

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-541361

(P2009-541361A)

(43) 公表日 平成21年11月26日(2009.11.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 H O 4 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	
C 4 O B 30/00 (2006.01)	C 4 O B 30/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁)		

(21) 出願番号	特願2009-516819 (P2009-516819)	(71) 出願人	509000552
(86) (22) 出願日	平成19年7月5日 (2007.7.5)		エフースター ビオテヒノロジーシュ フ
(85) 翻訳文提出日	平成21年2月25日 (2009.2.25)		ォルシュングスー ウント エントヴィッ
(86) 国際出願番号	PCT/AT2007/000343		クルングスゲス. エム. ベー. ハー.
(87) 国際公開番号	W02008/003116		ォーストリア共和国 ウィーン ムートガ
(87) 国際公開日	平成20年1月10日 (2008.1.10)		ッセ 1 8
(31) 優先権主張番号	A1145/2006	(74) 代理人	100106002
(32) 優先日	平成18年7月5日 (2006.7.5)		弁理士 正林 真之
(33) 優先権主張国	ォーストリア (AT)	(74) 代理人	100120891
			弁理士 林 一好
		(72) 発明者	ヒムラー ゴットフリート
			ォーストリア共和国 グロス-エンツァー
			スドルフ エスヴェー80 ドナウ-オー
			ダー-カナル イーファォ
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 免疫グロブリンのエンジニアリング方法

(57) 【要約】

【課題】改良された抗原結合特性を有する免疫グロブリン及び可変免疫グロブリンドメイン、並びに、改良された可変ドメインを有する免疫グロブリンのエンジニアリング及び調製方法を提供すること。

【解決手段】免疫グロブリンのエンジニアリング方法。詳細には、当該免疫グロブリンは、可変ドメイン及び前記免疫グロブリンの少なくとも2つの構造ループに少なくとも1つの修飾を有し、抗原のエピトープへの前記免疫グロブリンの結合を決定できる。未修飾の免疫グロブリンは前記エピトープと顕著に結合しない。少なくとも2つの構造ループを有してなる免疫グロブリンをコードする核酸を準備するステップと、前記構造ループ中の各々の少なくとも1つのヌクレオチド残基を修飾するステップと、発現システム中に前記修飾された核酸を移すステップと、前記修飾免疫グロブリンを発現させるステップと、エピトープと発現された前記修飾免疫グロブリンを接触させるステップと、前記修飾免疫グロブリンが前記エピトープと結合するか否かを測定するステップと、を有してなる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

免疫グロブリンのエンジニアリング方法であって、

前記免疫グロブリンが、可変ドメインと、前記免疫グロブリンの少なくとも 2 つの構造ループ中の少なくとも 1 つの修飾と、を有し、抗原エピトープに対する前記免疫グロブリンの結合を決定し、未修飾の免疫グロブリンが前記エピトープと顕著に結合せず、

前記方法が、

- 少なくとも 2 つの構造ループからなる免疫グロブリンをコードする核酸を準備するステップと、
 - 前記構造ループの各々の少なくとも 1 つのヌクレオチド残基を修飾するステップと、
 - 発現システム中に前記修飾された核酸を移すステップと、
 - 前記修飾免疫グロブリンを発現させるステップと、
 - エピトープと発現された修飾免疫グロブリンとを接触させるステップと、
 - 前記修飾免疫グロブリンが前記エピトープと結合するか否かを測定するステップと、
- を有してなる方法。

10

【請求項 2】

前記免疫グロブリンが、少なくとも 2 つの異なるエピトープに特異的に結合する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記免疫グロブリンが、ヒト、ラクダ科の動物又はマウス由来である、請求項 1 から 2 のいずれか 1 項記載の方法。

20

【請求項 4】

前記可変ドメインが V_H、V_K、V_L、V_HH 及びそれらの組み合わせのからなる群から選択される、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

V_H、V_K、V_L又はV_HHのループが、アミノ酸 7 ~ 21、アミノ酸 25 ~ 39、アミノ酸 41 ~ 81、アミノ酸 83 ~ 85、アミノ酸 89 ~ 103 又はアミノ酸 106 ~ 117 の範囲内で少なくとも 1 つの修飾を有し、ドメインのアミノ酸位の付番が I M G T に従う、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項記載の方法。

30

【請求項 6】

ヒト由来のV_H、V_K又はV_Lのループが、アミノ酸 8 ~ 20、アミノ酸 44 ~ 50、アミノ酸 67 ~ 76 及びアミノ酸 89 ~ 101、最も好ましくはアミノ酸位 12 ~ 17、アミノ酸位 45 ~ 50、アミノ酸位 69 ~ 75 及びアミノ酸位 93 ~ 98 の範囲内で少なくとも 1 つの修飾を有し、ドメインのアミノ酸位の付番が I M G T に従う、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

マウス由来のV_Hのループが、アミノ酸 6 ~ 20、アミノ酸 44 ~ 52、アミノ酸 67 ~ 76 及びアミノ酸 92 ~ 101 の範囲内で少なくとも 1 つの修飾を有し、ドメインのアミノ酸位の付番が I M G T に従う、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項記載の方法。

40

【請求項 8】

ラクダ科の動物由来のV_HHのループが、アミノ酸 7 ~ 18、アミノ酸 43 ~ 55、アミノ酸 68 ~ 75 及びアミノ酸 91 ~ 101 の範囲内で少なくとも 1 つの修飾を有し、ドメインのアミノ酸位の付番が I M G T に従う、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

前記修飾免疫グロブリンが、1 つ以上の修飾免疫グロブリン又は未修飾の免疫グロブリン又はその部分と更に組み合わせ、組合せ免疫グロブリンを得る、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

前記免疫グロブリンが組換え技術によって組み合わされている、請求項 9 記載の方法。

50

【請求項 1 1】

核酸中の少なくとも 1 つのヌクレオチドの修飾により、前記核酸によってコードされる免疫グロブリンの 1 つ以上のアミノ酸の置換、欠失及び / 又は挿入が生じる、請求項 1 から 1 0 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 2】

前記構造ループ中の各々の少なくとも 1 つのアミノ酸が、部位特異的ランダム変異導入により修飾される、請求項 1 から 1 1 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 3】

ランダムに修飾された前記核酸分子が、配列 5' - N N S - 3'、5' - N N N - 3' 又は 5' - N N K - 3' を有する少なくとも 1 つのヌクレオチドの反復単位を有してなる、請求項 1 2 記載の方法。

10

【請求項 1 4】

免疫グロブリンのライブラリの調製への、請求項 1 から 1 3 のいずれか 1 項記載の方法により得られる免疫グロブリンの使用。

【請求項 1 5】

少なくとも 2 つの構造ループに修飾を有し、請求項 1 から 1 3 のいずれか 1 項記載の方法により得られる、少なくとも 1 0 個の免疫グロブリンを有してなるライブラリ。

【請求項 1 6】

少なくとも 2 つの構造ループに少なくとも 4 つのアミノ酸変異を有する免疫グロブリンを有してなる、請求項 1 5 記載のライブラリ。

20

【請求項 1 7】

構造ループ中に修飾を有する可変ドメインを有する少なくとも 1 0 個の免疫グロブリンを有してなる、請求項 1 5 又は 1 6 記載のライブラリ。

【請求項 1 8】

各ドメインの構造ループに少なくとも 1 つの修飾を有する少なくとも 2 つの修飾された可変ドメインを有する免疫グロブリンを有してなる、請求項 1 5 から 1 7 のいずれか 1 項記載のライブラリ。

【請求項 1 9】

少なくとも 2 つの構造ループに少なくとも 4 つの修飾を有する免疫グロブリンを有してなる、請求項 1 5 から 1 8 のいずれか 1 項記載のライブラリ。

30

【請求項 2 0】

各単鎖免疫グロブリンの構造ループに少なくとも 2 つの修飾を有する修飾された単鎖免疫グロブリンを有する少なくとも 1 0 個の免疫グロブリンを有してなる、請求項 1 5 から 1 9 のいずれか 1 項記載のライブラリ。

【請求項 2 1】

各 V H H ドメインの構造ループに少なくとも 2 つの修飾を有する修飾された V H H ドメインを有する少なくとも 1 0 個の免疫グロブリンを有してなる、請求項 1 5 から 2 0 のいずれか 1 項記載のライブラリ。

【請求項 2 2】

各ヒト抗体の構造ループ領域に少なくとも 2 つの修飾を有する修飾されたヒト抗体を含む少なくとも 1 0 の免疫グロブリンを有してなる、請求項 1 5 から 2 1 のいずれか 1 項記載のライブラリ。

40

【請求項 2 3】

各 F a b 断片の構造ループ領域に少なくとも 2 つの修飾を有する修飾された F a b 断片を有する少なくとも 1 0 個の免疫グロブリンを有してなる、請求項 1 5 から 2 2 のいずれか 1 項記載のライブラリ。

【請求項 2 4】

V H、V K、V L 及び V H H からなる群から選択される免疫グロブリンを有してなる、請求項 1 5 から 2 3 のいずれか 1 項記載のライブラリ。

【請求項 2 5】

50

請求項 1 から 13 のいずれか 1 項記載の方法により得られ、構造ループ中に、少なくとも 2 つの修飾による抗原特異的な結合部位を有する、修飾免疫グロブリン。

【請求項 26】

前記抗原がヒト血清アルブミンである、請求項 25 記載の修飾免疫グロブリン。

【請求項 27】

前記抗原が Fc 受容体である、請求項 26 記載の修飾免疫グロブリン。

【請求項 28】

分子を特異的に結合させる及び / 又は検出する方法であって、

(a) 請求項 15 から 24 のいずれか 1 項記載の修飾免疫グロブリンのライブラリか、又は請求項 1 から 13 のいずれか 1 項記載の方法により得られる修飾免疫グロブリンと、前記分子を含有する試験サンプルと、を接触させるステップと、

(b) 特異的な免疫グロブリン / 分子複合体の潜在的形成を検出するステップと、を有してなる方法。

【請求項 29】

分子に特異的に結合する修飾免疫グロブリンを分離する方法であって、

(a) 請求項 15 から 24 のいずれか 1 項記載の修飾免疫グロブリンのライブラリか、又は請求項 1 から 13 のいずれか 1 項記載の方法により得られる修飾免疫グロブリンと、前記分子を含有するサンプルと、を接触させるステップと、

(b) 形成された特異的な修飾免疫グロブリン / 分子複合体を分離するステップと、

(c) 任意に修飾免疫グロブリンを前記複合体から分離するステップと、を有してなる方法。

【請求項 30】

結合パートナーのキットであって、

(a) 請求項 15 から 24 のいずれか 1 項記載の修飾免疫グロブリンのライブラリか、又は、請求項 1 から 13 のいずれか 1 項記載の方法によって得た修飾免疫グロブリンと、

(b) 抗原のエピトープを含有する結合分子と、を有してなるキット。

【請求項 31】

請求項 15 から 24 のいずれか 1 項記載の修飾免疫グロブリンをライブラリから選抜するための、請求項 30 記載のキットの結合分子の使用。

【請求項 32】

少なくとも 2 つの修飾された構造ループを有し、各構造ループ中の少なくとも 1 つのアミノ酸が、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、イソロイシン、セリン、メチオニン、アラニン及びアスパラギンからなる群から選択されるアミノ酸で修飾されている、変異型可変ドメインポリペプチド。

【請求項 33】

少なくとも 1 つの修飾された構造ループが、前記アミノ酸のうちの少なくとも 2 つを有する、請求項 32 記載の変異型可変ドメインポリペプチド。

【請求項 34】

修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインがヒト由来又はヒト化免疫グロブリン可変ドメインであって、

位置 12 ~ 17、45 ~ 50、69 ~ 75 及び 93 ~ 98 のいずれか 1 つにおける少なくとも 1 つのチロシン、

及び / 又は、位置 12 ~ 17、位置 45 ~ 50、69、71 ~ 75、93 ~ 94 及び 96 ~ 98 のいずれか 1 つにおける少なくとも 1 つのトリプトファン、

及び / 又は、12 ~ 17、46、47、49、50、69 ~ 74、及び 93 ~ 98 のいずれか 1 つにおける少なくとも 1 つのヒスチジン、

及び / 又は、位置 12 ~ 17、45 ~ 47、49、50、70 ~ 73、75、94 ~ 96 及び 98 のいずれか 1 つにおける少なくとも 1 つのアスパラギン、

及び / 又は、位置 12 ~ 17、46 ~ 50、69 ~ 71、73 ~ 75、93、95、96

10

20

30

40

50

及び 98 のいずれか 1 つにおける少なくとも 1 つのメチオニン、
及び / 又は、位置 13、71、75、94、95 及び 98 のいずれか 1 つにおける少なくとも 1 つのセリン、
及び / 又は、位置 12、14 ~ 17、45 ~ 50、69、70、72 ~ 75、93 及び 96 ~ 98 のいずれか 1 つにおける少なくとも 1 つのイソロイシン、
及び / 又は、位置 15、46、48、70 ~ 73、75、93、95 及び 98 のいずれか 1 つにおける少なくとも 1 つのフェニルアラニンを有する、請求項 32 又は 33 記載の変異型可変ドメインポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は修飾免疫グロブリン可変ドメインポリペプチドからなる分子のエンジニアリング及び調製方法に関する。

【0002】

本発明は広義には、特異的な結合特性をタンパク質に付与することを目的とする、エンジニアリングに関する。より詳細には、上記でエンジニアリングされたタンパク質は、免疫グロブリン（抗体）であって、より詳細には、可変ドメイン、又は免疫グロブリンの 1 つの可変ドメインのペア若しくはそれらの組合せ、又は他の免疫グロブリンドメインとの組合せから選択される。免疫グロブリンの特異的な結合特性は重要な特徴である。なぜなら、それらは抗原などの他の分子との相互作用を制御し、かかる免疫グロブリンは診断及び治療のアプリケーションにとり有用となるからである。

20

【背景技術】

【0003】

抗体の構造

抗体の基本構成は、様々な抗体の種類において、様々な種において類似しているため、本発明では例として、完全長 IgG1 免疫グロブリンを使用して説明する。

【0004】

同一の 2 つの重鎖（H）及び同一の 2 つの軽鎖（L）が結合し、Y 字形の抗体分子を形成する。重鎖は各々 4 つのドメインを有する。アミノ末端可変ドメイン（VH）は Y 字の先端部に存在する。これに続く形で、Y 字のステム側に、3 つの定常ドメインが存在する（CH1、CH2、及びカルボキシ末端側の CH3）。短いストレッチ（スイッチ）が、重鎖可変領域と定常領域を連結する。ヒンジ部が、CH2 及び CH3（Fc 断片）を、抗体の残りの部分（Fab 断片）と連結する。完全抗体分子のヒンジ部のタンパク質を分解させることにより、1 つの Fc 及び 2 つの同一の Fab 断片を生じさせることができる。軽鎖は 2 つのドメインから構成され（可変部（VL）及び定常部（CL））、スイッチにより分離されている。

30

【0005】

ヒンジ領域のジスルフィド結合により、2 つの重鎖が連結される。更なるジスルフィド結合によって、軽鎖が重鎖に連結される。

【0006】

40

Y の「先端」部に、重鎖及び軽鎖の可変領域（VH 及び VL）が存在し、それらが抗原と反応するために配置されている。この分子の先端は、アミノ酸配列の N 末端が位置する側である。

【0007】

Y のステム部分は幾つか突出しており、能率的にエフェクター機能を媒介する（例えば補体の活性化、及び Fc 受容体、又は ADC C 及び ADC P との相互作用）。その CH2 及び CH3 ドメインは、エフェクタータンパク質との相互作用を促進するために膨張する。アミノ酸配列における C 末端は先端とは反対側に位置し、Y の「ボトム部」と称される。

【0008】

50

免疫グロブリン可変ドメイン (Vドメイン)

抗体分子中の各ドメインは、コンプレス型の逆平行βバレル構造中に、各々強固にバックされた、2つのβシートからなる同様の構造を有する。この保存された構造は、免疫グロブリンフォールディング構造と称される。参考のため、非特許文献1：Borkら、(1994) J. Mol. Biol. 242: 309 - 320、非特許文献2：Halabyら、(1999) Protein Engineering 12: 563 - 571、非特許文献3：Immunobiology, 5th ed. Janeway, Charles A., Travers, Paul, Walport, Mark, Shlomchik, Mark. New York and London: Garland Publishing, 2001を参照。

10

【0009】

可変ドメイン中のフォールディング構造は、4鎖及び5鎖の2つのシート中に整列された、9つのβ鎖を有する。5鎖シートは、構造的に定常ドメインの3鎖シートに対応するが、余分のC鎖及びC'鎖を有する。残りの鎖(A、B、C、D、E、F、G)は、定常ドメインの免疫グロブリンフォールディング構造中のそれらの対応する鎖と同じトポロジー及び類似の構造を有する。定常ドメインの場合と同様、ジスルフィド結合は逆向きシート中のB鎖とF鎖を連結する。免疫グロブリン中の軽鎖及び重鎖の可変ドメインは、3つの超可変ループ又は相補性決定領域(CDRs)を有する。Vドメイン中の3つのCDRs(CDR1、CDR2、CDR3)は、βバレルの一端でクラスターを形成する。CDRsは、免疫グロブリンフォールディング構造中のβ鎖B-C、C-C'1及びF-Gを連結するループである。CDRs中の残基は各免疫グロブリン分子間で様々に異なり、抗原特異性を各抗体に与える。

20

【0010】

抗体分子の先端のVL及びVHドメインは密接にバックされ、6つのCDRs(各ドメイン3つずつ)が集まり、その結果、抗原との特異的な結合を可能にする表面(又は空腔)を形成する。天然における抗体の抗原結合部位はすなわち、軽鎖可変ドメインのB-C、C-C'1及びF-G鎖を連結するループ、並びに重鎖可変ドメインのB-C、C-C'1及びF-G鎖を連結するループから構成される。

【0011】タンパク質エンジニアリングのための足場：

タンパク質の3D構造を、デザインのための援助として使用し、多くのタンパク質の表面に存在するアミノ酸残基を、足場としてタンパク質のコア構造体を使用してランダム化する。例として、以下の先行技術文献(本願明細書に援用する)に、この戦略が記載又は概説されている：非特許文献4：Nygren PA, Uhlen M., Curr Opin Struct Biol. (1997) 7: 463 - 9、非特許文献5：Binz HK, Amstutz P, Kohl A, Stumpff MT, Briand C, Forrer P, Grutter MG, Pluckthun A. Nat Biotechnol. (2004) 22: 575 - 82、非特許文献6：Vogt M, Skerra A. Chembiochem. (2004) 5: 191 - 9、特許文献1：米国特許第6562617号、非特許文献7：Huf tonら、FEBS Letters. (2000) 475: 225、非特許文献8：Binzら、Nat Biotechnol. (2005) 23: 1257 - 68、非特許文献9：Hosseら、Protein Sci. (2006) 15: 14 - 27。

30

40

【0012】

この技術の基本的な原則は、多くのタンパク質が安定な核を有し、それらが二次的構造エレメント(例えばβシート又はαヘリックス(それらはループ、ターン若しくはランダムコイル構造などにより相互に連結している))の特異的なアレンジにより形成されているという観察に基づく。典型的には、これらの3つの構造要素は、タンパク質の全体構造にとりあまり重要でなく、これらの構造エレメント中のアミノ酸残基は、タンパク質の通常のフォールディング構造を破壊せずに置換することができる。この設計原理のための、

50

天然に存在する例としては、抗体中に存在する免疫グロブリン様ドメインのCDR、T細胞受容体、及び免疫グロブリンスーパーファミリーの他の分子が挙げられる。人工物の例としては、リボカリン、アンキリン、クニツドメイン阻害剤、ノッティング (knotting) 及び他のタンパク質足場などが挙げられる。

【0013】

免疫グロブリン可変ドメインのCDRループの操作：

従来技術の多くは、免疫グロブリンなどの足場が既存の抗原結合部位又はリガンド結合部位を操作するために使用され、それによって新規な結合特性が導入されることを記載している。より正確には、主にCDRドメインは、その結合親和性又は特異性を変化させるために修飾され、換言すれば、免疫グロブリンフォールディング構造の場合、天然の抗原結合部位は、抗原との結合に関してエンジニアリングされる。膨大な量の文献が存在し、それらはかかる操作された免疫グロブリンに関する様々なフォーマットを記載しており、通常全長抗体、融合生成物及び/又は断片 (例えば単鎖Fv断片 (scFv)、二特異性抗体、ミニ本体、シングルドメイン又はFab断片など) の形で、ファージ粒子又は他のウイルス及び細胞の表面にディスプレイするか、又は様々な原核若しくは真核生物発現システムにおいて可溶性発現させる方法が存在する。当該技術は、例えば非特許文献10：Holliger & Hudson, Nat. Biotechnol. (2005) 23：1126-36、及び非特許文献11：Hoogenboom, Nat. Biotechnol. (2005) 23：1105-16.において概説される。

10

【0014】

免疫グロブリン可変ドメインのフレームワーク、又は非CDRドメイン：

免疫グロブリン可変ドメインのCDRループは、抗原特異性を定める。当該分子の残りの部分は、フレームワーク (FR) と称される。これらのフレームワークドメインはしながらβ鎖及びループ構造からなる。

20

【0015】

天然の免疫グロブリンのCDRループでないループ、又はCDRループによって定まる抗原結合ポケットの一部でないループは、抗原結合又はエピート結合特異性を有しない。しかしながら、免疫グロブリン分子全体の正しいフォールディング、及び/又はそのエフェクター機能若しくはその他の機能に貢献し、それゆえ、本発明においては構造ループと称される。

30

【0016】

抗体可変ドメインは通常、多くの理由から操作される：例えば様々な抗体フォーマットの構築、CDRグラフティング (他のフレームワークへの特異的な抗体の特異性のグラフティング、例えば非特許文献12：Jonesら、Nature (1986) 321：522-525、非特許文献13：Kashmiriら、Methods (2005) 36：25-34)、可変ドメインの表層を変化させ、それにより可溶性及び安定性を向上させること (例えば非特許文献14：Ewertら、Methods (2004) 34：184-99、非特許文献15：Conrathら、J. Mol. Biol. (2005) 350：112-125)、単量体化 (例えば非特許文献16：Dottoriniら、Biochemistry (2004) 43：622-628)、又は、可変ドメイン間の相互作用の研究 (例えば非特許文献17：Masudaら、FEBS J. (2006) 273：2184-94)。それらの操作の多くは、分子のフレームワークドメインの変化を伴うものであり、例えば可変ドメインの構造ループ内の若干のアミノ酸変異を実施するものである。

40

【0017】

CDRループのポジショニングに対する、遠隔したフレームワークドメインの影響は、CDRグラフティングの結果から明白であり、それは、1つのフレームワークから他方へのCDRsのグラフティングの後、フレームワークアミノ酸の変異が通常、抗原結合を回復するのに必要であることを示す (例えば非特許文献18：Foot & Winter (1992) J. Mol. Biol. 224：487-499、非特許文献19：Kett

50

leboroughら、Protein Eng. (1991) 4: 773 - 783、非特許文献20: Wuら、J. Mol. Biol. (1999) 294: 151 - 162)。

【0018】

非特許文献21: Simon及びRajwesky (Protein Sci. (1992) 5: 229 - 234) は、抗NP抗体B1 - 8からの重鎖可変ドメイン中のFR3ループへの、4つの残基挿入の効果を研究している。挿入変異体は、生合成における顕著な支障なく分泌された抗体として得られており、それは、抗体可変ドメインが、相補性決定ドメイン(CDRs)のみならず、フレームワークドメイン(FR)ループにおいても、鎖長変化に適応できることを示している。この場合、CDRループにより形成される元の抗原結合部位は、隣接した構造ループの修飾に影響を受けない。

10

【0019】

構造ループ領域へのCDRループのグラフティング:

特許文献2: 欧州特許出願公告第0640130B1号は、複数の生物学的結合部位(単一のVドメイン又はFvs)を有するキメラ免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質のアナログ(χ タンパク質)を記載している。これらのタンパク質上の結合部位は分子の免疫グロブリンスーパーファミリーに関連する分子に由来する超可変ドメインからなり、例えば免疫グロブリン、細胞表面抗原(例えばT細胞抗原)及び細胞受容体(例えばFc受容体)などが挙げられる。超可変ドメインとは「CDR様ドメイン」と呼ばれ、リガンド結合部位を定める。更に、 χ タンパク質は少なくとも更に1つのリガンド結合部位部分、及びCDR様ドメインを有し、 β -バレルドメインのFR様領域にスプライスされる。

20

【0020】

χ タンパク質の各リガンド結合部位はゆえに、免疫グロブリンスーパーファミリーの分子に由来するCDR様ドメインからなる。例えば、リガンド結合部位はリガンドが抗原である免疫グロブリン分子に由来するCDRsからなる。

【0021】

特許文献2: 欧州特許出願公告第0640130B1はすなわち、可変ドメインの構造ループに、免疫グロブリンスーパーファミリー分子に由来する所定の特異性を有するCDR様ドメインをスプライシングする方法を教示する。 χ タンパク質の発明者は、機能的な二重特異的な抗体がこの技術により調製できることを示唆している。しかしながら、この技術の要件として、可変ドメインのためのCDR様ループの相対的な方向(CDRループの左右対称性)が、構造ループの相対的な方向と近似するように再生されていることが挙げられる。特許文献2: 欧州特許出願公告第0640130B1は、CDR様ループ左右対称のかかる近似が、構造ループにとり必要であることを記載している。しかしながら、CDRループ及び構造ループの相対的な方向が、十分な詳細及び解像度において同様であることは疑わしい。ゆえに、この技術によって二重特異的な分子を開発することが可能であることは、実は現在まで開示されていなかった。

30

【0022】

特許文献2: 欧州特許出願公告第0640130B1は、R19.9(p-アゾベンゼンアルソネートに特異的なマウスモノクローナル抗体)、及び26-10(ウアバインに特異的なマウスモノクローナル抗体)が、それぞれ主要なCDRループを提供するフレームワークとして使用できることを例示している。マウス抗リゾチーム抗体D1.3のCDRループは、構造ループ領域とグラフトしている。しかしながら、グラフト後の機能的な特異性は記載されていない。

40

【0023】

他の実施例では、ウアバインに特異的な単鎖抗体26-10は、ウアバインに特異的な単鎖Fv抗体断片の構造ループ中にリゾチームに特異的な抗体からの2つのCDRsをグラフトした後にそのウアバイン特異性が保持されていることを記載している。しかしながら、この方法に従って作られた抗体断片が、リゾチーム特異的な結合特異性を有すること

50

は記載されていない。

【0024】

構造ループ領域へのペプチドのグラフティング：

特許文献3：国際公開第00244215A2号は、特異的な標的結合部位及びFcエフェクターペプチドからなる結合分子を記載している。Fcエフェクターペプチドは、エフェクター分子と相互作用する最高100のアミノ酸のペプチドである。抗原との結合能力が悪影響を受けない場合には、エフェクターペプチドは例えば抗体のループ領域に挿入できる。免疫グロブリン断片のCH1-ドメインの非CDRループへのエフェクターペプチドの挿入が例として挙げられる。但し可変ドメインに関しては、同様の挿入をしたという記載は存在しない。この開示に従って調製される非CDRループとグラフト化したあらゆるペプチドは、それが配置された部位における異なる構造的環境のため、不活性となる可能性が高い。更に、ペプチドが可変ドメインの構造ループにグラフトする場合、親免疫グロブリンの特異的なCDRループ形態の保持が困難となる可能性もある。したがって、抗原との結合又はエフェクター分子との結合の損失なしに、エフェクターペプチドをいずれかの可変ドメインにグラフトさせることに関しては記載されていない。

10

【0025】

特許文献4（国際出願第PCT/EP2006/050059号）では、構造ループ領域中を修飾免疫グロブリンの設計方法が記載され、それにより新規な抗原結合部位を形成させている。この方法は免疫グロブリンに広く適用でき、様々な抗原を標的とする、免疫グロブリンのシリーズを作製する用途に使用できる。

20

【0026】

特許文献5（米国特許出願公開第2005/266000A1号）では、変異型の重鎖可変フレームワークドメイン（VFR）を有するポリペプチドを記載する。VFRは抗原結合ポケット又は溝の一部であり、抗原と接触できる。VFRはCDRループ領域の一部であって、CDRループの側部の可変ドメインに位置し、CDRループ領域を介して抗原結合を支持する機能を有する。VFR以外のフレームワークループは、抗原結合部位の設計上の理由から変異を有していない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0027】

30

【特許文献1】米国特許第6562617号

【特許文献2】欧州特許出願公告第0640130B1号

【特許文献3】国際公開第00244215A2号

【特許文献4】国際出願第PCT/EP2006/050059号

【特許文献5】米国特許出願公開第2005/266000A1号

【非特許文献】

【0028】

【非特許文献1】Borkら、(1994) J. Mol. Biol. 242: 309 - 320

【非特許文献2】Halabyら、(1999) Protein Engineering 12: 563 - 571

40

【非特許文献3】Immunobiology, 5th ed. Janeway, Charles A., Travers, Paul, Walport, Mark, Shlomchik, Mark. New York and London: Garland Publishing, 2001

【非特許文献4】Nygren PA, Uhlen M., Curr Opin Struct Biol. (1997) 7: 463 - 9

【非特許文献5】Binz HK, Amstutz P, Kohl A, Stumpp MT, Briand C, Forrer P, Grutter MG, Pluckthun A. Nat Biotechnol. (2004) 22: 575 - 82

50

【非特許文献6】Vogt M, Skerra A. Chembiochem. (2004) 5: 191 - 9

【非特許文献7】Huf tonら、FEBS Letters. (2000) 475: 225

【非特許文献8】Binzら、Nat Biotechnol. (2005) 23: 1257 - 68

【非特許文献9】Hosseら、Protein Sci. (2006) 15: 14 - 27

【非特許文献10】Holliger & Hudson, Nat. Biotechnol. (2005) 23: 1126 - 36

【非特許文献11】Hoogenboom, Nat. Biotechnol. (2005) 23: 1105 - 16

【非特許文献12】Jonesら、Nature (1986) 321: 522 - 525

【非特許文献13】Kashmiriら、Methods (2005) 36: 25 - 34

【非特許文献14】Ewertら、Methods (2004) 34: 184 - 99

【非特許文献15】Conrathら、J Mol Biol. (2005) 350: 112 - 125

【非特許文献16】Dottoriniら、Biochemistry (2004) 43: 622 - 628

【非特許文献17】Masudaら、FEBS J. (2006) 273: 2184 - 94

【非特許文献18】Foote & Winter (1992) J. Mol. Biol. 224: 487 - 499

【非特許文献19】Kettleboroughら、Protein Eng. (1991) 4: 773 - 783、

【非特許文献20】Wuら、J. Mol. Biol. (1999) 294: 151 - 162

【非特許文献21】Simon及びRajwesky (Protein Sci. (1992) 5: 229 - 234

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0029】

本発明の目的は、改良された抗原結合特性を有する免疫グロブリン及び可変免疫グロブリンドメイン、並びに、改良された可変ドメインを有する免疫グロブリンのエンジニアリング及び調製方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0030】

上記の課題は、以下の本発明の内容により解決される。

【0031】

本発明は免疫グロブリンのエンジニアリング方法の提供に関し、詳細には、当該免疫グロブリンは、可変ドメインと、前記免疫グロブリンの少なくとも2つの構造ループに少なくとも1つの修飾と、を有し、抗原のエピトープへの前記免疫グロブリンの結合を決定する。未修飾の免疫グロブリンは前記エピトープと顕著に結合しない。上記方法は以下のステップを有してなる：

- 少なくとも2つの構造ループを有してなる免疫グロブリンをコードする核酸を準備するステップと、
- 前記構造ループ中の各々の少なくとも1つのヌクレオチド残基を修飾するステップと、
- 発現システム中に前記修飾された核酸を移すステップと、
- 前記修飾免疫グロブリンを発現させるステップと、
- エピトープと発現された前記修飾免疫グロブリンを接触させるステップと、

10

20

30

40

50

- 前記修飾免疫グロブリンが前記エピトープと結合するか否かを測定するステップ。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】配列番号1及び配列番号2のアミノ酸配列を示す。

【図2】ラクダの抗-TNF- α VHHドメインをコードする合成遺伝子を示す核酸配列、並びに1文字コードで表記した翻訳後のアミノ酸配列を示す。クローニングに使用する制限部位を、ヌクレオチド配列中の下線で示す。ライブラリにおけるランダム化されたアミノ酸残基を、アミノ酸配列中の下線で示す（挿入されたアミノ酸はこの配列に示さない）。

【図3】PCR反応及びライゲーション手順の模式図を示す。水平の矢印は、PCRプライマの位置及び方向を示す。（左から右の）垂直線は、それぞれNcoI、BglII及びNotI部位を示す。

【図4】実施例6のライブラリの構築の際の、PCR反応の模式図を示す。

【図5】scFv 2F5 wtの合成遺伝子ライブラリ1（VH-リンカー-VL）及びその翻訳（ランダム化された2つの構造ループを有する）を示す。

【図6】scFv 2F5 wtの合成遺伝子ライブラリ2（VH-リンカー-VL）及びその翻訳（ランダム化された2つの構造ループを有する）を示す。

【図7】scFv 2F5 wtの合成遺伝子ライブラリ3（VH-リンカー-VL）及びその翻訳（ランダム化された3つの構造ループを有する）を示す。

【図8】scFv 2F5 wtの合成遺伝子及びその翻訳（VH-リンカー-VL）を示す。

【発明を実施するための形態】

【0033】

本発明により設計される構造ループは、好ましくは1つ又は2つの構造ループ領域中に位置し、若干の場合には、修飾が2つ以上の構造ループ領域内に設けられる。

【0034】

抗体可変ドメインの構造ループ領域に結合部位を設計する際の、国際公開第00/244215A2号及び欧州特許出願公告第0640130B1号にて説明される現在の技術水準の欠点を克服するために、本発明は、その天然の前後関係（すなわち抗体可変ドメイン）中のポリペプチド（すなわち修飾された構造ループ領域からなる可変ドメインペプチド）における特異的な結合を選抜する方法を提供する。抗原結合に関して選抜できる変異型の免疫グロブリンドメイン構造の数を増加させるため、少なくとも2つの構造ループ又はループ領域を本発明により修飾する。すなわち、それにより全体のドメイン構造の妨害を最小化しつつ、多くの修飾を選抜することが可能となる。少なくとも2つのループ又はループ領域を修飾することによる他の効果は、特異的な結合（パートナー）と相互作用できる表面を拡大できるということである。このようにして修飾された免疫グロブリン可変ドメインは、特定の機能又は結合に基づき選抜される。本発明は、結合パートナーに対して、高い親和性で結合し、及び/又は高い特異性で、修飾された構造ループ又はループ領域を介して結合する、修飾免疫グロブリン可変ドメイン及び修飾免疫グロブリンのエンジニアリングを可能とする。上記の方法は、最小の修飾で、可変免疫グロブリンドメインの全体構造の破壊を伴わない、特異的な結合分子の選抜を可能にする。

【0035】

親免疫グロブリンの特異的なCDRループ形態を保持するという課題を克服するため、可変ドメインの構造ループを本発明により修飾する。すなわち、親抗体の免疫グロブリンが有する、抗原との結合又はエフェクター分子との結合能力の顕著な損失を伴うことなく、抗原との結合特性を付与することに、最初に成功したのが本発明である。本発明では以外にも、親免疫グロブリンが有する、特異的なCDRループ形態による結合特性（例えば結合親和性、アビディティ及び特異性）を顕著に妨げることなく、免疫グロブリンを設計できることを見出した。

【0036】

10

20

30

40

50

特異的なCDRループ形態は、CDRループ又はCDRループ領域による抗原-結合を提供する。かかるCDRループ形態による抗原結合を行ういかなる免疫グロブリンも、本発明により修飾されることにより、免疫グロブリンの構造ループ中に更なる結合部位を形成させることができる。好ましくは、親分子の有する、特異的なCDRコンホメーション及び元の抗原結合特性が保持されるか又は変化しない。CDRループ形態の結合特性は、親分子の結合親和性が著しく減少しない限りにおいて、維持されるのが好ましく、例えば、解離定数 K_d が著しく増加しないことである（ K_d の差異が要因であり、 10^4 未満、好ましくは 10^3 未満、好ましくは 10^2 未満、若しくは 10 未満であることを意味する）。

【0037】

本発明においては、本発明の鍵となる特徴の1つは、免疫グロブリン若しくは免疫グロブリン可変ドメインのエンジニアリングが、抗原との結合に通常関係しない領域において、換言すれば、抗体可変ドメインのCDRs以外の領域において行われるということである。免疫グロブリンドメインの特異的なフォールディング構造により、構造的にCDRsに類似しているが、配列中の位置及び構造において異なる領域への、ランダムな変異導入が可能となることを見出した。本発明により同定される領域は、CDRs様の、免疫グロブリンフォールディング構造の β 鎖を連結しているループ領域である。これらの構造ループ領域は、CDRループにより媒介される免疫グロブリンの可変ドメインの結合に影響を及ぼすことなく、本発明にて説明したように変異されうる。前記構造ループ領域を変異させることにより、新規な分子結合面又は結合ポケットが形成され、それはサイズ及び形状において、抗体の天然の抗原結合部位のCDRループにより形成される結合面又は結合ポケットと類似している。構造ループは、更なるアミノ酸の挿入により延長できるため、新規に形成された結合部位の構造は、それが結合すべき標的に応じて調整できる。例えば、特に小分子との結合に適する深い結合ポケットは、長いループ（すなわちそれらの配列中に更なるアミノ酸を挿入された構造ループ）によって、優先的に形成されうる。平坦な結合表面（大きい、平坦な分子表面を有する標的と結合することに適する）は、構造ループ中の残余部分が更なる残余部分の挿入なしで変異する場合に、優先的に形成される。より詳細には、ヒト又はヒト化重鎖可変ドメインの β 鎖A-B、C'-D及びE-Fを連結しているループ中に、ランダム若しくはセミランダムに突然変異を導入することによって、ヒト血清アルブミン又はFc受容体（通常ヒト若しくはヒト化免疫グロブリン可変ドメインにより認識若しくは結合されない。）にも特異的に結合する変異ドメインが選抜されることが、本願明細書に記載されている。導入される突然変異には、野生型配列中の選択されたアミノ酸残基鎖が、ランダムに選ばれた残基と置換される突然変異が包含され、また、上記のループへの更なるアミノ酸残基の挿入も包含される。すなわち、本発明では、上記した方法に従って得られる、若しくは調製されうる、好適に修飾された免疫グロブリンの提供に関する。それは、抗原（特に血清アルブミン、細胞受容体及び補体因子、より詳しくはヒト血清アルブミン及びFcレセプタ）に特異的に結合する部位を有する。

【0038】

特に本発明は、抗原のエピトープに特異的に結合するドメインを有する、免疫グロブリン可変ドメイン及び免疫グロブリンのエンジニアリング（engineering）方法に関する。

【0039】

特に本発明に係る方法は、以下のステップを有してなる：

- 少なくとも1つの第1のエピトープに特異的に結合し、少なくとも2つの構造ループ又はループ領域を有してなる免疫グロブリンをコードする核酸を準備するステップと、
- 前記核酸によってコードされる前記構造ループ又はループ領域の各々の少なくとも1つのヌクレオチド残基を修飾するステップと、
- 発現システム中に前記修飾された核酸を移すステップと、
- 前記修飾免疫グロブリンを発現させるステップと、
- 前記少なくとも1つの第2のエピトープと、発現された前記修飾免疫グロブリン可変ド

メインを接触させるステップと、

- 前記修飾免疫グロブリン可変ドメインが第2のエピトープと特異的に結合するか否かを測定するステップ。

【0040】

この方法は、好ましくは免疫グロブリン可変ドメインペプチドに係る。好ましくは、本発明の本実施形態にかかる方法は、CDR領域、又は特異的なCDRループ立体構造を介して、前記第1のエピトープと結合する免疫グロブリンに関する。

【0041】

本発明に係る方法は更に、前記免疫グロブリン可変ドメインの少なくとも2つの構造ループ又はループ領域における各々の少なくとも1つの修飾であって、少なくとも1つの抗原に対する前記構造ループ又はループ領域の特異的な結合を決定する修飾に関し、未修飾の構造ループ又はループ領域を含有する免疫グロブリン可変ドメインは、かかる抗原と特異的に結合しない。

【0042】

本明細書で用いられる用語「免疫グロブリン」には、免疫グロブリン又はその部分、断片又は免疫グロブリンの誘導体が包含される。すなわち、本発明により修飾される「免疫グロブリン可変ドメインペプチド」（本明細書では、用語「免疫グロブリン」と「抗体」が同義的に用いられる）、並びに、構造ループ（例えばミニドメイン）を有する免疫グロブリン可変ドメイン又はそのドメイン若しくは部分、又はかかるドメインの構造ループが包含される。上記免疫グロブリンは、単離されたペプチドとして、又は他のペプチドとの組合せ分子として使用できる。場合によっては、単離された分子として、結合又は組合せを目的として、特定の修飾された構造ループ若しくは構造ループ領域、又はその部分を使用することが好ましい。「免疫グロブリン可変ドメイン」とは、本明細書では、修飾及び設計により、特異的な結合特性を有する免疫グロブリン可変ドメインペプチド又はポリペプチドを包含するものとして、定義される。上記ペプチドは、免疫グロブリン可変ドメイン配列に相応し、好ましくは少なくとも5アミノ酸長、好ましくは少なくとも10、又は少なくとも50若しくは100アミノ酸長であり、少なくとも構造ループ又は構造ループ領域を部分的に構成するか、あるいは当該可変ドメイン中の非CDRループ領域を構成する。上記ペプチドは好ましくは、機能を有さないアミノ酸、ハイブリッド若しくはキメラCDR-領域、又はCDR様領域、及び/又はCDR領域の標準的な構造と考えられる挿入物が除外される。上記結合特性は、特異的なエピトープ結合、親和性及び結合活性（アビディティ）に関連する特性である。

【0043】

本発明に係る免疫グロブリンの誘導体は、本発明の1つ以上の免疫グロブリン及び/又は融合タンパク質のあらゆる組合せであり、詳細には、本発明に係る免疫グロブリンのドメイン又はミニドメインは、他の1つ以上のタンパク質（例えば他の免疫グロブリン、リガンド、足場タンパク質、酵素、毒素など）の任意の部位において融合させてもよい。本発明の免疫グロブリンの誘導体はまた、組換え技術又は様々な化学的方法（例えば共有結合、静電的な相互作用、ジスルフィド結合など）によって、他の物質と結合させることにより調製できる。

【0044】

免疫グロブリンに結合する他の物質は、脂質、炭水化物、核酸、有機及び無機分子（例えばPEG、プロドラッグ又は薬剤）、又はそれらの任意の組み合わせでもよい。誘導体とは、同じアミノ酸配列を有するが、全部又は部分的に、非天然の又は化学的に合成したアミノ酸で修飾された免疫グロブリンである。

【0045】

本発明に係る設計された分子は、同様にそれ単独のタンパク質としても有用であるが、融合タンパク質又は誘導体としても有用であり、典型的には、大きな抗体構造体又は全長抗体分子の一部として融合してもよく、又は、その一部（例えばFab断片、Fc断片、Fv断片など）であってもよい。二重特異的、三重特異的な分子、あるいは同時により多

10

20

30

40

50

くの特異性を有する分子の作製を目的として、設計されたタンパク質を使用することができ、それにより、かかる分子の所望の使用条件に従って、同時に結合の多重性を制御し、あらかじめ選択することが可能となる。

【0046】

本発明の別の態様は、可変ドメインのCDRループ形態の他に、少なくとも1つのループ領域を有する免疫グロブリンに関し、特徴としては、前記少なくとも1つのループ領域が、少なくとも1つのアミノ酸修飾からなる少なくとも1つの修飾されたループ領域を形成し、前記少なくとも1つの修飾されたループ領域が、抗原中の少なくとも1つのエピトープと特異的に結合する。

【0047】

10

少なくとも1つの修飾された抗体ドメイン（非可変的な配列又は構造ループを介して特定のパートナーと結合する）と、少なくとも1つの他の結合分子（抗体、抗体断片、可溶性の受容体、リガンド若しくは他の修飾された抗体ドメインであってもよい）を結合させた分子であるのが好ましい。

【0048】

本発明に係る免疫グロブリンによって特異的に認識される結合ペアの一部として機能する分子は、好ましくはタンパク性分子、核酸分子及び炭水化物からなる群から選択される。

【0049】

20

修飾免疫グロブリンのループ又はループ領域は、特に抗原、タンパク性分子、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、核酸、グリカン、炭水化物、脂質、小さい有機分子、無機分子、又はその組合せ又は融合物など、あらゆる種類の結合分子又は構造とも特異的に結合できる。もちろん、上記修飾免疫グロブリンは、少なくとも2つのループ又はループ領域を有してもよく、それにより、当該ループ又はループ領域の各々が異なる分子又はエピトープと特異的に結合することができる。

【0050】

本発明では、各種の細胞表面抗原に対する抗原結合ドメイン又は抗原結合部位は、ある特定の抗体構造中の構造ループに導入されてもよい。

【0051】

30

本発明に係る免疫グロブリンの結合は、一方では好ましくはCDR - ドメインを介して、他方では、免疫グロブリンがかかるCDR - ドメインを含む場合、少なくとも2つの構造ループを修飾することにより形成される更なる結合部位によって行われる。それらの構造ループは、1つ以上の修飾された構造ループを有する、1つ又は少なくとも2つの可変ドメインにも配置される。すなわち、本発明に係る免疫グロブリンは、少なくとも2つの可変ドメイン中に少なくとも1つの修飾、又は少なくとも1つの可変ドメイン中に少なくとも2つの修飾を有することにより、可変ドメインの構造ループ中少なくとも2つの修飾を有する。好ましくは、修飾免疫グロブリンはすなわち、タンパク質の一次構造を変化させるか、又は三次構造を変化させてコンホメーション特異的な結合部位を得ることにより、結合部位を提示する。

【0052】

40

類推するに、いかなる種類、及びいかなる種からの免疫グロブリンの免疫グロブリン可変ドメインも、この種の設計を行うことができる。更に本発明では、目標とされる特異的なループを操作できるのみならず、免疫グロブリン可変ドメイン中のβ鎖を連結するいかなるループも同様に操作できる。

【0053】

いかなる生物体からの、いかなる種類の免疫グロブリンから設計された免疫グロブリン若しくは免疫グロブリン可変ドメインも、本発明により、シングルドメインとして、又はより大きな分子の一部として調製できる。例えば、それらは全長の免疫グロブリンの一部であってもよく、したがって、6つのCDRsにより形成されるその「通常の」抗原結合ドメイン、及び新規に設計された抗原結合ドメインを有する。このように、多重特異性、

50

例えば二重特異性の免疫グロブリンを調製できる。設計された免疫グロブリンドメインは、いかなる融合タンパク質の一部であってもよい。

【0054】

本発明の免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインは、全長抗体分子又は抗体の一部（例えばIgG、IgA、IgM、IgD、IgEなど）でもよい。本発明の免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインは、Fab、Fab2、scFv、Fv若しくはその部分、又は免疫グロブリンの他の誘導体又はそれらの組合せ（例えばミニボディ（minibody））、可変ドメインの重鎖及び軽鎖のドメイン（例えばFd、VL（V λ 及びV κ を含む）、VH、VHH）、並びに少なくとも2つの構造ループにより連結される免疫グロブリンドメインの2つの β 鎖からなるミニドメイン（Lafflyその他、（2005）Hum Antibodies、2005、14：33-55など）（単離されたドメインとして、又は、天然分子の前後において）、などの機能的な抗体断片を含むか、又はそれらからなってもよい。

10

【0055】

本発明に係る修飾免疫グロブリンは、可能であれば、1つ以上の修飾免疫グロブリンによって、又は、未修飾の免疫グロブリン又はそのパーツによって更に結合され、それにより組合せ免疫グロブリンを得る。当該組合せは好ましくは、コンビナトリアル技術によって得られるが、吸着、静電的な相互作用等、あるいはリンカーの有無における化学結合によっても得られる。好適なリンカー配列は、天然のリンカー配列若しくは機能的に適切な人工配列である。

20

【0056】

用語「免疫グロブリン」、「免疫グロブリン可変ドメインペプチド」、又は「免疫グロブリン可変ドメイン」は、同様に誘導体を含むものと理解される。本発明に係る免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインの誘導体は、本発明の1つ以上の免疫グロブリン及び/又は融合タンパク質のあらゆる組合せであり、詳細には、本発明に係る免疫グロブリンのドメイン又はミニドメインは、他の1つ以上のペプチド若しくはタンパク質（例えば他の免疫グロブリン、免疫グロブリンドメイン、Fc部分、リガンド、足場タンパク質、酵素、毒素、血清蛋白質など）の任意の部位において結合若しくは融合させてもよい。本発明の免疫グロブリンの誘導体はまた、組換え技術又は様々な化学的方法（例えば共有結合、静電的な相互作用、ジスルフィド結合など）によって、他の未修飾若しくは修飾された免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインと結合させることにより調製できる。

30

【0057】

免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインに結合させる他の物質は、脂質、炭水化物、核酸、有機及び無機分子（例えばPEG、プロドラッグ又は薬剤）、又はそれらの任意の組み合わせでもよい。誘導体とは、同じアミノ酸配列を有するが、全部又は部分的に、非天然の又は化学的に合成したアミノ酸で修飾された免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインでもある。

【0058】

本発明に係る設計された分子は融合タンパク質又は誘導体と同様、独立型タンパク質としても有用であり、最も典型的には、修飾の前後に、大きな抗体構造又は全長抗体分子の一部となるような方法で融合させる。本発明に係る免疫グロブリンはすなわち、Fab断片、Fc断片、Fv断片、単鎖抗体、特に単鎖Fv断片、二重又は多重特異性scFv、二重特異的抗体（diabody）、マルチボディ、免疫グロブリンドメインの多価体又は多量体などを有するか、又はそれらからなってもよい。一重特異的、二重特異的、三重特異的な分子、並びに多くの特性を有する分子を産生するために、設計されたタンパク質を使用することも可能である。本発明によって、かかる分子を使用する際の条件に従って、結合の原子価を制御し、同時に予め選択することも可能である。

40

【0059】

本発明によれば、抗原に対する1つ以上の結合部位、又は1つ以上の抗原に対する抗原

50

結合部位は、所定の抗体可変ドメイン構造の構造ループ又はループ領域に導入することができる。当該抗原は、天然に存在する分子、化学合成した分子又は組換え分子であってもく、溶液又は懸濁液に存在（固相のような粒子の表面若しくは内部、又は細胞又はウイルスの表面若しくは内部）に存在してもよい。抗原に対する免疫グロブリンの結合が本発明に従って達成できることが予想外であり、特に抗原が、その結合を妨げる分子及び構造に付着又は結合するときであっても、それが達成できることが予想外である。修飾された及び設計された免疫グロブリンを選抜するために、その選抜されたか若しくは天然の前後関係若しくは構造において標的抗原を使用することによって、診断若しくは治療用途で最も適切な、それらの修飾免疫グロブリンを同定し、得ることが可能となる。

【0060】

本明細書で用いられる用語「抗原」には、アレルゲン、腫瘍関連抗原、アルブミンなどの自己抗原、T細胞受容体、FcRn、細胞表面マーカー、酵素、Fc受容体、補体系のタンパク質、血清分子、細菌抗原、菌類の抗原、原生動物の抗原及びウイルス抗原、また海綿状脳炎（TSE）に関連するプリオン（伝染性の有無を問わない）、及びアルツハイマー病に関連するマーカー又は分子、からなる群から選択される分子などが包含される。本発明により設計される免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインによって、抗原は、少なくとも修飾された構造ループの一部を介して目標とされ、結合されることができる。

【0061】

好ましい実施形態では、当該免疫グロブリンは修飾された構造ループを介して、少なくともかかる2つの（各々同一若しくは異なる、同じ抗原若しくは異なる抗原中の）エピトープと特異的に結合する。

【0062】

例えば、本発明に係る方法は、少なくとも1つの第1のエピトープに特異的に結合し、前記免疫グロブリンの少なくとも2つの構造ループ又はループ領域の各々に少なくとも1つの修飾を有し、少なくとも1つの第2のエピトープに対する、前記ループ又はループ領域の特異的な結合を決定する、免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインの設計に関し、当該エピトープは上記した抗原のグループから選択され、未修飾の構造ループ又はループ領域（非CDRドメイン）は、前記少なくとも1つの第2のエピトープと特異的に結合しない。

【0063】

本発明の抗原という用語は特に、免疫グロブリン又は抗体構造の結合部位によって、全部の標的分子として、又はかかる分子の断片（特に標的のサブ構造、「エピトープ」と一般に呼ばれる）として認識されうる、全ての抗原及び標的分子のことをさす。

【0064】

本発明に係る免疫グロブリンによって目標とされる好適な抗原は、免疫原性がある又は有しうることが証明され、免疫反応因子と結合でき、又は、免疫学的若しくは治療的に有効な（特にその臨床有効性がすでに試験されている）抗原又は分子である。

【0065】

本発明に係る用語「抗原」とは、免疫グロブリンのCDRループ領域と相互作用するか又は相互作用できることが公知である、分子又は構造のことを意味する。天然抗体に係る従来公知の構造ループ領域は、抗原と相互作用せず、むしろ全体的な構造維持、及び/又はエフェクター分子に対する結合に関与するものである。本発明に係る設計を行うことにより、初めて、当該構造ループは、CDRループ又はCDR領域とは無関係に抗原結合ポケットを形成できる。

【0066】

好ましい実施形態では、本発明に係る免疫グロブリンにより結合される抗原は、細胞表面抗原である。本発明に係る用語「細胞表面抗原」には、細胞表面上に存在する、抗体構造によって認識されうる全ての抗原、ならびにかかる分子の断片が包含される。好適な「細胞表面抗原」とは、免疫学的又は治療的に有用である、又は有用でありうると証明され

10

20

30

40

50

ている抗原であり、特にかかる有用性が前臨床的若しくは臨床的に試験されている抗原のことを指す。それらの細胞表面分子は本発明において特異的な有用性を発揮し、細胞を殺傷する活性を示す。本発明に係る免疫グロブリンの、それらの細胞の少なくとも2つの表面分子に対する結合により、免疫系が細胞崩壊又は細胞死を生じさせ、それにより、ヒト細胞を攻撃するための有力な手段の提供が可能となる。

【0067】

好ましくは、上記抗原は細胞表面抗原（受容体を含む）から選抜され、特に、e r b B 受容体チロシンキナーゼ、（限定されないがE G F R、H E R 2、H E R 3及びH E R 4など）、T N F - 受容体スーパーファミリー分子（例えばA p o - 1受容体、T N F R 1、T N F R 2）、神経成長因子受容体N G F R、C D 4 0、T細胞表面分子、T細胞受容体、T細胞抗原O X 4 0、T A C I - 受容体、B C M A、A p o - 3、D R 4、D R 5、D R 6おとり受容体（限定されないがD c R 1、D c R 2、C A R 1、H V E M、G I T R、Z T N F R - 5、N T R - I、T N F L 1など）、B細胞表面抗原（例えばC D 1 0、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 1、C D 2 2）、抗原又は固形腫瘍又は血液癌細胞マーカー、リンパ腫又は白血病細胞、血小板などの他の血球などが挙げられる。

【0068】

本発明の更に好ましい実施形態では、修飾された構造ループ領域に対する分子結合は、以下からなる群から選択される：腫瘍関連抗原、特にE p C A M、腫瘍関連のグリコプロテイン - 7 2（T A G - 7 2）腫瘍関連抗原C A 1 2 5、前立腺特異的な膜抗原（P S M A）、高分子量黒色腫関連抗原（H M W - M A A）、ルイスY関連炭水化物、癌胎児性抗原（C E A）、C E A C A M 5、H M F G P E M、ムチンM U C 1、M U C 1 8及びサイトケラチン腫瘍関連抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、アレルゲン、アレルギー関連分子I g E、c K I T及びF c - ε - 受容体Iを発現する腫瘍関連抗原、I R p 6 0、I L - 5受容体、C C R 3、赤血球受容体（C R 1）、ヒト血清アルブミン、マウス血清アルブミン、マウス血清アルブミン、新生児F c - γ - 受容体F c R n、F c - γ - 受容体F c - γ R I、F c - γ - R I I、F c - γ R I I I、F c - α受容体、F c - ε - 受容体、フルオレセイン、リゾチーム、T o l l様受容体9、エリトロポイエチン、C D 2、C D 3、C D 3 E、C D 4、C D 1 0、C D 1 1、C D 1 1 a、C D 1 4、C D 1 6、C D 1 8、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 2 3、C D 2 5、C D 2 8、C D 2 9、C D 3 0、C D 3 2、C D 3 3（p 6 7タンパク質）、C D 3 8、C D 4 0、C D 4 0 L、C D 5 2、C D 5 4、C D 5 6、C D 6 4、C D 8 0、C D 1 4 7、G D 3、I L - 1、I L - 1 R、I L - 2、I L - 2 R、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 6 R、I L - 8、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 8、I L - 2 3、インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、T N F - α、T N F β 2、T N F α、T N F α β、T N F - R 1、T N F - R I I、F a s L、C D 2 7 L、C D 3 0 L、4 - 1 B B L、T R A I L、R A N K L、T W E A K、A P R I L、B A F F、L I G H T、V E G 1、O X 4 0 L、T R A I L受容体 - 1、A 1 アデノシン受容体、リンホトキシンB受容体、T A C I、B A F F - R、E P O、L F A - 3、I C A M - 1、I C A M - 3、インテグリンβ 1、インテグリンβ 2、インテグリンα 4 / β 7、インテグリンα 2、インテグリンα 3、インテグリンα 4、インテグリンα 5、インテグリンα 6、インテグリンα v、α V β 3インテグリン、F G F R - 3、ケラチノサイト成長因子、V L A - 1、V L A - 4、L - セレクチン、抗I d、Eセレクチン、H L A、H L A - D R、C T L A - 4、T細胞受容体、B 7 - 1、B 7 - 2、V N Rインテグリン、T G F β 1、T G F β 2、エオタキシン1、B L y S（B - リンパ球刺激因子）、補体C 5、I g E、I g A、I g D、I g M、I g G、因子V I I、C B L、N C A 9 0、E G F R（E r b B - 1）、H e r 2 / n e u（E r b B - 2）、H e r 3（E r b B - 3）、H e r 4（E r b B 4）、組織因子、V E G F、V E G F R、エンドセリン受容体、V L A - 4、血液型抗原などの炭水化物及び関連する炭水化物、ガリリ - グリコシル化、ガストリン、ガストリン受容体、腫瘍関連の炭水化物、ハプテンN P - キャップ又はN I P - キャップ、T細胞受容体α / β、Eセレクチン、P糖タンパク質、M R P 3、M R P 5、グルタチオン - S - 転移酵素π（

10

20

30

40

50

多剤耐性タンパク質)、 α -顆粒膜タンパク質(GMP)140、ジゴキシン、胎盤アルカリホスファターゼ(PLAP)、睾丸PLAP様アルカリホスファターゼ、トランスフェリン受容体、ヘパラーゼI、ヒト心臓ミオシン、グリコプロテインIIb/IIIIa(GPIIb/IIIIa)、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)gHエンベロープグリコプロテイン、HIV gp120、HCMV、RSウイルス(RSV)F、RSVF Fgp、VNRインテグリン、HepB gp120、CMV、gPIIbIIIIa、HIV IIII B gp120 V3ループ、RSウイルス(RSV)Fgp、ヘルペスシンプレックスウイルス(HSV)gDグリコプロテイン、HSV gBグリコプロテイン、HCMV gBエンベロープグリコプロテイン、ウェルシュ菌毒素、並びにそれらの断片。

10

【0069】

好ましくは、上記抗原は、病原抗原、腫瘍関連抗原、酵素、基質、自己抗原、有機分子又はアレルゲンからなる群から選択される。より好適な抗原は、ウイルス抗原、細菌抗原又は真核生物若しくはファージの病原体に由来する抗原からなる群から選択される。好適なウイルス抗原としては、HAV、HBV、HCV、HIVI、HIVII、パルヴォウイルス、インフルエンザ、HSV、肝炎ウイルス、フラビウイルス、ウェストニルウイルス、エボラウイルス、Poxウイルス、小poxウイルス、麻疹ウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、パピロマウイルス、ポリオマウイルス、パルヴォウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、エコウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス、コロナウイルス、RSウイルス、パラインフルエンザウイルス、ラクロスウイルス、ラサウイルス、狂犬病ウイルス、ロタウイルス抗原が挙げられる。好適な細菌抗原としては、シュードモナス、マイコバクテリウム、スタフィロコッカス、サルモネラ、メニンゴコッカス、ボレリア、リステリア、ネisseria、クロストリジウム、エシェリチア、レジオネラ、バシラス、ラクトバシラス、ストレプトコッカス、エンテロコッカス、コリネバクテリウム、ノカルジア、ロードコッカス、モラキセラ、ブルセラ、カンピロバクター、カルジオバクテリウム、フランシセラ、ヘリコバクター、ハエモフィラス、クレブシエラ、シゲラ、イエルシニア、ビブリオ、クラミジア、レプトスピラ、リケッチア、マイコバクテリウム、トレポネマ、バルトネラ抗原が挙げられる。病原性真核生物の好適な真核生物抗原としては、ジアルジア、トキソプラズマ、シクロスポラ、クリプトスポリジウム、トリチネラ、酵母、カンディダ、アスペルギルス、クリプトコッカス、ブラストマイセス、ヒストプラズマ、コキシジオイデスに由来する抗原が挙げられる。

20

30

【0070】

本発明に係る修飾免疫グロブリンは好ましくは、上記の分子のうちの1つと結合できる。これらの分子はまた、アレルゲン及びハプテンを含んでなる。

【0071】

免疫学的に同等のもの(すなわち天然抗体若しくはモノクローナル抗体で判別可能である)限り、抗原の下部構造を一般に「エピトープ」(例えばB細胞エピトープ、T細胞エピトープ)と呼ぶ場合もある。本発明に係る用語「エピトープ」とは、本発明の結合ドメイン又は免疫グロブリンと、特異的な結合パートナー又は特異的な結合パートナーの一部を完全に形成しうる分子構造を意味する。

40

【0072】

エピトープは、炭水化物、ペプチド、脂肪酸、有機物質、生体物質若しくは無機物質又はその誘導体、並びにそれらの任意の組み合わせから化学的に調製してもよく、それらに由来してもよい。エピトープがポリペプチドである場合、通常少なくとも3アミノ酸、好ましくは8~50アミノ酸、より好ましくは約10~20アミノ酸からなるペプチドである。特にペプチド長に関して上限はなく、ほとんどポリペプチド配列の全長であってもよい。エピトープは、直鎖状であってもよく、高次構造を有するエピトープであってもよい。直鎖状のエピトープは、ポリペプチド鎖の一次配列の単一セグメントからなる。直鎖状エピトープは隣接若しくは重複していてもよい。高次構造を有するエピトープは、ポリペ

50

プチドのフォールディングによる三次構造を形成するアミノ酸からなり、当該アミノ酸は、直鎖状配列中で必ずしも互いに隣接する必要はない。

【0073】

具体的には、エピトープは診断にとり有用な分子の少なくとも一部である（すなわち、サンプル中のエピトープの不在又は存在が、質的又は量的に、疾患若しくは健康状態、製造プロセス中の状況、又は環境及び食品の状況と対応する）。エピトープは、治療にとり有用な分子の少なくとも一部でもよい（すなわち、特異的結合ドメインの標的となり、疾患の過程を変化させる）。

【0074】

本発明により設計される免疫グロブリンの抗原結合部位の他に、更なる結合能を、可変ドメインの構造ループ領域の側部又は内部に導入することができる例えば小分子、薬剤若しくは酵素、酵素の触媒部位若しくは酵素基質に対する結合能、又は、酵素基質の遷移状態アナログに対する結合能である。

10

【0075】

好ましくは、構造ループ中の新しい抗原結合部位は、未修飾の免疫グロブリン可変ドメインポリペプチドとは適合しない。すなわち、エフェクター分子、血清タンパク質又はFc受容体及び細胞表面分子などの標的は、本発明に係るT細胞受容体ドメインポリペプチドの結合パートナーとして好ましい。

【0076】

本明細書において、「異質な」の用語は、抗原が免疫グロブリンの特異的なCDR結合ドメイン又は他の天然若しくは固有の結合ドメインにより認識されないことを意味する。異質な結合パートナーはすなわち、免疫グロブリンの天然の結合パートナーでなく、構造ループの新しく形成された抗原結合部位に結合してもよい。これは、天然の結合パートナー（例えばFc受容体又は免疫系のエフェクター）が未修飾の免疫グロブリンとは異質な抗原結合部位により結合されるとは考えられないことを意味する。

20

【0077】

本発明で使用する「特異的に結合する」という用語は、異質な分子集団の中から、関心の同族リガンドのみと結合する反応のことを指す。すなわち、所定の抗体は、所定の条件（例えば免疫グロブリンの場合、イムノアッセイ条件）下で、その特異的な「標的」と結合し、一方サンプル中に存在する他の分子とは顕著な量において結合しない。抗体のCDRsと同様、修飾された構造ループ領域は、抗原、構造又は分子と結合するタンパク質部分であり、それ自体抗原ではない。通常、結合定数又は結合動態が少なくとも10倍異なる場合、選択的な結合が可能となる。

30

【0078】

「発現システム」という用語は、コード配列と、操作可能に結合した所望の制御配列とを含む核酸分子のことを指し、これらの配列によって形質転換又はトランスフェクションされた宿主は、コードされたタンパク質を産生できる。形質転換を遂行するため、発現システムをベクター中に導入してもよいが、同様のDNAを宿主の染色体に導入してもよい。あるいは、当該発現システムをin vitro転写/翻訳に使用してもよい。

40

【0079】

本発明に係る「構造ループ」又は「非CDRループ」とは、以下のとおり理解される：すなわち免疫グロブリンは「いわゆる免疫グロブリンフォールド」と呼ばれるドメインから構成される。本質的には、逆平行βシートがループに結合し、圧縮型の逆平行βバレルを形成する。可変ドメインにおいて、ドメインのループのいくつかは、基本的に抗体の特異性（抗原に対する結合）に関与する。これらのループはCDRループと呼ばれる。

【0080】

CDRループは、CDRループ領域の中で位置し、若干の場合において、CDRループに可変フレームワークドメイン（「VFR」と呼ばれる）が隣接する。VFRが抗体の抗原結合ポケットに関与することが知られ、それは通常、主にCDRループにより決定される。すなわち、それらのVFRはCDRループ領域の一部として考慮されるため、本発明

50

への使用は適切でない。CDRループ領域内の、又はCDRループの最も近位側のVFRとは反対に、可変ドメイン内の他のVFRの使用は、本発明において特に適切である。それらは、CDRループ領域の反対側に、又は可変免疫グロブリンドメインのC末端側に位置するVFRの構造ループである。

【0081】

CDRループ領域の外側の抗体可変ドメインの全てのループは、むしろ分子の構造形成に関与する。これらのループは、構造ループ又は非CDRループとして本願明細書において定義される。

【0082】

免疫グロブリンのアミノ酸配列の全ての番号付けはIMGT付番に従う(IMGT, the international Immunogenetics information system@imgt.cines.fr, <http://imgt.cines.fr>; Lefrancら、, 1999, Nucleic Acids Res. 27:209-212、Ruizら、, 2000 Nucleic Acids Res. 28:219-221、Lefrancら、, 2001, Nucleic Acids Res. 29:207-209、Lefrancら、, 2003, Nucleic Acids Res. 31:307-310、Lefrancら、, 2005, Dev Comp Immunol 29:185-203)。

【0083】

本発明の好ましい実施形態では、免疫グロブリン可変ドメインはヒト若しくは動物の由来であり、好ましくはラクダ科の動物、ウサギ、チキン、マウス、イヌ、ウマ、ヒツジ又はマウス由来である。

【0084】

修飾された免疫グロブリンは様々な目的のために使用されることができ、特に医薬組成物では、当該免疫グロブリンはヒト、ラクダ若しくはマウス由来であるのが好ましい。

【0085】

当然ながら、修飾された免疫グロブリンは、ヒト化若しくはキメラT細胞受容体ドメインポリペプチドでもよい。最も多くの本発明の好ましい実施形態では、修飾された可変ドメインは、ヒト由来であるか、又はヒト化したいかなる種の可変ドメインであってもよい。

【0086】

ヒト化免疫グロブリン可変ドメインは、天然のヒト免疫グロブリン可変ドメイン配列に対して、少なくとも50%のアミノ酸配列同一性、好ましくは少なくとも55%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約60%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約65%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約75%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0087】

ヒト化免疫グロブリン可変ドメインは更に、全ての表層アクセス可能なアミノ酸を、表層でアクセス可能な、天然のヒト免疫グロブリン可変ドメイン配列のアミノ酸と比較したとき、少なくとも約50%のアミノ酸配列同一性、好ましくは少なくとも約55%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約60%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約65%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約75%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

【 0 0 8 8 】

好適な相同性又は配列同一性は具体的には、フレームワークドメインのそれらの配列に関連する。

【 0 0 8 9 】

本発明に係る好適な免疫グロブリンは、未修飾のドメインと少なくとも 50 % の相同性を有するドメインを有してなる。

【 0 0 9 0 】

「相同性」という用語は、ポリペプチドがそれらの一次若しくは二次若しくは三次構造において、対応する位置で同じ若しくは保存された残基を有することを意味する。当該用語はまた、対応するポリペプチドをコードする 2 つ以上のヌクレオチド配列にも適用される。

10

【 0 0 9 1 】

本願明細書に開示されるように、「相同な免疫グロブリンドメイン」とは全長の天然の配列を有する免疫グロブリンドメイン配列又は全長の免疫グロブリンドメイン配列の他のいかなる断片に対して、少なくとも約 50 % のアミノ酸配列同一性を有する、本発明に係る免疫グロブリンドメインを意味する。好ましくは、相同な免疫グロブリンドメインとは、少なくとも約 50 % のアミノ酸配列同一性、好ましくは少なくとも 55 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 60 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 65 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 70 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 75 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 85 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも約 95 % のアミノ酸配列同一性を、天然の免疫グロブリンドメイン配列、あるいは本願明細書において開示される他の全長免疫グロブリンドメイン配列の断片の配列と共有する免疫グロブリンドメインのことを指す。

20

【 0 0 9 2 】

本願明細書において同定される免疫グロブリンドメイン配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント (%)」とは、特異的な免疫グロブリン可変ドメイン配列中のアミノ酸残基と同一な、候補配列のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。それは、配列をアラインして、必要に応じてギャップを導入することにより、最大のパーセント配列同一性となるようにしたものであり、但し保存的な置換は配列同一性の一部としてはカウントしないことに留意すべきである。アミノ酸配列同一性パーセントの決定のためのアラインメントは、従来技術に公知の様々な方法により実施可能であり、一般公開されているコンピュータソフトウェア（例えば BLAST、BLAST - 2、ALIGN 又は Megalign (DNASTAR) ソフトウェア）を使用して行われる。当業者はアラインメントを測定するために適当なパラメータを決定できる。例えば、比較される配列の全長にわたり最大限のアラインメントを可能とする、必要なあらゆるアルゴリズムなどである。

30

【 0 0 9 3 】

後述するように、WU - BLAST - 2 コンピュータプログラム (Altschulら、Methods in Enzymology 266 : 460 - 480 (1996)) を用いてアミノ酸配列同一性パーセント (%) の数値を得ることができる。大部分の WU - BLAST - 2 サーチパラメータは、デフォルト値に設定される。デフォルト値にセットされないそれら (すなわち可調パラメータ) は、以下の値に設定される：

40

overlap span = 1、

overlap fraction = 0.125、

word threshold (T) = 11、

及び scoring matrix = BLOSUM62。

WU - BLAST - 2 を使用するとき、アミノ酸配列同一性 % は、以下の (a) / (b) により算出される：

(a) 天然の免疫グロブリン可変ドメインに由来する、目的の配列を有する免疫グロブリ

50

ン可変ドメインのアミノ酸配列と、目的の比較用アミノ酸配列（すなわち、目的の免疫グロブリン可変ドメインと比較するための配列。未修飾の免疫グロブリン可変ドメインであってもよい）との間で一致する同一アミノ酸残基の数（W U - B L A S T - 2として定義される）；

（b）目的の免疫グロブリン可変ドメイン中の非ランダム化部分のアミノ酸残基の総数。例えば「アミノ酸配列Aを含んでなり、アミノ酸配列Bと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチド」というときは、アミノ酸配列Aが、目的の比較用アミノ酸配列であり、アミノ酸配列Bが、目的の免疫グロブリン可変ドメインのアミノ酸配列である。

【0094】

好ましい実施形態では、本発明に係るポリペプチドは、二重特異的な抗体、又は二重特異的な単鎖抗体、又は二重特異的なF a b、又は二重特異的なs d A bである。更に好適なポリペプチドは、二重特異的なドメイン又はその一部である。具体例としては、C D Rドメインの反対側において、新規な結合部位を介した更なる機能を有するF a b又はd A b分子が挙げられる。本発明に係る好適な免疫グロブリン（F a b分子であるとき）は、例えばC H 1及び/又はC LドメインのC末端ループ側に、更に1又は2個の結合部位を有してもよい。本発明に係る好適な免疫グロブリン（d A b分子であるとき）は、例えばV h、V h h又はV lドメインのC末端ループ側で、更なる結合部位を有してもよい。かかる更なる結合部位によって、更なる機能、長期にわたる半減期（例えばF c R n又は血清タンパク質（例えばアルブミン又はI g G）に対する結合を介する）など、又はエフェクター機能（例えばT細胞受容体、C 1 q又はC D 6 4に対する結合を介する）を分子に付与することが可能となる。かかる例によれば、専用のF a b又はd A bライブラリは、特異的な結合パートナーに特異的な結合剤の選抜を可能にするために、適当なサイズで調製される。

【0095】

本発明に係る好適な可変ドメインは、V H、V L（V κ及びV λを含む）、V H H及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。それらの修飾が、V H、V κ、V λ又はV H Hのループ又はループ領域に導入され、その修飾されたループ又はループ領域がアミノ酸7～21、アミノ酸25～39、アミノ酸41～81、アミノ酸83～85、アミノ酸89～103又はアミノ酸106～117の範囲内で少なくとも1つの修飾を有するときに、特徴的な効果を発揮しうることがわかった。

【0096】

本発明により修飾されるヒト由来若しくはヒト化された免疫グロブリン又は免疫グロブリンの構造的ループ又は可変ドメインのループ領域は、アミノ酸8～20、アミノ酸44～50、アミノ酸67～76及びアミノ酸89～101、最も好ましくはアミノ酸位12～17、アミノ酸位45～50、アミノ酸位69～75及びアミノ酸位93～98を有してなる構造ループから好ましくは選択される。

【0097】

他の好ましい実施形態では、アミノ酸93～98を有する構造ループ又はループ領域の修飾は、アミノ酸8～20を有する構造ループ又はループ領域の修飾と組み合わせる。

【0098】

上記で同定されたそれぞれの免疫グロブリンのアミノ酸ドメインは、本発明に係る修飾目的に適していることが示されているループ若しくは又はループ領域である。好ましくは、かかる修飾の組合せ（例えば指定されたループ又はループ領域のうちの少なくとも2つ）を、本発明に係る免疫グロブリン中に設計する。

【0099】

好ましくは、アミノ酸93～98を有する構造ループ又はループ領域の修飾を、他の構造ループの1つ以上の修飾と組み合わせる。

【0100】

好ましい実施形態では、アミノ酸93～98を有する構造ループ又はループ領域の修飾

10

20

30

40

50

を、アミノ酸 69 ~ 75 からなる構造ループ領域の修飾と組み合わせる。

【0101】

最も好ましくは、アミノ酸 93 ~ 98、アミノ酸 69 ~ 75 及びアミノ酸 8 ~ 20 を有する構造ループの各々は、少なくとも 1 つのアミノ酸修飾を有する。

【0102】

他の好ましい例として、アミノ酸 93 ~ 98、アミノ酸 69 ~ 75、アミノ酸 44 ~ 50 及びアミノ酸 8 ~ 20 を有する構造ループの各々は、少なくとも 1 つのアミノ酸修飾を含む。

【0103】

本発明の好ましい実施形態では、免疫グロブリン又はマウス由来（例えば V_H）の免疫グロブリンの可変ドメインの構造ループ又はループ領域は、アミノ酸 6 ~ 20、アミノ酸 44 ~ 52、アミノ酸 67 ~ 76 及びアミノ酸 92 ~ 101 を有する。

【0104】

本発明の他の好適な実施形態では、免疫グロブリン又は免疫グロブリンの可変ドメイン中の構造ループ又はループ領域は、ラクダ科の動物由来（例えば V_HH）であり、アミノ酸 7 ~ 18、アミノ酸 43 ~ 55、アミノ酸 68 ~ 75 及びアミノ酸 91 ~ 101 を有する。

【0105】

ラクダ科の動物由来の、又はラクダ科の動物由来のヒト化変異型の可変ドメインは、例えばラクダ科の動物由来の他の V_HH（修飾されるか又は天然である）などの他の可変ドメインと容易に結合できるという効果がある。ラクダ科の動物由来の V_HH の可能な組合せは、多価免疫グロブリンの基礎である。すなわち、本発明では、ラクダ科の動物由来の特異的な修飾された可変ドメインは、多価を有する組合せであり、好ましくは少なくとも 3、好ましくは少なくとも 4 又は 5 つの価数又は V_HH_s を有する組合せである。

【0106】

好ましくは、構造ループ中の新しい抗原結合部位は、少なくとも 1 つのヌクレオチドの置換、欠失及び / 又は挿入により選抜される核酸によってコードされる免疫グロブリンに導入される。

【0107】

他の本発明の好ましい実施形態では、少なくとも 2 つの構造ループ又はループ領域の各々における少なくとも 1 つのヌクレオチドの修飾は、前記核酸によってコードされる免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインにおける置換、欠失及び / 又は挿入を生じさせる。

【0108】

修飾免疫グロブリン又は抗体可変ドメインの少なくとも 2 つのループ又はループ領域における修飾により、2 つ以上のアミノ酸の置換、欠失及び / 又は挿入、好ましくは点変異、全部ループのアミノ酸の変更を生じさせ、より好適には少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14（最高 30）のアミノ酸の変化を生じさせる。しかしながら、特殊な例において、免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメイン中の構造ループ又はループ領域に挿入できるアミノ酸の最大数は、30、好ましくは 25、好ましくは 20 アミノ酸の数を上回らない。

【0109】

それにより、かかる修飾された配列は、構造ループ中の保存されたドメイン中に元々含まれないアミノ酸を有してなり、新規に導入されたアミノ酸は天然に生じるが修飾部位においては外来アミノ酸であるか、又は天然に存在するアミノ酸を置換するものとなる。上記外来アミノ酸が特定のアミノ酸のグループ（例えば特定の極性又は疎水性を有するアミノ酸）から選択される場合、本発明の方法によって、ランダムな位置で上記の特定のアミノ酸グループでリッチにされたライブラリを得ることができる。かかるライブラリは、「フォーカスド」ライブラリとも称される。

【0110】

10

20

30

40

50

少なくとも2つのループ若しくはループ領域は、好ましくはランダム、セミランダム若しくは特に部位特異的ランダム変異導入方法により、変異導入若しくは修飾される。

【0111】

修飾を導入する好適な方法は、部位特異的なランダム突然変異導入である。この方法により、ループ内の2つ以上の特異的なアミノ酸残基が、かかる構造ループへのランダムに生成された挿入物により、置換若しくは挿入される。他の好適な方法は、コンビナトリアルアプローチの使用である。

【0112】

他の好ましい実施形態では、少なくとも3つの免疫グロブリン可変ドメインの構造ループ若しくはループ領域がランダム、セミランダム、特に部位特異的ランダム変異導入方法によって変異導入若しくは修飾される。

10

【0113】

これらの方法は、本発明の免疫グロブリン可変ドメインの所望の位置でアミノ酸修飾を行うために使用できる。これらの場合、当該位置はランダムに選択されるか、又はアミノ酸変化が特異的な規則によりもたらされる。例えば、特定の残基をいかなるアミノ酸にも変異できるが、他の残基は一定限度内のアミノ酸に変異できる。これは、突然変異及び選抜のサイクルを変化させることによる、段階的な方法により、又は同時に実施することが可能である。

【0114】

ランダムに修飾された核酸分子は、本願明細書で同定される繰り返し単位を有してもよく、それらは全ての周知の天然アミノ酸又はそのサブセットをコードする。修飾された配列を含むそれらのライブラリ（特異的なアミノ酸のサブセットが修飾のために使われる）は、「フォーカスド」ライブラリと呼ばれている。かかるライブラリのメンバーは、修飾された位置における、かかるサブセットのアミノ酸を有する確率が高く、通常少なくとも2倍、好ましくは少なくとも3倍、又は少なくとも4倍高い。かかるライブラリはまた、限られたか若しくは少ない数のライブラリメンバーを有する。その結果、実際のライブラリメンバーの数は理論的なライブラリメンバーの数に達する。場合によっては、フォーカスドライブラリのライブラリメンバーの数は、の 10^3 倍（理論的な数）未満でなく、好ましくは 10^2 倍未満でなく、最も好ましくは10倍未満でない。

20

【0115】

本発明に係るライブラリは、特異的な免疫グロブリンフォーマットのライブラリメンバーを含有するか又はそれらからなるライブラリとしてデザインできる。特異的な免疫グロブリン分子フォーマットからなるそれらのライブラリは、本発明のために専用のライブラリとも呼ばれる。専用のライブラリは好ましくは多数の特異的なフォーマットを、少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%含むか、又は実質的に特異的な抗体フォーマットからなる。特異的な抗体フォーマットの使用が好適であり、本発明に係る好適なライブラリとしては、VHライブラリ、VHHライブラリ、Vkライブラリ、Vλライブラリ、Fabライブラリ、CH1/CLライブラリ及びCH3ライブラリからなる群から選択される。複数の抗体ドメイン、例えばIgGライブラリ又はFcライブラリを含む複合分子を含んでなることを特徴とするライブラリが特に好ましい。他の好適なライブラリは、T細胞受容体を含有し、T細胞受容体ライブラリを形成するそれらである。更に好適なライブラリはエピトープライブラリであり、上記融合タンパク質は変異エピトープを有する分子を含んでなり、また、類似する結合性を有するが機能が異なる競争分子の選抜を可能にする。典型的にはTNFαライブラリであり、TNFα融合タンパク質の三量体が単一の遺伝子パッケージにより発現する。

30

40

【0116】

しかしながら、免疫グロブリンのループ領域に挿入されるアミノ酸の最大数は好ましくは30以下であり、好ましくは25、より好ましくは20アミノ酸以下である。アミノ酸の置換及び挿入は好ましくは、公知技術及び本特許出願にて開示する方法により、全ての

50

可能なアミノ酸、又はランダム化にとり好適なアミノ酸を選択して用い、ランダム若しくはセミランダムに行う。

【0117】

上記修飾部位は、特異的な単一の構造ループ又は構造ループ領域であってもよい。ループ領域は通常、少なくとも2つ、好ましくは少なくとも3つ又は少なくとも4つのループから構成され、それらは各々隣接し、抗原結合部位又は抗原結合ポケットを形成することにより抗原の結合に関与できる。1つ以上の修飾部位は、10アミノ酸、好ましくは20、30、40、50、60、70、80、90～100アミノ酸の範囲内で、特に構造領域内に存在し、表面又はポケットを形成し、その位置において抗原が当該ループ領域に立体的にアクセスできる。

10

【0118】

上記少なくとも1つのループ領域は、好ましくはランダム、セミランダム、又は特に部位特異的なランダム突然変異導入によって変異又は修飾がなされているのが好ましく、それにより得られるライブラリに欠失、置換もしくはランダムな挿入が構造ループ内に付与される。あるいは好適な方法を適宜組合せてもよい。あらゆる周知の突然変異導入方法を使用できるが、中でもカセット突然変異導入が好ましい。これらの方法は、本発明の免疫グロブリンの所望の位置でアミノ酸修飾を行うために使用できる。若干の場合において、例えば、いずれかの変異可能なアミノ酸、好適なアミノ酸をランダムに適宜選択してループ配列をランダム化してもよく、あるいは、簡便な規則を使用してアミノ酸変異を導入する。例えば、全ての残基を特定のアミノ酸（例えばアラニン、アミノ酸若しくはアラニン

20

【0119】

本発明に係る好適な方法は、免疫グロブリン、免疫グロブリンドメイン又はその一部をコードする、ランダムに修飾された核酸分子を用いる方法であり、当該分子は、配列5' - NNS - 3'、5' - NNN - 3'、5' - NNB - 3'又は5' - NNK - 3'を有し、構造ループをコードする領域内の、少なくとも1つのヌクレオチド反復ユニットを有してなる。若干の実施形態では、上記修飾された核酸は、TMT、WMT、BMT、RMC、RMG、MRT、SRC、KMT、RST、YMT、MKC、RSA、RRC、NNK、NNN、NNS又はいかなるそれらの組み合わせ（そのコードはIUPACによる）からなる群から選択されるヌクレオチドコドン

30

【0120】

ランダムに修飾された上記核酸分子は、全ての周知の天然アミノ酸またはそのサブセットをコードする上記の繰り返し単位を有してもよい。

【0121】

核酸分子の修飾は、核酸のより大きな部分に合成オリゴヌクレオチドを導入すること、又は、完全な核酸分子のde novo合成によって実施できる。核酸の合成はトリヌクレオチドのビルディングブロックを用いて実施でき、それにより、アミノ酸のサブセットがコードされる場合、ナンセンス配列が組合わされる数を減少させることができる（例えばYanezら、Nucleic Acids Res. (2004) 32: e158、Virnekasら、Nucleic Acids Res. (1994) 22: 5600 - 5607）。

40

【0122】

好ましくは、修飾される位置は表層に露出するアミノ酸である。構造ループのアミノ酸の表層への露出は、抗体可変ドメインの周知のタンパク質構造から、実験的に決定された構造が利用できないかかるアミノ酸配列に対する類似性（相同性）により判断できる。

【0123】

本発明の好ましい実施形態では、少なくとも1つの構造ループに導入される修飾は、非修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインの構造ループのそれぞれの部位で天

50

然に発生しない、少なくとも1、2、3、4、5、又は6個のアミノ酸からなる。

【0124】

アミノ酸の修飾はバイアスを有するのが好ましく、それにより、タンパク質-タンパク質相互作用に通常関与することが公知であるアミノ酸を構造ループ領域又はループ領域に導入できる(例えばLea&Stewart(1995)FASEB J. 9:87-93、Fellhouseら、(2006)J. Mol. Biol. 357:100-114、Adib-Conquuyら、(1998)International Immunology 10:341-346、Lo Conteら、(1999)J. Mol. Biol. 285:2177-2198、Zemlinら、(2003)J. Mol. Biol. 334:733-749)。

10

【0125】

本発明の一実施形態では、本発明に係る方法により得られる免疫グロブリンが、本発明に係る免疫グロブリン、特にタンパク質のライブラリ、融合タンパク質、細胞(特に細菌又は酵母細胞などの微生物細胞)、ファージ、ウイルス、核酸又はリボソームなどをディスプレイするか又はコードするライブラリメンバーを有するライブラリの調製のために用いられる。

【0126】

本発明は、ポリペプチド又はタンパク質変異型のライブラリ以外にも、当然ながら、本発明に係る免疫グロブリンを発現させるために使用する代替的なライブラリにも関連する。

20

【0127】

好ましい実施例では、本発明の免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインからなるポリペプチドの変異型のライブラリを、選抜のためのプールとして使用できる。当該修飾は、好ましくはアミノ酸のトリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、イソロイシン、セリン、メチオニン、アラニン及びアスパラギンからなる群のうちの少なくとも1つ(好ましくは修飾された構造ループあたり少なくとも2つのアミノ酸)を含有するか又は導入する。

【0128】

本発明により、変異型の可変ドメインポリペプチドが、天然のポリペプチドとは異質な、特異的な突然変異により提供されることができることがわかった。ヒト天然の免疫グロブリンの構造ループに存在しないアミノ酸である、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、イソロイシン、セリン、メチオニン、アラニン及びアスパラギンのいずれも、「異質」とであると考えられる。本発明に係る変種ポリペプチドは、少なくとも1つの構造ループを修飾して結合部位を形成することにより、構造ループ中に前記異質なアミノ酸のうちの少なくとも2つを含むことができる。

30

【0129】

修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインがヒト由来又はヒト化免疫グロブリン可変ドメインである場合、好適な修飾は、位置12~17、45~50、69~75及び93~98のいずれか1つにおける少なくとも1つのチロシンの導入、及び/又は、位置12~17、位置45~50、69、71~75、93~94及び96~98のいずれか1つにおける少なくとも1つのトリプトファンの導入、及び/又は、12~17、46、47、49、50、69~74、及び93~98のいずれか1つにおける少なくとも1つのヒスチジンの導入、及び/又は、位置12~17、45~47、49、50、70~73、75、94~96及び98のいずれか1つにおける少なくとも1つのアスパラギンの導入、及び/又は、位置12~17、46~50、69~71、73~75、93、95、96及び98のいずれか1つにおける少なくとも1つのメチオニンの導入、及び/又は、位置13、71、75、94、95及び98のいずれか1つにおける少なくとも1つのセリンの導入、及び/又は、位置12、14~17、45~50、69、70、72~75、93及び96~98のいずれか1つにおける少なくとも1つのイソロイシンの導入、及び/又は、位置15、46、48、70~73、75、93、95及び98のい

40

50

ずれか 1 つにおける少なくとも 1 つのフェニルアラニンの導入である。

【0130】

他の本発明の好ましい実施形態では、ヒト若しくはヒト化シングルドメイン抗体の位置 15 ~ 17、29 ~ 34、85、4 ~ 85、3、92 ~ 94、97 ~ 98 及び / 又は 108 ~ 110 の少なくとも 2 つのアミノ酸残基が修飾される。

【0131】

修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメイン（常に明細書の全体にわたって、免疫グロブリン及び修飾免疫グロブリン可変ドメインを有する免疫グロブリン断片を包含する）をコードする核酸分子を宿主細胞にクローニングし、発現させ、それらの結合特異性をアッセイできる。これらは周知の手順用して実施でき、本発明で使用する様々な方法 10 は、Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3. sup. rd Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), and Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons) に記載されている。本発明の修飾された免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインをコードする核酸は、前記免疫グロブリンを発現させるために、発現ベクターに組み込まれることができる。発現ベクターは典型的には、調節若しくは制御配列、選抜可能なマーカー、いかなる融合パートナー、及び / 又は更なるエレメントと、使用可能な状態で連結されている（すなわち機能的な関係に置かれている）T 細胞受容体ドメインポリペプチドを有してなる。本発明の修飾された免疫グロブリンは、核酸 20、好ましくは発現ベクター（修飾された T 細胞受容体ドメインポリペプチドをコードする核酸を含む）によって形質転換されて宿主細胞を、修飾された T 細胞受容体ドメインポリペプチドの発現を誘導するか又は生じさせる適当な条件下で培養することによって得られる。外生の核酸分子を宿主にもたらす方法は公知技術で、使用する宿主によって適宜変更できる。当然ながら、修飾された免疫グロブリンの発現のために、無細胞発現システムを使用できる。

【0132】

本発明の好ましい実施形態では、修飾された免疫グロブリンは、発現させた後、精製若しくは単離されうる。修飾された免疫グロブリンを、当業者に公知の様々な方法で分離又は精製できる。標準的な精製方法としては、クロマトグラフィ技術が挙げられ、例えば親 30 和性クロマトグラフィ、イオン交換又は疎水性クロマトグラフィ、電気泳動、免疫学的、沈殿、透析、濾過、濃縮及びクロマトフォーカス技術が挙げられる。精製は通常、特異的な融合パートナーを用いて行われる。例えば、GST 融合タンパクの場合、抗体はグルタチオン樹脂を使用して精製でき、His - タグの場合、Ni²⁺ 親和性クロマトグラフィを使用し、flag - タグの場合、固定した抗 flag 抗体を使用する。適切な精製技術の一般的なガイダンスは、Antibody Purification: Principles and Practice, 3. sup. rd Ed., Scopes, Springer - Verlag, NY, 1994 を参照。当然ながら、宿主の表面に本発明に係る免疫グロブリンを発現させることも可能であり、特に細菌、昆虫又は酵母細胞の表面、又は、ファージ又はウイルスの表面に発現させてもよい。 40

【0133】

免疫グロブリンは、限定されないが *in vitro* 分析、*in vivo* 及び細胞ベースの分析及び選抜技術などの、様々な方法を使用して選抜できる。オートメーション及びハイスループットスクリーニング技術を、スクリーニング手順に利用してもよい。スクリーニングでは融合パートナー又はラベルを使用してもよく、例えば酵素、イムノラベル、アイソトープラベル又は小分子ラベル（例えば蛍光若しくは比色色素若しくは発光分子）を使用してもよい。

【0134】

好ましい実施形態では、免疫グロブリンの機能的及び / 又は生物物理学的特性を、*in vitro* アッセイにおいてスクリーニングされる。好ましい実施形態では、抗体は、 50

機能（例えばその標的に対する結合親和性、交叉反応性又は触媒作用を及ぼす能力）を基に選抜される。

【0135】

他の好ましい例として、好ましい修飾された免疫グロブリンを、例えば細胞又は生物体に導入することによって、*in vivo*で選抜できる。修飾されたドメインの必要な特性に応じて、特異的に結合する変異型物質を、血液又はリンパ液などの体液から、又は特定の器官から分離することもできる。

【0136】

アッセイでは、発色、蛍光、発光又はアイソトープラベルを含むがこれに限らない様々な検出方法を使用できる。

10

【0137】

従来技術において周知のように、特異的な結合特性及び親和性を有するタンパク質の同定及び単離に使用できる様々な選抜技術が存在し、例えば様々なディスプレイ技術（例えばファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、細胞表面ディスプレイなど、後述する）が挙げられる。変異型抗体の生産及びスクリーニングのための方法は、従来技術において周知である。抗体に関する分子生物学、発現、精製及びスクリーニングのための一般方法は、Antibody Engineering, edited by Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001、及び Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5: 683 - 689、及び Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2: 339 - 76に記載されている。

20

【0138】

周知のように、スクリーニング方法のサブセットは、ライブラリの好ましいメンバーを選抜するものである。上記方法は本願明細書では「選抜方法」と称し、これらの方法では本発明の修飾免疫グロブリンのスクリーニングのために使用できる。免疫グロブリン可変ドメインライブラリが選抜方法を使用してスクリーニングされるとき、ライブラリ中の好適な（すなわち幾つかの選抜基準を満たす）メンバーのみが選抜され、分離され、及び／又は観察される。明らかなように、最も適当な変異型だけが観察されるため、かかる方法は、ライブラリメンバーの合理性を個々に検定する方法によってスクリーニングできるものより大きなライブラリのスクリーニングが可能となる。選抜は、いかなる方法、技術又は融合パートナー（共有結合又は非共有結合的）によっても行うことができる。免疫グロブリンの発現型はその遺伝子型と連結し、すなわち、抗体の機能は、それをコードする核酸と連結している。例えば、選抜方法としてのファージディスプレイの使用は、ファージコートタンパク質へのライブラリメンバーの融合によって可能となる（繊維状のファージ遺伝子ⅠⅠⅠタンパク質が最も頻繁に使われるが、タンパク質ⅤⅠⅠⅠのような他のコートタンパク質、タンパク質ⅤⅠⅠ、タンパク質ⅤⅠ及びタンパク質ⅠⅩも同様に使用できる）。このようにして、また、若干の基準（例えば免疫グロブリンの標的に対する結合親和性）を満たす修飾免疫グロブリンの選抜又は単離においては、それをコードする核酸の選抜又は分離が行われる。一旦分離されると、修飾免疫グロブリンをコードする遺伝子を更に増幅できる。この単離及び増幅のプロセスはパニングと呼ばれ、繰り返すことができ、それによりライブラリ中の良好な抗体変異体を増加させることができる。結合する核酸の塩基配列決定により、最終的な遺伝子同定が可能となる。

30

40

【0139】

様々な選抜方法が公知であり、本発明において免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインのライブラリのスクリーニング技術において使用できる。かかる技術としては、限定されないが、ファージディスプレイ（Phage display of peptides and antibodies: a laboratory manual, Kayら、, 1996, Academic Press, San Diego, Calif., 1996; Low-manら、, 1991, Biochemistry 30: 1

50

0832-10838; Smith, 1985, Science 228:1315-1317)、およびその変形方法(例えば選択的ファージ感染)、(Malmborgら、1997, J Mol Biol 273:544-551)、選択的感染ファージ(Krebberら、1997, J Mol Biol 268:619-630)、及び遅延感染性パニング(Benharら、2000, J Mol Biol 301:893-904)、細胞表面ディスプレイ(Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol 12:395-399)、例えば細菌ディスプレイ(Georgiouら、1997, Nat Biotechnol 15:29-34; Georgiouら、1993, Trends Biotechnol 11:6-10; Leeら、2000, Nat Biotechnol 18:645-648; Junら、1998, Nat Biotechnol 16:576-80)、酵母(Boder & Wittrup, 2000, Methods Enzymol 328:430-44; Boder & Wittrup, 1997, Nat Biotechnol 15:553-557)、及び哺乳動物細胞(Whitehornら、1995, Bio/technology 13:1215-1219)、並びにin vitroディスプレイ技術(Amsutzら、2001, Curr Opin Biotechnol 12:400-405)、例えばポリソームディスプレイ(Mattheakisら、1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:9022-9026)、リボソームディスプレイ(Hanesら、1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:4937-4942)、mRNAディスプレイ(Roberts & Szostak, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:12297-12302; Nemotoら、1997, FEBS Lett 414:405-408)、及びリボソーム不活化ディスプレイシステム(Zhouら、2002, J Am Chem Soc 124, 538-543)などが挙げられる。

【0140】

本発明で利用できる他の選抜方法には、ディスプレイに依存しない方法も含まれ、例えばペリプラズム発現及びサイトメトリによるスクリーニングなどのin vivo方法(Chenら、2001, Nat Biotechnol 19:537-542)、抗体フラグメント相補性アッセイ(Johnsson & Varshavskiy, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:10340-10344; Pelletierら、1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:12141-12146)、酵母ツーハイブリッド法(Fields & Song, 1989, Nature 340:245-246)選抜モード(Visintinその他、1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:11723-11728)などが挙げられる。代替的な実施形態では、発現ベクター上の特異的な配列と結合する融合パートナーによって選抜が可能となり、すなわち、融合パートナー及び付随するFc変異型のライブラリメンバーを、共有結合又は非共有結合的に、それらをコードする核酸と結合させることを特徴とする。例えば、国際公開第9308278号では、本発明で利用できるかかる融合パートナー及び技術を記載している。代替的な実施形態では、抗体の発現が細胞の成長、再生又は生存にとり有利である場合、in vivo選抜を実施できる。

【0141】

選抜方法として「誘導型進化」という方法が存在する。「誘導型進化」方法と言われる選抜のサブセット方法は、選抜の間、好ましい配列の交雑又は繁殖が行われ、しばしば新しい突然変異の取り込みも行われる。当業者に周知のように、誘導型進化方法は、複数のポリペプチド中の最も好ましい配列の同定を容易に可能とし、スクリーニングされる配列の多様性を増加させることができる。様々な誘導型進化方法が公知であり、本発明において変異抗体の生成及びスクリーニング技術として使用でき、限定されないが例えばDNAシャッフリング(国際公開第00/42561A3号、国際公開第01/70947A3号)、エキソンシャッフリング(米国特許第6365377号; Kolkmann & Ste

inmer, 2001, Nat Biotechnol 19:423-428)、ファミリーシャッフリング(Cramer ら、, 1998, Nature 391:288-291; 米国特許第6376246号)、RACHITT.TM.(Coco ら、2001, Nat Bio-technol 19:354-359; 国際公開第02/06469号)、STEP及びin vitro組み換えのランダムプライミング(Zhao ら、1998, Nat Biotechnol 16:258-261; Shao ら、, 1998, Nucleic Acids Res 26:681-683)、エキソヌクレアーゼによる遺伝子アセンブリ(米国特許第6352842号; 米国特許第6361974号)、遺伝子部位飽和変異導入(商標)(米国特許第6358709号)、遺伝子リアセンブリ(商標)(米国特許第6358709号)、SCRATCHY(Lutz ら、, 2001, Proc Natl Acad Sci USA 98:11248-11253)、DNA断片化方法(Kikuchi ら、, Gene 236:159-167)、一本鎖DNAシャッフリング(Kikuchi ら、, 2000, Gene 243:133-137)、及び進化抗体エンジニアリング技術(応用分子進化)(米国特許第5824514号、米国特許第5817483号、米国特許第5814476号、米国特許第5763192号、米国特許第5723323号)などが挙げられる。

【0142】

好ましい実施形態では、免疫グロブリン又は抗体可変ドメインを、1つ以上の細胞ベース若しくはin vivoアッセイを使用してスクリーニングする。かかるアッセイでは典型的には、精製若しくは未精製の修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインを外因的に添加し、細胞を、個々の免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメイン、又はライブラリに属する免疫グロブリン可変ドメインのプールに曝露する。しかしこれらのアッセイは典型的には、常にではないがT細胞受容体ドメインポリペプチドの機能に基づく。すなわち、その標的と結合し、若干の生化学応答を媒介する、本発明の方法により修飾されたT細胞受容体ドメインポリペプチドの能力(例えばエフェクター機能、リガンド/受容体結合阻害、アポトーシスなど)である。かかるアッセイでは、抗体に対する細胞の応答(例えば細胞生存、細胞死、細胞形態の変化)又は転写活性化(例えば天然遺伝子又はリポーター遺伝子の細胞発現)をモニターすることが必要な場合もある。例えば、かかるアッセイでは、ADCC、ADCP又はCDCを引き出す変異抗体の能力を測定できる。幾つかのアッセイでは、標的細胞以外にも、例えば血清補体、又はエフェクター細胞(例えば末梢血単球(PBMCs)、NK細胞、大食細胞など)などの細胞若しくは構成要素を添加する必要がある場合もある。かかる更なる細胞は、いかなる生物体(好ましくはヒト、マウス、ネズミ、ウサギ及びサル)から調製してもよい。免疫グロブリンは標的を発現する特異的な細胞系のアポトーシスを引き起こすことができ、又は、アッセイに加えられた免疫細胞による標的細胞への攻撃を媒介できる。細胞死又は生存度のモニタリング方法は公知技術で、色素、免疫化学的手段、細胞化学的手段及び放射性物質の使用に基づくものが挙げられる。例えば、カスパーゼ染色アッセイはアポトーシスの測定を可能とし、放射性基質若しくはalamar blueのような蛍光色素の取り込み若しくは放出により、細胞増殖若しくは活性化をモニターすることが可能となる。

【0143】

あるいは、死細胞若しくは傷害性標的細胞を、1つ以上の天然の細胞内構成要素(例えば乳酸脱水素酵素)の放出を測定することによってモニターしてもよい。転写活性化は、細胞ベースのアッセイにおいて、機能をアッセイする方法として有用でありうる。この場合、上方制御されうる天然遺伝子又は免疫グロブリンをアッセイすることにより、反応をモニターできる。例えば、特異的なインターロイキンの放出を測定するか、あるいはリポーターシステムを測定してもよい。細胞ベースのアッセイでは、修飾免疫グロブリン可変ドメインの存在への応答としての、細胞の形態的な変化の測定を行ってもよい。かかるアッセイのための細胞タイプは原核生物でも真核生物でもよく、従来技術において周知である様々な細胞系を使用できる。

【0144】

あるいは、細胞ベースのスクリーニングは、変異型の免疫グロブリン可変ドメインをコードする核酸によって形質転換又はトランスフェクションされた細胞を使用して実施できる。この場合、本発明の変異型の抗体可変ドメインを外因的に細胞に添加するのではない（例えばAuf der Maur, 2004, Methods, 34: 215 - 224と同様の方法）。他の代替的な方法では、細胞ベースのスクリーニングにおいて細胞表面ディスプレイを利用する。細胞表面における修飾免疫グロブリン可変ドメインのディスプレイを可能にする融合パートナーを使用してもよい（Witrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12: 395 - 399）。

【0145】

好ましい実施形態では、修飾免疫グロブリンの免疫原性は、1つ以上の細胞ベースのアッセイを使用して実験的に測定できる（Korenら、2002, Current Pharmaceutical Biotechnology 3: 349 - 360; Chirinoら、2004, Drug Discovery Today 9: 82 - 90; Tangriら、2005, J. Immunol. 174: 3187 - 3196; Hermelingら、2004, Pharm. Res. 21: 897 - 903）。好ましい実施形態では、ex vivoでのT-細胞活性化アッセイを用いて、実験的に免疫原性を定量する。この方法では、マッチするドナーからの抗原提示細胞及び天然のT細胞は、1回以上、ペプチド又は目的の全長抗体の曝露を受ける。例えばサイトカインの産生をモニタするか又はトリチル化されたチミジンの取り込みを測定するなど、多くの方法を使用してT細胞活性化を検出できる。他の好ましい実施形態では、サイトカイン放出を測定するためにLUMINEX技術（例えばde Jagerら、, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2003, 10: 133 - 139）を用いるか、又はElispotアッセイ（Schmitt et al., 2000, J. Immunol. Meth., 24: 17 - 24）によりインターフェロγ産生をモニターする。

【0146】

本発明の修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインの生物学的若しくは機能的な特性は、細胞、組織及び全生物体を用いた実験において特徴づけることが可能である。周知のように、限定されないがマウス、ネズミ、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ及びサルなどの動物において、in vivoにおいて薬剤を試験し、それにより当該薬の、治療への有効性を疾患又は疾患モデルと比較し、あるいは薬物動態学、薬力学、毒性及び他の特性を測定することが可能となる。当該動物は疾患モデルと称することもある。当該治療は、ヌードマウス、SCIDマウス、異種移植片マウス及びトランスジェニックマウス（ノックイン及びノックアウトを含む）などのマウスを用いて通常試験される。かかる実験により、当該抗体を治療薬として使用する際における、使用可能性を決定するために有用なデータが提供されうる。いかなる生物体（好ましくは哺乳類）も、試験に使用できる。例えばサルは、ヒト（霊長類）に対するそれらの遺伝子の類似性のため、適切な治療のモデルであり、ゆえに、本発明の修飾免疫グロブリンの有効性、毒性、薬物動態学又は他の特性を試験するために使用できる。ヒトにおける臨床試験は、薬剤として承認を受けるために最終的に必要とされ、また当然ながら、これらの試験も本発明に包含される。このように本発明の修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインは、それらの治療有効性、毒性、免疫原性、薬物動態学及び/又は他の臨床特性を決定するため、ヒトにおける試験にも使用できる。

【0147】

本発明に係る免疫グロブリンは、免疫グロブリンの用途として公知のいかなるものにも使用可能であるのみならず、本発明によって導入される特異性の組合せに応じて、その他の応用も可能となる。

【0148】

一実施形態では、本発明の抗体変異体は、治療又は予防に使用でき、例えば能動又は受動免疫療法、調製若しくは分析用途、診断用途、工業用化合物又は試験用試薬など（好ましくは治療用途）への応用が可能である。当該変異抗体の使用により、モノクローナル若

しくはポリクローナル抗体の合成が可能となる。好ましい実施形態では、本発明の修飾免疫グロブリンを用いて、標的抗原を運ぶ標的細胞（例えば癌細胞）を捕捉するか又は殺傷する。代替的な実施形態では、本発明の修飾免疫グロブリンを用いて、標的抗原をブロック、アンタゴナイズ又はアゴナイズし、例えばサイトカイン又はサイトカイン受容体をアンタゴナイズする。他の好適な実施形態では、本発明の修飾免疫グロブリンを用いて、標的抗原をブロック、アンタゴナイズ又はアゴナイズし、それにより標的抗原を運ぶ標的細胞の殺傷が可能となる。

【0149】

他の好適な実施形態では、本発明の修飾免疫グロブリンを用いて、成長因子又は成長因子受容体をブロック、アンタゴナイズ又はアゴナイズし、それにより標的抗原を運ぶか又は必要とする標的細胞の殺傷が可能となる。好適な代替的な実施形態では、本発明の修飾免疫グロブリンを用いて、酵素及び酵素基質をブロック、アンタゴナイズ又はアゴナイズする。他の好適な実施形態では、本発明の修飾されたT細胞受容体ドメインポリペプチドを用いて、伝染性の物体（例えばウイルス、小ウイルス、プリオン、バクテリア又は菌類）を中和する。

10

【0150】

本発明の修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインは、様々な治療に使用できる。好ましい実施形態では、修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインからなるT細胞受容体を患者に投与し、特異性障害を治療する。本発明のための「患者」は、ヒト及び他の動物（好ましくは哺乳類及び最も好ましくはヒト）を指す。本願明細書における「特異性障害」とは、本発明の修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインを含有する医薬組成物の投与により改善されうる障害のことを意味する。

20

【0151】

一実施形態では、本発明に係る修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインは、患者に投与される唯一の治療的有効成分である。あるいは、本発明に係る修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインは、1つ以上の他の治療薬と組み合わせて投与してもよく、かかるものとしては限定されないが、細胞障害剤、化学療法剤、サイトカイン、成長抑制剤、抗ホルモン剤、キナーゼ阻害剤、抗血管新生剤、心臓保護剤又は他の治療薬が挙げられる。上記修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインは、1つ以上の他の治療に付随して投与してもよい。例えば、本発明の抗体変異体を、化学療法、放射線療法、又は化学療法及び放射線療法の両方において、患者に投与できる。一実施形態では、本発明の修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインは、1つ以上の抗体との組み合わせで投与してもよく、それは本発明の抗体変異体を含んでも含まなくてもよい。本発明の他の実施形態では、本発明の修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメイン及び1つ以上の他の制癌治療を用いて、癌細胞を *ex vivo* で治療してもよい。かかる *ex vivo* な治療は、骨髄移植、及び特に自家骨髄移植において有用であると考えられる。本発明の抗体が更に他の治療技術（例えば手術）と組み合わせて使用できることは当然である。

30

【0152】

様々な他の治療薬を、本発明の修飾免疫グロブリンと組み合わせて投与することができる。一実施形態では、上記修飾免疫グロブリンを、抗血管新生剤（血管の形成をブロックするか、ある程度阻害する化合物）と共に投与する。抗血管形成因子とは、例えば、成長因子又は成長因子受容体に結合することにより、脈管形成を促進しうる、小分子又はタンパク質（例えば抗体、Fc融合分子又はサイトカイン）である。本願明細書において、好適な抗血管新生因子とは、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）と結合する抗体である。代替の実施形態では、上記修飾免疫グロブリンは、適応免疫反応を誘発するか又は強化する治療薬（例えばCTL A-4を標的とする抗体）と共に投与される。代替的な実施形態では、修飾免疫グロブリンはチロシンキナーゼ阻害剤（ある程度チロシンキナーゼのチロシンキナーゼ活性を阻害する分子）と共に投与される。代替の実施形態では、本発明の修飾免疫グロブリンは、サイトカインと共に投与される。本明細書で用いられる「サイトカイ

40

50

ン」とは、1つの細胞集団から放出され、細胞間メディエータ（ケモカインなど）として他の細胞において機能する、タンパク質の総称を意味する。

【0153】

医薬組成物とは、本発明に係る修飾免疫グロブリン及び1つ以上の治療的活性薬剤を処方したものである。本発明の変異ポリペプチドを含有する安定な製剤は、所望の純度の前記免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインと、任意の薬理学的に許容できる担体、賦形剤又は安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980）を混合することによって調製され、保存の際には凍結乾燥又は水溶液の形で調製される。in vivo投与のために使用される製剤は、好ましくは無菌状態である。これは滅菌フィルター又は他の方法による濾過によって容易に実施できる。本願明細書に開示される修飾免疫グロブリンと他の治療的有効成分は、免疫リボソームとして製剤化でき、及び/又はマイクロカプセル中に封入できる

10

【0154】

本発明の修飾された免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインからなる医薬組成物又は異なる修飾された免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインの混合物の投与は、好ましくは滅菌水溶液の形で、限定されないが以下のような様々な形態で実施できる：経口的、皮下、静脈注射、鼻腔内、耳内、経真皮、局所投与（例えばゲル、塗剤、ローション剤、クリームなど）、腹膜内、筋肉注射、肺内、経膈、非経口、直腸内又は眼内投与。

20

【0155】

本発明の別の態様は、免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインを含んでなり、少なくとも1つの修飾を前記免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインの2つの構造ループ又はループ領域の各々に含み、抗原のエピトープに対する前記分子の結合を決定する、分子の調製方法又はそれを含有する医薬品に関する。未修飾の当該分子は前記エピトープと顕著に結合しない。上記方法は以下のステップからなる、

- 少なくとも2つの構造ループ又はループ領域からなる免疫グロブリン可変ドメインをコードする核酸を準備するステップと、
- 前記構造ループ又はループ領域の各々の少なくとも1つのヌクレオチド残基を修飾するステップと、
- 発現システム中に前記修飾された核酸を移すステップと、
- 前記修飾免疫グロブリンを発現させること、
- エピトープと、発現された修飾免疫グロブリンとを接触させるステップと、
- 前記修飾免疫グロブリンが前記エピトープと結合するか否かを測定するステップと、
- 前記エピトープに結合する修飾免疫グロブリンを準備し、任意に医薬品として調製するステップ。

30

【0156】

特に本発明は、少なくとも1つの第1の分子又は医薬品に特異的に結合する、多重特異的分子の調製方法に関し、当該分子は、免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインの少なくとも2つの構造ループ又はループ領域の各々に、少なくとも1つの修飾を有し、抗原から選抜される少なくとも1つの第2の分子に対する、前記少なくとも2つのループ又はループ領域の特異的な結合を決定する。未修飾の構造ループ又はループ領域を含有する免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインは、前記少なくとも1つの第2の分子と特異的に結合しない。

40

【0157】

具体的には、上記方法は以下のステップを有してなる：

- 少なくとも1つの構造ループ又はループ領域を有し、少なくとも1つの第1の分子に特異的に結合する免疫グロブリンをコードする核酸を準備するステップと、
- 前記核酸によってコードされる少なくとも1つの前記ループ又はループ領域の少なくとも1つのヌクレオチド残基を修飾するステップと、

50

- 発現システム中に前記修飾された核酸を移すステップと、
- 前記修飾免疫グロブリンを発現させるステップと、
- 少なくとも1つの第2の分子と、発現された修飾免疫グロブリンとを接触させるステップと、
- 前記修飾免疫グロブリンが第2の分子と特異的に結合するか否かを測定するステップと、
- 前記少なくとも1つの第2の分子に特異的に結合する修飾免疫グロブリンを準備し、任意にそれを医薬品として調製するステップ。

【0158】

特異的な結合ペアのメンバーへの複数の結合部位又は少なくとも2つの特異性のエンジニアリングを行うのが好適である (K u f e r 其他。T r e n d s i n B i o t e c h n o l o g y、第22巻、ページ238 - 244 (2004))。

【0159】

多重特異的な抗体を調製するための多数の試み (例えば二重特異的、モノクローナル抗体又は抗体断片) が行われてきた。2つの異なるポリペプチド鎖 (重鎖及び軽鎖) で構成されている二重特異的な抗体の産生の1つの課題は、1つの細胞中で4つの異なる鎖 (2つの重鎖及び2つの軽鎖) を発現させる必要であることであり、それは分子の多くの様々な組合せを生じさせるため、混合物から、所望の二重特異的な分子を分離させる必要がある。それらの類似性のため、これらの分子の分離は困難かつ高コストである。かかる不必要な組合せの発生を最小化するために、多くの方法が使用されてきた (C a r t e r (2001) J o u r n a l o f I m m u n o l o g i c a l M e t h o d s , v o l 248, p 7 - 15)。

【0160】

1つの解決法は、2つの特性を有する1つのポリペプチド鎖の産生 (例えば2つの s c F v s を各々結合させるか、又はいわゆる二重特異性抗体の産生) である。かかる分子は、天然分子のフォールディング構造からは大きく異なることが示されており (L e - G a l l r a、(2004) P r o t e i n E n g i n e e r i n g , D e s i g n & S e l e c t i o n v o l 17 p a g e s 357 - 366)、文字どおり調製が困難である。

【0161】

本発明の好ましい実施形態では、上記発現システムはベクターを有してなる。必要に応じて、公知技術のいかなる発現ベクターを使用してもよい。

【0162】

修飾された免疫グロブリンを、好ましくは、宿主 (より好ましくはバクテリア、イースト、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞若しくは哺乳動物細胞、又は植物若しくは動物の器官、又は完全な植物体又は動物体) において発現させる。

【0163】

多種多様な適当な宿主細胞を、修飾免疫グロブリンの発現に使用でき、限定されないが例えば哺乳動物細胞 (動物細胞) 又は植物細胞、バクテリア (例えば枯草菌、大腸菌) 昆虫細胞及び酵母 (例えば P i c h i a p a s t o r i s、S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) などが使用できる。例えば、本発明で使用できる様々な細胞系は、A T C C c e l l l i n e カタログ (A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n から入手可能な) に記載されている。更に、動植物を、本発明に係る免疫グロブリンの発現のための宿主として使用できる。発現用又はトランスフェクション用のベクター若しくはカセットは、使用する宿主に従って選択できる。

【0164】

当然ながら、無細胞タンパク質発現システムを使用してもよい。i n v i t r o 転写 / 翻訳タンパク質発現プラットフォーム (十分な量のタンパク質を産生する) は無細胞タンパク質発現において多くの効果を発揮し、細胞ベースの発現システムにおいて典型的に存在する面倒な上流及び下流の工程 (例えば宿主細胞の形質転換、培養又は溶解) の必要

10

20

30

40

50

がない。

【 0 1 6 5 】

二重特異的な抗体の設計における他の課題としては、親抗体がそれらのそれぞれの結合パートナー（例えば I g G ）に対する二価的な結合を示す場合であっても、得られる二重特異的な抗体が、それぞれの結合パートナーの各々に対しては一価であるという事実が挙げられる。

【 0 1 6 6 】

本発明の好適な多重特異的分子は、これらの課題を解決する。

【 0 1 6 7 】

1 つのポリペプチド鎖としての二重特異的な分子の発現が可能であり（2 つの特異的結合を示す修飾された修飾免疫グロブリンドメイン、実施例を参照）、それは2 つの抗体ポリペプチド鎖の発現よりも実施が容易である（C a b i l l y ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 1 : 3 2 7 3 - 3 2 7 7 (1 9 8 4) ）。 10

【 0 1 6 8 】

それはまた、抗体様分子（2 つのポリペプチド鎖からなるホモ二量体若しくはヘテロ二量体）として調製することもできる。すなわち、第2 の特性が分子の非可変的な部分に位置するため、2 つの異なる重鎖又は異なる軽鎖を準備する必要がない。すなわち、2 つの鎖の間違った組合せの可能性がない。

【 0 1 6 9 】

本発明の抗体は重鎖及び軽鎖を有してもよく、それらは共に、特異的な結合パートナーに結合する可変 C D R ループ領域（すなわち特異的な C D R ループ形態）を形成し、また第2 の特異性は、免疫グロブリン分子中に含まれる修飾された構造ループ又はループ領域（例えば重鎖若しくは軽鎖可変ドメインの構造ループ）によって形成され、その際、特異的な C D R ループ形態が維持される。結合部位は、少なくとも1 又は2 つの可変ドメイン（例えば構造的に隣接してもよい重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメイン）上の複数の非 C D R ループにより形成されてもよい。 20

【 0 1 7 0 】

修飾された抗体は、全長抗体に少なくとも1 つの免疫グロブリン可変ドメイン及び修飾を有する抗体断片（例えば F a b 、 s c F v 、 F v 、ミニ本体、d A b ）、又は構造ループ若しくはループ領域、又はその誘導体であってもよい。 30

【 0 1 7 1 】

デザイン次第で、それは同じ若しくは異なる結合パートナーに、一価的、又は多価的に結合してもよく、又は異なる結合パートナーごとに異なる価数で結合してもよい。例えば、F a b 断片、又は同等に s c F v を設計する際は、両方の V H 及び V L ドメインの構造ループが別に設計され、C D R s によって形成される結合部位と同じエピトープと結合するような方法で行い、それにより、それぞれ三価 F a b 又は s c F v が得られる。他の実施形態では、同じように設計された V H 、 V L ドメインを含有する完全な免疫グロブリンは、六価でその標的エピトープと結合する。例えば、C D R s により形成される天然の結合部位が、設計された V h 及び V l ドメインとは異なる標的エピトープを認識する場合、得られる F a b 断片又は s c F v は、一価で第1 の標的と結合し、二価で第2 の標的に結合する。その際、それぞれ V h 及び V l ドメインの修飾された構造ループにより独立に結合する。当業者にとり自明であるが、このモジュラー設計の原理は、多数の異なる方法で応用することが可能である。 40

【 0 1 7 2 】

重鎖及び軽鎖の非 C D R ドメイン中に、特異的な結合部位の選抜及び設計が可能な、多くのループが存在するため、上記の課題のない2 つ以上の特性を有する抗体誘導体を設計することが可能となる。例えば、C D R s によって第1 の標的を認識する V H 及び V L ドメインを別に設計し、それにより、修飾された構造ループによって媒介される相互作用により、異なる（第2 及び第3 の）標的と特異的に結合させることが可能となる。すなわち、三重特異的な F a b 断片又は s c F v を調製し、それにより、その様々な標的の各々に 50

対して一価結合させてもよい。この F a b の修飾された可変ドメインがフルサイズの I g G の形で設計される場合、三重特異的に設計された I g G を調製することができ、各々 3 重特異的である場合、二価で結合する。

【 0 1 7 3 】

1 つのポリペプチド鎖内の特異的な結合ドメインを、ペプチドリナーの有無にかかわらず、連結してもよい。

【 0 1 7 4 】

一部の抗体クラスは、多重特異的（特に二重特異的な性質）であると考えられる。それらは、可変領域により抗原（典型的には、外来異物の構造又は癌に関連する構造）に結合し、また F c 部分（例えば様々な免疫細胞又は補体タンパク質上の F c 受容体）により F c エフェクター分子に結合し、それにより、A D C C、A D C P 又は C D C などの効果を発揮させる。

10

【 0 1 7 5 】

F c - エフェクター分子は免疫グロブリン分子（I g G 1 の場合、ドメイン C H 2 及び C H 3 からなる）の F c 部分に結合する。糖鎖工学技術（米国特許第 6 6 0 2 6 8 4 号）、又は直接 F c へのタンパク質エンジニアリング（米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 5 4 8 3 2 号）、又は F c の外側への間接的なエンジニアリング（米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 4 4 4 4 0 3 号）のいずれかによって、抗体分子の F c 部分の結合能を改良し、エフェクター機能を最適化するための多くの方法が開示されている。F c 受容体に対する F c ドメインの結合、及び / 又は C q 1 などの補体タンパク質に対する結合は、いずれもかかる技術によって変化することが示されている。通常、エフェクター機能を改良しようとする場合、F c エフェクター分子に対する結合親和性を改善しようとする。

20

【 0 1 7 6 】

本発明では、天然の F c 結合ドメインの外側における、F c - エフェクター分子との抗体結合をエンジニアリングすることが可能である。「天然の」F c - エフェクター分子結合に関係するループ以外の抗体可変ドメインの修飾されたループは、修飾されたループ構造のライブラリから選抜されてもよく、又は 1 つ以上の F c - エフェクター分子と結合するように設計されてもよい。かかる更なる F c - エフェクター分子結合部位を有する抗体は、特異的な F c - エフェクター分子又は F c - エフェクター分子をディスプレイするエフェクター細胞に対する強いアビディティを有し、それにより、糖鎖設計された抗体又はそうでなければ改良型 F c ドメインより更に強い効果を発揮しうる。

30

【 0 1 7 7 】

抗体断片は、全抗体と比較して特徴的な効果を発揮する。断片は通常、良好な生物学的な分布特性を有し、また調製が容易である。しかしながら、大部分の抗体断片のデザインは、エフェクター機能が欠如し、短い *in vivo* 半減期である（H o l l i g e r P、その他、N a t . B i o t e c h n o l . (2 0 0 5) 2 3 : 1 1 2 6 - 3 6 . ）。C H 1、C κ 又は C λ ドメインも、エフェクター機能を媒介することができず、それは F a b 分子が通常 A D C C、A D C P 又は C D C を示さない理由でもある。

【 0 1 7 8 】

国際公開第 0 2 / 4 4 2 1 5 号は、抗体の抗原結合部位、及びペプチド結合 F c - エフェクター分子を有する、結合分子を記載している。当該技術においては、エフェクター機能を示す抗体断片を調製することが可能である。当該ペプチドは、結合分子中において、ペプチドの抗原結合能力が破壊されず、F c - エフェクター分子との結合能力が破壊されない位置に導入される。

40

【 0 1 7 9 】

しかしながら本発明では、F c - エフェクター分子に対する結合は、修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインによりなされ、それらは、免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインの固定された足場内の、2、3 又は 4 つのランダム化された構造ループ配列のライブラリから、F c - エフェクター分子結合を基に選抜される。したがって、I g - ドメイン足場から分離された場合に、F c - エフェクター分子と結合しないと考

50

えられる特異的なループ配列に基づいて選抜することが可能である。本発明により得られるポリペプチドはゆえに、好ましくは100以上のアミノ酸からなり、1つ以上の免疫グロブリン可変ドメインを有するのが好ましい。

【0180】

本発明に係るかかる可変ドメインの潜在的エフェクター機能を選抜するためには、変異可変ドメインを含んでなる抗体若しくは抗体断片ライブラリを、Fc受容体及び/又は補体因子(例えばC1q)に対する結合に基づいて選抜するのが好ましい。選抜に供されるFcγ受容体は、天然にそれぞれの受容体を発現する細胞の表面に提示させてもよく、又は受容体の細胞外部分を各々発現及び精製してもよい。IFN-γ刺激されたU937細胞(CRL-1503、ATCC)を標的細胞として用いて、ファージディスプレイされた修飾免疫グロブリン可変ドメインを単離してもよい。具体的には、高親和性IgG受容体(FcγRI)に対して結合する(Berntzenら、, 2006, Protein Eng Des Sel, 19(3): 121-8と同様)。Fc受容体に対する結合は、選抜された修飾された免疫グロブリン可変ドメインで特異的に染色される標的として、U937細胞を使用したFACSによって試験できる。更に、ヒトのFcγ受容体の細胞外ドメインをクローニングし、可溶性タンパク質又は融合タンパク質として発現させることができ、潜在的結合パートナーの特異的な結合アッセイに使用できる(例えばBerntzenら、, 2005, J Immunol Methods, 298(1-2): 93-104)。補体因子C1qに対して特異的に結合する修飾免疫グロブリン可変ドメインの同定及び評価は、基本的に同様に実施できる(例えばLauvrakら、1997 Biol Chem, 378(12): 1509-19)。

10

20

【0181】

かかる可変ドメインを有する分子のin vivo半減期を長期化させるため、FcRnに対する結合を基に、本発明に係る変異可変ドメインのライブラリを用いて選抜してもよい。それらの修飾された構造ループ(その血清タンパク質又は補体タンパク質への特異的な結合により、分子の半減期を長期化できる)は、単離された構造ループとして、又は、免疫グロブリンの前後関係又はその部分において使用し、それにより、in vivoでの増加した半減期を有する分子としてエンジニアリングされる分子との組合せが可能となる。

30

【0182】

選抜に供されるFcRn受容体は、それぞれの受容体を天然に発現する細胞の表面に、又は、それぞれの受容体の細胞外部分のディスプレイ及び精製により調製できる。本発明においては、FcRnの第1のスクリーニングにより、変異可変ドメイン(又はかかる変異可変ドメインを有する分子)を選抜でき、それを更にin vitroで試験し、FcRn受容体を発現する細胞への結合を基に、FACS実験において更に解析できる。スクリーニング及び選抜は、FcRnへの結合のpH依存を考慮してもよい(国際公開第02/060919号、国際公開第97/34631号)。それは更に、例えば表面プラスモン共鳴技術などにより、様々な組換えFcRn、アイソフォーム及びアロタイプへの結合親和性のランキングによって特徴づけることが可能である(例えばDall'Aquilaら、Journal of Immunology, 2002, 169: 5171-5180)。

40

【0183】

本発明に係る修飾免疫グロブリンは、重鎖及び/又は軽鎖を有してもよく、また少なくとも1つの可変及び/又は定常ドメインを有してもよい。

【0184】

本発明に係る免疫グロブリンには、免疫グロブリンの好ましくは少なくとも1つの定常及び/又は少なくとも1つの可変ドメイン、又はその一部を有してなる。

【0185】

可変ドメインとは、免疫グロブリンの可変部分を構成する免疫グロブリンフォールディング構造単位であり、可変ドメイン(例えばVh、Vk、Vl、Vd)と称されることも

50

ある。

【0186】

本発明に係る他の好適な免疫グロブリンは、重鎖若しくは軽鎖の可変ドメイン又はその一部、並びに少なくとも2つの構造ループ又はループ領域を有してなり、前記少なくとも2つの構造ループ又はループ領域が、少なくとも2つの修飾された構造ループ若しくはループ領域を形成する少なくとも2つのアミノ酸修飾を有し、前記少なくとも2つの修飾された構造ループ又はループ領域が抗原の少なくとも1つのエピトープと特異的に結合する。本発明に係るかかる好適な免疫グロブリンにおいては、少なくとも2つのアミノ酸修飾を、1若しくは2つの構造ループ又はループ領域に、又は1若しくは2つの構造ループに配置し、抗原との結合部位を形成させる。

10

【0187】

本発明の好ましい実施形態では、分子に対する修飾ポリペプチドの特異的な結合は、以下からなる群から選択される結合アッセイにより測定される：免疫学的アッセイ、好ましくは酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、表面プラスモン共鳴アッセイ、飽和転送差核磁気共鳴分光アッセイ、転送NOE（trNOE）核磁気共鳴分光アッセイ、競争的アッセイ、組織結合アッセイ、生細胞結合アッセイ及び細胞抽出アッセイ。

【0188】

当該結合アッセイは、限定されないが、以下のような公知の様々な方法を用いて実施することができる：FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）及びBRET（生物発光共鳴エネルギー移動）-ベースのアッセイ、AlphaScreen（TM）（増幅蛍光近接ホモジニアスアッセイ）、シンチレーション近接アッセイ、ELISA（酵素結合イムノソルベントアッセイ）、SPR（表面プラスモン共鳴、別名「BIACORE」（TM））、等温滴定熱量測定、示差走査熱量測定、ゲル電気泳動、及びクロマトグラフィなどのゲル濾過。

20

【0189】

修飾ポリペプチドは、好ましくは以下からなる群から選択されるラベル又はリポーター分子とコンジュゲートしている：有機分子、酵素ラベル、放射性ラベル、染色ラベル、蛍光ラベル、発色ラベル、発光ラベル、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、金属複合体、金属、コロイド状金及びそれらの混合物。

【0190】

ラベル又はリポーター分子にコンジュゲートした修飾ポリペプチドは、例えば診断で利用できる。

30

【0191】

修飾免疫グロブリンを他の分子にコンジュゲートさせることにより、例えば結合アッセイ（例えばELISA）や結合試験において前記コンジュゲートを単純に検出することができる。

【0192】

本発明の別の態様は、軽鎖又は重鎖の可変ドメイン又はそれらの組み合わせ、並びに少なくとも2つの構造ループ又はループ領域を有してなるポリペプチドに関し、前記少なくとも2つの構造ループ又はループ領域が各々少なくとも2つの修飾された構造ループ又はループ領域を形成する少なくとも1つのアミノ酸修飾を有し、前記少なくとも2つの修飾された構造ループ又はループ領域は抗原の少なくとも1つのエピトープと特異的に結合する。

40

【0193】

少なくとも1つの修飾された抗体可変ドメイン（非可変的な配列又は構造ループを介して特定のパートナーと結合する）と、少なくとも1つの他の結合分子（抗体、抗体断片、可溶性の受容体、リガンド若しくは他の修飾された抗体ドメインであってもよい）を結合させた分子であるのが好ましい。

【0194】

少なくとも1つの本発明に係る抗体可変ドメインと組み合わせる多の結合分子は、好ま

50

しくはタンパク性分子、核酸分子及び炭水化物からなる群から選択される。

【0195】

修飾免疫グロブリンの構造ループ若しくはループ領域は、特に抗原、タンパク性分子、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、核酸、グリカン、炭水化物、脂質、小さい有機分子、無機分子、又はその組合せ又は融合物など、あらゆる種類の結合分子又は構造とも特異的に結合できる。もちろん、上記修飾免疫グロブリンは、少なくとも2つのループ又はループ領域を有してもよく、それにより、当該ループ又はループ領域の各々が異なる分子又はエピトープと特異的に結合することができる。

【0196】

本発明の別の態様は、本発明に係るか若しくは本発明の方法によって入手できる免疫グロブリン可変ドメインの、能動免疫のためのワクチンの調製のための使用に関する。これによって、当該免疫グロブリンを、ワクチンを調製する際の抗原性薬剤として用いるか、又はワクチンを調製する際の、抗原性構造をフィッシング又は捕捉するための物質として用いることとなる。

【0197】

本発明の別の態様は、修飾免疫グロブリン可変ドメインを有してなる分子のタンパク質ライブラリの調製のための、本発明に係る、又は本発明の方法によって入手できるT細胞受容体ドメインポリペプチドの使用に関する。

【0198】

本発明の更に別の態様は、以下のステップからなる、標的分子を特異的に結合させる、及び/又は検出する方法に関する：

(a) 本発明に係る修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインか、又は、本発明に係る方法によって入手できる修飾免疫グロブリン可変ドメインを有する分子を含有する、分子と、前記標的分子を含むと考えられる試験サンプルと、を接触させるステップと、

(b) 特異的な免疫グロブリン/分子若しくは免疫グロブリン可変ドメイン/標的分子複合体の潜在的形成を検出するステップ。

【0199】

本発明に係る好適な方法は、以下のステップからなる、分子を特異的に結合させる、及び/又は検出する方法に関する：

(a) 修飾免疫グロブリンのライブラリ又は本発明に係る修飾免疫グロブリンと、前記分子を含有する試験サンプルとを接触させるステップと、任意に、

(b) 特異的な免疫グロブリン/分子複合体の潜在的な形成を検出するステップ。

【0200】

試験試料はヒト若しくは動物性の試料(例えば血液サンプル又は他の体液及び細胞サスペンション)でもよく、かかるサンプルは、標的を補足し、及び/又は検出するための免疫グロブリンに特異的に結合する標的分子を含有する。

【0201】

本発明の別の態様は、以下のステップからなる、標的分子を特異的に分離する方法に関する：

(a) 本発明に係る修飾された免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインか、又は、本発明に係る方法によって入手できる修飾された免疫グロブリン可変ドメインを有する分子を含有する、分子と、前記標的分子を含むと考えられる試験サンプルと、を接触させるステップと、

(b) 形成された、特異的な免疫グロブリン可変ドメイン/標的分子複合体を分離するステップと、

(c) 任意に標的分子を前記複合体から分離するステップ。

【0202】

本発明の好適な態様は、以下のステップからなる、分子を特異的に分離する方法に関する：

10

20

30

40

50

- (a) 修飾免疫グロブリンのライブラリ又は本発明に係る修飾免疫グロブリンと、前記分子を含有する試験サンプルとを接触させるステップと、任意に、
- (b) 形成された、特異的な免疫グロブリン可変ドメイン/標的分子複合体を分離するステップと、
- (c) 任意に分子を前記複合体から分離するステップ。

【0203】

それらのサンプルは通常、調製的に単離される分子の給源であると考えられ、例えば、天然の複雑な給源（動物、ヒト若しくは植物由来、又は微生物由来の給源、又は細胞懸濁液若しくは培養液）が挙げられる。

【0204】

本発明に係る免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインは、標的分子をサンプルから特異的に分離するのに使用できる。多重特異的免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインが用いられる場合、複数の標的分子をサンプルから分離できる。かかる方法において修飾された免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインを使用することは特に有利である。なぜなら、例えば、所定の量の結合パートナー（すなわち修飾された免疫グロブリン可変ドメイン）を表面上に固定した、均一な表面を有するマトリックスを調製して、標的分子と結合させ、分離することが可能となるからである。それに対して、単一の特異的結合パートナーを用いる場合、1つの結合パートナーはマトリックスに同じ効率で結合しないため、均一なマトリックスの調製が困難である。

【0205】

本発明の別の態様は、以下のステップを有してなる、標的への化合物のターゲッティング方法に関する：

- (a) 特異的に結合できる、本発明に係る修飾免疫グロブリン可変ドメインを有する分子か、又は、本発明による方法により得られる修飾免疫グロブリン可変ドメインを有する分子を、前記化合物と接触させるステップと、
- (b) 標的に免疫グロブリン可変ドメイン/化合物複合体からなる分子を輸送するステップ。

【0206】

本発明に係る修飾免疫グロブリン若しくは免疫グロブリン可変ドメインは、CDRs及び/又は修飾ループ領域と結合した、少なくとも1つの化合物を標的に輸送するために使用できる。かかる免疫グロブリンを用いることにより、疾患の治療の経過で、好適な標的部位に、治療用の物質をターゲッティングできる。

【0207】

本発明の別の態様は、本発明に係る、又は本発明に係る方法によって入手できる免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインを、含有するか、発現するか、又はコードする分子ライブラリに関する。

【0208】

本発明に係る免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインの好適なライブラリには、少なくとも2つの構造ループ又はループ領域中に修飾を有する、少なくとも10の免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメイン、好ましくは100、より好ましくは1000、より好ましくは10000、より好ましくは100000、最も好ましくは1000000以上の変異型の免疫グロブリン又は可変ドメインを含有する。

【0209】

通常、本発明に係るライブラリは、少なくとも10の融合タンパク質又は結合物質を、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも1000、より好ましくは少なくとも 10^4 、より好ましくは少なくとも 10^5 、より好ましくは少なくとも 10^6 、より好ましくは少なくとも 10^7 、より好ましくは少なくとも 10^8 、より好ましくは少なくとも 10^9 、より好ましくは少なくとも 10^{10} 、より好ましくは少なくとも 10^{12} 、より好ましくは少なくとも 10^{11} で含む。リボソームディスプレイではそれより大きい数である。

10

20

30

40

50

【0210】

ライブラリの大部分の好適なメンバーは、少なくとも2つの構造ループ若しくはループ領域中に、少なくとも4つ、又は少なくとも5つ、又は少なくとも6つのアミノ酸変異を有することがわかっている。すなわち、本発明に係る特に好適なライブラリは、少なくとも2つの構造ループ中に、少なくとも2つ、3つ、又は4つのアミノ酸変異を有するメンバーからなる。

【0211】

本発明に係るライブラリはまた、V_H、V_K、V_L及びV_HHからなる群から選択される免疫グロブリン可変ドメインのうちの1つ又は混合物を含むか又はそれらのみからなり、商業的な理由から、結合パートナーを同定する際に適切である。

10

【0212】

前記ライブラリを構築する好適な方法は、上記、及び実施例に記載されている。本発明に係るライブラリは、様々な分子に対する免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインの結合を同定するために使用できる。

【0213】

特に本発明は、本発明に係る免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインを含有するか、又は本発明に係る方法により得られるタンパク質ライブラリの、免疫グロブリン誘導体の設計のための使用に関する。既存の免疫グロブリンは、それぞれの修飾された野生型ドメインのタンパク質ライブラリを用いて、抗原結合部位をドメインに導入するために変化させることができ、ライブラリは少なくとも10、好ましくは100、好ましくは1000、より好ましくは10000、より好ましくは100000、最も好ましくは1000000の変異型のドメインを有し、各々、少なくとも1つの修飾された構造ループを有する。好ましくは、変異型の構造ループドメインは少なくとも2の修飾を有する。ライブラリは更に、抗原との特異的な結合に関してスクリーニングされる。所望の特性に関する分子評価の後、選抜された免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインを、遺伝子工学的な方法によって元の免疫グロブリンにクローニングし、それにより野生型領域の置換を行う。あるいは、修飾ループ領域のみをコードするか、又は変異アミノ酸のみをコードするDNAを交換することにより、特異的な抗原との更なる結合部位を有する免疫グロブリンを得ることもできる。あるいは、可変ドメインの構造ループの修飾は、例えばin F_{ab}、s_cF_v又は完全な免疫グロブリン分子の形で、その天然の前後関係の可変ドメインと共に実施できる。単一ドメインの免疫グロブリンの場合を除き、1つの免疫グロブリンドメイン鎖又は単鎖免疫グロブリン（例えばs_cF_v又はユニボディ（一価の免疫グロブリン断片））が得られ、通常、本発明に係る免疫グロブリンは、好ましくはヘテロ二量体として提供される。

20

30

【0214】

変異した、抗原特異的な構造ループの位置の選択は、元の免疫グロブリンの構造、及び更なる結合部位の目的に依存する。例えば、元の若しくは親免疫グロブリンがF_{ab}又はs_cF_vである場合、軽鎖及び/又は重鎖の可変ドメイン中の少なくとも2つの構造ループの修飾が可能である。また、C_H1/C_Lの少なくとも2つの構造ループの修飾は、本発明に係る免疫グロブリンの産生にとり好ましい。すなわち、本発明に係るF_{ab}分子は、C_H1又はC_Lドメインの修飾されたループ領域を介した新しい結合部位を有することができる。本発明では、特異的なCDRループの構造、及び親免疫グロブリン、s_cF_v又はF_{ab}の本来の結合特性を維持することが最も重要である。

40

【0215】

ライブラリを構築するために、1つ以上の可変ドメインの1つ以上の構造ループ中に変異を有する元の変異体分子のライブラリを調製できる。完全な変異型の元の分子を用いた選抜は、修飾された構造ループと抗原との結合の選抜を行うことにより、立体配置的に有利な修飾が得られるため、有効であると考えられる。例えば、完全な分子がs_cF_vである場合、抗原への結合を基に、変異型の元のs_cF_vのライブラリをスクリーニングし、更にCDRループ（元の特性）により認識される抗原への結合のための特異的な結合物質

50

をスクリーニングすることは有利であると考えられる。代替的な選抜手順では、元の（第一の）抗原は、修飾された構造ループと抗原との結合のスクリーニングの間、C D R ループに結合するのが好ましい。この同時スクリーニングは、当該抗原の結合が第一の抗原への結合に影響を受ける場合に、構造ループ中に突然変異を有するクローンの優先的な選抜を可能とする。

【0216】

本発明の好ましい実施形態は、構造ループのうちの少なくとも2つの各々に、少なくとも1つの変異型のアミノ酸を有する可変ドメインを有するか又はそれらのみからなる変異型の免疫グロブリンのライブラリである。当該ライブラリは、重鎖及び軽鎖又はそれらの混合物及び組み合わせ分子の免疫グロブリンドメインを含んでもよい。

10

【0217】

他の好ましい実施形態は、V H H ドメイン又は少なくとも2つの構造ループ又はループ領域の各々に、少なくとも1つの変異型のアミノ酸を有する、上記ラクダ科の動物由来のヒト化ドメインを有するか若しくはそれらのみからなるライブラリである。

【0218】

他の本発明の好ましい実施形態は、単鎖抗体（例えば構造ループのうちの少なくとも2つの各々に、少なくとも1つの変異型のアミノ酸を有するs c F vライブラリ、又は単鎖抗体若しくはs c F vの可変ドメインのいずれかのループ領域）を有するか若しくはそれらのみからなるライブラリである。

【0219】

20

他の本発明の好ましい実施形態は、二重特異性抗体の可変ドメインのいずれかの構造ループ又はループ領域のうちの少なくとも2つの各々に、少なくとも1つの変異型のアミノ酸を有するか若しくはそれらのみからなる二重特異性抗体のライブラリである。

【0220】

他の本発明の好ましい実施形態は、ミニボディの可変ドメインのいずれかの構造ループ又はループ領域のうちの少なくとも2つの各々に、少なくとも1つの変異型のアミノ酸を有するか若しくはそれらのみからなるミニボディのライブラリである。

【0221】

更に別の本発明の好ましい実施形態は、F a bの可変ドメインのいずれかの構造ループ又はループ領域のうちの少なくとも2つの各々に、少なくとも1つの変異型のアミノ酸を有するか若しくはそれらのみからなるF a bのライブラリである。

30

【0222】

更に別の本発明の好ましい実施形態は、抗体又はI g Gライブラリ（好ましくはヒト抗体ライブラリ）であり、詳細には、当該抗体又はI g Gドメインの可変ドメインのいずれかの構造ループ又はループ領域のうちの少なくとも2つの各々に、少なくとも1つの変異型のアミノ酸を有するか若しくはそれらのみからなる。

【0223】

免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメイン、又は変異型可変抗体ドメインの融合分子を含んでなるタンパク質ライブラリのサイズ条件（すなわち変異型のタンパク質の数）は、その使用目的に応じて変化する。一般に、抗原結合部位をd e n o v oで生成するためのライブラリは、修飾された構造ループ若しくはループ領域により形成される、既存の設計された抗原結合部位を、（例えば親和性を強化するか又は抗原の良好な特異性を変化させるために）更に修飾したライブラリより大きい必要がある。

40

【0224】

本発明はまた、免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメイン又はミニドメインに含まれる少なくとも2つの構造ループ若しくはループ領域を有してなる複数のポリペプチド、又はそれをコードする核酸分子からなる、ポリペプチドライブラリ又は核酸ライブラリに関する。上記ライブラリは異なる修飾を有するメンバーを有し、それらの複数の、少なくとも1つの構造ループ領域中に修飾を有するとして定義される。核酸ライブラリは、好ましくは少なくとも10の異なるメンバー（少なくとも2つの潜在的アミノ酸修飾を有す

50

る)、好ましくは少なくとも100、より好ましくは1000又は10000の異なるメンバー(例えばランダム化ストラテジー又はコンビナトリアル技術でデザイン)を含有する。リボソームディスプレイの場合、更に多様化された個々のメンバーの数として、例えば少なくとも1000000又は少なくとも10000000が好ましく、より好ましくは少なくとも 10^8 、より好ましくは少なくとも 10^9 、より好ましくは少なくとも 10^{10} 、より好ましくは少なくとも 10^{11} 、又は 10^{12} まで数を増加させることも可能である。

【0225】

本発明の更なる態様は、本発明によって、少なくとも2つのライブラリから選抜した2つの異なる免疫グロブリン又は免疫グロブリンの可変ドメインのが組合せにより、多重特異性免疫グロブリンを調製することである。これらの選抜された特異的な免疫グロブリン可変ドメインを、各々他の分子と組み合わせ(建築用ブロックと同様)、所望の特性(例えば特異性及び/又は価数の組合せ)となるようにドメインの最適配列をデザインする。

【0226】

更に、本発明に係る1つ以上の修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインを、タンパク質構造の崩壊を生じさせることなく、タンパク質中の様々な又は全部の部位に導入することもできる。かかる「ドメインシャッフリング」テクニックによって、所望の特性に基づき再度選抜されうる新規なライブラリが構築できる。

【0227】

好適なライブラリは、本発明に係る免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメイン又はその誘導体を含む。

【0228】

本発明の好ましい実施形態は、少なくとも1つの免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメイン、及びその少なくとも2つの構造ループ若しくはループ領域(本発明により修飾され、抗原と結合する)を含んでなる、抗原に対する結合分子(抗原結合分子)である。前記結合分子は、そのCDRループとは同様の及び/又は特異的な結合活性を有しない。それは抗体活性のために使用できる他の部分を有してもよい(例えば天然若しくは修飾されたエフェクタードメイン(配列))が、それは抗体の「天然の」結合領域(それらの天然の位置における活性のCDRループ)を欠いている。本発明に係るこれらの抗原結合分子は、本発明の分子に関して上記した効果を有するが、抗体の特異的な結合活性を有さない。しかしながら、当該構造ループ若しくはループ領域中に新しく導入された特異的な結合活性を有する。

【0229】

また、本発明にかかる抗原結合分子においては、ランダム化技術によって(すなわちランダム化技術によって構造ループ中の1つ以上のアミノ酸残基を置換すること)、又はランダムに生成されたインサートをかかると構造ループ中に導入することによって、構造ループ中に新しい抗原結合部位を導入してもよい。その他の好適な方法としては、コンビナトリアル技術の使用が挙げられる。

【0230】

他の態様では、本発明は、未修飾の免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインとは異質の、1つ、2つ若しくは3つ以上の構造ループに導入された特性を示す抗原結合部位を有する、修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインに関する。「異質の」という用語は、当該抗原結合部位が、免疫グロブリン可変ドメインの特異的な構造ループ若しくはループ領域により形成されないことを意味する。

【0231】

更に別の態様では、本発明は、未修飾の免疫グロブリンとは異質であり、少なくとも1つのドメイン中の、少なくとも1つ、2つ、3つ又はそれ以上の構造ループ中に導入された抗原結合部位を有する、修飾された免疫グロブリンに関する。前記修飾された免疫グロブリンは、少なくとも 10^3 mol^{-1} 、少なくとも 10^4 mol^{-1} 、少なくとも 10^5 mol^{-1} 、少なくとも 10^6 mol^{-1} 、少なくとも 10^7 mol^{-1} 、少なくとも

10^8 mol^{-1} 又は少なくとも 10^9 mol^{-1} の親和性で前記抗原と結合する。

【0232】

本発明は、中程度又は高い親和性を有する結合物質の提供に関する。中程度の親和性を有するそれらは好ましくは $10^{-5} \sim 10^{-7}$ の範囲の解離率 K_d を有し、高親和性を有するそれらは $10^{-8} \sim 10^{-10}$ の範囲の証明された K_d を有する（高親和性結合物質として最も好適な態様は、 10^{-9} 未満の K_d を有するものである）。場合によっては、更により低い K_d （例えば 10^{-12} 以下、通常 10^{-11} 以下）を有する結合物質を選抜してもよい。

【0233】

本発明に係る好適な免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインは、少なくとも 2 つの抗原結合部位、第 1 のエピトープに結合する第 1 の部位、及び第 2 のエピトープに結合する第 2 の部位を有してなる。

【0234】

好適な実施形態では、本発明の免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインは少なくとも 3 つのループ領域（第 1 のエピトープに結合する第 1 のループ若しくはループ領域、第 2 のエピトープに結合する第 2 及び第 3 のループ若しくはループ領域）からなる。少なくとも第 1 のループ若しくはループ領域又は少なくとも第 2 及び第 3 のループ若しくはループ領域のいずれか、又はそれらの両方は、構造ループを有してなるのが好ましい。本発明に係る免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインは、従来技術において機能的であることが公知の断片を有し、それは本発明において必須の要素、すなわち本発明により修飾された構造ループ若しくはループ領域を有してなる。

【0235】

好ましくは、本発明に係る免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインは、少なくとも 2 つの T 細胞受容体ドメイン又はその一部（ミニドメインを含む）から構成され、各ドメインは少なくとも 1 つの抗原結合部位を含む。免疫グロブリンドメインの好適なペアのうちの 1 つは、 C_L / C_H1 のペアである。それは C_L / C_H1 ペアの C 末端に位置する構造ループ領域においてエンジニアリングできる。それにより、1 又は 2 個の新しい結合部位がエンジニアリングされる。特異的な C_L / C_H1 結合ドメインペアの選抜の後、それを可変ドメイン V_L 及び V_H に組み合わせ、 CDR ドメイン中に 1 つの「天然の」結合部位、及び反対側（ C_H1 / C_L ドメインの C 末端の構造ループ領域）に更に 1 又は 2 個の結合部位を有する、本発明に係る Fab 分子を得ることが可能となる。

【0236】

すなわち、本発明に係る免疫グロブリンは、可変ドメインを含む免疫グロブリン親分子を修飾することによって得ることができる。あるいは、免疫グロブリン定常ドメインをエンジニアリング（設計）し、構造ループ領域中に結合部位を形成させることができ、そのドメインは更に、建築用ブロックとして使用でき、免疫グロブリン可変ドメイン及び任意に他の定常ドメインと組合せて、可変ドメイン、及び構造ループ又は構造ループ領域により形成される新しい結合部位を有してなる、本発明に係る免疫グロブリンが得られる。

【0237】

かかる本発明の好ましい実施形態では、免疫グロブリンの可変領域の少なくとも 1 つのドメインと、免疫グロブリンの定常領域の少なくとも 1 つのドメイン（例えば可変ドメイン。 C_H1 ドメインに結合する少なくとも 2 つの構造ループが修飾されている）と、を有してなる免疫グロブリンの提供に関する。

【0238】

本発明の別の態様は、以下を含んでなる結合パートナーのキットに関する：

- (a) 抗原結合部位を有して、それが 1 つ以上の構造ループに導入されている修飾免疫グロブリン可変ドメインと、
- (b) 前記抗原のエピトープを有する結合分子。

【0239】

本発明の別の態様は、以下を含んでなる結合パートナーのキットに関する：

- (a) 本発明に係る修飾免疫グロブリンのライブラリと、
 (b) 抗原のエピトープを有する結合分子。

【0240】

本発明に係るこのキットのかかる結合分子は、サンプル又は本発明のライブラリ中の、天然若しくは修飾された免疫グロブリンを選抜し、識別するために使用できる。それは更に、本発明に係る修飾免疫グロブリン又は免疫グロブリン可変ドメインを有してなるポリペプチドの結合特性を同定するためにも使用できる。本発明に係るこのキットの結合分子を用いて、本発明に係る修飾ポリペプチドの力価を測定できる。

【0241】

本発明で定められる力価とは、本発明に係る分子のその抗原に対する結合特性のことを指す。当該結合は、品質管理目的で用いる場合は、特異性及び／又は親和性及び／又は選択性に関して、量的に及び／又は質的に、公知の方法を用いて測定できる。

【0242】

更に、構造ループ中に異なる修飾を有する、少なくとも10、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも1000、より好ましくは少なくとも10000、特に好ましくは少なくとも100000の免疫グロブリンからなるライブラリから、本発明に係る修飾免疫グロブリン若しくは免疫グロブリン可変ドメインを有するポリペプチドを選抜するために、本発明に係るキット中の当該結合分子を用いるのが好ましい。

【実施例】

【0243】

本発明を、以下の実施例で更に例示する。

実施例1：VHHライブラリのデザイン

結晶構造の、ラクダのVHHドメインD2-L24と、鶏卵White Lysozyme (Brookhaven Databaseにおいて、エントリー1ZVH.pdbとして公知)との複合体を用いて、変異VHHドメインのデザインの補助に用いた。構造ファイル1ZVH.pdbの鎖Aの配列を、配列番号1に示す。

配列番号1

【表1】

```
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAAA
```

【0244】

VHHライブラリの構築の基本として用いられる配列は、国際公開第04/041862A2号の抗-TNF- α VHHドメインの配列(クローン3E)であり、配列番号2に示す。

配列番号2

【表2】

```
ccatggcccc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgtgac
gagctcnnsn nsnnscaagt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta
tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcagccggagaaca
actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctctc
tacagcaagc ttaccgtggn snnsnnsagg tggnnsnns ggaacgtctt
ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acacagaaga
gcctctccct gtctccgggt aaagcgcccg ca
```

【0245】

1ZVH.pdbの構造の詳細アッセイ及び β 鎖を連結するループを形成する残基の解析の後、配列番号2の残基13、15(すなわち β 鎖A及びB間のループ)、89、90、92及び93(すなわち β 鎖E及びF間のループ)を、ライブラリの生成のためにラン

ダム化することとした。更に、3つのランダム化部位は残基14及び15の間に挿入することとし、3つのランダム化部位は配列番号2の残基92及び93の間に挿入することとした。

【0246】

実施例2：VHHライブラリの構築

VHH配列のコード遺伝子のデザインは、PCRアセンブリによる合成遺伝子の形で実施できる。配列及びその翻訳を図2に示す。ライブラリ構造のためにランダム化されるアミノ酸残基を下線で示す。クローニングのための以下の制限部位を、図2に示すようにヌクレオチド配列中に下線で示す部分として含有させた：NcoI、BglII及びNotI。

10

【0247】

合成遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を、配列番号3に示す。

配列番号3

【表3】

```
MAPREPQVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVXXXRWXXGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKAAA
```

【0248】

最初の2つの残基及び最後の2つの残基は、クローニングに使用する制限部位によって生じたものである。配列番号3をコードするヌクレオチド配列を、配列番号4に示す。

20

配列番号4：

【表4】

```
cttgccatgg ccccccgaga accacaggtg tac
```

【0249】

最初の2つのコドン及び最後の2つのコドンは、クローニングのために使用する制限部位によって生じたものである。

【0250】

合成遺伝子のPCR組立のためのオリゴヌクレオチドは、一般公開されているソフトウェアツールであるDNABWorks 3.1 (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>)を用いてデザインし、表1において、及び配列番号5から配列番号22に示される18のオリゴヌクレオチド(Hoover DM, Lubkowski J., DNABWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis, Nucleic Acids Res. 2002 May 15; 30(10): e43)から、標準的な方法を用いてPCRによりアセンブリした。

30

【0251】

40

【表 5】

1. CCATGGCAAGTTCAGCTGCAGGAAAGCGGTGGCGGCCTG (SEQ ID No. 5)
2. AGACGCAGGCTGCCGCCAGGCTGGACCAGGCCGCCACCGC (SEQ ID No. 6)
3. CGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGTGCGGCCAGCGGCCGTACC (SEQ ID No. 7)
4. AGGTGTAGCCGCTATGGTCGCTAAAGGTACGGCCGCTGGC (SEQ ID No. 8)
5. ACCATAGCGGCTACACCTATACCATTTGGCTGGTTTCGTCA (SEQ ID No. 9)
6. TCACGTTCTTTTCTGGCGCCTGACGAAACCAGCCAATGG (SEQ ID No. 10)
7. CGCCAGGAAAAGAACGTGAATTTGTGGCGCGTATTTACTG (SEQ ID No. 11)
8. ATAGGTATTGCCGCTGCTCCAGTAAATACGCGCCACAAAT (SEQ ID No. 12)
9. GAGCAGCGGCAATACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGC (SEQ ID No. 13)
10. TGTCGCGGCTAATCGCGAAACGGCCTTTCACGCTATCCGC (SEQ ID No. 14)
11. GCGATTAGCCGCGACATTGCCAAGAACACGGTAGATCTTA (SEQ ID No. 15)
12. GGCTCCAGGTTGTTTCATCGTAAGATCTACCGTGTTCTTGGC (SEQ ID No. 16)
13. CGATGAACAACCTGGAGCCCCGAAGACACAGCCGTGTATTA (SEQ ID No. 17)
14. GCCATCCCGAGCCGCGCAATAATACACGGCTGTGTCTTCG (SEQ ID No. 18)
15. GCGGCTCGGGATGGCATTCCGACCAGCCGTAGCGTGGAAG (SEQ ID No. 19)
16. CCCTGGCCCCAGTAATTGTAGCTTTCACGCTACGGCTGG (SEQ ID No. 20)
17. CAATTACTGGGGCCAGGGCACCCAGGTGACCGTCAGCTCT (SEQ ID No. 21)
18. GCGGCCGCAGAGCTGACGGTCACCTG (SEQ ID No. 22)

10

20

表 1：デザインされた V H H 遺伝子をコードする合成遺伝子のアセンブリに使用するオリゴヌクレオチド。

【0252】

簡潔には、等しい量のオリゴヌクレオチド溶液（～1 mg/ml の濃度の各々）を混合し、水でオリゴヌクレオチドごとに～1 ng/μl の最終濃度に希釈した。オリゴヌクレオチド混合物は、PCR 溶液で 5 倍希釈した。成分の最終濃度は、各オリゴヌクレオチド 0.2 ng/μl、トリス-HCl (pH 8.8) 20 mM、KCl 10 mM、(NH₄)₂SO₄ 10 mM、MgSO₄ 6 mM、トリトン X-100 0.1% (v/v)、ウシ血清アルブミン 0.1 mg/ml、各 dNTP 0.2 mM、及び Pfu ポリメラーゼ 2.5 U である。遺伝子アセンブリのための PCR プロトコルは、95 で 5 分の変性ステップ 1 回から開始され、その間、起こりうるあらゆるミスプライミングを回避するためにポリメラーゼを添加した（ホットスタート PCR）。このステップの後、30 秒の 95 の変性温度、30 秒の 55 のアニーリング温度、及び 1.5 分間の 72 の伸長温度が 25 サイクル継続させた。このプロトコルの最終ステップにおいて、10 分間の 72 のインキュベーションサイクルを実施した。遺伝子増幅においては、遺伝子アセンブリ反応により得られる混合物 1 μl をテンプレートとして用い、最も外部のオリゴヌクレオチド（配列番号 5 及び配列番号 22）をプライマとして使用した。遺伝子増幅のための PCR プロトコルは、遺伝子アセンブリのためのそれと基本的に同様である。アセンブルされた合成 V H H 遺伝子を、ベクター pET27b (Novagen (http://www.merckbiosciences.co.uk/product/69863、http://www.novagen.com) の NcoI 及び NotI 制限部位にクローニングし、その配列を DNA 塩基配列決定した。

30

40

【0253】

更に、ランダム化されたライブラリを構築するために PCR を用いた。最初の 2 つの PCR 反応のテンプレートは、上記でクローニングした合成 V H H 遺伝子である。最初の 2 つの PCR 反応に使用するプライマ対は、以下の通りである：

50

3 e s y n m u 1
 (g a c t c c a t g g c a a g t g c a a c t g c a g g a a a g c g g a g g
 c g g t c t g g t t n n s c c a n n s n n s n n s n n s g g c a g c c t
 g c g t c t g a (配列番号 2 3)) ;

3 e s y n m u 2

(c a t g a g a t c t a c g g t g t t c t t g g c g (配列番号 2 4)) ;

3 e s y n m u 3

(c a t g a g a t c t t a c g a t g n n s n n s t t g n n s n n s n n s n
 n s n n s g a a g a t a c g g c g g t g t a t t a t t g (配列番号 2 5))
 ; 3 e s y n 2

(a a t a g c g g c c g c a g a g c t c a c g g t c a c c (配列番号 2 6))

10

。得られる P C R 産物を B g l I I により切断し、ライゲーションし、ライゲーション生成物を、プライマ 3 e s y n 1

(a c g t c c a t g g c a a g t g c a a c t g c a g (配列番号 2 7))

及び 3 e s y n 2

(a a t a g c g g c c g c a g a g c t c a c g g t c a c c (配列番号 2 6))

による P C R 反応のテンプレートとして用いた。プライマ 3 e s y n m u 1 (配列番号 2 3) 及び 3 e s y n m u 3 (配列番号 2 5) の N N S コドンは、配列のランダム化部位を導入するためのものである。コドン N N S (I U P A C コード (S が C 又は G を意味する)) は、全ての 2 0 の天然アミノ酸をコードするが、3 つの停止コドン中 2 つを回避するように選択した。図 3 は、模式的な P C R 反応及びライゲーション手順を示す。水平の矢印は P C R プライマの位置及び方向を示し、それぞれの垂直のラインは N c o I、B g l I I 及び N o t I 部位 (左から右) を示す。

20

【 0 2 5 4 】

このランダム化された P C R 産物を更に、N c o I 制限部位を用いて、p e l B 分泌シグナルとインフレーションで、ファージミドクロニングベクター p H E N 1 にクロニングした (H o o g e n b o o m H R , G r i f f i t h s A D , J o h n s o n K S , C h i s w e l l D J , H u d s o n P , W i n t e r G . M u l t i - s u b u n i t p r o t e i n s o n t h e s u r f a c e o f f i l a m e n t o u s p h a g e : m e t h o d o l o g i e s f o r d i s p l a y i n g a n t i b o d y (F a b) h e a v y a n d l i g h t c h a i n s . N u c l e i c A c i d s R e s . 1 9 9 1 A u g 1 1 ; 1 9 (1 5) : 4 1 3 3 - 7) 。遺伝子の 3 ' 末端の N o t I 制限部位に、ベクター p H E N 1 に含まれる繊維状ファージ f d の小コートタンパク質 (プロテイン I I I) をコードする遺伝子とインフレーションで V H H ライブラリを挿入した。ランダム化された V H H ライブラリインサートのデザインされた配列を、配列番号 2 8 のヌクレオチド配列として示し、またアミノ酸配列を配列番号 2 9 に示す。配列番号 2 9 の文字 X は、ランダム化されたアミノ酸残基を意味する。

30

【 0 2 5 5 】

配列番号 2 8 :

40

【 表 6 】

1 c c a t g g c a a g t g c a a c t g c a g g a a g c g g a g g c g g t c t g g t t n n s c c a n n s n n s n n s n n s
 61 g g c a g c c t g c g t c t g a g o t g c g c g g c g t c c g g c g t a c c t t t a g c g a c c a t t c g g g c t a t
 121 a c c t a t a c c a t t g g c t g g t t c c g t c a g g c g c c a g g g a a a g a a c g t g a a t t t g t g g o g c g t
 181 a t t t a c t g g a g c a g c g g c a a t a c c t a c t a t g c g g a t a g c g t g a a a g g c c g t t t t t g c g a t t
 241 a g c c g c g a c a t c g c c a a g a a c a c c g t a g a t c t t a c g a t g n n s n n s t t g n n s n n s n n s n n s
 301 n n s g a a g a t a c g g c g g t g t a t t a t t g c g c a g c g c g t g a c g g c a t t c c g a c c t c c c g t a g c
 361 g t g g a a a g c t a c a a t t a c t g g g c c a g g g c a c c a g g t g a c c g t g a g c t c t g c g g c c g c

50

【 0 2 5 6 】

配列番号 2 9 :

【 表 7 】

PWQVQLQESGGGLVXPPXXXXGSLRLSCAASGRFTSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGR
FAISRDIKNTVDLTMXXLXXXXXEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSSAA

【 0 2 5 7 】

ライゲーション生成物を用いて更に大腸菌 T G 1 を形質転換し、得られたコロニーの数を測定し、多くの選抜されたクローンは制限酵素アッセイ及び D N A 塩基配列決定により解析した。次の表層ディスプレイライブラリファージの調製ステップは、標準的なプロトコルに従い実施した。簡潔には、ライゲーション混合物をエレクトロポレーションによって E . c o l i T G 1 細胞に導入して形質転換する。その後、ファージ粒子を、ヘルパーファージ M 1 3 - K O 7 をもちいて E . c o l i T G 1 細胞からレスキューした。ファージ粒子は更に、2つのステップで、P E G / N a C l を用いて培養上清から沈殿させ、水に溶解させ、パニングによる選抜に用いたか、又は - 8 0 で保存した。

10

【 0 2 5 8 】

実施例 3 : ヒト血清アルブミン (H S A) の、V H H のパニング - ファージライブラリ

標準的なプロトコル (例えばペプチド及び抗体のファージディスプレイ、a l a b o r a t o r y m a n u a l , K a y ら、1996, A c a d e m i c P r e s s , S a n D i e g o , C a l i f .) に従い、3ラウンドのパニングを実施した。簡潔には、以下の方法を実施した。M a x i s o r p 96穴プレート (ヌンク) を H S A でコーティングした。以下の溶液 200 μ l を、ウェルに添加した :

20

以下の濃度の H S A を有する、0 . 1 M の N a - 炭酸塩バッファ (p H 9 . 6) :

1 回目のパニングラウンド : 2 m g / m l の H S A ;

2 回目のパニングラウンド : 1 m g / m l の H S A ;

3 回目のパニングラウンド : 1 m g / m l の H S A ;

37 で 1 時間インキュベートし、更に室温で 1 時間、ウェルあたり 200 μ l の 2 % のスキムミルク (M - P B S) でブロッキングした。表層ディスプレイファージライブラリを更に、100 μ l ファージ懸濁液及び 100 μ l の 4 % スキムミルク (M - P B S) を添加することにより、結合した H S A と反応させ、45 分間振とうしてインキュベートし、更に振とうさせずに 90 分間インキュベートした。

30

【 0 2 5 9 】

未結合ファージ粒子を、以下の通りに洗浄除去した :

- 1 パニングラウンドの後 : 10 $\times$ 300 μ l T - P B S 、 5 $\times$ 300 μ l T - P B S ;

- 1 パニングラウンドの後 : 15 $\times$ 300 μ l T - P B S 、 10 $\times$ 300 μ l T - P B S ;

- 1 パニングラウンドの後 : 20 $\times$ 300 μ l T - P B S 、 20 $\times$ 300 μ l T - P B S 。

40

【 0 2 6 0 】

結合した粒子の溶出は、培養ウェルあたり 0 . 1 M のグリシン (p H = 2 . 2) を 200 μ l 添加し、室温で 30 分間振とうすることにより実施した。その後、ファージ懸濁液を 60 μ l 2 M トリス - ベースの添加によって中和し、更に、0 . 5 m l の抽出したファージと、10 m l の指数的に成長する培養液とを混合し、37 で 30 分間培養することにより、E . c o l i T G 1 細胞をトランスフェクションした。最後に、感染したバクテリアを、1 % のブドウ糖及び 100 μ g / m l アンピシリンを有する T Y E 培地で平板培養し、30 で一晚インキュベートした。

【 0 2 6 1 】

実施例 4 : 可溶性発現のための、H S A に対して選抜される V H H 変異体の選抜されたクローンのクローニング

50

3 パニングラウンドにより選抜されるファージ由来のファージミドDNAを、ミディブ
 レップで単離した。変異VHHドメインドメインをコードするDNAをPCRでバッチ増
 幅し、ベクターpNOTBAD/Myc-His(クローニングを容易にする挿入された
 NotI制限部位を有する、E.coli発現ベクターpBAD/Myc-His(Invitrogen社製))にNcoI-NotIをクローニングした。ライゲーションし
 た構築物を、エレクトロポレーションでE.coli LMG194細胞(Invitrogen社製)に導入して形質転換し、1%のブドウ糖及びアンピシリンを有するTYE
 培地で30℃で一晩増殖させた。選抜されたクローンを、アンピシリンを有する200µl
 2×YT培地に植継ぎ、30℃で一晩増殖させ、L-アラビノースを0.1%の最終
 濃度に添加して誘導した。16℃で一晩発現させた後、細胞を遠心分離により回収し、ペ
 リプラズム抽出液を、100µl Na-ホウ酸塩バッファ(pH8.0)で4℃で一晩
 処理した。ペリプラズム抽出物50µlをELISA(下記参照)で使用した。

【0262】

実施例5：HSAに対して選抜されたVHH変異体のELISA

ヒト血清アルブミン-結合に関して選抜されたVHH変異体のペリプラズム抽出液を、
 以下のプロトコルでELISA試験した。

【0263】

コーティング：マイクロタイタープレート(NUNC、Maxisorp)、ウェル
 あたり100µl、100µg HSA/ml(PBS中)で、4℃で一晩。

洗浄：3×200µlのPBS。ブロッキング：PBS(Pierce社製)中の1%の
 ブロッカーカゼイン、室温で1時間。

洗浄：3×200µlのPBS。

ペリプラズム抽出物の結合：50µlペリプラズム抽出物(実施例4)、50µlのPB
 S、0.05% Tween20、室温で一晩。

洗浄：3×200µlのPBS。

第1抗体：抗His4(Qiagen)、PBS、0.05% Tween20で1:1
 000希釈、室温で90分、ウェルあたり100µl。

洗浄：3×200µlのPBS。

第2抗体：ヤギ抗マウスHRP(SIGMA)、PBS、0.05% Tween20で
 1:1000希釈、室温で90分、ウェルあたり100µl。

洗浄：3×200µlのPBS。

検出：Na-クエン酸塩/リン酸塩バッファ(pH4.5)中の3mg/mlのOPD、
 0.4µlの30% H₂O₂。バックグラウンドが高くなりすぎる前に、100mlの3
 M H₂SO₄で停止。

吸光度測定：492/620nm。

【0264】

実施例6：1つのループだけがランダム化されたライブラリの例：C" Dループ

実施例2に記載した、デザインされたVHH遺伝子をコードする合成遺伝子を、以下の
 プライマ対を用いて、2つのPCR反応のテンプレートとして用いた：

配列番号26(3esyn2)と

配列番号30

(actgctcgag agacatcgcc aagaacac、esynmu4
)、並びに配列番号27(3esyn1)と

配列番号31

(cacactcgag atcgcaaaasn nsnnnsnnncac snnnsnn
 cgca tagtaggtat tgcc、3esynmu5)。

得られるPCR産物をXhoIで切断し、ライゲーションし、ライゲーション生成物を、
 プライマ3esyn1(配列番号27)及び3esyn2(配列番号26)を用いて、P
 CR反応のテンプレートとして用いた。プライマ3esynmu4(配列番号30)及び
 3esynmu5(配列番号31)のNNSコドンは、実施例2にて説明したのと同様な

10

20

30

40

50

ランダム化配列導入部位である。図 4 は、模式的な P C R 反応及びライゲーション手順を示す。水平の矢印は P C R プライマの位置及び方向を示し、それぞれの垂直のラインは N c o I、X h o I 及び N o t I 部位（左から右）を示す。このランダム化された P C R 産物を更に、実施例 2 と同様、p e l B 分泌シグナルとインフレーションで、ファージミドクローニングベクター p H E N 1 にクローニングした（H o o g e n b o o m H R, G r i f f i t h s A D, J o h n s o n K S, C h i s w e l l D J, H u d s o n P, W i n t e r G. M u l t i - s u b u n i t p r o t e i n s o n t h e s u r f a c e o f f i l a m e n t o u s p h a g e : m e t h o d o l o g i e s f o r d i s p l a y i n g a n t i b o d y (F a b) h e a v y a n d l i g h t c h a i n s . N u c l e i c A c i d s R e s . 1 9 9 1 A u g 1 1 ; 1 9 (1 5) : 4 1 3 3 - 7）。ランダム化された V H H ライブラリインサートのデザインされた配列を、配列番号 3 2 のヌクレオチド配列として示し、配列番号 3 3 にアミノ酸配列を示す。配列番号 3 3 の文字 X は、ランダム化したアミノ酸残基を意味する。

【 0 2 6 5 】

配列番号 3 2

【 表 8 】

```

1 ccatggcaag ttcagctgca ggaaagcggg ggcgccctgg tccagcctgg cggcagcctg
61 cgtctgagct gtgcggccag cgcccgtaac tttagcgacc atagcggcta cacctatacc
121 attggctggg ttctgcaggg gccaggaaaa gaacgtgaat ttgtggcgcg tattttactgg
181 agcagcggca atacctatta tgcggnnsnns gtggnnsnns nsttcgcgat ctgcagagac
241 attgccaaaga aacgggtaga tottacgatg aacaacctgg agccogaaga cacagccgtg
301 tattattgag cggctcggga tggcattccg accagccgta gcgtggaaag ctacaattac
361 tgggggccagg gcacccaggt gacgcgcagc tctgcggccg c

```

【 0 2 6 6 】

配列番号 3 3

【 表 9 】

```

PWQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYAXXVXXX
FAISRDIKNTVDLTMMNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSSAA

```

【 0 2 6 7 】

ライゲーション生成物を用いて更に大腸菌 T G 1 を形質転換し、得られたコロニーの数を測定し、多くの選抜されたクローンは制限酵素アッセイ及び D N A 塩基配列決定により解析した。次の表層ディスプレイライブラリファージの調製ステップは、標準的なプロトコルに従い、実施例 2 と同様に実施した。特異的結合クローンのパニング、選抜及び評価のステップは、基本的に実施例 3、4 及び 5 にて説明したのと同様に実施した。

【 0 2 6 8 】

実施例 7 : 3 つのループがランダム化されたライブラリの例 : A B、E F 及び C ' D ループ

実施例 2 にて説明したように A B ループ及び E F ループがランダム化された残基を有するライブラリを P C R のテンプレートとして用い、実施例 6 と同じプライマ対を用いた : 配列番号 2 6 (3 e s y n 2) と配列番号 3 0 (e s y n m u 4) 及び配列番号 2 7 (3 e s y n 1) と配列番号 3 1 (3 e s y n m u 5)。次の特異的結合クローンのライブラリ構造、クローニング、パニング、選抜及び評価のためのステップを、基本的に実施例 2、3、4 及び 5 にて説明したとおりに実施した。

【 0 2 6 9 】

実施例 8 : 1 つ、2 つ及び 3 つの構造ループのランダム化されたアミノ酸を有する可変ドメインライブラリの比較

パニングにおいて、様々な抗原を有するライブラリを用いた。抗原としての鶏卵リゾチーム：3つのパニングラウンドを実施した。ウェルあたり以下の溶液200 μ lを添加して、Maxisorp 96穴プレート(Nunc)を鶏卵リゾチームでコーティングした：

PBS(以下の濃度の鶏卵リゾチーム(HEL)を含有する)：

1回目のパニングラウンド：2mg/mlのHEL；

2回目のパニングラウンド：1mg/mlのHEL；

3回目のパニングラウンド：1mg/mlのHEL。

【0270】

37で1時間インキュベートし、室温で1時間、ウェルあたり200 μ lの2%のスキムミルク(M-PBS)でブロッキングした。表層ディスプレイファージライブラリを更に、100 μ lのファージ懸濁液、及び100 μ lの4%スキムミルク(M-PBS)を添加して、結合した鶏卵リゾチームと反応させ、振とうしながら室温で45分間、及び振とうせずに90分間インキュベートした。未結合ファージ粒子を、以下の通りに洗浄除去した：

- 1パニングラウンドの後：10 $\times$ 300 μ l T-PBS、5 $\times$ 300 μ l T-PBS；

- 1パニングラウンドの後：15 $\times$ 300 μ l T-PBS、10 $\times$ 300 μ l T-PBS；

- 1パニングラウンドの後：20 $\times$ 300 μ l T-PBS、20 $\times$ 300 μ l T-PBS。

【0271】

結合した粒子の溶出は、培養ウェルあたり0.1Mのグリシン(pH=2.2)を200 μ l添加し、室温で30分間振とうすることにより実施した。その後、ファージ懸濁液を60 μ l 2Mトリス-ベースの添加によって中和し、更に、0.5mlの抽出したファージと、10mlの指数的に成長する培養液とを混合し、37で30分間培養することにより、E.coli TG1細胞をトランスフェクションした。最後に、感染したバクテリアを、1%のブドウ糖及び100 μ g/mlアンピシリンを有するTYE培地で平板培養し、30で一晩インキュベートした。

【0272】

抗原としてのヒト血清アルブミン：

実施例2、6及び7のライブラリを用い、上記の通りパニングラウンドを実施した。簡潔には、ファージライブラリは、結合用緩衝液(PBS、1%のオバルブミン、0.005%のTween 20)に懸濁し、maxisorpプレートに直接固定したヒト血清アルブミン(PBS中の10 μ g/ml、4一晩)に対してパニングした。プレートを、ブロッカーカゼイン(Pierce社製)によってブロッキングした。2時間後に、未結合のファージを反復して洗浄(PBS、0.05%のTween 20)して除去し、結合したファージを、500mMのKCl、10mMのHCl、pH2で溶出させた。各HSAに特異的なパニングラウンドの後、得られるクローンを選抜するか、又はTNF α に対する結合を解析した。TNF- α に対する特異性に関する選抜及試験は、国際公開第2004/041862の実施例1に記載のように実施した。

【0273】

抗原としてのFcRn：

国際公開第02/060919号パンフレット(実施例6.2)に説明されるようにパニングを実施した。簡潔には、ファージライブラリを5mlの20mMのMES(pH6.0/5%スキムミルク/0.05%のTween 20)中に再懸濁し、事前に1マイクログラムのマウスFcRnでコーティングし、5%のスキムミルクでブロックしたMaxisorp免疫プレート(Nunc社製)の20ウェルに添加した(5 $\times$ 10¹²PFU/ml/ウェルで、100 μ l)。37で2時間培養した後、ウェルを、20mMのMES(pH6.0/0.2%のTween 20/0.3MのNaCl)で10~30回洗

10

20

30

40

50

浄し、100 μ LのPBS (pH 7.4 / ウェル) によって37 で30分間処理し、ファージを溶出させた。実施例3のように、ファージを用いて、指数関数的に増殖する大腸菌TG1に再度感染させた。FcRn上の各パニングラウンドの後、得られるクローンを選抜し、又はTNF α への結合を解析した。

【0274】

抗原としてのFc- γ 受容体：

Fc- γ RI、Fc- γ RIIA及びFc- γ RIIAの組換え融合タンパク質に対するパニングは、Bernitzenら(2006) Protein Eng Des Sel 19:121-128に記載のとおり実施した。Fc受容体上の各パニングラウンドの後、得られるクローンを選抜するか、又は上記の通りにTNF α に対する結合を解析した。

10

【0275】

実施例9：

この実施例は、新規な機能又は更なる結合特性を抗体断片にもたらす可能性を示すものである。修飾の開始材料として使用する分子は、マウス単鎖抗体断片sFv26-10 (Houstonら、(1988) Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879-5883)である。5つの異なるライブラリを構築し、ランダムアミノ酸配列によって、それぞれの構造ループ配列を修飾した：

【0276】

ライブラリ26-10-1：(配列番号34)

20

【表10】

EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKSSGYIFTDFYMNWVRQSHGKSLDYIGYISPYSGVTGYNQKF
KGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAGSSGNKWAMDYWGHGASVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLNWYLQKAGQSPKLLIYKVS
NRFSGXXXXFSGSGSGTDFTLKISXXXXXXXXXGIYFCSQTTHVPPTFGGGTKLEIKR

【0277】

ライブラリ26-10-2：(配列番号35)

30

【表11】

EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKSSGYIFTDFYMNWVRQSHGKSLDYIGYISPYSGVTGYNQKF
KGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAGSSGNKWAMDYWGHGASVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSDVVMQTPLSLPXXXXXQASISCRSSQSLVHSNGNTYLNWYLQKAGQSPKLLIYKVS
NRFSGXXXXFSGSGSGTDFTLKISXXXXXXXXXGIYFCSQTTHVPPTFGGGTKLEIKR

【0278】

ライブラリ26-10-3：(配列番号36)

40

【表12】

EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKSSGYIFTDFYMNWVRQSHGKSLDYIGYISPYSGVTGYNQKF
KGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAGSSGNKWAMDYWGHGASVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSDVVMQTPLSLPXXXXXQASISCRSSQSLVHSNGNTYLNWYLQKAGQSPKLLIYKVS
NRFSGXVPDRFSGSGSGTDFTLKISXXXXXXXXXGIYFCSQTTHVPPTFGGGTKLEIKR

【0279】

ライブラリ26-10-4：(配列番号37)

EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKSSGYIFTDFYMNWVRQSHGKSLDYIGYISPYSGVTGYNQKF
KGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAGSSGNKWAMDYWG HGASVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSDVVM TQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLNWYLQKAGQSPKLLIYKVSN
RFSGXXXXXXXXXFSGSGSGTDFTLKISXXXXXXXXXGIYFCSQTTHVPPTFGGGTKLEIKR

10

20

30

40

10

20

30

ライブラリ 26 - 10 - 4 遺伝子：（配列番号 42）

【表 18】

GAAGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGTCCGGAAGTGGTTAAACCGGGTGCTTCTGTTCGTATGTCTT
 GCAAATCTTCTGGTTACATCTTCACCGACTTCTACATGAACTGGGTTCGTCAGTCTCACGGTAA
 ATCTCTGGACTACATCGGTACATCTCTCCGTACTCTGGTGTACCGGTACAACCCAGAAATTC
 AAAGGTAAAGCTACCCTGACCGTTGACAAATCTTCTTCTACCGCTTACATGGAAGTGCCTTCTC
 TGACCTCTGAAGACTCTGCTGTTTACTACTGCGCTGGTCTTCTGGTAACAAATGGGCTATGGA
 CTACTGGGGTCACGGTGCTTCTGTTACCGTTTCTTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGT
 TCTGGTGGTGGTGGTCTGACGTTGTTATGACCCAGACCCCGCTGTCTCTGCCGGTTTCTCTGG
 GTGACCAGGCTTCTATCTCTTGCCGTTCTTCTCAGTCTCTGGTTCACTCTAACGGTAACACCTA
 CCTGAACTGGTACCTGCAGAAAGCTGGTCAGTCTCCGAAACTGCTGATCTACAAAGTTTCTAAC
 CGTTTCTCTGGTNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKTTCTCTGGTTCGTTCTGGTACCGACTTCA
 CCCTGAAAATCTCTNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKGGTATCTACTTCTGCTCTCAGACCACCCA
 CGTTCGCCGACCTTCGGTGGTGGTACCAAAGTGGAAATCAAACGT

10

【0286】

ライブラリ 26 - 10 - 5 遺伝子 : (配列番号 43)

【表 19】

GAAGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGTCCGGAAGTGGTTAAACCGGGTGCTTCTGTTCGTATGTCTT
 GCAAATCTTCTGGTTACATCTTCACCGACTTCTACATGAACTGGGTTCGTCAGNNKNNKNNKNN
 KNNKNNKGACTACATCGGTACATCTCTCCGTACTCTGGTGTACCGGTACAACCCAGAAATTC
 AAAGGTAAAGCTACCCTGACCGTTGACAAATCTTCTTCTACCGCTTACATGGAAGTGCCTTCTC
 TGACCTCTGAAGACTCTGCTGTTTACTACTGCGCTGGTCTTCTGGTAACAAATGGGCTATGGA
 CTACTGGGGTCACGGTGCTTCTGTTACCGTTTCTTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGT
 TCTGGTGGTGGTGGTCTGACGTTGTTATGACCCAGACCCCGCTGTCTCTGCCGGTTTCTCTGG
 GTGACCAGGCTTCTATCTCTTGCCGTTCTTCTCAGTCTCTGGTTCACTCTAACGGTAACACCTA
 CCTGAACTGGTACCTGCAGNNKNNKNNKNNKNNKNNKAAAGTCTGATCTACAAAGTTTCTAAC
 CGTTTCTCTGGTGTTCGCCGACCGTTTCTCTGGTTCGTTCTGGTACCGACTTCACCCCTGAAAA
 TCTCTCGTGTGAAGCTGAAGACCTGGGTATCTACTTCTGCTCTCAGACCACCCACGTTCCGCC
 GACCTTCGGTGGTGGTACCAAAGTGGAAATCAAACGT

20

30

【0287】

それぞれの遺伝子を、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドでアセンブルし、上記の通りファージ表面ディスプレイのためのファージディスプレイベクターにクローニングした。リーダーペプチド、sFv-変異型の及びファージのコートプロテインIIIとのインフレーム翻訳を可能にすべく、必要な修飾を行った。

【0288】

ファージディスプレイされたライブラリを、実施例8にて説明したように、ヒト血清アルブミン、リゾチーム、FcRn及びFcγ受容体への結合により選抜した。あるいは、遺伝子を、Binzその他、(2005)Nat Biotechnol. 22:575-582に記載の方法でベクターpRDVアナログとライゲーションし、Schaffitzelその他、(1999)J Immunol Methods 231:119-135に記載の方法で、ヒト血清アルブミン、Fc受容体及びリゾチームに関してパニングした。

40

【0289】

実施例 10 :

HIV-ペプチドELDKWAに特異的なヒト抗体(2F5)を、構造ループのランダ

50

ム化のための足場として用い、s c F vとして発現させた。発現ベクター及びファージディスプレイベクターの構築を、実施例9にて説明したように実施した。ファージ選抜も同様に実施した。

【0290】

野生型s c F v配列及びそれぞれのライブラリを図5から8に示す。

【0291】

実施例11：Fabライブラリ（定常ドメインの構造ループがランダム化）

免疫グロブリンドメイン（構造ループに位置する残基がランダム化）のライブラリからの特異的結合分子の選抜のために、様々なフォーマットを適用できる。シングルドメイン（例えばV L、V H、C H 1、C H 2、C H 3、C H 4又はC Lドメイン）が使用でき、C H 2及びC H 3ドメインからなるF c断片（ヒンジ部位又はそのパーツを含むか又は含まない）が使用でき、F v又は単鎖F v断片を使用でき、全長抗体を使用でき、又は免疫グロブリンドメインの他の組合せを使用できる。特異的結合分子の選抜のために特に好適な1つのフォーマットはFab断片であり、それは2つの鎖（すなわち抗体のV L - C L部分と、V H - C H 1部分）のヘテロ二量体である。Fab断片は従来公知で、プロテアーゼのパパインによるIg Gのタンパク質分解によって調製でき、それらは広範囲にわたる発現システム（例えば大腸菌、酵母、*Pichia pastoris*、昆虫細胞又は哺乳動物細胞）においてリコンビナント的に調製することもできる。

【0292】

表層ディスプレイシステム、例えばファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、及びリボソームディスプレイなどの他のシステムが、特異的結合分子（例えば大きなライブラリからのFab断片）の濃縮及び選抜に使用できることは公知である（例えばHoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acid Res.* 1991 Aug 11; 19(15): 4133-7.; Kang AS, Barbas CF, Janda KD, Benkovic SJ, Lerner RA. Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 May 15; 88(10): 4363-6.; Kang X, Yang BA, Hu Y, Zhao H, Xiong W, Yang Y, Si B, Zhu Q. Human neutralizing Fab molecules against severe acute respiratory syndrome coronavirus generated by phage display. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Aug; 13(8): 953-7.; Weaver-Feldhaus JM, Lou J, Coleman JR, Siegel RW, Marks JD, Feldhaus MJ. Yeast mating for combinatorial Fab library generation and surface display. *FEBS Lett.* 2004 Apr 23; 564(1-2): 24-34.)

【0293】

例えば、ファージディスプレイシステムがFab断片（例えばFab断片のライブラリ）のディスプレイのために適用される場合、Fab断片の1つの鎖（例えばV H - C H 1鎖）を、例えばファージM13のプロテインIIIとの融合タンパク質として発現させることができ、それによりファージ表面上にこの鎖がディスプレイされ、一方、他の鎖（V L - C L）が可溶形態として発現され、表面にアンカーされたV H - C H 1鎖と天然ヘテ

口二量体を形成する。典型的なF a b表面ディスプレイライブラリにおいて、異なるV H及びV L配列が存在し、それはドナーから得られ、典型的にはマウス又はヒトから得られる。しかしながら、その多様性はin vitroによる方法（例えばサイト誘導された突然変異生成）により生じる。それにより様々な結合部位が得られ、適切なディスプレイ又は他の強化又は選抜方法を用いて、かかるライブラリから、V H及びV Lにより形成される結合部位を経てそれらの結合パートナーと結合する特異的結合クローンを単離できる。

【0294】

F a b断片を調製することにより、V H及びV Lにより形成されるそれらの天然の結合部位を経て1つの標的と結合させることができ、またそれらの構造ループにより形成される結合部位を経て他の結合（又は同じものに2回目の結合）を形成させることもできる。かかるデザインされたF a b断片を得るために、構造ループの残基がランダム化された配列と置換されている、F a bのライブラリを最初に構築した。更なる残基の挿入を行ってもよい。この方法によりデザインできる構造ループは、V H若しくはV LのC末端ループ（「ボトム」ループ）、又はC H 1若しくはC LドメインのN末端（「トップ」ループ）又はC末端（「最後の」ループ）であってもよい。これらのいずれかの位置でデザインされた構造ループを有するドメインの様々な組合せを行ってもよい。特異的結合ドメインの選抜に使用できる1つのフォーマットは、シングルドメイン、F v又は単鎖F v断片、又は以下に詳細に記載のF a bフラグメントである。

【0295】

抗体4 D 5のそれぞれV H - C H 1及びV L - C Lをコードする遺伝子（ヒトHer 2と結合する）を、本実施例に使用する（Cho H S, Mason K, Ramyar K X, Stanley A M, Gabelli S B, Denney D W Jr, Leahy D J. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. Nature. 2003 Feb 13; 421 (6924): 756 - 60）。上記遺伝子の4 D 5 V L - C L部分をコードする部分、その5'末端のNco I部位にインフレームで連結させた、ファージミドベクターp H E N 1中のpe l Bシグナル配列、並びに停止コドンを含む合成遺伝子を構築した（Hoogenboom H R, Griffiths A D, Johnson K S, Chiswell D J, Hudson P, Winter G. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Nucleic Acids Res. 1991 Aug 11; 19 (15): 4133 - 7）。C LへのV Lからの配列置換で、特有のB s i W I制限部位が形成され、それを更に用いて、野生型C L配列を、V L - C Lをコードする遺伝子の停止コドンの下流に位置する固有のA s c I制限酵素部位との組合せで、ランダム化された構造ループを有するライブラリインサートへの置換を行った。それは、Carterその他から得られるリボソーム結合部位（シャイン - ダルガノ配列）を含む配列に続き（Carter P, Kelley R F, Rodrigues M L, Snedecor B, Covarrubias M, Velligan M D, Wong W L, Rowland A M, Kottts C E, Carver M E, et al. High level Escherichia coli expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. Biotechnology (NY). 1992 Feb; 10 (2): 163 - 7）、その後抗体4 D 5のV H - C H 1をコードする部分にインフレームで融合する熱安定エンテロトキシンI I (s t l l)シグナル配列をコードする遺伝子部分が続き、更にベクターp H E N 1へインフレーム挿入されたN o t I部位が続く。このジストロン構築物は、一方ではV L - C Lを発現させ（そのタンパク質配列を配列番号44に示す）、一方ではファージM 1

3 のプロテイン I I I に融合した V H - C H 1 (p H E N 1 にコードされる) (そのタンパク質配列を配列番号 4 5 に示す) を発現させる。4 D 5 F a b ディスプレイベクターの全配列を、配列番号 4 6 のヌクレオチド配列として示す。

【 0 2 9 6 】

構造ループの残基がランダム化された C L ドメインのライブラリの構築のため、ヒト κ 定常ドメイン (C L) をコードする合成遺伝子を作製した。特定のコドンが縮重コドンで置換されている (例えば N N B (I U P A C コード、N は C、G、T 及び A であり、B は T、C 及び G である))。更なる残基を配列に挿入することも可能である。この例では、3 つ、4 つ又は、5 つの残基を、残基 1 2 7 と 1 2 8 の間にそれぞれ挿入し、残基 1 8 2 - 1 8 5 及び 1 8 7 - 1 8 9 をランダム化した (カバット付番)。得られる遺伝子の配列を、配列番号 4 7、4 8 及び 4 9 (それぞれ残基 1 2 7 と 1 2 8 の間に 3 つ、4 つ又は、5 つの挿入) のヌクレオチド配列として示し、また配列番号 5 0、5 1 及び 5 2 (文字 X は 2 0 の自然にコードされたアミノ酸のいずれか) のアミノ酸配列としても示す。上記ヌクレオチド配列は、クローニングのため、5 ' 末端に B s i W I 部位を、また 3 ' 末端に A s c I 部位を導入した (配列番号 4 6)。

10

【 0 2 9 7 】

ファージディスプレイライブラリを構築するために、F a b 4 D 5 ディスプレイベクター (配列番号 4 6) を、制限酵素 B s i W I 及び A s c I で切断し、大きな断片を、調製用のアガロースゲル電気泳動により調製した。小さい断片 (野生型 C L をコードする遺伝子に対応する) を単離した。上記ライブラリインサートの混合物 (配列番号 4 7 から 4 9) を同様に B s i W I 及び A s c I で切断し、精製されたベクター断片にライゲーションした。ライゲーション混合物は例えばエレクトロポレーションによって、T G 1 などの適切な E . c o l i を形質転換し、多数の独立コロニーを発生させる (例えば 1 0 e x p 8、1 0 e x p 9 又はそれ以上)。形質転換させた細菌をプールし、ファージ粒子のレスキューのため、ヘルパーファージ (例えば M 1 3 K 0 7) に感染させた。ファージ粒子を、標準的方法によって調製し、ライブラリのパニングに用いた。

20

【 0 2 9 8 】

所定の標的に対するライブラリのパニングにより、H e r 2 に結合するのみならず、(抗体 4 D 5 の V H 及び V L によって形成される結合部位により) 選抜の対象となる標的にも結合する、F a b 断片を得た。

30

【 0 2 9 9 】

この実施例において、F a b ディスプレイライブラリのデザイン、調製及び使用 (C L ドメインの構造ループが修飾されている) を記載した。同様の方法により、他のドメイン (例えば C H 1、V H 又は V L ドメイン) の構造ループをランダム化したライブラリを調製し、使用できることは明白である。

【 0 3 0 0 】

配列番号 4 4

【 表 2 0 】

	5	10	15	20	25	30
1	M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A D I Q M T Q S P					
31	S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q					
61	K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G					
91	T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F					
121	G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G					
151	T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N					
181	S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K					
211	H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C					

40

【 0 3 0 1 】

配列番号 4 5

【表 2 1】

	5	10	15	20	25	30																								
1	M	K	K	N	I	A	F	L	L	A	S	M	F	V	F	S	I	A	T	N	A	Y	A	E	V	Q	L	V	E	S
31	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	N	I	K	D	T	Y	I	H	W	V
61	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	R	I	Y	P	T	N	G	Y	T	R	Y	A	D	S	V	K	G	R
91	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S
121	R	W	G	G	D	G	F	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S	T	K	G	P	S
151	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V
181	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S
211	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K
241	V	E	P	K	S	C	A	A	A	E	Q	K	L	I	S	E	E	D	L	N	G	A	A	@	T	V	E	S	C	L
271	A	K	P	H	T	E	N	S	F	T	N	V	W	K	D	D	K	T	L	D	R	Y	A	N	Y	E	G	C	L	W
301	N	A	T	G	V	V	V	C	T	G	D	E	T	Q	C	Y	G	T	W	V	P	I	G	L	A	I	P	E	N	E
331	G	G	G	S	E	G	G	G	S	E	G	G	G	S	E	G	G	G	T	K	P	P	E	Y	G	D	T	P	I	P
361	G	Y	T	Y	I	N	P	L	D	G	T	Y	P	P	G	T	E	Q	N	P	A	N	P	N	P	S	L	E	E	S
391	Q	P	L	N	T	F	M	F	Q	N	N	R	F	R	N	R	Q	G	A	L	T	V	Y	T	G	T	V	T	Q	G
421	T	D	P	V	K	T	Y	Y	Q	Y	T	P	V	S	S	K	A	M	Y	D	A	Y	W	N	G	K	F	R	D	C
451	A	F	H	S	G	F	N	E	D	P	F	V	C	E	Y	Q	G	Q	S	S	D	L	P	Q	P	P	V	N	A	G
481	G	G	S	G	G	S	G	G	G	S	E	G	G	G	S	E	G	G	G	S	E	G	G	G	S	E	G	G	G	G
511	S	G	G	G	S	G	S	G	D	F	D	Y	E	K	M	A	N	A	N	K	G	A	M	T	E	N	A	D	E	N
541	A	L	Q	S	D	A	K	G	K	L	D	S	V	A	T	D	Y	G	A	A	I	D	G	F	I	G	D	V	S	G
571	L	A	N	G	N	G	A	T	G	D	F	A	G	S	N	S	Q	M	A	Q	V	G	D	G	D	N	S	P	L	M
601	N	N	F	R	Q	Y	L	P	S	L	P	Q	S	V	E	C	R	P	Y	V	F	G	A	G	K	P	Y	E	F	S
631	I	D	C	D	K	I	N	L	F	R	G	V	F	A	F	L	L	Y	V	A	T	F	M	Y	V	F	S	T	F	A
661	N	I	L	H	K	E	S																							

10

20

【0 3 0 2】

配列番号 4 6

【表 2 2】

1	gacgaaaggg	cctcgtgata	cgcctatctt	tatagggttaa	tgatcatgata	ataatgggtt
61	cttagacgct	aggtggcaat	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aacctctatt	tggtttatctt
121	tctaaataca	ttcaaataatg	tatcgcgtca	tgagacaata	acctgataa	atgcttcaat
181	aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacatttccg	tgatgcctct	attcctcttt
241	ttgcggcatt	ttgccttctc	gtttttgctc	acctagaaac	gctgggtgaa	gtaaaagatg

【表 2 3】

301	ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	agcggtaaga	
361	tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacgtt	ttccaatgat	gagcactttt	aaagttctgc	
421	tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggg	cgccgcatac	
481	actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacgggatg	
541	gcatgacagt	aagagaatta	tgcagtgcgt	ccataaccat	gagtataaac	actgoggcca	
601	acttactttt	gacaacgac	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	
661	gggatcatgt	aactcgctt	gatcgttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaaccg	
721	acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaac	gttgcgcaaa	ctattaactg	
781	gcgaactact	tactctagct	tcccggcaac	aattaataga	ctggatggag	gcgataaag	
841	ttgcaggacc	acttctgcgc	tcggcccttc	cggctggctg	gtttattgct	gataaatctg	
901	gagccgggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	ggtaagccct	10
961	cccgatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	
1021	agatcgctga	gataggtgcc	tcactgatta	agcattggta	actgtcagac	caagtttact	
1081	catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	atttttaatt	taaaaggatc	taggtgaaga	
1141	tcctttttga	taatctcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	gtttctgttc	cactgagcgt	
1201	cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	ttttttctg	cgcgtaatct	
1261	gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgt	ttgtttgccg	gatcaagagc	
1321	taccaactct	ttttccgaag	gtaacttgct	tcagcagagc	gcagatacca	aatactgtcc	
1381	ttctagtcta	gcgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	
1441	tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	tgtcttaccg	
1501	ggttggactc	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	acggggggtt	
1561	cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	ctacagcgtg	
1621	agcattgaga	aagcggccacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacaggtat	ccggttaagcg	
1681	gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	20
1741	atagtcctgt	cggtgtttgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atttttgtga	tgtctgtcag	
1801	gggggcccgg	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	ctggcctttt	
1861	gctggccttt	tgtccacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	
1921	ttaccgcctt	tgagtgaact	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgcagcaggt	
1981	cagtgaagca	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaac	gcctctcccc	gcgcttggc	
2041	cgattcatta	atgcagctgg	caogacaggt	ttcccgactg	gaaagcgggc	agtgagcgca	
2101	acgcaattaa	tgtgagttag	ctcaactcatt	aggcacccca	ggctttacac	tttatgcttc	
2161	cggctcgtat	gttgtgtgga	atttgtgagc	gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	
2221	accatgatta	cgccaagctt	gcattgcaaat	tctattttcaa	ggagacagtc	ataatgaaat	
2281	acctattgcc	tacggcagcc	gctggattgt	tattactcgc	ggcccagccg	gccatggccg	
2341	atatccagat	gaccacgtcc	cogagctccc	tgtccgcctc	tgtgggcat	agggtcacca	
2401	tcacctgccg	tgccagtcag	gatgtgaata	ctgctgtagc	ctggtatcaa	cagaaaccag	
2461	gaaaagctcc	gaaactactg	atttactcgg	catccttctc	ctactctgga	gtcccttctc	30
2521	gcttctctgg	atccagatct	gggaacggatt	tcactctgac	catcagcagt	ctgcagccgg	
2581	aagacttcgc	aacttattac	tgtcagcaac	attatactac	tcctcccacg	ttcggacagg	
2641	gtaccaaggt	ggagatcaaa	cgtacgggtg	cgccgcctac	tgtcttctac	ttccgcat	
2701	ctgatgagca	gcttaagtct	ggaactgcct	ctgttgtgtg	cctgctgaat	aacttctatc	
2761	ccagagaggc	caaagtacag	tggaaagggtg	ataacgcctt	ccaatcgggt	aactcccagg	
2821	agagtgtcac	agagcaggac	agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	acctgacgc	
2881	tgagcaaagc	agactacgag	aaacacaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	catcagggcc	
2941	tgagctcgcc	cgtcacaaag	agcttcaaca	ggggagagtg	ttaataaggc	gcgcccgtga	
3001	tcctctacgc	cggacgcac	gtggccctag	tacgcaagtt	cacgtaaaaa	gggtatctag	
3061	aggttgagg	gattttatga	aaaagaatat	cgcatttctt	cttgcattct	tgttcgtttt	
3121	ttctattgct	acaaatgcac	acgctgaggt	tcaactagt	gagtcctggc	gtggcctggt	
3181	gcagccagg	ggctcactcc	gtttgtcctg	tgcagcttct	ggcttcaaca	ttaaagacac	
3241	ctatatacac	tgggtgcgtc	aggcccggtg	taaggggctg	gaatgggttg	caaggattta	
3301	tcctacgaat	ggttatacta	gatatgccga	tagcgtcaag	ggccgtttca	ctataagcgc	40
3361	agacacatcc	aaaaacacag	cctacctgca	gatgaacagc	ctgcgtgctg	aggacactgc	
3421	cgtctattat	tgttctagat	ggggagggga	cggcttctat	gctatggact	actgggggtca	
3481	aggaaccctg	gtcaccgtct	cctcggcgtc	gaccaagggc	ccatcggtct	tcctccctggc	
3541	acctctctcc	aagagcacct	ctgggggac	agcggccctg	ggctgcctgg	tcaaggacta	
3601	cttccccgaa	ccggtgacgg	tgtcgtggaa	ctcaggtgcc	ctgaccagcg	gcgtgcacac	
3661	cttccccggt	gtcctacagt	cctcaggact	ctactcctc	agcagcgtgg	tgaocgtgcc	
3721	ctccagcagc	ttgggcaccc	agacctacat	ctgcaacgtg	aatcacaagc	ccagcaacac	
3781	caagggtggac	aagaaagtgg	agcccaaact	ttgtgcggcc	gcagaacaaa	aactcatctc	
3841	agaagaggat	ctgaatgggg	ccgcatagac	tgttgaaagt	tgtttagcaa	aacctcatac	
3901	agaaaattca	tttactaacg	tctggaaaga	cgacaaaact	ttagatcggt	acgctaacta	
3961	tgagggtcgt	ctgtggaatg	ctacaggcgt	tgtgggttgt	actggtgacg	aaactcagtg	

【表 2 4】

4021 ttacgggtaca tgggttccta ttgggtttgc tatccctgaa aatgaggggtg gtggctctga
 4081 ggggtggcgggt tctgaggggtg ggggtttctga ggggtggcgggt actaaacctc ctgagtagcgg
 4141 tgatacacct attccgggct atacttatat caacctctc gacggcactt atccgcctgg
 4201 tactgagcaa aaccccgtata atcctaatac ttctcttgag gagtctcagc ctottaatac
 4261 ttatcatgttt cagaataata gggtccgaaa taggcaggggt gcattaactg tttatacggg
 4321 cactgttact caaggcactg accccgttaa aacttattac cagtacactc ctgtatcatc
 4381 aaaagccatg tatgacgctt actggaacgg taaattcaga gactgcgctt tccattctgg
 4441 ctttaatgag gatccattcg tttgtgaata tcaaggccaa tctgtctgacc tgcctcaacc
 4501 tcctgtcaat gctggcggcg gctctggtgg tgggttctggg ggogggctctg aggggtggcgg
 4561 ctctgaggggt ggcggttctg aggggtggcgg ctctgaggggt ggoggttccg gtggcggctc
 4621 cgggttccgggt gatttttgatt atgaaaaaat ggcaaacgct aataaggggg ctatgaccga
 4681 aaatgccgat gaaaacgcgc tacagttctga cgctaaaggc aaacttgatt ctgtcgctac
 4741 tgattacgggt gctgctatcg atgggttctat tgggtgacgtt tccggccttg ctaatggtaa
 4801 tgggtgctact ggtgattttg ctggctctaa tcccaaatg gctcaagtgc gtgacgggtga
 4861 taattcacct ttaatgaata atttccgtca atatttacct tctttgcctc agtcgggtga
 4921 atgtcgccct tatgtctttg gcgctggtaa accatatgaa ttttctattg attgtgacaa
 4981 aataaaactta ttccgtgggt tctttgcgtt tcttttatat gttgccacct ttatgtatgt
 5041 attttcgacg tttgctaaca tactgcataa ggagtcctaa taagaattca ctggccgtcg
 5101 ttttacaacg tctgactgg gaaaaccctg gcgttaccga acttaatcgc cttgcagcac
 5161 atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ctttcccaac
 5221 agttgcgag cctgaatggc gaatggcgcc tgatgcggta ttttctcctt acgcatctgt
 5281 gcggtatttc acaccgcacg tcaaagcaac catagtagcg gccctgtagc ggcgcattaa
 5341 gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc
 5401 ccgctccttt cgctttcttc ccttcccttc tgcaccgctt cgccggcttt ccccgctcaag
 5461 ctctaaatcg ggggtccct ttaggggtcc gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca
 5521 aaaaacttga tttgggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggttttct
 5581 gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa
 5641 cactcaaccc tatctcgggc tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggcct
 5701 attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa
 5761 cgttttacaat tttatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc
 5821 agcccgaca cccgccaaca ccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg ctcccgcat
 5881 ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttaccgt
 5941 catcaccgaa acgcgcga

10

20

【0 3 0 3】

配列番号 4 7

【表 2 5】

1 cgtacgggtgg cggcgccatc tgtcttcac tcccgccat ctgatgagca gcttaagtct
 61 nnnnnnnnnb gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc
 121 aaagtacagt ggaagggtga taacgcctc caatcggtga actcccagga gagtgtcaca
 181 gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc ctacgagca cctgacgct gnnnnnnnnb
 241 nnnbtaacnnb nnnnbbaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc
 301 gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt taataaggcg cgcc

30

【0 3 0 4】

配列番号 4 8

【表 2 6】

1 cgtacgggtgg cggcgccatc tgtcttcac tcccgccat ctgatgagca gcttaagtct
 61 nnnnnnnnnb nbgaactgc ctctgttgtg tgccctgctga ataacttcta tcccagagag
 121 gccaaagtac agtggaagggt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc
 181 acagagcagg acagcaaggga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac gctgnnnnnb
 241 nnnnnbtaac nnnnnbbaa agtctacgac tgcaaggtca cccatcaggg cctgagctcg
 301 cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tggttaataag gcgcgcc

40

【0 3 0 5】

配列番号 4 9

【表 2 7】

```

1  cgtacggtgg  cggcgccatc  tgtcttcac  ttcccgccat  ctgatgagca  gcttaagtct
61  nnbnbnbnbn  nbnnbggaac  tgctctgtt  gtgtgcctgc  tgaataactt  ctatcccaga
121 gaggccaaag  tacagtggaa  ggtggataac  gccctccaat  cgggtaactc  ccaggagagt
181 gtcacagagc  aggacagcaa  ggacagcacc  tacagcctca  gcagcaccct  gacgctgnnb
241 nnbnbnbnbt  acnnbnbnbn  baaagtctac  gcctgcgaag  tcacccatca  gggcctgagc
301 tcgcccgtca  caaagagctt  caacagggga  gagtgttaat  aaggcgcgcc

```

【0 3 0 6】

配列番号 5 0

【表 2 8】

10

```

          5          10          15          20          25          30
1  R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S X X X G T A S V V C
31 L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T
61 E Q D S K D S T Y S L S S T L T L X X X X Y X X X K V Y A C
91 E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

```

【0 3 0 7】

配列番号 5 1

【表 2 9】

20

```

          5          10          15          20          25          30
1  R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S X X X X G T A S V V
31 C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V
61 T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L X X X X Y X X X K V Y A
91 C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

```

【0 3 0 8】

配列番号 5 2

【表 3 0】

30

```

          5          10          15          20          25          30
1  R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S X X X X X G T A S V
31 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S
61 V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L X X X X Y X X X K V Y
91 A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

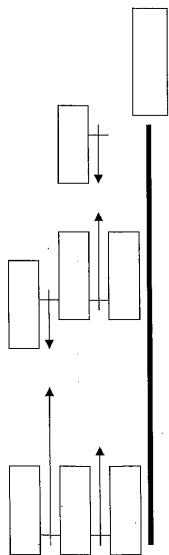
```

【☒ 1】

クエリー	2	VQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGTYTTHGFRQAPGKEREFVARIYSSG	61
		VQL ESGG VQ GGSIRLSCAASG S + +GWFROAPGKERE VA + + G	
サブジェクト	2	VQLVESGGGVQAGGSLRLSCAASGYIASINY-----LGWFRQAPGKEREGVAASVPSAGG	56
クエリー	62	NTYYADSVKGREALISRDIAKNTVDTLTNNLEPEDTAVYC-AARDGIPTSRVSSESYNYWG	120
		YYADSVKGRE +S D A+NTV L MN+L+PEDTA+YYC AAR G + YNYWG	
サブジェクト	57	TPYYADSVKGRFTVSIDNAENTVYLQMSLKPEDTALYYCAAARQGWYIPLNSYGYNYWG	116
クエリー	121	QGTQVTSS	129
		QGTQVTSS	
サブジェクト	117	QGTQVTSS	125

Figure 3

【☒ 3】



【☒ 2】

クエリー	2	VQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGTYTTHGFRQAPGKEREFVARIYSSG	61
		VQL ESGG VQ GGSIRLSCAASG S + +GWFROAPGKERE VA + + G	
サブジェクト	2	VQLVESGGGVQAGGSLRLSCAASGYIASINY-----LGWFRQAPGKEREGVAASVPSAGG	56
クエリー	62	NTYYADSVKGREALISRDIAKNTVDTLTNNLEPEDTAVYC-AARDGIPTSRVSSESYNYWG	120
		YYADSVKGRE +S D A+NTV L MN+L+PEDTA+YYC AAR G + YNYWG	
サブジェクト	57	TPYYADSVKGRFTVSIDNAENTVYLQMSLKPEDTALYYCAAARQGWYIPLNSYGYNYWG	116
クエリー	121	QGTQVTSS	129
		QGTQVTSS	
サブジェクト	117	QGTQVTSS	125

Figure 2

【☒ 4】

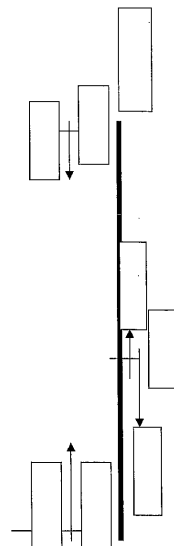


Figure 4

【配列表】

2009541361000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/AT2007/000343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/10 C07K16/16 C07K16/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2006/072620 A (RUEKER FLORIAN [AT]; WOZNIAK-KNOPP GORDANA [AT]) 13 July 2006 (2006-07-13) the whole document	1-15, 24, 25, 28-34
X	WO 93/23537 A (CREATIVE BIOMOLECULES INC [US]; HUSTON JAMES S [US]; KECK PETER C [US]) 25 November 1993 (1993-11-25) page 18, line 17 - line 25; figures 6-11, 14; example 1 page 48, line 21 - page 49, line 2; example 3 ----- -/--	1-7, 9-11, 25, 32, 33

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 March 2008

Date of mailing of the international search report

10/03/2008

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040; Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Armandola, Elena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/AT2007/000343

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BODER ERIC T ET AL: "Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 97, no. 20, 26 September 2000 (2000-09-26), pages 10701-10705, XP002185398 ISSN: 0027-8424 the whole document	25,28, 29,31-33
X	SIMON T ET AL: "A FUNCTIONAL ANTIBODY MUTANT WITH AN INSERTION IN THE FRAMEWORK REGION 3 LOOP OF THE V-H DOMAIN IMPLICATIONS FOR ANTIBODY ENGINEERING" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 5, no. 3, 1992, pages 229-234, XP008083103 ISSN: 0269-2139 the whole document	1-4,11, 12,25
A	FOOTE J ET AL: "ANTIBODY FRAMEWORK RESIDUES AFFECTING THE CONFORMATION OF THE HYPERCARIABLE LOOPS" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 224, no. 2, January 1992 (1992-01), pages 487-499, XP000564649 ISSN: 0022-2836 the whole document	
A	SAERENS ET AL: "Identification of a Universal VHH Framework to Graft Non-canonical Antigen-binding Loops of Camel Single-domain Antibodies" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 352, no. 3, 23 September 2005 (2005-09-23), pages 597-607, XP005052664 ISSN: 0022-2836 the whole document	
A	CONRATH K ET AL: "Antigen Binding and Solubility Effects upon the Veneering of a Camel VHH in Framework-2 to Mimic a VH" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 350, no. 1, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 112-125, XP004918534 ISSN: 0022-2836 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AT2007/000343**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 31
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/AT2007/000343

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 31

The present claim 31 relates to an extremely large number of possible compounds. Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is lacking. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claim 31 (PCT Guidelines 9.19 and 9.23).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2); should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/AT2007/000343

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006072620 A	13-07-2006	AU 2006204459 A1	13-07-2006
		CA 2594356 A1	13-07-2006
		CN 101098891 A	02-01-2008
		EP 1699826 A1	13-09-2006
		KR 20070092242 A	12-09-2007
WO 9323537 A	25-11-1993	AT 165113 T	15-05-1998
		AU 675223 B2	30-01-1997
		AU 4238993 A	13-12-1993
		CA 2135408 A1	25-11-1993
		DE 69318016 D1	20-05-1998
		EP 0640130 A1	01-03-1995

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 レードル ゲルダ

オーストリア共和国 グロス - エンツァースドルフ エスヴェー 8 0 ドナウ - オーダー - カナール イーファオ

(72)発明者 リュッカー フロリアン

オーストリア共和国 ウィーン モンティガッセ 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA61 BA63 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 DA06 EA03

GA11 HA01 HA11

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA71 FA74

专利名称(译)	免疫球蛋白的工程化方法		
公开(公告)号	JP2009541361A	公开(公告)日	2009-11-26
申请号	JP2009516819	申请日	2007-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	°F星毕熙术格哈德文件夹顺控股UND进入维克Rungu扫描猜测EM-基于硬		
申请(专利权)人(译)	的F - 星毕金泰熙术格哈德文件夹顺控股-... UND进入维克Rungu扫描猜测EM-基于硬.		
[标]发明人	ヒムラーゴットフリート レードルゲルダ リュッカーフロリアン		
发明人	ヒムラー ゴットフリート レードル ゲルダ リュッカー フロリアン		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/09 C07K14/47 G01N33/53 C40B30/00		
CPC分类号	C12N15/1037 C07K16/00 C07K16/005 C07K16/1045 C07K16/1063 C07K16/16 C07K16/18 C07K16/241 C07K16/283 C07K16/32 C07K16/40 C07K2317/21 C07K2317/22 C07K2317/55 C07K2317/622		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/00.A C07K14/47 G01N33/53.N C40B30/00		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
代理人(译)	Seihayashi正幸 和义林		
优先权	2006001145 2006-07-05 AT		
其他公开文献	JP5508002B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

甲免疫球蛋白和可变免疫球蛋白结构域具有改善的抗原结合特征，以及，提供一种工程和制备具有改进的可变结构域免疫球蛋白。解决方案：免疫球蛋白的工程方法。特别地，免疫球蛋白在可变结构域中具有至少一个修饰，并且在所述免疫球蛋白的至少两个结构环中具有至少一个修饰，并且可以确定所述免疫球蛋白与抗原表位的结合。未修饰的免疫球蛋白不显著结合所述表位。制备编码包含至少两个结构环的免疫球蛋白的核酸，修饰每个结构环的至少一个核苷酸残基，修饰修饰的核酸，表达修饰的免疫球蛋白，使表位与表达的修饰的免疫球蛋白接触，并测量修饰的免疫球蛋白是否与表位结合它已经组成。系统技术领域

