

(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2010-516747

(P2010-516747A)

(43) 公表日 平成22年5月20日(2010.5.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A	4 B O 2 4
C12N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 4
C07K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40	4 H O 4 5
C12P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2009-546785 (P2009-546785)	(71) 出願人	501374390
(86) (22) 出願日	平成20年1月29日 (2008.1.29)		バルティオン テクニリーネン トウトキ ムスケスクス
(85) 翻訳文提出日	平成21年6月30日 (2009.6.30)		フィンランド国、エフアイエヌー0215 0 エスポー、プオリミエヘンティエ 5
(86) 国際出願番号	PCT/FI2008/050027		Vuorimiehentie 5, F in-02150, Espoo, F inland
(87) 国際公開番号	W02008/092993	(74) 代理人	100116838
(87) 国際公開日	平成20年8月7日 (2008.8.7)		弁理士 渡邊 潤三
(31) 優先権主張番号	20075059	(72) 発明者	タッキネン, クリスティーナ
(32) 優先日	平成19年1月29日 (2007.1.29)		フィンランド国、エフアイー02200 エスポー、ハルティランティエ 12 ア ス 1
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		
(31) 優先権主張番号	60/887, 862		
(32) 優先日	平成19年2月2日 (2007.2.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	20075707		
(32) 優先日	平成19年10月5日 (2007.10.5)		
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I g E を主成分とする新規試薬の製造方法

(57) 【要約】

本発明はタンパク質工学技術に関する。さらに詳細には、本発明は、I g G または I g M に対する免疫活性が弱いエピトープ構造に結合する、ヒト I g E 抗体およびその誘導体に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

受容体タンパク質に対するリガンドの結合または酵素に対する基質の結合を防止しうる組み換え I g E モノクローナル抗体またはその機能的断片の製造方法であって、以下の工程を包含する製造方法。

a) ヒト由来サンプルの I g E 産生細胞から総 m R N A を単離し、

b) 上記工程 a) で得られた総 m R N A に基づいて、I g E F d 遺伝子領域およびカップノラムダ軽鎖遺伝子をコードする c D N A を合成して、I g E 発現ライブラリーを構築し、

c) 受容体タンパク質または酵素を目的の標的タンパク質とし、該標的タンパク質あるいは該タンパク質を表面に発現している細胞または粒子に対して発現ライブラリーをスクリーニングし、

d) 該タンパク質に対して、 10^7 M^{-1} を超える中度から高度の親和性を示すクローンを該ライブラリーから単離し、

e) 上記工程 d) で単離したクローンから、受容体タンパク質に対するリガンドの結合または酵素に対する基質の結合を防止する I g E モノクローナル抗体クローンを選択し、そして

f) 所望により、上記工程 e) で得た I g E モノクローナル抗体をコードする D N A を単離する。

10

【請求項 2】

20

工程 e) において選択した I g E モノクローナル抗体クローンが、該受容体タンパク質に対する全てのリガンドの結合または該酵素に対する全ての基質の結合を防止するクローンであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該受容体タンパク質または酵素には、複数種のリガンドまたは基質が存在することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

上記工程 e) において選択した I g E モノクローナル抗体クローンが、該受容体タンパク質に対する 1 種の特定のリガンドの結合または該酵素に対する 1 種の特定の基質の結合を防止するクローンであることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

30

【請求項 5】

該受容体タンパク質が薬剤耐性ポンプであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

該薬剤耐性ポンプが多剤耐性関連タンパク質 2 (M R P 2) であることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

該リガンドが、抱合型または非抱合型の有機アニオン、例えばグルタチオン抱合体、グルクロニド抱合体、ロイコトリエン、メトトリキセート、オクラトキシン A または P A H、であることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

40

【請求項 8】

該リガンドが、エストラジオール - 17 - b - D - グルクロニドであることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

工程 e) において選択した I g E モノクローナル抗体クローンが、M R P 2 に対する 1 種または数種のリガンドの結合を防止するが、A T P - 結合カセットトランスポーター (A B C - トランスポーター) に対するリガンドの結合は防止しないクローンであることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

工程 e) において選択した I g E モノクローナル抗体クローンが、M R P 2 に対する 1

50

種の特定のリガンドの結合を防止するクローンであることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 1 1】

受容体タンパク質に対するタンパク質リガンドの結合を防止しうる組み換え I g E モノクローナル抗体またはその機能的断片である、タンパク質 - タンパク質相互作用の調節因子の製造方法であって、以下の工程を包含する方法。

a) I g E 抗体から同定したアミノ酸配列を有する軽鎖をコードする核酸配列のプールであって、複数の軽鎖の核酸配列または単一の軽鎖の核酸配列に限定されたプールを選択し、

b) 該軽鎖核酸配列を、複数のアレルギー患者のリンパ球から単離した I g E 重鎖遺伝子の多様なプールと組み合わせることで、I g E 発現ライブラリーを構築し、

c) 受容体タンパク質を目的の標的タンパク質とし、該標的タンパク質あるいは該タンパク質を表面に発現している細胞または粒子に対して発現ライブラリーをスクリーニングし、

d) 該タンパク質に対して、 10^7 M^{-1} を超える中度から高度の親和性を示すクローンを該ライブラリーから単離し、

e) 上記工程 d) で単離したクローンから、該受容体タンパク質に対する該タンパク質リガンドの結合を防止する I g E モノクローナル抗体クローンを選択し、そして

f) 所望により、上記工程 e) で得た I g E モノクローナル抗体をコードする DNA を単離する。

【請求項 1 2】

該軽鎖が、表 5 で定義した C D R - L 1 配列および C D R - L 2 配列からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の配列を包含することを特徴とする、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

該 C D R - L 2 配列が下記アミノ酸配列を包含することを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。

L L I Y X A S S / T (配列番号 1)

(式中、X は任意のアミノ酸である。)

【請求項 1 4】

該 C D R - L 2 配列が下記アミノ酸配列を包含することを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。

L L X X X A S S / T X X X (配列番号 2)

(式中、X は任意のアミノ酸である。)

【請求項 1 5】

該 C D R - L 2 配列が下記アミノ酸配列を包含することを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。

L L I Y A A S S L Q S (配列番号 3)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明はタンパク質工学技術に関する。さらに詳細には、本発明は、I g G または I g M に対する免疫活性が弱いエピトープ構造に結合する、ヒト I g E 抗体およびその誘導体の製造方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

今日、抗体は、最も有効なヒト治療用薬剤として急速な発展を見せている。F D A は、アメリカ合衆国における癌、炎症、移植や感染症などの種々の疾患の治療を目的した、18 種の抗体の使用を認可している (Carter 2006)。治療用途に理想的な完全なヒト抗体の単離を可能とする、抗体ファージディスプレイライブラリーまたはトランスジェニックマウスの使用に基づく新規な抗体産生技術が、開発工程を著しく加速した。治療用抗体に

10

20

30

40

50

関する現在の市場規模は、約150億ドルであるが、2010年までには300億ドルを超えると予測される。ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスおよびインタラクトミクスの急速な発展は、治療用標的の同定に革命をもたらした。治療用標的とは、所望の作用メカニズム（例えば、タンパク質/リガンド相互作用やタンパク質/タンパク質相互作用の阻害または活性化）を伴う特異的認識が可能な抗体の開発を必要とする標的である。

【0003】

エピトープとは、抗体が結合する抗原表面の局在領域であり、エピトープは糖、脂質またはアミノ酸で構成されている。抗体に認識されるエピトープの大部分が抗原分子の三次元表面構造である。例外は直鎖状エピトープであり、これはタンパク質の立体的な三次元構造ではなく、アミノ酸配列（即ち、一次構造）によって決定されるものである。タンパク質データベースから現在入手可能な82種の異なる抗原-抗体免疫複合体のほぼ全てがIgG-抗原複合体である。IgGエピトープの構造要素（ α -ヘリックス、 β -鎖とループ）およびエピトープの形状（凸状、平面状、凹状）の解析によると、エピトープの半分はループのみで構成されており、残りの半分はループと二次構造要素の両方を含んでいる（図1を参照）。IgGエピトープの大部分（68%）が抗原の凸状領域または露出したループ領域に位置する。従って、タンパク質構造のクレフト（clefts）および/または窪み（depressions）、ならびに平面状表面はIgGエピトープ構造としては好ましくない。近年、ヒトコブラクダおよびサメから同定された抗体クラス、即ち、単ドメイン抗体と呼ばれるHCDR3ループのあるVH領域のみを有する抗体は、酵素基質部位などのクレフト領域を認識し結合することが確認された（De Genst et al. 2006）。しかし、これら抗体はヒト由来ではないため、治療用途には好ましくない。免疫原性の低い構造、クレフトおよび平面状表面を認識するヒト抗体は、ヒトの治療と診断のための新規な結合性物質を開発するための貴重な材料を提供するであろう。

【0004】

近年明らかになった、アレルゲン（ β -ラクトグロブリン（BLG, Bos d 5））と複合体を形成したIgE Fab抗体の構造は、IgE抗体がIgG抗体とは異なる結合部位を好むことを示唆している（出版準備中）。この発見は、免疫療法および診断における新たな構想の可能性を広げる。IgE/Fab軽鎖のCDRL3ループは、BLGの平坦な β -シート領域への結合を担っている。抗原の露出したループ領域に通常は位置するIgGエピトープと比べると、このIgEエピトープは驚くほど異なっている。さらにIgE-VH領域、特にそのHCDR3ループをIgG抗体と比較すると、構造的な違い、即ち、アレルゲン表面に存在する空隙を認識するループ構造の形成が認められた。この知見に基づけば、IgG型抗体またはIgM型抗体の定常部位にIgE-V領域を融合させたものからなるキメラヒト抗体であって、平面状表面または平坦な β -シート並びにタンパク質表面には露出していない構造（例えば、酵素の基質結合部位や薬剤耐性ポンプ）に対する結合特異性を必要とする治療用標的に対するヒト抗体の開発は可能であると考えられる。

【0005】

発明の概要

本発明は、タンパク質表面には露出していない構造、例えば、窪み、クレフトまたはチャンネル（例えば、耐性トランスポーターの薬剤チャンネル、酵素の基質結合部位、および受容体のリガンド結合部位）、あるいはタンパク質-タンパク質相互作用を仲介する平坦な表面、に結合するヒトIgE抗体およびその誘導体に関する。

【0006】

従って、本発明は、種々のイムノアッセイ法ならびにヒトの免疫療法やフォーカスト抗体ライブラリーの構築に使用するための新規な試薬の製造方法を提供する。また、本発明は、均一な品質を保持する上記の特異的な試薬の保証された継続的供給を可能とし、ポリクローナル抗血清に固有のバッチ間の品質のばらつきを排除する。これらの有用な効果によって、本発明は、均一な品質の、新規であり、特異的であり且つ経済的な免疫学的試薬の製造を可能にする。

【 0 0 0 7 】

上記から明かなように、本発明の方法の特定の目的の一つは、ヒト I g E モノクローナル抗体、その断片、または該抗体の誘導体であって、生物学的サンプルに対して行う定性的および定量的な測定ならびにイメージングのみならず、免疫療法にも使用可能な十分に高い結合親和性および特異性を標的タンパク質に対して示すものを提供することである。本発明の方法によって得られる抗体は、所望の様式において治療用または診断用の標的に対して特異的な結合性を示し、このような結合性は他の材料から開発されたモノクローナル抗体の範疇にはない。

【 0 0 0 8 】

本発明の更なる目的の一つは、ここで得られた構造データを、治療用および診断用の標的に対するフォーカスド I g E 抗体ライブラリーの構築のために使用する方法を提供することであり、ここで得られる抗体の結合特異性は、タンパク質構造中の、I g G / I g M に対する免疫活性の弱い領域に対するものである。

10

【 0 0 0 9 】

本発明の諸目的、諸特徴および諸利益は、添付の図面および詳細な説明の記載から明らかになる。しかしながら、以下の詳細な説明および実施例は本発明の好ましい態様を示すものの、あくまでもそれを例示しているに過ぎず、本発明の精神および発明の範囲内で行われる種々の変更および改良は、以下の詳細な説明より当業者には明らかであることを理解されたい。

尚、添付の図面において、構造を示す図面はいずれも実寸ではない。

20

【 0 0 1 0 】

略称

c D N A	相補的デオキシリボ核酸	
C D R	相補性決定領域	
D N A	デオキシリボ核酸	
<u>E. coli</u>	<u>Escherichia coli</u>	
E D T A	エチレンジアミン四酢酸	
E L I S A	酵素免疫測定法	
F a b	特異的抗原結合性を有する断片	30
F d	重鎖の可変ドメインおよび第 1 定常ドメイン	
F v	特異的抗原結合性を有する、抗体の可変領域	
I g E	免疫グロブリン E	
m R N A	メッセンジャーリボ核酸	
M R P 2	多剤耐性関連タンパク質 2	
M R P 1	多剤耐性関連タンパク質 1	
P C R	ポリメラーゼ連鎖反応	
R N A	リボ核酸	
s c F v	一本鎖抗体	
T E A	トリエタノールアミン	40
V _H	重鎖の可変領域	
V _L	軽鎖の可変領域	

【 0 0 1 1 】

発明の詳細の説明

本願明細書で使用した用語の一部について、その定義を提供する。「免疫グロブリン」、「重鎖」、「軽鎖」および「F a b」は欧州特許願第 0 1 2 5 0 2 3 号と同様に使用した。

【 0 0 1 2 】

本願明細書において使用した種々の活用形の「抗体」という用語は集合名詞であり、免疫グロブリン分子および/または免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部位、即ち、抗

50

原結合部位またはパラトープを有する分子、の総称である。

【0013】

「抗原結合性部位」または「パラトープ」とは、抗体分子において、抗原に特異的に結合する構造上の部位である。

【0014】

抗体の例としては、免疫グロブリン分子のパラトープを含む部分、例えばF a bやF vとして使える部分が挙げられる。

【0015】

「F a b」（特異的抗原結合性を有する断片）とは、実質的に完全な抗体に対してパパインによるタンパク質分解を公知の方法で実施することで得られる抗体の一部である。例えば、米国特許第4,342,566号を参照されたい。F a b断片は遺伝子組み換え法によって産生することもでき、このような方法は当業者によく知られている。例えば、米国特許第4,949,778号を参照されたい。

10

【0016】

「ドメイン」は、タンパク質の独立した折りたたみ部分を意味する。天然のタンパク質におけるドメイン間の境界に関する一般的な構造上の定義については、Argos, 1988を参照されたい。

【0017】

「可変ドメイン」または「F v」とは、抗原またはハプテンの結合を担う、免疫グロブリン分子中の領域である。通常この領域は、免疫グロブリン分子の軽鎖および重鎖のそれぞれのN末端から数えて約100個のアミノ酸からなる領域である。

20

【0018】

「一本鎖抗体」(s c F v)とは、抗体の重鎖および軽鎖のそれぞれの可変ドメインがリンカーペプチドを介して結合した連続したアミノ酸鎖であって、一本のmRNA分子(転写物)から合成されたものである。

【0019】

「リンカー」とは、天然または工学的に作られたタンパク質中の隣接する2つのドメインの間に存在するアミノ酸配列である。

【0020】

「I g E 産生細胞」とは、例えば、リンパ球などの白血球である。

30

【0021】

「ヒト由来サンプル」としては、ヒト患者、好ましくはアレルギーを発症した患者、から得た血液または血清が好ましい。

【0022】

「受容体タンパク質」とは、リガンドに結合しうるタンパク質であって、このリガンド/受容体の関係が、細胞の生物学的に重要な活性に関連するものを意味する。このようなリガンド/受容体関係の一例は、アセチルコリン(リガンド)とアセチルコリン受容体(例えば、ニコチン性やムスカリン性のコリン受容体)との関係であり、アセチルコリンの結合に対して、生物活性の変化によって応答するものである。上記リガンドは別のタンパク質でも良い。

40

【0023】

ヒト I g E V H 領域を含む、ヒト抗体 (s c F v 、 F a b または 全長抗体) のライブラリー

D 1 I g E F a b の I g E V H 領域、特にその H C D R 3 ループを I g G 抗体と比較すると、構造的な違いが認められた(図1を参照)。この知見に基づけば、ヒト I g E V H 領域を含む抗体であって、例えば、I g G / I g M に対する免疫活性の弱い、表面に露出していないタンパク質構造(受容体、薬剤耐性ポンプや酵素の基質結合部位など)に対する結合特異性を必要とする治療用標的について、抗体の開発が可能となる(De Genst et al. 2006)。ヒトリンパ球由来の多様な I g E V H プールを構成単位として使用し、s c F v 型、F a b 型または全長抗体型の機能的なヒト抗体ライブラリーを構築し

50

た。得られたライブラリーを I g G / I g M に対して免疫活性を示さない構造、例えば、クレフト構造や平面表面、に対する特異的認識を必要とする治療用標的に対して選択した。

【 0 0 2 4 】

従って、本発明の目的は、受容体タンパク質に対するリガンドの結合または酵素に対する基質の結合を防止しうる組み換え I g E モノクローナル抗体またはその機能的断片の製造法であって、以下の工程を包含する製造方法を提供することである。

a) ヒト由来サンプルの I g E 産生細胞から総 m R N A を単離し、

b) 上記工程 a) で得られた総 m R N A に基づいて、I g E F d 遺伝子領域およびカップラムダ軽鎖遺伝子をコードする c D N A を合成して、I g E 発現ライブラリーを構築し、

c) 受容体タンパク質または酵素を目的の標的タンパク質とし、該標的タンパク質、あるいは該タンパク質を表面に発現している細胞または粒子に対して発現ライブラリーをスクリーニングし、

d) 該タンパク質に対して中度から高度の (即ち、 $10^7 M^{-1}$ を超える) 親和性を示すクローンを該ライブラリーから単離し、

e) 上記工程 d) で単離したクローンから、受容体タンパク質に対するリガンドの結合または酵素に対する基質の結合を防止する I g E モノクローナル抗体クローンを選択し、そして

f) 所望により、上記工程 e) で得た I g E モノクローナル抗体をコードする D N A を単離する。

【 0 0 2 5 】

上記の方法は、工程 e) で得たクローンを I g G 型または I g M 型の抗体に変換する工程 g) をさらに包含することが好ましい。抗体の型を変更するために、抗体の定常部位を変更する方法は当業界で広く知られている。

【 0 0 2 6 】

本発明の好ましい態様の 1 つにおいては、本発明の方法における目的の標的タンパク質は多剤耐性関連タンパク質 2 (M R P 2) などの薬剤耐性ポンプである。薬剤耐性ポンプとは、細胞膜を隔てたアニオンの輸送を司る主要な胆管有機アニオントランスポーターである。ポンプの中には複数の異なるリガンドを有するものがある。本発明は、複数のリガンドを有するポンプと 1 種または数種のリガンドとの結合を防止するが、全てのリガンドの結合を防止することのない I g E を主成分とする化合物の製造方法であることが好ましい。より好ましくは、上記 I g E を主成分とする化合物は、複数のリガンドを有するポンプと 1 種の特定制のリガンドとの結合のみを防止する化合物であり、その結果、他のリガンドはポンプに結合するが、上記特定のリガンドの結合のみが I g E を主成分とする化合物のポンプへの結合によって防止される。従って本発明の方法は、複数のリガンドを有する薬剤耐性ポンプに結合するが、複数のリガンドの全てによる結合を防止またはブロックすることのない I g E モノクローナル抗体を選択するための工程をさらに包含することが好ましい。上記工程は、複数のリガンドを有する薬剤耐性ポンプに結合する I g E モノクローナル抗体であって、1 種の特定制のリガンドによる結合を防止またはブロックするが、該 I g E モノクローナル抗体の結合したポンプに他のリガンドが結合することを可能とする抗体の選択を包含することがより好ましい。同様の方法を、複数の基質を有する酵素に対して用いることができる。

【 0 0 2 7 】

本発明の他の好ましい態様においては、複数のリガンドを有する薬剤耐性ポンプに結合し、全てのリガンドの結合を防止またはブロックする I g E モノクローナル抗体を選択する。

【 0 0 2 8 】

本発明の他の好ましい態様においては、1 種または数種のリガンドを有する第 1 の受容体タンパク質に結合するが、1 種または数種のリガンドを有する第 2 の受容体タンパク質

には結合しないIgEモノクローナル抗体を選択する。第2の受容体タンパク質とは、第1の受容体タンパク質と関連し、1種または数種のリガンドを有するものである。例えば、標的タンパク質が複数のリガンドを有する薬剤耐性ポンプである多剤耐性関連タンパク質2(MRP2)である場合、MRP2に対する1種または数種のリガンドの結合を防止するが、ATP結合カセットトランスポーター(即ち、ABC-トランスポーター)などの、関連受容体タンパク質への1種または数種のリガンドの結合を防止しないIgEモノクローナル抗体を選択することが好ましい。このような状況において「関連受容体タンパク質」とは、構造の相同性、重複するリガンドまたは基質特異性、および/または細胞または組織において類似した機能を有する一群の受容体タンパク質を意味する。MRP2の他の関連受容体タンパク質としては、例えば、多剤耐性関連タンパク質1(MRP1)が挙げられる。MRP1とMRP2の基質/リガンド特異性の大部分が重複するが、組織における局在性は異なる。MRP2に対する公知のリガンドとしては、グルタチオン抱合体、グルクロニド抱合体(例えば、エストラジオール-17- β -D-グルクロニド)、ロイコトリン、メトリキセート、オクラトキシンAおよびp-アミノ馬尿酸(PAH)などの、抱合型または非抱合型の有機アニオンが挙げられる。

【0029】

本発明の他の好ましい態様の一例においては、多剤耐性関連タンパク質2(MRP2)に対する1種または数種のリガンドの結合を防止しうるIgEモノクローナル抗体を次の方法で調製する。ヒトIgE V_H/V_LまたはV_LのscFvファージライブラリーを、初めにアレルギー患者のリンパ球から単離したmRNAから構築する。軽鎖および重鎖の可変領域cDNAを、Fd cDNA用のヒトIgEに特異的なプライマーを用いて合成し、ヒト軽鎖のカッパ()鎖およびラムダ()鎖をヒト鎖および鎖に特異的なプライマーを用いて合成した。軽鎖および重鎖の可変領域は、V cDNA用のヒト鎖特異的プライマーとV cDNA用のヒト鎖特異的プライマーおよびV_H cDNA用のヒトIgE特異的プライマーをそれぞれ用いてPCRによって増幅した。これらのPCRプライマーに導入しておいた制限部位を利用して、scFvファージディスプレイベクターに可変領域のcDNAをクローニングし、ヒトIgE/IgG scFvライブラリーを構築した。

【0030】

次に、バイオパニング法を利用したファージディスプレイによって、ヒトIgE V_H/V_LまたはV_H/V_LのscFvライブラリーをMRP2含有ベシクル(MRP2については、Borst et al. 2006を参照)に対して選択した。MRP2ベシクルはマイクロプレートウエルに受動的に固定化することが好ましい。ファージの溶出は、TEAで行うことが好ましい。ファージ溶出液はE. coli細胞で増幅する。十分な回数のバイオパニングを繰り返した後、選択したscFv断片の結合特異性をELISAで分析する。数種のMRP2特異的scFv断片クローンが得られると考えられる。

【0031】

本願明細書に記載したように、ファージディスプレイ法は、本発明の選択工程のためのヒトIgE V_H/V_LまたはV_H/V_L組み換え抗MRP2抗体を開発するための有効かつ簡便な方法である。単離した抗MRP2抗体は、MRP2に対して高い親和性と特異性を示すことから、リガンド活性の測定によるMRP2の機能の特徴付けや、免疫化学染色法による細胞サンプルおよび組織サンプルにおけるMRP2分布の特定に有用である。さらに、単離した抗MRP2抗体は、MRP2の機能の詳細な調節、例えば、このトランスポーターに対する種々のリガンドの流出を不活性化または活性化すること、を行うための手段を提供する。単離したIgE抗体を、標的受容体、トランスポーターまたは酵素とそれに特異的なリガンドを用いた選択的な不活性化/活性化アッセイにも応用することで、細胞、組織または器官に存在する非常に関連性の高い相対物に対して影響を与えないクローンを発見することができる。

【0032】

平坦な構造に対するフォーカスドIgE-抗体ライブラリー

10

20

30

40

50

薬剤の開発において最も難しい課題は、「医薬品になり得ない (undruggable)」標的、即ち、タンパク質 - タンパク質相互作用によって形成された、生物学的なマクロ分子である。ホモ二量体、ヘテロ二量体、酵素基質や阻害剤との複合体、抗体 - 抗原複合体あるいは多成分複合体 (例えば、リボソームやプロテオソーム) を含む種々のタンパク質 - タンパク質複合体が、細胞、細胞小器官、組織および器官において重要な機能を仲介している。これらのタンパク質 - タンパク質相互作用には、一般的に複数の接触部位を有する大きく且つ比較的平坦な表面領域が関与しているため、小分子薬剤の標的とするのは難しい。

【0033】

アレルゲンである β -ラクトグロブリン (BLG, Bos d 5) 構造と複合体を形成した I g E F a b 抗体 (D 1 F a b) の最近判明した構造は、I g E 抗体が、I g G 抗体とは構造的に異なる結合部位を好むことを示唆している (出版準備中)。BLG のエピトープは 6 種の異なる短いポリペプチド鎖断片からなり、そのほとんどがアレルゲン表面の平坦な領域を覆う二次構造要素、特に β -鎖に位置している。I g E / F a b 断片の 6 種の C D R (相補性決定領域) ループは、BLG の結合に関与する。I g E / F a b 軽鎖の C D R ループは、BLG の平坦な β -シート領域の結合に関与している。文献に開示された I g E 配列のアミノ酸配列比較は、多様なアレルゲン群に結合する公知の I g E 抗体の軽鎖は驚くほど保存性が高いことを明らかにし (表 5 を参照)、これらの類似した軽鎖配列は、 β -シートの平坦な表面または類似した平坦な部位 (flat patch) にも結合しうることを示唆した。この結果は、診断または治療に適応可能な平坦な表面に特異的な抗体の単離 10
20
に使用できる、フォーカスライブラリーの構築に有効なツールを提供する。保存された軽鎖配列の情報は、I g E 抗体から同定された特徴的なアミノ酸配列を有する複数の軽鎖または単一の軽鎖に限定されたプールの構築に使用した。この軽鎖配列の情報を、複数のアレルギー患者から得たリンパ球から単離した I g E 重鎖遺伝子の多様なプールと組み合わせた。結果として得られた、ディスプレイ形式が s c F v 型または F a b 型である抗体ファージディスプレイライブラリーは、実施例 1 の記載または Hoogenboom et al. (1998) および Hoogenboom (2005) の記載と実質的に同様の方法で行う、標的特異的 I g E 抗体の選択に使用した。

【0034】

本発明の抗体断片を得るために有効な選択方法の一つを記載したが、本発明の抗体断片を得ることが可能な多数の応用方法も当業者には明らかとなる。s c F v 断片またはその誘導体のファージディスプレイライブラリーまたは微生物ディスプレイライブラリーから本発明の s c F v 断片を直接選択することが可能であることは明らかにはずである。本発明の s c F v 断片または他の抗体断片を表面タンパク質との融合タンパク質として提示するファージまたは微生物細胞は、本発明の更なる態様の一つである。また、フローサイトメトリーによって M R P - 特異的抗体を単離することも可能である。 30

【0035】

微生物細胞による本発明の抗体および抗体誘導体の発現は、免疫診断アッセイおよび免疫療法に適した均一な品質の高特異性試薬を効率よく且つ経済的に製造するための手段を提供する一方で、このような試薬またはその少なくとも一部が合成可能であることも示している。従来の遺伝子工学的手法を適用することにより、初めに得られた本発明の抗体断片をその結合特性を実質的に変えることなく改変する (例えば、新たな配列を連結する) ことができる。このような手法は、上記で定義した標的抗原に対する親和性および特異性の両方を保持する新規な結合性ハイブリッドタンパク質の製造にも用いることができる。 40

【0036】

本発明の他の一つの態様においては、本発明の抗体および抗体誘導体をコードする D N A 分子あるいは該 D N A の断片であって、 V_L および V_H または V_H 領域の C D R をコードするものを提供する。このような D N A はベクターにクローニングされていてもよく、具体的には、例えば、本発明の抗体の誘導体、少なくとも 1 つの抗体鎖または抗体鎖の一部を発現可能な発現ベクターにクローニングされていてもよい。 50

【0037】

本発明の更なる一つの態様においては、本発明のDNA分子を含む、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞および哺乳類細胞からなる群より選ばれる宿主細胞であって、本発明の抗体および抗体誘導体を発現することが可能な宿主細胞を提供する。したがって、本発明の抗体誘導体は、必要な抗体鎖を発現する本発明の宿主細胞を培養し、そして宿主細胞の産生した目的タンパク質を直接回収することで製造するか、あるいは、必要であれば個別の抗体鎖を回収し、それらを組み合わせることもできる。

【実施例1】

【0038】

I. ヒトIgE/IgM s c F vファージライブラリーの構築

以前に構築したヒト ナイーブ s c F vライブラリー (IgM / カッパおよびIgM / ラムダ) ならびに牛乳アレルギーおよびラテックスアレルギーのIgE s c F vライブラリー (IgE / カッパおよびIgE / ラムダ) を出発材料として、IgE / IgMライブラリーを構築した。簡単に説明すると、ヒト ナイーブライブラリー (IgM) は、50人の健常血液ドナーのリンパ球から構築した。IgEライブラリーの構築のためには、合計150mlの血液 (ヘパリンを加えたもの) を異なるアレルギープロファイルを示すアレルギー患者3人から得た。リンパ球をIg-Prime Kit Protocol (Novagen社製) に従って次の手順で単離した。血液10mlあたり30mlの溶解緩衝液 (155mMのNH₄Cl、10mMのNH₄HCO₃、0.1mMのEDTA、pH7.4) を加え、時々振とうしながら氷上で15分間インキュベートした。450gで10分間遠心分離した後、リンパ球、即ち白血球ペレット、を回収した。回収したペレットを溶解緩衝液で2回洗浄し、最後の遠心分離の後に得られたリンパ球ペレットをD-溶液 (D-solution) に再懸濁した。リンパ球RNAをPromega社のRNAagents Total RNA Isolation kitを用いて製造者のマニュアルに従って単離した。初めのcDNA合成はPromega社のReverse Transcription system kitを用いて行った。FdフラグメントcDNAおよび軽鎖cDNAの合成には、イプシロン () 鎖の定常領域のプライマー (C 1)、ならびにカッパ鎖のプライマー (C 1) とラムダ鎖のプライマー (C 1) をそれぞれ用いた。ヒトIgE Fd領域および軽鎖のcDNA合成とPCR増幅に用いたプライマーを表1および表2に示す。

【0039】

PCR増幅は2段階、具体的にはcDNAテンプレートからFd鎖および軽鎖を増幅するための一次PCRと、一次PCRで得たDNA断片の5'末端に制限部位を加えるための二次PCRを行った。まず、重鎖の可変領域に特異的なプライマー (VH1a - VH7a) およびC 1プライマーを用いてFd領域をPCRで増幅した。次に、カッパ鎖およびラムダ鎖を軽鎖可変領域に特異的なプライマー (それぞれV 1a - V 6bとV 1a - V 10) およびC / 1プライマーを用いて増幅した。二次PCRでは、カッパ軽鎖領域のPCR増幅にはC 1、V / 1およびC プライマーを用い、カッパ軽鎖のPCR増幅にはV / 1およびC 1プライマーを用い、ラムダ軽鎖のPCR増幅にはV 1AおよびC / 1プライマーを用いた。一次PCRは以下の条件で行った: 93 で3分間の変性を1サイクル; 93 で1分間、63 で30秒および58 で50秒のアニーリング、次いで72 で1分間の伸長を7サイクル; 93 で1分間、63 で30秒および72 で1分間を23サイクル; 最後に72 で10分間を1サイクル。二次PCRは以下の条件で行った: 95 で3分間の変性を1サイクル; 94 で1.5分間、65 で1分間のアニーリング、次いで72 で1.5分間の伸長を25サイクル; および72 で10分間を1サイクル。一次PCRと二次PCRの間、および二次PCRの後には、増幅したDNAフラグメントを精製した。

【0040】

種々の抗体断片の最終PCR産物をプールし、適切な制限酵素で消化した。消化したDNA断片であり、IgE Fd領域や 軽鎖や 軽鎖をコードするDNA断片をファージミドベクターに連結し、そのファージミドベクターでE. coli XL-1 Blue細胞を形質転換して10⁶個の独立したクローンからなるFab - ライブラリーおよびFab - ライ

10

20

30

40

50

ブラリーを得た。ファージ粒子上の F a b フラグメントの発現に関わる問題を防止するために、s c F v 形式の抗体ライブラリーを構築した。種々のライブラリーからファージミド DNA を単離し、ヒト I g E 重鎖およびヒト I g E 軽鎖の可変領域を増幅するための鋳型 DNA として用いることで、ヒト I g E s c F v - ライブラリーおよび s c F v - ライブラリーを構築した。

【0041】

重鎖可変領域の PCR 増幅は、ヒト V_H 特異的プライマー (VH1 - VH4 と VH1A) を用いて行った。軽鎖可変領域の増幅は以下のプライマーペアを用いて行った：ヒト カッパ鎖の増幅には V₁ - V₇, V₂ - V₈, V₃ - V₉, V₄ - V₁₀, V₅ - V₁₁ および V₆ - V₁₁ を用い、ヒト ラムダ鎖の増幅には V₁ - V₈, V₂ - V₉, V₃ - V₉, V₄ - V₉, V₅ - V₁₀, V₆ - V₁₀ および V₇ - V₁₀ を用いた (表3および表4参照)。s c F v ファージディスプレイベクターに連結するために、増幅した DNA フラグメントを精製し消化した (図3)。連結用混合物で *E. coli* XL-1 Blue 細胞を形質転換し、約 10⁵ 個の独立したクローンからなるヒト I g E s c F v - ライブラリーおよび s c F v - ライブラリーを得た。

10

【0042】

最終的に、ナイーブラライブラリーの カッパ鎖およびラムダ鎖の可変領域をコードする cDNA を *SacI* 制限酵素および *NotI* 制限酵素で消化した。次に、牛乳アレルギー患者由来の I g E 可変領域をコードする cDNA またはラテックスアレルギー患者由来の I g E 可変領域をコードする cDNA のを含有する、*SacI* - *NotI* 消化済みベクターのそれぞれに上記で得た DNA 断片を個別に導入した (I g E / I g M 牛乳および I g E / I g M ラテックス)。得られたプラスミドで *E. coli* XL-1 Blue 細胞の形質転換を行った。ライブラリーのプラスミド DNA を単離する際には、I g E / I g M 牛乳プラスミド DNA を保有する細胞と I g E / I g M ラテックスプラスミド DNA を保有する細胞を 1 つにプールすることで、ヒト I g E / I g M カッパライブラリーと I g E / I g M ラムダライブラリーを得た。

20

【0043】

II. ベシクルの作製

M R P 2 トランスポーターをコードする cDNA を保有するバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞を回収した (1000 g、+4、10分)。細胞ペレットを冷たい P B S で洗浄し、再度遠心分離した。細胞ペレットを回収用バッファー (50 mM の トリス - H C l , p H 6 . 8、300 mM の マニトール、プロテアーゼ阻害剤カクテル) で 2 回洗浄し、再度遠心分離 (800 g、+4、5分) に付した。細胞ペレットをメンブランバッファー (50 mM の トリス - H C l , p H 6 . 8、50 mM の マニトール、2 mM の E D T A , p H 8 . 0、プロテアーゼ阻害剤カクテル) に再懸濁して均質化し、続いて氷中で 1 時間インキュベートし、遠心分離 (800 g、+4、10分) に付した。上清を超遠心 (100,000 g、+4、60分) に付した。得られたベシクルのペレットをメンブランバッファーに再懸濁し、注射器と G 2 7 の注射針を用いて均質化した。

30

【0044】

III. M R P 2 提示ベシクル上のヒト I g E / I g M ライブラリーの選択

バッファー A (50 mM の M O P S - トリス H C l , p H 7 . 0、70 mM の K C l、7.5 mM の M g C l₂) 中の M R P 2 を有するベシクルと M R P 2 を有していないベシクルをマイクロプレートのウエルに固定化した。ウエルをバッファー A - 1% B S A でブロッキングした後、ファージプールの除去を行った。I g E / I g M カッパライブラリーと I g E / I g M ラムダライブラリーのファージを 1 つにまとめ、バッファー B (50 mM の M O P S - トリス H C l , p H 7 . 0、70 mM の K C l、7.5 mM の M g C l₂、1% B S A) で 1 : 4 に希釈し、終濃度がそれぞれ 50 μ M と 4 mM となるように - エストラジオールと M g A T P を添加した。次に、ファージプールを、M R P 2 を有していないベシクルと共に + 3 7 で 3 時間インキュベートすることで、M R P 2 を有して

40

50

いないベシクルに結合したファージを除去した。未結合のファージは回収した（除去ファージプール）。

【0045】

選択のために、除去ファージプールを両方のベシクルと共にインキュベートした。特異的結合性物質の富化に続いて、除去ファージプールを、MRP2を有していないベシクルと共にインキュベートした。初めに、除去ファージプールをバッファ-Bで1:2に希釈し、上記と同様に β -エストラジオールとMgATPを添加し、次にベシクルと共にインキュベートした。結合したファージはTEAで溶出した。最後に、*E. coli* XL-1 Blue細胞を溶出したファージに感染させて、富化したファージを増幅した。

【0046】

IV. 単離した抗体の特徴付け

MRP2に対する抗体の結合特性の特徴付けをELISAで行った。富化抗体ファージプールおよび/または個別のクローンから調製した抗体ファージを使用した。ELISAにおいては、バッファ-A（50mMのMOPS-トリスHCl, pH7.0、70mMのKCl、7.5mMのMgCl₂）中のMRP2を有するベシクルとMRP2を有していないベシクルをマイクロプレートのウエルに固定化した。ウエルをバッファ-A-1%

BSAでブロッキングした後、ファージを添加し、室温で1時間、振とう下でインキュベートした。洗浄工程の後、抗M13抗体を用いて結合ファージを検出した。二次抗体としては、AFOS-抱合抗マウスIgG（H+L）を用いた。基質であるp-ニトロフェニルホスファターゼの添加後、405nmで吸光度を測定した。

【0047】

基質（ β -エストラジオールなど）の細胞膜を隔てた輸送を、ベシキュラー輸送アッセイで実施した。このアッセイによって、試験薬（活性化剤/阻害剤）とMRP2トランスポーターおよび/または関連ATP-結合カセットトランスポーターとの相互作用を決定する。選択したscFv抗体クローン（種々の濃度）を、上述したように作製したMRP2ベシクルおよび対照ベシクルと共にインキュベートした。いずれのベシクルもアッセイバッファ（40mMのMOPS-トリスHCl, pH7.0、55mMのKCl、6mMのMgCl₂）で希釈した。次に、終濃度50mMの標識基質（例えば、³H- β -エストラジオール17-（ β -D-グルクロニド））を添加し、+37°Cで5分間プレインキュベートした。反応は、終濃度4mMのMg-ATPの添加によって開始した。反応は、+37°Cで16分間行った。ベシクルをグラスフィルター（孔径0.7 μ m）上に回収し、液体シンチレーションシステムで測定する前に洗浄した。

【0048】

10

20

30

【表 1】

ヒト I g E F d 領域の c D N A 合成及び P C R 増幅に用いたプライマー

Cε1: 5'- GCTGAAGGTTTTGTTGTCGACCCAGTC -3'	
CεNotI: 5'- GAATGGTGCGGCCGCGCTGAAGGTTTTGTTGTCG -3'	
VH1a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTKCAGCTGGTGCAG -3'	10
VH1b: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTCCAGCTTGTGCAG -3'	
VH1c: 5'- ATGGCCGCAGCTSAGGTCCAGCTGGTACAG -3'	
VH1d: 5'- ATGGCCGCAGCTCARATGCAGCTGGTGCAG -3'	
VH2a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGATCACCTTGAAGGAG -3'	
VH2b: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTCACCTTGARGGAG -3'	
VH3a: 5'- ATGGCCGCAGCTGARGTGCAGCTGGTGGAG -3'	
VH3b: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG -3'	20
VH3c: 5'- ATGGCCGCAGCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG -3'	
VH4a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGSTGCAGCTGCAGGAG -3'	
VH4b: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTGCAGCTACAGCAG -3'	
VH5a: 5'- ATGGCCGCAGCTGARGTGCAGCTGGTGCAG -3'	
VH6a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTACAGCTGCAGCAG -3'	
VH7a: 5'- ATGGCCGCAGCTCAGGTSCAGCTGGTGCAA -3'	30
VH1A: 5'- TTA CT CG CG GCC CAG CCG GCC AT GG CCG CAG CT -3'	

【 0 0 4 9 】

【表 2】

ヒトカッパ鎖及びヒトラムダ鎖の c D N A 合成及び P C R 増幅に用いたプライマー

Cκ1: 5'- AGGTAGGGCGCGCCTTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC -3'	
Vκ1a: 5'- ATGGCAGCGGCTRACATCCAGATGACCCAG -3'	
Vκ1b: 5'- ATGGCAGCGGCTGMCATCCAGTTGACCCAG -3'	
Vκ1c: 5'- ATGGCAGCGGCTGCCATCCRGATGACCCAG -3'	10
Vκ1d: 5'- ATGGCAGCGGCTGTCATCTGGATGACCCAG -3'	
Vκ2a: 5'- ATGGCAGCGGCTGATATTGTGATGACCCAG -3'	
Vκ2b: 5'- ATGGCAGCGGCTGATRRTTGTGATGACTCAG -3'	
Vκ3a: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAATTGTGTTGACRCAG -3'	
Vκ3b: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAATAGTGATGACGCAG -3'	
Vκ3c: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAATTGTAATGACACAG -3'	
Vκ4a: 5'- ATGGCAGCGGCTGACATCGTGATGACCCAG -3'	20
Vκ5a: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAACGACACTCACGCAG -3'	
Vκ6a: 5'- ATGGCAGCGGCTGAAATTGTGCTGACTCAG -3'	
Vκ6b: 5'- ATGGCAGCGGCTGATGTTGTGATGACACAG -3'	
Vκ/λ1: 5'- TTGTTATTGCTAGCTGCACAACCAGCAATGGCAGCGGCT -3'	
Cλ1: 5'- AGGTAGGGCGCGCCTTATGAACATTCYGYAGGGGC -3'	
Vλ1a: 5'- ATGGCAGCGGCTCAGTCTGTGCTGACTCAG -3'	
Vλ1b: 5'- ATGGCAGCGGCTCAGTCTGTGYTGACGCAG -3'	30
Vλ1c: 5'- ATGGCAGCGGCTCAGTCTGTGCTGACGCAG -3'	
Vλ2 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGTCTGCCCTGACTCAG -3'	
Vλ3a: 5'- ATGGCAGCGGCTTCCTATGWGCTGACTCAG -3'	
Vλ3b: 5'- ATGGCAGCGGCTTCCTATGAGCTGACACAG -3'	
Vλ3c: 5'- ATGGCAGCGGCTTCTTCTGAGCTGACTCAG -3'	
Vλ3d: 5'- ATGGCAGCGGCTTCCTATGAGCTGATGCAG -3'	
Vλ4 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGCYTGTGCTGACTCAA -3'	40
Vλ5 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGSCTGTGCTGACTCAG -3'	
Vλ6 : 5'- ATGGCAGCGGCTAATTTTATGCTGACTCAG -3'	
Vλ7 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGRCTGTGGTGACTCAG -3'	
Vλ8 : 5'- ATGGCAGCGGCTCAGACTGTGGTGACCCAG -3'	
Vλ4/9: 5'- ATGGCAGCGGCTCWGCCTGTGCTGACTCAG -3'	
Vλ10: 5'- ATGGCAGCGGCTCAGGCAGGGCTGACTCAG -3'	

【表 3】

ヒト重鎖の可変領域のPCR増幅に用いたプライマー

VH1: 5'- ATTTACTCGAGTGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC -3'

VH2: 5'- ATTTACTCGAGTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC -3'

VH3: 5'- ATTTACTCGAGTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC -3'

VH4: 5'- ATTTACTCGAGTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC -3'

VH1A: 5'- TTTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGCAGCT -3'

10

【 0 0 5 1 】

【表 4】

ヒト軽鎖の可変領域のPCR増幅に用いたプライマー

Vκ1: 5'- TTATAGAGCTCGACATCCAGATGACCCAGTCTCC -3'
 Vκ2: 5'- TTATAGAGCTCGATGTTGTGATGACTCAGTCTCC -3'
 Vκ3: 5'- TTATAGAGCTCGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC -3'
 Vκ4: 5'- TTATAGAGCTCGACATCGTGATGACCCAGTCTCC -3' 10
 Vκ5: 5'- TTATAGAGCTCGAAACGACACTCACGCAGTCTCC -3'
 Vκ6: 5'- TTATAGAGCTCGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC -3'
 Vκ7: 5'- TATAAGCGGCCGCGCACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCC -3'
 Vκ8: 5'- TATAAGCGGCCGCGCACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC -3'
 Vκ9: 5'- TATAAGCGGCCGCGCACGTTTGATATCCACTTTGGTCCC -3'
 Vκ10: 5'- TATAAGCGGCCGCGCACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC -3' 20
 Vκ11: 5'- TATAAGCGGCCGCGCACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC -3'
 Vλ1: 5'- ATTTAGAGCTCCAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC -3'
 Vλ2: 5'- ATTTAGAGCTCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC -3'
 Vλ3: 5'- ATTTAGAGCTCTCCTATGTGCTGACTCAGCCACC -3'
 Vλ4: 5'- ATTTAGAGCTCTCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC -3'
 Vλ5: 5'- ATTTAGAGCTCCACGTTATACTGACTCAACCGCC -3' 30
 Vλ6: 5'- ATTTAGAGCTCCAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC -3'
 Vλ7: 5'- ATTTAGAGCTCAATTTTATGCTGACTCAGCCCCA -3'
 Vλ8: 5'- ATATTGCGGCCGCGCACCTAGGACGGTGACCTTGGTCCC -3'
 Vλ9: 5'- ATATTGCGGCCGCGCACCTAGGACGGTCAGCTTGGTCCC -3'
 Vλ10: 5'- ATATTGCGGCCGCGCACCTAAAACGGTGAGCTGGGTCCC -3'

【 0 0 5 2 】

40

文献に開示された I g E 配列のアミノ酸配列比較によって、多様なアレルゲン群に結合する公知の I g E 抗体の軽鎖は驚くほど保存性が高いことが明らかになった。保存されているアミノ酸は太字で示した。

アレルゲン	Ig	クローン	PDB	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
Bet v 1 (1)	IgE	C-H1				QQSYSTP - - RT
		C-H2				AAWDDSLSGRVV
		C-H3				QQRSNWP - PLT
Phl p 1 (2)	IgE	25		SQSIGN - - - - - YLNWY	LLIYAAS SLQS	QQSNRTP - - ITF
		10		SQTFNN - - - - - YLNWY	LLIYAA STLRR	QQSYSTP - - LTF
Phl p 5 (3)	IgE	43		SRTIYN - - - - - YLNWY	LLIHA ASTLQD	QQSHGTP - - LTF
		31		SQSISS - - - - - YLNWY	LLIYA ASSLQS	QQSHSTP - - YTF
		14		SHSISN - - - - - YLNWY	LLIYA ASSLQS	QESFPS - - GTF
		28		SQSILG - - - - - YLNWY	LLIYA ASTLQS	QQSYITP - - RTF
		5		SQGISS - - - - - WLAWY	LLIYS ASSLQS	QQANSFP - - YTF
へべイン (4)	IgE	1A4	SQSVSS - - - - - SYLAWY	LLIYG ASSRAT	QQYSSP - - LTF	
へべイン (4)	IgE	1C2	SQSISS - - - - - YLNWY	LLIYA ASSLQS	QQSYSTP - - RTF	
Bos d 5 (5)	IgE	D1	SQGISS - - - - - RLAWY	LLIYA ASSLQS	QQYHSYP - - WTF	

(1) Jakobsen *et al.* (2004) Isolation of high-affinity human IgE and IgG antibodies recognising Bet v 1 and *Humicola lanuginosa* lipase from combinatorial phage libraries. *Mol. Immunol.* 41: 941-53.

(2) Flicker *et al.* (2006) Spatial clustering of the IgE epitopes on the major timothy grass pollen allergen Phl p 1: Importance for allergenic activity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117: 1336-43.

(3) Steinberger *et al.* (1996) Construction of a combinatorial IgE library from an allergic patient. Isolation and characterisation of human IgE Fabs with specificity for the major timothy grass pollen allergen, Phl p 5. *J. Biol. Chem.* 271: 10967-72.

(4) Laukkanen *et al.* (2003) Hevein-specific recombinant IgE antibodies from human single-chain antibody phage display libraries. *J. Immunol. Methods* 278: 271-81.

(5) Niemi *et al.* (2007) 出版準備中

参考文献

Argos, P. (1988) Protein Engineering 2, 101-113.

Borst, P., Zelcer, N. and van de Wetering, K. (2006) Cancer Letters, 234, 51-61.

Carter, P.J. (2006) Nature Reviews Immunology 6, 343-356.

De Genst E., Silence K., Decanniere K., Conrath K., Loris R., Kinne J., Muyldermans S., Wyns L. (2006) PNAS 103, 4586-4591. 10

Hoogenboom, H.R., de Bruine, A.P., Hufton, S.E., Hoet, R.M., Arends, J.-W. and Roovers, R.C. (1998) Immunotechnology 4, 1-20.

Hoogenboom, H.R (2005) Nature Biotechnology 23, 1105-1116.

Laukkanen, M.-L., Makinen-Kiljunen, S., Isoherranen, K., Hahtela, T., Soderlund, H., and Takkinen, K. (2003) J. Immunol. Meth. 278, 271-281.

Mirza, O., Henriksen, A., Ipsen, H., Larsen, J.N., Wissenbach, M., Spangfort, M. D., and Gajhede, M. (2000) J. Immunol. 165, 331-338. 20

Prasad, L., Waygood, E.B., Lee, J.S. and Delbaere, L.T.J. (1998) J. Mol. Biol. 280, 829-845

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 4 】

【図1】 I g E D 1 F a b アレルゲンおよび I g G - 抗原免疫複合体のエピトープ構造の比較。 D 1 I g E F a b の - ラクトグロブリンに対する結合 (左)、 I g G F a b J E L 4 2 のリン酸輸送タンパク質に対する I g G 抗体 - 抗原型結合 (中央) (Prasad et al. 1998) および B V 1 6 / F a b の花粉アレルゲン Bet v 1 に対する I g G - アレルゲン型結合 (右) (Mirza et al, 2000)。 30

【図2】 図2は、完全なヒト I g E サブクラス抗体、 F a b 断片および一本鎖抗体 (s c F v) の該略図である。抗原結合部位は三角形で示す。

【図3】 図3は、パニング法の概略図である。

【図4】 図4は、 s c F v ファージライブラリーの構築に使用した s c F v ファージディスプレイベクターの概略図である。

【図5】 図5は、 D 1 / F a b 抗体の表面およびアレルゲン B L G のリボンモデルである。この図においては、 D 1 / F a b に含まれる、ヘベイン結合性 I g E 抗体 (クローン I C 2) (Laukkanen et al. 2003) と同一の残基を薄いグレーで示し、異なる残基を濃いグレーで示した。 a) は正面図であり、 b) は側面図である。 40

【配列表フリーテキスト】

【 0 0 5 5 】

配列番号 1 C D R - L 2 領域の保存性ペプチド配列であって、配列中の第 5 番アミノ酸は任意のアミノ酸であり、第 8 番アミノ酸はセリンまたはスレオニンである。

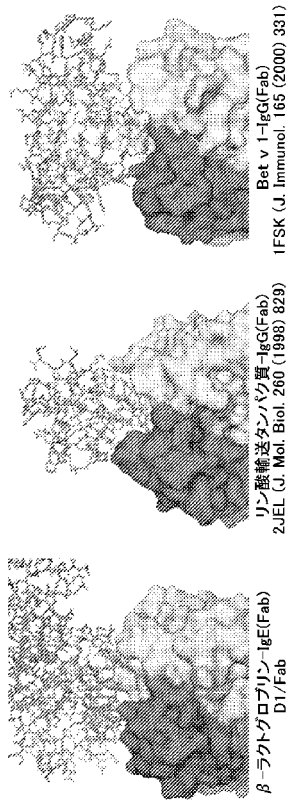
配列番号 2 C D R - L 2 領域の保存性ペプチド配列であって、配列中の第 3 番 ~ 第 5 番アミノ酸は任意のアミノ酸であり、第 8 番アミノ酸はセリンまたはスレオニンであり、第 9 番 ~ 第 1 1 番アミノ酸は任意のアミノ酸である。

配列番号 3 C D R - L 2 領域の保存性ペプチド配列である。

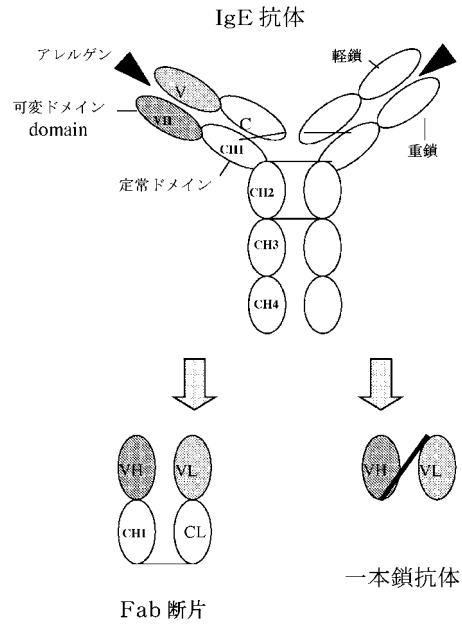
配列番号 4 P C R による増幅用のプライマー

配列番号 5 P C R による増幅用のプライマー 50

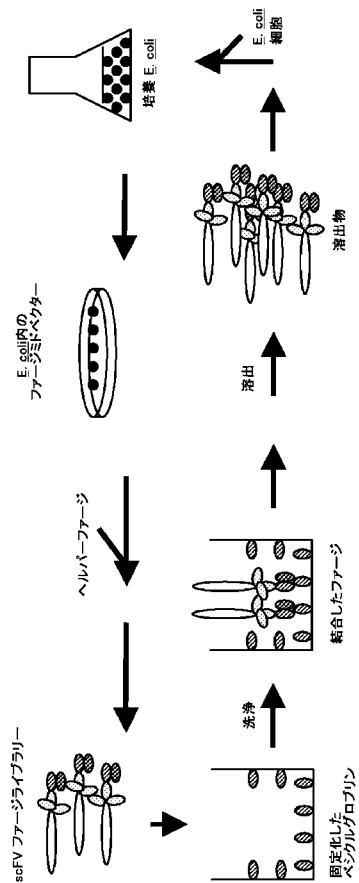
【 図 1 】



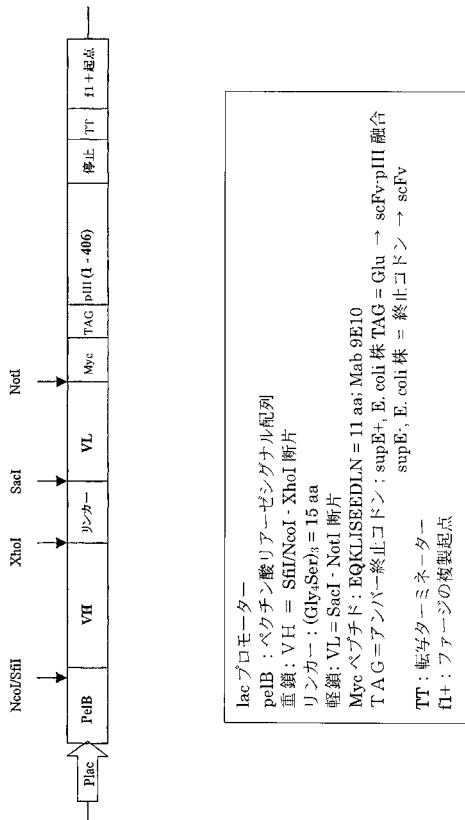
【 図 2 】



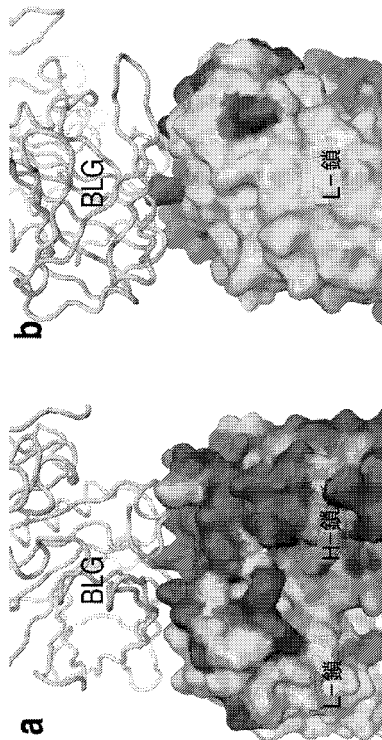
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

2010516747000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成21年4月2日(2009.4.2)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

受容体タンパク質に対するリガンドまたは酵素に対する基質の結合を防止しうる組み換え I g E モノクローナル抗体またはその機能的断片の製造方法であって、該リガンドまたは基質と結合する部位は、窪み、クレフト、チャネルまたは平面状表面を含んでおり、該結合部位は、I g G または I g M に対して弱い免疫活性を示すことを特徴とする、以下の工程を包含する製造方法。

a) ヒト由来サンプルの I g E 産生細胞から総 m R N A を単離し、

b) 上記工程 a) で得られた総 m R N A に基づいて、I g E F d 遺伝子領域およびカッパ/ラムダ軽鎖遺伝子をコードする c D N A を合成して、I g E 発現ライブラリーを構築し、

c) 該受容体タンパク質または酵素を目的の標的タンパク質とし、該標的タンパク質あるいは該標的タンパク質を表面に発現している細胞または粒子に対して発現ライブラリーをスクリーニングし、

d) 該タンパク質に対して、 10^7 M^{-1} を超える中度から高度の親和性を示すクローンを該ライブラリーから単離し、

e) 上記工程 d) で単離したクローンから、該リガンドまたは基質と結合する部位に含まれる窪み、クレフト、チャンネルまたは平面状表面に結合し、該受容体タンパク質に対する該リガンドの結合または該酵素に対する該基質の結合を防止する I g E モノクローナル抗体クローンを選択し、そして

f) 所望により、上記工程 e) で得た I g E モノクローナル抗体をコードする DNA を単離する。

【請求項 2】

工程 e) において選択した I g E モノクローナル抗体クローンが、該受容体タンパク質に対する全てのリガンドの結合または該酵素に対する全ての基質の結合を防止するクローンであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該受容体タンパク質または酵素には、複数種のリガンドまたは基質が存在することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

上記工程 e) において選択した I g E モノクローナル抗体クローンが、該受容体タンパク質に対する 1 種の特定のリガンドの結合または該酵素に対する 1 種の特定の基質の結合を防止するクローンであることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

該受容体タンパク質が薬剤耐性ポンプであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

該薬剤耐性ポンプが多剤耐性関連タンパク質 2 (M R P 2) であることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

該リガンドが、抱合型または非抱合型の有機アニオン、例えばグルタチオン抱合体、グルクロニド抱合体、ロイコトリエン、メトトリキセート、オクラトキシシン A または P A H、であることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

該リガンドが、エストラジオール - 17 - b - D - グルクロニドであることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

工程 e) において選択した I g E モノクローナル抗体クローンが、M R P 2 に対する 1 種または数種のリガンドの結合を防止するが、A T P - 結合カセットトランスポーター (A B C - トランスポーター) に対するリガンドの結合は防止しないクローンであることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

工程 e) において選択した I g E モノクローナル抗体クローンが、M R P 2 に対する 1 種の特定のリガンドの結合を防止するクローンであることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

受容体タンパク質に対するタンパク質リガンドの結合を防止しうる組み換え I g E モノクローナル抗体またはその機能的断片である、タンパク質 - タンパク質相互作用の調節因子の製造方法であって、タンパク質リガンドと結合する部位は平面状表面を含んでおり、該結合部位は、I g G または I g M に対して弱い免疫活性を示すことを特徴とする、以下の工程を包含する方法。

a) I g E 抗体から同定したアミノ酸配列を有する軽鎖をコードする核酸配列のプールであって、複数の軽鎖の核酸配列または単一の軽鎖の核酸配列に限定されたプールを選択し、

b) 該軽鎖核酸配列を、複数のアレルギー患者のリンパ球から単離した I g E 重鎖遺伝子の多様なプールと組み合わせることで、I g E 発現ライブラリーを構築し、

c) 該受容体タンパク質を目的の標的タンパク質とし、該標的タンパク質あるいは該標的タンパク質を表面に発現している細胞または粒子に対して発現ライブラリーをスクリーニングし、

d) 該タンパク質に対して、 10^7 M^{-1} を超える中度から高度の親和性を示すクローンを該ライブラリーから単離し、

e) 上記工程 d) で単離したクローンから、該タンパク質リガンドと結合する部位に含まれる平面状表面に結合し、該受容体タンパク質に対する該タンパク質リガンドの結合を防止する I g E モノクローナル抗体クローンを選択し、そして

f) 所望により、上記工程 e) で得た I g E モノクローナル抗体をコードする DNA を単離する。

【請求項 1 2】

該軽鎖が、表 5 で定義した C D R - L 1 配列および C D R - L 2 配列からなる群より選ばれる 1 種または数種を包含することを特徴とする、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

該 C D R - L 2 配列が下記アミノ酸配列を包含することを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。

L L I Y X A S S / T (配列番号 1)

(式中、X は任意のアミノ酸である。)

【請求項 1 4】

該 C D R - L 2 配列が下記アミノ酸配列を包含することを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。

L L X X X A S S / T X X X (配列番号 2)

(式中、X は任意のアミノ酸である。)

【請求項 1 5】

該 C D R - L 2 配列が下記アミノ酸配列を包含することを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。

L L I Y A A S S L Q S (配列番号 3)。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2008/050027

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: see extra sheet 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)		
IPC: C12N, C07K, C40B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004045512 A2 (GENMAB A/S), 3 June 2004 (03.06.2004), page 65, line 9 - line 24, claim 53	1-4,11-15
Y	--	5-10
Y	SCHEFFER GEORGE L. ET AL, "Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies", Cancer Research September 15 2000, Vol. 60, p. 5269-5277, table I	5-10
	--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"&" document member of the same patent family
"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		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
11 June 2008	11-06-2008	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Anna Björklund/ELY Telephone No. +46 8 782 25 00	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2008/050027

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BINYAMIN LIAT ET AL, "Targeting an extracellular epitope of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1) in malignant cells with a novel recombinant single chain Fv antibody", Int. J. Cancer 2004, Vol. 110, p. 882-890, page 886 discussion - page 887, column 1, line 2; page 889, column 1, line 42 - line 44; page 889, column 2, line 7 - line 13 --	5-10
Y	US 6063621 A (DEELEY ROGER G. ET AL), 16 May 2000 (16.05.2000), column 2, line 40 - line 41; column 3, line 18 - line 20; column 3, line 43 - line 52 --	5-10
A	STEINBERGER PETER ET AL, "Construction of a combinatorial IgE library from an allergic patient" The Journal of Biological Chemistry Issue of May 3 1996, Vol. 271, No. 18, p. 10967-10972, figure 5B --	1-15
A	HOOGENBOOM HENNIE R, "Selecting and screening recombinant antibody libraries", Nature Biotechnolog September 2005, Vol. 23, No. 9, p. 1105-1116, page 1109, column 2, line 1 - line 23; page 1112, column 1, line 18 - column 2, line 7 --	1-15
A	GERK PHILLIP M. ET AL, "Estradiol 3-glucuronide is transported by the multidrug resistance-associated protein 2 but does not activate the allosteric site bound by estradiol 17-glucuronide", Drug Metabolism and Disposition 2004, Vol. 32, No. 10, p. 1139-1145 abstract --	5-10
A	BORST P. ET AL, "MRP2 and 3 in health and disease", Cancer Letters 2006, Vol. 234, p. 51-61, table 1 -- -----	5-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/FI2008/050027
--

International patent classification (IPC)

C12N 15/13 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C40B 50/00 (2006.01)

Download your patent documents at www.prv.se

The cited patent documents can be downloaded at www.prv.se by following the links:

- In English/Searches and advisory services/Cited documents (service in English) or
- e-tjänster/anförda dokument (service in Swedish).

Use the application number as username.

The password is **RPQLROWZDZ**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

26/01/2008

International application No.

PCT/FI2008/050027

WO	2004045512	A2	03/06/2004	AU	2003295471	A	15/06/2004
				BR	0316282	A	11/10/2005
				CA	2505991	A	03/06/2004
				CN	101124244	A	13/02/2008
				EP	1578397	A	28/09/2005
				JP	2006523433	T	19/10/2006
				KR	20050086628	A	30/08/2005
				MX	PA05005160	A	22/07/2005
				NO	20052889	A	18/07/2005
				PL	377794	A	20/02/2006
				US	20040170626	A	02/09/2004

US	6063621	A	16/05/2000	US	5766880	A	16/06/1998
				US	5882875	A	16/03/1999
				US	5891724	A	06/04/1999
				US	6001563	A	14/12/1999
				US	6025473	A	15/02/2000
				US	5489519	A	06/02/1996
				AU	671160	B	15/08/1996
				AU	682140	B	18/09/1997
				AU	5173693	A	24/05/1994
				AU	7177896	A	06/02/1997
				CA	2147372	A,C	11/05/1994
				CA	2448557	A	11/05/1994
				EP	0666911	A,B	16/08/1995
				JP	3682926	B	17/08/2005
				JP	8504323	T	14/05/1996
				WO	9410303	A	11/05/1994

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/977,881

(32)優先日 平成19年10月5日(2007.10.5)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 ロウヴィネン, ユハ

フィンランド国、エフアイ - 8 0 1 4 0 ヨエンスー、カイスラランナンティエ 1 3

(72)発明者 ニエミ, メルヤ

フィンランド国、エフアイ - 8 0 1 3 0 ヨエンスー、レイニッキティエ 4 イー 3 2

(72)発明者 ユウルハ, シルパ

フィンランド国、エフアイ - 0 2 2 1 0 エスポー、ランシボルッティ 1 ビー 7

(72)発明者 ラウッカネン, マルヤ - レーナ

フィンランド国、エフアイ - 0 2 2 1 0 エスポー、エッリプシクヤ 3 デー 2 6

(72)発明者 ソデルlund, ハンス

フィンランド国、エフアイ - 0 2 9 4 0 エスポー、サロンキティエ 1 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA41 BA61 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02 DA06

EA04 GA11 HA01 HA11

4B064 AG26 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50 FA74