

(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2011-510617

(P2011-510617A)

(43) 公表日 平成23年4月7日(2011.4.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	4 C 0 8 4
C 0 7 K 1/13 (2006.01)	C 0 7 K 1/13	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-542649 (P2010-542649)
 (86) (22) 出願日 平成21年1月21日 (2009. 1. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年9月10日 (2010. 9. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/050656
 (87) 国際公開番号 W02009/092732
 (87) 国際公開日 平成21年7月30日 (2009. 7. 30)
 (31) 優先権主張番号 08100707.2
 (32) 優先日 平成20年1月21日 (2008. 1. 21)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/022, 661
 (32) 優先日 平成20年1月22日 (2008. 1. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/046, 957
 (32) 優先日 平成20年4月22日 (2008. 4. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502247787
 モルフォシス・アー・ゲー
 ドイツ連邦共和国 8 2 1 5 2 ・マルティン
 スリード/ブラネッグ, レナークリストー
 シュトラーセ 4 8
 (74) 代理人 100096024
 弁理士 柏原 三枝子
 (74) 代理人 100125520
 弁理士 高橋 剛一
 (74) 代理人 100155310
 弁理士 柴田 雅仁
 (72) 発明者 シュタイドゥル, シュテファン
 ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8 1 2 4
 1, プラネッガーシュトラーセ 3 7

最終頁に続く

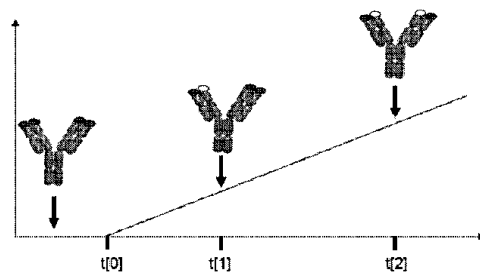
(54) 【発明の名称】 精製タグ又は不活性可変ドメインを具えるタンパク性結合分子

(57) 【要約】

本発明は、タンパク性結合分子、特に、少なくとも2個の可変ドメインを有する抗体を提供する。一方の可変ドメインが対象のターゲット分子に結合する。少なくとも1つの他方の可変ドメインが前記タンパク性結合分子の精製に適した精製タグを具える。ターゲット分子に対する一価の結合特性を有するタンパク性結合分子の簡便な精製を精製タグによって可能にする。

【選択図】 図 1

Figure 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも 2 つの変域ドメインを具える免疫グロブリン又はその機能性断片において、一方の変域ドメインがターゲット分子に結合し、少なくとも 1 つの他方の前記変域ドメインが精製タグを具えており、前記精製タグが前記別の可変ドメインの C D R 領域中に含まれていることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、2 つの変域ドメインを具えることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記精製タグを具える可変ドメインが、ターゲット分子に結合しないことを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

10

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記精製タグは、金属イオンに特異的に結合するペプチド配列を具えることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記金属イオンがニッケル及びコバルトから選択されることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

20

【請求項 6】

請求項 4 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記精製タグがヒスチジンタグ又はそれと実質的に同一な変異体であることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記ヒスチジンタグがヘキサヒスチジンペプチドであることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記精製タグが抗原決定基タグであることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

30

【請求項 9】

請求項 8 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記抗原決定基タグが、抗体によって特異的に認識されるペプチド配列からなることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記精製タグが、ヒスチジンタグ、Streptタグ、mycタグ、Flagタグ及びV5タグ又はこれらと実質的に同一な変異体から選択されることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

40

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリンにおいて、前記免疫グロブリンが抗体であることを特徴とする免疫グロブリン。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の免疫グロブリンにおいて、前記抗体が、ヒト抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体であることを特徴とする免疫グロブリン。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の免疫グロブリンにおいて、前記抗体がヒト抗体であることを特徴とする免疫グロブリン。

【請求項 14】

50

請求項 13 に記載の免疫グロブリンにおいて、前記ヒト抗体が I g G クラスであることを特徴とする免疫グロブリン。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の免疫グロブリンにおいて、前記ヒト抗体が I g G 1 サブクラス、I g G 2 サブクラス、I g G 3 サブクラス及び I g G 4 サブクラスのいずれかであることを特徴とする免疫グロブリン。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の免疫グロブリンにおいて、前記ヒト抗体が I g G 1 サブクラスであることを特徴とする免疫グロブリン。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記可変ドメインのそれぞれが可変重鎖 (V H) と可変軽鎖 (V L) とを具えることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記可変重鎖 (V H) が 3 つの相補性決定領域 (H - C D R) を具えることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 19】

請求項 17 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記可変軽鎖 (V L) が 3 つの相補性決定領域 (L - C D R) を具えることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 20】

請求項 17 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記精製タグが可変重鎖 (V H) 又は可変軽鎖 (V L) に含まれていることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記精製タグが可変重鎖 (V H) に含まれていることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記精製タグが、可変重鎖 (V H) の 3 つの相補性決定領域 (H - C D R) のいずれか 1 つに含まれていることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 23】

請求項 12 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記精製タグが H - C D R 3 又は H - C D R 2 に含まれていることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記精製タグが H - C D R 3 に含まれていることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 25】

請求項 20 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記精製タグが可変軽鎖 (V L) に含まれていることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記精製タグが、可変軽鎖 (V L) の 3 つの相補性決定領域 (L - C D R) のいずれか 1 つに含まれていることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片において、前記精製タグが L - C D R 2 に含まれていることを特徴とする免疫グロブリン又はその機能性断片。

【請求項 28】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片をコードすることを特徴とする核酸配列。

【請求項 29】

精製タグを具える可変ドメインをコードすることを特徴とする核酸配列。

【請求項 30】

請求項 28 又は 29 に記載の核酸配列において、前記可変ドメインが免疫グロブリン、又はその機能性断片に含まれていることを特徴とする核酸配列。

【請求項 31】

請求項 30 に記載の核酸配列において、前記可変ドメインが、前記免疫グロブリンの可変重鎖 (VH) 又は可変軽鎖 (VL) に含まれていることを特徴とする核酸配列。

10

【請求項 32】

請求項 31 に記載の核酸配列において、前記免疫グロブリンの可変重鎖 (VH) に含まれていることを特徴とする核酸配列。

【請求項 33】

請求項 32 に記載の核酸配列において、前記可変ドメインが前記可変重鎖 (VH) の H - CDR3 に含まれていることを特徴とする核酸配列。

【請求項 34】

請求項 28 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の核酸配列を具えることを特徴とするベクター。

【請求項 35】

20

請求項 34 に記載のベクターを含むことを特徴とする細胞。

【請求項 36】

請求項 35 に記載の細胞において、前記細胞が哺乳動物細胞であることを特徴とする細胞。

【請求項 37】

請求項 35 又は 36 に記載の細胞において、前記細胞が、分離された細胞であることを特徴とする細胞。

【請求項 38】

請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片と、その薬学的に許容可能な担体又は賦形剤と、を具えることを特徴とする医薬品組成物。

30

【請求項 39】

疾病又は疾患を治療する方法において、必要性がある対象に請求項 38 に記載の医薬品組成物を治療的有効量で投与するステップを具えることを特徴とする方法。

【請求項 40】

請求項 39 に記載の方法において、前記疾病又は疾患がターゲット分子の望ましくない存在を伴うものであることを特徴とする方法。

【請求項 41】

対象又はサンプル中のターゲット分子を検出する方法において、前記対象又はサンプルを、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片に接触させるステップを具えることを特徴とする方法。

40

【請求項 42】

対象の疾病又は疾患を診断する方法において、前記対象又はサンプルを、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片に接触させるステップを具えることを特徴とする方法。

【請求項 43】

請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片の医薬品製造のための使用。

【請求項 44】

疾病又は疾患の治療のための請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片。

50

【請求項 45】

請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片の、疾病又は疾患を診断するための使用。

【請求項 46】

請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片の、ターゲット分子を検出するための使用。

【請求項 47】

免疫グロブリン又はその機能性断片を精製する方法において：

(a) 請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の免疫グロブリン又はその機能性断片を含む溶液を提供するステップと；

(b) 前記免疫グロブリン又はその機能性断片の精製タグに対する親和性を有する部分にステップ (a) の溶液を接触させるステップと；

(c) 前記免疫グロブリン又はその機能性断片を前記部分に結合させるステップと、

(d) 前記部分に結合しない溶液成分のすべて又は実質的すべてを除去するステップと

；

(e) 前記部分から免疫グロブリン又はその機能性断片を回収するステップと、
を具えることを特徴とする方法。

【請求項 48】

請求項 47 に記載の方法において、前記溶液が、2 個の精製タグを具える免疫グロブリン又はその機能性断片をさらに含むことを特徴とする方法。

【請求項 49】

請求項 48 に記載の方法において、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の前記免疫グロブリン又はその機能性断片を、勾配によって 2 個の精製タグを具えるタンパク性結合分子から分離することを特徴とする方法。

【請求項 50】

請求項 49 に記載の方法において、前記勾配がイミダゾール勾配であることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

抗体などの免疫グロブリンは、医薬品工業用として継続的に関心が寄せられ、関心が高まっている。20 個を超えるモノクローナル抗体 (mAb) が市場に出ており、100 個を超えるモノクローナル抗体が臨床試験中である。この十年間に、従来の免疫グロブリン及び抗体とは異なるいくつかの特性を有する免疫グロブリンの誘導体及び断片が数多く設計された。これらは、診断及び治療への応用に望ましい。具体例は、組み換え抗体断片 (古典的一価抗体断片 (Fab、scFv) など)、又は、人工的に作り出した変異体 (二重特異性抗体、三重特異性抗体、ミニ抗体及びシングルメイン抗体) である。現在、これらのいくつかは、信頼性のある選択肢として浮上している。そのような断片及び変異体は、通常、完全長免疫グロブリンのターゲット特異性を保持しているが、多くの場合、より安価に生産することができる。さらに、新規な「抗体様」タンパクディスプレイ骨格が開発された。これらは、同様に、従来の免疫グロブリン及び抗体にはない、いくつかの特性を有している。

【背景技術】

【0002】

治療用アプリケーションとして、一価の抗体抗原相互作用、すなわち、免疫グロブリン、又は、別の骨格を、対象ターゲット分子に結合する 1 個のみの可変ドメインと共に、有することが望ましい。いくつかの IgG は、ターゲットレセプタと架橋することによって天然リガンドの効果を模倣することがわかっている。架橋することによってレセプタを活性化 (例えばレセプタリン酸化) できる。対照的に、同じ抗体に由来する一価の Fab は、レセプタと橋架せず、適切な抗原決定基がターゲットにされていれば、天然リガンドが

10

20

30

40

50

結合するのを防ぐ。従って、IgGがアゴニスト的に作用するのに対して、同じ抗体のFab断片はアンタゴニスト的に作用する。具体例は、インシュリン受容体(Kahn et al., Proc Natl Acad Sci USA. (1978) 75: 4209-13)、EGFレセプタ(Schreiber et al., J Biol Chem. (1983) 258: 846-53)、EPOレセプタ(Schneider et al., Blood (1997) 89: 473-82)、GHレセプタ(Wan et al., Mol Endocrinol. (2003) 17: 2240-50)又は2-アドレナリン受容体(Mijares et al., Mol Pharmacol. (2000) 58: 373-9)である。

【0003】

しかしながら、そのような一価の特性を有する構築物(例えばFab断片)は、インビボ短半減期などの別の特性のせいで不利である場合もある。従って、一価の抗体抗原相互作用を、Fcドメインを具える完全長免疫グロブリンの特性と組み合わせることが非常に望ましい。本発明においてはそのような分子を提供する。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、ターゲット分子との結合に関しては一価であるが、Fcドメインのサイズ及び存在に関しては完全長免疫グロブリンの特性を保持している、免疫グロブリンなどのタンパク性結合分子を提供することを目的とする。

【0005】

本発明は、一価のタンパク性結合分子、特に、各生産細胞系の培養液上清から容易に精製することができる完全長免疫グロブリンを提供することも目的とする。

【0006】

本発明は、精製タグに対する親和性を有するマトリックス又は樹脂へのタンパク性結合分子の結合などの精製工程用精製タグを使用することによって、本発明によるタンパク性結合分子を精製する方法を提供することも目的とする。

【0007】

本発明のタンパク性結合分子は、完全長免疫グロブリンなどのタンパク性結合分子の少なくとも1個の可変ドメイン中に精製タグを導入することによって生成される。精製タグを、好ましくは免疫グロブリンの1つのアームの可変重鎖中に導入し、最も好ましくはH-CDR3領域中又は代替的にH-CDR2領域中に導入する。精製タグの導入は、免疫グロブリンの各アームを特異性の欠損を生じさせる。

【0008】

本発明のタンパク性結合分子は、例えば、精製タグに対する親和性を有するマトリックスを用いた親和性クロマトグラフィーによって、各生産細胞系の培養液上清を簡便に精製することができる。

【0009】

少なくとも2個の可変ドメインを具えるタンパク性結合分子であって、一方の可変ドメインがターゲット分子と結合し、他方の可変ドメインが不活性であるタンパク性結合分子を提供することも本発明の目的である。そのようなタンパク性結合分子は、ターゲット分子と結合することに関しては一価であるが、Fcドメインのサイズ及び存在に関しては完全長免疫グロブリンの特性を保持している。

【0010】

本発明のタンパク性結合分子は、癌、免疫疾患又は炎症性疾患などの、疾病及び疾患の診断及び治療において多くの用途がある。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、Ni-NTAクロマトグラフィーによる本発明のタンパク性結合分子の精製を示している。x軸は時間軸である。y軸は、カラム(このケースにおいてはイミダゾール)から物質を溶出させるために用いた成分の濃度を示している。「黒丸」は、VH

10

20

30

40

50

又はV Lのそれぞれが精製タグを具えていないことを示している。そのようなV Hが精製タグを具えていないV Lと結合している場合は、それぞれのアームがターゲット分子に対して特異的である。「白丸」は、V H又はV Lのそれぞれの少なくとも1つのC D Rが精製タグを具えていることを示している。イミダゾール勾配中の異なる画分において、3つの異なる免疫グロブリン種が溶出している。精製タグを有していない免疫グロブリン種はフロースルー画分中にみられ、分子の1のアームに精製タグを具えている免疫グロブリン種は、分子の両方のアームに精製タグを具えている免疫グロブリン種と比較して、早く溶出される。

【図2】図2は、E L I S Aによって分析した4つのF a b断片の結合特異性を示している。ニワトリ卵白リゾチーム又はC D 3 8 - F cのいずれかをM a x i s o r p E L I S Aプレート(N u n c)にコーティングした(5 μ g / m l)。F a b断片を加え、洗浄した後、特異的に結合しているF a b断片を、A Pが結合した抗ヒトI g G (F a b)₂特異抗体を用いたインキュベーションによって検出し、次いで、水中に希釈した可溶性A t t o - P h o s基質(R o c h e)を用いて現像した。蛍光測定を535nmの発光においてT e c a nプレートリーダーで行った。試験を行ったF a bは、M O R 0 3 2 0 7(ニワトリ卵白リゾチーム特異的)、M O R 0 3 0 8 0(C D 3 8特異的)、M O R 0 8 4 2 8(M O R 0 3 2 0 7のH - C D R 3はG Y S G H H H H H S G D Yで置換されている)及びM O R 0 8 4 4 1(M O R 0 8 4 2 8のV H及びM O R 0 3 0 8 0のV L)であった。

【図3】図3は、組み換えられてヒトC D 3 8を発現するC H O - K 1細胞を用いてF A C Sによって分析した3つのF a b断片の結合特異性を示している。F a b断片を細胞に加え、洗浄の後、特異的に結合したF a b断片を、P Eが結合した抗ヒトI g G (F a b)₂特異的抗体(J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h)を用いたインキュベーションによって検出した。中央の蛍光をF A C Sアレー装置(B e c t o n D i c k i n s o n)を用いて測定した。試験を行ったF a bは、M O R 0 3 2 0 7(ニワトリ卵白リゾチーム特異的)、M O R 0 3 0 8 0(C D 3 8特異的)及びM O R 0 8 4 4 1(M O R 0 8 4 2 8のV H及びM O R 0 3 0 8 0のV L)であった。

【図4】図4は、溶出にイミダゾール勾配を適用するヒスパインドフラクトゲル(M e r c k # 7 0 6 9 3 - 3)カラムを用いたI M A C精製から得たタンパク画分の還元S D S - P A G Eを示している。p M o r p h 2 _ _ h _ _ I g G 1 _ _ M O R 0 8 4 2 8、p M o r p h 2 _ _ h _ _ I g G 1 _ _ M O R 0 3 0 8 0、p M o r p h 2 _ _ h _ _ I g _ _ l a m b d a 2 _ _ M O R 0 3 0 8 0の共トランスフェクション後に得た、プロテインAカラムで予め精製したI g G 1画分を、還元S D Sゲルにロードした。1 m l / 分の流速で1 m lの画分を得た。20 m M N aリン酸、p H 7 . 4 / 500 m M N a C l / 10 m Mイミダゾールを泳動バッファとして用いた。前記泳動バッファに250 m Mのイミダゾールを加えたものを溶出バッファとして用い、溶出バッファの勾配(0 ~ 100%)を適用した。L R M : タンパクサイズマーカー ; C L : 予備精製してカラムにロードしたI g G 1画分 ; F T : カラムフロースルー ; 番号は、異なる溶出画分を示している。

【図5】図5は、親和性クロマトグラフィーフロースルー(レーン3)から得たタンパク画分及びプールした画分# 30 - 58(レーン2)及び# 70 - 90(レーン1)からのサンプルの還元S D S - P A G Eを示している。レーン4にタンパクサイズマーカーをロードした。詳細については実施例3を参照されたい。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、当業界で知られている分子よりも優れた有点がある、免疫グロブリンなどのタンパク性結合分子を提供する。免疫グロブリンは、多くの場合、その分子の二価の性質によってそれぞれのターゲットと橋架する。そのような架橋活性は、例えばレセプタ活性化(例えばレセプタのリン酸化を介する)といった、特定の用途においていくつかの望ましくない効果を生じさせることがある。

【0013】

一方で、非常に多くの場合、完全長の免疫グロブリンと必要とされている。この要求は、より長い半減期を有する分子の必要性（例えば、Fab分子は免疫グロブリンと比較して非常に短い短半減期を有する）、又は、免疫グロブリン、特に完全長の免疫グロブリンの全特性（一例としてエフェクター機能）を有する分子の必要性といった、いくつかの理由による。

【0014】

この明らかなジレンマは本発明によって解決される。本明細書に記載されているタンパク性結合分子は、本来は一価であるが、完全長免疫グロブリンの特性をすべて具えている。更に、タンパク性結合分子を構築する方法によって、本発明は、これらの分子の簡便な精製を可能にする方法も提供する。

10

【0015】

ここで用いられているように、タンパク性結合分子などの分子が、「特異的に結合する」とは、結合特異性が絶対的ではないが相対的な特性であることによって、そのようなタンパク性結合分子がそのようなターゲット分子と1以上の参照分子とを区別することができる場合に、抗原などのターゲット分子「に対して/について特異的に」又は「を特異的に認識する」ことをいう。その大部分の一般形態において（及び基準が定められていない場合）、「特異的結合」は、タンパク性結合分子が、例えば下記方法の1つに従って決定されるように、対象のターゲット分子と無関係な分子とを区別できることを意味している。そのような方法は、限定されるものではないが、ウェスタンブロット、ELISA、RIA試験、ECL試験、IRMA試験及びペプチドスキャンを含んでいる。例えば、標準的なELISA分析を実行することができる。スコアリングは、標準的色現像（例えばホースラディッシュ過酸化水素と第2抗体、及び、テトラメチルベンジジンと過酸化水素）によって実行してもよい。いくつかの穴における反応を、例えば450nmで光電密度によってスコアリングする。標準的なバックグラウンド（=陰性反応）は0.1ODであってもよい。標準的な陽性反応は1ODであってもよい。これは、陽性と陰性との差が10倍を超えることがあることを意味している。一般的に、結合特異性の測定は、単一の参照分子ではなく、粉乳、BSA、又は、トランスフェリンなどなどの約3~5個の無関係な分子の1セットを用いて行う。

20

【0016】

しかしながら、「特異的結合」は、ターゲット分子と、例えば、ターゲットXとターゲットY間のような、基準点として用いられる1以上の密接に関連する分子とを区別するタンパク性結合分子の能力を意味するものでもある。さらに、「特異的結合」は、例えば、ターゲットの分子N末端若しくはC末端領域の抗原決定基などのターゲット分子の異なるドメイン又は領域といった、ターゲット分子の異なる部分間、又は、1個以上の重要なアミノ酸残基、又は、ターゲット分子のアミノ酸残基の伸展間を区別するタンパク性結合分子の能力に関するものである。

30

【0017】

ここで用いられている「タンパク性結合分子」という用語は、互いに結合したペプチド結合中に少なくとも2つのアミノ酸を具えている分子を意味する。そのタンパク性分子は、好ましくは生物有機体によって生産される分子、又は、その一部、誘導体及び/又は類似化合物である。生体分子による生産の後に化合物の修飾によって生成される誘導体も本発明の好ましい化合物であることは明らかである。特に好ましい実施形態において、タンパク性結合分子は、抗体などの免疫グロブリン又はその断片である。別の好ましいタンパク性結合分子は、アフィボディ（プロテインAのZドメインを具えている）、免疫タンパク（1mmE7など）、チトクロムb₅₆₂、アンキリン反復、PDZドメイン又はクニツドメインを具えているタンパク、昆虫デフェンシンA、サソリ毒（カリブドトキシン又はCTL A-4など）、ノッティン（Min-23、ネオカルチノスタチン、CBM4-2又はテングミスタットなど）、アンチカリン又はアルマジロ反復タンパクなどの抗体様特性を有する骨格を含む。

40

【0018】

50

「免疫グロブリン」(I g)は、ここで用いられているように、I g Gクラス、I g Mクラス、I g Eクラス、I g Aクラス又はI g Dクラス(又はこれらの任意のサブクラス)に属するタンパクを意味し、従来既知の抗体及びその機能性断片をすべて含む。ここで定義されている抗体/免疫グロブリンの「機能性断片」は、少なくとも2個の変域ドメインを有している抗体/免疫グロブリン断片(例えばI g Gの変域領域)であって、第1可変ドメインが、それぞれの完全長免疫グロブリンのターゲット分子に対する結合特性を保持している断片を意味する。本発明の機能性断片は、F(a b')₂断片又はF a b - d H L Xの断片を含む。そのような断片を組み替えて、C H 1ドメインとC Lドメインとの間に生じる分子間ジスルフィド相互作用を最小にするか又は完全に無くしてもよい。本発明のタンパク性結合分子の「機能性断片」という用語は、任意のタンパク性の部分であって、第1可変ドメインが、対象のターゲット分子に結合するが、別の可変ドメインのいずれもが対象のターゲット分子に結合しない部分を意味する。いくつかの好ましい実施形態においては、本発明の免疫グロブリンは、完全長の免疫グロブリン又は実質的に完全長の免疫グロブリンである。

10

20

30

40

50

【0019】

「可変ドメイン」という用語は、異なるタンパク性結合分子間で配列が大きく異なり、対象のターゲット分子(又はその欠損)にタンパク性結合分子の結合及び特異性を与えるタンパク性結合分子の部分の意味する。本発明によれば、ペプチド配列、特に、ここで定義されている精製タグが、可変ドメインがもはやターゲット分子に特異的に結合しなくなるような態様で可変ドメイン中に導入される。可変ドメインは、いかなる形状又は形態を有していてもよい。可変ドメインは、1個、2個又は2個より多いポリペプチド鎖に含まれるポリペプチド配列からなってもよい。抗体などの免疫グロブリンの可変ドメイン、又は、その機能性断片は、一般的に免疫グロブリン分子の1つのアームの完全な抗原結合領域を有している。その領域には、免疫グロブリン分子の1本のアームの両方の可変鎖のC D R領域、すなわち、H - C D R 3、H - C D R 2、H - C D R 1、L - C D R 3、L - C D R 2、及び、L - C D R 1及び、所定のターゲット分子に特異的に結合するために必要な隣接する骨格領域が含まれる。

【0020】

抗体の「抗原結合領域」は、一般に、抗体の1つ以上の超可変領域、すなわち、C D R - 1、C D R - 2及び/又はC D R - 3中にみられるが、可変「骨格」領域も、C D Rのための骨格を提供することなどによって、抗原結合に重要な役割を果たし得る。「抗原結合領域」は、好ましくは可変軽鎖(V L)のアミノ酸残基4 ~ 103と可変重鎖(V H)のアミノ酸残基5 ~ 109とを少なくとも有しており、より好ましくはV Lのアミノ酸残基3 ~ 107とV Hのアミノ酸残基4 ~ 111とを有しており、特に好ましくは完全長のV L鎖とV H鎖(V Lのアミノ酸位置1 ~ 109とV Hのアミノ酸位置1 ~ 113; W O 97 / 08320による番号付けに従う)である。本発明で使用される好ましいクラスの免疫グロブリンはI g Gである。

【0021】

本発明によれば、タンパク性結合分子の第1可変ドメインは、ターゲット分子に結合する。タンパク性結合分子のその他の可変ドメインは、同じターゲット分子に対する結合特異性を有さない。従って、タンパク性結合分子は、ターゲット分子に結合することに関して一価である。更に、その他の可変ドメインの少なくとも1つ、すなわち、ターゲット分子に結合しない可変ドメインは、前記タンパク性結合分子の精製に適した精製タグを有している。

【0022】

本発明の抗体は、コンピュータ内で設計されて合成によって作成された核酸でコードされたアミノ酸配列をベースとする組み換え抗体ライブラリに由来するものでもよい。抗体配列のコンピュータによる設計は、例えば、ヒト配列のデータベースを分析し、このデータベースから得たデータを利用してポリペプチド配列を開発することによって達成される。コンピュータ作成配列における設計及び取得の方法は、例えば、K n a p p i k e t

al., J. Mol. Biol. (2000) 296: 57; Krebs et al., J. Immunol. Methods. (2001) 254: 67; Rothe et al., J. Mol. Biol. (2008) in press、及び、Knappik et al.に付与された米国特許第6300064号に記載されており、これらの文献はここで言及することによって全体が組み込まれている。

【0023】

本明細書中に言う「ターゲット分子」は、タンパク性結合分子の第1可変ドメインに結合する任意の対象分子を意味する。ターゲット分子は、そのターゲット分子へのタンパク性結合分子の結合が、ある生物学的作用を達成する目的において望ましく、精製タグを具えているか又は不活性である、第2可変ドメイン又は後の任意の可変ドメインの結合パートナーから識別可能な分子を意味する。一般的に及び好ましくは、このターゲット分子は、ペプチド、タンパク又はその他の任意のタンパク性分子である。代替的に、ターゲット分子は、炭水化物、脂肪酸、脂質、染料又は蛍光色素分子などの、その他の有機分子又は無機分子であってもよい。

10

【0024】

本明細書で用いられている「精製タグ」という用語は、タンパク性結合分子の精製又は同定に適したすべてのペプチド配列を意味する。精製タグは、精製タグに対する親和性を有する別の部分に特異的に結合する。精製タグに特異的に結合する部分は、通常、アガロースビーズなどのマトリクス又は樹脂に付いている。精製タグに特異的に結合する部分には、抗体、ニッケルイオン若しくはコバルトイオン若しくは樹脂、ビオチン、アミロース、マルトース及びシクロデキストリンが含まれる。例示的精製タグは、ヒスチジンタグ（ヘキサヒスチジンペプチドなど）を含み、そのタグは、ニッケル又はコバルトイオンなどの金属イオンに結合する。従って、ある実施形態において、精製タグは、金属イオンに特異的に結合するペプチド配列を具えている。その他の実施形態においては、精製タグは、金属イオンに特異的に結合するペプチド配列からなる。好ましい実施形態において、精製タグは、ニッケルイオン又はコバルトイオンに特異的に結合するペプチド配列を具えているか、又は、該ペプチド配列からなる。その他の実施形態において、精製タグは、ニッケルイオンに特異的に結合するペプチド配列を具えているか、又は、該ペプチド配列からなる。代替の実施形態において、精製タグは、コバルトイオンに特異的に結合するペプチド配列を具えているか、又は、該ペプチド配列からなる。その他の例示的精製タグは、mycタグ（EQKLISEEDL）、Strepタグ（WSHPQFEK）、Flagタグ（DYKDDDDK）及びV5タグ（GKPIPNPLGLDST）である。「精製タグ」という用語には、「抗原決定基タグ」、すなわち、抗体によって特異的に認識されるペプチド配列も含まれる。例示的な抗原決定基タグには、モノクローナル抗FLAG抗体によって特異的に認識されるFLAGタグが含まれる。抗FLAG抗体によって認識されるペプチド配列は、配列DYKDDDDK又はこれと実質的に同一な変異体からなる。従って、ある実施形態において、精製タグは、抗体によって特異的に認識されるペプチド配列を具えているか、又は、該ペプチド配列からなる。「精製タグ」という用語には、精製タグと実質的に同一な変異体が含まれる。ここで用いられている「実質的に同一の変異体」は、オリジナルの精製タグ（例えばアミノ酸置換、欠失又は挿入による）と比較して修飾されるが、特異的に精製タグを認識する部分に特異的に結合する精製タグの特性を保持する精製タグの誘導體又は断片を意味する。精製タグは、4個未満、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個又は20個より多いアミノ酸からなるペプチド配列を具えてもよいし、又は、該ペプチド配列からなってもよい。ある実施形態において、精製タグは、4～20個のアミノ酸、5～20個のアミノ酸、6～20個のアミノ酸、4～15個のアミノ酸、5～15個のアミノ酸、6～15個のアミノ酸、4～12個のアミノ酸、5～12個のアミノ酸、6～12個のアミノ酸を具えているか、又は、該アミノ酸からなる。

20

30

40

【0025】

50

ある実施形態において、本発明は少なくとも2個の可変ドメインを具えるタンパク性結合分子であって、一方の可変ドメインがターゲット分子と結合し、他方の可変ドメインが不活性であるタンパク性結合分子に関する。

【0026】

可変ドメインの結合特異性に関する文脈において用いられている「不活性である」とは、別の分子に対する結合特異性を有しない可変ドメインを表す。特に、不活性可変ドメインは、ターゲット分子又はその他のいずれの分子にも結合せず、不活性可変ドメインは、精製タグを具えていない。少なくとも2個の可変ドメインを具えるタンパク性結合分子であって、一方の可変ドメインがターゲット分子に結合し、他方の可変ドメインが不活性である分子は、ターゲット分子に対して一価の結合特異性を有しており、本発明に従って用

10

【0027】

本発明は、可変ドメイン中に精製タグを導入することができるタンパク性結合分子を開示する。好ましくは、前記タンパク性結合分子は、可変重鎖及び可変軽鎖が由来するオリジナルの親バインダのターゲット分子にもはや結合しない。代替的に、前記タンパク性結合分子は、可変重鎖及び可変軽鎖が由来するオリジナルの親バインダと比較して、少なくとも10倍、少なくとも100倍、又は、少なくとも1000倍より小さい親和性でターゲット分子と結合する。代替的に、前記タンパク性結合分子は、可変重鎖及び可変軽鎖が由来するオリジナルの親バインダーと比較して、ターゲット分子に残されている結合親和性だけを示す。親和性を測定及び比較する方法及び分析は、当業者に知られており、実験手順セクションに記載されている。

20

【0028】

本発明によれば、免疫グロブリンの可変ドメインなどの可変ドメイン中に精製タグを導入することができる。免疫グロブリンの任意のCDR領域中に精製タグを導入することができる。免疫グロブリンのCDR領域は骨格領域に隣接している。それぞれの構造及びCDR領域と骨格領域との境界は、当業者に知られている。いくつかの異なる方法で可変ドメイン中に精製タグを導入することができる。精製タグがオリジナルのCDR領域全体を置換するような方法で、CDR領域中に精製タグを導入することができる。また、オリジナルのCDR領域のオリジナルのアミノ酸の1つ以上が精製タグによって置換されるが、オリジナルのCDR領域のオリジナルのアミノ酸の1つ以上がなお存在するように精製タグを導入することができる。また、精製タグがCDR領域に挿入されるように、すなわち、CDR領域のオリジナルのアミノ酸のいずれもが削除又は置換されないように精製タグを導入することができる。また、言い換えれば、例えば構造変化によって、前記精製タグの導入後にそれぞれの可変ドメインがもはやターゲット分子に結合しない方法で精製タグを可変ドメインの骨格領域中に導入することができる。また、CDR領域及び骨格領域と重複する可変ドメインの領域中に精製タグを導入することができる。すべてのこのような可能性及びオプション並びにこれらの組み合わせは当業者に自明である。

30

【0029】

本発明は、本発明のタンパク性結合分子をコードするDNA分子にも関する。本発明のDNA分子は、ここで開示されている配列に限定されず、その変異体を含む。本発明に含まれるDNA変異体をハイブリダイゼーションにおける物性を参考にして記載してもよい。当業者は、DNAが2本差であるので、核酸ハイブリダイゼーション技術によって、DNAを用いて、DNAの相補体やDNAの相当物又は同族体を同定できることを理解するであろう。相補性が100%未満であってもハイブリダイゼーションが生じる場合があることも理解されるであろう。しかしながら、条件を適切に選択すれば、ハイブリダイゼーション技術を用いて、特定のプローブに対するDNA塩基配列の構造的関連性に基づいてそのDNA塩基配列を区別することができる。そのような条件に関するガイダンスとしては、Sambrook et al., 1989 (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Ha

40

50

rbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 米国)、及び、Ausubel et al., 1995 (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. eds. (1995). Current Protocols in Molecular Biology. ニューヨーク: John Wiley and Sons)を参照されたい。

【0030】

本発明は、本発明のヌクレオチド配列の1つ以上を具える組換DNA構築物をさらに提供する。本発明の組み換え構築物は、本発明のタンパク性結合分子をコードするDNA分子が挿入される、プラスミド、ファージミド、ファージ又はウイルスベクターなどのベクターに接続させて用いることができる。コードされた遺伝子は、Sambrook et al., 1989及びAusubel et al., 1989に記載されている技術によって作ることができる。代替的に、例えば合成装置を用いて、DNA塩基配列を化学的に合成してもよい。例えば、Oligonucleotide Synthesis (1984, Gait, ed., IRL Press, Oxford)に記載されている技術を参照されたい。この文献はここで言及することによってその全体が組み込まれている。本発明の組み換えの構築物は、RNA及び/又はコードされたDNAのタンパク産物を発現することができる発現ベクターで構成されている。このベクターは、オープンリーディングフレーム(ORF)に作用可能な状態で連結されたプロモータを含む調節配列をさらに具えていてもよい。このベクターは、選択可能なマーカー配列をさらに具えてもよい。特定の開始シグナル及び細菌分泌シグナルが、挿入されたターゲット遺伝子コード配列の効率的な翻訳に必要な場合もある。

10

20

【0031】

本発明は、本発明のDNA構築物の少なくとも1つを含む宿主細胞をさらに提供する。この宿主細胞は、発現ベクターを入手可能な事実上すべての細胞であり得る。この宿主細胞は、例えば、哺乳動物細胞などの高等真核生物性宿主細胞若しくは酵母菌などの下等真核生物性宿主細胞であってもよいし、又は、細菌細胞などの原核細胞であってもよい。宿主細胞中への組み換え構築物の導入は、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE、デキストラン媒介性トランスフェクション、エレクトロポレーション又はファージ感染によって実行することができる。

30

【0032】

ある実施形態において、本発明は、少なくとも2個の変域ドメインを具えるタンパク性結合分子であって、1個の変域ドメインがターゲット分子に結合し、少なくとも1個の別の可変ドメインが精製タグを具えているタンパク性結合分子を提供する。タンパク性結合分子は、2個、3個、4個又は4個以上の可変ドメインを具えていてもよい。好ましい実施形態においては、タンパク性結合分子が2個の変域ドメインを具えている。

【0033】

本発明によれば、タンパク性結合分子の1個の変域ドメインは、ターゲット分子に結合する。その他の可変ドメインのいずれも、特に精製タグを具える可変ドメインは、ターゲット分子に結合しない。ある実施形態において、本発明は少なくとも2個の変域ドメインを具えるタンパク性結合分子に関し、第1可変ドメインがターゲット分子に結合し、少なくとも1つの別の可変ドメインが前記タンパク性結合分子の精製に適した精製タグを具えており、前記別の可変ドメインのいずれもが前記ターゲット分子に結合しない。その他の実施形態においては、少なくとも2個の変域ドメインを具えるタンパク性結合分子は、第1可変ドメインがターゲット分子に結合するが、その他の可変ドメインのいずれもが前記ターゲット分子に結合しない。

40

【0034】

ある実施形態において、精製タグは、ヒスチジンタグ、Streptタグ、mycタグ、V5タグ、及び、Flagタグ、又は、これらと実質的に同一な変異体から選択される。好ましい実施形態において、精製タグは、ヒスチジンタグ(Hisタグ)であり、最も好

50

ましくはヘキサヒスチジンペプチドである。代替的实施形態において、精製タグは、ペンタヒスチジンペプチド又はヘプタヒスチジンペプチドなどのヒスチジンタグと実質的に同一な変異体である。8個、9個、10個又はそれ以上のヒスチジン残基などのように、さらなるヒスチジン残基を有するその他のヒスチジンタグ、又は、1個以上のヒスチジン残基が別のアミノ酸で置換されているが、Ni-NTAになお結合することができるポリヒスチジン配列を、本発明に従って同様に用いてもよい。

【0035】

ある実施形態において、タンパク性結合分子は、免疫グロブリン又はその機能性断片である。前記免疫グロブリンは、好ましい実施形態においては抗体であり、より好ましくは完全長の抗体である。

10

【0036】

ある実施形態において、免疫グロブリンは、ヒト免疫グロブリンである。他の実施形態において、前記免疫グロブリンは、マウス又はラットなどのげっ歯動物の免疫グロブリンである。

【0037】

ある実施形態において、免疫グロブリンは、IgGクラス、IgMクラス、IgEクラス、IgAクラス及びIgDクラスのいずれかである。好ましい実施形態において、免疫グロブリンはIgGクラスである。ある実施形態において、免疫グロブリンは、IgGクラス、IgMクラス、IgEクラス、IgAクラス及びIgDクラスのいずれかのヒト免疫グロブリンである。好ましい実施形態において、免疫グロブリンは、IgGクラスのヒト免疫グロブリンである。

20

【0038】

ある実施形態において、免疫グロブリンは、IgG1サブクラス、IgG2サブクラス、IgG3サブクラス及びIgG4サブクラスのいずれか1つである。好ましい実施形態においては、免疫グロブリンがIgG1サブクラスである。ある実施形態において、免疫グロブリンは、IgG1サブクラス、IgG2サブクラス、IgG3及びIgG4サブクラスのいずれか1つのヒト免疫グロブリンである。好ましい実施形態において、免疫グロブリンはIgG1サブクラスのヒト免疫グロブリンである。

【0039】

好ましい実施形態においては、タンパク性結合分子が免疫グロブリンである。これらの実施形態において、可変ドメインは可変重鎖(VH)及び可変軽鎖(VL)を具える。好ましい実施形態において、タンパク性結合分子は、それぞれの可変ドメインが可変重鎖(VH)と可変軽鎖(VL)とを具えている2個の可変ドメインを具える免疫グロブリンである。

30

【0040】

ある実施形態においては、可変重鎖(VH)が3つの相補性決定領域であるH-CDRを具える。好ましい実施形態において、タンパク性結合分子は、3つの相補性決定領域であるH-CDR1、H-CDR2及びH-CDR3を具えている可変重鎖(VH)を具える免疫グロブリンである。

【0041】

ある実施形態においては、可変軽鎖(VL)が3つの相補性決定領域であるL-CDRを具える。好ましい実施形態において、タンパク性結合分子は、3つの相補性決定領域であるL-CDR1、L-CDR2及びL-CDR3を具えている可変軽鎖(VL)を具える免疫グロブリンである。

40

【0042】

ある実施形態において、精製タグは、タンパク性結合分子又は免疫グロブリンの可変重鎖(VH)又は可変軽鎖(VL)に含まれている。好ましい実施形態において、前記精製タグは、タンパク性結合分子又は免疫グロブリンの可変重鎖(VH)に含まれている。より好ましい実施形態において、精製タグは、可変重鎖(VH)の3つの相補性決定領域(H-CDR)のいずれか1つに含まれている。さらに好ましい実施形態においては、精製

50

タグが、H - C D R 3、H - C D R 2 又は H - C D R 1 に含まれており、より好ましくは H - C D R 3 又は H - C D R 2 に含まれ、最も好ましくは H - C D R 3 に含まれている。

【 0 0 4 3 】

ある実施形態において、精製タグは、タンパク性結合分子又は免疫グロブリンの可変軽鎖 (V L) に含まれている。より好ましい実施形態において、精製タグは、可変軽鎖 (V L) の 3 つの相補性決定領域 (L - C D R) のいずれかに含まれている。さらに好ましい実施形態において、精製タグは、L - C D R 3、L - C D R 2 又は L - C D R 1 に含まれており、最も好ましくは L - C D R 3 に含まれている。

【 0 0 4 4 】

「 C D R 領域」という用語は、一般的に、任意の相補性決定領域を含む免疫グロブリンの領域を意味する。免疫グロブリンの相補性決定領域は、可変重鎖 (V H) 及び可変軽鎖 (V L) に含まれている。特に、免疫グロブリンの相補性決定領域は、H - C D R 1、H - C D R 2、H - C D R 3、L - C D R 1、L - C D R 2 又は L - C D R 3 領域である。

【 0 0 4 5 】

本発明は、本発明のタンパク性結合分子をコードする核酸配列をさらに提供する。本発明のタンパク性結合分子は、1 個、2 個、3 個、4 個又はそれより多いポリペプチドからなってもよい。前記ポリペプチドのそれぞれは、同一又は異なる核酸によってコードされてもよい。同様に、本発明のタンパク性結合分子のそれぞれの前記ペプチドをコードする核酸は、同一又は異なるベクター上に存在していてもよい。

【 0 0 4 6 】

本発明は、精製タグを具える可変ドメインをコードする核酸配列をさらに提供する。好ましくは、前記可変ドメインは、免疫グロブリン又はその機能性断片に含まれている。ある実施形態において、前記可変ドメインは、前記免疫グロブリンの可変重鎖 (V H) 又は可変軽鎖 (V L) に含まれており、好ましくは可変重鎖 (V H) に含まれ、より好ましくは前記可変重鎖 (V H) の H - C D R 3 に含まれている。

【 0 0 4 7 】

本発明は、タンパク性結合分子の核酸配列を具えているか又は本発明による精製タグを具える可変ドメインの核酸配列を具えているベクターをさらに提供する。

【 0 0 4 8 】

本発明は、前記ベクターを具えている細胞及び宿主細胞をさらに提供する。好ましくは前記細胞又は宿主細胞が哺乳動物細胞である。また、前記細胞又は宿主細胞が単離された細胞又は単離された宿主細胞であることが好ましい。

【 0 0 4 9 】

本発明は、本発明のタンパク性結合分子と、該タンパク用の薬学的に許容可能な担体又は賦形剤とを具えている医薬品組成物をさらに提供する。

【 0 0 5 0 】

本発明は、疾病又は疾患を治療するための治療方法であって、本発明のタンパク性結合分子と、該タンパク用の薬学的に許容可能な担体又は賦形剤とを具えている医薬品組成物の治療的有効量を、必要性のある対象に投与するステップを具える方法をさらに提供する。好ましくは、前記疾病又は疾患は、望ましくないターゲット分子の存在を伴うものである。

【 0 0 5 1 】

本明細書による「治療的に有効な」量は、単独で又は別の治療と組み合わせて、不都合な病状の治療又は処置において治療的な利益を与えるタンパク性結合分子の量として定義される。この用語は、治療を全般的に改善するか、望ましくない効果を低減若しくは回避するか、治療的効果又は別の治療薬と相乗作用を強める量を包含し得る。治療を必要とする「対象」は、ヒト又はヒト以外の動物 (例えばウサギ、ラット、マウス、サル又は別の下等霊長類) であってもよい。

【 0 0 5 2 】

本発明のタンパク性結合分子を公知の医薬品と共に共投与してもよく、ある事例におい

10

20

30

40

50

てはタンパク性結合分子自体を修飾してもよい。例えば、タンパク性結合分子を抗毒素又は放射性同位元素に結合させて有効性をさらに高めることができる。

【0053】

ターゲット分子が望ましくなく発現され又はみられる様々な状況における治療的又は診断的ツールの1つとしてタンパク性結合分子を用いることができる。任意の疾病又は疾患を治療するために、本発明の使用のための医薬品組成物を、1以上の生理的に許容可能な担体又は賦形剤を用いて従来の方法で調剤してもよい。本発明のタンパク性結合分子を任意の適切な手段で投与することができ、その手段は治療する疾患の種類に応じて変わり得る。可能な投与経路には、非経口投与（例えば、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は、皮下）、肺内投与及び鼻腔内投与、及び、局所的免疫抑制療法において必要であれば、病巣内投与が含まれる。さらに、例えば用量を減らしたタンパク性結合分子と共に、本発明のタンパク性結合分子をパルス注入によって投与してもよい。投与が短期的であるか又は長期的であるかに応じて、好ましくは注射によって、最も好ましくは静脈内注射又は皮下注射によって投薬する。投与量は、臨床症状、患者の体重、その他の医薬品を投与するか否かなどの様々な要因に依存するであろう。当業者は、治療する疾患又は病状に応じて投与経路が変わることを理解するであろう。

10

【0054】

本発明のタンパク性結合分子の治療的有効量の決定は、大部分において、特定の患者の特性、投与経路及び治療する疾患の性質に依存するであろう。一般的なガイダンスは、例えば、ハーモナイゼーション国際会議の出版物及びRemington's Pharmaceutical Sciences, 第27章及び28章, 第484-528頁(18th ed., Alfonso R. Gennaro, Ed., Easton, Pa.: Mack Pub. Co., 1990)においてみることができる。特に、治療的有効量の決定は、医薬品の毒性及び効能のような要因に依存するであろう。当業界で周知の方法及び先行文献にみられる方法を用いて毒性を決定してもよい。効能を同じガイダンスを用いて決定してもよい。

20

【0055】

本発明は、対象又はサンプル内のターゲット分子を検出する方法であって、前記対象又はサンプルを、本発明のタンパク性結合分子に接触させるステップを具える方法をさらに提供する。

30

【0056】

本発明は、対象の疾病又は疾患を診断する方法であって、前記対象又はサンプルを、本発明のタンパク性結合分子に接触させるステップを具える方法をさらに提供する。

【0057】

本発明は、本発明のタンパク性結合分子の、医薬品製造のための使用をさらに提供する。

【0058】

本発明は、疾病又は疾患の治療のための本発明のタンパク性結合分子をさらに提供する。

【0059】

本発明は、本発明のタンパク性結合分子の、疾病又は疾患の診断のための使用をさらに提供する。

40

【0060】

本発明は、本発明のタンパク性結合分子の、ターゲット分子の検出のための使用をさらに提供する。

【0061】

ある実施形態においては、タンパク性結合分子が抗体などの免疫グロブリンである。そのようなケースにおいて、本発明の核酸分子をトランスフェクトされた細胞系は、2つの異なる可変重鎖(VH)：ターゲット分子に結合する可変ドメインの一部であるVH鎖(以下、「VH-targ」とする。)；及び、精製タグを具える可変ドメインの一部であ

50

るVH鎖(以下、「VH-puri」とする。代替的に、このVH鎖は不活性であってもよい。)を生産する。1種のみの変軽鎖(VL)が作られる。これは3つの異なる免疫グロブリン種の生産をもたらす。

- 種Aは、タイプVH-targの2つの変重鎖(VH)を具える。

- 種Bは、タイプVH-targの1つの変重鎖(VH)と、タイプVH-puriの1つの変重鎖(VH)とを具える。

- 種Cは、タイプVH-puriの2つの変重鎖(VH)を具える。

すべての免疫グロブリン種は、2つの同じ変軽鎖(VL)を具える。

【0062】

上述した免疫グロブリン種Aは、精製タグを具えていない。種Bは、1個の精製タグを具えており、種Cは、2個の精製タグを具えている。種Bは、本発明による望ましい特性、すなわち、ターゲット分子の一価結合を有する種である。

【0063】

種B及び種Cはいずれも、精製タグに対する親和性を有する部分によって、例えば精製タグがヒスチジンタグであればNi-NTAによって、精製することができる。免疫グロブリン種Cの親和性は、第2精製タグの存在によって種Bよりもはるかに強いので、これらの種は、適切な精製ステップによって簡便に分離することができる。可能な精製技術には、カラムクロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーが含まれる。様々な方法によって溶出を実行することができる。好ましくは、勾配を適用する。それぞれの技術は当業者に知られている。ヒスチジンタグを用いれば、イミダゾール勾配によって最も容易に溶出させることができる。そのプロセスを図1に示す。より結合力が強いため、種Cはカラムとのより強い親和性を有しており、従って、クロマトグラフィーカラムから前記種を回収するためにイミダゾールを含む溶液などのより高濃度の溶液が必要であろう。この技術(すなわち、溶出用高濃度イミダゾール)によって、種Bを種Cから簡便に分離することができる。

【0064】

従って、本発明は、本発明のタンパク性結合分子を精製する方法であって、(a)本発明のタンパク性結合分子を含む溶液を提供するステップと、(b)ステップ(a)の溶液を、前記タンパク性結合分子の精製タグに対して親和性を有する部分に接触させるステップと、(c)タンパク性結合分子を前記部分に結合させるステップと、(d)前記部分に結合しない溶液成分のすべて又は実質的すべてを除去するステップと、(e)前記部分からタンパク性結合分子を回収するステップとを具える方法を提供する。

【0065】

本発明のタンパク性結合分子を含む溶液は、好ましくは前記タンパク性結合分子を発現する細胞の培養液上清である。代替的に、本発明のタンパク性結合分子を含む他の溶液を用いてもよい。

【0066】

本発明のタンパク性結合分子を含む溶液は、2個の精製タグを具えるタンパク性結合分子をさらに具えてもよい。

【0067】

好ましくは、本発明のタンパク性結合分子は、勾配、好ましくはイミダゾール勾配によって、2個の精製タグを具えるタンパク性結合分子を含む溶液から分離される。

【0068】

ある実施形態において、本発明は、少なくとも2個の変ドメインを具える第1タンパク性結合分子であって、一方の変ドメインがターゲット分子に結合しており、他方の変ドメインが精製タグを具えている第1タンパク性結合分子を、2個の精製タグを具える第2タンパク性結合分子から分離する方法であって、(a)第1タンパク性結合分子と第2タンパク性結合分子とを含む溶液を提供するステップと、(b)ステップ(a)の溶液を、前記タンパク性結合分子の精製タグに対する親和性を有する部分に接触させるステップと、(c)前記タンパク性結合分子を前記部分に結合させるステップと、(d)前記部

10

20

30

40

50

分に結合しない溶液成分のすべて又は実質的すべてを除去するステップと、(e)前記第2タンパク性結合分子から第1タンパク性結合分子を分離する方法で、前記部分から前記タンパク性結合分子を回収するステップと、を具える方法を提供する。好ましい実施形態において、ステップ(e)は、精製タグに対する親和性を有する部分からタンパク性結合分子を回収するために勾配を適用するステップを具える。精製タグがヒスチジンタグであれば、イミダゾール勾配が好ましい。

【0069】

ある実施形態において、本発明は、少なくとも2個の変域ドメインを具える免疫グロブリン又はその機能性断片であって、1個の変域ドメインがターゲット分子に結合し、少なくとも1個の別の可変ドメインが精製タグを具えており、前記精製タグが前記別の可変ドメインのCDR領域に具えられている免疫グロブリン又はその機能性断片を提供する。最も好ましい前記免疫グロブリンは、完全長の免疫グロブリンである。

10

【0070】

ある実施形態において、本発明は、少なくとも2個の変域ドメインを具えるタンパク性結合分子であって、1個の変域ドメインがターゲット分子に結合し、少なくとも1個の別の可変ドメインが精製タグを具えているか又は不活性であるタンパク性結合分子を提供する。ある実施形態において、前記タンパク性結合分子は、2個の変域ドメインを具えていてもよい。ある実施形態において、精製タグを具える可変ドメインは、ターゲット分子に結合しない。ある実施形態において、精製タグは、ヒスチジンタグ、Streptタグ、mycタグ、Flagタグ、V5タグ及びこれらと実質的に同一の変異体から選択される。ある実施形態において、精製タグは、ヒスチジンタグ又はこれと実質的に同一の変異体である。ある実施形態において、ヒスチジンタグは、ヘキサヒスチジンペプチドである。ある実施形態においては、タンパク性結合分子が免疫グロブリン又はその機能性断片である。ある実施形態においては、免疫グロブリンが抗体である。ある実施形態において、抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体である。ある実施形態においては、抗体がヒト抗体である。ある実施形態においては、ヒト抗体がIgGクラスである。ある実施形態において、ヒト抗体は、IgG1サブクラス、IgG2サブクラス、IgG3サブクラス及びIgG4サブクラスのいずれかである。ある実施形態において、ヒト抗体は、IgG1サブクラスである。ある実施形態において、前記可変ドメインは、それぞれ、可変重鎖(VH)と可変軽鎖(VL)とを具える。ある実施形態においては、可変重鎖(VH)が3つの相補性決定領域(H-CDR)を具える。ある実施形態においては、可変軽鎖(VL)が3つの相補性決定領域(L-CDR)を具える。ある実施形態において、精製タグは、可変重鎖(VH)又は可変軽鎖(VL)に含まれている。ある実施形態においては、精製タグが可変重鎖(VH)に含まれている。ある実施形態においては、精製タグが、可変重鎖(VH)の3つの相補性決定領域(H-CDR)のいずれか1つに含まれている。その他の実施形態においては、精製タグが、可変重鎖(VH)の3つの相補性決定領域(H-CDR)の1つ以上に含まれている。ある実施形態においては、精製タグがH-CDR3又はH-CDR2に含まれている。ある実施形態においては、精製タグがH-CDR3に含まれている。ある実施形態においては、精製タグが可変軽鎖(VL)に含まれている。ある実施形態においては、精製タグが、可変軽鎖(VL)の3つの相補性決定領域(L-CDR)のいずれか1つに含まれている。他の実施形態においては、精製タグが、可変軽鎖(VL)の3つの相補性決定領域(L-CDR)の1つ以上に含まれている。ある実施形態においては、精製タグがL-CDR2に含まれている。

20

30

40

【0071】

ある実施形態において、本発明は、列挙されている上記タンパク性結合分子を含む、本発明のタンパク性結合分子をコードする核酸配列を提供する。ある実施形態において、これらの核酸配列は、精製タグを具える可変ドメインをコードする。ある実施形態において、可変ドメインは、免疫グロブリン又はその機能性断片に含まれている。ある実施形態において、これらの核酸配列の可変ドメインは、前記免疫グロブリンの可変重鎖(VH)又は可変軽鎖(VL)に含まれている。ある実施形態において、これらの核酸配列の可変ド

50

メインは、前記免疫グロブリンの可変重鎖（VH）に含まれている。ある実施形態において、これらの核酸配列の可変ドメインは、前記可変重鎖（VH）のH - CDR3に含まれている。

【0072】

ある実施形態において、本発明は、上記核酸配列を具えるベクターを提供する。

【0073】

ある実施形態において、本発明は、上記ベクターを含む、本発明のベクターを具える細胞を提供する。ある実施形態においては、この細胞が哺乳動物細胞である。ある実施形態において、この細胞は、単離された細胞である。

【0074】

ある実施形態において、本発明は、上記タンパク性結合分子と、該タンパク用の薬学的に許容可能な担体又は賦形剤と具える医薬品組成物を提供する。

【0075】

ある実施形態において、本発明は、疾病又は疾患を治療する方法であって、必要性のある対象に上記医薬品組成物を含む本発明の医薬品組成物を治療的有効量で投与するステップを具える方法を提供する。ある実施形態において、疾病又は疾患は、ターゲット分子の望ましくない存在を伴うものである。

【0076】

ある実施形態において、本発明は、対象又はサンプル中のターゲット分子を検出する方法であって、前記対象又はサンプルを上記タンパク性結合分子に接触させるステップを具える方法を提供する。

【0077】

ある実施形態において、本発明は、対象の疾病又は疾患を診断する方法であって、前記対象又はサンプルを上記タンパク性結合分子に接触させるステップを具える方法を提供する。

【0078】

ある実施形態において、本発明は、上記タンパク性結合分子の医薬品製造のための使用を提供する。

【0079】

ある実施形態において、本発明は、疾病又は疾患の治療のための上記タンパク性結合分子を提供する。

【0080】

ある実施形態において、本発明は、上記タンパク性結合分子の疾病又は疾患の診断のための使用を提供する。

【0081】

ある実施形態において、本発明は、ターゲット分子を検出するための、上記タンパク性結合分子の使用を提供する。

【0082】

ある実施形態において、本発明は、上記タンパク性結合分子を精製する方法であって、（a）タンパク性結合分子を含む溶液を提供するステップと、（b）ステップ（a）の溶液を精製タグに対する親和性を有する部分に接触させるステップと、（c）前記タンパク性結合分子を前記部分に結合させるステップと、（d）前記部分に結合しない溶液成分のすべて又は実質的にすべてを除去するステップと、（e）前記部分からタンパク性結合分子を回収するステップと、を具える方法を提供する。ある実施形態においては、溶液が、2個の精製タグを具えるタンパク性結合分子をさらに含んでいる。ある実施形態においては、2個の精製タグを具えるタンパク性結合分子から、1個の精製タグを具えるタンパク性結合分子を勾配によって分離する。ある実施形態においては、勾配がイミダゾール勾配である。

【0083】

実施例

10

20

30

40

50

実施例 1 : H - CDR3 領域に精製タグを含む F a b 断片の生成

MOR03207__FS は、ニワトリ卵白リゾチームに対する特異性を有する F a b である。MOR03207__FS は、VH 鎖の C 末端、すなわち、可変ドメインの外に、F l a g タグと S t r e p タグとを具える。適切なプライマー設計及び従来のクローニング技術によって、ヘキサヒスチジンタグは、H - CDR3 配列：G Y S G H H H H H S G D Y をコードする p M x 9 __MOR08428 を作るコード発現ベクターである p M x 9 __MOR03207__FS (R a u c h e n b e r g e r e t a l , 2 0 0 3) の可変重鎖の H - CDR3 に導入される。MOR08428 は、VH 鎖の C 末端に F l a g タグと S t r e p タグ (F S) とを具える。

【0084】

試験精製によって、MOR03207__FS 及び MOR08428__FS の両方を S t r e p タグによって精製することができることが確かめられた。しかしながら、ヘキサヒスチジンタグを自由に入手でき、それによって親和性クロマトグラフィーの目的に利用することができることを確認して、代替的に固定化金属親和性クロマトグラフィー (I M A C) によって MOR08428__FS を精製することができる。最後に、E L I S A による試験によって、MOR03207__FS がニワトリ卵白リゾチームに結合することができ、MOR08428__FS は結合できないことが確認され、H - CDR3 にヘキサヒスチジンタグを導入することによってオリジナルの F a b 断片の特異性が破壊されたことが示された (図 2) 。

【0085】

次いで、MOR08428__FS の VH を、クローニングによって MOR03080 の VL と結合させた。MOR03080 は、ヒト CD38 に対する特異性を有する F a b である。得られる構築物は、MOR08441__FS と呼ばれ、従って MOR08428 の VH と MOR03080 の VL とを含んでいる。

【0086】

F A C S 分析 (図 3) 及び E L I S A 試験 (図 2) によって、MOR03080 はヒト CD38 に結合できるが、MOR08428 及び MOR08441 はヒト CD38 に結合できないことを確認した。同様に、MOR03207__FS はニワトリ卵白リゾチームに結合することができるが、MOR08428 及び MOR08441 はニワトリ卵白リゾチームに結合できないことが確認された。最後に、MOR08428__FS を N i - N T A クロマトグラフィーによって精製できることは、H - CDR3 に組み込まれた 6 H i s 配列が親和性カムマトリクスに近接可能であることを示している。

【0087】

要約すると、ヒト F a b 断片の H - CDR3 中へのヘキサヒスチジンタグの導入などの、タンパク性結合分子の可変ドメイン中へのヘキサヒスチジンタグなどの精製タグの導入によって、(a) 各親和性樹脂への結合によって容易に精製することができ、かつ、(b) 可変重鎖 (V H) 及び可変軽鎖 (V L) が由来したオリジナルの親バインダのターゲット分子にもはや結合できない F a b を生成することが可能であることが証明されている。

【0088】

実施例 2 : H - CDR3 領域中に精製タグを含む完全長 I g G の生成

この実施例に記載されているように、本発明の一価免疫グロブリンを生成することができる。代替的に、別の技術を使用してもよい。例えば、所望の免疫グロブリン重鎖の好ましい対合を可能にするいくつかの実験技術が存在する。例えば、組み換えたジスルフィド結合及び「k n o b i n t o h o l e s 」突然変異 (M e r c h a n t e t a l , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y (1 9 9 8) 1 6 , 6 7 7) を用いた技術によって二重特異性 I g G を生成することができ、所望の重鎖の効率的な対合を可能にする。当業界で知られているその他の関連技術を同様に使用してもよい。

【0089】

下記において実施例 1 の F a b 断片を I g G 1 型に変換する。従って、各構築物を適切なベクターにクローニングする。

10

20

30

40

50

【0090】

不変ヒトガンマ1定常領域を有するベクターであるpMorph2__huIgG1中にMOR08428及びMOR03080の可変重鎖をクローニングすることによってpMorph2__h__IgG1__MOR08428ベクター及びpMorph2__h__IgG1__MOR03080ベクターをそれぞれ生成した。不変ヒトラムダ軽鎖を有するベクターであるpMorph2__h__Ig__ラムダ2中にMOR03080の可変軽鎖をクローニングすることによってベクターpMorph2__h__Ig__ラムダ2__MOR03080を作成した。3つの構築物のすべてをHKB11(ATCC番号:CRL-12568;Chonet al. J Biomed Sci. (2002):631-8)などのヒト細胞系中に共トランスフェクトして発現させる。細胞培養上澄みはさらなる試験に用いられる。標準的なプロテインA親和性クロマトグラフィーによって細胞培養上澄みを予め精製した。

10

【0091】

トランスフェクトされた細胞系において2つの異なる重鎖と1つの軽鎖とが作られるので、全部で3つの異なる免疫グロブリン種が生産される。1つの種は、MOR03080の2つの重鎖を含む。この免疫グロブリン種は、ヘキサヒスチジntagを含んでおらず、従って、Ni-NTAに対しては親和性がないが、CD38に対しては一価ではなく二価の特異性を有する。第2の免疫グロブリン種は、MOR03080の1つの重鎖とMOR08428の1つの重鎖とを含む。この免疫グロブリン種は、本発明における望ましい特性を有する種である。この免疫グロブリン種は、1つのMOR08428重鎖のH-CDR3中のヘキサヒスチジntagによって、Ni-NTAに対する親和性を有している。最後に、第3の免疫グロブリン種は、MOR08428の2つの重鎖を含む。この種は、ターゲット分子(このケースにおいてはヒトCD38)に対する親和性を有していない。しかしながら、この種は、免疫グロブリンの両方のアームにヘキサヒスチジntagを含んでおり、従って、IMACカラム(例えばNi-NTA(Qiagen)又はヒスバインドフラクトゲル(Merck))の樹脂に対して二価の結合を示し、従って樹脂に対してより高い親和性を有する。この免疫グロブリン種の樹脂に対する親和性は、望ましい第2の免疫グロブリン種の一価の親和性よりもはるかに強いので、例えば、イミダゾール勾配などの親和性クロマトグラフィーによってこの免疫グロブリン種を簡便に分離することができる。この溶出プロセスを図1に示す。

20

30

【0092】

このプロテインAで精製したIgG1分子の混合物をIMAC精製に供した。Akta-FPLCシステムを用い、予備精製したIgG1混合物をヒスバインドフラクトゲル(Merck#70693-3)カラムに装填した。1ml/分の流速で1mlの画分を得た。

【0093】

20mMのNaリン酸(pH7.4)/500mMのNaCl/10mMのイミダゾールを泳動バッファとして用いた。泳動バッファに250mMのイミダゾールを加えたものを溶出バッファとして用い、溶出バッファの勾配:0~100%を適用した。代表的な画分を還元分析的SDS PAGEにロードした(図4)。予想したように、約30KDに単一の軽鎖バンドがみられた。対照的に、2本の別々の重鎖バンドを区別することができた(いずれも約50KD)。カラム流出液中に下のバンドが観察され、一方で、イミダゾールを用いた溶出時には上のバンドのみが確認された。高濃度のイミダゾール(すなわち、後の画分)では、上の重鎖バンドだけが溶出された。下の重鎖バンドがMOR03080の重鎖を示しており、一方で、上のバンドがヘキサヒスチジntagを有するMOR08428の重鎖を示していることが結論付けられる。

40

【0094】

従って、ヘキサヒスチジンでタグされたIgG種によって、タグされていない(二価の)MOR03080IgG1を容易に分離することができる。更に、イミダゾール勾配による溶出は、1個のヘキサヒスチジンでタグされたIgG1種と2個のヘキサヒスチジン

50

でタグされた I g G 1 種とのさらなる分離を可能にした。

【 0 0 9 5 】

実施例 3 : 分離した I g G 1 種の機能分析

画分 # 3 0 - 5 8 及び画分 # 7 0 - 9 0 を貯留した (図 4 を参照) 。これらの貯留した画分のバッファー及びカラム流出液を透析によって P B S に交換した。これらのサンプルのタンパク濃度を A 2 8 0 n m 測定によって決定した。これらの3つのサンプルを還元条件下の S D S - P A G E で分析した (図 5) 。 M O R 0 3 0 8 0 の重鎖は、 M O R 0 8 4 2 8 の重鎖よりも見掛けの分子量が小さかった。流出液サンプルは M O R 0 3 0 8 0 の重鎖だけを含んでいたが、一方で、画分 # 7 0 - 9 0 の貯留サンプルは、主として M O R 0 8 4 2 8 の重鎖を含んでいた。対照的に、 # 3 0 - 5 8 の貯留サンプルは、およそ 1 : 1 の比率で両方の重鎖を含んでいた。これらのデータは、1つのヘキサヒスチジンでタグされた一価の I g G 1 及びヘキサヒスチジンで二重にタグされた I g G 1 から、溶出のためにイミダゾール勾配を適用して親和性クロマトグラフィーを用いることによって、二価の I g G 1 が分離されたことを示している。

【 0 0 9 6 】

F A C S における E C ₅₀ の決定

これらの I g G 1 画分の結合特性を明らかにするために、 C D 3 8 を発現する R P M I 8 2 2 6 細胞を用いて F A C S E C ₅₀ 試験を行った。この目的のために、規定の濃度 (2 5 0 n M ~ 0 . 2 4 p M) の I g G を一次抗体として用いた。1ウェル当たり 5 0 μ l の 1 : 2 0 0 に希釈した P E が結合した第 2 抗体 (ヤギ抗ヒト I g G (F a b) ' ₂ 断片特異的 ; J I R L a b o r a t o r i e s # 1 0 9 - 1 1 6 - 0 9 7) を用いて検出を行った。非線形回帰曲線フィットモデル (S 字用量反応 ; 可変傾斜) を応用するプリズム 3 . 0 3 ソフトウェア (グラフパッドソフトウェア) を用いて E C ₅₀ 値を決定した。表 1 は、この F A C S 滴定試験で得られた E C ₅₀ 値を示している。

IgG	EC ₅₀ (nM)
MOR03080 IgG1	0.4
MOR03080 Fab	1.2
流出液	0.5
画分#30-58 IgG1	1.5
画分#70-90 IgG1	13.4
MOR08588 IgG1	結合なし
MOR03207 IgG1	結合なし

【 0 0 9 7 】

流出液 I g G 1 画分の E C ₅₀ 値が M O R 0 3 0 8 0 参照 I g G 1 と非常に近似していたことは、流出液が二価の C D 3 8 結合 I g G 1 に一致することを示している。対照的に、画分 # 3 0 - 5 8 は、 1 / 3 の E C ₅₀ (1 . 5 n M) を示し、 M O R 0 3 0 8 0 の一価の参照 F a b 断片と同じ範囲内であった。このことは、 I g G 1 画分 # 3 0 - 5 8 が、 C D 3 8 が結合する一価の I g G 1 からなっていたことを示している。基準 I g G 1、 M O R 0 8 5 8 8 は、もっぱら M O R 0 8 4 2 8 の可変重鎖 (V H) と M O R 0 3 0 8 0 の可変軽鎖 (V L) とからなっており、従って、予想したように、2個のヘキサヒスチジンでタグされており、 C D 3 8 には結合しない。高濃度のイミダゾールで溶出された画分 # 7 0 - 9 0 は、その E C ₅₀ が画分 # 3 0 - 5 8 の E C ₅₀ と比較して 1 0 分の 1 であることによって証明されるように、主として、2個のヘキサヒスチジンでタグされた I g G

1種からできている。残りの結合特性は、共溶出した1個のヘキサヒスチジンでタグされたIgG1種のサンプル不純物に起因する。

【0098】

プラズモン表面共鳴（バイアコア）による親和性測定

バイアコア3000装置（バイアコア、ウブサラ、スウェーデン）を用いて、共有結合で固定化されたヒトCD38-Fcに結合する各精製抗体の段階希釈を用いて反応速度定数 k_{on} 及び k_{off} を決定した。標準的なEDC-NHSカップリング手法で共有結合による抗原固定化を実行した。1.5~500nMの濃度の抗体を用いてPBS（pH7.2）中で20 μ l/分の流速で反応速度測定を行った。各濃度における注入時間は1分であり、次いで、3分の電離段階を行った。再生のために、5 μ lの10mMグリシンバッファー（pH1.5）を2回注入した。1:1の結合反応速度を想定して、BIA評価ソフトウェア3.2（バイアコア）を用いてすべてのセンサーグラムを合わせた。

【0099】

表2は、バイアコア試験から得たみかけの親和性値を示している。

抗体	R_{max}	見かけ		見かけ
		k_{on}	k_{off}	
MOR03080 IgG1	275	9.13E+04	2.60E-04	3
MOR03080 Fab	100	6.07E+04	1.64E-03	27
流出液	182	9.80E+04	2.84E-04	3
画分#30-58 IgG1	140	4.46E+04	1.39E-03	31
画分#70-90 IgG1	44	2.80E+04	1.38E-03	49
MOR08588 IgG1	-	-	-	結合なし

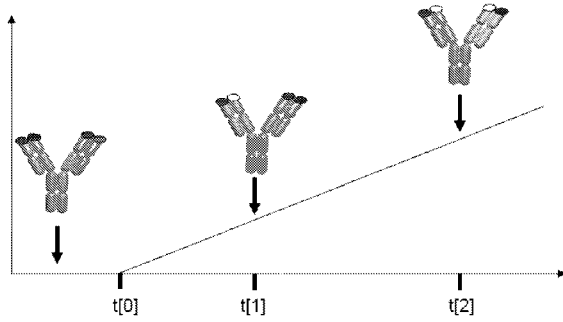
【0100】

流出液サンプルのみかけの K_D が精製したMOR03080IgG1に非常に近似していたことは、このサンプルが二価のIgG1からなっていることを示している。対照的に、#30-58の貯留サンプルは、MOR03080IgG1の10分の1であるMOR03080Fab断片に非常に近似したみかけの K_D を示した。この結果は、画分#30-58の貯留サンプルが、MOR03080Fab断片と同じ一価の結合特性を示すことを表している。MOR08588IgG1は、予想したように、CD38-Fcに対していかなる結合性も示さなかった。しかしながら、画分#70-90IgG1は、CD38-Fcに対する結合性を示した。高濃度のイミダゾールで溶出された画分#70-90は、主として、2個のヘキサヒスチジンでタグされたIgG1種からなっているようである。このことは、例えば画分#30-58よりも低い R_{max} によって説明される。これらのサンプルにおいてみられた k_{on} 及び k_{off} は、ほとんど、共溶出された1個のヘキサヒスチジンでタグされたIgG1種のサンプル不純物に起因している。

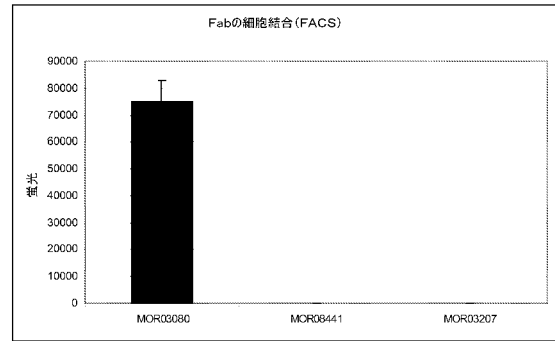
【0101】

要約すると、ターゲット分子に対して一価の親和性を有する完全長の免疫グロブリンが生産される。これらの分子は、容易に生産され、精製タグを用いてNi-NTAクロマトグラフィーによって精製され、それによって、そのような精製タグ有しない二価結合する免疫グロブリン分子から分離される。

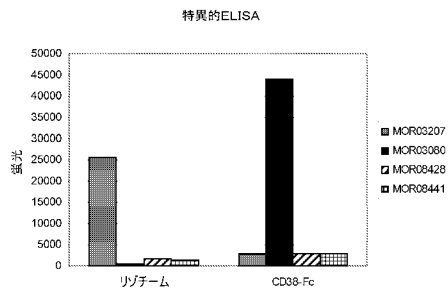
【 図 1 】



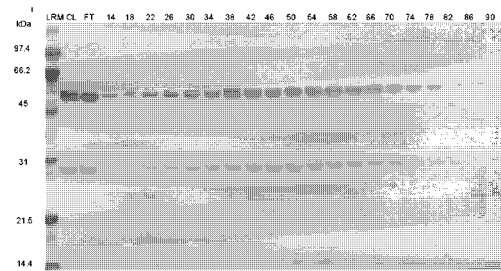
【 図 3 】



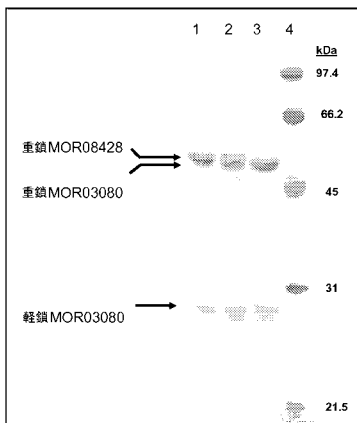
【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/EP2009/050656
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/435 C07K16/46		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched.		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BORTOLETTO NICOLA ET AL: "Optimizing anti-CD3 affinity for effective T cell targeting against tumor cells" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol. 32, no. 11, November 2002 (2002-11), pages 3102-3107, XP002436763 ISSN: 0014-2980	1-50
X	see the whole document; esp. p. 3106, 4.3 ----- -/--	29-37
<input checked="" 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 *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 April 2009		Date of mailing of the international search report 08/05/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Grosskopf, Ruediger

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2009/050656

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCHIWECK WOLFRAM ET AL: "Sequence analysis and bacterial production of the anti-c-myc antibody 9E10: The V-H domain has an extended CDR-H3 and exhibits unusual solubility" FEBS LETTERS, vol. 414, no. 1, 1997, pages 33-38, XP002477221 ISSN: 0014-5793	1-50
X	see the whole document; esp.p. 34, left col. 2.5; p. 37, left col. first para.	29-37
Y	MULLER K M ET AL: "A dimeric bispecific miniantibody combines two specificities with avidity" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 432, no. 1-2, 31 July 1998 (1998-07-31), pages 45-49, XP004259191 ISSN: 0014-5793 see e.g. Fig. 1	1-50
Y	PADIOLLEAU-LEFEVRE ET AL: "Expression and detection strategies for an scFv fragment retaining the same high affinity than Fab and whole antibody: Implications for therapeutic use in prion diseases" MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMSFORD, NY, US, vol. 44, no. 8, 1 December 2006 (2006-12-01), pages 1888-1896, XP005792725 ISSN: 0161-5890 see the whole document; esp. p. 1889, left col. 2.1	1-50
Y	LADNER ROBERT C ET AL: "Novel frameworks as a source of high-affinity ligands" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, vol. 12, no. 4, August 2001 (2001-08), pages 406-410, XP002524558 ISSN: 0958-1669 see esp. p. 408, last para - p. 409, sec. para.	1-50
Y	NUTTALL S D ET AL: "DESIGN AND EXPRESSION OF SOLUBLE CTLA-4 VARIABLE DOMAIN AS A SCAFFOLD FOR THE DISPLAY OF FUNCTIONAL POLYPEPTIDES" PROTEINS: STRUCTURE, FUNCTION AND GENETICS, JOHN WILEY & SONS, INC, US, vol. 36, no. 2, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 217-227, XP000866035 ISSN: 0887-3585 see the whole document	1-50

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/050656

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y.	<p>GOEL A ET AL: "Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - GENERAL SUBJECTS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 1523, no. 1, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 13-20, XP004276666 ISSN: 0304-4165 see the whole document; esp. abstract -----</p>	1-50
A	<p>TODOROVSKA ANETA ET AL: "Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 248, no. 1-2, 1 February 2001 (2001-02-01), pages 47-66, XP002288731 ISSN: 0022-1759 -----</p>	
A	<p>PLUECKTHUN A ET AL: "NEW PROTEIN ENGINEERING APPROACHES TO MULTIVALENT AND BISPECIFIC ANTIBODY FRAGMENTS" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 3, 1997, pages 83-105, XP002950976 ISSN: 1380-2933 -----</p>	

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 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
			G 0 1 N 33/53	Z

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

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA07 DA02 HA01 HA15
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA07 BA44 DA27 NA14 ZB072 ZB212 ZB262
 4C085 AA13 AA14 BB36 CC22 DD23 DD62 DD63 EE03
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA75 EA22 EA50 FA74

专利名称(译)	纯化标签或包含无活性可变结构域的蛋白质结合分子		
公开(公告)号	JP2011510617A	公开(公告)日	2011-04-07
申请号	JP2010542649	申请日	2009-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	莫佛塞斯公司		
申请(专利权)人(译)	Morufoshisu ARE游戏		
[标]发明人	シュタイドウルシュテファン		
发明人	シュタイドウル,シュテファン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/00 C12N5/10 C07K11/13 C07K16/46 A61K39/395 A61K38/00 A61P35/00 A61P29/00 A61P37/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61P29/00 C07K16/2896 C07K16/40 C07K2317/34 C07K2317/55 C07K2317/565		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/00 C12N5/00.102 C07K11/13 C07K16/46 A61K39/395.D A61K37/02 A61P35/00 A61P29/00 A61P37/02 A61K39/395.N G01N33/53.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/HA01 4B024/HA15 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA07 4C084/BA44 4C084/DA27 4C084/NA14 4C084/ZB072 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB36 4C085/CC22 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	Goichi高桥		
优先权	2008100707 2008-01-21 EP 61/022661 2008-01-22 US 61/046957 2008-04-22 US		
其他公开文献	JP5587792B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供具有至少两个可变结构域的蛋白质结合分子，特别是抗体。一个可变结构域与目标靶分子结合。至少一个其他可变结构域包含适用于纯化所述蛋白质结合分子的纯化标签。纯化标签能够方便地纯化具有针对靶分子的单价结合特性的蛋白质结合分子。

