

(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2005-538049

(P2005-538049A)

(43) 公表日 平成17年12月15日(2005.12.15)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 47/48	4 C 0 7 6
A 6 1 K 38/43	A 6 1 K 39/395	C
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 K 47/14	A 6 1 K 39/395	M
A 6 1 K 47/26	A 6 1 K 39/395	Y

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く

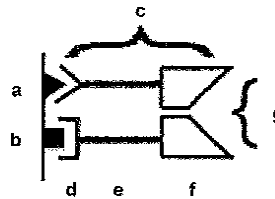
(21) 出願番号	特願2004-501909 (P2004-501909)	(71) 出願人	504403150 トレリス バイオサイエンス、インク。 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80 サウス サン フランシスコ コー ポレート ドライブ 2-B
(86) (22) 出願日	平成15年4月30日 (2003.4.30)	(74) 代理人	100080816 弁理士 加藤 朝道
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月28日 (2004.12.28)	(74) 代理人	100098648 弁理士 内田 潔人
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/013637	(74) 代理人	100116528 弁理士 三宅 俊男
(87) 国際公開番号	W02003/093793	(72) 発明者	カウヴァー、ローレンス、エム。 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80 サウス サン フランシスコ コー ポレート ドライブ 2-B
(87) 国際公開日	平成15年11月13日 (2003.11.13)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/377,067		
(32) 優先日	平成14年5月1日 (2002.5.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 2元的ないし多元的ターゲティング及びその使用

(57) 【要約】

【課題】 ターゲティングの特異性を向上すること。

【解決手段】 標的に機能性成分を提供する方法であって、a) 2又は3以上のターゲティング成分を提供すること、但し、各ターゲティング成分は、ターゲティング部分及び再構成部分を含み、各ターゲティング部分は、前記標的の近接して位置する2又は3以上の別異部位の1つと特異的に結合し、再構成部分は、互いに接近したとき、集合して前記標的において機能性成分を構築する、及びb) 前記複数のターゲティング成分を前記標的を含む環境と接触させ、前記標的における前記機能性成分の構築を誘発し、以って該機能性成分を前記標的に提供する方法。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

標的に機能性成分を提供する方法であって、

a) 2 又は 3 以上のターゲティング成分を提供すること、但し、各ターゲティング成分は、ターゲティング部分及び再構成部分を含み、各ターゲティング部分は、前記標的の近接して位置する 2 又は 3 以上の別異部位の 1 つと特異的に結合し、再構成部分は、互いに接近したとき、集合して前記標的において機能性成分を構築する、及び

b) 前記複数のターゲティング成分を前記標的を含む環境と接触させ、以って前記標的における前記機能性成分の構築を誘発し、以って該機能性成分を前記標的に提供することを含む方法。

10

**【請求項 2】**

前記機能性成分は、エフェクター機能を提供する、又は前記機能性成分は、直接的又は間接的にエフェクター機能と結合する

請求項 1 の方法。

**【請求項 3】**

前記エフェクター機能は、酵素活性又は標識である

請求項 2 の方法。

**【請求項 4】**

前記標識は、即時に検出可能なシグナルを生成する

請求項 3 の方法。

20

**【請求項 5】**

前記ターゲティング部分は、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、核酸、ビタミン、オリゴ糖、炭水化物、脂質、小分子、又はそれらの複合体ないし組合せ、及び/又は

前記再構成部分は、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、核酸、ビタミン、オリゴ糖、炭水化物、脂質、小分子、又はそれらの複合体ないし組合せ、及び/又は

前記ターゲティング部分及び前記再構成部分は、直接又はリンカーを介して共有結合的に結合する、及び/又は

前記複数のターゲティング成分の少なくとも 1 つは、融合タンパク質である

請求項 1 ~ 4 の何れか一の方法。

30

**【請求項 6】**

前記ターゲティング部分は、免疫グロブリン又はそのフラグメントである

請求項 5 の方法。

**【請求項 7】**

前記免疫グロブリン(複数)又はそのフラグメント(複数)は、互いに独立に、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fab フラグメント、Fab' フラグメント、F(ab')<sub>2</sub> フラグメント、Fv フラグメント、二重特異性抗体(diabodies)、単鎖抗体又は抗体フラグメントから生成される多特異性(multispecific)抗体である

請求項 6 の方法。

**【請求項 8】**

前記標的は、無処置の細胞又は細胞下構造である

請求項 1 ~ 7 の何れか一の方法。

40

**【請求項 9】**

前記機能性成分は、前記エフェクターと直接的に結合し、又は独立のリンク対を介して間接的にエフェクターと結合する

請求項 2 の方法。

**【請求項 10】**

前記独立のリンク対は、

a) ビオチン及びアビジン又はストレプトアビジン、又は

b) FLAG エピトープ及び該 FLAG エピトープと結合する抗体

50

を含む請求項 9 の方法。

【請求項 1 1】

前記標的の近接して位置する複数の別異部位は、1つの分子の異なる領域である、又は膜の面に対し水平方向に、又は、三次元的に、拡散によって接近可能な別々の分子に位置する

請求項 1 ~ 1 0 の何れか一の方法。

【請求項 1 2】

前記標的における前記機能性成分の構築は、該標的の酵素活性を惹起又は修飾するよう機能する

請求項 1 ~ 1 1 の何れか一の方法。

10

【請求項 1 3】

前記機能性成分自体が、酵素活性を提供するか、又は

前記機能性成分は、酵素のための、又は酵素と結合する 1 又は 2 以上の結合成分のための捕獲部位を提供するか、又は

少なくとも 1 つの再構成部分が、当該補因子の存在下酵素活性を有する少なくとも 1 つの第 2 再構成部分のための補因子を含み、以って再構成時に、酵素活性が惹起されるか、又は

少なくとも 1 つの再構成部分が酵素のためのアロステリック阻害剤を含み、かつ少なくとも 1 つの部分が該アロステリック阻害剤によって影響を及ぼされる酵素を含み、以って再構成時に、酵素活性が阻害されるか、又は

20

少なくとも 1 つの再構成部分が酵素の触媒部位を閉塞ないし占有するフレキシブルフラップのための高親和性結合部位を含み、かつ他の再構成部分が該フラップ又はその機能性フラグメントを含む該酵素を含み、以って再構成時に、酵素活性が賦活されるか、又は

前記酵素活性は、前記標的のプロドラッグを賦活する

請求項 1 2 の方法。

【請求項 1 4】

標的にエフェクター機能を提供する、請求項 1 ~ 1 3 の方法で使用するためのキットであって、

前記キットは、1 又は 2 以上の容器に含まれた、請求項 1 ~ 1 1 の方法で使用するための、2 又は 3 以上のターゲティング成分を含み、但し、該ターゲティング成分の各々は、標的の近接して位置する 2 又は 3 以上の別異部位の 1 つに特異的に結合する (1 つの) ターゲティング部分と、(複数の) 再構成部分とを含み、該再構成部分は、互いに接近したとき、集合して前記標的に機能性成分を構築し、及び

30

前記キットは、任意的に、前記構築された機能性成分と反応ないし結合するエフェクター成分を更に含み、及び

前記キットは、任意的に、前記ターゲティング成分を使用するための説明書を更に含むキット。

【請求項 1 5】

試料中の分析物をアッセイするための方法であって、

a) 近接して位置する少なくとも 2 つの別異部位であって、該部位の少なくとも 1 つが前記分析物又はそのアナログと結合している部位を含む表面を提供すること

40

b) 少なくとも 2 つのターゲティング成分を提供すること、但し該ターゲティング成分は、ターゲティング部分と、互いに接近したとき集合してシグナル成分又はシグナル成分のための結合部位を構築する相補的再構成部分を含む、

c) 少なくとも 1 つの前記ターゲティング成分は、前記分析物と結合するターゲティング部分を含み、かつ他のターゲティング成分の各々は、前記表面上で分析物又はそのアナログに結合した前記部位に近接して位置する該分析物又はそのアナログが存在しない部位に特異的に結合するターゲティング部分を含む

d) 前記分析物の不存在下及び存在下において前記表面と前記ターゲティング成分とを接触させ、前記シグナル成分によって生成される前記シグナルを、生じた場合には、検出

50

すること、及び

e) 前記分析物の不存在下及び存在下において検出した前記シグナルを比較して、前記試料中における前記分析物の存在及び/又はその量を求めること

を含む方法。

【請求項16】

前記表面は、マイクロプレート、スライドガラス、ニトロセルロース膜、ラテックスないしプラスチックビーズ、細胞、試験管、コロイド金粒子、有色 (colored) 粒子、磁性ビーズ、又は量子ドット (quantum dot) の表面であり、及び/又は

前記シグナル成分は、酵素、放射性成分、可視 (visible) 成分、NMR検出可能成分、又は蛍光ないし燐光成分であり、及び/又は

前記アッセイされるべき分析物は、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、核酸、ビタミン、オリゴ糖、炭水化物、脂質、小分子又はこれらの複合体ないし組合せであり、及び/又は

前記試料は、生物試料である

請求項15の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、少なくとも2元的ターゲティング成分の使用に基づいて改善された特異性を有する選択部位へのエフェクター機能のターゲティング及びその使用に関する。本発明は、特に、2又は3以上の別個の標的成分から機能性成分の標的部位における集合 (構築) に依拠する細胞ターゲティングのための方法及びキットに関する。このため、種々のエフェクター機能が、ただ1つのターゲティング成分によって供与される同じエフェクター機能に対して可能であるより大きな特異性を有する選択部位において提供可能となる。

【背景技術】

【0002】

標的部位に対し、当該標的部位を取り囲む環境を排除する特性ないし機能を付与することは、多くの場合、望ましいことであるということは、古くから知られていることである。そのような特異的ターゲティングの初期の例としては、原理的に、毒性成分が、周囲の組織に対する有害な副作用を引き起こすことなく毒性が望まれる細胞標的に選択的かつ特異的に送達可能とされる免疫毒素の設計がある。また、後述するように、環境を排除するために、特定の部位に酵素活性を付与することが望ましいこともある。典型的には、選択性を提供する標的部位のためのリガンドの親和性に依存して、所望の部位へ活性成分を運搬するただ1つのリガンドを用いて、活性の付与が試みられてきた。

【0003】

しかしながら、多くの場合、このようなアプローチは十分な選択性を付与しない。例えば、腫瘍細胞に結合する抗体の薬物動態は緩慢である (最大特異性に対し24~48時間) であることが証明されている。この時間の間、抗体と結合する毒性エフェクターは、全身の他の部分に対する有害な効果を有することが予期されるであろう。腫瘍細胞表面抗原に対する抗体とアビジンとの結合は、毒性エフェクターに対し全身を曝露することを回避する1つの方法として提案された。抗体の局在化が最大となった後にビオチン結合トキシン又は放射性リガンドを投与することにより、身体から小分子が1時間以内に除去されるため、全身性曝露は著しく減少する (Sung (Sung) 及びヴァン・オスドル (van Osdol), J. Nucl. Med. (1995) 36(5): 867-76)。

【0004】

また、抗体コンジュゲートの局在化が最大となった後に投与された小分子プロドラッグを活性化するために、抗体-酵素コンジュゲートが使用された (メルトン (Melton) 及びシェアーウッド (Sherwood), J. Natl. Cancer Inst. (1996) 88(3-4): 153-65)。この

10

20

30

40

50

ストラテジーは、シアトル・ジェネティクス・インク社によって商業化されている。プロドラッグの細胞外酵素活性化は、癌の治療にとりわけ望ましい。というのは、プロドラッグは、近傍において腫瘍細胞を死滅するための傍観者（第三者）効果を惹起するからである。従って、ターゲティング抗原は、多くの固形腫瘍内部の壊死細胞片に大量に存在するヒストンと同じくらい単純なものであり得る。

#### 【0005】

抗体 - エフェクターコンジュゲートの基本思想の更なるバリエーションは、イムノゲン社によって商業化されたTAP（腫瘍活性化プロドラッグ：tumor activated prodrug）技術によって例証される。これによると、トキシン、例えばマイタンシン（maytansine）とコンジュゲートした抗体が、当該抗体の関連する抗原を発現する細胞によって、細胞内放出性トキシンと共に、優先的に内部に取り入れられる（リュウ（Liu）及びチャリ（Chari）, Exp. Opi. Invest. Drugs (1997) 6: 169-172）。しかしながら、TAPアプローチには、傍観者効果がなく、従ってターゲティング抗原を喪失した変異体が選択されるという欠点がある。

10

#### 【0006】

これら従来技術は全て、ターゲティング抗体の特異性に関し本質的な限界を伴う。この観点において、標的細胞は、身体全細胞のうち小さなフラクション、しばしばほぼ1/100,000以下であるのが通常である。従って、身体他の抗原に対する場合より標的抗原に対し100,000倍以上親和性が大きいように、抗体の特異性が非常に大きい場合であっても、非標的細胞に分配されるコンジュゲートエフェクターのフラクションは、なお50%もある。実際、抗体特異性は、このような大きさであることは通常はなく、それに応じてバックグラウンドの結合はより大きい。従って、この意味において、単一のターゲティングリガンドは、通常、満足すべきものではない。

20

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

それゆえ、本発明の課題は、エフェクター機能が惹起される以前に複数の独立の結合イベントを生起することによりターゲティング一般の特異性を改善することである。このアプローチは、インビボで細胞の表面にエフェクター機能を送達することに限定されず、エフェクター機能を細胞内標的（ターゲット）へ送達すること、及びインビトロでエフェクター機能を細胞性若しくは非細胞性標的へ送達するために使用することも可能である。

30

#### 【0008】

本発明は、とりわけ細胞表面でのプロドラッグの活性化のために有用な、酵素活性を惹起するための2元的又は多元的ターゲティングのための特異的な方法及びキットも提供する。更に、本発明は、2元的又は多元的ターゲティングを使用した分析物をアッセイするための方法及びキットを提供する。

#### 【0009】

エフェクターの2元的再構成に関する自然界の例としては、細胞膜の幅の半分及びイオンチャンネルの直列的（縦列的）二量体化により細胞膜に貫通孔を形成するグラミシジントキシンがある。実際に、この特殊なトキシンは、細胞膜の面内において反転可能であるため、エフェクター機能を惹起するために1つのモノマーを細胞の内部へ向け、更に1つのモノマーを細胞の外部へ向ける必要はない。この先例は、本発明が天然に存在する構造体において実現されていることをあたかも示唆しているかのようではあるが、必要な特性を全て有するターゲティング成分を作成するためには、幾つかの成分の改変及び/又は組合せが通常必要とされる。上記のような自然発生的な現象は本発明から排除される。

40

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

本発明は、一般に、複数のターゲティング成分を用いた所望の部位に対するエフェクター機能のターゲティングに関する。本発明の方法は、治療のために使用することができ、また、予後及び診断的モニタリングのために、及び細胞生物学の基礎研究のために使用す

50

ることも可能である。本発明は、少なくとも2つのターゲティング成分を必要とする。2元的ターゲティングは好ましい形態である。尤も、3又は4以上のターゲティング成分も使用することができる。2元的ターゲティングは、説明のために多くの例で使用されるが、これによって本発明を2元的形態に限定することは意図しない。

#### 【0011】

1つの側面では、本発明は、所望の部位において選択的にエフェクター機能を惹起する方法を提供する。この方法は、例えば標的(ターゲット)を画像化(イメージング)するため、薬物を標的に送達するため、競合的分析物の存在を検出するため、酵素活性を惹起するため、及びその他の多くの処理に使用することが可能である。エフェクター機能は、単独では不活性な成分(複数)の集合によって惹起される。全ての実施形態の本質的特徴は、2又は3以上のターゲティング成分であって、個々のターゲティング成分が(1つの)ターゲティング部分と(1つの)再構成部分とを有し、ターゲティング部分(複数)が標的の(互いに)近接して位置する別異部位(複数)に(それぞれ)特異的に結合し、再構成部分(複数)が、互いに接近したとき、集合して機能性成分を構築するよう構成されたターゲティング成分を提供することである。

10

#### 【0012】

機能性成分は、それ自体が、酵素活性又は毒性のようなエフェクター機能を提供し得る。或いは、機能性成分は、トキシン又は酵素のような1又は2以上の他の物質に結合することによって間接的にエフェクター機能を提供することも可能である。

#### 【0013】

従って、1つの側面では、本発明は、標的に対し特異的に機能性成分を提供する方法であって、標的を含む環境と少なくとも2つのターゲティング成分とを接触させること、但し該ターゲティング成分の各々は(1つの)ターゲティング部分と(1つの)再構成部分とを含む、を含む方法に関する。個々のターゲティング部分は、標的の(互いに)近接する2又は3以上の部位の1つに特異的に結合する。再構成部分(複数)は、互いに接近したとき、集合して機能性成分を構築する。上述のように、機能性成分は、それ自体が、有効な機能を提供可能であるか、又はそのような機能を提供する1又は2以上の他の成分と結合することが可能である。

20

#### 【0014】

本発明のこの方法は、薬物、標識、毒素(トキシン)又は所望の成分一般を特異的標的に送達するためのインピボでの使用、同じ目的のためのインピトロでの使用、及びとりわけ機能性成分の形成を妨害する能力を有する分析物をアッセイするための方法における使用を含む、種々の処理に適用することができる。

30

#### 【0015】

他の側面では、本発明は、機能性成分、及び究極的にはエフェクター機能を標的に提供するキットであって、1つの容器に入れられた、2又は3以上のターゲティング成分であって、個々のターゲティング成分が(1つの)ターゲティング部分と(1つの)再構成部分とを有するよう構成されたキットを開示する。再構成部分(複数)が直接的にはエフェクター機能を生成しない場合は、再構成部分(複数)によって形成される機能性成分と反応する付加的成分も含まれ得る。好ましくは、キットは、ターゲティング成分及び/又は細胞構造又は他の選択部位にエフェクター機能を提供するエフェクターを使用するための説明書を更に含む。

40

#### 【0016】

更に他の側面では、本発明は、例えばその相補的ターゲティング成分が位置する部位に複数のターゲティング成分の1つが到達するのを阻止することにより、機能性成分の形成を妨害する分析物の能力を評価することにより試料中の分析物を競合的にアッセイするための方法を提供する。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0017】

本発明の基本原理は、ただ1つの構造体における2又は3以上のターゲティング成分の

50

互いに独立した（個別の）配置は、関連する（複数の）再構成成分（部分）を必要とされる分子レベルのスケールで接近させ、それ自体エフェクター機能を実行可能な又はエフェクター機能を提供する（1又は複数の）他の成分と結合可能な機能性成分を形成するために使用することができる、ということである。（1つの）ターゲティング部分と（1つの）再構成部分との組合せは、（1つの）ターゲティング成分を構成する。

**【0018】**

本発明の方法で使用するために、ターゲティング成分は、以下の3つの性質を有する必要がある。第1は、各ターゲティング成分は、細胞の外部又は内部から又はインビトロで、ターゲティング成分を選択部位へ誘導するための（1つの）ターゲティング部分を有する必要がある。第2に、各ターゲティング成分は、再構成部分として、機能性成分の一部を有する必要がある。但し、当該一部単独では、所望の機能は自然には（自動的に）発揮されない。第3に、（複数の）ターゲティング成分は、所望の標的において（集合して）機能性成分を構築する能力を有する必要がある。

10

**【0019】**

（複数の）ターゲティング部分は、通常、互いに近接する（複数の）部位にそれぞれ結合する。その（近接部位間の）間隔は、5～50nmであることが好ましい。このような部位は、細胞表面上又は96ウェルプラスチック製マイクロプレートのような人工的表面上に存在し得る。また、ターゲティング成分は、例えば当該ターゲティング成分をコードする核酸ベクターを使用することにより、細胞内的に提供することも可能である。

**【0020】**

そのターゲティング部分（複数）が標的の互いに近接する（複数の）部位にそれぞれ結合するターゲティング成分（複数）は「相補的」と呼ばれる。相補的ターゲティング成分は、再構成部分の性質及び隣接部位の位置及び性質に応じて、2つのターゲティング部分、3つのターゲティング部分、又は4つ若しくは5つ以上のターゲティング部分から構成され得る。

20

**【0021】**

以下に詳述するように、ターゲティング部分としての使用に好適な成分には、抗体、ペプチド、オリゴヌクレオチド、炭水化物、及びその他の生体特異的成分が含まれる。同様に、後述するように、タンパク質、オリゴヌクレオチド及びビタミンを含む広い範囲の化学要素が再構成部分として関与する。「再構成部分」とは、それ自体では所望の機能性を提供しないが、1又は2以上の相補的再構成部分に接近したとき当該機能性を提供する成分の一因（一部）となり得る成分を意味する。構築された「機能性成分」は、それ自体で「エフェクター機能」を提供することができる。例えば、再構成部分（複数）は、集合して構築されたとき酵素活性を提供することができる。或いは、再構成部分（複数）は、集合して構築されたときエフェクターが結合可能な機能性成分を提供することができる。ターゲティング部分とは異なり、個々の再構成部分に対する要求は、それ単独では所望の機能を提供不可能であるということである。寧ろ、2又は3以上の再構成部分は、互いに接近して集合し（1つの）機能性成分を構築することが必要である。例えば、好ましい一実施形態では、抗体の軽鎖及び重鎖の変領域が再構成成分として使用される。この場合の再構成成分は、それぞれ「デミトープ（demitope）」（抗原結合ドメインの半分。これは免疫学の分野では「パラトープ」として知られている）を構成する。デミトープは、単独では選択されたエピトープに適切な親和性で結合できないが、集合したとき、当該選択されたエピトープに結合可能な機能性パラトープを形成するよう選択される。

30

40

**【0022】**

ターゲティング部分及び再構成部分は、これら両者あわせてターゲティング成分を構成するが、好適な任意の態様で結合し得る。共有結合が好ましいが、十分に大きな親和性を有する非共有結合性結合を使用することも可能である。ターゲティング部分及び再構成部分は、別々に調製してから、直接的に又は短いリンカーを介して化学的に結合することも可能である。或いは、複数のターゲティング成分の少なくとも1つは、（1つの）ターゲティング部分と（1つの）再構成部分とから構成される融合タンパク質である。

50

## 【0023】

ターゲティング成分は、機能性成分を集合・構築するのに十分近接している（複数の）異なる位置に位置する少なくとも2つの部位と結合する必要がある。そのような異なって位置する部位は、例えばホモダイマータンパク質に見出されるような同じタイプのものでよく、巨大タンパク質上の非オーバーラップエピトープ等の異なるタイプのものでよい。また、別異部位（複数）は、膜の面において水平方向に又は三次元的に拡散によって近接を達成する複数の別個の分子上に存在してもよい。従って、例えば、必要な近接は、複数の細胞表面レセプターのパッチングによって形成されてもよい。他の例としては、必要な近接は、例えばDNAの同じプロモータ領域への結合又は神経伝達物質シナプス小胞のような同じ細胞下コンパートメントへの詰め込みによる、類似の細胞下ターゲティング特性を共有する2つの独立した分子によって生成されてもよい。

10

## 【0024】

正式な定義によって定義可能な他の用語を以下に示す。本書で使用される科学技術用語は、生化学の分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じの意味を有する。これらは、以下の定義によって増大ないし拡張される。なお、以下の定義は、概念の明確化を意図するに過ぎず、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

## 【0025】

「細胞構造」は、無処置ないし無傷ないし完全な（intact）細胞又は細胞下構造、例えば核、染色体、ミトコンドリア、葉緑体、リボソーム、小胞体、ゴルジ体、リソソーム、プロテオソーム、分泌胞、液胞、ミクロソーム、又はウイルスを意味する。細胞には、天然型及び組換え型の動物細胞、植物細胞、真菌細胞、細菌細胞、孢子細胞が含まれる。細胞構造は、独立の細胞又は細胞下構造として単独で存在することができるが、より高次の構造の一部として存在することも可能である。例えば、細胞下構造は無処置細胞の一部でありえ、無処置細胞は多細胞組織ないし器官の一部であるか、細胞培養物中の同じ又は異なるタイプの他の細胞と共に存在し得る。

20

## 【0026】

「免疫グロブリン」は、標準的な（canonical）免疫グロブリン様ドメインと配列相同性を有するタンパク質、例えば何れも保存的骨格と1又は2以上の可変配列とから構成される重鎖及び軽鎖の複合体を意味する。「抗体」は、免疫グロブリンの主要な類型であり、とりわけIgG、IgM、IgEのような当業者には周知の主要な形態が含まれる。尤も、免疫グロブリンは、MHC分子、ある種の細胞接着分子及びサイトカインレセプターのような非抗体性分子であってもよい。更に、抗体は、好適な任意の形態で存在することができ、本書において使用される場合、用語「抗体」には、好適な任意のフラグメント又は誘導体も含まれる。このような広義の抗体の例には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、Fvフラグメント、二重特異性抗体（diabody）（融合した同一のFvフラグメントの2つのコピー）、単鎖抗体、及び2以上の抗体フラグメントから形成される多重特異性（multi-specific）抗体が含まれる。他の免疫学用語についても、通常の意味より多少広義に使用することもある。例えば、「パラトープ」は、抗原決定基（「エピトープ」）に結合する抗体の部分を意味する。「ハプテン」は、担体タンパク質と結合しない限り、哺乳動物において通常免疫原性ではない小分子エピトープである。本書においては、パラトープ及びエピトープのこの定義は、レセプター及びそのリガンド等の非抗体性成分の類似の認識要素に拡張される。

30

40

## 【0027】

「デミトープ（demitope）」なる用語を創作したが、これは上記広義のパラトープの相補的部分を意味するものである。この場合、デミトープは、意味上、再構成部分と等価であるが、本書においては、当該成分に関する免疫学的起源を強調するために通常使用される。

## 【0028】

ターゲティング部分又は再構成部分を構築するために、他の抗体様タンパク質も使用す

50

ることができる。本発明者等によって既に開示されているように、免疫グロブリン相補性決定領域に類似する超可変領域を、免疫グロブリン基本骨格とは異なるタンパク質に基づく骨格に組み込むことにより抗体の特性を模倣することは可能である。例えば、グルタチオントランスフェラーゼは、「グルボディー (glubodies)」と称されるタンパク質のファミリーのための好適な骨格を提供することが示されている (ナポリターノ (Napolitano) et al., Chem. Biol. (1996) 3(5): 359-67)。従って、本書において使用される「抗体」又は「免疫グロブリン」は、タンパク質の構造・機能の分野の当業者には既に明らかであると思われるが、遺伝子にコードされた伝統的な Ig G 等だけではなく、グルボディー、グルボディーのフラグメント、及び他のタンパク質を基礎とする関連構造物を含む。

#### 【0029】

「遺伝子治療」は、直接的又は機能性遺伝子を含むベクターを介して、機能性遺伝子を細胞へ送達することによって行われる疾患の治療を意味する。

#### 【0030】

「プロドラッグ」は、身体内部において (例えば pH の変化による) 自発的な化学変化により又は身体内に通常存在する酵素により又は身体内に導入ないし操作された酵素により活性となる医薬的に不活性の化合物を意味する。

#### 【0031】

「エキソサイトモジュレータ」は、酵素への、典型的には当該酵素の触媒部位とは空間的に異なる部位における (尤も、必ずしも当該部位に限られるわけではない。) 結合が当該酵素の活性を上昇又は低下する分子を意味する。アロステリックモジュレータは、この一般概念の特別な例であり、自然発生的なエキソサイトモジュレータを意味する。同様に、本発明の目的のためのエキソサイトモジュレータなる用語は、DNA に遺伝子的にコードされていない酵素固有成分であるが、金属イオン、ヘム基、酸化還元又はメチル基ドナーのような酵素反応機構の正規の部分形成する補因子を含むことを意図している。

#### 【0032】

「エピトープタギング」は、目的のタンパク質をコードする遺伝子に突然変異を引き起こし、例えば抗体によって容易に認識されるエピトープを含有させる分子生物学技術を意味する。次いで、この目的のタンパク質は、当該エピトープの生物特異的認識により分析、単離又は生成することができる。当業者に既知のタグの例としては、myc 遺伝子に由来するペプチド、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、赤血球凝集素エピトープ、及び FLA G ペプチドが挙げられる。ハプテンの化学的付着は、同じ目的を果たし、従って本発明の目的のためにも、広義のエピトープタギングに含まれる。

#### 【0033】

##### ターゲティング成分の構成

#### 【0034】

自然界に存在する物質が上述のような性質を全て有し、従ってターゲティング成分として使用し得るということは、可能性は低いが、あり得る。例えば、毒素たるリシンは、2つのタンパク質から構成されるが、当該タンパク質の一方はリボソームの作用を阻害し、他方のタンパク質は細胞表面レクチンに結合して細胞侵入を促進する。この2つのタンパク質は、ジスルフィド結合により結合している。この結合は、ターゲティング部分とエフェクター部分の組合せ (結合) を提供する。このエフェクターは単一の成分として (単独で) 完全に機能するので、本発明の2元的ターゲティングという思想は、この先例とは異なるものである。

#### 【0035】

ターゲティング部分と再構成部分との間の結合は、ジスルフィド結合及びアミド結合を含む直接的化学架橋 (結合) であってもよく、又はピアース・ケミカル・カタログの膨大なリストを含む文献から既知の多数の2機能性リンカーの何れかによって媒介されてもよい。勿論、この結合は、合成された分子、融合タンパク質又はリボザイムに融合 (結合) された RNA アプタマー内の分子に固有のものであってもよい。共有結合が好ましいが、ニッケル含有成分及びヘキサヒスチジンニッケルキレート成分のような、十分に固定的な

10

20

30

40

50

非共有結合性の結合を使用することも可能である。

【0036】

多くの種類の化学物質は、ターゲティング部分又は再構成部分として関与することができる。一実施形態では、抗体はターゲティング部分を提供する。例えば、それらの近位Fab末端を介して細胞表面レセプター上の非オーバーラップエピトープに結合する2つの抗体は、2つの相補的ターゲティング成分のターゲティング部分として使用することができる。再構成部分を提供するために、Fc領域は、設計(操作)される第3の抗体が認識する非連続的エピトープを形成するように構成される。従って、この非連続的エピトープは、エフェクターに結合する付加的成分に結合可能な機能性成分である。例えば酵素のようないかなるエフェクターもこの第3の抗体に結合しうる。

10

【0037】

通常の抗体のほかに、抗体のフラグメント又は先に定義した関連タンパク質も使用することができる。単独で又は組合せてターゲティング部分を創出する他の化学物質も使用することができる。タンパク質結合アッセイの分野の当業者であれば認識できるように、例えば、EGFレセプターに対する抗体は、EGF自身又はそのフラグメントによって置き換えることができる。レクチンは、オリゴ糖を標的することができる。ペプチド性又は非ペプチド性小分子は、抗体又は、エストロゲンレセプター及び天然又は合成ステロイドに含まれるもののような他のタンパク質によって認識され得る。ターゲティング部分の他の例としては、オリゴヌクレオチド、ビタミン、脂質、及び特定のタンパク質に結合する薬物が含まれる。上記物質のあらゆる組合せに関しては、生物特異的認識の分野の当業者には周知であろう。

20

【0038】

近接の部位

【0039】

近接して位置する複数の別異部位は、どのような多重度でも標的を構成する。多くの応用例では、近接する部位(複数)は、既に存在しており、機能性成分及び究極的にはエフェクター機能を形成するための標的を構成する。インピボで使用するために、典型的には、近接する部位(複数)は、細胞表面か細胞内部に既に存在している。従って、一実施形態では、細胞構造、即ち細胞表面又は細胞内部の特定の(特異的)エピトープは、複数のターゲティング成分を近接して固定する別異部位(複数)として使用される。

30

【0040】

また、人工表面は、別異部位(複数)を提示するために使用することができる。例えば、2つのターゲティング成分を捕獲するために、2つのハプテンを結合して、単一のタンパク質又はラテックスミクロスフェアとすることもできる。別異部位(複数)は、抗体によって認識されるペプチド抗原又はハプテン、又はレクチンによって認識される炭水化物、又は相補的塩基対配列によって認識される核酸のように、ターゲティング成分のターゲティング部分による認識に対して適合的である必要がある。ビタミン-、オリゴ糖-、炭水化物-、脂質-、小分子-結合物質及び構造は、当業者には知られており(例えばWO 01/02600参照)、これらは本発明の方法で使用することができる。複数の別異部位は、種類が同一のもので異なるものであってもよい。

40

【0041】

例えば、2つのタンパク質抗原を混合して、ポリスチレン96ウェルマイクロプレート又はニトロセルロース膜に固定化する。異なる2つのサブユニットからなるタンパク質も別異部位(複数)を提供することができる。明らかに、これらの場合では何れも、別異部位(複数)は、複数のターゲティング成分が立体的にオーバーラップするのを回避するために互いに十分に離れている必要があるが、(余りに離れすぎて)結合される再構成部分が機能性成分を構築できなくなってしまうようにしなければならない。この(別異部位間の)間隔は、別異部位及びターゲティング成分の性質に応じて変化するが、一般的には5~50nmの範囲である。

【0042】

50

既に注意した通り、本発明は、ターゲティング成分が2つしか存在しない場合に本来の限定されるのではない。アスパラギン酸トランスカルバモイラーゼのような、個々のモノマーそれぞれの寄与によってその機能を発揮する三量体の酵素も本発明の目的に適合するであろう。プレクストリン相同ドメインを有するタンパク質を含む骨格（足場）タンパク質、又はアクチンのような細胞骨格タンパク質も、構築された機能性成分に寄与する3以上の成分を実現するために使用することができる。

**【0043】**

無処置細胞が標的とされる場合、当該無処置細胞はより高次の構造から独立して存在することが可能であり、また多細胞構造又は環境、例えば多細胞生物の組織又は器官、多細胞生物自体又は細胞培養物中に存在することも可能である。標的可能な細胞としては、動物、植物、真菌、細菌、孢子からの細胞、並びに天然及び組換え培養細胞等があるが、これらに限定されない。

10

**【0044】**

抗体-酵素を用いてプロドラッグを活性化しようとする従来の試みは、癌に対して集中的に行われた。これは、腫瘍部位において薬物濃度を局所的に増加するものであるが、抗癌剤の多くは全身性毒性が強力なので重要である。しかしながら、本発明は癌の治療に限定されるものではない。殆ど全ての薬物は、組織特異性の増大によって有用性を増す。例えば、本発明のターゲティングを、血液脳関門の浸透性に乏しい神経刺激性（向神経活性）薬物に適用すると、全身性曝露は低下するが、血液脳関門の部位へのターゲティング活性化による効率的な質量作用移動（mass action transfer）のための高濃度を達成することができる。

20

**【0045】**

標的されるべき細胞構造は、無処置細胞中に存在する又は独立した成分としての、細胞下構造とすることも可能である。標的可能な細胞下構造としては、核、染色体、ミトコンドリア、葉緑体、リボソーム、小胞体、ゴルジ体、リソソーム、プロテオソーム、分泌胞、ミクロソーム、及びその他の液胞等がある。ウイルスも標的とすることができるが、ウイルスとしては完成体のものでも、ウイルスのライフサイクルの中間段階のうちの何れかの段階のものでもあり得る。細胞内寄生生物も標的とすることができる。以下の例は、細胞内の部位（複数）のターゲティングの説明である。2つのデミトープが集合し、標識に結合するパラトープを形成する。1つのデミトープをヒストンに対する抗体に結合する。ペプチドのライブラリーを相補的な第2のデミトープとコンジュゲートし、ターゲティング成分のライブラリーを生成する。このペプチドライブラリーの（1つの）メンバーによって、（1つの）ターゲティング成分が、定常抗ヒストンターゲティング成分が局在化される核への局在化が誘導されれば、2つのデミトープは機能性パラトープを構成し、当該ライブラリーメンバーが核転移特性を有することを同定するシグナルの生成を可能とする。同様のストラテジーは、ペプチド試薬のレパートリーの創出を可能とする他の細胞下位置、又は所望の局在化を誘導する他の化学物質へ適用することも可能である。このため、細胞輸送における欠陥は緩和される。例えば、主要嚢胞性線維症危険因子遺伝子によってコードされた塩素イオンチャンネルは、イオンチャンネルとしてほぼ正常な性質を有するが、細胞の頂端部へ適切に通行しない。欠陥のあるチャンネルに結合しその適切な局在化を促進する剤は、嚢胞性線維症の有用な治療剤となるであろう。同様に、ターゲティング成分が2つの転写因子を認識するのであれば、染色体への転写因子の近接は、シグナル又は他のエフェクター機能を生成するために使用することができる。

30

40

**【0046】**

好ましい一実施形態では、標的とされるべき複数の別異部位の少なくとも1つは、シグナル伝達タンパク質のような、生物学的経路のマーカーである。他の重要な実施形態としては、リボソームのような、類似の生物学的機能に寄与する部位（複数）、並びに細胞周期のステージ（段階）、細胞のタイプ、組織のタイプ、器官のタイプ、成長期、又は疾患ないし障害を規定する部位（複数）等がある。

**【0047】**

50

とりわけ好ましい実施形態では、エフェクター機能は、無処置細胞の表面に創出される。このため、標的細胞を視覚化するエフェクターはより特異的に局在化される。例えば放射性リガンドの捕獲又はプロドラッグの活性化によって細胞に影響を及ぼすエフェクターも、この手段により標的細胞に対する特異性を獲得する。細胞表面の部位は、1つのタンパク質上の非オーバーラップエピトープ、又は1つのタンパク質の異なるサブユニットの非オーバーラップエピトープであり得る。異なる複数のエピトープが、膜の面内で面方向に拡散することにより結合する(複数の)タンパク質にそれぞれ存在することも可能である。このような部位は、細胞に固有のものであってもよいし、細胞に組み込まれたものであってもよい。

【0048】

再構成部分、機能性成分及びエフェクター機能の例

10

【0049】

多くの実施形態は、相補的ターゲティング成分の必要な再構成部分を提供する。例えば、2つのデミトープは、パラトープを機能性成分として形成するために使用される。2つのデミトープは、抗体の相応の重鎖及び軽鎖の変領域であることが好ましい。この場合、構築されたパラトープは標識と結合して、例えば標的部位の視覚化を可能にするエフェクター機能を創出する。核酸アプタマーの相補的フラグメント(複数)は、同じ態様で有用であろう。一層多くの化学的実施形態は、構築された再構成部分の機能が、抗体又は類似のタンパク質による認識がその機能である新規なエピトープを提示することのみである場合に有用である。オリゴ糖は、この観点から適切であろう。同様に、ある種の脂質、及び広範囲のハプテン(小分子エピトープ)も有用であろう。エフェクター機能の例に関する以下の説明は、再構成部分の非タンパク成分の使用に関する更なる情報を提供する。

20

【0050】

相補的ターゲティング成分の再構成部分は集合することにより、酵素活性のようなエフェクター機能を任意的に直接的に提供する機能性成分、又は放射性リガンドのような本質的に活性なエフェクター機能成分と結合可能な機能性成分を構築する。例えば、構築された機能性成分は、酵素のようなエフェクターに直接的に結合可能であり、また酵素に結合するビオチンのようなエピトープに結合することも可能である。操作(設計)されたエピトープ、例えばmyc又はFLAGを確立したエピトープタギング技術を用いてエフェクター酵素に導入することにより、当該部分に結合する再構築(再構成)されたパラトープの部位において捕獲可能とすることもできる。更に、構築された機能性成分は、(1つの)対(pair)のような結合システムを介して最終(完全)エフェクターに結合してもよい。適切な結合対であれば、任意のものがこの組合せ、例えばビオチンとアビジン、FLAGエピトープとFLAGエピトープに結合する抗体、ニッケル含有成分とヘキサヒスチジンニッケルキレート成分に使用可能である。例えば、構築された再構成部分は、酵素に結合するアビジンに結合するビオチンに結合したリガンドに結合することができる。このような「サンドイッチ」構造は、免疫学分野の文献において十分に確立されている。

30

【0051】

応用例

【0052】

本発明の方法及び該方法に有用なターゲティング成分は、広範囲の応用に適合することができる。1つの応用例では、本発明の方法は、遺伝子治療及びその関連研究に適用される。

40

【0053】

エフェクター機能は、アンチセンス配列、小干渉RNA(SiRNAs)、ペプチド核酸、配列特異的ポリアミド、又は遺伝子治療/規制ペイロードを担うウイルスによって提供される。エフェクター機能は、ウイルス粒子内部において提供される。このウイルス粒子のための機能性レセプター部位は、適切な近接部位の構築によって、又はターゲティング部分の適切な設計によって細胞表面に提供される。ウイルスがヒト細胞に対して非感染性である場合、例えば昆虫ウイルスである場合、ヒト細胞への遺伝子ベクター導入のため

50

のバックグラウンドは小さい。ターゲティング部分は、天然の細胞表面レセプターに対する抗体であってもよく、2元的ターゲティングによって引き起こされる大きな特異性を有する異種栄養性ウイルスのための新規なレセプターの創出を可能とする。口蹄疫ウイルス(hoof and mouth virus)に対する単鎖抗体は、細胞表面タンパク質(ICAM1)に結合すると、当該ウイルスのための新規なレセプターとして機能し、それ以前は該ウイルスに対して感受性でなかったICAM1を提示する細胞に関し大きな感染性を可能としたことが示されている(リーダー(Rieder) et al., PNAS (1996) 93:10428-10433)。本発明によれば、上記ウイルスを認識するパラトープを解体して2つの相補的デミトープを形成するが、これらデミトープは何れもICAM1に結合し、細胞によって発現される。細胞膜内における面方向の拡散によるICAM1分子の集合により、該ウイルスに対するレセプターが形成される。 10

#### 【0054】

また、本発明の方法は、特異的(に)標的を標識するために使用することも可能である。従って、エフェクター機能は、標識(ラベリング)成分である。標識成分は、例えば、化学標識、酵素標識、放射性標識、燐光標識、蛍光標識、蛍光消光標識、ルミネセンス標識及び蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)標識、並びに各種の色素含有ミクロスフェア等である。標識成分は、検出可能なシグナルの生成、既存のシグナルの増強、又は既存のシグナルの消失ないし減弱を行うことができる。好ましい一実施形態では、標識成分は、即時に検出可能なシグナル、例えば蛍光消失、蛍光増強、又はNMRスペクトルの変化を生成する。そのような相互作用の例は文献に記載されている。例えば、克蘭ツ(Kranz) et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 75: 5807-5811では、免疫グロブリン組換え及び活性部位形成をモニターするために、構築された抗体可変領域の、結合した蛍光色素の蛍光を90%以上にまで消光する能力が利用された。従って、蛍光消光は、分離された重鎖及び軽鎖の混合による再構成(活性部位形成)をモニターする実用的方法である。本発明の方法に適用すると、重鎖及び軽鎖はデミトープに相当し、形成された集合組合体は、蛍光色素との結合により、即時的シグナル、即ち蛍光消光を提供する機能性パラトープに相当する。克蘭ツのシステムは、軽鎖を第1のターゲティング部分と結合し、重鎖を第2の相補的ターゲティング部分と結合することにより、本発明の方法に適合される。 20

#### 【0055】

ロートシュタイン(Rothstein) et al., Mol. Immunol. (1983) 20: 161-168では、類似の現象、即ち色素に対する抗体の親和性の尺度としての、種々の抗イディオタイプ抗体によるp-アゾフェニルアルソン酸の蛍光消光が利用された。親和性が大きいほど、形成される再構成パラトープも多くなり、従って蛍光(消光)の程度もより大きくなる。パラトープへの結合による蛍光消光という現象は、有機蛍光分子に限定されない。金属系複合体も、抗体又は集合(構築)レセプターへの結合によるような、有機環境における隔離によって、消光を呈し得る。例えば、ルビジウム複合体の蛍光消光は、当該複合体に対して産生された抗体との結合により生じる(シュレーダー(Shreder) et al., J. Am. Chem. Soc. (1996) 118: 3192-3201)。 30

#### 【0056】

生成された即時的シグナルは、必ずしも蛍光の消光を伴わなくてもよく、フルオロフォア及びパラトープに応じて、傾向増強であってもよい。例えば、パーカー(Parker) et al., Biochemistry (1967) 6: 3417-3427によって示されたように、ダンシル-リジンに対して産生された抗体は、結合することにより、蛍光発光を150倍増強する。環境によって変化される蛍光の他の例としては、金属原子のクラスターである「量子ドット(Quantum Dots)」がある。量子ドットの蛍光特性は、適切な分子環境によって大きく増強され、狭い放出振動数に調節される(米国特許第6,207,392号; ブルチェス(Bruchez) et al., Science (1998) 281: 2013-2016)。同様に、化合物のNMR特性は、その環境、とりわけ水分子と反応するその能力によってしばしば影響を受ける。例えば、金属(ガドリニウム)を水に晒してNMRスペクトルを劇的に変化するガドリニウム含有化合物の酵素的 40 50

開裂に基づくプロテアーゼアッセイが開示されている（モーツ（Moats）et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (1997) 36: 726）。同様に、X線又はCATスキャン技術によるイメージングのために、陽性造影（radio-opaque）化合物を捕獲することも可能である。超音波に対し大きな反射率を示す化合物も捕獲することができる。

【0057】

他の応用例では、本発明の方法は、任意の無処置細胞の細胞周期の阻害、又は当該細胞若しくはその周囲細胞の損傷ないし死滅に使用することができる。例えば再構成部分によって形成される機能性成分と結合する放射性成分、トキシン又はプロドラッグのような、好適なエフェクターであればどのようなものでもそのような細胞成長阻害、細胞損傷又は根絶（死滅）機能のために使用することができる。（腫瘍を治療するために、個々のターゲティング成分のターゲティング部分は、壊死性腫瘍病巣の細胞片（壊死組織片）に存在するヒストンに対する抗体であり得る。）

10

【0058】

他の応用例では、本発明は、例えば細胞表面又は診断用96ウェルマイクロプレートにおいて酵素活性を創出する方法を提供する。特別な一実施形態では、再構成部分は、単独では不活性であるがターゲティング成分の共局在化の結果として集合したとき触媒活性を再構成（復元）する酵素のフラグメント（複数）を含む。そのような酵素活性の直接的形成の例は既に開示されている（米国特許第5,643,734号及び同第6,270,964号）。この従来技術の例では、再構成現象は、再構成部分に結合した成分が互いに相互作用するか否かを確認するために使用されたのであって、ターゲティングを実施するためではない。

20

【0059】

米国特許第5,643,734号及び同第6,270,964号に開示された方法に類似する方法を採用することにより特異的標的において酵素活性を生成するためのフォーマットは更に2つある。第1のフォーマットでは、2つの再構成部分が集合して（1つの）エピトープ認識成分を形成し、以って関連するエピトープを呈する酵素が当該集合構造体に結合し、酵素活性を提供する。このアプローチのバリエーションでは、上述のような結合対が使用される。例えば、認識されたエピトープが結合したピオチンを有する場合、酵素はアビジンに結合して再構成された成分と結合することができる。同様に、集合した再構成部分は、抗体によって認識される不連続エピトープを形成することができ、酵素は当該抗体に結合することができる。これらのバリエーション全てに共通の特徴は、集合した機能性成分が、エフェクター機能として酵素を捕獲することである。

30

【0060】

第2のフォーマットでは、複数の再構成部分の1つが、相補的再構成部分として機能する、無処置酵素のためのエキソサイトモジュレータを含む。従って、再構成により、酵素活性は即時的に誘導又は抑制されるので、エフェクター機能は直接的に形成される。本来的に存在するアロステリック部位は、分子生物学ないしコンビナトリアルケミストリー技術によって発見された（デニス（Dennis）et al., *Nature* (2000) 404: 465-470）非天然部位において可能であると同様に、この方法で使用することができる。このフォーマットの1つのバリエーションでは、複数の再構成部分の1つが、NADHのような酵素に必要な補因子を有し、他のデミトープは、酵素又はその機能性フラグメントを有し、以って再構成により、酵素活性が活性化される。従って、再構成部分（複数）は、補因子FADが分析物と結合される（ドッシュ（Dosch）et al., *Fresenius J. Anal. Chem.* (1998) 361: 174-178）、アポ-酵素再活性化アッセイ（ARIS）に規定されたアプローチを基礎とする。そのような補因子を使用するグルコースオキシダーゼのような酵素は、抗体との結合によって分析物-補因子が隔離される場合、触媒的に不活性である。抗体結合部位に対して競合する分析物が導入されれば、当該補因子は利用可能となり、酵素は活性化される。

40

【0061】

更なるバリエーションでは、複数の再構成部分の1つが、他の再構成部分として作用する酵素の阻害剤を有する。このため、再構成により、酵素活性は阻害される。また、複数

50

の再構成部分の1つは、他の再構成部分として作用する酵素の触媒部位を閉塞ないし占有するフレキシブルフラップ (flap) のための高親和性結合部位を提供することができる。このため、再構成によって、酵素活性が活性化される。このようなフラップはよく知られている。例えば、プロテインキナーゼC偽基質配列がそれであり、これは、そのタンパク質内で形態変化が引き起こされるまで酵素活性部位を閉塞する。また、1つの再構成部分が、活性の偽基質方阻害剤を提供することもできる (チョン (Zhong) et al., J. Biol. Chem. (1999) 274(48): 33913-20)。これらのバリエーション全てに共通の特徴は、無処置酵素の活性が第2の再構成部分によって調節されるということである。生成された酵素活性は、シグナルの生成又はプロドラッグの活性化等の任意の適切な目的に使用することができる。

10

#### 【0062】

本発明は、サンプル中の分析物 (analyte) をアッセイするために使用することも可能である。一実施形態では、少なくとも第1ターゲティング部分が、分析物自体及び表面に固定された当該分析物のアナログの両方を認識する。このような表面は、例えば、マイクロプレート、スライドガラス (glass slide)、試験管、ニトロセルロース膜、ラテックス若しくは他のプラスチックビーズ、コロイド金粒子、有色粒子 (colored particle)、磁性ビーズ、及び量子ドット (quantum dot) 等の表面である。上記アナログは、固定化された形態の分析物自体、又は密接に関連する分子であってもよく、また関連するターゲティング部分に関し交差反応性の任意の物質であり得る。これらは全て、本発明の目的に適合する分析物のアナログであると考えられる。第2のターゲティング成分は、シグナルを生成するために、分析物占有部位に近接した部位に結合することができる。シグナル成分は任意のものを使用することができるが、例えば酵素、放射性成分、マイクロスフェアを含む蛍光ないし燐光成分、及びNMR可検出成分等が該当する。検査されるべきサンプル中の分析物は、第1のターゲティング部分のための分析物占有部位と競合する。このようにして、分析物を含まない対照試料と比べた、サンプルによって引き起こされるシグナルの減少の存在ないし量の評価により、少なくとも上記第1ターゲティング部分によって認識される任意の分析物をアッセイすることができる。

20

#### 【0063】

分析物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、核酸、ビタミン、オリゴ糖、炭水化物、脂質、小分子、及びそれらの複合体ないし組合せがある。この例においては、分析物が治療用の2元的ターゲティングシステムに利用可能であるようなものであれば、2元的ターゲティングの利点は最大化される。即ち、分析の観点では、例えばターゲティング成分のどの対 (ペア) が、大きな特異性を有するエフェクター機能を腫瘍へ送達する可能性が最も大きいかを決定するために、多くの候補治療剤を腫瘍試料に対して検査することができる。腫瘍細胞の十分な試料が利用できる場合、シグナル生成エフェクターを用いて、候補ペアをすべて直接検査することができる。しかしながら、試料の量が限られている場合、又は血中若しくは尿中に漏出した無細胞腫瘍抗原の検出が望まれる場合は、上述の方法に類似する競合的アッセイは、直接的アッセイより適切である。

30

#### 【0064】

##### キット

40

#### 【0065】

本発明は、所望の標的に対する機能性成分及び/又はエフェクター機能を提供するように構成されたキットも提供する。個々のキットは、1又は2以上の容器に収納された、2又は3以上のターゲティング成分を有する。個々のターゲティング成分は、上述のような(1つの)ターゲティング部分と(1つの)再構成部分とを有する。再構成部分は、集合したとき、エフェクター機能を提供するか、又はエフェクター機能に結合可能な機能性成分をもたらす。後者の場合、キットは、エフェクター機能を提供する付加的成分を含む。更に、キットは、使用説明書を含むと好ましい。好ましいキットの一例では、標的細胞タイプの診断イメージング又は治療処置のための、2元的ターゲティングによる細胞表面での酵素活性の生成を可能とする。

50

## 【 0 0 6 6 】

特別な実施例

## 【 0 0 6 7 】

後述の実施例は、本発明の有用性の説明を意図しており、本発明をその記載事項に限定することは意図していない。生化学の分野の当業者には明らかであるとおり、本発明は、広範囲の化学物質において実施可能であるが、このような化学物質は皆、独立した複数のターゲティング成分の重要な特徴を共有している。この独立した複数のターゲティング成分は、単一のターゲティング成分によって送達されるエフェクターと比べて、当該同じエフェクターを選択部位へ運搬するための特異性が改善されている。

## 【 0 0 6 8 】

調製 Aターゲティング成分の構築

## 【 0 0 6 9 】

ターゲティング成分を得るための簡便な方法の1つを説明する。単鎖抗体 ( s c F v ) は、リンカーを介して結合した抗体の重鎖及び軽鎖に由来する可変領域を含む免疫グロブリン様小分子である。これらの構成要素を標準的なファージディスプレイ技術 ( マークス ( Marks ) et al., New England J. Med. (1996) 335: 730-733 ) を用いてスクリーニングする。これによって、複数の候補パラトープが得られるが、これらの中から、ビオチン又はダンシル - リジンのようなエフェクターに結合するものを幾つか選択する。このようにして適切なパラトープを同定したら、重鎖と軽鎖の間のリンカーに由来する可変領域を D N A レベルで開裂してデミトープ ( 複数 ) を得る。更に、結合したターゲティング部分の不存在下で互いに対し本来的に引き付け合う性質を弱めるために、これらデミトープに突然変異を引き起こしてもよい。同様に、 s c F v 抗体様構成要素のファージディスプレイを用いて、ターゲティング成分 ( 複数 ) のターゲティング部分 ( 複数 ) を単離することも可能である。その後、 ( 1 つの ) ターゲティング成分は、 ( 1 つの ) ターゲティング部分と ( 1 つの ) デミトープとを化学的に結合することにより、又は D N A レベルでコード配列を融合することにより生成される。

## 【 実施例 1 】

## 【 0 0 7 0 】

腫瘍細胞のイメージング

## 【 0 0 7 1 】

E G F レセプターを発現する腫瘍細胞は、2つのサブユニットを有するタンパク質を構築した後イメージングされる。これらサブユニットの各々は、抗体 F a b フラグメント (  $C_H - V_H :: C_L - V_L$  で表す ) を形成する定常ドメイン及び可変ドメインに類似する2つのドメインを有する。抗原に結合する  $V_H :: V_L$  部分は、通常、パラトープと称し、分離した  $V_H$  及び  $V_L$  部分は、本書ではデミトープということにする。同時出願中の米国出願、出願番号 1 0 / 0 7 1 , 8 4 4 , 2 0 0 2 年 2 月 8 日 提出には、互いに結合し合う任意のタンパク質 ( X 及び Y ) によって定常ドメイン (  $C_H :: C_L$  ) を置換することが記載されている。これにより、結合した可変領域によって形成されるパラトープ (  $V_H :: V_L$  ) は、X :: Y 相互作用の検出手段を提供する。本実施例では、X 及び Y 部分は、E F G レセプターの非オーバーラップエピトープと結合する、単鎖 F v 抗体のようなタンパク質により構成される。機能性パラトープの集合の結果として生成されるシグナルは、シグナル生成成分と結合した単一のターゲティング成分によって可能であるより、標的細胞の視覚化に対する特異性はより大きい。即ち、X と Y が、それぞれ、その標的抗原に対し、身体中の他の抗原に対して 1 , 0 0 0 : 1 の優先度 ( preference ) を有し、かつそれらの結合が互いに独立的に行われるとすれば、X :: Y の特異性は、 $\sim 1 , 0 0 0 , 0 0 0 : 1$  である。捕獲されるリガンドは、蛍光ハプテンダンシル - リジンであるが、その放出 ( 発光 ) は、結合により、1 5 0 倍刺激され、インビトロでの診断セット ( setting ) での検出が可能となる。また、別の態様では捕獲されるリガンドは、集合したパラトープに結合するまで水に曝露されるガドリニウム原子を有する化合物である。これによって、溶液中で遊

10

20

30

40

50

離している場合と比べた結合している場合のNMRシグナルの変化は、身体内部の腫瘍細胞の核磁気共鳴映像法を可能とする。

【実施例2】

【0072】

薬物送達

【0073】

治療エフェクターを標的腫瘍細胞へ送達するために、類似の構成要素を使用する。とりわけ、集合したパラトープは、ビオチン結合能に対して選択される。この場合、ビオチン結合放射性リガンド又はビオチン結合プロドラッグ活性化酵素は、治療エフェクターを提供する。ターゲティングタンパク質が最大限に局在化された後に、小分子の最終エフェクターを導入することの薬物動態学上の利点について記載した従来技術は存在する。しかしながら、(本発明の)2元的ターゲティングは、そのような利点を維持しつつ、当該技術のタンパク質ターゲティングの観点から特異性をより大きくすることができる。

10

【実施例3】

【0074】

ウイルス侵入の促進

【0075】

ターゲティング成分によって生成されるパラトープは、正常なヒト細胞に対しては非感染性の昆虫ウイルスのためのレセプターを構成する。再構成されたレセプターは、ヒト細胞への遺伝子治療ベクターの導入のためのバックグランドを著しく低くすることができる。新規なウイルスレセプターの細胞への導入可能性は、従来技術によって確立されている。この従来技術によると、口蹄疫ウイルス(hoof and mouth virus)に対する単鎖抗体が単離され、細胞表面タンパク質に結合されると、その単鎖抗体は口蹄疫ウイルスのための新規なレセプターとして機能し、それ以前は口蹄疫ウイルスに対して非感受性であった細胞に対する大きな感染性を可能とした(リーダー(Rieder) et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1996) 93: 10428-33)。

20

【実施例4】

【0076】

核局在化の分析

【0077】

この実施例では、当該核に結合することが知られている1つのターゲティング成分と、検査されるべき核に局在する能力を有するペプチドをターゲティング部分として含有する第2のターゲティング成分とを用いた核の2元的ターゲティングを説明する。この方法は核内のヒストンの存在を利用するが、これは、そのターゲティング部分がヒストンに対する抗体であるターゲティング成分はヒストンに局在化することが知られているのからである。従って、ヒストンに対する抗体は、第1のデミトープに結合する。局在化のために検査されるべきペプチドのライブラリーは、ターゲティング部分としての相補的な第2のデミトープと結合(接触)される。抗ヒストン:デミトープ-1構築物と、その結合したデミトープ-2を有するペプチドライブラリーの1つのメンバーとを発現するように、標準的な方法によって細胞は操作される。構築されたパラトープは、ダンシル-リジンの蛍光を刺激することによりシグナルを生成するように標識される。核に対する局在化を誘導するペプチドはシグナルを生成する。というのは、このシグナルは、上記ペプチドが、結合したデミトープ-2をデミトープ-1に近接させる場合にのみ生成されるからである。

30

40

【0078】

なお、添付の各図は、発明の理解を容易にするためのものであり、従って、図示の態様が発明の全てを表していること又は図示の態様によって発明の範囲を限定することは意図していない。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】本発明の基本的思想の説明。互いに近接する(複数の)部位(a、b)が(複数

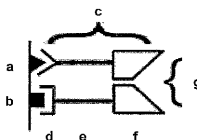
50

の) ターゲティング成分 ( c ) と結合する。 ( 1 つの ) ターゲティング成分 ( c ) は、 ( 1 つの ) ターゲティング部分 ( d )、 ( 1 つの ) 任意的リンカー ( e )、及び ( 1 つの ) 再構成部分 ( f ) を有する。 ( 複数の ) 再構成部分 ( f ) は、 ( 複数の ) ターゲティング成分が近接する ( 複数の ) 部位に結合することにより互いに接近したとき、集合して機能性成分 ( g ) を構築する。

【図 2】 ( a ) ~ ( f ) は、再構成部分 ( 1 及び 2 ) が集合して機能性成分を構築することを可能とする実施例。 ( a ) : 集合した再構成部分は、基質 ( 3 ) に対する酵素活性を有するエフェクター機能を提供する。 ( b ) : 再構成部分 ( 1 ) は、アロステリック活性化因子を供給することにより、基質 ( 3 ) に対する再構成部分 ( 2 ) の酵素活性を調節する。 ( c ) : 構築された機能性成分は、蛍光リガンド ( 3<sup>1</sup> ) に結合し、この結合により、放射が刺激される。 ( d ) : 構築された機能性成分は、酵素 ( 6 ) 上に本来的に存在する、又はエピトープタギングによる、又は任意的リンカーペア ( 4 及び 5 ) を介して酵素に結合するエピトープ ( 3<sup>2</sup> ) に結合する。 ( e ) : 構築された機能性成分は、ウイルス ( 3<sup>3</sup> ) のレセプターとして機能する。 ( f ) : 構築された機能性成分は、酵素 ( 4 ) にコンジュゲートする抗体 ( 3<sup>4</sup> ) によって認識される不連続エピトープを構成する。

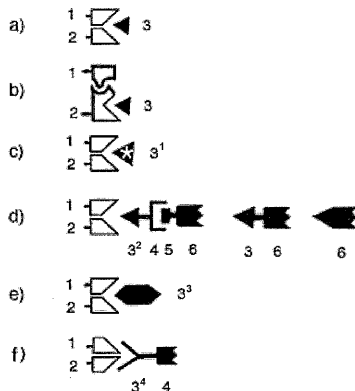
【図 1】

Figure 1



【図 2】

Figure 2



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/13637
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : C12Q 1/68; G01N 33/53, 33/543; C12P 19/34 US CL : 435/6, 7.1, 91.1; 436/518		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 7.1, 91.1; 436/518		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched East/West		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Embase, Biosis, Scisearch, Chem Abstracts, Medline		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	US 6,511,809 B1 (BAEZ et al) 28 January 2003 (28.01.2003), see entire document.	1-16
A	US 6,270,964 B1 (MICHNICK et al.) 07 August 2001 (07.08.2001), see entire document.	1-16
A	US 6,294,353 B1 (PACK et al) 25 September 2001 (25.09.2001), see entire document.	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" documents member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 18 March 2004 (18.03.2004)		Date of mailing of the international search report 05 AUG 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Gary Counts Telephone No. (703) 308-0196

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/30	A 6 1 K 47/14	
A 6 1 K 47/42	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 47/30	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 K 47/42	
	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 43/00	1 2 3
	A 6 1 K 37/48	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IT, LU, MC, NL, 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, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, M, W, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4C076 AA95 CC27 DD46 DD66 EE30 EE41 EE59 EE60 FF31 FF34  
 FF68  
 4C084 AA02 AA03 BA42 DC01 NA10 NA11 NA13 NA15 ZB261  
 4C085 AA13 AA14 AA19 AA21 AA33 BB01 BB11 BB22 BB31 BB41  
 BB43 BB44

专利名称(译)	双重或复数定位及其使用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005538049A</a>	公开(公告)日	2005-12-15
申请号	JP2004501909	申请日	2003-04-30
申请(专利权)人(译)	网格生物科学, 油墨.		
[标]发明人	カウヴァーローレンスエム		
发明人	カウヴァー、ローレンス、エム.		
IPC分类号	A61K47/48 A61K38/43 A61K39/395 A61K47/14 A61K47/26 A61K47/30 A61K47/42 A61P35/00 A61P43/00 C12P19/34 C12Q1/68 G01N G01N33/53 G01N33/542 G01N33/543 G01N33/58		
CPC分类号	B82Y5/00 B82Y10/00 G01N33/542 Y10S435/972		
FI分类号	A61K47/48 A61K39/395.C A61K39/395.L A61K39/395.M A61K39/395.Y A61K47/14 A61K47/26 A61K47/30 A61K47/42 A61P35/00 A61P43/00.123 A61K37/48		
F-TERM分类号	4C076/AA95 4C076/CC27 4C076/DD46 4C076/DD66 4C076/EE30 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/EE60 4C076/FF31 4C076/FF34 4C076/FF68 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA42 4C084/DC01 4C084/NA10 4C084/NA11 4C084/NA13 4C084/NA15 4C084/ZB261 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/AA21 4C085/AA33 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/BB22 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44		
代理人(译)	三宅 俊男		
优先权	60/377067 2002-05-01 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提高目标的特异性。一种向靶标提供功能组分的方法，包括步骤：a) 提供两个或更多个靶向部分，条件是每个靶向部分包含靶向部分和重组部分，每个靶向部分特定地与位于目标附近的两个或更多不同位点中的一个结合，并且当组装以在目标处构建功能组件时重组部分收集，和b) 使所述多个靶向部分与包含所述靶的环境接触，以诱导所述靶在所述靶上的构建，从而将所述功能组分提供给所述靶。

