

(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2017-536114

(P2017-536114A)

(43) 公表日 平成29年12月7日(2017.12.7)

|                                     |       |           |         |       |             |           |
|-------------------------------------|-------|-----------|---------|-------|-------------|-----------|
| (51) Int. Cl.                       |       | F I       |         |       | テーマコード (参考) |           |
| C 1 2 N                             | 15/02 | (2006.01) | C 1 2 N | 15/00 | C           | 4 B 0 6 4 |
| C 1 2 P                             | 21/08 | (2006.01) | C 1 2 P | 21/08 | Z N A       | 4 B 0 6 5 |
| C O 7 K                             | 16/46 | (2006.01) | C O 7 K | 16/46 |             | 4 C 0 8 4 |
| C O 7 K                             | 19/00 | (2006.01) | C O 7 K | 19/00 |             | 4 C 0 8 5 |
| C 1 2 N                             | 1/15  | (2006.01) | C 1 2 N | 1/15  |             | 4 H 0 4 5 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く |       |           |         |       |             |           |

(21) 出願番号 特願2017-524014 (P2017-524014)  
 (86) (22) 出願日 平成27年10月21日 (2015.10.21)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年5月2日 (2017.5.2)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/002086  
 (87) 国際公開番号 W02016/070959  
 (87) 国際公開日 平成28年5月12日 (2016.5.12)  
 (31) 優先権主張番号 14003700.3  
 (32) 優先日 平成26年11月3日 (2014.11.3)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591032596  
 メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ  
 ト ベシュレンクテル ハフツング  
 Merck Patent Gesell  
 schaft mit beschrae  
 nkter Haftung  
 ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ  
 ルムシュタット フランクフルター シュ  
 トラーセ 250  
 Frankfurter Str. 25  
 0, D-64293 Darmstadt  
 , Federal Republic o  
 f Germany

(74) 代理人 100094569  
 弁理士 田中 伸一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二重特異性サメ抗体可変ドメインの製造方法およびそれらの使用

## (57) 【要約】

本発明は、二重特異性サメ抗体可変ドメイン(vNARドメイン)の製造方法およびその使用を提供する。本発明はさらに、本発明の二重特異性vNARドメインだけでなく本発明の二重特異性vNARの製造に使用するためのポリヌクレオチドライブラリーを含む融合タンパク質を提供する。さらにまた、本発明は、個体の病的状態の治療に使用するための、本発明の二重特異性vNARまたは二重特異性vNARドメインを含む融合タンパク質を含む医薬組成物を提供する。本発明はまた、本発明の二重特異性vNARドメインまたは融合タンパク質を含むパーツのキットを提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

FW1-CDR1-FW2-HV2-FW3a-HV4-FW3b-CDR3-FW4の構造を有する二重特異性サメ抗体可変ドメイン(vNARドメイン)の製造方法であって、

d. 超可変領域2(HV2)をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列をランダム化する工程、

e. HV2が、対照試料と比較して改変された親和性で目的の抗原に結合し、第2の目的の抗原が、CDR3およびCDR1によって形成されるパラトープによって特異的に結合されるvNARドメインを検出する工程、

f. (b)のvNARドメインを選択する工程、  
を含む前記方法。

10

**【請求項 2】**

vNARドメインが、vNARタイプI、vNARタイプIIまたはvNARタイプIVの1つである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

vNARをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドに含まれるHV2領域をコードするポリヌクレオチドのランダム化が、コドンベースのランダム化、NNBランダム化、NNKランダム化、NNSランダム化または偏りのあるランダム化を含む、請求項1または2に記載の方法。

**【請求項 4】**

HV2ドメインをコードするポリヌクレオチド配列がヌクレオチド配列NNN<sub>1</sub>(NNN)<sub>7</sub>NNN<sub>9</sub>(配列番号1)を含み、前記ヌクレオチド配列において

- 位置1のコドンの50%がアミノ酸リジンをコードし、残りの50%がシステイン以外の任意のアミノ酸をコードし、
  - コドン2~8が任意のアミノ酸をコードすることができ、
  - 位置9のコドンの50%が、アミノ酸トレオニンをコードし、残りの50%がシステイン以外の任意のアミノ酸をコードする、
- 請求項1~3のいずれか1つに記載の方法。

20

**【請求項 5】**

第1抗原に対して対照試料に比較して改変された親和性を示すvNARが、酵母表面ディスプレイ、ファージディスプレイ、哺乳動物ディスプレイまたはタンパク質アレイの1つによって検出および/または選択される、請求項1~4のいずれか1つに記載の方法。

30

**【請求項 6】**

NARが、検出可能なタグをさらに含む、請求項1~5のいずれか1つに記載の方法。

**【請求項 7】**

検出可能なタグが、vNARのアミノ末端および/またはカルボキシ末端に位置する、請求項1~6のいずれか1つに記載の方法。

**【請求項 8】**

vNARの検出および/または選択が、フローサイトメトリー、FACS、ELISAまたはマイクロフルイディクスによって行われる、請求項1~7のいずれか1つに記載の方法。

40

**【請求項 9】**

第1および第2の目的の抗原が細胞表面抗原であり、好ましくは癌細胞表面抗原である、請求項1~8のいずれか1つに記載の方法。

**【請求項 10】**

請求項1~10のいずれか1つに記載のランダム化HV2ドメインを含む融合タンパク質または請求項1~10のいずれか1つに記載のランダム化HV2ドメインを含む前記vNARドメイン。

**【請求項 11】**

IgG-Fcドメイン、VH、VL、VHH抗体ドメインの1つまたはそれらのフラグメントを含む、請求項10に記載の融合タンパク質。

**【請求項 12】**

50

融合タンパク質がヒト化されている、請求項10または請求項11に記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

Fcドメインが、ヒトIgG-Fcドメインまたはその配列変種を含む、請求項10～12のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

前記第1および前記第2目的の抗原に結合する融合タンパク質が、in vivoでADCCを誘導する、請求項10～13のいずれか1つに記載の融合タンパク質。

【請求項 15】

請求項1～9のいずれか1つに記載の方法によって製造されるvNAR。

10

【請求項 16】

請求項15に記載のvNARまたは請求項10～14のいずれか1つに記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項 17】

請求項16に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 18】

請求項10～15のいずれか1つに記載のvNARまたはvNAR融合タンパク質の製造方法であって、

-vNARまたはvNAR融合タンパク質のタンパク質発現に十分な条件下で請求項17に記載の少なくとも1つの宿主細胞を培養する工程、

20

-前記vNARタンパク質またはvNAR融合タンパク質を分離精製する工程、を含む前記方法。

【請求項 19】

請求項1～9のいずれか1つに記載のHV2ドメインをコードする複数のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドライブラリー。

【請求項 20】

全体構造がFW1-CDR1-FW2-HV2-FW3a-HV4-FW3b-CDR3-FW4であるタイプI、IIまたはタイプIV vNARドメインをコードする複数のポリヌクレオチドを含み、前記HV2ドメインが、請求項1～4のいずれか1つに記載のランダム化ポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項20に記載のポリヌクレオチドライブラリー。

30

【請求項 21】

配列番号2、配列番号4、配列番号5のアミノ酸配列を含む二重特異性vNAR。

【請求項 22】

医薬の製造における、請求項1～9もしくは請求項15のいずれか1つに記載のvNARまたは請求項10～14のいずれか1つに記載の融合タンパク質の使用。

【請求項 23】

請求項15に記載のvNARまたは請求項10～14のいずれか1つに記載のvNAR融合タンパク質と薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む医薬組成物。

【請求項 24】

請求項23に記載の医薬組成物を、それを必要とする個体に投与することを含む、病的状態にある個体の治療方法。

40

【請求項 25】

病的状態が癌、自己免疫疾患またはウイルス感染である、請求項24に記載の治療方法。

【請求項 26】

個体が腫瘍を有する、請求項25に記載の治療方法。

【請求項 27】

個体がヒトである、請求項24～26のいずれか1つに記載の治療方法。

【請求項 28】

請求項1～9のいずれか1つまたは請求項15に記載の二重特異性vNARまたはvNAR融合タンパク質と前記vNARを検出する手段とを含むキット。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、二重特異性サメ抗体可変ドメイン(vNARドメイン)の製造およびその使用に関する。特に、本発明は、所望の表現型のvNARを同定するためのランダム化(randomized)vNARドメインのポリヌクレオチドライブラリーの製造方法およびスクリーニング方法に関する。本発明の方法は、特に、新規二重特異性抗体の製造およびそれらの使用に有用である。

## 【背景技術】

## 【0002】

10

セクター全体を顕著に上回る現在のおよび予測される市場の拡大で例示されるように、今日、生物由来物質は医薬産業の主な原動力の1つである。この生物学的薬物グループの中では、モノクローナル抗体(mAb)が最も多く販売される生物製剤クラスであり、ホルモン、増殖因子および融合タンパク質がそれぞれそれに続く。Fc媒介性免疫エフェクター機能と組み合わせられた、同種抗原に対する高い特異性は、医療用途のための有効なツールとして抗体の成功の基礎となった。米国食品医薬品局(FDA)が、今日まで、約40の抗体を認可し、数百のmAbが臨床開発中であることを考慮すれば、mAbの治療的価値および経済的価値は明らかである。

IgG型抗体は、分子量約150kDを有する、構造的に複雑で大きなヘテロ四量体タンパク質である。IgG型抗体は、2つのH鎖と2つのL鎖を含む。同一の2つの抗原結合部位(すなわち 20

## 【0003】

IgG分子のFcフラグメントのCH2ドメインは、N-グリコシル化によって連結されたグリカンを含み、これは、異なる末端糖が存在するため高度に不均一である。Fcグリカンは、IgGのFc受容体およびC1qへの結合に影響を及ぼすが、それゆえにIgGエフェクター機能に重要である。特に、シアル酸、コアフコース、バイセクティングN-アセチルグルコサミンおよびマンノース残基などの末端糖は、FcγRIIIa受容体に対するIgGの結合に影響を及ぼし、それによってADCC活性に影響する(例えばStadlmann et al. Proteomics. 2008 Jul;8(14):2858-71を参照のこと)。

しかしながら、特定の環境下では、IgG型抗体などの抗体による治療および診断の有効性は、それらの固有の物理化学的性質によって限定される場合がある。例えば、古典的抗体分子の組織浸透性は、それらの大きなサイズによって妨げられ(例えばMordenti et al. (1999) Toxicol Pathol 27:536-44を参照のこと)、それによってin vitroおよびin vivoにおける診断法においてもそれらの使用が限定される場合がある。さらにまた、長期の血漿半減期による従来の抗体の遅い血液クリアランスは、さらに、in vivo腫瘍イメージング目的に関して問題を引き起こす。また、健常組織による古典的抗体の非特異的取り込みによって、さらに、分子イメージングにおけるそれらの使用に制限が加わる。

## 【0004】

上記の古典的抗体の限界を克服し、それらの全般的な治療効果を増強する試みにおいて、非免疫グロブリンベースのタンパク質足場だけでなく、いわゆる"次世代"の抗体または抗体フラグメントが工夫された。次世代抗体の例は、例えば、ユニボディ、scFv、ダイアボディまたは例えばアドネクチン、アフイボディー、アンチカリンまたはシステインノットタンパク質(cysteine-knot protein)を含む(例えば Enever et al. (2009) Current Opinion in Biotechnology, Vol 20 (4), 405-411; Lofblom et al. Curr Opin Biotechnol. 2011 Dec;22(6):843-8を参照のこと)。

それらの不規則な構造によって、過去数年間にわたって多くの注目を集めてきた他のクラスの抗体が、ラクダ科動物および軟骨魚類において見いだされたが、それらはH鎖のみからなる天然抗体を有する(例えばGreenberg et al. (1995) Nature 374:168-73; Hamers-Casterman et al. (1993) Nature 363:446-8を参照のこと)。これらの抗体において、抗原結合部位は、それぞれVHHおよびvNARと呼ばれる1つの単一ドメインのみによって形成 50

される。従来の抗体の疎水性VH-VL界面に対応する溶媒暴露領域における極性および荷電アミノ酸の頻度増加のために、vNARおよびVHHドメインは高溶解性である。

#### 【0005】

H鎖のみの抗体(HCAb)の抗原結合性ドメインは、非免疫グロブリンベースのタンパク質足場の有益な特徴、例えば小型および高い安定性の大部分と、古典的抗体分子の有益な特徴、最も顕著には、免疫による高度に特異的かつ高親和性なバインダーを作成する実現可能性とを併せ持つ。興味深いことに、HCAbは、前述の種の従来のレパートリーを天然に補完する。古典的抗体は、通例、平面または凹面の抗原結合部位を有するが、vNAR-およびVHH-ドメインは、種々のさらなるループ構造(vNARの場合)および異なるループ構造を有する。これによって、古典的抗体には手に負えない、より潜在的なエピトープおよび酵素の触媒溝に接近し結合することができる劇的に拡大された利用可能なパラトープのレパートリーが生じる。

10

ラクダ科動物のVHHドメインは、前期(early phase)臨床試験において好結果を示すことが明らかとなったが(例えばHolz et al. (2012) Transfus Apher Sci. 2012 Jun;46(3):343-6)、vNARドメインの生体医学用途のための工学は、今までのところは進歩していない。しかしながら、ここ数年、これらのドメインの治療的有用性を示す著しい進歩が見られた。

#### 【0006】

軟骨魚類(サメ、エイ、ガンギエイおよびギンザメ)は、抗体の3つの異なるアイソタイプ、IgM、IgNARおよび始原(primordial)IgWを発現する(Rumfelt LL. et al. BMC immunology 2004; 5:8; Rumfelt LL et al. Journal of immunology 2004; 173:1129-39)。IgNARは、最初、コモリザメ(ギングリモストマ・キラタム(Ginglymostoma cirratum))の血清中で同定された(Greenberg AS et al. Nature 1995; 374:168-73)。IgNARは、L鎖を欠くH鎖のホモ二量体である。分泌型の各鎖は、1つの可変ドメインとそれに続く5つの定常ドメインからなり、最後の4つのドメインは、IgW定常ドメインに相同性を示す。血清IgNARレベルは、およそ0.1mg/ml ~ 1mg/mlである。

20

原子分解能構造データおよびX線小角散乱に基づいて、完全なIgNAR分子の構造モデルが得られた。その分子内で、各鎖のドメインC1およびC3はIgNARの二量体化を引き起こす。標準的なヒンジ領域を欠くにもかかわらず、可変ドメインは、様々なエピトープに結合するのに十分に広い間隔があげられており、このことは、C1二量体化界面の広い角度によっても容易となっている。両方のC3ドメイン間の小さな角度によって、IgNAR分子の細いストーク(stalk)の形成が誘導される。しかしながら、ドメインC3とドメインC4を連結するジスルフィド架橋リンカーの導入によってストークの柔軟性が導入される。H鎖のみの分子は、分子のおおよそ中央部の柔軟性リンカーの位置でねじれており、それがその特徴的な形状の原因となっている。IgNARの定常領域によってエフェクター機能が媒介されるかどうかについては、現在明らかにされていない。

30

ホモ二量体IgNARは、潜在的L鎖対合の抑制に関与するいくつかの特有の特徴を示す。典型的なVH-VL相互作用部位において、哺乳動物においてこの会合を媒介する残基は不十分にしか保存されていない。その代わり、一般的には疎水性のこれらのアミノ酸は、しばしば極性残基又は荷電残基によって置換されている。古典的抗体の場合には、特定の機構がH鎖とL鎖の対合の形成を確実にしている。小胞体において、CH1ドメインとの相互作用で、Ig結合タンパク質(BiP)によってH鎖が捕捉される。その放出のためには、L鎖がBiPと置き換わらなければならない。その結果として、H鎖とL鎖が対合した抗体のみが分泌される。

40

#### 【0007】

新規抗原受容体の可変ドメインは、T細胞受容体(TCR)V $\alpha$ に配列相同性を示し、免疫グロブリンV $\kappa$ ドメインにも配列相同性を示すが、構造的には、V $\alpha$ 、V $\lambda$ およびVHドメインに関連する。さらに、vNARドメインは細胞接着分子の構造的特徴を共有するため、IgNARは、IgG系統から生じたVHHとは明らかに識別される細胞表面受容体から進化したと示唆されている。vNARは、Igスーパーファミリーに属し、従って $\beta$ -サンドイッチフォールドを

50

有する。しかしながら、哺乳動物のVドメインと比較して、このフォールドは、フレームワーク2-CDR2領域における欠失によって、10の $\beta$ -ストランドの代わりに8つのみの $\beta$ -ストランドからなり、それによって、今日まで、動物界において、vNARドメインが、分子量おおよそ12kDaの最も小さい抗体様抗原結合性ドメインとされている(Barelle *et al.*, *Adv Exp Med Biol* 2009; 655:49-62; Stanfield *et al.*, *Science* 2004; 305:1770-3)。

結果として、哺乳動物の可変ドメインとは異なり、vNARドメインは2つの相補性決定領域CDR1およびCDR3しか有していない。一次vNARレパートリーの多様性は、主としてCDR3において見いだされる。抗原接触後の高率の体細胞変異は、CDR2欠失部位であるCDR1(残りのループは、分子の底部におけるベルト様構造を形成する)およびTCRにおけるHV4に相当するループにおいて見られる。従って、これらの変異を起こしやすい(mutation-prone)領域は、それぞれHV2およびHV4と命名された(例えばDooley *et al.*, *PNAS (USA)* 2006; 103:1846-51 を参照のこと)。

10

#### 【0008】

古典的抗体(2本鎖中で6つのループ)と比較して、可能性のある抗原結合性ループの数(一本鎖中で4つのループ)が減少しているにもかかわらず、驚くべきことに、vNARドメインは高親和性で抗原と結合する。抗原結合性が単にCDR3によって媒介される一次レパートリーからでさえ、所定の抗原に対して、低nM範囲において高親和性を示すvNAR分子が産生されることができる。しかしながら、vNARドメインに関して発表された最も高い親和性は、E06として知られる抗アルブミン結合ドメインによる免疫後に達成されたピコモルのレベルの親和性として観察されている(Muller *et al.*, *MAbs* 2012; 4:673-85)。

20

vNAR分子は、非標準的な(non-canonical)システイン残基のそれぞれの数に基づいて、4つのタイプに分類されてきた。すべてのタイプは、ジスルフィド結合によって免疫グロブリンフォールドを安定化する、古典的Ig標準システインを共通に有している。タイプI可変ドメインは、フレームワーク領域2および4に余分なシステインを有し、その結果として、CDR3に偶数のパートナーシステイン残基を有する。リゾチームと複合体を形成したタイプI vNARの結晶構造の決定によって、非標準的フレームワークシステインはそれぞれ共にCDR3の非標準的フレームワークシステインとジスルフィド結合を形成し、それによってこのループがHV2の方向に厳密に保持されていることが明らかとなった。これまで、IgNARのタイプI可変ドメインは、コモリザメ(ギングリモストマ・サータム)においてのみ同定されている。

30

タイプIIドメインは、タイプIとは、それぞれCDR1およびCDR3におけるさらなるシステインによって異なっており、両ループを近傍に持ってくる分子内ジスルフィド結合を形成する。しかしながら、タイプIIドメインは、タイプI vNARにおけるフレームワークにCDR3につなぎとめる両方のシステインモチーフを欠き、結果として、CDR3領域は、ポケットまたは溝、例えば酵素の活性部位に結合しやすくする突き出た‘指様(finger-like)’構造を形成する。

#### 【0009】

タイプIIIドメインは、幼魚において発現される。タイプIIドメインと類似して、このアイソタイプは、それぞれ、CDR1およびCDR3におけるさらなる非標準的システインを特徴とする。しかしながら、タイプIIと対照的に、タイプIIIドメインは、両ループ間のジスルフィド架橋に隣接して位置するCDR1における保存されたトリプトファン残基だけでなく、アミノ酸組成および長さにおいて極めて類似性の高い限定されたCDR3多様性を含む。

40

タイプIVドメインは、標準的ジスルフィド結合のみを含むという点で、記載されたすべてのvNARタイプとは異なる。従って、タイプIV可変ドメインのパラトープのトポロジーは、より柔軟性であり、より物理的に拘束されていない。タイプIVドメインは、タイプIIbとも呼ばれる(Streitsov *et al.*, *PNAS* 2004; 101:12444-9; Liu *et al.*, *Molecular immunology* 2007; 44:1775-83)。

タイプIIIドメインに多少類似する、CDR1に不変的なトリプトファン残基を有するタイプIVドメインが同定された。タイプIII vNARドメインを除いては、vNARドメインのすべてのタイプは、高親和性バインダーをもたらす。

50

## 【 0 0 1 0 】

この20年間に於いて、癌治療における抗体ベースの治療の使用が確立され、現在、それは血液悪性腫瘍患者および固形腫瘍患者の治療のための最も成功した重要な戦略の1つである。腫瘍の抗体ベース治療の基礎は、正常組織と比較して、過剰発現されているか、変異されているか、または選択的に発現されている腫瘍細胞による抗原の発現である。

米国市場に認可されたモノクローナル抗体(mAb)の大部分は、単一の細胞表面抗原を標的とする。例えば、アダリムマブ(ヒュミラ;Abbott社/AbbVie社)はTNFを標的とし、パニツムマブ(ベクチビックス;Amgen社)はEGFRを標的とし、オファツムマブ(アーゼラ;Genmab社)は、CD20を標的とする。しかしながら、腫瘍細胞は、多くの場合、種々の成長を促進させる受容体をアップレギュレートし、それらは独立して作用する場合もあり、細胞内でクロストークする場合もある。単一特異性抗体による1つの受容体のターゲッティングは、経路スイッチだけでなく、代替受容体のアップレギュレーションに関連する抵抗性をもたらす恐れがある(Kontermann (2012) mAbs 4:2, 182-197)。このことは、腫瘍細胞上の複数の細胞表面抗原を標的とするか、またはそれをブロックすることが有益であることを示唆している。このことは受け入れられており、現在、15を超える二重特異性抗体、すなわち2つの異なる細胞表面抗原を標的とする抗体が臨床試験中である(例えば、Garber, Nat Rev Drug Discov. 2014 Oct 31;13(11):799-801 を参照のこと)。しかしながら、ヒト二重特異性抗体は、これまでのところは、平面または凹面の抗原結合部位を標的とすることができるだけであるが、それによって、治療的により有効な可能性のある抗原結合部位が除外されている。

従って、ヒトまたはヒト化二重特異性抗体により標的とされる古典的エピトープの限界を考慮すれば、二重特異性抗体をベースとする新規で有効な癌治療薬の需要は継続している。従って、本発明の目的は、抗原ターゲッティングにおける現行の限界を克服する新規二重特異性抗体を提供することである。

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 1 1 】

驚くべきことに、本発明者らは、vNARタイプI、IIおよびIVドメインの超可変領域2(HV2)のアミノ酸配列をランダム化することによって二重特異性vNARドメインが得られることを見出した。従って、本発明は、FW1-CDR1-FW2-HV2-FW3a-HV4-FW3b-CDR3-FW4の構造を有する二重特異性サメ抗体可変ドメイン(vNARドメイン)の製造方法であって、

- a. 超可変領域2(HV2)をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列をランダム化する工程、
  - b. HV2が、対照試料に対するよりも改変された親和性で目的の抗原に結合し、第2の目的の抗原が、CDR3およびCDR1によって形成されるパラトープによって特異的に結合されるvNARドメインを検出する工程、
  - c. (b)のvNARドメインを選択する工程、
- を含む前記方法を提供する。

## 【 0 0 1 2 】

一実施形態において、本発明の方法によってランダム化することができるvNARドメインは、vNARタイプI、vNARタイプIIまたはvNARタイプIVの1つである。

一実施形態において、前記vNARをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドに含まれるHV2領域をコードするポリヌクレオチドの本発明によるランダム化は、コドンベースのランダム化、NNBランダム化、NNKランダム化、NNSランダム化または偏りのあるランダム化を含む。

一実施形態によれば、本発明によるHV2ドメインをコードするポリヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列NNN<sub>1</sub>(NNN)<sub>7</sub>NNN<sub>9</sub>であって、

- 位置1のコドンの50%がアミノ酸リジンをコードし、残りの50%がシステイン以外の任意のアミノ酸をコードし、
- コドン2~8が任意のアミノ酸をコードすることができ、
- 位置9のコドンの50%が、アミノ酸トレオニンをコードし、残りの50%がシステイン以外の

任意のアミノ酸をコードする  
前記ヌクレオチド配列を含む。

【0013】

一実施形態において、第1抗原に対して対照試料と比較して改変された親和性を示す本発明によるvNARは、酵母表面ディスプレイ、ファージディスプレイ、哺乳動物ディスプレイまたはタンパク質アレイの1つによって検出および/または選択される。

一実施形態によれば、本発明によるvNARは、検出可能なタグをさらに含む。

一実施形態において、本発明によるvNARの検出可能なタグは、vNARのアミノ末端および/またはカルボキシ末端に位置する。

一実施形態において、本発明のvNARは、フローサイトメトリー、FACS、ELISA、またはマイクロフルイディクスによって検出および/または選択される。

一実施形態によれば、本発明の方法の第1および第2の目的の抗原は細胞表面抗原であり、好ましくは癌細胞表面抗原である。

【0014】

一実施形態において、本発明は、本発明の方法によるランダム化HV2ドメインを含む融合タンパク質または本発明の方法によるランダム化HV2ドメインを含む本発明のvNARドメインを提供する。

一実施形態において、本発明の融合タンパク質は、IgG-Fcドメイン、VH、VL、VHH抗体ドメインの1つまたはそれらのフラグメントを含む。

一実施形態において、本発明の融合タンパク質はヒト化されている。

一実施形態において、本発明の融合タンパク質のFcドメインは、ヒトIgG-Fcドメインまたはその配列変種を含む。

一実施形態によれば、本発明の融合タンパク質は、前記第1および前記第2の目的の抗原に結合するとき、*in vivo*でADCCを誘導する。

一実施形態において、本発明は、本発明の方法によって製造されるvNARを提供する。

一実施形態において、本発明は、本発明のvNARまたは本発明の融合体をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。

一実施形態において、本発明は、本発明によるベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0015】

一実施形態において、本発明は、本発明のvNARまたはvNAR融合タンパク質の製造方法であって、

-本発明のvNARまたはvNAR融合タンパク質のタンパク質発現に十分な条件下で本発明による少なくとも1つの宿主細胞を培養し、

-本発明のvNARタンパク質またはvNAR融合タンパク質を分離精製する工程を含む前記方法を提供する。

【0016】

一実施形態によれば、本発明は、本明細書による本発明のHV2ドメインをコードする複数のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドライブラリーを提供する。

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチドライブラリーは、全構造FW1-CDR1-FW2-HV2-FW3a-HV4-FW3b-CDR3-FW4のタイプI、IIまたはタイプIV vNARドメインをコードする複数のポリヌクレオチドであって、HV2ドメインが、本発明によるランダム化(randomized)ポリヌクレオチド配列によってコードされる前記複数のポリヌクレオチドを含む。

一実施形態において、本発明は、配列番号2、配列番号4、配列番号5によるアミノ酸配列を含む二重特異性vNARを提供する。

一実施形態において、本発明は、医薬の製造における、本発明のvNARまたは本発明の融合タンパク質の使用に関する。

一実施形態において、本発明は、本明細書に記載の本発明のvNARまたは本発明のvNAR融合タンパク質と薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。

一実施形態において、本発明は、本発明による医薬組成物を、それを必要とする個体に投与することを含む、病的状態にある個体の治療方法に関する。

10

20

30

40

50

一実施形態において、本発明の方法によって治療される病的状態は、癌、自己免疫疾患またはウイルス感染である。

【0017】

一実施形態において、本発明の方法によって治療される個体は腫瘍を有する。

一実施形態によれば、本発明の方法によって治療される個体はヒトである。

一実施形態において、本発明は、二重特異性vNARまたは本発明のvNAR融合タンパク質と本発明のvNARを検出する手段とを含むパーツのキットを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】通常のパラトープ(抗原結合部位)を示すvNAR分子の図である。HV2のランダム化によって新規抗原結合部位が導入され、2つの異なる抗原を標的とする二重特異性分子が得られる。

10

【図2】種々の抗体分子の抗体構造の図である。(A)IgG分子、(B、C)ラクダ科動物および軟骨魚類の抗体分子(天然にはH鎖のみを含む)。

【図3】抗体構造の比較を示す図である。vNARはIgスーパーファミリーに属し、 $\beta$ -サンドイッチフォールドを有する。しかしながら、哺乳動物のVドメインと比較して、このフォールドは、フレームワーク2-CDR2領域における欠失によって、10の $\beta$ -ストランドの代わりに8つのみの $\beta$ -ストランドからなる。結果として、哺乳動物の可変ドメインとは異なり、vNARドメインは2つの相補性決定領域CDR1およびCDR3しか有していない。一次vNARレパートリーの多様性は、主としてCDR3において見いだされる。高率の体細胞変異は、CDR2欠失部位であるCDR1およびTCRにおけるHV4に相当するループにおいて見られる。従って、これらの変異を起こしやすい(mutation-prone)領域は、それぞれHV2およびHV4と命名された。

20

【図4】タイプI、タイプII、タイプIIIおよびタイプIVを含む、種々の公知のvNARタイプを示す図である。

【図5】酵母表面ディスプレイの説明図である。vNARは、表面発現の検出のために、それぞれN末端HA-エピトープおよびC末端cMyc-タグを含むAga2p融合体としてS.セレビシエの表面に提示される。

【図6】EpCAMおよびCD3 $\epsilon$ の同時結合に関するライブラリスクリーニングを示す図である。選別は二次元で行った。ライブラリスクリーニングのラウンド1およびラウンド4、選別ゲートならびに標的濃度が示してある。

30

【図7】酵母表面ディスプレイを用いる二重特異性の検証を示す図である。表面にvNAR B1を発現する酵母細胞を、540nM EpCAM(黒色)または770nM CD3 $\epsilon$ または第2検出試薬のみと共にインキュベートした。

【図8】EpCAM-およびCD3 $\epsilon$ -特異的vNAR分子B1ならびにその親分子5005(EpCAMにのみ特異的)の配列決定を示す図である。HV2におけるランダム化残基は灰色で示してある。

【図9A】酵母表面ディスプレイを用いる二重特異性の検証を示す図である。表面にvNAR F1を発現する酵母細胞を、540nM EpCAM(黒色)または第2検出試薬のみ(灰色)と共にインキュベートした。

【図9B】酵母表面ディスプレイを用いる二重特異性の検証を示す図である。表面にvNAR F1を発現する酵母細胞を、約500nM Fcフラグメント(黒色)または第2検出試薬のみ(灰色)と共にインキュベートした。

40

【図10】テンジクザメ(キロシリウム・ブラギオスム(Chiloscyllium plagiosum))のvNARドメインの残基43~56を含む、vNARドメイン表面暴露ループHV2のモデルを示す図である。残基番号は、種およびvNARタイプに応じて異なる。

【図11】ランダム化HV2を含む挿入物の構築のためのSOE-PCRスキームを示す図である。挿入フラグメントは、2段階PCRで生成された。第1段階において、vNAR-フラグメントはHV2の5'末端(1A)まで増幅された。第2段階において、HV2は、HV2rand\_upプライマーを用いてランダム化された。これによって、HV2コード領域の5'末端からvNAR分子コード領域の3'末端までのフラグメントが生成された。2回目のPCRにおいて、2つのフラグメントは、

50

それ自身のプライマーとして作用し、プライマーを生じるための完全長ランダム化HV2vNAR挿入物を生じた。6サイクル後、プライマーを加えて十分な量の完全長挿入物を生成させた。

【 0 0 1 9 】

配列表

配列番号1 HV2ドメインのランダム化に用いる人工ポリヌクレオチド  
配列番号2 vNARクローンB1のアミノ酸配列  
配列番号3 親vNARクローン5005のアミノ酸配列  
配列番号4 vNAR EphA2-Fcアミノ酸配列  
配列番号5 vNAR EphA2\_4-Fcのアミノ酸配列  
配列番号6 ビオチン受容体ポリペプチドのアミノ酸配列  
配列番号7 acTEV部位  
配列番号8 オリゴヌクレオチドHV2Rand\_up  
配列番号9 pCT-Seq-lo  
配列番号10 pCT-Seq-up  
配列番号11 HV2rand\_SOE-lo

10

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 0 】

発明の詳細な説明

本発明を以下に詳細に説明するが、本明細書による特定の方法、プロトコルおよび試薬は変形が可能であるため、本発明がそれらに限定されないことが理解されるべきである。本明細書に用いられる用語法は、特定の実施形態のみを説明するためのものであって、本発明の範囲を限定しようとするものではなく、それらは添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることもまた理解されなければならない。別途定義しない限り、本明細書で用いられるすべての学術用語は、当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。

20

以下では、本発明の要素を説明する。これらの要素を特定の実施形態と共に挙げるが、付加的な実施形態を作成するために、任意の様式かつ任意の数で該要素を組み合わせることができることを理解すべきである。様々に記載された実施例および好ましい実施形態は、明示的に記載された実施形態にのみ本発明を限定するものと解釈されるべきではない。本記載は、明示的に記載された実施形態を任意の数の開示されたおよび/または好ましい要素と組み合わせる実施形態を支持および包含するものと理解されるべきである。さらにまた、本願において記載されたあらゆる要素の任意の並べ替えおよび組み合わせは、文脈上他の意味を示していない限り、本願の記載により開示されているとみなすものとする。

30

本明細書および添付の特許請求の範囲を通じて、文脈上他の意味に解する必要がある場合を除き、用語"含む(comprise)"および変化形、例えば"含む(comprises)"および"含んでいる(complising)"は、記載された構成要素、整数または工程の包含を意味するが、任意の他の記載されていない構成要素、整数または工程を排除するものではないと理解されよう。用語"からなる(consist of)"は、用語"含む(comprise)"の特定の実施形態であり、その実施形態において、任意の他の記載されていない構成要素、整数または工程は排除される。本発明の文脈において、用語"含む(comprise)"は、用語"からなる(consist of)"を含む。

40

【 0 0 2 1 】

1つの("a"および"an"および"the")という用語ならびに本発明に記載の文脈において(特に特許請求の範囲の文脈において)用いられる同様な表示は、本明細書に別段の表示がない限り、または文脈によって明瞭に否定されない限り、単数および複数の両方を含むものと解釈されるべきである。本明細書において、数値の範囲の記載は、この範囲内にある個別の数値を個々に指す簡単な方法としてのみ意図されており、本明細書に別段の表示がない限り、個別の数値それぞれが、本明細書中に個別に記載されているものとして本明細書に組み込まれる。本明細書における用語は、任意の非請求の要素を、本発明の実施に

50

必須のものと指摘していると解釈されるべきではない。

本明細書のテキストを通じていくつかの文書が引用されている。本明細書に引用した文書のそれぞれ(特許、特許出願、科学出版物、製造業者の仕様書、使用説明書などをすべて含む)は、上記下記にかかわらず、全てが参照により本願に組み込まれる。これらのいずれも、先行発明によってこのような開示に本発明が先行しないと認めるものとして解釈してはならない。

#### 【0022】

記載された目的は、本発明、好ましくは添付の特許請求の範囲の主題事項によって解決される。本発明者らは、驚くべきことに、

(a) 超可変領域2(HV2)をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列をランダム化し、

(b) HV2が、対照試料と比較して改変された親和性で目的の抗原に結合し、第2の目的の抗原が、CDR3およびCDR1によって形成されるパラトープによって特異的に結合されるvNARドメインを検出し、(c) (b)のvNARドメインを選択する工程を含む本発明の方法によって、二重特異性vNARドメインが得られることを見出した。従って、本発明の方法は、少なくとも1つのvNARのHV2ドメインをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列をランダム化し、対照試料と比較して改変された親和性を示す第1の目的の抗原と、vNARドメインのCDR3およびCDR1によって形成されるパラトープに結合される第2の目的の抗原とに結合するvNARを検出し、次いで第1の目的の抗原に改変された親和性を示すvNARドメインを選択することを含む。本発明の方法に用いられる用語"vNARドメイン"は、軟骨魚類、例えばサメ、エイおよびガンギエイ、例えばギングリモストマ・サータムまたは*C. plagiosum* (*C. plagiosum*)において見いだされるIgNARに存在するただ1つの単ドメインによって形成される抗原結合部位のことをいう。本発明によるvNARドメインは、上記のvNARタイプI、vNARタイプIIまたはvNARタイプIVであるか、または例えばKovaleva et al. (2014), Expert Opin Biol Ther. Oct;14(10):1527-39 に開示されているものであることができる。

#### 【0023】

本発明の方法において、第1の目的の抗原および第2の目的の抗原は、例えば細胞表面抗原、例えば、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドであってよく、これらのタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの少なくとも1つの抗原性部分が生体膜の表面に暴露され、共有結合した以下の部分の1以上を有し得る：1以上の単糖または複合糖部分(糖タンパク質での)、脂質部分(リポタンパク質での)、脂質部分と糖部分の組み合わせまたは他の翻訳後修飾、の1以上を有することができるタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドであることができる。"タンパク質"は、一般的には、長鎖のアミノ酸ベースポリマー("ポリペプチド")である。タンパク質は、1または2以上のポリペプチド鎖で構成されることができ、そのポリペプチド鎖(単数または複数)と結合しているいくつかの他のタイプの物質、例えば炭水化物をさらに含むことができる。タンパク質のサイズは、5,000~数十万g/molの(任意数の)比較的広い範囲を含む。本発明の方法に用いられる目的の抗原または細胞表面抗原という用語は、例えば受容体型チロシンキナーゼ、例えばPDGFR、EGFR、VEGFR、HGFR、neurotrophinR、HER2、HER3、HER4、InsulinR、IGFR、CSFIR、FLK、KDR、VEGFR2、CCK4、MET、TRKA、AXL、TIE、EPH、RYK、DDR、ROS、RET、LTKまたはMUSKなどもまた含む。本発明の方法における目的の抗原は、例えば、グリカンを含むこともできるが、ここで用語"グリカン"は、グリコシド結合した多数の単糖からなる化合物のことをいう。例えば、グリカンは、グリコサミノグリカンを含むことができるが、これらは、ウロン酸で交互に連結された2-アミノ糖を含み、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン、ケラチンおよびデルマタンなどのポリマーを含む。本発明の方法において、第1の目的の抗原および第2の目的の抗原は、例えば、同じ分子または細胞表面抗原に位置することもできるし、第1および第2の目的の抗原は2つの異なる分子に位置することもでき、例えば第1の目的の抗原が細胞表面タンパク質またはタンパク質フラグメントによって形成され、第2の目的の抗原が、グリカンなどの非タンパク性細胞表面抗原によって形成されることもでき

る。本発明の第1および第2の目的の抗原はまた、例えば腫瘍細胞によって発現される任意の免疫原性エピトープを含む腫瘍抗原または細胞表面癌細胞抗原、腫瘍関連抗原または腫瘍特異抗原であることができる。該タンパク質は非腫瘍細胞によって発現される場合があるが、腫瘍細胞によって発現されたときのみ、例えば改変された(増加したまたは減少した)グリコシル化によって免疫原性を示す場合がある。あるいはまた、該タンパク質は腫瘍細胞または癌細胞によって発現されるが、正常細胞によって発現されない場合がある。一実施形態において、腫瘍抗原、細胞表面癌細胞抗原または腫瘍関連抗原または腫瘍特異抗原はヒト腫瘍抗原である。例えば、腫瘍抗原は、硫酸コンドロイチン・プロテオグリカンメラノーマ関連抗原(MCSP、UniProt Q6UVK1、NCBIアクセッション番号NP\_001888)、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP、UniProt Q12884、Q86Z29、Q99998;NCBIアクセッション番号NP\_004451)、上皮成長因子受容体(EGFR、別名ErbB1およびHer1、UniProt P00533;NCBIアクセッション番号NP\_958439、NP\_958440)、癌胎児性抗原(CEA、別名癌胎児性抗原関連細胞接着分子5またはCD66e;UniProt P06731、NCBIアクセッション番号NP\_004354)ならびにCD33(別名gp76またはシアル酸結合免疫グロブリン様レクチン3(Siglec-3)、UniProt P20138、NCBIアクセッション番号NP\_001076087、NP\_001171079)を含むことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0024】

本発明の方法において、用語"改変された"または"改変された親和性"は、1以上の目的の抗原、例えば1、2、3または4の目的の抗原に対する例えばvNAR HV2により形成されるパラトープまたは例えばvNAR CDR1およびCDR3により形成されるパラトープによるvNARの結合定数における変化を含む。例えば改変された親和性は、連続的なおよび/または不連続な抗原を含むことができる、所定の目的の抗原に対する減少した、または増加した親和性、好ましくは目的の抗原に対する増加した親和性を含むことができる。フラグメントの長さに対する重要な上限は存在せず、例えばフラグメントの長さは、抗原配列のほぼ完全長を含むこともでき、標的抗原からの2以上のエピトープを含む融合タンパク質を含むこともできる。一実施形態において、第1の目的の抗原に対するvNAR HV2ドメインの改変された親和性は、少なくとも例えば $10^{-7}$ M、 $2.5 \times 10^{-7}$ M、 $5 \times 10^{-7}$ M、 $7.5 \times 10^{-7}$ M、 $1 \times 10^{-8}$ M、 $2.5 \times 10^{-8}$ M、 $5 \times 10^{-8}$ M、 $7.5 \times 10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M、 $2.5 \times 10^{-9}$ M、 $5 \times 10^{-9}$ M、 $7.5 \times 10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M、 $2.5 \times 10^{-10}$ M、 $5 \times 10^{-10}$ M、 $7.5 \times 10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ M、 $2.5 \times 10^{-11}$ M、 $5 \times 10^{-11}$ M、 $7.5 \times 10^{-11}$ Mまたは $10^{-12}$ Mである。

本発明の方法で用いられるランダム化という用語は、1つまたはいくつかの位置がランダム化されている複数の配列を生じるプロセスのことをいう。いくつかの実施形態において、ランダム化は完全である(即ち、ランダム化位置で全4つのヌクレオチド、A、T、GおよびCが存在しうる)。別の実施形態において、ヌクレオチドのランダム化は、4つのヌクレオチドのサブセットに限定される。ランダム化は、超可変領域2(HV2)をコードするポリヌクレオチド配列の1つまたはいくつかのコドンに使用されることができる。発現されるとき、得られるライブラリーは、1以上のアミノ酸位置が、全20アミノ酸の混合物またはアミノ酸のサブセットを含むことができるHV2集団を生じる。

#### 【0025】

一実施形態において、本発明の方法において、HV2(HV2コード領域)をコードするポリヌクレオチド配列のランダム化は、コドンベースのランダム化、NNBランダム化、NNKランダム化、NNSランダム化または偏りのあるランダム化を含むことができる。例えば、本発明の方法に用いられるコドンベースのランダム化は、Gaytan et al. (1998) Chemistry & Biology 5:519-527 またはMonroy-Lagos et al. (2006), APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, May 2006, p. 3797-3801)に記載の方法に従って行うことができる。本発明の方法において、NNBランダム化とは、最初の2つの位置における各ヌクレオチドの25%および3番目の位置におけるC、TおよびGの33%を用いる縮重コドンのことをいう。Tyr/Serとは、チロシンとセリンの等量混合のことをいう。例えば、本発明の方法に用いられる"NNKランダム化"は、単一アミノ酸パリアントを作成するために用いることができ、ここで"N"とは任意の塩基(例えばA、C、GまたはT)のことをいい、"K"とは、GまたはTのいずれかのことをいう。NNKランダム化スキームは、天然に存在する全20のアミノ酸を包含する32の異

なるコドンにコードすることができる。タンパク質の各位置におけるアミノ酸残基は、同じ位置における野生型アミノ酸とは異なる19アミノ酸のいずれか1つに変異されることができ、そのタンパク質に沿った単一のアミノ酸点突然変異が生じる。最終的に、ライブラリーのメンバー間で異なる1つの残基を有する複数のタンパク質グループを含むタンパク質バリエーションライブラリーが生じる。

#### 【0026】

例えば、本発明の方法における本発明の二重特異性vNARのHVドメインをコードするポリヌクレオチドのランダム化における終止コドンの頻度を減少させるために、NNSランダム化を含むことができる。ここで、nは、含まれるランダムトリプレットの数を意味し、Nは任意のヌクレオチドを表し、Sは、標準的なIUPACヌクレオチド命名法におけるCまたはGを表す。3つの内2つの終止コドン(TGAおよびTAA)は、3番目の位置にAを有するため、NNS戦略は、NNN戦略と比較して終止コドンの頻度が3/64から1/32に減少していることが予想される。本発明の方法におけるランダム化は、例えば、偏りのあるランダム化(例えば、配列内のある位置が一定に保たれるか、または限られた数の可能性から選択される)であることもできる。例えば、一実施形態において、HV2コード領域を含むランダム化ポリヌクレオチドの最初および最後のコドンは、偏りのあるランダム化に供することができる。例えば、最初のコドンは、TGT、TGCを除くすべてのコドンを含むことができ、最後のコドンはTGT、TGCを除く任意のコドンであることができるが、最初のコドンに用いられるコドンの50%において、最初のコドンはTTA、TTG、CTT、CTC、CTA、CTGから選択されることができ、2番目のコドンは、ACT、ACC、ACA、ACGから選択されることができる。

10

20

#### 【0027】

一実施形態において、HV2ドメインをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号1に記載のヌクレオチド配列を含み、これは、例えば、上記のランダム化技術のいずれかによってランダム化されることができる。好ましくは、本発明によるポリヌクレオチドの最初のコドンは、ポリヌクレオチドの50%において、アミノ酸リジンにコードすることができ(例えば、コドンは、ポリヌクレオチドの50%においてAAAまたはAAGから選択される)、ポリヌクレオチドの50%において、システインにコードするTGT、TGCを除く任意のコドンが存在することができる。本発明によるHV2ドメインをコードするポリヌクレオチドのコドン2~8は、任意のアミノ酸にコードすることができ、例えば、TAA、TAGまたはTGAを除く任意のコドンが存在することができる。本発明によるHV2ドメインをコードするポリヌクレオチドのコドン9は、ポリヌクレオチドの50%において、アミノ酸トレオニン(例えば、コドンはACT、ACC、ACAまたはACGから選択される)にコードすることができ、ポリヌクレオチドの50%において、TGT、TGCを除く任意のコドンが存在することができる。例えば、配列番号1に記載のポリヌクレオチド配列は、オリゴヌクレオチド配列、例えば、ランダム化HV2ドメインを含むvNARタンパク質を含むかまたはそれをコードするポリヌクレオチドライブラリーを作成するために、PCRベースの技術(例えばSOE PCR)に用いることができる、配列番号8に記載のオリゴヌクレオチド配列に含まれることができる。

30

本発明の一側面において、vNARライブラリーは、例えばOmniscrypt(登録商標)逆転写キット(Qiagen社)およびOdT-オリゴヌクレオチドを用いて、例えばcDNA合成の鋳型としてのサメからの全RNAから得ることができる。PCR増幅したvNAR産物は、例えば、半合成ライブラリー構築のための出発材料として用いることができる。初期ライブラリーは、例えば、3回連続のPCRステップで得ることができる(例えば添付の実施例または例えば Zielonka, S. et al. (2014) Journal of Biotechnologyを参照のこと)。

40

#### 【0028】

一実施形態において、第1抗原に対して対照試料と比較して改変された親和性を示す本発明のvNARは、酵母表面ディスプレイ、ファージディスプレイ、哺乳動物ディスプレイまたはタンパク質アレイの1つによって検出および/または選択される。従って、本発明の方法は、例えば、ランダム化HV2ドメイン含有vNARを酵母表面ディスプレイ、ファージディスプレイ、哺乳動物ディスプレイまたはタンパク質アレイの1つにかけることを含む。例えば、本発明によるランダム化HV2ドメインを含むvNARをコードするポリヌクレオチド

50

は、第1抗原に対して対照試料と比較して改変された親和性を示すvNARを検出し選択するために酵母ディスプレイに供することができる。例えば、酵母ディスプレイは、Rakestraw (Rakestraw (2011) Protein Engineering, Design & Selection Vol. 24, no. 6: 525-530 を参照のこと)によって提供された方法に従って行うことができる。例えば、本発明のvNARをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドは、例えばSECANTベクターにクローニングすることができる。それによって、例えばビオチン受容体ペプチド(BAP:GLNDIFE AQKIEWHE)にacTEVプロテアーゼ部位(ENLYFQG)などを介して本発明のvNARを遺伝子的に融合することができる。このベクターは、例えば、vNARの5'に、例えばFLAGタグ(Sigma社)またはMycタグなどの作動的に連結されたタグを含むこともできる。それに作動的に連結された5'のタグは、例えばWT  $\alpha$  MFpp由来リーダー配列などのリーダー配列であることができる。異なる分泌リーダーおよびBAP配向性を有するベクターのパネルを作成するために、発現カセットを、例えば3'にクローニングし、低コピーpRS314酵母/大腸菌(*Escherichia coli*)シャトルベクター(ATCCマナッサス、バージニア州、米国)におけるGAL10(ガラクトース誘導性)プロモーターに作動的に連結することができる。すべてのベクターは、例えば、acTEV/BAPとFLAGタグとの間へのPOIの導入を容易にするKpnIおよびMluI制限部位に隣接するクローニング部位を含むことができる。宿主株(BJ5464a由来)は、BAPタグへのビオチンの連結に関与するE. コリ(*E. coli*)BirAビオチンリガーゼを発現する。BirA(Codon Devices社)は、C末端his-asp-glu-leu小胞体残留シグナル配列を有し、酵母インペルターゼ分泌リーダーに融合され、シトクロムc(CYC1)プロモーターの制御下で発現されることによって分泌経路に関与する。タンパク質ジスルフィド異性化酵素(PDI)が、ADH1プロモーターの制御下に同時発現される。BirAおよびPDI遺伝子は、例えば、それぞれpRS306およびpRS305ベクターにクローニングされることができ、次いで、それらは、例えば酵母染色体に安定に組み込まれ、JAC100H SECANT表面ディスプレイ株(mat a, trp1, pep4::HIS3, Dpdb1, ADH-PDI::LEU2, CYC1-BirA::URA3)を生じることができる。酵母細胞の形質転換は、例えば、添付の実施例に概略を示すように、Benatuil et al. (2011) Protein Engineering, Design & Selection Vol. 23, 4:155-159 に記載の方法によって行うか、または例えば以下のように、Rakestrawらの記載に従って行うことができる: EZ酵母形質転換キット(Zymo Research社、オレンジ郡、カリフォルニア州、米国)を用いて、本発明のポリヌクレオチドを含むSECANTベクターで、JAC100Hディスプレイ株を形質転換することができる。次いで、SCグルコース(Trp2プレート)(Teknova社、ホリスター、カリフォルニア州、米国)上、2日間308Cで形質転換細胞を選択することができる。次いで、単一コロニーを拾い、ビオチンを補充した合成デキストロースカゼインアミノ酸(SD-CAA)培地(2%グルコース、0.67%酵母窒素源、0.54%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.86%NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O、0.5%カゼインアミノ酸および2.5mg/lビオチン)5mlに接種し、例えば終夜30 で増殖させることができる。ひとたび、培養物が例えばOD600 ~ 0.5に増殖すれば、それをペレット化し、次いでリン酸緩衝化ビオチン補充酵母抽出物ペプトンガラクトース(YPG)培地(2%ガラクトース、2%ペプトン、1%酵母抽出物、0.025%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.54%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.86%NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>Oおよび2.5mg/lビオチン)5mlに再懸濁することができる。次いで、この培養物を、例えば20 で24時間振盪することができる。YPG中でのこのインキュベーションによって、POIの産生およびそのビオチン化が開始されるが、これは「前誘導」と呼ばれる。

#### 【0029】

前誘導後に、アビジン化(avidination)のために、 $2 \times 10^7$ 個の細胞を回収することができる: 例えば、該細胞は、最初にペレット化し、炭酸緩衝液(4.2%NaHCO<sub>3</sub>および0.034%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH8.4)1mlで3回洗浄し、炭酸緩衝液40mlに溶解した3.4kDa NHS-PEG-ビオチン(Laysan Bio社、アラバ、アラバマ州、米国)4mg(乾燥量40ml)中、室温で15分間インキュベーションすることによってビオチン化されることができる。ビオチン標識後に、細胞をペレット化し、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)/BSA(1mg/ml)1mlで3回洗浄することができる。前誘導後、 $2 \times 10^7$ 個の細胞をアビジン化のために回収することができる(図1b)。例えば、細胞は、例えば最初にペレット化し、炭酸緩衝液(4.2%NaHCO<sub>3</sub>および0.034%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH8.4)1mlで3回洗浄し、次いで炭酸緩衝液40mlに溶解した3.4kDa NHS-PEG-ビオチン(Laysan Bio社

、アラブ、アラバマ州、米国)4mg(乾燥量40ml)中、室温で15分間インキュベーションすることによってビオチン化されることができる。ビオチン標識後に、例えばリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)/BSA(1mg/ml)1mlで3回洗浄することができる。次いで細胞を、例えば、各ウェルにPBS/BSA1mlを添加し、室温で2分間インキュベートすることによってプレートから洗い取ることができる。次いで、細胞を、例えば上下にピペッティングすることによってPBS/BSA中に懸濁させ、1.5mlのチューブに移すことができる。任意の残りの細胞を、例えば、PBS/BSA1mlを少なくとも1回さらに添加してプレートから採取し、次いで1.5mlのチューブに移すことができる。次いで、細胞を、例えばペレット化し、PBS/BSA1mlで3回洗浄し、氷上に置くことができる。次いで、細胞を、例えば20mg/mlアビジン(Sigma社)40  $\mu$ lに懸濁し、室温で10分間インキュベートすることができる。前誘導されているが、アビジンで標識されていない細胞は、可溶性ビオチン化タンパク質を培地に直接的に分泌する。アビジン化後、細胞をペレット化し、PBS/BSA1mlで2回洗浄し、PBS/BSA50  $\mu$ lに再懸濁することができる。細胞25マイクロリットルを、例えば誘導培地1.2mlに接種し、十分にボルテックスすることができる。培地中に天然に見いだされるビオチンを除くために、アビジン-アガロースカラム(Pierce社、ロックフォード、イリノイ州、米国)にYPG/BSA(2%ガラクトース、2%ペプトン、1%酵母抽出物および0.025%BSA)を通過させることによって誘導培地を調製した。次いで、20.6w/v%(HSA用)または11w/v%8kDaポリエチレングリコール(Sigma社)をビオチン濾過培地3mlに溶解し、0.2  $\mu$ mシリンジフィルター(Becton Dickinson社、フランクリンレイクス、NJ、米国)でフィルターを滅菌した。最後に、100mg/mlアビジンを、例えば最終濃度1mg/mlになるように加えることができる。誘導培地に細胞を混合した後、例えば、培地/細胞浮遊液1.2mlを、6ウェルプレート(Becton Dickinson社)のウェル1つに加え、振盪なしで20 または25 で16時間インキュベートすることができる。この誘導によって、細胞がビオチン化タンパク質を分泌することを可能にするが、次いでこれは表面結合したアビジンに捕捉されるであろう。

10

20

30

40

50

#### 【0030】

一実施形態において、第1抗原に対して対照試料と比較して改変された親和性を示す本発明のvNARは、例えば、ファージディスプレイによって検出および/または選択されることができる。

本明細書において、"ファージディスプレイ"とは、本発明によるvNARドメイン、または例えば本発明のHV2ドメインを含む融合タンパク質が、バクテリオファージのコートタンパク質に遺伝的に融合され、その融合タンパク質またはペプチドをコードするDNAはビリオン内部に存在するが、ファージビリオンの外部にその融合タンパク質がディスプレイされる選択技術のことをいう。ディスプレイされるタンパク質とそれをコードするDNAとの間のこの物理的結合によって、膨大な数の本発明のvNAR HV2ドメインまたは例えば本発明のvNARドメインを含む融合タンパク質のパリアントのスクリーニングが可能となる。例えば、ファージディスプレイは、先行技術において公知の任意のプロトコル、例えばEngberg et al. (1996) Mol Biotechnol. Dec;6(3):287-310 のプロトコルに従って行うことができる。

#### 【0031】

一実施形態において、第1抗原に対して対照試料と比較して改変された親和性を示す本発明のvNARは、哺乳動物ディスプレイによって検出および/または選択される。例えば、哺乳動物 酵母ディスプレイのための任意のプロトコルまたは技術、例えばWO2008/070367 A2に開示されたものは、本発明の方法に用いることができる。一実施形態において、タンパク質アレイは、例えば、本発明のvNARドメインまたは例えば本発明のvNARドメインを含む本発明の融合タンパク質の検出および/または選択に用いることもできる。本発明の方法において用いられる用語"タンパク質アレイ"とは、タンパク質アレイ、タンパク質マイクロアレイまたはタンパク質ナノアレイのことをいう。タンパク質アレイは、例えば、"ProtoArray (登録商標)"ヒトタンパク質高密度アレイ(Invitrogen社、Invitrogen.com、インターネットで入手できる)を含むことができる。ProtoArray (登録商標) 高密度タンパク質アレイは、血清などの複雑な生物学的混合物のスクリーニングに使用して、ヒトタ

ンパク質に対する自己抗体の存在に関してアッセイすることができる。用語"タンパク質チップ"は、本発明の方法において、タンパク質アレイと同義で用いることができる。本発明の方法において用いられる用語"対照試料"は、ランダム化されていない少なくとも1以上の、例えば少なくとも10、100、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ または $10^6$ 個のvNARドメインのことをいうか、あるいは、たとえば、ランダム化されておらず、第1の目的の抗原に対する結合が改変されていない少なくとも1つのvNARドメイン、例えば10、100、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ または $10^6$ 個のvNARドメインをそれらの表面にディスプレイする例えば少なくとも10、100、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ または $10^6$ 個の細胞のことをいう。

#### 【0032】

一実施形態において、本発明のvNARドメインは検出可能なタグを含む。本発明の方法に用いられる検出可能なタグという用語は、本発明のvNARドメインに共有結合または非共有結合で結合している部分のことをいう。本発明によるタグは、例えば、直接的に検出(すなわち一次標識)または間接的に検出(すなわち二次標識)することができる分子であることができる。例えば標識は、その有無を知ることができるように、可視化および/または測定するか、あるいは他の方法で同定することができる。例示的な標識は、蛍光標識(例えば緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質など)および標識酵素または例えば光学的に検出可能な標識、結合ペアのパートナーおよび表面基質結合分子(すなわち結合タグ)を含む。当業者には明らかなように、多くの分子は、そのタグがどのように用いられるかによって、2以上のタイプのタグとしての使用を見出すことができる。一実施形態において、下記のタグまたは標識は、融合タンパク質としてポリペプチドに組み込まれる。本発明による検出可能なタグは、例えば、他の異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合される第1ポリペプチド(例えば本発明のvNARドメイン)を含む本発明のキメラvNAR分子の一部として提供されるポリペプチドを含むこともできる。一実施形態において、このようなキメラvNAR分子は、タグポリペプチドとの第1ポリペプチドの融合体を含む。検出可能なタグは、FLAG、HIS、Myc、HA、V5タグ、S-タグ、SBP-タグまたはStreptagなどのポリペプチドを含むこともできるし、例えばGSTタグ、MBP-タグ、GFP-タグなどのタンパク質タグを含むこともできる。

#### 【0033】

本発明による検出可能なタグは、例えば、本発明のvNARドメインまたは、本発明のvNARドメインを含む融合タンパク質または例えば少なくとも1つの本発明のvNARドメインを含む融合タンパク質上のvNARドメインのアミノ末端もしくはカルボキシル末端に存在することができる(例えば融合タンパク質は本発明によるvNARドメインを少なくとも1つ含むことができる)。

#### 【0034】

一実施形態において、本発明によるvNARドメインの検出および/または選択は、フローサイトメトリー、FACS、ELISAまたはマイクロフルイディクスを含む。本発明の方法に用いられる用語"選択する"とは、vNARドメインまたは例えば本発明の1以上のvNARドメインを含む融合タンパク質または例えば本発明のvNARを表面にディスプレイする細胞または例えば本発明の1以上のvNARドメインを含む融合タンパク質を同定および/または単離するプロセスのことをいう。本発明の方法における選択は、当業者に公知の様々な技術、例えばイムノパニング(例えば Wysocki et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 75, No. 6, pp. 2844-2848, June 1978 を参照のこと)、磁気活性化細胞分離(MACS)、フローサイトメトリー、蛍光標示式細胞選別(FACS)または液滴ベースマイクロフルイディクス(例えば Mazutis et al., 2013, Nature Protocols 8, 870-891 を参照のこと)を含むことができる。本発明の選択された細胞は、例えば選択の一部として、上記の方法ではその表面に目的のタンパク質をディスプレイしない宿主細胞から分離および単離されることができる。例えば、FACSは、異なるバイアルまたは容器に細胞を選別するために用いることができるし、MACSは、表面にタンパク質をディスプレイする宿主細胞を分離するために用いることができるし、液滴ベースマイクロフルイディクスは、目的のタンパク質を表面にディスプレイする宿主細胞を選択し、単離するために用いることができる。

## 【 0 0 3 5 】

本発明の一実施形態によれば、第1の目的の抗原は、細胞表面抗原、好ましくは癌細胞表面抗原または上記のような癌細胞表面抗原であることができる。

一実施形態において、本発明は、本発明のvNARドメインを含む融合タンパク質を提供する。例えば、本発明の融合タンパク質は、FW1-CDR1-FW2-HV2-FW3a-HV4-FW3b-CDR3-FW4の構造のvNARドメインを含むことができる（式中、FWxはフレームワークxを意味し、CDRxは相補性決定領域xを意味し、HV2は、本発明のHV2ドメイン、例えば本発明によるランダム化HV2ドメインを意味する）。本発明のvNARドメインは、例えば、Fcドメインに融合されることができる。本発明の方法において用いられる用語"Fcドメイン"または"Fc領域"は、IgG分子のパパイン消化によって得られる結晶性フラグメントに関連する免疫グロブリン、例えばIgG分子の一部のことをいう。Fc領域は、ジスルフィド結合で連結されたIgG分子の2つのH鎖のC末端側を含む。これは抗原結合活性を有さないが、炭水化物部分ならびに補体およびFc受容体（FcRn受容体を含む）の結合部位を含む。

Fcドメインは、ジスルフィド結合で連結されたIgG分子の2つのH鎖のC末端側を含む。これは抗原結合活性を有さないが、炭水化物部分ならびに補体およびFc受容体（FcRn受容体を含む）の結合部位を含む。"Fcドメイン"は、例えば、天然配列Fc領域およびバリエーションFc領域、例えばWO02/094852)に開示されたものならびにFcドメインにおける多くの位置（位置270、272、312、315、356および358を含むがこれに限定されない）において観察された多型を含む。本発明の方法において、用語"Fc"は、単離におけるこの領域または抗体、抗体フラグメントまたはFc融合タンパク質の文脈におけるこの領域を指すことができる。

## 【 0 0 3 6 】

例えば、IgG Fc領域は、IgG CH2ドメインおよびIgG CH3ドメインを含むことができる。ヒトIgG Fc領域の"CH2ドメイン"は、通例、位置約231のアミノ酸残基から位置約340のアミノ酸残基にわたり、そこで炭水化物鎖はCH2ドメインに結合することができる。"CH3ドメイン"は、Fc領域におけるCH2ドメインに対するアミノ酸C末端のストレッチ、例えばIgGの位置約341のアミノ酸残基から位置約447のアミノ酸残基を含むことができる。融合タンパク質は、例えば、血清アルブミン、好ましくはヒト血清アルブミンとの本発明のvNARドメインの1以上の融合体を含むこともできる。本発明の融合タンパク質は、例えば、アミノ末端融合体またはカルボキシ末端融合体としてのvNARドメインを含むことができる。例えば、本発明の融合タンパク質は、2以上のvNARドメインを含むこともでき、例えば、本発明の融合タンパク質は、例えばそれぞれの融合タンパク質のアミノ末端およびカルボキシ末端の両方への融合による2つ、3つまたは4つの本発明のvNARドメインを含むことができる。

本発明の一実施形態において、本発明の融合タンパク質はヒトFcドメインまたはその配列変種を含む。従って、本発明の融合タンパク質は、上記のFcドメインまたはその配列変種を含むことができる。本発明のFc-vNAR融合タンパク質のFcドメインの配列変種は、上記のFcドメインと少なくとも80%、85%、90%、95%または98%同一であり、あるいは約92%～約98%、例えば92%、93%、94%、95%、96%、97%または98%同一である。本発明のFc融合タンパク質の配列類似性は、前述のように算出することができる。配列類似性は、Fcドメインのアミノ酸配列の全長に関して算出することもできるが、長さ10～200アミノ酸または110～190アミノ酸または120～180アミノ酸または130～170アミノ酸または140～160アミノ酸または10～100アミノ酸または20～90アミノ酸、30～80アミノ酸、40～70アミノ酸、50～60アミノ酸のアミノ酸配列、例えば長さ約15～55アミノ酸、または長さ約25～115アミノ酸または長さ約35～95アミノ酸または長さ約45～85アミノ酸または長さ約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、34、35、36、37、38、39、40、42、46、48、51、54、56、57、59または60アミノ酸のアミノ酸配列の任意の部分または位置に関して算出することもできる。

## 【 0 0 3 7 】

例えば、本発明の融合タンパク質または本発明に開示されている任意のタンパク質のアミノ酸配列の配列同一性は、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入し、



かどうかを決定する。最後に、アミノ酸挿入および欠失を可能にする改良Needleman-Wunsch-Sellersアルゴリズム(Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48:444 (1970); Sellers, SIAM J. Appl. Math. 25:787 (1974))を用いて、2つのアミノ酸配列の最もスコアの高い領域をアラインメントする。FASTA解析の例示的なパラメータは、ktup=1、ギャップ開始ペナルティ=10、ギャップ伸長ペナルティ=1および置換行列=BLOSUM62である。これらのパラメータは、Appendix 2 of Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990)で説明されているように、スコアリングマトリックスファイル("SMATRK")を改良することによってFASTAプログラムに導入することができる。

#### 【0040】

一実施形態において、本発明の融合タンパク質は、例えば、CDR2とCDR3の間のベータフォールドが置換されるCDR2とCDR3の間のインフレーム融合によるVH抗体と本発明のHV2ドメインとの融合体を含むこともできるし、または例えば、HV2はbフォールドに含まれることもできる。本発明のHV2-ドメインはまた、他の免疫グロブリン、例えばIgMタイプ抗体に移植することもできるし、例えばVHHドメインに置き換わるVHH抗体に融合されることもできる。

一実施形態において、本発明の融合タンパク質は、*in vivo*で第1および第2の目的の抗原に結合するとき、例えば、本発明の二重特異性融合タンパク質が、腫瘍または癌細胞の第1および第2の抗原、例えば上記の癌細胞表面抗原が結合するときADCCを誘導する。本発明の融合タンパク質に用いられる用語ADCC(抗体依存性細胞傷害)とは、免疫系のエフェクター細胞が、特異的抗体によって膜表面抗原が結合された標的細胞を活発に溶解する細胞性免疫防御機構のことをいう。ADCCは、例えば、NK細胞上に発現されるCD16(Fc $\gamma$ RIII)の抗体Fcドメインへの結合によって媒介される(例えばClynes et al. (2000) Nature Medicine 6, 443-446 を参照のこと)。ADCCは、例えば、CD16へのFcドメインの結合に影響を及ぼす、Fcドメインにおけるアミノ酸置換によって改変されることができる。例えば、Shields et al. (J Biol Chem 9(2), 6591-6604 (2001))は、Fc領域の位置298、333、および/または334(残基のEUナンバリング)におけるアミノ酸置換がADCCを改変することを見出した。また、Fc受容体結合およびエフェクター機能の増加は、例えば、Fc領域のグリコシル化を改変することによって得ることができる。FcドメインのAsn297に結合した2つの複合分枝糖鎖(complex biantennary oligosaccharide)は、一般的にはCH2ドメイン間に埋もれ、ポリペプチド骨格と接触しているが、それらの存在は、抗体がADCCを含むエフェクター機能を媒介するために必須である(Lifely et al., Glycobiology 5, 813-822 (1995); Jefferis et al., Immunol Rev 163, 59-76 (1998); Wright and Morrison, Trends Biotechnol 15, 26-32 (1997))。例えば、二分岐(bisected)オリゴ糖の生成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼである $\beta$ (1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII)の過剰発現は、抗体の*in vitro* ADCC活性を顕著に増加させる。従って、例えば、本発明の融合タンパク質の産生に用いる細胞株におけるGnTIIIの過剰発現は、二分岐オリゴ糖が富化した本発明の融合タンパク質を生じることができ、これらはまた一般にフコシル化されていず、ADCCの増加を示すことができる。

#### 【0041】

本発明の融合タンパク質のADCCは、例えば、宿主細胞または細胞株におけるGnTIIIに加えてマンノシダーゼII(ManII)をさらに過剰発現することによって、さらに増加されることができる。なぜなら、得られた本発明の融合タンパク質が、複合タイプのフコシル化されていない二分岐オリゴ糖で富化されることができるためである(例えばFerrara et al., Biotechn Bioeng 93, 851-861 (2006) を参照のこと)。例えば、本発明のFc融合タンパク質に存在するオリゴ糖コアの最も内側のN-アセチルグルコサミン残基からフコースを除去することによっても、ADCC活性を増加させることができ(例えばShinkawa et al., J Biol Chem 278, 3466-3473 (2003)を参照のこと)、従って、本発明のFc融合タンパク質もまた、例えばフコシル化が減少した宿主細胞または細胞株において、例えば $\alpha$ (1,6)-フコシルトランスフェラーゼ欠損宿主細胞における発現によって産生されることができる(例えばYamane-Ohnuki et al., Biotech Bioeng 87, 614-622 (2004); Niwa et al., J Immuno

I Methods 306, 151-160 (2006)を参照のこと)。

【 0 0 4 2 】

一実施形態において、本発明は、本発明の方法によって得られるvNARを提供し、例えば、上記のvNARタイプI、IIまたはタイプIVであり得る上記のvNARを提供する。一実施形態において、本発明はまた、上記の本発明のvNARまたはvNAR融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはベクターを提供する。本発明の方法または本発明の融合タンパク質に用いるベクターまたは発現ベクターという用語は、染色体外複製が可能な核酸分子のことをいう。好ましいベクターは、それが連結されている核酸の自律複製および発現が可能なベクターである。それらが機能的に連結された遺伝子の発現を指示することができるベクターは、本明細書において"発現ベクター"と呼ぶ。一般に、組換えDNA技術に有用な発現ベクターは、多くの場合、一般に円形二本鎖DNAループと呼ぶ"プラスミド"の形態であり、そのベクター型では染色体に結合していない。本発明の融合タンパク質または本発明のvNARの真核細胞における発現に必要な核酸配列は、例えば、少なくとも1つのプロモーターおよびエンハンサー、終結およびポリアデニル化シグナルならびに選択マーカー、例えば抗生物質耐性などを含む。本発明のvNARまたはvNAR融合タンパク質の発現に用いることができる発現ベクターは、例えば、pCMV、pCDNA、p4X3、p4X4、p4X5、p4X6、pVL1392、pVL1393、pACYC177、PRS420を含むことができ、ウイルスベースベクター系が用いられる場合、例えばpBABEpuro、pWPXL、pXP-derivedベクターを含むことができる。

10

【 0 0 4 3 】

一実施形態において、本発明は、上記のポリヌクレオチド配列またはベクター、例えば上記の本発明のvNARまたは本発明の融合タンパク質のためのコード配列を含むポリヌクレオチドまたはベクターまたは発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。例えば、本発明に使用する宿主細胞は、酵母細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞であることができる。例えば、本発明の宿主細胞は、Sf9、Sf21、S2、Hi5またはBTI-TN-5B1-4細胞から選択される昆虫細胞であることができ、または例えば、本発明の宿主細胞は、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ハンセンラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、シュワンニオミセス・オシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*)、クリベロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*)、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) およびピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) から選択される酵母細胞であることができ、または例

20

30

【 0 0 4 4 】

一実施形態において、本発明は、本明細書による、本発明のvNARまたはvNAR融合タンパク質の製造方法を提供する。ここで、本発明の方法は、本発明のvNARまたはvNAR融合タンパク質のタンパク質発現に十分な条件下で上記の本発明の少なくとも1つの宿主細胞を培養する工程、および、本発明のvNARタンパク質またはvNAR融合タンパク質を分離精製する工程を含む。例えば、本発明のための宿主細胞は、10%FBSを含有するDMEM中で増殖させることができる。例えばその後の分離精製の助けとなるタンパク質を含まない培地中、または例えばグレース昆虫培地、express Five (登録商標) SFM培地 (Life Technologies社) またはHigh Five (登録商標) 培地 (Life Technologies社)、YNM培地、YPD培地または例えば *PichiaPink* (Life Technologies社) 中、10%CO<sub>2</sub>、37 °C でインキュベートした。

40

【 0 0 4 5 】

本発明の宿主細胞は、例えば、12~408時間、例えば約12~約400時間、例えば14時間、16時間、18時間、20時間、24時間、36時間、48時間、72時間、96時間から約120時間、144

50

時間、168時間、192、216時間、240時間、264時間、288時間、312時間、336時間、360時間、384時間、408時間増殖させることができる。続いて、本発明のvNARまたは本発明の融合タンパク質は単離および精製することができる。例えば、本発明のタンパク質は、クロマトグラフィー、例えばイオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、硫酸沈殿または限外濾過によって精製、および単離することができる。例えば、本発明のvNARまたは本発明の融合タンパク質は、例えばペプチド結合によって作動可能に連結されたポリペプチドの、宿主細胞の小胞体(ER)への通過を開始させることができるアミノ酸配列のことをいうシグナル配列を含むこともできる。このシグナルペプチドは、一般に、エンドペプチダーゼ(例えば特定のER局在シグナルペプチダーゼ)によって切除されて(成熟)ポリペプチドを放出する。シグナルペプチドの長さは、一般的には、約10～約40アミノ酸の範囲である。

10

#### 【0046】

一実施形態において、本発明はまた、本発明のHV2ドメインをコードする複数のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドライブラリーを提供する。本発明の用語"ポリヌクレオチドライブラリー"または"複数のポリヌクレオチド"は、少なくとも本発明のHV2ドメインをコードするか、または例えば、本発明のHV2ドメインを含むvNARタイプI、IIまたはタイプIVの1つをコードする、少なくとも2つの異なるDNA配列のライブラリーまたは集合を意味する。例えば、ポリヌクレオチドライブラリーは、少なくとも1000個の異なるDNA配列を含み、より好ましくは、本発明のHV2ドメインをコードする、少なくとも $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ または少なくとも100、1000または約 $10^3$ ～約 $10^7$ 個の異なるDNA配列を含む。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドライブラリーは、全体的構造FW1-CDR1-FW2-HV2-FW3a-HV4-FW3b-CDR3-FWのタイプI、IIまたはタイプIV vNARドメインをコードする複数のポリヌクレオチドを含む。一実施形態において、本発明は、配列番号2、配列番号4、配列番号5に記載の二重特異性vNAR分子を提供する。

20

#### 【0047】

一実施形態において、本発明は、医薬の製造における本発明のvNARまたは本発明のvNAR融合タンパク質の使用に関する。従って、本発明のvNARタンパク質または本発明のvNAR融合タンパク質は、例えば、それを必要とする個体に投与するために製剤化される医薬の製造に用いることができる。本発明の医薬は、例えば、注射用液体、カプセル、ロゼンジ、再構成のための凍結乾燥製剤であることができ、本発明のvNARタンパク質または本発明のvNAR融合タンパク質を、例えば約0.01mg/ml～約25mg/ml、または約0.02mg/ml～約20mg/ml、または約0.075mg/ml～約17.5mg/ml、または約0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、0.75mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml、3mg/ml、3.5mg/ml、3.75mg/ml、4mg/ml、4.25mg/ml、4.5mg/ml、5mg/ml、5.5mg/ml、6mg/ml、6.5mg/ml、7mg/ml、7.5mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、9.5mg/ml、10mg/ml、10.5mg/ml、11mg/ml、11.5mg/ml、12mg/ml、12.5mg/ml、12.75mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、14.5mg/ml、15mg/ml～約16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml、20mg/ml、21mg/ml、22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml、または例えば約26mg/ml～約50mg/ml、例えば27mg/ml、28mg/ml、29mg/ml、30mg/ml、31mg/ml、32mg/ml、33mg/ml、34mg/ml、35mg/ml、36mg/ml、37mg/ml、38mg/ml、39mg/ml、40mg/ml、41mg/ml、42mg/ml、43mg/ml、44mg/ml、45mg/ml、46mg/ml、47mg/ml、48mg/ml、49mg/ml、50mg/ml、または例えば0.001mg/ml～約0.009mg/ml含むことができる。

30

40

#### 【0048】

一実施形態において、本発明は、上記の本発明のvNARまたはvNAR融合タンパク質と薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物の文脈において、薬学的に許容される担体とは、器官の1つもしくは身体の一部から他の器官もしくは身体の一部への対象組成物または治療薬の運搬または輸送に関与する、液体もしくは固体充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒またはカプセル化材料、例えばリボソーム、ポリエチレングリコール(PEG)、PEG化リボソーム、ナノ粒子などの薬学的に許容される物質、組成物またはビヒクルのことをいう。各担体は、製剤の他の成分と適合し、患者に有害ではないという意味で"許容"されなければならない。薬学的に許容される担体として役立

50

つことができる物質の例は、例えば糖、例えばラクトース、グルコースおよびショ糖；または例えばデンプン、例えばコーンスターチおよびポテトスターチ；または例えばセルロースおよびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロース；または例えばゼラチン；または例えば賦形剤、例えばカカオバターおよび座薬ワックス；または例えばオイル、例えば落花生油、綿実油、ペニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーンオイルおよび大豆油；または例えばグリコール、例えばプロピレングリコール；または例えばポリオール、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール；または例えばエステル、例えばオレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；または例えば以下もまた用いることができる：等張生理食塩水または緩衝(水性)溶液、例えばホスフェート、シトレートなど、緩衝液、例えばナトリウム塩、好ましくは少なくとも50mMのナトリウム塩、カルシウム塩、好ましくは少なくとも0.01mMのカルシウム塩、および/またはカリウム塩、好ましくは少なくとも3mMのカリウム塩を含む水性緩衝液を含む。好ましい実施形態によれば、ナトリウム、カルシウムおよび/またはカリウム塩は、ハロゲン化物、例えば塩化物、ヨウ化物もしくは臭化物の形態、それらの水酸化物、炭酸塩、炭酸水素塩または硫酸塩などの形態で存在することができる。限定するものではないが、ナトリウム塩の例は、例えばNaCl、NaI、NaBr、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を含み、任意のカリウム塩の例は、例えばKCl、KI、KBr、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{KHCO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{SO}_4$ を含み、カルシウム塩の例は、例えば $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CaI}_2$ 、 $\text{CaBr}_2$ 、 $\text{CaCO}_3$ 、 $\text{CaSO}_4$ 、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を含む。さらにまた、前述のカチオンの有機アニオンを本発明の組成物に含むことができる。さらに好ましい実施形態によれば、上記の注射目的に適した本発明の組成物は、塩化ナトリウム(NaCl)、塩化カルシウム( $\text{CaCl}_2$ )および任意選択で塩化カリウム(KCl)から選択される塩を含むことができ、ここで、塩化物に加えて、さらなるアニオンが存在することができる。 $\text{CaCl}_2$ もまた、KClなどの他の塩によって置き換えることもできる。本発明の組成物は、特定の基準媒体を参照して高張、等張または低張であることができる。すなわち、本発明の医薬組成物は、特定の基準媒体を参照して、高い、同一のまたは低い塩分含有量を有することができるが、ここで、好ましくは、浸透または他の濃度効果による細胞の損傷を生じない上記の塩の濃度を用いることができる。基準媒体は、例えば、"in vivo"法で存在する液体であり、例えば血液、リンパ、細胞質ゾル液もしくは他の体液、または例えば"in vitro"法で標準媒体として用いることができる液体、例えば通常の緩衝液もしくは液体である。このような通常の緩衝液もしくは液体は当業者に公知である。

#### 【0049】

一実施形態において、本発明は、上記の本発明の医薬組成物を、それを必要とするヒトに投与することを含む、病的状態にあるそれを必要とする個体の治療方法に関する。例えば、本発明の治療方法は、病的状態にあるそれを必要とするヒトに、約0.001mg/kg～約50mg/kg、または約0.005mg/kg～約45mg/kg、または約0.01mg/kg～約40mg/kg、または約0.05mg/kg～約35mg/kg、または約0.1mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、2.5mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、12.5mg/kg、15mg/kg、17.5mg/kg、20mg/kg、22.5mg/kg、25mg/kg～約26mg/kg、27mg/kg、28mg/kg、29mg/kg、30mg/kg、32.5mg/kg、35mg/kg、37.5mg/kg、40mg/kg、42.5mg/kg、45mg/kgの本発明の医薬組成物を投与することを含むことができる。本明細書においては、用語"mg/kg"とは、本発明における本発明の医薬組成物(mg)/体重(kg)のことをいう。本発明の方法によって治療することができる病的状態は、癌、自己免疫疾患、またはウイルス感染であることができる。本発明の治療方法の文脈に用いられる用語"癌"は、異常で無制限な細胞の増殖によって引き起こされる種々の状態のことをいう。例えば、"癌細胞"と呼ばれる、癌を引き起こすことのできる細胞は、例えば制御されない増殖、不死、転移能、高い増殖速度および/または特定の典型的な形態学的特徴などの独得な特徴を有する。癌細胞は、例えば腫瘍の形態であることができるが、この細胞はまた、被験者に1つずつ存在することでもできるし、非腫瘍形成性癌細胞であることもできる。本発明の治療方法の文脈において用いられる癌という用語は、例えば、前立腺癌、乳癌、副腎癌、白血病、リンパ腫、骨髄腫、ワルデンストレーママクログロブリン血症、単クローン性免疫グロブリン血

症、良性単クローン性ガンマグロブリン血症、H鎖病、骨および結合組織肉腫、脳腫瘍、甲状腺癌、膵臓癌、下垂体癌、眼癌、腔癌、外陰癌、子宮頸癌、子宮癌、卵巣癌、食道癌、胃癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、胆嚢癌、胆管癌、肺癌、精巣癌、腎癌(penal cancer)、口腔癌、皮膚癌、腎癌、ウィルス腫瘍および膀胱癌を指すことができる。本発明の治療方法の文脈において、自己免疫疾患という用語は、例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)、グレーブス病、I型およびII型糖尿病、多発性硬化症、シェーグレン症候群、強皮症、糸球体腎炎、移植片拒絶、例えば臓器および組織の同種移植片および異種移植片拒絶ならびに移植片対宿主疾患を指すことができる。本発明の治療方法の文脈において用いられる用語"ウィルス感染"は、細胞ウィルス性形質転換、ウィルス複製および増殖、例えば、ヘルペス科、水痘帯状疱疹ウィルス(VZV)、EBウィルス(EBV)、サイトメガロウィルス(CMV)などのウィルスによる感染症を特徴とする異常な状態のことをいう。好ましい実施形態によれば、本明細書に記載の本発明の方法により治療される個体はヒトである。

10

#### 【0050】

一実施形態において、本発明は、上記の本発明のvNARまたはvNAR融合タンパク質と検出手段とを含むパーツのキットを提供する。従って、本発明のキットは、例えば、本発明のvNARまたはvNAR融合タンパク質が、貯蔵、例えば4 ~ 10 または周囲温度における、例えば少なくとも1~12週間、または例えば少なくとも1~6ヶ月間、または例えば少なくとも2~12ヶ月間、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または11ヶ月間の貯蔵に十分に安定であるような凍結乾燥製剤または液体製剤などの安定な形態で本発明のvNARまたはvNAR融合タンパク質を含むことができる。本発明のキットは、さらに、本発明のvNARタンパク質または本発明のvNAR融合タンパク質、例えば量子ドット、検出可能に標識された抗体、例えば抗体-酵素複合体または蛍光標識に連結された抗体の検出手段を含むことができる。

20

#### 【0051】

本発明のキットの文脈または上記の本発明の方法の文脈に用いられる量子ドットという用語は、単一球形ナノ結晶の半導体材料であって、このナノ結晶の半径が、その半導体材料の励起子ボア半径のサイズ以下である前記材料のことをいう(励起子ボア半径の値は、半導体特性に関する情報を含むハンドブック、例えばCRC Handbook of Chemistry and Physics, 83rd ed., Lide, David R. (Editor), CRC Press, Boca Raton, Fla. (2002)において見られるデータから算出できる)。量子ドットは、例えばWeller, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32: 41-53 (1993), Alivisatos, J. Phys. Chem. 100: 13226-13239 (1996) およびAlivisatos, Science 271: 933-937 (1996)などの文献に記載されているため、当該技術分野で公知である。量子ドットは、例えば、直径約1nm~約1000nmであり、例えば10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nmまたは500nmであり、好ましくは少なくとも約2nm~約50nmであり、より好ましくは、QDは、直径で少なくとも約2nm~約20nm(例えば約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20nm)であることができる。QDは、それらの実質的に均一なナノメートルサイズを特徴とし、しばしば、おおよそ10%~15%の多分散またはサイズ範囲を示す。QDは、励起によって電磁放射を放出することができる(すなわちQDは光ルミネセンスを生じる)、1以上の第1半導体材料の"コア"を含み、第2半導体材料の"シェル"によって囲まれることができる。半導体シェルによって囲まれるQDコアは、"コア/シェル"QDと呼ばれる。周囲の"シェル"材料は、好ましくは、コア材料のバンドギャップエネルギーより大きいバンドギャップエネルギーを有し、"コア"基板の原子スペースに近接して原子スペースを有するように選択されることができる。コアおよび/またはシェルは、限定するものではないが、II-VI族(ZnS、ZnSe、ZnTe、US、CdSe、CdTe、HgS、HgSe、HgTe、MgS、MgSe、MgTe、CaS、CaSe、CaTe、SrS、SrSe、SrTe、BaS、BaSe、BaTeなど)およびIII-V族(GaN、ギャップ、GaAs、GaSb、InN、InP、InAs、InSbなど)およびIV族(Ge、Siなど)材料、PbS、PbSeならびにそれらの合金または混合物を含む半導体材料であることができる。好ましいシェル材料はZnSを含む。

30

40

#### 【0052】

50

例えば、抗体を標識するために本発明のキットに用いることができ、本発明のvNARまたはvNAR融合タンパク質を検出するために用いることができる用語"蛍光標識"または"蛍光色素"または"フルオロフォア"は、限定された励起波長で光エネルギーを吸収し、異なる波長で光エネルギーを放出する部分のことをいう。本発明に用いることができる蛍光標識の例は、限定するものではないが、ダンシルクロリド、ダボキシル、ジアルキルアミノクマリン、ローダミンイソチオシアネート、Alexa 350、Alexa 430、アレクサフルオル488、アレクサフルオル 532、アレクサフルオル 546、アレクサフルオル 568、アレクサフルオル 594、アレクサフルオル 633、アレクサフルオル 660、アレクサフルオル 680、AMCA、アミノアクリジン、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-Y-TMR、BODIPY-TRX、BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TMR、BODIPY TR、BODIPY 530/550、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665)、カルボキシローダミン 6G、カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、カスケードブルー、カスケードイエロー、クマリン 343、シアニン色素(Cy3、Cy5、Cy3.5、Cy5.5)、ダンシル、ダボキシル、ジアルキルアミノクマリン、4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシ-フルオレセイン、DM-NERF、エオジン、エリスロシン、フルオレセイン、FAM、ヒドロキシクマリン、IRDyes(IRD40、IRD 700、IRD 800)、JOE、リッサミンローダミンB、マリーナブルー、メトキシクマリン、ナフトフルオレセイン、オレゴングリーン488、オレゴングリーン 500、オレゴングリーン 514、パシフィックブルー、PyMP0、5-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン、5-カルボキシ-2',4',5',7'-テトラクロロフルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン、5-カルボキシローダミン、6-カルボキシローダミン、6-カルボキシテトラメチルアミノ、カスケードブルー、Cy2、Cy3、Cy5、6-FAM、ダンシルクロリド、フルオレセイン、ヘキシ、6-JOE、NBD(7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール)、オレゴングリーン 488、オレゴングリーン 500、オレゴングリーン 514、パシフィックブルー、フタル酸、テレフタル酸、イソフタル酸、クレシルファストバイオレット、クレシルブルーバイオレット、ブリリアントクレシルブルー、p-アミノ安息香酸、エリスロシン、フタロシアニン、アゾメチン、シアニン、キサンチン系薬剤、スクシニルフルオレセイン、希土類金属クリプテート、ユウロピウムトリスジピリジンジアミン、ユウロピウムクリプテートもしくはキレート、ジアミン、ジシアニン、ラホヤブルー色素、アロフィコシアニン、アロフィコシアニンB、フィコシアニンC、フィコシアニンR、チアミン、フィコエリトロシアニン、フィコエリスリンR、REG、ローダミングリーン、ローダミンイソチオシアネート、ローダミンレッド、TAMRA、TET、TRIT(テトラメチルローダミンイソチオール)、テトラメチルローダミンまたはテキサスレッドを含む。例えば、本発明のキットは、試料、例えば、組織生検物またはパラフィン断片、組織培養物または体液などにおいて上記の癌細胞表面抗原を検出するために用いることができる。試料は、例えば、病的状態にある患者由来のものであることができるが、ここで、患者から試料を入手することは、本発明の一部を形成しない。

#### 【0053】

本明細書に記載の特定の方法論、プロトコルおよび試薬は、それらを改変することが可能であるため、本発明がそれらに限定されないことが理解されるべきである。本明細書に用いた用語法は、特定の実施形態のみを説明するためのものであって、本発明の範囲を限定しようとするものではなく、それらは、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることもまた理解されなければならない。別途定義しない限り、本明細書に用いたすべての学術用語は、当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。

#### 【実施例1】

#### 【0054】

酵母ディスプレイフラグメント生成のためのSOE PCR

酵母表面ディスプレイの挿入フラグメントの生成のために、出発材料として、EpCAM特異的バインダー5005(EpCAM-specific binder5005)からのプラスミドDNAを用いた。PCR反応を並行して2つ行ってDNAフラグメントを2つ生成させ、これらを3回目のPCRの出発材料として用いた(図11参照)。PCR条件は以下の通りとした。92℃で30分、[92℃で30分、52℃

10

20

30

40

50

で30分、72℃で30分]を30サイクル、次いで72℃で5分間。3回目のPCRのために、フラグメントAとフラグメントB(図11参照)を等モル比(それぞれおよそ50ng)で混合して鋳型として用いた。前述のPCRランを6サイクル行った後、オリゴヌクレオチドpCT\_Seq\_upおよびpCT\_Seq\_loを添加し、ランダム化HV2コード領域を含む最終PCR産物を生成させ、これをライブラリー作成のための挿入材料として用いた。

#### 【実施例2】

##### 【0055】

#### ライブラリー作成

高い配列多様性を有する酵母ライブラリーの作成のために、Benatuil et al., Protein Eng Des Sel 2010; 23:155-9 のプロトコルに従って*S. セレビシエ*(*S. cerevisiae*)の形質転換を行った。*S. セレビシエ*株EBY100の終夜培養物を用いて、OD600=0.3までYPD培地100mLに接種し、OD600=1.6の細胞密度に到達するまでインキュベーションを続けた。3000rpmで5分間の遠心分離によって培地から細胞を分離した。さらに進めて、氷水50mlで2回、エレクトロポレーション緩衝液で1回細胞を洗浄し、次いでリチウム緩衝液20ml中、30℃、180rpmで振盪しながら酵母細胞のコンディショニングを行った。エレクトロポレーション緩衝液を用いる最後の1回の洗浄工程後に、細胞ペレットをエレクトロポレーション緩衝液100~200μlに再懸濁し、最終容量1mlにして氷上に保存した。

##### 【0056】

各エレクトロポレーション反応のために、消化ベクターバックボーン1μgおよびDNA挿入物3μgを、冷形質転換キュベット中エレクトロコンピtent細胞400μlと混合した。エレクトロポレーション(U=2.5kV;C=25μF;R<200Ω;パルス時間=5ms)の直後、1Mソルビトール:YPD培地の1:1混合物8mlを加え、次いで30℃で1時間180rpmでインキュベーションした。最終の遠心分離工程後に、細胞をSDCAA培地に再懸濁し、2日間インキュベートした。SDCAAプレート上に段階希釈した細胞をストリーキングすることによって、3日後に、コロニー数からライブラリーサイズを決定することができた。より大きなライブラリーを作成するために、より多くのエレクトロコンピtent細胞を必要とする場合、細胞培養物および細胞調製物は比例的大規模で行った。

SGCAA培地:2%(w/v)ガラクトース、0.17%(w/v)酵母窒素源、0.5%(w/v)カザミノ酸、0.5%(w/v)硫酸アンモニウム、10%w/vポリエチレングリコール8000、38mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、62mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O[pH7.4]。

#### 【実施例3】

##### 【0057】

#### *S. セレビシエ*における遺伝子発現の誘導

細胞選別実験のために、pCTベクター(実施例2参照)を用いて酵母細胞を形質転換した。サメ抗体バリエーションは、ガラクトースプロモーターの制御下にあるベクターにコードされているため、遺伝子発現の誘導は、グルコース含有培地からガラクトース含有SGCAA培地へと培地を変更することによって行うことができた。従って、酵母終夜培養物の対応容量の細胞を沈殿させ(14000U/分;2分間)、OD600=0.5の細胞密度まで振盪フラスコ中の50~100ml SGCAA培地に接種し、20℃で少なくとも1日インキュベーションを行った。

SGCAA培地:2%(w/v)ガラクトース、0.17%(w/v)酵母窒素源、0.5%(w/v)カザミノ酸、0.5%(w/v)硫酸アンモニウム、10%w/vポリエチレングリコール8000、38mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、62mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O[pH7.4]。

#### 【実施例4】

##### 【0058】

#### FACS細胞染色およびFACS解析

SGCAA培地中で酵母細胞を終夜増殖させてペレット化し、PBSで1回洗浄した。その後、適切な容量の1μM EpCAM中で細胞をインキュベートした。15分後、細胞をPBSで再度洗浄し、CD3ε-ビオチンを加えた(1μM)。30~60分のインキュベーション後、細胞を再度洗浄した。PE標識抗EpCAM抗体を用いてEpCAM-結合を検出した。CD3ε-結合を、ビオチン化CD3εおよびストレプトアビジン-APCかまたはHisタグ付きCD3εおよびAlexaFluor標識ペンタH

10

20

30

40

50

is-抗体のいずれかが用いて検出した。氷冷しながら5分間第2試薬とのインキュベーションを行った。PBSで繰り返し洗浄した後、酵母細胞を二次元FACS選別(次元A:EpCAM-結合;次元B:CD3ε-結合)にかけた。これと同様に、EpCAMおよびヒトFcに対する二重特異性バインダーを選択するためにスクリーニングを行った。ここでは、Hisタグ付きEpCAMおよびAlexaFluor標識ペンタHis-抗体を用いてEpCAM結合が検出された。PE標識抗ヒト抗体を用いてヒトFcに対する結合が検出された。

#### 【0059】

##### 蛍光活性化細胞選別

MoFlo Cytomation装置を用い、Summit4.3によって解析することによって蛍光活性化細胞選別を行った。この装置は、単一細胞を含有する液滴の蛍光を測定することが可能である。488nmおよび640nmにおける2つのレーザー発光の使用によって、単一酵母細胞上のvNAR表面提示および標的タンパク結合の蛍光強度の平行測定が可能であった。細胞選別手順を開始する前に、選別装置のレーザーを、蛍光標識ビーズを用いて調整した。さらに、解析される細胞含有液滴の位置を決定するために、ドロップディレイ(drop-delay)を行った。各選別ラウンドのために、選別される細胞の蛍光特性を定める選別ゲートをセットした。選別ゲートの設定によって、一般に、抗原の非存在下で対照染色によって判断して、0.1%の偽陽性細胞が見込まれた。

#### 【0060】

細胞選別実験のためにこの研究で用いたMoFlo装置のパラメータ

側方散乱:650(LINモード)

FL1:650(Logモード)

FL2:600(Logモード)

FL3:640(Logモード)

プレートの電化:2,500V

イベントレート5,000~30,000イベント/s

試料圧力:60.1psi

シース圧力:59psi

ノズル直径:70μm

選別モード:Sort Purify1

細胞選別後、すでに選別された細胞の少量部分を解析し、選別効率を決定した。その後、30℃で2日間、細胞をSDCAAプレート上で増殖させ、続いて、次の選別ラウンドのために、次の選別を誘導するために細胞表面提示を誘導した。各選別ラウンドに関してプレート上でインキュベーション後、選別された細胞の10倍過剰を凍結保存のために10%グリセロールに懸濁した。

用いたSDCAA培地:2%(w/v)グルコース、0.17%(w/v)酵母窒素源、0.5%(w/v)カザミノ酸、0.5%(w/v)硫酸アンモニウム、38mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、62mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O[pH7.4]。FACS結果を図6、7および9に示す。

10

20

30

【 図 1 】

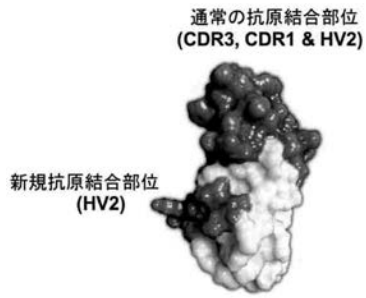


Fig. 1

【 図 2 】

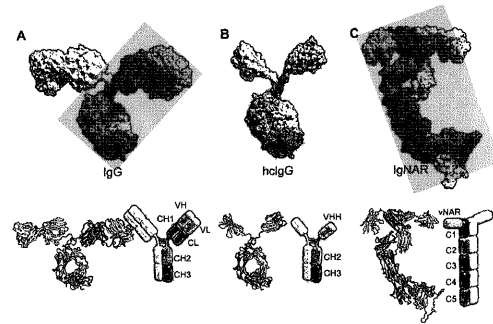


Fig. 2

【 図 3 】

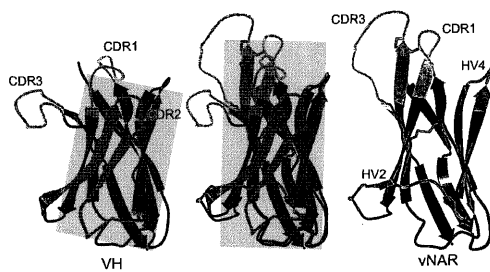


Fig. 3

【 図 4 】

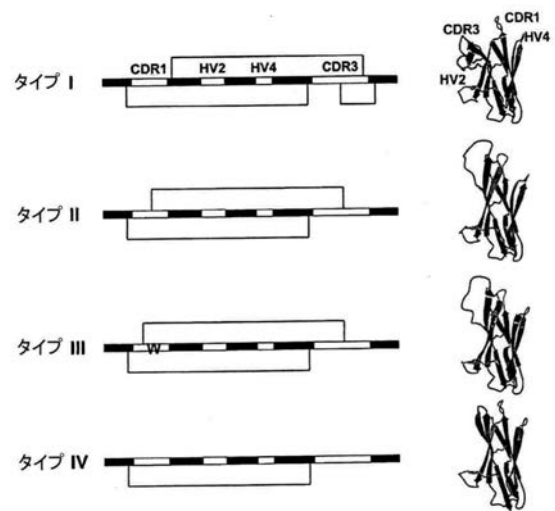


Fig. 4

【図 5】

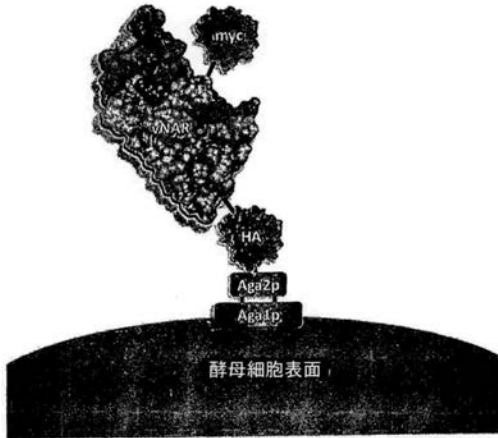


Fig. 5

【図 6】

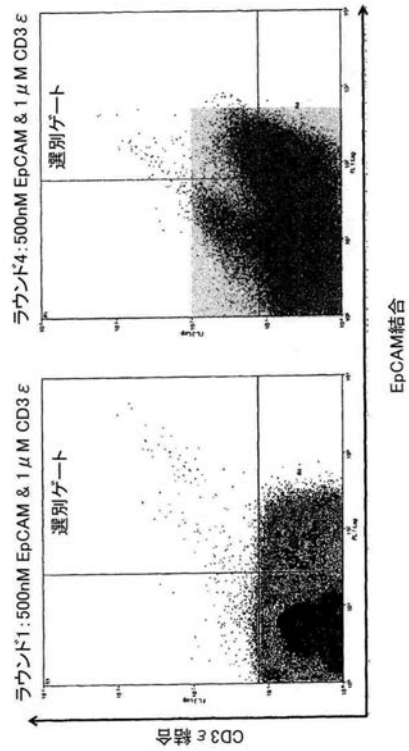


Fig. 6

【図 7】

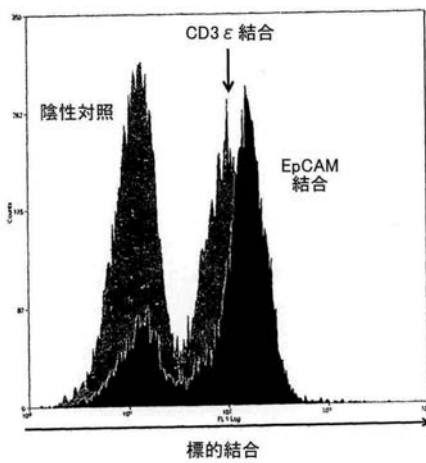


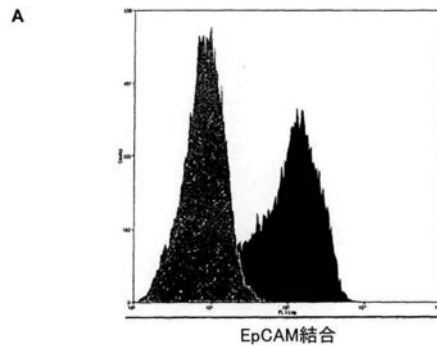
Fig. 7

【図 8】

|        |    |                                                      |           |     |
|--------|----|------------------------------------------------------|-----------|-----|
| クローンB1 | 1  | MAARLEQTPTTTTKEAGESLTINCVLKFEWTLGRTYWYFTKKGTAFKIGKWN | GGRYSDT   | 60  |
| 親5005  | 1  | MAARLEQTPTTTTKEAGESLTINCVLKFEWTLGRTYWYFTKKG          | K GGRYSDT | 60  |
| クローンB1 | 61 | KNTASKSLRLISDLRVEDSGTYHCEALIYSDMGIMMKIEGGGTTVTVK     |           | 110 |
| 親5005  | 61 | KNTASKSLRLISDLRVEDSGTYHCEALIYSDMGIMMKIEGGGTTVTVK     |           | 110 |

Fig. 8

【図 9 A】



【図 9 B】

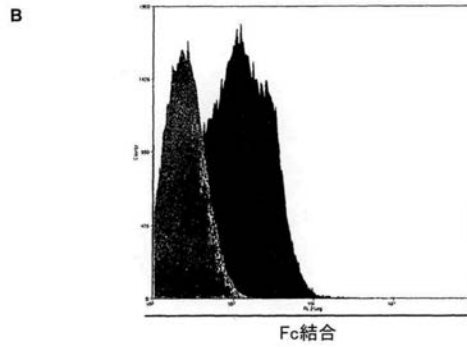


Fig. 9

【図 10】

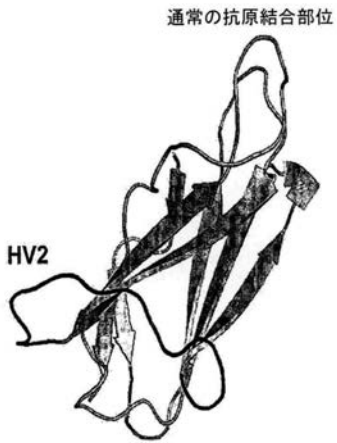


Fig. 10

【図 11】

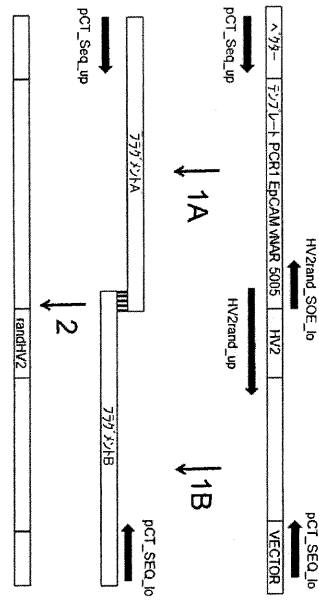


Fig. 11

【配列表】

2017536114000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/002086

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C07K16/30 C12N15/00  
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 C12N

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, Sequence Search

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | T. LI ET AL: "Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging",<br>THE FASEB JOURNAL,<br>vol. 26, no. 10, 22 June 2012 (2012-06-22)<br>, pages 3969-3979, XP055168396,<br>ISSN: 0892-6638, DOI: 10.1096/fj.11-201384<br>abstract<br><br>-----<br>-/-- | 10-14,22              |

☒ 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

"B" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 December 2015

Date of mailing of the international search report

26/01/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Malamoussi, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/002086

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | DATABASE Protein [Online]<br>4 March 2000 (2000-03-04),<br>"Green fluorescent protein",<br>XP002752447,<br>retrieved from NCBI<br>Database accession no. CAA65278<br>the whole document                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 10-14,22              |
| A         | -----<br>US 2013/302250 A1 (BARELLE CAROLINE [GB]<br>ET AL) 14 November 2013 (2013-11-14)<br>abstract<br>page 8, right-hand column, paragraph 0106<br>page 8, paragraph 0109 - page 9, paragraph<br>0111                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 1-28                  |
| A         | -----<br>ZIELONKA STEFAN ET AL: "Shark Attack:High<br>affinity binding proteins derived from<br>shark vNAR domains by stepwise in<br>vitro affinity maturation",<br>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,<br>vol. 191, 23 May 2014 (2014-05-23), pages<br>236-245, XP029095938,<br>ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL<br>ISSN: 0168-1656, DOI:<br>10.1016/J.JBIOTEC.2014.04.023<br>abstract<br>page 238, left-hand column, paragraph 2 -<br>right-hand column, paragraph 2<br>page 244, right-hand column, paragraph 2 | 1-28                  |
| A         | -----<br>MAKI OHTANI ET AL: "Variable domain<br>antibodies specific for viral hemorrhagic<br>septicemia virus (VHSV) selected from a<br>randomized IgNAR phage display library",<br>FISH AND SHELLFISH IMMUNOLOGY,<br>vol. 34, no. 2,<br>1 February 2013 (2013-02-01), pages<br>724-728, XP055237607,<br>GB<br>ISSN: 1050-4648, DOI:<br>10.1016/j.fsi.2012.11.041<br>abstract                                                                                                                                      | 1-28                  |
| A         | -----<br>SHAO ET AL: "Rapid isolation of IgNAR<br>variable single-domain antibody fragments<br>from a shark synthetic library",<br>MOLECULAR IMMUNOLOGY,<br>vol. 44, no. 4,<br>1 January 2007 (2007-01-01), pages<br>656-665, XP005622948,<br>PERGAMON, GB<br>ISSN: 0161-5890, DOI:<br>10.1016/J.MOLIMM.2006.01.010<br>abstract                                                                                                                                                                                    | 1-28                  |
|           | -----<br>-/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                       |

3

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/002086

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | SIMMONS D P ET AL: "Dimerisation strategies for shark IgNAR single domain antibody fragments", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 315, no. 1-2, 31 August 2006 (2006-08-31), pages 171-184, XP028017599, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL<br>ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2006.07.019<br>[retrieved on 2006-08-31]<br>abstract                                                                                                                                                    | 1-28                  |
| A         | -----<br>KOVALENKO O V ET AL: "Atypical Antigen Recognition Mode of a Shark Immunoglobulin New Antigen Receptor (IgNAR) Variable Domain Characterized by Humanization and Structural Analysis", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 288, no. 24, 14 June 2013 (2013-06-14), pages 17408-17419, XP002700029, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, BETHESDA, MD, USA<br>ISSN: 1083-351X, DOI: 10.1074/JBC.M112.435289<br>[retrieved on 2013-04-30]<br>the whole document<br>----- | 1-28                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/002086

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 2013302250                             | A1                  | 14-11-2013                 |                     |
|                                           |                     | AU 2013257848 A1           | 27-11-2014          |
|                                           |                     | EP 2847229 A1              | 18-03-2015          |
|                                           |                     | HK 1202556 A1              | 02-10-2015          |
|                                           |                     | US 2013302250 A1           | 14-11-2013          |
|                                           |                     | WO 2013167883 A1           | 14-11-2013          |
| -----                                     |                     |                            |                     |

## フロントページの続き

| (51) Int. Cl.                   | F I            | テーマコード ( 参考 ) |
|---------------------------------|----------------|---------------|
| <b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>   | C 1 2 N 1/19   |               |
| <b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>   | C 1 2 N 1/21   |               |
| <b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>   | C 1 2 N 5/10   |               |
| <b>C 0 7 K 16/18 (2006.01)</b>  | C 0 7 K 16/18  |               |
| <b>C 4 0 B 40/08 (2006.01)</b>  | C 4 0 B 40/08  |               |
| <b>A 6 1 K 38/17 (2006.01)</b>  | A 6 1 K 38/17  | 1 0 0         |
| <b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b> | A 6 1 K 39/395 | Y             |
| <b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>  | A 6 1 P 35/00  |               |
| <b>A 6 1 P 37/06 (2006.01)</b>  | A 6 1 P 37/06  |               |
| <b>A 6 1 P 31/12 (2006.01)</b>  | A 6 1 P 31/12  |               |
| <b>G 0 1 N 33/543 (2006.01)</b> | G 0 1 N 33/543 | 5 0 1 A       |
| <b>G 0 1 N 33/574 (2006.01)</b> | G 0 1 N 33/574 | A             |
| <b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>  | G 0 1 N 33/574 | D             |
|                                 | G 0 1 N 33/53  | D             |

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

(74)代理人 100088694

弁理士 弟子丸 健

(74)代理人 100103610

弁理士 ▲吉▼田 和彦

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100111501

弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 ベッカー シュテファン

ドイツ連邦共和国 6 4 2 9 5 ダルムシュタット カトラインシュトラッセ 3 アー

(72)発明者 ホック ビョルン

ドイツ連邦共和国 6 3 4 7 7 マイントール フリートリッヒ - エーベルト - シュトラッセ 5  
3

(72)発明者 ジエロンカ シュテファン

ドイツ連邦共和国 6 4 6 5 3 ロルシュ ノイブルガーシュトラッセ 1

(72)発明者 コルマール ハーラルト

ドイツ連邦共和国 6 4 3 6 7 ミュールタール イン デア レーデ 7

(72)発明者 エンプティング マルティン

ドイツ連邦共和国 6 3 1 6 5 ミュールハイム アム マイン ファッケルスヴィーゼンヴェー  
ク 3 3

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA83X AA86X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14  
BA02 CA25 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 BA01 BA21 CA45 CA53 DA39 MA16  
MA66 NA14 ZB082 ZB262 ZB332  
4C085 AA13 AA14 BB36 BB42 CC22 DD62 EE01 GG01 GG08 GG10  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA52 DA76 EA20 EA22  
EA29 EA50 FA72 FA74

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |         |            |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)     | 产生双特异性鲨鱼抗体可变区的方法及其用途                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| 公开(公告)号     | <a href="#">JP2017536114A</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 公开(公告)日 | 2017-12-07 |
| 申请号         | JP2017524014                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 申请日     | 2015-10-21 |
| 申请(专利权)人(译) | 默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| [标]发明人      | ベッカーシュテファン<br>ホックビヨルン<br>ジエロンカシュテファン<br>コルマールハーラルト<br>エンプディングマルティン                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| 发明人         | ベッカー シュテファン<br>ホック ビヨルン<br>ジエロンカ シュテファン<br>コルマール ハーラルト<br>エンプディング マルティン                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |            |
| IPC分类号      | C12N15/02 C12P21/08 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C40B40/08 A61K38/17 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/06 A61P31/12 G01N33/543 G01N33/574 G01N33/53                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |         |            |
| CPC分类号      | A61K39/00 C07K16/00 C07K16/30 C07K2317/20 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/567 C07K2317/569 C07K2319/00 C07K2319/30 C12N15/1037 C40B40/08 C40B50/06 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61K39/39558 A61K2039/505 C07K2317/565 C07K2317/92 C12N15/81                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| FI分类号       | C12N15/00.C C12P21/08.ZNA C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C40B40/08 A61K38/17.100 A61K39/395.Y A61P35/00 A61P37/06 A61P31/12 G01N33/543.501.A G01N33/574.A G01N33/574.D G01N33/53.D                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |            |
| F-TERM分类号   | 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA83X 4B065/AA86X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA21 4C084/CA45 4C084/CA53 4C084/DA39 4C084/MA16 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB082 4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB36 4C085/BB42 4C085/CC22 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA52 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 |         |            |
| 代理人(译)      | 田中真一郎<br>▲▼吉尔场和彦<br>山崎 一夫<br>服部博信                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
| 优先权         | 2014003700 2014-11-03 EP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| 其他公开文献      | JP2017536114A5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |            |
| 外部链接        | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |         |            |
| 摘要(译)       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |         |            |

本發明提供了產生雙特異性鯊魚抗體可變結構域（vNAR結構域）的方法及其用途。本發明進一步提供了一種融合蛋白，其包含本發明的雙特異性vNAR結構域以及用於產生本發明的雙特異性vNAR的多核苷酸文庫。此外，本發明提供了用於治療個體病理狀況的包含本發明的雙特異性vNAR或包含雙特異性vNAR結構域的融合蛋白的藥物組合物。本發明還提供了包含本發明的雙特異性vNAR結構域或融合蛋白的部分試劑盒。

(11)特許出願公表番号

(P2017-536114A)

(43) 公表日 平成29年12月7日(2017.12.7)

| (51) Int. Cl.           | F 1                 | テーマコード (参考)     |
|-------------------------|---------------------|-----------------|
| C 12 N 15/02 (2006. 01) | C 12 N 15/00        | C 4 B 06 4      |
| C 12 P 21/08 (2006. 01) | C 12 P 21/08 Z N A  | C 4 B 06 5      |
| C 07 K 16/46 (2006. 01) | C 07 K 16/46        | C 4 C 08 4      |
| C 07 K 19/00 (2006. 01) | C 07 K 19/00        | C 4 C 08 5      |
| C 12 N 1/15 (2006. 01)  | C 12 N 1/15         | C 4 H 04 5      |
|                         | 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 | (全 35 頁) 最終頁に続く |

|               |                              |          |                                 |
|---------------|------------------------------|----------|---------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2017-524014 (P2017-524014) | (71) 出願人 | 591032596                       |
| (68) (22) 出願日 | 平成27年10月21日 (2015.10.21)     |          | メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ             |
| (65) 新文提出出日   | 平成28年5月2日 (2017.5.2)         |          | ト ベンレンクアル ハフツング                 |
| (68) 国際出願番号   | PCT/EP2015/002086            |          | Merck Patent Gesellschaft       |
| (67) 国際公開番号   | W02016/070959                |          | schaft mit beschränkter Haftung |
| (67) 国際公開日    | 平成28年5月12日 (2016.5.12)       |          | ドイツ連邦共和国 デー-64293               |
| (51) 優先権主張番号  | 14003700.3                   |          | グムシュタット フランクフルター シュ             |
| (52) 優先日      | 平成26年11月3日 (2014.11.3)       |          | トラウセ 250                        |
| (53) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                   |          | Frankfurter Str. 25             |
|               |                              |          | O, D-64293 Darmstadt            |
|               |                              |          | , Federal Republic of Germany   |
|               |                              | (74) 代理人 | 100094569                       |
|               |                              |          | 弁理士 田中 伸一郎                      |
|               |                              |          | 最終頁に続く                          |

(54) 【発明の名称】二重特異性サメ抗体可変ドメインの製造方法およびそれらの使用