

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6162044号
(P6162044)

(45) 発行日 平成29年7月12日 (2017. 7. 12)

(24) 登録日 平成29年6月23日 (2017. 6. 23)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/46 (2006. 01)

C O 7 K 16/46

G O 1 N 33/563 (2006. 01)

G O 1 N 33/563

G O 1 N 33/577 (2006. 01)

G O 1 N 33/577 A

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

G O 1 N 33/53 D

請求項の数 9 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-545373 (P2013-545373)
 (86) (22) 出願日 平成23年12月21日 (2011. 12. 21)
 (65) 公表番号 特表2014-504157 (P2014-504157A)
 (43) 公表日 平成26年2月20日 (2014. 2. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/073633
 (87) 国際公開番号 W02012/085113
 (87) 国際公開日 平成24年6月28日 (2012. 6. 28)
 審査請求日 平成26年12月19日 (2014. 12. 19)
 (31) 優先権主張番号 10196685.1
 (32) 優先日 平成22年12月23日 (2010. 12. 23)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチー４０７０バーゼル・
 グレンツアーヘルストラッセ１２４
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100106208
 弁理士 宮前 徹
 (74) 代理人 100120112
 弁理士 中西 基晴

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結合剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式：

 $A - a' : a - S - b : b' - B : X(n)$

の単離された結合剤であって、

該結合剤は、リンカー $a - S - b$ を介して結合された、異なる特異性を有する２つの一価結合剤 A および B を含む二価結合剤であり、１個の抗原上の２個の異なるエピトープに、または２個の異なる抗原に結合することができる、

ここで、該一価結合剤 A および B により特異的に結合されるエピトープは重複しない、

ここで A ならびに B は、モノクローナル抗体に由来する一価の Fab 断片又は Fab' 断片であり、

ここで $a' : a$ ならびに $b : b'$ は、多数の塩基対合によって安定な二本鎖を形成する互いにハイブリダイズする核酸配列からなる結合対であり、ここで a' および a は b の b' への結合に干渉せず、逆もまた同じであり、そして結合対 $a' : a$ 中の配列はそれぞれ結合対 $b : b'$ の配列にハイブリダイズしない、

ここで該ハイブリダイズする核酸配列の結合対内の結合親和性は、少なくとも 10^8 l / mol であり、

ここで S は核酸であって、少なくとも 1 nm の長さのスペーサーであり、

ここで (: X) は、結合基、標識基、エフェクター基および反応基からなる群から選択される官能性部分であり、該部分は、 a' 、 a 、 b 、 b' または S の少なくとも１つに共

10

20

有結合的にまたは結合対を介してのどちらかで結合しており、

ここで (n) は整数であり、少なくとも 1 であり、

ここで - は共有結合を表し、そして

ここでリンカー a - S - b は 6 ~ 100 nm の長さを有する；

前記結合剤。

【請求項 2】

スペーサー S が 1 ~ 95 nm の長さである、請求項 1 に記載の結合剤。

【請求項 3】

X が標識基、結合基およびエフェクター基からなる群から選択される官能性部分である、請求項 1 または 2 に記載の結合剤。

10

【請求項 4】

官能性部分 X が a、b、または S に結合している、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の結合剤。

【請求項 5】

官能性部分 X がスペーサー S に結合している、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の結合剤。

【請求項 6】

官能性部分 X がスペーサー S に共有結合している、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の結合剤。

【請求項 7】

官能性部分 X がスペーサー S にハイブリダイズする核酸を介して結合している、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の結合剤。

20

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の結合剤の、目的の分析物の検出における使用。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の結合剤の、免疫アッセイにおける使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は式 A - a' : a - S - b : b' - B : X (n) の結合剤に関し、ここで A ならびに B は一価結合剤であり、ここで a' : a ならびに b : b' は結合対であり、ここで a' および a は b の b' への結合に干渉せず、逆もまた同じであり、ここで S は少なくとも 1 nm の長さのスペーサーであり、ここで X は a'、a、b、b' または S の少なくとも 1 つに共有結合的にまたは結合対を介してのどちらかで結合した官能性部分を示し、ここで (n) は整数であり、少なくとも 1 であり、ここで - は共有結合を表し、ここでそのリンカー a - S - b は 6 ~ 100 nm の長さを有する。そのような結合剤を生成する方法およびその特定の使用も開示する。

30

【背景技術】

【0002】

二重特異性抗体または二重特異性結合剤は一般に、それらが 1 個の抗原上の 2 個の異なるエピトープに、または 2 個の異なる抗原に同時に結合することができるという意味で独特である。この特性は、従来のモノクローナル抗体では不可能であった新規の療法および診断戦略の開発を可能にする。二重特異性二重結合剤の、例えば二重特異性抗体の形態の大きなパネル (panel) が発展しており、それはこれらの分子における強い科学的ならびに商業的興味を反映している。

40

【0003】

抗原上の単一のエピトープに対して向けられているモノクローナル抗体 (mAb) は、通常はポリクローナル抗血清の結合活性よりも低い親和性で結合する。しかし、同じ抗原上の異なるエピトープに対して向けられた mAb の特定の対は、その抗原により有効に、そしてその対応する個々の mAb 単独の親和性の合計よりも大きい結合活性で結合するこ

50

とができる。

【 0 0 0 4 】

しかし、相乗作用を示す m A b の対に関する、または化学的に架橋した二重特異性 F (a b ') 2 に関する結合活性定数は、個々の m A b に関する親和性定数よりも 1 5 倍まで大きいにすぎず、それはその反応物の間の理想的な組み合わせに期待される理論的な結合活性よりも著しく低い (Cheong, H. S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 173 (1990) 795-800)。これに関する 1 つの理由は、最適な相乗作用のためには (高い結合活性をもたらす) 相乗的結合に関わる個々のエピトープ / パラトープ相互作用が互いに関して特定の方向で配向されていなければならないことである可能性がある。

【 0 0 0 5 】

二重特異性抗体の生成は、例えば国際公開第2004/081051号において記述されている。この出願では、そのそれぞれが標的構造物の表面上に位置する異なるエピトープに対する結合特異性を有する 2 個の抗体を含む二重特異性抗体 (B A b) が開示されている。特異性における望まれる向上を達成するため、それぞれがそのそれぞれのエピトープに関して比較的低い結合親和性を有する 2 種類の M A b が用いられる。生成された B A b は、結合相互作用の累積的性質のため、標的組織に関して高い結合活性を提供するが、それらを生成するために用いられる個々の M A b のより低い親和性のため、交差反応する非標的組織に関してはるかに低い親和性を有する。これらの二重特異性抗体の生成は極めて複雑であり、例えば精巧な化学的カップリングおよび精製工程を必要とする。

【 0 0 0 6 】

二重特異性モノクローナル抗体は極めて興味深い新規の療法的様式でもある。広いスペクトルの二重特異性抗体の形態が設計および開発されてきた (例えば Fischer, N. and Leg er, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14 を参照)。そのような二重特異性療法用モノクローナル抗体は、例えば化学的架橋により、適切に設計されたタンパク質ドメインの相互作用により、完全に組み換えにより、等で得ることが出来る。明らかに、その結合剤のそれぞれの組み換えによる設計および望まれるヘテロ二量体の生化学的に類似したホモ二量体からの慎重な精製は、直面している課題の一部である。

【 0 0 0 7 】

Neri, D. et al. (1995) により最初に記述されたキレート性組換え抗体 (C R A b) は、非常に高い親和性の抗体の種を表し、ここで同じ抗原分子上の重複しないエピトープに特異的な 2 個の s c F v が柔軟なリンカーポリペプチドにより連結される。最初の原型を作られ (m o d e l e d) 設計された抗鶏卵リゾチーム (H E L) C R A b は、2 個の s c F v 抗体の間の距離にまたがる (s p a n) ために 1 8 アミノ酸のリンカーポリペプチドを用いて、結果として得られた親和性の増進は、様々な生物物理的方法により示されるように、その 2 個の s c F v のより優れた方よりも 1 0 0 倍に至るまで高いことが続いて示された (Neri, D. et al., J. Mol. Biol. 246 (1995) 367-373)。

【 0 0 0 8 】

Wright M. J. および Deonarain M. P. (Molecular Immunology 44 (2007) 2860-2869) は、キレート性組換え抗体の生成のためのファージディスプレイライブラリーを開発した。そこで記述されたライブラリーは、その 2 個の結合物の間において様々な長さのリンカーペプチドを有する二重結合剤を提供するような方法で考えられた (c o n s t r u e d) 発現ベクターを用いている。最高の結合剤、すなわちそのようなリンカーの最適な長さを有する二重結合剤の選択が、それにより促進される。しかし、それぞれのそのようなキレート性組換え抗体のために、(“ 結合剤 1 - (様々な長さの) リンカー - 結合剤 2 ” ポリペプチドの発現を可能にする) 組み換え発現系の完全なライブラリーを考え (c o n s t r u e d) なければならない。

【 0 0 0 9 】

上記で不十分な様式で概説したように、二重特異性二重結合剤の製造は依然として極めて困難であり、それらの二重特異性結合剤のそれぞれを個々に同定、解釈 (c o n s t r u e) および生成するために精巧な技法を必要とする。そのような二重特異性結合剤を頻

10

20

30

40

50

繁に誘導体化する、例えば標識する必要があることがさらなるレベルの複雑性を加えてさ
えいる。

【 0 0 1 0 】

ここで、驚くべきことに、先行技術から既知の不都合の少なくとも一部は本発明におい
て開示される新規の二重特異性結合剤により克服され得ることが分かっている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 1 1 】

【特許文献 1】国際公開第2004/081051号

【非特許文献】

10

【 0 0 1 2 】

【非特許文献 1】Cheong, H. S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 173 (1990)
795-800

【非特許文献 2】Fischer, N. and Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14

【非特許文献 3】Neri, D. et al., J. Mol. Biol. 246 (1995) 367-373

【非特許文献 4】Molecular Immunology 44 (2007) 2860-2869

【発明の概要】

【 0 0 1 3 】

本発明は式 $A - a' : a - S - b : b' - B : X(n)$ の結合剤に関し、ここで A なら
びに B は一価結合剤であり、ここで $a' : a$ ならびに $b : b'$ は結合対であり、ここで a 20
および a' は b の b' への結合に干渉せず、逆もまた同じであり、ここで S は少なくとも
1 nm の長さのスペーサーであり、ここで X は a' 、 a 、 b 、 b' または S の少なくと
も 1 つに共有結合的にまたは結合対を介してのどちらかで結合した官能性部分を示し、こ
こで (n) は整数であり、少なくとも 1 であり、ここで - は共有結合を表し、ここでその
リンカー $a - S - b$ は 6 ~ 100 nm の長さを有する。

【 0 0 1 4 】

さらに、そのような結合剤を作製する方法およびそのような剤の例えば免疫アッセイの
手順における使用を開示する。

その新規結合剤の、特に免疫学的検出手順における使用も記述および特許請求する。

【図面の簡単な説明】

30

【 0 0 1 5 】

【図 1】図 1 抗 p I G F 1 - R 二重結合剤の組み立ての効率を評価する分析的ゲル濾過
実験。線図 a、b および c は、個々の二重結合剤構成要素（フルオレセイン - $ssFab'$ 1.4.168、Cy5 - $ssFab'$ 8.1.2 およびリンカー DNA (T = 0
) ; Fab' は一本鎖オリゴヌクレオチドにコンジュゲートした Fab' 断片を意味する
) の溶離プロファイルを示す。線図 d は、二価結合剤を形成するのに必要な 3 種類の構成
要素を 1 : 1 : 1 のモル比で混合した後の溶離プロファイルを示す。より太い（一番下の
) 曲線は、 $ssFab'$ タンパク質またはリンカー DNA それぞれの存在を示す 280 nm
において測定された吸光度を表す。b) および d) におけるより細い一番上の曲線（4
95 nm における吸光度）はフルオレセインの存在を示し、a) におけるより細い一番上
の曲線および d) における中央の曲線（635 nm における吸光度）は、Cy5 の存在を
示す。単一の二重結合剤の構成要素の溶離体積（ $VE_{ssFab' 1.4.168}$ 約
15 ml ; $VE_{ssFab' 8.1.2}$ 約 15 ml ; $VE_{リンカー}$ 約 16 ml）の
反応混合物の溶離体積（ $VE_{混合物}$ 約 12 ml）との比較は、二重結合剤組み立て反応
が成功であったことを示す（収率：約 90 %）。溶離された二重結合剤に相当する主な 2
80 nm のピークは、495 nm および 635 nm のチャンネルにおける主なピークとう
まく重なっており、二価結合剤に相当するピーク中に $ssFab' 8.1.2$ および $ssFab' 1.4.168$
の両方が存在することを証明している。

40

【図 2】図 2 Biacore（商標）実験のスキーム。模式적および例示的に、溶液中
の 2 種類の結合分子を示す：T0 - T - Dig（リンカー 16）、二価結合剤および T4 50

0 - T - D i g (リンカー 15)、二価結合剤。これら両方の二価結合剤はそれらのリンカーの長さにおいてのみ異なる (2 個のハイブリダイズする核酸配列の間に追加の T を有しない中心のジゴキシゲニン化された (d i g o x i g e n y l a t e d) T 対 40 個の追加の T (中心の T - D i g のそれぞれの側に 20 個) を有する中心のジゴキシゲニン化された T)。さらに、s s F a b ' 断片 8 . 1 . 2 および 1 . 4 . 168 を用いた。

【図 3】図 3 100 nM 二価結合剤 (T 40 - T - D i g s s D N A リンカー、すなわちリンカー 15 上にハイブリダイズした s s F a b ' 8 . 1 . 2 および s s F a b ' 1 . 4 . 168 からなる) の固定されたペプチド p I G F - 1 R との相互作用を、100 nM s s F a b ' 1 . 4 . 168 または 100 nM s s F a b ' 8 . 1 . 2 の同じペプチドに対する結合特性と比較して示す、3 つの速度論を重ねてプロットした B i a c o r e (商標) センサーグラム (s e n s o r g r a m)。最も高い結合性能は二重結合剤コンストラクトを用いて得られ、これはその二重結合剤の協同的結合作用が標的ペプチド p I G F - 1 R に対する親和性を増大させることを明確に示している。

10

【図 4】図 4 T 40 - T - D i g s s D N A リンカー、すなわちリンカー 15 上にハイブリダイズした s s F a b ' 8 . 1 . 2 および s s F a b ' 1 . 4 . 168 からなる二価結合剤の固定されたペプチド p I G F - 1 R (リン酸化された I G F - 1 R)、I G F - 1 R または p I R (リン酸化されたインスリン受容体) との相互作用を示す 3 つの速度論を重ねてプロットした B i a c o r e (商標) センサーグラム。最も高い結合性能は p I G F - 1 R ペプチドで得られ、これは二重結合剤の協同的結合作用が標的ペプチド p I G F - 1 R に対する特異性を例えばリン酸化されたインスリン受容体ペプチド (p I R) と比較して増大させることを明確に示している。

20

【図 5】図 5 T 40 - T - D i g s s D N A リンカー、すなわちリンカー 15 上にハイブリダイズした s s F a b ' 8 . 1 . 2 および s s F a b ' 1 . 4 . 168 からなる 100 nM 二価結合剤ならびにリンカー DNA を有しない 100 nM s s F a b ' 8 . 1 . 2 および s s F a b ' 1 . 4 . 168 の混合物の相互作用を示す 2 つの速度論を重ねてプロットした B i a c o r e (商標) センサーグラム。最高の結合性能は二価結合剤を用いてのみ得られ、一方でリンカーを有しない s s F a b ' の混合物は、これらの s s F a b ' の合計濃度が 200 nM であったという事実にも関わらず、観察可能な協同的結合作用を示さない。

【図 6】図 6 B i a c o r e (商標) サンドイッチアッセイの概略図。このアッセイは、両方の抗体のリン酸化された I G F - 1 R ペプチドへのエピトープ接近可能性を調べるために用いられた。< M I g G F c y > R はマウス抗体 M - 1 . 4 . 168 を捕捉するために用いられたウサギ抗マウス抗体を示す。次いで M - 1 . 4 . 168 を用いて p I G F - 1 R ペプチドを捕捉する。M - 8 . 1 . 2 が最終的に M - 1 . 4 . 168、ペプチドおよび M - 8 . 1 . 2 からなるサンドイッチを形成する。

30

【図 7】図 7 二次抗体 8 . 1 . 2 の p I G F - 1 R ペプチドに対する、これが B i a c o r e (商標) チップ上で抗体 1 . 4 . 168 により捕捉された後の結合シグナル (太線) を示す B i a c o r e (商標) センサーグラム。その他のシグナル (細い線) は対照シグナルである：一番上から一番下に向かって、それぞれ 500 nM の 8 . 1 . 2、500 nM の 1 . 4 . 168；500 nM の標的と無関係の抗体 < C K M M > M - 33 - I g G；および 500 nM の標的と無関係の対照抗体 < T S H > M - 1 . 20 - I g G の線を示す。これらの対照にいずれにおいても結合事象を検出することはできなかった。

40

【図 8】図 8 センサー表面上のビオチン化二重結合剤を示す、B i a c o r e (商標) アッセイの概略図。フローセル 1 (= F C 1) (示していない) 上で、アミノ - P E O - ビオチンを捕捉させた。F C 2、F C 3 および F C 4 上で、増大するリンカーの長さを有する二価結合剤を固定した (F C 2 上の二重結合剤 (T 0 - b i = 1 個の中央の T - B i のみ) および F C 4 上の二重結合剤 (T 40 - b i = 1 個の中央の T - B i ならびに上流および下流それぞれの 20 個の T) をそれぞれ示す)。分析物 1：そのペプチドの右側の末端において M - 1 . 4 . 168 s s F a b ' エピトープを含有する I G F - 1 R ペプチド (一番上の線) - このペプチドはリン酸化されていないため、M - 8 . 1 . 2 s s

50

F a b' ホスホ - エピトープは存在しない；分析物 2：M - 8 . 1 . 2 s s F a b' ホスホ - エピトープ (P) および M - 1 . 4 . 1 6 8 s s F a b' エピトープを含有する p I G F - 1 R ペプチド (2 番目の線) ；分析物 3：交差反応する M - 8 . 1 . 2 s s F a b' ホスホ - エピトープを含有するが M - 1 . 4 . 1 6 8 s s F a b' に関するエピトープは含有しない、p I R ペプチド (3 番目の線) 。

【図 9】図 9 二重結合剤実験の速度論データ。s s F a b' 8 . 1 . 2 および s s F a b' 1 . 4 . 1 6 8 を有する T 4 0 - T - B i リンカー二重結合剤 (= 図中の T 4 0) は、p I G F - 1 R に対して、p I R ($k_d = 3 . 7 0 E - 0 2 / s$) と比較した場合に 1 3 0 0 倍低い解離速度 ($k_d = 2 . 7 9 E - 0 5 / s$) を示す。

【図 1 0】図 1 0 T 4 0 - T - B i 二重結合剤の p I G F - 1 R ペプチド (リン酸化された I G F - 1 R ペプチド) に対する濃度依存的測定を示す B i a c o r e (商標) センサーグラム。そのアッセイの構成は図 8 において示されている通りである。p I G F - 1 R ペプチドの濃度系列は、3 0 n M、1 0 n M、2 x 3 . 3 n M、1 . 1 n M、0 . 4 n M、0 n M で注入された。対応するデータが図 9 の表において示されている。

【図 1 1】図 1 1 T 4 0 - T - B i 二重結合剤の I G F - 1 R ペプチド (リン酸化されていない I G F - 1 R ペプチド) に対する濃度依存的測定を示す B i a c o r e (商標) センサーグラム。そのアッセイの構成は図 8 において示されている通りである。I G F - 1 R ペプチドの濃度系列は、3 0 0 n M、1 0 0 n M、2 x 3 3 n M、1 1 n M、4 n M、0 n M で注入された。対応するデータが図 9 の表において示されている。

【図 1 2】図 1 2 T 4 0 - T - B i 二重結合剤の p I R ペプチド (リン酸化されたインスリン受容体ペプチド) に対する濃度依存的測定を示す B i a c o r e (商標) センサーグラム。そのアッセイの構成は図 8 において示されている通りである。p I R ペプチドの濃度系列は、1 0 0 n M、2 x 3 3 n M、1 1 n M、4 n M、0 n M で注入された。対応するデータを図 9 として示した表において示す。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 6】

本発明は式：A - a' : a - S - b : b' - B : X (n) の結合剤に関し、ここで A ならびに B は一価結合剤であり、ここで a' : a ならびに b : b' は結合対であり、ここで a' および a は b の b' への結合に干渉せず、逆もまた同じであり、ここで S は少なくとも 1 n m の長さのスペーサーであり、ここで：X は a'、a、b、b' または S の少なくとも 1 つに共有結合的にまたは結合対を介してのどちらかで結合した官能性部分を示し、ここで (n) は整数であり、少なくとも 1 であり、ここで - は共有結合を表し、ここでそのリンカー a - S - b は 6 ~ 1 0 0 n m の長さを有する。明らかであるように、本発明に従う結合剤は少なくとも 2 個の異なる特異性の一価結合剤を含む結合剤である。1 態様において、本発明に従う結合剤は 2 個の一価結合剤を含む。1 態様において、本発明に従う結合剤は二価または二重結合剤である。

【0 0 1 7】

当業者は理解するであろうように、本発明において記述される結合剤は、望まれるように単離および精製することができる。1 態様において、本発明は本明細書において開示されるような単離された結合剤に関する。“単離された”結合剤は、同定され、例えばそのような結合剤の合成において用いられる試薬混合物から分離および / または回収された結合剤である。そのような反応混合物の望まれない構成要素は、例えば最終的にその望まれる結合剤にならなかった一価結合剤である。1 態様において、その結合剤は 8 0 % より大きい純度まで精製される。一部の態様において、その結合剤はそれぞれ 9 0 重量 %、9 5 重量 %、9 8 重量 % または 9 9 重量 % より大きい純度まで精製される。本発明に従う結合剤の両方の一価結合剤がポリペプチドである場合、純度は例えば還元または非還元条件下での S D S - P A G E により、タンパク質検出において例えばクーマシーブルーまたは銀染色を用いて容易に決定される。純度を核酸レベルで評価する場合、サイズクロマトグラフィーを適用して結合剤を副産物から分離し、2 6 0 n m における D O を監視してその純度を評価する。

10

20

30

40

50

【0018】

冠詞“a”および“an”は、本明細書において、その冠詞の文法上の目的語の1個を、または1個より多くを（すなわち少なくとも1個を）指して用いられる。例として、“抗体(an antibody)”は1個の抗体または1個より多くの抗体を意味する。

【0019】

用語“ポリペプチド”および“タンパク質”は互換的に用いられる。本発明の意味でのポリペプチドは、アルファアミノペプチド結合により連結された少なくとも5個のアミノ酸からなる。

【0020】

“標的分子”は、それに関して決定または測定のための方法が求められている対象の生体分子である。好ましい標的分子は、リポタンパク質、ポリペプチド、ポリペプチドの複合体、二次修飾されたポリペプチドならびにポリペプチドおよび核酸の間の複合体である。1つの好ましい態様において、標的分子はポリペプチドである。

10

【0021】

本発明に従う“一価結合剤”（式I中のAおよびBそれぞれ）は、標的分子と、例えば標的ポリペプチドと単一の部位（すなわち特異的結合部位）において相互作用する分子である。一価抗体または抗体断片が結合剤として用いられる場合、この部位はパラトープ(paratop)と呼ばれる。

【0022】

理解されるであろうように、その一価結合剤AおよびBはそれぞれそれらの対応する抗原に特異的に結合する。好ましい態様において、その一価結合剤AおよびBが特異的に結合するエピトープは重複しない。当業者は理解するであろうように、特異的という用語は、その試料中に存在する他の生体分子がその用いられる結合剤に有意に結合しないことを意味するために用いられる。好ましくは、特異的な結合剤に関して、その標的分子以外の生体分子に対する結合親和性のレベルは、結果としてそれが特異的に結合する標的分子に対して有する親和性の10%以下、より好ましくは5%以下でしかない結合親和性をもたらし。

20

【0023】

一価結合剤の例は、ペプチド、ペプチド模倣物、アプタマー、spiegelmer、darpin、アンキリンリピートタンパク質、Kunitz型ドメイン、単ドメイン抗体(Hey, T. and Fiedler, E., et al., Trends Biotechnol. 23 (2005) 514-522参照)および抗体の一価断片である。

30

【0024】

特定の好ましい態様において、その一価結合剤はポリペプチドである。1つの好ましい態様において、その一価結合剤AおよびBのそれぞれはポリペプチドである。

特定の好ましい態様において、その一価結合剤AおよびBはそれぞれ一価抗体断片、好ましくはモノクローナル抗体に由来する一価断片である。

【0025】

一価抗体断片には下記で提供するようなFab、Fab'-SH、単ドメイン抗体、Fv、およびscFv断片が含まれるが、それらに限定されない。

40

好ましい態様において、その一価結合剤のすくなくとも一方は、単ドメイン抗体、モノクローナル抗体のFab断片またはFab'断片である。

【0026】

本明細書で開示される結合剤においてその一価結合剤の両方がモノクローナル抗体に由来し、Fab断片である、またはFab'断片である、またはFab断片およびFab'断片であることも、好ましい態様である。2個のFab断片を一価結合剤AおよびBとして含む結合剤も好ましい。

【0027】

モノクローナル抗体の技法は、特異的なモノクローナル抗体またはその断片の形態の極めて特異的な結合剤の製造を可能にする。当技術で特に周知であるのは、マウス、ウサギ

50

、ハムスター、またはあらゆる他の哺乳類を目的のポリペプチドで免疫することによりモノクローナル抗体またはその断片を作り出すための技法である。モノクローナル抗体またはその断片を作り出す別の方法は、 sFv （単鎖可変領域）、特にヒトの sFv のファージライブラリーの使用である（例えば、Griffiths et al., 米国特許第5,885,793号；McCafferty et al., 国際公開第92/01047号；Liming et al., 国際公開第99/06587号を参照）。

【0028】

抗体断片は伝統的な手段、例えば酵素消化により、または組み換え技法により生成されてよい。特定の抗体断片の総説に関して、Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134を参照。

【0029】

Fv は完全な抗原結合部位を含有する最小限の抗体断片であり、定常領域を欠いている。1態様において、2鎖 Fv 種は堅固に非共有結合的に会合した1個の重鎖可変ドメインおよび1個の軽鎖可変ドメインの二量体からなる。単鎖 Fv （ $scFv$ ）種の1態様において、1個の重鎖可変ドメインおよび1個の軽鎖可変ドメインが、その軽鎖および重鎖が2鎖 Fv 種における二量体構造に類似した二量体構造で会合することができるように、柔軟なペプチドリinkerにより共有結合的に連結されていることができる。 $scFv$ の総説に関して、例えばPlueckthun, In: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore（編者）, Springer-Verlag, ニューヨーク(1994), pp. 269-315を参照；国際公開第93/16185号ならびに米国特許第5,571,894号および第5,587,458号も参照。一般に、6個の超可変領域（ HVR ）が抗体に抗原結合特異性を与える。しかし、単一の可変領域（または抗原に特異的な3個の HVR のみを含む Fv の半分）でさえも抗原を認識して結合する能力を有する。

【0030】

Fab 断片は重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含有し、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1定常ドメイン（ $CH1$ ）も含有する。 Fab' 断片は、抗体ヒンジ領域からの1個以上のシステインを含む重鎖 $CH1$ ドメインのカルボキシ末端における少数の残基の追加により Fab 断片と異なる。 $Fab'-SH$ は、その定常ドメインのシステイン残基（単数または複数）が遊離のチオール基を有する Fab' に関する本明細書における名称である。

【0031】

抗体断片の生成のために様々な技法が開発されてきた。伝統的に、抗体断片は完全な抗体のタンパク質分解による消化により得られた（例えばMorimoto, K. et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24 (1992) 107-117; およびBrennan, M. et al., Science 229 (1985) 81-83を参照）。例えば、抗体のパパイン消化は、“ Fab ”断片と呼ばれそれぞれが単一の抗原結合部位を有する2個の同一の抗原結合断片および残りの“ Fc ”断片を生成し、その名前は容易に結晶化するその能力を反映している。

【0032】

抗体断片は組み換え宿主細胞により直接生成することもできる。 Fab 、 Fv および $scFv$ 抗体断片は全て大腸菌中で発現させてそれから分泌させることができ、従ってこれらの断片の容易な大量生産が可能である。抗体断片は、標準的な手順に従って抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、 $Fab'-SH$ 断片は大腸菌から直接回収することができる（Carter, P. et al., Bio/Technology 10 (1992) 163-167）。哺乳類細胞系も、抗体断片を発現させる、そして望まれるならば分泌させるために用いることができる。

【0033】

特定の態様において、本発明の一価結合剤は単一ドメイン抗体である。単一ドメイン抗体は抗体の重鎖可変ドメインの全部もしくは一部または軽鎖可変ドメインの全部もしくは一部を含む単一のポリペプチド鎖である。特定の態様において、単一ドメイン抗体はヒトの単一ドメイン抗体である（Domantis, Inc., Waltham, MA；例えば米国特許第6,248,516

10

20

30

40

50

B1号を参照)。1 態様において、単ドメイン抗体は抗体の重鎖可変ドメインの全部または一部からなる。

【0034】

用語“オリゴヌクレオチド”または“核酸配列”は、本明細書で用いられる際、一般に短い、一般に一本鎖の、少なくとも8ヌクレオチドを、最大で約1000ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを指す。好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも9、10、11、12、15、18、21、24、27または30ヌクレオチドの長さを有するであろう。好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは200、150、100、90、80、70、60、50、45、40、35または30ヌクレオチドより長い長さを有するであろう。下記でポリヌクレオチドに関して示す記述は、オリゴヌクレオチドに等しく、かつ完全に適用可能である。

【0035】

オリゴヌクレオチドという用語は広く理解されるべきであり、DNAおよびRNAならびにそれらの類似体および修飾を含む。

オリゴヌクレオチドは、例えば標準的な塩基であるデオキシアデノシン(dA)、デオキシグアノシン(dG)、デオキシシトシン(dC)、デオキシチミジン(dT)、デオキシウラシル(dU)において置換基を有する置換されたヌクレオチドを含有している。そのような置換された核酸塩基の例は次のものである：5-置換ピリミジン類、例えば5メチル dC、アミノアリル dUまたは dC、5-(アミノエチル-3-アクリルイミド)-dU、5プロピニル dUまたは dC、5ハロゲン化-dUまたは dC；N置換ピリミジン類、例えばN4エチル dC；N置換プリン類、例えばN6エチル dA、N2エチル dG；8置換プリン類、例えば8-[6-アミノ)-ヘキサ-1-イル]-8-アミノ-dGまたは dA、8ハロゲン化 dAまたは dG、8-アルキル dGまたは dA；および2置換 dA、例えば2アミノ dA。

【0036】

オリゴヌクレオチドは、例えば標準的な塩基であるデオキシアデノシン(dA)、デオキシグアノシン(dG)、デオキシシトシン(dC)、デオキシチミジン(dT)、デオキシウラシル(dU)において置換基を有する置換されたヌクレオチドを含有している。そのような置換された核酸塩基の例は次のものである：5-置換ピリミジン類、例えば5メチル dC、アミノアリル dUまたは dC、5-(アミノエチル-3-アクリルイミド)-dU、5-プロピニル-dUまたは dC、5ハロゲン化-dUまたは dC；N置換ピリミジン類、例えばN4-エチル-dC；N置換プリン類、例えばN6-エチル-dA、N2-エチル-dG；8置換プリン類、例えば8-[6-アミノ)-ヘキサ-1-イル]-8-アミノ-dGまたは dA、8ハロゲン化 dAまたは dG、8-アルキル dGまたは dA；および2置換 dA、例えば2アミノ dA。

【0037】

オリゴヌクレオチドはヌクレオチドまたはヌクレオシド類似体を含有している。すなわち、天然存在核酸塩基を以下のような核酸塩基類似体を用いることにより交換することができる：5-ニトロインドール d リボシド；3ニトロピロール d リボシド、デオキシイノシン(dI)、デオキシキサントシン(deoxyxanthosine)(dX)；7デアザ-dG、-dA、-dIまたは-dX；7-デアザ-8-アザ-dG、-dA、-dIまたは-dX；8-アザ-dA、-dG、-dIまたは-dX；dホルマイシン；プソイド dU；プソイドイソ dC；4チオ dT；6チオ dG；2チオ dT；イソ dG；5-メチル-イソ-dC；N8-結合型8-アザ-7-デアザ-dA；5,6-ジヒドロ-5-アザ-dC；およびエテノ-dAまたはピロロ-dC(pyrolo-dC)。当業者には明らかであるように、相補鎖中の核酸塩基は二本鎖形成が特異的であるような様式で選択されなければならない。例えば、5-メチル-イソ-dCが一方の鎖(例えば(a))において用いられるならば、イソ dGがその相補鎖(例えば(a'))中にななければならない。

【0038】

10

20

30

40

50

そのオリゴヌクレオチド主鎖は、置換された糖残基、糖類似体、ヌクレオシド間ホスフェート部分における改変を含有するように改変されてよく、および/またはPNAであってよい。

【0039】

オリゴヌクレオチドは、例えば2'-メトキシ、2'-フルオロ、2'-メチルセレン、2'-アリルオキシ、4'-メチルdN(ここでNは核酸塩基、例えばA、G、C、TまたはUである)のような置換されたデオキシリボースを有するヌクレオチドを含有してよい。

【0040】

糖類似体は、例えばキシロース；(2'-O, 4'-Cメチレン)-(LNAとして知られるオリゴマー)または(2'-O, 4'-Cエチレン)-(ENAとして知られるオリゴマー)のような2', 4'架橋リボース；L-リボース、L-d-リボース、ヘキシトール(HNAとして知られるオリゴマー)；シクロヘキセニル(CeNAとして知られるオリゴマー)；アルトリトール(ANAとして知られるオリゴマー)；C3'およびC5'原子がエチレン架橋により連結されており、それが縮合してシクロプロパン環になっている三環式リボース類似体(トリシクロDNAとして知られるオリゴマー)；グリセリン(GNAとして知られるオリゴマー)；グルコピラノース(ホモDNA(Homo DNA)として知られるオリゴマー)；カルバリボース(carbaribose)(テトラヒドロフラン小単位の代わりにシクロペンタンを有する)；ヒドロキシメチル-モルホリン(モルホリノDNAとして知られるオリゴマー)である。

【0041】

多数のヌクレオシド間ホスフェート部分の改変もハイブリダイゼーション特性に干渉しないことが分かっており、そのような主鎖の改変は置換されたヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体と組み合わせることもできる。例はホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミデートおよびメチルホスホネートオリゴヌクレオチドである。

【0042】

PNA(ホスフェートおよびd-リボースなしの主鎖を有する)もDNA類似体として用いることができる。

上記で言及した修飾されたヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、ならびにオリゴヌクレオチド主鎖の改変は、本発明の意味でのオリゴヌクレオチド中で望まれるように組み合わせることができる。

【0043】

a-S-bからなるリンカーLは、6~100nmの長さを有する。好ましくは、a-S-bからなるリンカーLは6~80nmの長さを有する。そのリンカーが6~50nmの、または6~40nmの長さを有することも好ましい。やはり好ましい態様において、そのリンカーは10nm以上の長さを、または15nm以上の長さを有するであろう。1態様において、そのリンカーは10nm~50nmの長さを有する。1態様において、aおよびbはそれぞれ結合対のメンバーであり、それぞれ少なくとも2.5nmの長さを有する。

【0044】

理論上の、および複合的な方法による、所与のリンカー(a-S-b)の非ヌクレオシド構成要素の長さは、その非ヌクレオシド構成要素に化学的に類似した化合物の既知の結合距離および結合角を用いることにより計算することができる。そのような結合距離は、標準的な教本：CRC Handbook of Chemistry and Physics, 第91版, 2010-2011, 第9節においていくつかの分子に関して要約されている。しかし、正確な結合距離はそれぞれの化合物に関して異なる。その結合角においても変動性が存在する。

【0045】

従って、そのような計算において平均のパラメーター(分かりやすい近似値)を用いることがより实际的である。

スパーサーまたはリンカーの長さの計算において、以下の近似値が適用される：a)非

10

20

30

40

50

ヌクレオシド構成要素の長さの計算に関して、連結された原子の性質とは無関係に、 180° の結合角を伴う 130 pm の平均結合長が用いられ；b)一本鎖中の1個のヌクレオチドは 500 pm で計算され、そしてc)二本鎖中の1個のヌクレオチドは 330 pm で計算される。

【0046】

130 pm の値は、2個の $C(sp^3)$ の間の結合角が $109^\circ 28'$ および距離が 153 pm である $C(sp^3)-C(sp^3)-C(sp^3)$ 鎖の2個の末端の炭素原子の距離がおおよそ 250 pm であり、それは 180° の仮定された結合角および 125 pm の2個の $C(sp^3)$ の間の結合距離に換算されるという計算に基づく。PおよびSのような複素原子ならびに sp^2 および sp のC原子もそのスペーサーの一部であり得ることを考慮して、 130 pm の値が採用される。スペーサーがシクロアルキルまたはアリールのような環構造を含む場合、その距離は類似の方法で、その距離を定めている原子鎖全体の一部である前記の環構造の結合の数を数えることにより計算される。

【0047】

スペーサーSは、例えば望まれる長さを、ならびに他の望まれる特性を提供するために必要であると解釈することができる。そのスペーサーは、例えば完全または部分的に天然存在または非天然存在アミノ酸で、ホスフェート-糖単位、例えば核酸塩基なしのDNA様主鎖で、グリコペプチド性(glyco-peptidic)構造で、または少なくとも部分的に糖単位で、または少なくとも部分的にグリコール類もしくはアクリルアミドのような重合可能な小単位で構成されていることができる。

【0048】

本発明に従う結合剤中のスペーサーSの長さは、望まれるように異なっていてよい。多様な長さの利用可能なスペーサー(ライブラリー)を容易に作製するために、そのようなライブラリーのスペーサーへの簡単な合成経路(access)を有することが好ましい。スペーサーの組み合わせ固相合成が好ましい。スペーサーは約 100 nm の長さまで合成されなければならないため、その合成戦略は、その単量体合成構築ブロックが固相合成の間に高い効率で組み立てられるような方法で選択される。単量体構築ブロックとしてのホスホラミダイトの組み立てに基づくデオキシオリゴヌクレオチドの合成は、完全にこの要求を満たす。そのようなスペーサー中で、スペーサー内の単量体単位は、それぞれの場合においてホスフェートまたはホスフェート類似体部分により連結されている。

【0049】

そのスペーサーSは、多官能性アミノカルボン酸の遊離の正または/および負に荷電した基、例えばアミノ、カルボキシレートまたはホスフェートを含有することができる。例えば、その電荷担体は、a)1個のアミノ基および2個のカルボキシレート基またはb)2個のアミノ基および1個のカルボキシレート基を含有する三官能性アミノカルボン酸に由来することができる。そのような三官能性アミノカルボン酸の例は、リシン、オルニチン、ヒドロキシリシン、 γ -ジアミノプロピオン酸、アルギニン、アスパラギン酸およびグルタミン酸、カルボキシグルタミン酸ならびにEP-A-0 618 192またはUS-A-5,519,142において記述されている合成三官能性カルボン酸のような合成三官能性カルボン酸である。あるいは、その三官能性アミノカルボン酸a)中のカルボキシレート基の1つをホスフェート、スルホネートまたはサルフェート基により置き換えることができる。そのような三官能性アミノ酸の例はホスホセリンである。

【0050】

そのスペーサーSは、無電荷の親水基も含有することができる。無電荷の親水基の好ましい例は、エチレンオキシドまたは好ましくは少なくとも3個のエチレンオキシド単位を有するポリエチレンオキシド基、スルホキシド、スルホン、カルボン酸アミド、カルボン酸エステル、ホスホン酸アミド、ホスホン酸エステル、リン酸アミド、リン酸エステル、スルホン酸アミド、スルホン酸エステル、硫酸アミドおよび硫酸エステル基である。そのアミド基は、好ましくは第1級アミド基、特に好ましくはアミノ酸(例えばアミノ酸アスパラギンおよびグルタミン)側鎖基中のカルボン酸アミド残基である。そのエステルは好

ましくは親水性アルコール類、特に C 1 ~ C 3 アルコール類またはジオール類またはトリオール類に由来する。

【 0 0 5 1 】

1 態様において、そのスペーサー S は 1 タイプの単量体からなる。例えば、そのスペーサーは排他的にアミノ酸、糖残基、ジオール類、リン糖酸 (p h o s p h o - s u g a r) 単位からなり、またはそれはそれぞれ核酸であることができる。

【 0 0 5 2 】

1 態様において、そのスペーサーは DNA である。1 つの好ましい態様において、そのスペーサーは、ベータ - L - DNA、L - - DNA または鏡像 DNA としても知られている DNA の L - 立体異性体である。L - DNA は、2 本の L - DNA の相補的な一本鎖の間でのみ二本鎖が形成され、L - DNA の一本鎖および相補的な DNA 鎖の間では二本鎖が形成されないことを意味する直交 (o r t h o g o n a l) ハイブリダイゼーション挙動、ヌクレアーゼ耐性、ならびに長いスペーサーでさえも合成が容易であることのような利点を特徴とする。指摘したように、合成の容易さおよびスペーサーの長さにおける変動可能性は、スペーサーライブラリーに関して重要である。変動可能な長さのスペーサーは、最適な長さのスペーサーを有する本発明に従う結合剤の同定、従って 2 個の一価結合剤の間の最適な距離の提供において極めて有用である。

【 0 0 5 3 】

スペーサー構築ブロックは、その名の通り、間隔を空ける部分をスペーサー S の中に導入するために、またはリンカー a - S - b のスペーサー S を構築するために用いることができる。

【 0 0 5 4 】

異なる数および種類の非ヌクレオチド性ならびにヌクレオチド性スペーサー構築ブロックが、間隔を空ける部分を導入するためにすぐに利用できる。

多くの異なる非ヌクレオチド性二官能性スペーサー構築ブロックが文献において既知であり、多種多様なものが商業的に入手可能である。非ヌクレオチド性二官能性スペーサー構築の選択は、そのスペーサー分子の電荷および柔軟性に影響を及ぼす。

【 0 0 5 5 】

二官能性スペーサー構築ブロックにおいて、酸不安定性保護基で保護されたヒドロキシル基がホスホラミダイト基に連結されている。

1 態様における二官能性スペーサー構築ブロックは、非ヌクレオシド性化合物である。例えば、そのようなスペーサーは C 2 ~ C 18 アルキル、アルケニル、アルキニル (a l k i n y l) 炭素鎖であるが、前記のアルキル、アルケニル、アルキニル (a l k i n y l) 鎖はそのリンカーの親水性を増大させるために追加のエチレンオキシおよび / またはアミド部分または四級化された (q u a r t e r n i z e d) 陽イオン性アミン部分により遮られていてよい。場合により 1 または 2 個の C 1 ~ C 6 アルキル基で置換されている C 5 ~ C 6 - シクロアルキル、C 4 N、C 5 N、C 4 O、C 5 O - ヘテロシクロアルキル、フェニルのような環状部分も、非ヌクレオシド性二官能性スペーサー部分として用いることができる。好ましい二官能性構築ブロックは、C 3 ~ C 6 アルキル部分およびトリ - ~ ヘキサ - エチレングリコール鎖を含む。表 I は、異なる親水性、異なる剛性および異なる電荷を有するヌクレオチド性二官能性スペーサー構築ブロックのいくつかの例を示す。一方の酸素原子は酸不安定性保護基、好ましくはジメトキシトリチルに連結されており、他方はホスホラミダイトの一部である。

【 0 0 5 6 】

10

20

30

40

【表 1】

表 I : 非ヌクレオチド性二官能性スペーサー構築ブロックの例

非ヌクレオチド性二官能性スペーサー構築ブロック	参考文献
	Seela, F., Nucleic Acids Research 15 (1987) 3113-3129
	Iyer, R.P., Nucleic Acids Research 18 (1990) 2855-2859
	国際公開第89/02931 A1号
	欧州特許第1 538 221 号
	米国特許出願公開 第2004/224372号
	国際公開 第2007/069092号

【0057】

スペーサー S を構築する、またはスペーサー S 中に間隔を空ける部分を導入するための簡単な方法は、標準的な D または L ヌクレオシドホスホラミダイト構築ブロックを用いることである。1 態様において、一本鎖の一続きの d T が用いられる。d T は塩基保護基を有しないため、これは好都合である。

【0058】

二本鎖の長さは一本鎖と比較して低減し、二本鎖は一本鎖よりも堅いため、スペーサーの長さ（結合対のメンバー a および b の間の距離）およびスペーサーの柔軟性を変化させるためにハイブリダイゼーションを用いることができる。

【0059】

ハイブリダイゼーションに関して、1 態様において、官能性部分 X で修飾されたオリゴヌクレオチドが用いられる。ハイブリダイゼーションのために用いられるオリゴヌクレオチドは、そのスペーサーとハイブリダイズしない 1 または 2 個の末端の延長部分を有することができ、および / またはそれは内部で分枝している。そのようなスペーサーとハイブリダイズしない（かつ結合対 a : a' および b : b' に干渉しない）末端の延長部分は、さらなるハイブリダイゼーション事象のために用いることができる。1 態様において、末端の延長部分とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは標識されたオリゴヌクレオチド

である。この標識されたオリゴヌクレオチドも、さらなるハイブリダイゼーションを可能にするための末端の延長部分を含んでいてよく、または分枝していてもよく、それによりポリヌクレオチドの凝集体またはデンドリマーを得ることができる。多数の標識 (polylabel) をもたらすために、またはXの高い局所的濃度を得るために、好ましくはポリオリゴ核酸デンドリマーが用いられる。

【0060】

1 態様において、スパーサーSは1 ~ 100 nmの主鎖の長さを有する。言い換えると、ここで式Iの基aおよびbは1 ~ 100 nm離れている。1 態様において、aおよびbはそれぞれ結合対のメンバーであり、そのスパーサーSは1 ~ 95 nmの主鎖の長さを有する。

10

【0061】

“a' : a”ならびに“b : b'”はそれぞれ独立して結合対を表す。1 態様において、その結合対のメンバーaおよびbのそれぞれは少なくとも2.5 nmの長さを有する。

それぞれaおよびa'は結合対a' : aのメンバーであり、bおよびb'は結合対b : b'のメンバーである。好ましくは、結合対のそれぞれのメンバーは10 kD以下の分子量である。さらなるやはり好ましい態様において、そのような結合対のそれぞれの結合剤の分子量は8、7、6、5または4 kD以下である。

【0062】

結合対a : a'またはb' : bそれぞれに関する(結合対a : a'またはb' : bそれぞれ内の)結合親和性は少なくとも 10^8 l/molである。両方の結合対は異なる。ある結合対に関して、違いは例えば相互結合(reciprocal binding)、例えばaならびにa'のbまたはb'に対する結合に関する親和性に対するa : a'内の親和性の10%以下である場合に認められる。その相互結合、すなわちaならびにa'のbまたはb'それぞれに対する結合が対a : a'内の親和性の5%以下である、またはそれが対a : a'内の親和性の2%以下である場合も好ましい。1 態様において、その違いは、その相互(交差反応性)結合が結合対内の特異的結合親和性と比較して1%以下であるほど顕著である。

20

【0063】

1 態様において、a' : aおよびb : b'は結合対であり、結合対a' : aおよびb : b'のメンバーはロイシンジッパードメイン二量体およびハイブリダイズする核酸配列からなる群から選択される。1 態様において、両方の結合対はロイシンジッパードメイン二量体を表す。1 態様において、両方の結合対はハイブリダイズする核酸配列である。

30

【0064】

用語“ロイシンジッパードメイン”は、一続きのおおよそ35残基中に7残基ごとにロイシン残基が存在することを特徴とする一般的に認識されている二量体化ドメインを示すために用いられている。ロイシンジッパードメインは、それらがあるタンパク質のオリゴマー化を促進するペプチドである。ロイシンジッパーはいくつかのDNA結合タンパク質中で最初に同定され(Landschulz, W.H. et al., Science 240 (1988) 1759-1764)、それ以来様々な異なるタンパク質中で見付かってきた。既知のロイシンジッパーの中には、二量体化または3量体化する天然存在ペプチドおよびその誘導体がある。可溶性多量体タンパク質を生成するのに適したロイシンジッパードメインの例がPCT出願国際公開第94/10308号において記述されており、そのロイシンジッパーはHoppe, H.J. et al., FEBS Lett. 344 (1994) 191-195において記述されている肺サーファクタントタンパク質D (SPD) に由来する。

40

【0065】

ロイシンジッパードメインは、アルファらせんのコイルドコイルにより一緒の状態を保たれた二量体(結合対)を形成する。コイルドコイルは一周につき3.5残基を有し、それは7残基ごとにそのらせんの軸に関して同等の位置を占めることを意味する。そのコイルドコイルの内側のロイシンの規則的な配列は、疎水性およびファンデルワールス相互作用によりその構造を安定化する。

50

【 0 0 6 6 】

ロイシンジッパードメインが第1結合対 (a ' : a) および第2結合対 (b : b ') を形成する場合、両方のロイシンジッパー配列は異なり、すなわち、配列 a および a ' は b および b ' に結合しない。ロイシンジッパードメインは、そのようなドメインを含有することが既知である天然タンパク質、例えば転写因子から単離することができる。1つのロイシンジッパードメインが例えば転写因子 f o s に由来し、第2のロイシンジッパードメインが転写因子 j u n に由来することができる。ロイシンジッパードメインは合成および設計のための当技術で既知の標準的な技法を用いて人工的に設計および合成することもできる。

【 0 0 6 7 】

10

1つの好ましい態様において、結合対 a ' : a および b : b ' の両方のメンバー、すなわち a 、 a ' 、 b および b ' はロイシンジッパードメインを表し、スペーサー S はアミノ酸からなる。この態様において、コンストラクト a - S - b の生成は容易に可能である。そのようなスペーサー S の長さを望まれるように変えることは、当業者にとって簡単である。そのようなポリペプチドは合成することができ、または組み換えにより生成することができる。

【 0 0 6 8 】

例えば、N末端においてロイシンジッパーペプチドに、そしてC末端においてロイシンジッパーペプチドに融合したスペーサーポリペプチドを含む組み換え融合タンパク質を、標準的な技法に従って適切な宿主細胞中で発現させることができる。望まれるペプチドスペーサーをコードするDNA配列を、第1ロイシンジッパードメイン a のメンバーをコードする配列および同じ読み枠中で第2ロイシンジッパードメイン b のメンバーをコードするDNA配列の間に挿入することができる。

20

【 0 0 6 9 】

そのスペーサー S は、そのリンカー a - S - b がポリペプチドである場合、1態様において、GGGGS (SEQ ID NO:13) アミノ酸配列モチーフを1回または数回含む。そのスペーサー S はタグ配列も含んでいてよい。そのタグ配列は、一般的に用いられるタンパク質認識タグ、例えば YPYDVPDYA (HA-タグ) (SEQ ID NO:14) または GLNDIFEAQKIEWHE (Avi-タグ) (SEQ ID NO:15) から選択されてよい。

【 0 0 7 0 】

30

1つの好ましい態様において、結合対 (a ' : a) および (b : b ') の両方がハイブリダイズする核酸配列である。

名称により既に示されているように、a および a ' ならびに b および b ' はそれぞれ互いにハイブリダイズする。一方で a および a ' 中に含まれる核酸配列と他方で b および b ' 中に含まれる核酸配列は異なる。言い換えると、結合対 a ' : a 中の配列はそれぞれ結合対 b : b ' の配列に結合せず、逆もまた同じである。1態様において、本発明は式 I の少なくとも二重の結合剤に関し、ここでその結合対 a : a ' および b : b ' それぞれは両方ともハイブリダイズする核酸配列であり、ここでその異なる結合対 a ' : a および b : b ' のハイブリダイズする核酸配列は互いとハイブリダイズしない。言い換えると、a および a ' は互いにハイブリダイズするが、b または b ' のいずれにも結合せず、それらのハイブリダイゼーションにも干渉せず、逆もまた同じである。ハイブリダイゼーションの速度論およびハイブリダイゼーションの特異性は、融点分析により容易に監視することができる。結合対 (例えば a : a ') の特異的なハイブリダイゼーションおよび (例えば b または b ' への) 不干渉は、対 a : a ' に関する融解温度が b または b ' とのあらゆる可能性のある組み合わせそれぞれ (すなわち a : b ; a : b ' ; a ' : b および a ' : b ') と比較して少なくとも 20 高い場合に認められる。

40

【 0 0 7 1 】

結合対、例えば (a : a ') またはあらゆる他の核酸配列に基づく結合対を形成する核酸配列は、あらゆる天然存在核酸塩基またはそれらに対する類似体を弱めて (c o m p r o m i s e) よく、上記で記述したような改変された、もしくは改変されていない主鎖を

50

、それが多数の塩基対合により安定な二本鎖を形成することができる限り、有してよい。安定は、その二本鎖の融解温度が37より高いことを意味する。好ましくは、その二本鎖は2本の完全に相補的な一本鎖からなる。しかし、37における安定性が与えられる限り、ミスマッチまたは挿入が可能である。

【0072】

当業者は理解しているであろうように、核酸二本鎖は鎖間架橋によりさらに安定化され得る。いくつかの適切な架橋法、例えばソラレンを用いる、またはチオヌクレオシドに基づく方法が当業者に既知である。

【0073】

結合対のメンバーである核酸配列は、好ましくは12~50ヌクレオチドからなる。そのような核酸配列が15~35ヌクレオチドからなるであろうことも好ましい。

RNアーゼは至る所にあり、RNAに基づく結合対および/またはスペーサー配列の望まれない消化を避けるために特別な注意を払わなければならない。例えばRNAに基づく結合対および/またはスペーサーを用いることは確かに可能であるが、DNAに基づく結合対および/またはスペーサーが好ましい態様である。

【0074】

直交相補性オリゴヌクレオチドの2つより多くの対を提供するために、適切なハイブリダイズする核酸配列を容易に設計することができ、2つより多くの結合対の容易な生成および使用が可能になる。本発明の結合剤においてハイブリダイズする核酸配列を用いることの別の利点は、核酸配列中に容易に修飾を導入することができることである。修飾された構築ブロックは商業的に入手可能であり、それは例えば官能性部分を含むリンカーの容易な合成を可能にする。そのような官能性部分は、あらゆる望まれる位置において、構造aおよびa'ならびにbおよびb'および/またはSのいずれの中にも、それらがオリゴヌクレオチドを表す限り、容易に導入することができる。

【0075】

1つの好ましい態様において、式Iに従う結合剤中に含まれるスペーサーSは核酸である。1つの好ましい態様において、両方の結合対がハイブリダイズする核酸配列であり、スペーサーSも核酸である。この態様において、a-S-bからなるリンカーLはオリゴヌクレオチドである。

【0076】

そのスペーサーSならびに配列a、a'、bおよびb'が全てオリゴヌクレオチド配列である場合、Sならびに結合対a':aおよびb:b'それぞれのメンバーaおよびbを含むリンカーLに相当する単一のオリゴヌクレオチドを提供および合成することは、容易に可能である。その一価結合剤AおよびBがそれぞれポリペプチドである場合、それらはそれぞれそのハイブリダイズする核酸配列a'およびb'それぞれに容易に連結することができる。そのようなコンストラクト中に含まれるスペーサーSの長さは、あらゆる望まれる方法で容易に変えることができる。3つのコンストラクトa-S-b、A-a'およびb'-Bを元にして、式Iの結合剤を、標準的な手順に従って、a':aおよびb:b'それぞれの間のハイブリダイゼーションにより最も用意に得ることができる。異なる長さのスペーサーが用いられる場合、結果として得られるコンストラクトは他の点では同一の結合剤を提供するが、一価結合剤AおよびBの間において異なる距離を有する。これは最適な距離および/または柔軟性を可能にする。

【0077】

1つの好ましい態様において、そのスペーサSならびに配列a、a'、bおよびb'はDNAである。

鏡像異性のL-DNAは、その直交ハイブリダイゼーション挙動、そのヌクレアーゼ耐性に関して、および変動可能な長さのオリゴヌクレオチドの合成の容易さに関して知られている。この適切なスペーサーを設計することによるリンカーの長さの変動の容易さは、本明細書で開示されるような結合剤のその抗原(単数または複数)への結合を最適化するために重要である。

10

20

30

40

50

【0078】

1つの好ましい態様において、そのリンカー $L (= a - S - b)$ は鏡像異性の $L - DNA$ または $L - RNA$ である。1つの好ましい態様において、リンカー $a - S - b$ は鏡像異性の $L - DNA$ である。1つの好ましい態様において、 a 、 a' 、 b および b' ならびにそのスペーサー S は鏡像異性の $L - DNA$ または $L - RNA$ である。1つの好ましい態様において、 a 、 a' 、 b および b' ならびにそのスペーサー S は鏡像異性の $L - DNA$ である。

【0079】

1態様において、そのスペーサー S はオリゴヌクレオチドであり、互いにハイブリダイズすることができる末端を含む2つの部分で合成される。この場合、そのスペーサー S はこれらのハイブリダイズすることができる末端の互いとのハイブリダイゼーションにより簡単に構築することができる。結果として得られたスペーサーコンストラクトは、オリゴヌクレオチド二本鎖部分を含む。明らかであるように、そのスペーサーをその方法で解釈した(*constructed*)場合、前記の二本鎖を形成するそのハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチド構成要素の配列は、結合対 $a : a'$ および $b : b'$ とのハイブリダイゼーションまたはそれらへの干渉が起こり得ないような様式で選択される。

【0080】

上記で既に記述したように、式Iの一価特異的結合剤 A および B は核酸であってよい。本発明の1態様において、 a' 、 a 、 b 、 b' 、 A 、 B および s は全てオリゴヌクレオチド配列である。この態様において、式Iのサブユニット $A - a'$ 、 $a - S - b$ および $b' - B$ は標準的な手順に従って容易に、かつ独立して合成することができ、一般に用いられる標準的な手順に従ってハイブリダイゼーションにより組み合わせることができる。その官能性部分 X は、好ましくは結合基、標識基、エフェクター基および反応基からなる群から選択される。

【0081】

1個より多くの官能性部分 X が存在する場合、それぞれのそのような官能性部分はそれぞれの場合において独立して結合基、標識基、エフェクター基または反応基であることができる。

【0082】

1態様において、その官能性部分 X は好ましくは結合基、標識基およびエフェクター基からなる群から選択される。

1態様において、その基 X は結合基である。当業者には明らかであるように、その結合基 X は対 $a' : a$ および $b : b'$ に干渉しないように選択されるであろう。

【0083】

結合基の例はバイオアフィン(*bioaffine*)結合対のパートナーであり、それはそのバイオアフィン結合対の他方のパートナーと特異的に相互作用することができる。適切なバイオアフィン結合対は、ハプテンまたは抗原および抗体；ビオチンまたはビオチン類似体、例えばアミノビオチン、イミノビオチンまたはデスチオビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン；糖およびレクチン、オリゴヌクレオチドおよび相補性オリゴヌクレオチド、受容体およびリガンド、例えばステロイドホルモン受容体およびステロイドホルモンである。1態様において、 X は結合基であり、式Iの化合物の a' 、 a 、 b 、 b' または S の少なくとも1つに共有結合している。好ましくは、バイオアフィン結合対のより小さいパートナー、例えばビオチンもしくはそれに対する類似体、受容体リガンド、ハプテンまたはオリゴヌクレオチドは、上記で定義されたような a' 、 a 、 S 、 b または b' の少なくとも(*at least*)1個に共有結合している。

【0084】

1態様において、官能性部分 X は、ハプテン；ビオチンまたはビオチン類似体、例えばアミノビオチン、イミノビオチンまたはデスチオビオチン；オリゴヌクレオチドおよびステロイドホルモンから選択される結合基である。

【0085】

10

20

30

40

50

1 態様において、その官能性部分 X は反応基である。その反応基は、アミノ、スルフィドリル、カルボキシレート、ヒドロキシル、アジド、アルキニル (Alkiny l) またはアルケニルのようなあらゆる既知の反応基から選択することができる。1 態様において、その反応基はマレインイミド、スクシンイミジル、ジチオピリジル、ニトロフェニルエステル、ヘキサフルオロフェニルエステルから選択される。

【0086】

1 態様において、その官能性部分 X は標識基である。その標識基はあらゆる既知の検出可能な基から選択することができる。当業者は、最少の消光での最高の感度のために適切であるように標識の数を選択するであろう。

【0087】

その標識基はあらゆる既知の検出可能な基から選択することができる。1 態様において、その標識基は、色素、例えば発光標識基、例えば化学発光基、例えばアクリジニウムエステル類もしくはジオキセタン類、または蛍光色素、例えばフルオレセイン、クマリン、ローダミン、オキサジン、レゾルフィン、シアニンおよびそれらの誘導体、発光性金属錯体、例えばルテニウムもしくはユーロピウム錯体、CEDIA (クローン化酵素供与体免疫アッセイ (Cloned Enzyme Donor Immunoassay))、例えば欧州特許第 0 061 888 号) に関して用いられるような酵素、微粒子もしくはナノ粒子、例えばラテックス粒子または金属ゾル、ならびに放射性同位体から選択される。

【0088】

1 態様において、その標識基は発光性金属錯体であり、その化合物は一般式 (II) の構造を有し：



式中、M は希土類または遷移金属イオンから選択される二価または三価金属陽イオンであり、 L_1 、 L_2 および L_3 は同じまたは異なり、少なくとも 2 個の窒素含有複素環を有するリガンドを示し、ここで L_1 、 L_2 および L_3 はその金属陽イオンに窒素原子を介して結合しており、X はリンカー Y を介してそのリガンド L_1 、 L_2 および L_3 の少なくとも 1 個に共有結合している反応性官能基であり、n は 1 から 10 まで、好ましくは 1 から 4 までの整数であり、m は 1 または 2、好ましくは 1 であり、A は電荷を等しくするために必要である可能性のある対イオンを示す。

【0089】

その金属錯体は好ましくは発光性金属錯体、すなわち適切な励起後に検出可能な発光反応を経る金属錯体である。その発光反応は、例えば蛍光または電気化学発光測定により検出することができる。この錯体中の金属陽イオンは、例えば遷移金属または希土類金属である。その金属は好ましくはルテニウム、オスミウム、レニウム、イリジウム、ロジウム、白金、インジウム、パラジウム、モリブデン、テクネチウム、銅、クロムまたはタングステンである。ルテニウム、イリジウム、レニウム、クロムおよびオスミウムが特に好ましい。ルテニウムが最も好ましい。

【0090】

リガンド L_1 、 L_2 および L_3 は、少なくとも 2 個の窒素含有複素環を有するリガンドである。芳香族複素環、例えばビピリジル、ビピラジル、ターピリジルおよびフェナントロリルが好ましい。そのリガンド L_1 、 L_2 および L_3 は、特に好ましくはビピリジンおよびフェナントロリン環系から選択される。

【0091】

その錯体はさらに電荷を等しくするための 1 個または数個の対イオン A を含有することができる。適切な負に荷電した対イオンの例は、ハロゲン化物、 OH^- 、カーボネート、アルキルカルボキシレート、例えばトリフルオロアセテート、サルフェート、ヘキサフルオロホスフェートおよびテトラフルオロボレート基である。ヘキサフルオロホスフェート、トリフルオロアセテートおよびテトラフルオロボレート基が特に好ましい。適切な正に荷電した対イオンの例は、一価陽イオン、例えばアルカリ金属およびアンモニウムイオンである。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 2 】

さらに好ましい態様において、その官能性部分 X はエフェクター基である。好ましいエフェクター基は療法上有効物質である。

療法上有効物質は、例えば癌の抑制においてそれらが有効である方式が異なる。それらはアルキル化により、架橋により、または DNA の二本鎖の切断により DNA 鋳型を損傷することができる。他の療法上有効物質はインターカレーションにより RNA 合成を遮断することができる。一部の薬剤は紡錘体毒、例えばピンカアルカロイド類、または酵素活性を阻害する抗代謝剤、またはホルモン性薬剤および抗ホルモン性薬剤である。エフェクター基 X は、アルキル化剤、抗代謝剤、抗腫瘍性抗生物質、ピンカアルカロイド類、エピポドフィロトキシン類、ニトロソ尿素類、ホルモン性薬剤および抗ホルモン性薬剤、なら

10

【 0 0 9 3 】

現在より好ましいアルキル化剤は、シクロホスファミド、クロラムブシル、ブスルファン、メルファラン、チオテパ、イホスファミド、ナイトロジェンマスタードにより例示することができる。

【 0 0 9 4 】

現在より好ましい抗代謝剤は、メトトレキセート、5 - フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、6 - チオグアニン、6 - メルカプトプリンにより例示することができる。

現在より好ましい抗腫瘍性抗生物質は、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イドルビシン (idorubicin)、ニミトキサントロン (nimitoxantrolon)、ダクチノマイシン、プレオマイシン、マイトマイシン、およびプリカマイシンにより例示することができる。

20

【 0 0 9 5 】

現在より好ましい紡錘体毒はメイタンシンおよびメイタンシノイド類により例示することができ、ピンカアルカロイド類およびエピポドフィロトキシン類はピンクリスチン、ピンブラスチン、ビンデスチン (vindeshtin)、エトポシド、テニポシドにより例示することができる。

【 0 0 9 6 】

現在より好ましいニトロソ尿素類は、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシンにより例示することができる。

30

現在より好ましいホルモン性薬剤および抗ホルモン性薬剤は、アドレノコルチコルチコイド類 (adrenocorticoids)、エストロゲン類、抗エストロゲン剤、プロゲステロン類、アロマターゼ阻害剤、アンドロゲン類、抗アンドロゲン剤により例示することができる。

【 0 0 9 7 】

追加の好ましい無作為な合成薬剤は、ダカルバジン、ヘキサメチルメラミン、ヒドロキシ尿素、ミトタン、プロカルバジド (procarbazine)、シスプラチン、カルボプラチンにより例示することができる。

【 0 0 9 8 】

官能性部分 X は、共有結合的に、または追加の結合対を介してのどちらかで、(a ')、(a)、(b)、(b ') または S の少なくとも 1 つに結合している。その官能性部分 X は 1 回または数 (n) 回存在することができる。(n) は整数であり、1 または 1 より大きい。好ましくは、(n) は 1 ~ 100 である。(n) が 1 ~ 50 であることも好ましい。特定の態様において、n は 1 ~ 10、または 1 ~ 5 である。さらなる態様において、n は 1 または 2 である。

40

【 0 0 9 9 】

官能性部分 X の a '、a、b、b ' または S の少なくとも 1 つへの共有結合に関して、あらゆる適切なカップリング化学を用いることができる。当業者はそのようなカップリング化学を標準的なプロトコルから容易に選択することができる。a '、a、b、b ' または S を合成する際に適切な構築ブロックの使用により官能性部分を組み込むことも可能で

50

ある。

【0100】

1つの好ましい態様において、官能性部分Xは式Iにより定義されるような結合剤のa、b、またはSに結合している。

1つの好ましい態様において、官能性部分Xは式Iにより定義されるような結合剤のスペーサーSに結合している。

【0101】

1つの好ましい態様において、官能性部分Xは式Iにより定義されるような結合剤のa、b、またはSに共有結合している。

官能性部分Xがa、a'、bまたはb'それぞれに相当するハイブリダイズするオリゴヌクレオチド内に位置する場合、好ましくはそのような官能性部分は修飾されたヌクレオチドに結合しており、またはヌクレオシド間のP原子に結合している（国際公開第2007/059816号）。オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに干渉しない修飾されたヌクレオチドがそれらのオリゴヌクレオチド中に組み込まれる。そのような修飾されたヌクレオチドは、好ましくはC5置換ピリミジン類またはC7置換7デアザプリン類である。

【0102】

オリゴヌクレオチドは、内部で、または5'もしくは3'末端において、官能性部分の導入のために用いられる非ヌクレオチド性構成要素で修飾することができる。好ましくは、そのような非ヌクレオチド性構成要素はスペーサーSの内部、すなわち2個の結合対メンバーaおよびbの間に位置している。

【0103】

スペーサーの構築のための多くの異なる非ヌクレオチド性修飾剤(modifier)構築ブロックが文献において既知であり、多種多様なものが商業的に入手可能である。官能性部分の導入に関して、非ヌクレオシド性二官能性修飾剤構築ブロックまたは非ヌクレオシド性の三官能性修飾された構築ブロックのどちらも、末端標識のためのCPGとして、または内部標識のためのホスホラミダイトとしてのどちらでも用いられる(Wojczewski, C. et al., Synlett 10 (1999) 1667-1678参照)。

【0104】

二官能性修飾剤構築ブロック

二官能性修飾剤構築ブロックは、官能性部分または（必要であれば）保護された官能性部分をホスホラミダイト基に、その構築ブロックを成長しているオリゴヌクレオチド鎖の末端のヒドロキシル基に5'末端において（通常の合成）または3'末端において（逆向きの合成）取り付けするために連結する。

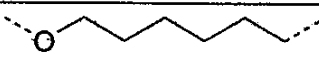
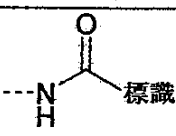
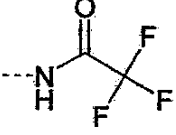
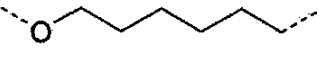
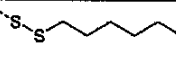
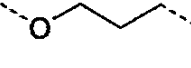

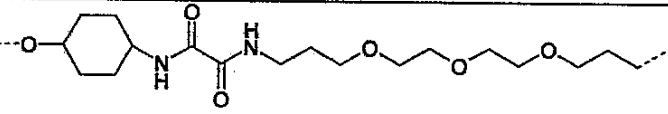
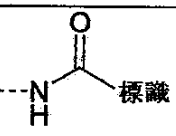
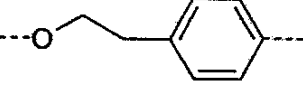
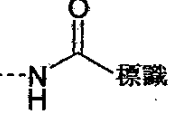
【0105】

二官能性修飾剤構築ブロックは、好ましくは非ヌクレオシド性化合物である。例えば、そのような修飾された構築ブロックはC2～C18アルキル、アルケニル、アルキニル炭素鎖であるが、前記のアルキル、アルケニル、アルキニル鎖はそのスペーサーの、それによりリンカー構造全体の親水性を増大させるために追加のエチレンオキシおよび/またはアミド部分により遮られていてよい。場合により1または2個のC1～C6アルキル基で置換されているC5～C6-シクロアルキル、C4N、C5N、C4O、C5O-ヘテロシクロアルキル、フェニルのような環状部分も、非ヌクレオシド性の二官能性修飾された構築ブロックとして用いることができる。好ましい修飾された二官能性構築ブロックは、C3～C6アルキル部分およびトリ-～ヘキサ-エチレングリコール鎖を含む。二官能性修飾剤構築ブロックの限定的でないが好ましい例を、下記の表IIにおいて示す。

【0106】

【表 2】

表 I I :

二官能性非ヌクレオシド性修飾剤構築ブロック	導入する対象	参考文献
	 	Pon, R.T., <i>Tetrahedron Letters</i> 32 (1991) 1715-1718 Theisen, P. et al., <i>Nucleic Acids Symposium Series</i> (1992), 27 (Nineteenth Symposium on Nucleic Acids Chemistry) 99-100 欧州特許第0 292 128号
		欧州特許第0 523 978号
		Meyer, A. et al., <i>Journal of Organic Chemistry</i> 75 (2010) 3927-3930
		Morcho, A.M. et al., <i>Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids</i> 22 (2003) 1439-1441
		Cocuzza, A.J., <i>Tetrahedron Letters</i> 30 (1989) 6287-6290

【 0 1 0 7 】

三官能性修飾剤構築ブロック

三官能性構築ブロックは、(i) 官能性部分または (必要であれば) 保護された官能性部分、(i i) レポーターまたは官能性部分または (必要であれば) 保護された官能性部分をオリゴヌクレオチド合成の間に成長しているオリゴヌクレオチド鎖のヒドロキシル基に連結するためのホスホラミダイト基、および (i i i) 酸不安定性保護基で、好ましくはジメトキシトリチル保護基で保護されているヒドロキシル基を連結する。この酸不安定性保護基を除去した後、ヒドロキシル基が解放され、それはさらなるホスホラミダイトと反応することができる。従って、三官能性構築ブロックは官能性部分をオリゴヌクレオチド内のあらゆる位置に配置することを可能にする。三官能性構築ブロックは、固体支持体、例えば制御細孔ガラス (controlled pore glass) (C P G) を用いる合成にも必須であり、それはオリゴヌクレオチドの 3 ' 末端標識のために用いられる。この場合、その三官能性構築ブロックは官能性部分または (必要であれば) 保護された官能性部分に C 2 ~ C 1 8 アルキル、アルケニル、アルキニル (alkynyl) 炭素鎖を介して連結されるが、前記のアルキル、アルケニル、アルキニル (alkynyl) 鎖はそのスペーサーの、それによりリンカー構造全体の親水性を増大させるために追加

のエチレンオキシおよび/またはアミド部分により遮られていてよく、切断可能なスペーサーを介して固体支持体に結合したヒドロキシル基および酸不安定性保護基で保護されたヒドロキシル基を含む。この保護基の除去の後、ヒドロキシル基が解放され、次いでそれはホスホラミダイトと反応することができるであろう。

【0108】

三官能性構築ブロックは非ヌクレオシド性またはヌクレオシド性であってよい。

非ヌクレオシド性三官能性構築ブロックはC₂ ~ C₁₈アルキル、アルケニル、アルキニル炭素鎖であるが、前記のアルキル、アルケニル、アルキニルはそのスペーサーの、それによりリンカー構造全体の親水性を増大させるために追加のエチレンオキシおよび/またはアミド部分により遮られている。他の三官能性構築ブロックは、場合により1または2個のC₁ ~ C₆アルキル基で置換されているC₅ ~ C₆-シクロアルキル、C₄N、C₅N、C₄O、C₅Oヘテロシクロアルキル、フェニルのような環式基である。環式および非環式基は1個の-(C₁ ~ C₁₈)アルキル-O-PG基により置換されていてよいが、前記のC₁ ~ C₁₈アルキルは(エチレンオキシ)_n、(アミド)_m部分を含み、nおよびmは互いに独立して0 ~ 6であり、PGは酸不安定性保護基である。好ましい三官能性構築ブロックは、場合により1個のアミド結合を含みC₁ ~ C₆アルキルO-PG基で置換されたC₃ ~ C₆アルキル、シクロアルキル、C₅Oヘテロシクロアルキル部分であり、ここでPGは酸不安定性保護基、好ましくはモノメトキシトリチル、ジメトキシトリチル、ピキシル、キサントリル、最も好ましくはジメトキシトリチルである。

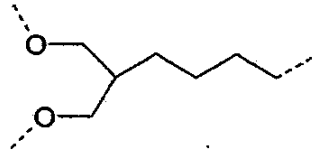
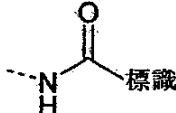
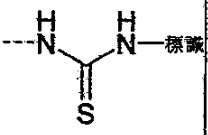
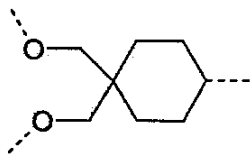
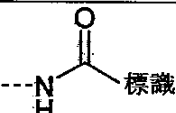
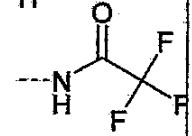
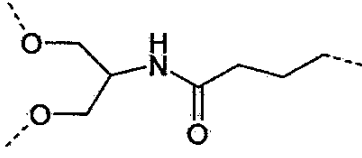
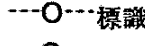
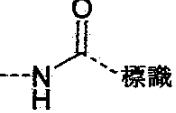
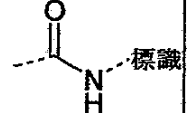
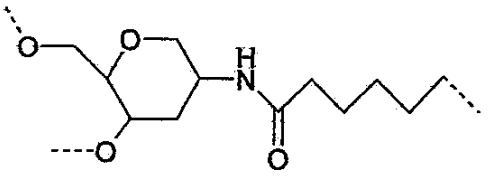
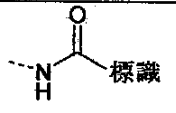
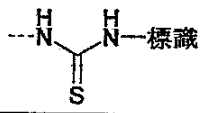
【0109】

非ヌクレオシド性三官能性構築ブロックに関する限定的でないが好ましい例が、例えば表IIIにおいて要約されている。

【0110】

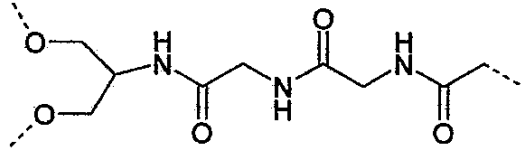
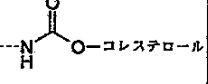
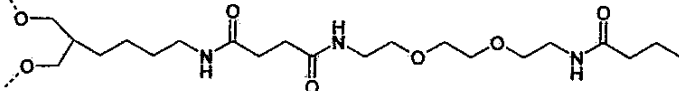
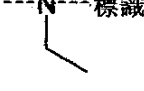
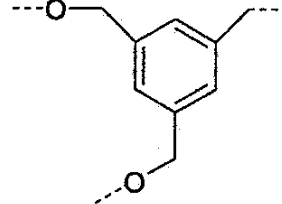
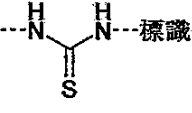
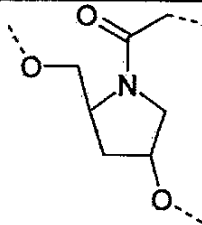
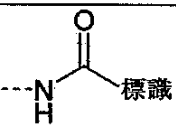
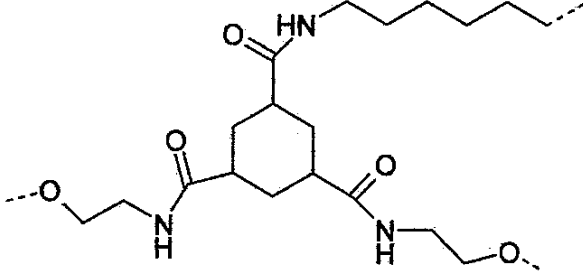
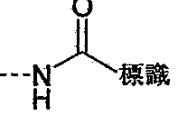
【表 3 - 1】

表 I I I : 非ヌクレオシド性三官能性修飾剤構築ブロックに関する例

三官能性	導入する対象	参考文献
	 	Nelson, P.S. et al., <i>Nucleic Acids Research</i> 20 (1992) 6253-6259 欧州特許第0313219号 米国特許第5,585,481号 米国特許第5,451,463号 欧州特許第0786468号 国際公開第92/11388号 国際公開第89/02439号
	 	Su, S.-H. et al., <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i> 7 (1997) 1639-1644 国際公開 第97/43451号
	  	Putnam, W.C. et al., <i>Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids</i> 24 (2005) 1309-1323 米国特許出願公開 第2005/214833号 欧州特許 第1 186 613号
	 	欧州特許 第1 431 298号

【 0 1 1 1 】

【表 3 - 2】

三官能性	導入する対象	参考文献
		国際公開 第94/04550号 Vu, H., et al., Nucleic Acids Symposium Series (1993), 29 (Second International Symposium on Nucleic Acids Chemistry), 19-20
		国際公開 第2003/019145号
		Behrens, C. and Dahl, O., Nucleosides & Nucleotides 18 (1999) 291-305 国際公開 第97/05156号
		Prokhorenko, I.A. et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 5 (1995) 2081-2084 国際公開 第2003/104249号
		米国特許 第5849879号

【0112】

ヌクレオシド性修飾剤構築ブロック：

ヌクレオシド性修飾剤構築ブロックは、未修飾のオリゴヌクレオチドと比較してそのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション特性に影響を及ぼさない必要がある場合に内部標識のために用いられる。従って、ヌクレオシド性構築ブロックは、なお相補的塩基とハイブリダイズすることができる塩基または塩基類似体を含む。本発明の式 I に従う結合剤中に含まれる a、a'、b、b' または S の 1 個以上の核酸配列を標識するための標識化合物の一般式は、式 II において与えられる。

【0113】

10

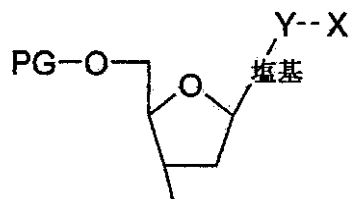
20

30

40

【化 1】

式 I I :



ホスホラミダイトまたはスクシニル-固体支持体

10

【0114】

式中、PGは酸不安定性保護基、好ましくはモノメトキシトリチル、ジメトキシトリチル、ピキシル、キサントリル、最も好ましくはジメトキシトリチルであり、ここでYはC2～C18アルキル、アルケニル、アルキニル(alkinyl)であり、ここで前記のアルキル、アルケニル、アルキニル(alkinyl)はエチレンオキシおよび/またはアミド部分を含んでいてよく、ここでYは好ましくはC4～C18アルキル、アルケニルまたはアルキニル(alkinyl)であり、1個のアミド部分を含有し、ここでXは官能性部分である。

【0115】

20

その塩基の具体的な位置は、そのような置換に関してハイブリダイゼーション特性への影響が最小限になるように選択されてよい。従って、以下の位置が置換に関して好ましい：a)天然塩基に関して：C5で置換されたウラシル；C5で、またはN4で置換されたシトシン；C8で、またはN6で置換されたアデニン、およびC8で、またはN2で置換されたグアニン、ならびにb)塩基類似体に関して：C7で置換された7デアザAおよび7デアザG；C7で置換された7デアザ8アザAおよび7デアザ8アザG；C7で置換された7デアザアザ2アミノA；N1で置換されたプソイドウリジンおよびN2で置換されたホルマイシン。

【0116】

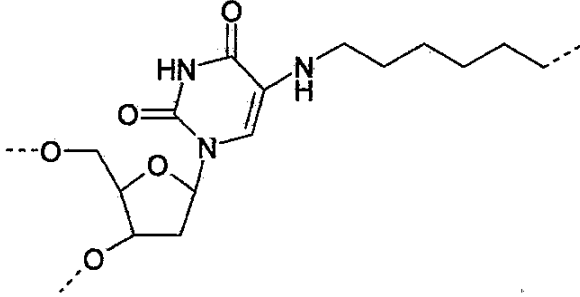
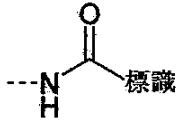
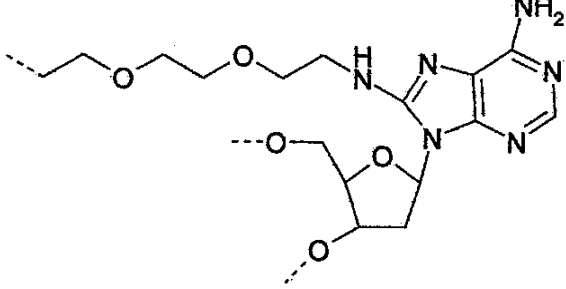
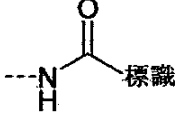
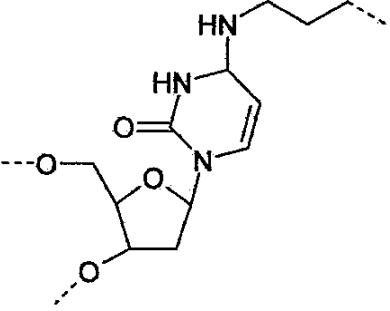
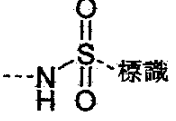
ヌクレオシド性三官能性構築ブロックに関する限定的でないが好ましい例を表IVにおいて示す。

30

【0117】

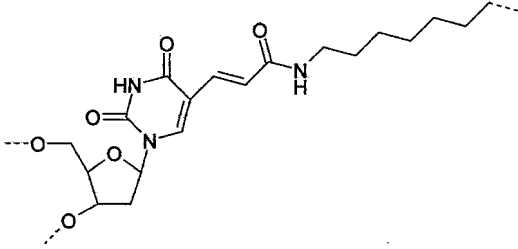
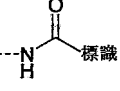
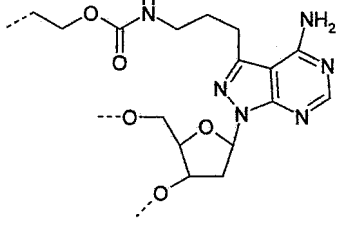

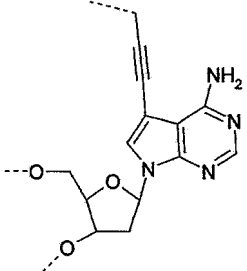
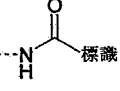
【表 4 - 1】

表 IV:

三官能性ヌクレオシド性	A	参考文献
		Roget, A. et al., <i>Nucleic Acids Research</i> 17 (1989) 7643-7651 国際公開 第 89/12642 号 国際公開 第 90708156 号 国際公開 第 93705060 号
		Silva, J.A. et al., <i>Biotechnologia Aplicada</i> 15 (1998) 154-158
		米国特許 第 6,531,581 号 欧州特許 第 0 423 839 号

【 0 1 1 8 】

【表 4 - 2】

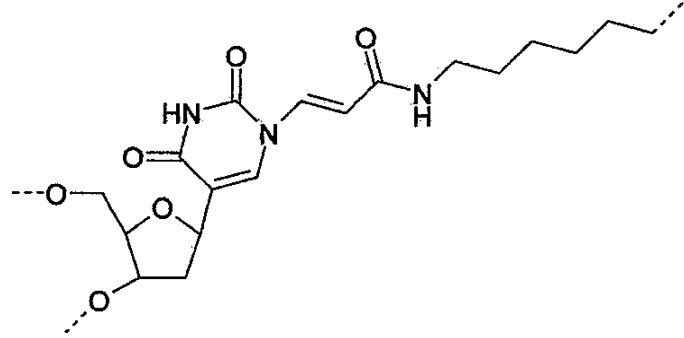
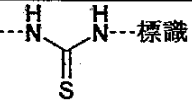
三官能性ヌクレオシド性	A	参考文献
	 標識	米国特許 第4,948,882号 米国特許 第5,541,313号 米国特許 第5,817,786号
	 標識	国際公開第 2001/042505号
	 標識	McKeen, C.M. et al., Organic & Biomolecular Chemistry 1 (2003), 2267-2275

10

20

【0119】

【表 4 - 3】

三官能性ヌクレオシド性	A	参考文献
	 標識	Ramzaeva, N. et al., Helvetica Chimica Acta 83 (2000) 1108-1126

30

40

【0120】

表 I I、I I I および I V において、二官能性部分の末端の酸素原子の 1 個または三官能性部分の末端の酸素原子の 1 個はホスホラミダイトの一部であり、それは完全に詳細には示されていないが当業者には明らかである。三官能性構築ブロックの第 2 の末端の酸素原子は、上記で式 I I に関して定義されたように、酸不安定性保護基 P G で保護されている。

【0121】

合成後修飾は、共有結合した官能性部分をリンカーまたはスペーサー分子中に導入するための別の戦略である。このアプローチにおいて、固相合成の間に二官能性または三官能性構築ブロックを用いることによりアミノ基が導入される。そのアミノ修飾されたオリゴ

50

ヌクレオチドの支持体からの切断および精製の後、官能性部分の活性化されたエステルと、またはその中の 1 個の官能基が活性エステルである二官能性試薬と反応させる。好ましい活性エステルは N H S エステルまたはペンタフルオロ (p e n t a f l u o r) フェニルエステル類である。

【 0 1 2 2 】

合成後修飾は、固相合成および脱保護の間に安定でない官能性部分を導入するために特に有用である。例は、シュタウディングーライゲーションのためのトリフェニルホスフィンカルボキシメチルエステルによる修飾(Wang, C.C. et al., Bioconjugate Chemistry 14 (2003) 697-701)、ジゴキシゲニンによる、または商業的に入手できるスルホ S M C C を用いてマレインイミド基を導入するための修飾である。

10

【 0 1 2 3 】

官能性部分 X は、1 態様において、a'、a、b、b' または S の少なくとも 1 個に追加の結合対を介して結合している。

官能性部分 X を結合させることができる追加の結合対は、好ましくはロイシンジッパードメインまたはハイブリダイズする核酸である。その官能性部分 X が a'、a、b、b' または S の少なくとも 1 個に追加の結合対のメンバーを介して結合している場合、X が結合している結合対のメンバーならびに結合対 a' : a および b : b' それぞれは全て異なる特異性を有するように選択される。その結合対 a : a'、b : b' および X が結合している結合対はそれぞれ、その他の結合対のいずれの結合にも干渉せずに、それらのそれぞれのパートナーに結合する (例えばハイブリダイズする)。

20

【 0 1 2 4 】

結合対のメンバーの一価結合剤への共有結合性カップリング

その結合剤の生化学的性質に応じて、異なるコンジュゲーション戦略がすぐに利用できる。

【 0 1 2 5 】

その結合剤が 50 ~ 500 アミノ酸の天然存在タンパク質または組み換えポリペプチドである場合、タンパク質コンジュゲートの合成に関する化学を記述する教本中に標準的な手順があり、当業者は容易にそれに従うことができる(Hackenberger, C.P. et al., Angew. Chem., Int. Ed., 47 (2008)10030-10074)。

【 0 1 2 6 】

30

1 態様において、マレインイミド部分のそのタンパク質内のシステイン残基との反応が用いられる。これは、例えば抗体の F a b または F a b' 断片が一価結合剤として用いられる場合に好ましいカップリング化学である。あるいは、1 態様において、結合対のメンバー (式 I の a' または b' それぞれ) のその結合剤ポリペプチドの C 末端へのカップリングが実施される。タンパク質の、例えば F a b 断片の C 末端修飾は、例えば記述されたように実施することができる(Sunbul, Murat and Yin, Jun, Organic & Biomolecular Chemistry 7 (2009) 3361-3371)。

【 0 1 2 7 】

一般に、結合対のメンバーの一価ポリペプチド性結合剤への部位特異的反応および共有結合性カップリングは、天然アミノ酸をタンパク質中に存在する他の官能基の反応性に対して直交性である反応性を有するアミノ酸に変換することに基づく。例えば、稀な配列前後関係 (s e q u e n c e c o n t e x t) 内の特定のシステインをアルデヒド中で酵素的に変換することができる(Frese, M.-A. et al., ChemBioChem 10 (2009) 425-427 参照)。特定の酵素の所与の配列前後関係中の天然アミノ酸との特異的な酵素反応性を利用することにより望まれるアミノ酸修飾を得ることも可能である (例えば以下の参考文献を参照:Taki, M. et al., Protein Engineering, Design & Selection 17 (2004) 119-126; Gautier, A. et al., Chemistry & Biology 15 (2008) 128-136;プロテアーゼに触媒される C - N 結合の形成がBordusa, F., HighlightsによりBioorganic Chemistry (2004) 389-403において用いられており、ソルターゼ (S o r t a s e) に媒介されるタンパク質ライゲーションがMao, H.らによりJ. Am Chem Soc. 126 (2004) 2670-2671において用い

40

50

られており、Proft, T.によりBiotechnol. Lett 32 (2010) 1-10において総説されている)。

【0128】

結合対のメンバーの一価ポリペプチド性結合剤への部位特異的反応および共有結合性カップリングは、末端のアミノ酸の適切な修飾試薬との選択的反応によっても達成することができる。

【0129】

N末端システインのベンゾニトリル類との反応性(Ren, Hongjun Xiao et al., Angewandte Chemie, International Edition 48 (2009) 9658-9662)を、部位特異的共有結合性カップリングを達成するために用いることができる。

10

【0130】

天然型(Native)化学的ライゲーションはC末端システイン残基に頼ることもできる(Taylor, E. Vogel, Imperiali, B., Nucleic Acids and Molecular Biology 22 (2009) (Protein Engineering) 65-96)。

【0131】

欧州特許第1 074 563号は、一続きの負に荷電したアミノ酸内のシステインの一続きの正に荷電したアミノ酸中に位置するシステインとのより速い反応に基づくコンジュゲーション法を記述している。

【0132】

その一価結合剤は、合成ペプチドまたはペプチド模倣物であってもよい。ポリペプチドが化学的に合成される場合、直交性化学反応性を有するアミノ酸をそのような合成の間に組み込むことができる(de Graaf, A.J. et al., Bioconjugate Chemistry 20 (2009) 1281-1295)。多種多様な直交性官能基が賭かっており(at stake)、合成ペプチド中に導入することができるため、そのようなペプチドのリンカー中へのコンジュゲーションは標準的な化学である。

20

【0133】

単一標識された(mono-labeled)タンパク質を得るため、1:1の化学量論を有するコンジュゲートをクロマトグラフィーにより他のコンジュゲーション産物から分離することができる。この手順は色素標識された結合対のメンバーおよび荷電したスペーサーを用いることにより促進される。この種類の標識された、および高度に負に荷電した結合対のメンバーを用いることにより、電荷および分子量の違いを分離のために用いることができるため、1コンジュゲート化タンパク質が未標識のタンパク質および1個より多くのリンカーを有するタンパク質から容易に分離される。その蛍光色素は、その結合剤を標識された一価結合剤のような未結合の構成要素から精製するために役立つ。

30

【0134】

従って、1態様において、本発明の結合剤を形成するために、(例えば合成の間に二官能性または三官能性修飾剤構築ブロックを二官能性スペーサー構築ブロックとの組み合わせで用いて合成された)蛍光色素で標識されている結合対のメンバー(式Iのa'および/またはb'それぞれ)を用いることが好ましい。1つの好ましい態様において、そのスペーサーSならびにその配列a、a'、bおよびb'はDNAであり、a'またはb'それぞれの少なくとも一方は蛍光色素で標識されている。1つの好ましい態様において、そのスペーサーSならびにその配列a、a'、bおよびb'はDNAであり、a'およびb'それぞれは両方ともそれぞれ異なる蛍光色素で標識されている。

40

【0135】

1態様において、本発明は式I: A - a' : a - S - b : b' - B : X(n)の二重特異性結合剤に関し、ここでAならびにBは一価特異的結合剤であり、ここでa' : aならびにb : b'は結合対を表し、a' : aおよびb : b'は異なる特異性を有し、ここでSはスペーサーを表し、ここで(: X)はa'、a、b、b'またはSの少なくとも1つにさらなる結合対を介して結合した官能性部分を示し、ここで(n)は整数であり、少なくとも1であり、ここで-は共有結合を表し、ここでそのリンカーa - S - bは6 ~ 100

50

nmの長さを有する。

【0136】

1つの好ましい態様において、結合対 $a' : a$ および $b : b'$ はハイブリダイズする核酸配列であり、官能性部分 X が結合しているさらなる結合対も核酸である。この態様において、好ましくはそのスペーサー S は、その2個の特異的にハイブリダイズする配列 a および a' ならびに b および b' それぞれに加えて、そのまたはそれらの相補的な配列にハイブリダイズすることもできる1個以上のさらなる配列を含むように考えられる (constructed)。この態様において、官能性部分 X はそのスペーサー S に、やはりハイブリダイズする核酸配列からなるさらなる結合対を介して結合している。

【0137】

本明細書で開示されるような結合剤の構築における使用のための一価結合剤は、 10^{-2} / 秒から 10^{-5} / 秒までの K_{dis} を有していなければならない。本明細書で開示されるような結合剤の構築における使用のための一価結合剤が 10^{-3} / 秒から 10^{-5} / 秒までの K_{dis} を有していなければならないことも好ましい。

【0138】

好ましくは、式 I に従う結合剤において、一価結合剤 A および B のそれぞれは、それぞれ 10^{-2} / 秒から 10^{-5} / 秒まで、好ましくは 10^{-3} / 秒から 10^{-5} / 秒までの K_{dis} を有する。

【0139】

好ましくは、式 I に従う結合剤は 10^{-5} / 秒またはよりよい K_{dis} を有し、 10^{-6} / 秒またはよりよい K_{dis} も好ましい。式 I に従う結合剤が 10^{-7} / 秒またはよりよい K_{dis} を有することも好ましい。

【0140】

当業者は理解しているであろうように、その K_{dis} は温度依存性の値である。理論上、本発明に従う結合剤の K_{dis} 値は同じ温度で決定される。理解されるであろうように、好ましくは K_{dis} 値はその結合剤が用いられることになる、例えばアッセイが実施されることになる温度と同じ温度で決定される。1態様において、その K_{dis} 値は室温で、すなわち 20、21、22、23、24 または 25 それぞれで確立される。1態様において、その K_{dis} 値は 4 または 8 それぞれで確立される。1態様において、その K_{dis} 値は 25 で確立される。1態様において、その K_{dis} 値は 37 で確立される。

【0141】

上記で既に言及したように、今では式 I で定義されるような結合剤を製造することが可能であり、非常に容易である。式 I に従う結合剤の完全なライブラリーを容易に提供、分析することができ、そのようなライブラリーからの最も強力な結合剤を必要に応じて大規模で製造することができる。

【0142】

上記で言及したライブラリーは式 I に従う結合剤の完全なセットを指し、ここでそれぞれの A、a、a'、b、b' および B は同一であり、ここでそのスペーサー S の長さはその結合剤に関して提示された要求を最もよく満たすように調節される。まず、1 ~ 100 nm の範囲全体にわたり、約 10 nm 離れた段階 (steps) を有するスペーサーのラダー (ladder) を用いることが容易に可能である。次いで、そのスペーサーの長さは、第1ラウンドで同定された最も適切な長さの周辺で再度容易にさらに精密化される。

【0143】

1態様において、本発明は式 I : $A - a' : a - S - b : b' - B : X(n)$ の結合剤を製造する方法に関し、ここで A ならびに B は一価結合剤であり、ここで $a' : a$ ならびに $b : b'$ は結合対であり、ここで a' および a は b の b' への結合に干渉せず、逆もまた同じであり、ここで S は少なくとも 1 nm の長さのスペーサーであり、ここで ($: X$) は a' 、a、b、 b' または S の少なくとも 1 つに共有結合的にまたは結合対を介してのどちらかで結合した官能性部分を示し、ここで (n) は整数であり、少なくとも 1 であり

10

20

30

40

50

、ここで - は共有結合を表し、ここでそのリンカー a - S - b は 6 ~ 100 nm の長さを有し、その方法は以下の工程を含み： a) A - a ' および b ' - B をそれぞれ合成し、 b) リンカー a - S - b を合成し、そして c) 式 I の結合剤を形成し、ここで a '、a、b、b ' または S の少なくとも 1 つに結合した官能性部分 X は、工程 a)、b) または c) において結合させる。

【 0 1 4 4 】

この方法の好ましい態様において、様々な長さのスペーサーを有するいくつかのリンカー分子を合成し、様々な長さのスペーサーを含む式 I に従う結合剤の形成において用いて、その 2 個の一価結合剤のよりよい方を超える少なくとも 5 倍の K d i s s における向上を有する結合剤（単数または複数）を選択する。1 態様における望まれる K d i s s を有する結合剤の選択は、実施例 2 . 8 において開示されるような B i a C o r e 分析により実施される。

10

【 0 1 4 5 】

本発明に従う結合剤は、例えば免疫アッセイにおいて分析物に強く結合させるために用いることができる。例えば分析物が少なくとも 2 個の重複しないエピトープを有する場合、本発明の結合剤は、そのスペーサー S がこれらのエピトープに対する一価結合剤の相乗的結合のための最適な長さを有するように考えられる（ c o n s t r u e d ）。この向上は、例えばそのような結合剤を用いる分析物の検出のための方法において非常に有用であり得る。従って、1 態様において、本発明は、目的の分析物の検出における本明細書において上記で開示したような結合剤の使用に関する。特定の態様において、用いられる検出法は、あらゆる適切なシグナル検出の方法、例えば電気化学発光を用いる酵素結合免疫吸着測定法（ E L I S A ）、直接的、間接的、競合的もしくはサンドイッチ免疫アッセイであり、またはその結合剤は免疫組織化学において用いられる。

20

【 0 1 4 6 】

以下の実施例、配列リストおよび図は本発明の理解を助けるために提供されており、その正確な範囲は添付された特許請求の範囲において述べられている。述べられた手順において本発明の精神から逸脱することなく修正を行うことができることは理解されている。

【 0 1 4 7 】

配列リストの記述

1 . 抗体断片

30

【 0 1 4 8 】

【化 2】

SEQ ID NO:1 V_H (mAb 1.4.168):

QCDVKLVESG GGLVKPGGSL KLSAASGFT FSDYPMSWVR QTPEKRLEWV
 ATITTTGGTYT YYPDSIKGRF TISRDNANT LYLQMGSLQS EDAAMYYCTR
 VKTDLWWGLA YWGQGTLLTV SA

SEQ ID NO:2 V_L (mAb 1.4.168):

QLVLTQSSSA SPSLGASAKL TCTLSSQHSY YTIWYQQQP LKPPKYVMEL
 KKGDSHTTGD GIPDRFSGSS SGADRYLSIS NIQPEDESIY ICGVGDTIKE
 QFVYVFGGGT KVTVLG

10

SEQ ID NO:3 V_H (mAb 8.1.2):

EVQLQQSGPA LVKPGASVKM SCKASGFTFT SYVIHWVKQK PGQGLEWIGY
 LNPYNDNTKY NEKFKGKATL TSDRSSSTVY MEFSSLTSED SAVYFCARRG
 IYAYDHYFDY WGQGTSLTVS S

SEQ ID NO:4 V_L (mAb 8.1.2):

QIVLTQSPAI MSASPGEKVT LTCSASSSVN YMYWYQQKPG SSPRLLIYDT
 SNLASGVPVR FSGSGSVTSY SLTISRMEAE DAATYYCQW STYPLTFGAG
 TKLELK

20

【 0 1 4 9 】

2. ssDNAの配列

a) 17塩基長 ssDNA (5'末端により抗トロポニンT MAB aのFab'またはIGF-1Rに対するFab' 1.4.168それぞれに共有結合している)

5'-AGT TCT ATC GTC GTC CA-3' (SEQ ID NO:5)

30

b) 19塩基長 ssDNA (3'末端により抗トロポニンT MAB bのFab'またはリン酸化されたIGF-1Rに対するFab' 8.1.2それぞれに共有結合している)

5'-A GTC TAT TAA TGC TTC TGC-3' (SEQ ID NO:6)

c) 相補性19塩基長 ssDNA (リンカーの一部として用いられる)

5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-3' (SEQ ID NO:7)

d) 相補性17塩基長 ssDNA (リンカーの一部として用いられる)

5'-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3' (SEQ ID NO:8)

3. トロポニンTエピトープの配列

SEQ ID NO:9 = ERAEQQRIRAEREKEUUSLKDRIEKRRRAERAエミド、ここでUは アラニンを表す。(抗トロポニン抗体aに関するエピトープ“A”)

40

SEQ ID NO:10 = SLKDRIERRRAERAEOOERAQQRIRAEREKEエミド、ここでOはアミノ-トリオキサ-オクタン酸を表す。(抗トロポニン抗体bに関するエピトープ“B”)

4. IGF-1R / IRエピトープの配列:

SEQ ID NO:11 = FDERQPYAHMNGGRKNERALPLQSST; IGF-1R (1340~1366)

SEQ ID NO:12 = YEEHIPYTHMNGGKKNRILTLPRSNPS; hIR(1355~1382)

5. タンパク質リンカーおよびタグ配列:

SEQ ID NO:13 = GGGGS (=G4S) モチーフ (例えばポリペプチドリンカーの一部として)

SEQ ID NO:14 = YPYDVPDYA (HA-タグ)

SEQ ID NO:15 = GLNDIFEAQKIEWHE (Avi-タグ)

50

図の説明

図1 抗pIGF1-R二重結合剤の組み立ての効率を評価する分析的ゲル濾過実験。線図a、bおよびcは、個々の二重結合剤構成要素（フルオレセイン-ssFab' 1.4.168、Cy5-ssFab' 8.1.2およびリンカーDNA（T=0）；Fab'は一本鎖オリゴヌクレオチドにコンジュゲートしたFab'断片を意味する）の溶離プロファイルを示す。線図dは、二価結合剤を形成するのに必要な3種類の構成要素を1:1:1のモル比で混合した後の溶離プロファイルを示す。より太い（一番下の）曲線は、ssFab'タンパク質またはリンカーDNAそれぞれの存在を示す280nmにおいて測定された吸光度を表す。b)およびd)におけるより細い一番上の曲線（495nmにおける吸光度）はフルオレセインの存在を示し、a)におけるより細い一番上の曲線およびd)における中央の曲線（635nmにおける吸光度）は、Cy5の存在を示す。単一の二重結合剤の構成要素の溶離体積（ $VE_{ssFab' 1.4.168}$ 約15ml； $VE_{ssFab' 8.1.2}$ 約15ml； $VE_{リンカー}$ 約16ml）の反応混合物の溶離体積（ $VE_{混合物}$ 約12ml）との比較は、二重結合剤組み立て反応が成功であったことを示す（収率：約90%）。溶離された二重結合剤に相当する主な280nmのピークは、495nmおよび635nmのチャンネルにおける主なピークとうまく重なっており、二価結合剤に相当するピーク中にssFab' 8.1.2およびssFab' 1.4.168の両方が存在することを証明している。

【0150】

図2 Biacore（商標）実験のスキーム。模式적および例示的に、溶液中の2種類の結合分子を示す：T0-T-Dig（リンカー16）、二価結合剤およびT40-T-Dig（リンカー15）、二価結合剤。これら両方の二価結合剤はそれらのリンカーの長さにおいてのみ異なる（2個のハイブリダイズする核酸配列の間に追加のTを有しない中心のジゴキシゲニン化された（digoxigenylated）T対40個の追加のT（中心のT-Digのそれぞれの側に20個）を有する中心のジゴキシゲニン化されたT）。さらに、ssFab'断片8.1.2および1.4.168を用いた。

【0151】

図3 100nM二価結合剤（T40-T-Dig ssDNAリンカー、すなわちリンカー15上にハイブリダイズしたssFab' 8.1.2およびssFab' 1.4.168からなる）の固定されたペプチドpIGF-1Rとの相互作用を、100nM ssFab' 1.4.168または100nM ssFab' 8.1.2の同じペプチドに対する結合特性と比較して示す、3つの速度論を重ねてプロットしたBiacore（商標）センサーグラム（sensorgram）。最も高い結合性能は二重結合剤コンストラクトを用いて得られ、これはその二重結合剤の協同的結合作用が標的ペプチドpIGF-1Rに対する親和性を増大させることを明確に示している。

【0152】

図4 T40-T-Dig ssDNAリンカー、すなわちリンカー15上にハイブリダイズしたssFab' 8.1.2およびssFab' 1.4.168からなる二価結合剤の固定されたペプチドpIGF-1R（リン酸化されたIGF-1R）、IGF-1RまたはpIR（リン酸化されたインスリン受容体）との相互作用を示す3つの速度論を重ねてプロットしたBiacore（商標）センサーグラム。最も高い結合性能はpIGF-1Rペプチドで得られ、これは二重結合剤の協同的結合作用が標的ペプチドpIGF-1Rに対する特異性を例えばリン酸化されたインスリン受容体ペプチド（pIR）と比較して増大させることを明確に示している。

図5 T40-T-Dig ssDNAリンカー、すなわちリンカー15上にハイブリダイズしたssFab' 8.1.2およびssFab' 1.4.168からなる100nM二価結合剤ならびにリンカーDNAを有しない100nM ssFab' 8.1.2およびssFab' 1.4.168の混合物の相互作用を示す2つの速度論を重ねてプロットしたBiacore（商標）センサーグラム。最高の結合性能は二価結合剤を用いてのみ得られ、一方でリンカーを有しないssFab'の混合物は、これらのssFab

’の合計濃度が200 nMであったという事実にも関わらず、観察可能な協同的結合作用を示さない。

【0153】

図6 Biacore (商標) サンドイッチアッセイの概略図。このアッセイは、両方の抗体のリン酸化されたIGF-1Rペプチドへのエピトープ接近可能性を調べるために用いられた。<MIgGFcy>Rはマウス抗体M-1.4.168を捕捉するために用いられたウサギ抗マウス抗体を示す。次いでM-1.4.168を用いてpIGF-1Rペプチドを捕捉する。M-8.1.2が最終的にM-1.4.168、ペプチドおよびM-8.1.2からなるサンドイッチを形成する。

【0154】

図7 二次抗体8.1.2のpIGF-1Rペプチドに対する、これがBiacore (商標) チップ上で抗体1.4.168により捕捉された後の結合シグナル(太線)を示すBiacore (商標) センサーグラム。その他のシグナル(細い線)は対照シグナルである:一番上から一番下に向かって、それぞれ500 nMの8.1.2、500 nMの1.4.168; 500 nMの標的と無関係の抗体<CKMM>M-33-IgG; および500 nMの標的と無関係の対照抗体<TSH>M-1.20-IgGの線を示す。これらの対照にいずれにおいても結合事象を検出することはできなかった。

【0155】

図8 センサー表面上のビオチン化二重結合剤を示す、Biacore (商標) アッセイの概略図。フローセル1(=FC1)(示していない)上で、アミノ-PEO-ビオチンを捕捉させた。FC2、FC3およびFC4上で、増大するリンカーの長さを有する二価結合剤を固定した(FC2上の二重結合剤(T0-bi=1個の中央のT-Biのみ)およびFC4上の二重結合剤(T40-bi=1個の中央のT-Biならびに上流および下流それぞれの20個のT)をそれぞれ示す)。分析物1:そのペプチドの右側の末端においてM-1.4.168 ssFab' エピトープを含有するIGF-1Rペプチド(一番上の線)-このペプチドはリン酸化されていないため、M-8.1.2 ssFab' ホスホ-エピトープは存在しない; 分析物2:M-8.1.2 ssFab' ホスホ-エピトープ(P)およびM-1.4.168 ssFab' エピトープを含有するpIGF-1Rペプチド(2番目の線); 分析物3:交差反応するM-8.1.2 ssFab' ホスホ-エピトープを含有するがM-1.4.168 ssFab' に関するエピトープは含有しない、pIRペプチド(3番目の線)。

【0156】

図9 二重結合剤実験の速度論データ。ssFab' 8.1.2およびssFab' 1.4.168を有するT40-T-Biリンカー二重結合剤(=図中のT40)は、pIGF-1Rに対して、pIR($k_d = 3.70 \times 10^{-2} / s$)と比較した場合に1300倍低い解離速度($k_d = 2.79 \times 10^{-5} / s$)を示す。

【0157】

図10 T40-T-Bi二重結合剤のpIGF-1Rペプチド(リン酸化されたIGF-1Rペプチド)に対する濃度依存的測定を示すBiacore (商標) センサーグラム。そのアッセイの構成は図8において示されている通りである。pIGF-1Rペプチドの濃度系列は、30 nM、10 nM、 2×3.3 nM、1.1 nM、0.4 nM、0 nMで注入された。対応するデータが図9の表において示されている。

【0158】

図11 T40-T-Bi二重結合剤のIGF-1Rペプチド(リン酸化されていないIGF-1Rペプチド)に対する濃度依存的測定を示すBiacore (商標) センサーグラム。そのアッセイの構成は図8において示されている通りである。IGF-1Rペプチドの濃度系列は、300 nM、100 nM、 2×3.3 nM、1.1 nM、4 nM、0 nMで注入された。対応するデータが図9の表において示されている。

【0159】

図12 T40-T-Bi二重結合剤のpIRペプチド(リン酸化されたインスリン受

10

20

30

40

50

容体ペプチド)に対する濃度依存的測定を示すB i a c o r e (商標)センサーグラム。そのアッセイの構成は図8において示されている通りである。p I Rペプチドの濃度系列は、100 nM、2×33 nM、11 nM、4 nM、0 nMで注入された。対応するデータを図9として示した表において示す。

【実施例】

【0160】

実施例1

トロポニンTに対する二価結合剤

1.1 モノクローナル抗体およびF a b '断片

ヒト心臓トロポニンTに異なる重複しないエピトープ(それぞれエピトープA'およびエピトープB')で結合する2種類のモノクローナル抗体を用いた。これらの抗体は両方とも最新のR o c h e E l e c s y s (商標)トロポニンTアッセイにおいて用いられ、ここでトロポニンTはサンドイッチ免疫アッセイの形式で検出される。

【0161】

モノクローナル抗体の培養上清からの精製は、タンパク質化学の現状技術の方法を用いて実施された。

その精製されたモノクローナル抗体を、予め活性化した(p r e - a c t i v a t e d)パパイン(抗エピトープA' M A b)またはペプシン(抗エピトープB' M A b)のどちらかを用いてプロテアーゼ消化するとF (a b ') 2断片が得られ、続いてそれを低濃度のシステアミンを用いて37 で還元すると、F a b '断片、すなわち式I (A - a ' : a - S - b : b ' - B : X_n)におけるAおよびBそれぞれになる。その反応を、S e p h a d e x G - 25カラム(G E H e a l t h c a r e)上でシステアミンをその試料のポリペプチド含有部分から分離することにより停止する。

【0162】

1.2 F a b '断片のs s D N A - オリゴヌクレオチドへのコンジュゲーション

そのF a b '断片を、下記で記述する活性化されたs s D N A aおよびs s D N A bオリゴヌクレオチドとコンジュゲートさせる。

【0163】

F a b - 断片 - s s D N A コンジュゲートA"およびB"それぞれの調製:

a) F a b ' - 抗トロポニンT<エピトープA'> - s s D N A - コンジュゲート(= A")

F a b ' - 抗トロポニンT<エピトープA'> - s s D N A a - コンジュゲートA"の調製のために、SED ID NO:5の誘導体、すなわち5' -AGT CTA TTA ATG CTT CTG C(=SEQ ID NO:5)-XXX-Y-Z-3' が用いられ、ここでX=ホスホラミダイトC3 (3-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピル-1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト(Glen Research)により導入されたプロピレン - ホスフェートであり、ここでY=3' -アミノ修飾剤TFAアミノC-6 lcaa CPG (ChemGenes)により導入された3' -アミノ - 修飾剤C6であり、ここでZ=スルホスクシンイミジル 4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート(ThermoFischer)により導入された4[N-マレイニンイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシである。

【0164】

b) F a b ' - 抗トロポニンT<エピトープB'> - s s D N A b - コンジュゲート(= B")

F a b ' - 抗トロポニンT<エピトープB'> - s s D N A - コンジュゲート(B")の調製のために、SED ID NO:6の誘導体、すなわち5' -Y-Z-XXX-AGT TCT ATC GTC GTC CA-3' が用いられ、ここでX=ホスホラミダイトC3 (3-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピル-1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト(Glen Research)により導入されたプロピレン - ホスフェートであり、ここでY=(6-(4-モノメトキシトリチルアミノ)ヘキシル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホラミダイト(Glen Research)により導入された5' -アミノ - 修飾剤C6であり、Z=スルホスクシンイミジル 4-[

N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート(ThermoFischer)により導入された4[N-マレイニイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシである。

【 0 1 6 5 】

SEQ ID NO:5または6のオリゴヌクレオチドはそれぞれ現状技術のオリゴヌクレオチド合成法により合成された。そのマレイニイミド基の導入は、Yのアミノ基のZのスクシンイミジル基との反応により行われ、それは固相オリゴヌクレオチド合成プロセスの間に組み込まれた。

【 0 1 6 6 】

上記で示した一本鎖DNAコンストラクトはチオール反応性マレイミド基を有し、それはシステアミン処理により生成されたFab'のヒンジ領域のシステインと反応する。高い百分率の単一標識されたFab'断片を得るため、ssDNAのFab'断片に対する相対的なモル比は低く保たれる。単一標識されたFab'断片(ssDNA:Fab'=1:1)の精製は、陰イオン交換クロマトグラフィー(カラム:MonoQ, GE Healthcare)により行われる。効率的な標識および精製の検証は、分析的ゲル濾過クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEにより達成される。

【 0 1 6 7 】

1.3 ビオチン化されたリンカー分子

ssDNAリンカーL1、L2およびL3それぞれにおいて用いられるオリゴヌクレオチドは、現状技術のオリゴヌクレオチド合成法により、ビオチン化に関してビオチン化ホスホラミダイト試薬を用いて合成された。

【 0 1 6 8 】

リンカー1(=L1)(ビオチン化チミジンの他にスペーサーを有しないビオチン化ssDNAリンカー1)は、以下の組成を有する:5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T(ビオチン-dT)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'。それはそれぞれSEQ ID NO:7および8のssDNAオリゴヌクレオチドを含み、そのスペーサーの中央においてビオチン-dT(=T-Bi)(5'-ジメトキシトリチルオキシ-5-[N-((4-t-ブチルベンゾイル)-ビオチニル)-アミノヘキシル]-3-アクリルイミド]-2'-デオキシウリジン-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト(Glen Research)の使用によりビオチン化された。

【 0 1 6 9 】

リンカー2(=L2)(11塩基長のスペーサーを有するビオチン化ssDNAリンカー2)は、以下の組成を有する:

5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T5-(ビオチン-dT)-T5 TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'。それはそれぞれSEQ ID NO:7および8のssDNAオリゴヌクレオチド、それぞれ5個のチミジンからなる2回のオリゴヌクレオチドの一続きを含み、そのスペーサーの中央においてビオチン-dT(5'-ジメトキシトリチルオキシ-5-[N-((4-t-ブチルベンゾイル)-ビオチニル)-アミノヘキシル]-3-アクリルイミド]-2'-デオキシウリジン-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト(Glen Research)の使用によりビオチン化された。

【 0 1 7 0 】

リンカー3(=L3)(31塩基長のスペーサーを有するビオチン化ssDNAリンカー3)は、以下の組成を有する:

5'-GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T15-(ビオチン-dT)-T15 TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'。それはそれぞれSEQ ID NO:7および8のssDNAオリゴヌクレオチド、それぞれ15個のチミジンからなる2回のオリゴヌクレオチドの一続きを含み、ビオチン-dT(5'-ジメトキシトリチルオキシ-5-[N-((4-t-ブチルベンゾイル)-ビオチニル)-アミノヘキシル]-3-アクリルイミド]-2'-デオキシウリジン-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト(Glen Research)の使用によりビオチン化された。

【 0 1 7 1 】

1.4 一価トロポニンT結合剤AおよびBそれぞれに関するエピトープ

抗トロポニンT抗体aおよびbそれぞれに由来する対応するFab'断片に対してそれ

10

20

30

40

50

ぞれ中程度の親和性しか有しない合成ペプチドが考えられた (c o n s t r u e d) 。

【 0 1 7 2 】

a) 抗体 a に関するエピトープ A ' は次の配列中に含まれ :

SEQ ID NO:9 = ERAEQQRIRAEREKEUUSLKDRIEKRRRAERAEアミド

ここでUは アラニンを表す。

【 0 1 7 3 】

b) 抗体 b に関するエピトープ B ' は次の配列中に含まれ :

SEQ ID NO:10 = SLKDRIERRRAERAE00ERAEQQRIRAEREKEアミド

ここで0はアミノ-トリオキサ-オクタン酸を表す。

【 0 1 7 4 】

当業者は理解するであろうように、これら 2 種類のエピトープを含有するペプチドを 2 通りで組み合わせることが可能であり、両方の変種はエピトープ A ' および B ' を線状に組み合わせることにより設計および調製された。両方の変種の配列 : エピトープの線状配列 A ' - B ' (= T n T - 1) および B ' - A ' (= T n T - 2) はそれぞれ現状技術のペプチド合成法により調製された。

【 0 1 7 5 】

エピトープ A ' および B ' に関する配列はそれぞれ、ヒトの心臓トロポニン T の配列 (P 4 5 3 7 9 / U n i P r o t K B) 上の本来のエピトープと比較してそれらに対する F a b のそれぞれに関する結合親和性を低減するために修正されていた。これらの状況下で、例えば B i a c o r e (商標) 技術により結合親和性を分析することにより、ヘテロ二価結合の作用の動態をよりよく観察することができる。

【 0 1 7 6 】

1 . 5 生体分子相互作用分析

この実験に関して、 B i a c o r e (商標) 3 0 0 0 機器 (G E H e a l t h c a r e) を、系の中に取り付けられた B i a c o r e (商標) S A センサーと共に T = 2 5 で用いた。前条件付け (P r e c o n d i t i o n i n g) は 1 0 0 μ l / 分で 5 0 m M N a O H 中の 1 M N a C l の 3 × 1 分間の注入および 1 分間の 1 0 m M H C l の注入で行われた。

【 0 1 7 7 】

H B S - E T (1 0 m M H E P E S p H 7 . 4 、 1 5 0 m M N a C l 、 1 m M E D T A 、 0 . 0 5 % T w e e n (登録商標) 2 0) をシステム緩衝液として用いた。試料緩衝液はシステム緩衝液と同一であった。

【 0 1 7 8 】

B i a c o r e (商標) 3 0 0 0 システムは制御ソフトウェア V 1 . 1 . 1 の下で運転された。フローセル 1 を 7 R U の D - ピオチンで飽和させた。フローセル 2 上に 1 0 6 3 R U のピオチン化 s s D N A リンカー L 1 を固定した。フローセル 3 上に 8 7 9 R U のピオチン化 s s D N A リンカー L 2 を固定した。フローセル 4 上に 6 7 4 R U のピオチン化 s s D N A リンカー L 3 を捕捉させた。

【 0 1 7 9 】

その後、 F a b ' 断片 D N A コンジュゲート A " を 6 0 0 n M で注入した。 F a b ' 断片 D N A コンジュゲート B " をシステム中に 9 0 0 n M で注入した。そのコンジュゲートを 2 μ l / 分の流速で 3 分間注入した。そのコンジュゲートを連続的に注入してそれぞれの F a b ' 断片 D N A コンジュゲートのそのそれぞれのリンカー上でのそれぞれの飽和シグナルを監視した。 F a b ' の組み合わせは、それぞれのリンカー上に存在する単一の F a b ' 断片 D N A コンジュゲート A " 、単一の F a b ' 断片 D N A コンジュゲート B " ならびに両方の F a b ' 断片 D N A コンジュゲート A " および B " を用いて駆動された (d r i v e n) 。安定なベースラインはそのリンカーが F a b ' 断片 D N A コンジュゲートにより飽和された後に生成され、それはさらなる速度論的測定のための必要条件であった。

【 0 1 8 0 】

10

20

30

40

50

人工のペプチド分析物 T n T - 1 および T n T - 2 を、溶液中の分析物として、表面に提示された F a b ' 断片と相互作用させるためにそのシステム中に注入した。

T n T - 1 を 5 0 0 n M の分析物濃度で注入し、T n T - 2 を 9 0 0 n M の分析物濃度で注入した。両方のペプチドを 5 0 μ l / 分で 4 分間の会合時間で注入した。解離を 5 分間監視した。全てのフローセルに関して、5 0 m M N a O H の 5 0 μ l / 分での 1 分間の注入により再生を行った。

【 0 1 8 1 】

速度論データを B i a e v a l u a t i o n ソフトウェア (V . 4 . 1) を用いて決定した。T n T - 1 および T n T - 2 ペプチドのそれぞれの表面に提示された F a b ' 断片の組み合わせからの解離速度 k_d (1 / s) を、線形ラングミュア 1 : 1 当てはめ (f i t t i n g) モデルに従って決定した。その複合体の分での半減時間を一次速度方程式 : $\ln (2) / (6 0 * k_d)$ の解法に従って計算した。

【 0 1 8 2 】

結果 :

表 1 および 2 それぞれにおいて示した実験データは、分析物 (T n T - 1 または T n T - 2) それぞれおよび様々なヘテロ二価 F a b ' - F a b ' 二量体 A " - B " の間の複体の安定性における一価 d s D N A F a b ' A " または B " コンジュゲートそれぞれと比較した場合の増大を実証している。この作用はそれぞれの表において 2 および 3 行目 (l i n e) と比較した 1 行目において見られる。

【 0 1 8 3 】

【 表 5 】

表 1 : T n T - 1 を様々な長さのリンカーと共に用いた分析データ

a) リンカー L 1

Fab'断片 DNA コンジュゲート A*	Fab'断片 DNA コンジュゲート B*	k_d (1/s)	t1/2 diss (分)
x	x	6.6E-03	1.7
x	-	3.2E-02	0.4
-	x	1.2E-01	0.1

b) リンカー L 2

Fab'断片 DNA コンジュゲート A*	Fab'断片 DNA コンジュゲート B*	k_d (1/s)	t1/2 diss (分)
x	x	4.85E-03	2.4
x	-	2.8E-02	0.4
-	x	1.3E-01	0.1

c) リンカー L 3

Fab'断片 DNA コンジュゲート A*	Fab'断片 DNA コンジュゲート B*	k_d (1/s)	t1/2 diss (分)
x	x	2.0E-03	5.7
x	-	1.57E-02	0.7
-	x	1.56E-02	0.7

【 0 1 8 4 】

【 表 6 】

表 2 : T n T - 2 を様々な長さのリンカーと共に用いた分析データ

a) リンカー L 1

Fab'断片 DNA コンジュゲート A'	Fab'断片 DNA コンジュゲート B'	kd (1/s)	t1/2 diss (分)
x	x	1.4E-02	0.8
x	-	4.3E-02	0.3
-	x	1.4E-01	0.1

10

b) リンカー L 2

Fab'断片 DNA コンジュゲート A'	Fab'断片 DNA コンジュゲート B'	kd (1/s)	t1/2 diss (分)
x	x	4.9E-03	2.3
x	-	3.5E-02	0.3
-	x	1.3E-01	0.1

20

c) リンカー L 3

Fab'断片 DNA コンジュゲート A'	Fab'断片 DNA コンジュゲート B'	kd (1/s)	t1/2 diss (分)
x	x	8.0E-03	1.5
x	-	4.9E-02	0.2
-	x	3.2E-01	0.04

30

【 0 1 8 5 】

その結合活性作用はさらにそのリンカーの長さに依存している。表 1 の下に示した副表 (s u b - t a b l e s) において、すなわち人工分析物 T n T - 1 に関して、31 塩基長のチミジンに基づくスペーサーを含むリンカー L 3 は最低の解離速度または最高の複合体安定性を示す。

【 0 1 8 6 】

表 2 の下に示した副表において、11 塩基長のチミジンに基づくスペーサーを含むリンカー L 2 は人工分析物 T n T - 2 に関して最低の解離速度または最高の複合体安定性を示す。

40

【 0 1 8 7 】

これらのデータをまとめると、本発明において与えられるアプローチに本来備わっているようなリンカーの長さにおける柔軟性は非常に有効かつ好都合であることを実証している。

【 0 1 8 8 】

実施例 2

リン酸化された I G F - 1 R に対する二価結合剤

2 . 1 モノクローナル抗体の開発 (m A b 8 . 1 . 2 および m A b 1 . 4 . 1 6

8)

a) マウスの免疫処置

50

BALB/Cマウスを0、3、6および9週目においてそれぞれ免疫する。免疫処置あたり100 μgのリン酸化されたペプチドpIGF-1R(1340~1366)(SEQ ID NO:11)を含むコンジュゲートを用いる。このペプチドは、チロシン1346においてリン酸化され(=1346-pTy r)、C末端のシステインを介してKLHに連結されて(=Aoc-Cys-MP-KLH-1340)、免疫処置のために用いられるコンジュゲートがもたらされた。0および6週目それぞれにおいて腹腔内に、3および9週目それぞれにおいてマウスの体の様々な部分において皮下に(subcutaneously)免疫処置を実施する。

【0189】

b) 融合およびクローニング

免疫したマウスの脾臓細胞を、Galfre G., and Milstein C., Methods in Enzymology 73 (1981) 3-46に従って骨髓腫細胞と融合させる。このプロセスにおいて、免疫したマウスの約 1×10^8 個の脾臓細胞を 2×10^7 個の骨髓腫細胞a(P3X63-Ag8653、ATCC CRL1580)と混合し、遠心分離する(250gおよび37において10分間)。次いでその細胞をウシ胎児血清(FCS)を含まないRPMI 1640培地で1回洗浄し、50mlコニカルチューブ中で250gで再度遠心分離する。上清を廃棄し、細胞沈降物をタッピングにより穏やかにほぐし、1mlのPEG(分子量4000、Merck、ダルムシュタット)を添加し、ピペット操作により混合する。37の水浴中で1分間保温した後、5mlのFCSを含まないRPMI 1640を室温で4~5分の期間内に滴加する。この工程をさらに10mlのFCSを含まないRPMI 1640を用いて繰り返す。その後、25mlの10% FCSを含有するRPMI 1640を添加し、続いて37、5%CO₂において30分間の保温工程を行う。250gおよび4において10分間の遠心分離の後、その沈降した細胞を10% FCSを含有するRPMI 1640中に回収し、ヒポキサンチン-アザセリン選択培地(RPMI 1640+10% FCS中100mmol/lヒポキサンチン、1μg/mlアザセリン)中で蒔く。100U/mlのインターロイキン6をその培地に増殖因子として添加する。7日後、その培地を新しい培地と交換する。10日目に、その初代培養物を特異的な抗体に関して試験する。陽性の初代培養物を、蛍光活性化セルソーターにより、96ウェル細胞培養プレートにおいてクローニングする。

【0190】

c) 細胞培養上清からの免疫グロブリンの単離

得られたハイブリドーマ細胞をCELL line 1000 CLフラスコ(Integra)中で 1×10^7 細胞の密度で蒔く。IgGを含有するハイブリドーマ細胞上清を週2回収集する。収量は典型的には1mlの上清あたり400 μg~2000 μgのモノクローナル抗体の範囲である。抗体の培養上清からの精製は、タンパク質化学の一般的に用いられる方法を用いて(例えばBruck, C., Methods in Enzymology 121 (1986) 587-695に従って)実施した。

【0191】

2.2 ハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドの合成

それぞれSEQ ID NO: 5および6において示した配列を含む、以下のアミノ修飾された前駆体を、標準的な方法に従って合成した。下記で示したオリゴヌクレオチドは、いわゆるアミノリンカーだけでなく蛍光色素も含む。当業者はすぐに理解するであろうように、この蛍光色素はオリゴヌクレオチド自体の、ならびにそれらを含む構成要素の精製を促進するために非常に好都合である。

【0192】

- a) 5'-フルオレセイン-AGT CTA TTA ATG CTT CTG C-(スパーサーC3)3-C7アミノリンカー-;
- b) 5'-Cy5 AGT CTA TTA ATG CTT CTG C-(スパーサーC3)3-C7アミノリンカー-;
- c) 5'-アミノリンカー-(スパーサーC3)3-AGT TCT ATC GTC GTC CA-フルオレセイン-3';

d) 5'-フルオレセイン-(ベータL AGT CTA TTA ATG CTT CTG C)-(スパーサーC3)3-C7アミノリンカー-;(ベータLはこれがL-DNAオリゴヌクレオチドであることを示す)および

e) 5'-アミノリンカー-(スパーサーC3)3-(ベータL-AGT TCT ATC GTC GTC CA)-フルオレセイン-3' (ベータLはこれがL-DNAオリゴヌクレオチドであることを示す)。

【0193】

合成はABI 394合成装置上で10 μmolスケールで、(5'アミノ修飾に関して)トリチルオンまたは(3'アミノ修飾に関して)トリチルオフモードで、固体支持体として商業的に入手可能なCPGを、ならびに標準的なdA(bz)、dT、dG(iBu)およびdC(Bz)ホスホラミダイト(Sigma Aldrich)を用いて実施された。

10

【0194】

オリゴヌクレオチド合成の間に以下のアミダイト類、アミノ修飾剤およびCPG支持体を用いてC3スパーサー、色素およびアミノ部分をそれぞれ導入した:

スパーサーホスホラミダイトC3(3-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピル-1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト(Glen Research);

5'アミノ修飾剤は、5'-アミノ-修飾剤C6(6-(4-モノメトキシトリチルアミノ)ヘキシル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホラミダイト(Glen Research)を用いることにより導入する;

5'-フルオレセインホスホラミダイト 6-(3',6'-ジピバロイルフルオレセイニル-6-カルボキサミド)-ヘキシル-1-0-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホラミダイト(Glen Research);

20

Cy5(商標)ホスホラミダイト 1-[3-(4-モノメトキシトリチルオキシ)プロピル]-1'-[3-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピルホスホラミジチル)プロピル]-3,3,3',3'-テトラメチルインドジカルボシアニンクロリド(1-[3-(4-monomethoxytrityloxy)propyl]-1'-[3-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl phosphoramidyl)propyl]-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine chloride)(Glen Research);

LightCyclerフルオレセインCPG 500 A (Roche Applied Science);および

3'-アミノ修飾剤TFAアミノC-6 Icaa CPG 500 A (Chemgenes)。

【0195】

30

Cy5標識されたオリゴヌクレオチドに関して、dA(tac)、dT、dG(tac)、dC(tac)ホスホラミダイト(Sigma Aldrich)を用いて、33%アンモニアによる脱保護を室温で2時間実施した。

【0196】

L-DNAオリゴヌクレオチドは、ベータ-L-dA(bz)、dT、dG(iBu)およびdC(Bz)ホスホラミダイト(Chemgenes)を用いることにより合成された。

フルオレセイン修飾されたハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドの精製は、2工程の手順により実施された:まず、そのオリゴヌクレオチドを逆相HPLC(Merck-Hitachi-HPLC; RP-18カラム;勾配系[A: 0.1 M (Et3NH)OAc (pH 7.0)/MeCN 95:5; B: MeCN]:3分間のA中20% B、12分間のA中20~50% Bおよび25分間のA中20% B、1.0 ml/分の流速、260 nmにおいて検出)上で精製した。望まれる生成物を含有する画分(分析的RP HPLCにより監視した)を合わせ、蒸発させて乾燥させた(5'末端においてモノメトキシトリチル保護されたアルキルアミノ基で修飾されたオリゴヌクレオチドは、20%酢酸と共に20分間保温することにより脱トリチル化する)。フルオレセインを標識として含有するオリゴマーは、HPLC上でのIEXクロマトグラフィー[Mono Qカラム:緩衝液A:水酸化ナトリウム(10 mM/l; pH約12);緩衝液B:水酸化ナトリウム(10 mM/l; pH約12)中で溶解させた1M塩化ナトリウム;勾配:30分間で100%緩衝液Aから100%緩衝液Bまで、流速1 ml/分、260 nmにおいて検出]により再度精製した。その生成物を透析により脱塩した。

40

【0197】

Cy5標識されたオリゴマーは、逆相HPLC上での最初の精製(Merck-Hitachi-HPLC; RP

50

-18カラム;勾配系[A: 0.1 M (Et₃NH)OAc (pH 7.0)/MeCN 95:5; B: MeCN]:3分間のA中20% B、12分間のA中20~50% Bおよび25分間のA中20% B、1.0 ml/分の流速、260 nmにおいて検出)の後に用いられた。そのオリゴマーを透析により脱塩し、Speed-Vacエバポレーター上で凍結乾燥させると固体が得られ、それを-24℃で凍結させた。

【0198】

2.3 ハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドの活性化

実施例2からのアミノ修飾されたオリゴヌクレオチドを0.1 Mホウ酸ナトリウム緩衝液(pH 8.5)中で溶解させ(c= 600 μmol)、DMF中で溶解させた18倍モル過剰量のThermo ScientificからのスルホSMCC (スルホスクシンイミジル 4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート) (c= 3mg/100 μl)と反応させた。その反応生成物を、スルホSMCCの加水分解分解産物である4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレートを除去するために、水に対して完全に透析した。

【0199】

その透析物を蒸発により濃縮し、チオール基を含む一価結合剤とのコンジュゲーションのために直接用いた。

2.4 両端においてハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドを含むリンカーオリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドは、標準的な方法により、ABI 394合成装置上で10 μmolスケールで、トリチルオンモードで、固体支持体として商業的に入手可能なdT-CPGを用いて、標準的なdA(bz)、dT、dG(iBu)およびdC(Bz)ホスホラミダイト(Sigma Aldrich)を用いて合成された。

【0200】

L-DNAオリゴヌクレオチドは、固体支持体として商業的に入手可能なベータL-dT-CPGを、ならびにベータ-L-dA(bz)、dT、dG(iBu)およびdC(Bz)ホスホラミダイト(Chem genes)を用いることにより合成された。

【0201】

オリゴヌクレオチドの精製を、実施例3の下で記述されるように逆相HPLC上で実施した。望まれる生成物を含有する画分(分析的RP HPLCにより分析/監視した)を合わせ、蒸発させて乾燥させた。脱トリチル化を、80%酢酸と共に15分間保温することにより実施した。酢酸を蒸発により除去した。残留物(reminder)を水中で溶解させ、凍結乾燥した。

【0202】

オリゴヌクレオチド合成の間に以下のアミダイト類およびCPG支持体を用いてC18スパーサー、ジゴキシゲニンおよびビオチン基を導入した:

スパーサーホスホラミダイト18 (18-O-ジメトキシトリチルヘキサエチレングリコール, 1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト(Glen Research);

ビオチン-dT (5'-ジメトキシトリチルオキシ-5-[N-((4-t-ブチルベンゾイル)-ビオチニル)-アミノヘキシル]-3-アクリルイミド]-2'-デオキシウリジン-3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト(Glen Research);

ビオチンホスホラミダイト 1-ジメトキシトリチルオキシ-2-(N-ビオチニル-4-アミノブチル)-プロピル-3-O-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホラミダイトならびに

ジゴキシゲニン-N-ヒドロキシル-スクシンイミジルエステルによるアミノ修飾および後標識に関して、5'-ジメトキシトリチル-5-[N-(トリフルオロアセチルアミノヘキシル)-3-アクリルイミド]-2'-デオキシウリジン、3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト。

【0203】

以下の架橋コンストラクトまたはリンカーを合成した:

リンカー1: 5' -G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

リンカー2: 5' -G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(T40)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

リンカー-3: 5' -[B-L]G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(ビオチン-dT)-TGG ACG ACG ATA GA
A CT-3'

リンカー-4: 5' -[B-L]G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T5-(ビオチン-dT)-T5-TGG ACG ACG
ATA GAA CT-3'

リンカー-5: 5' -[B-L]G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T20-(ビオチン-dT)-T20-TGG ACG AC
G ATA GAA CT-3'

リンカー-6: 5' -[B-L] G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T30-(ビオチン-dT)-T30-TGG ACG A
CG ATA GAA CT-3'

リンカー-7: 5' -GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T5-(ビオチン-dT)-T5 TG GAC GAC GAT AG
A ACT-3'

10

リンカー-8: 5' -GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T10-(ビオチン-dT)-T10 TGG ACG ACG ATA
GAA CT-3'

リンカー-9: 5' -GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T15-(ビオチン-dT)-T15 TGG ACG ACG ATA
GAA CT-3'

リンカー-10: 5' -GCA GAA GCA TTA ATA GAC T T20-(ビオチン-dT)-T20 TGG ACG ACG AT
A GAA CT-3'

リンカー-11: 5' -G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-スパーサーC18-(ビオチン-dT)-スパーサ
ーC18-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

リンカー-12: 5' -G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(スパーサーC18)2-(ビオチン-dT)-(ス
パーサーC18)2-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

20

リンカー-13: 5' -G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(スパーサーC18)3-(ビオチン-dT)-(ス
パーサーC18)3-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

リンカー-14: 5' -G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(スパーサーC18)4-(ビオチン-dT)-(ス
パーサーC18)4-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

リンカー-15: 5' -G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T20-(Dig-dT)-T20-TGG ACG ACG ATA GAA
CT-3'

リンカー-16: 5' -G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(Dig-dT)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'

リンカー-17: 5' -G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(ビオチン-dT)-TGG ACG ACG ATA GAA CT
-3'。

【 0 2 0 4 】

30

上記の架橋コンストラクトの実施例は、少なくとも第1のハイブリダイズ可能なオリゴ
ヌクレオチドおよび第2のハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドを含む。リンカー-3
~ 17は、そのハイブリダイズ可能な核酸の一続きに加えて、中央のそれぞれビオチン化
もしくはジゴキシゲニン化されたチミジンまたは上記で示した長さのチミジン単位からな
るスパーサーを含む。

【 0 2 0 5 】

その5' ハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドはSEQ ID NO:7に、その3' ハイブリ
ダイズ可能なオリゴヌクレオチドはSEQ ID NO:8にそれぞれ対応する。SEQ ID NO:7のオリ
ゴヌクレオチドは、SEQ ID NO:5のオリゴヌクレオチドに容易にハイブリダイズするであ
ろう。SEQ ID NO:8のオリゴヌクレオチドは、SEQ ID NO:6のオリゴヌクレオチドに容易に
ハイブリダイズするであろう。

40

【 0 2 0 6 】

上記の架橋コンストラクトの実施例において、[B - L]はL - DNAオリゴヌクレオ
チド配列が与えられていることを示し；スパーサーC18、ビオチンおよびビオチンdT
はそれぞれ上記で示した構築ブロックに由来するようなC18スパーサー、ビオチンおよ
びビオチン-dTを指し；そして数を伴うTは示した位置においてそのリンカー中に組み
込まれたチミジン残基の数を示す。

【 0 2 0 7 】

2.5 二重結合剤コンストラクトの組み立て

A) IgGの切断およびFab'断片のssDNAによる標識

50

精製したモノクローナル抗体をペプシンプロテアーゼの助けにより切断するとF(a b')₂断片が得られ、続いてそれを37℃での低濃度のシステアミンでの処理により還元するとFab'断片になる。その反応を、PD-10カラム上でのシステアミンの分離により停止する。そのFab'断片を、実施例3に従って生成されるような活性化されたオリゴヌクレオチドにより標識する。この一本鎖DNA(ssDNA)はチオール反応性マレイミド基を有し、それはFab'のヒンジ領域のシステインと反応する。高い百分率の単一標識されたFab'断片を得るため、ssDNAのFab'断片に対する相対的なモル比は低く保たれる。単一標識されたFab'断片(ssDNA:Fab'=1:1)の精製は、イオン交換クロマトグラフィー(カラム:Source 15 Q PE 4.6/100、Pharmacia/GE)により行われる。効率的な精製の検証は、分析的ゲル濾過およびSDS-PAGEにより達成される。

10

【0208】

B) 抗pIGF-1R二重結合剤の組み立て

抗pIGF-1R二重結合剤は、IGF-1Rの細胞内ドメインの異なるエピトープを標的とする2種類のFab'断片に基づいている: Fab' 8.1.2は前記の標的タンパク質のリン酸化部位(pTyr 1346)を検出し、Fab' 1.4.168は前記の標的タンパク質の非ホスホ部位を検出する。そのFab'断片は一本鎖DNA(ssDNA)に共有結合的に連結されている: Fab' 1.4.168はSEQ ID NO:6を含みフルオレセインを蛍光マーカーとして含有する17塩基長のssDNAに、そしてFab' 8.1.2はSEQ ID NO:5を含みCy5を蛍光マーカーとして含有する19塩基長のssDNAに共有結合的に連結されている。以下、共有結合した17塩基長または19塩基長のssDNAを有するこれらのFab'をそれぞれssFab' 1.4.168およびssFab' 8.1.2と呼ぶ。二重結合剤の組み立ては、そのssFab'断片の対応するssDNAにハイブリダイズする2種類の相補性ssDNAオリゴヌクレオチド(それぞれSEQ ID NO:7および8)を含むリンカー(すなわち架橋コンストラクト)により媒介される。その二重結合剤の2個のssFab'断片の間の距離は、スパーサー、例えばC18スパーサーまたは異なる長さのDNAをそれぞれ用いることにより修正することができる。

20

【0209】

組み立て評価のために、その二重結合剤構成要素ssFab' 8.1.2、ssFab' 1.4.168ならびにリンカーコンストラクト(I)(=実施例2.4のリンカー17)5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT T(-Bi)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'および(II)(=実施例2.4のリンカー10)5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-(T20)-T(-Bi)-(T20)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'を室温で等モル量で混合した。1分間の保温工程の後、その反応混合物を分析的ゲル濾過カラム(Superdex(商標)200、10/300 GL、GE Healthcare)上で分析した。単一の二重結合剤構成要素の溶離体積(V_E)のその反応混合物のV_Eとの比較は、その二重結合剤がうまく形成されたことを実証している(図1)。(そのリンカーの両方の中央にあるビオチン化チミジン(T-(Bi))は、これらの実験において機能を有しない。)

30

2.6 抗pIGF-1R二重結合剤の固定されたIGF-1RおよびIRペプチドへの結合を評価するBiacore(商標)実験

40

この実験に関して、Biacore(商標)2000機器(GE Healthcare)を、系の中に取り付けられたBiacore(商標)SAセンサーと共にT=25℃で用いた。前条件付けは100μl/分で50mM NaOH中の1M NaClの3×1分間の注入および1分間の10mM HClの注入で行われた。

【0210】

HBS-ET(10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、1mM EDTA、0.05% Tween(登録商標)20)をシステム緩衝液として用いた。試料緩衝液はシステム緩衝液と同一であった。Biacore(商標)2000システムは制御ソフトウェアV1.1.1の下で運転された。

50

【0211】

続いてビオチン化されたペプチドをそれぞれのフローセル中のSA表面上に捕捉させた。16RUのIGF-1R(1340~1366)[1346-pTyr;Glu(Bi-PEG-1340)]アミド(すなわち、1346位のチロシンがリン酸化されており、位置1340に対応するグルタミン酸を介して結合したPEGリンカーを含み、そのリンカーの他方の末端においてビオチン化されている、SEQ ID NO:11のペプチド)をフローセル2上に捕捉させた。18RUのIGF-1R(1340~1366);Glu(Bi-PEG-1340)]アミド(すなわち、1346位のチロシンがリン酸化されておらず、位置1340に対応するグルタミン酸を介して結合したPEGリンカーを含み、そのリンカーの他方の末端においてビオチン化されている、SEQ ID NO:11のペプチド)をフローセル3上に捕捉させた。20RUのhIR(1355~1382)[1361-pTyr;Glu(Bi-PEG-1355)]アミド(すなわち、1361位のチロシンがリン酸化されており、ヒトインスリン受容体の位置1355に対応するグルタミン酸を介して結合したPEGリンカーを含み、そのリンカーの他方の末端においてビオチン化されている、SEQ ID NO:12のペプチド)をフローセル4上に捕捉させた。最後に、全てのフローセルをd-ビオチンで飽和させた。

10

【0212】

二重結合剤の形成に関して、実施例2.5において記述したような組み立てプロトコルを用いた。2種類のssFab'の一方のみを用いて個々の運転を実施した際、リンカーDNAの非存在または存在は会合または解離曲線に影響を及ぼさなかった(データは示していない)。

20

【0213】

100nMの溶液中の分析物(これらの実験では二価二重結合剤)を50μl/分で240秒の会合時間の間に注入し、解離を500秒間監視した。80mM NaOHを用いた50μl/分での1分間の注入工程を用いることにより、効率的な再生が達成された。フローセル1は基準の役目を果たした。抗原の注入の代わりにブランク緩衝液の注入を用いて、緩衝液のシグナルを引くことによりそのデータを二重に参照した。

【0214】

それぞれの測定サイクルにおいて、溶液中の以下の分析物の1つを4つのフローセル全てにわたってそれぞれ注入した:100nMのssFab' 8.1.2、100nMのssFab' 1.4.168、100nMのssFab' 8.1.2および100nMのssFab'の混合物、リンカー(III)(5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T(20)-T(-Dig)-(T20)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3' (=実施例2.4のリンカー15))上にハイブリダイズしたssFab' 8.1.2およびssFab' 1.4.168からなる100nMの二価結合剤、ならびにリンカー(IV)(5'-G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T(-Dig)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3' (=実施例2.4のリンカー16))上にハイブリダイズしたssFab' 8.1.2およびssFab' 1.4.168からなる100nMの二価結合剤。(上記のリンカー中の中央のチミジンのジゴキシゲニン化(T(-Dig))は、これらの実験に関連しない。)

30

そのシグナルは、時間依存性Biacore(商標)センサーグラムとして監視された。

40

【0215】

報告の時点は、それぞれの相互作用の応答単位シグナルの高さを監視するため、分析物の会合段階の終了時(結合末期(Binding Late)、BL)に、および分析物の解離段階の終了時(安定性末期(Stability Late)、SL)に設定された。解離速度kd(1/s)をBiacore(商標)評価ソフトウェア4.1を用いて線形1:1ラングミュア当てはめに従って計算した。その複合体の分での半減時間を式 $\ln(2)/(60 * kd)$ に基づいて計算した。

【0216】

そのセンサーグラム(図2-5)は、ssFab' 1.4.168およびssFab

50

1.4.168が二重結合剤(=二価結合剤)の形態で用いられた際の、おそらく基礎になっている協同的結合作用による、pIGF-1R結合における特異性および複合体の安定性の両方における増大を示している。Fab' 1.4.168単独ではpIRペプチドに関する交差反応性を示さないが、IGF-1Rのリン酸化型および非リン酸化型を識別しない(両方の場合において $T_{1/2\text{ diss}} = 3$ 分)。しかし、Fab' 8.1.2はIGF1-Rペプチドのリン酸化版にのみ結合するが、リン酸化されたインスリン受容体とのいくらかの望まれない交差反応性を示す。その二重結合剤はpIGF-1Rペプチドおよび両方の他のペプチドを十分に識別し(図4参照)、従って非特異的結合の問題の克服を助ける。その特異性における増大は、両方のFab' がリンカーDNAなしで適用された場合には失われることを特筆する(図5)。その二重結合剤のpIGF-1Rペプチドに対する親和性における増大は、個々のFab' およびそのリンカーDNAを抜かしたFab' 混合物と比較して増大した解離半減時間において示される(図3および図5)。試験した2種類の異なるDNAリンカーの長さを有する二重結合剤は標的結合特異性および親和性への全体的なプラスの作用を共有しているが、より長いリンカー(T40-T-Digをスペーサーとして有する(III))(すなわち実施例2.4のリンカー15)が両方の基準に関して好都合であるように思われる。

10

【0217】

2.7 M-1.4.168-IgGおよびM-8.1.2-IgGのBiacore(商標)アッセイサンドイッチ

Biacore(商標)T100機器(GE Healthcare)をシステム中に取り付けられたBiacore(商標)CM5センサーと共に用いた。そのセンサーは、0.1% SDS、50mM NaOH、10mM HClおよび100mM H3PO4の100μl/分での1分間の注入により前条件付けされた。

20

【0218】

システム緩衝液はHBS-ET(10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、1mM EDTA、0.05% Tween(登録商標)20)であった。試料緩衝液はシステム緩衝液であった。

【0219】

Biacore(商標)T100システムは制御ソフトウェアV1.1.1の下で運転された。10mM酢酸Na(pH4.5)中で30μg/mlのポリクローナルウサギIgG抗体<IGGFC M>R(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)を、10000RUでフローセル1、2、3、および4それぞれの上に、EDC/NHS化学により、製造業者の説明書に従って固定した。最後に、そのセンサー表面を1Mエタノールアミンでブロッキングした。全部の実験を13で運転した。

30

【0220】

500nMの一次mAb M-1.004.168-IgGを<IGGFC M>R表面上に10μl/分で1分間捕捉させた。ブロッキング溶液を含有する3μMの(IgGクラスIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3の)IgG断片混合物を30μl/分で5分間注入した。ペプチドIGF-1R(1340~1366)[1346-pTyr;Glu(Bi-PEG-1340)]アミドを300nMで30μl/分において3分間注入した。300nMの二次抗体M-8.1.2-IgGを30μl/分で注入した。10mMグリシン-HCl(pH1.7)を50μl/分で3分間用いてセンサーを再生させた。

40

【0221】

図6はそのアッセイの構成を説明している。図7において、その測定の結果を示す。その測定は、両方のモノクローナル抗体がそれらのそれぞれの標的ペプチド上の2つの別個の無関係なエピトープに同時に結合することができることを明確に示している。これは、協同的結合事象を生じさせる目的を有するあらゆる後の実験のための必要条件である。

【0222】

50

2.8 センサー表面上の二重結合剤のBiacore（商標）アッセイ

Biacore（商標）3000機器（GE Healthcare）をシステム中に取り付けられたBiacore（商標）SAセンサーと共に $T = 25$ で用いた。そのシステムは、 $100\mu\text{l}/\text{分}$ での 50mM NaOH 中 1M NaCl の 3×1 分間の注入および1分間の 10mM HCl の注入により前条件付けされた。

【0223】

システム緩衝液は HBS-ET （ $10\text{mM HEPES pH}7.4$ 、 150mM NaCl 、 1mM EDTA 、 0.05% Tween（登録商標）20）であった。試料緩衝液はシステム緩衝液であった。

【0224】

Biacore（商標）3000システムは制御ソフトウェアV4.1の下で運転された。

124RUのアミノ-PEO-ビオチンを基準フローセル1上に捕捉させた。1595RUのビオチン化された 14.6kDa のT0-Bi 37塩基長ssDNA-リンカー（I）（ $5'-\text{G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T(-Bi)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'}$ ）（=実施例2.4のリンカー17）および1042RUのビオチン化された 23.7kDa のT40-Bi 77塩基長ssDNA-リンカー（II）（ $5'-\text{G CAG AAG CAT TAA TAG ACT-T(20)-(ビオチン-dT)-(T20)-TGG ACG ACG ATA GAA CT-3'}$ = 実施例2.4のリンカー10）を、異なるフローセル上に捕捉させた。

【0225】

300nM のssFab' 8.1.2および 300nM のssFab' 1.004.168をそのシステムの中に $50\mu\text{l}/\text{分}$ で3分間注入した。それぞれのssFabの速度論的寄与を試験するため、対照として 300nM のssFab' 8.1.2または 300nM のssFab' 1.004.168のみを注入した。対照として、緩衝液をssFabの代わりに注入した。ペプチドpIR（1355～1382）[1361-p Tyr]アミドおよびIGF-1R（1340～1366）アミドそれぞれ（溶液中で遊離している（free in solution））をシステム中に 0nM 、 4nM 、 11nM 、 33nM （2回）、 100nM および 300nM の濃度段階で $50\mu\text{l}/\text{分}$ で4分間注入した。ペプチドpIGF-1R（1340～1366）[1346-p Tyr]アミドに対する親和性を測定するための実験の別のセットにおいて、 0nM 、 0.4nM 、 1.1nM 、 3.3nM （2回）、 10nM および 30nM の濃度段階を用いた。

【0226】

解離を $50\mu\text{l}/\text{分}$ で5.3分間監視した。それぞれの濃度工程の後、 250mM のNaOHの12秒間のパルスによりシステムを再生し、ssFab' リガンドを再装填した（reloaded）。

【0227】

図8はBiacore（商標）機器上のアッセイ構成を模式的に説明している。図9で示した表は、このアプローチからの定量の結果を示す。図10、11および12はT40二重結合剤を用いたこのアッセイ構成からの典型的なBiacore（商標）の結果を示す。

【0228】

図9における表は、二重結合剤の概念の利益を実証している。T40二重結合剤（実施例2.4のリンカー10、すなわちT20-ビオチン-dT-T20のスペーサーを有するリンカーを有する二重結合剤）は結果として、それぞれ192分および 30pM であるT0二重結合剤（すなわち実施例2.4のリンカー16を有する二重結合剤）と比較した場合に、2倍向上した抗原複合体の半減時間（414分）および3倍向上した親和性（ 10pM ）をもたらす。これは最適な協同的結合作用をもたらすためにリンカーの長さを最適化する必要性を強調する。

【0229】

T40二重結合剤（すなわちT40-Biリンカー（実施例2.4のリンカー10）を

10

20

30

40

50

含む二重結合剤)は、リン酸化されたIGF-1Rペプチドに対する10 pMの親和性を示す(図9、図10における表)。これはリン酸化されたインスリン受容体ペプチド(24 nM)に対する2400倍の親和性の向上であり、リン酸化されていないIGF-1Rペプチドに対する100倍の向上である。

【0230】

従って、2種類の別個の分離された結合事象の組み合わせにより特異性および親和性を増大させる目的は達成されている。

協同的結合作用は特にリン酸化されたIGF-1Rペプチドに対する解離速度から明らかになり、ここで二重結合剤は、一価結合剤8.1.2単独による0.5分および一価結合剤1.4.168単独による3分それぞれに対して414分の抗原複合体半減時間を示す。

10

【0231】

さらに、完全に組み立てられたコンストラクトは、単独でFab'がハイブリダイズしたコンストラクトと比較した場合に、その解離速度 k_d (1/s)をおおよそ掛け合わせる(図10、11、12および図9中の表)。興味深いことに、会合速度 k_a (1/Ms)も単独のFab'の相互作用事象と比較した場合にわずかに増大し、これはそのコンストラクトの分子の柔軟性の増大によるものである可能性がある。

【0232】

強い洗浄手順を用いる診断系は、個々の(一価の)Fab'分子とは対照的に、そのT40二重結合剤の高い性能を確実に促進するはずである。そのハイブリダイズしたコンストラクト、すなわち本発明に従う二価結合剤は特異的かつ極めて安定な結合事象をもたらすが、一価結合剤はより急速に解離し、例えばそれらはより急速に洗い流される。

20

【0233】

実施例3

HER2に対する二価結合剤

3.1 抗HER2二価結合剤の組み立て

異なる重複しないエピトープAおよびBでヒトHER2(ErbB2またはp185^{neu})に結合する2種類のモノクローナル抗体を用いた。第1抗体は抗HER2抗体4D5(huMAb4D5-8、rhumaB HER2、トラスツズマブ(trastuzumab)またはHERCEPTIN(登録商標);本明細書にそのまま援用する米国特許第5,821,337号を参照)である。

30

【0234】

“4D5エピトープ”は、抗HER2抗体4D5(ATCC CRL 10463)が結合するErbB2の細胞外ドメイン中の領域である。このエピトープは、ErbB2の膜貫通ドメインに近い。

【0235】

第2抗体は抗HER2抗体2C4(per্তুzuma b(登録商標))である。その抗体2C4および特にそのヒト化変種は、本明細書にそのまま援用する国際公開第01/00245号において詳細に記述されている。2C4はアメリカ培養細胞系統保存機関(米国バージニア州マナサス)にATCC HB-12697の下で寄託されているハイブリドーマ細胞株により産生される。ヒト化2C4抗体の例が国際公開第01/00245号(本明細書にそのまま援用する)の実施例3において提供されている。そのヒト化抗HER2抗体2C4はPer্তুzuma bとも呼ばれる。

40

【0236】

Per্তুzuma b(以前は2C4)は、HER二量体化阻害剤(HDI)として知られる新しいクラスの薬剤の最初のものである。Per্তুzuma bはHER2にその二量体化ドメインにおいて結合し、それによりその活性化二量体型受容体複合体を形成する能力を阻害し、そうして最終的に結果として細胞増殖および分裂をもたらす下流のシグナルカスケードを遮断する(Franklin, M.C., Cancer Cell 5 (2004) 317-328参照)。Per্তুzuma bはHER2の細胞外ドメインに対して向けられた完全にヒト化された組

50

み換えモノクローナル抗体である。

【0237】

そのモノクローナル抗体の培養上清からの精製は、現状技術のタンパク質化学の方法を用いて実施することができる。

精製したモノクローナル抗体を、予め活性化したパパインまたはペプシンで消化すると、 $F(ab')_2$ 断片が得られる。続いてこれらを低濃度のシステアミンを用いて37で還元すると、Fab'断片になる。その反応を、Sephadex G-25カラム(GE Healthcare)上でシステアミンをその試料のポリペプチド含有部分から分離することにより停止する。

【0238】

得られたFab'断片を活性化されたssDNAポリヌクレオチドとコンジュゲートする。

a) 抗HER2抗体4D5 Fab' - ssDNA - コンジュゲート

抗HER2抗体4D5 Fab' - ssDNA - コンジュゲートの調製のため、SEQ ID NO:5の誘導体、すなわち5'-AGT CTA TTA ATG CTT CTG C(=SEQ ID NO:5)-XXX-Y-Z-3'が用いられ、ここでX=ホスホラミダイトC3 (3-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピル-1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト(Glen Research)により導入されたプロピレン-ホスフェートであり、ここでY=(6-(4-モノメトキシトリチルアミノ)ヘキシル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホラミダイト(Glen Research)により導入された5'-アミノ-修飾剤C6であり、ここでZ=スルホスクシンイミジル 4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート(ThermoFischer)により導入された4[N-マレイニイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシである。

【0239】

b) 抗HER2抗体2C4 Fab' - ssDNA - コンジュゲート

抗HER2抗体2C4 Fab' - ssDNA - コンジュゲートBの調製のため、SEQ ID NO:6の誘導体、すなわち5'-Y-Z-XXX-AGT TCT ATC GTC GTC CA-3'が用いられ、ここでX=ホスホラミダイトC3 (3-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピル-1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト(Glen Research)により導入されたプロピレン-ホスフェートであり、ここでY=(6-(4-モノメトキシトリチルアミノ)ヘキシル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホラミダイト(Glen Research)により導入された5'-アミノ-修飾剤C6であり、Z=スルホスクシンイミジル 4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート(ThermoFischer)により導入された4[N-マレイニイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシである。

【0240】

SEQ ID NO:5またはSEQ ID NO:6のポリヌクレオチドはそれぞれ現状技術のポリヌクレオチド合成法により合成された。そのマレイニイミド基の導入は、Yのアミノ基のZのスクシンイミジル基との反応により行われ、それは固相ポリヌクレオチド合成プロセスの間に組み込まれた。

【0241】

その一本鎖DNAコンストラクト(constructs)はチオール反応性マレイミド基を有し、それはシステアミン処理により生成されたFab'のヒンジ領域のシステインと反応する。高い百分率の単一標識されたFab'断片を得るため、ssDNAのFab'断片に対する相対的なモル比は低く保たれる。単一標識されたFab'断片(ssDNA:Fab'=1:1)の精製は、陰イオン交換クロマトグラフィー(カラム:Mono Q, GE Healthcare)により行われる。効率的な標識および精製の検証は、分析的ゲル濾過クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEにより達成される。

【0242】

3.2 生体分子相互作用分析

この実験に関して、Biacore T100機器(GE Healthcare)を、系の中に取り付けられたBiacore SAセンサーと共にT=25で用いた。前

10

20

30

40

50

条件付けは、 $100\mu\text{l}/\text{分}$ で、 50mM NaOH 中の 1M NaCl ($\text{pH } 8.0$)の 3×1 分間の注入、続いて1分間の 10mM HCl の注入で行われた。システム緩衝液は HBS-EP (10mM HEPES $\text{pH } 7.4$ 、 150mM NaCl 、 1mM EDTA 、 0.05% P20)であった。試料緩衝液は $1\text{mg}/\text{ml}$ CMD (カルボキシメチルデキストラン)を補ったシステム緩衝液であった。

【0243】

ビオチン化 ss-L-DNA リンカーをそれぞれのフローセル中の SA 表面上に捕捉させた。フローセル1をアミノ- PEO -ビオチン (PIERCE)で飽和させた。

40RU のビオチン化 37 塩基長オリゴヌクレオチドリンカー (実施例2.4のリンカー3)をフローセル2上に捕捉させた。 55RU のビオチン化 77 塩基長オリゴヌクレオチドリンカー (実施例2.4のリンカー5)をフローセル3上に捕捉させた。 60RU のビオチン化 97 塩基長オリゴヌクレオチドリンカー (実施例2.4のリンカー6)をフローセル4上に捕捉させた。

【0244】

250nM の抗 HER2 抗体 $4\text{D5-Fab}'\text{-ss-L-DNA}$ をシステム中に3分間注入した。 300nM の抗 HER2 抗体 $2\text{C4-Fab}'\text{-ss-L-DNA}$ をシステム中に $2\mu\text{l}/\text{分}$ で5分間注入した。その DNA 標識された Fab 断片は単独または組み合わせで注入された。

【0245】

対照として、 250nM の抗 HER2 抗体 $4\text{D5-Fab}'\text{-ss-L-DNA}$ および 300nM の抗 HER2 抗体 $2\text{C4-Fab}'\text{-ss-L-DNA}$ のみをシステム中に注入した。さらなる対照として、緩衝液を DNA 標識された Fab 断片の代わりに注入した。その ss-L-DNA 標識された Fab 断片のそれぞれの ss-L-DNA bi- リンカー上でのハイブリダイゼーションの後、溶液中の分析物 hHER2-ECD を、 24nM 、 8nM 、 3nM 、 1nM 、 0.3nM 、 0nM からの異なる濃度系列でシステム中に 3.5 分間の会合段階の間 $100\mu\text{l}/\text{分}$ で注入した。解離段階を $100\mu\text{l}/\text{分}$ で 15 分間監視した。その系を、 100mM グリシン緩衝液 (グリシン $\text{pH } 11$ 、 150mM NaCl)の $20\mu\text{l}/\text{分}$ で 30 秒間の注入、続いて2番目の水の $30\mu\text{l}/\text{分}$ で1分間の注入により再生させた。

【0246】

そのシグナルを、分析物濃度依存性の時間分析したセンサーグラムとして測定した。そのデータを $\text{Biacore Biaevaluation}$ ソフトウェア4.1を用いて評価した。当てはめモデルとして標準的なラングミュア2成分結合モデルを用いた。

【0247】

結果：

ss-D-DNA 標識された Fab 断片をシステム中に注入した場合、その ss-D-DNA 標識された Fab 断片はそのセンサー表面上に提示された spiegelmer 状 ss-L-DNA リンカーとハイブリダイズしなかったため、 HER2-ECD 相互作用を観察することはできなかった。

【0248】

表3：その二重結合剤実験の速度論的結果。リンカー：表面に提示されたビオチン化 ss-L-DNA ポリヌクレオチドリンカー、オリゴ 37 塩基長- Bi 、オリゴ 77 塩基長- Bi およびオリゴ 97 塩基長- Bi 、上記で記述したようにリンカーの長さが異なる。 ss-L-DNA-Fab ： 2C4-ss-L-DNA ： 19 塩基長-フルオレセインで標識された、抗 HER2 抗体 $2\text{C4-Fab}'\text{-ss-L-DNA}$ 。 4D5-ss-L-DNA ： 17 塩基長-フルオレセインで標識された、抗 HER2 抗体 $4\text{D5-Fab}'\text{-ss-L-DNA}$ 。 $4\text{D5} + 2\text{C4-ss-L-DNA}$ は、両方の一価抗 HER2 抗体断片の組み合わせを含む、表面に結合した二重結合剤に関する。

【0249】

表3において、次の略語を用いる： LRU ：応答単位での質量、それはセンサー表面上

10

20

30

40

50

にハイブリダイズしている。抗原：87 kDaのHER2-ECDを溶液中の分析物として用いた。 k_a ：(1/Ms)での会合速度。 k_d ：(1/s)での解離速度。 $t_{1/2 diss}$ ：一次速度方程式の解 $\ln(2)/k_d * 3600$ に従って時間(hours)で計算された抗原複合体半減時間。 K_D ：モル濃度での親和性。 K_D ：ピコモル濃度で計算された親和性。 R_{max} ：応答単位(RU)での飽和時の最大分析物応答シグナル。 MR ：モル比、その相互作用の化学量論比を示す。 Chi^2 、U値：その測定の品質指標。

【0250】

【表7】

表3

リンカー	ss-L-DNA-Fab	LRU	抗原	k_a 1/Ms	k_d 1/s	$t_{1/2 diss}$ hours	K_D M	K_D pM	R_{max} RU	MR	Chi^2 RU ²
オリゴ_35塩基長-Bi	4D5- + 2C4-ss-L-DNA	84	Her2-ECD	5.9E+05	6.7E-05	3	1.1E-10	100	59	0.9	0.2
オリゴ_35塩基長-Bi	4D5-ss-L-DNA	16	Her2-ECD	4.0E+05	3.4E-05	6	8.5E-11	100	29	1.2	0.1
オリゴ_35塩基長-Bi	2C4-ss-L-DNA	31	Her2-ECD	3.3E+05	3.8E-05	5	1.1E-10	100	28	0.8	0.03
オリゴ_75塩基長-Bi	4D5- + 2C4-ss-L-DNA	87	Her2-ECD	5.1E+05	4.6E-08	4164	9.1E-14	0.1	65	1.0	0.1
オリゴ_75塩基長-Bi	4D5-ss-L-DNA	16	Her2-ECD	2.9E+05	6.1E-05	3	2.1E-10	200	31	1.3	0.04
オリゴ_75塩基長-Bi	2C4-ss-L-DNA	29	Her2-ECD	3.8E+05	6.3E-05	3	1.6E-10	200	32	0.7	0.03
オリゴ_95塩基長-Bi	4D5- + 2C4-ss-L-DNA	76	Her2-ECD	5.0E+05	4.9E-08	3942	9.9E-14	0.1	58	1.0	0.1
オリゴ_95塩基長-Bi	4D5-ss-L-DNA	14	Her2-ECD	3.0E+05	9.5E-05	2	3.1E-10	300	28	1.3	0.03
オリゴ_95塩基長-Bi	2C4-ss-L-DNA	28	Her2-ECD	3.8E+05	6.8E-05	3	1.8E-10	300	27	0.6	0.03

【0251】

上記の表において、35塩基長、75塩基長および95塩基長それぞれは37塩基長、77塩基長および97塩基長それぞれを読む(read)はずである。

37塩基長二重結合剤HER2-ECD相互作用に関する(すなわち、その結合剤に結合したハイブリダイゼーション配列モチーフおよび中央のビオチン化チミジンのみからなるリンカーを有する結合剤に関する)biacoreデータは、この二重結合剤が速度論的性能において向上を示さないことを示している。これは、不十分なリンカーの長さおよびその37塩基長のリンカーの柔軟性の不足によるものである可能性が最も高い。

【0252】

77塩基長二重結合剤HER2-ECD相互作用に関する(すなわち、リンカーの長さを増大させるために中央のビオチン化チミジンに加えて2回の20個のチミジンを含むリンカーを有する結合剤に関する)biacoreデータは、この二重結合剤がその速度論的性能において劇的な向上を示すことを示している。これは、最適なリンカーの長さおよびこの77塩基長のリンカーの柔軟性によるものである可能性が最も高い。

【0253】

97塩基長二重結合剤HER2-ECD相互作用に関する(すなわち、リンカーの長さを増大させるために中央のビオチン化チミジンに加えて2回の30個のチミジンを含むリンカーを有する結合剤に関する)biacoreデータは、この二重結合剤がその速度論的性能において劇的な向上を示すことを示している。これは、最適なリンカーの長さおよびこの97塩基長のリンカーの柔軟性によるものである可能性が最も高い。

【0254】

表3におけるデータは、協同的結合事象の存在に関する証拠を提供する。完全に確立された二重結合剤の R_{max} 値は単独のFabを備えた(armed)コンストラクトのシグナルの高さのおおよそ2倍であるにも関わらず、モル比の値は正確に1である($MR = 1$)。これは、両方のFab断片の同時の協同的結合事象の存在に関する明確な証拠である。その二重結合剤の計数は、1:1ラングミュア結合化学量論比を有する単一の分子である。2個の独立して結合するHER2接触面を有するにも関わらず、1個の二重結合剤および2個のHER2ドメインの間の分子間結合は検出することができない。

【0255】

相乗作用を示すモノクローナル抗体の対に関する、または化学的に架橋された二重特異性のF(ab')₂に関する結合活性定数は、一般に個々のモノクローナル抗体に関する親和性定数よりも15倍まで大きいにすぎず、それはその反応物の間の理想的な組み合わせ

せに期待される理論的な結合活性よりも著しく低い(Cheong, H. S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 173 (1990) 795-800)。この理論により束縛されるわけではないが、これに関する1つの理由は、最適な相乗作用のためには(高い結合活性をもたらす)相乗的結合に関わる個々のエピトープ/パラトープ相互作用が互いに関して特定の方向で配向されていなければならないことである可能性がある。

【0256】

さらに、表3で示したデータは、ちょうどss-L-DNAハイブリダイゼーションモチーフのみからなる短い37塩基長のリンカーは協同的結合作用をもたらすために十分な柔軟性またはノおよびリンカーの長さを示さないことの証拠を提供している。その37塩基長のリンカーは堅い二重らせんのL-DNAコンストラクトである。そのハイブリダイゼーションは二重L-DNAらせんを生成し、それはそのss-L-DNA配列よりも短く、柔軟性が低い。そのらせんは低減した程度の自由さを示し、堅いリンカーコンストラクトであると理解することができる。表3は、その37塩基長のリンカーが協同的結合事象を生成することができないことを示している。その完全に確立された37塩基長の二重結合剤は、単独でハイブリダイズしたコンストラクトのみと同じ親和性を示す。

【0257】

そのリンカーの長さを高度に柔軟なポリT ss-L-DNAにより延長して77塩基長および97塩基長をそれぞれ形成することは、親和性における、特に抗原複合体安定性 $k_d(1/s)$ における増大を提供する。

【0258】

chi2値はその測定の高い品質を示す。全ての測定は極めて小さい誤差を示す。そのデータはラングミュア1:1当てはめモデルに当てはめることができ、余りは+/-1RUしか逸脱せず、小さいchi2値および10回をみの反復計算しかそのデータを得るために必要でなかった。

【0259】

協同的結合作用は、自由結合エネルギー G_1 および G_2 が要約する物理法則に従って作用する。その親和性は掛け算である： $K_{dcoop} = K_{D1} \times K_{D2}$ 。さらに、その解離速度も掛け算である： $k_{dcoop} = k_{d1} \times k_{d2}$ 。これは、77塩基長および97塩基長のリンカーの実験において正確に観察することができる。これは結果として、それぞれ4146時間(173日)および3942時間(164日)の非常に長い複合体半減期をもたらす。その親和性は100fmol/lの範囲内である。協同的結合事象が起こっていることは明らかである。

【0260】

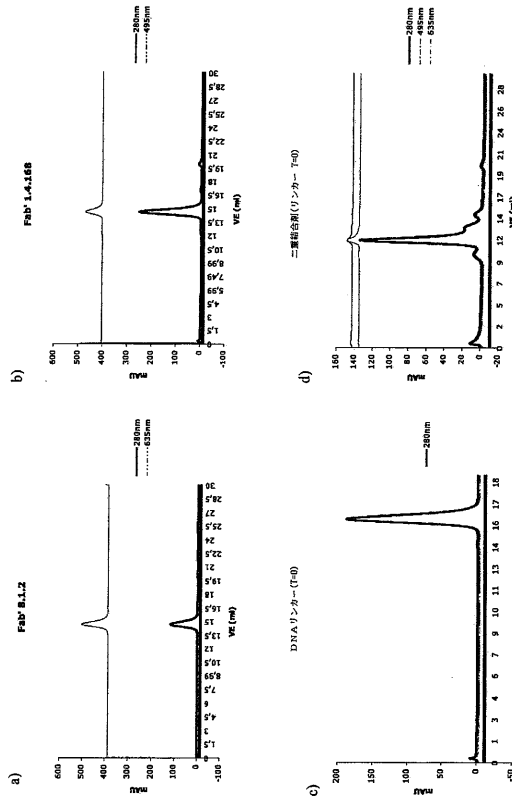
全ての二重結合剤の会合速度は、単独でハイブリダイズしたコンストラクトと比較した場合により速い。より高い分子量を示すにもかかわらず、その会合速度は増大する。

ここで、我々は、本明細書で報告したような複合体中で一緒に連結させたトラストズマブおよびpertuzumabはHER-2細胞外ドメイン(ECD)に同時に結合することを示すことができた。両方のFab断片はそのHER-ECD上の本物の(genuine)エピトープに結合する。加えて、両方のFab断片はそれらの結合する角度において強く異なっている。最適な77塩基長のリンカー(長さ約30nm)ss-L-DNAならびにその有益な柔軟性および長さの特性を用いることにより、協同的結合事象を示すことができた。

【0261】

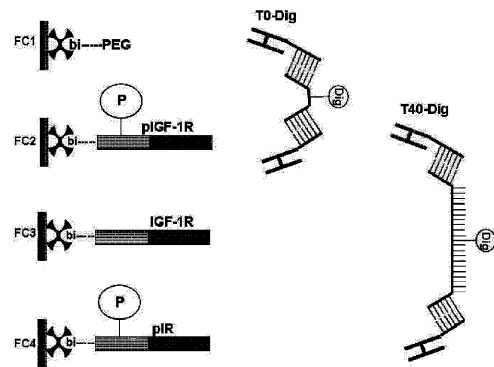
従って、高度に柔軟なss-L-DNAリンカーを介して一緒に連結させたHerceptin-FabおよびPertuzumab-Fabの間の協同的結合を示すことができた。

【図 1】

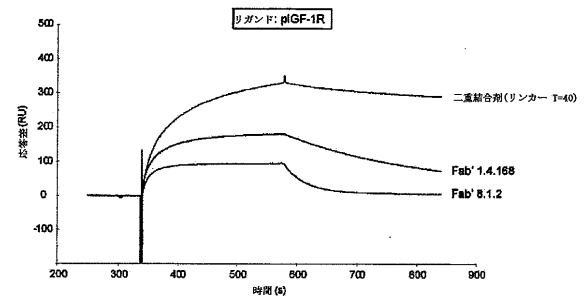


【図 2】

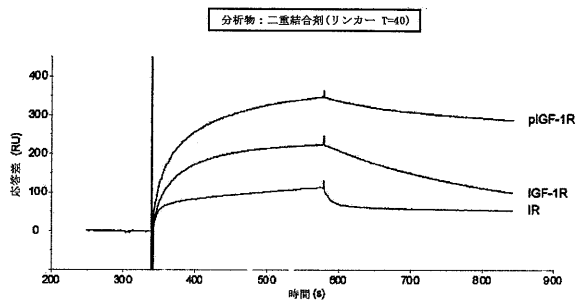
Fig. 2



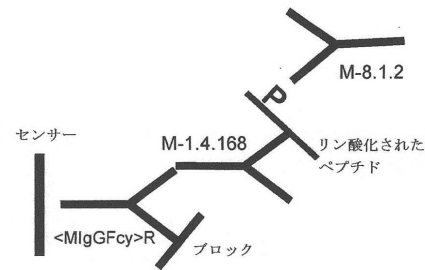
【図 3】



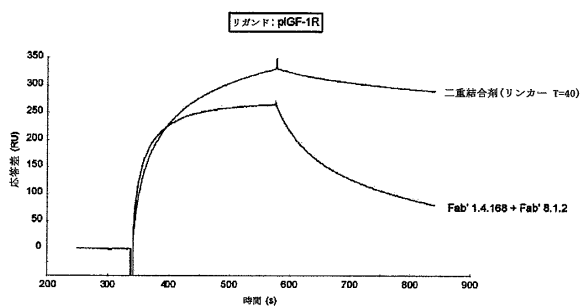
【図 4】



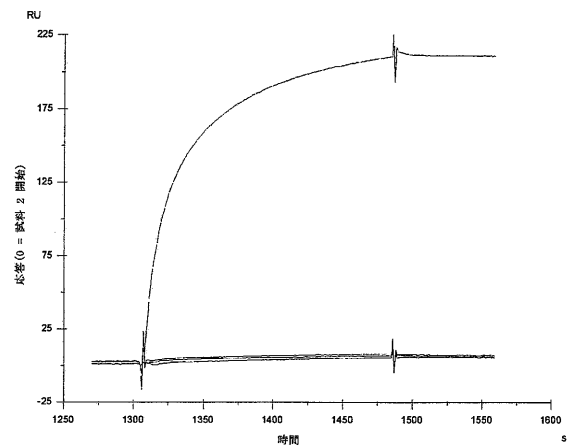
【図 6】



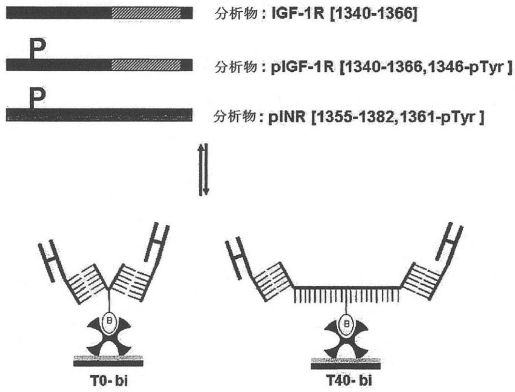
【図 5】



【図 7】



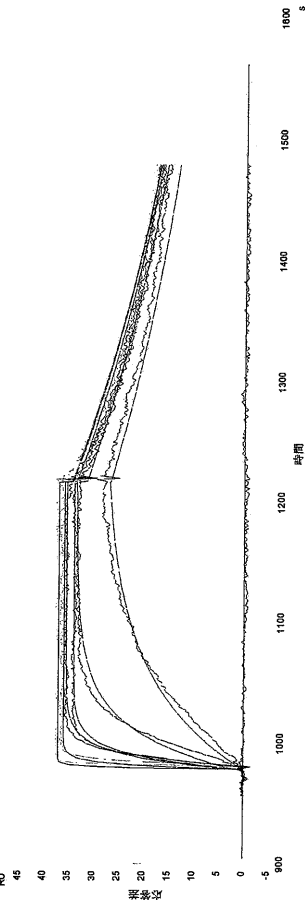
【図 8】



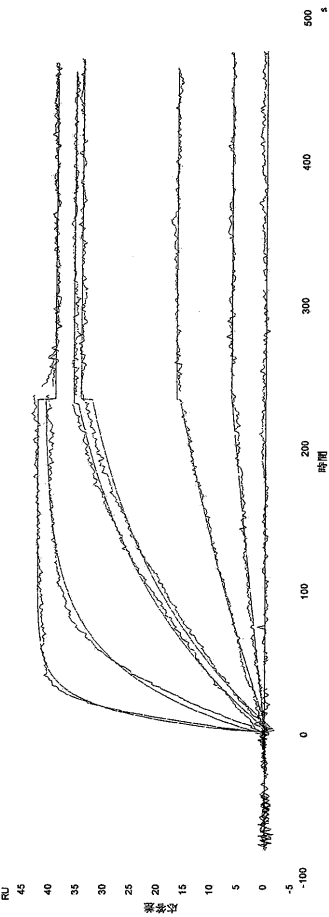
【図 9】

リンカー	分析物	ssFab 1	ssFab 2	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t1/2 diss (分)	KD (M)	KD (nM)
T40	pIGF-1R	8.1.2	1.4.168	2.24E+06	2.79E-06	414	1.26E-11	0.01
		8.1.2	-	1.17E+06	2.21E-02	0.5	1.89E-08	19
	pINR	-	1.4.168	1.96E+06	4.19E-03	3	2.14E-09	2
		8.1.2	1.4.168	1.67E+06	3.70E-02	0.3	2.36E-08	24
	IGF-1R	8.1.2	-	1.36E+06	4.45E-02	0.3	3.27E-08	33
		-	1.4.168	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	IGF-1R	8.1.2	1.4.168	2.73E+06	2.66E-03	4.3	9.73E-10	1
		8.1.2	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	pIGF-1R	8.1.2	1.4.168	3.20E+06	3.62E-03	3	1.10E-09	1
		-	1.4.168	1.75E+06	6.01E-06	192	3.44E-11	0.03
T0	pIGF-1R	8.1.2	-	1.03E+06	2.22E-02	1	2.15E-08	22
		-	1.4.168	1.12E+06	2.91E-03	4	2.69E-09	3
	pINR	8.1.2	1.4.168	1.70E+06	4.18E-02	0.3	2.46E-08	25
		8.1.2	-	1.09E+06	4.83E-02	0.2	4.41E-08	44
	IGF-1R	-	1.4.168	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		8.1.2	1.4.168	1.96E+06	2.30E-03	5	1.20E-09	1
	IGF-1R	8.1.2	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
		-	1.4.168	2.41E+06	3.26E-03	4	1.36E-09	1

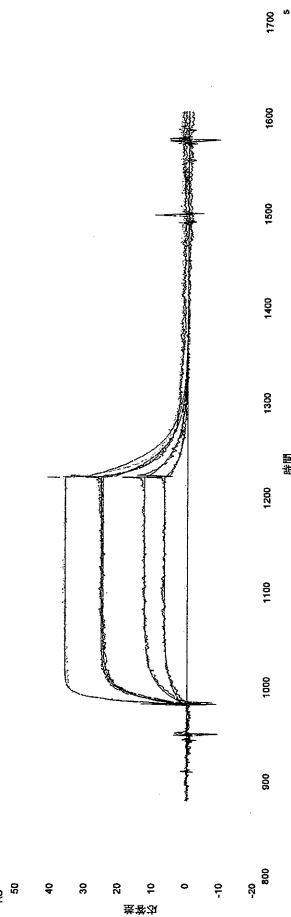
【図 11】



【図 10】



【図 12】



【配列表】

0006162044000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 16/18 (2006.01) C 0 7 K 16/18

(74)代理人 100157923

弁理士 鶴喰 寿孝

(72)発明者 ガルッサー, アンドレアス
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, アム・フェルヒェンホルツ 1 0

(72)発明者 ハインドル, ディーター
ドイツ国 8 2 3 9 6 ペール, シュテルンシュトラッセ 4

(72)発明者 シュレムル, ミヒャエル
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ホーホフェルトシュトラッセ 4 6

(72)発明者 ザイデル, クリストフ
ドイツ国 8 2 3 6 2 ヴァイルハイム, アマーシュトラッセ 3 9

(72)発明者 フォン デア エルツ, ヘルベルト
ドイツ国 8 2 3 6 2 ヴァイルハイム, イン・デア・アウ 2 1

審査官 市島 洋介

(56)参考文献 米国特許出願公開第2 0 0 8 / 0 0 4 4 8 3 4 (U S , A 1)
Mol Immunol.,2010 Jan,47(4),p.816-24,Epub 2009 Oct 27
KOSTELNY SHERI A, FORMATION OF A BISPECIFIC ANTIBODY BY THE USE OF LEUCINE ZIPPERS, JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 米国, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, 1 9 9 2 年 3 月 1 日, V148 N5, P1547-1553
Curr Opin Immunol.,1997 Apr,9(2),p.201-12
DE KRUIF JOHN, LEUCINE ZIPPER DIMERIZED BIVALENT AND BISPECIFIC SCFV ANTIBODIES FROM A PHAGE DISPLAY LIBRARY, IMMUNOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, 1 9 9 6 年 1 1 月 1 日, V2 N4, P298-299
J Biol Chem.,1996 Mar 29,271(13),p.7630-4

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

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

C A p l u s / B I O S I S (S T N)

P u b M e d

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)