないまたは伴う、H1L1。レーン 3 および 4: それぞれエンテロキナーゼ消化を伴わないまたは伴う、H1L7。レーン 5 および 6: それぞれエンテロキナーゼ消化を伴わないまたは伴う、H5L5。レーン 7: 3E10-Reg-Fab。

【図 18】エンテロキナーゼの非存在下および存在下における、プロテアーゼに調節される Fab 様抗体 H2L2 および H2L8 (タイプ 3) ならびに H3L4 (タイプ 4) のウエスタンプロット。抗体を、抗-Myc 抗体を用いて検出した。レーン 1 および 2: それぞれエンテロキナーゼ消化を伴わないまたは伴う、H2L2。レーン 3 および 4: それぞれエンテロキナーゼ消化を伴わないまたは伴う、H2L8。レーン 5 および 6: それぞれエンテロキナーゼ消化を伴わないまたは伴う、H3L4。20

【発明を実施するための形態】

【0011】

発明の説明

本発明は記載される特定の方法、プロトコール、細胞株、動物の種または属、コンストラクト(consturuct)および試薬には限定されず、異なり得ることが理解される。また、本明細書において用いられる用語は、特定の態様を説明することのみを目的とし、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図するものではないことが理解される。30

【0012】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる、単数形の“ある”、“1つの”および“該”は、文中において他に明確に指示しない限り複数のものに言及することに注意しなければならない。したがって、例えば、“ある抗体”とは1以上の抗体をいい、当業者に公知の、それと等価な物などを含む。

【0013】

他に定義しない限り、本明細書において用いられる全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書において記載されるものと類似のまたは等価なあらゆる方法、装置および材料を、本発明の実施または試験において用いることができるが、ここでは、好ましい方法、装置および材料について説明する。40

【0014】

本明細書において言及する全ての刊行物および特許は、例えば、本発明と関連して用い得る、該刊行物において記載されるコンストラクトおよび方法について説明および開示する目的で、引用により本明細書に包含される。上記の、および本明細書全体を通して言及される刊行物は、本願の出願日より前の開示事項に関してのみ、提供される。この中には、先行発明を理由に本発明者らがかかる開示に先行する資格がないと認められるようなものは存在しない。50

【0015】

便宜のため、明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において用いる特定の用語および表現の意味を、以下に示す。

【0016】

本明細書において用いる“抗体”とは、タンパク質のエピトープに特異的に結合することができる、インタクトなイムノグロブリン分子(例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgD、IgE、IgA)ならびにその断片、例えば Fab、 $F(ab')_2$ 、scFv、Fv および二特異性抗体を包含する。抗体との用語は、キメラタンパク質を用いて観察される標的抗原への結合が、相補性決定領域(CDR)が由来した天然抗体の結合活性と比較して維持されるよう、抗体の相補性決定領域(CDR)インサートを天然抗体において見出されるのと同じ活性な結合コンフォメーションへ向けることができる他のタンパク質骨格(scaffold)をも含む。10

【0017】

“抗体断片”とは、完全長抗体の一部、一般的にはその抗原結合ドメインあるいは可変ドメインを含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ および Fv 断片；二特異性抗体；直鎖状抗体；単鎖抗体分子；单一特異性抗体；二特異性抗体；および抗体断片から形成される多特異性抗体を包含する。

【0018】

“自己免疫疾患”的用語は、これらに限定されないが、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、ループス(狼瘡)、1型糖尿病、クローン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、糸球体腎炎、炎症性腸疾患、心筋炎、乾癬、甲状腺炎、潰瘍性大腸炎およびグレーブス病を包含する。20

【0019】

本明細書において用いる“生物学的サンプル”または“患者サンプル”的用語は、生物から、または生物の構成要素(例えば細胞)から得られるサンプルをいう。サンプルは、いかなる生物学的組織または流体(fluid)のものであってもよい。サンプルは、患者から得られるサンプルである“臨床サンプル”であってもよい。かかるサンプルは、これらに限定されないが、数ある体液サンプルのうち特に、痰、血液、血清、血漿、血液細胞(例えば白血球)、組織サンプル、生検サンプル、尿、腹水および胸水、唾液、精液、乳房滲出物(breast exudate)、脳脊髄液、涙、粘膜、リンパ、サイトゾル、腹水、羊水、膀胱洗浄、ならびに気管支肺胞上皮洗浄またはそこからの細胞を包含する。患者サンプルは、新鮮なものであっても凍結されたものであってもよく、ヘパリン、クエン酸 または EDTA で処理されてもよい。生物学的サンプルは、組織学的目的のために取得される組織の切片、例えば凍結切片をも包含し得る。30

【0020】

“癌”的用語は、これらに限定されないが、固形腫瘍、例えば乳房、気道、脳、生殖器、消化管、尿路、眼、肝臓、皮膚、頭頸部、甲状腺および副甲状腺の癌、ならびにその遠隔転移を包含する。該用語は、リンパ腫、肉腫および白血病を包含する。

【0021】

“複合体”的用語は、化学的部分、例えば治療物質または細胞毒性物質と化学的に連結した抗体をいう。40

【0022】

“感染症”的用語は、これらに限定されないが、HIV/AIDS、下気道感染、下痢症、結核、マラリア、麻疹、百日咳、破傷風、髄膜炎、梅毒、B型肝炎および熱帯病(tropical disease)を包含する。

【0023】

“リンカー”的用語は、ペプチド結合によって連結した 2 以上のアミノ酸残基を含むペプチド(またはポリペプチド)をいい、1 以上の抗体ドメインを連結するために用いられる。リンカーは、1 以上のプロテアーゼ切断部位を含有し得る。

【0024】

“プロテアーゼ”的用語は、タンパク質のペプチドまたはアミノ酸への加水分解を触媒

10

20

30

40

50

するあらゆる酵素をいい、エンドペプチダーゼおよびエキソペプチダーゼを含む。

【0025】

本発明は、単一特異性抗体、二特異性抗体および多特異性抗体の設計および生産に向けられる。例えば、二特異性抗体および多特異性抗体は、1つのポリペプチドにおける直列に連結した $V_Ha-V_Hb-V_Hc\dots C_H$ および別のポリペプチドにおける直列に連結した $V_La-V_Lb-V_Lc\dots C_L$ を含み得る。あるいは、 V_H および V_L ドメインを1つのポリペプチドから別のポリペプチドへ交換して、例えば $V_Ha-V_Lb-V_Hc\dots C_H$ および $V_La-V_Hb-V_Lc\dots C_L$ のようなポリペプチドを作成してもよい。2つのポリペプチドは、Fab型式またはIgG様の半分の型式においてダイマーを形成してもよく、あるいは各ポリペプチドの2つが、IgG様型式のホモダイマーを含有する4つのポリペプチドを形成してもよい。これらの二特異性もしくは多特異性の抗体またはその抗体断片は、異なる抗原または同じ抗原の異なるエピトープに同時に結合し得る。10

【0026】

一例として、組換えの IgG-様二特異性抗体は重鎖の2つの異なる V_H ドメインおよび軽鎖の2つの異なる V_L ドメインのタンデムな連結によって構築することが出来る。コンストラクトの例は以下である：

重鎖 = $NH_2-V_H1-V_H2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}-COOH$

軽鎖 = $NH_2-V_L1-V_L2-C_L$ 。

【0027】

別の二特異性抗体は以下を含みうる：

重鎖 = $NH_2-V_L1-V_H2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}-COOH$

軽鎖 = $NH_2-V_H1-V_L2-C_L-COOH$ 。

【0028】

本発明はまた、プロテアーゼに調節される抗体に関する。プロテアーゼに調節される抗体は、例えば、単一特異性抗体、二特異性抗体、多特異性抗体、または、例えば、Fab-様またはIgG-様形式のいずれかで、プロテアーゼ消化の結果として結合活性を備える抗体でありうる。プロテアーゼ制御または調節は、例えば、リンカーに位置する選択的プロテアーゼ部位によって提供されうる。これらプロテアーゼに調節される抗体は、様々な疾患、例えばこれらに限定されないが、癌、感染症、および自己免疫疾患の診断および処置のために利用することが出来、治療または診断用途のための生物学的薬物の制御のさらなるレベルを提供する。2030

【0029】

プロテアーゼに調節される抗体は、1つのポリペプチドにおいて重鎖(H)可変ドメイン(V_H)-リンカー-重鎖定常ドメイン(CH)、およびもう1つのポリペプチドにおいて軽鎖(L)可変ドメイン(V_L)-リンカー-軽鎖定常ドメイン(CL)を含みうる。二特異性のプロテアーゼに調節される抗体は、例えば、1つのポリペプチドにおいて V_{H1} -リンカー- V_{H2} -CH、およびもう1つのポリペプチドにおいて V_{L1} -リンカー- V_{L2} -CLを含み得、その両方がリンカーのタンパク分解性切断によって調節される。あるいは、二特異性のプロテアーゼに調節される抗体における V_H および V_L ドメインは、例えば、 V_{H1} -リンカー- V_{L2} -CHおよび V_{L1} -リンカー- V_{H2} -CLを作るため、1つのポリペプチドから別のポリペプチドへと交換されうる。これら2つのポリペプチドは、例えば、Fab-様形式、半-IgG-様形式、またはIgG-様形式(例えば、4つのポリペプチドを含むホモダイマーを形成する各ポリペプチドのうち2つ)におけるダイマーを形成しうる。プロテアーゼに調節される二特異性および逐次的(sequential)抗体または抗体断片は、(1)2つの異なる抗原または同じ抗原の異なるエピトープに同時に結合しうる、(2)長さ、隣接配列およびリンカーの設計に依存しうる様式で、2つの異なる抗原または同じ抗原上の異なるエピトープに逐次的に結合しうる、または(3)プロテアーゼ消化の前は潜在的またはプロドラッグ形式におけるものであり、プロテアーゼ切断によりスイッチオンされる、単一特異性プロテアーゼ-活性化結合因子でありうる。Fab-様形式における二特異性のプロテアーゼに調節される抗体のライブラリーは容易に作成することが出来、細菌で発現されることが出来、特定の機能、例えば4050

、特定のプロテアーゼによる切断に対するリンカーの感受性およびこの切断工程の最適化についてスクリーニングされうる。

【0030】

いくつかのタイプのプロテアーゼに調節される抗体が本明細書において記載され、それによって抗体形式が特定のプロテアーゼ-依存的結合またはプロテアーゼ-特異的機能に起因する選択性によって設計される。具体的には、これらプロテアーゼに調節される抗体は、抗体フレームワークの欠失および/または付加、リンカーの位置、およびその性質、例えば長さおよび溶媒露出度によって記載されうる。さらに、リンカーは標的細胞または組織にみられるプロテアーゼに特異的な切断部位を含みうる。プロテアーゼに調節される抗体の一例は、可変ドメインと定常領域ドメインとの間に位置するリンカーにおいてプロテアーゼ部位を含み得、この抗体は、図1（“タイプ1”）に示されるように1つのみの抗原と結合しうる。

10

【0031】

プロテアーゼに調節される抗体の別の例は、図2および3（“タイプ2”）に示すようにプロテアーゼの非存在下で2つの異なる抗原または2つの異なるエピトープに同時に結合しうるものである。この抗体の第一の V_H/V_L ドメインは、第二の V_H/V_L ドメインが第二の抗原に結合することをブロックせずに抗原に結合する。この抗体は、第二の可変ドメインのCDR領域を立体障害せずに抗原に結合することが出来る。このプロテアーゼに調節される抗体の両方の抗原への同時の結合は、タンパク分解性切断によって妨げられる。即ち、リンカーがプロテアーゼによって切断されると、抗体は第二の抗原のみに結合しうるか、または別々に2つの抗原に結合する。同時の抗原結合は、例えば、架橋受容体においては、抗体機能にとって重要であり、それはタンパク分解性切断によって妨げられ得る。したがって、さらなる程度の特異性が、リンカーにプロテアーゼ部位を含めることによって付加される。

20

【0032】

この二特異性のプロテアーゼに調節される抗体は、単一特異性抗体よりも選択性である。というのはこの抗体は、両方の抗原を発現する細胞または組織を特異的に標的化するからである。さらなる程度の特異性は、リンカーにおける特定のプロテアーゼ部位によって提供される。図4において、細胞Aおよび細胞Bは抗原1と抗原2との両方を発現するが、細胞Bのみが選択的プロテアーゼを発現する。切断不能リンカー（即ち、このリンカーはプロテアーゼ切断部位を含まない）を有する二特異性のプロテアーゼに調節される抗体は細胞Aにより大きな親和力で結合する。というのは、二特異性抗体は両方の抗原に結合するからである。一方、二特異性のプロテアーゼに調節される抗体は細胞Bにより小さい親和力にて結合する。というのは抗原1結合ドメインは細胞Bによって発現される選択的プロテアーゼによるリンカーのタンパク分解性切断により除かれるからである（あるいは、選択的プロテアーゼは、細胞Bと同じ組織に位置する隣接細胞によって発現されうる）。

30

【0033】

一方、図5は、プロテアーゼ-依存様式で各抗原に逐次的に結合しうるプロテアーゼに調節される抗体を例示する。即ち、リンカーのプロテアーゼ切断に先だって、プロテアーゼに調節される抗体は第一の抗原に結合し、プロテアーゼ切断の後に、この抗体は第二の抗原に結合する（“タイプ3”）。N-末端抗体の V_H/V_L ドメインが抗原に結合するが、下流 V_H/V_L ドメインのCDR領域が第二の抗原に結合することをブロックする。リンカーのプロテアーゼ切断はN-末端抗体の除去を可能とし、N-末端抗体ドメインの除去は次いで第二の抗原への結合を可能とする。これによって逐次的結合を要求することによりより大きな細胞および/または組織選択性が可能となる。

40

【0034】

図6において、細胞Aおよび細胞Bは抗原1と抗原2との両方を発現するが、細胞Bのみが選択的プロテアーゼを発現する。さらに、抗原2は細胞へとインターナライズされる細胞表面受容体であり、それに結合する抗体のインターナライゼーションを可能とする

50

。プロテアーゼに調節される抗体は細胞 A および細胞 B によって発現される抗原 1 に結合する。しかし、細胞 B のみ（またはおそらく同じ組織における細胞 B に隣接する細胞）が選択的プロテアーゼを発現する。プロテアーゼに調節される抗体はタンパク分解性切断により活性化され、細胞 B 上に発現される抗原 2 を介してインターナライズされる。したがって、このプロテアーゼに調節される抗体は抗原 1、抗原 2、および選択的プロテアーゼを発現する細胞によって特異的にインターナライズされる。

【0035】

さらなる例において、プロテアーゼに調節される抗体は、プロテアーゼ消化の前には抗原に結合することができないが、プロテアーゼ消化の後には抗原に結合することが出来る（“タイプ 4”）。この抗体の例を図 7 に示す。この単一特異性のプロテアーゼに調節される抗体はまた、N-末端非機能性抗体の除去を可能とするプロテアーゼ切断リンカーを含み、これは、それによって曝露された機能性抗体ドメインによる抗原への結合を導く。タイプ 4 のプロテアーゼに調節される抗体は 3 つのアプローチによって作成することが出来る。第一のアプローチにおいて、プロテアーゼ切断可能リンカー配列は、それがタイプ I II 抗体の N-末端 V_H および V_L ドメイン (V_H1 および V_L1) が第一の抗原に結合するのを妨げるように修飾される。かかるリンカーの例は、表 8 において配列にて示す。第二のアプローチにおいて、表 6 および 7 に示すタイプ III 抗体に用いられるリンカーを、その抗原結合機能を破壊するように突然変異を受けたヘテロダイマー N-末端 V_H および V_L ドメインと一緒にする。このアプローチの例を表 9 において配列にて示し、ここで、 V_H1 の CDR3 および V_L1 の CDR3 がそれぞれの CDR と類似の長さのポリ-アラニン配列によって置換されている。第三のアプローチにおいて、表 6 および 7 に示すタイプ III 抗体において用いられるリンカーが抗体の定常領域由来のホモダイマー N-末端ドメインと一緒にされる。例えば、タイプ III 抗体の完全な V_H1 および V_L1 ドメインはともに、ヘテロダイマー形成を行うことが出来る同じ定常ドメイン、例えば、IgG の CH3 ドメインまたは IgE の CH4 ドメインによって置換されている。

【0036】

これらのプロテアーゼに調節される抗体は、以下に記載するようにリンカーのプロテアーゼ切断によって修飾されうる。例えば、図 1 に示すプロテアーゼに調節される抗体（タイプ 1）は、抗原結合ドメインと Fc ドメインとの間のリンカーにおいてプロテアーゼ部位を含む。この抗体は、抗原を提示する細胞または組織を特異的に標的化する。リンカーがプロテアーゼによって切断されると、その結果得られるプロテアーゼに調節される抗体は機能的 Fc 部分を放出する。プロテアーゼが存在する組織において、この抗体は、抗原架橋に必須である Fc 部分を放出し、免疫応答、例えば、抗体依存性細胞毒性 (ADCC) および補体依存性細胞傷害 (CDC) を誘導する。説明のために、セリンプロテアーゼであるヘプシンは、腫瘍組織と正常肝臓組織との両方において発現している。プロテアーゼに調節されるヘプシンに対する抗体によって処理された癌患者において、抗体は Fc 部分 - 誘導性 ADCC および CDC を介して腫瘍細胞に攻撃するであろう。しかし、肝臓においては、プロテアーゼに調節される抗体はおそらくまずヘプシンに結合するが、Fc 部分は ADCC または CDC の惹起の前に肝臓 - 特異的プロテアーゼに切断されることにより、肝臓毒性が妨げられる。

【0037】

プロテアーゼに調節される抗体のペプチド（またはポリペプチド）リンカーは、2 以上のアミノ酸残基を含み得、1 以上のプロテアーゼ切断部位を含みうる。リンカーは抗体のコンフォメーション、安定性、および抗原 - 結合活性を変化させうる。リンカーの長さの範囲は、例えば、0 から 約 100 アミノ酸残基であり得る。以下はリンカーの例である：

リンカー 1: SDDDDK (配列番号 1)

リンカー 2: GGGGSDDDDK (配列番号 2)

リンカー 3: GGGGSDDDDKGGGGS (配列番号 3)

リンカー 4: GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 4)

リンカー 5: IHPVLSGLSRIVNGEDAVPG (配列番号 5)

リンカー 6: VAAPFDDDKIVGGYICEEN (配列番号 6)

10

20

30

40

50

リンカ－ 7: ELLESYIDGRIVEGSDAEIG (配列番号7)
リンカ－ 8: STQSFNDFTRVVGGEDAKPG (配列番号8)
リンカ－ 9: PERGDNNLTRIVGGQECKDG (配列番号9)
リンカ－ 10: EDQEDQVDPRILDGKMTRRG (配列番号10)
リンカ－ 11: KRNASKPQGRIVGGKVCSPKG (配列番号11)
リンカ－ 12: SVCTTKTSTRIVGGTNSSWG (配列番号12)
リンカ－ 13: SRIVG (配列番号13)
リンカ－ 14: GSLVSGSCSQIINGEDCSPH (配列番号14)
リンカ－ 15: SRIIN (配列番号15)
リンカ－ 16: NKLVH (配列番号16) 10
リンカ－ 17: DKIID (配列番号17)
リンカ－ 18: FNVLG (配列番号18)
リンカ－ 19: TRAIG (配列番号19)
リンカ－ 20: TRLDP (配列番号20)
リンカ－ 21: TRIIK (配列番号21)
リンカ－ 22: SGSNQ (配列番号22)
リンカ－ 23: SKVLN (配列番号23)
リンカ－ 24: NKIIG (配列番号24)
リンカ－ 25: DKLLE (配列番号25)。

【 0 0 3 8 】 20

表1は、いくつかのプロテアーゼの切除部位を示す。

【表1】

表1

切除部位 ↓	切断酵素 / 自己切斷	
Asp-Asp-Asp-Asp-Lys↓ (DDDDK) (配列番号 26)	エンテロキナーゼ	10
Ile-Glu/Asp-Gly-Arg↓ (IE/DGR) (配列番号 27)	第 Xa 因子プロテアーゼ	
Leu-Val-Pro-Arg↓Gly-Ser (LVPR GS) (配列番号 28)	トロンビン	
Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Gly (ENLYFQ G) (配列番号 29)	TEV プロテアーゼ	
Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln↓Gly-Pro (LEVLFQ GP) (配列番号 30)	ヒト ライノウイルス 3C プロテアーゼ	20
Ser-Ser-Val-Phe-Ala-Gln↓Ser-Ile-Pro (SSVFAQ SIP) (配列番号 31)	PCSK9 (NARC-1)	
Lys-Gln-Leu-Arg↓Val-Val-Asn-Gly (KQLR VVNG) (配列番号 32)	ヘプシン	
特異的インティンコード配列	インティン 1 & インティン 2	
シグナル配列	シグナルペプチダーゼ	30

【0039】

リンカーに組み込むことが出来るさらなるプロテアーゼの切断部位を表2に記載する。

【表2 - 1】

表2

腫瘍関連プロテアーゼ（細胞外または細胞内）	
ADAM メタロペプチダーゼ ドメイン 9(メルトリン ガンマ)	10
ADAM メタロペプチダーゼ ドメイン 10	
ADAM メタロペプチダーゼ ドメイン 17(TNF アルファ、変換酵素)	
ADAM メタロペプチダーゼ ドメイン 28	
ADAM 様、デサイシン(decysin) 1	
ADAM メタロペプチダーゼ、トロンボスponジン タイプ 1 モチーフ 1	
ADAM メタロペプチダーゼ、トロンボスponジン タイプ 1 モチーフ 5、アグリカナーゼ-2	
ADAMTS 様 3	
ADAMTS 様 4	20
ペータ部位 APP 切断酵素 1	
ブレオマイシン ヒドロラーゼ	
骨形成タンパク質 1	
補体成分 1、r サブコンポーネント	
補体成分 1、s サブコンポーネント	
カルバイン 2、(m/II) 大サブユニット	
カスパーーゼ 1、アポトーシス関連システインペプチダーゼ (IL-1 β コンバターーゼ)	30
カスパーーゼ 2、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	
カスパーーゼ 3、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	
カスパーーゼ 4、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	
カスパーーゼ 6、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	
カスパーーゼ 7、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	
カスパーーゼ 9、アポトーシス関連システインペプチダーゼ	
補体因子 D(アジブシン)	40
CASP8 および FADD 様 アポトーシスレギュレーター	

【表 2 - 2】

表 2 (続き)	
カテプシン B	
カテプシン F	
カテプシン H	
カテプシン K	10
カテプシン L	
カテプシン L2	
カテプシン O	
カテプシン S	
円柱腫症 (ターバン(turban)腫瘍症候群)	
余分な紡錘極体(Extra spindle pole bodies) ホモログ 1 (S. Cerevisiae)	
グランザイム A(グランザイム 1、CTL 関連 セリンエステラーゼ 3)	
組織適合性 (マイナー) 13	20
ヘプシン (膜貫通プロテアーゼ、セリン 1)	
HtrA セリンペプチダーゼ 1	
カリクレイン関連ペプチダーゼ 11	
レグマイン(Legumain)	
Lon ペプチダーゼ 1、ミトコンドリア	
粘膜関連リンパ組織リンパ腫転位遺伝子 1	
膜結合型転写因子ペプチダーゼ、部位 1	30
マトリックスメタロペプチダーゼ 1(間質コラゲナーゼ)	
マトリックスメタロペプチダーゼ 12(マクロファージエラスターーゼ)	
マトリックスメタロペプチダーゼ 14(膜挿入型(membrane-inserted))	
マトリックスメタロペプチダーゼ 9(ゼラチナーゼ B、92kDa タイプ IV コラゲナーゼ)	
N-アセチルアルファ結合酸性ジペプチダーゼ様 1	
ナプシン A アスパラギン酸ペプチダーゼ	40
妊娠関連血漿タンパク質 A、パパリシン 1	
プロタンパク質コンバターゼ スプチリシン/ケキシン タイプ 5	

【表2-3】

表2 (続き)	
プラスミノーゲンアクチベーター、組織	
プラスミノーゲンアクチベーター、ウロキナーゼ	
ペプチダーゼ (ミトコンドリア プロセシング) ベータ	
プロテアーゼ、セリン、3(メソトリプシン)	10
プロテアーゼ、セリン、8(プロスタシン)	
プロテアソーム (プロソーム(prosome)、マクロペイン(macropain)) サブユニット、アルファタイプ、1	
プロテアソーム (プロソーム、マクロペイン) サブユニット、アルファタイプ、6	
プロテアソーム (プロソーム、マクロペイン) サブユニット、ベータタイプ、4	
プロテアソーム (プロソーム、マクロペイン) サブユニット、ベータタイプ、9	
プロテアソーム (プロソーム、マクロペイン) サブユニット、ベータタイプ、10	
SUMO1/セントリン特異的ペプチダーゼ 1	20
腫瘍原性の抑制 14(結腸カルシノーマ)	
尿細管間質性腎炎抗原	
トーシンファミリー 1、メンバー A(トーシン A)	
トリペプチジルペプチダーゼ I	
トリペプチジルペプチダーゼ II	
トリプターゼ アルファ/ベータ 1	
トリプターゼ アルファ/ベータ 1	30
ユビキチン特異的ペプチダーゼ 4(癌原遺伝子)	
ユビキチン特異的ペプチダーゼ 10	
ユビキチン特異的ペプチダーゼ 11	
ユビキチン特異的ペプチダーゼ 14(tRNA-グアニン トランスグリコシラーゼ)	
ユビキチン特異的ペプチダーゼ 15	
ユビキチン特異的ペプチダーゼ 16	
ユビキチン特異的ペプチダーゼ 18	40
ユビキチン特異的ペプチダーゼ 25	
YME1 様 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	
亜鉛メタロペプチダーゼ (STE24 ホモログ、酵母)	

【0040】

本発明のプロテアーゼに調節される抗体は1以上の抗原に結合しうる。これらの抗原は、サイトカイン、細胞表面受容体、酵素、および受容体からなる群から選択されうる。これらの抗原としては、これらに限定されないが、CD3、CD4、CD8、CD20、CD25、CD28、CD3、CD52、IL-2、IL-7、IL-8、TNF-アルファ、TGF-ベータ、INF-ベータ、INF-ガンマ、GMC

SF、GCSF、VEGF、C5、EpCAM、EGF 受容体、CD2 受容体、IL 2 受容体、IgE 受容体、インテグリン、およびMHCクラスIIが挙げられる。

【0041】

本発明の抗体は、様々な疾患の診断および治療に利用することが出来る。例えば、ヒト免疫学的細胞および腫瘍関連抗原に対する抗体は癌治療に利用することが出来る。これらの抗体は、腫瘍関連抗原および毒性物質または癌治療薬としての使用のための酵素に対するものとすることができる。本発明の抗体は、血友病および血栓症の処置ならびに幹細胞移植に利用することも出来る。これらの抗体は、リンパ球サブセットの選択的刺激および拡張のために用いることが出来る。さらに、これらの抗体は、疾患-関連抗原の検出のために用いることができる。

10

【0042】

癌免疫療法のために、免疫系を動員して腫瘍細胞に結合(attach)させるために二特異性抗体を用いることが出来る。免疫学的細胞上の標的としては、これらに限定されないが、CD3、CD8、および Fc 受容体が挙げられる。腫瘍関連抗原としては、これらに限定されないが、Her2、EGF 受容体、CD20、CA-125、および癌胎児性抗原(CEA)が挙げられる。例えば、CD8 および Her2 に対する二特異性抗体は、CD8-発現細胞障害性リンパ球に向けることにより、Her2 発現乳房癌細胞を攻撃させることができる。

【0043】

本発明の抗体または抗体断片、または 抗体または断片を含む組成物は、抗体または断片と複合体となった細胞毒性物質を含みうる。一つの側面において、細胞毒性物質はモノメチルアウリスタチン-E (MMAE)であるが、その他の細胞毒性物質も提供され、それには、例えば、MMAEの機能類似体（例えば、モノメチルアウリスタチン-F）、およびその他の細胞毒性物質、例えば、アブリジン、アザリビン、アナストロゾール、アザシチジン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブリオスタチン-1、ブスルファン、カリケアマイシン、カンプトテシン、10-ヒドロキシカンプトテシン、カルムスチン、セレブレックス、クロラムブシル、シスプラチン、イリノテカン (CPT-11)、SN-38、カルボプラチン、クラドリビン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ドセタキセル、ダクチノマイシン、ダウノマイシングルクロニド、ダウノルビシン、デキサメタゾン、ジエチルスチルベストロール、ドキソルビシン、ドキソルビシングルクロニド、エピルビシングルクロニド、エチニルエストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エトポシドグルクロニド、エトポシドホスフェート、フロクスウリジン(FUdR)、3',5'-O-ジオレオイル-FudR (FUdR-dO)、フルダラビン、フルタミド、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、ゲムシタビン、ヒドロキシプロゲステロンカプロエート(caproate)、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、L-アスパラギナーゼ、ロイコボリン、ロムスチン、メクロレタミン、メドロプロゲステロンアセテート(medroprogesterone acetate)、酢酸メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、ミトラマイシン、マイトイシン、ミトタン、フェニルブチレート、ブレドニゾン、プロカルバジン、パクリタキセル、ペントスタチン、PSI-341、セムスチンストレプトゾシン、タモキシフェン、タキサン系抗癌剤(taxanes)、タキソール、プロピオン酸テストステロン、サリドマイド、チオグアニン、チオテパ、テニポシド、トポテカイン、ウラシル・マスターード、ベルケイド、ビンプラスチン、ビノレルビン、ビンクリスチン、リシン、アブリン、リボミクレアーゼ(ribomuclease)、オンコナーゼ、rapLRI、DNase I、ブドウ球菌エンテロトキシン-A、ヤマゴボウ抗ウイルス タンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素、および緑膿菌内毒素、またはそれらの組合せが挙げられる。いずれの細胞毒性物質もその機能類似体を含みうる。

20

【0044】

抗体技術

多数の技術が抗体の產生のために利用可能である。例えば、ファージ-抗体技術を用いて抗体を作成することが出来る(Knappik, et al., J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000)。抗体を得るために別のアプローチは、Dower, et al., (WO 91/17271)および McCafferty, e

40

50

t al.、(WO 92/01047)に記載されているようにしてB細胞からのDNAライブラリーをスクリーニングすることである。これらの方法において、ファージのライブラリーが作られ、そのメンバーはその外側表面に異なる抗体をディスプレーする。抗体は通常FvまたはFab断片としてディスプレーされる。抗体をディスプレーするファージは、選択されたタンパク質に対する結合についてのアフィニティー濃縮(enrichment)によって選択される。抗体はトリオーマ方法を用いて產生することもできる(Oestberg, et al., Hybridoma 2:361-367, 1983; 米国特許第4,634,664号; 米国特許第4,634,666号)。

【0045】

抗体はまた、抗体を発現するあらゆる細胞、例えば、抗体をコードする発現コンストラクトによってトランスフェクトされた宿主細胞から精製することもできる。宿主細胞を抗体が発現される条件下で培養するとよい。精製された抗体は、細胞において抗体と結合しうるその他の細胞成分、例えば、特定のタンパク質、炭水化物、または脂質から当該技術分野において周知の方法を用いて分離されうる。かかる方法としては、これらに限定されないが、サイズ排除クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム分画、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、および分取ゲル電気泳動が挙げられる。調製物の純度は、当該技術分野において公知のあらゆる手段、例えば、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって評価することが出来る。精製された抗体の調製物は2以上のタイプの抗体を含みうる。

【0046】

あるいは、抗体は、そのアミノ酸配列を合成する化学的方法、例えば、固相技術を用いる直接ペプチド合成によって作ることもできる(例えば、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963; Roberge, et al., Science 269:202-204, 1995を参照されたい)。タンパク質合成は手動技術を用いてまたは自動化によって行うことが出来る。自動化合成は、例えば、Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer)を用いて達成することが出来る。あるいは、抗体の断片は別々に合成して、化学的方法を用いて一緒にすることにより、全長分子を作ってもよい。

【0047】

本発明の抗体は、親抗体から作成することが出来る。親抗体は、特異的標的に結合することができる様々な抗体から選択することが出来、当該技術分野において周知であり、例えば、これらに限定されないが、抗-TNF抗体、抗-IL-12抗体；抗-IL-18抗体、抗-C5、抗-CD147、抗-gp120、抗-CD11a、抗-CD18、抗-VEGF、抗-CD40L、抗-ICAM-1、抗-CD2、抗-EGFR、抗-TGF-ベータ2、抗-E-セレクチン、抗-Her2/neu、抗-CD14、抗-ICAM-3、抗-CD80、抗-CD4、抗-CD3、抗-CD23、抗-ベータ2-インテグリン、抗-CD52、抗-CD22、抗-CD20、抗-CD25、抗-CD33、抗-HLA、抗-IL-1アルファ、抗-IL-1、抗-IL-1受容体、抗-IL-2受容体、抗-IL-4、抗-IL4受容体、抗-IL5、抗-IL-5受容体、抗-IL-6、抗-IL-8、抗-IL-9、抗-IL-13、抗-IL-13受容体、抗-IL-17、および抗-IL-23が挙げられる。親抗体はまた、様々な治療抗体から選択することも出来、例えば、これらに限定されないが、リツキシマブ、トラスツズマブ、バーツズマブ、セツキシマブ、アレムツズマブ、ムロモナブ、イブリツモマブ、ゲムツズマブ・オゾガマイシン、アレファセプト、アブシキシマブ、バシリキシマブ、パリビズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エタネルセプト、ナタリズマブ、ベバシズマブ、オマリズマブ、エファリズマブ、クレノリキシマブ、ラベツズマブ、エプラツズマブ、およびビジリズマブが挙げられる。

【0048】

新規に合成された分子は、分取高速液体クロマトグラフィーによって実質的に精製されうる(例えば、Creighton, Proteins: Structures and Molecular Principles, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983を参照されたい)。合成ポリペプチドの組成はアミノ酸分析または配列決定によって確認することが出来る(例えば、エドマン分解を用いる)。

【0049】

本発明はまた、第一の抗原に特異的に結合する一つの結合部位および第二の抗原に特異的に結合する第二の結合部位を有する二特異性または二機能性抗体にも関する。この結果

10

20

30

40

50

、多機能性価数(valency)、即ち、少なくとも2つの異なるエピトープに同時に結合する能力が得られる。

【0050】

抗体をコードするポリヌクレオチド

本発明はまた、抗体をコードするポリヌクレオチドにも関する。これらのポリヌクレオチドは、例えば、治療または診断用途のための量の抗体を生産するために利用できる。

【0051】

本発明のポリヌクレオチドは、細胞成分、例えば、膜成分、タンパク質、および脂質を有さないように宿主細胞から単離することも出来る。ポリヌクレオチドは標準的核酸精製技術を用いて単離することも出来るし、あるいは增幅技術、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて合成することも出来るし、あるいは自動合成装置を用いて合成することも出来る。ポリヌクレオチドを単離する方法は常套的であり、当該技術分野において公知である。ポリヌクレオチドを得るためのかかる技術のいずれも、本発明の抗体をコードする単離ポリヌクレオチドを得るために用いることが出来る。例えば、抗体をコードするポリヌクレオチドを単離するために制限酵素およびプローブを用いることが出来る。

10

【0052】

抗体をコードするcDNA分子は、標準的分子生物学技術によって、mRNAをテンプレートとして用いて作ることが出来る。その後、cDNA分子は、当該技術分野において公知であり、マニュアル、例えば、Sambrook、et al.、(Molecular Cloning: A Laboratory Manual、(Second Edition、Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor、N.Y.; 1989) Vol. 1-3)に開示の分子生物学技術を用いて複製することが出来る。増幅技術、例えば、PCRを用いて、さらなるコピーのポリヌクレオチドを得ることが出来る。あるいは、合成化学技術を用いて本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを合成することが出来る。

20

【0053】

抗体をコードするポリヌクレオチドを発現させるために、ポリヌクレオチドを挿入されたコード配列の転写および翻訳に必須の要素を含む発現ベクターに挿入してもよい。当業者に周知の方法を用いて、抗体をコードする配列および適当な転写および翻訳制御要素を含む発現ベクターを構築することが出来る。これらの方法には、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビトロ遺伝子組換えが含まれる。かかる技術は、例えば、Sambrook、et al. (1989) and in Ausubel、et al.、(Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、New York、N.Y.、1995)に記載されている。

30

【0054】

様々な発現ベクター/宿主系が、抗体をコードする配列を含めて発現させるために利用できる。これらには、例えば、これらに限定されないが、微生物、例えば、組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)により感染された昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV)で形質転換された植物細胞系；または細菌発現ベクター(例えば、TiまたはpBR322プラスミド)、または動物細胞系が挙げられる。

40

【0055】

制御要素または調節配列はベクターの非翻訳領域 - エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域 - であり、これらは、転写および翻訳を実施するために宿主細胞タンパク質と相互作用する。かかる要素は、強度および特異性において異なりうる。使用されるベクター系および宿主に応じて、あらゆる数の好適な転写および翻訳要素、例えば、構成的および誘導可能プロモーターが用いられ得る。例えば、細菌系にクローニングする場合は、誘導可能プロモーターを利用できる。バキュロウイルスピリヘドリンプロモーターは昆虫細胞において使用可能である。植物細胞のゲノム由来のプロモーターまたはエンハンサー(例えば、熱ショック、RUBISCO、および貯蔵タンパク質遺伝子)または植物ウ

50

イルス由来のプロモーターまたはエンハンサー(例えば、ウイルス性プロモーターまたはリーダー配列)はベクターにクローニングすることが出来る。哺乳類細胞系において、哺乳類遺伝子または哺乳類ウイルス由来のプロモーターが使用できる。抗体をコードする又クレオチド配列を複数コピー含む細胞株を作成する必要がある場合、SV40またはEBVに基づくベクターが、適当な選択マーカーとともに使用できる。

【0056】

抗体の調製を含む本明細書において有用なさらなる分子生物学的技術を記載する一般的テキストとしては、Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, Inc.); Sambrook, et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, N.Y.; 1989) Vol. 1-3); Current Protocols in Molecular Biology, (F. M. Ausabel et al. [Eds.], Current Protocols, a joint venture between Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (supplemented through 2000)); Harlow et al., (Monoclonal Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988), Paul [Ed.]); Fundamental Immunology, (Lippincott Williams & Wilkins (1998)); および Harlow, et al., (Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)) が挙げられる。

10

【0057】

アッセイ

抗体の抗原に対する結合のアフィニティー(K_d)は、当該技術分野において公知のあらゆる方法、例えば、イムノアッセイ、例えば、酵素免疫吸着測定法(ELISA)、生体分子相互作用分析(BIA)(例えば、Sjolander and Urbaniczky, Anal. Chem. 63:2338 2345, 1991; Szabo, et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699 705, 1995を参照されたい)、および抗原を発現する細胞への抗体結合の定量のための蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)を用いてアッセイすることが出来る。BIAは、反応体のいずれも標識せずにリアルタイムで生物特異的相互作用を分析する技術である(例えば、BIAcore (商標))。光学的現象である表面プラズモン共鳴(SPR)の変化を、生物学的分子の間のリアルタイムの反応の指標として用いることが出来る。

20

【0058】

本発明はまた、患者サンプルにおけるタンパク質のレベルを測定するための定量的イムノアッセイの使用にも関する。多くの形式を本発明の方法での使用のために適用することが出来る。例えば、患者サンプルにおけるタンパク質の検出および定量を、当該技術分野において一般的に知られているアッセイのなかでもとりわけ、酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ、二重抗体サンドイッチアッセイ、凝集アッセイ、蛍光イムノアッセイ、免疫電子および走査型顕微鏡によって行うことが出来る。かかるアッセイにおけるタンパク質の定量は、当該技術分野において公知の常套的方法によって行われる。循環するタンパク質レベルの系列変化は、捕獲抗体が支持体の表面上に常套技術を用いて固定化されている、サンドイッチアッセイによって検出および定量することが出来る。

30

【0059】

好適な支持体としては、例えば、合成ポリマー支持体、例えば、ポリプロピレン、ポリスチレン、置換ポリスチレン、ポリアクリルアミド(例えば、ポリアミドおよびポリ塩化ビニル)、ガラスピーズ、アガロース、およびニトロセルロースが挙げられる。

40

【0060】

タンパク質の同定に有用な抗体は、いずれの常套手段によって標識してもよい。標識の一例はセイヨウワサビペルオキシダーゼであり、抗体の標識方法の一例は、ビオチン-ストレプトアビシン複合体の使用によるものである。

【0061】

適当な場合、トレーサーとして使用される本発明のイムノアッセイにおいて用いられる抗体は、目視できるまたは可視可能にされうるシグナルを生じるよう直接的または間接的にいずれの様式で標識してもよい。検出可能マーカー物質としては、放射性核種、例えば

50

、³H、¹²⁵I、および¹³¹I; 蛍光体(fluorescer)、例えば、フルオレセイン イソチオシアネートおよびその他の蛍光色素、フィコビリタンパク質、フィコエリトリン(phycoerythrin)、希土類キレート、テキサスレッド、ダンシルおよびローダミン; 比色分析試薬(色原体); 電子不透明材料(electron opaque material)、例えば、コロイド金; 生物発光体; 化学発光体; 色素; 酵素、例えばとりわけ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、アルファ-、ベータ-ガラクトシダーゼ; 補酵素; 酵素基質; 酵素補因子; 酵素阻害剤; 酵素サブユニット; 金属イオン; フリーラジカル; または、形成された免疫複合体の存在または量を検出または測定する手段を提供するいずれかのその他の免疫学的に活性または不活性の物質が挙げられる。例示的な酵素と基質との組合せは、セイヨウワサビペルオキシダーゼとテトラメチルベンジジン(TMB)、およびアルカリホスファターゼとパラニトロフェニル ホスフェート(pNPP)である。

【0062】

本発明による別の検出および定量系は、発光シグナル、生物発光(BL)または化学発光(CL)を生じる。化学発光(CL)または生物発光(BL)アッセイにおいて、強度または総光放射が測定され、未知分析物の濃度と関係づけられる。光はルミノメーター(検出器としての光電子増倍管)または電荷結合素子を用いて定量的に測定することが出来るし、または、写真またはX線フィルムによって定性的に測定することが出来る。かかるアッセイを用いる主な利点は簡便性および分析感受性であり、それにより、非常に少量の分析物の検出および/または定量が可能となる。

【0063】

例示的な発光標識は、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルカルボキサミド、ルミノール、ウンベリフェロン、イソルミノール誘導体、発光タンパク質、例えば、ホタル、海洋細菌、*Varguilla* および*Renilla*由来のエクオリン、およびルシフェラーゼである。ルミノールは所望により、エンハンサー分子、例えば、4-ヨードフェノールまたは4-ヒドロキシ桂皮酸とともに用いることが出来る。典型的には、CLシグナルは塩基性条件下での酸化剤での処理により生じる。

【0064】

さらなる発光検出系は、基質が与えられると酵素反応によってシグナル(検出可能マークー)が生じるものである。CL およびBL 検出スキームが、とりわけアルカリホスファターゼ(AP)、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)、およびキサンチンオキシダーゼ標識のアッセイのために開発されている。AP および HRPは、CL および BL 反応の範囲によって定量されうる2つの酵素標識である。例えば、APは、例えば、アダマンチル-1,2-ジオキセタンアリールホスフェート基質(例えば、AMPPD または CSPD; Kricka、L.J.、"Chemiluminescence and Bioluminescence, Analysis by, " *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference* (ed. R.A. Meyers) (VCH Publishers; N.Y., N.Y.; 1995)); 例えば、4-メトキシ-4-(3-ホスフェートフェニル)スピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-アダマンタン]のジナトリウム塩とともに、エンハンサー分子、例えば、1-(トリオクチルホスホニウムメチル)-4-(トリブチルホスホニウムメチル)ベンゼンジクロリド有りまたは無しで、基質とともに用いることが出来る。HRPは、基質、例えば、2',3',6'-トリフルオロフェニル-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-カルボキシレートとともに用いることが出来る。

【0065】

CL および BL 反応は、酵素のみならず、その他の基質、補因子、阻害剤、金属イオン等の分析のために適用できる。例えば、ルミノール、ホタルルシフェラーゼ、および海洋細菌ルシフェラーゼ反応はそれぞれ、ペルオキシド、ATP、および NADPH の生産または消費の指標反応である。それらはオキシダーゼ、キナーゼ、およびデヒドロゲナーゼを含むその他の反応と共に役立つことができる。共役反応のいずれかの成分(酵素、基質、補因子)の測定に用いることが出来る。

10

20

30

40

50

【0066】

検出可能マーカーは本発明のアッセイにおいて用いられる抗体に直接的または間接的に連結されうる。検出可能な標識の間接的連結の例は、抗体とマーカーとの間の結合対の使用またはシグナル増幅系の使用である。

【0067】

抗体を検出可能マーカーに連結するのに使用されうる結合対の例は、ビオチン/アビジン、ストレプトアビジン、または抗ビオチン；アビジン/抗アビジン；チロキシン/チロキシン結合グロブリン；抗原/抗体；抗体/抗-抗体；炭水化物/レクチン；ハプテン/抗ハプテン抗体；色素および疎水性分子/疎水性タンパク質結合部位；酵素阻害剤、補酵素または補因子/酵素；ポリ核酸/相同的ポリ核酸配列；フルオレセイン/抗フルオレセイン；ジニトロフェノール/抗ジニトロフェノール；ビタミン B12/内因子；コルチゾン、コルチゾール/コルチゾール結合タンパク質；および特異的受容体タンパク質のリガンド/膜結合型特異的受容体タンパク質である。

【0068】

直接的または間接的に抗体に標識を連結させる様々な手段が当該技術分野において公知である。例えば、標識は共有結合または非共有結合により結合させうる。例示的な抗体結合方法はAvarmeas、et al.、Scan. J. Immunol. 8(Suppl. 7): 7、1978); Bayer、et al.、Meth. Enzymol. 62:308、1979; Chandler、et al.、J. Immunol. Meth. 53:187、1982; Ekeke and Abuknesha、J. Steroid Biochem. 11:1579、1979; Engvall and Perlmann、J. Immunol. 109:129、1972; Geoghegan、et al.、Immunol. Comm. 7:1、1978; およびWilson and Nakane、Immunofluorescence and Related Techniques、Elsevier/North Holland Biomedical Press; Amsterdam (1978)に記載されている。

【0069】

標識の性質に応じて、様々な技術が標識の検出および定量のために用いることが出来る。蛍光体のためには、多数の蛍光光度計が利用可能である。化学発光体のためには、ルミノメーターまたはフィルムが利用可能である。酵素の場合は、蛍光、化学発光、または着色生成物が、蛍光分光的に、発光定量的に、分光光度法的に、または可視的に判定または測定することが出来る。

【0070】

アクリジニウム、ベンズアクリジニウム、またはアクリダンタイプの複素環系を有する様々なタイプの化学発光化合物が標識のその他の例である。アクリジニウムエステルの例としては、正の酸化状態におけるヘテロ原子を含む複素環系または環系を有する化合物、例えば、アクリジニウム、ベンズ[a]アクリジニウム、ベンズ[b]アクリジニウム、ベンズ[c]アクリジニウム、ベンズイミダゾールカチオン、キノリニウム、イソキノリニウム、キノリジニウム、環状置換キノリニウム、フェナントリジニウム、およびキノキサリニウムなどの環系が挙げられる。

【0071】

トレーサーは、選択された抗体に直接的または間接的にアクリジニウムまたはベンズアクリジニウムエステル上に存在する反応性官能基を結合させることによって調製することが出来、当業者に周知の通りである(例えば、Weeks、et al.、Clin. Chem. 29(8):1474-1479、1983を参照されたい)。化合物の例は、アリール環脱離基およびアリール環のパラまたはメタ位に存在する反応性官能基を有するアクリジニウムおよびベンズアクリジニウムエステルである(例えば、米国特許第4,745,181号およびWO 94/21823を参照されたい)。

【0072】**使用方法**

本明細書において用いる場合、様々な用語が以下に定義される。

【0073】

「処置」という用語は、ヒトを含む対象(または患者)が、対象の症状を直接的または間接的に改善させる、または対象における症状または障害の進行を遅延させる目的で医療補助を提供される、あらゆる方法、作用、適用、治療などを含む。

【 0 0 7 4 】

「併用治療」または「共治療」という用語は、疾患、症状、および/または障害を処置するための2以上の治療薬の投与を意味する。かかる投与は、例えば、所定の比の有効成分を有する単一のカプセルにおける、または各阻害薬の別々のカプセルにおける、実質的に同時の様式での2以上の治療薬の共投与を含む。さらに、かかる投与は、逐次様式での各タイプの治療薬の使用を含む。

【 0 0 7 5 】

本発明の抗体は以下の薬剤と組み合わせて投与することが出来る：細胞毒性物質、血管新生阻害剤、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、睡眠薬、非ステロイド性抗-炎症薬、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗生物質、イムノグロブリン、抗うつ薬、喘息薬、サイトカイン、およびサイトカインアンタゴニスト。10

【 0 0 7 6 】

例えば、本発明の抗体は、様々な抗癌剤と組み合わせて投与することが出来、抗癌剤としてはこれらに限定されないが、ブレオマイシン、ドセタキセル、ドキソルビシン、エダトレキサート、エルロチニブ、エトポシド、フィナステリド、フルタミド、ゲムシタピン、ゲフィチニブ、酢酸ゴセレリン、グラニセトロン、イマチニブ、イリノテカン、オンダンセトロン、パクリタキセル、ペガスパルガーゼ、塩酸ピロカルピン、ポルフィマーナトリウム、インターロイキン-2、リツキシマブ、トポテカン、トラスツズマブ、トリアピン、ピンクリスチン、およびビノレルビン酒石酸塩、または治療抗体またはその断片、または抗-血管新生薬、例えば、アンジオスタチン、ベバシズマブ、ソラフェニブ、バキュロスタチン、カンスタチン、マスピン、抗-VEGF抗体またはペプチド、抗-胎盤増殖因子抗体またはペプチド、抗-FIK-1抗体、抗-Fit-1抗体またはペプチド、ラミニンペプチド、フィプロネクチンペプチド、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤、組織メタロプロテイナーゼ阻害剤、インターフェロン、インターロイキン12、IP-10、Gro-、トロンボスボンジン、2-メトキシエストラジオール、プロリフェリン-関連タンパク質、カルボキシアミドトリアゾール、CM101、マリマstatt、ペントサンポリサルフェート、アンジオポエチン2、インターフェロン-アルファ、ハービマイシンA、PNU145156E、16Kプロラクチン断片、リノミド、サリドマイド、ペントキシフィリン、ゲニステイン、TNP-470、エンドスタチン、パクリタキセル、アキュチン、シドフォビル、ピンクリスチン、ブレオマイシン、AGM-1470、血小板因子4またはミノサイクリンが挙げられる。20

【 0 0 7 7 】

「治療的に有効」という表現は、疾患、症状、および/または障害の重篤度における改善の目的を達成しつつ、与えられた治療処置に伴う有害な副作用を回避または最小とするように投与される各薬剤の量を意味する。

【 0 0 7 8 】

「医薬上許容される」という用語は、医薬品における使用のために適当な対象項目を意味する。

【 0 0 7 9 】

本発明の抗体は、治療薬として有用であることが期待される。したがって、本発明の一つの態様は、患者（哺乳類を含む）における様々な症状の処置方法を含み、該方法は、該患者に標的的症状の処置に有効な量の本発明の抗体を含む組成物を投与することを含む。40

【 0 0 8 0 】

本発明の抗体は、様々な疾患の処置または予防に使用され得、疾患としてはこれらに限定されないが、癌、感染症、および自己免疫疾患が挙げられる。

【 0 0 8 1 】

本発明の抗体または抗体を含む組成物は、抗体と複合体となった細胞毒性物質（例えば、モノメチルアウリスタチン-E）を含みうる。

【 0 0 8 2 】

本発明の抗体は、単独でまたは1以上のさらなる治療薬と組み合わせて投与することが出来る。併用治療は、本発明の抗体と1以上のさらなる治療薬とを含む単回医薬用量製剤50

の投与、ならびに、本発明の抗体とそれぞれのさらなる治療薬とのその独自の別々の医薬用量製剤における投与を含む。例えば、本発明の抗体と治療薬とは、単回経口用量組成物において共に患者に投与されうるし、各薬剤は別々の経口投与製剤において投与されうる。

【 0 0 8 3 】

別々の用量製剤が用いられる場合、本発明の抗体と 1 以上のさらなる治療薬とは実質的に同時に(例えば、併用)または互いに別々の時点で(例えば、逐次的に)投与されうる。

【 0 0 8 4 】

特定の抗体が癌の治療のために治療的に有用である能力を評価するために、一例として、抗体はインビボでマウス異種移植腫瘍モデルにおいて試験することが出来る。治療モデルの一例は実施例 8 に詳述する。 10

【 0 0 8 5 】

医薬組成物

本明細書に記載する抗体は、医薬上許容される担体を含む医薬組成物において提供されうる。医薬上許容される担体は非発熱性であればよい。組成物は単独でまたは少なくとも 1 つのその他の薬剤とともに投与され得、その他の薬剤としては、例えば、安定化化合物が挙げられ、それはあらゆる無菌の生体適合性医薬用担体中で投与され得、かかる担体としては例えばこれらに限定されないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、および水が挙げられる。様々な水性担体を用いることが出来、例えば、これらに限定されないが、生理食塩水、グリシン等が挙げられる。これらの溶液は無菌であり、一般的に粒状物を含まない。これらの溶液は常套の周知の滅菌技術(例えば、ろ過)によって滅菌されうる。組成物は、適切な生理条件のために必要とされる医薬上許容される補助物質、例えば、pH調整剤および緩衝剤等を含みうる。かかる医薬製剤における本発明の抗体の濃度は広範に変動し得、流体の体積、粘度等に主に基づいて、選択された投与の特定の様式にしたがって選択されうる。所望の場合、2 以上のタイプの抗体を医薬組成物に含めてよい。 20

【 0 0 8 6 】

組成物は患者に、単独でまたはその他の薬剤、薬物またはホルモンと組み合わせて投与されうる。有効成分に加えて、これらの医薬組成物は、賦形剤および活性化合物の医薬として用いられ得る調製物への加工を促進する助剤を含む好適な医薬上許容される担体を含みうる。本発明の医薬組成物は多数の経路によって投与され得、例えばこれらに限定されないが、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、脳室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、非経口、局所、舌下、または直腸手段が挙げられる。 30

【 0 0 8 7 】

皮下、静脈内、筋肉内等に好適な製剤；好適な医薬用担体；および製剤および投与の技術は、当該技術分野において周知の方法のいずれかによって調製されうる(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co.、Easton、Pa.、20th edition、2000を参照されたい)。

【 0 0 8 8 】

診断方法

本発明はまた、特定の抗原が患者サンプルまたは生物学的サンプルにおいて検出されうる診断方法を提供する。かかる診断方法は、例えば、特定の抗原が上昇または低下する障害の診断に使用されうる。かかる障害としては、これらに限定されないが、癌、感染症、および自己免疫疾患が挙げられる。一例として、診断に用いる場合、正常サンプルにおける複合体の量と比較して大きい患者からのサンプルにおける抗体-抗原複合体の量の検出により、患者が障害を有しているであろうと同定される。 40

【 0 0 8 9 】

患者サンプルは本発明の抗体と接触され得、患者サンプルは次いで、抗体-抗原複合体の存在についてアッセイされうる。上記のように、抗体は、検出可能な標識、例えば、蛍光、放射性同位体、化学発光、または酵素標識、例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ

ゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼを含みうる。

【0090】

所望により、抗体は固体支持体に結合させてもよく、これはアッセイの自動化に適合しうる。好適な固体支持体としては、これらに限定されないが、ガラスまたはプラスチックスライド、組織培養プレート、マイクロタイターウェル、チューブ、シリコンチップ、または粒子、例えば、ビーズ（例えば、これらに限定されないが、ラテックス、ポリスチレン、またはガラスピーブ）が挙げられる。当該技術分野において公知のあらゆる方法が抗体の固体支持体への付着に用いることが出来、例えば、共有および非共有結合の使用、受動的吸収、または抗体と固体支持体とに結合した結合部分のペアが挙げられる。抗原と抗体の結合は反応体を含めるのに好適なあらゆる容器において達成することが出来る。かかる容器の例としてはマイクロタイタープレート、試験管、および微量遠心管が挙げられる。10

【0091】

治療的に有効な用量の決定

治療的に有効な用量の決定は当業者の能力の範囲内である。治療的に有効な用量とは、治療的に有効な用量の非存在下において明白な有効性と比較して疾患（例えば、癌）を効果的に治療するために用いられ得る抗体の量をいう。

【0092】

治療的に有効な用量は動物モデル（例えば、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、またはブタ）においてまず見積もることができる。動物モデルはまた、適当な濃度範囲および投与経路の決定にも用いることが出来る。かかる情報を次いでヒトにおける投与のための有用な用量および投与経路の判定に用いることが出来る。20

【0093】

抗体の治療有効性および毒性（例えば、ED₅₀ - 50% の集団において治療的に有効な用量およびLD₅₀ - 50% の集団に対して致死的な用量）は、細胞培養または実験動物における標準的医薬手順によって決定することが出来る。治療効果に対する毒性の用量比は治療係数であり、それはLD₅₀/ED₅₀の比として表されうる。動物研究から得られたデータはヒトでの使用のための用量の範囲を製剤することにおいて使用されうる。かかる組成物に含まれる用量は、毒性がわずかまたは毒性がないED₅₀を含む循環濃度の範囲内でありうる。用量は、用いられる用量形態、患者の感受性、および投与経路に依存してこの範囲内で変動する。30

【0094】

実際の用量は、処置を必要とする患者に関連する因子を鑑みて医師によって決定されうる。用量および投与は、所望の効果を維持するために十分なレベルの抗体を提供するよう調整されうる。考慮されうる因子としては、疾患状態の重篤度、対象の全体的健康、対象の年齢、体重および性別、食事、投与の時間と頻度、併用する薬物、反応感受性、および治療に対する耐性/応答が挙げられる。抗体の有効なインピボ用量は、約 5 μgから約 500 μg/kg 患者体重の範囲内である。

【0095】

本発明の抗体-含有医薬組成物の投与様式は、抗体を宿主に送達するいずれの好適な経路であってもよい。一例として、本発明の医薬組成物は、非経口投与（例えば、皮下、筋肉内、静脈内、または鼻腔内投与）のために有用なものであり得る。40

【0096】

本開示に引用するすべての特許および特許出願は引用により明示的に本明細書に含める。上記開示は本発明を一般的に説明する。より完全な理解は、以下の特定の実施例を参照することにより得られ、実施例は、本発明の範囲を限定する意図はなく、単に例示の目的で提供される。

【実施例】

【0097】

本発明がよりよく理解されうるために、以下の実施例を示す。これらの実施例は単に例50

示の目的であり、本発明の範囲を限定するものであるといかなる場合にも解釈してはならない。本明細書において言及するすべての刊行物はその全体を引用により本明細書に含める。

【 0 0 9 8 】

実施例 1:Fab-様抗体の構築、発現、および精製

抗体3E10および19G9は、組織因子(TF)および腫瘍関連抗原 RG1をそれぞれ認識する。これら2つの抗体を用いて、抗原結合ドメインと定常領域ドメインとの間に位置するプロテアーゼ部位 DDDDK (配列番号26) リンカーを含むプロテアーゼに調節される抗体を構築した。具体的には、これら抗体は軽鎖に V_L -DDDDK-CLを含み、重鎖に V_H -DDDDK-CH1-Myc-His6を含み、リンカーはエンテロキナーゼにより切断可能であり、Myc およびHis6は、検出および精製のためのタグである。2つの抗体についてのDNA配列を細菌発現ベクターに標準的分子生物学技術を用いてクローニングし、コンストラクトをDNA配列決定により確認した。プラスミドの例を図8および9に示す。3E10または19G9のいずれかを含むプラスミドを細菌株 TG1から発現させ、精製した。簡単に説明すると、抗体発現プラスミドを含む細菌株 TG1のシングルコロニーを選択し、8 mlの2xYT培地中で 34 μg/mlの クロラムフェニコールおよび1% グルコースの存在下で一晩培養した。培養液の一定体積(7 ml)を34 μg/ml クロラムフェニコールおよび 0.1% グルコースを含む250 mlの新しい2xYT培地に移した。3時間のインキュベーションの後、0.5 mM IPTGを添加してFab 発現を誘導した。培養液を一晩25 ℃でインキュベートした。インキュベーションの後、培養液を遠心分離して細菌細胞をペレットにし、ペレットをBug Buster (登録商標) 溶解バッファー (Novagen, Madison, WI) に再懸濁した。遠心分離の後、細菌溶解上清をろ過し、Fab 断片を Ni-NTA カラム (Qiagen, Valencia, CA) を介して製造業者の指示に従ってアフィニティー-精製した。

【 0 0 9 9 】

プロテアーゼに調節される抗体の別の例も3E10および19G9からのタンデムに連結した可変領域を用いて構築した。これらの抗体は、例えば、軽鎖に V_L 3E10-DDDDK- V_L 19G9-CLを、重鎖に V_H 3E10-DDDDK- V_H 19G9-CH1-Myc-His6 を含んでおり、リンカーはエンテロキナーゼにより切断可能であり、Myc およびHis6は検出および精製のためのタグである。抗体ライブラリーも、フレームワーク領域(FR)、例えば、インタクトなまたは切断型の3E10のFR4 および19G9 のFR1を用いて構築した。いくつかのタイプのプロテアーゼに調節される抗体をこのライブラリーからスクリーニングした。クローニング、発現、および精製は上記のようにして行った。

【 0 1 0 0 】

実施例 2: IgG-様抗体のクローニングおよび発現

発現ベクター pIE_SRガンマ_fa は、ヒト IgG1 (fa ハプロタイプ)の定常領域およカッパー鎖をそれぞれコードするcDNAを含む。オーバーラップ PCRを行って抗-TF 抗体 3E10 および抗-RG1 抗体 19G9の可変領域を連結した。19G9のネイティブなシグナルペプチドをプロテアーゼに調節される抗体の分泌のために用いた。3E10 および19G9の可変領域の間に位置するペプチドリンカーの4つの例は以下の通りである：リンカー 1: SDDDK (配列番号2)、リンカー 2: GGGGSDDDDK (配列番号3)、リンカー 3: GGGGSDDDKGGGGS (配列番号4)、およびリンカー 4: GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号5)。軽鎖の可変領域の増幅のためのプライマーは、PCR 断片の 5' および 3' 末端にそれぞれ Hind III および Bsiw I 部位を導入するものであった。結果として得られたPCR-増幅された V_L 遺伝子を pIE_SRガンマ1_faのHindIII/Bsiw部位にクローニングし、pIE-3E10 V_L -リンカー-19G9 V_L を作成した。同じ戦略を用いて3E10 および19G9の V_H 融合(リンカー1-4を含む)をpIE-3E10 V_L -リンカー-19G9 V_L にインフレームにクローニングした。簡単に説明すると、3E10 および 19G9の可変領域のプライマー対はNotI/ApaI 部位を含んでいた。PCR産物をNotI/ApaI で消化し、pIE-3E10 V_H -リンカー-19G9 V_H のCH 領域の上流に挿入し、 V_H 領域が 対応する pIE 誘導体におけるCH 領域と確実にインフレームになるようにした。最終コンストラクトはDNA配列決定分析により確認した。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 1 】

プロテアーゼに調節される抗体のトランスフェクションおよび一過性発現は哺乳類細胞を用いて行った。CHO-SF培地を追加したおよそ 4×10^8 のCHO-S 細胞をトランスフェクションのために準備した。トランスフェクションは Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen、Carlsbad、CA) および 1 mg プラスミド DNAを用いて製造業者の指示に従って行った。細胞をトランスフェクションの後 3 日間培養し、培地を回収し、抗体単離および精製のためにろ過した。

【 0 1 0 2 】

プロテアーゼに調節される抗体の例を表3-9に記載する。

【 0 1 0 3 】

【表3】

表3：プロテアーゼに調節される抗体（タイプ1）	
TFに対する、プロテアーゼに調節される Fab 様抗体（3E10）	
<u>軽鎖</u> DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSSGSVA SYVQWYQQRPONGSSPTTVIYEDNHRPSGV DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVFGGGTKLTVLGAGGGGSDD DDKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAVV LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 33)	<u>重鎖</u> DLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFTDAW MSWVRQAPGKELEWVSSIISGSGGSTYYAGSV KGRFTIISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARVLSLTDDYYWYGMWDVGQGTLTVTSASDD DDKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDVFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 34)
RG1に対する、プロテアーゼに調節される Fab 様抗体（19G9）	
<u>軽鎖</u> DIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYS SSLTFGGGTKEIKDDDDKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC (配列番号 35)	<u>重鎖</u> QLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYV MHWLRQAPGKGLEWVSVIIGTGGVTHYADSVK GRFTIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWGYGGSGSYENDAFDIWQGQTMVTVDDDD KSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDVFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKCEF (配列番号 36)
TFに対する、プロテアーゼに調節される IgG 様抗体（3E10）	
<u>軽鎖</u> NFMLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSSGSVAS YYVQWYQQRPONGSSPTTVIYEDNHRPSGV FSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQS YDSNNLVFGGGTKLTVLGQSDDDDKPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVLCLISDFYPGAV TVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS (配列番号 37)	<u>重鎖</u> QVNLRGGTTLVQPGGSLRLSCAASGFSFTD AWMSWVRQAPGKELEWVSSIISGSGGSTYYAG SVKGRFTIISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARVLSLTDDYYWYGMWDVGQGTLTVTSAS DDDDKTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDVFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCCPAPEELLGGP SVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 38)
RG1に対する、プロテアーゼに調節される IgG 様抗体（19G9）	
<u>軽鎖</u> EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVS SSYLAQYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QYSSSLTFGGGTKEIKRTSDDDDKVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (配列番号 39)	<u>重鎖</u> EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFS SYVMHWLRQAPGKGLEWVSVIIGTGGVTHYA DSVKGRFTIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARWGYGGSGSYENDAFDIWQGQTMV TVSSASDDDDKTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDVFPEPVTVWSNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIISAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT OKSLSLSPGK (配列番号 40)

【表4 - 1】

表4 : プロテアーゼに調節される抗体 (タイプ2)	
TF および RG1 に対する、プロテアーゼに調節される Fab 様抗体	
H1L1	
軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSSGSVA SYYVQWYQQRPQGSSPTTVIYEDNHRPSGP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGGTKLTVLGASDDDDKE IVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQS SYLA YSSSLTFGGGT SKADYE GEC (配列番号 41)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLT VSASDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLS CAGSGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTGGVTHYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARWGYYGSGSYENDAF DIWGQGMVTVSSASTKGPSV TSGGTAALGCLVKDYF SGVHTFP TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 42)
H1L4	
軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSSGSVA SYYVQWYQQRPQGSSPTTVIYEDNHRPSGP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGGTKLTVLGASDDDDKL TQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQS AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDF SLTFGGGT LKSGTASVVCLNNFY QSGNSQESVTEQDSKDSTY DYE (配列番号 43)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLT VSASDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLS CAGSGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTGGVTHYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARWGYYGSGSYENDAF DIWGQGMVTVSSASTKGPSV TSGGTAALGCLVKDYF SGVHTFP TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 44)
H1L7	
軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSSGSVA SYYVQWYQQRPQGSSPTTVIYEDNHRPSGP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGGTKLTVLGASDDDDKS PGT QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDF FGGGT GTASVVCLNNFY NSQESVTEQDSKDSTY KHKVY (配列番号 45)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLT VSASDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLS CAGSGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTGGVTHYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARWGYYGSGSYENDAF DIWGQGMVTVSSASTKGPSV TSGGTAALGCLVKDYF SGVHTFP TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 46)

10

20

30

40

【表4 - 2】

表4 (続き)	
H4L2 軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGV DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGTQLTVLGDDDKIV LTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQS LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLPEDFAVYYCQQYS SSLTFGGGTKEIKRTVAAPS QLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS ADYEKHKVYACEVTHQGLSSP C (配列番号 47)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGF DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSG AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM TAVYYCARVLSLT VDDDDKQSG SSYVMH ADSVKGRFTISRDNA TAVYYCARW VTVSSAST GCLVKD VLQSSGLY NHKPSNT 10
H4L5 軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGV DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGTQLTVLGDDDKLTQ SPGTLSSLSPGERATLSCRASQS YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG GSGTDFTLTISRLPEDFAVYYCQQYSS TFGGGTKEIKRTVAAPS SGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNA GNSQESVTEQDSKDSTYSLSS EKHKVYACEVTHQGLSSP (配列番号 49)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGF DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSG AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM TAVYYCARVLSLT VDDDDKQSG SSYVMH ADSVKGRFTISRDNA TAVYYCARW VTVSSAST GCLVKD VLQSSGLY NHKPSNT 20
H4L7 軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGV DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGTQLTVLGAS PGTLSSLSPGERATLSCRASQS QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG SGTDFTLTISRLPEDFAVYYCQQYSS FGGGTKEIKRTVAAPS GTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNA NSQESVTEQDSKDSTYSLSS KHKVYACEVTHQGLSSP (配列番号 51)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGF DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSG AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM TAVYYCARVLSLT VDDDDKQSG SSYVMH ADSVKGRFTISRDNA TAVYYCARW VTVSSAST GCLVKD VLQSSGLY NHKPSNT 30

【表4 - 3】

表4 (続き)	
H5L5 <u>軽鎖</u> DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGV DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVFGGGTKLTVLGDDDKLTQ SPGTLSSLSPGERATLSCRASQS VSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYSSSL TFGGGTKEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLK SGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 53)	<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEVSSIISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLT DYYWYGM DVWGQGTLV VSASDDDDKL VQPGGSLRLSCAGSGFTFSS YVMHWLRQAPGKGLEWVSVI GTGGVTHYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARWGY YGSGSYENDAFDIWGQGT MVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 54)

10

【0105】

【表5 - 1】

表5：プロテアーゼに調節される抗体（タイプ2）	
TF および RG1 に対する、プロテアーゼに調節される IgG 様抗体	
3E10- リンカー 1-19G9	
<u>軽鎖</u> NFMLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHHRPSGVP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGGTKLTVLGASDDDDKE IVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YSSSLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (配列番号 55)	<u>重鎖</u> QVNLRSGGTLVQPGGSLRLSCAASGF SFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLTDDYYWYGMWDVGQGTLVT VSASDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLS CAGSGFTFSSYVMHWLRQAPGKGLEWVSI GTGGVTHYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARWGYGGSGSYENDAF DIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLG TQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESENQGPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK (配列番号 56)
<u>軽鎖</u> NFMLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHHRPSGVP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGGTKLTVLGAGGGGSDD DDKEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQ SVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYSSSLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS TTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC (配列番号 57)	<u>重鎖</u> QVNLRSGGTLVQPGGSLRLSCAASGF SFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLTDDYYWYGMWDVGQGTLVT VSAGGGSDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGS LRLSCAGSGFTFSSYVMHWLRQAPGKGLEW VSVIGTGGVTHYADSVKGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGYGGSGSYE NDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPPS SSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVD GVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 58)

10

20

30

【表 5 - 2】

表5 (続き)

3E10- リンカー 3-19G9	
軽鎖 NFMLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVASYYVQ WYQQRPGSSPTTVIYEDNHPRPSGVPDFSGSIDTS SNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSNNLVFGGG TKLTVLGAGGGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPGTLS LSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQYSSSLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYE KHVKYACEVTHQGLSPVTKSFRGEA (配列番号 59)	重鎖 QVNLRSGGTLVQPGGSLRLSCAASGF SFTDAWMS WVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYYAGSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVLSLTDY YWYGMWDVGQGTIVTVSAGGGGGGGGGGGSEV QLVQSGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYVMHWL RQAPGKGLEWVSVIGTGGVTHYADSVKGRFTI SRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGGYYGSGSYE NDAFDIWGQGTIVTVSSASTKGPSVPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHH PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSV FLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 60)
3E10- リンカー 4-19G9	
軽鎖 NFMLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVASYYVQ WYQQRPGSSPTTVIYEDNHPRPSGVPDFSGSIDTS SNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSNNLVFGGG TKLTVLGAGGGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPGTLS LSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQYSSSLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYE KHVKYACEVTHQGLSPVTKSFRGEA (配列番号 61)	重鎖 QVNLRSGGTLVQPGGSLRLSCAASGF SFTDAWMS WVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYYAGSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVLSLTDY YWYGMWDVGQGTIVTVSAGGGGGGGGGGGSEV QLVQSGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYVMHWL RQAPGKGLEWVSVIGTGGVTHYADSVKGRFTI SRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGGYYGSGSYE NDAFDIWGQGTIVTVSSASTKGPSVPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHH PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSV FLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 62)
3E10- リンク 1-19G9 Fab	
軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVASYYVQ WYQQRPGSSPTTVIYEDNHPRPSGVPDFSGSIDTS SNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSNNLVFGGG TKLTVLGASDDDDKEIVLTQSPGTLSLSPGERATL SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YSSSLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEKHVKYACEV THQGLSPVTKSFRGEA (配列番号 63)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGF SFTDAWMS WVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYYAGSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVLSLTDY YWYGMWDVGQGTIVTVSASDDDDKEVQLVQSGGG VQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYVMHWLQAPGKLE WWSVIGTGGVTHYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARWGGYYGSGSYENDAFDIWQ GTMVTVSSASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPABLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHPSNTKVDKK VEPKSEF (配列番号 64)

【 0 1 0 6 】

【表 6 - 1】

表6：プロテアーゼに調節される抗体（タイプ3）	
プロテアーゼに調節される Fab 様抗体	
H1L5	
<u>軽鎖</u> DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVFGGGTKLTVLGDDDDKLQ SPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSQGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSL TFFGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 65)	<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLT DYYWYGM DVWGQGTLVT VSASDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLS CAGSGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTGGVTHYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARWGYGGSYENDAF DIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALT SGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 66)
H2L1	10
<u>軽鎖</u> DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVFGGGTKLTVLGASDDDK IVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSS SYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YSSSLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL SKADYEHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (配列番号 67)	<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLT DYYWYGM DVWGQGTLVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQ MNS LRAEDTAVYYCARWGYGGSYENDAF DIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 68)
H2L2	20
<u>軽鎖</u> DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVFGGGTKLTVLGDDDDK I LTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSY LA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYS SSLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL SKADYEHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (配列番号 69)	<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLT DYYWYGM DVWGQGTLVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQ MNS LRAEDTAVYYCARWGYGGSYENDAF DIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 70)
	30
	40

【表 6 - 2】

表6 (続き)

H2L4	
<u>軽鎖</u> DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGKTLTVLGASASDDDD KLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVCSSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY SSSLTFGGGTKEIKRTVAAPSVDIFPPSD EQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRNG EC (配列番号 71)	<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLTDDYYWYGMWDVGQGTLVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTG GVTHYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARWGYYGSGSYENDAFDIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPALVQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 72)
H2L5	
<u>軽鎖</u> DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGKTLTVLGDDDDKLTO SPGTLSLSPGERATLSCRASQSVCSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSSSL TFGGGTKEIKRTVAAPSVDIFPPSDEQLK SGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQ GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRNGEC (配列番号 73)	<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLTDDYYWYGMWDVGQGTLVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTG GVTHYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARWGYYGSGSYENDAFDIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPALVQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 74)
H2L7	
<u>軽鎖</u> DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGKTLTVLGASDDDDKS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVCSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSSSLT FGGGTKVEIKRTVAAPSVDIFPPSDEQLKS GTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRNGEC (配列番号 75)	<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLTDDYYWYGMWDVGQGTLVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTG GVTHYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARWGYYGSGSYENDAFDIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPALVQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 76)

10

20

30

【表 6 - 3】

表6（続き）	
H2L8	
<u>軽鎖</u> DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGV DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVFGGGTKLTVLGDDDKSPG TLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSSSLTFG GGTKVVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTTL SKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGE (配列番号 77)	<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSSLTDYYWYGM DVNGQGTLV VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWRQAPGKG LEWVSVI GTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARWGY YGSGSYENDAFDIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFP A VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVN HKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 78)

10

【 0 1 0 7 】

【表7 - 1】

表7 : プロテアーゼに調節される抗体 (タイプ3)	
プロテアーゼに調節される IgG 様抗体	
3E10- リンカー 1a-19G9	<p><u>軽鎖</u></p> <p>NFMLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGV DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGTKLTVSDDDKEIVL TQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSS SLTFGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (配列番号 79)</p> <p><u>重鎖</u></p> <p>QVNRESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLT DYYWYGM DVWGQGTLVT VDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVIGTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARWGY GSGSYENDAFDIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSG GTAALGCLVKD YFPEPVTWSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELGGPSVFLFPPPKPD TLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVFKFNWYV DGVEVHN A KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPO VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDI AVEWE SNGQ PENNYKTT P VLDSDGSFFLYSKLTV SKLTV DKSRWQ QGNVFCS VMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (配列番号 80)</p>
3E10- リンカー 1b-19G9	<p><u>軽鎖</u></p> <p>NFMLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGV DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGTKLTVSDDDKLTQS PGTSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSLT FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (配列番号 81)</p> <p><u>重鎖</u></p> <p>QVNRESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLT DYYWYGM DVWGQGTLVT VDDDKQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTF SSYVMHWRQAPGKGLEWVSVIGTG VTHY ADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARWGY GSGSYENDAFDIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSG GCLVKD YFPEPVTWSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELGGPSVFLFPPPKPD TLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVFKFNWYV DGVEVHN A KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPO VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDI AVEWE SNGQ PENNYKTT P VLDSDGSFFLYSKLTV SKLTV DKSRWQ QGNVFCS VMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (配列番号 82)</p>

10

20

30

40

【表 7 - 2】

表7 (続き)	
3E10- リンカー 1c-19G9	
軽鎖 NFMLTQPHSVSASPGKTVT1SCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGV DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQS YDSNNLVVFGGTKLTVLGASDDDKL TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLPEDFAVYYCQQYSS SLTFGGGTKVEIKRTVAAPSFIGPPSDEQ LKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 83)	重鎖 QVNLR ESGGTLVQPGGSLRLSCAASGF SFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSI SGSGG STYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLT DYYWYGM DVWGQGT LVT VSASDDDKQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSG FTFSSYVMHWL RQAPGKGLEWVSVIGTGGV THYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTA VYYCARWGYYGGSYENDAFDIWGQ GTMVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQP REPVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (配列番号 84)
	10
	20

【0108】

【表 8 - 1】

表8：プロテアーゼに調節される抗体（タイプ4）	
H3L1	
軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGGTKLTVLGASDDDDKE IVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YSSSLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGE GEC (配列番号 85)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLTDDYYWYGMGVWGQGTLVT VSASDDDKQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSG FTFSSYVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTGGV THYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARWGYGSGSYENDAFDIWGQ GTMVTSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 86)
H3L2	10
軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGGTKLTVLGDDDDKEIV LTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSY LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYS SSLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGE C (配列番号 87)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLTDDYYWYGMGVWGQGTLVT VSASDDDKQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSG FTFSSYVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTGGV THYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARWGYGSGSYENDAFDIWGQ GTMVTSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 88)
H3L4	20
軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGGTKLTVLGASDDDDKL TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSS SLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGE C (配列番号 89)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLTDDYYWYGMGVWGQGTLVT VSASDDDKQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSG FTFSSYVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTGGV THYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARWGYGSGSYENDAFDIWGQ GTMVTSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 90)
H3L5	30
軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGGTKLTVLGDDDDKLTQ SPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSSSL TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSK GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGE C (配列番号 91)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLTDDYYWYGMGVWGQGTLVT VSASDDDKQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSG FTFSSYVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTGGV THYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARWGYGSGSYENDAFDIWGQ GTMVTSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 92)
	40

【表 8 - 2】

表8 (続き)	
H3L7	
軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYYY CQSYDSNNLVVFCCGTKLTVLGASDDDDKS PGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSSSLT FGGGTTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNPFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 93)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWSSIISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLTDTYYWYGMGVWGQGTLVT VSASDDDKQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSG FTFSSYVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTGGV THYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARWGYGGSGSYENDAFDIWGQ GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVFVPSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDDKKVEPKCEF (配列番号 94)
H1L2	10
軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYYY CQSYDSNNLVVFCCGTKLTVLGDDDDKEIV LTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSY LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYS SSLTFGGGTTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNPFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (配列番号 95)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWSSIISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLTDTYYWYGMGVWGQGTLVT VSASDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLS CAGSGFTFSSYVMHWLRQAPGKGLEWVSVI GTGGVTHYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARWGYGGSGSYENDAF DIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFVPSLGT TQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEPKCEF (配列番号 96)
H5L1	20
軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYYY CQSYDSNNLVVFCCGTKLTVLGASDDDDKE IVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YSSSLTFGGGTTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNPFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (配列番号 97)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWSSIISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLTDTYYWYGMGVWGQGTLVT VSASDDDKLVQPGGSLRLSCAGSGFTPSS YVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTHYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARWGYGGSGSYENDAFDIWGQGTMVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVFVPSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDDKKVEPKCEF (配列番号 98)
	30

【表 8 - 3】

表8 (続き)

H5L4	軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYVYQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGGTKLTVLGASDDDDKL TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLS AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSS SLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC (配列番号 99)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGF SFT DAWMSWVRQAPGKELEVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLT DYYWYGMDVWGQGTLVT VSASDDDKLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSS YVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTGGVTHYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARWGYGGSYENDAFDIWGQGT MVT VSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVWSNGALTSGVHTFP AVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 100)	10
H5L7	軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYVYQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGGTKLTVLGASDDDDKS PCTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSSSLT FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYE KHVKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC (配列番号 101)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGF SFT DAWMSWVRQAPGKELEVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLT DYYWYGMDVWGQGTLVT VSASDDDKLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSS YVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTGGVTHYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARWGYGGSYENDAFDIWGQGT MVT VSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVWSNGALTSGVHTFP AVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 102)	20
H5L8	軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYVYQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGGTKLTVLGDDDDKSPG TLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSG TDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYSSSLTF GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYE KHVKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC (配列番号 103)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGF SFT DAWMSWVRQAPGKELEVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLT DYYWYGMDVWGQGTLVT VSASDDDKLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSS YVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTGGVTHYAD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARWGYGGSYENDAFDIWGQGT MVT VSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVWSNGALTSGVHTFP AVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 104)	30
H6L1	軽鎖 DIVLTQPHSVSASPGKTVTISCTRSGSVA SYVYQWYQQRPGSSPTTVIYEDNHRPSGVP DRFSGSIDTSSNSASLTISGLKTEDEADYY CQSYDSNNLVVFGGGTKLTVLGASDDDDKE IVL TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSS SYLA YSSSLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLS SKADYE KHVKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC GEC (配列番号 105)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGF SFT DAWMSWVRQAPGKELEVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVLSLT DYYWYGMDVWGQGTLVT VDDDDKLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSSYVM HWLRQAPGKGLEWVSVI GTGGVTHYAD SVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARWGYGGSYENDAFDIWGQGT MVT VSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVWSNGALTSGVHTFP AVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 106)	40

【0109】

【表9 - 1】

表9：プロテアーゼに調節される抗体（タイプ4）	
H1L5a	
<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAAAAAA AAWGQGTLVT VSASDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLS CAGSGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTGGVTHYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARWGY GSGSYENDAF DIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSN SALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG (配列番号 107)	<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAAAAAA AAWGQGTLVT VSASDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLS CAGSGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTGGVTHYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARWGY GSGSYENDAF DIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSN SALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG (配列番号 108)
H2L1a	10
<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAAAAAA AAWGQGTLVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVIGTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARWGY GSGSYENDAFDIW GQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWSN SALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 109)	<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAAAAAA AAWGQGTLVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVIGTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARWGY GSGSYENDAFDIW GQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWSN SALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 110)
H2L2a	20
<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAAAAAA AAWGQGTLVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVIGTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARWGY GSGSYENDAFDIW GQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWSN SALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 111)	<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAAAAAA AAWGQGTLVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVIGTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARWGY GSGSYENDAFDIW GQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWSN SALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 112)
	30
	40

【表9 - 2】

表9 (続き)	
H2L4a	
<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAAAAAA AAWGQGT LVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDTA VYYCARW GYYGSGSYENDAFDIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVN HKPSNTKV DKKVEPKCEF (配列番号 113)	<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAAAAAA AAWGQGT LVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDTA VYYCARW GYYGSGSYENDAFDIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVN HKPSNTKV DKKVEPKCEF (配列番号 114)
	10
H2L5a	
<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAAAAAA AAWGQGT LVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDTA VYYCARW GYYGSGSYENDAFDIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVN HKPSNTKV DKKVEPKCEF (配列番号 115)	<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAAAAAA AAWGQGT LVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDTA VYYCARW GYYGSGSYENDAFDIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVN HKPSNTKV DKKVEPKCEF (配列番号 116)
	20
H2L7a	
<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAAAAAA AAWGQGT LVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDTA VYYCARW GYYGSGSYENDAFDIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVN HKPSNTKV DKKVEPKCEF (配列番号 117)	<u>重鎖</u> QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAAAAAA AAWGQGT LVT VDDDDKEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWRQAPGKGLEWVSVI GTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNS LRAEDTA VYYCARW GYYGSGSYENDAFDIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVN HKPSNTKV DKKVEPKCEF (配列番号 118)
	30

【表 9 - 3】

表9 (続き)	
H2L8a	
重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAAAAAAAAAWQGQTLVT VDDDDKEVQLVQSGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNS LRAEDTAVYYCARWGYGSGSYENDAFDIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 119)	重鎖 QVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFT DAWMSWVRQAPGKELEWVSSISGSGGSTYY AGSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARAAAAAAAAAAWQGQTLVT VDDDDKEVQLVQSGGLVQPGGSLRLSCAG SGFTFSSYVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTG GVTHYADSVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNS LRAEDTAVYYCARWGYGSGSYENDAFDIW GQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKCEF (配列番号 120)

【 0 1 1 0 】

実施例 3: TF-結合 ELISA

ビオチン化 TF (1 μg/ml)をストレプトアビジンであらかじめコーティングした96-ウェルプレート(Pierce Chemical、Rockford、IL)に添加し、1時間インキュベートした。プレートを次いで 0.5% Tween-20を含むPBSで(5x)洗浄した。サンプルおよび対照(段階希釈)をウェルに添加し、1時間インキュベートし、次いで0.5% Tween-20を含むPBSで(5x)洗浄した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)-複合化抗-ヒト IgGまたはHRP-複合化抗-ヒト FabをPBSで希釈し(1:5000)、各ウェルに添加した。1時間のインキュベーションの後、プレートを再び洗浄した。Amplex Red (10 μg/ml)を各ウェルに添加し、プレートリーダーを用いてシグナルを読み取った。データをSoftmax (Molecular Devices、Sunnyvale、CA)を用いて解析した。結果を図10に示す。

【 0 1 1 1 】

実施例 4: RG1-結合 ELISA

96ウェルプレートを一晩のインキュベーションによって RG1 (1 μg/ml)によりコーティングし、プレートを次いで 0.5% Tween-20を含むPBSで(5x)洗浄した。サンプルおよび対照(段階希釈)をウェルに添加し、1時間インキュベートし、次いで0.5% Tween-20を含むPBSで(5x)洗浄した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP)-複合化抗-ヒト IgGまたはHRP-複合化抗-ヒト FabをPBS で希釈し(1:5000)、各ウェルに添加した。1時間のインキュベーションの後、プレートを再び洗浄した。Amplex Red (10 μg/ml)を各ウェルに添加し、プレートリーダーを用いてシグナルを読み取った。データをSoftmax (Molecular Devices、Sunnyvale、CA) を用いて解析した。結果を 図11に示す。

【 0 1 1 2 】

実施例 5: サンドイッチ 抗原-結合 ELISA

二特異性のプロテアーゼに調節される抗体(図 2に図示する)の抗原結合活性を、サンドイッチ 抗原-結合 ELISAを用いて測定した。この抗体は2つの抗原、RG-1 および TF に結合し、リンカーはエンテロキナーゼ切断部位 (“EK”)を含む。

【 0 1 1 3 】

96ウェルプレートを一晩のインキュベーションによって RG1 (1 μg/ml) によりコーティングした。プレートを次いで 0.5% Tween-20を含むPBSで 5 回洗浄した。抗体サンプルおよび対照を30ユニットのエンテロキナーゼで16時間37 ℃で消化した(実施例 4参照)。エンテロキナーゼ消化を受けたかまたは受けていない抗体サンプルを段階希釈し、ELISA プレートのウェルに添加した。サンプルを1時間インキュベートし、次いで、0.5% Tween-20を含むPBSで(5x)洗浄した。ビオチン化 TF (0.1 μg/ml)を各ウェルに添加し、1時間インキュベートした。セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)-複合化ストレプトアビジン (1: 10000希釈)を各ウェルに添加した。1時間のインキュベーションの後、プレートを再び洗

10

20

30

40

50

浄した。Amplex Red (10 µg/ml)を各ウェルに添加し、シグナルをプレートリーダーを用いて読み取った。データをSoftmax (登録商標) (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いて解析した。親抗体である3E10、19G9、およびポリクローナルヒトFabを対照として用いた。結果は二連のウェルの平均である(図12)。非処理の二特異性のプロテアーゼに調節される抗体は同時にTFとRG-1との両方に結合した(それぞれ“リンク1”および“リンク2”)。しかしあンテロキナーゼ処理の後、両方の抗原に対する結合は大幅に低下した(それぞれ“リンク1/EK”および“リンク2/EK”)。

【0114】

いくつかの例のプロテアーゼに調節される抗体の抗原結合活性もまた、このアッセイを用いて測定した。例えば、プロテアーゼに調節される抗体である3E10-タイプ1-Fabおよび19G9-タイプ1-Fabの抗原結合活性を図13に示す。対照は3E10-Reg-Fab、19G9-Reg-Fab、およびHuFabと称する。

【0115】

プロテアーゼに調節されるFab-様抗体の抗原結合活性を図14に示す。抗体、H1L1、H1L4、H1L7、H4L7、およびH5L5(タイプ2)の活性をエンテロキナーゼの非存在下および存在下にて測定した。親抗体である3E10、19G9、およびポリクローナルヒトFabを対照として用いた。同様に、図15は、プロテアーゼに調節されるFab-様抗体であるH2L1、H2L2、およびH2L8(タイプ3)ならびにH3L1、H3L4、およびH5L4(タイプ4)の抗原結合活性を示す。

【0116】

実施例 6. プロテアーゼに調節される抗体のエンテロキナーゼ消化

プロテアーゼに調節される抗体を、エンテロキナーゼの触媒サブユニットであるEnterokinaseMax(商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA)で消化した。抗体の濃度を1-5 µg/mlに調整した。一定体積の抗体(100 µl)を20 µlの10x EnterokinaseMax(商標)バッファーおよび75 µlの滅菌水とチューブ中で混合した。EnterokinaseMax(商標)(5 µl)を各サンプルに添加し、サンプルを37 °Cで16時間インキュベートした。対照群については、一定体積の水(5 µl)を用いた。

【0117】

実施例 7. 抗体のウエスタンプロット

3つの検出抗体：抗-ヒトカッパー抗体、抗-ヒトIgG(H+L)、および抗-Myc tag抗体、をプロテアーゼに調節される抗体をプローブするために用いた。これら検出抗体はセイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)との複合体とした。およそ50 ngの抗体サンプルをDTTを含むローディングバッファー(Invitrogen, Carlsbad, CA)と混合し、5分間煮沸した。サンプルを12% Bis-Tris NuPAGE(登録商標)ゲル(Invitrogen, Carlsbad, CA)にローディングし、分離し、ニトロセルロースメンブレンにトランスファーした。5%粉乳で2時間ブロッキングした後、ニトロセルロースメンブレンを検出抗体とともに1.5時間インキュベートした。メンブレンを次いで0.5% Tween-20を含むPBSで洗浄し、SuperSignal West Femto (Pierce Chemical, Rockford, IL)とともにインキュベートし、X-線フィルムに露出して現像した。結果を図16-18に示す。

【0118】

実施例 8: 皮下異種移植癌モデル

ヒト乳房異種移植片であるMaTu細胞を10% FBSを追加したRPMI中で接着培養として維持する。Ncrヌードマウス(8-12週齢)の右側腹部に0.1 mLの80%マトリゲル/20%HBSS中の 5×10^6 の細胞を皮下接種する。腫瘍の平均サイズが~180 mg(6日間)に達すると、処理を開始する。抗体を4日に1回(Q4Dx3)、10 mg/kgの用量で静脈内投与する。対照マウスをPBSまたは複合体化していないモノクローナル抗体で処理する。各動物の健康状態について毎日検査を行う。各実験群は、10匹のマウスからなり、投薬体積は0.1 mL/10 g体重であった。各腫瘍の長さと幅を電気キャリバーを用いて週に2-3回測定し、腫瘍重量(mg)を下記式に基づいて算出する。

$$[\text{長さ}(\text{mm}) \times \text{幅}(\text{mm})^2]/2$$

10

20

30

40

50

日々の観察を含む、研究経過にわたって得られたすべてのデータを記録する。腫瘍増殖阻害(TGI)を、1-T/Cx100として算出し、ここで、T = 処理群からの最終腫瘍重量、およびC = 対照群からの最終腫瘍重量である。データは腫瘍の処置のための抗体の治療的有用性を示す。

【0119】

本発明のその他の態様は、本明細書に開示する本発明の記載または実施を考慮すると当業者に明らかであろう。本明細書および実施例は単に例示的なものとして考慮すべきであり、本発明の真の範囲および精神は以下の請求の範囲によって示される。

【図1】

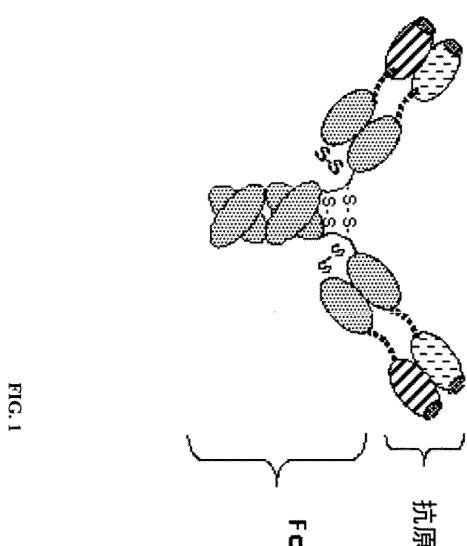
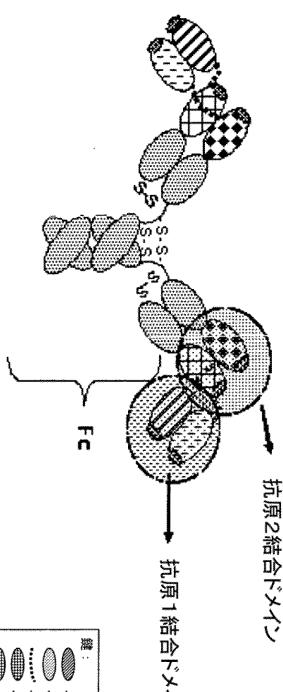


FIG.1

記号:
- VH 抗体1
- VL 抗体1
...
... - 切断可能な部位を有するリンクヤー
- VH 抗体2
- VL 抗体2
...
...
● - 定常ドメイン
○ - CDR 領域

抗原結合ドメイン

【図2】



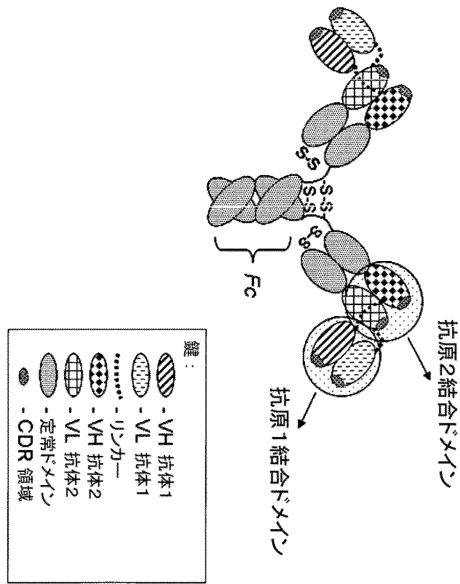
抗原1結合ドメイン

FIG.2

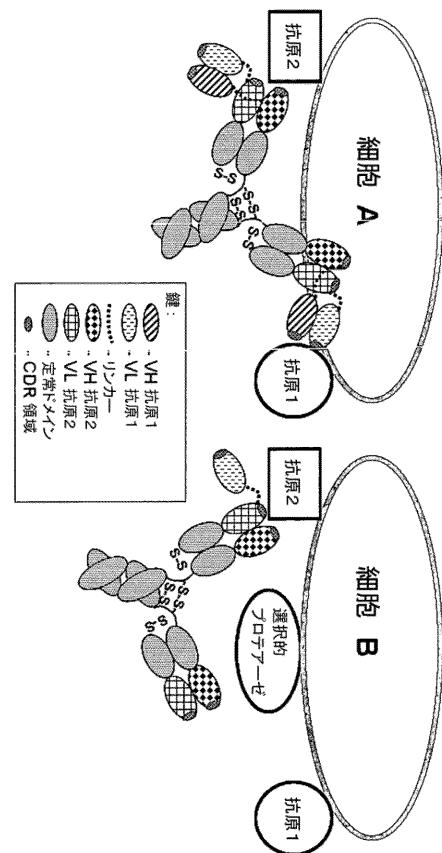
記号:
- VH 抗体1
- VL 抗体1
... - 切断可能な部位を有するリンクヤー
- VH 抗体2
- VL 抗体2
...
...
● - 定常ドメイン
○ - CDR 領域

【図3】

FIG. 3



【図4】

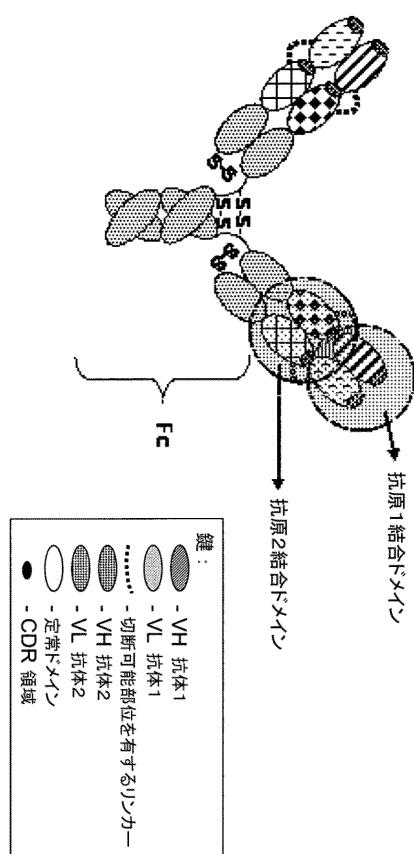


選択的高親和性結合

FIG. 4

【図5】

FIG. 5

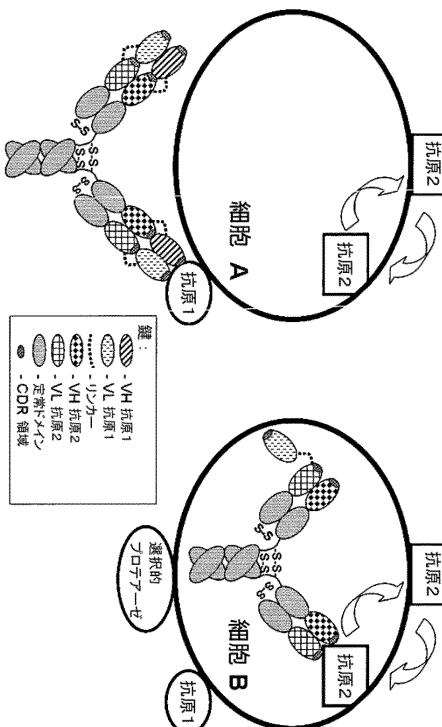


【図6】

FIG. 6

抗原依存性インターナリゼーションなし

選択的抗原依存性インターナリゼーション



【図7】

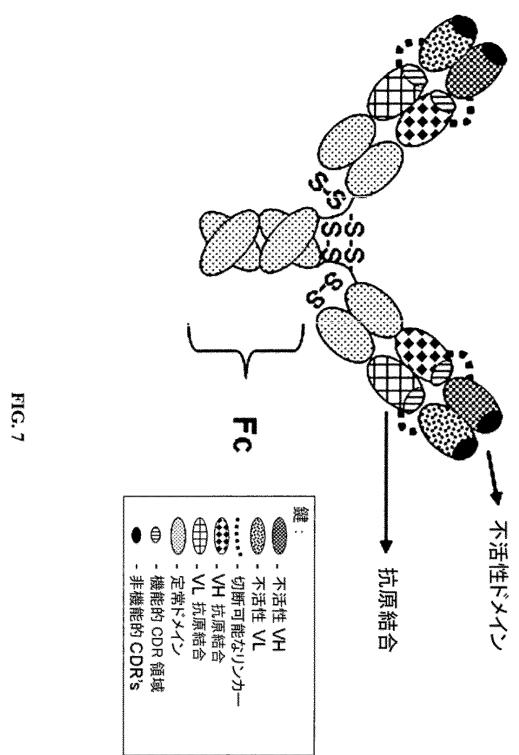


FIG. 7

【図8】

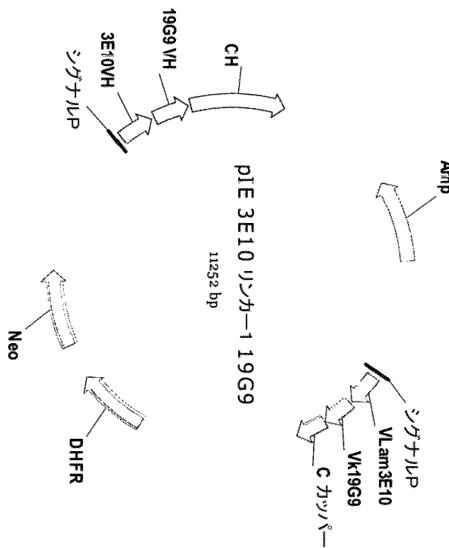


FIG. 8

【図9】

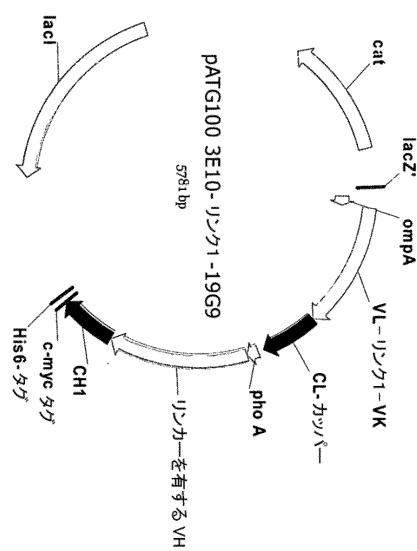


FIG. 9

【図10】

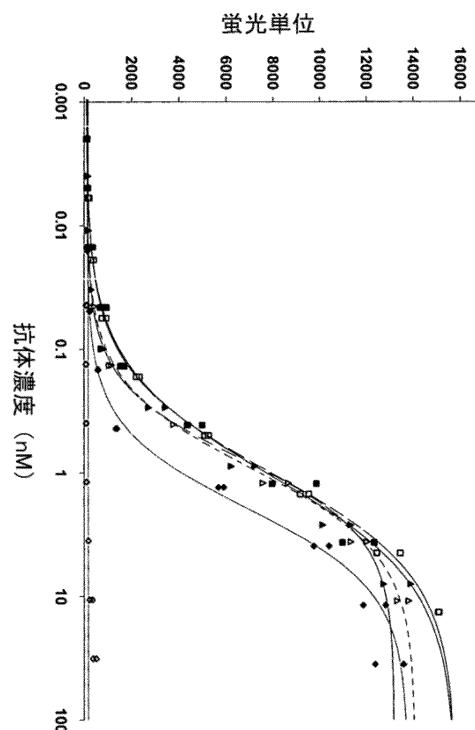


FIG. 10

【図 11】

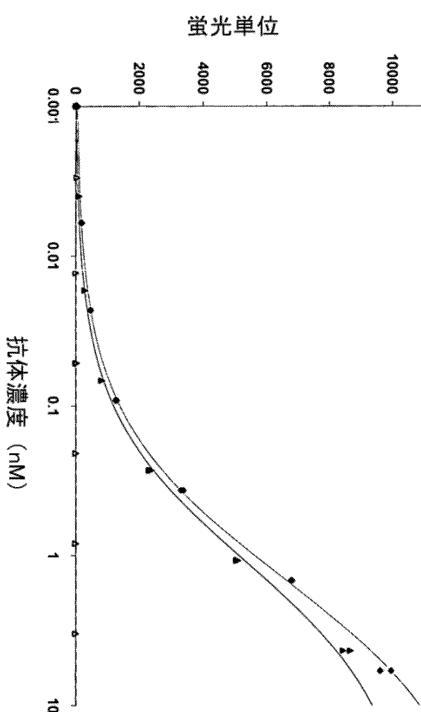


FIG. 11

【図 12】

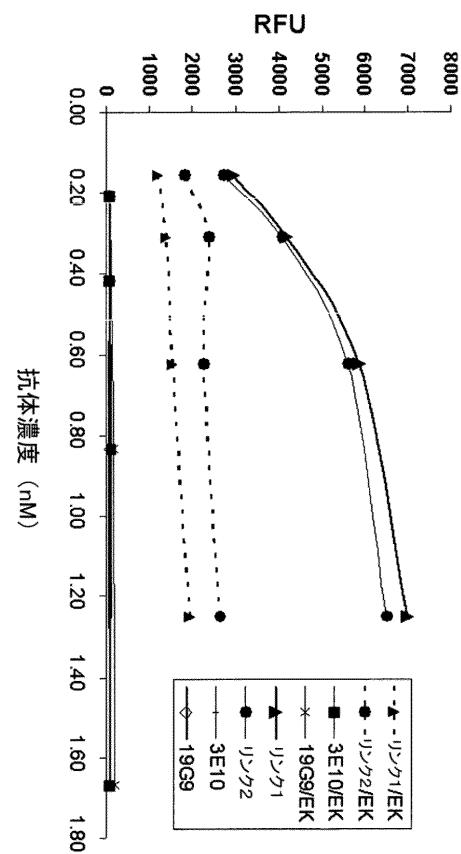


FIG. 12

【図 13】

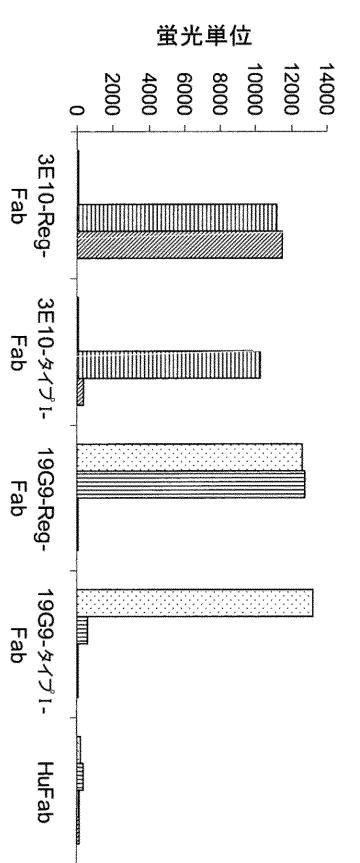


FIG. 13

【図 14】

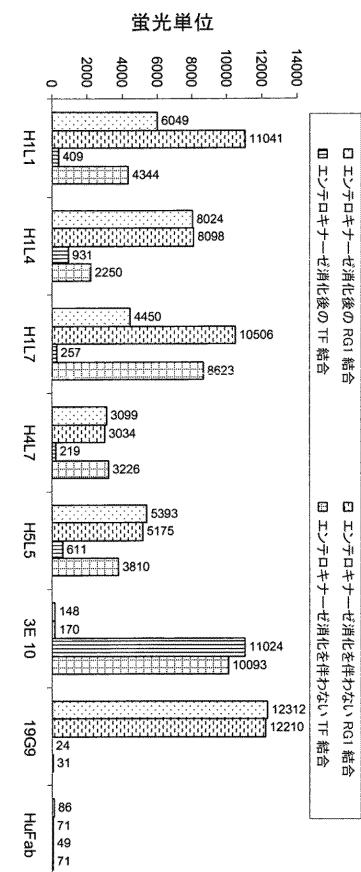


FIG. 14

【図 15】

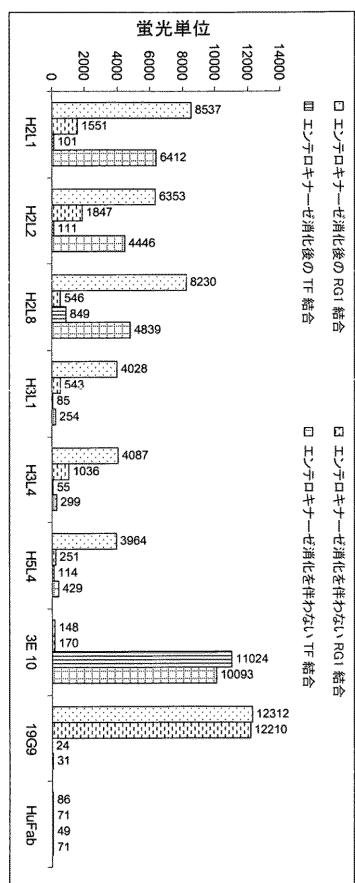
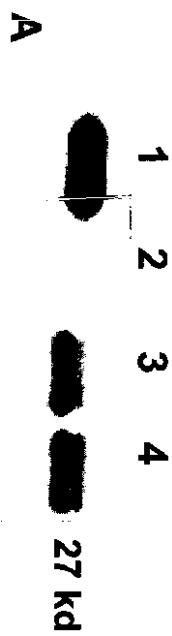
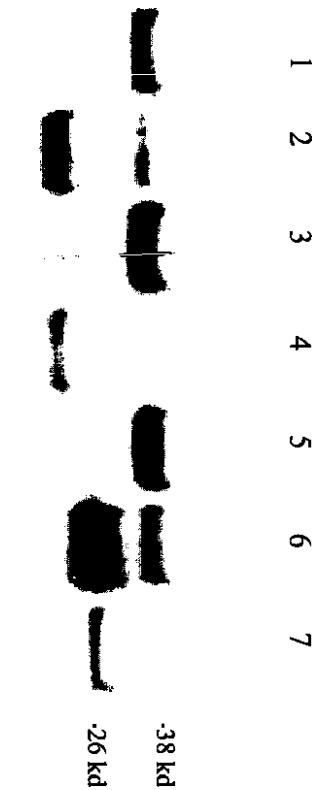


FIG.15

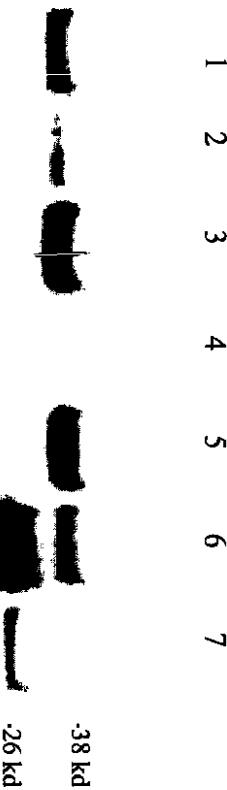
【図 16 A】



15 kd



27 kd



25 kd

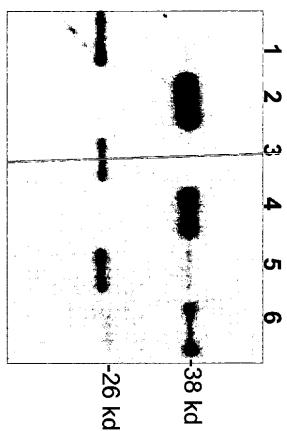
13 kd

FIG.17

【図 17】

【図 18】

FIG. 18



【配列表】

0005485152000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 S
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 Q
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P 29/00 101
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/06
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P 5/14
A 6 1 P	1/12	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P	31/06	(2006.01)	A 6 1 P 31/18
A 6 1 P	33/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P 1/12
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	A 6 1 P 31/06
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P 33/06 A 6 1 P 31/20
			G 0 1 N 33/574 A
			G 0 1 N 33/53 D

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 リュー・ビン

アメリカ合衆国 9 4 8 0 3 カリフォルニア州リッチモンド、サドルバック・コート 5 3 8 9 番

(72)発明者 デイビッド・ライト

アメリカ合衆国 9 4 4 0 2 カリフォルニア州サン・マテオ、サウス・フレモント・ストリート 6 1
4 番

(72)発明者 ワン・ジュオジ

アメリカ合衆国 9 4 0 1 0 カリフォルニア州バーリングーム、アパートメント 2 1 0、ガーデン・
ドライブ 1 9 3 3 番

(72)発明者 ダグラス・シュナイダー

アメリカ合衆国 9 4 5 4 9 カリフォルニア州ラフィエット、ウォルナット・レイン 3 3 2 9 番

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 7 / 0 2 4 7 1 5 (WO , A 1)

国際公開第 0 3 / 0 1 8 6 1 6 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 0 7 K 1 6 / 0 0

C 0 7 K 1 9 / 0 0

B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S / W P I X (S T N)

专利名称(译)	单特异性和多特异性抗体和使用方法		
公开(公告)号	JP5485152B2	公开(公告)日	2014-05-07
申请号	JP2010520502	申请日	2008-08-16
[标]申请(专利权)人(译)	拜耳先灵制药公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳先灵医药股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	拜耳知识产权法理社会米特Beshurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	リュービン デイビッドライト ワンジュオジ ダグラス・シュナイダー		
发明人	リュー・ビン デイビッド・ライト ワン・ジュオジ ダグラス・シュナイダー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/00 C07K19/00 A61K39/395 A61P35/00 A61P31/00 A61P37/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P19/02 A61P3/10 A61P1/04 A61P7/06 A61P1/16 A61P13/12 A61P9/00 A61P17/06 A61P5/14 A61P17/00 A61P31/18 A61P11/00 A61P1/12 A61P31/06 A61P33/06 A61P31/20 G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	A61K47/6807 A61K47/6809 A61K47/6821 A61K47/6827 A61K47/6829 A61K47/6851 A61K47/6869 A61K2039/505 A61P1/04 A61P1/12 A61P1/16 A61P3/10 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/06 A61P31/14 A61P31/18 A61P31/20 A61P33/06 A61P35/00 A61K47/6803 C07K16/3069 C07K16/3076 C07K16/36 C07K16/468 C07K2317/31 C07K2317/56 C07K2317/64 Y02A50/412 A61K39/3955 A61K39/39558 A61K45/06		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C07K16/00 C07K19/00 A61K39/395.T A61K39/395.R A61K39/395.S A61K39/395.Q A61P35/00 A61P31/00 A61P37/02 A61P25/00 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P3/10 A61P1/04 A61P7/06 A61P1/16 A61P13/12 A61P9/00 A61P17/06 A61P5/14 A61P17/00 A61P31/18 A61P11/00 A61P1/12 A61P31/06 A61P33/06 A61P31/20 G01N33/574.A G01N33/53.D		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	60/955913 2007-08-15 US		
其他公开文献	JP2010535832A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及可用于诊断和治疗各种疾病的单特异性和多特异性抗体。另外，这些抗体通过蛋白酶切割进行修饰。蛋白酶控制或调节由位于接头中的蛋白酶位点提供。这些蛋白酶调节的抗体也可用于诊断和治疗各种疾病。

切除部位 ↓	切断酵素 / 自己切断
Asp-Asp-Asp-Asp-Lys↓ (DDDDK) (配列番号 26)	エンテロキナーゼ
Ile-Glu/Asp-Gly-Arg↓ (IE/DGR) (配列番号 27)	第 Xa 因子プロテアーゼ
Leu-Val-Pro-Arg↓Gly-Ser (LVPR GS) (配列番号 28)	トロンビン
Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Gly (ENLYFQ G) (配列番号 29)	TEV プロテアーゼ
Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln↓Gly-Pro (LEVLFQ GP) (配列番号 30)	ヒト ライノウイルス 3C プロテアーゼ
Ser-Ser-Val-Phe-Ala-Gln↓Ser-Ile-Pro (SSVFAQ SIP) (配列番号 31)	PCSK9 (NARC-I)
Lys-Gln-Leu-Arg↓Val-Val-Asn-Gly (KQLR VVNG) (配列番号 32)	ヘブシン
特異的インデインコード配列	インデイン 1 & インデイン 2
シグナル配列	シグナルペプチダーゼ