

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5791895号
(P5791895)

(45) 発行日 平成27年10月7日(2015. 10. 7)

(24) 登録日 平成27年8月14日(2015. 8. 14)

(51) Int. Cl.

F I

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

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 P 21/08 (2006. 01)

C 1 2 P 21/08

C O 7 K 16/00 (2006. 01)

C O 7 K 16/00

請求項の数 23 (全 61 頁)

(21) 出願番号 特願2010-506111 (P2010-506111)
 (86) (22) 出願日 平成20年4月30日(2008. 4. 30)
 (65) 公表番号 特表2010-525808 (P2010-525808A)
 (43) 公表日 平成22年7月29日(2010. 7. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/PT2008/000018
 (87) 国際公開番号 W02008/136694
 (87) 国際公開日 平成20年11月13日(2008. 11. 13)
 審査請求日 平成23年4月18日(2011. 4. 18)
 (31) 優先権主張番号 60/916, 226
 (32) 優先日 平成19年5月4日(2007. 5. 4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 509302467
 テクノファージ, インベスティガサン
 エ デセンボルビメント エム ビオテク
 ノロジア, エスエー
 ポルトガル国 リスボア 1 6 4 9 - 0 2 8
 , サラエー8, ピソ2, エディフィシオ
 エガスモニス, アヴェニダプロフェッソ
 ールエガスモニス
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (74) 代理人 100102255
 弁理士 小澤 誠次
 (74) 代理人 100096482
 弁理士 東海 裕作

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子操作されたウサギ抗体可変ドメイン及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原と免疫特異的に結合し、かつ所望の安定性を示すウサギ V_L 又は V_H ドメインをコードする DNA 配列を取得するための方法であって、

a) ファージ発現ライブラリーから、前記抗原と免疫特異的に結合する V_H ドメインをコードする一連の DNA 配列、又は前記抗原と免疫特異的に結合する V_L ドメインをコードする一連の DNA 配列を選択するステップであって、前記ファージ発現ライブラリーが、免疫グロブリンを発現する細胞を含有するウサギの生体試料から取得された、V_H 又は V_L ドメインをコードする DNA 又は cDNA 配列から調製されるステップと；

b) 前記一連の DNA 配列又はそのサブセットを CAT との融合タンパク質として細菌内で発現させ、CAT 発現によるクロラムフェニコール耐性を有する細菌を選択し、前記選択された細菌からウサギ V_H 又は V_L ドメインに対応するアミノ酸配列をコードする DNA 配列を取得するステップとを含み、それによって、前記 CAT 融合によって付与された前記クロラムフェニコールに対する菌耐性が、CAT と融合させた前記アミノ酸配列の安定性と相関し、前記選択が、前記所望の安定性を選択するのに十分なクロラムフェニコール濃度で行われる、第 1 の方法、又は

a) V_H 又は V_L ドメインをコードする DNA 又は cDNA 配列を CAT との融合タンパク質として細菌内で発現させるステップであって、前記 DNA 又は cDNA 配列が、免疫グロブリンを発現する細胞を含有するウサギの生体試料から取得されたステップと；

b) CAT 発現によるクロラムフェニコール耐性を有する細菌を選択し、前記選択された

10

20

細菌からウサギV_Hドメインに対応するアミノ酸配列をコードする一連のDNA配列、又は前記選択された細菌からウサギV_Lドメインに対応するアミノ酸配列をコードする一連のDNA配列を取得し、それによって、前記CAT融合によって付与された前記クロラムフェニコールに対する菌耐性が、CATと融合させた前記アミノ酸配列の安定性と相関し、前記選択が、前記所望の安定性を選択するのに十分なクロラムフェニコール濃度で行われる、ステップと；

c) ファージ発現ライブラリーから、前記抗原と免疫特異的に結合するV_H又はV_LドメインをコードするDNA配列を選択するステップであって、前記ライブラリーが前記一連のDNA配列又はそのサブセットから調製されるステップとを含む第2の方法である方法。

10

【請求項2】

ウサギ生体試料が、抗原で免疫されたウサギに由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

第1の方法においてステップa)が1回又は複数回繰り返され、第2の方法においてステップc)が1回又は複数回繰り返される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

生体試料が形質細胞、リンパ系組織、骨髓組織、又は虫垂組織を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

試料がリンパ系組織を含み、前記リンパ系組織が脾臓組織又はリンパ節組織である、請求項4に記載の方法。

20

【請求項6】

抗原がマウス又はラットにおいて免疫原性でない、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

選択が、少なくとも1.8 mMのクロラムフェニコール濃度で行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

ウサギV_L又はV_Hドメインが、抗原に対して50 nM以下のK_dを示し、或いはウサギV_L又はV_Hドメインが、少なくとも54 のタンパク質T_mを有する、請求項1に記載の方法。

30

【請求項9】

少なくとも54 のタンパク質T_mを有し、かつ抗原と免疫特異的に結合するウサギV_L又はV_HドメインをコードするDNA配列を取得するための方法であって、

a) ファージ発現ライブラリーから、前記抗原と免疫特異的に結合するV_Hドメインをコードする一連のDNA配列、又は前記抗原と免疫特異的に結合するV_Lドメインをコードする一連のDNA配列を選択するステップであって、前記ファージ発現ライブラリーが、免疫グロブリンを発現する細胞を含有するウサギの生体試料から取得された、V_H又はV_LドメインをコードするDNA又はcDNA配列から調製されるステップと；

b) 前記一連のDNA配列又はそのサブセットをCATとの融合タンパク質として細菌内で発現させ、CAT発現によるクロラムフェニコール耐性を有する細菌を選択し、前記選択された細菌からウサギV_H又はV_Lドメインに対応するアミノ酸配列をコードするDNA配列を取得するステップとを含み、それによって、前記CAT融合によって付与された前記クロラムフェニコールに対する菌耐性が、CATと融合させた前記アミノ酸配列の前記T_mと相関し、前記選択が、少なくとも1.8 mMのクロラムフェニコール濃度で行われる、第1の方法、又は

40

a) V_H又はV_LドメインをコードするDNA又はcDNA配列をCATとの融合タンパク質として細菌内で発現させるステップであって、前記DNA又はcDNA配列が、免疫グロブリンを発現する細胞を含有するウサギの生体試料から取得されたステップと；

b) CAT発現によるクロラムフェニコール耐性を有する細菌を選択し、前記選択された細菌からウサギV_Hドメインに対応するアミノ酸配列をコードする一連のDNA配列、又

50

は前記選択された細菌からウサギV_Lドメインに対応するアミノ酸配列をコードする一連のDNA配列を取得し、

それによって、前記CAT融合によって付与された前記クロラムフェニコールに対する菌耐性が、CATと融合させた前記アミノ酸配列の前記T_mと関連し、前記選択が、少なくとも1.8 mMのクロラムフェニコール濃度で行われる、ステップと；

c) ファージ発現ライブラリーから、前記抗原と免疫特異的に結合するV_H又はV_LドメインをコードするDNA配列を選択するステップであって、前記ライブラリーが前記一連のDNA配列又はそのサブセットから調製されるステップとを含む第2の方法である方法。

【請求項10】

10

ウサギ生体試料が、抗原で免疫されたウサギに由来する、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

第1の方法においてステップa)が1回又は複数回繰り返され、第2の方法においてステップc)が1回又は複数回繰り返される、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

生体試料が形質細胞、リンパ系組織、骨髄組織、又は虫垂組織を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項13】

試料がリンパ系組織を含み、前記リンパ系組織が脾臓組織又はリンパ節組織である、請求項12に記載の方法。

20

【請求項14】

抗原がマウス又はラットにおいて免疫原性でない、請求項9に記載の方法。

【請求項15】

選択が、少なくとも2.0 mMのクロラムフェニコール濃度で行われる、請求項9に記載の方法。

【請求項16】

選択が、少なくとも2.5 mMのクロラムフェニコール濃度で行われる、請求項9に記載の方法。

【請求項17】

選択が、少なくとも3.0 mMのクロラムフェニコール濃度で行われる、請求項9に記載の方法。

30

【請求項18】

選択が、少なくとも5.0 mMのクロラムフェニコール濃度で行われる、請求項9に記載の方法。

【請求項19】

選択が、少なくとも10 mMのクロラムフェニコール濃度で行われる、請求項9に記載の方法。

【請求項20】

選択が、少なくとも15 mMのクロラムフェニコール濃度で行われる、請求項9に記載の方法。

40

【請求項21】

選択が、少なくとも20 mMのクロラムフェニコール濃度で行われる、請求項9に記載の方法。

【請求項22】

ウサギV_L又はV_Hドメインが、50 nM以下のK_dで抗原と免疫特異的に結合する、請求項9に記載の方法。

【請求項23】

ウサギV_L又はV_HドメインのK_dが20 nM以下である、請求項22に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

1. 発明の分野

本発明は、抗原と免疫特異的に結合し、ウサギ免疫グロブリン由来の結合ドメインを含むポリペプチドをスクリーニング及び作製するための方法に関する。本発明の方法は、ウサギ抗体重鎖又は軽鎖スキャフォールド (scaffold) の使用により、特にげっ歯動物抗体由来のドメインと比べて、単離された免疫グロブリン可変ドメインに安定性及び/又は親和性の増強を付与する新規な C D R ループ及びフレームワーク領域の同定を可能にする。本発明の可変ドメインの安定性及び/又は親和性の増強により、単一結合ドメインポリペプチド、つまり V_H 又は V_L ドメインの一方を含む単一ドメイン抗体を含む、所望の抗原に免疫特異性を示す研究ツール及び治療用ポリペプチドの作製におけるそれらの使用が可能になる。

10

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

2. 背景

抗体は、軽鎖及び重鎖と名付けられた 2 つの鎖から構成される。軽鎖は、アミノ末端の可変ドメイン (V_L ドメイン) 及びカルボキシ末端の定常ドメイン (C_L) を含有する。重鎖は、アミノ末端の可変ドメイン (V_H) 及び 3 つの定常ドメイン (C_H 1、C_H 2、C_H 3) から構成される。抗体結合部位は、V_L 及び V_H ドメインに位置し、相補性決定領域 (C D R, Complementarity-Determining Region) を表す 6 つの超可変ループにより作られている。V_L 及び V_H 領域は両方とも、構造的に保存されたベータシートフレームワークに結合している 3 つの C D R ループ (C D R 1、C D R 2、及び C D R 3) を含有する。

20

【 0 0 0 3 】

ハイブリドーマ技術の開発により、単一エピトープを特異的に標的とした単一集団の抗体、又はモノクローナル抗体 (m A b, monoclonal antibody) の作製が可能になり、創薬分野における革命が導かれた。しかしながら、抗体作製に関する問題、並びに免疫原性及びサイトカイン関連副作用を含むインビボ応答に関する問題は、免疫特異的結合を依然として保持しつつ、抗体構造及び/又は機能を変更させる研究に繋がった。抗原認識及び親和性を著しく変化させずに、抗体をその最も小さな機能的形態に縮減させる試みが研究でなされている。抗原に結合可能な最も小さな抗体断片を同定することにより、完全な抗体分子又は I g G から、F a b 及び組換え単鎖 F v 断片へと進化した。

30

【 0 0 0 4 】

80 年代の遺伝子組換えの進歩により、組換え可変ドメインを迅速に容易に作製することは可能であった。ポリメラーゼ連鎖反応を使用して、免疫された動物のゲノム D N A から V_H 及び V_L ドメインをコードする遺伝子の多様なレパートリーがクローニングされ、幾つかの抗原に対する多重結合活性及び機能性の特徴付けが可能になった。それにもかかわらず、初期に単離された可変ドメイン断片はほとんど可溶性がなく、作製が困難であった。

【 0 0 0 5 】

作製における問題は、重鎖のみを含む二量体分子であるラクダ抗体の特徴付けで取り上げられた。二量体分子の発見は、組換え抗体作製に関する多くの問題に対処しただけでなく、この分子は、免疫グロブリン分子の重鎖が軽鎖の非存在下で免疫特異的結合を導くことができる可能性も強調した。I g 重鎖が、軽鎖の非存在下で有意な抗原結合能を保持できることは、今や広く受け入れられている。免疫特異性に関する C D R ドメインの中で、V_H ドメインの C D R 3 領域が最も重要であるという構造研究からの証拠も存在する。これは、H C D R 3 アミノ酸残基がほとんどの表面接触区域を提供し、抗原との分子的相互作用に重要であるという知見に基づく。したがって、免疫グロブリン V_H ドメインに基づいて、抗原結合タンパク質のサイズを単一ドメイン結合タンパク質にさらに縮減することが可能であり得る。

40

【 0 0 0 6 】

50

2.1 ウサギ抗体

ポリクローナル抗体の形態で数十年間利用されているウサギ抗体レパートリーは、強力な親和性及び高度な特異性を特徴とする抗体の優れた供給源である (Mage et al., 2006)。そのうえ、ウサギ目に属するウサギは、げっ歯目に属するマウス及びラットから進化的に遠く離れている。その結果として、げっ歯動物 mAb (さらには、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスから作製されたヒト mAb) が検知できない、げっ歯動物抗原とヒト抗原の間で保存されたエピトープは、ウサギポリクローナル抗体により認識されることが多い。

【0007】

ファージディスプレイが産生するウサギ mAb は、表現型及び遺伝子型が同時に選択されるという事実により、さらなる利点を提供する。ウサギ mAb 配列についての知識は、単ドメイン抗体、scFv、Fab、及び IgG を含む種々の mAb 形態の容易な作製、並びに重要なことには、ヒト化及び親和性成熟を可能にする (Rader et al., 2000; Steinberger et al., 2000; Rader, 2001)。その結果として、ファージディスプレイが産生するウサギ mAb は、ヒトに対する治療的応用に有望な試薬となっている。

【0008】

正常なウサギでは、VDJ 遺伝子再編成で D 近位 VH 遺伝子セグメント、VH1 が使用されるため、70 ~ 90% の Ig 分子及び B 細胞は、VH a アロタイプを保持している。発現された cDNA 配列中に種々の異なる VL 配列が見い出されているため、種々の Vk 及び V1 遺伝子セグメントの再編成が、ウサギに生じると考えられる。

【0009】

ウサギ骨髄中で発生する B 細胞レパートリーは、VDJ 遺伝子再編成で使用する VH 遺伝子セグメントが少数であることにより制限されている。複数の Vk 遺伝子セグメントが骨髄 B 系列細胞で再編成されるが、ほとんどの B 系列細胞は、VH a アロタイプ配列をコードする同一の VH 遺伝子、VH1 を再編成する。レパートリーは、少数の JH 及び D 遺伝子セグメントが VDJ 再編成に使用されることによっても制限される。JH4 は VDJ 遺伝子再編成の 80% で、JH2 は残りの 20% で見出され、他の 3 つの機能的 JH 遺伝子セグメントは稀にしか使用されない。また、ほとんどの VDJ 遺伝子再編成では、合計 12 個の D 遺伝子セグメントのうち、D2a (D9)、D2b (Df)、D3、又は D5 が使用されており、D4 及び D6 は稀にしか使用されない。VH、D、及び JH 遺伝子セグメントの限定的使用は、限定的な VDJ レパートリーに帰着するであろうが、N クレオチドは、細胞分化中の最初期の再編成から VD 及び DJ 接合部の本質的に全てに見出される。VDJ 遺伝子再編成中の N 領域の高度な多様性は、限定的な数の V、D、及び J 遺伝子セグメントの再編成から期待されるより遥かに大きなレパートリーに帰着する。このレパートリーのサイズは推定されていない。しかしながら、B 細胞が骨髄及び B リンパ球産生の他の初期発生部位を離れた後、本質的に全ての VDJ 遺伝子が末梢で体細胞性に多様化するとすれば、B 細胞発生の初期発生部位で発達するレパートリーは機能的に不十分であることが想定される。

【0010】

B 細胞 Ig 遺伝子再編成が若年ウサギの骨髄などの部位で生じた後、未熟 IgM B 細胞は、虫垂及び他の腸関連リンパ系組織において、さらなる Ig レパートリー多様化を起こす。これらの部位は、一次的な免疫前レパートリーの発生を促すと考えられる。

【0011】

再編成された重鎖及び軽鎖配列の遺伝子変換は、3 ~ 4 週齢までウサギ虫垂において見出される。体細胞性超変異は、公知の遺伝子変換供与体を欠如する D 及び J 領域で生じる。JH 領域も体細胞性超変異により多様化され、したがって、体細胞性超変異は、再編成された VH 遺伝子セグメントにも生じる可能性が高い。

【0012】

遺伝子変換及び体細胞性超変異は、若年ウサギ虫垂の胚中心において生じるだけでなく、脾臓及びリンパ節などの二次的リンパ系組織における免疫応答中の多様化にも使用され

10

20

30

40

50

る。

【 0 0 1 3 】

発生中の虫垂に由来するクローン及び特異的免疫応答中の脾臓に由来するクローンの再編成された重鎖及び軽鎖遺伝子の配列を比較すると、虫垂に由来するクローンの多様化パターンは、脾臓に見出されたパターンとは著しく異なり、免疫抗原が、増殖及び選択過程を高親和性に向かって駆動させていた。クローンの関連した虫垂B細胞は、C D R 3を含む各相補性決定領域 (C D R) に様々なアミノ酸配列を発生させた一方で、脾臓に由来する優性クローンは、C D R 3における変化をほとんど起こさなかった。

【 0 0 1 4 】

データによると、ウサギでは、脾臓の胚中心において免疫応答中の超変異の割合がより高いことも示されており、マウスと比較してウサギでは、超変異と選択との釣り合いがより多く変異に向かい、選択にはそれほど向かわないという傾向がある。

【 0 0 1 5 】

二次的リンパ器官の胚中心 (G C , germinal center) は、再編成されたV遺伝子の体細胞性多様化がその中で生じ、T依存性抗原に対する免疫応答においてA bの親和性成熟を導く特殊構造体である。

【 0 0 1 6 】

マウス及びヒトと異なり、ウサギはほんの少数の重鎖V領域 (V H) 遺伝子を再編成し、そのためコンビナトリアル機序 (combinatorial mechanism) により生み出される多様性は限定されている。全体的なパターンは、その生殖細胞系列又は近似的生殖細胞系列配列が、初期分裂中の遺伝子変換及び点突然変異の両方により、及び大部分は後期分裂中の点突然変異により変化する脾臓前駆細胞のパターンである。同一増殖クローンの集団内では、軽鎖配列の相当な多様化がV H配列の変化と同時に生じた可能性があり、これらの事象は、G C内又は後には骨髓などの部位の移出細胞中のいずれかにおける選択により、さらなる親和性成熟のための基質として役立つ多様な配列を産生することができる。

【 0 0 1 7 】

V H 1 遺伝子セグメントの優先的使用による限定的な重鎖V H D H J Hレパートリーは、骨髓中で発生するB細胞の多様な軽鎖V k J kレパートリーにより補われる。このレパートリーは、遺伝子変換及び体細胞性超変異によりG A L Tで、及び後には免疫後の脾臓及びリンパ節の胚中心での両方において、著しく増殖する。

【 0 0 1 8 】

上記で考察したように、ウサギ抗体は、体細胞性超変異による進化成熟 (evolving maturation) の影響下にあり、所与の抗原に対するその親和性及び結合性を増加させるために遺伝子変換に依存しない。認識性に加えて、単離された単一ドメイン抗体の別の重要な特性は、その本来的な構造的安定性である。ウサギ抗体は体細胞性超変異により進化するため、ウサギ抗体のV H及びV L安定性は、単一V H又はV Lファミリーの本来的な特性に依存せず、進化が起きやすい特性に依存する。抗体安定性は、抗原を認識するためのC D Rの良好なコンフォメーションの促進だけでなく、産生及び血清半減期などの下流応用にとっても重要である。さらに、本発明はV H及びV Lタンパク質ドメインを単離するため、疎水性界面がタンパク質凝集を促進する場合があることが想定される。そのため、本来的に安定的な単離されたV H及びV Lドメインを選択するための本方法は、現存するものより独特な異なる特性を有する新規の小型ドメイン抗体を同定する可能性を提供する。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 9 】

【 非特許文献 1 】 Mage et al., 2006

【 非特許文献 2 】 Rader et al., 2000

【 非特許文献 3 】 Steinberger et al., 2000

【 非特許文献 4 】 Rader, 2001

【 発明の概要 】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

本方法は、ヒト、マウス、及びラクダ抗体と比較して固有の特性を有し、高度な親和性、特異性、及び安定性を示す特異なウサギ単ドメイン抗体の同定を包含する。

【課題を解決するための手段】

【0021】

3. 発明の概要

本発明は、ウサギ免疫グロブリン可変ドメインに由来する配列を含む免疫特異的ポリペプチドの作製方法、そのような配列を含むポリペプチド、及びそのような方法により作製されるポリペプチドに関する。特に、本発明は、ウサギ V_H 及び/若しくは V_L ドメイン、並びに/又はそれらに由来する新規なCDR及びフレームワーク領域を単離及び使用するための方法を包含する。本発明は、組換え型免疫特異的ポリペプチドのCDRループ及び/又はフレームワーク領域と関連した「スキャフォールド」又は構造的配列として使用するための、単離されたウサギ V_H 及び V_L ドメイン内の新規なアミノ酸配列（定義された位置の新規なアミノ酸残基を含む）の同定をさらに提供する。本発明のウサギスキャフォールド配列（スキャフォールド残基を含む）又は新規なCDR/フレームワーク配列は、特にげっ歯動物抗体と比べて、可変ドメイン（複数可）及び/又はそれらを含む免疫特異的ポリペプチド（例えば、抗体）の安定性及び/又は親和性を増強し、高度に特異的な単ドメイン免疫ペプチド、例えば単ドメイン抗体の作製及び/又は使用を可能にする。

すなわち、本発明は、

1. 抗原と免疫特異的に結合するウサギ V_L 又は V_H ドメインを作製するための方法であって、

a) ファージ発現ライブラリーから、前記抗原と免疫特異的に結合する V_H 又は V_L ドメインをコードする一組のDNA配列を選択するステップであって、前記ファージ発現ライブラリーが、免疫グロブリンを発現する細胞を含有するウサギの生体試料から取得された、 V_H 又は V_L ドメインをコードするDNA又はcDNA配列から調製されるステップと

b) 前記一組の配列又はそのサブセットをCATとの融合タンパク質として細菌内で発現させ、CAT発現によるクロラムフェニコール耐性を有する細菌を選択し、前記選択された細菌からウサギ V_H 又は V_L ドメインをコードする配列を取得するステップとを含む方法、

2. 抗原と免疫特異的に結合するウサギ V_L 又は V_H ドメインを作製するための方法であって、

a) V_H 又は V_L ドメインをコードするDNA又はcDNA配列をCATとの融合タンパク質として細菌内で発現させるステップであって、前記DNA又はcDNA配列が、免疫グロブリンを発現する細胞を含有するウサギの生体試料から取得されたステップと；

b) CAT発現によるクロラムフェニコール耐性を有する細菌を選択し、前記選択された細菌からウサギ V_H 又は V_L ドメインをコードする一組の配列を取得するステップと；

c) 前記抗原と免疫特異的に結合する V_H 又は V_L ドメインをコードするファージ発現ライブラリーDNA配列を選択するステップであって、前記ライブラリーが前記一組の配列又はそのサブセットから調製されるステップとを含む方法、

3. ウサギ生体試料が、抗原で免疫されたウサギに由来する、上記1又は2に記載の方法、

4. ステップa)が1回又は複数回繰り返される、上記1に記載の方法、

5. ステップc)が1回又は複数回繰り返される、上記2に記載の方法、

6. 生体試料が形質細胞を含む、上記1～3のいずれかに記載の方法、

7. 生体試料が、リンパ系組織、骨髄組織、又は虫垂組織を含む、上記1～3のいずれかに記載の方法、

8. 試料がリンパ系組織を含み、前記リンパ系組織が脾臓組織である、上記7に記載の方

10

20

30

40

50

法、

9. 試料がリンパ系組織を含み、前記リンパ系組織がリンパ節組織である、上記7に記載の方法、

10. 上記1に従って作製された V_H 又は V_L ドメインを含む抗体又はその抗原結合性断片、

11. 抗体が単鎖抗体である、上記10に記載の抗体又は断片、

12. 抗体が単ドメイン抗体である、上記10に記載の抗体又は断片、

13. 抗体が抗体断片である、上記10に記載の抗体、

14. Fab、Fab'、F(ab')₂、又はFv断片である、上記13に記載の断片

、

15. 抗体がミニボディである、上記10に記載の抗体又は断片、

16. 抗体がダイアボディである、上記10に記載の抗体又は断片、

17. 抗体が二重特異性抗体である、上記10に記載の抗体又は断片、

18. 抗体がナノボディである、上記10に記載の抗体又は断片、

19. 抗体がCH₁ドメインを含まない、上記10に記載の抗体又は断片、

20. 上記10～19のいずれかに記載の抗体又は断片のキメラ型、

21. 上記9～11のいずれかに記載の抗体又は断片のヒト化型、

22. 抗原がマウス又はラットにおいて免疫原性でない、上記10に記載の抗体又は断片

、

23. 抗原がマウス又はラットにおいて免疫原性でない、上記1又は2に記載の方法、

24. ステップ(b)において選択が、少なくとも1.8mMのクロラムフェニコール濃度での選択である、上記1又は2に記載の方法、

25. 組換え V_H 又は V_L ドメインが少なくとも54のTmを有する、上記1又は2に記載の方法、

26. 組換え V_H 又は V_L ドメインが、抗原に対して20nM以下のKdを示す、上記1又は2に記載の方法、

27. 抗原と免疫特異的に結合するポリペプチドであって、ウサギ V_H 又は V_L ドメインの一方又は両方を含み、CH₁ドメイン、CH₂ドメイン、CH₃ドメイン、又はCLドメインの1又は複数を有していない；又は V_H 若しくは V_L ドメインの一方を有していないポリペプチド、

28. ウサギ V_H ドメインを含まない、上記27に記載のポリペプチド、

29. ウサギ以外の種の V_H ドメインを含まない、上記28に記載のポリペプチド、

30. ウサギ V_L ドメインを含まない、上記27に記載のポリペプチド、

31. ウサギ以外の種の V_L ドメインを含まない、上記30に記載のポリペプチド、

32. CH₁ドメインを含まない、上記27に記載のポリペプチド、

33. CH₂ドメインを含まない、上記27又は上記32に記載のポリペプチド、

34. CH₃ドメインを含まない、上記27、32、又は33に記載のポリペプチド、

35. 抗原がマウス又はラットにおいて免疫原性でない、上記27に記載のポリペプチド

、

36. 単鎖抗体である、上記27に記載のポリペプチド、

37. 単ドメイン抗体である、上記27に記載のポリペプチド、

38. 抗体断片である、上記27に記載のポリペプチド、

39. Fab、Fab'、F(ab')₂、又はFv断片である、上記38に記載の断片

、

40. ミニボディである、上記27に記載のポリペプチド、

41. ダイアボディである、上記27に記載のポリペプチド、

42. 二重特異性抗体又は多特異性抗体である、上記27に記載のポリペプチド、

43. ポリペプチドがナノボディである、上記27に記載のポリペプチド又は断片、

44. 治療用作用剤、アルブミン相互作用ペプチド、フィブロネクチン相互作用ペプチド、フィブロネクチン、アルブミン、プロテインA、又はプロテインGをさらに含む上記2

10

20

30

40

50

7に記載のポリペプチド、

45．治療用作用剤が細胞毒素である、上記44に記載のポリペプチド、

46．治療用作用剤、アルブミン相互作用ペプチド、フィブロネクチン相互作用ペプチド、フィブロネクチン、アルブミン、プロテインA、又はプロテインGとさらにコンジュゲートしている、上記27に記載のポリペプチド、

47．治療用作用剤が細胞毒素又はs i R N Aである、上記46に記載のポリペプチド、

48．治療用作用剤、アルブミン相互作用ペプチド、フィブロネクチン相互作用ペプチド、フィブロネクチン、アルブミン、プロテインA、又はプロテインGとさらにコンジュゲートしている、上記10に記載の抗体又は断片、

49．治療用作用剤が細胞毒素又はs i R N Aである、上記48に記載のポリペプチド、

50．抗原と免疫特異的に結合するポリペプチドであって、ウサギV_H又はV_Lドメインの一方又は両方を含み、かつ

(a) アミノ酸配列QEQLMETESGGGAEGGLVKPGASLTLTCTAS (配列番号57)を有するV_HFR1ドメイン；

(b) アミノ酸配列WVRQAPGKGLEWIG (配列番号69)を有するV_HFR2ドメイン；

(c) アミノ酸配列YATWVNGRFTLSRDIDQSTGCLQLNSLTAADTATYYCAR (配列番号95)を有するV_HFR3ドメイン；

(d) アミノ酸配列WGQGTLVTVSS (配列番号139)を有するV_HFR4ドメイン；

(e) アミノ酸配列ELVLTQTTPPSLSASVGETVRIRC (配列番号150)又はELVLTQTTPSSVSAAVGGTVTINC (配列番号155)を有するV_LFR1ドメイン；

(f) アミノ酸配列WYQQKPEKPPTLLIS (配列番号174)又はWYQQKPGQRPKLLIY (配列番号181)を有するV_LFR2ドメイン；

(g) アミノ酸配列GVPPRFSGSGSDTYTLTIGGVQAEDVATYYC (配列番号183)又はGVSSRFKGGSGGTQFTLTISGVQCADAATYYC (配列番号205)を有するV_LFR3ドメイン；又は

(h) アミノ酸配列FGAGTNVEIK (配列番号206)又はFAFGGGTELEIL (配列番号210)を有するV_LFR4ドメインの少なくとも1つを含むポリペプチド、

51．抗原と免疫特異的に結合するポリペプチドであって、ウサギV_H又はV_Lドメインの一方又を含み、かつ、

(a) V_HFR2ドメインの46位フェニルアラニン；

(b) V_HFR2ドメインの53位グルタミン酸；

(c) V_HFR2ドメインの54位アルギニン；

(d) V_HFR2ドメインの56位グリシン；

(e) V_HFR2ドメインの58位アラニン；

(f) V_HCDR1ドメインの44位システイン；

(g) V_HCDR2ドメインの59位システイン；

(h) V_HFR4ドメインの126位アルギニン；

(i) V_LFR2ドメインの39位フェニルアラニン又はチロシン；

(j) V_LFR2ドメインの45位リジン；又は

(k) V_LFR3ドメインの91位システインの少なくとも1つを含み、

前記位置が、それぞれ図3及び4のV_Hドメイン配列アラインメント又はV_Lドメイン配列アラインメントの位置に一致するポリペプチド、

に関する。

【0022】

本発明は、所与の抗原又はそのエピトープに対する特異性を有する新規なウサギV_H又はV_Lドメインの作製を包含する。特に、本発明は、ウサギV_H又はV_Lドメインを作製するための方法であって、(a)ファージ発現ライブラリーから、所望の抗原又はそのエピトープと免疫特異的に結合するウサギV_H又はV_Lドメインをコードする一組のDNA配列を選択する(ファージ「パニング」としても知られている)ステップと、(b)一組の配列又はそのサブセットを、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(「C

10

20

30

40

50

A T」, chloramphenicol acetyltransferase) との融合タンパク質として細菌内で発現させ、C A T 発現によるクロラムフェニコール耐性を有する細菌を選択するステップとを含む方法を提供する。代替的な実施形態では、本発明は、ウサギ V_H 又は V_L ドメインを作製するための方法であって、(a) ウサギ免疫グロブリンの V_H 又は V_L ドメインをコードする D N A 又は c D N A の配列を、C A T との融合タンパク質として細菌内で発現させるステップと、(b) C A T 発現によるクロラムフェニコール耐性を有する細菌を選択し、選択された細菌からウサギ V_H 又は V_L ドメインをコードする一組の D N A 配列を取得するステップと、(c) ステップ (b) で取得された一組の D N A 配列からファージ発現ライブラリーを準備し、所望の抗原又はそのエピトープと免疫特異的に結合する V_H 又は V_L ドメインをコードする D N A 配列を選択する (つまり抗原又はエピトープに対する免疫特異的結合のライブラリーをパニングする) ステップとを含む方法を提供する。ある実施形態では、本発明は、ファージパニングステップが 1 回又は複数回繰り返される、ウサギ V_H 又は V_L ドメインの作製方法を包含する。関連する実施形態では、ファージパニングステップは、連続して繰り返してもよく、又はしなくてもよい。本発明により使用するためのファージ発現ライブラリーは、商業的に取得してもよく、又は本明細書中に記述した任意の方法及び / 又は当技術分野で公知な任意の方法により調製してもよい。D N A 又は c D N A 配列を細菌中で融合タンパク質として発現させることは周知であり、本明細書中に記述した任意の方法又は当技術分野で公知な任意の方法、例えば、C A T をコードするヌクレオチド配列及び融合タンパク質発現を駆動するプロモーター配列を含む発現ベクターに、V_H 又は V_L ドメインをコードする D N A 又は c D N A 配列をクローニングすることにより実施できる。

【 0 0 2 3 】

細菌中で不溶性ペプチドとの融合タンパク質として C A T が発現すると、可溶性ペプチド (例えば、細菌中で発現した際に、少なくとも部分的折り畳まれて、凝集しないペプチド) との融合タンパク質として発現するより、著しく低いクロラムフェニコール耐性が付与される。したがって、V_H 又は V_L ドメイン及び C A T を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を用いて形質転換された細菌のクロラムフェニコール耐性を選択することにより、正しく折り畳まれて及び / 又は非凝集形態で組換えによって発現することが可能な配列が選択されよう。ある実施形態では、本発明は、少なくとも 0 . 1 m M、少なくとも 0 . 2 m M、少なくとも 0 . 4 m M、少なくとも 0 . 6 m M、少なくとも 0 . 8 m M、少なくとも 1 . 0 m M、少なくとも 1 . 2 m M、少なくとも 1 . 4 m M、少なくとも 1 . 6 m M、少なくとも 1 . 8 m M、少なくとも 2 . 0 m M、少なくとも 2 . 5 m M、少なくとも 3 . 0 m M、少なくとも 5 . 0 m M、少なくとも 1 0 m M、少なくとも 1 5 m M、又は少なくとも 2 0 m M のクロラムフェニコールを含む選択培地で上記形質転換された細菌を培養することを含む方法を包含する。本明細書中に記述された C A T 融合アッセイにより、V_H 又は V_L ドメインをコードする配列を選択することにより、タンパク質安定性が選択される。本発明は、熱安定性及び / 又は動力学的安定性のアッセイ (例えば、タンパク質融解温度 (「 T m 」) 又は折り畳みのギブス自由エネルギー (G_{N - U}) の決定) を含む、本発明の V_H 又は V_L ドメインを評価するための、当技術分野で公知な任意の他の方法又は本明細書中に記述した任意の他の方法の使用をさらに包含する。ある実施形態では、本発明の V_H 又は V_L ドメインは、少なくとも約 4 0 、少なくとも約 4 5 、少なくとも約 5 0 、少なくとも約 5 4 、又は約 5 5 以上の融解温度を有する。

【 0 0 2 4 】

本発明は、ウサギ免疫グロブリンに由来する及び / 又はそこで同定された V_H 若しくは V_L ドメイン又はアミノ酸配列若しくは残基を含むポリペプチドであり、抗原 / 結合タンパク質特異性を評価するための当技術分野で公知な任意の標準的方法により決定されるように、所望の抗原又はそのエピトープと免疫特異的に結合するポリペプチドに関する。免疫特異的ポリペプチド、例えば抗原又はエピトープに対する抗体又はその抗原結合性断片の結合特異性を決定するアッセイには、これらに限定されないが、E L I S A、ウエスタンブロット、表面プラズモン共鳴 (例えば、BIAcore)、及びラジオイムノアッセイが含

まれる。結合ポリペプチドの特異性を評価するための当技術分野で公知な任意の方法を使用すると、 0.001 nM を越えるが、 5 nM 以下、 10 nM 以下、 15 nM 以下、 20 nM 以下、 25 nM 以下、 30 nM 以下、 35 nM 以下、 40 nM 以下、 45 nM 以下、又は 50 nM 以下の k_d を示す本発明のポリペプチドを同定することができる。ある実施形態では、本発明の単離された V_H 又は V_L ドメインは、BIAcoreアッセイにより決定されるような、 5 nM 以下、 10 nM 以下、 15 nM 以下、 20 nM 以下、 25 nM 以下、 30 nM 以下、 35 nM 以下、 40 nM 以下、 45 nM 以下、又は 50 nM 以下の k_d を示す。

【0025】

免疫グロブリン V_H 又は V_L ドメインをコードするヌクレオチド配列は、未処置ウサギ、又は以前に抗原で免疫されたウサギから取得することができる。ウサギの免疫、及びウサギ V_H 又は V_L ドメインをコードするヌクレオチド配列（例えば、cDNA）の単離は、当技術分野で公知な任意の方法又は本明細書中に記述した任意の方法により行うことができる。ある実施形態では、 V_H 又は V_L ドメインをコードするヌクレオチド配列は、未処置ウサギ又は免疫されたウサギの任意の組織から取得できるが、好ましくは、形質細胞、例えばB細胞が豊富な組織供給源から取得される。ある実施形態では、 V_H 又は V_L ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むウサギ組織は、骨髄である。他の実施形態では、 V_H 又は V_L ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むウサギ組織は、虫垂組織である。さらに他の実施形態では、 V_H 又は V_L ドメインをコードするヌクレオチド配列を含むウサギ組織はリンパ系組織であり、この実施形態による特定の例では、リンパ系組織は脾臓又はリンパ節組織である。

【0026】

本発明は、本明細書中に記述した方法により単離、同定、又は構築された V_H 又は V_L ドメインを含む免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体、又はその抗原結合性断片をさらに包含する。代替的な実施形態では、本発明は、新規な（ウサギ以外の種の免疫グロブリンのアミノ酸配列と比べて）スキヤフォールドアミノ酸配列、 V_H 又は V_L ドメインの特定の位置（例えば、それぞれ図3A及び図4に示されているウサギ V_H 及び V_L アラインメント配列における位置に従って決定されるような）における新規なアミノ酸残基、又は本発明の方法により同定されたCDRループの新規な配列を含む免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体を包含する。ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、モノクローナル抗体、多特異的抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ポリクローナル抗体、単鎖Fv（scFv）、単鎖抗体、抗イディオタイプ（抗Id）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗Id及び抗抗Id抗体を含む）、ダイアボディ（diabody）、ミニボディ（minibody）、ナノボディ（nanobody）、又はこれらに限定されないが、Fab断片、F(ab')断片、ジスルフィド連結二重特異的Fv（sdFv）、及び細胞内抗体（intrabody）を含む上記のいずれかの抗原結合性断片である。ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、二重特異的又は多特異的である。本発明の二重特異的又は多特異的分子は、当技術分野で周知の方法を使用して、例えば本発明の1又は複数の分子を、互いに及び/又は異なるエピトープ結合ポリペプチドと化学的にコンジュゲートさせることにより形成でき、二重特異的又は多特異的分子の結合ドメインは、少なくとも2つの異なる抗原に対する親和性を示す。例えば、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、第1及び第2の V_L ドメイン、又は第1及び第2の V_H ドメインを含むことができ、上記第1及び第2のドメインは、異なる結合特異性を有する（つまり、異なる抗原に結合する）。他の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、1つの V_L ドメイン、又は1つの V_H ドメイン、及び1つの抗原結合ポリペプチドを含み、この V_L ドメイン、又は V_H ドメイン、及び上記ポリペプチドは異なる結合特異性を示す。本発明のある実施形態では、本発明の二重特異的又は多特異的分子の少なくとも1つの抗原結合ドメインは、アルブミンと免疫特異的に結合する。本発明の他の実施形態では、本発明の二重特異的又は多特異的分子の少なくとも1つの抗原結合ドメインは、フィブロネクチンと免疫特異的に結合する。

【0027】

ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその抗原結合性断片は、 CH_1 ドメインを含まない。他の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド又はそのエピトープ結合性断片は、 CH_1 ドメイン、 CH_2 ドメイン、 CL ドメイン、 CH_3 ドメイン、又はHドメインの1又は複数を含まないか、又は CH_1 ドメイン、 CH_2 ドメイン、 CL ドメイン、 CH_3 ドメイン、又はHドメインのいずれも含まない。さらに別の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド又はそのエピトープ結合性断片は、 CH_1 ドメイン、Hドメイン、 CH_2 ドメイン、 CL ドメイン、又は CH_3 ドメインの1つを含み、免疫グロブリンに由来する他の定常ドメイン又はヒンジ領域をいずれも含まない（例えば、ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその断片は、 CH_1 ドメインを含むが、Hドメイン、 CH_2 ドメイン、又は CH_3 ドメインのいずれも含まないか；又は CH_2 ドメインを含むが、 CH_1 ドメイン、Hドメイン、又は CH_3 ドメインのいずれも含まない等）。

10

【0028】

ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、及び/又は V_L CDR3ドメインの1又は複数を含む。ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、及び/又は V_L CDR3ドメインの各々を含む。

20

【0029】

ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインの1つを含むが、他のCDRドメインをいずれも含まず、上記CDRドメインは本発明の方法により単離及び/又は同定されており、上記CDRドメインは本発明の方法により単離及び/又は同定されている（例えば、ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、 V_H CDR1ドメインを含むが、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_H CDR2ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_H CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_L CDR1ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_L CDR2ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_L CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、又は V_L CDR2ドメインを含まない）。

30

40

【0030】

ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインのいずれか2つを含むが、他のCDRドメインをいずれも含まず、上記CDRドメインは本発明の方法により単離及び/又は同定されており、上記CDRドメインは本発明の方法により単離及び/又は同定されている（例えば、ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、 V_H CDR1ドメイン及び V_H CDR2ドメインを含むが、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_H CDR2ドメイン及び V_H CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_L CDR

50

1 ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_H CDR1ドメイン及び V_H CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR2ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインは含まず；又は V_L CDR1ドメイン及び V_L CDR2ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_L CDR1ドメイン及び V_L CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、又は V_L CDR2ドメインを含まず；又は V_L CDR2ドメイン及び V_L CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、又は V_L CDR1ドメインを含まず；又は V_H CDR1ドメイン及び V_L CDR1ドメインを含むが、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_H CDR1ドメイン及び V_L CDR2ドメインを含むが、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_H CDR1ドメイン及び V_L CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、又は V_L CDR2ドメインを含まず；又は V_H CDR2ドメイン及び V_L CDR1ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_H CDR2ドメイン及び V_L CDR2ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_H CDR2ドメイン及び V_L CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、又は V_L CDR2ドメインを含まず；又は V_H CDR3ドメイン及び V_L CDR1ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_H CDR3ドメイン及び V_L CDR2ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_H CDR3ドメイン及び V_L CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、又は V_L CDR2ドメインを含まず；又は2つの V_H CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は2つの V_L CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、又は V_L CDR2ドメインを含まないなど。

【0031】

ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインのいずれか3つを含むが、他のCDRドメインをいずれも含まず、上記CDRドメインは本発明の方法により単離及び／又は同定されており、上記CDRドメインは本発明の方法により単離及び／又は同定されている（例えば、ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、及び V_H CDR3ドメインを含むが、 V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、及び V_L CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、又は V_H CDR3ドメインを含まず；又は V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、及び V_L CDR1ドメインを含むが、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_H CDR1ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、及び V_H CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR2ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は2つの V_H CDR3ドメイン及び V_L CDR1ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、

又は V_L CDR3ドメインを含まないなど)。

【0032】

ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインのいずれか4つを含むが、他のCDRドメインをいずれも含まず、上記CDRドメインは本発明の方法により単離及び/又は同定されており、上記CDRドメインは本発明の方法により単離及び/又は同定されている(例えば、ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、及び V_L CDR1ドメインを含むが、 V_L CDR2ドメイン又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、及び V_L CDR3ドメインを含むが、 V_L CDR1ドメイン又は V_L CDR2ドメインを含まず；又は V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、及び V_L CDR2ドメインを含むが、 V_H CDR3ドメイン又は V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、及び V_L CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン又は V_L CDR1ドメインを含まず；又は2つの V_H CDR3ドメイン及び2つの V_L CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR1ドメイン、又は V_L CDR2ドメインを含まないなど)。

【0033】

ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、又は V_L CDR3ドメインのいずれか5つを含むが、他のCDRドメインをいずれも含まず、上記CDRドメインは本発明の方法により単離及び/又は同定されており、上記CDRドメインは本発明の方法により単離及び/又は同定されている(例えば、ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、 V_H CDR1ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、 V_H CDR3ドメイン、 V_L CDR1ドメイン、及び V_L CDR2ドメインを含むが、 V_L CDR3ドメインを含まず；又は V_L CDR1ドメイン、 V_L CDR2ドメイン、 V_L CDR3ドメイン、 V_H CDR2ドメイン、及び V_H CDR3ドメインを含むが、 V_H CDR1ドメインを含まないなど)。

【0034】

ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、本発明の方法により単離及び/又は同定されたフレームワークドメインの1又は複数を含む。特定の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、そこに移植された異種性CDR配列を有する、本明細書中で同定されたフレームワークドメインを含む。

【0035】

本発明のポリペプチドには、任意の種(例えば、ウサギ、マウス、ラット)に由来してよい免疫グロブリン分子が含まれるが、好ましくは、任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY)、又は任意のクラス(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂)、又は任意のサブクラスであってよいヒト免疫グロブリン分子である。本発明の免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体、又はその抗原結合性断片は、当技術分野で周知な任意の方法、例えば化学合成又は組換え技術により作製することができる。

【0036】

ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、 V_H ドメイン、例えばウサギ V_H ドメインを含まず、及び/又はウサギ以外の任意の種に由来する V_H ドメインを含まない。他の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、 V_L ドメインを含まず、及び/又はウサギ以外の任意の種に由来する V_L ドメインを含まない。好ましい実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは V_H ドメインを含み、 V_L ドメインを含まない。他の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは V_L ドメインを含み、 V_H ドメ

インを含まない。特定の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体は、アミノ酸配列QEQLMETESGGGAEGGLVKPGASLTLTCTAS（配列番号57）を有するV_H FR1ドメイン；アミノ酸配列WVRQAPGKGGLEWIG（配列番号69）を有するV_H FR2ドメイン；アミノ酸配列YATWVNGRFTLSRDIDQSTGCLQLNSLTAADTATYYCAR（配列番号95）を有するV_H FR3ドメイン；アミノ酸配列WGQGTLLTVSS（配列番号139）を有するV_H FR4ドメイン；アミノ酸配列ELVLTQTTPSLASVGETVRIRC（配列番号150）又はELVLTQTTPSVSAAVGGTVTINC（配列番号155）を有するV_L FR1ドメイン；アミノ酸配列WYQQKPKKPPTLLIS（配列番号174）又はWYQQKPGQRPKLLIY（配列番号181）を有するV_L FR2ドメイン；アミノ酸配列GVPPRFSGSGSTDYTLTIGGVQAEDVATYYC（配列番号183）又はGVSSRFKSGSGTQFTLTISGVQCADAATYYC（配列番号205）を有するV_L FR3ドメイン；又はアミノ酸配列FGAGTNVEIK（配列番号206）若しくはFAFGGTELEIL（配列番号210）を有するV_L FR4ドメインの1又は複数を含む。他の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体、又はその抗原結合性断片（例えば、単一可変ドメイン）は、6.1.2節における表3のV_H FR1ドメイン、表4のV_H FR2ドメイン、表5のV_H FR3ドメイン、表6のV_H FR4ドメイン、表7のV_L FR1ドメイン、表8のV_L FR2ドメイン、表9のV_L FR3ドメイン、又は表10のV_L FR4ドメインの1又は複数を含む。

【0037】

さらに特定の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体は、ペプチドの安定性及び／又は抗原結合親和性を向上させる1又は複数のスキャフォールド残基を含む。ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、V_H FR2ドメインの46位のフェニルアラニン；V_H FR2ドメインの53位のグルタミン酸；V_H FR2ドメインの54位のアルギニン；V_H FR2ドメインの56位のグリシン；V_H FR2ドメインの58位のアラニン；V_H CDR1ドメインの44位のシステイン；V_H CDR2ドメインの59位のシステイン；V_H FR4ドメインの126位のアルギニン；V_L FR2ドメインの39位のフェニルアラニン又はチロシン；V_L FR2ドメインの45位のリジン；又はV_L FR3ドメインの91位のシステインの1又は複数を含み、上記位置は、それぞれ図3及び4に示されているV_H 又はV_L ドメインアミノ酸配列アラインメントによる。

【0038】

本発明は、可変ドメイン、CDR、アミノ酸スキャフォールド配列（例えば、6.1.2節の表3～10に列挙されているものなどのフレームワークドメイン）、又は上記のいずれかに突然変異（例えば、1又は複数のアミノ酸置換）を有する本発明のアミノ酸スキャフォールド残基のいずれかのアミノ酸配列を含む免疫特異的ポリペプチド又はその断片の使用も包含する。この実施形態による特定の例では、本発明は、1又は複数のアミノ酸置換を含む免疫特異的ポリペプチドを包含し、上記置換は、V_H FR2ドメインの46位では、フェニルアラニン；V_H FR2ドメインの53位では、グルタミン酸；V_H FR2ドメインの54位では、アルギニン；V_H FR2ドメインの56位では、グリシン；V_H FR2ドメインの58位では、アラニン；V_H CDR1ドメインの44位では、システイン；V_H CDR1ドメインの59位では、システイン；V_H FR4ドメインの126位では、システイン；V_L FR2ドメインの39位では、フェニルアラニン又はチロシン；V_L FR2ドメインの45位では、リジン；又はV_L FR3ドメインの91位では、システインの1又は複数に帰着する。好ましくは、これらの領域、ドメイン、又は残基における突然変異は、それらが免疫特異的に結合する抗原、つまりエピートプに対する免疫特異的ポリペプチドの結合活性及び／又は親和性を維持又は増強する。列挙した位置は、それぞれ図3及び4に示されているV_H 又はV_L ドメインアミノ酸配列アラインメントによる。

【0039】

ある実施形態では、本発明のポリペプチド又はその抗原結合性断片は、マウス及び／又はラットにおいて免疫的に中性（immuno-neutral）又は非免疫原性である抗原のエピート

10

20

30

40

50

ブと免疫特異的に結合する。

【 0 0 4 0 】

本発明は、治療用ポリペプチドの血清半減期を増加又は向上させることが知られている当技術分野で公知な任意の方法及び／又は本明細書中に記述されている任意の方法により修飾された本発明の免疫特異的ポリペプチドも包含する。そのような修飾の非限定的な例には、ペグ化、アセチル化、及び非天然アミノ酸の使用が含まれる。ある実施形態では、免疫特異的ポリペプチドの血清半減期は、アルブミン又はフィブロネクチンと免疫特異的に結合する付加的な抗原結合ドメインをポリペプチドに含めることにより増加又は向上させることができる。

【 0 0 4 1 】

本発明の方法は、本発明の免疫特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも包含する。1つの実施形態では、本発明は、本明細書中に記述した方法により同定又は構築された V_H 又は V_L ドメインをコードする単離された核酸配列を提供する。本発明は、新規の（ウサギ以外の種の免疫グロブリンのアミノ酸配列と比べて）スキヤフォールドアミノ酸配列、 V_H 又は V_L アミノ酸配列の特定の位置における新規のアミノ酸残基、又は本明細書中に記述した方法により同定されたCDRループの新規なアミノ酸配列を含む免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体、又はその抗原結合性断片をコードするポリヌクレオチドをさらに包含する。本発明は、さらに、上記核酸を含むベクターに関する。本発明の免疫特異的ポリペプチドが、本発明の方法により同定、単離、又は構築された V_H 及び V_L ドメインの両方を含む特定の実施形態では、本発明は、上記 V_H ドメインをコードする第1の核酸分子及び上記 V_L ドメインをコードする第2の核酸分子を含むベクターを提供し、上記 V_H 及び V_L ドメインは、同一の抗原及び／又はエピトープに対する免疫特異的結合について独立して又は同時に選択される。1つの特定の実施形態では、上記ベクターは発現ベクターである。本発明は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのベクターを含有する宿主細胞をさらに提供する。

【 0 0 4 2 】

本発明は、治療用作用剤又は追加的な抗原結合ドメイン、例えば異種性ポリペプチド（つまり、無関係なポリペプチド；又はその一部、好ましくは少なくとも10個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個、少なくとも50個、少なくとも60個、少なくとも70個、少なくとも80個、少なくとも90個、又は少なくとも100個のアミノ酸のポリペプチド）に組換えによって融合されるか、又は化学的にコンジュゲートされて（共有結合及び非共有結合によるコンジュゲーションの両方を含む）融合タンパク質を産生する免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体を包含する。融合は、必ずしも直接的である必要はなく、リンカー配列を介して又は化学的コンジュゲーションを介して生じてよい。本発明の免疫特異的ポリペプチドは、例えば、特定の細胞表面受容体に特異的な本発明の免疫特異的ポリペプチドに作用剤を融合又はコンジュゲートさせることにより、治療用作用剤を特定の細胞タイプにターゲティングするために、インビトロ又はインビボのいずれでも使用できる。他の実施形態では、追加的な抗原結合ドメインを使用して、本発明の免疫特異的ポリペプチドをアルブミン又はフィブロネクチンに結合させて、それにより血清半減期を向上させることができる（例えば、Holt et al., 2008, Protein Eng Des Sel 21:283-288及びStork et al., 2007, Protein Eng Des Sci 20:569-576を参照されたい。それぞれ参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる）。本発明の治療用作用剤／免疫特異的ポリペプチド融合体は、当技術分野で公知な方法を使用してインビトロイムノアッセイ及び精製方法にも使用することができる。例えば、PCT国際公開第93/21232号パンフレット；欧州特許第439,095号明細書；Naramura et al., Immunol. Lett., 39:91-99, 1994；米国特許第5,474,981号明細書；Gillies et al., PNAS, 89:1428-1432, 1992；及びFell et al., J. Immunol., 146:2446-2452, 1991を参照されたい。これらは参照により本明細書中にこれらの全体が組み込まれる。本発明の方法により使用するための治療用作用剤は、古典的な化学的治療用作用剤（例えば、化学療法剤）に限定されるとは解釈されるべきではないが、生体応答を改変又は変更しても

10

20

30

40

50

よく又はしなくてもよいペプチド、薬物部分、放射性物質、大環状キレート剤、及び siRNA を含むことができる。非限定的な例では、治療用作用剤としてのそのようなポリペプチドには、アルブミン、プロタミン、アルブミン相互作用タンパク質（例えば、gp60、gp30、gp18）、プロテイン A、G タンパク質、タンパク質形質導入ドメイン（Bogoyevitch et al., 2002, DNA Cell Biol 12:879-894 を参照されたい。これは参照によりその全体が組み込まれる）、毒素、細胞毒素、又は抗体分子の一部（例えば、Fc ドメイン、CH₁ ドメイン、CH₁ ドメイン、CH₁ ドメイン、CL ドメインなど）が含まれていてよく；そのような放射性核種には、標識用（つまり、インビボ又はインビトロで検出可能なシグナルを生成する）及び/又は治療効果生成用（例えば¹²⁵I、¹³¹I、¹⁴C など）に当技術分野で公知な放射性核種（例えば、アルファ、ベータ、ガンマ放射体など）が含まれていてよく；そのような大環状キレート剤には、放射性金属イオン（例えば、DOTA）をコンジュゲートさせるために当技術分野で公知なものが含まれる。

10

【0043】

ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドのCDR 及び/又はフレームワーク領域は、本明細書中に記述した方法により同定又は単離されたウサギV_H 又はV_L 領域に由来する。他の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドのCDR 及び/又はフレームワーク領域は、本明細書中に記述した方法により同定又は単離されたウサギV_H 又はV_L 領域に由来しないが、新規なスキファールドアミノ酸配列及び/又は本発明の方法により同定されたV_H 又はV_L ドメインのアミノ酸配列のある位置における新規なアミノ酸残基を含む。幾つかの実施形態では、本明細書中に記述された本発明の免疫特異的ポリペプチドは、これらに限定されないが、本明細書中で単離及び同定されたV_H 及び/又はV_L 配列のアミノ酸欠失、挿入、及び改変を含む追加的な変更を含む。

20

【0044】

好ましくは、本発明の免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体、又はその抗原結合性断片は、モノクローナル（つまり、抗原の同一エピトープに結合する）であり、ある実施形態ではヒト化されていてもよい。

【0045】

本発明は、(i)、及び(ii)薬学的に許容される担体を含む医薬組成物をさらに提供する。

30

【0046】

本発明のある実施形態では、医薬組成物は、本発明方法による使用のために提供され、上記医薬組成物は、治療有効量の本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその抗原結合性断片及び薬学的に許容される担体を含む。

【0047】

3.1 定義

本明細書で使用される場合、タンパク質性作用剤（例えば、タンパク質、ポリペプチド、及び抗体）の文脈における「類似体」という用語は、第2のタンパク質性作用剤と類似した又は同一の機能を所有するが、第2のタンパク質性作用剤と類似した又は同一のアミノ酸配列を必ずしも含まないか、又は第2のタンパク質性作用剤と類似した又は同一の構造を必ずしも所有しないタンパク質性作用剤を指す。類似のアミノ酸配列を有するタンパク質性作用剤とは、下記の少なくとも1つを満たす第2のタンパク質性作用剤を指す：(a) 少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%が第2のタンパク質性作用剤のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質性作用剤；(b) 少なくとも5個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも10個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも15個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも20個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも25個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも40個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも50個の隣接するア

40

50

ミノ酸残基、少なくとも60個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも70個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも80個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも90個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも100個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも125個の隣接するアミノ酸残基、又は少なくとも150個の隣接するアミノ酸残基の第2のタンパク質性作用剤をコードするヌクレオチド配列に厳密性の条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質性作用剤；及び(c)少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%が第2のタンパク質性作用剤をコードするヌクレオチド配列と同一であるヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質性作用剤。第2のタンパク質性作用剤と類似した構造を有するタンパク質性作用剤とは、第2のタンパク質性作用剤と類似した二次、三次、又は四次構造を有するタンパク質性作用剤を指す。ポリペプチドの構造は、これらに限定されないが、ペプチド配列決定法、X線結晶法、核磁気共鳴法、円偏光二色性法、及び結晶電子顕微鏡法を含む、当業者に公知な方法により決定できる。

【0048】

2つのアミノ酸配列又は2つの核酸配列のパーセント同一性を決定するためには、配列を最適に比較するためにアラインメントする(例えば、第2のアミノ酸又は核酸配列と最適にアラインメントさせるために、第1のアミノ酸配列又は核酸配列にギャップを導入することができる；例えば図3~4を参照)。その後、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置のアミノ酸残基又はヌクレオチドが比較される。第1の配列のある位置が、第2の配列の対応する位置と同一のアミノ酸残基又はヌクレオチドにより占められている場合、分子はその位置で同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、配列により共有されている同一位置の数の関数である(つまり、%同一性 = 同一重複位置の数 / 位置の総数 × 100%)。1つの実施形態では、2つの配列は同じ長さである。

【0049】

2つの配列間のパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを使用しても達成できる。2つの配列の比較に使用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877で改変された、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403のNBLAST及びXBLASTプログラムに組み込まれている。NBLASTヌクレオチドプログラムパラメータセット、例えばスコア = 100、ワード長 = 12で、BLASTヌクレオチド検索を実施すると、本発明の核酸分子と相同的なヌクレオチド配列を取得できる。XBLASTプログラムパラメータセット、例えばスコア = 50、ワード長 = 3で、BLASTタンパク質検索を実施すると、本発明のタンパク質分子と相同的なアミノ酸配列を取得できる。比較目的のためにギャップを考慮したアラインメント(gapped alignment)を取得するためには、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記述されているようにGapped BLASTを使用できる。代替的には、PSI-BLASTを使用すると、分子間の距離関係を検出する反復探索を実施することができる(Id)。BLAST、Gapped BLAST、及びPSI-BLASTプログラムを使用する場合、それぞれのプログラムの(例えば、XBLAST及びNBLASTの)初期パラメータを使用できる(例えば、NCBIウェブサイトを参照)。配列比較用に使用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている。アミノ酸配列の比較にALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重み付け残基表(PAM120 weight residue table)、ギャップ長ペナルティ12、及びギャップペナルティ4が使用できる。

【0050】

2つの配列間のパーセント同一性は、上述されたものに類似する技術を使用して、ギャップを考慮して又は考慮せずに決定することができる。パーセント同一性の計算では、典型的には完全な一致だけが計数される。

【0051】

本明細書で使用される場合、非タンパク質性作用剤の文脈における「類似体」という用語は、第1の有機又は無機分子と類似した又は同一の機能を所有し、第1の有機又は無機分子と構造的に類似する第2の有機又は無機分子を指す。

【0052】

本明細書で使用される場合、免疫特異的ポリペプチド（例えば、抗体）を含むポリペプチド又はタンパク質の文脈における「誘導体」という用語は、アミノ酸残基の置換、欠失、又は付加の導入により変更されたアミノ酸配列を含むポリペプチド又はタンパク質を指す。本明細書で使用される場合、「誘導体」という用語は、つまりポリペプチド又はタンパク質に任意のタイプの分子を共有結合させることにより修飾されたポリペプチド又はタンパク質も指す。例えば、限定目的ではないが、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、例えばグリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロッキング基による誘導体化、タンパク質切断、細胞リガンド又は他のタンパク質への連結などにより修飾できる。誘導体ポリペプチド又はタンパク質は、これらに限定されないが、特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む、当業者に公知の技術を使用した化学的修飾により作製できる。さらに、誘導体ポリペプチド又はタンパク質誘導体は、それが由来していたポリペプチド又はタンパク質と類似した又は同一の機能を所有する。

【0053】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、抗体が特異的に結合する抗原分子上の領域を指す。抗原分子は、単一の又は複数のエピトープを含む場合がある。

【0054】

本明細書で使用される場合、「断片」という用語は、別のポリペプチドのアミノ酸配列の、少なくとも5個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも10個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも15個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも20個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも25個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも40個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも50個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも60個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも70個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも隣接する80個のアミノ酸残基、少なくとも隣接する90個のアミノ酸残基、少なくとも隣接する100個のアミノ酸残基、少なくとも隣接する125個のアミノ酸残基、少なくとも150個の隣接するアミノ酸残基、少なくとも隣接する175個のアミノ酸残基、少なくとも隣接する200個のアミノ酸残基、又は少なくとも隣接する250個のアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むペプチド又はポリペプチドを指す。特定の実施形態では、ポリペプチドの断片は、ポリペプチドの少なくとも1つの機能を保持する。好ましくは、本発明の免疫特異的ポリペプチドの断片は、抗原結合性断片（特に、エピトープ結合性断片）である。

【0055】

本明細書で使用される場合、「重鎖」、「軽鎖」、「可変領域」、「フレームワーク領域」、「定常ドメイン」などの用語は、免疫学分野におけるそれらの通常の意味を有し、天然の免疫グロブリンのドメイン、及び合成（例えば、組換え型）結合タンパク質（例えば、ヒト化抗体、単鎖抗体、キメラ抗体など）の対応するドメインを指す。天然の免疫グロブリン（例えば、IgG）の基本的構造単位は、通常は約150,000Daの糖タンパク質として発現される2つの軽鎖及び2つの重鎖を有する四量体である。各鎖のアミノ末端（「N」）部分は、抗原認識の主因である約100～110アミノ酸以上の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端（「C」）部分は、単一の定常ドメインを有する軽鎖と、通常は3つの定常ドメイン及び1つのヒンジ領域を有する重鎖とを有する定常領域を定義する。したがって、免疫グロブリン分子、例えばIgGの軽鎖の構造は、 $n - V_L - - C_L - c$ であり、免疫グロブリン分子、例えばIgGの重鎖の構造は、 $n - V_H - - C_H 1$

- - H - - C_{H2} - - C_{H3} - c (ここで、Hはヒンジ領域である)である。本発明の免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体の可変領域は、抗原に接触する残基を含有する相補性決定領域(CDR)と、一般的に構造を維持しCDRループの位置決めを決定するフレームワークセグメントと呼ばれる非CDRセグメントとで構成される(あるフレームワーク残基は抗原と接触してもよい)。したがって、V_L及びV_Hドメインは、n - FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 - c 構造を有する。

【0056】

本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」又は「ヒト化免疫特異的ポリペプチド」という用語は、ヒトフレームワーク領域及び本発明の方法により同定された1又は複数のCDRを含む少なくとも1つの免疫グロブリン可変を含むポリペプチドを指す。幾つかの実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、免疫グロブリン全体は含まず、又は単一の免疫グロブリン可変ドメイン(例えば、V_H又はV_Lドメイン)を含んでいてもよいが、任意の他の免疫グロブリンドメイン又は領域(例えば、Fc、CH₁、CH₂、CH₃、CLなど)を含むことができない。CDRを提供する免疫特異的ポリペプチド(例えば、抗体又は可変ドメイン)は、「供与体」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリン又はその断片(例えば、可変ドメイン)は「受容体」と呼ばれる。定常領域が存在する必要はないが、存在する場合、それらは、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、つまり少なくとも約85~90%、好ましくは約95%以上同一でなければならない。したがって、本発明の免疫特異的ポリペプチドがヒト化免疫グロブリンを含む実施形態によると、上記免疫グロブリンの恐らくはCDR以外の部分は全て、自然ヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。本明細書で使用される免疫特異的ポリペプチド、つまり少なくとも可変ドメイン(又はそのエピトープ結合性断片)を含むポリペプチドの状況では、例えば本発明のキメラ分子の可変領域全体がヒトではないので、本発明のヒト化分子、例えば抗体は、本発明のキメラ分子を包含しない。その結果生じるヒト化分子がCDRを提供する供与体抗体と同一の抗原に結合すると予想されるため、供与体分子は「ヒト化」工程により「ヒト化された」と言われる。一般的に、ヒト化免疫特異的分子は、受容体の超可変領域残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有する非ヒト種(供与体抗体;例えば、ウサギV_H又はV_Lドメインに由来する供与体CDR)に由来する超可変領域残基に置換されているヒト免疫グロブリン(又はその可変ドメイン及び/若しくは断片)、受容体分子である。幾つかの場合では、ヒト免疫グロブリン又はその断片のフレームワーク領域(FR、Framework Region)残基は、対応する非ヒト残基に置換される。さらに、ヒト化分子は、受容体抗体又は供与体抗体に見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は、機能性、例えば免疫特異性をさらに洗練するためになされる。一般的に、ヒト化分子、例えば抗体は、超可変領域の全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリン又は可変ドメインの超可変領域に対応するか、又はFRの全て若しくは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のFRである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。ヒト化分子は、CL及び/又はCH₁ドメイン及び/又は免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分も含んでいてもよい。幾つかの実施形態では、本発明のヒト化分子は誘導体である。そのようなヒト化分子は、非ヒト、例えばウサギCDRの1又は複数におけるアミノ酸残基の置換、欠失、又は付加を含む。本発明のヒト化分子の誘導体は、本発明の非誘導体ヒト化分子と比較して、実質的に同一の結合性、良好な結合性、又は悪化した結合性を示す場合がある。特定の実施形態では、本発明の方法により同定及び/又は構築されたCDRの1つ、2つ、3つ、4つ、又は5つのアミノ酸残基が、置換、欠失、又は付加される(つまり、突然変異される)。抗体のヒト化に関するさらなる詳細については、以下を参照されたい;欧州特許第239,400号明細書、欧州特許第592,106号明細書、及び欧州特許第519,596号明細書;国際公開第91/09967号パンフレット及び国際公開第93/17105号パンフレット;米国特許第5,225,539号明細書、第5,530,101号明細書、第5,565,332号明細書、第5,585,089号明細書、第5,766,886号明細書、及び第6,407,213号明細書;並びにPadlan, 1991, Molecu

10

20

30

40

50

lar Immunology 28(4/5):489-498 ; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814 ; Roguska et al., 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:969-973 ; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-25 ; Caldas et al., 2000, Protein Eng. 13:353-60 ; Morea et al., 2000, Methods 20:267-79 ; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84 ; Roguska et al., 1996, Protein Eng. 9:895-904 ; Couto et al., 1995, Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s-5977s ; Couto et al., 1995, Cancer Res. 55:1717-22 ; Sandhu, 1994, Gene 150:409-10 ; Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol. 235:959-73 ; Jones et al., 1986, Nature 321:522-525 ; Reichmann et al., 1988, Nature 332:323-329 ; 及び Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (それぞれ参照により本明細書中にその全体が組み込まれる)。「ヒト化」という用語は、各々Studnickaらによる米国特許第 5, 770, 196号明細書 ; 第5, 776, 866号明細書 ; 第5, 821, 123号明細書 ; 及び第5, 896, 619号明細書 (それぞれ参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる)に開示されたものなどの、タンパク質及び/又は抗体の再表面化 (resurfacing) の方法も含む。

【0057】

本明細書で使用される場合、「免疫特異的に結合する」、「免疫特異的に認識する」、「特異的に結合する」、「特異的に認識する」という用語、及び類似の用語は、抗原 (例えば、エピトープ又は免疫複合体) と特異的に結合し、別の分子には特異的に結合しない分子を指す。抗原と特異的に結合する分子は、例えばイムノアッセイ、BIAcore、又は当技術分野で公知な他のアッセイにより決定されるような低親和性を有する他のペプチド又はポリペプチドと結合してもよい。好ましくは、抗原と特異的に結合する分子は、他のタンパク質と交差反応しない。抗原と特異的に結合する分子は、例えばイムノアッセイ、BIAcore、又は当業者に公知な他の技術により同定することができる。

【0058】

本明細書で使用される場合、「免疫特異的ポリペプチド」及び「免疫特異的ポリペプチド」という用語は、 V_H 又は V_L ドメインの少なくとも一方を含み、抗原/抗体特異性を評価するための、当技術分野で公知な任意の方法 (例えば、BIAcore) により決定されるような免疫特異的結合性を示すポリペプチド、ペプチド、及び/又はタンパク質を指す。この用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多特異的抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ポリクローナル抗体、単鎖 F_v (sc F_v)、単鎖抗体、抗イデオタイプ (抗 Id) 抗体 (例えば、本発明の抗体に対する抗 Id 及び抗抗 Id 抗体を含む)、ダイアボディ (例えば、米国特許出願公開第 2007/0004909号明細書及び第 2006/0210564号明細書を参照されたい。それぞれ参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる)、ミニボディ (例えば、米国特許第 5, 837, 821号明細書及び米国特許出願公開第 2007/0003556号明細書を参照されたい。それぞれ参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる)、ナノボディ (例えば、Revetz et al., 2005, Expert Opin Biol Ther 5:111-124を参照されたい。これはその全体が参照により組み込まれる)、又はこれらに限定されないが、Fab断片、 $F(ab')$ 断片、ジスルフィド連結二重特異的 F_v (sd F_v)、及び細胞内抗体を含む上記のいずれかの抗原結合性断片を指す。この用語には、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的活性断片、つまり抗原結合部位を含有し、任意のタイプ (例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY)、任意のクラス (例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂)、又は任意のサブクラスであってよい分子も含まれる。この用語は、その少なくとも1つが、本発明の方法により決定された V_H 又は V_L ドメインであるか、又はその少なくとも1つが本発明の方法により決定された可変ドメインフレームワーク領域を含む複数の抗原結合分子を含む二重特異的又は多特異的分子も意味することができる。

【0059】

本発明の免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体 (本明細書中で幅広く定義されたような) を参照する場合、各ドメインへのアミノ酸の帰属は、例えば、ヒトの可変ドメイン、マ

ウス及びウサギ可変ドメインを含む抗体可変ドメインの特徴付けのために当技術分野で周知の方法による。本発明の方法により単離及び同定されたような成熟した重鎖及び軽鎖のウサギ可変ドメインに由来するアミノ酸は、 V_H ドメインについては図3、及び V_L ドメインについては図4に示されているアラインメント配列におけるそれらの位置により指定される。例えば、本発明の方法により単離及び/又は同定されたウサギ V_H ドメインのFR1ドメインは、典型的には24個から31個までのアミノ酸残基から構成され、それらの残基の各々は、各ドメインの最長アミノ酸配列に基づくアラインメント配列におけるそれらの位置により指定される（例えば、図4を参照されたい）。したがって、特定の可変ドメインは、アラインメント配列の特定の位置の残基を含んでいてもよく、又は含まなくともよい。図3～4に示されているアラインメント及び本発明のポリペプチドの特異的ドメイン決定は、免疫グロブリン分子に基づいて配列を特徴付け及びアラインメントするための、当技術分野で公知の方法により決定された（例えば、参照により明示的に本明細書に組み込まれたKabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991)によりアラインメントされた）。したがって、図3に示されているように、 V_H ドメインのアラインメント配列では、FR1は、1位～31位から構成され、CDR1は32位～44位、FR2は45位～58位、CDR2は59位～69位、FR3は70位～110位、CDR3は111位～125位、及びFR4は126位～136位から構成され、並びに図4に示されているように、 V_L ドメインのアラインメント配列では、FR1は1位～23位から構成され、CDR1は24位～37位、FR2は38位～52位、CDR2は53位～59位、FR3は60位～91位、FR4は92位～105位、及びFR4は106位～116B位から構成される。

【0060】

本明細書で使用される場合、「核酸」及び「ヌクレオチド配列」という用語には、DNA分子（例えば、cDNA又はゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、DNA及びRNA分子の組合せ又はハイブリッドDNA/RNA分子、及びDNA又はRNA分子の類似体が含まれる。そのような類似体は、例えば、これらに限定されないが、イノシン又はトリチル化塩基を含むヌクレオチド類似体を使用して作製することができる。そのような類似体は、例えばヌクレアーゼ耐性又は細胞膜を通過する能力の増加などの、分子に有益な属性を与える修飾された骨格を含むDNA又はRNA分子も含むことができる。核酸又はヌクレオチド配列は、一本鎖、二本鎖であってよく、一本鎖及び二本鎖部分の両方を含有していてもよく、三本鎖部分を含有していてもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0061】

本明細書で使用される場合、「予防用作用剤 (prophylactic agent)」及び「予防用作用剤 (prophylactic agents)」という用語は、障害の予防、又は障害の再発若しくは蔓延の予防に使用できる任意の作用剤（複数可）を指す。予防上有効な量は、疾患の再発若しくは蔓延、疾患徴候の再発若しくは増悪、又は対象におけるそのようなものの出現を予防するのに十分な予防用作用剤の量を指すことができる。予防上有効な量は、疾患の予防に予防上の利益を提供する予防用作用剤の量を指すこともできる。さらに、本発明の予防用作用剤に関する予防上有効な量とは、予防用作用剤単独の量、又は疾患の予防に予防上の利益を提供する他の作用剤と組み合わせた量を意味する。

【0062】

本明細書で使用される場合、「単鎖Fv」又は「scFv」という用語は、これらのドメインが単一ポリペプチド鎖に存在する抗体の V_H 及び V_L ドメインを含む抗体断片を指す。一般的に、Fvポリペプチドは、scFvが所望の抗原結合用構造を形成することを可能にする、 V_H 及び V_L ドメイン間のポリペプチドリンカーをさらに含む。scFvに関する総説は、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照されたい。特定の実施形態では、scFvには、二重特異的scFv及びヒト化scFvが含まれる。

【 0 0 6 3 】

本明細書で使用される場合、本発明の免疫特異的ポリペプチドを含む製剤の文脈における「安定的」という用語は、タンパク質が、その物理的及び化学的安定性並びに保管時の完全性をその中で本質的に保持する製剤を指す。タンパク質安定性を測定するための種々の分析的技術は、当技術分野において利用可能であり、Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) 及び Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993) に総説されている（それぞれ参照によりその全体が組み込まれる）。安定性は、選択された温度で選択された期間、測定することができる。迅速スクリーニングの場合、製剤を2週間から1か月間40 で保持し、その間安定性を測定する。製剤が2～8 で保管される場合、一般的には、製剤は30 又は40 で少なくとも1か月間安定的であるべきであり、及び/又は2～8 では少なくとも2年間安定的であるべきである。製剤が30 で保管される場合、一般的には、製剤は30 で少なくとも2年間安定的であるべきであり、及び/又は40 では少なくとも6か月間安定的であるべきである。例えば、凍結乾燥及び保管後の凝集の程度は、タンパク質安定性の指標として使用することができる。例えば、「安定的」製剤は、約10%未満及び好ましくは約5%未満のタンパク質しか、製剤中に凝集体として存在しない製剤であり得る。他の実施形態では、凍結乾燥製剤の凍結乾燥及び保管後の凝集体形成は、そのいかなる増加も決定することができる。例えば、「安定的」な凍結乾燥製剤は、凍結乾燥製剤における凝集体の増加が、少なくとも1年間2～8 で凍結乾燥製剤が保管される場合、約5%未満及び好ましくは約3%未満である製剤であり得る。他の実施形態では、タンパク質製剤の安定性は、生物活性アッセイを使用して測定することができる。

10

20

【 0 0 6 4 】

本明細書で使用される場合、本発明の免疫特異的ポリペプチドの文脈における「安定的」という用語は、タンパク質の動力学的安定性、又は変性に対するタンパク質の耐性を指すことができる。動力学的安定性は、通常はより高次のエネルギー遷移状態（TS）により隔てられている2つのタンパク質コンフォメーション、天然折り畳み状態（N）及び変性状態（U）間の単純な平衡反応として、変性過程を例示することにより最適に説明できる。TS障壁の高さが折り畳み及び変性の速度を決定するため、動力学的に安定的なタンパク質は著しく高エネルギーのTSを所有し、そのため非常に遅い変性速度に帰着し、事実上タンパク質をその天然状態に閉じ込める。たとえ高濃度の変性剤などの極端な溶媒条件下で、ギブス自由エネルギー（G）の全体的な変化が変性に好ましい場合でも、TSの高い活性化エネルギーにより、動力学的に安定的なタンパク質の変性速度は著しく遅くなる。ポリペプチドの安定性を評価する方法は当技術分野で周知であり、例えば、単分子力分光法、例えば動的光散乱（「DLS」）によりモニターされる熱変性の評価、及びSDS変性に対する耐性の評価を含む（例えば、米国特許出願公開第2006/0099647号明細書を参照されたい。これはその全体が参照により組み込まれる）。安定性は、組換え発現系におけるタンパク質発現の特徴により評価することもできる。直ちに折り畳まれて変性に耐性のあるポリペプチドは、そのような系において可溶性タンパク質として発現されることになるが、不適切に又は部分的にのみ折り畳まれたタンパク質は、それらの疎水性領域を介して相互作用し、封入体を形成する。本発明者らは、組換えタンパク質の溶解度に基づき、上記タンパク質がCATとの融合体として発現され、融合体のCAT活性が評価される安定性アッセイをさらに実行した（以下を参照）。

30

40

【 0 0 6 5 】

本明細書で使用される場合、「対象」及び「患者」という用語は、同義的に使用される。本明細書で使用される場合、対象は、好ましくは、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど）又は霊長類（例えば、サル及びヒト）などの哺乳動物であり、最も好ましくはヒトである。

【 0 0 6 6 】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」とは、疾患又は障害の治療又は管理に十分な、本発明の治療用作用剤の量を指す。治療有効量は、疾患の発症を遅延又は最小限にす

50

るために十分な、治療用作用剤の量を指す場合がある。治療有効量は、疾患の治療又は管理における治療上の利益を提供する治療用作用剤の量も指すことができる。さらに、本発明の治療用作用剤に関する治療有効量は、治療用作用剤単独の量、又は例えば疾患を治療又は管理するのに十分な量の本発明の治療用作用剤の治療効能を増強するのに十分な、疾患の治療又は管理における治療上の利益を提供する他の治療法と組み合わせた量を意味する。

【図面の簡単な説明】

【0067】

4. 図面の簡単な説明

【図1】重鎖可変ドメインのヌクレオチド配列におけるプライマー位置の模式図である。

10

【図2A - 2B】軽鎖可変ドメインのヌクレオチド配列におけるプライマー位置の模式図である；(A) 鎖；(B) 鎖。

【図3】本発明の方法により選択された重鎖可変ドメイン(V_H ドメイン)のアミノ酸配列の典型的なアラインメントを示す図である。

【図4】本発明の方法により選択された軽鎖可変ドメイン(V_L ドメイン)のアミノ酸配列の典型的なアラインメントを示す図である。

【図5】SDVL及び/又はSDVHドメインをCATとの融合タンパク質として発現することを可能にする発現ベクターの模式図である。

【図6A - 6B】本発明の代表的なSDVLドメインの変性遷移曲線の内部蛍光を示す図である。(A) 熱誘導変性；(B) GdmCl誘導変性。

20

【発明を実施するための形態】

【0068】

5. 詳細な説明

5.1 免疫特異的ポリペプチド

本発明は、ウサギに由来する V_H 及び/若しくは V_L ドメイン又はその一部(例えば、CDRドメイン、フレームワークドメインなど)を有する、修飾され遺伝子操作された免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体に関する。好ましい実施形態では、本発明は、ウサギ免疫グロブリン可変ドメインに由来する単ドメイン抗体及び/又はそのエピトープ結合性断片を包含する。本発明者らは、ウサギ可変ドメインが、単ドメインとして組換えによって発現された際に、固有の安定性を維持し、高い結合親和性を保持することを発見した。

30

【0069】

本発明は、ウサギ V_H 及び/若しくは V_L ドメイン、並びに/又はそれらに由来する新規なCDR及びフレームワーク領域を単離及び使用するための方法を包含する。本発明は、組換え型免疫特異的ポリペプチドのCDRループ及び/又はフレームワーク領域と関連した「スキャフォールド」又は構造的配列として使用するための、単離されたウサギ V_H 及び V_L ドメイン内の新規なアミノ酸配列(定義された位置の新規なアミノ酸残基を含む)の同定をさらに提供する。本発明のウサギスキャフォールド配列(スキャフォールド残基を含む)又は新規なCDR/フレームワーク配列は、特にげっ歯動物抗体と比べて、可変ドメイン(複数可)及び/又はそれらを含む免疫特異的ポリペプチド(例えば、抗体)の安定性及び/又は親和性を増強し、高度に特異的な単ドメイン免疫ペプチド、例えば単ドメイン抗体の作製及び/又は使用を可能にする。

40

【0070】

本発明は、所与の抗原又はそのエピトープに対する特異性を有する新規なウサギ V_H 又は V_L ドメインの作製を包含する。特に、本発明は、ウサギ V_H 又は V_L ドメインを作製するための方法であって、(a)ファージ発現ライブラリーから、所望の抗原又はそのエピトープと免疫特異的に結合するウサギ V_H 又は V_L ドメインをコードする一組のDNA配列を選択する(ファージ「パニング」としても知られている)ステップと、(b)一組の配列又はそのサブセットを、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(「CAT」)との融合タンパク質として細菌内で発現させ、CAT発現によるクロラムフェニ

50

コール耐性を有する細菌を選択するステップとを含む方法を提供する。代替的な実施形態では、本発明は、ウサギ V_H 又は V_L ドメインを作製するための方法であって、(a)ウサギ免疫グロブリンの V_H 又は V_L ドメインをコードするDNA又はcDNAの配列を、CATとの融合タンパク質として細菌内で発現させるステップと、(b)CAT発現によるクロラムフェニコール耐性を有する細菌を選択し、選択された細菌からウサギ V_H 又は V_L ドメインをコードする一組のDNA配列を取得するステップと、(c)ステップ(b)で取得された一組のDNA配列からファージ発現ライブラリーを準備し、所望の抗原又はそのエピトープと免疫特異的に結合する V_H 又は V_L ドメインをコードするDNA配列を選択する(つまり抗原又はエピトープに対する免疫特異的結合のライブラリーをパニングする)ステップとを含む方法を提供する。ある実施形態では、本発明は、ファージパニ

10

ングステップが1回又は複数回繰り返される、ウサギ V_H 又は V_L ドメインの作製方法を包含する。関連する実施形態では、ファージパニングステップは、連続して繰り返してもよく、又はしなくてもよい。本発明により使用するためのファージ発現ライブラリーは、商業的に取得してもよく、又は本明細書中に記述した任意の方法及び/又は当技術分野で公知な任意の方法により調製してもよい。DNA又はcDNA配列を細菌中で融合タンパク質として発現させることは周知であり、本明細書中に記述した任意の方法又は当技術分野で公知な任意の方法、例えばCATをコードするヌクレオチド配列及び融合タンパク質発現を駆動するプロモーター配列を含む発現ベクターに、 V_H 又は V_L ドメインをコードするDNA又はcDNA配列をクローニングすることにより実施できる。本発明は、本明細書中に記述した方法により作製された V_H 及び/又は V_L ドメイン、又はその断片をさら

20

に包含する。本発明は、これらの方法により単離及び/又は同定された新規のスクャフォールドアミノ酸配列又はスクャフォールドアミノ酸残基(本発明の可変ドメインの定義された位置における)も包含する。

【0071】

1つの実施形態では、本発明は、2つの V_H ドメインを含む単ドメイン抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、1つの V_H ドメインを含む単ドメイン抗体の断片を提供する。さらに別の実施形態では、本発明は、単一の V_H 又は V_L ドメインを含み、他の免疫グロブリン由来のドメイン(例えば、 C_L ドメイン、 CH_1 ドメイン、 CH_2 ドメイン、 CH_3 ドメイン、Fcドメインなど)を含まない免疫特異的ポリペプチドを提供する。本発明以前は、単ドメイン抗体は、主としてラクダ属の抗体に基づいており、つまりラクダ化単ドメイン抗体であった(例えば、Muyldermans et al., 2001, Trends Biochem. Sci. 26:230; Nuttall et al., 2000, Cur. Pharm. Biotech. 1:253; Reichmann and Muyldermans, 1999, J. Immunol. Meth. 231:25; 国際公開第94/04678号パンフレット及び国際公開第94/25591号パンフレット; 米国特許第6,005,079号明細書を参照されたい; これらは参照によりそれらの全体が本明細書中に組み込まれる)。ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、二重特異的又は多特異的である。本発明の二重特異的又は多特異的分子は、当技術分野で公知な任意の方法及び/又は本明細書中に記述された任意の方法を使用して形成でき、例えば、融合又はコンジュゲートペプチドの生成により形成できる。本発明の二重特異的又は多特異的分子は、本発明の方法により同定、単離、又は構築された少なくとも1つの V_H 又は V_L ドメイン、又は可変ドメインの少なくとも1つのフレームワーク領域を含む。ある実施形態、ある実施形態では、本発明の二重特異的又は多特異的分子は、複数の V_L 及び/又は複数の V_L ドメインを含み、これらのドメインは、本発明の方法により単離、同定、及び/又は構築された。

30

40

【0072】

本発明の免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体には、これらに限定されないが、単ドメイン抗体、モノクローナル抗体、多特異的抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ポリクローナル抗体、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本発明の抗体に対する抗Id及び抗抗Id抗体を含む)、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、又はこれらに限定されないが、Fab断片、F(ab')断片、

50

ジスルフィド連結二重特異的Fv(s d Fv)、及び細胞内抗体を含む上記のいずれかの抗原結合性断片、並びにそれらのエピトープ結合性断片が含まれる。特に、本発明の免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体には、単ドメイン抗体又は免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分が含まれる。

【0073】

本発明の免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体のCDR、スキャフォールドアミノ酸配列及び/又はスキャフォールドアミノ酸残基は、ウサギ科(例えば、ウサギ及びノウサギ)の任意のメンバーに由来してよく、好ましくはウサギ(例えば、ニュージーランド白ウサギ)に由来する。ある実施形態では、本発明のポリペプチドは、ヒト化モノクローナル抗体である。

【0074】

本発明は、本発明のフレームワークドメインのアミノ酸配列と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一であるフレームワークドメインのアミノ酸配列を含む免疫特異的ポリペプチド又はその断片も包含する。ある実施形態では、本発明は、本発明のフレームワークドメインと比べて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のアミノ酸修飾(例えば、挿入、置換、欠失など)を含むフレームワークドメインを包含する。本発明は、本発明の1又は複数のCDRのアミノ酸配列と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%同一である1又は複数のCDRのアミノ酸配列を含む免疫特異的ポリペプチド又はその断片をさらに包含する。ある実施形態では、本発明は、本発明のCDRと比べて、1、2、3、4、又は5個のアミノ酸修飾(例えば、挿入、置換、欠失など)を含むCDRを包含する。2つのアミノ酸配列のパーセント同一性の決定は、当業者に公知な任意の方法により決定することができる。

【0075】

本発明は、本発明の変域ドメイン、CDR、アミノ酸スキャフォールド配列、又はアミノ酸スキャフォールド残基(例えば、重鎖可変ドメインFR2では46、53、54、56、及び58位、重鎖ドメインCDR1では44及び59位、重鎖可変ドメインFR4では126位、軽鎖可変ドメインFR2では39及び45位、並びに軽鎖可変ドメインFR3では91位)のいずれかのアミノ酸配列を含み、上記のいずれかにおける突然変異(例えば、1又は複数のアミノ酸置換)を有する免疫特異的ポリペプチド又はその断片の使用も包含する。この実施形態による特定の例では、本発明は、1又は複数のアミノ酸置換を含む免疫特異的ポリペプチドを包含し、上記置換は、V_H FR2ドメインの46位では、フェニルアラニン；V_H FR2ドメインの53位では、グルタミン酸；V_H FR2ドメインの54位では、アルギニン；V_H FR2ドメインの46位では、グリシン；V_H FR2ドメインの58位では、アラニン；V_H CDR1ドメインの44位では、システイン；V_H CDR1ドメインの59位では、システイン；V_H FR4ドメインの126位では、システイン；V_L FR2ドメインの39位では、フェニルアラニン又はチロシン；V_L FR2ドメインの45位では、リジン；又はV_L FR3ドメインの91位では、システインの1又は複数に帰着する。好ましくは、これらの領域、ドメイン、又は残基における突然変異は、それらが免疫特異的に結合する抗原、つまりエピトープに対する免疫特異的ポリペプチドの結合活性及び/又は親和性を維持又は増強する。特定の抗原に対する免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体の親和性をアッセイするためには、当業者に公知の標準的技術(例えば、イムノアッセイ)が使用できる。

【0076】

他の実施形態では、本発明は、本明細書中で同定された変域ドメイン、CDR、アミノ酸スキャフォールド配列のいずれかのアミノ酸配列を含む、又はアミノ酸スキャフォールド残基(例えば、重鎖可変ドメインFR2では46、53、54、56、及び58位、重

10

20

30

40

50

鎖ドメイン C D R 1 では 4 4 及び 5 9 位、重鎖可変ドメイン F R 4 では 1 2 6 位、軽鎖可変ドメイン F R 2 では 3 9 及び 4 5 位、並びに軽鎖可変ドメイン F R 3 では 9 1 位) を含む免疫特異的ポリペプチド又はその断片の使用を包含する。ある実施形態では、本発明は、 V_H F R 2 ドメインの 4 6 位では、フェニルアラニン； V_H F R 2 ドメインの 5 3 位では、グルタミン酸； V_H F R 2 ドメインの 5 4 位では、アルギニン； V_H F R 2 ドメインの 4 6 位では、グリシン； V_H F R 2 ドメインの 5 8 位では、アラニン； V_H C D R 1 ドメインの 4 4 位では、システイン； V_H C D R 1 ドメインの 5 9 位では、システイン； V_H F R 4 ドメインの 1 2 6 位では、システイン； V_L F R 2 ドメインの 3 9 位では、フェニルアラニン又はチロシン； V_L F R 2 ドメインの 4 5 位では、リジン；又は V_L F R 3 ドメインの 9 1 位では、システインの 1 又は複数を有する免疫特異的ポリペプチドを包含する。本明細書中で同定されたスキャフォールド残基は、特に、単一ドメイン結合タンパク質、つまり単一の V_L 又は V_H ドメインのみを含み、他のいずれの免疫グロブリン可変ドメインも含まないポリペプチドを含む本発明の実施形態の場合、それらが免疫特異的に結合する抗原、つまりエピトープに対する免疫特異的ポリペプチドの結合活性及び / 又は親和性を維持又は増強することができる。特定の抗原に対する免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体の親和性をアッセイするためには、当業者に公知の標準的技術（例えば、イムノアッセイ）が使用できる。

10

【 0 0 7 7 】

本発明の方法で使用されるポリペプチドには、つまり本発明の免疫特異的ポリペプチドに任意のタイプの分子を共有結合させることにより修飾される誘導体が含まれる。例えば、限定目的ではないが、誘導体には、例えばグリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基 / ブロッキング基による誘導体化、タンパク質切断、細胞リガンド又は他のタンパク質への連結などにより修飾された免疫特異的ポリペプチドが含まれる。任意の数の化学的修飾は、これらに限定されないが、特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む公知の技術により実施できる。そのうえ、誘導体は、1 又は複数の非古典的アミノ酸を含有してもよい。

20

【 0 0 7 8 】

ある実施形態では、本発明の免疫特異的分子を修飾して、インビボでの血清半減期を増加させる。血清半減期を増加させるための当技術分野で周知の方法には、これらに限定されないが、F c 及び / 又はヒンジ領域を含む抗体定常領域（例えば、米国特許第 5 , 5 6 5 , 3 3 5 号明細書及び第 6 , 2 7 7 , 3 7 5 号明細書を参照されたい。それぞれ本明細書中に引用された全ての参考文献を含み、その全体が参照により組み込まれる）、並びに / 又はインターフェロン及び / 若しくはサイモシン標的ペプチドなどの他の公知なエレメント、並びに透過性増強タンパク質（例えば、それぞれ米国特許第 6 , 3 1 9 , 6 9 1 号明細書及び第 5 , 6 4 3 , 5 7 0 号明細書を参照されたい。それぞれ、各特許内で引用された全参考文献を含み、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる）を含む抗体ドメインへのコンジュゲーション又は融合が含まれる。本発明の免疫特異的分子が I g G 定常ドメインを含む場合、そのような修飾は、上記定常ドメイン又は好ましくはその F c R n 結合性断片（好ましくは、F c 又はヒンジ - F c ドメイン断片）への、1 又は複数のアミノ酸修飾（つまり、置換、挿入、又は欠失）の導入も含むことができる。例えば、国際公開第 9 8 / 2 3 2 8 9 号パンフレット；国際公開第 9 7 / 3 4 6 3 1 号パンフレット；及び米国特許第 6 , 2 7 7 , 3 7 5 号明細書を参照されたい。それぞれ参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。本発明の分子の寿命を延ばすための当技術分野で公知な他の修飾には、例えば D 型の非天然アミノ酸の使用、又は代替的若しくは追加的には、硫黄含有型アミノ酸などのアミノ酸類似体の使用が含まれる。代替的には、本発明のポリヌクレオチド及び遺伝子は、ワクチン製剤用の免疫原性構築体の調製に有用なエレメント、又は準備したポリペプチドの単離に有用なエレメントに組換えによって融合することができる。

30

40

【 0 0 7 9 】

本発明の分子は、これらに限定されないが、アミド化又はアセチル化を含む、C 末端及

50

び／又はN末端に対する修飾を含有することができる。ある実施形態では、アミノ酸残基は、当技術分野で公知のキャッピング基によりキャッピングできる反応性側鎖、例えばグルタミン酸のカルボキシ側鎖を含有する。アセチル化とは、ペプチド（複数可）又はペプチド断片（複数可）のアミノ末端、又は少なくとも1つのリジンの側鎖（複数可）のいずれかに、 COCH_3 基を導入することを指す。重要なことには、アセチル化はタンパク質安定性を調節することができる。例えば、インビボでアセチル化されたE2F1を分析すると、アセチル化型がより長い半減期を有することが示される（Martinez-Balbas et al., (2000) EMBO J. 19(4):662-71; Takemura et al. (1992) J Cell Sci. 103 (Pt 4):953-64も参照されたい；それぞれ参照によりその全体が組み込まれる）。したがって、ある実施形態では、本発明の免疫特異的分子のアミノ末端は、アセチル化により修飾されている。ある実施形態では、免疫特異的分子のリジン側鎖は修飾されている。さらに他の実施形態では、本発明の免疫特異的分子は、アミノ末端及びリジン側鎖の両方がアセチル化されている。

10

【0080】

本発明は、フレームワーク又は可変領域に突然変異（例えば、1又は複数のアミノ酸置換）を有する本発明の免疫特異的ポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含む免疫特異的ポリペプチドの使用も包含する。好ましくは、これらの領域における突然変異は、それらが免疫特異的に結合する特定の抗原（複数可）及び／又はエピトープに対する抗体の結合活性及び／又は親和性を維持又は増強する。特定の抗原に対する抗体の親和性をアッセイするためには、当業者に公知の標準的技術（例えば、イムノアッセイ）が使用できる。

20

【0081】

本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその断片をコードするヌクレオチド配列に突然変異を導入するためには、例えば、アミノ酸置換に帰着する部位特異的変異誘発、PCRを媒介とした突然変異誘発を含む当業者に公知の標準的技術が使用できる。ある実施形態では、誘導体は、必須ではないと予測された1又は複数のアミノ酸残基においてなされる保存的なアミノ酸置換を有する。

【0082】

本発明は、フレームワーク又は可変領域に突然変異（例えば、1又は複数のアミノ酸置換）を有する本発明の免疫特異的ポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含む免疫特異的ポリペプチドの使用も包含する。好ましくは、これらの領域における突然変異は、それらが免疫特異的に結合する特定の抗原（複数可）及び／又はエピトープに対する抗体の結合活性及び／又は親和性を維持又は増強する。特定の抗原に対する抗体の親和性をアッセイするためには、当業者に公知の標準的技術（例えば、イムノアッセイ）が使用できる。

30

【0083】

インビボでの半減期が増加された本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその断片は、上記ポリペプチド又は断片に、高分子量のポリエチレングリコール（PEG, polyethylene glycol）などのポリマー分子を結合させることにより生成できる。PEGは、上記ポリペプチド又は断片のN末端又はC末端に対するPEGの部位特異的コンジュゲーションを介して、又はリジン残基に存在するイプシロン-アミノ基を介してのいずれかで、多官能性リンカーと共に又は伴わずに、上記ポリペプチド又は断片に結合することができる。生物活性の最小限の喪失に帰着する直鎖状又は分岐状ポリマー誘導體化が使用できる。SDS-PAGE及び質量分析法によりコンジュゲーションの度合いを詳細にモニターして、本発明の免疫特異的ポリペプチド又は断片に対するPEG分子の適切なコンジュゲーションを保証することができる。未反応のPEGは、例えばサイズ排除クロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーによりポリペプチド-PEGコンジュゲートから分離できる。

40

【0084】

ヒトにおけるインビボでの使用及びインビトロでの検出アッセイを含む幾つかの使用については、キメラ分子又はヒト化分子を使用することが望ましい場合がある。

【0085】

50

抗原及び／又はエピトープと免疫特異的に結合するウサギ V_H 又は V_L ドメインをコードする核酸配列は、各特徴に関する連続スクリーニング法を使用して親和性及び安定性の両方について選択される。本発明の方法を使用すると、ウサギ可変ドメインをコードする初期貯留は、高い安定性（例えば、組換え系で適切に発現及び折り畳まれる能力、これらの系で分解又は凝集に抵抗し、免疫特異的結合に関するその機能的な特徴を保持する能力）と同様に、所望の抗原に対する高親和性を示す免疫特異的ポリペプチド、例えばウサギ可変ドメインをコードする配列を多く含むことになる。ある実施形態では、上記配列によりコードされるポリペプチドは、安定性について選択される前に、抗原に対する免疫特異的結合について選択される。他の実施形態では、上記配列によりコードされるポリペプチドは、抗原に対する免疫特異的結合について選択される前に、安定性について選択される。本発明は、結合選択及び／又は安定性選択ステップ（複数可）のいずれか又は両方が、1回又は複数回繰り返される方法を包含する。本発明は、結合選択及び安定性選択ステップ並びに／又はその繰り返しが、任意の順番で1回又は複数回実施される方法をさらに包含する。

10

【0086】

5.1.1 ファージディスプレイを使用した親和性選択

抗原及び／又はエピトープと免疫特異的に結合するウサギ V_H 又は V_L ドメインは、当技術分野で公知な種々のファージディスプレイ及びパンニング法を使用して選択される。ファージディスプレイ法を使用すると、機能的なウサギ可変ドメインが、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保持するファージ粒子の表面に提示される。その後、ファージ粒子を、所望の抗原及び／又はエピトープと接触させ、当技術分野で周知の方法を使用して、例えば標識抗原、又は固体表面若しくはビーズに結合若しくは捕捉された抗原を使用して、上記記抗原及び／又はエピトープに対する免疫特異的結合を示す粒子を選択又は同定する。本発明の方法により使用できるファージディスプレイ法の例には、Brinkman et al., J. Immunol. Methods, 182:41-50, 1995; Ames et al., J. Immunol. Methods, 184:177-186, 1995; Kettleborough et al., Eur. J. Immunol., 24:952-958, 1994; Persic et al., Gene, 187:9-18, 1997; Burton et al., Advances in Immunology, 57:191-280, 1994; PCT出願番号PCT/GB91/01134; PCT国際公開第90/02809号パンフレット; 国際公開第91/10737号パンフレット; 国際公開第92/01047号パンフレット; 国際公開第92/18619号パンフレット; 国際公開第93/11236号パンフレット; 国際公開第95/15982号パンフレット; 国際公開第95/20401号パンフレット; 並びに米国特許第5,698,426号明細書; 第5,223,409号明細書; 第5,403,484号明細書; 第5,580,717号明細書; 第5,427,908号明細書; 第5,750,753号明細書; 第5,821,047号明細書; 第5,571,698号明細書; 第5,427,908号明細書; 第5,516,637号明細書; 第5,780,225号明細書; 第5,658,727号明細書; 第5,733,743号明細書、及び第5,969,108号明細書に開示されるものが含まれ、それぞれ参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。

20

30

【0087】

本発明の方法で使用されるファージディスプレイライブラリーは、商業的に取得してもよく、又は本明細書中に記述されているような及び／又は当技術分野で公知の未処理又は免疫ウサギの抗体レパートリーに由来してもよい。当技術分野で公知のように、ファージミドベクター中の核酸によりコードされ、したがってファージ表面に発現されるポリペプチドは、単一のウサギ V_H 又は V_L ドメインであってもよく、単鎖抗体であってもよく、scFvであってもよく、又はウサギ重鎖若しくは軽鎖の任意の断片であってもよい。ある実施形態では、各ファージ粒子は、その表面に単一可変ドメインを発現する。代替的な実施形態では、ファージ粒子は、 V_H 及び V_L ドメインが相互作用して結合対を形成するように、その表面に V_H 及び V_L ドメインを発現する。

40

【0088】

ファージディスプレイ及びパンニング法に使用されるファージ粒子は、繊維状ファージ

50

であり、クラスIファージ（例えば、f d、M13、f1、If1、ke、ZJ/Z、Ffなど）若しくはクラスIIファージ（例えば、Xf、Pf1、Pf3など）又はそれらの誘導体から選択することができる。ウサギ重鎖及び／又は軽鎖、例えばウサギV_H又はV_Lドメインの一部をコードするヌクレオチド配列は、ファージfdの遺伝子IIIカプシドタンパク質（pIII）又は別の繊維状ファージのその対応物との融合体として宿主細胞（つまり細菌）内で上記配列の発現を駆動するファージミドベクターから発現される。ファージディスプレイ技術は、ファージミドゲノムのパッケージングを支援するための、ヘルパーファージ又は相補的ファージ遺伝子をコードするプラスミドの使用を包含し、pIII融合タンパク質は、そのためのカプシドタンパク質である。

【0089】

ウサギ重鎖又は軽鎖の一部を発現し、したがって上記一部分をコードするヌクレオチド配列を含み、所望の抗原に対する特異性を示す個々のファージ粒子は、当技術分野で公知のスクリーニング法を使用してライブラリーから単離することができる（例えば、Gherardi et al., 1990, J Immunol Meth 126:61-68を参照されたい。これは参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる）。選択は、所望の抗原及び／又はエピトープを固体表面（例えば、培養皿、マイクロタイタープレート、クロマトグラフィービーズ、磁気ビーズなど）に係留し、結合されている抗原及び／又はエピトープ上にファージ粒子のライブラリーを通過させることにより達成できる。結合するこれらの個々のファージは洗浄後も保持され、当技術分野で公知の任意の検出系（例えば、抗fd抗体酵素コンジュゲート）により検出することができる。特定の実施形態では、pIII融合タンパク質は、抗標的抗体酵素コンジュゲートによる検出を容易にするために標的アミノ酸配列をさらに含む。結合したファージ粒子は、結合親和性の増加を選択するために、徐々に厳密性の洗浄条件下で除去することができる。洗浄条件の厳密性は、当技術分野で公知な任意の方法、例えば、洗浄pHの変更、洗浄時間の増加、洗浄溶液への表面活性剤の添加などにより、増加させることができる。特定の実施形態では、一組の結合したファージ粒子を回収し、標的抗原及び／又はエピトープに対する免疫特異的結合を1回又は複数回再選択する。ファージディスプレイ選択は、安定性分析による本発明のポリペプチドの選択前若しくは選択後、又は選択前及び選択後の両方で実施できる。

【0090】

ファージディスプレイ技術は、標的抗原及び／又はエピトープに対する本発明の免疫特異的ポリペプチドの親和性を増加させるために使用することができる。親和性成熟と呼ばれるこの技術では、選択された配列の初期貯留と比較してより高い親和性で抗原に結合する本発明のアミノ酸配列を同定するために、突然変異誘発又はCDRウォーキング（CDR walking）、並びに標的抗原及び／又はそのエピトープを使用する再選択が使用される。単一ヌクレオチドではなくコドン全体を突然変異させることは、アミノ酸突然変異の半無作為化レパートリーに帰着する。各々が単一CDRにおける単一アミノ酸の変更により異なる変異体クローンの貯留で構成され、各CDR残基の各可能なアミノ酸置換を表す変異体を含むライブラリーを構築することができる。抗原に対する結合親和性が増加した突然変異体は、固定化された突然変異体を標識抗原と接触させることによりスクリーニングすることができる。抗原に対する結合活性が増加した突然変異抗体を同定するためには、当技術分野で公知の任意のスクリーニング法が使用できる（例えば、ELISA）（Wu et al., 1998, Proc Natl. Acad. Sci. USA 95:6037; Yelton et al., 1995, J. Immunology 155:1994を参照されたい。それぞれ参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる）。

【0091】

本発明のポリペプチドの結合特異性は、これらに限定されないが、ELISA、ウエスタンブロット、表面プラズモン共鳴（例えば、BIAcore）、及びラジオイムノアッセイを含む、結合対相互作用を決定するための、当技術分野で公知な任意の方法により評価することができる。結合ポリペプチド特異性を評価するための当技術分野で公知な任意の方法を使用すると、0.001nMを越えるが、5nM以下、10nM以下、15nM以下、

10

20

30

40

50

20 nM以下、25 nM以下、30 nM以下、35 nM以下、40 nM以下、45 nM以下、又は50 nM以下の K_d を示す本発明のポリペプチドを同定することができる。ある実施形態では、本発明の単離された V_H 又は V_L ドメインは、BIAcoreアッセイにより決定されるような、5 nM以下、10 nM以下、15 nM以下、20 nM以下、25 nM以下、30 nM以下、35 nM以下、40 nM以下、45 nM以下、又は50 nM以下の K_d を示す。

【0092】

本発明は、所望の抗原に対して高い結合親和性を有する本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその断片も提供する。特定の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその断片は、少なくとも $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、又は少なくとも $10^8 M^{-1} s^{-1}$ の結合速度定数又は k_{on} 速度（抗体（Ab）+ 抗原（Ag）Ab-Ag）を有する。好ましい実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその断片は、少なくとも $2 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、又は少なくとも $10^8 M^{-1} s^{-1}$ の k_{on} を有する。

【0093】

別の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその断片は、 $10^{-1} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-1} s^{-1}$ 未満、 $10^{-2} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-2} s^{-1}$ 未満、 $10^{-3} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満、 $10^{-4} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満、 $10^{-5} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 未満、 $10^{-6} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-6} s^{-1}$ 未満、 $10^{-7} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-7} s^{-1}$ 未満、 $10^{-8} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-8} s^{-1}$ 未満、 $10^{-9} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-9} s^{-1}$ 未満、又は $10^{-10} s^{-1}$ 未満の k_{off} 速度（抗体（Ab）+ 抗原（Ag）Ab-Ag）を有する。好ましい実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその断片は、 $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満、 $10^{-5} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 未満、 $10^{-6} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-6} s^{-1}$ 未満、 $10^{-7} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-7} s^{-1}$ 未満、 $10^{-8} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-8} s^{-1}$ 未満、 $10^{-9} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-9} s^{-1}$ 未満、又は $10^{-10} s^{-1}$ 未満の k_{off} を有する。

【0094】

さらに別の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその断片は、少なくとも $10^2 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^2 M^{-1}$ 、少なくとも $10^3 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^3 M^{-1}$ 、少なくとも $10^4 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^4 M^{-1}$ 、少なくとも $10^5 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 M^{-1}$ 、少なくとも $10^6 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 M^{-1}$ 、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{12} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{13} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{13} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{14} M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{14} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{15} M^{-1}$ 、又は少なくとも $5 \times 10^{15} M^{-1}$ の親和定数又は k_a （ k_{on} / k_{off} ）を有する。さらに別の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその断片は、 $10^{-2} M$ 未満、 $5 \times 10^{-2} M$ 未満、 $10^{-3} M$ 未満、 $5 \times 10^{-3} M$ 未満、 $10^{-4} M$ 未満、 $5 \times 10^{-4} M$ 未満、 $10^{-5} M$ 未満、 $5 \times 10^{-5} M$ 未満、 $10^{-6} M$ 未満、 $5 \times 10^{-6} M$ 未満、 $10^{-7} M$ 未満、 $5 \times 10^{-7} M$ 未満、 $10^{-8} M$ 未満、 $5 \times 10^{-8} M$ 未満、 $10^{-9} M$ 未満、 $5 \times 10^{-9} M$ 未満、 $10^{-10} M$ 未満、 $5 \times 10^{-10} M$ 未満、 $10^{-11} M$ 未満、 $5 \times 10^{-11} M$ 未満、 $10^{-12} M$ 未満、 $5 \times 10^{-12} M$ 未満、 $10^{-13} M$ 未満、 $5 \times 10^{-13} M$ 未満、 $10^{-14} M$ 未満、 $5 \times 10^{-14} M$ 未満、 $10^{-15} M$ 未満、又は $5 \times 10^{-15} M$ 未満の解離定数又は K_d （ k_{off} / k_{on} ）を有する

。

【0095】

5.1.2 免疫特異的ポリペプチドの溶解度/安定性選択

高い安定性を示すウサギ V_H 又は V_L ドメインをコードするヌクレオチド配列は、改変されたクロラムフェニコール耐性アッセイを使用して選択する。このアッセイでは、可溶性のままであることを示し、適切に折り畳まれ、組換え発現中の凝集に耐性を有するポリペプチドが選択される。

【0096】

安定性選択の方法は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(「CAT」)、抗生物質クロラムフェニコールに対する菌耐性付与の原因である酵素との融合体として大腸菌(*E. coli*)内で発現されるような組換えタンパク質の溶解度の評価に基づく。CATは、種々の他のタンパク質と融合されても活性を維持することが示されている25 kDa分子量の高度に可溶性のホモ三量体タンパク質である(Robben et al., 1993, Gene 126:109-113)。しかしながら、融合タンパク質のCAT活性レベル(したがってクロラムフェニコールに対する耐性)は、遺伝子が可溶性タンパク質との構築体として発現される場合より、不溶性タンパク質との融合タンパク質で発現される場合に著しくより低い。したがって、可溶性形態の本発明のポリペプチド(例えばウサギ V_H 及び V_L ドメイン)は、クロラムフェニコールを用いる選択により、潜在的なタンパク質の大きな貯留から選択することができる。本発明のヌクレオチド配列を含む細菌は、液体培地又は細菌プレートを使用して選択することができる。本発明は、少なくとも0.1 mM、少なくとも0.2 mM、少なくとも0.4 mM、少なくとも0.6 mM、少なくとも0.8 mM、少なくとも1.0 mM、少なくとも1.2 mM、少なくとも1.4 mM、少なくとも1.6 mM、少なくとも1.8 mM、少なくとも2.0 mM、少なくとも2.5 mM、少なくとも3.0 mM、少なくとも5.0 mM、少なくとも10 mM、少なくとも15 mM、又は少なくとも20 mMのクロラムフェニコールを含む選択培地で上記形質転換された細菌を培養することを含む方法を包含する。当技術分野で公知の任意の方法により、細菌を形質転換し、選択された細菌からDNAを抽出することができる。

【0097】

本発明は、タンパク質安定性を評価するための、当技術分野で公知な他のアッセイも包含する。そのようなアッセイの非限定的な例は、単一分子力分光法、内部蛍光の変化の評価、例えば動的光散乱(「DLS」)によりモニターされる熱変性の評価、及びSDS変性に対する耐性の評価である(例えば、米国特許出願公開第2006/0099647号明細書を参照されたい。これはその全体が参照により組み込まれる)。本発明の方法は、安定性を決定する方法として、折り畳みのギブス自由エネルギー(G_{N-U})の決定をさらに包含する。ある実施形態では、本発明の分子の G_{N-U} は、約1 kJ/mol、約2 kJ/mol、約4 kJ/mol、約6 kJ/mol、約8 kJ/mol、約10 kJ/mol、約12 kJ/mol、約14 kJ/mol、約16 kJ/mol、約18 kJ/mol、約20 kJ/mol、約21 kJ/mol、約22 kJ/mol、約23 kJ/mol、約24 kJ/mol、約25 kJ/mol、約26 kJ/mol、約27 kJ/mol、約28 kJ/mol、約29 kJ/mol、約30 kJ/mol、約32 kJ/mol、約34 kJ/mol、約36 kJ/mol、約38 kJ/mol、約40 kJ/mol、約45 kJ/mol、又は約50 kJ/molである。

【0098】

タンパク質折り畳み/変性をモニターするための、当技術分野で公知な任意の他の方法も、本発明の方法により使用することができる。

【0099】

5.2 ヒト化分子

好ましい実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド及び/又はその断片は、ヒト化される。本発明のヒト化分子は、所定の抗原と免疫特異的に結合が可能であり、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域と、本明細書中に記述

した方法により単離及び／又は同定されたウサギ免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するCDRとを含む少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメイン（又はその変異体若しくは断片）を含むポリペプチドである。本発明のヒト化免疫特異的ポリペプチドは、全ての又は実質的に全てのCDR領域が、本発明の方法により単離／同定されたウサギ可変ドメインの領域（つまり、供与体ドメイン／領域）に対応し、全ての又は実質的に全てのフレームワーク領域が、ヒト免疫グロブリン共通配列の領域である、少なくとも1つの、又はある実施形態では2つの可変ドメインの実質的に全てを含むことができる。ある実施形態では、本発明のヒト化分子は、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部分も含む。本発明のヒト化分子の定常ドメインは、免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体の提唱されている機能、特に必要とされる場合があるエフェクター機能に関して選択することができる。幾つかの実施形態では、本発明のヒト化分子の定常ドメインは、ヒトIgA、IgE、IgG、又はIgMドメインである。特定の実施形態では、本発明のヒト化分子が治療的使用のためであり、抗体エフェクター機能が望ましい場合、特にIgG1及びIgG3イソタイプのヒトIgG定常ドメイン定常が使用される。代替的な実施例では、本発明のヒト化分子が治療目的のためであり、抗体エフェクター機能が必要でない場合、IgG2及びIgG4イソタイプが使用される。

【0100】

幾つかの実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、重鎖のみ、軽鎖のみ、V_Hドメインのみ、V_Lドメインのみ、又は上記断片及び／又はドメインの任意の組合せを含む。他の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド又は断片は、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、及びCH4領域を1つも含まなくてもよく、それらの1つ、又はそれらの1つ若しくは複数をさらに含んでもよい。他の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド又は断片は、CLドメインを含まない。本発明の免疫特異的ポリペプチド又は断片は、IgM、IgG、IgD、IgA、及びIgEを含む任意のクラスの免疫グロブリン、並びにIgG₁、IgG₂、IgG₃、及びIgG₄を含む任意のイソタイプから選択されるレセプター抗体を含むことができる。幾つかの実施形態では、定常ドメインは、ヒト化分子、例えば抗体が細胞毒性活性を示し、クラスが典型的にはIgG₁であることが望ましい補体結合定常ドメインである。そのような細胞毒性活性が望ましくない他の実施形態では、定常ドメインは、IgG₂クラスであり得る。本発明のヒト化分子は、1つを越えるクラス又はイソタイプに由来する配列を含んでもよく、所望のエフェクター機能を最適化するために特定の定常ドメインを選択することは、当技術分野の通常技術内にある。

【0101】

本発明のヒト化分子のフレームワーク及びCDR領域は、親配列に正確に対応する必要はなく、例えば、供与体ウサギCDR又はコンセンサスフレームワークは、その部位でのCDR又はフレームワーク残基がコンセンサス又は供与体分子のいずれにも対応しないように、少なくとも1つの残基の置換、挿入、又は欠失により突然変異していてもよい。しかしながら、そのような突然変異は広範でないことが好ましい。通常、ヒト化残基の少なくとも75%は、親フレームワーク領域（FR）及びCDRの配列に対応し、より多くの場合90%であり、及び最も好ましくは95%を越えることになる。ヒト化分子、特に抗体は、これらに限定されないが、CDR移植（CDR-grafting）（欧州特許第239,400号明細書；国際公開第91/09967号パンフレット；及び米国特許第5,225,539号明細書、第5,530,101号明細書、及び第5,585,089号明細書）、ベニアリング（veneering）又は再表面化（resurfacing）（欧州特許第592,106号明細書及び欧州特許第519,596号明細書；Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498；Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814；及びRoguska et al., 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:969-973）、鎖シャuffling（chain shuffling）（米国特許第5,565,332号明細書）、並びに例えば、米国特許第6,407,213号明細書、第5,766,886号明細書、第5,585,089号明

細書、国際公開第 9 3 1 7 1 0 5 号パンフレット、Tan et al., 2002, J. Immunol. 169: 1119-25、Caldas et al., 2000, Protein Eng. 13:353-60、Morea et al., 2000, Methods 20:267-79、Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84、Roguska et al., 1996, Protein Eng. 9:895-904、Couto et al., 1995, Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s-5977s、Couto et al., 1995, Cancer Res. 55:1717-22、Sandhu, 1994, Gene 150:409-10、Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol. 235:959-73、Jones et al., 1986, Nature 321: 522-525、Riechmann et al., 1988, Nature 332:323、及びPresta, 1992, Curr. Opin. Struct. Biol. 2:593-596で開示された技術を含む当技術分野で公知な種々の技術を使用して作製することができる。多くの場合、フレームワーク領域のフレームワーク残基は、抗原結合を変更、好ましくは向上させるために C D R 又は供与体ウサギ可変ドメイン由来の対応する残基と置換される（つまり、本発明の方法により同定されたスキヤフォールドアミノ酸配列及び / 又は残基の置換）。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で周知の方法により、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するために C D R 及びフレームワーク残基の相互作用をモデリングすること、及び特定の位置で稀であるフレームワーク残基を同定するために配列を比較することにより同定される。（例えば、Queen et al., 米国特許第 5, 585, 089 号明細書；米国特許公開第 2 0 0 4 / 0 0 4 9 0 1 4 号明細書、及び第 2 0 0 3 / 0 2 2 9 2 0 8 号明細書；米国特許第 6, 350, 861 号明細書；第 6, 180, 370 号明細書；第 5, 693, 762 号明細書；第 5, 693, 761 号明細書；第 5, 585, 089 号明細書；及び第 5, 530, 101 号明細書、並びに Riechmann et al., 1988, Nature 332:323 を参照されたい。これらは全て参照によりそれらの全体が本明細書中に組み込まれる）。「ヒト化」という用語は、各々 Studnicka らによる米国特許第 5, 770, 196 号明細書；第 5, 776, 866 号明細書；第 5, 821, 123 号明細書；及び第 5, 896, 619 号明細書（それぞれ参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる）に開示されたものなどのタンパク質及び / 又は抗体の新表面化の方法も含む。

【 0 1 0 2 】

幾つかの実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその断片は、供与体ウサギ可変ドメインに由来する少なくとも 1 つの C D R が受容体フレームワーク領域に移植されているヒト化分子を含む。他の実施形態では、供与体ウサギ V_H 及び / 又は V_L ドメインの少なくとも 2 つ及び好ましくは 3 つ全ての C D R が、受容体フレームワーク領域に移植されている。

【 0 1 0 3 】

5 . 3 キメラ分子

本発明のキメラ分子は、免疫特異的ポリペプチドの異なる部分が、ウサギ重鎖又は軽鎖に由来する可変領域及びヒト免疫グロブリン定常領域を有する分子などの異なる免疫グロブリン分子に由来する分子である。キメラ抗体を作製するための方法は、当技術分野で公知である。例えば、Morrison, 1985, Science 229:1202 ; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214 ; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202 ; 並びに米国特許第 6, 311, 415 号明細書、第 5, 807, 715 号明細書、第 4, 816, 567 号明細書、及び第 4, 816, 397 号明細書を参照されたい。これらは参照によりそれらの全体が本明細書中に組み込まれる。本発明のウサギ供与体分子に由来する 1 又は複数の C D R と、ヒト免疫グロブリン分子に由来するフレームワーク領域とを含む本発明のキメラ分子は、例えば、C D R 移植（欧州特許第 2 3 9, 4 0 0 号明細書；国際公開第 9 1 / 0 9 9 6 7 号パンフレット；並びに米国特許第 5, 225, 539 号明細書、第 5, 530, 101 号明細書、及び第 5, 585, 089 号明細書）、ベニアリング又は新表面化（欧州特許第 5 9 2, 1 0 6 号明細書；欧州特許第 5 1 9, 5 9 6 号明細書；Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 ; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7:805 ; 及び Roguska et al., 1994, PNAS 91:969）、鎖シャフリング（米国特許第 5, 565, 332 号明細書）を含む、当技術分野で公知な種々の技術を使用して作製することができる。上記で特定された参考文献の各々は、その全体が参照により本明細書

中に組み込まれる。

【0104】

多くの場合、フレームワーク領域のフレームワーク残基は、抗原結合を変更、好ましくは向上させるために、CDRウサギ供与体可変ドメイン由来の対応する残基と置換される。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で周知の方法により、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するために、CDR及びフレームワーク残基の相互作用をモデリングすること、及び特定の位置で稀であるフレームワーク残基を同定するために配列を比較することにより同定される。(例えば、米国特許第5,585,089号明細書;及びRiechmann et al., 1988, Nature 332:323を参照されたい。これらは参照によりそれらの全体が本明細書中に組み込まれる。)

10

【0105】

5.4 コンジュゲート分子

本発明は、融合タンパク質を作製するために、異種性ポリペプチド(つまり、無関係なポリペプチド;又はその一部、ポリペプチドの好ましくは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、又は少なくとも100個のアミノ酸)に組換えによって融合、又は化学的にコンジュゲートされた(共有結合及び非共有結合によるコンジュゲーションの両方を含む)、免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体を包含する。融合は、必ずしも直接的である必要はなく、リンカー配列を介して生じてよい。本発明の免疫特異的ポリペプチドは、例えば、特定の細胞表面受容体に対して免疫特異的性を示す本発明の分子に異種性ポリペプチドを融合又はコンジュゲートさせることにより、異種性ポリペプチドを特定の細胞タイプにターゲティングするために、インビトロ又はインビボのいずれでも使用できる。代替的には又は追加的には、異種性ポリペプチド、特に抗原結合異種性ポリペプチドは、例えば、特定のC血清タンパク質又は標的タンパク質に対して免疫特異性を示す異種性ポリペプチドに本発明の分子を融合又はコンジュゲートさせることにより、本発明の免疫特異的ポリペプチドを特定の血清タンパク質又はタンパク質標的にターゲティングするために、インビトロ又はインビボのいずれでも使用できる。そのような融合又はコンジュゲーションは、本発明の二重特異的又は多特異的ポリペプチドに帰着する。異種性ポリペプチドに融合又はコンジュゲートされた本発明の免疫特異的ポリペプチドは、当技術分野で公知な方法を使用してインビトロのイムノアッセイ及び精製法にも使用することができる。例えば、PCT国際公開第93/21232号パンフレット;欧州特許第439,095号明細書;Naramura et al., 1994, Immunol. Lett., 39:91-99;米国特許第5,474,981号明細書;Gillies et al., 1992, Proc Natl Acad Sci, 89:1428-1432;及びFell et al., 1991, J. Immunol., 146:2446-2452を参照されたい。それぞれ参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。

20

30

【0106】

さらに、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、所与の生体応答を改変する治療用作用剤又は薬物部分とコンジュゲートさせてもよい。治療用作用剤又は薬物部分は、古典的な化学的治療用作用剤に制限されるとは解釈するべきでない。例えば、薬物部分は、所望の生物活性を所有するタンパク質又はポリペプチドであり得る。そのようなタンパク質には、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス菌体外毒素(つまりPE-40)又はジフテリア毒素、リシン、ゲロニン、及びアメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質などの毒素、腫瘍壊死因子などのタンパク質、これらに限定されないが、アルファ-インターフェロン(IFN(interferon)-アルファ)、ベータ-インターフェロン(IFN(interferon)-ベータ)、神経成長因子(NGF, nerve growth factor)、血小板由来増殖因子(PDGF, platelet derived growth factor)、組織プラスミノゲン活性化因子(TPA, tissue plasminogen activator)を含むインターフェロン;アポトーシス作用剤(例えば、TNF-アルファ、TNF-ベータ、PCT国際公開第97/33899号パンフレットで開示されているようなAIM I)、AIM II(例えば、PCT国際公開第97/34911号パンフレットを参照)、Fasリガンド(Takahashi et al., 1994

40

50

、J. Immunol., 6:1567-1574)、及びVEGI (PCT国際公開第99/23105号パンフレット)、血栓剤又は抗血管新生剤(例えば、アンギオスタチン又はエンドスタチン)、又は例えばリンホカイン(例えば、インターロイキン1(「IL-1」, interleukin-1)、インターロイキン2(「IL-2」, interleukin-2)、インターロイキン6(「IL-6」, interleukin-6)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(「GM-CSF」, granulocyte macrophage colony stimulating factor)、及び顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」, granulocyte colony stimulating factor))などの生体応答調節剤、マクロファージコロニー刺激因子(「M-CSF」, macrophage colony stimulating factor)、又は増殖因子(例えば、成長ホルモン(「GH」, growth hormone); プロテアーゼ、又はリボヌクレアーゼが含まれる。

10

【0107】

本発明の免疫特異的ポリペプチドは、精製を容易にするためにペプチドなどのマーカー配列に融合することができる。好ましい実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、数ある中で、pQEベクター(QIAGEN Inc社製、9259 イートンアベニュー、チャッツワース、米国カリフォルニア州、91311)に備えられているタグなどの、ヘキサヒスチジンペプチドであり、それらの多くは商業的に入手可能である。Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824に記述されているように。精製に有用な他のペプチドタグには、これらに限定されないが、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する赤血球凝集素「HA」タグ(その全体が参照により組み込まれるWilson et al., 1984, Cell, 37:767)及び「Flag」タグ(その全体が参照により組み込まれるKnappik et al., 1994, Biotechniques, 17(4):754-761)が含まれる。

20

【0108】

本発明は、本発明の分子の断片に融合又はコンジュゲートされた異種性ポリペプチドを含む組成物の使用をさらに含む。例えば、異種性ポリペプチドは、Fab断片、Fc断片、Fv断片、F(ab)₂断片、scFv、ミニボディ、ナノボディ、又はその一部分に融合又はコンジュゲートすることができる。抗体部分にポリペプチドを融合又はコンジュゲートするための方法は、当技術分野で公知である。例えば、米国特許第5,336,603号明細書、第5,622,929号明細書、第5,359,046号明細書、第5,349,053号明細書、第5,447,851号明細書、及び第5,112,946号明細書; 欧州特許第307,434号明細書; 欧州特許第367,166号明細書; 国際公開第96/04388号パンフレット及び国際公開第91/06570号パンフレット; Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; 及びVil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341(上記参考文献は参照によりそれらの全体が組み込まれる)を参照されたい。

30

【0109】

追加的な融合タンパク質は、遺伝子シャフリング(gene-shuffling)、モチーフシャフリング(motif-shuffling)、エクソンシャフリング(exon-shuffling)、及び/又はコドンシャフリング(codon-shuffling)(「DNAシャフリング」と総称される)の技術により作製することができる。DNAシャフリングは、本発明の免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体、又はその断片の活性を変更するために使用できる(例えば、より高い親和性及びより低い解離速度を有する抗体又はその断片)。一般的には、米国特許第5,605,793号明細書; 第5,811,238号明細書; 第5,830,721号明細書; 第5,834,252号明細書; 及び第5,837,458号明細書、並びにPatten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16:76; Hansson, et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265; 及びLorenzo and Blasco, 1998, BioTechniques 24:308を参照されたい(これらの特許及び出版物はそれぞれ、参照によりその全体が組み込まれる)。本発明の核酸若しくはその断片、又はコードされたポリペプチド若しくはその断片は、組換えに先立って、誤りを起こし易いPCR、無作為ヌクレオチド挿入、又は他の方法により無作為突然変異誘発にかけることにより変更するこ

40

50

とができる。

【0110】

本発明は、診断薬又は治療用作用剤にコンジュゲートされた免疫特異的ポリペプチドも包含する。例えば、そのような分子は、例えば所与の治療計画の効能を決定するための臨床試験手順の一部として疾患、障害、又は感染の発生又は進行をモニターするために、診断的に使用することができる。検出は、本発明のポリペプチドを検出可能な物質に結合することにより容易になり得る。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、陽電子放出金属、及び非放射性的常磁性金属イオンが含まれる。検出可能な物質は、直接的に、又は当技術分野で公知の技術を使用して、媒介体（例えば、当技術分野で公知のリンカーなど）を介して間接的にのいずれかで、本発明の免疫特異的ポリペプチドと結合又はコンジュゲートさせることができる。本発明により診断法として使用するために抗体とコンジュゲートさせることができる金属イオンについては、例えば、米国特許第4,741,900号明細書（その全体が参照により組み込まれる）を参照されたい。そのような診断及び検出は、種々の酵素、これらに限定されないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼを含む酵素；これらに限定されないが、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンなどの補欠分子団複合体；これらに限定されないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、又はフィコエリトリンなどの蛍光物質；これに限定されないが、ルミノールなどの発光物質；これらに限定されないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンなどの生物発光物質；これらに限定されないが、ピスマス(^{213}Bi)、炭素(^{14}C)、クロム(^{51}Cr)、コバルト(^{57}Co)、フッ素(^{18}F)、ガドリニウム(^{153}Gd 、 ^{159}Gd)、ガリウム(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、ゲルマニウム(^{68}Ge)、ホルミウム(^{166}Ho)、インジウム(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、ヨウ素(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、ランタン(^{140}La)、ルテチウム(^{177}Lu)、マンガン(^{54}Mn)、モリブデン(^{99}Mo)、パラジウム(^{103}Pd)、リン(^{32}P)、プラセオジウム(^{142}Pr)、プロメチウム(^{149}Pm)、レニウム(^{186}Re 、 ^{188}Re)、ロジウム(^{105}Rh)、ルテニウム(^{97}Ru)、サマリウム(^{153}Sm)、スカンジウム(^{47}Sc)、セレン(^{75}Se)、ストロンチウム(^{85}Sr)、硫黄(^{35}S)、テクネチウム(^{99}Tc)、タリウム(^{201}Tl)、スズ(^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、トリチウム(^3H)、キセノン(^{133}Xe)、イッテルビウム(^{169}Yb 、 ^{175}Yb)、イットリウム(^{90}Y)、亜鉛(^{65}Zn)などの放射性物質；種々の陽電子放出断層撮影法を使用する陽電子放出金属、及び非放射性的常磁性金属イオンを含むがこれらに限定されない検出可能な物質に本発明のポリペプチドを結合することにより達成できる。そのうえ、上記トレーサー放射性金属はいずれも、本発明の方法による免疫特異的ポリペプチドにコンジュゲートされた場合、治療効果を示す場合がある。

【0111】

本発明の免疫特異的ポリペプチドは、細胞毒素（例えば、細胞増殖抑制性又は細胞破壊性作用剤）、治療用作用剤、又は放射性元素（例えば、アルファ放射体、ガンマ放射体など）などの治療用部分とコンジュゲートさせることができる。細胞毒素又は細胞毒性作用剤には、細胞に有害なあらゆる作用剤が含まれる。例としては、バクリタキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノボシド(tenoposide)、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びビューロマイシン、並びにそれらの類似体又は相同体が含まれる。治療用作用剤には、これらに限定されないが、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン

、シタラピン、5 - フルオロウラシルデカルボアジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブチル(thioepa chlorambucil)、メルファラン、カルマスティン(B S N U)、及びロムスチン(C C N U)、シクロトスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、並びにシスジクロロジアミン白金(II)(D D P、cis-dichlorodiamine platinum (II))シスプラチン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルピシン(かつてはダウノマイシン)及びドキシソルピシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(かつてはアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン(A M C))、及び抗有系分裂作用剤(例えば、ピンクリスチン及びピンブラスチン)が含まれる。

【0112】

ある実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、遺伝子の過剰発現又は誤発現により引き起こされる疾患、及び突然変異を含有する遺伝子の発現によりもたらされる疾患の治療又は予防に有用な s i R N A などの治療用部分とコンジュゲートさせることができる。s i R N A 活性の機序及びその使用様式は当技術分野で周知であり、例えば、Provost et al., 2002, EMBO J., 21: 5864-5874; Tabara et al., 2002, Cell 109:861-71; Ketting et al., 2002, Cell 110:563; 及びHutvagner & Zamore, 2002, Science 297:2056を参照されたい。それぞれその全体が参照により本明細書中に組み込まれる。

【0113】

さらに、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、放射性物質又は放射性金属イオンの結合に有用な大環状キレート剤などの治療用部分とコンジュゲートさせることができる(放射性物質の例に関しては上記を参照)。ある実施形態では、大環状キレート剤は、1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロドデカン - N, N', N'', N''' - 四酢酸(D O T A)であり、これはリンカー分子を介して抗体とコンジュゲートさせることができる。そのようなリンカー分子は、当技術分野で一般的に公知であり、Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; 及びZimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50に記述されており、それぞれ参照によりそれらの全体が組み込まれる。

【0114】

本発明の免疫特異的ポリペプチドは、生体応答を変更又は改変しないが、その代わりに免疫特異的ポリペプチド又はその断片の標的機能及び/又は輸送機能を変更又は改変する治療用部分とコンジュゲートさせることができる。そのような部分の非限定的な例には、プロテインA、Gタンパク質、アルブミン、アルブミン相互作用性ペプチド(例えば、gp60、gp30、gp18; 例えば、Schnitzer et al., 1992, J Biol Chem 34:24544-24553を参照); 及びタンパク質形質導入ドメイン(例えば、Bogoyevitch et al., 2002, DNA Cell Biol 12:879-894を参照)が含まれる(上記で引用した参考文献はそれぞれ、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる)。そのような部分には、本発明の免疫特異的ポリペプチドの血清半減期を向上又は増加させる部分も含まれる。ポリペプチドの血清半減期を増加又は向上させる部分の非限定的な例には、アルブミン及びフィブロネクチン、又はその活性断片、並びにアルブミン及び/又はフィブロネクチン結合タンパク質、例えば、アルブミン及び/又はフィブロネクチン結合性抗体、又はその抗原結合性断片が含まれる(例えば、Holt et al., 2008, Protein Eng Des Sel 21:238-288; Weimer et al., 2008, Thromb Haemost 99:659-667; Yazaki et al., 2008, Nucl Med Biol 35:151-158; Huang et al., 2007, J Pept Sci 12:588-595; 及びStork et al., 2007, Protein Eng Des Sel 20:569-576を参照されたい。それぞれ参照によりその全体が組み込まれる)。

【0115】

そのような治療用部分をポリペプチドとコンジュゲートさせるための技術は、周知であり、例えば、Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., "Antibodies For D

10

20

30

40

50

rug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), 1985, pp. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; 及び Thorpe et al., *Immunol. Rev.*, 62:119-58, 1982を参照されたい(それぞれ参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる)。

【 0 1 1 6 】

10

単独で投与されるか、又は細胞毒性因子(複数可)及び/若しくはサイトカイン(複数可)と組み合わせて投与され、それとコンジュゲートしている治療用部分を有する又は有しない本発明の免疫特異的ポリペプチド又はそのエピトープ結合性断片は、予防薬又は治療薬として使用することができる。

【 0 1 1 7 】

代替的には、本発明の免疫特異的なポリペプチドは、第2の抗体とコンジュゲートさせ、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる米国特許第4,676,980号明細書中でSegalにより記述されているような抗体ヘテロコンジュゲートを形成することができる。

【 0 1 1 8 】

20

本発明の分子は、固体支持体に結合させることもでき、イムノアッセイ又は標的抗原の精製に特に有用である。そのような固体支持体には、これらに限定されないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、又はポリプロピレンが含まれる。

【 0 1 1 9 】

本発明は、本発明の分子の血清半減期を延長又は増加させるためのリボソームの使用も包含する。ある実施形態では、本発明が意図する免疫特異的分子、例えば、 V_L 又は V_H ドメインは、過去に記述されている方法を使用してリボソームとコンジュゲートさせることができ、例えば、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれるMartin et al., 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288を参照されたい。したがって、本発明は、米国特許第5,013,556号明細書で開示された方法などの、血清半減期が延長された、つまり循環時間が増強されたりボソーム調製法を包含する。本発明の方法に使用される好ましいリボソームは、血行から迅速に除去されない、つまり、単核食細胞系(MPS)に摂取されない。本発明は、当業者に公知な一般的方法を使用して調製される、立体的に安定化されたりボソームを包含する。特定の作用機序に拘束されることを意図しないが、立体的に安定化されたりボソームは、かさ高く高度に可動性の親水性部分を有する脂質成分を含有し、これにより血清タンパク質とリボソームとの望ましくない反応が低減され、血清成分とのオプソニン化が低減され、MPSによる認識が低減される。立体的に安定化されたりボソームは、好ましくはポリエチレングリコールを使用して調製される。リボソーム及び立体的に安定化されたりボソームの調製には、例えば、Bendas et al., 2001 *BioDrugs*, 15 (4): 215-224; Allen et al., 1987 *FEBS Lett.* 223: 42-6; Klibanov et al., 1990 *FEB S Lett.*, 268: 235-7; Blum et al., 1990, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1029: 91-7; Torchilin et al., 1996, *J. Liposome Res.* 6: 99-116; Litzinger et al., 1994, *Biochim. Biophys. Acta*, 1190: 99-107; Maruyama et al., 1991, *Chem. Pharm. Bull.*, 39: 1620-2; Klibanov et al., 1991, *Biochim Biophys Acta*, 1062: 142-8; Allen et al., 1994, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13: 285-309を参照されたい。これらの全ては参照によりそれらの全体が本明細書中に組み込まれる。本発明は、特異的器官ターゲティングに適したりボソームを包含し、例えば米国特許第4,544,545号明細書を参照、又は特異的細胞ターゲティングに適したりボソームを包含し、例えば米国特許出願公開第2005/0074403号明細書を参照されたい。本発明の組成物及び方法に使用される特に有用

30

40

50

なりポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、及びPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE, PEG derivatized phosphatidylethanolamine）を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法（reverse phase evaporation method）により作製することができる。リポソームは、所望の直径を有するリポソームを産出するために、定義された細孔サイズのフィルターを通して押し出される。

【0120】

5.5 本発明のポリペプチドの調製及び特徴付け

本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその断片は、結合対の相互作用を特徴付けるための、当技術分野で公知な任意の免疫学又は生化学に基づく方法を使用して、抗原及び/又はエピトープへの特異的結合を特徴付けることができる。本発明の免疫特異的ポリペプチドの、抗原及び/又はエピトープに対する特異的結合は、例えば、これらに限定されないが、ELISAアッセイ、表面プラズモン共鳴アッセイ、免疫沈降アッセイ、親和性クロマトグラフィー、及び平衡透析法を含む免疫学又は生化学に基づく方法を使用して決定することができる。本発明の分子の免疫特異的結合及び交差反応を分析するために使用できるイムノアッセイには、ほんの数例を挙げれば、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着測定法、enzyme linked immunosorbent assay）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集反応アッセイ、補体結合アッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイなどの技術を使用する競合及び非競合アッセイ系が含まれるが、これらに限定されない。そのようなアッセイは、当技術分野において定常的であり、周知である（例えば、Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照されたい。これは参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる）。

【0121】

本発明の免疫特異的ポリペプチド又はその断片は、免疫特異的タンパク質と所望の抗原及び/又はエピトープとの相互作用の動力学的パラメータを特徴付けるための、当技術分野で公知な任意の表面プラズモン共鳴に基づくアッセイを使用して、アッセイすることもできる。本発明では、これらに限定されないが、Biacore AB社（ウプサラ、スウェーデン）から入手可能なBIAcore機器；Affinity Sensors社（フランクリン、米国マサチューセッツ州）から入手可能なIASys機器；Windsor Scientific Limited社（バークス、英国）から入手可能なIBISシステム、Nippon Laser and Electronics Lab社（北海道、日本）から入手可能なSPR-CELLIAシステム、及びTexas Instruments社（ダラス、米国テキサス州）から入手可能なSPR検出装置Spreetaを含む、市販されている任意のSPR機器が使用できる。SPRに基づく技術に関する総説は、これら全てが参照によりそれらの全体が本明細書中に組み込まれるMullet et al., 2000, Methods 22: 77-91；Dong et al., 2002, Review in Mol. Biotech., 82: 303-23；Fivash et al., 1998, Current Opinion in Biotechnology 9: 97-101；Rich et al., 2000, Current Opinion in Biotechnology 11: 54-61を参照されたい。そのうえ、米国特許第6,373,577号明細書；第6,289,286号明細書；第5,322,798号明細書；第5,341,215号明細書；第6,268,125号明細書に記述されているタンパク質間相互作用を測定するためのSPR機器及びSPRに基づく方法は、本発明の方法において企図されており、それらの全ては参照により本明細書中にそれらの全体が組み込まれる。

【0122】

簡潔に言えば、SPRに基づくアッセイは、結合対のメンバーを表面に固定し、結合対の他方のメンバーとの相互作用を溶液中でリアルタイムにモニターすることを伴う。SPRは、複合体の形成又は解離の際に生じる表面付近の溶媒屈折率の変化を測定することに基づく。固定化が起こる表面は、SPR技術の核心であるセンサーチップであり、センサーチップは、金の薄層で被覆されたガラス表面で構成され、分子の表面への結合を最適化するように設計された一連の特殊表面の基底を形成する。種々のセンサーチップが、特に上記で列挙された企業から商業的に入手可能であり、それらの全ては本発明の方法に使用

することができる。センサーチップの非限定的な例には、BIAcore AB, Inc.社から入手可能なチップ、例えば、センサーチップCM5、SA、NTA、及びHPAが含まれる。本発明の分子は、これらに限定されないが、アミン基を介する直接的共有結合、スルフヒドリル基を介する直接的共有結合、アビジン被覆表面へのビオチン結合、炭化水素基へのアルデヒド結合、及びヒスチジントグを介したNTAチップとの結合を含む、当技術分野で公知の固定化法及び化学的作用のいずれかを使用して、センサーチップの表面上に固定できる。

【0123】

5.5.1 本発明の免疫特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

本発明は、本発明の免疫特異的ポリペプチド（例えば、アミノ酸スキャフォールド配列又はアミノ酸スキャフォールド残基などを含む、本発明の方法により同定された1又は複数のCDRを含むウサギV_H又はV_Lドメインを含むポリペプチド）、又は本発明の方法により作製される他の免疫特異的ポリペプチド若しくはその断片、及びそれらのヒト化型をコードするポリヌクレオチド、並びにそれらを作製する方法も含む。

【0124】

本発明の方法は、種々の厳密性条件下で、例えば高度な厳密性、中程度の又はより低い厳密性条件下で、本発明の免疫特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドも包含する。ハイブリダイゼーションは、種々の厳密性条件下で実施することができる。限定ではなく一例として、低厳密性条件を使用する手順は以下の通りである（Shilo and Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6789-6792も参照）。DNAを含有しているろ紙を、35%ホルムアミド、5×SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、5mM EDTA、0.1% PVP、0.1% フィコール、1% BSA、及び500 µg/ml 変性サケ精子DNAを含有する溶液中で、6時間40℃で前処理する。ハイブリダイゼーションは、以下のように改変された同じ溶液中で実行する：0.02% PVP、0.02% フィコール、0.2% BSA、100 µg/ml サケ精子DNA、10%（重量/体積）硫酸デキストラン、及び5~20×10⁶ cpm³²P 標識プローブを使用する。ハイブリダイゼーション混合物中でろ紙を18~20時間40℃でインキュベートし、その後、2×SSC、25mM Tris-HCl (pH 7.4)、5mM EDTA、及び0.1% SDSを含有する溶液中で1.5時間55℃で洗浄する。洗浄溶液を新しい溶液と取り替え、60℃でさらに1.5時間インキュベートする。ろ紙をプロット乾燥（blotted dry）し、オートラジオグラフィーで露光させる。ろ紙は、必要に応じて65~68℃で3回目の洗浄を行い、フィルムに再度露光させる。使用できる低厳密性の他の条件は、当技術分野で周知である（例えば、異種間ハイブリダイゼーションに使用されるような）。限定ではなく一例として、高厳密性条件を使用する手順は以下の通りである。DNAを含有しているろ紙のプレハイブリダイゼーションは、6×SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% フィコール、0.02% BSA、及び500 µg/ml 変性サケ精子DNAで構成される緩衝液中で、8時間から終夜65℃で実行する。100 µg/ml 変性サケ精子DNA及び5~20×10⁶ cpmの³²P 標識プローブを含有するプレハイブリダイゼーション混合液中で、ろ紙を48時間65℃でハイブリダイズさせる。ろ紙の洗浄は、2×SSC、0.01% PVP、0.01% フィコール、及び0.01% BSAを含有する溶液中で、1時間37℃で行う。この後、オートラジオグラフィー前に0.1×SSC中で45分間50℃で洗浄する。使用できる他の高厳密性条件は、当技術分野で周知である。そのような厳密性に適切な条件を選択することは、当技術分野で周知である（例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; さらにはAusubel et al., eds., in the Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, .COPYRGHT. 1987-1997, Current Protocols, .COPYRGHT. 1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.; 特にDyson, 1991, "Immobilization of nucleic acids and hybridization analysis," In: Essential Molecular Biology: A P

10

20

30

40

50

ractical Approach, Vol. 2, T. A. Brown, ed., pp. 111-156, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UKを参照されたい) (それぞれ参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる)。

【0125】

当技術分野で公知な任意の方法により、ポリヌクレオチドを取得し、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定する。

【0126】

本発明の免疫特異的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、免疫グロブリン特異的プローブを用いるハイブリダイゼーションにより、及び/又は可変ドメイン配列の3'及び5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するPCR増幅、又は同定する特定の遺伝子配列、例えば抗体をコードするcDNAライブラリーに由来するcDNAクローンに特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングにより、好適な供給源(例えば、ウサギ抗体、特にウサギ可変ドメインを発現する任意の組織又は形質細胞などの細胞から生成されるcDNAライブラリー、又は単離される核酸、好ましくはポリA+RNA)由来の核酸から生成することができる。その後、PCRにより生成された増幅核酸は、当技術分野で周知な任意の方法を使用して、複製可能なクローニングベクターにクローニングすることができる。

【0127】

本発明の免疫特異的ポリペプチドのヌクレオチド配列が決定されると、ヌクレオチド配列を操作するための当技術分野で周知の方法、例えば組換えDNA技術、部位特異的突然変異誘発、PCRなどを使用して(例えば、Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.及びAusubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記述されている技術を参照されたい。これらはいずれも参照によりそれらの全体が本明細書中に組み込まれる)、このヌクレオチド配列を、異なるアミノ酸配列を有する本発明の分子を作製するため、例えばアミノ酸置換、欠失、及び/又は挿入を生成するために、操作することができる。

【0128】

特定の実施形態では、本発明の方法により同定されたウサギCDRの1又は複数を、定常的な組換えDNA技術を使用して異種性フレームワーク領域内に挿入する。フレームワーク領域は、天然又はコンセンサスフレームワーク領域であってよく、好ましくは、ヒトフレームワーク領域である(ヒトフレームワーク領域のリストは、Chothia et al., 1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479を参照)。好ましくは、フレームワーク領域及びCDRの組合せにより生成されたポリヌクレオチドは、所望の抗原及び/又はエピトープと特異的に結合する免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体をコードする。好ましくは、上記で考察されたように、フレームワーク領域内に1又は複数のアミノ酸置換を行うことができ、好ましくは、アミノ酸置換は、上記抗原及び/又はエピトープに対する本発明の抗体の結合を向上させる。

【0129】

別の実施形態では、ウサギ免疫グロブリン若しくは免疫グロブリン可変ドメインのライブラリー又は当技術分野で利用可能な任意の他のウサギライブラリーを、当技術分野で公知の標準的技術によりスクリーニングし、本発明の免疫特異的ポリペプチドをコードする核酸をクローニングすることができる。

【0130】

5.5.2 本発明の免疫特異的ポリペプチドの組換え発現。

本発明の分子をコードする核酸配列が取得されると、免疫特異的ポリペプチドを作製するためのベクターは、当技術分野で周知の技術を使用して組換えDNA技術により作製することができる。当業者に周知である方法を使用して、本発明のポリペプチドのコード配列、並びに適切な転写及び翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えば、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、及びインビ

が遺伝子組換えが含まれる。(例えば、Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 及び Ausubel et al. eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY に記述されている技術を参照)。

【0131】

本発明の免疫特異的ポリペプチドのヌクレオチド配列を含む発現ベクターは、従来技術(例えば、エレクトロポレーション、リポソーム形質移入、及びリン酸カルシウム沈殿)により宿主細胞に導入することができ、その後、形質移入された細胞を従来技術により培養し、本発明のポリペプチドが作製される。特定の実施形態では、ポリペプチドの発現は、構成的な特異的プロモーター、誘導可能な特異的プロモーター、又は組織性特異的プロモーターにより調節される。

10

【0132】

本発明の組換え型免疫特異的ポリペプチド発現に使用される宿主細胞は、大腸菌などの細菌細胞であるか、又は特に組換え免疫グロブリン分子全体を発現する場合は、好ましくは真核細胞であるかのいずれかである。特に、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要前初期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターを併用したチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO, Chinese hamster ovary cell)などの哺乳動物細胞は、免疫グロブリンの効率的な発現系である(Foecking et al., 1998, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2)。

【0133】

20

本発明の免疫特異的ポリペプチドを発現するためには、種々の宿主発現ベクター系を使用することができる。そのような宿主発現系は、それによりポリペプチドのコード配列が作製され、その後精製することができる媒介体を意味するだけでなく、適切なヌクレオチドコード配列を用いて形質転換又は形質移入した際に、本発明のポリペプチドをインサイツで発現することができる細胞も意味する。これらには、ポリペプチドコード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、又はコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換された細菌(例えば、大腸菌及び枯草菌(*B. subtilis*))などの微生物; ポリペプチドコード配列を含有する組換え酵母発現ベクターを用いて形質転換された酵母(例えば、サッカロマイセス・ピキア(*Saccharomyces Pichia*)); ポリペプチドコード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター(例えば、パキユロウイルス)に感染した昆虫細胞系; 組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV, cauliflower mosaic virus)及びタバコモザイクウイルス(TMV, tobacco mosaic virus))に感染したか、又はポリペプチドコード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)を用いて形質転換された植物細胞系; 又は哺乳動物細胞のゲノム(例えば、メタロチオネインプロモーター)又は哺乳動物ウイルス(例えば、アデノウイルス後期プロモーター; 牛痘ウイルス7.5Kプロモーター)に由来するプロモーターを含有する組換え発現構築体を内包する哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、293T、3T3細胞、リンパ球細胞(米国特許第5,807,715号明細書を参照)、Per C.6細胞(Crucell社により開発されたラット網膜細胞))が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0134】

細菌系では、発現させる免疫特異的ポリペプチドを対象とした使用に依存して、多数の発現ベクターを都合よく選択することができる。例えば、本発明の免疫特異的ポリペプチドの医薬組成物を製造するために、大量のそのようなタンパク質を作製する場合は、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を導くベクターが望ましい場合がある。そのようなベクターには、これらに限定されないが、融合タンパク質が産生されるように、免疫特異的ポリペプチドコード配列を個々にlacZコード領域とインフレームでベクターにライゲーションすることができる大腸菌発現ベクターpUR278(Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791); 及びpINベクター(Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509)などが

50

含まれる。グルタチオン S - トランスフェラーゼ (G S T , glutathione S-transferase) との融合タンパク質として外来性ポリペプチドを発現するためには、pGEXベクターを使用することもできる。一般的に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、マトリックスグルタチオン - アガロースビーズに吸着及び結合した後、遊離グルタチオンの存在下で溶出することにより、溶解細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターは、クローニングされた標的遺伝子産物を G S T 部分から遊離できるように、トロンピン又は X a 因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計されている。

【 0 1 3 5 】

昆虫系では、オートグラフィカリフォルニカ核多角体病ウイルス (A c N P V , Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) が、外来性遺伝子を発現するためのベクターとして使用される。このウイルスは、スポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) 細胞内で増殖する。免疫特異的ポリペプチドコード配列は、ウイルスの非必須領域 (例えば、ポリヘドリン遺伝子) に個々にクローニングし、A c N P V プロモーター (例えば、ポリヘドリンプロモーター) の制御下に配置することができる。

【 0 1 3 6 】

哺乳動物宿主細胞では、ウイルスに基づく多数の発現系を使用することができる。アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合、所望の免疫特異的ポリペプチドコード配列は、アデノウイルス転写 / 翻訳制御複合体、例えば後期プロモーター及び三重リーダー配列 (tripartite leader sequence) にライゲーションすることができる。その後、このキメラ遺伝子を、インビトロ又はインビボ組換えによりアデノウイルスゲノムに挿入することができる。ウイルスゲノムの非必須領域 (例えば、領域 E 1 又は E 3) における挿入は、生存可能で、感染した宿主内で免疫特異的ポリペプチド分子の発現が可能な組換えウイルスをもたらすことになる。 (例えば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359を参照)。挿入した抗体コード配列の効率的な翻訳には、特定の開始シグナルも必要な場合がある。これらのシグナルには、A T G 開始コドン及び隣接配列が含まれる。さらに、インサート全体の翻訳を保証するためには、開始コドンが、所望のコード配列のリーディングフレームと同相でなければならない。これらの外来性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、由来が種々であってよく、天然及び合成の両方であってよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを包含させることにより増強できる (Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544を参照)。

【 0 1 3 7 】

さらに、挿入した配列の発現を調節するか、又は所望の特定の様式で遺伝子産物を修飾及びプロセッシングする宿主細胞株を選択することができる。タンパク質産物のそのような修飾 (例えば、グリコシル化) 及びプロセッシング (例えば、切断) は、タンパク質の機能にとって重要であり得る。様々な宿主細胞が、タンパク質及び遺伝子産物を翻訳後にプロセッシング及び修飾するための特徴的で特異的な機序を有する。適切な細胞系又は宿主系を選択すると、発現される外来性タンパク質の正確な修飾及びプロセッシングを保証することができる。そのためには、一次転写産物の適切なプロセッシング、遺伝子産物のグリコシル化、及びリン酸化の細胞機構を所有する真核生物宿主細胞を使用することができる。そのような哺乳動物宿主細胞には、これらに限定されないが、C H O、V E R Y、B H K、H e l a、C O S、M D C K、2 9 3、2 9 3 T、3 T 3、W 1 3 8、B T 4 8 3、H s 5 7 8 T、H T B 2、B T 2 0 及び T 4 7 D、C R L 7 0 3 0、並びに H s 5 7 8 B s t が含まれる。

【 0 1 3 8 】

組換えタンパク質を長期にわたり高収量で作製するためには、安定的発現が好ましい。例えば、本発明の免疫特異的ポリペプチドを安定的に発現する細胞系を遺伝子操作することができる。宿主細胞は、ウイルス性複製開始点を含有する発現ベクターを使用するのではなく、適切な発現制御エレメント (例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など) により制御された D N A 及び選択可能なマー

カーを用いて形質転換することができる。外来性DNAの導入後、強化培地中で1～2日間、遺伝子操作された細胞の増殖を可能にし、その後選択培地に切り替える。組換えプラスミドの選択可能なマーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞が、自身の染色体にプラスミドを安定的に組み込み、その後クローニングして細胞系統へと増殖することができるフォーカスを形成するように増殖を可能にする。この方法は、本発明の免疫特異的ポリペプチドを発現する細胞系統を遺伝子操作するために都合よく使用できる。そのような遺伝子操作された細胞系統は、本発明の免疫特異的ポリペプチドと直接的に又は間接的に相互作用する化合物のスクリーニング及び評価に特に有用であり得る。

【0139】

これらに限定されないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wigler et al., 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202)、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy et al., 1980, Cell 22:817) 遺伝子を含む多数の選択系を使用することができ、それぞれ tk 細胞、hgp rt 細胞、又は aprt 細胞で使用する可以使用。また、以下の遺伝子の場合、選択基準として代謝拮抗剤耐性を使用することができる：メトトレキサートに対する耐性を付与する dhfr (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527)；ミコフェノール酸に対する耐性を付与する gpt (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072)；アミノグリコシド G-418 に対する耐性を付与する neo (Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; 及び Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215)。使用できる組換え DNA 技術の、当技術分野で一般的に公知な方法は、Ausubel et al. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; 及び Dracopoli et al. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY の 12 及び 13 章; Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150: 1 に記述されており、ヒグロマイシンに対する耐性を付与する hyg ro である (Santerre et al., 1984, Gene 30:147) (上記参考文献はそれぞれ、これによりそれらの全体が組み込まれる)。

【0140】

本発明の免疫特異的ポリペプチドの発現レベルは、ベクター増幅により増加させることができる (総説は、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987) を参照)。免疫特異的ポリペプチドを発現するベクター系のマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞の培養物に存在する阻害剤レベルの増加は、マーカー遺伝子のコピー数を増加させることになる。増幅された領域が、本発明の免疫特異的ポリペプチドのヌクレオチド配列に結合しているため、免疫特異的ポリペプチドの産生も増加することになる (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257) (上記参考文献の各々は、これによりそれらの全体が組み込まれる)。

【0141】

宿主細胞は、第1のベクターが重鎖由来のポリペプチドをコードし、第2のベクターが軽鎖由来のポリペプチドをコードする本発明の2つの発現ベクターを用いて同時形質移入することができる。2つのベクターは、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの同等な発現を可能にする同一の選択マーカーを含有することができる。代替的には、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方をコードする単一ベクターを使用することができる。そのような状況では、軽鎖は、過剰な毒性遊離重鎖を回避するために重鎖の前に配置されるべきである (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197)。重鎖及び軽鎖のコード配列は、cDNA 又はゲノムDNAを含むことができる。

【0142】

本発明の免疫特異的ポリペプチドは、組換えによって発現されると、免疫特異的ポリペプチドを精製するための当技術分野で公知な任意の方法により、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、特にプロテインA後の、特異的抗原に対する親和性による親和性クロマトグラフィー、及びサイズで分離するカラムクロマトグラフィー（sizing column chromatography））、遠心分離、溶解度の違い（differential solubility）、又はタンパク質精製用の任意の他の標準的技術により精製することができる。

【0143】

5.6 予防方法及び治療方法

疾患、障害、又は感染に対する予防用及び／又は治療用作用剤として機能する本発明の免疫特異的ポリペプチドは、疾患、障害、又は感染に伴う1又は複数の徴候を治療、予防、又は寛解するために、動物に、好ましくは哺乳動物に、及び最も好ましくはヒトに投与することができる。本発明の免疫特異的ポリペプチドは、疾患、障害、又は感染の治療、予防、又は管理に有用な1又は複数の他の予防用及び／又は治療用作用剤と組み合わせて投与することができる。ある実施形態では、1又は複数の本発明の免疫特異的ポリペプチドは、疾患の治療に有用な1又は複数の他の治療用作用剤と同時に、哺乳動物に、好ましくはヒトに投与される。「同時に」という用語は、予防用又は治療用作用剤の厳密な同時投与に制限されず、むしろ、本発明の免疫特異的ポリペプチドが他の作用剤と共に作用して、それ以外の方法で投与された場合より利益の増加が提供されるように、本発明の免疫特異的ポリペプチド及び他の作用剤を、ある時間間隔内で順次対象に投与することを意味する。例えば、各予防用又は治療用作用剤は、同時に又は異なる時点において任意の順番で順次投与することができる；しかしながら、同時に投与しない場合、所望の治療的又は予防的効果を提供するように、時間的に十分近接して投与すべきである。各治療用作用剤は、任意の適切な形態で、任意の好適な経路により、別々に投与することができる。

【0144】

種々の実施形態では、予防用又は治療用作用剤は、1時間未満ずらして、約1時間ずらして、約1時間～約2時間ずらして、約2時間～約3時間ずらして、約3時間～約4時間ずらして、約4時間～約5時間ずらして、約5時間～約6時間ずらして、約6時間～約7時間ずらして、約7時間～約8時間ずらして、約8時間～約9時間ずらして、約9時間～約10時間ずらして、約10時間～約11時間ずらして、約11時間～約12時間ずらして、長くとも24時間ずらして、又は長くとも48時間ずらして、投与する。好ましい実施形態では、1回の患者来診で複数の成分を投与する。

【0145】

本明細書中で提供される投与用量及び投与頻度は、治療上有効な及び予防上有効なという用語により包含される。用量及び頻度はさらに、典型的には、投与された特定の治療用又は予防用作用剤、疾患の重症度及び種類、投与経路、並びに患者の年齢、体重、応答性、及び既往症に依存して、各患者に特定の要因により変動しよう。当業者であれば、そのような要因を考慮することにより、例えば文献に報告されており、Physician's Desk Reference (56th ed., 2002)により推奨される用量に従うことにより、好適な治療計画を選択することができる。

【0146】

5.7 組成物及び投与方法

本発明は、本発明の免疫特異的ポリペプチドを含む方法及び医薬組成物を提供する。本発明は、有効量の本発明の融合タンパク質若しくはコンジュゲート分子、又は本発明の融合タンパク質若しくはコンジュゲート分子を含む医薬組成物を対象に投与することにより、疾患、障害、又は感染に伴う1又は複数の徴候を治療、予防、及び寛解する方法も提供する。好ましい態様では、免疫特異的ポリペプチド又は融合タンパク質若しくはコンジュゲート分子は、実質的に精製されている（つまり、その効果を制限するか、又は望ましくない副作用を生じる物質を実質的に含まない）。特定の実施形態では、対象は、動物、好ましくは、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど）及び霊長類

(例えば、カニクイザル及びヒト)などの哺乳動物である。好ましい実施形態では、対象はヒトである。

【0147】

種々の送達システムが公知であり、例えば、リポソーム内封入、微粒子、マイクロカプセル、免疫特異的ポリペプチド又は融合タンパク質を発現可能な組換え細胞、受容体依存性エンドサイトーシス(例えば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照)、レトロウイルス又は他のベクターなどの一部としての核酸構築が、本発明の免疫特異的ポリペプチドを含む組成物を投与するために使用することができる。

【0148】

本発明の免疫特異的ポリペプチドを投与する方法には、これらに限定されないが、非経口投与(例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、及び皮下)、硬膜外、粘膜(例えば、鼻腔内及び経口経路)が含まれる。特定の実施形態では、本発明の免疫特異的ポリペプチドは、筋肉内、静脈内、又は皮下に投与される。組成物は、任意の便利な手段により、例えば点滴又はボーラス注射により、上皮内層又は粘膜皮膚内層(例えば、口腔粘膜、直腸粘膜、及び腸粘膜など)による吸収により投与ことができ、他の生理活性物質と共に投与することができる。投与は、全身性であってもよく又は局所的であってもよい。そのうえ、例えば、吸入器又は噴霧器の使用及びアエロゾル化剤での製剤により、経肺投与も使用することができる。例えば、米国特許第6,019,968号明細書;第5,985,20号明細書;第5,985,309号明細書;第5,934,272号明細書;第5,874,064号明細書;第5,855,913号明細書;第5,290,540号明細書;及び第4,880,078号明細書;並びにPCT国際公開第92/19244号パンフレット;国際公開第97/32572号パンフレット;国際公開第97/44013号パンフレット;国際公開第98/31346号パンフレット、及び国際公開第99/66903号パンフレットを参照されたい。それぞれその全体が参照により本明細書中に組み込まれる。

【0149】

本発明の免疫特異的分子は、徐放性製剤で送達することができる。この製剤は、投与された治療用ポリペプチドの放出延長、及び半減期の延長を提供する。使用に好適な放出制御系には、限定ではないが、拡散制御系、溶媒制御系、及び化学的制御系が含まれる。拡散制御系には、例えば、分子の放出が拡散障壁を介する透過によって制御されるように、本発明の免疫特異的分子がデバイス内に封入されている貯蔵デバイス(reservoir device)が含まれる。一般的な貯留デバイスには、例えば、膜、カプセル、マイクロカプセル、リポソーム、及び中空繊維が含まれる。第2のタイプの拡散制御系は、免疫特異的分子が、速度制御マトリックス(例えば、ポリマーマトリックス)に分散又は溶解されているモノリシック(マトリックス)デバイスである。本発明の免疫特異的分子は、速度制御マトリックスにわたって均一に分散されており、放出速度はマトリックスを介した拡散により制御される。モノリシックマトリックスデバイスで使用するのに好適なポリマーには、天然ポリマー、合成ポリマー、及び合成的に修飾された天然ポリマー、並びにポリマー誘導体が含まれる。

【0150】

障害に伴う1又は複数の徴候の治療、予防、又は寛解に有効であろう本発明の組成物の量は、標準的な臨床技術により決定することができる。製剤に使用されるべき正確な用量は、投与経路及び状態の重症度にも依存し、開業医の判断及び各患者の状況に従って決定されるべきである。有効量は、インビトロ又は動物モデル試験系から導かれる用量反応曲線から推定することができる。

【0151】

一般的には、ヒト化免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体は、免疫特異的ポリペプチド、例えば外来性ポリペプチドに対する免疫応答による他種由来の抗体より長い人体内半減期を有する。したがって、ヒト化免疫特異的ポリペプチド、例えば抗体の用量が低ければ低いほど、より低頻度での投与が可能であることが多い。さらに、本発明の免疫特異的ポ

リペプチド又はその断片の投与用量及び投与頻度は、例えばGタンパク質とのコンジュゲーションなどの修飾により、抗体の取り込み及び組織透過性を増強することにより低減することができる。

【0152】

特定の実施形態では、本発明の医薬組成物を治療が必要な区域に局所投与することが望ましい場合があり、局所投与は、例えば、限定目的ではないが、局所注入により、注射により、又は移植体により達成することができ、上記移植体は、シラスティック膜などの膜又は繊維を含む多孔性物質、非多孔性物質、又はゲル状物質である。好ましくは、本発明の免疫特異的ポリペプチドを投与する場合、免疫特異的ポリペプチド又は融合タンパク質が吸収されない物質を使用するように注意しなければならない。

10

【0153】

治療上及び予防上有効な量の本発明の免疫特異的ポリペプチドを用いた対象の治療には、単回の治療、又は好ましくは一連の治療が含まれ得る。本発明の医薬組成物は、1日1回、1日2回、又は1日3回投与することができる。他の実施形態では、医薬組成物は、週1回、週2回、2週間に1回、1か月に1回、6週間に1回、2か月に1回、1年に2回、又は毎年1回投与することができる。治療に使用される抗体の有効量は、特定の治療の経過中に増加又は減少させることができることも理解されよう。

【0154】

5.7.1 医薬組成物

本発明の組成物には、医薬組成物の製造に有用なバルク薬剤組成物（例えば、不純物の混じった組成物又は滅菌されていない組成物）、及び単位剤形の調製に使用できる医薬組成物（つまり、対象又は患者への投与に好適な組成物）が含まれる。そのような組成物は、予防上又は治療有効量の本明細書中で開示された予防用及び/又は治療用作用剤、又はそれらの作用剤と薬学的に許容される担体との組合せを含む。好ましくは、本発明の組成物は、予防上又は治療有効量の本発明の免疫特異的ポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む。

20

【0155】

特定の実施形態では、「薬学的に許容される」という用語は、動物及びより好ましくはヒトにおける使用について、連邦政府又は州政府の規制当局により承認されているか、又は米国薬局方若しくは他の一般的に認識されている薬局方に列挙されていることを意味する。「担体」という用語は、治療薬がそれと共に投与される希釈剤、アジュバント（例えば、フロイントアジュバント（完全及び不完全）、賦形剤、又は媒体を指す。そのような医薬担体は、水、並びに石油、動物、植物、又は合成由来のもの、例えば、落花生油、大豆油、鉱油、及び胡麻油を含む油類などの滅菌液体であり得る。医薬組成物が静脈内に投与される場合、好ましい担体は水である。特に注射剤用の液体担体としては、生理食塩水、並びにデキストロース水溶液及びグリセリン水溶液も使用することができる。好適な医薬賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、及びエタノールなどが含まれる。所望の場合、組成物は、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤も含有することができる。これらの組成物は、溶剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、及び徐放性製剤などの形態をとることができる。

30

40

【0156】

一般的には、本発明の組成物の成分は、別々に又は単位剤形中に混合されてのいずれかで、例えば、活性作用剤の量を表示したアンプル又はサシェなどの密封容器中の乾燥凍結乾燥散剤又は無水濃縮物として供給される。点滴により投与される場合、組成物は、滅菌した医薬等級の水又は生理食塩水を含有する点滴ボトルを用いて投薬することができる。組成物が注射により投与される場合、成分を投与前に混合できるように、注射用滅菌水又は生理食塩水のアンプルを提供することができる。

【0157】

50

本発明の組成物は、中性形態又は塩形態として製剤することができる。薬学的に許容される塩には、これらに限定されないが、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するイオンなどの陰イオンと形成される塩、及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するイオンなどの陽イオンと形成された塩が含まれる。

【0158】

5.7.2 キット

本発明は、本発明の免疫特異的ポリペプチドの1又は複数を充填した1又は複数の容器を含む医薬パック又はキットを提供する。そのうえ、医薬パック又はキットには、疾患の治療に有用な1又は複数の他の予防用又は治療用作用剤も含むことができる。本発明は、本発明の医薬組成物の成分の1又は複数を充填した1又は複数の容器を含む医薬パック又はキットも提供する。自由選択的に、そのような容器（複数可）には、医薬品又は生物製剤の製造、使用、又は販売を規制する政府当局により規定された形態の注意書きを付随させることができ、注意書きはヒト投与用の製造、使用、又は販売の当局による承認を反映する。

10

【0159】

本発明は、上記の方法で使用できるキットを提供する。1つの実施形態では、キットは、1又は複数の本発明の免疫特異的ポリペプチドを含む。別の実施形態では、キットは、1又は複数の容器に、疾患の治療に有用な1又は複数の他の予防用又は治療用作用剤をさらに含む。他の実施形態では、予防用又は治療用作用剤は、生物学的治療薬又はホルモン治療薬である。

20

【0160】

5.8 治療的有用性の特徴付け及び例証

予防用及び/又は治療用作用剤の組合せは、ヒトに使用する前に、好適な動物モデル系で試験することができる。そのような動物モデル系には、これらに限定されないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、イヌ、ウサギなどが含まれる。当技術分野で周知な任意の動物系が使用できる。本発明の特定の実施形態では、予防用及び/又は治療用作用剤の組合せは、マウスモデル系で試験される。そのようなモデル系は、広く使用されており、当業者に周知されている。予防用及び/又は治療用作用剤は、繰り返し投与することができる。予防用及び/又は治療用作用剤投与の時間的投与計画、及びそのような作用剤が別々に投与されるか又は混合剤として投与されるかなどの手順の幾つかの様子は、様々であり得る。

30

【0161】

本発明の予防用及び/又は治療用作用剤は、動物モデルで試験されると、それらの効能を確立するために臨床試験で試験することができる。臨床試験の確立は、当業者に公知の一般的方法論に従って行われ、本発明の組成物の最適な投与量及び投与経路並びに毒性特性は、定常的な実験法を使用して確立することができる。

【0162】

本発明の予防用及び/又は治療用プロトコルの毒性及び効能は、例えばLD₅₀（集団の50%に致死的な用量）及びED₅₀（集団の50%に治療上有効な用量）を決定するための、細胞培養又は実験動物における標準的な医薬手順により決定することができる。毒性と治療効果との用量比は、治療指数であり、比率LD₅₀/ED₅₀と表すことができる。大きな治療指数を示す予防用及び/又は治療用作用剤が好ましい。毒性副作用を示す予防用及び/又は治療用作用剤を使用してもよいが、非感染細胞に対する潜在的損傷を最小限にし、それにより副作用を低減するために、そのような作用剤を患部組織の部位にターゲティングする送達系を設計するように注意すべきである。

40

【0163】

細胞培養アッセイ及び動物研究から得られたデータは、一連の用量の予防用及び/又は治療用作用剤をヒト使用に製剤する際に使用することができる。そのような作用剤の用量

50

は、好ましくは、毒性がほとんどないか又は全くないED₅₀を含む一連の血中濃度内に収まる。用量は、使用される剤形及び使用される投与経路に依存して、この範囲内で変動してよい。本発明の方法で使用される任意の作用剤の場合、治療上有効な用量は、最初は細胞培養アッセイから評価することができる。細胞培養で決定されるようなIC₅₀（つまり、徴候の最大半阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿中濃度範囲を達成するように、ある用量を動物モデルに処方することができる。そのような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。血漿中のレベルは、例えば、高性能液体クロマトグラフィーにより測定することができる。

【実施例】

【0164】

10

6. 実施例

下記方法は、未処理又は免疫されたウサギに使用することができる。

【0165】

6. 1 免疫特異的で安定的なV_H及びV_Lドメインの単離及び特徴付け

下記方法は、ヒト、マウス、又はラクダ抗体と比較して固有の特性を示し、高い親和性、特異性、及び安定性を表す独特なウサギ可変ドメインの同定及び単離を提供する。

【0166】

6. 1. 1 材料及び方法

ウサギ免疫（自由選択的）

ニュージーランド白ウサギを、12週間の経過にわたって、精製されたVif、HIV GP41、HIVインテグラーゼ、TNFアルファ、vWF、又はDelta4で免疫した。製造業者（Ribi Immunochem Research社製、ハミルトン、米国モンタナ州）の使用説明に従って1mlのアジュバント中に調製した50µgの精製タンパク質を、2～3週間間隔で4回皮下注射でウサギに投与した。最終追加免疫の5日後に、脾臓及び骨髓を回収し、全RNA調製用に使用した。

20

【0167】

RNA単離及びライブラリー構築

組織試料を回収し、製造業者のプロトコールに従ってTRI試薬（Molecular Research Centre社製）を使用して、全RNA単離用に調製した。単離された全RNAを、500µlの無RNase水に溶解し、濃度及び純度を分光測光法により決定した。製造業者のプロトコールを使用してオリゴ（dT）プライマー及び逆転写酵素（上述；Invitrogen社製）を使用して、第1鎖cDNA（first strand cDNA）を全RNAから合成した。

30

【0168】

重鎖及び軽鎖の可変領域をコードする遺伝子の初期増幅は、表1（可変領域の5'部分；図1）に示されているセンスプライマー、及び表2（重鎖及び軽鎖の定常領域の3'部分；図2A～B）に示されているアンチセンスプライマーを使用して実施した。

【0169】

【表 1】

表1.cDNA調製物からウサギVH又はVLドメインを単離するためのセンスプライマー

ドメイン	プライマー	配列
VH	SDVH1-F	5'GGG CCC AGG CGG CC CAG TCG GTG GAG GAG TCC TGG 3' (配列番号 10)
	SDVH2-F	5' GGG CCC AGG CGG CC CAG TCG GTG AAG GAG TCC GAG 3' (配列番号 11)
	SDVH3-F	5' GGG CCC AGG CGG CC CAG TCG YTG GAG GAG TCC GGG 3' (配列番号 12)
	SDVH4-F	5' GGG CCC AGG CGG CC CAG SAG CAG CTG RTG GAG TCC GG 3' (配列番号 13)
VL	SDVK1-F	5' GGG CCC AGG CGG CC GAGC TCG TGM TGA CCC AGA CTC CA 3' (配列番号 14)
	SDVK2-F	5' GGG CCC AGG CGG CC GAGC TCG ATM TGA CCC AGA CTC CA 3' (配列番号 15)
	SDVK3-F	5' GGG CCC AGG CGG CC GAGC TCG TGA TGA CCC AGA CTG AA 3' (配列番号 16)
	SDVΛ-F	5' GGG CCC AGG CGG CC GAGC TCG TGC TGA CTC AGT CGC CCT C 3' (配列番号 17)

【 0 1 7 0 】

【表 2】

表2.cDNA調製物からウサギVH又はVLドメインを単離するためのアンチセンスプライマー

ドメイン	プライマー	配列
VH	SDG-R	5' CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TGA CTG AYG GAG CCT TAG GTT GCC C 3' (配列番号 18)
VL	SDVKj10-R	5' CCT GGC CGG CCT GGCC TTT GAT TTC CAC ATT GGT GCC 3' (配列番号 19)
	SDVKj0-R	5' CCT GGC CGG CCT GGCC TAG GAT CTC CAG CTC GGT CCC 3' (配列番号 20)
	SDVK42j0-R	5' CCT GGC CGG CCT GGCC TTT GAC SAC CAC CTC GGT CCC 3' (配列番号 21)
	SDVΛ-R	5' CCT GGC CGG CCT GGC C GCCTGTGACGGTCAGCTGGGTCCC 3' (配列番号 22)

【 0 1 7 1 】

初期PCRは、25 pmolの各プライマーを使用して、50 μl 反応体積中で実施した。2.5 μlのランダムプライム又はオリゴ-dT cDNAを、鋳型(5 μg mRNA当量)として使用した。初期PCR用の反応条件は、94 で11分間、その後54 / 55 / 72 で30 / 60 / 120秒を30サイクル、及び72 で5分間であった。反応は全て、2.5 mMのMgCl₂、200 μMのdNTP (Roche Diagnostics社製、ブリュッセル、ベルギー)、及び1.25 UのAmpliTaq Gold DNAポリメラーゼ (Roche社製) を用いて実施した。

【 0 1 7 2 】

P C R 産物は、1 % アガロースゲルで分離し、D N A は、QIAquickゲル抽出キット又は QIAEXII (Qiagen社製) を使用して溶出した。

【 0 1 7 3 】

プライマーは全てSfiI部位を有する。D N A 断片を、Sfiで切断し、精製し、ファージミドベクターにクローニングした。ファージミドは、サプレッサー終止コドン (suppress or stop codon) 及び、精製用 (H i s ₆) 及び検出用 (H A) ペプチドタグをコードする配列を含有していた。

【 0 1 7 4 】

ライブラリーライゲーション及び形質転換

およそ50 ng の直線化ベクターD N A (ゲル電気泳動法により既知量に対して決定されるような) を、付着末端ライゲーションのライゲーション用の、1 × リガーゼ緩衝液 (50 mM T R I S p H 7 . 5 、 5 mM M g C l ₂ 、 1 mM ジチオエリトリール、 1 mM A T P 、 p H 7 . 5) 及び1 U の T 4 D N A リガーゼ (Roche社製) を含有する20 µ l 反応液中で、およそ1 ~ 3 倍過剰量のインサートを用いてライゲーションした。ライゲーションは、12 ~ 14 で16 ~ 18 時間インキュベートした。

【 0 1 7 5 】

ライゲーションの結果物及び対応する数のキュベットを、10 分間氷上でインキュベートした。同時に、エレクトロコンピテントな大腸菌を氷上で融解した。2 µ l の各ライゲーション反応物をエレクトロコンピテントな細菌に添加し、キュベットに移し、1 分間氷上で保管した。エレクトロポレーションは、2 . 5 k V 、 25 µ F 、 及び200 で実施した。1 ml の S O C 培地を用いて室温で直ちにキュベットを洗い流し、37 又は30 で1 時間、250 r p m で培養物を振とうした。その後、100 µ g / ml のアンピシリン、30 µ g / ml のカナマイシン、及び17 µ g / ml のクロラムフェニコールを含有するLB 寒天プレートに培養物を播き、37 又は30 で終夜インキュベートした。

【 0 1 7 6 】

ファージミドベクターを単離し、製造業者のプロトコールに従って宿主細胞へエレクトロポレーションした。エレクトロポレーション後、5 ml の S O C を添加し、培養物を37 で1 時間振とうした。その後、10 ml の S B 培地 / c a r b を、37 で1 時間添加した。次に4 . 5 µ l の100 mg / ml カルベニシリンを添加し、各15 ml の培養物に1 ml の V S C M 13 (ヘルパーファージ ; 10¹³ p f u / ml) を添加する前に、培養物をさらに1 時間37 で振とうした。合計170 ml の S B 培地 / c a r b を培養物に添加し、それを37 で2 時間振とうした。280 µ l の50 mg / ml カナマイシンを添加し、培養物を37 で終夜振とうし続けた。翌朝、培養物を遠心分離にかけ、25 ml の P E G - 8000 (ポリエチレングリコール) / N a C l を添加して30 分間氷上でインキュベーションすることにより、ファージ上澄みを沈殿させた。ファージを上澄みから遠心分離し、沈殿物を2 ml の T B S / B S A 1 % に再懸濁し、遠心沈降させ、0 . 2 µ m フィルターで滅菌チューブへとろ過した。

【 0 1 7 7 】

ライブラリーパニング

固定化された抗原 (V i f 、 G p 41 、 インテグラーゼ、 T N F アルファ、 v W F 、 D e l t a 4) を使用して、免疫特異的結合についてファージ発現ライブラリーをパニングした。4 で終夜インキュベーションすることにより、抗原をマイクロタイタープレートに結合させた。その後、37 で1 時間 T B S / B S A 3 % を用いてプレートを洗浄及びブロッキングした。50 µ l の新しく調製したファージライブラリーを各ウェルに添加し、37 で2 時間インキュベートした。パニングは、E L I S A プレートのウェルに固定化された抗原に対するファージ結合、洗浄、トリプシン処理による溶出 (ファージ表面から抗体断片を切り離す) 、 及び再増幅の数回のラウンドから構成されていた。各ラウンド中に、特異的結合クローンが選択及び増幅された。これらのクローンは、3 又は4 ラウンド後に圧倒的に多くなった。

【 0 1 7 8 】

10

20

30

40

50

150 μ l の TBS / 0.5 % Tween20 でウェルを洗浄した。洗浄ステップは、第1ラウンドの5回から、第2ラウンドでは10回、第3及び第4ラウンドでは15回に増加させた。

【0179】

さらなるラウンドのパニングが望ましい場合は、2 μ l の ER2537 を用いた接種により調製し、O.D = 1 まで 37 で2時間振とうさせてインキュベートした2mlの大腸菌培養液にファージ溶出物を移した。溶出物に曝された培養液を、室温で15分間インキュベートした。事前に暖めておいた6mlのSB培地 / carb を添加し、37 で1時間振とうさせ、その後1mlのVC SM13 (ヘルパーファージ) 及び事前に暖めておいた91mlのSB培地 / carb を添加した。培養液を37 で2時間振とうし、その後140 μ l の50 mg / ml カナマイシンを添加し、その後37 で終夜振とうした。次のラウンドのパニングを行うために、抗原被覆プレートに記載の通り準備した。その後、第2ラウンドのパニングを、同じプロトコールに従って繰り返した。

10

【0180】

パニング後、抗原被覆プレート (記載の通り準備された) に結合させることにより貯留ファージを試験し、HRPコンジュゲート抗HA (1 : 2000) により検出して、単一クローン分析の継続に値するかどうかを評価した。

【0181】

CAT融合単ドメイン抗体ライブラリーの構築

CAT遺伝子は、PCRによりpCAT (Stratagene社製) から増幅し、EcoRI及びSphI制限部位を使用してpET由来のプラスミドに挿入して、pE-CATを生成した。本来は可変ドメインをクローニングするために使用される5' PCRプライマーも、2つの連続した異なるSfiIクローニング部位、及びCAT遺伝子の始まりの直前にあるアンバーコドン (TAG) を含有するように設計した。CAT遺伝子に融合された本発明者らの単ドメイン抗体ライブラリーをクローニングするためには、SDVH及びSDVL断片を、各p-SDVH (VHドメインを発現するプラスミド) 及びpSDVL (VLドメインを発現するプラスミド) ライブラリーベクターから、又はパニングにより選択されたファージミドベクターからPCRにより作製した。その結果生じたSDVH及びSDVLのPCR断片をゲル精製し、制限エンドヌクレアーゼSfiIで消化し、SfiIで適切に切断したベクターpE-CATに個別にクローニングした。pSDVH-CAT及びpSDVL-CAT構築体は、N末端His₆ 親和性タグ及びアンピシリン耐性遺伝子も含む、強力なLacプロモーターの制御下にある。代替的には、SDVH又はSDVL断片は、クローニングされた配列をCATとの融合タンパク質として発現するように設計されている容易に入手可能なベクター (例えばPCFN1ベクター) にクローニングすることができる (Maxwell, et al., 1999, J Prot Sci 8:1908-1911を参照されたい。これは参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる; 図5)。

20

30

【0182】

クロラムフェニコール耐性分析

クロラムフェニコール耐性アッセイは、各単ドメインCAT融合ライブラリーを用いてER2738細胞 (New England Biolabs, Inc社製) を形質転換することにより実施した。形質転換混合物を5mlのSOCに接種し、1時間37 でインキュベートした。次に、3 μ l の100 mg / ml アンピシリンを有する10mlのSB培地を、各ライブラリーに添加した。合計15mlの各培養物を37 で1時間振とうした。続いて、4.5 μ l の100 mg / ml アンピシリンを添加し、培養物を37 で1時間振とうした。その後、85 μ l の100 mg / ml アンピシリンを有する85mlのSB培地を添加し、培養物を37 で終夜増殖させた。翌日、600 μ l の各培養物を使用して、100 μ g / ml のアンピシリンを含有する20mlのSB培地に接種した。CAT融合単ドメインタンパク質の発現は、培養物の光学密度が0.9 (600 nmで) に達した時に0.5 mM IPTG を添加することにより誘導した。37 で2時間のインキュベーション後、100 μ l 等量の各ライブラリーを、IPTG (200 μ g / ml) 及び種々の濃度のクロラムフェニコールを有する寒天プレートにプレーティングした。プレートを37 Cで

40

50

16～20時間培養した。耐性のレベルは、37でのインキュベーション期間後にコロニーが出現したクロラムフェニコールの最高レベルとして定量化した。

【0183】

安定性分析

パニング及びノ又はクロラムフェニコール耐性アッセイ（又は両方の組合せ）により選択されたクローンの安定性確認は、加熱又は塩化グアニジウム（GdmCl）の濃度増加に応答した変性遷移を内部蛍光によりモニターすることにより実施した。発現及び単離されたクローンを、6μMの濃度に希釈した。内部蛍光は、280又は295nmの波長で310～440nmまで記録された発光スペクトルを用いて決定した。蛍光スペクトルは、溶液の背景蛍光を補正した。図6Aは、加熱の増加に応答した本発明のV_Lドメインの代表的な変性遷移曲線を描写している。図6Bは、GdmCl濃度の増加に応答した本発明のV_Lドメインの代表的な変性遷移曲線を描写しており、蛍光測定前に、6μMのタンパク質試料を、各GdmCl濃度につき25で終夜インキュベートしておいた。

10

【0184】

配列分析

パニング及びノ若しくはクロラムフェニコール耐性、又はその両方の組合せにより選択されたベクタークローンを培養物に接種し、1mM IPTG（イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド、isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside）で培養物を誘導し、結合を試験した。DNAフィンガープリント法（PCRによる増幅後の様々なサイズの断片の分析）、及びPCR産物をコードする抗体断片のAluI分析（幾つかの配列でDNAを消化する酵素）を、クローン中の多様性に対する試験と同時に実施した。その後、選択されたクローンをDNA配列分析にかけ、さらなる分析のために遺伝子III産物無しで発現させた。

20

【0185】

6.1.2 結果

重鎖可変ドメイン

表3～6は、安定性アッセイ及びノ又はファージパニングを用いた安定性アッセイにより選択されたウサギ重鎖可変ドメインの代表的なフレームワーク配列を表す。選択されたクローンを初期貯留と比べて配列分析することにより、以下の配列が安定性及びノ又は親和性の増強を提供することが示された：VH FR1ドメインの場合、QEQLMETESGGGAEGGLVKPGASLTLTCTAS（配列番号57）；VH FR2ドメインの場合、WVRQAPGKGLEWIG（配列番号69）；VH FR3ドメインの場合、YATWVNGRFTLSRDIDQSTGCLQLNSLTAADTATYYCAR（配列番号95）；及びVH FR4ドメインの場合、WGQGLTVTVSS（配列番号139）。

30

【0186】

さらなる点突然変異研究により、以下のアミノ酸残基の1又は複数の存在が、V_Hドメインに安定性及びノ又は親和性の増強を付与したことが示された：46位のフェニルアラニン（FR2ドメイン内）、53位のグルタミン酸（FR2ドメイン内）、54位のアルギニン（FR2ドメイン内）、56位のグリシン（FR2ドメイン内）、58位のアラニン（FR2ドメイン内）、及び126位のアルギニン（FR4ドメイン内）。CDRドメイン内の分析及び点突然変異研究により、44位のシステイン（最後のCDR1残基）及びノ又は、59位のシステイン（CDR2の最初の残基）の存在が、安定性及びノ又は親和性の増強を付与したことも示された。これらのシステインは、ドメインの三次元構造を安定させるように作用すると考えられている。アミノ酸位置は、図3に示されている配列アラインメント内の位置による。

40

【0187】

【表 3】

表3.本発明の方法により選択されたV_H FR1ドメインのアミノ酸配列

配列番号	アラインメント位置 1~31
23	QQQLV--ESGGR----LVKPDETLTITCTVS
24	-QSVE--ESGGG----LVTPGTPLTLTCTVS
25	-QSLE--ESGGG----LVQPGGSLKVSCKAS
26	-QSLE--ESGGR----LVTPGTPLTLTCTVS
27	QQQLM--KSGGG----LVQPGGSLTLSCCKAS
28	-QSLE--ESGGR----LVTPGGSLTPTCTVS
29	-QSVE--ESGGR----LVKPDETLTLTCTVS
30	-QSVE--ESRGR----LVTPGTPLTLTCTVS
31	QEQLV--ESGGG----LVQPGGSLKLSCCKAS
32	QQQLV--ESGGG----LVQPGGSLKLSCCKAS
33	-QSMK--ESEGR----LVTPGGSLTLTCTVS
34	-QSVE--ESRGR----LVTPGGSLTLTCTVS
35	-QSVE--ESGGG----LVQPGGSLKVSCKAP
36	-QSLE--ESGGR----LVTPGGSLTLTCTVS
37	-QSVE--ESGGR----LVTPGGSLTLTCTVS
38	QEQLM--ESGGG----LVQPGGSLTLSCCKAS
39	-QSLE--ESGGR----LVTPGTPLTLTCTAS
40	QQQLV--ESGGG----LVQPGGSLTLSCCKAS
41	-QSVE--ESGGR----LVTPGTPLTLTCTVS
42	-QSVE--ESRGG----LVQPGGSLKVSCKAS
43	-QSVE--ESRGG----LFKPTDTLTLTCTVS
44	-QSVE--ESGGR----LISPGGSLTLTCTVS
45	-QSLE--ESGGR----LVKPDETLTLTCTVS
46	-QSVE--ESRGR----LVTPGTPLTLTCTAS
47	-QSVE--ESRGR----LVKPDETLTLTCTVS
48	-QSVE--ESRGD----LVKPEGSALTCTAS
49	-QSLE--ESGGR----LVTPGTPLTLCTIS
50	-QSLE--ESGGR----LVTLGTPLTLTCTVS
51	-QSLE--ESWGR----LVKPDETLTITCTVS
52	-QSVE--ESGGG----LVQPGGSLKLSCCKAS
53	QEQLV--ESGGG----LVKPEGSALTCTAS
54	-QSVE--ESGGN----LVTPGTPLTLTCTVS
55	QQQLM--ESGGG----LVQPGGSLKLSCCKAS
56	QEQLMETESGGGAEGGLVKPGGSLELCCCKAS
57	QEQLMETESGGGAEGGLVKPGASLTCTAS
58	--QSLE-ESGGR----LVTPGTPLTLTCTVS
59	--QSVE-ESRGD----LVKPGASLTCTAS
60	--QSVE-ESGGR----LITPGGSLTLTCTVS
61	--QSLE-ESGGD----LVKPGASLTCTAS
62	--QSVE-ESRGR----LVTPGTPLTLTCTVS
63	QEQLMETESGGG----LVKPGASLTCTAS

64	--QSLE-ESGGD----LVQPGASLTCTAS
65	-QQQLV-ESGGD----LVKPEGSALTCTAS
66	--QSLE-ESGGD----LVKPEGSALTCTAS

【表 4】

表4.本発明の方法により選択されたV_H FR2ドメインのアミノ酸配列

配列番号	アラインメント位置 45～58
67	WVRQAPGEGLEWIG
68	WVRQAPGKGLQYIG
69	WVRQAPGKGLEWIG
70	WVRQAPGKGLDWIG
71	WVRQAPGEGLDWIG
72	WVRQAPGKGLEYIG
73	WGRQAPREGLEWIG
74	WVRQAPGKRLEWIG
75	WVRQAPGKGLEWVA
76	WVRQAPEKGLEWIG
77	WVRQAPGKGLEWIA
78	WFRQAPGKGLEWIA
79	WFRQAPGKGLEWIG
80	WFRQAPGKELEWIG
81	WFRQAPGKGREWIG
82	WFRQAPGKGLEGIG
83	WVRQAPGKELEWIG
84	WVRQAPGKEREWIG
85	WVRQAPGKELEGIG
86	WVRQAPGKGREWIG
87	WVRQAPGKGREGIG
88	WVRQAPGKGLEGIG
89	WFRQAPGKEREWIG
90	WFRQAPGKELEGIG
91	WFRQAPGKGREGIG
92	WVRQAPGKEREGIG
93	WFRQAPGKEREGIG

10

20

30

【 0 1 8 9 】

【表 5】

表5.本発明の方法により選択されたV_H FR3ドメインのアミノ酸配列

配列番号	アラインメント位置 70~110
94	YASWAKGRFTIS-KTSSTTVDLKITSP--TTEDTATYFCAR
95	YATWVNGRFTLSRDIDQSTGCLQLNSL--TAADTATYYCAR
96	YATWAKGRFTIS-KTS-TTVNLQMETTSLTTEDTATFFCAR
97	YATWAKGRFTIS-KTSSTTVTLQMETTSLTAADTATYFCAR
98	YASWAKGRFTIS-KTS-TTVDLKITSP--TTEDTATYFCAS
99	YASWAEGRFSIS-KASSTTVTLQMETTSLTAADTATYFCAR
100	YANWAKGRFTIS-KTS-TTVDLKITSP--TTEDTATYFCVR
101	YASWPQGRFTIS-VTSSTTVTLQMETTSLTAADTATYFCAK
102	YASWAKGRFTIS-QTS-TTVDLKITSP--TTEDTATYFCAR
103	YATWAKGRFTIS-KPSSTTVTLQMETTSLTAADTATYFCAR
104	YANWAKGRFTIA-KTSSTTVTLQMETTSLTAADTATYFCAR
105	YASWAKGRFTIS-KTS-TTVDLKITSP--TTEDTATYFCAR
106	YPSWVDGRFTIS-KTS-TTVDLKITSP--TTEDTATYFCAR
107	YADWVTGRFTISSHNAQNTLYLQLNSL--TAADTATYFCAR
108	YANWAKGRCTIS-KTS-TTVDLKITSP--TTEDTATYFCAP
109	YATWVNGRRLTISSHNAQNTLYLQLNSL--TAADTATYFCAR
110	YANWAKGRFTIS-KTP-TTVDLKINS--TTEDTATYFCAR
111	YADWAKGRFTIS-KTS-TTVDLKITSP--TTEDTATYFCAR
112	YADWAKGRFTIS-KTS-TTMDLKITSP--TTEDTATYFCGR
113	YASWVNGRFTISSRNAQNTLYLQLNSL--TAADTATYFCAR
114	YASWVNGRFTISSDNAQNTVDLQLNSL--TAADTATYFCAR
115	YANWAKGRFTSS-KTS-TTVDLKITSP--TTEDTATYFCAR
116	YANWAKGRFTIS-KTS-TTVDLKIASP--TTEDTATYFCVR
117	YASWAEGRFTIS-KASSTTVDLKMTSL--TTEDTATYFCAR
118	YANWAKGRFTIS-RTS-TTVDLKMTSL--TTEDTATYFCAR
119	YASWAKGRFTIS-KTSSTTVDLKMTSL--TTEDTATYFCAR
120	YANWAKGRFTIS-KASSTTVELKMTGL--TTEDTATYFCAR
121	YASWVNGRFTISSHNAQNTLYLQLNSL--TAADTATYFCAR
122	YANWARGRFTIS-RTS-TTVDLKMTSL--TTEDTATYFCGR
123	YASWVNGRFTISRTS--TTVDLKMTSL--TTEDTATYFCIR
124	YARWAKDRVTSKTS--TTVDLKITSP--TTEDTATYFCAR
125	YANWAKGRFTISKTS--TTVDLEIISP--TKEDTATYFCAT
126	YANWAKGRFTISKAS--TTVDLKITSP--TTEDTATYFCVR
127	YANWARGRFTISKTS--TTVDLKMTSP--TTEDTATYFCAR
128	YATWAKGRFTISKTS--TTVDLKVTSP--TTEDTATYFCAS
129	YPSWAEGRFTISKTS--TTVDLKIASP--ATEDTATYFCAR
130	YASWAKGRFTISRTS--TTADLRITSP--TIEDTATYFCAR
131	YANWAKGRFTISKTS--TTVDLKMTSL--TAADTATYFCAR
132	YATWAKGRFTISKTS--TTVDLKMTSL--TTEDTATYFCTR
133	YANWAKGRFTIS-RTS-TTVDLKMTSP--TTEDTATYFCIR
134	YASWAEGRFTIS-RTS-TTVDLKMTSP--TTEDTATYFCAR

135	YASWAKGPFTIS-KTS-TTVDLKMTSP--TTEDMATYFCAR
136	YASWAKGRFTIS-KTS-TTVDLKITSP--ITEDTATYFCIR
137	YASWVNGRFTISSDNAQNTVDLQMNLSL--TAADTATYFCAR
138	YANWVNGRFTISLDNAQNTVFLQMTSL--TAADTATYFCAR

【表 6】

表6.本発明の方法により選択されたV_H FR4ドメインのアミノ酸配列

配列番号	アラインメント位置 126～136
139	WGQGT ¹ LVTVSS
140	WPGGT ¹ LVTVSS
141	WGQGIL ¹ TVTVSS
142	WGQ ¹ GALVTVSS
143	WPGGT ¹ LVTVSS
144	WGQGT ¹ LVTVSS
145	WPGGT ¹ LVAVSS
146	WGQGT ¹ RVTVSS
147	WPGGT ¹ LVTVSS
148	WGQGS ¹ LVTVSS
149	RGQGS ¹ LVTVSS

10

【0191】

軽鎖可変ドメイン

表7～10は、安定性アッセイ及びファージパニングにより選択されたウサギ軽鎖可変フレームワークドメインの代表的な配列を表す。選択されたクローンを初期貯留と比べて配列分析することにより、以下の配列が安定性及び／又は親和性の増強を提供することが示された：V_L FR1ドメインの場合、ELVLTQTPPSLSASVGETVRIRC（配列番号150）又はELVLTQTPSSVSAAVGGTVTINC（配列番号155）；V_L FR2ドメインの場合、WYQQKPEKPPTLLIS（配列番号174）又はWYQQKPGQRPKLLIY（配列番号181）；V_L FR3ドメインの場合、GVPPRFSGSGSGTDYTLTIGGVQAEDVATYYC（配列番号183）又はGVSSRFKGSGSGTQFTLTISGVQCADAATYYC（配列番号205）；及びV_L FR4ドメインの場合、FGAGTNVEIK（配列番号206）又はFAFGGGTELEIL（配列番号210）。

20

【0192】

さらなる点突然変異研究により、39位のフェニルアラニン（FR2ドメイン内）の存在及び／又は42位のリジン（FR2ドメイン内）の存在及び／又は91位のシステイン（最後のFR3残基）の存在は、V_Lドメインに安定性及び／又は親和性の増強を付与したことが示された。アミノ酸位置は、図4に示された配列アラインメント内の位置による。

30

【0193】

【表 7】

表7.本発明の方法により選択されたV_L FR1ドメインのアミノ酸配列

配列番号	アラインメント位置 1~23
150	ELVLTQTTPPSLSASVGETVRIRC
151	ELDMTQTPASVSEPVG GTVTIKC
152	ELVLTQTPSPVSAAVGGTVTIKC
153	ELDLTQTPASVSEPVG GTVTIKC
154	ELVLTQTPSSASEPVGGTATIKC
155	ELVLTQTPSSVSAAVGGTVTINC
156	ELDMTQTPASVSAAVGGTVTINC
157	ELDLTQTPASVEVAVGGTVTINC
158	ELDMTQTPSSVSAAVGGTVTINC
159	ELVMTQTPASVSAAVGGTVTINC
160	ELVMTQTPASVEAAVGDSTINC
161	ELVLTQTPASVSEPVG GTVTIKC
162	ELVLTQTPSPVSAAVGGTVTISC
163	ELVMTQTESPV SAPVG GTVTIKC
164	ELVLTQTPSSKSV PVGETVTINC
165	ELDMTQTPSSKSV PVRGTVSISC
166	ELVLTQSPSSKSV PVGDTVINC
167	ELDLTQTTPPSLSASVGETVRIRC
168	ELDLTQTPASVEAAVGGTVTIKC
169	ELVMTQTPSPVSAAVGGTVTISC
170	ELVLTQTPSSKSV PVGDTVINC
171	ELVLTQSPS-VSGAVGGTVINC
172	ELVLTQTPSSVEAAVGGTVTIKC
173	ELVLTQTPASVEAAVGGTVTIKC

10

20

【 0 1 9 4 】

【表 8】

30

表8.本発明の方法により選択されたV_L FR2ドメインのアミノ酸配列

配列番号	アラインメント位置 38~52
174	WYQQKPEKPPTLLIS
175	WYQQKPGQPPKLLIY
176	WYQQKPGQPPKRLIY
177	WYQLKPGQPPKLLIY
178	WYQQKPGQPPKPLIY
179	WFQQKPGQPPKLLIY
180	WYQQKPGKPPTLLIS
181	WYQQKPGQRPKLLIY
182	WYQQKAGKPPTLLIY

40

【 0 1 9 5 】

【表 9】

表9.本発明の方法により選択されたV_L FR3ドメインのアミノ酸配列

配列番号	アラインメント位置 60～91
183	GVPPRFSGSGSGTDYTLTIGGVQAEDVATYYC
184	GVSSRFKSGSGSGTEFTLTISGVQCDDAATYYC
185	GVSSRFKGSRSRGTEYTLTISDLECADAATYYC
186	GVSSRFKSGSGSGTEFTLTISDVQCDDAATYYC
187	GVPSRFKSGSGSGTEFTLTISDLECADAATYYC
188	GVPSRFRGSGSGSGTEFTLTISGMKAEDAATYYC
189	GVSSRFKSGSGSGTQFTLTISDLECDDAATYYC
190	GVPSRFKSGSGSGTEYTLTISGVECDAAATYYC
191	GVPPRFSGSGAGTQFTLTISDLECDDAATYYC
192	GVPSRFKSGSGSGAQFTLTISDLECDDAATYYC
193	GVPSRFKSGSGSGTQFTLTISDLECDDAATYYC
194	GVPSRFKSGSGSGTEFTLTISGVQCDDAATYFC
195	GVPSRFKSGSGSGTQFTLTISDVVCDDAATYYC
196	GVPSRFKSGSGSGTDFTLTISSECDAAATYYC
197	GVPSRFSGSGSGTQFTLTISDLECDDAATYYC
198	GVPPRFSGSGSGADYTLTIGGVQAEDAATYYC
199	GVPSRFKSGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYC
200	GVSSRFKSGSGSGTQFTLTINDLECDDAATYYC
201	GVPSRFKSGSGSGTQFTLTISDVVCDDAATYGC
202	GVPSRFKSGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC
203	GVPSRFSGSGSGTEFTLTINDLDCDDAATYYC
204	GVPSRFKSGSGSGTQFTLTISDLECADAATYYC
205	GVSSRFKSGSGSGTQFTLTISGVQCADAATYYC

10

20

【 0 1 9 6 】

【表 1 0】

表10.本発明の方法により選択されたV_L FR4ドメインのアミノ酸配列

配列番号	アラインメント位置 106～116B
206	F--GAGTNVEIK-
207	F--GGGTEVVVK-
208	F--GGGTELEIL-
209	F--GGGTQLTVTG
210	FAFGGGTELEIL-

30

【配列表】

0005791895000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100188352
弁理士 松田 一弘
- (74)代理人 100131093
弁理士 堀内 真
- (74)代理人 100150902
弁理士 山内 正子
- (74)代理人 100141391
弁理士 園元 修一
- (74)代理人 100198074
弁理士 山村 昭裕
- (74)代理人 100172797
弁理士 有馬 昌広
- (72)発明者 ブラス ゴンカルベス ジョアン マヌエル
ポルトガル国 モンチジョ 2 8 7 0 - 1 5 9 3 2 1 - 4 階 アヴェニダジョアン 2 3
- (72)発明者 カスタニエイラ アイレス ダ シルバ フレデリコ ヌノ
ポルトガル国 リスボア 1 9 0 0 - 0 1 9 3 番イーエスキュー . ルアアクトルイシドロ 2 6

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 特表 2 0 0 5 - 5 3 5 3 4 1 (J P , A)
J. Biol. Chem., (2000), 275, [18], p.13668-13676
Gene, (1993), 126, [1], p.109-113
Microb. Pathog., (2004), 37, [2], p.95-105

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 P 2 1 / 0 8
C 0 7 K 1 6 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
P u b M e d