

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-40780

(P2009-40780A)

(43) 公開日 平成21年2月26日(2009.2.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	4 C 0 8 4
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-195891 (P2008-195891)	(71) 出願人	500285934
(22) 出願日	平成20年7月30日 (2008.7.30)		フラームス・インテルユニフェルジテール
(62) 分割の表示	特願平9-535650の分割		・インスティテュート・フォール・ビオテ
原出願日	平成9年6月27日 (1997.6.27)		ヒノロジー
(31) 優先権主張番号	96201788.5		ベルギー、ペー 9 0 5 2 ズウェイナー
(32) 優先日	平成8年6月27日 (1996.6.27)		デ、レイフィスヘストラート 1 1 8 番、ブ
(33) 優先権主張国	ベルギー (BE)		ス 1
		(74) 代理人	100068526
			弁理士 田村 恭生
		(74) 代理人	100100158
			弁理士 鯨島 睦
		(74) 代理人	100138900
			弁理士 新田 昌宏
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 標的分子の活性部位またはクレフトと特異的に相互作用する認識分子

(57) 【要約】

【課題】 標的分子の活性部位またはクレフトと相互作用する能力を有する認識分子を見出すこと。

【解決手段】 該認識分子は、基本認識ユニットから突出したループ構造をもつ。該ループ構造はたとえば、標的分子の活性部位またはクレフトに対する結合特異性をもつ、ラクダ科の動物の重鎖抗体の C D R 3 またはそのような C D R 3 の誘導バージョンである。基本認識ユニットは、たとえば、標的分子に対する結合親和性をもつ抗体型構造によって形成される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ラクダ科重鎖抗体由来の V_{HH} ドメインまたは従来抗体由来のラクダ化 V_H ドメインを含む認識分子の使用であって、生物学的に活性な標的分子の生物学的機能を中和することにおいて、該認識分子が該標的分子の活性部位の残基を認識し、相互作用する使用。

【請求項 2】

該標的分子がウイルスまたは細菌特異的タンパク質である請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

ラクダ科重鎖抗体由来の V_{HH} ドメインまたは従来抗体由来のラクダ化 V_H ドメインを含む認識分子の使用であって、酵素の活性を阻害することにおいて、該酵素の触媒的活性部位の一部であるアミノ酸残基を認識し、相互作用する使用。

10

【請求項 4】

該酵素が、ウイルスまたは細菌特異的タンパク質、HIV プロテアーゼ、HIV 逆転写酵素、SIV プロテアーゼ、シュドモナス・アエルギノース由来のアルカリプロテアーゼ、プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、血液セリンプロテアーゼ、因子 X_a 、RNアーゼ、アンジオゲニン、シアリダーゼ、アミラーゼ、 β -グルカナーゼ、リゾチームまたは炭酸デヒドラーゼである請求項に記載の使用請求項 3 に記載の使用。

【請求項 5】

ラクダ科重鎖抗体由来の V_{HH} ドメインまたは従来抗体由来のラクダ化 V_H ドメインを含む認識分子の使用であって、毒性物質の有害な影響を阻害することにおいて、該毒性物質の毒性部位残基を認識し、相互作用する使用。

20

【請求項 6】

該毒性物質が、スタフィロコッカス・アウレウス由来の毒素ショック症候群毒 1、スタフィロコッカス・エンテロトキシン B タンパク質、コレラ毒素、破傷風菌毒素などの細菌毒素、ガラガラヘビ由来のアダマリシン II、ナジャ・モサンビカ (*naja mosambica*) 由来のカルディオトキシン CTX II b、台湾コブラ由来のカルディオトキシン CTX V、ブラックマンバ由来のデンドロトキシン、アジアコブラ由来のフラボリジン・ニューロトキシン - I および II、クロタラス・アトロクス (*Crotalus atrox*) 由来のメタロプロテイナーゼ Ht - c および Ht - d などのヘビ毒液、アバミン、テルチアピンなどのミツバチ毒液またはクモ毒素である請求項 5 に記載の使用。

30

【請求項 7】

ラクダ科重鎖抗体由来の V_{HH} ドメインまたは従来抗体由来のラクダ化 V_H ドメインを含む認識分子の使用であって、受容体をアゴナイズまたはアンタゴナイズすることにおいて、該受容体の認識部位を認識し、相互作用する使用。

【請求項 8】

該認識分子がシグナルトランスダクション経路を遮断する請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

ラクダ科重鎖抗体由来の V_{HH} ドメインまたは従来抗体由来のラクダ化 V_H ドメインを含む認識分子の使用であって、生物学的活性標分子をもつ寄生虫タンパク質の認識を妨げることにおいて、該標的分子の活性部位残基を認識し、相互作用する使用。

40

【請求項 10】

ラクダ科重鎖抗体由来の V_{HH} ドメインまたは従来抗体由来のラクダ化 V_H ドメインを含む認識分子の使用であって、酵素機能の不調またはタンパク質認識の不調を由来とする、複合した酵素的または生理的プロセスの機能不全を修復することにおいて、生物学的活性標的分子の活性部位残基を認識し、相互作用する使用。

【請求項 11】

ラクダ科重鎖抗体由来の V_{HH} ドメインまたは従来抗体由来のラクダ化 V_H ドメインを含む認識分子の使用であって、生物学的活性標的分子の単離および/または精製において、該生物学的活性分子の活性部位残基を認識し、相互作用する使用。

【請求項 12】

50

認識分子が、アミノ酸置換、G 4 4 E、L 4 5 R、W 4 7 GおよびV 3 7 Fが導入されるV_Hドメインの天然のアミノ酸配列を含む、従来の抗体由来の修飾ラクダ化V_Hドメインである請求項1～11のいずれか1つに記載の使用。

【請求項13】

請認識分子が、2つ以上の、ラクダ科重鎖抗体由来のV_{H H}ドメインまたは従来の抗体由来のラクダ化V_Hドメインを含む、二価または多価構築物である請求項1～12のいずれか1つに記載の使用。

【請求項14】

認識分子が、プロモーターおよび/または局在化シグナルの後ろの認識分子の遺伝子セグメントを形質転換することにより、第二のアミノ酸配列に融合した、ラクダ科重鎖抗体由来のV_{H H}ドメインまたは従来の抗体由来のラクダ化V_Hドメインである請求項1～13のいずれか1つに記載の使用。

10

【請求項15】

生物学的活性標的分子の活性部位残基を認識し、相互作用する分子のスクリーニング方法であって：

- a) ラクダ科重鎖抗体を準備し；
- b) ランダムなラクダ科重鎖抗体のコーディング配列を単離し、クローニングし；
- c) CDR3領域のコドンの少なくとも1つのランダム突然変異誘発により、該領域において、ランダムなラクダ科重鎖抗体のコーディング配列を修飾し；
- d) ラクダ科重鎖抗体のコーディング配列のライブラリを作成し；
- e) ベクターを宿しているファージにおいてラクダ科重鎖抗体のコーディング配列を発現し；

20

f) 固定された生物学的活性標的分子でファージを選り分け；次いで

g) 固定された標的タンパク質/基質複合体に分子をもたらし、該固定された標的タンパク質/基質複合体に結合しない分子で継続することによって、発現したコーディング配列の間で、生物学的活性標的分子の活性部位残基に結合する分子をコードする配列であるラクダ科重鎖抗体を選択するステップ、を特徴とする方法。

【請求項16】

- a) ラクダ科重鎖抗体を準備し；
- b) ランダムなラクダ科重鎖抗体のコーディング配列を単離し、クローニングし；
- c) CDR3領域のコドンの少なくとも1つのランダム突然変異誘発により、該領域においてランダムなラクダ科重鎖抗体のコーディング配列を修飾し；
- d) ラクダ科重鎖抗体のコーディング配列のライブラリを作成し；
- e) ベクターを宿しているファージにおいてラクダ科重鎖抗体のコーディング配列を発現し；

30

f) 固定された該生物学的活性標的分子でファージを選り分け；次いで

g) ファージを溶出し、固定された標的タンパク質/基質複合体に分子をもたらし、該固定された標的タンパク質/基質複合体に結合しない分子で継続することによって、発現したコーディング配列の間で、生物学的活性標的分子の活性部位残基に結合する分子をコードする配列であるラクダ科重鎖抗体を選択するステップ、を特徴とする請求項15に記載の分子のスクリーニング方法。

40

【請求項17】

ファージを溶出するステップが、過剰の基質および/またはインヒビターで行われる請求項16に記載の方法。

【請求項18】

ステップa)の前に、該生物学的活性標的分子でのラクダの免疫感作を含む請求項15～17のいずれか1つに記載の方法。

【請求項19】

CDR3領域におけるランダムなラクダ科重鎖抗体のコーディング配列が、1つ以上のランダムなコドンによる少なくとも1つのコドンの交換によって修飾される請求項15～

50

17のいずれか1つに記載の方法。

【請求項20】

生物学的活性標的分子の活性部位への分子の特異性および/または親和性を増加させるために、CDR1またはCDR2領域におけるアミノ酸置換を生成するように、ランダムなラクダ科重鎖抗体のコーティング配列を修飾することをさらに含む請求項15～17のいずれか1つに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標的分子の活性部位またはクレフト（裂け目）と相互作用する能力を有する認識分子に関する。さらに本発明は、それらの分子の設計および製造方法、ならびに診断、治療、ワクチンおよび標的分子の単離ならびに精製における該認識分子の用途に関する。認識分子は、酵素インヒビターとして用いるのが好ましい。また本発明は、本発明の認識分子を含む治療用組成物、診断用キット、ワクチンおよび精製材料に関する。

10

【背景技術】

【0002】

理論的には、ウイルス、細菌、寄生虫またはその他のいずれに由来する疾患であっても、多くの場合、病原タンパク質の酵素活性を妨害すること、または寄生タンパク質が標的分子を認識するのを妨害することによって疾患の発生を回避することができる。さらに、阻害分子を活性（毒性）部位に結合させることによって毒性物質の有害な影響を無効にすることができる。また、酵素機能の不調またはタンパク質認識の不調を由来とする、複合した酵素的または生理的プロセスの機能不全は、該複合タンパク質の活性部位またはグループ（みぞ）と相互作用する分子を与えることによって治療されることも多い。

20

【0003】

上記これらの例のすべてにおいて、これらの悪性分子の活性部位（酵素における触媒部位、マルチ成分システムといったような複合システムにおけるタンパク質内のグループ、または受容体内の認識部位など）を認識する特異的タンパク質を有することが有利である。

【0004】

明らかに、現在、このような分子を得るための手近な最もよいテクニックは、（モノクローナル）抗体を産生するためのハイブリドーマテクノロジーである。しかし、抗体を開発するには幾種類かの制限が存在する。たとえば、これまでに構造がわかっている抗体は、グループまたはキャビティ（くぼみ）のいずれかを形成する抗原結合表面があるいはフラットな抗原結合表面を有することが知られている〔Websterら、Current Opinion in Structural Biology, 4, 23, 1994〕。したがって、抗体の抗原結合部位は、グループまたはキャビティを貫通することができない。標的タンパク質の触媒性または機能的残基あるいは毒性部分は、たいていの場合、クレフト内に位置しており、その結果、活性クレフトを形成するアミノ酸との接触および相互作用が多くなり、それらのタンパク質の基質または受容体が、該タンパク質を認識するのが非常に特異的になる。しかし、クレフトおよびキャビティの少なくとも一部は分子内にあるという事実から、これらの構造はさほど免疫原性はない。より広いキャビティ（あるいは通常、タンパク質のクレフトという）でさえも、さほど免疫原性はないという不利点を有している。なぜ少数の抗体しかタンパク質の活性部位と相互作用しないか、ということの理由のひとつが、これである。

30

40

【0005】

おそらくこれら（活性部位の低免疫原性および抗原結合部位自身のフラット表面）が、一価のフラグメント（ F_{AB} 、 F_V 、 ScF_V ）として作用する場合に、なぜ少数の（モノクローナル）抗体しか酵素活性を中和しないのか、ということの2つの主たる理由である。利用できる少数の中和モノクローナル抗体しか、抗原の活性部位と一部オーバーラップするが、より大きな特異性を付与する活性部位の内部には位置しないエピトープ上で結合しない。さらに、抗原（ウイルスコートタンパク質など）の表面における単一点突然変

50

異によって、モノクローナル抗体のエピトープが機能を排除され、この新規変異体の検出には使えなくなる。抗体の最後の不利点は、それらの分子量とサイズが大きいことであり、そのために迅速な生体分散あるいは効率的な組織貫通に制限が加わり、同時に、抗体のFcが血液からの迅速なクリアランスを妨害する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記観点から、本発明の第1の目的は、大きな特異性をもって標的分子のキャビティまたは活性部位に結合する分子を設計し、構築することである。

【0007】

本発明の他の目的は、これらの分子(本明細書を通じて認識分子と称する)を診断、治療、ワクチンおよび標的分子の単離または精製方法において使用することならびに酵素インヒビターとして使用することである。

【0008】

本発明の第3の目的は、特定の目的用に、認識分子を製造および修飾方法を提供することである。

【0009】

本発明の第4の目的は、本発明認識分子を含む、治療用化合物、診断キット、ワクチンおよび物質の精製に関する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の第1の目的は、標的分子の活性部位またはクレフトと相互作用する能力を有する、基本認識ユニットから伸びる、露出ループ構造を特徴とする認識分子によって達成される。

【0011】

このような認識分子においては、該ループ構造が、標的分子またはその修飾バージョンの活性部位またはクレフトに対する結合特異性を有するラクダ科の重鎖抗体の相補性決定領域3(CD3)であるのが好ましい。該ループは、利用可能な基本認識ユニットのいずれにでも組み入れることができる。しかし、基本認識部位は、少なくとも幾らかの、標的分子に対する結合親和性も有する抗体タイプの構造によって形成されるのが好ましい。

【0012】

本発明は、まず最初に以下に述べる原則を明確にした後に創造された。本発明の認識分子は、認識ユニットから突き出た露出ループからなる(図1)。該ループは、標的タンパク質のキャビティ、グループまたはクレフトの内側に貫通するように設計される。良好な親和性をもつために、このループは、その固有の柔軟性が強制的に限定される必要がある。したがって、該フリーループの柔軟性は、標的分子の不在で制限される必要がある。制限されたループそれ自体、すでに十分な親和性を有しているが、標的タンパク質の活性部位またはクレフトの周囲のアミノ酸との接触数を増加するために、結合表面から突き出ているこのループを有することが利点である(必須ではないが)。したがって、理想の認識分子は、この抗原結合表面から突出露出ループの載った抗体の抗原結合部位という特性を示すものである。

【0013】

しかし、通常、抗体はその抗原結合部位から突出ループを形成せず、人工的に創造されたループでは、該ループが構築、抑制を必要とするように新たに設計することは困難であり、またループは標的のキャビティに対して相補的な表面を有するので、本発明者らは、従来の抗体またはFvといったような抗体フラグメントの抗原結合部位は、露出ループの挿入のための良好な開始足場ではないとみなした。

【0014】

さらに、抗体は、効率的に生体分散または組織貫通するには大きすぎ、またFvといったような抗体フラグメントは、かなり不安定であり、低濃度で使用される場合、特に解離

10

20

30

40

50

しやすい。

【 0 0 1 5 】

また、非常に小さいV H抗体フラグメントまたは従来の抗体から誘導された(d A b) と呼ばれる ‘ シングルドメイン抗体 ’ (Wardら、Nature,341,544-546,1989) には、3つの主要な制限、すなわち、親のF vフラグメントと比べて、細菌において発現収量が低いこと(培養物1リットルあたり平均0.2mgのみ)、水溶液において溶解度が低いこと、ならびに親和性および特異性が低いことがある。

【 0 0 1 6 】

標的タンパク質の他のキャビティ、グループまたはクレフトについても同様であるが、本発明分子は、該タンパク質の活性部位に貫通し、触媒性残基と相互作用するのが好ましい。この末端に、本発明分子は、最大に挿入するのに十分に大きく、かつ標的タンパク質のキャビティに対してできるだけ相補的な露出ループを有する。点突然変異は、標的分子自体の適正な機能における有害な影響をもたらすので、標的分子の活性部位残基に対し、認識分子が良好に接着し、かつ多数接触することから点突然変異が獲得されることによって、標的分子がこの相互作用から逃れることが不可能になる。本発明の認識分子はさらに、大きさが小さいことから生体分散性ならびに組織貫通性が良好であること、細菌系において発現濃度が十分に高いので経済的であること、溶解挙動が良好であること、安定性が高く存続時間が長いこと、標的分子への親和性および特異性が高いこと、クローニングならびに加工操作が容易であることを特徴とする。本発明者らは、驚くべきことに、ラクダ科動物(フタコブラクダ、ヒトコブラクダ、ペルーラマ、ラマ、ビクーニャおよびアルパカ) 由来の重鎖抗体から出発した場合に、これらすべての要求を満たせることを発見した。ラクダ科の動物は、重鎖抗体の形状のみの実質量の機能的抗体をもっている(Hamers-Castermanら、Nature,363,446,1993)。該重鎖抗体は、H鎖のホモダイマーからなり、L鎖が欠如している。H鎖のアミノ酸配列から、そのN末端ドメインには、いくつかの異常なアミノ酸置換が含まれており、そのことによって明らかに普通のV Hとは異なることがわかる(Muyldermanら、Prot. Enging.7,1129,1994)。

【 0 0 1 7 】

普通のV Hとラクダ科のV Hを区別するために、後者の重鎖抗体を ‘ V H H ’ (重鎖(H e a v y - c h a i n) 抗体のV H) として識別する。この相異というものは、以下に述べるように、ラクダ科の重鎖抗体が他のいずれのV Hからも明らかに相異しているという事実から完全に弁明されている。

【 0 0 1 8 】

ラクダ科の生殖系列が小遺伝子のV_HおよびV_{H H}セットの両方を含んでいるという事実は、V_{H H}ドメイン(V_{H H} - D - J - 再組み合わせ後に獲得された) が、軽鎖なしの重鎖抗体における処理用に予定されているということを証明する。

【 0 0 1 9 】

V H Hにおけるアミノ酸置換は、他のV Hと比較して、一次構造(配列) のいたるところにばら撒かれているけれども、それらは、通常、V Lドメインと相互作用する、分子の側面における三次構造(前部V Lサイドと呼ぶ) において空間内にクラスターを形成する。これらのアミノ酸置換は、V 3 7 F、G 4 4 E、L 4 5 RまたはL 4 5 CおよびW 4 7であり、多くがG l yにおいて置換されている。明らかに、このような置換は、V H Hの前部V Lサイドの親水性を高め、それによって、ヒトまたはマウスから得られた普通の単離されたV H(d A b (シングルドメイン抗体) ともいう) の溶解度制限を克服する。Wardら、Nature,341,544(1989)に該d A bが記載されている。

【 0 0 2 0 】

また該置換によって、チャペロンB i p (細菌のチャペロンタンパク質) に、この領域が結合しにくくなり、そのために、発現濃度も増加することが期待される。

【 0 0 2 1 】

さらに、ラクダ科の重鎖抗体は、軽鎖の不在下においてインビボで成熟したので、単離されたV H Hが、元の重鎖抗体の抗原に対する親の親和性および特異性を保持することが

10

20

30

40

50

仮定された。

【0022】

結論として、VHHは、単離されたVHあるいはdAbと比較して、少なくとも3つの主な利点、すなわち、細菌またはたの発現系における、より良好な発現収率、水溶液中での、より高い溶解度、およびより大きな親和性および特異性を有している。

【0023】

事実、本発明に至る再調査において、細菌発現ベクター（pHEN4、pHEN1の誘導体（Hoogenboomら、Nucl. Acids Res., 19, 4133(1991)））においてクローニングされたVHHは、およそ10mg/l培養物の収量で発現できることが証明された。このことは、単離されたマウスVHドメインの細菌発現収量が0.2mg/l培養物であることと比較すべきである。dAbのこれらの好ましくない特性は、前部VLサイドの疎水性面が水性溶媒にさらされることに起因するものである。また、VHHは、どのような凝集の徴候も見せることなく、10mg/mlにまで容易に濃縮することができ、この濃度は、マウスのVHの溶解度の約100倍に匹敵する。

【0024】

良好な発現性や溶解性を示すと同時に、VHHは熱変性に対する耐性をも示し、構造的完全性および抗原結合能力を保持したまま37℃で1週間維持することができた。したがって、VHHは安定な分子であるという結論が導かれた。

【0025】

VHHの利点を備えるように、普通のVHをラクダ化することが可能である。いわゆる‘ラクダ化（camelisation）’とは、44、45および47位置における対応するラクダアミノ酸を模倣するための、該位置にアミノ酸の突然変異を誘発することを意味する。‘ラクダ化’は溶解性を改善する（Davies & Reichmann FFEBS Lett., 339, 285-290, 1994）。さらに、V37F置換による37位置の‘ラクダ化’およびCDR1とCDR3の間へのジスルフィド結合の導入によって、単離されたドメインの安定性が著しく改善された。

【0026】

さらなるVHHクローン（ラクダおよびラマ由来）の配列分析により、それらの機能に関するいくつかのさらなる目覚ましい特徴が、特に、系抗原結合ループの不在下で、どのようにそれらが特異的抗原結合能力を保持するのかが、明らかになった。普通のVHでは、それは、配列が超可変であり、抗原に接触することがわかっているCDR1（アミノ酸31から35）である。しかし、第1の超可変ループ（アミノ酸26から30）の前面のN末端は、普通のVHでは溶媒に曝露され、これらのアミノ酸は保存され、抗原に接触することは、これまでに報告されたことはなかった（30位置のアミノ酸を除いて）。

【0027】

ラクダ科抗体のVHHでは、26から35位置におけるこれらのアミノ酸を超可変配列として定義することができる。第一に、このことは、このループのアミノ酸が、他の動物においてこれまでに述べられたものとは、異なるコンホメーションをとりうることを示唆し、第二に、これらのアミノ酸が抗原に接触し得る、すなわち抗原結合プラットフォームの表面が拡張されることを示す。

【0028】

さらに、配列および構造において最も可変なループであるCDR3が平均して普通のVHドメインの長さよりも長いことが発見された（マウスのアミノ酸が9であるのに対して15アミノ酸である）。再び、抗原結合表面の増加が予測される。

【0029】

抗原不在下においてループが長いことは、該ループがいくらかの柔軟性およびをもち、抗原と複合体を形成して固定してしまうような、より異なるコンホメーションをとるようになるという短所をもつ。このループの固定化は、結合において大きな負のエントロピー上の影響をもたらすと考えられる。ラクダ科VHHのCDR1（またはCDR2または枠組み領域2の45位置）およびCDR3においてシステインが同時に頻繁に出現するこ

10

20

30

40

50

と（特により長いループにおいて）は、ジスルフィド結合の形成によるものである。このことは、コンホーメーションの柔軟性を低下させ、それによって抗原の結合が、結合における負のエントロピー上の寄与をより小さくすることになる。

【0030】

VHHおよび「ラクダ化されたVH」の結果から、機能性をもつ小さな認識ユニットを産生するための2つの別々の方策を提案することができる。

【0031】

第一の方策は、骨格として、ファージを「ラクダ化されたVH」をディスプレイするようにし、これを用いてCDR3ループをランダム化して（CDR3から開始；次の段階において、結局は、CDR1およびCDR2ループはランダム化／突然変異化される）、親和性および特異性を調整することを特徴とする。

10

【0032】

第二の方策は、ラクダ（またはラマ）を所望の抗原で免疫感作し、動物の免疫系がそれ自身の重鎖抗体をインビボで成長させるようにすることを特徴とする。続いて、白血球（血液、脾臓、骨髄）由来のVHHをpHEN4などのファージディスプレイベクター内でクローニングし、抗原で選り分けることによって選択する。このテクニックを用いることにより、リゾチームの異なるエピトープに結合する2つのVHH分子と破傷風菌毒素に結合する（一方はCフラグメントに、他方はCフラグメントの範囲外に）2つのVHH分子の同定が成功する。これらのVHH分子を、cAb-Lys2、cAb-Lys3およびcAb-TT1、cAb-TT2と命名した。それらのアミノ酸およびヌクレオチド配列をカバット（Kabat）番号をつけて図2に示した（cAbとは、camel single domain antibody fragmentの意味である）。

20

【0033】

cAbは、抗原に特異的であり、それぞれ、 $2 \cdot 10^8$ 、 $2 \cdot 10^7$ 、 $6 \cdot 10^7$ および $2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ という親和性で該抗原に結合する。これらのcAbの細菌発現濃度は、常に、mg/L培養物の値域であり、cAbは、よく折りたたまれ、溶解性がよく、熱変性実験においても安定であった。

【0034】

ラクダ長ヒンジの中間体でcAbを二価／多価にすることによって、それらの親和性を増大することが可能である。同様の方策で、cAb-Lys3をcAb-TT2に結合して二重特異性の構築物を製作することができる。cAb-TT1およびcAb-TT2は、葉書風菌毒素をインビボにおいて中和する。同様にcAb-Lys3は、ミクロコッカス・リソデイクチカス（Micrococcus lysodeikticus）のリゾチームの細胞壁加水分解活性を阻害する。

30

【0035】

cAb-Lys3は、セファロースCNBrに固定化したニワトリ卵白リゾチームを用いるアフィニティークロマトグラフィーによって容易に精製することができる。その抗原（ニワトリ卵白リゾチーム）と複合したcAb-Lys3の構造を、X線結晶解析により、分解能2.5オングストロームまで決定した。露出したループ構造（「TUT」モチーフともいう）をもつ小さい認識ユニットとしてのVHHの開発または設計に関するcAb-Lys3の構造の主な情報は、以下の通りである。

40

【0036】

VHHのコアの主鎖コンホーメーションは、VHに類似しており、そのため、VHHを、CDRを他の有用な普通のVH分子からCDRを移植するのに使用することができる。

【0037】

cAb-Lys3の「前部VL」側は、完全に新しい形になり、ほとんどGlyで置換されるV37F、G44E、L45RおよびW47における置換のみならず、この領域の保存されたW103、Q105およびQ39の再配向により、VHと比べて親水性がより大きくなる。

【0038】

50

H 1 ループは、前述の普通の V H の基準的構造から完全に逸脱するコンホーメーションをもっており、普通の V H ドメインにおいて該ドメインの内部に埋もれているアミノ酸 29 が、構造の外側に飛び出して、抗原と接触する。アミノ酸 28 もまた、複合体において抗原と接近する。

【0039】

C D R 3 (c A b - L y s 3 において 24 アミノ酸長) は、2つの部分(' 前部 V L サイド' をカバーする C 部分および露出した、アクセス可能な、拡張され、突出ループを形成する N 部分(' T U T ' という)) に分割することができる。このループはジスルフィド結合(C D R 1 へ向かう) および Y 32、Y 99 ならびに Y 100 C のクラスター形成によって形成された内部芳香コアによって安定化される。Y 99 もまた、D 95 側鎖と H - 結合を形成している。

10

【0040】

アミノ酸 72 ~ 75 個のループは、抗原に接近するが、さほど秩序だったものではない。

【0041】

C D R 3 のループの露出した部分は、リゾチームの活性部位の内部に深く貫通し、ループの先端は、A l a および S e r 100 a で形成される。S e r 100 a は、リゾチームの触媒的 G l u 35 と H - 結合を形成する。

【0042】

低エネルギーエピトープ' であると考えられている酵素の領域であるリゾチームの活性クレフトに対する抗体を惹起するのが困難であるために、安定化され、大きな突き出したループ(T U T) が、分子のこの部分' と相互作用することがわかった。酵素の活性部位、あるいは一般的にタンパク質の表面のキャビティは、それらの免疫原性が低いこと、あるいは抗原結合部位が平坦であるかキャビティまたはグループをもつかのいずれかであることから、普通の抗体または抗体フラグメントと反応するのは困難であるが、大きな突出ループは、抗原のキャビティ、クレフトまたはグループを貫通できないために、抗体の抗原結合部位に見られなかった。

20

【0043】

本発明の認識分子は、特にペプチド様構造をしている。広い範囲のタンパク質または分子が、標的分子として機能することができる。タンパク質のリストは、たんにどの種類のタンパク質が選択されうるかを示すだけである。キャビティまたは小さなグループをもつ全ての他のタンパク質が、適しており、該リストに限定されるものではない。

30

【0044】

標的分子の例として、S.aureusによって分泌される毒素の大きなファミリーのメンバーであり、毒素ショック症候群の主要原因である、S.aureusの毒素ショック症候群毒 1 といったような細菌毒素が挙げられる。T S S T - 1 は、スタフィロコッカル・エンテロトキシン B タンパク質、コレラ毒素、破傷風菌毒素と 20 ~ 30 % の配列同一性をもつ。標的分子として選ばれる他の分子は、ガラガラヘビの亜鉛エンドペプチダーゼであり、高度に保存された触媒性ドメインからなる小タンパク質である、アダマリシン I I、カルディオトキシン C T X I I b (ナジャ・モサンピカ (naja mosambica))、カルディオトキシ
ン C T X V (台湾コブラ) といったようなヘビ毒液である。これらのカルディオトキシンは、コブラ科 (Elapidae) 由来の、ヘビの毒液中にある小タンパク質である。該毒素は、結合して、細胞膜の組織、無傷性および機能を破壊することが知られている。その他、デンドロトキシン K (ブラックマンバ)、フラボリジン・ニューロトキシン - I および I I (アジアコブラ)。アダマリシン I I とガラガラヘビ科の (クロタラス・アトロクス (Crotalus atrox)) 由来の I V 型コラーゲンを破壊する低分子量のメタロプロテイナーゼ H t - c および H t - d にも配列類似性がある。

40

【0045】

他の標的分子は、たとえば、受容体である。受容体は、相補的生体分子またはカウンターリガンドに結合することが可能であり、その結果として機能 (シグナルトランスダクシ

50

ョンまたは貯蔵およびそれに続く放出)を生じる生物学的マクロ分子である。本発明の認識分子は、たとえばシグナルトランスダクション機能を遮断するために、受容体に対するアンタゴニストとして用いることができる。また、該認識分子は、アゴニスト活性ももつことができる。

【0046】

標的分子としてさらに、アパミンおよびテルチアピンといったようなミツバチ毒液、クモ毒素、HIVプロテアーゼ、HIV逆転写酵素、SIVプロテアーゼ、シュードモナス・アエルギノーサ由来のアルカリプロテアーゼ、因子 α 様セリンプロテアーゼまたは他の血液セリンプロテアーゼなどの他のプロテアーゼ、RNアーゼおよびアンギオゲニン、シアル酸と複合糖質の間のグリコシル結合の切断を触媒する、多くの疾患の病原体(サルモネラ、インフルエンザウイルス)に含まれると考えられるシアリダーゼ、種々のオリゴサッカライドのグリコシル結合の加水分解を触媒する、アミラーゼおよび β -グルカナーゼといったようなウイルスおよび細菌特異的タンパク質が挙げられる。 α -アミラーゼの活性の変化もしばしばすい臓疾患の指標となる。酵素の活性部位は、AドメインとBドメインの間に存在するクレフトを形成する。触媒性残基Asp300、Asp197およびGlu233は、該クレフトに位置し、相同な残基が数種のアミラーゼ構造に発見されている。

10

【0047】

標的分子の他の例は、リゾチーム、破傷風毒素およびカルボニックアンヒドラーゼである。

20

【0048】

基本認識分子から出発して、基本認識ユニットおよびループ構造バリエーションからなる他の標的に対する認識分子を製作することができる。さらに、可変部の大きなグループから所望の標的に対する適当な候補を選ぶための選択システムを設計することができる。

【0049】

原則的には、このアプローチのための出発点としてすべての認識分子を用いることができる。しかし、さらなる免疫感作を避けるために、本明細書に記載した認識分子のひとつを使用すべきである。次いで、このような分子を加工して所望の特異性を得ることができる。

【0050】

ループおよび基本認識ユニットの修飾バージョンを導く経路は種々存在する。たとえば、CDR3の誘導バージョンは、少なくとも一つの天然アミノ酸が一個またはそれ以上の他のアミノ酸で置換されている突然変異したCDR3である。あるいは、別の態様では、CDR3の誘導バージョンは、1個またはそれ以上の追加のアミノ酸が付加されるかおよび/またはその天然アミノ酸配列内に組み込まれている突然変異したCDR3からなる。

30

【0051】

類似した修飾を行って、基本認識ユニットを製作することができる。基本認識ユニットは、ラクダ科重鎖抗体またはその修飾バージョンの少なくとも一部によって形成されており、その修飾バージョンは、少なくとも一つの天然アミノ酸が、1個またはそれ以上の他のアミノ酸によって置換されているバージョンであるかまたは1個またはそれ以上の追加のアミノ酸が付加されるかおよび/またはその天然アミノ酸配列内に組み込まれているバージョンである。別の態様として、該ラクダ科抗体の修飾バージョンは、第二のアミノ酸配列に融合しているかまたは生物学的に活性な分子に連結しているバージョンである。

40

【0052】

本発明の認識分子を得るために、以下に述べる種々の方策をとり得る。通常、第一の方法は、ラクダ科重鎖抗体を準備し；コーディング配列を単離し、ファージディスプレイベクターにおいてクローニングし；該ベクターを宿しているファージにおいて該コーディング配列を発現し；次いでファージを固定抗原で選り分けることによって抗原に特異的な認識分子を選択すること、を特徴とする。

【0053】

50

第二の方策は、ラクダ（またはラマ）を所望の抗原で免疫感作し、動物の免疫系がそれ自身の重鎖抗体をインビボで成長させるようにすることを特徴とする。続いて、白血球（血液、脾臓、骨髄）由来のVHHをpHEN4などのファージディスプレイベクター内でクローニングし、抗原で選り分けることによって選択する。結合体（所望の抗原を結合する認識分子）を溶離するには、以下の方法のひとつを選択した。

【0054】

結合物の溶離を、pHショックによって行い、一般結合体を得る（活性部位結合体のみではない）。キャビティまたは活性部位結合体を得ることを望む場合は、該結合体の溶離は、基質過剰によって行う。最初の方法で固定標的タンパク質/基質複合体から「一般結合体」を得、次いで非結合体で継続することにより、一般結合体からキャビティ結合体を選択される。

10

【0055】

本発明認識分子を得るためのこの一般法の実行可能性は、この方策を用いてcAbフラグメント、cAb-TT1、cAb-TT2、cAb-Lys2およびcAb-Lys3タンパク質を得ることによって立証された。すべてのリゾチーム結合体のうち最も長いCDR3ループ（24アミノ酸）およびCDR1とCDR3との間にジスルフィド結合を形成しているシステインをもつcAb-Lys3の構造分析から、仮定したとおり、酵素の活性部位に結合する突出ループをもつ小さい認識ユニットが確かに作成されたことが立証された。

【0056】

20

他の「標的」タンパク質を認識する認識分子を得るために第一の方策を繰り返すことは可能であるが、すべてのタンパク質が、この方策を完全に普遍化するほど充分に免疫原性があるものではない。したがって、第二の方策が開発された。

【0057】

この方策は、出発点として、ランダムに選択された認識分子を使用する。この方策の利点は、免疫感作を回避することができ、最終分子の三次構造がすでに本質的に与えられていることである。

【0058】

したがって、このような第二の方法は、ラクダ科重鎖抗体をランダムに選び；コーディング配列を単離し、ファージディスプレイベクターにおいてクローニングし；該コーディング配列を少なくともひとつのコドンにおいてランダムに置換することにより修飾し；ファージディスプレイベクターにおいてランダムに突然変異したコーディング配列のライブラリを作成し；該ベクターを宿しているファージにおいて該コーディング配列を発現し；次いで、ファージを固定抗原で選り分けることによって抗原に特異的な認識分子を選択する、ステップを特徴とする。

30

【0059】

この第二の方策では、ラクダの免疫感作が回避される。たとえば、cAb-Lys3タンパク質を修飾して、標的タンパク質のクレフトに結合するための「TUT」モチーフをもつ「小認識ユニット」を作製する。2つの経路が考えられる：突出ループを新しい形にする第一の経路およびcAb-Lys3の突出ループの「上張り」で終了する第二の経路である。

40

【0060】

ループを新しい形にするために、いくつかの段階が必要である。まず、ループの近くに制限酵素部位を導入する。これらの部位は、次ぎに続くクローニングおよび特徴づけを補助する。次いで、ランダムなコドン（1～X）によってアミノ酸交換する。Xの数が小さいほど、ライブラリが小さく、ループの長さが短くなる。細菌の形質転換効率における実験上の制限があるために、6～7アミノ酸以上のループは、完全なライブラリを作製するのが難しく、また、ループの柔軟になりすぎて、多反応性になり、結合が弱くなる。続いて、特異性または親和性を増大するために、ドメインCDR1、CDR2または72/75位置のループ周囲アミノ酸（図2、cAb-Lys3）のN末端を変えることによ

50

ってループの周囲のプラットフォームを交換する。上記ステップ 2 および 3 を循環的に繰り返して親和性および特性を成熟させる。別法として、多価構築物を作製することにより、同様に、結合活性を増強したり、あるいは二重特異的構築物を得ることができる。

【0061】

c A b - L y s 3 の C D R 3 ループの ' 上張り ' をするために、次のステップを行う。まず、クローニングおよび特徴づけのために、ループの周囲に制限酵素部位を導入する。次いで、c A b - L y s 3 の突出ループの外側に出ているアミノ酸を置換する。最後に、特異性または親和性を増大するために、ドメイン C D R 1、C D R 2 または 7 2 / 7 5 位置のループ周囲アミノ酸の N 末端を変えることによってループの周囲のプラットフォームを交換する。別法として、多価構築物を作製することにより、同様に、結合活性を増強したり、あるいは二重特異的構築物を得ることができる。

10

【0062】

認識分子をコードする D N A 配列を発現させるといったような、標準的遺伝子工学技術によって、本発明の認識分子を製造することもできる。このような方法は、たとえば、認識分子またはその先駆体をコードする D N A 配列を単離し、必要に応じて、1 個またはそれ以上の塩基置換、欠失または挿入を導入することによって該分子またはその先駆体を修飾し；このようにして得られた、必要に応じて修飾された、D N A 配列を適当な宿主に移入し；次いで、宿主内で D N A 配列を発現する、ステップを特徴とする。本明細書で用いる語句 ' 先駆体 ' とは、製造される認識分子の (完全な) 所望の特異性をもたない、すべての配列を含むことを意図している。

20

【0063】

これらのアプローチにより、免疫感作の問題 (免疫感作スキムが長いこと、ラクダ科動物への免疫原の毒性の影響、標的分子の免疫原性が低いこと、免疫感作のために相対的に多量の標的分子が必要であること) が回避されることは明らかである。

【0064】

他の態様では、本発明は、標的分子の生物学的機能を中和することおよび治療における認識分子の使用に関する。したがって、本発明はまた、本発明の認識分子の一種またはそれ以上および適当な賦形剤を含む、治療用組成物に関する。

【0065】

中和とは別の態様において、本発明認識分子は、サンプル中に標的分子が存在するかどうかを検出するのにも用いることができる。このように認識分子を診断に用いることができる。該認識分子は、普通の抗体と同様に用いることができる。したがって、当業者であれば、公知の免疫学的診断テストにおいて考え得るありとあらゆる診断テストを巧みに設計することができるであろうから、さらに解説をせずとも、類似した診断技術が企画される。このように、本発明は、一種またはそれ以上の本発明認識分子を含む診断テストキットを提供する。

30

【0066】

普通の抗体のような認識分子は、(能動的) ワクチンに使用することができる。最後に、本発明は、一種またはそれ以上の本発明認識分子を含むワクチンに関する。

【0067】

さらに、標的分子に対する認識分子の特異性を巧みに使用して、標的分子を単離もしくはさらなる精製法を開発することができる。通例の抗体または他の結合分子の代わりに本発明認識分子を用いて、アフィニティーカラムといったような標準的分離および精製技術を行うことができる。したがって、本発明はさらに、1 種またはそれ以上の本発明認識分子が結合した担体からなる精製材料に関する。担体は、カラム材料であるのが好ましく、アフィニティーカラムがさらに好ましい。

40

【0068】

' T U T ' モチーフをもつ小認識ユニット (本発明認識分子) を構築すれば、たとえば、血液からの過剰分子のクリアランスが迅速であるという利点をもつ従来のモノクローナル抗体に代わって、多くの適用法においてすぐに使用することができる。しかし、他の適

50

用においては、循環する血液中での存続時間を長くすることが好ましい。このことはヒト I g G 1 のヒンジ、C H 2 および C H 3 ドメインの前面で認識ユニットをクローニングすることによって容易に実現しうる。

【0069】

第3の適用では、これらの小認識ユニットを体内へ入れることが必要である。サイズが小さいことと、およびそれらのシングルドメイン構造が、このような使用を可能にしている。

【0070】

遺伝子セグメント末端の S K D E L モチーフのクローニングによって、該分子を細胞内細網の内側に保持することができるが、あるいは核標的シグナル、すなわちクロロプラス

10

【0071】

多くの場合、ループ自身の結合活性は、標的分子の活性クレフトの内側に特異的相互作用するのに充分である。

【0072】

該ループは、好ましくは天然のタンパク質の特性を模するペプチド模擬体を合理的に設計するのに用いることもできる。

【0073】

本発明は、後記の図および実施例を参照することにより、さらに明らかになる。

20

【実施例】

【0074】

リゾチームおよび破傷風菌毒素に対する特異的認識分子に基づいて、次に述べる実施例では、本発明認識分子を得るための一般的方策をさらに詳しく説明する。しかし、本発明はこれらの標的分子に限定されるものではない。

【0075】

実施例 1

c A b - L y s 2 および c A b - L y s 3 の製造

1996年10月31日公開の W O 9 6 3 4 1 0 3 の特許出願に、c A b - L y s 2 および c A b - L y s 3 を得るための操作が開示されている。

30

【0076】

実施例 2

c A b - L y s 3 の C D R 3 ループの N - パートの近くへの制限酵素部位の導入

【0077】

p H E N 4 - α L y s 3 (c A b - L y s 3 タンパク質をコードするラクダ V H H の遺伝子を含むプラスミド p H E N 4) をテンプレートに載せ、V H B A C K (A 4) および S M 0 2 0 で P C R を行う。他の P C R を、同じテンプレート D N A ならびに S M 0 1 9 および A M 0 0 6 で行う。

A M 0 0 6 は、p H E N 4 の遺伝子 p I I I の開始部に結合する。

40

5'-CGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG-3'

S M 0 1 9 は、c A b - L y s 3 のコドン 1 0 0 g から 1 0 0 m に結合する (S a l I サイトを下線で示す) 。

5'-CACGGTCTCTCGACGGGAGG-3'

S M 0 2 0 は、c A b - L y s 3 のコドン 1 0 0 m から 9 8 に結合する (S a l I サイトを下線で示す) 。

5'-CCTCCCGTCGACAGACCGTGGCCACATTCATAATASNNAGCGTAG-3'

V H B A C K (A 4) は、p H E N 4 の P e l B リーダーシグナルおよび c A b - L y s 3 のコドン 1 から 4 に結合する。(S f i I サイトを下線で示す)。

5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGA(G/T)GT(G/C)CAGCT-3'

両方の P C R フラグメントを S a l I で切断、V H B A C K (A 4) および A M 0 0 6 プライマーとの最終 P C R を行った後、S f i I および B s t E I I で切断した p H E N 4 内でクローニングしうる D N A フラグメントが得られる (B s t E I I サイトは、すべての V H H 遺伝子セグメントのフレームワーク 4 に天然に生じる)。得られるプラスミド D N A は、ランダム化された S e r 1 0 0 a をもつ c A b - L y s 3 をコードし、その中で c A b - L y s 3 のコドンは、突然変異している (下記)。

10

Leu100i.Ser100j.Thr100k

CTT TCC ACT

CTG TCG ACT

これらのサイレント突然変異は、S a l I に対する制限酵素部位 (下線) に含まれ、次に行うクローニングまたはクローンの特徴づけに用いることができる。下記のコドンのヌクレオチドもまた置換される。

20

Cys100e.Gly100f.His100g

TGT GGT CAC

TGT GGC CAC,

このサイレント突然変異は、B a l I サイト (下線) に導入され、これは S a l I サイト同様に、クローニングまたはクローン選択に用いることができる。

【 0 0 7 8 】

この方策を用いて、約 1 0 0 0 0 個のクローンを作製し、そのうち約 2 4 個のクローンを抽出して、個々に成長させ、次いで、それぞれについて発現濃度およびニワトリ卵白リゾチームへの結合を試験した。すべてのクローンは、1 0 0 a 位置および S a l I ならびに M l u I サイトに突然変異を含んでいた。わずかに親和性は低下しているが、2 つのクローンのみは、リゾチームに結合していた。これらの突然変異は、それぞれ P r o および H i s によって S e r 1 0 0 a が置換されたものである。すべての他のクローンは、A r g、L e u、L y s といったような異なるアミノ酸を含んでおり、発現はしているが、リゾチームに結合することができないことがわかった。

30

【 0 0 7 9 】

このことから、発現レベルは保持したままであるが、もとの c A b - L y s 3 と比較すると、リゾチームに対する親和性 / 特異性を变化させた状態になるようにループを突然変異させることが可能であるということが立証される。

40

【 0 0 8 0 】

実施例 3

‘ T U T ’ ループの完全ランダム化

c A b - L y s 3 テンプレートをを用いる P C R により、オリゴ体、V H B A C K (A 4) および S N 0 2 1 で、D N A フラグメントを作製し、S f i I / S a l I で切断した後、同じ酵素で切断した p H E N 4 - a L y s 3 に、クローニングすることができる。S M 0 2 1 の配列 (S a l I サイトを下線で示す) は、コドン 1 0 0 m から 1 0 0 e および 9 6 から 9 2 に結合する。

5'-CCTCCCGTCGACAGACCGTGGCCACA(SNN)₆CGAATCTGCCGCAC-3'

これらのプラスミドは、Thr 97からGlu 100dまでが除去され、ランダムコドン(NNS)₆によって置換されている配列をコードするコドンをもっている。pHEN4といったようなファージディスプレイベクターのライブラリーの構築後、本明細書で説明する溶離/選択方策で選り分けることによって適当なバインダーを選択する。

【0081】

サイズの異なるループを作製することも可能である。次いで、ランダムコドン(NNS)_xが、 $x = 1 \sim 10$ あるいはそれ以上の範囲で変化するようなものへと、プライマーSM021の配列を変化させた。 x が小さいと、ループが小さく、 x が大きいと、ループが大きくなる。これらの異なるループをそれぞれもつ異なるライブラリーを用いて、標的タンパク質のクレフトにの最適にフィットするものを見つける。

【0082】

実施例 4

cAb-Lys3の'TUT'ループの上張り

ループのランダム化とはわずかに異なる方法により、cAb-Lys3から突き出たループが、その外側表面のみ変化しているが、内部およびループ構造アミノ酸は保持されているもののライブラリーを作製する。この方策を'上張り'と呼ぶ。該方策は、SM021プライマーをSM022プライマー：

5'-

CCTCCCGTCGACAGACCGTGGCCACASNNATA(SNN)₃GTA(SNN)₃CGAATCTGCCGCA

C-3'

と交換し、テンプレートとしてプライマーVHBACK(A4)とPHEN- α Lys3とを組み合わせるPCRを行うことからなる。このプライマーをコドン100mから92とアニーリングし、コドン97、98、100、100a、100bおよび100dをランダム化し、他はすべて保持する。アミノ酸をコードするランダム化したコドンが、ループの外側を覆うことがわかった。PCRフラグメントをSfiおよびSalIで切断した後、同じ酵素で切断したpHEN4ベクター内にライブラリーを構築した。ファージウィルスに突然変異したcAbを発現させた後、実施例3で説明した溶離/選択方策で選り分けることによって適当なバインダーを選択した。

【0083】

ランダムコドン(SNN)₃を(SNN)_x(x が、 $x = 1 \sim 6$ あるいはそれ以上であって3ではない)と交換した類似のプライマーと、プライマーSM021に変化させ、上記プロトコルにしたがって、元のループと比べて、突出ループの先端が短くなるかまたは長くなったもののライブラリーを作製する。他のランダム化した位置もまた、より長くしたり、より短くしたりして、突出ループの側面に'ノブ(小山)'を作製することができる。これらの異なるライブラリーを用いて標的分子を選り分け、最適バインダーを選択する。

【0084】

実施例 5

突出ループの周囲の基本認識ユニットの修飾

'TUT'モチーフをもつ認識ユニットを一度構築すると、'TUT'ループの周囲の基本認識ユニット(またはプラットフォーム)に(安定な)修飾をすることによって、親和性または特異性を増加することができる。これらの修飾に最も適した3つの部位は、認識ユニットのN末端、ループ周辺アミノ酸72/75およびCDR1またはCDR2領域である。

【0085】

1. VHHのN-末端は、抗原結合ループに近く、この部位は、前述した修飾部位とし

て用いることができるが、挿入されたアミノ酸は閉じ込められない。むしろ両備生成物が得られる。したがって、この部位は、全ドメインの挿入および2重特異性分子の構築に適した部位である。

【0086】

2.72/75ループを新しく形成し、新規な機能的特質を挿入/導入することにより抗原結合表面を増大させ、親和性/特異性を調節する。ラクダおよびラマVHHクローン挿入において見られたように、このループは、突然変異(ランダム化)を導入するのに適した部位である。この部位は、折りたたみおよびその抗原結合活性を維持したまま、3つのアミノ酸で延長することができる。結晶中のこの領域の残りが柔軟なことから、この領域におけるcAb-Lys3の構造も非常によく見える。したがって、この領域が、欠失および挿入を収容するのに適当な場所であることが仮定される。オリゴヌクレオチドと結合したコドン81から82a

10

Leu.Met.Asn

CTC.ATG.AAC

の周囲にBspHI制限酵素部位が存在することから、PCR法および標準的クローニング法によって、この領域に突然変異を起こし得る。

たとえば、pHEN4- α Lys3を用いるPCR反応において、コドン67から82b(BspHI部位を下線で示す)

20

3'-AAGTGGTAGAGGGTT(XXX)TTGTGCCACATAGACGAGTACTTGTCG-5'

で結合するプライマーならびにVHBACK(A4)プライマーは、BspHIおよびSfiIで切断されたpHEN4- α Lys3にクローニングしうるフラグメントを作製する。作製されたライブラリーは、コドン72から75が、(XXX)xで置換されているcAb-Lys3タンパク質をコードする。(XXX)xの大きさに応じて、コドン72から75の間にコドンを導入、欠失または置換することができる。

【0087】

たとえば、この位置へのArgGlyAspの導入によって、タンパク質をインテグリンに変えることができ、またはこの領域においてランダム化もしくはシステインまたはヒスチジンを導入することによって、この位置で金属をキレート形成させ、メタロタンパク質を作製することができる。この位置において酵素のサブドメインまたはドメインを組み入れたい場合、VHHにおけるアミノ酸72から75と等価の方向性と距離をもつ所望するドメインを含むアミノ酸を見出すために、新規なタンパク質の構造を分析することが必要である。もし、構造が未知であるか、この要求を満たすアミノ酸がない場合、次いで、該欠点を補って、キメラタンパク質の折りたたみ、安定性および機能を阻害する、望ましくない埋込物が挿入されたドメイン上に押し付けられないようにするための、短いリンカーペプチドを導入することが望ましい。同様に、CDR1またはCDR2のアミノ酸を変更することにより、親和性および特異性を増加することができる。

30

40

【0088】

実施例6

‘TUT’モチーフをもつ認識ユニットの存続時間の増加

本発明の小シングルドメインタンパク質は、優れた組織貫通性、優れた生体分散性および血液からの急速なクリアランスを示す。しかし、ある種の適用(ウイルスの中和)において、血液中で、より長い存続時間をもつことが利点となる。血液中での存続時間を長くするために、TUTモチーフをもつタンパク質を、ヒトIgG1といったようなIgG1のヒンジ、CH2およびCH3ドメインの上流にクローニングすることができる。これは、標準的クローニング法を用いて行うことができる。ヒトおよびcAb-Lys3または他のラクダおよびラマVHH遺伝子セグメントに生じるBstEII部位は、2つの遺伝

50

子フラグメントを互いにライゲートするのに適した部位である。p H E N 4 発現ベクターは、これらの構築物を細菌を用いて発現させるのに用いることができるが、p C D N A - 3 ベクターは、哺乳動物細胞系における最終発現に用いることができる。これは、このような構築物（C H 1 および軽鎖をもたないもの）は、両方のシステムにおいて発現性がよいことが報告されているので問題はなく、これらのシステムにおいて機能性タンパク質が得られる。

【 0 0 8 9 】

実施例 7

体内

通常、細胞内の小器官に存在し、かつ機能する標的タンパク質および細胞内の小器官で機能する標的タンパク質と相互作用するために、T U T モチーフをもつ小認識ユニットを細胞内小器官（細胞質ゾル、核、小胞体、ミトコンドリアまたは葉緑体）の内部に持ち込むことが必要である。適当なプロモーターおよび/または局在化シグナルの後ろ、あるいは小胞体内へ標的化するために S K D E L コドンで延長された、T U T モチーフをもつ小認識分子の遺伝子セグメントを形質転換することにより、思うとおりに、設計した分子を細胞内小器官で発現するように、また該器官を指向するようにできる。

【 0 0 9 0 】

C M V プロモーターおよび葉緑体リーダーシグナルの後ろに c A b - T T 2 をクローニングした。タバコ（植物）において、この構築物を形質転換したところ、E L I S A 測定により、該構築物が発現し、機能することが示された。トランスジェニック植物の葉 2 グラムを 2 . 5 m l の P B S 、 2 0 % グリセロール、3 0 0 μ l の 1 0 m M P M S F （フェニルスルホニルフルオリド）とともに乳鉢ですりつぶす。P D 1 0 ゲルろ過カラム（ファルマシア）で脱塩した後、抽出物 1 0 0 μ l 、抽出物 1 0 μ l + 水 1 0 μ l および 2 倍希釈物で E L I S A を行う。コントロールとして、非形質転換植物を用いた。マイクロタイターウエルに 1 0 0 μ l の 6 . 5 μ g / m l の破傷風菌毒素を入れる。P B S 中の 1 % カゼインでブロッキングし、ウサギ抗ラクダ I g G およびヤギ抗ウサギアルカリフォスファターゼ複合体（シグマ）を用いて、結合した植物 c A b - T T 2 を検出する；パラニトロフェニルホスフェードが基質であり、4 0 5 n m で 1 5 分後、目盛りを読む。したがって、本発明の T U T モチーフをもつ小認識分子は、体内での使用に有用である。

【 0 0 9 1 】

実施例 8

ペプチド模擬体

一度 T U T ループを見出し、特徴づけすれば、強制構築ペプチドとしてそれを化学的に合成することができる。このペプチドは数多く接触するので、特異的かつ高い親和性にて標的タンパク質のキャピティの内側に結合する。1 1 個のアミノ酸（A s p 9 5 から C y s 1 0 0 e ）が、およそ 5 0 0 Å （オングストローム）² の表面積でリゾチーム活性クレフトと接触する。この量は、オリゴペプチドから特異的結合体を形成するのに充分である。したがって、' C G D S T I Y A S Y Y E G S ' （下線の配列が、c A b - L y s 3 の突出ループ部であり、末端の 2 つの C y s が、ジスルフィド結合を形成することにより、ペプチドのコンホメーションを強制的に作製するのを補助する）といったようなオリゴペプチドの合成を用いて、リゾチームに対する特異的結合をテストする。続いてのステップでは、有機化学によって、類似の結合特性を有する、このペプチドに基づくペプチド類縁体を合成することが可能である。

【 0 0 9 2 】

本方策にしたがって、酵素または受容体分子由来のものといったような、他の分子的クレフトに結合する特徴づけられた T U T を用いて、適当なペプチド模擬体を設計することができる。

【 0 0 9 3 】

実施例 8 A

c A b - T T 2 に対するモノクローナル抗体の作製

10

20

30

40

50

4～6週齢の老いた雌性BALB/c×C57/B/L，F1マウスに、完全フロイントアジュバント中の標識なしのcAb-TT2（5μg）をフットパッド内注射することにより、モノクローナル抗体（mAb）を作製した。8日後、マウスを屠殺し、膝のリンパ腺を切除する。細胞を機械的にばらばらにし、DMEM培地で洗浄する。

【0094】

骨髓腫パートナー細胞（NSO）をDMEMで長期培養する。細胞を一度洗浄し、計数する。リンパ腺細胞およびNSO細胞を5～1の比率で混合し、DMEM中、50%ポリエチレングリコール（PEG4000）と融合させる。細胞を遠心分離によりペレット化し、予熱した培地（DMEM-20%ウシ胎児血清含有ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンおよび抗生物質としてストレプトマイシンならびにペニシリン）中に静かに再懸濁させる。細胞を250mlのDMEMに写し、マイクロプレートに約 5×10^4 個の細胞/ウェルで配置する。培養物を37℃、5%CO₂で10日間インキュベートする。

【0095】

10日後、ハイブリッドクローンの出現を記録した。合計227個のコロニーが観察され、それらの上清をELISAでテストする。精製したcAb-TT2（1μg/ml PBS）をマイクロタイタープレートのウェルに一夜吸着させる。プレートを洗浄し、1%カゼイン-PBSでブロックし、ハイブリドーマ細胞の培養上清を37℃にて1時間インキュベートする。ウェルをPBS-tween 20（0.1%）で再度洗浄し、アルカリフォスファターゼと複合したヤギ抗マウス免疫グロブリン（シグマ）とともにさらに1時間インキュベートする。最後の洗浄後、1mMのMgSO₄を加え、HClでpH9.8に調節した1Mジエタノールアミンに溶解したp-ニトロフェニルホスフェートで酵素を検出した。着色の発展を405nmでモニターする。

【0096】

227個のハイブリッドコロニーのうち、約10%（24個）が、ELISAにおいて陽性反応を示した。これらのうちから、20個をさらなる分析のために選んだ。イソタイプのクラスおよびサブクラスのタイプに関しては、20個のクローンがIgGイソタイプのものであるが、残りの4個はIgMクラスに属することが示された。

【0097】

精製されたラクダIgG1（すなわち、軽鎖をもつ普通のラクダ抗体）、IgG2またはIgG3（すなわち、ラクダ重鎖イソタイプ）、未知の特異性をもつ3個のラクダVHH（cAb-VHH9、cAb-VHH16およびcAb-VHH21）、またはcAb-Lys1、cAb-TT1およびcAb-TT2に対するcAb-TT2特異性をもつ20個の選択されたIgGモノクローナル抗体の反応性を試験することにより、モノクローナル抗体を惹起するオリジナルの抗原であるcAb-TT2に対して強い応答が得られることが示された。2つのモノクローナル抗体（23G8および9A9）は、他のVHHドメインならびにラクダIgG1を弱く認識する。ハイブリドーマ18C11、21A3および3G2モノクローナル抗体は、ラクダIgG1に対し、中間の応答（最大応答の50%）を示し、モノクローナル抗体15A11は、2つの他の関連しないVHH（cAb-Lys1およびcAb-VHH21）を低レベル（最大結合の20%）で認識する。したがって、抗-cAb-TT2モノクローナル抗体のほとんどが、cAb-TT2に対して、イディオタイプの個特異性を示すモノ特異的である。

【0098】

実施例9

TUTモチーフをもつ認識ユニットによる免疫感作

BALB/cマウスにcAb-TT2をフットパッド内注射にて投与し、cAb-TT2に対する結合活性をもつ24個のハイブリドーマを作製した（227個のハイブリッドを試験したうちから）。これらのすべての24個のモノクローナル抗体から、2個のみが、他のラクダVHHに弱く結合することができたが、cAb-TT2に対する結合は、すべての試験クローンにおいて強かった。したがって、作製されたモノクローナル抗体は、抗イディオタイプのモノクローナル抗体のようである。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 9 】

Zanettiらの実験 (Nature, 355, 476 (1992)) から、V H の C D R 3 に存在するアミノ酸が免疫原性であり、マラリア原虫のエピトープをV H のC D R 3 に挿入することによって得られたタンパク質構築物を用いて、マラリアに対してマウスを免疫感作しうることがわかっている。同様に、言及した構築物において、小認識ユニット上の突出ループが、インビボ免疫感作のために他のループを挿入するのに良好な部位であることが予測される。

【 0 1 0 0 】

一度、特定の酵素または受容体分子に対するT U T が同定されると、それを用いてモノクローナル抗体を作製しうることが確定した。抗イディオタイプのモノクローナル抗体が、オリジナルの酵素または受容体の触媒部位を模倣するであろうことが予測される。‘ T U T ’ は、触媒活性をもつ抗体を開発するために用いた‘ 基質の遷移状態 ’ に入れ替わる。安定な‘ 基質の遷移状態 ’ の設計および合成は、困難であるかまたは不可能であることが多い。この方策は、これらの合成の困難さを解決する。

10

【 0 1 0 1 】

実施例 1 0

抗原リゾチームと共結晶化した c A b - L y s 3 の構造分析

この実施例は、論文“Nature Structural Biology”, Volume 3, No. 9, 1996年9月号の図1に示すものである。

【 0 1 0 2 】

実施例 1 1

免疫感作プロトコル

4頭のヒトコブラクダを用いて抗原または抗原量を変えて免疫感作を行う。

20

ヒトコブラクダ 1

抗原：ウシR Nアーゼ A 0 . 1 mg

炭酸デヒドラーゼ 0 . 1 mg

b - ラクタマーゼ 1 mg

リゾチーム 1 mg

B型肝炎表面抗原セロタイプ A y 0 . 2 5 mg を、約 0 . 5 m l の生理的食塩水および 2 m l 2 種の植物酵素と混合する。

第 0 日：血清 2 0 m l 採取

30

C F A (等量) で乳化した抗原混合物の注射、皮下

第 7 日：血清 2 0 m l 採取

第 1 4 日：I F A に混合した抗原で補助注射、皮下 = チューブ D A Y 1 4

第 2 1 日：血清 2 0 m l 採取

第 2 8 日：I F A に混合した抗原で補助注射、皮下 = D A Y 2 8

第 3 1 日：血液 2 0 m l 採取 (リンパ球調製用)

第 3 5 日：血清 2 0 m l 採取

第 5 4 日：I F A に混合した抗原で補助注射、皮下 = D A Y 5 4

第 5 7 日：血液 2 0 m l 採取 (リンパ球調製用)

第 6 1 日：血清 2 0 m l 採取

40

ヒトコブラクダ 2

抗原：ウシR Nアーゼ A 0 . 1 mg

炭酸デヒドラーゼ 0 . 1 mg

リゾチーム 1 . 4 mg

a - アミラーゼ 1 mg

を約 0 . 2 5 m l の生理的食塩水と混合する。

第 0 日：血清 2 0 m l 採取

C F A (等量) で乳化した抗原混合物の注射、皮下

第 7 日：血清 2 0 m l 採取

50

I F A に混合した抗原で補助注射、皮下
 第 1 4 日：I F A に混合した抗原で補助注射、皮下
 I F A に混合した抗原で補助注射、皮下
 第 2 1 日：血清 2 0 ml 採取
 I F A に混合した抗原で補助注射、皮下
 第 2 8 日：I F A に混合した抗原で補助注射、皮下
 I F A に混合した抗原で補助注射、皮下
 第 3 1 日：血液 2 0 ml 採取
 第 3 5 日：血清 2 0 ml 採取
 I F A に混合した抗原で補助注射、皮下
 第 3 5 日：血清 2 0 ml 採取
 I F A に混合した抗原で補助注射、皮下
 第 4 2 日：血清 2 0 ml 採取
 I F A に混合した抗原で補助注射、皮下
 第 4 9 日：血清 2 0 ml 採取
 I F A に混合した抗原で補助注射、皮下
 第 5 7 日：血液 2 0 ml 採取
 第 6 1 日：血清 2 0 ml 採取

10

ヒトコブラクダ 3

20

抗原：ウシ R N アーゼ A 0 . 1 mg
 炭酸デヒドラターゼ 0 . 1 mg
 b - ラクタマーゼ 1 mg
 リゾチーム 1 mg
 T A T 0 . 5 mg
 B 型肝炎表面抗原セロタイプ A d 0 . 2 5 mg を約 2 . 7 m l の生理的食塩水と混合する。
 第 0 日：血清 2 0 ml 採取、血液 2 0 ml 採取（リンパ球調製用）
 C F A （等量）と混合した抗原混合物の注射、皮下
 第 7 日：血清 2 0 ml 採取
 第 1 4 日：I F A に混合した抗原で補助注射、皮下
 第 2 1 日：血清 2 0 ml 採取
 第 2 8 日：I F A に混合した抗原で補助注射、皮下
 第 3 1 日：血液 2 0 ml 採取（リンパ球調製用）
 第 3 5 日：血清 2 0 ml 採取
 第 5 4 日：I F A に混合した抗原で補助注射、皮下
 第 5 7 日：血液 2 0 ml 採取（リンパ球調製用）

30

ヒトコブラクダ 4

抗原：T A T
 を混合し、中和抗体を作製するのに使用する。すべての注射は筋肉内注射である。
 第 0 日：血清 2 0 ml 採取
 カクテル 0 . 1 2 mg + P B S 2 m l + I F A 2 m l を注射
 第 2 日：カクテル 0 . 2 4 mg + P B S 2 m l + I F A 2 m l で感作
 第 4 日：カクテル 0 . 3 6 mg + P B S 2 m l + I F A 2 m l で感作
 第 7 日：カクテル 0 . 4 8 mg + 0 . 0 7 M 硫酸ナトリウム 2 m l
 + 0 . 0 7 M C a C l ₂ 2 m l で感作
 第 9 日：血清 2 0 ml 採取
 カクテル 0 . 9 6 mg + 0 . 0 7 M 硫酸ナトリウム 2 m l
 + 0 . 0 7 M C a C l ₂ 2 m l で感作
 第 1 1 日：カクテル 1 . 5 0 mg + 0 . 0 7 M 硫酸ナトリウム 2 . 5 m l

40

50

+ 0.07 M CaCl_2 2.5 ml で感作

第 14 日：カクテル 1.98 mg + 硫酸ナトリウム 3 ml + CaCl_2 3 ml で感作

第 16 日：カクテル 1.32 mg + 硫酸ナトリウム 2 ml + CaCl_2 2 ml で感作

第 18 日：カクテル 1.74 mg + 硫酸ナトリウム 2.5 ml + CaCl_2 2.5 ml で感作

第 21 日：カクテル 2.16 mg + 硫酸ナトリウム 3 ml + CaCl_2 3 ml で感作

第 24 日：カクテル 1.80 mg + 硫酸ナトリウム 3 ml + CFA 3 ml で感作

第 31 日：血液 20 ml および血清 20 ml 採取

第 65 日：カクテル 0.54 mg + 硫酸ナトリウム 2 ml + CaCl_2 2 ml を
補助注射

第 72 日：カクテル 1.08 mg + 硫酸ナトリウム 2 ml + CaCl_2 2 ml を
補助注射

第 75 日：カクテル 1.62 mg + 硫酸ナトリウム 2.5 ml + CaCl_2 2.5 ml
を補助注射

第 79 日：血液 50 ml 採取

第 82 日：血清 50 ml 採取

【0103】

実施例 12

時間と免疫応答との相関関係

実施例 11 の記載にしたがって、ラクダ 2 (D2) に異なる抗原を注射した。血液を採取し、凝血後、血清を除去する。

マキシソルブプレートをそれぞれ下記の酵素で 4 にて一夜コーティングした。

リゾチーム (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS)

ウシ赤血球炭酸デヒドラターゼ (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS)

ブタ膵臓 α -アミラーゼ (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS)

RNアーゼ A

酵素の免疫感作操作をする前に、室温にて、マキシソルブプレートを 0.25% グルタルアルデヒドで 30 分間処理した。水で洗浄し、次いで、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS の RNアーゼ A を加え、さらに 4 で一夜インキュベートした。

1% カゼイン / PBS 溶液で少なくとも 2 時間、室温にてブロックした。

血清を 1% カゼイン / PBS 溶液で希釈した。個々のウエルに 100 μl の希釈血清を加え、室温で 1 時間インキュベートした。

結合した IgG をウサギポリクローナル抗ラクダ IgG 血清 (0.1% カゼイン / PBS 中、1 / 1000) およびヤギ抗ウサギ IgG アルカリフォスファターゼ複合体 (0.1% カゼイン / PBS 中、1 / 1000 希釈) で検出した。各ステップの間にウエルを 200 μl PBS / 0.1% Tw20 で洗浄した。

【0104】

ELISA 緩衝液 (0.5 mM の MgCl_2 を含む、10% ジエタノールアミン緩衝液、pH 9.8) 中の濃度 2 mg / ml の p-ニトロフェニルホスフェートの溶液 100 μl を加え、20 分後、Labsystems Multiscan RC ELISA プレートリーダーで 405 nm における OD を測定した。光学密度のバックグラウンドは補正しなかった。

【0105】

実施例 13

フラクション化した D2 / 54 の IgG の固相結合

1. IgG のフラクション化

第 54 日のラクダ血清 1 ml をタンパク質 G / A でフラクション化した。278 nm にて、 $\epsilon_{1\%} = 13.5$ を仮定して、分光光度計でタンパク質濃度を決定した。

2. マキシソルブプレートのコーティング

マキシソルブプレートをそれぞれ下記の酵素で冷室にて一夜コーティングした。

リゾチーム、シグマ L6876 (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS)

10

20

30

40

50

ウシ赤血球炭酸デヒドラターゼ、シグマ C 3 9 3 4 (4 μ g / ml P B S)
 ブタ膵臓 α - アミラーゼ、A 6 2 5 5 (3 μ g / ml P B S)
 R N アーゼ A

酵素の免疫感作操作をする前に、室温にて、マキシソルブプレートに 0 . 2 5 % グルタルアルデヒドで 3 0 分間処理した。水で洗浄した後、次いで、1 0 μ g / ml P B S の R N アーゼ A を加え、さらに 4 で一夜インキュベートした。

1 % カゼイン / P B S 溶液で少なくとも 2 時間、室温にてブロックした。

3 . 結合した I g G の検出

5 0 0 0 ~ 3 9 n g / m l の異なる固定抗原を用いて、精製した I g G を個々にテストした。0 . 1 % カゼイン / P B S 溶液で希釈した。

個々のウェルに希釈した抗体溶液 1 0 0 μ l を加え、1 時間インキュベートした後、結合した I g G を総ウサギ血清抗ラクダ I g G - ホームメイドおよび抗 - ウサギ - アルカリフォスファターゼ複合体 (シグマ N o . 8 0 2 5) で検出した。これらの試薬を 0 . 1 % カゼイン / P B S 溶液で希釈し、1 : 1 0 0 0 希釈で使用した。各ステップの間にウェルを 2 0 0 μ l の P B S / 0 . 1 % T w 2 0 で 5 回洗浄した。

最後に、E L I S A 緩衝液 (0 . 5 m M の M g C l ₂ を含む、1 0 % ジエタノールアミン緩衝液、p H 9 . 8) 中の濃度 2 m g / m l の p - ニトロフェニルホスフェートの溶液 1 0 0 μ l を加え、1 0 分後、Labsystems Multiscan RC ELISA プレートリーダーで 4 0 5 n m における O D を測定した。

光学密度のバックグラウンドは補正しなかった。

【 0 1 0 6 】

実施例 1 4

ラクダ重鎖 I g G のいくつかのエピトープはキャビティである

長い C D R 3 ループをもつ重鎖 I g G が、天然のタンパク質の表面に存在するキャビティ、キャニオンまたはクレフトに結合するのを好むことを立証するために、いくつかの実験を行った。

【 0 1 0 7 】

酵素の活性部位は、最も大きなクレフトに存在することが多いので、重鎖抗体は、インヒビターの開発に特に適している。

【 0 1 0 8 】

同様の α - アミラーゼおよび炭酸デヒドラターゼに対し、競合的インヒビターの存在または不在下において行った結合実験から、重鎖 I g G の実質的フラクションが活性部位に結合することがわかった。

1 . ウシ膵臓 α - アミラーゼ

1 m M のアカルボース (K i = 1 0 ⁻⁶ M のシュードヘプタサッカライド) の存在または不在下における、フラクション化された I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b および I g G 3 (2 5 0 0 ~ 1 9 . 5 n g / m l) の固相酵素に対する結合。

マキシソルブプレートを 1 . 5 μ g / m l P B S のウシ膵臓 α - アミラーゼで 4 にて一夜コーティングした。プレートを 1 % カゼイン / P B S 溶液でブロックした。結合したラクダ免疫グロブリンを抗ラクダ抗血清 (R 1 7、1 : 1 0 0 0 希釈) およびヤギ抗 - ウサギ - アルカリフォスファターゼ複合体 (シグマ、1 : 1 0 0 0 希釈) で検出した。各ステップの間にウェルを 2 0 0 μ l の P B S / 0 . 1 % T w 2 0 で 5 回洗浄した。

最後に、E L I S A 緩衝液 (0 . 5 m M の M g C l ₂ を含む、1 0 % ジエタノールアミン緩衝液、p H 9 . 8) 中の濃度 2 m g / m l の p - ニトロフェニルホスフェートの溶液 1 0 0 μ l を加え、1 0 分後、Labsystems Multiscan RC ELISA プレートリーダーで 4 0 5 n m における O D を測定した。光学密度のバックグラウンドは補正しなかった。

これらの実験から、アミラーゼ特異的重鎖抗体の実質的部分が、酵素の活性部位に結合するかまたは接近するという結論を導くことができる。より重要なことは、抗原に対する I g G 1 サブクラスの結合は、インヒビターによって影響を受けないという観察結果である。

2. ウシ赤血球炭酸デヒドラターゼ

1 mMのドロゾールアミド (K_i がナノモルレンジの競合的インヒビター) の存在または不在下における、フラクション化された I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b および I g G 3 (2500 ~ 19.5 ng/ml) の固相酵素に対する結合。

マキシソルブプレートに 4 µg/ml PBS の炭酸デヒドラターゼで 4 日にて一夜コーティングした。プレートを 1% カゼイン / PBS 溶液でブロックした。結合したラクダ免疫グロブリンを抗ラクダ抗血清 (R17、1:1000 希釈) およびヤギ抗 - ウサギ - アルカリフォスファターゼ複合体 (シグマ、1:1000 希釈) で検出した。各ステップの間にウエルを 200 µl の PBS / 0.1% Tween 20 で 5 回洗浄した。

最後に、ELISA 緩衝液 (0.5 mM の MgCl₂ を含む、10% ジエタノールアミン緩衝液、pH 9.8) 中の濃度 2 mg/ml の p-ニトロフェニルホスフェートの溶液 100 µl を加え、10 分後、Labsystems Multiscan RC ELISA プレートリーダーで 405 nm における OD を測定した。光学密度のバックグラウンドは補正しなかった。これらの実験から、この酵素に対する活性部位バインダーは、I g G 3 サブクラスのものに存在するという結論を導くことができる。

【0109】

実施例 15

D2 / 61 の I g G 3 の V H H による膵臓アミラーゼの阻害

固相酵素への結合において競合的インヒビターアカルボースが重鎖抗体に競合しえたという観察結果に基づいて、次の実験を行い、これらの抗体の一部が酵素の酵素活性を阻害するということを立証した。酵素活性の低下の原因となる免疫沈降を除外するために、フラクション化された抗体がポリ反応性であり、かつポリクローナルであるように、I g G 3 の V H H フラグメントのフラクションを調製した。

【0110】

0.1 M の重炭酸アンモニウム (pH 8) 中の S. aureus V8 のエンドグリュプロテイナーゼ (ベーリンガー) (1/50、重量 / 重量、酵素 / タンパク質) で 2 時間処理することによって、D2 / 61 の I g G 3 フラクション由来のこれらの V H H を作製した。切断効率を SDS - PAGE によって確認した。PBS に対して透析をした後、タンパク質 G クロマトグラフィーによって、非切断物質および Fc - フラグメントを除去した。カラムのフロースルーには、V H H フラグメントが含まれていた (実施例 16 参照)。

【0111】

Ecoline (登録商標) 25 アミラーゼアッセイ (メルク - CNPG3 法) を用いて、残留酵素活性を測定した。カオトロップが誘発する解離を回避するために、出来合いの基質溶液を PBS で 10 倍に希釈して、KSCN 濃度を 90 mM まで低下させる。

【0112】

ブタ膵臓 α - アミラーゼ (シグマ A - 6255) を 0.1% カゼイン PBS で希釈して、濃度を 1.5 µg/ml にし、次いで、精製した V H H フラグメント 100 µl とともに、この溶液 50 µl をインキュベートする (タンパク質濃度 200 µg/ml)。60 分間ブレインキュベートした後、混合物の一部を 10 倍希釈基質溶液に添加することによって酵素活性を測定した。5 分間の OD 405 の増加から、酵素活性を算出した。酵素活性は、V H H フラグメント不在下で測定した酵素活性と比較して、65% に減少したが、このことは、阻害抗体が存在することを立証するものである。

【0113】

実施例 16

D2 / 61 の I g G 3 の V H H の切断および精製

0.1 M の重炭酸アンモニウム (pH 8) 中の S. aureus V8 のエンドグリュプロテイナーゼ (1/50、重量 / 重量、酵素 / タンパク質) で 2 時間処理することによって、第 61 日に採血したラクダ 2 (D2 / 61) の I g G 3 フラクションの V H H (1.72 mg/ml) を作製した。切断効率を SDS - PAGE によって確認した。PBS に対して透析をした後、タンパク質 G クロマトグラフィーによって、非切断物質および Fc

- フラグメントを除去した。カラムのフロースルーには、VHHフラグメントが含まれていた。VHHトッpfラクシヨn VHHのタンパク質濃度を分光光度計で測定した (E 1 % = 20)。このフラクシヨnを用いて阻害アッセイを行った。

【0114】

0.1 Mの重炭酸アンモニウム (pH 8) 中の *S. aureus* V8のエンドGluプロテナーゼ (1/50、重量/重量、酵素/タンパク質) で2時間処理することによって、D2/61のIgG3フラクシヨnの切断を行った。

1. 分子量マーカー

2. 未切断のIgG3

3. 2時間後、エンドGluプロテナーゼV8で切断

4 - 5 - 6. タンパク質Gセファロースカラムのフロースルー

7 - 8 - 9. グリシン/塩酸 (pH 2.7) によるンパク質Gセファロースの溶離

【0115】

実施例17

末梢血液リンパ球の調製

4頭のヒトコブラクダを用いた。各ヒトコブラクダからそれぞれ約7mlの血液を採取し (EDTA溶液)、4で輸送する。血液を同量の滅菌PBSで希釈し、50mlのチューブ (Wak chemie) の頂部に入れる。チューブを20、1000gで20分間遠心 (2200rpm) する。

【0116】

グリッドより上の液体を50mlのファルコンチューブに移す (血小板を排除するために、上清を除去し、グリッドのすぐ上にバンドを形成しているリンパ球のみを集める方がよい)。

【0117】

4で15分間、2500rpmにて細胞を遠心降下させる。ペレットを0.5mlのPBSに再懸濁させる。10μlのアリコートをして300μlのPBSで希釈した後、細胞を計数する。各フラクシヨnは、1ml当たり、およそ3.10⁷個の細胞を含んでいた。赤血球細胞のみが少数派であった。100mlチューブ5本にそれぞれアリコートをエッペンドルフピペットで加え、2500rpmにて5分間遠心分離した。上清を除去し、ペレットを-80で凍結する。各チューブには、3.10⁶個の細胞が含まれる。

【0118】

実施例18

末梢血液リンパ球由来のVHHライブラリーの構築および選り分け

mRNAの調製

第54日のヒトコブラクダ2 (D2) から採取した凍結したリンパ球 (チューブ2本、各5×10⁶個のリンパ球/チューブ) を用いて、マイクロ-ファストトラックキット (インビトロゲン) にてmRNAを単離した。水20μlにて、オリゴ-T固体支持体からmRNAを溶離した。分光光度計 (1のOD260nmは、35μg/mlである) で測定した、mRNAの合計収量は、1.5μgであった。

cDNAの調製

cDNAサイクルキット (インビトロゲン) を用い、キットの使用説明書にしたがって、1.5μgのmRNAからcDNAを調製した。フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈降によってcDNAを精製した。cDNAを100μlの水に再懸濁した。

VHHのPCR増幅

PCRのテンプレートとして使用する1μlのcDNAサンプルを用い、2つの遺伝子特異的プライマーCH2FOR TA4およびプライマーSM017とSM018の等モル混合物を用い、2.5ユニットのTagポリメラーゼ (ベーリンガー) を加えた合計体積100μlの緩衝液中、VHHを増幅した。94で1分間変性し、55で1分間アニーリングし、次いで72で1分間延長した。このサイクルを35回繰り返した。

10

20

30

40

CH2FORTA4:

5'-CGCCATCAAGGTACCAAGTTGA-3'

SM017:

5'-CCAGCCGGCCATGGCTGATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG-3'

SM018:

5'-CCAGCCGGCCATGGCTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG-3'

10

0.5 μ g の臭化エチジウム / ml TBE 中、1.0% アガロースゲル上でゲル電気泳動を行った後に可視化したところ、360 ~ 420 bp であった。

【0119】

このPCR産物をテンプレートとして用い、重ね合わせたプライマーA4SHORT (SfiI 部位 (下線) を含み、3' 末端の15ヌクレオチドが、SM017およびSM018の15ヌクレオチドとオーバーラップしている) とFRWRK4FOR) (NotI 部位 (下線)) で再増幅した。

20

A4SHORT:

5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGC-3'

FRWRK4FOR:

5'-GGACTAGTGCGGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT-3'

【0120】

20本のチューブの増幅産物を混合し、Geneclean(Bio 101, Inc.)で精製し、50ユニットのNotIおよび50ユニットのSfiI (Gibco-BRL) (総体積200 μ l)を用い、37 にて一夜切断した。切断した物質をGenecleanで再度精製した。

30

【0121】

pHEN4ベクターの作製

pHEN1ファージミドベクター (Hoogenboomら、Nucleic acid Research, 19, 4133-4137, 1992) のマルチクローニング部位の周囲の領域を修飾し、にpelBリーダーシグナル内のSfiIおよびNcoI部位、および (MullinaxらのProc. Natl. Acad. Sci., USA, 87, 8095-8099, 1990) のヘマグルチニンタグに先立つNotI部位を含むようにした(図8)。

HindIII:1 SfiI:87 NcoI:98 PstI:115 BamHI:129
BstEII:135 NotI:149

40

PelBリーダーシグナル: 40 - 105

HA-tag: 157 - 186

genPIII: 199で開始

ファージミド (40 μ g) をSfiIおよびNotIで一夜切断した。クローニングベクターをアガロースゲル電気泳動およびGenecleanで精製した。切断されたpHEN4を水40 μ lでガラスミルク (Geneclean) から溶離した。

【0122】

50

V H H - ベクターのライゲーション

S f i および N o t で切断したベクターおよび精製した V H H S f i - N o t フラグメントをアガロースゲル上に展開し、臭化エチジウム蛍光法により、サンプルの濃度を測定する。これらの測定値に基づき、ベクター $40 \mu\text{l}$ ($20 \mu\text{g}$) および V H H $40 \mu\text{l}$ ($5 \mu\text{g}$) を混合し (予測モル比 1 : 4)、総体積 $100 \mu\text{l}$ 、16、ライゲーション緩衝液 (1 倍) および T 4 D N A リガーゼ (ペーリンガー) 30 ユニットにて一夜ライゲートした。その後、 0.4 M L i C l の存在下、フェノール処理 (phenolization) およびエタノール沈降法によって、D N A を精製した。D N A ペレットを 70 % エタノールで洗浄し、乾燥し、最後に水 $100 \mu\text{l}$ に再度懸濁する。

【0123】

10

電氣的競合細胞

電氣的競合細胞を作成するために、最小培地プレート上で単離した T G 1 大腸菌コロニーのプレ培養を開始した。このプレ培養物を M g S O₄ を加えた 2 x T Y 培地 100 ml に移し、O D が 0.5 に達するまで (600 nm) 18 で成長させる。遠心分離 (3000 rpm 、10 分) によって細胞を集め、水で数回 (少なくとも 5 回) 洗浄した。最終の細胞ペレットを 7 % D M S O (1 ml) に再懸濁し、次に使用するまで、 $50 \mu\text{l}$ のアリコートをして -80 で貯蔵する。 $5 \times 10^8 / \mu\text{g}$ p U C 以上の形質転換効率を得られた。

【0124】

20

形質転換およびライブラリーの構築

氷上に保持した 2 mm 電気穿孔キュベット (EUROGENTEC、ベルギー) 中のライゲートした D N A サンプルのアリコート $1 \mu\text{l}$ に、 $50 \mu\text{l}$ の電氣的競合 T G 1 細胞を加えた。電氣的形質転換 (2.5 kV 、 $25 \mu\text{F}$ 、 200 オーム) 後、細胞を迅速に S O C 培地 (1 ml) に移し、37 で 1 時間インキュベートする。これらのチューブ 70 本を混合し、 $100 \mu\text{g}$ のアンピシリン / ml を含む、総量 50 のラージ ($24.3 \times 24.3 \text{ cm}$) L B 寒天平板に載せ、形質転換した細胞を選択し、37 で一夜インキュベートした。少なくとも 5×10^6 個の形質変換物が得られ、2 x T Y 培地でこれらを平板からこすり落とし、2 x T Y とともに遠心分離することにより洗浄し、最後に、 100 ml の 2 x T Y、 $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ のアンピシリン、1 % グルコースおよび 50 % グリセロールに再懸濁した。次に使用するまで、細菌懸濁物は、 -80 で凍結した。

30

【0125】

M 1 3 K 0 7 ヘルパー相の作製

M 1 3 K 0 7 を含む大腸菌細胞のプレ培養物を、 $70 \mu\text{g} / \text{ml}$ のカナマイシンを加えた 2 x T Y 培地 1 リットルに植え、激しく震とうしながら 37 にて一夜インキュベートする。遠心分離 (15 分、 8000 rpm) を 2 回行って最近を除去する。上清中に残っている細菌細胞を 55 に加熱して 30 分間インキュベートすることにより不活性化する。 $0.2 \mu\text{m}$ フィルターで上清をろ過する。P E G 沈殿法により、ファージを濃縮することができる。濃縮終了時に、1 / 5 容の 2.5 M N a C l、20 % P E G 8000 (200 ml) を上清 1 リットルに加え、混合物を少なくとも 1 時間氷上に保持する。

サンプルを 5000 rpm で 40 分間、あるいは 13000 rpm で 15 ~ 20 分間遠心分離する。M 1 3 K 0 7 ペレットを滅菌 P B S (10 ml) に再懸濁する。ファージの濃度を、分光光度計で測定する (260 nm における O D 1 が 4×10^{10} 個のファージ / ml に対応する) こともできるが、あるいは 10 mM の M g C l₂ 中の連続希釈物を指数成長している T G 1 細胞に添加し、該細胞をカナマイシン $70 \mu\text{g} / \text{ml}$ を含む L B 平板に植えることによって力価を決定することもできる。(M 1 3 K 0 7 は、カナマイシン耐性遺伝子をもっている)。ファージの力価は少なくとも 10^{12} ファージ / ml にまでもってゆく。

40

【0126】

ファージの救出および選り分け

1. ファージの救出

50

【 0 1 2 7 】

形質転換された細胞または p H E N 4 組換え体を含む細胞を 2 x T Y、アンピシリン (1 0 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、1 % グルコースにおいて成長させる。細胞を一回ペレット化し、培養物を O D 0 . 6 (6 0 0 n M) にする。細胞ペレットを 2 x T Y 培地で洗浄し、アンピシリン (1 0 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を追加した同じ培地に懸濁させる。感染多重度を 1 0 ~ 2 0 にて細胞を M 1 3 K 0 7 に感染させる。室温にて 2 0 分間インキュベートした後、細胞懸濁液に 7 0 μg カナマイシン / ml を加え、3 7 °C で一夜激しく震とうしながらインキュベートする。

【 0 1 2 8 】

まず、遠心分離ステップ (5 0 0 0 rpm、1 5 分間) によって細菌細胞を除去し、0 . 4 または 0 . 2 μm フィルターでろ過することによってウイルス粒子およびビリオンを精製する。1 / 4 容の P E G 溶液 (2 0 % P E G、2 . 5 M N a C l) を添加し、少なくとも 1 時間氷上でインキュベートすることによってファージを沈殿させる。1 5 0 0 0 rpm で 3 0 分間遠心分離することにより、ファージをペレット化する。約 1 m l の P B S 中にファージを再懸濁し、0 . 2 5 m l の P R G 溶液を加えて、さらにインキュベートする場合もあった。氷上で 3 0 分間インキュベートした後、エッペンドルフ遠心分離管を用い、1 3 0 0 0 rpm で 1 0 分間遠心分離することによってファージをペレット化することができる。ファージを P B S (1 0 0 μl) に再懸濁する。U V 吸収 (2 6 0 n m) によってファージの濃度を測定する。O D 1 は 2.2×10^{10} ファージ / ml のファージ濃度または 4.4×10^{10} ファージミドビリオン / ml の濃度に相当する。1 % カゼイン含有 P B S でファージ / ファージミドの濃度を 10^{12} / ml に到達させ、選り分けに用いる。

【 0 1 2 9 】

2 . 選り分け

二種類の方法で選り分けを行った。ひとつの方法では、ナンク (Nunc) 免疫管 (Nunc m axisop、スターチューブ) を用いて抗原を 4 °C にて一夜コートした [アミラーゼ 1 m l (1 0 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ P B S)、リゾチーム 1 m l (2 0 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ P B S) または R N アーゼ A 1 m l (1 0 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ T B S / C a C l ₂、0 . 2 5 % グルタルアルデヒド)]。救出されたビリオンとともにインキュベーションする前に、滅菌 P B S でチューブを 1 0 回洗浄した。1 時間インキュベーションした後、滅菌 P B S、T w e e n で少なくとも 1 0 回洗浄することにより、未結合のビリオンおよびファージを除去する。トリエチルアミン 1 m l (0 . 1 M) を添加することにより、結合したビリオンおよびファージを溶離し、室温で 5 分間インキュベートし、0 . 5 m l の 1 M トリス、p H 7 . 4 で中和する。指数的に成長する T G 1 細胞 2 m l を加え、2 0 分間インキュベートした後、細胞を L B / アンピシリンプレートに載せる。翌日、コロニーをプレートから擦り取り、次の M 1 3 K 0 7 で救出した後の選り分けラウンドに用いる。

第二の方法では、抗原を固定するためにマイクロタイタープレートの 4 個のウェルを用いた (1 0 0 μl 容 / ウェルを使用する以外は、上述したとおり)。ウェルを洗浄し、ファージ / ファージミドとともにインキュベートし、上述したとおり、T G 1 感染を行う。ブロッキング剤 (1 % カゼイン / P B S) のみでコートしたウェルにウイルス粒子を添加することにより、バックグラウンドを測定する。4 種の異なる抗原から得られる結果は次のとおりである：

第 1 ラウンド	インプット	溶出	バックグラウンド
アミラーゼ	4×10^{10}	0.06×10^6	0.025×10^6
炭酸デヒドラーゼ	4×10^{10}	0.06×10^6	0.025×10^6
リゾチーム	4×10^{10}	0.1×10^6	0.025×10^6
R N アーゼ A	4×10^{10}	0.06×10^6	0.025×10^6
第 2 ラウンド	インプット	溶出	バックグラウンド
アミラーゼ	4×10^{11}	1.3×10^6	0.27×10^6

炭酸デヒドラーゼ	4×10^{11}	1.3×10^6	0.056×10^6
リゾチーム	4×10^{11}	0.26×10^6	0.2×10^6
RNアーゼA	4×10^{11}	1.3×10^6	0.048×10^6

第3ラウンド	インプット	溶出	バックグラウンド
アミラーゼ	4×10^{10}	0.06×10^6	0.08×10^6
炭酸デヒドラーゼ	1×10^8	0.06×10^6	0.008×10^6
リゾチーム	1×10^{10}	0.1×10^6	0.016×10^6
RNアーゼA	1×10^{10}	0.06×10^6	0.004×10^6

個々のバインダーの選択

【0130】

選り分けの最後のラウンドを行った後、プレートからランダムに24個のクローンを選び、アンピシリン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む $2 \times \text{TY}$ 中で細胞を成長させることによって、抗原バインダーを選択する。2つのプロトコルを用いて抗原結合VHHの存在を検出した。細胞が指数成長期に到達したときに 1 mM のIPTGでVHHの発現を誘発するか、またはM13K07ヘルパーファージに細胞を感染させるかのいずれかを行った。前者の方策では、培養物の上清を抗-HAタグ(クローンBBBBBAbCo)でELISAに付すことによりcAbの抗原結合能力をチェックすることができた。第二の方策では、抗-M13検出キット(ファルマシア)を用いるELISAによって、先端に抗原バインダーをもつビリオンのスクリーニングを行った。

【0131】

ELISA実験またはファージELISAでは、炭酸デヒドラーゼによる選り分けを行った24個のクローンのうち23個が炭酸デヒドラーゼに結合していた。これらのクローンにCA01からCA24までの番号をつけた。RNアーゼA選り分けについては、24個のクローンすべてが陽性という評点であり、これらにRN01からRN24の番号をつけた。RN01からRN12までのクローン由来のプラスミドDNAを調製し、挿入物の配列決定を行った。RN02およびRN06は、同一であり、RN06を選んだ。他のクローンのすべては、第二セットのために選ばれたRN05クローンと同一である

【0132】

炭酸デヒドラーゼの12個のクローン(CA01~CA12)の配列決定を行った。配列は、CA01=CA06=CA07=CA09=CA12であり、CA04およびCA10のクローンはユニークであり、CA02、CA03、CA05、CA08およびCA08は、CA05のCDR3にサイレント突然変異が存在し、第1アミノ酸(PCRプライマーによって押し込まれている)が異なる以外は同一である少なくとも4つの異なるセットのクローンが生じたので、CA04、CA05、CA06、CA10を選ぶ。

【0133】

CA04およびCA05の核酸配列を実施例19で得る。CA04およびCA05の両方のクローンが、確かに重鎖抗体に由来し、普通の抗体(軽鎖をもつ)に由来しないVHHであることがわかりうる。キーマーカーSer11(コドン31~33nc)、Phe37(コドン109~111nc)、Glu44-Arg45(コドン130~135nc)およびGly47(コドン139~141nc)が存在することから、この説が提出される。余分のシステイン(CA04においてコドン97~99ncおよびコドン313~321nc、またはCA05においてコドン319~321nc)の存在によって示されるように、両者ともに、CDR1とCDR3の間にジスルフィド結合が存在する可能性があることもまた、ラクダVHHにはしばしば観察されることである。18アミノ酸からなるCA04の長いCDR3(コドン295~348nc)および19アミノ酸からなるCA05の長いCDR3(コドン289~345nc)は、両方のcAbがcAb-Lys3のループに類似した、長い第3の超可変ループをもつことを示している。

【0134】

CA04は炭酸デヒドラーゼの活性部位に結合するが、CA05は結合しないことが

10

20

30

40

50

実施例 18 において示される。炭酸デヒドラターゼの結晶構造がわかっており、この酵素の活性部位が、酵素の第二の最も大きなグループのみであるということから、このことは、C A 0 5 の長いループが抗原のグループに結合することができないということを意味しない。最も大きなグループは、活性部位とは反対の端に位置し、C A 0 5 の長い C D R 3 ループは、このグループに結合すると考えられる。

【 0 1 3 5 】

3 種の方法で選り分けを行った。第 1 の方法では、ナック免疫管を用いて抗原（アミラーゼ、炭酸デヒドラターゼ、リゾチームおよび R N アーゼ A ）をコートする。救出されたビリオンとともにインキュベーションする前に、滅菌 P B S でチューブを 10 回洗浄した。1 時間インキュベーションした後、滅菌 P B S , T w e e n で少なくとも 10 回洗浄することにより、未結合のビリオンおよびファージを除去する。トリエチルアミン 1 ml (0 . 1 M) を添加することにより、結合したビリオンおよびファージを溶離し、室温で 5 分間インキュベートし、0 . 5 ml の 1 M トリス , p H 7 . 4 で中和する。指数的に成長する T G 1 細胞 2 ml を加え、20 分間インキュベートした後、細胞を L B / アンプシリンプレートに載せる。翌日、コロニーをプレートから擦り取り、次の M 1 3 K 0 7 で救出した後の選り分けラウンドに用いる。

10

【 0 1 3 6 】

第二の方法では、抗原を固定するためにマイクロタイタープレートの 4 個のウエルを用いた。溶離は、トリエチルアミン 100 μ l で行う。

20

【 0 1 3 7 】

実施例 18 a

炭酸デヒドラターゼの活性部位へのラクダシングルドメイン抗体 C A 0 4 の結合

炭酸デヒドラターゼで選り分けた後に単離した 24 個のクローンすべてを 1 mM の I P T G で誘発した。ペリプラズムから、発現したラクダシングルドメイン V H H (c A b) を抽出し、マイクロタイタープレートのウエルに炭酸デヒドラターゼを固定する E L I S A 実験に用いた。ペリプラズムから抽出されたタンパク質 (100 μ l) を、50 μ l の P B S または 50 μ l の 2 % ドロゾールアミド溶液 (T R U S O P T 登録商標) または 50 μ l のアセタゾールアミド溶液 (D I A M O X 登録商標 - シアナミド) の存在下でインキュベートした。1 時間インキュベートした後、ウエルを P B S , T w e e n で洗浄し、0 . 1 % カゼイン P B S 中、室温にて 1 時間、1 / 5000 B A B C O 抗 - H A 抗体をインキュベートし、洗浄し、ウサギ抗 - マウスアルカリフォスファターゼ複合体 (シグマ) の 1 / 1000 希釈液とともにインキュベートした。基質は、p a r e ニトロフェニルホスフェート (2 m g / m l) であり、読み取りは、10 分後に 405 nm にて行った (表) 。

30

クローン／インヒビター なし ドロゾールアミド アセタゾールアミド

CA01	0.75	0.143	0.17
CA02	1.04	0.85	0.90
CA03	1.04	0.86	0.94
CA04	0.74	0.22	0.26
CA05	0.85	0.75	0.77
CA06	0.62	0.25	0.27
CA07	0.87	0.23	0.28
CA08	1.22	1.06	1.120
CA09	0.83	0.17	0.23
CA10	0.68	0.64	0.64
CA11	1.00	0.93	0.92
CA12	0.79	0.14	0.18
CA13	0.89	0.15	0.19
CA14	0.68	0.13	0.30
CA15	0.22	0.12	0.14
CA16	0.88	0.46	0.47
CA17	0.48	0.12	0.13
CA18	0.73	0.13	0.17
CA19	0.74	0.13	0.17
CA20	0.74	0.13	0.17
CA21	0.84	0.15	0.20
CA22	0.84	0.15	0.19
CA23	1.04	0.99	1.01
CA24	1.13	1.09	1.15

10

20

30

【 0 1 3 8 】

クローン C A 1 5 は、炭酸デヒドロターゼに結合しないかまたは弱く結合する。

クローン C A 1 6 は、ドロゾールアミドおよびアセタゾールアミドの両方によって一部交代されるのみである。

クローン C A 0 2、C A 0 3、C A 0 5、C A 0 8、C A 1 0、C A 1 1、C A 2 3 および C A 2 4 の c A b の結合は、活性部位結合剤によって交代されない。

クローン C A 0 1、C A 0 4、C A 0 6、C A 0 7、C A 0 9、C A 1 2、C A 1 3、C A 1 4、C A 1 7、C A 1 8、C A 1 9、C A 2 0、C A 2 1、C A 2 2 c A b の結合は、ドロゾールアミドおよびアセタゾールアミドの両方によって交代される。したがって、これらの c A b は活性部位バインダーとみなされる。活性部位バインダーの比率は、24 個のクローンのうち 14 である。C A 0 1 から C A 1 2 の配列決定データから、活性部位バインダーにおいて少なくとも 2 つの異なるグループ (C A 0 4 , C A 0 6) があることがわかる。

40

【 0 1 3 9 】

実施例 19

H i s 6 タグをもつバインダーの再クローニングと発現および c A b の特徴付け
p H E N 6 での再クローニング

p H E N 4 の N o t I と E c o R I 遺伝子の間の H A タグおよび M 1 3 p I I I 遺伝

50

子を6個のHisコドンで置換した。SfiIおよびNotI部位のなかに、cAb-Lys3遺伝子を挿入した(‘TCACGC’によって置換されたVHHの最後のSerコドン‘AGC’とともに、これは追加のSer-Argジペプチドを誘導することになる)。pHEN6-Lys3について次の配列が得られる(図)。

【0140】

酵素(Gibco-BRL)にとって最適の緩衝液および温度条件下で、プラスミドpHEN6-Lys3をHindIIIおよびBstEIIで切断する。cAb-Lys3を含むフラグメントを、NcoIで処理することにより、さらに切断する。0.4MのLiClの存在下、フェノライゼーションおよびエタノール沈降法によって、直線化したプラスミドDNAを精製する。DNAを水20μlに再懸濁し、3μlを使用して、アガロースゲル蛍光法によって濃度を測定し、残りの物質の濃度を100ng/μlまで到達させる。

10

【0141】

pHEN4-CA04またはpHEN4-CA05をHindIIIおよびNotIによって同様に切断する。cAb-CA04およびcAb-CA05含有フラグメントをGenecleanを用いてアガロースゲルから精製する。およそ100ngのこれらのフラグメント(アガロースゲル蛍光法で測定)を100ngのHindIII-NotI切断pHEN6ベクターと混合し、総体積10μlにおいて2.5ユニットのT4DNAリガーゼ(ベーリンガー)で室温にて一夜ライゲートする。ライゲートしたDNA(2μl)を電気的競合WK6細胞と混合し、LB/アンピシリンプレートに載せる。pHEN6-CA04またはpHEN6-CA05を含むコロニーを、コロニーPCRによってユニバーサル前後配列決定プライマーでスクリーニングする(標準的PCR条件)。cAb-Lys3挿入のためのより大きなCDRを得るために、PCRフラグメントをEcoRIで切断し、得られるフラグメントを5%アクリルアミドゲルで分離して、残りのpHEN6-Lys3およびpHEN6-CA04またはpHEN6-CA05の間で同定および識別を行う

20

【0142】

ポジティブであると評価されたコロニーのプラスミドをアルカリライシス法にて調製し、ジデオキシ配列決定のためのテンプレートとして用いる。HindIIIおよびEcoRI部位の間のpHEN6-CA04またはpHEN6-CA05を図面に示す(cAb-CA04またはcAb-CA05は太字で示し、his6-タグは下線で示す)。

30

【0143】

タンパク質の発現および精製

プラスミドpHEN6-CA04またはpHEN6-CA05で新たに形質転換したWK6細胞の一夜培養物を用いて、100μg/mlのアンピシリンおよび0.1%のグルコースを含む8リットルのTB培地に植えた。37℃で培養し、培養物の600nmにおける吸光度が0.75~1.0に達した後、最終濃度が1mMになるようにIPTGを加えて発現を誘発し、28℃でさらに16時間細胞成長を続けた。本質的にSkerraおよびPluckthn(Science,240,1038-1041,1988)に従って、ペリプラズムフラクションを調製した。4℃にて4000gで10分間遠心分離して細胞を採集し、もとの体積の氷冷TES緩衝液(0.2Mトリス-HCl、pH8.0、0.5mMEDTA、0.5Mスクロース)中に再懸濁した。氷上で1時間インキュベートした後、1.5%体積の氷冷1:4希釈TES緩衝液を加えることによって、細胞に緩やかな浸透圧ショックを与えた。氷上で1時間インキュベートした後、4℃にて13000gで30分間遠心分離し、最終濃度1mMになるようにPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を上清200mlに加え、ペリプラズムフラクションを作製した。

40

【0144】

アミコンセル(MW5kDaのミリポアフィルター)で限外ろ過することによって、このペリプラズムフラクションを10倍濃縮した後、2mlのNi-NTAアフィニティークラム(キアジェン)に入れる。40mlの50mM硫酸ナトリウム緩衝液、pH8.0

50

300 mM NaCl、10%グリセロール緩衝液で洗浄した後、His 6個のタグ付けをしたシングルドメイン抗体を、同じ緩衝液中の直線濃度勾配が0～0.5 Mのイミダゾール40 mlを用いて溶離した。cAb - CA04またはcAb - CA05をそれぞれ含むフラクションを集め、限外ろ過によって10倍濃縮し、スーパーデックス-75（ファルマシア）カラムにPBS緩衝液を用いて通してイミダゾールを除去した。1.5 mgの純粋なタンパク質が得られ（280 nmにて分光光度計で測定）、限外ろ過によって3 mg/mlまで濃縮した。

【0145】

実施例 20

競合的 ELISA による CA04 - His 構築物の親和性の測定

形質転換したTG1細胞にIPTGで可溶性タンパク質の産生を誘発した。40 mlの培養物から細胞を採取した後、ペリプラズムフラクションを調製した。簡単に述べると、氷冷TES（50 mMのTRIS 1.2 ml、pH、5 mM EDTA、20%スクロース）に再懸濁し、氷上で15分間インキュベートした。遠心分離後、上清を除去し、ペレットを冷水1.2 mlに再懸濁した。懸濁液を氷上にさらに30分間置いた。14000 rpmで遠心分離後、上清を回収し、次の結合および競合アッセイに用いる。

【0146】

結合アッセイおよび競合アッセイのいずれにおいても、Maxisorbプレート（ナunk）に炭酸デヒドラターゼをPBS中の濃度1 μg/mlにてコートした（100 μl、4 にて一夜）。プレートを200 μlの1%カゼイン/PBSにて室温で2時間ブロックした。競合アッセイのために、0.1%カゼイン/PBSで1/100に希釈した、濃度を1～10⁴ nMの間で変化させた遊離抗原と上清の混合物を調製した。これらの混合物100 μlをプレートの異なるウェルに加えた。2時間後、結合したCA04 - Hisをヒスチジンタグ特異的モノクローナル抗体（Dianova、dia900、マウスモノクローナル抗体IgG1、抗（His）₆タグ）、続いて、ウサギ抗-マウスアルカリフォスファターゼ複合体で検出した。両方の第2試薬は、0.1%カゼイン/PBSで1/1000に希釈して用いた。基質（100 μlの2 mg/mlパラニトロフェノールホスフェート/ELISA緩衝液）を加え、15分後、405 nmのODを測定した。405 nm対遊離抗原のODのプロットから、50 nMのK_dが算出された。

【0147】

実施例 21

CA04：炭酸デヒドラターゼ相互作用の親和性測定および動力学的分析

IASysバイオセンサー装置にて、CA04炭酸デヒドラターゼ相互作用のk_{on}、k_{off}およびK_dを決定した。

IASysカルボキシメチルデキストラン（CMD）キュベットを、次の相互作用に用いた。CMDマトリックスへの静電吸着および次に続く、CMDポリマー上のリシル基と活性化したカルボキシル基との共有反応によって、抗原をキュベットに固定した。EDC/NHSカップリングキット（アフィニティーセンサーズ）を用い、EDC/NHSカップリング化学反応（Johnsonら）によって、カルボキシル基の活性化を行った。

【0148】

CMDキュベットの活性化の7分後に、10 mMのNaAc緩衝液でキュベットを洗浄した。キュベットをPBSで洗浄した後、続いて、1 Mのエタノールアミン、pH 8を加えて、残っている活性化カルボキシル基を不活性化した。不活性化した後、10 mMのNaOHによる洗浄を数回行って、共有的に結合していないすべての炭酸デヒドラターゼを除去した。固定化された抗原の量は、6 ng/mm²であると算出された。飽和量のCA04をキュベットに加えることによって結合を化学量論的に評価したところ、0.4であった。

【0149】

すべての実験は、PBS中27 にて行い、セッティPBS中27 にて行い、セッティング100にて攪拌した。再生条件は最適条件であった。洗浄は10 mMのNaOHで

10

20

30

40

50

1 分間行った。

【0150】

C A 0 4 の濃度を变化させて ($2 \times 10^{-8} \text{ M} \sim 1.5 \times 10^{-7} \text{ M}$) 結合を追跡し、これを 3 回繰り返して平衡化した。曲線は F A S T f i t (アフィニティーセンサーズ) を用いると、一価指数的にフィットした。ベースライン補正も考慮に入れた。これらのフィットから得られた仮の一次速度定数を C A 0 4 の濃度に対してプロットした。線形回帰法により、 k_{on} を決定したところ、 $6.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の値が得られた。マスポート制限が生じるので、この値を下限として用いる。これは、有意な曲率を示す高濃度の C A 0 4 についてのシグナル対シグナルをプロットすることによって見られる。

10

【0151】

0.6 μM の炭酸デヒドラターゼの存在下で、飽和量の C A 0 4 を添加した後にキュベットを P B S で洗浄した場合の解離相を追跡した (3 回)。F A S T f i t ソフトウェア (アフィニティーセンサーズ) を用いて曲線をフィットさせた。曲線は、遅い相が再結合の結果として説明され、速い相が実際の脱離速度を反映するような二価指数的にフィットした。この値は、等しく 0.02 s^{-1} である。

【0152】

動力学的分析に基づいて K_d を算出した値は、32 nM である。

【0153】

K_d の値もまた、平衡値に対して C A 0 4 濃度 ($3 \times 10^{-8} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-7} \text{ M}$) をプロットすることによって決定し、再度 F A S T f i t (アフィニティーセンサーズ) を用いると、双曲線関係にフィットした。この分析から得られた K_d の値は、60 nM である。

20

【0154】

実施例 2 2

C A 0 4 - H i s によるウシ赤血球炭酸デヒドラターゼの阻害

炭酸デヒドラターゼ (シグマ、C - 3934) を P B S に溶解し、タンパク質濃度を、280 nm ($E_{1\%} = 19$) にて分光光度計を用いて決定した。

【0155】

精製した C A 0 4 - H i s の濃度を、算出された吸光係数 $E_{1\%} = 17$ を用いて決定した (P c G e n e)。固定最終濃度 2.3 μM の酵素に、一定定体積 (60 μl) の C A 0 4 - H i s の濃度を变化させて (1 ~ 8 μM) 混合した。室温にて 15 分間ブレインキュベートした後、P B S 945 μl およびパラニトロフェニルアセテート 5 μl (2% 無水エタノール溶液) (Pocker Y. および Stone J.T., Biochemistry, 6, 1967, 668 - 678) を加えた。反応混合物を迅速にキュベットに移し、少なくとも 5 分間室温にて OD 405 nm をモニターした。基質の同時加水分解に対し、酵素反応速度を補正した。C A 0 4 - H i s のない条件下で測定された酵素活性と比較して残りの活性を算出した。

30

【0156】

実施例 2 3

破傷風菌毒素のインビボ中和

Simpton らの記載 (J. Pharm. Exp. Therapeutics, 254, 98-103, 1990) に従って、破傷風菌毒素の中和を行った。8 ~ 12 週齢の 64 匹の N M R I マウス (雄性および雌性) をランダムに 8 つのグループに分ける (雄性 4 および雌性 4)。マウスに腹腔内注入にて破傷風菌毒素 (R I T、スミスクラインビーチャム、Rixensart、ベルギー)、抗体フラグメント、あるいは両方を次のように注入する。

40

グループ 1 P B S + c A b - T T 1

グループ 2 P B S + c A b - T T 2

グループ 3 P B S + 破傷風菌毒素 (10 $\times$ L D 50)

グループ 4 P B S + 破傷風菌毒素 (10 $\times$ L D 50) + c A b - T T 1 (4 μg)

グループ 5 P B S + 破傷風菌毒素 (10 $\times$ L D 50) + c A b - T T 1 (40 μg)

50

グループ 6 P B S + 破傷風菌毒素 (1 0 × L D 5 0) + c A b - T T 2 (4 μ g)
 グループ 7 P B S + 破傷風菌毒素 (1 0 × L D 5 0) + c A b - T T 2 (4 0 μ g)
 グループ 8 P B S + 破傷風菌毒素 (1 0 × L D 5 0) + 非特異的 c A b - V H H 2 1 (4 0 μ g)

注入総量は、すべての場合において 0 . 1 m l である。注入前に V H H と破傷風菌毒素の混合物を室温にて 3 0 分間インキュベートする。マウスは二週間観察する。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 5 7 】

【図 1】本発明認識分子の図的表現である。

【図 2 - 1】c A b - T T 1 のアミノ酸およびヌクレオチド配列である。

10

【図 2 - 2】c A b - T T 2 のアミノ酸およびヌクレオチド配列である。

【図 2 - 3】c A b - L y s 2 のアミノ酸およびヌクレオチド配列である。

【図 2 - 4】c A b - L y s 3 のアミノ酸およびヌクレオチド配列である。

【図 3 a】リゾチームに対する機能時間中の免疫応答を示す。実施例 1 2 を参照せよ。

【図 3 b】炭酸デヒドラターゼウシ赤血球に対する機能時間中の免疫応答を示す。実施例 1 2 を参照せよ。

【図 3 c】リボヌクレアーゼに対する機能時間中の免疫応答を示す。実施例 1 2 を参照せよ。

【図 3 d】α - アミラーゼに対する機能時間中の免疫応答を示す。実施例 1 2 を参照せよ。

20

【図 4 a】アミラーゼ、リゾチームおよび炭酸デヒドラターゼの R N A アーゼ A に対する、D 2 / 5 4 のフラクション化された I g G の固相結合を示す。実施例 1 3 参照。

【図 4 b】アミラーゼ、リゾチームおよび炭酸デヒドラターゼの R N A アーゼ A に対する、D 2 / 5 4 のフラクション化された I g G の固相結合を示す。実施例 1 3 参照。

【図 4 c】アミラーゼ、リゾチームおよび炭酸デヒドラターゼの R N A アーゼ A に対する、D 2 / 5 4 のフラクション化された I g G の固相結合を示す。実施例 1 3 参照。

【図 4 d】アミラーゼ、リゾチームおよび炭酸デヒドラターゼの R N A アーゼ A に対する、D 2 / 5 4 のフラクション化された I g G の固相結合を示す。実施例 1 3 参照。

【図 5 a】異なる I g G に対するウシおよび豚臓 α - アミラーゼの光学密度を示す。実施例 1 4 参照。

30

【図 5 b】異なる I g G に対するウシおよび豚臓 α - アミラーゼの光学密度を示す。実施例 1 4 参照。

【図 5 c】異なる I g G に対するウシおよび豚臓 α - アミラーゼの光学密度を示す。実施例 1 4 参照。

【図 5 d】異なる I g G に対するウシおよび豚臓 α - アミラーゼの光学密度を示す。実施例 1 4 参照。

【図 6 a】異なる I g G に対するウシ赤血球炭酸デヒドラターゼの光学密度を示す。実施例 1 4 参照。

【図 6 b】異なる I g G に対するウシ赤血球炭酸デヒドラターゼの光学密度を示す。実施例 1 4 参照。

40

【図 6 c】異なる I g G に対するウシ赤血球炭酸デヒドラターゼの光学密度を示す。実施例 1 4 参照。

【図 6 d】異なる I g G に対するウシ赤血球炭酸デヒドラターゼの光学密度を示す。実施例 1 4 参照。

【図 7】実施例 1 6 で得られたクロマトグラフを示す。

【図 8】遺伝子配列を示す。実施例 1 8 参照。

【図 9】C A 0 4 の遺伝子配列を示す。実施例 1 9 参照。

【図 1 0】C A 0 5 の遺伝子配列を示す。実施例 1 9 参照。

【図 1 1】コンペティティブ E L I S A による C A 0 4 - H I S 構築物のアフィニティー測定を示すグラフである。実施例 2 0 参照。

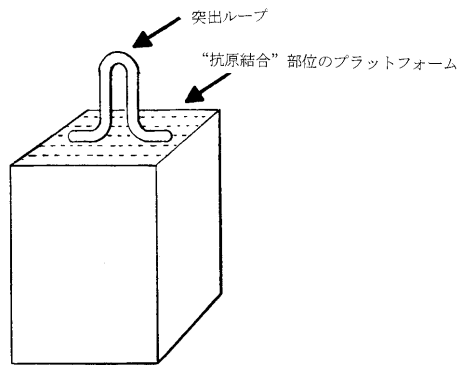
50

【図 1 2】炭酸デヒドラタ - ゼの阻害を現すグラフである。実施例 2 2 参照。

【図 1 3】実施例 7 で説明するグラフである。

【 図 1 】

‘TUT’ モチーフをもつタンパク質



【 図 2 - 1 】

cab-TT1	
GAG GTG CAG CTG CAG CGC TCT GGG GGA GGC TGG GTG CAG GCT GGA GGG TCT CTG AGA CTC TCC TGT GCG GCC TCT	1 25
E V Q L Q A S G G G S V Q A G S L R L S C A A	20
GGG GSA CAG ACC TTC GAT AGT TAT GGC ATG GCC TGG TTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GAG TGC GAA TTC GTC TCG	30 35 40 45 49
G G Q T F D S Y A M A W E R O A P G K E C E L V S	
AGT ATT ATT GGT GAT GAT AAC AGA AAC TAT GCC GAC TCC GTG AAA GGC CGA TTC ACC ATC TCC CGA GAC AAC GCC	50 55 60 65 70 74
S I I G D D N R N Y A D S V K G R F T I S R D N A	
ARG AAC ACG GTA TAT CTG CAA ATG GAC CGT CTG AAT CCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG CAA TTG GGT	75 80 85 90 95
K N T V Y L Q M D R L E D I A V Y C A Q L G	
AGT GCC CGG TCG GCT ATG TAC TGT GCG GGC ACG GGC ACC CAG GTC ACC GTC TCC TCA	100 105 110 113
S A R S A M Y C A G Q G T Q V T V S S	

【 図 2 - 2 】

cab-Lys2
 GAT GTG CAG CTG CAG GCG TCT GGA GGC TCG GTG CAG GCT GGA GGG TCT CTG AGG CTC TCT TGT ACA GCC GCT
 1 E V Q L Q A S G G 10 15 20 25
 AAT TAC GCC TTT GAT TCC AAG ACC GTG GGC TGG TTC CGC CAG GTT CCA GGA AAG CAG CAG GGT GGC GGT
 N Y A F D S K T V G W F R Q V P G K E R E G V A G
 30 35 40 45 50
 ATC AGT AGT GGT GGC AGT ACC ACA GCC TAT TCC GAC TCC GTG AGG GGC GGA TAC ACC GTG TCC CTT GAG AAC GCC
 I S G G S T T A Y S D S V K G R Y T V S L E N A
 52a 55 60 65 70 74
 AAG AAC ACT GTG TAT CTA CTG ATA GAC AAC CTA CAA CCT GAA GAC ACT GCC ATG TAC TAC TGC GCA GGA GTG AGC
 K N T V Y L L I D N L Q P E D T A I Y C A G V S
 75 80 82a 82b 82c 85 90 95
 GGT TGG CGA GGG CGG CAG TGG CTG CTA CTG GCA GAG ACC TAT CGG TTC TGG GGC CAG GGG ACT CAG GTG ACC GTC
 G W R Q W L L L A E T Y R F W G Q G T Q V T V
 100 a b c d e f g h i 101 105 110
 TCC TCA
 S S
 113

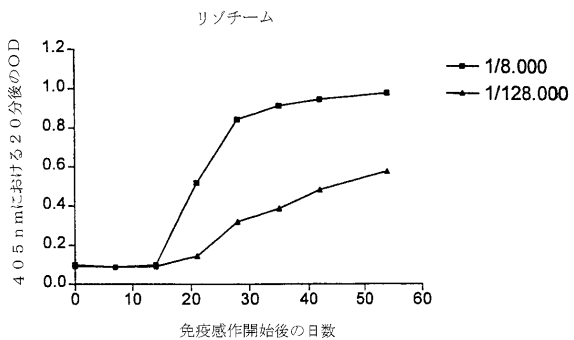
【 図 2 - 4 】

cab-Lys3
 GAT GTG CAG CTG CAG GCG TCT GGA GGC TCG GTG CAG GCT GGA GGG TCT CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT
 1 D V Q L Q A S G G 10 15 20 25
 GGA TAC ACC ATC GGT CCC TAC TGT ATG GGG TGG TTC CGC CAG GCC CCA GGG AAG CAG CAG GGT GGC GCA GCA
 G Y T I G P Y C M G W F R Q A P G K E R E G V A A
 30 35 40 45 50
 AAT AAT ATG GGT GGT ATC ACC TAC TAC GGC GAC TCC GTG AGG GGC GGA TTT ACC ATC TCC CAA GAC AAC GCC
 I N G G S T T A Y S D S V K G R Y T V S L E N A
 52a 55 60 65 70 74
 AAG AAC ACC GTG TAT CTA CTG ATA GAC AAC CTA CAA CCT GAA GAC ACT GCC ATG TAC TAC TGC GCA GAT TCG
 K N T V Y L L I D N L Q P E D T A I Y C A G V S
 75 80 82a 82b 82c 85 90 95
 ACC ATC TAC GGT TAT TAT GAA TGT GGT CAC GGT CTT TCC AGC GGA GGA TAT GGG TAT GAC TCC TCC TGG GGC CAG
 T I Y A S Y E C G H G L S T G G Y G Y D S W G Q
 100 a b c d e f g h i j k l m n o 101 105 110
 GGG ACC CAG GTC ACC GTC TCC TCA
 G T V T V S S
 113

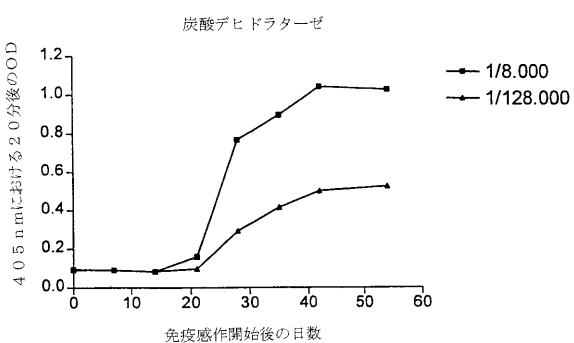
【 図 2 - 3 】

cab-Lys2
 GAT GTG CAG CTG CAG GCG TCT GGA GGC TCG GTG CAG GCT GGA GGG TCT CTG AGA CTC TCC TGT GCG ACC TCT
 1 E V Q L Q A S G G 10 15 20 25
 GGA GCC ACC TCC AGT AGC AAC TGC ATG GGC TGG TTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG CAG CAG GGT GGC GCA GGT
 G A T S S S N C M G W F R Q A P G K E R E G V A V
 30 35 40 45 50
 ATT GAT ACT GGT AGA GGG AAT ACA GCC TAT GCC GAC TCC GTG CAG GGC GGA TTT ACC ATC TCC TTA GAC AAC GCC
 I D T T G R G N T A Y A D S V Q G R L T T I S L D N A
 51 52a 55 60 65 70 74
 AAG AAC ACC CTA TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AAA CCT GAG GAC ACT GCC ATG TAC TGT GCA GCA GAT ACA
 K N T L Y L Q M N S L K P E D T A M Y Y C A A A D T
 75 80 82a 82b 82c 85 90 95
 TCC ACT TGG TAT GGT TAC TGC GGA ACA AAT CCA AAT TAT TCG TAC TGG GGC CAG GGC ACC CAG GTC ACC
 S T W Y R G Y C G T N P N Y F S Y W G Q G T Q V T
 97 100 a b c d e f g h i j 101 105 110
 GTC TCC TCA
 V S S
 113

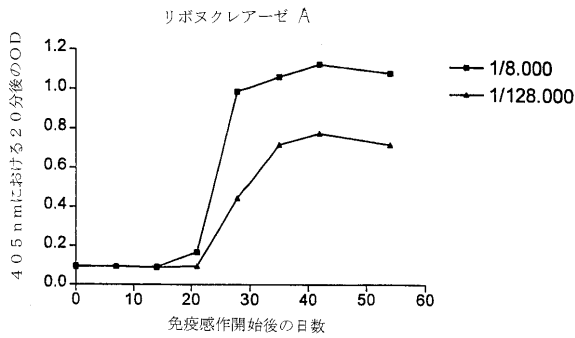
【 図 3 a 】



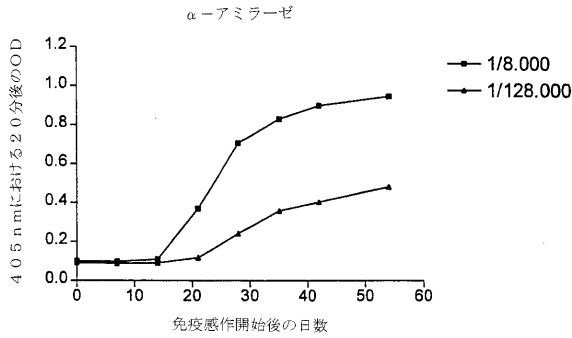
【 図 3 b 】



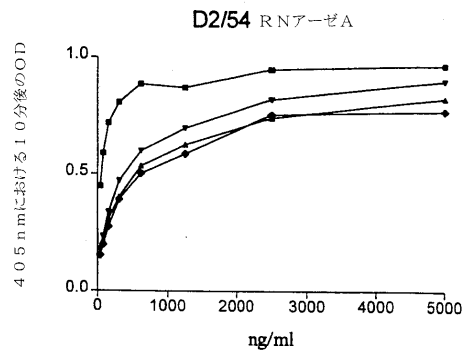
【図 3 c】



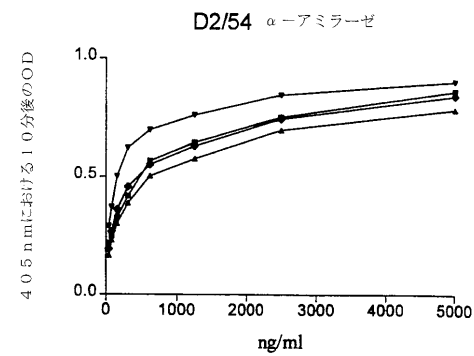
【図 3 d】



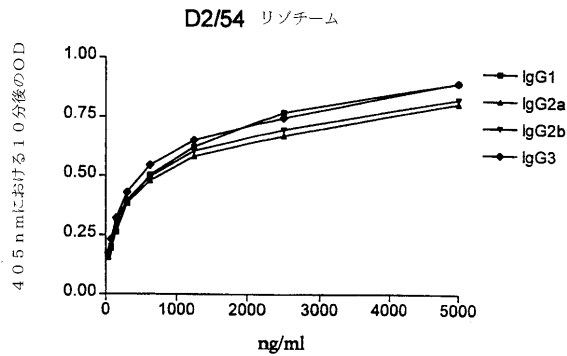
【図 4 a】



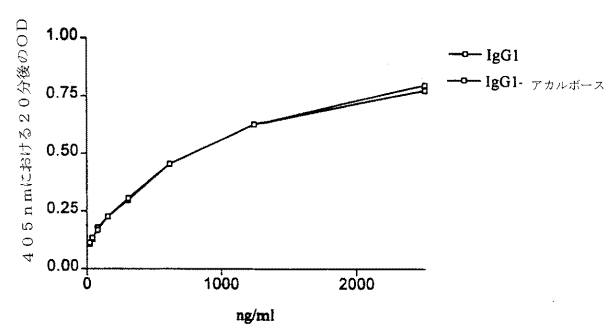
【図 4 b】



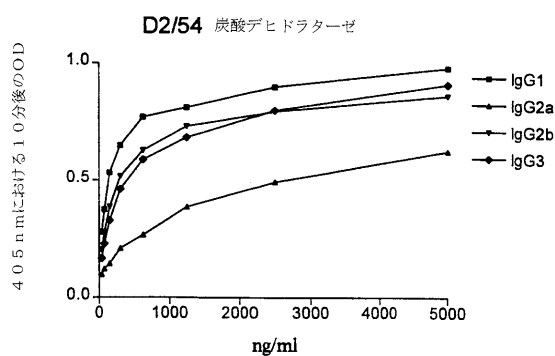
【図 4 c】



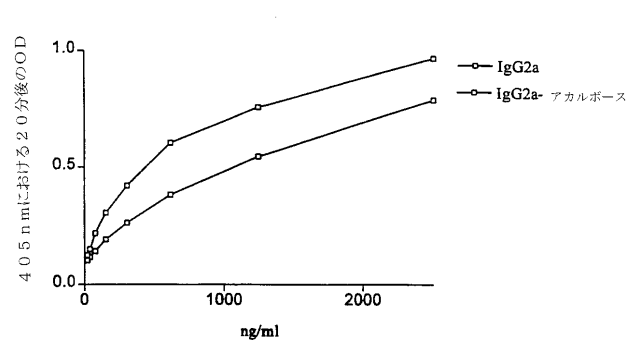
【図 5 a】



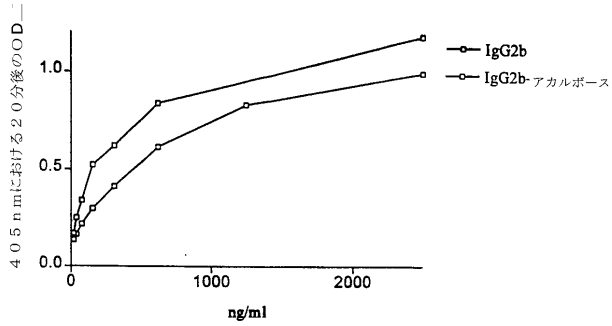
【図 4 d】



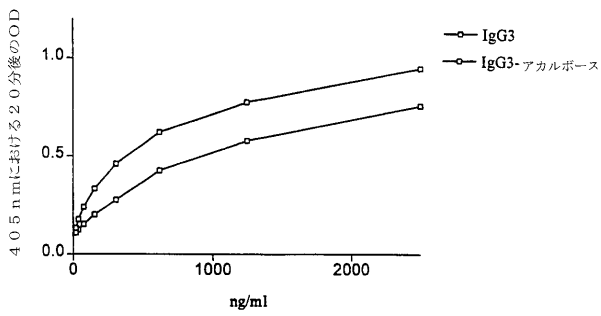
【図 5 b】



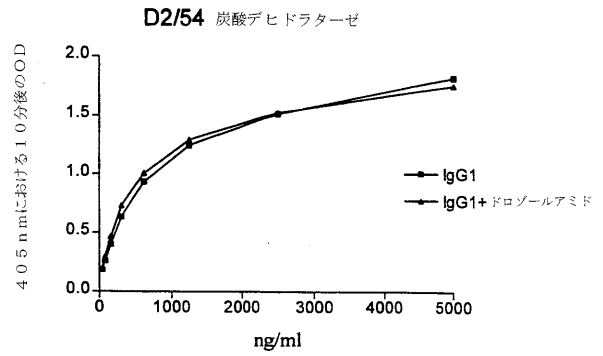
【図 5 c】



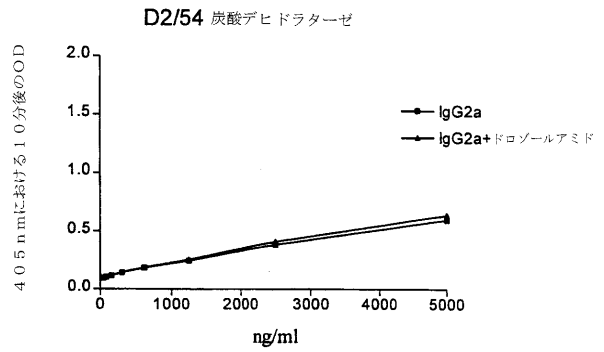
【図 5 d】



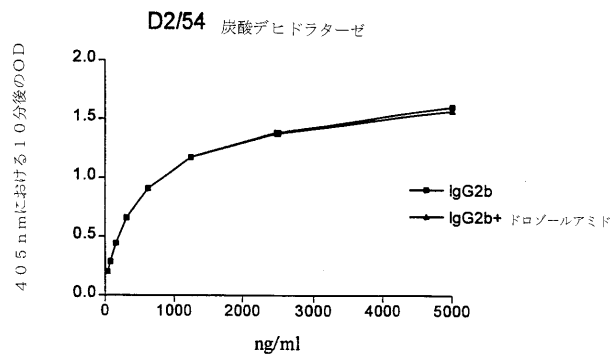
【図 6 a】



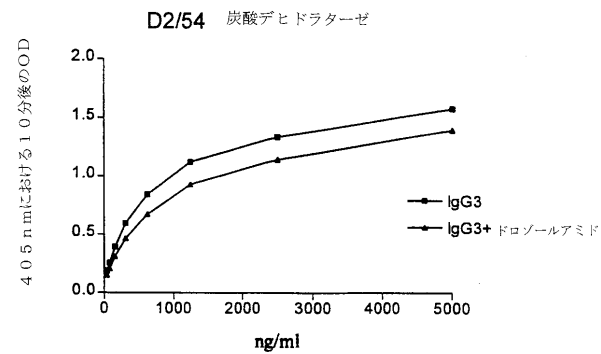
【図 6 b】



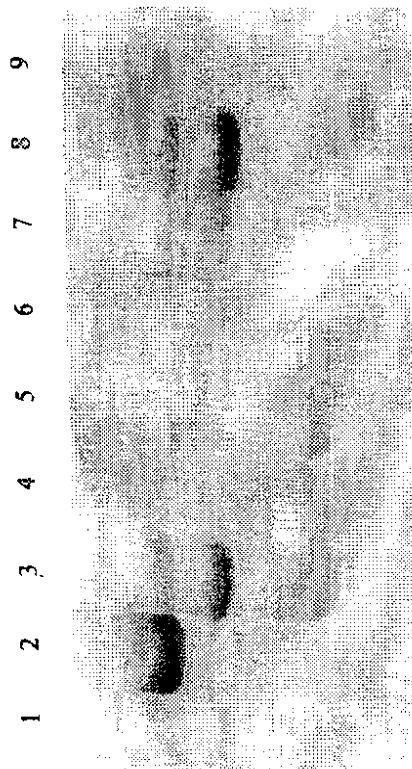
【図 6 c】



【図 6 d】



【図 7】



【 8 】

001-AAGCTTGCAT GCAAAATCTTA TTTCAGGAG ACAGTCATAA TGAATACCT ATTGCCTACG
 061-GCAGCCGCTG GATTGTTATT ACTCGCGGCC CAGCCGGCCA TGGCCAGGT GCAGCTGCAG
 121-GAGCTCGAGG ATCCGCTCAC GGTCTCCAGC GGCCTCCACC CGTACGACGT TCCGGACTAC
 181-GGTTCCGGCC GAGCATAGAC TGTGAAAGTT

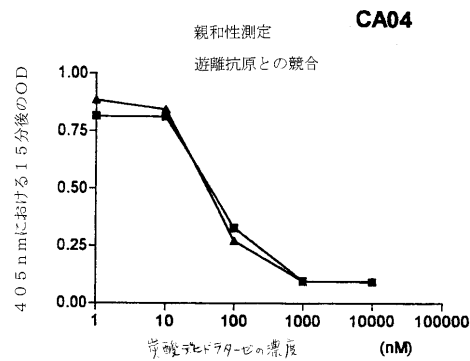
【 10 】

CA05
 AAGCTTGCAT GCAAAATCTTA TTTCAGGAG ACAGTCATAA TGAATACCT ATTGCCTACG
 GCAGCCGCTG GATTGTTATT ACTCGCGGCC CAGCCGGCCA TGGCCAGGT GCAGCTGCAG
 GAGTCTGGGG GAGGCTCGGT GCAGCTCGA GACTCTCTG GACTCTCTG TCCAGCTCTT
 GATACACCG TCAGTACCTA CTGCTCCGCC AGGCTCCAGG GAGGAGGCT
 GAGGGGTCG CACTATCTT CCGTGTAGC ACATCTACG GCGACTCCGT GAGGGGCCGA
 TTCACCATCT CTCAGACAA CGCCAGAAC ACCTGTATC TCCAAATGAA CAGCTGAAA
 CCTGAGGATA CGGCCATCTA TTATGTGCG GATTCGACGG TGGCCAGTAC TGGTGGTGC
 TCCCGCTAA GGCCTATGA CTACCACTAT CCGGCCCAGG GGACCCAGGT CACCGTCTCC
 TCACCGGCC GCCACCA TCCACATCAC TAATAGAAATTC

【 9 】

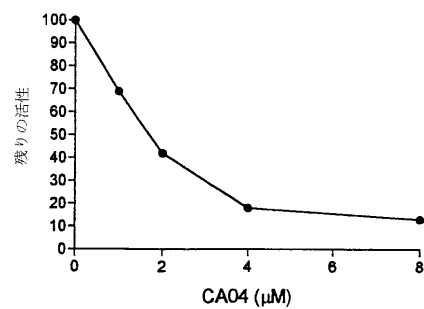
CA04
 AAGCTTGCAT GCAAAATCTTA TTTCAGGAG ACAGTCATAA TGAATACCT ATTGCCTACG
 GCAGCCGCTG GATTGTTATT ACTCGCGGCC CAGCCGGCCA TGGCCAGGT GCAGCTGCAG
 GAGTCTGGGG GAGGCTCGGT GCAGCTCGA GACTCTCTG GACTCTCTG TCCAGCTCTT
 GGATACACCT ACATCTCCG CTGCTCCGCC TGGTCCGCC AGGCTCCAGG AAAGGAGCG
 GAGGGGTCG CACTATCTA TATTGTGCT GATAGGACG ACTATGCCA CTCGGCAGG
 GGCCTATCA CCACTCTCCA AGACCCGCC AAGAACACG TGTATCTCCA AATGACAGC
 CTGAAACCTG AGGACACTG CATGTACTAT TGTGACAGG ATGGGGCAG ATTAGATCTT
 TACTCTCTCA TTAGGCCATA TCGGTATAGG TACTGGGCC AGGGGACCCA GGTACCGTC
 TCCTCACGCG GCCGCCACCA CCAATCACCAT CACTAATAGA ATTG

【 11 】

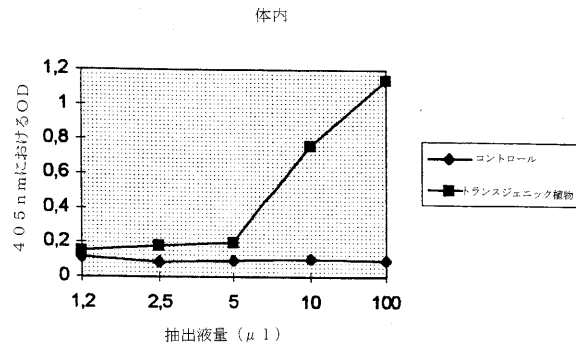


【 12 】

炭酸デヒドラターゼの阻害
(2.3 μ M)



【図 13】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	39/02	(2006.01)	A 6 1 P	39/02
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 K	38/55	(2006.01)	A 6 1 K	37/64
G 0 1 N	33/531	(2006.01)	G 0 1 N	33/531
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18

(72)発明者 セルジェ・ムイルデルマンス

ベルギー、ベー - 1 5 6 0 フーイラルト、ブリュッセルセステーンウェッヒ 5 5 番

(72)発明者 ローデ・ウンス

ベルギー、ベー - 2 0 0 0 アントウェルペン、オットー・フェニウスストラート 1 1 番

F ターム(参考) 2G045 DA37

4C084 AA17 NA14 ZB332 ZB352 ZC202 ZC372 ZC412

4C085 AA13

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	识别与靶分子的活性位点或裂缝特异性相互作用的分子		
公开(公告)号	JP2009040780A	公开(公告)日	2009-02-26
申请号	JP2008195891	申请日	2008-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	弗拉姆扫描英特尔海胆下跌迪尾学院2006年秋季比奥金泰熙术		
申请(专利权)人(译)	佛兰芒语英特尔海胆下跌迪尾学院2006年秋季比奥金泰熙术		
[标]发明人	セルジエムイルデルマンス ローデウィンス		
发明人	セルジエ・ムイルデルマンス ローデ・ウインス		
IPC分类号	A61K45/00 G01N33/15 G01N33/50 A61P43/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P39/02 A61K39/395 A61K38/55 G01N33/531 C07K16/18 A61K38/00 A61K39/00 C07K16/00 C07K16/12 C07K16/40 C12N15/09 C12N15/10 C12N15/62 C12P21/02 C12R1/19		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P39/02 A61P43/00 C07K16/00 C07K16/12 C07K16/18 /18 C07K16/40		
FI分类号	A61K45/00.ZNA G01N33/15.Z G01N33/50.Z A61P43/00.111 A61P31/04 A61P31/12 A61P39/02 A61K39/395.A A61K37/64 G01N33/531.A C07K16/18 A61K38/16.200 A61K38/55		
F-TERM分类号	2G045/DA37 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZC202 4C084/ZC372 4C084/ZC412 4C085/AA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	新田正弘		
优先权	96201788.5 1996-06-27 BE		
其他公开文献	JP2009040780A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：找到能够与活性位点或目标分子的裂缝相互作用的识别分子。识别分子具有从基本识别单元突出的环结构。环结构是，例如，骆驼科动物重链抗体的CDR3或这种CDR3的衍生形式，其对靶分子的活性位点或裂缝具有结合特异性。基本识别单元例如由对靶分子具有结合亲和力的抗体型结构形成。【选择图表】无

【 図 1 】

「T」モチーフをもつタンパク質

