

(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2019-511201

(P2019-511201A)

(43) 公表日 平成31年4月25日 (2019.4.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 C 0 7 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 169 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-537519 (P2018-537519)	(71) 出願人	518247933
(86) (22) 出願日	平成29年1月12日 (2017.1.12)		クレッシェンド、バイオロジックス、リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成30年9月10日 (2018.9.10)		CRESCENDO BIOLOGICS LIMITED
(86) 国際出願番号	PCT/GB2017/050075		イギリス国ケンブリッジ、メディトリーナ、ビルディング、260、バブラハム、リサーチ、キャンパス
(87) 国際公開番号	W02017/122018	(74) 代理人	100091982
(87) 国際公開日	平成29年7月20日 (2017.7.20)		弁理士 永井 浩之
(31) 優先権主張番号	1600559.7	(74) 代理人	100091487
(32) 優先日	平成28年1月12日 (2016.1.12)		弁理士 中村 行孝
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100082991
(31) 優先権主張番号	1605770.5		弁理士 佐藤 泰和
(32) 優先日	平成28年4月4日 (2016.4.4)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
(31) 優先権主張番号	1605763.0		
(32) 優先日	平成28年4月4日 (2016.4.4)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 前立腺特異的膜抗原 (PSMA) と結合する分子

(57) 【要約】

本開示は、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) と特異的に結合する結合分子、特に、単一ヒト可変重鎖ドメイン抗体および癌の処置のための関連法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト P S M A と結合し得る第 1 の単一ヒト重鎖可変免疫グロブリン (V_H) ドメイン抗体と、ヒト P S M A と結合し得る第 2 の単一 V_H ドメイン抗体とを含んでなる、結合分子。

【請求項 2】

前記第 1 の V_H ドメインおよび前記第 2 の V_H ドメインがヒト P S M A 上の同じエピトープと結合する、請求項 1 に記載の結合分子。

【請求項 3】

前記第 1 の単一 V_H ドメイン抗体が P S M A 上の第 1 のエピトープと結合し、前記第 2 の単一 V_H ドメイン抗体が P S M A 上の第 2 のエピトープと結合し、前記第 1 のエピトープと前記第 2 のエピトープが同一でない、請求項 1 に記載の結合分子。

10

【請求項 4】

前記第 1 または第 2 の単一 V_H ドメイン抗体が、配列番号 3 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含んでなる C D R 3 配列を含んでなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項 5】

前記第 1 または第 2 の単一 V_H ドメイン抗体が C D R 1 および C D R 2 配列を含んでなり、前記 C D R 1 配列が、配列番号 1 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含んでなり、かつ前記 C D R 2 配列が、配列番号 2 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含んでなる、請求項 4 に記載の結合分子。

20

【請求項 6】

前記第 1 または第 2 の単一 V_H ドメイン抗体が、配列番号 4 またはそれと少なくとも 70 %、75 %、80 %、90 % もしくは 95 % の同一性を有する配列を含んでなる、またははからなる、請求項 4 または 5 に記載の結合分子。

【請求項 7】

前記第 1 または第 2 の単一 V_H ドメイン抗体が、配列番号 8 3 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含んでなる C D R 3 配列を含んでなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の結合分子。

30

【請求項 8】

前記第 1 または第 2 の単一 V_H ドメイン抗体が C D R 1 および C D R 2 配列を含んでなり、前記 C D R 1 配列が、配列番号 8 1 またはそれと少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含んでなり、かつ C D R 2 配列が、配列番号 8 2 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を有する、請求項 7 に記載の結合分子。

40

【請求項 9】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 8 4 またはそれと少なくとも 70 %、75 %、80 %、90 % もしくは 95 % の同一性を有する配列を含んでなる、またははからなる、請求項 7 または 8 に記載の結合分子。

【請求項 10】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 1 8 3 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含んでなる C D R 3 配列を含んでなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項 11】

50

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが C D R 1 および 2 配列を含んでなり、前記 C D R 1 配列が、配列番号 1 8 1 またはそれと少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなり、かつ前記 C D R 2 配列が、配列番号 1 8 2 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる、請求項 1 0 に記載の結合分子。

【請求項 1 2】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 1 8 4 またはそれと少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 0 % もしくは 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる、請求項 1 0 または 1 1 に記載の結合分子。

10

【請求項 1 3】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 2 7 9 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる C D R 3 配列を含んでなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の結合分子。

。

【請求項 1 4】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 2 7 7 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 1 配列と、配列番号 2 7 8 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 2 配列とを含んでなる、請求項 1 3 に記載の結合分子。

20

【請求項 1 5】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 2 8 0 またはそれと少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 0 % もしくは 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる、請求項 1 3 または 1 4 に記載の結合分子。

【請求項 1 6】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 2 9 5 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる C D R 3 配列を含んでなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の結合分子。

30

【請求項 1 7】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 2 9 3 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 1 配列と、配列番号 2 9 4 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列 C D R 2 配列とを含んでなる、請求項 1 6 に記載の結合分子。

【請求項 1 8】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 2 9 6 またはそれと少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 0 % もしくは 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる、請求項 1 6 または 1 7 に記載の結合分子。

40

【請求項 1 9】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 0 3 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる C D R 3 配列を含んでなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項 2 0】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 0 1 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 1 配列と、配列番号 3 0 2 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R

50

2 配列とを含んでなる、請求項 19 に記載の結合分子。

【請求項 21】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 304 またはそれと少なくとも 70 %、75 %、80 %、90 % もしくは 95 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる、請求項 19 または 20 に記載の結合分子。

【請求項 22】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 331 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含んでなる CDR3 配列を含んでなる、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の結合分子。

10

【請求項 23】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 329 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を有する CDR1 配列と、配列番号 330 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を有する CDR2 配列とを含んでなる、請求項 22 に記載の結合分子。

【請求項 24】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 332 またはそれと少なくとも 70 %、75 %、80 %、90 % もしくは 95 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる、請求項 22 または 23 に記載の結合分子。

20

【請求項 25】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 363 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含んでなる CDR3 配列を含んでなる、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項 26】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 361 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を有する CDR1 配列と、配列番号 362 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を有する CDR2 配列とを含んでなる、請求項 25 に記載の結合分子。

30

【請求項 27】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 364 またはそれと少なくとも 70 %、75 %、80 %、90 % もしくは 95 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる、請求項 25 または 26 に記載の結合分子。

【請求項 28】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 367 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含んでなる CDR3 配列を含んでなる、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の結合分子。

40

【請求項 29】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 365 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を有する CDR1 配列と、配列番号 366 またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を有する CDR2 配列とを含んでなる、請求項 28 に記載の結合分子。

【請求項 30】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 368 またはそれと少なくとも 70 %、75 %、80 %、90 % もしくは 95 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる、請求項 28 または 29 に記載の結合分子。

50

【請求項 3 1】

前記第 1 および／または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 7 1 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる C D R 3 配列を含んでなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項 3 2】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 6 9 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 1 配列と、配列番号 3 7 0 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 2 配列とを含んでなる、請求項 3 1 に記載の結合分子。

10

【請求項 3 3】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 7 2 またはそれと少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 0 % もしくは 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる、請求項 3 1 または 3 2 に記載の結合分子。

【請求項 3 4】

前記第 1 および／または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 7 5 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる C D R 3 配列を含んでなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の結合分子。

20

【請求項 3 5】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 7 3 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 1 配列と、配列番号 3 7 4 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 2 配列とを含んでなる、請求項 3 4 に記載の結合分子。

【請求項 3 6】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 7 6 またはそれと少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 0 % もしくは 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる、請求項 3 4 または 3 5 に記載の結合分子。

30

【請求項 3 7】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 7 9 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる C D R 3 配列を含んでなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項 3 8】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 7 7 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 1 配列と、配列番号 3 7 8 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 2 配列とを含んでなる、請求項 3 7 に記載の結合分子。

40

【請求項 3 9】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 8 0 またはそれと少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 0 % もしくは 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる、請求項 3 7 または 3 8 に記載の結合分子。

【請求項 4 0】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 8 3 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる C D R 3 配列を含んでなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の結合分子。

50

【請求項 4 1】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 8 1 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 1 配列と、配列番号 3 8 2 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 2 配列とを含んでなる、請求項 4 0 に記載の結合分子。

【請求項 4 2】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 8 4 またはそれと少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 0 % もしくは 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる、請求項 4 0 または 4 1 に記載の結合分子。

10

【請求項 4 3】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 8 7 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる C D R 3 配列を含んでなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項 4 4】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 8 5 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 1 配列と、配列番号 3 8 6 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 2 配列とを含んでなる、請求項 4 3 に記載の結合分子。

20

【請求項 4 5】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、を含んでなり、前記 V_H ドメインが、配列番号 3 8 8 またはそれと少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 0 % もしくは 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる、請求項 4 3 または 4 4 に記載の結合分子。

【請求項 4 6】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 9 1 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる C D R 3 配列を含んでなる、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の結合分子。

30

【請求項 4 7】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 8 9 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 1 配列と、配列番号 3 9 0 またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する C D R 2 配列とを含んでなる、請求項 4 6 に記載の結合分子。

【請求項 4 8】

前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 3 9 2 またはそれと少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 0 % もしくは 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる、請求項 4 6 または 4 7 に記載の結合分子。

40

【請求項 4 9】

前記第 1 および第 2 の V_H ドメインが同じ V_H ドメインである、請求項 1、2 および 4 ～ 4 8 のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項 5 0】

a) 第 1 の単一 V_H ドメイン抗体が請求項 7 ～ 1 5、2 2 ～ 2 4、2 8 ～ 3 6、4 3 ～ 4 5 のいずれか一項に記載の単一 V_H ドメイン抗体から選択され、かつ b) 第 2 の単一 V_H ドメイン抗体が請求項 4 ～ 6、1 6 ～ 2 1、3 7 ～ 4 2 のいずれか一項に記載の単一 V_H ドメイン抗体から選択される、請求項 3 に記載の結合分子。

【請求項 5 1】

a) 第 1 の単一 V_H ドメイン抗体が請求項 7 ～ 9 のいずれか一項に記載の単一 V_H ドメ

50

イン抗体から選択され、b) 第2の単一V_Hドメイン抗体が請求項4～6のいずれか一項に記載の単一V_Hドメイン抗体から選択される、請求項4記載の結合分子。

【請求項52】

第1の単一V_Hドメイン抗体がCまたはN末端に位置する、請求項3または4に記載の結合分子。

【請求項53】

a) 第1のV_Hドメインが、PSMAとの結合に関して、配列番号4を含んでなるHumabody (商標)と競合することができ、かつ／または配列番号4を含んでなるHumabody (商標)とPSMAとの結合を交差遮断することができ、かつb) 第2のV_Hドメインが、PSMAとの結合に関して、配列番号76を含んでなるHumabody (商標)と競合することができ、かつ／または配列番号76を含んでなるHumabody (商標)とPSMAとの結合を交差遮断することができる、請求項3に記載の結合分子。

10

【請求項54】

前記第1および第2のV_Hドメインがペプチドによって共有結合的に連結される、請求項1～53のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項55】

前記ペプチドが3～50アミノ酸長の間である、請求項54に記載の結合分子。

【請求項56】

リンカーがグリシンおよびセリンアミノ酸残基を含んでなる、請求項54または55に記載の結合分子。

20

【請求項57】

ペプチドリリンカーが式(Gly₄Ser)_nからなり、式中、n=1～10である、請求項56に記載の結合分子。

【請求項58】

半減期延長部分を含んでなる、請求項1～57のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項59】

前記半減期延長部分が前記第1または第2のV_Hドメインに共有結合的に連結される、請求項58に記載の結合分子。

【請求項60】

前記半減期延長部分が、アルブミン結合部分、トランスフェリン結合部分、ポリエチレングリコール分子、組換えポリエチレングリコール分子、ヒト血清アルブミン、ヒト血清アルブミンのフラグメント、およびアルブミン結合ペプチドからなる群から選択される、請求項59に記載の結合分子。

30

【請求項61】

前記結合分子が細胞によって内部移行され得る、請求項1～60のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項62】

前記結合分子が細胞傷害性部分にコンジュゲートされる、請求項1～61のいずれか一項に記載の結合分子。

40

【請求項63】

前記結合分子が標識にコンジュゲートされる、請求項1～62のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項64】

前記結合分子が軽鎖を欠く、請求項1～63のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項65】

前記第1および第2のV_Hドメインが、軽鎖および重鎖遺伝子座が機能的にサイレンシングされ、かつ1以上のヒト重鎖遺伝子を有する導入遺伝子を発現するノックアウトマウスから得られるライブラリーから得られる、請求項1～64のいずれか一項に記載の結合分子。

50

【請求項 66】

請求項 1～65 のいずれか一項に記載の結合分子と、医薬担体とを含んでなる医薬組成物。

【請求項 67】

請求項 1～65 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 66 に記載の医薬組成物の治療上有効な量を投与することを含んでなる、前立腺癌または前立腺障害を治療するための方法。

【請求項 68】

薬剤として使用するための、1～65 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 1～66 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 69】

前立腺癌または前立腺障害の治療において使用するための、請求項 1～65 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 66 に記載の医薬組成物。

【請求項 70】

前立腺癌または前立腺障害の治療のための薬剤の製造における、請求項 1～65 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 66 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 71】

細胞傷害性部分を腫瘍細胞に送達するための方法であって、前記細胞を請求項 1～65 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 66 に記載の医薬組成物に曝すことを含んでなる、方法。

【請求項 72】

患者におけるイメージング法で使用するための、請求項 1～65 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 66 に記載の医薬組成物。

【請求項 73】

放射性標識化合物の調製のための、請求項 1～65 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 66 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 74】

1 以上の P S M A 腫瘍または細胞をイメージングするための方法であって、1 以上の腫瘍または細胞を有効量の請求項 1～65 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 66 に記載の医薬組成物に接触させることを含んでなる、方法。

【請求項 75】

試験サンプルにおいて P S M A の存在を決定する、またはイムノアッセイによって腫瘍細胞を検出するための方法であって、前記サンプルを請求項 1～65 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 66 に記載の医薬組成物および少なくとも 1 種類の検出可能な標識に接触させることを含んでなる、方法。

【請求項 76】

請求項 1～65 のいずれか一項に記載の結合分子をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、単離された核酸分子。

【請求項 77】

請求項 76 に記載の核酸分子を含んでなる構築物。

【請求項 78】

請求項 76 に記載の核酸または請求項 77 に記載の構築物を含んでなる宿主細胞。

【請求項 79】

請求項 1～65 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 66 に記載の医薬組成物を含んでなる、キット。

【請求項 80】

宿主細胞において前記結合分子をコードする核酸を発現させること、および宿主細胞培養から前記結合分子を単離することを含んでなる、請求項 1～65 のいずれか一項に記載の結合分子を作製するための方法。

【請求項 81】

10

20

30

40

50

対象が癌を有するか否かを決定する方法であって、前記対象に、請求項 1～65 のいずれか一項に記載の結合分子または請求項 66 に記載の医薬組成物を含んでなる組成物を投与すること、および対象の画像を取得すること、それにより対象が癌を有するか否かを決定することを含んでなる、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、前立腺特異的膜抗原(prostate specific membrane antigen) (PSMA) 結合分子、および疾患の処置におけるこのような結合分子の使用に関する。

【0002】

序論

前立腺癌は、先進国の男性において最も多く診断されている非皮膚関連悪性腫瘍である。6人に1人が前立腺癌と診断されると推計される。

【0003】

前立腺癌の現行治療には、手術、放射線、および補助ホルモン療法が含まれる。これらの療法は疾患の早期段階では比較的有効であるが、限局性前立腺癌と最初に診断された患者の大多数は最終的には再発する。化学療法は進行した前立腺癌との対抗において最も広く用いられているアプローチの1つであるが、その治療効力は通常、特異性の欠如と関連毒性のために十分ではない。前立腺癌細胞への標的化送達の欠如は、実現可能な治療効果を達成する上で主要な障害の1つである。よって、抗前立腺癌薬の選択性を高める戦略の重要な必要性が依然としてある(Barve et al., J Control Release. 2014 August 10; 0: 118-132)。

【0004】

前立腺癌の診断は、前立腺特異的抗原(PSA)などの血清に基づくマーカーの使用の後に著しく改善された。加えて、前立腺腫瘍関連抗原は、腫瘍イメージング、診断、および標的化療法のための標的となる。前立腺腫瘍関連マーカーである前立腺特異的膜抗原(PSMA)もこのような標的である。

【0005】

PSMAは、前立腺分泌上皮細胞膜に極めて限定された750残基のII型膜貫通糖タンパク質である。PSMAは前立腺癌細胞および非前立腺固形腫瘍新生血管に発現が高く、健康な前立腺、腎臓、肝臓、小腸、および脳を含む他の組織では低レベルで発現する。PSMA発現は、前立腺疾患の進行および転移とともに増大し、よって、その発現レベルは、腫瘍の悪性度との相関が見出されている。様々な免疫組織学的研究では、良性前立腺上皮細胞でのレベルに比べ、実質的に前立腺癌腫の総ての症例でPSMAレベルの増大が証明されている。前立腺上皮内新生物、後期アンドロゲン非依存性前立腺癌ならびにリンパ節、骨、軟組織、および肺に限局された続発性前立腺腫瘍を含む、この疾患のあらゆる病期で、強いPSMA染色が見られる。よって、PSMAは前立腺癌細胞のバイオマーカーとして広く使用されている。

【0006】

PSMAは、19アミノ酸の内部部分、24アミノ酸の膜貫通部分、および707アミノ酸の外部部分の、3部構造を有する。PSMAは、ニューロペプチドN-アセチルアスパルチルグルタミン酸およびグルタミン酸コンジュゲート葉酸誘導体を処理するその能力に基づくグルタミン酸カルボキシペプチダーゼ活性を有する非共有結合性のホモ二量体を形成する。PSMAは、内部移行経路によって迅速かつ効率的に内部移行を受け、迅速に再循環して膜に戻る。

【0007】

抗体に基づく療法は、腫瘍学、炎症性疾患および感染性疾患などの分野で数を増しているヒト悪性腫瘍に対する療法の重要な成分として登場した。ほとんどの場合、この療法の機能の基礎は、抗体に基づく薬物がその標的抗原に対して有する高い程度の特異性および親和性である。薬物、毒素、または放射性核種を伴う武装モノクローナル抗体(mAb)

10

20

30

40

50

は、m A b が治療効果を誘導し得るさらに別の戦略である。抗体の標的化特異性と毒性エフェクター分子の腫瘍死滅力を合わせることによって、免疫複合体は標的と正常組織の間の高感度の識別を可能とし、それによって、ほとんどの従来化学療法薬より副作用を少なくする。

【0008】

しかしながら、m A b はそれらの大きさおよびその他の物理的特性のために、静脈内 (i v) または皮下 (s c) のいずれかに投与しなければならないことが多く、いずれの場合でも、非罹患部の標的抗原に結合する抗体をもたらし得る (正常な非罹患組織の健全な機能を損なうおそれがある) か、または最適とは言えない P K / P D 特徴をもたらし得る。どちらの転帰も、最適とは言えない投与経路のために有効性の低下および / または安全性特性の障害をもたらし得る。

10

【0009】

報告された最初の P S M A 特異的 m A b であるマウス m A b 7 E 1 1 は、その後、腫瘍イメージング用の診断薬として開発および商品化された (P r o s t a S c i n t、C y t o g e n、プリンス頓、N. J.)。しかしながら、この抗体は、細胞死の際に露出する P S M A の細胞内エピトープを認識し、P S M A の検出のための造影剤としてのその有用性を限定する。さらに最近では、P S M A の細胞外部分を認識する J 5 9 1 などの m A b が同定された。

【0010】

本発明の目的は、前立腺癌の治療において使用するための別の、抗体に基づく処置の必要に対処することである。

20

【0011】

発明の概要

本発明は、ヒト P S M A と結合する結合分子に関する。特に、本発明は、2 以上の単一ヒト重鎖可変 (V_H) ドメイン抗体を含んでなる、ヒト P S M A と結合する多価 / 多重パラトープ性結合分子に関する。特に、結合は、その天然型のヒト P S M A に対するものである。好ましい実施形態では、単一 V_H ドメインは、ヒト V 遺伝子遺伝子座を発現しかつ P S M A 抗原で免疫されたトランスジェニック齧歯類で産生される重鎖単独抗体から生成される。本発明の結合分子において使用される単一ドメイン抗体は一価形態で標的と結合する。単一ドメイン抗体は従来のモノクローナル抗体形式よりも小さく、本発明者らは、このような分子がモノクローナル抗体の水準と比較して高いレベルの特異的腫瘍標的化、迅速な浸透および腫瘍での高い蓄積を助長することを示した。本明細書で示されるように、結合分子は、一価単一ドメイン抗体に比べて改善した特性を有し、特に、それらの結合分子は改善された細胞内部移行を示す。それらの結合分子はまた、モノクローナル水準抗体とは異なる特性を示す。本発明者らはまた、単一ドメイン抗体がヒト P S M A と高い親和性で結合し、極めて安定で、高レベルで発現されることも示した。さらに、本発明の単一 V_H ドメイン抗体は、マウス抗体よりも免疫原性が低く、ヒト化は必要とされない。これらの特性は、本発明の化合物を、種々の形式で、例えば、多価 / 多重パラトープ性形式で、および毒素または半減期延長部分とコンジュゲートして特に有用とする。よって、本化合物は疾患、特に、癌の処置において有用である。1 つの態様では、本発明は、2 以上の本明細書に記載の単一 V_H ドメイン抗体を含んでなる免疫複合体を提供する。本発明の態様を以下でさらにまとめる。

30

40

【0012】

よって、1 つの態様では、本発明は、ヒト P S M A と結合し得る第 1 の単一ヒト重鎖可変免疫グロブリン (V_H) ドメイン抗体と、ヒト P S M A と結合し得る第 2 の単一 V_H ドメイン抗体とを含んでなる結合分子に関する。

【0013】

1 つの実施形態では、前記第 1 の V_H ドメインと前記第 2 の V_H ドメインは、ヒト P S M A 上の同じエピトープと結合する。

50

【0014】

1つの実施形態では、前記第1の単一V_Hドメイン抗体は、P S M A上の第1のエピトープと結合し、前記第2の単一V_Hドメイン抗体は、P S M A上の第2のエピトープと結合し、前記第1のエピトープと前記第2のエピトープは同一でない。

【0015】

本発明はまた、前記第1または第2の単一V_Hドメイン抗体が、配列番号3またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含んでなるC D R 3配列を含んでなる、前記請求に記載の結合分子に関する。

【0016】

本発明はまた、前記第1または第2の単一V_Hドメイン抗体が、配列番号83またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含んでなるC D R 3配列を含んでなる結合分子に関する。

【0017】

本発明はまた、前記第1または第2のV_Hドメインが、配列番号183またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含んでなるC D R 3配列を含んでなる結合分子に関する。

【0018】

本発明はまた、前記第1または第2のV_Hドメインが、配列番号279またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含んでなるC D R 3配列を含んでなる結合分子に関する。

【0019】

本発明はまた、前記第1または第2のV_Hドメインが、配列番号295またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含んでなるC D R 3配列を含んでなる結合分子に関する。

【0020】

本発明はまた、前記第1または第2のV_Hドメインが、配列番号303またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含んでなるC D R 3配列を含んでなる結合分子に関する。

【0021】

本発明はまた、前記第1または第2のV_Hドメインが、配列番号331またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含んでなるC D R 3配列を含んでなる結合分子に関する。

【0022】

本発明はまた、前記第1または第2のV_Hドメインが、配列番号363またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含んでなるC D R 3配列を含んでなる結合分子に関する。

【0023】

本発明はまた、前記第1または第2のV_Hドメインが、配列番号367またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含んでなるC D R 3配列を含んでなる結合分子に関する。

【0024】

本発明はまた、前記第1および／または第2のV_Hドメインが、配列番号371またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含んでなるC D R 3配列を含んでなる結合分子に関する。

【0025】

本発明はまた、前記第1および／または第2のV_Hドメインが、配列番号375またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含んでなるC D R 3配列を含んでなる結合分子に関する。

【0026】

本発明はまた、前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 379 またはそれと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の同一性を有する配列を含んでなる CDR3 配列を含んでなる結合分子に関する。

【0027】

本発明はまた、前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 383 またはそれと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の同一性を有する配列を含んでなる CDR3 配列を含んでなる結合分子に関する。

【0028】

本発明はまた、前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 387 またはそれと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の同一性を有する配列を含んでなる CDR3 配列を含んでなる結合分子に関する。

10

【0029】

本発明はまた、前記第 1 または第 2 の V_H ドメインが、配列番号 391 またはそれと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の同一性を有する配列を含んでなる CDR3 配列を含んでなる結合分子に関する。

【0030】

本発明はまた、a) 第 1 の単一 V_H ドメイン抗体が系列 2、3、4、7、9、10、11 または 14 の単一 V_H ドメイン抗体から選択され、かつ、b) 第 2 の単一 V_H ドメイン抗体が系列 1、5、6、12 または 13 から選択される、請求項 3 に記載の結合分子に関する。

20

【0031】

本発明はまた、a) 第 1 の単一 V_H ドメイン抗体が系列 2 の単一 V_H ドメイン抗体から選択され、b) 第 2 の単一 V_H ドメイン抗体が系列 1 の単一 V_H ドメイン抗体から選択される結合分子に関する。前記第 1 の単一 V_H ドメイン抗体は C または N 末端のいずれかに位置し、従って、いずれの配向も本発明の範囲内である。

【0032】

本発明はまた、a) 第 1 の V_H ドメインが、PSMA との結合に関して、配列番号 4 を含んでなる Humabody (商標) と競合することができ、かつ/または配列番号 4 を含んでなる Humabody (商標) と PSMA との結合を交差遮断することができ、かつ、b) 第 2 の V_H ドメインが、PSMA との結合に関して、配列番号 76 を含んでなる Humabody (商標) と競合することができ、かつ/または配列番号 76 を含んでなる Humabody (商標) と PSMA との結合を交差遮断することができる結合分子に関する。

30

【0033】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の結合分子と医薬担体とを含んでなる医薬組成物に関する。

【0034】

別の態様では、本発明は、結合分子または本明細書に記載の医薬組成物の治療上有効な量を投与することを含んでなる前立腺癌または前立腺障害を処置するための方法に関する。

40

【0035】

別の態様では、本発明は、薬剤として使用するための本明細書に記載の結合分子または医薬組成物に関する。

【0036】

別の態様では、本発明は、前立腺癌または前立腺障害の治療において使用するための本明細書に記載の結合分子または医薬組成物に関する。

【0037】

別の態様では、本発明は、前立腺癌または前立腺障害の治療のための薬剤の製造における本明細書に記載の結合分子または医薬組成物の使用に関する。

【0038】

50

別の態様では、本発明は、ヒト P S M A を本明細書に記載の結合分子と接触させることを含んでなるヒト P S M A 活性を低減するための *in vivo* または *in vitro* 法に関する。

【0039】

別の態様では、本発明は、試験サンプル中の P S M A の存在をイムノアッセイにより決定するための方法であって、前記サンプルを本明細書に記載の結合分子および少なくとも 1 つの検出可能な標識と接触させることを含んでなる方法に関する。

【0040】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の核酸を含んでなる核酸構築物に関する。

【0041】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の核酸または構築物を含んでなる宿主細胞に関する。

【0042】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の結合分子を生産するための方法であって、前記結合分子をコードする核酸を宿主細胞内で発現させること、および前記結合分子を前記宿主細胞培養物から単離することを含んでなる方法に関する。

【0043】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の結合分子または医薬組成物を含んでなるキットに関する。

【0044】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の 1 以上の単ドメイン抗体を含んでなる二重パラトープ性、二価または多重特異性結合分子に関する。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図 1】系列 1 の配列。この図は、系列 1 における単ドメイン抗体のための全長 V_H 配列を示す。フレームワーク (Framework) (F R) および相補性決定領域 (complementarity determining region) (C D R) が標識されている。C D R 1、C D R 2 および C D R 3 は太字で強調されている。

【図 2】系列 2 の配列。この図は、系列 2 の単ドメイン抗体の全長 V_H 配列を示す。フレームワーク (F R) および相補性決定領域 (C D R) が標識されている。C D R 1、C D R 2 および C D R 3 は、太字で強調されている。

【図 3】系列 3 の配列。この図は、系列 3 の単ドメイン抗体の全長 V_H 配列を示す。フレームワーク (F R) および相補性決定領域 (C D R) が標識されている。C D R 1、C D R 2 および C D R 3 は、太字で強調されている。

【図 4】系列 4 の配列。この図は、系列 4 の単ドメイン抗体の全長 V_H 配列を示す。フレームワーク (F R) および相補性決定領域 (C D R) が標識されている。C D R 1、C D R 2 および C D R 3 は、太字で強調されている。

【図 5】系列 5 の配列。この図は、系列 5 の単ドメイン抗体の全長 V_H 配列を示す。フレームワーク (F R) および相補性決定領域 (C D R) が標識されている。C D R 1、C D R 2 および C D R 3 は、太字で強調されている。

【図 6】系列 6 の配列。この図は、系列 6 の単ドメイン抗体の全長 V_H 配列を示す。フレームワーク (F R) および相補性決定領域 (C D R) が標識されている。C D R 1、C D R 2 および C D R 3 は、太字で強調されている。

【図 7】系列 7 の配列。この図は、系列 7 の単ドメイン抗体の全長 V_H 配列を示す。フレームワーク (F R) および相補性決定領域 (C D R) が標識されている。C D R 1、C D R 2 および C D R 3 は、太字で強調されている。

【図 8】系列 8 の配列。この図は、系列 8 の単ドメイン抗体の全長 V_H 配列を示す。フレームワーク (F R) および相補性決定領域 (C D R) が標識されている。C D R 1、C D R 2 および C D R 3 は、太字で強調されている。

【図 9】系列 9 の配列。この図は、系列 9 の単ドメイン抗体の全長 V_H 配列を示す。フ

10

20

30

40

50

フレームワーク (FR) および相補性決定領域 (CDR) が標識されている。CDR 1、CDR 2 および CDR 3 は、太字で強調されている。

【図 10】系列 10 の配列。この図は、系列 10 の単ドメイン抗体の全長 V_H 配列を示す。フレームワーク (FR) および相補性決定領域 (CDR) が標識されている。CDR 1、CDR 2 および CDR 3 は、太字で強調されている。

【図 11】系列 11 の配列。この図は、系列 11 の単ドメイン抗体の全長 V_H 配列を示す。フレームワーク (FR) および相補性決定領域 (CDR) が標識されている。CDR 1、CDR 2 および CDR 3 は、太字で強調されている。

【図 12】系列 12 の配列。この図は、系列 12 の単ドメイン抗体の全長 V_H 配列を示す。フレームワーク (FR) および相補性決定領域 (CDR) が標識されている。CDR 1、CDR 2 および CDR 3 は、太字で強調されている。

【図 13】系列 13 の配列。この図は、系列 13 の単ドメイン抗体の全長 V_H 配列を示す。フレームワーク (FR) および相補性決定領域 (CDR) が標識されている。CDR 1、CDR 2 および CDR 3 は、太字で強調されている。

【図 14】系列 14 の配列。この図は、系列 14 の単ドメイン抗体の全長 V_H 配列を示す。フレームワーク (FR) および相補性決定領域 (CDR) が標識されている。CDR 1、CDR 2 および CDR 3 は、太字で強調されている。

【図 15】系列 15 の配列。この図は、系列 15 の単ドメイン抗体の全長 V_H 配列を示す。フレームワーク (FR) および相補性決定領域 (CDR) が標識されている。CDR 1、CDR 2 および CDR 3 は、太字で強調されている。

【図 16】FMA T ミラーボールアッセイにおける精製抗 P S M A V_H の結合。16 a ● 1. 1、黒四角 3. 1、▲ 2. 10、▼ 2. 1、16 b ● 2. 1、▲ 2. 13、▼ 2. 17 ◇ 2. 15、○ 2. 12 △ 2. 22 16 c 上から下へ記号で示されるように供試した単ドメイン抗体 ● 1. 8、黒四角 1. 10、▲ 1. 11、▼ 1. 12、1. 13、○ 1. 14、1. 16、△ 1. 17、1. 18 d) 上から下へ記号で示されるように供試した二重パラトープ性結合分子：L = (G 4 S) 6 1. 1-L-2. 1；1. 16-L-2. 1；1. 11-L-2. 1、1. 18-L-2. 1、1. 17-2. 1、1. 1-2. 17、1. 16-L-2. 17、1. 11-L-2. 17、1. 18-L-2. 17、1. 17-L-2. 17；e) 1. 1-L-2. 15、1. 16-L-2. 15、1. 11-L-2. 15、1. 18-L-2. 15、1. 17-L-2. 15、1. 1-L-2. 22、1. 16-L-2. 22、1. 11-L-2. 22、1. 11-L-2. 22、1. 18-L-2. 22、1. 17-L-2. 22。

【図 17】精製抗 P S M A 単ドメイン抗体の p H r o d o (商標) G r e e n 内部移行。使用した単ドメイン抗体 (上から下へ凡例の記号)：2. 20、12. 1、3. 1、3. 2、4. 1、5. 1、9. 1、14. 1、10. 1、7. 1。

【図 18】抗 P S M A 単ドメイン抗体を用いた c y n o P S M A および ヒト P S M A C H O の死滅化。A. 2. 1、B. 1. 1。

【図 19】抗 P S M A 単ドメイン抗体を用いた L N C a p の死滅化。使用した単ドメイン抗体 (上から下へ凡例の記号)：1. 1、2. 1、7. 1、3. 1、12. 1、4. 1。

【図 20】 V_H 2. 1-H I S を用いた局在研究。 V_H 染色は主として細胞膜に局在するが (太い矢印で示す)、4 °C および 37 °C の両方で、L A M P-1 (b) および E E A-1 (a) の両方とともに局在する単一中央クラスターの形態でいくつかの内部移行も見られた (細い矢印)。

【図 21】二価 V_H 構築物 2. 1-6 G S-2. 1-H I S を用いた局在研究。4 °C で、 V_H 染色は、主として細胞膜に局在する (太い矢印)。37 °C で 2 時間後、膜染色はより断続的に見られ (太い矢印)、L A M P-1 (a) および E E A-1 (b) の両方とともに局在する細胞内部の小 V_H クラスターの存在により内部移行が示される (細い矢印)。

【図 22】 V_H 1. 1-H I S を用いた局在研究。 V_H 染色は、細胞膜 (太い矢印で示す) 主として細胞膜に局在するが (太い矢印で示す)、4 °C および 37 °C の両方で、L A

10

20

30

40

50

MP-1 (b) および EEA-1 (a) の両方とともに局在する単一中央クラスターの形態でいくらかの内部移行が存在する (細い矢印)。

【図 23】二重パラトープ性 V_H 構築物 2. 1-6GS-1. 1-HIS を用いた局在研究。4℃で、 V_H 染色は、主として細胞膜に局在する (太い矢印)。37℃で2時間後、膜染色はほとんど消失し (太い矢印)、LAMP-1 (b) および EEA-1 (a) の両方とともに局在する細胞内部の断続的染色により示されるように、 V_H は内部移行を受ける (細い矢印)。

【図 24】水準抗 PSMA IgG を用いた局在研究。4℃で、 V_H 染色は、主として細胞膜に局在する (太い矢印)。37℃で2時間後、膜染色は薄くなり (太い矢印)、LAMP-1 (b) および EEA-1 (a) の両方とともに局在する細胞内部のクラスターの存在により示されるように、ほとんどの V_H が内部移行を受ける (細い矢印)。

【図 25】ヒト PSMA を発現する CHO 細胞を用いる、1. 1-6GS-2. 1-HIS (上のパネル) および 2. 1-6GS-1. 1-HIS (下のパネル) を用いた局在研究。

【図 26】図 26 は、48 時間インキュベーション時点でのヒト PSMA タンパク質を安定に発現するヒト細胞および合致する親細胞 (PSMA 陰性) に対する単量体 MMAE コンジュゲート V_H (A および B)、二価 V_H (C および D) ならびに二重パラトープ性 V_H (E および F) の *in vitro* 細胞傷害性を示す。

【図 27】図 27 は、72 時間インキュベーション時点でのヒト PSMA タンパク質を安定に発現するヒト細胞に対する MMAE コンジュゲート V_H の *in vitro* 細胞傷害性を示す。

【図 28】図 28 は、Humabody (商標) 薬物コンジュゲート (HDC) を作製するために使用される HiPEG (商標) val-cit-PAB-MMAE 試薬 (MW = 2805 g/mol) を示す。

【図 29】図 29 は、Pro_006 対照抗体薬物コンジュゲート (ADC) を作製するために使用されるマレイミドカプロイル-バリニン-シトルリン-p-アミノベンゾイルオキシカルボニル-モノメチルオースタチン E (mc-val-cit-PAB-MMAE) コンジュゲーション試薬 (MW = 1317 g/mol) を示す。

【図 30】A および B は、(A) PSMA を発現する DU145 細胞および (B) PSMA を発現するように改変されていない DU145 親細胞の場合の、PSMA-DU145 細胞傷害性アッセイ (72 時間) での IC_{50} 値を示す：対照 ADC mAb-MMAE (黒四角)、2. 1-6GS-1. 1-MMAE 二重パラトープ性 (▲)、2. 1-6GS-1. 1-MMAE-HLE 半減期延長二重パラトープ性 (▼)、HEL4-MMAE 一価 (●) および HEL4-HLE-MMAE 一価半減期延長 (1)。

【0046】

詳細な説明

以下、本発明をさらに説明する。以下の節では、本発明の種々の態様をより詳細に定義する。このように定義される各態様は、そうでないことが明示されない限り、他のいずれの 1 または複数の態様とも組み合わせることができる。特に、好ましいまたは有利であると示されたいずれの特徴も、好ましいまたは有利であると示された他のいずれの 1 または複数の特徴とも組み合わせることができる。

【0047】

一般に、本明細書に記載の細胞・組織培養、病理学、腫瘍学、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学およびタンパク質・核酸化学およびハイブリダイゼーションの技術に関して使用される術語は、当技術分野で周知かつ慣用されるものである。本開示の方法および技術は、一般に、特に断りのない限り、本明細書で引用および考察される種々の一般的小およびより特殊な参考文献に記載されているような従来法に従って一般に実施される。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 参照。酵素反応および精製技術は、製造者の仕様書に従い、当技術分野で一般に実施されているようにまたは本明細

10

20

30

40

50

書に記載されているように行う。本明細書に記載の分析化学、合成有機化学、および医薬・製薬化学に関して使用される術語、ならびにそれらの実験手順および技術は、当技術分野で周知かつ慣用されるものである。化学合成、化学分析、医薬製剤、処方、および送達、ならびに患者の治療には標準的な技術が使用される。

【0048】

本発明は、ヒト P S M A と結合する、単離され、形式化された結合分子、特に、ヒト P S M A と結合する少なくとも 2 つの単一 V_H ドメイン抗体を含んでなるもの、そのような結合分子を含んでなる医薬組成物、ならびにそのような結合タンパク質およびフラグメントを作製するための単離された核酸構築物、組換え発現ベクターおよび単離された宿主細胞を提供する。また、ヒト P S M A を検出するため、*in vitro* または *in vivo* のいずれかでヒト P S M A を阻害するために本明細書に開示される結合タンパク質を使用する方法、ならびに疾患を治療する方法も提供される。本発明の一態様は、単離されたヒト抗ヒト P S M A 結合分子、具体的には、ヒト P S M A と高い親和性、かつ緩慢な解離速度で結合する 2 以上の単一 V_H ドメイン抗体を含んでなる、またはからなるものを提供する。

10

【0049】

本発明の P S M A 結合分子は、野生型ヒト P S M A（受託番号 Q 0 4 6 0 9）と結合する。単量体の配列を以下に示す（配列番号 5 2 9）。

【化 1】

```

1 MWNLLHETDS AVATARRPRW LCAGALVLAG GFFLLGFLFG WFIKSSNEAT NITPKHNMKA
61 FLDELKAENI KKFLYNFTQI PHLAGTEQNF QLAKQIQSQW KEFGLDSVEL AHYDVLLSYP
121 NKTHPNYISI INEDGNEIFN TSLFEP PPPG YENVSDIVPP FSAFSPQGMP EGDLYVYNYA
181 RTEDFFKLER DMKINCSGKI VIARYGKVFR GNKVKNAQLA GAKGVILYSD PADYFAPGVK
241 SYPDGNWNLPG GGVQRGNILN LNGAGDPLTP GYPANEYAYR RGIAEAVGLP SIPVHPIGY
301 DAQKLEKMG GSAPPDSSWR GSLKVPYNVG PGFTGNFSTQ KVKMHIHSTN EVTRIYNVIG
361 TLRGAVEPDR YVILGGHRDS WFFGGIDPQS GAAVWHEIVR SFGTLKKEGW RPRRTILFAS
421 WDAEEFGLLG STEWAEENSR LLQERGVAYI NADSSIEGNY TLRVDCTPLM YSLVHNLTKE
481 LKSPDEGFEG KSLYESWTKK SPSPEFSGMP RISKLGSGND FEVFFQRLGI ASGRARYTKN
541 WETNKFSGYP LYHSVYETYE LVEKFYDPMF KYHLTVAQVR GGMVFELANS IVLPFDCRDY
601 AVVLRYKADK IYSISMKHPQ EMKTYSVSFD SLFSAVKNFT EIASKFSERL QDFDKSNPIV
661 LRMMNDQLMF LERAFIDPLG LPDRPFYRHV IYAPSSHNKY AGESFPGIYD ALFDIESKVD
721 PSKAWGEVKR QIYVAAFTVQ AAAETLSEVA

```

20

30

【0050】

1 つの実施形態では、本発明の P S M A 結合分子は、野生型ヒト P S M A および／または c y n o P S M A と結合する。用語「P S M A 結合分子」、「P S M A 結合タンパク質」、「抗 P S M A 単一ドメイン抗体」または「抗 P S M A 抗体」は、本明細書で使用する場合、総てヒト P S M A 抗原と結合し得る分子を意味する。用語「P S M A 結合分子」は、P S M A 結合タンパク質を含む。この結合反応は、例えば、結合アッセイ、競合アッセイまたはその受容体と結合する P S M A の阻害を判定するためのバイオアッセイ、またはいずれの種類の結合アッセイも含む標準的方法（定性的アッセイ）によって、抗体が無関連の特異性である陰性対照試験を参照して示すことができる。好適なアッセイを例に示す。

40

【0051】

対象抗原、例えば、P S M A 「と結合する」または「と結合し得る」本明細書に記載の単一ドメイン抗体および多価または多重特異性結合剤を含む本発明の抗体または結合分子は、P S M A 抗原と、その抗原を発現する細胞または組織を標的化するという療法において有用である十分な親和性で結合するものである。

【0052】

50

本発明の結合分子は、ヒト P S M A と特異的に結合する。言い換えれば、P S M A 抗原との結合は、非特異的相互作用とは測定可能に異なる。好ましくは、本発明の結合分子において使用される単一ドメイン抗体はヒト P S M A と結合し、また、c y n o P S M A と結合する。特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド標的上のエピトープ「に特異的結合」または「と特異的に結合する」または「に特異的」という用語は、本明細書で使用する場合、例えば、標的に対する K D が少なくとも約 10^{-4} M、あるいは少なくとも約 10^{-5} M、あるいは少なくとも約 10^{-6} M、あるいは少なくとも約 10^{-7} M、あるいは少なくとも約 10^{-8} M、あるいは少なくとも約 10^{-9} M、あるいは少なくとも約 10^{-10} M、あるいは少なくとも約 10^{-11} M、あるいは少なくとも約 10^{-12} M、またはそれを超える分子によって示され得る。1つの実施形態では、用語「特異的結合」は、分子が、他のいずれのポリペプチドまたはポリペプチドエピトープとも実質的に結合せずに特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープと結合する場合の結合を意味する。

10

【0053】

1つの態様では、本発明は、ヒト P S M A と結合し得る第1の単一 V_H ドメイン抗体と、ヒト P S M A と結合し得る第2の部分とを含んでなる結合分子に関する。単一 V_H ドメイン抗体および第2の部分は、好ましくは、例えば、ペプチドリinkerを介して、共有結合的に連結される。第2の部分は、抗体、重鎖単独抗体 (H C A b)、そのフラグメントまたは抗体模倣剤であり得る。

【0054】

20

1つの態様では、本発明は、ヒト P S M A と結合し得る第1の単一 V_H ドメイン抗体と、ヒト P S M A と結合し得る第2の単一 V_H ドメイン抗体とを含んでなる結合分子に関する。単一 V_H ドメイン抗体は、好ましくは、例えば、ペプチドリinkerを介して、共有結合的に連結される。

【0055】

1つの態様では、本発明は、ヒト P S M A と結合し得る、本明細書に記載されるような V_H ドメインを含んでなる H C A b と、ヒト P S M A と結合し得る第2の H C A b とを含んでなる結合分子に関する。これらの H C A b は、好ましくは、例えば、ペプチドリinkerを介して、共有結合的に連結される。

【0056】

30

1つの実施形態では、重鎖単独抗体はヒト可変領域を含んでなる。1つの実施形態では、H C A b は C_H1 ドメインを欠く。1つの実施形態では、H C A b は、マウス C 領域を含んでなる。1つの実施形態では、結合分子は、少なくとも1つの単一 V_H ドメイン抗体を含んでなる。

【0057】

1つの態様では、本発明は、表1～15を参照し、図1～15のいずれかに示されるような C D R 3 配列またはそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%もしくはそれを超える配列同一性を有する配列を含んでなる重鎖可変免疫グロブリンドメイン (V_H) を含んでなる、ヒト P S M A と結合し得る多価/多重パラトープ性の単離された結合分子に関する。1つの実施形態では、結合分子は、表1～15を参照し、図1～15のいずれかのクローンのいずれかに関して示されるような C D R 1、2および3配列のセットから選択される1セットの C D R 1、2および3配列を含んでなる。1つの実施形態では、結合分子は、表1～15を参照し、図1～15のいずれかのクローンのいずれかに関して示されるような C D R 1、2および3配列のセットから選択される1セットの C D R 1、2および3配列を有する V_H ドメインを含んでなる。本発明の結合分子は、2以上の単一 V_H ドメイン抗体を含んでなる。

40

【0058】

用語「単一ドメイン抗体、可変単一ドメインまたは免疫グロブリン単一可変ドメイン (I S V)」は総て、当技術分野で周知であり、標的抗原と結合する抗体の単一可変フラグメントを表す。これらの用語は、本明細書では互換的に使用される。以下に説明するよう

50

に、本発明の種々の態様の好ましい実施形態は、軽鎖の不在下でP S M A抗原と結合する単一重鎖可変ドメイン抗体／免疫グロブリン重鎖単一可変ドメインを意味する。ヒトP S M Aと結合する単一ドメイン抗体、可変単一ドメインまたは免疫グロブリン単一可変ドメインのフラグメントも本発明の範囲内にある。単一重鎖可変ドメイン抗体 (V_H) は、免疫グロブリン軽鎖を含まない。ヒト重鎖単一可変 (V_H) ドメイン抗体が特に好ましい。ヒト重鎖単一可変 V_H は一般に V_H ドメインと略される。単一 V_H ドメイン抗体はまた、本明細書ではH u m a b o d y (商標) とも呼称される。H u m a b o d y (商標) は、C r e s c e n d o B i o l o g i e s L t dの登録商標である。

【0059】

よって、いくつかの好ましい実施形態では、本発明の単離された結合剤／分子は、少なくとも2つの単一ドメイン抗体を含んでなり、前記ドメインは好ましくはヒト重鎖可変ドメインである。よって、1つの態様では、本発明の結合剤は、少なくとも2つのヒト免疫グロブリン単一可変重鎖ドメインを含んでなり、それらは V_L ドメインを欠いている。

【0060】

各単一 V_H ドメイン抗体は、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序で配置された3つのC D Rと4つのF Rを含んでなる：F R 1－C D R 1－F R 2－C D R 2－F R 3－C D R 3－F R 4。よって、本発明の1つの実施形態では、ドメインは、下式F R 1－C D R 1－F R 2－C D R 2－F R 3－C D R 3－F R 4を有するヒト可変重鎖 (V_H) ドメインである。

【0061】

用語「単離された」単一ドメイン抗体とは、異なる抗原特異性を有する他の単一ドメイン抗体、抗体または抗体フラグメントを実質的に含まない単一ドメイン抗体を意味する。さらに、単離された単一ドメイン抗体は、他の細胞材料および／または化学物質を実質的に含まないものであり得る。

【0062】

1つの実施形態では、前記第1または第2の単一 V_H ドメイン抗体は、表1～15を参照し、図1～15のいずれかに示されるようなC D R 3配列またはそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%もしくはそれを超える配列同一性を有する配列を含んでなる。1つの実施形態では、前記第1または第2の単一 V_H ドメインは、表1～15を参照し、図1～15のいずれかのクローンのいずれかに関して示されるようなC D R 1、2および3配列のセットから選択される1セットのC D R 1、2および3配列を含んでなる。1つの実施形態では、第1または第2の単一 V_H ドメイン抗体は、表1～15を参照し、図1～15のいずれかのクローンのいずれかに関して示されるようなC D R 1、2および3配列のセットから選択される1セットのC D R 1、2および3配列を含んでなる。1つの実施形態では、結合分子は重鎖単独抗体 (H C A b) である。

【0063】

1つの実施形態では、第1または第2の単一 V_H ドメイン抗体は、図1～15および表1～15のいずれかに示されるようなC D R 3配列またはそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%もしくはそれを超える配列同一性を有する配列を含んでなる。

【0064】

1つの実施形態では、第1または第2の単一 V_H ドメイン抗体は、図1～15および1～15のいずれかのs d A bのいずれかに関して示されるようなC D R 1、2および3配列のセットから選択される1セットのC D R 1、2および3配列を含んでなる。別の実施形態では、第1または第2の単一 V_H ドメイン抗体は、下記の単一 V_H ドメイン抗体1. 1～1. 20、2. 1～2. 25、3. 1～3. 24、4. 1～4. 4、5. 1～5. 2、6. 1～6. 7、7. 1～7. 8、8. 1、9. 1、10. 1、11. 1、12. 1、13. 1、14. 1または15. 1のいずれかから選択される。

【0065】

1つの実施形態では、前記配列相同性または同一性は、少なくとも60%、61%、6

10

20

30

40

50

2 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、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 %または99 %である。

【0066】

「相同性」は一般に、候補配列において、配列をアラインした後に、いくつかの実施形態では、最大相同性パーセントを達成するために必要に応じてギャップを導入した後に、配列同一性の一部として保存的置換を考慮せずに、それが比較されるポリペプチドの残基と同一である内のアミノ酸残基のパーセンテージを意味する。よって、2つのアミノ酸配列間の相同性パーセントは、それらの2配列間の同一性パーセントに等しい。N末端またはC末端延長部、タグまたは挿入はいずれも同一性または相同性を低下させると解釈されるべきでない。アラインメントの方法およびコンピュータプログラムは周知である。

【0067】

用語「抗体」は広義には、4本のポリペプチド鎖、すなわち、2本の重(heavy) (H)鎖および2本の軽(light) (L)鎖、またはその任意の機能的フラグメント、突然変異体、変異体、もしくは誘導体から構成され、Ig分子の必須のエピトープ結合特性を保持するいずれの免疫グロブリン(Ig)分子、またはその抗原結合部分も意味する。このような突然変異体、変異体、または誘導体抗体形式は、当技術分野で公知である。全長抗体では、各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書ではHCVRまたは V_H と略される)および重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン C_H1 、 C_H2 および C_H3 から構成される。各軽鎖は、鎖可変領域(本明細書ではLCVRまたは V_L と略される)および軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン C_L から構成される。 V_H および V_L 領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる、より保存された領域が散在した相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分することができる。各 V_H および V_L は、アミノ末端からカルボキシ末端へ下記の順序で配置された3つのCDRと4つのFRから構成される: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫グロブリン分子は、いずれのタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)またはサブクラスのものであってもよい。

【0068】

抗体フラグメントは、抗体の一部、例えば、 $F(ab')_2$ 、Fab、Fv、およびsFvなどである。全長抗体の機能的フラグメントは、全長抗体の標的特異性を保持する。従って、組換え機能的抗体フラグメント、例えば、Fab(フラグメント、抗体)、scFv(一本鎖可変鎖フラグメント)および単一ドメイン抗体(dAb)は、mAbに基づく治療薬に代わるものとしての治療薬を開発するために使用されてきた。scFvフラグメント(約25kDa)は、2つの可変ドメイン、 V_H および V_L からなる。当然のことながら、 V_H および V_L ドメインは、疎水性相互作用を介して非共有結合的に会合され、解離する傾向がある。しかしながら、安定なフラグメントは、これらのドメインと親水性のフレキシブルリンカーを連結して一本鎖Fv(scFv)を作出することによって工作することができる。最小の抗原結合フラグメントは、単一可変フラグメント、すなわち、 V_H または V_L ドメインである。標的結合のためには、軽鎖/重鎖相手それぞれとの結合が必要なわけではない。このようなフラグメントが単一ドメイン抗体において使用される。よって、単一ドメイン抗体(12~15kDa)は V_H または V_L ドメインのいずれかを有する。

【0069】

よって、本発明のいくつかの好ましい実施形態では、結合分子は軽鎖を含まない。いくつかの実施形態では、結合分子は重鎖ドメイン C_H2 および C_H3 を含まない。いくつかの実施形態では、結合分子は、ヒンジ領域および重鎖ドメイン C_H2 および C_H3 を含まない。いくつかの実施形態では、結合分子は、重鎖ドメイン C_H1 、 C_H2 、および C_H

3を含まない。いくつかの実施形態では、結合分子は、重鎖ドメインC_H1、ヒンジ領域重鎖ドメインC_H2および重鎖ドメインC_H3を含まない。いくつかの実施形態では、結合分子は、軽鎖、重鎖ドメインC_H1、ヒンジ領域重鎖ドメインC_H2および重鎖ドメインC_H3を含まない。

【0070】

各V_Hドメインは、アミノ末端からカルボキシ末端へ下記の順序で配置された3つのCDRと4つのFRを含んでなる：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。結合特性を改善するためにV_Hフレームワークに修飾を行ってもよい。例えば、V_Hドメインは、CまたはN末端延長部を含んでなり得る。1つの実施形態では、V_Hドメインは、1～10個、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の付加的アミノ酸のC末端延長部を含んでなる。1つの実施形態では、V_Hドメインは、C_H1ドメインの1～12個のアミノ酸残基、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の付加的アミノ酸のC末端延長部を含んでなる。1つの実施形態では、前記延長部は、少なくとも1個のアラニン基、例えば、単一のアラニン残基、2個のアラニン残基または3個のアラニン残基を含んでなる。このような延長されたV_Hドメインは本発明の範囲内にある。また、付加的CまたはN末端残基、例えば、リンカー残基および／またはHisタグ、例えば、ヘキサHisタグ（HHHHHH、配列番号530）またはmycタグを含んでなるV_Hドメインを含んでなる結合分子も本発明の範囲内にある。ペプターの付加的残基が、例えば、タグに加えて存在してもよい。使用される結合分子は、付加的残基LEGGSSEQLISEEDLNHHHHHHHGS（配列番号531）を有してもよい。

【0071】

本発明の種々の態様および実施形態によれば、単一ドメイン抗体の可変ドメインは、好ましくはヒト可変ドメイン（V_H）である。本明細書で使用する場合、ヒトV_Hドメインとしては、完全なヒトまたは実質的に完全なヒトV_Hドメインを含む。本明細書で使用する場合、用語ヒトV_Hドメインとしてはまた、例えば、WO2016/062990およびその実施例に記載されているように、特に対象抗原での免疫に応答して完全ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座を発現するトランスジェニックマウスにより生成された重鎖単独抗体から単離されたV_Hドメインも含む。1つの実施形態では、ヒトV_Hドメインとしてはまた、ヒトV_Hドメインアミノ酸から誘導される、もしくは、ヒトV_Hドメインアミノ酸に基づくV_Hドメイン、またはそのようなV_Hドメインをコードする核酸配列も含み得る。よって、この用語には、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列から誘導されるまたはヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によりコードされる可変重鎖領域を含む。ヒトV_Hドメインから誘導されるまたは基づく実質的ヒトV_HドメインまたはV_Hドメインには、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基（例えば、in vitroで、例えば、ランダムもしくは部位特異的突然変異誘発により導入された、またはin vivo体細胞突然変異により導入された突然変異）を含み得る。よって、用語「ヒトV_Hドメイン」にはまた、1以上のアミノ酸残基が修飾された実質的ヒトV_Hドメインも含む。例えば、実質的ヒトV_Hドメイン V_Hドメインは、完全ヒト配列と比較して最大10、例えば、1、2、3、4または5個のアミノ酸修飾を含み得る。しかしながら、用語「ヒトV_Hドメイン」または「実質的ヒトV_Hドメイン」は、本明細書で使用する場合、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系から誘導されるCDR配列がヒトフレームワーク配列にグラフトされた抗体を含むこと意図しない。好ましくは、用語「ヒトV_Hドメイン」は、本明細書で使用する場合、ラクダ化V_Hドメイン、すなわち、例えばin vitroで従来の突然変異誘発法によってV_Hドメイン配列内の所定の位置を選択し、その位置に、1以上の所定の残基をラクダ科動物V_HHドメインに見られ得る特異的残基に変えるように1以上の点突然変異を導入するために特異的に修飾されたヒトV_Hドメインを含むことも意図しない。

【0072】

本明細書で使用する場合、用語V_Hまたは「可変ドメイン」は、Kabat et al., Sequen

10

20

30

40

50

ces of Immunological Interest, 第5版, U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C. (1991)により定義された免疫グロブリン可変ドメインを意味する。可変ドメイン内のCDRアミノ酸残基のナンバリングおよび位置決定は、周知のKabatナンバリング規則に従う。

【0073】

より詳しくは、本発明は、単一V_Hドメイン抗体または結合分子単一V_Hドメイン抗体を含んでなる結合分子を提供し、前記単一V_Hドメイン抗体は、ヒトPSMAと、本発明に、特に、実施例にさらに記載されるような親和性、Kon速度、Koff速度、KDおよび/またはKA、EC50およびIC50値で結合する。これらの値を測定するのに好適なアッセイもまた実施例で示される。

10

【0074】

本発明の結合分子は、本明細書に定義されるような、アミノ酸配列および好ましい配列および/またはその一部、例えば、CDRを含んでなる、またはからなる。

【0075】

用語「CDR」は、抗体可変配列内の相補性決定領域を意味する。重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれに3つのCDRが存在し、それらは可変領域のそれぞれについてCDR1、CDR2およびCDR3と呼称される。用語「CDRセット」は、抗原と結合し得る単一可変領域内に存在する一群の3つのCDRを意味する。これらのCDRの正確な境界は、異なるシステムによって違った定義がされている。本明細書ではKabatにより記載されているシステムを用いる。用語「Kabatナンバリング」、「Kabat定義」および「Kabatラベリング」は、本明細書では互換的に使用される。当技術分野で認識されるこれらの用語は、抗体の重鎖および軽鎖可変領域、またはその抗原結合部分内の他のアミノ酸残基よりも可変性の大きい（すなわち、超可変）アミノ酸残基をナンバリングするシステムを意味する(Kabat et al, (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391およびKabat, et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。

20

【0076】

結合分子は、多価、例えば、二価、または多重パラトープ性、例えば、二重パラトープ性であり得る。よって、結合分子は、下式を有し得る：V_H(A)－V_H(B)。各V_Hは、CDRおよびFR領域を含んでなる。よって、結合分子は、下式を有し得る：FR1(A)－CDR1(A)－FR2(A)－CDR2(A)－FR3(A)－CDR3(A)－FR4(A)－FR1(B)－CDR1(B)－FR2(B)－CDR2(BA)－FR3(B)－CDR3(B)－FR4(B)。免疫グロブリン単一可変ドメインA(第1の単一V_Hドメイン抗体)およびB(第2の単一V_Hドメイン抗体)の順序は特に限定されず、従って、本発明のポリペプチド内で、免疫グロブリン単一可変ドメインAがN末端側に位置してもよく、免疫グロブリン単一可変ドメインBがC末端側に位置してもよく、またはその逆でもよい。V_Hドメインは、リンカーを介して連結されてよい。

30

【0077】

1つの実施形態では、結合分子は二重パラトープ性である。二重パラトープ性結合分子では、2つの結合部分は標的分子上の異なるエピトープと結合する。好ましい二重パラトープ性結合分子は、標的タンパク質PSMAと、ただし異なる部位で結合する、2つの異なる単一V_Hドメイン抗体を含んでなる。これらの部位は重複してもよい。遮断が完全か部分的かはエピトープ結合試験で評価することができる。

40

【0078】

用語「エピトープ」または「抗原決定基」は、V_H単一ドメイン抗体を含む、免疫グロブリン、抗体または抗体フラグメントが特異的に結合する抗原(例えば、PSMA)の表面の部位を意味する。一般に、抗原は数個または多数の異なるエピトープを有し、多くの異なる抗体と反応する。特異的という用語は、直線状エピトープおよび構造的エピトープを含む。タンパク質抗原内のエピトープは、連続アミノ酸(通常、直線状エピトープ)またはタンパク質の三次元折りたたみにより並置された不連続アミノ酸(通常、構造的エ

50

ピトープ) から形成され得る。連続アミノ酸から形成されるエピトープは、常にではないが一般に、変性溶媒に曝されても保持されるが、三次元折りたたみにより形成されるエピトープは一般に、変性溶媒で処理すると消失する。エピトープは一般に、ユニークな空間的立体配座で少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個のアミノ酸を含む。ある抗体または抗体フラグメントによってどのエピトープが結合されるかを決定するための方法(すなわち、エピトープマッピング)は当技術分野で周知であり、例えば、免疫プロット法および免疫沈降アッセイが含まれ、重複するまたは連続するペプチドが、ある抗体または抗体フラグメントとの反応性に関して試験される。2つの抗体が同一または立体的に重複するエピトープを認識する場合に、抗体は参照抗体と「本質的に同じエピトープ」と結合する。2つのエピトープが同一または立体的に重複するエピトープに結合するか否かを決定するために最も広く使用されている迅速な方法が競合アッセイであり、標的抗原か標的抗体のいずれかをを用いて種々の形式で構成することができる。

10

【0079】

1つの実施形態では、結合分子は二価である。二価結合分子は、同じ標的タンパク質(P SMA)と同じ部位で結合する2つのHumabody(商標) V_H を含んでなる。1つの実施形態では、このような分子は、同じHumabody(商標) V_H を含んでなり得る。別の実施形態では、このような分子は、同じHumabody(商標) V_H 系列の一部である2つのHumabody(商標) V_H を含んでなり得る。別の実施形態では、このような分子は、同じHumabody(商標) V_H の一部ではないが同じ側に結合する2つのHumabody(商標) V_H を含んでなり得る。本発明の二重パラトープ性および二価結合分子は、当技術分野で公知の方法を用いて構築することができる。

20

【0080】

実験の部でより詳細に記載されるように、本発明の多重パラトープ性または多価結合分子において使用可能な単一 V_H ドメイン抗体が単離され、CDR3配列の配列相同性に基づいて15系列に分類された。最適化の過程で、親分子と比較してP SMAに対する親和性を改善するため、かつ/または効力を改善するために親CDR配列から誘導されるCDR配列を有する変異体単一 V_H ドメイン抗体のパネルも作製した。各単一 V_H ドメイン抗体は、図1~15に示されるような1セットのCDR配列(CDR1、2および3)を有する。エピトープ結合を評価するために実施例11に示すようにエピトープ結合試験を行った。例えば、系列1の単一 V_H ドメイン抗体は、系列2とは異なるエピトープと結合することが示された。よって、系列1単一 V_H ドメイン抗体と系列2単一 V_H ドメイン抗体の組合せは、本発明の二重パラトープ性結合分子の1つの実施形態である。系列1単一 V_H ドメイン抗体は、CまたはN末端に位置し得る。好ましい実施形態では、それはN末端に位置する。

30

【0081】

いくつかの実施形態では、第1または第2の単一 V_H ドメイン抗体は、親分子の、特に、1以上のアミノ酸置換、欠失、挿入またはその他の修飾を有し、かつ、単一ドメイン抗体の生物学的機能を保持するsdAb 1. 1、2. 1、3. 1、4. 1、5. 1、6. 1、7. 1、8. 1、9. 1、10. 1、11. 1、12. 1、13. 1、14. 1または15. 1から選択される親 V_H 単一ドメイン抗体の、変異体 V_H 単一ドメイン抗体である。よって、変異体 V_H 単一ドメイン抗体は、配列操作が可能である。修飾は、天然配列 V_H 単一ドメイン抗体またはポリペプチドと比較してアミノ酸配列に変化をもたらす、単一ドメイン抗体またはポリペプチドをコードする1以上のコドンの1以上の置換、欠失または挿入を含み得る。アミノ酸置換は、ロイシンのセリンでの置換など、あるアミノ酸を類似の構造的および/または化学的特性を有する別のアミノ酸で置換すること、すなわち、保存的アミノ酸置換の結果であり得る。挿入または欠失は、場合により、約1~5個のアミノ酸の範囲内であり得る。許容される変形形態は、その配列内でアミノ酸の挿入、欠失または置換を系統的に作出し、生じた変異体を全長または成熟天然配列により示される活性に関して試験することによって決定することができる。本明細書に記載の V_H 単一ド

40

50

メイン抗体の変異体は、非変異体分子と少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列相同性、好ましくは、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列相同性を有する。

【0082】

1つの実施形態では、修飾は、保存的配列修飾である。本明細書で使用する場合、用語「保存的配列修飾」は、そのアミノ酸配列を含有する抗体の結合特性に有意に影響または変化を及ぼさないアミノ酸修飾を意味するものとする。このような保存的修飾は、アミノ酸置換、付加および欠失を含む。修飾は、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介突然変異誘発などの当技術分野で公知の標準的技術によって本発明の結合分子に導入することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基の系列は、当技術分野で定義されている。これらの系列としては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、β分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。よって、単一ドメイン抗体のCDR領域内の1以上のアミノ酸残基は、同じ側鎖系列からの他のアミノ酸残基で置換可能であり、変更された抗体を、本明細書に記載の機能アッセイを用いて、保持されている機能（すなわち、上記(c)～(I)に示す機能）に関して試験することができる。

【0083】

いくつかの実施形態では、V_H単一ドメイン抗体は、1以上の配列修飾を含んでなり、かつ、非修飾単一ドメイン抗体と比較して結合親和性、特異性、熱安定性、発現レベル、エフェクター機能、グリコシル化、免疫原性の低減、または溶解度などの特性の1以上に改善を有する、表1～15に示されるものから選択される単一ドメイン抗体の変異体である。

【0084】

当業者ならば、*in vitro*および*in vivo*発現ライブラリーを含む本明細書に記載の抗原結合分子を同定、取得および最適化するために種々の方法が存在することが分かるであろう。これはさらに実施例に記載する。ディスプレイ（例えば、リボソームおよび／またはファージディスプレイ）および／または突然変異誘発（例えば、エラープロン突然変異誘発）などの当技術分野で公知の最適化技術が使用可能である。よって、本発明はまた、本明細書に記載の単一ドメイン抗体の配列最適化変異体を含んでなる。

【0085】

1つの実施形態では、単一ドメイン抗体の免疫原性を低減するために修飾を行うことができる。例えば、1つのアプローチは、1以上のフレームワーク残基を対応するヒト生殖細胞系配列に復帰させることである。より具体的には、体細胞突然変異を受けた単一ドメイン抗体は、単一ドメイン抗体が誘導される生殖細胞系配列とは異なるフレームワーク残基を含み得る。このような残基は、単一ドメイン抗体フレームワーク配列を、その単一ドメイン抗体が誘導される生殖細胞系配列と比較することによって同定することができる。フレームワーク領域配列のアミノ酸残基の1以上をそれらの生殖細胞系構成に戻すためには、体細胞突然変異を例えば、部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介突然変異誘発によって生殖細胞系配列に「復帰突然変異させる」ことができる。

【0086】

別のタイプのフレームワーク修飾は、T細胞エпитープを除去してそれによって抗体の潜在的免疫原性を低減するために、フレームワーク領域内、または1以上のCDR領域内

でさえも、1以上の残基を突然変異させることを含む。さらに別の実施形態では、抗体のグリコシル化が改変される。例えば、非グリコシル化抗体が作製可能である（すなわち、抗体はグリコシル化を欠く）。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を高めるために変更することができる。このような糖鎖修飾は、例えば、抗体配列内の1以上のグリコシル化部位を変更することによって達成することができる。例えば、1以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位の除去をもたらし、それによってその部位のグリコシル化を除去する1以上のアミノ酸置換が作出できる。このようなグリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高め得る。

【0087】

1つの態様では、結合分子は、系列1または系列1様配列を含んでなる単一V_Hドメイン抗体を含んでなる。1つの実施形態では、系列1または系列1様配列を含んでなる2つのV_Hドメインを二価結合分子として組み合わせることができる。別の実施形態では、系列1または系列1様配列を含んでなる第1のV_Hドメインを、二価結合分子として、PSMAの同じエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーション(confirmation)と結合する本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせることができる。第2のV_Hドメインは、系列1、5、6、12もしくは13または系列1、5、6、12もしくは13様配列から選択され得る。1つの実施形態では、第1のV_Hドメインは配列番号4を含んでなり、第2のV_Hドメインは配列番号4を含んでなる。

【0088】

1つの実施形態では、系列1または系列1様配列を含んでなる第1のV_Hドメインを、二重パラトープ性結合分子としてPSMAの異なるエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列2、3、4、7、9、10、11もしくは14または系列2、3、4、7、9、10、11もしくは14様配列から選択され得る。1つの実施形態では、第1のV_Hドメインは配列番号4を含んでなり、第2のV_Hドメインは配列番号84を含んでなる。

【0089】

系列1単一V_Hドメイン抗体は、親の配列(1.1;配列番号4)またはその一部、例えば、CDR3配列、および最適化の過程で親1.1から誘導される配列、例えば、図1に示されるような配列を含み得る。系列1のCDR配列および全長V_H配列は、以下に示すように表1に従ってナンバリングされる。

【0090】

10

20

30

【表 1】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
1.1	配列番号 1 SYAMS	配列番号 2 SIGENDGT TDYADSV KG	配列番号 3 DGVH	配列番号 4 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIGEND GTTDYADSVKGRFTISRDNKSMYLYQM NSLRVEDTAVYYCVKDGVHWGQGTLTV SS
1.2	配列番号 5 SYAMS	配列番号 6 SIGDNNNS TEYADSV KG	配列番号 7 DGVH	配列番号 8 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIGDNN NSTEYADSVKGRFTISRDNKSTLYLQMN SLSAEDTAVYYCVKDGVHWGQGTLTVS S
1.3	配列番号 9 SYAMS	配列番号 10 IGDNNNST DYADSVK G	配列番号 11 DGVH	配列番号 12 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIGDNN NSTDYADSVKGRFTISRDNKSTLYLQMN SLRAEDTAVYYCVKDGVHWGQGTLTVS S
1.4	配列番号 13 SYAMS	配列番号 14 IGDGTYY ADSVKG	配列番号 15 DGVH	配列番号 16 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIGDGT TYYADSVKGRFTISRDNKSTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDGVHWGQGTLTVSS
1.5	配列番号 17 TYAMS	配列番号 18 SIGENDRT TYYVDSV KG	配列番号 19 DGVH	配列番号 20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSTYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIGEND RTTYYVDSVKGRFTISRDNKSTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDGVHWGQGTLTVS S
1.6	配列番号 21 SYAMS	配列番号 22 SIGDNNRT TYYADSV KG	配列番号 23 DGVH	配列番号 24 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIGDNN RTTYYADSVKGRFTISRDNKSTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDGVHWGQGTLTVS S
1.7	配列番号 25 SYAMS	配列番号 26 SIGDGTYY YADSVKG	配列番号 27 DGVH	配列番号 28 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIGDGT TYYADSVKGRFTISRDNKSTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDGVHWGQGTLTVSS

10

20

30

1.8	配列番号 29 SYAMS	配列番号 30 SIGENDGT TDYADSV KG	配列番号 31 DGVH	配列番号 32 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIGEND GTTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRVEDTAVYYCVKDG VHWGQGLTVTV SS
1.9	配列番号 33 SYALS	配列番号 34 SIGENDGT TDYADSV KG	配列番号 35 DGVH	配列番号 36 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS FSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENDG TTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRVEDTAVYYCVKDG VHWGQGLTVTVSS
1.10	配列番号 37 SYALS	配列番号 38 SIGENNAT TDYADFV KG	配列番号 39 DGVH	配列番号 40 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS FSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENNA TTDYADFVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRVEDTAVYYCVKDG VHWGQGLTVTVSS
1.11	配列番号 41 SYALS	配列番号 42 SIGENNDT TDYADNV KG	配列番号 43 DGVH	配列番号 44 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS FSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENND TTDYADNVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRVEDTAVYYCVKDG VHWGQGLTVTVSS
1.12	配列番号 45 SYALS	配列番号 46 SIGENNAT TDYADAV KG	配列番号 47 DGVH	配列番号 48 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS FSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENNA TTDYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRVEDTAVYYCVKDG VHWGQGLTVTVSS
1.13	配列番号 49 SYALS	配列番号 50 SIGENNHT TDYAADV KG	配列番号 51 DGVH	配列番号 52 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS FSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENNHT TTDYAADVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRVEDTAVYYCVKDG VHWGQGLTVTVSS
1.14	配列番号 53 SYALS	配列番号 54 SIGENNAT TDYADV KG	配列番号 55 DGVH	配列番号 56 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS FSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENNA TTDYADVVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRVEDTAVYYCVKDG VHWGQGLTVTVSS
1.15	配列番号 57 SYALS	配列番号 58 SIGENNHT TDYAAFVK G	配列番号 59 DGVH	配列番号 60 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS FSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENNHT TTDYAAFVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRVEDTAVYYCVKDG VHWGQGLTVTVSS
1.16	配列番号 61 SYALS	配列番号 62 SIGENNHT TDYADTV KG	配列番号 63 DGVH	配列番号 64 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS FSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENNHT TTDYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRVEDTAVYYCVKDG VHWGQGLTVTVSS
1.17	配列番号 65 SYALS	配列番号 66 SIGENNDT TDYADAV KG	配列番号 67 DGVH	配列番号 68 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS FSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENND TTDYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRVEDTAVYYCVKDG VHWGQGLTVTVSS
1.18	配列番号 69 SYALS	配列番号 70 SIGENNAT	配列番号 71 DGVH	配列番号 72 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS FSSYALSWVRQAPGKGLEWVSSIGENNA

10

20

30

40

		TDYAASV KG		TTDYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRVEDTAVYYCVKDG VHWGQGT LVTVSS
1.19	配列番号 73 SYALS	配列番号 74 SIGENNDT TDYAAYV KG	配列番号 75 DGVH	配列番号 76 EVQLLES G GGLVQ P G G S L R L S C A A S G F S F S S Y A L S W V R Q A P G K G L E W W S S I G E N N D T T D Y A A Y V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R V E D T A V Y Y C V K D G V H W G Q G T L V T V S S
1.20	配列番号 77 SYALS	配列番号 78 SIGENNHT TDYAATVK G	配列番号 79 DGVH	配列番号 80 EVQLLES G GGLVQ P G G S L R L S C A A S G F S F S S Y A L S W V R Q A P G K G L E W W S S I G E N N H T T D Y A A T V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R V E D T A V Y Y C V K D G V H W G Q G T L V T V S S

10

表 1. これは本発明の範囲内にある系列 1 C D R 配列および系列 1 全長 V_H 配列の配列番号を示す。対応する配列を図 1 に示す。系列 1 様配列は、本発明に示されるような系列 1 配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0091】

1つの態様では、 V_H ドメインは、配列番号 3 または配列番号 3 と少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の同一性を有する配列を含んでなる C D R 3 配列を含んでなる。

20

【0092】

1つの実施形態では、 V_H ドメインは、配列番号 3、7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、51、55、59、63、67、71、75 または 79 から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、またはからなる C D R 3 配列を含んでなる。

【0093】

1つの実施形態では、 V_H ドメインは、超可変領域 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含んでなり、前記 C D R 1 は、配列番号 1 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の同一性を有する配列を含んでなり、前記 C D R 2 は、配列番号 2 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の同一性を有する配列を含んでなり、かつ、前記 C D R 3 は、配列番号 3 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の同一性を有する配列を含んでなる。例えば、前記 C D R は、図 1 に示されるものから選択される C D R であり得る。

30

【0094】

1つの実施形態では、前記 C D R 1 は、配列番号 1 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 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% または 99% の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記 C D R 2 は、配列番号 2 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 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% または 99% の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記 C D R 3 は、配列番号 3 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 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% または 99% の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

40

50

る。

【0095】

1つの実施形態では、V_HドメインのCDR配列は、図1のような単一V_Hドメイン抗体1. 1～1. 20またはそれらの組合せに関して示される通りである。1つの実施形態では、CDR1は、配列番号1、5、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45、49、53、57、61、65、69、73または77のアミノ酸配列を含んでなり、またはからなり、CDR2は、配列番号2、6、10、14、18、22、26、30、34、38、42、46、50、54、58、62、66、70、74または78のアミノ酸配列を含んでなり、またはからなり、かつ、CDR3は、配列番号3、7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、51、55、59、63、67、71、75または79のアミノ酸配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、CDRは配列番号33である。

10

【0096】

1つの態様では、単一V_Hドメイン抗体は、図1のクローン1. 1～1. 20に関して示されるようなCDR1、CDR2およびCDR3の組合せを有する。よって、1つの実施形態では、単一V_Hドメイン抗体は、CDR1、2および3配列を含んでなり、CDR1は配列番号1であり、CDR2は配列番号2であり、かつ、CDR3は配列番号3である。別の実施形態では、CDR1は配列番号5であり、CDR2は配列番号6であり、かつ、CDR3は配列番号7である。別の実施形態では、CDR1は配列番号9であり、CDR2は配列番号10であり、かつ、CDR3は配列番号11である。別の実施形態では、CDR1は配列番号13であり、CDR2は配列番号14であり、かつ、CDR3は配列番号15である。別の実施形態では、CDR1は配列番号17であり、CDR2は配列番号18であり、かつ、CDR3は配列番号19である。別の実施形態では、CDR1は配列番号21であり、CDR2は配列番号22であり、かつ、CDR3は配列番号23である。別の実施形態では、CDR1は配列番号25であり、CDR2は配列番号26であり、かつ、CDR3は配列番号27である。別の実施形態では、CDR1は配列番号29であり、CDR2は配列番号30であり、かつ、CDR3は配列番号31である。別の実施形態では、CDR1は配列番号33であり、CDR2は配列番号34であり、かつ、CDR3は配列番号35である。別の実施形態では、CDR1は配列番号37であり、CDR2は配列番号38であり、かつ、CDR3は配列番号39である。別の実施形態では、CDR1は配列番号41であり、CDR2は配列番号42であり、かつ、CDR3は配列番号43である。別の実施形態では、CDR1は配列番号45であり、CDR2は配列番号46であり、かつ、CDR3は配列番号47である。別の実施形態では、CDR1は配列番号49であり、CDR2は配列番号50であり、かつ、CDR3は配列番号51である。別の実施形態では、CDR1は配列番号53であり、CDR2は配列番号54であり、かつ、CDR3は配列番号55である。別の実施形態では、CDR1は配列番号57であり、CDR2は配列番号58であり、かつ、CDR3は配列番号59である。別の実施形態では、CDR1は配列番号61であり、CDR2は配列番号62であり、かつ、CDR3は配列番号63である。別の実施形態では、CDR1は配列番号65であり、CDR2は配列番号66であり、かつ、CDR3は配列番号67である。別の実施形態では、CDR1は配列番号69であり、CDR2は配列番号70であり、かつ、CDR3は配列番号71である。別の実施形態では、CDR1は配列番号73であり、CDR2は配列番号74であり、かつ、CDR3は配列番号75である。別の実施形態では、CDR1は配列番号77であり、CDR2は配列番号78であり、かつ、CDR3は配列番号79である。

20

30

40

【0097】

1つの実施形態では、単一V_Hドメイン抗体は、配列番号4またはそれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからな

50

る V_H ドメインを有する。このような配列の CDR 配列は図 1 に示される。例えば、 V_H ドメインは、配列番号 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76 または 80 を含んでなる、またはからなる。別の実施形態では、 V_H ドメインは、例えば配列番号 4 など、上記の配列の 1 つから選択されるが、1 以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個のアミノ酸置換を含んでなる。1 つの実施形態では、1 以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の 1 以上にある。別の実施形態では、1 以上のアミノ酸置換は、CDR の 1 以上にある。1 つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列および CDR 配列内にある。1 つの実施形態では、 V_H ドメインは、配列番号 4 または配列番号 4 と比較してフレームワーク領域内に 1 以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個のアミノ酸置換を含んでなる配列を含んでなる、またはからなる。1 つの実施形態では、 V_H ドメインは、配列番号 32 を含んでなる、またはからなる。

10

【0098】

よって、1 つの実施形態では、本発明は、PSMA と結合し得る少なくとも 1 つの免疫グロブリン単ドメイン抗体を含んでなる、またはからなる結合分子に関し、前記ドメインはヒト V_H ドメインであり、前記 V_H ドメインは、配列番号 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76 もしくは 80 またはそれと少なくとも 40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

20

【0099】

1 つの実施形態では、単一 V_H ドメイン抗体は、配列番号 4 に示されるような V_H ドメイン、またはその変異体を含んでなり、前記変異体において、残基 33 は T であり、36 は L であり、残基 57 は D であり、残基 59 は N、R、A、D、H であり、残基 63 は D、Y であり、残基 65 は V であり、残基 66 は A であり、かつ／または残基 67 は F、N、A、D、V、T、S、Y である。

【0100】

1 つの実施形態では、 V_H ドメインは、配列番号 4 に示される通り、またはその変異体であり、前記変異体は、配列番号 4 と比較して下記の変更を含む

30

- S77 → N および M78 → T (1. 8 に関して示される通り)
- M34 → L、D55 → N、G56 → H、D62 → A、S63 → T および場合により S77 → N および M78 → T (1. 20 に関して示される通り)
- M34 → L、D55 → N、G56 → A、S63 → F および場合により S77 → N および M78 → T (1. 10 に関して示される通り)
- M34 → L、D55 → N、G56 → D、S63 → F および場合により S77 → N および M78 → T (1. 11 に関して示される通り)
- M34 → L、D55 → N、G56 → A、S63 → A および場合により S77 → N および M78 → T (1. 12 に関して示される通り)
- M34 → L、D55 → N、G56 → H、D62 → A、S63 → D および場合により S77 → N および M78 → T (1. 13 に関して示される通り)
- M34 → L、D55 → N、G56 → A、S63 → V および場合により S77 → N および M78 → T (1. 14 に関して示される通り)
- M34 → L、D55 → N、G56 → H、D62 → A、S63 → F および場合により S77 → N および M78 → T (1. 15 に関して示される通り)
- M34 → L、D55 → N、G56 → H、S63 → T および場合により S77 → N および M78 → T (1. 16 に関して示される通り)
- M34 → L、D55 → N、G56 → H、S63 → T および場合により S77 → N および M78 → T (1. 17 に関して示される通り)

40

50

—M 3 4 → L、D 5 5 → N、G 5 6 → D、D 6 2 → A、S 6 3 → S および場合により S 7 7 → N および M 7 8 → T (1. 1 8 に関して示される通り)

—M 3 4 → L、D 5 5 → N、G 5 6 → A、D 6 2 → A、S 6 3 → Y および場合により S 7 7 → N および M 7 8 → T (1. 1 9 に関して示される通り)。

【0101】

1つの実施形態では、付加的变化が含まれてもよい。別の実施形態では、上記に挙げた変異体は付加的变化を含まない。

【0102】

系列1の単一V_Hドメイン抗体は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるようなKD、K_{off}、K_A、K_d、E_{C₅₀}およびI_{C₅₀}値を有する。用語「KD」は、本出願で使用する場合、「平衡解離定数」を意味し、平衡時の滴定測定で、または解離速度定数(K_{off})を結合速度定数(K_{on})で割ることによって得られる値を意味する。

「K_A」は、本出願で使用する場合、親和性定数を意味する。結合速度定数、解離速度定数および平衡解離定数は、抗原に対する抗体の結合親和性を表すために使用される。結合および解離速度定数を決定するための方法は当技術分野で周知である。蛍光に基づく技術を使用すれば、高感度を得られ、平衡状態で生理学的バッファー中のサンプルを調べることができる。他の実験アプローチおよびBIAcore (商標) (生体分子相互作用分析) アッセイなどの機器および実施例に記載のアッセイを本発明の結合分子を試験するために使用することができる。

【0103】

1つの態様では、本発明の結合分子は、系列2または系列2様配列を含んでなる1以上のヒトV_Hドメインを含んでなる。よって、1つの実施形態では、結合分子は、系列2の、PSMA、好ましくは、ヒトPSMAと結合し得る少なくとも2つの単一V_Hドメイン抗体を含んでなる、またはからなる。別の実施形態では、系列2または系列2様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二価結合分子として、PSMAの同じエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列2、3、4、7、9、10、11または系列2、3、4、7、9、10、11様配列から選択され得る。

【0104】

1つの実施形態では、系列2または系列2様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二重パラトープ性結合分子として、PSMAの異なるエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列1、5、6、12または13または系列1、5、6、12または13様配列から選択され得る。

【0105】

系列2単一V_Hドメイン抗体は、親(2. 1; 配列番号84)から誘導される配列またはその一部、例えば、CDR3配列、および例えば図2に示されるように、最適化の過程で親2. 1から誘導されるV_H配列またはその一部を含み得る。系列2のクローンのCDR配列および全長配列は、以下に示すように表2に従ってナンバリングされる。

【0106】

【表 2】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
2.1	配列番号 81 GYGMH	配列番号 82 YISYD GSNKY YADSV KG	配列番号 83 DPAWGLRL GESSYDF DI	配列番号 84 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISYDGSNKY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWG QGTMVTVSS
2.2	配列番号 85 GYGMH	配列番号 86 YISYD GSNKY YADSV KG	配列番号 87 DPAWGLRL GESSYDF DI	配列番号 88 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISYDGSNKY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWG QGTMVTVSS
2.3	配列番号	配列番号	配列番号	配列番号 92

10

20

	89 GYGMH	90 HISYD GSNRY YAESV KG	91 DPAWGLRL GELSSYDF DI	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGMHWVRQAPGKGLEWVAHISYDGSNRY YAESVKGRFTISRENSKNTLSLQMNSLRAED TAVYYCAKDPAWGLRLGELSSYDFDIWGQG TMVTVSS
2.4	配列番号 93 GYGMH	配列番号 94 VISYD GSNRY YADSV KG	配列番号 95 DPAWGLRL GELSSYDF EI	配列番号 96 QVTLKESGGGVVQPGRSLKLSCAASGFSFS GYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNRY YADSVKGRFTISRDNKNTLSLQMNSLRAE DTAVYYCARDPAWGLRLGELSSYDFEIWGQ GTMVTVSS
25	配列番号 97 GYGMH	配列番号 98 VISYD GSNRY YADSV KG	配列番号 99 DPAWGLRL GELSSYDF EI	配列番号 100 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSF SGYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNR YYADSVKGRFTISRDNKNTLSLQMNSLRA EDTAVYYCAKDPAWGLRLGELSSYDFEIWG QGTMVTVSS
2.6	配列番号 101 GYGMH	配列 番号 102 VISYD GSNKY YADSV KG	配列番号 103 DPAWGLRL GELSSYKF EI	配列番号 104 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKY YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGELSSYKFEIWGQ GTMVTVSS
2.7	配列番号 105 GYGMH	配列 番号 106 LISYD GSNKY YADSV KG	配列番号 107 DPAWGLRL GEQSSYAF DI	配列番号 108 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGMHWVRQAPGKGLEWVALISYDGSNKY YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGEQSSYAFDIWG QGTMVTVSS
2.8	配列番号 109 GYGMH	配列 番号 110 VISYD GSNKY YADSV	配列番号 111 DPAWGLRL GEQSSYAF E	配列番号 112 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSF SGYGMHWVRQAPGKGLEWVVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRTE DTAVYYCAKDPAWGLRLGEQSSYAFEIWG QGTMVTVSS

10

20

30

40

		KG		
2.9	配列番号 113 GYGMH	配列 番号 114 VISYD GSNKY YADSV KG	配列番号 115 DPAWGLRL GEQSSYAF EI	配列番号 116 EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGMHWVRQAPGKGLEWWAVISYDGSNKY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVE DTAVYYCAKDPAWGLRLGEQSSYAFEIRGQ GTTVTVSS
2.10	配列番号 117 GYGMH	配列 番号 118 YISYD GSNRY YADSV KG	配列番号 119 DPAWGLRL GESSYDF DI	配列番号 120 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS GYGMHWVRQAPGKGLEWWAYISYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKKTLQLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWG QGTMTVSS
2.11	配列番号 121 GYGLH	配列 番号 122 YISYD ESNKY YAPSV KG	配列番号 123 DPAWGLRL GESSYDF DI	配列番号 124 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGLHWVRQAPGKGLEWWAYISYDESNKY YAPSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWG QGTMTVSS
2.12	配列番号 125 GYGMH	配列 番号 126 YISYD KSNKY YADKV KG	配列番号 127 DPAWGLRL GESSYDF DI	配列番号 128 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGMHWVRQAPGKGLEWWAYISYDKSNKY YADKVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWG QGTMTVSS
2.13	配列番号 129 GYGLH	配列 番号 130 YISYD ASNKY YADNV KG	配列番号 131 DPAWGLRL GESSYDF DI	配列番号 132 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGLHWVRQAPGKGLEWWAYISYDASNKY YADNVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWG QGTMTVSS
2.14	配列番号	配列番号	配列番号	配列番号 136

10

20

30

40

	133 GYGVH	134 YISYD ASNKY YADNV KG	135 DPAWGLRL GESSYDF DI	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGVHWRQAPGKGLEWWAYISYDASNKY YADNVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWG QGTMVTVSS
2.15	配列番号 137 GYGLH	配列 番号 138 YISYD KSNKY YADKV KG	配列番号 139 DPAWGLRL GESSYDF DI	配列番号 140 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGLHWRQAPGKGLEWWAYISYDKSNKY YADKVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWG QGTMVTVSS
2.16	配列番号 141 GYGAH	配列 番号 142 YISYD KSNKY YADKV KG	配列番号 143 DPAWGLRL GESSYDF DI	配列番号 144 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGAHWRQAPGKGLEWWAYISYDKSNKY YADKVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWG QGTMVTVSS
2.17	配列番号 145 GYGMH	配列 番号 146 YISYD ASNKY YADNV KG	配列番号 147 DPAWGLRL GESSYDF DI	配列番号 148 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGMHWRQAPGKGLEWWAYISYDASNKY YADNVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWG QGTMVTVSS
2.18	配列番号 149 GYGQH	配列 番号 150 YISYD ASNKY YADNV KG	配列番号 151 DPAWGLRL GESSYDF D	配列番号 152 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGQHWWRQAPGKGLEWWAYISYDASNKY YADNVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWG QGTMVTVSS
2.19	配列番号 153 GYGFH	配列 番号 154	配列番号 155 DPAWGLRL	配列番号 156 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGFHWRQAPGKGLEWWAYISYDASNKY

10

20

30

40

		YISYD ASNKY YADNV KG	GESSSYDF DI	YADNVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGESSSYDFDIWG QGTMVTVSS
2.20	SEQ ID NO. 157 GYGMH	配列 番号 158 IISYDG SNRY ADSVK G	配列番号 159 DPAWGLRL GESSSYDF EI	配列番号 160 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGMHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLSLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGESSSYDFEIWGQ GTMVTVSS
2.21	配列番号 161 GYGMH	配列 番号 162 VISYD GSNRY YADSV KG	配列番号 163 DPAWGLRL GKLSSYDF EI	配列番号 164 QVQLVESGGGVVQPGRSLKLSCAASGFSFS GYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLSLQMNSLRAE DTAVYYCAKDPAWGLRLGKLSSYDFEIWGQ GTMVTVSS
2.22	配列番号 165 GYGTH	配列番号 166 166 YISYD GSNKY YAAPV KG	配列番号 167 DAAWGLRL GESSSYDF DI	配列番号 168 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGTHWVRQAPGKGLEWVAIISYDGSNRY YAAPVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDAAWGLRLGESSSYDFDIWG QGTMVTVSS
2.23	配列番号 169 GYGTH	配列 番号 170 YISYD ESNKY YASSV KG	配列番号 171 DRAWGLRL GESSSYDF DI	配列番号 172 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGTHWVRQAPGKGLEWVAIISYDESNKY YASSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDRAWGLRLGESSSYDFDIWG QGTMVTVSS
2.24	配列番号 173 GYGMH	配列 番号 174 YISYD ESNKY	配列番号 175 DTAWGLRL GESSSYDF DI	配列番号 176 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGMHWVRQAPGKGLEWVAIISYDESNKY YARLVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE TAVYYCAKDTAWGLRLGESSSYDFDIWGQ

10

20

30

40

		YARLV KG		GTMVTVSS
2.25	配列番号 177 GYGLH	配列 番号 178 YISYDL SNKYY ARGVK G	配列番号 179 DVAWGLRL GESSYDF DI	配列番号 180 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFS GYGLHWVRQAPGKGLEWYAYISYDLSNKY YARGVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDVAWGLRLGESSYDFDIWG QGTMVTVSS

10

表2. これは本発明の範囲内にある系列2 CDR配列および系列2全長V_H配列の配列番号を示す。対応する配列を図2に示す。系列2様配列は、本発明に示されるような系列2配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0107】

1つの態様では、V_Hドメインは、配列番号83または配列番号83と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含んでなるCDR3配列を含んでなる。1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号83、87、91、95、99、103、107、111、115、119、123、127、131、135、139、143、147、151、155、159、163、167、171、175または179から選択されるCDR3を含んでなる。

20

【0108】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、CDR3を含んでなる少なくとも1つの抗原結合部位を含んでなり、前記CDR3は、配列番号75のアミノ酸配列またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を有する。1つの実施形態では、系列2系列2様配列は、PSMAと結合し得る少なくとも1つの免疫グロブリン単ドメイン抗体を含んでなる、またはからなる結合分子を含んでなり、前記ドメインは、超可変領域CDR1、CDR2およびCDR3を含んでなるヒトV_Hドメインであり、前記CDR1は、配列番号81のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記CDR2は、配列番号82のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記CDR3は、配列番号83のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

30

40

【0109】

1つの実施形態では、前記CDR1は、配列番号81のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも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%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR2は、配列番号82のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも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%もしくは99%の同一性

50

を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR3は、配列番号83のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも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%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0110】

1つの実施形態では、V_HドメインのCDR配列は、図2のようなs d A b 2. 1~2. 25またはそれらの組合せに関して示される通りである。1つの実施形態では、CDR1は、配列番号81、85、89、93、97、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173または177のアミノ酸配列を含んでなり、またはからなり、CDR2は、配列番号82、86、90、94、98、102、106、110、114、118、122、126、130、134、138、142、146、150、154、158、162、166、170、174または178のアミノ酸配列を含んでなり、またはからなり、かつ、CDR3は、配列番号783、87、91、95、99、103、107、111、115、119、123、127、131、135、139、143、147、151、155、159、163、167、171、175または179のアミノ酸配列を含んでなる、またはからなる。

【0111】

1つの態様では、単一V_Hドメイン抗体は、図2で2. 1~2. 25に関して示されるようなCDR1、CDR2およびCDR3の組合せを有する。別の実施形態では、CDR1は配列番号81であり、CDR2は配列番号82であり、かつ、CDR3は配列番号83である。別の実施形態では、CDR1は配列番号85であり、CDR2は配列番号86であり、かつ、CDR3は配列番号87である。別の実施形態では、CDR1は配列番号89であり、CDR2は配列番号90であり、かつ、CDR3は配列番号91である。別の実施形態では、CDR1は配列番号93であり、CDR2は配列番号94であり、かつ、CDR3は配列番号95である。別の実施形態では、CDR1は配列番号97であり、CDR2は配列番号98であり、かつ、CDR3は配列番号99である。別の実施形態では、CDR1は配列番号101であり、CDR2は配列番号102であり、かつ、CDR3は配列番号103である。別の実施形態では、CDR1は配列番号104であり、CDR2は配列番号105であり、かつ、CDR3は配列番号106である。別の実施形態では、CDR1は配列番号108であり、CDR2は配列番号109であり、かつ、CDR3は配列番号110である。別の実施形態では、CDR1は配列番号112であり、CDR2は配列番号113であり、かつ、CDR3は配列番号115である。別の実施形態では、CDR1は配列番号117であり、CDR2は配列番号118であり、かつ、CDR3は配列番号119である。別の実施形態では、CDR1は配列番号121であり、CDR2は配列番号122であり、かつ、CDR3は配列番号123である。別の実施形態では、CDR1は配列番号125であり、CDR2は配列番号127であり、かつ、CDR3は配列番号127である。別の実施形態では、CDR1は配列番号129であり、CDR2は配列番号130であり、かつ、CDR3は配列番号131である。別の実施形態では、CDR1は配列番号133であり、CDR2は配列番号134であり、かつ、CDR3は配列番号135である。別の実施形態では、CDR1は配列番号137であり、CDR2は配列番号138であり、かつ、CDR3は配列番号139である。別の実施形態では、CDR1は配列番号140であり、CDR2は配列番号141であり、かつ、CDR3は配列番号142である。別の実施形態では、CDR1は配列番号144であり、CDR2は配列番号145であり、かつ、CDR3は配列番号146である。別の実施形態では、CDR1は配列番号148であり、CDR2は配列番号149であり、かつ、CDR3は配列番号150である。別の実施形態では、CDR1は配列番号152であり、CDR2は配列番号153であり、かつ、CDR3は配列番号154である。別の実施形態で

は、CDR1は配列番号157であり、CDR2は配列番号158であり、かつ、CDR3は配列番号159である。別の実施形態では、CDR1は配列番号161であり、CDR2は配列番号162であり、かつ、CDR3は配列番号163である。別の実施形態では、CDR1は配列番号165であり、CDR2は配列番号166であり、かつ、CDR3は配列番号167である。別の実施形態では、CDR1は配列番号169であり、CDR2は配列番号170であり、かつ、CDR3は配列番号171である。別の実施形態では、CDR1は配列番号173であり、CDR2は配列番号174であり、かつ、CDR3は配列番号175である。別の実施形態では、CDR1は配列番号177であり、CDR2は配列番号178であり、かつ、CDR3は配列番号179である。

【0112】

1つの実施形態では、単一V_Hドメイン抗体は、配列番号84またはそれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、相同性は、少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%である。このような配列のCDR配列は図2に示される。例えば、単一V_Hドメイン抗体は、配列番号84、88、92、96、100、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176または180を含んでなる、またはからなる。

【0113】

別の実施形態では、V_Hドメインは、例えば配列番号84など、上記の配列の1つから選択されるが、1以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を含んでなる。1つの実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の1以上にある。別の実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、CDRの1以上にある。1つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列およびCDR配列内にある。

【0114】

1つの実施形態では、単一V_Hドメイン抗体は、配列番号84またはその変異体を含んでなり、前記変異体は、配列番号76と比較して下記のアミノ酸置換を有する：残基34はL、V、M、Q、T、Fであり、残基50はH、V、L、Iであり、残基55はE、K、A、Lであり、残基58はRであり、残基62はE、P、R、S、Aであり、残基63はEであり、残基64はN、K、P、L、G、Sであり、残基79はKであり、残基はL、Qであり、残基84はK、Aであり、残基はDである。

【0115】

1つの実施形態では、単一V_Hドメイン抗体は、配列番号4に示されるようなV_H、またはその変異体を含んでなり、またはからなり、前記変異体は、配列番号84と比較して下記の変更を含む：

- 1) M34→L34、G55→A55およびS63→N63（2.13に関して示される通り）、
- 2) G55→A55、G55→A55およびS63→N63（2.17に関して示される通り）、
- 3) M34→L34、G55→K55およびS63→K63（2.15に関して示される通り）、
- 4) G55→K55、およびS63→K63（2.15に関して示される通り）または
- 5) M34→L34、G55→E55およびD62→S62（2.11に関して示される通り）。

【0116】

1つの実施形態では、付加的变化が含まれてもよい。別の実施形態では、上記に挙げた

変異体は付加的变化を含まない。1つの実施形態では、変異体は、下記の変更の組合せ：G 5 5→A 5 5、S 6 3→N 6 3、D 9 9→N 9 9とP 1 0 0→T 1 0 0；G 3 4→L 3 4、G 5 5→K 5 5とS 6 3→K 6 3；G 5 5→T 5 5、S 6 3→R 6 3、D 9 9→G 9 9と、P 1 0 0→R 1 0 0とを含まない。

【0117】

系列2または系列2様結合分子は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるようなK D、K o f f、K A、K d、E C 5 0およびI C 5 0値を有する。

【0118】

1つの態様では、ヒトP S M Aと結合し得る結合分子は、系列3または系列3様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる。

10

【0119】

1つの実施形態では、系列3または系列3様配列を含んでなるV_Hドメインを二価結合分子として組み合わせ得る。別の実施形態では、系列3または系列3様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二価結合分子として、P S M Aの同じエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列2、3、4、7、9、10、11または系列2、3、4、7、9、10、11様配列から選択され得る。

【0120】

1つの実施形態では、系列3または系列3様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二重パラトープ性結合分子として、P S M Aの異なるエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列1、5、6、12または13または系列1、5、6、12または13様配列から選択され得る。

20

【0121】

系列3または系列3様単一V_Hドメイン抗体は、親配列および親（3. 1；配列番号184）から誘導される配列またはその一部、例えば、C D R 3配列、および例えば図3に示されるように、最適化の過程で親3. 1から誘導されるV_H配列またはその一部を含む。系列3のクローンのC D R配列および全長配列は、以下に示すように表3に従ってナンバリングされる。

【0122】

30

【表 3】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
3.1	配列番号 181 SYGMH	配列 番号 182 FMTYD GSNRY YADSV KG	配列番号 183 DRIVGGRV PDAFDI	配列番号 184 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMHWVRQAPGKGLEWVAFMTYDGSNR YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRD EDTALYYCARDIVGGRVPDAFDIWGQGTM VTSS
3.2	配列番号 185 SYGMN	配列 番号 186 FISYD GSNKY YADSV KG	配列番号 187 DRIVGARV PDAFDI	配列番号 188 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWVAFISYDGSNKY YADSVKGRFTISKDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAFDIWGQGTMTV TVSS
3.3	配列番号 189 SYGMN	配列 番号 190 FISYD GSNRY YADSV KG	配列番号 191 DRIVGARV PDAFDI	配列番号 192 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAFDIWGQGTMTV TVSS
3.4	配列番号 193 SYGMN	配列 番号 194 FITYD GSNRY YADSV KG	配列番号 195 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 196 EVQLVESGGGAVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWVAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMTV TVSS
3.5	配列番号 197 SYGMN	配列 番号 198 FITYD GSNRY YADSV KG	配列番号 199 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 200 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWVAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMTV TVSS
3.6	配列番号 201 SYGMN	配列 番号 202 FITYD	配列番号 203 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 204 EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWVAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPE

10

20

30

40

		GSNRY YADSV KG		DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMOV TVSS
3.7	配列番号 205 SYGMN	配列 番号 206 FITYD GSNRY YADSV KG	配列番号 207 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 208 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWVAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLHLQMDSLRPE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMOV TVSS
3.8	配列番号 209 SYGMN	配列 番号 210 FITYD GSNRY YADSV KG	配列番号 211 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 212 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWVAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMOV TVSS
3.9	配列番号 213 SYGMN	配列 番号 214 FISYD GSNRY YADSV KG	配列番号 215 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 216 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMOV TVSS
3.10	配列番号 217 SYGMN	配列 番号 218 FITYD GSNRY YADSV KG	配列番号 219 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 220 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWVAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLHLQMNSLRPE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMOV TVSS
3.11	配列番号 221 SYGMN	配列 番号 222 FITYD GSNRY YADSV KG	配列番号 223 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 224 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWVAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLHLQMNSLRPE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMOV TVSS
3.12	配列番号 225 SYGMN	配列 番号 226 FITYD GSNRY YADSV KG	配列番号 227 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 228 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWVAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMOV TVSS

10

20

30

40

3.13	配列番号 229 SYGMN	配列番号 230 FITYD GSNRY YADSV KG	配列番号 231 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 232 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMTVSS
3.14	配列番号 233 SYGMN	配列番号 234 FITYD GSNRY YADSV KG	配列番号 235 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 236 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLHLQMNSLRPE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMTVSS
3.15	配列番号 237 SYGMN	配列番号 238 FITYD GSNRY YADSV KG	配列番号 239 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 240 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLHLQMNSLRPE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMTVSS
3.16	配列番号 241 SYGMN	配列番号 242 FITYD GSNRY YADSV KG	配列番号 243 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 244 EVQLLES GGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLHLQMNSLRPE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMTVSS
3.17	配列番号 245 SYGMN	配列番号 246 FITYD GSNRY YADSV KG	配列番号 247 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 248 EVQLLES GGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLKPE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMTVSS
3.18	配列番号 249 SYGMN	配列番号 250 FITYD GSNRY YADSV KG	配列番号 251 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 252 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNWVRQAPGKGLDWAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLKPE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDIWGQGTMTVSS
3.19	配列番号 253 SYGMH	配列番号 254 FMTYD GSNRY YADAV KG	配列番号 255 DRIVGGRV PDAFDI	配列番号 256 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMHWVRQAPGKGLEWAFMTYDGSNR YYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDIVGGRVPDAFDIWGQGTMTVSS
3.20	配列番号 257	配列番号	配列番号 259	配列番号 260 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI

10

20

30

40

	SYGMH	258 FQTYD GSNRY YADAV KG	DRIVGGRV PDAFDI	SYGMHWVRQAPGKGLEWVAFQTYDGSNR YYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDRIVGGRVPDAFDI WGQGTMT VTVSS
3.21	配列番号 261 SYGMH	配列 番号 262 FQTYD GSNRY YADSV KG	配列番号 263 DRIVGGRV PDAFDI	配列番号 264 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMHWVRQAPGKGLEWVAFQTYDGSNR YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDRIVGGRVPDAFDI WGQGTMT VTVSS
3.22	配列番号 265 SYGMH	配列 番号 266 FQTYD ASNRY YADSV KG	配列番号 267 DRIVGGRV PDAFDI	配列番号 268 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMHWVRQAPGKGLEWVAFQTYDASNR YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDRIVGGRVPDAFDI WGQGTMT VTVSS
3.23	配列番号 269 SYGMH	配列 番号 270 FQTYD ASNRY YADAV KG	配列番号 271 DRIVGGRV PDAFDI	配列番号 272 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMHWVRQAPGKGLEWVAFQTYDASNR YYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDRIVGGRVPDAFDI WGQGTMT VTVSS
3.24	配列番号 273 SYGMN	配列 番号 274 FITYD GSNRY YADSV KG	配列番号 275 DRIVGARV PDAYDI	配列番号 276 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPLI SYGMNHWVRQAPGKGLEWVAFITYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDRIVGARVPDAYDI WGQGTMT TVSS

表 3. これは本発明の範囲内にある系列 3 CDR 配列および系列 3 全長 V_H 配列の配列番号を示す。対応する配列を図 3 に示す。系列 3 様配列は、本発明に示されるような系列 3 配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0123】

1 つの態様では、本発明は、配列番号 183 または配列番号 183 と少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含んでなる CDR 3 配列を含んでなるヒト V_H ドメインを含んでなる系列 3 または系列 3 様結合分子に関する。

【0124】

1 つの実施形態では、 V_H ドメインは、配列番号 183 または配列番号 183 と少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含んでなる CDR 3 配列を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなる。1 つの実施形態では、同一性は少なくとも 90 % である。

【0125】

1 つの実施形態では、単一 V_H ドメイン抗体は、配列番号 183 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95

%の相同性を有する配列を含んでなる。1つの実施形態では、系列3または系列3様配列は、P S M Aと結合し得る少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなる、またはからなる結合分子を含んでなり、前記ドメインはヒトV_Hドメインであり、前記P S M A結合分子は、超可変領域C D R 1、C D R 2およびC D R 3を含んでなる少なくとも1つの抗原結合部位を含んでなり、前記C D R 1は、配列番号181のアミノ酸配列またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記C D R 2は、配列番号182のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含んでなり、またはからなり、かつ、前記C D R 3は、配列番号183のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

10

【0126】

1つの実施形態では、前記C D R 1は、配列番号181のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも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%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなり、またはからなる。1つの実施形態では、前記C D R 2は、配列番号182のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも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%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記C D R 3は、配列番号183のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも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%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

20

【0127】

1つの実施形態では、V_HドメインのC D R配列は、図3のようなs d A b 3. 1～3. 24またはそれらの組合せに関して示される通りである。1つの実施形態では、C D R 1は、配列番号181、185、189、193、197、201、205、209、213、217、221、225、229、233、237、241、245、249、253、257、261、265、269または273のアミノ酸配列を含んでなり、またはからなり、C D R 2は、配列番号182、186、190、194、198、202、206、210、214、218、222、226、230、234、238、242、246、250、254、258、262、266、270または274のアミノ酸配列を含んでなり、またはからなり、かつ、C D R 3は、配列番号183、187、191、195、199、203、207、211、215、219、223、227、231、235、239、243または247、251、255、259、263、267、271または275のアミノ酸配列を含んでなる、またはからなる。

30

40

【0128】

1つの態様では、本発明は、図3で3. 1～3. 24に関して示されるようなC D R 1、C D R 2およびC D R 3の組合せを有する単一V_Hドメイン抗体に関する。1つの実施形態では、C D R 1は配列番号181であり、C D R 2は配列番号182であり、かつ、C D R 3は配列番号183である。1つの実施形態では、C D R 1は配列番号185であり、C D R 2は配列番号186であり、かつ、C D R 3は配列番号187である。1つの実施形態では、C D R 1は配列番号189であり、C D R 2は配列番号190であり、かつ、C D R 3は配列番号191である。1つの実施形態では、C D R 1は配列番号193であり、C D R 2は配列番号194であり、かつ、C D R 3は配列番号195である。1

50

つの実施形態では、CDR1は配列番号197であり、CDR2は配列番号198であり、かつ、CDR3は配列番号199である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号201であり、CDR2は配列番号202であり、かつ、CDR3は配列番号203である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号205であり、CDR2は配列番号206であり、かつ、CDR3は配列番号207である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号209であり、CDR2は配列番号210であり、かつ、CDR3は配列番号211である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号213であり、CDR2は配列番号214であり、かつ、CDR3は配列番号215である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号217であり、CDR2は配列番号218であり、かつ、CDR3は配列番号219である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号221であり、CDR2は配列番号222であり、かつ、CDR3は配列番号223である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号225であり、CDR2は配列番号226であり、かつ、CDR3は配列番号227である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号229であり、CDR2は配列番号230であり、かつ、CDR3は配列番号231である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号233であり、CDR2は配列番号234であり、かつ、CDR3は配列番号235である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号237であり、CDR2は配列番号238であり、かつ、CDR3は配列番号239である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号241であり、CDR2は配列番号242であり、かつ、CDR3は配列番号243である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号245であり、CDR2は配列番号246であり、かつ、CDR3は配列番号247である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号249であり、CDR2は配列番号250であり、かつ、CDR3は配列番号251である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号253であり、CDR2は配列番号254であり、かつ、CDR3は配列番号255である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号257であり、CDR2は配列番号258であり、かつ、CDR3は配列番号259である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号261であり、CDR2は配列番号262であり、かつ、CDR3は配列番号263である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号265であり、CDR2は配列番号266であり、かつ、CDR3は配列番号267である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号269であり、CDR2は配列番号270であり、かつ、CDR3は配列番号271である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号273であり、CDR2は配列番号274であり、かつ、CDR3は配列番号275である。

10

20

30

【0129】

1つの実施形態では、単一V_Hドメイン抗体は、配列番号180またはそれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、相同性は、少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%である。このような配列のCDR配列は図3に示される。例えば、V_Hドメインは、配列番号184、188、192、196、200、204、208、212、216、220、224、228、232、236、240、244、248、252、256、260、264、268、272または276を含んでなる、またはからなる。

40

【0130】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号184、188、192、196、200、204、208、212、216、220、224、228、232、236、240、244、248、252、256、260、264、268、272もしくは276、またはそれと少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはか

50

らなる。このような配列の C D R 配列を以下に挙げる。

【0131】

別の実施形態では、V_Hドメインは上記の配列の1つから選択されるが、1以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を含んでなる。1つの実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の1以上にある。別の実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、C D Rの1以上にある。1つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列およびC D R配列内にある。

【0132】

系列3または系列3様結合分子は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるようなK_D、K_{off}、K_A、K_d、E_{C₅₀}およびI_{C₅₀}値を有する。

10

【0133】

1つの態様では、ヒトP S M Aと結合し得る結合分子は、系列4または系列4様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる。

【0134】

1つの実施形態では、系列4またはa系列4様配列を含んでなる2つのV_Hドメインを二価結合分子として組み合わせ得る。別の実施形態では、系列4または系列4様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二価結合分子として、P S M Aの同じエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列2、3、4、7、9、10、11または系列2、3、4、7、9、10、11様配列から選択され得る。1つの実施形態では、系列4または系列4様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二重パラトープ性結合分子として、P S M Aの異なるエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列1、5、6、12または13または系列1、5、6、12または13様配列から選択され得る。

20

【0135】

系列4単一V_Hドメイン抗体は、親配列および親(4.1、配列番号279)から誘導される配列またはその一部、例えば、C D R 3配列、および例えば図4に示されるように、最適化の過程で親4.1から誘導されるV_H配列またはその一部を含む。系列4のC D R配列および全長配列は、以下に示すように表4に従ってナンバリングされる。

30

【0136】

【表 4】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
4.1	配列番号 277 SYGMH	配列番号 278 VISYDG SNRYY ADSVK G	配列番号 279 ERIFGVLT PDDFDI	配列番号 280 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFPFI SYGMHWVRQAPGKGREWWAVISYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCAKERIFGVLT PDDFDI WGQGTTVT VSS
4.2	配列番号 281 SYGMH	配列番号 282 VISYDG SNRYY ADSVK G	配列番号 283 ERIFGVLT PDDFDI	配列番号 284 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFI SYGMHWVRQAPGKGLEWWAVISYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCAKERIFGVLT PDDFDI WGQGTTVT VSS
4.3	配列番号 285 SYGMH	配列番号 286 VISYDG ANRYY ADSVK G	配列番号 287 ERIFGVLT PDDFEI	配列番号 288 EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFI SYGMHWVRQAPGKGLEWWAVISYDGANRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCAKERIFGVLT PDDFEI WGQGTTVT VSS
4.4	配列番号 289 SYGMH	配列番号 290 VISYDG SNRYY ADSVK G	配列番号 291 ERIFGALT PDDFDI	配列番号 292 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFT SYGMHWVRQAPGKGLEWWAVISYDGSNRY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPE DTAVYYCAKERIFGALT PDDFDI WGQGTTVT VSS

表 4. これは本発明の範囲内にある系列 4 CDR 配列および系列 4 全長 V_H 配列の配列番号を示す。対応する配列を図 4 に示す。系列 4 様配列は、本発明に示されるような系列 4 配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0137】

1つの態様では、本発明は、配列番号 279 または配列番号 279 と少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含んでなる CDR 3 配列を含んでなるヒト V_H ドメインを含んでなる系列 4 または系列 4 様結合分子に関する。

【0138】

1つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 279、282、287 または 291 から選択される CDR 3 を含んでなる。

【0139】

1つの実施形態では、単一 V_H ドメイン抗体は、超可変領域 CDR 3 を含んでなる少なくとも 1つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR 3 は、配列番号 279 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の同一性を有する配列を有する。1つの実施形態では、系列 4 または系列 4 様配列は、P S M A と結合し得る少なくとも 1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなる、またはからなる結合分子を含んでなり、前記ドメインはヒト V_H ドメインであり、前記 P S M A 結合分子は、超可変領域 CDR 1、CDR 2 および CDR 3 を含んでなる少なくとも 1つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR 1 は、配列番号 277 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは

少なくとも95%の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記CDR2は、配列番号278のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、かつ、前記CDR3は、配列番号279のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0140】

1つの実施形態では、前記CDR1は、配列番号277のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR2は、配列番号278のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR3は、配列番号279のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0141】

1つの実施形態では、V_HドメインのCDR配列は、図4のようなクローン4. 1～4. 4またはそれらの組合せに関して示される通りである。1つの実施形態では、CDR1は、配列番号277、281、285または289のアミノ酸配列を含んでなり、またはからなり；CDR2は、配列番号278、282、286または290のアミノ酸配列を含んでなり、またはからなり；かつ、CDR3は、配列番号279、283、287または291のアミノ酸配列を含んでなる、またはからなる。

【0142】

1つの態様では、単一V_Hドメイン抗体は、図4の4. 1～4. 4に関して示されるようなCDR1、CDR2およびCDR3の組合せを有する。よって、1つの実施形態では、CDR1は配列番号277であり、CDR2は配列番号278であり、かつ、CDR3は配列番号279である。よって、CDR1は配列番号281であり、CDR2は配列番号282であり、かつ、CDR3は配列番号283である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号285であり、CDR2は配列番号286であり、かつ、CDR3は配列番号287である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号289であり、CDR2は配列番号290であり、かつ、CDR3は配列番号291である。

【0143】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号280またはそれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、同一性は、少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%である。このような配列のCDR配列は図4に示される。例えば、V_Hドメインは、配列番号280、284、288または290を含んでなる、またはからなる。

【0144】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号280、284、288もしくは29

0、またはそれと少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。このような配列のCDR配列を以下に挙げる。

【0145】

別の実施形態では、V_Hドメインは上記の配列の1つから選択されるが、1以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を含んでなる。1つの実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の1以上にある。別の実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、CDRの1以上にある。1つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列およびCDR配列内にある。

10

【0146】

系列4または系列4様結合分子は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるようなKD、K_{off}、K_A、K_d、E_{C₅₀}およびI_{C₅₀}値を有する。

【0147】

1つの態様では、本発明は、系列5または系列5様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる、ヒトPSMAと結合し得る結合分子に関する。

【0148】

1つの実施形態では、結合分子は、PSMA、好ましくは、ヒトPSMAと結合し得る少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなるまたはからなる結合分子を含んでなり、またはからなり、前記ドメインはヒトV_Hドメインであり、前記PSMA結合分子は、系列5または系列5配列を含んでなる。1つの実施形態では、系列5または系列5様配列を含んでなる2つのV_Hドメインを二価結合分子として組み合わせ得る。別の実施形態では、系列5または系列5様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二価結合分子として、PSMAの同じエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列1、5、6、12もしくは13または系列1、5、6、12もしくは13様配列から選択され得る。

20

【0149】

1つの実施形態では、系列5または系列5様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二重パラトープ性結合分子として、PSMAの異なるエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列2、3、4、7、9、10、11もしくは14または系列2、3、4、7、9、10、11もしくは14様配列から選択され得る。

30

【0150】

系列5の単一V_Hドメイン抗体は、親(5.1;配列番号292)から誘導される配列またはその一部、例えば、CDR3配列、および例えば図5に示されるように、最適化の過程で親5.1から誘導されるV_H配列またはその一部を含む。系列5のCDR配列および全長配列は、以下に示すように表5に従ってナンバリングされる。

【0151】

40

【表 5】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
5.1	配列番号 293 NYGMH	配列番号 294 IISYDG NTKYYT DSVKG	配列番号 295 GLWPSDV	配列番号 296 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF NNYGMHWRQAPGKGLEWVAIISYDGNTK YYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRV EDTAVYYCAKGLWPSDVWGQGTTVTVSS
5.2	配列番号 297 NYGMH	配列番号 298 IISYDG NSKYYT DSVKG	配列番号 299 GLWPSDV	配列番号 300 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF NNYGMHWRQAPGKGLEWVAIISYDGNSK YYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRV EDTAVYYCAKGLWPSDVWGQGTTVTVSS

表5. これは本発明の範囲内にある系列5 CDR配列および系列5全長V_H配列の配列番号を示す。対応する配列を図5に示す。系列5様配列は、本発明に示されるような系列5様配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0152】

1つの態様では、本発明は、配列番号295または配列番号295と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含んでなるCDR3配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる系列5または系列5様結合分子に関する。

【0153】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号295および299から選択されるCDR3を含んでなる。

【0154】

1つの実施形態では、単一V_Hドメイン抗体は、超可変領域CDR3を含んでなる少なくとも1つの抗原結合部位を含んでなり、前記CDR3は、配列番号295のアミノ酸配列またはその少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を有する。1つの実施形態では、系列5または系列5配列は、PSMAと結合し得る少なくとも1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなるまたはからなる結合分子を含んでなり、前記ドメインはヒトV_Hドメインであり、前記PSMA結合分子は、超可変領域CDR1、CDR2およびCDR3を含んでなる少なくとも1つの抗原結合部位を含んでなり、前記CDR1は、配列番号293のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記CDR2は、配列番号294のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、かつ、前記CDR3は、配列番号295のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0155】

1つの実施形態では、前記CDR1は、配列番号293のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも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%

もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR2は、配列番号294のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも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%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR3は、配列番号295のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも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%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

10

【0156】

1つの実施形態では、V_HドメインのCDR配列は、図5のようなクローン5.1および5.2またはそれらの組合せに関して示される通りである。1つの実施形態では、CDR1は、配列番号293または297のアミノ酸配列を含んでなり、またはからなり、CDR2は、配列番号294または2984のアミノ酸配列を含んでなり、またはからなり、かつ、CDR3は、配列番号295または299のアミノ酸配列を含んでなる、またはからなる。

【0157】

1つの態様では、本発明は、図5の5.1～5.2に関して示されるようなCDR1、CDR2およびCDR3の組合せを有するV_Hドメインに関する。よって、1つの実施形態では、CDR1は配列番号293であり、CDR2は配列番号294であり、かつ、CDR3は配列番号295である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号297であり、CDR2は配列番号298であり、かつ、CDR3は配列番号299である。

20

【0158】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号296もしくは300またはそれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、同一性は、少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%である。このような配列のCDR配列は図5に示される。例えば、V_Hドメインは、配列番号296または300を含んでなる、またはからなる。

30

【0159】

別の実施形態では、V_Hドメインは上記の配列の1つから選択されるが、1以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を含んでなる。1つの実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の1以上にある。別の実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、CDRの1以上にある。1つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列およびCDR配列内にある。

40

【0160】

系列5または系列5結合分子は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるようなKD、K_{off}、K_A、K_d、EC₅₀およびIC₅₀値を有する。

【0161】

1つの態様では、本発明は、系列6または系列6様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる、ヒトPSMAと結合し得る結合分子に関する。

【0162】

1つの態様では、ヒトPSMAと結合し得る結合分子は、系列6または系列6様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる。1つの実施形態では、系列6または系列6様配列を含んでなる2つのV_Hドメインを二価結合分子として組み合わせ得る。別の実施形

50

態では、系列 6 または系列 6 様配列を含んでなる 1 つの V_H ドメインを、二価結合分子として、P S M A の同じエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第 2 の V_H ドメインと組み合わせ得る。第 2 の V_H ドメインは、系列 1、5、6、12 もしくは 13 または系列 1、5、6、12 もしくは 13 様配列から選択され得る。

【0163】

1 つの実施形態では、系列 6 または系列 6 様配列を含んでなる 1 つの V_H ドメインを、二重パラトープ性結合分子として、P S M A の異なるエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションに結合する、本明細書に記載されるような第 2 の V_H ドメインと組み合わせ得る。第 2 の V_H ドメインは、系列 2、3、4、7、9、10、11 もしくは 14 または系列 2、3、4、7、9、10、11 もしくは 14 様配列から選択され得る。

10

【0164】

系列 6 単一 V_H ドメイン抗体は、親 (6.1 ; 配列番号 304) またはその一部、例えば、C D R 3 配列、および例えば図 3 に示されるように、最適化の過程で親 6.1 から誘導される V_H 配列またはその一部を含む。系列 6 の C D R 配列および全長配列は、以下に示すように表 6 に従ってナンバリングされる。

【0165】

【表 6】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
6.1	配列番号 301 NSGY WS	配列番号 302 FIYNG SIHYNP SLKS	配列番号 303 DGDDYGDY	配列番号 304 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSIS NSGYWSWRQHHPGKDLEWIGFIYNGSI HYNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKMNSVTAA DTAVYYCARDGDDYGDYLRGQGTLLTVSS
6.2	配列番号 305 NSGY WS	配列番号 306 FIYNG SIHYNP SLKS	配列番号 307 DGDDYGDY	配列番号 308 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSIS NSGYWSWRQHHPGKGLEWIGFIYNGSIH YNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKMSSVTAA TAVYYCARDGDDYGDYLRGQGTLLTVSS
6.3	配列番号 309 NSGY WS	配列番号 310 FIYNG SIHYNP SLKS	配列番号 311 DGDDYGDY	配列番号 312 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSIS NSGYWSWRQHHPGKGLEWIGFIYNGSI HYNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKLNSVTAA DTAVYYCARDGDDYGDYLRGQGTLLTVSS
6.4	配列番号 313 NSGY WS	配列番号 314 FIYNG SIHYNP SLKS	配列番号 315 DGDDYGDY	配列番号 316 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSIS NSGYWSWRQHHPGKGLEWIGFIYNGSIH YNPSLKSRVIISVDTSKNQFSLKLSSVTAA TAVYYCARDGDDYGDYLRGQGTLLTVSS
6.5	配列番号	配列番号	配列番号	配列番号 320

10

20

30

	317 NSGY WS	318 FIYYNG SIHYNP SLKS	319 DGDDYGDY	QVQLQESGPGPLVKPSQTLSTCTVSGGSIS NSGYWSWVRQHHPGKGLEWIGFIYYNGSI HYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKMSSVTA ADTAVYYCARDGDDYGDYLRGQGTLTVS S
6.6	配列番号 321 NSGY WS	配列番号 322 FIYYNG SIHYNP SLKS	配列番号 323 DGDDYGDY	配列番号 324 QVQLQESGPGPLVKPSQTLSTCTVSGGSIS NSGYWSWVRQHHPGKGLEWIGFIYYNGSI HYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNSVTAA DTAVYYCARDGDDYGDYLRGQGTLTVSS
6.7	配列番号 325 NSGY WS	配列番号 326 FIYYNG SIHYNP SLKS	配列番号 327 DGDDYGDY	配列番号 328 QVQLQESGPGPLVKPSQTLSTCTVSGGSIS NSGYWSWVRQHHPGKGLEWIGFIYYNGSI HYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARDGDDYGDYLRGQGTLTVSS

10

20

表6. これは本発明の範囲内にある系列6 CDR配列および系列6全長V_H配列の配列番号を示す。対応する配列を図6に示す。系列6様配列は、本発明に示されるような系列6配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0166】

1つの態様では、本発明は、配列番号303または配列番号303と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含んでなるCDR3配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる系列6または系列6様結合分子に関する。

30

【0167】

1つの実施形態では、同一性は少なくとも90%である。1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号303、307、311、315、319、323または327から選択されるCDR3を含んでなる。

【0168】

1つの実施形態では、単一V_Hドメイン抗体は、超可変領域CDR3を含んでなる少なくとも1つの抗原結合部位を含んでなり、前記CDR3は、配列番号303のアミノ酸配列またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を有する。1つの実施形態では、系列6または系列6様配列は、PSMAと結合し得る少なくとも1つの免疫グロブリン単ドメイン抗体を含んでなる、またはからなる結合分子を含んでなり、前記ドメインはヒトV_Hドメインであり、前記PSMA結合分子は、超可変領域CDR1、CDR2およびCDR3を含んでなる少なくとも1つの抗原結合部位を含んでなり、前記CDR1は、配列番号301のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記CDR2は、配列番号302のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、かつ、前記CDR3は、配列番号303のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性

40

50

を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0169】

1つの実施形態では、前記CDR1は、配列番号301のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR2は、配列番号302のアミノ酸配列またはその少なくとも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%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR3は、配列番号303のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

10

【0170】

1つの実施形態では、V_HドメインのCDR配列は、図6のようなクローン6.1～6.7またはそれらの組合せに関して示される通りである。1つの実施形態では、CDR1は、配列番号301、305、309、313、317、321、325のアミノ酸配列を含んでなり、またはからなり、CDR2は、配列番号302、306、310、314、318、322、326のアミノ酸配列を含んでなり、またはからなり、かつ、CDR3は、配列番号303、307、311、315、319、323、327のアミノ酸配列を含んでなる、またはからなる。

20

【0171】

1つの態様では、単一V_Hドメイン抗体は、図6の6.1～6.7に関して示されるようなCDR1、CDR2およびCDR3の組合せを有する。よって、1つの実施形態では、CDR1は配列番号301であり、CDR2は配列番号302であり、かつ、CDR3は配列番号303である。よって、1つの実施形態では、CDR1は配列番号305であり、CDR2は配列番号306であり、かつ、CDR3は配列番号307である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号309であり、CDR2は配列番号310であり、かつ、CDR3は配列番号311である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号313であり、CDR2は配列番号314であり、かつ、CDR3は配列番号315である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号317であり、CDR2は配列番号318であり、かつ、CDR3は配列番号319である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号321であり、CDR2は配列番号322であり、かつ、CDR3は配列番号323である。1つの実施形態では、CDR1は配列番号325であり、CDR2は配列番号326であり、かつ、CDR3は配列番号327である。

30

【0172】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号304またはそれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、同一性は、少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%である。このような配列のCDR配列は図6に示される。例えば、V_Hドメインは、配列番号304、308、312、316、320、324または328を含んでなる、またはからなる。

40

【0173】

50

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号304、308、312、316、320、324もしくは328またはそれと少なくとも70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0174】

別の実施形態では、V_Hドメインは上記の配列の1つから選択されるが、1以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を含んでなる。1つの実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の1以上にある。別の実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、CDRの1以上にある。1つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列およびCDR配列内にある。

10

【0175】

系列6または系列6様結合分子は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるようなKD、K_{off}、K_A、K_d、E_{C₅₀}およびI_{C₅₀}値を有する。

【0176】

1つの態様では、本発明は、系列7または系列7様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる、ヒトPSMAと結合し得る結合分子に関する。

【0177】

1つの態様では、ヒトPSMAと結合し得る結合分子は、系列7または系列7様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる。1つの実施形態では、系列7または系列7様配列を含んでなる2つのV_Hドメインを二価結合分子として組み合わせ得る。別の実施形態では、系列7または系列7様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二価結合分子として、PSMAの同じエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列2、3、4、7、9、10、11または系列2、3、4、7、9、10、11様配列から選択され得る。

20

【0178】

1つの実施形態では、系列7または系列7様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二重パラトープ性結合分子として、PSMAの異なるエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列1、5、6、12もしくは13または系列1、5、6、12もしくは13様配列から選択され得る。

30

【0179】

系列7または系列7様配列は、親配列および親(7.1)から誘導されるクローンの配列またはその一部、例えば、CDR3配列、および例えば図7に示されるように、最適化の過程で親7.1から誘導されるV_H配列またはその一部を含む。系列7のCDR配列および全長配列は、以下に示すように表7に従ってナンバリングされる。

【0180】

【表 7】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
7.1	配列番号 329 SYWMY	配列番号 330 NINHGDGSEKYYV DSVKG	配列番号 331 DSLIVGERGY	配列番号 332 EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSS YWMYWVRQAPGKGL EWWANINHDGSEKYY VDSVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDSLIVGERGY WGQGTLVTVSS
7.2	配列番号 333 SYWMY	配列番号 334 NINHGDGSEKYYV DSVKG	配列番号 335 DNLIVGERGY	配列番号 336 EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSS YWMYWVRQAPGKGL EWWANINHDGSEKYY VDSVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDNLIVGERGY WGQGTLVTVSS
7.3	配列番号 337 SYWMY	配列番号 338 NINHGGSEKYYV DSVKG	配列番号 339 DSLIVGERGY	配列番号 340 EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSS YWMYWVRQAPGKGL EWWANINHGGSEKYY VDSVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDNLIVGERGY WGQGTLVTVSS
7.4	配列番号 341 SYWMY	配列番号 342 NINHQQSEKYYV DSVKG	配列番号 343 DSLIVGERGY	配列番号 344 EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSS YWMYWVRQAPGKGL EWWANINHQQSEKYY VDSVKGRFTISRDNAL

10

20

30

				NSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDSLIVGERGY WGQGTLTVTVSS
7.5	配列番号 345 SYWMY	配列番号 346 NINHPGSEKYYV DSVKG	配列番号 347 DSLIVGERGY	配列番号 348 EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSS YWMYWVRQAPGKGL EWWANINHPGSEKYYV DSVKGRFTISRDNACKN SLYLQMNSLRAEDTAV YVCARDSLIVGERGY WGQGTLTVTVSS
7.6	配列番号 349 SYWMY	配列番号 350 NINHEGSEKYYV DSVKG	配列番号 351 DSLIVGERGY	配列番号 352 EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSS YWMYWVRQAPGKGL EWWANINHEGSEKYYV DSVKGRFTISRDNACKN SLYLQMNSLRAEDTAV YVCARDSLIVGERGY WGQGTLTVTVSS
7.7	配列番号 353 SYWMY	配列番号 354 NINHIGSEKYYVD SVKG	配列番号 355 DSLIVGERGY	配列番号 356 EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSS YWMYWVRQAPGKGL EWWANINHIGSEKYYV DSVKGRFTISRDNACKN SLYLQMNSLRAEDTAV YVCARDSLIVGERGY WGQGTLTVTVSS
7.8	配列番号 357 SYWMY	配列番号 358 NINHKGSEKYYV DSVKG	配列番号 359 DTLIVGERGY	配列番号 360 EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSS YWMYWVRQAPGKGL EWWANINHKGSEKYY VDSVKGRFTISRDNACKN NSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDTLIVGERGY WGQGTLTVTVSS

表 7. これは本発明の範囲内にある系列 7 CDR 配列および系列 7 全長 V_H 配列の配列番号を示す。対応する配列を図 7 に示す。系列 7 様配列は、本発明に示されるような系列 7 配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0181】

1 つの態様では、本発明は、配列番号 331 または配列番号 331 と少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の相同性を有する配列を含んでなる CDR 3 配列を含んでなるヒト V_H ドメインを含んでなる系列 7 または系列

7 様結合分子に関する。

【0182】

1 つの実施形態では、相同性は少なくとも 90 % である。1 つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 331、335、339、343、347、351、355 または 359 から選択される CDR3 を含んでなる。

【0183】

1 つの実施形態では、単一 V_H ドメイン抗体は、超可変領域 CDR3 を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR3 は、配列番号 331 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の相同性を有する配列を有する。1 つの実施形態では、系列 7 または系列 7 様配列は、P S M A と結合し得る少なくとも 1 つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなるまたはからなる結合分子を含んでなり、前記ドメインはヒト V_H ドメインであり、前記 P S M A 結合分子は、超可変領域 CDR1、CDR2 および CDR3 を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR1 は、配列番号 329 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の相同性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記 CDR2 は、配列番号 330 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の相同性を有する配列を含んでなり、またはからなり、かつ、前記 CDR3 は、配列番号 331 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0184】

1 つの実施形態では、前記 CDR1 は、配列番号 329 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 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 % もしくは 99 % の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1 つの実施形態では、前記 CDR2 は、配列番号 330 のアミノ酸配列または少なくとも 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 % もしくは 99 % の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1 つの実施形態では、前記 CDR3 は、配列番号 331 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 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 % もしくは 99 % の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0185】

1 つの実施形態では、V_H ドメインの CDR 配列は、図 7 のようなクローン 7. 1 ~ 7. 8 またはそれらの組合せに関して示される通りである。1 つの実施形態では、CDR1 は、配列番号 329、333、337、341、345、349、353 または 357 のアミノ酸配列を含んでなり、またはからなり、CDR2 は、配列番号 330、334、338、342、346、350、354 または 358 のアミノ酸配列を含んでなり、またはからなり、かつ、CDR3 は、配列番号 331、335、339、343、347、351、355 または 359 のアミノ酸配列を含んでなる、またはからなる。

【0186】

1 つの態様では、単一 V_H ドメイン抗体は、図 7 の 7. 1 ~ 7. 8 に関して示されるような CDR1、CDR2 および CDR3 の組合せを有する。よって、1 つの実施形態では、CDR1 は配列番号 329 であり、CDR2 は配列番号 330 であり、かつ CDR3 は配列番号 331 である。よって、1 つの実施形態では、CDR1 は配列番号 333 であり

、C D R 2 は配列番号 3 3 4 であり、かつ、C D R 3 は配列番号 3 3 5 である。1 つの実施形態では、C D R 1 は配列番号 3 3 7 であり、C D R 2 は配列番号 3 3 8 であり、かつ、C D R 3 は配列番号 3 3 9 である。1 つの実施形態では、n C D R 1 は配列番号 3 4 1 であり、C D R 2 は配列番号 3 4 2 であり、かつ、C D R 3 は配列番号 3 4 3 である。1 つの実施形態では、C D R 1 は配列番号 3 4 5 であり、C D R 2 は配列番号 3 4 6 であり、かつ、C D R 3 は配列番号 3 4 7 である。1 つの実施形態では、C D R 1 は配列番号 3 4 9 であり、C D R 2 は配列番号 3 5 0 であり、かつ、C D R 3 は配列番号 3 5 1 である。1 つの実施形態では、C D R 1 は配列番号 3 5 3 であり、C D R 2 は配列番号 3 5 4 であり、かつ、C D R 3 は配列番号 3 5 5 である。1 つの実施形態では、C D R 1 は配列番号 3 5 7 であり、C D R 2 は配列番号 3 5 8 であり、かつ、C D R 3 は配列番号 3 5 9 である。

10

【0187】

1 つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 3 3 2 またはそれと少なくとも 4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % もしくは 9 9 % の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1 つの実施形態では、相同性は、少なくとも 7 0 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % である。このような配列の C D R 配列は図 2 に示される。例えば、V_H ドメインは、配列番号 3 3 2、3 3 6、3 4 0、3 4 4、3 4 8、3 5 2、3 5 6 または 3 6 0 を含んでなる、またはからなる。

20

【0188】

1 つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 3 3 2、3 3 6、3 4 0、3 4 4、3 4 8、3 5 2、3 5 6、3 6 0 またはそれと少なくとも 7 0 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % もしくは 9 9 % の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0189】

別の実施形態では、V_H ドメインは上記の配列の 1 つから選択されるが、1 以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 1 0 個のアミノ酸置換を含んでなる。1 つの実施形態では、1 以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の 1 以上にある。別の実施形態では、1 以上のアミノ酸置換は、C D R の 1 以上にある。1 つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列および C D R 配列内にある。

30

【0190】

系列 7 または系列 7 様結合分子は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるような K D、K o f f、K A、K d、E C 5 0 および I C 5 0 値を有する。

【0191】

1 つの態様では、本発明は、系列 8 または系列 8 様配列を含んでなるヒト V_H ドメインを含んでなる、ヒト P S M A と結合し得る結合分子に関する。

【0192】

系列 8 または系列 8 様配列は、親配列および親 (8 . 1、配列番号 3 6) から誘導されるクローンの配列またはその一部、例えば、C D R 3 配列、および最適化の過程で親 8 . 1 から誘導される V_H 配列またはその一部を含み、8 . 1 の C D R 配列および全長配列は、以下に示すように表 8 に従ってナンバリングされる。

40

【0193】

【表 8】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
8.1	配列番号 361 GYYSWS	配列番号 362 EINHSGSTNY NPSLKS	配列番号 363 GPIPATAIPDAF D	配列番号 364 QVQLQQWGAGLLKPS ETLSLTCAVYGGSFSG YYWSWIRQPPGKGLE WIGELNHSGSTNYPNPS LKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYY CARGPIPATAIPDAFDI WGQGTMTVSS

表 8. これは本発明の範囲内にある系列 8 CDR 配列および系列 8 全長 V_H 配列の配列番号を示す。対応する配列を図 8 に示す。系列 8 様配列は、本発明に示されるような系列 8 配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0194】

1 つの態様では、本発明は、配列番号 363 または配列番号 363 と少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の相同性を有する配列を含んでなる CDR 3 配列を含んでなるヒト V_H ドメインを含んでなる系列 8 または系列 8 様結合分子に関する。

【0195】

1 つの実施形態では、相同性は少なくとも 90 % である。1 つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 363 の CDR 3 を含んでなる。

【0196】

1 つの実施形態では、単一 V_H ドメイン抗体は、超可変領域 CDR 3 を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR 3 は、配列番号 363 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の相同性を有する配列を有する。1 つの実施形態では、系列 8 または系列 8 様配列は、PSMA と結合し得る少なくとも 1 つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなるまたはからなる結合分子を含んでなり、前記ドメインはヒト V_H ドメインであり、前記 PSMA 結合分子は、超可変領域 CDR 1、CDR 2 および CDR 3 を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR 1 は、配列番号 361 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の相同性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記 CDR 2 は、配列番号 362 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の相同性を有する配列を含んでなり、またはからなり、かつ、前記 CDR 3 は、配列番号 363 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 % もしくは少なくとも 95 % の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0197】

1 つの実施形態では、前記 CDR 1 は、配列番号 361 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 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 % もしくは 99 % の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1 つの実施形態では、前記 CDR 2 は、配列番号 362 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 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%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR3は、配列番号363のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%または99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、V_HドメインのCDR配列は、図8のようなs d A b 8. 1に関して示される通りである。

【0198】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号364またはそれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0199】

別の実施形態では、V_Hドメインは上記の配列の1つから選択されるが、1以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を含んでなる。1つの実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の1以上にある。別の実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、CDRの1以上にある。1つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列およびCDR配列内にある。

【0200】

系列8または系列8様結合分子は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるようなKD、K_{off}、K_A、K_d、E_{C₅₀}およびI_{C₅₀}値を有する。

【0201】

1つの態様では、本発明は、系列9または系列9様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる、ヒトPSMAと結合し得る結合分子に関する。

【0202】

1つの態様では、本発明は、系列9または系列9様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる、ヒトPSMAと結合し得る結合分子に関する。1つの実施形態では、系列9または系列9様配列を含んでなる2つのV_Hドメインを二価結合分子として組み合わせ得る。別の実施形態では、系列9または系列9様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二価結合分子として、PSMAの同じエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列2、3、4、7、9、10、11または系列2、3、4、7、9、10、11様配列から選択され得る。

【0203】

1つの実施形態では、系列9または系列9様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二重パラトープ性結合分子として、PSMAの異なるエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列1、5、6、12もしくは13または系列1、5、6、12もしくは13様配列から選択され得る。

【0204】

系列9または系列9配列は、親配列および親(9. 1; 配列番号368)から誘導される配列またはその一部、例えば、CDR3配列、および最適化の過程で親9. 1から誘導されるV_H配列またはその一部を含み、9. 1のCDR配列および全長配列は、以下に示すように表9に従ってナンバリングされる。

【0205】

10

20

30

40

【表 9】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
9.1	配列番号 365 GHYWS	配列番号 366 DINHSGSTNYN PSLKS	配列番号 367 DYGDSRSLFDY	配列番号 368 QVQLQQWGAGLLKPSETL SLTCAVYGGSFSGHYWSW IRQPPGKGLEWIGDINHSG STNYNPSLKSRTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVY YCVRDYGDSSRLFDYWGQ GTLTVTVSS

10

表 9. これは本発明の範囲内にある系列 9 CDR 配列および系列 9 全長 V_H 配列の配列番号を示す。対応する配列を図 9 に示す。系列 9 様配列は、本発明に示されるような系列 9 配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0206】

1つの態様では、本発明は、配列番号 367 または配列番号 367 と少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の相同性を有する配列を含んでなる CDR 3 配列を含んでなるヒト V_H ドメインを含んでなる系列 9 または系列 9 様結合分子に関する。

20

【0207】

1つの実施形態では、結合分子は、PSMA と結合し得る少なくとも 1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなる、前記ドメインはヒト V_H ドメインであり、前記ヒト V_H ドメインは、配列番号 367 または配列番号 367 と少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の相同性を有する配列を含んでなる CDR 3 配列を含んでなる少なくとも 1つの抗原結合部位を含んでなる。1つの実施形態では、相同性は少なくとも 90% である。1つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 367 の CDR 3 を含んでなる。

【0208】

1つの実施形態では、単一 V_H ドメイン抗体は、CDR 3 を含んでなり、前記 CDR 3 は、配列番号 363 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の相同性を有する配列を有する。1つの実施形態では、系列 9 または系列 9 様配列は、PSMA と結合し得る少なくとも 1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなる、またはからなる結合分子を含んでなり、前記ドメインはヒト V_H ドメインであり、前記 PSMA 結合分子は、超可変領域 CDR 1、CDR 2 および CDR 3 を含んでなる少なくとも 1つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR 1 は、配列番号 365 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の相同性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記 CDR 2 は、配列番号 366 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の相同性を有する配列を含んでなり、またはからなり、かつ、前記 CDR 3 は、配列番号 367 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

30

40

【0209】

1つの実施形態では、前記 CDR 1 は、配列番号 365 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 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% または 99% の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記 CDR 2 は、配列番号 366 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 70%、71%

50

、 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 %もしくは99 %の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR3は、配列番号367のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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 %もしくは99 %の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、V_HドメインのCDR配列は、図9のようなクローン9. 1に関して示される通りである。

10

【0210】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号368またはそれと少なくとも40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %もしくは99 %の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0211】

別の実施形態では、V_Hドメインは上記の配列の1つから選択されるが、1以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を含んでなる。1つの実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の1以上にある。別の実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、CDRの1以上にある。1つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列およびCDR配列内にある。

20

【0212】

系列9または系列9様結合分子は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるようなKD、K_{off}、K_A、K_d、EC₅₀およびIC₅₀値を有する。

【0213】

1つの態様では、本発明は、系列10または系列10様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる、ヒトPSMAと結合し得る結合分子に関する。

【0214】

1つの実施形態では、系列10または系列10様配列を含んでなる2つのV_Hドメインを二価結合分子として組み合わせ得る。別の実施形態では、系列10または系列10様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二価結合分子として、PSMAの同じエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列2、3、4、7、9、10、11または系列2、3、4、7、9、10、11様配列から選択され得る。

30

【0215】

1つの実施形態では、系列10または系列10様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二重パラトープ性結合分子として、PSMAの異なるエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列1、5、6、12もしくは13または系列1、5、6、12もしくは13様配列から選択され得る。系列10または系列10配列は、親配列および親(10. 1)から誘導される配列またはその一部、例えば、CDR3配列、および最適化の過程で親10. 1から誘導されるV_H配列またはその一部を含み、10. 1のCDR配列および全長配列は、以下に示すように表10に従ってナンバリングされる。

40

【0216】

【表 10】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
10.1	配列番号 369 SYGMY	配列番号 370 FMSYDGSNKY YVDSVKG	配列番号 371 GDYDFWSGY PDYD	配列番号 372 QVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYG MHWVRQAPGKGLEWV AFMSYDGSNKYYVDSV KGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCA KGDYDFWSGYPDYDM DVWGQGTTTVTVSS

表 10. これは本発明の範囲内にある系列 10 CDR 配列および系列 10 全長 V_H 配列の配列番号を示す。対応する配列を図 10 に示す。系列 10 様配列は、本発明に示されるような系列 10 配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0217】

1つの態様では、本発明は、配列番号 371 または配列番号 371 と少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の同一性を有する配列を含んでなる CDR 3 配列を含んでなるヒト V_H ドメインを含んでなる系列 10 または系列 10 様結合分に関する。

【0218】

1つの実施形態では、系列 10 または系列 10 様結合分子は、PSMA と結合し得る少なくとも 1つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなり、前記ドメインはヒト V_H ドメインであり、前記ヒト V_H ドメインは、配列番号 371 または配列番号 371 と少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の同一性を有する配列を含んでなる CDR 3 配列を含んでなる少なくとも 1つの抗原結合部位を含んでなる。1つの実施形態では、同一性は少なくとも 90% である。1つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 371 の CDR 3 を含んでなる。

【0219】

1つの実施形態では、前記 V_H ドメインおよび前記 PSMA 結合分子は、超可変領域 CDR 1、CDR 2 および CDR 3 を含んでなる少なくとも 1つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR 1 は、配列番号 369 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記 CDR 2 は、配列番号 370 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、かつ、前記 CDR 3 は、配列番号 371 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% もしくは少なくとも 95% の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0220】

1つの実施形態では、前記 CDR 1 は、配列番号 369 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 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% もしくは 99% の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記 CDR 2 は、配列番号 370 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 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%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR3は、配列番号371のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%または99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、V_HドメインのCDR配列は、図10のようなクローン10.1に関して示される通りである。

10

【0221】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号372またはそれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0222】

別の実施形態では、V_Hドメインは上記の配列の1つから選択されるが、1以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を含んでなる。1つの実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の1以上にある。別の実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、CDRの1以上にある。1つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列およびCDR配列内にある。

20

【0223】

系列10または系列10様結合分子は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるようなKD、K_{off}、K_A、K_d、EC₅₀およびIC₅₀値を有する。

【0224】

1つの態様では、本発明は、系列11または系列11様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる、ヒトPSMAと結合し得る結合分子に関する。1つの実施形態では、系列11または系列11様配列を含んでなる2つのV_Hドメインを二価結合分子として組み合わせ得る。別の実施形態では、系列11または系列11様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二価結合分子として、PSMAの同じエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列2、3、4、7、9、10、11または系列2、3、4、7、9、10、11様配列から選択され得る。

30

【0225】

1つの実施形態では、系列11または系列11様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二重パラトープ性結合分子として、PSMAの異なるエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列1、5、6、12もしくは13または系列1、5、6、12もしくは13様配列から選択され得る。

【0226】

系列11または系列11配列は、親配列および親(11.1、配列番号376)から誘導される配列またはその一部、例えば、CDR3配列、および最適化の過程で親11.1から誘導されるV_H配列またはその一部を含み、11.1のCDR配列および全長配列は、以下に示すように表11に従ってナンバリングされる。

40

【0227】

【表 1 1】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
11.1	配列番号 373 SYGMV	配列番号 374 VISYDGSNKNY ADSVKG	配列番号 375 GGNALYSSG WPDD	配列番号 376 EVQLVESGGGLVKPGGS LRLSCAASGFNLSYGMV WVRQAPGKGLEWVAVIS YDGSNKNYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNSLRV EDTAVYYCAKGGNALYS SGWPDDGFDIRGQGTMTV TVSS

表 1 1. これは本発明の範囲内にある系列 1 1 CDR 配列および系列 1 1 全長 V_H 配列の配列番号を示す。対応する配列を図 1 1 に示す。系列 1 1 様配列は、本発明に示されるような系列 1 1 配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0 2 2 8】

1 つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 3 7 5 または配列番号 3 7 5 と少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる CDR 3 配列を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなる。1 つの実施形態では、同一性は少なくとも 9 0 % である。1 つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 3 7 5 の CDR 3 を含んでなる。

【0 2 2 9】

1 つの実施形態では、単一 V_H ドメイン抗体は、超可変領域 CDR 3 を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR 3 は、配列番号 3 7 5 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する。1 つの実施形態では、系列 1 1 または系列 1 1 様配列は、P S M A と結合し得る少なくとも 1 つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなる、またはからなる結合分子を含んでなり、前記ドメインはヒト V_H ドメインであり、前記 P S M A 結合分子は、超可変領域 CDR 1、CDR 2 および CDR 3 を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR 1 は、配列番号 3 7 3 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記 CDR 2 は、配列番号 3 7 4 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、かつ、前記 CDR 3 は、配列番号 3 7 5 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0 2 3 0】

1 つの実施形態では、前記 CDR 1 は、配列番号 3 7 3 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % も

しくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR2は、配列番号374のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR3は、配列番号375のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、V_HドメインのCDR配列は、図11のようなs d A b 11.1に関して示される通りである。

10

【0231】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号376またはそれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0232】

別の実施形態では、V_Hドメインは上記の配列の1つから選択されるが、1以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を含んでなる。1つの実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の1以上にある。別の実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、CDRの1以上にある。1つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列およびCDR配列内にある。

20

【0233】

系列11または系列11様結合分子は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるようなKD、K_{off}、K_A、K_d、EC₅₀およびIC₅₀値を有する。

【0234】

1つの態様では、本発明は、系列12または系列12様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる、ヒトPSMAと結合し得る結合分子に関する。1つの実施形態では、列12または系列12様配列を含んでなる2つのV_Hドメインを二価結合分子として組み合わせ得る。別の実施形態では、系列12または系列12様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二価結合分子として、PSMAの同じエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列1、5、6、12または13または系列1、5、6、12または13様配列から選択され得る。

30

【0235】

1つの実施形態では、系列12または系列12様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二重パラトープ性結合分子として、PSMAの異なるエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列2、3、4、7、9、10、11もしくは14または系列2、3、4、7、9、10、11もしくは14様配列から選択され得る。

40

【0236】

系列12または系列12様配列は、親配列および親(12.1、配列番号380)から誘導される配列またはその一部、例えば、CDR3配列、および最適化の過程で親12.1から誘導されるV_H配列またはその一部を含み、12.1のCDR配列および全長配列は、以下に示すように表12に従ってナンバリングされる。

【0237】

【表 1 2】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
12.1	配列番号 377 NFGMH	配列番号 378 VISYDGNSKYYAD TVKG	配列番号 379 GLWPPMDV	配列番号 380 QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASGFTFSN FGMHWARQAPGKGLE WVAVISYDGNSKYYAD TVKGRFTISRDN SKNT LYLEMNSLRADDTAVY YCAKGLWPPMDVRGQ GTTVTVSS

表 1 2. これは本発明の範囲内にある系列 1 2 CDR 配列および系列 1 2 全長 V_H 配列の配列番号を示す。対応する配列を図 1 2 に示す。系列 1 2 様配列は、本発明に示されるような系列 1 2 配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0 2 3 8】

1 つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 3 7 9 または配列番号 3 7 9 と少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の相同性を有する配列を含んでなる CDR 3 配列を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなる。1 つの実施形態では、相同性は少なくとも 9 0 % である。1 つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 3 7 9 の CDR 3 を含んでなる。

【0 2 3 9】

1 つの実施形態では、単一 V_H ドメイン抗体は、超可変領域 CDR 3 を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR 3 は、配列番号 3 7 9 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の相同性を有する配列を有する。1 つの実施形態では、系列 1 2 または系列 1 2 様配列は、P S M A と結合し得る少なくとも 1 つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなる、またはからなる結合分子を含んでなり、前記ドメインはヒト V_H ドメインであり、前記 P S M A 結合分子は、超可変領域 CDR 1、CDR 2 および CDR 3 を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR 1 は、配列番号 3 7 7 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の相同性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記 CDR 2 は、配列番号 3 7 8 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の相同性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記 CDR 3 は、配列番号 3 7 9 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0 2 4 0】

1 つの実施形態では、前記 CDR 1 は、配列番号 3 7 7 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % もしくは 9 9 % の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1 つの実施形態では、前記 CDR 2 は、配列番号 3 7 8 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 7 0 %、7 1

%、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%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR3は、配列番号379のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%または99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、V_HドメインのCDR配列は、図12のようなクローン12.1に関して示される通りである。

10

【0241】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号380またはそれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0242】

別の実施形態では、V_Hドメインは上記の配列の1つから選択されるが、1以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を含んでなる。1つの実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の1以上にある。別の実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、CDRの1以上にある。1つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列およびCDR配列内にある。

20

【0243】

系列12または系列12様結合分子は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるようなKD、K_{off}、K_A、K_d、E_{C₅₀}およびI_{C₅₀}値を有する。

【0244】

1つの態様では、本発明は、系列13または系列13様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる、ヒトPSMAと結合し得る結合分子に関する。1つの実施形態では、系列13または系列13様配列を含んでなる2つのV_Hドメインを二価結合分子として組み合わせ得る。別の実施形態では、系列13または系列13様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二価結合分子として、PSMAの同じエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列1、5、6、12もしくは13または系列1、5、6、12もしくは13様配列から選択され得る。

30

【0245】

1つの実施形態では、系列13または系列13様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二重パラトープ性結合分子として、PSMAの異なるエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列2、3、4、7、9、10、11もしくは14または系列2、3、4、7、9、10、11もしくは14様配列から選択され得る。

40

【0246】

系列13または系列様13配列は、親配列および親(13.1、配列番号384)から誘導される配列またはその一部、例えば、CDR3配列、および最適化の過程で親13.1から誘導されるクローンV_H配列またはその一部を含み、13.1のCDR配列および全長配列は、以下に示すように表13に従ってナンバリングされる。

【0247】

【表 1 3】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
13.1	配列番号 381 DYWMT	配列番号 382 NIKQDGSEKYY VDSVKG	配列番号 383 DRGGAVALY HNGMDM	配列番号 384 EVQLVESGGGSVQPGG SLRLSCAASGFTFS DYWMTWVRQVPGKGLEWV ANIKQDGSEKYYVDSVK GRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR DRGGAVALYHNGMDM GGQGT TVTVSS

表 1 3. これは本発明の範囲内にある系列 1 3 CDR 配列および系列 1 3 全長 V_H 配列の配列番号を示す。対応する配列を図 1 3 に示す。系列 1 3 様配列は、本発明に示されるような系列 1 3 配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0 2 4 8】

1 つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 3 8 3 または配列番号 3 8 3 と少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる C D R 3 配列を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなる。1 つの実施形態では、同一性は少なくとも 9 0 % である。1 つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 3 8 3 の C D R 3 を含んでなる。

【0 2 4 9】

1 つの実施形態では、単一 V_H ドメイン抗体は、超可変領域 C D R 3 を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなり、前記 C D R 3 は、配列番号 3 8 3 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する。1 つの実施形態では、系列 1 3 または系列 1 3 様配列は、P S M A と結合し得る少なくとも 1 つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなる、またはからなる結合分子を含んでなり、前記ドメインはヒト V_H ドメインであり、前記 P S M A 結合分子は超可変領域 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなり、前記 C D R 1 は、配列番号 3 8 1 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記 C D R 2 は、配列番号 3 8 2 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記 C D R 3 は、配列番号 3 8 3 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0 2 5 0】

1 つの実施形態では、前記 C D R 1 は、配列番号 3 8 1 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % も

しくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR2は、配列番号382のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%または99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR3は、配列番号383のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%または99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、V_HドメインのCDR配列は、図13のようなクローン13.1に関して示される通りである。

10

【0251】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号384またはそれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0252】

別の実施形態では、V_Hドメインは上記の配列の1つから選択されるが、1以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を含んでなる。1つの実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の1以上にある。別の実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、CDRの1以上にある。1つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列およびCDR配列内にある。

20

【0253】

系列13または系列13様結合分子は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるようなKD、K_{off}、K_A、K_d、EC₅₀およびIC₅₀値を有する。

【0254】

1つの態様では、本発明は、系列14または系列14様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる、ヒトPSMAと結合し得る結合分子に関する。1つの実施形態では、系列14または系列14様配列を含んでなる2つのV_Hドメインを二価結合分子として組み合わせ得る。別の実施形態では、系列14または系列14様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二価結合分子として、PSMAの同じエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列2、3、4、7、9、10、11または系列2、3、4、7、9、10、11様配列から選択され得る。

30

【0255】

1つの実施形態では、系列14または系列14様配列を含んでなる1つのV_Hドメインを、二重パラトープ性結合分子として、PSMAの異なるエピトープ、部分、ドメイン、サブユニットまたはコンファメーションと結合する、本明細書に記載されるような第2のV_Hドメインと組み合わせ得る。第2のV_Hドメインは、系列1、5、6、12もしくは13または系列1、5、6、12もしくは13様配列から選択され得る。

40

【0256】

系列14または系列14配列は、親配列および親(14.1)から誘導されるクローンの配列またはその一部、例えば、CDR3配列、および最適化の過程で親14.1から誘導されるV_H配列またはその一部を含み、14.1のCDR配列および全長配列は、以下に示すように表14に従ってナンバリングされる。

【0257】

【表 1 4】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
14.1	配列番号 385 SYDIN	配列番号 386 WMNPNSGNTG YAQKFQG	配列番号 387 GNGPGITGTT DY	配列番号 388 KCSWWSLGEVKKPGAS VKVSCKASGYTFTSYDI NWVRQATGQGLEWMG WMNPNSGNTGYAQKF QGRVTMTRNTSISTAYM ELSSLRSEDVAVYYCAR GNGPGITGTTDYWGQG TLVTVSS

表 1 4. これは本発明の範囲内にある系列 1 4 CDR 配列および系列 1 4 全長 V_H 配列の配列番号を示す。対応する配列を図 1 4 に示す。系列 1 4 様配列は、本発明に示されるような系列 1 4 配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0 2 5 8】

1 つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 3 8 7 または配列番号 3 8 7 と少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる CDR 3 配列を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなる。1 つの実施形態では、同一性は少なくとも 9 0 % である。1 つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 3 8 7 の CDR 3 を含んでなる。

【0 2 5 9】

1 つの実施形態では、単一 V_H ドメイン抗体は、超可変領域 CDR 3 を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR 3 は、配列番号 3 8 5 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する。1 つの実施形態では、系列 1 4 または系列 1 4 様配列は、P S M A と結合し得る少なくとも 1 つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなる、またはからなる結合分子を含んでなり、前記ドメインはヒト V_H ドメインであり、前記 P S M A 結合分子は、超可変領域 CDR 1、CDR 2 および CDR 3 を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR 1 は、配列番号 3 8 5 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記 CDR 2 は、配列番号 3 8 6 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記 CDR 3 は、配列番号 3 8 7 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0 2 6 0】

1 つの実施形態では、前記 CDR 1 は、配列番号 3 8 5 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % も

しくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR2は、配列番号386のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%または99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR3は、配列番号387のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%または99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、V_HドメインのCDR配列は、図14のようなクローン14.1に関して示される通りである。

10

【0261】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号388またはそれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の相同性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0262】

別の実施形態では、V_Hドメインは上記の配列の1つから選択されるが、1以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を含んでなる。1つの実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の1以上にある。別の実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、CDRの1以上にある。1つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列およびCDR配列内にある。

20

【0263】

系列14または系列14様結合分子は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるようなK_D、K_{off}、K_A、K_d、EC₅₀およびIC₅₀値を有する。

【0264】

1つの態様では、本発明は、系列15または系列15様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる、ヒトPSMAと結合し得る結合分子に関する。1つの態様では、本発明は、系列15または系列15様配列を含んでなるヒトV_Hドメインを含んでなる、ヒトPSMAと結合し得る結合分子に関する。1つの実施形態では、結合分子は系列15または系列15配列の、PSMA、好ましくは、ヒトPSMAと結合し得る少なくとも2つ1つの単一V_Hドメイン抗体を含んでなる。系列15単一V_Hドメイン抗体は、親配列および親(15.1)から誘導される配列またはその一部、例えば、CDR3配列、および最適化の過程で親15.1から誘導されるV_H配列またはその一部を含み、15.1のCDR配列および全長配列は、以下に示すように表15に従ってナンバリングされる。

30

【0265】

【表 1 5】

名称	CDR1	CDR2	CDR3	V _H 全長配列
15.1	配列番号 389 DYGMS	配列番号 390 GINWNGDRTGY ADSVKG	配列番号 391 ENVIVPAATY	配列番号 392 EVQLVESGGGVV RPGGSLRLSCAA SGFTFDDYGMSW VRQAPGKGLEWW SGINWNGDRTGY ADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSL RAEDTALYYCGR ENVIVPAATYWGQ GTLVTVSS

表 1 5. これは本発明の範囲内にある系列 1 4 CDR 配列および系列 1 5 全長 V_H 配列の配列番号を示す。対応する配列を図 1 5 に示す。系列 1 5 様配列は、本発明に示されるような系列 1 5 配列と特定の配列同一性パーセントを有する変異体である。

【0 2 6 6】

1 つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 3 9 1 または配列番号 3 9 1 と少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる CDR 3 配列を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなる。1 つの実施形態では、同一性は少なくとも 9 0 % である。1 つの実施形態では、V_H ドメインは、配列番号 3 9 1 の CDR 3 を含んでなる。

【0 2 6 7】

1 つの実施形態では、単一 V_H ドメイン抗体は、超可変領域 CDR 3 を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR 3 は、配列番号 3 9 1 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する。1 つの実施形態では、系列 1 5 または系列 1 5 様配列は、P S M A と結合し得る少なくとも 1 つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなる、またはからなる結合分子を含んでなり、前記ドメインはヒト V_H ドメインであり、前記 P S M A 結合分子は、超可変領域 CDR 1、CDR 2 および CDR 3 を含んでなる少なくとも 1 つの抗原結合部位を含んでなり、前記 CDR 1 は、配列番号 3 8 9 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記 CDR 2 は、配列番号 3 9 0 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなり、またはからなり、前記 CDR 3 は、配列番号 3 9 1 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0 2 6 8】

1 つの実施形態では、前記 CDR 1 は、配列番号 3 8 9 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、

89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR2は、配列番号390のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%または99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、前記CDR3は、配列番号391のアミノ酸配列またはそれと少なくとも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%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。1つの実施形態では、V_HドメインのCDR配列は、図15のようなクローン15.1に関して示される通りである。

10

【0269】

1つの実施形態では、V_Hドメインは、配列番号392またはそれと少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有する配列を含んでなる、またはからなる。

【0270】

別の実施形態では、V_Hドメインは上記の配列の1つから選択されるが、1以上のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を含んでなる。1つの実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の1以上にある。別の実施形態では、1以上のアミノ酸置換は、CDRの1以上にある。1つの実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワーク配列およびCDR配列内にある。

20

【0271】

系列15または系列15様結合分子は、本発明にさらに記載され、実施例に示されるようなKD、K_{off}、K_A、K_d、EC₅₀およびIC₅₀値を有する。

【0272】

1つの態様では、単一V_Hドメイン抗体は、系列1または系列1様、系列2または系列2様、系列3または系列3様、系列4または系列4様、系列5または系列5様、系列6または系列6様、系列7または系列7様、系列8または系列8様、系列9または系列9様、系列10または系列10様、系列11または系列11様、系列12または系列12様、系列13または系列13様、系列14または系列14様または系列15または系列15様CDR3配列から選択されるCDR3配列を、本明細書に挙げられている別の系列に由来するCDR1およびCDR2配列と合わせて含んでなる。

30

【0273】

例えば、単一V_Hドメイン抗体は、系列1または系列1様CDR3配列を、表2～15のいずれかに示されるような1または2つの他の系列に由来するCDR1およびCDR2配列と合わせて含んでなる。

【0274】

別の態様では、単一V_Hドメイン抗体は、系列2または系列2様CDR3配列を、表1、3～15のいずれかに示されるような1または2つの他の系列に由来するCDR1およびCDR2配列と合わせて含んでなる。当業者により認識されるように種々の組合せが可能である。

40

【0275】

別の態様では、単一V_Hドメイン抗体は、系列3または系列3様CDR3配列を、表1、2、4～15のいずれかに示されるような1または2つの他の系列に由来するCDR1およびCDR2配列と合わせて含んでなる。当業者により認識されるように種々の組合せが可能である。

【0276】

50

別の態様では、単一 V_H ドメイン抗体は、系列 4 または系列 4 様 C D R 3 配列を、表 1 ~ 3、5 ~ 15 に示されるような 1 または 2 つの他の系列に由来する C D R 1 および C D R 2 配列と合わせて含んでなる。当業者により認識されるように種々の組合せが可能である。

【0277】

別の態様では、単一 V_H ドメイン抗体は、系列 5 または系列 5 様 C D R 3 配列を、表 1 ~ 4、6 ~ 15 のいずれかに示されるような 1 または 2 つの他の系列に由来する C D R 1 および C D R 2 配列と合わせて含んでなる。当業者により認識されるように種々の組合せが可能である。

【0278】

別の態様では、単一 V_H ドメイン抗体は、系列 6 または系列 6 様 C D R 3 配列を、表 1 ~ 5、7 ~ 15 のいずれかに示されるような 1 または 2 つの他の系列に由来する C D R 1 および C D R 2 配列と合わせて含んでなる。当業者により認識されるように種々の組合せが可能である。

【0279】

別の態様では、単一 V_H ドメイン抗体は、系列 7 または系列 7 様 C D R 3 配列を、表 1 ~ 6、8 ~ 15 のいずれかに示されるような 1 または 2 つの他の系列に由来する C D R 1 および C D R 2 配列と合わせて含んでなる。当業者により認識されるように種々の組合せが可能である。

【0280】

別の態様では、単一 V_H ドメイン抗体は、系列 8 または系列 8 様 C D R 3 配列を、表 1 ~ 7、9 ~ 15 のいずれかに示されるような 1 または 2 つの他の系列に由来する C D R 1 および C D R 2 配列と合わせて含んでなる。当業者により認識されるように種々の組合せが可能である。

【0281】

別の態様では、単一 V_H ドメイン抗体は、系列 9 または系列 9 様 C D R 3 配列を、表 1 ~ 8、10 ~ 15 のいずれかに示されるような 1 または 2 つの他の系列に由来する C D R 1 および C D R 2 配列と合わせて含んでなる。当業者により認識されるように種々の組合せが可能である。

【0282】

別の態様では、単一 V_H ドメイン抗体は、系列 10 系列 10 様 C D R 3 配列を、表 1 ~ 4、11 ~ 15 のいずれかに示されるような 1 または 2 つの他の系列に由来する C D R 1 および C D R 2 配列と合わせて含んでなる。当業者により認識されるように種々の組合せが可能である。

【0283】

別の態様では、単一 V_H ドメイン抗体は、系列 11 または系列 11 様 C D R 3 配列を、表 1 ~ 10、12 ~ 15 のいずれかに示されるような 1 または 2 つの他の系列に由来する C D R 1 および C D R 2 配列と合わせて含んでなる。当業者により認識されるように種々の組合せが可能である。

【0284】

別の態様では、単一 V_H ドメイン抗体は、系列 12 または系列 12 様 C D R 3 配列を、表 1 ~ 11、13 ~ 15 のいずれかに示されるような 1 または 2 つの他の系列に由来する C D R 1 および C D R 2 配列と合わせて含んでなる。当業者により認識されるように種々の組合せが可能である。

【0285】

別の態様では、単一 V_H ドメイン抗体は、系列 13 または系列 13 様 C D R 3 配列を、表 1 ~ 12、14 ~ 15 のいずれかに示されるような 1 または 2 つの他の系列に由来する C D R 1 および C D R 2 配列と合わせて含んでなる。当業者により認識されるように種々の組合せが可能である。

【0286】

10

20

30

40

50

別の態様では、単一V_Hドメイン抗体は、系列15または系列15様CDR3配列を、表1～14のいずれかに示されるような1または2つの他の系列に由来するCDR1およびCDR2配列と合わせて含んでなる。当業者により認識されるように種々の組合せが可能である。

【0287】

本発明はまた、上記のおよび表1～15のいずれかに挙げられたV_Hドメインの1つから選択される第1のV_Hドメインを、上記のおよび表1～15のいずれかに挙げられたものから選択される第2のV_Hドメインと連結して含んでなる結合分子に関し、前記第1のV_Hドメインは、競合アッセイにおいてPSMAとの結合に関して第2のV_Hドメインと競合する。

10

【0288】

本発明はまた、上記のおよび表1～15のいずれかに挙げられたV_Hドメインの1つから選択される第1のV_Hドメインを、上記のおよび表1～15のいずれかに挙げられるものから選択される第2のV_Hドメインと連結して含んでなる結合分子に関し、前記第1のV_Hドメインは、競合アッセイにおいてPSMAとの結合に関して第2のV_Hドメインと競合しない。

【0289】

好ましい実施形態では、結合分子は二重パラトープ性または多重パラトープ性であり、表1に示されるような単一ドメイン抗体1. 1～1. 20から選択される第1の単一V_Hドメイン抗体と、表2に示されるような2. 1～2. 25から選択される第2の単一V_Hドメイン抗体とを含んでなる。例えば、第1の単一V_Hドメイン抗体は、表1に示されるような単一ドメイン抗体1. 1、1. 8～1. 20から選択され、第2の単一V_Hドメイン抗体は、表2に示されるような2. 1、2. 2、2. 11～2. 19、2. 22～2. 25から選択される。別の実施形態では、結合分子は、表2に示されるような単一ドメイン抗体2. 1～2. 25から選択される第1の単一ドメイン抗体と、表1に示されるような1. 1～1. 20から選択される第2のV_H単一ドメイン抗体とを含んでなる。例えば、第1の単一V_Hドメイン抗体は、表2に示されるような単一ドメイン抗体2. 1、2. 2、2. 11～2. 19、2. 22～2. 25から選択され、第2の単一V_Hドメイン抗体は、表1に示されるような1. 1、1. 8～1. 20から選択される。単一ドメイン抗体は(G₄S)_nリンカー、好ましくは、(G₄S)_nで連結される。さらなる好ましい実施形態では、結合分子は、下記の成分：次のような単一V_Hドメイン抗体ーリンカーー単一V_Hドメイン抗体：1. 1-6GS-2. 1、1. 8-6GS-2. 1、1. 1-6GS-2. 17、1. 1-6GS-2. 15、1. 1-6GS-2. 22、1. 16-6GS-2. 1、1. 16-6GS-2. 17、1. 16-6GS-2. 15、1. 16-6GS-2. 22、1. 11-6GS-2. 1、1. 11-6GS-2. 17、1. 11-6GS-2. 15、1. 11-6GS-2. 22、1. 18-6GS-2. 1、1. 18-6GS-2. 17、1. 18-6GS-2. 15、1. 18-6GS-2. 22、1. 17-6GS-2. 1、1. 17-6GS-2. 17、1. 17-6GS-2. 15または1. 17-6GS-2. 22を含んでなる結合分子から選択される。

20

30

【0290】

別の態様では、上記のような単一V_Hドメイン抗体は、単一ドメイン抗体としてヒトPSMA上の同じエпитープと結合する結合分子、例えば、抗体、抗体フラグメントまたは抗体模倣剤（すなわち、PSMAとの結合に関して本明細書に記載の単一ドメイン抗体のいずれかと交差競合する能力を有する抗体）に取って代わり得る。よって、本明細書に記載の単一ドメイン抗体は参照抗体として使用可能である。好ましい実施形態では、交差競合試験用の参照抗体は、単一ドメイン抗体1. 1、2. 1、3. 1、4. 1、5. 1、6. 1、7. 1、8. 1、9. 1、10. 1、11. 1、12. 1、13. 1、14. 1または15. 1である。このような交差競合抗体は、標準的PSMA結合アッセイにおいて、本明細書に記載の単一ドメイン抗体のいずれかと交差競合する能力に基づいて同定することができる。例えば、BIACore（商標）分析、ELISAアッセイまたはフロー

40

50

サイトメトリーが、本発明の単ドメイン抗体との交差競合を証明するために使用可能である。1つの実施形態では、本発明は、ヒトPSMAと結合し得る結合剤を提供し、競合アッセイでは、上記の単ドメイン抗体のいずれか1つが結合剤に取って代わる。

【0291】

本明細書に記載の結合分子は、1以上の付加的タンパク質部分との融合タンパク質として提供される。

【0292】

第2の部分は、それもヒトPSMAに特異的であるV_Hドメインを含んでなり得るので、二価結合分子が提供される。1つの実施形態では、結合分子は二重パラトープ性である。二重パラトープ性結合分子は、異なるエピトープと結合する抗原結合部分を含んでなる。本発明の二重パラトープ性結合分子は、既知技術の方法を用いて構築することができる。

10

【0293】

結合分子の部分を接続するために好適なリンカーとしては、ペプチドリinker、例えば、(Gly₄Ser)_nなどのGS残基を含むリンカーが含まれ、式中、n=1~10、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である。本明細書で使用する場合、GSは、Gly₄Serを表す。(Gly₄Ser)_nもまた本明細書ではnGSと表す。

【0294】

別の実施形態では、第2の部分は、二重特異性結合分子を提供するために、異なる抗原に特異的なV_Hドメインまたは別の抗体フラグメントを含んでなり得る。よって、本明細書で使用する場合、用語「二重特異性結合分子」は、PSMAに対して結合特異性を有する結合部位を有する本明細書に記載されるような結合分子と、第2の標的に対して結合特異性を有する結合部位を有する第2のポリペプチドドメインとを含んでなるポリペプチドを意味し、すなわち、二重特異性結合分子は、2つの標的に対して特異性を有する。第1の標的と第2の標的は同じでなく、すなわち、異なる標的、例えば、タンパク質であり；両方とも細胞表面に存在し得る。よって、本明細書に記載されるような二重特異性結合分子は、第1の標的と第2の標的を発現する（またはその細胞表面に展示する）細胞と選択的かつ特異的に結合し得る。別の実施形態では、結合分子は、3以上の抗原結合部分を含んでなる。

20

30

【0295】

別の実施形態では、3以上の部分が相互連結されて多重特異性結合分子を提供する。本明細書に記載されるような多重特異性ポリペプチド剤は、PSMAと結合する他、1以上の付加的標的と結合し、すなわち、多重特異性ポリペプチドは、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、またはそれを超える標的と結合することができ、多重特異性ポリペプチド剤は、それぞれ少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、またはそれを超える標的結合部位を有する。

【0296】

本明細書で使用する場合、用語「標的」は、1つの結合部位を有するポリペプチドドメインが選択的に結合する生体分子（例えば、抗原、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、脂質、炭水化物）を意味する。標的は、例えば、細胞内標的（例えば、細胞内タンパク質標的）または細胞表面標的（例えば、膜タンパク質、例えば、受容体タンパク質）であり得る。好ましくは、標的は、細胞表面標的、例えば、細胞表面タンパク質である。好ましくは、第1の細胞表面標的および第2の細胞表面標的は、両方とも細胞上に存在する。1つの実施形態では、標的は免疫腫瘍学的標的である。

40

【0297】

本発明の多重特異性抗体は、既知技術の方法を用いて構築することができる。

【0298】

場合により、二重特異性または多重特異性結合分子は、C_H2およびC_H3ドメインの

50

一方または両方および場合によりヒンジ領域を含んでなる、抗体Fc領域またはそのフラグメントと連結することができる。このようなポリペプチドを作製するために、例えば、単一ヌクレオチド配列としてFc領域またはそのフラグメントに連結された二重特異性または多重特異性結合分子をコードするベクターを使用することができる。

【0299】

1つの実施形態では、第2の部分は、結合分子の半減期を延長する働きをし得る。第2の部分は、血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)またはマウス血清アルブミン(MSA)と結合する、タンパク質、例えば、抗体またはその一部を含んでなり得る。第2の部分は、血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)またはマウス血清アルブミン(MSA)と結合するV_Hドメインを含んでなり得る。

10

【0300】

さらなる部分は、血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)またはその変異体、例えば、HSA C34Sを含んでなり得る。さらに、V_HドメインおよびFcドメインを含んでなる、例えば、V_HドメインがFcドメインに融合された、本明細書に記載されるような結合分子も提供される。さらに、第2の抗原と特異的に結合する第2の可変ドメインを含んでなる、第2の抗原がヒトPSMA以外の抗原である、結合分子も提供される。第2の抗原は、分化抗原群(CD)分子または主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII分子であり得る。

【0301】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は、検出可能標識または機能的標識で標識される。標識は、限定されるものではないが、蛍光剤、放射性標識、酵素、化学発光剤、核磁気共鳴活性標識または光増感剤を含む、シグナルを生成するまたは生成するために誘導され得る任意の分子であり得る。よって、結合は、蛍光または発光、放射能、酵素活性または吸光度を検出することによって出および／または測定され得る。

20

【0302】

さらに他の実施形態では、本発明の結合分子は、薬物、酵素または毒素などの少なくとも1つの治療用成分とカップリングされる。1つの実施形態では、治療用成分は、毒素、例えば、細胞傷害性放射性核種、化学毒素またはタンパク質毒素である。例えば、本発明のPSMA結合分子は、 α -、 β -、もしくは γ -放射体、または β -および γ -放射体などの放射性同位体とカップリングさせ得る。

30

【0303】

毒素は、カリケアマイシン、エスペラマイシン、メトトレキサート、ドキソルビシン、メルファラン、クロラムブシル、ARA-C、ビンデシン、マイトマイシンC、シスプラチナム、エトポシド、ブレオマイシン、5-フルオロウラシル、エストラムスチン、ビンクリスチン、エトポシド、ドキソルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、ドラスタチン10、オーリスタチンEおよびオーリスタチンPHEから選択され得る。他の実施形態では、治療用成分は、免疫刺激剤または免疫調節剤である。

【0304】

1つの態様では、本発明は、本明細書に記載の2以上の単一V_Hドメイン抗体を含んでなる免疫複合体を提供する。

40

【0305】

本発明のPSMA結合分子の毒素コンジュゲート形態は、好ましくは、ピコモル濃度でPSMA発現細胞の特異的細胞死を媒介する。

【0306】

別の態様では、本発明のPSMA結合分子は、例えば、化学修飾により、特に、ペグ化により、またはリポソーム中への封入により、または血清アルブミンタンパク質を用いて、半減期を延長するように修飾される。

【0307】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は、共有結合的に修飾される。用語「共有結合的に修飾される／共有結合的修飾」とは、本発明による結合分子の、例えば、本明細書に

50

明示される配列の、有機タンパク質性または非タンパク質性誘導体化剤、異種ポリペプチド配列との融合、および翻訳後修飾による修飾を含む。例えば、明示された配列の、共有結合修飾ポリペプチドは、本明細書に記載の機能的特性、例えば、ヒト P S M A と結合する能力をなお有するか、または共有結合的修飾は一般に、標的アミノ酸残基を、選択された側鎖もしくは末端残基と反応し得る有機誘導体化剤と反応させることによって、または選択された組換え宿主細胞で機能的な翻訳後修飾の機構を利用することによって導入される。特定の翻訳後修飾は、発現したポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミル残基およびアスパラギン残基は、多くの場合、翻訳後に脱アミド化されて対応するグルタミル残基およびアスパルチル残基となる。あるいは、これらの残基は弱酸性条件下で脱アミノ化される。他の翻訳後修飾として、プロリンおよびリシンの水酸化、セリル、チロシンまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の $[\alpha]$ -アミノ基のメチル化が含まれる。共有結合的修飾としては、例えば、本発明による、例えば、指定の配列の P S M A 結合分子およびそれらのアミノ酸配列変異体を含んでなる融合タンパク質、例えば、イムノアドヘシン、および異種シグナル配列との N 末端融合物が含まれる。

10

【0308】

本発明の結合分子は、以下にさらに記載されるような特定の機能的特性を有する。本発明の結合分子のこれらのおよびその他の薬理学的活性は、例えば、当技術分野で記載されるような標準的試験法で証明することができる。

【0309】

本発明の結合分子は、前立腺特異的膜抗原とともに細胞内に移行され得る。本発明の結合分子はヒト P S M A の細胞外ドメイン上のエピトープと特異的に結合する。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、その二量体形態で P S M A と特異的に結合する。本発明の結合分子は、毒性部分とコンジュゲートし、P S M A 発現前立腺細胞または癌細胞を除去または死滅させるために使用することができる。

20

【0310】

本発明の結合分子は、腫瘍細胞または前立腺細胞、実施例および添付の表に示されるように、例えば、ヒト P S M A 発現 C H O 細胞、L N C a P 細胞などの生細胞と結合することができる。さらなる態様において、本発明は、好ましくは F M A T 結合アッセイで測定した場合に、100 nM ~ 100 pM の間の E C 50 値、例えば、100 nM 以下の平均 E C 50 値、いっそうより好ましくは、90 nM 以下の平均 E C 50 値、例えば、80、70、60、50、40、30、20、10、5 nM 未満またはさらにはそれより低い、例えば、4、3、2、または 1 nM 未満またはさらにはそれより低い、例えば、500、400、300、200、100 pM 未満、またはさらにはそれより低い、例えば、4 pM 未満で P S M A と結合する単一ドメイン抗体を提供する。特に、E C 50 値は、表 19 に示される。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、ヒト P S M A およびカニクイザル P S M A と特異的に結合し得る。

30

【0311】

効力は、そうではないことが述べられない限り、通常、I C 50 値として nM で表される。機能アッセイにおいて、I C 50 は、生物学的応答をその最大の 50 % 低下させる結合メンバーの濃度である。I C 50 は、最大生物学的応答の % を結合メンバー濃度の対数の関数としてプロットし、ソフトウェアプログラムを使用し、データにシグモイド関数を当てはめて I C 50 値を得ることによって計算することができる。I C 50 を測定するための方法は当技術分野で周知である。例えば、I C 50 を決定するためには、H I S Z A P 細胞死滅化アッセイを用いて I C 50 を求めることができる。E C 50 は、最大半分有効濃度と呼称する。

40

【0312】

別の態様では、本発明は、P S M A、好ましくは、ヒト P S M A に対する少なくとも 1 つの免疫グロブリン単一ドメイン抗体を含んでなる、またはからなる結合分子に関し、前記ドメインはヒト V_H ドメインであり、実施例に記載されるように試験した場合に、約 0

50

． 2～約1000nM以上、例えば、0． 2～900、0． 2～800、0． 2～700、0． 2～600、0． 2～500、0． 2～400、0． 2～300、0． 2～200、0． 2～100、0． 2～50、0． 2～40、0． 2～30、0． 2～20、0． 2～10、0． 2～9、0． 2～8、0． 2～7、0． 2～6、0． 2～5、0． 2～4、0． 2～3、0． 2～2または0． 2～1のIC₅₀を有する。

【0313】

さらに、結合PSMAに対する本発明のPSMA結合分子の結合動態および親和性（平衡解離定数KDとして表される）は、例えば、BIAcore（商標）またはOctetなどの表面プラズモン共鳴を用いて決定可能であり、またはKDはpA2分析から見積もることもできる。特に、本発明の分子は、極めて有効である（すなわち、例えば実験の部にてpM範囲で測定されるようなEC50値）。

10

【0314】

さらなる態様において、本発明は、本明細書に記載されるような単ドメイン抗体を提供し、前記sdAbは、100nM～10pMの間の平均KD値、例えば、90nM以下の平均KD値、いっそうより好ましくは、80nM以下、例えば、70、60、50、40、30、20、10、5nM未満またはさらにはそれより低い、例えば、4、3、2、または1nM未満、例えば、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20pM未満、またはさらにはそれより低い、例えば、10pM未満の平均KD値で前記PSMAと結合する。好ましくは、KDは、実施例に示されるように決定される。

20

【0315】

1つの実施形態では、本発明による結合分子は、少なくとも約 10^7 M^{-1} 、好ましくは、約 10^9 M^{-1} 、より好ましくは、約 10^{10} M^{-1} ～ 10^{11} M^{-1} 以上の親和定数で、PSMAに結合親和性を有する。1つの実施形態では、本発明による結合分子は、 $1.00 \text{ E}+04 \sim 1.00 \text{ E}+6$ （1/M）のKonを有する。1つの実施形態では、本発明による結合分子は、 $1.00 \text{ E}-03 \sim 1.00 \text{ E}-05$ （1/s）のKoffを有する。

【0316】

本発明の結合分子は、熱安定性および血清安定性を含む優れた安定性を示した（実施例参照）。さらに、本発明の結合分子は、実施例に示されるように、迅速な腫瘍の標的化を示す。さらに、本発明の結合分子はまた、ヒトPSMAに対する高い特異性と非標的組織への低い取り込みを示す（実施例参照）。

30

【0317】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は、急速な血液クリアランスを示す。1つの実施形態では、本発明の結合分子は、低い腎臓滞留を示す。1つの実施形態では、結合分子は、ヒトPSMAへの別の抗体、例えば、J591の結合を阻害、例えば競合的に阻害することができる。

【0318】

1つの実施形態では、本発明の結合分子は、下記の非限定リストから選択される1以上の特性を持ち得る：

40

- a) 腫瘍細胞の表面に見られるその天然型のヒトおよび／またはカニクイザル前立腺特異的膜抗原に対する高親和性結合、
- b) 腫瘍細胞による内部移行、
- c) 非標的組織における低い取り込み、
- d) 迅速な腫瘍の標的化、
- e) LNCaP細胞には強く結合するが、前立腺特異的膜抗原の発現を欠く細胞には結合しないか、または最小の結合しかしない、および／または
- f) PSMA上のユニークなエピトープに結合する。

【0319】

本発明はさらに、本発明の結合分子をコードする単離された核酸を提供する。核酸は、

50

DNAおよび／またはRNAを含み得る。1つの態様では、本発明は、上記で定義されるようなCDRまたはCDRセットまたはV_Hドメインをコードする核酸を提供する。

【0320】

本明細書に記載の単ドメイン抗体の核酸を以下に示す。これらは、発現用の核酸構築物を作成するために本明細書に記載のリンカーを用いて組み合わせることができる。

【0321】

以下に示すような配列番号393～410を含んでなるまたはからなる配列は、配列番号4～80を含んでなるまたはからなる系列1のV_Hドメインをコードする。

【0322】

配列番号393（V_Hドメイン1. 1をコードする）

10

【化2】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTTTTAGCAGCTATGCCATGAGTTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAGAATGATGGTACCACA
GACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAGTAT
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGTGA
AAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

20

【0323】

配列番号394（V_Hドメイン1. 2をコードする）

【化3】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGATAATAATAATAGCACA
GAGTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAGCA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGCGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGT
GAAAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

30

【0324】

配列番号395（V_Hドメイン1. 3をコードする）

【化4】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCTCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGATAATAATAATAGCACA
GACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAGTA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGT
GAAAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA

40

【0325】

配列番号396（V_Hドメイン1. 4をコードする）

【化 5】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGATGGAACCACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAGCACGCTGT
ATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGAT
GGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCCTCA

10

【0326】

配列番号 397 (V_H ドメイン 1. 5 をコードする)

【化 6】

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCACTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAAAATGATCGAACCACA
TACTACGTAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAGCAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG
AAAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

20

【0327】

配列番号 398 (V_H ドメイン 1. 6 をコードする)

【化 7】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGATAATAATAGAACCACA
TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAGCA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGC
GAAAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

30

【0328】

配列番号 399 (V_H ドメイン 1. 7 をコードする)

【化 8】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGATGGAACCACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAGCACGCTGT
ATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGAT
GGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

40

【0329】

配列番号 400 (V_H ドメイン 1. 8 をコードする)

【化 9】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTTTTAGCAGCTATGCCATGAGTTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAGAATGATGGTACCACA
GACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGTGA
AAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

10

【0 3 3 0】

配列番号 4 0 1 (V_H ドメイン 1. 9 をコードする)

【化 1 0】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTTTTAGCAGCTATGCCCTCAGTTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAGAATAACGATACCACA
GACTACGCAGACAACGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGTGA
AAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

20

【0 3 3 1】

配列番号 4 0 2 (V_H ドメイン 1. 10 をコードする)

【化 1 1】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTTTTAGCAGCTATGCCCTCAGTTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAGAATAACGCTACCACA
GACTACGCAGACTTCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGTGA
AAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

30

【0 3 3 2】

配列番号 4 0 3 (V_H ドメイン 1. 11 をコードする)

【化 1 2】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTTTTAGCAGCTATGCCCTCAGTTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAGAATAACGCTACCACA
GACTACGCAGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGTG
AAAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

40

【0 3 3 3】

配列番号 4 0 4 (V_H ドメイン 1. 12 をコードする)

【化 1 3】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTTTTAGCAGCTATGCCCTCAGTTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAGAATAACGCTACCACA
GACTACGCAGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGTG
AAAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

10

【0 3 3 4】

配列番号 4 0 5 (V_H ドメイン 1. 1 3 をコードする)

【化 1 4】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTTTTAGCAGCTATGCCCTCAGTTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAGAATAACCATACCACA
GACTACGCAGCCGACGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGTG
AAAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

20

【0 3 3 5】

配列番号 4 0 6 (V_H ドメイン 1. 1 4 をコードする)

【化 1 5】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTTTTAGCAGCTATGCCCTCAGTTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAGAATAACGCTACCACA
GACTACGCAGACGTCTGTAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGTGA
AAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

30

【0 3 3 6】

配列番号 4 0 7 (V_H ドメイン 1. 1 5 をコードする)

【化 1 6】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTTTTAGCAGCTATGCCCTCAGTTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAGAATAACCATACCACA
GACTACGCAGCCTTCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGTGA
AAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

40

【0 3 3 7】

配列番号 4 0 8 (V_H ドメイン 1. 1 6 をコードする)

【化 1 7】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTATGAGCTATGCCCTCAGTTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAGAATAACCATAACCACA
GACTACGCAGACACCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGTGA
AAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

10

【0 3 3 8】

配列番号 4 0 9 (V_H ドメイン 1. 17 をコードする)

【化 1 8】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTATGAGCTATGCCCTCAGTTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAGAATAACGATACCACA
GACTACGCAGACGCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGTG
AAAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

20

【0 3 3 9】

配列番号 4 1 0 (V_H ドメイン 1. 18 をコードする)

【化 1 9】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTATGAGCTATGCCCTCAGTTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAGAATAACGCTACCACA
GACTACGCAGCCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGTGA
AAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

30

【0 3 4 0】

配列番号 4 1 1 (V_H ドメイン 1. 19 をコードする)

【化 2 0】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTATGAGCTATGCCCTCAGTTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAGAATAACGATACCACA
GACTACGCAGCCTACGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGTGA
AAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

40

【0 3 4 1】

配列番号 4 1 2 (V_H ドメイン 1. 20 をコードする)

【化 2 1】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTATGAGCTATGCCCTCAGTTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTGGTGAGAATAACCATACCACA
GACTACGCAGCCACCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGTGA
AAGATGGTGTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

10

【0 3 4 2】

以下に示すような配列番号 4 1 3 ~ 4 3 7 は、配列番号 8 4 ~ 1 8 0 を含んでなるまたはからなる系列 2 の V_H ドメインをコードする。

【0 3 4 3】

配列番号 4 1 3 (V_H ドメイン 2. 1 をコードする)

【化 2 2】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGATGGAAGTAATAAAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGATATCTGGG
GCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

20

【0 3 4 4】

配列番号 4 1 4 (V_H ドメイン 2. 2 をコードする)

【化 2 3】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGATGGAAGTAATAAAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGATATCTGGG
GCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

30

【0 3 4 5】

配列番号 4 1 5 (V_H ドメイン 2. 3 をコードする)

40

【化 2 4】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCC
AGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACATATATCATATGATGGAAGTAATAG
ATACTATGCAGAATCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAGAATTCCAAGAACA
CGCTGTCTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC
GAAAGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTTATCGTCCTATGATTTTGACATTT
GGGGCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

10

【0 3 4 6】

配列番号 4 1 6 (V_H ドメイン 2. 4 をコードする)

【化 2 5】

CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAAA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAGA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTCTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCG
AGAGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTTATCGTCCTATGATTTTGAAATCTG
GGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTCTCA

20

【0 3 4 7】

配列番号 4 1 7 (V_H ドメイン 2. 5 をコードする)

【化 2 6】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAGA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
ACTGTCTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
AAGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTTATCGTCCTATGATTTTGAAATTTGG
GGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTCTCA

30

【0 3 4 8】

配列番号 4 1 8 (V_H ドメイン 2. 6 をコードする)

40

【化 2 7】

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
AAGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAACTATCGTCCTATAAATTTGAAATCTGG
GGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA

10

【0 3 4 9】

配列番号 4 1 9 (V_H ドメイン 2. 7 をコードする)

【化 2 8】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACTTATATCATATGATGGAAGTAATAAAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGCAATCGTCCTATGCTTTTGATATCTGGG
GCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA

20

【0 3 5 0】

配列番号 4 2 0 (V_H ドメイン 2. 8 をコードする)

【化 2 9】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAACTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGCAATCGTCCTATGCTTTTGAAATCTGGG
GCCAAGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA

30

【0 3 5 1】

配列番号 4 2 1 (V_H ドメイン 2. 9 をコードする)

【化 3 0】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
AAGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGCAATCGTCCTATGCTTTTGAAATCCGG
GGCCAGGGGACAACGGTCACCGTCTCTTCA

40

50

【0352】

配列番号 422 (V_H ドメイン 2. 10 をコードする)

【化31】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGATGGAAGTAATAGA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAGAC
GCTGTCTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCG
AAAGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCATATGATTTTGATATCTG
GGGCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA

10

【0353】

配列番号 423 (V_H ドメイン 2. 11 をコードする)

【化32】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCCTCCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGACGAGAGTAATAAAT
ACTATGCACCCAGCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGATATCTGGG
GCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA

20

【0354】

配列番号 424 (V_H ドメイン 2. 12 をコードする)

【化33】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGATAAGAGTAATAAAT
ACTATGCAGACAAGGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGATATCTGGG
GCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

30

【0355】

配列番号 425 (V_H ドメイン 2. 13 をコードする)

40

【化 3 4】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCCTCCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGATGCGAGTAATAAAT
ACTATGCAGACAACGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGATATCTGGG
GCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

10

【0 3 5 6】

配列番号 4 2 6 (V_H ドメイン 2. 1 4 をコードする)

【化 3 5】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCGTGCACTGGGTCCGCC
AGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGATGCGAGTAATAAA
TACTATGCAGACAACGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
AAGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGATATCTGG
GGCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

20

【0 3 5 7】

配列番号 4 2 7 (V_H ドメイン 2. 1 5 をコードする)

【化 3 6】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCCTCCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGATAAGAGTAATAAAT
ACTATGCAGACAAGGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGATATCTGGG
GCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

30

【0 3 5 8】

配列番号 4 2 8 (V_H ドメイン 2. 1 6 をコードする)

【化 3 7】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCGCGCACTGGGTCCGCC
AGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGATAAGAGTAATAAA
TACTATGCAGACAAGGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
AAGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGATATCTGG
GGCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

40

50

【0359】

配列番号429 (V_Hドメイン2. 17をコードする)

【化38】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATCATATGATGCGAGTAATAAAT
ACTATGCAGACAACGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGATATCTGGG
GCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

10

【0360】

配列番号430 (V_Hドメイン2. 18をコードする)

【化39】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCCAGCACTGGGTCCGCC
AGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGATGCGAGTAATAAA
TACTATGCAGACAACGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
AAGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGATATCTGG
GGCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

20

【0361】

配列番号431 (V_Hドメイン2. 19をコードする)

【化40】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCTTCCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGATGCGAGTAATAAAT
ACTATGCAGACAACGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGATATCTGGG
GCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

30

【0362】

配列番号432 (V_Hドメイン2. 20をコードする)

40

【化 4 1】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCAGCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCC
AGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGGAAGTAATAG
ATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACA
CGCTGTCTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC
GAAAGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTCAAATTT
GGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA

10

【0 3 6 3】

配列番号 4 3 3 (V_H ドメイン 2. 21 をコードする)

【化 4 2】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAAA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAGA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTCTCTACAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
AAGATCCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGAAATTATCGTCCTATGATTTTCAAATCTGG
GGCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

20

【0 3 6 4】

配列番号 4 3 4 (V_H ドメイン 2. 22 をコードする)

【化 4 3】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCACGCACTGGGTCCGCC
AGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGACGGGAGTAATAA
ATACTATGCAGCCCCGGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACA
CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC
GAAAGACGCGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGAATCT
GGGGCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

30

【0 3 6 5】

配列番号 4 3 5 (V_H ドメイン 2. 23 をコードする)

【化 4 4】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCACGCACTGGGTCCGCC
AGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGACGAGAGTAATAAA
TACTATGCATCCAGCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
AAGACCGGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGAATCTGG
GGCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

40

50

【0366】

配列番号436 (V_Hドメイン2. 24をコードする)

【化45】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGACGAGAGTAATAAAT
ACTATGCAAGGCTGGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGACACGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGATATCTGGG
GCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCTTCA

10

【0367】

配列番号437 (V_Hドメイン2. 25をコードする)

【化46】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTGGCTATGGCCTCCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCATATGACCTGAGTAATAAAT
ACTATGCAAGGGGGGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
AAGACGTGGCCTGGGGATTACGTTTGGGGGAGTCATCGTCCTATGATTTTGATATCTGG
GGCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCCTCA

20

【0368】

1つの態様では、本発明はまた、配列番号184～276を含んでなるまたはからなる系列3のV_Hドメインをコードする、以下に示すような配列番号438～461を含んでなるまたはからなる核酸配列に関する。

30

配列番号438 (V_Hドメイン3. 1をコードする)

【化47】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTTATGACATATGATGGAAGTAATAGA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGATGAGGACACGGCTCTATATTACTGTGCGA
GAGATCGTATAGTGGGAGGTAGGGTCCCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGAC
AATGGTCACCGTCTCTTCA

40

【0369】

配列番号439 (V_Hドメイン3. 2をコードする)

【化 4 8】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATATCATATGATGGAAGTAATAAAT
ATTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAAAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGATCGTATAGTGGGAGCCAGGGTCCCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACCGTCTCCTCA

10

【0 3 7 0】

配列番号 4 4 0 (V_H ドメイン 3. 3 をコードする)

【化 4 9】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCCTCATTAGCTATGGCATGAACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTATATCATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATAGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACCGTCTCCTCA

20

【0 3 7 1】

配列番号 4 4 1 (V_H ドメイン 3. 4 をコードする)

【化 5 0】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGCGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAG
ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCC
AGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAG
ATATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACA
CGCTTTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCG
AAAGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGA
CAATGGTCACCGTCTCCTCA

30

【0 3 7 2】

配列番号 4 4 2 (V_H ドメイン 3. 5 をコードする)

40

【化 5 1】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTTTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACCGTCTCCTCA

10

【0 3 7 3】

配列番号 4 4 3 (V_H ドメイン 3. 6 をコードする)

【化 5 2】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTTTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACCGTCTCCTCA

20

【0 3 7 4】

配列番号 4 4 4 (V_H ドメイン 3. 7 をコードする)

【化 5 3】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTTCATCTGCAAATGGACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACTGTCTCTTCA

30

【0 3 7 5】

配列番号 4 4 5 (V_H ドメイン 3. 8 をコードする)

【化 5 4】

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTTTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAGGGAACC
CTGGTCACTGTCTCCTCA

40

50

【0376】

配列番号446 (V_Hドメイン3.9をコードする)

【化55】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTATATCATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACCGTCTCTTCA

10

【0377】

配列番号447 (V_Hドメイン3.10をコードする)

【化56】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTTCATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACTGTCTCCTCA

20

【0378】

配列番号448 (V_Hドメイン3.11をコードする)

【化57】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTTCATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACTGTCTCCTCA

30

【0379】

配列番号449 (V_Hドメイン3.12をコードする)

40

【化 5 8】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTTTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACCGTCTCCTCA

10

【0 3 8 0】

配列番号 4 5 0 (V_H ドメイン 3. 1 3 をコードする)

【化 5 9】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTTTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACTGTCTCCTCA

20

【0 3 8 1】

配列番号 4 5 1 (V_H ドメイン 3. 1 4 をコードする)

【化 6 0】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTTCATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACTGTCTCCTCA

30

【0 3 8 2】

配列番号 4 5 2 (V_H ドメイン 3. 1 5 をコードする)

【化 6 1】

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTTCATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACCGTCTCCTCA

10

【0 3 8 3】

配列番号 4 5 3 (V_H ドメイン 3. 16 をコードする)

【化 6 2】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTTCATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACCGTCTCCTCA

20

【0 3 8 4】

配列番号 4 5 4 (V_H ドメイン 3. 17 をコードする)

【化 6 3】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTTTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACCGTCTCCTCA

30

【0 3 8 5】

配列番号 4 5 5 (V_H ドメイン 3. 18 をコードする)

40

【化 6 4】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGAT
ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTTTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAA
AGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ATGGTCACCGTCTCCTCA

10

【0 3 8 6】

配列番号 4 5 6 (V_H ドメイン 3. 19 をコードする)

【化 6 5】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTATGACATATGATGGAAGTAATAGA
TACTATGCAGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
GAGATCGTATAGTGGGAGGTAGGGTCCCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGAC
AATGGTCACCGTCTCTTCA

20

【0 3 8 7】

配列番号 4 5 7 (V_H ドメイン 3. 20 をコードする)

【化 6 6】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTTCAGACATATGATGGCAGTAATAGA
TACTATGCAGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
GAGATCGTATAGTGGGAGGTAGGGTCCCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGAC
AATGGTCACCGTCTCTTCA

30

【0 3 8 8】

配列番号 4 5 8 (V_H ドメイン 3. 21 をコードする)

【化 6 7】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTTCAGACATATGATGGCAGTAATAGA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
GAGATCGTATAGTGGGAGGTAGGGTCCCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGAC
AATGGTCACCGTCTCTTCA

40

50

【0389】

配列番号459 (V_Hドメイン3. 22をコードする)

【化68】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTTCAGACATATGATGCCAGTAATAGA
TACTATGCAGACGCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
GAGATCGTATAGTGGGAGGTAGGGTCCCTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGAC
AATGGTCACCGTCTCTTCA

10

【0390】

配列番号460 (V_Hドメイン3. 23をコードする)

【化69】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTTTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGA
AAGATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGAC
AATGGTCACTGTCTCCTCA

20

【0391】

配列番号461 (V_Hドメイン3. 24をコードする)

【化70】

AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGAC
TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTAATTAGCTATGGCATGAATTGGGTCCGCCAG
GCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTATAACATATGATGGAAGTAATAGATA
CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC
TTTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAAA
GATCGTATTGTGGGAGCTAGGGTCCCTGATGCTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACAAT
GGTCACTGTCTCCTCA

40

【0392】

以下に示すような配列番号4462、463、464および465は、配列番号280
～292を含んでなるまたはからなる系列4のV_Hドメインをコードする。

【0393】

配列番号462 (V_Hドメイン4. 1をコードする)

【化 7 1】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCTTGAGA
CTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCCCCTTCATTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCGGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAGA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTGTATTATTGTGCGA
AAGAGAGGATTTTTGGAGTGCTTACCCCTGATGATTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ACGGTCACCGTCTCCTCA

10

【0 3 9 4】

配列番号 4 6 3 (V_H ドメイン 4. 2 をコードする)

【化 7 2】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCTTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTCATTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAGA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
AAGAGAGGATTTTTGGAGTGCTTACCCCTGATGATTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ACGGTCACTGTCTCCTCA

20

【0 3 9 5】

配列番号 4 6 4 (V_H ドメイン 4. 3 をコードする)

【化 7 3】

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCTTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTCATTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAGCTAATAGA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTGTATTATTGTGCGA
AAGAGAGGATTTTTGGCGTGCTTACCCCTGATGATTTTGAAATCTGGGGCCAAGGGACA
ACGGTCACCGTCTCCTCA

30

【0 3 9 6】

配列番号 4 6 5 (V_H ドメイン 4. 4 をコードする)

40

【化 7 4】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCACTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAGA
TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
AAGAGAGGATTTTTGGAGCGCTTACCCCTGATGATTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACA
ACGGTCACCGTCTCTTCA

10

【0 3 9 7】

以下に示すような配列番号 4 6 6 または 4 6 7 は、配列番号 2 9 6 および 3 0 0 を含んでなるまたはからなる系列 5 の V_H ドメインをコードする。

【0 3 9 8】

配列番号 4 6 6 (V_H ドメイン 5. 1 をコードする)

【化 7 5】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAATAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGGAAATACTAAAT
ATTATACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGTTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGGTTTATGGCCTTCGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACTGTCTCTTCA

20

【0 3 9 9】

配列番号 4 6 7 (V_H ドメイン 5. 2 をコードする)

【化 7 6】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAATAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGGAAATAGTAAAT
ATTATACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGTTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGGTTTATGGCCTTCGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

30

【0 4 0 0】

以下に示すような配列番号 4 6 8 ~ 4 7 4 は、配列番号 3 0 4 ~ 3 2 8 を含んでなるまたはからなる系列 6 の V_H ドメインをコードする。

40

【0 4 0 1】

配列番号 4 6 8 (V_H ドメイン 6. 1 をコードする)

【化 7 7】

CAGGTGCAGCTACAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCC
TCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAATAGTGGTTATTACTGGAGCTGGGTC
CGCCAGCACCCAGGGAAGGACCTGGAGTGGATTGGGTTTCATCTATTACAATGGGAGCA
TCCACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTATCATATCAGTAGACACGTCTAAGAAC
CAGTTCTCCCTGAAAATGAACTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC
GAGAGACGGGGATGACTACGGTGACTACTTGAGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT
CTCCTCA

10

【0 4 0 2】

配列番号 4 6 9 (V_H ドメイン 6. 2 をコードする)

【化 7 8】

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCC
CTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAATAGTGGTTATTACTGGAGCTGGAT
CCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTTTCATCTATTACAATGGGAGC
ATCCACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTATCATATCAGTAGACACGTCTAAGAA
CCAGTTCTCCCTGAAAATGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTG
CGAGAGACGGGGATGACTACGGTGACTACTTGAGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG
TCTCCTCA

20

【0 4 0 3】

配列番号 4 7 0 (V_H ドメイン 6. 3 をコードする)

【化 7 9】

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCC
CTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAATAGTGGTTATTACTGGAGCTGGGT
CCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTTTCATCTATTACAATGGGAGC
ATCCACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTATCATATCAGTAGACACGTCTAAGAA
CCAGTTCTCCCTGAAACTGAACTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTG
CGAGAGACGGGGATGACTACGGTGACTACTTGAGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG
TCTCCTCA

30

【0 4 0 4】

配列番号 4 7 1 (V_H ドメイン 6. 4 をコードする)

40

【化 8 0】

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCC
CTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAATAGTGGTTATTACTGGAGCTGGAT
CCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTTCATCTATTACAATGGGAGC
ATCCACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTATCATATCAGTAGACACGTCTAAGAA
CCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGACGGGGATGACTACGGTGACTACTTGAGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCCTCA

10

【0 4 0 5】

配列番号 4 7 2 (V_H ドメイン 6 . 5 をコードする)

【化 8 1】

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCC
CTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAATAGTGGTTATTACTGGAGCTGGGT
CCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTTCATCTATTACAATGGGAGC
ATCCACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAA
CCAGTTCTCCCTGAAAATGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTG
CGAGAGACGGGGATGACTACGGTGACTACTTGAGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG
TCTCCTCA

20

【0 4 0 6】

配列番号 4 7 3 (V_H ドメイン 6 . 6 をコードする)

【化 8 2】

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCC
CTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAATAGTGGTTATTACTGGAGCTGGGT
CCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTTCATCTATTACAATGGGAGC
ATCCACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAA
CCAGTTCTCCCTGAACTGAACTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTG
CGAGAGACGGGGATGACTACGGTGACTACTTGAGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG
TCTCCTCA

30

【0 4 0 7】

配列番号 4 7 4 (V_H ドメイン 6 . 7 をコードする)

40

【化 8 3】

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCC
CTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAATAGTGGTTATTACTGGAGCTGGGT
CCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTTTCATCTATTACAATGGGAGC
ATCCACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCTAAGAA
CCAGTTCTCCCTGAACTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGT
GCGAGAGACGGGGATGACTACGGTGACTACTTGAGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCCTCA

10

【0 4 0 8】

以下に示すような配列番号 4 7 5 ~ 4 8 2 は、配列番号 3 3 2 ~ 3 6 0 を含んでなるま
たはからなる系列 7 の V_H ドメインをコードする。

【0 4 0 9】

配列番号 4 7 5 (V_H ドメイン 7. 1 をコードする)

【化 8 4】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTATTGGATGTACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAATCACGATGGAAGTGAGAA
ATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGT
CACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGCGC
GAGAGATTCCCTTATAGTGGGAGAGAGGGGCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCCTCA

20

【0 4 1 0】

配列番号 4 7 6 (V_H ドメイン 7. 2 をコードする)

【化 8 5】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTATTGGATGTACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAATCACGATGGAAGTGAGAA
ATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGT
CACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGCGC
GAGAGATAACCTTATAGTGGGAGAGAGGGGCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCCTCA

30

【0 4 1 1】

配列番号 4 7 7 (V_H ドメイン 7. 3 をコードする)

40

【化 8 6】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGCTATTGGATGTACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAATCACGGGGGAAGTGAGAA
ATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGT
CACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGCGC
GAGAGATTCCCTTATAGTGGGAGAGAGGGGCTACT

10

【0 4 1 2】

配列番号 4 7 8 (V_H ドメイン 7. 4 をコードする)

【化 8 7】

GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGCTATTGGATGTACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAATCACAGGGAAGTGAGAA
ATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGT
CACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGCGC
GAGAGATTCCCTTATAGTGGGAGAGAGGGGCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCCTCA

20

【0 4 1 3】

配列番号 4 7 9 (V_H ドメイン 7. 5 をコードする)

【化 8 8】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGCTATTGGATGTACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAATCACCCCGGAAGTGAGAA
ATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGT
CACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGCGC
GAGAGATTCCCTTATAGTGGGAGAGAGGGGCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCCTCA

30

【0 4 1 4】

配列番号 4 8 0 (V_H ドメイン 7. 6 をコードする)

【化 8 9】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTATTGGATGTACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAATCACGAGGGAAGTGAGAA
ATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACT
CACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGCGC
GAGAGATTCCCTTATAGTGGGAGAGAGGGGCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCCTCA

10

【0 4 1 5】

配列番号 4 8 1 (V_H ドメイン 7. 7 をコードする)

【化 9 0】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTATTGGATGTACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAATCACATCGGAAGTGAGAAA
TACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTC
ACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGCGCG
AGAGATTCCCTTATAGTGGGAGAGAGGGGCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCCTCA

20

【0 4 1 6】

配列番号 4 8 2 (V_H ドメイン 7. 8 をコードする)

【化 9 1】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTATTGGATGTACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAATCACGATGGAAGTGAGAA
ATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACT
CACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGCGC
GAGAGATACCCTTATAGTGGGAGAGAGGGGCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCCTCA

30

【0 4 1 7】

以下に示すような配列番号 4 8 3 は、配列番号 3 6 4 を含んでなるまたはからなる系列
8 の V_H ドメインをコードする。

【0 4 1 8】

配列番号 4 8 3

40

【化 9 2】

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCC
CTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCA
GCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAGCACCAAC
TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTT
CTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
GGCCCCATACCAGCCACTGCTATACCCGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAAT
GGTCACTGTCTCCTCA

10

【0 4 1 9】

以下に示すような配列番号 4 8 4 は、配列番号 3 6 8 を含んでなるまたはからなる系列
9 の V_H ドメインをコードする。

【0 4 2 0】

配列番号 4 8 4

【化 9 3】

GAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCC
CTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGGTCACTACTGGAGCTGGATCCGCC
AGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGACATAAATCATAGTGGAAGCACCAA
CTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAATCAGT
TCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGAG
AGACTACGGTGACTCCCGTAGCCTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCTTCA

20

【0 4 2 1】

以下に示すような配列番号 4 8 5 は、配列番号 3 7 2 を含んでなるまたはからなる系列
1 0 の V_H ドメインをコードする。

【0 4 2 2】

配列番号 4 8 5

【化 9 4】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTATGTCATATGATGGCAGTAATAAA
TACTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATAC
GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
AAGGCGATTACGATTTTTGGAGTGGTTACCCCGACTACGATATGGACGTCTGGGGCCAA
GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

40

【0 4 2 3】

以下に示すような配列番号 4 8 6 は、配列番号 3 7 6 を含んでなるまたはからなる系列
1 1 の V_H ドメインをコードする。

【0 4 2 4】

配列番号 4 8 6

50

【化 9 5】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACTTGATTAGCTATGGCATGTACTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAA
AACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATAC
GCTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA
AAGGGGGGAATGCCTTGTATAGCAGTGGCTGGCCCGATGATGGTTTTGATATCAGGGG
CCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCCTCA

10

【0 4 2 5】

以下に示すような配列番号 4 8 7 は、配列番号 3 8 0 を含んでなるまたはからなる系列
1 2 の V_H ドメインをコードする。

【0 4 2 6】

配列番号 4 8 7

【化 9 6】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACTTTGGCATGCACTGGGCCCCGCCA
GGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCAGTAATATCATATGATGGAAATAGTAAAT
ACTATGCAGACACCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG
CTGTATCTGGAAATGAACAGCCTGAGAGCTGATGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAA
AGGCCTATGGCCCCCAATGGACGTCAGGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTC
A

20

【0 4 2 7】

以下に示すような配列番号 4 8 8 は、配列番号 3 8 4 を含んでなるまたはからなる系列
1 3 の V_H ドメインをコードする。

30

【0 4 2 8】

配列番号 4 8 8

【化 9 7】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTGACTATTGGATGACCTGGGTCCGCCA
GGTTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAA
ATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGT
CACTATATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCG
AGAGATCGAGGAGGAGCAGTGGCCCTTTATCACACGGTATGGACATGGGGGGCCAAG
GGACCACGGTCACTGTCTCTTCA

40

【0 4 2 9】

以下に示すような配列番号 4 8 9 9 は、配列番号 3 8 8 を含んでなるまたはからなる系
列 1 4 の V_H ドメインをコードする。

【0 4 3 0】

配列番号 4 8 9

50

【化 9 8】

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCAGTTATGATATCAACTGGGTGCGACAGG
CCACTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATGAACCCTAACAGTGGTAACACAGG
CTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCACA
GCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGA
GAGGGAACGGGCCCCGGTATAACTGGAAGTACTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGG
TCACTGTCTCTTCA

10

【0 4 3 1】

以下に示すような配列番号 4 9 0 は、配列番号 3 9 2 を含んでなるまたはからなる系列 1 5 の V_H ドメインをコードする。

【0 4 3 2】

配列番号 4 9 0

【化 9 9】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCA
AGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATTGGAATGGTGATCGTACC
GGTTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTC
CCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGGGA
GAGAGAATGTTATAGTACCAGCTGCTACCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT
CTCCTCA

20

【0 4 3 3】

本発明による核酸は、DNA または RNA を含んでなり得、完全もしくは部分的合成または組換え生産され得る。本発明に示される場合、ヌクレオチド配列という場合には、指定の配列を有する DNA 分子を包含し、文脈がそうではないことを必要としない限り、T が U に置換された指定の配列を有する RNA 分子を包含する。

30

【0 4 3 4】

核酸は、構築物、例えば、プラスミド、ベクター、転写または発現カセットの形態であり得る。

【0 4 3 5】

本発明はまた、上記のように 1 以上の核酸構築物を含んでなる、単離された組換え宿主細胞に関する。宿主細胞は、細菌、ウイルス、哺乳動物または他の好適な宿主細胞であり得る。1 つの実施形態では、細胞は大腸菌細胞である。別の実施形態では、細胞は酵母細胞である。別の実施形態では、細胞はチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である。

40

【0 4 3 6】

in vitro 発現ライブラリーを用いて本明細書に記載のポリペプチド、核酸、宿主細胞、産物および組成物を調製または作製するための方法は、

a) アミノ酸配列をコードする核酸配列のセット、コレクションまたはライブラリーを準備する工程；および

b) P S M A と結合し得る／P S M A に対して親和性を持ち得るアミノ酸配列に関して前記セット、コレクションまたはライブラリーをスクリーニングする工程、および

c) P S M A と結合し得る／P S M A に対して親和性を持ち得るアミノ酸配列を単離する工程

50

を含んでなり得る。

【0437】

上記の方法において、アミノ酸配列のセット、コレクションまたはライブラリーは、例えばスクリーニングを容易にするためにファージ、ファージミド、リボソームまたは好適な微生物（例えば、酵母）上に展示することができる。アミノ酸配列（のセット、コレクションまたはライブラリー）を展示およびスクリーニングするために好適な方法、技術および宿主生物は、当業者には自明である（例えば、Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, Academic Press; 第1版(1996年10月28日) Brian K. Kay, Jill Winter, John McCafferty参照）。

【0438】

V_Hドメインを含む、本明細書に記載の結合分子は、トランスジェニック齧歯類で発現させることができる。トランスジェニック齧歯類、例えば、マウスは、内因性抗体遺伝子の発現能が低減されていてもよい。よって、1つの実施形態では、齧歯類は、内因性の軽鎖および／または重鎖抗体遺伝子の発現能が低減されている。従って、この齧歯類は、機能的な軽鎖および／または重鎖が産生されないように内因性の軽鎖および／または重鎖抗体遺伝子の発現を破壊するための修飾を含んでなり得る。

【0439】

ヒトPSMAと結合し得るヒト重鎖単独抗体は、

a) 非再構成ヒト重鎖V遺伝子を含んでなる核酸構築物を発現しかつ機能的内因性軽鎖または重鎖を生成できないトランスジェニック齧歯類をPSMA抗原で免疫すること、

b) ヒト重鎖単独抗体を単離すること
を含んでなる方法によって産生され得る。

【0440】

V_Hドメインは、

a) ヒト重鎖V遺伝子を含んでなる核酸構築物を発現しかつ機能的内因性軽鎖または重鎖を生成できないトランスジェニックマウスをPSMA抗原で免疫すること、

b) 前記マウス由来のV_Hドメイン配列を含んでなる配列のライブラリーを作製すること、および

c) 前記ライブラリーからV_Hドメイン配列を含んでなる配列を単離すること
を含んでなる方法によって生産され得る。

【0441】

さらなる工程は、例えば、実施例に示されるような機能アッセイを用いることによって、ヒトPSMAと結合する単一V_Hドメイン抗体または重鎖単独抗体を同定することを含み得る。

【0442】

1つの実施形態では、齧歯類はマウスである。マウスは、非機能的内因性λ軽鎖遺伝子座を含んでなり得る。よって、マウスは、機能的内因性λ軽鎖を生成しない。1つの実施形態では、λ軽鎖遺伝子座は、部分的もしくは完全に欠失されるか、または挿入、逆位、組換え事象、遺伝子編集もしくは遺伝子サイレンシングを介して非機能的とされる。例えば、少なくとも定常領域遺伝子C1、C2およびC3が、欠失されてもよいし、または上記のように挿入もしくはその他の修飾を介して非機能的とされてもよい。1つの実施形態では、マウスが機能的λ軽鎖を生成しないように遺伝子座が機能的にサイレンシングされる。

【0443】

さらに、マウスは、非機能的内因性κ軽鎖遺伝子座を含んでなってもよい。よって、マウスは機能的内因性κ軽鎖を生成しない。1つの実施形態では、κ軽鎖遺伝子座は、部分的もしくは完全に欠失されるか、または挿入、逆位、組換え事象、遺伝子編集もしくは遺伝子サイレンシングを介して非機能的とされる。1つの実施形態では、マウスが機能的κ軽鎖を生成しないように遺伝子座が機能的にサイレンシングされる。

【0444】

内因性 λ および κ L鎖遺伝子座が機能的にサイレンシングされているマウスは、例えば、引用することによりその全内容が本明細書の開示の一部とされるWO2003/000737に開示されているように作出され得る。

【0445】

さらに、マウスは、非機能的内因性重鎖遺伝子座を含んでなってもよい。よって、マウスは、機能的内因性重鎖を生成しない。1つの実施形態では、重鎖遺伝子座は、部分的もしくは完全に欠失されるか、または挿入、逆位、組換え事象、遺伝子編集もしくは遺伝子サイレンシングを介して非機能的とされる。1つの実施形態では、マウスが機能的重鎖を生成しないように遺伝子座が機能的にサイレンシングされる。

【0446】

例えば、WO2004/076618（引用することによりその全内容が本明細書の開示の一部とされる）に記載されるように、8つの内因性重鎖定常領域免疫グロブリン遺伝子（ μ 、 δ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 1$ 、 $y 2 a$ 、 $y 2 b$ 、 ϵ および a ）の総てがマウスに存在しないか、またはそれらが非機能的となる程度まで部分的に存在せず、または遺伝子 δ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 1$ 、 $y 2 a$ 、 $y 2 b$ および ϵ が存在せずに、隣接遺伝子の μ および a がそれらが非機能的となる程度まで部分的に存在せず、または遺伝子 μ 、 δ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 1$ 、 $y 2 a$ 、 $y 2 b$ および ϵ が存在せずに、 a がそれが非機能的となる程度まで部分的に存在せず、または δ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 1$ 、 $y 2 a$ 、 $y 2 b$ 、 ϵ および a が存在せずに、 μ がそれが非機能的となる程度まで部分的に存在しない。部分的欠失とは、機能的内因性遺伝子産物がその遺伝子座によってコードされない、すなわち、その遺伝子座から機能的産物が発現されない程度まで、例えば、挿入によって、内因性遺伝子座の遺伝子配列が欠失または破壊されていることを意味する。別の実施形態では、遺伝子座は機能的にサイレンシングされる。

【0447】

1つの実施形態では、マウスは、非機能的内因性重鎖遺伝子座、非機能的内因性 λ 軽鎖遺伝子座および非機能的内因性 κ 軽鎖遺伝子座を含んでなる。従って、マウスは、機能的内因性軽鎖または重鎖を産生しない。よって、このマウスはトリプルノックアウト（TKO）マウスである。

【0448】

トランスジェニックマウスは、異種重鎖遺伝子座を発現するためのベクター、例えば、酵母人工染色体（YAC）を含んでなってもよい。YACは、酵母において非常に大きなDNA挿入をクローニングするために使用可能なベクターである。天然酵母染色体のように挙動するために不可欠な3つのシス作用構造エレメント（自立複製配列（ARS）、セントロメア（CEN）および2つのテロメア（TEL））の総てを含んでなるとともに、それらの大きなDNA挿入の許容能は、それらを染色体様の安定性および酵母細胞における伝達の忠実性のために必要とされる最小サイズ（150 kb）に到達させることを可能とする。YACの構築および使用は当技術分野で周知である（例えば、Bruschi, C.V. and Gjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, Encyclopedia of Life Sciences, 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net）。

【0449】

例えば、YACは、過多のヒト V_H 、DおよびJ遺伝子を、 $C_H 1$ ドメインを欠くマウス免疫グロブリン定常領域遺伝子、マウスエンハンサーおよび調節領域と組み合わせて含んでなり得る。

【0450】

内因性マウスまたはラット免疫グロブリン遺伝子の欠失または不活性化およびヒト V_H 、DおよびJ遺伝子と、 $C_H 1$ ドメインを欠くマウス免疫グロブリン定常領域遺伝子、マウスエンハンサーおよび調節領域との組合せの挿入のために、当技術分野で公知の別法を用いてもよい。

【0451】

トランスジェニックマウスは、実施例に示されるような標準的技術に従って作出することができる。トランスジェニックマウスを作出するための2つの最も特徴付けられた経路

は、新しく受精した卵母細胞への遺伝物質の前核マイクロインジェクションを介するもの、または桑実胚もしくは胚盤胞段階の胚への安定トランスフェクト胚性幹細胞の導入を介するものである。どのようにして遺伝物質が導入されたかによらず、操作された胚は偽妊娠雌レシピエントに移植され、そこで妊娠を継続し、候補トランスジェニック仔が産まれる。

【0452】

これらの広範な方法の間の主要な違いは、ESクローンは、トランスジェニック動物を作出するためのそれらの使用の前に徹底的にスクリーニングできることである。これに対して、前核マイクロインジェクションは、その導入後の宿主ゲノムへの遺伝物質の組み込みに頼り、一般的に言えば、導入遺伝子の組み込みの成功は、子が産まれる後まで確認できない。

10

【0453】

導入遺伝子の組み込みの成功を補助する、および導入遺伝子の組み込みの成功が見られるか否かを決定する両方のために、当技術分野で公知の多くの方法が存在する。トランスジェニック動物は、構築物のゲノムへばランダムな組み込み、部位特異的組み込み、または相同組換えを含む複数の手段によって作出することができる。導入遺伝子組み込みならびに薬物耐性マーカー（正の選択）、リコンビナーゼ、組換え媒介カセット交換、負の選択技術、および組換え効率を改善するためのヌクレアーゼの使用を含むその後の修飾のための駆動および選択の両方を目的として使用可能な種々のツールおよび技術が存在する。これらの方法のほとんどのものはES細胞の修飾において慣用されている。しかしながら、これらの技術のいくつかは、前核注入により媒介される遺伝子導入を促進するために有用性を持ち得る。

20

【0454】

所望のバックグラウンド内でトランスジェニック系統のより効率的な作出を得るためにさらなる精密化が使用可能である。上記のように、好ましい実施形態では、創薬に利用可能な重鎖単独レパートリーの発現のために導入された導入遺伝子の単独使用を可能とするために、内因性マウス免疫グロブリン発現がサイレンシングされる。遺伝子操作マウス、例えば、総ての内因性免疫グロブリン遺伝子座（マウス重鎖、マウスκ鎖およびマウスλ鎖）がサイレンシングされたTKOマウスが上記のように使用可能である。導入された導入遺伝子のTKOバックグラウンドへの移入は、育種（従来またはプロセスの効率的なスクリーニングを得るためにIVF工程を含めた）を介して達成され得る。しかしながら、遺伝子導入手順にTKOバックグラウンドを含めることも可能である。例えば、マイクロインジェクションのために、卵母細胞がTKOドナーから誘導されてもよい。同様に、TKO胚由来のES細胞を遺伝子導入する使用するために誘導することもできる。導入遺伝子が導入されたトリプルノックアウトマウスは本明細書ではTKO/Tgと呼称する。1つの実施形態では、マウスは、WO 2016/062990に記載の通りである。

30

【0455】

本発明の別の態様では、本発明によるPSMA結合分子と場合により薬学的に許容可能な担体とを含んでなる医薬組成物が提供される。本発明の結合分子または組成物は、いずれの都合のよい経路によって投与することもできる。これらの化合物は、経口投与および非経口投与を含むいずれの経路によって投与してもよい。非経口投与には、例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、腹腔内、鼻腔内、直腸、膀胱内、皮内、局所的または皮下投与が含まれる。組成物は1以上の投与単位の形態を採り得る。

40

【0456】

本発明の組成物は、液体、例えば、溶液、エマルションまたは懸濁液の形態であり得る。液体は、注射、注入（例えば、IV注入）または皮下による送達に有用であり得る。本発明の液体組成物は、それらが溶液であれ、懸濁液であれ、または他の同様の形態であれ、以下の1以上も含み得る：水、塩水、好ましくは、生理食塩水、リンゲル溶液、等張性塩化ナトリウム、硬化油（例えば、合成モノまたはジグリセリド）、ポリエチレングリコール、グリセリン、またはその他の溶媒などの無菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメ

50

チルパラベンなどの抗菌剤；および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張力調整剤。組成物は、ガラス、プラスチックまたは他の材質から製造されたアンプル、使い捨てシリンジまたは多用量バイアル中に封入することができる。

【0457】

特定の実施形態では、本発明の1以上の結合分子または組成物を、治療の必要な領域に局所的に、または静脈注射または注入によって投与することが望ましい場合がある。

【0458】

特定の障害または病態の治療において効果的／有効な本発明の結合分子の量は、その障害または病態の性質によって異なり、標準的臨床技術によって決定することができる。加えて、最適な用量範囲を特定する助けとして場合により *in vitro* または *in vivo* アッセイを使用することもできる。その組成物中で使用される正確な用量はまた投与経路、および疾患または障害の重篤度によっても異なり、医師の判断および各患者の状況に応じて決定されるべきである。

【0459】

本発明の組成物は、有効量の本発明の結合分子を含んでなり、その結果、好適な用量が取得される。これらの化合物の適正な用量は、特定の処方物、適用様式、およびその特定の部位、宿主および処置される疾患によって異なる。年齢、体重、性、食餌、投与時間、排泄速度、宿主の状態、薬物組合せ、反応感受性および疾患の重篤度のような他の因子も考慮するべきである。投与は、最大耐用量内で連続的または周期的に行うことができる。

【0460】

一般に、この量は、組成物の重量により少なくとも約0.01%の本発明の結合分子である。

【0461】

本発明の好ましい組成物は、非経口投与単位が約0.01%～約2重量%の本発明の結合分子を含有するように調製される。

【0462】

静脈投与では、組成物は、一般に約0.1mg/kg～約250mg/kg動物体重、好ましくは、約0.1mg/kg～約20mg/kg動物体重の間、より好ましくは、約1mg/kg～約10mg/kg動物体重を含んでなり得る。

【0463】

本組成物は、エアロゾル、スプレー、懸濁液、または使用に好適な他の任意の形態などの好適な担体の形態と採り得る。好適な医薬担体の他の例は、E. W. Martinによる "Remington's Pharmaceutical Sciences" に記載されている。

【0464】

医薬組成物は、製薬技術で周知の方法論を用いて調製することができる。例えば、注射により投与することが意図される組成物は、本発明の結合分子を水と合わせて溶液を形成することによって調製することができる。均質な溶液または懸濁液の形成を助けるために界面活性剤を添加することができる。

【0465】

本発明さらに、本発明の結合分子を患者に投与することを含んでなる、癌、特に、前立腺癌の予防および／または治療のための方法に関し、前記方法は、それを必要とする対象に、薬学的に有効な量の本発明の結合分子および／または医薬組成物を投与することを含んでなる。特に、本発明は、癌、特に、前立腺癌の予防および／または治療の方法に関し、前記方法は、それを必要とする対象に、薬学的に有効な量の本発明の結合分子または医薬組成物を投与することを含んでなる。

【0466】

本発明はまた、疾患の治療において使用するための本発明の結合分子に関する。本発明はまた、癌、特に、前立腺癌または前立腺障害の治療において使用するための本発明の結合分子に関する。「前立腺癌」は、前立腺の組織から生じるあらゆる病期およびあらゆる形態の癌を意味する。本発明はまた、PSMAの異常な発現を特徴とする疾患の治療に関

10

20

30

40

50

する。

【0467】

別の態様では、本発明は、疾患の治療における本発明の結合分子の使用に関する。別の態様では、本発明は、癌、特に、前立腺癌または前立腺障害の治療のための薬剤の製造における本発明の結合分子の使用に関する。

【0468】

本発明の結合分子はまた、癌、特に、前立腺癌または前立腺障害の治療、予防、または改善にも有用である。前立腺障害とは、雄性生殖器の前立腺を侵すいずれの疾患も意味する。前立腺は、精巣のホルモン分泌に依存する。PSMAの発現は、他の癌で、より具体的には、これらの癌に関連する新生血管で検出されている。通常型（淡明細胞型）腎細胞癌、膀胱の移行上皮細胞、精巣-胎児性、神経内分泌、結腸、および乳房を含む広範な癌腫、ならびに種々のタイプの悪性腫瘍が、それらの新生血管でPSMAを一貫して強く発現することが見出されている。

【0469】

本発明の結合分子は、単独の有効成分として投与してもよいし、または1以上の他の治療部分および／または細胞傷害性部分と組み合わせて投与してもよい。1つの実施形態では、結合分子は、毒性部分とコンジュゲートしてもよい。

【0470】

前立腺障害、例えば、前立腺癌の療法では、抗PSMA結合分子は、既存の療法と組み合わせて使用可能である。1つの実施形態では、単ドメイン抗体は、既存の療法または治療薬、例えば、抗癌療法と組み合わせて使用される。よって、別の態様では、本発明はまた、本発明の単ドメイン抗体または医薬組成物の投与と抗癌療法を含んでなる併用療法に関する。抗癌療法は治療薬または放射線療法を含んでよく、遺伝子療法、ウイルス療法、RNA療法、骨髄移植、ナノ療法、標的抗癌療法または腫瘍溶解薬を含む。他の治療薬の例としては、他のチェックポイント阻害剤、抗悪性腫瘍剤、免疫剤、弱毒癌性細胞、腫瘍抗原、腫瘍由来抗原または核酸でパルスした樹状細胞などの抗原提示細胞、免疫刺激サイトカイン（例えば、IL-2、IFN α 2、GM-CSF）、標的化小分子および生体分子（例えば、シグナル伝達経路の成分、例えば、チロシンキナーゼの調節剤および受容体チロシンキナーゼの阻害剤、ならびにEGFRアンタゴニストを含む、腫瘍特異的抗原と結合する薬剤）、抗炎症剤、細胞傷害性薬剤、放射性毒性剤、または免疫抑制剤および免疫刺激サイトカイン（例えば、GM-CSF）をコードする遺伝子でトランスフェクトされた細胞、化学療法を含む。1つの実施形態では、単ドメイン抗体は、手術と組み合わせて使用される。本発明の結合分子は、他の療法と同じ時点または異なる時点で、例えば、同時に、個別にまたは逐次に投与され得る。

【0471】

別の態様では、本発明は、本発明の結合分子を含んでなる、診断、治療、予後または経過観察のために前立腺癌を検出するためのキットを提供する。キットはまた、使用説明書も含んでなり得る。キットは、標識された上記のような本発明の結合分子と標識を検出するための1以上の化合物を含み得る。本発明は、別の態様において、凍結乾燥形態でパッケージされた、または水性媒体中でパッケージされた本発明の結合分子を提供する。

【0472】

本発明はまた、本発明の結合分子を使用する検出方法に関する。ヒトPSMAと結合するそれらの能力を考えれば、本明細書に開示されるヒトPSMA結合分子は、従来のイムノアッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）または組織免疫組織化学を用いてPSMA（例えば、血清または血漿などの生体サンプル中）を検出するために使用可能である。特に、本発明はまた、癌、特に、前立腺癌の進行を診断または経過観察するためのin vitroまたはin vivo法に関する。in vitro法は、試験サンプル中でPSMAタンパク質の存在を検出すること、およびこれを正常対象からの対照サンプルまたは正常対象の標準値もしくは標準値範囲と比較することを含んでなる。これらのサンプルは、血液、血漿、血清、精液、尿ま

たは組織生検から選択され得る。

【0473】

本方法は、(a) サンプル（および場合により、参照、例えば、陽性および／または陰性対照サンプル）を本発明のPSMA結合分子と接触させること、および(b) サンプル中のPSMAと結合した結合分子または結合していない結合分子のいずれかを検出し、それにより生体サンプル中のPSMAを検出することを含み得る。結合分子は、結合したまたは結合していない抗体の検出を容易にするために検出可能な物質で直接または間接的に標識することができる。好適な検出可能な物質としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光物質および放射性物質が含まれる。

【0474】

本発明はまた、前記結合分子を標識することによって本発明のPSMA結合分子の内部移行を評価するためのアッセイに関する。このようなアッセイは例に記載されている。

【0475】

in vivo法は、例えば、対象におけるイメージングによりin vivoでPSMAの存在を検出することを含んでなり得る。この方法では、本発明のPSMA結合分子は、結合を検出するために標識される。

【0476】

本発明の結合分子を標識するための別法として、検出可能な物質で標識したPSMA標準と非標識ヒトPSMA結合分子を使用する競合イムノアッセイによって、体液中でヒトPSMAをアッセイすることができる。このアッセイでは、生体サンプル、標識されたPSMA標準およびヒトPSMA結合分子を合わせ、非結合分子に結合した標識PSMA標準の量を決定する。生体サンプル中のヒトPSMAの量は、PSMA結合分子に結合した標識PSMA標準の量に反比例する。同様に、検出可能な物質で標識したPSMA標準と非標識ヒトPSMA結合分子を使用する競合イムノアッセイによって、体液中でヒトPSMAをアッセイすることもできる。

【0477】

本明細書に開示される結合分子は、例えば、PSMAを含有する細胞培養物、ヒト対象、または本明細書に開示される結合分子が交差反応するPSMAを有する他の哺乳動物対象において、PSMA活性を阻害するために使用することができる。1つの実施形態では、PSMAを本明細書に開示される結合分子と接触させることを含んでなり、その結果、PSMA活性が阻害または増強される、PSMA活性を阻害または増強するための方法が提供される。例えば、PSMAを含有する、または含有が疑われる細胞培養物において、本明細書に開示される結合分子を、その培養物においてPSMA活性を阻害するために培養培地に添加することができる。

【0478】

よって、1つの実施形態では、本発明はまた、PSMAを発現する細胞、例えば、癌性または非癌性前立腺細胞を除去するまたは死滅させる方法に関する。本発明の方法は、細胞を本発明のPSMA結合分子と、前記細胞の除去または死滅化に十分な量で接触させることを含む。これらの方法は、例えば、in vitroまたはex vivoで培養中の細胞に対して使用することができる。

【0479】

本明細書でそうではないことが定義されない限り、本開示に関して使用される科学用語および技術用語は、当業者により一般に理解されている意味を持つ。以上の開示で、本発明を作製および使用する方法ならびにそれらの最良の様式を含め、本発明の範囲内に包含される対象の全般的説明を提供するが、さらに当業者が本発明を実施できるよう、また、その完全な記述的説明を提供するために下記の実施例を示す。しかしながら、当業者は、これらの実施例の明細が本発明の限定として読み取られるべきでなく、その範囲は本開示に付属する特許請求の範囲およびその等価物から理解されるべきであることを認識するであろう。本発明の種々のさらなる態様および実施形態は、本開示に照らして当業者に自明である。

10

20

30

40

50

【0480】

本明細書に記載される総ての文献は、遺伝子受託番号の参照を含め、引用することによりその全内容が本明細書の開示の一部とされる。

【0481】

「および／または」は、本明細書で使用する場合、2つの明示された特徴または成分のそれぞれの、他を伴うまたは伴わない具体的開示として理解されるべきである。例えば、「Aおよび／またはB」は、それぞれが本明細書に個々に示されているかのごとくの(i) A、(ii) Bおよび(iii) AおよびBのそれぞれの具体的開示と理解されるべきである。文脈がそうではないことを示さない限り、上記に示される特徴の記載および定義は本発明のいずれの特定の態様または実施形態にも限定されず、記載される総ての態様および実施形態に等しく当てはまる。

10

【0482】

本発明を限定されない例でさらに説明する。

【実施例】

【0483】

実施例1. Tg/TKOマウスの構築

内因性重鎖および軽鎖抗体発現に関してサイレンシングされた(トリプルノックアウトまたはTKO)バックグラウンド内の生殖細胞系構成中に重鎖抗体トランスジェニック遺伝子座)を有するマウスを従前に記載のように作出した(WO2004/076618およびWO2003/000737、Ren et al., Genomics, 84, 686, 2004; Zou et al., J. Immunol., 170, 1354, 2003)。簡単に述べれば、トランスジェニックマウスは、新しく受精した卵母細胞卵母細胞の、過多のヒトV_H、DおよびJ遺伝子を、C_H1ドメインを欠くマウス免疫グロブリン定常領域遺伝子、マウスエンハンサーおよび調節領域と組み合わせ含んでなる酵母人工染色体(YAC)による前核マイクロインジェクションの後に誘導された。酵母人工染色体(YAC)は、酵母における非常に大きなDNA挿入のクローニングのために使用可能なベクターである。天然酵母染色体のように挙動するために不可欠な3つのシス作用構造エレメント(自立複製配列(ARS)、セントロメア(CEN)および2つのテロメア(TEL))の総てを含んでなるとともに、それらの大きなDNA挿入の許容能は、それらを染色体様安定性および酵母細胞における伝達の忠実性のために必要とされる最小サイズ(150 kb)に到達させることを可能とする。YACの構築および使用は当技術分野で周知である(例えば、Bruschi, C.V. and Gjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, Encyclopedia of Life Sciences, 2002, Macmillan Publishers Ltd., Nature Publishing Group / www.els.net)。

20

30

【0484】

これらのトランスジェニック創始マウスを、内因性免疫グロブリン発現を欠いた動物に戻し交配して、記載の免疫研究で使用されるTg/TKO系統を作出した。

【0485】

実施例2. 免疫のための抗原

免疫には組換え精製タンパク質またはヒト細胞株LNCaPを使用した。組換えヒトPMSAはR&D(カタログ番号4234-ZN)から購入し、LNCaP細胞はSigma Aldrich(カタログ番号89110211-1V_L)から購入した。

40

【0486】

実施例3. 免疫プロトコール

簡単に述べれば、8~12週齢のTg/TKOマウスのそれぞれに、フロイントの完全アジュバントに乳化させ皮下送達する合計50 μgの組換え精製ヒトPMSAタンパク質、または腹膜内送達するPBS中1000万個のLNCaP細胞を施し、その後、これもまた皮下に投与されるフロイントの不完全アジュバントに乳化させた1~10 μgの組換えタンパク質を、初期プライミングの後に種々の間隔で与えて追加免疫を行った。最終用量の組換え精製ヒトPMSAタンパク質抗原は、アジュバントの不在下、リン酸緩衝生理食塩水中で腹膜内投与した。

50

【0487】

別の免疫経路および手順も使用可能である。例えば、フロイントのアジュバントの代わりに異なるアジュバントまたは免疫増強手順を使用してもよい。DNA免疫は筋肉内または遺伝子銃を介して送達される場合が多い。腹膜内投与されるトランスフェクト細胞またはそのような細胞からの膜調製物が、排他的ではないが多い。

【0488】

実施例4. 血清ELISA

免疫中およびその後に、マウスから血清を回収し、免疫原に対する重鎖抗体応答の存在をELISAによって確認した。Nunc Maxi sorpプレート（Nuncカタログ番号443404）を4℃にて一晚、50μl/ウェルの1μg組換え抗原/PBS溶液mlでコーティングした。抗原溶液のデカンテーションの後、0.05%（v/v）ツィーン（商標）20（Sigma P1379）を添加したPBS（PBS錠剤、オキソイドカタログ番号BR0014Gから調製）を用いてプレートを洗浄した後、ツィーン20を添加しないPBSで洗浄した。非特異的タンパク質相互作用をブロッキングするために、PBS中3%（w/v）脱脂粉乳（Marvel（商標））の溶液をウェルに加え、これらのプレートを少なくとも1時間室温でインキュベートした。3%Marvel（商標）/PBS中の血清の希釈液をポリプロピレンチューブまたはプレートに調製し、少なくとも1時間室温でインキュベートした後、ブロッキングしたELISAプレートに移し、そこでさらに少なくとも1時間インキュベーションを行った。次に、結合していないタンパク質を、PBS/ツィーン20、次いでPBSでの反復洗浄を用いて洗い流した。次に、PBS/3%Marvel中に調製したビオチンコンジュゲートヤギ抗マウスIgG、Fcγサブクラス1特異的抗体（Jacksonカタログ番号115-065-205）の溶液を各ウェルに加え、さらに室温で少なくとも1時間インキュベーションを行った。結合していない検出抗体を、PBS/ツィーン20およびPBSを用いて反復洗浄することによって除去した。次に、3%Marvel/PBS中、ニュートラビジン-HRP溶液（Pierceカタログ番号31030）をELISAプレートに加え、少なくとも30分間結合させた。さらなる洗浄後、ELISAを、TMB基質（Sigmaカタログ番号T0440）を用いて現像し、10分後に0.5M H₂SO₄溶液（Sigmaカタログ番号320501）の添加によって反応を停止させた。吸光度を、450nmでの光学密度を読み取ることによって決定した。免疫により誘導される重鎖抗体応答を確認するために、ELISPOTアッセイなどの別のアッセイも使用可能である。

【0489】

実施例5. 免疫マウスからのライブラリーの作製

a) 組織の処理、RNA抽出およびcDNA作製

各免疫動物から脾臓、鼠径部および上腕リンパ節をRNAlate（商標）へ回収した。各動物に関して、脾臓および4つのリンパ節の1/2を別個に処理した。まず、組織をホモジナイズし、組織をライジングマトリックスDビーズチューブ（MP Bio. カタログ番号116983001）に移した後、β-メルカプトエタノールを含有する600μlのRLTバッファー（Qiagen RNeasy（商標）キットから カタログ番号74104）を加え、その後、MP Bio Fast prep 96ホモジナイザー（カタログ番号116010500）にて1600rpmで60秒間ホモジナイゼーションを行った。ホモジナイズ組織を含有するチューブを氷中に移し、1200rpmで5分間の遠心分離によって残渣をペレットとした。400μlの上清サンプルを取り出し、RT-PCRに使用した。

【0490】

まず、製造者のプロトコールに従ってQiagen RNeasy（商標）キット（カタログ番号74104）を用いてRNAを抽出した。次に、各RNAサンプルを用い、スーパースク립トIII RT-PCR high-fidelityキット（Invitrogenカタログ番号12574-035）を用いてcDNAを作製した。各脾臓およびリンパ結節RNAサンプルについて、V_H-J/F（長鎖）プライマーをV_H1、V

$V_H 2$ 、 $V_H 3$ 、 $V_H 4$ または $V_H 6$ 系列のプライマーと組み合わせて用い、5回のRT-PCR反応を行った。これらのプライマーの詳細は以下の通りである。

【0491】

【表16】

表 16. V_{H10} のプライマー

V1a/pelB (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTBCA GCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGG 配列番号 491
V2/pelB (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGATCAC CTTGAAGGAGTCTGG 配列番号 492
V3/pelB (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAGGTGCA GCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG 配列番号 493
V4- 4/pelB (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGC AGCTGCAGGAGTCGGG 配列番号 494
V6/pelB (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTACA GCTGCAGCAGTCAGG 配列番号 495
VH_J/F (長鎖)	CCGTGGTGATGGTGGTGATGGCTACCGCCACCCTCGAGTGARGAGACRG TGACC 配列番号 496

太字の残基は pUCG3 と相同性を有する。

【0492】

10

20

【表 17】

表 17. V23 のプライマー

VH1-2 (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGC AGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGG 配列番号 497
VH1-3 (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTCC AGCTCGTGCAGTCTGGGGCTGAGG 配列番号 498
VH1-18 (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTTC AGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGG 配列番号 499
VH1-24 (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTCC AGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGG 配列番号 500
VH2 (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGRTCA CCTTGAAGGAGTCTGG 配列番号 501
VH3-7 (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGC AGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG 配列番号 502
VH3-9 (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAAGTGC AGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG 配列番号 503
VH3-11 (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGC AGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG 配列番号 504
VH3-23 (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGC AGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGG 配列番号 505
VH3-23 (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGC AGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGG 配列番号 506
VH4-4 (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGC AGCTGCAGGAGTCGGG 配列番号 507
VH4-34 (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGC AGCTACAGCAGTGGGGC 配列番号 508
VH6-1 (長鎖)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTAC AGCTGCAGCAGTCAGG 配列番号 509
VH_J/F (長鎖)	CCGTGGTGATGGTGGTGGTACCGCCACCCTCGAGTGARGAGACRG TGACC 配列番号 510

太字の残基は pUCG3 と相同性を有する。

【0493】

縮重プライマーに対するヌクレオチドの選択枝のコードを以下に示す。

R A、G
Y C、T
M A、C
K G、T
S C、G
W A、T
B C、G、T
V A、C、G

D A、G、T

N A、C、G、T

【0494】

R T-P C R 反応のために、下記の試験管反応成分に基づきマスターミックスを調製した。：

12.5 μ l 2倍反応混合物

0.5 μ l フォワードプライマー (10 μ M)

0.5 μ l リバースプライマー (10 μ M)

0.5 μ l 酵素混合物

500 ng-1 μ g RNA

水で25 μ l まで

10

【0495】

R T-P C R 反応は、サーマルサイクラーにて下記の条件を用いて行った：

55 $^{\circ}$ C 20分

94 $^{\circ}$ C 2分

35サイクルの94 $^{\circ}$ C 15秒

58 $^{\circ}$ C 30秒

68 $^{\circ}$ C 30秒

68 $^{\circ}$ C 5分

4 $^{\circ}$ Cで保持

20

【0496】

370 bp の範囲の産物をゲル電気泳動により確認した。

次に、各マウスについて、1/2の脾臓および各4リンパ節からの所与の系列に関して増幅されたV_H産物を、製造者の説明書に従って使用したThermo/Fermentas GeneJet PCR精製キット（カタログ番号K0702）を用いる精製のためにプールし、50 μ lの水中に産物が溶出された。

【0497】

a) ファージミドベクターへのクローニング

ファージミドベクターpUCG3をこれらの研究に使用した。PCRに基づく方法を用いて、増幅されたV_H配列からV_Hファージミドライブラリーを構築した。以下の手順を用いた：

30

下記のプライマーとともにPCRを用い、線状化型のpUCG3を作製した：

【化100】

pUCG3-pHENAPmut4 GGCCATGGCCGGCTGGGCCGCGAG 配列番号511

pUCG3-pHENAPmut5mycHis

TCATCGAGGGTGGCGAGCGAACAAAACTCATCTCAGAAGAATCTGAATCATCACACAT

CACACGGGAGCTAGACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACC 配列番号512

40

【0498】

下記の試薬を含んでなるPCR反応に、Phusion High fidelity PCRマスターミックスをGCバッファー（カタログ番号F532L、NEB）とともに用いた：

Phusion GC 2倍混合物 25 μ l

pUCG3 5~10 ng

プライマー (10 μ M) 各1.25 μ l

DMSO 1.5 μ l

ヌクレアーゼ不含H₂O 終容量50 μ l まで

【0499】

50

使用したサイクル条件は以下であった。：

98℃30秒

10サイクルの

98℃10秒

58℃20秒

68℃2分、30秒

20サイクルの

98℃10秒

58℃20秒

68℃3分

68℃5分

4℃保持

【0500】

PCR産物（3152bp）を、GeneJetゲル精製キット（カタログ番号K0691）を製造者の説明書に従って用いてゲル精製し、最終的に40μlの溶出バッファー中に溶出した。

【0501】

精製したV_H RT-PCR産物をメガプライマーとして、線状化したpUCG3ともに使用し、下記の反応に基づき、形質転換およびライブラリー作製のためのファージミド産物を得た。

Phusion GC 2倍混合物 25μl

線状化pUCG3 800ng

V_H PCR産物 200ng

DMSO 1.5μl

ヌクレアーゼ不含H₂O 終用量50μlまで

【0502】

PCRは次のように行った：

【表18】

98℃30秒

98℃10秒

58℃20秒

72℃2分

72℃5分

10℃で保持

10サイクル

【0503】

PCRの産物を1%（w/v）アガロースゲルで分析した。

【0504】

種々の系列V_H/ファージミド産物を、PCR精製キット（カタログ番号K0702）を製造者の説明書に従って用いて精製し、最終溶出は25μl H₂O中であり、この溶出液をBio-Rad GenePulser Xcell内のBioRad 2×0.2cmキュベット（BioRadカタログ番号165-2086）および予温した回復培地（Lucigen、特許混合物）を用いたエレクトロポレーションによるTG1大腸菌（Lucigen、カタログ番号60502-2）の形質転換のために使用した。22μlの精製産物をエレクトロポレーションのために160μlの細胞に加え、各V_H/ファージミド産物について2000vで2回のエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーション済みの細胞をプールし、50ml Falconチューブで回復させ、150rpmで振盪しながら37℃で1時間インキュベートした。形質転換アリコートの10

10

20

30

40

50

倍希釈を行い、2% (w/v) グルコースおよび100 μg/ml アンピシリンを添加した2倍TY寒天を含有するペトリ皿に播種した。生じたこれらのペトリ皿上のコロニーを用いてライブラリーサイズを評価した。形質転換の残りのものを、2% (w/v) グルコースおよび100 μg/ml アンピシリンを添加した2倍TY寒天を含有する大形式のバイオアッセイディッシュに播種した。総ての寒天プレートを一晩30℃でインキュベートした。10 mlの2×TY培養液を大形式のバイオアッセイディッシュに加え、コロニーを崩し、OD₆₀₀を測定した(1.0 = 5 × 10⁸ 細胞/mlのOD)。アリコートは、50% (v/v) グリセロール溶液の添加の後に、クリオバイアルにて-80℃で保存するか、または直接ファージ選択プロセスに使用した。

【0505】

10

実施例6. P S M A 結合剤の単離のための選択戦略

ライブラリーファージストックの作製およびファージディスプレイ選択は、公開されている方法(Antibody Engineering, Benny Lo編, chapter 8, p161-176, 2004)に従って行った。ほとんどの場合、パンニングアプローチと組み合わせたファージディスプレイを用いて結合V_Hドメインを単離した。しかしながら、可溶性選択およびストレス(例えば、加熱)下で行われる選択を含む、様々な異なる選択方法が当技術分野において十分に記載されている。また、抗P S M A V_Hの内部移行を増進するための選択も一価および多価ファージを用いて行われた(特許US 2009 170792 (A1) - 2009-07-02)。簡単に述べれば、氷冷細胞培地中でブロックしたファージを、2.5 × 10⁶ L n C A P細胞を含有する4 ml 氷冷細胞培地に加えた。ファージおよび細胞を、細胞の塊状化を防ぐために時々混合しながら氷上で2時間インキュベートした。結合していないまたは結合の弱いファージを、氷冷PBS中で5回洗浄することによって除去した。次に、ファージを、細胞を培地中、37℃でインキュベートすることによって内部移行させた後、細胞の外側に結合したファージを、低pHの細胞ストリッピングバッファー中4℃で5分の洗浄工程で除去した。次に、これらの細胞を、トリメチルアミンを用いて溶解させて内部移行したファージを採取した。ストリッピング画分と内部移行画分の両方をトリスバッファーで中和した後、大腸菌(E.coli)感染に用いた。ファージ生産物を、組換えタンパク質でのパンニング選択に関して記載したように分析した。

20

【0506】

実施例7. 標的結合のためのアッセイ

30

P M S Aと結合し得る特異的V_Hを同定するために、種々の選択からのV_Hを下記のアッセイのうち1以上でスクリーニングした。

【0507】

a) 結合E L I S A

ライブラリーの選択後、特異的V_H抗体を、(Antibody Engineering, Benny Lo編, chapter 8, p161-176, 2004)に従ってファージE L I S Aによって同定した。標的タンパク質および対照としての無関連抗原に対してファージE L I S Aを行った。いくつかの場合では、V_Hドメインの精製または未精製抽出物を、ファージE L I S Aを用いる代わりにE L I S Aによってアッセイした。これらの場合では、細菌原形質周辺抽出物または精製V_Hを使用した。

40

【0508】

小規模細菌原形質周辺抽出物を、ディープウェルプレートで増殖させた1 mlの培養から調製した。開始培養物を用い、37℃、250 rpmで振盪しながら、0.1% (w/v) グルコース+100 μg/ml アンピシリンを添加した2倍TY培養液(M e l f o r dカタログ番号M2130)を含有する96ウェルディープウェルプレート(フィッシャー、カタログ番号M P A - 600 - 030X)に接種した。OD₆₀₀が0.6~1に達した際に、I P T G(終濃度1 mM)およびアンピシリンを添加した100 μlの2倍TYを添加することによってV_H生産を誘導し、培養物を250 rpmで振盪しながら30℃で一晩増殖させた。3200 rpmで10分間の遠心分離によって大腸菌をペレットとし、上清を廃棄した。細胞ペレットを穏やかなピペット操作により30~100 μlの

50

氷冷抽出バッファー（20%（w/v）スクロース、1mM EDTAおよび50mM トリス-HCl pH8.0）に再懸濁させた。細胞を氷上で30分間インキュベートした後、4℃にて15分間4500rpmで遠心分離した。上清をポリプロピレンプレートに移し、Marvel/PBSブロッキング溶液中でのインキュベーション後に、ELISAに使用した。

【0509】

原形質周辺抽出物のNi-NTAアフィニティークロマトグラフィー精製のためにV_HC末端 6×HISタグを使用することによって精製V_Hを得た。各V_Hの開始培養物を、2%（w/v）グルコース+100μg/mlアンピシリンを添加した5ml 2倍TY培養液（Melfordカタログ番号M2103）中、30℃で一晩、250rpmで振盪しながら増殖させた。次に、50μlのこの一晩培養物を用いて、2%（w/v）グルコース+100μg/mlアンピシリンを添加した50ml 2倍TYに接種し、37℃、250rpmで振盪しながらおよそ6～8時間（OD₆₀₀=0.6～1.0まで）インキュベートした。その後、培養物を3200rpmで10分間遠心分離し、細胞ペレットを、100μg/mlアンピシリン+1mM IPTGを含有する50mlの新鮮な2倍TY培養液に再懸濁させた。次に、振盪フラスコを一晩、30℃、250rpmでインキュベートした。培養物を再び3200rpmで10分間遠心分離し、上清を廃棄した。細胞ペレットを穏やかなピペット操作により1mlの氷冷抽出バッファー（20%（w/v）スクロース、1mM EDTAおよび50mM トリス-HCl pH8.0）に再懸濁させた後、さらに1.5mlの1:5希釈した氷冷抽出バッファーを加えた。細胞を氷上で30分間インキュベートした後、4℃、15分間4500rpmで遠心分離した。上清を、イミダゾール（Sigma カatalog番号I2399-終濃度10mM）およびPBSバッファーで予め平衡化した0.5mlのニッケルアガロースビーズ（Qiagen、Ni-NTA 50% soln、カタログ番号30210）を含有する50ml Falconチューブに移した。ニッケルアガロースビーズへのV_Hの結合を穏やかに振盪しながら4℃で2時間進行させた。次に、ニッケルアガロースビーズをポリブレップカラム（BioRadカタログ番号731-1550）に移し、重力流により上清を廃棄した。次に、カラムを5mlのPBS+0.05%ツィーン（商標）で3回洗浄した後、20mM濃度のイミダゾールを含有する5mlのPBSで3回洗浄した。その後、250mM濃度のイミダゾールを含有する250μlのPBSの添加により、V_Hをカラムから溶出させた。次に、NAP-5カラム（GE Healthcare、17-0853-01）を用いてバッファー交換した後、1mlのPBSで溶出させることによってイミダゾールを精製V_H調製物から除去した。精製V_Hの収量は分光光度的に見積もり、純度はSDS PAGEを用いて評価した。

【0510】

あるいは、抗PSMA V_Hは、W3110大腸菌の上清からpJExpressベクターを用いて精製した。この手順のために、最大400mlの培養物をTB培地中、250rpmで振盪しながら37℃で増殖させた後、1mM IPTGで一晩誘導した。得られた上清を採取し、V_Hを、Ni-セファロースエクセルカラム（HiScale 16、GE Healthcare）を用いてAKTA Pure上で精製した。精製V_Hの収量は分光光度的に見積もり、純度はSDS PAGEを用いて評価した。

【0511】

未精製または精製V_Hに関する結合ELISAは、従前に記載した血清ELISAおよびファージELISAと同様であり、主に最終検出工程が異なった。簡単に述べれば、PBS中0.1～2μg/mlで50μl容量を加え、4℃で一晩インキュベートすることによって抗原をMaxisorbプレート（Nunc 443404）上に固定化した。コーティング後、抗原溶液を吸引し、これらのプレートを、0.05%ツィーン（商標）20（Sigmaカタログ番号P1379）を添加したPBS（PBS錠剤、オキソイドカタログ番号BR0014Gから調製）を用いて洗浄した後、ツィーン（商標）20を添加しないPBSで洗浄した。非特異的タンパク質相互作用をブロッキングするために、

PBS中3% (w/v) 脱脂粉乳 (Marvel (商標)) の溶液をウェルに加え、このプレートを少なくとも1時間室温でインキュベートした。3% Marvel (商標) / PBS中の原形質周辺抽出物の希釈液をポリプロピレンチューブまたはプレートに調製し、少なくとも1時間室温でインキュベートした後、ブロッキングしたELISAプレートに移し、そこでさらに少なくとも1時間インキュベーションを行った。次に、結合していないタンパク質を、PBS/ツィーン、次いでPBSでの反復洗浄を用いて洗い流した。次に、PBS/3% Marvel中に1:50希釈で調製したHRPコンジュゲート抗Myc Ab (Santa Cruzカタログ番号SC-40) の溶液を各ウェルに加え、さらに室温で少なくとも1時間インキュベーションを行った。結合していない検出抗体を、PBS/ツィーン (商標) およびPBSを用いて反復洗浄することによって除去した。次に、ELISAを、TMB基質 (Sigmaカタログ番号T0440) を用いて現像し、10分後に0.5M H_2SO_4 溶液 (Sigmaカタログ番号320501) の添加によって反応を停止させた。吸光度を、450nmでの読み取りによって決定した。

10

【0512】

b) FMA直接細胞結合アッセイ

大腸菌からの原形質周辺抽出物を、マイクロウェルの底部に設置したビーズまたはセルに局在した蛍光を検出する蛍光に基づくプラットフォームとしてのFluorescence Microvolume Assay Technology (FMAT) (Dietz et al., Cytometry 23: 177-186 (1996), Miraglia et al., J. Biomol. Screening 4: 193-204 (1999)を用いてPSMA結合Hisタグ V_H に関してスクリーニングした。CHO TREXヒトおよびカニクイザル細胞株は、標準的な手順を用い、全長ヒトおよびカニクイザルPSMAを用いて自家作製した。LnCAP細胞はSigma Aldrichから購入した。

20

【0513】

ペリプレップを、FMAT直接結合アッセイでCHO親細胞と結合せずに、CHOヒトPSMA、CHO cyno PSMAおよびLnCAP細胞と特異的に結合した V_H の存在に関して単一点スクリーニングにより試験した。細胞を、PBS、0.1%ウシ血清アルブミン、0.01%アジ化ナトリウムを含有するFMATアッセイバッファー (pH 7.4) 中に 0.1×10^6 細胞/mlで再懸濁させ、その細胞懸濁液に120nM DRAQ5 (Thermo Scientificカタログ番号62251) を加えた。ペリプレップ (10 μ l) を384ウェル黒色透明底アッセイプレート (Costarカタログ番号3655) に移し、10 μ lの6nMマウス抗His (Milliporeカタログ番号05-949) / 12nMヤギ抗マウスAlexa Fluor-488 (Jackson Immuno labsカタログ番号115-545-071) ミックスを加えた。次に、DRAQ5染色細胞 (20 μ l/ウェル) を加え、これらのアッセイプレートを2時間室温でインキュベートした。プレートを488nmおよび640nmで励起した後、TTPミラーボールプレートリーダーにてFL2 (502nm~537nm) およびFL5 (677~800nm) チャネルで読み取った。データはFL5周囲長にゲートを設定し、ゲーティングデータのピーク強度およびFL2中央平均蛍光強度を V_H 結合の決定に用いた。

30

【0514】

力価測定については、末端Hisタグによって精製した V_H をFMATアッセイバッファーで連続希釈した後、上記のように結合を測定した (図16)。改善した一価変異体は、親 V_H と同等の特性を示す (図16bおよび16c)。二重パラトープ性結合分子もまた試験し (16dおよびe)、ヒトPSMA CHO細胞との良好な結合を示した。以下の表は、同定された V_H 系列の種々のCDR3配列をそれらの結合の特徴とともに示す。用いたリンカー長は (G_4S)₆であった。下表は、同定された V_H 系列の種々のCDR3配列をそれらの結合特徴とともに示す。

40

【0515】

【表 19】

表 18 (ファージミドおよびペリプレップから調製)

CDR3	VH 系列	rhPSMA	Cyno PSMA CHO	ヒト PSMA CHO	CHO 親	LnCAP
DPAWGLRLGESSSYDFDI 配列番号 513	VH3-30	Y	Y	Y	N	Y
DRIVGGRVPDAFDI 配列番号 514	VH3-30	Y	Y	Y	N	Y
ERIFGVLTPDDFDI 配列番号 515	VH3-30	Y	Y	Y	N	Y
GLWPSDV 516	VH3-30	Y	Y	Y	N	Y
GLWPPMDV 配列番号 517	VH3-30	Y	Y	Y	N	Y
GDYDFWSGYPDYDMDV 配列番号 518	VH3-30	Y	Y	Y	N	Y
GGNALYSSGWPD 配列番号 519	VH3-30	Y	Y	Y	N	Y
DGVH 配列番号 520	VH3-23	Y	Y(弱い)	Y	N	Y
ENVIVPAATY 配列番号 521	VH3-20	Y	Y	Y	N	Y
DSLIVGERGY 配列番号 522	VH3-07	Y	Y(弱い)	Y(弱い)	N	Y (弱い)
DRGGAVALYHNGMDM 配列番号 523	VH3-07	Y	N	Y	N	Y
DYGDSRSLFDY 配列番号 524	VH4-34	N	Y	Y	N	Y
GPIPATAIPDAFDI 配列番号 525	VH4-34	N	Y	Y	N	Y
DGDDYGDY 配列番号 526	VH4-41	Y	Y(極めて弱い)	Y	N	Y
GNGPGITGTTDY 配列番号 527	VH1-08	Y/N	Y	Y	N	Y

【0516】

【表 20】

表 19 PSMA 発現細胞株と結合する抗 PSMA V_H の EC₅₀ 値 (精製 V_H から調製)。

EC50	huPSMA CHO	cynoPSMA CHO	DU145 PSMA	LNCap
2.1	1.097E-10	3.667E-10	2.304E-10	6.07E-11
2.18	1.044E-10	3.370E-10	2.496E-10	3.54E-11
2.17	1.004E-10	3.082E-10	2.181E-10	1.13E-11
2.15	9.212E-11	3.335E-10	1.663E-10	8.41E-11
2.14	1.103E-10	4.269E-10	2.023E-10	3.32E-11
2.22	1.232E-10	6.129E-10	2.293E-10	1.53E-10
1.8	1.029E-10	3.099E-10	9.455E-11	1.473E-10
1.10	7.182E-11	1.518E-10	6.699E-11	1.328E-10
1.11	8.634E-11	2.168E-10	7.604E-11	1.189E-10
1.12	5.023E-11	1.097E-10	4.15E-11	1.992E-10
1.13	5.127E-11	1.154E-10	4.564E-11	3.862E-11
1.14	5.884E-11	1.45E-10	5.201E-11	8.329E-11
1.16	6.805E-11	1.458E-10	5.938E-11	7.539E-11
1.17	3.338E-11	9.127E-11	3.099E-11	5.853E-11
1.18	5.858E-11	1.237E-10	4.949E-11	4.239E-11

10

20

【0517】

【表 21】

表 20 ヒト PSMA-CHO と結合する抗 PSMA V_H の EC₅₀ 値。使用したリンカー長は (G₄S)₆ であった。

No	構築物	EC50
1	1.1-2.1	3.616E-10
2	1.1-2.17	2.639E-10
3	1.1-2.15	1.948E-10
4	1.1-2.22	1.784E-10
5	1.16-2.1	3.057E-10
6	1.16-2.17	3.327E-10
7	1.16-2.15	1.967E-10
8	1.16-2.22	2.250E-10
9	1.11-2.1	2.871E-10
10	1.11-2.17	2.805E-10
11	1.11-2.15	2.100E-10
12	1.11-2.22	2.187E-10
13	1.18-2.1	2.938E-10
14	1.18-2.17	2.778E-10
15	1.18-2.15	1.921E-10
16	1.18-2.22	1.958E-10
17	1.17-2.1	3.252E-10
18	1.17-2.15	2.986E-10
19	1.17-2.17	1.921E-10
20	1.17-2.22	1.989E-10

30

40

【0518】

50

上記で同定した各個の V_H クローンをファージミドから配列決定し、 V_H 生殖細胞系および CDR 3 アミノ酸類似性に基づいて個別の系列に分類した。代表的なクローンをさらに特性決定した。生殖細胞系変異体を含む変異体を、親クローン、例えば、1. 1 および 2. 1 の標準的方法により作製した。図 1 は、本明細書で上記したように単離され、単一系列に分類されたクローン 1. 1 ~ 1. 20 の配列を示す。クローン 1. 8 ~ 1. 20 は、1. 1 の変異体である。図 2 は、本明細書で上記したように単離され、単一系列に分類されたクローン 2. 1 ~ 2. 25 の配列を示す。クローン 2. 2、2. 11 ~ 2. 19、2. 22 ~ 2. 25 は 2. 1 の変異体である。図 3 は、本明細書で上記したように単離され、単一系列に分類されたクローン 3. 1 ~ 3. 24 の配列を示す。クローン 3. 20 ~ 3. 25 は 3. 1 の変異体である。

10

【0519】

実施例 8 - V_H の特性決定

a) 抗 PMSA の特異性

標的抗原に対する個々の V_H の特異性は、実施例 7 (a) に記載の方法に従って ELISA により確認した。 V_H を PMSA との結合に関して試験し、無関連タンパク質と交差反応しないことが示された。

【0520】

b) Octet を用いた結合動態およびエピトープ結合の測定

精製抗 PMSA V_H 抗体の結合動態は、ForteBio Octet RED 384 装置で測定した。組換え PMSA を酢酸ナトリウムバッファー、pH 5 (ForteBio、カタログ番号 18-1069) で $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、アミンカップリング化学 (NHS-EDC アミンカップリング、ForteBio カタログ番号 18-1067 および 18-1033) を用いて ARG2G バイオセンサー (ForteBio カタログ番号 18-5092) にカップリングした後、エタノールアミン (ForteBio カタログ番号 18-1071) で急冷した。次に、抗 PMSA V_H 抗体の結合動態を、各 V_H 抗体を希釈系 (一般に、最高濃度の V_H $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ で始める 1:2 希釈系) として調製した後、PMSA カップリングバイオセンサーへの種々の V_H 濃度の結合を測定することによって決定した。その後、 V_H 結合動態を、(ブランク減算) センサーグラムトレースから 1:1 結合モデルおよび ForteBio Octet Data Analysis ソフトウェアを用いて決定した。1 ~ 150 nM およびナノモル未満の範囲の結合親和性が検出され、結合パラメーターの例を以下の表 21 に示す。

20

30

【0521】

【表 22】

表 21

	KD (nM)	Kdis (1/s)
2.1	1.64	4.56E-04
1.1	2.44	1.54E-03
3.1	3.78	4.52E-04

40

【0522】

さらなる系列メンバー、特に、親分子の変異体も、 $0.375 \mu\text{g}/\text{ml}$ で始め、1:2 希釈系を用いて以下のように試験した。表 22 および 23 に示されるように、ナノモルおよびピコモル範囲の結合親和性が検出された。

【0523】

【表 2 3】

表 22 系列 1

クローン	KD (nM)	Kdis (1/s)
1.8	1.95	1.04E-03
1.10	0.67	4.18E-04
1.11	0.80	4.95E-04
1.12	0.55	4.28E-04
1.14	0.46	3.35E-04
1.16	0.44	3.65E-04
1.17	0.61	5.51E-04
1.18	0.59	5.72E-04

10

【0 5 2 4】

【表 2 4】

表 23 系列 2

クローン	KD (nM)	Kdis (1/s)
2.1	0.32	2.28E-04
2.13	0.99	7.43E-04
2.17	0.76	7.26E-04
2.15	4.72	3.44E-03
2.12	1.56	1.57E-03
2.22	2.62	2.44E-03

20

【0 5 2 5】

実施例 7 のように、N i - N T A クロマトグラフィー（C 末端 H i s タグによる）を用いて原形質周辺抽出物から精製した単ドメイン抗体も試験した。結果を下表に示す。ナノモル範囲の結合親和性が検出された。

30

【0 5 2 6】

【表 2 5】

表 24

クローン番号	KD (nM)	Kdiss (1/s)
4.1	45	1.4 x 10 ⁻²
5.1	30	9.1 x 10 ⁻³
12.1	3.9	1.37E-03
10.1	95	1.85 x 10 ⁻³
11.1	26	0.00149
7.1	41	4.783 x 10 ⁻⁴
13.1	4.2	6 x 10 ⁻⁴
6.1	16	3.65 x 10 ⁻³
14.1	17	1.1 x 10 ⁻³

40

【0 5 2 7】

50

c) Fluorescence Microvolume Assay Technologyを用いたカニクイザルPSMA結合 V_H の内部移行の測定

精製 V_H の内部移行を、pH感受性蛍光色素pHrodo（商標）グリーンを用いて測定した。抗His抗体（Milliporeカタログ番号05-949）を製造者の説明書に従ってpHrodo（商標）グリーンSTPエステル（Molecular Probesカタログ番号P35369）で標識した。総てのサンプルおよび試薬を、PBSおよび0.1%ウシ血清アルブミンを含有する内部移行バッファー（pH7.4）で調製した。カニクイザルPSMAを発現するCHO細胞を 0.1×10^6 細胞/mlで再懸濁させ、その細胞懸濁液に120nM DRAQ5を加えた。 V_H （10 μ l）を384ウェル黒色透明底アッセイプレート（Costarカタログ番号3655）に移し、10 μ lの40nM pHrodo（商標）グリーン標識抗His抗体、次いで、20 μ lのDRAQ5染色細胞を加えた。プレートを37℃で2時間インキュベートした後、室温に平衡化した。FL2（502nm～537nm）およびFL5（677～800nm）チャンネルでの蛍光放出を、488nmおよび640nmで励起した後に、TTPミラーボールプレートリーダーで測定した。データはFL5周囲長にゲートを設定し、ゲーティングデータのピーク強度およびFL2中央平均蛍光強度を V_H 内部移行の決定に用いた（図17）。

【0528】

単ドメイン抗体1.1および1.2の変異体の内部移行は、連続希釈した V_H をpHrodo（商標）グリーン標識抗His抗体とともに室温で30分間ブレインキュベートした後にDRAQ5染色CHOヒトPSMAクローン1A10細胞（20 μ l）を加えたこと以外は、上記の通りにpH感受性蛍光色素pHrodo（商標）グリーンを用いて測定した。プレートを2時間室温でインキュベートした後、蛍光放出を測定した。このアッセイにおける V_H の活性を以下の表25に示す。

【0529】

【表26】

表 25

名称	pH(商標)RodoGreen 内部移行アッセイ
	ヒト PSMA 平均 $EC_{50}(M)$
1.8	5.0E-10
1.10	6.4E-10
1.11	3.7E-10
1.12	5.7E-10
1.14	4.4E-10
1.16	4.8E-10
1.17	2.9E-10
1.18	3.1E-10
2.1	8.0E-10
2.13	5.8E-10
2.17	8.0E-10
2.15	7.2E-10
2.12	5.3E-10
2.22	6.7E-10

【0530】

d) His-ZAPアッセイを用いたPSMA結合 V_H の内部移行の測定

HisタグPSMA結合 V_H の内部移行を、サボリン毒素にコンジュゲートした抗His抗体（His-ZAP Advanced targeting Systems IT52）を用いて評価した。このHis-ZAP試薬は V_H と結合し、細胞表面のPSM

Aとの V_H 相互作用を介して内部移行を受ける。サボリン毒素はエンドソーム内の複合体から放出され、リボソームを不活化し、やがて細胞死をもたらす。

【0531】

マウスまたはカニクイザルP S M Aを発現するC H O細胞（30 μ l 容量中、400細胞／ウェル）を384ウェル黒色透明底組織培養処理アッセイプレート（C o s t a r カタログ番号3712）中の、10%ウシ胎仔血清、2 mM L-グルタミン、10 μ g / m l プラストサイジン、300 μ g / m l ゼオシン、ペニシリン／ストレプトマイシン、1 μ g / m l テトラサイクリンを含むH a m s F12（S i g m a カタログ番号N6658）培地に播種し、C O₂ インキュベーターにて37℃で一晩インキュベートした。精製した V_H を培地で連続希釈した後、等容量の40 nM H i s - Z A Pを加えた。37℃で30分間インキュベートした後、 V_H / H i s - Z A Pサンプル（10 μ l）を細胞アッセイプレートに移し、C O₂ インキュベーターにて37℃で48時間インキュベートした。データの正規化のために各プレートについてH i s - Z A P対照ウェル（細胞とH i s - Z A P試薬）およびバックグラウンド対照（培地のみ）を設定した。細胞生存率は、48時間のインキュベーションの後に、C e l l T i t e r - G l o C e l l V i a b i l i t yアッセイ（P r o m e g a カタログ番号G7571）を製造者の説明書に従って用いて決定した。相対的発光シグナル（R L U）を、B M G P H E R A s t a r プレートリーダーを用いて測定した。データは、細胞の不在下で得られたR L Uシグナルの減算により正規化し、H i s - Z A P対照ウェルのバックグラウンド補正シグナルのパーセンテージとして表した（図18）。

10

20

【0532】

L n C A Pアッセイについては、細胞（100 μ l 容量中、2000／ウェル）を96ウェルT C処理プレート（C o s t a r 3340）中、10%ウシ胎仔血清、2 mM L-グルタミンおよびペニシリン／ストレプトマイシンを含むR P M I 1640培地に播種した。精製した V_H を培地で連続希釈し、等容量の60 nM H i s - Z A Pを加えた。37℃で30分間インキュベートした後、 V_H / H i s - Z A Pサンプル（100 μ l）を細胞アッセイプレートに移し、C O₂ インキュベーターにて37℃で96時間インキュベートした。細胞生存率は、C e l l T i t e r - G l o C e l l V i a b i l i t yアッセイを用いて測定し、データを上記のように分析した。例を図19に示す。

30

【0533】

単ドメイン抗体1.1および2.1の変異体がサボリンコンジュゲート抗H i s抗体とともに内部移行して毒素により媒介される細胞死をもたらす能力を決定した。アッセイは、ヒトP S M AアッセイにC H OヒトP S M Aクローン1 A 1 0細胞を使用し、プレートをC O₂ インキュベーターにて37℃で72時間インキュベートした後に細胞生存率を測定したこと以外は、上記の通りに行った。このアッセイで試験した単ドメイン抗体の活性を以下の表26に示す。

【0534】

【表 2 7】

表 26

	ヒト PSMA 平均 EC ₅₀ (M)	cyno PSMA 平均 EC ₅₀ (M)
1.8	2.6E-11	1.4E-09
1.10	2.1E-11	1.3E-09
1.11	1.4E-11	4.1E-10
1.12	1.8E-11	9.7E-10
1.14	1.7E-11	7.9E-10
1.16	1.7E-11	4.2E-10
1.17	1.5E-11	5.6E-10
1.18	2.3E-11	4.8E-10
2.1	1.4E-11	5.2E-11
2.13	2.7E-11	8.0E-11
2.17	3.5E-11	7.0E-11
2.15	6.9E-11	1.6E-10
2.12	1.6E-11	9.1E-11
2.22	6.9E-11	1.8E-10

10

20

【0 5 3 5】

二重パレート性分子を試験したところ、下記の EC 5 0 値を示した。

【0 5 3 6】

【表 28】

表 27

	ヒト PSMA 平均 EC ₅₀ (M)	cyno PSMA 平均 EC ₅₀ (M)
1.1-6GS-2.1	1.4E-11	1.2E-11
1.1-6GS-2.17	1.2E-11	1.1E-11
1.1-6GS-2.15	1.3E-11	8.6E-12
1.1-6GS-2.22	8.8E-12	7.8E-12
1.16-6GS-2.1	1.4E-11	1.3E-11
1.16-6GS-2.17	1.5E-11	1.1E-11
1.16-6GS-2.15	1.8E-11	1.1E-11
1.16-6GS-2.22	2.0E-11	1.1E-11
1.11-6GS-2.1	1.7E-11	1.2E-11
1.11-6GS-2.17	7.9E-12	8.1E-12
1.11-6GS-2.15	1.1E-11	9.0E-12
1.11-6GS-2.22	1.0E-11	9.5E-12
1.18- 6GS-2.1	5.7E-12	5.8E-12
1.18-6GS-2.17	1.2E-11	5.6E-12
1.18-6GS-2.15	1.4E-11	1.0E-11
1.18-6GS-2.22	1.5E-11	1.4E-11
1.17-6GS-2.1	1.3E-11	1.5E-11
1.17-6GS-2.17	1.4E-11	1.0E-11
1.17-6GS-2.15	1.5E-11	1.2E-11
1.17-6GS-2.22	1.8E-11	1.2E-11

10

20

【0537】

実施例 9 - V_H の安定性種々の CDR 3 系列からの V_H を、現像性特徴に関して試験した。

【0538】

30

a) 熱安定性：HPLC サイズ排除クロマトグラフィー

精製した V_H にサイズ排除クロマトグラフィーを行った。簡単に述べれば、精製した V_H を PBS バッファー中、4℃または 40℃のいずれかで 0～14 日間保存した後、Waters ACQUITY BEH 125 Å SEC カラムでの分離とともに、PDA 検出器（280nmでの検出）を含む Waters H-Class Bio UPLC を使い、種々の時点で分析した。サンプルは 10 μl 容量で注入し、200 mM NaCl、100 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4 + 5% プロパン-1-オールを含有する移動相で、流速 0.4 ml/分にて流した。データを 6 分間収集し、開始時（T = 0）に存在するものに比べて保存後に残留する単量体のパーセンテージを計算した。親分子は高い安定性を示した。変異体もまた試験した。

40

【0539】

これらのデータが非最適バッファー条件下で採集されたことに留意されたい。

種々のサンプル濃度：一価 1.1 変異体：5.0 mg/ml

一価 2.1 変異体：3.5 mg/ml

結果を下表に示す。

【0540】

【表 2 9】

表 27

名称	T0 単量体 4℃の面積%				T0 単量体 40℃の面積%				
	0	4	7	14	0	1	4	7	14
1.8	100.00	100.47	99.06	102.71	100.00	98.65	97.70	90.78	88.64
1.10	100.00	100.75	99.74	101.47	100.00	97.73	94.35	82.99	85.89
1.11	100.00	101.34	100.41	103.26	100.00	98.34	97.92	90.95	100.75
1.12	100.00	100.97	103.69	110.61	100.00	97.62	97.03	87.86	100.99
1.14	100.00	101.44	101.09	109.51	100.00	97.55	95.03	83.69	88.01
1.16	100.00	101.44	100.84	107.00	100.00	97.24	93.57	82.10	88.46
1.17	100.00	101.06	100.29	108.35	100.00	98.44	100.56	93.92	108.68
1.18	100.00	100.36	101.41	106.39	100.00	98.38	98.70	88.09	95.31

10

【 0 5 4 1 】

【表 3 0】

表 28

名称	T0 単量体 4℃の面積%				T0 単量体 40℃の面積%				
	0	4	7	14	0	1	4	7	14
2.1	100.00	100.85	98.69	101.05	100.00	99.75	100.07	100.59	100.55
2.13	100.00	103.11	100.91	99.78	100.00	99.80	99.92	100.30	100.34
2.17	100.00	101.89	99.62	99.64	100.00	100.10	101.00	101.17	101.50
2.15	100.00	102.20	99.85	99.20	100.00	99.46	100.23	100.28	101.03
2.12	100.00	100.06	99.56	99.66	100.00	99.51	99.92	100.84	101.71
2.22	100.00	100.76	99.91	100.48	100.00	99.12	99.88	100.23	102.02

20

【 0 5 4 2 】

30

【表 3 1】

名称	T0 単量体 4℃の面積%				T0 単量体 40℃の面積%				
	0	4	7	14	0	1	4	7	14
1.1-6GS-2.1	100.00	109.56	68.16	68.02	100.00	105.79	94.77	64.98	64.58
1.1-6GS-2.17	100.00	116.15	75.23	75.20	100.00	111.31	101.98	68.73	63.67
1.1-6GS-2.15	100.00	111.01	72.93	73.21	100.00	106.51	95.09	70.50	58.28
1.1-6GS-2.22	100.00	116.88	80.88	80.66	100.00	110.00	105.22	74.44	75.37
1.16-6GS-2.1	100.00	135.96	110.01	110.26	100.00	101.92	116.20	106.53	106.74
1.16-6GS-2.17	100.00	125.26	106.57	106.10	100.00	117.55	110.34	100.59	96.83
1.16-6GS-2.15	100.00	136.57	117.42	118.25	100.00	121.10	117.79	107.33	106.12
1.16-6GS-2.22	100.00	122.20	105.46	104.15	100.00	100.32	104.92	97.31	93.30
1.11-6GS-2.1	100.00	76.33	98.05	97.37	100.00	96.51	95.53	N/A	98.38
1.11-6GS-2.17	100.00	45.23	98.17	97.40	100.00	96.51	94.72	N/A	90.52
1.11-6GS-2.15	100.00	101.17	98.87	98.68	100.00	97.23	94.78	N/A	87.98
1.11-6GS-2.22His	100.00	102.38	100.84	99.07	100.00	98.45	100.47	N/A	82.62
1.18-6GS-2.1	100.00	102.42	98.53	97.83	100.00	92.81	90.11	85.86	85.82
1.18-6GS-2.17	100.00	101.18	97.79	97.30	100.00	92.66	87.07	84.42	79.49
1.18-6GS-2.15	100.00	100.57	N/A	N/A	100.00	88.40	93.87	N/A	N/A
1.18-6GS-2.22	100.00	102.69	97.73	97.54	100.00	94.07	91.87	86.53	100.98
1.17-6GS-2.1	100.00	101.15	98.97	97.85	100.00	97.08	96.59	95.85	97.40
1.17-6GS-2.17	100.00	98.88	98.94	99.34	100.00	96.16	95.61	98.86	92.37
1.17-6GS-2.15	100.00	97.67	N/A	N/A	100.00	99.14	99.77	N/A	N/A
1.17-6GS-2.22	100.00	100.20	97.98	98.47	100.00	101.00	102.12	102.52	100.19

10

20

【0543】

35日までの一価単一ドメイン抗体の長期安定性もまた試験し、良好なプロフィールを示した。

【0544】

30

b) 熱安定性：ミラーボール

精製したV_Hサンプルを0～8日間40℃でインキュベートした後、カニクイザルPSMAを発現するCHO細胞に対する結合を、実施例7(b)に詳説されるようなFMA T直接結合アッセイを用いて試験した。供試した分子は良好な安定性を示した。

【0545】

c) 均一時間分解蛍光(Homogenous Time Resolved Fluorescence)(HTRF)アッセイを用いたV_H血清安定性の評価

精製したV_Hをカニクイザル血清と混合し、0～7日間(day)37℃でインキュベートした。次に、サンプルを、HTRFアッセイを用いてPSMAとの結合に関して評価した。簡単に述べれば、PSMA(R&D Systemsカタログ番号4234-ZN)を、EZ-Link Microスルホ-NHS-LC-ビオチン化キット(Thermo Scientificカタログ番号21935)を用いてビオチン化した。HTRF結合アッセイについては、総てのサンプルおよび試薬を、PBS、0.1%(w/v)BSAおよび0.4Mフッ化カリウムを含むμHTRFアッセイバッファーで調製した。V_H(C末端His-Mycタグ)を黒色384シャローウェルプレート(Costarカタログ番号3676)中、総アッセイ容量10μlの3nMビオチン化PSMA、1.5nMストレプトアビジンクリプテート(Cisbioカタログ番号610SAKLA)および10nM抗Myc-Alexa Fluor-647(AbD Serotecカタログ番号CA2200AF647)とともに最低3時間、室温でインキュベートした。337nmで励起した後に、620nmおよび665nmでの時間分解蛍光放出をBMG

40

50

PHERAstarプレートリーダーで測定した。

【0546】

別の実験で、精製した V_H を、 37°C で0～7日間ヒト血清と混合した後、実施例7（b）FMA T直接細胞結合アッセイに記載の通りに、huPSMA CHO 1A10細胞との結合に関して評価した。得られたデータを示し、EC50値を以下の表29および30に示す。

【0547】

【表32】

表 29

V_H	EC50
2.1 Day 0	2.49E-10
2.1 Day 1	2.54E-10
2.1 Day 4	2.60E-10
2.1 Day 7	3.01E-10
2.17 Day 0	2.30E-10
2.17 Day 1	2.10E-10
2.17 Day 4	2.28E-10
2.17 Day 7	2.38E-10
2.15 Day 0	2.66E-10
2.15 Day 1	4.97E-10
2.15 Day 4	3.93E-10
2.15 Day 7	3.76E-10
2.22 Day 0	3.05E-10
2.22 Day 1	2.91E-10
2.22 Day 4	3.40E-10
2.22 Day 7	3.28E-10

【0548】

10

20

【表 3 3】

表 30

V_H	EC50
1.8 Day 0	4.09E-10
1.8 Day 1	4.86E-10
1.8 Day 4	4.96E-10
1.8 Day 7	5.42E-10
1.11 Day 0	2.34E-10
1.11 Day 1	2.08E-10
1.11 Day 4	2.27E-10
1.11 Day 7	2.78E-10
1.16 Day 0	1.65E-10
1.16 Day 1	2.43E-10
1.16 Day 4	2.42E-10
1.16 Day 7	2.36E-10
1.17 Day 0	2.73E-10
1.17 Day 1	2.53E-10
1.17 Day 4	2.59E-10
1.17 Day 7	2.74E-10
1.18 Day 0	3.04E-10
1.18 Day 1	3.11E-10
1.18 Day 4	3.19E-10
1.18 Day 7	3.13E-10

10

20

【0 5 4 9】

種々の二重パラトープ性組合せの血清安定性を評価するために、精製した二重パラトープ性 V_H を 37℃ で 0～7 日間ヒト血清と混合した後、実施例 7 (b) FMA T 直接細胞結合アッセイに記載のとおり $huPSMA-CHO$ 細胞との結合に関して評価した。表 31 は、細胞結合に関する EC50 値を示す。

30

【0 5 5 0】

【表 3 4】

表 31 PSMA 発現細胞株に対する二重パレート性抗 PSMA V_H 結合の EC50 値

二重パレート性結合分子	日	EC50
1.1-6GS-2.1	0	8.02E-11
	1	1.03E-10
	4	7.86E-11
	7	7.88E-11
1.1-6GS-2.17	0	7.7E-11
	1	9.16E-11
	4	8.49E-11
	7	7.42E-11
1.11-6GS-2.1	0	8.92E-11
	1	6.05E-11
	4	7.36E-11
	7	8.65E-11
1.11-6GS-2.17	0	6.39E-11
	1	7.25E-11
	4	8.44E-11
	7	1.01E-10
1.16-6GS-2.1	0	9.02E-11
	1	8.60E-11
	4	1.00E-10
	7	1.07E-10
1.16-6GS-2.17	0	7.41E-11
	1	9.44E-11
	4	6.28E-11
	7	6.75E-11
1.17-6GS-2.1	0	5.69E-11
	1	4.77E-11
	4	4.58E-11
	7	5.44E-11
1.17-6GS-2.17	0	6.74E-11
	1	3.32E-11
	4	4.73E-11
	7	5.7E-11

10

20

30

40

【0551】

d) V_H 熱安定性の評価

示差走査熱量測定(Differential scanning calorimetry) (DSC) は、MicroCal VP-キャピラリーDSC (Malvern) を用いて行った。PBS中0.25 mg/mlの300 μ lのタンパク質を、10~90℃の間で、60℃/分の走査速度を用いて流した。MicroCalソフトウェアを用いてデータを分析した。結果は、一価単ドメイン抗体に関して表32に示し、二重パレート性結合分子に関して表33に示す。

【0552】

【表 3 5】

表 32

名称	T _m (°C)	T _{onset} (°C)	T _½ (°C)
2.1	73.91	70.12	2.5
2.17	72.55	59.96	7.04
2.15	63.62	46.37	11.75
2.22	71.18	56.74	8.05
1.1	63.92	54.86	4.02
1.11	61.51	52.62	3.25
1.16	60.02	48.77	5.19
1.17	62.15	53.59	3.69
1.18	60.34	51.44	3.69

10

20

【 0 5 5 3 】

【表 3 6】

表 32

名称	$T_m (^{\circ}\text{C})$	$T_{\text{onset}} (^{\circ}\text{C})$	$T_{1/2} (^{\circ}\text{C})$
1.1-6GS-2.1	67.63	57.06	6.37
1.1-6GS-2.17	65.60	58.39	3.52
1.1-6GS-2.15	61.28	50.36	3.69
1.1-6GS-2.22	64.39	57.01	3.53
1.16-6GS-2.1	64.18	54.28	9.07
1.16-6GS-2.17	62.98	53.08	5.37
1.16-6GS-2.15	58.97	48.07	4.03
1.16-6GS-2.22	61.54	51.97	4.86
1.11-6GS-2.1	65.75	54.00	7.56
1.11-6GS-2.17	64.36	55.80	4.03
1.11-6GS-2.15	60.05	50.81	3.52
1.11-6GS-2.22	63.07	54.00	4.02
1.18-6GS-2.1	63.89	53.15	9.57
1.18-6GS-2.17	62.98	52.92	5.70
1.18-6GS-2.15	60.75	48.67	7.38
1.18-6GS-2.22	61.75	51.68	5.04
1.17-6GS-2.1	66.58	54.49	7.22
1.17-6GS-2.17	64.84	56.45	4.20
1.17-6GS-2.15	60.69	51.29	3.86
1.17-6GS-2.22	63.23	53.83	4.53

【0554】

実施例 10 マウスにおけるイメージング試験

V_H をマウスに注射した（半減期が延長した $V_H 1.1$ 、 $V_H 2.1$ および $V_H 2.1$ ）。マウスは P S M A 陽性（+）および P S M A 陰性（-）腫瘍を含む。試験は次のように行った：

- ・マウスごとの約 100 MBq の $Tc-99m$ 注射活性
- ・5分、30分、60分、3時間、6時間および24時間の時点での S P E C T / C T
- ・種々の時点に関して生成された画像
- ・イメージング後の *ex vivo* 生体分布およびオートラジオグラフィー
- ・陰性対照 V_H （ α H E L 4）

【0555】

半減期延長 V_H は、下記の配列を有する抗マウス血清アルブミン（抗 M S A） V_H を含んでなる：

10

20

30

40

【化 1 0 1】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWWATISDSGSSAD
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYNWNPRALGIWGQGTMVTV
SS (配列番号 528)

【0 5 5 6】

これらの試験は、P S M A + 腫瘍に対して、特に、対照モノクローナル I g G 抗 P S M A 抗体に比べて、高レベルの特異的腫瘍標的化、より速い浸透および注射用量のより多い蓄積を示した。これは V_H の半減期を延長することによりさらに改善され得る。さらに、

10

【0 5 5 7】

実施例 1 1 エピトープマッピング

互いに対する P S M A 結合 V_H のタンデムエピトープマッピングを、O c t e t R E D 3 8 4 を用いて行った。次に、V_H 結合をセンサーグラムトレースから、1 : 1 結合モデルおよび F o r t e B i o O c t e t D a t a A n a l y s i s ソフトウェアを用いて決定した（参照センサーを減算）。実施例 8 b も参照。エピトープマッピング結果を表 3 3 に示す。いくつかのクローンは部分的遮断を示した。

【0 5 5 8】

【表 3 7】

20

表 33

群 1	群 2
3.6	1.4
2.1	12.1
11.1	5.1
4.1	13.1
7.1	6.1
14.1	
10.1	
9.1	

30

さらなる実験では、単一ドメイン抗体 1 . 1 と 2 . 1 の間のエピトープ競合をさらに特性評価した。アミンカップリング第二世代キット（F o r t e B i o）を用い、P S M A を A R 2 G バイオセンサーに結合させた後、O c t e t R E D 3 8 4 を用いて行うエピトープマッピング実験に使用した。これらの実験では、各 V_H を 4 μ g / m l 濃度に希釈した。バイオセンサーには V_H を負荷しないか、または 2 . 1 もしくは 1 . 1 のいずれかを P S M A に対する結合が飽和レベルに達するまで負荷した。次に、これらのセンサーを短時間 P B S / ツイーンに浸した後、第 2 の結合工程を行った。第 2 の結合工程は、同じ V_H を単独でまたは 2 . 1 と 1 . 1 の両方を含むウェルにバイオセンサーを浸すことを含んだ。後の組合せに第 1 の V_H が存在することが、その P S M A 結合部位の飽和が続いていたことを保証した。次に、結合プロフィールを、F o r t e B i o 分析ソフトウェアを用いて調べた。得られたこれらのデータは、単一ドメイン抗体 2 . 1 および 1 . 2 が P S M A 上の異なるエピトープに結合することを示す。

40

【0 5 5 9】

実施例 1 2 イメージング研究

これらの研究に以下の構築物を供試した。

V_H 2 . 1

50

$\frac{V_H 2.1 - H I S.}{1.2 \text{ mg/ml}}$

配列：

【化 1 0 2】

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSGYGMHWVRQAPGKGLEWWAYISYDGSNKY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWGQ
GTMVTVSSLEGGGSEQKLISEEDLNHHHHHH (配列番号 532)

【0 5 6 0】

$\frac{V_H 1.1}{V_H 1.1 - H I S}$

配列：

【化 1 0 3】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIGENDGTTD
YADSVKGRFTISRDN SKMLYLQMNSLRVEDTAVYYCVKDG VHWGQGLTVTVSSLEGGGS
EQKLISEEDLNHHHHHH (配列番号 533)

【0 5 6 1】

$\frac{H e l 4}{H E L - 4 - H I S}$

配列：

【化 1 0 4】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRISDEDMGWVRQAPGKGLEWVSSIYGPSGSTYY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASALEPLSEPLGFWGQGLTVTVSSA
AAHHHHHH (配列番号 534)

【0 5 6 2】

$\frac{V_H 2.1 - V_H 2.1}{V_H 2.1 - 6 G S - V_H 2.1}$

配列：

【化 1 0 5】

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSGYGMHWVRQAPGKGLEWWAYISYDGSNKY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWGQ
GTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSL
RLSCAASGFSFSGYGMHWVRQAPGKGLEWWAYISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPAWGLRLGESSYDFDIWGQGTMTVSSAAHHHHHHH
(配列番号 535)

【0 5 6 3】

$\frac{V_H 2.1 - V_H 1.1}{V_H 2.1 - 6 G S - V_H 1.1}$

配列：

【化 1 0 6】

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSGYGMHWVRQAPGKGLEWWAYISYDGSNKY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKDP AWGLRLGESSSYDFDIWGQ
 GTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLR
 LSCAASGFSFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIGENDGTTDYADSVKGRFTISRDN SKSML
 YLQMNSLRVEDTAVYYCVKDG VHWGQGTLTVSSAAAH HHHHH (配列番号 536)

【0 5 6 4】

10

本研究で使用した総ての V_H ドメインは大腸菌で発現させた。これらのタンパク質を濾過上清から実施例 7 a に記載のようにニッケルアフィニティークロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を精製した。保存バッファーへのバッファー交換後、回転濃縮器を用いていくつかのタンパク質を濃縮した。タンパク質純度は、SDS-PAGE および分析的 SEC を用いて分析した。PSMA に対する結合を、組換えタンパク質および／または PSMA を発現する細胞を用いて確認した。安定性は、タンパク質を長期間 (一晚～4 週間の範囲) 40°C に加熱し、タンパク質分解の程度を測定することによって確認した。タンパク質のアリコートを使用まで -80°C で保存した。

【0 5 6 5】

20

PSMA 発現細胞株において対象 V_H (一価、二価および二重パラトープ性形式) と内部移行 LAMP-1 のマーカー (染色リソソーム) および EEA-1 のマーカー (染色初期エンドソーム) の間の同時局在の存在を調べるための共焦点蛍光顕微鏡法。PSMA と結合する IgG 水準抗体を陽性対照として使用した。結果を図 20～24 に示し、二価および二重パラトープ性 V_H 構築物の内部移行の改善を示す。

【0 5 6 6】

試験プロトコール

使用した細胞株は、CHO T-Rex huPSMA 細胞株であった。

【0 5 6 7】

1) 試験前日に CHO T-Rex huPSMA 細胞を PSMA 発現のためにテトラサイクリンで誘導し、カバーガラスに播種した。

30

【0 5 6 8】

2) 翌日、細胞を、 500 nM の試験 V_H (それらの一価、二価または二重パラトープ性形式のいずれか) を含んでなる培地または陽性対照とともにインキュベートした。

【0 5 6 9】

3) サンプルをまず氷上で 30 分間インキュベートして内部移行を遮断し、次に、室温で 10 分間、4% PFA で固定した後、PBS 中で 3 回洗浄した。二反復のサンプルをさらに 37°C で 2 時間インキュベートして、内部移行を誘発した後に固定した。

【0 5 7 0】

4) 固定後、サンプルにバッファーで透過処理を施した。

【0 5 7 1】

40

5) 陽性対照とともにインキュベートした細胞を、0.5% BSA / PBS + 0.05% ツィーン中で 1:2000 希釈した抗ヒト 488 抗体を用いて 1 時間染色した後、PBS + 0.05% ツィーン中で 3 回洗浄した (各 5 分)。

【0 5 7 2】

6) 一価または二価／二重パラトープ性試験 V_H とともにインキュベートした細胞を、一次抗 HIS 抗体 (マウス) を用いて 1 時間染色した後、洗浄し、その後、二次抗マウス 488 抗体で 1 時間インキュベートした後、洗浄した。

【0 5 7 3】

7) リソソームおよびエンドソームを初期エンドソーム抗原 1 (EEA-1) またはリソソーム膜抗原 1 (LAMP-1) のいずれかに対する一次抗体 (両方ともウサギ) を用い

50

て1時間染色した。細胞をさらに室温で抗ウサギ647二次抗体とともに1時間インキュベートした後、洗浄した。

【0574】

8) 総てのサンプルはまた、HOECHST 1:1000 (0.5 µg/ml) での5分間染色した後、洗浄した。

【0575】

9) カバーガラスをすりガラス端スライドにかけ、NIKON A1 R共焦点システムを用いて画像を得た。

【0576】

写真は、プログラムNIS-ELEMENTS ARを用いて撮影した。

10

【0577】

使用したレーザー線は、407.7 nm (HOECHST)、487.7 nm (V_H/モノクロナルベンチマーク)、639.7 (LAMP-1、EEA-1) であった。

対物レンズ: Apo 60× Oil AS DIC N2

共焦点モード: Pinhole Size (µm): 39.6、Zステップ: 0.49 µm。

【0578】

さらなるイメージング研究を、ヒトPSMAを発現するCHO細胞(15000/ウェル)を用いて行い、96ウェルポリ- L -リシン(Sigma P4707)コーティングプレート(Perkin Elmer 6005550)の、10%ウシ胎仔血清、2 mM L -グルタミン、10 pg/ml プラストサイジン、300 µg/ml ゼオシン、ペニシリン/ストレプトマイシン、1 pg/ml テトラサイクリンを含むHams F12 (Sigma N6658) 培地中に播種し、CO₂ インキュベーターにて37℃で一晩インキュベートした。V_Hをプレートに加え、4℃で30分間、次いで、37℃で2時間インキュベートした。プレートをPBSで3回洗浄した後、細胞を4%パラホルムアルデヒド中で固定し、0.5%サポニンで透過処理を施した。内部移行したV_Hは、抗His (Millipore 05-949) および抗マウスAF488 (Jackson ImmunoResearch 115-545-098) での染色によって検出した。リソソームは、LAMP-1 (Abcam Ab24170) および抗ウサギAF647 (Jackson ImmunoResearch 11-1-605-008) で染色した。核は、ヘキストステイン (Life technologies H3570) を用いて染色した。IN Cell Analyzer 6000を用いてプレートをイメージングし、ImageJソフトウェアを用いて画像を処理した。結果を図25に示す。

20

30

【0579】

実施例13 結合分子にコンジュゲートされたMMAE毒素のin vitroにおける効力

MMAE毒素コンジュゲートV_Hの、PSMA発現細胞内へ内部移行して細胞死滅をもたらす能力を、in vitro細胞傷害性アッセイを用いて決定した。

【0580】

40

ヒトPSMAを安定に発現するヒト細胞(DU-145、ATCC HTB-81)または適合するPSMA陰性細胞を、384ウェル黒色透明底組織培養処理アッセイプレートの、10%ウシ胎仔血清、2 mM L -グルタミン、1倍ペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地に3000細胞/ウェルで播種し、CO₂ インキュベーターにて37℃で一晩インキュベートした。次に、細胞を、連続希釈したMMAE毒素コンジュゲートV_Hとともに48時間または72時間インキュベートした。データの正規化のために各プレートについて非処理対照ウェル(毒素コンジュゲートV_Hの不在下の細胞)およびバックグラウンド対照ウェル(培地のみ)を設定した。細胞死滅は、インキュベーション後に、Cell Titer-Glo Cell Viability アッセイ(Promega G7571)を製造者の説明書に従って用いて決定した。相対

50

的発光シグナル (RLU) を、BMG PHERAstar プレートリーダーを用いて測定した。データは、バックグラウンド対照ウェルで得られたRLUシグナルの減算により正規化した後、非処理対照ウェルの% (生存率%) として表した。図26は、代表的試験 (48時間インキュベーション) で、ヒトPSMA発現ヒト細胞株および適合する親 (すなわち、非トランスフェクト) PSMA陰性細胞株を用いて得られた用量応答曲線を示す。MMAEコンジュゲート構築物について得られたIC₅₀値および最大%細胞死滅を表20にまとめた。HiPEG (商標) 技術 (WO2009/047500; Cong et al., (2012) Bioconjugate Chem. 2012, 23, 248-263) を用い、クレシェンドのHumabody (商標) V_H をMMAEにコンジュゲートし、陽性ADC対照はThioBridge (商標) 技術 (WO2016063006; WO2005/007197; Balan et al., (2007) Bioconjugate Chem., 18, 61-76) を用いて作製した。抗PSMA-MMAEコンジュゲートV_H は、PSMA陽性細胞を特異的に死滅させ、PSMA陰性対照細胞株に関して最小細胞死滅が見られた。PSMAの異なるエピトープを標的とする2つのV_H からなる二重パラトープは、一価または二価PSMAV_H 構築物よりも有効であった。DU145アッセイは48時間および72時間HDCインキュベーションで行った。これは測定IC₅₀値および最大死滅率%に影響を及ぼしたが、種々のHDC形式のランク付けに影響するとは思われなかった。スクリーニングについては、より高いスループットには48時間インキュベーションが好ましかった。48時間インキュベーションを用いた場合、供試した構築物に100%細胞死滅に達したものは無かった (供試した最高濃度でも)。最大応答は約70~85%で水平となった (表34参照)。表35はIC₅₀値を示し、図27は72時間のインキュベーション時間を用いた場合に見られたより高い最大%細胞死滅を示す (n=1 データ)。

【0581】

10

20

【表 3 8】

表 34. 48 時間インキュベーション後のヒト PSMA 発現ヒト細胞株で得られた in vitro 細胞傷害性データの要約

構築物			DAR	平均 IC ₅₀ ±SD(nM) 平均最大細胞死滅率%(n 数)	IC ₅₀ 毒素 (nM)
HiPEG™ A-His ₆ val-cit-PAB-MMAE	一価	2.1-myc-his	1	1.2 ± 0.7nM 最大細胞死滅 74% (n= 4)	1.16
HiPEG™ B-His ₆ val-cit-PAB-MMAE	一価	1.1-myc-his	0.9	2.7 ± 2.5nM 最大細胞死滅 73% (n= 4)	2.43
HiPEG™ C-His ₆ val-cit-PAB-MMAE	一価	3.1-myc-his	1	5.2 ± 2.6nM 最大細胞死滅 59% (n= 4)	5.21
HiPEG™ D-His ₆ val-cit-PAB-MMAE	一価	HEL4-his		>300nM (n= 3)	
HiPEG™ A-2-A-His ₆ val-cit-PAB-MMAE	二価	2.1-(G4S)6-2.1	1	0.32 ± 0.2nM 最大細胞死滅 57% (n= 3)	0.32
HiPEG™ B-2-B-His ₆ val-cit-PAB-MMAE	二価	1.1-(G4S)6-1.1	0.7	18 ± 8nM (n= 3) 最大細胞死滅 80% (推定)	12.6
HiPEG™ C-2-C-His ₆ val-cit-PAB-MMAE	二価	3.1-(G4S)6-3.1	1	4.5 ± 2.4nM 最大細胞死滅 69% (n= 3)	4.54
HiPEG™ A-1-B-His ₆ val-	二重パラトープ性	2.1-	1	0.67 ± 0.3nM	0.67

10

20

30

cit-PAB-MMAE		(G4S)2- 1.1		最大細胞死滅 75% (<i>n</i> = 4)	
HiPEG™ A-2-B-His ₆ val- cit-PAB-MMAE	二重パラト ープ性	2.1- (G4S)6- 1.1	1	0.37 ± 0.1nM 最大細胞死滅 78% (<i>n</i> = 3)	0.37
HiPEG™ B-1-A-His ₆ val- cit-PAB-MMAE	二重パラト ープ性	1.1- (G4S)2- 2.1	1	0.13 ± 0.1nM 最大細胞死滅 79% (<i>n</i> = 3)	0.13
HiPEG™ B-2-A-His ₆ val- cit-PAB-MMAE	二重パラト ープ性	1.1- (G4S)6- 2.1	1	0.15 ± 0.1nM 最大細胞死滅 79% (<i>n</i> = 3)	0.15
ThioBridge™ anti-PSMA val-cit-PAB-MMAE	対照 ADC	対照 ADC	4	0.03 ± 0.02nM 最大細胞死滅 82% (<i>n</i> = 3)	0.13

10

20

【 0 5 8 2 】

【表 3 9】

表 35. 72 時間インキュベーション後のヒト PSMA 発現ヒト細胞株で得られた in vitro 細胞傷害性データの要約

構築物	形式	V _H	DAR	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ 毒素 (nM)
HiPEG™ A-His ₆ val-cit-PAB-MMAE	一価	2.1-myc-his	1	0.55	0.55
HiPEG™ B-His ₆ val-cit-PAB-MMAE	一価	1.1-myc-his	0.9	4.1	3.69
HiPEG™ A-2-A-His ₆ val-cit-PAB-MMAE	二価	2.1-(G4S)6-2.1	1	0.19	0.19
HiPEG™ B-2-B-His ₆ val-cit-PAB-MMAE	二価	1.1-(G4S)6-1.1	0.7	21	14.7
HiPEG™ A-2-B-His ₆ val-cit-PAB-MMAE	二重 パラトープ性	2.1-(G4S)6-1.1	1	0.29	0.29
HiPEG™ B-1-A-His ₆ val-cit-PAB-MMAE	二重 パラトープ性	1.1-(G4S)2-2.1	1	0.1	0.1
ThioBridge™ anti-PSMA val-cit-mAb		対照 ADC	4	0.042	0.168
PAB-MMAE					

【0583】

一価構築物に関して見られた効力の順序は、V_H 2. 1 > V_H 1. 1 > V_H 3. 1 であった。

【0584】

V_H 2. 1 二価構築物は、V_H 2. 1 一価構築物のおよそ 3 倍の効力であると見られたが、より、二価構築物を用いた場合には、最大死滅率%は低下した。

【0585】

V_H 1. 1 二価構築物は、V_H 1. 1 一価構築物のおよそ 6 分の 1 の効力であると見られた。

【0586】

V_H 3. 1 二価構築物は、V_H 3. 1 一価構築物に匹敵する活性を有し、若干改善した最大死滅率%が見られた。

【0587】

二重パラトープ性構築物における V_H の順序は活性に影響を及ぼすことが判明し、2. 5 ~ 4. 6 倍の違いが見られた。配向 (N-C) V_H 2. 1 - V_H 1. 1 の二重パラトープ性構築物は、配向 V_H 1. 1 - V_H 2. 1 の場合よりも活性が低いと見られた。

【0588】

リンカー長は、行った実験では、活性に及ぼす影響は最小である (1. 2 ~ 2. 2 倍) と見られた。しかしながら、供試した一部の構築物では、(G4S) 6 リンカー型がやや

活性が高かった。

【0589】

二重パラトープ性構築物は、一価構築物よりも向上した活性を示した。最も活性の高い二重パラトープ性は、最も活性の高い一価のおよそ7倍の活性であることが判明した。

【0590】

最も活性の高い二重パラトープ性は、対照抗PSMA mAbの4.7分の1であったが、このmAbのDARは4であり、一方、二重パラトープ性構築物のDARは1であった。総ての構築物が予想された効力を示し、毒素濃度に対してIC₅₀を計算した場合、二重パラトープ性1.1-2.1 HDCは対照ADCに比べて匹敵する効力であった。

【0591】

Humabody (商標) 薬コンジュゲート (HDC) の調製のための手順

コンジュゲーション試薬HiPEG (商標) val-cit-PAB-MMAE (図28)の保存溶液は、コンジュゲーション反応を行う前にMeCNで調製した。Humabody (商標)の溶液(PBS中0.9mg/mL; 20mM EDTA, pH7.5)をHiPEG (商標) val-cit-PAB-MMAE試薬(1.5当量/Humabody (商標); 5% (v/v) MeCN終濃度)と穏やかに混合し、22℃で19時間インキュベートした。19時間後、コンジュゲーション反応物を等容量の600mMリン酸ナトリウムバッファー(150mM NaCl; 20mM EDTA)、pH7.5と混合し、4℃に冷却した。1mg/mL NaBH₄溶液の保存溶液は、0.1M NaOHで調製した。各2アリオートのNaBH₄溶液(10当量/試薬)を、添加間を30分空けて、冷却したコンジュゲーション反応物に加えた。さらに30分間隔の後、粗混合物を、TOSOH ToyoPearl Phenyl-650Sカラムを用いた疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)により精製した。サンプルを結合させ、カラム上で50mMリン酸ナトリウム(2M NaCl)、pH7(バッファーA)を用いて洗浄し、50mMリン酸ナトリウム(20% v/v イソプロパノール)、pH7(バッファーB)の勾配を用いて溶出させた。モノロード(mono-loaded)産物を含有する画分をプールし、5kDa MWCO PES膜を取り付けたVivaspin20濃縮器を用いて濃縮した。濃縮した画分を、PD10カラムを用いてDPBSへバッファー交換し、バッファー交換材料を、0.2μm PVDFシリンジ濾過装置を用いて無菌濾過した。

【0592】

HiPEG val-cit-PAB-MMAE部分を、C末端His6タグを介してV_Hに結合される。2つのヒスチジンは各「弾頭」毒素分子の結合のために必要とされる。Humabody V_H、DAR=1種を細胞傷害性試験で使用するために精製し、いくつかの場合では、正確なDAR=1は達成されなかった(下表参照)。本明細書の実施例では、単一MMAE部分を結合させたが、複数の弾頭が可能である(DAR>1)。

【0593】

薬物：抗体比(DAR)3.5の対照ADCの調製のための手順

陽性対照抗体Pro_006は、US8470330内に記載され、抗体006として例示される、重鎖および軽鎖配列から構成される抗PSMA抗体である。

【0594】

コンジュゲーション1：反応バッファー(20mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl; 20mM EDTA, pH7.5)中、mAb Pro_006(5.07mg/mL)の溶液を15分間40℃に温めた。TCEP(5mM、2当量/mAb)をmAb溶液に加え、穏やかに混合し、40℃で1時間インキュベートした。コンジュゲーション試薬mc-val-cit-PAB-MMAE(図29)の保存溶液をDMF中2.8mMで調製した。還元したmAbを22℃に冷却し、反応バッファーで4.2mg/mLに希釈し、mc-val-cit-PAB-MMAE(5.25当量/mAb)を加えた。コンジュゲーション混合物を22℃で2時間インキュベートした。粗コンジュゲーション混合物を22℃にて30分間、50mM/V-アセチル-L-システイン(試薬の20当量超)で処理した。反応混合物に、30kDa MWCO PES膜を取り付けたViv

10

20

30

40

50

aspin20濃縮器を用い、DPBSに対するダイアフィルトレーションを行った。ダイアフィルトレーションを行ったADC溶液を、Centripure P50カラムを用いてDPBSへバッファー交換した。サンプルのDARはHICによって評価した（平均DAR=3.21）。

【0595】

コンジュゲーション2：反応バッファー（20mMリン酸ナトリウム 150mM NaCl；20mM EDTA）、pH7.5中、mAb Pro_006（5.07mg/mL）の溶液を15分間40℃に温めた。TCEP（5mM、2.75当量/mAb）をmAb溶液に加え、穏やかに混合し、40℃で1時間インキュベートした。コンジュゲーション試薬mc-val-cit-PAB-MMAE（図29）の保存溶液をDMF中4.0mMで調製した。還元したmAbを22℃に冷却し、反応バッファーで4.2mg/mLに希釈し、mc-val-cit-PAB-MMAE（7当量/mAb）を加えた。コンジュゲーション混合物を22℃で2時間インキュベートした。粗コンジュゲーション混合物を22℃にて30分間、50mM/V-アセチル-L-システイン試薬の20当量超）で処理した。反応混合物に、30kDa MWCO PES膜を取り付けたVivaspin20濃縮器を用い、DPBSに対するダイアフィルトレーションを行った。ダイアフィルトレーションを行ったADC溶液を、Centripure P50カラムを用いてDPBSへバッファー交換した。サンプルのDARはHICによって評価した（平均DAR=4.52）。

10

【0596】

平均DAR3.5のADCの生産：ADC1（DAR3.21）およびADC2（DAR4.52）を4：1モル比で混合して、間的なDARを有するADCを調製した。得られたサンプルを、0.2µmPVDFシリンジ濾過装置を用いて無菌濾過した。サンプルのDARはHICによって評価した（平均DAR=3.45）。

20

【0597】

半減期延長HDCのin vitro効力

半減期延長HDCのin vitro効力は、DU145細胞死滅アッセイ（72時間）を用いて評価した。

【0598】

表36に記載のこの材料は、HDCに半減期延長部分を付加する効果を試験するために作製した。半減期延長型（HLE）は、MSA結合V_H（配列番号528）を用いて作製した。in vitro効力は、DU145細胞死滅アッセイを用いて評価した（72時間）。図30AおよびBは、（A）PSMAを発現するDU145細胞および（B）PSMAを発現するように改変されていないDU145親細胞の場合の、PSMA-DU145細胞傷害性アッセイ（72時間）でのIC₅₀値を示す：対照ADC mAB-MMAE（黒四角）、2.16GS-1.1-MMAE二重パラトープ性（▲）、2.16GS-1.1-MMAE-HLE半減期延長二重パラトープ性（▼）、HEL4-MMAE一価（●）およびHEL4-HLE-MMAE一価半減期延長（I）。

30

【0599】

【表 40】

表 36 IC₅₀ 値 PSMA-DU145 細胞傷害性アッセイ (72 時間)

形式	V _H	名称	DAR	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (毒素) (nM)	平均最大 細胞 死滅率%
一価	HEL4	HiPEG™ HEL4-His val-cit-PAB-MMAE	1	>100	>100	
二重 ハートアップ性	1.1-6GS-2.1	HiPEG™ 1.1-6GS- 2.1-His val-cit- PAB-MMAE	1	0.27	0.27	86
二重 ハートアップ性- HLE	1.1-6GS- 2.1-6GS- 半減期延長	HiPEG™ 1.1-6GS- 2.1-6GS- 半減期延長 -His val-	1	0.82	0.82	82
		cit-PAB-MMAE				
一価 -HLE	HEL4-6GS- 半減期延長	HiPEG™ HEL4- 6GS- 半減期延長 -His val- cit-PAB-MMAE	1	>100	>100	
mAb	Control PSMA mAb-MMAE	Pro_006-mc-val- cit-PAB-MMAE	3.5	0.061	0.2135	89

10

20

30

【図 1 - 2】

Figure 1

Figure 1 Continued

2.1
EVLVESGGGVWQPGSRSLRLCAASGFSFGYGMHVVVQAPGKLEWVAVSYDGSNNYYADSVKGRFTSRDN
SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDPAWGLRLGELSSYDFEWGGQTAVTVSS

2.2
EVLVESGGGVWQPGSRSLRLCAASGFSFGYGMHVVVQAPGKLEWVAVSYDGSNNYYADSVKGRFTSRDN
SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDPAWGLRLGELSSYDFEWGGQTAVTVSS

2.3
EVLVESGGGVWQPGSRSLRLCAASGFSFGYGMHVVVQAPGKLEWVAVSYDGSNNYYADSVKGRFTSRDN
SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDPAWGLRLGELSSYDFEWGGQTAVTVSS

2.4
QVTLVESGGGVWQPGSRSLRLCAASGFSFGYGMHVVVQAPGKLEWVAVSYDGSNNYYADSVKGRFTSRDN
NSKNTLSLQVNSLRAEDTAVYYCAKDPAWGLRLGELSSYDFEWGGQTAVTVSS

2.5
QVCLVESGGGVWQPGSRSLRLCAASGFSFGYGMHVVVQAPGKLEWVAVSYDGSNNYYADSVKGRFTSRDN
NSKNTLSLQVNSLRAEDTAVYYCAKDPAWGLRLGELSSYDFEWGGQTAVTVSS

2.6
EVLVESGGGVWQPGSRSLRLCAASGFSFGYGMHVVVQAPGKLEWVAVSYDGSNNYYADSVKGRFTSRDN
NSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDPAWGLRLGELSSYDFEWGGQTAVTVSS

2.7
EVLVESGGGVWQPGSRSLRLCAASGFSFGYGMHVVVQAPGKLEWVAVSYDGSNNYYADSVKGRFTSRDN
SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDPAWGLRLGELSSYDFEWGGQTAVTVSS

2.8
QVCLVESGGGVWQPGSRSLRLCAASGFSFGYGMHVVVQAPGKLEWVAVSYDGSNNYYADSVKGRFTSRDN
NSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDPAWGLRLGELSSYDFEWGGQTAVTVSS

2.9
EVLVESGGGVWQPGSRSLRLCAASGFSFGYGMHVVVQAPGKLEWVAVSYDGSNNYYADSVKGRFTSRDN
SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDPAWGLRLGELSSYDFEWGGQTAVTVSS

2.10
EVLVESGGGVWQPGSRSLRLCAASGFSFGYGMHVVVQAPGKLEWVAVSYDGSNNYYADSVKGRFTSRDN
NSKNTLSLQVNSLRAEDTAVYYCAKDPAWGLRLGELSSYDFEWGGQTAVTVSS

Figure 2

【☒ 3 - 1】

Figure 2 Continued

3.1:
EVQLVESGGGVVQPGKSLRLCAASGFLPSISGMNHWVRQAPKGKLEWVAFTYDGSNRYIYADSVKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCAKDRIVGARVPDAIYWGSGTMTVTS

3.2:
EVQLVESGGGVVQPGKSLRLCAASGFLPSISGMNHWVRQAPKGLDWVAFTYDGSNRYIYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDRIVGARVPDAFIWGSGTMTVTS

3.3:
EVQLVESGGGVVQPGKSLRLCAASGFLPSISGMNHWVRQAPKGLDWVAFTYDGSNRYIYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDRIVGARVPDAFIWGSGTMTVTS

3.4:
EVQLVESGGGVVQPGKSLRLCAASGFLPSISGMNHWVRQAPKGLDWVAFTYDGSNRYIYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDRIVGARVPDAFIWGSGTMTVTS

3.5:
EVQLVESGGGVVQPGKSLRLCAASGFLPSISGMNHWVRQAPKGLDWVAFTYDGSNRYIYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCAKDRIVGARVPDAIYWGSGTMTVTS

3.6:
EVQLVESGGGVVQPGKSLRLCAASGFLPSISGMNHWVRQAPKGLDWVAFTYDGSNRYIYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCAKDRIVGARVPDAIYWGSGTMTVTS

3.7:
EVQLVESGGGVVQPGKSLRLCAASGFLPSISGMNHWVRQAPKGLDWVAFTYDGSNRYIYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCAKDRIVGARVPDAIYWGSGTMTVTS

3.8:
EVQLVESGGGVVQPGKSLRLCAASGFLPSISGMNHWVRQAPKGLDWVAFTYDGSNRYIYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCAKDRIVGARVPDAIYWGSGTMTVTS

3.9:
EVQLVESGGGVVQPGKSLRLCAASGFLPSISGMNHWVRQAPKGLDWVAFTYDGSNRYIYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCAKDRIVGARVPDAIYWGSGTMTVTS

3.10:
EVQLVESGGGVVQPGKSLRLCAASGFLPSISGMNHWVRQAPKGLDWVAFTYDGSNRYIYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCAKDRIVGARVPDAIYWGSGTMTVTS

3.11:
EVQLVESGGGVVQPGKSLRLCAASGFLPSISGMNHWVRQAPKGLDWVAFTYDGSNRYIYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCAKDRIVGARVPDAIYWGSGTMTVTS

3.12:
EVQLVESGGGVVQPGKSLRLCAASGFLPSISGMNHWVRQAPKGLDWVAFTYDGSNRYIYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCAKDRIVGARVPDAIYWGSGTMTVTS

Figure 3

Figure 8

【図 9】

9.1

QVQLQQGAGLLKPSSETSLTCAVYGGSPGHYWSWIRQPPGKGLWIGDINHSGSTVYNPSLKSRYTISVOTSR
 NQPSLKLSVTAADTA VYCYRDYGGDSRLFDYVWGQSTLVTVSS

Figure 9

【図 10】

10.1

QVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLWVAIVMSYDGSNKKYYVDSVKGRFTSRO
 NSKNTLYEQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDYDFWVGYPDDMDIVWGQSTLVTVSS

Figure 10

【図 11】

11.1

EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLWVAIVMSYDGSNKKYYVDSVKGRFTISRDN
 SKNTLYEQMNSLRAEDTAVYYCAKGGNLYSSGWPDGDFIRGQSTLVTVSS

Figure 11

【図 12】

12.1

QVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLWVAIVMSYDGSNKKYYVDSVKGRFTISRDN
 NSKNTLYEQMNSLRAEDTAVYYCAKGLWPPMDVIRGQSTLVTVSS

Figure 12

【図 13】

13.1

EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLWVAIVMSYDGSNKKYYVDSVKGRFTISRDN
 NAKNTLYEQMNSLRAEDTAVYYCARDRGGAVALYHNGMDMVGQSTLVTVSS

Figure 13

【図 14】

14.1

KCSWWSLGEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMNPNNGNTGYAQKFGGRVMT
 RNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARNGSPGFTTDTYWGQSTLVTVSS

Figure 14

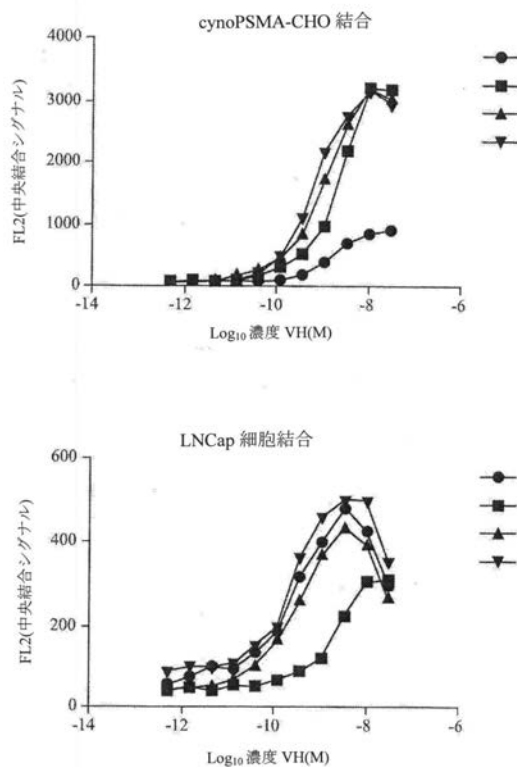
【図 15】

15.1

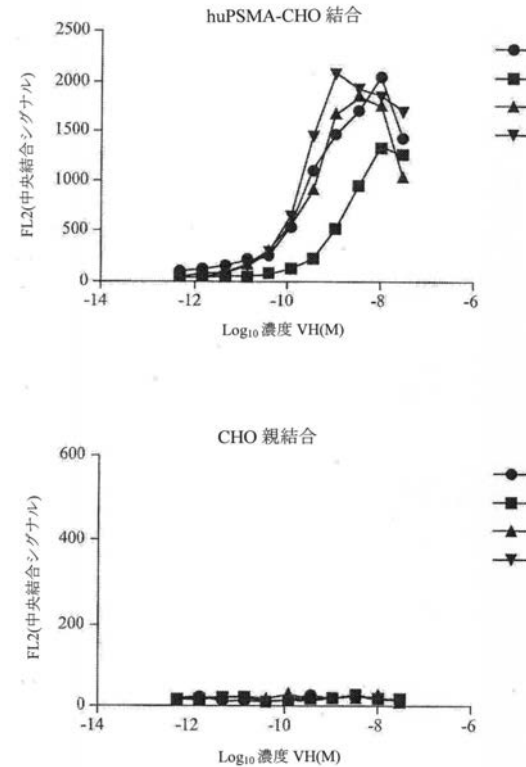
EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYGMSSWVRQAPGKGLWVSGINWNGDRGTGYADSVKGRFTISR
 DNARNSLYEQMNSLRAEDTALYYCGENVVPAATYWGQSTLVTVSS

Figure 15

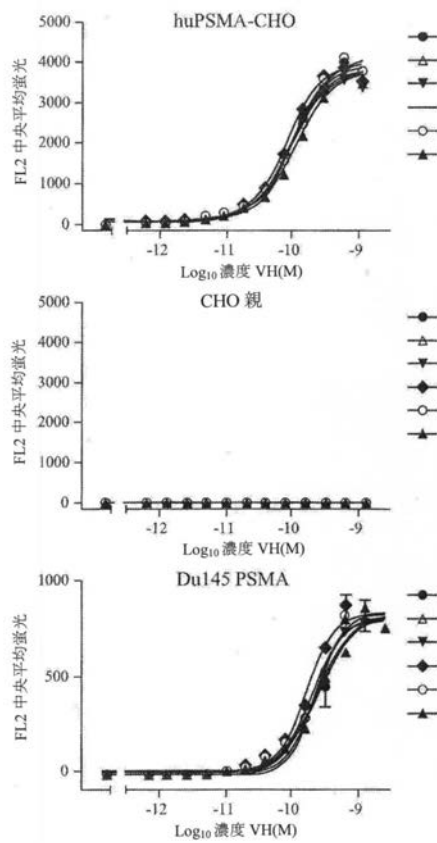
【図 16 a - 1】



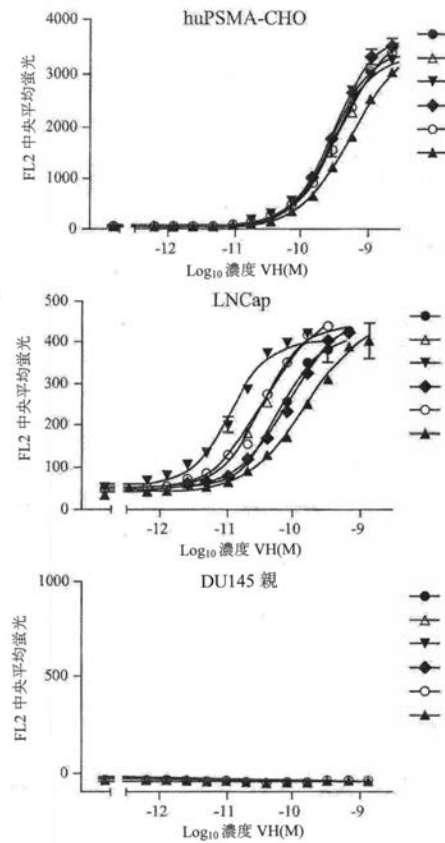
【図 16 a - 2】



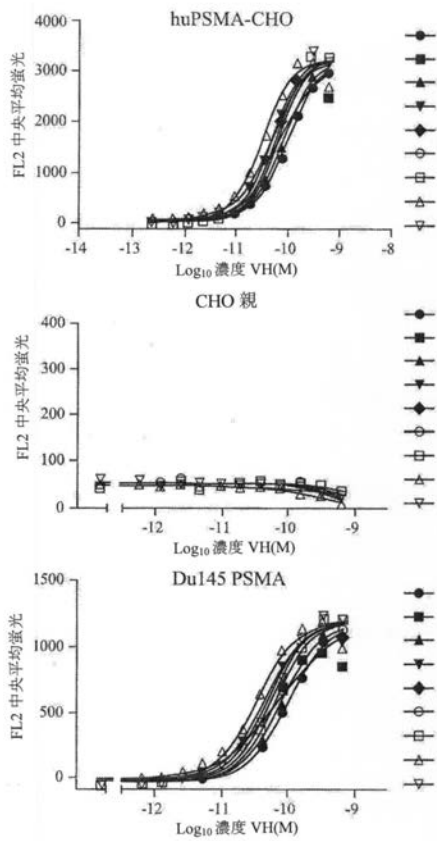
【図 16b-1】



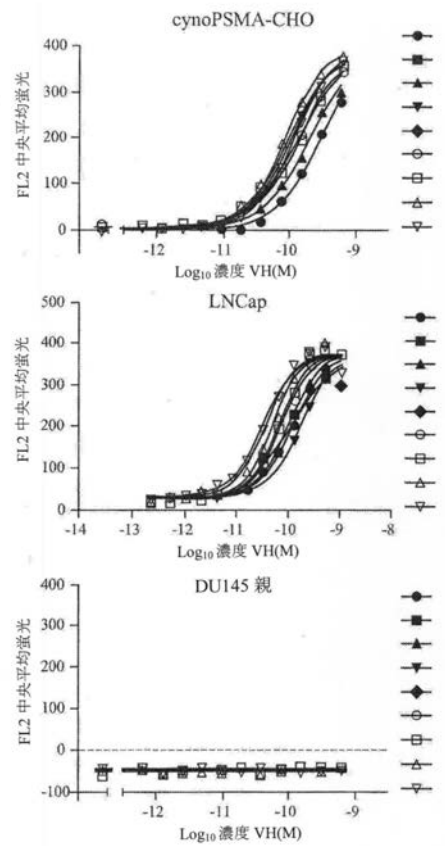
【図 16b-2】



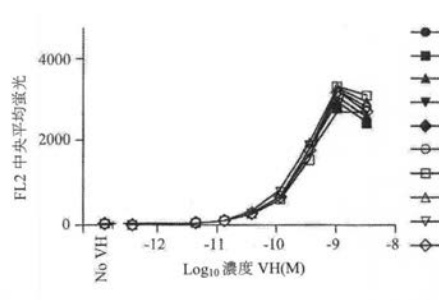
【図 16c-1】



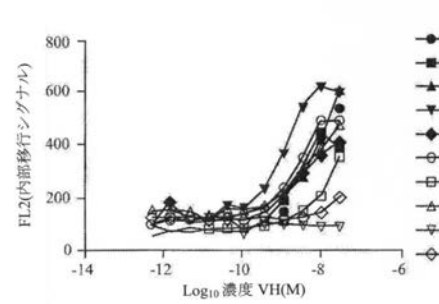
【図 16c-2】



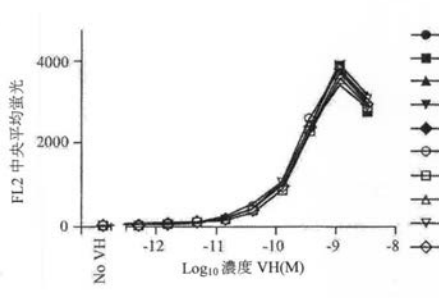
【図 16 d】



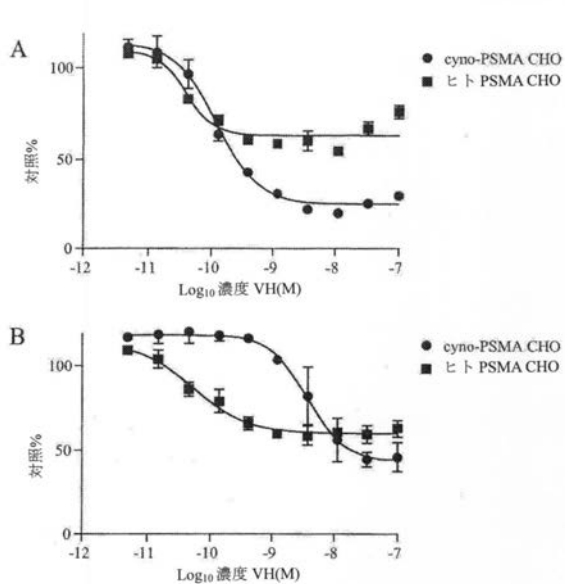
【図 17】



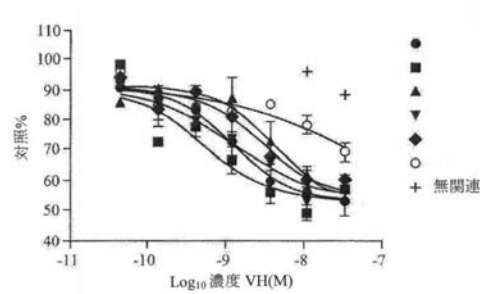
【図 16 e】



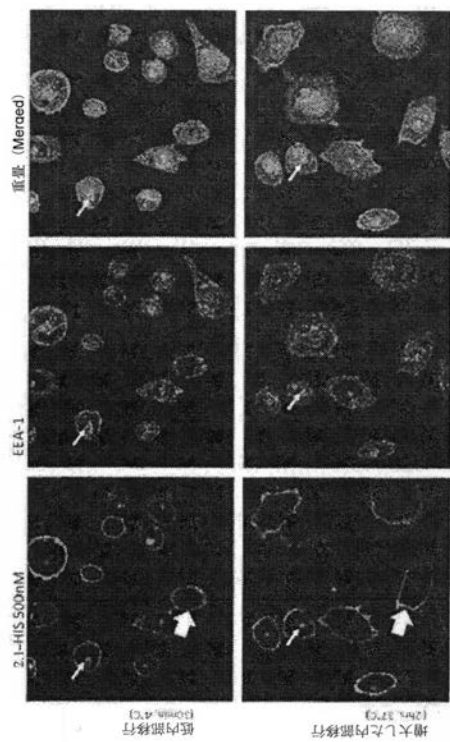
【図 18】



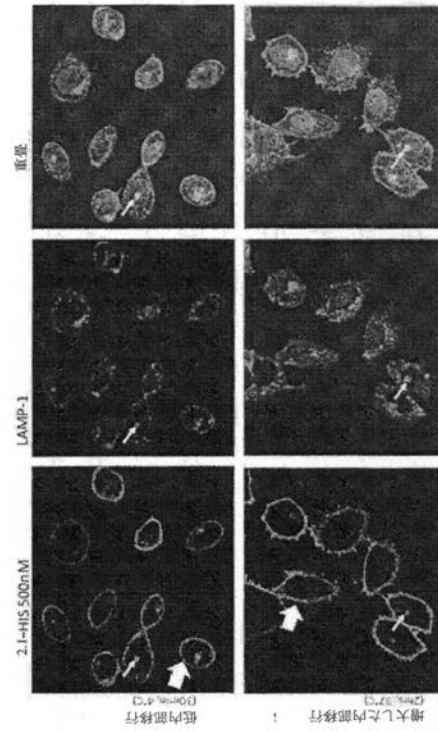
【図 19】



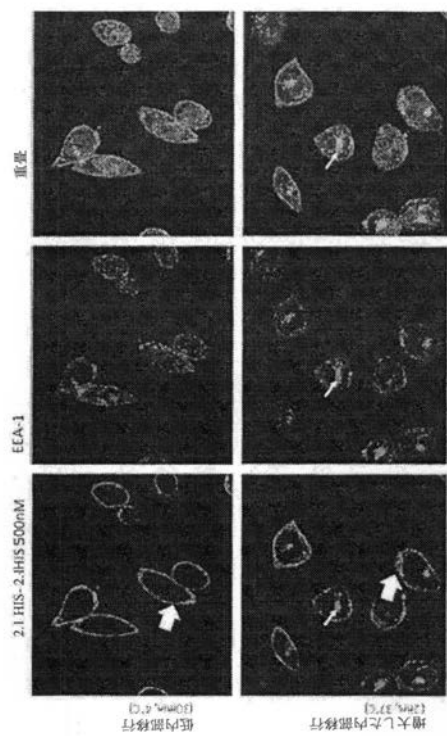
【図 20 a】



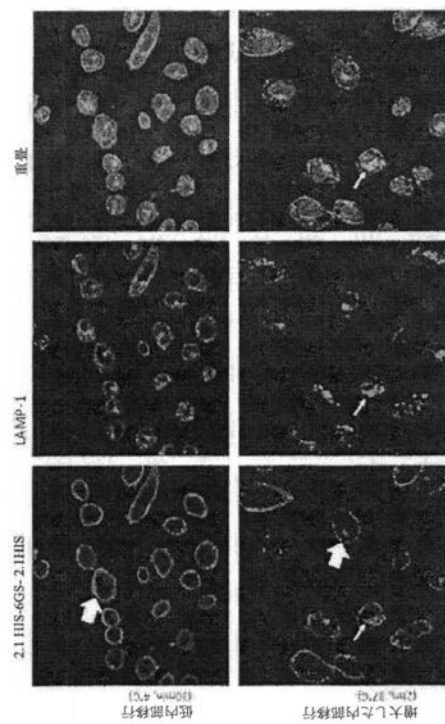
【図 20 b】



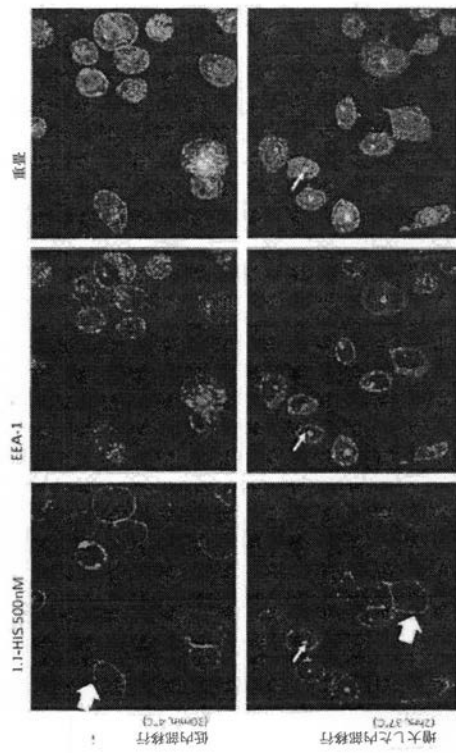
【図 21 a】



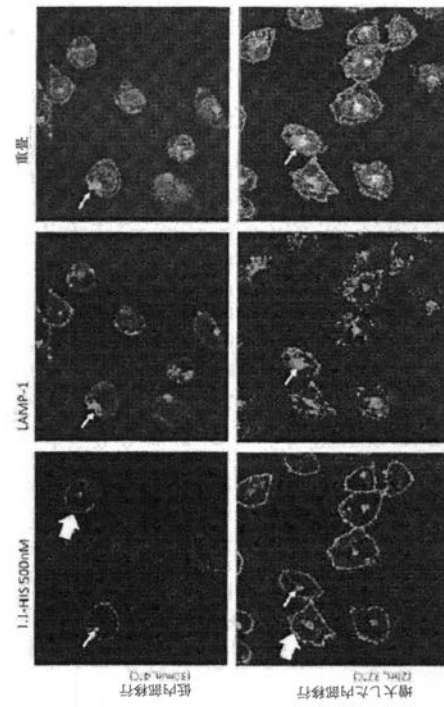
【図 21 b】



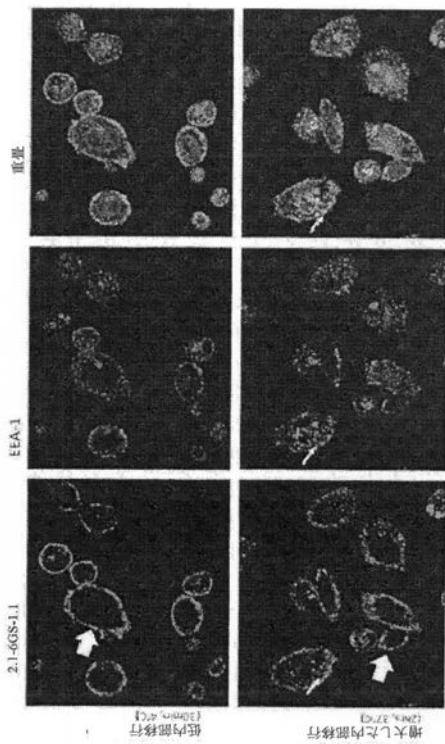
【図 2 2 a】



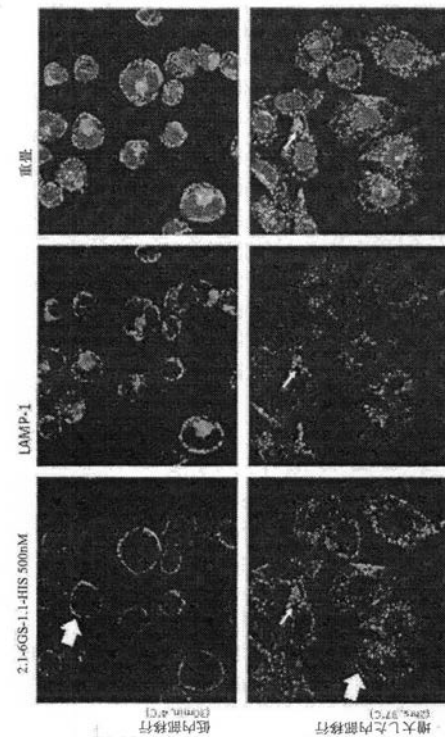
【図 2 2 b】



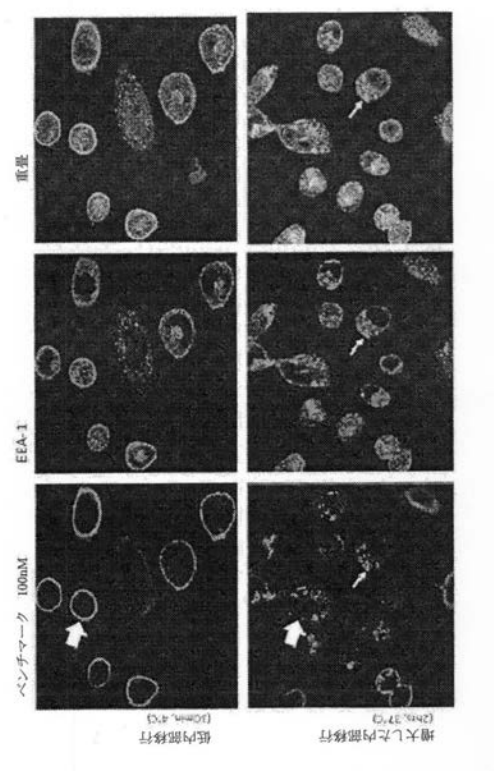
【図 2 3 a】



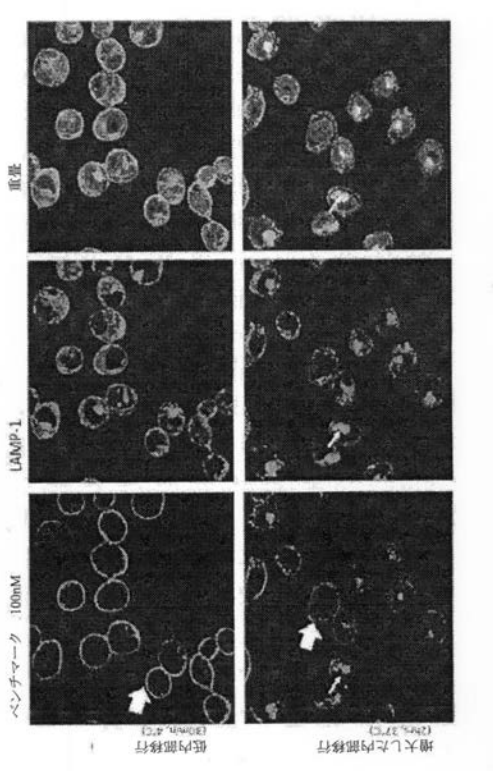
【図 2 3 b】



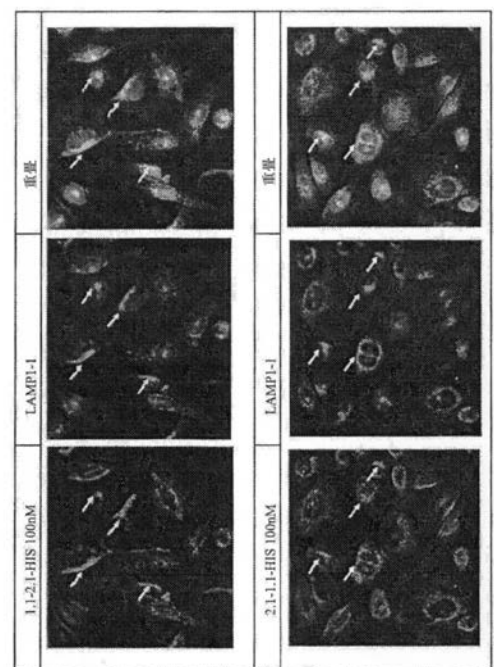
【図 2 4 a】



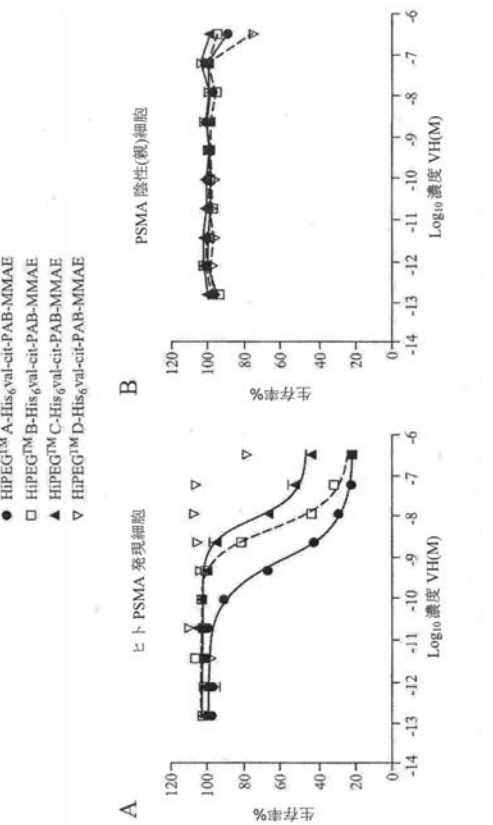
【図 2 4 b】



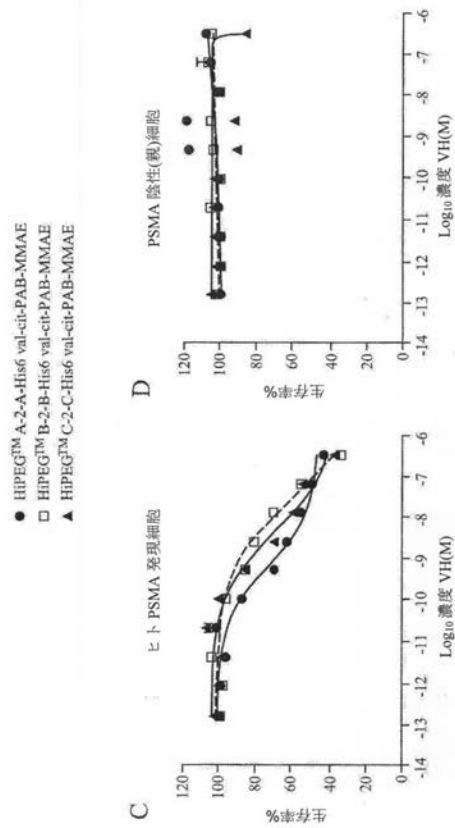
【図 2 5】



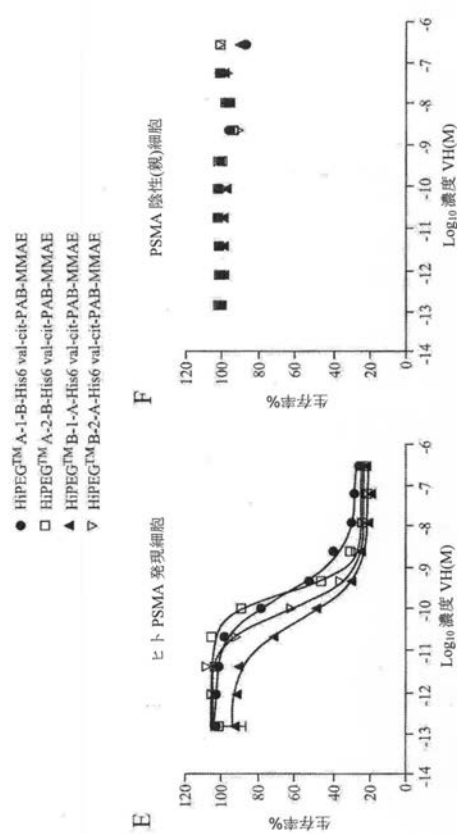
【図 2 6 A - B】



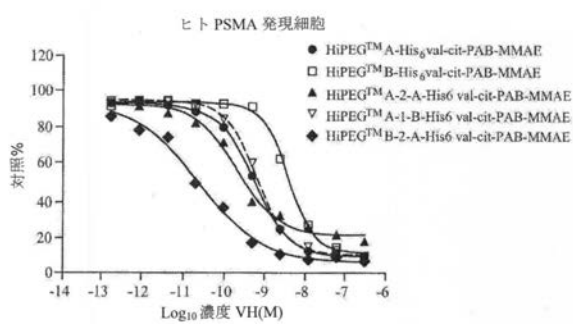
【図 26 C - D】



【図 26 E - F】



【図 27】



【図 28】

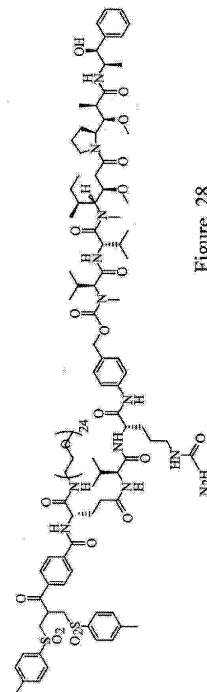
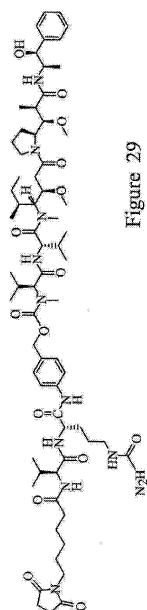
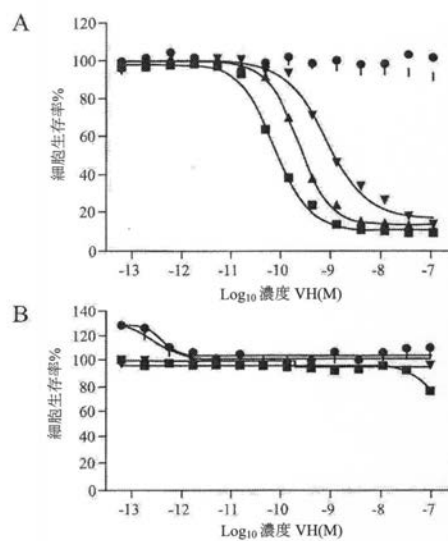


Figure 28

【図 29】



【図 30 A - B】



【配列表】

2019511201000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2017/050075

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/30 G01N33/53
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 G01N

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, BIOSIS, 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	XIAOZHOU FAN ET AL: "Ultrasonic Nanobubbles Carrying Anti-PSMA Nanobody: Construction and Application in Prostate Cancer-Targeted Imaging", PLOS ONE, vol. 10, no. 6, 25 June 2015 (2015-06-25), page e0127419, XP055354157, DOI: 10.1371/journal.pone.0127419	1-81
Y	the whole document page 3, paragraph 2 - page 4, paragraph 1; figure 2 page 10 ----- -/--	1-81

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent 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

14 March 2017

Date of mailing of the international search report

23/03/2017

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

Siaterli, Maria

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB2017/050075

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2017/056075

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K. L. S. CHATALIC ET AL: "A Novel 111In-Labeled Anti-Prostate-Specific Membrane Antigen Nanobody for Targeted SPECT/CT Imaging of Prostate Cancer", THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, vol. 56, no. 7, 1 July 2015 (2015-07-01), pages 1094-1099, XP055354159, US ISSN: 0161-5505, DOI: 10.2967/jnumed.115.156729	1-81
Y	the whole document paragraph [discussion]; figure 2 page 109, right-hand column, paragraph 3 -----	1-81
X	MEHDI EVAZALIPOUR ET AL: "Camel Heavy Chain Antibodies Against Prostate-Specific Membrane Antigen", HYBRIDOMA, vol. 31, no. 6, 1 December 2012 (2012-12-01), pages 424-429, XP055353574, US ISSN: 1554-0014, DOI: 10.1089/hyb.2012.0048	1-81
Y	the whole document paragraph [results] -----	1-81
X	MEKKI BAYACHOU ET AL: "Catalytic Two-Electron Reductions of N 2 O and N 3 - by Myoglobin in Surfactant Films", INORGANIC CHEMISTRY, vol. 39, no. 2, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 289-293, XP055352576, EASTON, US ISSN: 0020-1669, DOI: 10.1021/ic990672u	1-81
Y	the whole document paragraphs [section2], [02.4]; figure 2c -----	1-81
X	HAMED ZARE ET AL: "Production of nanobodies against prostate-specific membrane antigen (PSMA) recognizing LnCaP cells", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MARKERS., vol. 29, no. 2, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 169-179, XP055353599, IT ISSN: 0393-6155, DOI: 10.5301/jbm.5000063	1-81
Y	the whole document page 8, left-hand column, paragraph 4; figure 5 page 6, right-hand column, paragraph 3 page 8, right-hand column, last paragraph -----	1-81
	----- -/--	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2017/056075

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Crescendo Biologics: "Humabody fragments: Small and perfectly formed", 15 March 2015 (2015-03-15), pages B12-B13, XP055257512, Retrieved from the Internet: URL:http://www.crescendobiologics.com/uploads/news/id34/Crescendo0315.pdf [retrieved on 2016-03-11] figures 1,2 the whole document -----	1-81

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 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04	4 C 0 8 4
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
A 6 1 K	51/10	(2006.01)	A 6 1 K	51/10	2 0 0
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	C
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
A 6 1 K	38/05	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 K	47/68	
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	A 6 1 K	49/00	
G 0 1 N	33/48	(2006.01)	A 6 1 K	38/05	
C 1 2 N	5/09	(2010.01)	A 6 1 P	13/08	
C 1 2 N	15/70	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
			G 0 1 N	33/53	Y
			G 0 1 N	33/574	A
			G 0 1 N	33/48	M
			C 1 2 N	5/09	
			C 1 2 N	15/70	Z

(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,DJ,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,KH,KN,KP,KR,KW,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

(74)代理人 100105153

弁理士 朝倉 悟

(74)代理人 100120617

弁理士 浅野 真理

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(74)代理人 100143971

弁理士 藤井 宏行

(72)発明者 エレアノラ、バロイ

イギリス国ケンブリッジ、メディトリーナ、ビルディング、260、バブラハム、リサーチ、キャンパス

(72)発明者 ノルマン、グッドウィン

イギリス国ケンブリッジ、メディトリーナ、ビルディング、260、バブラハム、リサーチ、キャンパス

(72)発明者 ブライアン、マクギネス

イギリス国ケンブリッジ、メディトリーナ、ビルディング、260、バブラハム、リサーチ、キャンパス

ンパス

- (72)発明者 クリス、ロザント
イギリス国ケンブリッジ、メディトリーナ、ビルディング、260、バブラハム、リサーチ、キャンパス
- (72)発明者 トーマス、サンダル
イギリス国ケンブリッジ、メディトリーナ、ビルディング、260、バブラハム、リサーチ、キャンパス
- (72)発明者 ロレイン、トンプソン
イギリス国ケンブリッジ、メディトリーナ、ビルディング、260、バブラハム、リサーチ、キャンパス

F ターム(参考) 2G045 AA26 CB02 DA36 FB03
4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS07 QS33
QX01
4B064 AG27 CA19 CC24 CE02 DA05 DA14
4B065 AA26X AA92X AA92Y AA93X AA93Y AA98X AB01 AC14 BA02 BD01
CA25 CA44 CA46
4C076 AA11 AA17 AA22 AA24 AA94 AA95 BB01 BB11 BB13 BB14
BB15 BB16 BB21 BB25 BB28 BB29 CC17 CC27 EE23 EE59
FF02 FF31
4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA23 BA32 BA41 CA59 DA27 MA13
MA16 MA22 MA23 MA52 MA56 MA59 MA60 MA66 NA13 NA14
ZA811 ZA812 ZB261 ZB262
4C085 AA13 AA14 AA21 BB11 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41
BB42 BB43 CC01 CC21 DD32 DD33 DD35 DD36 DD88 EE01
GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10 HH03 HH07
HH11 HH20 JJ02 JJ03 JJ17 KA03 KA27 KA29 KA36 KB74
KB82 LL11 LL18
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 BA71 CA40 DA76 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	与前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 结合的分子		
公开(公告)号	JP2019511201A	公开(公告)日	2019-04-25
申请号	JP2018537519	申请日	2017-01-12
发明人	エレアノラ、バロイ ノルマン、グッドウィン ブライアン、マクギネス クリス、ロザント トーマス、サンダル ロレイン、トンプソン		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C07K16/46 C12P21/08 C12N15/62 C12Q1/04 C12N5/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 A61K51/10 A61K39/395 A61K47/68 A61K49/00 A61K38/05 A61P13/08 A61P35/00 G01N33 /53 G01N33/574 G01N33/48 C12N5/09 C12N15/70		
CPC分类号	C07K16/3069 A61K47/6415 A61K47/6425 A61K47/643 A61K47/644 A61K47/6811 A61K47/6869 A61K47/6889 A61P35/00 C07K2317/21 C07K2317/35 C07K2317/569 C07K2317/77 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/57434		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/28 C07K16/46 C12P21/08 C12N15/62.Z C12Q1/04 C12N5/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 A61K51/10.200 A61K39/395.C A61K39/395.D A61K39/395.E A61K39/395.L A61K39/395.N A61K39/395.T A61K47/68 A61K49/00 A61K38/05 A61P13/08 A61P35/00 G01N33/53.Y G01N33/574.A G01N33/48.M C12N5/09 C12N15/70.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FB03 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063 /QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS07 4B063/QS33 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE02 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065 /AA92X 4B065/AA92Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AA98X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065 /BA02 4B065/BD01 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA11 4C076/AA17 4C076/AA22 4C076/AA24 4C076/AA94 4C076/AA95 4C076/BB01 4C076/BB11 4C076/BB13 4C076/BB14 4C076 /BB15 4C076/BB16 4C076/BB21 4C076/BB25 4C076/BB28 4C076/BB29 4C076/CC17 4C076/CC27 4C076/EE23 4C076/EE59 4C076/FF02 4C076/FF31 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084 /BA08 4C084/BA23 4C084/BA32 4C084/BA41 4C084/CA59 4C084/DA27 4C084/MA13 4C084/MA16 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA66 4C084 /NA13 4C084/NA14 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085 /AA14 4C085/AA21 4C085/BB11 4C085/BB33 4C085/BB34 4C085/BB35 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB41 4C085/BB42 4C085/BB43 4C085/CC01 4C085/CC21 4C085/DD32 4C085/DD33 4C085 /DD35 4C085/DD36 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH11 4C085 /HH20 4C085/JJ02 4C085/JJ03 4C085/JJ17 4C085/KA03 4C085/KA27 4C085/KA29 4C085/KA36 4C085/KB74 4C085/KB82 4C085/LL11 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045 /BA41 4H045/BA71 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	永井裕之 中村KoTakashi 朝仓悟 浅野麻里 反町隆史博 藤井裕之		
优先权	2016000559 2016-01-12 GB 2016005770 2016-04-04 GB 2016005763 2016-04-04 GB		

摘要(译)

本公开涉及特异性结合前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的结合分子，特别是单个人可变重链结构域抗体以及用于治疗癌症的相关方法。

(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2019-511201	
				(P2019-511201A)	
				(平成31年4月25日 (2019. 4. 25))	
				(43) 公表日	
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)		C 1 2 N 15/13		Z N A 2 G 0 4 5	
C O 7 K 16/28 (2006.01)		C O 7 K 16/28		4 B 0 6 3	
C O 7 K 16/46 (2006.01)		C O 7 K 16/46		4 B 0 6 4	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08		4 B 0 6 5	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)		C 1 2 N 15/62		Z 4 C 0 7 6	
		審査請求 未請求		予備審査請求 未請求 (全 169 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号		特願2018-537519 (P2018-537519)		(71) 出願人 518247933	
(86) (22) 出願日		平成29年1月12日 (2017. 1. 12)		クレッシェンド、バイオロジックス、リミテッド	
(85) 翻訳文提出日		平成30年9月10日 (2018. 9. 10)		CRESCENDO BIOLOGICS LIMITED	
(86) 国際出願番号		PCT/GB2017/050075		イギリス国ケンブリッジ、メディトリーナ、ビルディング、260、バブラハム、リサーチ、キャンパス	
(87) 国際公開番号		W02017/122018			
(87) 国際公開日		平成29年7月20日 (2017. 7. 20)			
(31) 優先権主張番号		1600559. 7		(74) 代理人 100091982	
(32) 優先日		平成28年1月12日 (2016. 1. 12)		弁理士 永井 浩之	
(33) 優先権主張国		英国 (GB)		(74) 代理人 100091487	
(31) 優先権主張番号		1605770. 5		弁理士 中村 行孝	
(32) 優先日		平成28年4月4日 (2016. 4. 4)		(74) 代理人 100082981	
(33) 優先権主張国		英国 (GB)		弁理士 佐藤 泰和	
(31) 優先権主張番号		1605763. 0			
(32) 優先日		平成28年4月4日 (2016. 4. 4)			
(33) 優先権主張国		英国 (GB)			
				最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 前立腺特異的膜抗原 (P S M A) と結合する分子					