(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-518062
(P2010-518062A)
(43)公表日　平成22年5月27日(2010.5.27)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/00	(2006.01)	C07K	16/00	ZNA	4H045
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 200 頁）

(21)出願番号　特願2009-548740 (P2009-548740)
(86)(22)出願日　平成20年2月8日(2008.2.8)
(85)翻訳文提出日　平成21年10月5日(2009.10.5)
(86)国際出願番号　PCT/GB2008/000453
(87)国際公開番号　WO2008/096158
(87)国際公開日　平成20年8月14日(2008.8.14)
(31)優先権主張番号　11/704,832
(32)優先日　平成19年2月8日(2007.2.8)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　502197046
ドマンティス　リミテッド
イギリス国　ティーダブリュ８　９ジーエス　ミドルセックス，ブレントフォード，グレート　ウェスト　ロード　９８０
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100122389
弁理士　新井　栄一
(74)代理人　100111741
弁理士　田中　夏夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】血清アルブミンに対する抗体単一可変ドメイン

(57)【要約】
本発明は、第1の結合特異性を有する第1の免疫グロブリン可変ドメイン及び第2の結合特異性を有する相補的又は非相補的な免疫グロブリン可変ドメインを含む二重特異性リガンドを提供する。

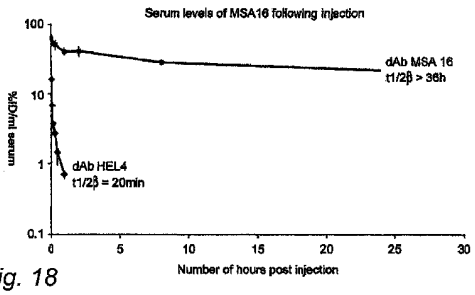


Fig. 18

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗体単一可変ドメインを含むリガンドであって、抗体単一可変ドメインが、血清アルブミンと特異的に結合し、かつdAb7r14、dAb7h11、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、drdAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7pからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むリガンド。
【請求項２】
一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドであって、前記一つ又は複数の単一可変ドメインのうちの少なくとも一つが、血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインであり、前記一つ又は複数の単一可変ドメインが、非天然単一可変ドメインであるリガンド。
【請求項３】
一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドであって、前記一つ又は複数の単一可変ドメインのうちの少なくとも一つが、血清アルブミンと特異的に結合する抗体単一可変ドメインであるリガンド。
【請求項４】
血清アルブミンと特異的に結合する単量体抗体単一可変ドメインを含む、請求項3に記載のリガンド。
【請求項５】
前記単量体抗体単一可変ドメインが薬物とコンジュゲートしている、請求項4に記載のリガンド。
【請求項６】
二重特異性リガンドであり、前記二重特異性リガンドが第1の抗体単一可変ドメインを含み、前記第1の抗体単一可変ドメインが血清アルブミンと特異的に結合する、請求項4に記載のリガンド。
【請求項７】
第2の抗体単一可変ドメインをさらに含み、前記第2の抗体単一可変ドメインが血清アルブミン以外の標的と特異的に結合する、請求項6に記載の二重特異性リガンド。
【請求項８】
a.前記第1の抗体単一可変ドメイン及び前記第2の単一抗体単一可変ドメインそれぞれが抗体重鎖単一可変ドメインであるか、又は
b.前記第1の抗体単一可変ドメイン及び前記第2の単一抗体単一可変ドメインそれぞれが抗体軽鎖単一可変ドメインであるか、又は
c.前記第1の抗体単一可変ドメインが抗体重鎖単一可変ドメインであり、前記第2の単一抗体単一可変ドメインが抗体軽鎖単一可変ドメインであるか、又は
d.前記第1の抗体単一可変ドメインが抗体軽鎖単一可変ドメインであり、前記第2の単一抗体単一可変ドメインが抗体重鎖単一可変ドメインである、
請求項7に記載の二重特異性リガンド。
【請求項９】
請求項8に記載の二重特異性リガンドを含むIgGであって、四つの抗体単一可変ドメインを含むIgG。
【請求項１０】
前記抗体単一可変ドメインが一組の四つのカバット抗体フレームワーク領域(FR)を含み、前記組がヒトフレームワーク生殖系列抗体遺伝子セグメントによってコードされている、請求項3に記載のリガンド。
【請求項１１】

抗体重鎖単一可変ドメインを含み、前記抗体重鎖単一可変ドメインが、dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、及びそれと少なくとも80%同一のアミノ酸配列からなる群から選択される抗体重鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列を含む、請求項3、4及び5のいずれか一項に記載のリガンド。

【請求項１２】

抗体軽鎖単一可変ドメインを含み、前記抗体軽鎖単一可変ドメインが、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、drdAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2、並びにそれと少なくとも80%同一のアミノ酸配列からなる群から選択される抗体軽鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列を含む、請求項3、4及び6のいずれか一項に記載のリガンド。

【請求項１３】

血清アルブミンと特異的に結合する抗体単一可変ドメインを含み、前記抗体単一可変ドメインが、dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2からなる群から選択される抗体単一可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体単一可変ドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合する、請求項3、4、及び6のいずれか一項に記載のリガンド。

【請求項１４】

前記抗体単一可変ドメインが、dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2からなる群から選択される抗体単一ドメイン抗体からの一つ又は複数のCDRを含む、請求項3又は4に記載のリガンド。

【請求項１５】

前記抗体単一可変ドメインが、CTLA4、リポカリン、ブドウ球菌プロテインA(SpA)、アフィボディ、アビマー、GroEl、GroES、トランスフェリン及びフィブロネクチンからなる群から選択されるフレームワークをさらに含む、請求項14に記載のリガンド。

【請求項１６】

前記第2の抗原又はエピトープ結合特異性が、サイトカイン、サイトカイン受容体、酵素、酵素補因子及びDNA結合タンパク質からなる群から選択される抗原に対する結合特異性である、請求項7に記載のリガンド。

【請求項１７】
前記抗体単一可変ドメインが、表面プラズモン共鳴によって決定される、1×10^{-3}M以下、1×10^{-4}M以下、1×10^{-5}M以下、1×10^{-6}M以下、1×10^{-7}M以下、1×10^{-8}M以下、及び1×10^{-9}M以下からなる群から選択される解離定数(Kd)でエピトープ又は抗原と特異的に結合する、請求項2、3、6、及び8のいずれか一項に記載のリガンド。
【請求項１８】
標識、タグ及び薬物からなる群から選択される一つ又は複数の要素をさらに含む、請求項1、2、4及び6のいずれか一項に記載のリガンド。
【請求項１９】
請求項2、3、4及び6のいずれかに記載のリガンド、並びにその担体を含む組成物。
【請求項２０】
単一可変ドメインを含むリガンドであって、前記単一可変ドメインがヒト血清アルブミン及び非ヒト血清アルブミンと相互に10倍以内のKd値で特異的に結合し、前記単一可変ドメインが非天然単一可変ドメインであるリガンド。
【請求項２１】
抗体単一可変ドメインを含むリガンドであって、前記抗体単一可変ドメインが、ヒト血清アルブミン及び非ヒト血清アルブミンと相互に10倍以内のKd値で特異的に結合するリガンド。
【請求項２２】
リガンドのTβ半減期がヒト宿主におけるヒト血清アルブミンのTβ半減期と実質的に同じである、請求項21に記載のリガンド。
【請求項２３】
前記抗体単一可変ドメインがヒト血清アルブミン及びマウス血清アルブミンと特異的に結合する、請求項21に記載のリガンド。
【請求項２４】
前記抗体単一可変ドメインがヒト血清アルブミン及びラット血清アルブミンと特異的に結合する、請求項21に記載のリガンド。
【請求項２５】
前記抗体単一可変ドメインがヒト血清アルブミン及びブタ血清アルブミンと特異的に結合する、請求項21に記載のリガンド。
【請求項２６】
前記抗体単一可変ドメインがヒト血清アルブミン及びカニクイザル血清アルブミンと特異的に結合する、請求項21に記載のリガンド。
【請求項２７】
前記抗体単一可変ドメインが抗体重鎖単一可変ドメインである、請求項21に記載のリガンド。
【請求項２８】
前記抗体重鎖単一可変ドメインが抗体VH3単一可変ドメインである、請求項27に記載のリガンド。
【請求項２９】
前記抗体VH3単一可変ドメインがヒト抗体VH3単一可変ドメインである、請求項28に記載のリガンド。
【請求項３０】
前記抗体単一可変ドメインが抗体軽鎖単一可変ドメインである、請求項21に記載のリガンド。
【請求項３１】
前記抗体軽鎖単一可変ドメインが抗体Vκ軽鎖単一可変ドメインである、請求項30に記載のリガンド。
【請求項３２】
DOM7h-9、DOM7h-11、DOM7h-13、DOM7h-14、DOM7r-3及びDOM7r-16、並びにそれと少なく

とも80%同一のアミノ酸配列からなる群から選択される抗体単一可変ドメインのアミノ酸配列を含む少なくとも一つの抗体Vκ単一可変ドメインを含む、請求項30に記載のリガンド。

【請求項３３】

dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2からなる群から選択される抗体単一可変ドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合する少なくとも一つの抗体Vκ単一可変ドメインを含む、請求項30に記載のリガンド。

【請求項３４】

前記抗体単一可変ドメインが一組の四つのカバット抗体フレームワーク領域(FR)を含む、請求項23、24、25及び26のいずれか一項に記載のリガンド。

【請求項３５】

前記一組の四つのカバット抗体フレームワーク領域(FR)が抗体VH3フレームワーク生殖系列抗体遺伝子セグメントによってコードされている、請求項34に記載のリガンド。

【請求項３６】

前記一組の四つのカバット抗体フレームワーク領域(FR)がヒトVκフレームワーク生殖系列抗体遺伝子セグメントによってコードされている、請求項34に記載のリガンド。

【請求項３７】

一組のCDRが一組の四つのカバット抗体フレームワーク領域を含む前記単一可変ドメイン上に移植されており、前記一組のCDRがCDR1、CDR2及びCDR3を含む、請求項34に記載のリガンド。

【請求項３８】

血清アルブミン以外の標的と特異的に結合することができる一つ又は複数の単一可変ドメインをさらに含む、請求項20、21、23、24、25及び26のいずれか一項に記載のリガンド。

【請求項３９】

血清アルブミン以外の標的と特異的に結合することができる前記一つ又は複数の単一可変ドメインが抗体単一可変ドメインである、請求項38に記載のリガンド。

【請求項４０】

前記抗体単一可変ドメインが少なくとも一つのCDR領域を含み、前記少なくとも一つのCDR領域がCDR1、CDR2及びCDR3からなる群から選択され、前記CDR領域のうちの少なくとも一つが抗体V領域又は抗体単一可変ドメインに由来する、請求項21に記載のリガンド。

【請求項４１】

血清アルブミン以外の標的と特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインのうちの少なくとも一つが少なくとも一つのCDR領域を含み、前記少なくとも一つのCDR領域がCDR1、CDR2及びCDR3からなる群から選択され、前記CDR領域のうちの少なくとも一つが抗体V領域又は抗体単一可変ドメインに由来する、請求項39に記載のリガンド。

【請求項４２】

前記抗体単一可変ドメインが、CTLA-4、リポカリン、ブドウ球菌プロテインA(SPA)、GroEL、GroES、トランスフェリン及びフィブロネクチンからなる群から選択される足場をさらに含む、請求項40に記載のリガンド。

【請求項４３】

前記抗体単一可変ドメインが300nM以下のKdでヒト血清アルブミンと特異的に結合する

、請求項21、23、24、25及び26のいずれか一項に記載のリガンド。
【請求項４４】
ヒト血清アルブミンと特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインがヒト血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する、請求項21、23、24、25及び26のいずれか一項に記載のリガンド。
【請求項４５】
二重特異性リガンドであり、
a.血清アルブミンと特異的に結合する前記抗体単一可変ドメイン及び血清アルブミン以外の標的と特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインのそれぞれが抗体重鎖単一可変ドメインであるか、又は
b.血清アルブミンと特異的に結合する前記抗体単一可変ドメイン及び血清アルブミン以外の標的と特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインのそれぞれが抗体軽鎖単一可変ドメインであるか、又は
c.血清アルブミンと特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインが抗体重鎖単一可変ドメインであり、血清アルブミン以外の標的と特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインが抗体軽鎖単一可変ドメインであるか、又は
d.血清アルブミンと特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインが抗体軽鎖単一可変ドメインであり、血清アルブミン以外の標的と特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインが抗体重鎖単一可変ドメインである、
請求項39に記載のリガンド。
【請求項４６】
単一可変ドメインを含むリガンドであって、前記単一可変ドメインがヒト血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合し、前記単一可変ドメインが非天然単一可変ドメインであるリガンド。
【請求項４７】
抗体単一可変ドメインを含むリガンドであって、前記抗体単一可変ドメインがヒト血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合するリガンド。
【請求項４８】
前記抗体単一可変ドメインが非天然抗体単一可変ドメインである、請求項47に記載のリガンド。
【請求項４９】
前記抗体単一可変ドメインが天然抗体単一可変ドメインである、請求項47に記載のリガンド。
【請求項５０】
前記抗体単一可変ドメインが抗体重鎖単一可変ドメインである、請求項47に記載のリガンド。
【請求項５１】
前記抗体重鎖単一可変ドメインが抗体VH3単一可変ドメインである、請求項50に記載のリガンド。
【請求項５２】
前記抗体VH3単一可変ドメインがヒト抗体VH3単一可変ドメインである、請求項51に記載のリガンド。
【請求項５３】
前記抗体単一可変ドメインが抗体Vκ単一可変ドメインである、請求項47に記載のリガンド。
【請求項５４】
前記抗体Vκ単一可変ドメインが、DOM7h-1、DOM7h-8、DOM7h-9、DOM7h-11、DOM7h-12、DOM7h-13及びDOM7h-14、DOM7r-3及びDOM7r-16からなる群から選択される、請求項53に記載のリガンド。
【請求項５５】

前記抗体単一可変ドメインが一組の四つのカバット抗体フレームワーク領域(FR)を含み、前記組が抗体VH3フレームワーク生殖系列抗体遺伝子セグメントによってコードされている、請求項47に記載のリガンド。

【請求項５６】

前記抗体単一可変ドメインが一組の四つのカバット抗体フレームワーク領域(FR)を含み、前記組がＶκフレームワーク生殖系列抗体遺伝子セグメントによってコードされている、請求項47に記載のリガンド。

【請求項５７】

血清アルブミン以外の標的と特異的に結合することができる一つ又は複数の単一可変ドメインをさらに含む、請求項47に記載のリガンド。

【請求項５８】

血清アルブミン以外の標的と特異的に結合することができる前記一つ又は複数の単一可変ドメインが抗体単一可変ドメインである、請求項57に記載のリガンド。

【請求項５９】

前記抗体単一可変ドメインが少なくとも一つの抗体CDR1、CDR2及び/又はCDR3領域を含む、請求項47に記載のリガンド。

【請求項６０】

前記抗体単一可変ドメインが、CTLA-4、リポカリン、ブドウ球菌プロテインA(SPA)、GroEL、GroES、トランスフェリン及びフィブロネクチンからなる群から選択される足場をさらに含む、請求項59に記載のリガンド。

【請求項６１】

前記抗体単一可変ドメインが300nM以下のKdでヒト血清アルブミンと特異的に結合する、請求項47に記載のリガンド。

【請求項６２】

二重特異性リガンドであり、

a.血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する前記抗体単一可変ドメイン及び血清アルブミン以外の標的と特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインのそれぞれが抗体重鎖単一可変ドメインであるか、又は

b.血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する前記抗体単一可変ドメイン及び血清アルブミン以外の標的と特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインのそれぞれが抗体軽鎖単一可変ドメインであるか、又は

c.血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインが抗体重鎖単一可変ドメインであり、血清アルブミン以外の抗原と特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインが抗体軽鎖単一可変ドメインであるか、又は

d.血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインが抗体軽鎖単一可変ドメインであり、血清アルブミン以外の抗原と特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインが抗体重鎖単一可変ドメインである、

請求項58に記載のリガンド。

【請求項６３】

血清アルブミンと特異的に結合する第1の単一可変ドメイン、及び第2の単一可変ドメインを含む融合タンパク質であって、前記第1及び第2の単一可変ドメインのそれぞれが非天然単一可変ドメインであり、1)第1の単一可変ドメインが第2の単一可変ドメインのN末端と連結しているか、又は2)第1の単一可変ドメインが第2の単一可変ドメインのC末端と連結しているか、又は3)第1の単一可変ドメインが第2の単一可変ドメインのN末端及び第2の単一可変ドメインのC末端の両方に結合している、融合タンパク質。

【請求項６４】

追加の単一可変結合ドメインをさらに含み、前記単一可変ドメインが非天然単一可変ドメインであり、前記追加の単一可変結合ドメインが前記第1の単一可変ドメインと隣接しているか、又は前記追加の単一可変結合ドメインが第1の単一可変ドメインのN末端と結合しているか若しくは第1の単一可変ドメインのC末端と結合している、請求項63に記載の融

合タンパク質。
【請求項６５】
第1の単一可変ドメインが抗体単一可変ドメインであり、抗体単一可変ドメインのN末端が第2の単一可変ドメインのCOOH末端と直接連結して接合部を形成し、前記第2の単一可変ドメインの前記COOH末端が前記抗体単一可変ドメインのN末端アミノ酸と結合しており、前記抗体単一可変ドメインが、Vκドメイン、Vλドメイン、抗体重鎖ドメイン、及びVHHドメインからなる群から選択される、請求項63に記載の融合タンパク質。
【請求項６６】
前記抗体単一可変ドメインがVκドメインであり、前記接合部が、XXXDIQ、XXXNIQ、XXXAIQ、XXXAIR、XXXVIW、XXXDIV、XXXDVV、XXXEIV及びXXXETTからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、XXXが第2の単一可変ドメインの最後三つのアミノ酸を表す、請求項65に記載の融合タンパク質。
【請求項６７】
前記抗体単一可変ドメインがVλドメインであり、前記接合部が、XXXQSV、XXXQSA、XXXSYE、XXXSSE、XXXSYV、XXXLPV、XXXQPV、XXXQLV、XXXQAV、XXXNFM、XXXQTV、及びXXXQAGからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、XXXが第2の単一可変ドメインの最後三つのアミノ酸を表す、請求項65に記載の融合タンパク質。
【請求項６８】
前記抗体単一可変ドメインが抗体重鎖単一可変ドメインであり、前記接合部が、XXXQVQ、XXXQMQ、XXXEVQ、XXXQIT、XXXQVT、及びXXXQLQからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、XXXが第2の単一可変ドメインの最後三つのアミノ酸を表す、請求項65に記載の融合タンパク質。
【請求項６９】
前記抗体単一可変ドメインがVHHドメインであり、前記接合部が、XXXEVQ、XXXQVQ、XXXDVQ、XXXQVK及びXXXAVQからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、XXXが第2の単一可変ドメインの最後三つのアミノ酸を表す、請求項65に記載の融合タンパク質。
【請求項７０】
第1の単一可変ドメインが抗体単一可変ドメインであり、抗体単一可変ドメインのCOOH末端が第2の単一可変ドメインのN末端と直接連結して接合部を形成し、前記第2の単一可変ドメインの前記N末端が前記抗体単一可変ドメインのCOOH末端アミノ酸と結合しており、前記抗体単一可変ドメインが、Vκドメイン、Vλドメイン、抗体重鎖ドメイン、及びVHHドメインからなる群から選択される、請求項63に記載の融合タンパク質。
【請求項７１】
前記抗体単一可変ドメインがVκドメインであり、前記接合部が、KVEIKXXX、KLEIKXXX、KVDIKXXX、RLEIKXXX及びEIKXXXからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、XXXが第2の単一可変ドメインの最初の三つのアミノ酸を表す、請求項70に記載の融合タンパク質。
【請求項７２】
前記抗体単一可変ドメインがVλドメインであり、前記接合部が、KVDVLXXX、KLDVLXXX及びQLDVLXXXからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、XXXが第2の単一可変ドメインの最初の三つのアミノ酸を表す、請求項70に記載の融合タンパク質。
【請求項７３】
前記抗体単一可変ドメインが抗体重鎖単一可変ドメインであり、前記接合部が、VTVSSXXXのアミノ酸配列を含み、XXXが第2の単一可変ドメインの最初の三つのアミノ酸を表す、請求項70に記載の融合タンパク質。
【請求項７４】
前記抗体単一可変ドメインがVHHドメインであり、前記接合部が、VTVSSXXXのアミノ酸配列を含み、XXXが第2の単一可変ドメインの最初の三つのアミノ酸を表す、請求項70に記載の融合タンパク質。
【請求項７５】

前記抗体単一可変ドメインがペプチドリンカーを介して前記第2の単一可変ドメインと連結しており、前記ペプチドリンカーが、可撓性リンカー、拘束リンカー及び天然のリンカーからなる群から選択される、請求項65に記載の融合タンパク質。

【請求項７６】

抗体単一可変ドメインのN末端がペプチドリンカーを介して第2の単一可変ドメインのCOOH末端と結合しているか、又は抗体単一可変ドメインのドメインのCOOH末端がペプチドリンカーを介して第2の単一可変ドメインのN末端と結合している、請求項75に記載の融合タンパク質。

【請求項７７】

前記可撓性リンカーがグリシンに富んだリンカー又はセリンに富んだリンカーである、請求項75に記載の融合タンパク質。

【請求項７８】

前記拘束リンカーが、SSSASASSA、GSPGSPG及びATTTGSSPGPTからなる群から選択される配列を有する、請求項75に記載の融合タンパク質。

【請求項７９】

前記天然のリンカーが、KESGSVSSEQLAQFRSLD、EPKIPQPQPKPQPQPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP及びGTNEVCKCPKCPからなる群から選択される配列を有する、請求項75に記載の融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願

本出願は、2002年6月28日出願のPCT/GB02/03014及び2002年12月27日出願の英国出願GB0230202.4の優先権を主張する2003年6月30日出願の国際出願PCT/GB2003/002804の継続出願である2004年12月28日出願の米国出願第11/023959号の一部継続出願であり、その内容は本明細書中に参照により組み込まれる。本出願はまた、2004年6月1日出願のUS60/576271及び2004年12月2日出願のUS60/632361の優先権を主張する2005年5月31日出願のWO2005118642の一部継続出願でもあり、その内容は本明細書中に参照により組み込まれている。本出願はまた、2007年2月8日出願のUS11/704832の優先権も主張する。

【０００２】

本発明は、二重特異性リガンドに関する。詳細には、本発明は、第1の抗原又はエピトープと結合する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン、及び第2の抗原又はエピトープと結合する第2の免疫グロブリン単一可変ドメインを含む二重特異性リガンドを調製する方法を提供する。より詳細には、本発明は、第1及び第2の抗原又はエピトープのうちの少なくとも一つとの結合がリガンドの半減期をin vivoで増加させるように作用する、二重特異性リガンドに関する。複数の結合特異性を含む開及び閉構造のリガンドについて記載する。

【背景技術】

【０００３】

抗体の抗原結合ドメインは二つの別々の領域を含む:重鎖可変ドメイン(V_H)及び軽鎖可変ドメイン(V_L:これはV_κ又はV_λであり得る)。抗原結合部位自体は6個のポリペプチドループによって形成される:V_Hドメインから3個(H1、H2及びH3)並びに3個がV_Lドメインを形成する(L1、L2及びL3)。V_H及びV_LドメインをコードしているV遺伝子の多様な一次レパートリーは、遺伝子セグメントの組合せの再構成によって生成される。V_H遺伝子は、三個の遺伝子セグメント、即ちV_H、D及びJ_Hの組換えによって生成される。ヒトでは、ハプロタイプに応じて約51個の機能的V_Hセグメント(Cook及びTomlinson(1995)Immunol Today、16:237)、25個の機能的Dセグメント(Corbett他(1997)J.Mol.Biol.、268:69)及び6個の機能的J_Hセグメント(Ravetch他(1981)Cell、27:583)が存在する。V_HセグメントはV_Hドメインの第1及び第2の抗原結合ループ(H1及びH2)を形成するポリペプチド鎖の領域をコードしており、一方で、V_H、D及びJ_Hセグメントは一緒になってV_Hドメインの第3の抗原結合ループ(H

3)を形成する。V_L遺伝子は、二つの遺伝子セグメント、V_L及びJ_Lのみの組換えによって生成される。ヒトでは、ハプロタイプに応じて約40個の機能的V_κセグメント(Schable及びZachau(1993)Biol.Chem.Hoppe-Seyler、374:1001)、31個の機能的V_λセグメント(Willians他(1996)J.Mol.Biol.、264:220;Kawasaki他(1997)Genome Res.、7:250)、5個の機能的J_κセグメント(Hieter他(1982)J.Biol.Chem.、257:1516)及び4個の機能的J_λセグメント(Vasicek及びLeder(1990)J.Exp.Med.、172:609)が存在する。V_LセグメントはV_Lドメインの第1及び第2の抗原結合ループ(L1及びL2)を形成するポリペプチド鎖の領域をコードしており、一方で、V_L及びJ_Lセグメントは一緒になってV_Lドメインの第3の抗原結合ループ(L3)を形成する。この一次レパートリーから選択された抗体は、ほぼすべての抗原と少なくとも中等度の親和性で結合するために十分に多様であると考えられている。高親和性抗体は、再構成された遺伝子の「親和性成熟」によって生成され、ここでは、点突然変異が生じ、結合の改善に基づいて免疫系によって選択される。

【０００４】

抗体の構造及び配列の分析により、6個の抗原結合ループのうち5個(H1、H2、L1、L2、L3)が、限定された数の主鎖コンホメーション又はカノニカル構造を保有することが示されている(Chothia及びLesk(1987)J.Mol.Biol.、196:901;Chothia他(1989)Nature、342:877)。主鎖コンホメーションは、(i)抗原結合ループの長さ、並びに(ii)抗原結合ループ及び抗体フレームワーク内の特定の重要な位置での特定の残基、又は残基の種類によって決定される。ループの長さ及び主要残基の分析により、ヒト抗体配列の大多数によってコードされているH1、H2、L1、L2及びL3の主鎖コンホメーションを予測することが可能となっている(Chothia他(1992)J.Mol.Biol.、227:799;Tomlinson他(1995)EMBO J.、14:4628;Williams他(1996)J.Mol.Biol.、264:220)。H3領域は配列、長さ及び構造に関してはるかに多様であるが(Dセグメントを使用するため)、これは、短いループ長では限定された数の主鎖コンホメーションを形成することにもなり、これはループ及び抗体フレームワーク内の重要な位置での特定の残基、又は残基の種類の長さ及び存在に依存する(Martin他(1996)J.Mol.Biol.、263:800;Shirai他(1996)FEBS Letters、399:1。

【０００５】

V_H及びV_L領域の相補的な対を含む二重特異性抗体が当分野で知られている。これらの二重特異性抗体は、必ず2対のV_H及びV_Lを含まなければならず、それぞれのV_H/V_L対は単一の抗原又はエピトープと結合する。記載した方法は、ハイブリッドのハイブリドーマ(Milstein及びCuello AC、Nature 305:537-40)、ミニボディー(Hu他、(1996)Cancer Res 56:3055-3061)、二重特異性抗体(Holliger他、(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90、6444-6448;WO94/13804)、キレート組換え抗体(CRAb;(Neri他、(1995)J.Mol.Biol.246、367-373)、ビスcFv(例えばAtwell他、(1996)Mol.Immunol.33、1301-1312)、「ノブ-イン-ホール」安定化抗体(Carter他、(1997)Protein Sci.6、781-788)を含む。それぞれの場合において、それぞれの抗体種は二つの抗原結合部位を含み、そのそれぞれがV_H及びV_Lドメインの相補的な対によって作られている。それにより、それぞれの抗体が二つの異なる抗原又はエピトープと同時に結合することができ、それぞれの抗原又はエピトープとの結合はV_H及びその相補的なV_Lドメインによって媒介される。これらの技術のそれぞれは、その特定の欠点を示す。例えば、ハイブリッドのハイブリドーマの場合、失活したV_H/V_L対が二重特異性IgGの画分を大幅に減少させる場合がある。さらに、ほとんどの二重特異性手法は、異なるV_H/V_L対の会合、又はV_H及びV_L鎖が会合して二つの異なるV_H/V_L結合部位を再度生じることに依存する。したがって、アセンブルした分子中のそれぞれの抗原又はエピトープに対する結合部位の比を制御することは不可能であるため、アセンブルした分子の多くは一方の抗原又はエピトープとは結合するが他方とは結合しない。一部の例では、両方の抗原又はエピトープに対する結合部位を有する分子の数を向上させるためにサブユニットの界面で重鎖又は軽鎖を操作することが可能であったが(Carter他、1997)、すべての分子が両方の抗原又はエピトープと結合する結果は絶対に得られない。

【０００６】

二つの異なる抗体結合特異性を同一の結合部位内に取り込む可能性の証拠もいくつか存

在するが、これらは一般に、構造的に関連性のある抗原若しくはエピトープ又は幅広い交叉反応性を有する抗体に対応する二つ以上の特異性を表す。例えば、交叉反応性抗体は、ニワトリ卵白リゾチームとシチメンチョウのリゾチーム(McCafferty他、WO92/01047)、又は遊離ハプテンに対して及び担体とコンジュゲートしたハプテンに対して(Griffiths AD他EMBO J 1994 13:14 3245-60)など、通常は二つの抗原の配列及び構造が関連している場合に記載されている。さらなる例では、WO02/02773(Abbott Laboratories)が「二重特異性」を有する抗体分子を記載している。言及されている抗体分子は、その特異性が単一の抗原以上にわたるように、複数の抗原に対して産生又は選択した抗体である。WO02/02773の抗体中のそれぞれの相補的V_H/V_L対は、二つ以上の構造的に関連性のある抗原に対して単一の結合特異性を示し、そのような相補的な対中のV_H及びV_Lドメインは、それぞれが別々の特異性を保有するわけではない。したがって、抗体は、構造的に関連性のある二つの抗原を包含する幅広い単一特異性を有する。さらに、構造的に関連性のない少なくとも二つ(通常はそれ以上)の異なる抗原又はエピトープと反応する、多反応性の天然の自己抗体も記載されている(Casali及びNotkins、Ann.Rev.Immunol.7、515-531)。また、モノクローナル抗体にファージディスプレイ技術を用いてランダムペプチドレパートリーを選択することで、抗原結合部位に適合するペプチド配列の範囲が同定されることも示されている。一部の配列は関連性が高く、コンセンサス配列に当てはまり、一方で、他の配列は非常に異なっており、ミモトープと呼ばれている(Lane及びStephen、Current Opinion in Immunology、1993、5、268-271)。したがって、会合した且つ相補的なV_H及びV_Lドメインを含む天然の四本鎖の抗体が、既知の抗原の大きな母集団のうち数多くの異なる抗原と結合する潜在性を有することが明らかである。同一抗体内で二つの所与の抗原、特に必ずしも構造的に関連性のないものに対する結合部位をどのように作製するかは、あまり明らかとなっていない。

【０００７】

このことに関係し得るタンパク質工学の方法が提案されている。例えば、一つの可変ドメインによって金属イオンに対して、並びに金属イオン及び相補的可変ドメインとの接触によってハプテン(基質)に対する結合活性を有する、触媒抗体が作製できることも提案されている(Barbas他、1993 Proc.Natl.Acad.Sci USA 90、6385-6389)。しかし、この場合、基質(第1の抗原)の結合及び触媒作用は金属イオン(第2の抗原)の結合を必要とすることが提案されている。したがって、V_H/V_L対との結合は単一であるが複数構成要素の抗原に関連する。

【０００８】

ラクダ抗体重鎖単一ドメインから二重特異性抗体を作製する方法が記載されており、一つの抗原に対する結合接触を一つの可変ドメイン中で作製し、第2の抗原に対するものを第2の可変ドメイン中で作製する。しかし、可変ドメインは相補的でなかった。そこで、第1の重鎖可変ドメインを第1の抗原に対して選択し、第2の重鎖可変ドメインを第2の抗原に対して選択し、その後、両方のドメインを同一鎖上で一緒に連結して二重特異性抗体断片を得る(Conrath他、J.Biol.Chem.270、27589-27594)。しかし、ラクダ重鎖単一ドメインは、軽鎖を有さない天然のラクダ抗体に由来するという点で通常とは異なり、実際、重鎖単一ドメインは、ラクダ軽鎖と会合して相補的なV_H及びV_L対を形成することができない。

【０００９】

通常は軽鎖と会合している天然の抗体に由来する単一重鎖可変ドメインもまた記載されている(モノクローナル抗体又はドメインのレパートリーに由来;欧州特許第-A-0368684号参照)。これらの重鎖可変ドメインは、一つ又は複数の関連する抗原と特異的に相互作用することが示されているが、他の重鎖又は軽鎖可変ドメインと組み合わせて二つ以上の異なる抗原に対する特異性リガンドは作製されていない。さらに、これらの単一ドメインは非常に短いin vivo半減期を有することが示されている。したがって、そのようなドメインの治療価値は限られている。

【００１０】

異なる特異性の重鎖可変ドメインを(上述のように)一緒に連結することによって二重特異性抗体断片を作製することが提案されている。この手法の欠点は、単離した抗体可変ドメインが、通常は軽鎖と相互作用し、溶媒に曝されている疎水性界面を有してもよく、且つ単一ドメインが疎水性表面と結合することを可能にする「粘着性」であってもよい。さらに、パートナー軽鎖が存在しない場合、二つ以上の異なる重鎖可変ドメインの組合せ、及び場合によってはその疎水性界面によるその会合が、それらが単独では結合できるリガンドの一方又は両方と結合することを妨げ得る。さらに、この場合、重鎖可変ドメインは相補的軽鎖可変ドメインと会合せず、したがって、安定性がより低くなり折り畳みが容易に展開され得る(Worn及びPluckthun、1998 Biochemistry 37、13120-7)。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１１】

本発明者らは、その同時係属中の国際特許出願であるWO03/002609及び同時係属中の非公表の英国特許出願第0230203.2号中で、それぞれが異なる特異性を有する免疫グロブリン単一可変ドメインを含む、二重特異性免疫グロブリンリガンドを記載している。ドメインは互いに競合又は独立して作用して、標的分子上の抗原又はエピトープと結合し得る。

【００１２】

第1の構成では、本発明は、本発明者らによって開発された二重特異性リガンドであって、リガンドの一つの特異性が、それと結合することによってリガンドの半減期を増加させるように作用することができる、生物中にin vivoで存在するタンパク質又はポリペプチドに対するリガンドのさらなる改善を提供する。

【００１３】

したがって、第1の態様では、第1の抗原又はエピトープに対する結合特異性を有する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン及び第2の抗原又はエピトープに対する結合活性を有する第2の相補的免疫グロブリン単一可変ドメインを含む二重特異性リガンドを提供し、前記抗原又はエピトープの一方又は両方がリガンドの半減期をin vivoで増加させるように作用し、前記第1及び第2のドメインが、同じ特異性を共有する相互に相補的なドメインを欠いており、但し、前記二重特異性リガンドは、抗HSA V_Hドメイン及び抗βガラクトシダーゼV_κドメインからなるものではない。好ましくは、第1又は第2の可変ドメインのどちらもヒト血清アルブミン(HSA)と結合しない。

【００１４】

本明細書中に記載のようにリガンドの半減期を増加させる抗原又はエピトープは、生物中にin vivoで見つかるタンパク質又はポリペプチド上に有利に存在する。例には、細胞外基質タンパク質、血液タンパク質、及び生物内の様々な組織中に存在するタンパク質が含まれる。タンパク質は、例えば、充填剤として作用することによって、又はリガンドを所望の作用部位に固定することによって、血液からのリガンドのクリアランス速度を低下させるように作用する。半減期をin vivoで増加させる抗原/エピトープの例を、後述の添付表1に示す。

【００１５】

増加した半減期は、免疫グロブリン、特に抗体、さらには小さな抗体断片のin vivo用途において有用である。このような断片(Fv、ジスルフィド結合したFv、Fab、scFv、dAb)は、体内から迅速にクリアランスされる弱点がある。したがって、これらは体内のほとんどの部分に迅速に到達することができ、且つ素早く産生でき取り扱いがより容易な一方で、そのin vivo用途は、これらがin vivoで短時間しか残留できないことによって制限されている。本発明は、in vivoでリガンドの増加した半減期をもたらし、その結果、リガンドの機能的活性の体内におけるより長い残留時間をもたらすことによってこの問題を解決する。

【００１６】

薬物動態の分析方法及びリガンド半減期の決定方法は、当業者が精通しているであろう。詳細は、Kenneth,A他:製薬の化学的安定性:薬剤師のハンドブック(Chemical Stability

of Pharmaceuticals:A Handbook for Pharmacists)及びPeters他、薬物動態分析:実用的手法(Pharmacokinetic analysis:A Practical approach)(1996)に見出すことができる。tα及びtβ半減期並びに曲線下面積(AUC)などの薬物動態パラメーターを記載している、「薬物動態学(Pharmacokinetics)」、M Gibaldi及びD Perron、Marcel Dekker出版、改訂第2版拡張版(1982)も参照されたい。

【００１７】

半減期(t1/2α及びt1/2β)並びにAUCは、リガンドの血清濃度 対 時間の曲線から決定することができる。ウィンノンリン分析パッケージ(Pharsight Corp.、米国カリフォルニア州Mountain View、94040から入手可能)を使用して、例えば曲線のモデリングを行うことができる。第1相(α相)では、リガンドは主に患者内で分布しつつあり、一部が排出されている。第2相(β相)は、リガンドがすでに分布され、リガンドが患者からクリアランスされるにつれて血清濃度が低下していく最終相である。tα半減期は第1相の半減期であり、tβ半減期は第2相の半減期である。したがって、有利には、本発明は、15分間以上の範囲のtα半減期を有する、本発明によるリガンド又は該リガンドを含む組成物を提供する。一実施形態では、当該範囲の下限は、30分間、45分間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、10時間、11時間又は12時間である。それに加えて、又はそれに代わって、本発明によるリガンド又は組成物は、12時間以下の範囲のtα半減期を有する。一実施形態では、当該範囲の上限は、11、10、9、8、7、6又は5時間である。適切な当該範囲の例は、1～6時間、2～5時間又は3～4時間である。

【００１８】

有利には、本発明は、2.5時間以上の範囲のtβ半減期を有する、本発明によるリガンド又は該リガンドを含む組成物を提供する。一実施形態では、当該範囲の下限は、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、10時間、11時間、又は12時間である。それに加えて、又はそれに代わって、本発明によるリガンド又は組成物は、21日間以下の範囲のtβ半減期を有する。一実施形態では、当該範囲の上限は、12時間、24時間、2日間、3日間、5日間、10日間、15日間又は20日間である。有利には、本発明によるリガンド又は組成物は、12～60時間の範囲のtβ半減期を有する。さらなる実施形態では、これは12～48時間の範囲である。さらなる実施形態では、これは12～26時間の範囲である。

【００１９】

上記基準に加えて、又はそれに代わって、本発明は、1mg/分/ml以上の範囲のAUC値(曲線下面積)を有する、本発明によるリガンド又はリガンドを含む組成物を提供する。一実施形態では、当該範囲の下限は、5、10、15、20、30、100、200又は300mg/分/mlである。それに加えて、又はそれに代わって、本発明によるリガンド又は組成物は、600mg/分/mlまでの範囲のAUCを有する。一実施形態では、当該範囲の上限は、500、400、300、200、150、100、75又は50mg/分/mlである。有利には、本発明によるリガンドは、好ましくは、それだけには限定されないが、15～150mg/分/ml、15～100mg/分/ml、15～75mg/分/ml、及び15～50mg/分/mlからなる群から選択される範囲のAUCを有する。

【００２０】

第1の実施形態では、二重特異性リガンドは、本発明の場面中ではその同族(cognate)エピトープと別々に結合するとしても、その天然の環境中では同族対又は群として一緒に作動することができる、二つの相補的可変ドメイン、即ち二つの可変ドメインを含む。例えば、相補的可変ドメインは免疫グロブリン重鎖及び軽鎖可変ドメイン(V_H及びV_L)であり得る。有利には、V_H及びV_Lドメインは、scFv又はFab抗体断片として提供される。可変ドメインは、例えば、それぞれのVドメインのC末端でヒンジ領域を提供し、そのヒンジ領域中のシステイン間でジスルフィド結合すること;又はドメインのC末端にそれぞれシステインを有するdAbを提供し、そのシステインが一緒にジスルフィド結合すること;又はV-CH及びV-CLを産生してFab体を生成すること;又はペプチドリンカー(例えば、本明細書中以下に記述するGly_4Serリンカー)を使用して二量体、三量体及びさらなる多量体を生成すること、によって、一緒に連結して多価リガンドを形成してもよい。

【００２１】

本発明者らは、相補的可変ドメインを使用することで、二つのドメイン表面が一緒に詰められ、溶媒から隔絶されることが可能になることを見出した。さらに、相補的ドメインは互いを安定化することができる。さらにこれは、従来技術で使用されているハイブリッドのハイブリドーマの欠点なしに、又はサブユニットの界面で重鎖又は軽鎖を操作する必要なしに、二重特異性IgG抗体の作製を可能にする。本発明の第1の態様の二重特異性リガンドは、少なくとも一つのV_H/V_L対を有する。したがって、本発明による二重特異性IgGは、Y型分子のそれぞれのアーム上に一対ずつ、二つのそのような対を含む。したがって、使用する鎖の比がその調製の成功の決定要因であり実用的な困難をもたらす従来の二重特異性抗体(bispecific antibody又はdiabody)とは異なり、本発明の二重特異性リガンドには鎖のバランスの問題がない。従来の二重特異性抗体における鎖の不均衡は、V_L鎖1がV_H鎖1と一緒になって抗原又はエピトープ1と結合することができ、V_L鎖2がV_H鎖2と一緒になって抗原又はエピトープ2と結合することができ、二つの正しい対が何らかの方法で互いに連結している、二つの異なるV_L鎖と二つの異なるV_H鎖との会合から生じる。したがって、単一分子内でV_L鎖1がV_H鎖1と対合し、V_L鎖2がV_H鎖2と対合している場合にのみ、二重特異性が生じる。そのような二重特異性分子は二つの異なる方法で作製することができる。第1に、それぞれが異なる抗原又はエピトープと結合する二つの既存のV_H/V_L対の会合によって作製することができる(例えば二重特異性IgGの場合)。この場合、すべてが二重特異性である分子集団を作製するためには、V_H/V_L対がすべて1:1の比で一緒になる必要がある。これが起こることは絶対になく(相補的CHドメインを「ノブ-イン-ホール」工学によって増強した場合でも)、二重特異性分子及び一方の抗原又はエピトープのみと結合することができるが他方とはできない分子の混合物が生じる。二重特異性抗体を作製する第2の方法は、二つの異なるV_H鎖と二つの異なるV_L鎖との同時会合によるものである(例えば二重特異性の二重特異性抗体の場合)。この場合、V_L鎖1はV_H鎖1と対合し、V_L鎖2はV_H鎖2と対合する優先度が存在する傾向はあるが(V_L及びV_Hドメインの「ノブインホール」工学によって増強させることができる)、この対合がすべての分子で達成されることは絶対になく、どちらも抗原又はエピトープにも結合できない不正確な対が生じる混合物がもたらされる。

【００２２】

本発明の第1の態様による二重特異性リガンド手法に従って構築した二重特異性抗体は、抗原又はエピトープ1との結合がV_H又はV_Lドメイン内に備わっており、抗原又はエピトープ2との結合が相補的なV_L又はV_Hドメイン内にそれぞれ備わっているため、これらの問題すべてを克服している。V_H及びV_Lドメインは1:1の基準で対合するため、すべてのV_H/V_L対が二重特異性となり、したがって、これらのV_H/V_L対(Fv、scFv、Fab、ミニボディー、IgGなど)を用いて構築したすべての形態が100%の二重特異的活性を有する。

【００２３】

本発明の場面では、第1及び第2の「エピトープ」とは、同一ではなく、単一の単一特異性リガンドによって結合されていないエピトープであると理解される。本発明の第1の構成では、これらは有利には異なる抗原上にあり、そのうちの一方はリガンドの半減期をin vivoで増加させるように作用する。同様に、第1及び第2の抗原は有利に同一ではない。

【００２４】

本発明の二重特異性リガンドには、WO02/02773に記載のリガンドは含まれない。したがって、本発明のリガンドは、任意の一つ又は複数の抗原又はエピトープと協同的に結合する相補的なV_H/V_L対を含まない。その代わり、本発明の第1の態様によるリガンドはV_H/V_Lの相補的な対を含み、Vドメインは異なる特異性を有する。

【００２５】

さらに、本発明の第1の態様によるリガンドは、構造的に関連性のないエピトープ又は抗原に対する異なる特異性を有する、V_H/V_Lの相補的な対を含む。構造的に関連性のあるエピトープ又は抗原とは、協同的な様式で作用して抗原又はエピトープと結合する従来のV_H/V_Lの相補的な対によって結合されるために十分な構造的類似度を保有する、エピトープ又は抗原をいう。構造的に関連性のあるエピトープの場合、エピトープは、V_H/V_L二量

体の抗原結合部位で形成された同じ結合ポケット内に「適合する」ように、構造が十分に類似している。

【００２６】

第2の態様では、本発明は、第1の抗原又はエピトープ結合特異性を有する第1の免疫グロブリン可変ドメイン及び第2の抗原又はエピトープ結合特異性を有する第2の免疫グロブリン可変ドメインを含むリガンドを提供し、前記第1及び第2の可変ドメインのうちの一方又は両方がリガンドの半減期をin vivoで増加させる抗原と結合し、可変ドメインは互いに相補的でない。

【００２７】

一実施形態では、一方の可変ドメインとの結合が、リガンドと第2の可変ドメインとの結合を調節(modulate)する。

【００２８】

本実施形態では、可変ドメインは、例えば、V_Hドメインの対又はV_Lドメインの対であり得る。第1の部位での抗原の結合は、第2の部位での抗原の結合を、増強又は阻害などして調節し得る。例えば、第1の部位での結合は、第2の部位での抗原の結合を少なくとも部分的に阻害する。そのような実施形態では、リガンドは、例えば、リガンドの半減期を増加させるタンパク質と結合することによって、第2の標的抗原と結合して半減期を増加させるタンパク質から解離する時まで対象生物の体内にin vivoで維持され得る。

【００２９】

上記場面における結合の調節(modulation)は、抗原結合部位の互いに対する構造的近接性の結果として達成される。そのような構造的近接性は、二つ以上の抗原結合部位を連結する構造要素の性質によって、例えば、抗原結合部位を近接させて保つ比較的強固な構造を有するリガンドを提供することによって達成することができる。有利には、二つ以上の抗原結合部位は、免疫グロブリン分子内の立体障害及び/又はコンホメーション変化に関連するプロセスによって一つの部位が別の部位での抗原の結合を調節するように、互いに物理的に近接している。

【００３０】

第1及び第2の抗原結合ドメインは、共有又は非共有結合のどちらかによって会合し得る。ドメインが共有的に会合している場合、会合は、例えば、ジスルフィド結合又は$(Gly_4Ser)_n$などのポリペプチドリンカー[式中、n=1～8、例えば、2、3、4、5又は7である]によって媒介され得る。

【００３１】

本発明によるリガンドは、組み合わせて非免疫グロブリン多リガンド構造となって多価複合体を形成してもよく、これは、同じ抗原を有する標的分子と結合して優れた結合力をもたらし、一方で、少なくとも一つの可変ドメインは、抗原と結合して多量体の半減期を増加させる。例えば、SpAなどの天然の細菌受容体が、一つ又は複数のエピトープと特異的に結合するリガンドを作製するためのCDRの移植の足場(scaffold)として使用されている。この手順の詳細は、米国特許第5,831,012号に記載されている。他の適切な足場には、フィブロネクチン及びAffibody(商標)に基づいたものが含まれる。適切な手順の詳細は、WO98/58965に記載されている。他の適切な足場には、van den Beuken他、J.Mol.Biol.(2001)310、591-601に記載のリポカリン及びCTLA4、並びにWO00069907(Medical Research Council)に記載のものなどの足場が含まれる、これらは、例えば細菌GroEL又は他のシャペロンポリペプチドの環構造に基づいている。

【００３２】

タンパク質足場は組み合わせることができる。例えば、CDRをCTLA4足場上に移植し、免疫グロブリンV_H又はV_Lドメインと一緒に使用してリガンドを形成し得る。同様に、フィブロネクチン、リポカリン及び他の足場を組み合わせることができる。

【００３３】

可変ドメインを、例えば本明細書中に記載のようにファージディスプレイ技術を用いて選択したV遺伝子のレパートリーから選択する場合は、これらの可変ドメインは、本明細

書中で定義した具体的な包括的リガンドによって認識できるように、普遍的フレームワーク領域を含むことができる。普遍的フレームワーク、包括的リガンドなどの使用は、WO99/20749に記載されている。本発明では、ファージディスプレイへの言及にはファージ及び/又はファージミドの両方の使用が含まれる。

【００３４】

V遺伝子のレパートリーを使用する場合、ポリペプチド配列の変異は、好ましくは可変ドメインの構造的ループ内に位置する。いずれかの可変ドメインのポリペプチド配列を、それぞれの可変ドメインとその相補的な対との相互作用を増強させるために、DNAシャフリング又は突然変異によって変更し得る。

【００３５】

本発明の好ましい実施形態では、「二重特異性リガンド」は単鎖Fv断片である。本発明の代替の実施形態では、「二重特異性リガンド」は抗体のFab領域からなる。用語「Fab領域」には、二つのVH又は二つのVLドメインが使用されるFab様領域が含まれる。

【００３６】

可変ドメインは、標的抗原又はエピトープに対する抗体に由来し得る。或いは、これらは、線維状バクテリオファージの表面上で発現されるものなどの単一抗体ドメインのレパートリーに由来し得る。選択は、以下に記載のように行い得る。

【００３７】

第3の態様では、本発明は、第1の結合特異性を有する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン及び第2の(異なる)結合特異性を有する第2の単一免疫グロブリン単一可変ドメインを含むリガンドを産生する方法であって、結合特異性のうちの一方又は両方がリガンドの半減期をin vivoで増加させる抗原に特異的であり、

(a)第1のエピトープと結合するその能力によって第1の可変ドメインを選択するステップと、

(b)第2のエピトープと結合するその能力によって第2の可変ドメインを選択するステップと、

(c)可変ドメインを組み合わせるステップと、

(d)前記第1のエピトープ及び前記第2のエピトープと結合するその能力によってリガンドを選択するステップと

を含む方法を提供する。

【００３８】

リガンドは、第1及び第2のエピトープに、同時に結合することができるか、又は、エピトープ結合に対して結合ドメイン間に競合が存在する場合は、一方のドメインの結合がその同族エピトープに対する他方のドメイン結合を妨げ得る。したがって、一実施形態では、上記ステップ(d)は、第1及び第2(並びに場合によってはさらなる)エピトープのいずれとも同時に結合することを必要とする。別の実施形態では、第1及び第2のエピトープとの結合は同時ではない。

【００３９】

エピトープは、好ましくは別々の抗原上にある。

【００４０】

リガンドは、有利には、上述のように、免疫グロブリン可変ドメインのV_H/V_Lの組合せ、又はV_H/V_H若しくはV_L/V_Lの組合せを含む。リガンドは、Conrath他、(2001)JBC 276:7346-7350及びWO99/23221に記載のように、リガンドの半減期をin vivoで増加させる抗原に特異的なV_{HH}ドメインが、ニワトリ卵白リゾチーム(HEL)、ブタ膵臓α-アミラーゼ若しくはNmC-A;hcg、BSA連結RR6アゾ色素又はミュータンス菌(S.mutans)HG982細胞と結合しない限りは、ラクダ科V_{HH}ドメインをさらに含んでもよく、これらの文献は、どちらもリガンドの半減期をin vivoで増加させるように半減期を増加させる抗原に対する特異性の使用について記載していない。

【００４１】

一実施形態では、前記第1の可変ドメインは、相補的可変ドメインの不在下で、前記第1

のエピトープに対する結合について選択する。さらなる実施形態では、前記第1の可変ドメインは、前記第2の可変ドメインとは異なり、第1のドメインに相補的な第3の可変ドメインの存在下で、前記第1のエピトープ/抗原に対する結合について選択する。同様に、第2のドメインは、相補的可変ドメインの不在下又は存在下で選択し得る。

【００４２】

リガンドの半減期が増加する本発明のリガンドが標的とする抗原又はエピトープは、血清アルブミン標的に限定されない。リガンドの半減期がin vivoで増加する本発明のリガンドが標的とする抗原又はエピトープの他の実施形態には、好ましくは、それだけには限定されないが、後述の添付表1に記載の抗原及びエピトープが含まれる。

【００４３】

本発明のリガンドが標的とする抗原又はエピトープは、半減期を増強させるタンパク質に加えて、任意の抗原又はエピトープであり得るが、有利には、治療上の利点を標的とする抗原又はエピトープである。本発明は、任意のそのような標的、特に本明細書中でさらに同定する標的に特異的な、開構造、閉構造及び単離したdAb単量体リガンドを含めたリガンドを提供する。そのような標的は、天然又は合成のものであり得る、ポリペプチド、タンパク質若しくは核酸又はその一部であり得る。この観点から、本発明のリガンドは、エピトープ又は抗原と結合し、拮抗剤又は作用剤(例えばEPO受容体作用剤)として作用し得る。当業者は、選択は広く且つ多様であることを理解されよう。これらは、例えば、ヒト又は動物のタンパク質、サイトカイン、サイトカイン受容体であってよく、サイトカイン受容体には、サイトカインの受容体、酵素、酵素の補因子又はDNA結合タンパク質が含まれる。適切なサイトカイン及び成長因子には、好ましくはそれだけには限定されないが、ApoE、Apo-SAA、BDNF、カルジオトロフィン-1、EGF、EGF受容体、ENA-78、エオタキシン、エオタキシン-2、Exodus-2、EpoR、FGF-酸性、FGF-塩基性、線維芽細胞成長因子-10、FLT3リガンド、フラクタルカイン(CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF-β1、インスリン、IFN-γ、IGF-I、IGF-II、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8(72個のアミノ酸)、IL-8(77個のアミノ酸)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18(IGIF)、インヒビンα、インヒビンβ、IP-10、ケラチノサイト成長因子-2(KGF-2)、KGF、レプチン、LIF、リンフォタクチン、ミュラー阻害物質、単球コロニー阻害因子、単球誘引タンパク質、M-CSF、MDC(67個のアミノ酸)、MDC(69個のアミノ酸)、MCP-1(MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC(67個のアミノ酸)、MDC(69個のアミノ酸)、MIG、MIP-1α、MIP-1β、MIP-3α、MIP-3β、MIP-4、骨髄前駆体阻害因子-1(MPIF-1)、NAP-2、ニューチュリン、神経成長因子、β-NGF、NT-3、NT-4、オンコスタチンM、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1α、SDF1β、SCF、SCGF、幹細胞因子(SCF)、TARC、TGF-α、TGF-β、TGF-β2、TGF-β3、腫瘍壊死因子(TNF)、TNF-α、TNF-β、TNF受容体I、TNF受容体II、TNIL-1、TPO、VEGF、VEGF受容体1、VEGF受容体2、VEGF受容体3、GCP-2、GRO/MGSA、GRO-β、GRO-γ、HCC1、1-309、HER1、HER2、HER3及びHER4、CD4、ヒトケモカイン受容体CXCR4又はCCR5、C型肝炎ウイルス由来の3型非構造タンパク質(NS3)、TNF-α、IgE、IFN-γ、MMP-12、CEA、ピロリ菌(H.pylori)、結核、インフルエンザ、E型肝炎、MMP-12、表皮成長因子受容体(EGFR)などの特定の細胞上で過剰発現される内部移行受容体、腫瘍細胞上のErBb2受容体、内部移行細胞受容体、LDL受容体、FGF2受容体、ErbB2受容体、トランスフェリン受容体、PDGF受容体、VEGF受容体、PsmAr、細胞外基質タンパク質、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、α1-アンチトリプシン、組織因子プロテアーゼ阻害剤、PDK1、GSK1、Bad、カスパーゼ-9、フォークヘッド、ピロリ菌(Helicobacter pylori)の抗原、結核菌(Mycobacterium tuberculosis)の抗原、及びインフルエンザウイルスの抗原が含まれる。このリストは決して網羅的でないことを理解されたい。

【００４４】

本発明の一実施形態では、可変ドメインは、抗原又はエピトープに対するそれぞれの抗体に由来する。好ましい実施形態では、可変ドメインは、単一可変抗体ドメインのレパートリーに由来する。

【００４５】

さらなる態様では、本発明は、少なくとも本明細書中に定義した二重特異性リガンドをコードしている一つ又は複数の核酸分子を提供する。二重特異性リガンドは単一の核酸分子上でコードされていてもよく、或いは、それぞれのドメインが別々の核酸分子によってコードされていてもよい。リガンドが単一の核酸分子によってコードされている場合、ドメインをscFv分子の様式で融合ポリペプチドとして発現させてもよく、又は別々に発現させ、続いて、例えば化学連結剤を用いて一緒に連結させてもよい。別々の核酸から発現させたリガンドは、適切な手段によって一緒に連結させる。

【００４６】

核酸は、発現後に宿主細胞からポリペプチドを輸送するためのシグナル配列をさらにコードしていてもよく、発現後に線維状バクテリオファージ粒子の表面構成要素(又は選択ディスプレイ系の他の構成要素)と融合させてもよい。

【００４７】

さらなる態様では、本発明は、本発明による二重特異性リガンドをコードしている核酸を含むベクターを提供する。

【００４８】

さらなる態様では、本発明は、本発明による二重特異性リガンドをコードしているベクターで形質移入した宿主細胞を提供する。

【００４９】

そのようなベクターからの発現は、例えばバクテリオファージ粒子の表面上に、選択用の可変ドメインを産生するように構成し得る。これにより、提示された可変ドメインの選択が可能となり、したがって本発明の方法を用いた「二重特異性リガンド」の選択が可能となる。

【００５０】

本発明は、少なくとも本発明による二重特異性リガンドを含むキットをさらに提供する。

【００５１】

本発明による二重特異性リガンドは、好ましくは、重鎖及び軽鎖ドメインの組合せを含む。例えば、二重特異性リガンドはV_Hドメイン及びV_Lドメインを含んでいてもよく、これらはscFvの形態で一緒に連結されていてもよい。さらに、リガンドは、一つ又は複数のC_H又はC_Lドメインを含み得る。例えば、リガンドは、C_H1ドメイン、C_H2若しくはC_H3ドメイン、及び/又はC_Lドメイン、Cμ1、Cμ2、Cμ3若しくはCμ4ドメイン、或いは任意のその組合せを含み得る。ヒンジ領域ドメインも含まれ得る。そのようなドメインの組合せは、例えば、IgG若しくはIgMなどの天然の抗体、又はFv、scFv、Fab若しくは$F(ab')_2$分子などのその断片を模倣し得る。V_H、V_L、C_H1及びC_Lドメインを含むIgG分子の単一アームなどの他の構造も想定される。

【００５２】

本発明の好ましい実施形態では、可変領域は、単一ドメインV遺伝子レパートリーから選択される。一般に、単一抗体ドメインのレパートリーは、線維状バクテリオファージの表面上に提示される。好ましい実施形態では、それぞれの単一抗体ドメインは、ファージレパートリーと抗原との結合によって選択される。

【００５３】

本発明の好ましい実施形態では、それぞれの単一可変ドメインを、相補的可変領域が存在しない場合のその標的抗原又はエピトープとの結合について選択し得る。代替の実施形態では、単一可変ドメインを、相補的可変領域が存在する場合のその標的抗原又はエピトープとの結合について選択し得る。したがって、第1の単一可変ドメインを第3の相補的可変ドメインの存在下で選択し、第2の可変ドメインを第4の相補的可変ドメインの存在下で選択し得る。相補的な第3又は第4の可変ドメインは、試験する単一ドメインと同じ特異性を有する天然の同族可変ドメイン、又は「ダミー」可変ドメインなどの非同族の相補的ドメインであり得る。

【００５４】

好ましくは、本発明の二重特異性リガンドは、二つの可変ドメインしか含まないが、いくつかのこのようなリガンドを同一タンパク質内に取り込ませてもよい。例えば、二つのこのようなリガンドを、IgG又はIgMなどの多量体免疫グロブリン内に取り込ませることができる。或いは、別の実施形態では、複数の二重特異性リガンドを組み合わせて多量体を形成する。例えば、二つの異なる二重特異性リガンドを組み合わせて四重特異性分子を作製する。

【００５５】

当業者は、本発明の方法に従って産生した二重特異性リガンドの軽鎖及び重鎖可変ドメインは、同一のポリペプチド鎖、又は異なるポリペプチド鎖上にあり得ることを理解されよう。可変ドメインが異なるポリペプチド鎖上にある場合、これらは、リンカー、一般には可撓性リンカー(ポリペプチド鎖など)、化学連結基、又は当分野で知られている任意の他の方法によって連結し得る。

【００５６】

さらなる態様では、本発明は、本発明の方法によって得ることができる二重特異性リガンド、及び製薬上許容される担体、希釈剤又は賦形剤を含む組成物を提供する。

【００５７】

さらに、本発明は、本発明による「二重特異性リガンド」又は組成物を用いた、疾患を治療及び/又は予防する方法を提供する。

【００５８】

第2の構成では、本発明は、少なくとも二つの非相補的可変ドメインを含む多特異性リガンドを提供する。例えば、リガンドは、V_Hドメインの対又はV_Lドメインの対を含み得る。有利には、ドメインはラクダ科由来ではなく、好ましくは、これらはヒトドメインであるか、又はヒトフレームワーク領域(FW)及び一つ若しくは複数の異種CDRを含む。CDR及びフレームワーク領域とは、免疫学的な対象となるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)のカバット(Kabat)データベースに定義されている免疫グロブリン可変ドメインの領域である。

【００５９】

好ましいヒトフレームワーク領域は、生殖系列遺伝子セグメントDP47及びDPK9によってコードされているものである。有利には、V_H又はV_LドメインのFW1、FW2及びFW3は、DP47又はDPK9からのFW1、FW2又はFW3の配列を有する。ヒトフレームワークは、任意選択で、突然変異、例えば、本発明のリガンドで使用するヒトフレームワーク中で合計約5個までのアミノ酸変化又は約10個までのアミノ酸変化を含み得る。

【００６０】

本発明の第2の構成による多特異性リガンド中の可変ドメインは、開構造又は閉構造で配置されていてよい。即ち、これらは、可変ドメインがその同族リガンドと独立して且つ同時に結合することができるように、又は、可変ドメインのうちの一つのみが任意の時点でその同族リガンドと結合し得るように、配置されていてよい。

【００６１】

本発明者らは、特定の構造的条件下では、非相補的可変ドメイン(例えば二つの軽鎖可変ドメイン又は二つの重鎖可変ドメイン)は、非相補的ドメインは同族対として一緒に作動しないにもかかわらず、第1のエピトープと第1の可変ドメインとの結合が第2のエピトープと第2の可変ドメインとの結合を阻害するように、リガンド中に存在し得ることに気づいた。

【００６２】

有利には、リガンドは二つ以上の可変ドメインの対を含む。即ち、これは少なくとも四つの可変ドメインを含む。有利には、四つの可変ドメインはヒト由来のフレームワークを含む。

【００６３】

好ましい実施形態では、ヒトフレームワークは、ヒト生殖系列配列のものと同一である。

【００６４】
本発明者らは、そのような抗体が治療及び他の用途におけるリガンド結合アッセイにおいて特に有用であると考えている。
【００６５】
したがって、第2の構成の第1の態様では、本発明は、
a)第1のエピトープと結合するその能力によって第1のエピトープ結合ドメインを選択するステップと、
b)第2のエピトープと結合するその能力によって第2のエピトープ結合ドメインを選択するステップと、
c)エピトープ結合ドメインを組み合わせるステップと、
d)前記第1の第2のエピトープ及び前記第2のエピトープと結合するその能力によって閉構造多特異性リガンドを選択するステップと
を含む、多特異性リガンドを産生する方法を提供する。
【００６６】
第2の構成のさらなる態様では、本発明は、第1のエピトープ結合特異性を有する第1のエピトープ結合ドメイン及び第2のエピトープ結合特異性を有する非相補的な第2のエピトープ結合ドメインを含む閉構造の多特異性リガンドを調製する方法であって、第1及び第2の結合特異性が、閉構造の多特異性リガンドが両方のエピトープと同時に結合し得ないように、エピトープ結合について競合し、
a)第1のエピトープと結合するその能力によって第1のエピトープ結合ドメインを選択するステップと、
b)第2のエピトープと結合するその能力によって第2のエピトープ結合ドメインを選択するステップと、
c)ドメインが閉構造であるようにエピトープ結合ドメインを組み合わせるステップと、
d)前記第1の第2のエピトープ及び前記第2のエピトープと結合するが、前記第1及び第2のエピトープの両方とは同時に結合しないその能力によって、閉構造多特異性リガンドを選択するステップと
を含む方法を提供する。
【００６７】
さらに、本発明は、第1のエピトープ結合特異性を有する第1のエピトープ結合ドメイン及び第2のエピトープ結合特異性を有する非相補的な第2のエピトープ結合ドメインを含む閉構造の多特異性リガンドを提供し、第1及び第2の結合特異性は、閉構造の多特異性リガンドが両方のエピトープと同時に結合し得ないように、エピトープ結合について競合する。
【００６８】
本発明の第2の構成の上記態様の代替の実施形態は、第3又はさらなるエピトープ結合ドメインを選択することを含む、さらなるステップ(b1)を任意選択で含む。この方法で、開構造又は閉構造にかかわらず、二つを超えるエピトープ結合特異性を含む多特異性リガンドが産生される。多特異性リガンドが二つを超えるエピトープ結合ドメインを含む、本発明の第2の構成の好ましい態様では、前記ドメインのうちの少なくとも二つが閉構造であり、結合について競合する。他のドメインは、結合について競合するか、又はその同族エピトープと独立して自由に会合し得る。
【００６９】
本発明によれば、用語「多特異性リガンド」とは、本明細書中に定義する複数のエピトープ結合特異性を保有するリガンドをいう。
【００７０】
本明細書中で定義する用語「閉構造」(多特異性リガンド)とは、リガンドのエピトープ結合ドメインが、任意選択でタンパク質骨格によって、一つのエピトープ結合ドメインによるエピトープ結合が別のエピトープ結合ドメインによるエピトープ結合と競合するように結合している又は互いに会合していることを意味する。即ち、同族エピトープは、それ

ぞれのエピトープ結合ドメインによって個々に結合し得るが、同時には結合し得ない。リガンドの閉構造は、本明細書中に記載の方法を用いて達成することができる。

【００７１】

「開構造」とは、リガンドのエピトープ結合ドメインが、任意選択でタンパク質骨格によって、一つのエピトープ結合ドメインによるエピトープ結合が別のエピトープ結合ドメインによるエピトープ結合と競合しないように結合している又は互いに会合していることを意味する。

【００７２】

本明細書中で言及する、用語「競合する」とは、第1のエピトープとその同族エピトープ結合ドメインとの結合が、第2のエピトープがその同族エピトープ結合ドメインと結合している場合に阻害されることを意味する。例えば、立体的に、例えば、エピトープに対するその親和性又は結合力が減少するような結合ドメインの物理的遮断又は結合ドメインの構造若しくは環境の変更によって、阻害され得る。

【００７３】

本発明の第2の構成のさらなる実施形態では、エピトープは、結合の際に互いに置換され得る。例えば、第1のエピトープは、その同族の第1の結合ドメインと結合した際に、第2の結合ドメインの立体障害、又はその内のコンホメーション変化を引き起こし、第2の結合ドメインと結合したエピトープを置換する抗原上に存在し得る。

【００７４】

有利には、結合は、結合が完全に阻害されるように、25%以上、有利には40%、50%、60%、70%、80%、90%以上、好ましくは100%まで又はほぼそれまで減少する。エピトープの結合は、ELISAなどの従来の抗原結合アッセイ、FRETを含めた蛍光に基づいた技術、又は分子の質量を測定する表面プラズモン共鳴などの技術によって測定することができる。抗原結合タンパク質と抗原又はエピトープとの特異的結合は、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)などのスキャッチャード分析及び/又は競合的結合アッセイ、ELISA及びサンドイッチ競合アッセイなどの酵素免疫アッセイ、並びに様々なその変形を含めた、適切なアッセイによって決定することができる。

【００７５】

結合親和性は、好ましくは、Biacoreシステム(スウェーデンUppsala)を用いて、表面プラズモン共鳴(SPR)及びBiacore(Karlsson他、1991)を用いて決定する。Biacoreシステムは、生体分子の相互作用をリアルタイムで監視するために表面プラズモン共鳴(SPR、Welford K.1991、Opt.Quant.Elect.23:1;Morton及びMyszka、1998、Methods in Enzymology 295:268)を使用し、ガラス担体上の薄金フィルムの表面での光の共鳴角度の変化を300nmまで離れた表面の屈折率の変化の結果として検出することができる表面プラズモン共鳴を使用する。Biacore分析は、会合速度定数、解離速度定数、平衡解離定数、及び親和定数を好都合に生じる。結合親和性は、Biacore表面プラズモン共鳴システム(Biacore,Inc.)を用いて会合及び解離速度定数を評価することによって得られる。標的の共有カップリングのために、バイオセンサーチップを製造者(Biacore)の指示書に従って活性化する。その後、標的を希釈し、チップ上に注入して、固定した物質の応答単位でシグナルを得る。そのレゾナンスユニット(RU)で示すシグナルは固定した物質の質量に比例するため、これは、マトリックス上の固定した標的密度の範囲を表す。解離データを片側(one-site)モデルに当てはめて、k_{off}+/-s.d.(測定値の標準偏差)が得られる。偽一次速度定数(Kd)をそれぞれの会合曲線について計算し、タンパク質濃度の関数としてプロットして、k_{on}+/-s.e.(当てはめの標準誤差)を得る。結合の平衡解離定数Kdは、SPR測定値からk_{off}/k_{on}として計算する。

【００７６】

Phizicky及びField、Microb.Rev.(1995)59:114-115に記載されているように、HSAなどの適切な抗原をデキストランポリマー上に固定し、単一可変ドメインなどのHSAに対するリガンドを含む溶液をセルに流し、固定したHSAと接触させる。固定したHSAによって保持される単一可変ドメインが衝突光の共鳴角度を変更する結果、デキストランポリマー付近

のタンパク質、即ち単一可変ドメインの量の増加によってもたらされる屈折率の変化が生じる。すべてのタンパク質が同じ屈折率を有し、共鳴角度のシフトと表面付近のタンパク質濃度との間に線形相関が存在するため、タンパク質/タンパク質の結合による表面におけるタンパク質濃度の変化を測定することができる。Phizicky及びField、上記を参照されたい。結合定数を決定するためには、レゾナンスユニット(RU)の増加を、単一可変ドメインタンパク質の溶液を固定したリガンド(HSA)に通すことによってRU値が安定化するまでの時間の関数として測定し、その後、RUの低下を、単一可変ドメインを欠くバッファーを用いた時間の関数として測定する。この手順を、いくつかの異なる濃度の単一可変ドメインタンパク質で繰り返す。詳細な理論的背景及び手順は、R.Karlsson他(991)J.Immunol Methods、145、229に記載されている。

【００７７】

装置のソフトウェアは上述の平衡解離定数(Kd)を生じる。表面プラズモン共鳴を使用することで決定される平衡解離定数は、dR_A/dt及びR_A値の表に基づいて、米国特許第5,573,957号に記載されており、この例中のRは、Biacoreによって測定したHSA/単一可変ドメイン複合体のレゾナンスユニットであり、dR/dtは、HSA/単一可変ドメイン複合体の形成速度、即ち結合曲線の導関数である。いくつかの異なる濃度の単一可変ドメインについてdR_A/dt対R_Aのグラフをプロットし、続いてこれらの線の傾き対単一可変ドメインの濃度をプロットし、この第2のグラフの傾きが会合速度定数(M^{-1}、s^{-1})である。解離速度定数、即ちHSA及び単一可変ドメインが互いを放出する速度は、Biacoreで作成した解離曲線を利用して決定することができる。応答の低下の対数対時間曲線をプロットして傾きを決定することによって、解離速度定数を測定することができる。平衡解離定数Kd＝解離速度定数／会合速度定数。

【００７８】

本発明の方法によれば、有利には、それぞれのエピトープ結合単一可変ドメインは、異なるエピトープ結合特異性をもつものである。

【００７９】

本発明の場面では、第1及び第2の「エピトープ」とは、それらが同一ではなく、単一の単一特異性リガンドによって結合されないエピトープであると理解される。異なる抗原又は同一の抗原上にあってよいが、従来の抗体の単一の単一特異性V_H/V_L結合対によって結合され得る単一の要素(entity)を形成しないように、十分な距離によって離されている。実験として、単鎖抗体形態(ドメイン抗体即ちdAb)中の個々の可変ドメインの両方が、二つのエピトープに対する単一特異性V_H/V_Lリガンドと別々に競合する場合は、これらの二つのエピトープは、本発明による別々のエピトープとみなされるよう十分に離れていない。

【００８０】

本発明の閉構造多特異性リガンドには、WO02/02773に記載のリガンドは含まれない。したがって、本発明のリガンドは、任意の一つ又は複数の抗原又はエピトープと協同的に結合する相補的なV_H/V_L対を含まない。その代わり、本発明によるリガンドは、好ましくは、非相補的なV_H-V_H又はV_L-V_L対を含む。有利には、それぞれのV_H-V_H又はV_L-V_L対中のそれぞれのV_H又はV_Lドメインは異なるエピトープ結合特異性を有しており、エピトープ結合部位は、一つの部位でのエピトープの結合が別の部位でのエピトープの結合と競合するように配置されている。

【００８１】

本発明によれば、有利には、それぞれのエピトープ結合ドメインが免疫グロブリン可変ドメインを含む。より有利には、それぞれのエピトープ結合ドメインは、抗体の可変軽鎖ドメイン(V_L)又は可変重鎖ドメイン(V_H)のどちらかである。本発明の第2の構成では、免疫グロブリンドメインは、本発明によるリガンド上に存在する場合は非相補的である、即ち、これらは会合してV_H/V_L抗原結合部位を形成しない。したがって、本発明の第2の構成で定義する多特異性リガンドは、同じサブタイプの免疫グロブリンドメイン、即ち可変軽鎖ドメイン(V_L)又は可変重鎖ドメイン(V_H)のどちらかを含む。さらに、本発明によるリガ

ンドが閉構造である場合、免疫グロブリンドメインはラクダ科V_{HH}型であり得る。

【００８２】

代替の実施形態では、本発明によるリガンドはラクダ科V_{HH}ドメインを含まない。より詳細には、本発明のリガンドは、ヒトV_Hドメインと比較してラクダ科V_{HH}ドメインに特異的な一つ又は複数のアミノ酸残基を含まない。

【００８３】

有利には、単一可変ドメインは、異なる抗原又はエピトープに対する結合活性について選択した抗体に由来する。例えば、可変ドメインは、ヒトの免疫化によって少なくとも部分的に単離し得る。ヒト抗体ライブラリーからの単離及び人工抗体遺伝子の合成を含めた代替方法が当分野で知られている。

【００８４】

選ばれた実施形態では、単一可変ドメインは天然単一可変ドメインである。他の選ばれた実施形態では、単一可変ドメインは非天然のものである。本明細書中で使用する用語「天然」とは、物体、例えばタンパク質ドメイン、例えば、単一可変ドメイン又は抗体単一可変ドメインを自然で見つけることができることを示す。したがって、抗体のV領域などの天然タンパク質ドメインは、自然で、例えば非組換え種、例えば、哺乳動物、霊長類、げっ歯類、魚、鳥、爬虫類など内で発現されるタンパク質、例えば抗体鎖タンパク質中に存在する。疑念を回避するために、多様性をin vitroで導入した核酸から発現させたポリペプチドのレパートリーから単離した単一可変ドメインは、非天然単一可変ドメインである。さらなる疑念を回避するために、動物の免疫化から生じる抗体に由来する抗体単一可変ドメインは、天然単一可変ドメインである。

【００８５】

可変ドメインは、プロテインA又はプロテインLなどのスーパー抗原と有利に結合する。スーパー抗原との結合は、正しく折り畳まれた抗体可変ドメインの特性であり、そのようなドメインを、例えば組換え又は突然変異体ドメインのライブラリーから単離することを可能にする。

【００８６】

本発明によるエピトープ結合ドメインは、タンパク質足場及びエピトープ相互作用部位(これらは有利にはタンパク質足場の表面上にある)を含む。

【００８７】

エピトープ結合ドメインはまた、免疫グロブリンドメイン以外のタンパク質足場又は骨格に基づいていてもよい。例えば、SpAなどの天然の細菌受容体が、一つ又は複数のエピトープと特異的に結合するリガンドを作製するためのCDRの移植の足場として使用されている。この手順の詳細は、米国特許第5,831,012号に記載されている。他の適切な足場には、フィブロネクチン及びアフィボディに基づいたものが含まれる。適切な手順の詳細は、WO98/58965に記載されている。他の適切な足場には、van den Beuken他、J.Mol.Biol.(2001)310、591-601に記載のリポカリン及びCTLA4、並びにWO00069907(Medical Research Council)に記載のものなどの足場が含まれ、これらは、例えば細菌GroEL又は他のシャペロンポリペプチドの環構造に基づいている。

【００８８】

タンパク質足場は組み合わせることができる。例えば、CDRをCTLA4足場上に移植し、免疫グロブリンV_H又はV_Lドメインと一緒に使用して多価リガンドを形成し得る。同様に、フィブロネクチン、リポカリン及び他の足場を組み合わせることができる。

【００８９】

当業者は、本発明の方法に従って産生した閉構造多特異性リガンドのエピトープ結合ドメインは、同一のポリペプチド鎖、又は異なるポリペプチド鎖上にあり得ることを理解されよう。可変ドメインが異なるポリペプチド鎖上にある場合、これらは、リンカー、有利には可撓性リンカー(ポリペプチド鎖など)、化学連結基、又は当分野で知られている任意の他の方法によって連結し得る。

【００９０】

第1及び第2のエピトープ結合ドメインは、共有又は非共有結合のどちらかによって会合し得る。ドメインが共有的に会合している場合、会合は例えばジスルフィド結合によって媒介され得る。

【００９１】

本発明の第2の構成では、第1及び第2のエピトープは、好ましくは異なる。これらは、天然又は合成であり得る、ポリペプチド、タンパク質若しくは核酸又はその一部であり得る。この観点から、本発明のリガンドは、エピトープ又は抗原と結合し、拮抗剤又は作用剤(例えばEPO受容体作用剤)として作用し得る。一実施形態のリガンドのエピトープ結合ドメインは、同じエピトープ特異性を有しており、例えば、エピトープの複数コピーが同一の抗原上に存在する場合に、そのエピトープを同時に結合し得る。別の実施形態では、これらのエピトープは、リガンドがエピトープと結合して抗原を架橋できるように異なる抗原上に提供されている。当業者は、エピトープ及び抗原の選択が広く且つ多様であることを理解されよう。これらは、例えば、ヒト又は動物のタンパク質、サイトカイン、サイトカイン受容体、酵素の酵素補因子又はDNA結合タンパク質であり得る。適切なサイトカイン及び成長因子には、好ましくはそれだけには限定されないが、ApoE、Apo-SAA、BDNF、カルジオトロフィン-1、EGF、EGF受容体、ENA-78、エオタキシン、エオタキシン-2、Exodus-2、EpoR、FGF-酸性、FGF-塩基性、線維芽細胞成長因子-10、FLT3リガンド、フラクタルカイン(CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF-β1、インスリン、IFN-γ、IGF-I、IGF-II、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8(72個のアミノ酸)、IL-8(77個のアミノ酸)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18(IGIF)、インヒビンα、インヒビンβ、IP-10、ケラチノサイト成長因子-2(KGF-2)、KGF、レプチン、LIF、リンフォタクチン、ミュラー阻害物質、単球コロニー阻害因子、単球誘引タンパク質、M-CSF、MDC(67個のアミノ酸)、MDC(69個のアミノ酸)、MCP-1(MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC(67個のアミノ酸)、MDC(69個のアミノ酸)、MIG、MIP-1α、MIP-1β、MIP-3α、MIP-3β、MIP-4、骨髄前駆体阻害因子-1(MPIF-1)、NAP-2、ニューチュリン、神経成長因子、β-NGF、NT-3、NT-4、オンコスタチンM、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1α、SDF1β、SCF、SCGF、幹細胞因子(SCF)、TARC、TGF-α、TGF-β、TGF-β2、TGF-β3、腫瘍壊死因子(TNF)、TNF-α、TNF-β、TNF受容体I、TNF受容体II、TNIL-1、TPO、VEGF、VEGF受容体1、VEGF受容体2、VEGF受容体3、GCP-2、GRO/MGSA、GRO-β、GRO-γ、HCC1、1-309、HER1、HER2、HER3、HER4、TACE認識部位、TNF BP-I及びTNF BP-II、CD4、ヒトケモカイン受容体CXCR4又はCCR5、C型肝炎ウイルス由来の3型非構造タンパク質(NS3)、TNF-α、IgE、IFN-γ、MMP-12、CEA、ピロリ菌、結核、インフルエンザ、E型肝炎、MMP-12、表皮成長因子受容体(EGFR)などの内部移行受容体は特定の細胞上で過剰発現され、腫瘍細胞上のErBb2受容体、内部移行細胞受容体、LDL受容体、FGF2受容体、ErbB2受容体、トランスフェリン受容体、PDGF受容体、VEGF受容体、PsmAr、細胞外基質タンパク質、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、α1-アンチトリプシン、組織因子プロテアーゼ阻害剤、PDK1、GSK1、Bad、カスパーゼ-9、フォークヘッド、ピロリ菌抗原、結核菌の抗原、インフルエンザウイルスの抗原、並びに本明細書の添付表2又は添付表3中に開示した任意の標的が、それら添付表中に記載した組合せ、それとは異なる組合せ又は個々に含まれる。サイトカイン受容体には、上記サイトカインの受容体、例えば、IL-1 R1;IL-6R;IL-10R;IL-18R、及び添付表2又は添付表3に記載のサイトカインの受容体、並びに添付表2及び3に開示した受容体が含まれる。このリストは決して網羅的でないことを理解されたい。多特異性リガンドが二つのエピトープ(同一又は異なる抗原上)と結合する場合、抗原をこのリストから選択し得る。

【００９２】

有利には、二重特異性リガンドを、治療の場面において生物の体内で相乗的に協同するサイトカイン及び他の分子を標的とするために使用し得る。したがって、本発明は、二つ以上のサイトカインと結合することができる二重特異性リガンドを投与することを含む、前記二つ以上のサイトカインの活性を相乗作用させる方法を提供する。本発明のこの態様では、二重特異性リガンドは、相補的及び/又は非相補的ドメイン、開構造のリガンド、

並びに閉構造のリガンドからなるリガンドを含めた、任意の二重特異性リガンドであり得る。例えば、本発明のこの態様は、V_Hドメイン及びV_Lドメイン、V_Hドメインのみ並びにV_Lドメインのみの組合せに関する。

【００９３】

治療場面における相乗作用は、いくつかの方法で達成し得る。例えば、標的の組合せは、リガンドが両方の標的を標的とする場合にのみ治療的に活性であるが、一つの標的単独の標的化は、治療上有効でない場合がある。別の実施形態では、一つの標的単独では、ある程度の低い又は最小限の治療効果をもたらし得るが、第2の標的と一緒にすると、組合せが治療効果の相乗的な増加をもたらし得る。

【００９４】

好ましくは、本発明のこの態様の二重特異性リガンドによって結合されるサイトカインは、添付表2に示すリストから選択される。

【００９５】

さらに、二重特異性リガンドは、一方の特異性が細胞傷害性細胞によって発現されるCD89を標的とし、他方が腫瘍に特異的である、腫瘍学的用途で使用し得る。標的とし得る腫瘍抗原の例を添付表3に示す。

【００９６】

本発明の第2の構成の一実施形態では、可変ドメインは、第1の及び/又は第2の抗原又はエピトープに対する抗体に由来する。好ましい実施形態では、可変ドメインは、単一可変抗体ドメインのレパートリーに由来する。一例では、レパートリーは、動物中で作製したレパートリー又は合成レパートリーではない。別の例では、単一可変ドメインは、動物の免疫化によって(少なくとも部分的に)単離していない。したがって、単一ドメインは、ナイーブなライブラリーから単離することができる。

【００９７】

別の態様では、本発明の第2の構成は、第1のエピトープ結合特異性を有する第1のエピトープ結合ドメイン及び第2のエピトープ結合特異性を有する非相補的な第2のエピトープ結合ドメインを含む多特異性リガンドを提供する。第1及び第2の結合特異性は、同じ又は異なるものであり得る。

【００９８】

さらなる態様では、本発明は、第1のエピトープ結合特異性を有する第1のエピトープ結合ドメイン及び第2のエピトープ結合特異性を有する非相補的な第2のエピトープ結合ドメインを含む閉構造の多特異性リガンドを提供し、第1及び第2の結合特異性は、閉構造の多特異性リガンドが両方のエピトープと同時に結合できないように、エピトープ結合と競合することができる。

【００９９】

さらなる態様では、本発明は、同一標的上の異なるエピトープに特異的な非相補的結合ドメインを含む、開構造のリガンドを提供する。そのようなリガンドは、増加した結合力で標的と結合する。同様に、本発明は、同一のエピトープに特異的であり、複数コピーの、例えば、IL-5、PDGF-AA、PDGF-BB、TGF-β、TGF-β2、TGF-β3及びTNFα、並びにヒトTNF受容体1及びヒトTNFαなどの前記エピトープを含む標的に対する非相補的結合ドメインを含む、多価リガンドを提供する。

【０１００】

同様の態様では、本発明によるリガンドは、個々のエピトープとの結合は治療上有意でないが、二つのエピトープと結合する結果生じる増加した結合力が治療上の利点をもたらすように、低い親和性を有する個々のエピトープと結合するように構成することができる。特定の例では、正常な細胞型上には個々に存在するが、腫瘍細胞などの異常又は患部細胞上にのみ一緒に存在するエピトープを標的とし得る。そのような状況では、異常又は患部細胞のみが、本発明による二重特異性リガンドによって有効に標的とされる。

【０１０１】

同一標的上の同一エピトープの複数コピー、又は隣接エピトープに特異的なリガンド(

キレートdAbとして知られる)はまた、三個、四個以上の非相補的結合ドメインを含む三量体又は高分子(四量体以上)のリガンドであり得る。例えば、三個又は四個のV_Hドメイン又はV_Lドメインを含むリガンドを構築し得る。

【０１０２】

さらに、それぞれの結合ドメインが標的のサブユニットに特異的な、多サブユニット標的と結合するリガンドを提供する。リガンドは、二量体、三量体又は高分子であり得る。

【０１０３】

好ましくは、本発明の上記態様による多特異性リガンドは、本発明の第1の態様の方法によって入手可能である。

【０１０４】

本発明の第2の構成の上記態様によれば、有利には、第1のエピトープ結合ドメイン及び第2のエピトープ結合ドメインは、本明細書中で定義する非相補的免疫グロブリン可変ドメインである。これは即ちV_H-V_H又はV_L-V_L可変ドメインのどちらかである。

【０１０５】

特に、キレートdAbは、本発明の好ましい態様に従って、即ち固定dAbを使用して調製してもよく、ここでは、二量体、三量体又は多量体dAbのライブラリーを、リンカー配列の上流又は下流の定常dAbを含むベクターを用いて構築し、第2、第3及びさらなるdAbのレパートリーを、リンカーの反対側に挿入する。例えば、固定又はガイドdAbは、TAR1-5(V_κ)、TAR1-27(V_κ)、TAR2h-5(VH)又はTAR2h-6(V_κ)であり得る。

【０１０６】

代替方法では、例えば、V_HとV_κなどの結合ドメイン間の非共有結合又は天然の親和性を使用することによって、リンカーの使用を回避し得る。したがって、本発明は、

(a)標的上の第1のエピトープに特異的な単一結合ドメインをコードしている核酸配列を含むベクターを提供するステップと、

(b)前記標的上の第2のエピトープに特異的な第2の結合ドメインを含むレパートリーをコードしているベクターを提供するステップであって、エピトープは第1のエピトープと同一又は異なるものであり得、前記第2のエピトープは前記第1のエピトープと隣接しているステップと、

(c)前記第1及び第2の結合ドメインを発現させるステップと、

(d)一緒に組み合わせて標的と結合する二量体を産生する第1及び第2の結合ドメインの組合せを単離するステップと

を含む、キレート多量体リガンドを調製する方法を提供する。

【０１０７】

第1及び第2のエピトープは、多量体リガンドが両方のエピトープと同時に結合することができるように、隣接している。これにより、リガンドに、結合している場合は増加した結合力の利点がもたらされる。エピトープが同一である場合、標的上に複数コピーのエピトープが存在することによって、増加した結合力の効果を得るために少なくとも二つのコピーが同時に結合することを可能にすることで、増加した結合力が得られる。

【０１０８】

結合ドメインは、いくつかの方法によって、及びリンカーを使用することによって会合し得る。例えば、結合ドメインは、cys残基、アビジン及びストレプトアビジン基又は合成後の非共有結合の他の手段を含み得る。標的と効率的に結合する組合せを単離する。或いは、例えば上述のように、リンカーが第1と第2の結合ドメインとの間に存在してもよく、これは、単一のベクターから単一のポリペプチドとして発現され、第1の結合ドメイン、リンカー及び第2の結合ドメインのレパートリーを含む。

【０１０９】

好ましい態様では、第1及び第2の結合ドメインは、抗原と結合した場合に自然に会合する。例えば、V_H及びV_L(例えばV_κ)ドメインは、隣接エピトープと結合した場合に、三方向の相互作用で自然に会合して安定な二量体を形成する。そのような会合したタンパク質は、標的結合アッセイで単離することができる。この手順の利点は、近接するエピトープ

と正しいコンホメーションで結合する結合ドメインだけが会合して、標的に対するその増加した結合力の結果として単離されることである。

【０１１０】

本発明の第2の構成の上記態様の代替の実施形態では、少なくとも一つのエピトープ結合ドメインは、本明細書中で定義する非免疫グロブリン「タンパク質足場」又は「タンパク質骨格」を含む。適切な非免疫グロブリンタンパク質足場には、好ましくはそれだけには限定されないが、上述のSpA、フィブロネクチン、GroEL及び他のシャペロン、リポカリン、CCTLA4並びにアフィボディからなる群から選択される任意のものが含まれる。

【０１１１】

本発明の第2の構成の上記態様によれば、有利には、エピトープ結合ドメインは「タンパク質骨格」と結合している。有利には、本発明によるタンパク質骨格は免疫グロブリン骨格である。

【０１１２】

本発明によれば、用語「免疫グロブリン骨格」とは、本明細書中に定義するように、少なくとも一つの免疫グロブリンの折り畳みを含み、一つ又は複数のエピトープ結合ドメインの核として作用するタンパク質をいう。

【０１１３】

本明細書中で定義する好ましい免疫グロブリン骨格には、少なくとも(i)抗体のCL(κ若しくはλサブクラス)ドメインを含む免疫グロブリン分子;又は(ii)抗体重鎖のCH1ドメイン;抗体重鎖のCH1及びCH2ドメインを含む免疫グロブリン分子;抗体重鎖のCH1、CH2及びCH3ドメインを含む免疫グロブリン分子;或いは抗体のCL(κ又はλサブクラス)ドメインと合わせたサブセット(ii)のうちの任意のものから選択された、任意の一つ又は複数が含まれる。ヒンジ領域ドメインも含まれ得る。そのようなドメインの組合せは、例えば、IgG若しくはIgMなどの天然の抗体、又はFv、scFv、Fab若しくは$F(ab')_2$分子などのその断片を模倣し得る。当業者なら、このリストは網羅的であることを意図しないことを理解するであろう。

【０１１４】

本明細書中で定義するように、骨格をエピトープ結合ドメインと連結することはポリペプチドレベルで、即ち、骨格及び/又はエピトープ結合ドメインをコードしている核酸の発現後に達成し得る。或いは、連結ステップは核酸レベルで行い得る。本発明によるタンパク質骨格を一つ又は複数のエピトープ結合ドメインに連結させる方法には、当業者が精通しており、本明細書中に記載のタンパク質化学及び/又は分子生物学的技術の使用が含まれる。

【０１１５】

有利には、閉構造多特異性リガンドは、標的分子と結合できる第1のドメイン、及びリガンドの半減期を延長する分子又は基と結合できる第2のドメインを含み得る。例えば、分子又は基は、HSA又は細胞マトリックスタンパク質などのかさ高いものであり得る。本明細書中で使用する語句「リガンドの半減期を延長する分子又は基」とは、そのような二重特異性リガンドを動物に投与した場合、本明細書中に記載の二重特異性リガンドと結合した際にその分子又は基と結合しないリガンドと比較してin vivo半減期を増加させる、分子又は化学基をいう。リガンドの半減期を延長する分子又は基の例を、本明細書中、下記に記載する。好ましい実施形態では、閉構造多特異性リガンドは、半減期を増強させる分子又は基と置換した際にのみ標的分子と結合し得る。したがって、例えば、閉構造多特異性リガンドは、HSAなどのかさ高い分子によって、対象の血流中で循環を維持する。標的分子に遭遇した際、閉構造多特異性リガンドの結合ドメイン間の競合の結果、HSAの置換及び標的の結合がもたらされる。

【０１１６】

本発明の任意の態様によるリガンドには、少なくとも一つの単一可変ドメインを、単量体単一可変ドメインの形態又は複数の単一可変ドメイン、即ち多量体の形態で有する、又はそれからなるリガンドが含まれる。リガンドは、融合タンパク質などの追加の部分、又

はコンジュゲートを含むように改変することができる。そのような多量体リガンド、例えば二重特異性リガンドの形態、及び/又は単一可変ドメインを含む若しくはそれからなるそのようなリガンド、即ち、そのような多量体リガンドの構築に有用なdAb単量体は、有利には、例えば表面プラズモン共鳴によって決定される、300nM以下、300nM～5pM(即ち3×10^{-7}～5×10^{-12}M)、好ましくは50nM～20pM、若しくは5nM～200pM若しくは1nM～100pM、1×10^{-7}M以下、1×10^{-8}M以下、1×10^{-9}M以下、1×10^{-10}M以下、1×10^{-11}M以下のKd;及び/又は5×10^{-1}～1×$10^{-7}$$S^{-1}$、好ましくは1×$10^{-2}$～1×$10^{-6}$$S^{-1}$、若しくは5×$10^{-3}$～1×$10^{-5}$$S^{-1}$、若しくは5×$10^{-1}$$S^{-1}$以下、若しくは1×$10^{-2}$$S^{-1}$以下、若しくは1×$10^{-3}$$S^{-1}$以下、若しくは1×$10^{-4}$$S^{-1}$以下、若しくは1×$10^{-5}$$S^{-1}$以下、若しくは1×$10^{-6}$$S^{-1}$以下の$K_{off}$速度定数で、その同族標的から解離し得る。Kd速度定数は、K_{off}/K_{on}として定義される。1モーラーよりも高いKd値が、一般に非特異的結合を示すとみなされる。好ましくは、単一可変ドメインは、500nM未満、好ましくは200nM未満、より好ましくは10nM未満、例えば500pM未満の親和性で、標的抗原又はエピトープと特異的に結合する。

【０１１７】

特に、本発明は、それぞれのdAbがTNFαと結合する、抗TNFαdAb単量体(若しくはそのようなdAbを含む二重特異性リガンド)、ホモ二量体、ヘテロ二量体又はホモ三量体リガンドを提供する。リガンドは、300nM～5pM(即ち3×10^{-7}～5×10^{-12}M)、好ましくは50nM～20pM、より好ましくは5nM～200pM、最も好ましくは1nM～100pMのKdでTNFαと結合する。他の様式で表すと、Kdは、1×10^{-7}M以下、好ましくは1×10^{-8}M以下、より好ましくは1×10^{-9}M以下、有利には1×10^{-10}M以下、最も好ましくは1×10^{-11}M以下;及び/又はK_{off}速度定数が5×10^{-1}～1×$10^{-7}$$S^{-1}$、好ましくは1×$10^{-2}$～1×$10^{-6}$$S^{-1}$、より好ましくは5×$10^{-3}$～1×$10^{-5}$$S^{-1}$、例えば5×$10^{-1}$$S^{-1}$以下、好ましくは1×$10^{-2}$$S^{-1}$以下、より好ましくは1×$10^{-3}$$S^{-1}$以下、有利には1×$10^{-4}$$S^{-1}$以下、さらに有利には1×$10^{-5}$$S^{-1}$以下、最も好ましくは1×$10^{-6}$$S^{-1}$以下であり、これは表面プラズモン共鳴によって決定される。

【０１１８】

好ましくは、リガンドは、標準のL929アッセイにおいて、500nM～50pM、好ましくは又は100nM～50pM、有利には10nM～100pM、より好ましくは1nM～100pM;例えば50nM以下、好ましくは5nM以下、有利には500pM以下、より好ましくは200pM以下、最も好ましくは100pM以下のND50で、TNFαを中和する。

【０１１９】

好ましくは、リガンドは、500nM～50pM、好ましくは100nM～50pM、より好ましくは10nM～100pM、有利には1nM～100pM;例えば50nM以下、好ましくは5nM以下、より好ましくは500pM以下、有利には200pM以下、最も好ましくは100pM以下のIC50で、TNFαとTNFα受容体I(p55受容体)との結合を阻害する。好ましくは、TNFαはヒトTNFαである。

【０１２０】

さらに、本発明は、好ましくは表面プラズモン共鳴によって決定される、300nM～5pM(即ち3×10^{-7}～5×10^{-12}M)、好ましくは50nM～20pM、より好ましくは5nM～200pM、最も好ましくは1nM～100pM、例えば1×10^{-7}M以下、好ましくは1×10^{-8}M以下、より好ましくは1×10^{-9}M以下、有利には1×10^{-10}M以下、最も好ましくは1×10^{-11}M以下のKd;及び/又は5×10^{-1}～1×$10^{-7}$$S^{-1}$、好ましくは1×$10^{-2}$～1×$10^{-6}$$S^{-1}$、より好ましくは5×$10^{-3}$～1×$10^{-5}$$S^{-1}$、例えば5×$10^{-1}$$S^{-1}$以下、好ましくは1×$10^{-2}$$S^{-1}$以下、有利には1×$10^{-3}$$S^{-1}$以下、より好ましくは1×$10^{-4}$$S^{-1}$以下、さらにより好ましくは1×$10^{-5}$$S^{-1}$以下、最も好ましくは1×$10^{-6}$$S^{-1}$以下の$K_{off}$速度定数でTNF受容体Iと結合する、抗TNF受容体I dAb単量体、又はそのようなdAbを含む二重特異性リガンドを提供する。

【０１２１】

好ましくは、dAb単量体リガンドは、標準のアッセイ(例えば、本明細書中に記載のL929又はHeLaアッセイ)において、500nM～50pM、好ましくは100nM～50pM、より好ましくは10nM～100pM、有利には1nM～100pM;例えば50nM以下、好ましくは5nM以下、より好ましくは500pM以下、有利には200pM以下、最も好ましくは100pM以下のND50で、TNFαを中和する。

【０１２２】

好ましくは、dAb単量体又はリガンドは、500nM～50pM、好ましくは100nM～50pM、より好ましくは10nM～100pM、有利には1nM～100pM;例えば50nM以下、好ましくは5nM以下、より好ましくは500pM以下、有利には200pM以下、最も好ましくは100pM以下のIC50で、TNFαとTNFα受容体I(p55受容体)との結合を阻害する。好ましくは、TNF受容体Iの標的はヒトTNFαである。

【０１２３】

さらに、本発明は、1nM～500μM(即ち1×10^{-9}～5×10^{-4})、好ましくは100nM～10μMのKdで血清アルブミン(SA)と結合するdAb単量体(又はそのようなdAbを含む二重特異性リガンド)を提供する。好ましくは、第1の抗SA dAb及び別の標的に対する第2のdAbを含む二重特異性リガンドでは、第2のdAbのその標的に対する親和性(例えば表面プラズモン共鳴によって、例えばBiacoreを使用して測定したKd及び/又はK_{off})は、第1のdAbのSAに対する親和性の1～100000倍(好ましくは100～100000、より好ましくは1000～100000、又は10000～100000倍)である。例えば、第1のdAbは、約10μMの親和性でSAと結合する一方で、第2のdAbは、100pMの親和性でその標的と結合する。好ましくは、血清アルブミンはヒト血清アルブミン(HSA)である。

【０１２４】

一実施形態では、第1のdAb(又はdAb単量体)は、約50、好ましくは70、より好ましくは100、150又は200nMのKdでSA(例えばHSA)と結合する。

【０１２５】

本発明はさらに、本発明の上記態様による前述のdAb単量体の二量体、三量体及びポリマーを提供する。

【０１２６】

dAb単量体、二量体及び三量体を含めた本発明によるリガンドは、C_H2及びC_H3ドメインの一方又は両方並びに任意選択でヒンジ領域を含む、抗体Fc領域と連結することができる。例えば、単一のヌクレオチド配列としてFc領域と連結しているリガンドをコードしているベクターを使用して、そのようなポリペプチドを調製し得る。

【０１２７】

本発明の第2の構成のさらなる態様では、本発明は、少なくとも本明細書中に定義した多特異性リガンドをコードしている一つ又は複数の核酸分子を提供する。一実施形態では、多特異性リガンドは閉構造のリガンドである。別の実施形態では、これは開構造のリガンドである。多特異性リガンドは単一の核酸分子上でコードされていてもよく、或いは、それぞれのエピトープ結合ドメインが別々の核酸分子によってコードされていてもよい。多特異性リガンドが単一の核酸分子によってコードされている、ドメインを融合ポリペプチドとして発現させてもよく、又は別々に発現させ、続いて、例えば化学連結剤を用いて一緒に連結させてもよい。別々の核酸から発現させたリガンドは、適切な手段によって一緒に連結させる。

【０１２８】

核酸は、発現後に宿主細胞からポリペプチドを輸送するためのシグナル配列をさらにコードしていてもよく、発現後に線維状バクテリオファージ粒子の表面構成要素(又は選択ディスプレイ系の他の構成要素)と融合させてもよい。細菌発現及び/又はファージ若しくはファージミドのディスプレイで使用し得るリーダー配列には、pelB、stII、ompA、phoA、bla及びpelAが含まれる。

【０１２９】

本発明の第2の構成のさらなる態様では、本発明は、本発明による核酸を含むベクターを提供する。

【０１３０】

さらなる態様では、本発明は、本発明によるベクターで形質移入した宿主細胞を提供する。

【０１３１】

そのようなベクターからの発現は、例えばバクテリオファージ粒子の表面上に、選択用

のエピトープ結合ドメインを産生するように構成し得る。これにより、提示されたドメインの選択が可能となり、したがって本発明の方法を用いた「多特異性リガンド」の選択が可能となる。

【０１３２】

本発明の第2の構成の好ましい実施形態では、エピトープ結合ドメインは免疫グロブリン可変ドメインであり、単一ドメインV遺伝子レパートリーから選択される。一般に、単一抗体ドメインのレパートリーは、線維状バクテリオファージの表面上に提示される。好ましい実施形態では、それぞれの単一抗体ドメインは、ファージレパートリーと抗原との結合によって選択される。

【０１３３】

本発明は、本発明による開構造又は閉構造のリガンドであり得る多特異性リガンドを少なくとも含むキットをさらに提供する。本発明によるキットは、例えば、診断キット、治療キット、化学又は生物種を検出するキットなどであり得る。

【０１３４】

本発明の第2の構成のさらなる態様では、本発明は、本発明によるリガンドを用いた同種免疫アッセイを提供する。

【０１３５】

本発明の第2の構成のさらなる態様では、本発明は、本発明の方法によって得ることができる閉構造多特異性リガンド、及び製薬上許容される担体、希釈剤又は賦形剤を含む組成物を提供する。

【０１３６】

さらに、本発明は、本発明による「閉構造多特異性リガンド」又は組成物を用いた、疾患を治療する方法を提供する。

【０１３７】

本発明の好ましい実施形態では、疾患は、癌又は炎症性疾患、例えば、関節リウマチ、喘息若しくはクローン病である。

【０１３８】

本発明の第2の構成のさらなる態様では、本発明は、本発明による閉構造多特異性リガンド又は組成物を用いた、疾患の診断を含めた診断方法を提供する。したがって、一般に、分析物と閉構造多特異性リガンドとの結合は、置換の際にシグナルの生成をもたらす薬剤を置換するために活用し得る。例えば、分析物(第2の抗原)の結合は、抗体と結合した酵素(第1の抗原)を置換して、特に酵素がその活性部位によって抗体と保持されている場合に、免疫アッセイの基礎を提供することができる。

【０１３９】

したがって第2の構成の最終態様では、本発明は、

(a)薬剤と結合した閉構造多特異性リガンドを提供するステップであって、前記リガンドが標的分子及び薬剤に対して特異的であり、リガンドによって結合される薬剤が、リガンドから置換された際に検出可能なシグナルの生成をもたらすステップと、

(b)閉構造多特異性リガンドを標的分子に曝すステップと、

(c)薬剤の置換の結果として生成されるシグナルを検出するステップと

を含む、標的分子の存在を検出する方法を提供する。

【０１４０】

本発明の第2の構成の上記態様によれば、有利には、薬剤は、閉構造の多特異性リガンドによって結合された場合に失活している酵素である。或いは、薬剤は、リガンドによって結合された場合に失活又は消光している、酵素の基質及び蛍光、発光又は色素原分子からなる群から選択される任意の一つ又は複数であり得る。

【０１４１】

本明細書中に開示した配列と類似又は相同的な配列(例えば少なくとも約70%の配列同一性)も、本発明の一部である。一部の実施形態では、アミノ酸レベルでの配列同一性は約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上であり得る。核酸レ

ベルでは、配列同一性は約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上であり得る。或いは、核酸セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下(例えば非常に高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件)で相補鎖とハイブリダイズする場合には、相当な同一性が存在する。核酸は、全細胞、細胞溶解液、又は部分的に精製した若しくは実質的に純粋な形態で存在し得る。

【０１４２】

同一性%とは、アミノ酸又はヌクレオチド配列の長さの全ストレッチに沿った同一性%をいうことができる。指定した場合は、アミノ酸又は核酸配列の同一性%とは、例えば、一つ又は複数の抗体CDR領域に沿った、及び/又は一つ又は複数の抗体可変フレームワーク領域に沿った、参照としたアミノ酸又は核酸配列の一つ又は複数の個別の領域からの配列に対する同一性%をいう。例えば、抗体重鎖又は軽鎖単一可変ドメインの一つ又は複数のCDRにわたるアミノ酸レベルでの配列同一性は、抗体重鎖又は軽鎖単一可変ドメインの対応するCDRのアミノ酸配列に対して、それぞれ約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の同一性を有することができる。核酸レベルでは、抗体重鎖又は軽鎖単一可変ドメインの一つ又は複数のCDRをコードしている核酸配列は、抗体重鎖又は軽鎖単一可変ドメインの対応するCDRをコードしている核酸配列に対して、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の同一性を有することができる。核酸レベルでは、抗体重鎖又は軽鎖単一可変ドメインの一つのCDRをコードしている核酸配列は、抗体重鎖又は軽鎖単一可変ドメインの対応するCDRをコードしている核酸配列よりも、それぞれ少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の同一性%を有することができる。一部の実施形態では、同一性%の構造的特徴は機能的側面と連動している。例えば、一部の実施形態では、参照とした核酸又はアミノ酸配列に対して100%未満の同一性を有する核酸配列又はアミノ酸配列は、参照アミノ酸配列又は参照とした核酸によってコードされているアミノ酸配列の少なくとも一つの機能的側面を提示することも必要である。他の実施形態では、参照とした核酸又はアミノ酸配列に対して100%未満の同一性を有する核酸配列又はアミノ酸配列は、それぞれ、参照アミノ酸配列又は参照とした核酸によってコードされているアミノ酸配列の少なくとも一つの機能的側面を提示することも必要であるが、その機能的特徴はわずかに変化していることができる、例えば、参照と比較して指定した抗原に対する親和性の増加を与えることができる。

【０１４３】

二つの配列間の「相同性」又は「配列同一性」又は「類似度」計算(これらの用語は、本明細書中で互換性があるように使用する)は、以下のように行う。配列は、最適な比較の目的でアラインメントを行う(例えば、最適なアラインメントのためにギャップを第1及び第2のアミノ酸又は核酸配列の一方又は両方に導入することができ、非相同配列は比較目的で無視することができる)。好ましい実施形態では、比較目的でアラインメントした参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも60%、さらにより好ましくは少なくとも70%、80%、90%、100%である。その後、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置でのアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドによって占有されている場合は、分子はその位置で同一である(本明細書中で使用するアミノ酸又は核酸の「相同性」は、アミノ酸又は核酸の「同一性」と等価である)。二つの配列間の同一性%は、二つの配列の最適アラインメントのために導入する必要があるギャップの数及びそれぞれのギャップの長さを考慮した、配列によって共有されている同一の位置の数の関数である。

【０１４４】

有利には、BLASTアルゴリズム(バージョン2.0)を配列アラインメントに用い、パラメーターは初期設定値に設定する。BLASTアルゴリズムは、米国政府(「gov」)の国立衛生研究所(「NIH」)のバイオテクノロジー情報センター(「NCBI」)ワールドワイドウェブサイト(「www」)内の、「/Blast/」ディレクトリ内の「blast_help.html」ファイルに詳述されて

いる。検索パラメーターは以下のとおり定義され、定義された初期設定パラメーターに有利に設定されている。

【０１４５】

BLAST(基本ローカルアラインメント検索ツール)とは、プログラムblastp、blastn、blastx、tblastn、及びtblastxによって用いられているヒューリスティックな検索アルゴリズムである。これらのプログラムは、いくつかの拡張により、Karlin及びAltschul、1990、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87(6):2264-8の統計的方法を用いてその発見に有意性を認める(上述の「blast_help.html」ファイル参照)。BLASTプログラムは、配列類似度の検索、例えばクエリー配列に対する相同体を同定するために調整された。このプログラムは、モチーフスタイルの検索には一般に有用ではない。配列データベースの類似度検索の基本的な問題の議論に関しては、Altschul他(1994)を参照されたい。

【０１４６】

バイオテクノロジー情報センターのウェブサイトで利用可能な五つのBLASTプログラムは、以下の作業を行う:

「blastp」アミノ酸のクエリー配列をタンパク質の配列データベースに対して比較する;

「blastn」ヌクレオチドのクエリー配列をヌクレオチドの配列データベースに対して比較する;

「blastx」ヌクレオチドのクエリー配列(両鎖)の六つのフレームの概念的翻訳産物を、タンパク質の配列データベースに対して比較する;

「tblastn」タンパク質のクエリー配列を、六つのリーディングフレームすべてで動的に翻訳されたヌクレオチドの配列データベース(両鎖)と比較する。

【０１４７】

「tblastx」ヌクレオチドのクエリー配列の六つのフレームの翻訳を、ヌクレオチドの配列データベースの六つのフレームの翻訳と比較する。

【０１４８】

BLASTでは以下の検索パラメーターを使用する:

HISTOGRAMは、それぞれの検索のスコアのヒストグラムを表示する。初期設定はyesである。(BLASTマニュアルのパラメーターHを参照)。

【０１４９】

DESCRIPTIONSは、報告される一致(マッチ)配列の短い説明の数を、指定した数に制限する。初期設定の制限は100個の説明である。(マニュアルページのパラメーターVを参照)。EXPECT及びCUTOFFも参照。

【０１５０】

ALIGNMENTSは、高スコアのセグメント対(HSP)が報告されるデータ塩基配列を指定した数に制限する。初期設定の制限は50である。これより多いデータ塩基配列が報告する統計的有意性の閾値を満たす場合は(以下のEXPECT及びCUTOFF参照)、最大の統計的有意性が帰する一致のみが報告される。(BLASTマニュアルのパラメーターBを参照)。

【０１５１】

EXPECTは、データ塩基配列に対する一致を報告するための統計的有意性の閾値である。初期設定値は10であり、Karlin及びAltschul(1990)の確率的モデルによれば、10個の一致が偶然によってのみ見つかると予測されている。一致に帰する統計的有意性がEXPECT閾値よりも高い場合は、一致は報告されない。より低いEXPECT閾値がよりストリンジェントであり、これにより、より少ない偶然の一致が報告される。少数値が許容される。(BLASTマニュアルのパラメーターEを参照)。

【０１５２】

CUTOFFは、高スコアのセグメント対を報告するためのカットオフスコアである。初期設定値はEXPECT値から計算される(上記参照)。HSPは、それに帰する統計的有意性が、CUTOFF値に等しいスコアを有する独立のHSPに帰するものと少なくとも同じ又はそれより高い場合にのみ、データ塩基配列について報告される。より高いCUTOFF値がよりストリンジェン

トであり、これにより、より少ない偶然の一致が報告される。(BLASTマニュアルのパラメーターS参照)。典型的には、有意性の閾値は、EXPECTを用いてより直感的に管理することができる。

【０１５３】

MATRIXは、BLASTP、BLASTX、TBLASTN及びTBLASTXの代替スコアマトリックスを指定する。初期設定マトリックスはBLOSUM62(Henikoff及びHenikoff、1992、Proc.Natl.Aacad.Sci.USA 89(22):10915-9)である。有効な代替選択には、PAM40、PAM120、PAM250及びIDENTITYが含まれる。BLASTNには利用可能な代替スコアマトリックスが存在しない。BLASTNのリクエストでMATRIXの指示を指定すると、エラー応答が返される。

【０１５４】

STRANDは、TBLASTN検索をデータ塩基配列の上若しくは下の鎖のみに制限する、又はBLASTN、BLASTX若しくはTBLASTX検索をクエリー配列の上若しくは下の鎖のリーディングフレームのみに制限する。

【０１５５】

FILTERは、Wootton及びFederhen(1993)Computers and Chemistry 17:149-163のSEGプログラムによって決定される組成の複雑性が低いクエリー配列のセグメント、又は、Claverie及びStates、1993、Computers and Chemistry 17:191-201のXNUプログラムによって、若しくはBLASTNにはTatusov及びLipmanのDUSTプログラムによって決定される短周期性の内部反復からなるセグメントを覆い隠す(NCBIのワールドワイドウェブサイトを参照)。フィルタリングにより、blastアウトプットからの統計的に有意であるが生物学的に興味の持たれない報告(例えば、一般的な酸性、塩基性又はプロリンに富んだ領域に対するヒット)を排除し、データ塩基配列に対する具体的一致に利用可能な、クエリー配列のより生物学的に興味の持たれる領域を残すことができる。

【０１５６】

フィルタープログラムによって見つかる複雑性の低い配列は、ヌクレオチド配列では文字「N」(例えば「N」を13回繰り返す)、タンパク質配列では文字「X」(例えば「X」を9回繰り返す)を用いて置き換える。

【０１５７】

フィルタリングはクエリー配列(又はその翻訳産物)にのみ適用し、データ塩基配列には適用しない。初期設定のフィルタリングは、BLASTNにはDUST、他のプログラムにはSEGである。

【０１５８】

SWISS-PROT中の配列に適用した場合、SEG、XNU、又は両方によって何も覆い隠されないのは珍しいことではないので、フィルタリングは常に効果を生じると期待すべきではない。さらに、一部の例では、配列の全体が覆い隠され、これは、フィルタリングしていないクエリー配列に対して報告された任意の一致の統計的有意性が疑わしいことを示す。

【０１５９】

NCBI-giにより、受託番号及び/又は場所名に加えて、NCBI gi識別子がアウトプットに示される。

【０１６０】

最も好ましくは、配列比較は、上述のNCBIのワールドワイドウェブサイトの「/BLAST」ディレクトリで提供されている、単純なBLAST検索アルゴリズムを用いて実施する。

【図面の簡単な説明】

【０１６１】

【図１】V_H HSAの抗原結合部位中にある位置H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H96、H97、H98(それぞれDVT又はNNKがコードされている)でのV_H/HSAの多様化を示す図である。V_Kの配列は位置L50、L53で多様化している。

【図２】以下を示す図である。ライブラリー1:生殖系列V_K/DVT V_H、ライブラリー2:生殖系列V_K/NNK V_H、ライブラリー3:生殖系列V_H/DVT V_K、ライブラリー4:生殖系列V_H/NNK V_K、ファージディスプレイ/ScFv様式。これらのライブラリーは、クローンの大多数及び選

択されたライブラリーが機能的であるように、包括的リガンドプロテインA及びプロテインLとの結合について事前に選択されている。ライブラリーは、HSA(第1ラウンド)及びβ-gal(第2ラウンド)又はHSA β-gal選択又はβ-gal(第1ラウンド)及びHSA(第2ラウンド)のβ-gal HSA選択で選択した。これらのPCRクローンからの可溶性scFvを配列中で増幅した。二重特異性抗体K8をコードしている一つのクローンをさらなる作業用に選択した。

【図３】V_H鎖及びV_κ鎖のアラインメントを示す図である。

【図４】K8抗体の結合特性の特徴づけを示す図であり、K8抗体の結合特性をモノクローナルファージELISAによって特徴づけ、二重特異性K8抗体は、HSA及びβ-galと結合し、1.0を超える吸収シグナルでファージの表面上に提示されることが見出された。他のタンパク質との交差反応性は検出されなかった。

【図５】既知の濃度のK8抗体断片を用いて行った可溶性scFv ELISAを示す図である。96ウェルプレートを、100μgのHSA、10μg/mlのBSA及びβ-gal並びに100μg/mlのプロテインAを用いて、1μg/mlの濃度でコーティングした。K8 scFvの段階希釈の50μgを施用し、結合した抗体断片をプロテインL-HRPで検出した。ELISA結果により、K8抗体の二重特異性性質が確認された。

【図６】可溶性scFv ELISAを用いて分析したクローンK8V_K/ダミーV_Hの結合特徴を示す図である。可溶性scFv断片の産生は、Harrison他、Methods Enzymol.1996;267:83-109に記載のようにIPTGによって誘導し、scFvを含む上清を直接アッセイした。可溶性scFv ELISAを実施例1に記載のように行い、結合したscFvをプロテインL-HRPで検出した。ELISA結果により、このクローンは依然としてβ-galと結合できるが、BSAの結合は消滅したことが明らかとなった。

【図７】可変ドメインベクター1及び2の配列を示す図である。

【図８】V_H1/V_H2多特異性リガンドの構築に用いたC_Hベクターのマップを示す図である。

【図９】$V_\kappa1$/$V_\kappa2$多特異性リガンドの構築に用いたV_κベクターのマップを示す図である。

【図１０】TAR1-5二量体4、TAR1-5-19二量体4及びTAR1-5-19単量体を比較するTNF受容体アッセイを示す図である。

【図１１】TAR1-5二量体1～6を比較するTNF受容体アッセイを示す図である。すべての二量体はFPLC精製し、最適な二量体種の結果を示す。

【図１２】3U、5U又は7Uリンカーを有するdAb-リンカー-dAb様式、Fab様式及びシステインヒンジリンカー様式の、様々な様式のTAR1-5 19ホモ二量体のTNF受容体アッセイを示す図である。

【図１３】ライブラリー1のダミーVH配列を示す図である。VHフレームワークの配列は生殖系列配列DP47-JH4bに基づく。NNKランダム化(N=A又はT又はC又はGヌクレオチド;K=G又はTヌクレオチド)がライブラリー1内に組み込まれている位置を太字及び下線の文字列で示した。

【図１４】ライブラリー2のダミーVH配列を示す図である。VHフレームワークの配列は生殖系列配列DP47-JH4bに基づく。NNKランダム化(N=A又はT又はC又はGヌクレオチド;K=G又はTヌクレオチド)がライブラリー2内に組み込まれている位置を太字及び下線の文字列で示した。

【図１５】ライブラリー3のダミーV_κ配列を示す図である。V_κフレームワークの配列は生殖系列配列DP$_K$9-J$_K$1に基づく。NNKランダム化(N=A又はT又はC又はGヌクレオチド;K=G又はTヌクレオチド)がライブラリー3内に組み込まれている位置を太字及び下線の文字列で示した。

【図１６】抗MSA dAb、MSA16及びMSA26のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。

【図１７－１】MSA16及び26の阻害Biacoreを示す図である。精製したdAb MSA16及びMSA26を、Kdを決定するために阻害Biacoreによって分析した。手短に述べると、高密度のMSAでコーティングしたBiacore CM5チップ上で200RUの応答を達成するために必要なdAbの濃度を決定するために、dAbを試験した。dAbの必要な濃度を決定した後、予測されるKd付近の

濃度範囲のMSA抗原をdAbと事前に混合し、終夜インキュベーションした。その後、それぞれの事前混合物におけるMSAでコーティングしたBiacoreチップとdAbとの結合を30μl/分間の高流速で測定した。

【図１７－２】MSA16及び26の阻害Biacoreを示す図である。精製したdAb MSA16及びMSA26を、Kdを決定するために阻害Biacoreによって分析した。手短に述べると、高密度のMSAでコーティングしたBiacore CM5チップ上で200RUの応答を達成するために必要なdAbの濃度を決定するために、dAbを試験した。dAbの必要な濃度を決定した後、予測されるKd付近の濃度範囲のMSA抗原をdAbと事前に混合し、終夜インキュベーションした。その後、それぞれの事前混合物におけるMSAでコーティングしたBiacoreチップとdAbとの結合を30μl/分間の高流速で測定した。

【図１８】注射後のMSA16の血清レベルを示す図である。dAb MSA16の血清半減期をマウスにおいて決定した。MSA16を、約1.5mg/kgの単一の静脈内注射でCD1マウスに投薬した。2区画モデルを用いたモデリングにより、MSA16は0.98時間のt1/2α、36.5時間のt1/2β及び913時間・mg/mlのAUCであったことが示された。MSA16はHEL4(抗ニワトリ卵白リゾチームdAb)と比較して相当に延長された半減期を有しており、0.06時間のt1/2α及び0.34時間のt1/2βであった。

【図１９】MSA26Ck及びTAR1-5-19CHを含むFab様断片と結合するTNFの阻害を示す、ELISA(a)及びTNF受容体アッセイ(c)の図である。MSAをFab様断片と共に加えることによって、阻害のレベルが低下する。1μg/mlのTNFαでコーティングしたELISAプレートを、二重特異性$V_\kappa C_H$及び$V_\kappa C_\kappa$ Fab様断片、及びELISA上で同様のシグナルを与えるように計算した濃度でdAbと結合する対照TNFαでプローブした。二重特異性及び対照dAbをどちらも用いて、2mg/mlのMSAの存在下及び不在下で、ELISAプレートをプローブした。二重特異性ウェルのシグナルは50%を超えて低下したが、dAbウェルのシグナルはまったく低下しなかった(図19a参照)。同じ二重特異性タンパク質を、MSAを用いた及び用いない受容体アッセイにも入れ、MSAによる競合も示された(図19c参照)。これは、MSAと二重特異性との結合が、TNFαとの結合と競合的であることを実証している。

【図２０】TAR1-5-19dAb及びMSA16dAbのジスルフィド結合したヘテロ二量体との結合のTNFの阻害を示す、TNF受容体アッセイの図である。MSAを二量体と共に加えることによって、阻害のレベルが用量依存的な様式で低下する。一定濃度のヘテロ二量体(18nM)並びにMSA及びHSAの段階希釈の存在下でTNF受容体アッセイ(図19(b))を実施した。ある濃度範囲(2mg/mlまで)のHSAの存在は、二量体がTNFαを阻害する能力の低下を引き起こさなかった。しかし、MSAの添加は、二量体がTNFαを阻害する能力の用量依存的な低下を引き起こした(図19a)。このことは、MSA及びTNFαが、cys結合したTAR1-5-19、MSA16二量体との結合に対して競合することを実証している。MSA及びHSAは、単独ではアッセイにおいてTNF結合レベルに影響を与えなかった。

【図２１】ヒト血清アルブミン(HSA)の精製した組換えドメインを示す図であり、レーン1～3はそれぞれHSAドメインI、II及びIIIを含む。

【図２２】HSAと結合するdAbが、完全長HSA(レーン8)及びHSAドメインII(レーン6)と結合するが、HSAドメインI及びIII(それぞれレーン5及び7)と結合しないことを示す、免疫沈降の例の図である。HSAと結合しないdAbは、完全長HSA又はHSAドメインI、II、若しくはIIIのいずれもプルダウンしない(レーン1～4)。

【図２３】表面プラズモン共鳴によって同定した、dAbによるHSAドメインの同定の例を示す図である。研究目的のdAbを、低密度にコーティングしたヒト血清アルブミンCM5センサーチップ(Biacore)上に、記載したように注入した。第1点では、研究目的のdAbを単独で、1μMで注入した。第2点では、同時注入コマンドを使用して、試料の注入を、1μMのdAb+ピキア(Pichia)中で産生させた7μMのHSAドメイン1、2又は3の混合物に切り替えた。第3点では、試料の注入を停止し、バッファー流を続けた。二つの異なるdAbの結果を23a)及び23b)に示す。dAbに、それが結合するHSAドメインを注入した際、これはチップ上のHSAともはや結合することができない複合体を形成し、したがって、Biacoreのシグナルは第2点で低下し、dAb、可溶性HSAドメイン、及びチップと結合したHSAの間の三方向の平衡を

反映する解離速度を有する。ドメインがdAbと結合しない場合、シグナルは第2点で変化しないまま保たれ、流れをバッファーに切り替える第3点でのみ低下し始める。これらのどちらの場合でも、dAbはHSAドメイン2と結合する。

【図２４－１】ファージ選択によって同定したAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)クローンの抗体配列を示す図である。すべてのクローンはヒト生殖系列遺伝子とアラインメントされている。生殖系列と同一の残基を「.」で表した。VH CDR3では、アラインメントであるが残基を表さないものを容易にするために記号「-」を使用した。すべてのクローンは、VHライブラリーには重鎖生殖系列遺伝子V3-23/DP47及びJH4b並びに抗原結合部位中の位置に側鎖の多様性が組み込まれているV_κライブラリーにはκ軽鎖遺伝子O12/O2/DPK9及びJ_κ1を含む、単一のヒトフレームワークに基づくライブラリーから選択した。

【図２４－２】図２４－１の続きである。

【図２５】ヒト血清アルブミンの三つのドメインのアラインメントを示す図である。システイン残基の保存を明白に見ることができる。

【発明を実施するための形態】

【０１６２】

定義

「相補的」。二つの免疫グロブリンドメインは、同族対若しくは群を形成する構造のファミリーに属するか、又はそのようなファミリーに由来し、この特徴を保持している場合に、「相補的」である。例えば、抗体のV_Hドメイン及びV_Lドメインは相補的であり、二つのV_Hドメインは相補的ではなく、二つのV_Lドメインは相補的でない。相補的ドメインは、T細胞受容体のV_α及びV_β(又はγ及びδ)ドメインなどの、免疫グロブリンスーパーファミリーの他のメンバーで見つかり得る。本発明の第2の構成の場面では、非相補的ドメインは、標的分子とは協同的に結合しないが、同一又は異なる分子上にあり得る異なる標的エピトープに独立して作用する。そのように操作しなければエピトープと結合しないタンパク質足場に基づくドメインなどの人工ドメインは、非相補的である。同様に、(例えば)免疫グロブリンドメイン及びフィブロネクチンドメインに基づく二つのドメインは相補的でない。

【０１６３】

「免疫グロブリン」。これは、二つのβシート及び通常は保存されているジスルフィド結合を含む、抗体分子の免疫グロブリンの折り畳み特徴を保持しているポリペプチドのファミリーをいう。免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーは、免疫系における広範な役割(例えば、抗体、T細胞受容体分子など)、細胞接着の関与(例えばICAM分子)及び細胞内シグナル伝達(例えばPDGF受容体などの受容体分子)を含めた、in vivoの細胞性及び非細胞性の相互作用の多くの側面に関与している。本発明は、結合ドメインを保有するすべての免疫グロブリンスーパーファミリー分子に適用可能である。好ましくは、本発明は抗体に関する。

【０１６４】

「組み合わせる」。本発明による可変ドメインは、組み合わされてドメイン群を形成する。例えば、V_LドメインをV_Hドメインと組み合わせるなど、相補的ドメインを組み合わせることができる。非相補的ドメインも組み合わせ得る。ドメインは、共有又は非共有結合の手段によるドメインの連結を含む、いくつかの方法で組み合わせることができる。

【０１６５】

「ドメイン」。ドメインとは、タンパク質の残りの部分とは独立してその三次構造を保持している、折り畳まれたタンパク質構造である。一般に、ドメインはタンパク質の別々の機能的特性を担っており、多くの場合は、タンパク質及び/又はドメインの残りの部分を機能喪失せずに付加、除去、又は他のタンパク質に移し得る。

【０１６６】

本明細書中で使用する「単一可変ドメイン」とは、エピトープ、抗原又はリガンドと独立して特異的に結合することができる、即ち、別の結合ドメインを必要とせずにエピトー

プ、抗原又はリガンドと協同的に結合するドメインである。そのようなエピトープ、抗原若しくはリガンドは、天然のものであるか、又は、天然エピトープ、抗原若しくはリガンドの変異体、又は合成であり得る。単一可変ドメインの「可変」部分が、それぞれの特定の単一可変ドメインの結合特異性を本質的に決定する。したがって、単一可変ドメインの場面における用語「可変」とは、配列可変性は単一可変ドメインにわたって均等に分布されていないが、本質的に単一可変ドメインのフレームワーク又は骨格部分間に分布されていることをいう。例えば、抗体単一可変ドメインでは、可変性は、一般的に相補性決定領域(CDR)として知られる1～3個のセグメントに集中している。一つ又は複数のCDRは、軽鎖又は重鎖の抗体フレームワーク領域(FR)間に分布されて、そのそれぞれが別の結合ドメインとは独立してエピトープと特異的に結合する抗体軽鎖単一可変ドメイン又は抗体重鎖単一可変ドメインのどちらかを、それぞれ形成することができる。その1～3個のCDRがTCRフレームワークドメイン間に分布されているT細胞受容体単一可変ドメインも同様の構造である。

【０１６７】

したがって、単一可変ドメインの結合特異性を与える可変部分は、足場部分の残りの部分が実質的に同一である他の単一可変ドメインとは配列が大幅に異なり、したがって、多様な範囲の結合特異性を有し得る。単一可変ドメインの足場には、抗体フレームワーク足場、コンセンサス抗体フレームワーク、また、細菌タンパク質に起源を持つ及び/又は由来する足場、例えば、GroEL、GroEs、SpA、SpG、並びに真核タンパク質に由来する足場、例えば、CTLA-4、リポカリン、フィブロネクチンなどが含まれる。単一可変ドメイン可変部分の一供給源には、非免疫グロブリン足場及び抗体フレームワーク足場上に移植して抗体単一可変ドメインを作製することができる一つ又は複数のCDRが含まれる。単一可変ドメインの変異の別の供給源は、フィブロネクチンなどの非免疫グロブリンフレームワーク足場中の選択した位置の多様化であり得、これにより、NNKコドン多様性などの分子生物学的技術を用いて単一可変ドメインを作製する。同様に、この変異の供給源は抗体単一可変ドメインにも適用可能である。

【０１６８】

抗体単一可変ドメインは、抗体を産生する種によってコードされている及び/又は産生される抗体配列に由来することができ、これには、一つ若しくは複数のフレームワーク領域若しくはフレームワークコンセンサス配列及び/又は一つ若しくは複数のCDRを含めた抗体可変領域の断片及び/又は誘導体が含まれる。したがって、抗体単一可変ドメインには、抗体軽鎖可変領域、抗体重鎖可変領域、又は抗体VHH領域の断片及び/又は誘導体が含まれる。例えば、抗体VHH領域には、ラクダ科例えば、ラクダ及びラマに内在するもの、並びにアメリカテンジクザメ(nurse shark)及びテンジクザメ(wobbegong shark)(Roux他、1998 PNAS 95(20):11804-9)の新規抗原受容体(NAR)並びにスポッテッドラットフィッシュ(spotted ratfish)のVH領域(Rast他、1998 Immunogenetics 47:234-245)が含まれる。抗体軽鎖可変ドメイン及び抗体重鎖可変ドメインには、好ましくはそれだけには限定されないが、ヒト、マウス、ラット、ブタ、カニクイザル、ハムスター、ウマ、ウシ、ヤギ、イヌ、ネコ、及びトリ種を含めた動物種に内在するもの、例えばそれぞれヒトVκ及びヒトVH3が含まれる。抗体軽鎖可変領域及び抗体重鎖可変領域にはまた、VH3ファミリーなどのV領域ファミリーのものを含めた、下記に記載のコンセンサス抗体フレームワークも含まれる。T細胞受容体単一可変ドメインとは、T細胞受容体鎖、例えば、α、β、γ及びδ鎖に由来し、抗体単一可変ドメインと同様に、エピトープ又は抗原又はリガンドと、そのエピトープ、抗原又はリガンドに対する別の結合ドメインとは独立して結合する、単一可変ドメインである。

【０１６９】

抗体単一可変ドメインにはまた、抗体又はT細胞受容体に由来しない足場を含み、足場内にCDR1、CDR2及び/若しくはCDR3、その誘導体若しくは断片、又は全抗体Vドメインのうちの一つ又は複数を取り込むことによって、その遺伝子操作する前の状態と比べて結合特異性の多様性を示すように遺伝子操作した、タンパク質ドメインも包含される。抗体単一

可変ドメインにはまた、下記に記載のGroEL単一可変ドメイン多量体によって例示されるように、非免疫グロブリン足場及び免疫グロブリン足場がどちらも含まれ得る。好ましくは、CDRは、抗体鎖、例えば、VH、VL、及びVHHの抗体Vドメインに由来する。抗体鎖は、第2の抗体鎖と協力して抗原若しくはエピトープと特異的に結合するものであるか、又は、抗体鎖は、VHH鎖などの第2の抗体鎖とは独立して抗原若しくはエピトープと特異的に結合するものであり得る。非免疫グロブリン足場を含む抗体単一可変ドメイン内への一つ又は複数のCDRの組み込みは、非免疫グロブリン足場の単一可変ドメインが、エピトープ又は抗原又はリガンドと、そのエピトープ、抗原又はリガンドに対する別の結合ドメインとは独立して特異的に結合する能力をもたらさなければならない。

【０１７０】

単一ドメインは、結合部位となるように設計された部位で多様性を導入し、次いで例えばディスプレイ技術を用いて所望の結合特徴を選択することによって、単一可変ドメインに変換する。足場の特定のループのアミノ酸配列を、例えばNNKコドンを導入することによってランダム化することによって、目的の非免疫グロブリン足場の特定部位内に多様性を導入することができる。多様性を生じさせ、次いで所望の結合特徴を選択するこの機構は、自然において抗体結合部位を構成するループ中で生じる多様性からもたらされる高親和性且つ抗原に特異的な抗体の、天然の選択に類似している。理想的には、小さい且つ抗体ループに類似の折り畳みを含む単一ドメインを単一可変ドメインに変換し、単一可変ドメインの変異体を発現させ、この中から、単一可変ドメインの多数の変異体を含むライブラリーから所望の結合特異性及び特徴を含む単一可変ドメインを選択することができる。

【０１７１】

単一可変ドメインの命名:場合によっては、抗体単一可変ドメインの命名は、最初の「d」又は文字列「Dom」を抜いて省略し、例えば、Ab7h24はdAb7h24と同一であり、これはDOM7h24と同一である。

【０１７２】

抗体単一可変ドメインとは、抗体可変ドメインに特徴的な配列を含む、折り畳まれたポリペプチドドメインを意味する。したがって、これには、完全抗体可変ドメイン並びに改変可変ドメイン、例えば一つ又は複数のループが抗体可変ドメインに特徴的でない配列によって置き換えられているもの、或いは切断された又はN若しくはC末端伸長を含む抗体可変ドメイン、及び完全長ドメインの結合活性及び特異性を少なくとも部分的に保持している可変ドメインの折り畳まれた断片が含まれる。

【０１７３】

「レパートリー」とは、その一次配列が異なる多様な変異体、例えばポリペプチド変異体のコレクションである。本発明中で使用するライブラリーは、少なくとも1000個のメンバーを含むポリペプチドのレパートリーを包含する。

【０１７４】

「ライブラリー」。用語ライブラリーとは、異種ポリペプチド又は核酸の混合物をいう。ライブラリーは、そのそれぞれが単一のポリペプチド又は核酸配列を有するメンバーからなる。この点で、ライブラリーは、レパートリーと同義である。ライブラリーのメンバー間の配列の差異が、ライブラリー中に存在する多様性を担っている。ライブラリーは、ポリペプチド若しくは核酸の単純な混合物の形態、又は、核酸のライブラリーで形質転換させた生物若しくは細胞、例えば、細菌、ウイルス、動物若しくは植物細胞などの形態であり得る。好ましくは、それぞれの個々の生物又は細胞は、一つ又は限定された数のライブラリーメンバーのみを含む。有利には、核酸によってコードされているポリペプチドの発現を可能にするために、核酸を発現ベクター内に取り込ませる。したがって、好ましい態様では、ライブラリーは、宿主生物の集団の形態であってよく、それぞれの生物は、ライブラリーの単一メンバーを核酸の形態で含み、発現させてその対応するポリペプチドメンバーを産生することができる、発現ベクターの一つ又は複数のコピーを含む。したがって、宿主生物の集団は、遺伝的に多様なポリペプチド変異体の大きなレパートリーをコードしている潜在性を有する。

【０１７５】
「閉構造の多特異性リガンド」とは、本明細書中で定義する少なくとも二つのエピトープ結合ドメインを含む本明細書中で定義する多特異性リガンドを説明するものである。用語「閉構造」(多特異性リガンド)とは、リガンドのエピトープ結合ドメインが、一つのエピトープ結合ドメインによるエピトープ結合が別のエピトープ結合ドメインによるエピトープ結合と競合するように配置されていることを意味する。即ち、同族エピトープは、それぞれのエピトープ結合ドメインによって個々に結合し得るが、同時には結合し得ない。リガンドの閉構造は、本明細書中に記載の方法を用いて達成することができる。
【０１７６】
「抗体」。抗体(例えば、IgG、IgM、IgA、IgD若しくはIgE)又は断片(Fab、$F(ab')_2$、Fv、ジスルフィド連結Fv、scFv、閉構造多特異性抗体、ジスルフィド連結scFv、二重特異性抗体など)である。これらは、自然に抗体を産生する任意の種から得られるものであるか、組換えDNA技術によって作製したものかにかかわらない。また、血清、B細胞、ハイブリドーマ、トランスフェクトーマ、酵母若しくは細菌から単離したかどうかにかかわらない。
【０１７７】
「二重特異性リガンド」とは、本明細書中で定義する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン及び第2の免疫グロブリン単一可変ドメインを含むリガンドであり、可変ドメインは、通常は単一特異性免疫グロブリンによって結合されない同一抗原上の二つの異なる抗原又は二つのエピトープと結合することができる。例えば、二つのエピトープは同一ハプテン上にあってもよいが、同一のエピトープではなく、又は単一特異性リガンドによって結合されるほど十分に隣接していない。本発明による二重特異性リガンドは、異なる特異性を有する可変ドメインからなり、同じ特異性を有する相互に相補的な可変ドメイン対を含まない。したがって、本明細書中に定義するように二つの単一可変ドメインを含む二重特異性リガンドとは、本明細書中で二つ以上の単一可変ドメインを含むと定義されている多量体リガンドのサブセットであり、単一可変ドメインのうちの少なくとも二つは同一の抗原上の二つの異なる抗原又は二つの異なるエピトープと結合することができる。さらに、本明細書中に定義する二重特異性リガンドはまた、抗体単一可変ドメイン、並びに単一可変ドメインではない第2の抗原及び/又はエピトープ結合ドメインを含むリガンドとも明確に異なる。さらに、本明細書中に定義する二重特異性リガンドはまた、抗原/エピトープ結合ドメインがどちらも本明細書中に定義する単一可変ドメインではない第1及び第2の抗原/エピトープ結合ドメインを含むリガンドとも明白に異なる。
【０１７８】
「抗原」とは、本発明によるリガンドによって結合される分子である。典型的には、抗原は抗体リガンドによって結合され、抗体応答をin vivoで産生することができる。これは、ポリペプチド、タンパク質、核酸又は他の分子であり得る。一般に、本発明による二重特異性リガンドは、特定の抗原に対する標的特異性について選択する。従来の抗体及びその断片の場合、可変ループ(L1、L2、L3及びH1、H2、H3)によって定義される抗体結合部位は、抗原と結合することができる。
【０１７９】
「エピトープ」とは、従来的に免疫グロブリンV_H/V_L対によって結合される構造ユニットである。エピトープは抗体の最小結合部位を定義し、したがって、抗体の特異性の標的を表す。単一ドメイン抗体の場合、エピトープは、単離された可変ドメインによって結合される構造ユニットを表す。エピトープ結合ドメインは、タンパク質足場及びエピトープ相互作用部位(これらは有利にはタンパク質足場の表面上にある)を含む。エピトープ結合ドメインは、直鎖状でないエピトープ相互作用部位を含むことができ、例えば、エピトープ結合ドメインが、複数のエピトープ相互作用部位がそれらの間に介在領域を有する、例えば、FRによって隔てられたCDRを含む、又は別々のポリペプチド鎖上に存在する場合がそうである。或いは、エピトープ結合ドメインは、一つのポリペプチド鎖上の連続的にコードされているアミノ酸からなる直鎖状エピトープ相互作用部位を含むことができる。

【０１８０】
「包括的リガンド」とは、レパートリーのすべてのメンバーと結合するリガンドである。一般に、これらは上記定義した抗原結合部位を介して結合しない。非限定的な例には、プロテインA、プロテインL及びプロテインGが含まれる。
【０１８１】
「選択」。ドメインと抗原若しくはエピトープ又は抗体と抗原若しくはエピトープとの間で結合相互作用が起こる、スクリーニング又はダーウィン選択プロセスによって導く。したがって、第1の可変ドメインは、相補的可変ドメインが存在する又は存在しない場合における、抗原又はエピトープとの結合について選択し得る。
【０１８２】
「普遍的フレームワーク」とは、カバット(Kabat)(「免疫学的な対象となるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」、米国保健社会福祉省)によって定義されている配列中で保存されている抗体の領域、又はChothia及びLesk、(1987)J.Mol.Biol.196:910-917によって定義されているヒト生殖系列免疫グロブリンレパートリー若しくは構造に対応する、単一抗体フレームワーク配列である。本発明は、超可変領域中の変異によって単独によって事実上任意の結合特異性の誘導を可能にすることが見出されている、単一のフレームワーク、又はそのようなフレームワークの組の使用を提供する。
【０１８３】
本明細書中で使用する「コンジュゲート」とは、薬物と結合している血清アルブミン抗体の抗原結合断片と結合する組成物をいう。
【０１８４】
本明細書中で使用する、用語「小分子」とは、1,500ダルトン未満、好ましくは1000ダルトン未満の分子量を有する化合物を意味する。
【０１８５】
そのようなコンジュゲートには、薬物が共有結合している血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合断片を含む「薬物コンジュゲート」、及び薬物が非共有結合している血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合断片を含む「非共有薬物コンジュゲート」が含まれる。
【０１８６】
本明細書中で使用する「薬物コンジュゲート」とは、薬物が共有結合している血清アルブミンと結合する抗体の抗原結合断片を含む組成物をいう。薬物は、適切なリンカー部分を介して抗原結合断片と直接又は間接的に共有結合していることができる。薬物は、アミノ末端、カルボキシル末端又は適切なアミノ酸側鎖(例えばリシンのアミノ基)を介してなど、任意の適切な位置で抗原結合断片と結合していることができる。
【０１８７】
「半減期」とは、リガンドの血清濃度がin vivoで、例えば天然の機構によるリガンドの分解及び/又はリガンドのクリアランス若しくは隔離によって、50%低下するのに要する時間である。本発明のリガンドは、in vivoで安定化されており、その半減期は、分解及び/又はクリアランス若しくは隔離に抵抗する分子と結合することによって増加している。典型的には、そのような分子は、それ自体が長いin vivo半減期を有する天然タンパク質である。リガンドの半減期は、その機能的活性が、半減期を増加させる分子に特異的でない同様のリガンドよりも長い期間の間in vivoで持続する場合に、増加している。したがって、HSA及び標的分子に特異的なリガンドを、HSAとは結合しないが別の分子とは結合するという点でHSAに対する特異性が存在しない、同じリガンドと比較する。例えば、これは、標的分子上の第2のエピトープと結合し得る。典型的には、半減期は10%、20%、30%、40%、50%以上増加する。半減期の2×、3×、4×、5×、10×、20×、30×、40×、50×以上の範囲の増加が可能である。或いは、又はさらに、半減期の30×まで、40×、50×、60×、70×、80×、90×、100×、150×の範囲の増加が可能である。
【０１８８】

宿主におけるリガンドのTβ半減期を血清アルブミンのTβ半減期と比較するために使用する場合の語句「実質的に同じ」とは、宿主におけるリガンドのTβ半減期が、同一宿主、好ましくはヒト宿主における血清アルブミンのTβ半減期自体と50%以下異なる、例えば、そのようなリガンドのTβ半減期が指定した宿主における血清アルブミンのTβ半減期よりも50%以下短い又は50%以下長いことを意味する。好ましくは、語句「実質的に同じ」に言及する場合、宿主におけるリガンドのTβ半減期は、血清アルブミン自体の半減期と20%～10%以下異なり、より好ましくは、血清アルブミン自体の半減期と9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、若しくは1%以下、又はそれ以下異なるか、或いは血清アルブミン自体の半減期とまったく異ならない。

【０１８９】

或いは、宿主におけるリガンドのTβ半減期を血清アルブミンのTβ半減期と比較するために使用する場合の語句「実質的に同じでない」とは、宿主におけるリガンドのTβ半減期が、同一宿主、好ましくはヒト宿主における血清アルブミンのTβ半減期自体と少なくとも50%異なる、例えば、リガンドのTβ半減期が指定した宿主における血清アルブミンのTβ半減期よりも50%を超えて長いことを意味する。

【０１９０】

「同種免疫アッセイ」とは、結合及び未結合の試薬を分離するステップを用いる必要なしに分析物が検出される免疫アッセイである。

【０１９１】

「実質的に同一な」又は「実質的に相同的な」とは、第1及び第2のアミノ酸又はヌクレオチド配列が同様の活性を有するように、第2のアミノ酸又はヌクレオチド配列と十分な数の同一又は等価の(例えば同様の側鎖と、例えば、保存されているアミノ酸置換)アミノ酸残基又はヌクレオチドを含む、第1のアミノ酸又はヌクレオチド配列である。本明細書中に記載の第1及び第2の抗体並びに/又は単一可変ドメインの場合、第2の抗体又は単一可変ドメインは、第1のものと同じ結合特異性を有し、且つ第1の抗体又は単一可変ドメインの親和性の少なくとも50%、又は少なくとも55%まで、60%、70%、75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%を有している。

【０１９２】

本明細書中で使用する、用語「低いストリンジェンシー」、「中程度のストリンジェンシー」、「高いストリンジェンシー」、又は「非常に高いストリンジェンシー条件」とは、核酸ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件を説明している。ハイブリダイゼーション反応を行うための指針は、その全体が本明細書中に参照により組み込まれている分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)、John Wiley & Sons、ニューヨーク(1989)、6.3.1-6.3.6中に見つけることができる。水性及び非水性方法がこの参考文献中に記載されており、どちらを用いることもできる。本明細書中で言及する具体的なハイブリダイゼーション条件は以下のとおりである:(1)低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)、約45℃、次いで0.2×SSC、0.1%のSDSで二回の洗浄、少なくとも50℃(洗浄の温度は、低いストリンジェンシー条件には55℃まで上げることができる);(2)中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、6×SSC、約45℃、次いで0.2×SSC、0.1%のSDSで一回又は複数回の洗浄、60℃;(3)高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、6×SSC、約45℃、次いで0.2×SSC、0.1%のSDSで一回又は複数回の洗浄、65℃;及び好ましくは(4)非常に高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、0.5Mのリン酸ナトリウム、7%のSDS、65℃、次いで0.2×SSC、1%のSDSで一回又は複数回の洗浄、65℃。非常に高いストリンジェンシー条件(4)が好ましい条件であり、別段に指定しない限りは使用すべき条件である。

【０１９３】

「表面プラズモン共鳴」競合アッセイを使用して、ヒト血清アルブミンなどの特定の抗原又はエピトープが、特定のdAbなどの本明細書中に記載の血清アルブミンと結合するリガンドとの結合に関してカニクイザル血清アルブミンなどの別の抗原又はエピトープと競

合するするかどうかを決定できる。同様に、競合アッセイを使用して、dAbなどの第1のリガンドが、標的抗原又はエピトープとの結合に関してdAbなどの第2のリガンドと競合するかどうかを決定できる。本明細書中で使用する用語「競合する」とは、二つ以上の分子間の特異的結合の相互作用に任意の程度まで干渉することができる、分子、化合物、好ましくはタンパク質などの物質をいう。語句「競合的に阻害しない」とは、分子、化合物、好ましくはタンパク質などの物質が、二つ以上の分子間の特異的結合の相互作用に任意の測定可能又は有意な程度まで干渉しないことを意味する。二つ以上の分子間の特異的結合の相互作用には、好ましくは、単一可変ドメインとその同族パートナー又は標的との間の特異的結合の相互作用が含まれる。干渉又は競合分子は、別の単一可変ドメインであるか、又は、同族パートナー若しくは標的と構造的に及び/若しくは機能的に類似の分子であり得る。

【０１９４】

単一可変ドメインには、免疫グロブリン単一可変ドメイン、及び抗体重鎖又は抗体軽鎖単一可変ドメインを含めた抗体可変ドメインなどの免疫グロブリン可変ドメインからの一つ、二つ、三つ以上のCDR領域を含むなどの非免疫グロブリン単一可変ドメインが含まれる。単一可変ドメインは、抗体可変(V)領域など、ヒト、ラット、マウス、ブタ、サル、ラクダ科を含めた動物に由来するものであるか、又は、GroEL及びGroEsの非免疫グロブリン足場の場合は、大腸菌(E.coli)などの微生物に由来するものであり得る。単一可変ドメインは、部分的に若しくは全体的に人工であるか、又は組換え分子生物学的技術を用いて作製することができる。

【０１９５】

単一可変ドメインが、別の単一可変ドメインなどの別の標的結合ドメインに対する標的との結合に関して競合する能力を決定するため、及びKdを決定するためのin vitro競合アッセイは、当分野で周知である。一つの好ましい競合アッセイは、表面プラズモン共鳴アッセイであり、これは、広範囲のタンパク質濃度にわたって迅速、高感度且つ有用であり、少量の試料物質しか必要としないという利点を有する。好ましい表面プラズモン共鳴アッセイの競合は、競合Biacore実験である。競合Biacore実験を使用して、例えば、カニクイザル血清アルブミン及びヒト血清アルブミンが、dAb DOM7h-xなどのリガンドとの結合に関して競合するかどうかを決定できる。そのような例の一実験プロトコルは、以下のとおりである。

【０１９６】

例えば、CM5センサーチップ(Biacore AB)を、25℃で、約1000レゾナンスユニット(RU)ヒト血清アルブミン(HSA)でコーティングした後、精製したdAbを、抗原表面上に単一濃度(例えば1um)で、単独、及びカニクイザル血清アルブミン(CSA)の希釈系列と組み合わせて注入する。HSAの段階希釈を一定濃度(40nM)の精製したdAbと混合した。CSAの適切な希釈系列は、5uMのCSAから開始し、6回の2倍希釈で78nMのCSAまで下がる。これらの溶液は、注入前に平衡に達せさせなければならない。注入後、dAbの単独及びいくつかのdAb/CSA混合物のそれぞれについて生じる結合RUを測定するために応答の読み取りを行い、データはBIA評価ソフトウェアに従って使用し、それぞれのCSAの、AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)とHSAが固定されているチップとの結合の阻害の用量応答曲線を作成する。dAb単独の結合したRUをdAb+CSAの結合したRUと比較することによって、CSAがdAbとの結合に関してHSAと競合するかどうかを見ることができる。競合する場合は、溶液中のCSA濃度が増加するにつれて、HSAと結合したdAbのRUは低下する。競合が存在しない場合は、CSAを加えることで、dAbがどの程度HSAと結合するかに影響を及ぼさない。

【０１９７】

当業者は、本競合アッセイを、血清アルブミンと結合する本明細書中に記載のいくつかのリガンドを含めた様々な異なるリガンドで行うために、本プロトコル又は他のプロトコルをどのように適応させるかを知っているであろう。種々のリガンドには、それだけには限定されないが、免疫グロブリン及び/又は非免疫グロブリン足場を含む単一可変ドメインを含めた単量体単一可変ドメイン、dAb、二重特異性リガンド、並びにこれらのリガン

ドの多量体が含まれる。当業者はまた、本競合アッセイを用いて抗原及び/又はエピトープのいくつかの異なる対とリガンドとの結合を比較するために、本プロトコルをどのように適応させるかも知っているであろう。

【０１９８】

これらの競合実験は、数値的なカットオフを提供することができ、これによって、抗原又はエピトープが、特定のリガンド、好ましくはdAbとの結合に関して別の抗原又はエピトープと競合するかどうかを決定できる。例えば、上記概要を示した実験では、溶液中に5μMのCSAが、HSAと結合するdAbのRUに10%以下の低下しかもたらさない場合、結合に関して競合は存在しないとみなされる。したがって、CSAの存在下において、HSAと結合するdAbのRUの10%を超える低下は、CSAによる、HSAと結合することに関するdAbの結合の競合の存在を示す。HSAと結合するdAbのRUの10%未満の低下は、dAbがHSAと結合することに関するCSAによる競合が存在しないことを示し、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、及び1%の低下は、競合が存在しないことを示すための進行的によりストリンジェントな要件である。HSAと結合するdAbのRUが大きければ大きいほど、競合が大きい。したがって、競合の漸増レベルは、HSAと結合するRUの%低下、即ち、少なくとも15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は100%までの低下に従って、段階分けすることができる。

【０１９９】

本明細書中で使用する断片とは、配列の100%未満(例えば、99%まで、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%など)であるが、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個以上の連続的なアミノ酸を含むものをいう。断片は、目的の血清アルブミン結合が1×10^{-6}M以下の親和性で維持されるように、十分な長さである。本明細書中で使用する断片とはまた、標的に対して産生させた単一ドメイン抗体と結合する改変したポリペプチドの能力を実質的に改変しない、一つ又は複数のアミノ酸の任意選択の挿入、欠失及び置換もいう。アミノ酸の挿入、欠失又は置換の数は、好ましくは、1個まで、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69又は70個アミノ酸である。

【０２００】

発明の詳細な説明

別段に定義しない限りは、本明細書中で使用するすべての技術用語及び科学用語は、当分野(例えば、細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、ハイブリダイゼーション技術及び生化学)の技術者によって一般に理解されているものと同じ意味である。標準技術は、分子、遺伝子及び生化学の方法(一般に、本明細書中に参照により組み込まれているSambrook他、分子クローニング:実験室の手引き(Molecular Cloning:A Laboratory Manual、第2版(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク州Cold Spring Harbor、及びAusubel他、分子生物学の手短なプロトコル(Short Protocols in Molecular Biology)(1999)第4版、John Wiley & Sons,Inc.参照)並びに化学的方法で使用されている。表面プラズモン共鳴アッセイの標準技術には、Jan Terje Andersen他(2006)Eur.J.Immunol.36:304-3051 Fagerstam(1991)Tech.Protein Chem.2:65-71、及びJohnsson他(1991)Anal.Biochem 198:268-277が含まれる。

【０２０１】

免疫グロブリンに基づく多特異性リガンドの調製

本発明による二重特異性リガンドは、本発明の所望の立体配置による開構造であれ閉構造であれscFv、「ファージ」抗体及び他の操作した抗体分子を調製するために、抗体操作の分野で使用される、既に確立されている技術に従って調製し得る。抗体、特に二重特異性抗体を調製するための技術は、例えば、以下の総説及びその中に引用される参考文献に記載されている:Winter及びMilstein、(1991)Nature 349:293-299;Plueckthun(1992)Immunological Reviews 130:151-188;Wright他、(1992)Crit..Rev.Immunol.12:125-168;Holli

ger,P.及びWinter,G.(1993)Curr.Op.Biotechn.4、446-449;Carter他(1995)J.Hematother.4、463-470;Chester,K.A.及びHawkins,R.E.(1995)Trends Biotechn.13、294-300;Hoogenboom,H.R.(1997)Nature Biotechnol.15、125-126;Fearon,D.(1997)Nature Biotechnol.15、618-619;Pluckthun,A.及びPack,P.(1997)Immunotechnology 3、83-105;Carter,P.及びMerchant,A.M.(1997)Curr.Opin.Biotechnol.8、449-454;Holliger,P.及びWinter,G.(1997)Cancer Immunol.Immunother.45、128-130。

【０２０２】

本発明は、二つの異なる抗原又はエピトープに対する可変ドメイン、及び続く可変ドメインの組合せの選択を提供する。

【０２０３】

可変ドメインの選択に用いた技術は、当分野で知られているライブラリー及び選択手順を用いる。ヒトB細胞から収集した、再構成されたV遺伝子を使用する天然のライブラリー(Marks他(1991)J.Mol.Biol.、222:581;Vaughan他(1996)Nature Biotech.、14:309)が当業者に周知である。合成ライブラリー(Hoogenboom及びWinter(1992)J.Mol.Biol.、227:381;Barbas他(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA、89:4457;Nissim他(1994)EMBO J.、13:692;Griffiths他(1994)EMBO J.、13:3245;De Kruif他(1995)J.Mol.Biol.、248:97)は、免疫グロブリンV遺伝子を、通常はPCRを用いてクローニングすることによって調製する。PCRプロセス中の誤りが高い度合のランダム化をもたらすことができる。V_H及び/又はV_Lライブラリーを、標的抗原又はエピトープに対して、単一ドメイン結合を直接且つ別々に選択してもよく、又は一緒に選択してもよい。

【０２０４】

本発明による二重特異性リガンドを作製する好ましい方法は、第1の抗原又はエピトープとの結合について可変ドメインのレパートリーを選択し、第2の抗原又はエピトープについて可変ドメインのレパートリーを選択する選択系を用いることを含む。その後、選択された可変の第1及び第2の可変ドメインを一緒に合わせ、第1及び第2の抗原又はエピトープの両方との結合について二重特異性リガンドを選択する。閉構造のリガンドは、第1及び第2の抗原又はエピトープの両方を孤立して結合するが同時には結合しないことについて選択する。

【０２０５】

A.ライブラリーベクター系

本発明での使用に適した様々な選択系が当分野で知られている。そのような系の例を以下に記載する。

【０２０６】

バクテリオファージλ発現系は、バクテリオファージ溶菌斑として又は溶原菌のコロニーとして直接、どちらも既に(Huse他(1989)Science、246:1275;Caton及びKoprowski(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.、87;Mullinax他(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.、87:8095;Persson他(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.、88:2432)に記載されているようにスクリーニングしてよく、本発明において有用である。そのような発現系は、ライブラリーの10^6個までの異なるメンバーをスクリーニングするために使用できるが、より多数(10^6個のメンバーを超える)のスクリーニングには、あまり適していない。

【０２０７】

ライブラリーの構築に特に有用なのは選択ディスプレイ系であり、これらは、核酸が、それが発現するポリペプチドと連結することを可能にする。本明細書中で使用する選択ディスプレイ系とは、包括的及び/又は標的リガンドと結合することによって、ライブラリーの個々のメンバーの適切な提示手段による選択を可能にする系である。

【０２０８】

大きなライブラリーの所望のメンバーを単離するための選択プロトコルは、ファージディスプレイ技術によって代表されるように、当分野で知られている。多様なペプチド配列が線維状バクテリオファージの表面上に提示されるそのような系(Scott及びSmith(1990)Science、249:386)は、標的抗原と結合する特異的抗体断片をin vitro選択及び増幅するた

めの抗体断片(及びそれらをコードしているヌクレオチド配列)のライブラリーの作製に有用であることが証明されている(McCafferty他、WO92/01047)。V_H及びV_L領域をコードしているヌクレオチド配列は、それらを大腸菌の細胞膜周辺腔に向かわせるリーダーシグナルをコードしている遺伝子断片と連結しており、その結果、生じる抗体断片がバクテリオファージの表面上に、典型的にはバクテリオファージコートタンパク質(例えば、pIII又はpVIII)との融合体として提示される。或いは、抗体断片は、λファージカプシド上に外部的に提示される(ファージボディー)。ファージに基づいたディスプレイ形の利点は、これらが生物系であるため、選択されたライブラリーメンバーを含むファージを細菌細胞中で増殖させることによって、選択されたライブラリーメンバーを単純に増幅できることである。さらに、ポリペプチドライブラリーメンバーをコードしているヌクレオチド配列がファージ又はファージミドベクター中に含まれるため、配列決定、発現及び続く遺伝子操作は比較的単純である。

【０２０９】

バクテリオファージ抗体ディスプレイライブラリー及びλファージ発現ライブラリーを構築する方法は当分野で周知である(本明細書中に参照により組み込まれている、McCafferty他(1990)Nature、348:552;Kang他(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.、88:4363;Clackson他(1991)Nature、352:624;Lowman他(1991)Biochemistry、30:10832;Burton他(1991)Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.、88:10134;Hoogenboom他(1991)Nucleic Acids Res.、19:4133;Chang他(1991)J.Immunol.、147:3610;Breitling他(1991)Gene、104:147;Marks他(1991)上記;Barbas他(1992)上記;Hawkins及びWinter(1992)J.Immunol.、22:867;Marks他、1992、J.Biol.Chem.、267:16007;Lerner他(1992)Science、258:1313)。

【０２１０】

一つの特に有利な手法は、scFvファージライブラリーの使用である(Huston他、1988、Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.、85:5879-5883;Chaudhary他(1990)Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.、87:1066-1070;McCafferty他(1990)上記;Clackson他(1991)Nature、352:624;Marks他(1991)J.Mol.Biol.、222:581;Chiswell他(1992)Trends Biotech.、10:80;Marks他(1992)J.Biol.Chem.、267)。バクテリオファージコートタンパク質上に提示されるscFvライブラリーの様々な実施形態が記載されている。ファージディスプレイ手法の改良も知られており、例えば、本明細書中に参照により組み込まれているWO96/06213及びWO92/01047(Medical Research Council他)並びにWO97/08320(Morphosys)に記載されている。

【０２１１】

ポリペプチドのライブラリーを作製する他の系は、ライブラリーメンバーをin vitro合成するための、細胞を含まない酵素的機構の使用を含む。一方法では、標的リガンドに対する選択及びPCR増幅の交互のラウンドによってRNA分子を選択する(Tuerk及びGold(1990)Science、249:505;Ellington及びSzostak(1990)Nature、346:818)。同様の技術を用いて、事前に決定したヒト転写因子と結合するDNA配列を同定し得る(Thiesen及びBach(1990)Nucleic Acids Res.、18:3203;Beaudry及びJoyce(1992)Science、257:635;WO92/05258及びWO92/14843)。同様にして、in vitro翻訳を用いて、大きなライブラリーを作製するための方法としてポリペプチドを合成することができる。安定したポリソーム複合体を一般に含むこれらの方法は、WO88/08453、WO90/05785、WO90/07003、WO91/02076、WO91/05058、及びWO92/02536にさらに記載されている。WO95/22625及びWO95/11922(Affymax)に開示されているものなど、ファージに基づくものでない代替ディスプレイ系は、選択するためにポリペプチドを提示させるために、ポリソームを使用する。

【０２１２】

さらなるカテゴリーの技術は、遺伝子をその遺伝子産物と連結させることを可能にする、人工区画中のレパートリーの選択を含む。例えば、望ましい遺伝子産物をコードしている核酸を、油中水乳剤によって形成されたマイクロカプセル中で選択し得る選択系が、WO99/02671、WO00/40712並びにTawfik及びGriffiths(1998)Nature Biotechnol 16(7)、652-6に記載されている。所望の活性を有する遺伝子産物をコードしている遺伝エレメントをマイクロカプセル内に区画化し、その後、転写及び/又は翻訳させてその対応する遺伝子

産物(RNA又はタンパク質)をマイクロカプセル内で産生させる。続いて、所望の活性を有する遺伝子産物を産生する遺伝エレメントを選別する。この手法では、様々な手段によって所望の活性を検出することによって、目的の遺伝子産物を選択する。

【０２１３】

B.ライブラリーの構築

選択を意図するライブラリーは、当分野で知られている技術、例えば上述のものを使用して構築するか、又は市販の供給源から購入し得る。本発明で有用なライブラリーは、例えば、WO99/20749に記載されている。ベクター系を選択し、目的のポリペプチドをコードしている一つ又は複数の核酸配列をライブラリーベクター内にクローニングした後、発現前に突然変異誘発を試みることによってクローニングした分子内に多様性を生じ得るか、或いは、コードされたタンパク質を上述のように発現及び選択した後に、突然変異誘発及びさらなる選択ラウンドを行い得る。構造的に最適化されたポリペプチドをコードしている核酸配列の突然変異誘発は、標準の分子方法によって実施する。ポリメラーゼ連鎖反応、即ちPCRが特に有用である(本明細書中に参照により組み込まれているMullis及びFaloona(1987)Methods Enzymol.、155:335)。熱安定性のDNA依存性DNAポリメラーゼによって触媒されるDNA複製の複数サイクルを用いて目的の標的配列を増幅するPCRは、当分野で周知である。様々な抗体ライブラリーの構築は、Winter他(1994)Ann.Rev.Immunology 12、433-55及びその中に引用される参考文献に記載されている。

【０２１４】

PCRは、鋳型DNA(少なくとも1fg;より有用には1～1000ng)及び少なくとも25pmolのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行う。プライマーのプールの異種性が高い場合は、それぞれの配列はプールの小画分の分子にしか表されず、量が後の増幅サイクルで限定されるため、より大量のプライマーを使用することが有利であり得る。典型的な反応混合物には、2μlのDNA、25pmolのオリゴヌクレオチドプライマー、2.5μlの10×PCRバッファー1(Perkin-Elmer、カリフォルニア州Foster City)、0.4μlの1.25μMのdNTP、0.15μl(又は2.5単位)のTaq DNAポリメラーゼ(Perkin Elmer、カリフォルニア州Foster City)及び合計体積25μlまでの脱イオン水が含まれる。鉱物油で表面を覆い、プログラム可能なサーマルサイクラーを用いてPCRを行う。PCRサイクルのそれぞれのステップの長さ及び温度、並びにサイクルの数は、実施するストリンジェンシー要件に従って調整する。アニーリング温度及び時間は、プライマーが鋳型とアニーリングすると予測される効率及び許容されるミスマッチの度合の両方によって決定される。明らかに、核酸分子を同時に増幅及び突然変異させる場合は、少なくとも合成の1回目ではミスマッチが必要である。プライマーのアニーリング条件のストリンジェンシーを最適化する能力は、十分に当業者の知識範囲内にある。30℃～72℃のアニーリング温度を使用する。鋳型分子の初回変性は、通常、92℃～99℃で4分間起こり、次いで、変性(94～99℃で15秒間～1分間)、アニーリング(温度は上述のように決定;1～2分間)、及び伸長(増幅産物の長さに応じて72℃で1～5分間)からなる20～40サイクルを行う。最終伸長は、一般に、4分間、72℃であり、次いで4℃での無期限(0～24時間)のステップが続き得る。

【０２１５】

C.単一可変ドメインの組合せ

本発明で有用なドメインは、選択したあと、共有及び非共有方法を含めた当分野で知られている様々な方法によって組み合わせ得る。

【０２１６】

好ましい方法には、例えば、scFv分子に関連して記載されているように(Bird他、(1988)Science 242:423-426)、ポリペプチドリンカーの使用が含まれる。適切なリンカーの記載は、Bird他Science 242、423-426;Hudson他、Journal Immunol Methods 231(1999)177-189;Hudson他、Proc Nat Acad Sci USA 85、5879-5883に提供されている。リンカーは好ましくは可撓性であり、二つの単一ドメインが相互作用することを可能にする。一つのリンカー例は$(Gly_4Ser)_n$リンカーであり、n=1～8、例えば、2、3、4、5又は7である。可撓性がより低い、二重特異性抗体中で使用するリンカーも使用し得る(Holliger他、(1993)P

NAS(USA)90:6444-6448)。

【０２１７】

一実施形態では、用いるリンカーは免疫グロブリンヒンジ領域ではない。

【０２１８】

可変ドメインは、リンカー以外の方法を用いて組み合わせ得る。例えば、天然又は操作したシステイン残基を介して提供されるジスルフィド橋の使用を活用して、V_H-V_H、V_L-V_L若しくはV_H-V_L二量体を安定化するか(Reiter他、(1994)Protein Eng.7:697-704)、又は可変ドメイン間の界面を再構築してその「フィット」を、ひいては相互作用の安定性を向上させ得る(Ridgeway他、(1996)Protein Eng.7:617-621;Zhu他、(1997)Protein Science 6:781-788)。

【０２１９】

免疫グロブリンの可変ドメイン、特に抗体V_Hドメインを結合又は安定化する他の技術を必要に応じて使用し得る。

【０２２０】

本発明に従って、二重特異性リガンドは、溶液中で「閉」構造であり得る。「閉」立体配置とは、二つのドメイン(例えばV_H及びV_L)が、抗体結合部位を形成する会合したV_H-V_L対のものなどの会合した形態で存在する立体配置である。例えば、scFvは、V_H及びV_Lドメインを連結するために使用するリンカーの配置に依存して、閉構造であり得る。この配置が、ドメインの会合を可能にする、又はこれらを会合した位置に強固に保つために十分に可撓性である場合は、ドメインが閉構造をとる可能性が高い。

【０２２１】

同様に、V_Hドメイン対及びV_Lドメイン対は閉構造で存在し得る。一般に、これは、リガンド分子中の強固なリンカーによるものなどのドメインの密な会合の機能である。閉構造のリガンドは、リガンドの半減期を増加させる分子及び第2の標的分子の両方には結合することができない。したがって、リガンドは、典型的には、リガンドの半減期を増加させる分子から解離した場合にのみ第2の標的分子と結合する。

【０２２２】

さらに、リンカーを用いずにV_H/V_H、V_L/V_L又はV_H/V_L二量体を構築することで、ドメイン間の競合がもたらされる。

【０２２３】

本発明によるリガンドはさらに、開構造であってもよい。そのようなコンホメーションでは、リガンドは、リガンドの半減期を増加させる分子及び第2の標的分子の両方と同時に結合することができる。典型的には、開の立体配置の可変ドメインは(V_H-V_L対の場合)、ドメインが相互作用せず、抗体結合部位を形成し、その対応するエピトープとの結合に関して競合しないように、十分に離れて保たれる。V_H/V_H又はV_L/V_L二量体の場合、ドメインは強固なリンカーによって強制的に一緒になっているわけではない。当然、そのようなドメイン対合は、抗原結合について競合せず、抗体結合部位を形成しない。

【０２２４】

Fab断片及び全抗体は、主に閉構造で存在するが、開及び閉の二重特異性リガンドは、様々な状況下で様々な平衡で存在する可能性が高いことを理解されたい。リガンドと標的との結合は、平衡のバランスを開の立体配置に向かってずらす可能性が高い。したがって、本発明による特定のリガンドは溶液中で二つのコンホメーションで存在することができ、その一方(開形態)は二つの抗原又はエピトープと独立して結合できるが、他方のコンホメーション(閉形態)は一つの抗原又はエピトープとして結合できず、したがって、抗原又はエピトープは、このコンホメーションのリガンドとの結合に関して競合する。

【０２２５】

溶液中で二重特異性リガンドの開形態は閉形態と平衡で存在し得るが、平衡は閉形態が有利であると予測される。さらに、開形態は、閉構造への標的結合によって隔絶することができる。したがって、好ましくは、本発明の特定の二重特異性リガンドは、二つ(開及び閉)の構造間の平衡で存在する。

【０２２６】
本発明による二重特異性リガンドは、開又は閉構造が有利となるように修飾し得る。例えば、ジスルフィド結合を用いたV_H-V_L相互作用の安定化により、閉構造が安定する。さらに、V_Hドメイン及びV_Lドメイン対を含めた、開構造が有利となるように、ドメインを結合させるために使用するリンカーを構築し得る。例えば、リンカーは、大きなアミノ酸残基を適切な位置で取り込むことによって、又はドメインを物理的に間隔を空けて保つ適切な強固な構造を設計することによってなど、ドメインの会合を立体的に妨害し得る。
【０２２７】
D.二重特異性リガンドの特徴づけ
二重特異性リガンドとその特異的抗原又はエピトープとの結合は、当業者が精通している方法によって試験することができ、これにはELISAが含まれる。本発明の好ましい実施形態では、結合は、モノクローナルファージELISAを用いて試験する。
【０２２８】
任意の適切な手順に従ってファージELISAを行い得る。例示的なプロトコルを以下に示す。
【０２２９】
それぞれの選択のラウンドで産生されたファージの集団を、ELISAによる選択した抗原又はエピトープとの結合についてスクリーニングして、「ポリクローナル」ファージ抗体を同定することができる。その後、これらの集団からの単一の感染細菌コロニーからのファージをELISAによってスクリーニングして、「モノクローナル」ファージ抗体を同定することができる。また、可溶性抗体断片を抗原又はエピトープとの結合についてスクリーニングすることも望ましく、これはまた、例えばC又はN末端タグに対する試薬を用いて、ELISAによって行うことができる(例えば、Winter他(1994)Ann.Rev.Immunology 12、433-455及びその中に引用される参考文献を参照。
【０２３０】
また、選択されたファージモノクローナル抗体の多様性は、PCR産物のゲル電気泳動(Marks他、1991、上記;Nissim他、1994、上記)、プロービング(Tomlinson他、1992)J.Mol.Biol.227、776)又はベクターDNAの配列決定によって評価し得る。
【０２３１】
E.「二重特異性リガンド」の構造
上述のように、抗体とは、少なくとも一つの重鎖及び軽鎖可変ドメイン、少なくとも二つの重鎖可変ドメイン又は少なくとも二つの軽鎖可変ドメインを含む、抗体(例えば、IgG、IgM、IgA、IgA、IgE)又は断片(Fab、Fv、ジスルフィド連結Fv、scFv、二重特異性抗体)として、本明細書中で定義される。これは、血清、B細胞、ハイブリドーマ、トランスフェクトーマ、酵母若しくは細菌から単離したかにかかわらず)、抗体を自然に産生する、若しくは組換えDNA技術によって作製した任意の種に少なくとも部分的に由来し得る。
【０２３２】
本発明の好ましい実施形態では、二重特異性リガンドは、抗体の少なくとも一つの単一重鎖可変ドメイン及び抗体の一つの単一軽鎖可変ドメイン、又は二つの単一重鎖若しくは軽鎖可変ドメインを含む。例えば、リガンドは、V_H/V_L対、V_Hドメインの対又はV_Lドメインの対を含み得る。
【０２３３】
そのようなリガンドの第1及び第2の可変ドメインは、同一のポリペプチド鎖上にあり得る。或いは、これらは別々のポリペプチド鎖上にあり得る。これらが同一のポリペプチド鎖上にある場合、これらは、優先的には上述のペプチド配列であるリンカーによって連結されていてよい。
【０２３４】
第1及び第2の可変ドメインは、共有又は非共有的に会合し得る。これらが共有的に会合している場合、共有結合はジスルフィド結合であり得る。
【０２３５】

可変ドメインを、例えば本明細書中に記載のようにファージディスプレイ技術を用いて選択したV遺伝子のレパートリーから選択する場合は、これらの可変ドメインは、本明細書中で定義した具体的な包括的リガンドによって認識され得るように、普遍的フレームワーク領域を含む。普遍的フレームワーク、包括的リガンドなどの使用は、WO99/20749に記載されている。

【０２３６】

V遺伝子のレパートリーを使用する場合、ポリペプチド配列の変異は、好ましくは可変ドメインの構造的ループ内に位置する。いずれかの可変ドメインのポリペプチド配列を、それぞれの可変ドメインとその相補的な対との相互作用を増強させるために、DNAシャフリング又は突然変異によって変更し得る。DNAシャフリングは当分野で知られており、例えば、どちらも本明細書中に参照により組み込まれている、Stemmer、1994、Nature 370:389-391及び米国特許第6,297,053号によって教示されている。突然変異誘発の他の方法は当業者に周知である。

【０２３７】

本発明の好ましい実施形態では、「二重特異性リガンド」は単鎖Fv断片である。本発明の代替の実施形態では、「二重特異性リガンド」はFab形式からなる。

【０２３８】

さらなる態様では、本発明は、少なくとも本明細書中で定義する「二重特異性リガンド」をコードしている核酸を提供する。

【０２３９】

当業者は、本発明の態様に応じて、抗原又はエピトープの両方が同一の抗体分子と同時に結合し得ることを理解されよう。或いは、これらは、同一の抗体分子との結合に関して競合し得る。例えば、両方のエピトープが同時に結合している場合は、二重特異性リガンドの両方の可変ドメインが独立してその標的エピトープと結合することができる。ドメインが競合する場合は、一方の可変ドメインはその標的と結合できるが、他方の可変ドメインがその同族標的と結合するのとは同時には結合できず、又は、第1の可変ドメインはその標的と結合できるが、第2の可変ドメインがその同族標的と結合するのとは同時には結合できない。

【０２４０】

可変ドメインは、標的抗原又はエピトープに対する抗体に由来し得る。或いは、これらは、線維状バクテリオファージの表面上で発現されるものなどの単一抗体ドメインのレパートリーに由来し得る。選択は、以下に記載のように行い得る。

【０２４１】

一般に、本発明を行うために必要な核酸分子及びベクター構築体は、Sambrook他(1989)分子クローニング:実験室の手引き(Molecular Cloning:A Laboratory Manual、米国Cold Spring Harborなどの標準の実験室の手引きに記載のように構築及び操作し得る。

【０２４２】

本発明で有用な核酸の操作は、典型的には組換えベクター中で実施する。

【０２４３】

したがって、さらなる態様では、本発明は、少なくとも本明細書中で定義する「二重特異性リガンド」をコードしている核酸を含むベクターを提供する。

【０２４４】

本明細書中で使用するベクターとは、異種DNAを、その発現及び/又は複製のために細胞内に導入するために使用する個別のエレメントをいう。そのようなベクターを選択又は構築し、続いて使用する方法は、当業者に周知である。数々のベクターが公的に利用可能であり、細菌プラスミド、バクテリオファージ、人工染色体及びエピソームベクターが含まれる。そのようなベクターは、単純なクローニング及び突然変異誘発のために使用してもよく、或いは、遺伝子発現ベクターを用いる。本発明による有用なベクターは、所望の大きさ、典型的には0.25キロ塩基(kb)～40kb以上の長さのポリペプチドコード配列を収容するように選択し得る。in vitroクローニング操作後に、適切な宿主細胞をベクターで形質

転換させる。それぞれのベクターは様々な機能的構成要素を含み、これには一般にクローニング(又は「ポリリンカー」)部位、複製起点及び少なくとも一つの選択マーカー遺伝子が含まれる。所定のベクターが発現ベクターである場合、これは、以下のうちの一つ又は複数をさらに保有する:本発明によるリガンドをコードしている遺伝子と作動可能に連結しているようにクローニング部位の近傍にそれぞれ位置している、エンハンサーエレメント、プロモーター、転写終結及びシグナル配列。

【０２４５】

クローニング及び発現ベクターはどちらも、一般に、ベクターが一つ又は複数の選択した宿主細胞中で複製することを可能にする、核酸配列を含む。典型的に、クローニングベクター中では、この配列は、ベクターが宿主の染色体DNAとは独立して複製することを可能にするものであり、複製起点又は自己複製配列が含まれる。そのような配列は、様々な細菌、酵母及びウイルスについて周知である。プラスミドpBR322からの複製起点はほとんどのグラム陰性細菌に適しており、2ミクロンのプラスミド起点は酵母に適しており、様々なウイルス起源のもの(例えば、SV40、アデノウイルス)は、哺乳動物細胞中のクローニングベクターに有用である。一般に、複製起点は、COS細胞などの、高レベルのDNAを複製できる哺乳動物細胞中で使用しない限りは、哺乳動物発現ベクターには必要ない。

【０２４６】

有利には、クローニング又は発現ベクターは、選択マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含み得る。この遺伝子は、選択培地中で成長させる形質転換させた宿主細胞の生存又は成長に必要なタンパク質をコードしている。したがって、選択遺伝子を含むベクターで形質転換していない宿主細胞は、培地中で生存しない。典型的な選択遺伝子は、抗生物質及び他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート若しくはテトラサイクリンに対する耐性を与える、栄養要求欠損を相補する、又は増殖培地中に利用可能でない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードしている。

【０２４７】

本発明によるリガンドをコードしているベクターの複製は大腸菌中で最も好都合に行われるので、大腸菌選択マーカー、例えば、抗生物質アンピシリンに対する耐性を与えるβ-ラクタマーゼ遺伝子が有用である。これらは、pBR322などの大腸菌プラスミド又はpUC18若しくはpUC19などのpUCプラスミドから得ることができる。

【０２４８】

発現ベクターは通常、宿主生物によって認識され、目的のコード配列と作動可能に連結しているプロモーターを含む。そのようなプロモーターは誘導性又は構成的であり得る。用語「作動可能に連結している」とは、記載されている構成要素が、それらの意図される様式で機能することを可能にする関係性にある並置をいう。コード配列と「作動可能に連結している」制御配列は、制御配列と適合性のある条件下でコード配列の発現が達成されるようにライゲーションされている。

【０２４９】

原核宿主での使用に適したプロモーターには、例えば、β-ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系並びにtacプロモーターなどのハイブリッドプロモーターが含まれる。細菌系で使用するためのプロモーターも、一般に、コード配列と作動可能に連結しているシャイン-ダルガーノ配列を含む。

【０２５０】

好ましいベクターは、ポリペプチドライブラリーメンバーの対応するヌクレオチド配列の発現を可能にする発現ベクターである。したがって、第1の及び/又は第2の抗原又はエピトープを用いた選択は、ポリペプチドライブラリーメンバーを発現する単一のクローンの別々の増幅及び発現によって、又は任意の選択ディスプレイ系を使用することによって、行うことができる。上述のように、好ましい選択ディスプレイ系はバクテリオファージディスプレイである。したがって、ファージ又はファージミドベクター、例えばpIT1又はpIT2を使用し得る。本発明で有用なリーダー配列には、pelB、stII、ompA、phoA、bla及

びpelAが含まれる。一例は、ファージミドベクターは、大腸菌複製起点(二本鎖の複製用)及びファージ複製起点(一本鎖DNAの産生用)を有する。そのようなベクターの操作及び発現は当分野で周知である(Hoogenboom及びWinter(1992)上記;Nissim他(1994)上記)。手短に述べると、ベクターは、pelBリーダー配列(発現されたポリペプチドを細胞膜周辺腔に向かわせる)、複数のクローニング部位(ライブラリーメンバーのヌクレオチド版をクローニングするため)、任意選択で一つ又は複数のペプチドタグ(検出のため)、任意選択で一つ又は複数のTAGストップコドン及びファージタンパク質pIIIからなる(NからC末端)発現カセットの上流に、ファージミドに選択性を与えるβ-ラクタマーゼ遺伝子及びlacプロモーターを含む。したがって、大腸菌の様々な抑制及び非抑制株を用いて、且つグルコース、イソプロピルチオ-β-D-ガラクトシド(IPTG)又はVCS M13などのヘルパーファージを添加して、ベクターは、発現されないプラスミドとして複製され、大量のポリペプチドライブラリーメンバーのみを産生する又はファージを産生することができ、その一部は、その表面上にポリペプチド-pIII融合物の少なくとも一つのコピーを含む。

【０２５１】

本発明によるリガンドをコードしているベクターの構築では、従来のライゲーション技術を用いる。単離したベクター又はDNA断片を切断し、目的に合わせ、所望する形態で再度ライゲーションして、必要なベクターを作製する。所望する場合は、正しい配列が構築したベクター中に存在することを確認するための分析は、既知の様式で行うことができる。発現ベクターを構築し、in vitro転写物を調製し、DNAを宿主細胞内に導入し、発現及び機能を評価するための分析を行う適切な方法は、当業者に知られている。試料中の遺伝子配列の存在を検出するか、或いはその増幅及び/又は発現を、サザン若しくはノーザン分析、ウェスタンブロッティング、DNA、RNA若しくはタンパク質のドットブロッティング、in situハイブリダイゼーション、免疫細胞化学又は核酸若しくはタンパク質分子の配列解析などの従来の方法によって定量する。当業者には、所望する場合に、どのようにこれらの方法を改変し得るかが容易に想定されるであろう。

【０２５２】

閉構造多特異性リガンドの構造

本発明の第2の構成の一態様によれば、二つ以上の非相補的エピトープ結合ドメインは、本明細書中で定義する閉構造であるように連結されている。有利には、これらは骨格とさらに結合していてもよく、これは、その代わりとして、又は本明細書中で記載するリンカーに加えて、互いに対するエピトープ結合部位の閉構造の形成及び/又は維持を容易にする。

【０２５３】

(I)骨格

骨格は、免疫グロブリン分子に基づいているか、又は上述の非免疫グロブリンを起源とするものであってよい。本明細書中で定義する好ましい免疫グロブリン骨格には、以下から選択されるもののうちの任意の一つ又は複数が含まれる:少なくとも(i)抗体のCL(κ若しくはλサブクラス)ドメイン;又は(ii)抗体重鎖のCH1ドメインを含む免疫グロブリン分子;抗体重鎖のCH1及びCH2ドメインを含む免疫グロブリン分子;抗体重鎖のCH1、CH2及びCH3ドメインを含む免疫グロブリン分子;或いはサブセット(ii)のうちの任意のものと併せた抗体のCL(κ又はλサブクラス)ドメイン。ヒンジ領域ドメインも含まれ得る。そのようなドメインの組合せは、例えば、IgG若しくはIgMなどの天然の抗体、又はFv、scFv、Fab若しくは$F(ab')_2$分子などのその断片を模倣し得る。当業者なら、このリストが網羅的であることを意図しないことを理解するであろう。

【０２５４】

(II)タンパク質足場

それぞれのエピトープ結合ドメインは、タンパク質足場及びドメインと一つ又は複数のエピトープとの特異的相互作用に関与している一つ又は複数のCDRを含む。有利には、本発明によるエピトープ結合ドメインは三つのCDRを含む。適切なタンパク質足場には、以下からなる群から選択される任意のものが含まれる:免疫グロブリンドメインに基づくも

の、フィブロネクチンに基づくもの、アフィボディに基づくもの、CTLA4に基づくもの、GroELなどのシャペロンに基づくもの、リポカリンに基づくもの並びに細菌Fc受容体SpA及びSpDに基づくもの。当業者なら、このリストが網羅的であることを意図しないことを理解するであろう。

【０２５５】

F:二重特異性リガンドの構築で使用するための足場

i.主鎖コンホメーションの選択

免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーは、すべてそのポリペプチド鎖で同様の折り畳みを共有する。例えば、抗体はその一次配列に関して多様性が高いが、配列及び結晶学的構造の比較により、予想に反して、抗体の6個の抗原結合ループのうちの5個(H1、H2、L1、L2、L3)が限定された数の主鎖コンホメーション、又はカノニカル構造をとることが明らかになっている(Chothia及びLesk(1987)J.Mol.Biol.、196:901;Chothia他(1989)Nature、342:877)。したがって、ループの長さ及び主要残基の分析により、ヒト抗体の大多数中に見つかるH1、H2、L1、L2及びL3の主鎖コンホメーションを予測することが可能となっている(Chothia他(1992)J.Mol.Biol.、227:799;Tomlinson他(1995)EMBO J.、14:4628;Williams他(1996)J.Mol.Biol.、264:220)。H3領域は配列、長さ及び構造に関してはるかに多様であるが(Dセグメントを使用するため)、これは、短いループ長では限定された数の主鎖コンホメーションを形成することにもなり、これはループ及び抗体フレームワーク内の重要な位置での特定の残基、又は残基の種類の長さ及び存在に依存する(Martin他(1996)J.Mol.Biol.、263:800;Shirai他(1996)FEBS Letters、399:1)。

【０２５６】

本発明の二重特異性リガンドは、有利には、V_Hドメインのライブラリー及び/又はV_Lドメインのライブラリーなどのドメインのライブラリーからアセンブルされている。さらに、本発明の二重特異性リガンドは、それ自体がライブラリーの形態で提供され得る。本発明の一態様では、二重特異性リガンド及び/又はドメインのライブラリーは、メンバーの主鎖コンホメーションが既知であることを確実にするために、特定のループの長さ及び主要残基が選択して設計されている。有利には、これらは、上述のように、これらが機能的でない可能性を最小限にするために、自然に見つかる免疫グロブリンスーパーファミリー分子の実際のコンホメーションである。生殖系列V遺伝子セグメントは、抗体又はT細胞受容体のライブラリーを構築するための一つの適切な基本フレームワークとして役割を果たす。他の配列も有用である。変異も、少数の機能的メンバーが、その機能に影響を与えない改変された主鎖コンホメーションを保有し得るように低頻度で起こり得る。

【０２５７】

カノニカル構造理論も、リガンドによってコードされている様々な主鎖コンホメーションの数を評価するため、リガンド配列に基づく主鎖コンホメーションを予測するため、及びカノニカル構造に影響を与えない多様化のために残基を選択するために有用である。ヒトV_κドメインでは、L1ループは四つのカノニカル構造のうちの一つをとることができ、L2ループは単一のカノニカル構造を有し、ヒトV_κドメインの90%がL3ループの四つ又は五つのカノニカル構造のうちの一つをとることが、知られている(Tomlinson他(1995)上記)。したがって、V_κドメイン単独中で、様々なカノニカル構造を組み合わせて様々な範囲の主鎖コンホメーションを作ることができる。V_λドメインがL1、L2及びL3ループの様々な範囲のカノニカル構造をコードしており、V_κ及びV_λドメインが、H1及びH2ループのいくつかのカノニカル構造をコードすることができる任意のV_Hドメインと対合できることを考慮すると、これら五つのループで観察されるカノニカル構造の組合せの数は非常に大きい。このことは、主鎖コンホメーションにおける多様性の発生は、広範囲の結合特異性の生成に不可欠であり得ることを示唆している。しかし、予想に反して、単一の既知の主鎖コンホメーションに基づいて抗体ライブラリーを構築することによって、主鎖コンホメーションの多様性は、実質的にすべての抗原を標的とするために十分な多様性を生じるために必要でないことが見出された。さらに驚くべきことに、単一の主鎖コンホメーションはコンセンサス構造である必要はない。単一の天然のコンホメーションを全ライブラリーの

基礎として使用することができる。したがって、好ましい態様では、本発明の二重特異性リガンドは、単一の既知の主鎖コンホメーションを保有する。

【０２５８】

選択された単一の主鎖コンホメーションは、好ましくは、目的の免疫グロブリンスーパーファミリー型の分子の間で一般的である。コンホメーションは、有意な数の天然分子がそれをとっていると観察された場合に、一般的である。したがって、本発明の好ましい態様では、免疫グロブリンドメインのそれぞれの結合ループの様々な主鎖コンホメーションの天然の発生率を別々に考慮し、その後、様々なループの主鎖コンホメーションの所望の組合せを保有する天然可変ドメインを選択する。利用可能なものがない場合は、最も近い等価なものを選択し得る。様々なループの主鎖コンホメーションの所望の組合せは、所望の主鎖コンホメーションをコードしている生殖系列遺伝子セグメントを選択することによって作ることが好ましい。選択された生殖系列遺伝子セグメントが自然で頻繁に発現されていることがより好ましく、すべての天然の生殖系列遺伝子セグメントで最も頻繁に発現されるものであることが最も好ましい。

【０２５９】

二重特異性リガンド又はそのライブラリーの設計にあたって、六つの抗原結合ループのそれぞれの様々な主鎖コンホメーションの発生率を別々に考慮し得る。H1、H2、L1、L2及びL3には、天然分子の抗原結合ループの20%～100%によってとられる所与のコンホメーションが選択される。典型的には、その観察された発生率は、35%(即ち35%～100%)を超える、理想的には、50%を超える又はさらには65%を超える。H3ループの大多数がカノニカル構造を有さないため、カノニカル構造を示さないループの間で一般的な主鎖コンホメーションを選択することが好ましい。ループのそれぞれについて、天然のレパートリーで最も頻繁に観察されるコンホメーションを選択する。ヒト抗体では、それぞれのループについて最も一般的なカノニカル構造(CS)は以下のとおりである:H1-CS1(発現されたレパートリーの79%)、H2-CS3(46%)、L1-V_κのCS2(39%)、L2-CS1(100%)、L3-V_κのCS1(36%)(計算は70:30のκ:λ比を仮定している、Hood他(1967)Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.、48:133)。カノニカル構造を有するH3ループでは、残基94～残基101までの塩橋を有する7個の残基のCDR3の長さ(Kabat他(1991)免疫学的な対象となるタンパク質の配列(Sequences of proteins of immunological interest)、米国保健社会福祉省)が最も一般的であると考えられる。このコンホメーションを形成するために必要なH3の長さ及び主要残基、並びに抗体モデリングの基礎として使用することができるタンパク質データバンク中の少なくとも二つの結晶学的構造(2cgr及び1tet)を有するヒト抗体配列がEMBLデータライブラリーに少なくとも16個存在する。このカノニカル構造の組合せの最も頻繁に発現される生殖系列遺伝子セグメントは、V_Hセグメント3-23(DP-47)、J_HセグメントJH4b、V_κセグメントO2/O12(DPK9)及びJ_κセグメントJ_κ1である。V_HセグメントDP45及びDP38も適切である。したがって、これらのセグメントを組み合わせて、所望の単一の主鎖コンホメーションを有するライブラリーを構築する基礎として使用することができる。

【０２６０】

或いは、単離した結合ループのそれぞれの様々な主鎖コンホメーションの天然の発生率に基づいて単一の主鎖コンホメーションを選択する代わりに、主鎖コンホメーションの組合せの天然の発生率を、単一の主鎖コンホメーションを選択する基礎として用いる。抗体の場合、例えば、任意の2、3、4、5又は6個すべての抗原結合ループのカノニカル構造の組合せの天然の発生率を決定することができる。ここでは、選択したコンホメーションは天然抗体において一般的であることが好ましく、天然のレパートリー中で最も頻繁に観察されることが最も好ましい。したがって、ヒト抗体では、例えば、5個の抗原結合ループ、H1、H2、L1、L2及びL3の天然の組合せを考慮した場合、最も頻繁なカノニカル構造の組合せを決定し、その後、単一の主鎖コンホメーションを選択する基礎として、H3ループの最も一般的なコンホメーションと組み合わせる。

【０２６１】

ii.カノニカル配列の多様化

いくつかの既知の主鎖コンホメーション、又は好ましくは単一の既知の主鎖コンホメーションを選択した後、本発明で使用するための本発明による二重特異性リガンド又はライブラリーを、構造的及び/又は機能的多様性を有するレパートリーを作製するために分子の結合部位を変化させることによって、構築することができる。このことは、変異体が、それが様々な活性を提供できるように、その構造及び/又はその機能に十分な多様性を保有するように作製されることを意味する。

【０２６２】

所望の多様性は、典型的には選択した分子を一つ又は複数の位置で変動させることによって生じさせる。変化させる位置は、ランダムに選択することができ、又は好ましくは選択する。その後、常在のアミノ酸を任意のアミノ酸又は天然若しくは合成のその類似体に置き換えて非常に多数の変異体を生じる際にランダム化するか、或いは、常在のアミノ酸を定めたアミノ酸サブセットのうちの一つ又は複数で置き換えてより限定された数の変異体を生じることによって、多様化を達成することができる。

【０２６３】

そのような多様性を導入するための様々な方法が報告されている。エラープローンPCR(Hawkins他(1992)J.Mol.Biol.、226:889)、化学突然変異誘発(Deng他(1994)J.Biol.Chem.、269:9533)又は細菌突然変異誘発株(Low他(1996)J.Mol.Biol.、260:359)を使用して、ランダム突然変異を、分子をコードしている遺伝子内に導入することができる。選択した位置を突然変異させる方法も当分野で周知であり、PCRの使用を用いた又は用いないミスマッチオリゴヌクレオチド又は縮重オリゴヌクレオチドの使用が含まれる。例えば、突然変異を抗原結合ループに標的化することによって、いくつかの合成抗体ライブラリーが作製されている。ヒト破傷風トキソイドと結合するFabのH3領域をランダム化して、様々な新しい結合特異性が作られている(Barbas他(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA、89:4457)。ランダム又は半ランダムH3及びL3領域を生殖系列V遺伝子セグメントに付加して、突然変異していないフレームワーク領域を有する大きなライブラリーが作製されている(Hoogenboom及びWinter(1992)J.Mol.Biol.、227:381;Barbas他(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA、89:4457;Nissim他(1994)EMBO J.、13:692;Griffiths他(1994)EMBO J.、13:3245;De Kruif他(1995)J.Mol.Biol.、248:97)。そのような多様化は、他の抗原結合ループの一部又は全体が含まれるように拡張されている(Crameri他(1996)Nature Med.、2:100;Riechmann他(1995)Bio/Technology、13:475;Morphosys、WO97/08320、上記)。

【０２６４】

ループのランダム化はH3単独について約10^{15}個を超える構造及び他の五つのループについて同様に多数の変異体を生じる潜在性を有するので、現在の形質転換技術、又は細胞を用いない系を使用してでも、すべての可能な組合せを表すライブラリーを作製することは実現不可能である。例えば、現在までに構築された最大ライブラリーの一つでは、この設計のライブラリーの潜在的な多様性の一部でしかない6×10^{10}個の異なる抗体が作製された(Griffiths他(1994)上記)。

【０２６５】

好ましい実施形態では、分子の所望の機能を作製又は改変することに直接関与している残基のみを多様化する。多くの分子では、機能は標的と結合することであり、したがって、多様性は、標的結合部位に集中している一方で、分子の全体的なパッキング又は選択した主鎖コンホメーションの維持にとって重大な残基を変えることを回避するべきである。

【０２６６】

抗体ドメインに適用されるカノニカル配列の多様化

抗体二重特異性リガンドの場合、標的に対する結合部位は、ほとんどの場合が抗原結合部位である。したがって、非常に好ましい態様では、本発明は、抗原結合部位中の残基のみが変動している抗体二重特異性リガンドのライブラリー又はアセンブリを提供する。これらの残基はヒト抗体レパートリー中で極度に多様性が高く、高分解能(resolution)抗体/抗原複合体において接触することが知られている。例えば、L2では、位置50及び53が天然抗体中で多様であることが知られており、抗原と接触することが観察されている。対照

的に、従来の手法は、Kabat他(1991、上記)によって定義されているように、対応する相補性決定領域(CDR1)中のすべての残基を多様化することであり、本発明による使用のためのライブラリーの二つの多様化と比較して約7個の残基であった。これは、様々な抗原結合特異性を生じるために必要な機能的多様性に関して顕著な改善を表す。

【０２６７】

自然では、抗体の多様性は二つのプロセスの結果である:すなわちナイーブな一次レパートリーを生じる生殖系列V、D及びJ遺伝子セグメントの体細胞組換え(いわゆる生殖系列及び接合の多様性)、並びに生じる再構成されたV遺伝子の体細胞高頻度突然変異である。ヒト抗体配列の分析により、一次レパートリー中の多様性は抗原結合部位の中心に集中している一方で、体細胞高頻度突然変異は、一次レパートリー中で高度に保存されている抗原結合部位の周辺の領域に多様性を拡げることが示されている(Tomlinson他(1996)J.Mol.Biol.、256:813参照)。この相補性は、恐らく配列空間を検索するための効率的な戦略として進化したものであり、抗体に特有に見えるが、他のポリペプチドレパートリーに容易に適用できる。変動した残基は、標的に対する結合部位を形成するもののサブセットである。標的結合部位中の残基の様々な(重複を含む)サブセットは、所望する場合は、選択中の異なる段階で多様化する。

【０２６８】

抗体レパートリーの場合、抗原結合部位中の残基のすべてではないが一部が多様化している、最初の「ナイーブ」なレパートリーを作製する。本明細書中の本場面で使用する用語「ナイーブ」とは、事前に決定された標的を持たない抗体分子をいう。これらの分子は、胎児及び新生児の個体の場合のように、その免疫系がまだ広範な抗原刺激によってアレルギー誘発されていない、免疫の多様化を受けていない個体の免疫グロブリン遺伝子によってコードされているものを表す。その後、このレパートリーを様々な抗原又はエピトープに対して選択する。必要な場合は、その後、さらなる多様性を、最初のレパートリー中の多様化している領域の外側に導入することができる。この成熟レパートリーを、改変された機能、特異性又は親和性について選択することができる。

【０２６９】

本発明は、抗原結合部位中の残基の一部又はすべてが多様化している、二重特異性リガンド又は二重特異性リガンドのナイーブなライブラリーを構築するための、結合ドメインの二つの異なるナイーブなレパートリーを提供する。「一次」ライブラリーは天然の一次レパートリーを模倣し、多様性は、生殖系列V遺伝子セグメント中で多様である(生殖系列の多様性)又は組換えプロセス中に多様化されている(接合の多様性)、抗原結合部位の中心の残基に限定される。多様化されている残基には、好ましくはそれだけには限定されないが、H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H96、H97、H98、L50、L53、L91、L92、L93、L94及びL96が含まれる。「体細胞」ライブラリーでは、多様性は、組換えプロセス中に多様化される(接合の多様性)、又は高度に体細胞突然変異している)残基に限定される。多様化されている残基には、好ましくはそれだけには限定されないが、H31、H33、H35、H95、H96、H97、H98、L30、L31、L32、L34及びL96が含まれる。これらのライブラリー中の多様化に適しているとして上記記載したすべての残基は、一つ又は複数の抗体-抗原複合体中で接触することが知られている。どちらのライブラリー中でも、抗原結合部位中のすべての残基は多様化していないので、所望する場合は、残りの残基を多様化させることによって、選択中にさらなる多様性を取り込む。当業者には、これらの残基の任意のもの(又は抗原結合部位を含むさらなる残基)の任意のサブセットを、抗原結合部位の最初及び/又は続く多様化に使用できることが明らかであろう。

【０２７０】

本発明で使用するためのライブラリーの構築において、選択した位置の多様化は、典型的には核酸レベルで行い、これは、いくつかの可能なアミノ酸(20種すべて又はそのサブセット)をその位置で取り込むことができるようにポリペプチドの配列を特定するコード配列を変化させることによる。IUPAC学名を用いて、最も可変性の高いコドンは、すべてのアミノ酸及びTAGストップコドンをコードしているNNKである。NNKコドンは、必要な多

様性を導入するために使用することが好ましい。同じ結果をもたらす他のコドンも有用であり、さらなるストップコドンTGA及びTAAの生成をもたらすNNNコドンが含まれる。

【０２７１】

ヒト抗体の抗原結合部位中の側鎖多様性の特徴は、特定のアミノ酸残基を優先する明白な偏りである。V_H、V_κ及びV_λ領域のそれぞれ中の10個の最も多様な位置のアミノ酸組成を合計すると、7個の異なる残基だけで側鎖多様性の76%を超え、これらは、セリン(24%)、チロシン(14%)、アスパラギン(11%)、グリシン(9%)、アラニン(7%)、アスパラギン酸(6%)及びスレオニン(6%)である。主鎖に可撓性を与えることができる親水性残基及び小残基へのこの偏りは、恐らく、広範囲の抗原又はエピトープと結合しやすい表面の進化を反映しており、一次レパートリー中の抗体の必要な乱雑状態の説明に役立ち得る。

【０２７２】

このアミノ酸分布を模倣することが好ましいため、多様化させる位置でのアミノ酸分布は、抗体の抗原結合部位で見られるものを模倣することが好ましい。様々な標的抗原に対する特定のポリペプチド(抗体ポリペプチドだけではない)の選択を可能にするアミノ酸の置換におけるそのような偏りは、任意のポリペプチドレパートリーに容易に適用される。多様化させる位置でのアミノ酸分布を偏らせる様々な方法が存在し(トリヌクレオチド突然変異誘発の使用を含む、WO97/08320参照)、そのうち、好ましい方法は、合成が容易なため、従来の縮重コドンの使用である。縮重コドン(それぞれの位置で等比の一重、二重、三重及び四重の縮重)のすべての組合せによってコードされているアミノ酸プロフィールを、天然のアミノ酸の使用と比較することによって、最も代表的なコドンを計算することが可能である。コドン(AGT)(AGC)T、(AGT)(AGC)C及び(AGT)(AGC)(CT)、即ち、IUPAC名を用いてそれぞれDVT、DVC及びDVYが、所望のアミノ酸プロフィールに最も近く、これらは22%のセリン並びに11%のチロシン、アスパラギン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、スレオニン及びシステインをコードしている。したがって、好ましくは、多様化している位置のそれぞれでDVT、DVC又はDVYコドンのいずれかを使用してライブラリーを構築する。

【０２７３】

G:リガンド半減期を増加することができる抗原

本発明による二重特異性リガンドは、その一つの立体配置で、リガンドの半減期をin vivoで増加させることができる一つ又は複数の分子と結合することができる。典型的には、そのような分子は、天然にin vivoで発生し、所望しない物質を生物から除去する内在機構による分解又は除去に耐性があるポリペプチドである。例えば、生物の半減期を増加させる分子は以下から選択し得る:

細胞外基質からのタンパク質;例えば、コラーゲン、ラミニン、インテグリン及びフィブロネクチン。コラーゲンは細胞外基質の主用なタンパク質である。身体の様々な部分で見つかっている約15種類のコラーゲン分子が現在知られており、例えば、骨、皮膚、腱、靱帯、角膜、内蔵中に見つかるI型コラーゲン(体内コラーゲンの90%を占める)又は軟骨、無脊椎動物ディスク、脊索、眼の硝子体液中に見つかるII型コラーゲンがある。

【０２７４】

血液中に見つかるタンパク質:血漿タンパク質、例えば、フィブリン、α-2マクログロブリン、血清アルブミン、フィブリノーゲンA、フィブリノーゲンB、血清アミロイドプロテインA、ヘプタグロビン、プロフィリン、ユビキチン、ウテログロブリン及びβ-2-ミクログロブリンが含まれる;

酵素及び阻害剤、例えば、プラスミノーゲン、リゾチーム、シスタチンC、α-1-アンチトリプシン及び膵臓トリプシン阻害剤。プラスミノーゲンは、トリプシン様セリンプロテアーゼプラスミンの不活性の前駆体である。これは通常、血流中に循環しているものが見つかる。プラスミノーゲンが活性化されてプラスミンに変換される際、血餅中で血液細胞をもつれさせるフィブリノーゲン線維を溶かす強力な酵素ドメインを展開する。これは線維素溶解と呼ばれる。

【０２７５】

免疫系タンパク質、例えばIgE、IgG、IgM。
【０２７６】
輸送タンパク質、例えばレチノール結合タンパク質、α-1ミクログロブリン。
【０２７７】
デフェンシン、例えばβ-デフェンシン1、好中球デフェンシン1、2及び3。
【０２７８】
血液脳関門又は神経組織中で見つかるタンパク質、例えばメラノコルチン受容体、ミエリン、アスコルビン酸トランスポーター。
【０２７９】
トランスフェリン受容体特異的リガンド-神経薬理物質融合タンパク質(米国第5,977,307号参照);
脳毛細内皮細胞受容体、トランスフェリン、トランスフェリン受容体、インスリン、インスリン様成長因子1(IGF1)受容体、インスリン様成長因子2(IGF2)受容体、インスリン受容体。
【０２８０】
腎臓に局在するタンパク質、例えばポリシスチン、IV型コラーゲン、有機陰イオントランスポーターK1、ヘイマン抗原。
【０２８１】
肝臓に局在するタンパク質、例えばアルコール脱水素酵素G250。
【０２８２】
血液凝固因子X
α1アンチトリプシン
HNF 1α
肺に局在するタンパク質、例えば分泌成分(IgAと結合)。
【０２８３】
心臓に局在するタンパク質、例えばHSP 27。これは拡張型心筋症に関連している。
【０２８４】
皮膚に局在するタンパク質、例えばケラチン。
【０２８５】
骨特異的タンパク質、例えば、骨原性活性を実証するトランスフォーミング成長因子βスーパーファミリーのサブセットである骨形態形成タンパク質(BMP)。例には、BMP-2、-4、-5、-6、-7(骨原性タンパク質(OP-1とも呼ばれる)及び-8(OP-2)が含まれる。
【０２８６】
腫瘍特異的タンパク質。ヒト栄養芽細胞抗原、ハーセプチン受容体、エストロゲン受容体、カテプシン、例えばカテプシンB(肝臓及び脾臓中に見つかる)が含まれる。
【０２８７】
疾患に特異的なタンパク質、例えば、活性T細胞上でのみ発現される抗原:LAG-3(リンパ球活性化遺伝子)、オステオプロテゲリンリガンド(OPGL)Nature 402、304-309;1999参照、OX40(TNF受容体ファミリーのメンバー、活性T細胞上で発現され、I型ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-I)産生細胞中で特異的にアップレギュレーションされることが知られている唯一の共刺激T細胞分子である。)J Immunol.2000年7月1日;165(1):263-70参照;CG6512ショウジョウバエ(Drosophila)、ヒトパラプレジン、ヒトFtsH、ヒトAFG3L2、ネズミftsHを含めたメタロプロテアーゼ(関節炎/癌に関連);酸性線維芽細胞成長因子(FGF-1)、塩基性線維芽細胞成長因子(FGF-2)、血管内皮成長因子/血管透過因子(VEGF/VPF)、トランスフォーミング成長因子-a(TGF a)、腫瘍壊死因子-α(TNF-α)、アンジオゲニン、インターロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-8(IL-8)、血小板由来内皮成長因子(PD-ECGF)、胎盤成長因子(PlGF)、ミッドカイン血小板由来成長因子-BB(PDGF)、フラクタルカインを含めた血管形成成長因子が含まれる。
【０２８８】
ストレスタンパク質(熱ショックタンパク質)HSPは通常、細胞内に見つかる。これらが

細胞外に見つかる場合、これは、細胞が死滅し、その内容物が溢れ出たことの指標である。このプログラムされていない細胞死(壊死)は、トラウマ、疾患又は傷害の結果としてのみ起こり、したがって、in vivoの細胞外HSPは、感染症及び疾患と闘う免疫系からの応答を始動させる。細胞外HSPと結合する二重特異性リガンドは疾患部位に局在することができる。

【０２８９】

Fc輸送に関連するタンパク質

ブラムベル(Brambell)受容体(FcRBとしても知られる)

このFc受容体は二つの機能を有しており、そのどちらも送達において潜在的に有用である。

【０２９０】

その機能は、

(1)胎盤を通る母から子へIgGを輸送すること

(2)IgGを分解から保護することによってIgGのその血清半減期を延長すること。受容体はIgGをエンドソームから再利用すると考えられている。

Holliger他、Nat Biotechnol 1997年7月;15(7):632-6を参照されたい。

【０２９１】

本発明によるリガンドは、in vivo半減期の増加又は漸増をまったく必要とせずに、上記標的に特異的であるように設計し得る。例えば、本発明によるリガンドは、組織特異的な上述のものから選択された標的に対して特異的であり得、それにより、組織特異的な治療上関連性のある標的と結合する二重特異性リガンド又はdAb単量体に対する組織特異的な標的化を、半減期の増加にかかわらず可能にするが、増加は起こり得る。さらに、リガンド又はdAb単量体が腎臓又は肝臓を標的とする場合は、これは、リガンド又はdAb単量体を、in vivoで代替クリアランス経路に再度向けられ得る(例えば、リガンドは、肝臓クリアランスから離れて腎臓クリアランスに対し得る)。

【０２９２】

上述のように、本明細書中に定義する単一可変ドメインを含む本明細書中で記載するリガンドは、標的に対して特異的であるように選択することができ、好ましくは、標的の半減期をin vivoで増加させるという付加的特性を有し得るが、これは必要ではない。二重特異性リガンドは、第1のエピトープ又は抗原に対する結合特異性を有する抗体重鎖単一可変ドメイン、また、第2のエピトープ又は抗原に対する結合特異性を有する抗体軽鎖単一可変ドメインからなっていてよく、抗原の一方若しくは両方が血清アルブミンであり得るか、又は、エピトープの一方若しくは両方が血清アルブミンのエピトープである。一実施形態では、両方の血清アルブミンエピトープは同一であり、別の実施形態では、それぞれの血清アルブミンエピトープは異なる。

【０２９３】

標的の半減期をin vivoで増加させる特性を有するこれらの二重特異性リガンドに加えて、リガンドの他の構造形態を本明細書中で記載し、これらは、標的と結合するリガンドの半減期をin vivoで、例えば血清アルブミンと結合することによって増加させる特性を有する本明細書中に定義する少なくとも一つの単一可変ドメインを有する、又はそれからなる。例えば、リガンドは、血清アルブミンと結合する本明細書中で定義する単量体単一可変ドメインからなるか、それを含むことができるか;又は、リガンドは、単一可変ドメインのうちの一つ若しくは複数が血清アルブミン、即ち多量体と結合する、本明細書中で定義する複数の単一可変ドメインを含む形態であり得る。多量体及び単量体はどちらも、血清アルブミンと、例えば融合タンパク質及び/又はコンジュゲートの形態で結合する一つ又は複数の単一可変ドメインに加えて、他の要素をさらに含むことができる。そのような融合タンパク質は、好ましくは単一のポリペプチド鎖であり、例えば本明細書中で定義する二つ以上の連結した単一可変ドメインを含むことができる。連結した単一可変ドメインは、互いに同一でもよく、又は互いに異なっていてもよい。そのような要素には、例えば、血清アルブミン以外の抗原若しくはエピトープに対する特異性を有する本明細書中で

定義する一つ又は複数の追加の単一可変ドメイン、及び/又は一つ又は複数の薬物、及び/又は血清アルブミン以外の抗原又はエピトープに対する特異性を有し、本明細書中で定義する単一可変ドメインでない一つ若しくは複数の標的結合ドメインが含まれる。そのような多量体は、その単一可変ドメインに関して複数の結合価、例えば、一価、二価、三価、四価を有し得る。そのような多量体は、本明細書中で定義するIgG構造又は二重特異性リガンドの形態、並びに他の構造、例えば、IgM、IgE、IgD、若しくはIgA、及び/又はそれだけには限定されないが、scFv断片、Fab、Fab'などの断片を含めたその断片を有し得る。リガンドは、融合タンパク質又はコンジュゲートなどのさらなる部分を含むように改変することができる。

【０２９４】

本明細書中で記載する二重特異性リガンド又は単量体リガンド又は多量体リガンドの抗体重鎖単一可変ドメインは、血清アルブミンと特異的に結合することができ、抗体重鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列を含む。そのような抗体重鎖単一可変ドメインは、好ましくはそれだけには限定されないが、以下のドメインのうちの一つから選択することができる:dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30及びdAb7h31、又は、それと少なくとも80%同一であり、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以下まで同一であり、血清アルブミンと特異的に結合する、アミノ酸配列を有するドメイン。或いは、リガンドは、以下のドメインのうちの一つと、血清アルブミンとの結合に関して競合する、抗体単一可変ドメイン、好ましくは抗体重鎖単一可変ドメインを含む:dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30 dAb7h31、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2、又は、それと少なくとも80%同一であり、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以下まで同一であり、血清アルブミンと特異的に結合するアミノ酸配列を有するドメイン。或いは、リガンドは、抗体重鎖単一可変ドメインに加えて、血清アルブミンと特異的に結合することができ、抗体軽鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列を含む、抗体軽鎖単一可変ドメインを含む。そのような抗体軽鎖単一可変ドメインは、好ましくはそれだけには限定されないが、以下のドメインのうちの一つから選択することができる:dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2、又は、それと少なくとも80%同一であり、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以下まで同一であり、血清アルブミンと特異的に結合するアミノ酸配列を有するドメイン。或いは、リガンドは、好ましくはそれだけには限定されないが、以下のドメインのうちの一つから選択することができるドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合する、抗体単一可変ドメイン、好ましくは抗体軽鎖単一可変ドメインを含む:dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30 dAb7h31、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2、又は、それと少なくとも80%同一であり、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以下まで同一であり、血清アルブミンに対する結合特異性を有するアミノ酸配列を有するドメイン。一実施形態では、リガンドは、上記二重特異性リガンドの一つ又は二つの任意の組合せを有するIgG免疫グロブリンであり得る。一実施形態では、リガンドは、上述の単一可変ドメインの一つ又は複数の単量

体を含むことができ、リガンドがこれらの単一可変ドメインのうちの複数を含む場合は、単一可変ドメインは、互いに同一でもよく、又は互いに異なっていてもよい。

【０２９５】

一実施形態では、リガンドは、第1の抗原又はエピトープ結合特異性を有する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン及び第2の抗原又はエピトープ結合特異性を有する第2の免疫グロブリン単一可変ドメインを有する二重特異性リガンドであり得、第1及び第2の免疫グロブリン単一可変ドメインは抗体重鎖単一可変ドメインであり、第1及び第2の抗体重鎖単一可変ドメインのうちの一方又は両方は血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の抗体重鎖単一可変ドメインのうちの一つから選択することができる、抗体重鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列を有する:dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30及びdAb7h31、又は、それと少なくとも80%同一であり、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%以下まで同一であるアミノ酸配列。そのようなリガンドの一実施形態は、第1の抗原又はエピトープ結合特異性を有する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン及び第2の抗原又はエピトープ結合特異性を有する第2の免疫グロブリン単一可変ドメインを有する二重特異性リガンドであり、第1及び第2の免疫グロブリン単一可変ドメインは抗体重鎖単一可変ドメインであり、第1及び第2の抗体重鎖単一可変ドメインのうちの一方又は両方は血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の抗体単一可変ドメインのうちの一つから選択することができる抗体単一可変ドメインのアミノ酸配列を有する単一可変ドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合する:dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30 dAb7h31、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2、又は、それと少なくとも80%同一であるか、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以下まで同一である配列。一実施形態では、リガンドは、上記二重特異性リガンドの一つ又は二つの任意の組合せを有するIgG免疫グロブリンであり得る。一実施形態では、リガンドは、上述の単一可変ドメインの一つ又は複数の単量体を含むことができ、リガンドがこれら単一可変ドメインのうちの複数を含む場合は、単一可変ドメインは、互いに同一でもよく、又は互いに異なっていてもよい。

【０２９６】

一実施形態では、二重特異性リガンドは、第1の抗原又はエピトープ結合特異性を有する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン及び第2の抗原又はエピトープ結合特異性を有する第2の免疫グロブリン単一可変ドメインを有し、第1及び第2の免疫グロブリン単一可変ドメインは抗体軽鎖単一可変ドメインであり、第1及び第2の抗体軽鎖単一可変ドメインのうちの一方又は両方は血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の抗体軽鎖単一可変ドメインのうちの一つから選択することができる抗体軽鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列を有する:dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2、又は、それと少なくとも80%同一であるか、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%まで同一である配列。

【０２９７】

一実施形態では、リガンドは、第1の抗原又はエピトープ結合特異性を有する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン及び第2の抗原又はエピトープ結合特異性を有する第2の免疫グロブリン単一可変ドメインを有する二重特異性リガンドであり得、第1及び第2の免疫グ

ロブリン単一可変ドメインは抗体軽鎖単一可変ドメインであり、第1及び第2の抗体軽鎖単一可変ドメインのうちの一方又は両方は血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の抗体単一可変ドメインのうちの一つから選択することができる抗体単一可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体軽鎖単一可変ドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合する:dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30 dAb7h31、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1及びdAb7p2、又は、それと少なくとも80%同一であるか、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%まで同一である配列。

【０２９８】

本明細書中では、一つ又は複数の抗体重鎖単一可変ドメインを有するリガンドを記載し、一つ又は複数の抗体重鎖単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、抗体重鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列は、好ましくはそれだけには限定されないが、以下から選択される:dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、及び、それと少なくとも80%同一であるか、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%まで同一である配列。

【０２９９】

本明細書中では、一つ又は複数の抗体重鎖単一可変ドメインを有するリガンドを記載し、一つ又は複数の抗体重鎖単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下:dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2、のうちの一つから選択される抗体単一可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体単一可変ドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合する。

【０３００】

本明細書中では、第1の抗原に対する結合特異性を有する抗体重鎖単一可変ドメイン、又はそのエピトープ、及び第2の抗原に対する結合特異性を有する抗体軽鎖単一可変ドメイン、又はそのエピトープを有するリガンドを記載し、第1の抗原及び前記第2の抗原のうちの一方又は両方は血清アルブミンであり、抗体重鎖単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の群:dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、dAb7p2、から選択される抗体単一可変ドメインのアミノ

酸配列を有する抗体単一可変ドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合し、抗体軽鎖単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下:dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、drdAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2、及び、それと少なくとも80%同一であるか、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%まで同一である配列、から選択される抗体軽鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列を有する。

【０３０１】

本明細書中では、第1の抗原に対する結合特異性を有する抗体重鎖単一可変ドメイン又はそのエピトープ、及び第2の抗原に対する結合特異性を有する抗体軽鎖単一可変ドメイン又はそのエピトープを有するリガンドを記載し、前記第1の抗原及び前記第2の抗原のうちの一方又は両方は血清アルブミンであり、抗体重鎖単一可変ドメインは血清アルブミンアルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の群:dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、及び、それと少なくとも80%同一であるか、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%まで同一である配列、から選択される抗体重鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列を有し、抗体軽鎖単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の群:dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1及びdAb7p2から選択される抗体単一可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体単一可変ドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合する。

【０３０２】

本明細書中では、第1の抗原に対する結合特異性又はそのエピトープ、及び第2の抗原に対する結合特異性を有する一つ若しくは複数の抗体軽鎖単一可変ドメイン又はそのエピトープを有する一つ又は複数の抗体重鎖単一可変ドメインを有するリガンドを記載し、第1の抗原及び第2の抗原のうちの一方又は両方は血清アルブミンであり、一つ又は複数の抗体重鎖単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の群:dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、dAb7p2から選択される抗体単一可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体単一可変ドメインと、血清ア

ルブミンとの結合に関して競合し、一つ又は複数の抗体軽鎖単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の群:dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、drdAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2、及び、それと少なくとも80%同一であるか、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%まで同一であるアミノ酸配列、から選択される抗体軽鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列を含む。

【０３０３】

本明細書中では、第1の抗原に対する結合特異性又はそのエピトープ、及び第2の抗原に対する結合特異性を有する一つ若しくは複数の抗体軽鎖単一可変ドメイン又はそのエピトープを有する一つ又は複数の抗体重鎖単一可変ドメインを有するリガンドを記載し、前記第1の抗原及び前記第2の抗原のうちの一方又は両方は血清アルブミンであり、一つ又は複数の抗体重鎖単一可変ドメインは血清アルブミンアルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の群:dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、及び、それと少なくとも80%同一であるか、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%まで同一である配列、から選択される抗体重鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列を有し、一つ又は複数の抗体軽鎖単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、以下の群:dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1及びdAb7p2から選択される抗体単一可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体単一可変ドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合する。

【０３０４】

本明細書中では、一つ又は複数の抗体軽鎖単一可変ドメインを有するリガンドを記載し、一つ又は複数の抗体軽鎖単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の群から選択される抗体軽鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列を有する:dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、drdAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、dAb7p2、及び、それと少なくとも80%同一であるか、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%まで同一である配列。

【０３０５】

本明細書中では、一つ又は複数の抗体軽鎖単一可変ドメインを有するリガンドを記載し、一つ又は複数の抗体軽鎖単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の群から選択される抗体単一可変ドメインのアミ

ノ酸配列を有する抗体単一可変ドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合する:dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2。

【０３０６】

本明細書中では、一つ又は複数の単一可変ドメインを有するリガンドを記載し、一つ又は複数の単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の群から選択される抗体単一可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体単一可変ドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合する:dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2。好ましくは、一つ又は複数の単一可変ドメインは、好ましくはそれだけには限定されないが、CTLA-4、リポカリン、SpA、アフィボディ、アビマー、GroEl及びフィブロネクチンからなる群から選択される足場を含み、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の群から選択される抗体単一可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体単一可変ドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合する:dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2。

【０３０７】

本明細書中では、第1の抗原又はエピトープ結合特異性を有する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン及び第2の抗原又はエピトープ結合特異性を有する第2の免疫グロブリン単一可変ドメインを有するリガンドを記載し、第1及び第2の免疫グロブリン単一可変ドメインは抗体重鎖単一可変ドメインであり、第1の抗体重鎖単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の群:dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、及び、それと少なくとも80%同一であるか、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%まで同一である配列、から選択される抗体重鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列を有し、第2の抗体重鎖単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、以下の群:dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29

、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2から選択される抗体単一可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体単一可変ドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合する。

【０３０８】

本明細書中では、第1の抗原又はエピトープ結合特異性を有する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン及び第2の抗原又はエピトープ結合特異性を有する第2の免疫グロブリン単一可変ドメインを有するリガンドを記載し、第1及び第2の免疫グロブリン単一可変ドメインは抗体軽鎖単一可変ドメインであり、第1の抗体軽鎖単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の群:dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、drdAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、dAb7p2、及び、それと少なくとも80%同一であるか、それに85%、90%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%まで同一である配列、から選択される抗体軽鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列を有し、第2の抗体軽鎖単一可変ドメインは血清アルブミンと特異的に結合し、好ましくはそれだけには限定されないが、以下の群:dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2から選択される抗体単一可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体単一可変ドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合する。

【０３０９】

上記文献及び本明細書中に記載のリガンドの実施形態には、上記二重特異性リガンドの一つ若しくは二つの任意の組合せを有するIgG構造、及び/又は非免疫グロブリン足場を含む単一可変ドメインを含む構造を有するものも含まれる。そのような免疫グロブリン構造は、四つの抗体重鎖単一可変ドメインを含むIgG構造、又は四つの抗体軽鎖単一可変ドメインを含むIgG構造、並びにそれぞれの対が抗体重鎖単一可変ドメイン及び抗体軽鎖単一可変ドメインを含む2対の鎖を含むIgG構造を含めた、抗体単一可変ドメインの様々な組合せを有することができる。これらのIgG構造に加えて、本明細書中で記載するリガンドは、好ましくはそれだけには限定されないが、上述の単一可変ドメインを含めた単一可変ドメインの一つ又は複数の単量体を含むことができ、リガンドがこれら単一可変ドメインのうちの複数を含む場合は、単一可変ドメインは、互いに同一でもよく、又は互いに異なっていてもよい。

【０３１０】

一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドの実施形態には、好ましくはそれだけには限定されないが、本明細書中で記載するdAb、少なくとも一つの単一可変ドメインを

含む二重特異性単量体、抗体単鎖単量体を含む二重特異性IgG分子、及び本明細書中で記載する抗体単鎖単量体を含む多価IgG分子が含まれる。これらの実施形態は、包括的リガンドに対する結合部位をさらに含むことができる。包括的リガンドには、好ましくはそれだけには限定されないが、プロテインA、プロテインL及びプロテインGが含まれ得る。IgG形態のものを含めたそのような二重特異性リガンドでは、それぞれの第2の抗原又はエピトープ結合特異性に対する標的には、好ましくはそれだけには限定されないが、サイトカイン、サイトカイン受容体、酵素、酵素補因子及びDNA結合タンパク質から選択される群で特徴づけることができる抗原に対する結合特異性が含まれ、好ましくはそれだけには限定されないが、EPO受容体、ApoE、Apo-SAA、BDNF、カルジオトロフィン-1、EGF、EGF受容体、ENA-78、エオタキシン、エオタキシン-2、Exodus-2、EpoR、FGF-酸性、FGF-塩基性、線維芽細胞成長因子-10、FLT3リガンド、フラクタルカイン(CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF-β1、インスリン、IFN-γ　IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、1L-8(72個のアミノ酸)、IL-8(77個のアミノ酸)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18(IGIF)、インヒビンα、インヒビンβ、IP-10ケラチノサイト成長因子-2(KGF-2)、KGF、レプチン、L1F、リンフォタクチン、ミュラー阻害物質、単球コロニー阻害因子、単球誘引タンパク質、M-CSF、MDC(67個のアミノ酸)、MDC(69個のアミノ酸)、MCP-1(MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC(67個のアミノ酸)、MDC(69個のアミノ酸)、MIG、MLP-1α、MIP-3α、MIP-3β、MIP-4、骨髄前駆体阻害因子-1(MPIF-1)、NAP-2、ニューチュリン、神経成長因子、β-NGF、NT-3、NT-4、オンコスタチンM、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1α、SDF1β、TGF-β、TGF-β2、TGF-β、TNF-β、TNF受容体1、TNF受容体II、TNIL-1、TPO、VEGF、VEGF受容体1、VEGF受容体2、VEGF受容体3、GCP-2、GRO/MGSA、GRO-β、GRO-γ、HCC1、1-309、HER1、HER2、HER3、HER4、CD4、ヒトケモカイン受容体CXCR4又はCCR5、C型肝炎ウイルス由来の3型非構造タンパク質(NS3)、TNF-α、IgE、IFN-γ、MMP-12、CEA、ピロリ菌、結核、インフルエンザ、E型肝炎、MMP-12、表皮成長因子受容体(EGFR)などの内部移行受容体、腫瘍細胞上のErBb2受容体、内部移行細胞受容体、LDL受容体、FGF2受容体、ErbB2受容体、トランスフェリン受容体、PDGF受容体、VEGF受容体、PsmAr、細胞外基質タンパク質、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、α1-アンチトリプシン、組織因子プロテアーゼ阻害剤、PDK1、GSK1、Bad、カスパーゼ-9、フォークヘッド、ピロリ菌の抗原、結核菌の抗原、及びインフルエンザウイルスの抗原から選択することができる。IgG形態で存在する二重特異性リガンドを含めたそのような二重特異性リガンドでは、一方又は両方の単一可変ドメインは、好ましくはそれだけには限定されないが、例えば表面プラズモン共鳴によって決定される、1×10^{-3}M以下、1×10^{-4}M以下、1×10^{-5}M以下、1×10^{-6}M以下、1×10^{-7}M以下、1×10^{-8}M以下、及び1×10^{-9}M以下から選択することができる解離定数(Kd)でエピトープ又は抗原と特異的に結合する。IgG形態で存在する二重特異性リガンドを含めたそのような二重特異性リガンドは、好ましくはそれだけには限定されないが、標識、タグ及び薬物を含めた一つ又は複数の要素(entity)をさらに含むことができる。そのようなIgG形態で存在する二重特異性リガンドを含めた二重特異性リガンド、及び上述の単一可変ドメインの一つ又は複数の単量体を含む多量体リガンドは、二重特異性リガンド及びその担体を含む、キット、及び薬剤組成物を含めた組成物中で存在することができる。

【０３１１】

同様に、上記で定義した単量体形態のリガンド及び多量体形態のリガンドを含めた本明細書中で記載する一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドでは、一つ又は複数の単一可変ドメインは、好ましくはそれだけには限定されないが、例えば表面プラズモン共鳴によって決定される、1×10^{-3}M以下、1×10^{-4}M以下、1×10^{-5}M以下、1×10^{-6}M以下、1×10^{-7}M以下、1×10^{-8}M以下、及び1×10^{-9}M以下から選択することができる解離定数(Kd)でエピトープ又は抗原と特異的に結合する。そのようなリガンドは、好ましくはそれだけには限定されないが、標識、タグ及び薬物を含めた一つ又は複数の要素をさらに含むことができる。そのようなリガンドは、リガンド及びその担体を含む、キット、薬剤組成物を含めた組成物中で存在することができる。

【０３１２】
本明細書中で言及する同一性%とは、アミノ酸又はヌクレオチド配列の長さの全ストレッチに沿った同一性%をいうことができる。指定した場合は、アミノ酸又は核酸配列の同一性%とは、例えば、一つ又は複数の抗体CDR領域に沿った、及び/又は一つ又は複数の抗体可変ドメインフレームワーク領域に沿った、参照としたアミノ酸又は核酸配列の一つ又は複数の個別の領域からの配列に対する同一性%をいう。例えば、ポリペプチドの一つ又は複数のCDRにわたるアミノ酸レベルでの配列同一性は、抗体重鎖又は軽鎖単一可変ドメインの対応するCDRのアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%以上の同一性を有することができる。同様に、ポリペプチドの一つ又は複数のフレームワーク領域にわたるアミノ酸レベルでの配列同一性は、抗体重鎖又は軽鎖単一可変ドメインの対応するフレームワークのアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%以上の同一性を有することができる。核酸レベルでは、ポリペプチドの一つ又は複数のCDRをコードしている核酸配列は、抗体重鎖又は軽鎖単一可変ドメインの対応するCDRをコードしている核酸配列に対して、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%以上の同一性を有することができる。核酸レベルでは、ポリペプチドの一つ又は複数のフレームワーク領域をコードしている核酸配列は、それぞれ抗体重鎖又は軽鎖単一可変ドメインの対応するフレームワーク領域をコードしている核酸配列に対して、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%以上の同一性を有することができる。フレームワーク領域(FW)は、好ましくは、ヒトV3-23[DP47]JH4B重鎖又はヒトκ軽鎖DPK9/JK1などの抗体フレームワーク領域からのものである。フレームワーク領域がヒトV3-23[DP47]/JH4B重鎖V領域中に見つかるものである場合、図24に例示するように、同一性%は、そのフレームワーク領域及び/又は好ましくはCDR領域のうち
の一つ又は複数を対象とすることができる。フレームワークがヒトDPK9/JK1軽鎖V領域中に見つかるものである場合、図24に例示するように、同一性%は、その参照フレームワーク領域及び/又は好ましくはCDR領域のうちの一つ又は複数と比較することができる。
【０３１３】
CDRは、好ましくは抗体可変ドメインのもの、好ましくは、それだけには限定されないが、抗体単一可変ドメインのものである。
【０３１４】
一部の実施形態では、同一性%の構造的特徴は機能的側面と連動している。例えば、一部の実施形態では、参照とした核酸又はアミノ酸配列に対して100%未満の同一性を有する核酸配列又はアミノ酸配列は、参照アミノ酸配列又は参照とした核酸によってコードされているアミノ酸配列の少なくとも一つの機能的側面を提示することも必要である。他の実施形態では、参照とした核酸又はアミノ酸配列に対して100%未満の同一性を有する核酸配列又はアミノ酸配列は、それぞれ、参照アミノ酸配列又は参照とした核酸によってコードされているアミノ酸配列の少なくとも一つの機能的側面を提示することも必要であるが、その機能的特徴はわずかに変化していることができる、例えば、参照と比較して指定した抗原に対する親和性の増加を与えることができる。
【０３１５】
H:本発明の第2の構成による多特異性リガンドの使用
本発明の第2の構成の方法による多特異性リガンドは、in vivoの治療及び予防用途、in vitro及びin vivoの診断用途、in vitroアッセイ並びに試薬用途などで用い得る。例えば、抗体分子は、当業者に知られている方法に従って、ELISA技術などの抗体に基づいたアッセイ技術で使用し得る。
【０３１６】
上記で暗示したように、本発明による多特異性リガンドは、診断、予防及び治療の手順において有用である。本発明による多特異性抗体は、ウェスタン分析及び標準の免疫組織化学的手順によるin situタンパク質検出において診断的に有用である。これらの用途に

おける使用では、リガンドを当分野で知られている技術に従って標識し得る。さらに、そのような抗体ポリペプチドは、樹脂などのクロマトグラフィー担体と複合体形成している場合は、アフィニティークロマトグラフィー手順において調製用に使用し得る。そのような技術はすべて当業者に周知である。

【０３１７】

本発明による閉構造多特異性リガンドの診断的使用には、閉構造多特異性リガンドが、二つの標的が同時に結合できないように(閉構造)競合している二つの標的と結合する能力、又は、二つの標的が同時に結合する(開構造)能力を活用する、分析物の同種アッセイが含まれる。

【０３１８】

真の同種免疫アッセイ様式は、創薬及び開発で使用される診断研究アッセイ系の製造者によって熱心に探求されている。主な診断の市場には、病院、医院や診療所、商業的基準試験機関、血液バンク、及び自宅におけるヒトの試験、非ヒト診断学(例えば、食品試験、水質試験、環境試験、生体防御、及び獣医学的試験)、並びに、最後に研究(薬剤開発;基礎研究及び学術研究を含む)が含まれる。

【０３１９】

現在、これらすべての市場で、化学発光性、ELISA、蛍光又は稀な場合に放射性免疫アッセイ技術を中心にして築かれている免疫アッセイ系を利用している。これらのアッセイ様式のそれぞれが、分離ステップ(結合した試薬を未結合の試薬と分離すること)を必要とする。一部の例では、いくつかの分離ステップが必要である。これらのさらなるステップを追加することにより試薬及び自動化が追加され、時間がかかり、アッセイの最終的な結果に影響が与えられる。ヒト診断学では、分離ステップは自動の場合があり、この問題は隠れるが、取り除かれるわけではない。ロボット工学、追加の試薬、追加のインキュベーション時間などは、相当な費用及び複雑さを付加する。非常に低いレベルの試験分子を用いて文字通り数百万個の試料を一度に試験する、そのような高スループットスクリーニングなどの薬剤開発では、追加の分離ステップを付加することはスクリーニングを行う能力が排除される場合がある。しかし、分離を回避すれば、読み取りで生じるノイズが大きすぎる。したがって、現在のアッセイ様式から得られる範囲で感度を提供する、真の同種様式が必要とされている。有利には、アッセイは、高感度且つ動作範囲が広い、完全に定量的な読み取りを有する。感度は重要な要件であり、必要な資料の低減もそうである。これらの特徴はどちらも、同種システムが提供する特徴である。これは、試料が貴重であるポイントオブケア試験及び薬剤開発において非常に重要である。当分野で現在利用可能な異種システムは、大量の試料及び高価な試薬を必要とする。

【０３２０】

同種アッセイの用途には、最大のアッセイが、男性の前立腺癌をスクリーニングするために使用する前立腺特異抗原に対するものである、癌試験が含まれる。他の用途には、妊娠のβ-hcgを含めた、妊娠を試みている女性の一連の試験を提供する受胎能試験が含まれる。肝炎、HIV、風疹、並びに他のウイルス及び微生物並びに性行為感染症を含めた感染症の試験。試験は、血液バンクによって、特にHIV、A、B、C、非A非B型肝炎の試験において使用されている。治療薬監視試験には、患者において処方された薬物のレベル、例えば、不整脈ではジゴキシン、精神病の場合はフェノバルビタールレベル、喘息ではテオフィリンを、有効性及び毒性の回避について監視することが含まれる。診断的試験はさらに、コカイン、マリファナなどの試験など、乱用薬物試験において有用である。代謝試験は、甲状腺機能、貧血並びに他の生理的障害及び機能の測定に使用される。

【０３２１】

同種免疫アッセイ様式はさらに、標準の臨床的化学アッセイの製造において有用である。免疫アッセイ及び化学アッセイを同一装置上に含めることは、診断的試験において非常に有用である。適切な化学アッセイには、グルコース、コレステロール、カリウムなどの試験が含まれる。

【０３２２】

同種免疫アッセイのさらなる主要な用途は、創薬及び開発である。高スループットスクリーニングには、コンビナトリアル化学ライブラリーを標的に対して超大体積で試験することが含まれる。シグナルが検出され、その後、陽性群をより小さな群に分割し、最終的には細胞で、その後は動物で試験する。同種アッセイは、これらの試験種類のすべてで使用し得る。薬剤開発、特に動物研究及び臨床治験では、免疫アッセイを頻繁に使用する。同種アッセイはこれらの手順を大きく加速及び単純化する。他の用途には、食品及び飲料試験:肉及び他の食品の大腸菌、サルモネラ菌(Salmonella)などの試験;大腸菌を含めたすべての種類の汚染物質について水工場を試験することを含めた水質試験;並びに獣医学的試験が含まれる。

【０３２３】

幅広い実施形態では、本発明は、本発明による閉構造多特異性リガンドと結合しており、その検出可能な特性が分析物と前記閉構造多特異性リガンドとの結合によって変更されている検出可能な薬剤を含む結合アッセイを提供する。そのようなアッセイは、それぞれが閉構造多特異性リガンドの上記特性を活用するいくつかの異なる様式で構成されていてよい。

【０３２４】

アッセイは、分析物による薬剤の直接又は間接的置換に依存し、薬剤の検出可能な特性の変化がもたらされる。例えば、薬剤が検出可能な終点を有する反応を触媒することができる酵素である場合、前記酵素はその活性部位を閉塞させるなどのためにリガンドによって結合されることができ、それにより酵素が失活する。やはり閉構造多特異性リガンドによって結合される分析物が酵素を置換し、活性部位を解放することによってそれを活性にする。その結果、酵素は基質と反応することができ、検出可能な事象が生じる。代替の実施形態では、リガンドは酵素を活性部位外で結合してもよく、これにより、酵素のコンホメーションに影響が与えられてその活性が変更される。例えば、活性部位の構造は、リガンドの結合によって拘束されるか、又は活性に必要な補因子の結合を妨げ得る。

【０３２５】

アッセイの物理的実行は、当分野で知られている任意の形態をとり得る。例えば、閉構造多特異性リガンド/酵素の複合体は試験条片上で提供してもよく;基質は試験条片の様々な領域中で提供してもよく、分析物を含む溶媒はリガンド/酵素の複合体を通って遊走し、酵素を置換して、それを基質領域まで運んでシグナルを生じることが可能である。或いは、リガンド/酵素の複合体は試験スティック又は他の固相上で提供してもよく、分析物/基質の溶液中に浸し、分析物の存在に応答して酵素を溶液中に放出する。

【０３２６】

分析物のそれぞれの分子は一つの酵素分子を潜在的に放出するため、アッセイは定量的であり、所定の時間内に生じるシグナルの強度は溶液中の分析物の濃度に依存する。

【０３２７】

閉構造の分析物を用いたさらなる立体配置が可能である。例えば、閉構造多特異性リガンドは、アロステリック部位で酵素と結合することによって酵素を活性化するように構成し得る。そのような実施形態では、酵素は分析物が存在しない場合に活性である。分析物を加えることにより酵素が置換されてアロステリック活性化が取り除かれることで、酵素が失活する。

【０３２８】

酵素活性を分析物の濃度の測度として用いる上記実施形態の場面では、酵素の活性化又は失活とは、酵素がシグナル生成反応を触媒する能力として測定する、酵素の活性の増加又は低下をいう。例えば、酵素は、検出不可能な基質からその検出可能な形態への変換を触媒し得る。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼは、市販されている色素原又は化学発光性基質と一緒に当分野で幅広く使用されている。酵素の活性の増加又は低下のレベルは、10%～100%、例えば20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%であり得る。活性の増加の場合、増加は100%を超える、即ち、200%、300%、500%以上であってもよく、又は、阻害される酵素のベースライン活性が検出不可能な場合はパーセントとして測定可能でなく

てもよい。

【０３２９】

さらなる立体配置では、閉構造多特異性リガンドは、酵素ではなく酵素/基質対の基質と結合し得る。したがって、基質は、分析物と結合することによって閉構造多特異性リガンドから放出されるまで、酵素には利用不可能である。この立体配置の実行は、酵素と結合する立体配置と同様である。

【０３３０】

さらに、アッセイは、フルオレセイン又は別のフルオロフォアなどの蛍光分子を、リガンドと結合した際に蛍光が消光されるようなコンホメーションで結合するように構成し得る。この場合、分析物とリガンドとの結合により蛍光分子が置換され、したがってシグナルが生じる。本発明で有用な、蛍光分子の代替物には、ルシフェリン/ルシフェラーゼなどの発光性薬剤、及びHRPなどの免疫アッセイで一般に使用される薬剤を含めた色素原薬剤が含まれる。

【０３３１】

本発明に従って調製した多特異性リガンドの治療及び予防的使用は、本発明によるリガンドをヒトなどのレシピエント哺乳動物に投与することを含む。多特異性は、抗体が多量体抗原と高い結合力で結合することを可能にする場合がある。多特異性リガンドは、例えば、細胞傷害性T細胞を動員して腫瘍細胞系の死滅を媒介することにおいて、二つの抗原の架橋結合を可能にする場合がある。

【０３３２】

少なくとも90～95%の均一性の実質的に純粋なリガンド又はその結合タンパク質、例えばdAb単量体が、哺乳動物に投与するために好ましく、98～99%以上の均一性が製薬使用に最も好ましく、特に哺乳動物がヒトである場合にそうである。所望に応じて部分的に又は均一まで精製した後、リガンドを、診断上若しくは治療上(体外を含む)で使用するか、又はアッセイ手順、免疫蛍光染色などの開発及び実行に使用し得る(Lefkovite及びPernis、(1979及び1981)免疫学的方法(Immunological Methods)、第I巻及び第II巻、Academic Press、ニューヨーク)。

【０３３３】

本発明のリガンド又はその結合タンパク質、例えばdAb単量体は、典型的には、炎症状態、アレルギー性過敏症、癌、細菌又はウイルス感染症、並びに自己免疫障害(これには、好ましくはそれだけには限定されないが、I型糖尿病、喘息、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、クローン病及び重症筋無力症が含まれる)の予防、抑制又は治療に有用である。

【０３３４】

本出願では、用語「予防」とは、疾患を誘発する前に保護組成物を投与することを含む。「抑制」とは、誘発事象の後であるが疾患の臨床的所見の前に組成物を投与することをいう。「治療」とは、疾患症状が顕在化した後に保護組成物を投与することを含む。

【０３３５】

疾患に対する保護又はその治療に関して抗体又はその結合タンパク質の有効性をスクリーニングするために使用できる動物モデル系が利用可能である。感受性マウスにおいて全身性エリテマトーデス(SLE)を試験する方法は、当分野で知られている(Knight他(1978)J.Exp.Med.、147:1653;Reinersten他(1978)New Eng.J.Med.、299:515)。別の種からの可溶性AchRタンパク質を用いて疾患を誘発させることによって、SJL/J雌マウスにおいて重症筋無力症(MG)を試験した(Lindstrom他(1988)Adv.Immunol.、42:233)。II型コラーゲンを注射することによって、マウスの感受性株において関節炎を誘発させた(Stuart他(1984)Ann.Rev.Immunol.、42:233)。マイコバクテリア熱ショックタンパク質を注射することによって感受性ラットにおいてアジュバント関節炎を誘発させたモデルが記載されている(Van Eden他(1988)Nature、331:171)。記載のようにサイログロブリンを投与することによって、マウスにおいて甲状腺炎を誘発させた(Maron他(1980)J.Exp.Med.、152:1115)。インスリン依存性真性糖尿病(IDDM)は、自然に起こるか、又はKanasawa他(1984)Diabetologia

、27:113によって記載されているものなどのマウスの特定の株で誘発させることができる。マウス及びラットにおけるEAEは、ヒトにおけるMSのモデルとして役割を果たす。このモデルでは、ミエリン塩基性タンパク質を投与することによって脱髄性疾患を誘発させる(Paterson(1986)免疫病理学の教科書(Textbook of Immunopathology)、Mischer他編、Grune及びStratton、ニューヨーク、ページ179-213;McFarlin他(1973)Science、179:478:並びにSatoh他(1987)J.Immunol.、138:179参照)。

【０３３６】

vWF、例えば、ヒトvWF、vWF A1ドメイン、活性vWFのA1ドメイン、又はvWF A3ドメインと特異的に結合する単一可変ドメインを含むリガンド、又はその組成物は、血栓溶解剤をさらに含み得る。この血栓溶解剤は、当業者に知られている共有又は非共有的手段を介して、単一可変ドメイン、特に抗体単一可変ドメインと非共有結合又は共有結合していてもよい。非共有的手段には、ビオチン/ストレプアビジンなどのタンパク質相互作用を介するもの、又は免疫コンジュゲートを介するものが含まれる。或いは、血栓溶解剤は、上述のvWF若しくはvWFドメイン又はその組成物と結合する単一可変ドメインからなる又はそれを含むリガンドと、同時に、別々に又は逐次的に投与し得る。本発明による血栓溶解剤には、例えば、スタフィロキナーゼ、組織プラスミノーゲン活性化因子、ストレプトキナーゼ、単鎖ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ及びアシルプラスミノーゲンストレプトキナーゼ複合体が含まれ得る。

【０３３７】

また、単一可変ドメイン、若しくは単一可変ドメインを含むリガンド、又はその組成物、或いは本明細書中で記載するスクリーニング方法から生じる単一可変ドメインでコーティングした侵襲性の医療機器も本明細書中で記載する。機器の非限定的な例には、外科用チューブ、閉塞機器、人工装具が含まれる。前記機器の用途には、侵襲部位の周辺の血小板媒介凝集の調節(例えばvWFと特異的に結合する単一可変ドメインでコーティングした機器)又は炎症の調節(例えばTNFαと特異的に結合する単一可変ドメインでコーティングした機器)を要する外科的処置が含まれる。

【０３３８】

一般に、本発明のリガンドは、精製した形態で、薬理学上適切な担体と一緒に利用する。典型的には、これらの担体には、水性若しくはアルコール/水性溶液、乳剤又は懸濁液、生理食塩水及び/又は緩衝媒体が含まれる任意のものが含まれる。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース並びに塩化ナトリウム及び乳酸加リンゲルが含まれる。適切な生理的に許容されるアジュバントは、ポリペプチド複合体を懸濁液に保持するために必要な場合は、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチン及びアルギン酸などのシックナーから選択し得る。

【０３３９】

静脈内ビヒクルには、リンゲルデキストロースに基づくものなどの、液体並びに栄養素補充剤及び電解質補充剤が含まれる。抗細菌性、抗酸化剤、キレート化剤及び不活性ガスなどの保存料及び他の添加剤も存在し得る(Mack(1982)レミントンの製薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)、第16版)。

【０３４０】

本発明のリガンドは、別々に投与する組成物として、又は他の薬剤と併せて使用し得る。これらには、シルコスポリン、メトトレキサート、アドリアマイシン又はシスプラチン、及び免疫毒素などの様々な免疫治療薬が含まれ得る。薬剤組成物には、本発明のリガンド、若しくは投与前にプールしたかどうかにかかわらず、様々な標的抗原又はエピトープを用いて選択したリガンドなどさらには異なる特異性を有する本発明によるリガンドの組合せと併せた、様々な細胞傷害剤又は他の薬剤の「カクテル」が含まれ得る。

【０３４１】

本発明による薬剤組成物の投与経路は、当業者に一般的に知られている任意のものであり得る。それだけには限定されないが免疫療法を含めた治療には、本発明のその選択されたリガンドは、標準技術に従って任意の患者に投与することができる。投与は、非経口、

静脈内、筋肉内、腹腔内、経皮、肺の経路を介するものを含めた任意の適切な様式によって、また、適切な場合は、カテーテルを用いた直接注入によって行うことができる。投与の用量及び頻度は、患者の年齢、性別及び状態、他の薬物の同時投与、禁忌並びに臨床医によって考慮される他のパラメーターに依存する。

【０３４２】

本発明のリガンドは、保管用に凍結乾燥し、使用前に適切な担体で再構成することができる。この技術は従来の免疫グロブリンで有効であることが示されており、当分野で知られている凍結乾燥及び再構成技術を用いることができる。当業者は、凍結乾燥及び再構成は様々な度合の抗体活性の損失をもたらす場合があり(例えば、従来の免疫グロブリンでは、IgM抗体はIgG抗体よりも活性の損失が大きい傾向がある)、それを補償するために使用レベルをアップレギュレーションしなければならない場合があることを理解するであろう。

【０３４３】

本発明のリガンド又はそのカクテルを含む組成物は、予防及び/又は治療処置のために投与することができる。特定の治療用途では、選択した細胞の集団の少なくとも部分的な阻害、抑制、調節、死滅、又は何らかの他の測定可能なパラメーターを達成するために十分な量は、「治療上有効な量」と定義される。この用量に達するために必要な量は、疾患の重篤度及び患者自身の免疫系の全体的な状態に依存するが、一般に、体重1キログラムあたり0.005～5.0mgのリガンド、例えば抗体、受容体(例えばT細胞受容体)又はその結合タンパク質の範囲であり、0.05～2.0mg/kg/用量の用量がより一般的に使用される。予防的用途には、本発明のリガンド又はそのカクテルを含む組成物を同様又はわずかに低い用量で投与してもよい。

【０３４４】

本明細書中で記載する組成物を用いて行う治療は、一つ又は複数の症状が、治療前に存在するそのような症状と比較して、又はそのような組成物で治療していない個体(ヒト若しくはモデル動物)におけるそのような症状と比較して軽減されている場合に(例えば、少なくとも10%又は臨床評価スケール上で少なくとも1点)、「有効」とみなされる。症状は、明らかに対象とする疾患又は障害に応じて変動するが、通常の技術を持つ臨床医又は技術者が測定することができる。そのような症状は、例えば、疾患若しくは障害の一つ若しくは複数の生化学的指標のレベル(例えば、疾患に関連する酵素若しくは代謝物のレベル、罹患した細胞数など)を監視することによって、物理的徴候(例えば、炎症、腫瘍の大きさなど)を監視することによって、又は認められている臨床評価スケール、例えば、総合障害度評価尺度(多発性硬化症用)、アーバイン(Irvine)炎症性腸疾患質問表(32点の評価によって腸機能、全身症状、社会的機能及び情動状態に関する生活の質を評価する-スコアの範囲は32～224である、より高いスコアがより良好な生活の質を示す)、生活の質関節リウマチスケール、若しくは当分野で知られている他の認められている臨床評価スケールによって測定することができる。疾患又は障害の症状の、持続した(例えば、1日以上、好ましくはより長い)、少なくとも10%又は所定の臨床スケール上で1点若しくは複数点の軽減が、「有効」な治療の指標である。同様に、本明細書中で記載する組成物を用いて行う予防は、一つ又は複数の症状の発症又は重篤度が、組成物で治療していない同様の個体(ヒト又は動物モデル)におけるそのような症状と比較して遅延、軽減又は消滅している場合に、「有効」である。

【０３４５】

本発明によるリガンド又はそのカクテルを含む組成物は、哺乳動物中の選択した標的細胞集団の変化、失活、死滅又は除去を補助するために、予防及び治療的設定で利用し得る。さらに、本明細書中で記載する選択したポリペプチドレパートリーを体外又はin vitroで選択的に使用して、標的細胞集団を細胞の異種コレクションから死滅、枯渇又は他の方法で有効に除去し得る。哺乳動物からの血液を体外でリガンド、例えば、抗体、細胞表面受容体又はその結合タンパク質と組み合わせてもよく、ここでは、所望しない細胞を死滅させる又は他の方法で血液から除去し、標準技術に従って哺乳動物に戻す。

【０３４６】
I:半減期を増強させた本発明による二重特異性リガンドの使用
本発明の方法による二重特異性リガンド、及び本明細書中で定義する一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドは、in vivoの治療及び予防用途、in vivo診断用途などで用い得る。
【０３４７】
本発明に従って調製した二重特異性リガンド、及び本明細書中で定義する一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドの治療及び予防的使用は、本発明によるリガンドをヒトなどのレシピエント哺乳動物に投与することを含む。本発明による二重特異性抗体及び本明細書中で定義する一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドは、半減期増強分子に対する少なくとも一つの特異性を含む。一つ又は複数のさらなる特異性は、標的分子に対するものでよい。例えば、二重特異性IgGは、一つは半減期増強分子上にある四つのエピトープに対して特異的であってよい。二重特異性及び三重特異性並びに高結合価は、少なくとも一つの単一可変ドメインを含むリガンドが、多量体抗原と高い結合力で結合することを可能にする場合がある。二重特異性抗体は、例えば、細胞傷害性T細胞を動員して腫瘍細胞系の死滅を媒介することにおいて、二つの抗原の架橋結合を可能にする場合がある。
【０３４８】
少なくとも90～95%の均一性の本発明の方法による実質的に純粋な二重特異性リガンド、及び本明細書中で定義する一つ若しくは複数の単一可変ドメインを含むリガンド、又はその結合タンパク質、例えば単一可変ドメイン単量体(即ちdAb単量体)が、哺乳動物に投与するために好ましく、98～99%以上の均一性が製薬使用に最も好ましく、特に哺乳動物がヒトである場合にそうである。所望に応じて部分的に又は均一まで精製した後、リガンドを、診断上若しくは治療上(体外を含む)で使用するか、又はアッセイ手順、免疫蛍光染色などの開発及び実行に使用し得る(Lefkovite及びPernis、(1979及び1981)免疫学的方法(Immunological Methods)、第I巻及び第II巻、Academic Press、ニューヨーク)。
【０３４９】
本発明の方法による二重特異性リガンド、及び本明細書中で定義する一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドは、典型的には、炎症状態、アレルギー性過敏症、癌、細菌又はウイルス感染症、並びに自己免疫障害(これには、好ましくはそれだけには限定されないが、I型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、クローン病及び重症筋無力症が含まれる)の予防、抑制又は治療に有用である。
【０３５０】
本出願では、用語「予防」とは、疾患を誘発する前に保護組成物を投与することを含む。「抑制」とは、誘発事象の後であるが疾患の臨床的所見の前に組成物を投与することをいう。「治療」とは、疾患症状が顕在化した後に保護組成物を投与することを含む。
【０３５１】
疾患に対する保護又はその治療に関して二重特異性リガンドの有効性をスクリーニングするために使用できる動物モデル系が利用可能である。感受性マウスにおいて全身性エリテマトーデス(SLE)を試験する方法は、当分野で知られている(Knight他(1978)J.Exp.Med.、147:1653;Reinersten他(1978)New Eng.J.Med.、299:515)。別の種からの可溶性AchRタンパク質を用いて疾患を誘発させることによって、SJL/J雌マウスにおいて重症筋無力症(MG)を試験した(Lindstrom他(1988)Adv.Immunol.、42:233)。II型コラーゲンを注射することによって、マウスの感受性株において関節炎を誘発させた(Stuart他(1984)Ann.Rev.Immunol.、42:233)。マイコバクテリア熱ショックタンパク質を注射することによって感受性ラットにおいてアジュバント関節炎を誘発させたモデルが記載されている(Van Eden他(1988)Nature、331:171)。記載のようにサイログロブリンを投与することによって、マウスにおいて甲状腺炎を誘発させた(Maron他(1980)J.Exp.Med.、152:1115)。インスリン依存性真性糖尿病(IDDM)は、自然に起こるか、又はKanasawa他(1984)Diabetologia、27:113によって記載されているものなどのマウスの特定の株で誘発させることができる。マウス及

びラットにおけるEAEは、ヒトにおけるMSのモデルとして役割を果たす。このモデルでは、ミエリン塩基性タンパク質を投与することによって脱髄性疾患を誘発させる(Paterson(1986)免疫病理学の教科書(Textbook of Immunopathology)、Mischer他編、Grune及びStratton、ニューヨーク、ページ179-213;McFarlin他(1973)Science、179:478:並びにSatoh他(1987)J.Immunol.、138:179参照)。

【０３５２】

本発明による二重特異性リガンド及びdAb単量体は、エンドサイトーシスに関与している細胞外標的(例えばクラスリン)と結合することができ、二重特異性リガンドがエンドサイトーシスされることを可能にし、細胞内標的と結合できる別の特異性が細胞内環境へ送達されることを可能にする。この戦略には、細胞内で機能的に保たれることを可能にする物理特性を有する二重特異性リガンドが必要である。或いは、最終目的地の細胞内区画が酸化的である場合、良好に折り畳まれるリガンドは、必ずしもジスルフィドを含まないものである必要はない場合がある。

【０３５３】

一般に、本発明の二重特異性リガンドは、精製した形態で、薬理学上適切な担体と一緒に利用する。典型的には、これらの担体には、水性若しくはアルコール性/水性溶液、乳剤又は懸濁液、生理食塩水及び/又は緩衝媒体が含まれる任意のものが含まれる。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース並びに塩化ナトリウム及び乳酸加リンゲルが含まれる。適切な生理的に許容されるアジュバントは、ポリペプチド複合体を懸濁液に保持するために必要な場合は、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチン及びアルギン酸などのシックナーから選択し得る。

【０３５４】

静脈内ビヒクルには、リンゲルデキストロースに基づくものなどの、液体並びに栄養素補充剤及び電解質補充剤が含まれる。抗細菌性、抗酸化剤、キレート化剤及び不活性ガスなどの保存料及び他の添加剤も存在し得る(Mack(1982)レミントンの製薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)、第16版)。

【０３５５】

本発明のリガンドは、別々に投与する組成物として、又は他の薬剤と併せて使用し得る。これらには、シルコスポリン、メトトレキサート、アドリアマイシン又はシスプラチン、及び免疫毒素などの様々な免疫治療薬が含まれ得る。薬剤組成物には、本発明のリガンドと併せた様々な細胞傷害剤又は他の薬剤の「カクテル」が含まれ得る。

【０３５６】

本発明による薬剤組成物の投与経路は、当業者に一般的に知られている任意のものであり得る。それだけには限定されないが免疫療法を含めた治療には、本発明のリガンドは、標準技術に従って任意の患者に投与することができる。投与は、非経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、経皮、肺の経路を介するものを含めた任意の適切な様式によって、また、適切な場合は、カテーテルを用いた直接注入によって行うことができる。投与の用量及び頻度は、患者の年齢、性別及び状態、他の薬物の同時投与、禁忌並びに臨床医によって考慮される他のパラメーターに依存する。

【０３５７】

本発明のリガンドは、保管用に凍結乾燥し、使用前に適切な担体で再構成することができる。この技術は従来の免疫グロブリンで有効であることが示されており、当分野で知られている凍結乾燥及び再構成技術を用いることができる。当業者は、凍結乾燥及び再構成は様々な度合の抗体活性の損失をもたらす場合があり(例えば、従来の免疫グロブリンでは、IgM抗体はIgG抗体よりも活性の損失が大きい傾向がある)、それを補償するために使用レベルをアップレギュレーションしなければならない場合があることを理解するであろう。

【０３５８】

本発明のリガンド又はそのカクテルを含む組成物は、予防及び/又は治療処置のために

投与することができる。特定の治療用途では、選択した細胞の集団の少なくとも部分的な阻害、抑制、調節、死滅、又は何らかの他の測定可能なパラメーターを達成するために十分な量は、「治療上有効な量」と定義される。この用量に達するために必要な量は、疾患の重篤度及び患者自身の免疫系の全体的な状態に依存するが、一般に、体重1キログラムあたり0.005～5.0mgのリガンドの範囲であり、0.05～2.0mg/kg/用量の用量がより一般的に使用される。予防的用途には、本発明のリガンド又はそのカクテルを含む組成物を同様又はわずかに低い用量で投与してもよい。

【０３５９】

本発明によるリガンドを含む組成物は、哺乳動物中の選択した標的細胞集団の変化、失活、死滅又は除去を補助するために、予防及び治療的設定で利用し得る。

【０３６０】

さらに、本明細書中で記載する選択したポリペプチドレパートリーを体外又はin vitroで選択的に使用して、標的細胞集団を細胞の異種コレクションから死滅、枯渇又は他の方法で有効に除去し得る。哺乳動物からの血液を体外でリガンド、例えば、抗体、細胞表面受容体又はその結合タンパク質と組み合わせてもよく、ここでは、所望しない細胞を死滅させる又は他の方法で血液から除去し、標準技術に従って哺乳動物に戻す。

【０３６１】

様々な種由来の血清アルブミンとの結合に関する単一可変ドメインを含むリガンドの選択及び特徴づけ

リガンドは一つ又は複数の単一可変ドメイン、例えば免疫グロブリン単一可変ドメイン及び/又は非免疫グロブリン単一可変ドメインを含むことができ、単一可変ドメインのうちの少なくとも一つは、ヒト及び非ヒト種由来の血清アルブミンと特異的に結合する。一実施形態では、単一可変ドメインは、ヒトに内在性の血清アルブミンとのみ特異的に結合する。別の実施形態では、単一可変ドメインは、非ヒト種由来の血清アルブミンと特異的に結合する。或いは、単一可変ドメインは、ヒトに内在性の血清アルブミン及び一つ又は複数の非ヒト種に内在性の血清アルブミンのどちらとも特異的に結合する。非限定的な例として、そのような単一可変ドメインは、ヒト及びカニクイザルのどちらにも内在性の血清アルブミン、又はヒト及びラットのどちらにも内在性の血清アルブミン、又はヒト及びマウスの両方に由来する血清アルブミン、又はヒト及びブタの両方に由来する血清アルブミンと特異的に結合することができる。或いは、単一可変ドメインは、二つ以上の非ヒト種由来の二つ以上の血清アルブミンと特異的に結合する。本明細書中で使用する血清アルブミンは、種に内在性の遺伝子、即ち天然の血清アルブミンによって、及び/又はその組換え等価物によって発現させることができる。一実施形態では、血清アルブミンには、天然及び組換え血清アルブミンの断片、類似体及び誘導体が含まれる。血清アルブミンのそのような断片には、血清アルブミン、好ましくはヒト血清アルブミンのドメインI、ドメインII、及び/若しくはドメインIII、又はドメインI、II及びIIIのそれぞれの一つ若しくは二つ以上の組合せを含む断片が含まれる。血清アルブミンのドメインIIが、本明細書中で定義する単一可変ドメインの標的として好ましい。他の好ましい組合せは、ドメインI及びドメインII;ドメインI及びドメインIII;ドメインII及びドメインIII;並びにドメインI単独;ドメインII単独;及びドメインIII単独;並びにドメインI及びドメインII及びドメインIIIである。一実施形態では、血清アルブミンは、動物宿主などの非ヒト宿主、又は酵母若しくは細菌などの単細胞宿主中で外因的に発現される組換え血清アルブミンである。

【０３６２】

血清アルブミンが内在性である種には、好ましくはそれだけには限定されないが、ヒト、マウス、ネズミ、ラット、カニクイザル、ブタ、イヌ、ネコ、ウマ、ヤギ、及びハムスターの種を含めた内在性血清アルブミンを発現する任意の種が含まれる。一部の例では、ラクダ又はラマに内在性の血清アルブミンは除外される。

【０３６３】

単一可変ドメインは、好ましくはそれだけには限定されないが、抗体重鎖単一可変ドメイン、抗体VHH重鎖単一可変ドメイン、ヒト抗体重鎖単一可変ドメイン、ヒトVH3重鎖単一

可変ドメイン、抗体軽鎖単一可変ドメイン、ヒト抗体軽鎖単一可変ドメイン、ヒト抗体κ軽鎖単一可変ドメイン、及び/又はヒトλ軽鎖単一可変ドメインを含めた免疫グロブリン単一可変ドメインであり得る。

【０３６４】

血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインは、免疫グロブリン足場又は非免疫グロブリン足場を含む単一可変ドメインであり得る。血清アルブミンと結合する単一可変ドメインは、抗体可変ドメイン、好ましくは単一可変ドメイン由来のCDR1、CDR2及びCDR3のうちの一つ又は二つ又は三つを含むことができ、CDR領域は、CTLA-4、リポカリン、ブドウ球菌(Staphylococcal)プロテインA(SPA)、GroEL及びフィブロネクチン、トランスフェリン(Biorexisから販売)、Avimer(商標)並びにAffibody(商標)足場などの非免疫グロブリン足場上で提供される。或いは、血清アルブミンと結合する非免疫グロブリン単一可変ドメインは、抗体CDR領域又は抗体の完全な結合ドメインをどちらも含まないことができる。或いは、血清アルブミンと結合する単一可変ドメインは、抗体可変ドメイン、好ましくは単一可変ドメイン由来のCDR1、CDR2及びCDR3のうちの任意の一つ又は二つ又は三つを含む単一可変ドメインであり得る。これらのCDR領域は、重鎖又は軽鎖抗体フレームワーク領域上で提供することができる。フレームワークには、例えば、VH3(DP47、DP38、DP45を含む)及び上述のVHHフレームワークなどのVHフレームワーク、並びにVκ(DPK9など)及びVλフレームワークを含めたVLフレームワークが含まれる。一部の実施形態では、可変ドメインは、ヒト生殖系列抗体遺伝子セグメントによってコードされているアミノ酸配列、又はヒト生殖系列抗体遺伝子セグメントによってコードされているアミノ酸配列と比較して5個までのアミノ酸の差異を含むアミノ酸配列を有する、少なくとも一つのヒトフレームワーク領域を含む。他の実施形態では、可変ドメインは、四つのヒトフレームワーク領域、即ちFW1、FW2、FW2及びFW4を含み、これは、ヒト生殖系列抗体遺伝子セグメントによってコードされているアミノ酸配列、又はヒト生殖系列抗体遺伝子セグメントによってコードされているアミノ酸配列と比較して合計10個までのアミノ酸の差異を含むFW1、FW2、FW3及びFW4のアミノ酸配列を有する。一実施形態では、三つのCDR領域はすべて、免疫グロブリン足場(例えば、重鎖若しくは軽鎖抗体足場)又は本明細書中で定義する非免疫グロブリン足場のどちらかの上で提供され、これらはいずれも、非ヒト、合成、半合成であり得る。或いは、CDR1、CDR2及び/又はCDR3領域の一つ、二つ又は三つすべての任意の組合せを、免疫グロブリン足場又は非免疫グロブリン足場のどちらかの上で提供し、例えば、CDR3領域単独、又はCDR2及びCDR3領域を一緒に、又はCDR1及びCDR2を、免疫グロブリン足場又は非免疫グロブリン足場のどちらかの上で提供する。そのようなCDR移植のための適切な足場及び技術は当業者に明らかであり、当分野で周知であり、例えば、米国出願第07/180370号、WO01/27160、欧州特許第0 605 522号、欧州特許第0 460 167号、米国出願第07/054297号、Nicaise他、Protein Science(2004)、13:1882-1891;Ewert他、Methods、2004年10月;34(2):184-199;Kettleborough他、Protein Eng.1991年10月;4(7):773-783;O'Brien及びJones、Methods Mol.Biol.2003:207:81-100;Skerra、J.Mol.Recognit.2000:13:167-187、Saerens他、J.Mol.Biol.2005年9月23日;352(3):597-607、並びにその中に引用されるさらなる参考文献を参照されたい。

【０３６５】

リガンドは、血清アルブミンと特異的に結合するそのような単一可変ドメインのうちの一つ又は複数を含むことができ、好ましくは、ヒトに内在性の血清アルブミン及び非ヒト種に内在性の少なくとも一つの追加の血清アルブミンのどちらとも特異的に結合する少なくとも一つの単一可変ドメインを含む。一実施形態では、この単一可変ドメインは、それが非ヒト種に内在性の少なくとも一つの血清アルブミンと特異的に結合する(即ち交差反応する)Kd値の10倍以内のKd値で、ヒトに内在性の血清アルブミンと特異的に結合する。或いは、この単一可変ドメインは、それが非ヒト種に内在性の少なくとも一つの血清アルブミンと特異的に結合する(即ち交差反応する)Kd値の15、20、25、30、50又は約100倍までであるKd値で、ヒトに内在性の血清アルブミンと特異的に結合する。一部の実施形態では、Kdの範囲は300nM～約5pMであり得る。他の実施形態では、単一可変ドメインは、少な

くとも5×10^{-1}、S^{-1}、$5\times10^{-2}S^{-1}$、$5\times10^{-3}S^{-1}$、$5\times10^{-4}S^{-1}$、$5\times10^{-5}S^{-1}$、$5\times10^{-6}S^{-1}$、$5\times10^{-7}S^{-1}$、$5\times10^{-8}S^{-1}$、$5\times10^{-9}S^{-1}$、$5\times10^{-10}S^{-1}$以下のK_{off}で、好ましくは$1\times10^{-6}S^{-1}$～$1\times10^{-8}S^{-1}$の範囲のK_{off}で、血清アルブミンと特異的に結合する。

【０３６６】

一実施形態では、この単一可変ドメインは、それが第2の非ヒト種に内在性少なくとも一つの血清アルブミンと特異的に結合する(即ち交差反応する)Kd値の10倍以内のKd値で、第1の非ヒト種に内在性の血清アルブミンと特異的に結合する。或いは、この単一可変ドメインは、それが第2の非ヒト種に内在性の少なくとも一つの血清アルブミンと特異的に結合する(即ち交差反応する)Kd値の15以下、20、25、30、50又は約100倍までであるKd値で、第1の非ヒト種に内在性の血清アルブミンと特異的に結合する。一部の実施形態では、Kdの範囲は300nM～約5pMであり得る。他の実施形態では、単一可変ドメインは、少なくとも5×10^{-1}、S^{-1}、$5\times10^{-2}S^{-1}$、$5\times10^{-3}S^{-1}$、$5\times10^{-4}S^{-1}$、$5\times10^{-5}S^{-1}$、$5\times10^{-6}S^{-1}$、$5\times10^{-7}S^{-1}$、$5\times10^{-8}S^{-1}$、$5\times10^{-9}S^{-1}$、$5\times10^{-10}S^{-1}$以下のK_{off}で、好ましくは$1\times10^{-6}S^{-1}$～$1\times10^{-8}S^{-1}$の範囲のK_{off}で、血清アルブミンと特異的に結合する。

【０３６７】

例えば、そのようなリガンドには免疫グロブリン単一可変ドメインが含まれ得、免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミン及びマウス血清アルブミンと特異的に結合し、リガンドのTβ半減期は、マウス宿主におけるマウス血清アルブミンのTβ半減期と実質的に同じである。そのようなリガンドの一つの変型では、エピトープ結合ドメインは、ヒト血清アルブミン及びマウス血清アルブミンと特異的に結合する非免疫グロブリン足場を含み、リガンドのTβ半減期は、マウス宿主におけるマウス血清アルブミンのTβ半減期と実質的に同じである。語句「実質的に同じ」とは、リガンドのマウス宿主におけるTβ半減期が、マウス宿主におけるマウス血清アルブミンのそれの少なくとも50%である、即ち、マウス宿主におけるマウス血清アルブミンのTβ半減期の少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、101%、102%、105%、110%、125%、及び150%までであることを意味する。非免疫グロブリン足場には、任意選択で、ヒト宿主におけるヒト血清アルブミンのTβ半減期の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、101%、102%、105%、110%、125%、又は150%までであるヒト宿主におけるTβ半減期を有する抗体単一可変ドメインを含めた、抗体可変ドメインのCDR領域のうちの一つ又は複数などの抗体単一可変ドメインの断片が含まれ得る。

【０３６８】

例えば、一実施形態は単一可変ドメインであり、単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミン及びラット血清アルブミンと特異的に結合し、リガンドのTβ半減期は、ラット宿主におけるラット血清アルブミンのTβ半減期と実質的に同じである。そのようなリガンドの一つの変型では、単一可変結合ドメインは、ヒト血清アルブミン及びラット血清アルブミンと特異的に結合する非免疫グロブリン足場を含み、リガンドのTβ半減期は、ラット宿主におけるラット血清アルブミンのTβ半減期と実質的に同じである。語句「実質的に同じ」とは、リガンドのラット宿主におけるTβ半減期が、ラット宿主におけるラット血清アルブミンのそれの少なくとも50%である、即ち、ラット宿主におけるラット血清アルブミンのTβ半減期の55%まで、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、101%、102%、105%、110%、125%、150%までであることを意味する。非免疫グロブリン足場には、任意選択で、抗体可変ドメインのCDR領域のうちの一つ又は複数などの抗体単一可変ドメインの断片が含まれ得る。

【０３６９】

例えば、リガンドには免疫グロブリン単一可変ドメインが含まれ得、免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミン及びブタ血清アルブミンと特異的に結合し、リガンドのTβ半減期は、ブタ宿主におけるブタ血清アルブミンのTβ半減期と実質的に同じである。リガンドの一つの変型では、エピトープ結合ドメインは、ヒト血清アルブミン及びブタ血清アルブミンと特異的に結合する非免疫グロブリン足場を含み、リガンドのTβ半

減期は、ブタ宿主におけるブタ血清アルブミンのTβ半減期と実質的に同じである。語句「実質的に同じ」とは、リガンドのブタ宿主におけるTβ半減期が、ブタ宿主におけるブタ血清アルブミンのそれの少なくとも50%である、即ち、ブタ宿主におけるブタ血清アルブミンのTβ半減期の55%まで、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、101%、102%、105%、110%、125%、150%までであることを意味する。非免疫グロブリン足場には、任意選択で、抗体単一可変ドメインを含めた、抗体可変ドメインのCDR領域のうちの一つ又は複数などの抗体単一可変ドメインの断片が含まれ得る。

【０３７０】

例えば、リガンドには免疫グロブリン単一可変ドメインが含まれ得、免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミン及びカニクイザル血清アルブミンと特異的に結合し、リガンドのTβ半減期は、カニクイザル宿主におけるカニクイザル血清アルブミンのTβ半減期と実質的に同じである。リガンドの一つの変型では、血清アルブミンと結合するドメインは、ヒト血清アルブミン及びカニクイザル血清アルブミンと特異的に結合する非免疫グロブリン足場を含み、リガンドのTβ半減期は、カニクイザル宿主におけるカニクイザル血清アルブミンのTβ半減期と実質的に同じである。語句「実質的に同じ」とは、リガンドのカニクイザル宿主におけるTβ半減期が、カニクイザル宿主におけるカニクイザル血清アルブミンのそれの少なくとも50%である、即ち、カニクイザル宿主におけるカニクイザル血清アルブミンのTβ半減期の55%まで、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、101%、102%、105%、110%、125%、又は150%までであることを意味する。

【０３７１】

非免疫グロブリン足場には、任意選択で、抗体可変ドメインのCDR領域のうちの一つ又は複数などの抗体単一可変ドメインの断片が含まれ得る。

【０３７２】

一実施形態では、リガンド及び/又は二重特異性リガンドはヒトに内在性の血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインを含み、ヒト宿主におけるTβ半減期が、ヒト宿主におけるヒト血清アルブミンのそれの少なくとも50%、ヒト宿主におけるヒト血清アルブミンのTβ半減期の55%まで、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、101%、102%、105%、110%、125%又は150%までである。好ましい実施形態では、非ヒトに内在性の血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインは、そのそれぞれの非ヒト宿主におけるTβ半減期が、そのそれぞれの非ヒト宿主における非ヒト血清アルブミンのそれの少なくとも50%、そのそれぞれの非ヒト宿主における非ヒト血清アルブミンのTβ半減期の55%まで、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、101%、102%、105%、110%、125%、又は150%までである。好ましい実施形態では、ヒトに内在性の血清アルブミンと特異的に結合し、且つ少なくとも一つの非ヒト種由来の血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインは、ヒト宿主におけるTβ半減期が、ヒト宿主におけるヒト血清アルブミンの55%まで、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、101%、102%、105%、110%、125%、又は150%までであり、又は非ヒト宿主におけるTβ半減期が、そのそれぞれの非ヒト宿主における非ヒト血清アルブミンの55%まで、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、101%、102%、105%、110%、125%、又は150%までである。一部の実施形態では、血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインのTβ半減期の範囲は、低くは2時間から、3時間以下、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間、1日間、2日間、3日間、4日間、4日間、6日間、8日間、10日間、12日間、14日間、16日間、18日間、高くは21日間以上までであり得る。ヒト宿主、及びブタ、カニクイザル、ラット、ネズミ、マウス宿主などの非ヒト宿主では、血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインのTβ半減期の範囲は、低くは2時間から、3時間以下、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時

間、22時間、1日間、2日間、3日間、4日間、4日間、6日間、8日間、10日間、12日間、14日間、16日間、18日間、高くは21日間まで、又はそれより長いものであり得る。血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインを含むリガンドの他の好ましいTβ半減期には、サル宿主では、低くは2時間から、3時間以下、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間、1日間、2日間、3日間、4日間、4日間、6日間、8日間、10日間、12日間、14日間、16日間、18日間、高くは21日間までを含めた、約3～約5、6、7、又は8日間が含まれる。ラット又はマウス宿主では、血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインのTβ半減期の範囲は、低くは40時間から、高くは約75時間までであり得、低くは2時間から、3時間以下、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、14時間、16時間、18時間、20時間、22時間、1日間、2日間、3日間、4日間、4日間、6日間、8日間、10日間、12日間、14日間、16日間、18日間、高くは21日間までが含まれる。

【０３７３】

血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインには、好ましくはそれだけには限定されないが、DOM7h-9 DOM7h-1、DOM7h-8、DOM7h-9、DOM7h-11、DOM7h-12、DOM7h-13及びDOM7h-14から選択されるVκ単一可変ドメイン、DOM7r-3及びDOM7r-16、並びに/又は血清アルブミン、好ましくはヒト血清アルブミンとの結合に関して、好ましくはそれだけには限定されないが、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30 dAb7h31、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、及びdAb7p2から選択された単一可変ドメインと競合するドメインが含まれる。血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインは、抗体重鎖単一可変ドメイン、特にヒトVH_3、又はVHHであり得る。前述の単一可変ドメインはまた、少なくとも5×10^{-1}、S^{-1}、$5\times10^{-2}S^{-1}$、$5\times10^{-3}S^{-1}$、$5\times10^{-4}S^{-1}$、$5\times10^{-5}S^{-1}$、$5\times10^{-6}S^{-1}$、$5\times10^{-7}S^{-1}$、$5\times10^{-8}S^{-1}$、$5\times10^{-9}S^{-1}$、$5\times10^{-10}S^{-1}$以下のK_{off}、好ましくは$1\times10^{-6}S^{-1}$～$1\times10^{-8}S^{-1}$の範囲のK_{off}で、さらにヒト血清アルブミンと特異的に結合し得る。ヒト血清アルブミン及び非ヒト種に内在性の血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインは、さらに第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9又は第10の非ヒト種に内在性の血清アルブミンと結合することができる。非限定的な一実施形態では、ヒト血清アルブミン及びラット血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインは、さらにカニクイザル血清アルブミンと特異的に結合する。別の非限定的な実施形態では、ヒト血清アルブミン及びマウス血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインは、さらにカニクイザル血清アルブミンと特異的に結合する。

【０３７４】

本明細書中で記載するように、血清アルブミンと特異的に結合する一つの単一可変ドメイン(単量体)又は複数の単一可変ドメイン(本明細書中で定義する多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、及び二重特異性リガンド)を含むリガンドは、好ましくはそれだけには限定されないが、標識、タグ、追加の単一可変ドメイン、dAb、抗体、並びに抗体断片、マーカー及び薬物から選択される一つ又は複数の要素をさらに含むことができる。これらの要素のうちの一つ又は複数は、単一可変ドメイン(免疫グロブリン又は非免疫グロブリン単一可変ドメイン)を含むリガンドのCOOH末端又はN末端又はN末端及びCOOH末端の両方に位置することができる。これらの要素のうちの一つ又は複数は、一つの単一可変ドメイン(単量体)又は複数の単一可変ドメイン(本明細書中で定義する多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、及び二重特異性リガンド)を含むリガンドの血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインのCOOH末端、又はN末端、又はN末端及びCOOH末端の両方に位置することができる。これらの末端の一方又は両方に位置することができるタグの非限定的な例には、HA、his又はmycタグが含まれる。一つ又は複数のタグ、標識及び薬物を含めた要素は、一つの単一可変ドメイン(単量体)又は複数の単一可変ドメイン(本明細書

中で定義する多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、及び二重特異性リガンド)を含む、血清アルブミンと結合するリガンドと、直接又は以下の別のセクションに記載するリンカーを介して、結合することができる。

【０３７５】

血清アルブミンと特異的に結合する、又はヒト血清アルブミン及び少なくとも一つの非ヒト血清アルブミンのどちらとも特異的に結合する、一つの単一可変ドメイン(単量体)又は複数の単一可変ドメイン(本明細書中で定義する多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、及び二重特異性リガンド)を含むリガンドは、以下にさらに詳述するように、ヒト血清アルブミンのドメインI、及び/又はドメインII及び/又はドメインIIIのうちの一つ又は複数と特異的に結合することができる。ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミンと特異的に結合する、又はヒト血清アルブミン及び少なくとも一つの非ヒト血清アルブミンのどちらとも特異的に結合する、一つ又は複数の単一可変ドメイン(例えば、血清アルブミンと結合する免疫グロブリン単一可変ドメイン又は血清アルブミンと結合する非免疫グロブリン単一可変ドメイン)を含むことに加えて、リガンドは、血清アルブミン以外の抗原及び/又はエピトープと特異的に結合することができる一つ又は複数の追加のドメインを含むことができ、抗原又はエピトープは、サイトカイン、並びに/又は微生物、病原体、単細胞生物、昆虫、ウイルス、藻類及び植物に由来する抗原を含めた任意の動物タンパク質からなる群から選択される。血清アルブミン以外の部分と結合するこれらの一つ又は複数の追加のドメインは、非免疫グロブリン結合ドメイン、非免疫グロブリン単一可変ドメイン、及び/又は免疫グロブリン単一可変ドメインであり得る。

【０３７６】

一部の実施形態では、ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミンと特異的に結合する、又はヒト血清アルブミン及び少なくとも一つの非ヒト血清アルブミンのどちらとも特異的に結合する、一つ又は複数の単一可変ドメイン(免疫グロブリン単一可変ドメイン又は非免疫グロブリン単一可変ドメインのどちらか)を含む二重特異性リガンドは、(a)血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメイン及び血清アルブミン以外のリガンドと特異的に結合する単一可変ドメインであり、両方の単一可変ドメインが重鎖単一可変ドメインであるもの;又は(b)血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメイン及び血清アルブミン以外のリガンドと特異的に結合する単一可変ドメインであり、両方の単一可変ドメインが軽鎖単一可変ドメインであるもの;又は(c)血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインが重鎖単一可変ドメインであり、血清アルブミン以外の抗原と特異的に結合する単一可変ドメインが軽鎖単一可変ドメインであるもの;又は(d)血清アルブミンと特異的に結合する単一可変ドメインが軽鎖単一可変ドメインであり、血清アルブミン以外の抗原と特異的に結合する単一可変ドメインが重鎖単一可変ドメインであるものからなり得る。

【０３７７】

また、本明細書中で記載するリガンドのうちの任意のもの、例えば、リガンド血清アルブミンと特異的に結合する、若しくはヒト血清アルブミン及び少なくとも一つの非ヒト血清アルブミンのどちらとも特異的に結合する、一つの単一可変ドメイン(単量体)若しくは複数の単一可変ドメイン(例えば、本明細書中で定義する多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、及び二重特異性リガンド)、又は機能的に活性のあるその断片を含むリガンドをコードしている、単離した核酸も、本明細書中に包含される。また、ベクター及び/又はその発現ベクター、ベクターを含む宿主細胞、例えば、ベクターで形質転換させた植物又は動物の細胞及び/又は細胞系、前記ベクターによってコードされている血清アルブミンと特異的に結合する一つの単一可変ドメイン(単量体)若しくは複数の単一可変ドメイン(例えば、本明細書中で定義する多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、及び二重特異性リガンド)を含む一つ若しくは複数のリガンド、又はその断片を発現及び/又は産生する方法(一部の例では、一つ若しくは複数のリガンド又はその断片が発現されるように宿主細胞を培養し、任意選択で血清アルブミンと特異的に結合する一つの単一可変ドメイン(単量体)又は複数の単一可変ドメイン(例えば、本明細書中で定義する多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、及び二重特異性リガンド)を含むリガンドを宿主細胞培地か

ら回収することが含まれる)も、本明細書中に包含される。また、本明細書中で記載するリガンドを、血清アルブミン及び/又は非ヒト血清アルブミン、及び/又は一つ若しくは複数の血清アルブミン以外の標的を含めた血清アルブミンと接触させる方法も包含され、標的には生物活性のある分子が含まれ、動物タンパク質、上述のサイトカインが含まれ、接触がin vitroである方法、並びに本明細書中で記載するリガンドのうちの任意のものを個々の宿主動物又は細胞にin vivo及び/又はex vivoで投与する方法が含まれる。好ましくは、血清アルブミン及び/又は非ヒト血清アルブミンに対する単一可変ドメイン(免疫グロブリン又は非免疫グロブリン)、並びに一つ又は複数の血清アルブミン以外の標的に対する一つ又は複数のドメインを含む本明細書中で記載するリガンドを投与することで、抗標的リガンドのTβ半減期を含めた半減期が増加する。リガンド又はその機能的断片を含めたその断片を含む単一ドメインをコードしている核酸分子が、本明細書中で記載されている。好ましくはそれだけには限定されないが発現ベクターを含めた核酸分子をコードしているベクター、及びこれらの発現ベクターのうちの一つ又は複数を含む細胞系又は生物由来の宿主細胞が本明細書中で記載されている。また、好ましくはそれだけには限定されないが、前述の核酸、ベクター及び宿主細胞のうちの任意のものを含めた、単一ドメインを含むリガンドのうちの任意のものを産生する方法も記載されている。

【０３７８】

血清アルブミンのエピトープマップ作成

哺乳動物種由来の血清アルブミンは同様の構造を有しており、図25で強調するように、同様の折り畳み及びジスルフィド結合パターンを有する三つの優勢ドメインを含む。タンパク質は、二つの直列型の複製事象、及び続く残基の多様化から生じたと考えられている。

【０３７９】

ヒト血清アルブミンの構造は、様々な結合したリガンドを用いて/用いずに、X線結晶構造解析によって解析されている:

・ヒト血清アルブミンの原子構造及び化学。(Atomic structure and chemistry of human serum albumin.)He XM、Carter DC。

【０３８０】

・Nature.1992;358:209-15。Erratum、Nature 1993;364:362。

【０３８１】

・ヒト血清アルブミンの原子構造及び化学。(Atomic structure and chemistry of human serum albumin.)He XM、Carter DC;J Mol Biol.2001;314:955-60。

【０３８２】

・一価不飽和及び多価不飽和の脂肪酸と複合体形成したヒト血清アルブミンの結晶構造。(Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids.)Petitpas I、Grune T、Bhattacharya AA、Curry S.;J Biol Chem.2001;276:22804-9。

【０３８３】

ヒト血清アルブミンは、ハート形の分子であることが示されている。I、II及びIIIと呼ばれる個々のドメインは、主にヘリックスであり、それぞれが、IA、IB、IIA、2B、IIIA、及びIIIBと呼ばれる二つのサブドメインからなる。これらは可撓性のランダムコイルによって連結されている。

【０３８４】

本明細書中では、ヒト血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドを記載する。単一可変ドメインはVH抗体単一可変ドメインであり得る。単一可変ドメインはVHH抗体単一可変ドメインであり得る。VH単一可変ドメインはVH3単一可変ドメインであり得る。VH3単一可変ドメインはヒトVH3単一可変ドメインであり得る。或いは、又はさらに、リガンドには、以下のうちの一つが含まれるVκ抗体単一可変ドメインである単一可変ドメインが含まれ得る:DOM7h-1、DOM7h-8、DOM7h-9、DOM7h-11、DOM7h-12、DOM7h-13、DOM7h-14、DOM7r-3及びDOM7r-16、又は、それに約80%

、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の同一性のアミノ酸配列を有するドメインを有するVκ抗体単一可変ドメイン。

【０３８５】

抗体単一可変ドメインには、抗体VH、好ましくはVH3フレームワークの生殖系列抗体遺伝子セグメントによってコードされている、一組の四つのカバットフレームワーク領域(FR)が含まれ得る。VH3フレームワークは、DP47、DP38及びDP45からなる群から選択される。抗体単一可変ドメインには、抗体VLフレームワーク、好ましくはVκフレームワークの生殖系列抗体遺伝子セグメントによってコードされている、一組の四つのカバットフレームワーク領域(FR)が含まれ得る。好ましくは、κフレームワークはDPK9である。

【０３８６】

ヒト血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドには、血清アルブミン以外の部分と特異的に結合することができる一つ又は複数のドメインがさらに含まれ得、標識、タグ及び薬物のうちの一つ又は複数を含めた一つ又は複数の要素をさらに含むことができる。血清アルブミン以外の部分と特異的に結合することができる一つ又は複数のドメインは、免疫グロブリン単一可変ドメインであり得る。また、本明細書中では、ヒト血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドも記載し、ドメインに非免疫グロブリン足場並びにCDR1、CDR2及び/若しくはCDR3領域が含まれるか、又は、CDR1、CDR2及び/若しくはCDR3領域のうちの少なくとも一つが、ヒト血清アルブミンのドメインIIと結合する抗体単一可変ドメインの単一可変ドメインに由来する。非免疫グロブリン足場には、好ましくはそれだけには限定されないが、CTLA-4、リポカリン、ブドウ球菌プロテインA(SPA)、Affibody(商標)、Avimer(商標)、GroEL及びフィブロネクチンが含まれる。

【０３８７】

ヒト血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドには、300nM以下のKdでヒト血清アルブミンと特異的に結合するドメインが含まれる。ヒト血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドは、標識、タグ及び薬物のうちの一つ又は複数を含めた一つ又は複数の要素をさらに含むことができる。タグには、C末端のHA若しくはmycタグ又はN末端のHA若しくはmycタグのうちの一つ又は複数が含まれ得る。

【０３８８】

ヒト血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する一つ又は複数の単一可変ドメインを含み、血清アルブミン以外の部分と特異的に結合することができる一つ又は複数のドメインがさらに含まれ得、任意選択で標識、タグ及び薬物のうちの一つ又は複数を含めた一つ又は複数の要素をさらに含むことができるリガンドは、その単一可変ドメインのうちの少なくとも一つを介して、好ましくはそれだけには限定されないが、サイトカイン受容体、EPO受容体、ApoE、Apo-SAA、BDNF、カルジオトロフィン-1、EGF、EGF受容体、ENA-78、エオタキシン、エオタキシン-2、Exodus-2、EpoR、FGF-酸性、FGF-塩基性、線維芽細胞成長因子-10、FLT3リガンド、フラクタルカイン(CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF-β1、インスリン、IFN-γ、IGF-I、IGF-II、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、1L-8(72個のアミノ酸)、IL-8(77個のアミノ酸)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18(IGIF)、インヒビンα、インヒビンβ、IP-10ケラチノサイト成長因子-2(KGF-2)、KGF、レプチン、L1F、リンフォタクチン、ミュラー阻害物質、単球コロニー阻害因子、単球誘引タンパク質、M-CSF、MDC(67個のアミノ酸)、MDC(69個のアミノ酸)、MCP-1(MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC(67個のアミノ酸)、MDC(69個のアミノ酸)、MIG、MLP-1α、MIP-3α、MIP-3β、MIP-4、骨髄前駆体阻害因子-1(MPIF-1)、NAP-2、ニューチュリン、神経成長因子、β-NGF、NT-3、NT-4、オンコスタチンM、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1α、SDF1β、SCF、SCGF、幹細胞因子(SCF)、TARC、TGF-α、TGF-β、TGF-β2、TGF-β3、腫瘍壊死因子(TNF)、TNF-α、TNF-β、TNF受容体1、TNF受容体II、TNIL-1、TPO、VEGF、VEGF受容体1、VEGF受容体2、VEGF受容体3、GCP-2、GRO/MGSA、GRO-β、GRO-γ、HCC1、1-309、HER1、HER2、HER3及びHER4、CD4、ヒトケモ

カイン受容体CXCR4又はCCR5、C型肝炎ウイルス由来の3型非構造タンパク質(NS3)、TNF-α、IgE、IFN-γ、MMP-12、CEA、ピロリ菌、結核、インフルエンザ、E型肝炎、MMP-12、表皮成長因子受容体(EGFR)などの特定の細胞上で過剰発現される内部移行受容体、腫瘍細胞上のErBb2受容体、内部移行細胞受容体、LDL受容体、FGF2受容体、ErbB2受容体、トランスフェリン受容体、PDGF受容体、VEGF受容体、PsmAr、細胞外基質タンパク質、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、α1-アンチトリプシン、組織因子プロテアーゼ阻害剤、PDK1、GSK1、Bad、カスパーゼ-9、フォークヘッド、ピロリ菌の抗原、結核菌の抗原、及びインフルエンザウイルスの抗原を含めた抗原と結合することができる。

【０３８９】

ヒト血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する一つ又は複数の単一可変ドメインを含み、血清アルブミン以外の部分と特異的に結合することができる一つ又は複数のドメインがさらに含まれ得るリガンドは、最小限、以下の構造のうちの一つを有することができる二重特異性リガンドである:(a)血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する前記単一可変ドメイン及び血清アルブミン以外の部分と特異的に結合する前記単一可変ドメインのそれぞれが抗体重鎖単一可変ドメインであるか、又は(b)血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する前記単一可変ドメイン及び血清アルブミン以外の部分と特異的に結合する前記単一可変ドメインのそれぞれが抗体軽鎖単一可変ドメインであるか、又は(c)血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する前記単一可変ドメインが抗体重鎖単一可変ドメインであり、血清アルブミン以外の抗原と特異的に結合する前記単一可変ドメインが抗体軽鎖単一可変ドメインであるか、又は(d)血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する前記単一可変ドメインが抗体軽鎖単一可変ドメインであり、血清アルブミン以外の抗原と特異的に結合する前記単一可変ドメインが抗体重鎖単一可変ドメインである。本明細書中で記載する任意のリガンド若しくはその機能的断片を含めたその断片をコードしている核酸分子、好ましくはそれだけには限定されないが発現ベクターを含めたベクター、及び、これらの発現ベクターのうちの一つ若しくは複数を含む任意の種類の細胞系若しくは生物の宿主細胞、並びに/又は、好ましくはそれだけには限定されないが、任意の前述の核酸、ベクター及び宿主細胞を含めた、任意のリガンドを産生する方法が含まれる。

【０３９０】

血清アルブミンは、他の血清タンパク質と比較して長い血清半減期と共に、血清濃度と画分の異化率との正の関係(即ち、SAの濃度が高ければ高いほど、分解される量が多い)を有しており、これはIgGと共通する特性である。IgG及び血清アルブミンがどちらも、新生児Fc受容体FcRnによって媒介される再利用機構を共有することが最近明らかとなった。FcRnは、膜アンカーFCRGT鎖のヘテロ二量体及び膜非結合β-2ミクログロブリンからなるI型MHCファミリーメンバーである。FcRn又はβ-2ミクログロブリンのどちらかのマウスノックアウト突然変異体は機能的なFcRnを発現せず、血清アルブミンの生合成率の増加(約20%までの増加)及び血清アルブミンの異化の増加を示し、半減期がより低い、40%低い血清アルブミンの血清レベルがもたらされる(Chaudhry他2005)。ヒトでは、β-2ミクログロブリンの突然変異は、はるかに低下した機能的FcRnのレベルを与え、最終的にはHSAの血清半減期の低下によって特徴づけられる、IgG欠乏及び低アルブミン血症をもたらすことが示されている(Wani他2006、PNAS)。

【０３９１】

理論に拘泥するものではないが、FcRn媒介性サルベージの提案されている機構は以下のとおりである:

1.血漿タンパク質すべての血管の裏側にある内皮細胞、及び場合によっては血管外区画のピノサイトーシスが活性化されている細胞によってピノサイトーシスを受ける。これは非特異的なステップであり、すべての循環中のタンパク質が受ける。FcRnは、血清のpHである約pH7.4でアルブミン(及びIgG)に対して非常に低い親和性を有する。

【０３９２】

2.ピノサイトーシスを受けた後、形成された小胞がpH5.0まで酸性化する。酸条件下では、FcRnはアルブミンに対してより高い親和性を有し、アルブミン及びIgGと結合する。

したがって、アルブミン及びIgGがFcRn受容体と結合している。FcRnは、ドメインIII上の部位で、IgGと結合する部位とは明確に異なる部位を介してヒト血清アルブミンと結合する。

【０３９３】

3.選別事象が起こり、受容体と結合していないタンパク質の大多数がエンドソーム内に選別され、ここでほとんどのタンパク質が分解の標的となる。受容体と結合しているアルブミン及びIgGは細胞表面を標的とした小胞内に選別されることで、分解を免れる。

【０３９４】

4.その後、細胞表面を標的とした小胞は、細胞表面と融合するか、又は細胞膜と一時的に融合する。これらの条件下では、エンドソームのpHがpH7.4近くまで上昇し、FcRnのアルブミンに対する親和性が低下し、アルブミンが放出されて循環中に戻される。

【０３９５】

したがって、任意のSA結合タンパク質が最大の半減期を有する明白な望ましいパラメーターの組を定義することができる。これらのパラメーターは、血清アルブミンサルベージ受容体FcRnのモデルを用いて明白に例示することができるが、持続した半減期を媒介する他の受容体にも適用される。

【０３９６】

・血清アルブミン結合の親和性は、好ましくは、SA結合タンパク質が腎臓内で糸球体濾過を受けている間はアルブミンから解離せず、したがって尿への損失を最小限にするものである、且つ/又は

・SAとの結合は、好ましくは、血清アルブミンと循環中の血清アルブミンレベルの維持を担っている任意の受容体との結合に対して有害効果を有さず、これは、再利用を阻害し、ひいては血清アルブミン及びSA結合剤の両方の半減期を減少させないためである。したがって、SAと結合するdAbは、好ましくは、HSAドメインIII上のFcRnによって結合されるものとは明確に異なるエピトープと結合し、SA/dAb複合体は、好ましくはFcRnと結合することもできる、且つ/又は

・SAとの結合は、好ましくは、受容体及び結合したSA/SA結合剤の複合体が選別若しくは再利用される条件下で維持する。エンドソームのpHはpH5.0に近づくことが示されており、したがって、pH7.4及びpH5.0の両方でのdAbと血清アルブミンとの安定な結合が望ましい。

【０３９７】

後述の実施例15に例示するように、大多数のdAbがHSAの第2のドメインと結合し、したがって、ヒト血清アルブミンとFcRnとの結合と競合しないと予測される。二つのdAb(DOM7h-27及びDOM7h-30)がドメインIIIと結合する。

【０３９８】

pH範囲7.4～5.0でSAに対して十分な親和性を保持する抗SA DAb

SAに対する親和性に加えて、SA:FcRn複合体の形成との競合が存在しない場合、血清アルブミンに特異的なdAbは、好ましくは、FcRn媒介性のサルベージ経路の完全な利点を得るために、血清中でpH7.4からエンドソーム中でpH5.0のpH範囲内でSAに対する親和性を維持する。

【０３９９】

pH範囲では、ヒスチジン残基及び撹乱したpKaを有するアミノ酸側鎖のみが、そのプロトン化状態を変更する可能性を有する。アミノ酸側鎖が複合体の結合エネルギーに顕著に寄与する場合、複合体の結合親和性を低下した際に、範囲内の一方の極限から他方の極限へのpHシフトが生じる可能性があることを予測できる。理論に拘泥するものではないが、これは、立ち代って、SAに特異的なdAbがFcRn媒介性のサルベージ経路によって救出されず、分解経路に入る可能性の増加をもたらす。

【０４００】

したがって、SAと結合するAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)では、血清アルブミンに対する結合特徴がpH(5.0～7.4の範囲)に伴って顕著に変化しないもの

を選択することが望ましい。このことを確実にする単純な方法は、抗SA dAbのアミノ酸配列を、CDR中にヒスチジン残基が存在しないことについて分析することである。以下に示すように、そのような特性に関するいくつかの選択手順が想定される:

例えば、第1ラウンドの選択を、「ナイーブ」なdAbファージレパートリーを用いて、固定したヒト血清アルブミンを使用して、バッファーのpHがpH7.4(例えばPBS)である条件下で行う。その後、回収及び増幅したファージ集団を、インキュベーションバッファーがpH5.0である第2ラウンドの選択に供する。両方のpHでHSAと結合するdAbの選択圧を維持するために、さらなるラウンドでバッファー及びpHの交互交代を任意選択で繰り返す。

【０４０１】

第2の例では、すべての選択ラウンドを、「ナイーブ」なdAbファージレパートリーを用いて、固定したヒト血清アルブミンを使用して、バッファーのpHがpH7.4(例えばPBS)である条件下で行う。しかし、未結合のファージをPBS(又はTweenを添加したPBS)で洗浄除去した直後、且つ結合したファージの溶出の前に、pH5.0での長時間(例えば4時間まで)の追加の洗浄/インキュベーションステップを加える。この期間中、pH5.0でSAと結合することができない(がpH7.4では結合できる)dAbを提示しているファージが、固定したSAから脱離する。第2の一連の洗浄ステップ後(pH5.0、Tweenを含む(又は含まない)、結合したファージを回収し、分析する。

【０４０２】

第3の例では、すべての選択ラウンドを、「ナイーブ」なdAbファージレパートリーを用いて、固定したヒト血清アルブミンを使用して、バッファーのpHがpH7.4(例えばPBS)である条件下で行う。その後、最良のdAb候補(即ち、pH7.4及びpH5.0で結合できる)をスクリーニングによって同定する。典型的には、dAbをコードしている遺伝子をプールし選択したファージから回収し、可溶性dAbを大腸菌培養物の上清中に向ける発現ベクター内にサブクローニングする。個々のクローンを拾い、マイクロタイタープレートのウェル中で別々に増殖させ、発現を誘導する。その後、上清(又は精製したdAb)をBiacoreチップ上に直接添加して、固定した血清アルブミンに対して親和性を提示するdAbを同定する。それぞれの上清を、「ランニング」バッファーがpH7.4又はpH5.0のどちらかである条件下で、HSAとの結合(主にセンサーグラムの解離速度の追跡)についてスクリーニングする。Biacore上のdAb結合のスクリーニングは、上記二つの例からの最良の先導を同定する好ましい方法としても使用できることを理解されたい。

【０４０３】

本明細書中では、本明細書中で定義する単一可変ドメインを含むリガンドを記載し、単一可変ドメインは、天然の血清pH及び細胞内小胞のpHの両方で血清アルブミンと特異的に結合する。天然の血清pHは約7(例えば7.4)であり、前記細胞内小胞のpHは約4.8～5.2の範囲であり得るか、又は約5のpHであり得る。一実施形態では、単一可変ドメインは、約7～5の血清アルブミンと特異的に結合することができるか、又はpH7.4であり得る。理論に拘泥するものではないが、このリガンドのさらなる特徴は、血清アルブミンと特異的に結合するその単一可変ドメインが、腎臓内で糸球体濾過を受けている間は血清アルブミンから実質的に解離しないことである。理論に拘泥するものではないが、このリガンドのさらなる特徴は、血清アルブミンと特異的に結合するその単一可変ドメインが、FcRnと血清アルブミンとの結合に実質的に干渉しないことである。この単一可変ドメインは、抗体単一可変ドメインであり得る。抗体単一可変ドメインはVH3ドメインであり得、及び/又は抗体単一可変ドメインはVκドメインであり得る。この単一可変ドメインは、非免疫グロブリン足場、例えば、CTLA-4、リポカリン、SpA、Affibody(商標)、GroEL、Avimer(商標)又はフィブロネクチン足場を含むことができ、また、好ましくは必須ではないが血清アルブミンと特異的に結合する、抗体単一可変ドメイン由来のCDR1、CDR2及び/又はCDR3のうちの一つ又は複数を含むことができる。このリガンドの単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミン、及び/又は一つ若しくは複数の種、例えば、ヒト、ラット、サル、ブタ、ウサギ、ハムスター、マウス若しくはヤギ由来の血清アルブミンを含めたものと、特異的に結合することができる。細胞内区画は、エンドソーム区画又は細胞内小胞若しくは出芽小胞を含め

た、任意の動物の任意の細胞の任意の細胞内区画であり得る。エンドソーム区画は約5、又は5.0のpHを有することができる。本明細書中で記載するリガンドは、血清アルブミンと単一可変ドメインとの結合がFcRnと血清アルブミンとの結合を実質的に競合的に阻害しない、免疫グロブリン及び/又は非免疫グロブリンドメインが含まれる一つ又は複数の単一可変ドメインを含むことができる。これらの一つ又は複数の単一可変ドメインは、好ましくは、300nM以下の平衡解離定数(Kd)で血清アルブミンと特異的に結合することができる。

【０４０４】

本明細書中では、血清アルブミンと特異的に結合する一つの単一可変ドメイン(単量体)又は複数の単一可変ドメイン(例えば、本明細書中で定義する多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、及び二重特異性リガンド)を含む単一可変ドメインを含むリガンドの選択方法を記載し、単一可変ドメインは、天然の血清pHでヒト血清アルブミンと特異的に結合し、単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミンとFcRnとの結合を競合的に阻害せず、単一可変ドメインは、細胞内区画のpHでヒト血清アルブミンと特異的に結合し、以下のステップを含む:(A)FcRnと結合するヒト血清アルブミンの領域と結合しない単一可変ドメインを含むリガンドを選択するステップと、(B)ステップ(A)で選択したリガンドから、前記天然の血清pHで血清アルブミンと結合する単一可変ドメインを含むリガンドを選択するステップと、(C)ステップ(B)で選択したリガンドを、前記細胞内区画のpHで血清アルブミンと結合するものについて選択するステップ。或いは、ステップ(A)及び(B)は、以下のように逆にすることができる:(A)前記天然の血清pHでヒト血清アルブミンと結合する単一可変ドメインを含むリガンドを選択するステップと、(B)(A)で選択したリガンドから、FcRnと結合するHSAの領域の外でヒト血清アルブミンと結合する単一可変ドメインを含むリガンドを選択するステップと、(C)ステップ(B)で選択したリガンドから、前記細胞内区画の前記pHで血清アルブミンと結合するものを選択するステップ。また、単一可変ドメインを含むリガンドを選択する方法も記載されおり、単一可変ドメインは、天然の血清pHでヒト血清アルブミンと特異的に結合し、単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミンとFcRnとの結合を競合的に阻害せず、単一可変ドメインは、細胞内区画のpHでヒト血清アルブミンと特異的に結合し、以下のステップを含む:(A)FcRnと結合するヒト血清アルブミンの領域と結合しない単一可変ドメインを含むリガンドを選択するステップと、(B)ステップ(A)から、前記天然の血清pHで血清アルブミンと結合する単一可変ドメインを含むリガンドを選択するステップと、(C)前記細胞内区画の前記pHで血清アルブミンと結合するように、ステップ(B)の単一可変ドメインを遺伝子改変するステップ。或いは、ステップ(A)及び(B)は、以下のように逆にすることができる:(A)前記天然の血清pHで血清アルブミンと結合する単一可変ドメインを含むリガンドを選択するステップと、(B)(A)で選択したリガンドから、FcRnと結合するヒト血清アルブミンの領域と結合しない単一可変ドメインを含むリガンドを選択するステップと、(C)前記細胞内区画の前記pHで血清アルブミンと結合するように、ステップ(B)の単一可変ドメインを遺伝子改変するステップ。

【０４０５】

単一可変ドメインがヒト血清アルブミンとFcRnとの結合を競合的に阻害しないかどうかを決定するアッセイ:競合Biacore実験を用いて、単一可変ドメインが血清アルブミンとFcRnとの結合を競合的に阻害するかどうかを決定することができる。そのような例の一つの実験プロトコルは、以下のとおりである。CM5センサーチップ(Biacore AB)を25℃で、約1100レゾナンスユニット(RU)の精製したFcRnを用いて、pH7.4でコーティングした後、ヒト血清アルブミン(HSA)を、単一の濃度(例えば1um)で単独で、並びにそれぞれの混合物がHSA及び漸増量の対象単一可変ドメインを有する混合物の希釈系列と組み合わせて、抗原表面上に注入する。生じる結合RUをHSA単独及びHSA/単一可変ドメイン混合物のそれぞれについて決定する。HSA単独の結合したRUをHSA+単一可変ドメインの結合したRUと比較することによって、FcRnが、HSAとの結合に関して単一可変ドメインと競合するかどうかを見ることができる。競合する場合、溶液中の単一可変ドメインの濃度が増加するにつれて、FcRnと結合したHSAのRUは減少する。競合しない場合、単一可変ドメインを加えることに

よっては、どの程度HSAがFcRnと結合するかに影響を及ぼさない。この競合アッセイは、任意選択で、単一可変ドメインがpH5.0で血清アルブミンとFcRnとの結合を競合的に阻害するかどうかを決定するために、pH5.0でHASと結合する単一可変ドメインについて、pH5.0で繰り返すことができる。

【０４０６】

単一可変ドメインを有するこれらのリガンドであって、血清アルブミンと特異的に結合する一つの単一可変ドメイン(単量体)又は複数の単一可変ドメイン(例えば、本明細書中で定義する多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、及び二重特異性リガンド)を含み、単一可変ドメインが、天然の血清pH及び細胞内小胞のpHの両方で血清アルブミンと特異的に結合するリガンドは、少なくとも一つの追加の単一可変ドメインをさらに含むことができ、それぞれの追加の単一可変ドメインは、天然の血清pHで血清アルブミン以外の抗原と特異的に結合するが、細胞内小胞のpHでは抗原と結合しない。天然の血清pHは約7.4であり、前記細胞内小胞のpHは約4.8～5.2の範囲であり、一部の実施形態では、前記細胞内小胞のpHは約5である。

【０４０７】

上記考えに基づいた方法には、半減期を延長するために血清アルブミンに対する親和性を有し、結合した抗原を分解又は再利用に向けるために上述のように所望の標的抗原に対する親和性を有する、二重特異性結合剤の使用が含まれる。上述のように、分子をFcRn媒介性のプロセスによってエンドソームで分解されないように選別するために、結合がpH5.0で高親和性であるように、血清アルブミン結合部分を選択する。その後、上述のようにpH7.4及びpH5での高親和性結合を選択する代わりに、pH7.4で高親和性結合でありpH5で標的抗原に対する低い又はゼロの親和性の選択を行う以外は上述と同様の技術を使用して、所望の標的抗原結合部分を選択する。これを達成する一方法は、接触表面中のヒスチジンを有する部分を選択することによる。その後、二つの分子間の融合タンパク質を、化学的誘導体化及び架橋結合による、又は遺伝子融合による従来の分子生物学的技術によって作製する。この結果は、pH5でSAと結合するSA結合性dAbを設計する一方で、pH5で低い又はゼロの親和性を有する、リガンドと結合するパートナーdAbをもたらすことによる、所与のAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)のin vivoの力価の増加である。理論に拘泥するものではないが、エンドソーム再利用の際、標的分子は放出され、分解性エンドソームを目的にする一方で、AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)は、FcRn媒介性の再利用によって再利用化されて新しいリガンドと結合する。この方法は、この経路が再生に利用不可能な場合に、PEG化分子又は他の半減期延長技術を超える主要な利点を提供する。これらの例の場合はおそらく、結合したリガンドはただPEG化された部分上に位置して占有するだけである。

【０４０８】

本明細書中では、少なくとも一つの単一可変ドメインを有するリガンドを投与することを含み、単一可変ドメインは、天然の血清pH及び細胞内小胞のpHの両方で血清アルブミンと特異的に結合し、リガンドは少なくとも一つの追加の単一可変ドメインをさらに有し、単一可変ドメインは、天然の血清pHで血清アルブミン以外の抗原と特異的に結合するが、細胞内小胞のpHで前記抗原と結合せず、したがって血清アルブミン以外の抗原を分解に標的化させる、抗原を分解に向ける方法を記載する。また、本明細書中では、少なくとも一つの追加の単一可変ドメインをさらに含むリガンドも記載し、前記単一可変ドメインは、天然の血清pHで血清アルブミン以外の抗原と特異的に結合するが、細胞内小胞のpHで前記抗原と結合しない。

【０４０９】

代謝物の存在下におけるdAbのin vitro選択

本明細書中で記載するリガンドには、血清アルブミンと特異的に結合する、一つの単一可変ドメイン(単量体)又は複数の単一可変ドメイン(例えば、本明細書中で定義する多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、及び二重特異性リガンド)を含む、単一可変ドメインを含むリガンドも包含され、単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミンと特異的に結

合し、単一可変ドメインによる血清アルブミンの特異的結合は、薬物及び/又は代謝物及び/又は小分子と血清アルブミン上の一つ又は複数の部位との結合によって本質的に遮断されない。ヒト血清アルブミン上の一つ又は複数の部位には、サドロウ(Sudlow)部位1及びサドロウ部位2が含まれる。一つ又は複数の部位は、ドメインI、ドメインII及びドメインIIIからなる群から選択されるヒト血清アルブミンの一つ又は複数のドメインの任意の組合せ上に位置することができる。

【０４１０】

本明細書中で記載するリガンドには、血清アルブミンと特異的に結合する、一つの単一可変ドメイン(単量体)又は複数の単一可変ドメイン(例えば、本明細書中で定義する多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、及び二重特異性リガンド)を含む、単一可変ドメインを含むリガンドも包含され、単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミンと特異的に結合し、前記単一可変ドメインによる血清アルブミンの特異的結合は、SAと結合した薬物及び/又は代謝物及び/又は小分子に対する血清アルブミンの結合特徴を変更しない。一実施形態では、リガンドの単一可変ドメインは、薬物、代謝物又は他の小分子が存在する場合及び/又は存在しない場合のどちらでも、血清アルブミンと結合する。別の実施形態では、前記単一可変ドメインによる血清アルブミンの特異的結合は、好ましくはそれだけには限定されないが、Fasano他(2005)57(12):787-96.ヒト血清アルブミンの並外れたリガンド結合特性(The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin)、及びBertucci,C.他(2002)9(15):1463-81、薬物とヒト血清アルブミンとの可逆的且つ共有的結合:方法論的手法及び生理的関連性(Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin:methodological approaches and physiological relevance)に記載の薬物及び/又は代謝物及び/又は小分子を含めた、in vivoで自然にSAと結合した薬物及び/又は代謝物及び/又は小分子に対する血清アルブミンの結合特徴を実質的に変更しない。

【０４１１】

SAと結合した薬物及び/又は代謝物及び/又は小分子は、単一可変ドメインとの結合に関して血清アルブミンを実質的に阻害又はそれと競合しない薬物及び/又は代謝物及び/又は小分子と、重複していてもしていなくてもよい。薬物及び/又は代謝物には、好ましくはそれだけには限定されないが、ワルファリン、イブプロフェン、ビタミンB6、シータビリルビン、ヘミン、チロキシン、脂肪酸、アセトアルデヒド、脂肪酸代謝物、アシルグルクロニド、ビリルビンの代謝物、ハロタン、サリチレート、ベンゾダペン及び1-O-ゲムフィブロジル-B-D-グルクロニドが含まれる。小分子による単一可変ドメインとの結合に関する血清アルブミンのこの阻害又は競合は、直接置換及び小分子結合に誘導される他の小分子の結合の変化について記載されているアロステリック効果のどちらによっても起こり得る。Ascenzi他(2006)Mini Rev.Med.Chem.6(4):483-9.ヒト血清アルブミンと結合する薬物のアロステリック調節(Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin)、及びGhuman J.他(2005)J.Mol.Biol.353(1):38-52、ヒト血清アルブミンとの薬物結合の構造的基礎(Structural basis of the drug-binding to human serum albumin)を参照されたい。一実施形態では、小分子は、単独で、又は一つ若しくは複数の他の小分子、及び/若しくは代謝物、及び/若しくはタンパク質及び/若しくは薬物と協力して、血清アルブミンと結合する。別の実施形態では、小分子は、単独で、又は一つ若しくは複数の他の小分子、及び/若しくは代謝物、及び/若しくはタンパク質及び/若しくは薬物と協力して、単一可変ドメインとの結合に関して血清アルブミンを実質的に阻害又はそれと競合しない。別の実施形態では、小分子は、単独で、又は一つ若しくは複数の他の小分子、及び/若しくは代謝物、及び/若しくはタンパク質及び/若しくは薬物と協力して、単一可変ドメインとの結合に関して血清アルブミンを実質的に阻害又はそれと競合する。

【０４１２】

単一可変ドメインは、抗体単一可変ドメインであり得る。抗体単一可変ドメインは、VH3ドメインであり得る。抗体単一可変ドメインは、Vκドメインであり得る。単一可変ドメインは、一つ又は複数の非免疫グロブリン足場を含むことができる。非免疫グロブリン足場には、好ましくはそれだけには限定されないが、CTLA-4、リポカリン、SpA、GroEL及び

フィブロネクチンのうちの一つ又は複数が含まれ得、Affibody(商標)及びAvimer(商標)が含まれる。

【０４１３】

本明細書中では、一つ又は複数の代謝物及び/又は薬物の存在下で、一つ又は複数の代謝物及び/又は薬物の存在下で血清アルブミンと結合するその能力によって第1の可変ドメインを選択するステップを含む、血清アルブミンと結合する単一可変ドメインを選択する方法を記載する。また、本明細書中では、(a)一つ又は複数の代謝物及び/又は薬物の存在下で第1のエピトープと結合するその能力によって第1の可変ドメインを選択するステップと、(b)第2のエピトープと結合するその能力によって第2の可変ドメインを選択するステップと、(c)可変ドメインを組み合わせるステップと;(d)前記一つ又は複数の代謝物及び/又はリガンド並びに前記第2のエピトープの存在下で血清アルブミンと結合するその能力によってリガンドを選択するステップとを含む、一つ又は代謝物及び/又は薬物の存在下で血清アルブミンに対する第1の結合特異性を有する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン、並びに第2の結合特異性を有する第2の免疫グロブリン単一可変ドメインを含む二重特異性リガンドを産生する方法も記載する。この方法には、第1の可変ドメインを、相補的可変ドメインの不在下で、前記第1のエピトープに対する結合について選択するステップ、及び/又は第1の可変ドメインを、前記第2の可変ドメインとは異なる第3の相補的可変ドメインの存在下で、前記第1のエピトープに対する結合について選択するステップも含まれ得る。これらの選択ステップは、代謝物及び/又は薬物及び/又はタンパク質及び/又は小分子の混合物の存在下で行うことができる。また、選択ステップは、以下のように行うこともできる:(a)第1の代謝物及び/又は薬物及び/又は小分子の存在下で血清アルブミンと結合する単一可変ドメインを選択するステップと;(b)ステップ(a)で選択したドメインから、第2の代謝物及び/又は薬物及び/又は小分子の存在下でドメインを選択するステップ。また、(a)一つ又は複数の代謝物及び/又は薬物及び/又は小分子の存在下で血清アルブミンと結合するその能力によって第1の可変ドメインを選択するステップと、(b)エピトープと結合するその能力によって第2の可変ドメインを選択するステップと、(c)可変ドメインを組み合わせて第1及び第2の可変ドメインを含むリガンドを提供するステップと;(d)ステップ(c)によって提供されるリガンドから、一つ又は複数の代謝物及び/又は薬物の存在下で血清アルブミンと結合するその能力及び前記エピトープと結合するその能力によってリガンドを選択するステップとによって二重特異性リガンドを産生することを有する、一つ又は代謝物及び/又は薬物及び/又は小分子の存在下で血清アルブミンに対する第1の結合特異性を有する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン、並びに第2の結合特異性を有する第2の免疫グロブリン単一可変ドメインを有する二重特異性リガンドを産生する方法も包含される。一実施形態では、第1の可変ドメインは、相補的可変ドメインの不在下で血清アルブミンと結合することについて選択する。別の実施形態では、第1の可変ドメインは、第2の可変ドメインとは異なる相補的可変ドメインの存在下における第1のエピトープとの結合について選択する。

【０４１４】

本明細書中では、pH7及び細胞内区画のpHのどちらでもin vitroで血清アルブミンと特異的に結合し、非天然単一可変ドメインを含む、リガンドを記載する。また、本明細書中では、pH7及び細胞内区画のpHのどちらでもin vitroで血清アルブミンと特異的に結合する抗体単一可変ドメインを含むリガンドも記載する。一実施形態では、細胞内区画のpHの範囲は4.8～5.2である。別の実施形態では、in vitro表面プラズモン共鳴競合アッセイによって決定される、血清アルブミンと抗体単一可変ドメインとの結合は、FcRnと血清アルブミンとの結合を実質的に阻害しない。別の実施形態では、抗体単一可変ドメインは抗体重鎖単一可変ドメインである。さらなる実施形態では、抗体重鎖単一可変ドメインはVH3単一可変ドメインであり得、VH3単一可変ドメインはヒトVH3単一可変ドメインであり得る。別の実施形態では、抗体単一可変ドメインは抗体軽鎖単一可変ドメインである。一実施形態では、抗体軽鎖単一可変ドメインはVκ単一可変ドメインであり、別の実施形態ではVλ単一可変ドメインである。

【０４１５】
別の実施形態では、抗体単一可変ドメインは、CDR1、CDR2及びCDR3からなる群から選択される抗体CDR領域のうちの一つ又は複数を含む。別の実施形態では、抗体単一可変ドメインは、CTLA-4、リポカリン、ブドウ球菌プロテインA(SpA)、GroEL、GroES、トランスフェリン及びフィブロネクチンからなる群から選択される足場を含む。一実施形態では、血清アルブミンと単一可変ドメインとの結合は、FcRnと血清アルブミンとの結合と実質的に競合せず、別の実施形態では、抗体単一可変ドメインは、300nM以下の平衡解離定数(Kd)で血清アルブミンと特異的に結合する。
【０４１６】
別の実施形態では、抗体単一可変ドメインは、少なくとも一つの追加の抗体単一可変ドメインをさらに含み、追加の抗体単一可変ドメインは、pH7で血清アルブミン以外の抗原と特異的に結合するが、細胞内区画のpHでは抗原と結合しない。また、本明細書中では、pH7及び細胞内区画のpHのどちらでもin vitroで血清アルブミンと特異的に結合する、抗体単一可変ドメインなどの単一可変ドメインを含むリガンドを、個体に投与することを含み、リガンドが、単一可変ドメイン、例えば抗体単一可変ドメインを含む少なくとも一つの追加の抗体単一可変ドメインをさらに含み、血清アルブミン以外の抗原が分解に標的化されている抗原である、個体において抗原を分解に向ける方法も記載する。
【０４１７】
本発明のリガンドの一実施形態では、抗体単一可変ドメインによるヒト血清アルブミンの特異的結合は、事前に決定した薬物及び/又は代謝物及び/又は小分子とヒト血清アルブミン上の一つ又は複数の部位との結合によって遮断されない。これらの実施形態では、追加の抗体単一可変ドメインは、CDR1、CDR2及び/又はCDR3からなる群から選択される一つ又は複数の抗体CDRを含む抗体重鎖単一可変ドメイン又は抗体軽鎖単一可変ドメインであり得る。単一可変ドメインは、CTLA-4、リポカリン、ブドウ球菌プロテインA(SpA)、GroEL、GroES、トランスフェリン及びフィブロネクチンからなる群から選択される足場を含むことができる。
【０４１８】
本明細書中で記載するリガンドの別の実施形態は、単一可変ドメインを含むリガンドであり、単一可変ドメインは非天然単一可変ドメインであり、単一可変ドメインは、ヒトpH7及び細胞内区画のpHのどちらでもin vitroで血清アルブミンと特異的に結合し、単一可変ドメインによるヒト血清アルブミンの特異的結合は、事前に決定した薬物及び/又は代謝物及び/又は小分子とヒト血清アルブミン上の一つ又は複数の部位との結合によって遮断されず、ヒト血清アルブミン上の一つ若しくは複数の部位にはサドロウ部位1若しくはサドロウ部位2が含まれるか、又は一つ若しくは複数の部位は、ドメインI、ドメインII及びドメインIIIからなる群から選択されるヒト血清アルブミンのうちの一つ若しくは複数のドメイン上に位置している。
【０４１９】
リンカー
AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)(抗血清アルブミンドメイン抗体又は単一可変ドメイン)を別の生物活性のある部分と結合することは、組換え操作技術によって達成することができる。基本的には、両方の目的タンパク質をコードしている遺伝子をインフレームで融合させる。抗血清アルブミンドメイン抗体が、融合のN末端(即ち、AlbudAb(商標)-Y、Yは生物活性のあるポリペプチドである)、融合のC末端(即ち、Z-AlbudAb(商標)、Zは生物活性のあるペプチドである)のどちらかに位置する、いくつかの様式を検討することができる。一部の例では、複数の生物活性のあるポリペプチドをAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)と融合させて、融合設計に関していくつかの可能性をもたらすことを検討し得る。例えば、融合は、Z-Y-AlbudAb(商標)、Z-AlbudAb(商標)-Y又はAlbudAb(商標)-Z-Yであり得る。
【０４２０】
これらの融合分子すべてにおいて、二つのポリペプチドは、少なくとも一つのペプチド

結合を介して一緒に共有結合されている。その最も単純な手法では、AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)及び生物学的ポリペプチドを直接連結させる。したがって、AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)とポリペプチドとの間の接合部は以下のようになる:

a)C末端にAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)がある場合は、

AlbudAb(商標)がVKである場合:-

xxxDIQ
xxxNIQ
xxxAIQ
xxxAIR
xxxVIW
xxxDIV
xxxDVV
xxxEIV
xxxETT

AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)がVλである場合:-

xxxQSV
xxxQSA
xxxSYE
xxxSSE
xxxSYV
xxxLPV
xxxQPV
xxxQLV
xxxQAV
xxxNFM
xxxQTV
xxxQAG

AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)がVH(例えばヒトVH)である場合:-

xxxQVQ
xxxQMQ
xxxEVQ
xxxQIT
xxxQVT
xxxQLQ

AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)がVHH(例えばラクダ科重鎖可変ドメイン)である場合:-

xxxEVQ
xxxQVQ
xxxDVQ
xxxQVK
xxxAVQ

b)N末端にAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)がある場合は、

AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)がVKである場合:-

KVEIKxxx
KLEIKxxx
KVDIKxxx
RLEIKxxx
EIKRxxx

AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)がVλである場合:-
KVDVLxxx
KLDVLxxx
QLDVLxxx
AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)がVH(例えばヒトVH)である場合:-
VTVSSxxx
AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)がVHH(例えばラクダ科重鎖可変ドメイン)である場合:-
VTVSSxxx
「xxx」は、AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)と融合した(第1の)生物活性のあるポリペプチドの最初又は最後の三つのアミノ酸を表す。

【０４２１】

しかし、どちらのポリペプチドの機能的活性も回復している組換え融合タンパク質の産生が、直列型に連結しているポリペプチドの間でスプライシングされるペプチドリンカーをコードしている架橋DNAセグメントでコード遺伝子を連結することによって容易になり得る場合もあり得る。最適なペプチドリンカーの長さは、通常は経験的に考案し、短くて1個のアミノ酸、又は50個のアミノ酸まで伸びていることができる。様々な設計のリンカーが提案されており、当分野で周知である。以下の例は、可能なリンカー手法の広範であるが包括的ではないリストを提供することを意図する。

【０４２２】

1.可撓性リンカー:

可撓性リンカーは、二つのポリペプチド部分を連結する際に安定な二次構造を採用しないように設計されており、したがって融合タンパク質の様々なコンホメーションが可能である。これらのリンカーは、好ましくは、これらが一方又は両方の融合したポリペプチドと相互作用することを防止するために親水性の性質である。通常は、ペプチド主鎖の可撓性且つ親水性の特徴をそれぞれ増加させるために、グリシン及びセリンなどの小さな極性残基がこれらのリンカー中で優勢である。これらのリンカーの長さは変動的であり、経験的に又は3Dコンピュータ手法の支援を用いて最も良好に決定される。一般に、好ましいリンカーの長さは、良好な発現、良好な溶解度並びにネイティブ機能及び目的構造の完全回復を伴う最小の適合性のあるものである。その可撓性の特徴により、可撓性リンカーは内在性プロテアーゼの良好な基質を構成し得る。一般に、望ましい特徴でない限りは、可撓性リンカーは、幅広い基質特異性を有する内在性プロテアーゼによって容易に認識される荷電したアミノ酸又は大きな疎水性/芳香族などのアミノ酸を欠く。さらに、遊離システインは一緒に反応してシステインを形成して、(i)リンカーを介して二つの融合タンパク質を架橋させる、及び/又は(ii)生物活性ポリペプチドのうちの一つ若しくは複数が一つ若しくは複数のシステイン残基を含む場合は融合タンパク質の発現/折り畳みを損なわせる(「システインスクランブル」)場合があるため、システイン残基を回避することが好ましい。

【０４２３】

可撓性リンカーの例は、(i)$(GGGGS)_y$モチーフの反復に基づくグリシンに富んだリンカー[式中、yは少なくとも1であるが、yは2、3、4、5、6、7、8及び9、又はそれ以上であり得る](PCT国際公開:欧州特許第0 753 551号、米国特許第5,258,498号、欧州特許第0 623 679号参照)、(ii)$(SSSSG)_y$モチーフの反復に基づくセリンに富んだリンカー[式中、yは少なくとも1であるが、yは2、3、4、5、6、7、8及び9、又はそれ以上であり得る](PCT国際公開:欧州特許第0 573 551号、米国特許第5,525,491号参照)である。

【０４２４】

2.拘束リンカー:

拘束リンカーは、二つのポリペプチド部分を連結する際に安定な二次構造を採用するように設計されており、したがって融合タンパク質のコンホメーションの範囲が制限される

。そのようなリンカーは、通常は、いくつかのターンにわたるヘリックス構造を採用する。ここでも、これらのリンカーの長さは変動的であり、経験的に又はコンピュータ手法の支援を用いて最も良好に決定される。拘束リンカーを選択する主な理由は、融合のそれぞれのポリペプチド間の最長距離を維持するためである。このことは、両方のポリペプチドが異種凝集体を形成する傾向にある場合に、特に関連する。その構造により、拘束リンカーはまた、タンパク質分解性の分解に対する耐性がより高い場合があり、したがってin vivoで注射した場合に利点が提供される。

【０４２５】

拘束リンカーの例は、PCT国際公開:WO00/24884(例えば、SSSASASSA、GSPGSPG、又はATTTGSSPGPT)、米国特許第6,132,992号(例えばヘリックスペプチドリンカー)に言及されている。

【０４２６】

3.「天然」のリンカー:

天然のリンカーとは、反対に合成でない、(様々な長さの)ポリペプチド配列である、即ち、リンカーを構成するポリペプチド配列は自然に見つかる。天然のリンカーは、可撓性又は拘束型のどちらでもあり得、アミノ酸の配列及び組成が非常に多様であり得る。タンパク質分解に対するその耐性の度合は、それらがどのタンパク質を起源とするか、及びそれらのタンパク質が自然においてどのような生物学的環境(細胞外、細胞内、原核、真核など)に面しているかに依存する。一つのリンカークラス、即ちヒトタンパク質中で見つかるペプチドに基づくリンカーが、人類の生物学的治療学の開発に特に関連している。実際、そのようなリンカーは、免疫原性が存在しない又は非常に弱い性質であり、したがってヒト治療により安全な可能性がある。

【０４２７】

天然のリンカーの例は、(i)KESGSVSSEQLAQFRSLD(Bird他(1988)Science、242、423-426参照)、(ii)軽鎖を欠く免疫グロブリンのヒンジドメインに対応する配列(Hamers-Castermann他(1993)Nature、363、446-448及びPCT国際公開:WO096/34103参照)である。抗アルブミンドメイン抗体(例えば、ヒト、ヒト化、ラクダ化ヒト又はラクダ科VHHドメイン抗体)で使用するためのリンカーの例は、EPKIPQPQPKPQPQPQPQPKPQPKPEPECTCPKCP及びGTNEVCKCPKCPである。ヒト及びラクダ科のヒンジに由来する他のリンカーが、本明細書中に参照により組み込まれているEP0656946号に開示されている。ヒンジに由来するリンカーは、様々な長さ、例えば0～約50個のアミノ酸を有することができ、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48又は49個のアミノ酸が含まれる。

【０４２８】

本明細書中で使用する「薬物」とは、個体において生物学的標的分子と結合及び/又はその機能を変更することによって有益な治療又は診断的効果をもたらすために、個体に投与することができる、任意の化合物(例えば、有機小分子、核酸、ポリペプチド)をいう。標的分子は、個体のゲノムによってコードされている内在性標的分子(個体のゲノムによってコードされている例えば、酵素、受容体、成長因子、サイトカイン)、又は病原体のゲノムによってコードされている外因性標的分子(例えば、ウイルス、細菌、真菌、線虫若しくは他の病原体のゲノムによってコードされている酵素)であり得る。

【０４２９】

薬物組成物は、薬物がポリペプチド結合部分と共有結合又は非共有結合している、コンジュゲートであり得る。薬物は、ポリペプチド結合部分と直接又は間接的に、共有又は非共有的に結合していることができる(例えば、適切なリンカー及び/又は相補的結合パートナー(例えば、ビオチン及びアビジン)の非共有結合を介して)。相補的結合パートナーを用いる場合、結合パートナーのうちの一方が薬物と直接又は適切なリンカー部分を介して共有結合していることができ、相補的結合パートナーがポリペプチド結合部分と直接又は適切なリンカー部分を介して共有結合していることができる。薬物がポリペプチド又はペ

プチドである場合、薬物組成物は融合タンパク質であり得、ポリペプチド又はペプチド、薬物及びポリペプチド結合部分は、連続的なポリペプチド鎖の個別の部品(部分)である。本明細書中で記載するように、ポリペプチド結合部分及びポリペプチド薬物部分は、ペプチド結合を介して互いに直接結合していてもよく、又は適切なアミノ酸、若しくはペプチド若しくはポリペプチドリンカーを介して連結されていてもよい。

【０４３０】

免疫原性の減少

本明細書中では、薬剤が単一可変ドメイン領域をさらに含むように前記薬剤を改変することを含み、単一可変ドメインが、in vivo及び/又はex vivoで血清アルブミンと特異的に結合し、薬剤には薬物、代謝物、リガンド、抗原及びタンパク質が含まれ得る、製薬の免疫原性を減少させる方法を記載する。血清アルブミンはヒト血清アルブミンであり得る。単一可変ドメインは免疫グロブリン単一可変ドメインであり得る。免疫グロブリン単一可変ドメインはVH抗体単一可変ドメインであり得る。VH単一可変ドメインはVH3単一可変ドメインであり得る。VH3単一可変ドメインはヒトVH3単一可変ドメインであり得る。単一可変ドメインはVκ又はVλ抗体単一可変ドメインであり得る。抗体単一可変ドメインは、VH3フレームワーク生殖系列抗体遺伝子セグメントによってコードされている、一組の四つのカバットフレームワーク領域(FRを含むことができる。VH3フレームワークは、DP47、DP38及びDP45からなる群から選択される。抗体単一可変ドメインは、Vκフレームワーク生殖系列抗体遺伝子セグメントによってコードされている、一組の四つのカバットフレームワーク領域(FR)を含むことができる。κフレームワークの非限定的な例はDPK9である。単一可変ドメインは、CDR1、CDR2及び/又はCDR3領域を含む免疫グロブリン又は非免疫グロブリン足場を含むことができ、CDR1、CDR2及びCDR3領域のうちの少なくとも一つが、血清アルブミンと特異的に結合する抗体可変ドメインに由来する。非免疫グロブリン足場には、好ましくはそれだけには限定されないが、CTLA-4、リポカリン、SpA、Affibody(商標)、GroEL、Avimer(商標)及びフィブロネクチンが含まれ得る。血清アルブミンはヒト血清アルブミンであり得る。免疫グロブリン単一可変ドメイン及び/又は非免疫グロブリン単一可変ドメインは、300nM未満のKdでヒト血清アルブミンと特異的に結合することができる。免疫グロブリン単一可変ドメイン及び/又は非免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミン及び一つ又は複数の非ヒト血清アルブミンの両方と相互に10倍以内のKd値で特異的に結合することができる。免疫グロブリン単一可変ドメイン及び/又は非免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミン及び一つ又は複数の非ヒト血清アルブミンの両方と特異的に結合することができ、リガンドのTβ半減期は、ヒト宿主におけるヒト血清アルブミンのTβ半減期と実質的に同じである。さらに、免疫グロブリン単一可変ドメイン及び/又は非免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合することができる。免疫グロブリン単一可変ドメイン及び/又は非免疫グロブリン単一可変ドメインはさらに、天然の血清pH及び細胞内小胞のpHの両方で血清アルブミンと特異的に結合することができる。前記免疫グロブリン単一可変ドメイン及び/又は非免疫グロブリン単一可変ドメインによる血清アルブミンの特異的結合は、好ましくは、薬物及び/又は代謝物と血清アルブミン上の一つ又は複数の部位との結合によって実質的に遮断されない。一実施形態では、単一可変ドメインによる血清アルブミンの特異的結合は、SAと結合した薬物及び/又は代謝物及び/又は小分子に対する血清アルブミンの結合特徴を変更しない。一実施形態では、薬剤を改変する方法は、a-(X)n1-b-(Y)n2-c-(Z)n3-d又はa-(Z)n3-b-(Y)n2-c-(X)n-d[式中、Xは、第1の標的に対する結合特異性を有するポリペプチド薬物であり;Yは単一可変ドメイン、例えば、in vivo及び/又はex vivoで血清アルブミンと特異的に結合する抗体単一可変ドメインであり;Zは、第2の標的に対する結合特異性を有するポリペプチド薬物であり;a、b、c及びdは、独立して、1個～約のアミノ酸残基を含むポリペプチドであるか存在せず;n1は1～約10であり;n2は1～約10であり;n3は0～約10である]を含む式を有する、改変された薬剤の形成をもたらす。さらなる実施形態では、nl及びn2がどちらも1であり、n3が0である場合、Xは抗体鎖又は抗体鎖の断片を含まない。

【０４３１】
本明細書中では、薬剤が単一可変ドメインをさらに含み、単一可変ドメインが血清アルブミンと特異的に結合し、単一可変ドメインが非天然単一可変ドメインであるように薬剤を改変することを含み、薬剤が、薬物、代謝物、リガンド、抗原及びタンパク質からなる群から選択される、製薬の免疫原性を減少させる方法を記載する。また、本明細書中では、薬剤が抗体単一可変ドメインをさらに含み、抗体単一可変ドメインが血清アルブミンと特異的に結合するように薬剤を改変することを含み、薬剤が、薬物、代謝物、リガンド、抗原及びタンパク質からなる群から選択される、製薬の免疫原性を減少させる方法も記載する。一実施形態では、抗体単一可変ドメインは、抗体重鎖単一可変ドメイン、例えば、抗体VH3単一可変ドメイン、又はヒト抗体VH3単一可変ドメインである。別の実施形態では、抗体単一可変ドメインは、抗体軽鎖単一可変ドメイン、例えば、抗体Vκ又は抗体Vλ単一可変ドメインである。一実施形態では、抗体単一可変ドメインは、CDR1、CDR2及びCDR3領域を含み、CDR1、CDR2及びCDR3領域のうちの少なくとも一つが、血清アルブミンと特異的に結合する抗体可変ドメインに由来し、任意選択で、CTLA-4、リポカリン、ブドウ球菌プロテインA(SpA)、GroEL、GroES、トランスフェリン及びフィブロネクチンからなる群から選択される足場をさらに含む。これらの方法の別の実施形態では、単一可変ドメイン、例えば抗体単一可変ドメインは、300nM未満のKdでヒト血清アルブミンと特異的に結合し、これらの方法の別の実施形態では、単一可変ドメイン、例えば抗体単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミン及び一つ又は複数の非ヒト血清アルブミンと相互に10倍以内のKd値で特異的に結合する。これらの方法の別の実施形態では、単一可変ドメイン、例えば抗体単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミン及び非ヒト血清アルブミンと特異的に結合し、リガンドのTβ半減期は、ヒト宿主におけるヒト血清アルブミンのTβ半減期と実質的に同じである。これらの方法の別の実施形態では、単一可変ドメイン、例えば抗体単一可変ドメインは、ヒト血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する。これらの方法の別の実施形態では、単一可変ドメイン、例えば抗体単一可変ドメインは、pH7及び細胞内区画のpHのどちらでも血清アルブミンと特異的に結合する。

【０４３２】
本発明を、例示することのみを目的として、以下の実施例で詳述する。dAbの命名の目的で、本明細書中で使用するヒトTNFαはTAR1と呼び、ヒトTNFα受容体1(p55受容体)はTAR2と呼ぶ。

【実施例】

【０４３３】

実施例１

【０４３４】
ヒト血清アルブミン(HSA)及びβ-ガラクトシダーゼ(β-gal)に対する二重特異性scFv抗体(K8)の選択
本実施例では、生殖系列(ダミー)V_Hドメインと連結したV_κ可変ドメインのレパートリーをβ-galとの結合に選択し、生殖系列(ダミー)V_κドメインと連結したV_H可変ドメインのレパートリーを、HSAとの結合に選択する、β-gal及びHSAに対する二重特異性抗体を作製する方法を説明する。その後、選択した可変V_H HSA及びV_κ β-galドメインを合わせて、β-gal及びHSAとの結合に関して抗体を選択する。HSAは、ヒト血液中に見つかる半減期を増加させるタンパク質である。

【０４３５】
四つのヒトファージ抗体ライブラリーを本実験で用いた。

【０４３６】
ライブラリー1　-生殖系列V_κ/DVT V_H　　8.46×10^7
ライブラリー2　-生殖系列V_κ/NNK V_H　　9.64×10^7
ライブラリー3　-生殖系列V_H/DVT V_κ　　1.47×10^8
ライブラリー4　-生殖系列V_H/NNK V_κ　　1.45×10^8
すべてのライブラリーは、側鎖の多様性を相補性決定領域(CDR2及びCDR3)中に取り込ん

だ、V_H(V3-23/DP47及びJ_H4b)並びにV_κ(O12/O2/DPK9及びJ_κ1)の単一のヒトフレームワークに基づいている。

【０４３７】

ライブラリー1及びライブラリー2はダミーV_κ配列を含む一方で、V_Hの配列は位置H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H96、H97及びH98で多様化している(それぞれDVT又はNNKがコードされている)(図1)。ライブラリー3及びライブラリー4はダミーV_H配列を含む一方で、V_κの配列は位置L50、L53、L91、L92、L93、L94及びL96で多様化している(それぞれDVT又はNNKがコードされている)(図1)。ライブラリーはファージミドpIT2/ScFvの形態であり(図2)、未選択のライブラリー中の大多数のクローンが機能的であるように、包括的リガンドであるプロテインA及びプロテインLとの結合について事前に選択されている。上記のライブラリーの大きさは、事前選択後の大きさに対応する。ライブラリー1及びライブラリー2を、抗原上で選択する前に混合して単一のV_H/ダミーV_κライブラリーが得られ、ライブラリー3及びライブラリー4を混合して単一のV_κ/ダミーV_Hライブラリーを形成した。

【０４３８】

3回の選択のラウンドをβ-galでV_κ/ダミーV_Hライブラリーを用いて行い、3回の選択のラウンドをHSAでV_H/ダミーV_κライブラリーを用いて行った。β-galの場合、ファージ力価が第1ラウンドで1.1×10^6から第3ラウンドで2.0×10^8まで上昇した。HSAの場合、ファージ力価が第1ラウンドで2×10^4から第3ラウンドで1.4×10^9まで上昇した。選択は、KM13ヘルパーファージ(D2及びD3ドメインの間にプロテアーゼ切断部位を有するpIIIタンパク質を含む)を使用し、ファージを1mg/mlのPBS中のトリプシンで溶出させた以外は、Griffith他、(1993)に記載のように行った。トリプシンの添加により、ヘルパーファージに由来するpIIIタンパク質が切断され(ファージミドからのものは切断されない)、結合したscFv-ファージ融合体がc-mycタグの切断によって溶出され(図2)、したがって、機能的scFvを発現するファージのさらなる濃縮及び対応するバックグラウンドの低下がもたらされる(Kristensen及びWinter、Folding & Design 3:321-328、1998年7月9日)。選択は、HSA又はβ-galを100μg/mlの濃度でコーティングしたイムノチューブを用いて行った。

【０４３９】

結合を確認するために、それぞれの選択の第3ラウンドからの24個のコロニーをモノクローナルファージELISAによってスクリーニングした。ファージ粒子をHarrison他、Methods Enzymol.1996;267:83-109に記載のように産生した。96ウェルのELISAプレートを、PBS中に10μg/mlの濃度の100μlのHSA又はβ-galを用いて、終夜4℃でコーティングした。抗M13-HRPコンジュゲートを用いた結合したファージの検出を使用して、標準のELISAプロトコルに従った(Hoogenboom他、1991)。クローンの選択により、50μlの上清で1.0を超えるELISAシグナルが得られた。

【０４４０】

次に、QIAprep Spin Miniprepキット(Qiagen)を用いて、HSAで選択したV_H/ダミーV_κライブラリー及びβ-galで選択したV_κ/ダミーV_HライブラリーからDNA調製物を作製した。多様性のほとんどを利用可能にするために、DNA調製物を3回の選択のラウンドのそれぞれから作製し、その後、抗原のそれぞれについてまとめた。その後、DNA調製物を、SalI/NotIを用いて終夜37℃で消化。断片のゲル精製後、β-galで選択したV_κ/ダミーV_HライブラリーからのV_κ鎖を、HSAで選択したV_H/ダミーV_κライブラリーのダミーV_κ鎖の代わりにライゲーションして、3.3×10^9個のクローンのライブラリーを作製した。

【０４４１】

その後、このライブラリーを、HSA(第1ラウンド)及びβ-gal(第2ラウンド)のHSA/β-gal選択、又はβ-gal(第1ラウンド)及びHSA(第2ラウンド)のβ-gal/HSA選択のどちらかで選択した。選択は上述のように行った。それぞれの場合において、第2ラウンド後に48個のクローンを、モノクローナルファージELISA(上述)及び可溶性scFv断片のELISAによって、HSA及びβ-galとの結合について試験した。可溶性抗体断片はHarrison他、(1996)によって記載されているように産生し、2%のTween/PBSを遮断バッファーとして使用し、結合し

たscFvをプロテインL-HRPで検出した以外は、標準のELISAプロトコルに従ったHoogenboom他(1991)Nucleic Acids Res.、19:4133。HSA/β-gal選択からの3個のクローン(E4、E5及びE8)並びにβ-gal/HSA選択からの2個のクローン(K8及びK10)が、両方の抗原と結合することができた。プライマーLMB3及びpHEN配列を用いて、これらのクローンからのscFvをPCR増幅し、Ignatovich他、(1999)J Mol Biol 1999年11月26日;294(2):457-65によって記載されているように配列を決定した。配列解析によりすべてのクローンが同一であることが明らかとなった。したがって、二重特異性抗体をコードしている1個のクローン(K8)のみを、さらなる作業用に選択した(図3)。

実施例2

【０４４２】

K8抗体の結合特性の特徴づけ

第1に、K8抗体の結合特性をモノクローナルファージELISAによって特徴づけた。96ウェルプレートに、100μlのHSA及びβ-galを、アルカリホスファターゼ(APS)、ウシ血清アルブミン(BSA)、ピーナッツ凝集素、リゾチーム及びチトクロームc(交差反応性を確認するため)と並べて、PBS中に10μg/mlの濃度で用いて、終夜4℃でコーティングした。K8クローンからのファージミドを、Harrison他、(1996)によって記載されているようにKM13を用いて救出し、ファージを含む上清(50μl)を直接アッセイした。抗M13-HRPコンジュゲートを用いた結合したファージの検出を使用して、標準のELISAプロトコルに従った(Hoogenboom他、1991)。二重特異性K8抗体は、ファージの表面上に提示された場合に、1.0を超える吸光度シグナルでHSA及びβ-galと結合することが判明した(図4)。BSAとの強力な結合も観察された(図4)。HSA及びBSAはアミノ酸レベルで76%相同的であるので、K8抗体がこれらの構造的に関連性のあるタンパク質をどちらも認識したことは、驚くべきことではない。他のタンパク質との交差反応性は検出されなかった(図4)。

【０４４３】

第2に、K8抗体の結合特性を可溶性scFv ELISAで試験した。可溶性scFv断片の産生は、Harrison他、(1996)によって記載されているように、IPTGによって誘導した。K8 scFvの発現レベルを決定するために、可溶性抗体断片を、50mlの誘導物の上清から、プロテインA-セファロースカラムを用いて、Harlow及びLane、抗体:実験室の手引き(Antibodies:a Laboratory Manual)、(1988)Cold Spring Harborによって記載されているように精製した。その後、OD_{280}を測定し、タンパク質濃度を、Sambrook他、(1989)によって記載されているように計算した。K8 scFvは、19mg/lで上清中に産生された。

【０４４４】

その後、既知の濃度のK8抗体断片を用いて可溶性scFv ELISAを行った。96ウェルプレートを、100μlのHSA、10μg/mlのBSA及びβ-gal並びに100μlのプロテインAを用いて、1μg/mlの濃度でコーティングした。50μlのK8 scFvの段階希釈を施用し、結合した抗体断片をプロテインL-HRPで検出した。ELISAの結果により、K8抗体の二重特異性性質が確認された(図5)。

【０４４５】

β-galとの結合がV_κドメインによって決定され、HSA/BSAとの結合がK8 scFv抗体のV_Hドメインによって決定されることを確認するために、V_κドメインをK8 scFvのDNAからSalI/NotI消化によって切り出し、ダミーV_H鎖を含むSalI/NotIで消化したpIT2ベクター内にライゲーションした(図1及び2)。生じたクローンK8V_κ/ダミーV_Hの結合特徴を可溶性scFv ELISAによって分析した。可溶性scFv断片の産生は、Harrison他、(1996)によって記載されているように、IPTGによって誘導し、scFvを含む上清(50μ)を直接アッセイした。可溶性scFv ELISAを実施例1に記載のように行い、結合したscFvをプロテインL-HRPで検出。ELISAの結果により、このクローンは依然としてβ-galと結合できるが、BSAとの結合は消滅したことが明らかとなった(図6)。

実施例3

【０４４６】

単一V_Hドメイン抗体抗原A及びB並びに抗原C及びDに対する単一V_κドメイン抗体の選択

本実施例では、相補的可変ドメインの不在下でこれらの抗原と結合することに関して未選択の(virgin)単一抗体可変ドメインのレパートリーを選択することによる、抗原A及びBに対する単一V_Hドメイン抗体並びに抗原C及びDに対する単一V_κドメイン抗体を作製する方法を説明する。

【０４４７】

結合クローンの選択及び特徴づけは、以前に記載されているように行う(実施例5、PCT/GB02/003014参照)。四つのクローンをさらなる作業用に選択した:

VH1-抗A V_H

VH2-抗B V_H

VK1-抗C V_κ

VK2-抗D V_κ

上記実施例1～3に記載の手順を、記載した方法と同様の様式で使用して、V_Hドメインの組合せ(即ちV_H-V_Hリガンド)及びV_Lドメインの組合せ(V_L-V_Lリガンド)を含む二量体分子を産生し得る。

実施例４

【０４４８】

二重特異性ScFv抗体(抗原A及びBに対するVH1/VH2並びに抗原C及びDに対するVK1/VK2)の作製及び特徴づけ

本実施例では、二重特異性ScFv抗体(抗原A及びBに対するVH1/VH2並びに抗原C及びDに対するVK1/VK2)が、対応する抗原に対して選択したV_κ及びV_H単一ドメインをScFvベクター内で組み合わせることによって作製できることを実証する。

【０４４９】

二重特異性抗体VH1/VH2を作製するために、VH1単一ドメインを可変ドメインベクター1(図7)からNcoI/XhoI消化によって切除し、NcoI/XhoIで消化した可変ドメインベクター2(図7)内にライゲーションして、VH1/可変ドメインベクター2を作製した。SalI制限部位を5'末端に、NotI制限部位を3'末端に導入するプライマーを用いて、VH2単一ドメインを可変ドメインベクター1からPCR増幅した。その後、PCR産物をSalI/NotIで消化し、SalI/NotIで消化したVH1/可変ドメインベクター2内にライゲーションして、VH1/VH2/可変ドメインベクター2を作製した。

【０４５０】

VK1/VK2/可変ドメインベクター2を同様の方法で作製した。生じたVH1/VH2 ScFv及びVK1/VK2 ScFvの二重特異的性質を、以前に記載されているように可溶性ScFv ELISAで試験した(実施例6、PCT/GB02/003014参照)。競合ELISAを以前に記載されているように行った(実施例8、PCT/GB02/003014参照)。

【０４５１】

可能性のある結果:

-VH1/VH2 ScFvは、抗原A及びBと同時に結合できる

-VK1/VK2 ScFvは、抗原C及びDと同時に結合できる

-VH1/VH2 ScFvの結合は競合的である(抗原Aと結合している場合、VH1/VH2 ScFvは抗原Bと結合することができない)

-VK1/VK2 ScFvの結合は競合的である(抗原Cと結合している場合、VK1/VK2 ScFvは抗原Dと結合することができない)

実施例５

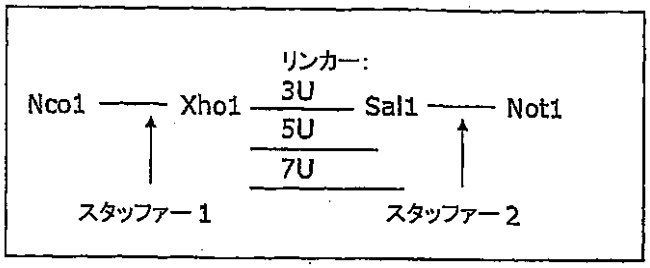
【０４５２】

二重特異性VH1/VH2 Fab及びVK1/VK2 Fabの構築並びにその結合特性の分析

VH1/VH2 Fabを作製するために、VH1単一ドメインをNcoI/XhoIで消化したCHベクター(図8)内にライゲーションしてVH1/CHを作製し、VH2単一ドメインをSalI/NotIで消化したCKベクター(図9)内にライゲーションしてVH2/CKを作製する。VH1/CH及びVH2/CKからのプラスミドDNAを用いて、以前に記載されているようにコンピテント大腸菌細胞を同時形質転換させた(実施例8、PCT/GB02/003014参照)。

【０４５３】
その後、VH1/CH及びVH2/CKプラスミドを含むクローンをIPTGによって誘導して、以前に記載されているように可溶性VH1/VH2 Fabを産生させた(実施例8、PCT/GB02/003014参照)。
【０４５４】
VK1/VK2 Fabを同様の方法で産生した。
【０４５５】
Fabの結合特性を以前に記載されているように競合ELISAによって試験した(実施例8、PCT/GB02/003014参照)。
【０４５６】
可能性のある結果:
-VH1/VH2 Fabは、抗原A及びBと同時に結合できる
-VK1/VK2 Fabは、抗原C及びDと同時に結合できる
-VH1/VH2 Fabの結合は競合的である(抗原Aと結合している場合、VH1/VH2 Fabは抗原Bと結合することができない)
-VK1/VK2 Fabの結合は競合的である(抗原Cと結合している場合、VK1/VK2 Fabは抗原Dと結合することができない)
実施例６
【０４５７】
キレートdAb二量体
概要
VH及びVKホモ二量体は、可撓性ポリペプチドリンカーを用いてdAb-リンカー-dAb形態で作製する。ベクターは、様々な長さのグリシン-セリンリンカーを含むdAbリンカー-dAb形態で作製した。3U:$(Gly_4Ser)_3$、5U:$(Gly_4Ser)_5$、7U:$(Gly_4Ser)_7$。二量体ライブラリーは、リンカーの上流のガイドdAbを用いて作製した:TAR1-5(VK)、TAR1-27(VK)、TAR2-5(VH)又はTAR2-6(VK)及びリンカー後の対応する第2のdAbのライブラリー。この方法を用いて、新規の二量体dAbを選択した。抗原結合に対する二量体化の効果をELISA及びBiacore研究によって、並びに細胞中和及び受容体結合アッセイにおいて決定した。TAR1-5及びTAR1-27の二量体化により、結合親和性及び中和レベルに有意な改善がもたらされた。
【０４５８】
1.0 方法
1.1 ライブラリーの作製
1.1.1 ベクター
pEDA3U、pEDA5U及びpEDA7Uベクターを設計してdAb-リンカー-dAb形態に適合性のある様々なリンカー長を導入した。pEDA3Uでは、ゆっくりのアニーリングプログラム(95℃-5分間、80℃-10分間、70℃-15分間、56℃-15分間、使用時まで42℃)を用いて、0.1MのNaCl、10mMのトリス-HClを含むバッファー、pH7.4中で、センス及びアンチセンスの73塩基対のオリゴリンカーをアニーリングし、Xho1及びNot1制限部位を用いてクローニングした。リンカーは3個の(Gly_4Ser)ユニットを包含しており、スタッファー領域がSal1及びNot1クローニング部位の間に収容されていた(スキーム1)。単量体のdAbがファージディスプレイによって選択される可能性を下げるために、スタッファー領域には、第2のdAbが存在しない場合に領域をフレーム外にさせる、3個のストップコドン、Sac1制限部位及びフレームシフト突然変異が含まれるように設計した。pEDA5U及び7Uでは、必要なリンカーの長さが原因で、重複するオリゴリンカーをそれぞれのベクターで設計し、アニーリングし、クレノウを用いて伸長した。その後、断片を精製し、適切な酵素を用いて消化した後、Xho1及びNot1制限部位を用いてクローニングした。

【化１】



スキーム1

【０４５９】

1.1.2　ライブラリーの調製

ガイドdAbに対応するN末端V遺伝子を、Nco1及びXho1制限部位を用いてリンカーの上流にクローニングした。VH遺伝子は既存の適合部位を有するが、VK遺伝子のクローニングには適切な制限部位の導入が必要であった。これは、PCRプライマー(VK-DLIBF:5'cggccatggcgtcaacggacat;VKXho1R:5'atgtgcgctcgagcgtttgattt3')の、SuperTaq(HTBiotechnology Ltd)及びpfu turbo(Stratagene)の2:1の混合物を用いた30サイクルのPCR増幅における改変を使用して達成した。これにより、Nco1部位を5'末端に維持する一方で、隣接のSal1部位を破壊し、3'末端にXho1部位が導入された。5個のガイドdAbを3個の二量体ベクターのそれぞれ内にクローニングした:TAR1-5(VK)、TAR1-27(VK)、TAR2-5(VH)、TAR2-6(VK)及びTAR2-7(VK)。すべての構築体を配列解析によって確認した。

【０４６０】

ガイドdAbをベクターのそれぞれ(pEDA3U、5U及び7U)をリンカーの上流にクローニングした:TAR1-5(VK)、TAR1-27(VK)、TAR2-5(VH)又はTAR2-6(VK)ので、対応する第2のdAbのライブラリーをリンカーの後ろにクローニングした。これを達成するために、相補的dAbライブラリーを、TAR1-5若しくはTAR1-27がガイドdAbである場合はヒトTNFαに対するVKライブラリー(第1ラウンド後に約1×10^{6}個の多様性)、又はTAR2-5若しくはTAR2-6がガイドdAbである場合はそれぞれヒトp55 TNF受容体に対するVH若しくはVKライブラリー(どちらも第1ラウンド後に約1×10^{5}個の多様性)の、第1ラウンドの選択から回収したファージからPCR増幅した。VKライブラリーでは、PCR増幅は、プライマーをSuperTaq及びpfu turboの2:1の混合物を用いた30サイクルのPCR増幅で使用して、実施した。遺伝子の5'末端にSal1制限部位を導入するためにプライマーを用いてVHライブラリーをPCR増幅した。dAbライブラリーのPCRを適切な制限酵素で消化し、Sal1/Not1制限部位を用いて対応するベクター内のリンカーの下流にライゲーションし、新しく調製したコンピテントTG1細胞内にエレクトロポレーションした。

【０４６１】

それぞれのライブラリーで得られた力価は以下のとおりである:

TAR1-5:pEDA3U=4×10^{8}、pEDA5U=8×10^{7}、pEDA7U=1×10^{8}

TAR1-27:pEDA3U=6.2×10^{8}、pEDA5U=1×10^{8}、pEDA7U=1×10^{9}

TAR2h-5:pEDA3U=4×10^{7}、pEDA5U=2×10^{8}、pEDA7U=8×10^{7}

TAR2h-6:pEDA3U=7.4×10^{8}、pEDA5U=1.2×10^{8}、pEDA7U=2.2×10^{8}

1.2　選択

1.2.1　TNFα

選択は、イムノチューブ上に受動的にコーティングしたヒトTNFαを用いて実施した。手短に述べると、イムノチューブを1～4mlの必要な抗原で終夜コーティングした。その後、イムノチューブをPBSで3回洗浄し、PBS中に2%の粉乳で1～2時間遮断し、PBSでさらに3回洗浄した。ファージ溶液をPBS中に2%の粉乳で希釈し、室温で2時間インキュベーションした。その後、チューブをPBSで洗浄し、ファージを1mg/mlのトリプシン-PBSで溶出させた。三つの選択戦略をTAR1-5二量体ライブラリーについて調査した。第1ラウンドの選択は、1μg/ml又は20μg/mlでコーティングしたヒトTNFα、PBS0.1%のTweenで20回の洗浄を

用いたイムノチューブで実施した。TG1細胞を溶出させたファージで感染させ、力価を決定した(例えば、Marks他J Mol Biol.1991年12月5日;222(3):581-97、Richmann他Biochemistry.1993年8月31日;32(34):8848-55)。

【０４６２】

回収された力価は以下のとおりである:

pEDA3U=2.8×10^{7}(1μg/mlのTNF)1.5×10^{8}(20μg/mlのTNF)、

pEDA5U=1.8×10^{7}(1μg/mlのTNF)、1.6×10^{8}(20μg/mlのTNF)

pEDA7U=8×10^{6}(1μg/mlのTNF)、7×10^{7}(20μg/mlのTNF)。

【０４６３】

第2ラウンドの選択は、三つの異なる方法を用いて実施した。

【０４６４】

1.イムノチューブ中、20回の洗浄、終夜のインキュベーション、次いでさらに10回の洗浄。

【０４６５】

2.イムノチューブ中、20回の洗浄、次いで(1μg/mlのTNFα)を含む洗浄バッファー中で1時間室温でのインキュベーション、さらに10回の洗浄。

【０４６６】

3. 33pmoleのビオチン標識したヒトTNFαを用いたストレプトアビジンビーズでの選択(Henderikx他、2002、ビオチン標識した抗原に対する抗体の選択。抗体ファージディスプレイ:方法及びプロトコル(Selection of antibodies against biotynylated antigens,Antibody Phage Display:Methods and protocols)、O'Brien及びAtkin編、Humana Press)。第2ラウンドの選択からの単一クローンを拾って96ウェルプレートに入れ、粗上清調製物を2mlの96ウェルプレート形態で作製した。

【０４６７】

	第1ラウンド ヒトTNFαイムノチューブ コーティング濃度	第2ラウンド 選択方法1	第2ラウンド 選択方法2	第2ラウンド 選択方法3
pEDA3U	1μg/ml	1×10^{9}	1.8×10^{9}	2.4×10^{10}
pEDA3U	20μg/ml	6×10^{9}	1.8×10^{10}	8.5×10^{10}
pEDA5U	1μg/ml	9×10^{8}	1.4×10^{9}	2.8×10^{10}
pEDA5U	20μg/ml	9.5×10^{9}	8.5×10^{9}	2.8×10^{10}
pEDA7U	1μg/ml	7.8×10^{8}	1.6×10^{8}	4×10^{10}
pEDA7U	20μg/ml	1×10^{10}	8×10^{9}	1.5×10^{10}

【０４６８】

TAR1-27では、選択を、既に記載したように、以下の改変を伴って実施した。第1ラウンドの選択は、1μg/ml又は20μg/mlでコーティングしたヒトTNFα、PBS0.1%のTween20回の洗浄を用いたイムノチューブで実施した。第2ラウンドの選択は、イムノチューブ中、20回の洗浄、終夜のインキュベーション、次いでさらに20回の洗浄を用いて実施した。第2ラウンドの選択からの単一クローンを拾って96ウェルプレートに入れ、粗上清調製物を2mlの96ウェルプレート形態で作製した。

【０４６９】

TAR1-27の力価は以下のとおりであった。

【０４７０】

	ヒトTNFαイムノチューブ コーティング濃度	第1ラウンド	第2ラウンド
pEDA3U	1μg/ml	4×10^{9}	6×10^{9}
pEDA3U	20μg/ml	5×10^{9}	4.4×10^{10}
pEDA5U	1μg/ml	1.5×10^{9}	1.9×10^{10}
pEDA5U	20μg/ml	3.4×10^{9}	3.5×10^{10}
pEDA7U	1μg/ml	2.6×10^{9}	5×10^{9}
pEDA7U	20μg/ml	7×10^{9}	1.4×10^{10}

【０４７１】

1.2.2 TNF受容体1(p55受容体;TAR2)

選択を、既に記載したように、TAR2h-5ライブラリーについてのみ実施した。3回の選択のラウンドを、イムノチューブ中、1μg/mlのヒトp55 TNF受容体又は10μg/mlのヒトp55 TNF受容体のどちらか、PBS0.1%のTween20で20回の洗浄、終夜のインキュベーション、次いでさらに20回の洗浄を用いて実施した。第2及び第3ラウンドの選択からの単一クローンを拾って96ウェルプレートにいれ、粗上清調製物を2mlの96ウェルプレート形態で作製した。

【０４７２】

TAR2h-5の力価は以下のとおりであった。

【０４７３】

	第1ラウンド ヒトp55 TNF受容体 イムノチューブ コーティング濃度	第1ラウンド	第2ラウンド	第3ラウンド
pEDA3U	1μg/ml	2.4×10^{6}	1.2×10^{7}	1.9×10^{9}
pEDA3U	10μg/ml	3.1×10^{7}	7×10^{7}	1×10^{9}
pEDA5U	1μg/ml	2.5×10^{6}	1.1×10^{7}	5.7×10^{8}
pEDA5U	10μg/ml	3.7×10^{7}	2.3×10^{8}	2.9×10^{9}
pEDA7U	1μg/ml	1.3×10^{6}	1.3×10^{7}	1.4×10^{9}
pEDA7U	10μg/ml	1.6×10^{7}	1.9×10^{7}	3×10^{10}

【０４７４】

1.3 スクリーニング

第2又は第3ラウンドの選択からの単一クローンを、必要に応じて、様々な選択方法からの3U、5U及び7Uのライブラリーのそれぞれから拾った。クローンを、100μg/mlのアンピシリン及び1%のグルコースを含む2×TY中、終夜37℃で増殖させた。この培養物の1/100希釈液を2mlの100μg/mlのアンピシリン及び0.1%のグルコースを含む2×TY中に2mlの96ウェルプレート形態で接種し、37℃、振盪下で、OD600が約0.9となるまで増殖させた。その後、培養物を、1mMのIPTGを用いて終夜30℃で誘導した。sorvalプレート遠心分離内で、4000rpmで15分間遠心分離することによって上清を清澄にした。上清調製物を初期スクリーニングに使用した。

【０４７５】

1.3.1 ELISA

二量体組換えタンパク質の結合活性を、プロテインA/L ELISAによって又は抗原ELISAに

よって単量体と比較した。手短に述べると、96ウェルプレートを、抗原又はプロテインA/Lを用いて終夜4℃でコーティングした。プレートを0.05%のTween-PBSで洗浄し、2%のTween-PBSで2時間遮断した。試料をプレートに加え、1時間、室温でインキュベーションした。プレートを洗浄し、二次試薬と共に1時間、室温でインキュベーションした。プレートを洗浄し、TMB基質で展開した。プロテインA/L-HRP又はインディア-HRPを二次試薬として用いた。抗原ELISAでは、使用した抗原濃度は、ヒトTNFα及びヒトTHF受容体1でPBS中に1μg/mlであった。ほとんどの場合でガイドdAbが存在していたため、二量体は陽性ELISAシグナルを与え、したがって、解離速度の決定をBiacoreによって検査した。

【０４７６】

1.3.2 Biacore

Biacore分析を、TAR1-5及びTAR2h-5クローンについて実施した。スクリーニングには、ヒトTNFαをCM5チップと高密度(約10000RU)でカップリングさせた。50μlのヒトTNFα(50μg/ml)をチップと、pH5.5の酢酸バッファー中、5μl/分でカップリングさせた。標準方法を用いた分析後のチップの再生はヒトTNFαが不安定なため可能でなく、したがって、各試料を分析した後、チップをバッファーで10分間洗浄した。

【０４７７】

TAR1-5では、第2ラウンドの選択からのクローン上清をBiacoreによってスクリーニングした。

【０４７８】

48個のクローンを、以下の選択方法を用いて得られた3U、5U及び7Uのライブラリーのそれぞれからスクリーニングした:

R1:1μg/mlのヒトTNFαイムノチューブ、R2 1μg/mlのヒトTNFαイムノチューブ、終夜洗浄。

【０４７９】

R1:20μg/mlのヒトTNFαイムノチューブ、R2 20μg/mlのヒトTNFαイムノチューブ、終夜洗浄。

【０４８０】

R1:1μg/mlのヒトTNFαイムノチューブ、R2 ビーズ上の33pmoleのビオチン標識したヒトTNFα。

【０４８１】

R1:20μg/mlのヒトTNFαイムノチューブ、R2 33pmoleのビオチン標識したヒトTNFαのビーズ。

【０４８２】

スクリーニングには、ヒトp55 TNF受容体をCM5チップと高密度(約4000RU)でカップリングさせた。100μlのヒトp55 TNF受容体(10μg/ml)をチップと、pH5.5の酢酸バッファー中、5μl/分でカップリングさせた。標準の再生条件を検査したが(グリシンpH2又はpH3)、それぞれの場合において、抗原がチップの表面からTNFαと共に除去され、したがって各試料を分析した後、チップをバッファーで10分間洗浄した。

【０４８３】

TAR2-5では、第2ラウンドの選択からのクローン上清をスクリーニングした。

【０４８４】

48個のクローンを、以下の選択方法を用いて得られた3U、5U及び7Uのライブラリーのそれぞれからスクリーニングした:

R1:1μg/mlのヒトp55 TNF受容体イムノチューブ、R2 1μg/mlのヒトp55 TNF受容体イムノチューブ、終夜洗浄。

【０４８５】

R1:10μg/mlのヒトp55 TNF受容体イムノチューブ、R2 10μg/mlのヒトp55 TNF受容体イムノチューブ、終夜洗浄。

【０４８６】

1.3.3 受容体及び細胞のアッセイ

二量体が受容体アッセイにおいて中和する能力を以下のように実施した。

【０４８７】

受容体結合

抗TNF dAbを、TNFと組換えTNF受容体1(p55)との結合を阻害する能力について試験した。手短に述べると、Maxisorpプレートを30mg/mlの抗ヒトFcマウスモノクローナル抗体(Zymed、米国San Francisco)と共に終夜インキュベーションした。ウェルを、0.05%のTween-20を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、その後、PBS中に1%のBSAで遮断した後、100ng/mlのTNF受容体1 Fc融合タンパク質(R&D Systems、米国Minneapolis)とインキュベーションした。抗TNF dAbをTNFと混合し、これを洗浄したウェルに最終濃度10ng/mlで加えた。TNFの結合を0.2mg/mlのビオチン標識した抗TNF抗体(HyCult biotechnology、オランダUben)、次いで、1:500希釈液を西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したストレプトアビジン(Amersham Biosciences、英国)、その後、TMB基質(KPL、米国Gaithersburg)とインキュベーションすることで検出した。HClを加えることによって反応を停止させ、吸光度を450nmで読み取った。抗TNF dAb活性は、TNF結合の低下をもたらし、したがって、TNFのみの対照と比較して吸光度の低下がもたらされた。

【０４８８】

L929細胞傷害アッセイ

抗TNF dAbはまた、マウスL929線維芽細胞に対するTNFの細胞傷害活性を中和する能力についても試験した(Evans,T.(2000)Molecular Biotechnology 15、243-248)。手短に述べると、マイクロタイタープレートにプレートしたL929細胞を、抗TNF dAb、100pg/mlのTNF及び1mg/mlのアクチノマイシンD(Sigma、英国Poole)と共に終夜インキュベーションした。[3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルブボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム(Promega、米国Madison)と共にインキュベーションした後に490nmで吸光度を読み取ることによって、細胞生存度を測定した。抗TNF dAbの活性は、TNF細胞傷害性の低下をもたらし、したがって、TNFのみの対照と比較して吸光度の増加がもたらされた。

【０４８９】

初期スクリーニングでは、上述のようにBiacore分析用に調製した上清を受容体アッセイにも使用した。選択した二量体のさらなる分析も、精製したタンパク質を用いて受容体及び細胞のアッセイで実施した。

【０４９０】

HeLa IL-8アッセイ

抗TNFR1又は抗TNFα dAbを、HeLa細胞中のTNFによるIL-8分泌の誘導を中和する能力について試験した(方法は、HUVEC中のIL-1によるIL-8の誘導を記載しているAkeson,L.他(1996)Journal of Biological Chemistry 271、30517-30523から適用した;ここではヒトTNFαによる誘導を見ており、本発明ではHUVEC細胞系の代わりにHeLa細胞を用いる)。手短に述べると、マイクロタイタープレートにプレートしたHeLa細胞を、dAb及び300pg/mlのTNFと共に終夜インキュベーションした。インキュベーション後、上清を吸引して細胞から除去し、IL-8の濃度をサンドイッチELISA(R&D Systems)によって測定した。抗TNFR1 dAbの活性は、TNFのみの対照と比較して、上清中へのIL-8の分泌の低下をもたらした。

【０４９１】

L929アッセイを以下の実験全体にわたって使用する。しかし、抗TNF受容体1(p55)リガンドを測定するためにHeLa IL-8アッセイの使用が好ましい。L929アッセイにおけるマウスp55の存在はその使用に特定の制限をもたらす。

【０４９２】

1.4 配列解析

Biacore及び受容体アッセイのスクリーニングにおいて興味深い特性を有することが証明された二量体の配列を決定した。配列は配列表に詳述する。

【０４９３】

1.5 構築(formatting)

1.5.1 TAR1-5-19二量体

良好な中和特性を有することが示されたTAR1-5二量体を再構築し、細胞及び受容体のアッセイで分析した。TAR1-5ガイドdAbを親和性の成熟クローンTAR1-5-19で置換した。これを達成するために、TAR1-5を個々の二量体対からクローニングして取り出し、PCRによって増幅したTAR1-5-19で置換した。さらに、TAR1-5-19ホモ二量体も3U、5U及び7Uのベクター中で構築した。遺伝子のN末端コピーをPCRによって増幅し、上述のようにクローニングし、既存のSal1及びNot1制限部位を使用してC末端遺伝子断片をクローニングした。

【０４９４】

1.5.2 突然変異誘発

TAR1-5二量体対中のC末端dAbの一つである、dAb2中に存在するamberストップコドンを、部位特異的突然変異誘発によってグルタミンに突然変異させた。

【０４９５】

1.5.3 Fab

TAR1-5又はTAR1-5-19を含む二量体をFab発現ベクター内に再構築した。dAbを、CK又はCH遺伝子のどちらかを含む発現ベクター内に、Sfi1及びNot1制限部位を用いてクローニングし、配列解析によって確認した。CKベクターはpUCに基づくアンピシリン耐性ベクターに由来し、CHベクターはpACYCクロラムフェニコール耐性ベクターに由来する。Fab発現には、dAb-CH及びdAb-CK構築体をHB2151細胞内に同時形質転換させ、0.1%のグルコース、100μg/mlのアンピシリン及び10μg/mlのクロラムフェニコールを含む2×TY中で増殖させた。

【０４９６】

1.5.3 ヒンジ二量体化

システイン結合の形成によるdAbの二量体化を検査した。ヒトIgGC1ヒンジの改変型であるアミノ酸EPKSGDKTHTCPPCPの短い配列を、dAb上のC末端領域で操作した。この配列をコードしているオリゴリンカーを合成し、前述のようにアニーリングした。リンカーを、TAR1-5-19を含むpEDAベクター内に、Xho1及びNot1制限部位を用いてクローニングした。二量体化はin situでペリプラズム中に生じた。

【０４９７】

1.6 発現及び精製

1.6.1 発現

前述のように、上清を2mlの96ウェルプレート形態中で初期スクリーニング用に調製した。初期スクリーニングプロセスの後、選択した二量体をさらに分析した。二量体構築体をTOP10F'又はHB2151細胞中で上清として発現させた。手短に述べると、新しく画線したプレートからの個々のコロニーを終夜37℃で、100μg/mlのアンピシリン及び1%のグルコースを含む2×TY中で増殖させた。この培養物の1/100希釈を100μg/mlのアンピシリン及び0.1%のグルコースを含む2×TYに接種し、37℃、振盪下で、OD600が約0.9となるまで増殖させた。その後、培養物を、1mMのIPTGを用いて終夜30℃で誘導した。細胞を遠心分離によって除去し、上清をプロテインA又はLアガロースで精製した。

【０４９８】

Fab及びシステインヒンジ二量体は、HB2152細胞中でペリプラズムタンパク質として発現された。終夜培養物の1/100希釈液を、0.1%のグルコース及び適切な抗生物質を含む2×TYに接種し、30℃、振盪下で、OD600が約0.9となるまで増殖させた。その後、培養物を、1mMのIPTGを用いて3～4時間25℃で誘導した。細胞を遠心分離によって収集し、ペレットをペリプラズム調製バッファー(30mMのトリス-HCl、pH8.0、1mMのEDTA、20%のスクロース)に再懸濁させた。遠心分離後、上清を保持し、ペレットを5mMの$MgSO_4$に再懸濁させた。上清を遠心分離によって再度収集し、プールし、精製した。

【０４９９】

1.6.2 プロテインA/L精製

プロテインLアガロース(Affitech、ノルウェー)又はプロテインAアガロース(Sigma、英国)からの二量体タンパク質の精製の最適化を検査した。タンパク質を、蠕動ポンプを用

いてバッチによって又はカラム溶出によって溶出させた。三つのバッファー、即ち0.1Mのリン酸-クエン酸バッファー、pH2.6、0.2Mのグリシン、pH2.5及び0.1Mのグリシン、pH2.5を検査した。最適条件は、0.1Mのグリシン、pH2.5を10倍カラム体積にわたって使用する蠕動ポンプ条件下であることが決定された。プロテインAからの精製を、0.1Mのグリシン、pH2.5を用いて蠕動ポンプ条件で実施した。

【０５００】

1.6.3 FPLC精製

さらなる精製を、AKTA Explorer100システム(Amersham Biosciences Ltd)上のFPLC分析によって実施した。TAR1-5及びTAR1-5-19二量体を、50mMの酢酸バッファー、pH4中の0～1MのNaCl勾配で溶出させる陽イオン交換クロマトグラフィー(1mlのResource S-Amersham Biosciences Ltd)によって分画した。ヒンジ二量体を、25mMトリスHCl、pH8.0中の0～1MのNaCl勾配で溶出させるイオン交換(1mlのResource Q Amersham Biosciences Ltd)によって精製した。Fabを、0.05%のtweenを含むPBS中で0.5ml/分の流速で流すsuperose12(Amersham Biosciences Ltd)カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。精製後、vivaspinの5Kカットオフの濃縮器(Vivascience Ltd)を用いて試料を濃縮した。

【０５０１】

2.0 結果

2.1 TAR1-5二量体

6×96個のクローンを、すべてのライブラリー及び選択条件を包含する第2ラウンドの選択から拾った。上清調製物を作製し、抗原及びプロテインL ELISA、Biacore並びに受容体アッセイによってアッセイした。ELISAでは、陽性結合クローンをそれぞれの選択方法から同定し、3U、5U及び7Uのライブラリーの間で分布していた。しかし、ガイドdAbが常に存在しているため、この方法によって高親和性及び低親和性の結合剤を判別することは可能でなく、したがって、Biacore分析を実施した。

【０５０２】

2mlの上清を用いてBiacore分析を実施した。Biacore分析により、二量体のKoff速度が単量体TAR1-5と比較して大いに向上していたことが明らかとなった。単量体のKoff速度は10^{-1}Mの範囲であり、それと比較して、二量体のKoff速度は10^{-3}～10^{-4}Mの範囲であった。非常に遅い解離速度を有すると見られる16個のクローンを選択し、これらは3U、5U及び7Uのライブラリー由来であり、配列を決定した。さらに、上清を、受容体アッセイにおいてヒトTNFαを中和する能力について分析した。

【０５０３】

これらのアッセイにおいて中和させ、配列を決定した6個の先導クローン(以下のd1～d6)。結果は、得られた6個のクローンのうち、三つの異なる第2のdAb(dAb1、dAb2及びdAb3)しか存在しないことを示している。しかし、第2のdAbが複数回見つかる場合、これらは異なる長さのリンカーと連結している。

【０５０４】

TAR1-5d1:3Uリンカー、第2のdAb=dAb1-1μg/mlのAgイムノチューブ、終夜洗浄
TAR1-5d2:3Uリンカー、第2のdAb=dAb2-1μg/mlのAgイムノチューブ、終夜洗浄
TAR1-5d3:5Uリンカー、第2のdAb=dAb2-1μg/mlのAgイムノチューブ、終夜洗浄
TAR1-5d4:5Uリンカー、第2のdAb=dAb3-20μg/mlのAgイムノチューブ、終夜洗浄
TAR1-5d5:5Uリンカー、第2のdAb=dAb1-20μg/mlのAgイムノチューブ、終夜洗浄
TAR1-5d6:7Uリンカー、第2のdAb=dAb1-R1:1μg/mlのAgイムノチューブ、終夜洗浄、R2:ビーズ

6個の先導クローンをさらに検査した。タンパク質をペリプラズム及び上清から産生させ、プロテインLアガロースで精製し、細胞及び受容体のアッセイで検査した。中和のレベルは変動的であった(表1)。タンパク質調製の最適条件を決定した。HB2151細胞から上清として産生されたタンパク質が最も高い収率を与えた(約10mg/培養物1L)。上清をプロテインLアガロースと共に2時間、室温で、又は終夜4℃でインキュベーションした。ビーズをPBS/NaClで洗浄し、蠕動ポンプを用いてFPLCカラム上に詰めた。ビーズを10倍カラム

体積のPBS/NaClで洗浄し、0.1Mのグリシン、pH2.5で溶出させた。一般に、二量体タンパク質は単量体の後に溶出される。

【０５０５】

TAR1-5d1-6二量体をFPLCによって精製した。FPLC精製によって三つの種が得られ、SDS PAGEによって同定した。一つの種は単量体に対応し、他の二つの種が異なる大きさの二量体に対応する。二つの種のうちの大きい方は、C末端タグの存在が原因である可能性がある。これらのタンパク質を受容体アッセイで検査した。表1に示すデータは、二つの二量体種から得られた最適結果を表す(図11)。

【０５０６】

二量体対からの三つの第2のdAb(即ち、dAb1、dAb2及びdAb3)を単量体としてクローニングし、ELISA並びに細胞及び受容体のアッセイで検査した。三つのdAbすべてが、抗原ELISAによってTNFと特異的に結合し、プラスチック又はBSAと交差反応しない。単量体としては、dAbはどれも細胞又は受容体アッセイにおいて中和しなかった。

【０５０７】

2.1.2 TAR1-5-19二量体

6個の先導クローン中でTAR1-5-19をTAR1-5で置換した。細胞及び受容体のアッセイにおけるすべてのTAR1-5-19二量体の分析は、別段に記述しない限りは、全タンパク質(プロテインL精製のみ)で実施した(表2)。TAR1-5-19d4及びTAR1-5-19d3は細胞アッセイにおいて最良のND_{50}(約5nMまで)を有しており、これは受容体アッセイの結果と一貫性があり、TAR1-5-19単量体(約30nMまでのND_{50})を超える改善である。精製したTAR1-5二量体は受容体及び細胞のアッセイにおいて変動的な結果を与えるが、TAR1-5-19二量体はより一貫していた。タンパク質精製中に異なる溶出バッファーを使用した場合は変動が示された。0.1Mのリン酸-クエン酸バッファー、pH2.6又は0.2Mのグリシン、pH2.5を用いた溶出は、すべてのタンパク質をプロテインLアガロースから除去するが、ほとんどの場合、機能的がより低いものが得られた。

【０５０８】

TAR1-5-19d4を発酵槽中で発現させ、陽イオン交換FPLCで精製して、完全に純粋な二量体が得られた。TAR1-5d4と同様に、FPLC精製によって単量体及び二つの二量体種に対応する三つの種が得られた。この二量体のアミノ酸を配列決定した。その後、TAR1-5-19単量体及びTAR1-5-19d4を受容体アッセイで検査し、生じたIC50は単量体で30nM、二量体では8nMであった。TAR1-5-19単量体、TAR1-5-19d4及びTAR1-5d4を比較する受容体アッセイの結果を図10に示す。

【０５０９】

TAR1-5-19ホモ二量体を3U、5U及び7Uのベクター中で作製し、発現させ、プロテインLで精製した。タンパク質を細胞及び受容体のアッセイで検査し、生じたIC_{50}(受容体アッセイ)及びND_{50}(細胞アッセイ)を決定した(表3、図12)。

【０５１０】

2.2 Fab

TAR1-5及びTAR1-5-19二量体もFab形態内にクローニングし、発現させ、プロテインLアガロースで精製した。Fabを受容体アッセイで評価した(表4)。結果により、TAR1-5-19及びTAR1-5二量体のどちらにおいても、中和レベルは、それらが由来する最初のGly_4Serリンカー二量体と同様であったことが示された。TAR1-5-19がCH及びCKにどちら上にも提示されたTAR1-5-19 Fabを発現させ、プロテインLで精製し、受容体アッセイで評価した。生じたIC50は約1nMであった。

【０５１１】

2.3 TAR1-27二量体

3×96個のクローンを、すべてのライブラリー及び選択条件を包含する第2ラウンドの選択から拾った。2mlの上清調製物を、ELISA及びバイオアッセイで分析するために作製した。抗原ELISAにより71個の陽性クローンが得られた。粗上清の受容体アッセイにより、阻害特性(TNF結合0～60%)を有する42個のクローンが得られた。多くの場合、阻害特性は強

力なELISAシグナルと相関していた。42個のクローンの配列を決定し、そのうちの39個が固有の第2のdAb配列を有する。最良の阻害特性を示した12個の二量体をさらに分析した。

【０５１２】

12個の中和クローンを200mlの上清調製物として発現させ、プロテインLで精製した。これらをプロテインL及び抗原ELISA、Biacore並びに受容体アッセイで評価した。強力な陽性ELISAシグナルがすべての場合で得られた。Biacore分析により、すべてのクローンが速い会合及び解離速度を有することが明らかとなった。解離速度は単量体のTAR1-27と比較して向上していたが、TAR1-27二量体の解離速度(Koffは大体10^{-1}～10^{-2}Mの範囲)は、以前に検査したTAR1-5二量体(Koffは大体10^{-3}～10^{-4}Mの範囲)よりも速かった。精製した二量体の安定性が疑われたため、安定性を改善するために、5%グリセロール、0.5%のTriton×100又は0.5%のNP40(Sigma)上の添加を、二つのTAR1-27二量体(d2及びd16)の精製に含めた。NP40又はTriton×100(商標)の添加は、精製産物の収率を約2倍向上させた。どちらの二量体も受容体アッセイで評価した。TAR1-27d2は、すべての精製条件下で約30nMまでのIC50を与えた。TAR1-27d16は、安定化剤を使用せずに精製した場合に中和効果を示さなかったが、安定化条件下で精製した場合に約50nMまでのIC50を与えた。さらなる分析は実施しなかった。

【０５１３】

2.4 TAR2-5二量体

3×96個のクローンを、すべてのライブラリー及び選択条件を包含する第2ラウンドの選択から拾った。2mlの上清調製物を分析するために作製した。プロテインA及び抗原ELISAをそれぞれのプレートで実施した。30個の興味深いクローンを、Biacoreによって良好な解離速度を有するものとして同定した(10^{-2}～10^{-3}MのKoff範囲)。クローンの配列を決定し、13個の固有の二量体を配列解析によって同定した。

【表１】

表1:TAR1-5二量体

二量体	細胞型	精製	タンパク質画分	溶出条件	受容体/細胞アッセイ
TAR1-5d1	HB2151	プロテインL+FPLC	小さな二量体種	0.1Mのグリシン pH2.5	RA約30nM
TAR1-5d2	HB2151	プロテインL+FPLC	小さな二量体種	0.1Mのグリシン pH2.5	RA約50nM
TAR1-5d3	HB2151	プロテインL+FPLC	大きな二量体種	0.1Mのグリシン pH2.5	RA約300nM
TAR1-5d4	HB2151	プロテインL+FPLC	小さな二量体種	0.1Mのグリシン pH2.5	RA約3nM
TAR1-5d5	HB2151	プロテインL+FPLC	大きな二量体種	0.1Mのグリシン pH2.5	RA約200nM
TAR1-5d6	HB2151	プロテインL+FPLC	大きな二量体種	0.1Mのグリシン pH2.5	RA約100nM

*注記:二量体2及び二量体3は同一の第2のdAb(dAb2と呼ばれる)を有するが、異なるリンカー長を有する(d2=$(Gly_4Ser)_3$、d3=$(Gly_4Ser)_3$)。dAb1は二量体1、5及び6のパートナーdAbである。dAb3は二量体4のパートナーdAbである。パートナーdAbはどれも単独では中和しない。FPLC精製は、別段に記述しない限りは陽イオン交換による。FPLCによって得られたそれぞれの二量体に最適な二量体種をこれらのアッセイで決定した。

【０５１４】

【表２】

表2:TAR1-5-19二量体

二量体	細胞型	精製	タンパク質画分	溶出条件	受容体/細胞アッセイ
TAR1-5-19d1	TOP10F'	プロテインL	全タンパク質	0.1Mのグリシン pH2.0	RA約15nM
TAR1-5-19d2 (ストップコドンなし)	TOP10F'	プロテインL	全タンパク質	0.1Mのグリシン pH2.0+ 0.05%NP40	RA約2nM
TAR1-5-19d3 (ストップコドンなし)	TOP10F'	プロテインL	全タンパク質	0.1Mのグリシン pH2.5+ 0.05%NP40	RA約8nM
TAR1-5-19d4	TOP10F'	プロテインL+ FPLC	FPLC精製した画分	0.1Mのグリシン pH2.0	RA約2-5nM CA約12nM
TAR1-5-19d5	TOP10F'	プロテインL	全タンパク質	0.1Mのグリシン pH2.0+NP40	RA約8nM CA約10nM
TAR1-5-19d6	TOP10F'	プロテインL	全タンパク質	0.1Mのグリシン pH2.0	RA約10nM

【０５１５】

【表３】

表3:TAR1-5-19ホモ二量体

二量体	細胞型	精製	タンパク質画分	溶出条件	受容体/細胞アッセイ
TAR1-5-19 3U ホモ二量体	HB2151	プロテインL	全タンパク質	0.1Mのグリシン pH2.5	RA約20nM CA約30nM
TAR1-5-19 5U ホモ二量体	HB2151	プロテインL	全タンパク質	0.1Mのグリシン pH2.5	RA約2nM CA約3nM
TAR1-5-19 7U ホモ二量体	HB2151	プロテインL	全タンパク質	0.1Mのグリシン pH2.5	RA約10nM CA約15nM
TAR1-5-19 cysヒンジ	HB2151	プロテインL+ FPLC	FPLC精製した二量体画分	0.1Mのグリシン pH2.5	RA約2nM
TAR1-5-19CH/ TAR1-5-19 CK	HB2151	タンパク質	全タンパク質	0.1Mのグリシン pH2.5	RA約1nM

【０５１６】

【表４】

表4:TAR1-5/TAR1-5-19 Fab

二量体	細胞型	精製	タンパク質画分	溶出条件	受容体/細胞アッセイ
TAR1-5CH/ dAb1 CK	HB2151	プロテインL	全タンパク質	0.1Mのクエン酸 pH2.6	RA約90nM
TAR1-5CH/ dAb2 CK	HB2151	プロテインL	全タンパク質	0.1Mのグリシン pH2.5	RA約30nM CA約60nM
dAb3CH/ TAR1-5CK	HB2151	プロテインL	全タンパク質	0.1Mのクエン酸 pH2.6	RA約100nM
TAR1-5-19CH/ dAb1 CK	HB2151	プロテインL	全タンパク質	0.1Mのグリシン pH2.0	RA約6nM
dAb1 CH/ TAR1-5-19CK	HB2151	プロテインL	0.1Mのグリシン pH2.0	Myc/flag	RA約6nM
TAR1-5-19CH/ dAb2 CK	HB2151	プロテインL	全タンパク質	0.1Mのグリシン pH2.0	RA約8nM CA約12nM
TAR1-5-19CH/ dAb3CK	HB2151	プロテインL	全タンパク質	0.1Mのグリシン pH2.0	RA約3nM

実施例７

【０５１７】

末端システイン結合によるdAb二量体化

概要

dAbの二量体化には、遊離システインをタンパク質のC末端で操作した。発現された際、タンパク質は二量体を形成し、これを二ステップの精製方法によって精製することができる。

【０５１８】

TAR1-5-19CYS二量体のPCR構築

dAb三量体を記載している実施例8を参照されたい。三量体のプロトコルは、単量体、二量体及び三量体の混合物を生じる。

【０５１９】

TAR1-5-19CYS二量体の発現及び精製

実施例8に概要を示すように、二量体を培養物の上清から、プロテインLアガロースで捕捉することによって精製した。

【０５２０】

TAR1-5-19CYS二量体からのTAR1-5-19CYS単量体の分離

陽イオン交換分離の前に、PD-10カラム(Amersham Pharmacia)を用いて製造者の指針に従って、混合単量体/二量体試料を、50mMの酢酸ナトリウムバッファー、pH4.0にバッファー交換した。その後、試料を、50mMの酢酸ナトリウム、pH4.0で事前に平衡化した、1mLのResource S陽イオン交換カラム(Amersham Pharmacia)に施用した。50mMの酢酸ナトリウム、pH4.0中の以下の塩勾配を用いて単量体及び二量体を分離した:

15倍カラム体積にわたる150～200mMの塩化ナトリウム

10倍カラム体積にわたる200～450mMの塩化ナトリウム

15倍カラム体積にわたる450～1000mMの塩化ナトリウム

二量体のみを含む画分を、SDS-PAGEを用いて同定し、その後、プールし、1/5体積の1Mのトリス、pH8.0を加えることによってpHを8まで上げた。

【０５２１】
in vitro機能的結合アッセイ:TNF受容体アッセイ及び細胞アッセイ
ヒトTNFαに対する二量体の親和性を、TNF受容体及び細胞のアッセイを用いて決定した。受容体アッセイのIC50約0.3～0.8nMであり、細胞アッセイのND50は約3～8nMであった。
【０５２２】
他の可能なTAR1-5-19CYS二量体形態
PEG二量体及びカスタム合成マレイミド二量体
Nektar(Shearwater)は、単量体が二量体として構築されることを可能にして、小さなリンカーがdAbを隔離し、どちらも5～40Kdaの範囲の大きさのPEGと連結される、様々な二重マレイミドPEG[mPEG2-(MAL)2又はmPEG-(MAL)2]を提供している。5KdaのmPEG-(MAL)2(即ち、マレイミドが二量体中で一緒に連結されている[TAR1-5-19]-Cys-マレイミド-PEG×2)が、TNF受容体アッセイにおいて約1～3nMまでの親和性を有することが示されている。また、二量体は、TMEA(トリス[2-マレイミドエチル]アミン)(Pierce Biotechnology)又は他の二重官能性リンカーを用いても生成することができる。
【０５２３】
また、2,2'-ジチオジピリジン(Sigma Aldrich)及び還元した単量体を用いた化学的カップリング手順を使用してジスルフィド二量体を生成することも可能である。
【０５２４】
DAbのC末端へのポリペプチドリンカー又はヒンジの付加。
【０５２５】
小さなリンカーである$(Gly_4Ser)_n$[式中、n=1～10、例えば、1、2、3、4、5、6若しくは7である]、又は免疫グロブリン(例えば、IgGヒンジ領域若しくはランダムペプチド配列(例えばランダムペプチド配列のライブラリーから選択される)のどちらかを、dAbと末端システイン残基との間に操作することができる。その後、これを使用して、上記概要を示したように二量体を作製することができる。
実施例８
【０５２６】
dAb三量体化
概要
dAbの三量体化には、遊離システインがタンパク質のC末端に必要である。システイン残基は、還元されて遊離チオールを与えた後、タンパク質を三量体マレイミド分子、例えばTMEA(トリス[2-マレイミドエチル]アミン)と特異的にカップリングさせるために使用することができる。
【０５２７】
TAR1-5-19CYSのPCR構築
以下のオリゴヌクレオチドを、クローニング用のSalI及びBamHI部位を有するTAR1-5-19の特異的なPCRを行うために、また、C末端システイン残基を導入するために使用した:

【化２】

```
                SalI
                ~~~~~~~~
     Trp Ser Ala Ser Thr Asp* Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
  1  TGG AGC GCG TCG ACG GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCT CTG TCT GCA TCT GTA
     ACC TCG CGC AGC TGC CTG TAG GTC TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGA GAC AGA CGT AGA CAT

     Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr Leu His Trp
 61  GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT GAT AGT TAT TTA CAT TGG
     CCT CTG GCA CAG TGG TAG TGA ACG GCC CGT TCA GTC TCG TAA CTA TCA ATA AAT GTA ACC

     Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln
121  TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AGT GCA TCC GAG TTG CAA
     ATG GTC GTC TTT GGT CCC TTT CGG GGA TTC GAG GAC TAG ATA TCA CGT AGG CTC AAC GTT

     Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
181  AGT GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC
     TCA CCC CAG GGT AGT GCA AAG TCA CCG TCA CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG TGG TAG

     Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro
241  AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG GTT GTG TGG CGT CCT
     TCG TCA GAC GTT GGA CTT CTA AAA CGA TGC ATG ATG ACA GTT GTC CAA CAC ACC GCA GGA
                                                          BamHI
                                                          ~~~~~~~~
     Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Cys *** *** Gly Ser Gly
301  TTT ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG TGC TAA TAA GGA TCC GGC
     AAA TGC AAG CCG GTT CCC TGG TTC CAC CTT TAG TTT GCC ACG ATT ATT CCT AGG CCG
```

(*TAR1-5-19CYS配列の開始点)

【０５２８】

順方向プライマー

5'-TGGAGCGCGTCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCA-3'

逆方向プライマー

5'-TTAGCAGCCGGATCCTTATTAGCACCGTTTGATTTCCAC-3'

PCR反応(50μL体積)を以下のとおりに設定した:200μMのdNTP、0.4μMのそれぞれのプライマー、5μLの10×PfuTurboバッファー(Stratagene)、100ngの鋳型プラスミド(TAR1-5-19をコードしている)、1μLのPfuTurbo　酵素(Stratagene)及び滅菌水を使用して体積を50μLに調整した。以下のPCR条件を使用した:最初の変性ステップを94℃で2分間、その後、25サイクルの94℃で30秒間、64℃で30秒間及び72℃で30秒間。72℃で5分間の最終的な伸長ステップも含めた。PCR産物を精製し、SalI及びBamHIで消化し、やはり同じ制限酵素で切断したベクター内にライゲーションした。正しいクローンをDNA配列決定によって確認した。

【０５２９】

TAR1-5-19CYSの発現及び精製

TAR1-5-19CYSベクターを、製造者のプロトコルに従って、BL21(DE3)pLysS化学的コンピテント細胞(Novagen)内に形質転換させた。dAbプラスミドを保有する細胞を、100μg/mLのカルベニシリン及び37μg/mLのクロラムフェニコールを用いて選択した。500mLのterrificブロス(Sigma-Aldrich)、100μg/mLのカルベニシリン及び37μg/mLのクロラムフェニコールを含む2Lのバッフルフラスコ中に培養を設定した。培養物を30℃、200rpmで、O.D.600が1～1.5となるまで増殖させ、その後、1mMのIPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド、Melford Laboratories)を用いて誘導した。dAbの発現を12～16時間、30℃で

続けた。dAbのほとんどが培養培地中に存在することが判明した。したがって、細胞を培地から遠心分離(8,000×gで30分間)によって分離し、上清を使用してdAbを精製した。上清1リットルあたり30mLのプロテインLアガロース(Affitech)を加え、dAbを攪拌しながら2時間バッチ結合させた。その後、樹脂を重力下でさらに1時間沈降させ、上清をサイホンによって除去した。その後、アガロースをXK50カラム(Amersham Pharmacia)に詰め、10倍カラム体積のPBSで洗浄した。結合したdAbは100mMのグリシン、pH2.0で溶出され、その後、1/5倍体積の1Mのトリス、pH8.0を加えることによってタンパク質含有画分を中和した。培養上清1リットルあたり20mgの純粋タンパク質が単離され、これは、単量体及び二量体を50:50の比で含んでいた。

【０５３０】

TAR1-5-19CYSの三量体化

2.5mlの100μMのTAR1-5-19CYSを5mMのジチオスレイトールで還元し、室温で20分間静置した。その後、PD-10カラム(Amersham Pharmacia)を用いて試料のバッファー交換を行った。カラムは5mMのEDTA、50mMのリン酸ナトリウム、pH6.5で事前に平衡化し、製造者の指針に従って試料を施用して溶出させた。試料を必要時まで氷上に置いた。TMEA(トリス[2-マレイミドエチル]アミン)はPierce Biotechnologyから購入した。20mMのストック溶液のTMEAを100%のDMSO(ジメチルスルホキシド)中で作製した。3:1(dAb:TMEAのモル比)を超えるTMEA濃度は、タンパク質の急速な沈殿及び架橋結合を引き起こすことが判明した。また、沈殿及び架橋結合の速度はpHの増加に伴って上昇した。したがって、100μMの還元したTAR1-5-19CYSを用いて、25μMのTMEAを加えてタンパク質を三量体化させ、反応を室温で2時間進行させた。グリセロール又はエチレングリコールなどの添加剤を20%(v/v)まで添加することで、カップリング反応の進行に伴う三量体の沈殿が顕著に減少することが判明した。カップリング後、SDS-PAGE分析により、溶液中に単量体、二量体及び三量体の存在が示された。

【０５３１】

三量体TAR1-5-19CYSの精製

pHを約4まで下げるために、1mLのTMEA-TAR1-5-19cys反応あたり40μLの40%の氷酢酸を加えた。その後、試料を、50mMの酢酸ナトリウム、pH4.0で事前に平衡化した、1mLのResource S陽イオン交換カラム(Amersham Pharmacia)に施用した。二量体及び三量体を、30倍カラム体積にわたる340～450mMの塩化ナトリウム、50mMの酢酸ナトリウム、pH4.0の塩勾配を用いて部分的に分離した。三量体のみを含む画分を、SDS-PAGEを用いて同定し、その後、プールし、1/5倍体積の1Mのトリス、pH8.0を加えることによってpHを8まで上げた。濃縮ステップ(5Kのカットオフの Viva spin濃縮器を使用;Vivascience)中の三量体の沈殿を防止するために、10%のグリセロールを試料に加えた。

【０５３２】

in vitro機能的結合アッセイ:TNF受容体アッセイ及び細胞アッセイ

ヒトTNFαに対する三量体の親和性を、TNF受容体及び細胞のアッセイを用いて決定した。受容体アッセイのIC50は0.3nMであり、細胞アッセイのND50は3～10nMの範囲(例えば3nM)であった。

【０５３３】

他の可能なTAR1-5-19CYS三量体形態

TAR1-5-19CYSも以下の試料を用いて三量体に構築し得る。

【０５３４】

PEG三量体及びカスタム合成マレイミド三量体

Nektar(Shearwater)は、PEGの末端で化学修飾することができる様々な多重アームPEGを提供している。したがって、それぞれのアームの末端にマレイミド官能基を有するPEG三量体を使用することで、TMEAを使用する上記概要を示した様式と同様に、dAbの三量体化が可能となる。また、PEGは、三量体の溶解度を増加させることで、凝集の問題を防止するという利点も有し得る。したがって、それぞれのdAbがマレイミド官能基に連結しているC末端システインを有し、マレイミド官能基がPEG三量体と連結している、dAb三量体を

生成することができる。

【０５３５】

DAbのC末端へのポリペプチドリンカー又はヒンジの付加

小さなリンカーである$(Gly_4Ser)_n$[式中、n=1～10、例えば、1、2、3、4、5、6又は7]、免疫グロブリン(例えば、IgGヒンジ領域又はランダムペプチド配列(例えば、ランダムペプチド配列のライブラリーから選択される)のどちらかを、dAbと末端システイン残基との間に操作することができる。多量体(例えば、二量体又は三量体)を作製するために使用する場合、これにより、ここでもより高い度合の可撓性及び個々の単量体間の距離が導入され、これは、標的、例えば、ヒトTNFαなどの多サブユニット標的に対する結合特徴が改善させ得る。

実施例９

【０５３６】

ヒト血清アルブミン(HSA)及びマウス血清アルブミン(MSA)に対する単一ドメイン抗体(dAb)のコレクションの選択

本実施例では、血清アルブミンに対する単一ドメイン抗体(dAb)を作製する方法を説明する。マウス血清アルブミン(MSA)及びヒト血清アルブミン(HSA)の両方に対するdAbの選択を記載する。三つのヒトファージディスプレイ抗体ライブラリーを本実験で使用し、それぞれが、NNKコドンによってコードされている側鎖多様性が相補性決定領域(CDR1、CDR2及びCDR3)内に組み込まれている、V_H(図13参照:ダミーV_Hの配列はV3-23/DP47及びJH4bに基づく)又はV_κ(図15参照:ダミーV_κの配列はo12/o2/DPK9及びJk1に基づく)の単一ヒトフレームワークに基づく。

【０５３７】

ライブラリー1(V_H):

以下の位置での多様性:H30、H31、H33、H35、H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H97、H98。

【０５３８】

ライブラリーの大きさ:6.2×10^9個

ライブラリー2(V_H):

以下の位置での多様性:H30、H31、H33、H35、H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H97、H98、H99、H100、H100a、H100b。

【０５３９】

ライブラリーの大きさ:4.3×10^9個

ライブラリー3(V_κ):

以下の位置での多様性:L30、L31、L32、L34、L50、L53、L91、L92、L93、L94、L96

ライブラリーの大きさ:2×10^9個

V_H及びV_κライブラリーは、未選択のライブラリー中の大多数のクローンが機能的であるように、包括的リガンドであるプロテインA及びプロテインLとの結合についてそれぞれ事前に選択されている。上記のライブラリーの大きさは、事前選択後の大きさに対応する。

【０５４０】

それぞれのライブラリーを別々に使用して、2回のラウンドの選択を血清アルブミンで行った。それぞれの選択について、抗原を4mlのPBS中、100μg/mlの濃度で、イムノチューブ(nunc)上にコーティングした。第1ラウンドの選択では、三つのライブラリーのそれぞれを、HSA(Sigma)及びMSA(Sigma)に対して別々にパニングした。第2ラウンドの選択では、6個の第1ラウンドの選択のそれぞれからのファージを、(i)再度同じ抗原(例えば、第1ラウンドでMSA、第2ラウンドでMSA)及び(ii)相反の抗原(例えば、第1ラウンドでMSA、第2ラウンドでHSA)に対してパニングし、12個の第2ラウンドの選択が生じた。それぞれの場合において、第2ラウンドの選択後、48個のクローンをHSA及びMSAとの結合について試験した。Harrison他、Methods Enzymol.1996;267:83-109によってscFv断片について記載されているように可溶性dAb断片を産生し、2%のtween PBSを遮断バッファーとして使用し、

結合したdAbをプロテインL-HRP(Sigma)(V_κ用)及びプロテインA-HRP(Amersham Pharmacia Biotech)(V_H用)のどちらかで検出した以外は、標準のELISAプロトコルに従った(Hoogenboom他(1991)Nucleic Acids Res.、19:4133)。

【０５４１】

MSA、HSA又は両方との結合を示す、バックグラウンドより高いシグナルを与えたdAbを、プラスチック単独と結合することについてELISA不溶型(ELISA insoluble)で試験したが、すべてが血清アルブミンに対して特異的であった。その後、クローンの配列を決定し(表5参照)、21個の固有のdAb配列が同定されたことが明らかとなった。選択されたV_κdAbクローン間の最小の類似度(アミノ酸レベル)は、86.25%であった((69/80)×100;すべての多様化した残基が異なる場合の結果、例えばクローン24と34)。選択されたV_HdAbクローン間の最小の類似度は、94%であった((127/136)×100)。

【０５４２】

次に、血清アルブミンと結合するdAbを、ビオチン標識した抗原を溶液から捕捉するその能力について試験した。ELISAプレートを1μg/mlのプロテインL(V_κクローン用)及び1μg/mlのプロテインA(V_Hクローン用)でコーティングした以外は、ELISAプロトコル(上記)に従った。プロトコルに記載のように可溶性dAbを溶液から捕捉し、ビオチン標識したMSA又はHSA及びストレプトアビジンHRPを用いて検出した。ビオチン標識したMSA及びHSAは、血清アルブミン分子1個あたり平均して2個のビオチンを達成することを目的として、製造者の指示に従って調製したものである。ELISAで、ビオチン標識したMSAを溶液から捕捉する24個のクローンが同定された、表5。これらのうちの2個(以下のクローン2及び38)は、ビオチン標識したHSAも捕捉した。次に、dAbを、CM5 Biacoreチップ上にコーティングしたMSAと結合するその能力について試験した。BiacoreでMSAと結合するクローンが8個見つかった。

【表５】

表5

dAb(すべてビオチン標識したMSAを捕捉)	H又はκ	CDR1	CDR2	CDR3	BiacoreでMSAと結合	ビオチン標識したHSAを捕捉
V_κライブラリー3鋳型(ダミー)	κ	XXXLX	XASXLQS	QQXXXXPXT		
2、4、7、41、	κ	SSYLN	RASPLQS	QQTYSVPPT		✓4個すべてが結合
38、54	κ	SSYLN	RASPLQS	QQTYRIPPT		✓両方が結合
46、47、52、56	κ	FKSLK	NASYLQS	QQVVYWPVT		
13、15	κ	YYHLK	KASTLQS	QQVRKVPRT		
30、35	κ	RRYLK	QASVLQS	QQGLYPPIT		
19、	κ	YNWLK	RASSLQS	QQNVVIPRT		
22、	κ	LWHLR	HASLLQS	QQSAVYPKT		
23、	κ	FRYLA	HASHLQS	QQRLLYPKT		
24、	κ	FYHLA	PASKLQS	QQRARWPRT		
31、	κ	IWHLN	RASRLQS	QQVARVPRT		
33、	κ	YRYLR	KASSLQS	QQYVGYPRT		
34、	κ	LKYLK	NASHLQS	QQTTYYPIT		
53、	κ	LRYLR	KASWLQS	QQVLYYPQT		
11、	κ	LRSLK	AASRLQS	QQVVYWPAT	✓	
12、	κ	FRHLK	AASRLQS	QQVALYPKT	✓	
17、	κ	RKYLR	TASSLQS	QQNLFWPRT	✓	
18、	κ	RRYLN	AASSLQS	QQMLFYPKT	✓	
16、21	κ	IKHLK	GASRLQS	QQGARWPQT	✓	
25、26	κ	YYHLK	KASTLQS	QQVRKVPRT	✓	
27、	κ	YKHLK	NASHLQS	QQVGRYPKT	✓	
55、	κ	FKSLK	NASYLQS	QQVVYWPVT	✓	
V_Hライブラリー1(及び2)鋳型(ダミー)	H	XXYXXX	XIXXXGXXTXYADSVKG	XXXX(XXXX)FDY		
8、10	H	WVYQMD	SISAFGAKTLYADSVKG	LSGKFDY		
36、	H	WSYQMT	SISSFGSSTLYADSVKG	GRDHNYSLFDY		

【０５４３】

すべての場合で、フレームワークは対応するダミー配列中のフレームワークと同一であり、表5に示すようにCDR中に多様性を有していた。

【０５４４】

BiacoreでMSAと結合した8個のクローンのうち、大腸菌中で発現が高い2個のクローン(クローンMSA16及びMSA26)をさらなる研究用に選択した(実施例10参照)。MSA16及び26の完全なヌクレオチド及びアミノ酸配列を図16に示す。

実施例１０

【０５４５】

MSAと結合するdAb MSA16及びMSA26のマウスにおける親和性及び血清半減期の決定

米国特許第20060251644号に記載されているように、結合親和性を決定する一つの一般的な方法は、Biacore(商標)表面プラズモン共鳴システムを(Biacore,Inc.)用いて会合及び解離速度定数を評価することによる。標的の共有カップリングのために、バイオセンサーチップを製造者(Biacore)の指示書に従って活性化する。その後、標的を希釈し、チップ上に注入して、固定した物質の応答単位(RU)でシグナルを得る。RUで示すシグナルは固定した物質の質量に比例するため、これは、マトリックス上の固定した標的密度の範囲を表す。解離データを1サイトモデルに当てはめて、k_{off}+/-s.d.(測定値の標準偏差)が得られる。偽一次速度定数(Kd)をそれぞれの会合曲線について計算し、タンパク質濃度の関数としてプロットして、k_{on}+/-s.e.(当てはめの標準誤差)が得られる。結合の平衡解離定数Kdは、SPR測定値からk_{off}/k_{on}として計算する。

【０５４６】

dAb MSA16及びMSA26を大腸菌のペリプラズム中で発現させ、プロテインL-アガロース親和性樹脂(Affitech、ノルウェー)へのバッチ吸収、次いで、pH2.2のグリシンを用いた溶出を使用して精製した。その後、精製したdAbを、Kdを決定するために阻害Biacoreによって分析した。手短に述べると、高密度のMSAでコーティングしたBiacore CM5チップ上で200RUの応答を達成するために必要なdAbの濃度を決定するために、精製したMSA16及びMSA26を試験した。DAbの必要な濃度を決定した後、予測されるKd付近の濃度範囲のMSA抗原をdAbと事前に混合し、終夜インキュベーションした。その後、それぞれの事前混合物におけるMSAでコーティングしたBiacoreチップとdAbとの結合を30μl/分間の高流速で測定した。親和性は表面プラズモン共鳴(SPR)及びBiacore(Karlsson他、1991)を用いて決定した。Biacoreシステム(スウェーデンUppsala)は、結合親和性を決定するための好ましい方法である。Biacoreシステムは、生体分子の相互作用をリアルタイムで監視するために表面プラズモン共鳴(SPR、Welford K.1991、Opt.Quant.Elect.23:1;Morton及びMyszka、1998、Methods in Enzymology 295:268)を使用する。Biacore分析は、会合速度定数、解離速度定数、平衡解離定数、及び親和定数を好都合に生じる。生じる曲線を用いてクロッツプロット(Klotz,I.M.(1982)Science 217:1247-1249及びKlotz,I.M.(1983)J.Trends in Pharmacol.Sci.4:253-255)を作成し、これにより、MSA16で200nM及びMSA26で70nMのKdの推定値が与えられた(図17A及びB)。

【０５４７】

次に、クローンMSA16及びMSA26を、HAタグ(核酸配列:TATCCTTATGATGTTCCTGATTATGCA及びアミノ酸配列:YPYDVPDYA)を有する発現ベクター内にクローニングし、2～10mgの量を大腸菌中で発現させ、プロテインL-アガロース親和性樹脂(Affitech、ノルウェー)を用いて上清から精製し、pH2.2のグリシンで溶出させた。dAbの血清半減期をマウスにおいて決定した。MSA26及びMSA16を、約1.5mg/kgの単一の静脈内注射でCD1マウスに投薬した。血清レベルの分析は、ヤギ抗HA(Abcam、英国)捕捉及び4%のMarvelで遮断したプロテインL-HRP(invitrogen)検出ELISAによるものであった。洗浄は0.05%のtween PBSを用いて行った。試験試料との比較可能性を確実にするために、既知の濃度のdAbの検量線を、1×マウス血清の存在下で設定した。2区画モデルを用いたモデリングにより。MSA-26は0.16時間のt1/2α、14.5時間のt1/2β及び465時間・mg/mlの曲線下面積(AUC)であり(データ示さず)、MSA-16は0.98時間のt1/2α、36.5時間のt1/2β及び913時間・mg/mlのAUCであったことが示された(図18)。どちらの抗MSAクローンもHEL4(抗ニワトリ卵白リゾチームdAb)と比較して

相当に延長された半減期を有しており、0.06時間のt1/2α及び0.34時間のt1/2βであった。

実施例１１

【０５４８】

V_H-V_H及びV_κ-V_κ二重特異性Fab様断片の作製

本実施例では、V_H-V_H及びV_κ-V_κ二重特異性をFab様断片として作製する方法を記載する。記載するFab様断片のそれぞれを構築する前に、選択した標的と結合するdAbを、最初に、実施例9に記載したものと類似にdAbライブラリーから選択した。V_HdAbでは、鶏卵リゾチーム(Sigma)と結合するHEL4を単離し、TNFα受容体(R and D systems)と結合する第2のV_HdAb(TAR2h-5)も単離した。これらの配列は配列表に示す。TNFα(TAR1-5-19)と結合するV_κdAbを選択及び親和性成熟によって単離し、この配列も配列表に示す。配列を図17Bに示す実施例9に記載の第2のV_κdAb(MSA26)もこれらの実験で使用した。

【０５４９】

上述の四つのdAbを含む発現ベクターからのDNAを酵素SalI及びNotIで消化して、dAbをコードしているDNAを切除した。予測される大きさ(300～400bp)のバンドを、消化物をアガロースゲルに流してバンドを切除し、次いで、Qiagenゲル精製キット(Qiagen、英国)を用いてゲル精製することによって精製した。その後、dAbをコードしているDNAを、表6に示すように、C_H又はC_κベクター(図8及び9)のどちらかの中に挿入した。

【表６】

表6

dAb	標的抗原	dAbV_H又はdAbV_κ	ベクター内に挿入	タグ(C末端)	抗生物質耐性
HEL4	鶏卵リゾチーム	V_H	C_H	myc	クロラムフェニコール
TAR2-5	TNF受容体	V_H	C_κ	flag	アンピシリン
TAR1-5-19	TNFα	V_κ	C_H	myc	クロラムフェニコール
MSA26	マウス血清アルブミン	V_κ	C_κ	flag	アンピシリン

【０５５０】

V_HC_H及びV_HC_κ構築体をHB2151細胞内に同時形質転換させた。別に、$V_\kappa C_H$及び$V_\kappa C_\kappa$構築体をHB2151細胞内に同時形質転換させた。同時形質転換細胞系のそれぞれの培養物を終夜増殖させた(C_H及びC_κプラスミドの両方に対する抗生物質選択を維持するために5%のグルコース、10μg/mlのクロラムフェニコール及び100μg/mlのアンピシリンを含む2×Ty中で)。終夜培養物を用いて新鮮な培地(2×Ty、10μg/mlのクロラムフェニコール及び100μg/mlのアンピシリン)を接種し、OD0.7～0.9まで増殖させた後、IPTGを添加することによって誘導してそのC_H及びC_κ構築体を発現させた。その後、発現されたFab様断片を、ペリプラズムから、プロテインA精製(同時形質転換させたV_HC_H及びV_HC_κ用)及びMSA親和性樹脂精製(同時形質転換させた$V_\kappa C_H$及び$V_\kappa C_\kappa$用)によって精製した。

【０５５１】

V_H-V_H二重特異性

V_HC_H及びV_HC_κ二重特異性の発現を、タンパク質をゲル上に流すことによって試験した。ゲルをブロットし、Fab断片に予測される大きさのバンドは、mycタグ及びflagタグの両方によってウェスタンブロットで検出することができ、Fab様断片のV_HC_H及びV_HC_κ部分の両方が存在することが示された。次に、二重特異性の二つの半分が同一Fab様断片中に存在するかどうかを決定するために、ELISAプレートを、終夜4℃で、100μl/ウェルの鶏卵リゾチーム(HEL)を炭酸水素ナトリウムバッファー中に3mg/mlで用いてコーティングした。その後、プレートを2%のtween PBSで遮断し(実施例1に記載のように)、次いでV_HC_H/V_HC

$_{\kappa}$二重特異性Fab様断片とインキュベーションした。二重特異性とHELとの結合の検出は、9e10(mycタグと結合するモノクローナル抗体、Roche)及び抗マウスIgG-HRP(Amersham Pharmacia Biotech)を用いた非同族鎖によるものであった。V_HC_{κ}鎖を単独で発現させた場合のバックグラウンドシグナル0.069と比較して、V_HC_H/V_HC_{κ}二重特異性Fab様断片に対するシグナルは0.154であった。これは、Fab様断片が標的抗原に対して結合特異性を有することを実証している。

【０５５２】

V_{κ}-V_{κ}二重特異性

同時形質転換させた$V_{\kappa}C_H$及び$V_{\kappa}C_{\kappa}$二重特異性Fab様断片をMSA親和性樹脂で精製した後、生じたタンパク質を使用して、１μg/mlのTNFαでコーティングしたELISAプレート及び10μg/mlのMSAでコーティングしたELISAプレートをプローブした。予測どおり、どちらのELISAプレートでも、プロテインL-HRPで検出した場合にバックグラウンドより高いシグナルが存在した(データ示さず)。このことは、MSAと結合することができる(したがってMSA親和性カラムで精製される)タンパク質の画分は、続くELISAでTNFαとも結合することができることを示し、抗体断片の二重特異性が確認された。その後、このタンパク質の画分を二つの続く実験に使用した。第1に、１μg/mlのTNFαでコーティングしたELISAプレートを、二重特異性$V_{\kappa}C_H$及び$V_{\kappa}C_{\kappa}$ Fab様断片、及びELISA上で同様のシグナルを与えるように計算した濃度でdAbと結合する対照TNFαでプローブした。二重特異性及び対照dAbをどちらも用いて、2mg/mlのMSAの存在下及び不在下で、ELISAプレートをプローブした。二重特異性ウェルのシグナルは50%を超えて低下したが、dAbウェルのシグナルはまったく低下しなかった(図19a参照)。同じタンパク質を、MSAを用いた及び用いない受容体アッセイにも入れ、MSAによる競合も示された(図19c参照)。これは、MSAと二重特異性との結合が、TNFαとの結合と競合的であることを実証している。

実施例１２

【０５５３】

マウス血清アルブミン及びTNFαに対する特異性を有する、V_{κ}-V_{κ}二重特異性cys結合二重特異性の作製

本実施例では、ジスルフィド結合を介した化学的カップリングによる、マウス血清アルブミン及びTNFαの両方に特異的な二重特異性抗体断片を作製する方法を記載する。MSA16(実施例1から)及びTAR1-5-19 dAbの両方を、C末端システインを有しタグを有さないpETに基づくベクター内に再度クローニングした。二つのdAbを4～10mgのレベルで発現させ、上清からプロテインL-アガロース親和性樹脂(Affitiech、ノルウェー)を用いて精製した。その後、システインでタグ付けしたdAbをジチオスレイトールで還元した。その後、PEP1-5-19ホモ二量体の形成をもたらすジスルフィド結合の再形成を遮断するために、TAR1-5-19 dAbをジチオジピリジンとカップリングさせた。その後、二つの異なるdAbをpH6.5で混合して、ジスルフィド結合の形成及びTAR1-5-19、MSA16cys結合ヘテロ二量体の作製を促進した。二つの似ていないタンパク質のコンジュゲートを生成するこの方法は、最初にKing他によって記載されている(King TP、Li Y Kochoumian L Biochemistry.1978、第17巻:1499-506、分子間ジスルフィド結合の形成によるタンパク質コンジュゲートの調製(Preparation of protein conjugates via intermolecular disulfide bond formation))。ヘテロ二量体を単量体種から陽イオン交換によって分離した。分離は、SDSゲル上の予測される大きさのバンドの存在によって確認された。生じたヘテロ二量体種をTNF受容体アッセイで試験し、TNFの中和において約18nMのIC50を有することが判明した。次に、受容体アッセイを一定濃度のヘテロ二量体(18nM)並びにMSA及びHSAの希釈系列で繰り返した。ある濃度範囲(2mg/mlまで)のHSAの存在は、二量体がTNFαを阻害する能力の低下を引き起こさなかった。しかし、MSAの添加は、二量体がTNFαを阻害する能力の用量依存的な低下を引き起こした(図20)。このことは、MSA及びTNFαが、cys結合したTAR1-5-19、MSA16二量体との結合に対して競合することを実証している。

【０５５４】

データの概要

前述の実施例に記載した実験で得られたデータの概要を添付表4に記載する。

実施例１３

【０５５５】

様々な種由来の血清アルブミンとの結合に関するdAbの選択及び特徴づけ

ヒト血清アルブミン、マウス血清アルブミン及びブタ血清アルブミンに対するdAbを、プロトコルに以下の変更を加えた以外は抗MSA dAbについて既に記載したように選択した:合成V_Hドメインのファージライブラリーはライブラリー4G及び6Gであり、これは、VHではDP47生殖系列遺伝子及びJ_H4セグメントを含むヒトV_H3、VκではDPK9生殖系列遺伝子及びJκ1セグメントを含むヒト$V_κ$1に基づく。ライブラリーは1×10^{10}個の個々のクローンを含む。V_H及び$V_κ$ライブラリーのサブセットは、未選択のライブラリー中の大多数のクローンが機能的であるように、包括的リガンドであるプロテインA及びプロテインLとの結合についてそれぞれ事前に選択されている。上記のライブラリーの大きさは、事前選択後の大きさに対応する。

【０５５６】

V_H及び$V_κ$ライブラリーのサブセットを別々に使用して、2回又は3回の選択のラウンドをマウス、ブタ及びヒト血清アルブミンで行った。それぞれの選択において、抗原は、(i)4mlのPBS中、100μg/mlの濃度でイムノチューブ(nunc)上にコーティングした、又は(ii)ビオトチン標識し、その後、可溶性選択、次いでストレプトアビジンビーズ若しくはneutravidinビーズ上の捕捉に使用した。それぞれの場合において、第2又は第3ラウンドの選択後、選択からのDNAを発現ベクター内にクローニングして可溶性dAbを産生させ、個々のコロニーを拾った。Harrison他(Methods Enzymol.1996;267:83-109)によってscFv断片について記載されているように可溶性dAb断片を産生し、それぞれの選択について、96個の可溶性クローンを、様々な血清アルブミンとの結合について試験した。

【０５５７】

様々な種由来の血清アルブミンとの結合に関するクローンのスクリーニングは、Biacore表面プラズモン共鳴装置(Biacore AB)を用いて行った。CM-5 Biacoreチップを、様々な種由来の血清アルブミンで、フローセル2～4のそれぞれ上に、高密度にコーティングした。一つ又は複数の目的の血清アルブミンとの結合を示したdAbの配列を決定し、50mlスケールで発現させ、プロテインLで精製し、その後、低密度の血清アルブミンでフローセル2～4をコーティングしたCM-5 Biacoreチップ上の、血清アルブミンのパネルとの結合に関して、既知の濃度でスクリーニングした。様々な異なる種由来の血清アルブミンと結合するいくつかのdAbが見つかり、好ましい候補をその結合プロフィールと共に、表7に記載する。

【表７】

表7

	HSA (測定した場合は親和性)	RSA (測定した場合は親和性)	MSA (測定した場合は親和性)	カニクイザル (測定した場合は親和性)
DOM7h-9	結合する 200nM	結合する	結合する	結合する
DOM7h-10	結合する	ND	ND	ND
DOM7h-11	結合する	結合する	結合する	結合する
DOM7h-12	結合する	ND	結合する	結合する
DOM7h-13	結合する	結合する	結合する	
DOM7h-14	結合する 38nM	結合する	結合する 27nM	結合する 123nM

【０５５８】

したがって、本実験では、HSA及び様々な非ヒト種のうちの一つ又は複数由来のアルブミンと結合するdAbを単離した。例えば、本発明者らは、(i)ヒト及びマウス、(ii)ヒト及びカニクイザル、(iii)ヒト及びラット並びに(iv)ヒト、マウス、ラット及びカニクイザルアルブミンと結合するdAbを発見した。

実施例１４

【０５５９】

dAb/HAエピトープタグ又はdAb/mycエピトープタグ融合タンパク質と結合する血清アルブミンのラット及びカニクイザルにおける血清半減期の決定及び血清半減期の決定

抗カニクイザル血清アルブミンdAbを、C末端のHA又はmycタグを用いて大腸菌のペリプラズム中で発現させ、Vk dAbではプロテインL-アガロース親和性樹脂(Affitech、ノルウェー)へのバッチ吸収、VH dAbではプロテインA親和性樹脂へのバッチ吸収、次いでpH2.0のグリシンを用いた溶出を使用して精製した。血清半減期を決定するために、3匹のカニクイザルマカク(cynomolgus macaque)の群に、2.5mg/KgのDOM7h-9、DOM7h-11又はDOM7h-14の単一の静脈内注射を与えた。21日間の期間にわたる大腿の静脈又は動脈からの一連の採血によって血液試料を得て、それぞれの試料から血清を調製した。血清試料は、ELISAプレート上にコーティングしたヤギ抗HA(Abcam、英国Cambridge)又はヤギ抗myc(Abcam、英国Cambridge)を用いたサンドイッチELISAによって分析し、次いでプロテインL-HRPで検出した。試験試料との比較可能性を確実にするために、既知の濃度のdAbの検量線を、実験試料と同じ濃度のカニクイザル血清の存在下で設定した。二重指数関数モデリングに2区画モデル当てはめること(kaleidographソフトウェアを使用(Synergy software、米国ペンシルバニア州))を使用してt1/2βを計算した、表8参照。

【０５６０】

抗ラット血清アルブミンdAbを、C末端のHA又はmycタグを用いて大腸菌のペリプラズム中で発現させ、プロテインL-アガロース親和性樹脂(Affitech、ノルウェー)へのバッチ吸収、次いでpH2.0のグリシンを用いた溶出を使用して精製した。その後、以下の方法を用いてdAbを^{3}Hで標識した:一つのバイアル/タンパク質を調製した。300μlのNSPをバイアルに分注し、溶媒を≦30℃の穏やかな窒素下で除去した。その後、残渣をDMSO(100μL)に再懸濁させた。タンパク質溶液のアリコート(2.5mL)をDMSO溶液に加え、混合物を60分間、室温でインキュベーションした。その後、正確に2.5mlの溶液を事前に平衡化したPD10カラム(25mLのリン酸緩衝生理食塩水、PBSで事前に平衡化)に添加し、溶出液を廃棄した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS、3.5mL)を加え、溶出液を収集した。これにより、約2mg/mLの標識されたタンパク質溶液が得られた。物質の特異的活性を決定し、有効な標識を条件として、溶液をすぐに使用したか、又は必要時まで-20℃で保管した。

【０５６１】

血清半減期を決定するために、4匹のラットの群に、2.5mg/KgのDOM7h-9、DOM7h-11、DOM7h-13又はDOM7h-14の単一の静脈内注射を与えた。血液試料を7日間の期間にわたって尾部静脈から得て、血漿を調製した。^{3}Hのレベルを液体シンチレーション計数によって決定し、それぞれの試料中の標識されたタンパク質の濃度を、実験開始時に投与したタンパク質の既知の特異的活性に従って計算した。二重指数関数モデリングに2区画モデルを当てはめること(kaleidographソフトウェアを使用(Synergy software、米国ペンシルバニア州))を使用して、t1/2βを計算した、表8参照。

【表８】

表8

薬剤	足場	t1/2β(カニクイザル)	t1/2β(ラット)
DOM7h-9	V_κ	3.8日間	66時間
DOM7h-11	V_κ	5.2日間	61時間
DOM7h-13	V_κ	試験せず	73時間
DOM7h-14	V_κ	6.8日間	56時間
DOM7r-3	V_κ		53時間
DOM7r-16	V_κ		43時間
薬剤	足場	t1/2β(カニクイザル)	t1/2β(ラット)
DOM7h-9	V_κ	3.8日間	66時間
DOM7h-11	V_κ	5.2日間	61時間
DOM7h-13	V_κ	試験せず	73時間
DOM7h-14	V_κ	6.8日間	56時間
DOM7r-3	V_κ		53時間
DOM7r-16	V_κ		43時間

【０５６２】

ラット及びカニクイザルにおけるアルブミンの半減期は、それぞれ53時間(実験により決定)及び7～8日間(推定)である。表8から、ラット手法におけるdAb DOM7r-3、DOM7h-9、DOM7h-11、DOM7h-13及びDOM7h-14の半減期は、ラットにおけるアルブミンの半減期と実質的に同じであることが見られる。また、カニクイザル手法におけるdAb DOM7h-11及びDOM7h-14の半減期は、カニクイザルにおけるアルブミンの半減期と実質的に同じであることを見ることができる。dAb DOM7h-14の半減期は、ラット及びカニクイザルの両方において、両種におけるアルブミンの半減期と実質的に同じである。

実施例１５

【０５６３】

エピトープマップ作成

ヒト血清アルブミンの三つのドメインは、ピキアパストリス(Pichia pastoris)中で以前に発現されている(Dockal Carter及びRuker(1999)J.Biol.Chem.2000年2月4日;275(5):3042-50。本発明者らは、同じドメインをピキアパストリス(Pichia pastoris)pPICZaAベクターを用いて発現させ、必要な場合は、Mimetic BLue SAマトリックス(供給者:Prometic Biosciences)でこれらを均一になるまで精製した、図21。dAbによって結合された血清アルブミンドメインの同定は、二つの方法、即ち、ドメイン抗体の免疫沈降及び競合Biacoreのうちの一つによって評価した。結果を以下の図22及び図23に示す。

【０５６４】

免疫沈降アッセイでは、HSAドメインI、II又はIIIのいずれかを発現している1mlのピキアパストリス(Pichia pastoris)の上清をpH7.4に調整し、１μｇのdAb、及び10μｌのプロテインA又はプロテインLアガロース(それぞれV_H又はV_KdAb用)と混合した。複合体形成を可能にするために混合物を反転によって1時間混合し、その後、アガロースと結合した複合体を13,000×gで10分間の遠心分離によって回収し、上清をデカントし、ペレットにした物質をPBSで1回洗浄し、遠心分離によって回収した。その後、ビーズを、ジチオスレイトール(DTT)を含むSDS-PAGEローディングバッファーに再懸濁させ、70℃まで10分間加熱し、その後、4～12%のNuPAGE SDS-PAGEゲル(供給者:Invitrogen)に流し、SimplyBlue安全染

色で染色した。

【０５６５】

競合Biacoreアッセイでは、精製したdAbを、pH7.4のHBS-EP1μMにするか、又は50mMのクエン酸リン酸緩衝液、150mMのNaCl、pH5.0で1μMにし、必要な場合は、7μMの精製したHSAドメインを用いた。Biacoreの実行は、30μl分の流速で、500～1000RUのヒト血清アルブミンでコーティングしたCM5チップ表面、及びベースラインの引き算を行うために使用するブランクの参照セルで実施した。

【０５６６】

表9は、ヒト血清アルブミン及びそれらがマップされるヒト血清アルブミンのドメインに特異的なdAbのリストを提供する(免疫沈降及び/又はBiacoreによって決定):

【表９】

表9

クローン	H/K	マップ作成したHSAドメイン
DOM7h-1	K	ドメインII
DOM7h-2	K	Nd
DOM7h-6	K	Nd
DOM7h-7	K	Nd
DOM7h-8	K	ドメインII
DOM7h-9	K	ドメインII
DOM7h-10	K	Nd
DOM7h-11	K	ドメインII
DOM7h-12	K	ドメインII
DOM7h-13	K	ドメインII
DOM7h-14	K	ドメインII
DOM7h-21	H	Nd
DOM7h-22	H	ドメインI+III
DOM7h-23	H	Nd
DOM7h-24	H	Nd
DOM7h-25	H	Nd
DOM7h-26	H	Nd
DOM7h-27	H	ドメインIII
DOM7h-30	H	ドメインIII
DOM7h-31	H	Nd

Nd:決定せず

【０５６７】

結論として、大多数のdAbがHSAの第2のドメインと結合し、したがって、ヒト血清アルブミンとFcRnとの結合と競合しないと予測される。二つのdAb(DOM7h-27及びDOM7h-30)がドメインIIIと結合する。

【表１０】

dAb	結合した HSAドメイン	1μM、pH7.4での HSA結合のRU	1μM、pH5.0での HSA結合のRU	CDR中のHis
DOM7h-1	II	600c	150	なし
DOM7h-3	NI	0	0	
DOM7h-4	NI	0	0	
DOM7h-8	II	1000	250	なし
DOM7h-9	II	150	0	CDR1
DOM7h-11	II	250	0	CDR3
DOM7h-12	IIa	55	0	なし
DOM7h-13	II	300	40	CDR3中に2個
DOM7h-14	II	20	0	なし
DOM7h-22	I+IIIb	100c	0	CDR2
DOM7h-27	III	50	0	なし
DOM7h-30	III	320	35	なし

【０５６８】

HSAと結合するAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)エピトープマップ作成及びpH7.4及び5.0でのBiacoreデータの結果の概要。

実施例１６

【０５６９】

代謝物の存在下におけるdAbのin vitro選択

アルブミン分子は、約19日間のその寿命中に曝される血清中の他の化合物の効果を蓄積する。これらの効果には、好ましくはそれだけには限定されないが、混合ジスルフィドとして運搬されるシステイン及びグルタチオン、ビタミンB_6、δ-ビルルビン、ヘミン、チロキシン、長鎖及び中の脂肪酸並びにε-アミノ基上で運搬されるグルコースを含めた、アルブミン対して親和性を有する数々の分子の結合が含まれる。また、アセトアルデヒド(肝臓におけるエタノール代謝の産物)、脂肪酸代謝物、アシルグルクロニド及びビリルビンの代謝物などの代謝物。さらに、ワルファリン、ハロタン、サリチレート、ベンゾジアゼピン及び他のもの(Fasano他2005、IUBMB Lifeに総説))並びに1-O-ゲムフィブロジル-β-D-グルクロニドなどの多くの薬物が血清アルブミンと結合する。

【０５７０】

血清アルブミンと結合することが判明している化合物は、アルブミン分子上の特定の部位で結合する傾向にあり、したがって、これらの部位がAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)などの他の分子と結合することを潜在的に遮断する。多くのリガンドの結合部位が同定されており、主要且つ最も良好に特徴づけられている結合部位は、「サドロウ部位1」及び「サドロウ部位2」と呼ばれる。学名に従って、部位1はサブドメインIIA内に位置し、ワルファリン及び一般にはかさ高いヘテロ環式の陰イオン分子である他の薬物と結合する。部位2はサブドメインIIIA中に位置し、ステレオタイプの部位2リガンドであるイブプロフェンなど、伸長したコンホメーションを有し、一方の末端に負電荷を有する芳香族カルボン酸と結合する。ワルファリン及びイブプロフェンの二次結合部位がどちらも、それぞれドメインII及びI上で同定されている。他の結合部位及びこれらのサブ部位も存在し、これは、循環中、血清アルブミンは結合したリガンドの複合体混合物と共に存在することを意味し、1×10^{-2}Mから1×10^{-8}Mまで変動する親和性を有する。例えば、オレイン酸はSA上の7個までの部位と結合する(J Mol Biol.2001;314:955-60)。

【０５７１】
ヒト血清アルブミンは、脂肪酸との結晶化した複合体中にある場合もある(Petitpas I、Grune T、Bhattacharya AA、Curry S.Nat.Struct Biol.(1998)5:827-35)。これらの分子の結合部位は、SA表面の周りの疎水性間隙中に位置し、HSA分子のほぼ3倍の対称性であるにもかかわらず、非対称分布を有する。後に、血清アルブミンの様々な組換え断片の使用は、結合部位の形成におけるドメインの寄与のより正確な割当を支援している(例えば、Protein Sci(2000)9:1455-65;J Biol Chem.(1999)274:29303-10)。SAからの結合したリガンドの置換は、薬物の相互作用において重要な役割を果たし、例えばワルファリンの半減期は、それがSAからエタノールによって置換されるにつれて減少する(J Biol Chem.(2000)275:38731-8)。他の薬物のSAに対する親和性は、他の結合部位にある他の薬物の存在によって変更される。例えば、部位2と結合するジアゼパムは、結合の際のコンホメーション変化の結果、テノキシカムに対する部位1の親和性を増加させる。このことは、薬物動態学特性に顕著な影響を与える(Fundam Clin Pharmacol.(1989)3:267-79)。

【０５７２】
したがって、SAと結合するAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)では、SAと結合した薬物の血清アルブミン結合特徴を変更しないものを選択することが望ましい。さらに、薬物の結合がSAのコンホメーションを変更することが示されている場合は、薬物が存在する場合又は存在しない場合のどちらでもSAと結合するAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)を有することが望ましい。これらの手法は、主要な製薬との顕著な陽性又は陰性の薬物相互作用が存在しないようにAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)を同定することが可能であることを意味する。したがって、本実施例では、アルブミンとin vivoで結合して存在する可能性が高い化合物及び代謝物の存在下で血清アルブミンと結合するdAbを同定するための、ファージ選択を記載する。ファージ選択を、血清アルブミンとin vivoで相互作用することが知られている代謝物又は化合物のうちの一つ又はいくつかの存在下で行う。これらの選択では、代謝物又は他の化合物の存在によって妨害される可能性が低い様式で血清アルブミンと結合するAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)を同定する。

【０５７３】
実施例1に記載したファージライブラリーを実施例1に記載のように使用して、ヒト、カニクイザル、ラット及びマウスを含めた様々な種のうちの一つ又は複数からアルブミンに対して選択する。抗原として使用したアルブミンは、アルブミン自体よりも10～100倍高い濃度の代謝物又は化合物と共に終夜プレインキュベーションするという点で、実施例1に記載したものとは異なる。これは、単一の化合物若しくは代謝物と共に、又は複数の化合物若しくは代謝物と共にであり得る。具体的には、アルブミン部位I若しくは部位II又は両方を占有する化合物の存在下であり得る。この代謝物の濃度は、イムノチューブを抗原でコーティングするために使用するバッファー及び選択の主要ステップ中で使用するバッファー中にも存在する。代謝物が存在するステップには、抗原でコーティングしたイムノチューブ又はビオチン標識した抗原(溶液選択用)を遮断するために使用するMPBS遮断バッファー、及びファージライブラリーを遮断するバッファーが含まれる。このように、遮断したファージをイムノチューブ又はビオチン標識した抗原に加えた際、代謝物の濃度が維持される。したがって、アルブミンと結合するファージを選択する選択のフェーズ全体にわたって、アルブミン分子上の特定の部位をin vivoで遮断し得る代謝物も存在し、結合に関してファージと競合し、代謝物によって遮断されるものとは異なるアルブミン上の部位と結合するdAbを優先するように選択を偏らせる。

【０５７４】
別の選択の組では、結合した化合物又は代謝物の存在下及び不在下で、血清アルブミンに対する選択の交互ラウンドを行う。これにより、結合した化合物が存在する場合及び存在しない場合のどちらでも血清アルブミンと結合できるdAbが選択されることが確実となる。どちらの選択スキームでも、血清アルブミンと結合した薬物を置換することができるdAbが選択されることが可能であり、これは、AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に

結合するdAb)がSAと結合した薬物を置換する能力を測定することによって、スクリーニングする。そのようなアッセイは小分子薬物において十分に確立されており、この目的で容易に適用される。当分野で周知の様々な方法を用いて、AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)がSAと結合した薬物を置換する能力を決定し得る。これらは、平衡透析、固定したリガンド又は血清アルブミン上のクロマトグラフィー方法、NMR分析によるものに及ぶ。以下の例は、最も単純な平衡透析方法を記載する。他のより技術的に複雑な方法でも本質的に同じ情報が得られる。

【０５７５】

血清アルブミンの溶液を生理的バッファー、例えば、20mMのリン酸ナトリウム緩衝液、150mMのNaCl、pH7.4中の定義した濃度で作製する。薬物は同様のバッファーで構成し、その最初の薬理学的特性を保持しているが、例えばトリチウム又は^{14}Cで放射標識されているように合成する。血清アルブミンと結合する抗体断片は、同様のバッファー中の定義した濃度で構成する。

【０５７６】

血清アルブミン溶液を一連のチューブに入れ、漸増量のAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)を加え、ここで、それぞれのチューブ内の血清アルブミンの濃度が固定されるが(例えば1%w/v、約150μM)、(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)(商標)の濃度範囲は一連のチューブにわたって0～150μMであるようにする。これは一つの実験組を構成する。

【０５７７】

それぞれの組について固定濃度の放射標識したリガンドを含む透析チューブ又は容器をチューブに加える。使用するリガンド、その親和性及び溶解度に応じて、0.2～10mMの濃度範囲が適切であり得る。

【０５７８】

透析に使用する膜のカットオフサイズは、血清アルブミン及びAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)は通過して拡散しないが、放射標識したリガンドは自由に拡散できるものであるべきである。3.5Kdaのカットオフサイズがこの目的に十分である。

【０５７９】

混合物を固定温度、例えば37℃で、固定時間の間、例えば5時間攪拌して、放射標識した薬物を両区画の間で平衡にさせる。この時間後には平衡に達しているはずでありこれは、AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)が血清アルブミンと結合して薬物結合を阻害する能力によって影響を受ける。

【０５８０】

どちらの区画も試料であり、シンチレーションカウンターを用いて放射活性を計数する。アルブミンと結合したリガンドの濃度は、二つの区画間の計数の差異によって決定することができる。化学量論的結合定数K'は、結合したリガンドb、遊離リガンドc、及びアルブミンpの平衡濃度から方程式K'=b/c(p-b)に従って計算することができる。これは、1個のリガンド分子が1個の血清アルブミン分子と結合することを仮定している。

【０５８１】

その後、スキャッチャード(Scarchard)プロットを用いて、方程式r/c=nk-rkに従って、結合データを測定することができる[式中、rは、リガンドが結合しているアルブミンの割合(即ちb/pであり、nはアルブミン分子1個あたりの結合部位の数であり、kは部位会合定数である]。n及びkの値は、rに対するr/cのプロットから決定することができる。

【０５８２】

AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)の結合が放射標識したリガンドの結合を遮断する場合は、リガンドの化学量論的結合定数、及びリガンドの結合部位の見かけの数のどちらにも影響が与えられる。AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)は血清アルブミンの表面上の一つの定義された部位と結合し、一部のリガンドは血清アルブミン上に複数の結合部位を有するため、すべての結合部位が遮断されるわけではないことは予測され得る。AlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)が薬

物と複合した血清アルブミンと特異的に結合してそれを置換し、薬物が低い治療指数を有し、血清と結合している場合、薬物と結合した血清アルブミンを置換できるAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)と血清アルブミンを薬物に置換できないAlbudAb(商標)(血清アルブミンと特異的に結合するdAb)とを識別するためのカットオフ親和性は、10nM～100nMの範囲であろう。この方法は以下の論文に例示されている:Livesey及びLund Biochem J.204(1):265-272、分枝鎖状2-オキソ酸とウシ血清アルブミンとの結合(Binding of branched-chain 2-oxo acids to bovine serum albumin)。

実施例１７

【０５８３】

CDR移植による、血清アルブミンと結合するCTLA-4非免疫グロブリン足場を含む二重特異性リガンドの作製

dAb7h14のCDRドメインを用いて、以下の様式で、ヒト血清アルブミンと結合する、細胞傷害性T-リンパ球と会合した抗原4(CTLA-4)非免疫グロブリン足場ポリペプチドを構築した。dAb7h14のCDR1(RASQWIGSQLS;配列番号_)、CDR2(WRSSLQS;配列番号_)、及びCDR3(AQGAALPRT;配列番号_)の配列を、S1-S2ループ(BCループ)内のCDR1(SPGKATE;配列番号_)、S5-S6ループ内のCDR2(YMMGNELTF;配列番号_)、及びCDR3(LMYPPPYYL;配列番号_)のそれぞれに対応するネイティブCTLA-4アミノ酸残基(CTLA-4の足場組成及び/又は構造の詳細には、すべてその全体が本明細書中に参照により組み込まれている、WO00/60070;WO99/45110;Metzler他Nat.Struct.Biol.4:527-53;及びNuttall他Proteins Struct.Funct.Genet.36:217-27を参照されたい)の代わりに、CTLA-4V様ドメインを含む(WO99/45110に記載;任意選択で、CTLA-4の操作した形態、例えばA2及びA3ドメインが欠失しているもの)CTLA-4の可溶性の切断突然変異体内に移植した。pGC系、pPOW系、又は他の当分野で認識されている発現系中でこのCLTA-4由来のポリペプチドの発現を行い、主に単量体の可溶性タンパク質の産生が予想された。このCTLA-4由来のポリペプチドのタンパク質溶解度を検査し、ネイティブな細胞外CTLA-4ポリペプチドよりも優れていると予想された。ELISA分析を使用して、精製した単量体ポリペプチドが、非特異的な抗原と比較して及び非特異的なポリペプチドを移植した細胞外CTLA-4由来のポリペプチドと比較して(例えば、CDR1ループ構造内で置換されたソマトスタチン)、ヒト血清アルブミンと特異的に結合するかどうかを検査した。Biacoreによるリアルタイム結合分析を行って、ヒト血清アルブミンが、dAb7h14の抗ヒト血清アルブミンCDRドメインを含む固定したCTLA-4由来のポリペプチドと特異的に結合するかどうかを評価した。(当業者は、結合親和性は、例えば、標識したヒト血清アルブミンの沈殿、競合的Biacoreアッセイなどを含めた任意の適切な方法を使用して評価することができることを理解されよう。)任意選択で、CTLA-4抗ヒト血清アルブミンポリペプチドの発現を、大腸菌発現で優先的なコドンを取り込むスプライス重複PCRを用いた、コード配列の調整によって増強する。検出されるヒト血清アルブミン親和性(例えばμM範囲以上のKd値)が存在しない又は低い場合、結合親和性に寄与する以下の任意の方法を含めたいくつかの戦略のうちの少なくとも一つを用いて、CDRを移植したCTLA-4ポリペプチドのヒト血清アルブミン結合特性を改善する。

【０５８４】

dAb7h14 CDRを提示するCDRを移植したCTLA-4ポリペプチドのヒト血清アルブミン結合を、任意選択で以下に記載されているように及び/又は他の様式で当分野において知られているように並行した及び/又は反復の選択方法と組み合わせて、突然変異誘発によって最適化する。移植したdAb7h14 CDRポリペプチド配列を取り囲むCTLA-4足場ポリペプチドドメインを、下記に記載のように行うランダム化及び/又はNNK突然変異誘発に供する。そのような突然変異誘発は、非CDRアミノ酸残基上のCTLA-4ポリペプチド配列内で、新規又は改良されたヒト血清アルブミンと結合するポリペプチドを作製する目的で行う。任意選択で、CDRを移植したCTLA-4ポリペプチド内に提示されるdAb7h14 CDRポリペプチドドメインを、例えば、ランダム突然変異誘発、NNK突然変異誘発、ルックスルー突然変異誘発及び/又は他の当分野で認識されている方法による突然変異誘発に供する。そのような突然変異誘発方法を行うためにPCRを任意選択で使用して、CDRを移植したCTLA-4ポリペプチド内の

標的配列全体にわたって、配列多様性が生じることがもたらされる。そのような手法は、dAbライブラリーの作製について下記に記載したものに類似している。突然変異誘発のランダム及び/又はルックスルー方法に加えて、構造情報により特定のアミノ酸残基がヒト血清アルブミンの結合に重大であることが確立された場合は、標的アミノ酸残基の部位特異的突然変異誘発を用いる。

【０５８５】

上述のように操作した、移植したdAb7h14 CDR配列を含むCTLA-4ポリペプチドを、並行した及び/又は反復の選択方法に供して、ヒト血清アルブミン結合に最適化されているCTLA-4ポリペプチドを同定する。例えば、dAb7h14 CDRを移植したCTLA-4ポリペプチド配列のライブラリーを生成した後、そのようなポリペプチドのこのライブラリーをファージ上に提示させ、dAbのライブラリーからの血清アルブミンと結合するdAbの選択について記載したように、血清アルブミンの結合及び/又は増殖を要する複数ラウンドの選択に供する。任意選択で、イムノチューブ上に固定した血清アルブミンに対して又は溶液中のビオチン標識した血清アルブミンに対して選択を行う。任意選択で、結合親和性を、表面プラズモン共鳴(SPR)及びBiacoreシステム(スウェーデンUppsala)を用いたBiacore(Karlsson他、1991)を使用して決定し、完全に最適化されたCTLA-4由来のポリペプチドは、理想的には、nM範囲又はそれ以上のヒト血清アルブミンの結合親和性のKd値に達する。

【０５８６】

ヒト血清アルブミンと結合するCTLA-4由来のポリペプチドを同定した後、そのようなポリペプチドを使用して、下記に記載する任意の方法によって二重特異性リガンド組成物を作製する。

実施例１８

【０５８７】

血清アルブミン結合部分の選択による、血清アルブミンと結合するCTLA-4非免疫グロブリン足場を含む二重特異性リガンドの作製

ネイティブCTLA-4V様ドメインを含み(WO99/45110に記載;任意選択で、CTLA-4の操作した形態、例えば、A2及びA3ドメインが欠失しているもの)、可変性領域を含むように操作された、CTLA-4の可溶性の切断突然変異体を、ライブラリー中で提示させ、選択に供し、任意選択で、本発明のリガンドで使用するためのヒト血清アルブミンと結合するCTLA-4非免疫グロブリン足場分子を生成するための親和性成熟技術に供する。

【０５８８】

pGC系、pPOW系、又は他の当分野で認識されている発現系中でこのCLTA-4由来のポリペプチドの発現を行う。このCTLA-4由来のポリペプチドのタンパク質溶解度を検査し、CTLA-4由来のポリペプチドの溶解度をネイティブな細胞外CTLA-4ポリペプチドと比較して増強させるために、突然変異誘発を行う。ELISA分析を使用して、精製した単量体ポリペプチドが、CTLA-4由来の足場を含む非特異的な単一可変ドメインを比較して、及び非特異的なポリペプチドを移植した細胞外CTLA-4由来のポリペプチドと比較して(例えば、CDR1ループ構造内でソマトスタチンが置換されたCTLA-4ポリペプチド)、任意選択でヒト血清アルブミンと特異的に結合するかどうかを検査した。Biacoreによるリアルタイム結合分析を行って、ヒト血清アルブミンが固定したCTLA-4由来のポリペプチドと特異的に結合するかどうかを評価した。任意選択で、CTLA-4抗ヒト血清アルブミンポリペプチドの発現を、大腸菌発現で優先的なコドンを取り込むスプライス重複PCRを用いた、コード配列の調整によって増強する。ヒト血清アルブミンに対するCTLA-4ポリペプチドの結合親和性(例えばμM範囲以上のKd値)が存在しない又は低いことが検出された後、結合親和性に寄与する以下の方法のうちの一つ又は複数を含めたいくつかの戦略のうちの少なくとも一つを用いて、CTLA-4ポリペプチドにヒト血清アルブミン結合特性を与える。

【０５８９】

CTLA-4足場ポリペプチドのヒト血清アルブミン結合を行い、突然変異方法によって、任意選択で以下に記載されているように及び/又は他の様式で当分野において知られているように並行した及び/又は反復の選択方法と組み合わせて、最適化する。CTLA-4ポリペプ

チドドメインを、下記に記載のように行うランダム化及び/又はNNK突然変異誘発に供する。そのような突然変異誘発は、CTLA-4ポリペプチドの全体又はCTLA-4ポリペプチド内の特定の配列に、任意選択でCDRに対応するアミノ酸を標的として行う(例えばCDR1及び/又はCDR3配列がランダム化し、生じるポリペプチドを、例えばWO99/45110の実施例6に記載のように選択に供する)。任意選択で、CDR様ループの提示に構造的に重要であると決定又は予測された特定のアミノ酸残基を突然変異誘発の標的とする。突然変異誘発、特にランダム化突然変異誘発は、新規又は改良されたヒト血清アルブミンと結合するポリペプチドを進化させるために行う。そのような突然変異誘発方法を行うためにPCRを任意選択で使用して、CTLA-4ポリペプチド内の標的配列全体にわたって、配列多様性が生じることがもたらされる。(そのような手法は、dAbライブラリーの作製について下記に記載したものに類似している。)突然変異誘発のランダム方法に加えて、構造情報によりCTLA-4ポリペプチドの特定のアミノ酸残基がヒト血清アルブミンの結合に重大であることが確立された場合は、標的アミノ酸残基の部位特異的突然変異誘発を用いる。

【０５９０】

上述のように操作したCTLA-4ポリペプチドを、並行した及び/又は反復の選択方法に供して、ヒト血清アルブミン結合に最適化されているCTLA-4ポリペプチドを同定する。例えば、突然変異誘発したCTLA-4ポリペプチド配列のライブラリーを生成した後、前記ポリペプチドのライブラリーをファージ上に提示させ、dAbのライブラリーからの血清アルブミンと結合するdAbの選択について記載したように、血清アルブミンの結合及び/又は増殖を要する複数ラウンドの選択に供する。任意選択で、イムノチューブ上に固定した血清アルブミンに対して又は溶液中のビオチン標識した血清アルブミンに対して選択を行う。任意選択で、結合親和性を、Biacoreシステム(スウェーデンUppsala)を用いて、表面プラズモン共鳴(SPR)及びBiacore(Karlsson他、1991)を用いて決定し、完全に最適化されたCTLA-4由来のポリペプチドは、理想的には、nM範囲又はそれ以上のヒト血清アルブミンの結合親和性のKd値に達する。

【０５９１】

ヒト血清アルブミンと結合するCTLA-4ポリペプチドを同定した後、そのようなポリペプチドを使用して、下記に記載する任意の方法によって二重特異性リガンド組成物を作製する。

【０５９２】

CTLA-4V様ドメイン

CTLA-4は、特異的結合パートナーと結合し、V様ドメインも含む非免疫グロブリンリガンドの例である。これらのV様ドメインは、一緒に結合してFv型分子となる性向を有さないため、抗体又はT細胞受容体のものとは区別される。そのような非免疫グロブリンリガンドは、標的分子に対して高い親和性を有する新規結合部分を開発するための代替フレームワークを提供する。したがって、可溶性であるCTLA-4に由来する単一ドメインV様結合分子が望ましい。

【０５９３】

細胞傷害性T-リンパ球と会合した抗原4(CTLA-4)は、免疫応答中のT細胞の制御に関与している。CTLA-4は、活性T細胞の表面上で主に且つ一過的に発現される44Kdaのホモ二量体であり、ここでこれは抗原提示細胞上のCD80及びCD86表面抗原と相互作用して、免疫応答の制御をもたらす(Waterhouse他1996 Immunol Rev 153:183-207、van der Merwe他1997 J Exp Med 185:393-403)。それぞれのCTLA-4単量体サブユニットは、N末端細胞外ドメイン、膜貫通領域及びC末端細胞内ドメインからなる。細胞外ドメインは、N末端V様ドメイン(VLD;免疫グロブリンスーパーファミリーとの相同性による約14Kdaの分子量が予測される)及びVLDと膜貫通領域とを連結する約10個の残基の柄を含む。VLDは、抗体VドメインのCDR-1、CDR-2及びCDR-3に対応する表面ループを含む(Metzler他1997 Nat Struct Biol 4:527-531)。CTLA-4の最近の構造及び突然変異の研究により、CD80及びCD86との結合は、A'GFCC'V様β鎖及びCDR3様表面ループ内の高度に保存されているMYPPPY配列から形成されるVLD表面によって起こることが示されている(Peach他1994 J Exp Med 180:2049-2058;Morton

他1996 J.Immunol.156:1047-1054;Metzler他1997 Nat Struct Biol 4:527-531)。CTLA-4単量体間の二量体化は、二つの柄内のシステイン残基(CYS120)間のジスルフィド結合によって起こり、これは二つの細胞外ドメインの係留をもたらすが、V様ドメイン間で明白な直接会合はまったくない(Metzler他1997 Nat Struct Biol 4:527-531)。

【０５９４】

VLD内のCDRループ構造の置換は、変更された結合特異性及び改善された溶解度を有する、単量体の正しく折り畳まれた分子の産生をもたらすことが以前に示されている。したがって、特定の実施形態では、CTLA-4に由来する少なくとも一つの単量体V様ドメイン(VLD)を含む結合部分を作製し、少なくとも一つの単量体V様ドメインは、改変されたVLDの溶解度が改変されていないVLDと比較して改善しているように、少なくとも一つのCDRループ構造又はその一部が改変又は置き換えられていることを特徴とする。

【０５９５】

特定の実施形態では、(i)CDRループ構造の大きさが改変されていないVLD中の対応するCDRループ構造と比較して増加している;及び/又は(ii)改変又は置換によりCDRループ構造のうちの一つ若しくは複数の内部若しくはその間でジスルフィド結合の形成がもたらされるように、少なくとも一つのCDRループ構造又はその一部が改変又は置き換えられている。

【０５９６】

特定の実施形態では、本発明は、CTLA-4に由来する少なくとも一つの単量体V様ドメイン(VLD)を含む結合部分を提供し、少なくとも一つの単量体V様ドメインは、(i)CDRループ構造の大きさが改変されていないVLD中の対応するCDRループ構造と比較して変更されている;及び/又は(ii)改変又は置換によりCDRループ構造のうちの一つ若しくは複数の内部若しくはその間でジスルフィド結合の形成がもたらされるように、少なくとも一つのCDRループ構造又はその一部が改変又は置き換えられていることを特徴とする。

【０５９７】

特定の実施形態では、CDRループ構造の大きさは、少なくとも2個、より好ましくは少なくとも3個、より好ましくは少なくとも6個、より好ましくは少なくとも9個のアミノ酸残基が増加している。さらなる実施形態では、本発明の改変された結合部分は、改変されていない結合部分と比較して変更された結合親和性又は特異性も示す。好ましくは、CDRループ構造を置き換える又は改変することの効果は、改変されていないVLDの一つ又は複数の天然のリガンドに対するVLDの親和性を減少又は消滅させることである。好ましくは、CDRループ構造を置換する又は改変することの効果は、VLDの結合特異性を変化させることでもある(例えばヒト血清アルブミンと結合する組成物を生成するため)。したがって、改変されたVLDは、改変されていないVLDのそれとは異なる特異的結合パートナー(例えばヒト血清アルブミン)と結合することが好ましい。

【０５９８】

語句「VLD」とは、可変重鎖(VH)又は可変軽鎖(VL)抗体と類似の構造的特徴を有するドメインをいうことを意図する。これらの類似の構造的特徴にはCDRループ構造が含まれる。

【０５９９】

本明細書中で使用する用語「CDRループ構造」とは、表面ポリペプチドループ構造又は抗体Vドメイン中の相補性決定領域などの領域をいう。

【０６００】

本発明のCTLA-4由来の結合部分は、化学的に又は遺伝子的に一緒にカップリングされて、多価又は多官能性試薬を形成し得ることを理解されよう。例えば、ネイティブCTLA-4でCys'20を用いるなどのC末端尾部の付加は、二量体をもたらす。本発明の結合部分はまた、二重特異性リガンドを含むものを含めて、様々な配合物のために他の分子とカップリングさせてもよい。例えば、CTLA-4VLDはC末端ポリペプチド尾部を含んでいてもよく、又はストレプトアビジン若しくはビオチンとカップリングしていてもよい。CTLA-4VLDはまた、in vivo検出及び/又は癌、血餅などの位置特定のために、放射性同位体、色素マーカー

又は他のイメージング試薬とカップリングしていてもよい。CTLA-4VLDはまた、診断及びバイオセンサー用途のために不溶性の装置及びプラットフォーム上へのカップリングによって固定されていてもよい。

【０６０１】

本発明の特定の実施形態では、細胞外CTLA-4V様ドメインを使用する。CTLA-4V様ドメインの一つ又は複数の表面ループ、好ましくはCDR1、CDR2又はCDR3ループ構造を、血清アルブミンに対する結合親和性を有するポリペプチド(例えば、下記に例示するように、dAb7h14のCDRドメイン及びそれに由来する配列)で置き換える。これらのCTLA-4VLDは、その天然の表面及び改変されたポリペプチドループの両方によって指示される親和性を有し、多特異性であり得ることを理解されたい。

【０６０２】

CTLA-4VLDのCDRループ構造のうちの一つ又は複数は、抗体に由来する一つ又は複数のCDRループ構造で置き換えることができる。抗体は任意の種に由来し得る。好ましい実施形態では、抗体は、ヒト、ラット、マウス、ラクダ、ラマ又はサメに由来する。CDR1及びCDR3ループ構造は、長さが非常に異種である非カノニカルコンホメーションをとり得る。V様ドメインはまた、CDR1及びCDR3ループ構造(一部のラクダ科VHH抗体で見つかる)又はCDR2及びCDR3ループ構造(一部のラマVHH抗体で見つかる)を相互連結するジスルフィド結合も保有し得る。

【０６０３】

in vivo用途には、VLDが治療又は診断の対象に相同的であり、任意の潜在的な異種抗原を取り除いておくことが好ましい。したがって、臨床応用で使用するVLD分子が天然ヒト免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーに実質的に相同的であることが好ましい。

【０６０４】

CTLA-4ポリペプチド(例えばCTLA-4に由来するVLD)の血清アルブミン結合は、例えばポリヌクレオチドのライブラリーを血清アルブミンに対して親和性を有する結合部分の発現についてスクリーニングすることを含む、血清アルブミンに対して親和性を有する結合部分の選択によって最適化することができ、ポリヌクレオチドは、少なくとも一つのVLD中の少なくとも一つのCDRループ構造の改変又は置き換えがもたらされる突然変異誘発に供されており、単離した改変されたVLDの溶解度は、単離した改変されていないVLDと比較して改善している。

【０６０５】

当業者は、そのような親和性スクリーニング方法の場面では、ランダム又は標的化突然変異誘発の任意の方法を用いて改変をV様ドメイン内に導入し得ることを理解されよう。好ましい実施形態では、突然変異誘発は標的化突然変異誘発である。任意選択で、標的化突然変異誘発は、例えばスプライス重複又は他のPCR技術を用いた、少なくとも一つのCDRループ構造内の少なくとも一つの配列の置き換えを含む。

【０６０６】

また、当業者には、ポリヌクレオチドライブラリーが、天然免疫グロブリンで見つかるCDRループ構造と実質的に同じであるCDRループ構造を含むVLDをコードしている配列、及び/又は非天然CDRループ構造を含むVLDをコードしている配列を含み得ることも理解されるであろう。任意選択で、スクリーニングプロセスは、改変されたV様ドメインを遺伝子IIIタンパク質融合体としてバクテリオファージ粒子の表面上に提示させることを含むこともできる。

【０６０７】

ライブラリーは、V様ドメインをコードしているポリヌクレオチドを含むpHFA、fd-tet-dog又はpFAB.5cなどのバクテリオファージベクターを含み得る。スクリーニングプロセスはまた、改変されたV様ドメインをリボソームディスプレイ選択系で提示させることも含むことができる。

【０６０８】

本発明の好ましいCTLA-4由来血清アルブミン結合分子は以下の利点を提供する(i)ネイ

ティブヒトタンパク質の使用は、ヒト治療で使用した場合に免疫系応答に対して保護するためにしばしば必要なステップである、後の組換え分子のヒト化の必要性を取り除く;(ii)ドメインは上述のように自然に単量体である(残基Cys120をC末端尾部に取り込むことにより、二量体分子の生成がもたらされる);及び(iii)構造的改変により大腸菌発現レベルの改善がもたらされた。

【０６０９】

ネイティブCTLA-4構造の初期決定により、抗体CDR1、2及び3の領域に対応する領域のモデリング及び予測が可能となった。そのような領域は、分子フレームワークに実質的な効果を与えずに突然変異又は置換に対して感受性であり、したがって、正しく折り畳まれた分子の発現を可能にすることが仮定された。CTLA-4の公開された構造(Metzler他1997 Nat Struct Biol 4:527-531)により、CDR1がリガンド結合部位から予想外に分離しており、CDR3が大規模に折り曲がってリガンド結合面連続的な平面表面を形成していたにもかかわらず、これらの予測が正確であることが示された。

【０６１０】

V様ドメインは、可溶性の単一ドメイン分子を構築するための基本フレームワークを提供し、分子の結合特異性はCDRループ構造の改変によって操作し得る。V様ドメインの基本フレームワーク残基は、ラクダ科抗体中に存在する構造的特徴に従って改変し得る。ラクダ重鎖免疫グロブリンは、VHH鎖からなることによって「従来の」抗体構造とは異なる(Hamers-Casterman他1993 Nature 363:446-448)。ラクダ抗体は、それぞれがV_{HH}ドメインを含む二つの重鎖からなる。いくつかの固有の特徴により、これらの抗体が溶解度及び十分に大きな抗原結合表面を提示できないという二重の問題に打ち勝つことを可能にする。

【０６１１】

第1に、曝されたフレームワーク残基でのいくつかの従来でない置換(主に疎水性から極性の性質)が、疎水性表面を減少する一方で、内部のβシートフレームワーク構造を維持する(Desmyter他1996 Nat Struct Biol 3:803-811)。さらに、三つのCDRループ内で、いくつかの構造的特徴が、通常はVLドメインによって提供される抗原結合表面の損失を補償する。CDR2ループは他のVHドメインとは大幅に異ならないが、CDR1及びCDR3ループは、長さが非常に異種である非カノニカルコンホメーションをとる。例えば、H1ループは、Ig分子における通常の5個と比較して2～8個の残基のいずれかを含み得る。しかし、最大の変動を示すのはCDR3ループである。報告されている17個のラクダ抗体配列では、この領域の長さは7～21個の残基で変動する(Muyldermans他1994 Protein Eng 7:1129-1135)。第3に、多くのラクダ科VHHドメインは、ラクダの場合はCDR1及びCDR3を相互連結し、ラマの場合はCDR1及びCDR2を相互連結する、ジスルフィド結合を保有する(Vu他1997 Molec.Immunol.34:1121-113)。この構造的特徴の機能は、ループの安定性を維持すること、及び平面的と対比してより曲線的なループコンホメーションを提供することであると考えられ、これらはどちらも、抗原内のポケットとの結合を可能にし、表面積の増加をもたらす。しかし、すべてのラクダ科抗体がこのジスルフィド結合を保有するわけではなく、これが絶対的な構造要件でないことを示している。

【０６１２】

本発明はまた、標的分子(例えばヒト血清アルブミン)に対して新規の結合親和性を有する単一VLD分子を作製及び選択する方法にも関する。この方法は、周知の分子進化技術をCTLA-4由来のポリペプチドに適用することを含む。この方法は、多数の突然変異したCTLA-4由来のポリペプチドをスクリーニングするための、ファージ又はリボソームディスプレイライブラリーの生成を含み得る。

【０６１３】

線維状fd-バクテリオファージゲノムを、ファージがその表面上に、ファージ内に含まれるDNAによってコードされているIg様タンパク質(scFv、Fab)などのタンパク質を提示するように、操作する(Smith、1985 Science 228:1315-1317;Huse他1989 Science 246:1275-81;McCafferty他、1990 Nature 348:552-4;Hoogenboom他、1991 Nucleic Acids Res.19:4133-4137)。タンパク質分子は、Fdバクテリオファージの表面上に、遺伝子III又はより

一般的でない遺伝子VIIIによってコードされているファージコートタンパク質と共有結合して提示されることができる。抗体遺伝子を遺伝子IIIコートタンパク質内に挿入することで、ファージ1個あたり3～5個の組換えタンパク質分子の発現が、末端に位置して与えられる。対照的に、抗体遺伝子を遺伝子VIII内に挿入することは、ファージ粒子1個あたり約2000コピーの組換えタンパク質を提示する潜在性を有するが、これは単一の提示されたタンパク質の親和性を覆い隠す可能性がある多価システムである。Fdファージミドベクターも、可溶性Ig様断片を大腸菌中で分泌するfd-バクテリオファージの表面上の機能的Ig様断片から容易に切り替えることができるため、使用する。遺伝子IIIコートタンパク質のN末端を有するファージが提示された組換えタンパク質融合体は、二つのタンパク質遺伝子の間に戦略的に配置したamberコドンによって可能となる。大腸菌のamber抑制株では、生じるIgドメイン-遺伝子III融合体はファージのコート内に固定される。

【０６１４】

タンパク質親和性に基づく選択プロセスを、抗体、抗原、受容体及びリガンドなどの任意の高親和性結合試薬に施用することができる(例えば、そのすべての内容が本明細書中に参照により組み込まれているWinter及びMilstein、1991 Nature 349:293-299参照)。したがって、バクテリオファージ上に提示される最も高い親和性の結合タンパク質の選択は、そのタンパク質をコードしている遺伝子の回収と連結している。Ig又は非Ig足場提示ファージを、ELISA又は固相ラジオイムノアッセイに類似の様式で、ビーズと共有結合した又はプラスチック表面上に吸着した同族結合パートナーとの結合によって親和性選択することができる。ほとんどすべてのプラスチック表面がタンパク質抗原を吸着するが、Nuncイムノチューブなどの一部の市販の製品がこの目的で特別に形成されている。

【０６１５】

リボソームディスプレイライブラリーは、細胞を含まない翻訳系で新規合成し、選択目的でリボソームの表面上に提示させたポリペプチドを含む(Hanes及びPluckthun、1997 Proc.Natl.Acad.Sci.USA.94:4937-4942;He及びTaussig、1997 Nucl.Acids Res.25:5132-5134)。「細胞を含まない翻訳系」は、リボソーム、タンパク質合成に必要な可溶性酵素(通常はリボソームと同じ細胞からのもの)、転移RNA、アデノシン三リン酸、グアノシン三リン酸、リボヌクレオシド三リン酸再生系(ホスホエノールピルビン酸及びピルビン酸キナーゼなど)、並びに外因性mRNAによってコードされているタンパク質の合成に必要な塩及びバッファーを含む。ポリペプチドの翻訳は、インタクトなポリソームが維持される、即ち、リボソーム、mRNA分子及び翻訳されたポリペプチドが単一の複合体で会合する条件下で生じさせることができる。これは、翻訳されたポリペプチドの「リボソームディスプレイ」を有効にもたらす。選択には、対応するリボソーム複合体と会合した翻訳されたポリペプチドを、マトリックス(例えばDynabeads)と結合した標的(例えば血清アルブミン)分子と混合する。翻訳されたポリペプチドを提示するリボソームは標的分子と結合し、これらの複合体を選択し、RT-PCRを用いてmRNAを再増幅することができる。

【０６１６】

結合分子を改変するためのいくつかの代替手法が存在するが、すべての提示されたタンパク質の一般的な手法は、個々の結合試薬がディスプレイライブラリーからその同族リガンド及び/又は受容体に対する親和性によって選択されるというパターンに一致する。これらの試薬をコードしている遺伝子は、いくつかのin vivo及びin vitro突然変異戦略のうちの任意の一つ又は組合せによって改変して、最も高い親和性の結合分子を提示及び選択するための新規遺伝子プールとして構築する。

【０６１７】

結合親和性の評価

特定の実施形態では、その構成要素の分子(例えばヒト血清アルブミンと結合する非免疫グロブリン分子)を含めた本発明の二重特異性リガンドを、標的タンパク質(例えばヒト血清アルブミン)に対する結合親和性について評価する。標的タンパク質エピトープの結合は、ELISAなどの従来の抗原結合アッセイ、FRETを含めた蛍光に基づいた技術、又は分子の質量を測定する表面プラズモン共鳴などの技術によって測定することができる。抗原

結合タンパク質と抗原又はエピトープとの特異的結合は、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)などのスキャッチャード分析及び/又は競合的結合アッセイ、ELISA及びサンドイッチ競合アッセイなどの酵素免疫アッセイ、並びに様々なその変形を含めた、適切なアッセイによって決定することができる。

【０６１８】

結合親和性は、好ましくは、Biacoreシステム(スウェーデンUppsala)を用いて、表面プラズモン共鳴(SPR)及びBiacore(Karlsson他、1991)を用いて決定する。Biacoreシステムは、生体分子の相互作用をリアルタイムで監視するために表面プラズモン共鳴(SPR、Welford K.1991、Opt.Quant.Elect.23:1;Morton及びMyszka、1998、Methods in Enzymology 295:268)を使用し、ガラス担体上の薄金フィルムの表面での光の共鳴角度の変化を300nmまで離れた表面の屈折率の変化の結果として検出することができる表面プラズモン共鳴を使用する。Biacore分析は、会合速度定数、解離速度定数、平衡解離定数、及び親和定数を好都合に生じる。結合親和性は、Biacore表面プラズモン共鳴システム(Biacore,Inc.)を用いて会合及び解離速度定数を評価することによって得られる。標的の共有カップリングのために、バイオセンサーチップを製造者(Biacore)の指示書に従って活性化する。その後、標的を希釈し、チップ上に注入して、固定した物質の応答単位(RU)でシグナルを得る。RUで示すシグナルは固定した物質の質量に比例するため、これは、マトリックス上の固定した標的密度の範囲を表す。解離データを1サイトモデルに当てはめて、k_{off}+/-s.d.(測定値の標準偏差)が得られる。偽一次速度定数(Kd)をそれぞれの会合曲線について計算し、タンパク質濃度の関数としてプロットして、k_{on}+/-s.e.(当てはめの標準誤差)が得られる。結合の平衡解離定数Kdは、SPR測定値からk_{off}/k_{on}として計算する。

【０６１９】

Phizicky及びField、Microb.Rev.(1995)59:114-115に記載されているように、HSAなどの適切な抗原をデキストランポリマー上に固定し、単一可変ドメインなどのHSAに対するリガンドを含む溶液をセルに流し、固定したHSAと接触させる。固定したHSAによって保持される単一可変ドメインが衝突光の共鳴角度を変更する結果、デキストランポリマー付近のタンパク質、即ち単一可変ドメインの量の増加によってもたらされる屈折率の変化が生じる。すべてのタンパク質が同じ屈折率を有し、共鳴角度のシフトと表面付近のタンパク質濃度との間に線形相関が存在するため、タンパク質/タンパク質の結合による表面でのタンパク質濃度の変化を測定することができる。Phizicky及びField、上記を参照されたい。結合定数を決定するためには、レゾナンスユニットの増加を、単一可変ドメインタンパク質の溶液を固定したリガンド(HSA)に通すことによってRU値が安定化するまでの時間の関数として測定し、その後、RUの低下を、単一可変ドメインを欠くバッファーを用いた時間の関数として測定する。この手順を、いくつかの異なる濃度の単一可変ドメインタンパク質で繰り返す。詳細な理論的背景及び手順は、R.Karlsson他(991)J.Immunol Methods、145、229に記載されている。

【０６２０】

装置のソフトウェアは上述の平衡解離定数(Kd)を生じる。表面プラズモン共鳴(SPR)を使用することで決定される平衡解離定数は、dR_A/dt及びR_A値の表に基づいて、米国特許第5,573,957号に記載されており、この例中のRは、Biacoreによって測定したHSA/単一可変ドメイン複合体のレゾナンスユニットであり、dR/dtは、HSA/単一可変ドメイン複合体の形成速度、即ち結合曲線の導関数である。いくつかの異なる濃度の単一可変ドメインについてdR_A/dt対R_Aのグラフをプロットし、続いてこれらの線の傾き対単一可変ドメインの濃度をプロットし、この第2のグラフの傾きが会合速度定数(M^{-1}、s^{-1})である。解離速度定数、即ちHSA及び単一可変ドメインが互いを放出する速度は、Biacoreで作成した解離曲線を利用して決定することができる。応答の低下の対数対時間曲線をプロットして傾きを決定することによって、解離速度定数を測定することができる。平衡解離定数Kd＝解離速度定数／会合速度定数。

【０６２１】

本発明の任意の態様によるリガンドには、少なくとも一つの単一可変ドメインを、単量

体単一可変ドメインの形態又は複数の単一可変ドメイン、即ち多量体の形態で有する、又はそれからなるリガンドが含まれる。リガンドは、融合タンパク質などの追加の部分、又はコンジュゲートを含むように改変することができる。そのような多量体リガンド、例えば二重特異性リガンドの形態、及び/又は単一可変ドメインを含む若しくはそれからなるそのようなリガンド、即ち、そのような多量体リガンドの構築に有用なdAb単量体は、有利には、例えば表面プラズモン共鳴によって決定される、300nM以下、300nM～5pM(即ち3×10^{-7}～5×10^{-12}M)、好ましくは50nM～20pM、若しくは5nM～200pM若しくは1nM～100pM、1×10^{-7}M以下、1×10^{-8}M以下、1×10^{-9}M以下、1×10^{-10}M以下、1×10^{-11}M以下のKd;及び/又は5×10^{-1}～$1\times10^{-7}S^{-1}$、好ましくは1×10^{-6}～$1\times10^{-8}S^{-1}$、好ましくは1×10^{-2}～$1\times10^{-6}S^{-1}$、若しくは5×10^{-3}～$1\times10^{-5}S^{-1}$、若しくは$5\times10^{-1}S^{-1}$以下、若しくは$1\times10^{-2}S^{-1}$以下、若しくは$1\times10^{-3}S^{-1}$以下、若しくは$1\times10^{-4}S^{-1}$以下、若しくは$1\times10^{-5}S^{-1}$以下、若しくは$1\times10^{-6}S^{-1}$以下の範囲のK_{off}速度定数で、その同族標的から解離し得る。Kd速度定数は、K_{off}/K_{on}として定義される。好ましくは、単一可変ドメインは、500nM未満、好ましくは200nM未満、より好ましくは10nM未満、例えば500pM未満の親和性で、標的抗原又はエピトープと特異的に結合する。

実施例１９

【０６２２】

リポカリン

血清アルブミン結合部分の選択による、血清アルブミンと結合するリポカリン非免疫グロブリン足場を含む二重特異性リガンドの作製

ピエリス・ブラシカエ(Pieris brassicae)に由来するリポカリンであるビリン結合タンパク質(BBP)は、ヒト血清アルブミンを認識するように、コンビナトリアルタンパク質設計によって再形成することができる。この目的を達成するために、ネイティブBBPをライブラリー選択に供し、任意選択で、本発明の二重特異性リガンドで使用するためのヒト血清アルブミンと結合するBBP分子を生成するための親和性成熟に供する。

【０６２３】

ネイティブBBPがヒト血清アルブミンと結合する能力を、CTLA-4由来のポリペプチドについて下記に記載のように、最初にBiacoreアッセイによって確認する。(当業者は、結合親和性は、例えば、標識したヒト血清アルブミンの沈殿、競合的Biacoreアッセイなどを含めた任意の適切な方法を使用して評価することができることを理解されよう。)ヒト血清アルブミンに対するBBPの結合親和性(例えばμM範囲以上のKd値)が存在しない又は低いことが検出された後、結合親和性に寄与する以下の方法のうちの一つ又は複数を含めたいくつかの戦略のうちの少なくとも一つを用いて、BBPにヒト血清アルブミン結合特性を与える。

【０６２４】

BBP及びBBP由来のポリペプチドのヒト血清アルブミン結合を行い、突然変異方法によって、任意選択で以下に記載されているように及び/又は他の様式で当分野において知られているように並行した及び/又は反復の選択方法と組み合わせて最適化する。BBPポリペプチドドメインを、下記に記載のように行うランダム化及び/又はNNK突然変異誘発に供する。そのような突然変異誘発は、BBP(又はBBP由来)ポリペプチドの全体に行う、及び/又は、8本鎖のβバレルに加えて四つのループによって形成されているネイティブBBP結合部位の中心に存在すると同定された16個のアミノ酸残基を含めたBBPポリペプチド内の特定の配列に行う(Beste他1999 Proc.Natl Acad.Sci.USA 96:1898-903)。任意選択で、そのような突然変異誘発手順は、新規又は改良されたヒト血清アルブミンと結合するポリペプチドを進化させるためにランダム化されており、複数ラウンドの突然変異誘発を、ヒト血清アルブミンと最適に結合するBBPを作製するプロセス中に行い得る。そのような突然変異誘発方法を行うためにPCRを任意選択で使用して、BBP(又はBBP由来)ポリペプチド内の標的配列全体にわたって、配列多様性が生じることがもたらされる。(そのような手法は、dAbライブラリーの作製について下記に記載したものに類似している。)突然変異誘発のランダム方法に加えて、構造情報によりBBP(又はBBP由来)ポリペプチドの特定のアミノ酸残基

がヒト血清アルブミンの結合に重大であることが確立された場合は、標的アミノ酸残基の部位特異的突然変異誘発を用いる。

【０６２５】

上述のように操作したBBP(又はBBP由来)ポリペプチドを、並行した及び/又は反復の選択方法に供して、ヒト血清アルブミン結合に最適化されているBBPポリペプチドを同定する。例えば、突然変異誘発したBBPポリペプチド配列のライブラリーを生成した後、前記ポリペプチドのライブラリーをファージ上に提示させ、dAbのライブラリーからの血清アルブミンと結合するdAbの選択について記載したように、血清アルブミンの結合及び/又は増殖を要する複数ラウンドの選択に供する。任意選択で、イムノチューブ上に固定した血清アルブミンに対して又は溶液中のビオチン標識した血清アルブミンに対して選択を行う。任意選択で、結合親和性を、Biacoreシステム(スウェーデンUppsala)を用いて、表面プラズモン共鳴(SPR)及びBiacore(Karlsson他、1991)を用いて決定し、完全に最適化されたBBP由来のポリペプチドは、理想的には、nM範囲又はそれ以上のヒト血清アルブミンの結合親和性のKd値に達する。

【０６２６】

ヒト血清アルブミンと結合するBBPポリペプチドを同定した後、そのようなポリペプチドを使用して、下記に記載する任意の方法によって二重特異性リガンド組成物を作製する。

【０６２７】

リポカリン足場タンパク質

リポカリン(Pervaiz及びBrew、FASEB J.1(1987)、209-214)は、様々な生物から単離されている、小さな、多くの場合単量体の分泌タンパク質のファミリーであり、その生理的役割は、様々なリガンドの保管又は輸送、及びより複雑な生体機能である(Flower、Biochem.J.318(1996)、1-14)。リポカリンは比較的低い相互配列類似度を示し、これらが同じタンパク質構造ファミリーに属することは、X線構造解析によって最初に解明された(Sawyer他、Nature 327(1987)、659)。

【０６２８】

既知の空間構造の最初のリポカリンは、血清中の非水溶性ビタミンAの輸送に影響を与えるレチノール結合タンパク質Rbpであった(Newcomer他、EMBO J.3(1984)、1451-1454)。そのすぐ後に、チョウのピエリス・ブラシカエ(Pieris brassicae)からのビリン結合タンパク質Bbpの三次構造が決定された(Huber他、J.Mol.Biol.195(1987)、423-434)。このタンパク質クラスの必須の構造的特徴がこのリポカリンの空間構造に例示されている。リポカリンの折り畳み構造の中心的エレメントは、円柱状のβプリーツシート構造、いわゆるβバレルであり、これは、8個のほぼ円形状に配置された逆平行β鎖からなる。

【０６２９】

このスーパー二次構造エレメントは、二つの4本鎖のβシート構造の「サンドイッチ」配置としても見ることができる。さらなる構造エレメントは、ポリペプチド鎖のアミノ末端の伸長されたセグメント、及び、それ自体に伸長されたセグメントが続くカルボキシ末端近くのαヘリックスである。しかし、これらのさらなる特徴は、すべてのリポカリンで必ずしも示されているわけではない。例えば、N末端セグメントの顕著な部分が精巣上体のレチノイン酸結合タンパク質で欠損している(Newcomer、Structure(1993)1:7-18)。例えば、特定のリポカリン中にのみ存在する膜アンカー(Bishop及びWeiner、Trends Biochem.Sci.(1996)21:127)など、さらなる独特な構造エレメントも知られている。

【０６３０】

βバレルは、密なアミノ酸パッキング及びループセグメントによって一端が閉じている。他方の端では、βバレルは、リポカリンの対応するリガンドが複合体形成している結合ポケットを形成する。8本の隣接する逆平行β鎖は、ポリペプチド鎖中のヘアピンの折曲がりによって対応する対の様式で連結されており、これは、依然として円柱状のβプリーツシート構造の領域内に部分的に位置する隣接アミノ酸と一緒になって、それぞれがループエレメントを形成する。リガンドの結合ポケットは、これらによって合計四つのペプチ

ドループで形成されている。Bbpの場合、ビリベルジンIXγがこの結合ポケット内で複合体形成している。リポカリンの別の典型的なリガンドは、Rbp及びβ-ラクトグロブリンの場合のビタミンAである(Papiz他、Nature 324(1986)、383-385)。

【０６３１】

例えば、米国特許公報第20060058510号に記載のように、リポカリンポリペプチドファミリーのメンバーを用いて、円柱状βプリーツシート構造の末端の四つのペプチドループの領域内に位置するアミノ酸の突然変異によって新規リガンドを認識するように設計されており、所与のリガンド(例えばヒト血清アルブミン)と決定可能な親和性で結合することを特徴とする、「アンチカリン」と呼ばれる分子クラスを生成することができる。

【０６３２】

リポカリンのリガンド結合部位は免疫グロブリンのそれよりも単純に構築されている。リポカリンポリペプチドは、8本の逆平行β鎖の一つの環、即ちβバレルしか含まない。この環状βプリーツシート構造は、リポカリンのタンパク質折り畳みで保存されている。結合部位は、βバレルの進入領域で、そのそれぞれが二つの隣接するβ鎖と互いに連結している四つのペプチドループによって形成されている。これらのペプチドループは、リポカリンファミリーの個々のメンバー間でその構造が顕著に変動することができる。

【０６３３】

リポカリンポリペプチドを非免疫グロブリン足場として使用するために、リポカリンのリガンド結合部位を形成する四つのペプチドループのうちの一つ又は複数を突然変異誘発、次いで選択、即ち、所与のリガンドに対して所望の結合活性を示すタンパク質変異体(突然変異体タンパク質)の選択に供する。このようにして得られたリポカリン突然変異体タンパク質は「アンチカリン」と呼ばれる。

【０６３４】

アンチカリンの産生中にその配列が突然変異誘発によって改変されるリポカリンの四つのペプチドループは、Bbpのアミノ酸の位置28～45、58～69、86～99及び114～129を含むBBPの直鎖状ポリペプチド配列中のセグメントによって特徴づけられている。これらの配列セグメントのそれぞれは、βバレルの開いた側の保存されているβ鎖の一つのC末端の前に開始され、実際のペプチドヘアピンが含まれ、続く配列の同様に保存されているβ鎖のN末端の後ろで終わる。

【０６３５】

配列アラインメント又は構造的重ね合わせにより、Bbpで与えられた配列位置を他のリポカリンに割り当てることが可能となる。例えば、Peitsch及びBoguski(New Biologist 2(1990)、197-206)の公開されたアラインメントに対応する配列アラインメントは、ApoDの四つのペプチドループにアミノ酸位置28～44、59～70、85～98及び113～127が含まれていることを明らかにしている。また、同様に突然変異誘発に適した新規リポカリン中の対応するペプチドループを同定することも可能である。

【０６３６】

一部の例では、リポカリンの比較的弱い配列相同性が、保存されているβ鎖の決定において問題であることが判明し得る。したがって、ポリペプチド配列が、8本の逆平行β鎖から作製される環状βプリーツシート構造を形成できることが重大である。これは、タンパク質結晶構造解析又は多次元核磁気共鳴分光分析などの構造解析方法を用いることによって決定することができる。

【０６３７】

例えば、ApoD又はRbpなどの非Bbpリポカリンでは、突然変異誘発に適した配列セグメントは、容易に、ペプチドループの個別に変動する構造に基づくBbpよりも長い又は短いことができる。配列セグメントの長さを、一つ又は複数のアミノ酸の欠失又は挿入によってさらに改変することが有利でさえある場合がある。特定の実施形態では、Bbpの配列位置34～37、58、60、69、88、90、93、95、97、114、116、125、及び127に対応するアミノ酸位置を突然変異する。それに対応して、ApoDの場合、配列位置34～37、59、61、70、87、89、92、94、96、113、115、123及び125が突然変異誘発に好ましい。しかし、アンチカリ

ンの生成には、上述した配列位置のすべてを突然変異誘発に供する必要はない。

【０６３８】

他のリポカリンも、アンチカリンを生成する基本構造として適切である。好ましくは、現在既に生化学的に網羅的研究されているリポカリンRbp、Bbp又はApoDを使用する。ヒト由来のリポカリンの使用がアンチカリンの生成に特に好ましい。これは、他の生物由来のリポカリンと比較して最小限の免疫原性効果が予測されるため、生じるアンチカリンの用途がヒトを意図する場合に、例えば、in vivoの診断又は治療用途で、特に適用される。しかし、他のリポカリン及び未だ発見されていない可能性があるリポカリンが、アンチカリンの生成に特に有利であると判明する場合がある。リポカリンのβバレルと構造的に等価である折り畳みエレメントを有する人工タンパク質も使用できる。

【０６３９】

好ましくは、本発明のアンチカリン分子は、所望のリガンド(例えばヒト血清アルブミン)と、決定可能な親和性、即ち、少なくとも10^5M^{-1}の親和定数で結合できるべきである。これより低い親和性は、一般に、もはや一般的な方法では正確に測定可能でなくなり、実用的な用途にはあまり重要でなくなる。少なくとも、１μMの複合体の解離定数に相当する10^6M^{-1}の親和性で所望のリガンドと結合するアンチカリンが特に好ましい。所望のリガンドに対するアンチカリンの結合親和性は、当業者によって、多数の方法によって、例えば蛍光滴定、競合ELISA又は表面プラズモン共鳴技術によって測定することができる。

【０６４０】

当業者が既知の方法によって産生及びクローニングすることができるリポカリンcDNAは、例えばBbpについて記載されているように(Schmidt及びSkerra、Eur.J.Biochem.219(1994)、855-863)、ペプチドループの突然変異誘発の開始点として役割を果たすことができる。或いは、ゲノムDNAも遺伝子合成に用いることができ、又はこれらの方法の組合せを行うことができる。四つのペプチドループ中のアミノ酸の突然変異誘発では、当業者は、ポリメラーゼ連鎖反応による部位特異的突然変異誘発又は突然変異誘発の様々な既知の方法を自由に使える。突然変異誘発方法は、たとえは、所望の位置で縮重塩基組成を保有する合成オリゴデオキシヌクレオチドの混合物を用いて突然変異を導入できる点を特徴とすることができる。例えばイノシンなどのように減少した塩基対特異性を有するヌクレオチド構成単位の実装も、突然変異を選択した配列セグメント又はアミノ酸位置内に導入する一つの選択肢である。リガンド結合部位の突然変異誘発の手順は抗体と比較して単純化されており、これは、リポカリンでは、6個ではなく、四つの上述のペプチドループに対応する4個の配列セグメントしかこの目的で操作する必要がないためである。

【０６４１】

合成オリゴデオキシヌクレオチドを実行する部位特定期ランダム突然変異誘発の方法では、突然変異させるリポカリン構造中の関連するアミノ酸位置を事前に決定することができる。突然変異させるアミノ酸位置の理想的な選択は、一方では使用するリポカリン、他方では所望のリガンド(例えばヒト血清アルブミン)に依存することができる。突然変異誘発によって得られる変異体のコレクション、即ちいわゆるライブラリーが、コード核酸のレベルだけでなく遺伝子産物のレベルでも、その全体で又は少なくともそれからの代表的な選択が、そのコンビナトリアル複雑さにおいて可能な限り完全に実現できるように、単一実験での突然変異したアミノ酸位置の合計数を十分に低く保つことが有利な場合がある。

【０６４２】

特に、BBP及びRbpの場合のように使用するリポカリン自体に関する、又は、例えばApoDの場合のように少なくとも同様の構造を有するリポカリンに関する構造情報が存在する場合、突然変異するアミノ酸位置を有意義な様式で選択することが可能である。選択するアミノ酸位置の組はさらに、所望のリガンドの特徴に依存することができる。また、例えば、タンパク質の折り畳み効率又は折り畳みの安定性に重要であることが判明している場合は、リガンド結合ポケットの領域中の単一のアミノ酸位置を突然変異誘発から除外することも有利であると判明する場合がある。リポカリン突然変異誘発の特定オリゴヌクレオチ

ドに基づいた方法、例えば、そのすべての内容が本明細書中に参照により組み込まれている米国特許公報第20060058510号に記載されている。

【０６４３】

突然変異誘発に供したコード核酸配列を発現させた後、所与のリガンド(例えばヒト血清アルブミン)と結合するアンチカリンの遺伝情報を保有するクローンを、得られたライブラリーの様々なクローンから選択することができる。既知の発現戦略及び選択戦略をこれらのクローンの選択に実行することができる。この種の方法は、「ファージディスプレイ」技術又は「コロニースクリーニング」方法などの組換え抗体断片を産生又は操作する場面で記載されている(Skerra他、Anal.Biochem.196(1991)、151-155)。

【０６４４】

「ファージディスプレイ」技術の説明は、例えば、Hoess、Curr.Opin.Struct.Biol.3(1993)、572-579;Wells及びLowman、Curr.Opin.Struct.Biol.2(1992)、597-604;並びにKay他、ペプチド及びタンパク質のファージディスプレイ-実験室の手引き(Phage Display of Peptides and Proteins-A Laboratory Manual)(1996)、Academic Pressに見つかる。手短に述べると、例示的な実施形態では、シグナル配列、好ましくはOmpAシグナル配列をN末端に有し、ファージM13のコートタンパク質pIII(Model及びRussel、「バクテリオファージ(The Bacteriophages)」、第2巻(1988)、Plenum Press、ニューヨーク、375-456)又はファージのコート内に組み込まれているこのコートタンパク質の断片をC末端に有する融合タンパク質として、突然変異したリポカリン構造遺伝子の発現をもたらす、ファスミドを産生する。天然のコートタンパク質pIIIのアミノ酸217～406のみを含むファージコートタンパク質のC末端断片ApIIIを使用して、融合タンパク質を生成することが好ましい。位置201のシステイン残基が欠損又は別のアミノ酸によって置き換えられている、pIIIからのC末端断片が特に好ましい。特異的な結合特性を有する「アンチカリン」の産生においてリポカリンに適用できる、ファージディスプレイ方法、選択方法などのさらなる説明は、例えば、そのすべての内容が本明細書中に参照により組み込まれている米国特許公報第20060058510号に詳述されている。

【０６４５】

アンチカリンを、例えば上述の方法を用いて、所与のリガンド(例えばヒト血清アルブミン)に対して高い親和性を保有するように、同定及び産生することができる。新規リガンドが、Bbpの最初のリガンドであるビリベルジンIXγとまったく構造的関係性を有さない場合でも、$10^{6}M^{-1}$を超えるリガンド結合定数をアンチカリンで達成することができる(米国特許公報第20060058510号参照)。アンチカリンで達成可能な新規リガンドに対するそのような親和性は、二次免疫応答からの抗体で知られている親和性に匹敵する。さらに、そのようにして得られた新しいライブラリーからさらに高い親和性の変異体を選択するために、生成されたアンチカリンを、任意選択のさらなる部分的ランダム突然変異誘発に供する可能性もさらに存在する。対応する手順は、「親和性成熟」の目的で組換え抗体断片の場合について既に記載されており(Low他、J.Mol.Biol.260(1996)、359-368;Barbas及びBurton、Trends Biotechnol.14(1996)、230-234)、当業者によって対応する様式でアンチカリンにも適用することができる。

実施例２０

【０６４６】

ブドウ球菌プロテインA(SPA)/アフィボディ

血清アルブミン結合部分の選択による、血清アルブミンと結合するアフィボディ(ブドウ球菌プロテインA(SPA))非免疫グロブリン足場を含む二重特異性リガンドの作製

ブドウ球菌プロテインA(SPA)のZドメインをライブラリー選択に供し、任意選択で、本発明の二重特異性リガンドで使用するためのヒト血清アルブミンと結合するSPA由来非免疫グロブリン足場分子(「アフィボディ」と呼ばれる)を生成するための親和性成熟技術に供する。

【０６４７】

Biacoreによるリアルタイム結合分析を行って、ヒト血清アルブミンが固定したSPAポリ

ペプチドと特異的に結合するかどうかを評価した。(当業者は、結合親和性は、例えば、標識したヒト血清アルブミンの沈殿、競合的Biacoreアッセイなどを含めた任意の適切な方法を使用して評価することができることを理解されよう。)ヒト血清アルブミンに対する変更されていないSPAポリペプチドの結合親和性(例えばμM範囲以上のKd値)が存在しない又は低いことが検出された後、標的抗原に対する分子の結合親和性を与える及び/又は増強させるように設計されている以下の方法のうちの一つ又は複数を含めたいくつかの戦略のうちの少なくとも一つを用いて、SPAポリペプチドにヒト血清アルブミン結合特性を与える。

【０６４８】

SPA足場ポリペプチドのヒト血清アルブミン結合を行い、突然変異方法によって、任意選択で以下に記載されているように及び/又は他の様式で当分野において知られているように並行した及び/又は反復の選択方法と組み合わせて、最適化する。SPA足場ポリペプチドドメインを、下記に記載のように行うランダム化及び/又はNNK突然変異誘発に供する。そのような突然変異誘発は、SPAポリペプチドのZドメインの全体、又はSPAポリペプチド内の特定の配列、例えば、Nord他(1997 Nat.Biotechnol.15:772-77)によって同定されたドメインZの13個の溶媒に接近可能な表面残基に行い、任意選択で、新規又は改良されたヒト血清アルブミンと結合するポリペプチドを進化させるためにランダム化されている。そのような突然変異誘発方法を行うためにPCRを任意選択で使用して、SPAポリペプチド内の標的配列全体にわたって、配列多様性が生じることがもたらされる。(そのような手法は、dAbライブラリーの作製について下記に記載したものに類似している。)突然変異誘発のランダム方法に加えて、構造情報によりSPAポリペプチドの特定のアミノ酸残基がヒト血清アルブミンの結合に重大であることが確立された場合は、標的アミノ酸残基の部位特異的突然変異誘発を用いる。特定の実施形態では、突然変異体Zドメイン遺伝子のレパートリーをアセンブルし、一価ファージディスプレイに適用させたファージミドベクター内に挿入する。例えば数百万個の形質転換体を含むライブラリーを、例えば、突然変異誘発のためにNN(G/T)又は代わりに(C/A/G)NN縮重を使用して構築する。

【０６４９】

上述のように操作したSPAポリペプチドを、並行した及び/又は反復の選択方法に供して、ヒト血清アルブミン結合に最適化されているSPAポリペプチドを同定する。例えば、突然変異誘発したSPAポリペプチド配列のライブラリーを生成した後、前記ポリペプチドのライブラリーをファージ上に提示させ、dAbのライブラリーからの血清アルブミンと結合するdAbの選択について記載したように、血清アルブミンの結合及び/又は増殖を要する複数ラウンドの選択に供する。血清アルブミンと結合するSPA分子の有意な濃縮を果たすために、ヒト血清アルブミン標的タンパク質に対するバイオパニングを行う。続いて選択したクローンを大腸菌で発現させ、SDS-PAGE、円二色性分光分析、及び生物特異的相互作用分析によるヒト血清アルブミンに対する結合研究によって分析した。ヒト血清アルブミンと結合するSPA分子(アフィボディ)は、ネイティブZドメインに類似の二次構造を有し、そのそれぞれの標的に対するマイクロモル範囲の解離定数(Kd)がμM以上(例えば、nM又はpM)の範囲であることが予想される。

【０６５０】

任意選択で、イムノチューブ上に固定した血清アルブミンに対して又は溶液中のビオチン標識した血清アルブミンに対して選択を行う。任意選択で、結合親和性を、Biacoreシステム(スウェーデンUppsala)を用いて、表面プラズモン共鳴(SPR)及びBiacore(Karlsson他、1991)を用いて決定し、完全に最適化されたSPA由来のポリペプチドは、理想的には、nM範囲又はそれ以上のヒト血清アルブミンの結合親和性のKd値に達する。

【０６５１】

ヒト血清アルブミンと結合するSPAポリペプチドを同定した後、そのようなポリペプチドを使用して、下記に記載する任意の方法によって二重特異性リガンド組成物を作製する。

【０６５２】

ブドウ球菌プロテインA(SPA)アフィボディポリペプチド

細菌受容体の溶媒に曝された表面を、ランダム突然変異誘発、次いで、例えば血清アルブミンに対する結合親和性をそのような受容体分子に与えることを目的とする表現型選択の標的とすることができる。そのようなタンパク質は異常に安定である場合があり、それによりこれらが様々な用途に適切となる(Alexander他(1992)Biochemistry 31:3597-3603)。特に、ヘリックスバンドル構造を含む細菌受容体では、コンホメーションは、残基の側鎖の変化を許容するがヘリックスパッキング界面に関与しないと予測することができる。そのような分子の例は、ブドウ球菌プロテインA(SPA)の比較的小さな(58個の残基)IgG結合ドメインB及びドメインZと呼ばれるドメインBの合成類似体である(Nilsson他(1987)Protein Engineering 1:107-113)。

【０６５３】

SPA由来ドメインZは、新規結合特性を有するドメイン変異体を構築する目的で足場として利用するSPAの一次ドメインである(例えば、その全体で本明細書中に参照により組み込まれている、WO00/63243及びWO95/19374参照)。SPAのZドメインは、ファージディスプレイ技術を用いて所望の分子(例えばヒト血清アルブミン)を標的とする変異体が選択するコンビナトリアルファージミドライブラリーを構築するための足場として使用される、58個のアミノ酸残基のシステインを含まない、三つのヘリックスのバンドルドメインである(Nilsson他1987 Protein Eng.1:107-113;Nord他1997 Nat.Biotechnol.15:772-777;Nord他2000 J.Biotechnol.80:45-54;Hansson他1999 Immunotechnology 4:237-252;Eklund他、2002 Proteins 48:454-462;Ronnmark他2002 Eur.J.Biochem.269:2647-2655)。「アフィボディ」分子と呼ばれるそのような標的と結合する変異体は、コンビナトリアルライブラリーのファージディスプレイによってタンパク質を標的とするための結合剤として選択され、典型的には、Zドメイン内のヘリックス1及び2の表面上の13個の側鎖(Q9、Q10、N11、F13、Y14、L17、H18、E24、E25、R27、N28、Q32及びK35)がランダム化されている(Lendel他2006 J.Mol.Biol.359:1293-304)。そのようなアフィボディ分子の単純且つ頑強な構造が、その低分子量(7Kda)とあいまって、これらを広範な用途に適切なものとする。バイオプロセス及び実験室スケールのバイオ分離で示された有効性が文献に記載されており(Nord他2000 J.Biotechnol.80:45-54;Nord他2001 Eur.J.Biochem.268:4269-4277;Graslund他2002 J.Biotechnol.99:41-50)、アフィボディリガンドを検出試薬として評価した場合(Karlstrom及びNygren 2001 Anal.Biochem.295:22-30;Ronnmark他2002 J.Immunol.Methods 261:199-211)、アデノウイルスの指向性を操作するため(Henning他2002 Hum.Gene Ther.13:1427-1439)及び受容体相互作用を阻害するために(Sandstrom他2003 Protein Eng.16:691-697)、有望な結果が得られている。したがって、例えばヒト血清アルブミンと結合する操作したアフィボディリガンドが、本発明の特定の二重特異性リガンド組成物の望ましい構成要素である。

【０６５４】

ブドウ球菌プロテインAのZドメインに由来するポリペプチドのライブラリーは、当分野で知られている及び/又は下記に記載の突然変異誘発の任意の方法によって作製し得る。そのようなポリペプチドライブラリーを作製した後、所望の標的分子(例えばヒト血清アルブミン)と結合することができる変異体を、例えば、ファージディスプレイ(Dunn 1996;Smith及びPatrenko 1997;Hoogenboom他1998)、リボソームディスプレイ(Hanes及びPluckthun 1997;He及びTaussig 1997)プラスミド上のペプチド(Schatz 1993)又は細菌ディスプレイ(Georgiou他1997)などのin vitro選択技術を用いて、効率的に選択及び同定することができる。そのような選択では、ライブラリーの大きさ(複雑さ)とより高い親和性の結合剤($KD=10^{-8}M$以下)を単離する可能性との相関が、理論的に検討され(Perelson及びOster 1979)、実験的に実証されている(Griffiths他1994;Vaughan他1996;Aujame他1997)。

【０６５５】

アフィボディは、従来の抗体を超えるいくつかの利点、例えば、(i)製造コストがより低いこと;(ii)より小さな大きさ;(iii)増加した安定性及び頑健性;並びに(iv)ウイルス汚染の危険性を取り除く、細菌宿主内、又は化学合成によって組換えによって産生できるこ

とを有する。

【０６５６】

アフィボディは、ブドウ球菌プロテインA(SPA)ドメインの誘導体であるポリペプチドであり、前記SPAドメインはB又はZドメインであり、いくつかのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基によって置換されており、前記置換は前記SPAドメインの基本的な構造及び安定性を実質的に損失させずに行われ、前記置換は、前記ポリペプチドが標的抗原(例えばヒト血清アルブミン)の少なくとも一つのドメインと相互作用する能力をもたらす。置換されたアミノ酸残基の数は、1～約30、又は1～約13であり得る。他の可能な範囲は、4～約30;4～約13;5～約20、又は5～約13個のアミノ酸残基である。当業者には、例えばNord他1997 Nat.Biotechnol.15:772-777から、優先的には、Zドメインの表面上に位置するアミノ残基を置換することができる一方で、バンドルの核は分子の構造的特性を保存するために一定に保つべきであることが理解されよう。

【０６５７】

アフィボディを製造する方法は、例えばWO00/63243に記載されており、本発明の目的で、例えば以下のステップを含むことができる:(i)例えば、ファージディスプレイ(総説には、例えば、Kay,K.他(編)ペプチド及びタンパク質のファージディスプレイ:実験室の手引き(Pharge Display of Peptides and Proteins:A Laboratory Manual)、Academic Press、San Diego、ISBN 0-12-4023 80-0を参照されたい)、リボソームディスプレイ(総説には、例えば、Hanes,J.他(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:14130-14135を参照されたい)又は細胞ディスプレイ(総説には、例えば、Daugherty,P.S.他(1998)Protein Eng.11:825-832を参照されたい)によって、SPAドメインB又はZに由来するポリペプチド変異体のレパートリーを具現化するタンパク質ライブラリーからのポリペプチド変異体を提示するステップと;(ii)ヒト血清アルブミンと結合するポリペプチドを発現するクローンを選択するステップと;(iii)選択したクローンの組換え発現又は化学合成によってポリペプチドを産生するステップ。

実施例２１

【０６５８】

アビマー

CDR移植による、血清アルブミンと結合するアビマーを含む二重特異性リガンドの作製

dAb7h14のCDRドメインを用いて、以下の様式で、ヒト血清アルブミンと結合するアビマーポリペプチドを構築した。dAb7h14のCDR1(RASQWIGSQLS;配列番号_)、CDR2(WRSSLQS;配列番号_)、及びCDR3(AQGAALPRT;配列番号_)の配列を、C2単量体(その全体が本明細書中に参照により組み込まれている米国特許公報第2005/0,221,384号に記載)内の、C2単量体のそれぞれループ領域1、2及び3を構成する残基17～28、49～53及び78～85にそれぞれ移植した。Biacoreによるリアルタイム結合分析を行って、ヒト血清アルブミンが、dAb7h14の抗ヒト血清アルブミンCDRドメインを含む固定したC2由来単量体ポリペプチドと特異的に結合するかどうかを評価した。(当業者は、結合親和性は、例えば、標識したヒト血清アルブミンの沈殿、競合的Biacoreアッセイなどを含めた任意の適切な方法を使用して評価することができることを理解されよう。)検出されるヒト血清アルブミン親和性(例えばμM範囲以上のKd値)が存在しない又は低い場合、結合親和性に寄与する以下の任意の方法を含めたいくつかの戦略のうちの少なくとも一つを用いて、CDRを移植したC2単量体(並びに/又はアビマー二量体、三量体及び他の高次反復組成物)のヒト血清アルブミン結合特性を改善させる。

【０６５９】

ネイティブC2単量体(及び/又はアビマー組成物で使用される他のネイティブ単量体)内の溶媒に曝されたループ領域に対応する、最初のC2単量体ポリペプチド(及び/又は反復産生したアビマー二量体、三量体などのポリペプチド)のdAb7h14 CDRを移植した領域の長さは、リンカーポリペプチドを使用することで調整する。例えば、dAb7h14の9個のアミノ酸残基のCDR3ペプチド配列は、dAb7h14 CDR3ポリペプチド配列のN又はC末端の隣接する側の一方及び/又は両方上に位置する、例えば0～4個の残基の長さのアミノ酸リンカーを用い

て、長さを13個のアミノ酸残基まで延長することができ、これにより、C2単量体ポリペプチドのループ3に対応するCDR3を移植したドメイン内の移植したペプチド配列の長さが、合計13個のアミノ酸となる。リンカーポリペプチドのそのような使用を、任意選択で、リンカー配列、CDR配列及び/又は非CDR C2単量体ポリペプチド配列の突然変異誘発(例えば、以下に記載の突然変異最適化手順を使用)と組み合わせて、CDRを移植したC2単量体ポリペプチドのヒト血清アルブミン結合能力を改善させる(例えば、CDRを移植したC2単量体ポリペプチド内のCDR及びC2単量体ポリペプチド配列の両方の最適化による)。そのような目的で用いるポリペプチドリンカーは、事前に決定した配列を保有するか、又は、任意選択で、リンカー含有のCDRを移植したC2単量体ポリペプチドのヒト血清アルブミン結合能力の評価によって、ランダム化されたポリペプチドリンカー配列の集団から選択する。最適化方法は並行して及び/又は反復で行う。並行した及び反復の最適化(例えば親和性成熟)プロセスはどちらも、以下に記載の及び/又は当分野でポリペプチド結合特性の最適化に有用であることが知られている選択方法を用いる。

【０６６０】

dAb7h14 CDRを提示するCDRを移植したC2単量体ポリペプチド(及び/又はアビマー二量体、三量体などの反復産生した高次組成物、若しくはそれに寄与する個々のさらなる単量体)のヒト血清アルブミン結合を、任意選択で以下に記載されているように及び/又は他の様式で当分野において知られているように並行した及び/又は反復の選択方法と組み合わせて、突然変異誘発によって最適化する。例示的なC2単量体足場ポリペプチドでは、移植したdAb7h14 CDRポリペプチド配列を取り囲むドメインを、下記に記載のように行うランダム化及び/又はNNK突然変異誘発に供する。そのような突然変異誘発は、任意選択でC2単量体ポリペプチド配列内の、例えば米国特許公報第2005/0,221,384号に記載した選択したアミノ酸残基に行うか、又は、任意選択ですべての非CDRアミノ酸残基に行い、任意選択で、新規又は改良されたヒト血清アルブミンと結合するポリペプチドを進化させるためにランダム化されている。任意選択で、CDRを移植したC2単量体ポリペプチド内に提示されるdAb7h14 CDRポリペプチドドメインを、例えば、ランダム突然変異誘発、NNK突然変異誘発、ルックスルー突然変異誘発及び/又は他の当分野で認識されている方法による突然変異誘発に供する。そのような突然変異誘発方法を行うためにPCRを任意選択で使用して、CDRを移植したC2単量体ポリペプチド内の標的配列全体にわたって、配列多様性が生じることがもたらされる。そのような手法は、dAbライブラリーの作製について下記に記載したものに類似している。突然変異誘発のランダム及び/又はルックスルー方法に加えて、構造情報により特定のアミノ酸残基がヒト血清アルブミンの結合に重大であることが確立された場合は、標的アミノ酸残基の部位特異的突然変異誘発を用いる。

【０６６１】

上述のように操作した、移植したdAb7h14 CDR配列を含むC2単量体ポリペプチド(及び/又は個々の単量体を含む反復産生したアビマー組成物)を、並行した及び/又は反復の選択方法に供して、ヒト血清アルブミン結合に最適化されているC2単量体ポリペプチド(及びアビマー組成物)を同定する。例えば、dAb7h14 CDRを移植したC2単量体ポリペプチド配列のライブラリーを生成した後、そのようなポリペプチドのこのライブラリーをファージ上に提示させ、dAbのライブラリーからの血清アルブミンと結合するdAbの選択について下記に記載したように、血清アルブミンの結合及び/又は増殖を要する複数ラウンドの選択に供する。任意選択で、イムノチューブ上に固定した血清アルブミンに対して又は溶液中のビオチン標識した血清アルブミンに対して選択を行う。任意選択で、結合親和性を、Biacoreシステム(スウェーデンUppsala)を用いて、表面プラズモン共鳴(SPR)及びBiacore(Karlsson他、1991)を用いて決定し、完全に最適化されたC2由来単量体を含むアビマーは、理想的には、nM範囲又はそれ以上のヒト血清アルブミンの結合親和性のKd値に達する。

【０６６２】

ヒト血清アルブミンと結合するC2単量体由来のポリペプチドを同定する際、そのような初期単量体のヒト血清結合特性は、そのような単量体と他の単量体との組合せ、次いでさらなる突然変異誘発及び/又は選択、それによりヒト血清アルブミンに対して特異的親和

性を有するアビマー組成物を形成することによって、さらに増強させ得る。ヒト血清アルブミンに対して親和性を有するアビマー組成物を同定した後、そのようなアビマーポリペプチドを使用して、下記に記載する任意の方法によって二重特異性リガンド組成物を作製する。

実施例２２

【０６６３】

血清アルブミン結合部分の選択による、血清アルブミンと結合するアビマー非免疫グロブリン足場を含む二重特異性リガンドの作製

記載したネイティブC2単量体ポリペプチドをライブラリー選択に供し、任意選択で親和性成熟技術に供し、その後、追加の単量体(例えば、フィブロネクチン単量体、そのヒト血清アルブミン親和性を任意選択で並行して最適化することができる)と組み合わせ、任意選択でライブラリー選択に反復的に供し、任意選択で、本発明の二重特異性リガンドで使用するための、ヒト血清アルブミンと結合するアビマー非免疫グロブリン足場分子を生成するための親和性成熟技術に供する。

【０６６４】

Biacoreによるリアルタイム結合分析を行って、ヒト血清アルブミンが、固定したC2単量体ポリペプチド(及び/又は反復産生したアビマー分子)と特異的に結合するかどうかを評価した。ヒト血清アルブミンに対するC2単量体ポリペプチドの結合親和性(例えばμM範囲以上のKd値)が存在しない又は低いことが検出された後、結合親和性に寄与する以下の方法のうちの一つ又は複数を含めたいくつかの戦略のうちの少なくとも一つを用いて、C2単量体ポリペプチドにヒト血清アルブミン結合特性を与える。

【０６６５】

C2単量体ポリペプチド(及び/又は反復産生したアビマー二量体、三量体などの分子)のヒト血清アルブミン結合を行い、突然変異方法によって、任意選択で以下に記載されているように及び/又は他の様式で当分野において知られているように並行した及び/又は反復の選択方法と組み合わせて、最適化する。C2単量体ポリペプチドドメインを、下記に記載のように行うランダム化及び/又はNNK突然変異誘発に供する。そのような突然変異誘発は、C2単量体ポリペプチドの全体、又はC2単量体ポリペプチド内の特定の配列、例えば米国特許公報第2005/0,221,384号に記載の選択したアミノ酸残基に行い、任意選択で、新規又は改良されたヒト血清アルブミンと結合するポリペプチドを進化させるためにランダム化されている。そのような突然変異誘発方法を行うためにPCRを任意選択で使用して、C2単量体ポリペプチド及び/又はアビマー分子内の標的配列全体にわたって、配列多様性が生じることがもたらされる。(そのような手法は、dAbライブラリーの作製について下記に記載したものに類似している。)突然変異誘発のランダム方法に加えて、構造情報によりC2単量体及び/又はアビマー分子の特定のアミノ酸残基がヒト血清アルブミンの結合に重大であることが確立された場合は、標的アミノ酸残基の部位特異的突然変異誘発を用いる。

【０６６６】

上述のように操作したC2単量体ポリペプチドを、並行した及び/又は反復の選択方法に供して、ヒト血清アルブミン結合に最適化されているC2単量体ポリペプチド及び/又はアビマー分子を同定する。例えば、突然変異誘発したC2単量体ポリペプチド配列のライブラリーを生成した後、前記ポリペプチドのライブラリーをファージ上に提示させ、dAbのライブラリーからの血清アルブミンと結合するdAbの選択について下記に記載したように、血清アルブミンの結合及び/又は増殖を要する複数ラウンドの選択に供する。任意選択で、選択ラウンドには、さらなる単量体サブユニットを加えて新しいアビマー分子を形成する反復が含まれる。任意選択で、イムノチューブ上に固定した血清アルブミンに対して又は溶液中のビオチン標識した血清アルブミンに対して選択を行う。任意選択で、結合親和性を、Biacoreシステム(スウェーデンUppsala)を用いて、表面プラズモン共鳴(SPR)及びBiacore(Karlsson他、1991)を用いて決定し、完全に最適化されたC2由来単量体を含むアビマーポリペプチドは、理想的には、nM範囲又はそれ以上のヒト血清アルブミンの結合親和性のKd値に達する。

【０６６７】
ヒト血清アルブミンと結合するC2単量体由来のポリペプチドを同定する際、そのような初期単量体のヒト血清結合特性は、そのような単量体と他の単量体との組合せ、次いでさらなる突然変異誘発及び/又は選択、それによりヒト血清アルブミンに対して特異的親和性を有するアビマー組成物を形成することによって、さらに増強させ得る。ヒト血清アルブミンに対して親和性を有するアビマー組成物を同定した後、そのようなアビマーポリペプチドを使用して、下記に記載する任意の方法によって二重特異性リガンド組成物を作製する。

【０６６８】
アビマーポリペプチドの産生及び使用

アビマーは、in vitroエクソンシャフリング及びファージディスプレイによって結合及び/又は阻害特性を有する複数ドメインタンパク質を生じるヒト細胞外受容体ドメインの大きなファミリーから進化している。複数の独立した結合ドメイン(例えば、標的タンパク質、例えばヒト血清アルブミンに対する結合について反復的に選択した)を連結することで結合力が生じ、従来の単一エピトープ結合タンパク質と比較して改善した親和性及び特異性がもたらされる。他の潜在的な利点には、大腸菌中での多重標的特異的な分子の単純且つ効率的な産生、改善された熱安定性及びプロテアーゼ耐性が含まれる。標的タンパク質に対してnM以下の親和性を保有するアビマーを産生することができる。例えば、細胞に基づいたアッセイでインターロイキン6をIC_{50}の0.8pMで阻害するアビマーが産生され、生物活性があると特徴づけられている(そのそれぞれがその全体で本明細書中に参照により組み込まれている、Silverman他2005 Nature Biotechnology 23:1556-1561;また、例えば、米国特許出願第2005/0,221,384号、第2005/0,164,301号、第2005/0,053,973号及び第2005/0,089,932号、第2005/0,048,512号、並びに第2004/0,175,756号も参照)。

【０６６９】
アビマーの合成は、Aドメインのヒトレパートリーに由来するファージディスプレイライブラリーを含む。Silverman他(2005 Nature Biotechnology 23:1556-1561)に記載のように、合成組換えを用いて、多様性の高い単量体のプールを作製する。単量体のプールを作製した後、プールを標的タンパク質(例えばヒト血清アルブミン)に対してスクリーニングする。初期候補を同定し、追加の単量体を加え、生じる二量体ライブラリーを標的タンパク質に対してスクリーニングして、標的と結合する候補二量体を同定する。その後、この方法を繰り返して、標的タンパク質に対して非常に高い結合親和性を有する三量体を得て、任意選択で、より高次の候補複合体を同定するためにさらに繰り返し得る。高い親和性及び特異性で標的タンパク質と結合すると同定された候補複合体をアビマーと呼ぶ(「結合力多量体(avidity multimer)」から)。

【０６７０】
アビマーの単量体ドメインは、任意の大きさのポリペプチド鎖であり得る。例えば、単量体ドメインは、約25～約500、約30～約200、約30～約100、約90～約200、約30～約250、約30～約60、約9～約150、約100～約150、約25～約50、又は約30～約150個のアミノ酸を有することができる。同様に、アビマーの単量体ドメインは、例えば、約30～約200個のアミノ酸;約25～約180個のアミノ酸;約40～約150個のアミノ酸;約50～約130個のアミノ酸;又は約75～約125個のアミノ酸を含むことができる。単量体ドメイン及び免疫ドメインは、典型的には溶液中で安定したコンホメーションを維持することができる。場合によっては、アビマー及び免疫ドメインの単量体ドメインは、独立して安定なコンホメーションに折り畳まれることができる。安定したコンホメーションは、金属イオンによって安定化することができる。安定したコンホメーションは、任意選択でジスルフィド結合(例えば、少なくとも1個、2個、又は3個以上のジスルフィド結合)を含むことができる。ジスルフィド結合は、任意選択で二つのシステイン残基間に形成されることができる。

【０６７１】
単量体ドメイン及びモザイクタンパク質を記載する公報及びそれらに引用される参考文献には、Hegyi,H及びBork,P.1997 J.Protein Chem.、16:545-551;Baron他1991 Trends Bi

ochem.Sci.16:13-17;Ponting他2000 Adv.Protein Chem.54:185-244;Doolittle 1995 Annu.Rev.Biochem 64:287-314;Doolitte及びBork 1993 Scientific American 269:50-6;並びにBork 1991 FEBS letters 286:47-54が含まれる。また、アビマーで使用する単量体ドメインには、Pfamデータベース及びSMARTデータベースに見つかるドメインも含まれ得る。Schultz他2000 Nucleic Acid Res.28:231-34を参照されたい。

【０６７２】

アビマー組成物での使用が特に適した単量体ドメインは、(1)βサンドイッチドメイン;(2)βバレルドメイン;又は(3)ジスルフィド結合を含むシステインに富んだドメインである。アビマーで用いるシステインに富んだドメインは、典型的にはαヘリックス、βシート、又はβバレル構造を形成しない。典型的には、ジスルフィド結合がドメインの三次元構造への折り畳みを促進する。通常、システインに富んだドメインは、少なくとも二つのジスルフィドバンド、より典型的には少なくとも三つのジスルフィド結合を有する。

【０６７３】

アビマーの単量体ドメインは、任意の数の特徴を有することができる。例えば、ドメインは、動物(例えばヒト)における免疫原性が低い又は存在しないことができる。ドメインは小さな大きさであり得、例えば、ドメインは、皮膚又は他の組織に浸透するほど十分に小さくてもよい。ドメインは、様々なin vivo半減期又は安定性を保有することができる。

【０６７４】

アビマー組成物での使用に適した例示的な単量体ドメインには、例えば、EGF様ドメイン、クリングルドメイン、フィブロネクチンI型ドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、フィブロネクチンIII型ドメイン、PANドメイン、Glaドメイン、SRCRドメイン、クニッツ/ウシ膵臓トリプシン阻害ドメイン、カザール型セリンプロテアーゼ阻害ドメイン、トレフォイル(P型)ドメイン、フォンウィルブランド因子C型ドメイン、アナフィラトキシン毒素様ドメイン、CUBドメイン、サイログロブリンI型反復、LDL-受容体クラスAドメイン、スシドメイン、連結ドメイン、トロンボスポンジンI型ドメイン、サイログロブリン単量体ドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、フォンウィルブランド因子A型ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型の四重ジスルフィド核ドメイン、F5/8 C型ドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、及び当業者に知られている他のそのようなドメイン、並びにそれらの誘導体及び/又は変異体が含まれる。米国特許公報第20050221384号は、LDL-受容体ファミリー中の分子に見つかる単量体ドメインの様々な例示的な形態の模式図を示す。

【０６７５】

適切な単量体ドメイン(例えば、独立して又は何らかの限定された支援により折り畳まれる能力を有するドメイン)は、Simple Modular Architecture Research Tool(SMART;Shultz他2000 Nucleic Acids Research 28:231-234参照)又はCATH(Pearl他2000 Nucleic Acids Research 28:277-282参照)などのコンピュータ配列解析ツールによって定義される、βサンドイッチ又はβバレルの三次元構造を含むタンパク質ドメインのファミリーから選択することができる。また、アビマーの例示的な単量体ドメインには、フィブロネクチンIII型ドメイン、アンチカリンドメイン及びCTLA-4由来のIg様ドメインのドメインも含まれる。これらのドメインの態様の一部は、その内容がその全体で本明細書中に参照により組み込まれている、Lipovsek他のWO01/64942、Beste他のWO99/16873、及びDesmet他のWO00/60070に記載されている。

【０６７６】

アビマーの単量体ドメインは、任意選択でシステインに富んでいる。適切なシステインに富んだ単量体ドメインには、例えば、LDL受容体クラスAドメイン(「Aドメイン」)又はEGF様ドメインが含まれる。また、単量体ドメインは、陰性残基のクラスターも有することができる。任意選択で、単量体ドメインは、βプロペラドメイン中に見つかるYWTDなどの反復配列を含む。アビマーでの使用に適した別の例示的な単量体ドメインは、C2ドメイン

である。突然変異標的化に最も望ましい例示的なアミノ酸残基のセレクション(例えば表面に曝されたループ残基)を含めた、アビマーの産生に有用な例示的なAドメイン及びC2ドメイン配列並びにコンセンサス配列は、米国特許公報第2005/0,221,384号に記載されている。

【０６７７】

典型的には、単量体ドメインをコードしているポリヌクレオチド(核酸とも呼ばれる)を用いて、発現によって単量体ドメインを作製する。単量体ドメインをコードしている核酸は、様々な異なる供給源に由来することができる。天然単量体ドメイン、変更された単量体ドメイン(即ち単量体ドメイン変異体)、又はそれらの組合せをコードしている複数の異なる核酸を発現させることによって、単量体ドメインのライブラリーを調製することができる。

【０６７８】

選択した若しくは所望のリガンド(例えばヒト血清アルブミン)又はリガンドの混合物と結合する単量体ドメインを、任意選択でアビマー産生の最初のステップとして同定する。一部の実施形態では、単量体ドメイン及び/又は免疫ドメインを所望の特性(例えばヒト血清アルブミンに対する結合親和性)に関して同定又は選択し、その後、単量体ドメイン及び/又は免疫ドメインを多量体に形成する。これらの実施形態では、所望の特性(例えばヒト血清アルブミン結合)を有するドメインの選択をもたらす任意の方法を使用することができる。例えば、この方法は、それぞれの核酸が単量体ドメインをコードしている複数の異なる核酸を提供し;複数の異なる核酸を翻訳することで、複数の異なる単量体ドメインを提供し;所望のリガンド又はリガンドの混合物の結合について複数の異なる単量体ドメインをスクリーニングし;所望のリガンド又はリガンドの混合物と結合する複数の異なる単量体ドメインのメンバーを同定することを含むことができる。

【０６７９】

アビマーを産生するための単量体ドメインは、天然又は変更されているもの(非天然の変異体)であり得る。本明細書中で使用する用語「天然」とは、自然で見つけることができる物体を示す。例えば、天然の単量体ドメインには、ヒト単量体ドメイン、又は、任意選択で、様々な種若しくは供給源、例えば、哺乳動物、霊長類、げっ歯類、魚、鳥、爬虫類、植物などに由来するドメインが含まれ得る。天然単量体ドメインは、いくつかの方法によって、例えば、ゲノムDNA又はcDNAのPCR増幅によって得ることができる。本明細書中で使用する用語「ネイティブ」とは、突然変異誘発又は下記に記載する任意の方法を行うことによる他の方法によって変更されていない、核酸及び/又はポリペプチドをいう。

【０６８０】

アビマーの単量体ドメインは、天然ドメイン又は非天然変異体であり得る。アビマーの合成で用いる単量体ドメインのライブラリーは、天然単量体ドメイン、非天然単量体ドメイン変異体、又はその組合せを含み得る。

【０６８１】

様々なレポートディスプレイベクター又はシステムを用いて、単量体ドメイン及びアビマーをコードしている核酸を発現させ、所望の活性(例えばヒト血清アルブミン結合)に対して試験する。例えば、ファージディスプレイシステムは、単量体ドメインを融合タンパク質としてファージ表面上に発現させるシステムである(Pharmacia、ウィスコンシン州Milwaukee)。ファージディスプレイは、単量体ドメイン及び/又は免疫ドメインをコードしているポリペプチド配列を、線維状バクテリオファージの表面上に、典型的にはバクテリオファージコートタンパク質との融合体として提示することを含むことができる。親和性濃縮及びファージディスプレイの例示的な方法は、例えば、その全体で本明細書中に参照により組み込まれている、PCT特許公開第91/17271号、第91/18980号、並びに第91/19818号及び第93/08278号に記載されている。

【０６８２】

他のディスプレイシステムの例には、リボソームディスプレイ、ヌクレオチド連結ディスプレイ(例えば、米国特許第6,281,344号;第6,194,550号、第6,207,446号、第6,214,553

号、及び第6,258,558号参照)、細胞表面ディスプレイなどが含まれる。細胞表面ディスプレイには、様々な細胞、例えば、大腸菌、酵母及び/又は哺乳動物細胞が含まれる。細胞をディスプレイとして使用する場合、例えば、PCR増幅、次いで消化によって得た核酸を細胞内に導入し、翻訳する。任意選択で、単量体ドメイン又はアビマーをコードしているポリペプチドを、例えば注入によって細胞内に導入することができる。

【０６８３】

下記及び当分野で記載されているように、アビマーは多量体組成物である。例示的な実施形態では、多量体は、少なくとも二つの単量体ドメイン及び/若しくは免疫ドメインを含む。例えば、本発明の単量体は、2～約10個の単量体ドメイン及び/若しくは免疫ドメイン、2～約8個の単量体ドメイン及び/若しくは免疫ドメイン、約3～約10個の単量体ドメイン及び/若しくは免疫ドメイン、約7個の単量体ドメイン及び/若しくは免疫ドメイン、約6個の単量体ドメイン及び/若しくは免疫ドメイン、約5個の単量体ドメイン及び/若しくは免疫ドメイン、又は約4個の単量体ドメイン及び/若しくは免疫ドメインを含むことができる。一部の実施形態では、多量体は、少なくとも3個の単量体ドメイン及び/又は免疫ドメインを含む。典型的には、単量体ドメインは、目的の標的分子(例えばヒト血清アルブミン)との結合について事前に選択されている。

【０６８４】

アビマー内では、それぞれの単量体ドメインが一つの標的分子(例えばヒト血清アルブミン)と特異的に結合し得る。任意選択で、それぞれの単量体が標的分子上の異なる位置(エピトープに類似)に結合する。同じ標的分子と結合する複数の単量体ドメイン及び/又は免疫ドメインは、それぞれの個々の単量体と比較して標的分子に対する多量体アビマーの結合力の改善をもたらす、結合力効果をもたらすことができる。任意選択で、多量体は、標的タンパク質(例えばヒト血清アルブミン)に対して、単量体ドメイン単独の結合力の少なくとも約1.5、2、3、4、5、10、20、50又は100倍の結合力を保有することができる。

【０６８５】

選択した単量体ドメインは、リンカーによって結合して多量体(アビマー)を形成することができる。例えば、リンカーは、多量体中のそれぞれの別個の単量体ドメインの間に配置する。典型的には、免疫ドメインも、リンカー部分を介して互いに又は単量体ドメインと連結している。免疫ドメイン変異体を一緒に連結するために容易に使用することができるリンカー部分は、単量体ドメイン変異体の多量体について記載したものと同じである。免疫ドメイン変異体と他のドメインとを結合して多量体にするために適した例示的なリンカー部分は、本明細書中に記載されている。

【０６８６】

選択した単量体ドメインをリンカーによって結合してアビマーを形成することは、当分野で知られている様々な技術を用いて達成することができる。例えば、選択した単量体ドメインをコードしているポリヌクレオチドのコンビナトリアルアセンブリは、DNAライゲーションによって、又は、任意選択で、PCRに基づいた自己プライミング重複反応によって達成することができる。リンカーは、単量体を標的多量体と結合するその能力について同定する前又は単量体を標的多量体と結合する能力について選択した後に、単量体と結合させることができる。

【０６８７】

上述のように、アビマーを含むポリペプチドを変更することができる。これらのポリペプチドをコードしている改変された又は変更した核酸配列を作製するために、様々な多様性を生じさせる手順説明は、以下の公報及びその中に引用される参考文献において上記及び下記に記載されている:Soong,N.他、ウイルスの分子育種(Molecular breeding of viruses)、(2000)Nat Genet 25(4):436-439;Stemmer他、標的化及び他の臨床特性のためのウイルスの分子育種(Molecular breeding of viruses for targeting and other clinical properties)、(1999)Tumor Targeting 4:1-4;Ness他、サブチリシンのサブゲノム配列のDNAシャフリング(DNA Shuffling of subgenomic sequences of subtilisin)、(1999)Nature Biotechnology 17:893-896;Chang他、DNAファミリーシャフリングを用いたサイトカイ

ンの進化(Evolution of a cytokine using DNA family shuffling)、(1999)Nature Biotechnology 17:793-797;Minshull及びStemmer、分子育種によるタンパク質進化(Protein evolution by molecular breeding)、(1999)Current Opinion in Chemical Biology 3:284-290;Christians他、DNAファミリーシャフリングを用いたAZTリン酸化のチミジンキナーゼの定向進化(Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling)、(1999)Nature Biotechnology 17:259-264;Crameri他、多様な種からの遺伝子ファミリーのDNAシャフリングが定向進化を加速する(DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution)、(1998)Nature 391:288-291;Crameri他、DNAシャフリングによるヒ酸解毒経路の分子進化(Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling)、(1997)Nature Biotechnology 15:436-438;Zhang他、DNAシャフリング及びスクリーニングによるガラクトシダーゼから有効なフコシダーゼへの定向進化(Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening(1997)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:4504-4509;Patten他、製薬及びワクチンへのDNAシャフリングの応用(Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines)、(1997)Current Opinion in Biotechnology 8:724-733;Crameri他、DNAシャフリングによる抗体-ファージライブラリーの構築及び進化(Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling)、(1996)Nature Medicine 2:100-103;Crameri他、DNAシャフリングを用いた分子進化による改良緑色蛍光タンパク質(Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling)、(1996)Nature Biotechnology 14:315-319;Gates他、lacリプレッサーの「頭部二量体」上のディスプレイによる、ペプチドライブラリーからのリガンドの親和性選択的単離(Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lacrepressor 'headpiece dimer')、(1996)Journal of Molecular Biology 255:373-386;Stemmer、性PCR及びアセンブリPCR(Sexual PCR and Assembly PCR)、(1996)分子生物学百科事典(The Encyclopedia of Molecular Biology)、VCH Publishers、ニューヨーク、ページ447-457;Crameri及びStemmer、コンビナトリアル複数カセット突然変異誘発が突然変異体及び野生型カセットのすべての順列を作製する(Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wildtype cassettes)、(1995)BioTechniques 18:194-195;Stemmer他、遺伝子及び全プラスミドの単一ステップのアセンブリが多数のオリゴデオキシ-リボヌクレオチドを形成する(Single-step assembly of a gene and entire plasmid form large numbers of oligodeoxy-ribonucleotides)、(1995)Gene、164:49-53;Stemmer、分子計算学の進化(The Evolution of Molecular Computation)、(1995)Science 270:1510;Stemmer、配列空間の検索(Searching Sequence Space)、(1995)Bio/Technology 13:549-553;Stemmer、DNAシャフリングによるin vitroにおけるタンパク質の急速な進化(Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling)、(1994)Nature 370:389-391;並びにStemmer、ランダム断片化及び再アセンブリによるDNAシャフリング:分子進化のためのin vitro組換え(DNA shuffling by random fragmentation and reassembly:In vitro recombination for molecular evolution)、(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:10747-10751。

【０６８８】

多様性を作製するための突然変異方法には、例えば、部位特異的突然変異誘発(Ling他、DNA突然変異誘発の手法:概要(Approaches to DNA mutagenesis:an overview)、(1997)Anal Biochem.254(2):157-178;Dale他、ホスホロチオエート方法を用いたオリゴヌクレオチド特異的ランダム突然変異誘発(Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method)、(1996)Methods Mol.Biol.57:369-374;Smith、in vitro突然変異誘発(In vitro mutagenesis)、(1985)Ann.Rev.Genet.19:423-462;Botstein及びShortle、in vitro突然変異誘発の戦略及び応用(Strategies and applications of in vitro mutagenesis)、(1985)Science 229:1193-1201;Carter、部位特異的突然変異誘発(Site-directed mutagenesis)、(1986)Biochem.J.237:1-7;並びにKunkel、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発の効率(The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis)

、(1987)、核酸及び分子生物学(Nucleic Acids & Molecular Biology)(Eckstein,F.及びLilley,D.M.J.編、Springer Verlag、Berlin));ウラシル含有鋳型を用いた突然変異誘発(Kunkel、表現型選択を用いない迅速且つ効率的な部位特異的突然変異誘発(Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection)、(1985)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:488-492;Kunkel他、表現型選択を用いない迅速且つ効率的な部位特異的突然変異誘発(Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection)、(1987)Methods in Enzymol.154、367-382;及びBass他、新規DNA結合特異性を有する突然変異Trpリプレッサー(Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities)、(1988)Science 242:240-245);オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発((1983)Methods in Enzymol.100:468-500;(1987)Methods in Enzymol.154:329-350;Zoller及びSmith、M13由来のベクターを用いたオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発:任意のDNA断片中に点突然変異を生成するための効率的且つ一般的な手順(Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors:an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment)、(1982)Nucleic Acids Res.10:6487-6500;Zoller及びSmith、M13ベクター内にクローニングしたDNA断片のオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発(Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors)、(1983)Methods in Enzymol.100:468-500;並びにZoller及びSmith、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発:二つのオリゴヌクレオチドプライマー及び一本鎖DNA鋳型を用いた単純方法(Oligonucleotide-directed mutagenesis:a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template)、(1987)Methods in Enzymol.154:329-350);ホスホロチオエートで改変したDNA突然変異誘発(Taylor他

、ニックの入ったDNAを調製するための制限酵素反応におけるホスホロチオエート修飾したDNAの使用(The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA)、(1985)Nucl.Acids Res.13:8749-8764;Taylor他、ホスホロチオエート修飾したDNAを用いた高頻度のオリゴヌクレオチド特異的突然変異の迅速な作製(The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA)、(1985)Nucl.Acids Res.13:8765-8787;Nakamaye及びEckstein、ホスホロチオエート基による制限エンドヌクレアーゼNci Iの切断の阻害及びオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発におけるその応用(Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis)、(1986)Nucl.Acids Res.14:9679-9698;Sayers他、ホスホロチオエートに基づいたオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発におけるY-Tエキソヌクレアーゼ(Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis)、(1988)Nucl.Acids Res.16:791-802;並びにSayers他、臭化エチジウムの存在下における制限エンドヌクレアーゼとの反応による、ホスホロチオエート含有DNAの鎖特異的切断(Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide)、(1988)Nucl.Acids Res.16:803-814);ギャップ有り二重鎖DNAを用いた突然変異誘発(Kramer他、オリゴヌクレオチド特異的突然変異の構築のギャップ二重鎖DNA手法(The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction)、(1984)Nucl.Acids Res.12:9441-9456;Kramer及びFritz、ギャップ二重鎖DNAによる突然変異のオリゴヌクレオチド特異的構築(Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA)、(1987)Methods in Enzymol.154:350-367;Kramer他、突然変異のオリゴヌクレオチド特異的構築のギャップ二重鎖DNA手法における改良酵素in vitro反応(Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations)、(1988)Nucl.Acids Res.16:7207;並びにFritz他、突然変異のオリゴヌクレオチド特異的構築:in vitro酵素反応を用いないギャップ二重鎖DNA手順(Oligonucleotide-directed construction of mutations:a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro)、(1988)Nucl.Acids Res.16:

6987-6999)が含まれる。

【０６８９】

さらなる適切な方法には、点ミスマッチ修復(Kramer他、点ミスマッチ修復(Point Mismatch Repair)、(1984)Cell 38:879-887)、修復欠損宿主株を用いた突然変異誘発(Carter他、M13ベクターを用いた改良オリゴヌクレオチド部位特異的突然変異誘発(Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors)、(1985)Nucl.Acids Res.13:4431-4443;及びCarter、M13ベクターを用いた改良オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発(Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors)、(1987)Methods in Enzymol.154:382-403)、欠失突然変異誘発(Eghtedarzadeh及びHenikoff、大きな欠失を作製するためのオリゴヌクレオチドの使用(Use of oligonucleotides to generate large deletions)、(1986)Nucl.Acids Res.14:5115)、制限選択及び制限精製(Wells他、サブチリシンの遷移状態を安定化させるための水素結合形成の重要性(Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin)、(1986)Phil.Trans.R.Soc.Lond.A 317:415-423)、全遺伝子合成による突然変異誘発(Nambiar他、リボヌクレアーゼSタンパク質をコードしている遺伝子の全合成及びクローニング(Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein)、(1984)Science 223:1299-1301;Sakamar及びKhorana、ウシ桿体外節グアニンヌクレオチド結合タンパク質(トランスデューシン)のa-サブユニットの遺伝子の全合成及び発現(Total synthesis and expression of a gene for the a-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein(transducin)、(1988)Nucl.Acids Res.14:6361-6372;Wells他、カセット突然変異誘発:定義した部位で複数の突然変異を作製する効率的な方法(Cassete mugatenesis:an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites)、(1985)Gene 34:315-323;並びにGrundstrom他、ミクロスケールの「ショットガン」遺伝子合成によるオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発(Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis)、(1985)Nucl.Acids Res.13:3305-3316)、二重鎖切断修復(Mandecki、大腸菌のプラスミドにおけるオリゴヌクレオチド特異的二重鎖切断の修復:部位特異的突然変異誘発方法(Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli:a method for site-specific mutagenesis)、(1986)Proc.Natl.Acad.Sci.USA、83:7177-7181;及びArnold、異常環境のタンパク質工学(Protein engineering for unusual environments)、(1993)Current Opinion in Biotechnology 4:450-455)が含まれる。上記方法の多くのさらなる詳細は、酵素学の方法(Methods in Enzymology)の第154巻に見つけることができ、これには、様々な突然変異誘発方法のトラブルシューティングの問題の有用な制御も記載されている。

【０６９０】

様々な多様性を生じさせる方法に関するさらなる詳細は、以下の米国特許、PCT公報及び出願、及びEPO公報に見つけることができる:Stemmerの米国特許第5,605,793号(1997年2月25日)「in vitro組換え方法(Methods for In Vitro Recombination)」;Stemmer他の米国特許第5,811,238号(1998年9月22日)「反復選択及び組換えによって所望の特徴を有するポリヌクレオチドを作製する方法(Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination)」;Stemmer他の米国特許第5,830,721号(1998年11月3日)「ランダム断片化及び再アセンブリによるDNA突然変異誘発(DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly)」;Stemmer他の米国特許第5,834,252号(1998年11月10日)「末端相補的ポリメラーゼ反応(End-Complementary Polymerase Reaction)」;Minshull他の米国特許第5,837,458号(1998年11月17日)「細胞及び代謝工学の方法及び組成物(Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering)」;Stemmer及びCrameriのWO95/22625、「ランダム断片化及び再アセンブリによる突然変異誘発(Mutagenesis by Random Frangmentation and Reassembly)」;Stemmer及びLipschutzのWO96/33207「末端相補的ポリメラーゼ反応(End Complementary Polymerase Reaction)」;Stemmer及びCrameriのWO97/20078「反復選択及び組換えによって所望の特徴を有するポリヌクレオチドを作製する方法(Methods for Generating Polynucleotide

s having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination)」;MinshullおよびStemmerのWO97/35966「細胞及び代謝工学の方法及び組成物(Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering)」;Punnonen他のWO99/41402「遺伝子ワクチンベクターの標的化(Targeting of Genetic Vaccine Vectors)」;Punnonen他のWO99/41383「抗原ライブラリー免疫化(Antigen Library Immunization)」;Punnonen他のWO99/41369「遺伝子ワクチンベクター工学(Genetic Vaccine Vector Engineering)」;Punnonen他のWO99/41368「遺伝子ワクチンの免疫調節性特性の最適化(Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines)」;Stemmer及びCrameriの欧州特許第752008号「ランダム断片化及び再アセンブリによるDNA突然変異誘発(DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly)」;Stemmerの欧州特許第0932670号「反復的配列組換えによる細胞のDNA取り込みの進化(Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombinations)」;Stemmer他のWO99/23107「ウイルスゲノムシャフリングによるウイルス向性及び宿主範囲の改変(Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling)」;Apt他のWO99/21979「ヒトパピローマウイルスベクター(Human Papillomavirus Vectors)」;del Cardayre他のWO98/31837「反復配列組換えによる全細胞及び生物の進化(Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombinations)」;Patten及びStemmerのWO98/27230「ポリペプチド工学の方法及び組成物(Methods and Compositions for Polypeptide Engineering)」;Stemmer他のWO98/27230「反復配列シャフリング及び選択による遺伝子治療の最適化方法(Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling)」、WO00/00632「多様の高いライブラリーの作製方法(Methods for Generating Highly Diverse Libraries)」、WO00/09679「in vitro組換えポリヌクレオチド配列バンクを得る方法及び生じる配列(Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequende Banks and Resulting Sequences)」、Arnold他のWO98/42832「ランダム又は定義されたプライマーを用いたポリヌクレオチド配列の組換え(Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers)」、Arnold他のWO99/29902「ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列の作製方法(Method for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences)」、VindのWO98/41653「DNAライブラリーを構築するためのin vitro方法(An in Vitro Method for Construction of a DNA Library)」、Borchert他のWO98/41622「DNAシャフリングを用いたライブラリーの構築方法(Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling)」、Pati及びZarlingのWO98/42727「相同組換えを用いた配列変更(Sequence Alterations using Homologous Recombination)」;Patten他のWO00/18906「コドン変更した遺伝子のシャフリング(Shuffling of Codon-Altered Genes)」;del Cardayre他のWO00/04190「反復組換えによる全細胞及び生物の進化(Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Recombination)」;Crameri他のWO00/42561「オリゴヌクレオチド媒介性の核酸組換え(Oligonucleotide Mediated Nucleic Acid Recombination)」;Selifonov及びStemmerのWO00/42559「進化シミュレーションで使用するためのデータ構造の取り込み方法(Methods of Populating Data Structures for Use in Eolutionary Simulations)」;Selifonov他のWO00/42560「所望の特徴を有する文字列、ポリヌクレオチド及びポリペプチドの作製方法(Methods for Making Character Strings,Polynucleotides & Polypeptides Having Desired Characteristics)」;Welch他のWO01/23401「合成シャフリングのためのコドンを変動したオリゴヌクレオチド合成の使用(Use of Codon-Varied Oligonucleotide Synthesis for Synthetic Shuffling)」;並びにAffholterのPCT/US01/06775「一本鎖核酸鋳型媒介性の組換え及び核酸断片の単離(Single-Stranded Nucleic Acid Template-Mediated Recombination and Nucleic Acid Fragment Isolation)」。

【０６９１】

本発明で使用するポリペプチド(例えばアビマー)は、任意選択で、細胞内で発現させる。多量体ドメインは、当分野で周知の発現系を用いて単一のタンパク質として合成することができる。上記で言及した多数の文献に加えて、ベクター、プロモーターの使用並びに単量体ドメイン、選択した単量体ドメイン、多量体及び/又は選択した多量体などの核酸

の発現に関する多くの他の主題を含めた、本明細書中で有用な分子生物学的技術を記載している一般的な文献には、Berger及びKimmel、分子クローニング技術の指針(Guide to Molecular Cloning Techniques)、酵素学の方法(Methods in Enzymology)第152巻、Academic Press,Inc.、カリフォルニア州San Diego(Berger);Sambrook他、分子クローニング-実験室の手引き(Molecular Cloning-A Laboratory Manual)(第2版)、第1-3巻、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク州Cold Spring Harbor、1989(「Sambrook」)及び分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)、F.M.Ausubel他編、最新プロトコル(Current Protocols)、Greene Publishing Associates,Inc.及びJohn Wiley & Sons,Inc.の共同ベンチャー、(1999年まで追補)(「Ausubel」))が含まれる。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、Q-レプリカーゼ増幅及び他のRNAポリメラーゼ媒介技術(例えばNASBA)を含めた、当業者に、単量体ドメイン及び多量体をコードしている核酸を同定、単離及びクローニングすることに有用なin vitro増幅方法を導くために十分な技術の例は、Berger、Sambrook、及びAusubel、並びにMullis他、(1987)米国特許第4,683,202号;PCRプロトコル、方法及び応用の指針(PCR Protocols A Guide to Methods and Applications)(Innis他編)Academic Press Inc.カリフォルニア州San Diego(1990)(Innis);Arnheim及びLevinson(1990年10月1日)C&EN 36-47;The Journal Of NIH Research(1991)3、81-94;(Kwoh他(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86、1173;Guatelli他(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87、1874;Lomell他(1989)J.Clin.Chem 35、1826;Landegren他、(1988)Science 241、1077-1080;Van Brunt(1990)Biotechnology 8、291-294;Wu及びWallace、(1989)Gene 4、560;Barringer他(1990)Gene 89、117、Sooknanan及びMalek(1995)Biotechnology 13:563-564に見つかる。in vitroで増幅した核酸をクローニングする改善された方法は、Wallace他、米国特許第5,426,039号に記載されている。大きな核酸をPCRによって増幅する改善された方法は、Cheng他(1994)Nature 369:684-685及びその中の参考文献に要約されており、40kbまでのPCR単位複製配列が生じる。当業者は、本質的に任意のRNAを、逆転写酵素及びポリメラーゼを用いて、制限消化、PCR拡大及び配列決定に適した二本鎖DNAに変換できることを理解するであろう。

【０６９２】

例えば、単量体ドメイン及び/又はアビマーをコードしているベクターを、宿主細胞内に導入し、産生させ及び/又は組換え技術によって選択し得る。宿主細胞を、例えばクローニングベクター又は発現ベクターであり得るベクターを用いて遺伝子操作する(即ち、形質導入、形質転換又は形質移入する)。ベクターは、例えば、プラスミド、ウイルス粒子、ファージなどの形態であり得る。操作した宿主細胞は、必要に応じて、プロモーターを活性化する、形質転換体を選択する、又は目的の単量体ドメイン、選択した単量体ドメイン、多量体及び/若しくは選択した多量体の遺伝子を増幅するために改変した、従来の栄養培地中で培養することができる。温度、pHなどの培養条件は、発現に関して選択した宿主細胞で以前に使用したものであり、当業者には明らかであり、例えば、Freshney(1994)動物細胞の培養、基本技術の手引き(Culture of Animal Cells,a Manual of Basic Technique)、第3版、Wiley-Liss、New York及びその中に引用される参考文献を含めた本明細書中で言及する参考文献中にある。

【０６９３】

また、本発明のポリペプチドは、植物、酵母、真菌、細菌などの非動物細胞中で産生させることもできる。実際、全体にわたって言及しているように、ファージディスプレイがそのようなポリペプチドを産生するための特に関連性のある技術である。Sambrook、Berger及びAusubelに加えて、細胞培養に関する詳細は、Payne他(1992)液体系における植物細胞及び組織培養物(Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems)John Wiley & Sons,Inc.ニューヨーク州New York;Gamborg及びPhillips(編)(1995)植物細胞、組織及び器官の培養;基礎方法(Plant Cell,Tissue and Organ Culture;Fundamental Methods)シュプリンガー実験室手引き(Springer Lab Manual)、Springer-Verlag(Berlin Heidelberg New York)並びにAtlas及びParks(編)微生物培地の手引き(The Handbook of Microbiological Media)(1993)CRC Press、フロリダ州Boca Ratonに見つけることができる。

【０６９４】
また、アビマーは、薬理学的特性を改善する、免疫原性を減少させる、又は多量体及び/若しくは単量体ドメインの細胞若しくは組織内への輸送(例えば、血液脳関門を通る、若しくは皮膚を通る)を促進する、単量体ドメイン、免疫ドメイン及び/又は多量体の変更を保有することができる。このような種類の変更には、様々な修飾(例えば、糖基の付加又はグリコシル化)、PEGの付加、特定のタンパク質(例えば、HSA又は他の血清タンパク質)と結合するタンパク質ドメインの付加、細胞内へ、細胞外へ、及び細胞を通る移動又は輸送を合図するタンパク質断片又は配列の付加が含まれる。多量体及び/又は単量体ドメインの特性を操作するために、さらなる構成要素も多量体及び/又は単量体ドメインに付加することができる。また、例えば、既知の受容体と結合するドメイン(例えば、Fc受容体と結合するFc領域タンパク質ドメイン)、毒素若しくは毒素の一部、任意選択で切断されて多量体若しくは単量体ドメインを活性化させることができるプロドメイン、レポーター分子(例えば緑色蛍光タンパク質)、レポーター分子と結合する構成要素(放射線療法の放射性核種、ビオチン若しくはアビジンなど)又は修飾の組合せを含めた、様々な構成要素も付加することができる。
【０６９５】
本明細書中で使用する「定向進化」とは、ポリヌクレオチド変異体の作製、発現、活性(例えば、ヒト血清アルブミン標的タンパク質に対して結合活性を有するポリペプチド)のスクリーニングを、反復プロセスで行うプロセスをいう。スクリーニングの一つ又は複数の候補を選択し、その後、選択した候補をコードしているポリヌクレオチドを用いてプロセスを繰り返して、新しい変異体を作製する。定向進化は、少なくとも2回のラウンドの変異発生を含み、3、4、5、10、20回以上のラウンドの変異発生及び選択を含む場合がある。変異は、例えば、エラープローンPCR、遺伝子シャフリング、化学突然変異誘発などを含めた、当業者に知られている任意の方法によって発生させることができる。
【０６９６】
本明細書中で使用する用語「シャフリング」とは、非同一配列間の組換えを示す。一部の実施形態では、シャフリングには、cre/lox及び/又はflp/frt系などの相同組換え又は非相同組換えによるクロスオーバーが含まれ得る。シャフリングは、例えば、すべて非同一配列間の組換え事象に基づいており、本明細書中以下に詳述するか引用されている、in vitro及びin vivoシャフリング様式、in silicoシャフリング様式、二本鎖又は一本鎖の鋳型のどちらかを利用するシャフリング様式、プライマーに基づくシャフリング様式、核酸断片化に基づくシャフリング様式、及びオリゴヌクレオチド媒介性のシャフリング様式を含めた、様々な異なる様式、並びに他の同様の組換えに基づく様式を用いることによって実施することができる。
【０６９７】
本明細書中で使用する用語「ランダム」とは、二つ以上のアミノ酸からなり、確率的又はランダムプロセスによって構築される、ポリヌクレオチド配列又はアミノ酸配列をいう。ランダムポリヌクレオチド配列又はアミノ酸配列には、不変配列を含むことができるフレームワーク又は足場材料モチーフが含まれ得る。
実施例２４
【０６９８】
GroEL及びGroES
CDR移植による、血清アルブミンと結合するcpn10(GroES)非免疫グロブリン足場を含む二重特異性リガンドの作製
dAb7h14のCDR3ドメインを用いて、以下の様式で、ヒト血清アルブミンと結合するcpn10(GroES)非免疫グロブリン足場ポリペプチドを構築した。dAb7h14のCDR3(AQGAALPRT;配列番号_)配列をネイティブcpn10アミノ酸残基の代わりに、位置19～27(可動性ループ残基)でcpn10ポリペプチド内に移植した。Biacoreによるリアルタイム結合分析を行って、ヒト血清アルブミンが、dAb7h14の抗ヒト血清アルブミンCDR3ドメインを含む固定したcpn10由来のポリペプチドと特異的に結合するかどうかを評価した。(当業者は、結合親和性は、

例えば、標識したヒト血清アルブミンの沈殿、競合的Biacoreアッセイなどを含めた任意の適切な方法を使用して評価することができることを理解されよう。)検出されるヒト血清アルブミン親和性(例えばμM範囲以上のKd値)が存在しない又は低い場合、結合親和性に寄与する以下の任意の方法を含めたいくつかの戦略のうちの少なくとも一つを用いて、CDR3を移植したcpn10ポリペプチドのヒト血清アルブミン結合特性を改善させる。

【０６９９】

ネイティブcpn10ポリペプチド内の可動性ループ領域に対応するcpn10ポリペプチドのdAb7h14 CDR3を移植した領域の長さは、アミノ酸残基の欠失及び/又はリンカーポリペプチドを使用することで調整する。例えば、dAb7h14の9個のアミノ酸残基のCDR3ペプチド配列は、dAb7h14 CDR3ポリペプチド配列のN又はC末端の隣接する側の一方及び/又は両方上に位置する、例えば0～7個の残基の長さのアミノ酸リンカーを用いて、長さが16個のアミノ酸残基まで延長され、これにより、ネイティブcpn10配列中の可動性ループに対応するCDR3を移植したドメイン内の移植したペプチド配列の長さが、合計16個のアミノ酸となる。リンカーポリペプチドのそのような使用を、任意選択で、リンカー配列、CDR3配列及び/又は非CDR cpn10配列の突然変異誘発(例えば、以下に記載の突然変異最適化手順を使用)と組み合わせて、CDR3を移植したcpn10ポリペプチドのヒト血清アルブミン結合能力を改善させる(例えば、CDR3を移植したcpn10ポリペプチド内のCDR及びフィブロネクチン配列の両方の最適化による)。そのような目的で用いるポリペプチドリンカーは、事前に決定した配列を保有するか、又は、任意選択で、リンカー含有のCDR3を移植したcpn10ポリペプチドのヒト血清アルブミン結合能力の評価によって、ランダム化されたポリペプチドリンカー配列の集団から選択する。最適化方法は並行して及び/又は反復で行う。並行した及び反復の最適化(例えば親和性成熟)プロセスはどちらも、以下に記載の及び/又は当分野でポリペプチド結合特性の最適化に有用であることが知られている選択方法を用いる。

【０７００】

dAb7h14 CDR3を提示するCDRを移植したcpn10ポリペプチドのヒト血清アルブミン結合を、任意選択で以下に記載されているように及び/又は他の様式で当分野において知られているように並行した及び/又は反復の選択方法と組み合わせて、突然変異誘発によって最適化する。移植したdAb7h14 CDR3ポリペプチド配列を取り囲むcpn10足場ポリペプチドドメインを、下記に記載のように行うランダム化及び/又はNNK突然変異誘発に供する。そのような突然変異誘発は、移植していないアミノ酸残基内のcpn10ポリペプチド配列内で行い、任意選択で、新規又は改良されたヒト血清アルブミンと結合するポリペプチドを進化させるためにランダム化されている。任意選択で、CDR3を移植したcpn10ポリペプチド内に提示されるdAb7h14 CDR3ポリペプチドドメインを、例えば、ランダム突然変異誘発、NNK突然変異誘発、ルックスルー突然変異誘発及び/又は他の当分野で認識されている方法によって、突然変異誘発に供する。そのような突然変異誘発方法を行うためにPCRを任意選択で使用して、CDR3を移植したcpn10ポリペプチド内の標的配列全体にわたって、配列多様性が生じることがもたらされる。そのような手法は、dAbライブラリーの作製について下記に記載したものに類似している。突然変異誘発のランダム及び/又はルックスルー方法に加えて、構造情報により特定のアミノ酸残基がヒト血清アルブミンの結合に重大であることが確立された場合は、標的アミノ酸残基の部位特異的突然変異誘発を用いる。

【０７０１】

上述のように操作した、移植したdAb7h14 CDR3配列を含むcpn10ポリペプチドを、並行した及び/又は反復の選択方法に供して、ヒト血清アルブミン結合に最適化されているcpn10ポリペプチドを同定する。例えば、dAb7h14 CDR3を移植したcpn10ポリペプチド配列のライブラリーを生成した後、そのようなポリペプチドのこのライブラリーをファージ上に提示させ、dAbのライブラリーからの血清アルブミンと結合するdAbの選択について下記に記載したように、血清アルブミンの結合及び/又は増殖を要する複数ラウンドの選択に供する。任意選択で、イムノチューブ上に固定した血清アルブミンに対して又は溶液中のビオチン標識した血清アルブミンに対して選択を行う。任意選択で、結合親和性を、Biacoreシステム(スウェーデンUppsala)を用いて、表面プラズモン共鳴(SPR)及びBiacore(Karls

son他、1991)を用いて決定し、完全に最適化された単量体及び/又はオリゴマーcpn10由来のポリペプチドは、理想的には、nM範囲又はそれ以上のヒト血清アルブミンの結合親和性のKd値に達する。

【０７０２】

ヒト血清アルブミンと結合する単量体cpn10由来のポリペプチドを同定する際、そのような初期単量体のヒト血清結合特性は、そのような単量体と他の単量体との組合せ、次いでさらなる突然変異誘発及び/又は選択、それによりヒト血清アルブミンに対して特異的親和性を有するオリゴマーcpn10/GroES組成物を形成することによって、さらに増強させ得る。ヒト血清アルブミンに対して親和性を有するオリゴマーcpn10/GroES組成物を同定した後、そのようなポリペプチドを使用して、下記に記載する任意の方法によって二重特異性リガンド組成物を作製する。

実施例２５

【０７０３】

血清アルブミン結合部分の選択による、血清アルブミンと結合するcpn10非免疫グロブリン足場を含む二重特異性リガンドの作製

ネイティブcpn10ポリペプチドをライブラリー選択に供し、任意選択で、本発明の二重特異性リガンドで使用するためのヒト血清アルブミンと結合するcpn10非免疫グロブリン足場分子を生成するための親和性成熟技術に供する。

【０７０４】

ネイティブcpn10ポリペプチドがヒト血清アルブミンと結合する能力を、上述のように、最初にBiacoreアッセイによって確認する。ヒト血清アルブミンに対するcpn10ポリペプチドの結合親和性(例えばμM範囲以上のKd値)が存在しない又は低いことが検出された後、結合親和性に寄与する以下の方法のうちの一つ又は複数を含めたいくつかの戦略のうちの少なくとも一つを用いて、cpn10ポリペプチドにヒト血清アルブミン結合特性を与える。

【０７０５】

cpn10足場ポリペプチドのヒト血清アルブミン結合を行い、突然変異方法によって、任意選択で以下に記載されているように及び/又は他の様式で当分野において知られているように並行した及び/又は反復の選択方法と組み合わせて、最適化する。cpn10足場ポリペプチドドメインを、下記に記載のように行うランダム化及び/又はNNK突然変異誘発に供する。そのような突然変異誘発は、cpn10ポリペプチドの全体、又は位置19～27での可動性ループアミノ酸残基を含めたcpn10ポリペプチド内の特定の配列に行い、任意選択で、新規又は改良されたヒト血清アルブミンと結合するポリペプチドを進化させるためにランダム化されている。そのような突然変異誘発方法を行うためにPCRを任意選択で使用して、cpn10ポリペプチド内の標的配列全体にわたって、配列多様性が生じることがもたらされる。(そのような手法は、dAbライブラリーの作製について下記に記載したものに類似している。)突然変異誘発のランダム方法に加えて、構造情報によりcpn10ポリペプチドの特定のアミノ酸残基がヒト血清アルブミンの結合に重大であることが確立された場合は、標的アミノ酸残基の部位特異的突然変異誘発を用いる。

【０７０６】

上述のように操作したcpn10ポリペプチドを、並行した及び/又は反復の選択方法に供して、ヒト血清アルブミン結合に最適化されているcpn10ポリペプチドを同定する。例えば、突然変異誘発したcpn10ポリペプチド配列のライブラリーを生成した後、前記ポリペプチドのライブラリーをファージ上に提示させ、dAbのライブラリーからの血清アルブミンと結合するdAbの選択について下記に記載したように、血清アルブミンの結合及び/又は増殖を要する複数ラウンドの選択に供する。任意選択で、イムノチューブ上に固定した血清アルブミンに対して又は溶液中のビオチン標識した血清アルブミンに対して選択を行う。任意選択で、結合親和性を、Biacoreシステム(スウェーデンUppsala)を用いて、表面プラズモン共鳴(SPR)及びBiacore(Karlsson他、1991)を用いて決定し、完全に最適化された単量体及び/又はオリゴマーcpn10由来のポリペプチドは、理想的には、nM範囲又はそれ以上

のヒト血清アルブミンの結合親和性のKd値に達する。

【０７０７】

ヒト血清アルブミンと結合する単量体cpn10由来のポリペプチドを同定する際、そのような初期単量体のヒト血清結合特性は、そのような単量体と他の単量体との組合せ、次いでさらなる突然変異誘発及び/又は選択、それによりヒト血清アルブミンに対して特異的親和性を有するオリゴマーcpn10/GroES組成物を形成することによって、さらに増強させ得る。ヒト血清アルブミンに対して親和性を有するオリゴマーcpn10/GroES組成物を同定した後、そのようなポリペプチドを使用して、下記に記載する任意の方法によって二重特異性リガンド組成物を作製する。

【０７０８】

GroELポリペプチド

GroELは、二つの7員環で配置されているそれぞれ約57.5Kdの分子質量の14個のサブユニットからなる、大腸菌中の主要な分子シャペロンである(Braig他1994 Proc.Natl.Acad.Sci.90:3978-3982)。GroEL環系内には大きな空洞が存在し、この空洞がタンパク質折り畳み活性の成功に必要であることが広く考えられている。最適な活性のためには、10Kdのサブユニットの7員環からなるコシャペロンGroESが必要である(Hunt他1996 Nature 379:37-45)。それぞれのGroESサブユニットは、GroELと相互作用するために、保存されている疎水性トリペプチドを有する可動性ループを使用する(Landry他1993 Nature 364:255-258)。可動性ループの長さは一般に16個未満のアミノ酸であり、GroELの頂端との結合と同時に障害ループからβヘアピンへの移行を受ける(Shewmaker他2001 J.Biol.Chem.276:31257-31264)。GroEL/GroES複合体の活性にはATPが必要である。GroEL及びGroESはすべての生物にわたって広く行き渡っており、しばしばシャペロニン(cpn)分子、それぞれcpn60及びcpn10と呼ばれる。

【０７０９】

GroELはアロステリックタンパク質である。アロステリックタンパク質とは、リガンドと基質との結合中に二つ以上の異なる三次元構造の間で交互する、特別なクラスのオリゴマータンパク質である。アロステリックタンパク質は多くの場合、生物学又は機械的と物理化学的エネルギーが相互変換される場合に、において制御プロセスに関与している。ATPの役割は、このアロステリック変化を始動し、GroELの変性したタンパク質と密に結合する状態から変性したタンパク質と弱く結合する状態への変換を引き起こすことである。コシャペロンGroESは、弱く結合する状態を好むことでこのプロセスを補助する。これはまた、GroELの空洞を封鎖するキャップとしても作用し得る。さらに、GroELとのその結合は、変性した基質の結合と直接競合する可能性が高い。最終的な結果は、GroES及びATPとその変性した形態で基質が結合しているGroELとの結合が、変性した基質を空洞内又は溶液内のどちらかに放出することであり、これはここで再度折り畳まれることができる。

【０７１０】

GroEL及びGroESは、単量体ポリペプチド又はタンパク質ドメインを多量体化して、任意の所望の特徴を有する多量体タンパク質を生成するために使用できる、ポリペプチド足場である。例えばアビマー組成物について下記にも記載されているように、ポリペプチド単量体を多量体化することが望ましい。

【０７１１】

多くのタンパク質は、高収率でin vivoで折り畳まれる又はin vitroで再度折り畳まれるために、分子シャペロンの支援を必要とする。分子シャペロンは、多くの場合大きく、機能するためにATPなどのエネルギー源を必要とするタンパク質である。大腸菌中の主要な分子シャペロンは、二つの7員環で配置されているそれぞれ約57.5Kdaの分子質量の14個のサブユニットからなるGroELである。GroEL環系内には大きな空洞が存在し、この空洞がタンパク質折り畳み活性の成功に必要であると広く考えられている。最適な活性には、10Kdaのサブユニットの7員環からなるコシャペロンGroESが必要である。GroEL/GroES複合体の活性は、エネルギー源ATPを必要とする。

【０７１２】

ミニシャペロンが他の箇所で詳細に記載されている(その開示が本明細書中に参照により組み込まれている国際特許出願WO99/05163号参照)。ミニシャペロンポリペプチドは、単量体形態にある場合にシャペロン活性を保有し、ATPの形態のエネルギーを必要としない。長さが約143～186個のアミノ酸残基のGroELの頂端の定義された断片は、単量体条件下で溶液中、又は単分散されており担体と結合している場合のいずれかにおいて、タンパク質に対して分子シャペロン活性を有する。

【０７１３】

GroEL及び/又はGroES足場は、ポリペプチドがオリゴマー化して、組換え単量体ポリペプチドのそれに勝る活性を有する機能的タンパク質オリゴマーを形成することを可能にする。cpn10は、cpn60/cpn10シャペロニン系の広く行き渡った構成要素である。cpn10の例には細菌GroES及びバクテリオファージT4 Gp31が含まれ、以下にも記載する。cpn10ファミリーのさらなるメンバーは当業者に知られている。

【０７１４】

タンパク質足場サブユニットは、アセンブルしてタンパク質足場を形成する。そのような足場は任意の形状を有していてよく、任意の数のサブユニットを含み得る。特定のGroEL及びGroESの実施形態では、足場は、2～20個のサブユニット、5～15個のサブユニット、又は約10個のサブユニットを含む。cpn10ファミリーメンバーの天然足場構造は、7員の環又は環形の形状の7個のサブユニットを含む。したがって、特定の実施形態では、足場は7員環である。

【０７１５】

例えば、抗体若しくは標的タンパク質(例えばヒト血清アルブミン)に対して親和性を保有しているその抗原結合断片に由来するCDR3ドメインであり得る、又は、任意選択で、さらなる基若しくは分子と足場との連結を可能にするシステインなどの単一の残基であり得る異種アミノ酸配列を、ポリペプチド単量体のN及びC末端の両方がオリゴマー化可能なタンパク質足場サブユニットの配列によって形成されるように、オリゴマー化可能なタンパク質足場サブユニットの配列内に挿入することができる。したがって、異種ポリペプチドは、足場サブユニットの配列内に、例えば一つ又は複数のそのアミノ酸を置き換えることによって、含まれる。

【０７１６】

cpn10サブユニットはその構造内に「可動性ループ」を保有することが知られている。可動性ループは、大腸菌GroESの配列のアミノ酸15～34、好ましくはアミノ酸16～33に位置し、cpn10ファミリーの他のメンバー上にも同様に位置する。T4 Gp31の可動性ループは、残基22～45、好ましくは23～44に位置する。任意選択で、cpn10ファミリーのポリペプチドの可動性ループの全部又は一部を置き換えることによって、異種ポリペプチドを挿入することができる。タンパク質足場サブユニットがcpn10ファミリーのポリペプチドである場合、異種配列を、そのN若しくはC末端で、又はcpn10ファミリーのペプチドのルーフbヘアピンに等しい位置で、さらに取り込ませてもよい。この位置は、バクテリオファージT4 Gp31の位置54～67、好ましくは55～66、好ましくは59～61、又は大腸菌のGroESの位置43～63、好ましくは44～62、有利には50～53に位置する。

【０７１７】

任意選択で、ポリペプチドを、サブユニット自体の環状順列に関連して足場サブユニットのN又はC末端に挿入し得る。環状順列はGraf及びSchachman、PNAS(USA)1996、93:11591に記載されている。本質的に、既存のN及びC末端の融合によってポリペプチドを環状化し、ポリペプチド鎖を他の箇所で切断して新しいN及びC末端を作製する。本発明の好ましい実施形態では、異種ポリペプチドは、環状順列後に形成されたN及び/又はC末端に含まれ得る。新規末端の形成部位は所望する特徴に応じて選択してよく、可動性ループ及び/又はルーフβヘアピンが含まれ得る。

【０７１８】

有利には、同一又は異なっていてよい異種配列を、位置のうちの複数及び/又はタンパク質足場サブユニット内の上記同定した位置とは異なる位置に挿入し得る。したがって、

それぞれのサブユニットは、これがアセンブルされた際に足場上に提示される二つ以上の異種ポリペプチドを含み得る。異種ポリペプチドは、足場配列内への挿入部位によってもたらされる自由度に応じて、遊離又は拘束された形態で足場サブユニット上に提示され得る。例えば、足場中の可動性又はβヘアピンループに隣接する配列の長さを多様化することで、それ内に挿入した任意の異種ポリペプチド拘束度が調節する。

【０７１９】

また、GroEL及び/又はGroESの組成物は、二つ以上の単量体を含むポリペプチドオリゴマーも含み得る。オリゴマーは、足場内に挿入された二つ以上の異なるアミノ酸配列を含むヘテロオリゴマーとして、又は足場内に挿入された配列が同一であるホモオリゴマーとして構成され得る。

【０７２０】

オリゴマーを構成する単量体は、互いに共有的に架橋結合し得る。架橋結合は、単量体が最初からオリゴマーとして発現されるように組換え手法によって行ってよく、或いは、架橋結合を足場中のCys残基で行ってもよい。例えば、GroES足場の位置50～53、又はcpn10ファミリーの他のメンバー上の同等の位置に挿入した固有のCys残基を使用して、足場サブユニットを架橋結合し得る。

【０７２１】

足場サブユニット内に挿入する異種ポリペプチドの性質は、任意に選択し得る。特定の実施形態では、抗体又はscFv、天然若しくはラクダ化VHドメイン及びVH CDR3断片などのその断片を提示する足場タンパク質を合成する。

【０７２２】

例示的な実施形態では、オリゴマー化することができるポリペプチド単量体は、上述のように及び/又はその全体が本明細書中に参照により組み込まれているWO00/69907に記載のように調製することができる。そのような調製の方法は、異種ポリペプチドをコードしている核酸配列をオリゴマー化可能なタンパク質足場のサブユニットをコードしている核酸配列内に挿入するステップ、生じる核酸を発現ベクター内に取り込ませるステップと、核酸を発現させてポリペプチド単量体を産生させるステップとを含むことができる。任意選択で、その後、ポリペプチドオリゴマーを、上述のように産生したポリペプチド単量体をオリゴマーへと会合させることを含むプロセスによって生成し得る。特定の実施形態では、単量体を架橋結合させてオリゴマーを形成する。

【０７２３】

特定の実施形態では、足場ポリペプチドは、GroES又はその類似体などのcpn10/Hsp10ファミリーのメンバーに基づく。非常に好ましい類似体は、T4ポリペプチドGp31である。Gp31を含めたGroES類似体は可動性ループを保有しており(Hunt,J.F.他、(1997)Cell 90、361-371;Landry,S.J.他、(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.93、11622-11627)、これは、異種ポリペプチドを足場と融合させるために挿入又は置き換えてもよい。

【０７２４】

cpn10相同体は、動物、植物及び細菌にわたって広く行き渡っている。例えば、GenBankの検索により、以下の種でcpn10相同体が知られていることが示される:アクチノバチルス・アクチノミセタムコミタンス(Actinobacillus actinomycetemcomitans);アクチノバチルス・プルロニューモニア(Actinobacillus pleuropneumoniae);エロモナス・サルモニシダ(Aeromonas Salmonicida);アグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens);アロクロマチウム・ビノスム(Allochromatium vinosum);アメーバ・プロテウス(Amoeba proteus)共生細菌;アキ/エックス・アエオリカス(Aqui/ex aeolicus);シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana);バチルス(Bacillus)sp;バチルス・ステアロサーモフィルス(Bacillus stearothermophilus);枯草菌(Bacillus subtilis);ヘンセラ菌(Bartonella henselae);百日咳菌(Bordetella pertussis);ライム病菌(Borrelia burgdorferi);ウシ流産菌(Brucella abortus);ブフネラ・アフィディコラ(Buchnera aphidicola);類鼻疽菌(Burkholderia cepacia);バークホルデリア・ベトナミエンシス(Burkholderia vietnamiensis);カンピロバクター・ジェジュニ(Campylobacterjejuni);カウロバクター・クレセン

タス(Caulobacter crescentus);クラミジア・ムリダルム(Chlamydia muridarum);トラコーマ病原体(Chlamydia trachomatis);肺炎クラミジア(Chlamydophila pneumoniae);クロストリジウム・アセトブチリカム(Clostridium acetobutylicum);ウェルシュ菌(Clostridium perfringens);クロストリジウム・サーモセラム(Clostridium thermocellum);大腸菌ファージT心線維状虫(Cowdria ruminantium);チアネル・シアノフォラ・パラドキサ(Cyanelle cyanophora paradoxa);エーリキア・カニス(Ehrlichia canis);エーリキア・シャフェンシス(Ehrlichia chaffeensis);エーリキア・エクイ(Ehrlichia equi);エーリキア・ファゴサイトフィラ(Ehrlichia phagocytophila);エーリキア・リスチシ(Ehrlichia risticii);エーリキア・センネツ(Ehrlichia sennetsu);エーリキア(Ehrlichia)spのHGE剤;エンテロバクター・エロゲネス(Enterobacter aerogenes);エンテロバクター・アグロメランス(Enterobacter agglomerans);エンテロバクター・アムニゲナス(Enterobacter amnigenus);エンテロバクター・アスブリエ(Enterobacter asburiae);エンテロバクター・ゲルゴビエ(Enterobacter gergoviae);エンテロバクター・インターメディウス(Enterobacter intermedius);エルウィニア・アフィディコラ(Erwinia aphidicola);軟腐病菌(Erwinia carotovora);エルウィニア・ヘルビコラ(Erwinia herbicola);大腸菌(Escherichia coli);野兎病菌(Francisella tularensis);ダイズ(Glycine max);軟性下疳菌(Haemophilus ducreyi);インフルエンザ菌Rd(Haemophilus influenzae Rd);ピロリ菌);ホロスポラ・オブツサ(Holospora obtusa);ヒト(Homo sapiens);クレブシエラ・オルニチノリティカ(Klebsiella ornithinolytica);クレブシエラ・オキシトカ(Klebsiella oxytoca);クレブシエラ・プランチコラ(Klebsiella planticola);クレブシエラ肺炎(Klebsiella pneumoniae);ラクトバチルス・ヘルベティクティス(Lactobacillus helvetictis);ラクトバチルス・7エー(LactobacillUS 7eae);ラクチス乳酸菌(Lactococcus lactis);ローソニア・イントラセルラリス(Lawsonia intracellularis);レプトスピラ・インターロガンス(Leptospira interrogans);メチロボラス(Methylovorus)sp株SS;トリ結核菌(Mycobacterium avium);トリ結核菌アビウム亜種(Mycobacterium avium subsp avium);ヨーネ菌(Mycobacterium avium subsp paratuberculosis);ライ菌(Mycobacterium leprae);結核菌;マイコプラズマ・ゲニタリウム(Mycoplasma genitalium);肺炎マイコプラズマ(Mycoplasma pneumoniae);モモアカアブラムシ(Myzus persicae)主要内部共生体;淋病(Neisseria gonorrhoeae);オシラトリア(Oscillatoria)sp NKBG、パンテア・アナナス(Pantoea ananas);パスツレラ・マルトシダ(Pasteurella multocida);ジンジバリス菌(Porphyromonas gingivalis);緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa);緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa);プチダ菌(Pseudomonas putida);ラット(Rattus norvegicus);ラット(Rattus norvegicus);エンドウ根粒菌(Rhizobium leguminosarum);ロドバクター・カプスラータ(Rhodobacter capsulatus);ロドバクター・スフェロイデス(Rhodobacter sphaeroides);ロドサーマス・マリナス(Rhodothermus marinus);発疹チフスリケッチア(Rickettsia prowazekii);リケッチア・リケッチイ(Rickettsia rickettsii);出芽酵母(Saccharoyces cerevisiae);セラチア・フィカリア(Serratia ficaria);霊菌(Serratia marcescens);セラチア・ルビデア(Serratia rubidaea);アルファルファ根粒菌(Sinorhizobium meliloti);ココクゾウ(Sitophilus oryzae)主要内部共生体;ステノトロホモナス・マルトフィリア(Stenotrophomonas maltophilia);肺炎球菌(Streptococcus pneumoniae);ストレプトマイセス・アルブス(Streptomyces albus);ストレプトマイセス・セリカラー(Streptomyces coelicolor);ストレプトマイセス・セリカラー(Streptomyces coelicolor);ストレプトマイセス・リビダンス(Streptomyces lividans);シネコッカス(Synechococcus)sp;シネコッカス・バルカナス(Synechococcus vulcanus);シネコシスティス(Synechocystis)sp;サーモアナエアロバクター・ブロッキー(Thermoanaerobacter brockii);サーモトガ・マリティマ(Thermotoga maritima);サーマス・アクアティカス(Thermus aquaticus);梅毒トレポネーマ(Treponema pallidum);ウォルバキア(Wolbachia)sp;ザイモモナス・モビリス(Zymomonas mobilis)。

【０７２５】

cpn10ファミリーのサブユニットの利点は、天然のシャペロニンのタンパク質折り畳み活性を担っている、足場に影響を与えずに除去し得る可動性ループを保有することである

。可動性ループが欠失したcpn10は生物活性を保有せず、これは有利に不活性な足場となり、したがって任意の潜在的に有害な効果を最小限にする。

【０７２６】

適切な生物活性のあるポリペプチドの挿入は、作製された新規ポリペプチドに生物活性(例えばヒト血清アルブミン結合)を与えることができる。実際、特に、例えば、足場に提示されるポリペプチドの標的タンパク質結合を最適化するために本明細書中で記載する突然変異誘発及び親和性に基づいたスクリーニング方法を使用する場合に、生物活性のあるポリペプチドを足場内に取り込ませることによって、挿入したポリペプチドの生物活性を改善し得る。

【０７２７】

ペプチドを挿入するための代替部位が可能である。有利な選択肢は、GroES中のループβヘアピンと同等の位置である。これは、Gp3l中のGlu-を所望のペプチドによって置き換えることを含む。アミノ酸配列はPro(59)-Glu(60)-Gly(61)である。これを、Pro-Glyをコードしているレベル(CCC:GGG)でSmaI部位へと好都合に変換し、DNA断片としてペプチド挿入するための平滑末端の制限部位が残る。同様に、GroES配列の位置50～53、及び他のcpn10ファミリーメンバー中の同等の位置で挿入を行い得る。或いは、足場の逆側上のペプチドを提示させるために逆PCRを使用し得る。

【０７２８】

シャペロニン分子のcpn60/Hsp60ファミリーのメンバーも、足場として使用し得る。例えば、四十量体細菌シャペロニンGroELを使用し得る。特定の実施形態では、異種ポリペプチドを、位置191～376、特に位置197～333(操作したSacII及び固有のClaI部位によって表される)に挿入して、挿入したポリペプチドに可動性を与えるためにエクアトリアル及び頂端ドメインの間のインタクトなヒンジ領域を維持する。足場の選択は、オリゴマー(又はそのようなオリゴマーを含む及び/若しくはそれに由来する二重特異性リガンド)の意図する用途に依存し得る。例えば、オリゴマーをワクチン接種目的に意図する場合は、結核菌に由来するものなどの免疫原性足場の使用が非常に有利であり、アジュバント効果が与えられる。

【０７２９】

cpn60分子の突然変異体も使用することができる。例えば、GroELの単一環突然変異体(GroELSRI)は、GroELの二つの環間の主要な結合に影響を与える四つの点突然変異を含み(R452E、E461A、S463A及びV464A)、放出されてGroESと結合しているためにin vitroで機能的に失活している。GroELSR2は、Glul9l-Glyでさらなる突然変異を有し、これは、GroESに対する親和性を低下させることによって活性を修復する。これらの突然変異体はどちらも環構造を形成し、足場としての使用に適している。

【０７３０】

特定の天然足場分子は、バクテリオファージ産物である。そのため、そのような足場に対する天然抗体は稀である。これは、足場融合体をワクチン剤として使用することを強化する。ループが欠失したT4 Gp3lは生物活性を有さず(T4バクテリオファージに対するドミナント陰性又は細胞内ワクチンとして以外)、したがって宿主に対する有害効果が最小限である。しかし、ポリペプチドをコードしている適切な配列の挿入により新規タンパク質に生物活性を与えることができる。実際、足場タンパク質内への挿入によって生物活性を改善し得る。

【０７３１】

抗原(例えばヒト血清アルブミン)に対する抗体又は抗体断片の親和性は、本発明によるオリゴマー化によって増加させ得る。抗体断片は、Fv、Fab及び$F(ab')_2$断片などの断片、又は単鎖Fv断片などのその任意の誘導体であり得る。抗体又は抗体断片は、非組換え、組換え又はヒト化であり得る。抗体は、任意の免疫グロブリンアイソタイプ、例えば、IgG、IgMなどのものであり得る。

【０７３２】

特定の実施形態では、抗体断片はラクダ化VHドメインであり得る。抗体とその同族抗原

との間の主要な分子間相互作用はVH CDR3によって媒介されることが知られている。

【０７３３】

下記に記載のように及び当分野で知られているようにGroEL及び/又はGroES(cpn10)足場分子を使用することで、VHドメイン又はVH CDR3ドメインのオリゴマー化がもたらされて高親和性オリゴマーが生じる。二つ以上のドメインがそのようなオリゴマー中に含まれ得る。cpn10足場に基づくオリゴマーでは、7個までのドメインが含まれていてよく、標的タンパク質(例えばヒト血清アルブミン)と結合する七量体オリゴマー分子(ヘプタボディ)を形成する。

【０７３４】

標的タンパク質(例えばヒト血清アルブミン)に対する親和性を特定の足場ポリペプチド/オリゴマーに与える及び/又はそれを最適化する目的で、そのようなポリペプチド/オリゴマーのそのリガンド/基質に対する特異性及び/又は親和性を検査及び/又はマップ作成できるように、足場ポリペプチド内に挿入する異種ポリペプチド内に変異を導入し得る。標的タンパク質(例えばヒト血清アルブミン)に対する新規ポリペプチドの親和性を迅速に評価するために、変異体は同一ループから生成するか、又は一組の標準の異なるループを考案し得る。変異体は、PCRなどの既知の技術に従った配列のランダム化によって生成し得る。これらは、タンパク質足場内に取り込ませる前に、ファージディスプレイなどのスクリーニングプロトコルによる選択に供し得る。

【０７３５】

本明細書中で言及する「オリゴマー化可能な足場」とは、オリゴマー化して又はオリゴマーされて足場を形成することができ、異種ポリペプチドが、好ましくは共有的に、オリゴマー化能力を消滅させずに融合し得るポリペプチドである。したがって、これは、本発明に従って多量体へと配置され得るポリペプチドを使用して「足場」を提供する。任意選択で、足場が由来する野生型ポリペプチドの一部分を、例えば、足場上に提示させる異種ポリペプチドで置き換えることによって、除去し得る。

【０７３６】

単量体とは、オリゴマー化する又はオリゴマー化される潜在性を保有するポリペプチドである。オリゴマー化は、ポリペプチド中に、それと合わせた場合にさらなる足場サブユニットとオリゴマー化するオリゴマー化可能な足場サブユニットを取り込ませることによってもたらすことができる。任意選択で、オリゴマー化は、単量体を一緒に結合する目的で、当分野で認識されているリンカーを使用することによってもたらすことができる。

【０７３７】

本明細書中で使用する「オリゴマー」とは、「ポリマー」又は「多量体」と同義であり、対象の物体が単量体でないことを示すために使用する。したがって、オリゴマーポリペプチドは、一緒に共有結合又は非共有結合した少なくとも二つの単量体ユニットを含む。用いる単量体ユニットの数はオリゴマーの意図する使用に依存し、2～20個以上であり得る。任意選択で、これは5～10個、好ましくは約7個である。

【０７３８】

ファージディスプレイ

ファージディスプレイ技術は、生物学的研究において非常に有用であることが判明している。これは、分子の大きなライブラリーからリガンドを選択することを可能にする。足場技術では、独特に有利な様式でファージディスプレイの力を生かすことができる。単鎖Fv分子ディスプレイと同様に、cpn10分子を単量体としてfdバクテリオファージ上に提示させることができる。挿入物(高度に可動性のループの代わり、例えば、ヒト血清アルブミンと結合する抗体に由来するCDR3ポリペプチドを用いる)のライブラリーを標準方法によって構築し、生じるライブラリーを目的の分子についてスクリーニングする。そのような選択は親和性に基づいている。場合によっては突然変異誘発、発現の1回又は複数回の反復(GroELタンパク質、-57.5KdaのGroEL及び-10KdaのGroESは、以前に記載のように(Chatellier他1998 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:9861-9866;Corrales及びFersht 1996 1:265-273)、又は任意の当分野で認識されている方法によって発現及び精製することができる)

並びに親和性スクリーニングによって、標的タンパク質(例えばヒト血清アルブミン)に対する親和性を保有する分子を同定した後、そのような分子をオリゴマー化させることができ、これによりそのような分子の結合力を利用する。任意選択で、特定の選択した単量体がその結合パートナーと架橋結合又はオリゴマー化することができる。

実施例２６

【０７３９】

フィブロネクチン

CDR移植による、血清アルブミン結合性フィブロネクチン非免疫グロブリン足場を含む二重特異性リガンドの作製

dAb7h14のCDRドメインを用いて、以下の方法で、ヒト血清アルブミンと結合するフィブロネクチン非免疫グロブリン足場ポリペプチドを構築した。dAb7h14のCDR1(RASQWIGSQLS;配列番号_)、CDR2(WRSSLQS;配列番号_)、及びCDR3(AQGAALPRT;配列番号_)の配列を、ネイティブ^{10}Fn3アミノ酸残基の代わりに、それぞれ位置21～31(BCループ)、51～56(DEループ)、及び76～88(FGループ)で、^{10}Fn3内に移植した。Biacoreによるリアルタイム結合分析を行って、ヒト血清アルブミンが、dAb7h14の抗ヒト血清アルブミンCDRドメインを含む固定したフィブロネクチン由来のポリペプチドと特異的に結合するかどうかを評価した。(当業者は、結合親和性は、例えば、標識したヒト血清アルブミンの沈殿、競合的Biacoreアッセイなどを含めた任意の適切な方法を使用して評価することができることを理解されよう。)検出されるヒト血清アルブミン親和性(例えばμM範囲以上のKd値)が存在しない又は低い場合、結合親和性に寄与する以下の任意の方法を含めたいくつかの戦略のうちの少なくとも一つを用いて、CDRを移植したフィブロネクチンポリペプチドのヒト血清アルブミン結合特性を改善させる。

【０７４０】

ネイティブフィブロネクチンポリペプチド内の溶媒に曝されたループ領域に対応するフィブロネクチンポリペプチドのdAb7h14 CDRを移植した領域の長さは、リンカーポリペプチドを使用することで調整する。例えば、dAb7h14の9個のアミノ酸残基のCDR3ペプチド配列は、dAb7h14 CDR3ポリペプチド配列のN又はC末端の隣接する側の一方及び/又は両方上に位置する、例えば0～4個の残基の長さのアミノ酸リンカーを用いて、長さを13個のアミノ酸残基まで延長し、これにより、ネイティブフィブロネクチン配列中のFGループに対応するCDR3を移植したドメイン内の移植したペプチド配列の長さが、合計13個のアミノ酸となる。リンカーポリペプチドのそのような使用を、任意選択で、リンカー配列、CDR配列及び/又は非CDRフィブロネクチン配列の突然変異誘発(例えば、以下に記載の突然変異最適化手順を使用)と組み合わせて、CDRを移植したフィブロネクチンポリペプチドのヒト血清アルブミン結合能力を改善させる(例えば、CDRを移植したフィブロネクチンポリペプチド内のCDR及びフィブロネクチン配列の両方の最適化による)。そのような目的で用いるポリペプチドリンカーは、事前に決定した配列を保有するか、又は、任意選択で、リンカー含有のCDRを移植したフィブロネクチンポリペプチドのヒト血清アルブミン結合能力の評価によって、ランダム化されたポリペプチドリンカー配列の集団から選択する。最適化方法は並行した及び/又は反復で行う。並行した及び反復の最適化(例えば親和性成熟)プロセスはどちらも、以下に記載の及び/又は当分野でポリペプチド結合特性の最適化に有用であることが知られている選択方法を用いる。

【０７４１】

DAb7h14 CDRを提示するCDRを移植したフィブロネクチンポリペプチドのヒト血清アルブミン結合を、任意選択で以下に記載されているように及び/又は他の様式で当分野において知られているように並行した及び/又は反復の選択方法と組み合わせて、突然変異誘発によって最適化する。移植したdAb7h14 CDRポリペプチド配列を取り囲む^{10}Fn3足場ポリペプチドドメインを、下記に記載のように行うランダム化及び/又はNNK突然変異誘発に供する。そのような突然変異誘発は、^{10}Fn3ポリペプチド配列内のアミノ酸1～9、44～-50、61～54、82～94(βシートの端);19、21、30～46(偶数)、79～65(奇数)(両方のβシートの溶媒に接近可能な面);並びに14～16及び36～45(非CDR様の溶媒に接近可能なループ及びβタ

ーン)で行い、任意選択で、新規又は改良されたヒト血清アルブミンと結合するポリペプチドを進化させるためにランダム化されている。任意選択で、CDRを移植したフィブロネクチンポリペプチド内に提示されるdAb7h14 CDRポリペプチドドメインを、例えば、ランダム突然変異誘発、NNK突然変異誘発、ルックスルー突然変異誘発及び/又は他の当分野で認識されている方法による突然変異誘発に供する。そのような突然変異誘発方法を行うためにPCRを任意選択で使用して、CDRを移植したフィブロネクチンポリペプチド内の標的配列全体にわたって、配列多様性が生じることがもたらされる。そのような手法は、dAbライブラリーの作製について下記に記載したものに類似している。突然変異誘発のランダム及び/又はルックスルー方法に加えて、構造情報により特定のアミノ酸残基がヒト血清アルブミンの結合に重大であることが確立された場合は、標的アミノ酸残基の部位特異的突然変異誘発を用いる。

【０７４２】

上述のように操作した、移植したdAb7h14 CDR配列を含むフィブロネクチンポリペプチドを、並行した及び/又は反復の選択方法に供して、ヒト血清アルブミン結合に最適化されているフィブロネクチンポリペプチドを同定する。例えば、dAb7h14 CDRを移植したフィブロネクチンポリペプチド配列のライブラリーを生成した後、そのようなポリペプチドのこのライブラリーをファージ上に提示させ、dAbのライブラリーからの血清アルブミンと結合するdAbの選択について下記に記載したように、血清アルブミンの結合及び/又は増殖を要する複数ラウンドの選択に供する。任意選択で、イムノチューブ上に固定した血清アルブミンに対して又は溶液中のビオチン標識した血清アルブミンに対して選択を行う。任意選択で、結合親和性を、Biacoreシステム(スウェーデンUppsala)を用いて、表面プラズモン共鳴(SPR)及びBiacore(Karlsson他、1991)を用いて決定し、完全に最適化されたフィブロネクチン由来のポリペプチドは、理想的には、nM範囲又はそれ以上のヒト血清アルブミンの結合親和性のKd値に達する。ヒト血清アルブミンと結合するフィブロネクチン由来のポリペプチドを同定した後、そのようなポリペプチドを使用して、下記に記載する任意の方法によって二重特異性リガンド組成物を作製する。

実施例２７

【０７４３】

血清アルブミン結合部分の選択による、血清アルブミンと結合するフィブロネクチン非免疫グロブリン足場を含む二重特異性リガンドの作製

ネイティブフィブロネクチンタンパク質、具体的にはフィブロネクチンの^{10}Fn3ポリペプチドをライブラリー選択に供し、任意選択で、本発明の二重特異性リガンドで使用するためのヒト血清アルブミンと結合するフィブロネクチン非免疫グロブリン足場分子を生成するための親和性成熟技術に供した。

【０７４４】

Biacoreによるリアルタイム結合分析を行って、ヒト血清アルブミンが固定したネイティブフィブロネクチン及び/又はフィブロネクチン由来のポリペプチドと特異的に結合するかどうかを評価した。ヒト血清アルブミンに対するフィブロネクチンポリペプチドの結合親和性(例えば□M範囲以上のKd値)が存在しない又は低いことが検出された後、結合親和性に寄与する以下の方法のうちの一つ又は複数を含めたいくつかの戦略のうちの少なくとも一つを用いて、フィブロネクチンポリペプチドにヒト血清アルブミン結合特性を与える。

【０７４５】

フィブロネクチン足場ポリペプチドのヒト血清アルブミン結合を行い、突然変異方法によって、任意選択で以下に記載されているように及び/又は他の様式で当分野において知られているように並行した及び/又は反復の選択方法と組み合わせて、最適化する。^{10}Fn3足場ポリペプチドドメインを、下記に記載のように行うランダム化及び/又はNNK突然変異誘発に供する。そのような突然変異誘発は、^{10}Fn3ポリペプチドの全体、又はアミノ酸1～9、44～50、61～54、82～94(βシートの端);19、21、30～46(偶数)、79～65(奇数)(両方のβシートの溶媒に接近可能な面);21～31、51～56、76～88(CDR様の溶媒に接近可能なル

ープ);並びに14～16及び36～45(他の溶媒に接近可能なループ及びβターン)を含めた^{10}Fn3ポリペプチド内の特定の配列に行い、任意選択で、新規又は改良されたヒト血清アルブミンと結合するポリペプチドを進化させるためにランダム化されている。そのような突然変異誘発方法を行うためにPCRを任意選択で使用して、フィブロネクチンポリペプチド内の標的配列全体にわたって、配列多様性が生じることがもたらされる。(そのような手法は、dAbライブラリーの作製について下記に記載したものに類似している。)突然変異誘発のランダム方法に加えて、構造情報によりフィブロネクチンポリペプチドの特定のアミノ酸残基がヒト血清アルブミンの結合に重大であることが確立された場合は、標的アミノ酸残基の部位特異的突然変異誘発を用いる。

【０７４６】

上述のように操作したフィブロネクチンポリペプチドを、並行した及び/又は反復の選択方法に供して、ヒト血清アルブミン結合に最適化されているフィブロネクチンポリペプチドを同定する。例えば、突然変異誘発したフィブロネクチンポリペプチド配列のライブラリーを生成した後、前記ポリペプチドのライブラリーをファージ上に提示させ、dAbのライブラリーからの血清アルブミンと結合するdAbの選択について記載したように、血清アルブミンの結合及び/又は増殖を要する複数ラウンドの選択に供する。任意選択で、イムノチューブ上に固定した血清アルブミンに対して又は溶液中のビオチン標識した血清アルブミンに対して選択を行う。任意選択で、結合親和性を、Biacoreシステム(スウェーデンUppsala)を用いて、表面プラズモン共鳴(SPR)及びBiacore(Karlsson他、1991)を用いて決定し、完全に最適化されたフィブロネクチン由来のポリペプチドは、理想的には、nM範囲又はそれ以上のヒト血清アルブミンの結合親和性のKd値に達する。

【０７４７】

ヒト血清アルブミンと結合するフィブロネクチンポリペプチドを同定した後、そのようなポリペプチドを使用して、下記に記載する任意の方法によって二重特異性リガンド組成物を作製する。

【０７４８】

フィブロネクチン非免疫グロブリン足場

本発明の特定の実施形態では、フィブロネクチン、又はその機能的部分及び/若しくは断片を含む非免疫グロブリン足場を、血清アルブミンと結合するように操作する。フィブロネクチンIII型モジュール(Fn3)に由来する非免疫グロブリン足場構造を使用する。フィブロネクチンIII型モジュールは、哺乳動物の血液及び構造タンパク質中に見つかる一般的なドメインであり、タンパク質配列データベース中に400回を超えて現れ、現在までに配列が決定されたすべてのタンパク質の2%に現れると推定されている。Fn3モジュール配列が含まれるタンパク質には、フィブロネクチン、テネイシン、細胞内細胞骨格タンパク質、及び原核酵素(Bork及びDoolittle、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:8990、1992;Bork他、Nature Biotech.15:553、1997;Meinke他、J.Bacteriol.175:1910、1993;Watanabe他、J.Biol.Chem.265:15659、1990)が含まれる。具体的なフィブロネクチンの非免疫グロブリン足場は、94個のアミノ酸残基を含むヒトFn3の第10モジュール(^{10}Fn3)である。このドメインの全体的な折り畳みは、ラクダ及びラマIgG中の全抗原認識ユニットを含む、最も小さな機能的抗体断片である重鎖の可変領域に密に関連している。ラクダ及びラマドメインと^{10}Fn3ドメインとの主要な差異は、(i)^{10}Fn3がより少ないβ鎖を有すること(7本対9本)並びに(ii)互いに対してパッキングされている二つのβシートは、ラクダ及びラマドメイン中ではジスルフィド橋によって連結されているが、^{10}Fn3ではそうでないことである。

【０７４９】

IgG重鎖の抗原結合ループに対応する^{10}Fn3の三つのループは、アミノ酸残基21～31(BC)、51～56(DE)、及び76～88(FG)の間を通る(その完全な内容が本明細書中に参照により組み込まれている米国特許第7,115,396号の図3を参照)。BC及びDEループの長さ、それぞれ11及び6個の残基は、抗体重鎖中に見つかる対応する抗原認識ループの狭い範囲内、即ちそれぞれ7～10及び4～8個の残基の範囲内にある。したがって、CDR移植戦略を容易に用いて、重鎖CDR配列をこれらのドメイン内に導入することができる。さらに及び/又は或いは、

これらの二つのループを、任意の当分野で認識されている方法(例えば、部位特異的、ルックスルー又は他の突然変異誘発方法、ランダム化など)による遺伝子可変性に供することができ、任意選択で、生じるポリペプチドを高い抗原親和性に関する選択に供し得る。(或いは、遺伝子可変性の導入及び/又は選択手順を用いて、結合親和性が低下した及び/又は安定性、毒性などの最適化した特性を有する組成物を同定することができる。)そのような方法を使用することで、フィブロネクチンのBC及びDEループを操作して、抗体中の対応するCDR1及びCDR2ドメインの接点に等価な抗原の接点を作製することができる。

【０７５０】

BC及びDEループとは異なり、^{10}Fn3のFGループの長さは12個の残基であるが、抗体重鎖中の対応するループの範囲は4～28個の残基である。したがって、抗原結合を最適化するために、4～28個の残基であるCDR3の長さ範囲をカバーして抗原結合における最大の可能な可撓性及び親和性を得るために、^{10}Fn3のFGループを、長さ(例えば、ランダム化の使用及び/又はポリペプチドリンカー配列の使用による(これはランダム化することもできる))並びに配列に関して多様化させることができる。実際、CDRをフィブロネクチン足場内に直接移植する方法並びにネイティブフィブロネクチン足場を血清アルブミン(又は他の標的抗原)との結合について選択及び/又は最適化する方法のどちらにおいても、抗体模倣体のCDR様ループの長さ及び配列をin vitro又はin vivoの親和性成熟中にランダム化し得る(以下にさらに詳述する)。

【０７５１】

第10のヒトフィブロネクチンIII型ドメイン、^{10}Fn3は、低温でも迅速に再折り畳みされる。その主鎖コンホメーションは、5℃で1秒以内に回復している。^{10}Fn3の熱力学的安定性は高く(ΔG_u=24kJ/mol=5.7kcal/mol)、これは110℃というその高い融解温度と相関している。

【０７５２】

^{10}Fn3の生理的役割の一つは、体液中では可溶形、細胞外基質中では不溶形で存在する糖タンパク質であるフィブロネクチンのサブユニットとしてである(Dickinson他、J.Mol.Biol.236:1079、1994)。220～250Kdのフィブロネクチン単量体は12個のI型モジュール、2個のII型モジュール、及び17個のフィブロネクチンIII型モジュールを含む(Potts及びCampbell、Curr.Opin.Cell Biol.6:648、1994)。様々なIII型モジュールがフィブロネクチンとインテグリン、ヘパリン、及びコンドロイチン硫酸との結合に関与している。^{10}Fn3は、その曝されたループのうちの一つ上にあるインテグリンと結合するArg-Gly-Asp(RGD)モチーフを介して細胞接着を媒介することが判明している。同様のRGDモチーフが、フィブリノーゲン、フォンウェルブランド因子、及びビトロネクチンなどの他のタンパク質によるインテグリン結合に関与していることが示されている(Hynes他、Cell 69:11、1992)。他のマトリックス又は細胞と結合する役割は^{10}Fn3について記載されていない。

【０７５３】

^{10}Fn3がRGDを含む短いペプチドよりもわずかに高い接着活性しか持たないという観察は、^{10}Fn3の細胞結合活性が、^{10}Fn3構造全体にわたって分布しているのではなくRGDペプチド中に局在しているという結論と、一貫している(Baron他、Biochemistry 31:2068、1992)。RGDモチーフを有さない^{10}Fn3が他の血漿タンパク質又は細胞外基質と結合する可能性が低いことにより、^{10}Fn3が抗体を置き換える有用な足場となる。さらに、血流中の天然のフィブリノーゲン中に^{10}Fn3が存在することは、^{10}Fn3自体が、起源の生物中で免疫原性となる可能性が低いことを示す。

【０７５４】

さらに、^{10}Fn3フレームワークがランダム化に耐性がある曝されたループ配列を保有することが示され、これは抗体模倣体の多様なプールの作製を容易にする。これは、^{10}Fn3配列の可撓性を検査することによって決定した。具体的には、ヒト^{10}Fn3の配列と他の供給源由来のフィブロネクチンの配列及び関連するタンパク質の配列とのアラインメントを行い、このアラインメントの結果をヒト^{10}Fn3ドメインの三次元構造上にマッピングした。このアラインメントにより、保存されている残基の大多数がβシートサンドイッチの核

内で見つかる一方で、高度に可変性の残基は、N及びC末端を含めたβシートの端に沿って、両方のβシートの溶媒に接近可能な面上、及び抗体模倣体の親和性成熟において超可変ループとして役割を果たす三つの溶媒に接近可能なループ上に位置することが明らかとなった。これらの結果に鑑みて、これら三つのループのランダム化は、^{10}Fn3フレームワーク自体の全体的な折り畳み又は安定性に対して有害作用を有する可能性が低いと決定された。

【０７５５】

ヒト^{10}Fn3配列では、この分析により、最小でも、アミノ酸1～9、44～50、61～54、82～94(βシートの端);19、21、30～46(偶数)、79～65(奇数)(両方のβシートの溶媒に接近可能な面);21～31、51～56、76～88(CDR様の溶媒に接近可能なループ);並びに14～16及び36～45(他の溶媒に接近可能なループ及びβターン)をランダム化させて、新規又は改良された化合物結合タンパク質を進化させることができることが示された。さらに、上述のように、一つ又は複数の溶媒に曝されたループの長さの変更も、そのような定向進化方法に含めることができる。

【０７５６】

或いは、βシート配列の変化も、新規タンパク質を進化させるために使用することができる。これらの突然変異は足場を変化させ、したがってループ構造を間接的に変更する。この手法をとる場合は、突然変異は配列を飽和するのではなく、数個の突然変異を導入すべきである。好ましくは、3～20個以下の変化しかこの手法によってβシート配列内に導入すべきでない。

【０７５７】

配列の変異は、例えば、Taqポリメラーゼによる突然変異誘発(Tindall及びKunkel、Biochemistry 27:6008(1988))、断片の組換え、又はその組合せを含めた任意の技術によって導入することができる。同様に、例えば、CDRを提示する及び/若しくはCDR様のループの長さ及び配列を多様化することによる、又は選択したプール中に見つかる有利なフレームワーク突然変異に基づく構造的再設計による、ライブラリーの構造的多様性の増加を用いて、非免疫グロブリン足場にさらなる改善を導入することができる。

【０７５８】

フィブロネクチン足場ポリペプチドを含む融合タンパク質

本明細書中で記載するフィブロネクチン足場ポリペプチドを他のタンパク質ドメインと融合し得る。例えば、ヒト血清アルブミンと結合すると同定されたフィブロネクチン足場ポリペプチドを、重鎖単一可変ドメイン又はその抗原結合断片と融合させて、フィブロネクチンに基づく血清アルブミン結合部分を含む本発明の二重特異性リガンドを作製することができる。フィブロネクチン足場ポリペプチドはさらに、IgGの定常領域(F_c)を^{10}Fn3モジュールなどのフィブロネクチン足場ポリペプチドと、好ましくは^{10}Fn3のC末端を介して融合させることによって、ヒト免疫応答と統合させ得る。そのような^{10}Fn3-F_c融合分子中のF_cは免疫応答の補体成分を活性化し、操作したフィブロネクチンポリペプチドの治療価値を上げる役割を果たすことができる。同様に、^{10}Fn3などのフィブロネクチン足場ポリペプチドとC1qなどの補体タンパク質との融合を、細胞の標的化に使用してもよく、また、^{10}Fn3などのフィブロネクチン足場ポリペプチドと毒素との融合を、特定の抗原を保有する細胞を特異的に破壊するために使用し得る。これらの融合のうちの任意のものを、標準技術、例えば、公的に利用可能な遺伝子配列を用いて構築した組換え融合遺伝子からの融合タンパク質の発現によって及び/又は下記に記載した他の方法で、作製し得る。

【０７５９】

足場多量体

単量体に加えて、本明細書中で記載するフィブロネクチン足場構築体のうちの任意のものを、足場の二量体又は多量体として、結合価を増加させ、ひいては抗原(例えば血清アルブミン)結合の結合力を増加させる手段として、作製し得る。そのような多量体は、共有結合によって作製し得る。例えば、個々の10Fn3モジュールを、天然の8Fn3-9Fn3-10Fn3のCからN末端の結合を模倣することによって、又はその定常領域を介して一緒に保たれて

いる抗体二量体を模倣することによって、結合し得る。10Fn3-Fc構築体を活用して、一般スキーム10Fn3-Fc::Fc-10Fn3の二量体を設計し得る。Fc::Fc界面内に操作した結合は、共有又は非共有であり得る。さらに、他の非免疫グロブリン足場部分及び/又は免疫グロブリンに基づく抗原結合部分などの、Fc以外の二量体化又は多量体化パートナーを、10Fn3ハイブリッドなどのハイブリッド中で使用して、そのような高次構造を作製することができる。多量体の他の例には、本明細書中で記載する単一可変ドメインが含まれる。

【０７６０】

具体的な例では、共有結合した多量体は、多量体をコードしている融合遺伝子を構築することによって、又はシステイン残基のコドンを単量体配列内に操作し、発現産物間でジスルフィド結合形成を生じさせることによって、作製し得る。非共有結合した多量体もまた、様々な技術によって作製し得る。これらには、単量体配列内に陽性及び/又は陰性荷電残基に対応するコドンを導入し、発現産物中のこれらの残基間(したがって単量体間)の相互作用を生じさせることが含まれる。この手法は、単量体サブユニット中に自然に存在する荷電した残基、例えばフィブロネクチンの陰性荷電残基を利用することによって単純化し得る。フィブロネクチン足場ポリペプチドを含む非共有結合した組成物を作製する別の手段は、単量体遺伝子内に(例えば、アミノ又はカルボキシ末端で)、相互作用することが知られているタンパク質又はタンパク質ドメインのコード配列を導入することである。そのようなタンパク質又はタンパク質ドメインには、コイル-コイルモチーフ、ロイシンジッパーモチーフ、及び二量体又はより高次の多量体の形成を指示することが知られている数々のタンパク質サブユニット(又はその断片)のうちの任意のものが含まれる。

【０７６１】

フィブロネクチン様分子

^{10}Fn3は抗体模倣体を作製するための好ましい足場を表すが、本明細書中で記載する分子において、他の分子で^{10}Fn3を置換し得る。これらには、それだけには限定されないが、ヒトフィブロネクチンモジュール^{1}Fn3～^{9}Fn3及び^{11}Fn3～^{17}Fn3、並びに非ヒト動物及び原核生物由来の関連するFn3モジュールが含まれる。さらに、テネイシン及びアンデュリン(undulin)などの、^{10}Fn3と配列相同性を有する他のタンパク質からのFn3モジュールも使用し得る。免疫グロブリン様の折り畳みを有する(がV_Hドメインと無関連の配列を有する)他の例示的な足場には、N-カドヘリン、ICAM-2、タイチン、GCSF受容体、サイトカイン受容体、グリコシダーゼ阻害剤、E-カドヘリン、及び抗生物質色素タンパク質が含まれる。関連する構造を有するさらなるドメインは、ミエリン膜接着分子P0、CD8、CD4、CD2、クラスI MHC、T細胞抗原受容体、VCAM-1のCD1、C2及びI組ドメイン、ミオシン結合タンパク質CのI組免疫グロブリンドメイン、ミオシン結合タンパク質HのI組免疫グロブリンドメイン、テロキンのI組免疫グロブリンドメイン、テリキン(telikin)、NCAM、トゥイッチン、ニューログリアン、成長ホルモン受容体、エリスロポエチン受容体、プロラクチン受容体、GC-SF受容体、インターフェロン-γ受容体、β-ガラクトシダーゼ/グルクロニダーゼ、β-グルクロニダーゼ、及びトランスグルタミナーゼに由来し得る。或いは、一つ又は複数の免疫グロブリン様の折り畳みが含まれる任意の他のタンパク質を利用し得る。そのようなタンパク質は、例えば、プログラムSCOPを用いて同定し得る(Murzin他、J.Mol.Biol.247:536(1995);Lo Conte他、Nucleic Acids Res.25:257(2000)。

【０７６２】

一般に、V_Hドメインと構造的関連性を示す任意の分子(例えば上記SCOPコンピュータプログラムを用いて同定)を非免疫グロブリン足場として利用することができる。そのような分子には、フィブロネクチンと同様、分子のN末端極に3個のループ及びC末端極に3個のループが含まれいてよく、そのそれぞれが多様なライブラリーを作製するためにランダム化されていてもよい。或いは、より多数のループを有するより大きなドメインを利用し得るが、但し、表面のランダム化可能なループのうちのいくつかが抗原結合に参加できるように十分に空間的に近く配置されている。互いに近くに配置された3個より多くのループを保有するポリペプチドの例には、それぞれランダム化することができる4個のループを有する、T細胞抗原受容体及びスーパーオキシドジスムターゼ;並びに3個のランダム化可

能なループが二つのドメインの一部であるそれぞれ3組の2個の類似のドメインを有する(ループの合計数が6個となる)、Fn3二量体、組織因子ドメイン、及びサイトカイン受容体ドメインが含まれる。

【０７６３】

さらに別の代替方法では、空間的に近く配置されている可変ループを有する任意のタンパク質を、候補結合タンパク質の産生に利用し得る。例えば、空間的に関連している、溶媒と接近可能なループを有する大きなタンパク質を、免疫グロブリン様の折り畳みと構造的に関連していない場合でも使用し得る。例示的なタンパク質には、それだけには限定されないが、チトクロームF、緑色蛍光タンパク質、GroEL、及びタウマチンが含まれる。これらのタンパク質によって表示されるループをランダム化してもよく、本明細書中、例えば実施例1に記載するように、ランダム化されたライブラリーから優れた結合剤を選択する。その大きさにより、抗体-抗原の相互作用で見つかるものよりも相当に大きな抗原結合表面を表示する分子が得られ得る。この種の他の有用な足場はまた、多数のループ、特に平行βシート又はいくつかのαヘリックスに沿って配置されているループを有する候補タンパク質を閲覧するためにプログラムSCOP(Murzin他、J.Mol.Biol.247:536(1995))を使用しても、同定し得る。

【０７６４】

様々な生物及び親タンパク質に由来するモジュールが、様々な用途に最も適切であり得る。例えば、本発明のフィブロネクチン足場ポリペプチドを設計するにあたって、そのタンパク質を、治療を意図する生物に固有のフィブロネクチン又はフィブロネクチン様分子から作製することが最も望ましい場合がある。対照的に、診断学などのin vitro用途又は研究試薬として使用するフィブロネクチン足場では、起源の生物はそれほど重要でない又は無関係でさえある。

【０７６５】

これらの分子の任意のものにおいて、本明細書中で記載する方法のうちの任意のものによって、ライブラリーを作製し、結合タンパク質を選択するために使用し得る。

【０７６６】

足場に基づく結合タンパク質の定向進化

本明細書中で記載する非免疫グロブリン足場は、新規又は改良された結合タンパク質を進化させるための任意の技術で使用し得る。具体的な一例では、結合の標的(例えば血清アルブミン)をカラム樹脂又はマイクロタイタープレートウェルなどの固体担体上に固定し、標的を候補非免疫グロブリン足場に基づく結合タンパク質のライブラリーと接触させる。そのようなライブラリーは、^{10}Fn3 CDR様ループの配列及び/又は長さのランダム化によってネイティブ(野生型)^{10}Fn3足場から構築した^{10}Fn3クローンなどのフィブロネクチン足場クローンからなり得る。所望する場合は、このライブラリーは、例えば、Szostak他、U.S.Ser.No.09/007005及びSer.No.09/247190;Szostak他、WO98/31700;並びにRoberts及びSzostak、Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1997)第94巻、ページ12297-12302に記載の技術によって作製したRNA-タンパク質の融合ライブラリーであり得る。或いは、これは、DNA-タンパク質のライブラリーであり得る(例えば、Lohse、DNA-タンパク質の融合対及びその使用(DNA-Protein Fusions and Uses Thereof)、U.S.Ser.No.60/110549、U.S.Ser.No.09/459190、及びWO00/32823に記載)。融合ライブラリーを固定した標的とインキュベーションし、担体を洗浄して非特異的な結合剤を除去し、最も密な結合剤を非常にストリンジェントな条件下で溶出させ、配列情報を回収するため又は結合剤の新規ライブラリーを作製するためにPCRに供し、これは、配列をさらに突然変異誘発して又はせずに選択プロセスを繰り返すために使用し得る。抗原(例えば血清アルブミン)に対する親和性が十分な結合剤が得られるまで、数ラウンドの選択を行い得る。

【０７６７】

具体的な一例では、^{10}Fn3足場を選択標的として使用し得る。例えば、10個の残基のループ中で提示される特定のペプチド配列(例えば血清アルブミン)と結合するタンパク質が必要な場合、そのループのうちの一つが10個の長さ及び所望の配列に設定された、単一の

^{10}Fn3クローンを構築する。新しいクローンをin vivoで発現させて精製し、その後、固体担体上に固定する。その後、適切な足場に基づくRNA-タンパク質の融合ライブラリーを担体と相互作用させ、その後これを洗浄し、所望の分子を溶出させて上述のように再度選択する。

【０７６８】

同様に、本明細書中で記載する足場、例えば^{10}Fn3足場を用いて、足場によって、例えば^{10}Fn3ループ中で表示されるペプチド配列と相互作用する天然のタンパク質を見つけ得る。^{10}Fn3タンパク質などの足場タンパク質を上述のように固定し、RNA-タンパク質の融合ライブラリーを、表示されたループに対する結合剤についてスクリーニングする。結合剤を複数ラウンドの選択によって濃縮し、DNA配列決定によって同定する。

【０７６９】

さらに、上記手法では、RNA-タンパク質のライブラリーは定向進化の例示的なライブラリーを表すが、任意の種類の足場に基づくライブラリーを本発明の選択方法で使用し得る。

【０７７０】

フィブロネクチン足場ポリペプチドの使用

本明細書中で記載するフィブロネクチン足場ポリペプチドは、血清アルブミン又は任意の目的抗原と結合するように進化させ得る。そのようなフィブロネクチン足場タンパク質は、天然の抗体よりも優れた熱力学的特性を有しており、in vitroで迅速に進化させることができる。したがって、これらのフィブロネクチン足場ポリペプチドを用いて、研究、治療、及び診断分野で使用するための結合ドメインを生成し得る。

【０７７１】

突然変異性の親和性成熟

本明細書中で記載する選択はまた、ライブラリーの多様性をさらに増加させるために、選択ステップのすべて又は部分集合の後に、突然変異誘発と組み合わせ得る。親和性成熟の方法では、例えば、1回又は複数回のラウンドの抗原結合親和性に対する選択と組み合わせた、エラープローンPCR(Cadwell及びJoyce、PCR Methods Appl 2:28(1992))又はランダム突然変異誘発の代替形態、下記に記載のNNK突然変異誘発、ルックスルー突然変異誘発(CDRを移植したフィブロネクチン足場ポリペプチドは、天然CDRの多様性を使用することで、抗原結合を最適化するように操作されている、例えば本明細書中に参照により組み込まれているWO06/023144参照)、及び/又はポリペプチドの多様性を生じるために他の当分野で認識されている突然変異手法を用い得る。

【０７７２】

下記に記載の足場タンパク質のうちの任意のものを、例えば本発明の二重特異性リガンド組成物で使用するために、互いに組み合わせ得る。例えば、CDRをCTLA-4足場上に移植し、抗体のVH又はVLドメインと一緒に使用して多価リガンドを形成し得る。同様に、フィブロネクチン、リポカリン、アフィボディ、及び他の足場を組み合わせ得る。

【０７７３】

本明細書中で言及するすべての公報、及び前記公報中に引用される参考文献は、本明細書中に参照により組み込まれている。本発明の記載した方法及びシステムの様々な改変及び変型は、本発明の範囲及び精神から逸脱せずに当業者に明らかであろう。本発明は具体的な好ましい実施形態に関連して記載したが、特許請求した本発明は、そのような具体的な実施形態に過度に限定されないことを理解されたい。実際、分子生物学又は関連分野の技術者に明らかな、本発明を実施するための記載した様式の様々な改変が、特許請求の範囲内にあることを意図する。

【０７７４】

添付表1;半減期をin vivoで増強させるポリペプチド

α-1糖タンパク質(オロソムコイド)(AAG)

α-1アンチキロモトリプシン(ACT)

α-1アンチトリプシン(AAT)

α-1ミクログロブリン(タンパク質HC)(AIM)
α-2マクログロブリン(A2M)
抗トロンビンIII(AT III)
アポリポプロテインA-1(Apo A-1)
アポリタンパク質B(Apo B)
β-2-ミクログロブリン(B2M)
セルロプラスミン(Cp)
補体成分(C3)
補体成分(C4)
C1エステラーゼ阻害剤(C1 INH)
C-反応性タンパク質(CRP)
シスタチンC(Cys C)
フェリチン(FER)
フィブリノーゲン(FIB)
フィブロネクチン(FN)
ハプトグロビン(Hp)
ヘモペキシン(HPX)
免疫グロブリンA(IgA)
免疫グロブリンD(IgD)
免疫グロブリンE(IgE)
免疫グロブリンG(IgG)
免疫グロブリンM(IgM)
免疫グロブリン軽鎖(κ/λ)
リポタンパク質(a)[Lp(a)]
マンノース結合タンパク質(MBP)
ミオグロビン(Myo)
プラスミノーゲン(PSM)
プレアルブミン(トランスサイレチン)(PAL)
レチノール-結合タンパク質(RBP)
ロイマトイド因子(RF)
血清アミロイドA(SAA)
可溶性トランフェリン受容体(sTfR)
トランスフェリン(Tf)

【０７７５】

添付表2

【表１１】

対	治療上関連性のある参考文献。
TNFα/TGF-β	・TGF-b及びTNFは、コラーゲンで誘発させた関節炎モデルの足首関節に注射した場合、関節の炎症を有意に増強した。コラーゲンで誘発していないマウスでは効果がなかった。
TNFα/IL-1	・TNF及びIL-1はブドウ膜炎の病態において相乗作用する。 ・TNF及びIL-1はマラリア(低血糖症、NO)の病態において相乗作用する。 ・TNF及びIL-1は炎症における多形核(PMN)細胞の遊走の誘発において相乗作用する。 ・IL-1及びTNFは相乗作用してPMNの浸潤を腹膜内に誘発する。 ・IL-1及びTNFは相乗作用して内皮細胞によるIL-1の分泌を誘発する。炎症で重要。 ・IL-1又はTNFは単独である程度の細胞浸潤を膝滑膜内で誘発した。IL-1はPMN、TNF-単球を誘発させた。これらは一緒になって、増加したPMNによるより重篤な浸潤を誘発させた。 ・循環中の心筋抑制物質(敗血症で存在)は相乗的に作用している低レベルのIL-1及びTNFである。
TNFα/IL-2	・キラーT細胞の相乗的活性化に最も関連している。
TNFα/IL-3	・急性骨髄性白血病芽球のクローン増殖の刺激におけるインターロイキン3及び腫瘍壊死因子αの相乗作用は、腫瘍壊死因子αによる二次造血サイトカインの誘発の結果である。 ・Cancer Res.1992年4月15日;52(8):2197-201。
TNFα/IL-4	・IL-4及びTNFは相乗作用して内皮細胞上のVCAMの発現を誘発する。喘息において役割を持つと示唆されている。滑膜についても同様-RAに関連づけられている。 ・TNF及びIL-4は相乗作用してケラチノサイトにおけるIL-6の発現を誘発する。 ・培養線維芽細胞様滑膜細胞における持続的な上昇したレベルのVCAM-1は、IL-4又はIL-13のどちらかと組み合わせたTNF-αによって、増加したmRNA安定性によって達成することができる。Am J Pathol.1999年4月;154(4):1149-58
TNFα/IL-5	・成人及びその子供の気管支機能亢進における腫瘍壊死因子系と血清インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-8、好酸球陽イオンタンパク質、及び免疫グロブリンEのレベルとの関係性。Allergy Asthma Proc.2003年3月-4月;24(2):111-8。
TNFα/IL-6	・TNF及びIL-6は新規ヒト骨髄腫細胞系であるOH-2の強力な成長因子である。Eur J Haematol.1994年7月;53(1):31-7。
TNFα/IL-8	・TNF及びIL-8はPMNと相乗作用して血小板を活性化する。急性呼吸窮迫症候群に関連づけられている。 ・IL-5/TNF(喘息)を参照。好中球媒介性血小板活性化にインターロイキン-8と腫瘍壊死因子-αとの間の相乗作用。Eur Cytokine Netw.1994年9月-10月;5(5):455-60。(成人呼吸窮迫症候群(ARDS))
TNFα/IL-9	
TNFα/IL-10	・IL-10は慢性感染したT細胞中のHIV発現の誘発においてTNFを誘発してそれと相乗作用する。

TNFα/IL-11	・サイトカインは破骨細胞分化を相乗的に誘発する:不死化又は正常な頭蓋冠細胞によって支持。Am J Physiol Cell Physiol.2002年9月;283(3):C679-87。(骨減少)
TNFα/IL-12	
TNFα/IL-13	・培養線維芽細胞様滑膜細胞における持続的な上昇したレベルのVCAM-1は、IL-4又はIL-13のどちらかと組み合わせたTNF-αによって、増加したmRNA安定性によって達成することができる。Am J Pathol.1999年4月;154(4):1149-58。 ・インターロイキン-13及び腫瘍壊死因子-αは、ヒト鼻線維芽細胞におけるエオタキシンの産生を相乗的に誘発する。Clin Exp Allergy.2000年3月;30(3):348-55。 ・インターロイキン-13及び腫瘍壊死因子-αは、ヒト鼻線維芽細胞におけるエオタキシンの産生を相乗的に誘発する。Clin Exp Allergy.2000年3月;30(3):348-55(アレルギー性炎症) ・小児ネフローゼ症候群の治療応答における血清TNF-β及びIL-13の関連。Cytokine.2003年2月7日;21(3):155-9。
TNFα/IL-14	・緩和な喘息に罹患している対象における吸入した腫瘍壊死因子αの効果。Thorax.2002年9月;57(9):774-8。
TNFα/IL-15	・緩和な喘息に罹患している対象における吸入した腫瘍壊死因子αの効果。Thorax.2002年9月;57(9):774-8。
TNFα/IL-16	・気道上皮細胞における腫瘍壊死因子-α誘発性インターロイキン-16の合成:セロトニン刺激のプライミング。Am J Respir Cell Mol Biol.2003年3月;28(3):354-62。(気道炎症) ・関節リウマチに罹患している患者における循環インターロイキン16と炎症誘発性サイトカインとの相関。Rheumatology(Oxford)。2001年4月;40(4):474-5。要約は利用不可。 ・インターロイキン16はクローン病でアップレギュレーションされており、マウスにおいてTNBS大腸炎に関与する。Gastroenterology.2000年10月;119(4):972-82。
TNFα/IL-17	・インターロイキン-17の阻害は、ライム病菌を用いて誘発した、ワクチン接種したマウスにおいて関節炎の発生を予防する。Infect Immun.2003年6月;71(6):3437-42。 ・インターロイキン17は腫瘍壊死因子αと相乗作用して軟骨破壊をin vitroで誘発する。Ann Rheum Dis.2002年10月;61(10):870-6。 ・IL-17及びTNF-αによって引き起こされる気道中の好中球の蓄積におけるGM-CSFの役割。Eur Respir J.2003年3月;21(3):387-93。(気道炎症) ・要約　インターロイキン-1、腫瘍壊死因子α、及びインターロイキン-17は、ヒト骨関節炎の膝半月板の外植片において一酸化窒素及びプロスタグランジンE2の産生を相乗的にアップレギュレーションする。Arthritis Rheum.2001年9月;44(9):2078-83。
TNFα/IL-18	・関節リウマチに罹患している患者の膝滑膜組織における、インターロイキン-18の発現とインターロイキン-1β及び腫瘍壊死因子α両方の増強したレベルとの関連。Arthritis Rheum.2003年2月;48(2):339-47。 ・要約　2型真性糖尿病に罹患している患者の血清における上昇したレベルのインターロイキン-18及び腫瘍壊死因子-α:糖尿病性腎症との関係性。Metabolism.2003年5月;52(5):605-8。
TNFα/IL-19	・要約　IL-19はIL-6及びTNF-αの産生を誘発し、TNF-αによって細胞アポトーシスをもたらす。J Immunol.2002年10月15日;169(8):4288-97。

【０７７６】

TNFα/IL-20	・要約　サイトカイン:IL-20-皮膚炎症の新規エフェクター。Curr Biol.2001年7月10日;11(13):R531-4
TNFα/補体	・炎症及び凝固:敗血症の患者との関連性。Clin Infect Dis.2003年5月15日;36(10):1259-65。Epub 2003年5月08日。総説。
TNFα/IFN-γ	・脳におけるMHCの誘発。 ・抗ウイルス応答/IFN-βの誘発で相乗作用する。 ・好中球活性化/呼吸バースト。 ・内皮細胞活性化 ・抗ウイルス治療としてTNF/IFN-γで患者を治療した場合に毒性が指摘される ・ヒト星細胞によるフラクタルカイン発現。 ・炎症反応に関する多数の論文-即ちLPS、また、マクロファージ活性化。 ・抗TNF及び抗IFN-γは相乗作用してマウスを致死的内毒血症から保護する。

【０７７７】

【表１２】

TGF-β/IL-1	・骨芽細胞によるプロスタグルンジンの合成 ・腸管上皮細胞によるIL-6の産生(炎症モデル) ・肺線維芽細胞においてIL-11及びIL-6を刺激する(炎症モデル) ・網膜におけるIL-6及びIL-8の産生
TGF-β/IL-6	・軟骨肉腫増殖
IL-1/IL-2	・B細胞活性化 ・LAK細胞活性化 ・T細胞活性化 ・リンホカイン活性化キラー細胞の産生におけるIL-1とIL-2との相乗作用はTNF-α及びβによって媒介される(リンフォトキシン)。Cytokine.1992年11月;4(6):479-87。
IL-1/IL-3	
IL-1/IL-4	・B細胞活性化 ・IL-4は内皮細胞活性化においてIL-1の発現を誘発する。
IL-1/IL-5	
IL-1/IL-6	・B細胞活性化 ・T細胞活性化(アクセサリー細胞に置き換えることができる) ・IL-1はIL-6の発現を誘発する ・C3及び血清アミロイドの発現(急性期反応) ・HIV発現 ・軟骨コラーゲン分解。
IL-1/IL-7	・IL-7はIL-1誘発性の胸腺細胞増殖に必須である。顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子又は腫瘍壊死因子とIL-1との相乗効果におけるIL-7の関与。J Immunol.1992年1月1日;148(1):99-105。
IL-1/IL-8	
IL-1/IL-10	
IL-1/IL-11	・サイトカインは破骨細胞分化を相乗的に誘発する:不死化又は正常な頭蓋冠細胞によって支持。Am J Physiol Cell Physiol.2002年9月;283(3):C679-87。(骨減少)
IL-1/IL-16	・関節リウマチに罹患している患者における循環インターロイキン16と炎症誘発性サイトカインとの相関。Rheumatology(Oxford)。2001年4月;40(4):474-5。要約は利用不可.
IL-1/IL-17	・インターロイキン-17の阻害はライム病菌を用いて誘発したワクチン接種したマウスにおいて関節炎の発生を予防する。Infect Immun.2003年6月;71(6):3437-42。 ・骨関節炎におけるヒト軟骨分解及び滑膜炎症におけるインターロイキン17の寄与。Osteoarthritis Cartilage.2002年10月;10(10):799-807。 ・要約　インターロイキン-1、腫瘍壊死因子α、及びインターロイキン-17は、ヒト骨関節炎の膝半月板の外植片において一酸化窒素及びプロスタグランジンE2の産生を相乗的にアップレギュレーションする。Arthritis Rheum.2001年9月;44(9):2078-83。
IL-1/IL-18	・関節リウマチに罹患している患者の膝滑膜組織における、インターロイキン-18の発現とインターロイキン-1β及び腫瘍壊死因子α両方の増強したレベルとの関連。Arthritis Rheum.2003年2月;48(2):339-47。

【０７７８】

IL-1/IFN-g	
IL-2/IL-3	・T細胞増殖 ・B細胞増殖
IL-2/IL-4	・B細胞増殖 ・T細胞増殖 ・(CD8及びNKリンパ球の活性化を選択的に誘発する)IL-2Rβ作用剤P1-30はIL-2、IL-4、IL-9、及びIL-15と相乗的に作用する:生物学的及び分子学的効果。J Immunol.2000年10月15日;165(8):4312-8。
IL-2/IL-5	・B細胞増殖/Ig分泌 ・IL-5はB細胞上でIL-2受容体を誘発させる
IL-2/IL-6	・細胞傷害性T細胞の発生
IL-2/IL-7	
IL-2/IL-9	・IL-2/IL-4参照(NK細胞)
IL-2/IL-10	・B細胞活性化
IL-2/IL-12	・IL-12はIL-2と相乗作用して、新鮮なヒトNK細胞においてリンホカイン活性化細胞傷害性並びにパーフォリン及びグランザイムの遺伝子発現を誘発させる。Cell Immunol.1995年10月1日;165(1):33-43。(T細胞活性化)
IL-2/IL-15	・IL-2/IL-4参照(NK細胞) ・(T細胞の活性化及び増殖)IL-15及びIL-2:in vivoにおけるT細胞の死活問題。Nat Med.2001年1月;7(1):114-8。
IL-2/IL-16	・IL-16及びIL-2によるCD4+T細胞の相乗的な活性化。J Immunol.1998年3月1日;160(5):2115-20。
IL-2/IL-17	・ヒト及び実験的な腎臓同種移植片拒絶におけるインターロイキン17の初期関与の証拠。J Pathol.2002年7月;197(3):322-32。
IL-2/IL-18	・IL-2と相乗作用するインターロイキン18(IL-18)はマウスで致死的肺傷害を誘発する:間質性肺炎の病因におけるサイトカイン、ケモカイン、及びナチュラルキラー細胞の潜在的な役割。Blood.2002年2月15日;99(4):1289-98。
IL-2/TGF-β	・CD4エフェクターの運命の制御:トランスフォーミング成長因子β1及びインターロイキン2は相乗作用してアポトーシスを予防し、エフェクターの拡大を促進する。J Exp Med.1995年9月1日;182(3):699-709。
IL-2/IFN-γ	・B細胞によるIg分泌 ・IL-2はT細胞によるIFN-γの発現を誘発する
IL-2/IFN-α/β	・なし
IL-3/IL-4	・肥満細胞の増殖において相乗作用する ・ヒト単球によるCD23の発現の誘発に対するIL-4とGM-CSF又はIL-3のどちらかとの相乗効果:IFN-α及びIFN-γの制御効果。Cytokine.1994年7月;6(4):407-13。
IL-3/IL-5	
IL-3/IL-6	
IL-3/IFN-γ	・IL-4及びIFN-γはヒト腸管上皮細胞中の全高分子IgA受容体レベルを相乗的に増加させる。タンパク質チロシンキナーゼの役割。J Immunol.1996年6月15日;156(12):4807-14。

【０７７９】

IL-3/GM-CSF	・サイトカインによるヒト好酸球IL-3、IL-5、及びGM-CSF受容体α鎖の発現の示差的制御:IL-3、IL-5、及びGM-CSFはIL-5の応答性の損失を伴ってIL-5受容体αの発現をダウンレギュレーションするが、IL-3受容体αの発現をアップレギュレーションする。J Immunol.2003年6月1日;170(11):5359-66。(アレルギー性炎症)
IL-4/IL-2	・IL-4はネズミNK細胞においてIL-2及びIL-12誘発性のIFN-{γ}の発現をどちらも相乗的に増強させる。Blood.2003年3月13日[出版前のEpub]
IL-4/IL-5	・増強した肥満細胞ヒスタミンなど。IgEに応答して分泌 ・Th2様サイトカイン応答は水疱性類天疱瘡に関与している。疾患の病因におけるIL-4及びIL-5の役割。Int J Immunopathol Pharmacol.1999年5月-8月;12(2):55-61。
IL-4/IL-6	
IL-4/IL-10	
IL-4/IL-11	・マウスの未分化造血前駆体の増殖の支持におけるインターロイキン-11とインターロイキン-4との間の相乗的な相互作用。Blood.1991年9月15日;78(6):1448-51。
IL-4/IL-12	・樹状細胞によるIL-12依存性のIFN-γの産生に対するIL-4及びIL-18の相乗効果。J Immunol.2000年1月1日;164(1):64-71。(Th1/Th2の分化を増加) ・IL-4はネズミNK細胞においてIL-2及びIL-12誘発性のIFN-{γ}の発現をどちらも相乗的に増強させる。Blood.2003年3月13日[出版前のEpub]
IL-4/IL-13	・要約　インターロイキン-4及びインターロイキン-13のシグナル伝達連結マップ。Science.2003年6月6日;300(5625):1527-8。(アレルギー、喘息) ・IL-4/IL-13受容体系の阻害はアレルギー性喘息のマウスモデルにおいて確立されたアレルギーに影響を与えずにアレルギー性感作を予防する。J Allergy Clin Immunol.2003年6月;111(6):1361-1369。
IL-4/IL-16	・(喘息)インターロイキン(IL)-4/IL-9及び外因性IL-16は気管支上皮細胞系であるBEAS-2B細胞によるIL-16の産生を誘発する。Cell Immunol.2001年2月1日;207(2):75-80
IL-4/IL-17	・インターロイキン(IL)-4及びIL-17はヒト結腸筋線維芽細胞においてIL-6の分泌を相乗的に刺激する。Int J Mol Med.2002年11月;10(5):631-4。(腸炎症)
IL-4/IL-24	・IL-24はラット及びヒトマクロファージによって発現される。Immunobiology.2002年7月;205(3):321-34。
IL-4/IL-25	・要約　新規IL-17ファミリーメンバーは肺におけるTh1又はTh2応答を促進する:新規サイトカインIL-25のin vivo機能。J Immunol.2002年7月1日;169(1):443-53。(アレルギー性炎症) ・要約　肥満細胞はFcε RI媒介性の活性化の際にインターロイキン-25を産生する。Blood.2003年5月1日;101(9):3594-6。Epub 2003年1月02日。(アレルギー性炎症)
IL-4/IFN-γ	・要約　インターロイキン4は内皮細胞によるインターロイキン6の産生を誘発する:インターフェロン-γとの相乗作用。Eur J Immunol.1991年1月;21(1):97-101。
IL-4/SCF	・幹細胞因子及びIL-4によるヒト腸管肥満細胞の制御。Immunol Rev.2001年2月;179:57-60。総説。

【０７８０】

IL-5/IL-3	・サイトカインによるヒト好酸球IL-3、IL-5、及びGM-CSF受容体α鎖の発現の示差的制御:IL-3、IL-5、及びGM-CSFはIL-5の応答性の損失を伴ってIL-5受容体αの発現をダウンレギュレーションするが、IL-3受容体αの発現をアップレギュレーションする。J Immunol.2003年6月1日;170(11):5359-66。(アレルギー性炎症、要約参照)
IL-5/IL-6	
IL-5/IL-13	・デキサメタゾンによるマウスにおけるアレルギー性気道炎症及び気道過敏症の阻害:好酸球、IL-5、エオタキシン、及びIL-13の役割。J Allergy Clin Immunol.2003年5月;111(5):1049-61。
IL-5/IL-17	・インターロイキン-17はアレルギー性喘息のマウスモデルにおいてアレルゲン吸入後の気道内への顆粒球の流入を編成する。Am J Respir Cell Mol Biol.2003年1月;28(1):42-50。
IL-5/IL-25	・要約　新規IL-17ファミリーメンバーは肺におけるTh1又はTh2応答を促進する:新規サイトカインIL-25のin vivo機能。J Immunol.2002年7月1日;169(1):443-53。(アレルギー性炎症) ・要約　肥満細胞はFcε RI媒介性の活性化の際にインターロイキン-25を産生する。Blood.2003年5月1日;101(9):3594-6。Epub 2003年1月02日。(アレルギー性炎症)
IL-5/IFN-γ	
IL-5/GM-CSF	・サイトカインによるヒト好酸球IL-3、IL-5、及びGM-CSF受容体α鎖の発現の示差的制御:IL-3、IL-5、及びGM-CSFはIL-5の応答性の損失を伴ってIL-5受容体αの発現をダウンレギュレーションするが、IL-3受容体αの発現をアップレギュレーションする。J Immunol.2003年6月1日;170(11):5359-66。(アレルギー性炎症)
IL-6/IL-10	
IL-6/IL-11	
IL-6/IL-16	・インターロイキン-16はヒト単球による炎症誘発性サイトカインの発現及び産生を刺激する。Immunology.2000年5月;100(1):63-9。
IL-6/IL-17	・IL-6パラ分泌/自己分泌ループを介したインターロイキン(IL)-17による気道ムチンの遺伝子発現の刺激。J Biol Chem.2003年5月9日;278(19):17036-43。Epub 2003年3月06日。(気道炎症、喘息)
IL-6/IL-19	・要約　IL-19はIL-6及びTNF-αの産生を誘発し、TNF-αによって細胞アポトーシスをもたらす。J Immunol.2002年10月15日;169(8):4288-97。
IL-6/IFN-g	
IL-7/IL-2	・インターロイキン7は移植片対宿主疾患を悪化させる。Blood.2002年10月1日;100(7):2642-9。
IL-7/IL-12	・ヒトT細胞活性化に対するIL-7とIL-12との相乗効果。J Immunol.1995年5月15日;154(10):5093-102。
IL-7/IL-15	・インターロイキン-7及びインターロイキン-15は皮膚T細胞リンパ腫細胞においてbcl-2及びc-myb遺伝子の発現を制御する。Blood.2001年11月1日;98(9):2778-83。(成長因子)
IL-8/IL-11	・真性多血症におけるインターロイキン(IL)-11及びIL-8の異常産生。Cytokine.2002年11月21日;20(4):178-83。

【０７８１】

IL-8/IL-17	・関節破壊におけるIL-17の役割。Drug News Perspect.2002年1月;15(1):17-23。(関節炎) ・要約　インターロイキン-17はヒト気道上皮細胞によるインターロイキン-8、成長関連癌遺伝子-α、及び顆粒球-コロニー刺激因子の発現を刺激する。Am J Respir Cell Mol Biol.2002年6月;26(6):748-53。(気道炎症)
IL-8/GSF	・インターロイキン-8:コロニー刺激因子-1と相乗的に作用して単球-マクロファージの成長及び分化を促進する、ヒト造血前駆体の自己分泌/パラ分泌成長因子。Exp Hematol.1999年1月;27(1):28-36。
IL-8/VGEF	・原発性及び再発性の悪性神経膠腫における腔内のVEGF、bFGF、IL-8、IL-12のレベル。J Neurooncol.2003年5月;62(3):297-303。
IL-9/IL-4	・抗インターロイキン-9抗体治療はマウス喘息モデルにおいて気道炎症及び機能亢進を阻害する。Am J Respir Crit Care Med.2002年8月1日;166(3):409-16。
IL-9/IL-5	・IL-9の肺内過剰発現はTh2サイトカインの発現を誘発し、免疫病態をもたらす。J Clin Invest.2002年1月;109(1):29-39。 ・Th2サイトカイン及び喘息。喘息の治療標的としてのインターロイキン-9。Respir Res.2001;2(2):80-4。Epub 2001年2月15日。総説。 ・要約　インターロイキン-9はヒト好酸球のインターロイキン-5受容体の発現、分化、及び生存を増強させる。Blood.2000年9月15日;96(6):2163-71(喘息)
IL-9/IL-13	・抗インターロイキン-9抗体治療はマウス喘息モデルにおいて気道炎症及び機能亢進を阻害する。Am J Respir Crit Care Med.2002年8月1日;166(3):409-16。 ・上皮細胞に対するインターロイキン-13の直接効果は喘息において気道過敏及び粘液過剰産生を引き起こす。Nat Med.2002年8月;8(8):885-9。
IL-9/IL-16	・IL-4/IL-16参照
IL-10/IL-2	・液性免疫応答におけるインターロイキン-10(IL-10)とインターロイキン-2(IL-2)との相互作用:IL-10はIL-2と相乗作用して、CD25の発現のアップレギュレーションとは異なる機構でヒトBリンパ球の応答を増強させる。Cell Immunol.1994年9月;157(2):478-88。
IL-10/IL-12	
IL-10/TGF-β	・IL-10及びTGF-βは正常な免疫及び特定の免疫療法における粘膜アレルゲンに対する制御的T細胞応答において協同する。Eur J Immunol.2003年5月;33(5):1205-14。
IL-10/IFN-γ	
IL-11/IL-6	・インターロイキン-6及びインターロイキン-11はRANKL非依存性の機構によってヒト破骨細胞の形成を支持する。Bone.2003年1月;32(1):1-7。(炎症における骨吸収)
IL-11/IL-17	・急性及び慢性の皮膚病変の間でのIL-11及びIL-17の偏向in vivo発現。J Allergy Clin Immunol.2003年4月;111(4):875-81。(アレルギー性皮膚炎) ・IL-17は、NF-κBリガンドの受容体活性化剤/オステオプロテゲリンのバランスの損失によってネズミコラーゲン誘発性関節炎において骨侵食を促進する。J Immunol.2003年3月1日;170(5):2655-62。
IL-11/TGF-β	・急性及び慢性の皮膚病変の間でのIL-11及びIL-17の偏向in vivo発現。J Allergy Clin Immunol.2003年4月;111(4):875-81。(アレルギー性皮膚炎)

【０７８２】

IL-12/IL-13	・全身性エリテマトーデスにおけるインターロイキン-12及びインターロイキン-13の不均衡とクラスに特異的なリウマチ因子及び抗カルジオリピン抗体との関係性。Clin Rheumatol.2003年5月;22(2):107-11。
IL-12/IL-17	・活動性炎症性腸疾患におけるインターロイキン-12及び17のアップレギュレーション。Scand J Gastroenterol.2003年2月;38(2):180-5。
IL-12/IL-18	・インターロイキン12及びインターロイキン18によるナチュラルキラー細胞の相乗的な増殖及び活性化。Cytokine.1999年11月;11(11):822-30。 ・IL-12及びIL-18によって引き起こされる炎症性脂肪肝。J Interferon Cytokine Res.2003年3月;23(3):155-62。
IL-12/IL-23	・脳の自己免疫炎症の重要なサイトカインはインターロイキン-12ではなくインターロイキン-23である。Nature.2003年2月13日;421(6924):744-8。 ・要約　細胞性免疫の促進におけるIL-23の独特な役割。J Leukoc Biol.2003年1月;73(1):49-56。総説。
IL-12/IL-27	・要約　EBI3及びp28タンパク質からなるヘテロ二量体サイトカインであるIL-27はナイーブなCD4(+)T細胞の増殖を誘発する。Immunity.2002年6月;16(6):779-90。
IL-12/IFN-γ	・IL-12は免疫刺激の一部としてB及びT細胞によるIFN-γの発現を誘発する。
IL-13/IL-5	・IL-5/IL-13参照
IL-13/IL-25	・要約　新規IL-17ファミリーメンバーは肺におけるTh1又はTh2応答を促進する:新規サイトカインIL-25のin vivo機能。J Immunol.2002年7月1日;169(1):443-53。(アレルギー性炎症) ・要約　肥満細胞はFcε RI媒介性の活性化の際にインターロイキン-25を産生する。Blood.2003年5月1日;101(9):3594-6。Epub 2003年1月02日。(アレルギー性炎症)
IL-15/IL-13	・子宮内膜症に罹患している女性及び正常に受胎可能な女性の異所性及び正所性の子宮内膜におけるインターロイキン(IL)-13及びIL-15の示差的発現。Am J Reprod Immunol.2003年2月;49(2):75-83。
IL-15/IL-16	・皮膚T細胞リンパ腫におけるIL-15及びIL-16の過剰発現:菌状息肉腫の進行の段階依存的な増加。Exp Dermatol.2000年8月;9(4):248-51。
IL-15/IL-17	・要約　リンパ球及び好中球によって産生されるIL-17はリポ多糖誘発性の気道好中球増加症に必要である:考えられる原因としてのIL-15。J Immunol.2003年2月15日;170(4):2106-12。(気道炎症)
IL-15/IL-21	・IL-15又はIL-18と相乗作用するIL-21はヒトNK及びT細胞においてIFN-γの産生を増強させる。J Immunol.2003年6月1日;170(11):5464-9。
IL-17/IL-23	・インターロイキン-23はインターロイキン-17の産生によって特徴づけられる明白なCD4 T細胞活性化状態を促進する。J Biol Chem.2003年1月17日;278(3):1910-4。Epub 2002年11月03日
IL-17/TGF-β	・急性及び慢性の皮膚病変の間でのIL-11及びIL-17の偏向in vivo発現。J Allergy Clin Immunol.2003年4月;111(4):875-81。(アレルギー性皮膚炎)
IL-18/IL-12	・インターロイキン12及びインターロイキン18によるナチュラルキラー細胞の相乗的な増殖及び活性化。Cytokine.1999年11月;11(11):822-30。 ・要約　ネズミの慢性移植対宿主疾患におけるIL-12によるin vitro免疫グロブリンの産生の阻害:IL-18との相乗作用。Eur J Immunol.1998年6月;28(6):2017-24。

【０７８３】

IL-18/IL-21	・IL-15又はIL-18と相乗作用するIL-21はヒトNK及びT細胞においてIFN-γの産生を増強させる。J Immunol.2003年6月1日;170(11):5464-9。
IL-18/TGF-β	・コルチコステロイドで治療したグレーブス眼症に罹患している患者の血清中のインターロイキン18及びトランスフォーミング成長因子β1。Int Immunopharmacol.2003年4月;3(4):549-52。
IL-18/IFN-γ	
抗TNFα/抗CD4	・DBA/1関節炎マウスにおける相乗的な治療効果。

【０７８４】

添付表3:腫瘍学の組合せ

【表１３】

標的	疾患	対となるもの
CD89*	細胞傷害性細胞動員因子として使用	すべて
CD19	B細胞リンパ腫	HLA-DR CD5
HLA-DR	B細胞リンパ腫	CD89 CD19 CD5
CD38	多発性骨髄腫	CD138 CD56 HLA-DR
CD138	多発性骨髄腫	CD38 CD56 HLA-DR
CD138	肺癌	CD56 CEA
CD33	急性骨髄リンパ腫	CD34 HLA-DR
CD56	肺癌	CD138 CEA
CEA	膵癌	MET受容体
VEGF	膵癌	MET受容体
VEGF受容体	膵癌	MET受容体
IL-13	喘息/肺炎症	IL-4 IL-5 エオタキシン MDC TARC TNFα IL-9 EGFR CD40L IL-25 MCP-1 TGFβ
IL-4	喘息	IL-13 IL-5 エオタキシン MDC TARC TNFα IL-9 EGFR CD40L IL-25 MCP-1 TGFβ

【０７８５】

エオタキシン	喘息	IL-5 エオタキシン-2 エオタキシン-3
EGFR	癌	HER2/neu HER3 HER4
HER2	癌	HER3 HER4
TNFR1	RA/クローン病	IL-1R IL-6R IL-18R
TNFα	RA/クローン病	IL-1α/β IL-6 IL-18 ICAM-1 IL-15 IL-17
IL-1R	RA/クローン病	IL-6R IL-18R
IL-18R	RA/クローン病	IL-6R

【０７８６】
添付表4

【表１４】

データの要約

標的	dAb	平衡解離定数(Kd=Koff/Kon)	Koff	リガンドアッセイのIC50	細胞に基づいた中和アッセイのND50
TAR1	TAR1単量体	300nM～5pM (即ち3×10^{-7}～5×10^{-12})、 好ましくは50nM～20pM	5×10^{-1}～1×10^{-7}	500nM～100pM	500nM～50pM
	TAR1二量体	TAR1単量体として	TAR1単量体として	TAR1単量体として	TAR1単量体として
	TAR1三量体	TAR1単量体として	TAR1単量体として	TAR1単量体として	TAR1単量体として
	TAR1-5				
	TAR1-27				
	TAR1-5-19単量体	30nM			
	TAR1-5-19ポモ二量体			$(Gly_4Ser)_3$リンカー=20nm $(Gly_4Ser)_5$リンカー=2nm $(Gly_4Ser)_7$リンカー=10nm Fab形態=1nM	=30nM =3nM =15nM

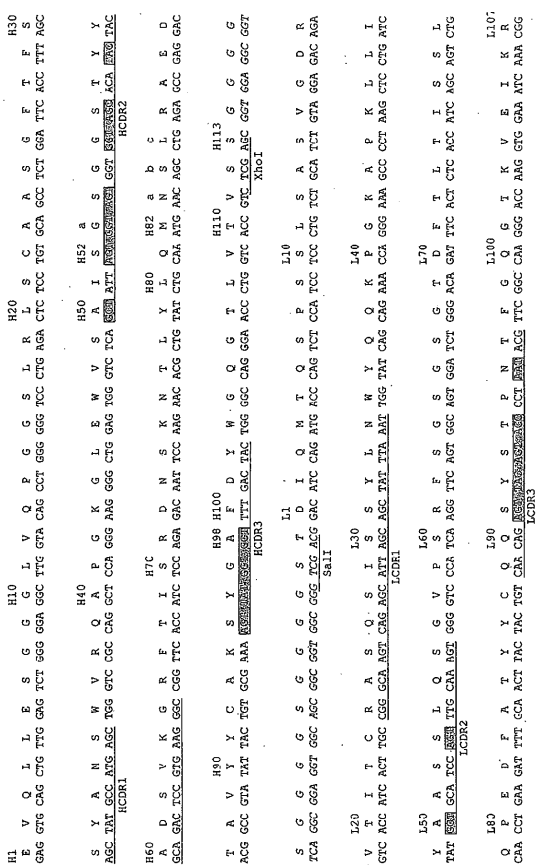
【０７８７】

	TAR1-5-19 ヘテロ二量体				=12nM =10nM
	TAR1-5ヘテロ二量体			(Gly4Ser)nリンカー TAR1-5d1=30nM TAR1-5d2=50nM TAR1-5d3=300nM TAR1-5d4=3nM TAR1-5d5=200nM TAR1-5d6=100nM Fab形態 TAR1-5CH d2CK=30nM TAR1-5CK d3CH=100nM	=60nM
	TAR1-5-19ホモ二量体			0.3nM	3～10nM(例えば3nM)
TAR2	TAR2単量体	TAR1単量体として	TAR1単量体として	500nM～100pM	500nM～50pM
	TAR2-10				
	TAR2-5				

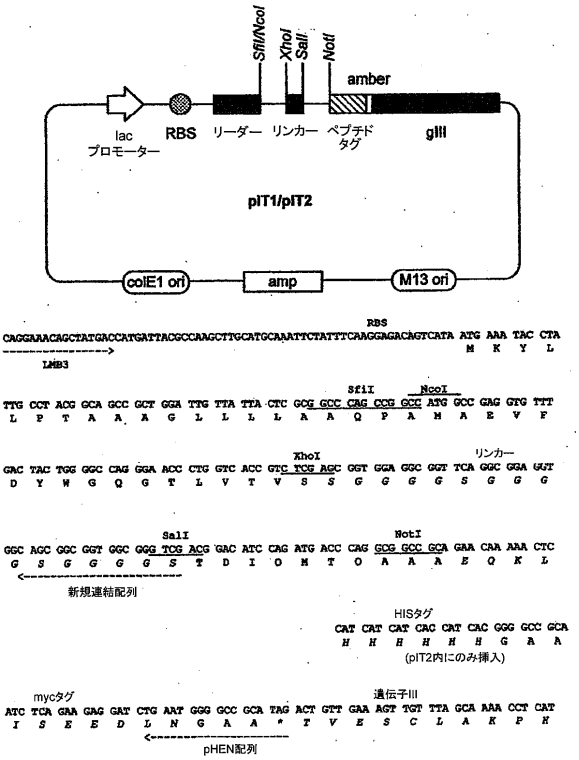
【０７８８】

血清アルブミン	抗SA単量体	1nM～500μM、 好ましくは100nM～10μM 二重特異性形態では、標的の親和性はSA dAbの親和性の1～100,000倍の親和性であり、例えば、100pM(標的)及び10μMのSA親和性である。		1nM～500μM、 好ましくは100nM～10μM 二重特異性形態では、標的の親和性はSA dAbの親和性の1～100,000倍の親和性であり、例えば、100pM(標的)及び10μMのSA親和性である。
	MSA-16	200nM		
	MSA-26	70nM		

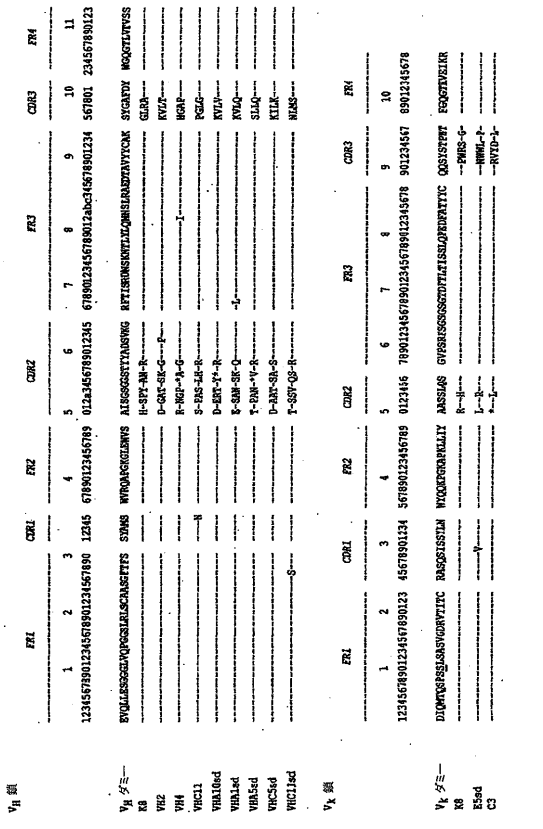
【図１】



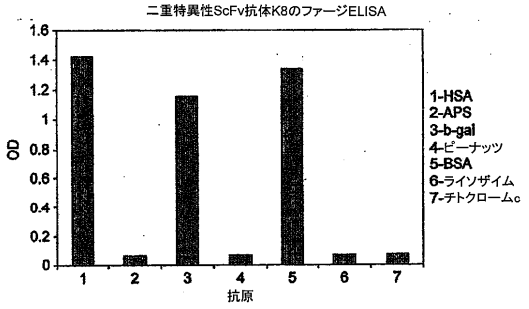
【図２】


SfiI/NcoI
XhoI
SalI
NotI
amber
lac プロモーター
RBS
リーダー
リンカー
ペプチドタグ
gIII
pIT1/pIT2
colE1 ori
amp
M13 ori
新規連結配列
HISタグ
(pIT2内にのみ挿入)
mycタグ
遺伝子III
pHEN配列

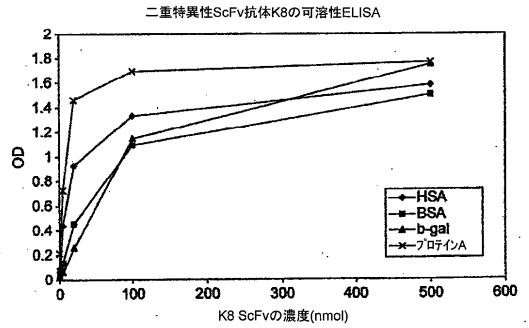
【図３】



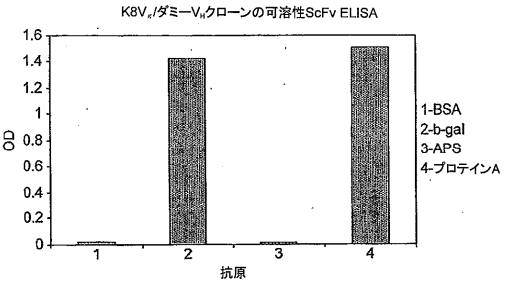
【図４】


二重特異性ScFv抗体K8のファージELISA
OD
抗原
1-HSA
2-APS
3-b-gal
4-ピーナッツ
5-BSA
6-ライソザイム
7-チトクロームc

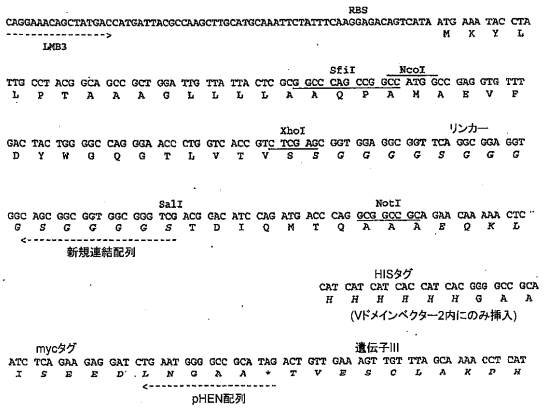
【図５】


二重特異性ScFv抗体K8の可溶性ELISA
OD
K8 ScFvの濃度(nmol)
HSA
BSA
b-gal
プロテインA

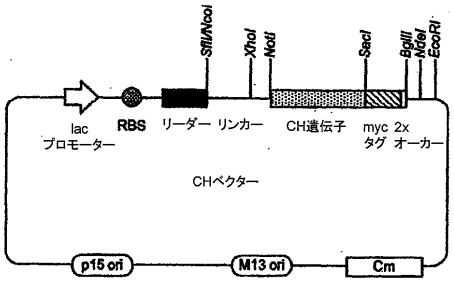
【図６】



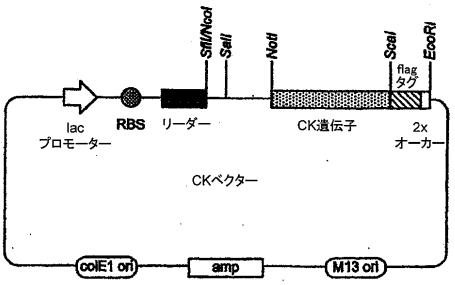
【図７】



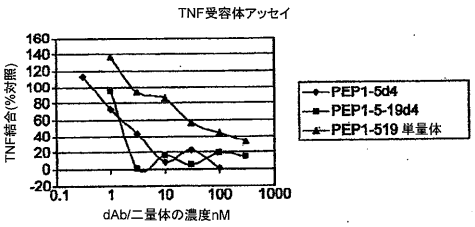
【図８】



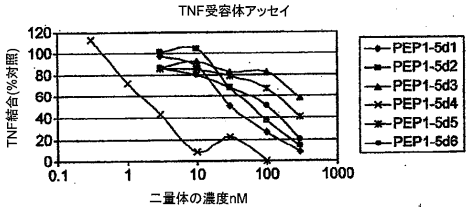
【図９】



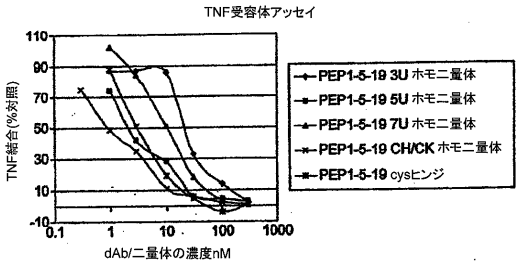
【図１０】



【図１１】



【図１２】



【図１３】

ライブラリー1のダミーVH配列

```
1   E  V  Q  L  L  K  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G
    GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG
    CTC CAC GTC GAC AAC CTC AGA CCC CCT CCG AAC CAT GTC GGA CCC CCC

49  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y
    TCC CTG CGT CTC TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
    AGG GAC GCA GAG AGG ACA CGT CGG AGG CCT AAG TGG AAA TCG TCG ATA

97  A  M  S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V
    GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGT CTA GAG TGG GTC
    CGG TAC TCG ACC CAG GCG GTC CGA GGT CCC TTC CCA GAT CTC ACC CAG

145 S  A  I  S  G  S  G  G  S  T  Y  Y  A  D  S  V
    TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG
    AGT CGA TAA TCA CCA TCA CCA CCA TCG TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC

193 K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y
    AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC CGT GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT
    TTC CCG GCC AAG TGG TAG AGG GCA CTG TTA AGG TTC TTG TGC GAC ATA

241 L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C
    CTG CAA ATG AAC AGC CTG CGT GCC GAG GAC ACC GCG GTA TAT TAC TGT
    GAC GTT TAC TTG TCG GAC GCA CGG CTC CTG TGG CGC CAT ATA ATG ACA

289 A  K  S  Y  G  A  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V
    GCG AAA AGT TAT GGT GCT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC
    CGC TTT TCA ATA CCA CGA AAA CTG ATG ACC CCG GTC CCT TGG GAC CAG

337 T  V  S  S
    ACC GTC TCG AGC
    TGG CAG AGC TCG
```

【図１４】

ライブラリー2のダミーV_H配列

```
   E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G
1  GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG
   CTC CAC GTC GAC AAC CTC AGA CCC CCT CCG AAC CAT GTC GGA CCC CCC

   S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y
49 TCC CTG CGT CTC TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
   AGG GAC GCA GAG AGG ACA CGT CGG AGG CCT AAG TGG AAA TCG TCG ATA

   A  M  S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V
97 GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGT CTA GAG TGG GTC
   CGG TAC TCG ACC CAG GCG GTC CGA GGT CCC TTC CCA GAT CTC ACC CAG

   S  A  I  S  G  S  G  G  S  T  Y  Y  A  D  S  V
145 TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG
   AGT CGA TAA TCA CCA TCA    CCA CCA TCG TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC

   K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y
193 AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC CGT GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT
   TTC CCG GCC AAG TGG TAG AGG GCA CTG TTA AGG TTC TTG TGC GAC ATA

   L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C
241 CTG CAA ATG AAC AGC CTG CGT GCC GAG GAC ACC GCG GTA TAT TAC TGT
   GAC GTT TAC TTG TCG GAC GCA CGG CTC CTG TGG CGC CAT ATA ATG ACA

   A  K  S  Y  G  A  X  X  X  X  F  D  Y  W  G  Q
289 GCG AAA AGT TAT GGT GCT NNK NNK NNK NNK TTT GAC TAC TGG GGC CAG
   CGC TTT TCA ATA CCA CGA NNK NNK NNK NNK AAA CTG ATG ACC CCG GTC

   G  T  L  V  T  V  S  S
337 GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGC
   CCT TGG GAC CAG TGG CAG AGC TCG
```

【図１５】

ライブラリー3のダミーV_L配列

```
   D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G
1  GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA
   CTG TAG GTC TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGG GAC AGA CGT AGA CAT CCT

   D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  S  I  S  S  Y
49 GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT
   CTG GCA CAG TGG TAG TGA ACG GCC CGT TCA GTC TCG TAA TCG TCG ATA

   L  N  W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I
97 TTA AAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC
   AAT TTA ACC ATG GTC GTC TTT GGT CCC TTT CGG GGA TTC GAG GAC TAG

   Y  A  A  S  S  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G
145 TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC
   ATA CGA CGT AGG TCA AAC GTT TCA CCC CAG GGT AGT GCA AAG TCA CCG

   S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P
193 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT
   TCA CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG TGG TAG TCG TCA GAC GTT GGA

   E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  S  Y  S  T  P  N
241 GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT AAT
   CTT CTA AAA CGA TGC ATG ATG ACA GTT GTC TCA ATG TCA TGG GGA TTA

   T  F  G  Q  G  T  K  V  E  I  K  R
289 ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG
   TGC AAG CCG GTT CCC TGG TTC CAC CTT TAG TTT GCC
```

【図１６】

抗MSA dAb、MSA16及びMSA26のヌクレオチド及びアミノ酸配列

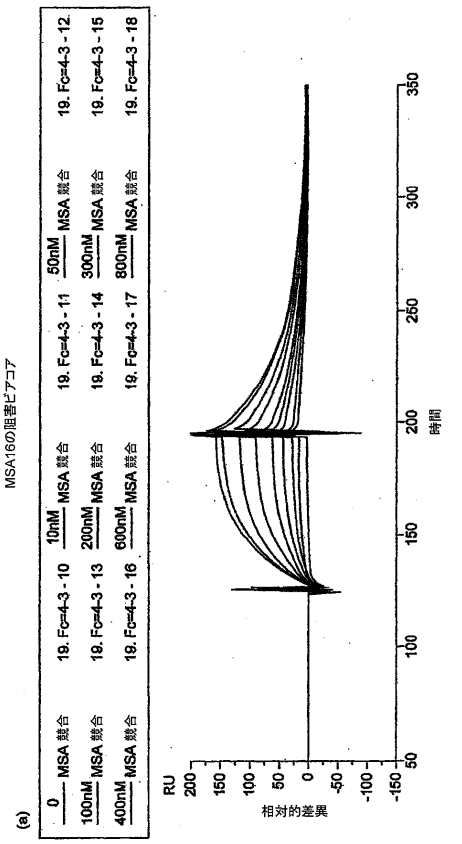
A: MSA 16

```
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S

GTA GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC
 V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   S

ATT ATT AAG CAT TTA AAG TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA
 I   I   K   H   L   K   W   Y   Q   Q   K   P   G   K

GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT GGT GCA TCC CGG TTG CAA AGT
 A   P   K   L   L   I   Y   G   A   S   R   L   Q   S

GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
 G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D

TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT
 F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A

ACG TAC TAC TGT CAA CAG GGG GCT CGG TGG CCT CAG ACG TTC
 T   Y   Y   C   Q   Q   G   A   R   W   P   Q   T   F

GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG
 G   Q   G   T   K   V   E   I   K   R
```

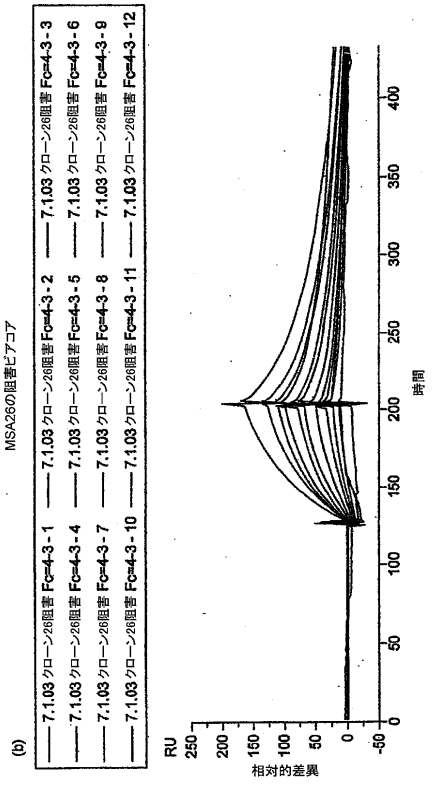
B: MSA 26

```
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S

GTA GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC
 V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   S

ATT TAT TAT CAT TTA AAG TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA
 I   Y   Y   H   L   K   W   Y   Q   Q   K   P   G   K

GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AAG GCA TCC ACG TTG CAA AGT
 A   P   K   L   L   I   Y   K   A   S   T   L   Q   S

GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
 G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D

TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT
 F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A

ACG TAC TAC TGT CAA CAG GTT CGG AAG GTG CCT CGG ACG TTC
 T   Y   Y   C   Q   Q   V   R   K   V   P   R   T   F

GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG
 G   Q   G   T   K   V   E   I   K   R
```

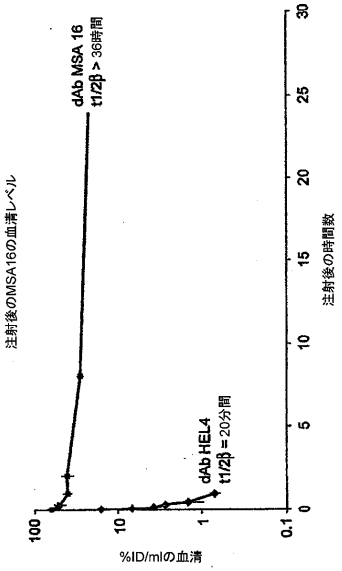
【図１７－１】



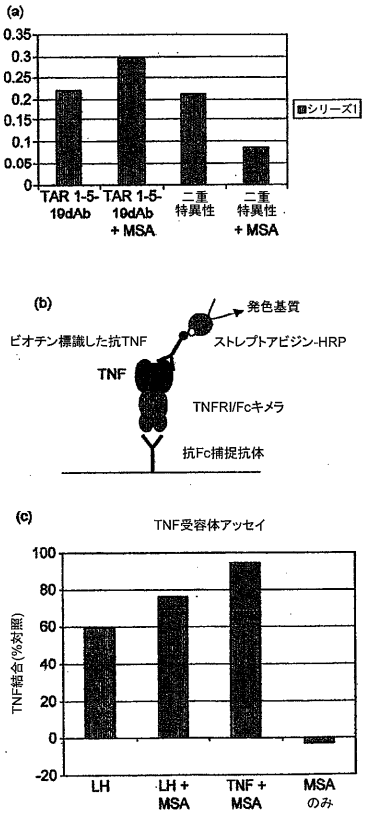
【図１７－２】



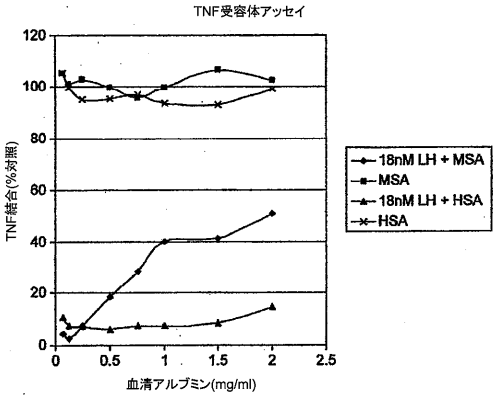
【図１８】



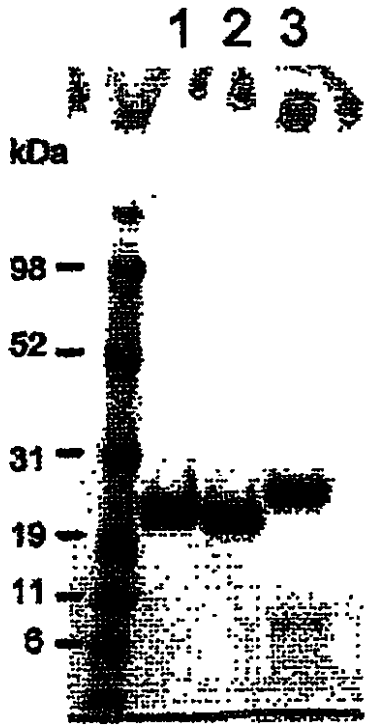
【図１９】



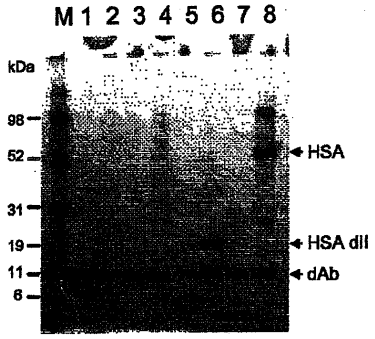
【図２０】



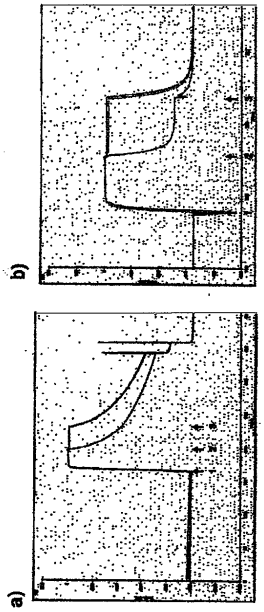
【図２１】



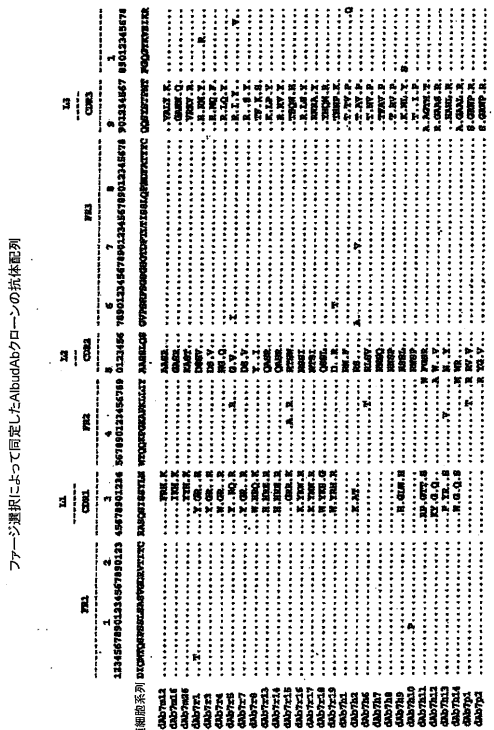
【図２２】



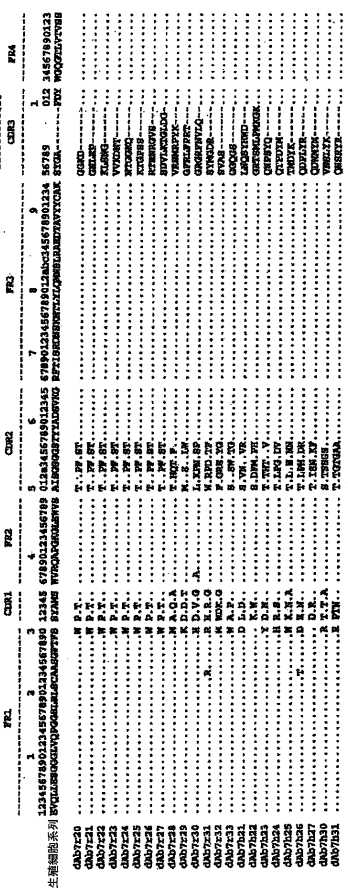
【図２３】



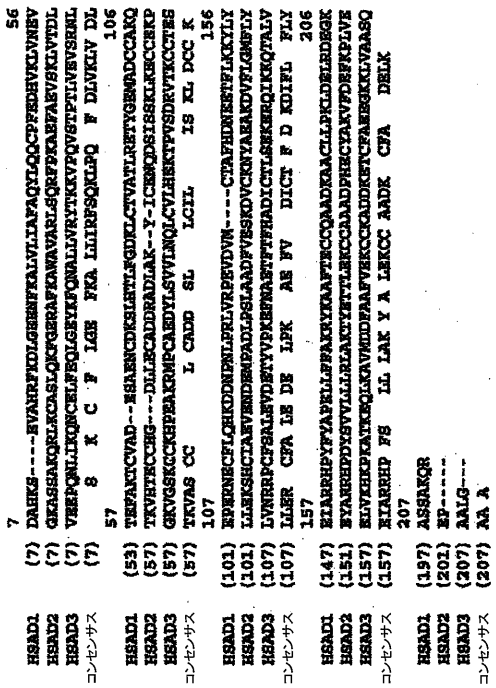
【図２４－１】



【図２４－２】



【図２５】



【配列表】

2010518062000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成21年10月8日(2009.10.8)

【手続補正１】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項１】

一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドであって、血清アルブミンと特異的に結合する抗体軽鎖単一可変ドメインを含み、ここで前記抗体軽鎖単一可変ドメインが、dAb7h14、dAb7h11、若しくはdAb7h9のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む、リガンド。

【請求項２】

一つ又は複数の単一可変ドメインを含むリガンドであって、血清アルブミンと特異的に結合する抗体単一可変ドメインを含み、ここで前記抗体単一可変ドメインが、dAb7h14、dAb7h11、若しくはdAb7h9のアミノ酸配列を含む抗体単一可変ドメインと、血清アルブミンとの結合に関して競合する、リガンド。

【請求項３】

血清アルブミンと特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインが、dAb7h14、dAb7h11、及びdAb7h9から選択される抗体単一可変ドメインからの一つ又は複数のCDRを含む、請求項１又は２に記載のリガンド。

【請求項４】

血清アルブミンと特異的に結合する前記抗体単一可変ドメインが、CTLA4、リポカリン、ブドウ球菌プロテインA(SpA)、アフィボディ、アビマー、GroEl、GroES、トランスフェリン及びフィブロネクチンからなる群から選択されるフレームワークをさらに含む、請求項３に記載のリガンド。

【請求項５】

血清アルブミンと特異的に結合する前記単一可変ドメインが、ヒト血清アルブミン及びラット血清アルブミンに結合し、かつ、前記リガンドのTβ半減期がラット宿主におけるラット血清アルブミンのTβ半減期と実質的に同じである、請求項１～４のいずれか１項に記載のリガンド。

【請求項６】

血清アルブミンと特異的に結合する前記単一可変ドメインが、ヒト血清アルブミン及びカニクイザル(Cynomolgus)血清アルブミンに結合し、かつ、前記リガンドのTβ半減期がカニクイザル宿主におけるカニクイザル(Cynomolgus)血清アルブミンのTβ半減期と実質的に同じである、請求項１～４のいずれか１項に記載のリガンド。

【請求項７】

血清アルブミンと特異的に結合する前記単一可変ドメインが、ラット、ヒト及びカニクイザル(Cynomolgus)血清アルブミンに結合する、請求項１～６のいずれか１項に記載のリガンド。

【請求項８】

血清アルブミンと特異的に結合する前記単一可変ドメインが、マウス、ヒト及びカニクイザル(Cynomolgus)血清アルブミンに結合する、請求項１～６のいずれか１項に記載のリガンド。

【請求項９】

血清アルブミンと特異的に結合する前記単一可変ドメインが、ラット、マウス、ヒト及びカニクイザル(Cynomolgus)血清アルブミンに結合する、請求項１～６のいずれか１項に記載のリガンド。

【請求項１０】

血清アルブミンと特異的に結合する抗体重鎖単一可変ドメインであって、前記抗体重鎖単一可変ドメインが、dAb7r29、dAb7r31、dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r30、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、Ab7h24、Ab7h25、Ab7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、及びそれと少なくとも80%同一のアミノ酸配列からなる群から選択される抗体重鎖単一可変ドメインのアミノ酸配列を含む、抗体重鎖単一可変ドメイン。

【請求項１１】

抗体単一可変ドメインを含むリガンドであって、前記抗体単一可変ドメインが、ヒト血清アルブミン及び非ヒト血清アルブミンと相互に10倍以内のKd値で特異的に結合する、リガンド。

【請求項１２】

dAb7h14、dAb7h11、若しくはdAb7h9のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む少なくとも一つの抗体Vκ単一可変ドメインを含む、請求項１１に記載のリガンド。

【請求項１３】

抗体単一可変ドメインを含むリガンドであって、前記抗体単一可変ドメインがヒト血清アルブミンのドメインIIと特異的に結合する、リガンド。

【請求項１４】

血清アルブミンと特異的に結合する第1の単一可変ドメイン、及び第2の単一可変ドメインを含む融合タンパク質であって、前記第1及び第2の単一可変ドメインのそれぞれが非天然単一可変ドメインであり、1)第1の単一可変ドメインが第2の単一可変ドメインのN末端と連結しているか、又は2)第1の単一可変ドメインが第2の単一可変ドメインのC末端と連結しているか、又は3)第1の単一可変ドメインが第2の単一可変ドメインのN末端及び第2の

単一可変ドメインのC末端の両方に結合しているかのいずれかである、融合タンパク質。
【請求項１５】
pH7及び細胞内区画のpHの両方でin vitroにて血清アルブミンと特異的に結合する抗体単一可変ドメインを含むリガンド。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/000453

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/003019 A (DOMANTIS) 8 January 2004 (2004-01-08) cited in the application	1,2
Y	page 114	38,39, 41,42, 45,57, 58,62
	example 12	
X	WO 2005/118642 A (DOMANTIS LTD [GB]; HOLT LUCY J [GB]; TOMLINSON IAN M [GB]) 15 December 2005 (2005-12-15)	1,2, 20-45
Y	figure 7	38,39, 41,42, 45,57, 58,62
	-/—	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 September 2008	31/10/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Wagner, René

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/000453

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/059110 A (DOMANTIS LTD [GB]; TOMLINSON IAN M [GB]) 8 June 2006 (2006-06-08)	1,2, 20-49, 53,54, 56,59,61
Y	figure 7; sequence 24	38,39, 41,42, 45,57, 58,62
E	WO 2008/052933 A (DOMANTIS LTD [GB]; DE WILDT RUDOLF M T [GB]; JAMES LEO C [GB]; JONES P) 8 May 2008 (2008-05-08) figure 7d	1,2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2008/000453

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1 (in part), 2, 20-62

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2008/000453

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1 in part, claim 2

Invention 1:
antibody single variable domains specifically binding serum albumin, in particular the light chain domains dAb7m12, dAb7m16, dAb7m26

---

2. claim: 1 in part

Invention 2
antibody single variable domain dAb7r14

---

3. claim: 1 in part

Invention 3:
antibody single variable domain dAb7h11

---

4. claim: 1 in part

Inventions 4-59
corresponding to antibody single domains of claim 1 from respectively dAb2 to dAb7p.

---

5. claims: 3-8, in part 11,13-15

Invention 60:
single domains and constructs of claims 3-8, 16-19 and the subject-matter of claims 11,13,14,15 as far as pertaining to the first domain "dAb8"

---

6. claims: 11,13-15 all in part

Invention 61:
subject-matter of claims 11,13-15 as far as pertaining to domain "dAb10"

---

7. claims: 11,13-15 in part

Invention 62 to 85:
subject-matter of claims 11,13-15 as far as pertaining to respectively domains "dAb36" to "dAb7h31" as listed in claim 11.

---

8. claims: 20-45

International Application No. PCT/GB2008/000453

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Invention 86
Single domains specifically binding to human and non-human serum albumin with Kd values within 10fold of each other.

---

9. claims: 46-62

Invention 87:
single domains which specifically bind to Domain II of serum albumin

---

10. claims: 63-79

Invention 88
fusion proteins comprising a first single variable domain which specifically binds to serum albumin and which is linked to a second variable domain in a certain order and/or by a certain junction or linker

---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/000453

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004003019 A	08-01-2004	AT 328906 T	15-06-2006
		CA 2492092 A1	08-01-2004
		CN 1678634 A	05-10-2005
		DE 60305919 T2	18-01-2007
		DK 1517921 T3	09-10-2006
		EP 1517921 A2	30-03-2005
		ES 2263984 T3	16-12-2006
		JP 2006512895 T	20-04-2006
		PT 1517921 T	29-09-2006
WO 2005118642 A	15-12-2005	AU 2005250216 A1	15-12-2005
		BR PI0511755 A	02-01-2008
		CA 2569240 A1	15-12-2005
		EP 1784427 A2	16-05-2007
		JP 2008500830 T	17-01-2008
		KR 20070039911 A	13-04-2007
WO 2006059110 A	08-06-2006	AU 2005311103 A1	08-06-2006
		CA 2589802 A1	08-06-2006
		KR 20070099584 A	09-10-2007
WO 2008052933 A	08-05-2008	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 トムリンソン，イアン，エム．
イギリス国 シービー４ ０ダブリュジー ケンブリッジ，ケンブリッジ サイエンス パーク ３１５，ドマンティス リミテッド
(72)発明者 ジェスパース，ローレント，エス．
イギリス国 シービー４ ０ダブリュジー ケンブリッジ，ケンブリッジ サイエンス パーク ３１５，ドマンティス リミテッド
(72)発明者 クルーベ，ジャスパー
イギリス国 シービー４ ０ダブリュジー ケンブリッジ，ケンブリッジ サイエンス パーク ３１５，ドマンティス リミテッド
(72)発明者 ホルト，ルーシー，ジェイ．
イギリス国 シービー４ ０ダブリュジー ケンブリッジ，ケンブリッジ サイエンス パーク ３１５，ドマンティス リミテッド
(72)発明者 ション，オリバー
イギリス国 シービー４ ０ダブリュジー ケンブリッジ，ケンブリッジ サイエンス パーク ３１５，ドマンティス リミテッド

Ｆターム(参考) 4H045 AA10 BA10 BA41 CA40 DA75 EA20 FA74