

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5651476号  
(P5651476)

(45) 発行日 平成27年1月14日(2015.1.14)

(24) 登録日 平成26年11月21日(2014.11.21)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z C C A
C 40 B 40/10	(2006.01) C 40 B 40/10 Z N A
C 40 B 40/08	(2006.01) C 40 B 40/08
C 12 P 21/00	(2006.01) C 12 P 21/00 C
C 07 K 14/00	(2006.01) C 07 K 14/00

請求項の数 20 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-538789 (P2010-538789)	(73) 特許権者 307015286 アフィボディ・アーベー
(86) (22) 出願日	平成20年12月22日(2008.12.22)	スウェーデン国 S E - 1 6 1 0 2 プロン
(65) 公表番号	特表2011-509073 (P2011-509073A)	マ. ボックス 2 0 1 3 7
(43) 公表日	平成23年3月24日(2011.3.24)	(74) 代理人 100127926 弁理士 結田 純次
(86) 國際出願番号	PCT/EP2008/068168	(74) 代理人 100140132 弁理士 竹林 則幸
(87) 國際公開番号	W02009/080811	(72) 発明者 ラーシュ・アブラフムセン スウェーデン国 E S - 1 6 8 5 8 プロン
(87) 國際公開日	平成21年7月2日(2009.7.2)	マ. リーベンクスガータン 2 8
審査請求日	平成23年11月25日(2011.11.25)	(72) 発明者 ニーナ・ヘルネ スウェーデン国 E S - 1 1 7 6 2 ストックホルム、ニーボダリンイエン 6 4
(31) 優先権主張番号	07150394.0	
(32) 優先日	平成19年12月21日(2007.12.21)	
(33) 優先権主張国	欧洲特許庁(EP)	
(31) 優先権主張番号	61/009, 171	
(32) 優先日	平成19年12月26日(2007.12.26)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】所定のスカフォールドを有するポリペプチドライブラー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

共通のスカフォールドに基づくポリペプチド変異体の集団であって、該集団中の各ポリペプチドは、スカフォールドアミノ酸配列

【化1】

EXXXAXX**EIX XLPNLTXQX XAFIXKLXDD PSQSSELLSE AKKLND**SQ,****

(配列番号1)

(ここで、各Xは、それぞれ該集団内で変化するアミノ酸残基に対応する)を含む、上記集団。

10

【請求項2】

請求項1に記載のポリペプチド変異体の集団であって、該スカフォールドアミノ酸配列が

【化2】

AKYAKEXXXAXX EIXX**LPNLTX XQXXAFIXKL XDDPSQSSEL**

**LSEAKKLND**SQ,****

(配列番号2)

(ここで、各Xは、それぞれ該集団内で変化するアミノ酸残基に対応する)

20

である、上記集団。

【請求項 3】

少なくとも  $1 \times 10^4$  のユニークなポリペプチド分子を含む、請求項 1 または 2 に記載の集団。

【請求項 4】

ポリヌクレオチド集団であって、それらの各メンバーが請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド集団のメンバーをコード化することを特徴とする、上記ポリヌクレオチド集団。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド集団と請求項 4 に記載のポリヌクレオチド集団との組み合わせであって、ここで、該ポリペプチド集団の各メンバーは、遺伝子型 - 表現型カップリング手段を介してそのメンバーをコード化するポリヌクレオチドと物理的または空間的に関連する、上記組み合わせ。

【請求項 6】

ポリペプチド集団から所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドを選択する方法であって、

( a ) 請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド集団を備える工程；  
( b ) ポリペプチド集団を、標的と標的に対する親和性を有する少なくとも 1 つの所望のポリペプチドとの間で特異性相互作用を可能にする条件下、所定の標的と接触させる工程；および

( c ) 該特異性相互作用に基づいて、残りのポリペプチド集団から少なくとも 1 つの所望のポリペプチドを選択する工程を含む、上記方法。

【請求項 7】

工程 ( a ) が、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド集団を備え、そして該ポリヌクレオチド集団を発現させて、該ポリペプチド集団を得る予備工程を含み、ここでポリペプチド集団の各メンバーが、遺伝子型 - 表現型カップリング手段を介してそのメンバーをコード化するポリヌクレオチドと物理的または空間的に関連する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを単離する方法であって、

- 該所望のポリペプチドおよびそれをコード化するポリヌクレオチドを、ポリペプチド集団から請求項 7 に記載の方法を使用して選択する工程；および  
- このように分離した、所望のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを単離する工程を含む、上記方法。

【請求項 9】

所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドを同定する方法であって、  
- 該所望のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを、請求項 8 に記載の方法を使用して単離する工程；および  
- ポリヌクレオチドを配列決定して、該所望のポリペプチドのアミノ酸配列を推論することにより確立する工程を含む、上記方法。

【請求項 10】

ポリペプチド集団から所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドを選択し、そして同定する方法であって、( a ) 分離担体またはビーズ上の請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド集団の各メンバーを合成し；( b ) 担体またはビーズを、ポリペプチドと所定の標的との相互作用に基づいて選択または濃縮し；そして ( c ) タンパク質キャラクタリゼーション方法により、該ポリペプチドを同定する工程を含む、上記方法。

【請求項 11】

所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドを生産する方法であって、  
- 請求項 9 に記載の方法を使用して、所望のポリペプチドを単離し、そして同定するか；

10

20

30

40

50

または、請求項 10 に記載の方法を使用して、所望のポリペプチドを選択し、そして同定する工程；および

- 該所望のポリペプチドを生産する工程  
を含む、上記方法。

【請求項 12】

所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドを生産する方法であって、  
(a 1) 請求項 8 に記載の方法を使用して、該所望のポリペプチドをコード化するポリ  
ヌクレオチドを単離する工程；または

(a 2) 請求項 10 に記載の方法を使用することにより同定されたポリペプチドを逆翻  
訳する工程；および

(b) (a 1) または (a 2) のいずれかに続いて、このように単離されたポリヌクレ  
オチドを発現させ、該所望のポリペプチドを生産する工程  
を含む、上記方法。

【請求項 13】

スカフォールドに基づいて第一のポリペプチドを生産する方法であって、  
所定の標的に対する親和性を有する第二のポリペプチドを備える工程（ここで、該第二  
のポリペプチドは、以下に示す S p A 由来の元のスカフォールドに基づく：

EXXXAXXEIX XLPNLNXQX XAFIXSLXDD PSQSANLLAE AKKLNDAQ）、および、

元のスカフォールドアミノ酸を突然変異させ、スカフォールドアミノ酸配列

【化 3】

**EXXXAXXEIX XLPNLTXQX XAFIXKLXDD PSQSSELLSE AKKLNDSQ,**

(配列番号 1)

（ここで、各 X は、それぞれ第二のポリペプチドから保存されるアミノ酸残基に対応する  
）を含む第一のポリペプチドを生成させる工程  
を含む、上記方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の方法であって、  
ここで、該第二のポリペプチドは、以下に示す S p A 由来の元のスカフォールドに基づ  
き：

NKFNK XXXAXXEIX XLPNLNXQX XAFIXSLXDD PSQSANLLAE AKKLNDAQ、また、

該第一のポリペプチドは、スカフォールドアミノ酸配列

【化 4】

**AKYAK XXXAXXEIX XLPNLTXQX XAFIXKLXDD PSQSSELLSE AKKLNDSQ,**

(配列番号 2)

（ここで、各 X は、それぞれ第二のポリペプチドから保存されるアミノ酸残基に対応する  
）を含む、  
上記方法。

【請求項 15】

第一のスカフォールドアミノ酸配列

【化 5】

**EXXXAXXEIX XLPNLTXQX XAFIXKLXDD PSQSSELLSE AKKLNDSQ,**

(配列番号 1)

（ここで、各 X は、以下に示す元のスカフォールドアミノ酸配列に基づく、所定の標的に  
対する親和性を有する第二のポリペプチド中の各 X に対応する：

EXXXAXXEIX XLPNLNXQX XAFIXSLXDD PSQSANLLAE AKKLNDAQ）を含む、

該所定の標的に対する親和性を有するポリペプチド。

10

20

30

40

50

## 【請求項 16】

第一のスカフォールドアミノ酸配列

## 【化 6】

AKYAK EXXXAXXEIX XLPNLTXXQX XAFIXKLXDD PSQSSELLSE AKKLNDSQ,

(配列番号 2)

(ここで、各 X は、以下に示す元のスカフォールドアミノ酸配列に基づく、所定の標的に対する親和性を有する第二のポリペプチド中の各 X に対応する：

NKFNK EXXXAXXEIX XLPNLNXXQX XAFIXSLXDD PSQSANLLAE AKKLNDAQ ) を含む、

請求項 15 に記載のポリペプチド。

10

## 【請求項 17】

検出試薬、捕捉試薬または分離試薬としての、請求項 15 または 16 に記載のポリペプチドの使用。

## 【請求項 18】

治療に使用するための、請求項 15 または 16 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 19】

診断剤として使用するための、請求項 15 または 16 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 20】

標的が TNF - 、インスリンおよび t a q - ポリメラーゼから選択される、請求項 15 または 16 に記載のポリペプチド。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、共通のスカフォールドに基づく新規なポリペプチド変異体の集団に関する。これらの集団は、とりわけ、新規な結合タンパク質およびポリペプチドを提供するのに使用され得る。

## 【背景技術】

## 【0002】

新規な結合タンパク質を構築するための様々な方法が記載されている（非特許文献 1）。1 つのストラテジーは、ライブラリー生成と所望の特性のスクリーニングまたは選択を組み合わせている。

30

## 【0003】

元の A f f i b o d y <sup>(R)</sup> 分子、このような分子の集団およびこのような分子のスカフォールドは、とりわけ、特許文献 1 に記載されており、この教示は参照により本明細書に加入される。

## 【0004】

いくつかの適用のための、改善された特性（例えば、アルカリ安定性、低い抗原性、構造的安定性、化学合成のし易さおよび親水性）を有するタンパク質、ポリペプチドまたは A f f i b o d y <sup>(R)</sup> 分子、このような分子の集団およびスカフォールドが記載されている。

40

## 【0005】

アルカリ安定性

タンパク質製剤および生物工学試薬の生産は、所望でない汚染物質を除去しながら、特定の生成物に濃縮（e n r i c h）するために、数回の生成工程を必要とする。タンパク性アフィニティーマトリクス（例えば、モノクローナル抗体およびブドウ球菌（S t a p h y l o c o c c a l）プロテイン A（S p A））により媒介されるアフィニティー精製は、1 工程での効率的精製を可能にする。しかし、費用効率を高めるために、アフィニティーマトリクスを適切に再生可能とすることが所望される。これは、通常、定置洗浄（C I P）として公知の手段に関し、ここで、試薬 - しばしばアルカリ溶液 - が、汚染物質を溶出するのに使用される。

50

## 【0006】

アルカリ安定性はまた、最も一般的なS P E C T 核種テクネチウム - 99mで標識され、そして実施されるいくつかの他の種類の化学修飾を可能にする分子像トレーサーを必要とする。

## 【0007】

## 低い抗原性

タンパク質ベースの製剤（例えば、治療的モノクローナル抗体およびA f f i b o d y<sup>(R)</sup>分子）は、ヒトにおいて所望でない免疫応答を引き起こす可能性を有する。免疫原性の一因となる主な因子は、不純物、タンパク質凝集体、外来エピトープ、例えば、新しいイディオトープ、異なるI g アロタイプまたは非自己配列の存在である。さらに、交差反応免疫グロブリン（I g）相互作用は、タンパク質製剤に対する特定のT細胞媒介性記憶免疫応答を生成する可能性が最も高い。免疫系との所望でない相互作用の危険性を最小化するために、製剤のタンパク質工学により既存の免疫エピトープを除去することが所望される。

10

## 【0008】

A f f i b o d y<sup>(R)</sup>分子は、ブドウ球菌（S t a p h y l o c o c c a l）プロティンA（S p A）由来であり、これは、グラム陽性菌黄色ブドウ球菌（S t a p h y l o c o c c a l a u r e u s）の表面上の細胞壁関連レセプターである。もっと正確に言えば、S p Aは、5つの高度相同ドメインからなり、この全ては、多くの哺乳動物種（ヒトを含む）の免疫グロブリンに結合する。各S p Aドメインは、2つの異なる方法；I g G 1、I g G 2 およびI g G 4 を含むF c に直接結合することにより（非特許文献2）、またはV H 3 ファミリーのメンバーに結合することにより（非特許文献3）ヒトI g と相互作用する。元のA f f i b o d y<sup>(R)</sup>分子の共通のスカフォールドは、G 2 9 A突然変異（この突然変異は、タンパク質安定性を増大し、そしてヒドロキシルアミン切断部位を除去するために含まれた）、およびドメイン間のスペーサー領域中に導入されるA 1 V突然変異を除外してS p AのドメインBと同一である（非特許文献4）。F c とV H 3との相互作用に関連するS p A中のアミノ酸残基は周知であり、そして文献に記載されている（非特許文献5）。異なるA f f i b o d y<sup>(R)</sup>分子の分子ライブラリーは、分子の1つの表面で表面残基（F c との相互作用に関連することが公知である残基を含む）をランダム化し、それにより、F c に対する親和性を除去することにより構築された。

20

## 【0009】

## 構造的安定性

ペプチドおよびタンパク質製剤を成功させるための鍵となる因子の1つは、タンパク質の安定性である。高い構造的安定性を示すタンパク質は、生産の間さらにヒト体内の両方で、化学修飾およびタンパク質分解に最も機能的に耐えるようである。さらに安定性は、ペプチドまたはタンパク質製剤の活性化貯蔵期間（a c t i v e s h e l f - l i f e）さらにヒト体内でのペプチドまたはタンパク質製剤の活性化期間（a c t i v e l i f e）に影響を与える。

## 【0010】

30

## 化学合成のし易さ

研究者は、伝統的に、生物学的方法によりタンパク質を得ているが、ペプチドおよび低分子タンパク質の化学合成は、有力な相補的ストラテジーであり、そして一般に、構造生物学、タンパク質工学および生物医学研究に使用される。タンパク質の化学合成は、生物学的汚染物質（例えば、D N A不純物および宿主細胞タンパク質）を含まない均一タンパク質を迅速かつ効率的に生産する方法を提供する。さらに、化学合成は、非天然アミノ酸の取り込み、化学修飾および生化学的および生物物理的プローブの導入を可能にすること、柔軟性が増す。ペプチドおよびタンパク質の化学合成の成功は、問題になっている分子のアミノ酸配列に依存する。特定のアミノ酸残基は、低効率なカップリングを示し、これは保証された成功を伴わない時間のかかるプロセスである、合成の間のいくつかの工程が最適化される必要があることを意味する。さらに、化学合成の間に効率的に導入しにくい

40

50

アミノ酸は、タンパク質配列が長いほどタンパク質収率により悪い影響を与える。

【0011】

増大した親和性

多くの適用について、ペプチドおよびタンパク質が低い凝集傾向を示す高溶解性であることが所望される。タンパク質製剤についていえば、このようなタンパク質特性は、特に重要である。タンパク質表面疎水性と低い安定性および凝集傾向の増加との間に強い正相関が存在する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

10

【特許文献1】WO 95/19374

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Nygren PA and Uhlen M (1997) Curr Opin Struct Biol 7:463-469

【非特許文献2】Langone JJ (1982) Adv Immunol 32:157-252

【非特許文献3】Silverman GJ et al (1992) Int Rev Immunol 9:57-78

【非特許文献4】Nilsson B et al (1987), Prot Eng 1:107-113

20

【非特許文献5】Graillie M et al (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97:5399-5404

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明の説明

新規なスカフォールドに基づくポリペプチド変異体の集団を提供することが本発明の目的である。

【0015】

30

これらの新規なスカフォールドは、既知の類似のスカフォールド（いわゆる、元のスカフォールド）と比較していくつかの利点を有する。利点はまた、これらの新規なスカフォールドを使用することで得られるポリペプチドにも適用される。これらの利点は、以下により詳細に議論されるが、いくつかの例はここに示される。例えば、アルカリ性環境において、高い安定性を示す新規なポリペプチドスカフォールドを開発するために、広範囲の研究が実施されている。アルカリ安定性の1つの局面は、アスパラギンの脱アミドに対する安定性である。構造的硬直性を増大させることにより、またはこの残基を置換することにより、この反応を回避することはまた、アスパラギンの脱アミドが分離しにくい不均一混合物の強い一因となる、例えば、発酵プロセスにおける生産または貯蔵の後に均一生成物を得ることに寄与する化学安定性を提供する。

40

【0016】

さらに、新規なスカフォールド配列において、免疫グロブリン（主にVH3媒介性）に対する残存アフィニティーを除去することにより、低い抗原性に関する改善されたプロファイル（ほとんどないIgG結合性）を得た。

【0017】

さらに、新規なスカフォールドは、容易に折り畳まれるらせん構造、高い融解温度およびタンパク質分解を標的する公知である部位の除去（abolishment）について、高い構造的安定性を示すように操作されている。

【0018】

元のAffibody<sup>(R)</sup>分子スカフォールドは、化学合成の速度および成功を減少さ

50

せることを示しているいくつかのアミノ酸を含む。効率的な、すなわちハイスループットおよび高収率の A f f i b o d y<sup>(R)</sup> タンパク質生産方法にするために、多数のアミノ酸が化学合成により適合する特性を有する残基に交換された。

【 0 0 1 9 】

親水性および安定性を改善するために、A f f i b o d y<sup>(R)</sup> 分子スカフォールドの表面上の疎水性残基はより親水性なアミノ酸に交換されている。

【 0 0 2 0 】

本発明の別の目的は、ポリヌクレオチド集団を提供することである。

【 0 0 2 1 】

本発明の別の目的は、ポリペプチド集団とポリヌクレオチド集団との組み合わせを提供することである。 10

【 0 0 2 2 】

本発明のさらなる目的は、ポリペプチド集団から所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドを選択するための方法を提供することである。

【 0 0 2 3 】

別の目的は、所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを単離する方法を提供することである。

【 0 0 2 4 】

別の目的は、所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドを同定する方法を提供することである。 20

【 0 0 2 5 】

さらなる目的は、所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドを選択し、そして同定する方法を提供することである。

【 0 0 2 6 】

関連する目的は、所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドを生産する方法を提供することである。

【 0 0 2 7 】

本発明に従う集団および方法は、所定の標的に特異的に結合することにより特徴付けられるポリペプチドの提供を通じて、所定の標的に対する親和性を有する薬剤の提供（生産および評価を含む）を可能にする。 30

【 0 0 2 8 】

ほとんど非特異的結合を示さない所定の標的に結合するポリペプチドを提供することもまた可能である。

【 0 0 2 9 】

融合ポリペプチド中の一部として容易に使用され得る所定の標的に結合するポリペプチドを提供することもまた可能である。

【 0 0 3 0 】

さらに、既存の抗体試薬で経験される 1 つまたはそれ以上の公知の問題を解決する所定の標的に結合するポリペプチドを提供することが可能である。

【 0 0 3 1 】

さらに、治療的および / または診断的適用に使用され易い所定の標的に結合するポリペプチドを提供することが可能である。 40

【 0 0 3 2 】

化学ペプチド合成により容易に作製される所定の標的に結合するポリペプチドを提供することもまた可能である。

【 0 0 3 3 】

さらに、本発明は、同じ標的に結合する公知の薬剤に対して改善された安定性を示す所定の標的に結合するポリペプチドの同定を可能にする。

【 0 0 3 4 】

哺乳動物において、インビボで使用される場合に低い抗原性を示し、そして / または哺 50

乳動物に投与される際、改善された生体内分布を示す所定の標的に結合するポリペプチドを提供することもまた可能である。

【0035】

これらおよび他の目的は、添付の特許請求の範囲において主張されるように、本発明の異なる局面により対処される。

【課題を解決するための手段】

【0036】

第一の局面において、本発明は、共通のスカフォールドに基づくポリペプチド変異体の集団を提供し、該集団中の各ポリペプチドは、スカフォールドアミノ酸配列

【化1】

10

**EXXXAXXEIX XLPNLTXQX XAFIXKLXDD PSQSSELLSE AKKLNDSQ,**

(配列番号1)

またはいくつかの場合において、より好ましくは

【化2】

**AKYAKEXXXAXX EIXXLPNLTX XQXXAFIXKL XDDPSQSSEL**

**LSEAKKLNDS Q,**

(配列番号2)

20

を含む。

【0037】

上記の配列において、各Xは、独立して、集団内で変化するアミノ酸残基に対応する。

【0038】

集団は、このようなポリペプチド分子の多数の変異体からなる。これに関連して、多数とは、少なくとも $1 \times 10^4$ のユニークなポリペプチド分子、または少なくとも $1 \times 10^6$ または少なくとも $1 \times 10^8$ または少なくとも $1 \times 10^{10}$ 、または少なくとも $1 \times 10^{12}$ 、または少なくとも $1 \times 10^{14}$ のユニークなポリペプチド分子を含む集団を意味する。しかし、所望の大きさの集団を提供するのに十分な大きさである群を使用することが必要である。本明細書中に記載される「集団」はまた、「ライブラリー」を示し得る。

30

【0039】

各Xが、独立して、変更されるアミノ酸残基に対応することが上記されている。これは、各Xが配列中のXで示される任意の他の残基の同一性から独立して、任意のアミノ酸残基であり得ることを意味する。スカフォールドアミノ酸配列において、任意のこれらの20の天然のアミノ酸残基が、任意の所定の変異体において、対応するX位置に存在し得るように、異なる変更されたアミノ酸Xは、20の天然のアミノ酸残基全てから選択され得る。各位置におけるアミノ酸の選択は、ほぼランダム化される。異なる変更されたアミノ酸残基が19、18、17、16または20未満の天然のアミノ酸残基から選択される群に限定することもまた可能である。異なる位置における変動性は、1(ランダム化がないことを意味する)から20までのアミノ酸全ての間で個別に調節され得る。導入されるデオキシリボヌクレオチド塩基の厳選により、アミノ酸のより小さいサブセットのランダム導入を得ることができ、例えば、ポリペプチド鎖中の所定の位置でセリンまたはチロシンのいずれかのランダム導入を得るために、コドンT(A/C)Cを導入し得る。同様に、ポリペプチド鎖中の所定の位置でフェニルアラニン、ロイシン、アラニンおよびバリンのランダム導入を得るために、コドン(T/C/A/G)CCを導入し得る。当業者は、ポリペプチド鎖中の所定の位置でアミノ酸の異なる組み合わせを得るために使用され得る多くの代替のデオキシリボムクレオチド塩基の組み合わせを承知している。ポリペプチド鎖中の所定の位置に現れ得る一連のアミノ酸はまた、オリゴヌクレオチド合成の間に、同時に1つのデオキシリボヌクレオチド塩基の代わりにトリヌクレオチドを導入することにより決定され得る。

40

50

## 【0040】

上記のスカフォールドアミノ酸配列を含むポリペプチドは、新規な *A f f i b o d y* (R) 分子である。それ自体、これらは、ブドウ球菌 (*S t a p h y l o c o c c a l*) プロテイン A (*S p A*) 由来である。これに関連して、「由来する」とは、ポリペプチドそれ自体が何らか必ず直接的に *S p A* が起源であることを意味しない。代わりに、スカフォールドが 1 つの *S p A* ドメイン (3 ヘリックスバンドルタンパク質の疎水性コア中にアミノ酸が保存されている) に類似する配列および構造を有することを意味する。

## 【0041】

本発明に従う集団を構成するポリペプチドの異なる修飾、および / またはこれらへの付加が、本発明の範囲から逸脱することなく、意図される特定の使用にポリペプチドを適合させるために実施され得る。このような修飾および付加が以下により詳細に記載され、そして同じポリペプチド鎖に含まれる追加のアミノ酸、または集団を構成するポリペプチドに化学的に抱合されるか、または別の方法で結合される標識および / もしくは治療薬を含み得る。いくつかの実施形態において、C 末端上の追加のアミノ酸残基が好ましくあり得る。これらの追加のアミノ酸残基は、ポリペプチドの結合において役割を果たし得るが、例えばポリペプチドの生産、精製、安定化、カップリングまたは検出の 1 つまたはそれ以上に関連する他の目的にも同様に十分役立ち得る。このような追加のアミノ酸残基は、化学的カップリングの目的で付加される 1 つまたはそれ以上のアミノ酸残基を含み得る。この一例は、ポリペプチド鎖の最初および最後の位置、すなわち N - または C - 末端でのシステイン残基の付加である。化学的カップリングに使用されるシステイン残基はまた、タンパク質ドメインの表面上、好ましくは、標的結合に関連しない表面の一部上の別のアミノ酸の置換により導入され得る。このような追加のアミノ酸残基はまた、ポリペプチドの精製または検出のための「タグ」、例えば、ヘキサヒスチジル (*H i s*6) タグ、またはタグに対して特異的な抗体との相互作用のための「*m y c*」タグもしくは「*F L A G*」タグを含み得る。当業者は、他の代替法を承知している。

## 【0042】

上述の「追加のアミノ酸残基」はまた、任意の所望の機能、例えば、別の結合機能、もしくは酵素機能、もしくは金属イオンキレート化機能、もしくは蛍光機能、またはそれらの組み合わせ (*m i x t u r e*) を有する 1 つまたはそれ以上のポリペプチドドメインを構成し得る。

## 【0043】

第二の局面において、本発明は、ポリヌクレオチド集団を提供する。この集団中の各ポリヌクレオチドは、上記のポリペプチド集団のメンバーをコード化する。

## 【0044】

第三の局面において、本発明は、本発明に従うポリペプチド集団と本発明に従うポリヌクレオチド集団の組み合わせを提供し、ここで、ポリペプチド集団の各メンバーは、遺伝子型 - 表現型カップリング手段を介するメンバーをコード化するポリヌクレオチドと物理的または空間的に関連する。この物理的または空間的な関連は、使用されるシステムに依存してほぼ厳密である。

## 【0045】

遺伝子型 - 表現型カップリング手段としては、ファージディスプレイシステムが挙げられ得る。ファージディスプレイシステムは当業者に周知であり、そして例えば、*S m i t h G P (1985) S c i e n c e 2 2 8 : 1 3 1 5 - 1 3 1 7* および *Bar b a s C F e t a l (1991) P r o c N a t l A c a d S c i U S A 8 8 : 7 9 7 8 - 7 9 8 2* に記載される。

## 【0046】

さらに、遺伝子型 - 表現型カップリング手段としては、細胞表面ディスプレイシステムが挙げられ得る。細胞表面ディスプレイシステムは、原核細胞、例えば、グラム陽性細胞、または真核細胞、例えば、酵母細胞を含み得る。細胞表面ディスプレイシステムは当業者に周知である。原核細胞系は、例えば、*F r a n c i s c o J A e t a l (19*

10

20

30

40

50

93) Proc Natl Acad Sci U S A 90:10444-104  
 48およびLee SY et al (2003) Trends Biotechnol  
 21:45-52に記載される。真核細胞系は、例えば、Boder ET et al (1997) Nat Biotechnol 15:553-557およびGai SA et al (2007) Curr Opin Struct Biol 17:467-473に記載される。

【0047】

さらに、遺伝子型 - 表現型カップリング手段としては、無細胞ディスプレイシステムが挙げられ得る。無細胞ディスプレイシステムとしては、リボソームディスプレイシステム、またはインビトロコンパートメント化(*in vitro compartmentalization*)ディスプレイシステム、またはシスディスプレイのためのシステム、または微粒子ディスプレイシステムが挙げられ得る。リボソームディスプレイシステムは当業者に周知であり、そして例えば、Mattheakis LC et al (1994) Proc Natl Acad Sci U S A 91:9022-9026およびZahnd C et al (2007) Nat Methods 4:269-279に記載される。インビトロコンパートメント化システムは当業者に周知であり、そして例えば、Sepp A et al (2002) FEBS Lett 532:455-458に記載される。シスディスプレイシステムは当業者に周知であり、そして例えば、Odegrip R et al (2004) Proc Natl Acad Sci U S A 101:2806-2810に記載される。微粒子ディスプレイシステムは当業者に周知であり、そして例えば、Nord O et al (2003) J Biotechnol 106:1-13に記載される。

【0048】

さらに、遺伝子型 - 表現型カップリング手段としては、非 - ディスプレイシステム、例えば、タンパク質 - フラグメント相補性試験 (PCA) が挙げられ得る。PCAシステムは当業者に周知であり、そして例えば、Koch H et al (2006) J Mol Biol 357:427-441に記載される。

【0049】

第四の局面において、本発明は、ポリペプチド集団から所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドを選択する方法を提供し、該方法は、以下：

- (a) 上記のポリペプチド集団を備える工程；
- (b) ポリペプチド集団を、標的と標的に対する親和性を有する少なくとも1つの所望のポリペプチドとの間で特異性相互作用を可能にする条件下、所定の標的と接触させる工程；および
- (c) 該特異性相互作用に基づいて、残りのポリペプチド集団から少なくとも1つの所望のポリペプチドを選択する工程を含む。

【0050】

この方法は、以下で本発明に従う選択方法と称される。

【0051】

工程(a)は、ポリヌクレオチド集団を提供し、そして前記ポリヌクレオチド集団を発現させ、該ポリペプチド集団を得る予備工程を包含し得る。ポリペプチド集団を得る手段は、使用されるディスプレイシステムによって変わり、そしてこのような手段の例としては、上記の遺伝子型 - 表現型参考文献に見出され得る。本発明に従う選択方法において使用される前記ポリペプチド集団の各メンバーは、遺伝子型 - 表現型カップリング手段を介するメンバーをコード化するポリヌクレオチドと物理的に関連し得る。遺伝子型 - 表現型カップリング手段は、上記されるものの1つであり得る。

【0052】

工程(b)は、標的と標的に対する親和性を有する少なくとも1つの所望のポリペプチドとの間で特異性相互作用を可能にする条件下、ポリペプチド集団を所定の標的と接触させる工程を含む。適用可能な条件の範囲は、標的のロバスト性、ディスプレイシステムの

10

20

30

40

50

ロバスト性により、および標的との相互作用の所望の特性により決定される。例えば、所定のpHまで酸性化することのような、相互作用を分離する特定の方法が望ましくあり得る。当業者は、適切な条件を決定するためにどのような実験が必要であるか理解している。

【0053】

工程(c)は、少なくとも1つのポリペプチドの選択を包含する。所定の標的と標的に対する親和性を有する少なくとも1つの所望のポリペプチドとの間の特異性相互作用に基づいて、残りの集団から所望のポリペプチドを選択する手段は、使用されるディスプレイシステムによって変わり、そして上記の遺伝子型-表現型参考文献に見出され得る。例えば、システム、例えば、ファージディスプレイおよびタンパク質フラグメントコンパートメント化アッセイと対照的に、インビボディスプレイ選択システムは無細胞である。

10

【0054】

第五の局面において、本発明は、所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを単離する方法を提供し、該方法は、以下：

- 所望のポリペプチドおよびそれをコード化するポリヌクレオチドを、ポリペプチド集団から本発明に従う選択方法を使用して選択する工程；および
- このように分離した、所望のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを単離する工程を含む。

【0055】

この方法は、以下で本発明に従う単離方法と称される。

20

【0056】

ポリペプチドからのポリヌクレオチドの分離は、選択のために使用されるディスプレイシステムに依存して別々になされ得る。例えば、無細胞ディスプレイシステム、例えば、シスディスプレイおよびリボソームディスプレイにおいて、ポリヌクレオチドまたは対応するmRNAは、上記の遺伝子型-表現型参考文献に記載される手段を使用してポリペプチドから有効な溶出により回収される。

【0057】

ポリヌクレオチドの単離は、選択のために使用されるディスプレイシステムに依存して別の方法でなされ得る。上記の選択システム(例えばタンパク質フラグメント相補性試験)のほとんどにおいて、ポリヌクレオチドは、適切なオリゴヌクレオチドを使用する特定のPCR增幅により直接単離され得る。例外的に、リボソームディスプレイにおいて見られるように、逆翻訳を使用して、ポリヌクレオチドを対応するmRNAから単離し得る。ポリヌクレオチドを単離するための種々の手段は、上記の遺伝子型-表現型参考文献において見出され得る。

30

【0058】

第六の局面において、本発明は、所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドを同定する方法を提供し、該方法は、以下：

- 所望のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを、本発明に従う単離方法を使用して単離する工程；および
- 該ポリヌクレオチドを配列決定して、該所望のポリペプチドのアミノ酸配列を推論することにより確立する工程を含む。

40

【0059】

ポリヌクレオチドの配列決定は、当業者に周知の標準的な手順に従ってなされ得る。

【0060】

第七の局面において、本発明は、ポリペプチド集団から所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドを選択し、そして同定する方法を提供し、該方法は、以下：

- (a) 分離担体またはビーズ上の該ポリペプチド集団の各メンバーを合成する工程；
- (b) 担体またはビーズを、ポリペプチドと所定の標的との相互作用に基づいて選択または濃縮する工程；および
- (c) タンパク質キャラクタリゼーション方法により、該ポリペプチドを同定する工程を

50

含む。

【0061】

工程(c)において、例えば、質量分析法が使用可能である。

この方法は、以下で本発明に従う選択および同定方法と称される。

【0062】

第八の局面において、本発明は、所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドを生産する方法を提供し、該方法は、以下：

- 本発明に従う選択方法または本発明に従う選択および同定方法を使用して、所望のポリペプチドを単離し、そして同定する工程；および
- 該所望のポリペプチドを生産する工程を含む。

10

【0063】

この方法は、以下で本発明に従う生産方法と称される。

【0064】

本発明に従う生産方法において、所望のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドの組換え発現を使用して、生産が実行され得る。生産はまた、所望のポリペプチドのデノボ化学合成を使用して実行され得る。

【0065】

第九の局面において、本発明は、所定の標的に対する親和性を有する所望のポリペプチドを生産する方法を提供し、該方法は、以下：

(a1) 本発明に従う単離方法を使用して、該所望のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを単離する工程；または

20

(a2) 本発明に従う選択および同定方法を使用して同定されたポリペプチドを逆翻訳する工程；および

(b) このように単離されたポリヌクレオチドを発現させ、該所望のポリペプチドを生産する工程を含み、ここで工程(b)は工程(a1)または工程(a2)のいずれかの後に実施される。

【0066】

ポリヌクレオチドの発現は、当業者に公知の任意の適切な発現宿主(例えば、これらに限定されないが、細菌性細胞、酵母細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞)においてなされ得る。

30

【0067】

「所定の標的に対する結合親和性」、「所定の標的に結合する」などのような表現は、親和性定数、すなわち、所定の抗原濃度で結合および解離するポリペプチドの量の決定により直接測定され得るポリペプチドの特性をいう。異なる方法を使用して、分子間相互作用をキャラクタリゼーションすることができ、これらの方法としては、例えば、競合分析、均衡分析および微小熱量分析、ならびに表面プラズモン共鳴相互作用に基づくリアルタイム相互作用分析(例えば、Biacore<sup>(R)</sup>機器を使用する)が挙げられるが、これらに限定されない。これらの方法は当業者に周知であり、そして例えば、Neri D et al (1996) Tibtech 14:465-470およびJansson M et al (1997) J Biol Chem 272:8189-8197に記載される。

40

【0068】

本発明者らは、所定の標的に結合し、任意の上記の方法により得られるポリペプチドが、同じ標的に結合する既知のポリペプチドと比較して、これらのすでに既知であるポリペプチドが標的に結合する能力を残したまま、1つまたはそれ以上の驚くべき利点を示し得ることを見出している。このような利点の非限定的な例は、次の通りである：

- ・所定の標的に結合し、そして任意の上記の方法により得られるポリペプチドは、ポリペプチド配列の化学合成において、低収率および低い成功率のような問題となり得るいくつかのアミノ酸残基、例えば、アスパラギン、アルギニン、アスパラギン酸およびメチオニンを含む。

50

・所定の標的に結合し、そして任意の上記の方法により得られるポリペプチドは、表面疎水性を与えるいくつかのアミノ酸残基を含む。これは低い安定性および凝集に関連するいくつかの問題を暗示する。理論に拘束されることなく、より親水性である特性は、宿主に投与される際、肝胆経路（肝臓による排出）からより所望される腎臓経路（腎臓による排出）へ、ポリペプチドの生体内分布をシフトするように作用すると現在考えられている。

・所定の標的に結合し、そして任意の上記の方法により得られるポリペプチドは、ポリペプチド安定性問題に関連するいくつかのアミノ酸残基、例えば、メチオニン、アスパラギンおよびジペプチドアスパラギン-プロリンを含む。メチオニンは、酸化され易く、アスパラギンは脱アミドされ易く、そしてアスパラギン-プロリン結合は酸開裂し易く、従って、これらは最終生成物の非均一性の一因となる。

・所定の標的に結合し、そして任意の上記の方法により得られるポリペプチドは、類似の配列において、V H 3 由来の重鎖可変ドメインを含む免疫グロブリンとの相互作用を増大させることが見出されているアミノ酸残基を欠損する (S i l v e r m a n G J (1992) 前出)。理論に拘束されることなく、所定の標的に結合し、そして任意の上記の方法により得られるポリペプチド中のこのようなアミノ酸残基の置換は、宿主に同じものを投与する際、ポリペプチドの抗原性を低下させると現在考えられている。

#### 【0069】

本発明のスカフォールドの利点のうち、アルカリ安定性、低い抗原性、構造的安定性、化学合成の改善された特性および/または増大した親水性が特に重要である。

#### 【0070】

所定の標的に結合し、そして任意の上記の方法により得られるポリペプチドは、検出試薬、捕捉試薬、分離試薬、インビボまたはインビトロでの診断のための診断用薬として、それ自体での治療薬としてまたは所定の標的に対する他の治療薬および/または診断用薬を標的化するための手段として使用され得る。インビトロで本発明に従うポリペプチドを利用する方法は、異なる形式、例えば、マイクロタイタープレート中、タンパク質アレイ中、バイオセンサー表面上、組織切片上などで実施され得る。

#### 【0071】

本発明に従う集団を構成するポリペプチドに対する上記の修飾はまた、任意の上記の方法により得られるポリペプチドに適用可能である。

#### 【0072】

本発明に従うポリペプチドは、任意の公知の手段により生産され得、この手段としては、化学合成または異なる原核生物または真核生物宿主（植物およびトランスジェニック動物を含む）での発現が挙げられる。

#### 【0073】

本発明は、これから、本発明に従って実施される実施例の記述により詳細に説明される。以下の実施例は、限定として解釈されない。この実施例において、添付の図について申し述べる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0074】

【図1】J a s c o J - 8 1 0 分光偏光計を使用するCD測定から得られた結果を示す。H i s<sub>6</sub> - Z<sub>T N F -</sub> : 3230の温度可変測定をP B S 緩衝液中 0 . 5 m g / m l で行なった。吸光度を2 2 1 n m で2 0 ~ 8 0 、5 / 分の温度傾斜を用いて測定した。1 m m の光路長を有するセルを使用した。H i s<sub>6</sub> - Z<sub>T N F -</sub> : 3230の融解温度 (T m) を温度可変測定から決定した。

【図2】実施例4に記載される選択の概観を示す。選択を2つの異なるトラック、高い標的濃度を有するもの（トラック1）および低い標的濃度を有するもの（トラック2）で行なった。標的濃度が各トラックおよびサイクルについて示され、さらに洗浄の回数（丸括弧内）が示される。

#### 【図3】H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 6 7 4 の 9 6 での加熱前（実線）および加熱後（点線）の 2

10

20

30

40

50

つのCDスペクトルのオーバーレイプロットである。

【図4】ポリペプチド変異体のバイアコア(Biaco re)分析の結果を示す；固定化ダイナザイム(Dynazyme)に対するHis<sub>6</sub>-Z04777(黒矩形)、His<sub>6</sub>-Z04687(黒三角)、His<sub>6</sub>-Z04665(白三角)、His<sub>6</sub>-Z04674(黒線)、His<sub>6</sub>-Z04781(灰色線)およびランニングバッファー(白矩形)の連続注入後に得られるセンサーグラム(sensorgram)。反応(RUにおける)を時間(s)に対してプロットした。

【図5A】アミノ酸残基18～58の合成段階で、配列maESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRCAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPKを有するポリペプチドの分析的HPLC溶出プロファイルを示す。位置22～23、41～42、45～46および53～54にシュードプロリンを使用して、ポリスチレン樹脂上で行なった合成。

【図5B】アミノ酸残基18～58の合成段階で、配列maESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRCAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPKを有するポリペプチドの分析的HPLC溶出プロファイルを示す。シュードプロリンを使用しないポリスチレン樹脂上で標準的ペプチド合成。

【図6A】アミノ酸残基1～58(A)および10～58(B)の合成段階で、配列maESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRCAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPKを有するポリペプチドの分析的HPLC溶出プロファイルを示す。位置22～23、41～42、45～46および53～54にシュードプロリンを使用して、ポリスチレン樹脂上で行なった合成。

【図6B】アミノ酸残基1～58(A)および10～58(B)の合成段階で、配列maESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRCAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPKを有するポリペプチドの分析的HPLC溶出プロファイルを示す。シュードプロリンを使用しないポリスチレン樹脂上で標準的ペプチド合成。

【図7A】配列A) AEAKYAKEMW IAWEETIRNLP NLNGWQMTAF IAKLLDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPKC(本発明に従う)およびB) AENKFNKEMW IAWEETIRNLP NLTGWQMTAF IASLLDDPSQ SANLLAEAKK LNDAQAPK(比較用)を有するポリペプチドの分析的HPLC溶出プロファイルを示す。

【図7B】配列A) AEAKYAKEMW IAWEETIRNLP NLNGWQMTAF IAKLLDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPKC(本発明に従う)およびB) AENKFNKEMW IAWEETIRNLP NLTGWQMTAF IASLLDDPSQ SANLLAEAKK LNDAQAPK(比較用)を有するポリペプチドの分析的HPLC溶出プロファイルを示す。

### 【実施例】

#### 【0075】

##### 実施例1 - コンビナトリアルポリペプチドライプラリーの構築

基本的にGroenwall et al(2007)J Biotechnol 128:162-183に記載されるように、黄色ブドウ球菌タンパク質A-誘導性タンパク質Z(Nilsson et al(1987、前出)のヘリックス1および2をコード化し、点突然変異N3A、F5Y、N6A、N23TおよびS33Kを有する特定の縮重コドンを有する123-ヌクレオチドの鋳型オリゴヌクレオチド(5'-GTA GAT GCC AAA TAC GCC AAA GAA NNN NNN NNN GCG NNN NNN GAG ATC NNN NNN TTA CCT AAC TTA ACC NNN NNN CAA NNN NNN GCC TTC ATC NNN AAA TTA NNN GAT GAC CCA AGC CAG AGC-3')のPCR増幅により、ポリペプチドのコンビナトリアルライプラリーを構築した。それぞれ、Xho I部位およびSac I部位(表1で下線を引く)を有するプライマ

10

20

30

40

50

- A F F I - 1 3 6 4 および A F F I - 1 3 6 5 を使用して、 P C R 増幅を行なった。

【 0 0 7 6 】

得られたライプラリーコード化遺伝子フラグメントを、 X h o I および S a c I で制限した。続いて、ライプラリーコード化遺伝子フラグメントを、点突然変異 A 4 2 S 、 N 4 3 E 、 A 4 6 S および A 5 4 S を有するヘリックス 3 をコード化するタンパク質 Z のアミノ酸残基 4 1 ~ 5 8 を備えたフレーム内で、ファージミドベクター p A f f i 1 ( G r o e n w a l l C e t a l ( 2 0 0 7 ) 、前出 ) に基本的に基づいて、ファージディスプレイ用に採用された X h o I - および S a c I - 制限ファージミドベクター ( p A Y 2 0 1 6 で示される ) 中にライゲーションした。2 つの相補的オリゴヌクレオチド A F F I - 1 3 3 3 および A F F I - 1 3 3 4 ( 表 1 ) のアニーリングにより、ヘリックス 3 を構築した。 10

【 0 0 7 7 】

得られたライプラリーベクターを、大腸菌 ( E s c h e r i c h i a c o l i ) 株 R R 1 M 1 5 ( R u t h e r U ( 1 9 8 2 ) N u c l A c i d s R e s 1 0 : 5 7 6 5 - 5 7 7 2 ) にエレクトロポレーションし、  $2.4 \times 10^{10}$  メンバーのライプラリーを得た。

【 0 0 7 8 】

M 1 3 K 0 7 ヘルパーファージ ( N e w E n g l a n d B i o l a b s , B e v e r l y , M A , U S A ) を含む標準的な手順を使用して、ライプラリーからのファージストックの調製を実施し、培養液 ( c u l t i v a t i o n ) 1 m l あたり約  $10^{11}$  c f u のファージ力値を型どおりに得た。 20

【 0 0 7 9 】

【表 1 】

表 1. オリゴヌクレオチドのリスト

名称	配列 5'-3'
AFFI-1333	AGCTCTGAATTACTGAGCGAAGCTAAAAGCTAAATGATAGCCAGGCGCCGA AAGTAGACTAC
AFFI-1334	GTAGTCTACTTTGGCGCCTGGCTATCATTAGCTTTAGCTTCGCTCAGT AATTCAAGAGCT
AFFI-1364	AAATAAA <u>CTCGAGGTAGATGCCAATACGCCAAAG</u>
AFFI-1365	TAAATAAT <u>GAGCTGGCTGGTCATC</u>

【 0 0 8 0 】

実施例 2 - ヒト H E R 2 結合ポリペプチド変異体のファージディスプレイ選択およびキャラクタリゼーション

要約

実施例 1 で構築したライプラリーを使用するファージディスプレイ選択における標的として、ビオチン化 H E R 2 タンパク質を使用する。 H E R 2 に対して高い親和性を有する分子を得る見込みを最大化するために、種々の条件を使用して選択を実行する。選択されたファージの溶出後、 E L I S A セットアップにおいて、対応する発現タンパク質の H E R 2 に対する親和性について試験する。陽性クローンを同定し、そして配列決定し、そして対応するポリペプチドの予測されるアミノ酸配列およびそれらの H E R 2 結合モチーフを推論し、これにより多数の H E R 2 結合分子の配列を得る。 40

【 0 0 8 1 】

H E R 2 のビオチン化

凍結乾燥したヒト H E R 2 タンパク質 ( R & D S y s t e m s , # 1 1 2 9 - E R )

50

を 10 mg / ml の最終濃度で PBS ( 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4 ) に溶解する。EZ-連結スルホ-NHS-LC-ビオチン ( Pierce, # 21335 ) を 1 mg / ml の最終濃度で水に溶解し、そして 5 および 30 倍のモル過剰を 0.5 ml の全体積中 HER2 ( 500 µg ) に添加する。混合物を室温 ( RT ) で 30 分間インキュベートする。透析カセット ( Slide-A-Lyser, 10 kDa ; Pierce ) を使用して PBS 対して透析することにより、未結合のビオチンを除去する。

【 0082 】

ファージディスプレイ選択

次第にストリンジエントになる条件 ( 例えば HER2 濃度の減少および洗浄回数の増加 ) を使用して、全体で、5 ラウンドの選択を実行する。主に適切な選択プロトコルを確立する目的で最初の 3 ラウンドを行なう。次いで、表 2 に掲記される選択緩衝液、標的濃度および固体支持体の組み合わせを使用して、さらに 2 サイクルの選択を実行する。

【 0083 】

【表 2】

表 2 : HER2 選択ための選択条件

	サンプル名	選択緩衝液 の補助剤	標的濃度 (nM)	ストレプトアビシン ビーズ (µg)
サイクル 4	A	ゼラチン	20	100
	B	ゼラチン	10	100
	C	BSA	5	100
	D	BSA	2.5	100
サイクル 5	A	ゼラチン	10	50
	B	ゼラチン	5	50
	C	BSA	1	50
	D	BSA	0.5	50

10

20

30

【 0084 】

選択手順において使用される全てのチューブおよびビーズ ( Dynabeads<sup>(R)</sup> M-280 Streptavidin, # 112.06 ; Dynal ) を TPBSB ( 5 % ) ( PBS 中 0.05 % Tween 20, 5 % ウシ血清アルブミン ( BSA )、0.02 % アジ化 Na ) またはゼラチン ( 0.5 % ) 中、 RT で少なくとも 30 分間プレブロック ( pre-block ) する。

【 0085 】

表 2 に従うビオチン化ヒト HER2、ファージ、アジ化 Na ( 0.02 % )、Tween 20 ( 0.05 % )、および BSA ( 3 % ) またはゼラチン ( 0.1 % ) のいずれかを含む選択溶液 ( 1 ml ) を PBS 中で調製する。ファージをビオチン化ヒト HER2 標的と共に 4 でサイクル 4 について 3 日間およびサイクル 5 について 1 日間インキュベートし、次いで、RT で攪拌下 1 時間インキュベートする。選択サンプルをブロックしたストレプトアビシンビーズに RT で攪拌下 15 分間で移す。ビーズを選択緩衝液 ( すなわち、TPBSB ( 3 % ) ( PBS 中 0.05 % Tween 20, 3 % ウシ血清アルブミン ( BSA )、0.02 % アジ化 Na ) または GT 0.1 ( PBS 中 0.1 % ゼラチン、0.1 % Tween 20 および 0.02 % アジ化 Na ) ) ( 1 ml ) で 10 回洗浄し、次いで PBS で 10 回洗浄し、2 回目の最後の洗浄は 5 分間行なう。ファージを、RT の 50 mM グリシン - HCl、pH 2.2 ( 1000 µl ) で 10 分間溶出し次いで 1 M Tris - HCl ( 100 µl ) を補充した PBS ( pH 8.0 ) ( 9

40

50

0 0  $\mu$  l ) すぐに中和するか、または R T のトリプシン ( 2 m g / m l ) ( 1 0 0 0  $\mu$  l ) で 3 0 分間溶出し、次いでアプロチニン ( 0 . 4 m g / m l ) ( 1 0 0 0  $\mu$  l ) を添加する。選択の各サイクルの後、溶出したファージ ( 3 / 4 の体積 ) を使用して、対数期の大腸菌 R R 1 M 1 5 細胞 ( Rue ether, 1 9 8 2, 前出 ) ( 5 0 m l ) に感染させる。3 7 で 3 0 分間穏やかに攪拌しながらインキュベートし、そして 3 0 分間激しく攪拌した後、細胞を遠心分離し、そしてペレットをより少ない体積に溶解し、そして T Y E プレート ( 1 5 g / l 寒天、 1 0 g / l トリプトン水 ( Merck ) 、 5 g / l 酵母エキス、 3 g / l N a C l 、 2 % グルコースおよび 1 0 0  $\mu$  g / m l アンピシリンを補充している ) 上に塗り、そして最後に 3 7 で一晩インキュベートする。

## 【 0 0 8 6 】

10

## ファージストック調製

プレートからの細胞を T S B 培地 ( 3 0 g / l トリプティックソイプロス ) に再懸濁し、そして  $OD_{600} = 1$  が  $5 \times 10^8$  細胞 / m l に対応すると仮定して、 6 0 0 n m での光学密度を測定することにより細胞濃度を決定する。細胞を 2 % グルコースおよび 1 0 0  $\mu$  g / m l アンピシリンを補充した T S B + Y E 培地 ( 1 0 0 m l ) に植菌し ( 溶出ファージと比較して、細胞の約 1 0 0 倍過剰 ) 、 3 7 で約  $OD_{600} = 0 . 5 \sim 0 . 7$  まで増殖させる。その後、 1 0 m l を新しいフラスコに移し、そして 1 0 倍モル過剰の M 1 3 K 0 7 ヘルパーファージ ( New England Biolabs, # N O 3 1 5 S ) を感染させ、そして静かに攪拌しながら 3 0 分間インキュベートする。細胞を 1 0 分間 2 0 0 0 g でペレット化し、そして 1 0 0  $\mu$  M イソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド ( I P T G ) 、 5 0  $\mu$  g / m l カナマイシンおよび 1 0 0  $\mu$  g / m l アンピシリンを補充した T S B + Y E 培地 ( 1 0 0 m l ) に再懸濁し、そして 1 0 0 r p m および 2 5 で一晩増殖させる。再懸濁した細胞の一部をグリセリンストックとして - 8 0 で保存する。

## 【 0 0 8 7 】

20

一晩培養物を 2 5 0 0 g で 1 0 分間遠心分離し、そしてシの体積の沈殿緩衝液 ( 2 0 % P E G / 2 . 5 M N a C l ) を添加することにより上清中のファージを沈殿させ、そして 1 時間氷上でインキュベートする。 1 0 0 0 0 g 、 4 で 3 0 分間遠心分離することにより、沈殿したファージをペレット化し、 P B S ( 2 0 m l ) に再懸濁し、その後、沈殿手順を繰り返す。最後にファージを P B S ( 1 m l ) に再懸濁し、そして 0 . 4 5  $\mu$  m フィルターに通して濾過する。

30

## 【 0 0 8 8 】

選択の各ラウンド後に、選択溶液、洗浄溶液および溶出溶液を滴定する。ファージ溶液をマイクロタイヤプレート中の滅菌水に希釈し、そして対数期の大腸菌 R R 1 M 1 5 細胞 ( 1 0 0  $\mu$  l ) を各ファージ希釈液に添加する。 R T で 2 0 分間インキュベートした後、各滴定から 5  $\mu$  l を T Y E プレートに移し、そして 3 7 で一晩インキュベートする。得られたコロニーを計数し、そして力価 ( c f u / m l ) を計算する。

## 【 0 0 8 9 】

## H E R 2 結合の E L I S A 分析

40

以下の実施例 4 に記載されるように ( しかし、標的タンパク質として H E R 2 を使用する ) 、または以下に記載されるように、最終選択サイクルからのクローンを発現させ、そして E L I S A セットアップを使用して、 H E R 2 結合活性についてスクリーニングする。 1 0 0  $\mu$  g / m l アンピシリンおよび 1 m M I P T G を補充した T S B + Y E 培地 ( 1 m l ) 中に各コロニーを植菌することにより、ランダムに採取したコロニーを 9 6 ディープウェルプレート中で発現させ、そして 3 7 で 1 8 ~ 2 4 時間増殖させる。インキュベート後、 - 2 0 で保存するために、 1 5 % グリセリンを含む 9 6 ウェルプレートに各培養物の少量の画分を移すことにより、複製プレートを作製する。

## 【 0 0 9 0 】

残りの細胞を 3 0 0 0 g で 1 0 分間の遠心分離によりペレット化し、 P B S - T 0 . 0 5 ( 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 ) を補充した P B S ( 4 0 0  $\mu$  l ) に再懸濁し、そ

50

して-80で凍結する。凍結したサンプルを水浴中で解かし、そして細胞を3700gで少なくとも20分間ペレット化する。発現した分子を含む上清を集め、そしてELISAに使用する。

【0091】

ハーフエリアマイクロタイターウェル(Costar、#3690)を、ELISAコーティング緩衝液(Sigma、#3041)中6 $\mu$ g/mlの濃度のHSA(50 $\mu$ l)で4で一晩コーティングする。ウェルをブロッキング緩衝液(PBS中2%脱脂粉乳)(100 $\mu$ l)を用いてRTで2時間ブロックする。ブロッキング緩衝液を除去した後、調製したタンパク質(50 $\mu$ l)をウェルに添加し、そしてプレートをRTで1.5時間インキュベートする。上清を廃棄し、そしてPBS-T 0.05中0.5~10 $\mu$ g/mlの濃度のビオチン化HER2をウェルに添加し、そして1.5時間インキュベートする。結合複合体をPBS-T 0.05に1:5000で希釈し、RTで1時間インキュベートした西洋ワサビペルオキシダーゼ複合ストレプトアビシン(HRP、Dak o、#P0397)を用いて検出する。ImmunoPure<sup>(R)</sup> TMB基質(Pierce、#34021)(50 $\mu$ l)をウェルに添加し、そしてプレートを製造業者の推奨に従って処理する。ウェルの吸光度をTecan Ultra 384 ELISAリーダー(Tecan)中450nmで読み取り、そしてMagellan v.5.0ソフトウェア(Tecan)を使用して評価する。各新しい試薬を添加する前に、PBS-T 0.05で洗浄を4回行う。

【0092】

この実験結果に基づいて、配列決定するために、次に記載されるようにクローンを採取する。

【0093】

ELISA陽性クローンの配列決定

適切なオリゴヌクレオチドを使用して、選択したコロニー由来のPCRフラグメントを増幅させる。製造業者の推奨に従って、BigDye<sup>(R)</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を使用し、そして適切なビオチン化オリゴヌクレオチドを用いて、増幅したフラグメントの配列決定を行なう。Magnatrix 8000 機器(Magnetic Biosolutions)を使用して、Dynabeads<sup>(R)</sup> REGEN<sup>TM</sup>ストレプトアビシンコート化常磁性ビーズに結合させることにより、配列決定反応物を精製し、そして最後にABI PRISM<sup>(R)</sup> 3100 Genetic Analyser(Applied Biosystems)で分析する。

【0094】

プラスミドpAY1448へのサブクローニング

選択したDNAコード化物(DNA encoding)およびHER2-特異的分子を発現ベクター発現ベクター-pAY1448中にサブクローニングし、MGSSHHHHHHHLQ-[Z#####]-VD(His<sub>6</sub>-Z#####)として発現されるHis<sub>6</sub>-タグ化単量体分子を作出し、ここで、Z#####は、変異体分子の出発集団の同定されたメンバーを表す。製造業者の推奨に従って、Qiagen Mini Kit(Qiagen)を使用して、挿入物を含むプラスミドを100 $\mu$ g/mlアンピシリンを補充したTSB中の大腸菌RR1 M15細胞の一晩培養物(2ml)から精製する。

【0095】

適切なPCRプライマー対を使用するAccI-NotI PCR付着末端クローニングにより、選択された分子のDNAを発現ベクター-pAY1448中にサブクローニングする。

【0096】

発現ベクター-pAY1448をそれぞれ、NEB4およびNEB3緩衝液(New England Biolabs)中AccIおよびNotIを使用して、37で4時間2工程で消化し、そしてコウシ腸アルカリホスファターゼ(CIAP; Ferment

10

20

30

40

50

as)を用いて37で1時間脱リン酸化する。切断したプラスミドおよびフラグメントを、製造業者の推奨に従って、QIAquick PCR精製キット(Qiagen)により精製する。

【0097】

PCR産物をハイブリダイズし、そしてT4 DNAリガーゼ(5単位/μl; Fermentas)を使用して、RTで1時間AccI-NotI消化および脱リン酸化pAY1448にライゲーションする。ライゲーションのアリコートを大腸菌BL21(DE3)細胞にエレクトロポレーションする。50μg/mlカナマイシンを補充したトリプトース血液寒天基礎培地(TBAB)プレート上に細胞をプレーティングし、そして37で一晩インキュベートする。陽性クローニングを始めにPCRスクリーニングで挿入について検証し、次いで上記のように正しい配列(correct sequence)について分析する。

10

【0098】

His<sub>6</sub>-タグ化ポリペプチドの発現および精製

上記のように全てをpAY1448にサブクローニングした選択分子を、N-末端His<sub>6</sub>-タグへの融合として大腸菌BL21(DE3)中で発現させ、そしてIMACにより精製する。各分子のコロニーを使用して、50μg/mlカナマイシンを補充したTSB培地(5ml)に植菌する。培養物を37で一晩増殖させる。翌日、各培養物(50μl)を、1リットルフラスコ中の50μg/mlカナマイシンを補充したTSB+YE培地(100ml)に別々に植菌する。培養物を100rpm、37で0.7~1のOD<sub>600</sub>まで増殖させ、その後、IPTGを0.5mMの最終濃度で添加し、そして細胞を100rpm、RTで一晩インキュベートする。8000gで5分間の遠心分離により培養物を採取し、そしてペレットをタンパク質調製まで冷凍庫中で保存する。

20

【0099】

1.5ml Ni-NTA Superflowカラム(Qiagen)を使用して、変性条件下、His<sub>6</sub>-タグ化タンパク質をIMAC精製する。PD-10カラム(GE Healthcare)を使用して、緩衝液をPBSに交換する。

【0100】

製造業者に推奨されるように、A<sub>280</sub>およびBCA Protein Assay Reagent Kit(Pierce)を使用して、タンパク質濃度を決定する。クマシブルーRで染色したSDS-PAGEによりタンパク質の純度を分析する。

30

【0101】

ヒトHER2に対する選択分子の親和性のバイオセンサー分析

製造業者の推奨に従って、CM-5チップ(研究グレード(research grade); GE Healthcare)の表面上のカルボキシル化されたデキストラン層上へのアミンカップリングにより固定化されたヒトHER2を用いて、Biacore 2000機器(GE Healthcare)でのバイオセンサー分析を行なう。チップ上の表面1を活性化し、そして失活させ、そして注入の間、参照細胞として使用する。上記のように発現させ、そして精製した選択分子を25nMでHBS-EP(GE Healthcare)に希釈し、そして25μl/分の一定流速で10分間注入し、次いでHBS-EP中で30分間解離させる。表面を25mM HClの2回の注入で再生させる。

40

【0102】

実施例3-元のおよび本発明のスカフォールド変異体のクローニング、生産ならびに融解温度およびインビトロ抗原性の評価

要約

この実施例は、元のおよび本発明のスカフォールド変異体のクローニング、生産および評価を記載する。導入されたスカフォールド突然変異は、ポリペプチド分子のいくつかの特性、例えば抗原性、親水性ならびにアルカリ安定性および構造的安定性を改善すると考えられている。従って、種々の分子を、融解温度およびインビトロ抗原性について評価し、そして結果は、元の分子と比較して、本発明の分子が融解温度を上昇させ、そしてより

50

低下したインビトロ抗原性（より低い Ig G 結合性）を有することを示した。

【0103】

ポリペプチドのクローニング

元の構築物について、腫瘍壞死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、HER2、インスリン、Taq ポリメラーゼおよび血小板由来増殖因子受容体 (PDGF-R) に特異的な DNA 配列コード化分子（表3）を各2つの別個の反応 (PCR1 および PCR2) において、PCR により増幅させた。5' - 末端に AccI 制限酵素認識部位の一部をコード化するプライマー対 AFFI-267 / AFFI-1014 および AFFI-1015 / AFFI-270（表4）を、それぞれ、PCR1 および PCR2 に適用した。プラスミド鑄型を調製するために、プラスミドDNAを含む細菌を 50 μg / ml カナマイシンを補充した TSB 培地中で一晩増殖させた。遠心分離により細胞をペレット化し、そして QIA prep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を使用してプラスミドを調製した。

【0104】

本発明の構築物について、鑄型として部分的重複オリゴヌクレオチド (AFFI-1320 - AFFI-1323、AFFI-1326 および AFFI-1327) を使用するか、または元の構築物および関連する突然変異を含むオリゴヌクレオチドを有するベクター (AFFI-69、AFFI-70、AFFI-11151 および AFFI-11152)（表4）を使用して、修飾された本発明の分子をコード化するヌクレオチド配列の PCR 増幅 (PCR1 および PCR2) を行なった。5' - 末端に AccI 制限酵素認識部位の一部をコード化するプライマー対 AFFI-1328 / AFFI-1331 および AFFI-1329 / AFFI-1330 が、PCR 反応物中に含まれた。

【0105】

標準 PCR プロトコルに従って、Pfu Turbo DNA ポリメラーゼ (Stratagene、#600854-52) を使用して、PCR 反応物を増幅させ、そして PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動により分析した。

【0106】

多様なコドンを有するオリゴヌクレオチドおよび PCR ベースの突然変異誘発技術を使用して、PDGF-R 結合 Z 变異体を生成させた。In-Fusion 技術 (Clontech、#639607) を使用して、得られた PCR フラグメントを切断発現ベクター中にライゲーションした。

【0107】

全ての構築物について、上流および下流の AccI 付着末端を含む DNA フラグメントを生成させるために、電磁ストレプトアビジンビーズを使用して、PCR1 および PCR2 産物の順方向および逆方向のヌクレオチド鎖を分離した。持続回転の下、RT で 30 分間インキュベートした後、ビーズを洗浄緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM DTT) で洗浄し、そして 95 °C で 5 分間加熱した。非 - ビオチン化フラグメントを含む上清を集め、そして 95 °C で加熱し、次いで、DNA 鎖をハイブリダイズするために、25 °C で 30 分間段階的に冷却した。

【0108】

その後、結合分子をコード化する DNA フラグメントを、CIP - 処理し (コウシ腸アルカリホスファターゼ)、そして精製した発現ベクター (予め AccI 制限酵素で消化している) 中に RT で、2 時間または一晩のいずれかでライゲーションした。得られた構築物は、MGSSHHHHHLQ - [Z# #####] - VD、MGSSLQ - [Z# ## ##] - VDC (Z<sub>PDGF-R</sub> : 2465 について) または M - [Z# #####] - C (Z<sub>PDGF-R</sub> : 3358 について) であった。

【0109】

ライゲーション物 (ligation) をエレクトロコンピテントな大腸菌 TOP10 細胞に形質転換し、そして実施例 2 に記載されるようにプレート上で培養した。新しく構築されたプラスミドを含む細菌コロニーを PCR スクリーニングし、そして挿入 DNA

配列を実施例 2 に記載されるように検証した。

【0110】

検証したプラスミドを、前述のように調製した。

【0111】

ポリペプチドの発現

関連するプラスミドを用いて形質転換された大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) 培養物を、 5 0  $\mu$  g / m l カナマイシンおよび 0 . 3 m l / l 消泡剤 ( B r e o x F M T 3 0 ) を補充した T S B - Y E 培地 ( 8 0 0 m l ) 中に植菌し、そして約 2 の O D 6 0 0 まで 3 7 で増殖させた。次いで、 0 . 5 m M の最終濃度で 1 M I P T G を添加することにより、タンパク質発現を誘導した。マルチ発酵槽 ( m u l t i f e r m e n t e r ) システム G r e t a ( B e l a c h ) を使用して、培養を行なった。誘導の 5 時間後、 1 5 9 0 0  $\times$  g で 2 0 分間の遠心分離により培養物を採取した。上清を廃棄し、そして細胞ペレットを回収し、そして - 2 0 で保存した。 S D S - P A G E および染色ゲルの目視検査 ( o c u l a r i n s p e c t i o n ) を使用して、タンパク質発現レベルを決定した。

【0112】

発現したポリペプチドの精製

H i s<sub>6</sub> タグを含むタンパク質を以下のように精製した：可溶性 H i s<sub>6</sub> タグ化ポリペプチドを含むペレット化した細菌細胞を H i s G r a v i T r a p 結合緩衝液 ( 2 0 m M リン酸ナトリウム、 0 . 5 M N a C l 、 2 0 m M イミダゾールおよび 4 0 U / m l B e n z o n a s e<sup>(R)</sup> ) に懸濁し、そして超音波処理により破碎した。清澄化した後、上清を予め H i s G r a v i T r a p 結合緩衝液で平衡化した H i s G r a v i T r a p カラム ( G E H e a l t h c a r e ) にロードした。 1 0 カラム体積 ( C V ) の H i s G r a v i T r a p 洗浄緩衝液 ( 2 0 m M リン酸ナトリウム、 0 . 5 M N a C l 、 6 0 m M イミダゾール ) でカラムを洗浄した後、ポリペプチドを 3 C V H i s G r a v i T r a p 溶出緩衝液 ( 2 0 m M リン酸ナトリウム、 0 . 5 M N a C l 、 5 0 0 m M イミダゾール ) で溶出した。

【0113】

H i s<sub>6</sub> タグを含まないタンパク質を以下のように精製した：可溶性 Z<sub>PDGF-R : 2465</sub> - C y s または Z<sub>PDGF-R : 3358</sub> - C y s を含むペレット化した細菌細胞を 2 0 m M T r i s - H C l ( p H 7 . 1 ) に懸濁した。細胞を破碎し、そして細胞内内容物を放出させるために、細胞懸濁液を 8 5 で 3 分間加熱した。遠心分離により溶解物を清澄化し、続いて濾過し、そして予め 2 0 m M T r i s - H C l ( p H 7 . 1 ) で平衡化した X K 2 6 カラム ( G E H e a l t h c a r e ) 中にパックされた 2 5 m l Q S e p h a r o s e F F ( G E H e a l t h c a r e ) にロードした。 5 C V 2 0 m M T r i s - H C l ( p H 7 . 1 ) でカラムを洗浄した後、結合タンパク質を 1 0 C V の間、 2 0 m M T r i s - H C l ( p H 7 . 1 ) 中 0 ~ 0 . 5 M N a C l の直線グラジエントで溶出した。流速は 5 m l / 分であり、そして 2 8 0 n m シグナルをモニターした。 Z<sub>PDGF-R : 2465</sub> - C y s または Z<sub>PDGF-R : 3358</sub> - C y s を含む画分を S D S - P A G E 分析により同定した。関連する画分をプールし、そして 5 0 m M の最終濃度で 1 M T r i s - H C l ( p H 8 . 0 ) を添加することにより、 p H を 8 . 0 に調整した。 2 0 m M までの D T T を添加し、次いで 4 0 で 3 分間インキュベートし、構築物上の C - 末端システインを還元した。還元後、 5 % の最終濃度でアセトニトリル ( A C N ) を添加し、そして還元 Z<sub>PDGF-R : 2465</sub> - C y s または Z<sub>PDGF-R : 3358</sub> - C y s を予め R P C A 緩衝液 ( 0 . 1 % T F A 、 5 % A C N 、 9 5 % 水 ) で平衡化した 1 m l R e s o u r c e 1 5 R P C カラム ( G E H e a l t h c a r e ) にロードした。 1 0 C V R P C A 緩衝液でカラムを洗浄した後、結合タンパク質を 0 ~ 4 0 % R P C B 緩衝液 ( 0 . 1 % T F A 、 8 0 % A C N 、 2 0 % 水 ) の直線グラジエントで溶出した。流速は 1 m l / 分であり、そして 2 8 0 n m シグナルをモニターした。純粋な Z<sub>PDGF-R : 2465</sub> - C y s または Z<sub>PDGF-R : 3358</sub> - C y s を含む画分を S D S - P A G E 分析

により同定し、そしてプールした。

【0114】

タンパク質の凍結乾燥を可能にするために、使い捨てPD-10脱塩カラム(GE Health care)を使用して、緩衝液を10mM炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH 8.0)、または10mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 6.0)のいずれかに交換した。関連するタンパク質の等電点に対して凍結乾燥緩衝液を選択した。最後に、Christ Alpha 2-4 LSC機器を使用して、結合ポリペプチドHis<sub>6</sub>-Z<sub>TNF-</sub>:185、His<sub>6</sub>-Z<sub>HER2:342</sub>、His<sub>6</sub>-Zインスリン:810、His<sub>6</sub>-Z<sub>Taq:115</sub>、Z<sub>PDGF-R</sub>:2465-Cys、His<sub>6</sub>-Z<sub>HER2:2628</sub>、His<sub>6</sub>-Z<sub>Taq:3229</sub>、His<sub>6</sub>-Z<sub>TNF-</sub>:3230、His<sub>6</sub>-Zインスリン:3232およびZ<sub>PDGF-R</sub>:3358-Cysを凍結乾燥させ、使用するまで4で保存した(表5)。製造業者(Pierce)の推奨に従つて、N-エチルマレイミド(ethylmaleimide)(NEM)を使用して、遊離のC-末端システインをブロックした。

【0115】

精製したポリペプチドの分析

NanoDrop<sup>(R)</sup> ND-1000分光光度計を使用して、280nmでの吸光度を測定することにより、ポリペプチド溶液の濃度の決定を行なった。タンパク質をさらにSDS-PAGEおよびLC-MSで分析した。

【0116】

SDS-PAGE分析について、ポリペプチド(約10μg)を LDSサンプル緩衝液およびDTT(45mM最終濃度)と混合し、70で15分間インキュベートし、そしてNuPAGE<sup>(R)</sup> 4~12% Bis-Trisゲル上にロードした。分子量マーカーとしてSeeBlue<sup>(R)</sup> Plus2 Prestained Standardおよび染色のためにPageBlue<sup>TM</sup> Protein Staining Solutionを利用して、Novex Mini-Cell中MES SDSランニング緩衝液を用いてゲルを走らせた(run)。

【0117】

ポリペプチドの同定を検証するために、API-ESIを備えたAgilent 1100 LC/MSDシステムおよびシングル四重極質量分析器(single quad rupture mass analyzer)を使用して、LC/MS分析を行なった。緩衝液交換の後、タンパク質サンプルを0.5mg/mlの最終濃度で凍結乾燥緩衝液に希釈し、そして10μlを0.5ml/分の流速で、Zorbax 300SB-C8 Narrow-Boreカラム(2.1×150mm, 3.5μm)にロードした。0.5ml/分で30分間、10~70%溶液Bの直線グラジエントを使用して、タンパク質を溶出した。30で分離を行なった。イオンシグナルならびに280および220nmでの吸光度をモニターした。イオンシグナルの分析により、精製タンパク質の分子量を決定した。

【0118】

融解温度(Tm)の決定

凍結乾燥ポリペプチドを約0.5mg/mlの最終濃度でPBSに溶解し、そして氷上で保存した。1mmの光路長を有するセルにおいて、Jasco J-810分光偏光計でCD分析を行なった。温度可変測定において、5/分の温度傾斜を用いて、吸光度を221nm、20~80で測定した。CD対温度プロットにおける転移(transition)の中間点を決定することにより、試験ポリペプチドについての融解温度(Tm)を計算した。

【0119】

本発明に従つて修飾されたポリペプチド分子は、元の分子と比較して融解温度を上昇させた(表6)。図1において、His<sub>6</sub>-Z<sub>TNF-</sub>:3230(本発明のTNF-特異的ポリペプチド)について得られた融解曲線を示す。

【0120】

10

20

30

40

50

## インビトロ抗原性 E L I S A ( 血清中の I g G 結合性の分析 )

E L I S A についての一般条件は以下の通りであった：ハーフエリア、96 - ウェルプレート中で E L I S A アッセイを行なった。100  $\mu$  l を使用するプロッキングを除いて、全てのインキュベートについて使用した体積は1ウェルあたり50  $\mu$  l であった。コーティング緩衝液 (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> および 35 mM NaHCO<sub>3</sub>) 中、4 で一晩コーティングを行い、そして全ての他のインキュベートを室温で行なった。靈長類の血清および検出抗体の希釈を P B S + 0 . 5 % カゼインで作製した。全ての洗浄を自動 E L I S A Scan Washer 300 を使用して行い、各ウェルを1回の洗浄あたり洗浄緩衝液 (P B S - T ; 1 × P B S 中 0 . 0 5 % Tween 20) (175  $\mu$  l) で4回洗浄した。

10

## 【 0 1 2 1 】

E L I S A プレートのウェルを2  $\mu$  g / m l の結合ポリペプチド H i s<sub>6</sub> - Z<sub>TNF-</sub> : 18 5、H i s<sub>6</sub> - Z<sub>HER2:342</sub>、H i s<sub>6</sub> - Z インスリン : 810、H i s<sub>6</sub> - Z<sub>Taq:1154</sub>、Z<sub>PDGF-R : 2465</sub> - C y s - N E M、H i s<sub>6</sub> - Z<sub>HER2:2628</sub>、H i s<sub>6</sub> - Z<sub>Taq:3229</sub>、H i s<sub>6</sub> - Z<sub>TNF- : 3230</sub>、H i s<sub>6</sub> - Z インスリン : 3232 および Z<sub>PDGF-R : 3358</sub> - C y s - N E M でコーティングした。Z<sub>HER2:342</sub> を標準として使用した。コーティング後、ウェルを水道水で2回洗浄し、そして P B S + 0 . 5 % カゼインでプロックした。プレートを空にし、そして 2 - 倍希釈系列のカニクイザル由来の靈長類血清プール (M A c c a c a f a s c i c u l a r i s ; S w e d i s h I n s t i t u t e f o r I n f e c t i o u s D i s e a s e C o n t r o l から入手) をウェルに添加した。滴定系列 (t i t r a t i o n s e r i e s) を 1 / 1 0 0 希釈で開始し、そして 1 / 1 0 2 4 0 0 で終了した。96 - ウェルプレート中で希釈を直接行った。靈長類血清プールと共に1時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、そして検出のために 1 / 5 0 0 0 希釈でヤギ抗 - ヒト I g - H R P 抗体を添加した。検出抗体と共に 5 0 分間インキュベートした後、プレートを洗浄し、そして基質を添加した。I m m u n o P u r e<sup>(R)</sup> T M B キット中の等体積の2つの成分を混合し、そして1ウェルあたり50  $\mu$  l を添加した。続いて、プレートを暗所で 1 2 分間インキュベートし、そして停止溶液 (2 M H<sub>2</sub>S O<sub>4</sub>) (50  $\mu$  l) を添加することにより反応を停止させた。E L I S A リーダーを使用して、450 nm で吸光度を読み取った。陰性対照として、靈長類血清プールの代わりに、P B S + 0 . 5 % カゼインを使用した。

20

## 【 0 1 2 2 】

結果を評価するため、およびポリペプチドに対する靈長類 I g - 分子結合性のレベルを示す I V A 値を得るために、プログラム G r a p h P a d P r i s m 5 を使用した。バックグラウンド O D 値を差引いたサンプル値を、X Y - 非線形回帰 (S 字型用量反応 (s i g m o i d a l d o s e r e s p o n s e)) 式に基づくテンプレートに入れた。O D 0 . 3 についての希釈値を式から得、そして標準希釈値を 1 0 0 に設定し、そして全てのサンプルを 1 0 0 に関連付けることにより、I V A 値を計算する。1 0 0 以下の値は、陽性対照として使用される Z<sub>HER2:342</sub> 分子と比較して、試験ポリペプチドが免疫グロブリンに結合する能力の低下を指示する。

30

## 【 0 1 2 3 】

本発明の分子は、元の分子と比較して、免疫グロブリンに結合する可能性が少ないことを示した (表 7)。結果をインビトロ抗原性 (I V A) 値として示し、そして低下したインビトロ抗原性 (I g G 結合性) を I V A 値の減少として読み取る。

40

## 【 0 1 2 4 】

【表3】

表3. 結合ポリペプチド配列のリスト

名前	アミノ酸配列
$Z_{\text{TNF-}\alpha:185}$	VDNKFNLGWAIGEIGTLPNLNHQFRAFILSLWDDPSQSANLLAEAKK LNDAQAPK
$Z_{\text{HER2:342}}$	VDNKFNLKEMRNAYWEIALLPNLNQQKRAFIRSLYDDPSQSANLLAEAKK LNDAQAPK
$Z_{\text{インスリン:810}}$	VDNKFNLKEKYMAYGEIRLLPNLNHQVMAFIDSLVDDPSQSANLLAEAKK LNDAQAPK
$Z_{\text{Taq:1154}}$	VDNKFNLKEKGEAVVEIFRLPNLNGRQVKAFIASLYDDPSQSANLLAEAKK LNDAQAPK
$Z_{\text{PDGF-R}\beta:2465}$	VDNKFNLKELIEAAAEIFALPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKK LNDAQAPK

【0 1 2 5】

10

20

【表4】

表4. オリゴヌクレオチドのリスト

名前	配列 5'-3'
AFFI-069	GTGAGCGGATAACAATTCCCTC
AFFI-070	CAGCAAAAACCCCTCAAGACCC
AFFI-115	CAGCAAAAACCCCTCAAGACCC
AFFI-267	AGATAACAAATTCAACAAAG
AFFI-270	CTACTTCGGCGCCTGAGCATCATTAG
AFFI-1014	ACTTCGGCGCCTGAGCATCATTAG
AFFI-1015	ATAACAAATTCAACAAAGAA
AFFI-1043	ACTTCGGCGCCTGAGAATCATTAGCTTTA
AFFI-1044	CTACTTCGGCGCCTGAGAATCATTAGCTTTA
AFFI-1143	AGATGCCAATACGCCAAGAAATGCGAA
AFFI-1144	ATGCCAATACGCCAAGAAATGCGAA
AFFI-1151	CCCAAGCCAAAGCTCTGAATTGCTATCAGAAGCTAAAAGC
AFFI-1152	GCTTTTAGCTCTGATAGCAATTAGCTTGGCTTGGG
AFFI-1320	AGATGCCAATACGCCAAGAAAAGGGGGAGGCCTGGTTGAGATCTTA GGTTACCTAACCTAACCGGGAGGCAAGTGAAGGCCTTCATCGCGAAATT TA
AFFI-1323	CTACTTCGGCGCCTGGCTATCATTAGCTTTAGCTTCGCTCAGTAAT TCAGAGCTCTGGCTTGGGTATCCCATAATTAAAGGATGAAGGCCCGAAA TT
AFFI-1326	AGATGCCAATACGCCAAGAAAAGTATATGGCGTATGGTGAGATCCGGT TGTTACCTAACCTAACCCATCAGCAAGTTATGGCCTTCATCGATAAAATT GT
AFFI-1327	CTACTTCGGCGCCTGGCTATCATTAGCTTTAGCTTCGCTCAGTAAT TCAGAGCTCTGGCTTGGGTATCCACTAATTATCGATGAAGGCCATAAC TT
AFFI-1328	AGATGCCAATACGCCAAG
AFFI-1329	ATGCCAATACGCCAAGAA
AFFI-1330	CTACTTCGGCGCCTGGCTATCATTAG
AFFI-1331	ACTTCGGCGCCTGGCTATCATTAG

【0126】

【表5】

表5. 試験ポリペプチドのリスト

標的	記号表示	変異体
TNF- $\alpha$	His <sub>6</sub> -Z <sub>TNF-<math>\alpha</math>:185</sub>	元
TNF- $\alpha$	His <sub>6</sub> -Z <sub>TNF-<math>\alpha</math>:3230</sub>	本発明
HER2	Z <sub>HER2:342</sub>	元
HER2	His <sub>6</sub> -Z <sub>HER2:342</sub>	元
HER2	His <sub>6</sub> -Z <sub>HER2:2628</sub>	本発明
インスリン	His <sub>6</sub> -Z <sub>インスリン:810</sub>	元
インスリン	His <sub>6</sub> -Z <sub>インスリン:3232</sub>	本発明
Taq ポリメラーゼ	His <sub>6</sub> -Z <sub>Taq:1154</sub>	元
Taq ポリメラーゼ	His <sub>6</sub> -Z <sub>Taq:3229</sub>	本発明
PDGF-R $\beta$	Z <sub>PDGF-R<math>\beta</math>:2465</sub> -Cys	元
PDGF-R $\beta$	Z <sub>PDGF-R<math>\beta</math>:3558</sub> -Cys	本発明

10

20

【0127】

【表6】

表6. 試験ポリペプチドの決定されたTm値

標的	記号表示	変異体	Tm(°C)
TNF- $\alpha$	His <sub>6</sub> -Z <sub>TNF-<math>\alpha</math>:185</sub>	元	53
TNF- $\alpha$	His <sub>6</sub> -Z <sub>TNF-<math>\alpha</math>:3230</sub>	本発明	60
HER2	His <sub>6</sub> -Z <sub>HER2:342</sub>	元	63
HER2	His <sub>6</sub> -Z <sub>HER2:2628</sub>	本発明	69
インスリン	His <sub>6</sub> -Z <sub>インスリン:810</sub>	元	42
インスリン	His <sub>6</sub> -Z <sub>インスリン:3232</sub>	本発明	48
Taq ポリメラーゼ	His <sub>6</sub> -Z <sub>Taq:1154</sub>	元	46
Taq ポリメラーゼ	His <sub>6</sub> -Z <sub>Taq:3229</sub>	本発明	50
PDGF-R $\beta$	Z <sub>PDGF-R<math>\beta</math>:2465</sub> -Cys-NEM	元	42
PDGF-R $\beta$	Z <sub>PDGF-R<math>\beta</math>:3558</sub> -Cys-NEM	本発明	42

30

40

【0128】

## 【表7】

表7. 試験ポリペプチドのIVA値

標的	記号表示	変異体	IVA-値
TNF- $\alpha$	His <sub>6</sub> -Z <sub>TNF-<math>\alpha</math>:185</sub>	元	38
TNF- $\alpha$	His <sub>6</sub> -Z <sub>TNF-<math>\alpha</math>:3230</sub>	本発明	21
HER2	His <sub>6</sub> -Z <sub>HER2:342</sub>	元	99
HER2	His <sub>6</sub> -Z <sub>HER2:2628</sub>	本発明	14
インスリン	His <sub>6</sub> -Z <sub>インスリン:810</sub>	元	43
インスリン	His <sub>6</sub> -Z <sub>インスリン:3232</sub>	本発明	16
Taq ポリメラーゼ	His <sub>6</sub> -Z <sub>Taq:1154</sub>	元	26
Taq ポリメラーゼ	His <sub>6</sub> -Z <sub>Taq:3229</sub>	本発明	18
PDGF-R $\beta$	Z <sub>PDGF-R<math>\beta</math>:2465</sub> -Cys-NEM	元	35
PDGF-R $\beta$	Z <sub>PDGF-R<math>\beta</math>:3558</sub> -Cys-NEM	本発明	3

10

20

## 【0129】

実施例4 - Dynazyme 結合ポリペプチド変異体のファージディスプレイ選択およびキャラクタリゼーション

## Dynazyme のビオチン化

製造業者のプロトコルに従って、10×モル過剰のNo-weight<sup>TM</sup>スルホ-NH<sub>2</sub>-LC-ビオチン(Pierce、#21327)を使用して、種サームスプロッキアヌス(Thermus brockianus)(Finnzymes、#F-501L)由来の標的タンパク質Dynazyme II DNAポリメラーゼ(Dynazyme)をビオチン化した。Slide-a-lyzer透析カセット(Pierce、10K、0.5~3ml)を使用する透析により、緩衝液をビオチン化前にPBSに交換し、そしてビオチン化後にTKMT(10mM Tris-HCl、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% Triton X-100、pH 8.8)に交換し、未結合のビオチンを除去した。

30

## 【0130】

## ファージディスプレイ選択

本発明のポリペプチド集団(実施例1)を使用して、ビオチン化Dynazymeに対する選択を行なった。選択のために2つのアプローチを利用した;高い標的濃度を有するもの(トラック1)および低い標的濃度を有するもの(トラック2)。4回の選択サイクルを行なった。各サイクルの間に新しいファージストックを調製した。選択の要旨および詳細について、図2を参照のこと。

40

## 【0131】

ファージライブラリーストックを実施例2に記載されるように2回PEG/NaCl沈殿させ、そして0.1%ゼラチンを補充したTKMT(TKMTg)に溶解した。ファージをストレプトアビシン-コート化ビーズ(SAビーズ、Dynabeads<sup>(R)</sup> M-280)と共にRTで30分間プレインキュベートした。選択手順に使用したビーズおよび全てのチューブをTKMTg中でプレブロックした(pre-blocked)。

## 【0132】

各サイクルにおける標的濃度および洗浄回数を図2に示す。選択および洗浄に使用した緩衝液はTKMTgであった。予め選択したファージをビオチン化標的と共に4で17時間インキュベートし、次いで第一サイクルの間RTで3時間、そして次のサイクルの間

50

にそれぞれ、3時間または1時間インキュベートした。続いて、ファージ粒子をプレブロックSAビーズ、5mg(第一サイクルトラック1)、3.5mg(第一サイクルトラック2)または0.5mg(全ての他のサイクル)に移し、そして攪拌しながら10分間インキュベートした。その後、ビーズを洗浄し、そしてファージ粒子を実施例2に記載されるように低pH緩衝液で溶出した。選択の各ラウンドの後、溶出したファージを使用して、対数期大腸菌RR1M15細胞に感染させた。37で20分間インキュベートした後、細胞を遠心分離により採取した。ペレットを少量のTSB-YEに溶解し、TYEプレートに塗り、そして37で一晩インキュベートした。基本的に実施例2に記載されるように、各サイクルの間にファージストックを調製した。各選択サイクルの後にファージ粒子力価および収率を計算した。ファージ粒子収率(ファージ粒子アウト/ファージ粒子イン)は各サイクル(第二のものを除く)で増加し、この増加は標的結合クローンにおける濃縮を指示した。

#### 【0133】

##### Dynazyme結合ポリペプチドのELISA分析

実施例2に記載されるように、選択の最終ラウンドの後に得られたクローンをランダムに採取し、そして96-ウェルプレート形式におけるペリプラズムタンパク質発現に使用した。ABDに融合した可溶性ポリペプチド変異体を含む上清を、以下の通りにELISAにおいて標的結合性についてアッセイした。推定結合ポリペプチドをAQLE-[Z# #####]-VDYV-[ABD]-SQKA(ABD=連鎖球菌属の種(Streptococcus sp.)G148由来のアルブミン結合ドメインGA3、Kraulits et al(1996)FEBS Lett. 378(2):190-194)(ここで、Z#####は本発明のポリペプチド集団の個々の変異体を表す)として発現させた。

#### 【0134】

ハーフエリアマイクロタイターウェル(Costar、#3690)を、ELISAコーティング緩衝液中2~3μg/ml Dynazyme(50μl)でコーティングした。ウェルを0.5%カゼイン(Sigma)を補ったTKMT(TKMT-カゼイン)(100μl)を用いてRTで1時間ブロックした。ブロッキング溶液を除去した後、上清(50μl)をウェルに添加し、そしてプレートをRTで1.5時間インキュベートした。一次、次いで二次抗体を添加することにより、捕捉したポリペプチド変異体を検出した。一次抗体、Z変異体に対するアフィニティー精製したポリクローナルウサギIgを、TKMT-カゼインに1:5000で希釈し、そしてRTで1.5時間インキュベートした。二次抗体、ヤギ-ウサギ-HRP Ig(Dako Cytomation、#P0448)をTKMT-カゼインに1:5000で希釈し、そしてRTで1時間インキュベートした。抗体および発色溶液(developing solution)と共にインキュベートする前に、プレートをTKMTで4回洗浄した。

#### 【0135】

プレートを実施例2に記載されるように発色させ(develop)、そしてELISA分光光度計において450nmで読み取った。全てのプレートを関連する陰性および陽性対照、さらにブランクを用いて調製し、ここではペリプラズム上清の代わりTKMTを用いた。全体で、1080のランダムに採取されたクローンをDynazymeに対するそれらの結合性についてELISAでスクリーニングした。陽性クローンおよび低い吸光度値を有するいくつかのクローンが、配列決定のために選択された。

#### 【0136】

##### ELISA陽性ポリペプチドの配列決定

実施例2に従って、個々のクローンを配列決定に供した。ELISAスクリーニングにおいて陽性とされる11のユニークな結合ポリペプチドが見出された。いくつかのクローンは、数個のコピーを生じた。さらに、より低いELISA値を有するクローン由来の数個の配列が同定された。

#### 【0137】

10

20

30

40

50

### ポリペプチドのプラスミド p A Y 1 4 4 8へのサブクローニング

付着末端 P C R のための鋳型として調製されたプラスミドを使用して、単量体として 15 のユニークなポリペプチドを、N - 末端 H i s<sub>6</sub> - タグを与える発現ベクター p A Y 1 4 4 8 ( 実施例 2 に記載されるような ) へのサブクローニングに供した。実施例 3 に記載されるように、サブクローニングを行なった。

#### 【 0 1 3 8 】

##### ポリペプチドの精製

以下のテキストは、15 の単量体の H i s<sub>6</sub> - タグ化ポリペプチド、すなわち、H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 6 6 5 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 6 7 2 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 6 7 4 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 6 7 8 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 6 8 7 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 6 7 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 7 0 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 7 5 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 7 6 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 7 7 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 7 8 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 7 9 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 8 0 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 8 1 および H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 8 9 9 の精製を記載する。可溶性 H i s<sub>6</sub> - タグ化分子を含むペレット化細菌細胞を、 H i s G r a v i T r a p™ 結合緩衝液 ( 2 0 m M リン酸ナトリウム、 0 . 5 M N a C l 、 2 0 m M イミダゾールおよび 2 5 U / m l B e n z o n a s e ( R ) ) に懸濁し、そして超音波処理により破碎した。上清の温度が 9 0 付近で安定するまでの 5 分間、熱水 ( 9 5 ) を使用して、超音波処理した細胞の上清を加熱した。遠心分離により清澄化した後、上清を予め H i s G r a v i T r a p 結合緩衝液で平衡化した H i s G r a v i T r a p カラム ( G E H e a l t h c a r e ) にロードした。 5 C V H i s G r a v i T r a p 結合緩衝液および 5 C V H i s G r a v i T r a p 洗浄緩衝液 ( 2 0 m M リン酸ナトリウム、 0 . 5 M N a C l 、 6 0 m M イミダゾール ) でカラムを洗浄した後、ポリペプチドを 3 C V H i s G r a v i T r a p 溶出緩衝液 ( 2 0 m M リン酸ナトリウム、 0 . 5 M N a C l 、 5 0 0 m M イミダゾール ) で溶出した。

#### 【 0 1 3 9 】

ポリペプチド変異体をさらに、逆相クロマトグラフィー ( R P C ) により精製した。 H i s G r a v i T r a p からの溶出画分中に 2 % の最終濃度でアセトニトリル ( A C N ) を添加した。サンプルを予め R P C A 緩衝液 ( 0 . 1 % トリフルオロ酢酸 ( T F A ) 、 2 % A C N 、 9 8 % 水 ) で平衡化した R E S O U R C E™ R P C 3 m l カラム ( G E H e a l t h c a r e ) にロードした。 5 C V R P C A 緩衝液でカラムを洗浄した後、結合タンパク質を 2 0 C V 0 ~ 5 0 % R P C B 緩衝液 ( 0 . 1 % T F A 、 8 0 % A C N 、 2 0 % 水 ) の直線グラジエントで溶出した。流速は 5 m l / 分であり、そして 2 8 0 n m シグナルをモニターした。純粋なポリペプチドを含む画分を S D S - P A G E 分析により同定し、そしてプールした。

#### 【 0 1 4 0 】

使い捨て P D - 1 0 脱塩カラム ( G E H e a l t h c a r e ) のサイズ排除クロマトグラフィーにより、精製したポリペプチドの緩衝液を 5 0 m M T r i s - H C l ( p H 8 . 8 ) に置き換えた。

#### 【 0 1 4 1 】

15 のポリペプチド変異体のうちの 12 が、首尾よく精製された : H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 6 6 5 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 6 7 2 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 6 7 4 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 6 8 7 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 7 0 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 7 5 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 7 6 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 7 7 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 7 8 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 8 0 、 H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 7 8 1 および H i s<sub>6</sub> - Z 0 4 8 9 9 。

#### 【 0 1 4 2 】

##### 精製したポリペプチドの分析

Na n o D r o p™ N D - 1 0 0 0 分光光度計を使用して、 2 8 0 n m での吸光度を測定することにより、ポリペプチド溶液の濃度の決定を行なった。タンパク質をさらに S D S - P A G E および L C - M S で分析した。

#### 【 0 1 4 3 】

10

20

30

40

50

S D S - P A G E 分析のため、ポリペプチド溶液を L D S サンプル緩衝液 ( I n v i t r o g e n ) と混合し、74 で 10 分間インキュベートした。各ポリペプチド変異体 ( 10  $\mu$  g ) を N u P A G E <sup>(R)</sup> 4 ~ 12 % Bis - Tris ゲル ( I n v i t r o g e n ) 上にロードした。分子量マーカーとして N o v e x <sup>(R)</sup> S h a r p P r e - s t a i n e d P r o t e i n S t a n d a r d ( I n v i t r o g e n ) および染色のために Ph a s t G e l T M B l u e R ( G E H e a l t h c a r e ) タンパク質染色溶液を利用して、X C e l l S u r e L o c k <sup>TM</sup> M i n i - C e l l ( I n v i t r o g e n ) 中 M E S S D S ランニング緩衝液 ( I n v i t r o g e n ) を用いてゲルを走らせた。

#### 【 0 1 4 4 】

ポリペプチド変異体の同定を検証するために、A P I - E S I を備えた A g i l e n t 1100 L C / M S D システムおよびシングル四重極質量分析器を使用して、L C / M S 分析を行なった。タンパク質サンプルを 0.5 m g / m l の最終濃度で 50 m M T r i s - H C l ( p H 8.8 ) に希釈し、そして 10  $\mu$  l を 1 m l / 分の流速で、Z o r b a x 300 S B - C 18 カラム ( 4.6  $\times$  150、3.5  $\mu$  m ) ( A g i l e n t ) にロードした。溶液 A は水中 0.1 % T F A を含み、そして溶液 B は A C N 中 0.1 % T F A を含んだ。1 m l / 分で、15 ~ 65 % 溶液 B の 22 分間直線グラジエントを使用して、タンパク質を溶出した。30 で分離を行なった。イオンシグナルならびに 280 および 220 n m での吸光度をモニターした。イオンシグナルの分析により、精製タンパク質の分子量を確認した。

#### 【 0 1 4 5 】

S D S - P A G E および L C / M S - 分析により、ポリペプチド変異体の純度は、95 % 以上であることを決定した。

#### 【 0 1 4 6 】

##### 融解温度 ( T m ) の決定

精製ポリペプチド変異体を 0.5 m g / m l の最終濃度で 50 m M T r i s - H C l ( p H 8.8 ) に希釈した。1 m m の光路長を有するセルにおいて、J a s c o J - 810 分光偏光計で円偏光二色性 ( C D ) 分析を行なった。温度可変測定において、5 / 分の温度傾斜を用いて、吸光度を 221 n m 、 20 ~ 90 で測定した。C D 対温度プロットにおける転移の中間点を決定することにより、ポリペプチド融解温度 ( T m ) を計算した。結果について、表 8 を参照のこと。

#### 【 0 1 4 7 】

10

20

30

## 【表 8】

表 8. Dynamazyme 結合ポリペプチド変異体の  $T_m$ 

記号表示	$T_m$ (°C)
His <sub>6</sub> -Z04665	38
His <sub>6</sub> -Z04672	33
His <sub>6</sub> -Z04674	35
His <sub>6</sub> -Z04687	60
His <sub>6</sub> -Z04770	44
His <sub>6</sub> -Z04775	45
His <sub>6</sub> -Z04776	55
His <sub>6</sub> -Z04777	58
His <sub>6</sub> -Z04778	43
His <sub>6</sub> -Z04780	65
His <sub>6</sub> -Z04781	66
His <sub>6</sub> -Z04899	39

10

20

30

40

## 【0148】

## 熱安定性の分析

加熱に供された後、元のヘリカル構造がリフォールディングする能力は、上記のポリペプチド変異体に要求される特性であった。構造の可逆性を詳細に調べるために、1サンプルあたり2つのCDスペクトルを20で得た。2つの測定の間に、サンプルを96に加熱した。サンプルを96で2分間維持し、次いで20に冷却した。加熱前および加熱後の類似のCDスペクトルは、サンプルが構造可逆性であることを証明する。12の分析したポリペプチド変異体のうち3つが、熱処理により悪影響を受けたが、9つのポリペプチド変異体は、それらのヘリックス構造を完全に取り戻すことを示した。加熱前および加熱後の2つのCDスペクトルの典型的なオーバーレイを図3に示す。

## 【0149】

## Biacore結合分析

本発明に従って選択された12のHis<sub>6</sub>-タグ化単量体Z変異体とDynamazymeとの間の相互作用を、Biacore機器(GE Healthcare)で分析した。標的タンパク質をCM5チップ表面のカルボキシル化デキストラン層上のフローセル(GE Healthcare)に固定化した。製造業者のプロトコルに従うアミンカップリング化学を使用し、そしてアセテート(pH 5.5)を使用して、固定化を行なった。被検体注入の間、ブランクとして使用するために、チップ上の1つのフローセル表面を活性化し、そして失活させた。被検体、すなわち、10 μMの最終濃度でHBS-EPランニング緩衝液(GE Healthcare)に希釈したポリペプチド変異体を、ランダムな順に二連(duplicate)で10 μl/分の流速で5分間注入した。10分間の解離の後、0.05% SDSの1回の注入を用いて表面を再生した。BiaEvaluationソフトウェア(GE Healthcare)で結果を分析した。ブランク表面の曲線をリガンド表面の曲線から引いた。図4に概説されるように、固定化Dynamazymeに対する5つのポリペプチド変異体の相互作用が分析により示された。

## 【0150】

## 実施例5 - 本発明に従うポリペプチド集団の化学合成の比較研究

50

## 要約

この実施例を構成する実験において、本発明に従うポリペプチド集団の固相ペプチド合成(SPPS)が記載され、そして元のスカフォールドに基づくポリペプチドの合成と比較した。4つの位置、すなわち、[N23T]、[A42S]、[A46S]および[A54S]に導入された突然変異が、シードプロリン前転体(簡略化された省略形Fmoc-Xxx-Yyy-OHを有する)を用いる代替合成ストラテジーを使用することを可能にした。上記の3または4つの位置でシードプロリンを使用して、以下：

SEQ A : m a E S E K Y A K E M R N A Y W E I A L L P N L T N Q Q K R A F I R K L Y D D P S Q S S E L L S E A K K L N D S Q A P K

(ここで、maはポリペプチドのN-末端にカップリングしたメルカプトアセチル示す) 10  
; および

SEQ B : A E A K Y A K E M W I A W E E I R N L P N L N G W Q M T A F I A K L L D D P S Q S S E L L S E A K K L N D S Q A P K Cの配列を有する完全長分子を合成することを可能にし；

その一方で、標準合成はSEQ Aを有するペプチドを生産できなかった。

## 【0151】

SEQ C : A E N K F N K E M W I A W E E I R N L P N L T G W Q M T A F I A S L L D D P S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P Kの標準合成(これは、SEQ Bに類似するが、非常に不純な調製物およびペプチドの低収率をもたらす元のスカフォールドアミノ酸を含む)。 20

## 【0152】

新規なセリンまたはスレオニン残基の導入はまた、イソアシルジペプチドの使用を可能にし、このイソアシルジペプチドはペプチド合成中、凝集を抑制することにより合成効率を高めるためのシードプロリンの代替物である(Sohma et al, Tetrahedron Lett. 47: 3013, 2006)。いくつかのこのよう構成要素は、Merck Biosciences AGのNovabiochemから入手可能である。

## 【0153】

## 原理

HER2結合分子Z<sub>HER2:342</sub>(Z<sub>HER2:107</sub>としてWO 2005/003156に開示され、そして時折Z00342とも称される)のペプチド合成、さらにこの分子のN-末端へのDOTAのカップリングが可能であり、そして文献に記載されている(Orlova A et al (2006) Cancer Research 67: 2178-2186)。しかし、合成後、ペプチド収率において膨大なばらつきが観察された。再現性良くペプチドを合成することの困難さは、ペプチドの長さ、さらに一次アミノ酸配列の両方に関連し得る。さらに、依然として保護されているアミノ酸側鎖の反応基を有する長いペプチドは、都合の悪い二次構造、例えばシートを生成し得、これは固相ペプチド合成を妨げ得る(Quibell M and Johnson T in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach, W.C. Chan, P.D. White Eds, Oxford University Press 2000: 115-135)。ペプチド合成中の二次構造形成を妨げる1つに方法は、シードプロリンの使用である。アミノ酸Yyyがセリン、スレオニンまたはシスティンである場合、シードプロリン(簡略された省略形Fmoc-Xxx-Yyy-OHを有する)を使用し得る。これらのシードプロリンは、バックボーンに連結した側鎖を有する閉プロリン様構造(closed proline-like structure)を示し、そして酸処理により通常のアミノ酸構造に変換され得る(Haack T and Mutter M (1992) Tetrahedron Lett 33: 1589-1592)。位置Yyyにおけるセリンまたはスレオニンと一緒に位置Xxxにおける14のアミノ酸(Arg、Cys、His、Met、Pro、Thrを除く全ての天然アミノ酸)についてのシードプロリンが市販されている 30  
40  
50

。

## 【0154】

親分子  $Z_{HER2:342}$  は、一次配列中にスレオニンおよびシスティンを有さない。セリンは位置 33、39 および 41 においてのみ見出される。シュードプロリン前駆体は、セリン 41 (Q<sup>40</sup> - S<sup>41</sup>) についてのみ利用可能である。2 つの他のセリンについて、利用可能な前駆体 (R<sup>32</sup> - S<sup>33</sup> および P<sup>38</sup> - S<sup>39</sup>) が存在しないので、位置 X x x におけるアミノ酸は、シュードプロリンの使用を避ける。

## 【0155】

本発明に従う集団中に含まれるポリペプチドに導入される突然変異は、ペプチド合成を促進することを目標にするが、これに限定されない。特に、位置 23、42、46 および 10 54、すなわち [N23T]、[A42S]、[A46S] および [A54S] における突然変異は、SPPS において認識される 2 つの問題を解決する能力を有し得る：これらは、シュードプロリンの使用を可能にし、そしてアスパラギンをスレオニンに置き換えることにより、アミノ酸位置 21 ~ 26 周辺の臨界 (critical) 領域を位置 23 で変更する。

## 【0156】

## 合成ストラテジー 1

アミノ酸配列 SEQ-A を、完全自動化ペプチドシンセサイザー中 Fmoc-Lys(Boc) - Wang ポリスチレン樹脂上でアセンブルした。この樹脂は、Fmoc-ストラテジーを用いるペプチドの形成に非常にふさわしい。57 アミノ酸を樹脂上に (適切な側鎖保護を用いて) カップリングした。最後の工程において、S-トリチル-保護化メルカプト酢酸のカップリングを手動で行なった。

## 【0157】

## 工程 1：固相ペプチド合成

Fmoc-Lys(Boc) - Wang ポリスチレン樹脂を、攪拌棒を備えた SPPS 反応器中に移した。次いで、樹脂の Fmoc 脱保護で合成を開始し、以下に示される一般的記載に従って Fmoc-Pro-OH を用いるカップリング手順を続けた。この工程の後再び、Fmoc 脱保護、次いで配列に従うアミノ酸誘導体のカップリングを行った。最後にイソプロピルエーテル (IPE) で樹脂を洗浄した後、ペプチド樹脂をデシケーター中で減圧下乾燥させた。

## 【0158】

標準 Fmoc ペプチド合成、および 4 つの位置にシュードプロリンを使用する合成の両方を行なった。標準ペプチド合成のため、Fmoc-アミノ酸のみを使用した。代替のペプチド合成のため、Fmoc-アミノ酸とは別に、以下のシュードプロリンを使用した：位置 22 ~ 23 において Fmoc-Leu-Thr-OH、位置 41 ~ 42 において Fmoc-Ser-Ser-OH、位置 45 ~ 46 において Fmoc-Leu-Ser-OH および位置 53 ~ 54 において Fmoc-Asp-Ser-OH。

## 【0159】

## Fmoc 脱保護手順

N - - Fmoc 保護基の切断を達成するために、樹脂をまた、N-メチル-2-ピロリドン (NMP) 中 20% ピペリジンで処理した。次いで、樹脂の洗浄を NMP で行なった。

## 【0160】

## カップリング手順

アミノ酸誘導体 Pro57 ~ Glu1 の自動化カップリング。最大 3 当量の Fmoc-AA 誘導体を NMP に溶解した。カップリングのため、ジメチルホルムアミド (DMF) 中 2 - (1H-ベンゾトリアゾール-1-イル) - 1,1,3,3 - テトラメチルウロニウムテトラフルオロボラート (TBTU) および NMP 中 sym - コリジン (2,4,6 - トリメチルピリジン) を添加した。樹脂上に注ぐ前に、得られた溶液を室温で混合した。溶媒として NMP を使用した。60 で少なくとも 15 分のカップリング時間後、樹脂

10

20

30

40

50

をNMPで洗浄した。

【0161】

各カップリング手順の後、カップリング試薬としてDMF中2-(1H-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボラート(TATU)を用いて、そして溶媒としてジクロロエタンを用いるカップリングの繰り返しを自動的に行ない、無水酢酸カップリングを続ける。

【0162】

工程2：メルカブト酢酸のカップリング

5モル当量のアミノ酸、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(hexafluorophosphate)(HBTU)および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)および10当量のN-エチルジイソプロピルアミン(DIEA, Lancaster Synthesis, Morecambe, Englandから入手)を用いて、アシル化を行なった。S-トリチル-メルカブト酢酸をAnaspec Inc(San Jose, CA, USA)から入手した。

【0163】

工程3：残りの保護基の切断を含む樹脂からの切断

精製水、エタンジオール(EDT)、およびトリイソプロピルシラン(TIS)の存在下、ペプチド樹脂をトリフルオロ酢酸(TFA)で処理した。室温で約2時間の切断時間後、反応混合物を約0に冷却し、そしてヨウ化アンモニウムおよび硫化ジメチルを添加し、酸化メチオニンを還元した。約0でさらに60分間の切断時間後、形成されたヨウ素をアスコルビン酸で還元した。生成物を濾過して取り出した後、これを低温中、IPE中で沈殿させ、再び濾過して取り出し、IPEで洗浄し、そして減圧下乾燥させた。

【0164】

HPLCによる純度分析

Vydac 218 TP54(5μm, 250×4.6mm)カラムおよびそれぞれ溶媒AおよびBとして、H<sub>2</sub>O中0.1%TFA、1%アセトニトリルおよびアセトニトリル中0.1%TFAを使用して、58アミノ酸長ペプチドおよびいくつかの中間体の純度を逆相HPLCにより決定した。カラムオーブンの温度を35に設定した。カラムを30分で15~45%溶媒Bのグラジエント、または30分で20~50%Bのグラジエントのいずれかを用いて溶出した。UV検出は220nmであった。面積正規化により、純度を計算した。

【0165】

結果

シュードプロリンを用いてまたは用いずに合成した配列SEQ-Aを有する分子の収率および純度を、分析用逆相クロマトグラフィーにより分析した。合成の経過を追跡するために、合成樹脂のごく一部をいくつかのカップリング工程後に取り、そして所望のペプチドの中間体の存在、純度および収率について分析した。図5は、41アミノ酸長ペプチド中間体(アミノ酸18~58)のHPLC分析を示す。シュードプロリンを使用して合成を行なった場合、ペプチド合成のこの段階で、正しい配列を有する1つの明確かつ重要なペプチドピーク(RT=15.33分、収率49%)を同定した(図5A)。しかし、標準Fmoc合成は、大量の小さいペプチドピークおよび同じ大きさの2つの主なピークをもたらしたが、収率は低かった。正しい配列(aa 18~58)を有するペプチド中間体としてこの2つのピークの一方(RT=20.82分)を同定した(図5B)。シュードプロリンを使用して合成を行なった場合、完全長ペプチド(アミノ酸1~58)のみを得た。図6Aは、26%の最終ペプチドの収率を有する单一生成物ピークを示す。しかし、標準Fmoc-合成は、最終ペプチド生成物を生産できなかった。標準合成からの49アミノ酸長中間体(アミノ酸10~58)の分析は、所望の中間体が検出され得ず、そして合成が停止されたことを明らかにした(図6B)。

【0166】

10

20

30

40

50

## 合成ストラテジー 2

集積マイクロ波オーブン (integrated microwave oven) を用いる完全自動化ペプチドシンセサイザー上で Fmoc - ストラテジーを使用して、2つの分子をアセンブルした。

本発明のスカフォールド配列に基づく SEQ B の 59 アミノ酸残基を Fmoc - Cys (Trt) - Wang LL ポリスチレン樹脂上で (適切な側鎖保護を用いて) アセンブルした。

元の Affibody<sup>(R)</sup>分子スカフォールドに基づく SEQ C の 58 アミノ酸残基を、Fmoc - Lys (Boc) - Wang LL ポリスチレン樹脂上で (適切な側鎖保護を用いて) アセンブルした。

Wang 樹脂 LL は、Fmoc ストラテジーを用いるペプチドの形成に非常にふさわしい。

## 【0167】

## 工程 1：固相ペプチド合成

ポリスチレン樹脂をシンセサイザー (Liberty, CEM Corporation, NC USA) により、SPPS 反応容器中に自動的に移した。次いで、樹脂の Fmoc 脱保護で合成を開始し、以下に示される要約に従って、次の Fmoc - 保護化アミノ酸 (Fmoc - AA) を用いるカップリング手順を続けた。この工程の後再び、Fmoc

脱保護、次いで配列に従うアミノ酸誘導体のカップリングを行った。最後にジクロロメタン (DCM) で樹脂を洗浄した後、ペプチド樹脂を減圧下乾燥させた。標準 Fmoc ペプチド合成により、完全なペプチド SEQ C が作製されたが、一方、シュードプロリンはスカフォールドになされた改善により可能となった SEQ B 中の位置で使用した。以下のシュードプロリンを使用した：位置 41 ~ 42 に Fmoc - Ser - Ser - OH、位置 45 ~ 46 に Fmoc - Leu - Ser - OH および位置 53 ~ 54 に Fmoc - Asp - Ser - OH。

## 【0168】

## Fmoc 脱保護手順

N - - Fmoc 保護基の切断を達成するために、マイクロ波照射を用いて、樹脂を NMP 中 5 % ピペラジンで処理した。次いで、樹脂の洗浄を NMP で行なった。

## 【0169】

## カップリング手順

アミノ酸誘導体 Cys 59 ~ Ala 1 (SEQ B について) および Lys 58 ~ Al a 1 (SEQ C について) の自動化カップリング。最大 5 当量の Fmoc - AA を NMP に溶解した。カップリングのため、O - (ベンゾトリアゾール - N, N, N', N' - テトラメチルウロニウムテトラフルオロホスフェート (HBTU) およびジメチルホルムアミド (DMF) 中 N - ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT) 、NMP 中 N, N' - デイソプロピルエチルアミン (DIPEA) を 1 : 1 : 2 (AA / HBTU / HOBT / DIPEA) のモル比で樹脂に添加した。反応容器の底から窒素ガスを泡立てることにより、混合物を攪拌した。マイクロ波照射を使用してエネルギーを加えながら 75 ~ 80 で少なくとも 5 分のカップリング時間後、樹脂を NMP で洗浄した。

## 【0170】

各カップリング手順の後、自動化無水酢酸カップリングを行なった。

## 【0171】

## 工程 2：残りの保護基の切断を含む樹脂からの切断

精製水、エタンジチオール (EDT) 、およびトリイソプロピルシラン (TIS) の存在下、ペプチド樹脂をトリフルオロ酢酸 (TFA) で処理した。室温で約 2 時間の切断後、切断混合物を濾過し、そして樹脂をストレートの 95 % TFA / 水でリーンスした。濾液を冷却したメチルtert - ブチルエーテル (MTBE) にゆっくりと添加した。沈殿物を遠心分離し、そして MTBE を除去した。固体をエーテルに再懸濁し、そして全体で 3 回の操作を繰り返した。エーテルの最後の除去後、固体を 0.1 % TFA / 水に再懸

10

20

30

40

50

濁し、残りのエーテルをエバポレートのためにそのままにし、そして凍結乾燥前に溶液を凍結した。

【0172】

HPLC-MSによる純度分析および質量分析

エレクトロスプレーイオン化(ESI)および単一四重極(single quadrupole)を備えたAgilent 1100 HPLC/MSDを使用する、高速液体クロマトグラフィーおよびオンライン質量分析(HPLC-MS)によりペプチドの純度を決定した。Zorbax 300SB C18(3.5 μm, 150 × 4.6 mm)カラムおよびそれぞれ溶媒AおよびBとして、0.1% TFA/水および0.1% TFA/アセトニトリル(ACN)を使用して、HPLCを実行した。カラムオーブンの温度を30℃に設定した。カラムを40分で15~55%溶媒Bのグラジェントを用いて溶出した。UV検出は220 nmであった。面積正規化により、純度を計算した。質量分析および評価に使用したソフトウェアは、ChemStation Rev. B.02.01.(Agilent)であった。

【0173】

結果

分子SEQ-BおよびSEQ-Cの収率および純度を、分析用逆相クロマトグラフィーにより分析した。完全長ペプチドが両方の合成において得られたが、しかしSEQ-Bについてより大きな収率が得られた。図7Aは、SEQ-Bについての予測される質量を有する主な生成物ピーク(RT = 41.48分)および15%の最終ペプチドの収率を示す。8%の収率のさらなるピーク(RT = 41.21分)は、完全長生成物の予測される質量よりも72 Da高い質量を有することが見出された。これは、Cys59アミノ酸残基上の副反応が原因であると考えられる。副反応の種類によって、これは合成の間または樹脂からペプチドを切断する間に生じ得る。合成および/または切断プロトコルを最適化することにより、この副反応は最小化され、それによりこの場合において、最高で全収率の23%まで収率が増加し得る。

【0174】

しかし、SEQ-Cの標準Fmoc-合成は、多数の小さなペプチドピークをもたらした(図7B)。主なピークの1つ(RT = 43.60分)は、予測される質量を有する完全長ペプチドとして同定された。この生成物の収率は4%であった。

【0175】

実施例6-元のおよび本発明のポリペプチド変異体の免疫原性

要約

この実施例において、1つの元のおよび1つの本発明のポリペプチド変異体の免疫原性をインピボで比較した。二量体分子をラットに投与し、そして特異的抗体反応を抗-薬物抗体(ADA)アッセイで決定した。本発明に従って導入されたスカフォールド突然変異を有する分子は、元のZ変異体と比較して、より低い抗体反応および遅延した抗体反応を示す。

【0176】

ポリペプチドのクローニングおよび生産

アルブミン結合ドメインABD035(Jonsson et al.(2008) Protein Eng Des Sel 8:515-27)に融合した2つのTaq-ポリメラーゼ特異的結合ポリペプチドをこの研究に使用した:

1. (Z01154)<sub>2</sub>-ABD035:元のスカフォールド

2. (Z03229)<sub>2</sub>-ABD035:本発明のスカフォールド

AccI-オーバーハングを有するZ01154およびZ03229のPCR增幅し、そしてハイブリダイズしたフラグメントを、それぞれ、AccI消化pET(Novagen)誘導発現ベクターpAY492およびpAY1450において、二量体としてクローニングした。得られたベクターをAccI-NotIで消化し、そしてAccIおよびNotIオーバーハングを有するPCR增幅したABD035フラグメントでライゲ

10

20

30

40

50

ーションし、構築物 p A Y 1 8 2 7 ( M G S S L Q - [ Z 0 1 1 5 4 ] - [ Z 0 1 1 5 4 ] - V D - [ A B D 0 3 5 ] をコード化する ) および p A Y 2 2 9 2 ( M G S S L Q - [ Z 0 3 2 2 9 ] - [ Z 0 3 2 2 9 ] - V D - [ A B D 0 3 5 ] をコード化する ) を生成した。基本的に実施例 3 に記載されるように、プラスミドをコンピテントな大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) 細胞に形質転換し、そして発酵によりタンパク質を生産した。ペレット化した細胞を [ 2 5 m M Tris - H C l 、 2 0 0 m M N a C l 、 1 m M E D T A 、 2 5 U / m l B e n z o n a s e <sup>(R)</sup> ( M e r c k 、 # 1 . 0 1 6 5 4 . 0 0 0 1 ) 、 p H 8 . 0 ] に懸濁し、そして氷上で超音波処理により破碎した。清澄化した上清を、ヒト血清アルブミンを用いて組織内でカップリングした C N B r - 活性化 S e p h a r o s e ( G E H e a l t h c a r e 、 # 1 7 - 0 9 8 1 - 0 3 ) をパックしたカラムにロードした。カラムを予め 1 × T S T [ 2 5 m M Tris - H C l 、 2 0 0 m M N a C l 、 1 m M E D T A 、 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 、 p H 8 . 0 ] 中で平衡化した。サンプル適用後、 A b s <sub>280</sub> シグナルの還元が観察されなくなるまで、 1 × T S T 、次いで 5 m M N H <sub>4</sub> A c ( p H 5 . 5 ) での洗浄を行なった。結合したタンパク質を 0 . 5 M H A c ( p H 2 . 8 ) で溶出した。溶出したサンプルに 2 % の最終濃度でアセトニトリルを補充し、そして R e s o u r c e R P C カラム ( G E H e a l t h c a r e 、 # 1 7 - 1 1 8 2 - 0 1 ) の逆相クロマトグラフィーによりさらに精製した。 [ 2 % アセトニトリル、水中 0 . 1 % T F A ] をランニング緩衝液として使用し、そして 2 5 カラム体積にわたって 0 ~ 5 0 % の [ 8 0 % アセトニトリル、水中 0 . 1 % T F A ] の直線グラジエントを使用してサンプルを溶出した。 H i P r e p 2 6 / 1 0 脱塩カラム ( G H H e a l t h c a r e 、 # 1 7 - 5 0 8 7 - 0 1 ) を使用して、 [ 5 m M リン酸ナトリウム、 1 5 0 m M N a C l 、 p H 7 . 2 ] への緩衝液の交換を行なった。実施例 3 に記載されるように、サンプル純度を S D S - P A G E および L C / M S 分析により確認した。製造業者の使用説明書に従って、 A f f i n i t y P a k D e t o x i - G e l エンドトキシン除去ゲル ( T h e r m o 、 # 2 0 3 4 4 ) で微量のエンドトキシンを除去した。 A P L ( A p o t e k e t P r o d u k t i o n & L a b o r a t o r i e r A B , S w e d e n ) により実施されたゲルクロット L A L 試験で、エンドトキシンは検出されなかった。ランニング緩衝液として 1 × P B S 、 0 . 5 m l / 分の流速および 1 m g / m l の濃度での 1 0 0  $\mu$  l のサンプル体積を使用して、 S u p e r d e x 7 5 1 0 / 3 0 0 カラム ( G E H e a l t h c a r e 、 # 1 7 - 5 1 7 4 - 0 1 ) で実行されるサイズ排除クロマトグラフィーにより検証されるように、サンプルは可溶性凝集体を含まなかった。

## 【 0 1 7 7 】

## 投与およびサンプリングスキーム

動物実験倫理委員会 ( l o c a l a n i m a l e t h i c s c o m m i t t e e ) から認証された A g r i s e r a A B ( V a n n a s , S w e d e n ) で、動物実験を行なった。3群に分けた雌の S p r a g u e D a w l e y ラットを、表 9 に概説されるように、 ( Z 0 1 1 5 4 ) <sub>2</sub> - A B D 0 3 5 、 ( Z 0 3 2 2 9 ) <sub>2</sub> - A B D 0 3 5 または緩衝液コントロールを皮下注射した。日 0 、 4 、 7 、 1 4 、 2 1 および 2 8 に注射した。血液サンプル ( 2 5 0  $\mu$  l ) を日 1 ( 前血清 ( p r e - s e r u m ) ) ならびに日 6 、 1 3 、 2 0 および 3 5 に各動物から採取した。全ての動物を 3 5 日目に犠牲にした。採取した血液サンプルを 4 で一晩放置して凝固させ、そして得られた血清を分析まで - 2 0 で保存した。

## 【 0 1 7 8 】

## 【表9】

表9. サンプル投与スキーム

グループ	動物の数	分子	投与方法	mg/動物/注射	ml/動物/注射	
1	8	(Z01154) <sub>2</sub> -ABD035	s. c.	0.125	0.1	
2	8	(Z03229) <sub>2</sub> -ABD035	s. c.	0.125	0.1	
3	4	緩衝液コントロール: 5 mM リン酸ナトリウム、150mM NaCl、pH 7.2	s. c.	-	0.1	10

## 【0179】

## 抗-薬物抗体 (ADA) アッセイ

抗-(Z01154)<sub>2</sub>-ABD035 および抗-(Z03229)<sub>2</sub>-ABD035 抗体の存在を分析するために、3種類のELISA分析を行なった。全てのサンプルを、始めて反応抗体の存在についてスクリーニングし、次いで特異性を検証するために確認分析した。その後、Z変異体に対する特異的抗体を有する血清サンプルを滴定し、抗-(Z01154)<sub>2</sub>-ABD035 および抗-(Z03229)<sub>2</sub>-ABD035 抗体の力価を定量した。

## 【0180】

血清サンプルをスクリーニングするために、2 μg/ml の最終濃度でコーティング緩衝液 (Sigma、#C3041) に希釈した (Z01154)<sub>2</sub>-ABD035 または (Z03229)<sub>2</sub>-ABD035 で ELISA プレート (96-ウェル、ハーフエリアプレート、Costar、#3690) で一晩コーティングした。コーティング溶液 (50 μl) をウェル毎に添加し、そしてプレートを 4°C で一晩インキュベートした。プレートを手動で、脱イオン水で 2 回洗浄し、その後、100 μl/ウェルの PBS-カゼイン (0.5% カゼイン (Sigma、#8654) を含む PBS) で 2 時間ブロックした。ブロッキング溶液を除去し、そしてブロッキング緩衝液に 1:50 で希釈した血清サンプル (50 μl/ウェル) を添加した。RT で 1.5 時間インキュベートした後、プレートを自動 ELISA 洗浄器 (Scanwasher 300, Scatron) 中 PBS-T (0.05% Tween 20 (Acros Organics、#233362500) を含む PBS) で洗浄した。Z変異体に対するラット抗体を検出するために、PBS-カゼインに 1:6000 で希釈した HRP-複合抗-ラット IgG (Southern Biotech、#3050-05) (50 μl/1ウェル) を添加した。インキュベートの 1 時間後、プレートを上記のように洗浄し、そして 50 μl/ウェルの基質溶液 (Immuno pure<sup>(R)</sup> TMB、Pierce、#34021) を添加した。プレートを暗所中 RT でインキュベートし、そして 15 分後、50 μl/ウェルの 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (VWR、#14374-1) を用いて発色 (color development) を停止させた。プレートを ELISA リーダー (Victor<sup>3</sup>, Perkin Elmer) で 450 nm で読み取った。

## 【0181】

上記の ELISA 法をまた、確認および滴定 ELISA アッセイに使用したが、いかで変更した。確認分析のため、血清サンプルを PBS-カゼインまたはそれぞれの 1 μg/ml のポリペプチド変異体を含む PBS-カゼインに 1:50 で希釈した。45% またはそれ以上の OD シグナルが減少した血清サンプルは、Z変異体に対する特異的抗体を含むと考えられた。滴定分析のため、血清サンプルを PBS-カゼインに 1:50 で希釈し、次いでそれらが力価の値がサンプルについて計算可能となるプレート-特異的カットポイントと交差するまで、2 倍または 5 倍で連続希釈した。

## 【0182】

アッセイの進行の間、以下の主要パラメータを決定した：

- ・最小希釈：1：50
- ・非特異的バックグラウンド（NSB）：希釈マトリクスとして使用され、そして分析の間、各プレートに含まれる正常なラット血清プール（Sprague Dawley ラット、Scambur）のOD<sub>450</sub>
- ・アッセイカットポイント：30の個体からの正常なラット血清の平均OD<sub>450</sub> + 平均値の標準偏差の1.645倍。（Z01154）<sub>2</sub>-ABD035および（Z03229）<sub>2</sub>-ABD035の両方で0.11の値を得た。
- ・正規格化因子：NSBの平均OD<sub>450</sub>で割ったアッセイカットポイント：それぞれ、（Z01154）<sub>2</sub>-ABD035および（Z03229）<sub>2</sub>-ABD035について1.87および1.86

サンプル分析の間、次いでプレート特異的カットポイントを以下のように決定した：

プレート特異的NSBの平均OD<sub>450</sub> × 正規化因子。

## 【0183】

2つのポリペプチド変異体に対する抗体を含むことが確認されたラット血清（過免疫（hyperimmunised）Sprague Dawley ラット、Agrisera）を、分析の間、各プレート上に含まれる陽性対照（PC）サンプルを調製するために使用した：High PC：陽性対照血清はPBS-カゼイン中に最小限希釈する前に、マトリクスに1：4で希釈した。このPCは、アッセイ/プレートカットポイントのすぐ上のOD値を有する。Low PC：陽性対照血清はPBS-カゼイン中に最小限希釈する前に、マトリクスに1：300で希釈した。このPCは、アッセイ/プレートカットポイントすぐ上にはわずかに足らないOD値を有する。

## 【0184】

Low PCおよびHigh PC値を使用して、力値品質管理（Titration quality control）（LoQC1-5およびHiQC1-5）を調製した。Low PCおよびHigh PCをPBS-カゼインに1：50で希釈し、それぞれ、LoQC1およびHiQC1を得た。次いで、これらをPBS-カゼインにさらに希釈し、それぞれ、LoQC2（1：100）、LoQC3（1：200）、LoQC4（1：400）およびLoQC5（1：800）、ならびにHiQC2（1：250）、HiQC3（1：1250）、HiQC4（1：6250）およびHiQC5（1：31250）を得た。

## 【0185】

GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc)を使用して、力値の値を計算した。簡潔に、OD<sub>450</sub>値を対数希釈(log dilution)に対してプロットし、そしてサンプルの力値を、プレート特異的カットポイントで対数希釈として定義した。

## 【0186】

## 結果

元の((Z01154)<sub>2</sub>-ABD035)と本発明の((Z03229)<sub>2</sub>-ABD035)分子との間のインピボ比較は、本発明の分子がより低い免疫原性であったことを示した。反応は、各個体間で大幅に変動し、そして経時的と共に増加した。力値は、本発明の分子を投与した2つの個体と比較して、元の分子を投与した3つの個体で決定することができた。実際の力値はまた、本発明の分子を投与したグループにより低かった（表10）。数匹の動物が抗体反応を発生させると見られる理由は、融合ABD分子が原因であり得、これは融合ポリペプチドの免疫原性を減少させることができることが以前に示されている（例えば、WO 2005/097202を参照のこと）。

## 【0187】

10

20

30

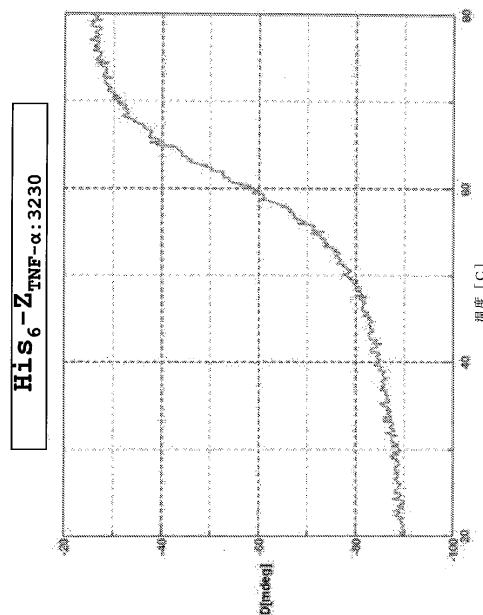
40

【表 10】

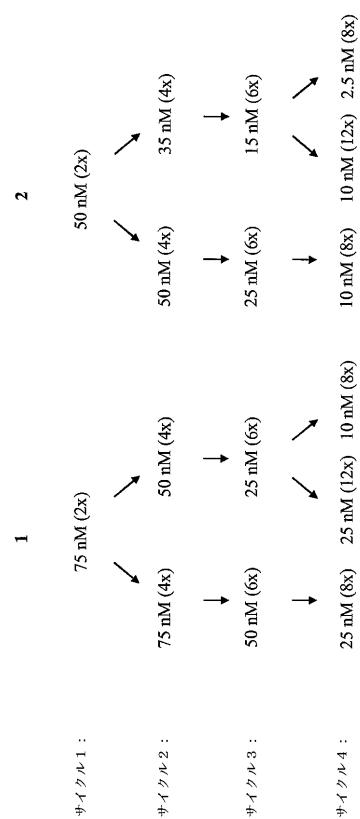
表 10. 元または本発明のポリペプチド変異体を与えられたラットにおける  
免疫反応

グループ 1 (Z01154) <sub>2</sub> -ABD035 n = 8			グループ 2 (Z03229) <sub>2</sub> -ABD035 n = 8			グループ 3 緩衝液コントロール n = 4			10
時間 (日)	特異的反応 (動物の数)	力価 平均±SD	特異的反応 (動物の数)	力価 平均±SD	特異的反応 (動物の数)	力価 平均±SD			
-1	0	-	0	-	0	-			
6	0	-	0	-	0	-			
13	1	2.9	0	-	0	-			
20	2	3.4(±1.0)	1	2.1	0	-			
27	3	2.7(±1.0)	1	2.4	0	-			
35	2	3.4(±1.3)	2	2.8(±0.1)	0	-			

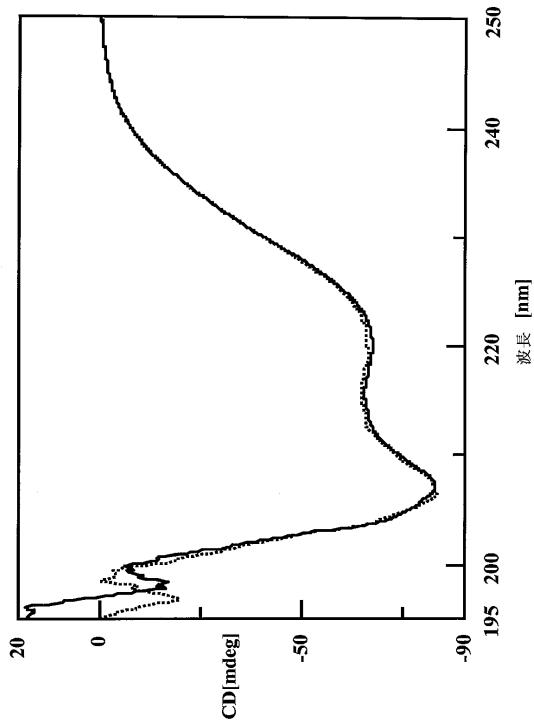
【図 1】



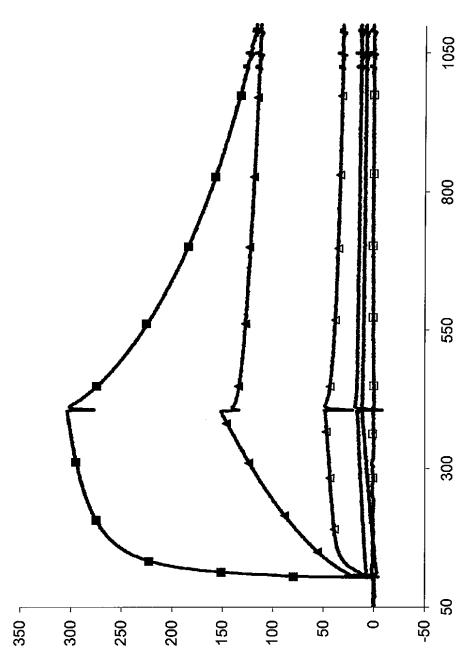
【図 2】



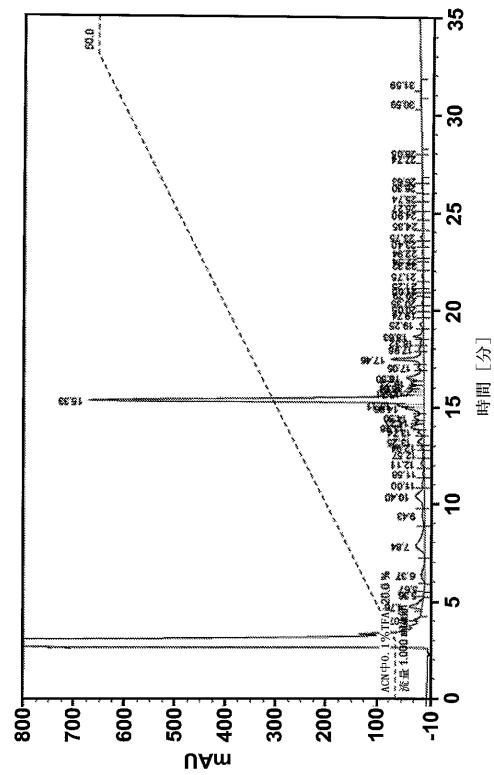
【図3】



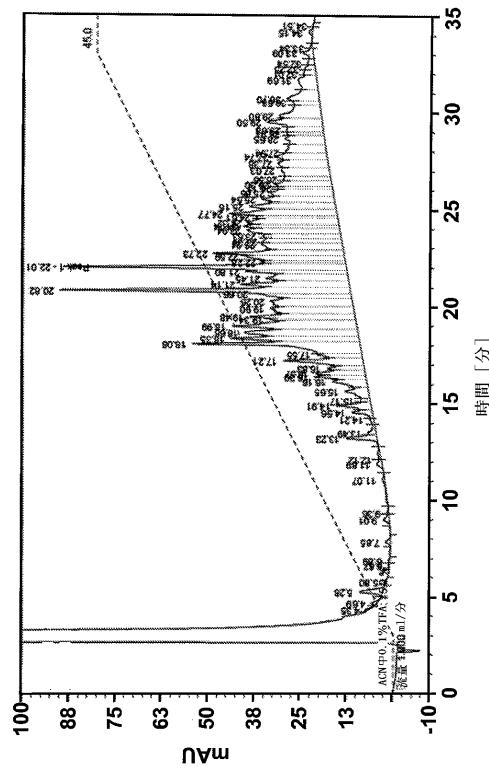
【図4】



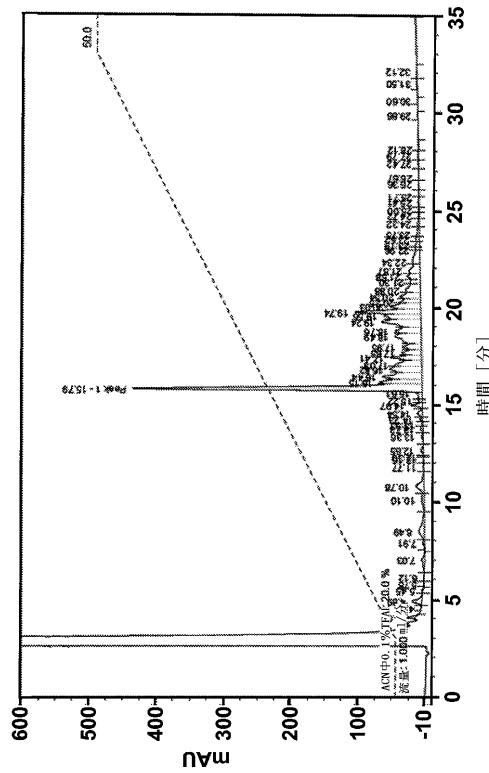
【図5 A】



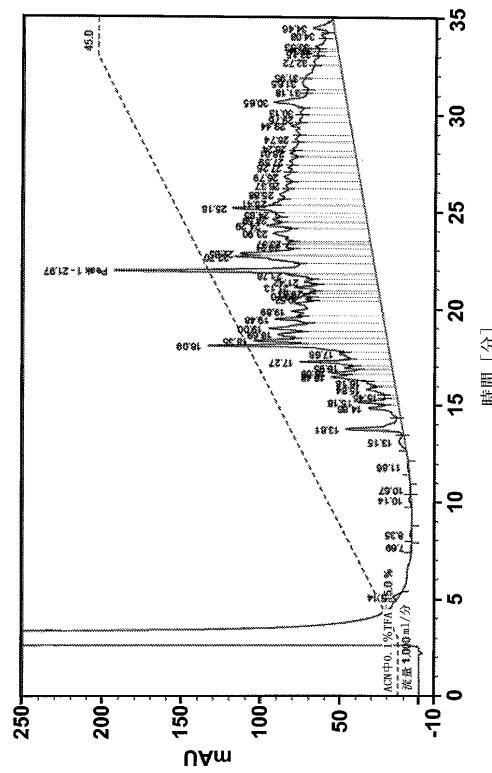
【図5 B】



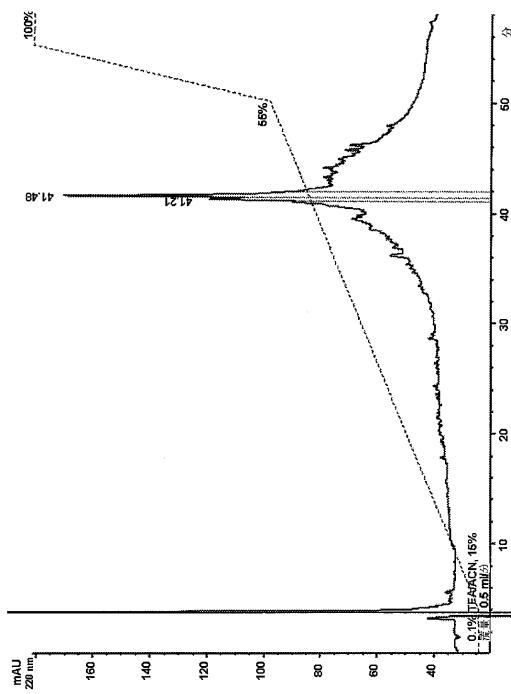
【図 6 A】



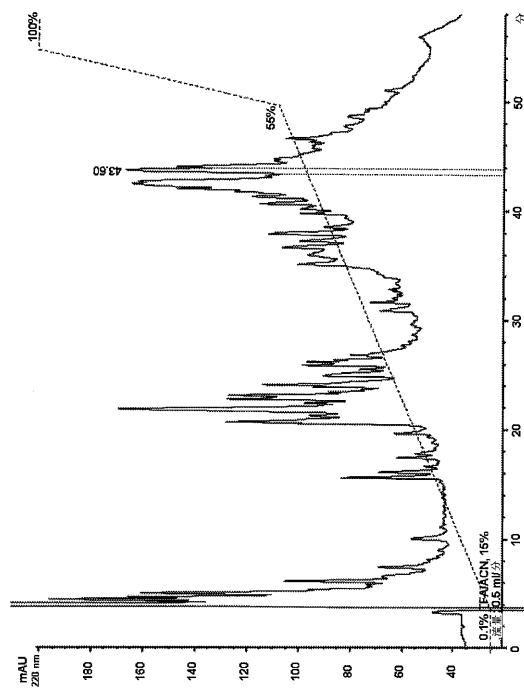
【図 6 B】



### 【図 7 A】



【図7B】



【配列表】

0005651476000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 0 7 K 19/00 (2006.01) C 0 7 K 19/00  
A 6 1 K 38/00 (2006.01) A 6 1 K 37/02  
C 4 0 B 30/04 (2006.01) C 4 0 B 30/04

(72)発明者 シュリストフェル・レンデル  
スウェーデン国エス - 1 2 3 7 1 ファシュタ . グラーヴァガーテン 3

(72)発明者 ヨーアヒム・フェルトヴィシュ  
スウェーデン国エス - 1 3 5 4 2 ティーレシェ . コーラルヴェーイエン 1 6

審査官 櫛引 明佳

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 6 / 0 9 2 3 3 8 (WO , A 2 )  
国際公開第 9 2 / 0 0 0 9 1 (WO , A 1 )  
国際公開第 9 5 / 0 1 9 3 7 4 (WO , A 1 )  
国際公開第 2 0 0 5 / 0 9 7 2 0 2 (WO , A 1 )  
国際公開第 2 0 0 5 / 0 0 3 1 5 6 (WO , A 1 )  
Protein engineering. 1995, Vol.8, No.6, p.601-608  
Journal of biotechnology. 2007 Jan, Vol.128, No.1, p.162-183  
Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals. 2007 Oct, Vol.22, No.5, p.573-584

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 9 / 0 0  
C 4 0 B 3 0 / 0 0 - 4 0 / 1 8  
C a p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
U n i P r o t / G e n e S e q  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
P u b M e d