

(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2005-289809

(P2005-289809A)

(43) 公開日 平成17年10月20日(2005.10.20)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

C07K 16/18

C12N 15/09

F I

C07K 16/18

C12N 15/00

Z N A

A

テーマコード (参考)

4B024

4H045

審査請求 有 請求項の数 13 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2002-4184 (P2002-4184)  
 (22) 出願日 平成14年1月11日 (2002.1.11)  
 (31) 優先権主張番号 01204037.4  
 (32) 優先日 平成13年10月24日 (2001.10.24)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

特許法第30条第1項適用申請有り 2001年6月13日 発行の「THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Vol. 276, No. 28」に発表

(71) 出願人 301034267  
 フラームス・インテルユニフェルシタイル・インステイチュート・フォール・ピオテヒノロヒー・ヴェーゼットウェー (ヴェーイーペー・ヴェーゼットウェー)  
 VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INSTITUUT VOOR BIOTECHNOLOGIE VZW (VIB VZW)  
 ベルギー国、ペー9052 ツウェナールデ、レイフィスヘストラート 120  
 (74) 代理人 100078662  
 弁理士 津国 肇  
 (74) 代理人 100075225  
 弁理士 篠田 文雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 突然変異重鎖抗体

(57) 【要約】

【課題】免疫学分野において有用な新規重鎖抗体及び単一ドメイン重鎖抗体断片を提供する。

【解決手段】カバットの番号付けによる、45位に荷電アミノ酸でもシステインでもないアミノ酸を含み、場合により108位のQと組み合わせて、103位にR、G、K、S及びPよりなる群から選択されるアミノ酸を含む機能性重鎖抗体。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

カバットの番号付けによる、45位に荷電アミノ酸でもシステインでもないアミノ酸を含み、場合により108位のQと組合せて、103位にR、G、K、S及びPよりなる群から選択されるアミノ酸を含む、機能性重鎖抗体。

## 【請求項 2】

抗体が、人工の突然変異体である、請求項1記載の機能性重鎖抗体。

## 【請求項 3】

配列番号1を含む、請求項1又は2記載の機能性重鎖抗体。

## 【請求項 4】

配列番号2を含む、請求項1又は2記載の機能性重鎖抗体。

## 【請求項 5】

配列番号3を含む、請求項1又は2記載の機能性重鎖抗体。

## 【請求項 6】

元の配列において、場合によりカバットの番号付けによるアミノ酸108をQにより置換することと組合せて、カバットの番号付けによるアミノ酸103をR、G、K、S及びPよりなる群から選択される親水性アミノ酸により置換することによる、単ドメイン重鎖抗体断片を可溶化するための方法。

## 【請求項 7】

ラクダ科重鎖抗体又はその機能性断片をヒト化するための方法であって、場合により1つ以上の他のラクダ科に顕著な特徴であるアミノ酸の置換と組合せた、少なくとも45位のラクダ科に顕著な特徴であるアミノ酸の置換を含む方法。

## 【請求項 8】

45位のラクダ科に顕著な特徴であるアミノ酸が、ロイシンにより置換される、請求項7記載の方法。

## 【請求項 9】

置換が、元の配列において、場合によりカバットの番号付けによるアミノ酸108をQにより置換することと組合せて、カバットの番号付けによるアミノ酸103をR、G、K、S及びPよりなる群から選択される親水性アミノ酸により置換することで代償される、請求項7又は8記載の方法。

## 【請求項 10】

機能性断片が、単ドメイン重鎖断片である、請求項7～9のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 11】

請求項6記載の方法により入手可能な、可溶性単ドメイン重鎖抗体断片。

## 【請求項 12】

請求項10記載の方法により入手可能な、ヒト化単ドメイン重鎖抗体断片。

## 【請求項 13】

請求項11又は12記載の1つ以上の重鎖抗体断片を含む、単ドメイン重鎖抗体断片ライブラリー。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

IgGアイソタイプは、血清において認められる最も豊富なイムノグロブリンである。全ての哺乳動物において、これは2つの同一の重鎖(H)及び2つの同一の軽鎖(L)からなる。よってこの構造を有するイムノグロブリンは、4鎖イムノグロブリンと称される。4鎖イムノグロブリンのH鎖は、4つのドメイン、及び第2と第3ドメインとの間のヒンジ領域を含む。L鎖は、2つのドメインを有する。L及びH鎖両方のN末端ドメインは、残りのドメインよりも配列の可変性が高く、Vドメイン(それぞれVH及びVL)として知られている。VH内の3つのループ及びVL内の3つのループが、VH-VLドメイン対において並列して、抗原結合部位を構成している。ループは、配列が超可変性であり、

10

20

30

40

50

相補性決定領域 (Complementarity Determining Region) に因んで C D R と命名されている。4 鎖イムノグロブリンの一般構造の記述は、「免疫学 (Immunology)」、Roitt I.ら、Ed. MEDSI/Mc GRAWHILLにおいて与えられる。

#### 【0002】

事実上全ての可能性ある外来物質に対する厳密な抗原結合物質を作成するための抗体の抗原結合多様性及び成功の多くは、数千の可能性ある V H からの 1 つと数千の可能性ある V L からの 1 つとのランダムな対形成に由来する。より保存的な配列を有し、C L と表示される L の第 2 のドメインは、これも保存配列を有する H 鎖の第 2 のドメイン (C H 1) と会合している。

#### 【0003】

重鎖病として知られている、ヒトにおける病的障害は、L 鎖を含まない血清中の抗体の存在を特徴とする。更に、これらの抗体はまた V H 及び C H 1 の重要な部分を欠いている (失われた V H 及び C H 1 領域は、異なる H C A b (重鎖抗体 (Heavy Chain Antibody)) 間で大きく変化しうるのではあるが)。H 鎖における欠失は、V H 及び C H 1 ドメインの一部を伴う再配列 H 鎖の欠失による。これらの抗体は、V L が存在せず、そして V H の多くの部分も存在しないため、もはや抗原を認識しないはずである。C H 1 と会合するシャペロンタンパク質 (B I P など) が、B I P が L 鎖により置換されるまで、小胞体中に H 鎖を保持するため、H C A b は B 細胞から分泌されることができる。C H 1 ポリペプチドドメインの非存在下では、B I P は、もはや切断型 H 鎖を小胞体中に保持できず、そして L 鎖も結合できないため、結果として H 鎖が、ホモダイマーとして直ちに分泌される事になる。

#### 【0004】

同様な H C A b が、マウスモノクローナル細胞株において出現したことも報告された。

#### 【0005】

ラクダ科 (Camelidae) (ラクダ、ヒトコブラクダ及びラマ) の血清において、我々は、4 鎖イムノグロブリンの存在を発見し、更に大量の機能性 H C A b の存在を発見した。これらの機能性 H C A b は、ヨーロッパ特許出願第 0656946 号、並びに Hamers-Casterman ら (1993)、Vu ら (1997) 及び Muyldermans ら (2001) を含む種々の刊行物において報告されている。これらは幾つかの点で、病的段階の結果として存在するヒト/マウス H C A b とは別個のものである。第 1 に、そして最も重要なことに、これらは抗原結合において機能性である。この点で、ラクダ科において見いだされた機能性 H C A b は、機能性の正常イムノグロブリンである。第 2 に、欠失しているのは、常に C H 1 ドメイン全体であり、そして V ドメインは、無傷であるが、正常 V H 配列から幾つかの部位で逸脱している配列を有する。該機能性 H C A b は、ホモダイマー分子として存在する。

#### 【0006】

しかし C H 1 は、ヒトコブラクダ (及びラマ) における全 遺伝子の生殖細胞系においてコードされ、そしてヒンジエクソンの 5 末端との V エクソンの 3 末端のスプライシングにより、機能性 H C A b をコードする m R N A から除去される。即ち C H 1 は、イントロンの一部であり、コンセンサススプライシングシグナル配列の単一の点突然変異のため、もはやエクソンとして認識されない。ラマ及びヒトコブラクダは、同じ点突然変異を元の C H 1 エクソンに持っており、そしてこの知見は、ラマとラクダが相互に分岐する前にこれらの 遺伝子が出現したことを示している。全 m R N A が、このスキームによりスプライシングされるため、m R N A の異なるスプライシング活性は、複式スプライシングではない。よってこれらの 遺伝子は常に、その C H 1 が除去された H 鎖をもたらす。他の 遺伝子は、C H 1 ドメインを伴う共通の H 鎖を産生させるために使用される。

#### 【0007】

機能性 H C A b の H 鎖の V ドメイン (正常、即ち免疫学的に機能性の H C A b の H 鎖の可変 (Variable) ドメインに因んで、V H H と呼ぶ) は、もはや V L (又は C H 1) ドメインと接触していない領域において、及び抗原結合に関与している領域 (即ち、パラトープ) において、V H (即ち、従来の 4 鎖抗体の H 鎖の V ドメイン) に対する適応を獲得して

10

20

30

40

50

いると予想される。

【0008】

例えば、Vuら（1997）は、上記参考文献において、結晶学的データにより、従来の4鎖IgGでは保存Val37、Gly44、Leu45及びTrp47が、空間的に密集して、VLとの重要な疎水性接触を作っていることを明らかにした。彼らは、VHアミノ酸のGln39、Tyr91、Trp103及びGlu105もまたVL会合のために重要と認識されることを加えた。Vuら（1997）は更に、ラクダ科に存在し、そしてVLと相互作用する従来のIgGのVH側に対応する、VHHドメインの表面が、ラクダ科VHHでは大きく造り直されていることを観察した。本特許出願においてアミノ酸残基の番号付けは、<http://www.bioinf.org.uk/abs>で利用可能なカバットのデータベースにしたがって使用

10

【0009】

VLと相互作用することが知られている12個のVH位置に最も出現しやすいアミノ酸残基の頻度を、332個の脊椎動物VHセグメントに関して測定した。本出願の目的のために、可変重鎖ポリペプチドのタンパク質ドメインは「VH」と呼び、そして対応するDNAはVHと称されることに言及しておく。実際にはCDR3及びFR4は、元の遺伝子配列中のVHにはコードされないが、VHに組換えられるD及びJミニ遺伝子により提供される。

【0010】

比較のため、アミノ酸コンセンサスは、対応する位置の42個のヒトコブラクダ生殖細胞系VHH配列に関して計算した。4つの位置（39、43、60及び91、カバットの番号付け）の好ましいアミノ酸残基は、VHとVHHで不変である。対照的に、4つの他の部位（33、35、50及び58）ではVHでもVHH配列でも明白なアミノ酸選択性は示さない。後者のVH部位では、VLとの接触可能性は、VHとVLドメインとの間の実際の角度に依存しており、そしてこのことが、観察されるアミノ酸縮重を説明する。この領域におけるVHとVHHタンパク質の間の唯一の決定的に重大な差は、37、44、45及び47位に関わる。これらは、VH表現型の中で非常に保存されたアミノ酸残基（即ち、Val37、Gly44、Leu45及びTrp47）であるが、VHHでは、本発明者らは、Arg45（又はCys）、Glu44、Phe37（又はTyr）及びGly47（又はLeu）を最も頻繁に観察した。これらの比較は、L鎖の非存在に回答して生じる、前述のラクダVHH特異的「顕著な特徴（ホールマーク）」残基の同定を立証する。

20

30

【0011】

Nguyenら（2000）により発表された結果から、VHHとVH遺伝子が、ヒトコブラクダゲノムにインプリンティングされていることは明白である。VH及びVHH遺伝子は、おそらく同じ遺伝子座に存在する。VH及びVHH生殖細胞系遺伝子は、従来の4鎖抗体のH鎖と共に、同じD及びJ遺伝子を利用することが認められる。PCRにより、約50個のVHと約40個のVHH生殖細胞系遺伝子をヒトコブラクダにおいて同定した。各PCR断片は、リーダーシグナルエクソンと、CDR3が開始すべきところで終わるVエクソンを含む。CDR3及びFR4は、組換えD-Jセグメントにより提供される。VH生殖細胞系セグメントは、Val37、Gly44、Leu45及びTrp47のコドンを含み、そしてVHH生殖細胞系ミニ遺伝子は、Phe37（11x）、Tyr37（30x）又はただ1ケースのVal37；Glu44又はGln44（8x）；Arg45（37x）又はCys45（5x）及びGly47（6x）又はLeu47（24x）又はTrp47（8x）又はPhe47（3x）に対するコドンを有する。更に、これらのVHH生殖細胞系遺伝子は常に（1例を除いて）、45位又はCDR1領域（コドン30、32又は33）にCysコドンを含む。CDR2（16又は17アミノ酸のサイズ）の長さ及び特別のCYSの位置に基づいて、VHH生殖細胞系セグメントは、サブファミリーに分類した。幾つかのサブファミリーは、数個のメンバーを持つが、一方これら以外のものは、ゲノム中ではるかに稀である。しかし発現されるHCAbにおけるこのVHH生殖細胞

40

50

系遺伝子の出現の頻度は、ゲノムにおけるこれらの出現の頻度とは少しも関連しないことに注意する必要がある。45位又はCDR1周辺のCysは、再配列V-D-Jセグメントにおいて正常には維持されており、これらの再配列産物もまた、CDR3に特別のCysを獲得している。同様に、特別のCysをそのCDR3に生成させられなかったV-D-J再配列は、おそらく体細胞の過剰突然変異又はB細胞受容体エディティングによって、Cys45又はCDR1領域のCysを明らかに破壊する。B細胞受容体エディティングは、おそらく機能性でないか又は自己抗原を認識しており、存在するV-D-J組換え産物中に、上流の非再配列Vセグメントが組換えられる機序である。

#### 【0012】

ヒトコブラクダでは、VHHドメインもVHドメインのものよりも長いCDR3を有する（平均長17～18対9）。長いCDR3を生じるために、3つの可能性を考えることができる。VHHが2つ以上のDミニ遺伝子を使用してもよいが、これは2つのミニ遺伝子を異なる組換えシグナル配列（12～23スパーサー定規）と組換える必要性の観点から見込みがやすい。あるいは、D-J又はV-DJ組換えの間に活性の高い末端デオキシヌクレオチド転移酵素を幾つかの非鋳型コードヌクレオチドに加えてもよい。最後に、長さの差は単に、長いCDR3のVHHドメインの画分又は短いCDR3のVHドメインの画分が、抗原と相互作用するためにはるかに機能性になりやすい選択のためであるということは無視できない。後者の2つの説明の組合せもまた該当しよう。

#### 【0013】

37、44、45若しくは47位のVHHに顕著な特徴であるの存在又はVHHに顕著な特徴であるへのVHの置換が、可溶性単ドメイン抗体断片の形成をもたらすことは、繰り返し提議されている。これは、Arg45が本質的役割を演じると考えられる、正しく折り畳まれたイムノグロブリン構造を採る。他のに顕著な特徴であるアミノ酸37、47及び103の重要性は、これらのアミノ酸及び103の上流の3つのアミノ酸（後者はCDR3の一部であり、通常Jセグメントによりコードされる）が内部疎水性クラスターを形成するため、限定されている。VH-VL会合には、疎水性相互作用が介在するため、荷電した親水性のArgによる、大きな芳香族で疎水性のTrp残基の置換が、VL及び更にサロゲート軽鎖のそれとの会合を破壊することも明らかである。WO 92/01787は、37、39、45、47、91、93又は103位の1つ以上のアミノ酸残基が改変されており、それによって、103位のトリプトファンがグルタミン酸、チロシン又はトレオニンに変えられている、合成可変イムノグロブリン重鎖ドメインである、単鎖可変ドメインの特許請求している。しかしアルギニン、グリシン、プロリン、セリン又はリシンによる103位のトリプトファンだけの置換で、機能性重鎖抗体を得るのに十分であるということを示すものはなく、またこの突然変異が、荷電アミノ酸又は45位のシステインの非存在を埋め合わせることができるとも、該突然変異が、単ドメイン重鎖抗体断片の溶解度の上昇を引き起こすことも示していない。

#### 【0014】

驚くべきことに、本発明者らは、場合により108位の突然変異と組合せて、103位に突然変異を有する重鎖が、たとえ37、44、45及び47位のVHHに顕著な特徴であるアミノ酸を持たないとしても、機能性重鎖抗体（HCAb）として挙動することを見出した。詳細には、本発明者らは、103位（カバットの番号付け）に対応するアミノ酸残基を、アルギニン、グリシン、プロリン、セリン又はリシンから選択されるアミノ酸に突然変異させる突然変異が、45位の決定的に重要な顕著な特徴であるアミノ酸の消失（ここで、荷電アミノ酸又はシステインは、他の任意のアミノ酸（しかし好ましくはロイシン）に変えられている）を埋め合わせることができることを見出した。これまでに、この構造で見い出されたわずかな重鎖は、当業者には古典的な4鎖抗体複合体の一部と考えられた（Harmsenら、2000）。更に、この構造の幾つかの抗体について、軽鎖が記述されている（Ankerら、1990；Chukwuochaら、1999）。

#### 【0015】

驚くべきことに、本発明者らは、アルギニン、グリシン、プロリン、セリン又はリシンが

ら選択される103位のアミノ酸が、一方で軽鎖と相互作用する可能性を破壊するかもしれないが、重鎖の溶解度を上昇させることを証明できた。したがってこのような重鎖分子は、45位に機能性H C A bのに顕著な特徴であるアミノ酸がなくても重鎖抗体のように挙動する。

#### 【0016】

本発明は、カバットの番号付けによる、45位に荷電アミノ酸でもシステインでもないアミノ酸を含むことを特徴とし、かつ場合により108位のQと組合せて、103位にR、G、K、S及びPよりなる群から選択されるアミノ酸を含むことを特徴とする、機能性H C A bに関する。好ましくは、45位のアミノ酸はLである。更に好ましくは、103位のアミノ酸はRである。

10

#### 【0017】

好ましい実施態様において、本発明の機能性H C A bは、人工の突然変異体である。本明細書において使用されるとき、人工の突然変異体とは、変化が意図的に誘導され、かつ自然状態で見い出される配列とは異なることを意味する。該人工の突然変異体は、場合により108位（カバットの番号付け）に対応するアミノ酸残基が、グルタミンに突然変異している突然変異と組合せて、103位（カバットの番号付け）に対応するアミノ酸残基が、アルギニン、グリシン、プロリン、セリン又はリシンから選択されるアミノ酸に突然変異している、イムノグロブリンの重鎖ポリペプチドの可変ドメイン（V Hと称される）に由来してよい。好ましくは、該人工の突然変異体は、103位（カバットの番号付け）に対応するアミノ酸残基が、アルギニンに突然変異している、イムノグロブリンの重鎖ポリペプチドの可変ドメイン（V Hと称される）に由来する。更に好ましくは、該人工の突然変異体は、103位（カバットの番号付け）に対応するアミノ酸残基が、アルギニンに突然変異しており、かつ108位（カバットの番号付け）に対応するアミノ酸残基が、グルタミンに突然変異している、イムノグロブリンの重鎖ポリペプチドの可変ドメイン（V Hと称される）に由来する。あるいは、該人工の突然変異体は、場合により37、44及び47位の1つ以上の他のに顕著な特徴であるアミノ酸のV a l 37、G l y 44及びT r p 47への突然変異と組合せて、45位のに顕著な特徴であるアミノ酸残基が、ロイシンに突然変異している、重鎖抗体の重鎖ポリペプチドの可変ドメイン（V H Hと称される）に由来してもよい。好ましい実施態様は、37、44、45及び47位の全に顕著な特徴であるアミノ酸がV a l 37、G l y 44、L e u 45及びT r p 47に突然変異している、人工の突然変異体である。

20

30

#### 【0018】

本発明の好ましい人工の突然変異体は、V Hドメインに由来するポリペプチド配列を含むことを特徴とし、そしてこのポリペプチド内に配列R G Q G T Q（配列番号1）あるいは配列R G K G T Q（配列番号2）を包含する。

#### 【0019】

本発明の別の好ましい人工の突然変異体は、V H Hドメインに由来するポリペプチド配列を含むことを特徴とし、そしてこのポリペプチド内に配列V X X X X X X G L X W（配列番号3）（ここでXは、任意のアミノ酸であってよい）を包含する。

40

#### 【0020】

本発明の人工の突然変異体は、V Hドメイン、又はV H Hドメインに由来するが、このことは、本発明によりこの突然変異体が、該突然変異を導入することにより該ドメインから単離できること、あるいは該V Hドメイン又はV H Hドメインのポリペプチド配列及び突然変異を導入すべき位置の知識から出発して、化学合成を含めて合成できること、又は宿主細胞中を含めて特に組換え法により発現させられることを意味している。更に一般的には、この突然変異体は、ポリペプチド鎖の調製に利用可能な任意の方法により調製することができる。

#### 【0021】

V Hに由来し、かつ本明細書に上述のような特色を有するポリペプチド鎖は、好ましくは部位指定突然変異誘起法又はP C R（該突然変異を有するプライマーを使用）を伴う方法

50

により、従来のVH、特にライブラリーから得られるVHから出発して得られる。適切な方法は、Hemsleyら(1989)により報告されたものである。よって本発明は、VH生殖細胞系遺伝子から生じる、可溶性突然変異体の単ドメイン抗体断片を産生させる可能性を提供する。

#### 【0022】

あるいは、VHHに由来し、かつ本明細書に上述のような特色を有するポリペプチド鎖は、好ましくは部位指定突然変異誘起法又はPCR(該突然変異を有するプライマーを使用)を伴う方法により、HCAb VHH、特にライブラリーから得られるVHHから出発して得られる。この場合に、本発明は、VHH遺伝子から生じる単ドメイン抗体断片をヒト化する可能性を提供する。本明細書において使用されるとき、ヒト化とは、保存ヒト残基のVal37、Gly44、Leu45及びTrp47への37、44、45及び47位の1つ以上のに顕著な特徴であるアミノ酸の置換を意味する。

10

#### 【0023】

本発明は更に、従来の4鎖イムノグロブリンに由来する単ドメイン重鎖断片を可溶化するための方法に関する。実際、本発明者らは、103位の親水性アミノ酸残基、特にアルギニン、グリシン、プロリン、セリン又はリシンから選択される残基の存在が、VHに由来する生じるポリペプチド配列の溶解度を、103位にトリプトファン残基を有する同じポリペプチドに比べて改善させうることを証明している。この効果は、108位のアミノ酸をグルタミンにより置換することによって、更に強化されよう。

#### 【0024】

本発明の別の側面は、ラクダ科重鎖抗体を「ヒト化」するための方法であって、該方法は、場合により37、44及び47位の1つ以上の他のラクダ科に顕著な特徴であるアミノ酸の置換と組合せた、少なくとも45位のラクダ科に顕著な特徴であるアミノ酸の置換を含むことを特徴とする。本明細書において使用されるとき、ヒト化とは、HCAb中の1つ以上のラクダ科に顕著な特徴であるアミノ酸が、該重鎖抗体がその典型的な特徴を消失することなく、ヒトのコンセンサス配列において見い出されるようなヒトの対応部により置換されることを意味する(即ち、ヒト化は、生じるHCAb又はその断片の抗原結合能力に有害な影響を及ぼさない)。

20

#### 【0025】

本発明の別の側面は、本発明の方法により入手可能な、可溶性単ドメイン重鎖抗体断片である。本発明の更に別の側面は、本発明の方法により入手可能な、ヒト化単ドメイン重鎖抗体断片である。

30

#### 【0026】

本発明の別の側面は、本発明の1つ以上の単ドメイン重鎖抗体断片を含むことを特徴とするライブラリーである。

#### 【0027】

#### 【実施例】

実施例1: 単離VH1のラクダ化

標準どおりに組換えVHドメインをscFvライブラリーから単離した。このようなVHドメインは、クローニング人工産物(VH-VLの代わりにVHをクローニング)又はクローン内の遺伝子組換え(リンカー配列の不安定さのため)から生じるため、VL遺伝子断片が欠失する。これらの分子は、通常取扱いが難しい(低い発現収量、低い溶解度)。本発明者らは、Trp103をArgに変える突然変異を導入することにより、これらのVH分子が高度に発現され、高い溶解度を示すことを証明した。これは、元々DaviesとRiechmann(1994)により実施された、Val37Phe、Gly44Glu、Leu45Arg及びTrp47Gly又はその一部よりも、はるかに容易かつ直接的な突然変異である。更に、全VH配列で遂行しうるという利点も有する。

40

#### 【0028】

実施例2: scFv抗原結合性断片からの可溶性単ドメインの作成

最小サイズの抗原結合物質を考える場合に、存在するscFvから単ドメインを設計す

50

るのが有利であろう。VHは、このドメインのCDR3が原則として特異性を提供し、かつ親和性に対する最も大きな誘因であるため、特別な重要性を有する。単一ドメインは更に、その小さなサイズのために利点を有する。VHはそれら自体が抗原と十分に相互作用できることが繰り返し証明されたが、VHの粘着性及び不溶性は改善を必要とする。本発明は、これがTrp103Arg置換により改善できることを証明している。

【0029】

実施例3：Arg103Trp突然変異により引き起こされる溶解度の差

断片増幅PCR：

WT：TEM04：A4短 - 38 (=FWK4)

WT：CEA71：A4短 - 38 (=FWK4)

突然変異型：TEM04：A4短 - TEMVH：

【0030】

【表1】

GGA GAC GGT GAC CTG GGT CCC CTG GCC CCA TAC GAC

【0031】

突然変異型：CEA71：A4短 - CEAVH：

【0032】

【表2】

GGA GAC GGT GAC CTG GGT CCC CTG GCC CCA GGG GC

【0033】

pHEN6におけるクローニング及び突然変異の配列決定

断片及びベクターは、NcoI - BstEIで消化して、1%アガロースゲルに装填した。断片及びベクターは、ジェットソルブ (Jetsorb) によりゲルから精製した。ベクター及び断片は、WK6コンピテント細胞中に連結及び形質転換させて、100 µg/mlアンピシリン及び2%グルコースを含むLB寒天プレート上で平板培養した。R103からW103への突然変異を配列決定により確認した。

【0034】

TEM04

【表3】

CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTG CAG GCT GGA  
GGG TCT CTG AGG CTC CCA GGG AAG GGA CTC GAG TGG GTC ACA AGT ATT  
GCT ACG GAT GGG TCC ACG GAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC  
ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA TTA AAC  
AGC CTG AAC ACT GAA GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA AAA GAT CGT  
TGG GGG TAT GTC GTA **AGA** GGC CAG GGG ACC CAG GTC ACC GTC TCC TCA  
CGC GGC CGC CAC CAC CAT CAC CAT CAC

【0035】

AGA = 野生型

TGG = 突然変異型

【0036】

CEA71

【表4】

10

20

30

40



CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTG CAA CCT GGG  
 GGG TCT CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC  
 AGC TAC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG  
 TGG GTG TCC GGC ATT AAT ACC GAT GGA AGT TTC ACG CGC TAT GCC GAC  
 TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC ACG  
 CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AAA TCT GAG GAC ACG GCC CTG TAT  
 TAC TGT GCC GTA GGC GGC GGG TTA GGC TAT GGC CCC **AGG** GGC CAG  
 GGG ACC CTG GTC ACT GTC TCC TCA GCG GCC GCA CAC CAC CAT CAC CAT  
 CAC

10

【 0 0 3 7 】

A G G = 野生型

T G G = 突然変異型

【 0 0 3 8 】

野生型及び突然変異型の発現

各作成体について、100  $\mu$ g/mlアンピシリン及び2%グルコースを含むLB中で3つの  
 プレ培養を開始した。

【 0 0 3 9 】

各プレ培養について、37 で100  $\mu$ g/mlアンピシリンを含むTB中で330ml培養を  
 開始した。

20

【 0 0 4 0 】

培養は、OD600nm = 0.4で10mM IPTGで誘導して、28 で一晩増殖させた。  
 結果は、表1に要約した。

【 0 0 4 1 】

【 表 5 】

一晩培養液のOD600nm

	R (野生型)	W (突然変異型)
<b>cAb-TEM04</b>	0.770	1.085
	1.119	1.177
	1.251	1.112
<b>cAb-CEA71</b>	1.156	1.234
	1.622	1.523
	1.649	1.141

30

40

【 0 0 4 2 】

表1：突然変異型及び野生型のTEM04及びCEA71のWK6における発現に関する  
 一晩培養液のOD600nm。

【 0 0 4 3 】

全細胞のウェスタンブロット：OD600nm = 0.1で15% SDSゲル上に装填、ニ  
 トロセルロースにブロット、抗ヒスチジン結合体、及び抗マウスアルカリホスファターゼ  
 と基質：NBT / BCIPで検出（図1を参照のこと）。

【 0 0 4 4 】

結論：細胞は同様な密度まで増殖したが、TEM04突然変異型の発現はTEM04野生

50

型よりもはるかに低かった。

【 0 0 4 5 】

T E S 4 ml 及び T E S / 4 6 ml を含む全ての一晚培養液について、ペリプラズム抽出物を調製し、そして組換えタンパク質を N i - N T A で精製した。

【 0 0 4 6 】

【 表 6 】

一晚培養液のOD280nm

	R (野生型)	W (突然変異型)
<b>cAb-TEM04</b>	3.05	0.218
	0.717	0.114
	1.24	0.235
<b>cAb-CEA71</b>	0.43	2.05
	1.7	1.26
	1.46	1.87

10

20

【 0 0 4 7 】

表 2 : 突然変異型及び野生型 T E M 0 4 及び C E A 7 1 に関する、精製タンパク質の O D 2 8 0 nm

【 0 0 4 8 】

【 表 7 】

平均	R (野生型)	W (突然変異型)
<b>cAb-TEM04</b>	1.67	0.189
<b>cAb-CEA71</b>	1.21	1.72

30

【 0 0 4 9 】

表 3 : 突然変異型及び野生型 T E M 0 4 及び C E A 7 1 に関する、精製タンパク質の平均 O D 2 8 0 nm

【 0 0 5 0 】

結論 : T E M 0 4 突然変異型の発現が T E M 野生型よりもはるかに低いことを確認した。

【 0 0 5 1 】

吸光係数 : c A b - T E M 0 4 E = R : 2 . 1 6 8 W : 2 . 5 8 2  
c A b - C E A 7 1 E = R : 1 . 4 4 4 W : 1 . 8 6 5

40

【 0 0 5 2 】

【 表 8 】

濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ):

	R (野生型)	W (突然変異型)
<b>cAb-TEM04</b>	1407 331 572	84 56 91
<b>cAb-CEA71</b>	319 1177 1011	1099 676 1003

10

【 0 0 5 3 】

表 4 : 突然変異型及び野生型 T E M 0 4 及び C E A 7 1 に関する、精製タンパク質の濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )

【 0 0 5 4 】

【 表 9 】

20

平均	R (野生型)	W (突然変異型)
<b>cAb-TEM04</b>	770	73
<b>cAb-CEA71</b>	838	922

【 0 0 5 5 】

表 5 : 突然変異型及び野生型 T E M 0 4 及び C E A 7 1 に関する、精製タンパク質の平均濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )

【 0 0 5 6 】

30

突然変異型及び野生型 C E A 7 1 の C E A 結合性に関する E L I S A

マイクロタイタープレートに  $1\mu\text{g/ml}$  C E A でコーティングして、P B S 中の 1 % カゼインで一晩ブロックした。

【 0 0 5 7 】

全 N i - N T A 精製試料を  $10000\text{ng/ml}$  から  $4.37\text{ng/ml}$  に希釈して、室温 ( R T ) で 2 時間結合させた。結合は、抗ヒスチジン結合体で R T で 1 時間、続いて抗マウスアルカリホスファターゼで R T で 1 時間、そして基質: P N P P ( p - ニトロフェニル - ホスファート ) により検出した。O D 4 0 5 を測定した ( 表 ) 。

【 0 0 5 8 】

【 表 1 0 】

40

濃度 (ng/ml)	WT1	WT2	WT3	突然変異型 1	突然変異型 2	突然変異型 3
<b>10.000</b>	0.543	0.542	0.498	0.441	0.456	0.446
<b>3.333</b>	0.466	0.449	0.470	0.429	0.410	0.449
<b>1.111</b>	0.474	0.462	0.465	0.403	0.371	0.419
<b>370</b>	0.460	0.454	0.457	0.385	0.265	0.366
<b>123</b>	0.411	0.409	0.393	0.250	0.149	0.250
<b>41</b>	0.310	0.371	0.294	0.189	0.110	0.149
<b>13.7</b>	0.211	0.238	0.206	0.131	0.093	0.118
<b>4.57</b>	0.126	0.139	0.130	0.111	0.090	0.106

10

## 【 0 0 5 9 】

表 6 : C E A 7 1 野生型 ( W T ) の 3 つの発現及び C E A 7 1 突然変異型の 3 つの発現に関する E L I S A : O D 4 0 5 n m

## 【 0 0 6 0 】

結論 : C E A 野生型は、突然変異型よりも 1 0 × 低い濃度のコーティング C E A でも結合した。これは、突然変異型タンパク質の 9 0 % が正しく折り畳まれていないか、又は 9 0 % が不活性であることを意味した。 20

## 【 0 0 6 1 】

溶解度

我々は、硫酸アンモニウムストック溶液を調製して、R T で 2 時間平衡化した。この溶液を 4 , 3 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離して、上清 ( = 1 0 0 % 硫酸アンモニウム ) を使用して 0 ~ 8 0 % の希釈液を調製した。試料 6 0 μ l を硫酸アンモニウム溶液 3 0 0 μ l と混合して、4 で 1 8 時間インキュベートした。この混合物を 1 3 , 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離した。上清 3 0 0 μ l を使用して、E L I S A において検出 ( 上述のとおり ) して、O D 2 8 0 n m を測定した。 30

## 【 0 0 6 2 】

## 【 表 1 1 】

硫酸 アンモニウム%	CEA71 WT OD280	CEA71 突然変異型 OD280	CEA71 WT OD405, ELISA	CEA71突然変異型 OD405, ELISA
0	0.183	0.318	0.144	0.214
5	0.199	0.330	0.185	0.247
10		0.349	0.167	0.250
15	0.228	0.345	0.173	0.249
20	0.217	0.344	0.135	0.280
25	0.206	0.348	0.158	0.369
30	0.202	0.334	0.150	0.348
35	0.213	0.349	0.130	0.369
40	0.209	0.338	0.095	0.340
45	0.218	0.342	0.122	0.320
50	0.213	0.313	0.137	0.321
55	0.198	0.278	0.133	0.346
60	0.188	0.142	0.181	0.183
65	0.114	0.06	0.153	0.115
70	0.080	0.028	0.094	0.092
75	0.053	0.044	0.058	0.041
80	0.009	0.008	0.034	0.047
100	-0.006	-0.036	0.035	0.034

10

20

30

【 0 0 6 3 】

表 7 : 硫酸アンモニウム沈殿後のOD 280 nm又はOD 405 nm ( E L I S A から )

【 0 0 6 4 】

【 表 1 2 】

硫酸 アンモニウム%	CEA71 WT OD280 %	CEA71突然変異型 OD280 %	CEA71 WT OD405 %	CEA71突然変異型 OD405 %
45	104	101		
50	102	93	98	111
55	95	82	98	111
60	90	42	133	58
65	55	18	113	37
70	38	8	69	29
75	25		43	13
80	4		25	15

40

50

【 0 0 6 5 】

表 8 : 硫酸アンモニウム沈殿後の O D 2 8 0 nm又は O D 4 0 5 nm ( E L I S A から ) の %  
( 平均最大値から )

【 0 0 6 6 】

【 表 1 3 】

## 参考文献

- Anker, R., Zavala, F and Pollok, B.A. (1990). Eur J Immunol 20: 2757-2761.
- Chukwuocha R., Hsiao, E.T., Shaw, P., Witztum, J.L. and Chen P.P. (1999). J Immunol 163: 4604-4611.
- Daires, J. and Riechmann, L. (1994). FEBS Lett. 339, 285 – 299.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa E.B., Bendaham, N. and Hamers, R. (1993). Nature, 363: 446-448.
- Harmsen, M.M., Ruuls, R.C., Nijman, I.J., Niewold, T.A., Frenken, L.G.J. and de Geus, B. (2000). Mol Immunol, 37, 579-590.
- Muyldermans, S., Cambillau, C. and Wyns, L. (2001). Trends Biochem Sci, 26: 230-235.
- Nguyen, V.K., Hamers, R., Wyns, L. and Muyldermans, S. (2000). Embo J 19: 921-930.
- Vu, K.B., Ghahroudi, M.A., Wyns, L. and Muyldermans, S. (1997). Mol Immunol, 34, 1121-1131.

10

20

## 【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 ( a ) 野生型及び突然変異型 T E M 0 4 に関する、全細胞の O D 6 0 0 nm = 0 . 1 のウェスタンブロット ; ( b ) 野生型及び突然変異型 C E A 7 1 に関する、全細胞の O D 6 0 0 nm = 0 . 1 のウェスタンブロット。

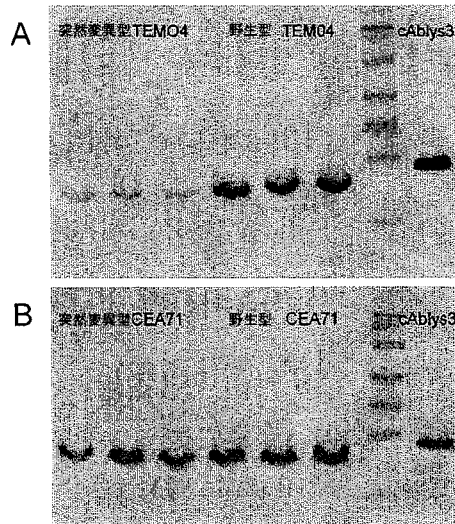
30

【 図 2 】 プールした精製タンパク質の 1 5 % S D S ゲル ( T E M レーンの余分なバンドは、共精製した - ラクタマーゼである ; その基質との反応により確認 )

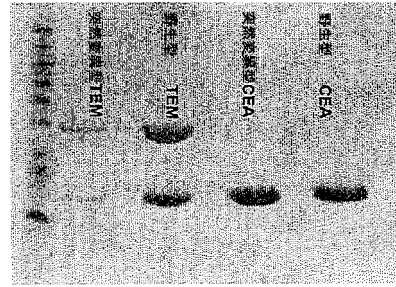
【 図 3 】 ( a ) C E A 7 1 の野生型 ( W T ) 及び突然変異型の 3 つの発現に関する O D 4 0 5 nm ; ( b ) C E A 7 1 の野生型 ( W T ) 及び突然変異型の発現に関する平均 O D 4 0 5 nm。

【 図 4 】 硫酸アンモニウム沈殿法により測定される溶解度。

【 図 1 】

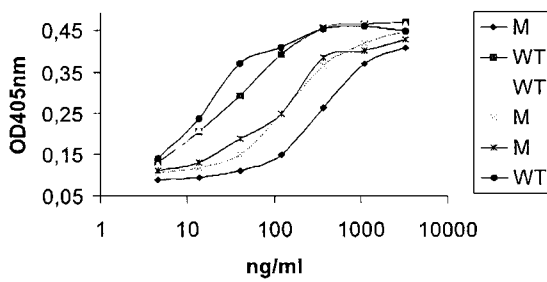


【 図 2 】

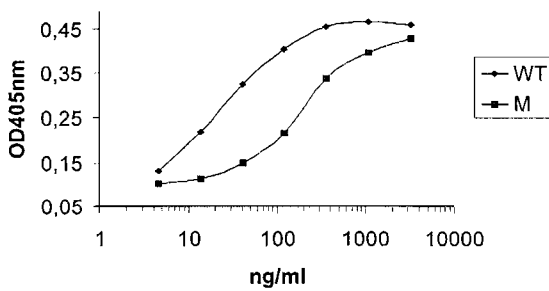


【 図 3 】

**A** 突然変異型(M)及び野生型(WT)CEA71のCEA結合性

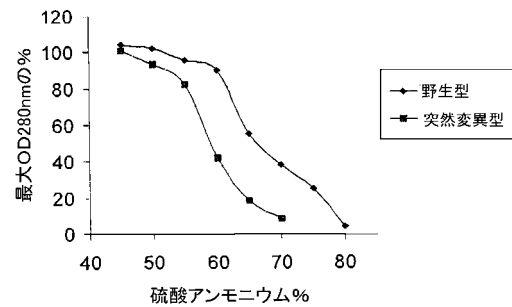


**B** 突然変異型(M)及び野生型(WT)CEA71の  
CEA結合性: 平均

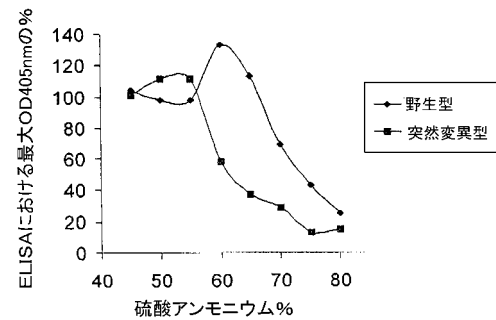


【 図 4 】

**A** 溶解度: 硫酸アンモニウム沈殿



**B** 溶解度: 硫酸アンモニウム沈殿



---

フロントページの続き

(72)発明者 セルヘ・マイルデルマンス

ベルギー国、ペー - 1 5 6 0 ホエイラールト、クレイン・ヒュールハートストラート 3

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA43 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA02 EA04

GA11

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 FA72 FA74