(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2011-125342
(P2011-125342A)
(43)公開日　平成23年6月30日(2011.6.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B065
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C085
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4H045
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	101	

審査請求 有　請求項の数 117　ＯＬ　（全 120 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-5778(P2011-5778)
(22)出願日　平成23年1月14日(2011.1.14)
(62)分割の表示　特願2004-516979(P2004-516979)の分割
原出願日　平成15年6月30日(2003.6.30)
(31)優先権主張番号　PCT/GB02/03014
(32)優先日　平成14年6月28日(2002.6.28)
(33)優先権主張国　英国(GB)
(31)優先権主張番号　0230202.4
(32)優先日　平成14年12月27日(2002.12.27)
(33)優先権主張国　英国(GB)

(71)出願人　502197046
ドマンティス　リミテッド
イギリス国　ティーダブリュ８　９ジーエス　ミドルセックス，ブレントフォード，グレート　ウェスト　ロード　９８０
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100122389
弁理士　新井　栄一
(74)代理人　100111741
弁理士　田中　夏夫
(74)代理人　100170221
弁理士　小瀬村　暁子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】リガンド

(57)【要約】
【課題】所定の結合特異性を有する二重特異性リガンドの提供。
【解決手段】本発明は、第1の結合特異性を有する第1の免疫グロブリン可変ドメイン、およびそれと相補的なまたは非相補的な、第2の結合特異性を有する免疫グロブリン可変ドメインを含んでなる二重特異性リガンドを提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
第1のエピトープまたは抗原に対する結合特異性を有する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン、および第2のエピトープまたは抗原に対する結合活性を有する第2の相補的免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでなる二重特異性リガンドであって、該抗原またはエピトープの一方または双方がin vivoでの該リガンドの半減期を延長させるように作用し、該第1のおよび第2のドメインが、同一の特異性を共有する互いに相補的なドメインを欠いているが、但し該二重特異性リガンドは抗HSA V_Hドメインおよび抗β-ガラクトシダーゼV_κドメインからなるものではない、二重特異性リガンド。
【請求項２】
抗体の少なくとも1つの単一重鎖可変ドメインおよび抗体の1つの相補的単一軽鎖可変ドメインを含んでなり、それによりその2つの領域が結合して相補的V_H/V_L対を形成することができる、請求項1に記載の二重特異性リガンド。
【請求項３】
前記V_HおよびV_Lが抗体scFvフラグメントによって提供される、請求項2に記載の二重特異性リガンド。
【請求項４】
前記V_HおよびV_Lが抗体Fab領域によって提供される、請求項2に記載の二重特異性リガンド。
【請求項５】
請求項2に記載の二重特異性リガンドを含んでなる4本鎖IgG免疫グロブリンリガンド。
【請求項６】
そのIgGが2つの二重特異性リガンドを含んでなり、該二重特異性リガンドはそれらの可変ドメインが同一である、請求項5に記載の4本鎖IgG免疫グロブリンリガンド。
【請求項７】
そのIgGが2つの二重特異性リガンドを含んでなり、該二重特異性リガンドはそれらの可変ドメインが異なるものである、請求項5に記載の4本鎖IgG免疫グロブリンリガンド。
【請求項８】
第1の抗原またはエピトープに対する結合特異性を有する第1の免疫グロブリン可変ドメイン、および第2の抗原またはエピトープに対する結合特異性を有する第2の免疫グロブリン可変ドメインを含んでなるリガンドであって、該第1のおよび第2の可変ドメインのうちの一方または双方が、in vivoで該リガンドの半減期を延長させる抗原と結合し、かつ、該可変ドメインが互いに相補的ではない、リガンド。
【請求項９】
第1のおよび第2の免疫グロブリン可変ドメインが重鎖可変ドメイン(V_H)である、請求項8に記載のリガンド。
【請求項１０】
第1のおよび第2の免疫グロブリン可変ドメインが軽鎖可変ドメイン(V_L)である、請求項8に記載のリガンド。
【請求項１１】
第1のおよび第2のエピトープが独立に結合し、それにより前記二重特異性リガンドが第1のおよび第2のエピトープもしくは抗原の双方と同時に結合することができる、請求項1～10のいずれかに記載のリガンド。
【請求項１２】
前記二重特異性リガンドが、溶液中で平衡状態にある第1の形態と第2の形態を含んでなり、双方のエピトープまたは抗原がともに第1の形態とは独立に結合するが、第2の形態への結合に対しては競合する、請求項11に記載のリガンド。
【請求項１３】
前記可変領域が、前記エピトープまたは抗原に対する免疫グロブリン由来のものである、請求項1～12のいずれかに記載のリガンド。

【請求項１４】
第1のおよび第2のエピトープが別々の抗原上に存在する、請求項1～13のいずれかに記載のリガンド。
【請求項１５】
第1のおよび第2のエピトープが同一の抗原上に存在する、請求項1～11のいずれかに記載のリガンド。
【請求項１６】
単一抗体ドメインのレパートリー由来の可変ドメインを含んでなる、請求項1～15のいずれかに記載のリガンド。
【請求項１７】
前記レパートリーが線状バクテリオファージの表面上に提示されており、前記単一抗体ドメインが該バクテリオファージレパートリーの抗原に対する結合によって選択されている、請求項16に記載のリガンド。
【請求項１８】
少なくとも1つの可変ドメインの配列が突然変異またはDNAシャッフリングによって改変されている、請求項1～17のいずれかに記載のリガンド。
【請求項１９】
前記可変領域が非共有結合している、請求項1～18のいずれかに記載の二重特異性リガンド。
【請求項２０】
前記可変領域が共有結合している、請求項1～18のいずれかに記載の二重特異性リガンド。
【請求項２１】
前記共有結合がジスルフィド結合によって媒介されるものである、請求項20に記載の二重特異性リガンド。
【請求項２２】
ヒトTNFαから、表面プラズモン共鳴で測定する場合に50 nM～20 pMの解離定数(K_d)、5 x 10^{-1}～1 x 10^{-7} S^{-1}のK_{off}速度定数で解離する、TNFαに特異的なdAb単量体リガンド。
【請求項２３】
dAbがV_κである、請求項22に記載のTNFαに特異的なdAb単量体リガンド。
【請求項２４】
ヒトTNF受容体から、表面プラズモン共鳴で測定する場合に50 nM～20 pMの解離定数(K_d)、5 x 10^{-1}～1 x 10^{-7} S^{-1}のK_{off}速度定数で解離する、TNF受容体1(p55)に特異的なdAb単量体リガンド。
【請求項２５】
単量体が、標準的な細胞アッセイでヒトTNFαまたはTNF受容体1を、500 nM～50 pMのND_{50}で中和する、請求項22～24のいずれかに記載のdAb単量体リガンド。
【請求項２６】
TNF受容体1(p55)に特異的なdAb単量体リガンドであって、標準的な細胞アッセイにおいて該dAbがTNF受容体1の活性に対し≦100 nMのND_{50}にてアンタゴニスト作用をもたらし、該アッセイにおいて該dAbは≦10 μMの濃度でTNF受容体1の活性に対し≦5%のアゴニスト作用をもたらす、リガンド。
【請求項２７】
表面プラズモン共鳴で測定する場合に1 nM～500 μMの解離定数(K_d)で血清アルブミン(SA)から解離する、SAに特異的なdAb単量体リガンド。
【請求項２８】
標準的なリガンド結合アッセイにおいて、前記単量体が、SAと1 nM～500 μMのIC50で結合する、請求項27に記載のdAb単量体リガンド。
【請求項２９】

dAbが、TAR1-5-19のアミノ酸配列、またはその配列と少なくとも80%相同な配列を含んでなる、TNFαに特異的なdAb単量体リガンド。
【請求項３０】
dAbが、TAR1-5のアミノ酸配列、またはその配列と少なくとも80%相同な配列を含んでなる、TNFαに特異的なdAb単量体リガンド。
【請求項３１】
dAbが、TAR1-27のアミノ酸配列、またはその配列と少なくとも80%相同な配列を含んでなる、TNFαに特異的なdAb単量体リガンド。
【請求項３２】
dAbが、TAR2-10のアミノ酸配列、またはその配列と少なくとも80%相同な配列を含んでなる、TNF受容体1に特異的なdAb単量体リガンド。
【請求項３３】
dAbが、TAR2-10のアミノ酸配列、またはその配列と少なくとも90%相同な配列を含んでなる、TNF受容体1に特異的なdAb単量体リガンド。
【請求項３４】
dAbが、TAR2-5のアミノ酸配列、またはその配列と少なくとも80%相同な配列を含んでなる、TNF受容体1に特異的なdAb単量体リガンド。
【請求項３５】
dAbが、TAR2-5のアミノ酸配列、またはその配列と少なくとも90%相同な配列を含んでなる、TNF受容体1に特異的なdAb単量体リガンド。
【請求項３６】
dAbが、MSA-16のアミノ酸配列、またはその配列と少なくとも80%相同な配列を含んでなる、SAに特異的なdAb単量体リガンド。
【請求項３７】
dAbが、MSA-26のアミノ酸配列、またはその配列と少なくとも80%相同な配列を含んでなる、SAに特異的なdAb単量体リガンド。
【請求項３８】
TNFα、TNF受容体1、またはSAがヒト型のものである、請求項29～37のいずれかに記載のdAb単量体。
【請求項３９】
末端にシステイン残基をさらに含んでなる、dAb単量体。
【請求項４０】
末端にシステイン酸基をさらに含んでなる、請求項29～38のいずれかに記載のdAb単量体。
【請求項４１】
請求項22～40のいずれかに記載のdAb単量体を少なくとも1つ含んでなる、二重特異性リガンド。
【請求項４２】
二量体である、請求項41に記載の二重特異性リガンド。
【請求項４３】
二量体が、請求項22、23、および28～30のいずれか１項に記載の抗ヒトTNFαdAb、ならびに請求項26、27、および34～36のいずれか１項に記載の抗SA dAbを含んでなる、請求項42に記載の二重特異性リガンド。
【請求項４４】
二量体が、第1のおよび第2の抗ヒトTNFαdAbを含んでなるホモ二量体またはヘテロ二量体であり、dAbの各々が請求項22、23、および28～30のいずれか１項に記載のものである、請求項42に記載の二重特異性リガンド。
【請求項４５】
三量体である、請求項41に記載の二重特異性リガンド。
【請求項４６】

請求項22、23、および29～31のいずれか１項に記載の抗ヒトTNFαdAbを3コピー含んでなるホモ三量体である、請求項45に記載の二重特異性リガンド。

【請求項４７】

ユニバーサルフレームワークを含んでなる、請求項1～46のいずれかに記載のリガンド。

【請求項４８】

ユニバーサルフレームワークが、DP47、DP45、およびDP38からなる群から選択されるV_Hフレームワークを含んでなり、および/またはV_LフレームワークがDPK9である、請求項47に記載のリガンド。

【請求項４９】

共通リガンドに対する結合部位を含んでなる、請求項1～48のいずれかに記載のリガンド。

【請求項５０】

前記共通リガンド結合部位がプロテインA、プロテインL、およびプロテインGからなる群から選択される、請求項49に記載のリガンド。

【請求項５１】

ヒト生殖細胞系列抗体遺伝子セグメントによってコードされる対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含んでなる1つ以上のフレームワーク領域を有する可変ドメインを含んでなるリガンドであるか、または、1つ以上の該フレームワーク領域のアミノ酸配列が、ヒト生殖細胞系列抗体遺伝子セグメントによってコードされる対応する該フレームワーク領域のアミノ酸配列と比較して合計5個までのアミノ酸の相違を含む、請求項1～50のいずれかに記載のリガンド。

【請求項５２】

リガンドが可変ドメインを含んでなり、かつ、FW1、FW2、FW3、およびFW4のアミノ酸配列がヒト生殖細胞系列抗体遺伝子セグメントによってコードされる対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列と同一であるか、またはFW1、FW2、FW3、およびFW4のアミノ酸配列が該ヒト生殖細胞系列抗体遺伝子セグメントによってコードされる対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列と比較して合計10個までのアミノ酸の相違を含む、請求項1～51のいずれかに記載のリガンド。

【請求項５３】

FW1、FW2、およびFW3領域を含んでなる抗体可変ドメインを含んでなり、該FW1、FW2、およびFW3のアミノ酸配列がヒト生殖細胞系列抗体遺伝子セグメントによってコードされる対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列と同一である、請求項51または52に記載のリガンド。

【請求項５４】

ヒト生殖細胞系列抗体遺伝子セグメントがDP47、DP45、DP48、およびDPK9からなる群から選択される、請求項51～53のいずれかに記載のリガンド。

【請求項５５】

ラクダ科の免疫グロブリン可変ドメインではないV_Hドメインを含んでなる、請求項1～54のいずれかに記載のリガンド。

【請求項５６】

ヒトV_Hドメインと比較してラクダ科の免疫グロブリン可変ドメインに特異的である1個以上のアミノ酸を含有していないV_Hドメインを含んでなる、請求項55に記載のリガンド。

【請求項５７】

リガンドを製造する方法であって、但し該リガンドが、第1の結合特異性を有する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン、および第2の結合特異性を有する第2の免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでなり、該結合特異性のうちの一方または双方がin vivoでの該リガンドの半減期を延長させるタンパク質に対して特異的なものであり、ここで該方法は次のステップ：

(a) 第1の可変ドメインを、第1のエピトープに対するその結合能によって選択するステ

ップ、
(b) 第2の可変領域を、第2のエピトープに対するその結合能によって選択するステップ、
(c) それらの可変領域を組み合わせるステップ；そして
(d) 該第1のおよび第2のエピトープに対する結合能によってリガンドを選択するステップ、
を含んでなり、該可変ドメインが相補的である場合にはそのドメインのどちらもHSAに対して特異的なV_Hドメインではない、前記方法。
【請求項５８】
第1の可変ドメインが、相補的な可変ドメインの不在下で前記第1のエピトープとの結合により選択されたものである、請求項57に記載の方法。
【請求項５９】
第1の可変ドメインが、第3の相補的可変ドメインの存在下で前記第1のエピトープとの結合により選択されたものであり、該第3の可変ドメインが前記第2の可変ドメインとは異なるものである、請求項57に記載の方法。
【請求項６０】
請求項1～56のいずれかに記載の二重特異性リガンドをコードする核酸。
【請求項６１】
TNFαに対して特異的であり、TAR1-5-19の核酸配列またはそれと少なくとも70%相同な配列を含んでなる、請求項60に記載の核酸。
【請求項６２】
TNFαに対して特異的であり、TAR1-5の核酸配列またはそれと少なくとも70%相同な配列を含んでなる、請求項60に記載の核酸。
【請求項６３】
TNFαに対して特異的であり、TAR1-27の核酸配列またはそれと少なくとも70%相同な配列を含んでなる、請求項60に記載の核酸。
【請求項６４】
TNF受容体1に対して特異的であり、TAR2-10の核酸配列またはそれと少なくとも70%相同な配列を含んでなる、請求項60に記載の核酸。
【請求項６５】
TNF受容体1に対して特異的であり、TAR2-10の核酸配列またはそれと少なくとも80%相同な配列を含んでなる、請求項60に記載の核酸。
【請求項６６】
TNF受容体1に対して特異的であり、TAR2h-5の核酸配列またはそれと少なくとも70%相同な配列を含んでなる、請求項60に記載の核酸。
【請求項６７】
TNF受容体1に対して特異的であり、TAR2h-5の核酸配列またはそれと少なくとも80%相同な配列を含んでなる、請求項60に記載の核酸。
【請求項６８】
SAに対して特異的であり、MSA-16の核酸配列またはそれと少なくとも70%相同な配列を含んでなる、請求項60に記載の核酸。
【請求項６９】
SAに対して特異的であり、MSA-26の核酸配列またはそれと少なくとも70%相同な配列を含んでなる、請求項60に記載の核酸。
【請求項７０】
請求項60～69のいずれかに記載の核酸を含んでなるベクター。
【請求項７１】
二重特異性リガンドの発現に必要な成分をさらに含んでなる、請求項70に記載のベクター。
【請求項７２】

請求項71に記載のベクターでトランスフェクトされた宿主細胞。
【請求項７３】
閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドを製造する方法であって、但し該リガンドは、第1のエピトープ結合特異性を有する第1の単一エピトープ結合ドメイン、および第2のエピトープ結合特異性を有する非相補的な第2のエピトープ結合ドメインを含んでなり、該第1および第2の結合特異性はエピトープ結合に対して競合することができ、それによって該閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドは双方のエピトープと同時には結合しないものであり、ここで該方法は次のステップ：
a) 第1のエピトープ結合ドメインを、第1のエピトープに対するその結合能によって選択するステップ、
b) 第2のエピトープ結合ドメインを、第2のエピトープに対するその結合能によって選択するステップ、
c) それらのエピトープ結合ドメインを、閉鎖型コンホメーションを取るように組み合わせるステップ；および
d) 閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドを、該第1のエピトープおよび該第2のエピトープと結合するが該第1および第2のエピトープの双方に同時には結合しない能力によって選択するステップ、
を含んでなる、前記方法。
【請求項７４】
第1のおよび第2のエピトープ結合ドメインが免疫グロブリン可変重鎖ドメイン(V_H)である、請求項73に記載の方法。
【請求項７５】
前記第1のおよび第2の免疫グロブリン可変ドメインが免疫グロブリン可変軽鎖ドメイン(V_L)である、請求項73に記載の方法。
【請求項７６】
前記免疫グロブリンドメインが前記エピトープに対する免疫グロブリン由来のものである、請求項73～75のいずれかに記載の方法。
【請求項７７】
第1のおよび第2のエピトープが別々の抗原上に存在するものである、請求項73～76のいずれかに記載の方法。
【請求項７８】
第1のおよび第2のエピトープが同一の抗原上に存在するものである、請求項73～76のいずれかに記載の方法。
【請求項７９】
前記可変ドメインが単一抗体ドメインのレパートリー由来のものである、請求項73～78のいずれかに記載の方法。
【請求項８０】
前記レパートリーが線状バクテリオファージの表面上に提示されており、前記単一抗体ドメインがバクテリオファージレパートリーの抗原に対する結合によって選択されている、請求項79に記載の方法。
【請求項８１】
少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメインの配列が突然変異またはDNAシャッフリングによって改変されている、請求項73～80のいずれかに記載の方法。
【請求項８２】
閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドであって、第1のエピトープ結合特異性を有する第1のエピトープ結合ドメイン、および第2のエピトープ結合特異性を有する非相補的な第2のエピトープ結合ドメインを含んでなり、該第1と第2の結合特異性はエピトープ結合に対して競合することができ、それによって該閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドは双方のエピトープと同時には結合しないものである、リガンド。
【請求項８３】

請求項73～80のいずれかに記載の方法で得ることができる、請求項82に記載の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド。

【請求項８４】

抗体の2つ以上の単一重鎖可変ドメイン、または抗体の2つ以上の軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項82または請求項83に記載の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド。

【請求項８５】

V_HおよびV_Lがペプチドリンカーによって連結されている、請求項84に記載の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド。

【請求項８６】

V_HまたはV_Lが抗体のFab様領域によって提供される、請求項84に記載の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド。

【請求項８７】

前記可変領域が非共有結合している、請求項82～84のいずれかに記載の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド。

【請求項８８】

前記可変領域が共有結合している、請求項82～84のいずれかに記載の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド。

【請求項８９】

共有結合がジスルフィド結合によって媒介されている、請求項87に記載の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド。

【請求項９０】

ユニバーサルフレームワークを含んでなる、請求項82～89のいずれかに記載の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド。

【請求項９１】

共通リガンドに対する結合部位を含んでなる、請求項82～90のいずれかに記載の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド。

【請求項９２】

前記共通リガンド結合部位が、プロテインA、プロテインL、およびプロテインGからなる群から選択される、請求項91に記載の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド。

【請求項９３】

ヒト生殖細胞系列抗体遺伝子セグメントによってコードされる対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含んでなる1つ以上のフレームワーク領域を有する可変ドメインを含んでなるリガンドであるか、または、1つ以上の該フレームワーク領域のアミノ酸配列が、ヒト生殖細胞系列抗体遺伝子セグメントによってコードされる対応する該フレームワーク領域のアミノ酸配列と比較して合計5個までのアミノ酸の相違を含む、請求項82～92のいずれかに記載の閉鎖型コンホメーションのリガンド。

【請求項９４】

可変ドメインを含んでなる請求項93に記載の閉鎖型コンホメーションのリガンドであって、FW1、FW2、FW3、およびFW4のアミノ酸配列がヒト生殖細胞系列抗体遺伝子セグメントによってコードされる対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列と同一であるか、またはFW1、FW2、FW3、およびFW4のアミノ酸配列が該ヒト生殖細胞系列抗体遺伝子セグメントによってコードされる対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列と比較して合計10個までのアミノ酸の相違を含む、リガンド。

【請求項９５】

FW1、FW2、およびFW3領域を含んでなる抗体可変ドメインを含んでなり、該FW1、FW2、およびFW3のアミノ酸配列がヒト生殖細胞系列抗体遺伝子セグメントによってコードされる対応するフレームワーク領域のアミノ酸配列と同一である、請求項93または94に記載の閉鎖型コンホメーションのリガンド。

【請求項９６】

ヒト生殖細胞系列抗体遺伝子セグメントがDP47、DP45、DP48、およびDPK9からなる群から選択される、請求項92～95のいずれかに記載の閉鎖型コンホメーションのリガンド。

【請求項９７】

ラクダ科の免疫グロブリン可変ドメインではないV_Hドメインを含んでなる、請求項92～96のいずれかに記載の閉鎖型コンホメーションのリガンド。

【請求項９８】

前記V_Hドメインが、ヒトV_Hドメインと比較してラクダ科の免疫グロブリン可変ドメインに特異的である1個以上のアミノ酸を含有していないものである、請求項97に記載の閉鎖型コンホメーションのリガンド。

【請求項９９】

その特異性の1つがリガンドの半減期を延長するために有効な作用物質に対するものである、請求項82～98のいずれかに記載の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド。

【請求項１００】

請求項82～99のいずれかに記載の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドを含んでなるキット。

【請求項１０１】

請求項82～99のいずれかに記載の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドを少なくともコードする核酸。

【請求項１０２】

請求項101に記載の核酸を含んでなるベクター。

【請求項１０３】

閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドの発現に必要な成分をさらに含んでなる、請求項102に記載のベクター。

【請求項１０４】

請求項103に記載のベクターでトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項１０５】

以下を含んでなる、標的分子の存在を検出する方法：

(a) 作用物質と結合させた閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドを提供し、但し該リガンドは該標的分子および該作用物質に対して特異的であり、該リガンドと結合した該作用物質は、該リガンドから置換されると検出可能なシグナルを生じるものであり；

(b) 該閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドを該標的分子に暴露し；そして

(c) 該作用物質が置換された結果として生じるシグナルを検出すること。

【請求項１０６】

作用物質が、閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドと結合しているときには不活性な酵素である、請求項105に記載の方法。

【請求項１０７】

作用物質が酵素の基質である、請求項105に記載の方法。

【請求項１０８】

作用物質が、前記リガンドと結合しているときには不活性であるかまたは消光されている蛍光分子、発光分子、または発色分子である、請求項107に記載の方法。

【請求項１０９】

標的分子と結合することのできる閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド、および任意にそれに適した作用物質およびバッファーを含んでなる、請求項105～108のいずれかに記載の方法を実施するためのキット。

【請求項１１０】

請求項105～108のいずれかに記載の方法を組み込んだ、均質イムノアッセイ。

【請求項１１１】

治療に用いるための、請求項1～56のいずれかに記載のリガンド。

【請求項１１２】

請求項1～56のいずれかに記載のリガンド、および製薬上許容される賦形剤、担体、ま

たは希釈剤を含んでなる医薬組成物。
【請求項１１３】
次のステップを含む、キレート多量体リガンドを製造する方法：
(a) 標的上の第1のエピトープに対して特異的な単一結合ドメインをコードする核酸配列を含んでなるベクターを提供するステップ；
(b) 該標的上の第2のエピトープに対して特異的な第2の結合ドメインを含んでなるレパートリーをコードするベクターを提供するステップであって、但しそのエピトープは第1のエピトープと同一であるかまたは異なるものであり、該第2のエピトープは該第1のエピトープに隣接する、ステップ；
(c) 該第1および第2の結合ドメインを発現させるステップ；および
(d) 1つに組み合わされて標的結合二量体を生成する第1と第2の結合ドメインの組み合わせを単離するステップ。
【請求項１１４】
第1のおよび第2の結合ドメインがリンカーを介して共有結合している、請求項113に記載の方法。
【請求項１１５】
第1のおよび第2の結合ドメインが非共有結合している、請求項113に記載の方法。
【請求項１１６】
第1のおよび第2の結合ドメインが該ドメインの天然結合によって結合している、請求項113に記載の方法。
【請求項１１７】
前記結合ドメインがV_HドメインおよびV_κドメインを含んでなる、請求項116に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は二重特異性リガンドに関する。特に、本発明は第1の抗原またはエピトープと結合する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン、および第2の抗原またはエピトープと結合する第2の免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでなる、二重特異性リガンドの製造方法を提供する。より具体的には、本発明は、第1および第2の抗原またはエピトープの少なくとも1つとの結合がin vivoでの該リガンドの半減期を増大させるように作用する、二重特異性リガンドに関する。2種以上の結合特異性を有する、開放型および閉鎖型コンホメーションのリガンドについて説明する。
【背景技術】
【０００２】
序論
抗体の抗原結合ドメインは2つの別個の領域、すなわち重鎖可変ドメイン(V_H)および軽鎖可変ドメイン(V_L:これはV_κまたはV_λのいずれかである)を含む。抗原結合部位自体は次の6個のポリペプチドループで形成されている：V_Hドメインからの3個(H1、H2、およびH3)ならびにV_Lドメインからの3個(L1、L2、およびL3)。遺伝子セグメントの組み合わせによる再構成によって、V_HおよびV_LドメインをコードするV遺伝子の多様な一次レパートリーが作製される。V_H遺伝子は3つの遺伝子セグメント、V_H、D、およびJ_Hの組換えによって作製される。ヒトでは、ハプロタイプにより、約51種の機能的V_Hセグメント(CookとTomlinson(1995), Immunol. Today, 16:237)、25種の機能的Dセグメント(Corbettら, (1997), J. Mol. Biol., 269:69)、および6種の機能的J_Hセグメント(Ravetchら, (1981), Cell, 27:583)が存在する。V_HセグメントはV_Hドメインの第1と第2の抗原結合ループ(H1およびH2)を形成するポリペプチド鎖の領域をコードするが、一方、V_H、D、およびJ_Hセグメントは組み合わされてV_Hドメインの第3の抗原結合ループ(H3)を形成する。V_L遺伝子は2つの遺伝子セグメント、V_LとV_λのみの組換えによって生成される。ヒトでは、ハプロタイプにより、約40種の機能的V_κセグメント(SchableとZachau(1993), Biol. Chem. Hoppe-Seyler,

374:1001)、31種の機能的V_λセグメント(Williamsら, (1996), J. Mol. Biol., 264:220; Kawasakiら, (1997), Genome Res., 7:250)、5種の機能的J_κセグメント(Hieterら, (1982), J. Biol. Chem., 257:1516)、および4種の機能的J_λセグメント(VasicekとLeder(1990), J. Exp. Med., 172:609)が存在する。V_LセグメントはV_Lドメインの第1および第2の抗原結合ループ(L1およびL2)を形成するポリペプチド鎖の領域をコードし、一方、V_LおよびV_Lセグメントは組み合わされてV_Lドメインの第3の抗原結合ループ(L3)を形成する。この一次レパートリーから選択される抗体は、少なくとも中等度の親和性ではほとんど全ての抗原と結合するのに十分な程度の多様性を有しているものと考えられる。高親和性抗体は再構成された遺伝子の「親和性成熟(affinity maturation)」によって産生されるが、その際には、点突然変異が生じ、向上した結合性に基づいて免疫系によって選択される。

【０００３】

抗体の構造と配列の分析によって、6個の抗原結合ループのうちの5個(H1、H2、L1、L2、L3)は限定された数の主鎖コンホメーションまたは基準構造を有することが示された(ChothiaとLesk(1987), J. Mol. Biol., 196:901; Chothiaら(1989), Nature, 342:877)。主鎖コンホメーションは、(i)抗原結合ループの長さ、および(ii)抗原結合ループおよび抗体フレームワーク中の特定の重要な位置に存在する特定の残基または残基の種類、によって決定される。ループの長さと重要な残基の分析によって、ヒト抗体配列の大多数によってコードされるH1、H2、L1、およびL3の主鎖コンホメーションを予測することができるようになった(Chothiaら, (1996), J. Mol. Biol., 227:799; Tomlinsonら, (1995), EMBO J., 14:4628; Williamsら, (1996), J. Mol. Biol., 264:220)。H3領域は配列、長さ、および構造に関してははるかに多様ではあるが(Dセグメントの使用のため)、やはりその短いループ長に対して限定された数の主鎖コンホメーションを形成する。その主鎖コンホメーションは、その長さや、そのループおよび抗体フレームワーク中の重要な位置における特定の残基の存在または残基の種類に、応じたものである(Martinら, (1996), J. Mol. Biol., 263:800; Shiraiら, (1996), FEBS Letters, 399:1)。

【０００４】

V_HおよびV_L領域の相補的ペアを含んでなる二重特異性抗体が当業界では知られている。それらの二重特異性抗体はV_HおよびV_Lの対を2組含み、各々のV_H/V_L対が単独の抗原またはエピトープと結合したものでなければならない。報告のある方法としては、ハイブリッドハイブリドーマ(MilsteinとCuello AC, Nature, 305:537-40)、ミニボディー(Huら, (1996), Cancer Res., 56:3055-3061)、ダイアボディ(diabody)(Hollingerら, (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:6444-6448; WO 94/13804)、組換え抗体のキレート化(CRAbs; (Neriら, (1995) J. Mol. Biol., 246:367-373)、biscFv(例えば、Atwellら, (1996), Mol. Immunol., 33:1301-1312)、「ノブ・イン・ホール(knobs in holes)」安定化抗体(Carterら, (1997), Protein Sci., 6:781-788)を利用するものがある。それらの各々で、各抗体種は2カ所の抗原結合部位を含み、その各々はV_HおよびV_Lドメインの相補的ペアによって形成されている。それによって各抗体は2つの異なる抗原またはエピトープと同時に結合することができ、その各抗原またはエピトープとの結合は、V_Hおよびそれに相補的なV_Lドメインによって媒介される。それらの技法のそれぞれには特定の不都合な点がある。例えば、ハイブリッドハイブリドーマ法の場合には、不活性なV_H/V_L対は二重特異性IgGの割合を大きく低減させる。さらに、二重特異性アプローチの大部分は、異なるV_H/V_L対の結合、または2種類の異なるV_H/V_L結合部位を新たに作り出すようなV_H鎖とV_L鎖の結合に依存している。従って、組み立てられた分子中の各抗原またはエピトープに対する結合部位の比率を制御することは不可能であり、組み立てられた分子の多くは一方の抗原またはエピトープとは結合するが、他方の抗原またはエピトープとは結合しないこととなろう。場合によっては、サブユニット境界面で重鎖または軽鎖を加工して、2種類の抗原またはエピトープの双方に対する結合部位を有する分子の数を向上させることが可能であったが(Carterら, 1997)、この方法によっても全ての分子が双方の抗原またはエピトープに対して結合性を有するようになることはない。

【０００５】

2種類の異なる抗体結合特異性を同一の結合部位中に組み入れうることを示す証拠はいくつかあるが、それらのものは通常は、構造的に関連した抗原またはエピトープに対応する2種以上の特異性を示すものであるか、または広い交差反応性のある抗体に対応する2種以上の特異性を示すものである。例えば、交差反応性の抗体が報告されているが、通常はそのような抗体では、2種の抗原は配列および構造の点で関連しており、例えばニワトリ卵白リゾチームとシチメンチョウリゾチーム(McCaffertyら, WO 92/01047)に対するもの、または遊離のハプテンと、担体にコンジュゲートされたハプテンに対するもの(Griffiths, ADら, EMBO J., 1994, 13:143245-60)などがある。さらに別の1例では、WO 02/02773 (Abbott Laboratories)では「二重特異性」を有する抗体分子について述べている。そこで述べられている抗体分子は、2つ以上の抗原に対して特異性を有するようにするために、複数の抗原に対して産生された、または選択されたものである。WO 02/02773の抗体中の相補的V_H/V_L対の各々は、2種以上の構造的に関連性のある抗原に対して、単一の結合特異性を示す。なおそのような相補的対をなすV_HドメインとV_Lドメインはそれぞれが別々の特異性を有するわけではない。従ってこのような抗体は、構造的に関連している2種類の抗原を含む広い単一の特異性を有する。さらに、構造的には関連していない少なくとも2種(通常はそれ以上)の異なる抗原またはエピトープと反応する多反応性の天然の自己抗体が報告されている(CasaliとNotkins, Ann. Rev. Immunol. 7, 515-531)。また、ファージディスプレイ技法を用いてモノクローナル抗体のランダムペプチドレパートリーの選択を行うことにより、抗原結合部位に適合する一連のペプチド配列が同定されうることも示されている。それらの配列のいくつかは高度に関連し、コンセンサス配列に合致しているが、その他のものは非常に相違しており、ミモトープと呼ばれている(LaneとStephan, Current Opinion in Immunology, 1993, 5:268-271)。従って、互いに結合した相補的なV_HドメインとV_Lドメインを含む天然の4本鎖の抗体は、非常に莫大な既知の抗原のうちの多数の異なる抗原と結合する能力を有していることは明らかである。同一の抗体内に、2種類の所定の抗原、特に構造的に必ずしも関連していない抗原に対する結合部位を生成する方法についてはほとんど明らかではない。

【０００６】

タンパク質工学的手法によってこのことを行いうることが示唆されてきた。例えば、可変ドメインの1つにより金属イオンと結合する活性、および金属イオンと相補的可変ドメインとを接触させることによりハプテン(基質)と結合する活性を持った触媒性抗体を作製できることが、提案された(Barbasら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6385-8389)。しかし、この場合には、基質(第1の抗原)との結合と触媒作用には金属イオン(第2の抗原)との結合が必要であるとされている。そのようなV_H/V_L対との結合は、単一抗原ではあるが複数の成分からなる抗原に関連している。

【０００７】

ラクダ抗体の重鎖の単一ドメインから二重特異性抗体を作る方法が報告されており、その方法では、1つの抗原に対する結合的接触は１つの可変ドメイン中で生じ、第2の抗原に対する結合的接触は第2の可変ドメイン中で生じる。しかしそれらの可変ドメインは相補的なものではなかった。従って、第1の重鎖可変ドメインは第1の抗原に対して選択されたものであり、第2の重鎖可変ドメインは第2の抗原に対して選択されたものであって、双方のドメインが同一の鎖上に一緒に連結されて、二重特異性抗体フラグメントをなしている(Conrathら, J. Biol. Chem. 270:27589-27594)。しかし、そのラクダ重鎖単一ドメインは軽鎖のない天然のラクダ抗体から得られたものであるという点で特殊なものであり、実際、その重鎖単一ドメインはラクダ軽鎖と結合して相補的なV_HとV_Lの対を形成することはできない。

【０００８】

また、通常は軽鎖と結合している天然の抗体由来の、単一重鎖可変ドメインも報告されている(モノクローナル抗体由来、またはドメインのレパートリー由来のもの；EP-A-0368684を参照せよ)。これらの重鎖可変ドメインは1種以上の関連抗原と特異的に相互作用することが示されているが、他の重鎖または軽鎖可変ドメインと組み合わせられて2種以上

の異なる抗原に対して特異性を有するリガンドは生成されていない。さらに、これらの単一ドメインはin vivoでの半減期が非常に短かいことが示された。従って、これらのドメインの治療的価値は限定的なものである。

【０００９】

異なる特異性を有する複数の重鎖可変ドメインを一緒に連結することによって二重特異性抗体フラグメントを作成しうることが示唆されている(上述のとおり)。この方法の不利な点は、単離された抗体可変ドメインが、通常は軽鎖との相互作用を行い溶媒に対して暴露されている疎水性の境界面を有しており、この境界面が「粘着性」でありうるために、単一ドメインが疎水性表面に結合してしまうことである。さらに、対になる相手の軽鎖の存在しない状態では、2種以上の異なる重鎖可変ドメインが組み合わされ、結合し（おそらくはそれらの疎水性の境界面を介して）、それによってそれらのドメインが単離状態で結合することのできるリガンドの双方ばかりかその一方との結合をも妨げられるであろう。そのうえ、この場合には、重鎖可変ドメインは相補的な軽鎖可変ドメインと結合しないから、したがってより安定性が低く、容易に折り畳みが開かれてしまうであろう(WormとPluckthum, 1998 Biochemistry, 37:13120-7)。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１０】

発明の要旨

本発明の発明者らは、発明者らの同時係属中の国際特許出願 WO 03/002609ならびに同時係属中の未公開英国特許出願 0230203.2で、各々が異なる特異性を有する免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでなる二重特異性免疫グロブリンリガンドについて述べている。それらのドメインはお互いに競合的に作用するかまたは独立に作用して標的分子上の抗原またはエピトープと結合する。

【００１１】

第1の構成では、本発明は、本発明者らによって開発された二重特異性リガンドにおけるさらなる改良を提供する。その改良において、該リガンドの特異性の1つは、生物体中にin vivoで存在するタンパク質またはポリペプチドであって、それに結合することによって該リガンドの半減期を延長させるように作用しうるタンパク質またはポリペプチド、に対するものである。

【００１２】

従って、第1の態様においては、第1の抗原またはエピトープに対する結合特異性を有する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン、および第2の抗原またはエピトープに対する結合活性を有している第2の相補的免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでなる二重特異性リガンドが提供される。このリガンドは、前記抗原もしくはエピトープの一方または双方がin vivoでそのリガンドの半減期を延長させるように作用するものであり、該第1および第2のドメインが同一の特異性を共有する互いに相補的なドメインを欠いているものであるが、但し該二重特異性リガンドは抗HSA V_Hドメインおよび抗βガラクトシダーゼV_κドメインからなるものではない。好ましくは、第1または第2の可変ドメインのどちらもヒト血清アルブミン(HSA)に結合しない。

【００１３】

本明細書に記載のとおり、リガンドの半減期を延長する抗原またはエピトープは、好都合には、in vivoで生物体に見出されるタンパク質またはポリペプチド上に存在する。例としては、細胞外マトリクスタンパク質、血液タンパク質、および生物体の様々な組織に存在するタンパク質が含まれる。それらのタンパク質は血液からのリガンドのクリアランス速度を、例えば、充填剤として作用することによって、またはリガンドを所望の作用部位に固着させることによって、低減させるように作用する。in vivoで半減期を延長させる抗原/エピトープの例は下記の補遺1に示している。

【００１４】

半減期の延長は、免疫グロブリン、特に抗体、そしてとりわけ特に小さいサイズの抗体

フラグメントのin vivoへの適用において有用である。そのようなフラグメント(Fv、ジスルフィド結合したFv、Fab、scFv、dAb)は生体から急速に排除されてしまう。そのため、これらのフラグメントは生体の大部分に急速に到達することができ、迅速に製造することができ、取り扱いが容易である一方で、そのin vivoへの適用はそれらがin vivoでは短時間しか存在し得ないことから限定されていた。本発明はこの課題を、in vivoでそのリガンドの半減期を延長させて、その結果、そのリガンドの機能的活性の生体内での持続時間をより長くすることによって、解決するものである。

【００１５】

リガンドの半減期の薬物動態分析と測定のための方法は当業者にはよく知られている。詳細は、Kenneth, A.ら:「医薬品の化学的安定性：薬剤師のためのハンドブック」"Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists"、およびPetersら,「薬物動態分析：実際的なアプローチ」"Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach"(1996)中に記載されている。また、「薬物動態学」"Pharmacokinetics", M. GibaldiとD. Perron, Marcel Dekker刊、第2改訂版をも参照すればよく、これはtαおよびtβの半減期や曲線下面積(AUC)などの薬物動態パラメーターについて述べている。

【００１６】

半減期(t1/2αおよびt1/2β)とAUCはリガンドの血清中濃度を時間に対して描いた曲線から求めることができる。WinNonlin解析パッケージ(Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, USAから入手できる)を、例えば、曲線を描くために用いることができる。第1相(α相)ではリガンドは、いくらか排除されつつも主として患者の体内へと分配されている。第2相(β相)は終局相であり、ここではリガンドの分配は完了し、その血清中濃度は該リガンドが患者体内から排出されるにつれて減少する。tαの半減期は第1相の半減期であり、tβの半減期は第2相の半減期である。本発明は好都合なことに、tαの半減期が15分間以上の範囲にある本発明のリガンドまたは該リガンドを含んでなる組成物を提供する。1実施形態においては、その範囲の下限は30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、10時間、11時間、または12時間である。さらに、あるいはそれとは別に、本発明のリガンドまたは組成物は、tαの半減期を12時間以内の範囲としうる。1実施形態においては、その範囲の上限は11、10、9、8、7、6、または5時間である。適切な範囲の1例は、1～6時間、2～5時間、または3～4時間である。

【００１７】

好都合なことに、本発明は、tβの半減期が2.5時間以上の範囲にある本発明のリガンドまたは該リガンドを含んでなる組成物を提供する。1実施形態においては、その範囲の下限は3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、10時間、11時間、または12時間である。さらに、あるいはそれとは別に、本発明のリガンドまたは組成物は、tβの半減期を21日間以内の範囲としうる。1実施形態においては、その範囲の上限は12時間、24時間、2日間、3日間、5日間、10日間、15日間、または20日間である。本発明のリガンドまたは組成物はtβの半減期を12時間から60時間の範囲とすることが好都合であろう。さらに別の1実施形態においては、その半減期は12時間～48時間の範囲となる。さらにまた別の1実施形態においては、その半減期は12時間～26時間の範囲となる。

【００１８】

さらに、あるいは上記の基準とは別に、本発明は、AUC値(曲線下面積)が1 mg・min/mL以上の範囲の、本発明のリガンドまたは該リガンドを含んでなる組成物を提供する。1実施形態においては、その範囲の下限は、5、10、15、20、30、100、200、または300 mg・min/mLである。さらに、あるいはそれとは別に、本発明のリガンドまたは組成物は、600 mg・min/mLまでの範囲のAUCを有する。1実施形態においては、その範囲の上限は500、400、300、200、150、100、75、または50 mg・min/mLである。本発明のリガンドが、次の値からなる群から選択される範囲のAUCを有することが好都合であろう：15～150 mg・min/mL、15～100 mg・min/mL、15～75 mg・min/mL、および15～50 mg・min/mL。

【００１９】

第1の実施形態においては、二重特異性リガンドは2つの相補的可変ドメイン、すなわち

、それらが本発明の内容においてそれらの同族(cognate)エピトープと別々に結合するとしても、天然の環境下では、同族(cognate)の対または群として一緒に機能することのできる2つの可変ドメインを、含んでなる。例えば、その相補的可変ドメインは、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変ドメイン(V_HおよびV_L)であってよい。V_HおよびV_LドメインはscFvまたはFab抗体フラグメントによって提供することが好都合である。可変ドメインは、例えば、各VドメインのC末端にヒンジ領域を提供し、そのヒンジ領域中のシステイン間にジスルフィド結合を生成させるか；または、各々が該ドメインのC末端にシステインを有しており、そのシステインが互いにジスルフィド結合しているdAbを提供するか；または、V-C_HとV-C_Lを作製してFab形態を生成させるか；または、ペプチドリンカー(例えば、下記のGly_4Serリンカー)を用いて二量体、三量体、およびそれ以上の多量体を作製することにより、１つに連結させて多価リガンドを形成させることができる。

【００２０】

本発明の発明者らは、相補的可変ドメインの使用によって2つのドメインの表面を1つに密に詰め込んで、溶媒から隔離されるようにすることができることを見出した。さらに、この相補的ドメインは互いに安定化することができる。さらに、この相補的ドメインによって、従来技術で用いられているハイブリッドハイブリドーマの不都合な点を伴わずに、または重鎖や軽鎖をサブユニット境界面で加工する必要なしに、二重特異性IgG抗体を作製することが可能になる。本発明の第1の態様の二重特異性リガンドは少なくとも１つのV_H/V_L対を有する。従って、本発明の二重特異性IgGはそのような対を2組含んでなり、Y字型分子の各アームに1組の対を含む。従って、用いる鎖の比率がそれらの製造の際の成功を決定付けており、それが実用上の困難性をもたらしている従来の二重特異性抗体またはダイアボディとは異なり、本発明の二重特異性リガンドは、鎖のバランスの問題には左右されない。従来の二重特異性抗体における鎖の不均衡は、2つの異なるV_L鎖と2つの異なるV_H鎖の結合に起因するものである。即ちその場合、V_L鎖1はV_H鎖1と一緒になって抗原またはエピトープ1と結合することができ、V_L鎖2はV_H鎖2と一緒になって抗原またはエピトープ2と結合することができ、それらの2つの正しいペアリングが何らかの形で互いに連結される。従って、単一分子中で、V_L鎖1がV_H鎖1と対をなし、V_L鎖2がV_H鎖2と対をなす場合にのみ、二重特異性が生み出される。このような二重特異性分子は2種類の異なる方法で作製することができる。第1には、2つの既存のV_H/V_L対であってその各々が異なる抗原またはエピトープと結合するもの(例えば二重特異性IgG中に含まれるものなど)を結合することによって作製することができる。この場合には、全ての分子が二重特異性であるような分子集団を作るためには、そのV_H/V_Lの組み合わせが全体で1:1の比率とならなければならない。このことは決して起こらず(相補的C_Hドメインが"ノブ・イントゥ・ホール(knobs into holes)"操作によって増強された場合であっても)、その結果、二重特異性の分子と、一方の抗原またはエピトープだけには結合できるが他方とは結合できない分子との混合物となる。二重特異性抗体を作る第2の方法は、2種の異なるV_H鎖を2種の異なるV_L鎖と同時に結合させることによるものである(例えば二重特異性ダイアボディへと)。この場合には、V_L鎖1はV_H鎖1とペアを作りやすく、V_L鎖2はV_H鎖2とペアを作りやすい傾向はあるものの(これらはV_LドメインとV_Hドメインの"ノブ・イントゥ・ホール(knob into holes)"操作によって増強しうるものである)、このペアリングが全分子に起こることはあり得ず、それによりいずれかの抗原またはエピトープと結合できない正しくないペアリングが生じ、そのため混合配合物がもたらされる。

【００２１】

本発明の第1の態様に従って二重特異性リガンド法によって構築された二重特異性抗体では、抗原またはエピトープ1との結合がV_HドメインまたはV_Lドメイン内に存在し、抗原またはエピトープ2との結合が相補的なV_LドメインまたはV_Hドメインにそれぞれ存在するため、上記課題の全てを克服している。V_HドメインとV_Lドメインが1:1の比率で対になるので、V_H/V_L対の全てが二重特異性となり、その結果これらのV_H/V_L対を用いて構築される全ての構成(Fv、scFv、Fab、ミニボディー、IgG、その他)が、100%の二重特異性活性を有することとなる。

【００２２】
本発明の文脈では、第1および第2の「エピトープ」は、同一のものではなく、単一特異性を示す単一リガンドによっては結合されないエピトープと理解される。本発明の第1の構成では、エピトープは異なる抗原上にあってそのうちの1つがin vivoでのそのリガンドの半減期を延長させるように作用するものであることが好都合である。同様に、第1のおよび第2の抗原は同一のものでないことが好都合である。
【００２３】
本発明の二重特異性リガンドにはWO 02/02773に記載のリガンドは含まれない。従って、本発明のリガンドは、1種以上の抗原またはエピトープと協働的に結合する相補的なV_H/V_L対を含んでなるものではない。そうではなく、本発明の第1の態様のリガンドは、V_H/V_Lの相補的な対を含んでなるものであるが、そのVドメインが異なる特異性を有するものである。
【００２４】
さらに、本発明の第1の態様のリガンドは、構造的に関連していないエピトープまたは抗原に対して異なる特異性を有するV_H/V_Lの相補的な対を含んでなるものである。構造的に関連したエピトープまたは抗原とは、協働的な様式で抗原またはエピトープと結合するように働く従来のV_H/V_Lの相補的な対が結合するのに十分な構造的類似性を有する抗原またはエピトープである。ここで、構造的に関連したエピトープの場合には、V_H/V_L二量体の抗原結合部位に形成された同一の結合ポケット内に「適合」するそれらの構造が十分に類似しているエピトープである。
【００２５】
第2の態様では、本発明は、第1の抗原またはエピトープに対する結合特異性を有する第1の免疫グロブリン可変ドメイン、および第2の抗原またはエピトープに対する結合特異性を有する第2の免疫グロブリン可変ドメインを含んでなるリガンドであって、該第1および第2の可変ドメインの一方または双方がin vivoでのそのリガンドの半減期を延長させる抗原と結合し、かつ、それら可変ドメインが互いに相補的でないリガンドを、提供する。
【００２６】
1実施形態においては、1つの可変ドメインへの結合が、そのリガンドの第2の可変ドメインとの結合をモジュレートする。
【００２７】
この実施形態においては、該可変ドメインは、例えば、V_Hドメインの対またはV_Lドメインの対とすることができる。第1の部位での抗原の結合が、第2の部位での抗原の結合をモジュレートし、例えば増強または阻害することができる。例えば、第1の部位での結合は少なくとも部分的には第2の部位での抗原の結合を阻害する。そのような実施形態においては、該リガンドは例えば、第2の標的抗原と結合し、半減期を延長するタンパク質から解離する時点まで、そのリガンドの半減期を延長するタンパク質との結合により、被験生物の体内でin vivoで維持されうる。
【００２８】
上述の内容での結合のモジュレーションは、抗原結合部位の互いの構造上の近接性の結果として得られる。そのような構造上の近接性は、2つ以上の抗原結合部位を連結している構造的成分の性質によって得られ、例えば、抗原結合部位を非常に近接した状態に保持する比較的硬い構造を保有するリガンドを提供することによって、得られる。2つ以上の抗原結合部位が互いに物理的に非常に近接しているため、1つの部位が別の部位での抗原の結合を、免疫グロブリン内部での立体障害および/またはコンホメーション変化を伴うプロセスによってモジュレートすることが好都合である。
【００２９】
第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインは、共有結合または非共有結合のいずれかにより結合されうる。それらのドメインが共有結合する場合には、その結合は例えば、ジスルフィド結合によって、または$(Gly_4Ser)_n$ [式中、nは1～8、例えば2、3、4、5、または7である]などのポリペプチドリンカーによって媒介されうる。

【００３０】
本発明のリガンドは非免疫グロブリン性の多重リガンド構造中に組み合わせて多価複合体を形成させることもでき、その場合に該多価複合体は、同一の抗原を有する複数の標的分子と結合し、それによってより優れた結合活性を提供するものであるが、一方で少なくとも1つの可変ドメインがその多量体の半減期を延長させる抗原と結合するものである。1種以上のエピトープと特異的に結合するリガンドを作製するためには、例えば、SpAなどの天然の細菌受容体が、CDRを移植するための足場(scaffold)として用いられてきた。この方法の詳細は米国特許第5,831,012号に記載されている。その他の適切な足場としては、フィブロネクチンおよびアフィボディ(affibody)に基づくものが挙げられる。適切な方法に関しての詳細はWO 98/58965中に述べられている。その他の適切な足場としては、van den Beukenら, J. Mol. Biol. (2001), 310, 591-601中に述べられているリポカリンおよびCTLA4、ならびにWO 00/69907 (Medical Research Council) 中に述べられているもののような足場(これは、例えば細菌GroELまたはその他のシャペロンポリペプチドの環状構造に基づく)が挙げられる。

【００３１】
タンパク質の足場は組み合わせることができる。例えば、CDRをCTLA4足場に移植し、それを免疫グロブリンのV_HまたはV_Lドメインとともに使用して、リガンドを形成させることができる。同様にしてフィブロネクチン、リポカリン、およびその他の足場を組み合わせることができる。

【００３２】
可変ドメインが、例えば、本明細書に述べているファージディスプレイ技法を用いて選択されたV遺伝子レパートリーから選ばれる場合には、それら可変ドメインはユニバーサルフレームワーク領域を含んでなり、そのためそれらは、本明細書で定義する特定の共通リガンドによって認識されうる。ユニバーサルフレームワーク、共通リガンドなどの使用についてはWO 99/20749中に述べられている。本発明では、ファージディスプレイ（ファージ提示）への言及には、ファージおよびファージミドの双方の使用を含んでいる。

【００３３】
V遺伝子レパートリーを用いる場合、ポリペプチド配列のバリエーションは好ましくは可変ドメインの構造ループ内に位置する。いずれかの可変ドメインのポリペプチド配列は、各可変ドメインとそれの相補的なペアとの相互作用を増強するために、DNAシャッフリングによってまたは突然変異によって変化させてもよい。

【００３４】
本発明の好ましい1実施形態においては、「二重特異性リガンド」は一本鎖Fvフラグメントである。本発明のまた別の1実施形態においては、「二重特異性リガンド」は抗体のFab領域からなる。「Fab領域」という用語には、2つのV_Hドメインまたは2つのV_Lドメインが用いられるFab様領域が含まれる。

【００３５】
可変領域は標的抗原または標的エピトープに対する抗体から得られるものであってよい。あるいはまた、可変領域は、線状バクテリオファージの表面上に発現させたものなどの単一抗体ドメインのレパートリー由来のものであってよい。

【００３６】
第3の態様においては、本発明は第1の結合特異性を有する第1の免疫グロブリン単一可変ドメイン、および第2の(異なる)結合特異性を有する第2の単一免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでなるリガンドを製造する方法であって、但しそれらの結合特異性の一方または双方がin vivoでのそのリガンドの半減期を延長させる抗原に対して特異的である方法を提供する。その方法は次のステップを含んでなる：
(a) 第1の可変ドメインを、第1のエピトープに対するその結合能によって選択し、
(b) 第2の可変領域を、第2のエピトープに対するその結合能によって選択し、
(c) それらの可変ドメインを組み合わせ、そして
(d) その第1のエピトープおよび第2のエピトープに対する結合能によってリガンドを選択

する。

【００３７】

このリガンドは、第1および第2のエピトープと同時に結合してもよいし、またはエピトープ結合に対して結合ドメイン間の競合が存在する場合には、1つのドメインの結合が別のドメインのその同族エピトープへの結合を妨げることもありうる。従って、1実施形態においては、上記のステップ(d)では第1と第2(および場合によってはそれ以上)のエピトープの双方へ同時に結合することが必要であり、別の1実施形態においては、第1および第2のエピトープへの結合は同時に起こらない。

【００３８】

このエピトープは好ましくは別々の抗原上にある。

【００３９】

リガンドは、上述のとおり、免疫グロブリン可変ドメインの、V_H/V_Lの組み合わせ、またはV_H/V_HまたはV_L/V_Lの組み合わせを含むことが好都合である。さらに、該リガンドは、ラクダ科のV_{HH}ドメインを含んでなるものであってもよいが、但しin vivoでそのリガンドの半減期を延長する抗原に対して特異的であるそのV_{HH}ドメインが、ニワトリ卵白リゾチーム(HEL)、ブタ膵αアミラーゼ、またはNmC-A;hcg、BSAに連結したRR6アゾ色素、またはS.mutans HG982細胞(これらはConrathら, (2001) JBC 276:7346-7350およびWO 99/23221に記載されているが、これらの文献のどちらも、in vivoでそのリガンドの半減期を延長する抗原に対する特異性を用いることは述べていない)とは結合しないものである。

【００４０】

1実施形態においては、第1の可変ドメインは、相補的な可変ドメインの不在下での第1のエピトープとの結合により選択される。さらに別の1実施形態においては、第1の可変ドメインは、第3の可変ドメインの存在下での第1のエピトープ/抗原との結合により選択されるが、但し該第3の可変ドメインは第2の可変ドメインとは異なるものであり、かつ第1のドメインと相補的なものである。同様に、第2のドメインは相補的な可変ドメインの不在下または存在下で選択することができる。

【００４１】

本発明のリガンドが標的とする抗原またはエピトープは、半減期を延長するタンパク質に加えて、いかなる抗原またはエピトープであっても良いが、治療上有益であることから標的とされる抗原またはエピトープであるのが好都合である。本発明は、開放型コンホメーション、閉鎖型コンホメーション、および単離されたdAb単量体リガンドを包含するリガンドであって、上述のような任意の標的、特に本明細書でさらに特定する標的に対して特異的なリガンドを、提供する。そのような標的は、ポリペプチド、タンパク質、もしくは核酸、またはその一部であってよく、それらは天然物であっても合成物であってもよい。この点で、本発明のリガンドはエピトープまたは抗原と結合してアンタゴニストまたはアゴニスト(例えばEPO受容体アゴニスト)として作用することができる。当業者であればそのような選択が広範にわたり多様であることが理解できよう。抗原またはエピトープは例えば、ヒトもしくは動物のタンパク質、サイトカイン、サイトカイン受容体、酵素、酵素の補因子、またはDNA結合タンパク質であってよい。適切なサイトカインおよび増殖因子としては、限定はされないが、次のものが含まれる：ApoE、Apo-SAA、BDNF、カルジオトロフィン-1、EGF、EGF受容体、ENA-78、エオタキシン、エオタキシン-2、エクソダス(Exodus)-2、EpoR、FGF-酸性、FGF-塩基性、線維芽細胞成長因子-10、FLT3リガンド、フラクタルカイン(CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF-β1、インスリン、IFN-γ、IGF-I、IGF-II、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8(72アミノ酸)、IL-8(77アミノ酸)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18(IGIF)、インヒビンα、インヒビンβ、IP-10、ケラチノサイト成長因子-2(KGF-2)、KGF、レプチン、LIF、リンホタクチン、ミュラー管抑制物質、単球コロニー阻害因子、単球誘引タンパク質(monocyte attractant protein)、M-CSF、MDC(67アミノ酸)、MDC(69アミノ酸)、MCP-1(MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC(67アミノ酸)、MDC(69アミノ酸)、MIG、MIP-1α、MIP-1β、MIP-3α、MIP-3β、MIP-4、骨髄前駆細胞阻害因子(myeloid progenitor innhib

itor factor)-1(MPIF-1)、NAP-2、ニュールタリン(Neurturin)、神経成長因子、β-NGF、NT-3、NT-4、オンコスタチンM、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1α、SDF1β、SCF、SCGF、幹細胞因子(SCF)、TARC、TGF-α、TGF-β、TGF-β2、TGF-β3、腫瘍壊死因子(TNF)、TNF-α、TNF-β、TNF受容体I、TNF受容体II、TNIL-1、TPO、VEGF、VEGF受容体1、VEGF受容体2、VEGF受容体3、GCP-2、GRO/MGSA、GRO-β、GRO-γ、HCC1、1-309、HER 1、HER 2、HER 3、およびHER 4。サイトカイン受容体としては、上述のサイトカインに対する受容体が挙げられる。このリストが決して網羅的なものではないことは理解されよう。

【００４２】

本発明の1実施形態においては、可変ドメインは、前記抗原またはエピトープに対するそれぞれの抗体由来のものである。好ましい1実施形態においては、可変ドメインは単一可変抗体ドメインのレパートリー由来のものである。

【００４３】

さらに別の1態様においては、本発明は、本明細書に定義する二重特異性リガンドを少なくともコードする1種以上の核酸分子を提供する。その二重特異性リガンドは単一の核酸分子でコードされていてもよい。あるいはまた、各ドメインが別々の核酸分子でコードされていてもよい。該リガンドが単一の核酸分子でコードされている場合には、該ドメインはscFv分子の形で融合ポリペプチドとして発現させるか、または、別々に発現させた後、例えば化学結合剤を用いて1つに連結することができる。別々の核酸から発現されたリガンドは適切な手法で1つに連結することができる。

【００４４】

該核酸は、発現の際の宿主細胞からの該ポリペプチドの輸送のためのシグナル配列をさらにコードすることができ、発現の際に線状バクテリオファージ粒子の表面成分(または選択提示システムの他の成分)と融合させることができる。

【００４５】

さらに別の1態様では、本発明は、本発明の二重特異性リガンドをコードする核酸を含んでなるベクターを提供する。

【００４６】

また別の1態様では、本発明は、本発明の二重特異性リガンドをコードするベクターを用いてトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。

【００４７】

そのようなベクターからの発現を、例えばバクテリオファージ粒子の表面上に、選択のために可変ドメインを産生させるように構成することができる。このことによって提示された可変領域の選択が可能となり、本発明の方法を用いた「二重特異性リガンド」の選択が可能となる。

【００４８】

本発明はさらに、本発明の二重特異性リガンドを少なくとも含むキットを提供する。

【００４９】

本発明の二重特異性リガンドは好ましくは重鎖ドメインと軽鎖ドメインの組み合わせを含んでなる。例えば、二重特異性リガンドはV_HドメインとV_Lドメインを含んでなることができ、それらのドメインは一緒に連結してscFvの形態とすることができる。さらに、該リガンドは1種以上のC_HドメインまたはC_Lドメインを含んでもよい。例えば、該リガンドはC_H1ドメイン、C_H2もしくはC_H3ドメイン、および/または、C_Lドメイン、Cμ1、Cμ2、Cμ3、もしくはCμ4ドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含んでもよい。ヒンジ領域ドメインも含めることができる。ドメインのそのような組み合わせは、例えば、IgGもしくはIgMなどの天然抗体の模擬体、またはFv、scFv、Fab、もしくは$F(ab')_2$分子などのそれらのフラグメントであってよい。その他の構造、例えばV_H、V_L、C_H1、およびC_Lドメインを含んでなるIgG分子の単一のアームなども想定している。

【００５０】

本発明の好ましい1実施形態においては、可変領域は単一ドメインV遺伝子レパートリー

から選択される。通常は単一抗体ドメインのレパートリーは線状バクテリオファージの表面上に提示される。好ましい1実施形態においては、個々の単一抗体ドメインはファージレパートリーの抗原への結合によって選択される。

【００５１】

本発明の好ましい1実施形態においては、個々の単一可変ドメインは、それと相補的な可変領域が不在下での、その標的抗原またはエピトープとの結合によって選択することができる。別の1実施形態においては、単一可変ドメインはそれと相補的な可変領域の存在下でその標的抗原またはエピトープとの結合によって選択することができる。このようにして、第1の単一可変ドメインは第3の相補的可変ドメインの存在下で選択することができ、第2の可変ドメインは第4の相補的可変ドメインの存在下で選択することができる。この相補的な第3または第4の可変ドメインは、試験する単一ドメインと同一の特異性を有する天然の同族可変ドメインであってもよく、または同族でない相補的ドメイン－例えば「ダミー」可変ドメインであってもよい。

【００５２】

好ましくは、本発明の二重特異性リガンドは2つの可変ドメインのみを含んでなるものであってもよく、いくつかのそのようなリガンドを一緒に同一のタンパク質中に組み込むことが可能であるが、例えば、2つのそのようなリガンドをIgGまたは例えばIgMなどの多量体免疫グロブリンに組み込むことができる。あるいはまた、別の1実施形態においては、複数の二重特異性リガンドを組み合わせて多量体を形成させる。例えば、2つの異なる二重特異性リガンドを組み合わせて、四重特異性分子を作製する。

【００５３】

当業者には、本発明の方法に従って作製された二重特異性リガンドの軽鎖および重鎖可変領域が同一のポリペプチド鎖上にあってもよいし、またはその代わりに、異なるポリペプチド鎖上にあってもよいことは理解されよう。該可変領域が異なるポリペプチド鎖上にある場合には、それらはリンカー、通常はフレキシブルなリンカー(例えばポリペプチド鎖など)、化学結合基、またはその他の当業界で既知の他の任意の方法により、連結することができる。

【００５４】

さらに別の1態様においては、本発明は、本発明の方法で得ることのできる二重特異性リガンドと、製薬上許容される担体、希釈剤、もしくは賦形剤を含んでなる組成物を提供する。

【００５５】

さらに本発明は、本発明の「二重特異性リガンド」または組成物を用いた疾患の治療および/または予防の方法を提供する。

【００５６】

第2の構成においては、本発明は、少なくとも2つの非相補的可変ドメインを含んでなる多重特異性リガンドを提供する。例えば、該リガンドはV_Hドメインの対またはV_Lドメインの対を含んでもよい。該ドメインはラクダ科起源でないものが好都合であり、好ましくは該ドメインはヒトドメインであるか、またはヒトのフレームワーク領域(FW)と1つ以上の異種CDRを含むものである。CDRとフレームワーク領域は「免疫学の対象となるタンパク質の配列のKabatデータベース（Kabat database of Sequences of Proteins of Immunological Interest）」中で定義されている免疫グロブリン可変ドメインのそれらの領域である。

【００５７】

好ましいヒトフレームワーク領域は、生殖細胞系列の遺伝子セグメントDP47およびDPK9によってコードされるものである。有利には、V_HまたはV_LドメインのFW1、FW2、およびFW3は、DP47またはDPK9由来のFW1、FW2、またはFW3の配列を有している。ヒトフレームワークは、場合により突然変異を含んでもよく、例えば本発明のリガンド中で用いるヒトフレームワーク中に、合計で約5個までのアミノ酸の変更、または約10個までのアミノ酸の変更を含んでもよい。

【００５８】
本発明の第2の構成に従う多重特異性リガンド中の可変ドメインは、開放型コンホメーションまたは閉鎖型コンホメーションの形に配置することができる。すなわち、該可変ドメインは、それらがそれらの同族リガンドと独立してかつ同時に結合することができるように、またはどの時点であっても該可変ドメインのうちの１つのみがその同族リガンドと結合することができるように、配置することができる。
【００５９】
本発明の発明者らは、特定の構造条件下では、非相補的可変ドメイン(例えば、2つの軽鎖可変ドメイン、または2つの重鎖可変ドメイン)が1つのリガンド中に存在し、その結果、そのような非相補的ドメインが同族の対として一緒に機能しない場合でも、第1のエピトープの第1の可変ドメインへの結合が、第2のエピトープの第2の可変ドメインへの結合を阻害するようにしうることを、見出した。
【００６０】
該リガンドは可変ドメインの対を2つ以上含んでなるものであることが好都合である。すなわち、そのリガンドは少なくとも4つの可変ドメインを含んでなる。その4つの可変ドメインがヒト起源のフレームワークを含んでなることが好都合である。
【００６１】
好ましい1実施形態においては、そのヒトフレームワークはヒト生殖細胞系列の配列のフレームワークと同じものである。
【００６２】
本発明者らは、そのような抗体が治療用途およびその他の使用目的でのリガンド結合アッセイにおいて特に有用であろうと考えている。
【００６３】
従って、第2の構成の第1の態様においては、本発明は多重特異性リガンドを作製する方法を提供する。ここでその方法は次のステップを含んでなる：
a)　第1のエピトープ結合ドメインを、第1のエピトープに対するその結合能によって選択し、
b)　第2のエピトープ結合ドメインを、第2のエピトープに対するその結合能によって選択し、
c)　それらのエピトープ結合ドメインを組み合わせ、そして
d)　閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドを、該第1のエピトープおよび該第2のエピトープに対するその結合能によって選択する。
【００６４】
第2の構成のさらに別の態様においては、本発明は、第1のエピトープ結合特異性を有する第1のエピトープ結合ドメイン、および第2のエピトープ結合特異性を有する非相補的な第2のエピトープ結合ドメインを含んでなる閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドを製造する方法であって、但し該第1および第2の結合特異性がエピトープ結合に対して競合し、それによってその閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドは双方のエピトープと同時には結合できないであろう方法を、提供する。ここでそのような方法は次のステップを含んでなる：
a)　第1のエピトープ結合ドメインを、第1のエピトープに対するその結合能によって選択し、
b)　第2のエピトープ結合ドメインを、第2のエピトープに対するその結合能によって選択し、
c)　それらのエピトープ結合ドメインを、それらのドメインが閉鎖型コンホメーションを取るように組み合わせ、そして
d)　閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドを、該第1のエピトープおよび該第2のエピトープと結合するが該第1および第2のエピトープの双方に同時には結合しない能力によって選択する。
【００６５】

さらに、本発明は第1のエピトープとの結合特異性を有する第1のエピトープ結合ドメイン、および第2のエピトープとの結合特異性を有する非相補的な第2のエピトープ結合ドメインを含んでなる閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドであって、但し該第1および第2の結合特異性がエピトープ結合に対して競合し、それによってその閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドは双方のエピトープと同時には結合できないであろう前記リガンドを、提供する。

【００６６】

本発明の第2の構成の上記態様の別の実施形態は、場合により、第3のまたはそれ以上のエピトープ結合ドメインを選択することを含むさらなるステップ(b1)を含んでなる。このようにして作製される多重特異性リガンドは、開放型コンホメーションまたは閉鎖型コンホメーションのいずれであっても、3つ以上のエピトープ結合特異性を含む。本発明の第2の構成の好ましい1態様では、多重特異性リガンドが3つ以上のエピトープ結合ドメインを含んでなり、該ドメインのうちの少なくとも2つが閉鎖型コンホメーションをとって結合に対して競合するが、その他のドメインは結合に対して競合してもよく、または自由にその同族エピトープと独立して結合してもよい。

【００６７】

本発明では「多重特異性リガンド」という用語は、本明細書で定義する通り、2つ以上のエピトープ結合特異性を有するリガンドを意味する。

【００６８】

本明細書で定義する通り、「閉鎖型コンホメーション」(多重特異性リガンド)とは、リガンドのエピトープ結合ドメインが、（場合によりタンパク質骨格によって）互いに付着または結合しており、それによって1つのエピトープ結合ドメインによるエピトープ結合が別のエピトープ結合ドメインによるエピトープ結合と競合することを意味する。すなわち、同族エピトープには、エピトープ結合ドメインの各々が、同時にではなく独立して結合する。リガンドの閉鎖型コンホメーションは本明細書に記載の方法で実現することができる。

【００６９】

「開放型コンホメーション」とは、リガンドのエピトープ結合ドメインが、(場合によりタンパク質骨格によって)互いに付着または結合しており、それによって1つのエピトープ結合ドメインによるエピトープ結合が別のエピトープ結合ドメインによるエピトープ結合と競合しないことを意味する。

【００７０】

「競合する」という用語は本明細書では、第1のエピトープのその同族エピトープ結合ドメインへの結合が、第2のエピトープがその同族エピトープ結合ドメインに結合する際に阻害されることを意味する。例えば結合は、立体的に、例えば結合ドメインの物理的な妨害によって、またはそのドメインのエピトープに対する親和性もしくは結合活性を低減させるように結合ドメインの構造もしくは環境を変化させることによって、阻害されうる。

【００７１】

本発明の第2の構成のさらに別の1実施形態においては、前記エピトープが結合の際に互いに置き換わることがありうる。例えば、第1のエピトープが抗原上に存在していて、それが、その同族の第1の結合ドメインと結合する際に、第2の結合ドメインの立体障害を生じるか、またはその内部にコンホメーション変化を生じさせ、その結果、第2の結合ドメインに結合していたエピトープと置き換わることがありうる。

【００７２】

好都合なのは、結合が25%以上低減することであり、好都合なのは40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上低減することであり、好ましくは100%もしくはほぼ100%まで低減して、結合が完全に阻害されることである。エピトープの結合は、例えばELISAなどの従来の抗原結合アッセイによって、またはFRETを含む蛍光に基づく技法によって、または分子質量を測定する表面プラズモン共鳴などの技法によって、測定することができる。

【００７３】
本発明の方法では、各エピトープ結合ドメインが異なるエピトープ結合特異性を有することが好都合である。
【００７４】
本発明の内容においては、第1および第2の「エピトープ」は、同一ではなく、単独の単一特異性のリガンドによっては結合されないエピトープであると理解される。それらのエピトープは異なる抗原上にあってもよいし、同一の抗原上にあってもよいが、それらは、従来の抗体の単独の単一特異性V_H/V_L結合対によって結合されうる単一の存在を形成しないだけの十分な距離によって隔てられている。実験的には、一本鎖抗体の形態(ドメイン抗体またはdAb)中の個々の可変ドメインの双方が、単一特異性のV_H/V_Lリガンドと、2つのエピトープに対して別個に競合する場合には、それらの2つのエピトープは本発明における別々のエピトープと見なすのに十分なほど離れてはいないものとする。
【００７５】
本発明の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドにはWO 02/02773に記載のリガンドは含まれない。従って、本発明のリガンドは1種以上の任意の抗原またはエピトープと協働的に結合する相補的V_H/V_L対を含まない。その代わりに、本発明のリガンドは、好ましくは非相補的V_H-V_HまたはV_L-V_L対を含んでなる。各V_H-V_HまたはV_L-V_L対中の各V_HまたはV_Lドメインは、異なるエピトープ結合特異性を有し、それらのエピトープ結合部位が、1つの部位でのエピトープの結合が別の部位でのエピトープの結合と競合するように配置されていることが有利である。
【００７６】
本発明では、各エピトープ結合ドメインが免疫グロブリン可変ドメインを含んでなることが好都合である。各免疫グロブリン可変ドメインが、可変軽鎖ドメイン(V_L)または可変重鎖ドメイン(V_L)のいずれかであることがより好都合であろう。本発明の第2の構成においては、該免疫グロブリンドメインは、本発明のリガンド上に存在する場合には非相補的であり、すなわちそれらのドメインは結合してV_H/V_L抗原結合部位を形成しない。従って、本発明の第2の構成においては定義される多重特異性リガンドは、同一のサブタイプの免疫グロブリンドメイン、すなわち可変軽鎖ドメイン(V_L)または可変重鎖ドメイン(V_H)のいずれかを含んでなる。さらに、本発明のリガンドが閉鎖型コンホメーションをとる場合には、その免疫グロブリンドメインはラクダ科V_{HH}タイプのものであろう。
【００７７】
別の1実施形態においては、本発明のリガンドはラクダ科V_{HH}ドメインを含まない。より具体的には、本発明のリガンドは、ヒトV_Hドメインと比較してラクダ科V_{HH}ドメインに特異的である1つ以上のアミノ酸残基を含まない。
【００７８】
単一可変ドメインは種々の抗原またはエピトープに対する結合活性について選択された抗体由来のものであることが好都合である。例えば、該可変ドメインは少なくとも部分的にはヒトの免疫によって単離されうる。別の方法が当業界では既知であり、ヒト抗体ライブラリーからの単離、および人工的な抗体遺伝子の合成が挙げられる。
【００７９】
該可変ドメインはスーパー抗原、例えばプロテインAまたはプロテインLと結合することが好都合である。スーパー抗原との結合は正しく折り畳まれた抗体可変ドメインの特性であり、それによって、そのようなドメインを、例えば組換えドメインまたは変異させたドメインのライブラリーから単離することが可能になる。
【００８０】
本発明のエピトープ結合ドメインはタンパク質の足場およびエピトープ相互作用部位(その部位はそのタンパク質の足場の表面上にあることが好都合である)を含んでなる。
【００８１】
エピトープ結合ドメインはまた、免疫グロブリンドメイン以外のタンパク質の足場または骨格に基づくものとすることができる。例えば、SpAなどの天然の細菌受容体は、1種以

上のエピトープと特異的に結合するリガンドを作製するために、CDRを移植するための足場として用いられてきた。この方法の詳細は米国特許第5,831,012号に記載されている。その他の適切な足場としては、フィブロネクチンおよびアフィボディ(affibody)に基づくものが含まれる。適切な方法に関しての詳細はWO 98/58965中に述べられている。その他の適切な足場としては、van den Beukenら, J. Mol. Biol. (2001), 310-5 91-601中に述べられているリポカリンおよびCTLA4、ならびにWO 00/69907 (Medical Research Council)中に述べられているもののような足場(これは例えば細菌GroELまたはその他のシャペロンポリペプチドの環状構造に基づく)が挙げられる。

【００８２】

タンパク質の足場は組み合わせることができる。例えば、CDRはCTLA4の足場の上に移植してそれを免疫グロブリンのV_HまたはV_Lドメインとともに多価リガンドを形成するために用いることができる。同様にしてフィブロネクチン、リポカリン、およびその他の足場を組み合わせることができる。

【００８３】

当業者には、本発明の方法に従って作製された閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドのエピトープ結合ドメインが同一のポリペプチド鎖上にあってもよいし、またはその代わりに異なるポリペプチド上にあってもよいことは理解されよう。該可変領域が異なるポリペプチド鎖上にある場合には、それらはリンカー、通常はフレキシブルなリンカー(例えばポリペプチド鎖など)、化学結合基、またはその他の当業界で既知の何らかの方法によって連結することが好都合である。

【００８４】

第1のおよび第2のエピトープ結合ドメインは共有結合または非共有結合のいずれかで結合することができる。該ドメインが共有結合されている場合には、その結合は例えばジスルフィド結合によって媒介されうる。

【００８５】

本発明の第2の構成においては、該第1および第2のエピトープは異なることが好ましい。それらのエピトープは、ポリペプチド、タンパク質、もしくは核酸、またはその一部であってよく、天然物であっても合成物であってもよい。この点で、本発明のリガンドはエピトープまたは抗原と結合してアンタゴニストまたはアゴニスト(例えばEPO受容体アゴニスト)として作用することができる。1実施形態においては、このリガンドのエピトープ結合ドメインは同一のエピトープ特異性を有しており、例えば、複数コピーのエピトープが同一抗原上に存在する場合にはそれらのエピトープに同時に結合しうる。別の実施形態では、それらのエピトープは異なる抗原上に提供されており、それにより、そのリガンドは該エピトープに結合し抗原同士を橋渡すことができる。当業者であればエピトープおよび抗原の選択が広範にわたり多様であることが理解できよう。エピトープおよび抗原は、例えば、ヒトもしくは動物のタンパク質、サイトカイン、サイトカイン受容体、酵素、酵素の補因子、またはDNA結合タンパク質であってよい。適切なサイトカインおよび増殖因子としては、限定はされないが、次のものが含まれる：ApoE、Apo-SAA、BDNF、カルジオトロフィン-1、EGF、EGF受容体、ENA-78、エオタキシン、エオタキシン-2、エクソダス(Exodus)-2、EpoR、FGF-酸性、FGF-塩基性、線維芽細胞成長因子-10、FLT3リガンド、フラクタルカイン(CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF-β1、インスリン、IFN-γ、IGF-I、IGF-II、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8(72アミノ酸)、IL-8(77アミノ酸)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18(IGIF)、インヒビンα、インヒビンβ、IP-10、ケラチノサイト成長因子-2(KGF-2)、KGF、レプチン、LIF、リンホタクチン、ミュラー管抑制物質、単球コロニー阻害因子、単球誘引タンパク質(monocyte attractant protein)、M-CSF、MDC(67アミノ酸)、MDC(69アミノ酸)、MCP-1(MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC(67アミノ酸)、MDC(69アミノ酸)、MIG、MIP-1α、MIP-1β、MIP-3α、MIP-3β、MIP-4、骨髄前駆細胞阻害因子(myeloid progenitor innhibitor factor)-1(MPIF-1)、NAP-2、ニューレタリン(Neurturin)、神経成長因子、β-NGF、NT-3、NT-4、オンコスタチンM、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1α、SD

F1β、SCF、SCGF、幹細胞因子(SCF)、TARC、TGF-α、TGF-β、TGF-β2、TGF-β3、腫瘍壊死因子(TNF)、TNF-α、TNF-β、TNF受容体I、TNF受容体II、TNIL-1、TPO、VEGF、VEGF受容体1、VEGF受容体2、VEGF受容体3、GCP-2、GRO/MGSA、GRO-β、GRO-γ、HCC1、1-309、HER 1、HER 2、HER 3、およびHER 4、TACE認識部位、TNF BP-IおよびTNF BP-II、ならびに本明細書の補遺2または補遺3に開示した全ての標的(それらの補遺中に示した組み合わせで、または異なる組み合わせで、もしくは個別に)。

【００８６】

サイトカイン受容体としては、前述のサイトカイン、例えば、IL-1 R1、IL-6R、IL-10R、IL-18R、ならびに補遺2または補遺3に記載のサイトカインに対する受容体、および補遺2および3に開示されている受容体が挙げられる。このリストが決して網羅的なものではないことは理解されよう。多重特異性リガンドが2つのエピトープ(同一の抗原上または異なる抗原上の)と結合する場合には、該抗原はこのリストから選択することができる。

【００８７】

都合の良いことに、二重特異性リガンドは、生物の体内で治療を行う状況において相乗的に協働するサイトカインおよびその他の分子を標的とするために用いることができる。従って、本発明は、2種以上のサイトカインと結合することのできる二重特異性リガンドを投与することを含んでなる、その2種以上のサイトカインの活性を相乗的に増強する方法を提供する。本発明のこの態様においては、該二重特異性リガンドはいかなる二重特異性リガンドであっても良く、そのようなものには相補的および/または非相補的ドメインからなるリガンド、開放型コンホメーションのリガンド、および閉鎖型コンホメーションのリガンドが含まれる。例えば、本発明のこの態様は、V_HドメインとV_Lドメインの組み合わせ、V_Hドメインのみ、およびV_Lドメインのみのものにも関する。

【００８８】

治療を行う際の相乗効果は多数の方法で達成することができる。例えば、標的の組み合わせはそれら標的の双方が該リガンドによって標的とされる場合にのみ治療上活性なものでありうるが、一方、1つの標的のみが標的とされる場合には、治療上有効ではない。別の1実施形態においては、1つの標的のみではいくらかの少ないかまたは最低限の治療効果が提供されるが、第2の標的と一緒になるとその組み合わせは治療効果を相乗的に増強する。

【００８９】

好ましくは、本発明のこの態様の二重特異性リガンドによって結合されるサイトカインは、補遺2に示したリストから選択されるものである。

【００９０】

さらに二重特異性リガンドは腫瘍学での適用に用いることができ、この場合、特異性の一方の標的は細胞傷害性細胞によって発現されるCD89であり、もう一方は腫瘍特異的である。標的とされうる腫瘍抗原の例は補遺3に示している。

【００９１】

本発明の第2の構成の1実施形態においては、可変ドメインは、第1および/または第2の抗原またはエピトープに対する抗体由来のものである。好ましい1実施形態においては、該可変ドメインは単一可変抗体ドメインのレパートリー由来のものである。1実施形態においては、該レパートリーは動物体内で作られたものでなく、また合成レパートリーでもないレパートリーである。別の1実施形態においては、該単一可変ドメインは(少なくとも部分的には)動物を免疫することによって単離されたものではない。従って、該単一ドメインはナイーブなライブラリーから単離することができる。

【００９２】

本発明の第2の構成の別の1態様は、第1のエピトープ結合特異性を有する第1のエピトープ結合ドメイン、および第2のエピトープ結合特異性を有する非相補的な第2のエピトープ結合ドメインを含んでなる多重特異性リガンドを提供する。該第1のおよび第2の結合特異性は同一のものまたは異なるものとすることができる。

【００９３】

さらに別の1態様においては、本発明は、第1のエピトープ結合特異性を有する第1のエピトープ結合ドメイン、および第2のエピトープ結合特異性を有する非相補的な第2のエピトープ結合ドメインを含んでなる閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドであって、但しその第1および第2の結合特異性はエピトープ結合に対して競合することができ、そのため閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドが双方のエピトープと同時には結合できない前記リガンドを提供する。

【００９４】

さらに別の1態様においては、本発明は非相補的結合ドメインを含んでなる開放型コンホメーションのリガンドであって、そのドメインが同一の標的上の異なるエピトープに対して特異的であるリガンドを提供する。そのようなリガンドは、増強された結合活性によって標的と結合する。同様にして、本発明は、同一のエピトープに対して特異的であり、かつ該エピトープ、例えばIL-5、PDGF-AA、PDGF-BB、TGFβ、TGFβ2、TGFβ3、およびTNFα、例えばヒトTNF受容体1およびヒトTNFαなどを、複数のコピー含んでなる標的に向けられた非相補的結合ドメインを含んでなる、多価リガンドを提供する。

【００９５】

同様の1態様においては、本発明のリガンドは、個々のエピトープと低い親和性で結合するように設計して、個々のエピトープへの結合が治療上有意にならないようにしておき；しかし2つのエピトープとの結合によって結合活性が増強されると治療上の利益がもたらされるようにすることができる。具体例では、正常な細胞型上では個別に提示されているが、例えば腫瘍細胞などの異常なまたは病的状態の細胞のみその上に一緒に提示されているエピトープを、標的とすることができる。そのような状況では、異常なまたは病的状態の細胞は本発明の二重特異性リガンドによって効果的に標的とされる。

【００９６】

同一の標的上で同一のエピトープまたは隣接したエピトープの複数のコピーに対して特異的なリガンド(キレート化dAbとして知られている)は、非相補的結合ドメインを3個、4個、またはそれ以上含んでなる、三量体または多量体(四量体以上)のリガンドでありうる。例えば、リガンドは3個または4個のV_HドメインまたはV_Lドメインを含んでなるように構築することができる。

【００９７】

さらに、複数のサブユニットを有する標的と結合するリガンドであって、各結合ドメインが該標的の個々のサブユニットに対して特異的であるリガンドが提供される。このリガンドは二量体、三量体、または多量体であってよい。

【００９８】

好ましくは、本発明の上記の態様の多重特異性リガンドは本発明の第1の態様の方法によって得られるものである。

【００９９】

本発明の第2の構成の上記の態様では、該第1のエピトープ結合ドメインと該第2のエピトープ結合ドメインが、本明細書で定義する非相補的な免疫グロブリン可変ドメインであることが好都合である。それはV_H-V_HまたはV_L-V_L可変ドメインのどちらであっても良い。

【０１００】

キレート化dAbは、特に、本発明の好ましい1態様に従って、すなわちアンカーdAbを使用して製造することができる。その場合、リンカー配列の上流または下流の定常dAbを含むベクターを用いて、第2、第3、またはそれ以上のdAbのレパートリーをそのリンカーのもう一方の側に挿入した、二量体、三量体または多量体のdAbのライブラリーが構築される。例えば、アンカーまたはガイドdAbは、TAR1-5(V_κ)、TAR1-27(V_κ)、TAR2h-5(V_H)、またはTAR2h-6(V_κ)とすることができる。

【０１０１】

別の方法では、例えばV_HおよびV_κなどの結合ドメイン間の非共有結合性の結合または天然の親和性を用いることによって、リンカーの使用を避けることができる。従って、本発明は次のステップを含むキレート化多量体リガンドを製造する方法を提供する：

(a) 標的上の第1のエピトープに対して特異的な単一の結合ドメインをコードする核酸配列を含んでなるベクターを提供するステップ；
(b) 該標的上の第2のエピトープに対して特異的な第2の結合ドメインを含んでなるレパートリーをコードするベクターを提供するステップであって、但しそのエピトープは第1のエピトープと同一であっても異なるものであってもよく、第2のエピトープは該第1のエピトープに隣接して存在する、該ステップ；
(c) 該第1および第2の結合ドメインを発現させるステップ；および
(d) 1つに組み合わされて標的に結合する二量体を形成する第1および第2の結合ドメインの組み合わせを単離するステップ。

【０１０２】

該第1と第2のエピトープは隣接しており、そのため多量体リガンドは双方のエピトープと同時に結合できる。このことはリガンドが結合した際に結合活性が増強されるという利点をそのリガンドに提供する。該エピトープが同一のものである場合には、結合活性の増強は標的上のエピトープの複数コピーの存在によって得られ、それによって、結合活性の増強効果を得るために、少なくとも2つのコピーが同時に結合することが可能となる。

【０１０３】

該結合ドメインはいくつかの方法、およびリンカーの使用によって結合させることができる。例えば、結合ドメインは、システイン残基、アビジンおよびストレプトアビジン基、または合成後の非共有結合による付着のためのその他の手段を含んでもよい。標的に効率的に結合するような組み合わせが取り出されることとなろう。あるいはまた、リンカーを第1と第2の結合ドメイン間に存在させることもでき、それによりそれらは単一のベクターから単一のポリペプチドとして発現され、例えば、上述のとおり、第1の結合ドメイン、リンカー、および第2の結合ドメインのレパートリーを含んでなるものでありうる。

【０１０４】

好ましい1態様においては、該第1および第2の結合ドメインは抗原と結合すると自然に結合する。例えば、V_HドメインとV_κドメインは、隣接したエピトープと結合すると、三者間の相互作用で自然に結合して安定な二量体を形成する。このような結合したタンパク質は標的結合アッセイで単離することができる。この方法の利点は、それらの標的に対する結合活性が増強した結果として、非常に近接しているエピトープと正しいコンホメーションで結合する結合ドメインのみが結合し、単離されることである。

【０１０５】

本発明の第2の構成の上記の態様の別の1実施形態においては、少なくとも1つのエピトープ結合ドメインが、本明細書で定義する、非免疫グロブリン性の「タンパク質の足場」または「タンパク質骨格」を含んでなる。非免疫グロブリン性のタンパク質の足場として適切なものとしては、限定はされないが、次のものからなる群から選択される任意のものを含む：上記で説明した、SpA、フィブロネクチン、GroELおよびその他のシャペロン、リポカリン、CCTLA4、ならびにアフィボディ。

【０１０６】

本発明の第2の構成の上記の態様では、該エピトープ結合ドメインが「タンパク質骨格」に結合していることが好都合である。本発明のタンパク質骨格は免疫グロブリン骨格であることが好都合である。

【０１０７】

本発明では、「免疫グロブリン骨格」という用語は、少なくとも1つの免疫グロブリンの折り畳みを含み、本明細書で定義する1つ以上のエピトープ結合ドメインのための核としての役割を果たすタンパク質を意味する。

【０１０８】

本明細書で定義する好ましい免疫グロブリン骨格としては、下記のものから選択される任意の1つ以上のものを含む：少なくとも(i)抗体のC_L(カッパまたはラムダサブクラス)ドメイン；または(ii)抗体重鎖のC_H1ドメインを含んでなる免疫グロブリン分子；抗体重鎖のC_H1およびC_H2ドメインを含んでなる免疫グロブリン分子；抗体の重鎖のC_H1、C_H2、およ

びC$_H$3ドメインを含んでなる免疫グロブリン分子；または、抗体のC$_L$(カッパまたはラムダサブクラス)ドメインと組み合わせたサブセット(ii)のいずれか。ヒンジ領域ドメインも含めることができる。このようなドメインの組み合わせは、例えばIgGまたはIgMなどの天然の抗体の模擬体、またはFv、scFv、Fab、またはF(ab')$_2$分子などのそれらの抗体のフラグメントであってもよい。当業者であれば、このリストが網羅的であることを意図していないことが理解できよう。

【０１０９】

本明細書で定義した該骨格の該エピトープ結合ドメインとの連結は、ポリペプチドのレベルで行うことができ、それはその骨格および/またはエピトープ結合ドメインをコードする核酸の発現後に行われる。あるいはまた、その連結ステップは核酸のレベルで行うこともできる。本発明ではタンパク質骨格の1個以上の該エピトープ結合ドメインへの連結方法としては、当業者によく知られ、本明細書中に記載しているタンパク質化学および/または分子生物学的技法の使用を含む。

【０１１０】

閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドは、標的分子を結合することのできる第1のドメインおよびそのリガンドの半減期を延長する分子または基と結合することのできる第2のドメインを含んでなるものであることが好都合である。例えば、該分子または基は嵩高な物質、例えばHSAまたは細胞マトリクスタンパク質とすることができる。本明細書で用いている「リガンドの半減期を延長する分子または基」という表現は、本明細書に記載の二重特異性リガンドと結合すると、その二重特異性リガンドが動物に投与されたときに、その分子または基と結合しないリガンドと比較して、in vivoでの半減期を増大させる分子または基を意味する。リガンドの半減期を延長させる分子または基の例は後述する。好ましい1実施形態においては、閉鎖型コンホメーションの該多重特異性リガンドは、半減期を延長する分子または基が置き換わる場合にのみ標的分子と結合することができる。従って、例えば、閉鎖型コンホメーションの該多重特異性リガンドは、HSAなどの嵩高な分子によって被験者の血流中で循環しつつ維持される。標的分子が閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドと遭遇すると、そのリガンドの結合ドメイン間の競合によってHSAが外れて標的の結合がもたらされる。

【０１１１】

本発明の任意の態様でのリガンド、ならびにそのようなリガンドの構築に有用なdAb単量体は、それらの同族標的から、表面プラズモン共鳴で測定する場合にK$_d$が300nMから5pM(すなわち、3 x 10^{-7}から5 x 10-^{12})、好ましくは50nMから20pM、または5nMから200pM、または1nMから100pM、1 x 10^{-7} M以下、1 x 10^{-8} M以下、1 x 10^{-9} M以下、1 x 10^{-10} M以下、1 x 10^{-11} M以下；および/またはK$_{off}$ 速度定数が、5 x 10^{-1}から1 x 10^{-7} S^{-1}、好ましくは1 x 10^{-2}から1 x 10^{-6} S^{-1}、または5 x 10^{-3}から1 x 10^{-5} S^{-1}、または5 x 10^{-1} S^{-1}以下、または1 x 10^{-2} S^{-1}以下、または1 x 10^{-3} S^{-1}以下、または1 x 10^{-4} S^{-1}以下、または1 x 10^{-5} S^{-1}以下、または1 x 10^{-6} S^{-1}以下、で解離することが好都合である。K$_d$速度定数はK$_{off}$/K$_{on}$として定義される。

【０１１２】

特に本発明は、抗TNFα dAbの単量体(またはそのようなdAbを含んでなる二重特異性リガンド)、ホモ二量体、ヘテロ二量体、またはホモ三量体のリガンドであって、各dAbがTNFαと結合する該リガンドを提供する。このリガンドはTNFαと、表面プラズモン共鳴で測定する場合に、K$_d$が300nMから5pM(すなわち、3 x 10^{-7}から5 x 10-12)、好ましくは50nMから20pM、より好ましくは5nMから200pM、最も好ましくは1nMから100pM；別の表現方法ではK$_d$は1 x 10^{-7} M以下、好ましくは1 x 10^{-8} M以下、より好ましくは1 x 10-9 M以下、好都合なのは1 x 10-10 M以下、最も好ましくは1 x 10-11 M以下；および/またはKoff速度定数は5 x 10-1から1 x 10^{-7} S^{-1}、好ましくは1 x 10-2から1 x 10^{-6} S^{-1}、より好ましくは5 x 10^{-3}から1 x 10^{-5} S^{-1}、例えば5 x 10-1 S^{-1}以下、好ましくは1 x 10-2 S^{-1}以下、より好ましくは1 x 10^{-3} S^{-1}以下、好都合なのは1 x 10^{-4} S^{-1}以下、さらに好都合なのは1 x 10^{-5} S^{-1}以下、最も好ましいのは1 x 10^{-6} S^{-1}以下で結合する。

【０１１３】
好ましくは、標準的なL929アッセイで該リガンドはTNFαを、500nMから50pM、好ましくは100nMから50pM、好都合なのは10nMから100pM、より好ましくは1nMから100pM；例えば50nM以下、好ましくは5nM以下、好都合なのは500pM以下、より好ましくは200pM以下、最も好ましくは100pM以下のND50で、中和する。
【０１１４】
好ましくは、該リガンドは、TNFαのTNFα受容体I(p55 受容体)への結合を、500nMから50pM、好ましくは100nMから50pM、より好ましくは10nMから100pM、好都合なのは1nMから100pM；例えば50nM以下、好ましくは5nM以下、より好ましくは500pM以下、好都合なのは200pM以下、最も好ましくは100pM以下のIC50で阻害する。好ましくは、そのTNFαはヒトTNFαである。
【０１１５】
さらに本発明は、抗TNF受容体I dAb単量体、またはそのようなdAbを含んでなる二重特異性リガンドであって、TNF受容体Iと、表面プラズモン共鳴で測定する場合にK_dが300nMから5pM(すなわち、3 x 10^{-7}から5 x 10^{-12})、好ましくは50nMから20pM、より好ましくは5nMから200pM、最も好ましくは1nMから100pM、例えば1 x 10^{-7} M以下、好ましくは1 x 10^{-8} M以下、より好ましくは1 x 10^{-9} M以下、好都合なのは1 x 10^{-10} M以下、最も好ましくは1 x 10^{-11} M以下；および/またはK_{off}速度定数が5 x 10^{-1}から1 x 10^{-7} S^{-1}、好ましくは1 x 10^{-2}から1 x 10^{-6} S^{-1}、より好ましくは5 x 10^{-3}から1 x 10^{-5} S^{-1}、例えば5 x 10^{-1} S^{-1}以下、好ましくは1 x 10^{-2} S^{-1}以下、好都合なのは1 x 10^{-3} S^{-1}以下、より好ましくは1 x 10^{-4} S^{-1}以下、さらにより好ましくは1 x 10^{-5} S^{-1}以下、最も好ましいのは1 x 10^{-6} S^{-1}以下で結合するものを、提供する。
【０１１６】
好ましくは、該dAb単量体リガンドは標準的なアッセイ(例えば、本明細書に記載のL929またはHeLaアッセイ)でTNFαを、ND50が500nMから50pM、好ましくは100nMから50pM、より好ましくは10nMから100pM、好都合なのは1nMから100pMで；例えば50nM以下で、好ましくは5nM以下で、より好ましくは500pM以下で、好都合なのは200pM以下で、最も好ましくは100pM以下で、中和する。
【０１１７】
好ましくは、該dAb単量体またはリガンドは、TNFαのTNFα受容体I (p55 受容体)への結合を、500nMから50pM、好ましくは100nMから50pM、より好ましくは10nMから100pM、好都合なのは1nMから100pM；例えば50nM以下、好ましくは5nM以下、より好ましくは500pM以下、好都合なのは200pM以下、最も好ましくは100pM以下のIC50で、阻害する。好ましくはそのTNF受容体Iの標的はヒトTNFαである。
【０１１８】
さらに、本発明は血清アルブミン(SA)と、1nMから500μM(すなわち、1 x 10^{-9}から5 x 10^{-4})、好ましくは100nMから10μMのK_dで結合するdAb単量体(またはそのようなdAbを含んでなる二重特異性リガンド)を提供する。好ましくは、第1の抗SA dAbおよび別の標的に対する第2のdAbを含んでなる二重特異性リガンドについて、その第2のdAbの標的に対する親和性(例えば、表面プラズモン共鳴、例えばBiaCoreを用いて測定する場合のK_dおよび/もしくはK_{off})は、第1のdAbのSAに対する親和性の、1～100000倍(好ましくは100～100000倍、より好ましくは1000～100000倍、または10000～100000倍)である。例えば、第1のdAbはSAと約10μMの親和性で結合するが、一方第2のdAbはその標的と100pMの親和性で結合する。好ましくは、該血清アルブミンはヒト血清アルブミン(HSA)である。
【０１１９】
1実施形態においては、該第1のdAb(またはdAb単量体)はSA(例えばHSA)と、約50、好ましくは70、より好ましくは100、150、または200nMのK_dで結合する。
【０１２０】
本発明はさらに、本発明の前述の態様に従って、前述のdAb単量体の二量体、三量体、および多量体を提供する。

【０１２１】
本発明のリガンド（dAb単量体、二量体、および三量体を含む）は、C_H2およびC_H3ドメインのうちの1つまたは双方および任意でヒンジ領域を含んでなる抗体Fc領域と、連結することができる。例えば、Fc領域に連結されたリガンドを単一のヌクレオチド配列としてコードするベクターを、そのようなポリペプチドの製造のために用いることができる。
【０１２２】
本発明の第2の構成のさらに別の1態様においては、本発明は、本明細書で定義する多重特異性リガンドを少なくともコードする1つ以上の核酸分子を提供する。1実施形態においては、該リガンドは閉鎖型コンホメーションのリガンドである。別の1実施形態においては、該リガンドは開放型コンホメーションのリガンドである。該多重特異性リガンドは単一の核酸分子でコードされうる。あるいはまた、各エピトープ結合ドメインが、別々の核酸分子にコードされていてもよい。該リガンドが単一の核酸分子にコードされている場合には、該ドメインを融合ポリペプチドとして発現させるか、または別々に発現させてその後、例えば化学結合剤を用いて一緒に連結することができる。別々の核酸から発現させたリガンドは適切な手法によって一緒に連結させることとなろう。
【０１２３】
該核酸は、発現の際に該ポリペプチドを宿主細胞から輸送するためのシグナル配列をさらにコードしてもよく、線状バクテリオファージ粒子の表面成分(または選択提示システムのその他の成分)と融合させてもよい。細菌での発現および/またはファージもしくはファージミド提示に用いることのできるリーダー配列としては、pelB、stII、ompA、phoA、bla、およびpelAが挙げられる。
【０１２４】
本発明の第2の構成のさらに別の1態様においては、本発明は、本発明の核酸を含んでなるベクターを提供する。
【０１２５】
さらにまた別の1態様においては、本発明は、本発明のベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。
【０１２６】
そのようなベクターからの発現は、例えばバクテリオファージ粒子の表面上に、選択のためにエピトープ結合ドメインが産生されるように設計することができる。このことによって提示されたドメインの選択が可能となり、本発明の方法を用いた「多重特異性リガンド」の選択が可能となる。
【０１２７】
本発明の第2の構成の好ましい1実施形態においては、該エピトープ結合ドメインは免疫グロブリン可変領域であり、単一ドメインのV遺伝子レパートリーから選択されるものである。通常、単一抗体ドメインのレパートリーは線状バクテリオファージの表面に提示される。好ましい1実施形態においては、各単一抗体ドメインは、ファージレパートリーの抗原に対する結合によって選択される。
【０１２８】
本発明はさらに、開放型コンホメーションまたは閉鎖型コンホメーションのリガンドでありうる本発明の多重特異性リガンドを少なくとも含むキットを提供する。本発明のキットは、例えば、診断用キット、治療用キット、化学的または生物学的物質種の検出のためのキットなどでありうる。
【０１２９】
本発明の第2の構成のさらに別の1態様においては、本発明は、本発明のリガンドを用いた均質イムノアッセイを提供する。
【０１３０】
本発明の第2の構成のさらにまた別の1態様においては、本発明は、本発明の方法によって得られる閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド、および製薬上許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含んでなる組成物を提供する。

【０１３１】
さらに、本発明は、「閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド」または本発明の組成物を用いた、疾患の治療方法を提供する。
【０１３２】
本発明の好ましい1実施形態においては、該疾病は癌、または例えば関節リウマチ、喘息、もしくはクローン病などの炎症性疾患である。
【０１３３】
本発明の第2の構成のさらに別の1態様においては、本発明は、閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドまたは本発明の組成物を用いた疾患の診断を含む、診断方法を提供する。一般的には、アナライトの閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドへの結合を、作用物質を置換するために利用することができ、それによって置換の際にシグナルが生じる。例えば、アナライト(第2の抗原)の結合は、イムノアッセイの基礎となる抗体に結合させた酵素(第1の抗原)を、その酵素がその活性部位によりその抗体に保持されている場合には特に、置換することができた。
【０１３４】
本発明の第2の構成の最後の1態様においては、本発明は、以下を含む、標的分子の存在を検出する方法を提供する：
(a) 作用物質と結合させた閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドを提供し、但し該リガンドは該標的分子および該作用物質に対して特異的であり、該リガンドと結合させた該作用物質はそのリガンドから置換されて外れる際に検出可能なシグナルを生じるものであり；
(b) 該閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドを該標的分子に暴露し；そして
(c) 該作用物質が置換された結果として生じたシグナルを検出すること。
【０１３５】
本発明の第2の構成の上記の態様では、該作用物質が酵素であって、それが閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドに結合する際に不活性であることが好都合である。あるいはまた、該作用物質は次のものからなる群から選択される任意の1つ以上のものでありうる：酵素の基質、および該リガンドと結合すると不活性であるかまたは消光される蛍光分子、発光分子、または発色分子。
【０１３６】
本明細書で開示した配列に対して類似の、または相同な(例えば少なくとも配列の70%が同一の)配列も本発明の一部である。いくつかの実施形態においては、アミノ酸レベルでの配列の同一性は約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上とすることができる。核酸のレベルでは、配列の同一性は約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上とすることができる。あるいはまた、該核酸セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件(例えば、非常に高いストリンジェンシーを示すハイブリダイゼーション条件)下でその鎖の相補鎖に対してハイブリダイズする場合には、実質的な同一性が存在する。該核酸は、全細胞、細胞溶解物、部分精製形態、または実質的に精製された形態として存在することができる。
【０１３７】
2つの配列の間の「相同性」または「配列の同一性」または「類似性」（これらの用語は本明細書では互換的に使用される）の計算は次のとおり行われる。それらの配列は、最適比較を行う目的でアラインされる(例えば、最適なアラインメントのために第1のおよび第2のアミノ酸配列または核酸配列の一方または双方にギャップを導入することができ、相同性のない配列は比較目的では無視されうる)。好ましい1実施形態においては、比較目的でアラインされる参照配列の長さは、その参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも60%、さらにいっそう好ましくは70%、80%、90%、100%である。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列

のある位置に、第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドが存在した場合には、その分子はその位置では同一である(本明細書ではアミノ酸または核酸の「相同性」とは、アミノ酸または核酸の「同一性」と同等である)。2つの配列の間の同一性のパーセンテージは、2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要のあるギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れて、それらの配列によって共有されている同一である位置の関数として得られる。

【０１３８】

配列のアラインメントにはBLASTアルゴリズム(version 2.0)を、各パラメーターをデフォルト値にセットして行うことが好都合である。BLASTアルゴリズムについては米国政府(".gov")の国立保健研究所 ("nih")の全米バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)(".ncbi")のワールドワイドウェブサイト("www")の、"/Blast/"ディレクトリ中の"blast_help.html"ファイルに詳細に記載されている。検索パラメーターは下記のとおり定義され、定められたデフォルトのパラメーターにセットすることが好都合である。

【０１３９】

BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)は ヒューリスティック(発見的)な検索アルゴリズムで、blastp、blastn、blastx、tblastn、およびtblasxのプログラムによって用いられる。これらのプログラムは、KarlinとAltschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87(6):2264-8の統計学的方法を、いくつかの改良を加えて用いて、それらで得られた知見に統計学的意味づけを行うものである(上述の"blast help.html"を参照せよ)。BLASTプログラムは、例えばある問合せ(query)配列に対する相同性を同定するための配列類似性検索用に作成されたものである。これらのプログラムは一般的にはモチーフスタイルの検索には有用でない。配列データベースの類似性検索に関する基本的な事項についての考察はAltsculら(1994)を参照せよ。

【０１４０】

全米バイオテクノロジー情報センターのウェブサイトから利用可能な5種類のBLASTのプログラムは次のようなタスクを実行する：

"blastp"はアミノ酸の問合せ配列をタンパク質配列データベースに対して比較する；

"blastn"はヌクレオチドの問合せ配列をヌクレオチド配列データベースに対して比較する；

"blastx"は、ヌクレオチド問合せ配列(2本鎖の双方)の6通りのフレームの概念上の翻訳産物をタンパク質配列データベースに対して比較する；

"tblastn"は、タンパク質問合せ配列を、ヌクレオチド配列データベースの6通りの読み枠の全て(2本鎖の双方)を動的に翻訳したものと比較する；

"tblastx"は、ヌクレオチド問合せ配列の6通りの読み枠の翻訳を、ヌクレオチド配列データベースのヌクレオチド6通りの読み枠の翻訳と比較する。

【０１４１】

BLASTは下記の検索パラメーターを用いる。

【０１４２】

HISTOGRAMは、各検索についてそのスコアをヒストグラムとして提示する；デフォルトはyes(実施)である(BLASTマニュアル中のパラメーターHを参照せよ)。

【０１４３】

DESCRIPTIONSは、結果として報告されるマッチした配列の短い説明の数を、特定の数に制限する；デフォルトの限定数は100の説明である(マニュアルのパラメーターVのページを参照せよ)。またEXPECTおよびCUTOFFの項も参照せよ。

【０１４４】

ALIGNMENTSは、スコアの高いセグメントペア(HSP)が結果として報告される際のデータベース配列の数を特定の数に制限する；デフォルトの限定数は50である。結果として報告する際の統計学的有意性の閾値(下記のEXPECTおよびCUTOFFの項を参照せよ)を満足するデータベース配列の数がこの現定数よりも多い場合には、統計学的有意性が最も大きいマッ

チのみが結果として報告される(BLASTマニュアルのパラメーターBを参照せよ)。

【０１４５】

EXPECTは、データベース配列に対して結果が報告されるマッチの統計学的有意性の閾値である；デフォルトの値は10であり、それはKarlinとAltschul (1990)の確率論的モデルに従えば10個のマッチが単なる偶然から見出されるものと予測されることを意味する。あるマッチに対しての統計学的有意性が EXPECTの閾値よりも大きい場合には、そのマッチは結果として報告されないこととなる。EXPECTの閾値の値がより低いことはよりストリンジェントであることであり、それはマッチとして報告されることとなる機会がより少なくなることを意味する。半端な値も許容される(BLASTマニュアルのパラメーターEを参照せよ)。

【０１４６】

CUTOFFは、高スコアのセグメントペアの報告のためのスコアのカットオフを行う。デフォルトの値はEXPECTの値(上記参照)から計算される、。HSPは、あるデータベース配列についてそれらのHSPの統計学的有意性が少なくともCUTOFF値と等しいスコアの単一のHSPに帰せられる統計学的有意性の高さである場合にのみ結果として報告される。CUTOFF値がより高いことはよりストリンジェントであることであり、そのことはマッチとして報告される機会がより少なくなることを意味する(BLASTマニュアルのおあらメーターSを参照せよ)。典型的には、有意性の閾値はEXPECTを用いてより直感的に扱うことができる。

【０１４７】

MATRIXは、BLASTP、BLASTX、TBLATX、TBLASTN、およびTBLASTXについての別のスコアリングマトリクスを特定する。デフォルトのマトリクスはBLOSUM62(HeinkoffとHeinkoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89(22):10915-9)である。用いうる別の選択としては：PAM40、PAM120、PAM250、およびIDENTITYが含まれる。BLASTNについては別のスコアリングマトリクスはない；BLASTNでMATRIXの指示を特定するとエラーとなる。

【０１４８】

STRANDは、TBLASTN検索をデータベース配列のトップの鎖もしくはボトムの鎖のみに制限する；またはBLASTN、BLASTX、もしくはTBLASTX検索を問合せ配列のトップの鎖もしくはボトムの鎖上の読み枠のみに制限する。

【０１４９】

FILTERは、WoottonとFederhen(1993), Computers and Chemistry, 17:149-163のSEGプログラムで調べて決定した組成の複雑性の低い問合せ配列のセグメント、またはClaverieとStates (1993), Computers and Chemistry, 17:191-201のXNUプログラムあるいは、BLASTINでは、TatusovとLipmanのDUSTプログラムで調べて決定した短い周期性を持つ内部リピートからなるセグメントのマスクをはずす(NCBIのウェブサイトを参照せよ)。フィルタリングによって統計学的には有意であるが生物学的には対象とならない報告をblastの出力から排除して(例えば、一般的な酸性リッチ、塩基性リッチ、またはプロリンリッチの領域に対してヒットさせて)、データベース配列に対してのマッチングに用いる、問合せ配列のより生物学的に意味のある領域を残すようにすることができる。

【０１５０】

フィルタープログラムによって見出された複雑度の低い配列はヌクレオチド配列中で、文字"N"を用いて置き換え(例えば"N"が13回反復されるなど)、タンパク質配列中では文字"X"で置き換える(例えば"X"が9回反復されるなど)。

【０１５１】

フィルタリングは問合せ配列(またはその翻訳産物)にのみ適用され、データベース配列には適用されない。デフォルトのフィルタリングはBLASTNではDUSTであり、その他のプログラムではSEGである。SWISS-PROT中の配列に適用した場合には、SEG、XNU、またはその双方でマスクされるべきものが全くないこともまれなことではなく、フィルタリングが常に効果をもたらすと期待すべきではない。さらに、場合によっては、配列全体がマスクされることがあり、それはフィルタリングされていない問合せ配列に対して報告されたマッチのいずれについても、その統計学的有意性は疑うべきであることを示している。

【０１５２】
NCBI-giは、出力に登録名および/または所在地名に加えてNCBI giの識別名が示されるようにする。
【０１５３】
最も好ましくは、配列比較が上述のNCBIのウェブサイトの"/BLAST"ディレクトリ中で提供される単純なBLAST検索アルゴリズムを用いて行われることである。
【図面の簡単な説明】
【０１５４】
【図１】図1はV_H HSAの抗原結合部位に存在する、H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H96、H97、H98 (DVTまたはNNKをそれぞれコードする)の位置でのV_H/HSAの多様性を示している。V_κの配列はL50、L53の位置で多様化している。
【図２】図2は、ファージ提示/scFv構成で、ライブラリー1：生殖細胞系列 V_κ/DVT V_H、ライブラリー2：生殖細胞系列 V_κ/NNK V_H、ライブラリー3：生殖細胞系列 V_H/DVT V_κ、ライブラリー4：生殖細胞系列 V_H/NNK V_κ、を示している。これらのライブラリーは、共通リガンドであるプロテインAおよびプロテインLとの結合性についてあらかじめ選択されたものであるので、クローンの大多数と選択されたライブラリーは機能を有するものである。ライブラリーはHSA(1回目)およびβgal(2回目)に対するHSA βgal選択に基づいて、またはβgal(1回目)およびHSA(2回目)に対するβgal HSA選択に基づいて選択したものである。これらのPCRのクローンから、その配列中の可溶性scFvをPCR増幅した。二重特異性抗体 K8をコードする1つのクローンを選択してそれ以後の作業に用いた。
【図３】図3は、V_H鎖とV_κ鎖のアラインメントを示す。
【図４】図4は、K8抗体の結合特性の特性解析を示す。K8抗体の結合特性は、モノクローナルファージELISAで分析した。二重特異性K8抗体はHSAおよびβgalと結合することが見出され、また1.0を超える吸光度シグナルでファージの表面上に提示された。その他のタンパク質との交差反応性は検出されなかった。
【図５】図5は、既知濃度のK8抗体フラグメントを用いて行った可溶性scFvのELISAを示す。96ウエルのプレートを100μgのHSA、BSA、およびβgalを10μg/mLの濃度で、100μg/mlのプロテインAを1μg/mLの濃度で用いて被覆した。K8 scFvの連続希釈物50μgをアプライし、結合した抗体フラグメントをプロテイン L-HRPで検出した。ELISAの結果はK8抗体の二重特異的性質を確認するものである。
【図６】図6は、可溶性scFv ELISAを用いて分析した、クローンK8 V_κ/ダミーV_Hの結合特性を示している。可溶性scFvフラグメントの作製は、Harrisonら, Methods in Enzymol. 1996, 267:83-109に記載のとおりIPTGで誘導し、scFvを含有する上清を直接的にアッセイした。可溶性scFv ELISAは実施例1に記載したとおりに行い、結合したscFvをプロテインL-HRPで検出した。このELISAの結果はこのクローンが依然としてβgalと結合できるが、BSAとは結合できなくなったことを示した。
【図７】図7は、可変ドメインベクター1および2の配列を示す。
【図８】図8は、V_H1/V_H2多重特異性リガンドの構築に用いたC_Hベクターのマップである。
【図９】図9は、V_κ1/V_κ2多重特異性リガンドの構築に用いたV_κベクターのマップである。
【図１０】TAR1-5二量体4、TAR1-5-19二量体4、およびTAR1-5-19単量体を比較するTNF受容体アッセイを示す。
【図１１】TAR1-5二量体1～6を比較するTNF受容体アッセイを示す。二量体は全てFPLCで精製したもので、最適な二量体分子種についての結果を示している。
【図１２】異なる構成のTAR1-5 19ホモ二量体のTNF受容体アッセイを示す：3U、5U、もしくは7Uリンカーを用いたdAb-リンカー-dAb構成、Fab構成、およびシステインヒンジリンカー構成。
【図１３】ライブラリー1についてのダミーV_H配列。V_Hフレームワークの配列は生殖細胞系列の配列DP47-J_H4bに基づいたものである。NNKランダム化(N=AまたはTまたはCまたはGヌクレオチド；K=GまたはTヌクレオチド)をライブラリー1内に組み入れた位置は太字で下

線を付して示している。
【図１４】ライブラリー2についてのダミーV_H配列。V_Hフレームワークの配列は生殖細胞系列の配列DP47-J_H4bに基づいたものである。NNKランダム化(N=AまたはTまたはCまたはGヌクレオチド；K=GまたはTヌクレオチド)をライブラリー2内に組み入れた位置は太字で下線を付して示している。
【図１５】ライブラリー3についてのダミーV_κ配列。V_κフレームワークの配列は生殖細胞系列の配列DP_K9-J_K1に基づいたものである。NNKランダム化(N=AまたはTまたはCまたはGヌクレオチド；K=GまたはTヌクレオチド)をライブラリー3内に組み入れた位置は太字で下線を付して示している。
【図１６】抗MSA dAbのMSA 16およびMSA 26のヌクレオチド配列とアミノ酸配列。
【図１７－１】MSA16と26の阻害biacoreを示す。精製したdAbのMSA16とMSA26を阻害biacoreで分析してK_dを決定した。簡潔に記せば、dAbを試験して、高密度のMSAで被覆したbiacore CM5チップ上で200RUの応答が達成されるために必要なdAbの濃度を求めた。必要とされるdAbの濃度がいったん決定された後、予想されるK_d値の前後の濃度範囲のMSA抗原をあらかじめdAbと混合して一晩インキュベートした。あらかじめ混合しておいた液の各々においてMSAを被覆したbiacoreチップへのdAbの結合を、30μL/分の速い流速で測定した。
【図１７－２】MSA16と26の阻害biacoreを示す。
【図１８】注射後のMSA16の血清中濃度。dAb MSA16の血清中の半減期をマウスで測定した。MSA16をCD1マウスに約1.5 mg/kg、単回静脈内注射で投与した。2コンパートメントモデルを用いたモデル化では、MSA16について、t1/2αが0.98時間、t1/2βが36.5時間で、AUCが913 hr・mg/mLであったことが示された。MSA16は、t1/2αが0.06時間でt1/2βが0.34時間であるHEL4(抗ニワトリ卵白リゾチームdAb)と比べると、かなり長い半減期を有している。
【図１９】ELISA(a)とTNF受容体アッセイ(c)は、MSA26CkとTAR1-5-19CHを含んでなるFab様フラグメントによるTNF結合の阻害を示している。Fab様フラグメントとともにに MSAを添加すると阻害レベルが低下する。1μg/mLのTNFαで被覆したELISAプレートを、二重特異性$V_\kappa C_H$および$V_\kappa C_\kappa$ Fab様フラグメントにより、そして対照のTNFα結合性dAbにより、それらがELISA上で類似のシグナルを与えるものと計算された濃度で、プローブした。二重特異性のおよび対照のdAbの双方を2 mg/mLのMSAの存在下および不在下でELISAプレートをプローブするのに用いた。二重特異性のウェルのシグナルは50%を超えて低減したが、dAbのウェルのシグナルは全く低減しなかった(図19a参照)。これと同じ二重特異性タンパク質を、MSAを用いる受容体アッセイそして用いない受容体アッセイにかけたところ、MSAによる競合が示された(図19c参照)。これはMSAの二重特異性物への結合はTNFαへの結合と競合的であることを示している。
【図２０】TAR1-5-19 dAbとMSA16 dAbがジスルフィド結合したヘテロ二量体によるTNF結合の阻害を示すTNF受容体アッセイ。その二量体とともにMSAを添加すると、阻害レベルを用量依存的に低下させる。このTNF受容体アッセイ(図19(b))は、一定濃度のヘテロ二量体(18nM)とMSAおよびHSAの希釈系列の存在下で行った。広範な濃度(2 mg/mLまで)のHSAの存在は二量体がTNFαを阻害する能力を低下させることができなかった。しかし、MSAの添加は、二量体のTNFα阻害能の低下を用量依存的に生じさせた(図19a)。これは、MSAとTNFαが、システインで結合されたTAR1-5-19、MSA16の二量体との結合に対して競合することを示している。このアッセイでは、MSAとHSAは単独ではTNF結合レベルに対して影響を及ぼさない。
【発明を実施するための形態】
【０１５５】
本発明の詳細な説明
定義
相補的　2つの免疫グロブリンドメインがそれらが同族の対または群を形成する構造ファミリーに属しているか、またはそのようなファミリーに由来しその特徴を維持している場合には、それらは「相補的」である。例えば、ある抗体の1つのV_Hドメインと1つのV_Lド

メインは相補的であるが、2つのV_Hドメイン同士は相補的ではなく、2つのV_Lドメイン同士は相補的でない。相補的なドメインは免疫グロブリンスーパーファミリーのその他のメンバーにも見出すことができ、それは例えばT細胞受容体のV_αおよびV_β(またはγとδ)ドメインなどである。本発明の第2の構成の内容では、非相補的ドメインは標的分子と協動的に結合せず、同一のまたは異なる分子上に存在しうる異なる標的エピトープに対して独立に作用する。人工的なドメイン、例えば特に操作しない限りはエピトープとは結合しない、タンパク質足場に基づくドメインなどは、非相補的である。同様に、(例えば)免疫グロブリンドメインおよびフィブロネクチンドメインに基づく2つのドメインは相補的でない。

【０１５６】

免疫グロブリン　これは抗体分子に特徴的な免疫グロブリンの折り畳み構造を保持しているポリペプチドのファミリーを意味し、2つのβシートと、通常は、保存されたジスルフィド結合を含んでいる。免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーはin vivoの細胞性および非細胞性相互作用の多数の様相に関与しており、そのようなものとしては、免疫系の広範な役割(例えば、抗体、T細胞受容体分子など)、細胞接着への関与(例えば、ICAM分子)、ならびに細胞内シグナル伝達(例えば、PDGF受容体などの受容体分子)が含まれる。本発明は、結合ドメインを有する免疫グロブリンスーパーファミリーの全ての分子に応用可能である。好ましくは、本発明は抗体に関する。

【０１５７】

組み合わせ　本発明の可変ドメインは組み合わせてドメインの群を形成する。例えば、相補的ドメインは組み合わせることができ、例えば、V_LドメインはV_Hドメインと組み合わせることができる。非相補的ドメインも組み合わせることができる。ドメインは多数の方法で組み合わせることができ、そのような方法としては共有または非共有結合的手段によるドメインの連結が含まれる。

【０１５８】

ドメイン　ドメインとは折り畳まれたタンパク質構造であって、そのタンパク質の残りの部分とは独立にその三次構造を保持しているものである。通常は、ドメインはタンパク質の独立した機能的性質を担っており、多くの場合、そのタンパク質の残りの部分および/またはそのドメインの機能を失うことなく、付加、除去、または他のタンパク質に導入することができる。単一抗体可変ドメインとは、抗体の可変ドメインの配列に特徴的な配列を含んでなる折り畳まれたポリペプチドドメインを意味する。従ってそれには完全な抗体可変ドメイン、および改変された可変ドメイン、例えば1つ以上のループが抗体可変ドメインに特徴的でない配列によって置換されたもの、または末端を切断されたかもしくはN末端やC末端が伸長された抗体可変ドメイン、ならびに完全長のドメインの結合活性と特異性を少なくとも部分的には保持している可変ドメインの折り畳まれた断片が含まれる。

【０１５９】

レパートリー　一次配列が異なる多様な変異型、例えばポリペプチド変異型のコレクション。本発明で用いられるライブラリーは、少なくとも1000個のメンバーを含むポリペプチドのレパートリーを含む。

【０１６０】

ライブラリー　ライブラリーという用語は、ポリペプチドまたは核酸の不均質な混合物を意味する。ライブラリーは、その各々が単一のポリペプチド配列または核酸配列を有している複数のメンバーからなる。その限りにおいては、ライブラリーはレパートリーの同義語である。ライブラリーのメンバー間の配列の相違によって、そのライブラリーに存在する多様性がもたらされている。ライブラリーはポリペプチドまたは核酸の単純な混合物の形態をとってもよく、または、例えば、核酸のライブラリーで形質転換した細菌、ウイルス、動物もしくは植物細胞などの、生物体もしくは細胞の形態であってもよい。好ましくは、個々の生物体または細胞の各々が、ライブラリーの1つまたは限定された数のメンバーを含んでいる。核酸はそれによってコードされているポリペプチドが発現されうるように、発現ベクター中に組み込まれていることが好都合である。従って、好ましい1態様

においては、ライブラリーは宿主細胞の集団の形態をとることができ、その生物体の各々が、そのライブラリーの単一のメンバーを核酸の形態で含んでいる発現ベクターを1コピー以上含んでおり、そのメンバーは発現されてそれに対応するポリペプチドのメンバーを産生することができるものである。従って、その宿主生物の集団は遺伝的に多様なポリペプチド変異型の大きなレパートリーをコードする可能性を有する。

【０１６１】

「閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド」という表現は、本明細書で定義するエピトープ結合ドメインを少なくとも2つ含んでなる、本明細書で定義する多重特異性リガンドについて述べたものである。「閉鎖型コンホメーション」(多重特異性リガンド)という用語は、該リガンドのエピトープ結合ドメインが、1つのエピトープ結合ドメインによるエピトープとの結合が別のエピトープ結合ドメインによるエピトープとの結合に対して競合するように配置されていることを意味する。すなわち、同族エピトープに、各エピトープ結合ドメインは、同時にではなく独立して結合しうる。該リガンドの閉鎖型コンホメーションは本明細書に記載の方法を用いて得ることができる。

【０１６２】

抗体　抗体(例えば、IgG、IgM、IgA、IgD、もしくはIgE)、またはフラグメント(例えば、Fab、$F(ab')_2$、Fv、ジスルフィド結合したFv、scFv、閉鎖型コンホメーションの多重特異性抗体、ジスルフィド結合したscFv、ダイアボディ)。それらは天然に抗体を産生するいかなる生物種由来のものでも良く、または組換えDNA技術で作製されたものでもよい。それらは、血清、B細胞、ハイブリドーマ、トランスフェクト細胞、酵母、または細菌から単離されるものでもよい。

【０１６３】

二重特異性リガンド　本明細書で定義するように、第1の免疫グロブリン単一可変ドメインと第2の免疫グロブリン単一可変ドメインとを含んでなるリガンドであって、該可変領域が、通常は単一特異性の免疫グロブリンによっては結合されない2つの異なる抗原または同一の抗原上にある2つのエピトープと結合することができるものである、該リガンド。例えば、その2つのエピトープは同一のハプテン上に存在するものであってよいが、それらは同一のエピトープではなく、単一特異性リガンドが結合するのに十分な程度に隣接しているものでもない。本発明の二重特異性リガンドは、異なる特異性を有する複数の可変ドメインから構成されており、同一の特異性を有する互いに相補的な可変ドメインの対を含まない。

【０１６４】

抗原　本発明のリガンドと結合する分子。典型的には、抗原は抗体リガンドに結合し、in vivoで抗体応答を生じさせることができる。抗原は、ポリペプチド、タンパク質、核酸、またはその他の分子でありうる。通常は、本発明の二重特異性リガンドは、特定の抗原に対する標的特異性について選択される。従来の抗体およびそのフラグメントの場合には、可変ループ(L1、L2、L3、およびH1、H2、H3)によって定められる抗体結合部位が、抗原と結合することができる。

【０１６５】

エピトープ　免疫グロブリンのV_H/V_L対と従来の方法で結合する構造単位。エピトープは抗体に対する最小結合部位を規定し、抗体の特異性の標的となる。単一ドメイン抗体の場合には、エピトープは単離された可変ドメインによって結合される構造単位である。

【０１６６】

共通リガンド　あるレパートリーの全てのメンバーと結合するリガンド。通常は、上記で定義した抗原結合部位を介しての結合ではない。非限定的な例としては、プロテインA、プロテインL、およびプロテインGが含まれる。

【０１６７】

選択　スクリーニングによって得られる、またはダーウィンの自然選択過程によって得られることを言い、結合の相互作用が、あるドメインと抗原またはエピトープとの間、またはある抗体とある抗原またはエピトープとの間で起こる。第1の可変ドメインは、相補

的可変ドメインの存在下または不在下での抗原またはエピトープへの結合により選択することができる。

【０１６８】

ユニバーサルフレームワーク　Kabat(「免疫学の対象となるタンパク質の配列」"Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services)によって定義されているような配列が保存された抗体の領域に対応するか、またはChothiaとLesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917によって定義されているヒト生殖細胞系列免疫グロブリンレパートリーもしくは構造に対応する、単一抗体フレームワーク配列。本発明は、単一のフレームワーク、またはそのようなフレームワークのセットの使用を提供し、それは、超可変領域のみでの変異により事実上全ての結合特異性を誘導できることが見出されているものである。

【０１６９】

半減期　例えば、自然のメカニズムによるリガンドの分解、および/またはリガンドのクリアランスもしくは錯形成(sequestration)によって、in vivoで該リガンドの血清中濃度が50%低減するのに要する時間。本発明のリガンドはin vivoで安定化され、その半減期は、分解および/またはクリアランスもしくは錯形成に耐性を有する分子との結合によって延長される。典型的には、そのような分子は、それ自体がin vivoでの長い半減期を有している天然のタンパク質である。リガンドの半減期は、そのリガンドの機能的活性が、半減期を延長するその分子に対して特異性を有しない類似のリガンドよりも、in vivoでより長い持間保持される場合には、延長されている。従って、HSAおよび標的分子に特異的なリガンドを、HSAに対する特異性がないのでHSAとは結合しないが別の分子とは結合する同種のリガンドと比較する。例えば、そのリガンドは該標的分子上の第2のエピトープと結合することができる。典型的には、半減期は10%、20%、30%、40%、50%、またはそれ以上延長される。半減期の2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、またはそれ以上の範囲の延長が可能である。あるいはまた、もしくはさらに、半減期の30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、までの範囲の延長が可能である。

【０１７０】

均質イムノアッセイ　結合した試薬と非結合試薬とを分離するステップを必要とせずに、アナライトを検出するイムノアッセイ。

【０１７１】

実質的に同一(または「実質的に相同」)　第2のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列に対して同一または等価な(例えば、類似の側鎖を有している、例えば、保存されたアミノ酸置換)アミノ酸残基またはヌクレオチドを十分な個数含んでおり、それによりその第1および第2のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列が類似の活性を有している第1のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列。抗体の場合には、第2の抗体は同一の結合特異性を有し、第1の抗体の親和性の少なくとも50%を有する。

【０１７２】

「低ストリンジェンシー」、「中等度のストリンジェンシー」、「高ストリンジェンシー」、または「非常に高いストリンジェンシーを示す条件」という本明細書で用いている用語は、核酸のハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を説明するものである。ハイブリダイゼーション反応を行うための手引きは、「分子生物学の最新プロトコール」"Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6(これはその全体を本明細書中に参照により組み入れる)に見出すことができる。この参考文献には水性および非水性の方法が述べられており、どちらも用いることができる。本明細書で言及する特定のハイブリダイゼーション条件は次のとおりである：(1)6X塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中で約45℃とした後、0.2X SSC、0.1% SDSで少なくとも50℃で洗う、低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件(低ストリンジェンシー条件では洗浄の温度を55℃まで上げることができる)；(2)6X SSC中で約45℃とした後、0.2X SSC、0.1% SDSで60℃で1回以上洗う、中等度ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件；(3)6X SSC中で約45℃とした後、0.2X SSC、0.1% SDSで65℃で1回以上洗う、高

ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件；および好ましくは(4)0.5M リン酸ナトリウム、7% SDSで65℃とした後、0.2X SSC、1% SDSで65℃で1回以上洗う、非常に高いストリンジェンシーを示す条件。非常に高いストリンジェンシーを示す条件(4)は好ましい条件であり、特に断らない限りは、この条件を用いるべきである。

【０１７３】

発明の詳細な説明

特に断って別に定義しない限りは、本明細書中で用いている技術用語および科学用語は、当業界(例えば、細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、ハイブリダイゼーション技法、および生化学)の当業者であれば一般的に理解しているものと同じ意味を有する。分子遺伝学および分子生化学的方法(Sambrookら，「分子クローニング、実験室マニュアル」"Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 第2版, (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.およびAusbelら，「分子生物学での簡潔なプロトコール」"Short Protocols in Molecular Biology", 第4版, John Wiley & Sons, Inc.を参照。これらは本明細書中に参照により組み入れる)、ならびに化学的方法には標準的な技術が用いられる。

【０１７４】

免疫グロブリンに基づく多重特異性リガンドの製造

本発明の二重特異性リガンドは、本発明の望ましい構造に従って、開放型または閉鎖型コンホメーションにかかわらず、抗体工学の分野でscFv、「ファージ」抗体、およびその他の操作された抗体分子の製造に用いられている既に確立された技術に従って製造することができる。抗体、特に二重特異性抗体の製造のための技術については、例えば、次の総説およびその中で引用されている文献中に述べられている：WinterとMilstein, (1991), Nature 349:293-299; Plueckthun, (1992), Immunological ReviewS^{-1}30:151-188; Wright ら, (1992), Crti. Rev. Immunol. 12:125-168; Holliger, P.とWinter, G., (1993), Curr. Op. Biotechn., 4:446-449; Carterら, (1995), J. Hematother., 4:463-470; Chester, K. A.とHawkins, R. E., (1995), Trends Biotechn., 13:294-300; Hoogenboom, H. R., (1997), Nature Biotechnol., 15:125-126; Fearon, D., (1997), Nature Biotechnol., 15:618-619; Pluckthun, A.とPack, P., (1997), Immunotechnology 3:83-105; Carter, P.とMerchant, A. M., (1997), Curr. Opin. Biotechnol., 8:449-454; Holliger, P.とWinter, G., (1997), Cancer Immunol. Immunother., 45:128-130。

【０１７５】

本発明は2つの異なる抗原またはエピトープに対する可変ドメインの選択、およびその後のそれらの可変ドメインの組み合わせを提供する。

【０１７６】

該可変ドメインの選択に用いられる技術は、当業界で既知のライブラリーおよび選択法を用いたものである。ヒトB細胞から得た再構成されたV遺伝子を用いる天然ライブラリー(Marksら, (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Vaughanら, (1996), Nature Biotech., 14:309)は、当業者にはよく知られている。合成ライブラリー(HoogenboomとWinter, (1992), J. Mol. Biol., 227:381; Barbasら, (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457; Nissimら, (1994), EMBO J., 13:692; Griffithsら, (1994), EMBO J, 13:3245; De Kruifら, (1995), J. Mol. Biol., 248:97)は、通常はPCRを用いて、免疫グロブリンV遺伝子のクローニングによって調製される。PCRプロセスでのエラーによって高度なランダム化を得ることができる。V_Hおよび/またはV_Lライブラリーは標的の抗原またはエピトープに対して別々に選択することができ、そのような場合には、単一ドメイン結合が直接的に選択されるか、または一緒に選択される。

【０１７７】

本発明の二重特異性リガンドを作製する好ましい方法では、可変ドメインのレパートリーを第1の抗原またはエピトープとの結合により選択し、可変ドメインのレパートリーを第2の抗原またはエピトープとの結合により選択することを特徴とする選択系を用いることを含む。その後、選択された多様な第1および第2の可変ドメインは組み合わされて、第

1と第2の抗原またはエピトープの双方との結合について二重特異性リガンドが選択される。閉鎖型コンホメーションのリガンドは第1のおよび第2の抗原またはエピトープの双方と単離された状態では起こるが同時には起こらない結合によって選択される。

【０１７８】

A.　ライブラリーベクター系

当業界では本発明での使用に適した様々な選択系が知られている。そのような系の例を下記に示す。

【０１７９】

バクテリオファージλ発現系は、バクテリオファージプラークとして、または溶原菌のコロニーとして直接的にスクリーニングすることができ、これらは双方とも既に報告されており(Huseら, (1989), Science, 246:1275; Caton とKoprowski, (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87; Mullinaxら, (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87:8095; Perssonら, (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88:2432)、本発明に有用である。このような発現系は1ライブラリーの10^6までの異なるメンバーをスクリーニングするために用いることができ、それより多い数(10^6個のメンバーより多い)のスクリーニングには、実際には適していない。

【０１８０】

ライブラリーの構築に特に有用なのは選択提示系であり、その系は核酸をそれが発現するポリペプチドと連結されたものとすることができる。本明細書で用いている、選択提示系は、適切な提示法によって、汎用および/または標的リガンドを結合することによってライブラリーの個々のメンバーを選択できる系である。

【０１８１】

大きなライブラリーから所望のメンバーを単離するための選択プロトコールは、ファージディスプレイ技法として当業界では知られている。多様なペプチド配列が線状バクテリオファージの表面上に提示されている(ScottとSmith, (1990), Science, 249:386)そのような系が、標的と結合する特異的抗体フラグメントのin vitroでの選択および増幅のために、抗体フラグメント(およびそれらのフラグメントをコードするヌクレオチド配列)のライブラリーを作るために有用であることが示されている(McCaffertyら, WO 92/01047)。V_HおよびV_L領域をコードするヌクレオチド配列は遺伝しフラグメントと連結され、その遺伝子フラグメントはそれらのヌクレオチド配列を大腸菌(E.coli)の周辺質へと方向を示すリーダー配列をコードするものであり、その結果、得られた抗体フラグメントはバクテリオファージの表面上に、典型的にはバクテリオファージ被覆タンパク質(例えば、pIIIまたはpVIII)との融合体として、提示される。あるいはまた、抗体フラグメントはλファージカプシド上で外部に提示される(ファージボディー)。ファージをベースとした提示系の利点は、その系が生物の系であるので、選択されたライブラリーのメンバーは、その選択されたライブラリーのメンバーを含んでいるファージを細菌の細胞中で単に増殖させるのみで増幅することができることである。さらに、該ポリペプチドライブラリーメンバーをコードするヌクレオチド配列はファージまたはファージミドベクター上にあるので、配列分析、発現、およびその後の遺伝子的操作は比較的簡単である。

【０１８２】

バクテリオファージ抗体提示ライブラリーおよびλファージ発現ライブラリーの構築方法は当業界ではよく知られている(McCaffertyら, (1990), Nature, 348:552; Kangら, (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88:4363; Clacksonら, (1991), Nature, 352:624; Lowmanら, (1991), Biochemistry, 30:10832; Burtonら, (1991), Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 88:10134; Hoogenboomら, (1991), Nucleic Acids ReS^{-1}9:4133; Changら, (1991), J. Immunol., 147:3610; Breitlingら, (1991), Gene, 104:147; Marksら, (1991), 上述の文献; Barbasら, (1992), 上述の文献; HawkinsとWinter, (1992), J. Immunol., 22:867; Marksら, (1992), J. Biol. Chem., 267:16007; Lernerら, (1992), Science, 258:1313、これらは本明細書中に参照により組み入れる)。

【０１８３】

特に有利な1つの方法は、scFvファージライブラリーの使用である(Hustonら, (1988), Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 85:5879-5883; Chaudharyら, (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:106610-70; McCaffertyら, (1990), 上述の文献; Clacksonら, (1991), Nature, 352:624; Marksら, (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Chiswellら, (1992), Trends Biotech., 10-80; Marksら, (1992) J. Biol. Chem., 267)。バクテリオファージの被覆タンパク質上に提示されたscFvライブラリーの種々の実施形態が報告されている。ファージ提示アプローチの改良も、例えば、WO 96/06213およびWO 92/01047 (Medical Research Council他)ならびにWO 97/08320(Morphosys)中に述べられており、これらは本明細書中に参照により組み入れる。

【０１８４】

ポリペプチドのライブラリーを生成するその他の系では、ライブラリーのメンバーのin vitroでの合成のための無細胞酵素法の使用を伴う。1つの方法においては、標的リガンドに対する選択の別のラウンドとPCR増幅によってRNA分子が選択される(TuerkとGold, (1990), Science, 249:505; EllingtonとSzostak, (1990), Nature, 346:818)。類似の技法を、あらかじめ定められたヒト転写因子を結合するDNA配列を同定するために用いることができる(ThiesenとBach, (1990), Nucleic Acids ReS-18:3203; BeaudryとJoyce, (1992), Science, 257:635; WO 92/05258およびWO 92/14843)。通常は安定化ポリソーム複合体を含んでなるこれらの方法については、さらにWO 88/08453、WO 90/05785、WO 90/07003、WO 91/02076、WO 910-5058、およびWO 92/02536に述べられている。ファージに基づかない別の提示系、例えばWO 95/22625およびWO 95/11922(Affymax)では、選択のためのポリペプチドの提示にポリソームを用いている。

【０１８５】

さらに別のカテゴリーの技法としては、人工的コンパートメント中でのレパートリーの選択が含まれ、それによって遺伝子をそれの産物と連結することができる。例えば、所望の遺伝子産物をコードする核酸を油中水型乳剤によって形成されるマイクロカプセル中で選択することができる選択系が、WO 99/02671、WO 00/40712、およびTawfikとGriffiths, (1998), Nature Biotechnol., 16(7):652-6中に述べられている。所望の活性を有する遺伝子産物をコードする遺伝的エレメントをマイクロカプセル中にコンパートメント化し、次いで、転写および/または翻訳して、それらそれぞれの遺伝子産物(RNAまたはタンパク質)をそのマイクロカプセル中に産生させる。その後、所望の活性を有する遺伝子産物を産生する遺伝的エレメントをソートする。このアプローチでは、所望の活性を種々の手段で検出することによって対象の遺伝子産物を選択する。

【０１８６】

B. ライブラリーの構築

選択のために用いることを意図したライブラリーは、当業界では既知の技法を用いて構築することができ、例えば、上記で示したように、または、市販のものを購入することができる。本発明で有用なライブラリーについては、例えば、WO 99/20749に述べられている。ベクター系を選択し、対象のポリペプチドをコードする1種以上の核酸配列をクローン化すれば、発現前に突然変異誘発を行うことによってそのクローン化した分子内に多様性を生じさせることができる。あるいはまた、コードされたタンパク質は、上述のとおり、突然変異誘発の前に発現させ選択することができ、さらにもう1ラウンドの選択を行うことができる。構造的に最適化されたポリペプチドをコードしている核酸配列の突然変異誘発は標準的な分子的方法で行われる。特に有用なのは、ポリメラーゼ連鎖反応、すなわちPCRである(MullisとFaloona, (1987), Methods Enzymol., 155:335、これは本明細書中に参照により組み入れる)。PCRは熱安定性でDNA依存性のDNAポリメラーゼによって触媒される多数回のサイクルのDNA複製を用いて対象の標的配列を増幅するものであるが、当業界ではよく知られている。種々の抗体ライブラリーの構築については、Winterら, (1994), Ann. Rev. Immunology, 12:433-55およびその論文中で引用されている参照文献中で論じられている。

【０１８７】

PCRは鋳型DNA(少なくとも1 fg；より有用なのは1-1000 ng)と少なくとも25 ピコモルのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行われる。プライマーのプールが非常に不均質の場合には、各配列がそのプールの分子の小さな部分しか代表しないので、より多量のプライマーを用いることがおそらく好都合であり、増幅サイクルのより後半ではその量は限定されるようになる。典型的な反応混液には：2μLのDNA、25ピコモルのオリゴヌクレオチドプライマー、25μLの10X PCRバッファー1 (Perkin-Elmer, Foster City, CA)、0.4μLの1.25μM dNTP、0.15μL(または2.5ユニット)のTaq DNAポリメラーゼ(Perkin-Elmer, Foster City, CA)、および脱イオン水を加えて全量を25μLとする。鉱油を重層してプログラム可能な熱サイクラーを用いてPCRを行う。PCRサイクルの各ステップの長さと温度、ならびにサイクル数は実際に必要とされるストリンジェンシーに従って調節する。アニーリング温度とタイミングはプライマーが鋳型に対してアニールすることが期待される効率、および許容されるミスマッチの度合いの双方によって定められる。核酸分子が同時に増幅と突然変異誘発されると、合成の少なくとも最初のラウンドではミスマッチが避けられない。プライマーアニーリング条件のストリンジェンシーを最適化することは当業者であれば承知している。30℃から72℃の間のアニーリング温度が用いられる。鋳型分子の最初の変性は通常は92℃から99℃の間の温度で4分間かけて行われ、その後、変性(94-99℃15秒から1分間)、アニーリング(上述のとおり定めた温度；1-2分間)、および鎖の伸長(72℃1-5分間、増幅された産物の長さによって変わる)からなるサイクルを20-40サイクル行う。最終回の伸長は通常は72℃で4分間、およびその後に4℃で不定の(0-24時間)ステップを行うことができる。

【０１８８】

C. 単一可変ドメインの組み合わせ

本発明で有用なドメインは、選択した後は、共有結合および非共有結合による手法を含む当業界で既知の種々の方法で組み合わせることができる。

【０１８９】

好ましい方法としては、例えばscFv分子に関して報告されているような(Birdら, (1988), Science, 242:423-426)、ポリペプチドリンカーの使用が含まれる。適切なリンカーについてはBirdら, Science, 242:423-426; Hudsonら, Journal Immunol. Methods, 231 (1999):177-189; Hudsonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883で論じられている。リンカーは好ましくはフレキシブルであって、2つの単一ドメインが相互作用できるようにする。リンカーの1例は$(Gly_4Ser)_n$リンカー［式中、n=l～8、例えば、2、3、4、5、または7］である。ダイアボディで用いられるリンカーも、フレキシビリティはより低いが、用いることができる(Hollingerら, (1993), PNAS(USA), 90:6444-6448)。

【０１９０】

1実施形態においては、用いられるリンカーは免疫グロブリンヒンジ領域ではない。

【０１９１】

可変ドメインはリンカー以外の方法を用いて組み合わせることができる。例えば、天然のまたは操作されたシステイン残基を通じて提供されるジスルフィド架橋の使用は、V_H-V_H、V_L-V_L、またはV_H-V_L二量体を安定化するために(Reiterら, (1994), Protein Eng., 7:697-704)用いることができ、または、可変ドメイン間の境界面を再モデル化することによってその「適合性」を改良しそれによって相互作用の安定性を改善するために用いることができる(Ridgewayら, (1996), Protein Eng., 7:617-621; Zhuら, (1997), Protein Science, 6:781-788)。

【０１９２】

免疫グロブリンの可変ドメイン、特に抗体V_Hドメインを結合させ、または安定化するためのその他の方法も適宜用いることができる。

【０１９３】

本発明では、二重特異性リガンドは溶液中で「閉鎖型」コンホメーションの状態とすることができる。「閉鎖型」コンホメーションとは、その中で2つのドメイン(例えばV_HおよびV_L)が結合形態で、例えば抗体結合部位を形成している結合したV_H-V_L対などの形態で存

在するものである。例えば、scFvはV_HとV_Lドメインを連結するのに用いられるリンカーの配置に依存して、閉鎖型コンホメーションをとりうる。もしこのリンカーが、ドメインが結合しうる程度に十分に柔軟（フレキシブル）であるか、または結合位置においてそれらを硬く保持している場合には、それらのドメインは閉鎖型コンホメーションに適合することとなろう。

【０１９４】

同様に、V_Hドメインの対、およびV_Lドメインの対は閉鎖型コンホメーションで存在しうる。一般的には、このことは該リガンド分子中のドメインの近接した結合、例えば硬いリンカーによるその結合によるものでありうる。閉鎖型コンホメーションをとるリガンドは、リガンドの半減期を延長させる分子と第2の標的分子の双方を結合することはできない。従って、該リガンドは通常は、そのリガンドの半減期を延長する分子から解離するときにだけ第2の標的分子に結合する。

【０１９５】

さらに、リンカーを用いずにV_H/V_H、V_L/V_L、またはV_H/V_L二量体を構築すると、ドメイン間の競合がもたらされる。

【０１９６】

本発明のリガンドはさらに、開放型コンホメーションをとってもよい。そのようなコンホメーションでは、該リガンドは、そのリガンドの半減期を延長する分子と第2の標的分子との双方に同時に結合することができる。典型的には、開放型コンホメーションをとる可変ドメインは、(V_H-V_L対の場合には)それらのドメインが相互作用しないように十分に離して保持されて、抗体結合部位を形成しており、それらのそれぞれのエピトープとの結合については競合しない。V_H/V_HまたはV_L/V_L二量体の場合には、それらのドメインは硬いリンカーで1つにはされない。自然な状態では、このようなドメインの対形成は抗原との結合について競合せず、または抗体結合部位を形成する。

【０１９７】

開放型および閉鎖型の二重特異性リガンドは種々の環境下で様々な平衡状態で存在するものと考えられるが、Fabフラグメントおよび全抗体は大部分が閉鎖型コンホメーションの形で存在することとなろう。リガンドの標的との結合は、おそらく平衡のバランスを開放型コンホメーションの側へとシフトさせる。従って、本発明のある種のリガンドは、溶液中で2種類のコンホメーションで存在することができ、それらのうちの一方(開放型)は2つの抗原またはエピトープと独立して結合することができ、もう一方のコンホメーション(閉鎖型)は1つの抗原またはエピトープとのみ結合できる。このコンホメーションでは抗原またはエピトープはリガンドへの結合について競合する。

【０１９８】

二重特異性リガンドの開放型は溶液中で閉鎖型と平衡状態で存在することはできるが、その平衡は閉鎖型の側に傾くものと考えられる。さらに、開放型は標的結合により閉鎖型コンホメーションへと錯形成される。従って、好ましくは、本発明のある種の二重特異性リガンドは、2種類の(開放型および閉鎖型)コンホメーションの間の平衡状態で存在する。

【０１９９】

本発明の二重特異性リガンドは、開放型または閉鎖型コンホメーションのいずれかに傾くように改変することができる。例えば、ジスルフィド結合によるV_H-V_L相互作用の安定化は、閉鎖型コンホメーションを安定化する。さらに、V_HドメインとV_Lドメインの対を含め、ドメイン間を連結するリンカーを、開放型に傾くように構築することができる。例えば、そのようなリンカーはそれらのドメイン間の結合を、例えば適切な位置に大きなアミノ酸残基を組み入れるか、またはそれらのドメインを物理的に隔てておくような適切な硬い構造を設計することによって、立体的に妨げることができるであろう。

【０２００】

D.　二重特異性リガンドの特性分析

二重特異性リガンドの特異的抗原またはエピトープとの結合は、ELISAを含む当業者に

はよく知られた方法で試験することができる。本発明の好ましい1実施形態においては、結合はモノクローナルファージELISAを用いて試験される。

【０２０１】

ファージELISAは適切な任意の方法に従って行うことができる。代表的なプロトコールは下記に示す。

【０２０２】

各ラウンドの選択で作製されるファージ集団を、ELISAによって、選択された抗原またはエピトープに対する結合性について選択して、「ポリクローナルな」ファージ抗体を同定することができる。次いで、それらの集団からの単一感染細菌コロニーから得たファージをELISAによってスクリーニングして「モノクローナルな」ファージ抗体を同定することができる。また、可溶性抗体フラグメントを、抗原またはエピトープとの結合についてスクリーニングすることが望ましく、これは、例えばC末端またはN末端タグに対する試薬を用いて、ELISAによって行うことができる(例えば、Winterら, (1994), Ann. Rev. Immunology, 12:433-55およびその論文中に引用されている文献を参照せよ)。

【０２０３】

選択されたファージモノクローナル抗体の多様性もまた、PCR産物のゲル電気泳動(Marksら, (1991), 上述の文献; Nissimら, (1994), 上述の文献)、プロービング(Tomlinsonら, (1992), J. Mol. Biol., 227:776)またはベクターDNAの配列決定によって、評価することができる。

【０２０４】

E. 「二重特異性リガンド」の構造

上述のとおり、抗体は、本明細書では、少なくとも1個の重鎖可変ドメインと1個の軽鎖可変ドメイン、少なくとも2個の重鎖可変ドメイン、もしくは少なくとも2個の軽鎖可変ドメインを含んでなる、抗体(例えば、IgG、IgM、IgA、IgD、IgE)またはフラグメント(Fab、Fv、ジスルフィド結合したFv、scFv、ダイアボディ)と定義される。それは少なくとも部分的には、天然に抗体を産生する生物種由来のものであるか、または組換えDNA技術で作製されたものであってよい。それは、血清、B細胞、ハイブリドーマ、トランスフェクト細胞、酵母、または細菌から単離されたものであってよい。

【０２０５】

本発明の好ましい1実施形態においては、二重特異性リガンドは、抗体の1つの単一重鎖可変ドメインと抗体の1つの単一軽鎖可変ドメインを少なくとも含んでなるか、または2つの単一重鎖(または軽鎖)可変ドメインを含んでなる。例えば、該リガンドはV_H/V_L対、V_Hドメイン対、またはV_Lドメイン対を含んでもよい。

【０２０６】

そのようなリガンドの第1のおよび第2の可変ドメインは同一のポリペプチド鎖上に存在することができる。あるいはまた、それらのドメインは別々のポリペプチド鎖上に存在することができる。それらが同一のポリペプチド鎖上にある場合には、それらをリンカーで連結することができ、そのリンカーは好ましくは、上述のとおり、ペプチド配列である。

【０２０７】

該第1と第2の可変ドメインは共有結合で、または非共有結合で結合しうる。それらが共有結合している場合には、その共有結合はジスルフィド結合でありうる。

【０２０８】

該可変ドメインが、例えば本明細書で定義したファージ提示技法を用いて選択されたV遺伝子レパートリーから選択される場合には、それらの可変ドメインはそれらが本明細書において定義された特異的な共通リガンドによって認識されるように、ユニバーサルフレームワーク領域を含んでなる。ユニバーサルフレームワーク、共通リガンドなどの使用については、WO 99/20749に述べられている。

【０２０９】

V遺伝子のレパートリーを用いる場合には、ポリペプチド配列の変異は可変ドメインの構造ループ中にあることが好ましい。どちらの可変ドメインのポリペプチド配列も、各可

変ドメインとその相補的なペアとの相互作用を増強するために、DNAシャッフリングまたは突然変異によって変化させることができる。DNAシャッフリングは当業界ではよく知られていて、例えば、Stemmer, (1994), Nature, 370:389-391および米国特許第6,297,053号(これらは双方とも本明細書中に参照により組み入れられる)に述べられている。突然変異誘発のその他の方法は当業者には周知である。

【０２１０】

本発明の好ましい1実施形態においては、「二重特異性リガンド」は一本鎖Fvフラグメントである。本発明の別の1実施形態においては、「二重特異性リガンド」はFab形態からなる。

【０２１１】

さらに別の態様においては、本発明は、本明細書で定義した「二重特異性リガンド」を少なくともコードする核酸を提供する。

【０２１２】

当業者であれば、本発明の態様に応じて、抗原またはエピトープの双方が同時に同一の抗体分子と結合することができることは理解されよう。あるいはまた、それらの抗原またはエピトープは同一の抗体分子への結合に対して競合しうる。例えば、エピトープが双方とも同時に結合する場合には、二重特異性リガンドの可変ドメインは双方とも独立にそれらの標的エピトープと結合することができる。それらドメインが競合する場合には、一方の可変ドメインはその標的と結合することができるが、もう一方の可変ドメインがその同族標的を結合するのと同時には結合しない。すなわち、第1の可変ドメインはその標的と結合することができるが、第2の可変ドメインがその同族標的と結合するのと同時には結合しない。

【０２１３】

該可変領域は標的抗原またはエピトープに対する抗体由来のものとすることができる。あるいはまた、該可変領域は、線状バクテリオファージの表面上に発現させたものなどの単一抗体ドメインのレパートリー由来のものとすることができる。選択は下記のとおりに行うことができる。

【０２１４】

一般的には、本発明を実施するために必要な核酸分子およびベクター構築物は、標準的な実験室マニュアル、例えば、Sambrookら, 「分子クローニング、実験室マニュアル（"Molecular Cloning, A Laboratory Manual"）」 Cold Spring Harbor, USAなどに示されているように構築し、取り扱うことができる。

【０２１５】

本発明で有用な核酸の取り扱いは、通常は組換えベクターで行われる。

【０２１６】

従って、さらに別の1態様においては、本発明は、本明細書に定義した「二重特異性リガンド」を少なくともコードする核酸を含んでなるベクターを提供する。

【０２１７】

本明細書で用いている「ベクター」とは、異種のDNAを細胞中に導入してそのDNAを発現および/または複製するために用いられる分離したエレメントを意味する。そのようなベクターを選択または構築し、その後それを用いる方法については当業者には周知である。多数のベクターが一般的に入手可能であり、そのようなものとしては、細菌性プラスミド、バクテリオファージ、人工染色体、およびエピソームベクターが含まれる。そのようなベクターは単純なクローニングおよび突然変異誘発に用いることができる。あるいはまた、遺伝子発現ベクターを用いることができる。本発明で有用なベクターを、所望のサイズ（通常は長さが0.25キロベース(kb)から40kb以上のもの）のポリペプチドコード配列を収容するために選択することができる。適切な宿主細胞を、in vitroでクローニング操作した後、そのベクターで形質転換する。各ベクターは種々の機能的成分を含んでおり、通常はそれらとしてはクローニング(または「ポリリンカー」)部位、複製起点、および少なくとも1つの選択マーカー遺伝子が含まれる。ベクターが発現ベクターである場合には、さ

らに1種以上の次のものを有している：エンハンサーエレメント、プロモーター、転写終結配列およびシグナル配列。それらの各々は、本発明のリガンドをコードする遺伝子に機能しうる形で連結されるように、クローニング部位の近傍に配置される。

【０２１８】

クローニングベクターと発現ベクターは通常は双方とも、1種以上の選択された宿主細胞中でそのベクターが複製されることを可能とする核酸配列を含んでいる。典型的には、クローニングベクター中では、その配列は、ベクターが宿主の染色体DNAとは独立に複製することを可能にするものであり、そのような配列としては、複製起点または自律複製配列が含まれる。そのような配列は、種々の細菌、酵母、およびウイルスについてよく知られている。

【０２１９】

プラスミドpBR322由来の複製起点はほとんどのグラム陰性細菌に適しており、2ミクロンプラスミドの起点は酵母に適しており、哺乳類細胞では種々のウイルスの起点(例えば、SV40、アデノウイルス)がクローニングベクター用に有用である。一般的には、哺乳類の発現ベクターについては、それが高レベルのDNAを複製することのできる哺乳類細胞、例えばCOS細胞などで用いられない限りは、複製起点は必要でない。

【０２２０】

クローニングベクターまたは発現ベクターは、選択マーカーとも言われる、選択遺伝子を含んでいることが好都合である。この遺伝子は選択培地中で増殖する形質転換された宿主細胞の生存または増殖に必要なタンパク質をコードしている。従って、その選択遺伝子を含んでいるベクターでの形質転換を受けていない宿主細胞は、その培地中では生存できない。典型的な選択遺伝子は、抗生物質およびその他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートもしくはテトラサイクリンに対する抵抗性を付与するか、または栄養要求性欠損を相補するか、増殖培地中には含まれていない決定的に重要な栄養素を供給するタンパク質をコードしている。

【０２２１】

本発明のリガンドをコードするベクターの複製は大腸菌(E.coli)中で最も都合よく行われるので、大腸菌選択マーカー、例えば、抗生物質アンピシリンに対する抵抗性を付与するβラクタマーゼ遺伝子が有用である。これらは、pBR322、またはpUC18もしくはpUC19などのpUCプラスミドのような大腸菌のプラスミドから得ることができる。

【０２２２】

発現ベクターは、通常は、対象のコード配列に機能しうる形で連結される、宿主生物によって認識されるプロモーターを含んでいる。そのようなプロモーターは誘導性であっても構成性であってもよい。「機能しうる形で連結される」という用語は、言及している成分が、その意図された様式で機能を発揮できる関係になるよう並べられていることを意味する。あるコード配列に機能しうる形で連結された調節配列は、そのコード配列の発現が調節配列と適合する条件下で達成されるように連結されている。

【０２２３】

原核生物宿主での使用に適したプロモーターとしては、例えば、βラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系、およびtacプロモーターなどのハイブリッドプロモーターが含まれる。細菌の系で用いるためのプロモーターはまた、通常、コード配列に機能しうる形で連結されたシャイン－ダルガノ配列を含んでいる。

【０２２４】

好ましいベクターは、ポリペプチドライブラリーメンバーに対応するヌクレオチド配列の発現を可能にする発現ベクターである。第1のおよび/または第2の抗原またはエピトープを用いた選択は、そのポリペプチドライブラリーメンバーを発現している単一クローンを別々に増殖し発現させることによって、または任意の選択提示系の使用によって、実施することができる。上述のとおり、好ましい選択提示系はバクテリオファージ提示である。従って、例えばpIT1またはpIT2などのファージまたはファージミドベクターを用いるこ

とができる。本発明に有用なリーダー配列としては、pelB、stII、ompA、phoA、bla、およびpelAが含まれる。1例は大腸菌の複製起点(二本鎖の複製用)およびファージの複製起点(一本鎖DNAの生成用)を有するファージミドベクターである。そのようなベクターの取り扱いと発現については当業界ではよく知られている(HoogenboomとWinter, (1992), 上述の文献; Nissimら, (1994), 上述の文献)。簡潔に記せば、そのベクターは、選択性を付与するためのβラクタマーゼ遺伝子をファージミド上に含み、さらに、(N末端からC末端に向かって)pelBリーダー配列(これは発現されたポリペプチドを細胞質周辺腔へと向ける)、多重クローニング部位(該ライブラリーメンバーのヌクレオチド形態のクローニングのため)、場合により1個以上のペプチドタグ(検出用)、場合により1個以上のTAG停止コドン、およびファージタンパク質pIIIからなる発現カセットの上流にlacプロモーターを含んでいる。大腸菌の種々のサプレッサー株および非サプレッサー株を用い、そしてグルコース、イソプロピルチオ-βD-ガラクトシド(IPTG)、またはヘルパーファージ、例えばVCS M13を添加することによって、該ベクターは発現することなくプラスミドとして複製されるか、該ポリペプチドライブラリーメンバのみが多量に生成されるか、またはファージが生成される。その生成されるファージの一部は、その表面上に少なくとも1コピーのポリペプチド-pIII融合物を含む。

【０２２５】

本発明のリガンドをコードするベクターの構築には従来のライゲーション技術が用いられる。単離したベクターまたはDNA断片を切断し、末端を整え、必要とされるベクターを作るために望ましい形態になるよう再連結させる。所望により、構築したベクター中に正しい配列が存在することを確認するための分析を既知の様式で行うことができる。発現ベクターを構築し、in vitroで転写産物を調製し、DNAを宿主細胞中に導入し、発現と機能を調べるための分析を行うために適した方法は、当業者には既知である。サンプル中のある遺伝子配列の存在、またはその遺伝子配列の増幅および/もしくは発現は、従来法により、例えば、DNA、RNA、もしくはタンパク質の、サザンもしくはノーザン分析、ウェスタンブロッティング、ドットブロッティング、in situ ハイブリダイゼーション、免疫細胞化学、または核酸分子もしくはタンパク質分子の配列分析によって検出し、または定量する。当業者であれば、それらの方法を所望によりどのように改変しうるかは容易に予想できよう。

【０２２６】

閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドの構造

本発明の第2の構成の1態様では、2個以上の非相補的エピトープ結合ドメインが、本明細書で定義している閉鎖型コンホメーションをとるように、連結される。好都合には、それらのドメインを、本明細書に記載のリンカーの代替として、またはそれに付け加えるものとして骨格にさらに付着させることができるが、その骨格は、それらのエピトープ結合部位の互いの閉鎖型コンホメーションの形成および維持を容易にするものでありうる。

【０２２７】

(I)骨格

上述した通り、骨格は免疫グロブリン分子に基づくものであっても、またはその起源が免疫グロブリン以外のものであってもよい。本明細書で定義した好ましい免疫グロブリン骨格としては、次から選択されるものの任意の1つ以上を含む：(i)抗体のC_L(κまたはλサブクラス)ドメイン；または(ii)抗体重鎖のC_H1ドメインを少なくとも含む免疫グロブリン分子；抗体重鎖のC_H1およびC_H2ドメインを含んでなる免疫グロブリン分子；抗体重鎖のC_H1、C_H2、およびC_H3ドメインを含んでなる免疫グロブリン分子；または抗体のC_L(κもしくはλサブクラス)ドメインと組み合わせたサブセット(ii)のいずれかのもの。ヒンジ領域ドメインをさらに含ませることができる。このようなドメインの組み合わせは、例えば、IgGもしくはIgMなどの天然の抗体の模擬体、またはそれらのフラグメント、例えばFv、scFv、Fab、もしくは$F(ab')_2$分子などであってよい。当業者にはこのリストが網羅的であるとは意図されないことは理解されよう。

【０２２８】

(II)タンパク質の足場（スカホールド; scaffold）

各エピトープ結合ドメインはタンパク質の足場、およびそのドメインの1つ以上のエピトープとの特異的相互作用に関与する1つ以上のCDRを含んでなる。本発明のエピトープ結合ドメインが3個のCDRを含んでなるものであることが好都合である。適切なタンパク質足場としては、次のものからなる群から選択されるもののいずれかが挙げられる：免疫グロブリンドメインに基づくもの、フィブロネクチンに基づくもの、アフィボディに基づくもの、CTLA4に基づくもの、GroELなどのシャペロンに基づくもの、リポカリンに基づくもの、および細菌のFc受容体であるSpAおよびSpDに基づくもの。当業者にはこのリストが網羅的であると意図されないことが理解されよう。

【０２２９】

F: 二重特異性リガンドの構築に用いるための足場

i 主鎖コンホメーションの選択

免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーは全てそのポリペプチド鎖に類似の折り畳み構造を共有している。例えば、一次構造の点で言えば抗体は高度な多様性を有するが、配列と結晶構造の比較から、予期していなかったことだが、抗体の6個の抗原結合ループのうち5個(H1、H2、L1、L2、L3)は、限定された数の主鎖コンホメーション、すなわち基準構造に適合することが明らかとなった(ChothiaとLesk, (1987), J. Mol. Biol., 196:901; Chothiaら, (1989), Nature, 342:877)。従って、ループの長さと重要な残基を分析することによって、ヒト抗体の大多数に認められるH1、H2、L1、L2、およびL3の主鎖コンホメーションを予測することが可能となった(Chothiaら, (1992), J. Mol. Biol., 227:799; Tomlinsonら, (1995), EMBO J., 14:4628; Williamsら, (1996), J. Mol. Biol., 264:220)。H3領域は配列、長さ、および構造に関してはるかに多様ではあるが(Dセグメントの使用のため)、H3領域もその短いループ長について限定された数の主鎖コンホメーションを形成し、そのコンホメーションは、その長さ、ならびにループ中および抗体フレームワーク中の重要な位置における特定の残基、または残基の種類の存在に依存する(Martinら, (1996), J. Mol. Biol, 263:800; Shiraiら, (1996), FEBS Letters, 399:1)。

【０２３０】

本発明の二重特異性リガンドは、V_Hドメインのライブラリーおよび/またはV_Lドメインのライブラリーのようなドメインのライブラリーから組み立てることが好都合である。さらに、本発明の二重特異性リガンドはそれ自体がライブラリーの形態で提供される。本発明の1態様においては、そのメンバーの主鎖コンホメーションが既知のものであることを確保するように、特定のループ長および重要な残基が選択されている二重特異性リガンドおよび/またはドメインのライブラリーが設計される。上述のとおり、それらが非機能性である可能性を最小限とするためには、それらが免疫グロブリンスーパーファミリー分子の天然に見出される実際のコンホメーションであることが好都合である。生殖細胞系列のV遺伝子セグメントは抗体またはT細胞受容体ライブラリーを構築するために適した基本的フレームワークの１つとして機能する。その他の配列も有用である。変異は低頻度で起こり、それによって少数の機能的メンバーが変化した主鎖コンホメーションを有することとなる可能性はあるが、それは機能には影響を及ぼさない。

【０２３１】

リガンドの配列に基づいて主鎖のコンホメーションを予測し、基準構造に影響を及ぼさないように多様化する残基を選択するために、基準構造理論もまた、リガンドによって規定される異なる主鎖コンホメーションの数を調べる上で有用である。ヒトV_κドメインでは、L1ループは4種類の基準構造のうちの1つに適合することができ、L2ループは単一の基準構造を有し、ヒトV_κドメインの90％はL3ループについて4種または5種の基準構造のうちの1つに適合することが知られている(Tomlinsonら, (1995), 上述の文献)。従って、V_κドメイン単独では、種々の基準構造を組み合わせて種々の異なる主鎖コンホメーションを作製することができる。V_λドメインがL1、L2、およびL3ループについて種々の範囲の基準構造をコードし、V_κおよびV_λドメインが、H1およびH2ループについていくつかの基準構造をコードすることのできる任意のV_Hドメインと対形成できる場合には、これらの5

つのループについて観察される基準構造の組み合わせの数は非常に多数となる。このことは、主鎖コンホメーション中に多様性を生じさせることが、広範な結合特異性を生成するためにはおそらく不可欠であろうことを暗示している。しかし、単一の既知の主鎖コンホメーションに基づいて抗体ライブラリーを構築することによって、予期しなかったことであるが、実質的に全ての抗原を標的とするのに十分なだけの多様性を生じさせるために、主鎖コンホメーションの多様性は必要がないことが見出された。さらに驚いたことは、その単一の主鎖コンホメーションはコンセンサス構造である必要がなく、ある単一の天然のコンホメーションをライブラリー全体の基礎として用いることができるということである。従って、好ましい1態様においては、本発明の二重特異性リガンドは単一の既知の主鎖コンホメーションを有する。

【０２３２】

選択される単一の主鎖コンホメーションは、当該の免疫グロブリンスーパーファミリータイプの分子のうちでありふれたものであることが好ましい。あるコンホメーションは、天然の分子の非常に多数がそのコンホメーションに適合する場合には、ありふれたものである。従って、本発明の好ましい1態様においては、ある免疫グロブリンドメインの各結合ループについて種々の主鎖コンホメーションが天然に生じていれば、それらは別々なものと見なし、天然の可変ドメインは種々のループに対する主鎖コンホメーションの所望の組み合わせを有しているものが選択される。そのようなものが得られない場合には、それに最も近い等価物を選択することができる。種々のループに対する主鎖コンホメーションの所望の組み合わせは、その所望の主鎖コンホメーションをコードする生殖細胞系列の遺伝子セグメントを選択することによって作製される。より好ましくは、その選択された生殖細胞系列の遺伝子セグメントが自然界で頻繁に発現されているものであり、それらのセグメントが天然の生殖細胞系列の遺伝子セグメントの全てのうちで最も頻繁に発現されているものであることが最も好ましい。

【０２３３】

二重特異性リガンドまたはそれのライブラリーを設計する際には、6個の抗原結合ループの各々について異なる主鎖コンホメーションが出現する率は別々に考慮することができる。H1、H2、L1、L2、L3について、天然の分子の抗原結合ループのうちの20%～100%が適合するコンホメーションが選択される。典型的には、観察される出現率は35%以上であり(すなわち35%～100%の間)、理想的には50%以上、さらに理想的なのは60%以上である。H3ループの大多数は基準構造を有していないので、基準構造を示すそれらループの中でありふれた主鎖コンホメーションを選択することが好ましい。従って、各ループについて天然のレパートリーで最も頻繁に観察されるコンホメーションが選択される。ヒト抗体では、各ループについて最も一般的な基準構造(CS)は次のとおりである：H1 － CS 1 (発現されたレパートリーの79%)、H2 － CS 3 (46%)、L1 － V_κのCS 2 (39%)、L2 －CS 1 (100%)、L3 － V_κのCS 1 (36%)(計算はκ:λの比を70:30と仮定している、Hoodら, (1967), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 48:133)。基準構造を有するH3ループについては、7個の残基を有し残基94と残基101の間に塩架橋を有するCDR3長 (Kabatら, (1991), 「免疫学の対象となるタンパク質の配列」"Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services)が最も一般的なものと思われる。このコンホメーションを形成するために必要なH3の長さと重要な残基を有するヒト抗体配列がEMBLデータライブラリー中には少なくとも16個あり、抗体のモデリングの基礎として用いることのできる結晶構造がタンパク質データバンク中に少なくとも2つある(2cgrと1tet)。基準構造のこの組み合わせである生殖細胞系列遺伝子セグメントであって最も高頻度に発現されているものはV_Hセグメント3-23 (DP-47)、J_HセグメントのJH4b、V_κセグメントのO2/O12 (DPK9)、およびJ_κセグメントのJ_κ1である。V_HセグメントのDP45とDP38も適している。従って、これらのセグメントは、組み合わせて所望の単一主鎖コンホメーションを有するライブラリーを構築する基礎として用いることができる。

【０２３４】

あるいはまた、分離された結合ループの各々に対する種々の主鎖コンホメーションの天

然の出現率に基づいて単一の主鎖コンホメーションを選択する代わりに、主鎖コンホメーションの組み合わせの天然の出現率を単一の主鎖コンホメーション選択の基礎として用いる。例えば、抗体の場合には、全部で6個の抗原結合ループのうちの任意の2個、3個、4個、5個、または6個全てについての基準構造の組み合わせの天然の出現率を決定することができる。選択したコンホメーションが天然の抗体ではありふれたものであることが好ましく、また、そのコンホメーションが天然のレパートリー中で最も高頻度であると認められることが最も好ましい。従って、例えば、ヒト抗体では、5個の抗原結合ループH1、H2、L1、L2、およびL3の天然の組み合わせを考慮するとき、最も高頻度な基準構造の組み合わせが決定され、次いでそれをH3ループについての最も一般的なコンホメーションと組み合わせて、単一の主鎖コンホメーションの選択の基礎とする。

【０２３５】

ii. 基準配列の多様化

いくつかの既知の主鎖コンホメーション、好ましくは単一の既知の主鎖コンホメーションを選択した後、本発明の二重特異性リガンドまたは本発明で使用するためのライブラリーを、構造的および/または機能的多様性を有するレパートリーを作製するため、該分子の結合部位を変化させることによって構築することができる。このことは、変異型が構造的および/または機能的に十分な多様性を有し、それによってそれらの変異体が広範な活性を提供しうるように、変異型が作製されることを意味する。

【０２３６】

所望の多様性は典型的には、選択した分子を1箇所以上で変化させることによって作製される。変化させる位置はランダムに選択されるか、または好ましい位置が選択される。そのような変異は、ランダム化(もともとのアミノ酸が天然または合成の任意のアミノ酸またはその類似体と置換され、非常に多種類の変異型が生成される)によって、またはもともとのアミノ酸を、アミノ酸の1つ以上の定められたサブセットで置換して、より限定された種類の変異型を作製することによって、達成され得る。

【０２３７】

そのような多様性を導入するための種々の方法が報告されている。誤りがちのPCR(error-prone PCR)(Hawkinsら, (1992), J. Mol. Biol., 226:889)、化学的突然変異誘発(Dengら, (1994), J. Biol. Chem., 269:9533)、または細菌ミューテーター株(bacterial mutator strain)(Lowら, (1996), J. Mol. Biol., 260:359)を、該分子をコードする遺伝子中にランダムな突然変異を導入するために用いることができる。選択した位置を変異させるための方法も当業界ではよく知られており、そのような方法としては、PCRを用いる、または用いない、ミスマッチオリゴヌクレオチドまたは縮重オリゴヌクレオチドの使用が含まれる。ヒト破傷風トキソイド結合FabのH3領域をランダム化して広範な新規の結合特異性が生成されている(Barbasら, (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457)。ランダムなまたは準ランダムなH3およびL3領域が生殖細胞系列V遺伝子セグメントに付加されて、変異していないフレームワーク領域を有する大きなライブラリーが作製されている(HoogenboomとWinter, (1992), J Mol. Biol., 227:381; Barbasら, (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457; Nissimら, (1994), EMBO J., 13:692; Griffithsら, (1994), EMBO J., 13:3245; De Kruifら, (1995), J. Mol. Biol., 248:97)。このような多様化はその他の抗原結合ループのいくつかまたは全てを含むように拡張されている(Crameriら, (1996), Nature Med., 2:100; Riechmannら, (1995), Biol/Technology, 13:475; Morphosys, WO 97/08320, 上述の文献)。

【０２３８】

ループのランダム化は、H3のみに対して約10^{15}種を超える構造を生成する可能性を有し、同様にその他の5個のループについても多数の変異型を生成する可能性を有することから、可能な組み合わせの全てを示しているライブラリーを作製するために現行の形質転換技術や、さらには無細胞系を用いるのは実行可能ではない。例えば、現在までに構築されたライブラリーで最大のものの１つでは、6×10^{10}の異なる抗体のライブラリーが生成されたが(Griffithsら, (1994), 上述の文献)、これは上記の設計でのライブラリーについ

ての潜在的な多様性のほんの一部にすぎない。

【０２３９】

好ましい1実施形態においては、該分子の所望の機能を生成するまたは改変することに直接的に関与している残基のみが多様化される。多くの分子について、その機能は標的と結合することであり、従って多様化は標的結合部位に集中されるべきであって、分子の全体的な充填状態または選択した主鎖コンホメーションの維持にとってきわめて重要な残基を変更することを回避される。

【０２４０】

抗体ドメインに適用する際の基準配列の多様化

抗体二重特異性リガンドの場合には、標的結合部位はほとんど抗原結合部位である。従って、非常に好ましい態様においては、本発明は抗原結合部位中の残基のみが変化しているような抗体二重特異性リガンドのライブラリーまたはそのアセンブリーを提供する。それらの残基はヒト抗体レパートリーでは非常に多様であり、高分解能(high-resolution)で抗体/抗原複合体中に接触することが知られている。例えば、L2において天然の抗体では位置50および53が多様であり、抗原と接触することが観察されている。これに対して従来のアプローチでは対応する相補性決定領域(CDR1)（これはKabatら，(1991，上述の文献)によって定義されている）内の全ての残基、つまりほぼ7個の残基を多様化してきたが、これに対して本発明で使用するライブラリー中では2個の残基が多様化される。このことは、広範な抗原結合特異性を生成するために必要な機能的多様性に関して著しく改善されたことを示している。

【０２４１】

自然界では、抗体の多様性は次の2つのプロセスの結果である：生殖細胞系列のV、D、およびJ遺伝子セグメントの体細胞組換えによるナイーブな一次レパートリー(いわゆる、生殖細胞系列および結合部領域の多様性)の生成、およびその結果得られる再構成されたV遺伝子の体細胞超突然変異。ヒト抗体配列の分析からは、一次レパートリーの多様性は抗原結合部位の中心に集中しているが、体細胞超突然変異では、一次レパートリーでは高度に保存されている抗原結合部位の周辺領域にまで多様性が広がることが示されている(Tomlinsonら，(1996)，J．Mol．Biol．，256:813)。この相補性はおそらくは、配列の間隙を探索するための効率的な戦略として進化したものであろうと考えられ、明らかに抗体に独特なものであるが、他のポリペプチドレパートリーにも容易に適用することができる。多様化される残基は、標的に対する結合部位を形成する残基のサブセットである。標的結合部位内の残基の異なるサブセット(オーバーラップするものを含む)を、所望により、選択の際の異なる段階で多様化することができる。

【０２４２】

抗体レパートリーの場合には、最初の「ナイーブな」レパートリーは、その抗原結合部位内の残基の全てではなく一部を多様化して作られる。本明細書でこの内容で用いる「ナイーブな」という用語はあらかじめ定められた標的を持たない抗体分子を意味する。それらの分子は免疫多様化を受けていない個体、例えば胎児や新生児個体など、その免疫系が多種多様な抗原刺激でまだチャレンジされたことのない個体の免疫グロブリン遺伝子によってコードされるものと似たものである。次いで、このレパートリーを広範な抗原またはエピトープに対して選択する。必要があれば、最初のレパートリー中で多様化されていた領域の外側に多様性をさらに導入することができる。この成熟したレパートリーを、改変された機能、特異性、または親和性について選択することができる。

【０２４３】

本発明は、二重特異性リガンド、または二重特異性リガンドのナイーブなライブラリーであって抗原結合部位中の残基のいくつかまたは全てが多様化しているライブラリーを構築するための、結合ドメインの2つの異なるナイーブなレパートリーを提供する。「一次ライブラリー」は天然の一次レパートリーを模倣したものであり、その多様性は生殖細胞系列V遺伝子セグメント中で多様である抗原結合部位の中心部の残基に限定されているか(生殖細胞系例多様性)、または組換えプロセスの際に多様化される(結合部領域の多様性)

。多様化される残基としては、限定はされないが、H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H96、H97、H98、L50、L53、L91、L92、L93、L94、およびL96が含まれる。「体細胞の」ライブラリーでは、多様性は、組換えプロセスの際に多様化されるか(結合部領域の多様性)、または、体細胞で高度に突然変異する残基に限定される。多様化される残基としては、限定はされないが、H31、H33、H35、H95、H96、H97、H98、L30、L31、L32、L34、およびL96が含まれる。これらのライブラリー中での多様化に適したものとして上記で列挙した残基は全て、1種以上の抗体-抗原複合体中に接触するものとして知られている。双方のライブラリー中で抗原結合部位の全ての残基が多様化するわけではないので、選択の際にさらに多様性を組み込みたいのであれば、残りの残基を変化させることによってそれを行うことができる。当業者であれば、それらの残基(または、抗原決定部位を含んでなる付加的な残基)の任意のもののサブセットを、抗原結合部位の最初のおよび/またはその後の多様化に用いることができることは明らかであろう。

【０２４４】

本発明で用いるためのライブラリーの構築では、選択した位置の多様化は典型的には、核酸レベルで、該ポリペプチドの配列を特定しているコード配列を変化させて行うことができ、それによって多数の可能性のあるアミノ酸(20種全て、またはそのサブセット)をその位置に組み入れることができる。IUPAC命名法を用いれば、最も多目的なコドンはNNKであり、それは全てのアミノ酸に加えてTAG停止コドンもコードする。必要とされる多様性を導入するためにNNKコドンを用いることが好ましい。同じ目的を達成しうるその他のコドンも有用であり、そのようなものとしては、NNNコドンが含まれ、これはさらに別の停止コドンであるTGAおよびTAAの作成をもたらす。

【０２４５】

ヒト抗体の抗原結合部位中の側鎖の多様性の特徴は、特定のアミノ酸残基を好む顕著な偏りである。V_H、V_κ、およびV_λ領域の各々で最も多様な10箇所のアミノ酸組成を合計すれば、側鎖多様性の76%を超える割合が7つの異なる残基のみに由来しており、それらは、セリン(24%)、チロシン(14%)、アスパラギン(11%)、グリシン(9%)、アラニン(7%)、アスパラギン酸(6%)、およびトレオニン(6%)である。主鎖に柔軟性を与えうる親水性残基および小さな残基に対するこのような偏りは、おそらく、広範な抗原またはエピトープへの結合に傾くような表面の進化を反映しているものと考えられ、一次レパートリー中の抗体の混合状態がどうして必要とされるのかを説明することの助けとなりうる。

【０２４６】

このようなアミノ酸の分布を模倣することが好ましいので、多様化させる位置のアミノ酸の分布は、抗体の抗原結合部位中に見られるものを模倣することが好ましい。広範な標的抗原に対して特定のポリペプチド(抗体ポリペプチドのみでなく)の選択を可能にする、アミノ酸置換におけるこのような偏りは、任意のポリペプチドレパートリーに容易に適用することができる。多様化させる位置のアミノ酸の分布に偏りを与えるための種々の方法があり(トリヌクレオチド突然変異誘発の使用を含む、WO 97/08320参照)、その中で好ましい方法は、合成の容易さから言って、従来から知られている縮重コドンの使用である。縮重コドンの組み合わせ全て(各位置で等しい比率で単一、二重、三重、および四重の縮重性を示すもの)によってコードされるアミノ酸のプロフィールを、天然のアミノ酸の使用と比較することによって、最も代表的なコドンを計算することができる。コドン(AGT)(AGC)T、(AGT)(AGC)C、および(AGT)(AGC)(CT)、すなわちIUPAC命名法ではそれぞれDVT、DVC、およびDVYだが、これらは所望のアミノ酸プロフィールに最も近いものである。それらは22%セリン、および11%チロシン、アスパラギン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、トレオニン、およびシステインをコードしている。従って、好ましくは、ライブラリーは多様化される位置の各々でDVT、DVC、またはDVYコドンのいずれかを用いて構築される。

【０２４７】

G:　リガンドの半減期を延長させることのできる抗原

本発明の二重特異性リガンドは、その１つの構成において、in vivoでそのリガンドの

半減期を延長することのできる1種以上の分子と結合することができる。典型的には、そのような分子はin vivoで天然に存在するポリペプチドであり、その分子は、生体から望ましくない物質を除去する内因性の機作による分解または除去に抵抗する。例えば、その有機物の半減期を延長させる分子は次のものから選択することができる：

細胞外マトリクス由来のタンパク質：例えば、コラーゲン、ラミニン、インテグリン、およびフィブロネクチンなど。コラーゲンは細胞外マトリクスの主要なタンパク質である。約15種類のタイプのコラーゲン分子が現在知られていて、生体の様々な部分で見出されており、例えば、I型コラーゲン(生体内のコラーゲンの90%を占める)は、骨、皮膚、腱、靱帯、角膜、内臓中に見出され、II型コラーゲンは軟骨、椎間板、脊索、眼の硝子体液中に見出される。

【０２４８】

血液中にあるタンパク質としては次のものが挙げられる：

フィブリン、α2マクログロブリン、血清アルブミン、フィブリノゲンA、フィブリノゲンB、血清アミロイドタンパク質A、ヘプタグロビン、プロフィリン、ユビキチン、ウテログロブリン、およびβ2ミクログロブリンなどの血漿タンパク質。

【０２４９】

プラスミノゲン、リゾチーム、シスタチンC、α1アンチトリプシン、および膵臓トリプシンインヒビターなどの酵素およびインヒビター。プラスミノゲンはトリプシン様セリンプロテアーゼであるプラスミンの不活性な前駆体である。これは通常循環血流中に認められる。プラスミノゲンが活性化されてプラスミンに変換されると、それは折り畳みを開いて強力な酵素ドメインを表に出し、血液細胞をからめとって血餅とするフィブリノゲン線維を溶解する。これを繊維素溶解と言う。

【０２５０】

免疫系のタンパク質、例えばIgE、IgG、IgMなど。

【０２５１】

輸送タンパク質、例えばレチノール結合タンパク質、α1マクログロブリンなど。

【０２５２】

ディフェンシン、例えばβディフェンシン1、好中球ディフェンシン1、2、3など。

【０２５３】

脳血液関門または神経組織で見出されるタンパク質、例えば、メラノコルチン受容体、ミエリン、アスコルビン酸トランスポーターなど。

【０２５４】

トランスフェリン受容体特異的リガンド-神経薬理物質融合タンパク質(米国特許第5,977,307号を参照せよ)。

【０２５５】

脳毛細管内皮細胞受容体、トランスフェリン、トランスフェリン受容体、インスリン、インスリン様増殖因子1(IGF 1)受容体、インスリン様増殖因子2(IGF 2)受容体、インスリン受容体。

【０２５６】

腎臓に局在するタンパク質、例えば、ポリシスチン、IV型コラーゲン、有機陰イオントランスポーターK1、Heymann抗原など。

【０２５７】

肝臓に局在するタンパク質、例えば、アルコール脱水素酵素、G250。

【０２５８】

血液凝固第X因子

α1アンチトリプシン

HNF 1α

肺に局在するタンパク質、例えば、分泌成分(IgAと結合する)など。

【０２５９】

心臓に局在するタンパク質、例えばHSP27。これは拡張性心筋症に関与している。

【０２６０】
皮膚に局在するタンパク質、例えばケラチン。
【０２６１】
骨に特異的なタンパク質、例えば、骨形態形成タンパク質(BMP)。これは骨形成活性を示すトランスフォーミング増殖因子βスーパーファミリーの1サブセットである。例としては、BMP-2、-4、-5、-6、-7(骨形成タンパク質(OP-1)とも呼ばれる)、および-8(OP-2)が含まれる。
【０２６２】
腫瘍特異的タンパク質、例えば、ヒトトロフォブラスト抗原、ハーセプチン受容体、エストロゲン受容体、カテプシン、例えばカテプシンB(肝臓および脾臓中に見出される)が含まれる。
【０２６３】
疾病特異的タンパク質、例えば、活性化されたT細胞上でのみ発現される抗原。例えば、LAG-3 (リンパ球活性化遺伝子)、オステオプロテグリンリガンド(OPGL)(Nature, 402:304-309(1999)を参照せよ)、OX40 (TNF受容体ファミリーの1メンバー、活性化されたT細胞上で発現され、ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-I)産生細胞中で特異的にアップレギュレーションされることが知られている唯一の共刺激性T細胞分子である)。Immunol., 2000, JUL 1; 165(1):263-70を参照せよ；ショウジョウバエCG6512、ヒトパラプレギン、ヒトFtsH、ヒトAFG3L2、マウスftsHを含むメタロプロテアーゼ(関節炎/癌に関連する)；酸性線維芽細胞成長因子(FGF-1)、塩基性線維芽細胞成長因子(FGF-2)、血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(VEGF/VPF)、トランスフォーミング成長因子-a (TGF a)、腫瘍壊死因子-α(TNF-a)、アンギオゲニン、インターロイキン-3 (IL-3)、インターロイキン-8 (IL-8)、血小板由来内皮成長因子(PD-ECGF)、胎盤成長因子(P1GF)、ミッドカイン血小板由来増殖因子-BB (PDGF)、フラクタルカインを含む血管増殖因子。
【０２６４】
ストレスタンパク質(熱ショックタンパク質)
HSPは通常は細胞内に見出される。細胞外に見出される場合は、細胞が死んでその内容物が漏れ出ていることを示している。このプログラムされていない細胞死(壊死)は、外傷、疾病、または損傷の結果としてのみ起こり、従ってin vivoでは細胞外にあるHSPは免疫系の応答の引き金を引いて感染および疾病と闘わせる。細胞外HSPと結合する二重特異性リガンドは疾病部位に局在することができる。
【０２６５】
Fc輸送に関与するタンパク質
Brambell受容体(FcRBとしても知られている)
このFc受容体は2つの機能を持っており、その双方ともが潜在的に送達に有用である。
【０２６６】
それらの機能とは、
(1)IgGを母体から子供へ胎盤を通過して輸送すること。
【０２６７】
(2)IgGを分解から保護し、それによってIgGの血清中の半減期を延長する。この受容体はエンドソームからIgGを再利用するものと考えられている。
【０２６８】
Holligerら, Nat. Biotechnol., 1997, Jul.;15(7):632-6を参照せよ。
【０２６９】
本発明のリガンドは、in vivoでの半減期の延長を必要とすることなく、または半減期を延長させることなく、上記の標的に対して特異的であるように設計してもよい。例えば、本発明のリガンドは組織特異的な前述のものから選択された標的に対して特異的であってもよく、それによって、半減期の延長とは無関係に(結果としてそうなるかもしれないが)、組織特異的であり治療上関連のある標的と結合する二重特異性リガンドまたはdAb単量体の、組織特異的な標的化を可能にする。さらに、該リガンドまたはdAb単量体が腎臓

または肝臓を標的とする場合には、該リガンドまたはdAb単量体を、in vivoでの別のクリアランス経路へ再度向け直すことができる(例えば、肝臓でのクリアランスから腎臓でのクリアランスへと方向付けることができる)。

【０２７０】

H:　本発明の第2の構成の多重特異性リガンドの使用

本発明の第2の構成の方法での多重特異性リガンドは、in vivoでの治療および予防での適用、in vitroおよびin vivoの診断での適用、in vitroアッセイおよび試薬としての適用などに用いることができる。例えば、抗体分子は抗体に基づくアッセイ技法、例えば、ELISA法などに、当業者に既知の方法に従って用いることができる。

【０２７１】

上記で言及したとおり、本発明の多重特異性リガンドは診断、予防、および治療方法において有用である。本発明の多重特異性抗体は診断用として、ウェスタン分析、および標準的な免疫組織化学的方法でのin situでのタンパク質の検出に有用である。これらの用途に用いるために、該リガンドを当業界では既知の技法によって標識することができる。さらに、そのような抗体ポリペプチドを、アフィニティークロマトグラフィー法で、樹脂などのクロマトグラフィーの支持体と複合体化して、調製用として用いることができる。そのような技法は全て、当業者にはよく知られたものである。

【０２７２】

本発明の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドの診断用途での使用には、閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドが2つの標的と競合して結合しそのため2つの標的が同時に結合することができない(閉鎖型コンホメーション)という能力を利用した、あるいはまた多重特異性リガンドが2つの標的と同時に結合する(開放型コンホメーション)能力を利用した、アナライトの均質アッセイ法が含まれる。

【０２７３】

真に均質なイムノアッセイ様式は、薬剤の探索と開発に用いられる診断用および研究アッセイ系の製造者が熱心に探し求めていたものである。診断薬市場の主たるものとしては、病院、開業医のオフィスとクリニック、民間の臨床検査ラボ、血液銀行、および居宅でのヒトの試験、ヒト以外の診断(例えば、食品の試験、水質試験、環境試験、生物学的防御(bio-defence)、および獣医学的試験)、ならびに研究(医薬品開発、基礎研研究、および学術的研究が含まれる)が含まれる。

【０２７４】

現在のところ、これらの全ての市場では、イムノアッセイ系は化学発光、ELISA、蛍光、またはまれではあるがラジオイムノアッセイを用いて行うものが用いられている。これらのアッセイフォーマットの各々は分離ステップ(結合した試薬を未結合の試薬と分離する)が必要である。場合によっては、いくつかの分離ステップが必要なこともある。これらの追加的ステップが加わると、試薬と自動化がさらに必要となり、時間がかかり、アッセイの最終的な結果に影響を及ぼす。ヒトの診断では、この分離ステップは自動化することができ、それはこの問題点を覆い隠すが、問題点は取り去られてはいない。ロボット工学、試薬の追加、インキュベーション時間の追加などは、相当な費用と複雑性を加える。高スループットスクリーニング法などの医薬品の開発においては、文字通り数百万のサンプルが、供試分子のレベルが非常に低い状態で一度に試験されるが、そこにさらに分離ステップを加えることはスクリーニングを行う能力を失わせうる。しかし、その分離を避ければ読み出しに多くのノイズを入れてしまう。従って、現行のアッセイ様式から得られる範囲の感度を提供する真に均質な様式が必要とされている。あるアッセイ法が、高感度でかつ大きなダイナミックレンジを有し十分な定量的な読み出しを有することが好都合である。感度は重要な要件であるが、それは必要とされるサンプル量を低減させるからである。これらの特徴は双方とも、均質系がもたらしうるものである。このことは患者での試験(care testing)において、および医薬品の開発において重要であるが、それはサンプルが貴重なものであるためである。現在当業界で用いられているような不均質な系は多量のサンプルと高価な試薬を必要とする。

【０２７５】
均質アッセイの適用としては、癌の試験が含まれ、その最大のアッセイは前立腺癌の男性のスクリーニングに用いられる前立腺特異的抗原用のアッセイである。その他の適用としては、受胎能の試験が含まれ、これは妊娠を試みる女性のための一連の試験を提供し、それらには妊娠診断用のβHCGの試験が含まれる。感染症の試験には、肝炎、HIV、風疹、ならびにその他のウイルスおよび微生物、ならびに性行為感染症が含まれる。試験は血液銀行により、特にHIV、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、非A非B型肝炎の試験が用いられている。治療用薬剤のモニタリング試験としては、処方した薬剤の患者体内のレベルを、有効性を調べ毒性を避けるためにモニターすること、例えば頻脈用のジゴキシン、精神疾患でのフェノバルビタールのレベル、喘息でのテオフィリンなどのモニタリングが含まれる。さらに、診断用試験は、乱用薬剤の試験、例えばコカイン、マリファナなどの試験などに有用である。代謝試験は甲状腺機能、貧血、およびその他の生理学的障害および機能を測定するために用いられる。

【０２７６】
さらに、均質イムノアッセイフォーマットは、標準的な臨床化学アッセイの製造に有用である。同一の機器でイムノアッセイと化学的アッセイを行いうることは診断用試験において非常に好都合である。適切な化学的アッセイとしては、ブドウ糖、コレステロール、カリウムなどの試験が含まれる。

【０２７７】
均質イムノアッセイのさらに主要な適用は、薬剤の発見と開発である。高スループットスクリーニングは、コンビナトリアル化学ライブラリー対標的のきわめて多量の試験を含む。シグナルを検出し、陽性を示した群をより小さな群に分け、やがては細胞で、次いで動物で試験することとなる。均質アッセイはこれらの試験のタイプの全てで用いることができる。医薬品の開発においては、特に動物試験と臨床試験においてイムノアッセイが非常に頻繁に用いられる。均質アッセイはそれらの進行を大いに加速し単純化する。その他の適用としては、食品と飲料の試験が含まれる。大腸菌、サルモネラ菌などについての食肉およびその他の食品の試験；水質試験（浄水場での大腸菌を含む全てのタイプの汚染物の試験を含む）；および獣医学的試験が含まれる。

【０２７８】
広範囲にわたる1実施形態においては、本発明は、本発明の閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドに結合する検出可能な作用物質、およびその検出可能な性質がアナライトの該閉鎖型コンホメーション多重特異性リガンドへの結合によって変化することを含んでなる結合アッセイを提供する。そのようなアッセイはいくつかの異なる方法で設計することができ、その各々は閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドの上述の性質を利用したものである。

【０２７９】
このアッセイはある作用物質がアナライトによって直接的または間接的に置換されて外れ、その結果その作用物質の検出しうる性質が変化することに基づいて行われる。例えば、該作用物質が、検出しうるエンドポイントを有する反応を触媒することのできる酵素である場合には、例えばその酵素の活性部位を妨害することによってその酵素を不活化するように、該リガンドとその酵素を結合させることができる。そのアナライトも閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドと結合するものであるが、そのアナライトが酵素を置換し、その活性部位を遊離状態とすることによってその酵素を活性なものにする。その結果、その酵素は基質と反応することができるようになり、検出しうるイベントが生ずる。別の1実施形態においては、該リガンドは酵素と活性部位の外側で結合することができ、それがその酵素のコンホメーションに影響を及ぼし、その結果、酵素活性を変化させる。例えば、その活性部位の構造はリガンドの結合によって拘束すされうるか、または活性発揮に必要な補因子の結合が妨害されうる。

【０２８０】
該アッセイを実施するための物理的な実装は、当業界で既知の任意の形態とすることが

できる。例えば、閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンド/酵素複合体は試験紙上に提供することができる。基質はその試験紙の異なる領域に提供してもよく、アナライトを含有する溶媒はそのリガンド/酵素複合体を通って移動することができ、それによって、酵素が置き換わり、その酵素を基質領域まで運んでシグナルが生じる。あるいはまた、そのリガンド/酵素複合体を試験用スティックまたはその他の固相上に提供し、それをアナライト/基質溶液中に浸漬すると、アナライトの存在に応じて酵素がその溶液中に放出されるようにすることができる。

【０２８１】

アナライトの各分子は1個の酵素分子を放出しうるので、このアッセイは定量的であり、一定時間内に生ずるシグナルの強度は溶液中のアナライトの濃度に依存している。

【０２８２】

閉鎖型コンホメーションのアナライトを用いるその他の構成も可能である。例えば、該閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドはアロステリックな部位で酵素と結合し、それによってその酵素を活性化するように設計することができる。そのような1実施形態においては、その酵素はアナライトの不在下でも活性である。アナライトを添加すると酵素が置換され、アロステリックな活性化が失われ、その結果、酵素が不活化される。

【０２８３】

酵素活性をアナライトの濃度の尺度として用いる上記の各実施形態の内容では、酵素の活性化または不活化とは、その酵素がシグナル生成反応を触媒する能力として測定される、その酵素の活性の増大または低減を意味する。例えば、その酵素は、検出できない基質の検出可能な形態への変換を触媒することができる。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼは発色性または化学発光性基質とともに当業界では広く用いられており、市販されている。酵素活性の増大または減少のレベルは、10%～100%、例えば20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%であってよい。活性の増大の場合には、その増大の程度は100%を超える程度、すなわち、200%、300%、500%またはそれ以上であってよい。あるいは、阻害された酵素のベースラインの活性が検出し得ない場合には、パーセンテージとして測定することができないかもしれない。

【０２８４】

別の構成では閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドは酵素ではなく、酵素/基質対の基質と結合することができる。従って、その基質は、アナライトの結合によってその閉鎖型コンホメーションの多重特異性リガンドから放出されるまでは、酵素に利用されない。この構成の実装は、酵素と結合する構成と同様である。

【０２８５】

さらに、このアッセイは蛍光分子、例えばフルオレセインまたはその他のフルオロフォアなどを、リガンドに結合する際にその蛍光が消失するようなコンホメーションとなるように結合させるよう設計することができる。この場合には、アナライトのリガンドへの結合は蛍光分子に置き換わり、その結果シグナルを生成する。本発明で有用な蛍光分子の代替物としては、ルシフェリン/ルシフェラーゼなどの発光物質、HRPなどの、イムノアッセイで一般的に用いられているものを含む発色物質が、含まれる。

【０２８６】

本発明の多重特異性リガンドの治療的および予防的使用としては、本発明のリガンドをレシピエントの動物、例えばヒトに投与することが含まれる。多重特異性は抗体が多量体抗原と高い結合活性で結合することを可能とする。多重特異性リガンドは、例えば、腫瘍細胞系の殺滅を媒介するための細胞傷害性T細胞の動員（リクルート）において、2つの抗原の架橋を可能としている。

【０２８７】

実質的に純粋なリガンドまたはそれの結合タンパク質、例えばdAb単量体は、哺乳類への投与には少なくとも90から95%の均質性を有したものであることが好ましく、医薬品としての使用、特にその哺乳類がヒトである場合には、98から99%、またはそれ以上の均質性が最も好ましい。部分精製または所望の均質性まで精製した後、そのリガンドを診断用

として、または治療用として(体外での使用を含む)、またはアッセイ法の開発と実施において、免疫蛍光染色などにおいて、用いることができる(LefkoviteとPernis, (1979と1981), Immunological Methods, 第I巻とII巻, Academic Press, NY)。

【０２８８】

本発明のリガンドまたはそれの結合タンパク質、例えばdAb単量体は、典型的には、炎症状態、アレルギー性過敏症、癌、細菌またはウイルス感染、および自己免疫疾患(自己免疫疾患としては、限定はされないが、I型糖尿病、喘息、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、クローン病、および重症筋無力症が含まれる)の予防、抑制、または治療に用いうる。

【０２８９】

本発明において、「予防」という用語は、保護作用のある組成物を疾病が誘発される前に投与することを含む。「抑制」という用語は、疾病の誘発イベントの後であるが、その疾病の臨床症状発現前にその組成物を投与することを意味する。「治療」とは疾病の症状が出現した後にその保護作用のある組成物を投与することを含む。

【０２９０】

該抗体またはそれの結合タンパク質の、その疾病に対する保護またはその治療における有効性をスクリーニングするために用いることのできる動物モデル系は入手可能である。易罹患マウスにおける全身性エリテマトーデス(SLE)の試験方法は当業界では公知である(Knightら, (1978), J. Exp. Med., 147:1653; Reinerstenら, (1978), New Engl. J. Med., 299:515)。重症筋無力症(MG)は別の動物種から得た可溶性AchRタンパク質を用いて雌のSV$_\lambda$/Jマウスにおいてこの疾病を誘発することによって試験する(Lindstromら, (1988), Adv. Immunol., 42:233)。関節炎は易罹患系統のマウスにおいてII型のコラーゲンを注射することによって誘発される(Stuartら, (1984), Ann. Rev. Immunol., 42:233)。易罹患ラットにマイコバクテリアの熱ショックタンパク質を注射することによってアジュバント関節炎が誘発されるモデルについて報告されている(Van Edenら, (1988), Nature, 331:171)。甲状腺炎は報告されているようにマウスにチログロブリンを投与することによって誘発される(Maronら, (1980), J. Exp. Med., 152:1115)。インスリン依存性糖尿病(IDDM)は天然に発生するか、またはマウスの特定の系統のもの、例えばKanasawaら, (1984), Diabetologia, 27:113に報告されている系統などにおいて誘発させることができる。マウスおよびラットのEAE(実験的アレルギー性脳脊髄炎)はヒトでのMS(多発性骨髄腫)のモデルとして役立つ。このモデルでは脱髄性疾患がミエリン塩基性タンパク質の投与によって誘発される(Paterson, (1986), Textbook of Immunopathology, Mischerら編, GruneとStratton, New York, pp.179-213; McFarlinら, (1973), SCIENCE, 179:478: およびSatohら, (1987), J. Immunol., 138:179を参照せよ)。

【０２９１】

通常、本発明のリガンドは薬理学上適切な担体とともに精製形態で用いられる。典型的には、それらの担体としては、水性またはアルコール性/水性の溶液、乳剤または懸濁液、食塩液および/または緩衝化媒体を含む任意のものが挙げられる。非経口用ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、ブドウ糖リンゲル液、ブドウ糖と塩化ナトリウムと乳酸を添加したリンゲル液が含まれる。ポリペプチド複合体を懸濁液で保持することが必要である場合には、適切な生理学的に許容されるアジュバントを、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、およびアルギン酸塩などの増粘剤から選択することができる。

【０２９２】

静脈注射用のビヒクルとしては、液体ならびに栄養補液および電解質補液が含まれ、例えば、ブドウ糖リンゲル液をベースとしたものなどがある。保存剤およびその他の添加剤、例えば抗微生物剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスなども含有させることができる(Mack, (1982), Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版)。

【０２９３】

本発明のリガンドは、別個に投与される組成物として、または他の薬剤と組み合わせて

用いることができる。そのような薬剤としては、種々の免疫療法剤、例えば、シクロスポリン、メトトレキセート、アドリアマイシン、またはシスプラチン、およびイムノトキシンなどが含まれる。医薬組成物としては、種々の細胞傷害剤またはその他の薬剤を本発明のリガンドとともに含んだ「カクテル」、または異なる特異性を有する本発明のリガンド同士のさらなる組み合わせ、例えば異なる標的抗原またはエピトープを用いて選択された複数のリガンドが含まれ、それらは投与の前にプールしたものでもそうでないものでもよい。

【０２９４】

本発明の医薬組成物の投与経路は当業者が一般的に承知しているもの任意のものであってよい。治療（限定はされないが免疫療法を含む）のために、本発明の選択されたリガンドを標準的な技法によって任意の患者に対しても投与することができる。その投与は適切な方式であればどのような方法でも良く、そのようなものとしては、非経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、経皮、経肺、また適切であれば、カテーテルでの直接点滴が挙げられる。投与量と投与頻度は、その患者の年齢、性別、および病状、その他の薬剤との併用投与、医師が考慮すべき禁忌およびその他のパラメーターに依存する。

【０２９５】

本発明のリガンドは保管のために凍結乾燥して、使用に際して適切な担体中に再構成(溶解)することができる。この技法は従来から用いられている免疫グロブリンによって有効であることが示されており、当業界で知られている凍結乾燥および再構成法を用いることができる。当業者であれば、凍結乾燥および再構成が種々の程度の抗体活性のロスをもたらしうること(例えば、従来の免疫グロブリンでは、IgM抗体ではその活性のロスがIgG抗体よりも大きい傾向がある)、およびそのロスを補填するために使用量は多目に調整しなければならないかもしれないことは、理解されよう。

【０２９６】

本発明のリガンドを含有している組成物またはそれのカクテルは、予防的および/または治療的処置のために投与することができる。特定の治療的な適用では、選択された細胞集団に対し、少なくとも部分的な阻害、抑制、改変、殺滅、またはその他の何らかの測定可能なパラメーターを達成するのに十分な量を、「治療上有効な量」と定義する。この投与量を達成するために必要な量は、その疾患の重篤度、患者自身の免疫系の全体的な状態によって決まるが、通常はリガンド、例えば、抗体、受容体(例えばT細胞受容体)、またはそれらの結合タンパク質などを、体重1 kgあたり0.005～5.0 mgの範囲で用いるが、より一般的には、0.05 mg～2.0 mg/kg/1回投与量が用いられる。予防的な適用には、本発明のリガンドまたはそれのカクテルを含有している組成物を、治療用と同様の、またはやや低い投与量で投与することができる。

【０２９７】

本明細書に記載の組成物を用いて行われる治療は、1種以上の症状が、治療前のそれらの症状と比較して、またはその組成物での治療を受けていない個体(ヒトまたは動物モデル)でのそれらの症状と比較して、低減された場合に(例えば、少なくとも10%、または臨床評価の尺度で少なくとも1ポイント)、「有効」と見なされる。症状は標的としている疾患または障害によって異なることは当然であるが、普通の技術を持った医師やテクニシャンであれば評価することができる。それらの症状は例えば、当該疾患または障害の1種以上の生化学的指標のレベルをモニターすることによって(例えば、その疾患に関連する酵素または代謝産物のレベル、影響を受けた細胞数など)、物理学的な徴候(例えば炎症、腫瘍の大きさなど)によって、または、既に認められている臨床評価基準、例えば、総合傷害度評価尺度(Expanded Disability Status Scale)(多発性硬化症用)、炎症性腸疾患質問表(Irvine Inflammatory Bowel Disease Questionnaire)(32ポイントのアセスメントで腸の機能、全身症状、社会的機能、および情動状態のスコアを32から224の範囲でスコアリングし、スコアがより高ければクオリティー・オブ・ライフがより良いことを示す)、関節リウマチのクオリティー・オブ・ライフ尺度(Quality of Life Rheumatoid Arthritis Scale)、またはその他の本分野で知られている、既に認められている臨床評価尺度によっ

て、評価することができる。疾患または障害の症状が少なくとも10%または一定の臨床尺度で1ポイント以上持続的に低減(例えば、1日以上、好ましくはさらに長く)すれば、「有効な」治療であることを示している。同様にして、本明細書に記載の組成物を用いて行われる予防は、その組成物での処置を受けていない類似の個体(ヒトまたは動物モデル)でのそれらの症状と比較して、1種以上の症状の出現または重篤度が、遅延し、低減し、または出現しなければ、「有効」である。

【０２９８】

本発明のリガンドまたはそれのカクテルを含有する組成物は、哺乳類の体内の選択した標的細胞集団の変更、不活性化、殺滅、または除去を助けるために、予防的および治療的な状況において用いることができる。さらに、本明細書に記載の、選択されたポリペプチドのレパートリーは体外で、またはin vitroで、異種動物から採取した細胞から得た標的細胞集団を、選択的に殺滅、枯渇、または効果的に除去するために用いることができる。哺乳類から得た血液を体外で該リガンド、例えば抗体、細胞表面の受容体、またはそれらの結合タンパク質と組み合わせ、それによって望ましくない細胞を、該哺乳類に標準的な技法によって戻すための血液から殺滅するかまたは除去することができる。

【０２９９】

I:　本発明の半減期が延長されたリガンドの使用

本発明の方法で調製された二重特異性リガンドは、in vivoでの治療および予防への適用、in vivoでの診断への適用などに用いることができる。

【０３００】

本発明の二重特異性リガンドの治療的および予防的使用としては、本発明のリガンドをレシピエントの動物、例えばヒトに投与することが含まれる。本発明の二重特異性抗体は、半減期を延長する分子に対しての少なくとも1つの特異性を含んでなり、これはさらに別の1種以上の特異性を標的分子に対して向けることができる。例えば、二重特異性IgGは4種のエピトープに対して特異的であってよく、そのうちの1つが半減期を延長する分子でありうる。二重特異性は抗体が多量体の抗原と高い結合活性で結合することを可能としている。二重特異性抗体は、例えば、腫瘍細胞系の殺滅を媒介するための細胞傷害性T細胞の動員において、2つの抗原の架橋を可能としている。

【０３０１】

実質的に純粋なリガンドまたはそれの結合タンパク質、例えばdAb単量体は、哺乳類への投与には少なくとも90～95%の均質性を有するものであることが好ましく、医薬品としての使用、特にその哺乳類がヒトである場合には、98～99%、またはそれ以上の均質性が最も好ましい。部分精製または所望の均質性まで精製した後、そのリガンドを診断用として、または治療用として(体外での使用を含む)、またはアッセイ法の開発と実施において、免疫蛍光染色などにおいて、用いることができる(LefkoviteとPernis, (1979と1981), Immunological Methods, 第I巻とII巻, Academic Press, NY)。

【０３０２】

本発明のリガンドは、典型的には、炎症状態、アレルギー性過敏症、癌、細菌またはウイルス感染、および自己免疫疾患(自己免疫疾患としては、限定はされないが、I型糖尿病、喘息、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、クローン病、および重症筋無力症が含まれる)の予防、抑制、または治療に用いうる。

【０３０３】

本発明において、「予防」という用語は、保護作用のある組成物を疾病が誘発される前に投与することを含む。「抑制」という用語は、疾病の誘発イベントの後であって、その疾病の臨床症状発現前にその組成物を投与することを意味する。「治療」とは疾病の症状が出現した後にその保護作用のある組成物を投与することを含む。

【０３０４】

該二重特異性リガンドの、その疾病の保護または治療における有効性をスクリーニングするために用いることのできる動物モデル系を入手できる。易罹患マウスにおける全身性エリテマトーデス(SLE)の試験方法は当業界では既知である(Knightら, (1978), J. Exp.

Med., 147:1653; Reinerstenら, (1978), New Engl. J. Med., 299:515)。重症筋無力症(MG)は別の動物種から得た可溶性AchRタンパク質を用いてSV$_\lambda$/Jマウスの雌においてこの疾病を誘発することによって試験する(Lindstromら, (1988), Adv. Immunol., 42:233)。関節炎はマウスの易罹患系統にII型のコラーゲンを注射することによって誘発される(Stuartら, (1984), Ann. Rev. Immunol., 42:233)。易罹患ラットにマイコバクテリアの熱ショックタンパク質を注射することによってアジュバント関節炎が誘発されるモデルについて報告されている(Van Edenら, (1988), Nature, 331:171)。甲状腺炎は報告されているようにマウスにチログロブリンを投与することによって誘発される(Maronら, (1980), J. Exp. Med., 152:1115)。インスリン依存性糖尿病(IDDM)は天然に発生するか、またはマウスの特定系統のもの、例えばKanasawaら, (1984), Diabetologia, 27:113に報告されている系統などにおいて誘発することができる。マウスおよびラットのEAE(実験的アレルギー性脳脊髄炎)はヒトでのMS(多発性骨髄腫)のモデルとなる。このモデルでは脱髄性疾患がミエリン塩基性タンパク質の投与によって誘発される(Paterson, (1986), Textbook of Immunopathology, Mischerら編, GruneとStratton, New York, pp.179-213; McFarlinら, (1973), SCIENCE, 179:478: およびSatohら, (1987), J. Immunol., 138:179を参照せよ)。

【０３０５】

本発明の二重特異性リガンドおよびdAb単量体は、エンドサイトーシスに関与する細胞外の標的(例えば、クラスリン)と結合して、二重特異性リガンドをエンドサイトーシスで取り込まれるようにすることができ、もう一つの特異性で細胞内の環境へと送達される細胞内の標的と結合できるようにすることができる。この方策には、細胞内でも機能を保持できる物理的性質を持った二重特異性リガンドが必要である。あるいはまた、最終目的地である細胞内コンパートメントが酸化状態であるならば、十分に折り畳まれたリガンドであれば、ジスルフィドを含まないものである必要はないかもしれない。

【０３０６】

通常、本発明の二重特異性リガンドは薬理学上適切な担体とともに精製形態で用いられる。典型的には、それらの担体には、水性またはアルコール性/水性の溶液、乳剤または懸濁液、生理食塩液および/または緩衝化媒体を含んでいる何らかのものが含まれる。非経口用のビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、ブドウ糖リンゲル液、ブドウ糖と塩化ナトリウムと乳酸を添加したリンゲル液が含まれる。ポリペプチド複合体を懸濁液中に保持することが必要である場合には、適切な生理学的に許容されるアジュバントを、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、およびアルギン酸塩などの増粘剤から選択することができる。

【０３０７】

静脈注射用のビヒクルとしては、液体ならびに栄養補液および電解質補液が含まれ、例えば、ブドウ糖リンゲル液をベースとしたものなどがある。保存剤およびその他の添加剤、例えば抗微生物剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性気体なども含有させることができる(Mack, (1982), Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版)。

【０３０８】

本発明のリガンドは別個に投与される組成物として、または他の薬剤と組み合わせて用いることができる。そのような薬剤としては、種々の免疫療法剤、例えば、シクロスポリン、メトトレキセート、アドリアマイシン、またはシスプラチン、およびイムノトキシンなどが含まれる。医薬組成物としては、種々の細胞傷害剤またはその他の薬剤を本発明のリガンドとともに含んだ「カクテル」が含まれる。

【０３０９】

本発明の医薬組成物の投与経路は当業者が一般的に承知している任意のものであってよい。治療（限定はされないが免疫療法が含まれる）のためには、本発明のリガンドを標準的な技法によって任意の患者に対して投与することができる。その投与は適切な方法であればどのような方法でも良く、そのようなものとしては、非経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、経皮、肺を経由する経路、また適切であれば、カテーテルでの直接点滴も挙げられる

。投与量と投与頻度は、その患者の年齢、性別、および病状、その他の薬剤の併用投与、医師が考慮すべき禁忌およびその他のパラメーターによって決まる。

【０３１０】

本発明のリガンドは保管のために凍結乾燥して、使用に際して適切な担体中に再構成(溶解)することができる。この技法は従来から用いられている免疫グロブリンに有効であることが示されており、当業界で知られている凍結乾燥および再構成法を用いることができる。当業者であれば、凍結乾燥および再構成が種々の程度の抗体活性のロスをもたらしうること(例えば、従来の免疫グロブリンでは、IgM抗体ではその活性のロスがIgG抗体よりも大きい傾向がある)、およびそのロスを補填するために使用量は多目に調整しなければならないかもしれないことは、理解されよう。

【０３１１】

本発明のリガンドを含有している組成物またはそれのカクテルは、予防的および/または治療的処置として投与することができる。特定の治療的適用では、選択された細胞集団について、少なくとも部分的な阻害、抑制、改変、殺滅、またはその他の何らかの測定可能なパラメーターを達成するのに十分な量を、「治療上有効な量」と定義する。この投与量を達成するために必要な量は、その疾患の重篤度、患者自身の免疫系の一般的状態の如何によって変わるが、通常はリガンドを、体重1 kgあたり0.005から5.0 mgの範囲で用いるが、より一般的には、0.05 mgから2.0 mg/kg/1回投与量が用いられる。予防的な適用には、本発明のリガンドまたはそれのカクテルを含有している組成物を治療用と同様の、またはやや低い投与量で投与することができる。

【０３１２】

本発明のリガンドを含有する組成物は、哺乳類の体内での選択した標的細胞集団の変更、不活性化、殺滅、または除去を助けるために、予防的および治療的な状況において用いることができる。

【０３１３】

さらに、本明細書に記載の、選択されたポリペプチドのレパートリーは体外で、またはin vitroで、異種動物から採取した細胞から得た標的細胞集団を、選択的に殺滅、枯渇、または効果的に除去するために用いることができる。哺乳類から得た血液を体外で該リガンド、例えば抗体、細胞表面の受容体、またはそれらの結合タンパク質と組み合わせ、それによって望ましくない細胞を、該哺乳類に標準的な技法によって戻すための血液から殺滅するかまたは除去することができる。

【実施例】

【０３１４】

本発明を、以下の実施例において、例示のみのためにさらに説明する。dAbを命名する目的で、本明細書で用いる場合、ヒトTNFαをTAR1と呼び、ヒトTNFα受容体1(p55受容体)をTAR2と呼ぶ。

【０３１５】

実施例1．ヒト血清アルブミン(HSA)およびβ-ガラクトシダーゼ(β-gal)に対する二重特異性scFv抗体(K8)の選択

本実施例は、生殖細胞系列(ダミー)のV_Hドメインに連結されたV_κ可変ドメインのレパートリーを、β-galへの結合について選択し、生殖細胞系列(ダミー)のV_κドメインに連結されたV_H可変ドメインのレパートリーを、HSAへの結合について選択することを含む、β-galおよびHSAに対する二重特異性抗体を作製する方法を説明する。次いで、選択された可変V_H HSAおよびV_κ β-galドメインを結合させ、抗体をβ-galおよびHSAへの結合のために選択する。HSAはヒト血液中に認められる半減期を増加させるタンパク質である。

【０３１６】

本実験では4つのヒトファージ抗体ライブラリーを用いた。

【０３１７】

ライブラリー1　生殖細胞系列V_κ/DVT V_H　8.46×10^7

ライブラリー2　生殖細胞系列V_κ/NNK V_H　9.64×10^7

ライブラリー3　生殖細胞系列V_H/DVT V_κ　1.47 x 10^8
ライブラリー4　生殖細胞系列V_H/NNK V_κ　1.45 x 10^8

全ライブラリーは、相補性決定領域(CDR2およびCDR3)に組み込まれた側鎖多様性を有するV_H(V3-23/DP47およびJ_H4b)ならびにV_κ(O12/O2/DPK9およびJ_κ1)について単一のヒトフレームワークに基づく。

【０３１８】

ライブラリー1およびライブラリー2はダミーV_κ配列を含むが、V_Hの配列は位置H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H96、H97およびH98(それぞれ、DVTまたはNNKをコードする)において多様化している(図1)。ライブラリー3およびライブラリー4はダミーV_H配列を含むが、V_κの配列は位置L50、L53、L91、L92、L93、L94およびL96(それぞれ、DVTまたはNNKをコードする)において多様化している(図1)。このライブラリーは、ファージミドpIT2/ScFv構成をとっており(図2)、かつ、選択されなかったライブラリー中のクローンの大多数が機能的となるように、共通リガンドであるプロテインAおよびプロテインLへの結合について予備選択されている。上記で示されたライブラリーの大きさは予備選択後の大きさと一致する。ライブラリー1およびライブラリー2を混合した後、抗原について選択したところ、単一のV_H/ダミーV_κライブラリーが得られ、ライブラリー3およびライブラリー4を混合したところ、単一のV_κ/ダミーV_Hライブラリーが形成された。

【０３１９】

V_κ/ダミーV_Hライブラリーを用いてβ-galについて3回の選択を行い、また、V_H/ダミーV_κライブラリーを用いてHSAについて3回の選択を行った。β-galの場合、ファージ力価は1回目の1.1 x 10^6から3回目の2.0 x 10^8まで上がった。HSAの場合、ファージ力価は1回目の2 x 10^4から3回目の1.4 x 10^9まで上がった。この選択を、KM13ヘルパーファージ(D2ドメインとD3ドメインの間にプロテアーゼ切断部位を有するpIIIタンパク質を含む)を用い、ファージを1 mg/mlトリプシンを含むPBSで溶出したこと以外はGriffithら(1993)により記載されたように実施した。トリプシンの添加は、ヘルパーファージに由来するpIIIタンパク質(ファージミドに由来するものではなく)を切断し、さらにc-mycタグ中での切断により結合したscFv-ファージ融合物を溶出し(図2)、それにより機能的なscFvを発現するファージのさらなる富化およびバックグラウンドでの対応する減少を提供する(Kristensen & Winter, Folding & Design 3: 321-328, Jul 9, 1998)。選択を、100μg/mlの濃度のHSAまたはβ-galで被覆した免疫チューブを用いて実施した。

【０３２０】

結合について調べるため、各選択の3回目に由来する24個のクローンをモノクローナルファージELISAによりスクリーニングした。ファージ粒子を、Harrisonら、Methods Enzymol. 1996; 267:83-109により記載されたように製造した。96穴ELISAプレートを、PBS中10μg/mlの濃度の100μlのHSAまたはβ-galで、4℃にて一晩被覆した。抗M13-HRPコンジュゲートを用いた結合したファージの検出を用いる標準的なELISAプロトコルに従った(Hoogenboomら、1991)。クローンの選択により、50μlの上清について1.0を超えるELISAシグナルが得られた。

【０３２１】

次に、HSAについて選択されたV_H/ダミーV_κライブラリーおよびβ-galについて選択されたV_κ/ダミーV_Hライブラリーから、QIAprep Spin Miniprepキット(Qiagen)を用いて、DNAプレップを作製した。多様性の大部分にアクセスするため、DNAプレップを3回の選択の各々から作製した後、各々の抗原に対して一緒に取り出した。次いで、DNAプレップをSalI/NotIで37℃にて一晩消化した。断片をゲル精製した後、β-galについて選択されたV_κ/ダミーV_Hライブラリーに由来するV_κ鎖を、HSAについて選択されたV_H/ダミーV_κライブラリーのダミーV_κ鎖の代わりに連結し、3.3 x 10^9個のクローンのライブラリーを作製した。

【０３２２】

次いで、このライブラリーを、HSA(1回目)およびβ-gal(2回目)について選択（HSA/β-gal選択）するか、またはβ-gal(1回目)およびHSA(2回目)について選択（β-gal/HSA選択

）した。選択は上記のように行った。それぞれの場合に、2回目の選択の後、48個のクローンを、モノクローナルファージELISA(上記の通り)により、および可溶性scFv断片のELISAにより、HSAおよびβ-galへの結合について試験した。可溶性抗体フラグメントを、Harrisonら(1996)により記載されたように製造し、続いて、ブロッキングバッファーとして2% Tween/PBSを使用し、結合したscFvをプロテインL-HRPで検出したこと以外はHoogenboomら(1991) Nucleic Acids Res., 19: 4133による標準的なELISAプロトコルに従って実施した。HSA/β-gal選択からの3個のクローン(E4、E5およびE8)ならびにβ-gal/HSA選択からの2個のクローン(K8およびK10)は、両方の抗原に結合することができた。これらのクローンに由来するscFvを、プライマーLMB3およびpHENseqを用いて、Ignatovichら(1999) J Mol Biol 1999 Nov 26; 294(2):457-65により記載されたようにPCR増幅し、配列決定した。配列解析により、全てのクローンが同一であることが示された。従って、二重特異性抗体(K8)をコードするただ1個のみのクローンがさらなる研究のために選択された(図3)。

【０３２３】

実施例2. K8抗体の結合特性の特性解析

第1に、K8抗体の結合特性を、モノクローナルファージELISAにより特性解析した。96穴プレートを、PBS中、10μg/mlの濃度で、アルカリホスファターゼ(APS)、ウシ血清アルブミン(BSA)、ピーナッツ凝集素、リゾチームおよびシトクロムc(交叉反応性について調べるため)をともに含むHSAおよびβ-galを100μl用いて、4℃にて一晩被覆した。K8クローンに由来するファージミドをHarrisonら(1996)により記載されたようにKM13を用いてレスキューし、ファージを含む上清(50μl)を直接アッセイした。抗M13-HRPコンジュゲートを用いた結合したファージの検出を用いる標準的なELISAプロトコル(Hoogenboomら、1991)を行った。二重特異性K8抗体は、ファージの表面上に提示された場合、1.0を超える吸光度シグナルでHSAおよびβ-galに結合することが見出された(図4)。BSAへの強い結合も観察された(図4)。HSAおよびBSAはアミノ酸レベルで76%相同であるので、K8抗体がこれらの構造的に関連するタンパク質の両方を認識したことは驚くに値しない。他のタンパク質との交叉反応性は検出されなかった(図4)。

【０３２４】

第2に、K8抗体の結合特性を、可溶性scFv ELISAにおいて試験した。可溶性scFvフラグメントの産生を、Harrisonら(1996)により記載されたようにIPTGにより誘導した。K8 scFvの発現レベルを決定するために、可溶性抗体フラグメントを、HarlowおよびLane, Antibodies: a Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harborにより記載されたようにプロテインA-セファロースカラムを用いて、50 mlの誘導物の上清から精製した。次いで、OD_{280}を測定し、タンパク質濃度をSambrookら(1989)により記載されたように算出した。K8 scFvは上清中に19 mg/lの濃度で産生されていた。

【０３２５】

次いで、可溶性scFv ELISAを、既知の濃度のK8抗体フラグメントを用いて実施した。96穴プレートを、100μlの10μg/mlのHSA、BSAおよびβ-gal、ならびに100μlの1μg/ml濃度のプロテインAで被覆した。50μlのK8 scFvの連続希釈物をアプライし、結合した抗体フラグメントを、プロテインL-HRPを用いて検出した。ELISAの結果により、K8抗体の二重特異的性質が確認された(図5)。

【０３２６】

β-galへの結合がK8 scFv抗体のV_κドメインにより決定され、HSA/BSAへの結合がK8 scFv抗体のV_Hドメインにより決定されることを確認するために、そのV_κドメインを、SalI/NotI消化によりK8 scFv DNAから切り出し、ダミーV_H鎖を含むSalI/NotI消化されたpIT2ベクター中に連結した(図1および2)。得られたクローンK8V_κ/ダミーV_Hの結合特性を、可溶性scFv ELISAにより分析した。可溶性scFvフラグメントの産生を、Harrisonら(1996)により記載されたようにIPTGにより誘導し、scFvを含む上清(50μl)を直接アッセイした。可溶性scFv ELISAを実施例1に記載のように実施し、結合したscFvを、プロテインL-HRPを用いて検出した。ELISAの結果により、このクローンは依然としてβ-galに結合することができるが、BSAへの結合は無効になったことが示された(図6)。

【０３２７】
実施例3．抗原AおよびBに対する単一V_Hドメイン抗体ならびに抗原CおよびDに対する単一V_κドメイン抗体の選択
本実施例は、抗原AおよびBに対する単一V_Hドメイン抗体ならびに抗原CおよびDに対する単一V_κドメイン抗体を、相補的な可変ドメインの非存在下で、これらの抗原への結合について、最初の単一抗体可変ドメインのレパートリーを選択することにより作製する方法を説明する。
【０３２８】
結合するクローンの選択および特性解析を、以前に記載(実施例5を参照、PCT/GB 02/003014)のように行った。以下の4個のクローンを、さらなる研究のために選択した：
VH1-抗A V_H
VH2-抗B V_H
VK1-抗C V_κ
VK2-抗D V_κ
【０３２９】
V_Hドメインの組合せ(すなわち、V_H-V_Hリガンド)およびV_Lドメインの組合せ(V_L-V_Lリガンド)を含む二量体分子を製造するために、実施例1～3に上記された手順を、記載されたのと同様にして用いることができる。
【０３３０】
実施例4．二重特異性ScFv抗体(抗原AおよびBに対するVH1/VH2ならびに抗原CおよびDに対するVK1/VK2)の作製および特性解析
本実施例は、二重特異性ScFv抗体(抗原AおよびBに対するVH1/VH2ならびに抗原CおよびDに対するVK1/VK2)を、ScFvベクター中でそれぞれの抗原に対して選択されたV_κおよびV_H単一ドメインを結合させることにより作製することができることを証明するものである。
【０３３１】
二重特異性抗体VH1/VH2を作製するために、可変ドメインベクター1(図7)からNcoI/XhoI消化によりVH1単一ドメインを切り出し、NcoI/XhoI消化された可変ドメインベクター2(図7)中に連結して、VH1/可変ドメインベクター2を作製する。VH2単一ドメインを、5'末端にSalI制限部位を導入し、かつ3'末端にNotI制限部位を導入するプライマーを用いて、可変ドメインベクター1からPCR増幅する。次いで、得られたPCR産物をSalI/NotIで消化し、SalI/NotI消化されたVH1/可変ドメインベクター2中に連結して、VH1/VH2/可変ドメインベクター2を作製する。
【０３３２】
VK1/VK2/可変ドメインベクター2も同様の方法で作製する。作製されたVH1/VH2 ScFvおよびVK1/VK2 ScFvの二重特異的性質を、以前に記載(実施例6を参照、PCT/GB 02/003014)のように、可溶性ScFv ELISAにおいて試験する。競合ELISAを、以前に記載(実施例8を参照、PCT/GB 02/003014)のように実施する。
【０３３３】
予想される結果：
-VH1/VH2 ScFvは抗原AおよびBに同時に結合することができる、
-VK1/VK2 ScFvは抗原CおよびDに同時に結合することができる、
-VH1/VH2 ScFv結合は競合的である(抗原Aに結合した場合、VH1/VH2 ScFvは抗原Bに結合することができない)、
-VK1/VK2 ScFv結合は競合的である(抗原Cに結合した場合、VK1/VK2 ScFvは抗原Dに結合することができない)。
【０３３４】
実施例5．二重特異性VH1/VH2 FabおよびVK1/VK2 Fabの構築ならびにそれらの結合特性の分析
VH1/VH2 Fabを作製するために、VH1単一ドメインをNcoI/XhoI消化されたCHベクター(図8)中に連結してVH1/CHを作製し、VH2単一ドメインをSalI/NotI消化されたCKベクター(図9

)中に連結してVH2/CKを作製する。VH1/CHおよびVH2/CKから誘導されたプラスミドDNAを用いて、以前に記載(実施例8を参照、PCT/GB 02/003014)のようにコンピテントな大腸菌細胞を同時形質転換する。

【０３３５】

次いで、VH1/CHおよびVH2/CKプラスミドを含むクローンをIPTGにより誘導して、以前に記載(実施例8を参照、PCT/GB 02/003014)のように可溶性VH1/VH2 Fabを作製する。

【０３３６】

VK1/VK2 Fabも同様に作製する。

【０３３７】

作製されたFabの結合特性を、以前に記載(実施例8を参照、PCT/GB 02/003014)のように競合ELISAにより試験する。

【０３３８】

予想される結果：

-VH1/VH2 Fabは抗原AおよびBに同時に結合することができる、

-VK1/VK2 Fabは抗原CおよびDに同時に結合することができる、

-VH1/VH2 Fab結合は競合的である(抗原Aに結合した場合、VH1/VH2 Fabは抗原Bに結合することができない)、

-VK1/VK2 Fab結合は競合的である(抗原Cに結合した場合、VK1/VK2 Fabは抗原Dに結合することができない)。

【０３３９】

実施例6

dAb二量体のキレート化

概要

VHおよびVKホモ二量体を、フレキシブルなポリペプチドリンカーを用いて、dAb-リンカー-dAb構成で作製する。ベクターを、異なる長さのグリシン-セリンリンカー 3U:$(Gly_4Ser)_3$、5U:$(Gly_4Ser)_5$、7U:$(Gly_4Ser)_7$を含むdAbリンカー-dAb構成で作製した。二量体のライブラリーを、リンカーの上流にガイドdAbを用い［TAR1-5(VK)、TAR1-27(VK)、TAR2-5(VH)またはTAR2-6(VK)］、対応する第2のdAbのライブラリーを該リンカーの後ろに用いることにより作製した。この方法を用いて、新規な二量体dAbを選択した。抗原結合に対する二量体化の効果を、ELISAおよびBIAcore試験により、ならびに細胞中和アッセイおよび受容体結合アッセイにおいて決定した。TAR1-5およびTAR1-27の双方の二量体化により、結合親和性および中和レベルにおける大幅な改善が得られた。

【０３４０】

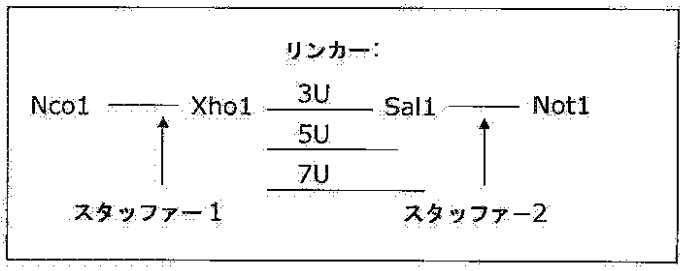
1.0 方法

1.1 ライブラリーの作製

1.1.1 ベクター

pEDA3U、pEDA5UおよびpEDA7Uベクターを、dAb-リンカー-dAb構成と適合した異なるリンカー長を導入するように設計した。pEDA3Uについては、センスおよびアンチセンスの73塩基対のオリゴリンカーを、0.1M NaCl、10 mM Tris-HCl pH7.4を含むバッファー中でゆっくりとしたアニーリングプログラム(95℃-5分、80℃-10分、70℃-15分、56℃-15分、使用するまで42℃)を用いてアニーリングし、XhoIおよびNotI制限部位を用いてクローニングした。このリンカーは、3個の(Gly_4Ser)単位、およびSalIとNotIクローニング部位の間に置かれたスタッファー領域を含んでいた(スキーム1)。ファージ提示により単量体dAbが選択される可能性を低下させるために、スタッファー(stuffer)領域を、3個の停止コドンと、SacI制限部位と、第2のdAbが存在しない場合にはその領域を読み枠から外れさせるフレームシフト突然変異とを含有するように設定した。必要とされるリンカーの長さのために、pEDA5Uおよび7Uについては、重複するオリゴリンカーを各ベクターについて設計し、アニーリングさせ、Klenowを用いて伸長させた。次いで、この断片を精製し、好適な酵素を用いて消化した後、XhoIおよびNotI制限部位を用いてクローニングした。

【０３４１】



スキーム1

【０３４２】

1.1.2 ライブラリーの調製

ガイドdAbに相当するN末端V遺伝子を、NcoIおよびXhoI制限部位を用いてリンカーの上流にクローニングした。VH遺伝子は既存の適合部位を有するが、クローニングするVK遺伝子は好適な制限部位の導入を必要とした。これを、SuperTaq(HTBiotechnology Ltd)およびpfuターボ(Stratagene)の2:1混合物を用いる30サイクルのPCR増幅において、改変性PCRプライマー(VK-DLIBF:5' cggccatggcgtcaacggacat 3'; VKXhoIR: 5' atgtgcgctcgagcgtttgattt 3')を用いることにより達成した。これは5'末端のNcoI部位を維持していたが、隣接したSalI部位を破壊し、3'末端にXhoI部位を導入した。5つのガイドdAbを、3つの二量体ベクターの各々にクローニングした：TAR1-5(VK)、TAR1-27(VK)、TAR2-5(VH)、TAR2-6(VK)およびTAR2-7(VK)。全ての構築物を配列決定により確認した。

【０３４３】

ベクター(pEDA3U、5Uおよび7U)の各々におけるリンカーの上流にガイドdAbをクローニングして［TAR1-5(VK)、TAR1-27(VK)、TAR2-5(VH)またはTAR2-6(VK)］、対応する第2のdAbのライブラリーを該リンカーの後ろにクローニングした。このことを達成するために、TAR1-5もしくはTAR1-27がガイドdAbである場合には、ヒトTNFαに対するVKライブラリー(1回目の選択後に約1 x 10^6の多様性を示す)、またはTAR2-5もしくはTAR2-6がそれぞれガイドdAbである場合には、ヒトp55 TNF受容体に対するVHもしくはVKライブラリー(1回目の選択後に両方とも約1 x 10^5の多様性を示す)の1回目の選択から回収したファージから、相補的aAbライブラリーをPCR増幅した。VKライブラリーについては、SuperTaqおよびpfuターボの2:1混合物を用いる30サイクルのPCR増幅において、プライマーを用いてPCR増幅を行った。VHライブラリーを、プライマーを用いてPCR増幅して、この遺伝子の5'末端にSalI制限部位を導入した。dAbライブラリーのPCRを好適な制限酵素で消化し、SalI/NotI制限部位を用いて対応するベクター中のリンカーの下流に連結し、新しく調製したコンピテントなTG1細胞中にエレクトロポレーションした。

【０３４４】

各ライブラリーについて達成された力価は以下の通りである。

TAR1-5: pEDA3U = 4 x 10^8、pEDA5U = 8 x 10^7、pEDA7U = 1 x 10^8

TAR1-27: pEDA3U = 6.2 x 10^8、pEDA5U = 1 x 10^8、pEDA7U = 1 x 10^9

TAR2h-5: pEDA3U = 4 x 10^7、pEDA5U = 2 x 10^8、pEDA7U = 8 x 10^7

TAR2h-6: pEDA3U = 7.4 x 10^8、pEDA5U = 1.2 x 10^8、pEDA7U = 2.2 x 10^8

【０３４５】

1.2 選択

1.2.1 TNFα

選択を、免疫チューブ上で受動的に被覆されたヒトTNFαを用いて行った。簡単に述べると、免疫チューブを、1～4 mlの必要な抗原を用いて一晩被覆する。次いで、免疫チューブをPBSで3回洗浄し、2%粉乳を含むPBSで1～2時間ブロックし、PBSでさらに3回洗浄した。ファージ溶液を2%粉乳を含むPBS中に希釈し、室温にて2時間インキュベートした。次いで、チューブをPBSで洗浄し、ファージを1 mg/mlトリプシン-PBSで溶出する。3回の選択手順をTAR1-5二量体ライブラリーについて行って調べた。1回目の選択を、ヒトTNFα

を用いて1μg/mlまたは20μg/mlで被覆した免疫チューブ中で行い、PBS 0.1%Tween中で20回洗浄した。TG1細胞を、溶出したファージに感染させ、力価を測定する(例えば、Marksら、J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97, Richmannら、Biochemistry 1993 Aug 31;32(34):8848-55)。

【０３４６】

回収された力価は、以下のとおりであった。

pEDA3U = 2.8 x 10^7(1μg/ml TNF)、1.5 x 10^8(20μg/ml TNF)、
pEDA5U = 1.8 x 10^7(1μg/ml TNF)、1.6 x 10^8(20μg/ml TNF)、
pEDA7U = 8 x 10^6(1μg/ml TNF)、7 x 10^7(20μg/ml TNF)

【０３４７】

2回目の選択を、3つの異なる方法を用いて行った。

1．免疫チューブ中、20回洗浄し、一晩インキュベートした後、さらに10回洗浄した。

【０３４８】

2．免疫チューブ中、20回洗浄した後、1μg/ml TNFαを含む洗浄バッファー中、室温にて1時間インキュベートした後、さらに10回洗浄した。

【０３４９】

3．33ピコモルのビオチン化ヒトTNFαを用いてストレプトアビジン上で選択した(Henderikxら、2002, Selection of antibodies against biotinylated antigens. Antibody Phage Display: Methods and Protocols, O'Brien and Atkin(編), Humana Press)。2回目の選択から単一クローンを96穴プレート中に拾い、粗上清調製物を2 mlの96穴プレート様式で作製した。

【０３５０】

	1回目 ヒトTNFα免疫チューブ被覆濃度	2回目 選択方法1	2回目 選択方法2	2回目 選択方法3
pEDA3U	1μg/ml	1 x 10^9	1.8 x 10^9	2.4 x 10^{10}
pEDA3U	20μg/ml	6 x 10^9	1.8 x 10^{10}	8.5 x 10^{10}
pEDA5U	1μg/ml	9 x 10^8	1.4 x 10^9	2.8 x 10^{10}
pEDA5U	20μg/ml	9.5 x 10^9	8.5 x 10^9	2.8 x 10^{10}
pEDA7U	1μg/ml	7.8 x 10^8	1.6 x 10^8	4 x 10^{10}
pEDA7U	20μg/ml	1 x 10^{10}	8 x 10^9	1.5 x 10^{10}

【０３５１】

TAR1-27については、以下の変更を加えて以前に記載のように選択を行った。1回目の選択を、ヒトTNFαを用いて1μg/mlまたは20μg/mlで被覆された免疫チューブ中で行い、PBS 0.1%Tween中で20回洗浄した。2回目の選択を免疫チューブ中で行い、20回洗浄し、一晩インキュベートした後、さらに20回洗浄した。2回目の選択から単一クローンを96穴プレート中に拾い、粗上清調製物を2 mlの96穴プレート様式で作製した。

【０３５２】

TAR1-27の力価は以下の通りである：

	ヒトTNFα受容体免疫チューブ被覆濃度	1回目	2回目
pEDA3U	1μg/ml	4×10^9	6×10^9
pEDA3U	20μg/ml	5×10^9	4.4×10^{10}
pEDA5U	1μg/ml	1.5×10^9	1.9×10^{10}
pEDA5U	20μg/ml	3.4×10^9	3.5×10^{10}
pEDA7U	1μg/ml	2.6×10^9	5×10^9
pEDA7U	20μg/ml	7×10^9	1.4×10^{10}

【０３５３】

1.2.2 TNF受容体1(p55受容体；TAR2)

選択を、TAR2h-5ライブラリーのみに関して以前に記載のように行った。3回の選択を、1μg/mlヒトp55 TNF受容体または10μg/mlヒトp55 TNF受容体のいずれかを用いて免疫チューブ中で行い、PBS 0.1%Tween中で20回洗浄し、一晩インキュベートした後、さらに20回洗浄した。2および3回目の選択から単一クローンを96穴プレート中に拾い、粗上清調製物を2 mlの96穴プレート様式で作製した。

【０３５４】

TAR2h-5の力価は以下の通りである：

	1回目 ヒトp55 TNF受容体 免疫チューブ被覆濃度	1回目	2回目	3回目
pEDA3U	1μg/ml	2.4×10^6	1.2×10^7	1.9×10^9
pEDA3U	10μg/ml	3.1×10^7	7×10^7	1×10^9
pEDA5U	1μg/ml	2.5×10^6	1.1×10^7	5.7×10^8
pEDA5U	10μg/ml	3.7×10^7	2.3×10^8	2.9×10^9
pEDA7U	1μg/ml	1.3×10^6	1.3×10^7	1.4×10^9
pEDA7U	10μg/ml	1.6×10^7	1.9×10^7	3×10^{10}

【０３５５】

1.3 スクリーニング

必要に応じて、異なる選択方法に由来する3U、5Uおよび7Uライブラリーの各々から、2または3回目の選択から単一クローンを拾った。クローンを100μg/mlアンピシリンおよび1%グルコースを含む2 x TY中、37℃にて一晩増殖させた。この培養物の1/100希釈物を、2 mlの96穴プレート様式に入れた100μg/mlアンピシリンおよび0.1%グルコースを含む2 mlの2 x TYに接種し、OD_{600}が約0.9になるまで振とうしながら37℃にて増殖させた。次いで、その培養物を、30℃にて一晩にわたり1 mM IPTGを用いて誘導した。上清をsorvalプレート遠心分離機中、4000 rpmにて15分間遠心分離することにより清澄化した。上清調製物を最初のスクリーニングに用いた。

【０３５６】

1.3.1 ELISA

二量体組換えタンパク質の結合活性を、プロテインA/L ELISAまたは抗原ELISAにより単量体と比較した。簡単に述べると、96穴プレートを抗原またはプロテインA/Lで4℃にて一晩被覆する。プレートを0.05%Tween-PBSで洗浄し、2%Tween-PBSで2時間ブロックした。サンプルをプレートに加え、室温にて1時間インキュベートする。プレートを洗浄し、第2の試薬と共に室温にて1時間インキュベートする。プレートを洗浄し、TMB基質を用いて発

色させる。タンパク質A/L-HRPまたはIndia-HRPを第2の試薬として用いた。抗原ELISAについては、用いた抗原濃度は、ヒトTNFαおよびヒトTHF受容体1に関してPBS中1μg/mlであった。多くの場合、ガイドdAbの存在により、二量体は陽性のELISAシグナルを与えたので、解離速度測定をBIAcoreにより試験した。

【０３５７】

1.3.2 BIAcore

TAR1-5およびTAR2h-5クローンについてBIAcore分析を行った。スクリーニングのために、ヒトTNFαを高密度(約10000 RU)でCM5チップに結合させた。50μlのヒトTNFα(50μg/ml)を、酢酸バッファーpH5.5中、5μl/分でチップに結合させた。分析後のチップの標準的な方法を用いた再生は、ヒトTNFαの不安定性のために不可能であるので、各サンプルを分析した後、チップをバッファーで10分間洗浄した。

【０３５８】

TAR1-5については、2回目の選択からのクローン上清をBIAcoreによりスクリーニングした。48個のクローンを、以下の選択方法を用いて得られた3U、5Uおよび7Uの各々からスクリーニングした。

R1：1μg/mlヒトTNFα免疫チューブ、R2 1μg/mlヒトTNFα免疫チューブ、一晩洗浄、
R1：20μg/mlヒトTNFα免疫チューブ、R2 20μg/mlヒトTNFα免疫チューブ、一晩洗浄、
R1：1μg/mlヒトTNFα免疫チューブ、R2 ビーズ上のビオチン化ヒトTNFα 33ピコモル、
R1：20μg/mlヒトTNFα免疫チューブ、R2 33ピコモルのビオチン化ヒトTNFαビーズ。

【０３５９】

スクリーニングのために、ヒトp55 TNF受容体を高密度(約4000 RU)でCM5チップに結合させた。100μlのヒトp55 TNF受容体(10μg/ml)を酢酸バッファーpH5.5中、5μl/分でチップに結合させた。標準的な再生条件を試験した(グリシンpH2またはpH3)が、各事例においては、抗原をチップの表面から除去したので、TNFαと同様、各サンプルを分析した後、チップをバッファーで10分間洗浄した。

【０３６０】

TAR2-5については、2回目の選択由来のクローン上清をスクリーニングした。48個のクローンを、以下の選択方法を用いて、3U、5Uおよび7Uライブラリーの各々からスクリーニングした：

R1:1μg/mlヒトp55 TNF受容体免疫チューブ、R2 1μg/mlヒトp55 TNF受容体免疫チューブ、一晩洗浄、
R1:10μg/mlヒトp55 TNF受容体免疫チューブ、R2 10μg/mlヒトp55 TNF受容体免疫チューブ、一晩洗浄。

【０３６１】

1.3.3 受容体および細胞アッセイ

二量体の中和能を以下のように受容体アッセイで調べた。

【０３６２】

受容体結合

抗TNF dAbを、TNFの組換えTNF受容体1(p55)への結合を阻害する能力について試験した。簡単に述べると、Maxisorpプレートを、30 mg/ml抗ヒトFcマウスモノクローナル抗体(Zymed, San Fransisco, USA)と共に一晩インキュベートした。ウェルを0.05%Tween-20を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、続いて1%BSAを含むPBSでブロックした後、100 ng/ml TNF受容体1 Fc融合タンパク質(R&D Systems, Minneapolis, USA)と共にインキュベートした。抗TNF dAbをTNFと混合し、これを10 ng/mlの最終濃度で洗浄されたウェルに加えた。TNF結合を、0.2 mg/mlビオチン化抗TNF抗体(HyCult biotechnology, Uben, Netherlands)、次いでセイヨウワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(Amersham Biosciences, UK)の1/500希釈物で、検出した後、TMB基質(KPL, Gaithersburg, USA)と共にインキュベートした。HClを添加することにより反応を停止させ、吸光度を450 nmで読み取った。抗TNF dAb活性はTNF結合の減少をもたらし、従ってTNFのみの対照と比較して吸光度の減少をもたらした。

【０３６３】
L929細胞毒性アッセイ
また、抗TNF dAbを、マウスL929線維芽細胞(Evans, T.(2000) Molecular Biotechnology 15, 243-248)について、TNFの細胞毒性活性を中和する能力について試験した。簡単に述べると、マイクロタイタープレート中に塗布したL929細胞を、抗TNF dAb、100 pg/ml TNFおよび1 mg/mlアクチノマイシンD(Sigma, Poole, UK)と共に一晩インキュベートした。細胞の生存度を、[3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム(Promega, Madison, USA)と共にインキュベートした後、490 nmで吸光度を読み取ることにより、測定した。抗TNF dAb活性はTNF細胞毒性の減少をもたらし、従ってTNFのみの対照と比較して吸光度の増加をもたらす。
【０３６４】
初期スクリーニングでは、上記のような、BIAcore分析のために調製した上清も受容体アッセイにおいて用いた。選択された二量体のさらなる分析も、精製されたタンパク質を用いて、受容体アッセイおよび細胞アッセイにおいて行った。
【０３６５】
HeLa IL-8アッセイ
抗TNFR1または抗TNFα dAbを、HeLa細胞において、TNFによるIL-8分泌の誘導を中和する能力について試験した(HUVECにおけるIL-1によるIL-8の誘導を記載するAkeson, L.ら(1996) Journal of Biological Chemistry 271, 30517-30523の方法から適合させた方法；ここでは本発明者らはヒトTNFαによる誘導に注目し、HUVEC細胞系の代わりにHeLa細胞を使用している)。簡単に述べると、マイクロタイタープレート中にプレーティングしたHeLa細胞を、dAbおよび300 pg/mlのTNFと共に一晩インキュベートした。インキュベーション後、上清を細胞から吸引除去し、サンドイッチELISA(R&D Systems)によりIL-8濃度を測定した。抗TNFR1 dAb活性は、TNFのみの対照と比較して上清中へのIL-8分泌の減少をもたらす。
【０３６６】
L929アッセイを以下の実験を通して用いる；しかしながら、抗TNF受容体1(p55)リガンドを測定するには、HeLa IL-8アッセイの使用が好ましい；L929アッセイにおけるマウスp55の存在は、その使用にある種の制限をもたらす。
【０３６７】
1.4 配列解析
BIAcoreおよび受容体アッセイスクリーニングにおいて興味深い特性を有することが証明された二量体を配列決定した。配列を配列表に詳述する。
【０３６８】
1.5 構成
1.5.1 TAR1-5-19二量体
良好な中和特性を有することが示されたTAR1-5二量体を、再構成して細胞アッセイおよび受容体アッセイにおいて分析した。TAR1-5ガイドdAbを、親和性のある成熟したクローンTAR1-5-19と置換した。これを達成するために、TAR1-5を個々の二量体対から排除してクローニングし、PCRにより増幅されたTAR1-5-19と置換した。さらに、TAR1-5-19ホモ二量体も3U、5Uおよび7Uベクター中に構築した。この遺伝子のN末端コピーをPCRにより増幅し、上記のようにクローニングし、C末端遺伝子断片を、既存のSalIおよびNotI制限部位を用いてクローニングした。
【０３６９】
1.5.2 突然変異誘発
dAb2に存在するアンバー停止コドン、TAR1-5二量体対のC末端dAbのうちの1つを、部位特異的突然変異誘発によりグルタミンに突然変異させた。
【０３７０】
1.5.3 Fab
TAR1-5またはTAR1-5-19を含む二量体を、Fab発現ベクター中で再構成した。dAbを、Sfi

IおよびNotI制限部位を用いて、CKまたはCH遺伝子のいずれかを含む発現ベクター中にクローニングし、配列解析により確認した。CKベクターはpUC系アンピシリン耐性ベクターから誘導されたものであり、CHベクターはpACYCクロラムフェニコール耐性ベクターから誘導されたものである。Fab発現のために、dAb-CHおよびdAb-CK構築物をHB2151細胞中に同時形質転換し、0.1％グルコース、100μg/mlアンピシリンおよび10μg/mlクロラムフェニコールを含む2 x TY中で増殖させた。

【０３７１】

1.5.3 ヒンジ二量体化

シスチン結合形成を介するdAbの二量体化を調べた。ヒトIgGC1ヒンジの改変形態である短いアミノ酸配列EPKSGDKTHTCPPCPを、dAb上のC末端領域に遺伝子工学的に作製した。この配列をコードするオリゴリンカーを、以前に記載のように合成しおよびアニーリングさせた。このリンカーを、XhoIおよびNotI制限部位を用いて、TAR1-5-19を含むpEDAベクター中にクローニングした。二量体化は周辺質中、in situで起こる。

【０３７２】

1.6 発現および精製

1.6.1 発現

上清を、以前に記載のとおり、初期スクリーニングのために2 mlの96穴プレート様式で調製した。初期スクリーニングプロセスに続いて、選択された二量体をさらに分析した。二量体構築物を、TOP10F'またはHB2151細胞中で上清として発現させた。簡単に述べると、新しくストリークされたプレートからの個々のコロニーを、100μg/mlアンピシリンおよび1％グルコースを含む2 x TY中、37℃にて一晩増殖させた。この培養物の1/100希釈物を、100μg/mlアンピシリンおよび0.1％グルコースを含む2 x TY中に接種し、OD600が約0.9になるまで振とうしながら37℃で増殖させた。次いで、培養物を30℃にて一晩、1 mM IPTGで誘導した。細胞を遠心分離により除去し、上清をプロテインAまたはLアガロースを用いて精製した。

【０３７３】

Fabおよびシステインヒンジ二量体を、HB2152細胞中の周辺質タンパク質として発現させた。一晩培養物の1/100希釈物を、0.1％グルコースおよび適当な抗生物質を含む2 x TY中に接種し、OD600が約0.9になるまで30℃で振とうしながら増殖させた。次いで、培養物を25℃にて3～4時間、1 mM IPTGを用いて誘導した。細胞を遠心分離により回収し、ペレットを周辺質調製バッファー(30 mM Tris-HCl pH8.0、1 mM EDTA、20％スクロース)中に再懸濁した。遠心分離後、上清を保持し、ペレットを5 mM $MgSO_4$に再懸濁した。上清を再度遠心分離により回収し、プールし、精製した。

【０３７４】

1.6.2 プロテインA/L精製

プロテインLアガロース(Affitech, Norway)またはプロテインAアガロース(Sigma, UK)からの二量体タンパク質の精製の最適化を調べた。タンパク質を、蠕動ポンプを用いて、バッチ式またはカラム式溶出により溶出した。3つのバッファー、0.1Mリン酸-クエン酸バッファーpH2.6、0.2MグリシンpH2.5および0.1MグリシンpH2.5を試験した。最適条件を、10カラム容量を超える量の0.1MグリシンpH2.5を用いる蠕動ポンプ条件下であると決定した。プロテインAからの精製を、0.1MグリシンpH2.5を用いる蠕動ポンプ条件下で行った。

【０３７５】

1.6.3 FPLC精製

AKTA Explorer 100システム(Amersham Biosciences Ltd)でのFPLC分析により、さらなる精製を行った。TAR1-5およびTAR1-5-19二量体を、陽イオン交換クロマトグラフィー(1 ml Resource S Amersham Biosciences Ltd)により分画し、50 mM酢酸バッファーpH4中での0-1M NaCl勾配を用いて溶出した。ヒンジ二量体を、イオン交換(1 ml Resource Q Amersham Biosciences Ltd)により精製し、25 mM Tris HCl pH8.0中の0-1M NaCl勾配を用いて溶出した。Fabを、0.05％tweenを含むPBS中、0.5 ml/分の流速でのsuperose 12(Amersham Biosciences Ltd)カラム運転を用いるサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。

精製後、vivaspin 5Kカットオフ濃縮装置(Vivascience Ltd)を用いてサンプルを濃縮した。

【０３７６】

2.0 結果

2.1 TAR1-5二量体

全ライブラリーおよび選択条件を含む2回目の選択から6 x 96個のクローンを拾った。上清調製物を作製し、抗原およびプロテインL ELISA、BIAcoreにより、ならびに受容体アッセイにおいてアッセイした。ELISAにおいて、陽性結合クローンを各選択方法から同定し、3U、5Uおよび7Uライブラリー間に分配した。しかしながら、ガイドdAbが常に存在するので、この方法により高親和性結合物質と低親和性結合物質との間を区別するのは不可能であり、従ってBIAcore分析を行った。

【０３７７】

BIAcore分析を、2 mlの上清を用いて行った。BIAcore分析により、二量体Koff速度が、単量体TAR1-5と比較して大きく改善されることが示された。単量体Koff速度は、10^{-3}～10^{-4}Mの範囲にある二量体Koff速度と比較して、10^{-1}Mの範囲であった。非常に遅い解離速度を有するようである16個のクローンを選択したが、これらは3U、5Uおよび7Uライブラリー由来のものであり、配列決定された。さらに、上清を、受容体アッセイにおいてヒトTNFαを中和する能力について分析した。

【０３７８】

これらのアッセイにおいて中和し、配列決定された6個のリードクローン(以下のd1～d6)が得られた。この結果は、得られた6個のクローンにはたった3つの異なる第2のdAbが存在すること(dAb1、dAb2およびdAb3)、しかしその第2のdAbが2回以上認められる場合には、それらは異なった長さのリンカーと結合していることを示している。

【０３７９】

TAR1-5d1：3Uリンカー　第2のdAb＝dAb1　- 1μg/ml Ag免疫チューブ、一晩洗浄、
TAR1-5d2：3Uリンカー　第2のdAb＝dAb2　- 1μg/ml Ag免疫チューブ、一晩洗浄、
TAR1-5d3：5Uリンカー　第2のdAb＝dAb2　- 1μg/ml Ag免疫チューブ、一晩洗浄、
TAR1-5d4：5Uリンカー　第2のdAb＝dAb3　- 20μg/ml Ag免疫チューブ、一晩洗浄、
TAR1-5d5：5Uリンカー　第2のdAb＝dAb1　- 20μg/ml Ag免疫チューブ、一晩洗浄、
TAR1-5d6：7Uリンカー　第2のdAb＝dAb1　- R1:1μg/ml Ag免疫チューブ、一晩洗浄、R2:ビーズ。

【０３８０】

この6個のリードクローンをさらに試験した。タンパク質を周辺質および上清から製造し、プロテインLアガロースを用いて精製し、細胞アッセイおよび受容体アッセイにおいて試験した。中和のレベルは様々であった(表1)。タンパク質調製のための最適条件を決定した。HB2151細胞から上清として産生されたタンパク質が最も高い収量(約10 mgs/L培養物)を与えた。上清をプロテインLアガロースと共に、室温にて2時間または4℃にて一晩インキュベートした。ビーズをPBS/NaClで洗浄し、蠕動ポンプを用いてFPLCカラム上に充填した。ビーズを10カラム容量のPBS/NaClで洗浄し、0.1Mグリシンph2.5を用いて溶出した。一般的には、二量体タンパク質は単量体の後に溶出される。

【０３８１】

TAR1-5d1～6の二量体をFPLCにより精製した。FPLC精製により、3種が得られ、SDS PAGEにより同定した。1種は単量体に相当し、他の2種は異なる大きさの二量体に相当する。2種の大きい方は、おそらくC末端タグの存在に起因するものであろう。これらのタンパク質を受容体アッセイにおいて試験した。表1に示されるデータは、2つの二量体種から得られた最適な結果を表す(図11)。

【０３８２】

二量体対に由来する3つの第2のdAb(すなわち、dAb1、dAb2およびdAb3)を単量体としてクローン化し、ELISAにより、ならびに細胞アッセイおよび受容体アッセイにおいて試験した。3つのdAbは全て、抗原ELISAによりTNFに特異的に結合し、プラスチックまたはBSA

と交叉反応しない。単量体としては、dAbはいずれも細胞アッセイまたは受容体アッセイにおいて中和しない。

【０３８３】

2.1.2 TAR1-5-19二量体

6個のリードクローンにおいて、TAR1-5-19をTAR1-5と置換した。細胞アッセイおよび受容体アッセイにおける全TAR1-5-19二量体の分析を、特に指摘しない限りは総タンパク質(精製のみ行ったプロテインL)を用いて行った(表2)。TAR1-5-19d4およびTAR1-5-19d3は細胞アッセイにおいて最良のND_{50}(約5nM)を示したが、これは受容体アッセイの結果と一致し、TAR1-5-19単量体(ND_{50} 約30nM)を上回る改善である。精製されたTAR1-5二量体は受容体アッセイおよび細胞アッセイにおいて変動する結果を与えるが、TAR1-5-19二量体はより一貫していた。変動性は、タンパク質精製の際に異なる溶出バッファーを用いる場合に示された。0.1Mリン酸-クエン酸バッファーpH2.6または0.2MグリシンpH2.5を用いる溶出は、多くの場合、プロテインLアガロースから全タンパク質を除去するが、その機能性を低下させる。

【０３８４】

TAR1-5-19d4を発酵槽中で発現させ、陽イオン交換FPLC上で精製して、完全に純粋な二量体を得た。TAR1-5d4に関して、単量体および2つの二量体種に対応する3種がFPLC精製により得られた。この二量体をアミノ酸配列決定した。次いで、TAR1-5-19単量体およびTAR1-5-19d4を受容体アッセイにおいて試験したところ、単量体について得られたIC50は30 nMであり、二量体については8 nMであった。TAR1-5-19単量体、TAR1-5-19d4およびTAR1-5d4を比較した受容体アッセイの結果を図10に示す。

【０３８５】

TAR1-5-19ホモ二量体を、3U、5Uおよび7Uベクター中に作製し、発現させ、プロテインL上で精製した。このタンパク質を細胞アッセイおよび受容体アッセイにおいて試験し、得られたIC_{50}(受容体アッセイについて)およびND_{50}(細胞アッセイについて)を決定した(表3、図12)。

【０３８６】

2.2 Fab

またTAR1-5およびTAR1-5-19二量体をFab構成としてクローニングし、発現させ、プロテインLアガロース上で精製した。Fabを受容体アッセイにおいて評価した(表4)。その結果は、TAR1-5-19およびTAR1-5二量体の中和レベルが両方とも、それらが誘導された元のGly_4Serリンカー二量体と類似していることを示した。TAR1-5-19がCHおよびCKの両方の上に提示されたTAR1-5-19 Fabを発現させ、それをプロテインL精製し、受容体アッセイにおいて評価した。得られたIC50は約1 nMであった。

【０３８７】

2.3 TAR1-27二量体

全ライブラリーおよび選択条件を含む2回目の選択から、3 x 96個のクローンを拾った。2 mlの上清調製物をELISAにおける分析およびバイオアッセイのために作製した。抗原ELISAにより、71個の陽性クローンが得られた。粗上清の受容体アッセイにより、阻害特性(TNF結合0～60％)を有する42個のクローンが得られた。その大多数の場合において、阻害特性は強いELISAシグナルと相関していた。42個のクローンを配列決定したところ、これらのうち39個はユニークな第2のdAb配列を有していた。最良の阻害特性を与えた12個の二量体をさらに分析した。

【０３８８】

12個の中和クローンを200 mlの上清調製物として発現させ、プロテインL上で精製した。これらをプロテインLおよび抗原ELISA、BIAcoreにより、ならびに受容体アッセイにおいて評価した。強い陽性ELISAシグナルが全ての場合において得られた。BIAcore分析により、全クローンが速い会合速度および解離速度を有することが示された。解離速度は単量体TAR1-27と比較して改善されたが、TAR1-27二量体の解離速度は、以前に試験されたTAR1-5二量体(Koffは約10^{-3}～10^{-4}Mの範囲である)よりも速かった(Koffは約10^{-1}～10^{-2}Mの範

囲である)。精製された二量体の安定性が問題であったので、安定性を改良するために、5%グリセロール、0.5%Triton X100または0.5%NP40(Sigma)の添加を、2つのTAR1-27二量体(d2およびd16)の精製に含めた。NP40またはTriton X100(商標)の添加により、精製される産物の収率が約2倍改善された。両二量体を、受容体アッセイにおいて評価した。TAR1-27d2は全精製条件下で約30 nMのIC50を与えた。TAR1-27d16は、安定剤を使用せずに精製した場合には中和作用を示さなかったが、安定化条件下で精製した場合には約50 nMのIC50を与えた。さらなる分析は行わなかった。

【０３８９】

2.4 TAR2-5二量体

全ライブラリーおよび選択条件を含む2回目の選択から、3 x 96個のクローンを拾った。2 mlの上清調製物を分析のために作製した。プロテインAおよび抗原ELISAを、各プレートについて行った。30個の目的のクローンを、BIAcoreにより良好な解離速度(10^{-2}～10^{-3} MのKoff範囲)を示すものとして同定した。これらのクローンを配列決定し、13個のユニークな二量体を配列解析により同定した。

【表１】

表 1: TAR1-5 二量体

二量体	細胞型	精製	蛋白質画分	溶出条件	受容体アッセイ(RA)/ 細胞アッセイ(CA)
TAR1-5d1	HB2151	プロテインL + FPLC	小さい二量体種	0.1M グリシン pH2.5	RA 約 30nM
TAR1-5d2	HB2151	プロテインL + FPLC	小さい二量体種	0.1M グリシン pH2.5	RA 約 50nM
TAR1-5d3	HB2151	プロテインL + FPLC	大きい二量体種	0.1M グリシン pH2.5	RA 約 300nM
TAR1-5d4	HB2151	プロテインL + FPLC	小さい二量体種	0.1M グリシン pH2.5	RA 約 3nM
TAR1-5d5	HB2151	プロテインL + FPLC	大きい二量体種	0.1M グリシン pH2.5	RA 約 200nM
TAR1-5d6	HB2151	プロテインL +FPLC	大きい二量体種	0.1M グリシン pH2.5	RA 約 100nM

【０３９０】

＊二量体2および二量体3は同じ第2のdAb(dAb2と呼ぶ)を有するが、異なるリンカー長(d2＝$(Gly_4Ser)_3$、d3＝$(Gly_4Ser)_3$)を有する。dAb1は二量体1、5および6に対するパートナーdAbである。dAb3は二量体4に対するパートナーdAbである。パートナーdAbはいずれも単独では中和しない。FPLC精製は、特に指摘しない限り陽イオン交換による。FPLCにより得られる各二量体についての最適な二量体種を、これらのアッセイにおいて決定した。

【表２】

表２：TAR1-5-19二量体

二量体	細胞型	精製	蛋白質画分	溶出条件	受容体アッセイ(RA)/ 細胞アッセイ(CA)
TAR1-5-19 d1	TOP10F'	プロテインL	総タンパク質	0.1M グリシン pH 2.0	RA 約15nM
TAR1-5-19 d2 (停止コドンなし)	TOP10F'	プロテインL	総タンパク質	0.1M グリシン pH 2.0 + 0.05%NP40	RA 約2nM
TAR1-5-19d3 (停止コドンなし)	TOP10F'	プロテインL	総タンパク質	0.1M グリシン pH 2.5 + 0.05%NP40	RA 約8nM
TAR1-5-19d4	TOP10F'	プロテイン L + FPLC	FPLC精製画分	0.1Mグリシン pH2.0	RA 約2～5nM CA 約12nM
TAR1-5-19d5	TOP10F'	プロテインL	総タンパク質	0.1M グリシン pH2.0 + NP40	RA 約8nM CA 約10nM
TAR1-5-19 d6	TOP10F'	プロテインL	総タンパク質	0.1M グリシン pH 2.0	RA 約10nM

【０３９１】

【表３】

表３：TAR1-5-19ホモ二量体

二量体	細胞型	精製	蛋白質画分	溶出条件	受容体アッセイ(RA)/ 細胞アッセイ(CA)
TAR1-5-19 3U ホモ二量体	HB2151	プロテインL	総タンパク質	0.1M グリシン pH2.5	RA 約20nM CA 約30nM
TAR1-5-19 5U ホモ二量体	HB2151	プロテインL	総タンパク質	0.1M グリシン pH2.5	RA 約2nM CA 約3nM
TAR1-5-19 7U ホモ二量体	HB2151	プロテインL	総タンパク質	0.1M グリシン pH2.5	RA 約10nM CA 約15nM
TAR1-5-19 cys ヒンジ	HB2151	プロテイン L + FPLC	FPLC精製した二量体画分	0.1M グリシン pH2.5	RA 約2nM
TAR1-5-19CH/ TAR1-5-19 CK	HB2151	プロテイン	総タンパク質	0.1M グリシン pH2.5	RA 約1nM

【０３９２】

【表４】

表４：TAR1-5/TAR1-5-19 Fab

二量体	細胞型	精製	蛋白質画分	溶出条件	受容体アッセイ(RA)/ 細胞アッセイ(CA)
TAR1-5CH/ dAb1 CK	HB2151	プロテインL	総タンパク質	0.1M クエン酸 pH2.6	RA 約90nM
TAR1-5CH/ dAb2 CK	HB2151	プロテインL	総タンパク質	0.1M グリシン pH2.5	RA 約30nM CA 約60nM
dAb3CH/ TAR1-5CK	HB2151	プロテインL	総タンパク質	0.1M クエン酸 pH2.6	RA 約100nM
TAR1-5-19CH/ dAb1 CK	HB2151	プロテインL	総タンパク質	0.1M グリシン pH2.0	RA 約6nM
dAb1 CH/ TAR1-5-19CK	HB2151	プロテインL	0.1M グリシン pH2.0	Myc/flag	RA 約6nM
TAR1-5-19CH/ dAb2 CK	HB2151	プロテインL	総タンパク質	0.1M グリシン pH2.0	RA 約8nM CA 約12nM
TAR1-5-19CH/ dAb3CK	HB2151	プロテインL	総タンパク質	0.1M グリシン pH2.0	RA 約3nM

【０３９３】

TAR1-5-19CYS二量体のPCR構築物

dAb三量体を記載する実施例8を参照されたい。三量体プロトコルにより、単量体、二量体および三量体の混合物が得られる。

【０３９４】

TAR1-5-19CYS二量体の発現および精製

二量体を、実施例8に概略するようにしてプロテインLアガロース上への捕捉により培養物の上清から精製した。

【０３９５】

TAR1-5-19CYS二量体からのTAR1-5-19CYS単量体の分離

陽イオン交換分離の前に、混合された単量体／二量体のサンプルを、PD-10カラム(Amersham Pharmacia)を用いて、製造業者の指示書に従って50 mM酢酸ナトリウムバッファーpH4.0中でバッファー交換した。次いで、サンプルを、50 mM酢酸ナトリウムpH4.0で予め平衡化した1 mL Resource S陽イオン交換カラム(Amersham Pharmacia)にアプライした。単量体と二量体を、50 mM酢酸ナトリウムpH4.0中での以下の塩勾配を用いて分離した：
15カラム容量に対して150～200 mM塩化ナトリウム、
10カラム容量に対して200～450 mM塩化ナトリウム、
15カラム容量に対して450～1000 mM塩化ナトリウム。

【０３９６】

二量体のみを含む画分を、SDS-PAGEを用いて同定した後、それをプールし、1/5容量の1 M Tris pH8.0を添加することによりpHを8に増加させた。

【０３９７】

in vitroでの機能的結合アッセイ：TNF受容体アッセイおよび細胞アッセイ

ヒトTNFαに対する二量体の親和性を、TNF受容体アッセイおよび細胞アッセイを用いて決定した。受容体アッセイにおけるIC50は約0.3～0.8 nMであり；細胞アッセイにおけるND50は約3～8 nMであった。

【０３９８】

他の可能性のあるTAR1-5-19CYS二量体構成

PEG二量体およびカスタム合成マレイミド二量体

Nektar(Shearwater)は一連のビ-マレイミドPEG［mPEG2-(MAL)2またはmPEG-(MAL)2］を提供しているが、これは、dAbを隔てる小さいリンカーを有し、かつ双方とも5～40 kDaのサイズのPEGに連結されているものであり、単量体を二量体として構成させることができる。5 kDaのmPEG-(MAL)2(すなわち、[TAR1-5-19]-Cys-マレイミド-PEG × 2個、ここでマレイミドが１つに連結されて二量体となる)がTNF受容体アッセイにおいて約1～3 nMの親和性を有することが示された。また、この二量体をTMEA(Tris[2-マレイミドエチル]アミン)(Pierce Biotechnology)または他の二官能性リンカーを用いて製造することもできる。

【０３９９】

2,2'-ジチオジピリジン(Sigma Aldrich)および還元された単量体を用いる化学結合法を用いて、ジスルフィド二量体を製造することもできる。

【０４００】

dAbのC末端へのポリペプチドリンカーまたはヒンジの付加

小さいリンカー、$(Gly_4Ser)n$ [式中、nは1～10、例えば、1、2、3、4、5、6または7である]、免疫グロブリン(例えば、IgGヒンジ領域)またはランダムペプチド配列(例えば、ランダムペプチド配列のライブラリーから選択される)を、dAbと末端システイン残基の間に遺伝子工学的に作製することができる。次いでこれを使用し、上記で概説したようにして二量体を作製することができる。

【０４０１】

実施例8

dAbの三量体化

概要

dAbの三量体化のためには、遊離システインがタンパク質のC末端に必要である。そのシステイン残基を一度還元して遊離チオールを得た後、これを用いて、三量体マレイミド分子、例えば、TMEA(Tris[2-マレイミドエチル]アミン)に、そのタンパク質を特異的に結合させることができる。

【０４０２】

TAR1-5-19CYSのPCR構築

以下のオリゴヌクレオチドを用いて、クローニングのためのSalIおよびBamHI部位を有するTAR1-5-19を特異的にPCRし、次のようにC末端システイン残基を導入した：

```
                SalI
                ~~~~~~~~

        Trp Ser Ala Ser Thr Asp* Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
  1     TGG AGC GCG TCG ACG GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCT CTG TCT GCA TCT GTA
        ACC TCG CGC AGC TGC CTG TAG GTC TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGA GAC AGA CGT AGA CAT

        Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr Leu His Trp
 61     GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT GAT AGT TAT TTA CAT TGG
        CCT CTG GCA CAG TGG TAG TGA ACG GCC CGT TCA GTC TCG TAA CTA TCA ATA AAT GTA ACC

        Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln
121     TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AGT GCA TCC GAG TTG CAA
        ATG GTC GTC TTT GGT CCC TTT CGG GGA TTC GAG GAC TAG ATA TCA CGT AGG CTC AAC GTT

        Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
181     AGT GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC
        TCA CCC CAG GGT AGT GCA AAG TCA CCG TCA CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG TGG TAG

        Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro
241     AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG GTT GTG TGG CGT CCT
        TCG TCA GAC GTT GGA CTT CTA AAA CGA TGC ATG ATG ACA GTT GTC CAA CAC ACC GCA GGA
                                                                        BamHI
                                                                        ~~~~~~~~

        Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Cys *** *** Gly Ser Gly
301     TTT ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG TGC TAA TAA GGA TCC GGC
        AAA TGC AAG CCG GTT CCC TGG TTC CAC CTT TAG TTT GCC ACG ATT ATT CCT AGG CCG
```

(＊は、TAR1-5-19CYS配列の開始部位)

【０４０３】

フォワードプライマー

5'-TGGAGCGCGTCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCA-3'

リバースプライマー

5'-TTAGCAGCCGGATCCTTATTAGCACCGTTTGATTTCCAC-3'

【０４０４】

PCR反応(50μL容量)を以下のように設定した：200μM dNTPs、各プライマー 0.4μM、5μLの10x Pfuターボバッファー(Stratagene)、100 ngの鋳型プラスミド(TAR1-5-19をコードする)、1μLのPfuターボ酵素(Stratagene)および滅菌水を用いて容量を50μLに調整した。以下のPCR条件を用いた：最初の変性工程を94℃にて2分間、次いで、94℃にて30秒間、64℃にて30秒間および72℃にて30秒間を25サイクル。最後の伸長工程も72℃にて5分間含めた。PCR産物を精製し、SalIおよびBamHIで消化し、同じ制限酵素で切断したベクター中に連結した。正しいクローンをDNA配列決定により確認した。

【０４０５】

TAR1-5-19CYSの発現および精製

TAR1-5-19CYSベクターを、BL21(DE3)pLysS化学的にコンピテントにした細胞(Novagen)中に、製造業者の指示書に従って形質転換した。dAbプラスミドを担持する細胞を、100μg/mLカルベニシリンおよび37μg/mLクロラムフェニコールを用いて選択した。培養物を、500 mLのテリフィックブロス(terrific broth)(Sigma-Aldrich)、100μg/mLカルベニシリンおよび37μg/mLクロラムフェニコールを含む2Lのバッフルフラスコ中に調製した。培養物をOD600が1～1.5になるまで200 rpmにて30℃で増殖させた後、1 mM IPTG(イソプロピル

-β-D-チオガラクトピラノシド、Melfold Laboratories社製)を用いて誘導した。dAbの発現を、30℃にて12～16時間継続させた。dAbのほとんどが培養培地中に存在することがわかった。そこで細胞を遠心分離(8,000 x g、30分間)により培地から分離し、その上清を用いてdAbを精製した。上清1リットルあたり、30 mLのプロテインLアガロース(Affitech)を加え、dAbを2時間攪拌しながらバッチ結合させた。次いで、樹脂をさらに1時間かけて重力のもとで沈殿させた後、上清を吸引除去した。次いで、アガロースをXK 50カラム(Amersham Pharmacia)中に充填し、10カラム容量のPBSで洗浄した。結合したdAbを、100 mMグリシンpH2.0で溶出し、次にタンパク質含有画分を1/5容量の1M Tris pH8.0を添加することにより中和した。培養上清1リットルあたり、20 mgの純粋なタンパク質が単離され、これは単量体と二量体を50:50の比率で含んでいた。

【０４０６】

TAR1-5-19CYSの三量体化

2.5 mlの100μM TAR1-5-19CYSを、5 mMジチオトレイトールで還元し、室温にて20分間静置した。次いで、サンプルを、PD-10カラム(Amersham Pharmacia)を用いてバッファー交換した。カラムは5 mM EDTA、50 mMリン酸ナトリウムpH6.5で予め平衡化したものであり、これにサンプルをアプライし、製造業者のガイドラインに従って溶出させた。サンプルを、必要になるまで氷上に置いた。TMEA(Tris[2-マレイミドエチル]アミン)はPierce Biotechnologyから購入したものであった。20 mMのTMEAの保存溶液を、100％DMSO(ジメチルスルホキシド)中に作製した。3:1(dAb:TMEAのモル比)を超えるTMEA濃度はタンパク質の急速な沈殿および架橋を引き起こすことがわかった。また、沈殿および架橋の速度はpHが増加するにつれて大きくなった。従って、100μMの還元されたTAR1-5-19CYSを用いて、25μM TMEAを、タンパク質を三量体化するために添加し、その反応を室温にて2時間進行させた。20％(v/v)までのグリセロールまたはエチレングリコールなどの添加物の添加により、会合反応が進行するにつれて三量体の沈殿が有意に減少した。会合反応の後、SDS-PAGE分析により、溶液中に単量体、二量体および三量体の存在が示された。

【０４０７】

三量体TAR1-5-19CYSの精製

TMEA-TAR1-5-19cys反応物1 mLあたり、40μLの40％氷酢酸を添加し、pHを約4に低下させた。次いで、サンプルを1 mLのResource S 陽イオン交換カラム(Amersham Pharmacia)(50 mM酢酸ナトリウムpH4.0で予め平衡化させておいた)にアプライした。二量体および三量体を、30カラム容量に対して340～450 mM塩化ナトリウムの塩勾配、50 mM酢酸ナトリウムpH4.0を用いて、部分分離した。三量体のみを含む画分をSDS-PAGEを用いて同定した後、それをプールし、1/5容量の1M Tris pH8.0を添加することによりpHを8に増加させた。濃縮工程(5Kカットオフ Vivaスピン濃縮装置；Vivascience)における三量体の沈殿を防止するために、10％グリセロールをサンプルに添加した。

【０４０８】

in vitroでの機能的結合アッセイ：TNF受容体アッセイおよび細胞アッセイ

ヒトTNFαに対する三量体の親和性を、TNF受容体アッセイおよび細胞アッセイを用いて決定した。受容体アッセイにおけるIC50は0.3 nMであり；細胞アッセイにおけるND50は3～10 nM(例えば、3 nM)の範囲であった。

【０４０９】

他の可能性のあるTAR1-5-19CYS三量体構成

TAR1-5-19CYSはまた、以下の試薬を用いて三量体に構成させた。

【０４１０】

PEG三量体およびカスタム合成マレイミド三量体

Nektar(Shearwater)は、PEGの末端で化学修飾されうる一連のマルチアームPEGを提供する。そこで、各アームの末端にマレイミド官能基を有するPEG三量体を用いて、TMEAを用いる上記で概略された方法と同様にしてdAbの三量体化を行うことができる。PEGは三量体の溶解性を増加させる利点も有し、かくして凝集の問題を防止することができる。かくして、各dAbがマレイミド官能基(PEG三量体に連結される)に連結されているC末端システイ

ンを有するdAb三量体を作製することができる。

【０４１１】

dAbのC末端へのポリペプチドリンカーまたはヒンジの付加

小さいリンカー、$(Gly_4Ser)_n$[式中、nは1～10、例えば、1、2、3、4、5、6もしくは7である]のいずれか、免疫グロブリン(例えば、IgGヒンジ領域)またはランダムペプチド配列(例えば、ランダムペプチド配列のライブラリーから選択される)を、dAbと末端システイン残基の間に遺伝子工学的に作製することができる。多量体(例えば、二量体または三量体)を作製するのに用いる場合、これをさらに、フレキシビリティーの程度がより大きくなるように、そして個々の単量体間の距離がより大きくなるように実施して、それにより標的、例えば、ヒトTNFαなどのマルチサブユニット型標的に対する結合特性を改善することができる。

【０４１２】

実施例9

ヒト血清アルブミン(HSA)およびマウス血清アルブミン(MSA)に対する単一ドメイン抗体(dAb)のコレクションの選択

本実施例は、血清アルブミンに対する単一ドメイン抗体(dAb)の作製方法を説明する。マウス血清アルブミン(MSA)およびヒト血清アルブミン(HSA)の双方に対するdAbの選択を説明する。本実験では3つのヒトファージ提示抗体ライブラリーを用いた。そのそれぞれは、相補性決定領域(CDR1、CDR2およびCDR3)に組み込まれたNNKコドンによりコードされる側鎖多様性を有する、V_H(図13を参照：V3-23/DP47およびJH4bに基づくダミーV_Hの配列)またはV_κ(図15を参照：o12/o2/DPK9およびJk1に基づくダミーV_κの配列)の単一ヒトフレームワークに基づくものである。

【０４１３】

ライブラリー1(V_H)：

位置H30、H31、H33、H35、H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H97、H98において多様性を示す。

【０４１４】

ライブラリーの大きさ：6.2×10^9

【０４１５】

ライブラリー2(V_H)：

位置：H30、H31、H33、H35、H50、H52、H52a、H53、H55、H56、H58、H95、H97、H98、H99、H100、H100a、H100bにおいて多様性を示す。

【０４１６】

ライブラリーの大きさ：4.3×10^9

【０４１７】

ライブラリー3(V_κ)：

位置：L30、L31、L32、L34、L50、L53、L91、L92、L93、L94、L96において多様性を示す。

【０４１８】

ライブラリーの大きさ：2×10^9

【０４１９】

V_HおよびV_κライブラリーを、選択しないライブラリー中のクローンの大多数が機能的となるように、遺伝的リガンドであるプロテインAおよびプロテインLのそれぞれへの結合について予備選択した。上記に示されたライブラリーの大きさは予備選択後の大きさに一致する。

【０４２０】

2回目の選択を、それぞれのライブラリーを別々に用いて血清アルブミンに対して実施した。各選択のために、抗原を100μg/mlの濃度で、PBS 4 ml中、免疫チューブ(nunc)に被覆した。1回目の選択において、3つのライブラリーの各々をHSA(Sigma)およびMSA(Sigma)に対して別々にパンニングした。2回目の選択において、この6つの系の1回目の選択の

各々から得たファージを、(i)再度同じ抗原に対して(例えば、1回目がMSA、2回目もMSA)、および(ii)他方の抗原に対して(例えば、1回目がMSA、2回目はHSA)パンニングし、2回目の選択を全部で12サンプル得た。それぞれについて、2回目の選択後に、48個のクローンをHSAおよびMSAへの結合について試験した。可溶性dAbフラグメントを、Harrisonら、Methods Enzymol. 1996; 267:83-109によりscFvフラグメントについて記載されたように製造した。そして得られた可溶性dAbフラグメントについて、2%tween PBSをブロッキングバッファーとして使用し、結合したdAbをプロテインL-HRP(Sigma)(V_κについて)およびプロテインA-HRP(Amersham Pharmacia Biotech)(V_Hについて)のいずれかを用いて検出する以外は、標準的なELISAプロトコルに従った分析を行った。

【０４２１】

MSA、HSAまたはその両方への結合を示す、バックグラウンドを超えるシグナルを与えるdAbを、プラスチック単独への結合についてELISA不溶性形態で試験したが、全て血清アルブミンに特異的なものであった。次いで、クローンを配列決定(以下の表を参照)したところ、21個のユニークなdAb配列が同定された。選択されたV_κ dAbクローン間の類似性の最小値(アミノ酸レベルで)は86.25%((69/80)x100; 多様化した残基が全て異なる場合、例えば、クローン24と34の場合の結果)であった。選択されたV_H dAbクローン間の類似性の最小値は94%((127/136)x100)であった。

【０４２２】

次に、血清アルブミン結合性dAbを、溶液からビオチン化抗原を捕捉するその能力について試験した。ELISAプレートを1μg/mlプロテインL(V_κクローンについて)および1μg/mlプロテインA(V_Hクローンについて)で被覆する以外はELISAプロトコル(上記の通り)に従った。可溶性dAbを、前記プロトコルと同様にして溶液から捕捉し、ビオチン化したMSAまたはHSAおよびストレプトアビジンHRPを用いて検出を行った。血清アルブミン分子1個あたり平均2個のビオチンを達成するために、ビオチン化MSAおよびHSAを、製造業者の指示書に従って調製した。ELISAにて、溶液からビオチン化されたMSAを捕捉した24個のクローンを同定した。これらのクローンのうちの2個(下記のクローン2および38)もビオチン化されたHSAを捕捉した。次に、dAbを、CM5 biacoreチップ上に被覆されたMSAに結合するその能力について試験した。biacore上のMSAに結合した8個のクローンを見出した。

【０４２３】

dAb（全捕捉ビオチン化 MSA）	Hまたはκ	CDR1	CDR2	CDR3	biacoreでMSAに結合？	ビオチン化HSAに捕捉？
$V_κ$ライブラリー3鋳型（ダミー）	κ	XXXLX	XASXLQS	QQXXXXPXT		
2, 4, 7, 41,	κ	SSYLN	RASPLQS	QQTYSVPPT		✓ 4つ全てが結合
38, 54	κ	SSYLN	RASPLQS	QQTYRIPPT		✓ 両方とも結合
46, 47, 52, 56	κ	FKSLK	NASYLQS	QQVVYWPVT		
13, 15	κ	YYHLK	KASTLQS	QQVRKVPRT		
30, 35	κ	RRYLK	QASVLQS	QQGLYPPIT		
19,	κ	YNWLK	RASSLQS	QQNVVIPRT		
22,	κ	LWHLR	HASLLQS	QQSAVYPKT		
23,	κ	FRYLA	HASHLQS	QQRLLYPKT		
24,	κ	FYHLA	PASKLQS	QQRARWPRT		
31,	κ	IWHLN	RASRLQS	QQVARVPRT		
33,	κ	YRYLR	KASSLQS	QQYVGYPRT		
34,	κ	LKYLK	NASHLQS	QQTTYYPIT		
53,	κ	LRYLR	KASWLQS	QQVLYYPQT		
11,	κ	LRSLK	AASRLQS	QQVVYWPAT	✓	
12,	κ	FRHLK	AASRLQS	QQVALYPKT	✓	
17,	κ	RKYLR	TASSLQS	QQNLFWPRT	✓	
18,	κ	RRYLN	AASSLQS	QQMLFYPKT	✓	
16, 21	κ	IKHLK	GASRLQS	QQGARWPQT	✓	
25, 26	κ	YYHLK	KASTLQS	QQVRKVPRT	✓	
27,	κ	YKHLK	NASHLQS	QQVGRYPKT	✓	
55,	κ	FKSLK	NASYLQS	QQVVYWPVT	✓	
V_Hライブラリー1(および2)鋳型（ダミー）	H	XXYXX	XIXXXGXXTXYADSVKG	XXXX(XXXX)FDY		
8, 10	H	WVYQMD	SISAFGAKTLYADSVKG	LSGKFDY		
36,	H	WSYQMT	SISSFGSSTLYADSVKG	GRDHNYSLFDY		

【０４２４】

全ての場合について、フレームワークは、上記の表に示されるように、CDR中で多様性を有する対応するダミー配列におけるフレームワークと同一であった。

【０４２５】

biacoreでMSAに結合した8個のクローンのうち、大腸菌で高度に発現される2個のクローン(クローンMSA16およびMSA26)を、さらなる試験のために選択した(実施例10を参照)。MSA16および26の完全長ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図16に示す。

【０４２６】

実施例10

MSA結合性dAbのMSA16およびMSA26のマウスにおける親和性および血清半減期の決定

dAb MSA16およびMSA26を、大腸菌の周辺質中で発現させ、プロテインL-アガロースアフィニティー樹脂(Affitech, Norway)へのバッチ式吸着、次いでpH2.2でのグリシンによる溶出を用いて、精製した。次いで、精製されたdAbを阻害biacoreにより分析して、K_dを決定した。簡単に述べると、精製されたMSA16およびMSA26を、高密度のMSAで被覆されたbiacore CM5チップに対する200RUの応答を達成するのに必要なdAbの濃度を決定するように試験した。dAbの必要な濃度を決定したら、予想されるK_d前後の濃度範囲のMSA抗原を、dAbと予め混合し、一晩インキュベートした。次いで、プレミックスの各々における、MSA被覆biacoreチップへのdAbの結合を、30μl/分の速い流速で測定した。得られる曲線を用いてKlotzプロットを作製し、そのプロットから、MSA16については200 nM、MSA26については70 nMのK_d推定値を得た(図17AおよびB)。

【０４２７】

次に、クローンMSA16およびMSA26を、HAタグ(核酸配列：TATCCTTATGATGTTCCTGATTATGCAおよびアミノ酸配列：YPYDVPDYA)を有する発現ベクター中にクローニングし、2～10 mg量

を大腸菌中で発現させ、プロテインL-アガロースアフィニティー樹脂(Affitech, Norway)を用いて上清から精製し、pH2.2でグリシンを用いて溶出した。dAbの血清半減期をマウスにおいて決定した。MSA26およびMSA16を、CD1マウスに約1.5 mg/kgで単回静脈注射として投与した。血清レベルの分析は、ヤギ抗HA(Abcam, UK)捕捉および4% Marvelでブロックしたプロテイン L-HRP (invitrogen)検出ELISAによるものであった。洗浄は0.05%tween PBSで行った。試験サンプルとの比較可能性を保証するために、既知の濃度のdAbの標準曲線を1xマウス血清の存在下で作成した。2コンパートメントモデルを用いたモデリングにより、MSA-26ではt1/2αが0.16時間、t1/2βが14.5時間、および曲線下面積(AUC)が465時間・mg/mlであり(データは示さない)、MSA-16ではt1/2αが0.98時間、t1/2βが36.5時間およびAUCが913時間・mg/mlであった(図18)ことが示された。両方の抗MSAクローンは、HEL4(抗ニワトリ卵白リゾチームdAb)と比較してかなり長い半減期を有し、0.06時間のt1/2αおよび0.34時間のt1/2βであった。

【０４２８】

実施例11

V_H-V_HおよびV_κ-V_κ二重特異性Fab様フラグメントの作製

本実施例は、V_H-V_HおよびV_κ-V_κ二重特異性Fab様フラグメントの作製方法を記載する。記載されたFab様フラグメントの各々の構築前に、最初に、選択の標的に結合するdAbを、実施例9に記載のものと同様のdAbライブラリーから選択した。ニワトリ卵白リゾチーム(Sigma)に結合するV_H dAb、HEL4を単離し、TNFα受容体(RおよびD系)に結合する第2のV_H dAb (TAR2h-5)も単離した。これらの配列を、配列表に示す。TNFα(TAR1-5-19)に結合するV_κ dAbを、選択およびアフィニティー成熟により単離し、その配列も配列表に示す。配列が図17Bに示される実施例9に記載の第2のV_κ dAb(MSA26)もこれらの実験で用いた。

【０４２９】

上記の4つのdAbを含む発現ベクターから得たDNAを、酵素SalIおよびNotIで消化し、dAbをコードするDNAを切り出した。アガロースゲル上で消化物を泳動し、目的のバンドを切り出した後、Qiagenゲル精製キット(Qiagen, UK)を用いてゲル精製を行うことによって、予想される大きさのバンド(300～400 bp)を精製した。次いで、dAbをコードするDNAを、以下の表に示されるように、C_HまたはC_κベクター(図8および9)のいずれかに挿入した。

【０４３０】

dAb	標的抗原	dAb V_H または dAb V_κ	挿入したベクター	タグ (C末端)	抗生物質耐性
HEL4	ニワトリ卵リゾチーム	V_H	C_H	myc	クロラムフェニコール
TAR2-5	TNF受容体	V_H	C_κ	flag	アンピシリン
TAR1-5-19	TNFα	V_κ	C_H	myc	クロラムフェニコール
MSA 26	マウス血清アルブミン	V_κ	C_κ	flag	アンピシリン

【０４３１】

V_H C_HおよびV_H C_κ構築物を、HB2151細胞中に同時形質転換した。これとは別に、V_κ C_HおよびV_κ C_κ構築物を、HB2151細胞中に同時形質転換した。それぞれの同時形質転換した細胞系の培養物を一晩増殖させた(C_HおよびC_κプラスミドの双方について抗生物質選択を維持するための、5%グルコース、10μg/mlクロラムフェニコールおよび100μg/mlアンピシリンを含む2xTy中で)。この一晩培養物を用いて、新鮮な培地(2 xTy、10μg/mlクロラムフェニコールおよび100μg/mlアンピシリン)に接種し、OD 0.7～0.9まで増殖させた後、IPTGの添加により誘導してそのC_HおよびC_κ構築物を発現させた。次いで、発現されたFab様フラグメントを、プロテインA精製(同時形質転換されたV_H C_HおよびC_H C_κについて)ならびにMSAアフィニティー樹脂精製(同時形質転換されたV_κ C_HおよびV_κ C_κについて)によって、周辺質から精製した。

【０４３２】

V_H-V_H二重特異性

V_H C_HおよびV_H C_κ二重特異性の発現を、ゲル上でタンパク質を泳動することにより試験した。ゲルをブロットし、Fabフラグメントの予想される大きさのバンドを、mycタグおよびflagタグの双方によるウェスタンブロットで検出したところ、Fab様フラグメントのV_H C_HおよびV_H C_κ部分が両方とも存在していた。次に、二重特異性の２つの構成部分が同じFab様フラグメント中に存在するかどうか決定するために、ELISAプレートを、炭酸水素ナトリウムバッファー中3 mg/mlのニワトリ卵リゾチーム(HEL)を１ウェルあたり100μl用いて4℃にて一晩被覆した。次いで、プレートを2%tween PBSでブロック(実施例1に記載の通り)した後、V_H C_H/V_H C_κ二重特異性Fab様フラグメントと共にインキュベートした。HELへの二重特異性の結合の検出は、9e10(mycタグに結合するモノクローナル抗体、Roche)および抗マウスIgG-HRP(Amersham Pharmacia Biotech)を用いる非同系鎖によるものであった。V_H C_H/V_H C_κ二重特異性Fab様フラグメントのシグナルは、発現されたV_H C_κ鎖単独についての0.069のバックグラウンドシグナルと比較して、0.154であった。これは、Fab様フラグメントが標的抗原に対する結合特異性を有することを示している。

【０４３３】

V_κ-V_κ二重特異性

MSAアフィニティー樹脂上で同時形質転換された$V_\kappa C_H$および$V_\kappa C_\kappa$二重特異性Fab様フラグメントを精製した後、得られたタンパク質を用いて、1μg/mlのTNFαで被覆されたELISAプレートおよび10μg/mlのMSAで被覆されたELISAプレートをプローブした。予測された通り、bot ELISAプレート上でプロテインL-HRPを用いて検出した場合、バックグラウンドを超えるシグナルが存在した(データは示さない)。これは、そのタンパク質の画分がMSAに結合することができ(従って、MSAアフィニティーカラムで精製される)、その後のELISAにおいてTNFαに結合することができ、そのため抗体フラグメントの二重特異性を確認することができることを示唆していた。次いで、このタンパク質の画分を、後の2つの実験に用いた。第1には、1μg/ml TNFαで被覆したELISAプレートを、二重特異性$V_\kappa C_H$および$V_\kappa C_\kappa$ Fab様フラグメント、ならびにELISA上で同様のシグナルを与えると算出された濃度の対照TNFα結合性dAbを用いて、プローブした。二重特異性および対照dAbの両方を用いて、2 mg/ml MSAの存在下または非存在下でELISAプレートをプローブした。二重特異性ウェルにおけるシグナルは、50%を超えて低下したが、dAbウェルにおけるシグナルは全く低下しなかった(図19aを参照)。また、同じタンパク質を、MSAを用いる、そして用いない受容体アッセイにかけて、MSAによる競合をも示した(図19cを参照)。これは、二重特異性へのMSAの結合がTNFαへの結合と競合的であることを示している。

【０４３４】

実施例12

マウス血清アルブミンおよびTNFαに対する特異性を有するV_κ-V_κ二重特異性cys結合二重特異性の作製

本実施例は、ジスルフィド結合を介する化学結合による、マウス血清アルブミンおよびTNFαの両方に特異的な二重特異性抗体フラグメントの作製方法を記載する。MSA16(実施例1から)およびTAR1-5-19 dAbの両方を、C末端システインを含むがタグを含まないpET系ベクター中に再クローニングした。2つのdAbを、4～10 mgレベルで発現させ、プロテインL-アガロースアフィニティー樹脂(Affitiech, Norway)を用いて上清から精製した。次いで、システインでタグ付けしたdAbを、ジチオトレイトールで還元した。次いで、TAR1-5-19 dAbをジチオジピリジンと結合させて、PEP1-5-9ホモ二量体の形成をもたらすジスルフィド結合の再形成を阻害した。次いで、2つの異なるdAbをpH6.5で混合して、ジスルフィド結合の形成を促進し、またTAR1-5-19、MSA16 cys結合したヘテロ二量体の生成を促進した。2つの非類似タンパク質のコンジュゲートを作製するこの方法は、元々はKingら(King TP, Li Y Kochoumian L Biochemistry. 1978 vol.17: 1499-506 「分子間ジスルフィド結合形成によるタンパク質コンジュゲートの調製(Preparation of protein conjugates via intermolecular disulfide bond formation)」)により記載されたものである。ヘテロ二量体を、陽イオン交換により単量体種から分離した。SDSゲル上に予想される大きさの

バンドが存在することにより、分離を確認した。得られたヘテロ二量体種を、TNF受容体アッセイにおいて試験したところ、TNFの中和について約18 nMのIC50を示すことがわかった。次に、一定濃度のヘテロ二量体(18 nM)ならびにMSAおよびHSAの希釈系列を用いて、受容体アッセイを繰り返した。ある範囲の濃度(2 mg/mlまで)のHSAの存在は、TNFαを阻害する二量体の能力の低下を引き起こさなかった。しかしながら、MSAの添加により、TNFαを阻害する二量体の能力の用量依存的な低下が引き起こされた(図20)。これは、MSAとTNFαが、cys結合したTAR1-5-19、MSA二量体への結合について競合することを示している。

【０４３５】

データ概要

前記実施例で説明した実験において得られたデータの概要を、補遺4に説明する。

【０４３６】

本明細書で言及した全刊行物、および該刊行物中で引用された参考文献は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。記載された方法および本発明の系の種々の変更および改変は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、当業者にとっては明らかであろう。本発明を、特定の好ましい実施形態と関連付けて説明してきたが、特許請求の範囲に記載の本発明はそのような特定の実施形態に不当に限定されるべきではないと理解されるべきである。実際、分子生物学または関連分野における当業者にとって明らかである本発明を実施するための記載された様式の種々の変更は、以下の特許請求の範囲内にあると意図される。

【０４３７】

補遺1：in vivoで半減期を増大させるポリペプチド

α-1糖タンパク質(オロソムコイド)(AAG)
α-1抗キモトリプシン(ACT)
α-1抗トリプシン(AAT)
α-1ミクログロブリン(プロテインHC)(AIM)
α-2マクログロブリン(A2M)
抗トロンビンIII(AT III)
アポリポタンパク質A-1(Apo A-1)
アポリポタンパク質B(Apo B)
β-2-ミクログロブリン(B2M)
セルロプラスミン(Cp)
補体成分(C3)
補体成分(C4)
C1エステラーゼ阻害剤(C1 INH)
C-反応性タンパク質(CRP)
シスタチンC(Cys C)
フェリチン(FER)
フィブリノーゲン(FIB)
フィブロネクチン(FN)
ハプトグロビン(Hp)
ヘモペキシン(HPX)
免疫グロブリンA(IgA)
免疫グロブリンD(IgD)
免疫グロブリンE(IgE)
免疫グロブリンG(IgG)
免疫グロブリンM(IgM)
免疫グロブリン軽鎖(κ/λ)
リポタンパク質(a)[Lp(a)]
マンノース結合タンパク質(MBP)

ミオグロビン(Myo)
プラスミノーゲン(PSM)
プレアルブミン(トランスチレチン)(PAL)
レチノール結合タンパク質(RBP)
リウマチ因子(RF)
血清アミロイドA(SAA)
可溶性トランスフェリン受容体(sTfR)
トランスフェリン(Tf)
補遺2

組合せ	治療に関する関連文献
TNF-α/TGF-β	• コラーゲンを導入した関節炎モデルの足関節に注入した場合、TGF-βおよびTNFは関節の炎症を有意に増加させた。コラーゲンでチャレンジしていないマウスにおいては、影響はなかった。
TNF-α/IL-1	• TNFおよびIL-1はブドウ膜炎の病理学において相乗作用する。 • TNFおよびIL-1はマラリア(低血糖症は無し)の病理学において相乗作用する。 • TNFおよびIL-1は炎症における核多角体(PMN)細胞移動の誘導において相乗作用する。 • IL-1およびTNFは相乗作用して腹膜へのPMN浸潤を誘導する。 • IL-1およびTNFは相乗作用して内皮細胞によるIL-1の分泌を誘導する。炎症において重要である。 • IL-1またはTNFは単独で膝滑膜へのいくらかの細胞浸潤を誘導した。IL-1はPMN、TNF-単球を誘導した。同時に、それらはPMNの増加に起因するより重篤な浸潤を誘導した。 • 循環心筋抑制物質(敗血症において存在する)は、低レベルのIL-1およびTNFであり、これらは相乗的に作用する。
TNF-α/IL-2	• キラーT細胞の相乗的活性化に最も関連する。
TNF-α/IL-3	• 急性骨髄性白血病芽細胞のクローン増殖の刺激におけるインターロイキン3および腫瘍壊死因子αの相乗作用は、腫瘍壊死因子αによる二次造血サイトカインの誘導の結果である。 • Cancer Res. 1992 Apr 15;52(8):2197-201.
TNF-α/IL-4	• IL-4およびTNFは相乗作用して内皮細胞上でのVCAM発現を誘導する。喘息における役割を有することが示された。滑膜についても同様にRAに関与する。 • TNFおよびIL-4は相乗作用してケラチノサイトでのIL-6発現を誘導する。 • 培養線維芽細胞様滑膜細胞におけるVCAM-1のレベルの持続的な上昇は、mRNAの安定性の増加を通じてIL-4またはIL-13と組合せたTNF-αにより達成することができる。Am J Pathol. 1999 Apr;154(4):1149-58。
TNF-α/IL-5	• 成人およびその子供の気管支過敏症における、腫瘍壊死因子系と、血清インターロイキン4、インターロイキン5、インターロイキン8、好酸球カチオン性タンパク質、および免疫グロブリンEレベルとの間の関連。Allergy Asthma Proc. 2003 Mar-Apr;24(2):111-8。
TNF-α/IL-6	• TNFおよびIL-6は、新規なヒト骨髄腫細胞系OH-2に対する強力な増殖因子である。Eur J Haematol. 1994 Jul;53(1):31-7。
TNF-α/IL-8	• TNFおよびIL-8はPMNと相乗作用して血小板を活性化した。急性呼吸困難症候群における関与。 • IL-5/TNFを参照(喘息)。好中球を介した血小板活性化に対するインターロイキン8と腫瘍壊死因子αとの相乗作用。Eur Cytokine Netw. 1994 Sep-Oct;5(5):455-60(成人呼吸困難症候群(ARDS))。
TNF-α/IL-9	
TNF-α/IL-10	• IL-10は、慢性感染したT細胞におけるHIV発現の誘導においてTNFを誘導し、これと相乗作用する。

【０４３８】

TNF-α/IL-11	• サイトカインは、破骨細胞分化を相乗的に誘導する：不死化または正常頭蓋冠細胞によるサポート。 *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Sep;283(3):C679-87. (骨喪失)
TNF-α/IL-12	
TNF-α/IL-13	• 培養線維芽細胞様滑膜細胞におけるVCAM-1のレベルの持続的な上昇は、mRNAの安定性の増加を通じてIL-4またはIL-13と組合せたTNF-αにより達成することができる。 Am J Pathol. 1999 Apr;154(4):1149-58. • インターロイキン13および腫瘍壊死因子αは、ヒト鼻線維芽細胞におけるエオタキシン産生を相乗的に誘導する。 Clin Exp Allergy. 2000 Mar;30(3):348-55. • インターロイキン13および腫瘍壊死因子αは、ヒト鼻線維芽細胞におけるエオタキシン産生を相乗的に誘導する。 *Clin Exp Allergy.* 2000 Mar;30(3):348-55 (アレルギー性炎症) • 小児性ネフローゼ症候群の治療応答における血清TNF-βおよびIL-13の関与。 *Cytokine.* 2003 Feb 7;21(3):155-9.
TNF-α/IL-14	• 軽症の喘息を有する被験者において吸入された腫瘍壊死因子αの効果。 *Thorax.* 2002 Sep;57(9):774-8.
TNF-α/IL-15	• 軽症の喘息を有する被験者において吸入された腫瘍壊死因子αの効果。 *Thorax.* 2002 Sep;57(9):774-8.
TNF-α/IL-16	• 気道上皮細胞において腫瘍壊死因子αにより誘導されるインターロイキン16の合成：セロトニン刺激のプライミング。 *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Mar;28(3):354-62. (気道炎症) • 関節リウマチを患う患者における循環インターロイキン16と前炎症性サイトカインとの相関。 *Rheumatology* (Oxford). 2001 Apr;40(4):474-5. 要約は入手不可能。 • インターロイキン16はクローン病においてアップレギュレートされ、マウスにおけるTNBS大腸炎に関与する。 *Gastroenterology.* 2000 Oct;119(4):972-82.
TNF-α/IL-17	• インターロイキン17の阻害は、Borrelia Burgdorferiでチャレンジしたワクチン接種マウスにおける関節炎の発症を防止する。 *Infect Immun.* 2003 Jun;71(6):3437-42. • インターロイキン17は腫瘍壊死因子αと相乗作用して、in vitroでの軟骨破壊を誘導する。 *Ann Rheum Dis.* 2002 Oct;61(10):870-6. • IL-17およびTNF-αにより引き起こされる気道における好中球の蓄積におけるGM-CSFの役割。 *Eur Respir J.* 2003 Mar;21(3):387-93. (気道炎症) • (要約) インターロイキン1、腫瘍壊死因子α、およびインターロイキン17は、ヒト変形性関節症に罹った膝関節半月の外植片における一酸化窒素およびプロスタグランジンE2の産生を相乗的にアップレギュレートする。 *Arthritis Rheum.* 2001 Sep;44(9):2078-83.
TNF-α/IL-18	• 慢性関節リウマチを有する患者の膝滑膜組織における、インターロイキン18の発現と、増強されたレベルのインターロイキン1βおよび腫瘍壊死因子αの両者との関連。 *Arthritis Rheum.* 2003 Feb;48(2):339-47. • (要約) 2型糖尿病を有する患者の血清における、インターロイキン18および腫瘍壊死因子αのレベルの上昇。糖尿病性腎症との関連。 *Metabolism.* 2003 May;52(5):605-8.

【０４３９】

TNF-α/IL-19	• （要約）IL-19は、IL-6およびTNF-αの産生を誘導し、TNF-αを介して細胞のアポトーシスをもたらす。 *J Immunol.* 2002 Oct 15;169(8):4288-97.
TNF-α/IL-20	• （要約）サイトカイン：IL-20 - 皮膚炎症における新しいエフェクター。 *Curr Biol.* 2001 Jul 10;11(13):R531-4
TNF-α/補体	• 炎症と凝固：敗血症患者への関与。 *Clin Infect Dis.* 2003 May 15;36(10):1259-65. Epub 2003 May 08. Review.
TNF-α/IFN-γ	• 脳におけるMHC誘導。 • 抗ウィルス応答／IFN-β誘導における相乗作用。 • 好中球活性化／呼吸バースト。 • 内皮細胞活性化。 • 抗ウィルス治療としてTNF/IFN-γで患者を治療した場合に報告された毒性。 • ヒト星状細胞によるフラクタルカインの発現。 • 炎症応答に関する多くの文献-すなわち、LPS、またマクロファージの活性化。 • 抗TNFおよび抗IFN-γは相乗作用して致死性内毒素血症からマウスを保護する。

TGF-β/IL-1	• 骨芽細胞によるプロスタグランジン合成。 • 腸上皮細胞によるIL-6産生(炎症モデル)。 • 肺線維芽細胞におけるIL-11およびIL-6の刺激(炎症モデル)。 • 網膜におけるIL-6およびIL-8の産生。
TGF-β/IL-6	• 軟骨肉腫の増殖。
IL-1/IL-2	• B細胞の活性化。 • LAK細胞の活性化。 • T細胞の活性化。 • リンホカインにより活性化されたキラー細胞の生成におけるIL-1とIL-2の相乗作用はTNF-αおよびβ(リンホトキシン)により媒介される。
IL-1/IL-3	
IL-1/IL-4	• B細胞の活性化。 • IL-4は内皮細胞活性化においてIL-1発現を誘導する。
IL-1/IL-5	
IL-1/IL-6	• B細胞の活性化。 • T細胞の活性化(補助細胞を置換可能)。 • IL-1はIL-6発現を誘導する。 • C3および血清アミロイド発現(急性期応答)。 • HIVの発現。 • 軟骨コラーゲン破壊。
IL-1/IL-7	• IL-7は、IL-1により誘導される胸腺細胞増殖にとって必須である。顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子または腫瘍壊死因子とIL-1との相乗作用におけるIL-7の関与。 *J Immunol.* 1992 Jan 1;148(1):99-105.
IL-1/IL-8	
IL-1/IL-10	
IL-1/IL-11	• サイトカインは破骨細胞分化を相乗的に誘導する：不死化または正常頭蓋冠細胞によるサポート。 *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Sep;283(3):C679-87. (骨喪失)
IL-1/IL-16	• 関節リウマチを患う患者における循環インターロイキン16と前炎症性サイトカインとの相関。 *Rheumatology* (Oxford). 2001 Apr;40(4):474-5. 要約は入手不可能。

【０４４０】

IL-1/IL-17	• インターロイキン17の阻害は、Borrelia Burgdorferiでチャレンジしたワクチン接種マウスにおける関節炎の発症を防止する。 *Infect Immun.* 2003 Jun;71(6):3437-42. • 変形性関節症におけるヒト軟骨分解および滑膜炎症へのインターロイキン17の寄与。 *Osteoarthritis Cartilage.* 2002 Oct;10(10):799-807. • (要約) インターロイキン1、腫瘍壊死因子α、およびインターロイキン17は、ヒト変形性関節症に罹った膝関節半月の外植片における一酸化窒素およびプロスタグランジンE2の産生を相乗的にアップレギュレートする。 *Arthritis Rheum.* 2001 Sep;44(9):2078-83.
IL-1/IL-18	• 関節リウマチを患う患者の膝滑膜組織における、インターロイキン18の発現と、増強されたレベルのインターロイキン1βおよび腫瘍壊死因子αの両者との関連。 *Arthritis Rheum.* 2003 Feb;48(2):339-47.
IL-1/IFN-g	
IL-2/IL-3	• T細胞増殖。 • B細胞増殖。
IL-2/IL-4	• B細胞増殖。 • T細胞増殖。 • (CD8およびNKリンパ球の活性化の選択的誘導) IL-2Rβアゴニスト P1-30は、IL-2、IL-4、IL-9、およびIL-15と相乗的に作用する：生物学的および分子的効果。 *J Immunol.* 2000 Oct 15;165(8): 4312-8.
IL-2/IL-5	• B細胞増殖／Ig分泌。 • IL-5はB細胞上のIL-2受容体を誘導する。
IL-2/IL-6	• 細胞傷害性T細胞の発達。
IL-2/IL-7	
IL-2/IL-9	• IL-2/IL-4 (NK細胞)を参照。
IL-2/IL-10	• B細胞活性化。
IL-2/IL-12	• IL-12はIL-2と相乗作用して、新しいヒトNK細胞において、リンホカインにより活性化された細胞傷害性、およびペルフォリンおよびグランザイム遺伝子発現を、誘導する。 *Cell Immunol.* 1995 Oct 1;165(1):33-43. (T細胞活性化)
IL-2/IL-15	• IL-2/IL-4(NK細胞)を参照。 • (T細胞の活性化および増殖) IL-15およびIL-2：in vivoにおけるT細胞の生死の問題。 *Nat Med.* 2001 Jan;7(1):114-8.
IL-2/IL-16	• IL-16およびIL-2によるCD4+T細胞の相乗的活性化。 *J Immunol.* 1998 Mar 1;160(5):2115-20.
IL-2/IL-17	• ヒトのおよび実験的な腎臓同種移植片拒絶におけるインターロイキン17の初期の関与に関する証拠。 *J Pathol.* 2002 Jul;197(3):322-32.
IL-2/IL-18	• インターロイキン18(IL-18)はIL-2と相乗作用して、マウスにおける致死的な肺損傷を誘導する：間隙性肺炎の病因におけるサイトカイン、ケモカイン、およびナチュラルキラー細胞の潜在的な役割。 *Blood.* 2002 Feb 15;99(4):1289-98.
IL-2/TGF-β	• CD4エフェクターの運命の制御：トランスフォーミング増殖因子β1およびインターロイキン2は相乗作用してアポトーシスを防止し、エフェクターの増加を促進する。 *J Exp Med.* 1995 Sep 1;182(3):699-709.
IL-2/IFN-γ	• B細胞によるIg分泌。

【０４４１】

	• IL-2はT細胞によるIFN-γ発現を誘導する。
IL-2/IFN-α/β	• なし
IL-3/IL-4	• 肥満細胞増殖における相乗作用。 • ヒト単球によるCD23発現の誘導に対するIL-4とGM-CSFまたはIL-3のいずれかとの相乗作用：IFN-αおよびIFN-γの調節作用。 *Cytokine.* 1994 Jul;6(4):407-13.
IL-3/IL-5	
IL-3/IL-6	
IL-3/IFN-γ	• IL-4およびIFN-γは、ヒト腸管上皮細胞におけるポリマー性IgA受容体レベル全体を相乗的に増加させる。タンパク質チロシンキナーゼの役割。 *J Immunol.* 1996 Jun 15;156(12):4807-14.
IL-3/GM-CSF	• サイトカインによるヒト好酸球IL-3、IL-5、およびGM-CSF受容体α鎖発現の示差的調節：IL-3、IL-5、およびGM-CSFは、IL-5応答性を喪失してIL-5受容体αの発現をダウンレギュレートするが、IL-3受容体α発現をアップレギュレートする。 *J Immunol.* 2003 Jun 1;170(11):5359-66. (allergic inflammation)
IL-4/IL-2	• IL-4は、マウスNK細胞におけるIL-2およびIL-12の両方により誘導されるIFN-γ発現を相乗的に増強する。 *Blood.* 2003 Mar 13 [印刷準備中]
IL-4/IL-5	• IgEに応答した肥満細胞のヒスタミンなどの分泌の増強。 • Th2様サイトカイン応答は、水疱性類天疱瘡に関与する。該疾患の病因におけるIL-4およびIL-5の役割。 *Int J Immunopathol Pharmacol.* 1999 May-Aug;12(2):55-61.
IL-4/IL-6	
IL-4/IL-10	
IL-4/IL-11	• マウスの原始造血前駆細胞の増殖の支持における、インターロイキン11とインターロイキン4の間の相乗的相互作用。 *Blood.* 1991 Sep 15;78(6):1448-51.
IL-4/IL-12	• 樹状細胞によるIL-12依存性IFN-γ産生に対するIL-4およびIL-18の相乗効果。 *J Immunol.* 2000 Jan 1;164(1):64-71. (Th1/Th2分化の増加) • IL-4は、マウスNK細胞におけるIL-2およびIL-12の両方により誘導されるIFN-γ発現を相乗的に増強する。 *Blood.* 2003 Mar 13 [印刷準備中]
IL-4/IL-13	• (要約)インターロイキン4およびインターロイキン13のシグナル伝達関連マップ。 *Science.* 2003 Jun 6;300(5625):1527-8. (アレルギー、喘息) • IL-4/IL-13受容体系の阻害は、アレルギー性喘息のマウスモデルにおけるアレルギーの確立に影響することなくアレルギー感作を防止する。 *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jun;111(6):1361-1369.
IL-4/IL-16	• (喘息)インターロイキン(IL)-4/IL-9および外因性IL-16は、気管支上皮細胞系であるBEAS-2B細胞によるIL-16産生を誘導する。 *Cell Immunol.* 2001 Feb 1;207(2):75-80
IL-4/IL-17	• インターロイキン(IL)-4およびIL-17は、ヒト結腸筋線維芽細胞におけるIL-6分泌を相乗的に刺激する。 *Int J Mol Med.* 2002 Nov;10(5):631-4. (消化管炎症)
IL-4/IL-24	• IL-24はラットおよびヒトのマクロファージにより発現される。 *Immunobiology.* 2002 Jul;205(3):321-34.

【０４４２】

IL-4/IL-25	• (要約)新規なIL-17ファミリーのメンバーは肺におけるTh1またはTh2応答を促進する：新規サイトカインIL-25のin vivoにおける機能。 *J Immunol.* 2002 Jul 1;169(1):443-53. (アレルギー性炎症) • (要約)肥満細胞は、Fcイプシロン RIを介する活性化に際してインターロイキン25を産生する。 *Blood.* 2003 May 1;101(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02. (allergic inflammation)
IL-4/IFN-γ	• (要約)インターロイキン4は、内皮細胞によるインターロイキン6産生を誘導する：インターフェロンγとの相乗作用。 *Eur J Immunol.* 1991 Jan;21(1):97-101.
IL-4/SCF	• 幹細胞因子およびIL-4によるヒト腸管肥満細胞の調節。 *Immunol Rev.* 2001 Feb;179:57-60.(総説)
IL-5/IL-3	• サイトカインによるヒト好酸球IL-3、IL-5、およびGM-CSF受容体α鎖発現の示差的調節：IL-3、IL-5、およびGM-CSFは、IL-5の応答性喪失によりIL-5受容体αの発現をダウンレギュレートするが、IL-3受容体α発現をアップレギュレートする。 *J Immunol.* 2003 Jun 1;170(11):5359-66. (アレルギー性炎症、要約を参照)
IL-5/IL-6	
IL-5/IL-13	• デキサメタゾンによるマウスにおけるアレルギー性気道炎症および気道過敏症の抑制：好酸球、IL-5、エオタキシン、およびIL-13の役割。 *J Allergy Clin Immunol.* 2003 May;111(5):1049-61.
IL-5/IL-17	• インターロイキン17は、アレルギー性喘息のマウスモデルにおけるアレルゲン吸入後の気道中への顆粒球流入を調整する。 *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Jan;28(1):42-50.
IL-5/IL-25	• (要約)新規なIL-17ファミリーのメンバーは肺におけるTh1またはTh2応答を促進する：新規サイトカインIL-25のin vivoにおける機能。 *J Immunol.* 2002 Jul 1;169(1):443-53. (アレルギー性炎症) • (要約)肥満細胞は、Fcイプシロン RIを介する活性化に際してインターロイキン25を産生する。 *Blood.* 2003 May 1;101(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02. (アレルギー性炎症)
IL-5/IFN-γ	
IL-5/GM-CSF	• サイトカインによるヒト好酸球IL-3、IL-5、およびGM CSF受容体α鎖発現の示差的調節：IL-3、IL-5、およびGM-CSFは、IL-5応答性を喪失させてIL-5受容体αの発現をダウンレギュレートするが、IL-3受容体α発現をアップレギュレートする。 *J Immunol.* 2003 Jun 1;170(11):5359-66. (アレルギー性炎症)
IL-6/IL-10	
IL-6/IL-11	
IL-6/IL-16	• インターロイキン16は、ヒト単球による前炎症性サイトカインの発現および産生を刺激する。 *Immunology.* 2000 May;100(1):63-9.
IL-6/IL-17	• IL-6パラクライン／オートクラインループを介するインターロイキン(IL)-17による気道ムチン遺伝子発現の刺激。 *J Biol Chem.* 2003 May 9;278(19):17036-43. Epub 2003 Mar 06. (気道炎症、喘息)
IL-6/IL-19	• (要約)IL-19は、IL-6およびTNF-αの産生を誘導し、TNF-αを介する細胞アポトーシスをもたらす。 *J Immunol.* 2002 Oct 15;169(8):4288-97.

【０４４３】

IL-6/IFN-g	
IL-7/IL-2	• インターロイキン7は移植片対宿主疾患を悪化させる。 *Blood.* 2002 Oct 1;100(7):2642-9.
IL-7/IL-12	• ヒトT細胞活性化に対するIL-7およびIL-12の相乗効果。 *J Immunol.* 1995 May 15;154(10):5093-102.
IL-7/IL-15	• インターロイキン7およびインターロイキン15は、皮膚T細胞リンパ腫細胞におけるbcl-2およびc-myb遺伝子の発現を調節する。 *Blood.* 2001 Nov 1;98(9):2778-83. (増殖因子)
IL-8/IL-11	• 真性赤血球増加症におけるインターロイキン(IL)-11およびIL-8の異常産生。 *Cytokine.* 2002 Nov 21;20(4):178-83.
IL-8/IL-17	• 関節破壊におけるIL-17の役割。 *Drug News Perspect.* 2002 Jan;15(1):17-23. (関節炎) • (要約)インターロイキン17は、ヒト気道上皮細胞によるインターロイキン8、増殖関連癌遺伝子α、および顆粒球-コロニー刺激因子の発現を刺激する。 *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 Jun;26(6):748-53. (気道炎症)
IL-8/GSF	• インターロイキン8：コロニー刺激因子1と相乗的に作用して単球-マクロファージの増殖および分化を促進するヒト造血前駆細胞のオートクライン／パラクライン増殖因子。 *Exp Hematol.* 1999 Jan;27(1):28-36.
IL-8/VGEF	• 原発性および再発性悪性グリオーマにおける腔内VEGF、bFGF、IL-8、IL-12レベル。 *J Neurooncol.* 2003 May;62(3):297-303.
IL-9/IL-4	• 抗インターロイキン9抗体治療は、マウス喘息モデルにおいて気道炎症および過敏症を抑制する。 *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Aug 1;166(3):409-16.
IL-9/IL-5	• IL-9の肺における過剰発現は、免疫病理をもたらすTh2サイトカイン発現を誘導する。 *J Clin Invest.* 2002 Jan;109(1):29-39. • Th2サイトカインと喘息。喘息に対する治療標的としてのインターロイキン9。 *Respir Res.* 2001;2(2):80-4. Epub 2001 Feb 15. (総説) • (要約)インターロイキン9は、ヒト好酸球のインターロイキン5受容体の発現、分化、および生存を増強する。 *Blood.* 2000 Sep 15;96(6):2163-71 (asthma)
IL-9/IL-13	• 抗インターロイキン9抗体治療は、マウス喘息モデルにおいて気道炎症および過敏症を抑制する。 *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Aug 1;166(3):409-16. • 上皮細胞に対するインターロイキン13の直接作用は、喘息における気道過敏症および粘膜過剰産生を引き起こす。 *Nat Med.* 2002 Aug;8(8):885-9.
IL-9/IL-16	• IL-4/IL-16を参照。
IL-10/IL-2	• 体液性免疫応答におけるインターロイキン10(IL-10)とインターロイキン2(IL-2)の相互作用：IL-10はIL-2と相乗作用して、CD25発現のアップレギュレーションとは異なる機構でヒトBリンパ球の応答を増強する。 *Cell Immunol.* 1994 Sep;157(2):478-88.
IL-10/IL-12	
IL-10/TGF-β	• IL-10とTGF-βは、正常免疫および特定の免疫治療における粘膜アレルゲンに対する調節性T細胞応答において協働する。 *Eur J Immunol.* 2003 May;33(5):1205-14.
IL-10/IFN-γ	
IL-11/IL-6	• インターロイキン6およびインターロイキン11は、RANKL依存的

【０４４４】

	機構によりヒト破骨細胞形成を支援する。 *Bone.* 2003 Jan;32(1):1-7.（炎症における骨再吸収）
IL-11/IL-17	• IL-11およびIL-17の、急性皮膚病変と慢性皮膚病変の間で極端に異なったin vivo発現。 *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Apr;111(4):875-81.（アレルギー性皮膚炎） • IL-17は、NF-κBリガンド／オステオプロテゲリン・バランスの受容体アクチベーターの喪失を通じてマウスのコラーゲン誘導性関節炎における骨腐食を促進する。 *J Immunol.* 2003 Mar 1;170(5):2655-62.
IL-11/TGF-β	• IL-11およびIL-17の、急性皮膚病変と慢性皮膚病変の間で極端に異なったin vivo発現。 *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Apr;111(4):875-81.（アレルギー性皮膚炎）
IL-12/IL-13	• 全身性エリテマトーデスにおけるインターロイキン12およびインターロイキン13の不均衡と、クラス特異的リウマチ因子および抗カルジオリピン抗体との関係。 *Clin Rheumatol.* 2003 May;22(2):107-11.
IL-12/IL-17	• 活動性の炎症性腸疾患におけるインターロイキン12および17のアップレギュレーション。 *Scand J Gastroenterol.* 2003 Feb;38(2):180-5.
IL-12/IL-18	• インターロイキン12およびインターロイキン18によるナチュラルキラー細胞の相乗的な増殖および活性化。 1999 Nov;11(11):822-30. • IL-12およびIL-18により引き起こされる炎症性肝脂肪症。 *J Interferon Cytokine Res.* 2003 Mar;23(3):155-62.
IL-12/IL-23	• インターロイキン12よりもむしろインターロイキン23が脳の自己免疫性炎症にとって重要なサイトカインである。 *Nature.* 2003 Feb 13;421(6924):744-8. • (要約)細胞免疫の促進におけるIL-23のユニークな役割。 *J Leukoc Biol.* 2003 Jan;73(1):49-56.(総説)
IL-12/IL-27	• (要約)EBI3およびp28タンパク質からなるヘテロ二量体性サイトカインであるIL-27は、ナイーブなCD4(+)T細胞の増殖を誘導する。 *Immunity.* 2002 Jun;16(6):779-90.
IL-12/IFN-γ	• IL-12は免疫刺激の一部としてのBおよびT細胞によるIFN-γ発現を誘導する。
IL-13/IL-5	• IL-5/IL-13を参照。
IL-13/IL-25	• (要約)新規なIL-17ファミリーのメンバーは肺においてTh1またはTh2応答を促進する：新規サイトカインIL-25のin vivoにおける機能。 *J Immunol.* 2002 Jul 1;169(1):443-53.（アレルギー性炎症） • (要約)肥満細胞は、Fcイプシロン RIを介する活性化に際してインターロイキン25を産生する。 *Blood.* 2003 May 1;101(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02.（アレルギー性炎症）
IL-15/IL-13	• 子宮内膜症を有する女性および正常な妊娠可能な女性の異所性および正常性子宮内膜におけるインターロイキン(IL)-13およびIL-15の示差的発現。 *Am J Reprod Immunol.* 2003 Feb;49(2):75-83.
IL-15/IL-16	• 皮膚T細胞リンパ腫におけるIL-15およびIL-16の過剰発現：菌状息肉腫の進行における段階依存的増加。 *Exp Dermatol.* 2000 Aug;9(4):248-51.
IL-15/IL-17	• (要約)リンパ球および好中球により産生されるIL-17は、リポ多糖により誘導される気道好中球増加症にとって必須である：トリガーとしての可能性を有するIL-15。 *J Immunol.* 2003 Feb

【０４４５】

	15;170(4):2106-12. (気道炎症)
IL-15/IL-21	• IL-21は、IL-15またはIL-18と相乗作用して、ヒトNKおよびT細胞におけるIFN-γ産生を増強する。 *J Immunol.* 2003 Jun 1;170(11):5464-9.
IL-17/IL-23	• インターロイキン23は、インターロイキン17の産生を特徴とする独特のCD4 T細胞の活性化状態を促進する。 *J Biol Chem.* 2003 Jan 17;278(3):1910-4. Epub 2002 Nov 03
IL-17/TGF-β	• IL-11およびIL-17の、急性皮膚病変と慢性皮膚病変の間で極端に異なったin vivo発現。 *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Apr;111(4):875-81. (アレルギー性皮膚炎)
IL-18/IL-12	• インターロイキン12およびインターロイキン18によるナチュラルキラー細胞の相乗的な増殖および活性化。 *Cytokine.* 1999 Nov;11(11):822-30. • (要約)マウス慢性移植片対宿主疾患におけるIL-12によるin vitroでの免疫グロブリン産生の阻害：IL-18との相乗作用。 *Eur J Immunol.* 1998 Jun;28(6):2017-24.
IL-18/IL-21	• IL-21は、IL-15またはIL-18と相乗作用して、ヒトNKおよびT細胞におけるIFN-γ産生を増強する。 *J Immunol.* 2003 Jun 1;170(11):5464-9.
IL-18/TGF-β	• コルチコステロイドで治療したグレーブス眼症を有する患者の血清中のインターロイキン18およびトランスフォーミング増殖因子β1。 *Int Immunopharmacol.* 2003 Apr;3(4):549-52.
IL-18/IFN-γ	
抗TNF-α/抗CD4	• DBA/1関節炎マウスにおける相乗的な治療効果。

【０４４６】

補遺3：腫瘍学的組合せ

標的	疾患	ペアになる相手
CD89*	細胞傷害性細胞リクルーターとして使用	全て
CD19	B細胞リンパ腫	HLA-DR CD5
HLA-DR	B細胞リンパ腫	CD89 CD19 CD5
CD38	多発性骨髄腫	CD138 CD56 HLA-DR
CD138	多発性骨髄腫	CD38 CD56 HLA-DR
CD138	肺癌	CD56 CEA
CD33	急性骨髄性リンパ腫	CD34 HLA-DR
CD56	肺癌	CD138 CEA
CEA	汎性癌	MET受容体
VEGF	汎性癌	MET受容体
VEGF受容体	汎性癌	MET受容体
IL-13	喘息/肺炎症	IL-4 IL-5 エオタキシン (Eotaxin) MDC TARC TNFα IL-9 EGFR CD40L IL-25 MCP-1 TGFβ
IL-4	喘息	IL-13 IL-5 エオタキシン MDC TARC TNFα IL-9 EGFR CD40L IL-25 MCP-1 TGFβ

【０４４７】

エオタキシン (Eotaxin)	喘息	IL-5 エオタキシン-2 エオタキシン-3
EGFR	癌	HER2/neu HER3 HER4
HER2	癌	HER3 HER4
TNFR1	RA/クローン病	IL-1R IL-6R IL-18R
TNFα	RA/クローン病	IL-1α/β IL-6 IL-18 ICAM-1 IL-15 IL-17
IL-1R	RA/クローン病	IL-6R IL-18R
IL-18R	RA/クローン病	IL-6R

【０４４８】

補遺4

データ概要

標的	dAb	平衡解離定数 (Kd=Koff/Kon)	Koff	リガンドアッセイの IC50	細胞に基づく中和アッセイについての ND50
TAR1	TAR1 単量体	300nM～5pM (すなわち 3 x 10^{-7} ～ 5 x 10^{-12}) 好ましくは 50nM～20pM	5 x 10^{-1} ～ 1 x 10^{-7}	500nM ～ 100pM	500nM ～ 50pM
	TAR1 二量体	TAR1 単量体と同様	TAR1 単量体と同様	TAR1 単量体と同様	TAR1 単量体と同様
	TAR1 三量体	TAR1 単量体と同様	TAR1 単量体と同様	TAR1 単量体と同様	TAR1 単量体と同様
	TAR1-5				
	TAR1-27				
	TAR1-5-19 単量体	30nM			
	TAR1-5-19 ホモ二量体			$(Gly_4Ser)_3$リンカーを保持= 20nm $(Gly_4Ser)_5$リンカーを保持= 2nm $(Gly_4Ser)_7$リンカーを保持= 10nm Fab様式のもの = 1nM	=30nM =3nM =15nM
	TAR1-5-19 ヘテロ二量体			$(Gly_4Ser)_n$リンカーを保持するもの TAR1-5-19 d2 = 2nM TAR1-5-19 d3 = 8nM TAR1-5-19 d4 = 2-5nM TAR1-5-19 d5 = 8nM Fab形態のもの TAR1-5-19CH d1CK = 6nM	= 12nM = 10nM

				TAR1-5-19CK d1CH = 6nM TAR1-5-19CH d2CK = 8nM TAR1-5-19CH d3CK = 3nM	= 12nM
	TAR1-5 ヘテロ二量体			$(Gly_4Ser)_3$リンカーを保持するもの TAR1-5d1 = 30nM TAR1-5d2 = 50nM TAR1-5d3 = 300nM TAR1-5d4 = 3nM TAR1-5d5 = 200nM TAR1-5d6 = 100nM Fab形態のもの TAR1-5CH d2CK = 30nM TAR1-6CK d3CH = 100nM	= 60nM
	TAR1-5-19 ホモ三量体			0.3nM	3～10nM（例えば3nM）
TAR2	TAR2単量体	TAR1単量体と同様	TAR1単量体と同様	500nM ～ 100pM	500nM ～ 50pM
	TAR2-10				

【０４５０】

血清アルブミン	TAR2-5	抗SA単量体	1nM ～ 500μM、好ましくは100nM ～ 10 μM 二重特異性形態においては、標的親和性はSA dAbの1～100,000倍の親和性、例えば、100 pM(標的)および10μM SAの親和性である。		1nM ～ 500μM、好ましくは100nM ～ 10 μM 二重特異性形態においては、標的親和性はSA dAbの1～100,000倍の親和性、例えば、100 pM(標的)および10μM SAの親和性である。
	MSA-16		200nM		
	MSA-26		70nM		

【０４５１】

SEQUENCE LISTING

HEL4
E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F R I S D E D M ·
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT TAGGATTAGC GATGAGGATA

· G W V R Q A P G K G L E W V S S I Y G P S G S T Y Y A D S V K G R ·
TGGGCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTATCAAGC ATTTATGGCC CTAGCGGTAG CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG

· F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A S A L
GTTCACCATC TCCCGTGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTATTGCGC GAGTGCTTTG

E P L S E P L G F W G Q G T L V T V S S
GAGCCGCTTT CGGAGCCCCT GGGCTTTTGG GGTCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCGAGC

TAR2-5
E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F D L Y N M ·
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT CTTTATAATA

· F W V R Q A P G K G L E W V S F I S Q T G R L T W Y A D S V K G R ·
TGTTTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATTT ATTAGTCAGA CTGGTAGGCT TACATGGTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG

· F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K T L
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAACGCTG

E D F D Y W G Q G T L V T V S S
GAGGATTTTG ACTACTGGGG CCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGC

TAR1-5-19
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V K E F L W ·
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCGTTAAG GAGTTTTTAT

· W Y Q Q K P G K A P K L L I Y M A S N L Q S G V P S R F S G S G S ·
GGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATATG GCATCCAATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC

· G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q K F K L P R T F G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AAGTTTAAGC TGCCTCGTAC GTTCGGCCAA

G T K V E I K R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

30 20 10

TAR2-10

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGAGTGGTATTGGATGGGTTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGA
ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGTTAAGTTGGGGGGGGGGGCCTAATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCT
GGTCACCGTCTCGAGCGCEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEWYWMGWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
KVKLGGGPNFDYWGQGTLVTVSS

```
        E  V  Q  L    L  E  S    G  G  G    L  V  Q  P    G  G  S ·
  1   GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC
      · L  R  L    S  C  A  A    S  G  F    T  F  E    W  Y  W  M ·
 51   CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAG TGGTATTGGA
      ·  G  W  V    R  Q  A    P  G  K  G    L  E  W    V  S  A
101   TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGCT
       I  S  G  S    G  G  S    T  Y  Y    A  D  S  V    K  G  R ·
151   ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
      · F  T  I    S  R  D  N    S  K  N    T  L  Y    L  Q  M  N ·
201   GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA
      · S  L  R    A  E  D    T  A  V  Y    Y  C  A    K  V  K
251   ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTTAAG
       L  G  G  G    P  N  F    D  Y  W    G  Q  G  T    L  V  T ·
301   TTGGGGGGGG GGCCTAATTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC
          AvaI
         ~~~~~~
      · V  S  S
351   CGTCTCGAGC
```

TAR-1 dAb DNA and amino acid sequences.
dAbs 1, 2 and 3 are the partner sequences from TAR1-5 dimers 1-6. dAb1 is the partner dAb to dimers 1, 5 and 6 the second dAbs are the same but the linker lengths are different, likewise, dAb2 is the partner dAb to dimers 2 and 3, dAb3 is the partner dAb to dimer 4. * indicates the presence of an amber stop codon.Sequence homology between, TAR1-5,TAR1-5-19 and the unique second dAbs is 88%

TAR1-5-19

```
D  I  Q  M    T  Q  S    P  S  S    L  S  A  S    V  G  D    R  V  T    I  T  C  R    A  S  Q    S  I  D    S  Y  L  H .
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCT CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTGAT AGTTATTTAC
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGA GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAACTA TCAATAAATG
  W  Y  Q    Q  K  P    G  K  A  P    K  L  L    I  Y  S    A  S  E  L    Q  S  G    V  P  S    R  F  S  G    S  G  S
```

```
ATTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGT GCATCCGAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATATCA CGTAGGCTCA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
  G T D  F T L  T  I S S  L Q P  E D F  A  T Y Y  C Q Q  V V W  R P F T  F G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTGTGTGGC GTCCTTTTAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC CAACACACCG CAGGAAAATG CAAGCCGGTT
  G T K V  E I K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGC
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCG

TAR1-5
  D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  S I F  M N L L
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTAT ATGAATTTAT
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAAATA TACTTAAATA
  W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y N  A S V L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
TGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GCATCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
ACACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATATTA CGTAGGCACA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
  G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  V V W R  P F T  F G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTGTGTGGC GTCCTTTTAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC CAACACACCG CAGGAAAATG CAAGCCGGTT
  G T K V  E I K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

Monomer - dAb1: Partner dAb in TAR1-5d1 (3U linker), d5 (5U linker), d6 (7U linker)
  D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  S I Y  D A L  E
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTAT GATGCGTTAG
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAAATA CTACGCAATC
  W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y T  A S R L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATACT GCATCCCGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
TCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATATGA CGTAGGGCCA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
  G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  V M Q R  P P V T  F G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTATGCAGC GTCCTGTTAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC CAATACGTCG CAGGACAATG CAAGCCGGTT
  G T K V  E I K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC

Monomer - dAb2: Partner dAb in TAR1-5d2 (3U linker), d3 (5U linker)
  D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  S I Y  D A L  *
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTAT GATGCTTTAC
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAAATA CTACGAAATG
  W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y T  A S R L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATACT GCATCCCGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
TCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATATGA CGTAGGGCCA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
```

```
  G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y H  C Q Q  V M Q R  P V T  F G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACCA CTGTCAACAG GTTATGCAGC GTCCTGTTAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGGT GACAGTTGTC CAATACGTCG CAGGACAATG CAAGCCGGTT
 G T K V  E I K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC
```

Monomer - dAb3: Partner dAb in TAR1-5d4 (5U linker)

```
 D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  S V K  E F L W
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCGTTAAG GAGTTTTTAT
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGCAATTC CTCAAAAATA
  W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y M  A S N L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
GGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATATG GCATCCAATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
CCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATATAC CGTAGGTTAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
 G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  K F K L  P R T  F G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AAGTTTAAGC TGCCTCGTAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC TTCAAATTCG ACGGAGCATG CAAGCCGGTT
 G T K V  E I K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC
```

TAR1-27 and related partner dAb amino acid and DNA sequences (* indicates the presences of an amber stop codon). Sequence homology between TAR1-27 and the unique second dAbs is 90.4%.

TAR1-27

```
 D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  S I W  T K L H
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTGG ACGAAGTTAC
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAAACC TGCTTCAATG
  W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y M  A S S L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
ATTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATATG GCATCCAGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATATAC CGTAGGTCAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
 G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  W F S N  P S T  F G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TGGTTTAGTA ATCCTAGTAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC ACCAAATCAT TAGGATCATG CAAGCCGGTT
 G T K V  E I K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGC
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCG
```

Partner dAb monomer in TAR1-27d1 (3U linker)

```
 D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  S I *  P I L C
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTAG CCGATTTTAT
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAAATC GGCTAAAATA
  W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y A  A S S L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
```

```
GTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCAGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
CAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATACGA CGTAGGTCAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
  G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  I Q H I  P V T  F G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ATTCAGCATA TTCCTGTGAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC TAAGTCGTAT AAGGACACTG CAAGCCGGTT
  G T K V  E I K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC
```

Partner dAb monomer in TAR1-27d2 (3U linker)

```
  D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  S I G  * D L H
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTGGG TAGGATTTAC
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAACCC ATCCTAAATG
  W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y T  A S L L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
ATTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATACG GCATCCCTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATATGC CGTAGGGAAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
  G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  Q S A F  P N T  L G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CAGAGTGCTT TTCCTAATAC GCTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC GTCTCACGAA AAGGATTATG CGAGCCGGTT
  G T K V  E I K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC
```

Partner dAb monomer in TAR1-27d7 (3Ulinker)

```
  D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  S I T  K N L L
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CCGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAAG AAGAATTTAC
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GGCATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAATTC TTCTTAAATG
  W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y *  A S S L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
TTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTAG GCATCCTCTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
AAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAATC CGTAGGAGAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
  G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  L R H K  P P T  F G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CTTCGTCATA AGCCTCCGAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC GAAGCAGTAT TCGGAGGCTG CAAGCCGGTT
  G T K V  E I K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC
```

Partner dAb monomer in TAR1-27d8 (3Ulinker)

```
  D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  S I *  K S L R
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAAG AAGTCTTAA
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAAATC TTCAGAAATT
  W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y H  A S D L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
GGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAT GCATCCGATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
CCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAGTA CGTAGGCTAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
```

```
   G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  M V N S  P V T  F G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ATGGTTAATA GTCCTGTTAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC TACCAATTAT CAGGACAATG CAAGCCGGTT
   G T K V  E I K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC
```

Partner dAb monomer in TAR1-27d12 (3U1inker)

```
   D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  S I *  T A L H
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTAG ACGGCGTTAC
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAAATC TGCCGCAATG
   W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y S  A S S L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
ATTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTCT GCATCCAGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
TAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAAGA CGTAGGTCAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
   G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  S S F L  P F T  F G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TCGAGTTTTT TGCCTTTTAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC AGCTCAAAAA ACGGAAAATG CAAGCCGGTT
   G T K V  E I K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC
```

Partner dAb monomer in TAR1-27d16 (3U linker)

```
   D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  S I G  P N L E
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTGGG CCGAATTTAG
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAACCC GGCTTAAATC
   W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y A  A S S L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCAGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
TCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATACGA CGTAGGTCAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
   G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  Q M G R  P R T  F G Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CAGATGGGGC GTCCTCGGAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC GTCTACCCCG CAGGAGCCTG CAAGCCGGTT
   G T K V  E I K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC
```

Partner dAb monomer in TAR1-27d23 (5U linker)

```
   D I Q M  T Q S  P S S  L S A S  V G D  R V T  I T C R  A S Q  S I K  H * L A
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAAG CATTAGTTAG
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAATTC GTAATCAATC
   W Y Q  Q K P  G K A P  K L L  I Y K  A S V L  Q S G  V P S  R F S G  S G S
CTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAG GCATCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
GAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATATTC CGTAGGCACA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
   G T D  F T L T  I S S  L Q P  E D F A  T Y Y  C Q Q  L R R R  P T T  F G Q
```

```
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CTTAGGCGTC GTCCTACTAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC GAATCCGCAG CAGGATGATG CAAGCCGGTT
  G  T  K  V  E  I  K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC
```

Partner dAb monomer in TAR1-27d30 (7U linker)

```
  D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  S  V  K  A  *  L  T
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCGTTAAG GCTTAGTTAA
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGCAATTC CGAATCAATT
  W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  K  A  S  T  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
CTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAG GCATCCACTT TGCAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
GAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATATTC CGTAGGTGAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  H  S  S  R  P  Y  T  F  G  Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CATAGTTCTA GGCCTTATAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC GTATCAAGAT CCGGAATATG CAAGCCGGTT
  G  T  K  V  E  I  K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC
```

Partner dAb monomer in TAR1-27d31 (7U linker)

```
  D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  S  I  E  N  R  L  G
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTGAG AATCGGTTAG
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAACTC TTAGCCAATC
  W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  K  A  S  T  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
GTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTAG GCGTCCTTGT TGCAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
CAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAATC CGCAGGAACA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  D  S  Y  F  P  R  T  F  G  Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GATTCGTATT TTCCTCGTAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC CTAAGCATAA AAGGAGCATG CAAGCCGGTT
  G  T  K  V  E  I  K  R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC
```

Partner dAb monomer in TAR1-27d36 (7U linker)

```
  D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  S  I  M  D  K  L  K
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTATG GATAAGTTAA
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAATAC CTATTCAATT
  W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  *  A  S  I  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S
AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTAG GCATCCATTT TGCAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
TCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAATC CGTAGGTAAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  D  S  G  G  G  P  N  T  F  G  Q
```

```
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GATAGTGGGG GTCCTAATAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC CTATCACCCC CAGGATTATG CAAGCCGGTT
  G  T  K  V   E  I  K   R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC
```

Partner dAb monomer in TAR1-27d37 (7U linker)

```
  D  I  Q  M   T  Q  S   P  S  S   L  S  A  S   V  G  D   R  V  T   I  T  C  R   A  S  Q   S  I  G   R  N  L  E
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTGGG AGGAATTTAG
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAACCC TCCTTAAATC
    W  Y  Q   Q  K  P   G  K  A  P   K  L  L   I  Y  D   A  S  H  L   Q  S  G   V  P  S   R  F  S  G   S  G  S
AGTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GCATCCCATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
TCACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATACTA CGTAGGGTAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
  G  T  D   F  T  L  T   I  S  S   L  Q  P   E  D  F  A   T  Y  Y   C  Q  Q   S  R  W  L   P  R  T   F  G  Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TCGCGTTGGC TTCCTCGTAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC AGCGCAACCG AAGGAGCATG CAAGCCGGTT
  G  T  K  V   E  I  K   R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC
```

Partner dAb monomer in TAR1-27d39 (7U linker)

```
  D  I  Q  M   T  Q  S   P  S  S   L  S  A  S   V  G  D   R  V  T   I  T  C  R   A  S  Q   S  I  R   K  M  L  V
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGG AAGATGTTAG
CTGTAGGTCT ACTGGGTCAG AGGTAGGAGG GACAGACGTA GACATCCTCT GGCACAGTGG TAGTGAACGG CCCGTTCAGT CTCGTAATCC TTCTACAATC
    W  Y  Q   Q  K  P   G  K  A  P   K  L  L   I  Y  R   A  S  Y  L   Q  S  G   V  P  S   R  F  S  G   S  G  S
TTTGGTACCA GCAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG GCATCCTATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC
AAACCATGGT CGTCTTTGGT CCCTTTCGGG GATTCGAGGA CTAGATAGCC CGTAGGATAA ACGTTTCACC CCAGGGTAGT GCAAAGTCAC CGTCACCTAG
  G  T  D   F  T  L  T   I  S  S   L  Q  P   E  D  F  A   T  Y  Y   C  Q  Q   A  F  R  R   P  R  T   F  G  Q
TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GCTTTTCGGC GGCCTAGGAC GTTCGGCCAA
ACCCTGTCTA AAGTGAGAGT GGTAGTCGTC AGACGTTGGA CTTCTAAAAC GATGCATGAT GACAGTTGTC CGAAAAGCCG CCGGATCCTG CAAGCCGGTT
  G  T  K  V   E  I  K   R
GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG
CCCTGGTTCC ACCTTTAGTT TGCC
```

TAR2 dAb amino acid and DNA sequences (* indicates the presences of an amber stop codon) sequence homology between TAR2h-5 and the unique second dAbs is 83.5%

TAR2h-5

```
  E  V  Q  L   L  E  S   G  G  G   L  V  Q  P   G  G  S   L  R  L   S  C  A  A   S  G  F   T  F  D   L  Y  N  M
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT CTTTATAATA
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACTA GAAATATTAT
    F  W  V   R  Q  A   P  G  K  G   L  E  W   V  S  F   I  S  Q  T   G  R  L   T  W  Y   A  D  S  V   K  G  R
```

```
TGTTTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATTT ATTAGTCAGA CTGGTAGGCT TACATGGTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
ACAAAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTAAA TAATCAGTCT GACCATCCGA ATGTACCATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC
  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  T  L
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAACGCTG
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTTGCGAC
  E  D  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S
GAGGATTTTG ACTACTGGGG CCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCG
CTCCTAAAAC TGATGACCCC GGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGC

Partner dAb monomer in TAR2h-5d1 (3U linker)
  E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  P  V  Y  M  M
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCCG GTTTATATGA
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAGGC CAAATATACT
  G  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  D  A  L  G  G  R  T  G  Y  A  D  S  V  K  G  R
TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGATGCTC TTGGTGGGCG GACAGGTTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
ACCCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGATGAGC TAACTACGAG AACCACCCGC CTGTCCAATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC
  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  T  M
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAACTATG
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTTGATAC
  S  N  K  T  H  T  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S
TCGAATAAGA CGCATACGTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG
AGCTTATTCT GCGTATGCAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC

Partner dAb monomer in TAR2h-5d2 (3U linker)
  E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  V  A  Y  N  M
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGTG GCTTATAATA
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACAC CGAATATTAT
  T  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  S  I  N  T  F  G  N  *  T  R  Y  A  D  S  V  K  G  R
TGACTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTAATACTT TTGGTAATTA GACAAGGTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
ACTGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTCA TAATTATGAA AACCATTAAT CTGTTCCATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC
  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  G  S
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTAGT
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTCCATCA
  R  P  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S
AGGCCTTTTG ACTACTGGGG CCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCG
TCCGGAAAAC TGATGACCCC GGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGC

Partner dAb monomer in TAR2h-5d3 (3U linker)
  E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  *  G  Y  R  M
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTAG GGGTATCGTA
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATTC CCCATAGCAT
  G  W  V  ·  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  W  I  T  R  T  G  G  T  T  Q  Y  A  D  S  V  K  G  R
TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATGG ATTACGCGTA CTGGTGGGAC GCACACAGTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
ACCCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTACC TAATGCGCAT GACCACCCTG CTGTGTCATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC
```

```
  F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K P A
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACCGGCG
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTGGCCGC
  K L V G  V G F  D Y W  G Q G T  L V T  V S
AAGCTTGTTG GGGTTGGGTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG
TTCGAACAAC CCCAACCCAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC
```

Partner dAb monomer in TAR2h-5d4 (3U linker)

```
  E V Q L  L E S  G G G  L V Q  P G G G  S L R  L S C  A A S  G F T  F R K  Y * M
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTCGG AAGTATTAGA
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAGCC TTCATAATCT
  G W V  R Q A  P G K G  L E W  V S Q  I G A K  G Q S  T D Y  A D S V  K G R
TGGGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCACAG ATTGGTGCGA AGGGTCAGTC TACAGATTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
ACCCCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTGTC TAACCACGCT TCCCAGTCAG ATGTCTAATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC
  F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K K K
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CPCGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAAGAAG
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTTTCTTC
  R G E N  Y F F  D Y W  G Q G T  L V T  V S
AGGGGGGAGA ATTATTTTTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG
TCCCCCCTCT TAATAAAAAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC
```

Partner dAb monomer in TAR2h-5d5 (3U linker)

```
  E V Q L  L E S  G G G  L V Q  P G G G  S L R  L S C  A A S  G F T  F R R  Y S M
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTCGG CGGTATAGTA
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAGCC GCCATATCAT
  S W V  R Q A  P G K G  L E W  V S D  I S R S  G R Y  T H Y  A D S V  K G R
TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGAT ATTTCTCGTT CTGGTCGGTA TACACATTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
ACAGCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCTA TAAAGAGCAA GACCAGCCAT ATGTGTAATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC
  F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K R I
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACGTATT
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTGCATAA
  D S S Q  N G F  D Y W  G Q G T  L V T  V S
GATTCTTCTC AGAATGGGTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG
CTAAGAAGAG TCTTACCCAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC
```

Partner dAb monomer in TAR2h-5d6 (3U linker)

```
  E V Q L  L E S  G G G  L V Q  P G G G  S L R  L S C  A A S  G F T  F * G Y K M
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CCTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAG GGGTATAAGA
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAATC CCCATATTCT
  F W V  R Q A  P G K G  L E W  V S A  I S G S  G G S  T Y Y  A D S V  K G R
TGTTTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
ACAAAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCGA TAATCACCAT CACCACCATC GTGTATGATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC
```

```
  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  Q  K
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGAAG
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTGTCTTC
  E  N  F  D     Y  W  G     Q  G  T     L  V  T  V     S
GAGAATTTTG ACTACTGGGG CCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCG
CTCTTAAAAC TGATGACCCC GGTCCCTTGG GACCAGTGGC AGAGC
```

Partner dAb monomer in TAR2h-5d7 (3U linker)

```
  E  V  Q  L  L  E  S     G  G  G  G     L  V  Q  P     G  G  G  S     L  R  L     S  C  A  A     S  G  F     T  F  G     D  Y  A  M
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGGG GATTATGCTA
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAACCC CTAATACGAT
  W  W  V     R  Q  A     P  G  K  G     L  E  W     V  S  V     I  S  S  N     G  G  S     T  F  Y     A  D  S  V     K  G  R
TGTGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGTG ATTAGTTCGA ATGGTGGGAG TACATTTTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
ACACCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCAC TAATCAAGCT TACCACCCTC ATGTAAAATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC
  F  T  I     S  R  D  N     S  K  N     T  L  Y     L  Q  M  N     S  L  R     A  E  D     T  A  V  Y  Y  C  A     K  R  V
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACGTGTT
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTGCACAA
  R  K  R  T     P  E  F     D  Y  W     G  Q  G  T     L  V  T     V  S
CGTAAGAGGA CTCCTGAGTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG
GCATTCTCCT GAGGACTCAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC
```

Partner dAb monomer in TAR2h-5d8 (3U linker)

```
  E  V  Q  L  L  E  S     G  G  G  G     L  V  Q  P     G  G  G  S     L  R  L     S  C  A  A     S  G  F     T  F  R     R  Y  K  M
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAGG AGGTATAAGA
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATCC TCCATATTCT
  G  W  V     R  Q  A     P  G  K  G     L  E  W     V  S  A     I  G  R  N     G  T  K     T  N  Y     A  D  S  V     K  G  R
TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGCG ATTGGGAGGA ATGGTACGAA GACAAATTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
ACCCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCGC TAACCCTCCT TACCATGCTT CTGTTTAATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC
  F  T  I     S  R  D  N     S  K  N     T  L  Y     L  Q  M  N     S  L  R     A  E  D     T  A  V  Y  Y  C  A     K  I  Y
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAATTTAT
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTTAAATA
  T  G  K  P     A  A  F     D  Y  W     G  Q  G  T     L  V  T     V  S
ACGGGGAAGC CTGCTGCGTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG
TGCCCCTTCG GACGACGCAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC
```

Partner dAb monomer in TAR2h-5d9 (3U linker)

```
  E  V  Q  L  L  E  S     G  G  G  G     L  V  Q  P     G  G  G  S     L  R  L     S  C  A  A     S  G  F     T  F  K     K  Y  *  M
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAG AAGTATTAGA
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATTC TTCATAATCT
  S  W  V     R  Q  A     P  G  K  G     L  E  W     V  S  A     I  S  G  S     G  G  S     T  Y  Y     A  D  S  V     K  G  R
TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
ACAGAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCGA TAATCACCAT CACCACCATC GTGTATGATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC
```

```
   F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K M L
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAATGCTG
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTTACGAC
 R T K N  K V F  D Y W  G Q G T  L V T  V S
AGGACTAAGA ATAAGGTGTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG
TCCTGATTCT TATTCCACAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC
```

Partner dAb monomer in TAR2h-5d10 (5U linker)

```
   E V Q L  L E S  G G G L  V Q P  G G G S  L R L  S C A A  S G F  T F R  R Y K M
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAGG AGGTATAAGA
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAATCC TCCATATTCT
   G W V  R Q A  P G K G  L E W  V S A  I G R N  G T K  T N Y  A D S V  K G R
TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGCG ATTGGGAGGA ATGGTACGAA GACAAATTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
ACCCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCGC TAACCCTCCT TACCATGCTT CTGTTTAATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC
  F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K I Y
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAATTTAT
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTTAAATA
  T G K P  A A F  D Y W  G Q G T  L V T  V S
ACGGGGAAGC CTGCTGCGTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG
TGCCCCTTCG GACGACGCAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC
```

Partner dAb monomer in TAR2h-5d11 (5U linker)

```
   E V Q L  L E S  G G G L  V Q P  G G G S  L R L  S C A A  S G F  T F *  S Y R M
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTAG AGTTATCGGA
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAATC TCAATAGCCT
   G W V  R Q A  P G K G  L E W  V S S  I S S R  G R H  T S Y  A D S V  K G R
TGGGTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAAGT ATTTCGTCGA GGGGTAGGCA TACATCTTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
ACCCAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTTCA TAAAGCAGCT CCCCATCCGT ATGTAGAATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC
  F T I  S R D N  S K N  T L Y  L Q M N  S L R  A E D  T A V Y  Y C A  K R V
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAGGGTT
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTTCCCAA
  P G R G  R S F  D Y W  G Q G T  L V T  V S
CCGGGTCGGG GGCGTTCTTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG
GGCCCAGCCC CCGCAAGAAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC
```

Partner dAb monomer in TAR2h-5d12 (5U linker)

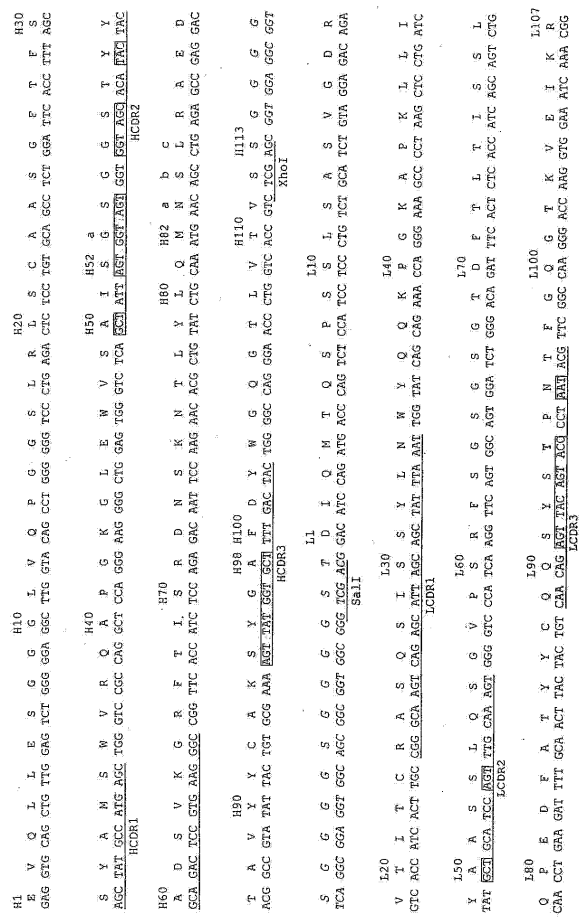
```
   E V Q L  L E S  G G G L  V Q P  G G G S  L R L  S C A A  S G F  P F R  R Y R M
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CCCCTTTCGT CGGTATCGGA
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GGGGAAAGCA GCCATAGCCT
   R W V  R Q A  P G K G  L E W  V S G  I S P G  G K H  T T Y  A D S V  K G R
TGAGGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGGT ATTTCTCCGG GTGGTAAGCA TACAACGTAC GCAGACTCCG TGAGGGCCG
ACTCCACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGAGTCCA TAAAGAGGCC CACCATTCGT ATGTTGCATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC
```

```
   F  T  I     S  R  D  N     S  K  N     T  L  Y     L  Q  M  N     S  L  R     A  E  D     T  A  V  Y     Y  C  A     K  G  E
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTGAG
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTCCACTC
   G  G  A     S  S  A     F  D  Y     W  G  Q     G  T  L     V  T  V     S
GGGGGGCGA GTTCTGCGTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG
CCCCCCCGCT CAAGACGCAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC
```

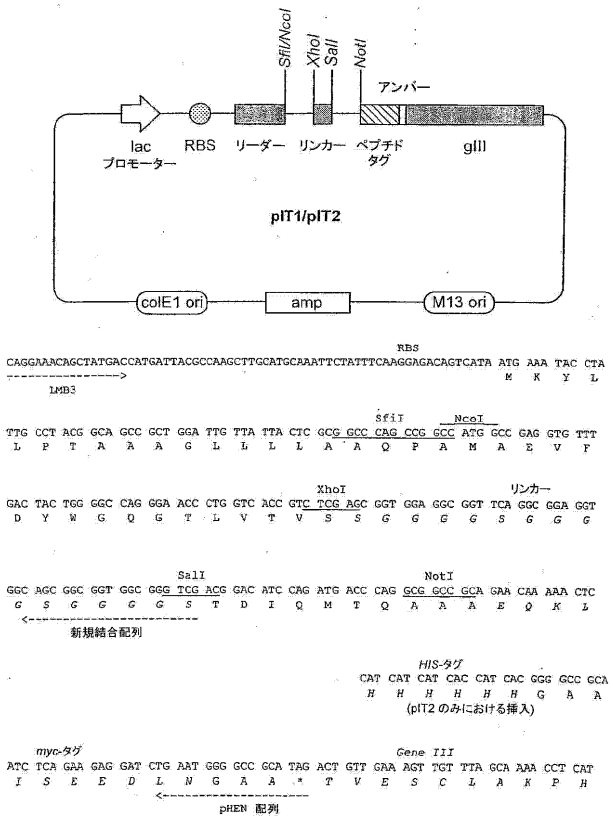
Partner dAb monomer in TAR2h-5d13 (5U linker)

```
   E  V  Q  L     L  E  S     G  G  G     L  V  Q  P     G  G  G     S     L  R  L     S  C  A  A     S  G  F     T  F  *     R  Y  G  M
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTAG CGGTATGGGA
CTCCACGTCG ACAACCTCAG ACCCCCTCCG AACCATGTCG GACCCCCCAG GGACGCAGAG AGGACACGTC GGAGGCCTAA GTGGAAAATC GCCATACCCT
   V  W  V     R  Q  A     P  G  K  G     L  E  W     V  S  A     I  S  G  S     G  G  S     T  Y  Y     A  D  S  V     K  G  R
TGGTTTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG
ACCAAACCCA GGCGGTCCGA GGTCCCTTCC CAGATCTCAC CCAGATCGA TAATCACCAT CACCACCATC GTGTATGATG CGTCTGAGGC ACTTCCCGGC
   F  T  I     S  R  D  N     S  K  N     T  L  Y     L  Q  M  N     S  L  R     A  E  D     T  A  V  Y     Y  C  A     K  R  H
GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACGGCAT
CAAGTGGTAG AGGGCGCTGT TAAGGTTCTT GTGCGACATA GACGTTTACT TGTCGGACGC ACGGCTCCTG TGGCGCCATA TAATGACACG CTTTGCCGTA
   S  S  E  A     R  Q  F     D  Y  W     G  Q  G  T     L  V  T     V  S
AGTTCTGAGG CTAGGCAGTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTGGTCAC CGTCTCG
TCAAGACTCC GATCCGTCAA ACTGATGACC CCGGTCCCTT GGGACCAGTG GCAGAGC
```

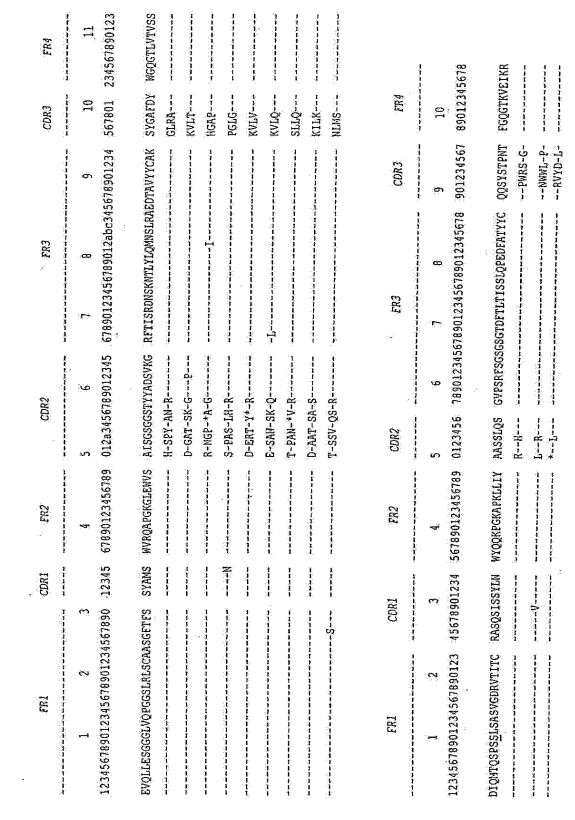
【図１】



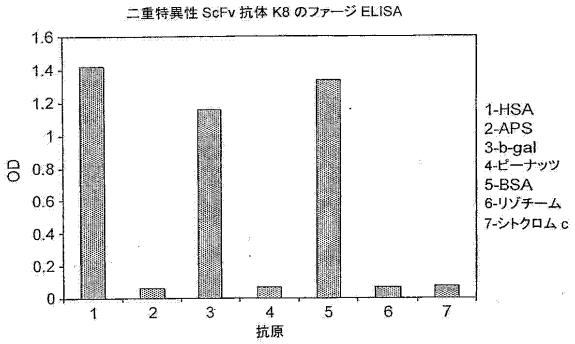
【図２】


SfiI/NcoI
XhoI
SalI
NotI
アンバー
lac
プロモーター
RBS
リーダー
リンカー
ペプチド
タグ
gIII
pIT1/pIT2
colE1 ori
amp
M13 ori
RBS
LMB3
SfiI
NcoI
XhoI
リンカー
SalI
NotI
新規結合配列
HIS-タグ
(pIT2 のみにおける挿入)
myc-タグ
Gene III
pHEN 配列

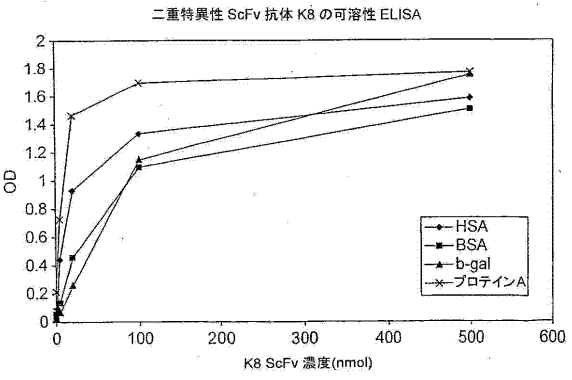
【図３】



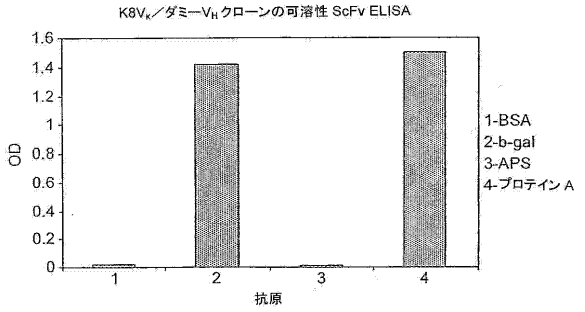
【図４】


二重特異性 ScFv 抗体 K8 のファージ ELISA
OD
抗原
1-HSA
2-APS
3-b-gal
4-ピーナッツ
5-BSA
6-リゾチーム
7-シトクロム c

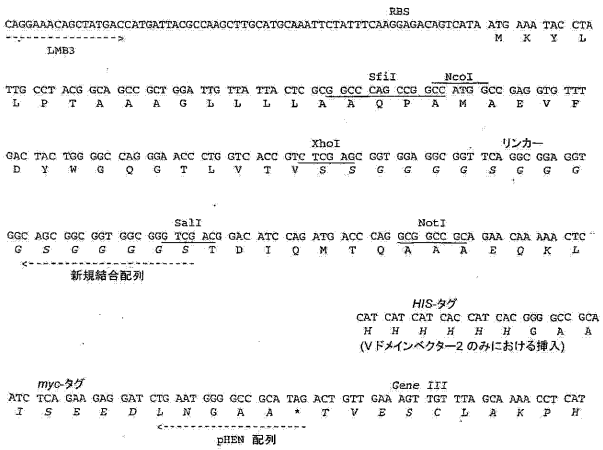
【図５】


二重特異性 ScFv 抗体 K8 の可溶性 ELISA
OD
K8 ScFv 濃度(nmol)
HSA
BSA
b-gal
プロテインA

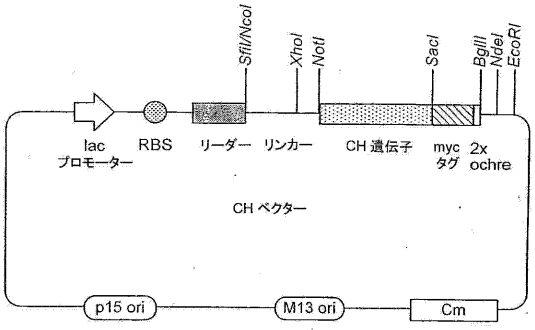
【図６】



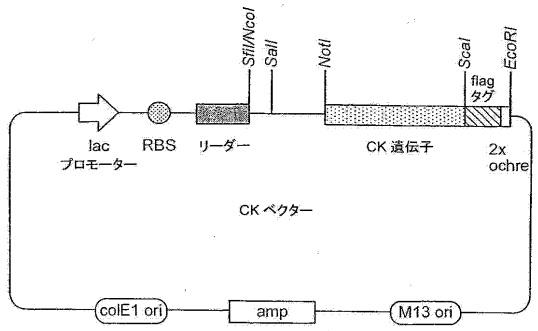
【図７】



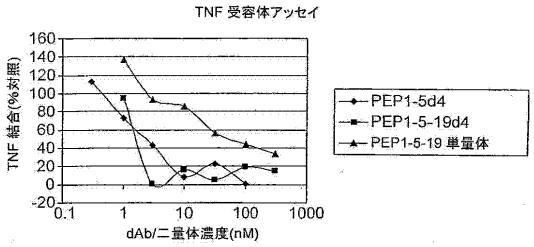
【図８】



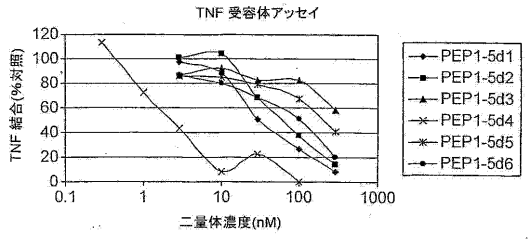
【図９】



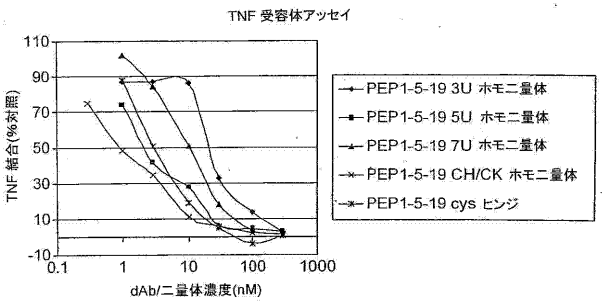
【図１０】



【図１１】



【図１２】



【図１３】

ライブラリー1 のダミーV$_H$配列

```
    E   V   Q   L   L   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G
1   GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG
    CTC CAC GTC GAC AAC CTC AGA CCC CCT CCG AAC CAT GTC GGA CCC CCC

    S   L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y
49  TCC CTG CGT CTC TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
    AGG GAC GCA GAG AGG ACA CGT CGG AGG CCT AAG TGG AAA TCG TCG ATA

    A   M   S   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V
97  GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGT CTA GAG TGG GTC
    CGG TAC TCG ACC CAG GCG GTC CGA GGT CCC TTC CCA GAT CTC ACC CAG

    S   A   I   S   G   S   G   G   S   T   Y   Y   A   D   S   V
145 TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG
    AGT CGA TAA TCA CCA TCA CCA CCA TCG TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC

    K   G   R   F   T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y
193 AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC CGT GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT
    TTC CCG GCC AAG TGG TAG AGG GCA CTG TTA AGG TTC TTG TGC GAC ATA

    L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C
241 CTG CAA ATG AAC AGC CTG CGT GCC GAG GAC ACC GCG GTA TAT TAC TGT
    GAC GTT TAC TTG TCG GAC GCA CGG CTC CTG TGG CGC CAT ATA ATG ACA

    A   K   S   Y   G   A   F   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V
289 GCG AAA AGT TAT GGT GCT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC
    CGC TTT TCA ATA CCA CGA AAA CTG ATG ACC CCG GTC CCT TGG GAC CAG

    T   V   S   S
337 ACC GTC TCG AGC
    TGG CAG AGC TCG
```

【図１４】

ライブラリー2 のダミーV_H配列

```
     E  V  Q  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G
1    GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG
     CTC CAC GTC GAC AAC CTC AGA CCC CCT CCG AAC CAT GTC GGA CCC CCC

     S  L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y
49   TCC CTG CGT CTC TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
     AGG GAC GCA GAG AGG ACA CGT CGG AGG CCT AAG TGG AAA TCG TCG ATA

     A  M  S  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V
97   GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGT CTA GAG TGG GTC
     CGG TAC TCG ACC CAG GCG GTC CGA GGT CCC TTC CCA GAT CTC ACC CAG

     S  A  I  S  G  S  G  G  S  T  Y  Y  A  D  S  V
145  TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG
     AGT CGA TAA TCA CCA TCA CCA CCA TCG TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC

     K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y
193  AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC CGT GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT
     TTC CCG GCC AAG TGG TAG AGG GCA CTG TTA AGG TTC TTG TGC GAC ATA

     L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C
241  CTG CAA ATG AAC AGC CTG CGT GCC GAG GAC ACC GCG GTA TAT TAC TGT
     GAC GTT TAC TTG TCG GAC GCA CGG CTC CTG TGG CGC CAT ATA ATG ACA

     A  K  S  Y  G  A  X  X  X  X  F  D  Y  W  G  Q
289  GCG AAA AGT TAT GGT GCT NNK NNK NNK NNK TTT GAC TAC TGG GGC CAG
     CGC TTT TCA ATA CCA CGA NNK NNK NNK NNK AAA CTG ATG ACC CCG GTC

     G  T  L  V  T  V  S  S
337  GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGC
     CCT TGG GAC CAG TGG CAG AGC TCG
```

【図１５】

ライブラリー3 のダミー$V_κ$配列

```
     D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G
1    GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA
     CTG TAG GTC TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGG GAC AGA CGT AGA CAT CCT

     D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  S  I  S  S  Y
49   GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT
     CTG GCA CAG TGG TAG TGA ACG GCC CGT TCA GTC TCG TAA TCG TCG ATA

     L  N  W  Y  Q  Q  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I
97   TTA AAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC
     AAT TTA ACC ATG GTC GTC TTT GGT CCC TTT CGG GGA TTC GAG GAC TAG

     Y  A  A  S  S  L  Q  S  G  V  P  S  R  F  S  G
145  TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC
     ATA CGA CGT AGG TCA AAC GTT TCA CCC CAG GGT AGT GCA AAG TCA CCG

     S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P
193  AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT
     TCA CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG TGG TAG TCG TCA GAC GTT GGA

     E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  S  Y  S  T  P  N
241  GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT AAT
     CTT CTA AAA CGA TGC ATG ATG ACA GTT GTC TCA ATG TCA TGG GGA TTA

     T  F  G  Q  G  T  K  V  E  I  K  R
289  ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG
     TGC AAG CCG GTT CCC TGG TTC CAC CTT TAG TTT GCC
```

【図１６】

抗 MSA dAb MSA16 および MSA26 のヌクレオチドおよびアミノ酸配列

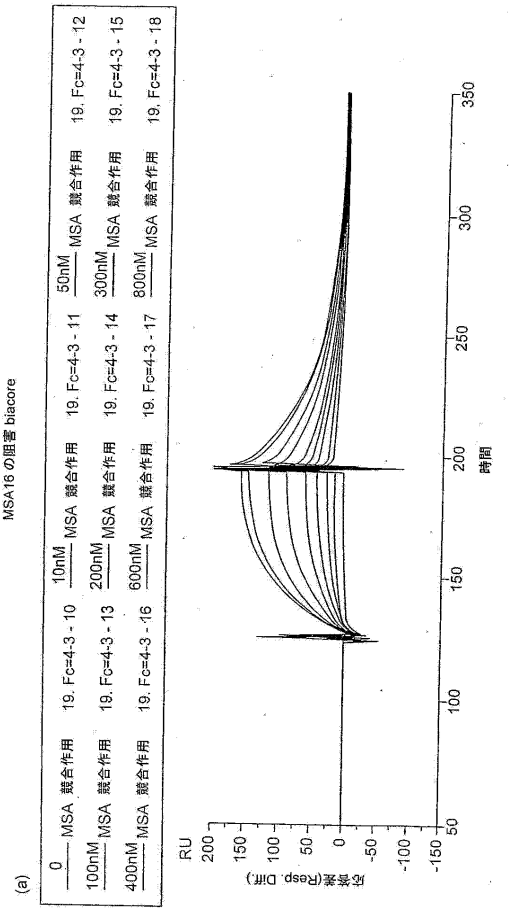
A: MSA 16

```
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S

GTA GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC
 V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  S

ATT ATT AAG CAT TTA AAG TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA
 I  I  K  H  L  K  W  Y  Q  Q  K  P  G  K

GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT GGT GCA TCC CGG TTG CAA AGT
 A  P  K  L  L  I  Y  G  A  S  R  L  Q  S

GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
 G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D

TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT
 F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A

ACG TAC TAC TGT CAA CAG GGG GCT CGG TGG CCT CAG ACG TTC
 T  Y  Y  C  Q  Q  G  A  R  W  P  Q  T  F

GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG
 G  Q  G  T  K  V  E  I  K  R
```

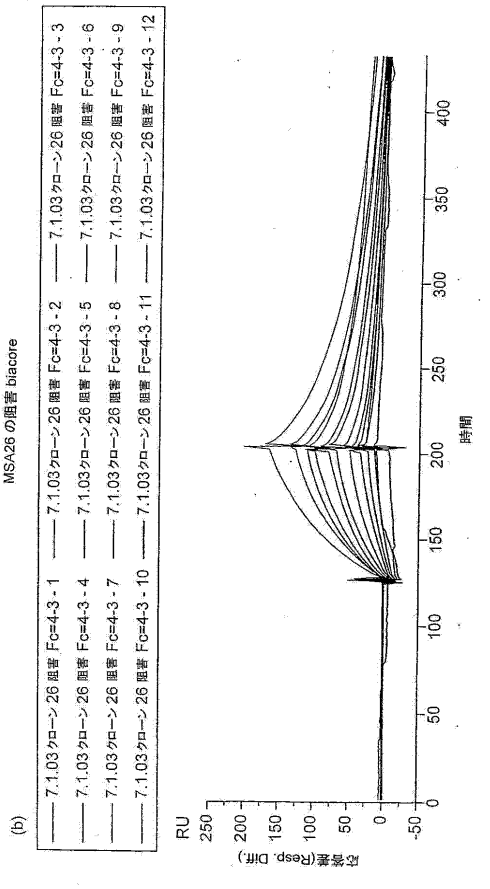
B: MSA 26

```
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S

GTA GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC
 V  G  D  R  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  S

ATT TAT TAT CAT TTA AAG TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA
 I  Y  Y  H  L  K  W  Y  Q  Q  K  P  G  K

GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AAG GCA TCC ACG TTG CAA AGT
 A  P  K  L  L  I  Y  K  A  S  T  L  Q  S

GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
 G  V  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D

TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT
 F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P  E  D  F  A

ACG TAC TAC TGT CAA CAG GTT CGG AAG GTG CCT CGG ACG TTC
 T  Y  Y  C  Q  Q  V  R  K  V  P  R  T  F

GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG
 G  Q  G  T  K  V  E  I  K  R
```

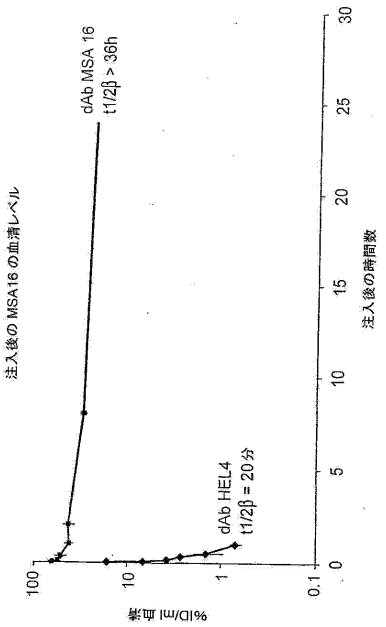
【図１７－１】



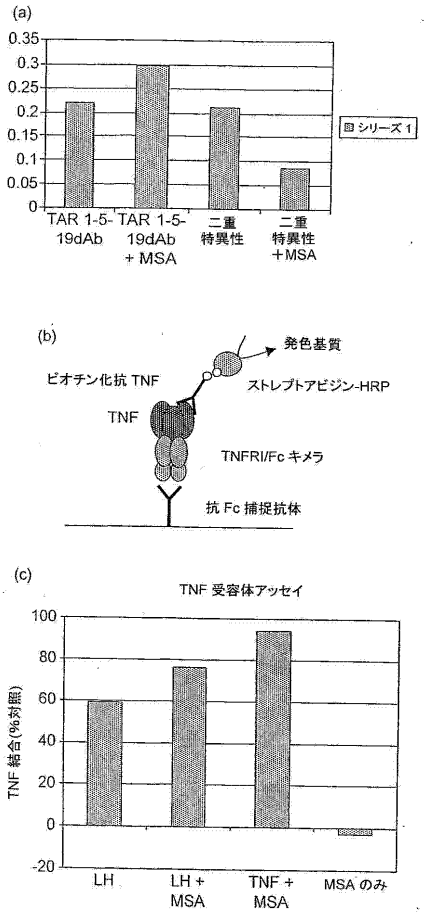
【図１７－２】



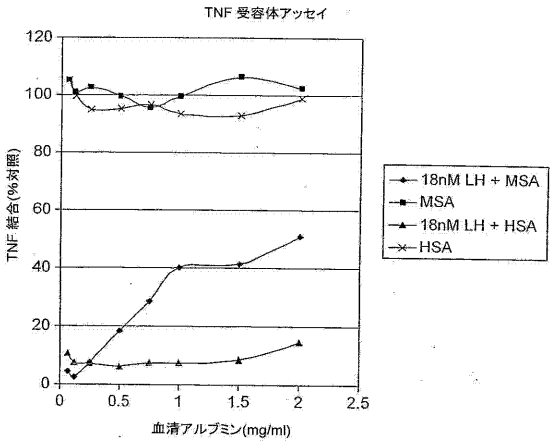
【図１８】


dAb MSA 16
t1/2β > 36h
dAb HEL4
t1/2β = 20分
注入後の MSA16 の血清レベル
注入後の時間数
%ID/ml 血清

【図１９】


(a)
シリーズ1
TAR 1-5-19dAb
TAR 1-5-19dAb + MSA
二重特異性
二重特異性＋MSA
(b)
発色基質
ビオチン化抗 TNF
ストレプトアビジン-HRP
TNF
TNFRI/Fc キメラ
抗 Fc 捕捉抗体
(c)
TNF 受容体アッセイ
TNF 結合(%対照)
LH
LH + MSA
TNF + MSA
MSA のみ

【図２０】


TNF 受容体アッセイ
TNF 結合(%対照)
血清アルブミン(mg/ml)
18nM LH + MSA
MSA
18nM LH + HSA
HSA

【配列表】
2011125342000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	C07K	16/18		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	D	
A61P	*29/00*	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	29/00		
A61P	*25/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61P	*1/04*	*(2006.01)*	A61P	25/00		
G01N	*33/542*	*(2006.01)*	A61P	1/04		
G01N	*33/531*	*(2006.01)*	G01N	33/542	A	
			G01N	33/531	A	

(72)発明者 ウィンター，グレッグ
イギリス国 シービー２ ２キューエイチ ケンブリッジ，ヒルズ ロード，エムアールシー ラボラトリー オブ モレキュラー バイオロジー
(72)発明者 トムリンソン，イアン
イギリス国 シービー１ ６ジーエス ケンブリッジ，アビントン，グランタ パーク，ドマンティス リミテッド
(72)発明者 イグナトヴィッチ，オルガ
イギリス国 シービー１ ６ジーエス ケンブリッジ，アビントン，グランタ パーク，ドマンティス リミテッド
(72)発明者 ホルト，ルーシー
イギリス国 シービー１ ６ジーエス ケンブリッジ，アビントン，グランタ パーク，ドマンティス リミテッド
(72)発明者 デ アンゲリス，エレナ
イギリス国 シービー１ ６ジーエス ケンブリッジ，アビントン，グランタ パーク，ドマンティス リミテッド
(72)発明者 ジョーンズ，フィリップ
イギリス国 シービー４ ９エルティー ケンブリッジ，インピントン，インピントン レーン１５

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA01 CA09 CA10 CA11 CA20 DA02 EA03 EA04
GA11 HA01 HA11
4B065 AA90X AA90Y AB01 CA24 CA44
4C085 AA13 AA14 CC22 DD62 DD63 EE01 GG01
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 FA71 FA74