

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7291700号
(P7291700)

(45)発行日 令和5年6月15日(2023.6.15)

(24)登録日 令和5年6月7日(2023.6.7)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 4 0 B 40/06 (2006.01)	C 4 0 B 40/06	Z N A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
請求項の数 74 (全31頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2020-527909(P2020-527909)	(73)特許権者	515258402 ナントバイオ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 2 3 2、カルバー シティ、ジェファ ーソン プールバード 9 9 2 0
(86)(22)出願日	平成30年11月16日(2018.11.16)	(74)代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
(65)公表番号	特表2021-503292(P2021-503292 A)	(74)代理人	100120031 弁理士 宮嶋 学
(43)公表日	令和3年2月12日(2021.2.12)	(74)代理人	100120617 弁理士 浅野 真理
(86)国際出願番号	PCT/US2018/061592	(74)代理人	100126099 弁理士 反町 洋
(87)国際公開番号	WO2019/099882	(72)発明者	オルソン, アンダース アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 最終頁に続く
(87)国際公開日	令和1年5月23日(2019.5.23)		
審査請求日	令和3年5月24日(2021.5.24)		
(31)優先権主張番号	62/588,914		
(32)優先日	平成29年11月20日(2017.11.20)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54)【発明の名称】 mRNAディスプレイ抗体ライブラリー及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数の s c F v をコードする高多様性 mRNA ライブラリーを作製する方法であって、
(1) V_H-CDR1/2 サブライブラリー、(2) 複数の V_H-CDR3 サブライブラリー、及び(3) V_L サブライブラリーを作製又は提供する工程であって、前記サブライブラリー(1)~(3)の各々が複数のメンバーを含み、

前記サブライブラリーの各メンバーが、複数の縮重塩基位置を有する少なくとも1つのランダムカセットを含む工程であって、前記ランダムカセットが、配列番号1~配列番号25から選択される配列からなるオリゴヌクレオチドを使用して作製される工程；及び前記 V_H-CDR1/2 サブライブラリー、前記複数の V_H-CDR3 サブライブラリー、及び前記 V_L サブライブラリーの少なくとも2つのメンバーの少なくとも一部を組み換えて、発現ライブラリー中の発現ライブラリーメンバーを形成する工程であって、前記発現ライブラリーが、複数の発現ライブラリーメンバーを含み、各発現ライブラリーメンバーが、別個の s c F v をコードする工程を含み、且つ、

前記 mRNA ライブラリーが、シングルパス又はツーパスの濃縮において、100 nM 以下の K_d を有する、任意の抗原に対する少なくとも1つの s c F v バインダーの単離を可能にする、方法。

【請求項2】

前記 V_H-CDR1/2 サブライブラリーの複数のメンバーが、V_H CDR1の一部及び V_H CDR2の一部のうち少なくとも1つに相当するランダムカセットを含む、請

求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 V_H-CDR 1 / 2 サプライブラリーの複数のメンバーが、V_H CDR 1 の少なくとも一部及び V_H CDR 2 の一部に相当する複数のランダムカセットを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 V_H-CDR 1 / 2 サプライブラリーの複数のメンバーが、V_H CDR 2 の少なくとも一部に相当する複数のランダムカセットを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 V_H-CDR 3 サプライブラリーの複数のメンバーが、V_H CDR 3 の少なくとも一部に相当するランダムカセットを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記 V_H-CDR 3 サプライブラリーのメンバーの少なくとも 2 つのランダムカセットが、異なる長さを有するペプチドをコードする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ペプチドが、10 ~ 20 個のアミノ酸の範囲の長さを有する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 V_L サプライブラリーの複数のメンバーが、V_L CDR 3 の一部でランダムカセットを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記サプライブラリーの複数のメンバーが、共通の配列を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記発現ライブラリーメンバーの各々が、複数の前記ランダムカセットを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

組み換える工程が、前記 V_H-CDR 1 / 2 サプライブラリーのメンバーの少なくとも一部及び前記複数の V_H-CDR 3 サプライブラリーの 1 つを単離し、合わせて融合して、V_H ドメインライブラリーにおける V_H ドメインライブラリーメンバーを形成する工程を含み、前記 V_H ドメインライブラリーが、複数の V_H ドメインライブラリーメンバーを含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記 V_L サプライブラリーのメンバーの少なくとも一部を単離し、前記 V_L サプライブラリーのメンバーの一部を前記 V_H ドメインライブラリーメンバーの 1 つと融合して、前記発現ライブラリーメンバーを形成する工程をさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 V_L サプライブラリーのメンバーの一部が、リンカーをコードする配列を介して結合される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記リンカーが、グリシンリッチペプチドである、請求項 13 に記載の方法。

40

【請求項 15】

組み換える工程が、前記 V_H-CDR 1 / 2 サプライブラリーのメンバーの少なくとも一部及び前記複数の V_H-CDR 3 サプライブラリーの 1 つを単離し、合わせて融合して、発現ライブラリーメンバーの第 1 の群を形成する工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

発現ライブラリーメンバーの第 2 の群であって、前記第 2 の群が、前記 V_L サプライブラリーのメンバーの少なくとも一部を含む前記第 2 の群をさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

50

前記発現ライブラリーメンバーをサブクロニングして、前記 s c F v を有する I g G 1 を構築する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記第 1 の群及び第 2 の群の各々からそれぞれ 1 つのメンバーをサブクロニングして、組換え V_H 及び V_L ドメインを有する I g G 1 を形成する工程をさらに含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

以下：リガンドに対する親和性、pH 感受性、及び種間交差反応性のうちの少なくとも 1 つに基づいて前記発現ライブラリーメンバーのサブセットを選択する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 20】

50 nM 未満の K_d で前記リガンドに結合する s c F v をコードする前記発現ライブラリーメンバーのサブセットを選択する工程をさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記発現ライブラリーメンバーを mRNA 断片に転写する工程；及び前記 mRNA 断片の 3' 末端でピューロマイシン分子を結合する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

(1) V_H-CDR1/2 サブライブラリー、(2) 複数の V_H-CDR3 サブライブラリー、及び(3) V_L サブライブラリーを含む複数の mRNA ライブラリーを有する組成物であって；

20

前記サブライブラリー(1)~(3)の各々が、複数のメンバーを含み；

前記サブライブラリーの各メンバーが、複数の縮重塩基位置を有する少なくとも 1 つのランダムカセットを含み、且つ

前記ランダムカセットが、配列番号 1 ~ 配列番号 25 から選択される配列からなるオリゴヌクレオチドを使用して作製される、組成物。

【請求項 23】

フレキシブルペプチドリンカーをコードする核酸配列をさらに含む、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

30

前記サブライブラリー(1)~(3)の少なくとも 1 つが、フレキシブルペプチドリンカーをコードする核酸配列を含む、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 25】

第 1 の前記複数の V_H-CDR3 サブライブラリーが、第 2 の前記複数の V_H-CDR3 サブライブラリーとは異なる長さを有する、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記複数の縮重塩基位置が、少なくとも 2 つの縮重塩基位置である、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記 V_H-CDR1/2 サブライブラリーの複数のメンバーが、V_H-CDR1 の一部及び V_H-CDR2 の一部のうち少なくとも 1 つに相当するランダムカセットを含む、請求項 22 に記載の組成物。

40

【請求項 28】

前記 V_H-CDR1/2 サブライブラリーの複数のメンバーが、V_H-CDR1 の少なくとも一部及び V_H-CDR2 の一部に相当する複数のランダムカセットを含む、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 29】

前記 V_H-CDR1/2 サブライブラリーの複数のメンバーが、V_H-CDR2 の少なくとも一部に相当する複数のランダムカセットを含む、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 30】

50

前記 V_H-CDR3 サプライブラリーの複数のメンバーが、V_H-CDR3 の少なくとも一部に相当するランダムカセットを含む、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

前記 V_L サプライブラリーの複数のメンバーが、V_L-CDR3 の一部でランダムカセットを含む、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

前記 V_H-CDR3 サプライブラリーのメンバーの少なくとも 2 つのランダムカセットが、異なる長さを有するペプチドをコードする、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記ペプチドが、10 ~ 20 個のアミノ酸の範囲の長さを有する、請求項 3 2 に記載の組成物。

10

【請求項 3 4】

前記サプライブラリーの複数のメンバーが、コンセンサス配列を含む、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

複数の V_H ドメインライブラリーメンバーを有する V_H ドメインをさらに含み、前記 V_H ドメインライブラリーメンバーの各々が、前記 V_H-CDR1/2 サプライブラリーのメンバーの少なくとも一部及び前記 V_H-CDR3 サプライブラリーの 1 つのメンバーの少なくとも一部を含む、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

高多様性 mRNA ライブラリーを作製するための請求項 2 2 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

20

【請求項 3 7】

各ライブラリーメンバーが、それぞれ複数の縮重塩基位置を有する複数のランダムカセットを含む組換え mRNA を含み、前記ランダムカセットが、配列番号 1 ~ 配列番号 2 5 から選択される配列からなるオリゴヌクレオチドを使用して作製され；

前記複数のランダムカセットが、以下：(1) V_H-CDR1/2 サプライブラリー、(2) 複数の V_H-CDR3 サプライブラリー、及び(3) V_L サプライブラリーからの 2 つのライブラリーのいずれかから少なくとも 2 つのメンバーに由来し；且つ

前記サプライブラリーの各々が、複数のメンバーを含む、複数のライブラリーメンバーを有する高多様性 mRNA ライブラリー組成物。

30

【請求項 3 8】

前記 V_H-CDR1/2 サプライブラリーの複数のメンバーが、V_H-CDR1 の一部及び V_H-CDR2 の一部のうち少なくとも 1 つに相当するランダムカセットを含む、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記 V_H-CDR1/2 サプライブラリーの複数のメンバーが、V_H-CDR2 の少なくとも一部に相当する複数のランダムカセットを含む、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記 V_H-CDR1/2 サプライブラリーの複数のメンバーが、V_H-CDR2 の少なくとも一部に相当する複数のランダムカセットを含む、請求項 3 7 に記載の組成物。

40

【請求項 4 1】

前記 V_H-CDR3 サプライブラリーの複数のメンバーが、V_H-CDR3 の少なくとも一部に相当するランダムカセットを含む、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 2】

前記 V_L サプライブラリーの複数のメンバーが、V_L-CDR3 の一部でランダムカセットを含む、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記 V_H-CDR3 サプライブラリーのメンバーの少なくとも 2 つのランダムカセット

50

が、異なる長さを有するペプチドをコードする、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 44】

前記ペプチドが、10～20個のアミノ酸の範囲の長さを有する、請求項 43 に記載の組成物。

【請求項 45】

前記サブライブラリーの複数のメンバーが、コンセンサス配列を含む、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 46】

前記複数のライブラリーメンバーが、前記複数のランダムカセットの2つの間にリンカーを含む、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 47】

各ライブラリーメンバーが、別個の抗体又は抗体断片をコードする、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 48】

前記複数のライブラリーメンバーが、以下：リガンドに対する親和性、pH感受性、及び種間交差反応性のうちの少なくとも1つに基づいて分類される、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 49】

前記ライブラリーメンバーのサブセットが、50 nM未満のKdで前記リガンドに結合するscFvをコードする、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 50】

前記ライブラリーメンバーが、mRNA断片であり、各々が3'末端でピューロマイシンと結合される、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 51】

癌ネオエピトープに対する治療用組換え抗体を作製するための請求項 37～50のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 52】

(1) V_H-CDR1/2サブライブラリー、(2)複数のV_H-CDR3サブライブラリー、及び(3)V_Lサブライブラリーを作製又は提供する工程であって、前記サブライブラリー(1)～(3)の各々が複数のメンバーを含み；

前記サブライブラリーの各メンバーが、複数の縮重塩基位置を有する少なくとも1つのランダムカセットを含む工程；

前記V_H-CDR1/2サブライブラリー、前記複数のV_H-CDR3サブライブラリー、及び前記V_Lサブライブラリーの少なくとも2つのメンバーの少なくとも一部を組換え、発現ライブラリー中の発現ライブラリーメンバーを形成する工程であって、前記発現ライブラリーが、複数の発現ライブラリーメンバーを含み、各発現ライブラリーメンバーが、別個のscFvをコードする工程；及び

前記発現ライブラリーメンバーを用いて前記組換えscFvの作製する工程を含み、且つ

前記ランダムカセットが、配列番号1～配列番号25から選択される配列からなるオリゴヌクレオチドを使用して作製される、組換えscFvを作製する方法であり、且つ、

前記複数のscFvが、シングルパス又はツーパスの濃縮において、100 nM以下のKdを有する、任意の抗原に対する少なくとも1つのscFvバインダーの単離を可能にする、方法。

【請求項 53】

前記組換えscFv又はその断片が、前記発現ライブラリーメンバーを抗体ベクターにサブクロニングすることによって作製される、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記抗体ベクターが、
(b) ヒトIgG1定常ドメイン；

10

20

30

40

50

- (c) ヒト IgG2 定常ドメイン；
- (d) ヒト IgG3 定常ドメイン；
- (e) ヒト IgG4 定常ドメイン；及び
- (f) ヒト IgA 定常ドメイン

からなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記 V_H-CDR1/2 サブライブラリーの複数のメンバーが、V_H CDR1 の一部及び V_H CDR2 の一部のうちの少なくとも 1 つに相当するランダムカセットを含む、請求項 5 2 に記載の方法。

10

【請求項 5 6】

前記 V_H-CDR1/2 サブライブラリーの複数のメンバーが、V_H CDR1 の少なくとも一部及び V_H CDR2 の一部に相当する複数のランダムカセットを含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記 V_H-CDR1/2 サブライブラリーの複数のメンバーが、V_H CDR2 の少なくとも一部に相当する複数のランダムカセットを含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記 V_H-CDR3 サブライブラリーの複数のメンバーが、V_H CDR3 の少なくとも一部に相当するランダムカセットを含む、請求項 5 2 に記載の方法。

20

【請求項 5 9】

前記 V_L サブライブラリーの複数のメンバーが、V_L CDR3 の一部でランダムカセットを含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記 V_H-CDR3 サブライブラリーのメンバーの少なくとも 2 つのランダムカセットが、異なる長さを有するペプチドをコードする、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記ペプチドが、10 ~ 20 個のアミノ酸の範囲の長さを有する、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記サブライブラリーの複数のメンバーが、コンセンサス配列を含む、請求項 5 2 に記載の方法。

30

【請求項 6 3】

前記発現ライブラリーメンバーの各々が、複数の前記ランダムカセットを含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

組み換える工程が、前記 V_H-CDR1/2 サブライブラリーのメンバーの少なくとも一部及び前記複数の V_H-CDR3 サブライブラリーの 1 つを単離し、合わせて融合して、V_Hドメインライブラリーにおける V_Hドメインライブラリーメンバーを形成する工程を含み、前記 V_Hドメインライブラリーが、複数の V_Hドメインライブラリーメンバーを含む、請求項 5 2 に記載の方法。

40

【請求項 6 5】

前記 V_L サブライブラリーのメンバーの少なくとも一部を単離し、前記 V_L サブライブラリーのメンバーの一部を前記 V_Hドメインライブラリーの 1 つと融合して、前記発現ライブラリーメンバーを形成する工程をさらに含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記 V_L サブライブラリーのメンバーの一部が、リンカーと結合される、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記リンカーが、グリシンリッチペプチドである、請求項 6 6 に記載の方法。

50

【請求項 68】

組み換える工程が、前記 $V_H - CDR 1 / 2$ サプライブラリーのメンバーの少なくとも一部及び前記複数の $V_H - CDR 3$ サプライブラリーの 1 つを単離し、合わせて融合して、発現ライブラリーメンバーの第 1 の群を形成する工程を含む、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 69】

発現ライブラリーメンバーの第 2 の群であって、前記第 2 の群が、前記 V_L サプライブラリーのメンバーの少なくとも一部を含む前記第 2 の群をさらに含む、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 70】

前記第 1 の群及び第 2 の群の各々からそれぞれ 1 つのメンバーをサブクローニングして、組換え V_H 及び V_L ドメインを有する $IgG 1$ を形成する工程をさらに含む、請求項 69 に記載の方法。

10

【請求項 71】

以下：リガンドに対する親和性、pH感受性、及び種間交差反応性のうちの少なくとも 1 つに基づいて前記発現ライブラリーメンバーのサブセットを選択する工程をさらに含む、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 72】

50 nM 未満の K_d で前記リガンドに結合する $s c F v$ をコードする前記発現ライブラリーメンバーのサブセットを選択する工程をさらに含む、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 73】

抗原に対して 100 nM 以下の親和性を有する高親和性バインダーを単離する方法であって、請求項 1 ~ 21 又は請求項 52 ~ 72 のいずれか一項に記載の方法によって構築された組成物に前記抗原を接触させる工程を含む、方法。

20

【請求項 74】

配列番号 1 ~ 配列番号 25 から選択される核酸配列を有する合成 mRNA 混合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2017年11月20日に出願された本出願人の同時係属の米国仮特許出願第 62 / 588 , 914 号に対する優先権を主張する。

30

【0002】

本発明の分野は、特に、mRNA ディスプレイライブラリー及び組換え高親和性バインダーを作製するための mRNA ディスプレイライブラリーの使用に関するため、極めて高い多様性の抗体ライブラリーのための組成物及び方法である。

【背景技術】

【0003】

背景の説明には、本発明の理解に有用であり得る情報が含まれる。本明細書で提供される情報がいずれも本明細書で請求される発明の先行技術であるか又はこれに関連するものであること、或いは具体的又は暗示的に参照される任意の刊行物が先行技術であることを認めるものではない。

40

【0004】

本明細書における刊行物及び特許出願はいずれも、各々の個々の刊行物又は特許出願が具体的且つ個別に参照によって組み込まれることが示された場合と同程度に、参照によって組み込まれる。組み込まれる参考文献における用語の定義及び使用が、本明細書で提供される用語の定義と一致しないか、これに反する場合、本明細書で提供されるその用語の定義が適用され、参考文献中でのその用語の定義は適用されない。

【0005】

高親和性、特異的抗体又は結合分子により腫瘍抗原又はネオエピトープを標的化することが、癌患者を治療するための効果的な方法であると証明されている。ますます多くの患

50

者特異的且つ／若しくは癌特異的腫瘍抗原及び／又はネオエピトープが、オミクスデータ解析を介してインピボ、インピトロ、又はインシリコで同定されるにつれて、安定であり、可溶性であり、機能的であり、且つ適応可能である抗体又はバインダーを高い確率で選択できる抗体ライブラリー又はディスプレイライブラリーを作製することの要求が高まってきた。高親和性の特異的抗体又は結合分子は、天然の抗体プールの中で同定され得るか、又は天然の抗体プールに由来し得るが、そのような同定又は由来の天然抗体又はバインダーは、そのような抗原又はネオエピトープへの曝露の頻度又は強度に依存して、そのような天然抗体の多様性が制限される可能性があるため、効果的又は特異的ではない場合がある。

【0006】

このような問題を解決するための1つのアプローチとして、組換えファージディスプレイライブラリーが使用され得る。このようなアプローチは、適度に高い多様性を有するライブラリーの作製を可能にするが、多くの場合、バインダーのために何度も濃縮を行う必要があり、手間と時間がかかる。さらに、比較的大きな多様性を有するにもかかわらず、バインダーは理想的な親和性と安定性を欠く傾向がある。さらに、多様性は通常、ライブラリー量、トランスフェクション効率などの実用的な考慮事項によって制限される。そのようなアプローチ及び他のアプローチはさらに、例えば、国際公開第2006/072773号パンフレットに記載されるように複数の人工的な選択圧力を使用して最適化され得る。このような方法は、安定性の特徴を向上させる場合があるが、著しい量のライブラリー操作と時間が必要とされる。

【0007】

さらに別のアプローチにおいて、mRNAディスプレイが実施され得る。ここで、候補結合分子(典型的にはscFv)をコードするmRNA配列は、それらの3'末端でピュロマイシン分子と結合し、mRNA配列によってコードされるペプチドは、インピトロ翻訳を介して生成され、mRNAをmRNAによってコードされるタンパク質に直接結合した融合産物を生成する。しかしながら、現在のmRNAディスプレイ技術は、トランスフェクション制限に関連する問題を有利に回避し、少なくとも概念的にはより高い多様性を可能にするが、構造的完全性又は安定性、比較的低い親和性、及び／又は交差反応性の問題は依然として残っている。mRNAディスプレイからのscFvの少なくとも選択された結合特性をさらに改善するために、VH-CDR3スペクトラタイピング分析が実施された(Protein Engineering, Design & Selection, 2015, vol. 28 no. 10, pp. 427-435を参照のこと)。しかしながら、このようなプロセスは反復分析を必要とし、全ての抗原に対して生産的ではない場合がある。

【0008】

したがって、mRNAディスプレイ及び他の方法を使用して候補バインダーを作製し且つ同定する方法は知られているが、高い構造的完全性／安定性、低い親和性、及び／又は低い交差反応性を有するバインダーによる高い多様性のライブラリーは、実現しないままであった。したがって、安定な組換え高親和性バインダーを迅速に作製するためのmRNAディスプレイライブラリーの改善された組成物、方法、及び使用の必要性が依然として存在する。

【発明の概要】

【0009】

本発明の主題は、様々な生体分子、特に、癌抗原又はネオエピトープに対する安定で可溶性の機能的な抗体又はバインダーの信頼性があり且つ効率的な同定を可能にする複数の抗体又は抗体断片をコードする高多様性核酸ライブラリーの様々な組成物、方法、及び使用を対象とする。したがって、主題の一態様は、複数の抗体又は抗体断片をコードする高多様性核酸ライブラリーを作製する方法を含む。この方法では、各々が複数のメンバーを有する3つのサブライブラリー：(1) VH-CDR1/2サブライブラリー、(2)複数のVH-CDR3サブライブラリー、及び(3) VLサブライブラリーが作製されるか

10

20

30

40

50

又は提供される。3つのサブライブラリーの各メンバーは、複数の縮重塩基位置を有する少なくとも1つのランダムカセットを含む。3つのライブラリーの少なくとも2つのメンバーの少なくとも一部が組み換えられて、発現ライブラリー中の発現ライブラリーメンバーを形成し、これは、複数の発現ライブラリーメンバーを有する。別々の抗体又は抗体断片をコードする各発現ライブラリーメンバー。好ましい実施形態では、発現ライブラリーメンバーは、mRNA断片に転写され、続いてこれは3'末端でピューロマイシン分子と結合される。

【0010】

本発明の主題の別の態様では、本発明者らは、複数の核酸ライブラリーを有する組成物を企図する。複数の核酸ライブラリーは、(1) V_H -CDR1/2サブライブラリー、(2) 複数の V_H -CDR3サブライブラリー、及び(3) V_L サブライブラリーを含む。サブライブラリー(1)~(3)の各々は、複数のメンバーを含み、サブライブラリーの各メンバーは、複数の縮重塩基位置を有する少なくとも1つのランダムカセットを含む。

10

【0011】

本発明の主題のさらに別の態様では、本発明者らは、高多様性の核酸ライブラリーを作製するための上の組成物の使用を企図する。

【0012】

本発明の主題のさらに別の態様では、本発明者らは、複数の核酸ライブラリーメンバーを有する高多様性核酸ライブラリー組成物を企図する。高多様性核酸ライブラリーメンバーは、それぞれ複数の縮重塩基位置を有する複数のランダムカセットを含む組換え核酸を含む。複数のランダムカセットは、以下：(1) V_H -CDR1/2サブライブラリー、(2) 複数の V_H -CDR3サブライブラリー、及び(3) V_L サブライブラリーからの2つのライブラリーのいずれかからの少なくとも2つのメンバーに由来する。

20

【0013】

本発明の主題のさらに別の態様では、本発明者らは、癌ネオエピトープに対する治療用組換え抗体を作製するための高多様性核酸ライブラリーの使用を企図する。

【0014】

本発明の主題のさらに別の態様では、本発明者らは、組換え抗体を作製する方法を企図する。この方法では、各々が複数のメンバーを有する3つのサブライブラリー：(1) V_H -CDR1/2サブライブラリー、(2) 複数の V_H -CDR3サブライブラリー、及び(3) V_L サブライブラリーが作製されるか又は提供される。3つのサブライブラリーの各メンバーは、複数の縮重塩基位置を有する少なくとも1つのランダムカセットを含む。3つのライブラリーの少なくとも2つのメンバーの少なくとも一部が組み換えられて、発現ライブラリー中の発現ライブラリーメンバーを形成し、これは、複数の発現ライブラリーメンバーを有する。別々の抗体又は抗体断片をコードする各発現ライブラリーメンバー。次に、方法は、発現ライブラリーメンバーを用いて組換え抗体又はその断片の作製を続ける。

30

【0015】

本発明の主題のさらに別の態様では、本発明者らは、上記の方法により構築された組成物に抗原を接触させることにより、抗原に対して100nM以下の親和性を有する高親和性バインダーを単離する方法を企図する。

40

【0016】

本発明の主題のさらに別の態様では、本発明者らは、下に提供される表1又は表2から選択されるオリゴヌクレオチドを用いて作製される組換え核酸断片を企図する。

【0017】

本発明の主題のさらに別の態様では、本発明者らは、下に提供される表1又は表2から選択される核酸配列を有する合成核酸混合物を企図する。

【0018】

本発明の主題の様々な目的、特徴、態様及び利点は、添付の図面とともに、好ましい実施形態の以下の詳細な説明からより明らかになるであろう。

50

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】VH3/Vk1の対を使用する1つの例示的ランダム化戦略を示す。

【図2】重鎖CDR1及びCDR2における配列ランダム化のための例示的位置を示す。

【図3】重鎖CDR3における例示的配列ランダム化を示す。

【図4】左に核酸配列、右にアミノ酸の選択を伴う軽鎖CDR3における例示的な配列ランダム化を示す。

【図5】複数の組換え核酸セグメントのランダムカセットを単離して組み合わせることによるハイブリッド核酸エレメントの例示的な作製を示す。

【図6】B7-H4₈₀₁の安定なタンパク質発現を示す単一ピークを示すサイズ排除クロマトグラフィーの結果を示す。 10【図7】市販の抗体と比較してB7-H4₈₀₁の類似した分子挙動を示すキャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム(CE-SDS)データを示す。

【図8】B7-H4に対してインビトロで選択されたB7-H4抗体の結合を示すグラフを示す。

【図9】インビトロで選択されたB7-H4及びPD-L1バインダーの機能性分析のグラフを示す。

【図10】B7-H4_{scFv}及びB7-H4_{IgG1}の結合親和性を示すグラフを示す。

【図11】好中球のサイズ変化を測定することによるIL-8活性アッセイ及びその結果を示す。 20

【図12】好中球サイズを増大させるIL-8活性に対するIL-8抗体の中和作用を示す棒グラフを示す。

【図13】好中球遊走を阻害することによるIL-8抗体活性に対するIL-8抗体の中和作用を示す棒グラフにおいて示されるIL-8活性アッセイ及びその結果を示す。

【図14】選択された抗原標的に関して本明細書に提示されるmRNAディスプレイライブラリー組成物を使用する例示的結果を示す。

【図15】本明細書に提示されるmRNAディスプレイライブラリー組成物を用いてバインダーを同定した、scFv対IgGとして構成される選択されたバインダーの親和性を示す例示的なグラフを示す。 30

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明者らは目下、高多様性核酸ライブラリーのメンバーによってコードされる抗体又はその断片の選択されたドメインの標的化された多様性を用いて高多様性核酸ライブラリーを構築することによって、特異的且つ効果的な組換え抗体又はその断片が、作製又は同定され得ることを発見した。このような目的を達成するために、本発明者らは目下、抗体/バインダーの1つ以上のドメイン又はサブドメインを予め選択することができ、予め選択されたドメイン又はサブドメイン内のランダムカセットを使用して、複数の核酸サブライブラリーを作製できることを発見した。本発明者らはさらに、サブライブラリーのメンバーを組み換えて、ライブラリーのメンバー間で高い多様性を可能にしながらも、癌抗原又はネオエピトープ(好ましくは癌特異的、患者特異的ネオエピトープ又はネオ抗原)に対してインビボで使用された場合に、安定であり、可溶性であり、機能的であり、且つ適応可能である抗体/バインダーを同定する確率を高める高多様性核酸ライブラリーを構築できることを発見した。 40

【0021】

実際に、以下でより詳細に示されるとおり、本明細書に提示されるライブラリーは、典型的には、シングルパス又はツーパスの濃縮において、バインダーが100nM以下、より典型的には10nM以下のK_dを有する任意の抗原に対する少なくとも1つのバインダーの単離を可能にする。さらに、企図された系及び方法は、少なくとも10⁹、少なくとも10¹⁰、少なくとも10¹¹、少なくとも10¹²、少なくとも10¹³、少なくとも 50

10^{14} 、少なくとも 10^{15} 、又は少なくとも 10^{16} の異なるライブラリーメンバーの多様性を有するscFvライブラリーを、従来のライブラリー構築と比較して大幅に短縮された時間枠内で可能にする。したがって、抗体発見の速度が実質的に上昇することが理解されるはずである。

【0022】

本明細書で使用する場合、用語「腫瘍」は、人体内の1つ以上の解剖学的位置に配置され得るか、又は見出され得る1つ以上の癌細胞、癌組織、悪性腫瘍細胞、又は悪性腫瘍組織を指し、且つそれらと互換的に使用される。

【0023】

本明細書で使用する場合、用語「結合する」は、用語「認識する」及び/又は「検出する」を指し、且つそれらと互換的に使用することができ、2つの分子間の相互作用は、 10^{-6} M以下又は 10^{-7} M以下の K_D を有して高親和性を有する。

10

【0024】

本明細書で使用する場合、用語「提供する」又は「提供すること」は、製造するか、作製するか、配置するか、使用可能にするか、又は使用の準備をすることのいずれかの行為を指し、且つ含む。

【0025】

核酸サブライブラリーの構築

一般に、抗体の構造部品（重鎖、軽鎖、定常ドメイン、可変ドメイン）は、それらの機能に密接に関係する。例えば、重鎖における可変ドメイン（ V_H ）及び軽鎖（ V_L ）はともに、抗体に特異性をもたらすエピトープ結合ドメインを構成する。 V_H 及び V_L の各々は、抗原に対するそれらの特異性に基づく固有のアミノ酸配列を有する3つの相補性決定領域（CDRs、CDR1~3）を含む。したがって、 V_H 及び V_L のCDRをコードする配列をランダム化することにより、抗体を作製又は同定するための組換え核酸ライブラリーが作製され得ることが以前に企図されていた。しかしながら、本発明者らは、 V_H 及び V_L の全てのCDRを完全にランダム化することは、ライブラリーに大きな多様性をもたらす可能性がある一方で、全てのランダム化された V_H 及び V_L が、抗体（例えば、IgG1など）を形成するために組み換えられるときに可溶性又は安定に発現され得るわけではないため、ランダム配列の全ての組合せを作製し、全てのランダム化された組合せをスクリーニングすることにおいて非効率も生じさせることを見出した。さらに、多様性空間全体を網羅することは、可能なライブラリーメンバーの数が非常に多いため、現実的ではない。

20

30

【0026】

したがって、本発明者らは、 V_H 及び V_L のサブドメインを2つのカテゴリー：異なる抗体（又はその抗体をコードする遺伝子）の V_H 又は V_L の間で一般的に共通するフレームワーク領域、並びに最終的なペプチド生成物（例えば、scFv、IgG1など）の安定性及び/又は可溶性に著しい影響を与えることなく、少なくとも部分的に又は完全にランダム化され得る標的化される多様化領域に分割できることを企図する。好ましくは、 V_H の標的化される多様化領域は、CDR1、CDR2-n（CDR2のN末端側）、CDR2-c（CDR2のC末端側）、及びCDR3の少なくとも一部を含む。さらに好ましい態様では、 V_L の標的化される多様化領域は、CDR3の少なくとも一部を含む。

40

【0027】

そのため、本発明の主題の1つの例示的且つ特に好ましい態様では、核酸ライブラリーは、 V_H 及び/又は V_L の1つ以上の標的化される多様化領域における1つ以上のランダム配列カセットを含む組換え核酸を生成することによって作製され得る。一つの好ましい実施形態では、本発明者らは、単一のサブライブラリー内のランダム化された組換え配列が多すぎて、単一のサブライブラリーの量を迅速又は適時のスクリーニングのために扱うことが非実用的又は非効率的になり得ることを回避しながら、各サブライブラリーが、ランダム化された標的化される多様化領域内の多様性を保持するように、異なる標的化される多様化領域内に異なるセットのランダム配列カセットを有する3つの異なるサブライブ

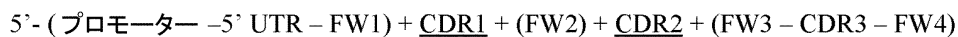
50

ラリーを企図している。さらに、標的化される多様化領域間の保存された領域は、最大の安定性及び可溶性のために選択されるか又は設計される。

【0028】

一実施形態では、サブライブラリーは、 $V_H - CDR1 / 2$ サブライブラリーを含む。 $V_H - CDR1 / 2$ サブライブラリーは、 $V_H - CDR1$ の少なくとも一部及び / 又は $V_H - CDR2$ の一部に相当する1つ以上のランダム配列カセットを有する複数の組換え核酸（例えば、組換えDNA）を含む。本明細書で使用する場合、 $V_H - CDR1$ の一部に相当するランダムカセットは、ランダムカセットが組換え核酸の領域内に位置することを意味し、その中でCDR1部分をコードする配列が、天然抗体の V_H ドメインに少なくとも構造的又は機能的に類似している V_H ドメインの一部をコードするために存在すべきである。例えば、 $V_H - CDR1 / 2$ サブライブラリー中の組換え核酸は、以下のとおりの構造を有する（ランダム化された領域は下線が引かれ、固定の配列決定された領域は括弧に入れられる）：

【化1】



本明細書で使用する場合、UTRは非翻訳領域を指し、FWはフレームワーク領域（例えば、FW1は、第2のフレームワーク領域（FW2）とは異なり得る第1のフレームワーク領域である）を指す。この構造において、ランダム配列カセットは、CDR1若しくはCDR2、又は好ましくは、CDR1とCDR2の両方の領域において挿入され得る。いくつかの実施形態では、2つ以上ランダム配列カセット、好ましくは2つのランダム配列カセットは、CDR2の領域において挿入され得る： $CDR2 - n$ （CDR2の5' - 末端側に関して）及び $CDR - c$ （CDR2の3' - 末端側に関して）。

【0029】

サブライブラリーはまた、複数の $V_H - CDR3$ サブライブラリーを含み得る。 $V_H - CDR3$ サブライブラリーの各々は、 $V_H - CDR3$ の少なくとも一部に相当する1つ以上のランダム配列カセットを有する複数の組換え核酸（例えば、組換えDNA）を含む。 $V_H - CDR1 / 2$ サブライブラリーと同様に、 $V_H - CDR1 / 2$ サブライブラリー中の組換え核酸は以下のとおりの構造を有し得る（ランダム化された領域は下線が引かれ、固定の配列決定された領域は括弧に入れられる）：

【化2】



好ましくは、 $V_H - CDR1 / 2$ サブライブラリー及び / 又は $V_H - CDR3$ サブライブラリーの組換え核酸の固定配列（例えば、プロモーター - 5' UTR - FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3、FW4）は、固定配列が最も発現可能であり、一本鎖可変断片（scFv）、scFvの改変形態、全長免疫グロブリン、又は免疫グロブリンの一部として発現されるペプチドを含む複数の形態に適応可能であるように、天然抗体（例えば、種々の抗原に対するIgG1）の中で最も一般的及び / 又は保存された配列を使用するように選択される。したがって、好ましい実施形態では、 $V_H - CDR1 / 2$ サブライブラリーの組換え核酸及び $V_H - CDR3$ サブライブラリーの組換え核酸の固定配列は、互いに少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%同一である（共有される）。

【0030】

サブライブラリーはまた、 V_L サブライブラリーを含み得る。 V_L サブライブラリーは、 $V_L - CDR3$ の少なくとも一部に相当する1つ以上のランダム配列カセットを有する

複数の組換え核酸（例えば、組換えDNA）を含む。V_H-CDR1/2サブライブラリーと同様に、V_H-CDR1/2サブライブラリー中の組換え核酸は以下のとおりの構造を有し得る（ランダム化された領域は下線が引かれ、固定の配列決定された領域は括弧に入れられる）：

【化3】

5'-(プロモーター-5' UTR-FW1+CDR1+FW2+CDR2+FW3)-CDR3-(FW4)

好ましくは、V_Lサブライブラリーの組換え核酸の固定配列は、V_H-CDR1/2サブライブラリー又はV_H-CDR3サブライブラリーの組換え核酸のものと同様にも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%同一である（共有される）。

【0031】

任意のランダム化された配列は、ランダム配列カセットを作製するために考慮され得るが、本発明者らは、V_HのCDR1、CDR2、CDR3及びV_LドメインのCDR3のための戦略化されたランダム配列カセットが、結合ペプチド（例えば、scFvなど）として発現された場合に、高い複雑性及び大きな潜在的な結合面を与えることを企図する。例えば、V_H-CDR1/2サブライブラリーのCDR1、CDR2のための戦略化されたランダム配列カセットは、カセット1個当たり3個以下、好ましくは2個以下、又はより好ましくは1個のランダム配列（カセット1個当たり3個以下、2個以下、又は1個のランダムアミノ酸をコードする）を有するセミランダム配列カセットであってもよい。ランダムカセット中のランダム配列の位置は、カセット中のランダムアミノ酸に応じて変動し得る。別の例において、V_H-CDR3サブライブラリーのCDR3のための戦略化されたランダム配列カセットは、カセット1個当たり4個以上、好ましくは5個以上、又はより好ましくは6個以上のランダム配列（カセット1個当たり4個以上、好ましくは5個以上、又はより好ましくは6個以上のランダムアミノ酸をコードする）が存在するように、よりランダム化された配列を含み得る。さらに別の例において、V_LサブライブラリーのCDR3のための戦略化されたランダム配列は、カセット1個当たり4個以上、好ましくは5個以上、又はより好ましくは6個以上のランダム配列（カセット1個当たり4個以上、好ましくは5個以上、又はより好ましくは6個以上のランダムアミノ酸をコードする）が存在するように、よりランダム化された配列を含み得る。

【0032】

本発明の主題の特定の好ましい態様では、本発明者らは、サブライブラリーのための好ましいランダム配列カセットが、表1（V_H-CDR1/2サブライブラリー及びV_H-CDR3サブライブラリーに関する）、及び表2（V_Lサブライブラリーに関する）において提示されるオリゴヌクレオチドを使用して作製され得ることを企図する。表1及び2において示されるとおり、各オリゴヌクレオチドは、IUPACアンビギュイティコードとして示される縮重コードを有する（強調された）ランダム配列を含む。例えば、CDR1ランダム配列カセットのための1つのオリゴヌクレオチドは、ランダム配列「RVT」を含み、これは、「A/G、A/C/G、T」を表し、その組合せは、スレオニン（T）、アラニン（A）、アスパラギン（N）、アスパラギン酸（D）、セリン（S）又はグリシン（G）のうちの1つをコードできる。縮重コドンによってコードされるアミノ酸の選択は、右に表され、Xとともに示される。

【0033】

さらに且つ好ましくは、V_H-CDR3サブライブラリーのためのランダム配列カセットは、異なる長さの核酸配列を含み得る。例えば、V_H-CDR3サブライブラリーのためのランダム配列カセットは、10~30個のアミノ酸、好ましくは10~25個のアミノ酸、より好ましくは10~20個のアミノ酸の任意の長さであり得る。したがって、表1において示されるとおり、V_H-CDR3サブライブラリーのためのランダム配列カセ

10

20

30

40

50

ットを作製するためのオリゴヌクレオチドは、D / G - R / L 及び A / G をコードする配列間に「NNK」(G / A / T / C、G / A / T / C、G / T を表す)の様々なリピート(例えば、4 ~ 10 のリピート)を含み得る(図3も参照のこと)。軽鎖配列の作製及び多様性は、図4において例示的に示される。

【0034】

【表1】

V _H CDR1	配列番号1: GGCTTAGGTCTCATTTCAGTTACGCTATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=T,A,N,D,S,G	10
	配列番号2: GGCTTAGGTCTCATTCTCTACGCTATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=T,A,N,K,D,E, S,R,G	
	配列番号3: GGCTTAGGTCTCATTCTCTAGTTACATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=G,W,L,V	
	配列番号4: GGCTTAGGTCTCATTCTCTAGTTACATGCATTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=S,Y,T,N	
	配列番号5: GGCTTAGGTCTCATTCTCTAGTTACGCTATGTTGGGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=S,T,N	
V _H CDR2-n	配列番号6: GGCTTAGGTCTCGTTCAATTAGTGGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,F,S	20
	配列番号7: GGCTTAGGTCTCGTTCAATTAGTGGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=V,G,I,S,L,R	
	配列番号8: GGCTTAGGTCTCGTTCAATTAGTGGTAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=W,R	

10

20

30

【0035】

40

50

【表 2】

	GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTGGGTTAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG		
	配列番号9: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTGGTAATGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,N,D+N53	
	配列番号101: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGTGGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,S,T,N	
	配列番号11: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGTGGAGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=W,G	10
	配列番号12: GGCTTAGGTCTCGTTCAGCTATTAGTGGTGGACGAGACGAGGTCTGAACGG	X=D,G,S,N	
V _H CDR2-c	配列番号13: GGCTTAGGTCTCGTGGARVAGTACTTACTACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=S,T,G,A,N,K,D,E	
	配列番号14: GGCTTAGGTCTCGTGGAGGTACTTACTACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=Y,N,D,H	20
	配列番号15: GGCTTAGGTCTCGTGGAGGTACTTACTACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=T,K,R,E,A,G	
	配列番号16: GGCTTAGGTCTCGTGGAGGTAGTACTTACTACGCGAGACGAGGTCTGAACGG	X=D,G,N,S,H,R	
V _H CDR3	配列番号17: GGCTTAGGTCTCTCCGTGGTCTCTCTGGTTTCGCGAGACGAGGTCTGAACGG	(D,G)-(R,L)- (Xaa=4-10)-(A,G)	30

表1

【 0 0 3 6 】

10

20

30

40

50

【表 3】

V _L CDR3	配列番号18: GGCTTAGGTCTCTGCAGGSGDMTRVYDSCCTTWCACCTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	Q-X ₁ -X ₂ -X ₃ -X ₄ -P-X ₅ X ₁ =Y,D,L,A,H,S, F,R,T,W,G
	配列番号19: GGCTTAGGTCTCTGCAGGWTDMTRVYDSCCTTWCACCTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	X ₂ =Y,N,D,S,T,A X ₃ =S,N,T,A,D,G
	配列番号20: GGCTTAGGTCTCTGCAGGSGDMTRVYDSCCTTWCACCTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	X ₄ =Y,F,A,L,T,S, H,W,I,N,R,V,D,G X ₅ =L,Y,W,F,R
	配列番号21: GGCTTAGGTCTCTGCAGGWTDMTRVYDSCCTTWCACCTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	配列番号22: GGCTTAGGTCTCTGCAGGSGDMTRVYDSCCTTWCACCTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	配列番号23: GGCTTAGGTCTCTGCAGGWTDMTRVYDSCCTTWCACCTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	配列番号24: GGCTTAGGTCTCTGCAGGSGDMTRVYDSCCTTWCACCTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	
	配列番号25: GGCTTAGGTCTCTGCAGGWTDMTRVYDSCCTTWCACCTTCGAGACGAGGTCTGAACGG	

10

20

表2

30

【0037】

最も典型的には、表1及び2において提示されるオリゴヌクレオチドは、一本鎖DNAにおいて提供され、これはDNAポリメラーゼI(クレンー断片)を使用して二重鎖DNA断片に変換されて、固定の配列決定された領域(例えば、V_Lサブライブラリーなどの組換え核酸に関して、5'- (プロモーター - 5' UTR - FW1 + CDR1 + FW2 + CDR2 + FW3) - (FW4))を含む骨格に挿入され得る。さらに、表1及び2に提示されるオリゴヌクレオチドはまた、ポリメラーゼ酵素を使用せずに二重鎖核酸を形成するために相補的なオリゴヌクレオチドとともに存在することもまた企図される。

【0038】

いくつかの実施形態では、サブライブラリーの組換え核酸はまた、組換え核酸によってコードされるペプチドが、タンパク質タグに対するバインダーを使用して単離され得るように、タンパク質タグをコードする核酸配列を含む。例えば、好ましいタンパク質タグとしては、FLAGタグ(配列モチーフDYKDDDDKを有する)、Mycタグ(配列モチーフEQKLISEEDLを有する)、及びHA-タグが挙げられる。いくつかの実施形態では、タンパク質タグは、シグナルを強化するか又は検出を増大させるために繰り返され得る(例えば、FLAGタグの3回の反復(3X FLAG)など)。

【0039】

サブライブラリーの組換え核酸に挿入されたいくつかのランダム配列カセットは、フレームシフト、ナンセンス変異、及び組換え核酸によってコードされるペプチドの構造を不

40

50

安定化させている配列を導入し得ることが企図される。したがって、いくつかの実施形態では、本発明者らは、不安定又はミスフォールドしたペプチドをコードする任意の組換え核酸がライブラリーから除去され得るように、サブライブラリーの組換え核酸をインビトロで試験することを企図する。例えば、 V_H -CDR3サブライブラリー又は V_L サブライブラリーの組換え核酸は、それぞれCDR配列とは独立して免疫グロブリンの V_H 3ドメイン又は V_L (V)ドメインの構造化エピトープに結合するスタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) のプロテインA又はフィネゴールドディア・マグナ (*Finegoldia magna*) のプロテインLに対するそれらの結合親和性について試験され得る。

【0040】

プロテインA又はプロテインLに対するそれらの結合親和性によって組換え核酸をスクリーニングするための任意の好適な方法が企図される。例示的な一実施形態では、サブライブラリーの組換え核酸は、インビトロ転写によってmRNAに転写され、mRNAの3'末端がピューロマイシンに結合(共有結合)される。ピューロマイシン結合型mRNAから転写されるペプチドがピューロマイシンを介してmRNAと結合されるように、ピューロマイシン結合型mRNAはインビトロで転写される。次に、ペプチドをプロテインA又はプロテインLと接触させて、プロテインA又はプロテインLに効率的に結合するペプチドを同定する。好ましくは、 10^{-6} M以下、好ましくは 10^{-7} M以下の K_D を有する親和性を有するプロテインA又はプロテインLに結合するペプチドが選択され、単離される。プロテインA又はプロテインLに対して高い親和性を有するペプチドが単離されると、単離されたペプチドのcDNAが、ピューロマイシン及びペプチドと結合したmRNAのインビトロ逆転写を介して作製され得る。次に、そうして作製された単離ペプチドのcDNAは、 V_H -CDR3サブライブラリー又は V_L サブライブラリーの選択された組換え核酸を作製するためのランダム配列カセットとして挿入され得る。或いは、サブライブラリーの組換え核酸が、組換え核酸のためのインビトロ転写工程(DNAフォーマットにおける)が必要とされなくてもよいように、任意選択によりピューロマイシン分子と予め結合されたmRNAの形態で存在し得ることもまた企図される。

【0041】

サブライブラリーからのscFvライブラリーの構築

本発明者らはさらに、サブライブラリーのうちの少なくとも2つの組換え核酸(メンバー)を組み換えて、組換えscFv核酸を形成できることを企図する。好ましい実施形態では、少なくとも2つの組換え核酸(メンバー)の各々は、異なるサブライブラリーから選択される。例えば、1つの組換え核酸は、 V_H -CDR1/2サブライブラリー、複数の V_H -CDR3サブライブラリー、及び V_L サブライブラリーの各々から選択され得る。他の例に関して、1つの組換え核酸は、 V_H -CDR1/2サブライブラリー、複数の V_H -CDR3サブライブラリー、及び V_L サブライブラリーのうちの2つの各々から選択され得る。好ましくは、サブライブラリーから選択される組換え核酸のうちの少なくとも1つ、より好ましくはそのうちの全ては、上記のとおり親和性結合スクリーニングにより予め選択される。

【0042】

最も典型的には、組換えscFv核酸は、サブライブラリーに由来する組換え核酸の一部を組み換えることによって構築され得る。この実施形態では、組換え核酸の一部は、組換え核酸に挿入されたランダム配列カセットを含む。したがって、例えば、第1の工程として、 V_H -CDR1/2サブライブラリーの組換え核酸の一部は、

【化4】



(ランダム配列カセットは下線が引かれる)、好ましくは、

【化 5】

$$5'-(FW1の部分)-[\underline{CDR1} + (FW2) + \underline{CDR2}]-(\underline{FW3の部分})-3'$$

より好ましくは、

【化 6】

$$5'-(\text{プロモーター} - 5' \text{ UTR} - \text{FW1}) + \underline{CDR1} + (\text{FW2}) + \underline{CDR2} + (\text{FW3の部分})-3' \text{ 又は } 5'-(\text{プロモーター} - 5' \text{ UTR} - \text{FW1}) + \underline{CDR1} + (\text{FW2}) + \underline{CDR2} + (\text{小さいリンカー})-3'$$

10

であってもよい。同様に、例えば、 $V_H - CDR3$ サプライブラリーの組換え核酸の一部は、

【化 7】

$$5' - [\underline{CDR3}] - 3'$$

20

(ランダム配列カセットは下線が引かれる)、好ましくは、

【化 8】

$$5'-(FW3の部分) - \underline{CDR3} - (FW4の部分)-3'$$

より好ましくは、

【化 9】

$$5'-(FW3の部分) - \underline{CDR3} - (FW4)-3', \text{ 又は } 5'-(\text{小さいリンカー}) - \underline{CDR3} - (FW4)-3'$$

30

であってもよい。次に、 $V_H - CDR1 / 2$ サプライブラリー及び $V_H - CDR3$ サプライブラリーに由来する組換え核酸の一部が単離され(例えば、PCRによって)、組み換えられて(例えば、制限-ライゲーション法を介して融合される、組換えPCRを介して作製されるなど)、 V_H ドメイン組換え核酸が形成され得る。したがって、通常、 V_H ドメイン組換え核酸は、

【化 10】

$$5' - \text{プロモーター} - 5' \text{ UTR} - \text{FW1} + \underline{CDR1} + \text{FW2} + \underline{CDR2} + \text{FW3} - \underline{CDR3} - \text{FW4} - 3'$$

40

(ランダム配列カセットは下線が引かれる)の構造であろう。任意選択により、 V_H ドメイン組換え核酸はまた、上記のとおりその3'末端においてタンパク質タグ(例えば、FLAGタグ、Mycタグ、HAタグなど)をコードする核酸配列を含み得る。加えて、このように作製された V_H ドメイン組換え核酸は、 V_H ドメインライブラリーメンバーとして V_H ドメインライブラリー中に配置され得る。

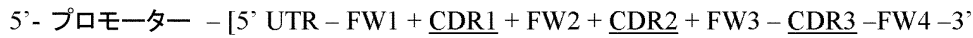
【0043】

そのように形成された V_H ドメイン組換え核酸はさらに、 V_L サプライブラリーの組換え核酸と組み換えられて、組換えscFv核酸が形成され得る。図5は、サプライブラリ

50

一からの配列を組み換える1つの例示的な方法を示す。示されるとおり、また典型的には、 V_H ドメイン組換え核酸の一部及び V_L サブライブラリーの組換え核酸の一部が、組換え $s c F v$ 核酸に融合される。例えば、 V_L サブライブラリーの組換え核酸が、 V_H ドメイン組換え核酸の一部の3'末端に融合され得るように、 V_H ドメイン組換え核酸の一部は、

【化11】



10

(好ましくは、その3'末端においてタンパク質タグをコードする任意の核酸を伴わない)を含んでもよく、且つ V_L サブライブラリーの組換え核酸の一部は、

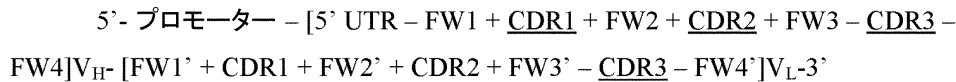
【化12】



(プロモーター及び5'-UTRを伴わない)を含んでもよい。したがって、典型的な組換え $s c F v$ 核酸は、

【化13】

20



の構造であろう。 V_H ドメイン組換え核酸の一部及び V_L サブライブラリーの組換え核酸の一部は、単一のポリペプチドをコードするように同じ読み枠に置かれることが非常に好ましい。

【0044】

好ましくは、 V_H ドメイン組換え核酸の一部及び V_L サブライブラリーの組換え核酸の一部は、2つの部分の間のリンカー(短いペプチドスペーサー断片)をコードする核酸を介して融合される。リンカー又はスペーサーのためのペプチド配列の任意の好適な長さ及び順序が使用され得る。しかしながら、リンカーペプチドの長さは、3~30個のアミノ酸、好ましくは5~20個のアミノ酸、より好ましくは5~15個のアミノ酸であることが好ましい。例えば、本発明者らは、グリシンリッチ配列(例えば、 $g l y - g l y - s e r - g l y - g l y$ など)が、 V_H と V_L ドメイン間で $s c F v$ の可動性をもたらすように利用されることを企図する。

30

【0045】

任意選択により、組換え $s c F v$ 核酸はまた、上記のとおりその3'末端においてタンパク質タグ(例えば、FLAGタグ、Mycタグ、HAタグなど)をコードする核酸配列を含み得る。加えて、このように作製された組換え $s c F v$ 核酸は、発現ライブラリーメンバーとして発現ライブラリー中において配置され得る。

40

【0046】

いくつかの実施形態では、そのように形成された組換え $s c F v$ 核酸はさらに、1つ以上の目的のリガンド(例えば、癌抗原、ネオエピトープなど)に対するそれらの結合親和性、安定性、pH感受性、及び/又は種間交差反応性に基づいて、スクリーニング及び/又は分類される。例えば、組換え $s c F v$ 核酸によってコードされる $s c F v$ ペプチドの安定性は、経時的にペプチドのサイズを測定するサイズ排除クロマトグラフィーによって分析され得る。他の例に関して、組換え $s c F v$ 核酸によってコードされる $s c F v$ ペプチドのpH感受性及び結合親和性は、異なる緩衝液条件(pH、温度など)において $s c$

50

Fvペプチドを1つ以上のリガンドと接触させることによって分析され得る。

【0047】

発現ライブラリーに由来する所望の組換えscFv核酸のそれらの分析及びさらなる単離に関して、本発明者らは、組換えscFv核酸が、mRNAの形態で存在する場合があります。任意選択により、mRNAの3'末端でピューロマイシン分子と予め結合されることを企図する。次に、ピューロマイシン結合型mRNAから転写されるペプチドがピューロマイシンを介してmRNAと結合されるように、ピューロマイシン結合型mRNAはインビトロで転写され得る。次に、ペプチドは、1つ以上のリガンドと、任意選択により異なる緩衝液条件(pH、温度など)において接触される。好ましくは、pH5.0~8.0、好ましくはpH6.0~8.0、より好ましくはpH6.5~8.0で 10^{-6} M以下、好ましくは 10^{-7} M以下の K_D を有する親和性を有してリガンドに結合するペプチドが、選択され、且つ単離される。リガンドに対して高い親和性を有するペプチドが単離されると、単離されたペプチドのcDNAが、ピューロマイシン及びペプチドと結合したmRNAのインビトロ逆転写を介して作製され得る。

10

【0048】

さらに、組換えscFv核酸によってコードされる単離ペプチドのそのように作製されたcDNAを、免疫グロブリンの部分に移植し、置き換えて、組換え免疫グロブリン又はその断片を形成できる。例えば、そのように作製されたcDNAは、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の可変領域が単離ペプチドによって形成されるscFvと置き換えられ得るように、免疫グロブリン重鎖定常領域の骨格と融合され得る。或いは、本発明者らはまた、組換えscFv核酸のV_H部分(又はV_Hドメイン組換え核酸に由来する)及びV_L部分(又は組換えscFv核酸に由来する)を、免疫グロブリンの部分に移植し、置き換えて、組換え免疫グロブリン又はその断片を形成できることを企図する。例えば、組換えscFv核酸のV_H部分(又はV_Hドメイン組換え核酸に由来する)及びV_L部分(又は組換えscFv核酸に由来する)を、それぞれ免疫グロブリン重鎖定常領域又は軽鎖定常領域の骨格と融合させて、所望のリガンドに特異的な可変領域を有する免疫グロブリンを形成する。

20

【0049】

これらの例において、免疫グロブリンは、異なる型の免疫グロブリンを構成する重鎖又は定常ドメインの任意の型(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)及び任意のクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2)を含み得ることが企図される。加えて、「抗体」は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体を含んでもよいが、これらに限定されない。この文脈において、企図された系及び方法により、単離されたV_H及びV_Lドメインを所望の種(例えば、ヒト)の抗体の残部に移植することによって種特異的抗体の作製が可能になることが留意されるべきである。別の例において、そのように作製されたcDNAを、免疫グロブリンの他の部分をコードする核酸と融合させて、免疫グロブリンの断片を形成できる。この例において、免疫グロブリンの断片は、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、及びFvであり得ることが企図される。本発明者らはさらに、そのように作製されたcDNAの一部を、免疫グロブリンの他の部分をコードする核酸と融合させて、V_Hセグメント及び/又はV_Lセグメントのいずれかを含む任意の断片を形成できることを企図する。

30

40

【0050】

さらに、本発明者らは、scFv部分が、様々なタンパク質及び非タンパク質分子のための標的化実体として使用され得ることを企図する。例えば、scFv部分を、(典型的にはキメラタンパク質として)ALT-803型分子に結合させて、特異的な標的化性能を有するTxM実体を形成してもよい(例えば、J Biol Chem. 2016 Nov 11; 291(46):23869-23881を参照のこと)。別の例において、scFv部分を担体タンパク質(例えば、アルブミン)に結合して、薬物が担体に結合される場合に腫瘍微小環境における特定の位置に1つ以上の薬物の標的的特異的な送達を可能にし得る。

50

【 0 0 5 1 】

本発明者らはさらに、ランダム配列の標的化された多様化を介してサブライブラリーを構築すること、及び/又はサブライブラリーのメンバーを予め選択することによって、発現ライブラリーが、不安定配列、非結合配列、又は誤って折り畳まれた配列を除去することにより、多様性の犠牲を最小限に抑えながら、約 10^{12} の複雑さを達成できることを企図する。したがって、発現ライブラリーを作製するための上記のアプローチは、配列の複雑さに意味のある大きさを提供しつつ、少量でバインダー/抗体をスクリーニングするのに実用的である。加えて、発現ライブラリーを作製するための上記のアプローチは、バインダー/抗体のスクリーニング手順を単純化した。従来、結合ドメイン（又はモチーフ）をコードする任意の核酸配列（例えば、ランダム化された配列）のインビトロバリデーションは、核酸配列を F_ab ドメインに変換することを必要とし、その後、結合親和性を、目的のリガンドとのプルダウンアッセイを介して試験することができた。本明細書に提示される方法は、核酸配列を F_ab ドメインに変換することなく、親和性（例えば、K_d 値）、pH 感受性、及び種間交差反応性（例えば、表面プラズモン共鳴アッセイなどを介して）による順位付けを介して、結合ドメイン（又はモチーフ）をコードする核酸配列のインビトロバリデーションを可能にする。さらに、安定性及び感受性に基づく各ライブラリーからのメンバーの事前選択は、所望のバインダー/s c F v /抗体ドメインがより迅速且つ効率的に同定され得るように、ライブラリーにおいて試験されることになるプールを減少させる。したがって、本発明者らはまた、インビトロ翻訳後のライブラリーメンバーが固相結合抗原に対してスクリーニングされる m R N A ディスプレイ技術を用いて、高多様性プールから高親和性バインダー（例えば、ナノ及びピコモル K_d を有する）を単離するための方法を企図する。バインダーが同定されると、それらは、以下にさらに記載されるとおり、親和性及び K_on / K_of f 特性に関して表面プラズモン共鳴分光法によってさらに特徴付けられ得る。別の観点から見ると、企図された系及び方法は、インビボ免疫系から完全に独立したプロセスにおいて、バインダーの迅速な検出及び s c F v 又は抗体の作製を可能にする。

【実施例】

【 0 0 5 2 】

実施例

効率を維持しながら多様性を最大化するために、標的化される多様化領域（複数可）を同定するための任意の好適な多様化スキームが企図され得るが、本発明者らは、V_H3 / V_k1 が、免疫グロブリンの様々なドメインの中でランダム化のための良好な候補領域の 1 つであり得、V_H3 が、最も安定で可溶性の V_H ドメインであると考えられ、且つ軽鎖の V_k1 が、安定で可溶性であることを見出した。したがって、V_H3 / V_k1 ランダム化対が、より効率的に完全なサイズの免疫グロブリンに変換することが企図される。したがって、本発明者らは、V_H3 及び V_k1 フレームワークを使用する事前選択戦略を開発した。図 1 は、V_H3 / V_k1 の対を使用する 1 つの例示的ランダム化戦略を示す。1 個の抗原に特異的な少なくとも 14 個の免疫グロブリン分子のタンパク質配列が比較され、分析される。14 個の免疫グロブリン分子の中で最も安定で保存された配列がフレームワークとして使用され、可変配列の位置を分析して、ランダム化された配列及びランダム化の程度（例えば、完全にランダム、部分的にランダムなど）として使用する。

【 0 0 5 3 】

このランダム化戦略に基づいて、本発明者らはさらに、V_H ドメインの C D R 1、C D R 2 - n、C D R 2 - c（図 2 を参照のこと）及び V_H ドメインの C D R 3（図 3 を参照のこと）について、標的化された多様化配列（ランダム化された配列、ランダムオリゴ）を作製した。V_H ドメインの C D R 1、C D R 2 - n、C D R 2 - c、C D R 3、及び V_L ドメインの C D R 3 のランダムオリゴを用いて組換え s c F v 核酸を作製する工程は上に記載され、図 4 の模式図においても示される。高多様性ライブラリーは、図 5 において例示的に示されるとおりに構築され、上でより詳細に論じられた。

【 0 0 5 4 】

10

20

30

40

50

図1～5において記載されるとおりの組換え s c F v 核酸を作製する標的化された多様化スキーム及び方法を使用して、本発明者らは、高多様性ライブラリーを作製し、それから組換え - B 7 - H 4 8 0 1 (- B 7 - H 4、クローンナンバー 8 0 1) バインダーを単離した。組換え - B 7 - H 4 8 0 1 の安定性は、抗体の分解又は変形を評価するための 1 5 分間の分析的サイズ排除クロマトグラフィーにより決定された。図6において示されるとおり、 - B 7 - H 4 8 0 1 の溶出物は、著しく小さいピークを伴わない単一のピークを示し、これは上記の方法によって作製された - B 7 - H 4 8 0 1 バインダーが、高い安定性を有する s c F v 又は抗体を生成できたことを示している。

【0055】

本発明者らは、組換え - B 7 - H 4 8 0 1 が、他の市販の - B 7 - H 4 抗体 (リツキサン (登録商標)、L E A F (登録商標)) と実質的に同様な抗体成分を含むことを見出した。組換え - B 7 - H 4 8 0 1 と 2 つの市販の - B 7 - H 4 抗体 (リツキサン (登録商標)、L E A F (登録商標)) の断片が、キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム (C E - S D S) を介して分析された。図7において示されるとおり、組換え - B 7 - H 4 8 0 1 抗体と 2 つの市販の - B 7 - H 4 抗体 (リツキサン (登録商標)、L E A F (登録商標)) 断片の C E - S D S 分離は、2 つの著明なピークを示し、各々が軽鎖 (中央のピーク) 及びグリコシル化された重鎖 (右のピーク) に相当する。左のピークは、C E - S D S 分析のための 1 0 K d の標準的なマーカーの位置を示す。

【0056】

本発明者らはさらに、様々な組換え - B 7 - H 4 抗体が、標的リガンドに対する異なる結合特性 (例えば、親和性、特異性など) を示し得ることを見出した。図8は、平均蛍光強度 (M F I) によって測定される、B 7 - H 4 発現 2 9 3 T 細胞との結合について試験される 2 つの組換え - B 7 - H 4 抗体である - B 7 - H 4 8 0 1 及び - B 7 - H 4 8 1 7 を示す。結果は、 - B 7 - H 4 8 0 1 抗体が、 - B 7 - H 4 8 1 7 抗体と比較して B 7 - H 4 発現 2 9 3 T 細胞に対してより高い結合親和性を有することを示し、これは、別々にランダム化された C D R ドメインが、リガンドに対して異なる結合親和性をもたらし得ることを示している。一番右端のパネルは、非特異的ヒト I g G 1 (h I g G 1) による対照実験を示す。

【0057】

組換え - B 7 - H 4 抗体はさらに、フローサイトメトリーを使用して、抗原提示細胞 (A P C) 上で発現されるリガンド (B 7 - H 4) に対する特異的且つ効率的な結合を決定するために試験された。図9において示されるとおり、組換え - B 7 - H 4 抗体は、B 7 - H 4 リガンドに特異的に結合でき (非特異的アイソタイプ結合からピークアウトを分離している)、これは、組換え - B 7 - H 4 抗体が十分に機能的であることを示している。

【0058】

本発明者らはまた、B 7 - H 4 (s c F v B 7 - H 4 8 0 1) に対する s c F v ペプチドと s c F v B 7 - H 4 8 0 1 とともに同じ s c F v ペプチドによって作製された組換え - B 7 - H 4 抗体 (I g G - B 7 - H 4 8 0 1) が、表面プラズモン共鳴アッセイを使用して機能的に互換性があることを見出した。このアッセイにおいて、F l a g タグ付き s c F v B 7 - H 4 8 0 1 は、表面結合ニュートラアビジンと結合される - F l a g ビオチン化抗体を介して表面に固定化される。次に、表面に固定化された s c F v B 7 - H 4 8 0 1 ペプチドは、B 7 - H 4 を含む分析物と接触される。同様のアッセイが - B 7 - H 4 抗体により実施された。図10及び表3において示されるとおり、s c F v B 7 - H 4 8 0 1 及び I g G - B 7 - H 4 8 0 1 は、B 7 - H 4 に対して実質的に同様の親和性及び結合特性を示し、それらが、機能的に互換性があることを示している。さらに、インビトロ翻訳ペプチド (s c F v) の結合親和性は、ペプチドを抗体骨格に移植することなく直接的に測定され得るため、発現ライブラリー中のより多くの組換え s c F v 核酸が効率的にスクリーニングされ得る。

【0059】

10

20

30

40

50

【表 4】

	Ka	Kd	KD	Res sd
IgG	1.2e ⁶	2.0e ⁻⁴	175pm	0.391
scFv	1.2e ⁶	1.7e ⁻⁴	141pm	0.353

表3

10

【 0 0 6 0 】

V_HのCDR1～3及びV_LのCDR3において様々なランダム配列カセットを有するB7-H4に対する複数のscFvペプチドの間で、本発明者らは、特定のドメイン(特定のランダム配列カセット)における類似性が、scFvペプチドにリガンドに対する同様の結合特性を有するようにし得るかどうかを試験した。5つのscFvペプチド(801、802、905、906、及び817)は、B7-H4に対するそれらの結合親和性について試験された。表4において示されるとおり、それらの中で4つのscFvペプチド(クローン801、802、905、906)は、同様のCDR3配列を有する。V_HのCDR3において同様のランダム配列カセットを有するそれらの4つのscFvペプチドは、25と37の両方においてB7-H4に対する同様の結合親和性を示し(表5において示されるとおり)、これは、少なくともB7-H4に対するscFvペプチド中において、V_HのCDR3における配列が、リガンドに対する結合に重要であり得ることを示している。

20

【 0 0 6 1 】

【表 5】

クローン	CDR1	CDR2	CDR3	CDR L3
801	NSYAMH (配列番号 26)	AISGNGGSTR (配列番号 27)	DRFRKVHG (配列番号 28)	DATFPL (配列番号 29)
802	GSYAMH (配列番号 30)	AISGSGGSTR (配列番号 31)	DLYRRVHG (配列番号 32)	DYGFPL (配列番号 33)
905	SSYLMH (配列番号 34)	VISGSGGSTR (配列番号 35)	DLYRRVAG (配列番号 36)	DYALPL (配列番号 37)
906	SNYAMH (配列番号 38)	AISGNGGSTH (配列番号 39)	DRFRRVYG (配列番号 40)	DYTFPL (配列番号 41)
817	SSYAMH (配列番号 42)	AISGSGGSTR (配列番号 43)	GRWSKWG (配列番号 44)	TDNFPY (配列番号 45)

30

表4

【 0 0 6 2 】

40

50

【表 6】

温度	scFv	ka	kd	KD
25℃	801	1.20E+06	2.00E-04	174 pM
	802	4.50E+05	2.40E-05	54 pM
	905	4.10E+05	1.20E-04	290 pM
	906	1.70E+05	1.00E-05	59 pM
37℃	801	6.10E+05	7.30E-04	1.2 nM
	802	5.70E+05	5.50E-04	1.0 nM
	905	5.80E+05	9.70E-04	1.7 nM
	906	2.80E+05	3.80E-04	1.4 nM

表5

【0063】

本発明者らはまた、サブライブラリー及び発現ライブラリーを用いてインターロイキン-8 (IL-8) (scFv IL-8) に結合する複数の scFv ペプチドを作製し、様々な条件 (温度及び pH) において IL-8 に対する親和性を試験した。例示的な scFv IL-8 ペプチド及び様々な条件において測定されたそれらの結合親和性は、表 6 において示される。表 6 において示されるクローンの中で、クローン 49-7、49-1 及び 49-12 が同様の V_H CDR3 配列を含有し、クローン 49-19、49-37、及び 49-25 が同様の V_H CDR3 配列を含有する。加えて、クローン 49-3 及び 43-2 は、同様の V_H CDR3 配列を含有する。B7-H4 に対する scFv ペプチドとは対照的に、本発明者らは、scFv IL-8 ペプチドの結合親和性が、V_H の CDR3 におけるランダム配列における類似性に決定的に依存的ではない場合があることを見出した。例えば、クローン 49-18、49-37、及び 49-25 が、同様の V_H CDR3 配列を含有する一方で、それらの配列の結合親和性 (K_D × 10⁻⁹ M において測定される単位) は、0.894 × 10⁻⁹ M と 25 × 10⁻⁹ M の間で変動する。

【0064】

10

20

30

40

50

【表 7】

クローン	計数	25℃	pH 6	25℃	pH 6	37℃
49-31	1/36	0.012	0.0025			
49-22	3/36	0.113	0.328			
49-7	1/36	0.166	0.462			
49-32	1/36	0.239	0.714			
49-34	1/36	0.618	0.342			
49-18	1/36	0.894	2.23			
49-3	4/36	1.26	6.68	2.14	3.14	9.19
43-2	5/16	1.41	1.3	0.79	0.96	0.89
49-37	1/36	1.46	4.01			
43-12	3/16	1.5	11.04			
49-10	6/36	1.65	8.58	2.21	8.7	3.45
49-1	1/36	2.66	6.13			
49-6	1/36	4.8	17.6			
49-12	3/36	10.1	11.9			
49-25	2/36	25	7.26			

10

表6

20

【0065】

本発明者らはさらに、好中球サイズを測定することにより、s c F v I L - 8 が、I L - 8 を効率的に捕捉することによってI L - 8 の作用を中和できるかどうかを試験した。一般に、好中球は、I L - 8 によって刺激されると拡大される（例えば、より大きな直径を有するなど）（図11に示されるとおり）。本発明者らは、好中球拡大に対するそのようなI L - 8 作用を、組換え - I L - 8 抗体（m A b I L - 8 2 0 1、図12において示されるとおり、上段左のグラフ）又はいくつかのs c F v I L - 8 ペプチド（I L - 8 # 2、I L - 8 4 9 - 3、I L - 8 4 9 - 1 0、図12において示されるとおり、下段のグラフ）の添加によって大幅に消失できたことを見出したが、これは、s c F v I L - 8 ペプチドが、培地中の遊離I L - 8 に結合することによってI L - 8 の作用を効率的に中和できたことを示している。

30

【0066】

I L - 8 は、好中球をI L - 8 放出の部位（例えば、感染の部位）に向かって遊走させる好中球走化性因子である。s c F v I L - 8 ペプチドの機能的作用を評価するために、好中球を、多孔性膜を有する挿入物の底に置き、I L - 8 によって誘引された好中球が多孔性膜を介して挿入物から培地に向かって遊出できるように、様々な濃度のI L - 8 を含む媒体中に置いた。図13において示されるとおり、培地中のI L - 8 濃度を増大させることによって、遊走した好中球の数が増加した。興味深いことに、そのようなI L - 8 作用は、s c F v I L - 8 ペプチド（I L - 8 4 3 - 2）又はs c F v I L - 8 ペプチドに由来する組換えI L - 8 抗体（m A b I L - 8 2 0 1）の添加により、ほぼ完全に消失した。

40

【0067】

図14は、本明細書に提示されるm R N Aディスプレイライブラリーを使用して単離された様々なs c F vに関するさらなる実験データを示す。より具体的には、各データポイントは下部に示される標的に対するs c F vを表し、各s c F vに対する親和性値を決定した。見てのとおり、（同じ）ライブラリーにより、様々な異なる標的に対して複数の高親和性のバインダーが得られ、全てのバインダーはマイクロM以下で、及び多くはナノM以下の親和性範囲を有した。さらに、本発明者らはまた、ヒトI g G上にC D Rを移植し

50

た際に、s c F v の親和性が維持され得るかどうかについても検討している。図 1 5 は、ヒト I g G 1 足場に移植された選択された s c F v についての 2 9 個の C D R 移植実験の例示的な結果を示す。図 1 5 の結果から分かるとおり、ヒト化 I g G 1 抗体は高い特異性と親和性を保持した（通常、1 桁以内）。

【 0 0 6 8 】

本明細書の発明的概念から逸脱することなく、既に記載されたもの以外にも多くの変形形態が可能であることは、当業者には明らかなはずである。したがって、本発明の主題は、添付の特許請求の範囲以外に制限されるものではない。さらに、本明細書及び特許請求の範囲の両方を解釈する際には、全ての用語は、文脈に沿った可能な限り広範な方法で解釈されるべきである。特に、用語「含む」及び「含むこと」は、非排他的な様式で要素、構成要素、又は工程を参照していると解釈されるべきであり、参照される要素、構成要素、又は工程が存在し得るか、利用され得るか、又は明示的に参照されない他の要素、構成要素、又は工程と組み合わせられ得ることを示している。本明細書及び後続の特許請求の範囲全体で使用されるとおり、「a」、「an」、及び「the」の意味は、文脈が明らかにそうでないことを指示しない限り、複数の参照を含む。また、本明細書において使用されるとおり、「in」の意味は、文脈が明らかにそうでないことを指示しない限り、「in」及び「on」を含む。本明細書の請求項が、A、B、C、... 及びNからなる群から選択されるもののうちの少なくとも1つを指す場合、本文は、A + N、又はB + Nなどではなく、群から1つの要素のみを必要とするものと解釈されるべきである。

10

20

30

40

50

【 図 面 】
【 図 1 】

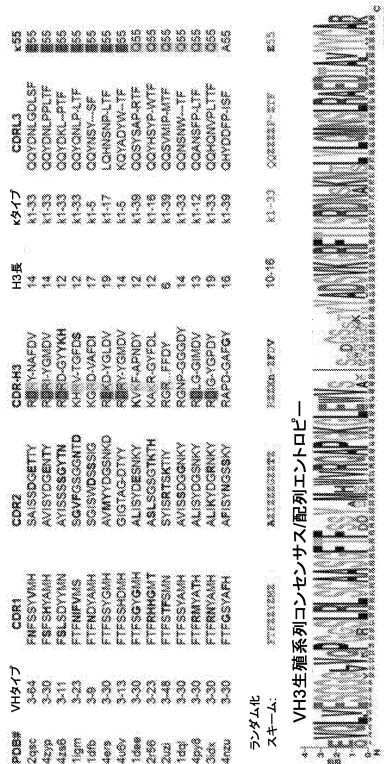


図 1

【 図 2 】

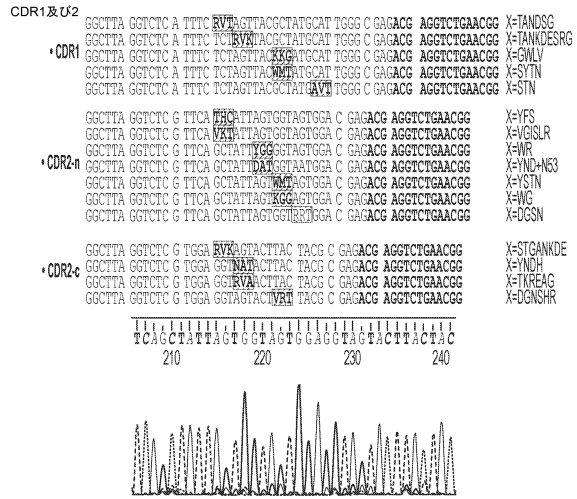
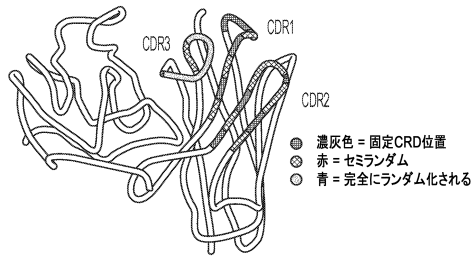


図 2

【 図 3 】

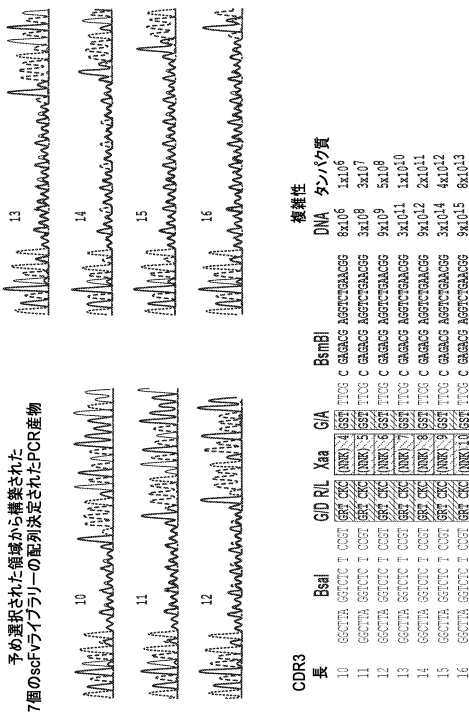


図 3

【 図 4 】

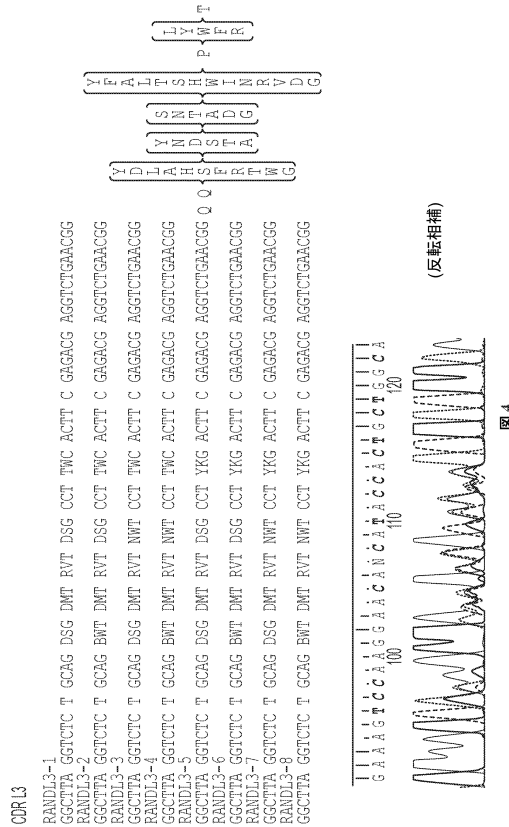


図 4

10

20

30

40

50

【 図 5 】

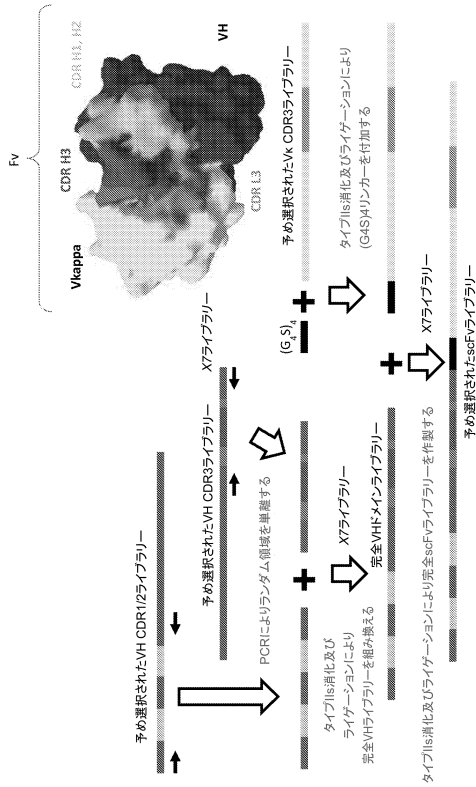


図 5

【 図 6 】

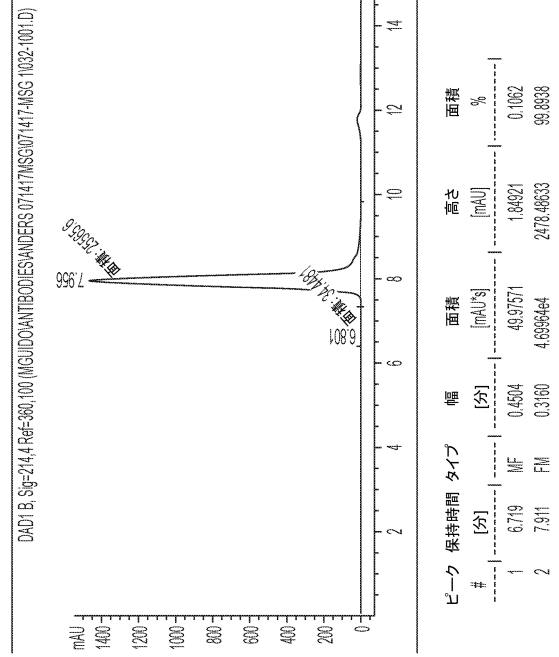


図 6

【 図 7 】

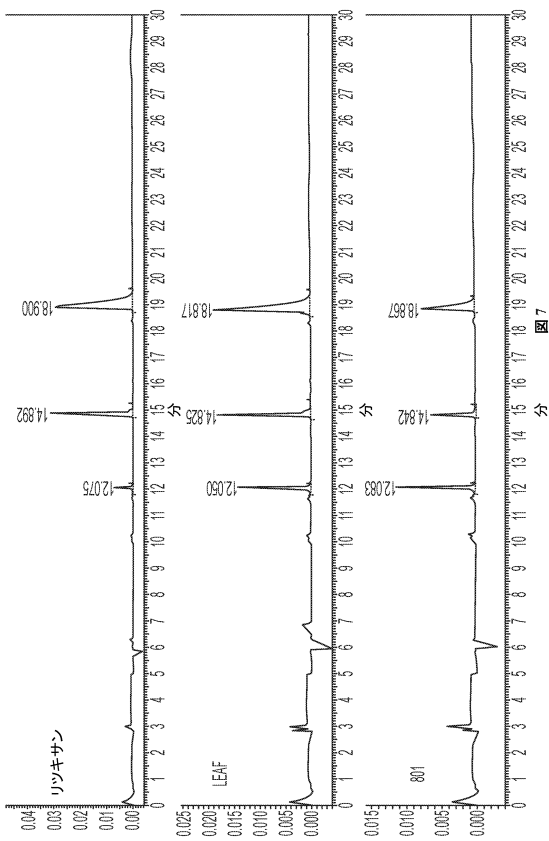


図 7

【 図 8 】

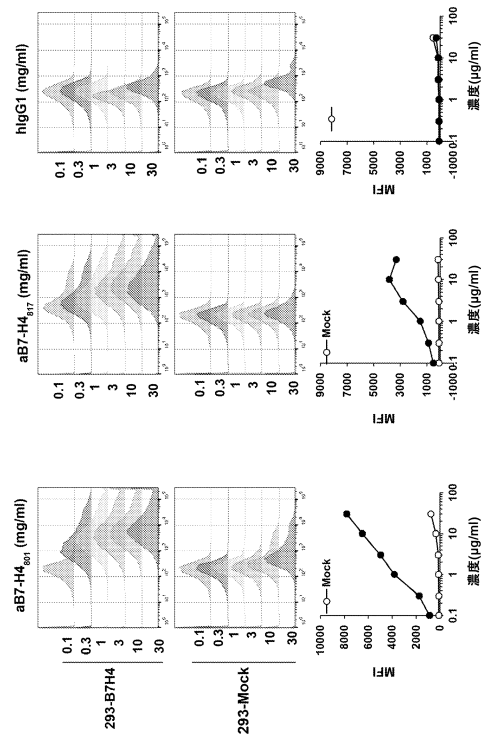


図 8

【 図 9 】

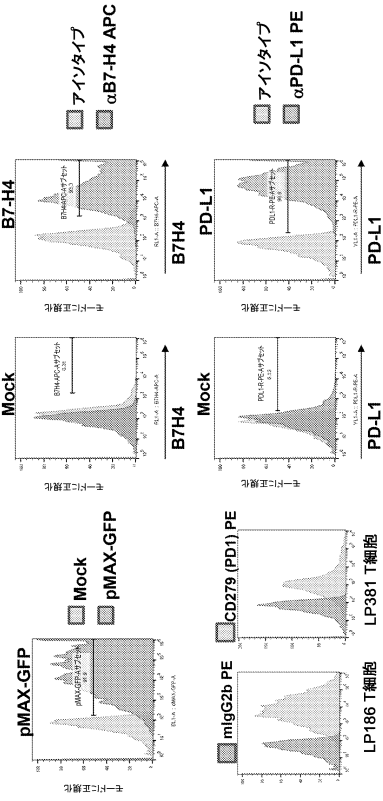


図 9

【 図 10 】

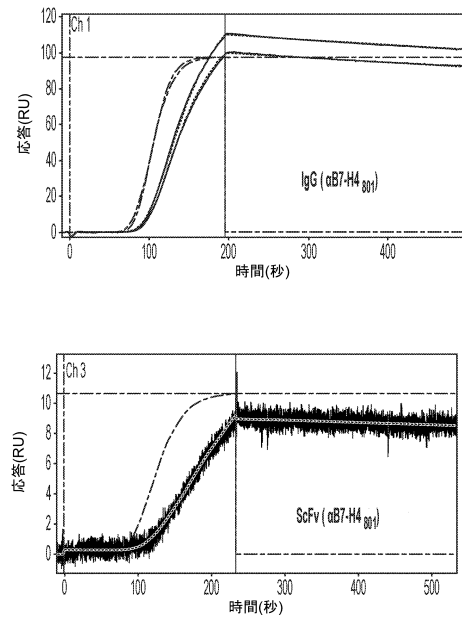


図 10

【 図 11 】

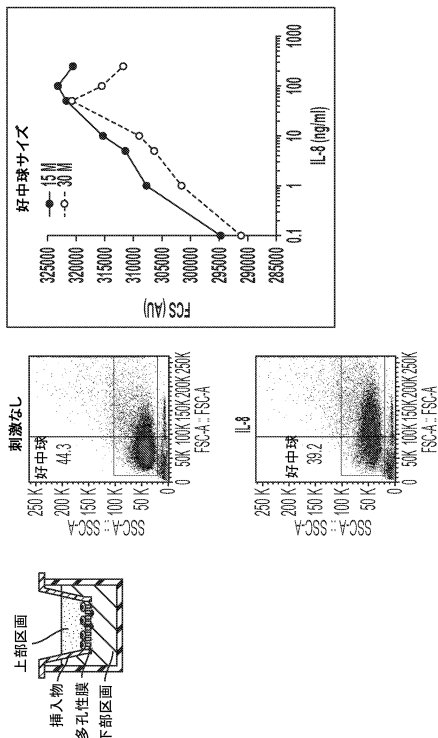


図 11

【 図 12 】

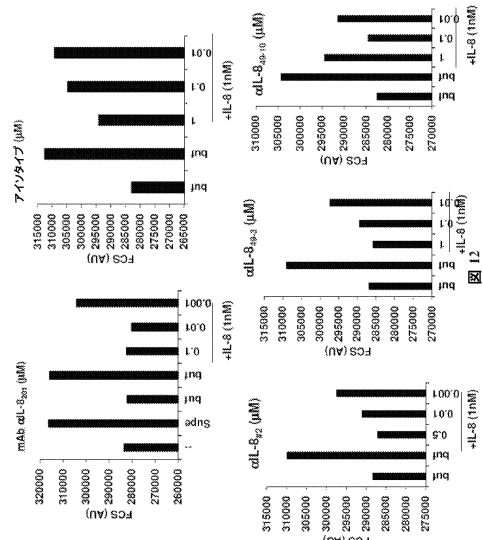


図 12

10

20

30

40

50

【 図 1 3 】

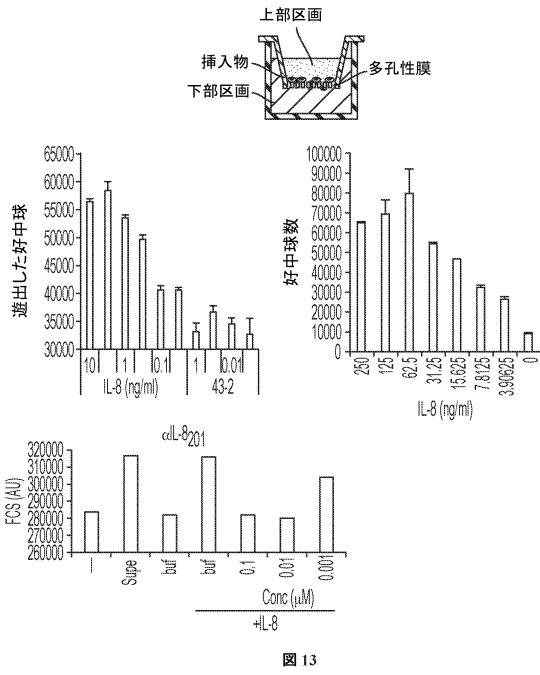


図 13

【 図 1 4 】

インビトロscFv発現からのSPRによるK_D選別

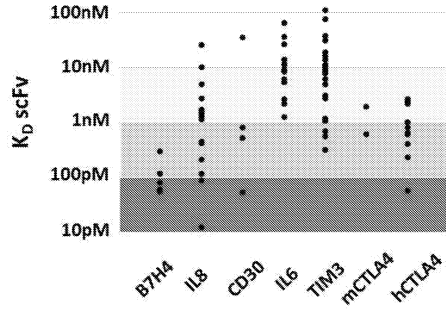


図 14

【 図 1 5 】

IgG1変換: 今まで試験された全ての29個の的が機能的である

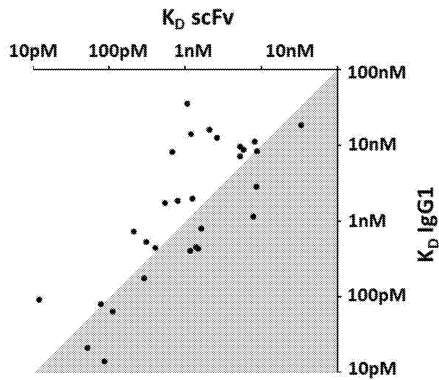


図 15

【 配列表 】

0007291700000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 K	7/00 (2006.01)	F I	C 0 7 K	7/00
C 0 7 K	16/46 (2006.01)		C 0 7 K	16/46

0 2 3 2 , カルバー シティ , 9 9 2 0 ジェファーソン ブールバード

審査官 野村 英雄

(56)参考文献

特表 2 0 0 8 - 5 3 6 4 7 3 (J P , A)

FUKUDA, I., et al. , "In vitro evolution of single-chain antibodies using mRNA display." , *Nucleic Acids Res.* , 2006年 , Vol.34, No.19 , e127(pp.1-8) , DOI: 10.1093/nar/gkl618 , Published online 29 September 2006

CHEN, W., et al. , "Construction of a human antibody domain (VH) library." , *Methods Mol Biol* , Vol.525 , 2009年 , pp.81-99 , DOI: 10.1007/978-1-59745-554-1_4

SIDHU, S., et al. , "Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions." , *J Mol Biol* , 2004年 , Vol.338 , pp.299-310

KNAPPIK, A., et al. , "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides." , *J Mol Biol* , 2000年 , Vol.296 , pp.57-86

TILLER, T., et al. , "A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties." , *Mabs* , 2013年 , Vol.5, No.3 , pp.445-470 , DOI: 10.4161/mabs.24218

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 4 0 B 1 0 / 0 0

C 4 0 B 4 0 / 0 2

C 4 0 B 4 0 / 0 6 - 4 0 / 1 0

C 4 0 B 5 0 / 0 6

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d