

(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2018-506302

(P2018-506302A)

(43) 公表日 平成30年3月8日(2018.3.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 16/40 Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-558784 (P2017-558784)
 (86) (22) 出願日 平成28年2月2日 (2016.2.2)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年9月28日 (2017.9.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/052136
 (87) 国際公開番号 W02016/124568
 (87) 国際公開日 平成28年8月11日 (2016.8.11)
 (31) 優先権主張番号 15305160.2
 (32) 優先日 平成27年2月3日 (2015.2.3)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591100596
 アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ
 サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
 ディカル
 フランス国、エフー75013 パリ、リ
 ユ・ドゥ・トルビアック 101
 (71) 出願人 510139564
 ユニヴェルシテ ポール サバティエ ト
 ウールーズ トロワ
 フランス共和国 エフー31062 トウ
 ールーズ セデックス 9, ルート ド
 ウ ナルボンヌ 118

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗RHO GTPASEコンホーメーションシングルドメイン抗体及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、活性型に特異的な抗Rho GTPaseコンホーメーションシングルドメイン抗体、ならびに特に、治療及び診断分野におけるその使用に関する。特に、本発明は、CDR1-IMGT、CDR2-IMGT、及びCDR3-IMGTのアミノ酸配列が、表Bで定義されたシングルドメイン抗体(hs2dAb)H12、B6、4P75、4SP1、4SNP36、4SNP61、5SP10、5SP11、5SP58、5SNP47、5SNP48、5SNP65、B20、B15、B5、B71、E3、A6、G12、NB61、212B、111B、又は404FのCDR1-IMGT、CDR2-IMGT、及びCDR3-IMGTのアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する、シングルドメイン抗体に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CDR1 - IMGT、CDR2 - IMGT、及び CDR3 - IMGT のアミノ酸配列が、表 B で定義されたシングルドメイン抗体 (hs2dAb) H12、B6、4P75、4SP1、4SNP36、4SNP61、5SP10、5SP11、5SP58、5SNP47、5SNP48、5SNP65、B20、B15、B5、B71、E3、A6、G12、NB61、212B、111B、又は 404F の CDR1 - IMGT、CDR2 - IMGT、及び CDR3 - IMGT のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する、
シングルドメイン抗体。

10

【請求項 2】

シングルドメイン抗体 (hs2dAb) H12、B6、4P75、4SP1、4SNP36、4SNP61、5SP10、5SP11、5SP58、5SNP47、5SNP48、5SNP65、B20、B15、B5、B71、E3、A6、G12、NB61、212B、111B、又は 404F の CDR1 - IMGT、CDR2 - IMGT、及び CDR3 - IMGT を含む、請求項 1 記載のシングルドメイン抗体。

【請求項 3】

配列番号：1 に対して少なくとも 90% の同一性を有するフレームワーク領域 FR1 を含む、請求項 1 記載のシングルドメイン抗体。

【請求項 4】

配列番号：2 に対して少なくとも 90% の同一性を有するフレームワーク領域 FR2 を含む、請求項 1 記載のシングルドメイン抗体。

20

【請求項 5】

配列番号：3 に対して少なくとも 90% の同一性を有するフレームワーク領域 FR3 を含む、請求項 1 記載のシングルドメイン抗体。

【請求項 6】

配列番号：4 に対して少なくとも 90% の同一性を有するフレームワーク領域 FR4 を含む、請求項 1 記載のシングルドメイン抗体。

【請求項 7】

配列番号：62 ~ 80 及び配列番号：93 ~ 96 で表わされるアミノ酸配列に対して少なくとも 70% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 記載のシングルドメイン抗体。

30

【請求項 8】

配列番号：62 ~ 80 及び配列番号：93 ~ 96 で表わされるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 記載のシングルドメイン抗体。

【請求項 9】

異種ポリペプチドに融合して、融合タンパク質を形成している、請求項 1 記載のシングルドメイン抗体。

【請求項 10】

免疫グロブリンドメイン、シグナルドメイン抗体、キャリアポリペプチド、蛍光ポリペプチド、酵素、融合タンパク質の精製もしくは単離を容易にするポリペプチド、細胞透過性ペプチド、又はユビキチンリガーゼドメインに融合している、請求項 1 記載のシングルドメイン抗体。

40

【請求項 11】

F ボックドメインに融合している、請求項 1 記載のシングルドメイン抗体。

【請求項 12】

請求項 1 記載のシングルドメイン抗体をコードする、核酸分子。

【請求項 13】

請求項 1 2 記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 14】

50

請求項 1 2 記載の核酸分子によりトランスフォーメーションされている、宿主細胞。

【請求項 1 5】

少なくとも 1 つの活性型 R h o G T P a s e の存在を検出する方法であって、

i) 対象からサンプルを得る工程と、

i i) *in vitro*において、サンプルを請求項 1 記載のシングルドメイン抗体と接触させる工程と、

i i i) 前記シングルドメイン抗体の前記サンプルへの結合を検出する工程と、

i v) 工程 (i i i) で検出された結合を標準と比較する工程とを含み、

前記サンプルに対する結合の差が、活性型 R h o G T P a s e の存在を示す、方法。

10

【請求項 1 6】

医薬として使用するための、請求項 1 記載のシングルドメイン抗体又は請求項 1 2 記載の核酸分子。

【請求項 1 7】

ガンの処置を必要とする対象において、ガンを処置するための方法であって、治療的に有効量の、請求項 1 記載のシングルドメイン抗体又は請求項 1 2 記載の核酸分子を、対象に投与することを含む、

方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

[発明の分野]

本発明は、抗 R h o G T P a s e コンホーメーションシングルドメイン抗体、ならびに特に、治療及び診断分野におけるその使用に関する。

【0002】

[発明の背景]

R h o G T P a s e は、アンドラッグプルタンパク質と主に考えられている R a s に相同な 20 個の低分子量 G T P a s e のファミリーに属する。その生理活性は、そのグアニンヌクレオチド三リン酸ヒドラーゼの非常に遅い触媒活性よりも、スイッチ I とスイッチ I I との高度に保存されたドメインのコンホーメーション変化にある。したがって、低分子量 G タンパク質は、不活性な G D P 結合状態と活性な G T P 結合コンホーメーションとの間をサイクルする分子スイッチである。R h o サブファミリーは、85% 超の配列同一性を共有する R h o A、R h o B、及び R h o C を含み、広い範囲の主な細胞プロセスに関与する多面的なタンパク質である。同細胞プロセスには、アクトミオシン細胞骨格の制御、細胞接着、細胞質分裂、細胞遊走、ストレス応答、及び細胞生存又はアポトーシスが含まれる。これらの G T P a s e は、細胞膜へのそのアンカーに必須であるカルボキシ末端イソプレノイド基の付加により、翻訳後に修飾される。この場合、G T P a s e は、グアニンヌクレオチド交換因子 (G E F) により触媒されるヌクレオチド交換による種々の刺激に基づいて活性化することができる。ついで、活性化工程は、G T P a s e 活性化タンパク質 (G A P) により向上される G T P 加水分解によりつり合わせられる。したがって、活性型 R h o の細胞プールは、細胞膜において、限られたプールに維持される。主な画分は、膜から抽出され、グアニンヌクレオチド解離阻害剤 (G D I) により、細胞質中に捕捉される。これらの大型のタンパク質は、そのアミノ末端部分により、R h o のスイッチドメインと相互作用するため、G D P の放出を妨害し、そのカルボキシ末端部によっても、イソプレニル基に対して、R h o タンパク質の可溶性を維持するが、膜から締め出すために、この疎水性部分を遮断する。

30

40

【0003】

これらのレギュレーターは共に、エフェクタータンパク質と相互作用して、細胞伝達経路を開始するであろう、非常に小さな集団を素早く活性化させるために、細胞中で不活性な R h o タンパク質の最も大きな画分、多くの場合、95% 程度を維持している。さらに

50

、3つのGDIと全ての相互作用しているRhoとの間のクロストークの研究から、ある1つのRhoの過剰発現が、他のRhoの移動及び分解を人工的に誘導することができ、導入遺伝子により直接制御されていないシグナル伝達経路を損なわせることができることが証明された。この重要な点により、選択的な方法において、個々のRhoをターゲットとする複雑性が強調される。

【0004】

独特なRhoBは、その最も近いホモログであるRhoA及びRhoCとは異なる細胞機能及びレギュレーションに関与していると考えられる。RhoBは、パルミトイル化することができ、ファルネシル化又はゲラニルゲラニル化のいずれかを行うことができる。プレニル化は、細胞膜又はエンドソームそれぞれへの局在を画定する。細胞内輸送及び接着における一部の主なRhoBの機能は、従来分子ツール、例えば、野生型もしくは変異型の過剰発現又はRNA干渉による遺伝子ノックダウンを使用して特徴決定されてきた。他の機能は、サイトカイン又は成長因子及びDNA損傷剤又は放射線に対する最初期応答としての、RhoB遺伝子発現に関連付けられてきた。加えて、RhoBは、ガンの進行において、矛盾する役割を果たす。RhoBは、腫瘍形成を変化させることができ、多くの場合、頭部及び頸部又は肺のガンにおいてダウンレギュレーションされる。

10

【0005】

それにも関わらず、RhoBは、腫瘍の血管新生を促進し、ゲノム不安定性を有する細胞におけるアポトーシスを防止する。現在では、RhoBが細胞及び環境依存性の多面的な機能を発揮するという明確な証拠が存在している。以前の研究では、RhoBは、マウスにおける、過剰発現、RNAi、又は遺伝子ノックアウトによる遺伝子レベルでターゲットにされた。しかしながら、これらの方法では、細胞中の全てのRhoB活性をノックダウンさせる全体的な方法において、RhoBの機能を変化させてしまい、GDI-Rho相互作用における不均衡を誘導する場合があるGDP結合の主な画分と、より少ないGTP結合活性プールとの両方の大部分を変化させてしまった。他のRho活性と干渉せずにRhoB機能を解明するために、タンパク質レベルで、RhoBをターゲットにする必要があるであろう。Rho GTPaseをターゲットにする小分子阻害剤は存在しないが、*Claustidium butulinum*又は*Bacillus cereus*からのC3細胞外酵素は、RhoのADPリボシル化を誘導し、GEFによるその活性化を妨害し、遊離RhoのGDIへの結合を更に増大させる、天然の阻害剤である。実際に、真核生物細胞におけるC3遺伝子の発現又は細胞透過性tat-C3とのインキュベーションが、3つ全てのRhoの機能を全体的に変化させるのにうまく使用されてきた。これにより、アクチン繊維を失い、細胞が丸まった、強力な表現型がもたらされた。複数の他の細菌トキシンも、Rhoタンパク質をターゲットにしている。それにも関わらず、これら全てのトキシンは、特異性を欠いている。RhoA、RhoB、又はRhoC間を区別せず、大部分は、活性型Rhoを直接ブロックしないためである。

20

30

【0006】

幾つかの以前の研究では、活性なGTP結合状態のRhoタンパク質に選択的な結合分子を特定するために、ファージディスプレイライブラリからのリコンビナント一本鎖抗体の選択が確立された。実際に、大きなディスプレイライブラリから選択されたリコンビナント抗体が、多くのバイオテクノロジー的又は生物医学的用途に使用されてきた。大部分のリコンビナント抗体は、安定性のために、VH又はVL可変ドメイン内に、標準的なジスルフィド結合を必要とするが、一部の特有な細胞内抗体(細胞内抗体(*intrabody*))と呼ばれる)は、還元環境において安定な状態にある。このため、抗体フォーマット、足場特性、及びライブラリの多様性に依りて、幾つかの稀なりコンビナント抗体は機能性であるが、真核生物細胞の細胞質ゾル中で発現されることが報告されている(Tanaka, T., Williams, R. L. & Rabbitts, T. H. Tumour prevention by a single antibody domain targeting the interaction of signal transduction proteins with RAS. *EMBO J* 26, 3250-3259, doi:7601744 [pii] 10.1038/sj.emboj.7601744 (2007); Nizak, C. et al. Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Sci*

40

50

ence 300,984-987, doi:10.1126/science.1083911 (2003). ; Meli, G., Visintin, M., Cannistraci, I. & Cattaneo, A. Direct in vivo intracellular selection of conformation-sensitive antibody domains targeting Alzheimer's amyloid-beta oligomers. *J Mol Biol* 387, 584-606, doi:10.1016/j.jmb.2009.01.061 (2009))。最初の活性型 Rho コンホーメーション一本鎖可変フラグメント (scFv)、いわゆる、scFvC1は、in vitroでの生化学アッセイ法において、GTP結合状態の3つ全てのRhoを認識した (Goffinet, M. et al. Identification of a GTP-bound Rho specific scFv molecular sensor by phage display selection. *BMC Biotechnol* 8, 34, doi:1472-6750-8-34 [pii] 10.1186/1472-6750-8-34 (2008))。scFvC1の分子進化により、scFvC1より高い親和性のpan活性なRhoバインダーであるscFvF7、及び、活性なRhoBを優先的に認識するが、細胞内抗体として機能的ではないscFvE3の特定がもたらされた。

10

【発明の概要】

【0007】

本発明は、活性型に特異的な抗Rho GTPaseコンホーメーションシングルドメイン抗体、ならびに特に、治療及び診断分野におけるその使用に関する。特に、本発明は、特許請求の範囲により定義される。

【0008】

[発明の詳細な説明]

本発明者らは、一般的には、camelidae由来のシングルドメインVHと呼ばれる、ヒト化ナノボディの完全な合成ライブラリを生成した。この新規なファージディスプレイライブラリは、安定性について最適化された固有のスキホルドに基づいており、非常に機能的な結合分子の系統的な選択が可能である。同分子は、ヒト合成シングルドメイン抗体 (hs2dAb) に相当する。このため、本発明者らは、特に、種々のターゲットに対して、複数の機能的な細胞内抗体を選択した。それらの中でも、活性なGTP結合状態のRhoタンパク質の1つのコンホーメーションセンサは、H12 hs2dAbと呼ばれるクローンである。H12 hs2dAbは、RhoサブファミリーメンバーRhoA、RhoB、及びRhoC間を区別せず、Rasのホモログである低分子量Gタンパク質に近いRac1ファミリーのメンバーにも結合するpanRhoバインダーであることが証明された。さらに、本発明者らは、より競合的な選択スキームを使用することにより、Rhoサブファミリーに対してより特異性を有する、すなわち、Rac1又は他の低分子量Gタンパク質を認識しない、複数の活性なRho選択的hs2dAb分子を単離した。これらのhs2dAbの一部は、Rhoの構成的に活性なリコンビナントL63変異体に対して、ナノモル濃度未満の親和性を有したことが証明された。これらの分子の細胞内発現により、アクチン細胞骨格の明確な再構築がもたらされる。このことから、これらの分子は、培養細胞におけるRhoシグナル伝達の強力な細胞内阻害剤として機能することが示唆される。ついで、本発明者らは、同じ戦略を、そのGTP結合状態にあるRhoBを特異的に認識するシングルドメイン抗体を選択するのに適用した。特に、本発明者らは、活性なRhoBタンパク質ノックダウンを誘導することができる、機能的な細胞内抗体の視覚的な細胞内スクリーニングを確立した。このタンパク質ノックダウンは、選択されたシングルドメイン抗体に遺伝的に融合されたFボックドメインの使用に基づいていた。同使用により、結合したターゲットのユビキチン化及びその後のプロテアーゼ依存性分解が誘導される。二重の困難性は、RhoBを最も近いホモログから生理学的に区別することができ、活性なGTP結合状態に選択的であることができる細胞内抗体を特定することであった。種々のRho変異体を発現する細胞株を使用して、本発明者らは、その活性状態に選択的な、遺伝的にコードされた堅牢なRhoB阻害剤を選択するのに成功し、内因性RhoB活性画分をノックダウンし、その基底活性を枯渇させるだけでなく、成長因子処理後のその細胞内活性化もブロックする、この固有のツールの効率性を証明した。さらに、原理証明の研究において、本発明者らは、巧妙なRhoB活性ノックダウンがRhoBの全細胞画分を置換えなかったが、ヒト気管支上皮細胞の遊走及び浸潤においてRNAi

20

30

40

50

と同様の表現型を誘導したことを証明した。したがって、本発明は、抗 R h o G T P a s e コンホーメーションシングルドメイン抗体、ならびに特に、治療及び診断分野におけるその使用に関する。

【0009】

本明細書で使用する場合、「R h o - G T P a s e」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、低分子量グアノシントリホスファターゼ R h o G T P a s e の R h o (r a s ホモロジー)ファミリーを意味する。同ファミリーは、細胞骨格組織化、遺伝子発現、細胞サイクル進行、細胞運動性、及び他の細胞プロセスをレギュレーションするシグナル伝達経路を制御する分子スイッチである (Cell Communication and Signaling, 2010, 8, 23)。R h o ファミリー G T P a s e は、ガンの進行に関連する多様な細胞機能を制御する、重要なシグナル伝達タンパク質である。同機能は、アクチン細胞骨格組織化、転写レギュレーション、細胞サイクル進行、アポトーシス、小胞輸送、ならびに、細胞-細胞及び細胞-細胞外マトリックス間接着を含む (Cell Communication and Signaling, 2010, 8 (23), 1 -14 ; Genes Dev., 1997, 11, 2295-2322)。特に、R h o - G T P a s e は、R h o A、R h o B、及び R h o C を含む。

10

【0010】

本発明者らにより生成されたシングルドメイン抗体は、少なくとも1つの R h o - G T P a s e に対して、およびとりわけ、1つの R h o - G T P a s e に対してのみ特異的である (例えば、「B6」h s 2 d A b は、R h o B に対して特異的である)。ただし、本発明の一部の抗体は、複数の R h o - G T P a s e と相互作用することができる (例えば、H12 h s 2 d A b は、R h o A、R h o B、及び R h o C ならびに R a c 1 に対する親和性を有する)。したがって、本発明のシングルドメイン抗体は、ヒト化され、1つの R h o - G T P a s e 又は複数の R h o - G T P a s e に対して特異的な親和性を有し、1つの活性型 R h o - G T P a s e (すなわち、コンホーメーション) に対して特異的であり、活性型 R h o - G T P a s e を阻害することができ、非常に安定したシングルドメイン抗体であり、高い親和性を表わし、細胞内環境において活性な、1つ以上の機能性により特徴付けられる。

20

【0011】

本明細書で使用する場合、「シングルドメイン抗体」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、天然に軽鎖を欠いているラクダ科哺乳類に見出すことができる種類の抗体の1つの重鎖可変ドメインを意味する。このようなシングルドメイン抗体は、「nanobody (登録商標)」でもある。(シングル)ドメイン抗体の全般的な説明については、上記引用された従来技術ならびに欧州特許第0368684号、Ward et al. (Nature 1989 Oct 12; 341 (6242): 544-6)、Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490; 及び国際公開公報第06/030220号、同第06/003388号も参照される。シングルドメイン抗体のアミノ酸配列及び構造は、4つのフレームワーク領域又は「FR」を含むと考えることができる。4つのフレームワーク領域又は「FR」は、当技術分野及び本明細書において、それぞれ「フレームワーク領域1」又は「FR1」; 「フレームワーク領域2」又は「FR2」; 「フレームワーク領域3」又は「FR3」; 及び「フレームワーク領域4」又は「FR4」と呼ばれる。該フレームワーク領域は、3つの相補性決定領域又は「CDR」により中断される。3つの相補性決定領域又は「CDR」は、当技術分野において、それぞれ「相補性決定領域1」又は「CDR1」; 「相補性決定領域2」又は「CDR2」、及び「相補性決定領域3」又は「CDR3」と呼ばれる。したがって、シングルドメイン抗体は、全体的な構造: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 を有するアミノ酸配列として定義することができる。同構造において、FR1 ~ FR4 はそれぞれ、フレームワーク領域1 ~ 4 を意味し、CDR1 ~ CDR3 は、相補性決定領域1 ~ 3 を意味する。本発明の文脈において、シングルドメイン抗体のアミノ酸残基は、IMGTナンバリングシステムにより与えられるVHドメインについて一般的なナンバリングに従ってナンバリングされる (Lefranc M.-P., 「Unique database numbering system for immunogenetic analysis」 Immunology Toda

30

40

50

y, 18, 509 (1997))。IMGT固有のナンバリングは、抗原レセプター、鎖種、又は種が何であっても、可変ドメインを比較するのに定義されている (Lefranc M.-P., 「Unique database numbering system for immunogenetic analysis」 Immunology Today, 18, 509 (1997) ; Lefranc M.-P., 「The IMGT unique numbering for Immunoglobulins, T cell receptors and Ig-like domains」 The Immunologist, 7, 132-136 (1999). ; Lefranc, M.-P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, G., 「IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains」 Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003))。IMGT固有のナンバリングにおいて、保存アミノ酸は、通常、同じ位置、例えば、システイン23、トリプトファン41、疎水性アミノ酸89、システイン104、フェニルアラニン又はトリプトファン118を有する。IMGT固有のナンバリングは、フレームワーク領域 (FR1 - IMGT : 1 ~ 26位、FR2 - IMGT : 39 ~ 55位、FR3 - IMGT : 66 ~ 104位、及びFR4 - IMGT : 118 ~ 128位) 及び相補性決定領域 : CDR1 - IMGT : 27 ~ 38位、CDR2 - IMGT : 56 ~ 65位、及びCDR3 - IMGT : 105 ~ 117位の標準化された範囲設定を提供する。ギャップが空白位置を表わすため、CDR - IMGT長は、重要な情報になる。CDR1 - IMGT及びCDR2 - IMGT (それぞれ、12未満及び10未満のアミノ酸長) におけるギャップは、CDR - IMGTループの頂点に存在している。例えば、CDR1 - IMGT長が7個のアミノ酸である場合、27、28、29、30、36、37、及び38位を含む。CDR2 - IMGT長が7個のアミノ酸である場合、56、57、58、59、63、64、及び65位を含む。再配置されたCDR3 - IMGTの基本長は、13個のアミノ酸 (105 ~ 117位) である。同アミノ酸は、15個のアミノ酸 (2番目のCYS104 ~ J - TRP又はJ - PHE118)。のJUNCTIONに相当する。この長さ及び対応するナンバリングは、使用するのに都合が良いため選択された。実際には、IMGT/LIGM-DB中のIG及びTR再配置配列の80%は、13個以下のアミノ酸のCDR3 - IMGT長を有する。CDR3 - IMGT長が13個未満のアミノ酸である場合、ギャップは、下記順序111、112、110、113、109、114等において、ループの頂点から形成される。したがって、CDR3 - IMGT長が9個のアミノ酸である場合、105 ; 106 ; 107 ; 108 ; 109 ; 114 ; 115 ; 116 ; 及び117位を含む。CDR3 - IMGT長が9個のアミノ酸である場合、105 ; 106 ; 107 ; 108 ; 109 ; 110 ; 112 ; 113 ; 114 ; 115 ; 116 ; 及び117位を含む。CDR3 - IMGT長が13個超のアミノ酸である場合、更なる位置が、CDR3 - IMGTループの頂点における111と112位との間に、下記順序112.1, 111.1, 112.2, 111.2, 112.3, 111.3等において形成される。したがって、CDR3 - IMGT長が15個のアミノ酸である場合、更なる111.1及び112.1位を含む。

10

20

30

40

【0012】

本発明者らにより生成された全てのシングルドメイン抗体 (hs2dAb) は、表Aに記載されたのと同じフレームワーク領域FR1 ~ FR4により特徴付けられ、表Bに記載された、7個のアミノ酸長を有するCDR1 - IMGT及びCDR2 - IMGT、ならびに9、12、又は15個のアミノ酸長を有するCDR3 - IMGTを含む。

【0013】

表A : 本発明者らにより生成されたシングルドメイン抗体 (hs2dAb) のフレームワーク領域FR1 ~ FR4 (IMGT)

【表 1】

フレームワーク領域	配列
FR1	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASG (配列番号:1)
FR2	MGWFRQAPGKEREFVSAISS (配列番号:2)
FR3	YYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCA (配列番号:3)
FR4	YWGQGTQVTVSS (配列番号:4)

【0014】

10

表 B : 本発明者らにより生成されたシングルドメイン抗体 (hs2dAb) の CDR - I M G T 領域

【表 2】

hs2dAb	CDR1-IMGT	CDR2-IMGT	CDR3-IMGT
H12	DGSRIYA (配列番号:5)	WEQDWEH (配列番号:6)	AFMTPHRNLTSM (配列番号:7)
4P75	RYSAWDG (配列番号:8)	SQHDLEE (配列番号:9)	ATIRTGWAD (配列番号:10)
4SP1	DTSDGYI (配列番号:11)	EYNSQSE (配列番号:12)	QSFNEVWKMPNKFPH (配列番号:13)
4SNP36	TSWKDYT (配列番号:14)	EGPGAQY (配列番号:15)	YSSWQPYVS (配列番号:16)
4SNP61	FTSTSTV (配列番号:17)	SAHTMDT (配列番号:18)	YCAPAPMLGQMITQPALP (配列番号:19)
5SP10	RFWRRYT (配列番号:20)	GTSDWT (配列番号:21)	PPHFSGAAI (配列番号:22)
5SP11	AGWRAEA (配列番号:23)	SDGDHTI (配列番号:24)	IMQTQMRRTSDYRF (配列番号:25)
5SP58	DTFSDDV (配列番号:26)	DWPTTQS (配列番号:27)	YCAQANGDHSYPLWKYGNM (配列番号:28)
5SNP47	RTSRFYS (配列番号:29)	FNSDYFL (配列番号:30)	AWWYRYTEGMTM (配列番号:31)
5SNP48	TSWFTEV (配列番号:32)	GLHDVGT (配列番号:33)	ALDKWYTKAMDARKD (配列番号:34)

20

30

40

5SNP65	ATYEGEA (配列番号:35)	SYPSVIS (配列番号:36)	YWVNHEGTIREI (配列番号:37)	
B6	YGSTIET (配列番号:38)	RAPGPSQ (配列番号:39)	PINNRTMQDSMFLWN (配列番号:40)	
B20	TTSFWYT (配列番号:41)	WRFNTTT (配列番号:42)	IPRYSLDAVPHRAS (配列番号:43)	
B15	SYSRGET (配列番号:44)	DTHNYET (配列番号:45)	ASPQFHKIMKGSQVG (配列番号:46)	10
B5	ATSGGTV (配列番号:47)	RSQTKAT (配列番号:48)	PMEHEALKQHPL (配列番号:49)	
B71	DGSDGDV (配列番号:50)	RYPGRSP (配列番号:51)	ARWISRKWYTTPFQG (配列番号:52)	
E3	STYETYA (配列番号:53)	ASPTIEG (配列番号:54)	TWSKMGISI (配列番号:55)	
A6	DTWDQYV (配列番号:56)	RSGTHGI (配列番号:57)	PLTHQWMGRTP (配列番号:58)	20
G12	RTSGWYA (配列番号:59)	SRASSQE (配列番号:60)	VWMKMGIEI (配列番号:61)	
NB61	TTWFNEV (配列番号:81)	GSTSWAE (配列番号:82)	RMSFMRAGRTPMTPM (配列番号:83)	
212B	DTWWSSA (配列番号:84)	FYPTEYT (配列番号:85)	WIAWGPWMRTSW (配列番号:86)	
111B	GTSKQYG (配列番号:87)	RQEGETI (配列番号:88)	YRHVWPYPE (配列番号:89)	30
404F	RTSKNYA (配列番号:90)	WTTNQDT (配列番号:91)	IWDKREISI (配列番号:92)	

【 0 0 1 5 】

抗体 (h s 2 d A b) は、表 C の配列により特徴付けられる。

【 0 0 1 6 】

表 C : 本発明者らにより生成されたシングルドメイン抗体 (h s 2 d A b) の配列

【表 3】

hs2dAb	配列
H12	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGDGSRUYAMGWFRQAPGKEREVSAISWEQD WEHYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCAAFMTPHRNLTSM YWGQGTQVTVSS (配列番号:62)
4P75	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGRYSAWDGMGWFRQAPGKEREVSAISSQH DLEYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCAATIRGWADYWG QGTQVTVSS (配列番号:63)
4SP1	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGDTSDGYIMGWFRQAPGKEREVSAISEYNS QSEYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCAQSFNEVWKMPNK FPHYWGQGTQVTVSS (配列番号:64)
4SNP36	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGTSWKDYTMGWFRQAPGKEREVSAISEGPG AQYYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCAYSSWQPYVSYWGQ GTQVTVSS (配列番号:65)
4SNP61	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTSTSTVMGWFRQAPGKEREVSAISSAHT MDTYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCAPAPMLGQMITQP ALPYWGQGTQVTVSS (配列番号:66)
5SP10	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGRFWRRYTMGWFRQAPGKEREVSAISGTSD WTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCAPPHFSGAAIYWGQ GTQVTVSS (配列番号:67)
5SP11	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGAGWRAEAMGWFRQAPGKEREVSAISSDG DHTIYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCAIMQTQMRRTSDY RFYWGQGTQVTVSS (配列番号:68)
5SP58	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGDTFSDDVMGWFRQAPGKEREVSAISDWPT TQSYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCAQANGDHSYPLWK YGNMYWGQGTQVTVSS (配列番号:69)
5SNP47	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGRTSRFYSMGWFRQAPGKEREVSAISFNSDY FLYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCAAWWYRYTEGMTM YWGQGTQVTVSS (配列番号:70)
5SNP48	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGTSWFTEVMGWFRQAPGKEREVSAISGLHD VGTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCAALDKWYTKAMD ARKDYWGQGTQVTVSS (配列番号:71)
5SNP65	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGATYEGEAMGWFRQAPGKEREVSAISSYPS VISYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCAYWVNHEGTIREIY WGQGTQVTVSS (配列番号:72)
B6	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGYGSTIETMGWFRQAPGKEREVSAISRAPGP SQYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYYCAPINNRTMQDSMFL WNYWGQGTQVTVSS (配列番号:73)

10

20

30

40

50

B20	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGTTSFWYTMGWFRQAPGKEREVSAISWRFN TTTTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLRAEDTATYYCAIPRYSLDAVPHRAS TYWGQGTQVTVSS (配列番号:74)	
B15	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGSYSRGETMGWFRQAPGKEREVSAISDTHN YETYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLRAEDTATYYCAASPQFHKIMKGSQ VGYWGQGTQVTVSS (配列番号:75)	
B5	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGATSGGTVMGWFRQAPGKEREVSAISRSQT KATYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLRAEDTATYYCAPMEHEALKQHPL YWGQGTQVTVSS (配列番号:76)	10
B71	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGDGSDGDVMGWFRQAPGKEREVSAISRYPG RSPYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLRAEDTATYYCAARWISRKWYTPPF QGYWGQGTQVTVSS (配列番号:77)	
E3	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGSTYETYAMGWFRQAPGKEREVSAISASPTI EGYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLRAEDTATYYCATWSKMGISIIYWGQ GTQVTVSS (配列番号:78)	20
A6	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGDTWDQYVMGWFRQAPGKEREVSAISRSG THGIYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLRAEDTATYYCAPLTHQWMGRTPF YWGQGTQVTVSS (配列番号:79)	
G12	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGRTSGWYAMGWFRQAPGKEREVSAISSRAS SQEYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLRAEDTATYYCAVWMKMGIEIYWG QGTQVTVSS (配列番号:80)	
NB61	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGTTWFNEVMGWFRQAPGKEREVSAISGSTS WAEYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLRAEDTATYYCARMSFMRAGRTPM TPMYWGQGTQVTVSS (配列番号:93)	30
212B	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGDTWWSSAMGWFRQAPGKEREVSAISFYPT EYTYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLRAEDTATYYCAWIAWGPWMRTS WYWGQGTQVTVSS (配列番号:94)	
111B	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGGTSKQYGMGWFRQAPGKEREVSAISRQEG ETIYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLRAEDTATYYCAYRHVWPYPEYWG QGTQVTVSS (配列番号:95)	40
404F	VQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGRTSKNYAMGWFRQAPGKEREVSAISWTTN QDTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLRAEDTATYYCAIWDKREISIIYWGQ GTQVTVSS (配列番号:96)	

【 0 0 1 7 】

本発明の第1の目的は、CDR1-IMGT、CDR2-IMGT、及びCDR3-IMGTのアミノ酸配列が、シングルドメイン抗体(hs2dAb)H12、4P75、4SP1、4SNP36、4SNP61、5SP10、5SP11、5SP58、5SNP47、5SNP48、5SNP65、B6、B20、B15、B5、B71、E3、A6、G12、NB61、212B、111B、又は404FのCDR1-IMGT、CDR

2 - I M G T、及び C D R 3 - I M G T のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する、シングルドメイン抗体に関する。

【0018】

本発明によれば、第 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する第 1 のアミノ酸配列は、第 1 の配列が第 2 のアミノ酸配列に対して、90 ; 91 ; 92 ; 93 ; 94 ; 95 ; 96 ; 97 ; 98 ; 99、又は 100% の同一性を有することを意味する。アミノ酸配列の同一性は、典型的には、適切な配列アライメントアルゴリズム及びデフォルトパラメータ、例えば、BLAST P (Karlin and Altschul, 1990) を使用して決定される。

【0019】

一部の実施態様では、本発明のシングルドメイン抗体は、シングルドメイン抗体 (h s 2 d A b) H 1 2、4 P 7 5、4 S P 1、4 S N P 3 6、4 S N P 6 1、5 S P 1 0、5 S P 1 1、5 S P 5 8、5 S N P 4 7、5 S N P 4 8、5 S N P 6 5、B 6、B 2 0、B 1 5、B 5、B 7 1、E 3、A 6、G 1 2、N B 6 1、2 1 2 B、1 1 1 B、又は 4 0 4 F の C D R 1 - I M G T、C D R 2 - I M G T、及び C D R 3 - I M G T を含む。

10

【0020】

一部の実施態様では、本発明のシングルドメイン抗体は、配列番号：1 に対して少なくとも 90% の同一性を有するフレームワーク領域 F R 1 を含む。

【0021】

一部の実施態様では、本発明のシングルドメイン抗体は、配列番号：2 に対して少なくとも 90% の同一性を有するフレームワーク領域 F R 2 を含む。

20

【0022】

一部の実施態様では、本発明のシングルドメイン抗体は、配列番号：3 に対して少なくとも 90% の同一性を有するフレームワーク領域 F R 3 を含む。

【0023】

一部の実施態様では、本発明のシングルドメイン抗体は、配列番号：4 に対して少なくとも 90% の同一性を有するフレームワーク領域 F R 4 を含む。

【0024】

一部の実施態様では、本発明のシングルドメイン抗体は、それぞれ配列番号：1 ~ 4 に対して少なくとも 90% の同一性を有するフレームワーク領域 F R 1 ~ F R 4 を含む。

30

【0025】

一部の実施態様では、本発明のシングルドメイン抗体は、配列番号：62 ~ 80 及び配列番号：93 ~ 96 で表わされるアミノ酸配列に対して少なくとも 70% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0026】

本発明によれば、第 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 70% の同一性を有する第 1 のアミノ酸配列は、第 1 の配列が第 2 のアミノ酸配列に対して、70 ; 71 ; 72 ; 73 ; 74 ; 75 ; 76 ; 77 ; 78 ; 79 ; 80 ; 81 ; 82 ; 83 ; 84 ; 85 ; 86 ; 87 ; 88 ; 89 ; 90 ; 91 ; 92 ; 93 ; 94 ; 95 ; 96 ; 97 ; 98 ; 又は 99% の同一性を有することを意味する。

40

【0027】

一部の実施態様では、本発明のシングルドメイン抗体は、配列番号：62 ~ 80 及び配列番号：93 ~ 96 で表わされるアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0028】

一部の実施態様では、本発明のシングルドメイン抗体は、配列番号：62 ~ 80 及び配列番号：93 ~ 96 で表わされるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0029】

一部の実施態様では、本発明のシングルドメイン抗体は、異種ポリペプチドに融合して

50

、融合タンパク質を形成している。本明細書で使用する場合、「融合タンパク質」は、異種ポリペプチド（すなわち、同じシングルドメイン抗体以外のポリペプチド）に操作可能に連結している、本発明のシングルドメイン抗体の内の（典型的には、生物学的に活性な）全部又は一部を含む。融合タンパク質内において、「操作可能に連結している」という用語は、本発明のポリペプチドと異種ポリペプチドとが互いにインフレームに融合していることを示すのを意図している。異種ポリペプチドは、本発明のシングルドメイン抗体のN末端又はC末端に融合していることができる。一部の実施態様では、異種ポリペプチドは、本発明のシングルドメイン抗体のC末端に融合している。

【0030】

一部の実施態様では、本発明のシングルドメイン抗体と異種ポリペプチドとは、互いに直接（すなわち、リンカーを使用することなく）融合しているか、又は、リンカーを介して融合している。リンカーは、典型的には、リンカーペプチドであり、本発明によれば、シングルドメイン抗体を異種ポリペプチドに結合させることができるように選択されるであろう。適切なリンカーは、本明細書における開示に基づいて、場合により、幾らかの限られた程度のルーチンな試行錯誤の後に、当業者に明らかであろう。適切なリンカーは、本明細書に記載されており、例えば、アミノ酸配列を含むことができるが、これに限定されない。同アミノ酸配列は、好ましくは、2以上のアミノ酸長を有する。典型的には、リンカーは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30個のアミノ酸を有する。ただし、上限は、重要ではなく、例えば、このような融合タンパク質のバイオ医薬品製造に関する便宜のために選択される。リンカー配列は、天然の配列又は非天然の配列であることができる。治療目的で使用される場合、リンカーは、好ましくは、本発明の融合タンパク質が投与される対象において非免疫原性である。リンカー配列の1つの有用なグループは、国際公開公報第96/34103号及び同第94/04678号に記載された重鎖抗体のヒンジ領域から得られるリンカーである。他の例は、ポリアラニンリンカー配列、例えば、Ala-Ala-Alaである。リンカー配列の更に好ましい例は、(gly4ser)3、(gly4ser)4、(gly4ser)、(gly3ser)、gly3、及び(gly3ser)2)3を含む、種々の長さのGly/Serリンカーである。

【0031】

一部の実施態様では、本発明のシングルドメイン抗体は、免疫グロブリンドメインに融合している。例えば、本発明の融合タンパク質は、Fc部分（例えば、ヒトFc）に融合している本発明のシングルドメイン抗体を含むことができる。前記Fc部分は、半減期を延長させ、本発明のシングルドメイン抗体の生成をも向上させるのに有用であることができる。例えば、Fc部分は、血清タンパク質に結合させることにより、シングルドメイン抗体の半減期を延長させることができる。一部の実施態様では、少なくとも1つのシングルドメイン抗体は、1つ以上の（典型的には、ヒトの）CH1及び/又はCH2及び/又はCH3ドメインにも、場合により、リンカー配列を介して融合していることができる。例えば、適切なCH1ドメインに融合しているシングルドメイン抗体は、例えば、適切な軽鎖と共に使用されて、従来Fabフラグメント又はF(ab')₂フラグメントに類似するが、同フラグメントにおいて、従来VHドメインの一方、又は、(F(ab')₂フラグメントの場合には)一方もしくは両方が、本発明のシングルドメイン抗体により置き換えられている、抗体フラグメント/構造を生じさせることができる。一部の実施態様では、1つ以上の本発明のシングルドメイン抗体は、1つ以上の定常ドメイン（例えば、Fc部分の一部として使用することができる/Fc部分を形成するのに使用することができる、2又は3つの定常ドメイン）に、Fc部分に、ならびに/又は、1つ以上のエフェクター機能を付与し、及び/もしくは、1つ以上のFcレセプターに結合する能力を付与することができる1つ以上の抗体部分、フラグメント、もしくはドメインに融合していることができる。例えば、この目的で、そして、この目的に制限されることなく、1つ以上の更なるアミノ酸配列は、抗体、例えば、重鎖抗体、及びより典型的には、従来ヒト

10

20

30

40

50

鎖抗体の1つ以上のCH2及び/もしくはCH3ドメインを含むことができ、ならびに/又は、例えば、IgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4）、IgE、又は別のヒトIg、例えば、IgA、IgD、もしくはIgMからのFc領域を形成することができる。例えば、国際公開公報第94/04678号には、ラクダ科VHドメイン又はそのヒト化誘導体（すなわち、シングルドメイン抗体）を含む重鎖抗体が記載されている。同誘導体において、ラクダ科CH2及び/又はCH3ドメインは、それぞれジシングルドメイン抗体ならびにヒトCH2及びCH3ドメインを含む（が、CHIドメインを含まない）2つの重鎖からなる免疫グロブリンを提供するために、ヒトCH2及びCH3ドメインにより置き換えられている。同免疫グロブリンは、CH2及びCH3ドメインにより提供されたエフェクター機能を有し、同免疫グロブリンは、任意の軽鎖の存在なしに機能することができる。

10

【0032】

一部の実施態様では、異種ポリペプチドは、シングルドメイン抗体である。したがって、一部の実施態様では、本発明の融合タンパク質は、二重パラトープ型ポリペプチドである。本明細書で使用する場合、「二重パラトープ型」ポリペプチドという用語は、本明細書で定義された第1のシングルドメイン抗体と第2のシングルドメイン抗体とを含み、これら2つのシングルドメイン抗体が、1つの抗原（すなわち、Rhogtpase）の2種類のエピトープに結合することができる、ポリペプチドを意味する。本発明の二重パラトープ型ポリペプチドは、異なるエピトープ特異性を有するシングルドメイン抗体から構成され、同じエピトープに結合する相互に相補的な可変ドメインペアを含有しない。したがって、シングルドメイン抗体は、Rhogtpaseに対する結合について、互いに競合しない。

20

【0033】

一部の実施態様では、異種ポリペプチドは、キャリアポリペプチドである。適切なキャリアは、当技術分野において周知であり、例えば、チログロブリン、アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン、破傷風トキソイド；ジフテリアトキソイド；ポリアミノ酸、例えば、ポリ（D-リシン；D-グルタミン酸）；ロタウイルスのVP6ポリペプチド；インフルエンザウイルスヘマグルチニン、インフルエンザウイルス核タンパク質；B型肝炎ウイルスコアタンパク質、B型肝炎ウイルス表面抗原；Mycobacterium tuberculosisからのツベルクリンの精製タンパク質誘導体（PPD）；不活化Pseudomonas aeruginosaエキソトキシンA（トキシンA）；キーホール・リンペット・ヘモシアニン（KLH）；Bordetella pertussisの糸状菌ヘマグルチニン（FHA）；破傷風トキソイド（TT）及び無菌化牛型結核菌（BCG）細胞壁のTヘルパー細胞（Th）エピトープ；M. lepraeもしくはM. tuberculosisからのリコンビナント10kDa、19kDa、及び30～32kDaタンパク質、又はこれらのタンパク質の任意の組み合わせ等を含む。

30

【0034】

一部の実施態様では、異種ポリペプチドは、蛍光ポリペプチドである。適切な蛍光ポリペプチドは、緑色蛍光タンパク質（GFP）を含むが、これに限定されない。GFPは、例えば、天然のヌクレオチド配列のコドンがヒトコドンバイアスにより近く一致するように変更されている「ヒト化」版のGFP；Aequoria victoriaから得られるGFP又はその誘導体、例えば、「ヒト化」誘導体、例えば、高感度GFP（例えば、Clontech Inc.から市販されている）；別の種、例えば、Renilla reniformis、Renilla mulleri、又はPtilosarcus guerneiからのGFP（例えば、国際公開公報第99/49019号及びPeelle et al. (2001) J. Protein Chem. 20:507-519に記載）；「ヒト化」リコンビナントGFP（hrGFP）（Stratagene）；Anthozoan種から得られる各種の蛍光及び着色タンパク質（例えば、Matz et al. (1999) Nature Biotechnol. 17:969-973に記載）のいずれか等を含むが、これに限定されない。

40

【0035】

一部の実施態様では、異種ポリペプチドは、酵素である。典型的には、前記酵素は、-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、及び西洋ワサビペルオ

50

キシダーゼからなる群より選択することができる。異種ポリペプチドが検出可能な生成物を生成する酵素である場合、この生成物は、適切な手段を使用して検出することができる。例えば、 α -ガラクトシダーゼは、基質に応じて、分光光度計により検出される着色生成物又は蛍光生成物を生成することができ、ルシフェラーゼは、ルミノメーターにより検出可能な発光生成物を生成することができる等である。

【0036】

一部の実施態様では、異種ポリペプチドは、融合タンパク質の精製又は単離を容易にするポリペプチド、例えば、金属イオン結合ポリペプチド、例えば、6Hタグ（例えば、アセチル化Tat/6His）又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼである。

【0037】

一部の実施態様では、異種ポリペプチドは、細胞透過性ペプチドである。「細胞透過性ペプチド」という用語は、当技術分野において周知であり、細胞透過性配列又は膜透過性配列、例えば、ペネトラチン、TATミトコンドリア透過性配列、ならびに、Bechara and Sagan, 2013; Jones and Sayers, 2012; Khafagy et al and Morishita, 2012; 及びMalhi and Murthy, 2012に記載された化合物を意味する。特定の実施態様では、異種ポリペプチドは、細胞透過性HIV Tatペプチドから最初に得られた転写のトランスアクチベータ（TAT）細胞透過性配列である。

【0038】

一部の実施態様では、異種ポリペプチドは、ユビキチンリガーゼ、例えば、E3ユビキチンリガーゼのドメインである。種々のE3ユビキチンリガーゼドメインの例は、RING、HECT、Uボックス、RIBRR、Fボックスドメイン、DCAFドメイン、DD2、HIF-疑似ペプチド、I κ B-疑似配列、BTBドメイン、又はそれらの組み合わせを含む。これらのE3リガーゼドメインは、ユビキチン化を容易にし、本発明のシングルドメイン抗体と融合した場合、抗原-抗体複合体の分解を可能にする。公知のE2結合ドメイン又はその後に見られもしくは開発されるドメインを含めた任意のE3リガーゼドメインを使用することができる。リコンビナントE3リガーゼドメインを使用することができる。一部の実施態様では、異種ポリペプチドは、Fボックスドメインである。Fボックスドメインは、典型的には、約50個のアミノ酸のタンパク質モチーフである。Fボックスドメインは、Fボックスタンパク質をSCF複合体の他のコンポーネントに、コアSCFコンポーネントであるSkp1を結合させることにより繋ぎ止める。

【0039】

一部の実施態様では、異種ポリペプチドは、切替え可能なドメインである。同ドメインは、小分子により又は光活性化により活性化させることができる。小分子の切替え可能な系の例は、ホルモンリガンド結合ドメイン、例えば、ERalpha LBD、オーキシンAID系、Halotag 2誘導体系HyT、又はHALTS、FKB-FRBラパマイシン、又はshield1系を含む。光活性化系の例は、Lov2ドメイン、PhyB-PIF、Cry2、UVR8、又はDronpaを含む。これらの切替え可能な系は、典型的には、コンホーメーション変化又は再局在化によるタンパク質機能の正確な空間的又は時間的制御に使用される。

【0040】

本発明のシングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）は、当技術分野において公知の任意の技術により生成される。同技術は、例えば、任意の化学的、生物学的、遺伝的、又は酵素的な技術を、いずれかの単独又は組み合わせで含むが、これらに限定されない。例えば、所望の配列のアミノ酸配列を知ること、当業者であれば、前記シグナルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）を、ポリペプチドの生成に標準的な技術により容易に生成することができる。例えば、前記シグナルドメイン抗体は、周知の固相法を使用して、好ましくは、市販のペプチド合成装置（例えば、Applied Biosystems, Foster City, California製の装置）を使用し、製造メーカーの説明に従って合成することができる。あるいは、本発明のシングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）

10

20

30

40

50

は、当技術分野において周知のリコンビナントDNA技術により合成することができる。例えば、本発明のシングルドメイン（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）は、シグナルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）をコードするDNA配列の発現ベクターへの組み込み及びこのようなベクターの所望のシングルドメイン抗体を発現させるであろう適切な真核生物又は原核生物ホストへの導入後に、DNA発現生成物として得ることができる。その後、同ホストから、シグナルドメイン抗体を、周知の技術を使用して単離することができる。各種の発現ベクター/ホスト系が、本発明のシングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）を含有し、発現させるのに利用することができる。これらは、微生物、例えば、リコンビナントバクテリオファージ、プラスミド、又はコスミドDNA発現ベクターによりトランスフォーメーションされた細菌；酵母発現ベクターによりトランスフォーメーションされた酵母（Giga-Hama et al., 1999）；ウイルス発現ベクターにより感染された昆虫細胞系（例えば、バキュロウイルス、Ghosh et al., 2002を参照のこと）；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスCaMV；タバコモザイクウイルスTMV）によりトランスフェクションされ、もしくは、細菌発現ベクター（例えば、TiもしくはhpBR322プラスミド、例えば、Babe et al., 2000を参照のこと）によりトランスフォーメーションされた植物細胞系；又は動物細胞系を含むが、これらに限定されない。当業者であれば、タンパク質の哺乳類における発現を最適化させる種々の技術を知っている。例えば、Kaufman, 2000；Colosimo et al., 2000を参照のこと。リコンビナントタンパク質生成に有用な哺乳類細胞は、VERO細胞、HeLa細胞、

10

20

30

40

50

チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株、COS細胞（例えば、COS-7）、W138、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562、及び293細胞を含むが、これらに限定されない。細菌、酵母、及び他の無脊椎動物におけるペプチド基質又は融合ポリペプチドのリコンビナント発現についての例示的なプロトコールは、当業者に公知であり、本明細書において、以下で簡潔に記載されている。また、リコンビナントタンパク質の発現用の哺乳類ホスト系も、当業者に周知である。ホスト細胞株は、発現されたタンパク質を処理し、又は、タンパク質活性を提供するのに有用である特定の翻訳後修飾を生じさせる特定の能力について選択することができる。ポリペプチドのこのような修飾は、アセチル化、カルボキシル化、グルコシル化、ホスホリル化、リピデーション、及びアシル化を含むが、これらに限定されない。また、「プレプロ」型のタンパク質を開裂させる翻訳後処理も、正確な挿入、折畳み、及び/又は機能に重要である場合がある。種々のホスト細胞、例えば、CHO、HeLa、MDCK、293、WI38等は、このような翻訳後活性についての特異的な細胞機構及び特徴的なメカニズムを有し、導入された外因性タンパク質の正確な修飾及び処理を確保するのに選択することができる。本発明のシングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）のリコンビナント生成において、前記シングルドメイン抗体をコードするポリヌクレオチド分子を含むベクターを利用する必要があるであろう。このようなベクターを調製する方法及びこのようなベクターによりトランスフォーメーションされたホスト細胞を製造する方法は、当業者に周知である。このような試みに使用されるポリヌクレオチド分子は、ベクターに連結させることができる。同ベクターは、一般的には、ホスト中での伝播のための選択マーカー及び複製起点を含む。発現構築物のこれらのエレメントは、当業者に周知である。一般的には、発現ベクターは、適切な転写又は翻訳レギュラトリ配列、例えば、哺乳類、微生物、ウイルス、又は昆虫遺伝子から得られるものに操作可能に連結している所定のタンパク質をコードするDNAを含む。レギュラトリ配列の例は、転写プロモーター、オペレーター、又はエンハンサー、mRNAリボソーム結合部位、ならびに、転写及び翻訳を制御するのに適した配列を含む。「発現ベクター」、「発現構築物」、又は「発現カセット」という用語は、この明細書全体を通して互換的に使用され、遺伝子産物をコードする核酸を含有する任意の種類遺伝子構築物を含むことを意味している。同遺伝子産物において、一部又は全部の核酸コード配列を転写させることができる。本発明のシングルドメイン抗体の発現に適した発現ベクターの選択は、当

然、使用される特定の宿主細胞により決まるであろうし、当業者のスキルの範囲内である。発現には、ベクターに提供される適切なシグナル、例えば、宿主細胞中での対象となる核酸の発現を駆動させるのに使用することができるウイルス及び哺乳類ソースの両方からのエンハンサー/プロモーターが必要とされる。通常、発現される核酸は、プロモーターの転写制御下にある。典型的には、ヌクレオチド配列は、レギュラトリー配列が対象となるタンパク質（例えば、シングルドメイン抗体）をコードするDNAに機能的に関連する場合に、操作可能に連結している。このため、プロモーターヌクレオチド配列は、プロモーターヌクレオチド配列が配列の転写を指揮する場合、所定のDNA配列に操作可能に連結している。ついで、対象となるタンパク質は、必要に応じて、それ自体当業者に公知である従来法により、例えば、分画沈殿法、特に、硫酸アンモニウム沈殿、電気泳動、ゲルろ過、親和性クロマトグラフィー等により精製することができる。特に、リコンビナントタンパク質を調製し、精製するための従来法は、本発明に基づいてタンパク質を生成するのに使用することができる。

【0041】

本発明の更なる目的は、本発明のシングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）をコードする核酸分子に関する。

【0042】

本明細書で使用する場合、「核酸分子」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、DNA又はRNA分子を意味する。ただし、この用語は、DNA及びRNAの公知の塩基類似体のいずれかを含む配列を表現する。同類似体は、例えば、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、プソイドイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチル-アミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、及び2,6-ジアミノプリンを含むが、これらに限定されない。

【0043】

一部の実施態様では、本発明の核酸分子は、適切なベクター、例えば、プラスミド、コスミド、エピソーム、人工染色体、ファージ、又はウイルスベクターに含まれる。したがって、本発明の更なる目的は、本発明のシングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）をコードする核酸を含むベクターに関する。典型的には、ベクターは、アデノ関連ウイルス(AAV)、レトロウイルス、ウシパピローマウイルスであるウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ワクシニアウイルス、ポリオーマウイルス、又は感染性ウイルスである。一部の実施態様では、ベクターは、AAVベクターである。本明細書で使用する場合、「AAVベクター」という用語は、アデノ関連ウイルス血清型から得られるベクターを意味する。同血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、及びそれらの変異型を含むが、これらに限定されない。AAVベクターは、全体又は一部において、好ましくは、rep及び/又はcap遺伝子を欠失しているが、機能的な隣接ITR配列を保持している、1つ以上のAAV野生型遺伝子を有することができる。レトロウイルスは、その遺伝子を宿主ゲノム内に組み込み、大量の外因性遺伝

10

20

30

40

50

子材料を輸送し、広いスペクトルの種及び細胞種に感染し、特定の細胞株にパッケージングされるその能力のために、遺伝子送達ベクターとして選択することができる。レトロウイルスベクターを構築するために、特定のウイルス配列の代わりに、対象となる遺伝子をコードする核酸が、ウイルスゲノム内に挿入されて、複製欠損のウイルスを生成する。ピリオンを生成するために、gag、pol、及び/又はenv遺伝子を含有するが、LTR及び/又はパッケージングコンポーネントを含有しないパッケージング細胞株が構築される。cDNAを含有するリコンビナントプラスミドが、レトロウイルスLTR及びパッケージング配列と共にこの細胞株に（例えば、リン酸カルシウム沈殿により）導入される場合、パッケージング配列により、ウイルス粒子内にパッケージングされるリコンビナントプラスミドのRNA転写が可能となる。ついで、同粒子は、培養培地中に分泌される。ついで、リコンビナントレトロウイルスを含有する培地は、回収され、場合により、濃縮され、遺伝子導入に使用される。レトロウイルスベクターは、広い各種の細胞種に感染することができる。レンチウイルスは、複雑なレトロウイルスである。同レトロウイルスは、共通するレトロウイルス遺伝子であるgag、pol、及びenvに加えて、レギュラトリー又は構造的な機能を有する他の遺伝子を含有する。より高度な複雑性により、ウイルスは、一連の潜伏感染と同様に、そのライフサイクルをモデレーションすることが可能となる。レンチウイルスの幾つかの例は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV1、HIV2）及びサル免疫不全ウイルス（SIV）を含む。レンチウイルスベクターは、HIV病原遺伝子を複数回弱毒化することにより生成されてきた。例えば、遺伝子env、vif、vpr、vpu、及びnefは、生物学的に安全なベクターを作製するのに欠失される。レンチウイルスベクターは、当技術分野において公知である。例えば、米国特許第6,013,516号及び同第5,994,136号を参照のこと。両文献は、参照により本明細書に組み入れられる。一般的には、ベクターは、プラスミド系又はウイルス系であり、外因性核酸を組み込み、核酸を選択し、核酸を宿主細胞内に輸送するのに必須の配列を有するように構成されている。対象となるベクターのgag、pol、及びenv遺伝子も、当技術分野において公知である。このため、関連する遺伝子は、選択されたベクター内でクローニングされ、ついで、対象となるターゲット細胞をトランスフォーメーションするのに使用される。適切な宿主細胞がパッケージング機能、すなわち、gag、pol、及びenvならびにrev及びtatを有する2つ以上のベクターによりトランスフェクションされる非分裂細胞に感染することができるリコンビナントレンチウイルスは、米国特許第5,994,136号に記載されている。同文献は、参照により本明細書に組み入れられる。ここには、ウイルスgag及びpol遺伝子をコードする核酸を提供することができる第1のベクターと、ウイルスenvをコードする核酸を提供し、パッケージング細胞を生成することができる別のベクターとが記載されている。異種遺伝子をそのパッケージング細胞内に提供するベクターを導入することにより、対象となる外因性遺伝子を有する感染性ウイルス粒子を放出するプロデューサー細胞を生じさせる。envは、好ましくは、ヒト及び他の種の細胞の形質導入を可能にする、広宿主性エンベロープタンパク質である。典型的には、本発明の核酸分子又はベクターは、「制御配列」を含む。同配列は、まとめて、プロモーター配列、ポリアデニル化シグナル、転写終了配列、上流レギュラトリードメイン、複製起点、配列内リボソーム進入部位（「IRES」）、エンハンサー等を意味する。同配列は、まとめて、レシピエント細胞において、コード配列の複製、転写、及び翻訳を提供する。これらの制御配列は、選択されたコード配列を適切な宿主細胞中で複製し、転写し、翻訳することができる限りにおいて、常に存在する必要は必ずしもない。別の核酸配列は、「プロモーター」配列である。同配列は、本明細書において、DNAレギュラトリー配列を含むヌクレオチド領域を意味する、その通常の意味で使用される。そしてここで、レギュラトリー配列は、RNAポリメラーゼに結合し、下流（3'方向）のコード配列の転写を開始することができる遺伝子から得られる。転写プロモーターは、「誘導可能なプロモーター」（この場合、このプロモーターに操作可能に連結しているポリヌクレオチド配列の発現は、分析物、補助因子、レギュラトリータンパク質等により誘導される）、「リプレッシブルプロモーター」（この場合、このプロモーター

10

20

30

40

50

に操作可能に連結しているポリヌクレオチド配列の発現は、分析物、補助因子、レギュラトリタンパク質等により誘導される)、及び「構成的プロモーター」を含むことができる。

【0044】

本発明の更なる目的は、本発明の核酸分子によりトランスフォーメーションされた宿主細胞を意味する。「トランスフォーメーション」という用語は、「外来 (foreign)」（すなわち、外因性 (extrinsic) 又は細胞外) 遺伝子、DNA 又は RNA 配列の宿主細胞への導入を意味する。これにより、宿主細胞は、導入された遺伝子又は配列を発現して、所望の物質、典型的には、導入された遺伝子又は配列によりコードされたタンパク質又は酵素を生成するであろう。導入された DNA 又は RNA を受容し、発現している宿主細胞は、「トランスフォーメーション」されている。例えば、上記開示されたように、本発明のシングルドメイン抗体を発現させ、生成するために、原核生物細胞、及び特に、大腸菌細胞が選択されるであろう。実際に、本発明によれば、本発明のシングルドメイン抗体を、翻訳後修飾 (例えば、グリコシル化) が望まれるであろう真核生物環境において生成するのは必須ではない。典型的には、宿主細胞は、上記された本発明のシングルドメイン抗体 (異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない) を生成するのに適していることができる。一部の 경우에는、宿主細胞は、例えば、実施例に記載された対象となる細胞における RhogTPase の活性化又は不活性化 (例えば、機能的なノックダウン) の影響を研究するための調査ツールとして使用される。一部の実施態様では、宿主細胞は、ヒト、ウマ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウシ、及びヒツジからなる群より選択される哺乳類の対象から単離される。一部の実施態様では、宿主細胞は、ヒト細胞である。一部の実施態様では、宿主細胞は、培養細胞である。この細胞は、哺乳類 (好ましくは、ヒト) から、又は、商業的な供給元から、もしくは組織から直接得ることができ、又は、例えば、培養細胞の状態で得ることができ、オンサイトで調製することができ、又は、商業的な細胞供給元から購入する等を行うことができる。細胞は、任意の起源からのものであることができる。同起源は、血液又はリンパ系、筋肉、任意の臓器、腺、皮膚、脳、肺...を含むが、これらに限定されない。一部の実施態様では、細胞は、上皮細胞、神経細胞、表皮細胞、ケラチノサイト、造血細胞、メラノサイト、軟骨細胞、肝細胞、B細胞、T細胞、赤血球、マクロファージ、単球、線維芽細胞、筋肉細胞、血管平滑筋細胞、肝細胞、脾臓細胞、膵臓細胞...からなる群より選択される。一部の実施態様では、宿主細胞は、ガン細胞である。典型的には、ガン細胞は、乳ガン、前立腺ガン、リンパ腫、皮膚ガン、膵臓ガン、結腸ガン、メラノーマ、悪性メラノーマ、卵巣ガン、脳ガン、原発性脳ガン腫、頭頸部ガン、グリオーマ、グリオブラストーマ、肝臓ガン、膀胱ガン、非小細胞肺ガン、頭部又は頸部のガン腫、乳房のガン腫、卵巣のガン腫、肺のガン腫、小細胞肺ガン腫、ウィルムス腫瘍、子宮頸管のガン腫、精巣のガン腫、膀胱のガン腫、膵臓のガン腫、胃のガン腫、結腸のガン腫、前立腺のガン腫、尿生殖器のガン腫、甲状腺のガン腫、食道のガン腫、骨髄腫、多発性骨髄腫、副腎のガン腫、腎細胞のガン腫、子宮内膜のガン腫、副腎皮質のガン腫、悪性膵臓インスリノーマ、悪性カルチノイドのガン腫、絨毛ガン腫、菌状息肉腫、悪性高カルシウム血症、子宮頸管過形成、白血病、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性顆粒球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、ヘアリー細胞白血病、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、カポジ肉腫、真性多血症、本態性血小板増加症、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、柔組織肉腫、骨原性肉腫、原発性マクログロブリン血症、及びレチノブラストーマからなる群より選択されるガンから単離される。一部の実施態様では、宿主細胞は、幹細胞である。本明細書で使用する場合、「幹細胞」という用語は、増殖を誘導することができる未分化細胞を意味する。幹細胞は、自己維持又は自己再生可能である。これらは、各細胞分裂について、1つの娘細胞がまた幹細胞であろうことを意味する。幹細胞は、胚、出産後、若年、又は成体組織から得ることができる。幹細胞は、多能性又は多分化性であることができる。本明細書で使用する場合、「前駆細胞」という用語は、幹細胞から得られた未分化細胞を意味し、それ自体は幹細胞ではない。一部の前駆

10

20

30

40

50

細胞は、2つ以上の細胞種に分化することができる子孫を生成することができる。幹細胞は、多能性幹細胞を含む。同多能性幹細胞は、身体の組織系統：中胚葉、内胚葉、及び外胚葉のいずれかの細胞を形成することができる。したがって、例えば、幹細胞は、ヒト胚性幹（ES）細胞、ヒト内部細胞塊（ICM）/原外胚葉細胞、ヒト原始外胚葉細胞、ヒト原始内胚葉細胞、ヒト原始中胚葉細胞、及びヒト始原生殖（EG）細胞から選択することができる。また、幹細胞は、多分化性幹細胞を含む。同多分化性幹細胞は、組織全体又は複数の組織を構成する複数の細胞系統を形成することができる。同多分化性幹細胞は、例えば、造血幹細胞又は神経前駆細胞を含むが、これらに限定されない。また、幹細胞は、全能性幹細胞を含む。同全能性幹細胞は、生物全体を形成することができる。一部の実施態様では、幹細胞は、間葉系幹細胞である。「間葉系幹細胞」又は「MSC」という用語は、最後まで分化していない成体細胞について、互換的に使用される。同細胞は、いずれかの幹細胞である細胞を生成するように分裂することができ、又は、生理活性因子、例えば、サイトカインからの種々の影響に応じて、間葉系細胞系統の細胞、例えば、脂肪、骨、軟骨、弾性及び線維性結合組織、筋原細胞、ならびに、胚性中胚葉起源の組織以外の組織（例えば、神経細胞）を生じるように、不可逆的に分化することができる。一部の実施態様では、幹細胞は、部分的に分化された又は分化している細胞である。一部の実施態様では、幹細胞は、人工多能性幹細胞（iPSC）である。iPSCは、再プログラミングされ、又は、脱分化している。幹細胞は、胚、胎児、又は成体組織から得ることができる。

10

【0045】

20

本発明のシングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）を、調査及び診断分野に使用することができる。このため、例えば、本発明のシングルドメイン抗体は、活性型 Rho GTPase の存在を検出するのに特に適している。前記検出は、調査又は診断目的についての有用性を見出すことができる。

【0046】

このため、本発明の更なる態様は、少なくとも1つの活性型 Rho GTPase（例えば、RhoA、RhoB、及び/又はRhoC）の存在を検出する方法であって、i) 対象からサンプルを得る工程と、ii) *in vitro*において、サンプルを、本発明のシングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）と接触させる工程と、iii) 前記シングルドメイン抗体の前記サンプルへの結合を検出する工程と、iv) 工程（iii）で検出された結合を標準と比較する工程とを含み、前記サンプルに対する結合の差異が活性型 Rho GTPase の存在を示す、方法を提供する。典型的には、検出は、任意の適切な手段、例えば、顕微鏡又は自動分析システムにより行われる。

30

【0047】

本明細書で使用する場合、「サンプル」という用語は、対象から得られる各種のサンプル型を包含し、診断又は調査のアッセイ法に使用することができる。生体サンプルは、血液及び生体起源の他の液体サンプル、固体組織サンプル、例えば、生検標本、又はそれらから得られる組織培養物もしくは細胞、ならびにそれらの子孫を含むが、これらに限定されない。一部の実施態様では、サンプルは、腫瘍組織サンプルである。「腫瘍サンプル」という用語は、対象の腫瘍から得られる任意の組織サンプルを意味する。組織サンプルは、*in vitro*での評価の目的で得られ、典型的には、対象の腫瘍に行われた生検から得られる。サンプルは、新鮮であり、凍結し、又は、包埋する（例えば、FFPE生検）ことができる。

40

【0048】

したがって、一部の実施態様では、本発明のシングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）は、検出可能なラベルとコンジュゲートしている。適切な検出可能なラベルは、例えば、放射性同位体、蛍光ラベル、化学発光ラベル、酵素ラベル、生物発光ラベル、又はコロイド状金を含む。このような検出可能なラベルされた免疫コンジュゲートを作製し、検出する方法は、当業者に周知であり、以下により

50

詳細に記載されている。例えば、検出可能なラベルは、オートラジオグラフィーにより検出される放射性同位体であることができる。本発明の目的に特に有用な同位体は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、及び ^{14}C である。本発明のシングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）は、蛍光化合物によりラベルすることもできる。本発明の蛍光ラベルされたシングルドメイン抗体の存在は、免疫コンジュゲートを適切な波長の光に曝し、得られた蛍光を検出することにより決定される。蛍光ラベル化合物は、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、フィコエリセリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルデヒド、及びフルオレサミン、ならびにAlexa Fluor染料を含む。あるいは、本発明のシングルドメイン抗体は、前記シングルドメイン抗体を化学発光化合物にカップリングさせることにより検出可能にラベルすることができる。化学発光タグ付き免疫コンジュゲートの存在は、一連の化学反応の間に生じる発光の存在を検出することにより決定される。化学発光ラベル化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、及びオキサラートエステルを含む。同様に、生物発光化合物を、本発明のシングルドメイン抗体をラベルするのに使用することができる。生物発光は、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を向上させる、生体系において見出される種類の化学発光である。生体発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することにより決定される。ラベリングに有用な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、及びエクオリンを含む。典型的には、シングルドメイン抗体が上記された蛍光ポリペプチドに融合している場合、融合タンパク質の存在は、当技術分野において周知の任意の手段、例えば、顕微鏡もしくは顕微鏡又は自動分析システムにより検出することができる。典型的には、シングルドメイン抗体が酵素に融合している場合には、融合タンパク質は、適切な基質の存在下においてインキュベーションされ、酵素部分は、基質と反応して、例えば、分光光度測定的、蛍光測定的、又は視覚的な手段により検出することができる化学部分を生じさせる。多重特異性免疫コンジュゲートを検出可能にラベルするのに使用することができる酵素の例は、 β -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、及びアルカリホスファターゼを含む。当業者であれば、本発明に基づいて利用することができる他の適切なラベルを知っているであろう。マーカー部分の本発明のシングルドメイン抗体への結合は、当技術分野において公知の標準的な技術を使用して達成される。これに関する典型的な方法は、Kennedy et al., Clin. Chim. Acta 70: 1, 1976; Schurs et al., Clin. Chim. Acta 81: 1, 1977; Shih et al., Int'U. Cancer 46: 1101, 1990; Stein et al., Cancer Res. 50: 1330, 1990; 及び前記Coliganに記載されている。さらに、免疫化学検出の便宜及び多様性は、アビジン、ストレプトアビジン、及びビオチンとコンジュゲートしている、本発明のシングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）を使用することにより向上させることができる{例えば、Wilchek et al. (eds.), 「Avidin-Biotin Technology」, Methods In Enzymology (Vol. 184) (Academic Press 1990); Bayer et al., 「Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology,」 in Methods In Molecular Biology (Vol. 10) 149- 162 (Manson, ed., The Humana Press, Inc. 1992)を参照のこと}。一部の実施態様では、シングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）の存在は、本発明のシングル抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）に特異的な二次抗体により検出される。典型的には、前記二次抗体は、上記されたのと同じ方法によりラベルされる。例えば、本発明のシングルドメイン抗体がタグ（例えば、ヒスチジンタグ）に融合している場合、二次抗体は、前記タグに特異的である。免疫アッセイ法を行うための方法は、十分確立されている{例えば、Cook and Self, 「Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays」, in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application 180-208 (Ritter and Ladyman, eds., Cambridge University Press 1995); Perry, 「The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology」, in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications 107-120 (Birch and Lennox, eds., Wiley-Liss, Inc. 1995); Diamandis, Immunoassay (Academic Press,

10

20

30

40

50

Inc. 1996)を参照のこと}。

【0049】

本発明のシングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）及びそれをコードする核酸分子を、医薬として使用することができる。特に、本発明の核酸分子（ベクター内に挿入されているか、又は、挿入されていない）は、遺伝子治療に特に適している。

【0050】

一部の実施態様では、本発明のシングルドメイン抗体及び核酸分子（ベクター内に挿入されているか、又は、挿入されていない）は、ガンの処置に特に適している。本明細書で使用する場合、「ガン」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、固体腫瘍及び血液骨腫瘍を含むが、これらに限定されない。ガンという用語は、皮膚、組織、臓器、骨、軟骨、血液、及び血管の疾患を含む。「ガン」という用語は、原発性及び転移性の両方のガンを更に包含する。本発明の方法及び組成物により処置することができるガンの例は、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳房、結腸、食道、消化管、歯茎、頭部、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌、又は子宮からのガン細胞を含むが、これらに限定されない。加えて、ガンは、下記組織型：悪性新生物、ガン腫、未分化ガン腫、巨大紡錘型細胞種、小細胞ガン、乳頭ガン、扁平上皮ガン、リンパ上皮ガン、基底細胞ガン、石灰化ガン、移行上皮ガン、乳頭状移行上皮ガン、腺ガン、悪性ガストリノーマ、胆管細胞ガン、肝細胞ガン、肝細胞ガンと胆管細胞ガンとの組み合わせ、小柱状腺ガン、腺様嚢胞ガン、腺腫性ポリープにおける腺ガン、家族性ポリポーシス腺ガン、固形ガン、悪性カルチノイドガン、細気管支肺胞性腺ガン、乳頭腺ガン、色素嫌性ガン、好酸性ガン、酸親和性腺ガン、塩基好性ガン、明細胞腺ガン、顆粒細胞ガン、濾胞腺ガン、乳頭及び濾胞腺ガン、非被包性硬化性ガン、副腎皮質ガン、類内膜ガン、皮膚付属器ガン、アポクリン腺ガン、皮脂腺ガン、耳垢腺ガン、粘表皮ガン、嚢胞腺ガン、乳頭嚢胞腺ガン、乳頭漿液嚢胞腺ガン、粘液性嚢胞腺ガン、粘液性腺ガン、印環細胞ガン、浸潤性乳管ガン、髄様ガン、小葉ガン、炎症性ガン、バジェット病、乳房、腺房細胞ガン、腺扁平上皮ガン、腺ガンw/扁平上皮化、悪性胸腺腫、悪性卵巣間質腫、悪性英膜細胞腫、悪性顆粒膜細胞腫、及び悪性セルトリ間質細胞腫、セルトリ細胞ガン、悪性ライディッヒ細胞腫、悪性脂質細胞腫、悪性傍神経節腫、悪性乳房外傍神経節腫、クロム親和性細胞腫、血管球血管肉腫、悪性メラノーマ、無色素性メラノーマ、表層進展性メラノーマ、巨大色素性母斑における悪性メラノーマ、上皮細胞メラノーマ、悪性青色母斑、肉腫、線維肉腫、悪性線維性組織球腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、胎児性横紋筋肉腫、胞巣性横紋筋肉腫、間質性肉腫、悪性混合腫瘍、ミューラー管混合腫瘍、腎芽細胞腫、肝芽細胞腫、ガン肉腫、悪性間葉細胞腫、悪性ブレンナー腫瘍、悪性葉状腫瘍、滑膜肉腫、悪性中皮腫、未分化胚細胞腫、胎児性ガン、悪性奇形腫、悪性卵巣甲状腺腫、絨毛ガン、悪性中腎腫、血管肉腫、悪性血管内皮腫、カボジ肉腫、悪性血管外皮腫、リンパ肉腫、骨肉腫、傍骨性骨肉腫、軟骨肉腫、悪性軟骨芽細胞腫、間葉性軟骨肉腫、骨の巨大細胞腫瘍、ユーイング肉腫、悪性歯原性腫瘍、エナメル上皮歯牙肉腫、悪性エナメル上皮腫、エナメル上皮線維肉腫、悪性松果体腫、脊索腫、悪性グリオーマ、上衣腫、星状細胞腫、原形質性星状細胞腫、線維性星状細胞腫、星芽細胞腫、グリオブラストーマ、乏突起神経膠腫、乏突起神経膠芽細胞腫、原始神経外胚葉性腫瘍、小脳肉腫、神経節芽細胞腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、嗅神経腫瘍、悪性骨髄腫、神経線維肉腫、悪性神経鞘腫、悪性顆粒細胞腫瘍、悪性リンパ腫、ホジキン病、ホジキンリンパ腫、側肉芽腫、悪性小リンパ球性リンパ腫、悪性びまん性大細胞リンパ腫、悪性濾胞性リンパ腫、歯状息肉腫、他の指定された非ホジキンリンパ腫、悪性組織球増殖症、多発性骨髄腫、マスト細胞肉腫、免疫増殖性小腸疾患、白血病、リンパ球性白血病、形質細胞白血病、赤血白血病、リンパ肉腫細胞性白血病、骨髄性白血病、好塩基球性白血病、好酸球性白血病、単球性白血病、マスト細胞性白血病、巨核芽球性白血病、骨髄性肉腫、及びヘアリー細胞白血病に特異的であることができるが、これらに限定されない。

【0051】

10

20

30

40

50

したがって、本発明の更なる目的は、ガンの処置を必要とする対象において、ガンを処置するための方法であって、対象に、治療的に有効な量の、本発明のシングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）、又は、上記されたようにベクター内に挿入されているか、又は、挿入されていない本発明の核酸分子を投与することを含む、方法に関する。

【0052】

本明細書で使用する場合、「処置」又は「処置する」という用語は、予防的（prophylactic）又は予防的（preventive）な処置及び治療的又は疾患改善的処置の両方（疾患にかかるリスクにあるか、又は、疾患にかかっていると疑われる患者、及び、病気であるか、又は、疾患もしくは症状を患っていると診断されている患者の処置を含む）を意味し、臨床的な再発のサプレッションを含む。処置は、障害を予防し、治療し、障害の開始を遅延させ、障害の重症度を低下させ、又は、障害の1つ以上の兆候を改善し、もしくは、障害を回復させるために、又は、このような処置を行わない場合に予測される生存を超えて対象の生存を延長させるために、医的障害を有する対象、又は、最終的に疾患になるおそれがある対象に投与することができる。「治療的に有効な量」は、任意の医療的処置に適用可能で合理的な利益/リスク比で、疾患の処置に十分な量の本発明のシングルドメイン抗体又はその核酸分子を意味する。活性剤の総日量は、主治医により通常の医療的判断の範囲内で決定されるであろうことが理解されるであろう。任意の特定の対象について具体的な治療的に有効な用量レベルは、各種の要因により決まるであろう。同要因は、対象の年齢、体重、健康全般、性別、及び食事；投与のタイミング、投与経路、及び利用される具体的な化合物の排泄速度；処置の持続期間；利用される具体的なポリペプチドと組み合わせで又は同時に使用される薬剤；医療分野において周知の要因等を含む。例えば、化合物の用量を、所望の治療効果を達成するのに必要とされる用量より低いレベルで開始し、所望の効果が達成されるまで、用量を徐々に増加させることは、当業者に周知である。ただし、製品の日量は、成人1日当たりに、0.01~1,000mgの広い範囲にわたって変動させることができる。典型的には、組成物は、処置される対象に対する用量の症候調節のために、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、250、及び500mg活性成分を含有する。医薬は、典型的には、約0.01mg~約500mg活性成分、好ましくは、1mg~約100mg活性成分を含有する。有効量の薬剤は、通常、1日当たりに、0.0002mg/kg体重~約20mg/kg体重、特に、1日当たりに、約0.001mg/kg体重~7mg/kg体重の用量レベルで供給される。

【0053】

本発明によれば、本発明のシングルドメイン抗体（異種ポリペプチドに融合しているか、又は、融合していない）又は核酸分子（ベクター内に挿入されているか、又は、挿入されていない）は、医薬組成物の形態で対象に投与される。典型的には、本発明のシングルドメイン抗体又は核酸分子（ベクター内に挿入されているか、又は、挿入されていない）は、薬学的に許容し得る賦形剤、及び場合により、持続性放出マトリックス、例えば、生分解性ポリマーと組み合わせられて、医薬組成物を形成することができる。「薬学的に」又は「薬学的に許容し得る」は、哺乳類、特にヒトに適切に投与された場合、有害、アレルギー、又は他の不都合な反応を生じさせない分子実体及び組成物を意味する。薬学的に許容し得る担体又は賦形剤は、非毒性の固体、半固体、又は液体充填材、希釈剤、カプセル化材料、又は任意の種類配合補助剤を意味する。経口、舌下、皮下、筋肉内、静脈内、経皮、局所、又は直腸投与用の本発明の医薬組成物において、活性成分は、単独又は別の活性成分との組み合わせで、単位投与形態において、従来の薬学的支持体との混合物として、動物及びヒトに投与することができる。適切な単位投与形態は、経口経路形態、例えば、錠剤、ゲルカプセル剤、粉末剤、顆粒剤、及び経口懸濁剤又は液剤、舌下及び側頬の投与形態、エアロゾル剤、インプラント、皮下、経皮、局所、腹腔内、筋肉内、静脈内、真皮下、経皮、くも膜下腔内、及び鼻内の投与形態、ならびに直腸投与形態を含む。典型的には、医薬組成物は、注入可能な配合用に薬学的に許容し得る媒体を含有する。これ

10

20

30

40

50

らは、特に、等張性で無菌の生理食塩水（リン酸ナトリウムもしくは二ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウム、もしくはマグネシウム等、又はこのような塩の混合物）、又は、場合により、滅菌水もしくは生理食塩水を添加することで注射液の構成が可能な、乾燥、特に、凍結乾燥成分の場合がある。注射用途に適した剤型は、無菌の水溶液剤又は分散剤；ゴマ油、ピーナツ油、又は水性プロピレングリコールを含む製剤、及び、無菌注射液剤又は分散剤の即時調製用の無菌粉末剤を含む。全ての場合において、製剤は、無菌である必要があり、容易に注入できるよう程度に流動性である必要がある。製剤は、製造及び保存の条件下において安定である必要があり、微生物、例えば、細菌及び真菌の汚染作用を防いで保存される必要がある。本発明の化合物を遊離塩基又は薬学的に許容し得る塩として含む液剤は、界面活性剤、例えば、ヒドロキシプロピルセルロースと共に安定的に混合された水中で調製することができる。分散剤も、グリセロール、液状ポリエチレングリコール、及びそれらの混合物中及び油中で調製することができる。保存及び使用の通常の条件下において、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するための保存剤を含有する。本発明のシングルドメイン抗体又は核酸分子（ベクター内に挿入されているか、又は、挿入されていない）は、中性型又は塩型で組成物中に配合することができる。薬学的に許容し得る塩は、（タンパク質の遊離アミノ基と共に形成された）酸付加塩を含む。同酸付加塩は、無機酸、例えば、塩酸、リン酸等、又は、有機酸、例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等により形成される。遊離カルボキシル基により形成される塩は、無機塩基、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、又は鉄の水酸化物等、及び、有機塩基、例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等から得ることもできる。また、担体は、溶媒、分散媒体であることもでき、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液状ポリエチレングリコール等）、それらの適切な混合物、及び植物油を含む。適切な流動性は、例えば、コーティング、例えば、レシチンの使用により、分散剤の場合には、必要とされる粒径の維持により、及び、界面活性剤の使用により維持することができる。微生物作用の防止は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によりもたすことができる。多くの場合には、等張剤、例えば、糖又は塩化ナトリウムを含むのが好ましいであろう。注射組成物の持続性吸収は、吸収を遅延させる作用剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの組成物中での使用によりもたすことができる。無菌の注射液剤は、活性化合物を、必要とされる量で適切な溶媒中に、必要に応じて上記で挙げられた複数の他の成分と共に包含させ、続けて、無菌ろ過することにより調製される。一般的には、分散剤は、種々の無菌の活性成分を基本的な分散媒体及び上記で挙げられたものから必要とされる他の成分を含有する無菌媒体中に包含させることにより調製される。無菌注射液剤を調製するための無菌粉末剤の場合には、調製の典型的な方法は、活性成分と任意の更なる所望の成分との粉末をそれらの予め無菌ろ過された溶液から生成する、真空乾燥及び凍結乾燥技術である。直接注入用のより高い濃度の液剤の調製も想到される。この場合、溶媒としてのDMSOの使用が極度に素早い浸透をもたらし、高濃度の活性剤を小さな腫瘍領域に送達するのが明らかである。配合に基づいて、液剤は、剤形に適合可能な方法で、例えば、治療的に有効な量で投与されるであろう。製剤は、各種の剤形、例えば、上記された注射液剤の種類において、容易に投与されるが、薬剤放出カプセル剤等も利用することができる。水溶液剤における非経口投与のために、例えば、液剤は、必要であれば、適切に緩衝化されるべきである。まず、液体希釈剤を、十分な生理食塩水又はグルコースにより等張性にする。これらの特定の水溶液剤は、特に、静脈内、筋肉内、皮下、及び腹腔内投与に適している。これに関して、利用することができる無菌水性媒体は、本開示を考慮して、当業者に公知であろう。用量の幾らかの変動は、処置される対象の状態に応じて当然生じるであろう。投与を担う人物は、任意の事象において、個々の対象に適した用量を決定するであろう。

10

20

30

40

50

【0054】

本発明は、下記図面及び実施例により更に例示されるであろう。ただし、これらの実施

例及び図面は、本発明の範囲を限定すると何ら解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0055】

図面

【図1】H12 h s 2 d A bはその活性なコンホーメーションにあるRhoに選択的である。(A)H12は、GTP結合活性化状態のRhoA GTPaseにのみ結合するコンホーメーションh s 2 d A bである。ELISAにより、100 μM GTPガンマS (黒色)もしくは1mM GDP (白色)のいずれかをロードされたりコンビナントGST-RhoA野生型、又は、RhoAの構成的に活性な変異体であるQ63Lの精製されたGST融合物(チェック)を明らかにしている。(B)インプットとして100 μM GTPガンマS (GTP)又は1mM GDPをロードされたHeLa細胞抽出物からのCBDタグ付きH12プルダウン。ウェスタンブロットから、CBD-H12プルダウンにおいて、GTPロード抽出物でのみ、両インプットの5%における同レベルでRhoAが証明される。D5抗チューブリンを、陰性対照として使用し、標準GST-RBD (RhotekinのRho結合ドメイン)を活性Rhoプルダウンの陽性対照として使用した。(C)不活性な変異体であるGFP-RhoA T19N又はGFP RhoA Q63Lを過剰発現するHeLa細胞における免疫蛍光。mycタグ抗体を使用して検出されたH12染色から、構成的に活性な変異体を過剰発現している細胞のみがGFP蛍光に類似するパターンを有することが証明された。

10

【図2】H12 h s 2 d A bは、細胞質ゾル中で発現された場合、内因性Rho活性を攪乱させることができる。HeLa細胞を、GFP融合物として発現させる、対照となる無関係のh s 2 d A b又はクローンH12抗Rho-GTPでトランスフェクションした。細胞を、トランスフェクション後20時間固定し、DAPI及びAlexa 594ファロイジンで染色して、アクチンストレスファイバーをラベリングした。

20

【図3-1】選択されたF-Ibの特徴決定。(A)Hm及びHmB細胞株におけるフローサイトメトリーによるmCherry蛍光定量。Hm及びHmB細胞株におけるF-Ibトランスフェクションの48時間後、mCherry蛍光を、トランスフェクションされた部分集団及びトランスフェクションされていない部分集団において、各F-Ibについて定量した。蛍光の各中央値の比(トランスフェクション集団対非トランスフェクション集団)から、あるF-IbについてのmCherry蛍光強度の割合が与えられる。(B)Fボックスドメインは、HmB細胞株において、RhoB分解を担っている。F-h s 2 d A b及びh s 2 d A bを、HmB細胞株にトランスフェクションした。mCherry蛍光の中央値を、(A)においてと同様に、フローサイトメトリーにより決定した。mCherry蛍光の減少は、F-Ibについてのみ観察される。一方、h s 2 d A b単独では、このような減衰を誘導することができない。

30

【図3-2】選択されたF-Ibの特徴決定。(C)HmB細胞株における分解は、プロテアソーム依存性である。HmB細胞を、F-Ibでトランスフェクションし、1 μM MG132 (プロテアソーム阻害剤)又はDMSOで、36時間処理した。MG132処理により、蛍光レベルが対照レベル近くに回復する。蛍光の中央値を、NR対照に正規化する。(D)F-H12及びF-B5は、Rac1変異体を分解する。F-Ibトランスフェクションの48時間後、mCherry蛍光を、Hm、HmB、及びH2B-mCherry-Rac1 L63細胞株において、(A)に記載されたのと同様に、フローサイトメトリーにより定量した。各細胞株についての蛍光の中央値を、NR対照に正規化した。F-H12及びF-B5は、他のF-Ibと比較して、Rac1 L63細胞株におけるmCherry蛍光の顕著な減少を誘導する。

40

【図3-3】選択されたF-Ibの特徴決定。(E)RhoB陽性F-Ibは全て、コンホーメーション感受性であり、活性な変異体であるRhoB L63に対して選択的である。上記されたように、mCherry蛍光を、Hm、HmB、及びH2B-mCherry-RhoB N19細胞株へのF-Ibトランスフェクション後に、フローサイトメトリーにより定量した。各細胞株についての蛍光の中央値を、NR対照に正規化した。mCh

50

erry 蛍光の顕著な減少は、対照細胞株である Hm と比較して、各 F - I b について、RhoBN19 細胞株において観察されなかった。

【図 4 - 1】内因性 RhoB 細胞活性化ノックダウン。(A) HeLa S3 細胞を、F - I b プラスミドで 48 時間トランスフェクションした。GST - RBD プルダウンを、各 F - I b について、Rho - GTP レベル (ライン RhoB - GTP、RhoA - GTP、及び RhoC - GTP) を制御するために行った。Rho タンパク質の総レベルが、インプット (ライン 総 RhoB、総 RhoA、及び総 RhoC) の 2% をロードすることにより証明された。F - I b 生成は、myc タグ顕色により示される。チューブリンを、ロード対照とする。(B) 3 つの独立した GST - RBD プルダウン実験の定量。F - B6 は、RhoA 又は RhoC より選択的に RhoB - GTP を分解すると考えられる。F - H12 及び F - B15 は、panRho バインダーである。相対活性を、チューブリンに正規化されたインプットレベルに対する GTP レベル間の比として算出した。正規化平均 \pm SEM を示す。

10

【図 4 - 2】内因性 RhoB 細胞活性化ノックダウン。(C) EGF 処理後の RhoB 活性化速度論。HeLa S3 細胞を、F - NR 対照により 48 時間トランスフェクションした。この 48 時間には、24 時間の血清飢餓を含む。48 時間のトランスフェクション中に、細胞を、示されたタイミングで、濃度 50 ng.mL⁻¹ EGF で処理した。GST - RBD プルダウンを、この処理後の Rho - GTP 誘導をモニターするのに行った。RhoB は、30 分までに 5 分以内で活性化される。活性化の 2 回目の波は、120 分で示される。RhoA 及び RhoC は、5 ~ 30 分の間でのみ活性化され、5 分において最大である。(C、D、E) EGF 処理の 15 分後及び F - I b による細胞トランスフェクションの 48 時間後に、RhoB - GTP (B)、RhoA - GTP (C)、及び RhoC - GTP (D) レベルを確認した。F - H12 及び F - B6 は、陰性対照と比較して、EGF 処理後に、RhoB 活性化を阻害することができる。F - H12 は、部分的に RhoA 活性化を阻害し (50%)、EGF 処理下において、RhoC - GTP レベルを、基底レベル (処理なし) 近くに低下させる。一方、F - B6 は、これら 2 つの Rho GTPase 活性化について、EGF 処理後に阻害作用を有さない。定量は、正規化平均 \pm SEM について示される。

20

【図 4 - 3】内因性 RhoB 細胞活性化ノックダウン。(C、D、E) EGF 処理の 15 分後及び F - I b による細胞トランスフェクションの 48 時間後に、RhoB - GTP (B)、RhoA - GTP (C)、及び RhoC - GTP (D) レベルを確認した。F - H12 及び F - B6 は、陰性対照と比較して、EGF 処理後に、RhoB 活性化を阻害することができる。F - H12 は、部分的に RhoA 活性化を阻害し (50%)、EGF 処理下において、RhoC - GTP レベルを、基底レベル (処理なし) 近くに低下させる。一方、F - B6 は、これら 2 つの Rho GTPase 活性化について、EGF 処理後に阻害作用を有さない。定量は、正規化平均 \pm SEM について示される。

30

【図 4 - 4】内因性 RhoB 細胞活性化ノックダウン。(C、D、E) EGF 処理の 15 分後及び F - I b による細胞トランスフェクションの 48 時間後に、RhoB - GTP (B)、RhoA - GTP (C)、及び RhoC - GTP (D) レベルを確認した。F - H12 及び F - B6 は、陰性対照と比較して、EGF 処理後に、RhoB 活性化を阻害することができる。F - H12 は、部分的に RhoA 活性化を阻害し (50%)、EGF 処理下において、RhoC - GTP レベルを、基底レベル (処理なし) 近くに低下させる。一方、F - B6 は、これら 2 つの Rho GTPase 活性化について、EGF 処理後に阻害作用を有さない。定量は、正規化平均 \pm SEM について示される。

40

【実施例】

【0056】

実施例 1：コンホーメーション感受性抗体の選択

ディスプレイ技術を使用する完全に *in vitro* での免疫化の主な利点の 1 つは、所望のアウトカムに対して選択させるための、抗原のコンホーメーション及び濃度の制御である。例えば、選択スキームは、低いオフレート速度論を備えた、高い親和性バインダ

50

ーの回復を改善し、特異的なエピトープをターゲットにし、又は、コンホーメーション感受性バインダーを特定するように策定することができる。リンコンビナント抗体フラグメントライブラリスクリーニングにより、例えば、活性なコンホーメーションの低分子量GTPaseを選択的にターゲットにする、複数のバインダーが提供されてきた。(国際出願第EP2014/073713号に記載された)本発明者らの合成ライブラリは、選択的なコンホーメーションバインダーの特定を可能にするのに十分な多様性及び機能性を有したと仮定した。Rhoサブファミリーから、低分子量GTPaseに対するコンホーメーション特異的抗体を選択するために、減法パニングを行った。低分子量GTPaseは、GDP又はGTPヌクレオチドそれぞれに結合した場合、不活性状態と活性状態との間をサイクルする分子スイッチである。活性又は不活性なコンホーメーションを安定的にとる低分子量GTPaseの変異体を設計することができる。構成的に活性な変異体(例えば、RhoA Q63L、RhoB Q63L、又はRhoC Q63L)を、ベイトとしてHEK293中で発現させ、ついで、そのネイティブなコンホーメーションを保存するパニングのために新鮮にプルダウンさせた。GTP結合RhoAに特異的なファージ中で濃縮するために、枯渇工程を、GDP結合RhoAタンパク質を使用する2回目のラウンドのパニングから導入して、活性変異体に対する選択前に、汎用バインダーを除去した。4回のラウンドの選択後に、クローンを、ファージELISAを使用し、GTP S (GTPの非加水分解性類似物)ロードRho GTPase又はGDPロードRho GTPaseのいずれかに対して分析した。選択されたシングルドメイン抗体の基本的な特徴を、表1に示す。

10

20

【0057】

【表 4】

表 1 : 選択されたシングルドメイン抗体の基本的な特徴 : (ND = 未決定)

名称	ELISA	IF	IP	IB		Kon (10 ⁶ M ⁻¹ .sec ⁻¹)	Koff (10 ⁻³ sec ⁻¹)	Kd (nM)
					(2SHA)			
H12	X	X	X	X	RhoA Q63L	4.81+5	1.28-4	2.65-10= 0.265nM
					RhoB Q63L	2.24+5	3.59-4	1.57-9= 1.57nM
					RhoC Q63L	1.12+6	5.41-5	4.79-11= 0.0479nM
					RhoA T19N	négatif	négatif	négatif
					Rac Q61L	7.53+5	2.55-4	3.3-10= 0,33nM
4P75	X	X	ND	ND	RhoA Q63L	ND	ND	ND
					RhoB Q63L	ND	ND	ND
					RhoC Q63L	ND	ND	ND
					RhoA T19N	ND	ND	ND
					Rac Q61L	ND	ND	ND
4SP1	X	X	X	X	RhoA Q63L	ND	ND	ND
					RhoB Q63L	ND	ND	ND
					RhoC Q63L	ND	ND	ND

10

20

30

40

					RhoA T19N	ND	ND	ND
					Rac Q61L	ND	ND	ND
4SNP36	X	0	X	X	RhoA Q63L	1.76+6	5.22-4	2.96-10=0.296nM
					RhoB Q63L	2.99+6	8.34-4	2.78-10=0.278nM
					RhoC Q63L	6.52+6	5.42-4	8.31-11=0.0831nM
					RhoA T19N	ND	ND	ND
					Rac Q61L	ND	ND	ND
4SNP61	X	0	X	X	RhoA Q63L	1.10+6	0,0013	1.21-9=1.21nM
					RhoB Q63L	7.22+5	0,0033	4.68-9=4.68nM
					RhoC Q63L	8.75+5	0,0046	5.30-9=5.30nM
					RhoA T19N	ND	ND	ND
					Rac Q61L	ND	ND	ND
5SP10	X	0	X	X	RhoA Q63L	ND	ND	ND
					RhoB Q63L	ND	ND	ND
					RhoC Q63L	ND	ND	ND

10

20

30

40

					RhoA T19N	ND	ND	ND
					Rac Q61L	ND	ND	ND
5SP11	X	0	X	X	RhoA Q63L	ND	ND	ND
					RhoB Q63L	ND	ND	ND
					RhoC Q63L	ND	ND	ND
					RhoA T19N	ND	ND	ND
					Rac Q61L	ND	ND	ND
5SP58	X	0	X	X	RhoA Q63L	ND	ND	ND
					RhoB Q63L	ND	ND	ND
					RhoC Q63L	ND	ND	ND
					RhoA T19N	ND	ND	ND
					Rac Q61L	ND	ND	ND
5SNP47	X	0	X	X	RhoA Q63L	ND	ND	ND
					RhoB Q63L	ND	ND	ND
					RhoC Q63L	ND	ND	ND

10

20

30

40

					RhoA T19N	ND	ND	ND	
					Rac Q61L	ND	ND	ND	
5SNP48	X	0	X	X	RhoA Q63L	8.14+5	6.86-4	8.4210= 0.84nM	10
					RhoB Q63L	4.62+5	0,0024	5.21-9= 5.21nM	
					RhoC Q63L	1.72+6	9.01-4	5.24-10= 0.524nM	
					RhoA T19N	négatif	négatif	négatif	20
					Rac Q61L	ND	ND	ND	
5SNP65	X	0	X	X	RhoA Q63L	8.70+5	5.22-4	6.00-10= 0.600nM	
					RhoB Q63L	2.53+5	5.99-4	2.36-9= 2.36nM	
					RhoC Q63L	1.71+6	0,001	6.08-10= 0.608nM	30
					RhoA T19N	négatif	négatif	négatif	
					Rac Q61L	ND	ND	ND	
B6	ND	X	X	X	RhoA Q63L	1,05	0,8	1,3125 nM	40
					RhoB Q63L	1,1	1,55	0,70969 nM	
					RhoC Q63L	1,45	0,625	2,32 nM	

【 0 0 5 8 】

実施例 2 : H 1 2 抗体の機能的な特徴

クローンH12を、ELISAにより更に分析した。本事例では、大腸菌中でGST融合物として発現された複数の精製Rhotaンパク質について、可溶性の抗体を使用する。H12 h s 2 d A bは、構成的に活性な変異体であるRh o A_{L63}及びGTP Sでロードされた野生型Rh o Aに効率的に結合したことが示された。対照的に、不活性なRh o A_{N19}変異体又はGDPロード野生型Rh o Aへの結合は観察されなかった(図1A)。ついで、H12がGTPロードRh o Aを哺乳類の細胞抽出物から特異的にプルダウンすることができたかどうかを試験した。大腸菌中で発現させたCBDタグ付きH12構築物を、キチンビーズに固定し、GTP S又はGDPのいずれかで予め処理されたHeLa細胞抽出物と共にインキュベーションした。GSTに融合されたRho te k i nのRh o結合ドメイン(GST-RBD)を、対照として使用した。このドメインは、活性なコンホーメーションのRh o GTPaseに結合するのが公知であり、現時点でRh o活性をアッセイするのに標準的な方法である。H12 h s 2 d A bは、GTP SでロードされたRh oに非常に選択的であり、GDPロード抽出物ではシグナルを与えないことが見出された(図1B)。次に、H12により、Rh o A活性コンホーメーションを免疫蛍光において特異的に検出したかどうかを試験した。GFP-Rh o A_{L63}活性変異体又は不活性なGFP-Rh o A_{N19}を発現しているHeLa細胞を固定し、H12 h s 2 d A bで染色した。不活性な変異体であるGFP-Rh o A_{N19}の過剰発現は、Rh o A経路においても、又は、細胞の形状においても、ドミナントネガティブな作用を有さず、トランスフェクションされていない細胞のバックグラウンドを上回って増大されたシグナルをもたらさなかった。対照的に、強力な染色が、GFP-Rh o A_{L63}活性変異体を発現している細胞において、選択的に得られた。これらの細胞は、束ねられたアクチンストレスファイバーを示すことに留意。この特徴的な表現型は、向上したRh o A活性に関連付けられる(図1B)。要するに、これらの結果から、H12 h s 2 d A bは、その活性なコンホーメーションにあるRh oに選択的であることが示された。

【0059】

さらに、結果から、H12抗体は、細胞質ゾル中で発現された場合、内因性Rh o活性を攪乱することができたことが示唆される。まず、H12-GFPを、HeLa細胞中で、Rh o A_{N19}不活性変異体又はRh o A_{L63}構成的活性変異体のいずれかと共発現させ、抗GFPモノクローナル抗体を使用する共免疫沈降実験を行った。活性なRh o Aは、H12-GFPと共免疫沈降された。一方、不活性なRh o Aは、共沈降されなかった。このことから、H12は、細胞内抗体として機能し、細胞質ゾル中でそのコンホーメーション感受性を維持したことが示された。Rh o GTPaseがアクチン細胞骨格重合を促進するシグナル伝達経路に関与しているため、H12過剰発現により誘導される機能的作用が見られた。トランスフェクションされていない細胞又は種々の無関係なGFP融合h s 2 d A bでトランスフェクションされた細胞とは対照的に、H12-GFPを発現している細胞は、総じて、アクチンストレスファイバーを欠くことが観察された(図2)。アクチンフィラメント組織化のこの変化は、細胞内の機械的な力及び張力の損失に特徴的な細胞形状の相当な変化に関連している(図2)。Rh o AがミオシンIIの活性化及びアクチン細胞骨格再組織化において主要な役割を果たしているため、この結果から、H12は、Rh o依存性シグナル伝達を効率的に攪乱し、C3細胞外酵素Rh o阻害剤により誘導される作用を模倣したことが示唆された。

【0060】

実施例3：Rh o B活性をターゲットにする機能性コンホーメーション細胞内抗体
蛍光タンパク質ノックダウンの視覚的スクリーニングによる細胞内抗体の直接選択

細胞内抗体を使用して細胞内でのRh o B活性に干渉する目的で、ファージディスプレイ選択で開始し、続けて、機能的な阻害性細胞内抗体の特定を目的として細胞内をスクリーニングする戦略が確立された。過去10年間に、Rh oタンパク質のGTPコンホーメーションを区別するバインダーを単離するために、精緻なファージディスプレイ選択スキームが確立された。選択中にRh o Bのネイティブなコンホーメーションを保持するために、ベイト抗原を、哺乳類細胞中で発現させ、新鮮に抽出し、NaLi-H1ライブラリ

10

20

30

40

50

ファージとのインキュベーション中に、ナノモル濃度範囲で使用した。競合的パニング選択を、過剰のGDPロード野生型Rhobの存在下における事前洗浄工程後に、構成的に活性な変異体であるRhobL63を使用して行い、その最も近いホモログより、Rhobに対して選択的なバインダーを濃縮した。2回のラウンドの濃縮後に、5モル濃度過剰のRhobAL63及びRhobCL63を加えて、ベイトと更に競合させた。細菌により発現され、精製されたGST-RhobL63に対する結合ファージの陽性濃縮をファージELISAにおいて制御した後に、Rhob細胞内抗体についての直接スクリーニングの開発が望まれた。このようなモノクローナル結合ドメインの有効性は、非常にアッセイ法依存的である場合がある、すなわち、ELISAスクリーニングにおいて陽性のものが免疫蛍光においては作用しない、又は、その逆もある場合があることを、リコンビナント抗体技術における過去の経験から学んだ。また、ターゲットに対するナノボディの蛍光融合物の共同在に基づく選択スキームも使用して、細胞内抗体を単離した。ついで、1セットのこれらのトラッキング細胞内抗体を機能化し、抗原を分解するために、GFPをプロテアソームターゲットドメインにより置き換えた時点では、驚くべきことに、最良のトラッカーと最良のデグレーダーとの間の相関関係は明らかではなかった。したがって、特定のアッセイ法において作用する細胞内抗体を特定する最良の方法は、最終的なフォーマットにおいて直接スクリーニングすることであろうと判断した。

【0061】

ここで、そのプロテアソーム媒介性分解を誘導することによりRhobを阻害するように選択する。細胞内抗体の複数の機能化は、ターゲットの分解を誘導するのを目的とした。それらの内の1つは、Fボックスタンパク質のFボックスドメインを融合させることである。Fボックスタンパク質は、2つのモジュールドメインを含有する。1つは、ターゲット認識のためのものであり、Fボックスドメインは、Skip1と相互作用する。Skip1は、SCF E3ユビキチンリガーゼ複合体のコンポーネントである。同複合体は、Fボックスタンパク質ターゲットのポリユビキチン化を誘導し、続けて、その後のプロテアソーム分解を誘導する。ターゲット結合ドメインの細胞内抗体による置換えにより、ターゲットを指定することができるため、抗原の分解を誘導することができる。そのノックダウン戦略の1つの利点は、Fボックス-細胞内抗体(F-Ib)が触媒的なやり方で作用し、共分解されないことである。別の利点は、分解が観察されない場合、これにより、抗原とナノボディとの間の細胞内相互作用が間接的に報告されるという事実にある。主な欠点は、ターゲットされた抗原がユビキチン化部位を提示しない場合があることである。ただし、それが、低分子量GTPase又はプロテアソームにより自然に分解することができる任意のタンパク質であるという訳ではない。この戦略を、複数の抗GFP hsdAb細胞内抗体について以前に試験し、hsdAbに融合されたdrosophilaのslmb遺伝子からのアミノ末端Fボックスドメイン及びIRESから翻訳された第2のシストロンとして発現されたミトコンドリア蛍光レポーター遺伝子カルボキシ末端mycタグ上流の発現を可能にするプラスミドを構築してきた。Rhobを蛍光タンパク質に融合させることにより、ターゲット分解の視覚的なスクリーニングを設定するために選択する。活性なRhobを模倣するために、構成的に活性な変異体であるRhobL63を発現させるのを選択する。同変異体は、GTPヌクレオチド加水分解の触媒が強く損なわれているため、GTPロードされた活性状態のままである。内因性Rhobとの結合クロストークを避けるために、RHOB-/-肺上皮細胞株H2882を使用した。RhobL63発現毒性により安定した細胞株を生成することができなかったため、アミノ末端ヒストンH2B、続けて、mCherry蛍光タンパク質ならびに、パルミトイル化及びプレニル化シグナルに対応する5つの末端アミノ酸を欠失しているカルボキシ末端RhobL63をコードする配列からなるキメラを構築した。この融合タンパク質は、膜アンカー能を失っており、クロマチンヌクレオソームに人工的に取り込まれ、核中に蛍光シグナルを与える一方で、HmBと呼ばれる安定した細胞株を作成するのに無毒性であると考えられる位置で、活性なRhobL63変異体を提示した。RhobL63への結合特異性を制御するために、同様に、H2B-mCherryのみを発現している細胞株(Hmと呼ばれる

10

20

30

40

50

)が作成された。Fボックス-hs2dAbが安定したF-Ibであり、相互作用がRhobL63と特異的に生じる場合、核でのmCherry蛍光の減少が、HmB細胞株において観察され、Hm細胞において観察されないであろうと仮定された。したがって、RhobL63分解に関連する蛍光減衰は、F-Ib Rhob阻害剤についての視覚的なスクリーニングの根拠かもしれない。クロマチンの量及び密度は、細胞依存性であり、細胞周期に従って変動し、細胞核蛍光におけるわずかな不均一性を与える。一過性のプラスミドトランスフェクションに基づくスクリーニングにおける細胞依存性不均一性の別の原因は、変動するプラスミドコピー数、トランスフェクション効率、及びF-Ibの相対的な発現レベルに由来する。これらのパラメータをより良好に評価するために、レポーター遺伝子としてミトコンドリア基質にターゲットされる単量体GFPを有するF-Ib二重シストロン発現ベクターを使用し、このスクリーニングにおける2つの陰性hs2dAbを使用するアッセイ法を設定した。これら2つは、Rhobファージディスプレイに無関係なF-NRと、以前にRhobに対して選択されたが、分解性細胞内抗体でないF-20と呼ばれる。まとめると、視覚的なスクリーニングは、GFP蛍光ミトコンドリアを示す細胞における、mCherry核蛍光減衰の観察による。4ラウンドのパニング後、hs2dAb配列を、プール中で消化し、F-Ib二重シストロンベクターに直接挿入した。このようなポリクローナルサブクローニングにより、ファージミドサブライブラリと比較して、ある程度の多様性の損失がもたらされる場合があるが、従来ファージディスプレイ戦略において、1セットのランダムに採取されたコロニーのみをスクリーニングし、ファージ選択中に特異的なバインダーの効果的な濃縮がサブクローニング中にトランスフェクションされない可能性がほとんどないと考えられる。1回のクローニング工程後に、数百のF-hs2dAbを、両細胞株(HmB及びHm)における個々のプラスミドクローンの一過性トランスフェクションによりスクリーニングし、倒立型顕微鏡において、mCherry蛍光強度を観察した。陽性ヒットをシーケンシングした後、2つの陰性内部対照であるF-NR及びF-B20と比較して、トランスフェクション細胞であるHmB細胞においてのみ、mCherry蛍光の強力な減衰を誘導した、4つの固有のクローンを特定した。選択されたクローンの内の1つは、H12 hs2dAbであった。H12 hs2dAbは、そのNaLi-H1ライブラリから以前に特定されたpan活性なRhobである。一部の選択された領域における蛍光減衰定量から、これらのF-Ibは、RhobL63の存在に応じて、H2B-mCherry-RhobL63の分解を誘導したことが示唆された。ついで、これらの結果は、フローサイトメトリーにより更に定量された。このことから、F-H12、F-B6、F-B15、及びF-B5が、H2BmCherry-RhobL63を選択的に分解することが確認され、F-H12及びF-B6が、最も効率的なF-Ibであることが示された(図3A)。

10

20

30

40

50

【0062】

選択されたF-Ibの特徴決定

Fボックスドメインのペプチド又は細胞内抗体への融合が、種々の細胞環境におけるプロテアソームによるターゲット分解を媒介することが報告されている。Fボックスドメインの存在が分解を担うかどうかを確認するために、hs2dAbを単独で、Hm及びHmB細胞株中で発現させたが、mCherry蛍光の減少は観察されなかった(図3B)。次に、MG132プロテアソーム阻害剤を使用して、観察された分解がプロテアソーム依存性であったことの対照実験を行った。フローサイトメトリーにより定量された4つのF-Ib誘導蛍光減衰をわずかに減少させるDMSO処理と比較して、36時間の間の1µM MG132の処置により、mCherry蛍光は、ほぼ対照レベルに回復した(図3C)。最後に、蛍光減衰が、トランスフェクションにおけるプラスミド濃度を2µgから0に減少させた後に蛍光を定量することにより、F-Ib発現の直接的な作用であったかどうかを分析した。用量応答性の直接的な作用が、プラスミド濃度が低いほど、蛍光シグナルが大きくなるように、効果的なF-H12及びF-B6について観察された(データを示さず)。これらの結果と共に、直接的な視覚的スクリーニングにより選択されたF-Ibが特異的にターゲティングし、プロテアソーム依存法において、クロマチンで濃縮さ

れた R h o B L 6 3 デルタ C A A X タンパク質を分解することが証明された。

【 0 0 6 3 】

選択された F - I b の特異性及びコンホーメーション選択性

H 1 2 h s 2 d A b は、コンホーメーションセンサであり、R h o A、R h o B、R h o C ホモログ間を区別しない G T P ロード R h o タンパク質のブロッキング細胞内抗体であり、近くの関連する G T P a s e である R a c 1 及び C D C 4 2 をも認識する。本研究において、H 1 2 h s 2 d A b が再度濃縮され、選択されたという事実は、以前のパニングにおいて、その提示が R h o A L 6 3 での 3 回目のラウンドのパニングにおいてクローンの 5 0 % を上回ったように、その濃縮が初期のラウンドの選択において非常に高かったため、驚くべきことではなかった。ここで、活性な R h o A 及び R h o C により競合を導入したにも関わらず、H 1 2 は、総じて、選択から排除されなかった。このことは、他の新たに選択された h s 2 d A b も、p a n R h o であった場合があることを示唆している。それにも関わらず、H 1 2 濃縮は非常に低かった。このことは、新たな減法選択が、少なくとも部分的に効果的であったことを示唆している。選択された F - h s 2 d A b の選択性を決定するために、H 2 B - m C h e r r y - R h o B L 6 3 以外で、同じ基礎において種々の安定した細胞株を生成した。H 2 B - m C h e r r y - R h o A L 6 3 及び H 2 B - m C h e r r y - R h o C L 6 3 のトランスフェクションでは、安定した細胞株を生成することができず、一過性発現の不均一性は、蛍光減衰の決定的な定量をもたらさなかった（データを示さず）。しかしながら、類似する細胞株の生成は、H 2 B - m C h e r r y - R a c 1 L 6 1 によって可能であった。R a c 1 は、主にスイッチドメインにおいて、R h o サブファミリーの最も近いホモログである。予想通りに、F - H 1 2 は、後者の細胞株において、蛍光減衰を誘導した。他の選択された F - I b の中でも、F - B 5 は、H 2 B - m C h e r r y - R a c 1 L 6 3 の蛍光レベルにも影響を及ぼしたが、F - 6 B 及び F - B 1 5 は、活性型 R a c 1 を分解することができなかった（図 3 D）。この点において、h s 2 d A b 5 又はその F - 5 機能化なしに、研究を続行したが、h s 2 d A b H 1 2 を、p a n 活性な R h o 対照として維持した。ついで、同じ変異が他の R a s ホモログに結合するヌクレオチドにおいて G T P a s e 欠損をもたらすため、主に不活性であると考えられている R h o B N 1 9 変異体に対するその作用を比較することにより、残りの F - I b のコンホーメーション選択性に取り組んだ。F - I b として発現させた h s 2 d A b のコンホーメーション選択性を、蛍光減衰アッセイ法において決定するために、H 2 B - m C h e r r y - R h o B N 1 9 の安定した細胞株を生成した。F A C S 分析後に、全ての効果的な F - I b は、R h o B の活性な変異体のみを分解し、不活性型を分解しなかった（図 3 E）。これらの結果から、F - B 6 及び F - B 1 5 は、その活性なコンホーメーションにある R h o B を優先的に認識するコンホーメーション h s 2 d A b であることが示される。

【 0 0 6 4 】

内因性 R h o B 活性ノックダウン

ついで、これらの細胞内抗体が、内因性の活性型 R h o B を分解できたかどうかを調査した。この目的を達成するために、顕著な量の R h o B タンパク質を検出可能な基底レベルの活性な R h o B を伴って発現する一般的な細胞株である H e L a S 3 細胞を使用した。R h o G T P a s e 活性をアッセイするための標準的な方法は、G S T - R B D を使用するプルダウンに基づいている。R B D は、G T P 結合 R h o とのみ相互作用する 3 つの R h o の共通するエフェクターである R h o t e k i n からの R h o 結合ドメインである。F - I b の一過性トランスフェクションの 4 8 時間後、R h o B 基底活性画分のプルダウンは、対照である F - B 2 0 及び F - N R より、F - B 6、F - B 1 5、又は F - H 1 2 によりトランスフェクションされた細胞において低かった。R h o A 及び R h o C の検出から、それらの基底活性も影響を受けたかどうかを評価することが可能であった。予想通りに、F - H 1 2 は、3 つ全ての R h o 活性画分のレベルの強力な低下を誘導した。しかしながら、3 つの活性な R h o のレベルは、F - B 1 5 及び F - B 6 の発現について、等しく低下しなかった。このことから、これらは、F - H 1 2 と同じ選択性を有さな

いことが示唆される。活性化 RhoB 及び RhoA の両方の分解を誘導した F - B 1 5 h s 2 d A b とは対照的に、F - B 6 は、RhoA 又は RhoC プルダウン画分の明らかなモデュレーションを誘導しなかった (図 4 A)。定量から、F - B 6 は、この細胞環境及びアッセイ条件において、RhoB 活性のみを低下させることが示された (図 4 B)。この結果は、それらの GTP ロード状態にある RhoB と RhoA とを区別し、その細胞内タンパク質分解を可能にするであろう分子の最初の例である。

【 0 0 6 5 】

F - 6 によるトランスフェクションの 4 8 時間後に観察されたタンパク質ノックダウンが直接的で、特異的であったかどうかを調査するために、Rho タンパク質の細胞内活性化の素早いプロセスをターゲットにした。実際には、RhoB 及び RhoA 及びより低い程度の RhoC が、EGF 処理後数分で活性化されることが報告された。血清飢餓の 2 4 時間後に、EGF による各 Rho の活性化速度論を、HeLa S3 細胞中で評価した。活性化は、3 つ全ての Rho について刺激後 5 分程度で観察され、1 5 分で最大に達した。同最大への到達を、更なる実験についての活性化時間として選択した (図 5 C 及び図 5 D)。F - H 1 2 及び F - B 6 の作用を、Rho 活性化について特徴決定し、RhoA / B 活性の選択的に観察された低下を確認した。一方、F - NR 又は F - B 2 0 対照は、EGF 媒介性 Rho 活性化を妨害しなかった。F - B 6 は、EGF により誘導された RhoB 活性のみを低下させる。一方、FH 1 2 は、全く全ての Rho 活性を阻害する (図 5 C 及び図 5 D)。

10

【 0 0 6 6 】

まとめると、h s 2 d A b B 6 は、RhoB - GTP に非常に選択的な細胞内抗体であると考えられる。同細胞内抗体は、細胞内 RhoB の主な画分をダウンレギュレーションすることなく、F - I b として機能化されると、RhoB 基底活性及びその刺激活性をブロックすることができる。

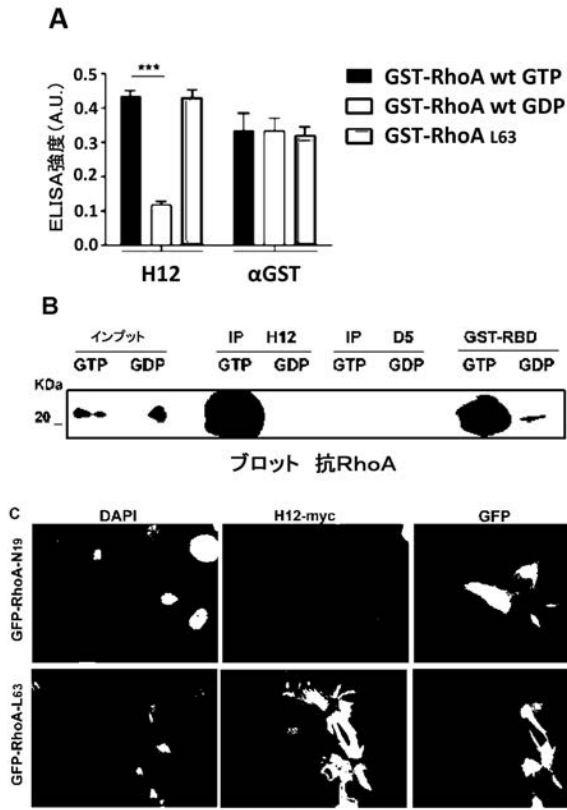
20

【 0 0 6 7 】

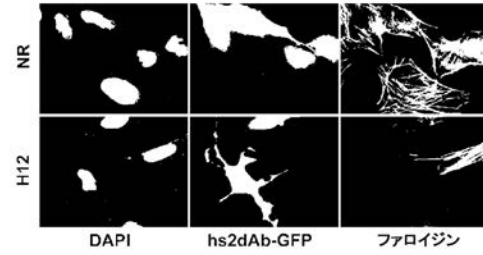
参考文献

本願全体を通して、種々の参考文献が、本発明が属する分野の水準を説明している。これらの参考文献の開示は、参照により本開示に組み入れられる。

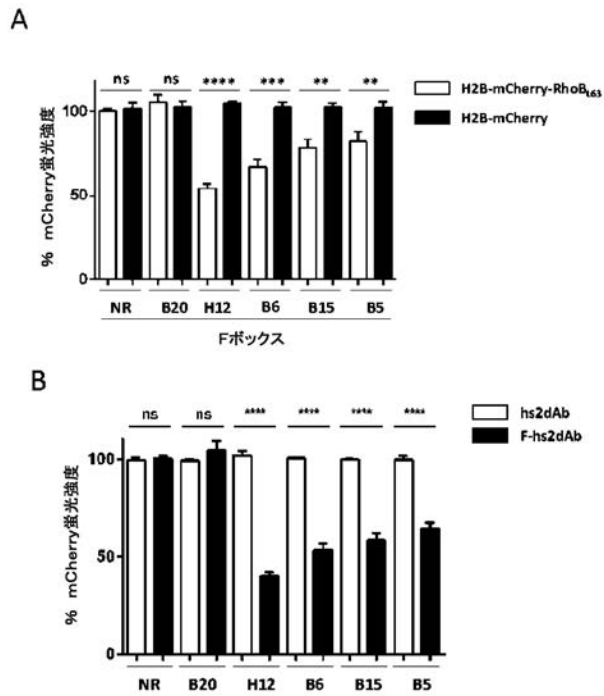
【 図 1 】



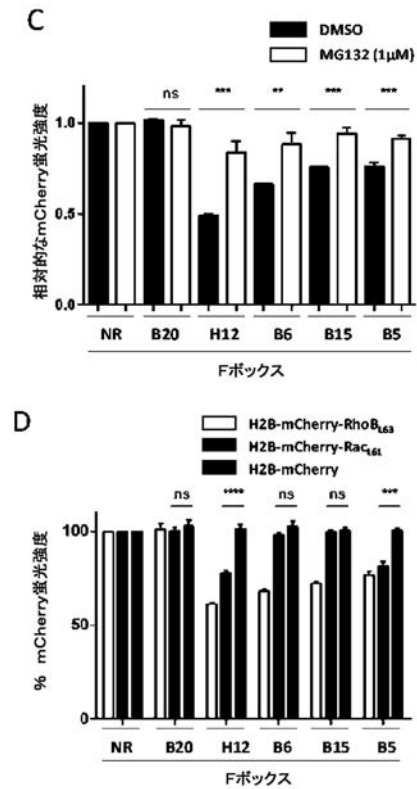
【 図 2 】



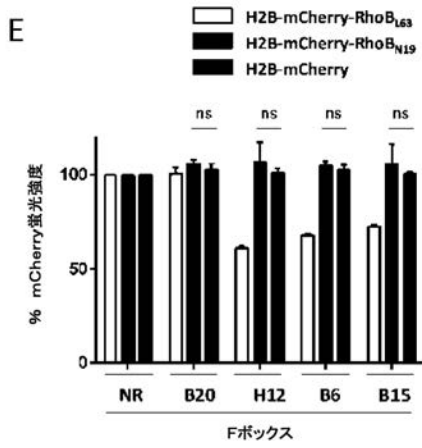
【 図 3 - 1 】



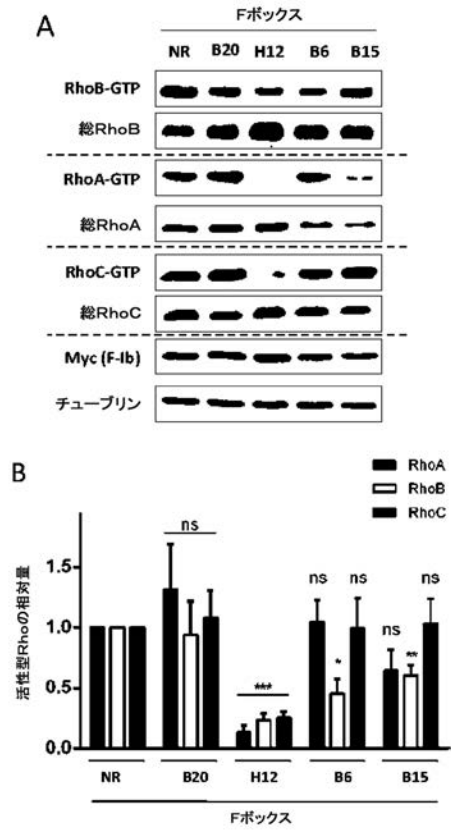
【 図 3 - 2 】



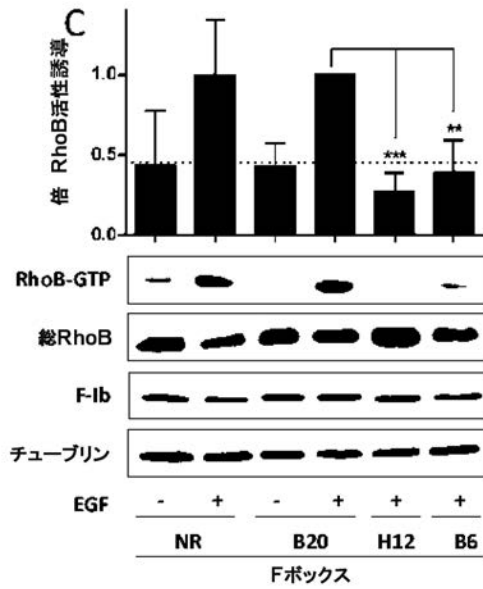
【 図 3 - 3 】



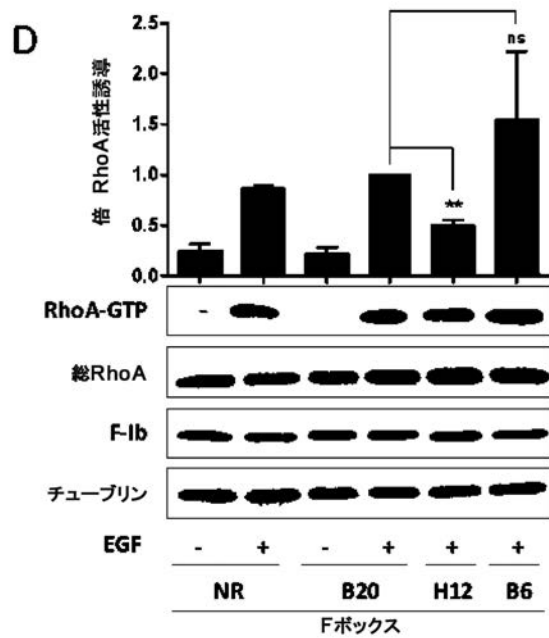
【 図 4 - 1 】



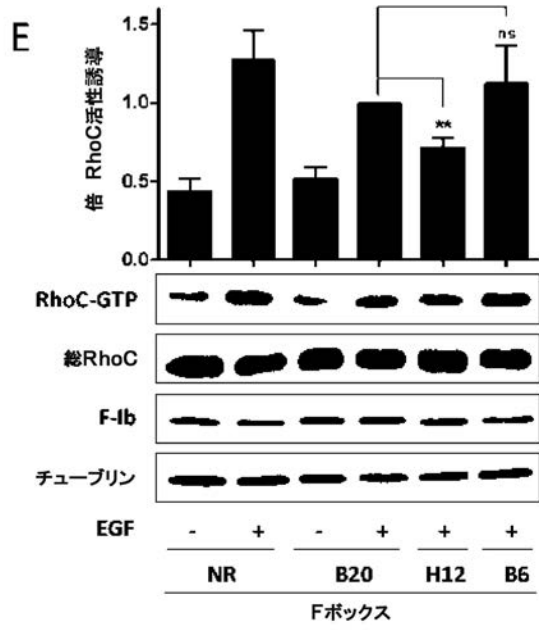
【 図 4 - 2 】



【 図 4 - 3 】



【 図 4 - 4 】



【 配 列 表 】

[2018506302000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/052136

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/18 A61K39/12 ADD.		
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 A61K		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Patrick Chinestra ET AL: "Generation of a Single Chain Antibody Variable Fragment (scFv) to Sense Selectively RhoB Activation", PLoS ONE, vol. 9, no. 11, 3 November 2014 (2014-11-03), page e111034, XP055198362, DOI: 10.1371/journal.pone.0111034 the whole document ----- -/--	1-16
<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		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 22 June 2016		Date of mailing of the international search report 29/06/2016
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 Lechner, Oskar

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/052136

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	T MILLER ET AL: "Intrabody applications in neurological disorders: progress and future prospects", MOLECULAR THERAPY, vol. 12, no. 3, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 394-401, XP055198532, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.04.003 the whole document -----	1-17
A	ALYSE D. PORTNOFF ET AL: "Ubiquibodies, Synthetic E3 Ubiquitin Ligases Endowed with Unnatural Substrate Specificity for Targeted Protein Silencing", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 289, no. 11, 28 January 2014 (2014-01-28), pages 7844-7855, XP055198417, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M113.544825 the whole document -----	1-17
A	ZHANG JING ET AL: "Intracellular antibody capture: A molecular biology approach to inhibitors of protein-protein interact", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - PROTEINS & PROTEOMICS, ELSEVIER, NETHERLANDS, vol. 1844, no. 11, 29 May 2014 (2014-05-29), pages 1970-1976, XP029050310, ISSN: 1570-9639, DOI: 10.1016/J.BBAPAP.2014.05.009 figures 1, 2, 4, 5 -----	1-17
A	RUDIHOFF S ET AL: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979 the whole document ----- ----- -/--	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/052136

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>YEE WAH WONG ET AL: "Structural Requirements for a Specificity Switch and for Maintenance of Affinity Using Mutational Analysis of a Phage-Displayed Anti-Arsonate Antibody of Fab Heavy Chain First Complementarity-Determining Region", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 160, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 5990-5997, XP007916801, ISSN: 0022-1767 the whole document</p> <p>-----</p>	1-17
A	<p>JEFFEREY R JACKSON: "In Vitro Antibody Maturation Improvement of a High Affinity, Neutralizing Antibody Against IL-1 beta", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 154, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 3310-3319, XP055033979, the whole document</p> <p>-----</p>	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP2016/052136**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-17(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2016/ 052136

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-17(partially)

A single domain antibody wherein the amino acid sequences of CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT have at least 90% of identity with the amino acid sequences of the CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT of the H12 single domain antibody which are defined in Table B, said single domain antibody binding to at least one activated form of a Rho GTPase.

2. claims: 1-14, 17(all partially)

A single domain antibody wherein the amino acid sequences of CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT have at least 90% of identity with the amino acid sequences of the CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT of the H12 single domain antibody which are defined in Table B, said single domain antibody binding to another target than at least one activated form of a Rho GTPase.

3. claims: 1-17(partially)

A single domain antibody wherein the amino acid sequences of CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT have at least 90% of identity with the amino acid sequences of the CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT of the B6 single domain antibody which are defined in Table B.

4-24. claims: 1-17(partially)

A single domain antibody wherein the amino acid sequences of CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT have at least 90% of identity with the amino acid sequences of the CDR1-IMGT, CDR2-IMGT and CDR3-IMGT of the 4P75 (invention 3), 4SP1, 4SNP36, 4SNP61, 5SP10, SSP11, 5SP58, 5SNP47, 5SNP48, 5SNP65, B20, B15, B5, B71, E3, A6, G12, NB61, 212B, 111B or 404F (hs2dAb) (invention 24) single domain antibody which are defined in Table B.

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71) 出願人 517269518

アンスティチュ・クロディウス・ルゴー

INSTITUT CLAUDIUS REGAUD

フランス国、エフ - 3 1 1 0 0 トゥールーズ、アヴニユ・イレーヌ・ジョリオ - キュリー 1

(74) 代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72) 発明者 オリション, オーレリアン

フランス国、エフ - 3 1 0 3 7 トゥールーズ・セデックス、アヴニユ・ユベール・キュリアン
2、オンコポル、ユエムエール 1 0 3 7・アンセルム・セエールセテ

(72) 発明者 ケラー, ローラ

フランス国、エフ - 3 1 0 3 7 トゥールーズ・セデックス、アヴニユ・ユベール・キュリアン
2、オンコポル、ユエムエール 1 0 3 7・アンセルム・セエールセテ

(72) 発明者 ファーヴ, ジル

フランス国、エフ - 3 1 0 3 7 トゥールーズ・セデックス、アヴニユ・ユベール・キュリアン
2、オンコポル、ユエムエール 1 0 3 7・アンセルム・セエールセテ

(72) 発明者 ベリー, ニコラ

フランス国、エフ - 3 1 0 3 7 トゥールーズ・セデックス、アヴニユ・ユベール・キュリアン
2、オンコポル、ユエムエール 1 0 3 7・アンセルム・セエールセテ

(72) 発明者 チネストラ, パトリック

フランス国、エフ - 3 1 0 3 7 トゥールーズ・セデックス、アヴニユ・ユベール・キュリアン
2、オンコポル、ユエムエール 1 0 3 7・アンセルム・セエールセテ

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC22 CC24 DA01

4B065 AA01X AA57X AA72X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44

4C076 AA95 CC03 CC41 EE41N

4C084 AA13 NA14 ZB262 ZB272

4C085 AA14 BB22 CC23 DD62 EE01

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72 FA74

專利名稱(譯)	抗RHO GTPASE構象單域抗体及其用途		
公開(公告)号	JP2018506302A	公開(公告)日	2018-03-08
申請号	JP2017558784	申請日	2016-02-02
[標]申請(專利權)人(譯)	法國國家健康醫學研究院		
申請(專利權)人(譯)	Ansutichu國家德拉桑特等德拉RECHERCHE醫療 Université電保羅薩巴蒂埃圖盧茲特魯瓦		
[標]發明人	オリシオンオーレリアン ケラーローラ ファーヴジル ペリーニコラ チネストラパトリック		
發明人	オリシオン,オーレリアン ケラー,ローラ ファーヴ,ジル ペリー,ニコラ チネストラ,パトリック		
IPC分类号	C12N15/02 C07K16/40 C07K19/00 C12N11/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 A61K39/395 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 A61K47/64 C12P21/08		
CPC分类号	A61K39/12 C07K16/18 C07K2317/22 C07K2317/33 C07K2317/569 C07K2317/76 C07K2317/80		
FI分类号	C12N15/00.C C07K16/40.ZNA C07K19/00 C12N11/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 A61K47/64 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC22 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065 /AA57X 4B065/AA72X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C076/AA95 4C076/CC03 4C076/CC41 4C076/EE41N 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C085/AA14 4C085/BB22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045 /AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
優先權	2015305160 2015-02-03 EP		
其他公開文獻	JP2018506302A5		
外部鏈接	Espacenet		

摘要(譯)
 本發明涉及抗Rho GTP酶構象單結構域抗體的活性形式，特別是在治療和診斷領域中的用途。特別地，本發明涉及單結構域抗体 (hs2 dAb) H 12, B 6,4 P 75,4 SP 1,4 SN 35,4 SNP 61,5 SP 10,5 SP 11的用途。
 , 5 SP 58,5 SNP 47,5 SNP 48,5 SNP 65, B 20, B 15, B 5, B 71, E 3, A 6, G 12結構域抗体與NB 61,212 B, 111 B或404 F的CDR1-IMGT, CDR2-IMGT和CDR3-IMGT的氨基酸序列具有至少90%的同一性。

(19) 日本國特許庁 (JP)	(12) 公表特許公報 (A)	(11) 特許公開表番号 特表2018-506302 (P2018-506302A)
	(43) 公表日	平成30年3月8日 (2018.3.8)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (參考)
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00	C 4B064
C07K 16/40 (2006.01)	C07K 16/40	ZNA 4B065
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4C076
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C084
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C085
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 46 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2017-558784 (P2017-558784)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成28年2月2日 (2016.2.2)	アンステイチュ ナショナル ドウ ラ
(85) 翻訳文提出日	平成29年9月28日 (2017.9.28)	サンテ エ ドウ ラ ルシエルシュ メ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/052136	ディカル
(87) 国際公開番号	W02016/124568	フランス国、エフ-75013 バリ、リ
(87) 国際公開日	平成28年8月11日 (2016.8.11)	ユ・ドゥ・トルビアク 101
(31) 優先権主張番号	15305160.2	(71) 出願人
(32) 優先日	平成27年2月3日 (2015.2.3)	ユニヴェルシテ ボール サバティエ ト
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	ールズ トロワ
		フランス共和国 エフ-31062 トウ
		ールズ セザックス 9, ルートド
		ゥ ナルボンヌ 118
		最終頁に続く

