

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7520002号
(P7520002)

(45)発行日 令和6年7月22日(2024.7.22)

(24)登録日 令和6年7月11日(2024.7.11)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63
		Z N A	
		Z	
		Z	
		請求項の数 22 (全33頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2021-525805(P2021-525805)	(73)特許権者	517142462
(86)(22)出願日	令和1年11月13日(2019.11.13)		クレシェンド・バイオリジックス・リミテッド
(65)公表番号	特表2022-507307(P2022-507307 A)		イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2・3 A T・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・リサーチ・キャンパス・メディトリーナ・ビルディング
(43)公表日	令和4年1月18日(2022.1.18)	(74)代理人	100108453
(86)国際出願番号	PCT/GB2019/053220		弁理士 村山 靖彦
(87)国際公開番号	WO2020/099871	(74)代理人	100110364
(87)国際公開日	令和2年5月22日(2020.5.22)		弁理士 実広 信哉
審査請求日	令和4年8月24日(2022.8.24)	(74)代理人	100133400
(31)優先権主張番号	1818460.6		弁理士 阿部 達彦
(32)優先日	平成30年11月13日(2018.11.13)	(72)発明者	ブライアン・エドワーズ
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)		イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ヒト血清アルブミンに結合する単一ドメイン抗体

(57)【特許請求の範囲】

- 【請求項1】
- a)配列番号2を含むCDR1
- b)配列番号3を含むCDR2、及び
- c)配列番号4を含むCDR3を含む、
- ヒト血清アルブミン(HSA)に結合する免疫グロブリンヒト単一可変重鎖ドメイン。
- 【請求項2】
- 配列番号1を含む、請求項1に記載の免疫グロブリンヒト単一可変重鎖ドメイン。
- 【請求項3】
- 請求項1又は2に記載の免疫グロブリンヒト単一可変重鎖ドメイン及び異なる標的に結合する少なくとも1つの第2の部分を含むタンパク質又は構築物。
- 【請求項4】
- 治療部分を含む、請求項3に記載のタンパク質又は構築物。
- 【請求項5】
- 前記治療部分が抗体又はその断片である、請求項4に記載のタンパク質又は構築物。
- 【請求項6】
- 前記断片が、scFv、Fv、重鎖、又は単一ドメイン抗体である、請求項5に記載のタンパク質又は構築物。
- 【請求項7】
- 前記単一ドメイン抗体が、単一可変重鎖ドメイン抗体である、請求項6に記載のタンパ

ク質又は構築物。

【請求項 8】

前記免疫グロブリンヒト単一可変重鎖ドメインが、ペプチドリinkerによって治療部分に連結している、請求項3から7のいずれか一項に記載のタンパク質又は構築物。

【請求項 9】

前記ペプチドリinkerが(G4S)_nであり、nが1から15である、請求項8に記載のタンパク質又は構築物。

【請求項 10】

前記免疫グロブリンヒト単一可変重鎖ドメインが前記タンパク質のN又はC末端に位置している、請求項3から9のいずれか一項に記載のタンパク質又は構築物。

10

【請求項 11】

前記免疫グロブリンヒト単一可変重鎖ドメインが前記タンパク質のC末端に位置しており、1から50個のアミノ酸のC末端伸長を含む、請求項10に記載のタンパク質又は構築物。

【請求項 12】

タンパク質を請求項1又は2に記載の免疫グロブリンヒト単一可変重鎖ドメインに結合することを含む、タンパク質の半減期を延長する方法。

【請求項 13】

治療部分の半減期の延長における請求項1又は2に記載の免疫グロブリンヒト単一可変重鎖ドメインの使用であって、前記免疫グロブリンヒト単一可変重鎖ドメインが融合タンパク質において治療部分に連結している、使用。

20

【請求項 14】

請求項1若しくは2に記載の免疫グロブリンヒト単一可変重鎖ドメイン又は請求項3から11のいずれか一項に記載のタンパク質若しくは構築物を含む、医薬組成物。

【請求項 15】

請求項1又は2に記載の免疫グロブリンヒト単一可変重鎖ドメインをコードする核酸。

【請求項 16】

配列番号16を含む請求項15に記載の核酸。

【請求項 17】

リンカーによって第2の核酸に連結している、請求項15又は16に記載の核酸。

30

【請求項 18】

前記第2の核酸が治療部分をコードしている、請求項17に記載の核酸。

【請求項 19】

前記リンカーが核酸リンカーである、請求項17又は18に記載の核酸。

【請求項 20】

請求項15から19のいずれか一項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 21】

請求項15から19のいずれか一項に記載の核酸又は請求項20に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 22】

40

請求項1又は2に記載の免疫グロブリンヒト単一可変重鎖ドメイン又は請求項3から11のいずれか一項に記載のタンパク質若しくは構築物又は請求項14に記載の医薬組成物を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト血清アルブミンに結合する免疫グロブリン単一可変ドメイン、特に、ヒト免疫グロブリン単一可変重鎖ドメインに関する。

【背景技術】

【0002】

50

タンパク質及びペプチドの薬物動態は、吸収、生体内分布、代謝、及び排出のパラメータによって制御されている。タンパク質及びペプチドの最も一般的な排出経路には、より大きなタンパク質では肝細胞によるエンドサイトーシス及び膜輸送を介した排出、より小さなタンパク質及びペプチドでは腎臓による糸球体濾過が含まれる。

【0003】

治療及び/又は診断目的に有用であり得る活性を備えた多くの薬物は、投与されると速やかに体から排除されるため、その価値は限定されてしまう。例えば、治療上有用な活性を有する多くのポリペプチドは、腎臓を介して循環から速やかに排出されてしまう。

【0004】

したがって、所望の治療効果を達成するために、大用量を投与しなければならない。薬物動態特性が改善された、改善治療薬及び診断薬が必要とされている。

【0005】

そのため、より小さなタンパク質及びペプチドの薬物動態を改善するために、タンパク質及びペプチドのサイズ及び流体力学的半径を大きくすること、標的タンパク質及びペプチドの負電荷を増やすこと、又はアルブミンへの結合によってペプチド及びタンパク質の血清タンパク質結合のレベルを高めることを含む、様々な戦略が採用されてきた。これは、慢性状態において重要となる可能性がある。内在性アルブミンを標的とする半減期延長部分によって、長時間曝露が達成される。これには、生物学的に活性のあるタンパク質又はペプチドのヒト血清アルブミン(HSA)への融合、ヒト免疫グロブリン(Ig)Gの定常断片(Fc)ドメインへの融合、又はXTEN等の非構造化ポリペプチドへの融合が含まれる(Stroh 「Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Bio

20
better BioDrugs」 2015; 29(4): 215~239に概説されている)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【文献】国際公開第2016/062990号パンフレット

【文献】国際公開第2003/000737号パンフレット

【文献】国際公開第2004/076618号パンフレット

【非特許文献】

【0007】

【文献】Stroh 「Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters BioDrugs」 2015; 29(4): 215~239

【文献】Green及びSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第4編、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012)

【文献】Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic, Zhiqiang An (編集), Wiley, (2009)

【文献】Antibody Engineering,第2編、第1巻及び第2巻、Ontermann及びDubel編、Springer-Verlag, Heidelberg (2010)

【文献】Kabatら、(1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382~391

【文献】Kabatら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5編、U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版番号91-3242

【文献】Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196:901~917(1987)

【文献】Lefrancら、Dev. Comp. Immunol., 29, 185~203(2005)

【文献】Wardら、1989, Nature 341: 544~546

【文献】Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, Academic Press;第1版(1996年10月28日) Brian K. Kay, Jill Winter, John McCafferty

【文献】Bruschi, C.V.及びGjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, Encyclopedia of Life Sciences, 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group

【文献】Renら、Genomics, 84, 686, 2004

【文献】Zouら、J. Immunol., 170, 1354, 2003

10

20

30

40

50

【文献】Antibody Engineering, Benny Lo編、第8章、161～176頁、2004

【文献】Viuff D, Antunes F, Evans L, Cameron J, Dyrnesli H, Thue Ravn B, Stougaard M, Thiam K, Andersen B, Kjarulff S, Howard KA. 2016. 「Generation of a double transgenic humanized neonatal Fc receptor (FcRn)/albumin mouse to study the pharmacokinetics of albumin-linked drugs.」 J Control Release

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

異なる適用は異なる半減期を必要とするので、オーダーメイドの半減期延長分子を提供することが依然として必要とされている。本発明は、この必要性に取り組むことを目指している。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、HSAに結合する免疫グロブリン単一可変ドメイン、特に、ヒト免疫グロブリン単一可変重鎖ドメイン、例えば、特に、再配置されていないヒトV、D、J遺伝子セグメントを発現しているトランスジェニックマウスから得られたか、又は得ることができるヒト免疫グロブリン単一可変重鎖ドメインに関する。

【0010】

一態様では、本発明は、配列番号1又はそれと少なくとも75%、80%、90%、若しくは95%の配列同一性/相同性を有する配列を含むか、又はそれからなる、HSAに結合する免疫グロブリン単一可変ドメインに関する。本発明はまた、配列番号1のバリエーションであり、アミノ酸置換、例えば、配列番号1と比較して1から20個のアミノ酸置換を有する、HSAに結合する免疫グロブリン単一可変ドメインに関する。本発明は、配列番号19若しくは20、又はそれらと少なくとも75%、80%、90%、若しくは95%の配列同一性/相同性を有する配列を含むか、又はそれからなる、HSAに結合する免疫グロブリン単一可変ドメインに関する。

20

【0011】

別の態様では、本発明はまた、タンパク質を本明細書で記載したような免疫グロブリン単一可変ドメインに結合することを含む、タンパク質の半減期を延長する方法に関する。

【0012】

本発明はまた、本明細書で記載した前記免疫グロブリン単一可変ドメインが融合タンパク質中の前記治療部分に連結されると治療部分の半減期が延長する、本明細書で記載したような免疫グロブリン単一可変ドメインの使用に関する。

30

【0013】

本発明は、別の標的に結合する別の部分と、例えば、ペプチドリinkerで連結した、配列番号1又はそれと少なくとも75%、80%、90%、若しくは95%の配列同一性/相同性を有する配列を含むか、又はそれからなる、HSAに結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを含む融合タンパク質に関する。

【0014】

別の態様では、本発明は、本明細書で記載したような免疫グロブリン単一可変ドメイン、又は本明細書で記載したようなタンパク質若しくは構築物を含む医薬組成物に関する。

40

【0015】

本発明はまた、本明細書で記載したようなアミノ酸配列をコードする核酸配列に関する。

【0016】

本発明は更に、本明細書で記載したような核酸配列を含むベクターに関する。

【0017】

本発明はまた、本明細書で記載したような核酸配列、又は本明細書で記載したようなベクターを含む宿主細胞に関する。

【0018】

本発明はまた、本明細書で記載したような免疫グロブリン単一可変ドメイン、又は本明

50

細書で記載したようなタンパク質若しくは構築物、又は本明細書で記載したような医薬組成物を含むキットに関する。

【発明を実施するための形態】

【0019】

ここでは、本発明の実施形態を更に説明する。以下の部分では、様々な実施形態を説明する。このように設定された各態様は、異議が明示されていない限り、その他のいかなる態様又は態様類と組み合わせてもよい。

【0020】

一般的に、本明細書で記載した細胞や組織の培養、病理学、腫瘍学、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、及びタンパク質や核酸の化学、及びハイブリダイゼーションに関連して使用される名称及びそれらの技術は、当技術分野でよく知られており、通常使用されている。本開示の方法及び技術は一般的に、当技術分野でよく知られている従来の方法に従って、並びに、他に指示されていない限り、本明細書全体で引用され、議論されている様々な一般的な、及びより具体的な文献に記載されている通りに、実行される。例えば、Green及びSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第4編、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012); Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic, Zhiqiang An (編集), Wiley, (2009);並びにAntibody Engineering,第2編、第1巻及び第2巻、Ontermann及びDubel編、Springer-Verlag, Heidelberg (2010)を参照。

【0021】

酵素反応及び精製技術は、製造元の仕様書に従って、当技術分野で通常遂行されているように、又は本明細書で記載したように実行する。本明細書で記載されている分析化学、有機合成化学、及び医薬化学に関連して使用されている名称、並びにそれらの実験的手法及び技術は、当技術分野でよく知られており、通常使用されているものである。標準的技術は、化学合成、化学分析、医薬品調製、製剤化、及び送達、及び患者の治療に使用されている。

【0022】

本発明は、ヒト血清アルブミン(HSA)に結合するアミノ酸配列及びこのようなアミノ酸配列を含むタンパク質等の結合分子に関する。特に、本発明は、本明細書で記載したようなアミノ酸を有し、本明細書で記載したような治療方法及び使用、並びに医薬製剤に利用することができる、単ドメイン抗体、免疫グロブリン単一可変ドメイン、特にヒト免疫グロブリン単一可変重鎖ドメイン(V_H)抗体に関する。

【0023】

本明細書で記載した単ドメイン抗体は、野生型ヒト血清アルブミン(UniProtアクセッション番号Q56G89)に特異的に結合する。野生型ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列を以下に示す(配列番号5)。

MKWVTFISLL FLFSSAYSRG VFRRDAHKSE VAHRFKDLGE ENFKALVLIA FAQYLQQ
CPF EDHVKLVEV TEFAKTCVAD ESAENCDKSL HTLFGDKLCT VATLRETYGE MAD
CCAKQEP ERNECFLQHK DDNPNLPLRV RPEVDVMCTA FHDNEETFLK KYLYEIARRH
PYFYAPELLF FAKRYKAAFT ECCQAADKAA CLLPKLDEL R DEGKASSAKQ GLKCA
SL QKF GERAFAKAWAV ARLSQRFPKA EFAEVSKLVT DLTQVHTECC HGDLL
ECADD RAD LAKYICE NQDSISSKLK ECCEKPLLEK SHCIAEVEND EMPADLP
SLA ADFVGSKDVC KNYAEAKDVF LGMFLYEYAR RHPDYSVLL LRLAKTYETT
LEKCCAAADP HECYAK VFDE FKPLVEEPQN LIQNCSELF QLGEYKFQNA
LLVRYTKKVP QVSTPTLVEV SRN LGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDCLSVF
LNQLCVLHEK TPVSDRVTKC CTESLVNGRP CFSALEVDET YVPKEFNAET
FTFHADICTL SEKERQIKKQ TALVELVKHK PKATKEQL KA VMDDFAAFVE
KCKKADDKET CFAEEGKKLV AASQAALGL

【0024】

ヒト血清アルブミン(HSA、2BXN)は、血漿タンパク質の約60%を占めている。HSAは、3つの相同ドメイン(I、II、及びIII)を組み入れた長さ585アミノ酸の単一鎖から構成さ

れている。ドメインIは残基5～197から構成され、ドメインIIは残基198～382を含み、ドメインIIIは残基383～569から形成されている。各ドメインは、A及びBと呼ばれる2つのサブドメインから構成されている(IA;残基5～107、IIA;残基108～197、IIA;残基198～296、IIB;残基297～382、IIIA;残基383～494、IIIB;残基495～569)。

【0025】

目的の抗原、例えばヒト血清アルブミンに「結合する」又は「結合することができる」本発明の単ドメイン抗体(sdAb)、免疫グロブリン単一可変ドメイン、又はタンパク質は、十分な親和性で抗原に結合するものであり、したがって、本明細書で記載したような単ドメイン抗体は抗原ヒト血清アルブミンを発現している細胞又は組織を標的とした治療薬として有用である。

【0026】

本明細書で記載した単ドメイン抗体、免疫グロブリン単一可変ドメイン、又はタンパク質は、ヒト血清アルブミンに特異的に結合する。言い換えると、ヒト血清アルブミン抗原への結合は、非特異的な相互作用とは測定可能なほど異なっている。実施例で示したように、本発明の単ドメイン抗体は、マウスヒト血清アルブミンとは交差反応しない。好ましくは、本発明の単ドメイン抗体は、ヒト血清アルブミンに結合し、実施例に示したようにサル血清アルブミンにも結合する。

【0027】

本明細書で使用したように「抗体」という用語は、2本の重鎖(H)及び2本の軽鎖(L)の4本のポリペプチド鎖からなる免疫グロブリン(Ig)分子、又はその抗原結合部分、或いはIg分子の本質的なエピトープ結合特性を保持しているその任意の機能的断片、変異体、バリエーション、又は派生物を広く意味している。

【0028】

完全長抗体では、各重鎖は、重鎖可変領域又はドメイン(本明細書ではHCVRと略す)及び重鎖定常領域から構成されている。重鎖定常領域は、3つのドメイン C_{H1} 、 C_{H2} 、及び C_{H3} から構成されている。各軽鎖は、軽鎖可変領域又はドメイン(本明細書ではLCVRと略す)及び軽鎖定常領域から構成されている。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、 C_L で構成されている。

【0029】

重鎖及び軽鎖の可変領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれるより保存された領域が介在した、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域に更に分けることができる。各重鎖及び軽鎖の可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端まで、以下の順番:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配置された3つのCDR及び4つのFRから構成されている。

【0030】

免疫グロブリン分子は、いかなる型(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY)、クラス(例:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2)又はサブクラスであってもよい。「CDR」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域を意味する。重鎖及び軽鎖の可変領域それぞれに3つのCDRがあり、可変領域のそれぞれについてはCDR1、CDR2、及びCDR3と呼ばれている。「CDRセット」という用語は、抗原に結合することができる単一可変領域で生じる3つのCDRの群を意味する。これらのCDRの正確な境界は、当技術分野で知られている様々なシステムに従って様々な定義することができる。

【0031】

Kabatの相補性判定領域(CDR)は、配列の可変性に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabatら、(1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382～391及びKabatら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5編、U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版番号91-3242)。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置について言及している(Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196:901～917(1987))。可変ドメインの残基について言及する場合には、一般的にKabatナンバリングシステムが使用されている(大体、軽鎖の残基1～107、及び重鎖の残基1～113)。別のシス

10

20

30

40

50

テムは、ImMunoGeneTics(IMGt)のナンバリング形式である。IMGtナンバリング形式は、Lefrancら、Dev. Comp. Immunol., 29, 185~203(2005)に記載されている。

【0032】

本明細書ではKabatによって記載されたシステムを使用する。本明細書では「Kabatナンバリング」、「Kabat定義」及び「Kabat標識」という用語は同義に使用されている。これらの用語は、当技術分野で承認されており、抗体の重及び軽鎖可変領域におけるその他のアミノ酸残基よりも可変性の高い(すなわち、超可変性の)アミノ酸残基又は抗原結合部分をナンバリングするシステムを意味している。

【0033】

「抗原結合部位」という用語は、抗原に特異的に結合する領域を含む抗体の一部又は抗体断片を意味する。抗原結合部位は、1つ又は複数の抗体可変ドメインによって形成されていてもよい。抗原結合部位は典型的に、抗体又は抗体断片の関連する V_H 及び V_L 内に含まれている。

10

【0034】

抗体断片は抗体の一部、例えば、 $F(ab')_2$ 、Fab、Fv、scFv、重鎖、軽鎖、可変重鎖(V_H)、可変軽鎖(V_L)ドメイン等である。完全長抗体の機能的断片は、完全な抗体の標的特異性を保持している。したがって、Fab(断片、抗体)、scFv(一本鎖可変鎖断片)及び単ドメイン抗体(dAb)等の組換え機能抗体断片は、mAbをベースにした治療薬の代わりとなる治療薬を開発するために使用されてきた。

【0035】

20

scFv断片(約25kDa)は、2つの可変ドメイン、 V_H 及び V_L から構成されている。本来、 V_H 及び V_L ドメインは、疎水性相互作用を介して非共有的に関連づけられ、解離する傾向がある。しかし、安定した断片は、単鎖Fv(scFv)を生成するために、親水性可撓性リンカーでドメインを連結することによって操作することができる。

【0036】

最小抗原結合断片は単一変数断片、すなわち、可変重鎖(V_H)又は可変軽鎖(V_L)ドメインである。 V_H 及び V_L ドメインはそれぞれ、抗原に結合することができる。軽鎖/重鎖パートナーそれぞれへの結合、又は完全な抗体のその他の部分の実際の存在は、標的結合のために必要ではない。1つの単ドメイン(V_H 又は V_L ドメインに対応する)のサイズに低減された抗体の抗原結合実体は一般的に、「単ドメイン抗体」又は「免疫グロブリン単一可変ドメイン」と呼ばれる。したがって、単ドメイン抗体(約12~15kDa)は、 V_H 又は V_L ドメインのいずれを有し、すなわち、完全な抗体のその他の部分を有していない。元々軽鎖がないラクダ科の重鎖のみ抗体から得られた単ドメイン抗体並びにヒト重鎖ドメインを有する単ドメイン抗体について記載されたことがある。抗原結合単一 V_H ドメインはまた、例えば、免疫したマウスの脾臓由来のゲノムDNAから増幅されたマウス V_H 遺伝子のライブラリーから特定され、大腸菌(E.coli)中で発現させたことがある(Wardら、1989, Nature 341: 544~546)。Wardらは、単離された単一 V_H ドメインを「ドメイン抗体」として「dAb」と名付けた。「dAb」という用語は一般的に、抗原に特異的に結合する単一免疫グロブリン可変ドメイン(V_H 、 V_{HH} 、又は V_L)ポリペプチドを意味する。治療における使用では、ヒト単ドメイン抗体がラクダ科由来の V_{HH} よりも好ましいのは、主に患者に投与したとき免疫応答を誘発する可能性があまりないからである。

30

40

【0037】

「[単ドメイン抗体(sdAb)、単一可変ドメイン、単一可変ドメイン抗体、又は免疫グロブリン単一可変ドメイン(ISV)]」という用語は全て、当技術分野ではよく知られており、標的抗原に結合する抗体の単一可変断片について述べている。これらの用語は、本明細書では同義に使用されている。「単一重鎖ドメイン抗体、単一可変重鎖ドメイン、単一可変重鎖ドメイン、免疫グロブリン単一重鎖可変ドメイン(ISV)、免疫グロブリン単一重鎖可変ドメイン、ヒト V_H 単ドメイン」は、本明細書において同義に使用されており、軽鎖又はその他の抗体断片がなくても抗原への結合特異性を保持していて、単離された形態で使用される完全な抗体の単一重鎖可変断片について述べており、すなわち完全長抗体の一部で

50

はない。単一可変重鎖ドメイン抗体は、完全長抗体のいかなるその他の鎖もドメインも含まず、いかなる軽鎖も定常ドメインも有さない。したがって、軽鎖が存在しなくても抗原に結合することができる。

【0038】

一態様では、本発明は、ヒト血清アルブミンに結合する免疫グロブリン単一可変ドメイン、詳細には免疫グロブリン単一重鎖可変ドメインに関する。以下に説明したように、実施形態はHSA抗原に結合する単一可変重鎖ドメイン抗体/免疫グロブリン単一可変重鎖ドメインに関する。そのため、単一可変重鎖ドメイン抗体は、軽鎖がなくても、HSAに結合することができる。ヒト単一可変重鎖ドメイン抗体(「V_H単一ドメイン抗体/単一V_Hドメイン抗体」)が特に好ましい。このような結合分子はまた、本明細書ではHumabody(登録商標)と称される。Humabody(登録商標)は、Crescendo Biologics社の登録商標である。

10

【0039】

したがって、一部の実施形態では、単離された結合剤/分子は、少なくとも1つの単一ドメイン抗体を含むか、又はそれらからなり、前記ドメインがヒト免疫グロブリン可変重鎖ドメインであり、それらはV_Lドメインやその他の抗体断片がなく、標的抗原に結合する。

【0040】

「単離した」という用語は、その天然の環境から単離された部分を意味する。例えば、「単離した」という用語は、その他の単一ドメイン抗体、抗体類、又は抗体断片を実質的に含まない単一ドメイン抗体を意味する。更に、単離された単一ドメイン抗体は、その他の細胞物質及び/又は化学物質を実質的に含んでいなくてもよい。

20

【0041】

各V_Hドメイン抗体は、アミノ末端からカルボキシ末端まで、以下の順番:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4で配置された3個のCDR及び4個のFRを含む。したがって、本発明の一実施形態では、ドメインは、以下の式FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4のヒト可変重鎖(V_H)ドメインである。

【0042】

本発明の単一ドメイン抗体に対して、C又はN末端のV_Hフレームワーク配列に修飾を加えて、その特性を改善してもよい。例えば、V_Hドメインは、C又はN末端伸長を含んでもよい。C末端伸長は、残基VTVSSで終わるV_Hドメイン(配列番号6)のC末端に付加することができる。

30

【0043】

一実施形態では、本発明の単一ドメイン抗体は、1から50残基、例えば、1から10残基のC末端伸長、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9若しくは10、1~20、1~30又は1~40個の付加アミノ酸を含んでいる。一実施形態では、本発明の単一ドメイン抗体は、ヒトC_H1ドメインの付加アミノ酸を含んでおり、したがってC末端がC_H1ドメインに伸長している。

【0044】

付加されたC又はN-末端残基は、例えば、本発明の単一ドメイン抗体を別の部分にコンジュゲートするために使用されるペプチドリンカー、又は分子の検出を補助するタグであってもよい。このようなタグは、当技術分野ではよく知られており、例えば、リンカーHisタグ、例えば、ヘキサ-His(HHHHHH、配列番号7)又はmycタグが含まれる。

40

【0045】

本明細書で使用したように、「相同性」又は「同一性」という用語は一般的に、配列を整列させた後、一部の実施形態では、最大パーセント相同性を達成するために必要に応じてギャップを導入した後に、配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮しないで、比較する参照ポリペプチドの残基と同一である配列内のアミノ酸残基のパーセンテージを意味している。したがって、2つのアミノ酸配列の間のパーセント相同性は、2つの配列の間のパーセント同一性と同等である。N若しくはC末端伸長、タグ、又は挿入はいずれも、同一性又は相同性を減少させるものとして解釈されるべきではない。アラインメントの方法及びコンピュータプログラムはよく知られている。2つのアミノ酸配列の間のパーセ

50

ント同一性は、よく知られた数学的アルゴリズムを使って決定することができる。

【0046】

本明細書に記載したような単ドメイン抗体の可変ドメインは、完全なヒト又は実質的に完全なヒトである。本明細書で使用したようなV_Hドメイン抗体という用語は、単一ヒト可変重鎖ドメイン抗体を示している(ラクダ科重鎖ドメインを示すV_{HH}に対して)。本明細書で使用したように、ヒトV_Hドメインは、完全なヒト又は実質的に完全なヒトV_Hドメインを含む。本明細書で使用したように、ヒトV_Hドメインという用語はまた、例えば国際公開第2016/062990号パンフレット及び以下の実施例に記載されているように、特に目的の抗原(すなわちHSA)による免疫に応答して、完全なヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座を発現するトランスジェニックマウスによって形成された重鎖のみ抗体から単離されたV_Hドメインを含む。一実施形態では、ヒトV_Hドメインはまた、ヒトV_Hドメインアミノ酸から得られた、若しくはそれに基づいた、又はヒトV_H核酸配列から生成された、V_Hドメインを含むことができる。したがって、ヒトV_Hドメインという用語は、ヒト免疫グロブリン配列から得られた、又はそれによってコードされた、及び、例えば、完全なヒトの再配置されていないV、D、J遺伝子セグメントを発現するトランスジェニックマウスで生成された重鎖のみ抗体から得られた、可変重鎖領域を含む。一部の実施形態では、実質的なヒトV_Hドメイン、或いはヒトV_Hドメインから得られた、又はヒトV_Hドメインに基づいたV_Hドメインは、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基(例えば、インビトロにおいて、例えば、ランダム若しくは部位特異的変異誘発によって導入された変異、又はインビボにおいて体細胞変異によって導入された変異)を含むことができる。したがって、「ヒトV_Hドメイン」という用語はまた、例えば配列の傾向を取り除くために1つ又は複数のアミノ酸残基が修飾された、実質的ヒトV_Hドメインを含む。例えば、実質的ヒトV_Hドメインでは、V_Hドメインは生殖細胞系ヒト配列と比較して、最大で10個、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、若しくは10個、又は最大で20個のアミノ酸修飾を含むことができる。

【0047】

しかし、本明細書で使用したように、「ヒトV_Hドメイン」又は「実質的ヒトV_Hドメイン」という用語は、マウス等の別の哺乳類種の生殖細胞から得られたCDR配列がヒトフレームワーク配列にグラフトされた抗体を含むことを意図していない。一実施形態では、本明細書で使用したように、「ヒトV_Hドメイン」という用語はまた、ラクダ科V_Hドメイン、すなわち、例えば、1つ又は複数の所定の残基をラクダ科V_{HH}ドメインに見いだすことができる特定の残基に変化させるために、インビトロにおいて、V_Hドメイン配列の所定の位置を選択し、所定の位置に1つ又は複数の点突然変異を導入する従来の変異誘発方法によって、特異的に改変されたヒトV_Hドメインを含むことを意図していない。

【0048】

本発明の分子は、完全なヒトであるため免疫原性がないので有利である。本発明の分子は、ヒト化する必要がない。

【0049】

HSAは3つのドメイン、ドメインI、ドメインII及びドメインIIIを有する。ドメインIIIは血清アルブミンのFcRnへの結合に関与する。驚くべきことに、本発明者らは、配列番号1を含むか、又はそれからなる本明細書でHumabody(登録商標)1と称する単一可変重鎖ドメイン抗体がHSAのドメインIIIに結合することを示した。いかなる理論によっても拘束されることは望まないが、ドメインIIIとの相互作用は半減期の調整に有益であり得ると考えられる。この相互作用は、HSAとFcRnの相互作用に影響を与え、いくつかのアゴニスト分子に必要とされるかもしれないより短い半減期を導く可能性がある。

【0050】

第一の態様では、したがって、本発明はHSAのドメインIII(すなわち、HSAのアミノ酸残基383~569)に結合する免疫グロブリン単一可変重鎖ドメインに関する。一実施形態では、これはドメインI及びIIには結合しない。一実施形態では、前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、配列番号1又はそれと少なくとも75%、80%、85%、90%、又は95%の相

同性を有する配列を含むか、又はそれからなる。

【0051】

配列番号1を以下に示す。

【0052】

【化1】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRSCAASGFTFHHYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNGNKITYADSVKG
RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVRDSSLFIVGAPTFEHWGRGTLTVSS
(配列番号1、本明細書ではHumabody(登録商標)1とも称する)

10

【0053】

CDR1、CDR2及びCDR3の配列はそれぞれ、上記で太字で示されている。Humabody(登録商標)1のCDRは以下の配列を有する：

CDR1:HYAMH(配列番号2)

CDR2:GISWNGNKITYADSVKG(配列番号3)

CDR3:DSSLFIVGAPTFEH(配列番号4)

【0054】

配列相同性/同一性は少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%、例えば、少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%の配列相同性であってもよい。

20

【0055】

一実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは、

a)配列番号2又は配列番号2と1、2、3、4若しくは5個の差を有するアミノ酸配列を有するCDR1

b)配列番号3又は配列番号3と1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16若しくは17個の差を有するアミノ酸配列を有するCDR2、及び/又は

c)配列番号4又は配列番号4と1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13若しくは14個の差を有するアミノ酸配列を有するCDR3を含む。

【0056】

アミノ酸配列の差は、アミノ酸の欠失、置換、又は付加であってもよい。一実施形態では、差はアミノ酸置換である。一実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは、本明細書で定義されたCDRのうちの1つ、例えば、CDR1、CDR2、又はCDR3を有している。一実施形態では、CDRは配列番号2、3、又は4それぞれから選択される。別の実施形態では、CDRはバリエーションであり、上記で定義したような置換を有する。別の実施形態では、CDR配列の2つのうちの1つは、配列番号の2、3、又は4で定義された通りであり、残りのCDRは、適用できるならば、それぞれのCDR配列2、3、又は4のバリエーションである。

30

【0057】

一実施形態では、免疫グロブリン単一可変重鎖ドメインは、1つ又は複数のアミノ酸置換、例えば、20個まで、例えば、1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個の置換、1つ又は複数の欠失、1つ又は複数の挿入或いはその他の修飾を有する配列番号1のバリエーションであり、単一ドメイン抗体の生物学的機能を保持しており、すなわちHSAに結合する。したがって、バリエーションV_H単一ドメイン抗体は操作された配列であってもよい。修飾は、元の配列V_H単一ドメイン抗体又はポリペプチドと比較してアミノ酸配列の変化をもたらす、単一ドメイン抗体又はポリペプチドをコードする1つ又は複数のコドンの1つ又は複数の置換、欠失又は挿入を含んでもよい。アミノ酸置換は、ロイシンとセリンの置換、すなわち、保存的アミノ酸置換等の、1つのアミノ酸と構造的及び/又は化学的に類似した特性を有する別のアミノ酸の置換の結果であってもよい。挿入又は欠失は、任意選択で、約1から25、例えば、1から5、1から10、1から15、1から20アミノ酸、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10アミノ酸の範囲で

40

50

あってもよい。許容される変動は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作製し、得られたバリエーションを完全長又は成熟した元の配列によって示される活性について試験することによって決定することができる。

【0058】

本明細書で記載したV_H単ドメイン抗体のバリエーションは、バリエーションではない分子に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列相同性/同一性を有する。一実施形態では、修飾は保存的配列修飾である。本明細書で使用したように、「保存的配列修飾」という用語は、アミノ酸配列を含有する抗体の結合特性に著しい影響又は変化を与えないアミノ酸修飾を指すことを意図している。このような保存的修飾には、アミノ酸置換、付加及び欠失が含まれる。修飾は、部位特異的変異誘発及びPCR媒介変異誘発等の当技術分野で知られている標準的技術によって、本発明のs dAbに導入することができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されている置換である。当技術分野では、類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、無荷電の極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、ベータ枝分かれ側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)及び芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸が含まれる。したがって、本発明の単ドメイン抗体のCDR領域内の1つ又は複数のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーのその他のアミノ酸で置換することができ、変化した抗体は、本明細書で記載した機能アッセイを使用して機能保持(すなわち、HSA結合)について試験することができる。

【0059】

したがって、これらのアミノ酸は通常、抗原に対する親和性若しくは特異性等のポリペプチドの生物活性、機能、又はその他の所望される特性を変化させることなく変化させることができる。一般的に、ポリペプチドの重要ではない領域において単一のアミノ酸を置換しても、生物活性は実質的に変化しない。更に、構造又は機能が類似しているアミノ酸の置換は、ポリペプチドの生物活性を混乱させる可能性は少ない。本明細書で記載したポリペプチド及びペプチドを構成するアミノ酸残基及びこれらのアミノ酸残基の保存的置換の略語を以下のTable 1(表1)に示す。

【0060】

10

20

30

40

50

【表 1】

Table 1. アミノ酸残基及び保存的アミノ酸置換の例

元の残基 3文字コード、1文字コード	保存的置換
アラニン, Ala, A	Gly, Ser
アルギニン, Arg, R	Lys, His
アスパラギン, Asn, N	Gln, His
アスパラギン酸, Asp, D	Glu, Asn
システイン, Cys, C	Ser, Ala
グルタミン, Gln, Q	Asn
グルタミン酸, Glu, E	Asp, Gln
グリシン, Gly, G	Ala
ヒスチジン, His, H	Asn, Gln
イソロイシン, Ile, I	Leu, Val
ロイシン, Leu, L	Ile, Val
リジン, lys, K	Ar, His
メチオニン, Met, M	Leu, Ile, Tyr
フェニルアラニン, Phe, F	Tyr, Met, Leu
プロリン, Pro, P	Ala
セリン, Ser, S	Thr
スレオニン, Thr, T	Ser
トリプトファン, Trp, W	Tyr, Phe
チロシン, Tyr, Y	Try, Phe
バリン, Val, V	Ile, Leu

【0061】

一部の実施形態では、本発明は、1つ又は複数の配列修飾を含み、未修飾の単ドメイン抗体と比較して、結合親和性、特異性、熱安定性、発現レベル、エフェクター機能、グリコシル化、免疫原性の低下、又は溶解性等の1つ又は複数の特性が改善されている、配列番号1と比較してV_H単ドメイン抗体のバリエーションであるV_H単ドメイン抗体を提供する。

【0062】

当業者であれば、インビトロ及びインビボの発現ライブラリーを含む、本明細書で記載したような抗原結合分子を特定し、入手し、最適化する様々な方法があることを知っているだろう。これは更に実施例において説明する。ディスプレイ(例えば、リボソーム及び/又はファージディスプレイ)及び/又は変異誘発(例えば、エラープロン変異誘発)等の当該技術分野で知られている最適化技術を使用することができる。したがって、本発明はまた、本明細書で記載した単ドメイン抗体の配列最適化バリエーションを含む。

【0063】

一実施形態では、単ドメイン抗体の免疫原性を低下させるために修飾することができる。例えば、1つの方法は、1つ又は複数のフレームワーク残基を対応するヒト生殖細胞系

配列に戻すことである。更に詳細には、体細胞変異を受けた単ドメイン抗体は、単ドメイン抗体が得られる生殖細胞系配列とは異なるフレームワーク残基を含有していてもよい。このような残基は、単ドメイン抗体フレームワーク配列と単ドメイン抗体が得られる生殖細胞系配列を比較することによって特定することができる。一実施形態では、フレームワーク配列は全て生殖細胞系配列である。

【0064】

フレームワーク領域配列におけるアミノ酸残基の1つ又は複数をそれらの生殖細胞系配置に戻すために、例えば、部位特異的変異誘発又はPCR媒介変異誘発によって、体細胞変異を生殖細胞系配列に「復帰突然変異」させることができる。

【0065】

フレームワーク修飾の別の種類は、フレームワーク領域内の、或いは1つ又は複数のCDR領域内でもよい1つ又は複数の残基を変異させて、T細胞エピトープを除去し、それによって抗体の潜在的な免疫原性を低減することが関与している。

【0066】

更に別の実施形態では、グリコシル化は修飾されている。例えば、アグリコシル化抗体が形成されてもよい(すなわち、抗体はグリコシル化が欠如している)。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を高めるために、変化させることができる。このような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の1つ又は複数のグリコシル化部位の変化によって達成することができる。例えば、1つ又は複数の可変領域フレームワークグリコシル化部位の排除を引き起こし、それによってその部位におけるグリコシル化を排除するために、1つ又は複数のアミノ酸置換を行うことができる。このようなアグリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させることができる。

【0067】

一実施形態では、1つ又は複数の置換がCDR1、2又は3領域内にある。例えば、1、2、3、4、5個、又はそれ以上のアミノ酸置換がCDR1、2、又は3内にあってもよい。別の例では、1又は2個のアミノ酸欠失があってもよい。一実施形態では、1つ又は複数の置換はフレームワーク領域内にある。例えば、1から10個又はそれ以上のアミノ酸置換がフレームワーク領域内にあってもよい。

【0068】

一実施形態では、バリエーションは、配列番号1を参照して以下の置換の1つ又は複数或いはそれらの組合せを含む。

E111→D;

R115→Q;

S100→H又はV;

V97→A;

K98→R;

13Q→H又はK;

16R→G;

19R→K;

23A→T;

24A→V;

H30→N又はD;

H31→E又はD;

G55→S;

G56→N;

K57→S、T、V、又はR;

T59→A、D、又はG;

K65R;

A89→V又はP及び/又は

I104→L。

10

20

30

40

50

【0069】

一実施形態では、バリエントは上記の修飾の1、2、3、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18又は19個を含む。したがって、修飾の組合わせは、具体的に考えられる。一実施形態では、バリエントは修飾E111→D及びR115→Qを有する。一実施形態では、バリエントは配列番号19若しくは20、又はそれらと少なくとも80%、90%、若しくは90%の配列同一性を有し、配列番号19若しくは20で示したようなCDR配列を保持している配列を有する。したがって、本発明はまた、配列番号1、19、若しくは20、又はそれらのバリエントを含むか、又はそれらからなる単一V_Hドメイン抗体に関する。

【0070】

本明細書で記載したsdAbの断片、例えば、HASへの結合を保持している配列番号1、19、又は20の断片、例えば、CDR配列の1つ又は複数を含むか、又はそれらからなるペプチドも包含される。

【0071】

前述のように、本発明によって用意されたアミノ酸配列は、ヒト血清アルブミンに結合することができ、(本明細書で記載したように)ヒト血清アルブミンに特に特異的に結合することができるタンパク質である。したがって、これらは、例えば、治療化合物、部分又は実体に半減期(本明細書で定義した通り)の増加を付与するために、ヒト血清アルブミンに結合するための結合ユニット又は結合ドメインとして使用することができる。

【0072】

使用した「半減期」という用語は一般的に、例えば、配列若しくは化合物の分解、及び/又は自然の機構による配列若しくは化合物の排出若しくは隔離によって、インビボにおいてアミノ酸配列、化合物、又はポリペプチドの血清濃度が50%減少するためにかかる時間を意味している。本発明のアミノ酸配列、化合物又はポリペプチドのインビボ半減期は、薬物動態分析等の、それ自体知られている任意の方法で決定することができる。適切な技術は、当業者には明らかであろう。半減期は、 $t_{1/2}$ -アルファ、 $t_{1/2}$ -ベータ、及び曲線下面積(AUC)等のパラメータを使用して表すことができる。半減期($t_{1/2}$ -アルファ及び $t_{1/2}$ -ベータ)及びAUCは、コンジュゲート又は融合物の血清濃度の時間に対する曲線から決定することができる。したがって、本明細書で使用したような「半減期」という用語は特に、 $t_{1/2}$ -ベータ又は最終半減期を意味している(この場合、 $t_{1/2}$ -アルファ及び/又はAUC又はその両方は考慮に入れなくてもよい)。

【0073】

例えば、第一段階(アルファ段階)では、薬物組成物(例えば、薬物コンジュゲート、非共有薬物コンジュゲート、薬物融合物)は、一部の排除を伴うが、患者において主に分配されている。第2段階(ベータ段階)は、薬物組成物(例えば、薬物コンジュゲート、非共有薬物コンジュゲート、薬物融合物)が分配され、患者から薬物組成物が排出されるにつれて血清濃度が減少していく最終段階である。 $t_{1/2}$ -アルファ半減期は第1段階の半減期であり、 $t_{1/2}$ -ベータ半減期は第2段階の半減期である。

【0074】

本発明のHSA結合免疫グロブリン可変ドメインは、

- ・ ヒトにおいて1から72時間、例えば、2、4、6、8、若しくは10時間、例えば、10時間以上、例えば、10、11、12、14、14、15、16、17、18、19、20時間、例えば、約18時間、例えば、最高20時間、又は12、24、36、若しくは48時間の半減期($t_{1/2}$ として表現される)を有し、及び/又は

- ・ 治療部分に連結した場合、得られる融合タンパク質に、ヒトにおいて1から72時間、例えば、10時間以上、例えば、2、4、6、8、若しくは10時間、例えば、10、11、12、14、14、15、16、17、18、19、20時間、例えば、約18時間、又は最高20時間、又は12、24、36、若しくは48時間の血清半減期を付与する。

【0075】

一実施形態では、本発明のHSA結合免疫グロブリン可変重鎖ドメインは、ヒト化したマ

10

20

30

40

50

ウスモデルにおいて、分子、例えば、別の単一可変重鎖ドメイン抗体の半減期を約18時間延長させる。例えば、本発明のHSA結合免疫グロブリン可変重鎖ドメインは、HSA結合免疫グロブリン可変重鎖ドメインがi.v.投与によって提供される例において示されるように、genOway(登録商標)HSA/FcRnヒト化マウスモデルにおいて、分子、例えば、別の単一可変重鎖ドメイン抗体の半減期を約18時間延長させる。

【0076】

本発明のHSA結合免疫グロブリン可変ドメインは、実施例8に示したように、保存安定性にも優れている。例えば、本発明のHSA結合免疫グロブリン可変ドメインは、4°で14日間安定性を維持する。これらは、実施例で示したように、V_H単一ドメイン抗体の半減期を延長するのに特に適している。

【0077】

したがって、本発明はまた、配列番号1を含むか、又はそれからなる免疫グロブリン単一可変ドメイン及び別の標的に結合する第2の部分を含む結合分子、例えばHSA結合免疫グロブリン可変ドメイン及び別の部分を含むか、又はそれらからなる融合タンパク質に関する。一実施形態では、この部分は治療部分である。結合分子は、ポリペプチド、タンパク質又は構築物であってもよい。

【0078】

一実施形態では、治療部分は、例えば、抗体又は抗体断片(例えば、Fab、F(ab')₂、Fv、一本鎖Fv断片(scFv)又は単一ドメイン抗体、例えば、V_H若しくはV_{HH}ドメイン)又は抗体模倣タンパク質から選択される結合分子である。一実施形態では、本発明の単一ドメイン抗体は、C_H2及びC_H3ドメインの1つ又は両方を含む抗体のFc領域又はその断片、並びに任意選択でヒンジ領域と連結することができる。一実施形態では、少なくとも第2の部分は単一ドメイン抗体、例えば、単一V_Hドメイン抗体である。

【0079】

一実施形態では、本明細書で記載したようなHSAに結合する免疫グロブリン単一可変ドメイン及び第2の部分を含むタンパク質又はポリペプチドは、融合タンパク質である。一実施形態では、本明細書で記載したようなHSAに結合する免疫グロブリン単一可変ドメイン及び第2の部分を含むタンパク質又はポリペプチドは薬物コンジュゲートである。

【0080】

本明細書で使用したように、「コンジュゲート」とは、本明細書で記載したような血清アルブミンに結合する単一V_Hドメイン抗体が薬物に結合/コンジュゲートしている組成物を意味している。

【0081】

このようなコンジュゲートには、血清アルブミンに結合する抗体の抗原結合断片に薬物が共有結合している「薬物コンジュゲート」、及び血清アルブミンに結合する抗体の抗原結合断片に薬物が非共有結合している「非共有薬物コンジュゲート」が含まれる。

【0082】

本明細書で使用したように、「薬物コンジュゲート」とは、血清アルブミンに結合する抗体の抗原結合断片に薬物が共有結合している組成物を意味する。薬物は、適切なリンカー部分を介して抗原結合断片に直接的又は間接的に共有結合することができる。薬物は、アミノ末端、カルボキシル末端等の任意の適切な位置で、又は適切なアミノ酸側鎖を介して、抗原結合断片に結合することができる。

【0083】

一実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは、ペプチドリinker又は2つの部分を連結するその他の適切なリンカーによって第2の部分に連結している。

【0084】

「ペプチドリinker」という用語は、1つ又は複数のアミノ酸を含むペプチドを意味する。ペプチドリinkerは1から50個、例えば1から20個のアミノ酸を含む。ペプチドリinkerは当技術分野では知られており、非限定的な例が本明細書に記載されている。適切な、非免疫原性リンカーペプチドは、例えば、G及び/又はS残基を含むリンカー、(G4S)_n、

10

20

30

40

50

(SG4)_n又はG4(SG4)_nペプチドリンカーであり、ここで、「n」は一般的に、1から10の間の数であり、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10である。一実施形態では、ペプチドは、例えば、GGGGS(配列番号8)、GGGGSGGGGS(配列番号9)、SGGGGSGGGGS(配列番号10)、GGGGSGGGGS(配列番号11)、GSGSGSGS(配列番号12)、GSGSGSGS(配列番号13)、GSGSGS(配列番号14)、及びGSGS(配列番号15)からなる群から選択される。

【0085】

結合剤は、多特異性、例えば2重特異性であってもよい。一実施形態では、結合分子は、本明細書で記載したようなHSAに結合する第1のV_H単ドメイン抗体(V_H(A))及び別の抗原に結合する第2のV_H単ドメイン抗体(V_H(B))を含み、したがって、以下の式:V_H(A)-L-V_H(B)を有する。V_H(A)は、例えば、ペプチドリンカーによって、V_H(B)にコンジュゲートし、すなわち、V_H(B)に連結している。Lはリンカーを意味する。

【0086】

各V_Hは、CDR及びFR領域を含む。したがって、結合分子は、以下の式:FR1(A)-CDR1(A)-FR2(A)-CDR2(A)-FR3(A)-CDR3(A)-FR4(A)-L-FR1(B)-CDR1(B)-FR2(B)-CDR2(B)-FR3(B)-CDR3(B)-FR4(B)を有していてもよい。

【0087】

単一V_HドメインA及びBの順番は特に限定されていないので、本発明のポリペプチドの中で、単一可変ドメインAがN末端に位置し、単一可変ドメインBがC末端に位置していてもよいし、その逆であってもよい。

【0088】

一実施形態では、結合分子は2重特異性である。したがって、一態様では、本発明は、本明細書で記載した単ドメイン抗体が前記単ドメイン抗体とは異なる結合特異性を有する第2の機能性部分に連結している2重特異性分子に関する。

【0089】

一実施形態では、結合分子、例えば、タンパク質又は構築物は多特異性であり、更に、すなわち、第3、第4、第5等の部分を含んでいる。

【0090】

多特異性タンパク質の一実施形態では、HSA結合V_Hドメインはタンパク質のC末端に位置している。

【0091】

第2又は更なる治療部分は、例えば、腫瘍抗原又は免疫腫瘍学的標的に結合する部分から選択することができるが、当業者であれば、本発明がこのように限定されないことを知っているであろう。

【0092】

本発明はまた、請求項のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメインが融合タンパク質において治療部分に連結している場合に、治療部分の半減期を延長する、本明細書で記載したような免疫グロブリン単一可変ドメインの使用に関する。

【0093】

本発明はまた、請求項のいずれかに記載の免疫グロブリン単一可変ドメインが融合タンパク質において治療部分に連結している場合に、治療部分の半減期を延長する、本明細書で記載したような免疫グロブリン単一可変ドメインの使用に関する。例えば、本明細書で記載したように、CD137に結合するsdAb及びPSMAに結合するsdAbを含むタンパク質の半減期を延長するために使用することができる。本明細書で記載したような免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えば、分子は、V_H(A)-V_H(B)-V_H(C)、V_H(B)-V_H(A)-V_H(C)、V_H(C)-V_H(A)-V_H(B)又はV_H(C)-V_H(B)-V_H(A)の形式であってもよく、式中、AはCD137に結合するsdAbであり、BはPSMAに結合するsdAbであり、Cは本明細書で記載したような免疫グロブリン単一可変ドメイン(例えば、配列番号1)である。例えば、この分子は配列番号17を含むか、又はそれからなる。

【0094】

したがって、本発明の融合タンパク質では、治療部分は、例えば、腫瘍学的標的、例えば、免疫腫瘍学的標的に結合することができる。

【0095】

一実施形態では、単一可変重鎖ドメイン抗体は、再配置されていないヒトV_H、D、及びJ領域を含む導入遺伝子を発現しているトランスジェニック齧歯類、特にヒト重鎖のみ抗体を生成している齧歯類から入手されるか、又は入手可能である。一実施形態では、前記齧歯類は機能的な内在性軽鎖及び重鎖を生成しない。

【0096】

一般的に、本明細書で別段の指示がない限り、本明細書で言及した免疫グロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチド、タンパク質、並びにその他の化合物及び構築物は、ヒト(及び/又は任意選択で温血動物、特に哺乳動物も)における疾患又は障害の予防又は治療での使用を意図するものである。したがって、一般的に、本明細書で記載した免疫グロブリン単一可変ドメイン、ポリペプチド、タンパク質、並びにその他の化合物及び構築物は、(生物学的)薬物又はその他の薬学的若しくは治療的に活性のある化合物及び/又は医薬品若しくは医薬組成物の一部として使用することができ、及び/又は適し得ることが好ましい。

【0097】

したがって、本発明はまた、本明細書で記載したような免疫グロブリン単一可変ドメインポリペプチド、タンパク質又は構築物を含む医薬組成物又は製剤、例えば、本明細書で記載したようなHSA結合単一ドメインを含む結合分子又は融合タンパク質に関する。医薬組成物は、任意選択で薬学的に許容される担体を含んでいてもよい。免疫グロブリン単一可変ドメインポリペプチド、タンパク質又は構築物又は医薬組成物は、限定はしないが、経口、局所、非経口、舌下、直腸、腔内、眼内、鼻腔内、肺、皮内、硝子体内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、脳内、経皮、経粘膜、吸入によって、又は特に耳、鼻、目、若しくは皮膚へ局所的に、又は吸入を含む、任意の便利な経路によって投与することができる。

【0098】

非経口投与には、例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、腹腔内、鼻腔内、直腸内、膀胱内、皮内、局所、又は皮下投与が含まれる。好ましくは、組成物は非経口的に投与される。

【0099】

薬学的に許容される担体又は媒体は、組成物が、例えば、錠剤又は粉末の形態であるように、粒子状にすることができる。「担体」という用語は、本発明の薬物抗体コンジュゲートと一緒に投与される希釈剤、アジュバント又は賦形剤を意味する。このような薬学的担体は、水及び油等の液体であってもよく、石油、動物、植物若しくは合成物由来のものが含まれ、ピーナッツ油、大豆油、鉱物油、ゴマ油等が挙げられる。担体は、生理食塩水、アカシアガム、ゼラチン、デンプンペースト、タルク、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素等であってもよい。更に、補助剤、安定化剤、増粘剤、潤沢剤、及び着色剤を使用することができる。一実施形態では、動物に投与する場合、本発明の単一ドメイン抗体又は組成物及び薬学的に許容される担体は滅菌する。本発明の薬物抗体コンジュゲートを静脈内投与する場合、水が好ましい担体である。生理食塩水溶液並びに水性デキストロース及びグリセロール溶液も、液体担体として、特に注射溶液に採用することができる。適切な医薬担体には、デンプン、グルコース、乳糖、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール等の賦形剤も含まれる。本発明の組成物は、所望するならば、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤も含むことができる。

【0100】

本発明の医薬組成物は、液体、例えば、溶液、エマルジョン、又は懸濁液の形態であってもよい。液体は、注射、注入(例えば、IV注入)、又は皮下に送達するために有用であり得る。経口投与を目的とする場合、組成物は好ましくは固体又は液体の形態であり、半固体、半液体、懸濁液及びゲルの形態は、固体又は液体のいずれかとして本明細書で考慮されている形態の中に含まれる。

【0101】

経口投与用の固形組成物として、組成物は粉末、顆粒、圧縮錠剤、丸薬、カプセル、チューインガム、ウエハ等の形態に製剤化することができる。このような固形組成物は通常、1つ又は複数の不活性な希釈剤を含有している。更に、以下の1つ又は複数が存在していてもよい：カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロース、又はゼラチン等の結合剤；デンプン、乳糖、又はデキストリン等の賦形剤、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、トウモロコシデンプン等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素等の流動促進剤；スクロース又はサッカリン等の甘味料；ペパーミント、サリチル酸メチル、又はオレンジ香味料等の香味料；及び着色剤。組成物がカプセル（例えば、ゼラチンカプセル）の形態である場合、上記種類の材料に加えて、ポリエチレングリコール、シクロデキストリン、又は脂肪油等の液体担体を含有することができる。

10

【0102】

組成物は、液体、例えば、エリキシル剤、シロップ、溶液、エマルジョン、又は懸濁液の形態であってもよい。液体は経口投与のため、又は注射による送達のために有用であり得る。経口投与を目的とする場合、組成物は甘味料、保存剤、染料/着色剤、及び風味増強剤の1つ又は複数を含んでいてもよい。注入による投与のための組成物では、界面活性剤、保存剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、緩衝剤、安定化剤、及び等張剤の1つ又は複数も含んでいてもよい。

【0103】

組成物は、1つ又は複数の投薬単位の形態を取ることができる。特定の実施形態では、治療を必要とする領域に局所的に、又は静脈内注射又は注入によって組成物を投与することが望ましいことがある。

20

【0104】

本発明は、本明細書で記載した医薬組成物若しくは製剤、又は本明細書で記載したようなHSA結合単一ドメインを含む結合分子若しくは融合タンパク質を投与することを含む、疾患、例えば、がんの治療のための方法に更に適用される。疾患の治療で使用するため、例えば、がんの治療で使用するために、本明細書で記載した医薬組成物若しくは製剤、又は本明細書で記載したようなHSA結合単一ドメインを含む結合分子若しくは融合タンパク質も想定される。がんの治療のための医薬の製造における、本明細書で記載した医薬組成物若しくは製剤、又は本明細書で記載したようなHSA結合単一ドメインを含む結合分子若しくは融合タンパク質の使用も想定される。

30

【0105】

特定の障害又は状態の治療で有効/活性のある治療薬の量は、障害又は状態の性質に左右され、標準的な臨床技術によって決定することができる。更に、最適な投薬範囲の特定を助けるために、インビトロ又はインビボアッセイを任意選択で採用することができる。組成物で採用される正確な用量はまた、投与経路及び疾患又は障害の重症度によって左右されるので、医師の判断及び各患者の状況に応じて決定すべきである。年齢、体重、性別、食事、投与時間、排泄率、宿主の状態、薬物の組合せ、反応の感度、及び疾患の重症度のような要素を考慮しなければならない。

【0106】

典型的には、その量は、組成物の質量によって、本発明の単一ドメイン抗体の少なくとも約0.01%である。経口投与を目的とする場合、この量は、組成物の約0.1質量%から約80質量%までの範囲になるように変化させることができる。好ましい経口組成物は、組成物の質量によって、本発明の単一ドメイン抗体の約4%から約50%までを含むことができる。

40

【0107】

本発明の好ましい組成物は、非経口投薬単位が本発明の単一ドメイン抗体の約0.01質量%から約2質量%までを含有するように調製される。

【0108】

注射による投与のために、組成物は、通常は対象の体重の約0.1mg/kgから約250mg/kgまで、好ましくは、動物の体重の約0.1mg/kgから約20mg/kgの間、より好ましくは、

50

動物の体重の約1mg/kgから約10mg/kgまでを含むことができる。一実施形態では、組成物は、約1から30mg/kg、例えば、約5から25mg/kg、約10から20mg/kg、約1から5mg/kg、又は約3mg/kgの用量で投与される。投与計画は、例えば、週1回から2、3又は4週間に1回まで変化させることができる。

【0109】

本明細書で使用したように、「治療する」、「治療すること」又は「治療」は、疾患又は障害を阻害又は緩和することを意味する。例えば、治療は、疾患若しくは障害に関連した症状の発症の延期、及び/又は、前記疾患で発症する、又は発症すると予想されるこのような症状の重症度の軽減を含むことができる。この用語は、既存の症状の回復、更なる症状の防止、及びこのような症状の根本的な原因の回復又は防止を含む。したがって、この用語は、治療する哺乳動物、例えば、ヒト患者の少なくとも一部に有益な結果が授けられることを示している。多くの医療的治療は、治療を受けた一部の患者にとっては有効であるが、全ての患者にとっては有効ではない。

10

【0110】

「対象」又は「患者」という用語は、治療、観察、又は実験の対象となる動物を意味する。単なる例として、対象には哺乳動物が含まれるが、これに限定されるものではなく、ヒト又は非ヒト哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、マウス、ウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ、又はネコが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0111】

本発明の分子又は医薬組成物は、単独の活性成分として、或いは1つ又は複数のその他の治療薬と組み合わせて投与することができる。治療薬とは、疾患の治療に有用な化合物又は分子である。治療薬の例には、抗体、抗体断片、薬物、毒素、ヌクレアーゼ、ホルモン、免疫調節剤、アポトーシス促進剤、抗血管新生剤、ホウ素化合物、光活性剤又は色素及び放射性同位元素が含まれる。

20

【0112】

本発明はまた、タンパク質を本明細書で記載したような免疫グロブリン単一可変ドメインに結合することを含む、タンパク質の半減期を延長する方法に関する。

【0113】

本発明はまた、本明細書で記載したアミノ酸配列をコードする核酸配列に関する。一実施形態では、前記核酸は配列番号16又はそれに少なくとも75%、80%、又は90%の配列相同性を有する核酸である。一実施形態では、前記核酸配列は、リンカーによって第2の核酸配列に連結している。一実施形態では、前記第2の核酸は治療部分をコードする。一実施形態では、前記リンカーは核酸リンカーである。核酸の1例を以下に示す。しかし、当業者であれば、遺伝子コードの縮重によって、その他の配列が想定されることを理解するだろう。

30

GGCTTTGTGA GCGGATACAA TTATAATATG TGGAATTGTG AGCGCTCACA ATTCCA
CAAC GGTTTCCCTC TAGAAATAAT TTTGTTTAAC TTTTAGGAGG TAAAACATAT GA
AGAAAACG GCAATCGCAA TCGCAGTCGC TCTGGCGGGT TTCGCAACTG TAGCGCAA
GC CGAGGTGCAA CTGGTCGAGT CTGGTGGTGG TTTGGTGCAA CCTGGTAGAA GCTT
GCGTTT GAGTTGTGCC GCTTCCGGCT TCACTTTCCA TCATTATGCT ATGCACTGGG
TTCGTCAAGC TCCCGGAAAA GGTTTGGAGT GGGTTTCCGG AATTTCTGG AATGGC
AATA AGATTACGTA CGCTGATTCA GTGAAAGGAA GGTTTACAAT CAGTAGAGAT A
ATGCTAAAA ACTCATTGTA TCTACAAATG AACAGCCTAA GAGCAGAAGA TACCGCT
CTG TACTACTGTG TTAGAGATAG CTCGTTATTC ATTGTAGGTG CACCAACTTT TGA
ACATTGG GGTCGGGGTA CTCTTGTGAC TGTCTCATCC GCGGCCGCAC ACCACCATCA
TCACCACTAA CTCGAGCGCC TAATGAAAGC TTCCCCAAGG GCGACACCCC CTAATT
AGCC CGGGCGAAAG GCCCAGTCTT TCGACTGAGC CTTTCGTTTT ATTTGATGCC TG
GCAGTTCC CTA CTCTCTCGC ATGGGGAGTC CCCACACTAC CATCGGCGCT ACGGCGTT
TC ACTTCTGAGT TCGGCATGGA (配列番号16)

40

【0114】

50

本発明はまた、本明細書で記載したような核酸配列を含むベクターに関する。

【0115】

本発明はまた、本明細書で記載したような核酸配列又は本明細書で記載したようなベクターを含む宿主細胞に関する。

【0116】

本発明はまた、本明細書で記載したような免疫グロブリン単一可変ドメイン又は医薬組成物、本明細書で記載したようなタンパク質若しくは構築物、又は本明細書で記載したような医薬組成物、及び任意選択で使用するための指示書を含むキットに関する。

【0117】

本明細書で記載した単ドメイン抗体は、HSA抗原で刺激すると重鎖のみ抗体を発現するトランスジェニック哺乳動物、例えば齧歯類から得ることができる。トランスジェニック齧歯類、例えばマウスは、好ましくは、内在性抗体遺伝子を発現する能力が低下している。したがって、一実施形態では、齧歯類は内在性の軽及び/又は重鎖抗体遺伝子を発現する能力が低下している。そのため、齧歯類は、機能的な軽及び/又は重鎖が生成されないように、例えば以下に更に説明するように、内在性のカッパ及びラムダ軽及び/又は重鎖抗体遺伝子の発現を妨害する修飾を含んでいてもよい。

10

【0118】

HSAに結合することができるヒト重鎖のみ抗体を生成する方法であって、

a) トランジェニック齧歯類、例えば、マウスをHSA抗原で免疫する工程であり、前記齧歯類が再配置されていないヒト重鎖V遺伝子を含む核酸構築物を発現しており、機能的な内在性軽若しくは重鎖を形成することができない工程と、

20

b) ヒト重鎖のみ抗体を単離する工程と、を含む方法も開示している。

【0119】

更なる工程は、例えば、前記齧歯類、例えばマウスからV_Hドメイン配列を含む配列のライブラリーを作製し、前記ライブラリーからV_Hドメイン配列を含む配列を単離することによって、前記重鎖のみ抗体からV_Hドメインを単離する工程を含むことができる。

【0120】

ヒトHSAに結合することができる単一V_Hドメイン抗体を生成する方法であって、

a) トランジェニック齧歯類、例えば、マウスをHSA抗原で免疫する工程であり、前記齧歯類が再配置されていないヒト重鎖V遺伝子を含む核酸構築物を発現しており、機能的な内在性軽若しくは重鎖を形成することができない工程と、

30

b) 前記齧歯類、例えば、マウスからV_Hドメイン配列を含む配列のライブラリーを作製する工程と、

c) 前記ライブラリーからV_Hドメイン配列を含む配列を単離する工程と、を含む方法も開示している。

【0121】

更なる工程は、例えば、実施例で示したような機能的アッセイを使用することによって、HSAに結合する単一V_Hドメイン抗体又は重鎖のみ抗体を特定する工程を含んでいてもよい。

【0122】

インビトロ発現ライブラリーを使用して、本明細書で記載したポリペプチド、核酸、宿主細胞、生成物及び組成物を調製又は作製する方法は、

40

a) アミノ酸配列をコードする核酸配列のセット、収集物又はライブラリーを提供する工程と、

b) 前記セット、収集物又はライブラリーを、HSAに結合する/親和性を有することができるアミノ酸配列についてスクリーニングする工程と、

c) HSAに結合する/親和性を有することができるアミノ酸配列を単離する工程と、を含むことができる。

【0123】

上記の方法では、アミノ酸配列のセット、収集物又はライブラリーは、例えば、スクリ

50

ーニングを容易にするために、ファージ、ファージミド、リボソーム、又は適切な微生物(酵母等)にディスプレイすることができる。アミノ酸配列(のセット、収集物又はライブラリー)をディスプレイ及びスクリーニングするのに適した方法、技術、及び宿主生物は、当業者には明らかであろう(例えば、Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, Academic Press;第1版(1996年10月28日) Brian K. Kay, Jill Winter, John McCaffertyを参照)。ライブラリー、例えば、ファージライブラリーは、抗原特異的な重鎖のみ抗体を発現している細胞又は組織を単離し、単離した細胞又は組織から得られたmRNAからVHドメインをコードする配列をクローニングし、ライブラリーを使用してコードされたタンパク質をディスプレイすることによって作製される。VHドメインは、細菌、酵母、又はその他の発現系で発現させることができる。

10

【0124】

別の態様はまた、ヒトV_H生殖細胞系配列の、又はそれから得られたアミノ酸生成物を含む、HSAに結合するV_Hドメインを含む単離されたV_H単ドメイン抗体又は単離された重鎖のみ抗体に関する。重鎖のみ抗体は、完全にヒトであってもよく、又はマウス配列を含んでいてもよい。

【0125】

本明細書に出てくるような様々な態様及び実施形態では、齧歯類という用語は、マウス又はラットに関し得る。一実施形態では、齧歯類はマウスである。マウスは、非機能的な内在性ラムダ軽鎖遺伝子座を含んでいてもよい。したがって、マウスは機能的な内在性ラムダ軽鎖を形成しない。一実施形態では、挿入、反転、組換え事象、遺伝子編集、又は遺伝子サイレンシングによって、ラムダ軽鎖遺伝子座は一部若しくは全部が欠失しているか、又は機能しなくなっている。例えば、少なくとも定常領域遺伝子C1、C2及びC3は、前述のような挿入又はその他の修飾によって、欠失しているか、又は機能しなくなっている。一実施形態では、遺伝子座が機能的にサイレンシングされているため、マウスは機能的なラムダ軽鎖を形成しない。

20

【0126】

更に、マウスは非機能的な内在性カッパ軽鎖遺伝子座を含んでいてもよい。したがって、マウスは機能的な内在性カッパ軽鎖を形成しない。一実施形態では、挿入、反転、組換え事象、遺伝子編集、又は遺伝子サイレンシングによって、カッパ軽鎖遺伝子座は一部若しくは全部が欠失しているか、又は機能しなくなっている。一実施形態では、遺伝子座が機能的にサイレンシングされているため、マウスは機能的なカッパ軽鎖を形成しない。

30

【0127】

機能的にサイレンシングされた内在性ラムダ及びカッパL鎖遺伝子座を有するマウスは、例えば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれている国際公開第2003/000737号パンフレットに開示されているように作製することができる。

【0128】

更に、このマウスは、例えば、国際公開第2004/076618号パンフレット(その全体が参照によって本明細書に組み込まれている)に記載されているような非機能的な内在性重鎖遺伝子座を含んでいてもよい。したがって、マウスは機能的な内在性重鎖を形成しない。一実施形態では、挿入、反転、組換え事象、遺伝子編集、又は遺伝子サイレンシングによって、重鎖遺伝子座は一部若しくは全部が欠失しているか、又は機能しなくなっている。一実施形態では、遺伝子座が機能的にサイレンシングされているため、マウスは機能的な重鎖を形成しない。

40

【0129】

一実施形態では、マウスは非機能的な内在性重鎖遺伝子座、非機能的な内在性ラムダ軽鎖遺伝子座、及び非機能的な内在性カッパ軽鎖遺伝子座を含む。したがって、マウスはいかなる機能的な内在性軽又は重鎖も生成しない。したがって、マウスはトリプルノックアウト(TKO)マウスである。

【0130】

トランスジェニックマウスは、異種、好ましくはヒトの重鎖遺伝子座を発現させるため

50

のベクター、例えば、酵母の人工染色体(YAC)を含んでいてもよい。YACは、酵母における非常に大きなDNA挿入物のクローニングのために採用することができるベクターである。天然の酵母染色体のように振る舞うために不可欠な3つのシス作用構造要素(自己複製配列(ARS)、セントロメア(CEN)、及び2つのテロメア(TEL))を全て含むだけでなく、大きなDNA挿入物を受け入れる能力によって、染色体のような安定性及び酵母細胞における伝達の忠実性に必要な最小サイズ(150kb)に達することができる。YACの構造及び使用は当技術分野ではよく知られている(例えば、Bruschi, C.V.及びGjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, Encyclopedia of Life Sciences, 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group)。

【0131】

例えば、YACは、CH1ドメインを欠如したマウス免疫グロブリン定常領域遺伝子、マウスエンハンサー、及び調節領域と組み合わせて過剰な再配置されていないヒトVH、D、及びJ遺伝子を含んでいてもよい。ヒトVH、D、及びJ遺伝子は、ヒトVH、D、及びJ遺伝子座であり、それらは完全にヒトである再配置されていない遺伝子である。YACは、国際公開第2016/062990号パンフレットに記載されている通りであってもよい。

【0132】

当技術分野で知られている代替方法は、内在性マウス又はラット免疫グロブリン遺伝子の欠失又は不活性化、並びにCH1ドメインを欠如したマウス免疫グロブリン定常領域、マウスエンハンサー、及び調節領域と組み合わせたヒトV、D、及びJ遺伝子の導入のために使用することができる。

【0133】

トランスジェニックマウスは、標準的技術に従って実施例で例示した通りに作出することができる。トランスジェニックマウスを作出するための最も特徴的な2つの経路は、新たに受精した卵母細胞への遺伝物質の前核マイクロインジェクション、又は桑実期若しくは胚盤胞期胚の安定的にトランスフェクトされた胚性幹細胞の導入を介する。遺伝物質の導入方法に関係なく、操作された胚は、疑似妊娠した雌レシピエントに移植され、妊娠を継続し、トランスジェニック候補の仔が生まれる。

【0134】

これらの広範囲な方法の主な違いは、トランスジェニック動物を作出するために使用する前に、ESクローンを十分にスクリーニングすることができることである。対照的に、前核マイクロインジェクションは、導入後に宿主のゲノムに統合された遺伝物質に依存しており、一般的に、導入遺伝子の組み込みの成功は、仔が生まれるまで確認することができない。

【0135】

導入遺伝子の統合の成功を支援し、成功したかどうかを判定するために、当技術分野では多くの方法が知られている。トランスジェニック動物は、構築物のゲノムへのランダムな統合、部位特異的統合、又は相同組換えを含む多数の手段によって作出することができる。薬物耐性マーカー(ポジティブ選択)、リコンビナーゼ、組換えによって媒介されるカセット交換、ネガティブ選択技術、及び組換えの効率を改善するためのヌクレアーゼの使用を含む、導入遺伝子統合とそれに続く修飾を推進し選択するために使用することができる様々な手段及び技術がある。これらの方法のほとんどは、ES細胞の修飾において一般的に使用されている。しかし、これらの技術のいくつかは、前核注射を介して媒介される遺伝子組換えの促進に有用であり得る。

【0136】

所望するバックグラウンド内でより効率的に遺伝子導入株を作製するために、更なる改良を使用することができる。前述したように、好ましい実施形態では、内在性マウス免疫グロブリンの発現を抑制して、薬物の発見に利用することができる重鎖のみのレパートリーの発現のために、導入した導入遺伝子を単独で使用することができる。遺伝的に操作されたマウス、例えば、全内在性免疫グロブリン遺伝子座(マウス重鎖、マウスカッパ鎖、及びマウスラムダ鎖)が抑制されたTKOマウスを、前述のように使用することができる。導入

10

20

30

40

50

された任意の導入遺伝子をこのTKOバックグラウンドに移すことは、従来の、又はプロセスを効率的に拡大するためのIVFステップを含めた交配によって、実現することができる。しかし、遺伝子組換え手法の間にTKOバックグラウンドを含めることも可能である。例えば、マイクロインジェクションの場合、卵母細胞はTKOドナーから得ることができる。同様に、遺伝子組換えで使用するためにTKO胚からES細胞を得ることができる。

【0137】

免疫グロブリン遺伝子座を発現させるために導入遺伝子が導入されたトリプルノックアウトマウスを本明細書ではTKO/Tgと称する。

【0138】

一実施形態では、マウスは国際公開第2016/062990号パンフレットに記載されている通りである。本発明はまた、ヒト重鎖遺伝子座を発現し、HSA抗原で免疫された齧歯類、好ましくはマウスに関する。本発明はまた、ヒトHSAに結合するヒトVHドメインを含む重鎖のみ抗体を発現する、前述のような齧歯類、好ましくはマウスに関する。好ましくは、前記齧歯類は、機能的な内在性カップ及びラムダ軽及び/又は重鎖を形成することができない。ヒト重鎖遺伝子座は、前述の通りであってもよい導入遺伝子に位置している。

【0139】

本発明はまた、ヒトVHドメインを含む、又はヒトHSA抗原で免疫され、ヒト重鎖遺伝子座を発現する齧歯類、好ましくはマウスから得られた又は得ることができる、抗ヒトHSA単一VHドメイン抗体又は抗ヒトHSA重鎖のみ抗体に関する。好ましくは、前記齧歯類は、機能的な内在性カップ及びラムダ軽及び/又は重鎖を形成することができない。ヒト重鎖遺伝子座は、前述の通りであってもよい導入遺伝子に位置している。

【0140】

本明細書において特に定義しなければ、本開示に関連して使用した科学的及び技術的な用語は、当業者によって一般的に理解されている意味を有するものとする。前記の開示は、本開示を形成及び使用する方法、並びにその最良の形式を含む、本開示の範囲内に包含される対象物の一般的な説明を提供する一方で、以下の実施例は、当業者が本開示を実施することを更に可能にするために提供されている。しかし、当業者であれば、これらの実施例の詳細は、本発明を限定するものとして読まれるべきではなく、その範囲は本開示に添付された特許請求の範囲及びその同等物から理解されるべきであることを理解するであろう。本開示の様々な更なる態様及び実施形態は、本開示を考慮して当業者に明らかになるであろう。

【0141】

本明細書中で言及されている文書は全て、遺伝子受入番号、科学出版物の参照、及び特許出版物の参照を含めて、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【0142】

本明細書で使用した「及び/又は」とは、その他を有するか又は有さない、指定された2つの特徴又は成分のそれぞれの特定の開示として解釈されるべきである。例えば、「A及び/又はB」は、(i)A、(ii)B、並びに(iii)A及びBのそれぞれの特定の開示として、あたかもそれぞれが本明細書に個別に記載されているかのように解釈されるべきである。文脈上別段の解釈が明記されていない限り、前述の特徴の説明及び定義は、本発明の特定のいかなる態様又は実施形態に限定されるものではなく、説明されている態様及び実施形態全てに等しく適用される。

【0143】

本発明は、以下の非限定的な実施例で更に例示される。

【実施例】

【0144】

(実施例1)

Tg/TKOマウスの構築

内在性重及び軽鎖抗体の発現が抑制されているバックグラウンド内で生殖細胞系の構成の重鎖抗体トランスジェニック遺伝子座を有するマウス(三重ノックアウト、又はTKO)は

以前に記載されたように作出された(国際公開第2004/076618号パンフレット及び国際公開第2003/000737号パンフレット、Renら、Genomics, 84, 686, 2004; Zouら、J. Immunol., 170, 1354, 2003)。簡単に説明すると、トランスジェニックマウスは、国際公開第2016/062990号パンフレットに記載されたようにCH1ドメインが欠如したマウス免疫グロブリン定常領域遺伝子、マウスエンハンサー及び調節領域と組み合わせて、過剰なヒトV_H、D及びJ遺伝子を含む、酵母人工染色体(YAC)を用いた新鮮な受精卵母細胞の前核マイクロインジェクションの後に得られた。酵母人工染色体(YAC)は、酵母における非常に大きなDNA挿入物のクローニングのために採用することができるベクターである。天然の酵母染色体のように振る舞うために不可欠な3つのシス作用構造要素(自己複製配列(ARS)、セントロメア(CEN)、及び2つのテロメア(TEL))を全て含むだけでなく、大きなDNA挿入物を受け入れる能力によって、染色体のような安定性及び酵母細胞における伝達の忠実性に必要な最小サイズ(150kb)に達することができる。YACの構造及び使用は当技術分野ではよく知られている(例えば、Bruschi, C.V.及びGjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net)。

【0145】

(実施例2)

免疫用の抗原

免疫は、組換え精製タンパク質を使用した。組換えヒトHSAタンパク質は、Sigma社(カタログ番号A9731)から購入した。

【0146】

(実施例3)

免疫手順

8～12週齢の3匹のCrescendoマウスはそれぞれ、完全フロイントアジュバントで乳化して皮下に送達したHSA10 µgで初回免疫を受け、その後、不完全フロイントアジュバントで乳化してまた皮下に投与したHSA10 µgで、初回刺激に続いて週間隔で3回追加免疫を受けた。HSAの最終用量は、アジュバントの非存在下でリン酸緩衝生理食塩水に溶かし、腹腔内投与した。初回免疫の28日後にマウスを致死処置し、上腕及び鼠径リンパ節、並びに脾臓をRNAlater(Qiagen社 カタログ番号76104)中に回収した。血清は、応答を試験するために収集し、保存した。

【0147】

(実施例4)

血清ELISA

Nunc社マキシソーププレートは、5 µg/ml HSAのPBS溶液で4℃で一晩コーティングした。その後、プレートを0.05% Tween20を補給したPBSで洗浄し、続いてtween を添加していないPBSで洗浄し、3%脱脂粉乳(Marvel社)のPBS溶液で室温で少なくとも1時間ブロックした。3% Marvel/PBSに溶かした血清の希釈液をポリプロピレンチューブ又はプレートで調製し、室温で少なくとも1時間インキュベートしてから、ブロックされたELISAプレートに移し、そこで更に少なくとも1時間インキュベーションを行った。PBS/Tween及びPBSで洗浄後、PBS/3% Marvelで1:10000希釈に調製した、ビオチンをコンジュゲートしたヤギ抗マウスIgG、Fcガンマサブクラス1特異的抗体(Jackson社、115-065-205)の溶液を次に添加し、プレートを室温で少なくとも1時間インキュベートし、次いでPBS/Tween及びPBSで洗浄した。3% Marvel/PBSで1:1000に希釈したニュートラアビジン-HRP溶液(Pierce社31030)をELISAプレートに添加し、少なくとも30分間インキュベートした。更に洗浄した後、TMB基質(Sigma社カタログ番号T0440)を使用してELISAを発色させ、10分後にH₂SO₄ 0.5M溶液の添加によって反応を停止させた。吸光度は、450nmで読み取ることにより判定した。陽性応答は、全マウスで認められた。

【0148】

(実施例5)

免疫マウスからのライブラリー作製

a.組織の処理、RNA抽出及びcDNA製造

脾臓、鼠径及び上腕リンパ節は、免疫した各動物からRNAlaterに収集した。各動物について、脾臓の1/3及び4つのリンパ節を別々に処理した。最初に、組織をホモジナイズし、組織を溶解マトリックスDビーズチューブ(MP Bio社カタログ番号116913100)に移した後、 β -メルカプトエタノールを含有するRLT緩衝液(Qiagen RNeasyキット カタログ番号74104)600 μ lを添加してから、MP Bio Fastprepホモジナイザー(カタログ番号116004500)で、6m/s 40秒のサイクルを使用してホモジナイズした。ホモジナイズした組織を含有するチューブを氷に移し、10gで5分間微量遠心することによって残渣をペレットにした。上清400 μ lを取り出し、RT-PCRのために使用した。

【0149】

最初に、Qiagen RNeasyキット カタログ番号74104を使用して、製造元の手順に従ってRNAを抽出した。次に、各RNA試料を使用して、Superscript III RT-PCR高忠実度キット(Invitrogen社カタログ番号12574-035)を用いてcDNAを作製した。脾臓及びLNの各RNA試料について、V_Hファミリーのプライマーと組み合わせてVH_J/F(ロング)プライマーをそれぞれ用いて、5回のRT-PCR反応を実施した。各マウスについて、V_H生成物は、標準的手順を使用して脾臓とリンパ節との混合物から増幅した。

【0150】

b.ファージミドベクターへのクローニング

ファージミドベクター、pUCG3をこれらの研究で使用した。示したように、NcoIやXhoIを用いた制限酵素消化、ライゲーション及び形質転換等の当技術分野で広く使用されている従来の方法を使用して、V_HをpUCG3にクローニングすることができる。本明細書では、以下に説明したように、V_Hファージミドライブラリーを構築するために、PCRをベースにした代替方法を使用した。

【0151】

精製されたV_HRT-PCR生成物は、形質転換及びライブラリー作製のためのファージミド生成物を得るために、ベクターpUCG3でメガプライマーとして使用した。PCRの生成物は、1%アガロースゲルで分析した。

【0152】

V_H/ファージミドのPCR生成物は、元の動物によってプールされ、Fermentas PCR精製キット(カタログ番号K0702)を使用して製造元の指示に従って精製した。溶出したDNAを使用して、Bio-Rad社のGenePulser Xcellを用いたエレクトロポレーションによって、TG1大腸菌(Lucigen社、カタログ番号60502-2)を形質転換した。エレクトロポレートした細胞をプールした。形質転換体の10倍希釈系列を、2%(w/v)グルコース及びアンピシリン100 μ g/mlを含む2 $\times$ TY寒天ペトリプレートに入れた。これらの皿で得られたコロニーを使用して、ライブラリーサイズを推定した。残りの形質転換体は、2%(w/v)グルコースとアンピシリン100 μ g/mlを補給した大型2 $\times$ TY寒天バイオアッセイ皿に入れた。寒天プレートは全て、30℃で一晩インキュベートした。大型バイオアッセイ皿に2 $\times$ TYブロス10mlを添加することによって、ライブラリーを回収した。細菌のコロニーはそっと掻き取り、OD600を記録した。同量の50%(v/v)グリセロール溶液を添加した後、少量をクライオバイアル中で-80℃で保存するか、又はファージ選択方法に直接使用した。

【0153】

(実施例6)

HSA結合V_Hの単離のための選択戦略

ライブラリーファージストックの調製及びファージディスプレイ選択は、公開された方法(Antibody Engineering, Benny Lo編、第8章、161～176頁、2004)に従って実施した。ほとんどの場合、結合V_Hドメインを単離するために、パニングアプローチと組み合わせたファージディスプレイを使用した。しかし、様々な異なる選択方法が当技術分野ではよく記載されており、可溶性選択、ストレス下(例えば、熱)で実施される選択、及び過剰な抗原又は抗原反応性V_Hドメインを競合として添加し、高親和性V_Hドメインの回収を促すか、又は特定のエピトープから選択を遠ざける競合選択が含まれる。HSAで免疫した

10

20

30

40

50

マウスからのライブラリーについては、HSAに対するパニング選択又は可溶性選択のいずれかを1回実施した。

【0154】

(実施例7)

標的結合のアッセイ

様々な選択によるV_Hは、以下のアッセイの1つ又は複数でスクリーニングしてHSAに結合するV_Hを特定した。

【0155】

a)細菌の粗ペリプラズム調製物による結合ELISA

ライブラリーの選択後、細菌宿主が発現したV_Hドメインの粗抽出物を使用したELISAによって、HSA特異的V_H抗体を特定した。小規模な細菌のペリプラズム抽出物は、ディープウェルプレートで増殖させた培養物1mlから調製した。開始培養物を使用して、0.1%(w/v)グルコース+アンピシリン100 µg/mlを補給した2XTYブロス(Melford社、M2130)を含有する96ウェルディープウェルプレート(Fisher社、カタログ番号MPA-600-030X)に接種し、37℃にて250rpmで振とうした。OD₆₀₀が0.6~1に達した時、IPTG(最終濃度1mM)及びアンピシリンを補給した2XTY 100 µlを添加することによってV_H生成を誘導し、培養物は250rpmで振とうしながら30℃で一晩増殖させた。大腸菌を3200rpmで10分間遠心分離することによってペレットにし、上清を廃棄した。細胞ペレットを氷冷抽出緩衝液(20%(w/v)スクロース、EDTA 1mM、50mMトリス-HCl pH8.0)150 µlにゆっくりピペッティングすることによって再懸濁した。細胞を氷上で30分間インキュベートした後、4℃で4500rpmで15分間遠心分離した。上清をポリプロピレンプレートに移し、1×PBSTブロッキング液でインキュベーションした後、直接ELISAに使用した。

【0156】

HSAは、炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.6に1 µg/mlで溶かしてマキシソーププレート(Nunc社443404)に体積50 µlを添加し、4℃で一晩インキュベートすることによって固定した。コーティング後、抗原溶液を吸引し、プレートを0.05% Tween20(sigma社 P1379)を補給したPBS(PBS錠剤、Oxoid社カタログ番号BR0014Gから調製)を使用して洗浄し、その後Tweenを添加せずにPBSで洗浄した。非特異的なタンパク質相互作用をブロックするために、PBSTをウェルに添加し、プレートを室温で少なくとも1時間インキュベートした。ペリプラズム抽出液を1×PBST(最終濃度)で希釈したものをポリプロピレンチューブ又はプレートで調製し、室温で少なくとも1時間インキュベートした後、ブロックしたELISAプレートに移し、少なくとも1時間のインキュベーションを更に行った。次に、結合していないタンパク質をPBS/Tween、続いてPBSによる繰り返し洗浄で洗い流した。その後、PBSTで1:1000希釈に調製したHRPコンジュゲート抗His Ab(Miltenyi Biotec社、130-092-785)の溶液を各ウェルに添加し、室温で少なくとも1時間のインキュベーションを更に行った。結合していない検出抗体は、PBS/Tween及びPBSを使用して繰り返し洗浄によって除去した。次にELISAは、TMB基質(Sigma社カタログ番号T0440)を使用して発色させ、10~30分後にH₂SO₄ 0.5M溶液(Sigma社カタログ番号320501)の添加によって反応を停止させた。吸光度は、450nmで読み取ることによって判定した。

【0157】

b)精製V_Hドメインによる結合ELISA

精製したV_Hは、ペリプラズム抽出液のニッケル-アガロースアフィニティークロマトグラフィー精製のためにV_HC末端6×HISタグを使用することによって得られた。各V_Hの開始培養物は、2%(w/v)グルコース及びアンピシリン100 µg/mlを補給した2XTY培地(2XTYブロス)(Melford社、カタログ番号M2103)中で、250rpmで振とうしながら30℃で一晩増殖させた。次に、この一晩培養したものを使用して2XTY培地50ml~200mlに接種し、250rpmで振とうしながら37℃で約6~8時間(OD₆₀₀=0.6~1.0になるまで)インキュベートした。培養物を3200rpmで10分間遠心分離し、細胞ペレットをアンピシリン100 µg/ml/IPTG 1mMを含有する新しい2XTYブロスに再懸濁した。振とうフラスコは、30℃で250rpmで一晩インキュベートした。培養物を再び3200rpmで10分間遠心分離し、

10

20

30

40

50

上清を廃棄した。細胞ペレットを氷冷抽出緩衝液(20%(w/v)スクロース、EDTA 1mM、50mM トリス-HCl pH8.0又はMOPS 50mM)にゆっくりピペティングすることによって再懸濁し、その後1:5に希釈した氷冷抽出緩衝液で更に希釈した。細胞を氷上で30分間インキュベートした後、4℃で4500rpmで15分間遠心分離した。上清を、イミダゾール(Sigma社、カタログ番号12399)10mM及び予め平衡化したニッケルアガロースビーズ(Qiagen社、Ni-NTA50%溶液、カタログ番号30210)を含有するチューブに移した。V_H結合は4℃で2時間、ゆっくり振とうして進行させた。ビーズをポリプレップカラム(BioRad社カタログ番号731-1550)に移し、重力流を利用して上清を廃棄した。カラムをPBS/0.05% Tween(登録商標)で3回洗浄した後、PBS/イミダゾール20mM 5mlで3回洗浄した。V_Hは、PBS/イミダゾール250mMを使用してカラムから溶出させた。イミダゾールは、NAP-5カラム(GE Healthcare社、17-0853-01)で緩衝液交換し、PBSで溶出することによって、精製したV_H調製物から除去した。精製したV_Hの収率は分光光度法で推定し、純度はSDS PAGEを使用して評価した。

【0158】

或いは、V_HはpJExpressベクターを用いてW3110大腸菌の上清から精製した。この手法では、最高1Lの培養液を、TB培地中で250rpm振とうしながら37℃で増殖させた後、IPTG 1mMで一晩誘導した。得られた上清を回収し、Ni-Sepharose excel樹脂(GE Healthcare社カタログ番号17-3712-03)、続いてAKTA Pure SystemでHiLoad 26/600 Superdrex 75pgカラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーを使用してV_Hを精製した。

【0159】

或いは、Capture Select C-タグXLアフィニティマトリクス(Thermo Fisher社カタログ番号2943072010)、続いてAKTA Pure SystemでHiLoad 26/600 Superdrex 75pgカラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、上清からV_Hを精製した。精製したV_Hの収率は分光光度法で推定し、純度はSDS PAGEを使用して評価した。

【0160】

その後、精製したV_HをPBST中で既知濃度でELISAに滴下し、いずれも炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.6中で1μg/mlでコーティングされたHSA及びCSA(カニクイザル血清アルブミン、Equitech-Bio Inc社、カタログ番号CMSA62)の両方に対する結合を試験すること以外は、ELISAは前述のように実施した。精製したV_HはHSA及びCSAに結合することが見いだされた。

【0161】

c) 結合速度論

ヒト、イヌ、及びマウス血清アルブミンとの結合研究は、ForteBio社 OCTET RED384装置を使用して実施した。血清アルブミン(HSA、CSA、MSA)は、アミン試薬カップリングキット(第2世代、ForteBio社)を使用したアミンカップリングによって、AR2Gバイオセンサーに結合させた。簡単に説明すると、AR2Gバイオセンサーを水で再水和した後、EDC/sNHS試薬を使用して10分間活性化した。活性化したバイオセンサーを、10mM酢酸ナトリウムpH5.0で10μg/mlに希釈した血清アルブミン(HSA、CSA、MSA)を含有するウェルに10分間浸漬した後、1MエタノールアミンpH8.5を使用して10分間遊離活性部位を不活性化した。次に、これらを10mMグリシンpH2.5に浸漬して表面を安定化した。その後、HSA及びCSAを付加したバイオセンサーを、1×アッセイ緩衝液(PBS/Tween-20 0.05%)に120秒間浸漬してベースラインを確立した後、血清アルブミンへの結合を起こさせる実験のために、所定の濃度のHumabody(登録商標)V_Hを含有するウェル(7点2倍希釈系列、最高濃度は50nM(HSAの場合)又は1500nM(MSA、CSA)に120秒かけて浸漬した。その後、バイオセンサーをアッセイ緩衝液を含有するウェルに移し、300秒かけてHumabody(登録商標)V_Hを血清アルブミンから解離させた。結合相互作用の動態及び親和性は、1:1結合モデルを使用してモデル化し、ForteBio解析ソフトウェアバージョン8.1以上を使用して算出した。異常な、又は適合しない曲線は解析から除外した。

【0162】

【表 2】

	ヒト血清アルブミン(HSA)			イヌ血清アルブミン(CSA)			MSA
	K _D	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D
実施例 10 で記載し たような 3 価化合 物	4.83E- 09	2.38E+05	1.08E- 03	1.02E-07	1.44E+05	1.47E-02	結合せ ず

Table 2a:血清アルブミンに対するHumabody(登録商標)V_Hの算出した速度定数及びK_Dの平均

【0163】

【表 3】

V _H 名	抗原	BIAcore(親和性)		
		kon (1/Ms)	kdis (1/s)	KD (nM)
配列番号 19 を有 する V _H	HSA, pH7	1.77E+05	1.75E-03	10
	HSA, pH5	1.98E+05	3.1E-03	16
	CSA, pH7	2.77E+05	1.73E-02	62
	CSA, pH5	2.53E+05	2.35E-02	93
配列番号 20 を有 する V _H	HSA, pH7	4.88E+05	1.33E-03	3
	HSA, pH5	3.13E+05	1.24E-03	4
	CSA, pH7	3.17E+05	1.01E-02	32
	CSA, pH5	2.68E+05	9.72E-03	36
E111→D 及び R115→Q を有する 配列番号 1 のバリ アント	HSA, pH7	2.55E+05	1.62E-03	6
	HSA, pH5	2.42E+05	3.19E-03	13
	CSA, pH7	2.50E+05	1.68E-02	67
	CSA, pH5	2.44E+05	2.41E-02	99
配列番号 1	HSA, pH7	8.13E+05	2.38E-03	3
	HSA, pH5	5.28E+05	6.33E-03	12
	CSA, pH7	6.40E+05	2.11E-02	33
	CSA, pH5	4.35E+05	4.19E-02	96

Table 2b:血清アルブミンに対する Humabody(登録商標)V_H の算出した速度定数及び K_D の平均

【0164】

(実施例 8)

V_H単ドメイン抗体は良好な安定性を示す

精製したV_Hをサイズ排除クロマトグラフィーに供した。簡単に説明すると、精製したV_Hを2mg/mlでPBS緩衝液に溶かし、4℃又は40℃で0～14日間保存した後、PDA検出器(280nmで検出)を備えたWaters H-Class Bio UPLCを使用して様々な時点で分析し、Waters ACQUITY BEH 125 Å SECカラムで分離した。試料を10μlの体積で注入し、NaCl 200mM、100mMリン酸ナトリウムpH7.4+5%プロパン-1-オールを含有する移動相で、0.4ml/分の流速で流した。6分間データを収集し、保存後の試料中の単量体タンパク質のパーセンテージを算出した。

【0165】

4℃で14日間インキュベーションした後、著しい変化は認められなかった。40℃でインキュベーションした後、単量体パーセンテージのわずかな低下が観察された。以下の結果は、(Humabody(登録商標)1(配列番号1))について示している。

【0166】

【表4】

SEC による% 純度	SEC4℃による%純度				SEC40℃による%純度				
	1	4	7	14	0	1	4	7	14
Humabody(登録商標)1-ctag	100.00	100.00	100.00	99.96	100.00	100.00	99.65	99.75	96.84

Table 3: V_H単ドメイン抗体(Humabody(登録商標)1(配列番号1))の安定性。これは、0、1、3、7及び14日後に存在する単量体のパーセンテージを示している。

【0167】

(実施例9)

2重トランスジェニックヒト化FcRn/HSAマウスにおける半減期延長分子の単回静脈内投与の薬物動態分析

genOway(登録商標)によるヒト新生児Fc受容体/ヒトアルブミンマウスモデルを使用して実験を実行した。この2重ヒト化新生児Fc受容体(FcRn)/アルブミンマウスモデルは、自己由来受容体-リガンド相互作用を維持しており、ヒトにおける生理的薬物クリアランスを模倣しているため、アルブミンに連結した低分子及び従来の薬物動態を測定し最適化するので、並びに循環する生物製剤及びバイオシミラー薬物の半減期を研究し予測するための、独特で信頼性の高い手段となっている(Viuff D, Antunes F, Evans L, Cameron J, Dyrnesli H, Thue Ravn B, Stougaard M, Thiam K, Andersen B, Kjarulff S, Howard KA. 2016. 「Generation of a double transgenic humanized neonatal Fc receptor (FcRn)/albumin mouse to study the pharmacokinetics of albumin-linked drugs.」 J Control Release)。

【0168】

hFcRn/HSAヒト化マウスは、WTマウスよりも予測可能な「ヒト様の」薬物動態の結果をもたらす。このモデルは、HSA結合薬物の薬物動態、分布、及び毒性のインビボ評価に非常に適している。

【0169】

薬物動態を試験するこれらの実験では、Humabody(登録商標)1(配列番号1)を含む3重特異性分子(配列番号17)を使用した。3価の構築物は、CD137及び前立腺特異的膜抗原(PSMA)それぞれに結合する2つのVHドメイン、並びに構築物のC末端に位置するHSA結合配列番号1を含む(3つのVHはG4Sリンカーによって連結されている)。

【0170】

簡単に説明すると、雄のgenOway(登録商標)ヒトHSA/FcRn Tgマウスに尾静脈を介して単回静脈内注射で2mg/kg(n=3)を投与した。血液試料は投与前並びに薬物投与の0.083h、1h、8h、24h、48h、72h、及び96h後に伏在静脈から収集した。投与の168時間後に全動物を安楽死させ、血液を収集した。血漿を分離し、アッセイを実施するまで-80℃で保存した。血漿試料は、Gyrolab免疫アッセイプラットフォームで、ビオチン化したヒトPSMAを捕捉剤として、ヒトCD137Dylight650を検出剤として使用して分析した。データはGyrosを使用して分析し、血漿中の濃度を得た。データの薬物動態分析は、エクセルのアドオンであるPK Solver 2.0を使用して行った。

【0171】

試験の結果は、ヒトHSA/FcRn Tgマウスに2mg/kgを静脈内投与したとき、分子が18.13±0.412時間(n=3)の半減期を有することを示している。配列番号1を有さない対照は急速に排出され、1時間後には血漿中で検出されなくなった。

【0172】

【表5】

試験した化合物	動物	性別	用量	経路	Cmax[ug/ml]	半減期[h]
3価の分子	Genoway	雄	2	i.v.	47.8	18.12

Table 4: pKパラメータをまとめた表

10

【0173】

(実施例10)

Humabody(登録商標)1の結合部位の決定

ForteBio OCTET RED384装置を使用して、Humabody(登録商標)1V_HとHSAドメインI、II、及びIIIとの間の相互作用を調べた。HSAドメインは、Albumin Bioscience社から購入した。簡単に説明すると、AR2Gバイオセンサーを水で再水和した後、EDC/sNH₂S試薬を使用して10分間活性化した。活性化したバイオセンサーを、10mM酢酸ナトリウムpH5.0で50μg/mlに希釈したHSAドメインを含有するウェルに5分間浸漬した後、1MエタノールアミンpH8.5を使用して遊離活性部位を10分かけて不活性化した。次に、これらを10mMグリシンpH2.5に浸漬して表面を安定化させた。その後、バイオセンサーに付加したドメインHSAを、1×アッセイ緩衝液(PBS/Tween-20 0.05%)に120秒間浸漬してベースラインを確立した後、HSAへの結合を起こさせるために300nMの所定濃度のHumabody(登録商標)1V_Hを含有するウェルに120秒かけて浸漬した。その後、バイオセンサーをアッセイ緩衝液を含有するウェルに移し、300秒かけてHumabody(登録商標)1V_HをHSAドメインから解離させた。

20

【0174】

Humabody(登録商標)1はHSAのドメインIIIには結合するが、ドメインI及びIIには結合しない。

30

【0175】

40

50

【表 6】

クローン名	HSA ドメイン	結合(Y/N)
Humabody(登録商標)1	I	N
Humabody(登録商標)1	II	N
Humabody(登録商標)1	III	Y
HSA に結合する Humabody(登録商標)VH	I	Y
HSA に結合する Humabody(登録商標)VH	II	N
HSA に結合する Humabody(登録商標)VH	III	N
HSA に結合する sdAb	I	N
HSA に結合する sdAb	II	Y
HSA に結合する sdAb	III	N

Table 5: Humabody(登録商標)1(配列番号1)及び対照のHSAドメインへの結合

【0176】

上記の実験で使用した配列

配列番号17

タンパク質

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISYDGSNKY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWG
QGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS
CAASGFTLSNYWMNWVRQAPGKGLEWVANINQDGSERYVDSVKGRFTISRDN AKNSL
YLQMNSLRAEDTAVYYCARGGEGYGVVDHYGLDVSGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFHHYAMHWVRQAPGKG
LEWVSGISWNGNKITYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVRDSSLFI
VGAPTFEHWGRGTLTVTSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

配列番号18のタンパク質をコードする核酸

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGG
CTCCAGGCAAGGGA CTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGATGGAAGTAATAAATAC
TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCT
GTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAG
ATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGATATCTGGGGC
CAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGTGGCGGTT CAGGCGGAGGTGGCTCTGG
AGGTGGAGGTT CAGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGTGGATCGGGTGGAGGTGGTAGTG
AGGTGCAGTTAGTTGAGAGCGGAGGTGGTTTAGTT CAGCCGGGGGGCTCGCTTCGCCTG
TCGTGCGCCGCCTCGGGATTACATTATCAAAC TACTGGATGAATTGGGTCCGCCAGGC
TCCGGGCAAAGGTCTTGAGTGGGTGGCGAACATTAATCAGGACGGGAGCGAGCGTTATT
ACGTTGATTCCGGTAAAAGGACGTTTCACTATCAGTCGTGACAACGCTAAAAATTCCTTG
TACTTACAGATGAACTCACTTCGTGCTGAGGACACCGCAGTGTACTACTGTGCTCGCGG
TGGTGAAGGATACGGCGTCGATCACTACGGCCTTGATGTATCAGGACAGGGGACTACAG
TTACCGTCTCTTCCGGCGGAGGTGGCTCTGGAGGAGGCGGATCGGGGGGTGGAGGAAGT

GGCGGCGGTGGTAGTGGAGGAGGTGGTTCTGGAGGCGGTGGCTCTGAAGTACAACTGGT
TGAATCGGGTGGTGGATTGGTCCAACCTGGAAGATCATTGAGGCTTTCTTGTGCAGCTT
CCGGATTACCTTTTCATCACTATGCTATGCACTGGGTGAGACAAGCCCCTGGTAAGGGC
TTGGAATGGGTGTCCGGAATCTCCTGGAATGGTAACAAAATAACATATGCAGATTCCGT
TAAGGGTAGATTTACTATTAGCCGTGATAATGCAAAAAACAGTTTATACTTGCAGATGA
ATTCTTGAGGGCTGAGGATACAGCTCTTTACTATTGTGTGCGTGACTCATCGTTGTTC
ATTGTGCGAGCCCCAACTTTTGAACATTGGGGTAGAGGTACCCTAGTTACGGTTAGCTC
AGGCGGAGGTGGCTCTGGAGGAGGCGGATCGGGGGGTGGAGGAAGTGGCGGCGGTGGT
AGT

配列番号19

10

QVQLVESGGGLVHPGGSLKLSCAVSGFTFHYYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNGNKI
TYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVRDSSLFIVGAPTFDHWGQGT
LVTSS

配列番号20

QVQLVESGGGLVHPGGSLKLSCAVSGFTFHYYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNGNKI
TYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVRDSSLFIVGAPTFDHWGQGT
LVTSS

【配列表】

0007520002000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/15 (2006.01)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 47/68 (2017.01)

F I

C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10
A 6 1 K 39/395 W
A 6 1 K 47/68

2・3 A T・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・リサーチ・キャンパス・メディトリーナ
・ビルディング・クレシェンド・バイオロジックス・リミテッド内

(72)発明者

デボラ・ピント
イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2・3 A T・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・
リサーチ・キャンパス・メディトリーナ・ビルディング・クレシェンド・バイオロジックス・リミ
テッド内

審査官 市島 洋介

(56)参考文献

特表 2 0 1 0 - 5 1 8 0 6 2 (J P, A)
国際公開第 2 0 1 7 / 1 2 2 0 1 8 (W O, A 1)

(58)調査した分野

(Int.Cl., D B 名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)