

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506064

(P2005-506064A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int.C1.⁷

F 1

テーマコード(参考)

C12N 15/09
C07K 14/705
C07K 16/00
C07K 16/46
C07K 19/00

C12N 15/00 Z N A A
C07K 14/705
C07K 16/00
C07K 16/46
C07K 19/00

4B024
4B064
4B065
4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 197 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-517247(P2003-517247)	(71) 出願人	504041309 アブマクシス、インコーポレイティド アメリカ合衆国、カリフォルニア 940 43, マウンテン ビュー, レイベンデイ ル ドライブ 453, スイート ビー
(86) (22) 出願日	平成14年7月31日(2002.7.31)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月2日(2004.2.2)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敏
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/024582	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 國際公開番号	W02003/012069	(74) 代理人	100127085 弁理士 越阪部 優子
(87) 國際公開日	平成15年2月13日(2003.2.13)	(74) 代理人	100082898 弁理士 西山 雅也
(31) 優先権主張番号	09/921,144		
(32) 優先日	平成13年8月1日(2001.8.1.)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】キメラヘテロ多量体の生成のための組成物及び方法

(57) 【要約】

本発明によれば、ヘテロ多量体を形成するための単量体ポリペプチドの特異的集合に用いられる方法が提供される。この方法は、抗原結合ユニット等のヘテロ多量体の遺伝学的に多様なレパートリーを生成するのに特に有用である。また、本発明によれば、本明細書に記載の方法によりアセンブルされる、非一本鎖抗原結合ユニットと一本鎖抗原結合ユニットの両方も提供される。また、本発明によれば、対象の抗原結合ユニットを産生させるために使用される組み換えポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞及びキットも提供される。さらに、本発明によれば、対象の抗原結合ユニットの使用方法も提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

非一本鎖抗原結合ユニットであって、以下の：

(a) フレーム内で第一ヘテロ二量体化配列に融合している軽(L)鎖可変領域を含んでいる軽(L)鎖ポリペプチド；及び、

(b) フレーム内で第二ヘテロ二量体化配列に融合している重(H)鎖可変領域を含んでいる重(H)鎖ポリペプチド

を含んでなり、ここで、

前記L鎖ポリペプチドと前記H鎖ポリペプチドは、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化し、且つ前記ヘテロ二量体化配列の少なくとも一方が、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、前記非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 2】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列の両方が、生理学的緩衝条件下及び生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、請求項1に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 3】

非一本鎖抗原結合ユニットであって、以下の：

(a) フレーム内で第一ヘテロ二量体化配列に融合している軽(L)鎖可変領域を含んでいる軽(L)鎖ポリペプチド；及び、

(b) フレーム内で第二ヘテロ二量体化配列に融合している重(H)鎖可変領域を含んでいる重(H)鎖ポリペプチド

を含んでなり、ここで、

前記L鎖ポリペプチドと前記H鎖ポリペプチドは、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化し、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列がヘテロ二量体性受容体配列を含み、前記ヘテロ二量体性受容体配列が前記受容体のヘテロ二量体化を仲介する、前記非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 4】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列が、コイルドコイル二量体を形成する、請求項1又は3に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 5】

前記L鎖ポリペプチドと前記H鎖ポリペプチドが、前記2つのヘテロ二量体化配列の非共有結合性の対による親和性を介して二量体化する、請求項1又は3に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 6】

前記L鎖ポリペプチドが、前記L鎖可変領域及び前記第一ヘテロ二量体化配列により両側を挟まれているフレクソンをさらに含む、請求項4に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 7】

前記H鎖ポリペプチドが、前記H鎖可変領域及び前記第二ヘテロ二量体化配列により両側を挟まれているフレクソン配列をさらに含む、請求項4に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 8】

前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の両方が、少なくとも一つのシステイン残基に連結している、請求項4に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 9】

多価である、請求項4に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 10】

多重特異性である、請求項4に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

二重特異性である、請求項 10 に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 12】

三重特異性である、請求項 10 に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 13】

前記 L 鎖ポリペプチドが、ヒト軽鎖由来の配列を含む、請求項 4 に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 14】

前記 H 鎖ポリペプチドが、ヒト重鎖由来の配列を含む、請求項 4 に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 15】

化学的機能性部分に結合している、請求項 4 に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 16】

前記部分が、以下の：シグナルペプチド、免疫学的反応性を高める物質、固体支持体へのカップリングを容易にする物質、ワクチンキャリア、生物反応修飾物質、トキシン、検出可能な標識、常磁性標識及び薬物からなる群から選択されたものである、請求項 15 に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 17】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列が、それぞれ G A B A_B 受容体 1 及び G A B A_B 受容体 2 の C 末端配列に由来するものである、請求項 4 に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 18】

請求項 4 に記載の非一本鎖抗原結合ユニットであって、ここで、前記第一ヘテロ二量体化配列が、配列番号 (S E Q I D N O .) 2 に示されている匹敵する長さの線状ペプチド配列と基本的に同一である、少なくとも 30 のアミノ酸残基の G A B A_B 受容体 1 ポリペプチドを含むヘテロ二量体化配列であり、且つ前記第二ヘテロ二量体化配列が、配列番号 (S E Q I D N O .) 4 に示されている匹敵する長さの線状ペプチド配列と基本的に同一である、少なくとも 30 のアミノ酸残基の G A B A_B 受容体 2 ポリペプチドを含むヘテロ二量体化配列であり、前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列がシステイン残基に連結されている、前記非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 19】

請求項 4 に記載の非一本鎖抗原結合ユニットであって、ここで、前記第一ヘテロ二量体化配列が、配列番号 (S E Q I D N O .) 4 に示されている匹敵する長さの線状ペプチド配列と基本的に同一である、少なくとも 30 のアミノ酸残基の G A B A_B 受容体 1 ポリペプチドを含むヘテロ二量体化配列であり、且つ前記第二ヘテロ二量体化配列が、配列番号 (S E Q I D N O .) 2 に示されている匹敵する長さの線状ペプチド配列と基本的に同一である、少なくとも 30 のアミノ酸残基の G A B A_B 受容体 2 ポリペプチドを含むヘテロ二量体化配列であり、前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列がシステイン残基に連結されている、前記非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 20】

一本鎖結合ユニットであって、軽 (L) 鎖可変領域と重 (H) 鎖可変領域とを含み、前記軽 (L) 鎖可変領域と前記重 (H) 鎖可変領域が、前記領域の一方の C 末端と前記他の領域の N 末端の間の距離をまたがった第一ヘテロ二量体化配列と第二ヘテロ二量体化配列により接続されており、前記 2 つの領域が、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して分子内二量体を形成し、且つ前記ヘテロ二量体化配列の少なくとも一方が、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、前記一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 21】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列の両方が、生理学的緩衝条件下及び生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、請求項 20 に記載の一本鎖抗原結合ユニット。

10

20

30

40

50

【請求項 22】

一本鎖抗原結合ユニットであって、軽(L)鎖可変領域と重(H)鎖可変領域とを含み、前記軽(L)鎖可変領域と前記重(H)鎖可変領域が、前記領域の一方のC末端と前記他の領域のN末端の間の距離をまたがった第一ヘテロ二量体化配列と第二ヘテロ二量体化配列により接続されており、前記2つの領域が、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して分子内二量体を形成し、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列が前記受容体のヘテロ二量体化を仲介するヘテロ二量体性受容体配列を含む、前記一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 23】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列が、コイルドコイル二量体を形成する、請求項20又は22に記載の一本鎖抗原結合ユニット。 10

【請求項 24】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列が、非共有結合性の対による親和性を介して二量体化している、請求項20又は22に記載の一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 25】

化学的機能性部分に結合している、請求項23に記載の一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 26】

前記L鎖可変領域が、ヒト軽鎖由来の配列を含む、請求項23に記載の一本鎖抗原結合ユニット。 20

【請求項 27】

前記H鎖可変領域が、ヒト重鎖由来の配列を含む、請求項23に記載の一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 28】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列が、それぞれGABA_B受容体1及びGABA_A受容体2のC末端配列に由来するものである、請求項23に記載の一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 29】

請求項23に記載の一本鎖抗原結合ユニットであって、ここで、前記第一ヘテロ二量体化配列が、配列番号(S EQ ID NO.)2に示されている匹敵する長さの線状ペプチド配列と基本的に同一である、少なくとも30のアミノ酸残基のGABA_B受容体1ポリペプチドを含むヘテロ二量体化配列であり、且つ前記第二ヘテロ二量体化配列が、配列番号(S EQ ID NO.)4に示されている匹敵する長さの線状ペプチド配列と基本的に同一である、少なくとも30のアミノ酸残基のGABA_A受容体2ポリペプチドを含むヘテロ二量体化配列であり、前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列がシステイン残基に連結されている、前記一本鎖抗原結合ユニット。 30

【請求項 30】

請求項23に記載の一本鎖抗原結合ユニットであって、ここで、前記第一ヘテロ二量体化配列が、配列番号(S EQ ID NO.)4に示されている匹敵する長さの線状ペプチド配列と基本的に同一である、少なくとも30のアミノ酸残基のGABA_B受容体1ポリペプチドを含むヘテロ二量体化配列であり、且つ前記第二ヘテロ二量体化配列が、配列番号(S EQ ID NO.)2に示されている匹敵する長さの線状ペプチド配列と基本的に同一である、少なくとも30のアミノ酸残基のGABA_A受容体2ポリペプチドを含むヘテロ二量体化配列であり、前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列がシステイン残基に連結されている、前記一本鎖抗原結合ユニット。 40

【請求項 31】

請求項1に記載のL鎖ポリペプチドをコードするコード配列を含む、組み換えポリヌクレオチド。

【請求項 32】

請求項1に記載のH鎖ポリペプチドをコードするコード配列を含む、組み換えポリヌクレ 50

オチド。

【請求項 3 3】

請求項 1 に記載の L鎖ポリペプチドをコードする第一コード配列と、請求項 1 に記載の H鎖ポリペプチドをコードする第二コード配列とを含む、組み換えポリヌクレオチド。

【請求項 3 4】

請求項 3 に記載の L鎖ポリペプチドをコードするコード配列を含む、組み換えポリヌクレオチド。

【請求項 3 5】

請求項 3 に記載の H鎖ポリペプチドをコードするコード配列を含む、組み換えポリヌクレオチド。

10

【請求項 3 6】

請求項 3 に記載の L鎖ポリペプチドをコードする第一コード配列と、請求項 3 に記載の H鎖ポリペプチドをコードする第二コード配列とを含む、組み換えポリヌクレオチド。

【請求項 3 7】

請求項 2 0 に記載の一本鎖抗原結合ユニットをコードするコード配列を含む、組み換えポリヌクレオチド。

【請求項 3 8】

請求項 2 2 に記載の一本鎖抗原結合ユニットをコードするコード配列を含む、組み換えポリヌクレオチド。

20

【請求項 3 9】

請求項 3 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の組み換えポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 4 0】

発現ベクターである、請求項 3 9 に記載のベクター。

【請求項 4 1】

ファージディスプレイベクターである、請求項 3 9 に記載のベクター。

【請求項 4 2】

請求項 3 9 に記載の 1 以上のベクターを含む、抗原結合ユニットのレパートリーをコードしている、発現ベクターの選択可能なライブラリー。

【請求項 4 3】

前記ベクターが、ファージディスプレイベクターである、請求項 4 2 に記載の前記選択可能なライブラリー。

30

【請求項 4 4】

請求項 3 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の組み換えポリヌクレオチドを含む、宿主細胞。

【請求項 4 5】

前記 L鎖ポリペプチドをコードする前記組み換えポリヌクレオチド及び前記 H鎖ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、単一のベクターに存在する、請求項 4 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 6】

前記 L鎖ポリペプチドをコードする前記組み換えポリヌクレオチド及び前記 H鎖ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、別々のベクターに存在する、請求項 4 4 に記載の宿主細胞。

40

【請求項 4 7】

真核細胞である、請求項 4 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 8】

原核細胞である、請求項 4 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 9】

非一本鎖抗原結合ユニットの製造方法であって、以下のステップ：

(a) フレーム内で第一ヘテロ二量体化配列に融合して軽 (L)鎖可変領域を含んでいる、軽 (L)鎖ポリペプチドをコードしている第一組み換えポリヌクレオチドと、フレーム内で第二ヘテロ二量体化配列に融合して重 (H)鎖可変領域を含んでいる、重 (H)鎖ポ

50

リペプチドをコードしている第二組み換えポリヌクレオチドとを、宿主細胞内で発現させるステップであって、ここで、前記L鎖ポリペプチドと前記H鎖ポリペプチドが、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化し、且つ前記ヘテロ二量体化配列の少なくとも一方が、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、前記ステップ；及び場合により、(b)前記宿主細胞において発現された前記抗原結合ユニットを分離するステップを含む、前記方法。

【請求項 5 0】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列の両方が、生理学的緩衝条件下及び生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、請求項49に記載の方法。 10

【請求項 5 1】

非一本鎖抗原結合ユニットの製造方法であって、以下のステップ：

(a) 第一ヘテロ二量体化配列に融合して軽(L)鎖可変領域を含んでいる、軽(L)鎖ポリペプチドをコードしている第一組み換えポリヌクレオチドと、第二ヘテロ二量体化配列に融合して重(H)鎖可変領域を含んでいる、重(H)鎖ポリペプチドをコードしている第二組み換えポリヌクレオチドとを、宿主細胞内で発現させるステップであって、前記L鎖ポリペプチドと前記H鎖ポリペプチドが、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化し、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列が、前記受容体のヘテロ二量体化を仲介するヘテロ二量体性受容体配列を含む、前記ステップ；及び、場合により、

(b) 前記宿主細胞において発現された前記抗原結合ユニットを分離するステップを含む、前記方法。 20

【請求項 5 2】

前記ステップ(a)で発現された前記非一本鎖抗原結合ユニットが、前記宿主細胞の表面上にディスプレイされる、請求項49又は51に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記ステップ(a)で発現された前記非一本鎖抗原結合ユニットが、ファージ粒子上にディスプレイされる、請求項49又は51に記載の方法。 30

【請求項 5 4】

前記宿主細胞が、真核細胞である、請求項49又は51に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記宿主細胞が、原核細胞である、請求項49又は51に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列が、コイルドコイル二量体を形成する、請求項49又は51に記載の方法。 40

【請求項 5 7】

前記L鎖ポリペプチド及び前記H鎖ポリペプチドが、非共有結合性の対による親和性を介して二量体化している、請求項49又は51に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記L鎖ポリペプチドが、前記L鎖可変領域及び前記第一ヘテロ二量体化配列により両側を挟まれているフレクソンをさらに含む、請求項56に記載の方法。 40

【請求項 5 9】

前記H鎖ポリペプチドが、前記H鎖可変領域及び前記第二ヘテロ二量体化配列により両側を挟まれているフレクソン配列をさらに含む、請求項56に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の両方が、少なくとも一つのシステイン残基に連結している、請求項56に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記非一本鎖抗原結合ユニットが、多価である、請求項56に記載の方法。

【請求項 6 2】

10

20

30

40

50

前記非一本鎖抗原結合ユニットが、多重特異性である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記非一本鎖抗原結合ユニットが、二重特異性である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記非一本鎖抗原結合ユニットが、三重特異性である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記 L 鎖ポリペプチドが、ヒト軽鎖由来の配列を含む、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記 H 鎖ポリペプチドが、ヒト重鎖由来の配列を含む、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 7】

非一本鎖抗原結合ユニットの製造方法であって、以下のステップ：

(a) フレーム内で第一ヘテロ二量体化配列に融合して軽 (L) 鎖可変領域を含んでいる、軽 (L) 鎖ポリペプチドをコードしている第一組み換えポリヌクレオチドと、フレーム内で第二ヘテロ二量体化配列に融合して重 (H) 鎖可変領域を含んでいる、重 (H) 鎖ポリペプチドをコードしている第二組み換えポリヌクレオチドとを調製するステップであって、ここで、前記 L 鎖ポリペプチドと前記 H 鎖ポリペプチドが、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化し、且つ前記ヘテロ二量体化配列の少なくとも一方が、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、前記ステップ；及び

(b) 前記第一ポリペプチド及び前記第二ポリペプチドを、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化させるステップを含む、前記方法。 20

【請求項 6 8】

前記ステップ (b) が、前記第一ポリペプチドと前記第二ポリペプチドとを生体外で二量体化することを含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

一本鎖抗原結合ユニットの製造方法であって、以下のステップ：

(a) 請求項 20 又は 22 に記載の前記一本鎖抗原結合ユニットをコードしているコード配列を含むポリヌクレオチドを宿主細胞において発現させるステップ；及び場合により、
(b) 前記宿主細胞において発現された前記一本鎖抗原結合ユニットを分離するステップを含む、前記方法。 30

【請求項 7 0】

前記ポリヌクレオチドがファージディスプレイベクターに含まれている、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

宿主細胞の表面上に少なくとも 2 つのポリペプチドを含むキメラヘテロ多量体をディスプレイする方法であって、以下のステップ：

前記宿主細胞において、

(a) フレーム内において第一ヘテロ二量体化配列及び表面提示配列に融合している、第一ポリペプチドをコードしている第一組み換えポリヌクレオチド； 40

(b) フレーム内において第二ヘテロ二量体化配列に融合している第二ポリペプチドをコードしている第二組み換えポリヌクレオチド

を発現させるステップを含み、ここで、

前記第一ポリペプチドと前記第二ポリペプチドが、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化し、且つ前記ヘテロ二量体化配列の少なくとも一方が、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、前記方法。

【請求項 7 2】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列の両方が、生理学的緩衝条件下及び生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、請求項 7 1 に記載の方法。 50

【請求項 7 3】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列が、コイルドコイル二量体を形成する、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記第一ポリヌクレオチド及び前記第二ポリヌクレオチドが、単一ファージディスプレイベクターにより発現される、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記第一ポリヌクレオチド及び前記第二ポリヌクレオチドが、別々のファージディスプレイベクターにより発現される、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記宿主細胞が、原核細胞である、請求項 7 1 に記載の方法。 10

【請求項 7 7】

前記宿主細胞が、真核細胞である、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記キメラヘテロ多量体が、非一本鎖抗原結合ユニットである、請求項 7 1 に記載の方法。
。

【請求項 7 9】

請求項 7 1 に記載の方法により前記宿主細胞の表面上にディスプレイされるキメラヘテロ多量体。

【請求項 8 0】

所望の抗原と免疫反応性である非一本鎖抗原結合ユニットを同定する方法であって、以下のステップ：

(a) 抗原結合ユニットの遺伝学的に多様なレパートリーを調製するステップであって、前記レパートリーが請求項 1 又は 3 に記載の 1 以上の抗原結合ユニットを含む、前記ステップ；

(b) 抗原結合ユニットの前記レパートリーを前記所望の抗原と接触させるステップ；及び

(c) 抗原結合ユニットと前記抗原との間の特異的結合を検出することにより、前記所望の抗原と免疫反応性である前記抗原結合ユニットを同定するステップ
を含む、前記方法。 30

【請求項 8 1】

抗原結合ユニットの前記レパートリーが、前記抗原結合ユニットの複数をコードしているベクターのライブラリーを発現させることにより調製される、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

ベクターの前記ライブラリーが、複数のファージベクターを含む、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 3】

所望の抗原と免疫反応性である一本鎖抗原結合ユニットを同定する方法であって、以下のステップ：

(a) 一本鎖抗原結合ユニットの遺伝学的に多様なレパートリーを調製するステップであって、前記レパートリーが請求項 2 0 又は 2 2 に記載の少なくとも一つの抗原結合ユニットを含む、前記ステップ；及び

(b) 抗原結合ユニットの前記レパートリーを前記所望の抗原と接触させるステップ；抗原結合ユニットと前記抗原との間の特異的結合を検出することにより、前記所望の抗原と免疫反応性である前記一本鎖抗原結合ユニットを同定するステップ
を含む、前記方法。 40

【請求項 8 4】

抗原結合ユニットの前記レパートリーが、前記抗原結合ユニットの複数をコードしているベクターのライブラリーを発現させることにより調製される、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

10

20

30

40

50

ベクターの前記ライブラリーが、複数のファージベクターを含む、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 6】

好適なパッケージングに請求項 3 9 に記載のベクターを含むキット。

【請求項 8 7】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列が、増殖因子受容体のヘテロ二量体性受容体配列を含む、請求項 1 又は 3 に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 8 8】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列が、G タンパク質結合受容体のヘテロ二量体性受容体配列を含む、請求項 1 又は 3 に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。
10

【請求項 8 9】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列が、神経伝達物質のヘテロ二量体性受容体配列を含む、請求項 1 又は 3 に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 9 0】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列が、核ホルモン受容体のヘテロ二量体性受容体配列を含む、請求項 1 又は 3 に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 9 1】

c c F v フラグメントである、請求項 1 又は 3 に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 9 2】

前記生理学的体温が、約 3 7 である、請求項 1 に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【請求項 9 3】

前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列が、等モル混合したときにホモ二量体を基本的に形成できない、請求項 1 に記載の非一本鎖抗原結合ユニット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願への相互参照

本出願は、2001年8月1日に出願、現在係属中であり、本明細書中に参考文献としてそのまま援用されている、米国特許出願第 0 9 / 9 2 1 , 1 4 4 号の一部継続出願である
30

。

【0 0 0 2】

本発明は、免疫学の分野に属する。具体的には、本発明は、独特のヘテロ二量体化配列を用いた非一本鎖抗原結合ユニット等のキメラヘテロ多量体の生成に関する。また、本発明は、対象のヘテロ二量体化配列により安定化された一本鎖抗原結合ユニットの生成に関する。本発明による組成物及び方法は、主に診断及び/又は治療に使用される可能性のある抗原結合ユニットを同定するのに特に有用である。

【背景技術】

【0 0 0 3】

抗体又は免疫グロブリンは、特異的同族抗原を認識し且つそれに結合する分子である。それらが排他的特異性を有するため、抗体、特にモノクローナル抗体は、種々のヒトの疾患の診断及び治療に広く使用してきた。

【0 0 0 4】

脊椎動物系における塩基性免疫グロブリン (Ig) は、2つの同一の軽 ('L') 鎮ポリペプチド (約 23 kDa) と 2 つの同一の重 ('H') 鎮ポリペプチド (約 53 ~ 70 kDa) からなる。4つの鎖は、「Y」配置においてジスルフィド結合により連結されている。Y の塩基で、2つの H 鎮は、共有ジスルフィド結合されている。L 鎮と H 鎮は、一連のドメインで組織化されている。L 鎮は、C 領域に相当する 2 つのドメイン ('CL') を有し、他は V 領域 ('VL') に相当する。H 鎮は、4 つのドメインを有し、一つが V 領域 ('VH') に相当し、3 つのドメイン (CH1, CH2 及び CH3) は C 領域にあ
40
50

る。抗体は、2つのアーム（各アームはFabフラグメントである）を含む。各アームは、互いに関連したVL領域とVH領域を有する。このV領域対（VL及びVH）は、一つの抗体ごとに異なり（アミノ酸配列の変化により）、且つ一緒に抗原の認識及び抗原結合部位の付与に関与している。より詳細には、各V領域は、4つのフレームワーク領域（FR）により分離されている3つの相補性決定領域（CDR）から構成されている。CDRは、可変領域の最も変えられる部分であり、決定的な抗原結合機能を果たす。CDR領域は、組み換え、突然変異及び選択を含む複雑なプロセスを介して数多くの可能性のある生殖細胞系配列に由来している。

【0005】

最近の研究により、結合抗原の機能が、全抗体のフラグメントにより果たされることができる事が、明らかとなった。典型的な抗原結合フラグメントは、(i) VLドメイン、VHドメイン、CLドメイン及びCH1ドメインからなるFabフラグメント；(ii)VHドメインとCH1ドメインとからなるFdフラグメント；(iii)VHドメインからなるdAbフラグメント(Ward, E. S. 等, *Nature* 341, 544-546 (1989))；(iv)分離されたCDR領域；及び(v)ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFabフラグメントを含む二価のフラグメントであるFab'₂フラグメント；及び(vi)抗体の单アームのVLドメイン及びVHドメインからなるFvフラグメントである。Fvフラグメントは、抗原の高アフィニティー結合に必要とされる最小の機能性ユニットである。

【0006】

抗体の分野における一つの主要な挑戦は、ヒト免疫系における免疫グロブリンプールを再現する、免疫グロブリンの非常に多種多様なレパートリーを再構成することであった。このようなレパートリーは、一般的に10⁸~10¹³個の範囲の別個の免疫グロブリンの複雑性を有する。このようなレパートリーが生成すると、治療標的と特異的に相互作用できる免疫グロブリンの同定及び産生が非常に容易になる。しかしながら、このようなレパートリーの設計及び産生は、従来では最小機能性ユニット、すなわち、Fvフラグメントのアセンブリのための安定化手段を欠いているために妨害されていた。当該技術分野においては、VH領域及びVL領域は単独で発現されると、極めて低い相互作用エネルギーを示すことは、周知な問題である(Glockshuber等(1990) *Biochemistry* 29 (6) : 1362-1367)。2つの成分は、低タンパク質濃度で解離し、生理学的体温では数多くの用途で非常に不安定である。また、全抗体等の大タンパク質は（極めて安定であるにもかかわらず）、宿主細胞では明らかなレベルでは発現しないので、非常に種々の抗体レパートリーを構成するのが極めて困難となることも、長年にわたって認識されている技術的な障害である。

【0007】

より最近では、安定なVLとVHの複合体を生成するのに、3つの方法が開発された。しかしながら、これらの方法の各々は、多数の固有の限界があり、これらの方法のどれもが、上記した技術的な障害を完全に回避していない。第一の方法では、ペプチドリンクを用いてVLとVHを一本鎖（「scFv」）として接続している(Huston等(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85: 5879-5883)。得られたscFvは実質的な抗原結合活性を示すが、全ての抗体が一本鎖として製造できるわけではなく、まだ高い結合親和性を保持している(Huston等(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85: 5879-5883; Stemmer等(1993) *Biotechniques* 14 (2) : 256-265)。部分的に、このことは、抗原結合部位によるリンク配列の妨害によるものである。第二の方法では、VL領域とVH領域における1対のシステイン残基を挿入してジスルフィド結合安定化Fv（「dsFv」）を生成することが含まれる(Brinkmann等(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (16) : 7538-7542)。しかしながら、組み込まれたジスルフィド結合は、数多くの宿主細胞における還元条件下では不安定である。例えば、大腸菌(E. coli)のサイトゾルでは

10

20

30

40

50

、分子間ジスルフィド結合は、しばしばV LとV Hの複合体を安定化するのには不十分である。さらに、この方法では、典型的には結合活性を破壊することなくシステイン対を適切な場所に確実に挿入するために、V領域の3次元構造情報が必要である。大部分の既存の抗体の3次元情報は知られていないので、この方法はほとんど実用性がなく、特に抗体ライブラリーの構築、とりわけB細胞由来の抗体レパートリーを構成するのには適していない。V L領域及びV H領域を安定化するための第三の方法では、C H 1ドメイン及びC Lドメインに由来するジスルフィド結合を利用する。この方法は続けて、C H 1ドメインとC Lドメインを連結するジスルフィド結合をV L領域及びV H領域のC末端にグラフトしてF a bフラグメントを再構成する。得られたF a bフラグメントは、一般的により安定であり、しばしばs c F vよりも大きな結合親和性を示すが、F a bは、その大きなサイズのために、高レベル発現及び抗体レパートリー構築には最適ではない。
10

【0008】

コイルドコイル構造を形成する一定の二量体化配列も、多価抗体を構築するために用いられてきた。具体的には、米国特許第5,932,448号は、F o s及びJ u nロイシンジッパーにより連結された二重特異性F(a b')₂ヘテロ二量体を記載している。F o s及びJ u nロイシンジッパーは、優先的にヘテロ二量体を形成することが知られている十分に特徴付けられた配列である。しかしながら、F o s及びJ u nロイシンジッパーは、まだ生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を形成する顕著な傾向を示す(O'Shea等(1992)C e l l 6 8 : 6 9 9 - 7 0 8; V i d a l等(1996)P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A .)。実際に、J u n/J u nホモ二量体は、非常に安定であるので、生体外でF o s/J u nヘテロ二量体の形成には、まず加熱によるか、又は2-メルカプトエタニルアミンで還元することによりJ u n/J u nホモ二量体を解離させる必要がある(米国特許第5,910,573号第7欄第35~37行目;米国特許第5,932,448号第16欄第15~30行目参照)。生体内で試験すると、F o s及びJ u nの両方が、検出可能な量のホモ二量体を生成する(例えば、米国特許第5,932,448号第15欄第41~43行目;及びV i d a l等(1996)P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A .参照)。ホモ二量体化の傾向が多少あることは、単一の抗体種の生成にとっては実質的に重要ではないが、このような傾向は、V L領域とV H領域との間の効率の高いヘテロ二量体化が必要である抗体レパートリーの構築には問題である。
20
30

【0009】

H o u s t o n等による米国特許第5,824,483号では、F o s及びJ u nロイシンジッパーの他に、コイルドコイル二量体化ペプチドの組み合わせライブラリーの構築が記載されている。H o u s t o n等は、このライブラリーは、抗体等の選択された高分子リガンドと特異的に相互作用できるポリペプチドを同定するのに有用であることを提案している(第8頁と第9頁にかけての最終パラグラフを参照)。明らかに、H o u s t o n等の特許は、標的抗体の構築及び選択よりむしろ、標的抗体に結合する「抗原ペプチド」の選択に関する。H o u s t o n等の特許は、全くことなる目的に焦点をあてており、コイルドコイル配列を使用して安定な抗原結合ユニットを生成することを記載又は示唆さえしていない。
40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、安定な抗原結合ユニット及びそれらのレパートリーを生成して治療的抗原結合ユニットの同定をおこなうための改善された組成物及び方法について、かなりの必要性がある。理想的な抗原結合ユニットは、F vフラグメントよりも安定であるが、F a bフラグメントよりも小さくて大規模製造及び効率的なディスプレイを可能にするものが好ましい。また、このような抗原結合ユニットは、多価抗体及び/又は多重特異性抗体を構築するためのビルディングブロックとしての役割も果たす。本発明は、これらの必要性を満足し、関連した利点も提供する。
50

【課題を解決するための手段】**【0011】****発明の要約**

本発明の主要な態様は、安定なヘテロ多量体を形成するための単量体ポリペプチドの特異的集合の方法の設計にある。このヘテロ多量体産生法により、機能性ヘテロ多量体を高生産性で產生することが容易であり、望ましくないホモ二量体の集合が回避される。この方法は、特に抗原結合ユニット等のヘテロ多量体の遺伝学的に多種多様なレパートリーを生成するのに有用である。この方法は、所望の結合特異性を有する抗原結合ユニットの選択を容易にする種々の「遺伝パッケージディスプレイ」技術に容易に適合できる。このような遺伝パッケージディスプレイ技術の詳細は、米国特許第6248516号、第5969108号、第5885793号、第5837500号、第5571698号、第5223409号、第5514548号、PCT国際出願公開第WO9005144号、EP0368684、PCT国際出願公開第WO09201047号、同第WO09311236号及び同第WO09708320号に記載されている。

10

【0012】

対象とする抗原結合ユニットが、ヘテロ二量体化配列の異なる対による親和性により、集合させられ、且つ安定化される。これらの配列は、ヘテロ二量体化対の少なくとも一つのメンバーが、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない点で異なる。ある実施態様では、安定化抗原結合ユニットは、Fabフラグメントよりも小さい分子サイズを有するだけでなく、必要とする結合特異性及び親和性を示す。さらに、本発明のある種の非一本鎖抗原結合ユニットは、対応する慣用の一本鎖抗体(scfv)よりも結合親和性が大きい。抗原結合ユニットは、抗体ライブラリーの構築及び表示に特に適している。対象の抗原結合ユニットの一定の配置は、多価及び多重特異的免疫グロブリンのための都合のよいビルディングユニットとしての役割を果たす。

20

【0013】

すなわち、本発明によれば、以下の：(a)第一ヘテロ二量体化配列に融合した軽(L)鎖可変領域を含んでいる軽(L)鎖ポリペプチド；(b)第二ヘテロ二量体化配列に融合した重(H)鎖可変領域を含んでいる重(H)鎖ポリペプチド；を含み、前記L鎖ポリペプチドと前記H鎖ポリペプチドは、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化し；且つ前記ヘテロ二量体化配列の少なくとも一方が、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、非一本鎖抗原結合ユニットが提供される。好ましくは、前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列の両方が、生理学的緩衝条件下及び生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない。

30

【0014】

本発明の別の態様によれば、以下の：(a)第一ヘテロ二量体化配列に融合した軽(L)鎖可変領域を含んでいる軽(L)鎖ポリペプチド；(b)第二ヘテロ二量体化配列に融合した重(H)鎖可変領域を含んでいる重(H)鎖ポリペプチド；を含み、前記L鎖ポリペプチドと前記H鎖ポリペプチドは、ヘテロ二量体性受容体由來の前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化する、非一本鎖抗原結合ユニットが提供される。一の態様によれば、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列が、前記受容体のヘテロ二量体化を仲介するヘテロ二量体化受容体配列を含む。さらに別の態様によれば、対象とするヘテロ二量体化配列は、コイルドコイル二量体を形成する。さらに別の態様によれば、前記L鎖ポリペプチドと前記H鎖ポリペプチドは、前記2つのヘテロ二量体化配列の非共有結合性の対による親和性を介して二量体化する。好ましくは、前記L鎖又はH鎖ポリペプチドが、前記可変領域及び前記ヘテロ二量体化配列により両側を挟まれているフレクソンをさらに含んでいる。L鎖ポリペプチド配列とH鎖ポリペプチド配列の両方が、ヒトL鎖及びヒトH鎖由來のものでよい。ヘテロ二量体性抗原結合ユニットをさらに安定化するために、システイン残基を導入して、第一ヘテロ二量体化配列と第二ヘテロ二量体化配列との間のジスルフィド結合を形成することが

40

50

できる。非一本鎖抗原結合ユニットは、一価でも、多価でもよい。これらは、单一特異的でも、多重特異的でもよい。好ましい多重特異性Abusは、二重特異性分子、三重特異性分子及び四重特異性分子である。

【0015】

本発明の別の実施態様によれば、軽(L)鎖可変領域と重(H)鎖可変領域とを含み、前記軽(L)鎖可変領域と前記重(H)鎖可変領域が、前記領域の一方のC末端と前記他の領域のN末端の間の距離をまたがった第一ヘテロ二量体化配列と第二ヘテロ二量体化配列により接続されており、前記2つの領域が、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して分子内二量体を形成し；且つ前記ヘテロ二量体化配列の少なくとも一方が、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、一本鎖抗原結合ユニットが提供される。好ましくは、前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列の両方が、生理学的緩衝条件下及び生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない。

【0016】

本発明の別の態様によれば、一本鎖抗原結合ユニットであって、VL領域及びVH領域が、ヘテロ二量体性受容体に由来する前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して分子内二量体を形成する、一本鎖抗原結合ユニットが提供される。一の態様によれば、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列が、前記受容体のヘテロ二量体化を仲介するヘテロ二量体化受容体配列を含む。

【0017】

さらに別の態様によれば、第一ヘテロ二量体化配列及び第二ヘテロ二量体化配列が、コイルドコイル二量体を形成する。別の態様によれば、前記第一ヘテロ二量体化配列及び前記第二ヘテロ二量体化配列が、非共有結合性の対による親和性を介して二量体化している。VL領域とVH領域の両方が、それぞれヒトL鎖及びヒトH鎖における対応の配列に由来するものでよい。

【0018】

非一本鎖抗原結合ユニットと一本鎖抗原結合ユニットの両方は、化学的機能性部分に結合できる。典型的な機能性部分には、シグナルペプチド、免疫学的反応性を高める物質、固体支持体へのカップリングを容易にする物質、ワクチンキャリア、生物反応修飾物質、トキシン、検出可能な標識、常磁性標識及び薬物などが含まれるが、これらには限定されない。

【0019】

対象とする抗原結合ユニットに含まれている好ましいヘテロ二量体化配列は、それぞれGABA_A受容体1及びGABA_B受容体2のC末端配列に由来するものである。より好ましくは、第一ヘテロ二量体化配列は、システイン残基に連結されており、前記第一ヘテロ二量体化配列が、配列番号(SEQ ID NO.)2に示されているものに匹敵する長さの線状ペプチド配列と基本的に同一である、少なくとも30のアミノ酸残基のGABA_A受容体1ポリペプチドを含み；且つ前記第二ヘテロ二量体化配列が、システイン残基に連結されており、前記第二ヘテロ二量体化が、配列番号(SEQ ID NO.)4に示されているものに匹敵する長さの線状ペプチド配列と基本的に同一である、少なくとも30のアミノ酸残基のGABA_B受容体2ポリペプチドを含む。別法として、前記第一ヘテロ二量体化配列が、システイン残基に連結されており、前記第一ヘテロ二量体化配列が、配列番号(SEQ ID NO.)4に示されているものに匹敵する長さの線状ペプチド配列と基本的に同一である、少なくとも30のアミノ酸残基のGABA_B受容体2ポリペプチドを含み；且つ前記第二ヘテロ二量体化配列が、システイン残基に連結されており、前記第二ヘテロ二量体化配列が、配列番号(SEQ ID NO.)2に示されているものに匹敵する長さの線状ペプチド配列と基本的に同一である、少なくとも30のアミノ酸残基のGABA_A受容体1ポリペプチドを含む。

【0020】

本発明は、非一本鎖抗原結合ユニットのLポリペプチド及び/又はHポリペプチドをコ-

10

20

30

40

50

ドしているコード配列を含む組み換えポリヌクレオチドを提供する。また、本発明は、一本鎖抗原結合ユニットのV L領域又はV H領域をコードするコード配列を含む組み換えポリヌクレオチドも提供する。また、本明細書に記載の組み換えポリヌクレオチドのいずれか一つを含むベクターも、提供される。ベクターは、発現ベクター、例えば、ファージディスプレイベクターであることができる。さらに、本発明によれば、1以上の対象ベクターを含む、抗原結合ユニットのレパートリーをコードしている発現ベクターの選択可能なライブラリーが提供される。好ましくは、前記選択可能なライブラリーは、複数のファージディスプレイベクターを含む。

【0021】

また、本発明によれば、対象の組み換えポリヌクレオチドを含む宿主細胞も提供される。
前記L鎖ポリペプチドをコードする前記組み換えポリヌクレオチド及び前記H鎖ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、単一のベクターに存在しても、別個のベクターに存在してもよい。宿主細胞は、真核細胞であっても、原核細胞であってもよい。

【0022】

本発明のさらに別の態様によれば、非一本鎖抗原結合ユニットの製造方法が提供される。この方法は、以下のステップ：(a) 第一ヘテロ二量体化配列に融合して軽(L)鎖可変領域を含んでいる、軽(L)鎖ポリペプチドをコードしている第一組み換えポリヌクレオチドと、第二ヘテロ二量体化配列に融合して重(H)鎖可変領域を含んでいる、重(H)鎖ポリペプチドをコードしている第二組み換えポリヌクレオチドとを、宿主細胞で発現するステップであって、前記L鎖ポリペプチドと前記H鎖ポリペプチドは、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化し、且つ前記ヘテロ二量体化配列の少なくとも一方が、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、前記ステップと；そして、場合により(b) 前記宿主細胞において発現された抗原結合ユニットを分離するステップを含む。

【0023】

また、產生した抗原結合ユニットは、ヘテロ二量体性受容体由来であるヘテロ二量体化配列を含んでいてもよい。さらに、ステップ(a)で発現される非一本鎖抗原結合ユニットは、宿主細胞の表面上にディスプレイされることができる。好ましくは、ステップ(a)で発現される非一本鎖抗原結合ユニットは、ファージ粒子上に表示される。

【0024】

本発明のさらに別の実施態様によれば、非一本鎖抗原結合ユニットの製造方法が提供される。この方法には、以下のステップ：(a) 第一ヘテロ二量体化配列に融合して軽(L)鎖可変領域を含んでいる、軽(L)鎖ポリペプチドをコードしている第一組み換えポリヌクレオチドと、第二ヘテロ二量体化配列に融合して重(H)鎖可変領域を含んでいる、重(H)鎖ポリペプチドをコードしている第二組み換えポリヌクレオチドとを調製するステップであって、前記L鎖ポリペプチドと前記H鎖ポリペプチドは、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化し、且つ前記ヘテロ二量体化配列の少なくとも一方が、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、前記ステップと；そして、(b) 前記第一ポリペプチド及び前記第二ポリペプチドを、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化させるステップ、を含む。二量体化のステップは、生体外でおこなってもよいし、生体内でおこなってもよい。

【0025】

また、本発明は、一本鎖抗原結合ユニットの製造方法を含む。この方法は、以下のステップ：(a) 対象の一本鎖抗原結合ユニットをコードしているコード配列を含むポリヌクレオチドを宿主細胞において発現するステップ；そして、場合により(b) 前記宿主細胞において発現された前記一本鎖抗原結合ユニットを分離するステップを含む。

【0026】

さらに、本発明は、宿主細胞の表面上に少なくとも2つのポリペプチドを含むキメラヘテロ多量体をディスプレイする方法を含む。この方法は、以下のステップ：前記宿主細胞に

10

20

30

40

50

おいて、(i) 第一ヘテロ二量体化配列及び表面提示配列に融合した第一ポリペプチドをコードしている第一組み換えポリヌクレオチドと；そして、(ii) 第二ヘテロ二量体化配列に融合した第二ポリペプチドをコードしている第二組み換えポリヌクレオチド、を発現させるステップであって、前記第一ポリペプチドと前記第二ポリペプチドは、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化し、且つ前記ヘテロ二量体化配列の少なくとも一方が、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を形成できない、前記ステップを含む。一つの側面によれば、前記第一ポリヌクレオチド及び前記第二ポリヌクレオチドが、単一のファージディスプレイベクターにより発現される。別の態様によれば、前記第一ポリヌクレオチド及び前記第二ポリヌクレオチドが、別々のファージディスプレイベクターにより発現される。キメラヘテロ多量体は、好ましくは本発明の非一本鎖抗原結合ユニットである。

10

【0027】

また、本発明には、所望の抗原と免疫反応性である非一本鎖抗原結合ユニットを同定する方法が含まれる。この方法は、以下のステップ：(a) 抗原結合ユニットの遺伝学的に種々のレパートリーを調製するステップであって、前記レパートリーが対象の1以上の抗原結合ユニットを含む、前記ステップと；(b) 前記抗原結合ユニットのレパートリーを前記所望の抗原と接触させるステップと；そして、(c) 抗原結合ユニットと前記抗原との間の特異的結合を検出することにより、前記所望の抗原と免疫反応性である前記抗原結合ユニットを同定するステップを含む。この実施態様の一つの側面によれば、抗原結合ユニットのレパートリーは、複数の抗原結合ユニットをコードしているベクターのライブラリーを発現させることにより調製される。好ましくは、ベクターのライブラリーは、複数のファージベクターを含む。

20

【0028】

最後に、本発明によれば、本発明のベクターを好適なパッケージに入れて含むキットが提供される。

【0029】

本明細書で使用される略語の説明

1. Nsc : 非一本鎖
2. Sc : 一本鎖
3. Abu : 抗原結合ユニット
4. Abus : 抗原結合ユニット（複数）
4. L鎖 : 軽鎖
5. H鎖 : 重鎖
6. VL : 軽鎖可変領域
7. VH : 重鎖可変領域

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0030】

この開示全体を通じて、種々の刊行物、特許及び公表された特許明細書が、引用により言及される。これらの刊行物、特許及び公表された特許明細書は、参考文献として本開示中に援用されている。

40

【0031】

一般的な方法：

本発明の実施では、特記のない限りは、当業者には明らかである免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクス及び組み換えDNAの慣用の方法が用いられる。例えば、Matthews, PLANT Virology、第3版(1991)；Sambrook, Fritsch及びManiatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL(分子クローニング: 実験マニュアル)、第2版(1989)；CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(分子生物学の現在のプロトコール)(編者F.M.Ausubel等(1987))；METHODS IN ENZYMOLOGY(酵素学の方

50

法) シリーズ (Academic Press 社) : PCR2 : A PRACTICAL APPROACH (実用的手法) (M. J. MacPherson, B. D. Hames 及び G. R. Taylor 編 (1995))、編者 Harlow 及び Lane (1988) ANTIODIES, A LABORATORY MANUAL and ANIMAL CELL CULTURE (抗体、実験マニュアル及び動物細胞培養) (編者 R. I. Freshney (1987)) 参照。

【0032】

本明細書及び特許請求の範囲では、用語は、特記のない限りは複数をも含む。例えば、用語「細胞」は、複数の細胞（混合物を含む）をも含む。

【0033】

定義：

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書では、いずれかの長さのアミノ酸のポリマーに言及するのに相互に交換可能に（同じ意味で）使用される。ポリマーは、線状でも、環状でも、分岐状でもよく、修飾アミノ酸を含んでいてもよく、また、非アミノ酸により中断されていてもよい。また、これらの用語は、例えば、硫酸化、グリコシリ化、脂質化、アセチル化、リン酸化、ヨウ素化、メチル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、ブレニル化、ラセミ化、セレノイル化、アミノ酸のタンパク質へのトランスファー - RNA 媒介付加、例えば、アルギニル化、ユビキチン化、又は標識成分との結合等の他の操作により修飾されたアミノ酸ポリマーを包含する。本明細書で使用される用語「アミノ酸」は、天然及び/又は非天然又は合成のアミノ酸、例えば、グリシン及び D 又は L 光学異性体の両方、並びにアミノ酸類似体及びペプチド模倣体を意味する。

【0034】

指定されたタンパク質「由来」のポリペプチド又はアミノ酸配列は、ポリペプチドの起源を意味する。好ましくは、ポリペプチドは、配列中にコードされているポリペプチド又はその一部分と基本的に同一であるアミノ酸配列を有する。ここで、上記部分は、少なくとも 10 ~ 20 アミノ酸、好ましくは少なくとも 20 ~ 30 アミノ酸、より好ましくは少なくとも 30 ~ 50 アミノ酸からなるか、又は配列中にコードされているポリペプチドで免疫学的に同定可能なものである。また、この用語には、指定された核酸配列から発現されたポリペプチドも含まれる。

【0035】

「キメラ」タンパク質は、天然で生じる配列とは異なる位置に領域を含む少なくとも一つの融合ポリペプチドを含む。これらの領域は、通常別個のタンパク質に存在し、融合ポリペプチドと一緒にに入れられてもよいし；又はこれらは、通常同じタンパク質に存在するが、融合ポリペプチドにおける新しい配置に入れられたものでもよい。キメラタンパク質は、例えば、化学合成によるか、又はペプチド領域が所望の関係においてコードされているポリヌクレオチドを生成及び翻訳することにより生成できる。

【0036】

本明細書で使用される用語「多量体タンパク質」は、互いに関連して 1 以上の別個のポリペプチド又はタンパク質鎖を含んで、生体外又は生体内で单一の球状タンパク質を形成する、球状タンパク質を意味する。多量体タンパク質は、同じ種類の 1 以上のポリペプチドから成り、「ホモ多量体」を形成することができる。別法として、多量体タンパク質は、別個の配列の 1 以上のポリペプチドから構成されて「ヘテロ多量体」を形成してもよい。したがって、「ヘテロ多量体」は、少なくとも第一ポリペプチドと第二ポリペプチドを含む分子であって、第二ポリペプチドが、第一ポリペプチドとは、アミノ酸配列において、少なくとも一つのアミノ酸残基で異なる、分子である。ヘテロ多量体は、第一ポリペプチド及び第二ポリペプチドにより形成された「ヘテロ二量体」を含んでいてもよいし、又は 2 つを超えるポリペプチドが存在する高度三次構造を形成することができる。ヘテロ多量体のための典型的な構造には、ヘテロ二量体（例えば、Fv フラグメント及び Fab フラグメント、二重特異性抗体（diabodies）、GABA_B 受容体 1 及び 2 複合体）

10

20

30

40

50

、三量体 G タンパク質、ヘテロ四量体（例えば、 $F(ab')_2$ フラグメント）及びさらなるオリゴマー構造体などがある。

【 0 0 3 7 】

キメラヘテロ多量体の「第一組み換えポリペプチド」は、それぞれ第一ポリペプチド及び第二ポリペプチドに連結した 2 つの二量体化配列の対による親和性を介して「第二組み換えポリペプチド」と関連しているか、関連していたいはずれかのポリペプチドを意味する。好ましくは、第一ポリペプチド及び第二ポリペプチドは、免疫グロブリンの軽鎖又は重鎖由来の配列を含む。より好ましくは、第一ポリペプチド及び第二ポリペプチドは、所望の抗原に対する結合特異性を付与する N s c A b u を形成する。

【 0 0 3 8 】

「第一ヘテロ二量体化配列」は、「第二ヘテロ二量体化配列」と関連しているか、又は関連していたいはずれかの二量体化配列を意味する。ここで、第二ヘテロ二量体化配列は、アミノ酸配列において、少なくとも一つのアミノ酸残基だけ異なる。「ヘテロ二量体化対」は、ヘテロ二量体を形成することができる 2 つのヘテロ二量体化配列を意味する。

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用される用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原と特異的に結合する（「と免疫反応する」）抗原結合部位を含む分子を意味する。構造的には、最も単純な天然の抗体（例えば、IgG）は、ジスルフィド結合により相互接続された、4 つのポリペプチド鎖（2 つの重（H）鎖及び 2 つの軽（L）鎖）を含む。免疫グロブリンは、数種の分子、例えば、IgD、IgG、IgA、IgM 及び IgE を含む大きな分子群を表す。用語「免疫グロブリン分子」には、例えば、ハイブリッド抗体又は変更抗体、それらの断片などが含まれる。抗体の抗原結合機能は、天然の抗体のフラグメントにより果たされることが判明した。これらのフラグメントは、まとめて「抗原結合ユニット（複数）」（「Abus」）と称される。Abus は、それらの分子構造に基づいて、おおざっぱに「一本鎖」（「Sc」）型及び「非一本鎖」（「Nsc」）型に分けられる。

【 0 0 4 0 】

用語「抗体」及び「Abus」には、無脊椎動物及び脊椎動物などの多種多様な種に由来するの免疫グロブリン分子も包含される。抗体又は Abu に適用したときの用語「ヒト」は、ヒト遺伝子又はそのフラグメントにより発現される免疫グロブリン分子を意味する。非ヒト（例えば、齧歯類又は靈長類）抗体に適用したときの用語「ヒト化」は、ハイブリッド免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はそのフラグメント（非ヒト免疫グロブリン由来の最小の配列を含む）を意味する。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（CDR）からの残基が、所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ又は靈長類等の非ヒト種（ドナー抗体）の CDR から残基により置き換えられた、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンの Fv フレームワーク領域（FR）残基が、対応する非ヒト残基により置き換える。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも移入 CDR 配列又はフレームワーク配列にもみられない残基を含んでいてもよい。抗体性能を改善し且つ最適化するとともに、ヒトの体に導入したときに、免疫原性を最小限とするために、修飾がなされる。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも一つ及び典型的に 2 つの可変領域の実質的に全てを含む。ここで、CDR 領域の全て又は実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR 領域の全て又は実質的に全てが、ヒト免疫グロブリン配列のものである。また、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部を含んでいてもよい。

【 0 0 4 1 】

「非一本鎖抗原結合ユニット」（「Nsc Abus」）は、軽鎖ポリペプチドと重鎖ポリペプチドとを含むヘテロ多量体である。Nsc Abus としては、例えば、(i) 本明細書で開示されているヘテロ二量体化配列により安定化された ccfv フラグメント（図 1）；(ii) 本明細書で記載されている少なくとも一つの ccfv フラグメントを含

10

20

30

40

50

むいすれか他の一価分子及び多価分子；(i i i) V L ドメイン、V H ドメイン、C L ドメイン及びC H 1 ドメインからなるF a b フラグメント；(i v) V H ドメイン及びC H 1 ドメインからなるF d フラグメント；(v) 抗体の单一アームのV L ドメイン及びV H ドメインからなるF v フラグメント；(v i) ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのF a b フラグメントを含む二価のフラグメントであるF (a b ') 2 フラグメント；(v i i) 二重特異性抗体(diabody)；及び(v i i i) L i t t l e 等(2 0 0 0) Immunology Todayに記載されているいすれか他のN s c A b u s があるが、これらには限定されない。

【 0 0 4 2 】

上記したように、N s c A b u s は、「一価」でも、「多価」でもよい。前者は、一抗原結合ユニットあたり一つの結合部位を有しているのに対して、後者は、同じ又は異なる種類の1以上の抗原に結合することができる複数の結合部位を含んでいる。結合部位の数に応じて、N s c A b u s は、二価(2つの抗原結合部位を有する)、三価(3つの抗原結合部位を有する)、四価(4つの抗原結合部位を有する)等であることができる。

【 0 0 4 3 】

多価N s c A b u s は、さらにそれらの結合の特異性に基づいて分類できる。「单一特異性」N s c A b u s は、同じ種類の一つ以上の抗原に結合できる分子である。「多重特異性」N s c A b u s は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有する分子である。このような分子は、通常2つの別個の抗原にしか結合しない(すなわち、二重特異性A b u s)が、三重特異性抗体等のさらなる特異性を有する抗体は、本明細書中で使用するときにこの表現に包含される(例えば、図15～図17参照)。二重特異性抗原結合ユニットとしては、例えば、一つのアームが腫瘍細胞抗原に指向し、他のアームが細胞障害トリガー分子に指向しているもの、例えば、抗F c R I / 抗C D 1 5 、抗p 1 8 5^{H E R 2} / F c R I I I (C D 1 6)、抗C D 3 / 抗悪性B細胞(1 D 1 0)、抗C D 3 / 抗p 1 8 5^{H E R 2} 、抗C D 3 / 抗p 9 7 、抗C D 3 / 抗腎細胞癌、抗C D 3 / 抗O V C A R - 3 、抗C D 3 / L - D 1 (抗大腸癌)、抗C D 3 / 抗メラニン細胞刺激ホルモン類似体、抗E G F 受容体 / 抗C D 3 、抗C D 3 / 抗C A M A 1 、抗C D 3 / 抗C D 1 9 、抗C D 3 / M o V 1 8 、抗神経細胞接着分子(N C A M) / 抗C D 3 、抗葉酸結合タンパク質(F B P) / 抗C D 3 、抗パンカルシノーマ(p a n c a r c i n o m a)関連抗原(A M O C - 3 1) / 抗C D 3 ；一つのアームが腫瘍抗原に特異的に結合し、一つのアームがトキシンに結合する二重特異性A b u s 、例えば、抗サポリン / 抗I d - 1 、抗C D 2 2 / 抗サポリン、抗C D 7 / 抗サポリン、抗C D 3 8 / 抗サポリン、抗C E A / 抗リシンA鎖、抗インターフェロン- (I F N -) / 抗ハイブリドマイディオタイプ、抗C E A / 抗ビンカアルカロイド；酵素活性化プロドラッグを転化するためのB s A b s 、例えば、抗C D 3 0 / 抗アルカリホスファターゼ(マイトマイシンホスフェートプロドラッグのマイトマイシンアルコールへの転化を触媒する)；線維素溶解薬として使用できる二重特異性A b u s 、例えば、抗フィブリン / 抗組織プラスミノゲン活性化因子(t P A)、抗フィブリン / 抗ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(u P A)；免疫複合体を細胞表面受容体に対して標的とするための二重特異性抗原結合ユニット、例えば、抗低密度リポタンパク質(L D L) / 抗F c 受容体(例えば、F c R I 、F c R I I 又はF c R I I I)；感染症の治療に使用される二重特異性A b u s 、例えば、抗C D 3 / 抗单纯ヘルペスウイルス(H S V)、抗T細胞受容体：C D 3 複合体 / 抗インフルエンザ、抗F c R / 抗H I V ；生体外又は生体内における腫瘍検出のための二重特異性A b u s 、例えば、抗C E A / 抗E O T U B E 、抗C E A / 抗D P T A 、抗p 1 8 5^{H E R 2} / 抗ハプテン；ワクチン補助剤としてのB s A b s (上記したF a n g e r 等参照)；並びに診断ツールとしての二重特異性A b u s 、例えば、抗ウサギI g G / 抗フェリチン、抗ホースラディッシュペルオキシダーゼ(H R P) / 抗ホルモン、抗ソマトスタチン / 抗物質P、抗H R P / 抗F I T C 、抗C E A / 抗ベータ-ガラクトシダーゼ(上記したN o l a n 等参照)などがある。三重特異性抗体としては、例えば、抗C D 3 / 抗C D 4 / 抗C D 3 7 、抗C D 3 / 抗C D 5 / 抗C D 3 7 及び抗C D 3 / 抗C D 8 / 抗C D 3 7 などを含む。

10

20

30

40

50

【0044】

「一本鎖抗原結合ユニット」(「S c A b u」)は、単量体A b uを意味する。F vフラグメントの2つのドメインは別個の遺伝子によりコードされているが、組み換え法により、B i r d等(1988)S c i e n c e 242:423-426及びH u s t o n等(1988)P N A S 85:5879-5883に記載されているような單一タンパク質鎖(すなわち、一本鎖F v(「s c F v」)として製造できる合成リンカーを製造できる。他のS c A b u sには、対象のヘテロ二量体化配列により安定化された抗原結合分子(例えば、図18参照)、及びV Hドメインと分離された相補性決定領域(C D R)からなるd A b フラグメント(W a r d等(1989)N a t u r e 341:544-546)などがある。連結ペプチドの一例として、一つのV領域のカルボキシル末端と別のV領域のアミノ末端との間の約3.5 nmを架橋する(G G G G S)₃がある。他のリンカー配列を使用することもでき、さらなる機能、例えば、薬剤又は固体支持体を結合させるための手段を提供できる。好ましい一本鎖抗原結合ユニットは、1対の対象ヘテロ二量体化配列により一緒に連結及び安定化されたV L領域及びV H領域を含む。s c F vは、いずれの順序で構築してもよく、例えば、V H - (第一ヘテロ二量体化配列) - (第二ヘテロ二量体化配列) - V L又はV L - (第一ヘテロ二量体化配列) - (第二ヘテロ二量体化配列) - V Hの順序でよい。

10

【0045】

「抗原結合ユニットのレパートリー」は、複数の抗原結合ユニットであって、そのうちの少なくとも2つが別個の結合特異性を示す、抗原結合ユニットを意味する。抗原結合ユニットの遺伝学的に多様なレパートリーは、複数の抗原結合ユニットを意味し、抗原結合ユニットの大部分及びさもなければ抗原結合ユニットの全てが、互いに独特的の結合特異性を示す。遺伝学的に多様なレパートリーは、典型的には少なくとも $10^6 \sim 10^{13}$ 、好ましくは $10^7 \sim 10^9$ 、より好ましくは $10^8 \sim 10^{10}$ 、さらにより好ましくは $10^8 \sim 10^{11}$ の別個の抗原結合ユニットの複雑性を有する。

20

【0046】

抗体又はA b uは、ポリペプチド又は他の物質を含む他の標準抗原に結合するよりも大きな親和性又はアビディティで結合する場合には、抗原「に特異的に結合する」か、又は「と免疫反応する」。

30

【0047】

A b uが宿主細胞の外表面で提示されるときには、A b uは、「宿主細胞の表面上」でディスプレイされる。ディスプレイされたA b uは、宿主細胞の外表面に直接結合してもよいし、ファージ粒子等の宿主細胞結合遺伝子パッケージを介して宿主細胞に間接的に結合してもよい。

【0048】

「表面提示配列」は、異種配列のディスプレイを容易にする配列を意味する。典型的には、表面提示配列は、遺伝子パッケージ、例えば、ファージ又は細菌の外表面に存在する。ファージの好ましい表面提示配列は、M 1 3 繊維状ファージのp I I Iである。

【0049】

本明細書で使用される用語「抗原」は、抗体により特異的に認識され且つ結合される物質を意味する。抗原としては、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、多糖類及び脂質；それらの一部分及びそれらの組み合わせを含むことができる。

40

【0050】

本明細書で使用される用語「表面抗原」は、細胞の形質膜成分を意味する。表面抗原は、形質膜を構成する内在性及び表在性膜タンパク質、糖タンパク質、多糖類及び脂質を包含する。「内在性膜タンパク質」は、細胞の形質膜の脂質二分子層にわたって延びている膜貫通型タンパク質である。典型的な内在性膜タンパク質は、一般的に疎水性アミノ酸残基を含む少なくとも一つの「膜スパンニングセグメント」からなる。表在性膜タンパク質は、脂質二分子層の疎水性内部に延びておらず、且つ他の膜タンパク質との非共有結合性相互作用によって膜表面に結合される。

50

【0051】

細胞タンパク質に適用したときの用語「膜」、「細胞質」、「核」及び「分泌された」は、細胞タンパク質がほとんど、大部分又は優先的に局在化している細胞外及び/又は亜細胞の位置を規定する。

【0052】

「細胞表面受容体」は、それぞれのリガンドに結合できる膜タンパク質の一部分を表す。細胞表面受容体は、細胞形質膜に固定又は挿入された分子である。これらは、形質膜の構造成分としての役割を果たすだけでなく、種々の生物学的機能を支配する調節要素としての役割を果たす、タンパク質、糖タンパク質、多糖類及び脂質の大きな群を構成する。

【0053】

「ヘテロ二量体性受容体」は、リガンドに対して結合親和性を示す二つのタンパク性サブユニットからなる細胞タンパク質を包含する。これらの2つのタンパク性サブユニットは、アミノ酸配列において、少なくとも一つのアミノ酸残基だけ異なる別個の分子である。ヘテロ二量体性受容体として、増殖因子（例えば、ヘレグリン）、神経伝達物質（例えば、-アミノ酪酸）及び他の有機又は無機小分子（例えば、ミネラルコルチコイド、グルココルチコイド）に結合するものが挙げられるが、これらには限定されない。好ましいヘテロ二量体性受容体には、核ホルモン受容体である（B e l s h a w 等 (1 9 9 6) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A 93 (1 0) : 4 6 0 4 - 4 6 0 7 ）、erbB3及びerbB2受容体複合体並びにGタンパク質結合型受容体、例えば、オピオイド（G o m e s 等 (2 0 0 0) J . N e u r o s c i e n c e 20 (2 2) : R C 1 1 0 ）；J o r d a n 等 (1 9 9 9) N a t u r e 399 : 6 9 7 - 7 0 0 ）、ムスカリントン性、ドーパミン、セロトニン、アデノシン/ドーパミン及びGABA_A群の受容体などがあるが、これらには限定されない。

【0054】

「ドメイン」は、タンパク質又はペプチドの他の部分から物理的又は機能的に区別されるタンパク質の一部分を意味する。物理的に定義されるドメインには、極めて疎水性又は親水性であるアミノ酸配列、例えば、膜関連又は細胞質関連の配列などが含まれる。また、ドメインは、例えば、遺伝子重複から生じる内部相同性により定義することもできる。機能的に定義されるドメインは、別個の生物学的機能（单一又は複数）を有する。例えば、受容体のリガンド結合ドメインは、リガンドに結合するドメインである。抗原結合ドメインは、抗原に結合する抗原結合ユニットの部分又は抗原に結合する抗体を意味する。機能的に定義されるドメインは、近接するアミノ酸配列によりコードされる必要がない。機能的に定義されるドメインは、一つ以上の物理的に定義されるドメインを含んでいてもよい。例えば、受容体は、一般的に細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通型ドメイン及び細胞内エフェクタードメインに分けられる。「膜固定ドメイン」は、膜会合を媒介するタンパク質の部分を意味する。一般的に、膜固定ドメインは、疎水性アミノ酸残基からなる。また、膜固定ドメインは、修飾アミノ酸、例えば、脂肪酸鎖に結合し、次にタンパク質を膜に固定するアミノ酸を含むことができる。

【0055】

「宿主細胞」には、対象ベクターについてレシピエントであることができるか、レシピエントであった個々の細胞又は細胞培養が含まれる。宿主細胞には、単一の宿主細胞の子孫が含まれる。子孫は、最初の親細胞とは、自然、偶然又は意図的な突然変異のために、完全に同一（形態学的に又は総DNAのゲノムにおいて）である必要はない。宿主細胞には、本発明のベクターを生体内トランスフェクションした細胞などが含まれる。

【0056】

「細胞株」又は「細胞培養」は、生体外で成長又は維持される細菌、植物、昆虫又は高等真核細胞を意味する。細胞の子孫は、親細胞に完全に同一（形態学、遺伝子型又は表現型の面で）でなくてもよい。

【0057】

「定義された培地」は、培地の成分が公知であるような培養における細胞の生存及び/又

10

20

30

40

50

は成長に必要な栄養上及びホルモン上の要求を含む培地を意味する。従来、定義された培地は、成長及び/又は生存のために必要な栄養因子及び成長因子を付加することにより処方されてきた。典型的には、定義された培地により、以下のカテゴリーの一つ以上からの少なくとも一つの成分が供給される：a) 全ての必須アミノ酸、及び通常20アミノ酸+システィンからなる基本的な組；b) 通常グルコース等の炭水化物の形態のエネルギー源；c) 低濃度で必要とされるビタミン類及び/又は他の有機化合物；d) 遊離脂肪酸；及びe) 典型的に極めて低濃度（通常マイクロモル範囲）で必要とされる、無機化合物又は天然元素として定義される微量元素。また、定義された培地には、以下のカテゴリーのいずれかからの一つ以上の成分を必要に応じて補充することができる：a) 一種以上の分裂促進剤；b) 例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩及びホスフェートとしての塩及び緩衝剤；c) 例えば、アデノシン及びチミジン、ヒポキサンチン等のヌクレオシド及び塩基；並びにd) タンパク質及び組織加水分解物。

10

【0058】

本明細書で使用される用語「単離された」とは、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体又はそれらのフラグメントが自然状態では通常関連している、成分、細胞等から分離されたことを意味する。当業者には明らかなように、非天然のポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体又はそれらのフラグメントは、その天然の対応物から区別するのに、「単離」を必要としない。さらに、「濃縮された」、「分離された」又は「希釈された」ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体又はそれらのフラグメントは、その天然の対応物とは、容積あたりの分子の濃度又は数が、その天然の対応物の「濃縮された」ものよりも大きいか、「分離された」ものよりも小さい点で区別できる。

20

【0059】

濃縮は、溶液の容積あたり重量等の絶対基準で測定してもよいし、又はソース混合物に存在する第二の干渉する可能性のある物質との関連で測定できる。本発明の実施態様では、濃縮度を増加すればするほど好ましい。したがって、例えば、2倍濃縮が好ましく、10倍濃縮がより好ましく、100倍濃縮がさらに好ましく、1000倍濃縮がさらにもっと好ましい。また、物質を、化学合成又は組み換え発現による等の人工的アセンブリプロセスにより単離された状態で提供することができる。

30

【0060】

「連結した」及び「融合した」又は「融合」は、ここでは可換性に使用される。これらの用語は、化学的共役又は組み換え手段を含むどのような手段であろうとも、2つ以上の化学元素又は成分を一緒に連結することを意味する。「フレーム内での融合」とは、2つ以上のオープンリーディングフレーム（OFR）を、最初のOFRの正しいリーディングフレームを維持するように連結して、連結したより長いOFRを形成することを意味する。したがって、得られる組み換え融合タンパク質は、最初のOFRによりコードされているポリペプチドに相当する2つ以上のセグメントを含む单一のタンパク質である（セグメントが自然の状態では通常そのように連結されていない）。したがって、リーディングフレームは、融合されたセグメント全体を通して連續に形成されるが、セグメントは、以下で記載する、例えば、フレーム内リンカー配列（例えば、「フレクソン」）により、物理的又は空間的に分離できる。

40

【0061】

ポリペプチドとの関連で、「直鎖状配列」又は「配列」は、配列において互いに隣り合う残基がポリペプチドの一次構造において連續している、アミノ末端からカルボキシル末端方向におけるポリペプチドでのアミノ酸の順序である。「部分配列」は、一方向又は両方向においてさらなる残基を含むことが知られているポリペプチドの一部分の直鎖状配列である。

【0062】

「異種」とは、比較される残りの存在物とは遺伝子型で区別可能な存在物に由来することを意味する。例えば、天然コード配列から取り出され且つ天然配列以外のコード配列に作

50

動可能に連結されているプロモーターは、異種のプロモーターである。ポリヌクレオチド、ポリペプチドに適用される用語「異種」とは、ポリヌクレオチド又はポリペプチドが、比較されている残りの存在物とは遺伝子型として別個の存在物に由来していることを意味する。例えば、異種のポリヌクレオチド又は抗原は、異なる種の起源、異なる細胞型、及び別個の個体の同じ種類の細胞に由来するものでよい。

【0063】

用語「ポリヌクレオチド」、「核酸」、「ヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」は、可換性に使用される。これらは、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド又はそれらの類似体であるいずれかの長さのポリマー型ヌクレオチドを意味する。ポリヌクレオチドは、3次元構造を有していてもよく、且つ公知又は未知の機能を果たすものでよい。以下に、ポリヌクレオチドの例を示すが、これらには限定されない：遺伝子又は遺伝子フラグメントのコード領域又は非コード領域、結合解析から定義される座、エクソン、インtron、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組み換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、いずれかの配列の単離DNA、いずれかの配列の単離RNA、核酸プローブ及びプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体等の修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。もし存在する場合には、ヌクレオチド構造に対する修飾を、ポリマーの集合の前又は後に加えることができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断されていてよい。ポリヌクレオチドは、例えば、標識成分との結合により、重合後にさらに修飾してもよい。

10

20

30

40

50

【0064】

ポリヌクレオチドに適用される「組み換え」は、ポリヌクレオチドは、クローニングステップ、制限ステップ及び/又はライゲーションステップ、並びに自然の状態でみられるポリヌクレオチドとは別個である構築物を生じる他の手順の種々の組み合わせの産物であることを意味する。

【0065】

用語「遺伝子」又は「遺伝子フラグメント」は、本明細書では可換性に使用される。これらは、転写及び翻訳された後、特定のタンパク質をコードすることができる少なくとも一つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドを意味する。遺伝子又は遺伝子フラグメントは、ポリヌクレオチドが全体のコード領域又はそのセグメントをカバーすることができる少なくとも一つのオープンリーディングフレームを含む限り、ゲノム又はcDNAであることができる。

【0066】

「作動可能に連結された」とは、そのように記載された構成要素が、それらの意図する方法で機能することができる関係にある並置を意味する。例えば、プロモーター配列がコード配列の転写を促進する場合には、プロモーター配列は、コード配列に作動可能に連結される。

【0067】

「融合遺伝子」は、互いに連結された少なくとも2つの異種のポリヌクレオチドからなる遺伝子である。

【0068】

遺伝子「データベース」は、生物学的標準物質の集合を表すヌクレオチド及びペプチド配列を含む配列の集合を表す一連の保存データを意味する。

【0069】

本明細書で使用される用語「発現」は、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセス及び/又は転写されたmRNA(「転写物」とも称される)が続いてペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に翻訳されるプロセスを意味する。転写物及びコードされているポリペプチドは、まとめて遺伝子産物と称される。ポリヌクレオチドがゲノムDNA由来である場合には、発現は、真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含んでいてよい。

【0070】

本明細書で使用される用語「対象」とは、発現された遺伝子物質を含む生物学的存在物を意味する。生物学的存在物は、好ましくは植物、動物又はバクテリア、ウィルス、菌類及び原生動物を含む微生物である。生体内で得られたか、又は生体外で培養された生物学的存在物の組織、細胞及びそれらの子孫も、含まれる。

【0071】

「ベクター」は、挿入された核酸分子を、宿主細胞中及び/又は間でトランスファーする核酸分子、好ましくは自己複製核酸分子である。この用語は、主として細胞へのDNA又はRNAの挿入について機能するベクター、主としてDNA又はRNAの複製について機能するベクターの複製、及びDNA又はRNAの転写及び/又は翻訳について機能する発現ベクターなどを含む。また、上記機能の複数を提供するベクターも含まれる。

10

【0072】

「発現ベクター」は、適切な宿主細胞に導入されたときに、ポリペプチド（単一又は複数）に転写及び翻訳ができるポリヌクレオチドである。「発現系」は、通常所望の発現産物が得られるように機能することができる発現ベクターを含む好適な宿主細胞をも意味する。

【0073】

「レプリコン」は、適切な宿主細胞においてポリヌクレオチドの複製を可能にする複製源（一般的にori配列と称される）を含むポリヌクレオチドを意味する。レプリコンには、例えは、エピソーム（プラスミド等）、並びに染色体（例えは、核又はミトコンドリア染色体）などが含まれる。

20

【0074】

本発明のキメラヘテロ多量体

上記したように、多量体タンパク質の生物学的機能を確保するには、安定な複合体を形成するためのポリペプチドサブユニットの適切な会合が必要である。したがって、本発明の中心的態様は、選択された単量体ポリペプチドの特異的会合がヘテロ多量体を効率的に產生できる方法の設計にある。実験計画法が、結合の特異性が特定の方法での特異的サブユニットの会合に依存するAbus等のヘテロ多量体の生成及びスクリーニングに特に有用である。以前に報告したキメラAbusとは区別される対象Abusは、以下の独特な特徴の一つ以上を有している。第一に、Abusは2つのヘテロ二量体化配列の対による親和性により再構成される。この際、2つのヘテロ二量体化配列の少なくとも一つ、好ましくは両方が、ホモ二量体を検出可能な程度に形成する傾向を欠いている。生物学的緩衝条件と生物学的体温の両方の下でホモ二量体を形成することが知られているFos及びJunロイシンジッパー等の以前に報告した二量体化配列(O'Shea等(1992)Cell 68:699-708; Vidal等(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.)とは異なり、対象のヘテロ二量体化配列は、規定の緩衝条件下及び/又は規定の体温ではホモ二量体を基本的に形成できない。また、対象のヘテロ二量体化配列は、以下で詳細に述べるように以前に用いられた配列とは構造レベルで区別することができる。

30

【0075】

本発明の一実施態様によれば、宿主細胞の表面上に表示されるキメラヘテロ多量体が提供される。ここで、ヘテロ多量体は、以下の：(i)第一ヘテロ二量体化配列及び表面提示配列に融合した第一ポリペプチド；(ii)第二ヘテロ二量体化配列に融合した第二ポリペプチドを含み；ここで、前記第一ポリペプチドと前記第二ポリペプチドは、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化し；且つ前記ヘテロ二量体化配列の少なくとも一方が、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない。

40

【0076】

本発明の別の実施態様によれば、以下の：(a)第一ヘテロ二量体化配列に連結した軽鎖可変領域を含んでいる軽鎖ポリペプチド；(b)第二ヘテロ二量体化配列に連結した重鎖可変領域を含んでいる重鎖ポリペプチドとを含んでなり、ここで、前記軽鎖ポリペプチド

50

と前記重鎖ポリペプチドは、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化し、且つ前記ポリペプチドの少なくとも一方が、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、N s c A b u が提供される。本発明の別の側面によれば、ヘテロ二量体性受容体に由来する第一ヘテロ二量体化配列と第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して、軽鎖ポリペプチドと重鎖ポリペプチドが二量体化する N s c A b u が提供される。一の側面によれば、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列が、前記受容体のヘテロ二量体化を仲介するヘテロ二量体化受容体配列を含む。

【0077】

本発明の別の実施態様によれば、軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含み、前記軽鎖可変領域と前記重鎖可変領域が、前記領域の一方の C 末端と前記他の領域の N 末端の間の距離をまたがった第一ヘテロ二量体化配列と第二ヘテロ二量体化配列により接続されており、ここで、前記 2 つの領域が、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して分子内二量体を形成し、且つ前記ヘテロ二量体化配列の少なくとも一方が、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を基本的に形成できない、S c A b u が提供される。この実施態様の別の側面によれば、本発明により、軽鎖可変領域と重鎖可変領域が、ヘテロ二量体性受容体に由来する 2 つのヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して分子内二量体を形成する、S c A b u が提供される。一の側面によれば、前記第一ヘテロ二量体化配列と前記第二ヘテロ二量体化配列が前記受容体のヘテロ二量体化を仲介するヘテロ二量体化受容体配列を含む。

10

20

30

【0078】

ヘテロ二量体化配列の選択：

いくつかの因子が、上記した特性の一つ以上を有する A b u s の設計に適用される。最初に、ヘテロ二量体化配列は、対による親和性を示して安定な複合体を形成しなければならない。「安定な」とは、複合体又は二量体が、複合体又は二量体の形成と、それに続いての検出及び/又は精製との間の期間に存続する程度に十分に長期間存続することを意味する。複合体又は二量体は、どのような条件が存在し、また、形成時と検出時との間に導入されたとしてもそれらに耐えることができなければならない。これらの条件は、おこなわれるアッセイ又は反応と相關している。好ましくは、複合体又は二量体の形成は、生理学的緩衝条件下及びほぼ室温～ほぼ 37 の範囲の生理学的体温で実施される。場合により存在することができ、且つ複合体又は二量体を除去することができる介在条件には、洗浄、加熱、さらなる溶質又は溶媒の反応混合物（例えば、変性物）への添加、さらなる反応種との競合などがある。安定な複合体又は二量体は、不可逆性であっても、可逆性であってもよいが、この定義の他の要件を満足しなければならない。したがって、過渡的複合体又は二量体が反応混合物中で形成することがあるが、これは、生理学的緩衝条件下で自然に解離するか、新たに課せられた条件又は検出前に導入された操作の結果として解離する場合には、安定な複合体を構成しない。

40

【0079】

第二に、選択されたヘテロ二量体化配列は、対による親和性を示して、優越的にヘテロ二量体を形成してホモ二量体を実質的に排除しなければならない。好ましくは、優越した形成により、生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温で形成されることがある、ヘテロ二量体を少なくとも 60 %、より好ましくはヘテロ二量体を少なくとも 80 %、より好ましくはヘテロ二量体を 85 ~ 90 %、より好ましくはヘテロ二量体を 90 ~ 95 %、さらにより好ましくはヘテロ二量体を 96 ~ 99 % 含有するヘテロ多量体プールが得られる。本発明のある実施態様によれば、A b u を再構成するのに用いられるヘテロ二量体化配列の少なくとも一つは、生理学的緩衝液及び/又は生理学的体温ではホモ二量体を基本的に形成できない。「基本的に形成できない」とは、単独で試験したときに、選択されたヘテロ二量体化配列が、Kammerer 等 (1999) Biochemistry 38 : 13263 - 13269 に詳細に記載されている生体外沈降実験、又は生体内酵母ツーハイブリッド解析（例えば、White 等、Nature (1998) 396 : 679

50

- 6 8 2 参照)においては、検出できる量のホモ二量体を形成しないことを意味する。具体的には、Kammerer等は、沈降実験により、GABA_Bの受容体1及び2のヘテロ二量体化配列は、単独で試験したときに、生理学的条件下及び生理学的体温(例えば、37)で、単量体の分子質量で沈降することを明らかにした。等モル量で混合すると、GABA_Bの受容体1及び2のヘテロ二量体化配列は、2つの配列のヘテロ二量体に対応する分子質量で沈降する(Kammerer等の表1参照)。さらに、個々のヘテロ二量体化配列は、宿主細胞において発現でき、宿主細胞にホモ二量体が存在しないことは、SDS-PAGE、ウェスタンプロット及び免疫沈降を含むがこれらには限定されない種々のタンパク質分析により明らかにすることができる。生体外アッセイは、生理学的緩衝条件下及び/又は好ましくは生理学的体温でおこなわなければならぬ。一般的に、生理学的緩衝液は、生理学的濃度の塩を含有し、pHを約6.5~約7.8の中性pH範囲、好ましくは約7.0~約7.5のpHに調整してある。種々の生理学的緩衝液が、上記したSambrook等(1989)に挙げられており、したがって、ここでは詳細には説明しない。好ましい生理学的条件が、上記したKammerer等に記載されている。

10

20

【0080】

ヘテロ二量体化配列の特異的関連には、典型的には非共有結合性相互作用が含まれる。このような相互作用には、共有結合を生じない全ての存在する安定な結合が含まれる。非共有結合性相互作用としては、静電結合、水素結合、ファンデルワールス力、両親媒性ペプチドの立体的嵌合などが含まれるが、これらには限定されぬ。

30

【0081】

対象Abuを設計する際にさらに考慮することは、ヘテロ二量体化配列と、得られたヘテロ多量体の抗原結合部位との間の構造的干渉を最小限とすることである。内部構造の干渉を最小限としたキメラヘテロ多量体を設計するには、当該技術分野における種々の方法が使用できる。例えば、一つの方法として、ヘテロ二量体化に必要とされるアミノ酸残基のみを含む最小ヘテロ二量体化配列を使用することがある。第二の方法は、ヘテロ二量体化配列を、得られたヘテロ多量体のN末端又はC末端に連結することである。どちらの末端を選択するかは、ヘテロ多量体の生物学的活性ドメインの位置に依存する。抗原結合部位が軽鎖可変領域及び重鎖可変領域のN末端側半分にあるキメラAbuを構築するためには、軽鎖又は重鎖のC末端にヘテロ二量体化配列を連結することが好ましい。別の代替設計では、「フレクソン」を、ヘテロ多量体の抗原結合部位とヘテロ二量体化配列との間に組み込んで用いる。本明細書で使用される用語「フレクソン」は、典型的に小側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びセリン)を含むフレキシブルポリペプチドリンカー(又はこのようなポリペプチドをコードしている核酸配列)を意味する。対象Abuの一つ以上の部位の間にフレクソンを組み込むことは、それらが相対的に互いに独立している立体構造をとることにより、機能性を促進すると思われる。このような構成により、一般的に抗原結合ドメインにさらなるフレキシビリティが付与される。好適なフレクソンは、好ましくはアミノ酸を、約4~約100、より好ましくは約4~50、さらにより好ましくは約4~15含む。

40

【0082】

対象のAbusを構築するのに適用できるヘテロ二量体化配列は、種々のソースから得ることができる。一般的に、安定なヘテロ多量体の形成に関与しているタンパク質配列は、ヘテロ二量体化配列の候補である。そのようなものとして、これらの配列を、ヘテロ多量体タンパク質複合体から得ることができる。代表的な候補配列には、アデノ関連ウイルスのキャプシドタンパク質等のウイルスタンパク質、SH2ドメイン含有タンパク質と相互作用するタンパク質キナーゼリン酸化部位である(Cantely等(1993)Cel1
1 72:767-778; Cantely等(1995)J.Biol.Chem. 270(44):26029-26032)、ヘテロマーの形成を仲介する転写因子及びヘテロ二量体性受容体のドメインがある。

50

【0083】

好ましいヘテロ多量体転写因子には、a-Pal/Max複合体及びHox/Pbx複合

体がある。Hoxは、胚形成中に前・後軸のパターンニングに関与する大きな転写因子群を表す。Hoxタンパク質は、保存された3つのアルファらせんホメオドメインを有するDNAと結合する。特異的にDNA配列に結合するためには、Hoxタンパク質には、Pbxホメオドメイン等のヘテロパートナーが存在する必要がある。Wolberger等は、Hox-Pbx複合体の形成がどのようにして生じるか、及びこの複合体がどのようにしてDNAに結合するかを理解するために、HoxB1-Pbx1-DNA三元複合体の2.35A結晶構造を解明した。この構造から、各タンパク質のホメオドメインが、DNAの反対側の隣接する認識配列に結合することが分かる。ヘテロ二量体化は、6アミノ酸ヘキサペプチドN末端とHoxB1のホメオドメインとの間で形成される接点、及びらせん3とらせん1及び2との間で形成されるPbx1におけるポケットを介して生じる。Pbx1ホメオドメインのC末端延長により、らせん1に対して充填するアルファらせんが形成されてより大きな4らせんホメオドメインを形成する(Wolberger等(1999) Cel1 96:587-597; Wolberger等 J Mol Bio 1.291:521-530)。

10

20

30

40

50

【0084】

また、おびただしい数のヘテロ二量体性受容体も、同定された。これらには、成長因子(例えば、ヘレグリン)、神経伝達物質(例えば、-アミノ酪酸)及び他の有機又は無機小分子(例えば、ミネラルコルチコイド、グルココルチコイド)に結合するものがあるが、これらには限定されない。好ましいヘテロ二量体性受容体には、核ホルモン受容体(Beleshaw等(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93(10):4604-4607)、erbB3及びerbB2受容体複合体並びにGタンパク質結合型受容体、例えば、オピオイド(Gomes等(2000) J. Neuroscience 20(22):RC110); Jordan等(1999) Nature 399:697-700)、ムスカリン性、ドーパミン、セロトニン、アデノシン/ドーパミン及びGABA_B群の受容体などがあるが、これらには限定されない。公知のヘテロ二量体性受容体の大部分については、それらのC末端配列は、ヘテロ二量体形成を仲介する。

【0085】

所望により、新規なヘテロ二量体性受容体からの配列を、対象のAbusを構築するのに用いることができる。このような状況では、一定の受容体対における候補のヘテロ二量体化配列の同定は、過度の実験をおこなうことなく、遺伝アッセイ又は生化学アッセイによりおこなうことができる。さらに、コンピュータによるモデリング及びサーチ技術により、関連遺伝子及び非関連遺伝子において現れる共通ドメインの配列ホモロジーに基づくヘテロ二量体化配列の検出が、さらに容易となる。ホモジーサーチが可能であるプログラムには、BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)、FastA(ウィスコンシン州MadisonにあるGenetics Computing Groupのパッケージ)、DNA Star、ClustLaw、TOFFEE、COBLATH、Genthreader及びMegAlignがあるが、これらには限定されない。標的受容体に対応するDNA配列又はそれらのセグメントを含む配列データベースを使用して、配列の解析をおこなうことができる。一般的に用いられるデータベースには、GenBank、EMBL、DDBJ、PDB、SWISS-PROT、EST、STS、GSS及びHTGSなどがあるが、これらには限定されない。

【0086】

別の好ましい種類のヘテロ二量体化配列は、コイルドコイルらせん構造を採用する両親媒性ペプチドからなる。らせんコイルドコイルは、タンパク質における主要なサブユニットオリゴマー化配列の一つである。一次配列解析から、全てのタンパク質残基の約2~3%がコイルドコイルを形成することが分かった(Wolff等(1997) Protein Sci. 6:1179-1189)。十分に特徴付けされたコイルドコイル含有タンパク質は、細胞骨格ファミリー(例えば、-ケラチン、ビメンチン)、細胞骨格モーターファミリー(例えば、ミオシン、キネシン及びダイニン)、ウイルス膜タンパク質(例えば

、E b o l a 又はH I V の膜タンパク質)、D N A 結合タンパク質及び細胞表面受容体(例えば、G A B A_Bの受容体1及び受容体2)のメンバーなどを含む。本発明のコイルドコイルヘテロ二量体化配列は、大ざっぱに2つのグループ、すなわち、左巻きコイルドコイル及び右巻きコイルドコイルに分類できる。左巻きコイルドコイルは、無極性残基が第一(a)位置及び第四(d)位置に優先的に位置する「a b c d e f g」で示されるヘプタッド反復(heptad repeat)により特徴付けられる。これらの2つの位置での残基は、典型的には他のスタンドのものとインターロックしてきっちりとした疎水性コアを形成する「ノブズアンドホールズ」のジグザグパターンを構成する。これに対して、コイルドコイルの周辺をカバーする第二(b)位置、第三(c)位置及び第六(f)位置は、好ましくは帯電残基である。帯電アミノ酸としては、例えば、塩基性残基、例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン、及び酸性残基、例えば、アスルバテート、グルタメート、アスパラギン及びグルタミンなどがある。ヘテロ二量体性コイルドコイルの設計に好適な非帯電又は無極アミノ酸には、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン及びスレオニンなどがあるが、これらには限定されない。非帯電残基は、典型的には疎水性コアを形成するが、たとえコア位置であっても帯電残基を含むらせん間塩架橋及びらせん内塩架橋を用いて、全体的ならせんコイルドコイル構造を安定化させることができる(Burkhardt等(2000) *J. Biol. Chem.* 275: 11672-11677)。種々の長さのコイルドコイルを用いることができるが、対象のヘテロ二量体化配列は、好ましくは2~10のヘプタッド反復を含む。より好ましくは、ヘテロ二量体化配列は、3~8のヘプタッド反復、さらにより好ましくは4~5のヘプタッド反復を含む。

10

20

30

【0087】

最適なコイルドコイルヘテロ二量体化配列を設計する際に、ペプチドの二次構造を予測する種々の既存のコンピュータソフトウェアプログラムを使用できる。一例としてのコンピュータ解析では、アミノ酸配列を公知の二本鎖コイルドコイルのデータベースにおける配列と比較するCOILSアルゴリズムを使用し、高い確率でコイルドコイル延伸を予測する(Kammerer等(1999) *Biochemistry* 38: 13263-13269)。

40

【0088】

ヘテロオリゴマー化に関する多種多様なコイルドコイルを本発明に用いることができるが、好ましいコイルドコイルは、ヘテロ二量体性受容体由来のものである。したがって、本発明は、G A B A_B受容体1及びG A B A_B受容体2に由来するコイルドコイル二量体性配列を含む。一の側面によれば、対象コイルドコイルは、G A B A_B受容体1及びG A B A_B受容体2のC末端配列を含む。別の側面では、対象のコイルドコイルが、さらにシスティン残基に連結される。コイルドコイルは、少なくとも30アミノ酸残基のG A B A_B受容体1ポリペプチド及びG A B A_B受容体2ポリペプチドである。これらのうちの一方が、配列番号(SEQ ID NO):2に示されているものに匹敵する長さの線状配列と基本的に同一であり、他方は、配列番号(SEQ ID NO):4に示されているものに匹敵する長さの線状ペプチド配列と基本的に同一である。

50

【0089】

ペプチドの線状配列は、両方の配列が実質的にアミノ酸配列ホモロジーを示す場合には、別の線状配列に「基本的に同一」である。一般的に、基本的に同一の配列は、相同領域を整列すると、互いに少なくとも約60%が同一である。好ましくは、配列は、少なくとも約70%が同一であり、より好ましくは少なくとも約80%が同一であり、より好ましくは少なくとも約90%が同一であり、より好ましくは少なくとも約95%が同一であり、さらにより好ましくは100%が同一である。

【0090】

ポリペプチド配列が基本的に同一であるかどうかを決定するには、比較されているポリペプチドの機能性を保存する配列が、特に好ましい。機能性は、異なる基準、例えば、対形成コイルドコイル配列とヘテロ二量体を形成する能力、及び生理学的緩衝条件下及び/又は生理学的体温でホモ二量体を形成できない能力により確定できる。

【0091】

本発明には、本明細書で例示されている配列と機能的に同等である修飾 G A B A_B ヘテロ二量体化配列が含まれる。得られた A b u s に対して改善された安定性を付与する修飾ポリペプチドが、好ましい。修飾ポリペプチドとしては、例えば、アミノ酸残基の保存的置換、及びヘテロ二量体化特異性に顕著な害を及ぼさないアミノ酸の一つ以上の欠失又は付加を受けたものなどがある。置換の範囲は、対による親和性が維持される限り、一つ以上のアミノ酸残基の変更又は修飾から領域の完全な再設計にわたることができる。アミノ酸の置換（存在する場合には）、ペプチドの折りたたみ又は機能特性に悪影響を及ぼさない保存的置換が好ましい。保存的置換をなすことができる機能的に関連したアミノ酸群には、グリシン／アラニン；バリン／イソロイシン／ロイシン；アスパラギン／グルタミン；アスパラギン酸／グルタミン酸；セリン／スレオニン／メチオニン；リジン／アルギニン；及びフェニルアラニン／チロシン／トリプトファンがある。本発明のポリペプチドは、グリコシル化された形態でも、非グリコシル化形態でもよいし、翻訳後に修飾されてもよいし（例えば、アセチル化及びリン酸化）、又は合成的に修飾してもよい（例えば、標識基の結合）。

10

【0092】

抗原結合ユニット（A b u s）の配置及び修飾：

本発明の A b u s は、種々の配置をとることができる。最小の非一本鎖 A b u は、1 値の c c F v フラグメントである。c c F v フラグメントは、それぞれ V L 領域及び V H 領域とフレーム内で融合した第一ヘテロ二量体化配列及び第二ヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化した、V L 領域と V H 領域とからなる二量体タンパク質である。好ましくは、c c F v は、V L 領域及び V H 領域にさらなるフレキシビリティを付与する短フレクソン配列を含む（図 1 に例示した c c F v 参照）。より複雑な N s c A b u は、同種の 1 以上の抗原に結合できる（すなわち、多価であるが、単一特異性）又は異種の 1 以上の抗原に結合できる（すなわち、多価であり且つ多重特異性 A b u s）多価分子である。典型的には、多価 A b u は、L ポリペプチド若しくは H ポリペプチド又はこれらの両方が一以上の V 領域を含んでいる、1 以上の L 鎖及び H 鎖ポリペプチドからなるヘテロ多量体である。例えば、例示的な 2 価 A b u s は、図 1 2 に示すような (c c F v)₂ の配置をとる。この例示の 2 価 A b u s における H 鎖ポリペプチドは、2 つの V H 領域を含む。これら 2 つの V H 領域の各々は、V L 領域と二量体化して 2 つの抗原結合部位を構成する。あるいは、L 鎖ポリペプチドは、2 つの V L 領域を提供し、これらの 2 つの V L 領域の各々は、V H 領域と二量体化して 2 つの結合部位を再構成してもよい。図 1 2 に示すように、多価 A b u は、V L 領域及び V H 領域に連結された 2 つのヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して安定化される。ヘテロ二量体化配列の少なくとも一つ及び好ましくはこれらの両方が、ホモ二量体を形成することができないので、分子内二量体化して非機能性 V H / V H 二量体又は V L / V L 二量体を形成するのが最小限となることから、A b u は効率的に構築される。この一般的な抗体エンジニアリングスキームを適用して、3 価 A b u s 及び 4 価 A b u s を構築できる（例えば、図 1 2 参照）。

20

30

30

【0093】

多価 A b u s を構築するための変法では、図 1 3 に示したような s c F v フラグメント又は d s F v フラグメントが用いられる。一つの抗原結合部位を提供するビルディングユニット c c F v の他に、この配置の A b u s は、c c F v に連結した一つ以上の s c F v フラグメント又は d s F v フラグメントを含む。連結した s c F v 又は d s F v により、追加の結合部位が形成される。例えば、2 価 A b u s は、c c F v - s c F v 配置又は c c F v - d s F v 配置をとることができ（図 1 3）。抗原結合部位の一つは、V L 領域及び V H 領域に連結したヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して構築される（c c F v と同様に）のに対して、他のものは、フレーム内で V L 領域と融合した s c F v フラグメント又は d s F v フラグメントにより形成される。あるいは、s c F v フラグメント又は d s F v フラグメントは、V H 領域に連結してもよい。

40

【0094】

50

同様な手法を用いて、図14に示すような3価のc c F v - s c F v A b u s又はc c F v - d s F v A b u sを生成することができる。一の側面によれば、3価のA b u sは、c c F v - (s c F v)₂の配置をとる。ここでは、2つのポリペプチド「V H - 第一ヘテロ二量体化配列 - s c F v」及び「V L - 第二ヘテロ二量体化配列 - s c F v」は、2つのヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して二量体化して3つの結合部位を構成する。結合部位の一つは、c c F v ビルディングユニットのV L領域及びV H領域からなり、残りの2つは、それぞれV Lポリペプチド及びV Hポリペプチドに連結したs c F v フラグメントにより提供される。あるいは、多価A b u sは、c c F v - s c F v - d s F vとして構成できる。この配置では、抗原結合部位の一つは、d s F v フラグメントのV H領域及びV L領域内に位置する1対のシステイン残基の間の分子間ジスルフィド結合により構築され且つ安定化される。この配置のさらなる変形例は、3価のc c F v - (d s F v)₂である。この場合、結合部位のうちの2つは、d s F v フォーマットをとる(例えば、図14参照)。单一特異性であるか多重特異性であるかとは無関係に、塩基性c c F v ビルディングユニットを用いたいずれかの他の多価A b u s変形例も、本発明に含まれる。

【0095】

したがって、本発明によれば、さらに多重特異性A b u sが提供される。これらは、少なくとも2つの別個の抗原に結合することができる多価分子である。好ましい多重特異性A b u sは、それぞれ2個及び3個の別個の抗原に対して結合特異性を示す二重特異性分子及び三重特異性分子である。以前に特徴付けられた多重特異的抗体(例えば、米国特許第5,932,448号参照)とは区別される対象の多重特異的A b u sは、別個の結合特異性を有する一つ以上のc c F v ビルディングユニットを含む。また、対象の多重特異的A b u sは、上記で詳細に説明した一つ以上のs c F v フラグメント又はd s F v フラグメントを組み込むことができる。好ましい二重特異性A b u s及び三重特異性A b u sは、図15～17に示す一般的な構造にしたがって配置される。

【0096】

非一本鎖A b u sとは別に、本発明では、対象のヘテロ二量体化配列により安定化される一本鎖A b u sが含まれる。典型的には、S c A b u sは、V L領域とV H領域を含み、これらの領域は、これらの2つの領域に接続したヘテロ二量体化配列の対による親和性を介して分子内二量体を形成している。ヘテロ二量体化配列は、平行又は逆平行で配置できる(例えば、図18参照)。平行配置では、2つのヘテロ二量体化配列は、これらが同じ配向(アミノ末端～カルボキシル末端)を有するように整列される。逆平行配置では、一つの配列のアミノ末端が他の配列のカルボキシル末端と整列するように、又はこの逆に、ヘテロ二量体化配列が配列される。一般的には、ヘテロ二量体化配列は、フレクソン配列を介して一緒に連結される。ここで、フレクソンは、典型的に小側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びセリン)を含むフレキシブルポリペプチドリンクー(又はこのようなポリペプチドをコードする核酸配列)である。2つのヘテロ二量体化配列の間にフレクソンを組み込むことにより、一般的にそれらが分子内二量体を形成するための空間的フレキシビリティが提供される。逆平行配置に好適なフレクソンは、好ましくはアミノ酸を、約4～約100、より好ましくは約4～50、さらにより好ましくは約4～15を含む。平行配置のためのフレクソンは、一般的にもっと長く、アミノ酸残基を、好ましくは約10～約100、より好ましくは約50～約30を含む。

【0097】

所望により、一つ以上のシステイン残基の対を、ヘテロ二量体化配列のN末端又はC末端に組み込んで本発明のA b u sをさらに安定化することができる。

【0098】

本発明のA b u sは、L鎖又はH鎖の定常領域由来の配列を含むことができる。定常領域に由来するこのような配列は、一般的に軽鎖又は重鎖可変領域と、連結されるヘテロ二量体化配列の間に配置される。さらに、軽鎖及び重鎖は、ヒト配列を部分的に含

10

20

30

40

50

んでいてもよい。

【0099】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該技術分野において周知である。「ヒト化」抗体は、配列の少なくとも一部分が、その最初の形態から変更され、よりヒト免疫グロブリンに類似した抗体である。一つの方法として、H鎖及びL鎖のC領域を、ヒト配列と置き換えることが考えられる。これは、V領域及び異種の免疫グロブリンC領域を含む融合ポリペプチドである。別の方法として、CDR領域が非ヒト抗体配列を含むとともに、Vフレームワーク領域も、転化されたヒト配列とすることが考えられる。例えば、EP0329400を参照のこと。第3の方法として、ヒトV領域及びマウスV領域のコンセンサス配列を設計し、コンセンサス配列の間で異なるCDRの外の残基を転化することにより、V領域がヒト化されることが考えられる。

【0100】

ヒト化抗体の調製では、フレームワーク残基の選択は、高結合親和性を保持するのに極めて重要である。原則として、いずれかのHuAbからのフレームワーク配列は、CDRグラフト化のためのテンプレートとしての役割を果たすことができる。しかしながら、このようなフレームワークへのストレートCDR置き換えにより、抗原への結合親和性の顕著な損失が生じることがあることが明らかとなった(Glaser等(1992)J. Immunol. 149:2606; Tempest等(1992)Biotechnology 9:266; 及びShalaby等(1992)J. Exp. Med. 17:217。HuAbが最初のmuAbにより相同であるほど、ヒトフレームワークが歪みをマウスCDRに導入して親和性を減少させることが少なくなる。抗体配列データベースに対しての配列ホモロジーサーチに基づいて、HuAb IC4により、muM4TS.22に対する良好なフレームワークホモロジーが得られる。但し、他の高度に相同性のHuAbs、とりわけヒトサブグループIIからのヒトサブグループI又はH鎖からのカッパL鎖も、好適であろう(Kabat等(1987))。ENCAD(Levitt等(1983)J. Mol. Biol. 168:595)等の種々のコンピュータプログラムが、V領域に理想的な配列を予測するのに有効である。したがって、本発明は、異なるV領域を有するHuAbsを含む。当業者には、好適なV領域配列を決定し且つこれらの配列を最適化することは明らかである。免疫原性が減少した抗体を得るための方法が、米国特許第5,270,202号及びEP699,755にも記載されている。

【0101】

抗原及び他の好ましい生物学的特性に対して高い親和性を保持しながら、抗体をヒト化することが重要である。この目標を達成するために、好ましい方法によれば、ヒト化抗体は、親配列及び種々の概念上のヒト化産物を親配列及びヒト化配列の三次元モデルを用いて解析するプロセスにより調製される。三次元免疫グロブリンモデルは、当業者においてよく知られている。選択された免疫グロブリン配列候補の可能性のある三次元立体構造を説明し且つ表示するコンピュータプログラムは、入手できる。これらのディスプレイを調べることにより、免疫グロブリン配列候補の機能における残基の可能性のある役割の分析、すなわち、免疫グロブリン候補がその抗原に結合する能力に影響する残基の分析が可能である。このように、FR残基は、コンセンサス及びインポート配列から選択され、組み合わせられて、所望の抗体特性、例えば、標的抗原(单一又は複数)に対する親和性の増加が達成できるようになる。

【0102】

また、本発明は、化学的に機能的な部分に結合したAbusを含む。典型的には、この部分は、検出できるシグナルを生成できる標識である。これらの結合Abusは、例えば、全身腫瘍組織量の定量化及び転移性病巣のイメージング及び腫瘍のイメージング等の検出系において有用である。このような標識は、当該技術分野において公知であり、放射性同位元素、酵素、蛍光化合物、化学発光化合物、生物発光化合物基質共同因子及びインヒビターなどを含むが、これらには限定されない。このような標識の使用を教示している特許、例えば、米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,

10

20

30

40

50

350号、第3, 996, 345号、第4, 277, 437号、第4, 275, 149号及び第4, 366, 241号を参照のこと。この部分は、Abusに共有結合するか、組み換え連結するか、又はAbusに、二次試薬、例えば、第二抗体、プロテインA又はビオチン・アビジン複合体を用いて結合することができる。

【0103】

他の機能的部分は、シグナルペプチド、免疫学的反応性を高める物質、固体支持体へのカップリングを容易にする物質、ワクチンキャリア、生物反応修飾物質、常磁性標識及び薬物などを含む。シグナルペプチドは、新たに合成されたタンパク質を、細胞膜、通常真核細胞における小胞体及び細菌の内膜又は内膜と外膜の両方を介して導く、短いアミノ酸配列である。シグナルペプチドは、典型的にはポリペプチドのN末端部分にあり、典型的には生合成と、細胞からのポリペプチドの分泌との間で酵素的に除去される。このようなペプチドを、対象Abusに組み込むことにより、合成した分子を分泌できる。

【0104】

免疫反応性を高める物質には、細菌性超抗原などがあるが、これらには限定されない。固体支持体へのカップリングを容易にする物質には、ビオチン又はアビジンがあるが、これらには限定されない。免疫原キャリアには、生理学的に許容される緩衝液などがあるが、これらには限定されない。生物反応修飾物質は、サイトカイン、特に腫瘍壞死因子(TNF)、インターロイキン-2、インターロイキン-4、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子及び-インターフェロンなどを含む。

【0105】

好適な薬物部分には、抗腫瘍薬などがある。これらとしては、例えば、放射性同位体、ビンカアルカリド類、例えば、ビンプラスチン硫酸塩、ビンクリスチン硫酸塩及びビンデシン硫酸塩、アドリアマイシン、ブレオマイシン硫酸塩、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、デュアノルビシン塩酸塩、ドキソルビシン塩酸塩、エトポシド、フルオロウラシル、ロムスチン、メクロロレタミン塩酸塩、メルファン、メルカブトブリン、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトーテン、ペントスタチン、ピポブロマン、プロカルバゼ塩酸塩、ストレプトゾシン、タキソール、チオグアニン及びウラシルマスターなどがあるが、これらには限定されない。

【0106】

一本鎖分子を含む免疫毒素は、組み換え手段により產生できる。種々の免疫毒素の產生は、当該技術分野において周知であり、このための方法は、例えば、「*Monoclonal Antibody-toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet* (モノクローナル抗体-トキシン結合体:特効薬を目指して)」Thorpe等(1982)Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press社、第168~190頁; Vitetta(1987)Science 238:1098~1104; 並びにWinter及びMilstein(1991)Nature 349:293~299に記載されている。好適なトキシンには、リシン、放射性核種、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、シュードモナスエクソトキシンA、ジフテリア毒素、リシンA鎖、真菌毒素、例えば、レストリクトシン及びホスホリパーゼ酵素などがあるが、これらには限定されない。一般的には、「*Chimeric Toxins* (キメラトキシン)」、Olson及びPihl、Pharmac. Ther. 15:355~381(1981); 並びに「*Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy* (癌の検出及び治療のためのモノクローナル抗体)」、編者Baldwin及びByers、第159~179頁、第224~266頁、Academic Press社(1985)を参照されたい。

【0107】

化学的に機能的な部分は、組み換えて、例えば、Abu部分及び機能的部分をコードしている融合遺伝子を生成することにより調製できる。あるいは、Abuは、種々の十分に確

10

20

30

40

50

立された化学的方法のいずれかにより部分に化学的に結合できる。例えば、部分がタンパク質であるときには、結合は、ヘテロ二機能性クロスリンカー、例えば、S P D P、カルボジイミドグルタルアルデヒド等によるものでよい。これらの部分は、共有結合してもよいし、二次試薬、例えば、二次抗体、プロテインA又はビオチン・アビジン複合体を介して結合してもよい。常磁性部分及び抗体へのその結合は、当該技術分野において周知である。例えば、M i l t e n y i 等(1990) Cytometry 11: 231-238 を参照のこと。

【0108】

抗原結合ユニット(A bus)の調製:

対象A busは、組み換えDNA技術、合成化学法又はそれらの組み合わせにより調製できる。例えば、VL、VH及びヘテロ二量体化配列を含むA busの所望の成分をコードしている配列は、典型的に構築され、フラグメントを発現ベクターにライゲーションする。これらの配列は、所望のタンパク質配列をコードしている他のベクターからか、それぞれのテンプレート核酸を用いたPCR生成フラグメントからか、又は所望の配列をコードしている合成オリゴヌクレオチドの集合により構築されることができる。しかしながら、A busをコードしている全ての核酸配列は、好ましくはコード配列のフレーム内融合により構築される。上記したフレクソンは、種々の成分及びドメインとの間に含ませて、個々の成分が相対的に互いに独立している配置をとる能力を高めることができる。Nsc A busを產生するために、L鎖とH鎖を、別個に形成した後、集合させる、すなわち、両鎖のための発現系による生体内集合をすることができる。このような発現系は、好適な細胞を、L鎖及びH鎖用の別個の転写可能領域を含むベクターでトランスフェクションするか、同じ細胞を各鎖用のベクターで同時形質移入することにより生成できる。

【0109】

集合させられたA busは、当該技術分野において公知の種々のタンパク質精製法を用いて単離できる。一般的に、Abuは、培地から分泌されたポリペプチドとして単離される。但し、これらは、シグナルペプチドなしで直接に產生されるときに、宿主細胞ライゼート又は細菌ペリプラスマから回収できる。A busが膜結合している場合、当業者により一般的に用いられる好適な洗浄剤溶液により可溶化される。回収されたA busは、塩析沈殿(例えば、硫酸アンモニウムで)、イオン交換クロマトグラフィー(例えば、カチオン又はアニオン交換カラム上、中性pHでイオン強度を増加させる段階的勾配で溶離)、ゲル濾過クロマトグラフィー(ゲル濾過HPLC等)、並びにタグアフィニティーカラム、又はアフィニティー樹脂、例えば、プロテインA、プロテインG、ヒドロキシアパタイト及び抗免疫グロブリン、によるクロマトグラフィーにより、さらに精製できる。

【0110】

本発明のポリヌクレオチド及びベクター

本発明によれば、本発明のA busをコードする種々のポリヌクレオチドが提供される。本発明のポリヌクレオチドは、部分的に、上記で詳細に説明したように、その中に含まれる独特的ヘテロ二量体化配列により特徴付けられる。このようなヘテロ二量体化配列により、所望の抗原に特異的に結合するもの等のA busの効率的な構築及びスクリーニングができる。また、このような配列により、ファージ、細菌、他の原核細胞又は真核細胞等の生体生理学的存在物上へのヘテロ二量体のディスプレイが容易となる。好ましいヘテロ二量体化配列を、配列番号(SEQ ID NO): 2及び4に示す。

【0111】

本発明の一実施態様によれば、対象Nsc A busをコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。この実施態様の一の側面によれば、組み換えポリヌクレオチドは、対象Nsc Abuの軽鎖ポリペプチドをコードするコード配列を含む。別の側面によれば、組み換えポリヌクレオチドは、Nsc Abuの重鎖ポリペプチドをコードするコード配列を含む。さらに別の側面によれば、組み換えポリヌクレオチドは、2つの別個のコード配列を含む。これらのコード配列のうちの一つは軽鎖ポリペプチドをコードし、他の配列は重鎖をコードしている。

10

20

30

40

50

【0112】

既存の抗体のL鎖又はH鎖の種々の領域に対応するヌクレオチド配列は、ハイブリダイゼーション、PCR及びDNA配列決定を含むがこれらには限定されない通常の方法を用いて容易に得られ且つ配列決定できる。モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ細胞は、抗体ヌクレオチド配列の好ましいソースとしての役割を果たす。一連のモノクローナル抗体を產生する数多くのハイブリドーマ細胞を、公共又は私的な寄託機関から得ることができる。最大の寄託機関は、American Type Culture Collection (<http://www.atcc.org>)である。ここでは、十分に特徴付けされたハイブリドーマ細胞系の多様なコレクションが提供されている。あるいは、抗体ヌクレオチドを、免疫化又は非免疫化齧歯類又はヒトから得ることができ、且つ脾臓及び末梢血リンパ球等の器官から得ることができる。抗体ヌクレオチドを抽出及び合成するのに適用できる具体的な方法が、Orlandi等(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 86:3833-3837; Larrick等(1989)Biochem.Biophys.Res.Commun. 160:1250-1255; Sastry等(1989)Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A. 86:5728-5732; 及び米国特許第5,969,108号に記載されている。

10

【0113】

また、抗体ヌクレオチド配列は、例えば、相同性非ヒト配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常領域についてのコード配列を用いることによっても修飾できる。この方法で、最初の抗体の結合特異性を保持するキメラ抗体が調製される。

20

【0114】

また、本発明によるポリヌクレオチドには、例示されたポリペプチドの機能的等価物及びそれらのフラグメントをコードしているものなどが含まれることも分かる。機能的に等価のポリペプチドには、それらによりコードされているポリペプチドの特性を高めるか、減少させるか、又は顕著な影響を及ぼさないものが含まれる。機能的等価物は、保存的アミノ酸の置換を有するポリペプチド、融合を含む類似体及び突然変異体であることができる。

【0115】

遺伝コードの縮重のため、L配列及びH配列だけでなく、本発明のポリヌクレオチド及びベクターの構築に好適なヘテロ二量体化配列のヌクレオチドがかなりの変化をすることがある。配列変異体は、一つ以上の置換、欠失又は付加(これらの本質的な効果は、所望の抗原結合活性を保持することである)の行われた修飾されたDNA又はアミノ酸配列を有することができる。例えば、コードされているアミノ酸の変更や、保存的変化を生じない、コード領域における種々の置換をおこなうことができる。これらの置換は、本発明に含まれる。保存的アミノ酸の置換には、以下の群の範囲内の置換が含まれる:グリシン、アラニン;バリン、イソロイシン、ロイシン;アスパラギン酸、グルタミン酸;アスパラギン、グルタミン;セリン、スレオニン;リジン、アルギニン;及びフェニルアラニン、チロシン。保存的置換は、産生されるポリペプチドに含まれる一つ以上のアミノ酸残基を効果的に変化させるが、これらの置換は、得られた産生されるAbusの抗原結合活性を妨害するとは思われない。コードされるアミノ酸残基を変更しないヌクレオチドの置換は、種々の系における遺伝子発現を最適化するのに有用である。好適な置換は、当業者には公知であり、例えば、発現系において好ましいコドンの使用を反映するようにおこなわれる。

30

40

【0116】

所望により、組み換えポリヌクレオチドは、遺伝子産物の発現及び精製の検出を容易にする異種の配列を含むことができる。このような配列の例は、当該技術分野において公知であり、-ガラクトシダーゼ、-ラクタマーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)及びそれらの誘導体等のレポータータンパク質をコードするものなどが含まれる。精製を容易にする他

50

の異種配列は、エピトープ、例えば、Myc、HA（インフルエンザウイルス血球凝集素由来）、His-6、FLAG、又は免疫グロブリンのFc部分、グルタチオンS-トランسفェラーゼ（GST）及びマルトース結合タンパク質（MBP）をコードすることができる。

【0117】

ポリヌクレオチドは、上記した種々の化学的機能性部分に結合できる。一般的に用いられる部分には、検出可能なシグナルを產生できる標識、シグナルペプチド、免疫学的反応性を高める物質、固体支持体へのカップリングを容易にする物質、ワクチンキャリア、生物反応修飾物質、常磁性標識及び薬物などが含まれる。これらの部分は、ポリヌクレオチドに、共有結合か、組み換えか、又は当該技術分野において公知の他の手段により連結できる。10

【0118】

本発明のポリヌクレオチドは、追加の配列、例えば、同じ転写ユニット内の追加のコード配列、制御要素、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位及びポリアデニル化部位、同一又は異なるプロモーターの制御下での追加の転写ユニット、宿主細胞のクローニング、発現及び形質転換を可能にする配列、並びに本発明の実施態様に望ましいことがある構築物を含むことができる。

【0119】

本発明で提供されるポリヌクレオチドは、化学合成、組み換えクローニング法、PCR又はそれらの組み合わせを用いて得ることができる。化学的なポリヌクレオチド合成法は、当該技術分野において周知であり、ここで詳細に説明する必要はない。当業者は、ここに記載の配列データを使用して、DNA合成装置又は商業サービスからのオーダリングを用いることにより所望のポリヌクレオチドを得ることができる。20

【0120】

所望の配列を含むポリヌクレオチドを、好適なベクターに挿入し、それを次に好適な宿主細胞に導入して複製及び増幅することができる。したがって、本発明には、本発明のポリヌクレオチドの一つ以上を含む種々のベクターが含まれる。また、対象Abusをコードしている少なくとも一つのベクターを含む発現ベクターの選択可能なライブラリーも、提供される。

【0121】

本発明のベクターは、一般的にクローニングベクター及び発現ベクターのカテゴリーに入る。クローニングベクターは、それらが含有するポリヌクレオチドの複製コピーを得たり、又は今後の回収のために寄託機関にポリヌクレオチドを保管する手段として有用である。発現ベクター（及びこれらの発現ベクターを含む宿主細胞）を使用して、ポリペプチドを、それらに含まれるポリヌクレオチドから產生することができる。好適なクローニングベクター及び発現ベクターには、当該技術分野において公知のもの、例えば、細菌、哺乳動物、酵母、昆虫及びファージディスプレイ発現系に使用されるものなどが含まれる。30

【0122】

好適なクローニングベクターは、標準的な方法により構築してもよいし、当該技術分野において入手できる多数のクローニングベクターから選択してもよい。選択されるクローニングベクターは、使用しようとする宿主細胞に応じて異なることができるが、有用なクローニングベクターは、一般的に自己複製能を有し、特定の制限エンドヌクレアーゼについての単一の標的を有していてもよく、又はマーカー遺伝子を担持していてもよい。好適な例として、プラスミド及び細菌ウイルス、例えば、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、pUC18、mp18、mp19、ファージDNA（纖維状ファージDNA及び非纖維状ファージDNA等）並びにシャトルベクター、例えば、pSA3及びpAT28などがある。これら及び他のクローニングベクターは、Clontech、BioRad、Stratagene及びInvitrogen等の商業的ベンダーから入手できる。40

【0123】

10

20

30

40

50

これらの核酸を含む発現ベクターは、タンパク質及びポリペプチドを産生する宿主ベクター系を得るのに有用である。これらの発現ベクターは、エピソーマーとして又は、染色体DNAの一体部分として宿主生物において複製可能でなければならないことを意味している。好適な発現ベクターには、プラスミド、ウイルスベクター、例えば、ファージミド、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レトロウイルス、コスミッド等が含まれる。酵母、鳥類及び哺乳動物の細胞などの真核細胞における発現に好適な多数の発現ベクターが、当該技術分野において公知である。発現ベクターの一例として、転写がサイトメガロウイルス(CMV)初期プロモーター/エンハンサーにより推進されるp c DNA 3(カリфорニア州サンディエゴにあるInvitrogen社)があげられる。対象Abusを発現するのに特に有用な発現ベクターとして、ファージディスプレイベクター及び細菌ディスプレイベクターの2種類がある。

【0124】

ファージディスプレイベクターを構築するための方法は、当該技術分野において十分に確立されている(Winter G.等(1994)Ann. Rev. Immunol. 12:433-55の総論参照)。纖維状ファージ配列と非纖維状ファージ配列の両方が、ディスプレイベクターを構築するのに適用できる。この種の数多くの代表的なファージのゲノムが配列決定され、それらのゲノムは非纖維状ファージよりもはるかに小さいことがわかっているので、纖維状ファージベクターが好ましい。この種の代表的なファージには、M13、f1、fd、If1、Ike、Xf、Pf1及びPf3などがある。ファージベクターは、典型的にはヘテロマルチマー、例えば、抗体ペプチドを発現するように、ファージコートタンパク質の一部分又は全てに融合することにより構築される。好適なコートタンパク質には、M13のpIII、VIII、VI、VII及びIXなどが含まれる。ヘテロ多量体配列は、発現ファージコートの一体性が損なわれないようにファージベクターに挿入しなければならない。ヘテロ多量体は、好ましくは生物学的に機能性である。

【0125】

pIII融合ベクターを構築するために、一般的に用いられる融合部位を、アミノ末端、pIIIの2つのドメインの間のフレキシブルスペーサーの間(Smith等、Science 288:1315-17)又は米国特許第5,969,108号、第5,837,500号に記載されている他の代替融合部位に位置する。ファージのpIII融合及び他のタンパク質は、同じファージレプリコン内又は異なるレプリコン上に全体的にコードされることができる。少なくとも2つのレプリコンを使用するとき、pIII融合は、一般的にファージミド、複製のファージオリジンを含むプラスミド上にコードされる。ファージミドは、pIIIを含む全てのファージタンパク質を提供するが、欠陥オリジンのため、ファージミドとの競合でそれ自体よくはパッケージされないM13KO7等のヘルパー・ファージを用いた「レスキュ」によりファージ粒子にパッケージができる。パッケージ効率を高めるために変更pIIIを欠くか、それを含む他の多価ヘルパー・ファージ(例えば、M13gIII)を、用いることもできる(Rondot等、Nature Biotechnology 19:75-78)。

【0126】

他の纖維状ファージを用いて、同様の構築をおこなうことができる。Pf3は、IncP-1プラスミドを含む緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)細胞に感染する周知の纖維状ファージである。ゲノム全体の配列決定がなされており、複製及び集合に関する遺伝シグナルは、特徴付けされている。Pf3の主要なコートタンパク質は、その分泌を導くためのシグナルペプチドを有しない点で通常とは異なる。配列は、露出されるアミノ末端と一致している帯電残基ASP₇、ARG₃₇、LYS₄₀及びPHE₄₄-COO⁻を有している。ディスプレイPf3ベクターを構築するためには、異種のポリペプチドをコードしている遺伝子フラグメントにフレーム内で融合され、次に成熟Pf3コートタンパク質をコードしているDNAとフレーム内で融合している緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)において分泌を生じることが知られているシグナル配列を構成することが、一般的に望ましい。

10

20

30

40

50

【0127】

同じ一般的な構築スキームは、バクテリオファージX174、T4及びT7ファージを含む非纖維状ファージから得た配列を含む提示ベクターの構成に適用される。これらの非纖維状ファージの構造についての豊富な情報が、当該技術分野において公知である。当業者は、必要以上の実験をおこなうことなく独特のヘテロ二量体化配列を用いて対象のヘテロ多量体を発現する対応のディスプレイベクターを容易に生成できる。

【0128】

ファージ提示ベクターの他に、別の種類の好ましいベクターとして、細菌ディスプレイベクターがあげられる。上記で概略示した一般的なスキームは、このようなベクターを構築するのに等しく適用できる。簡単に述べると、ベクターは、ヘテロ多量体、特に**A bus**の発現を、細菌表面タンパク質との融合体の形態で容易にする。事前のサーチから、このような融合体を発現するのに適用できる非常に数多くの細菌表面タンパク質が明らかとなつた。細菌表面タンパク質として、例えば、L a m B (B r e m e r 等、P r o c . N a t l . A c a d . S c i U . S . A . (1984) 81 : 3830 - 34 ; G e n e (1987) 52 : 165 - 73) ; OmpA (P r o g B i o p h y s M o l e c B i o l (1987) 49 : 89 - 115) ; OmpC ; OmpF (P a g e s 等、B i o c h e m i m i e (1990) 72 : 169 - 76) ; PhoE (v a n d e r L e y 等、J . B i o l . C h e m . 261 : 12222 - 5) ; p i l i n (S o 等、C u r r T o p i n M i c r o b i o l & I m m u n o l (1985) 118 : 13 - 28) ; p l d A (d e G e u s 等、E M B O J . (1984) 3 (8) : 179 20 9 - 1802) 及びそれらの同族体があげられるが、これらには限定されない。これら及び他の表面タンパク質の特徴付け並びにこれらのタンパク質を異種ポリペプチドのディスプレイに用いる方法が、米国特許第5,837,500号及びそれに引用されている文献に詳細に記載されている。

【0129】

本発明のベクターは、一般的に**A bus**を発現するために必要とする転写又は翻訳制御配列を含む。好適な転写又は翻訳制御配列には、複製オリジン、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー結合領域、転写開始部位、リボソーム結合部位、翻訳開始部位並びに転写及び翻訳のための末端部位などがあるが、これらには限定されない。

【0130】

本明細書で使用される用語「プロモーター」は、一定の条件下で、RNAポリメラーゼに結合でき且つプロモーターよりも下流(3'方向)に位置するコード領域の転写を開始できるDNA領域である。プロモーターは、構成してもよいし、誘導してもよい。一般的に、プロモーター配列は、その3'端末で、転写開始部位に結合され、上流(5'方向)に延びてバックグラウンドより上の検出可能なレベルで転写を開始するのに必要とする、最小数の塩基又は要素を含むようとする。転写開始部位だけでなく、RNAポリメラーゼの結合に関与しているタンパク質結合ドメインも、プロモーター配列内にある。真核生物のプロモーターは、常にではないが、「T A T A」ボックス及び「C A T」ボックスを含むことがしばしばある。

【0131】

選択されるプロモーターは、ベクターを導入する宿主細胞に大きく依存する。動物細胞については、種々の強固なプロモーター(ウイルスプロモーター及び非ウイルスプロモーターの両方)が当該技術分野において公知である。代表的なウイルスプロモーターとしては、例えば、CMV、SV40ウイルスの初期及び後期プロモーター、種々の種類のアデノウイルス(例えば、アデノウイルス2)及びアデノ関連ウイルスのプロモーターが挙げられるが、これらには限定されない。また、通常所望の軽鎖遺伝子又は重鎖遺伝子と関連したプロモーターを利用することが、このような制御配列が宿主細胞系と適合する限りは、可能であり且つしばしば望ましい。

【0132】

他の真核細胞に好適なプロモーター配列には、3'-ホスホグリセレートキナーゼ、又は他

10

20

30

40

50

の解糖系酵素、例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ及びグルコキナーゼのためのプロモーターなどがある。転写が成長条件により制御されるというさらなる利点を有する他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連した分解系酵素、上記したグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ並びにマルトース及びガラクトース利用に関与する酵素のためのプロモーター領域である。

【0133】

10

ある好ましい実施態様によれば、本発明のベクターでは、強力なエンハンサー及びプロモーター発現カセットを使用する。このような発現カセットとしては、例えば、ヒトサイトメガロウイルス直初期(HCMV-IE)プロモーター(Boshart等、Cell 41:521(1985))、-アクチンプロモーター(Gunning等(1987)Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)84:5831)、ヒストンH4プロモーター(Guild等(1988)、J. Viral.62:3795)、マウスマタロチオネインプロモーター(McIvor等(1987)、Mol. Cell. Biol.7:838)、ラット成長ホルモンプロモーター(Milliet等(1985)、Mol. Cell. Biol.5:431)、ヒトアデノシンデアミナーゼプロモーター(Hantzapoulos等(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA86:3519)、HSV tkプロモーター25(Tabin等(1982)Mol. Cell. Biol.2:426)、-1アンチトリプシンエンハンサー(Peng等(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:8146)及び免疫グロブリンエンハンサー/プロモーター(Blankenstein等(1988)Nucleic Acid Res.16:10939)、SV40初期又は後期プロモーター、Adenovirus 2主要後期プロモーター、又はポリオーマウイルス、ウシパピローマウイルス又は他のレトロウイルス若しくはアデノウイルスなど由来の他のウイルスプロモーターがある。免疫グロブリン(Ig)遺伝子のプロモーター及びエンハンサー要素は、Bリンパ球(Banerji等(1983)Cell33:729; Gillies等(1983)Cell33:717; Mason等(1985)Cell41:479)に対する著しい特異性を付与し、一方Bグロブリン遺伝子の転写を制御する要素は、赤血球系細胞でのみ機能する(van Assendelft等(1989)Cell56:969)。

20

30

40

【0134】

細胞特異的又は組織特異的プロモーターを、使用することもできる。極めて多様な組織特異的プロモーターが、当業者により記載され且つ用いられてきた。選択動物細胞において作動可能な代表的なプロモーターには、肝細胞特異的プロモーター及び心筋特異的プロモーターなどがある。選択されるレシピエント細胞型に応じて、当業者は、本発明の発現ベクターの構築に適用できる他の好適な細胞特異的又は組織特異的プロモーターについて知るであろう。

【0135】

周知の制限及びライゲーション法を使用して、適切な転写制御配列を、種々のDNAソースから切除し、本発明により発現される無傷選択可能融合遺伝子との作動的関係において一体化することができる。

【0136】

40

対象ベクターを構築する際、外生的配列と関連した終止配列も、転写される所望の配列の3'端に挿入してmRNAのポリアデニレーション及び/又は転写終止シグナルを得る。ターミネーター配列は、好ましくは一つ以上の転写終止配列(ポリアデニル化配列等)を含み、またさらなる転写読み過ごしを中断させるようにさらなるDNA配列を含ませることにより長くすることができる。本発明の好ましいターミネーター配列(又は終止部位)

50

は遺伝子を有し、その遺伝子の後に転写終止配列（それ自身の終止配列又は異種の終止配列）が存在する。このような終止配列としては、例えば、当該技術分野において公知であり、広く入手可能であり、以下で例示する、種々のポリアデニル化配列にカップリングした停止コドンがあげられる。ターミネーターが遺伝子を含む場合、検出可能又は選択可能なマークターをコードする遺伝子を使用するのが有利であり、それによりターミネーター配列（及びしたがって、転写ユニットの対応する失活及び/又は活性化）の存在及び/又は不存在を、検出及び/又は選択できる手段が提供される。

【0137】

上記要素の他に、ベクターは、選択可能なマークター（例えば、ベクターで形質転換した宿主細胞の生存又は成長に必要なタンパク質をコードする遺伝子）を含んでいてよいが、このようなマークター遺伝子は、宿主細胞に共導入した別のポリヌクレオチド配列に担持することができる。選択可能な遺伝子が導入されたこのような宿主細胞のみが、選択的条件下で生存及び/又は成長する。典型的な選択的遺伝子は、(a) 抗生物質又は他のトキシン、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、G 4 1 8、メトトレキサート等に対する耐性を付与するタンパク質、(b) 栄養素要求性欠乏を補完するタンパク質、又は(c) 天然培地からは得られない必須の栄養物を供給するタンパク質をコードする。どのマークター遺伝子を選択するのが適切かは、宿主細胞に依存し、種々の宿主について適切な遺伝子は、当該技術分野において公知である。

【0138】

好ましい実施態様によれば、ベクターは、少なくとも2つの非関連発現系で複製できるシャトルベクターである。このような複製を容易にするために、ベクターは、一般的に少なくとも2つの複製オリジンを含み、一つは各発現系において有効である。典型的には、シャトルベクターは、真核生物発現系及び原核生物発現系において複製できる。これにより、真核宿主（発現細胞の種類）のタンパク質発現及び原核宿主（増幅細胞の種類）におけるベクターの増幅を検出できる。好ましくは、複製の一つのオリジンはS V 4 0 に由来し、一つはp B R 3 2 2 に由来する。但し、ベクターの複製を導く限りは、当該技術分野において公知のいずれかの好適なオリジンを、使用することができる。ベクターがシャトルベクターである場合、ベクターは、好ましくは少なくとも2つの選択可能なマークターを含み、一つは発現細胞の種類のためのものであり、一つは増幅細胞の種類のためのものである。利用される発現系において機能する限り、当該技術分野において公知の選択可能なマークター又は本明細書に記載の選択可能なマークターのいずれも用いることができる。

【0139】

本発明によるベクターは、組み換えクローニング法の使用及び/又は化学合成により得ることができる。極めて多数の組み換えクローニング法、例えば、P C R、制限エンドヌクレアーゼ消化及びライゲーションが、当該技術分野において周知であり、ここで詳細には説明する必要がない。また、当業者は、ここに記載の配列データ又は公共又は企業のデータベースにおける配列データを使用して、当該技術分野において入手できるいずれかの合成手段により所望のベクターを得ることができる。

【0140】

本発明の宿主細胞：

本発明によれば、ベクターで形質転換した宿主細胞又は上記した発現ベクターのライブライバーが提供される。発現ベクターは、多数の好適な手段、例えば、エレクトロポレーション、マイクロプロジェクタイルボンバードメント；リポフェクション、感染（ベクターを感染物質にカップリングする）、塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、D E A E - デキストラン又は他の物質を用いたトランスフェクションのいずれかにより、好適な原核細胞又は真核細胞に導入できる。ベクターを導入するのにどの手段を選択するかは、宿主細胞の特徴によって決まることがしばしばある。

【0141】

ほとんどの動物細胞の場合、上記した方法のいずれも、ベクターのデリバリーに好適である。好ましい動物細胞は、例えば、ミリグラムのレベルで、外生的に導入される遺伝子産

10

20

30

40

50

物を多量に発現できる、脊椎動物細胞、好ましくは哺乳動物細胞である。好ましい細胞としては、N I H 3 T 3 細胞、C O S、H e L a 及びC H O 細胞があるが、これらには限定されない。

【 0 1 4 2 】

動物細胞は、種々の培地で培養できる。市販の培地、例えば、H a m ' s F 1 0 (S i g m a 社)、M i n i m a l E s s e n t i a l M e d i u m (M E M、S i g m a 社)、R P M I - 1 6 4 0 (S i g m a 社)及びD u l b e c c o ' s M o d i f i e d E a g l e ' s M e d i u m (D M E M、S i g m a 社)が、宿主細胞を培養するのに好適である。さらに、動物細胞を、血清を欠くが、ホルモン、増殖因子又は特定の細胞型の生存及び/又は成長に必要な他の因子を補充した定義された培地で増殖できる。細胞の生存を支持する定義された培地は、生存能、モルホロジー、代謝能及びもしかしたら細胞の分化能を維持するのに対して、細胞成長を促進する定義された培地は、細胞の繁殖又は増殖に必要な全ての化学物質が提供される。生体外での哺乳動物の細胞の生存及び成長を支配する一般的なパラメータは、当該技術分野において十分に確定している。異なる細胞培養系で制御できる物理化学的パラメータは、例えば、p H、p O₂、温度及び浸透圧である。細胞の栄養上の必要物は、通常最適な環境を提供するために開発された標準培地配合物で供給される。栄養物は、以下のいくつかのカテゴリー：アミノ酸及びその誘導体、炭水化物、糖類、脂肪酸、複合脂質、核酸誘導体及びビタミン類、に分けることができる。細胞の代謝を維持するための栄養物とは別に、ほとんどの細胞は、無血清培地での増殖のために、以下の群：ステロイド類、プロスタグランジン類、増殖因子、下垂体ホルモン及びペプチドホルモン (S a t o , G . H . 等、「G r o w t h o f C e l l s i n H o r m o n a l l y D e f i n e d M e d i a (ホルモン的に定義された培地における細胞の成長) 」、C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s 社, N . Y . , 1 9 8 2) 、の少なくとも一つから選択される一種以上のホルモンも必要とする。ホルモンの他に、細胞は、生体外での生存及び成長のために、輸送タンパク質、例えば、トランスフェリン（血漿鉄輸送タンパク質）、セルロプラスミン（銅輸送タンパク質）及び高密度リポタンパク質（脂質キャリア）を必要とすることがある。最適なホルモン又は輸送タンパク質の組は、各細胞型ごとに異なる。これらのホルモン又は輸送タンパク質のほとんどは、外生的に添加されるか、又はめったにないことではあるが、特定の因子を必要としない突然変異細胞系が発見された。当業者には、必要以上の実験をおこなうことなく、細胞培養を維持するには他にどのような因子が必要かは、分かるであろう。

【 0 1 4 3 】

植物細胞については、種々のベクターデリバリー法が、当該技術分野において公知である。宿主細胞は、全植物、単離細胞又はプロトプラストの形態ができる。ベクターを植物細胞に導入するための具体的な手順には、アグロバクテリウムを用いた植物形質転換、プロトプラスト形質転換、花粉への遺伝子トランスファー、生殖器官への注射及び未成熟胚への注射などがある。当業者には明らかのように、これらの方法の各々は、異なる利点及び欠点がある。したがって、特定の植物種へベクターを導入する一つの特定の方法は、別の植物種にとっては最も有効ではないことがある。

【 0 1 4 4 】

A g r o b a c t e r i u m t u m e f a c i e n s (アグロバクテリウムツメファシエンス) を用いたトランスファーは、ベクターを全植物組織に導入でき、プロトプラストからの完全な植物の再分化の必要性を回避できるので、植物細胞にベクターを導入するために広く適用できる系である。アグロバクテリウムを用いた発現ベクターを使用して植物細胞にベクターを導入することは、当該技術分野において周知である。この方法では、それらのD N A の一部分 (T - D N A) を宿主細胞にトランスファーして核D N A に一体化することにより、植物をコロニー化するアグロバクテリウムの共通の特徴を利用する。T - D N A は、長さが25塙基対であるボーダー配列により定義され、且つこれらのボーダー配列の間のD N A を、植物細胞にトランスファーすることもできる。T - D N A ボーダー配列の間の組み換え植物ウイルス核酸の挿入により、組み換え植物ウイルス核酸の植物

10

20

30

40

50

細胞へのトランスファーが生じ、そこで組み換え植物ウイルス核酸が複製された後、植物全体に組織的に広がる。

【0145】

全ての植物がアグロバクテリウムについての天然の宿主というわけではないので、プロトプラストの形質転換等の代替法を用いて対象ベクターを宿主細胞に導入してもよい。一定の単子葉植物について、植物プロトプラストの形質転換は、リン酸カルシウム共沈法、ポリエチレングリコール処理、エレクトロポレーション及びこれらの処理の組み合わせに基づく方法を用いて達成できる。

【0146】

プロトプラスト形質転換の他に、パーティクル・ボンバードメントは、本発明によるベクターを植物宿主細胞へ放出するための別の都合のよい方法である。具体的には、植物細胞は、複数の対象ベクターでコーティングした微小粒子を打ち込まれることができる。DNA被覆微小入射粒子を打ち込むことにより、植物及び動物の両方において安定な形質転換体をうまく產生した（例えば、Sanford等（1993）Methods in Enzymology, 217: 483-509参照）。ベクターを植物細胞に導入するのに好適である微小粒子は、典型的には金属、好ましくはタンゲステン又は金で作製される。これらの微小粒子は、例えば、BioRad（例えば、Bio-Rad PDS-1000/He）から入手できる。当業者には、パーティクル・ボンバードメントプロトコールが、パラメータ、例えば、He圧、被覆粒子量、マクロキャリアと停止スクリーンとの間の距離、及び停止スクリーンから標的までの飛行距離を変化させることにより、植物について最適化できることを、当業者は分かるであろう。

【0147】

また、ベクターを、Zhou等、Methods in Enzymology, 101: 433 (1983); D. Hess, Intern Rev. Cytol., 107: 367 (1987); Luo等、Plant Mol. Biol. Reporter, 6: 165 (1988)により記載されているように、花粉に直接DNAトランスファーすることにより植物に導入することもできる。別法として、ベクターを、Pena等、Nature, 325: 274 (1987)により記載されているように植物の生殖器官に注入できる。

【0148】

核酸を植物細胞に導入するための他の方法には、以下のものがある：

(a) ハンド接種。ハンド接種を、セライト又はカーボランダム（通常約1%）を添加した、中性pH、低モル濃度リン酸緩衝液を用いておこなう。試料の1~4滴を、葉の上表面に置き、穏やかに擦る。

(b) 植物床の機械的接種。植物床接種は、葉を切断しながらベクター溶液をトラクター駆動の草刈り機に噴霧（ガス推進）することによりおこなわれる。別法として、植物床を刈り、ベクター溶液を、切斷葉上に直ちに噴霧する。

(c) 単葉の高圧噴霧。また、単一植物接種を、緩衝化ベクター溶液にカーボランダム約1%を含有する狭い定方向噴霧（50psi、葉から6~12インチ）で葉に噴霧することによりおこなうこともできる。

(d) 真空侵入。宿主生物を実質的に真空圧環境において感染を容易にすることにより、接種をおこなうことができる。

【0149】

対象ベクターをクローニング及び発現するのに好適な他の宿主細胞は、原核微生物及び真核微生物、例えば、菌類又は酵母細胞である。これに好適な原核細胞には、グラム陰性生物及びグラム陽性生物を含む細菌が含まれる。この種類の微生物の代表的なメンバーには、腸内細菌科（Enterobacteriaceae）（例えば、大腸菌）、エンテロバクター属（Enterobacter）、エルビニア属（Erwinia）、クレブシエラ属（Klebsiella）、プロテウス属（Proteus）、サルモネラ属（Salmonella）（例えば、ねずみチフス菌（Salmonella typhim

10

20

50

30

40

50

urium))、セラチア属 (Serrati a) (例えば、靈菌 (Serrati a marcescans))、赤痢菌属 (Shigella)、ナイセリア属 (Neisseria) (例えば、髓膜炎菌 (Neisseria meningitidis))だけでなく、バチルス綱 (Bacilli) (例えば、バチルススブチリス (Bacilli subtilis) 及びバチルスリキニホルムス (Bacilli licheniformis))がある。好ましくは、宿主細胞は、発現 *A bus* のタンパク質分解フラグメントの最小量を分泌する。一般的に用いられる菌類 (酵母を含む) 宿主細胞は、*S. セレビジアエ* (*S. cerevisiae*)、クリュイベロミセス・ラクティス (*Kluveromyces lactis* (*K. lactis*))、カンジダ属 (*Candida*) に属する種、例えば、カンジダ・アルビカンス (*C. albicans*)、カンジダ・グラブラー (C. glabrata)、カンジダ・マルトーサ (*C. maltoosa*)、カンジダ・アティリス (*C. utilis*)、カンジダ・ステラトイデア (*C. stellatoidea*)、カンジダ・パラプシローシス (*C. parapsilosis*)、カンジダ・トロピカルス (*C. tropicalis*)、アカパンカビ (*Neurospora crassans*)、アスペルギルス・ニダランス (*Aspergillus nidulans*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*))、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 及びヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) などがある。

【0150】

好適な宿主細胞に導入したら、*A bus* の発現を、当該技術分野において公知の核酸又はタンパク質アッセイを用いて測定できる。例えば、L鎖又はH鎖 (*ScaAbu*) の転写mRNAの存在は、*Abu*ポリヌクレオチドのいずれかの領域に相補的なプローブを用いて、慣用のハイブリダイゼーションアッセイ (例えば、ノーザンプロット分析)、增幅法 (例えば、RT-PCR)、SAGE (米国特許第5,695,397号) 及びアレイ系法 (例えば、米国特許第5,405,783号、第5,412,087号及び第5,445,934号参照) により検出及び/又は定量化できる。

【0151】

また、ベクターの発現は、発現された*Abu*を試験することにより測定することもできる。タンパク質分析について当該技術分野において公知の種々の方法が、可能である。これらには、ラジオイムノアッセイ、ELISA (酵素結合免疫放射測定法)、「サンドイッチ」免疫アッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、インサイツイムノアッセイ (例えば、コロイド金、酵素又は放射性同位元素標識を用いて)、ウェスタンブロッティング分析、免疫沈降アッセイ、免疫蛍光アッセイ及びPAGE-SDSなどがあるが、これらには限定されない。

【0152】

本発明のポリヌクレオチド、ベクター及び宿主細胞の使用：

本発明のポリヌクレオチド及びベクターには、いくつかの特定の用途がある。これらは、例えば、*Sc*と*NscAbus*の両方の産生の発現系に有用である。また、ポリヌクレオチドは、所望のポリヌクレオチドの増幅をおこなうためのプライマーとしても有用である。さらに、本発明のポリヌクレオチドは、ワクチン、診断薬及び薬物等の医薬組成物にも有用である。

【0153】

本発明の宿主細胞は、とりわけ対象のポリヌクレオチドのリポジトリー、ベクター、又はそれらの抗原結合特異性に基づく所望の*Abus*を产生及びスクリーニングするためのビヒクルとして使用できる。

【0154】

したがって、本発明によれば、所望の抗原と免疫反応性である*NscAbu*を同定する方法が提供される。この方法は、以下のステップ：(a) 遺伝学的に種々のレパートリーの*Abus*を準備するステップであって、前記レパートリーが少なくとも一つの対象*Ab*

10

20

30

40

50

uを含む、前記ステップと、(b)前記抗原結合ユニットのレパートリーを前記所望の抗原と接触させるステップと、(c)Abusと前記抗原との間の特異的結合を検出することにより、前記所望の抗原と免疫反応性である前記Abuを同定するステップを含む。

【0155】

Abuが所望の抗原に特異的に結合する能力は、当該技術分野において十分に確立された種々の方法により試験できる。Harlow及びLane(1988)Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Gherardi等(1990)J. Immunol. Meth. 126: 61-68を参照のこと。典型的には、所望の結合特異性を示すAbusは、免疫アッセイ、例えば、標識されたAbusを、固体支持体又は基質上に固定化した抗原と反応させることにより直接検出できる。一般的に、抗原が接着した基質は、免疫アッセイ中に低レベルの非特異的結合を示す物質を用いて調製される。好ましい固体支持体は、以下の種類の物質:プラスチックポリマー、ガラス、セルロース、ニトロセルロース、半導電性物質及び金属、の一つ以上から調製される。好ましくは、基質は、ペトリ皿、クロマトグラフィービーズ、磁性ビーズ等である。

【0156】

このような固相アッセイについて、未反応Abusは、洗浄により除去される。しかしながら、液相アッセイでは、未反応Abusは、濾過又はクロマトグラフィー等のなんからの他の分離法により除去される。抗原を標識Abusに結合した後、結合した標識の量を測定する。この方法の変法に、競合アッセイがある。この方法では、抗原は、最初の結合分子と飽和まで結合させられる。対象Abuの集団を複合体に導入するとき、より高い結合親和性を示すもののみが競合でき、したがって、抗原に結合したままである。

【0157】

別法として、一定の抗原への特異的結合を、セルソーティングにより評価できる。セルソーティングには、所望の抗原を、ソーティングされる細胞上に提示した後、標的細胞を、検出可能な物質にカップリングするAbusで標識し、その後標識した細胞を、セルソーターにおいて未標識のものから分離することが含まれる。最新の細胞分離法は、蛍光標示式セルソーティング(FACS)である。微細流における单一ファイルを移動する細胞は、レーザービームを通過し、蛍光標識Abuにより結合された各細胞の蛍光を、次に測定する。

【0158】

溶離されたAbusの続いての分析では、L鎖及びH鎖のアミノ酸配列を描写するためのタンパク質の配列決定が含まれていてよい。推定されたアミノ酸配列に基づいて、抗体ポリペプチドをコードしているcDNAは、次にPCR、ライブラリースクリーニング、既存の核酸データベースにおけるホモロジーサーチ、又はそれらの組み合わせを含む組み換えクローニング方法により得られることができる。一般的に用いられるデータベースには、GenBank、EMBL、DDBJ、PDB、SWISS-PROT、EST、STS、GSS及びHTGSとがあるが、これらには限定されない。

【0159】

Abuのレパートリーを、ファージ又は細菌粒子上にディスプレイするとき、好ましくは、アフィニティーコロマトグラフィーを用いて選択がおこなわれる。この方法は、典型的には抗原被覆プレート、カラムマトリックス、細胞へのファージAbusのレパートリーの結合、又は溶液中のビオチニル化抗原に結合した後に捕獲することにより進行する。固相に結合したファージ又は細菌を、洗浄した後、可溶性ハブテン、酸又はアルカリにより溶離する。別法として、抗原の濃度を増加することにより、Abusをアフィニティーマトリックスから解離できる。抗原への極めて高い親和性又は結合活性を有する一定のAbusについては、効率的に溶離するには、PCT国際出願公開第WO92/01047号に記載のような高pH又は温和な還元溶液を必要とすることがある。

【0160】

所望の結合特異性を有する結合Abusを回収する際の困難を回避するために、プロテア

10

20

30

40

50

ーゼ切断部位を、A b u s をディスプレイするために用いられる、ヘテロ二量体化配列とファージ被覆タンパク質との間に導入することができる。この目的のための適用できる切断部位には、因子X、トリプシン及びトロンビン認識部位などがあるが、これらには限定されない。ファージレパートリーをアフィニティーマトリックスに結合し且つ非特異的ファージを洗浄した後、所望の親和性を有するA b u s をディスプレイする残存ファージを、切斷部位での消化に好適な条件下でプロテアーゼで抗原アフィニティーマトリックスを洗浄することにより、採集することができる。このような消化により、ファージ粒子からA b u s が放出される。

【 0 1 6 1 】

上記の方法の別法では、強力に結合したファージ又は細菌粒子を保持したアフィニティーマトリックスを採取し、それらの核酸を、例えば、S D S 溶液における沸騰により抽出する。抽出した核酸を使用してE . c o l i 宿主細胞を直接形質転換してもよいし、又は抗体コード配列を、好適なプライマーを用いたP C R により増幅できる。

【 0 1 6 2 】

選択の効率は、いくつかの因子の組み合わせ、例えば、洗浄中の解離の動力学、及び単一ファージ又は細菌上の複数のA b u s が固体支持体上の抗原に同時に結合することができるかどうかに依存しやすい。例えば、速い解離速度（及び弱い結合親和性）を有する抗体は、短い洗浄、多価のディスプレイ、及び固体支持体での抗原の高コーティング密度を使用することにより保持しなければならない。逆に、低解離速度（及び良好な結合親和性）を有するA b u s を選択するには、長時間洗浄、一価ファージ及び抗原の低コーティング密度を使用することが好ましい。

【 0 1 6 3 】

必要に応じて、A b u s のレパートリーを、無関係抗原に対して予備選択して望ましくないA b u s を対向選択することができる。また、レパートリーを、関係のある抗原に対して予備選択して、例えば、抗イディオタイプA b u s を単離することができる。

【 0 1 6 4 】

対象A b u レパートリーにより、所望の特異性を有するA b u s を迅速に単離できる。単離されたA b u s の数多くのものは、慣用のハイブリドーマ又は遺伝子組み換え動物技術により得ることは困難又は不可能であると思われる。

【 0 1 6 5 】

本発明のベクターを含むキット

本発明には、本発明のベクターを好適なパッケージング中に含むキットも含まれる。本発明によるキットには、本明細書に記載の獨特のヘテロ二量体化配列対の対による親和性により再構成されたA b u s の生成が可能であるものが含まれる。

【 0 1 6 6 】

各キットは、必ずベクターの宿主細胞へのデリバリーを可能にする試薬を含む。ベクターのデリバリーを容易するのに選択される試薬は、使用される特定のトランスフェクション法又は感染法によって異なることがある。また、キットは、A b u s の検出のための標識ポリヌクレオチドプローブ又はタンパク性プローブを生成するのに有用な試薬も含有できる。各試薬は、固体の形態で供給してもよいし、又は在庫貯蔵に好適であり、且つあとで実験をおこなうときに交換したり、反応培地に添加したりするのに好適である緩衝液に溶解／懸濁して供給できる。好適なパッケージングが提供される。キットは、必要に応じて手順に有用であるさらなる成分を提供できる。これらの任意成分には、緩衝剤、捕獲剤、展開試薬、標識、反応表面、検出手段、対照試料、説明書及び説明用情報などがあるが、これらには限定されない。

【 0 1 6 7 】

本発明によるA b u s 、ポリヌクレオチド、ベクター及び宿主細胞の開発及び使用について、以下の実施例セクションにおいてさらに説明する。これらの実施例は、当業者が実施するための指針として提供されるものであり、いかなる方法によっても本発明を限定しない。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0168】

非一本鎖抗原結合ユニットの構築：コイルドコイル Fv (c c Fv)

上記したように、Fv フラグメントは、全抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。重鎖及び軽鎖 (VH 及び VL) の 2 つの可変領域からなる Fv は、Y 字状免疫グロブリン分子の「上」先端に位置している。Fv フラグメントは、これら 2 つの VH フラグメント及び VL フラグメントの間の相互作用エネルギーが極めて低く、生理学的条件では、数多くの用途にとってはしばしば不安定すぎる。天然の免疫グロブリン（例えば、IgG）では、定常ドメイン CH1 及び CL に位置している鎖間ジスルフィド結合を使用して、VH 及び VL を連結する。この結合により、分子量 50 kDa の安定化抗原結合フラグメント Fab が形成される。VH フラグメント及び VL フラグメントは、一つのフラグメントのカルボキシル末端と、別のフラグメントのアミノ末端との間に、短ペプチドリンカーにより一緒に人工的に保持されて、一本鎖 Fv 抗体フラグメント (scFv) を形成することもできることが判明した。scFv 抗原結合ユニットは、Fab のサイズの半分しかない。しかしながら、ある種の scFv タンパク質も、不安定である。scFv におけるポリペプチドリンカーは、ある場合において結合を妨害することがある。また、鎖間ジスルフィド結合は、VH 及び VL におけるフレームワーク領域に導入されてジスルフィド安定化 Fv (dsFv) が形成された。dsFv 配置も、著しい制限がある。2 つの Cys 残基を抗原結合可変領域へ導入することにより、VH 又は VL における鎖内ジスルフィド結合を変化させることがあり、したがって、抗原結合が妨害されることがある。

10

20

30

40

【0169】

本発明者等は、VH と VL のヘテロ二量体を安定化させる新規な方法を考え出した。本発明者等は、独特のヘテロ二量体化配列対を設計し、使用して Fab 様機能性人工 Fv フラグメント、すなわち、コイルドコイル Fv フラグメント (c c Fv) を生成した。ヘテロ二量体化対は、ヘテロ二量体性受容体 GABA_A 受容体 1 及び 2 に由来する。配列の対は、コイルドコイル構造を形成し、GABA_A-R1 受容体及び GABA_A-R2 受容体の機能的ヘテロ二量体化を仲介する。

【0170】

Fos タンパク質及び Jun タンパク質からの先に特徴付けされたコイルドコイルロイシンジッパーとは区別される、GABA_A-R1 受容体及び GABA_A-R2 受容体の C 末端コイルドコイルは、生理学的条件下（例えば、生体内）では検出可能なホモ二量体を形成しないだけでなく、生理学的体温でホモ二量体を形成しない。Kuner 等及び White 等 (*Science* (1999) 283 : 74 - 77); *Nature* (1998) 396 : 679 - 682)) による研究から、生体内における GABA_A-R1 及び GABA_A-R2 のヘテロ二量体化特異性が明らかとなった。実際に、White 等は、このヘテロ二量体性受容体対の排他的特異性に基づいて酵母細胞から GABA_A-R2 をクローニングすることができた。上記 Kammerer 等による生体外での研究から、GABA_A-R1 C 末端配列も GABA_A-R2 C 末端配列も、生理学的体温でアッセイしたときに生理学的緩衝条件においてホモ二量体を形成できないことがわかった (Kammerer の表 1 参照)。しかしながら、GABA_A-R2 遺伝子の最初の分離及びコイルドコイル配列の特徴付けに関与したこれらの研究者のだれも、抗原結合ユニット等のヘテロ多量体の構築にこの独特的ヘテロ二量体化配列を使用することは、記載していないし、示唆していない。

【0171】

本発明者等は、フレクソン「Ser Arg Gly Gly Gly Gly」を GR1 ドメイン及び GR2 ドメインのアミノ末端に付加することにより、GR1 ドメイン及び GR2 ドメインのカルボキシル末端を修飾して V 領域にさらなるフレキシビリティを付与した。さらに c c Fv を安定化するために、c c Fv をさらに安定化するために本発明者等は、コイルドコイルの C 末端に「Val Gly Gly Cys」スペーサーを付加することにより、1 対のシステイン残基を導入した。GR1 ドメイン及び GR2 ドメインは、それぞれ VH

50

フラグメント及びV L フラグメントのカルボキシル末端に融合する。V H - G R 1 融合及びV L - G R 2 融合を、大腸菌（E . c o l i ）で発現させ、ファージによりディスプレイした。図10及び図11に示すように、平行コイルドコイルらせんにより安定化された機能性ヘテロ二量体性c c F v A b u sを、生成した。コイルドコイルヘテロ二量体化配列はC H 1 ドメイン及びC L ドメインのサイズのほぼ半分であるので、c c F v（約35kDa）は、慣用のF a b フラグメント（約50kDa）よりも小さい。サイズが小さいので、c c F vとその誘導体は、腫瘍及び組織侵入等の臨床用途においてより有用である可能性がある。c c F vのより効率的な発現及び表示が、予想される。さらに、独特のヘテロ二量体化配列の対による親和性によるV H 領域及びV L 領域の特異的集合により、強固な多種多様なA b sのレパートリーの構築がより実現可能となる。

10

【0172】

材料及び方法：

細菌及びファージの株：大腸菌（E s c h e r i c h i a c o l i ）T G 1 (s u p E (h s d M - m c r B) 5 (r k ^ m k ^ M c r B ^) t h i (l a c - p r o A B / F ' t r a D 3 6 , L a c 1 ^ { q } (l a c Z) M 1 5] を、プラスミドDNA及びファージの產生に使用した；Phamersham Pharmacia Biotech社製K O 7 ヘルパー ファージ及びH R P 結合抗M 1 3 抗体；Stratagene社製p b l u e s c r i p t S K (+)；Santa Cruz Biotechnology社製抗H A 抗体。

20

【0173】

実施例1：ベクターの構築

p A B M X 1 ベクター及びp A B M X 2 ベクター：

ファージミドディスプレイベクターp A B M X 1 及びp A B M X 2 を、p b l u e s c r i p t S K (+)から得た。独特のA g e I 制限部位を、一組のプライマーを用いたP C R 系部位指定突然変異誘発により、l a c プロモーターのすぐあとに導入し(p B S - S K a : 5 ' G G A A T T G T G A G C G G A T A A C A A T T A C C G G T C A C A C A G G A A A C A G C T A T G A C C A T G - 3 ' 及びp B S - S K b 5 ' C A T G G T C A T A G C T G T T C C T G T G A C C G G T A A A T T G T T A T C C G C T C A C A A T T C C - 3 ')、そしてX h o I 部位及びK p n I 部位を、切断及び平滑末端ライゲーションにより欠失させた。その後、5 ' にA g e I 部位及び3 ' にB g l I I / E c o R I 部位と隣接し、T 7 ファージ遺伝子10からの翻訳エンハンス配列E P (T T A A C T T T A)、リボソーム結合配列S / D (T A A G G A G G)、H i n d I I I 部位を有するf d ファージ遺伝子8リーダー配列(p A B M X 1について、A T G A A A A A G T C T T A G T C C T C A A A G C C T C C G T A G C C G T T G C T C C C T C G T T C C G A T G C T A A G C T T C G C T)又はp e l B リーダー配列(p A B M X 2について、A T G A A A T A C C T A T T G C C T A C G G C A G C C G C T G G A T T G T T A T T A C T C G C G G C C C A G C C G G C C A T G G C G)及びH A - (H i s)₆ - タグ(D H タグ)(T A T C C A T A C G A C G T A C C A G A C T A C G C A G G A G G T C A T C A C C A T C A T C A C C A T T A G)を含む合成DNAフラグメントを、修飾p b l u e s c r i p t S K (+)にクローニングした。得られたベクターを、p A B M X 1 及びp A B M X 2 と命名する(制限マップ及び配列については、図3A～3B参照)。N s c A b u s 等のヘテロ多量体をコードしている異種配列を、さらにこれらのベクターにサブクローニングして、ペリプラスム発現させた。

30

【0174】

p A B M D 1 ベクター及びp A B M D 2 ベクター：

B g l I I 部位とS a l I 部位を両側に有するP C R 増幅f d 遺伝子I I I (又は遺伝子3) フラグメントを、p A B M X 1 ベクター及びp A B M X 2 ベクターに挿入した(図4参照)。ディスプレイされるべき異種配列を、リーダー配列の後に挿入できる。l a c プロモーターは、p I I I キャプシド融合の発現を推進し、これを次に、K O 7 等のヘルパー ファージによる重複感染後にファージ表面にディスプレイできる。

40

50

【0175】

PABMX5ベクター及びpABMX6ベクター：

これらの2つのベクターを、pABMX1及びpABMX2から得た。5'でXbaI/AscI部位、3'でMluI/XhoI/NotI部位と隣接し、リボソーム結合配列S/D(TAAGGAGG)及び遺伝子3リーダー配列(ATGAAAAATTATT ATTCTGCATTCCCTTAGTTGTTCCCTTCTATTCTCACCTCC GCT)を含む合成DNAフラグメントを、XbaI/NotI部位によりpABMX1及びpABMX2に挿入した。その後、GR1ドメインコード配列(図2)をXbaI/AscI部位にサブクローニングし、GR2ドメインコード配列(図2)をXhoI/NotI部位に挿入した。その後、VHドメインとVLドメインを、それぞれGR1配列及びGR2配列の前に挿入した。ベクターpABMX5及びベクターpABMX6の概略を、図5Aとして示す。これらのベクターは、一つのlacプロモーターの下に2種のタンパク質VH-GR1及びVL-GR2を発現する。

【0176】

pABMD5ベクター及びpABMD6ベクター：

ベクターpABMX5及びベクターpABMX6からのccFvDNAフラグメントを、pABMD1及びpABMD2にサブクローニングしてベクターpABMD5及びベクターpABMD6を得た(制限マップ及び配列については、図6A及び図6B参照)。これらのベクターは、2種のタンパク質であるVH-GR1融合タンパク質とVL-GR2-pIII融合タンパク質を発現する。発現されたVH-GR1融合タンパク質及びVL-GR2-pIII融合タンパク質を、ペリプラスムスペースに分泌し、ここで二量体化がコイルドコイルドメインヘテロ二量体化を介しておこる。次に、集合したAbuを、K07等のヘルパーファージの重複感染によりファージ表面にディスプレイする。

【0177】

実施例2：機能性ccFvの発現

抗体AM1からの抗体可変ドメインを、ccFvフラグメントを発現させるためにpABMX6ベクターにサブクローニングした。次に、このベクターを、TG1細胞又はBL21細胞に導入した。単一コロニーからの約100g/mlカルベニシリン及び0.1%グルコースを含有する500ml2YTにおいて、形質転換したバクテリアを、37度OD₆₀₀=0.7(ほぼ)まで増殖させた。1mM IPTGを、30における4時間の誘導のために添加した。細菌ペレットを、ペリプラスム及び浸透圧ショック調製物のために集めた。ペレットを、Sigma社製の1.25mlのタンパク質分解酵素抑制剤混合物を含有する12.5mlのPPB緩衝液(200mg/mlスクロース、1mM EDTA、30mM Tris-HCl、pH8.0)に再懸濁し、20分間氷上に置いた。上清を、回転により集めた。得られたペレットを、5mM MgSO₄に再懸濁し、氷上で20分間インキュベーションした。MgSO₄及びPPB上清を混ぜ、PBSに対して透析した。Ni-NTAカラム1mlに加えた後、His-タグタンパク質を、350mMイミドゾールによる溶離により精製した。図10Aは、精製したccFvが非還元ゲル上で35kDaの電気泳動移動度を有することを示す。還元条件下で分析したとき、VL及びVHに相当する2つのサブユニットを観察した。上のバンドは、ウエスタンブロッティング解析によりVL-His-タグ融合として確認した。

【0178】

可溶性AM1-ccFvの結合特異性を測定するために、ELISAアッセイを実施した。AM1抗原(0.2~1ug/ウェル)で、ELISAプレート上をコーティングして、4度一晩おいた。5%ミルク/PBSプロッキング後、5%ミルク/PBS中の抗体溶液をELISAプレートに添加し、室温で1~2時間インキュベーションした。未結合Absを、洗浄除去した。図10Bは、AM1-ccFvのその抗原への特異的結合を示す。対照は、PBSにミルクを5%添加したものを含有する。この結果から、コイルドコイルGABA_BR1/R2ヘテロ二量体化配列による、機能的ccFvの集合が確認される。

【0179】

実施例3：機能的c c F vのディスプレイ

遺伝学的パッケージによる抗体のディスプレイは、大きなライブラリーから特異的A b uを濃縮し且つ分離するための強力なツールである。c c F vがファージディスプレイシステムにおいて利用できるかどうかを解析するために、本発明者等は、AM1抗体のc c F v遺伝子をpABMD6ベクターにサブクローニングすることにより、ファージミドベクターを構築した。ファージミドベクターを担持するTG1細胞を、KO7ヘルパー・ファージにより重複感染した。感染したTG1細胞を、2×YT/Amp/Kan中、30度で一晩成長させた。ファージミド粒子を、PEG/NaClにより、培養上清から2回沈殿させ、PBSに再懸濁させた。ファージ上にディスプレイさせた抗体を、ファージELISAアッセイを用いて抗原結合活性により検出した。すなわち、抗原で、まずELISAプレート上をコーティングした。5%ミルク/PBSブロッキング後、ファージ溶液を、ELISAプレートに添加した。抗原に結合したファージを、HRP結合抗M13抗体とともにインキュベーションすることにより、検出した。基質ABTS[2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)]を使用して、HRP活性を測定した。また、抗HAタグ抗体を使用して、ファージ粒子上に表示したタンパク質を検出した。抗HA抗体で、96ウエルプレート上をコーティングした(各ウエルあたり2ug)。ELISAプレートをコーティングした抗HA抗体に結合したファージを、HRP結合抗M13抗体により検出した。

10

20

【0180】

また、c c F v及びs c F vのファージディスプレイを比較するために、一本鎖抗体ファージも調製した。図11A及び図11Bに示すように、c c F vファージの結合能は、慣用のs c F vファージに匹敵する。一定のc c F v発現ファージについては、それらの結合能は、慣用のs c F vを発現するファージよりもほとんど一桁大きい(図11B)。したがって、c c F vは、ファージ粒子上にディスプレイされた場合であっても機能性A b uである。

【0181】

一本鎖抗原結合ユニットの発現：

実施例4：慣用のs c F vの発現

AM2-s c F vを、可溶性発現ベクターpABMX1の Hind III / Not I部位にサブクローニングした。ペリプラスム調製物を、上記で概説したようにして実施した。NI-NTAカラムから精製した30kDaの抗体タンパク質を、SDS-PAGE分析により確認し、ELISAを用いてその抗原結合特異性について試験した。AM2抗原を、最初にELISAプレートを、0.2ug/ウェルの濃度でコーティングした。種々の量のAM2-s c F vフラグメントを、抗原とともにインキュベーションした。結合AM2-s c F vフラグメントを、抗HA-タグ抗体により検出した。実験により、AM2-s c F vのそのAM2抗原への用量依存的結合が明らかとなった(図8)。

30

【0182】

実施例5：ファージ上での慣用のs c F vのディスプレイ

AM2-s c F vフラグメントを、まずファージミドベクターpABMD1のHind III / Not I部位にサブクローニングした。このファージミドベクターを担持しているTG1細胞を、ヘルパー・ファージKO7により感染させた。ファージを、上清から精製した。続いて、ファージELISAアッセイをおこなって、ファージ粒子上にディスプレイされたAM2-s c F vを検出した。コートpIII遺伝子はHA-タグで標識されているので、融合は、抗HA抗体で検出できる。AM2抗原及び抗HA抗体を用いたELISAアッセイにより、ディスプレイされたs c F vが対応の抗原に特異的に結合できることが確認された(図9)。対照は、HA標識されていない無関係抗体を表示するファージが含む。

40

【0183】

真核細胞における対象抗原結合ユニットの発現：

50

実施例 6 : 酵母における c c F v の発現

対象ヘテロ二量体化配列に連結した V L 配列と V H 配列の両方を担持している酵母ベクター p A M E X 7 を、構築する。コンピテント酵母細胞、例えば、A H 1 0 9 細胞、を調製し、当該技術分野において公知の方法で p A M E X 7 ベクターで形質転換する。形質転換された酵母細胞を、タンパク質の発現に好適な条件下で培養する。このような条件は、当業者には周知であり、したがって、ここでは詳細には説明しない。発現された c c F v A b u s を、当該技術分野において公知の慣用の方法及び/又は本明細書に記載の方法を用いて採取する。収穫した c c F v の抗原結合能を、上記したプロトコールにしたがって E L I S A により測定する。

【 0 1 8 4 】

10

所望の結合特異性を示す c c F v ファージの濃縮及び同定 :

実施例 7 : モデルライブラリーからの A M 2 - c c F v ファージの濃縮

所望の結合特異性を有する c c F v 表示ファージをバックグラウンドファージから選択し且つ最終的に濃縮できることを示すために、モデルライブラリーからの A M 2 - c c F v ファージのパンニングをおこなった。A M 2 - c c F v ファージを関係のない A M 1 - c c F v ディスプレイファージと 1 : 1 0⁶ 又は 1 : 1 0⁷ の比で混合することにより、モデルライブラリーを調製した。N u n c Max i s o r b 9 6 ウエルプレートをコーティングした特異的タンパク質抗原に対してライブラリーのパンニングを、2 ラウンドおこなった。P B S にミルクを 5 % 添加したものでブロッキングした後、2 % ミルク / P B S に 1 X 1 0¹² ライブラリーファージを添加したものを、ウエルに添加し、室温で 2 時間インキュベーションした。次に、ファージ溶液を捨て、ウエルを P B S T (P B S に T w e e n - 2 0 を 0 . 0 5 % 添加) で 5 回洗浄し、P B S で 5 回洗浄した。結合ファージを、1 0 0 m M トリエチルアミンで溶離し、T G 1 培養に添加して感染させた。感染 T G 1 細胞から調製したファージを、次のラウンドのパンニング、及び A M 2 - c c F v の固定化タンパク質抗原に対する E L I S A に使用した。各ラウンドのパンニングの後、A M 1 - c c F v ではなく (P C R 産物ではない) 、A M 2 - c c F v のみについて特異的に設計 (約 1 k b P C R 産物のバンドは、1 % アガロースゲル上で可視化できた) した 1 対のプライマーを介して、ランダムに選んだクローンの P C R 解析を行ない、A M 2 - c c F v ファージのバックグラウンドファージ A M 1 - c c F v ファージに対する比も測定した。図 2 0 に示すように、A M 2 - c c F v の固定化タンパク質抗原に対する E L I S A を実施した。第二ラウンドのパンニングからのファージでは、第一ラウンドに比較してはるかに高い O D 4 0 5 読み取り値が得られた。このことは、A M 2 - c c F v ファージがうまく選択され、パンニング中に濃縮されたことを示唆している。図 2 1 に示す P C R 分析は、ランダムに選んだクローンの P C R 産物からの 1 % アガロースゲルイメージを示す。得られた結果から、A M 2 - c c F v ファージの発生率が、第一ラウンドのパンニング後の 1 : 1 0⁷ ライブラリーから 4 . 4 % であるのに対して、第二ラウンドのパンニング後では、発生率が 1 0 0 % に達したことが分かった。

20

30

30

【 0 1 8 5 】

40

実施例 8 : 機能的 c c F v をディスプレイするファージライブラリーを用いたライブラリースクリーニング

多数の A b u s を有するファージライブラリー (これらの全ては、所望の抗原に結合できるが、各 A b u は、臨界的結合ドメインの一定領域において異なる) をスクリーニングすることにより、さらに高い親和性を有する抗体を同定し且つさらに設計することができる。c c F v を抗体ライブラリースクリーニング用のビヒクルとして効率的に使用できることを示すために、本発明者等は、c c F v のフォーマットで A M 2 のライブラリーを構築した。A M 2 のフレームワーク構造は、V H 領域と V L 領域とから構成されていた。各々を、上記したようなベクター p A B M D 6 の対応する位置にサブクローニングした。すなわち、V H を G R 1 の N 末端に、V L を G R 2 の N 末端にそれぞれ連結した。次に、c c F v 抗体フラグメントをファージ粒子の表面にディスプレイするために、G R 2 を p I I I に融合した (例 1 、 3 及び 7 参照) 。ファージを選択するために (c c F v ファージラ

50

イブライアーパンニングを介した高い親和性バインダー)、VHのCDR3を、複数の位置に複数の選択残基を含むライブラリーとして構築した。このライブラリーは、両末端での変性DNAオリゴフランキング制限部位の標準合成により、PCR増幅及び制限消化後のAM2のその位置にサブクローニングができるよう調製した。図22は、変性DNAオリゴ、その増幅プライマー及び方向の設計を示す。ライブラリーの多様性については、合計約 1×10^6 種であるように設計した。ライゲーション後、ライブラリーを、TG1コンピメント細胞に、エレクトロポレーションした。次に、ライブラリーのファージ粒子を、上記した例で述べたようにして集める前に形質転換体を収穫し、レスキューした(KO7ヘルパーファージにより)。ライブラリーを「パン」するために、組み換え抗原を、4で一晩、0.05M NaHCO₃ pH 9.6緩衝液中でNunc Maxisorb 96ウェルプレート上に固定化した。ミルク2%を含有するPBS緩衝液で希釈した 10^{12} ファージ粒子を含有するライブラリーファージのアリコットを、抗原でコーティングしたウェルに添加した。37で2時間インキュベーションした後、ウェルを洗浄し、ファージを実施例3及び実施例7で記載したようにして溶離した。溶離したファージを使用してTG1細胞を感染させた後、KO7ヘルパーファージによりレスキューした。30で一晩成長させた後、ファージを、TG1細胞で増幅し、次のラウンドのパンニングのために収穫できるようにした。事前の実験では、解離速度 K_{off} は、その特定の抗体の親和性に最も顕著に寄与するのに対して、 K_{on} は比較的一定であることが分かった。したがって、高結合親和性を有するファージを選択するために、生存ファージを選択するために長時間洗浄する方法であるオフレートパンニングを設計して、より低速の K_{off} を有するファージを特異的に選択した。このライブラリーのために、合計7ラウンドの連続パンニングをおこなった。

【0186】

第5ラウンドのパンニング及び第7ラウンドのパンニング後に、個々のクローンをランダムに選んで、ファージパンニングにおいて同じタンパク質抗原を用いて、ELISA用のファージを調製した。ELISAは、上記実施例7に記載の手順に準じて、96ウェルマイクロタイープレートを用いておこなった。図23に示すように、第5ラウンド及び第7ラウンドで選択された全てのクローンは、抗原との反応が陽性であった。但し、負の対照は、第5ラウンドの位置H10、H11、H12及び第7ラウンドの位置H11、H12に設定した。これらの全ては、0.05OD₄₀₅未満であった。

【0187】

次に、第7パンニングのELISAにおいて陽性の反応性を示したクローンを、配列決定用にランダムに選び、VHのCDR3上の残基を、図24にマッピングした。次に、ライブラリーにより標的とされた位置上のコンセンサスを、同定した。コンセンサス配列を表すクローン及び野生型(オリジナルAM2)のタンパク質発現をおこない、続いてタンパク質を、BiaCore(表面プラズモン共鳴)を用いて固定化タンパク質抗原との結合におけるそれらの K_{off} を測定するのに使用した。図25に示すように、ライブラリーから選択されたAM2変異体は、顕著により遅い K_{off} を示す。

【図面の簡単な説明】

【0188】

【図1】種々の抗原結合ユニットを示す概略図である。

【図2】対象Abusを構築するのに使用したGABAAB受容体1及びGABAAB受容体2のスクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す；コイルドコイル配列は、ヒトGABA_B-R1受容体及びGABA_AB-R2受容体由来のものである；GABA_AB受容体1からのコードアミノ酸配列は、図2の上のパネルに示すように、EEKSから始まり、QLQSで終わる；GABA_AB受容体2からのコードアミノ酸配列は、図2の下のパネルに示すように、TSRLから始まり、QLQDで終わる；フレキシブルSerArgGlyGlyGlyGlyスペーサーを、R1とR2のヘテロ二量体化配列のアミノ末端に付加して機能的Fvヘテロ二量体が形成するようにした；このヘテロ二量体をさらに安定化するために、本発明者等は、ValGlyGlyCysスペーサーを導入して、ヘテロ二量体性コ

10

20

30

40

50

イルドコイル対をシステイン残基の間のジスルフィド結合を介してロックした（配列番号（SEQ ID NO）：2 及び配列番号（SEQ ID NO）：4）；GGGGスペーサーのN末端でのSer Arg コード配列により、GR1（GABA_B受容体由来のヘテロ二量体化配列）ドメイン及びGR2（GABA_B2由来のヘテロ二量体化配列）ドメインのそれぞれVHフラグメント及びVLフラグメントのカルボキシル末端への融合のためのXbaI部位又はXhoI部位が得られる。

【図3A】2つの発現ベクターpABMX1及びpABMX2の概略図である；pABMX1とpABMX2の両方は、抗生物質選択用アンピシリン耐性遺伝子（Amp）、複製のプラスミドオリジン（colE1 ori）、複製のf1ファージオリジン（f1 ori）及びlacプロモーター/lacO1推進タンパク質発現カセット（pABMX1について、p lac-RBS-p8リーダー-DHタグ、pABMX2について、p lac-RBS-pe1Bリーダー-DHタグ）を含むpblue script SK (+)由来のものであった；異種配列を、DH-タグ（HA及び6xHis tag）融合タンパク質として発現させ、シグナルペプチド（p8リーダー又はpe1Bリーダー）により、リーダー配列が切断されるペリプラスミドスペースに方向づける。
10

【図3B】pABMX1及びpABMX2のAge I部位とBgl II部位との間のlacプロモーターの後の配列（配列番号（SEQ ID NO）：5～8）を示す； Hind III/Xba I部位又はHind III/Not I部位又はXba I/Not I部位を使用して、pABMX1ベクターで発現される異種配列を挿入することができる；pABMX2ベクターに含まれるさらなるクローニング部位は、Nco I、Pst I、Xba I及びNot Iである。
20

【図4A】抗原結合ユニットをディスプレイするのに有用であるファージミドベクターpABMD1及びpABMD2の概略図である；pABMD1及びpABMD2は、それ respective pABMX1及びpABMX2に由来するものであった；これらは、pABMX1ベクター及びpABMX2ベクターの機能的要素の全て並びに纖維状ファージのpIII遺伝子を含む；pIII遺伝子を、DH-タグの3'端にすぐに隣接している位置に挿入した；lacプロモーターは、pIIIキャブシド融合タンパク質としての異種配列の発現を推進し、次にKO7（Amersham Pharmacia Biotech社）又はR408ヘルパーファージ（Stratagene社）等のヘルパーファージの重複感染によりファージ粒子上にディスプレイする；また、このベクターを非サブレッサー細菌の菌株における可溶性タンパク質の発現に使用できる。
30

【図4B】pABMD1及びpABMD2のAge I部位とSal I部位との間のlacプロモーターの後の配列（配列番号（SEQ ID NO）：9～12）を示す。

【図5A】ベクターpABMX5及びベクターpABMX6の概略図である；pABMX5及びpABMX6は、それ respective pABMX1及びpABMX2に由来するものであった；異なるリーダー配列を、pABMX5及びpABMX6に組み込んだ；異種配列の挿入用サブクローニング部位（例えば、VH遺伝子）も、これらの2つのベクターにおいて異なる；pABMX5は、p8リーダーを含み、pABMX6は、pe1Bリーダーを含む；lacプロモーターを用いる2つのタンパク質発現カセットを、これらの2つのベクターに組み込んだ；第一のカセットを使用してVH-GR1（GABA_B受容体1のVH-ヘテロ二量体化配列）を発現し、第二のカセットを使用してVL-GR2（GABA_B受容体2のVL-ヘテロ二量体化配列）を発現する；DH-タグをGR2ドメインに融合して、得られたヘテロ二量体の精製を容易にした。
40

【図5B】pABMX5ベクター及びpABMX6ベクターにおけるリーダー配列とDH-タグとの間の配列（配列番号（SEQ ID NO）：13～16）を示す；さらに、リボソーム結合部位、DH-タグ、VH、VL、GR1及びGR2の挿入のためのサブクローニング部位も示す。

【図6A】ファージ粒子上にccFvを発現及びディスプレイするのに有用であるファージミドベクター、pABMD5及びpABMD6の概略図である；pABMD5及びpABMD6は、それ respective pABMX5及びpABMX6に由来するものであった。纖維状フ
50

アージに由来する p I I I 遺伝子を、 D H - タグのすぐ後に挿入した； V L - G R 2 タンパク質を、 p I I I キャプシドタンパク質に連結して c c F v ヘテロ二量体のディスプレイを容易にした。

【図 6 B】 p A B M D 5 ベクター及び p A B M D 6 ベクターについての、リーダー配列と p I I I との間の配列（配列番号（SEQ ID NO）：17～20）を示す；さらに、リボソーム結合部位、 D H - タグ、部分的 p I I I 、 V H 、 V L 、 G R 1 及び G R 2 の挿入のためのサブクローニング部位も示す。

【図 7】酵母において c c F v フラグメントを発現するのに有用なベクター p A M E X 7 を示す。

【図 8】 p A B M X 1 ベクターにより発現された A M 2 - s c F v フラグメントを用いた E L I S A アッセイの結果を示す；これらの結果は、用量依存的な A M 2 - s c F v のその抗原 A M 2 への結合を示す。 10

【図 9】ファージ粒子上にディスプレイされた A M 2 - s c F v フラグメントを用いた E L I S A アッセイの結果を示す；これらの結果は、ファージミドベクター p A B M D 1 を用いてファージ粒子上に機能的 s c F v フラグメントが集合したことを示す。

【図 10 A】還元条件下及び非還元条件下で大腸菌（E. coli）中で発現された A M 1 - c c F v の S D S - P A G E 解析の結果を示す；得られた結果は、大腸菌（E. coli）中でヘテロ二量体性 c c F v がうまく発現し且つ集合したことを示す。

【図 10 B】大腸菌（E. coli）中で発現された可溶性 A M 1 - c c F v を用いた E L I S A アッセイの結果を示す；これらの結果は、対応の抗原に対する予想される結合特異性を有する機能性 c c F v がうまく集合したことを示す。 20

【図 11 A】 A M 1 - c c F v 発現ファージの抗原結合能と A M 1 - s c F v 発現ファージの抗原結合能の比較を示す；得られた結果は、 A M 1 - c c F v フラグメントを表示するファージ粒子は、慣用の s c F v フラグメントをディスプレイするファージよりも、結合能がわずかに高いことを示す。

【図 11 B】 A M 2 - c c F v 発現ファージの抗原結合能と A M 2 - s c F v 発現ファージの抗原結合能の比較を示す；得られた結果は、 A M 2 - c c F v フラグメントをディスプレイするファージ粒子の結合能は、 A M 2 - s c F v 発現ファージの結合能よりもほぼ一桁大きいことを示す。

【図 12】各々が一つ以上の塩基性 c c F v ユニットを含む 3 つの多価 A b u 配置を示す。 30

【図 13】各々が塩基性 c c F v ユニットと s c F v フラグメント又は d s F v フラグメントとを含む、 4 つの 2 価 A b u 配置を示す。

【図 14】各々が一つ以上の塩基性 c c F v ユニットと、一つ以上の s c F v フラグメント又は d s F v フラグメントとを含む、 3 つの 3 価 A b u 配置を示す。

【図 15】各々が別個の結合特異性を有する一つ以上の塩基性 c c F v ユニット及び / 又は s c F v フラグメント又は d s F v フラグメントを含む、 4 つの二重特異性 A b u 配置を示す。

【図 16】 3 つのさらなる二重特異性 A b u 配置を示す。

【図 17】各々が少なくとも一つの塩基性 c c F v ユニットと、少なくとも一つの s c F v フラグメント又は d s F v フラグメントとを含む、 3 つの三重特異性 A b u 配置を示す。 40

【図 18】ヘテロ二量体化配列を平行配置又は逆平行配置に配置した、 2 つの典型的な单一 A b u s を示す。

【図 19】原核細胞又は真核細胞の表面上にディスプレイされる c c F v の概略図である；一番上のパネルは、宿主細胞の表面に付着したファージ粒子によりディスプレイされた c c F v を示す。

【図 20】「モデルライブラリー」のパンニングからの A M 2 についての固定化タンパク質抗原を含む E L I S A を用いた「モデルファージライブラリー」のパンニングの結果を示す；「モデルライブラリー」は、 A M 2 - c c F v ファージと、関連のないファージで 50

ある AM 1 - c c F v とのそれぞれ $1 : 10^6$ 及び $1 : 10^7$ の比の混合物を含有していた ; AM 2 - c c F v 反応性のみを検出したので、ELISA の読み取り値は、混合物における AM 2 - c c F v の集団を表す ; 第一ラウンドのパンニングの後、ELISA シグナルは検出されなかった ; このことは、混合物に存在する AM 2 - c c F v 画分がまだ低いことを示している ; しかしながら、2 ラウンドのパンニング後、測定された AM 2 - c c F v 画分が、ELISA シグナルが劇的に増加したことから明らかなように優勢になった。

【図 21】図 12 に示すモデルライブラリーのパンニングを用いた AM 2 - c c F v の濃縮を PCR 解析により確認した結果を示す ; パンニングの前に、一つの AM 2 - c c F v ファージが、 10^7 個の関係のないファージごとに検出された (0.00001%) ; 第一ラウンドのパンニング後、AM 2 - c c F v の発生は 4.4 % に達し、そして第二ラウンドのパンニング後には 100 % に達した。 10

【図 22】AM 2 - c c F v の VH (重鎖) の CDR3 の設計を示す ; 変性 DNA オリゴを、2 つのサブクローニング制限部位に隣接した 2 つの PCR プライマーにより増幅した ; オリゴを、まず PCR で増幅し、続いてサブクローニングして AM 2 - c c F v の VH の野生型 CDR3 を置き換える前に制限消化した。

【図 23】第 5 (上パネル) パンニング及び第 7 (下パネル) パンニングからランダムに選んだ個々のクローンからの AM 2 - c c F v ファージ ELISA の結果を示す ; 各バーは、特定の AM 2 - c c F v 変異体の OD 405 での読み取り値を示す。

【図 24】AM 2 - c c F v CDR3 VH ライブラリー パンニングから選択された変異体の配列を示す ; 一番上には、ライブラリーのアミノ酸配列 (但し、X は図 22 に示した変性 DNA オリゴ由来の残基の複数の選択可能物を示す) が示されている ; その下には、パンニングからの各「X」位置において選択された残基及びヒットレート (特定の残基の発生率) が示されている ; ライブラリー設計により変更されなかった位置を、ブランクで示す ; パンニング由来のコンセンサスを、一番下に示す。 20

【図 25】AM 2 - c c F v 変異体と野生型 AM 2 - c c F v の K_{off} 速度の比較を示す ; 曲線の勾配は、試験抗体が抗原から解離する速度を示す。

〔 図 1 〕

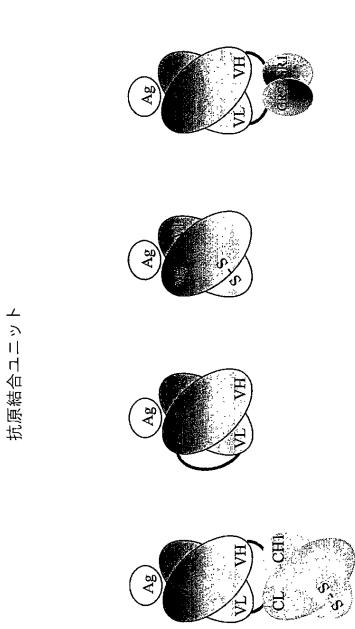
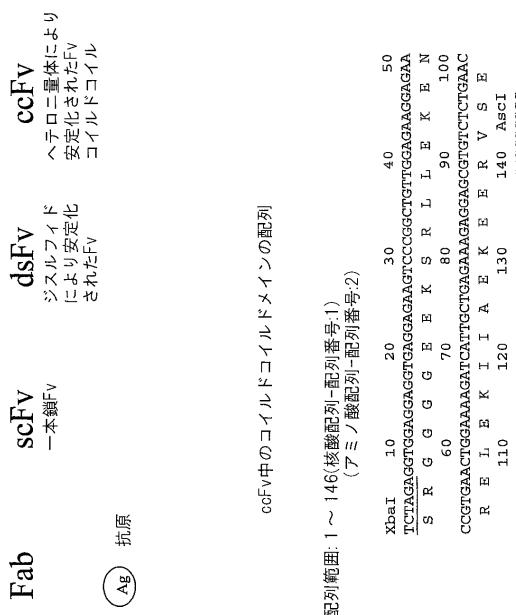


Fig. 1

【 図 2 】



【 図 3 A 】

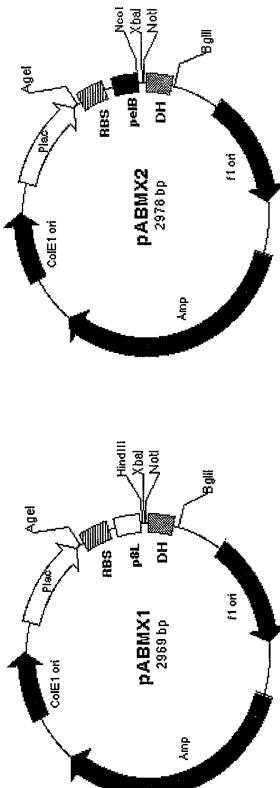


Fig. 3A

【 図 3 B 】

PABMX1ベクター:Age I～Bgl II の配列(核酸配列-配列番号:5)
(アミノ酸配列-配列番号:6)

PABMX2ベクター:Age I ~Bgl II の配列(核酸配列-配列番号:7)

lacプロモーター-/lac O1
 AATTTGAGCCTGATAAAATT Agel S/D
 ACCGT TCCTT TTAACCTTAG TAAGGAGG ATTAAAAA
 Nco I PstI XbaI
 ATGAAATACCTATTGCTACCGAGCCGGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCGCCATTGCGCCGCCTTGCGCCGCTCTGAG
 M Y L L P T A A G L L L A A P A M A A L Q A S R
 His-タグ BglII
 Nod
 GCGGCGT TATCCATACGCTTACGATACCCA GGAAGT CATCACATCATCACCAT TAG AGTCG

Eig 3B

XbaI	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
TCTTAAGTGGAGGAGGAGAGAGAGATGCTGCGGTGTTGAGGAGGAA	S R G G G	E K S R L	E K N		
CGGTGACTGAAAAGAACATTCATGCTGAAAGAAGGAGGGTCTCAAC	R E I E K I A K E E R V S	E			
	110	120	130	140	140
					Asci

[3] 1 ~ 140(核糖配列-配列番号-3)	
(アミノ酸配列-配列番号-4)	
XhoI	10
	TCCTGAGGAGTGTGGAAATCCGCCTGAGGCCCTAACGTCAGAAAA
	S R G G G G Q T S R L E G L Q S E N
KpnI	20
	TCTGAGGAGTGTGGAAATCCGCCTGAGGCCCTAACGTCAGAAAA
	S R G G G G Q T S R L E G L Q S E N
BamH I	30
	TCTGAGGAGTGTGGAAATCCGCCTGAGGCCCTAACGTCAGAAAA
	S R G G G G Q T S R L E G L Q S E N
HindIII	40
	TCTGAGGAGTGTGGAAATCCGCCTGAGGCCCTAACGTCAGAAAA
	S R G G G G Q T S R L E G L Q S E N
EcoRI	50
	TCTGAGGAGTGTGGAAATCCGCCTGAGGCCCTAACGTCAGAAAA
	S R G G G G Q T S R L E G L Q S E N
	CCATCCCTCGAATGAGATCACAGGTGTGATAAAGCTTGAAAGCC
	H R L R M K I T E L D K D L E E
	110
	TCACACGAGCTGAGACTGAGCTGGAGTTGGCGCCCGC
	120
	TCACACGAGCTGAGACTGAGCTGGAGTTGGCGCCCGC
	130
	TCACACGAGCTGAGACTGAGCTGGAGTTGGCGCCCGC
	NotI
	140

Fig. 2

【 図 4 A 】

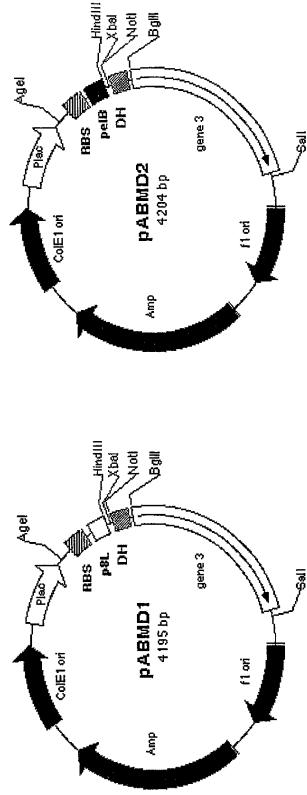


Fig. 4A

【 図 4 B 】

PABMD1ベクター: Age1～SalIの配列(核酸配列-配列番号:9)
(アミノ酸配列-配列番号:10)

PABMD2ベクター: AgeI～SalIの配列(核酸配列-配列番号:11)
(アミノ酸配列-配列番号:12)

【図 5 A】

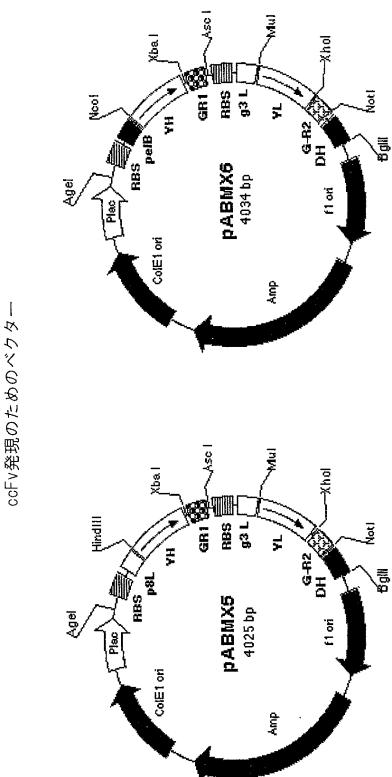


Fig. 5A

PABMX5ベクター: p8リードマークタグの配列(核酸配列-配列番号:13)
(アミノ酸配列-配列番号:14)

$P_8 U - \cancel{Z} -$ $M \ K \ K \ L \ V \ L \ K \ A \ S \ V \ A \ V \ A \ T \ L \ V \ P \ M \ L \ S \ F \ A$ $\text{Ascl} \quad \boxed{\text{GRI1}} \quad \boxed{\text{GRC1}}$	$HindIII$ SD $P_3 U - \cancel{Z} -$ $M \ K \ L \ L \ P \ A \ I \ P \ L \ V \ V \ P$ MluI XbaI Tcbl VIL $\text{TTCTATTCCTACCTCGCTACGCT}$ $F \ Y \ S \ H \ S \ A \ T \ R$	$\text{VH} \quad \boxed{\text{TCGA}}$ $S \ R$ NotI HA-Zy' GR2 GR2 S \ R $\text{A \ A \ A \ Y \ P \ Y \ D \ V \ P \ D \ Y \ A}$
--	---	--

GGAGGT CATCACCATATACCAAT TAG
G G H H H H *
PABMX6ベクター：pEBリーダー→DHタグの配列(核酸配列-配列番号:15)
(アミノ酸配列)-配列番号:16

Fig. 5B

【 図 6 A 】

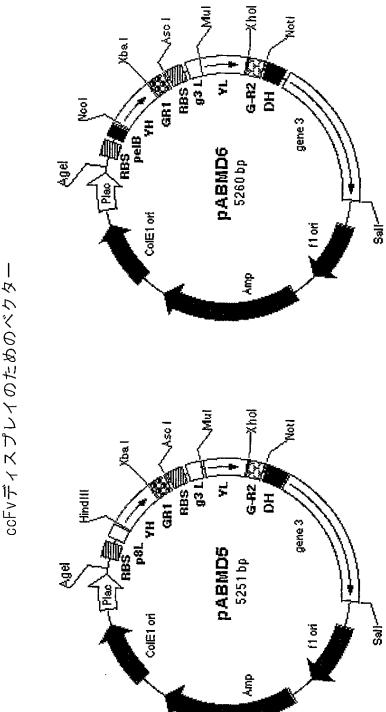
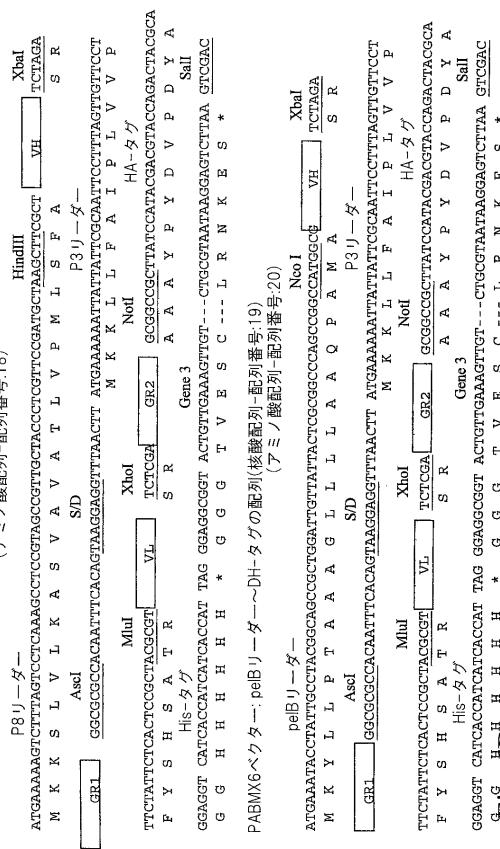


Fig. 6A

【 図 6 B 】



〔 図 7 〕

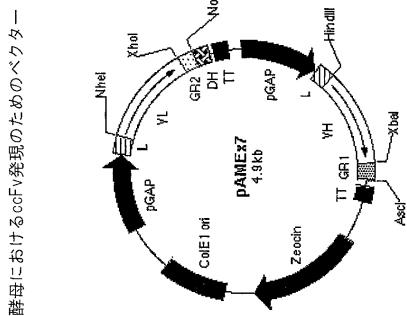
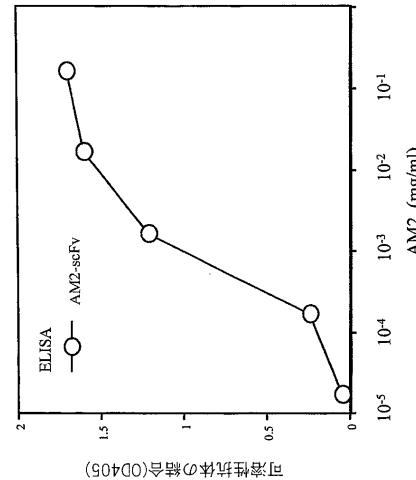


Fig. 7

【 四 8 】



8
Eig

【図 9】

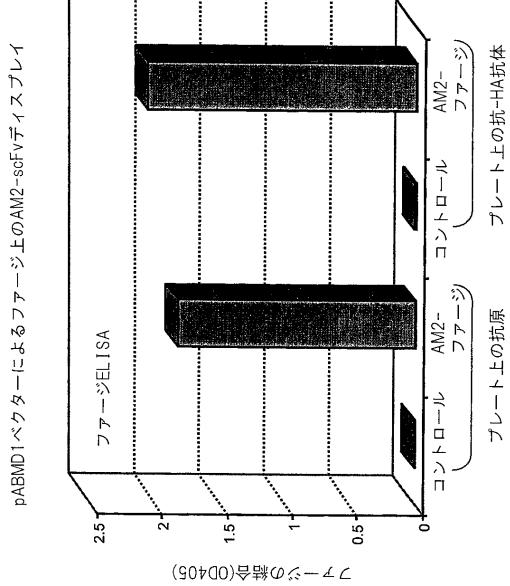


Fig. 9

【図 10 A】

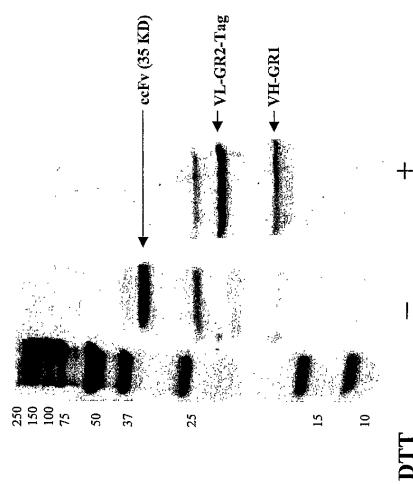


Fig. 10A

【図 10 B】

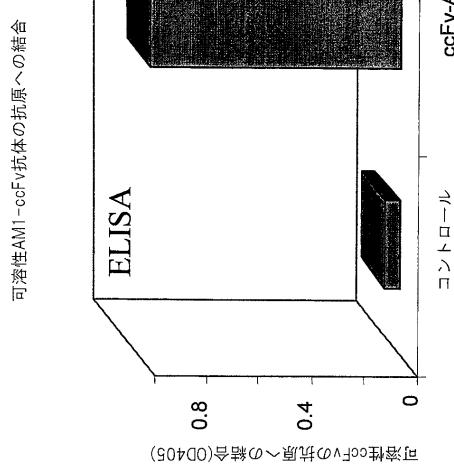


Fig. 10B

【図 11 A】

フージ上でのAM1-ccFv抗体ディスプレイ

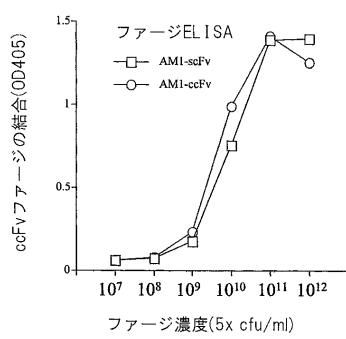


Fig. 11A

【図 11B】

ファージ粒子上にディスプレイされたAM2-ccFv及び
AM2-scFvの抗原結合能の比較

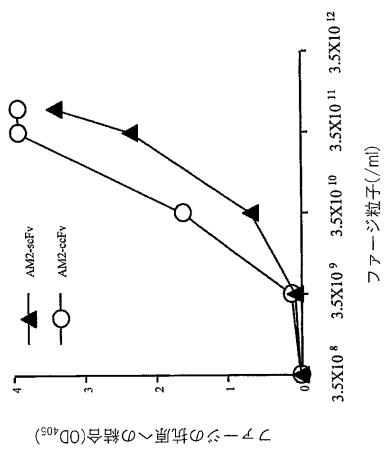


Fig. 11B

【図 12】

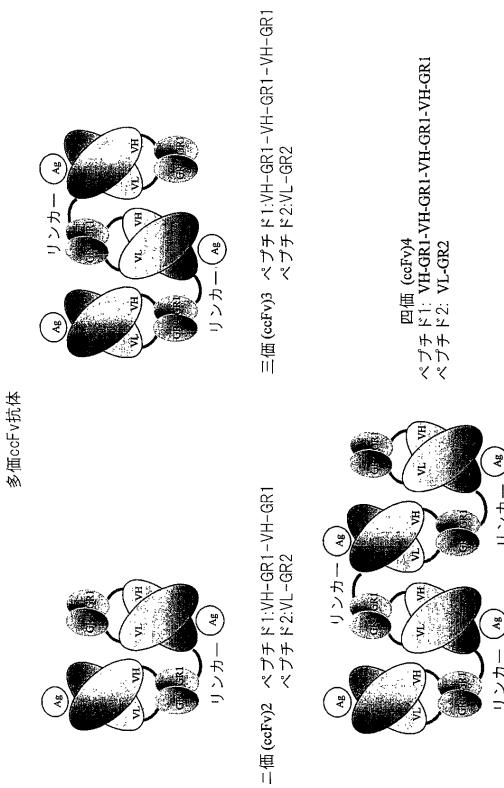


Fig. 12

【図 13】

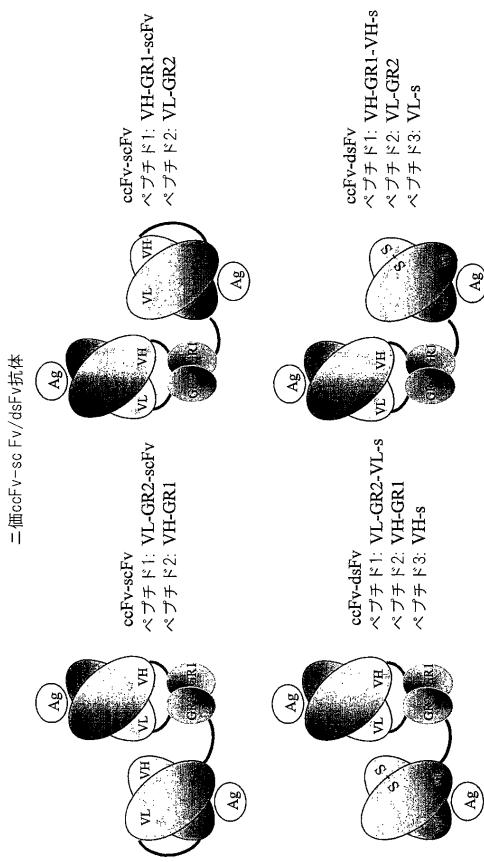


Fig. 13

【図 14】

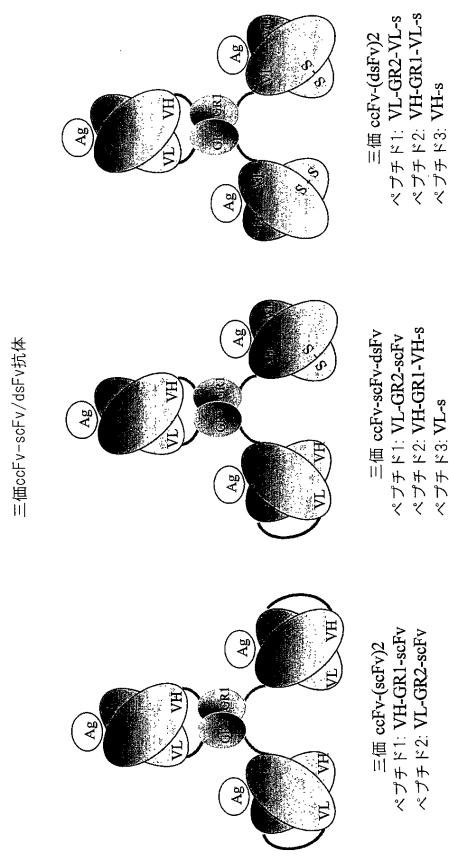


Fig. 14

【図15】

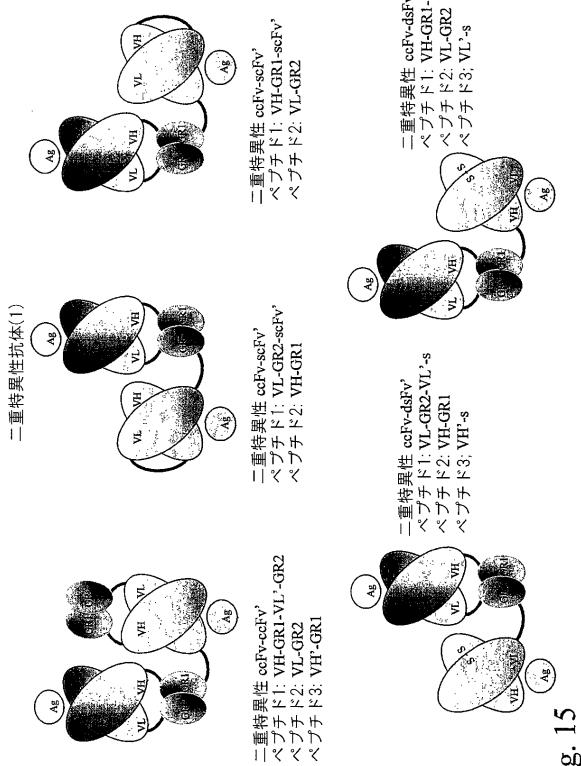


Fig. 15

【 図 1 6 】

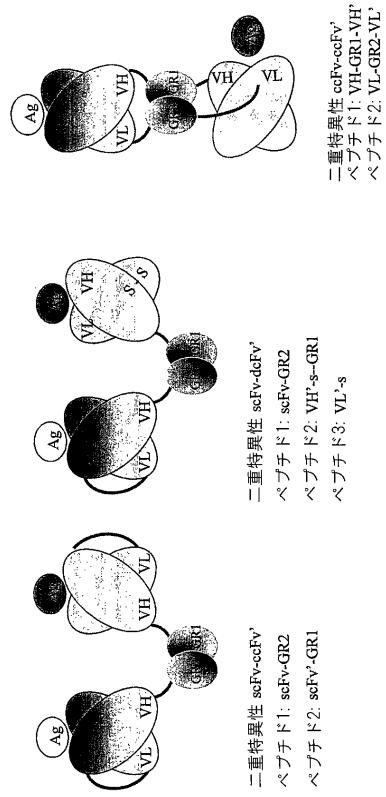


Fig. 16

【 図 17 】

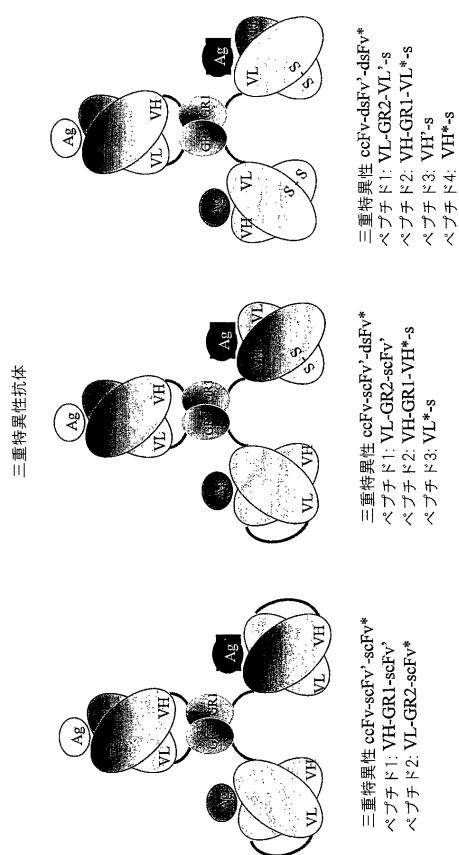


Fig. 17

【 図 18 】

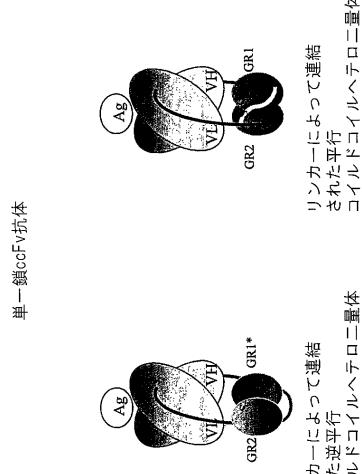


Fig. 18

【図 19】

ccFvディスプレイ及び抗体ライブライアリーモデルにおけるその使用

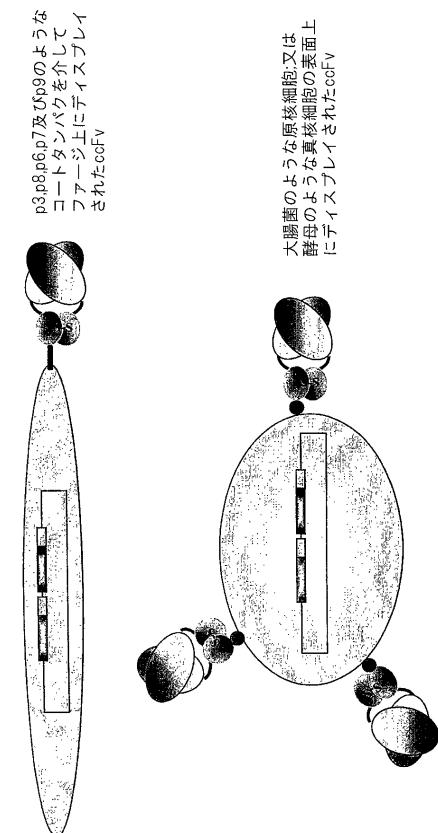


Fig. 19

【図 20】

"モデルライブライアリー"のパンニングにおけるOD405を
ディスプレイするファージの濃縮

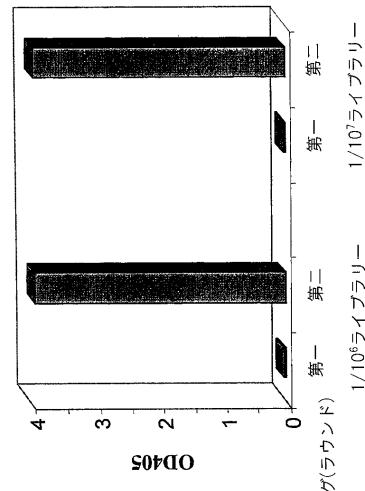


Fig. 20

【図 21】

"モデルライブライアリー"のパンニングにおけるAM2-ccFvファージの濃縮

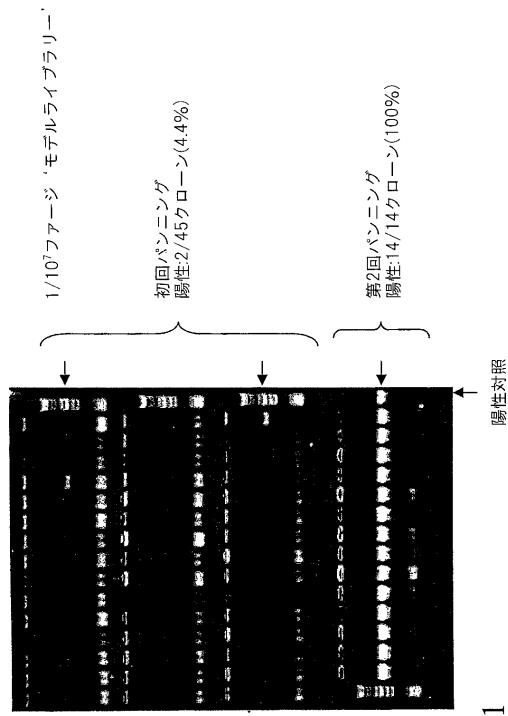


Fig. 21

【図 22】

抗体AM2-ccFvのCD3のファージライブライアリーの設計



Fig. 22

【図 2 3】

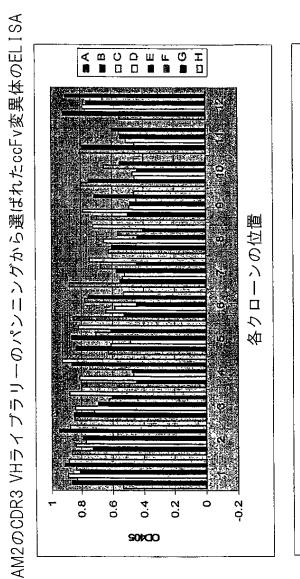


Fig. 23

【図 2 4】

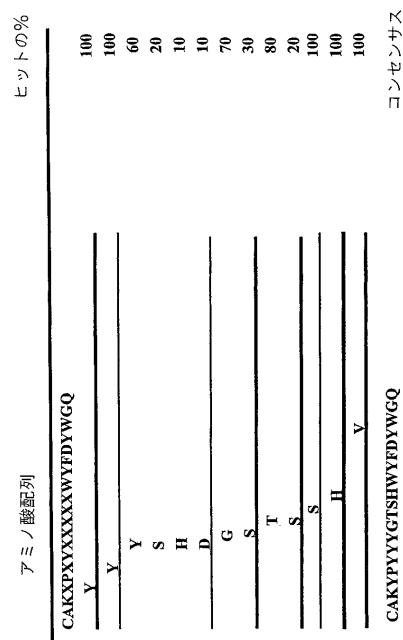


Fig. 24

【図 2 5】

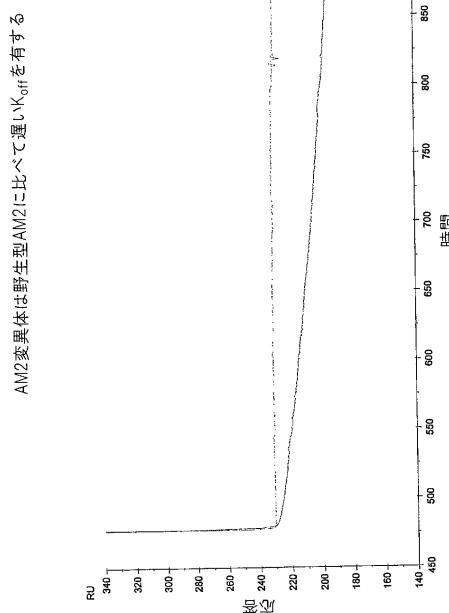


Fig. 25

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 February 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/012069 A2(51) International Patent Classification⁵: C12N (74) Agent: WONG, Karen; HOWRIE SIMON ARNOLD & WHITTE LLP, 301 Ravenswood Avenue, Menlo Park, CA 94025 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/24582

(22) International Filing Date: 31 July 2002 (31.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/921,144 1 August 2001 (01.08.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): AB-MAXIS, INC. [US/US]; 453 Raveland Drive, Suite B, Mountain View, CA 94043 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): WANG, Caili [CN/US]; 95 Judah Street, Apartment 1, San Francisco, CA 94122 (US); ZHONG, Pingyu [US/US]; 1475 Tyler Parkway, Mountain View, CA 94040 (US); LIU, Shengjiang [US/US]; 535 Devonshire Court, Mountain View, CA 94043 (US); LUO, Peizhi [US/US]; 545 Dawn Drive, Sunnyvale, CA 94087 (US); LI, Shengfeng [US/US]; 1114 Ladara Way, Belmont, CA 94003 (US); WANG, Xinwei [CN/US]; 7221 Via Vico, San Jose, CA 95129 (US).

(81) Designated States (national): AT, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/012069 A2

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR GENERATING CHIMERIC HETEROMULTIMERS

(57) **Abstract:** The present invention provides a technique for specific assembly of monomeric polypeptides to form a heteromultimer. This technique is particularly useful for generating a genetically diverse repertoire of heteromultimers such as antigen-binding units. The invention also provides both non-single-chain and single-chain antigen-binding units that are assembled by the technique described herein. The present invention also provides recombinant polynucleotides, vectors, host cells, and kits for producing the subject antigen-binding units. Further provided by the invention are methods of using the subject antigen-binding units.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

COMPOSITIONS AND METHODS FOR GENERATING CHIMERIC HETEROMULTIMERSCROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATION

1 This application is a continuation-in-part of U.S. Utility Patent Application
09/921,144, filed August 1, 2001, pending, which is hereby incorporated herein by
reference in its entirety.

TECHNICAL FIELD

2 This invention is in the field of immunology. Specifically, the invention relates
to the generation of chimeric heteromultimers such as non-single-chain antigen-binding
units using unique heterodimerization sequences. This invention also relates to the
generation of single-chain antigen-binding units stabilized by the subject
heterodimerization sequences. The compositions and methods embodied in the present
invention are particularly useful for identifying antigen-binding units that are of major
diagnostic and/or therapeutic potential.

BACKGROUND OF THE INVENTION

3 Antibodies or immunoglobulins are molecules that recognize and bind to specific
cognate antigens. Because of their exclusive specificities, antibodies, particularly
monoclonal antibodies, have been widely used in the diagnosis and treatment of a variety
of human diseases.

4 The basic immunoglobulin (Ig) in vertebrate systems is composed of two
identical light ("L") chain polypeptides (approximately 23 kDa), and two identical heavy
("H") chain polypeptides (approximately 53 to 70 kDa). The four chains are joined by
disulfide bonds in a "Y" configuration. At the base of the Y, the two H chains are bound
by covalent disulfide linkages. The L and H chains are organized in a series of domains.
The L chain has two domains, corresponding to the C region ("CL") and the other to the
V region ("VL"). The H chain has four domains, one corresponding to the V region
("VH") and three domains (CH1, CH2 and CH3) in the C region. The antibody contains

WO 03/012069

PCT/US02/24582

two arms (each arm being a Fab fragment), each of which has a VL and a VH region associated with each other. It is this pair of V regions (VL and VH) that differ, from one antibody to another (due to amino acid sequence variations), and which together are responsible for recognizing the antigen and providing an antigen-binding site. More specifically, each V region is made up from three complementarity determining regions (CDR) separated by four framework regions (FR). The CDR's are the most variable part of the variable regions, and they perform the critical antigen binding function. The CDR regions are derived from many potential germ line sequences via a complex process involving recombination, mutation and selection.

5 Research in recent years has demonstrated that the function of a binding antigen can be performed by fragments of a whole antibody. Exemplary antigen binding fragments are (i) the Fab fragment consisting of the VL, VH, CL and CH1 domains; (ii) the Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; (iii) the dAb fragment (Ward, E. S. *et al.*, *Nature* **341**, 544-546 (1989) which consists of a VH domain; (iv) isolated CDR regions; and (v) F(ab')₂ fragments, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; and (vi) the Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody. The Fv fragment is the smallest functional unit required for high affinity binding of antigen.

6 One major challenge in the antibody field has been to reconstitute a vast diverse repertoire of immunoglobulins that mimics the immunoglobulin pool in the human immune system. Such a repertoire generally has a complexity ranging from 10⁸ to 10¹³ distinct immunoglobulins. The generation of such a repertoire would greatly facilitate the identification and production of immunoglobulins capable of interacting specifically with therapeutic targets. However, the design and production of such a repertoire has traditionally been hampered by the lack of a stabilizing means for assembly of the minimal functional unit, namely the Fv fragment. It is a well-known problem in the art that the VH and VL regions, when expressed alone, have very low interaction energy (Glockshuber *et al.* (1990) *Biochemistry* **29**(6):1362-1367). The two components dissociate at low protein concentrations and are too unstable for many applications at

WO 03/012069

PCT/US02/24582

physiological body temperature. It is also a long-recognized technical obstacle that large proteins, such as whole antibodies (albeit extremely stable), do not express at an appreciable level in the host cell, thus rendering the construction of a highly diverse antibody repertoire very difficult.

7 More recently, three approaches have been developed to generate stable VL and VH complexes. However, each of these techniques bears a number of intrinsic limitations and none of them circumvents the aforementioned technical hurdles completely. The first approach uses a peptide linker to connect the VL and VH as a single-chain ("scFv") (Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**:5879-5883). While the resulting scFv exhibits substantial antigen-binding activity, not all antibodies can be made as single chains and still retain high binding affinity (Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**:5879-5883; Stemmer *et al.* (1993) *Biotechniques* **14**(2): 256-265). In part, this is due to the interference of linker sequences with the antigen binding sites. The second approach involves inserting a pair of cysteine residues in the VL and VH regions to generate a disulfide-bond stabilized Fv ("dsFv") (Brinkmann *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**(16): 7538-7542). The incorporated disulfide linkage, however, is unstable under reducing conditions in many host cells. For instance, in cytosol of *E. Coli*, the inter-molecular disulfide bond is often insufficient to stabilize the VL and VH complex. Moreover, this method typically requires 3-dimensional structural information of the V regions to ensure that the cysteine pair is inserted in a proper place without disrupting the binding activity. Because the 3-dimensional information of vast majority of the existing antibodies is unknown, this approach has little practical utility, and is particularly unsuited for antibody library construction, especially for constructing antibody repertoires derived from B cells. The third approach for stabilizing the VL and VH regions utilizes the disulfide bonds native to the CH1 and CL domains. This method proceeds with grafting a disulfide-bond linked CH1 and CL domains to the C-termini of the VL and VH regions in order to reconstitute a Fab fragment. While the resulting Fab fragment is generally more stable and often exhibits

WO 03/012069

PCT/US02/24582

higher binding affinity than scFv, Fab is not optimal for high level expression and antibody repertoire construction due to its large size.

8 Certain dimerization sequences that form coiled-coil structures have also been employed to assemble multivalent antibodies. Specifically, U.S. Patent No. 5,932,448 describes a bispecific F(ab')₂ heterodimer linked by the *Fos* and *Jun* leucine zippers. The *Fos* and *Jun* leucine zippers are well-characterized sequences known to preferentially form heterodimers. However, they still exhibit significant propensity to form homodimers under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperature (O'Shea *et al.* (1992) *Cell* 68: 699-708; Vidal *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*). In fact, the *Jun/Jun* homodimer is so stable that formation of *Fos/Jun* heterodimer *in vitro* requires dissociation of the *Jun/Jun* homodimer by first heating or reduction with 2-mercaptoethanamine (see U.S. Patent No. 5910,573 column 7 lines 35-37; U.S. Patent No. 5,932,448, column 16 lines 15-30). When tested *in vivo*, both *Fos* and *Jun* yield detectable amounts of homodimers (see, e.g. column 15, lines 41-43 of U.S. Patent No. 5,932,448; and Vidal *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*). While the existence of some homodimerization propensity may not be of substantial concern for the production of a single antibody species, such propensity is problematic for antibody repertoire construction, where high efficiency of heterodimerization between VL and VH regions is required.

9 Aside from *Fos* and *Jun* leucine zippers, U.S Patent No. 5,824,483 by Houston *et al.* describes the construction of a combinatorial library of coiled-coil dimerization peptides. Houston *et al.* proposes that the library is useful for identifying a polypeptide that is capable of interacting specifically with a selected macromolecule ligand such as antibodies (see last paragraph bridging pages 8 and 9). Apparently, Houston *et al.* concerns the selection of "antigen peptides" that bind to targeted antibodies, rather than the construction and selection of target antibodies. Focusing on an entirely different purpose, Houston *et al.* does not describe or even suggest the use of coiled-coil sequences to generate stable antigen-binding units.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

10 Thus, there remains a considerable need for improved compositions and methods to generate stable antigen-binding units and repertoires thereof to effect identification of therapeutic antigen-binding units. An ideal antigen-binding unit would be more stable than an Fv fragment, but would preferably be smaller than a Fab fragment to allow large-scale production and efficient display. Such antigen-binding unit would also serve as a building block for constructing multivalent and/or multispecific antibodies. The present invention satisfies these needs and provides related advantages as well.

SUMMARY OF THE INVENTION

11 A principal aspect of the present invention is the design of a technique for specific assembly of monomeric polypeptides to form a stable heteromultimer. This technique of heteromultimer production facilitates high throughput production of functional heteromultimers and avoids the assembly of undesired homodimers. The method is particularly useful for generating a genetically diverse repertoire of heteromultimers such as antigen-binding units. The technique can readily be adapted to a variety of "genetic package display" technologies that facilitate the selection of antigen-binding units possessing the desired binding specificities. Such genetic package display technologies are detailed in U.S. Patent Nos. 6248516, 5969108, 5885793, 5837500, 5571698, 5223409, 5514548, WO9005144, EP0368684, WO9201047, WO09311236, and WO09708320.

12 The subject antigen-binding unit is assembled and stabilized by the pairwise affinity of a distinct pair of heterodimerization sequences. The sequences are distinct in that at least one member of the heterodimerization pair is essentially incapable of forming homodimers under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperatures. In certain embodiments, the stabilized antigen-binding unit not only has a molecular size smaller than a Fab fragment, but also exhibits the required binding specificity and affinity. Moreover, certain non-single-chain antigen-binding units of the present invention bear higher binding affinities than the corresponding conventional

WO 03/012069

PCT/US02/24582

single-chain antibodies (scFv). The antigen-binding unit is particularly suited for antibody library construction and display. Certain configurations of the subject antigen-binding unit serve as convenient building units for multivalent and multispecific immunoglobulins.

13 Specifically, the present invention provides a non-single-chain antigen-binding unit comprising: (a) a light (L) chain polypeptide comprising a light (L) chain variable region fused to a first heterodimerization sequence; (b) a heavy (H) chain polypeptide comprising a heavy (H) chain variable region fused to a second heterodimerization sequence; wherein the L chain and the H chain polypeptides dimerize via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences; and wherein at least one of the heterodimerization sequences is essentially incapable of forming a homodimer under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperatures. Preferably, both of the first and second heterodimerization sequences are essentially incapable of forming homodimers under physiological buffer conditions and at physiological body temperatures.

14 In another aspect, the present invention provides a non-single-chain antigen-binding unit comprising: (a) a light (L) chain polypeptide comprising a light (L) chain variable region fused to a first heterodimerization sequence; (b) a heavy (H) chain polypeptide comprising a heavy (H) chain variable region fused to a second heterodimerization sequence; wherein the L chain and the H chain polypeptides dimerize via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences which are derived from heterodimeric receptors. In one aspect, the first and second heterodimerization sequences comprising heterodimerization receptor sequences that mediate heterodimerization of the receptors. In yet another aspect, the subject heterodimerization sequences form a coiled-coil dimer. In still another aspect, the L and the H chain polypeptides dimerize via non-covalent pairwise affinity of the two heterodimerization sequences. Preferably, the L or the H chain polypeptide further comprises a flexon that is flanked by the variable region and the heterodimerization sequence. Both the L and H polypeptide sequences may be derived from human L and H

WO 03/012069

PCT/US02/24582

chains. To further stabilize the heterodimeric antigen-binding units, cysteine residues can be introduced to provide disulfide bonds between the first and the second heterodimerization sequences. The non-single-chain antigen-binding units may be monovalent or multivalent. They may be monospecific or multispecific. Preferred multispecific Abus are bispecific, trispecific and tetraspecific molecules.

15 In a separate embodiment, the present invention provides a single-chain antigen-binding unit comprising a light (L) chain variable region and a heavy (H) chain variable region connected by a first and a second heterodimerization sequence spanning the distance between the C-terminus of one of the region to the N-terminus of the other region, wherein the two regions form an intra-molecular dimer via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences; and wherein at least one of the heterodimerization sequences is essentially incapable of forming a homodimer under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperatures. Preferably, both of the first and second heterodimerization sequences are essentially incapable of forming homodimers under physiological buffer conditions and at physiological body temperatures.

16 In another aspect, the present invention provides a single-chain antigen-binding unit, wherein the VL and VH regions form an intra-molecular dimer via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences which are derived from heterodimeric receptors. In one aspect, the first and second heterodimerization sequences comprising heterodimerization receptor sequences that mediate heterodimerization of the receptors.

17 In yet another aspect, first and second heterodimerization sequences form a coiled-coil dimer. In another aspect, the first and second heterodimerization sequences dimerize via non-covalent pairwise affinity. Both the VL and VH regions can be derived from the corresponding sequences in a human L and H chains, respectively.

18 Both the non-single-chain and single-chain antigen-binding units can be conjugated to a chemically functional moiety. Exemplary functional moieties include but are not limited to signal peptides, agents that enhance immunologic reactivity, agents

WO 03/012069

PCT/US02/24582

that facilitate coupling to a solid support, vaccine carriers, bioresponse modifiers, toxins, detectable labels, paramagnetic labels, and drugs.

19 Preferred heterodimerization sequences contained in the subject antigen-binding units are derived from C-terminal sequences of GABA_B receptor 1 and GABA_B receptor 2, respectively. More preferably, the first heterodimerization sequence is linked to a cysteine residue, said first heterodimerization comprising a GABA_B receptor 1 polypeptide of at least 30 amino acid residues that is essentially identical to a linear peptide sequence of comparable length depicted in SEQ ID NO. 2; and the second heterodimerization sequence is linked to a cysteine residue, said second heterodimerization comprising a GABA_B receptor 2 polypeptide of at least 30 amino acid residues that is essentially identical to a linear peptide sequence of comparable length depicted in SEQ ID NO. 4. Alternatively, the first heterodimerization sequence is linked to a cysteine residue, said first heterodimerization comprising a GABA_B receptor 2 polypeptide of at least 30 amino acid residues that is essentially identical to a linear peptide sequence of comparable length depicted in SEQ ID NO. 4; and the second heterodimerization sequence is linked to a cysteine residue, said second heterodimerization comprising a GABA_B receptor 1 polypeptide of at least 30 amino acid residues that is essentially identical to a linear peptide sequence of comparable length depicted in SEQ ID NO. 2.

20 The present invention provides a recombinant polynucleotide comprising a coding sequence that encodes the L and/or H polypeptide of a non-single-chain antigen-binding unit. The invention also provides a recombinant polynucleotide comprising a coding sequence that encodes the VL or VH regions of a single-chain antigen-binding unit. Also provided is a vector comprising any one of the recombinant polynucleotides described herein. The vector can be an expression vector, e.g. a phage display vector. Further provided in this invention is a selectable library of expression vectors encoding a repertoire of antigen-binding units, comprising more than one subject vector. Preferably, the selectable library comprises a plurality of phage display vectors.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

21 The present invention also provides a host cell comprising the subject recombinant polynucleotides. The recombinant polynucleotide encoding the L chain polypeptide and the polynucleotide encoding the H chain polypeptide may be present in a single vector or in separate vectors. The host cell may be eukaryotic or prokaryotic.

22 In yet another embodiment, the present invention provides a method of producing a non-single-chain antigen-binding unit. The method involves the following steps: (a) expressing in a host cell a first recombinant polynucleotide encoding a light (L) chain polypeptide comprising a light (L) chain variable region fused to a first heterodimerization sequence, and a second recombinant polynucleotide encoding a heavy (H) chain polypeptide comprising a heavy (H) chain variable region fused to a second heterodimerization sequence; wherein the L chain and the H chain polypeptides dimerize via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences; and wherein at least one of the heterodimerization sequences is essentially incapable of forming a homodimer under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperatures; and optionally (b) isolating the antigen-binding unit expressed in the host cell.

23 The produced antigen-binding unit may also contain heterodimerization sequences that are derived from heterodimeric receptors. Additionally, the non-single-chain antigen-binding expressed in step (a) can be displayed on surface of the host cell. Preferably, the non-single-chain antigen-binding expressed in step (a) is displayed on a phage particle.

24 In still another embodiment, the present invention provides a method of producing a non-single-chain antigen-binding unit, the method comprises the steps of (a) preparing a first recombinant polynucleotide encoding a light (L) chain polypeptide comprising a light (L) chain variable region fused to a first heterodimerization sequence, and a second recombinant polynucleotide encoding a heavy (H) chain polypeptide comprising a heavy (H) chain variable region fused to a second heterodimerization sequence; wherein the L chain and the H chain polypeptides dimerize via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences; and wherein at least one of

WO 03/012069

PCT/US02/24582

the heterodimerization sequences is essentially incapable of forming a homodimer under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperatures; and (b) allowing the first and second polypeptides to dimerize via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences. The step of dimerization may take place *in vitro* or *in vivo*.

25 This invention also includes a method of producing a single-chain antigen-binding unit. The methods involves the steps of (a) expressing in a host cell a polynucleotide comprising a coding sequence that encodes the subject single-chain antigen-binding unit; and optionally (b) isolating the single-chain antigen-binding unit expressed in the host cell.

26 This invention further includes a method of displaying a chimeric heteromultimer comprising at least two polypeptides on a surface of a host cell. This method comprises expressing in the host cell (i) a first recombinant polynucleotide encoding a first polypeptide fused to a first heterodimerization sequence and a surface presenting sequence; (ii) a second recombinant polynucleotide encoding a second polypeptide fused to a second heterodimerization sequence; wherein the first and second polypeptides dimerize via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences; wherein at least one of the heterodimerization sequences is incapable of forming a homodimer under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperatures. In one aspect, the first and second polynucleotides are expressed by a single phage display vector. In another aspect, the first and second polynucleotides are expressed by separate phage display vectors. The chimeric heteromultimer is preferably a non-single-chain antigen-binding unit of the present invention.

27 The invention also encompasses a method of identifying a non-single-chain antigen-binding unit that is immunoreactive with a desired antigen. The method comprises the steps of: (a) preparing a genetically diverse repertoire of antigen-binding units, wherein the repertoire comprises more than one subject antigen-binding unit; (b) contacting the repertoire of antigen binding units with the desired antigen; and (c) detecting a specific binding between antigen binding units and the antigen, thereby

WO 03/012069

PCT/US02/24582

identifying the antigen-binding unit that is immunoreactive with the desired antigen. In one aspect of this embodiment, the repertoire of antigen-binding units is prepared by expressing a library of vectors encoding a plurality of the antigen-binding units. Preferably, the library of vectors comprises a plurality of phage vectors.

28 Finally, the present invention provides a kit comprising a vector of this invention
in suitable packaging.

EXPLANATION OF ABBREVIATIONS USED HEREIN

- 29 1. Nsc: Non-single chain
30 2. Sc: Sing-chain
31 3. Abu: Antigen-binding unit
32 4. Abus: Antigen-binding units
33 4. L chain: Light chain
34 5. H chain: Heavy chain
35 6. VL: Light chain variable region
36 7. VH: Heavy chain variable region

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

37 Figure 1 is a schematic representation depicting various antigen-binding units.
38 Figure 2 depicts the nucleotide and amino acid sequences of GABAB receptor 1
and 2 that were used in constructing the subject Abus. The coiled-coil sequences are
derived from human GABA_B-R1 and GABA_B-R2 receptors. The coding amino acid
sequences from GABA_B receptor 1 begins with EEKS and ends with QLQS as shown in
the top panel of Figure 2. The coding amino acid sequences from GABA_B receptor 2
begins with TSRL and ends with QLQD as shown in the bottom panel of Figure 2. A
flexible SerArgGlyGlyGly spacer was added to the amino-termini of R1 and R2
heterodimerization sequences to favor the formation of functional Fv heterodimer. To
further stabilize the heterodimer, we have introduced a ValGlyGlyCys spacer to lock the
heterodimeric coiled-coil pair via the disulfide bond between the cysteine residues (SEQ

WO 03/012069

PCT/US02/24582

ID NOS. 2 and 4). The SerArg coding sequences at the N-terminus of the GGGG spacer provides XbaI or XhoI sites for fusion of the GR1 (heterodimerization sequence derived from GABAB1 receptor) and GR2 (heterodimerization sequence derived from GABAB2) domains to the carboxyl-termini of VH and VL fragments, respectively.

39 Figure 3A is a schematic representation of two expression vectors pABMX1 and pABMX2. Both pABMX1 and pABMX2 were derived from pbluescript SK(+) comprising an ampicillin-resistance gene (Amp) for antibiotic selection, a plasmid origin of replication (colE1 ori), an f1 phage origin of replication (f1 ori), and lac promoter/lac O1 driven protein expression cassette (plac-RBS-p8Leader-DH tag for pABMX1, plac-RBS-peLB Leader-DH tag for pABMX2). The heterologous sequence is expressed as a DH-tag (HA and 6 x His tag) fusion protein, and is directed by the signal peptide either p8 leader or peLB leader into periplasmid space, where the leader sequence is cleaved

40 Figure 3B depicts the sequences (SEQ ID NOS. 5-8) after the lac promoter between AgeI and BglII sites of pABMX1 and pABMX2. The HindIII/XbaI or HindIII/NotI or XbaI/NotI sites can be used for inserting heterologous sequences that are to be expressed in pABMX1 vector. Additional cloning sites included in the pABMX2 vector are NcoI, PstI, XbaI and NotI.

41 Figure 4A is a schematic representation of the phagemid vectors pABMD1 and pABMD2 useful for displaying antigen-binding units. pABMD1 and ABMD2 were derived from pABMX1 and pABMX2 respectively. They comprise all of the functional elements of pABMX1 and pABMX2 vectors, and pIII gene of a filamentous phage. The pIII gene was inserted immediately adjacent to the 3' end of DH-tag. The lac promoter drives expression of a heterologous sequence as pIII capsid fusion protein, which in turn is displayed on a phage particle upon superinfection of a helper phage such as KO7 (Amersham Pharmacia Biotech) or R408 helper phage (Stratagene). This vector can also be used for soluble protein expression in a non-suppressor bacterial strain.

42 Figure 4B depicts the sequence (SEQ ID NOS. 9-12) after the lac promoter between AgeI and Sall sites of pABMD1 and pABMD2.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

- 43 Figure 5A is a schematic representation of the vectors, pABMX5 and pABMX6. pABMX5 and ABMX6 were derived from pABMX1 and pABMX2 respectively. Different leader sequences were incorporated into pABMX5 and pABMX6. The subcloning sites for insertion of heterologous sequence, e.g. VH gene, also differ in these two vectors. pABMX5 contains the p8 leader, and pABMX6 contains the pelB leader. Two protein expression cassettes employing the lac promoter were engineered into these two vectors. The first cassette is used to express VH-GR1 (VH- heterodimerization sequence of GABA_B receptor 1) and the second is used to express VL-GR2 (VL-heterodimerization sequence of GABA_B receptor 2). The DH-tag was fused to GR2 domain to facilitate purification of the resulting heterodimers.
- 44 Figure 5B depicts the sequences (SEQ ID NOS. 13-16) between the leader sequence and DH-tag in pABMX5 and pABMX6 vectors. In addition, the ribosome-binding site, DH-tag, subcloning sites for insertion of VH, VL, GR1 and GR2, are also indicated.
- 45 Figure 6A is a schematic representation of phagemid vectors, pABMD5 and pABMD6, which are useful for expressing and displaying ccFv on a phage particle. pABMD5 and ABMD6 were derived from pABMX5 and pABMX6 respectively. pIII gene derived from the filamentous phage was inserted immediately after DH-tag. The VL-GR2 proteins were linked to pIII capsid protein to facilitate display of the ccFv heterodimer.
- 46 Figure 6 B depicts the sequences (SEQ ID NOS. 17-20) between the leader sequence and pIII for pABMD5 and pABMD6 vectors. In addition, ribosome binding site, DH-tag, partial pIII , subcloning sites for insertion of VH, VL, GR1 and GR2, are also indicated.
- 47 Figure 7 depicts the vector pAMEX7 useful for expressing ccFv fragment in yeast.
- 48 Figure 8 depicts the results of an ELISA assay using AM2-scFv fragments that were expressed by the pABMX1 vector. The results show a dose-dependent AM2-scFv binding to its antigen AM2.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

49 Figure 9 depicts the results of an ELISA assay using AM2-scFv fragments that
were displayed on phage particles. The results demonstrate the assembly of functional
scFv fragments on phage particles using the phagemid vector pABMD1.

50 Figure 10A depicts the results of SDS-PAGE analysis of AM1-ccFv expressed in
E. coli under reducing and non-reducing condition. The results demonstrate successful
expression and assembly of heterodimeric ccFv in E. coli.

51 Figure 10B depicts the results of an ELISA assay using soluble AM1-ccFv
expressed in E. coli. The results indicate successful assembly of functional ccFv with
expected binding specificity to its corresponding antigen.

52 Figure 11A depicts a comparison of the antigen binding capability of AM1-ccFv
expressing phage and that of AM1-scFv expressing phage. The results demonstrate that
the phage particles displaying the AM1-ccFv fragments exhibit slightly higher binding
capability than the phages displaying conventional scFv fragments.

53 Figure 11B depicts a comparison of the antigen binding capability of AM2-ccFv
expressing phage and that of AM2-scFv expressing phage. The results indicate that the
binding capability of the phage particles displaying the AM2-ccFv fragments is about
one order of magnitude higher than that of the AM2-scFv expressing phages.

54 Figure 12 depicts three multivalent Abu configurations, each comprising more
than one basic ccFv unit.

55 Figure 13 depicts four bivalent Abu configurations, each comprising a basic ccFv
unit and a scFv or a dsFv fragment.

56 Figure 14 depicts three trivalent Abu configurations, each comprising one or
more basic ccFv unit, one or more scFv or dsFv fragment.

57 Figure 15 depicts four bispecific Abu configurations, each comprising one or
more basic ccFv unit with distinct binding specificities, and/or a scFv or dsFv fragment.

58 Figure 16 depicts three additional bispecific Abu configurations.

59 Figure 17 depicts three trispecific Abu configurations, each comprising at least
one basic ccFv unit, and at least one scFv or dsFv fragment.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

- 60 Figure 18 depicts two exemplary single Abus, in which the heterodimerization sequences are arranged in either a parallel or anti-parallel configuration.
- 61 Figure 19 is a schematic representation of ccFv displayed on the surface of a prokaryotic or eukaryotic cell. The top panel depicts ccFv displayed by a phage particle that is adhered to the surface of a host cell.
- 62 Figure 20 depicts the results of panning a “model phage library” using ELISA involving immobilized protein antigen for AM2 from panning of a “model library”. The “model library” contained a mixture of AM2-ccFv phages and unrelated phages, AM1-ccFv, in a ratio of 1:10⁶ and 1:10⁷, respectively. The readings of the ELISA, since it detected only AM2-ccFv reactivity, would represent the population of AM2-ccFv in the mixture. After the first round of panning, no ELISA signal was detected, indicating that the AM2-ccFv fraction present in the mixture was still low. However, after two rounds of panning, the AM2-ccFv fraction measured becomes predominant, as evidenced by a dramatic increase in ELSIA signal.
- 63 Figure 21 depicts PCR analysis to confirm enrichment of AM2-ccFv via panning the model library shown in Figure 12. Before panning, one AM2-ccFv phage was detected in every 10⁷ unrelated phages (0.00001%). After the first round of panning, the occurrence of AM2-ccFv reached 4.4% and then 100% after the second round of panning.
- 64 Figure 22 depicts the design of CDR3 of VH (heavy chain) of AM2-ccFv. The degenerative DNA oligo was amplified by two PCR primers that franked by two subcloning restriction sites. The oligo was first amplified in PCR and subsequently restriction digested before being subcloned to replace the wild type CDR3 of VH of AM2-ccFv.
- 65 Figure 23 depicts AM2-ccFv phage ELISA results from individual clones that were randomly picked from the 5th (upper panel) and the 7th (lower panel) pannings. Each bar represented the reading at OD405 of a particular AM2-ccFv variant.
- 66 Figure 24 depicts the sequences of variants selected from the AM2-ccFv CDR3 VH library panning. Shown on the top is the amino acid sequence of the library (X

WO 03/012069

PCT/US02/24582

indicated multiple options of residues derived from the degenerative DNA oligo described in Figure 22); shown below it are the selected residues at each "X" position from panning and their hit rates (occurrence rate of a particular residue). Positions that were not changed by the library design are shown in blank. The consensus derived from the panning is shown on the bottom.

67 Figure 25 depicts a comparison of the K_{off} rates of an AM2-ccFv variant and the wild type AM2-ccFv. The slope of the curves represents how fast the test antibody dissociates from the antigen.

MODE(S) FOR CARRYING OUT THE INVENTION

68 Throughout this disclosure, various publications, patents and published patent specifications are referenced by an identifying citation. The disclosures of these publications, patents and published patent specifications are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

General Techniques:

69 The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of immunology, biochemistry, chemistry, molecular biology, microbiology, cell biology, genomics and recombinant DNA, which are within the skill of the art. See, e.g., Matthews, PLANT VIROLOGY, 3rd edition (1991); Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (1987)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, ed. (1987)).

WO 03/012069

PCT/US02/24582

70 As used in the specification and claims, the singular form "a", "an" and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise. For example, the term "a cell" includes a plurality of cells, including mixtures thereof.

Definitions:

71 The terms "polypeptide", "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to polymers of amino acids of any length. The polymer may be linear, cyclic, or branched, it may comprise modified amino acids, and it may be interrupted by non-amino acids. The terms also encompass amino acid polymers that have been modified, for example, via sulfation, glycosylation, lipidation, acetylation, phosphorylation, iodination, methylation, oxidation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, ubiquitination, or any other manipulation, such as conjugation with a labeling component. As used herein the term "amino acid" refers to either natural and/or unnatural or synthetic amino acids, including glycine and both the D or L optical isomers, and amino acid analogs and peptidomimetics.

72 A polypeptide or amino acid sequence "derived from" a designated protein refers to the origin of the polypeptide. Preferably, the polypeptide have an amino acid sequence that is essentially identical to that of a polypeptide encoded in the sequence, or a portion thereof wherein the portion consists of at least 10-20 amino acids, preferably at least 20-30 amino acids, more preferably at least 30-50 amino acids, or which is immunologically identifiable with a polypeptide encoded in the sequence. This terminology also includes a polypeptide expressed from a designated nucleic acid sequence.

73 A "chimeric" protein contains at least one fusion polypeptide comprising regions in a different position in the sequence than that occurs in nature. The regions may normally exist in separate proteins and are brought together in the fusion polypeptide; or they may normally exist in the same protein but are placed in a new arrangement in the

WO 03/012069

PCT/US02/24582

fusion polypeptide. A chimeric protein may be created, for example, by chemical synthesis, or by creating and translating a polynucleotide in which the peptide regions are encoded in the desired relationship.

74 A "multimeric protein" as used herein refers to a globular protein containing more than one separate polypeptide or protein chain associated with each other to form a single globular protein *in vitro* or *in vivo*. The multimeric protein may consist of more than one polypeptide of the same kind to form a "homomultimer." Alternatively, the multimeric protein may also be composed of more than one polypeptide of distinct sequences to form a "heteromultimer." Thus, a "heteromultimer" is a molecule comprising at least a first polypeptide and a second polypeptide, wherein the second polypeptide differs in amino acid sequence from the first polypeptide by at least one amino acid residue. The heteromultimer can comprise a "heterodimer" formed by the first and second polypeptide or can form higher order tertiary structures where more than two polypeptides are present. Exemplary structures for the heteromultimer include heterodimers (e.g. Fv and Fab fragments, diabodies, GABA_B receptors 1 and 2 complexes), trimeric G-proteins, heterotetramers (e.g. F(ab')₂ fragments) and further oligomeric structures.

75 The "first recombinant polypeptide" of a chimeric heteromultimer refers to any polypeptide which is or was associated with a "second recombinant polypeptide" via the pairwise affinity of two dimerization sequences that are linked to the first and second polypeptides, respectively. Preferably, the first and second polypeptides contain sequences derived from a light or a heavy chain of an immunoglobulin. More preferably, the first and second polypeptides form a Nsc Abu that confers binding specificity to a desired antigen.

76 A "first heterodimerization sequence" refers to any dimerization sequence which is or was associated with a "second heterodimerization sequence," wherein the second heterodimerization sequence differs in amino acid sequence by at least one amino acid residue. A "heterodimerization pair" refers to two heterodimerization sequences capable of forming a heterodimer.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

77 The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, i.e., molecules that contain an antigen-binding site which specifically binds ("immunoreacts with") an antigen. Structurally, the simplest naturally occurring antibody (e.g., IgG) comprises four polypeptide chains, two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds. The immunoglobulins represent a large family of molecules that include several types of molecules, such as IgD, IgG, IgA, IgM and IgE. The term "immunoglobulin molecule" includes, for example, hybrid antibodies, or altered antibodies, and fragments thereof. It has been shown that the antigen binding function of an antibody can be performed by fragments of a naturally-occurring antibody. These fragments are collectively termed "antigen-binding units" ("Abus"). Abus can be broadly divided into "single-chain" ("Sc") and "non-single-chain" ("Nsc") types based on their molecular structures.

78 Also encompassed within the terms "antibodies" and "Abus" are immunoglobulin molecules of a variety of species origins including invertebrates and vertebrates. The term "human" as applies to an antibody or an Abu refers to an immunoglobulin molecule expressed by a human gene or fragment thereof. The term "humanized" as applies to non-human (e.g. rodent or primate) antibodies refer to hybrid immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or primate having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, Fv framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, the humanized antibody may comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. These modifications are made to further refine and optimize antibody performance and minimize immunogenicity when introduced into a human body. In general, the

WO 03/012069

PCT/US02/24582

humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody may also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin.

79 "Non-single-chain antigen-binding unit" ("Nsc Abus") are heteromultimers comprising a light-chain polypeptide and a heavy-chain polypeptide. Examples of the Nsc Abus include but are not limited to (i) a ccFv fragment (Figure 1) stabilized by the heterodimerization sequences disclosed herein; (ii) any other monovalent and multivalent molecules comprising at least one ccFv fragment as described herein; (iii) a Fab fragment consisting of the VL, VH, CL and CH1 domains; (iv) an Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; (v) an Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody; (vi) an F(ab')2 fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (vii) a diabody; and (viii) any other Nsc Abus that are described in Little *et al.* (2000) Immunology Today.

80 As noted above, a Nsc Abu can be either "monovalent" or "multivalent." Whereas the former has one binding site per antigen-binding unit, the latter contains multiple binding sites capable of binding to more than one antigen of the same or different kind. Depending on the number of binding sites, a Nsc Abu may be bivalent (having two antigen-binding sites), trivalent (having three antigen-binding sites), tetravalent (having four antigen-binding sites), and so on.

81 Multivalent Nsc Abus can be further classified on the basis of their binding specificities. A "monospecific" Nsc Abu is a molecule capable of binding to one or more antigens of the same kind. A "multispecific" Nsc Abu is a molecule having binding specificities for at least two different antigens. While such molecules normally will only bind two distinct antigens (i.e. bispecific Abus), antibodies with additional specificities such as trispecific antibodies are encompassed by this expression when used

WO 03/012069

PCT/US02/24582

hercin (see, e.g. Figures 15-17). Examples of bispecific antigen binding units include those with one arm directed against a tumor cell antigen and the other arm directed against a cytotoxic trigger molecule such as anti-Fc γ RI/anti-CD15, anti-p185^{HER2}/Fc γ RIII (CD16), anti-CD3/anti-malignant B-cell (1D10), anti-CD3/anti-p185^{HER2}, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-renal cell carcinoma, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (anti-colon carcinoma), anti-CD3/anti-melanocyte stimulating hormone analog, anti-EGF receptor/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMAI, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti-neural cell adhesion molecule (NCAM)/anti-CD3, anti-folate binding protein (FBP)/anti-CD3, anti-pan carcinoma associated antigen (AMOC-31)/anti-CD3; bispecific Abus with one arm which binds specifically to a tumor antigen and one arm which binds to a toxin such as anti-saporin/anti-ld-1, anti-CD22/anti-saporin, anti-CD7/anti-saporin, anti-CD38/anti-saporin, anti-CEA/anti-ricin A chain, anti-interferon- α (IFN- α)/anti-hybridoma idiotype, anti-CEA/anti-vinca alkaloid; BsAbs for converting enzyme activated prodrugs such as anti-CD30/anti-alkaline phosphatase (which catalyzes conversion of mitomycin phosphate prodrug to mitomycin alcohol); bispecific Abus which can be used as fibrinolytic agents such as anti-fibrin/anti-tissue plasminogen activator (tPA), anti-fibrin/anti-urokinase-type plasminogen activator (uPA); bispecific antigen-binding units for targeting immune complexes to cell surface receptors such as anti-low density lipoprotein (LDL)/anti-Fc receptor (e.g. Fc γ RI, Fc γ RII or Fc γ RIII); bispecific Abus for use in therapy of infectious diseases such as anti-CD3/anti-herpes simplex virus (HSV), anti-T-cell receptor:CD3 complex/anti-influenza, anti-Fc γ R/anti-HIV; bispecific Abus for tumor detection *in vitro* or *in vivo* such as anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185^{HER2}/anti-hapten; BsAbs as vaccine adjuvants (see Fanger *et al.*, *supra*); and bispecific Abus as diagnostic tools such as anti-rabbit IgG/anti-ferritin, anti-horse radish peroxidase (HRP)/anti-hormone, anti-somatostatin/anti-substance P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-beta-galactosidase (see Nolan *et al.*, *supra*). Examples of trispecific antibodies include anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 and anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

- 82 "Single-chain antigen-binding unit" ("Sc Abu") refers to a monomeric Abu. Although the two domains of the Fv fragment are coded for by separate genes, a synthetic linker can be made that enables them to be made as a single protein chain (i.e. single chain Fv ("scFv") as described in Bird *et al.* (1988) *Science* **242**:423-426 and Huston *et al.* (1988) *PNAS* **85**:5879-5883) by recombinant methods. Other Sc Abus include antigen-binding molecules stabilized by the subject heterodimerization sequences (see e.g. Figure 18), and dAb fragments (Ward *et al.*, (1989) *Nature* **341**:544-546) which consist of a VH domain and an isolated complementarity determining region (CDR). An example of a linking peptide is (GGGGS)₃, which bridges approximately 3.5 nm between the carboxyl terminus of one V region and the amino terminus of another V region. Other linker sequences can also be used, and can provide additional functions, such as a means for attaching a drug or a solid support. A preferred single-chain antigen-binding unit contains VL and VH regions that are linked together and stabilized by a pair of subject heterodimerization sequences. The scFvs can be assembled in any order, for example, VH—(first heterodimerization sequence)-(second heterodimerization sequence)—VL, or VL—(first heterodimerization sequence)-(second heterodimerization sequence)—VH.
- 83 A "repertoire of antigen-binding units" refers to a plurality of antigen-binding units, at least two of which exhibit distinct binding specificities. A genetically diverse repertoire of antigen-binding units refers to a plurality of antigen-binding units, the majority and if not all of the antigen-binding units exhibit unique binding specificities with respect to each other. Genetically diverse repertoire typically has a complexity of at least 10^6 to 10^{13} , preferably between 10^7 to 10^9 , more preferably between 10^8 to 10^{10} , even more preferably between 10^8 to 10^{11} distinct antigen-binding units.
- 84 An antibody or Abu "specifically binds to" or "immunoreactive with" an antigen if it binds with greater affinity or avidity than it binds to other reference antigens including polypeptides or other substances.
- 85 An Abu is displayed "on the surface of a host cell" when the Abu is presented at the outer surface of a host cell. The displayed Abu may be directly attached to the outer

WO 03/012069

PCT/US02/24582

surface of the host cell, or may be indirectly attached to the host cell via a host cell bound genetic package such as phage particle.

86 "Surface presenting sequences" refers to sequences that facilitate display of heterologous sequences. Typically, the surface presenting sequences are present on the outer surface of a genetic package, e.g. phage or bacteria. Preferred surface presenting sequences of phage is pIII of M13 filamentous phage.

87 "Antigen" as used herein means a substance that is recognized and bound specifically by an antibody. Antigens can include peptides, proteins, glycoproteins, polysaccharides and lipids; portions thereof and combinations thereof.

88 As used herein, the term "surface antigens" refers to the plasma membrane components of a cell. It encompasses integral and peripheral membrane proteins, glycoproteins, polysaccharides and lipids that constitute the plasma membrane. An "integral membrane protein" is a transmembrane protein that extends across the lipid bilayer of the plasma membrane of a cell. A typical integral membrane protein consists of at least one "membrane spanning segment" that generally comprises hydrophobic amino acid residues. Peripheral membrane proteins do not extend into the hydrophobic interior of the lipid bilayer and they are bound to the membrane surface by noncovalent interaction with other membrane proteins.

89 The terms "membrane", "cytosolic", "nuclear" and "secreted" as applied to cellular proteins specify the extracellular and/or subcellular location in which the cellular protein is mostly, predominantly, or preferentially localized.

90 "Cell surface receptors" represent a subset of membrane proteins, capable of binding to their respective ligands. Cell surface receptors are molecules anchored on or inserted into the cell plasma membrane. They constitute a large family of proteins, glycoproteins, polysaccharides and lipids, which serve not only as structural constituents of the plasma membrane, but also as regulatory elements governing a variety of biological functions.

91 A "heterodimeric receptor" encompasses cellular proteins composed of two proteinaceous subunits which exhibits binding affinity to a ligand. The two

WO 03/012069

PCT/US02/24582

proteinaceous subunits are distinct molecules which differ in amino acid sequence by at least one amino acid residue. Non-limiting illustrative heterodimeric receptors are those that bind to growth factors (e.g. heregulin), neurotransmitters (e.g. γ -Aminobutyric acid), and other organic or inorganic small molecules (e.g. mineralocorticoid, glucocorticoid). Preferred heterodimeric receptors are nuclear hormone receptors (Belshaw *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**(10):4604-4607), erbB3 and erbB2 receptor complex, and G-protein-coupled receptors including but not limited to opioid (Gomes *et al.* (2000) *J. Neuroscience* **20**(22): RC110); Jordan *et al.* (1999) *Nature* **399**:697-700), muscarinic, dopamine, serotonin, adenosine/dopamine, and GABA_B families of receptors.

92 "Domain" refers to a portion of a protein that is physically or functionally distinguished from other portions of the protein or peptide. Physically-defined domains include those amino acid sequences that are exceptionally hydrophobic or hydrophilic, such as those sequences that are membrane-associated or cytoplasm-associated. Domains may also be defined by internal homologies that arise, for example, from gene duplication. Functionally-defined domains have a distinct biological function(s). The ligand-binding domain of a receptor, for example, is that domain that binds ligand. An antigen-binding domain refers to the part of an antigen-binding unit or an antibody that binds to the antigen. Functionally-defined domains need not be encoded by contiguous amino acid sequences. Functionally-defined domains may contain one or more physically-defined domain. Receptors, for example, are generally divided into the extracellular ligand-binding domain, a transmembrane domain, and an intracellular effector domain. A "membrane anchorage domain" refers to the portion of a protein that mediates membrane association. Generally, the membrane anchorage domain is composed of hydrophobic amino acid residues. Alternatively, the membrane anchorage domain may contain modified amino acids, e.g. amino acids that are attached to a fatty acid chain, which in turn anchors the protein to a membrane.

93 A "host cell" includes an individual cell or cell culture which can be or has been a recipient for the subject vectors. Host cells include progeny of a single host cell. The progeny may not necessarily be completely identical (in morphology or in genomic of

WO 03/012069

PCT/US02/24582

total DNA complement) to the original parent cell due to natural, accidental, or deliberate mutation. A host cell includes cells transfected *in vivo* with a vector of this invention.

94 A "cell line" or "cell culture" denotes bacterial, plant, insect or higher eukaryotic cells grown or maintained *in vitro*. The descendants of a cell may not be completely identical (either morphologically, genotypically, or phenotypically) to the parent cell.

95 A "defined medium" refers to a medium comprising nutritional and hormonal requirements necessary for the survival and/or growth of the cells in culture such that the components of the medium are known. Traditionally, the defined medium has been formulated by the addition of nutritional and growth factors necessary for growth and/or survival. Typically, the defined medium provides at least one component from one or more of the following categories: a) all essential amino acids, and usually the basic set of twenty amino acids plus cysteine; b) an energy source, usually in the form of a carbohydrate such as glucose; c) vitamins and/or other organic compounds required at low concentrations; d) free fatty acids; and e) trace elements, where trace elements are defined as inorganic compounds or naturally occurring elements that are typically required at very low concentrations, usually in the micromolar range. The defined medium may also optionally be supplemented with one or more components from any of the following categories: a) one or more mitogenic agents; b) salts and buffers as, for example, calcium, magnesium, and phosphate; c) nucleosides and bases such as, for example, adenosine and thymidine, hypoxanthine; and d) protein and tissue hydrolysates.

96 As used herein, the term "isolated" means separated from constituents, cellular and otherwise, in which the polynucleotide, peptide, polypeptide, protein, antibody, or fragments thereof, are normally associated with in nature. As is apparent to those of skill in the art, a non-naturally occurring the polynucleotide, peptide, polypeptide, protein, antibody, or fragments thereof, does not require "isolation" to distinguish it from its naturally occurring counterpart. In addition, a "concentrated", "separated" or "diluted" polynucleotide, peptide, polypeptide, protein, antibody, or fragments thereof, is distinguishable from its naturally occurring counterpart in that the concentration or

WO 03/012069

PCT/US02/24582

number of molecules per volume is greater than "concentrated" or less than "separated" than that of its naturally occurring counterpart.

97 Enrichment can be measured on an absolute basis, such as weight per volume of solution, or it can be measured in relation to a second, potentially interfering substance present in the source mixture. Increasing enrichments of the embodiments of this invention are increasingly more preferred. Thus, for example, a 2-fold enrichment is preferred, 10-fold enrichment is more preferred, 100-fold enrichment is more preferred, 1000-fold enrichment is even more preferred. A substance can also be provided in an isolated state by a process of artificial assembly, such as by chemical synthesis or recombinant expression.

98 "Linked" and "fused" or "fusion" are used interchangeably herein. These terms refer to the joining together of two or more chemical elements or components, by whatever means including chemical conjugation or recombinant means. An "in-frame fusion" refers to the joining of two or more open reading frames (OFRs) to form a continuous longer OFR, in a manner that maintains the correct reading frame of the original OFRs. Thus, the resulting recombinant fusion protein is a single protein containing two or more segments that correspond to polypeptides encoded by the original OFRs (which segments are not normally so joined in nature.) Although the reading frame is thus made continuous throughout the fused segments, the segments may be physically or spatially separated by, for example, in-frame linker sequence (e.g. "flexon"), as described *infra*.

99 In the context of polypeptides, a "linear sequence" or a "sequence" is an order of amino acids in a polypeptide in an amino to carboxyl terminus direction in which residues that neighbor each other in the sequence are contiguous in the primary structure of the polypeptide. A "partial sequence" is a linear sequence of part of a polypeptide which is known to comprise additional residues in one or both directions.

100 "Heterologous" means derived from a genotypically distinct entity from the rest of the entity to which it is being compared. For example, a promoter removed from its native coding sequence and operatively linked to a coding sequence other than the native sequence is a heterologous promoter. The term "heterologous" as applied to a polynucleotide, a polypeptide, means that the polynucleotide or polypeptide is derived

WO 03/012069

PCT/US02/24582

from a genotypically distinct entity from that of the rest of the entity to which it is being compared. For instance, a heterologous polynucleotide or antigen may be derived from a different species origin, different cell type, and the same type of cell of distinct individuals.

101 The terms "polynucleotides", "nucleic acids", "nucleotides" and "oligonucleotides" are used interchangeably. They refer to a polymeric form of nucleotides of any length, either deoxyribonucleotides or ribonucleotides, or analogs thereof. Polynucleotides may have any three-dimensional structure, and may perform any function, known or unknown. The following are non-limiting examples of polynucleotides: coding or non-coding regions of a gene or gene fragment, loci (locus) defined from linkage analysis, exons, introns, messenger RNA (mRNA), transfer RNA, ribosomal RNA, ribozymes, cDNA, recombinant polynucleotides, branched polynucleotides, plasmids, vectors, isolated DNA of any sequence, isolated RNA of any sequence, nucleic acid probes, and primers. A polynucleotide may comprise modified nucleotides, such as methylated nucleotides and nucleotide analogs. If present, modifications to the nucleotide structure may be imparted before or after assembly of the polymer. The sequence of nucleotides may be interrupted by non-nucleotide components. A polynucleotide may be further modified after polymerization, such as by conjugation with a labeling component.

102 "Recombinant" as applied to a polynucleotide means that the polynucleotide is the product of various combinations of cloning, restriction and/or ligation steps, and other procedures that result in a construct that is distinct from a polynucleotide found in nature.

103 The terms "gene" or "gene fragment" are used interchangeably herein. They refer to a polynucleotide containing at least one open reading frame that is capable of encoding a particular protein after being transcribed and translated. A gene or gene fragment may be genomic or cDNA, as long as the polynucleotide contains at least one open reading frame, which may cover the entire coding region or a segment thereof.

104 "Operably linked" or "operatively linked" refers to a juxtaposition wherein the components so described are in a relationship permitting them to function in their

WO 03/012069

PCT/US02/24582

intended manner. For instance, a promoter sequence is operably linked to a coding sequence if the promoter sequence promotes transcription of the coding sequence.

105 A “fusion gene” is a gene composed of at least two heterologous polynucleotides that are linked together.

106 A gene “database” denotes a set of stored data which represent a collection of sequences including nucleotide and peptide sequences, which in turn represent a collection of biological reference materials.

107 As used herein, “expression” refers to the process by which a polynucleotide is transcribed into mRNA and/or the process by which the transcribed mRNA (also referred to as “transcript”) is subsequently being translated into peptides, polypeptides, or proteins. The transcripts and the encoded polypeptides are collectively referred to as gene product. If the polynucleotide is derived from genomic DNA, expression may include splicing of the mRNA in a eukaryotic cell.

108 A “subject” as used herein refers to a biological entity containing expressed genetic materials. The biological entity is preferably plant, animal, or microorganisms including bacteria, viruses, fungi, and protozoa. Tissues, cells and their progeny of a biological entity obtained *in vivo* or cultured *in vitro* are also encompassed.

109 A “vector” is a nucleic acid molecule, preferably self-replicating, which transfers an inserted nucleic acid molecule into and/or between host cells. The term includes vectors that function primarily for insertion of DNA or RNA into a cell, replication of vectors that function primarily for the replication of DNA or RNA, and expression vectors that function for transcription and/or translation of the DNA or RNA. Also included are vectors that provide more than one of the above functions.

110 An “expression vector” is a polynucleotide which, when introduced into an appropriate host cell, can be transcribed and translated into a polypeptide(s). An “expression system” usually connotes a suitable host cell comprised of an expression vector that can function to yield a desired expression product.

111 A “replicon” refers to a polynucleotide comprising an origin of replication (generally referred to as an ori sequence) which allows for replication of the

WO 03/012069

PCT/US02/24582

polynucleotide in an appropriate host cell. Examples of replicons include episomes (such as plasmids), as well as chromosomes (such as the nuclear or mitochondrial chromosomes).

Chimeric Heteromultimer of the Present Invention

112 As noted above, proper assembly of polypeptide subunits to form a stable complex is required to ensure the biological function of a multimeric protein. Accordingly, a central aspect of the present invention is the design of a technique that enables specific assembly of selected monomeric polypeptides to effect efficient production of heteromultimers. The experimental design is particularly useful for generating and screening for heteromultimers such as Abus whose binding specificities depend on the assembly of specific subunits in a specific manner. Distinguished from the previously reported chimeric Abus, the subject Abus have one or more of the following unique features. First, the Abus are reconstituted via pairwise affinity of two heterodimerization sequences, at least one of which and preferably both of which, lack(s) detectable propensity to form homodimers. Unlike the previously reported dimerization sequences such as *Fos* and *Jun* leucine zippers that are known to form homodimers under both physiological buffer conditions and physiological body temperature (O'Shea *et al.* (1992) *Cell* **68**: 699-708; Vidal *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*), the subject heterodimerization sequences are essentially incapable of forming homodimers either under the specified buffer conditions and/or at the specified body temperatures. The subject heterodimerization sequences may be also distinguished from the previously employed sequences at the structural level as detailed below.

113 In one embodiment, the present invention provides a chimeric heteromultimer displayed on the surface of the host cell, wherein heteromultimer comprises: (i) a first polypeptide fused to a first heterodimerization sequence and a surface presenting sequence; (ii) a second polypeptide fused to a second heterodimerization sequence; wherein the first and second polypeptides dimerize via pairwise affinity of the first and

WO 03/012069

PCT/US02/24582

second heterodimerization sequences; wherein at least one of the heterodimerization sequences is essentially incapable of forming a homodimer under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperatures.

114 In another embodiment, the present invention provides a Nsc Abu that comprises:
(a) a light-chain polypeptide comprising a light-chain variable region linked to a first heterodimerization sequence; (b) a heavy-chain polypeptide comprising a heavy-chain variable region linked to a second heterodimerization sequence; wherein the light-chain and the heavy-chain polypeptides dimerize via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences, at least one of which is essentially incapable of forming a homodimer under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperatures. In another aspect, the present invention provides a Nsc Abu whose the light-chain and the heavy-chain polypeptides dimerize via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences that are derived from heterodimeric receptors. In one aspect, the first and second heterodimerization sequences comprising heterodimerization receptor sequences that mediate heterodimerization of the receptors.

115 In a separate embodiment, the present invention provides a Sc Abu which comprises a light-chain variable region and a heavy-chain variable region connected by a first and a second heterodimerization sequence spanning the distance between the C-terminus of one of the region to the N-terminus of the other region, wherein the two regions form an intra-molecular dimer via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences, at least one of which is essentially incapable of forming a homodimer under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperatures. In another aspect of this embodiment, the present invention provides a Sc Abu wherein the light-chain variable region and the heavy-chain variable region form an intra-molecular dimer via pairwise affinity of two heterodimerization sequences that are derived from heterodimeric receptors. In one aspect, the first and second heterodimerization sequences comprising heterodimerization receptor sequences that mediate heterodimerization of the receptors.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Selection of Heterodimerization Sequences:

- 116 Several factors apply to the design of Abus having one or more of the above-mentioned characteristics. First, the heterodimerization sequences must exhibit pairwise affinity to effect formation of a stable complex. By "stable" is meant that the complex or dimer is sufficiently long-lasting to persist between the formation of the complex or dimer, and its subsequent detection and/or purification. The complex or dimer must be able to withstand whatever conditions exist or are introduced between the moment of formation and the moment of detection, these conditions being a function of the assay or reaction which is being performed. Preferably, the formation of the complex or dimer is carried out under physiological buffer conditions and at physiological body temperatures ranging from approximately room temperature to approximately 37°C. Intervening conditions which may optionally be present and which may dislodge a complex or dimer include washing, heating, adding additional solutes or solvents to the reaction mixture (such as denaturants), and competing with additional reacting species. Stable complex or dimer may be irreversible or reversible, but must meet the other requirements of this definition. Thus, a transient complex or dimer may form in a reaction mixture, but it does not constitute a stable complex if it dissociates spontaneously under physiological buffer conditions or as a result of a newly imposed condition or manipulation introduced before detection.
- 117 Second, the selected heterodimerization sequences must exhibit pairwise affinity resulting in predominant formation of heterodimers to a substantial exclusion of homodimers. Preferably, the predominant formation yields a heteromultimeric pool that contains at least 60% heterodimers, more preferably at least 80% heterodimers, more preferably between 85-90% heterodimers, and more preferably between 90-95% heterodimers, and even more preferably between 96-99% heterodimers that are allowed to form under physiological buffer conditions and/or physiological body temperatures. In certain embodiments of the present invention, at least one of the heterodimerization sequences employed to reconstitute an Abu is essentially incapable of forming a homodimer in a physiological buffer and/or at physiological body temperature. By

WO 03/012069

PCT/US02/24582

"essentially incapable" is meant that the selected heterodimerization sequences when tested alone do not yield detectable amounts of homodimers in an *in vitro* sedimentation experiment as detailed in Kammerer *et al.* (1999) *Biochemistry* **38**: 13263-13269), or in the *in vivo* two-hybrid yeast analysis (see e.g. White *et al.* *Nature* (1998) **396**: 679-682). Specifically, Kammerer et al. have demonstrated by sedimentation experiments that the heterodimerization sequences of GABA_B receptor 1 and 2, when tested alone, sediment at the molecular mass of the monomer under physiological conditions and at physiological body temperatures (e.g. at 37°C). When mixed in equimolar amounts, GABA_B receptor 1 and 2 heterodimerization sequences sediment at the molecular mass corresponding to the heterodimer of the two sequences (see Table 1 of Kammerer et al.). In addition, individual heterodimerization sequences can be expressed in a host cell and the absence of homodimers in the host cell can be demonstrated by a variety of protein analyses including but not limited to SDS-PAGE, Western blot, and immunoprecipitation. The *in vitro* assays must be conducted under a physiological buffer conditions, and/or preferably at physiological body temperatures. Generally, a physiological buffer contains a physiological concentration of salt and at adjusted to a neutral pH ranging from about 6.5 to about 7.8, and preferably from about 7.0 to about 7.5. A variety of physiological buffers is listed in Sambrook *et al.* (1989) *supra* and hence is not detailed herein. Preferred physiological conditions are described in Kammerer *et al.*, *supra*.

118 The specific association of heterodimerization sequences typically involves noncovalent interactions. Such interactions encompass every exiting stable linkage that does not result in the formation of a covalent bond. Non-limiting examples of noncovalent interactions include electrostatic bonds, hydrogen bonding, Van der Waal's forces, steric interdigitation of amphiphilic peptides.

119 A further consideration in designing the subject Abu is to minimize any structural interference between the heterodimerization sequences and the antigen-binding site of the resulting heteromultimer. A variety of techniques is available in the art for designing a chimeric heteromultimer with minimal internal structural interference. For instance,

WO 03/012069

PCT/US02/24582

one approach involves the use of minimal heterodimerization sequences containing only amino acid residues that are required for heterodimerization. The second approach is to link the heterodimerization sequences to either N-terminus or C-terminus of the resulting heteromultimer. The choice of either terminus will depend on the location of the biological active domain of the heteromultimer. For constructing a chimeric Abu whose antigen-binding site resides in the N-terminal half of the light and heavy chain variable regions, it is preferable to link the heterodimerization sequences to the C-terminus of a light or heavy chain. Another alternative design employs a "flexon" incorporated between the antigen-binding site and the heterodimerization sequence of the heteromultimer. "Flexon" as used herein, refers to a flexible polypeptide linker (or a nucleic acid sequence encoding such a polypeptide) which typically comprises amino acids having small side chains (e.g. glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, and serine). Incorporating flexons between one or more sites of the subject Abu is believed to promote functionality by allowing them to assume a conformations relatively independent of each other. Such a construction generally provides additional flexibility to the antigen-binding domain. Suitable flexons preferably comprise between about four and about one hundred amino acids, more preferably about four to fifty amino acids, and even more preferably about four to fifteen amino acids.

120 Heterodimerization sequences applicable for constructing the subject Abus can be derived from a variety of sources. Generally, any protein sequences involved in the formation of stable heteromultimers are candidate heterodimerization sequences. As such, these sequences may be derived from any heteromultimeric protein complexes. Representative candidate sequences are viral proteins such as the capsid proteins of adeno-associated viruses, protein kinase phosphorylation sites that interact with SH2-domain-containing proteins (Cantely *et al.* (1993) *Cell* **72**: 767-778; Cantely *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270**(44): 26029-26032), domains of transcription factors and heterodimeric receptors, which mediate heteromer formation.

121 Preferred heteromultimeric transcription factors are a-Pal/ Max complexes and Hox/Pbx complexes. Hox represents a large family of transcription factors involved in

WO 03/012069

PCT/US02/24582

patterning the anterior-posterior axis during embryogenesis. Hox proteins bind DNA with a conserved three alpha helix homeodomain. In order to bind to specific DNA sequences, Hox proteins require the presence of hetero-partners such as the Pbx homeodomain. Wolberger *et al.* solved the 2.35Å crystal structure of a HoxB1-Pbx1-DNA ternary complex in order to understand how Hox-Pbx complex formation occurs and how this complex binds to DNA. The structure shows that the homeodomain of each protein binds to adjacent recognition sequences on opposite sides of the DNA. Heterodimerization occurs through contacts formed between a six amino acid hexapeptide N-terminal to the homeodomain of HoxB1 and a pocket in Pbx1 formed between helix 3 and helices 1 and 2. A C-terminal extension of the Pbx1 homeodomain forms an alpha helix that packs against helix 1 to form a larger four helix homeodomain (Wolberger *et al.* (1999) *Cell* **96**: 587-597; Wolberger *et al.* *J Mol Biol.* **291**: 521-530).

122 A vast number of heterodimeric receptors have also been identified. They include but are not limited to those that bind to growth factors (e.g. heregulin), neurotransmitters (e.g. γ -Aminobutyric acid), and other organic or inorganic small molecules (e.g. mineralocorticoid, glucocorticoid). Preferred heterodimeric receptors are nuclear hormone receptors (Belshaw *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**(10):4604-4607), erbB3 and erbB2 receptor complex, and G-protein-coupled receptors including but not limited to opioid (Gomes *et al.* (2000) *J. Neuroscience* **20**(22): RC110); Jordan *et al.* (1999) *Nature* **399**:697-700), muscarinic, dopamine, serotonin, adenosine/dopamine, and GABA_B families of receptors. For majority of the known heterodimeric receptors, their C-terminal sequences are found to mediate heterodimer formation.

123 Where desired, sequences from novel heterodimeric receptors can be employed in constructing the subject Abus. In such situation, the identification of a candidate heterodimerization sequences in a given receptor pair can be determined by any genetic or biochemical assays without undue experimentation. Additionally, computer modeling and searching technologies further facilitates detection of heterodimerization sequences based on sequence homologies of common domains appeared in related and unrelated

WO 03/012069

PCT/US02/24582

genes. Non-limiting examples of programs that allow homology searches are Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), Fasta (Genetics Computing Group package, Madison, Wisconsin), DNA Star, Clustalw, TOFFEE, COBLATH, Genthreader, and MegAlign. Any sequence databases that contains DNA sequences corresponding to a target receptor or a segment thereof can be used for sequence analysis. Commonly employed databases include but are not limited to GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, SWISS-PROT, EST, STS, GSS, and HTGS.

124 Another preferred class of heterodimerization sequences consists of amphiphilic peptides that adopt a coiled-coil helical structure. The helical coiled coil is one of the principal subunit oligomerization sequences in proteins. Primary sequence analysis reveals that approximately 2-3% of all protein residues form coiled coils (Wolf *et al.* (1997) *Protein Sci.* **6**:1179-1189). Well-characterized coiled-coil-containing proteins include members of the cytoskeletal family (e.g. α -keratin, vimentin), cytoskeletal motor family (e.g. myosine, kinesins, and dyneins), viral membrane proteins (e.g. membrane proteins of Ebola or HIV), DNA binding proteins, and cell surface receptors (e.g. GABA_A receptors 1 and 2). Coiled-coil heterodimerization sequences of the present invention can be broadly classified into two groups, namely the left-handed and right-handed coiled coils. The left-handed coiled coils are characterized by a heptad repeat denoted "abcdefg" with the occurrence of apolar residues preferentially located at the first (a) and fourth (d) position. The residues at these two positions typically constitute a zig-zag pattern of "knobs and holes" that interlock with those of the other stand to form a tight-fitting hydrophobic core. In contrast, the second (b), third (c) and sixth (f) positions that cover the periphery of the coiled coil are preferably charged residues. Examples of charged amino acids include basic residues such as lysine, arginine, histidine, and acidic residues such as aspartate, glutamate, asparagine, and glutamine. Uncharged or apolar amino acids suitable for designing a heterodimeric coiled coil include but are not limited to glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, serine and threonine. While the uncharged residues typically form the hydrophobic core, inter-helical and intra-helical salt-bridge including charged residues even at core positions may be employed to

WO 03/012069

PCT/US02/24582

stabilize the overall helical coiled-coiled structure (Burkhard *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* **275**:11672-11677). Whereas varying lengths of coiled coil may be employed, the subject heterodimerization sequences preferably contain two to ten heptad repeats. More preferably, the heterodimerization sequences contain three to eight heptad repeats, even more preferably contain four to five heptad repeats.

125 In designing optimal coiled-coil heterodimerization sequences, a variety of existing computer software programs that predict the secondary structure of a peptide can be used. An illustrative computer analysis uses the COILS algorithm which compares an amino acid sequence with sequences in the database of known two-stranded coiled coils, and predicts the high probability coiled-coil stretches (Kammerer *et al.* (1999) *Biochemistry* **38**:13263-13269).

126 While a diverse variety of coiled coils involved in hetero-oligomerization can be employed in the subject invention, preferred coiled coils are derived from heterodimeric receptors. Accordingly, the present invention encompasses the coiled-coil dimeric sequences derived from GABA_B receptors 1 and 2. In one aspect, the subject coiled coils comprise the C-terminal sequences of GABA_B receptor 1 and GABA_B receptor 2. In another aspect, the subject coiled coils are further linked to cysteine residues. The coiled coils are GABA_B receptor 1 and 2 polypeptides of at least 30 amino acid residues, one of which is essentially identical to a linear sequence of comparable length depicted in SEQ ID NO. 2, and the other is essentially identical to a linear peptide sequence of comparable length depicted in SEQ ID NO. 4.

127 A linear sequence of peptide is "essentially identical" to another linear sequence, if both sequences exhibit substantial amino acid sequence homology. Generally, essentially identical sequences are at least about 60% identical with each other, after alignment of the homologous regions. Preferably, the sequences are at least about 70% identical; more preferably, they are at least about 80% identical; more preferably, they are at least about 90% identical; more preferably, the sequences are at least about 95% identical; still more preferably, the sequences are 100% identical.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

128 In determining whether polypeptide sequences are essentially identical, a sequence that preserves the functionality of the polypeptide with which it is being compared is particularly preferred. Functionality may be established by different criteria, such as ability to form a heterodimer with a pairing coiled-coil sequence, and inability to form a homodimer under physiological buffer conditions and/or physiological body temperatures.

129 The invention includes modified GABA_B heterodimerization sequences which are functionally equivalent to the sequences exemplified herein. Modified polypeptides providing improved stability to the resulting Abus are preferred. Examples of modified polypeptides include those with conservative substitutions of amino acid residues, and one or more deletions or additions of amino acids which do not significantly deleteriously alter the heterodimerization specificity. Substitutions can range from changing or modifying one or more amino acid residues to complete redesign of a region as long as the pairwise affinity is maintained. Amino acid substitutions, if present, are preferably conservative substitutions that do not deleteriously affect folding or functional properties of the peptide. Groups of functionally related amino acids within which conservative substitutions can be made are glycine/alanine; valine/isoleucine/leucine; asparagine/glutamine; aspartic acid/glutamic acid; serine/threonine/methionine; lysine/arginine; and phenylalanine/tryosine/tryptophan. Polypeptides of this invention can be in glycosylated or unglycosylated form, can be modified post-translationally (e.g., acetylation, and phosphorylation) or can be modified synthetically (e.g., the attachment of a labeling group).

Configurations and Modifications of Antigen-Binding Units (Abus):

130 The Abus of the present invention can adopt a variety of configurations. The smallest non-single chain Abu is a monovalent ccFv fragment. The ccFv fragment is a dimeric protein composed of VL and VH regions, which dimerize via the pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences fused in-frame with the VL and VH regions, respectively. Preferably, the ccFv contains a short flexon sequence that provides additional flexibility to the VL and VH regions (see an exemplary ccFv in

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Figure 1). A more complex Nsc Abu is a multivalent molecule capable of binding to more than one antigen of the same kind (i.e. multivalent but monospecific) or different kind (i.e. multivalent and multispecific Abus). Typically, a multivalent Abu is a heteromultimer composed of more than one L and H chain polypeptides, in which either the L or H polypeptide or both contain more than one V region. For instance, an exemplary bivalent Abu assumes the configuration of (ccFv)₂ as depicted in Figure 12. The H chain polypeptide in this illustrative bivalent Abu contains two VH regions, each of which dimerizes with a VL region to constitute two antigen-binding sites. Alternatively, the L chain polypeptide may provide two VL regions, each of which dimerizes with a VH region to reconstitute the two binding sites. As shown in Figure 12, the multivalent Abu is stabilized via pairwise affinity of the two heterodimerization sequences linked to the VL and VH regions. The Abu is assembled efficiently because at least one, and preferably both, of the heterodimerization sequences is or are incapable of forming homodimers, thus minimizing intra-molecular dimerization to form nonfunctional VH/VH or VL/VL dimers. Applying this general antibody engineering scheme, trivalent and tetravalent Abus can be constructed (see, e.g. Figure 12).

131 A variant approach to construct multivalent Abus employs a scFv or dsFv fragment as illustrated in Figure 13. In addition to the building unit ccFv that provides one antigen-binding site, Abu of this configuration contains one or more scFv or dsFv fragments that are linked to the ccFv. The linked scFv or dsFv provides the additional binding sites. For instance, a bivalent Abu may adopt the ccFv-scFv or ccFv-dsFv configuration (Figure 13). Whereas one of the antigen-binding site is assembled via the pairwise affinity of the heterodimerization sequences linked to the VL region and VH region (as in ccFv), the other is provided by the scFv or dsFv fragment that is fused in-frame with the VL region. Alternatively, the scFv or dsFv fragment can be linked to the VH region.

132 The same approach can be employed to generate trivalent ccFv-scFv or ccFv-dsFv Abus as shown in Figure 14. In one aspect, the trivalent Abu assumes the configuration of ccFv-(scFv)₂, in which two polypeptides "VH-first" heterodimerization

WO 03/012069

PCT/US02/24582

sequence-scFv" and "VL-second heterodimerization sequence-scFv" dimerize via the pairwise affinity of the two heterodimerization sequences to constitute three binding sites. One of the binding sites is composed of the VL and VH regions of the ccFv building units; the remaining two are provided by the scFv fragments linked to the respective VL and VH polypeptides. Alternatively, the multivalent Abus can be configured as ccFv-scFv-dsFv. In this configuration, one of the antigen-binding sites is assembled and stabilized via an inter-molecular disulfide bond between a pair of cysteine residues that is located within the VH and VL regions of the dsFv fragment. A further variant of this configuration is a trivalent ccFv-(dsFv)₂, in which two of the binding sites assume the dsFv format (see, e.g. Figure 14). Any other multivalent Abus variants employing the basic ccFv building unit, whether being monospecific or multispecific, are encompassed by this invention.

133 Accordingly, this invention further provides multispecific Abus. They are multivalent molecules capable of binding to at least two distinct antigens. Preferred multispecific Abus are bispecific and trispecific molecules exhibiting binding specificities to two and three distinct antigens, respectively. Distinguished from previously characterized multispecific antibodies (see e.g. U.S. Patent No. 5,932,448), the subject multispecific Abus comprises one or more ccFv building unit with distinct binding specificities. The subject multispecific Abus can also incorporate one or more scFv or dsFv fragments as detailed above. Preferred bispecific and trispecific Abus are configured according to the general structures depicted in Figures 15-17.

134 Aside from non-single chain Abus, the present invention includes single-chain Abus that is stabilized by the subject heterodimerization sequences. Typically, the Sc Abus comprises a VL and a VH region forming an intra-molecular dimer via the pairwise affinity of the heterodimerization sequences connected to these two regions. The heterodimerization sequences may be configured in either a parallel or anti-parallel manner (see, e.g. Figure 18). In a parallel configuration, the two heterodimerization sequences are aligned such that they have the same orientation (amino-terminal to carboxyl-terminal). In an anti-parallel configuration, the heterodimerization sequences

WO 03/012069

PCT/US02/24582

are arranged such that the amino-terminal end of one sequence is aligned with the carboxyl-terminal end of the other sequence, and vice versa. Generally, the heterodimerization sequences are linked together via a flexon sequence. As described herein, flexon is a flexible polypeptide linker (or a nucleic acid sequence encoding such a polypeptide) which typically comprises amino acids having small side chains (e.g. glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, and serine). Incorporating flexons between the two heterodimerization sequences generally provides spatial flexibility for them to form an intra-molecular dimer. Suitable flexons for the anti-parallel configuration preferably comprise between about four to about one hundred amino acids, more preferably about four to fifty amino acids, and even more preferably about four to fifteen amino acids. Flexons for the parallel configuration are generally longer, preferably ranging from about ten to about one hundred amino acids, more preferably from about fifty to about thirty amino acid residues.

135 Where desired, one or more pairs of cysteine residues may be incorporated at the N- or C- terminus of the heterodimerization sequences to further stabilize the Abus of the present invention.

136 The Abus of this invention may contain sequences derived from the constant regions of an L chain or a H chain. Such sequences derived from the constant regions are generally placed between a light-chain or a heavy-chain variable region and the heterodimerization sequence to which it is linked. In addition, the light and heavy chains may contain partly or entirely human sequences.

137 Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. "Humanized" antibodies are antibodies in which at least part of the sequence has been altered from its initial form to render it more like human immunoglobulins. In one version, the H chain and L chain C regions are replaced with human sequence. This is a fusion polypeptide comprising a V region and a heterologous immunoglobulin C region. In another version, the CDR regions comprise non human antibody sequences, while the V framework regions have also been converted human sequences. See, for example, EP 0329400. In a third version, V regions are humanized by designing consensus sequences

WO 03/012069

PCT/US02/24582

of human and mouse V regions, and converting residues outside the CDRs that are different between the consensus sequences.

138 In making humanized antibodies, the choice of framework residues can be critical in retaining high binding affinity. In principle, a framework sequence from any HuAb can serve as the template for CDR grafting; however, it has been demonstrated that straight CDR replacement into such a framework can lead to significant loss of binding affinity to the antigen. Glaser *et al.* (1992) *J. Immunol.* 149:2606; Tempest *et al.* (1992) *Biotechnology* 9:266; and Shalaby *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* 17:217. The more homologous a HuAb is to the original muAb, the less likely that the human framework will introduce distortions into the murine CDRs that could reduce affinity. Based on a sequence homology search against an antibody sequence database, the HuAb IC4 provides good framework homology to muM4TS.22, although other highly homologous HuAbs would be suitable as well, especially kappa L chains from human subgroup I or H chains from human subgroup III. Kabat *et al.* (1987). Various computer programs such as ENCADC (Levitt *et al.* (1983) *J. Mol. Biol.* 168:595) are available to predict the ideal sequence for the V region. The invention thus encompasses HuAbs with different V regions. It is within the skill of one in the art to determine suitable V region sequences and to optimize these sequences. Methods for obtaining antibodies with reduced immunogenicity are also described in U.S. Patent No. 5,270,202 and EP 699,755.

139 It is important that antibodies be humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to a preferred method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three dimensional models of the parental and humanized sequences. Three dimensional immunoglobulin models are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, i.e., the analysis of residues that influence the ability of the candidate

WO 03/012069

PCT/US02/24582

immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the consensus and import sequence so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved.

140 The invention also encompasses Abus conjugated to a chemically functional moiety. Typically, the moiety is a label capable of producing a detectable signal. These conjugated Abus are useful, for example, in detection systems such as quantitation of tumor burden, and imaging of metastatic foci and tumor imaging. Such labels are known in the art and include, but are not limited to, radioisotopes, enzymes, fluorescent compounds, chemiluminescent compounds, bioluminescent compounds substrate cofactors and inhibitors. See, for examples of patents teaching the use of such labels, U.S. Patent Nos. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; and 4,366,241. The moieties can be covalently linked to Abus, recombinantly linked, or conjugated to Abus through a secondary reagent, such as a second antibody, protein A, or a biotin-avidin complex.

141 Other functional moieties include signal peptides, agents that enhance immunologic reactivity, agents that facilitate coupling to a solid support, vaccine carriers, bioresponse modifiers, paramagnetic labels and drugs. Signal peptides is a short amino acid sequence that directs a newly synthesized protein through a cellular membrane, usually the endoplasmic reticulum in eukaryotic cells, and either the inner membrane or both inner and outer membranes of bacteria. Signal peptides are typically at the *N*-terminal portion of a polypeptide and are typically removed enzymatically between biosynthesis and secretion of the polypeptide from the cell. Such a peptide can be incorporated into the subject Abus to allow secretion of the synthesized molecules.

142 Agents that enhance immunologic reactivity include, but are not limited to, bacterial superantigens. Agents that facilitate coupling to a solid support include, but are not limited to, biotin or avidin. Immunogen carriers include, but are not limited to, any physiologically acceptable buffers. Bioresponse modifiers include cytokines, particularly tumor necrosis factor (TNF), interleukin-2, interleukin-4, granulocyte macrophage colony stimulating factor and γ -interferons.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

143 Suitable drug moieties include antineoplastic agents. Non-limiting examples are radioisotopes, vinca alkaloids such as the vinblastine, vincristine and vindesine sulfates, adriamycin, bleomycin sulfate, carboplatin, cisplatin, cyclophosphamide, cytarabine, dacarbazine, dactinomycin, duanorubicin hydrochloride, doxorubicin hydrochloride, etoposide, fluorouracil, lomustine, mechlorethamine hydrochloride, melphalan, mercaptopurine, methotrexate, mitomycin, mitotane, pentostatin, pipobroman, procarbazine hydrochloride, streptozotocin, taxol, thioguanine, and uracil mustard.

144 Immunotoxins, including single chain molecules, can be produced by recombinant means. Production of various immunotoxins is well-known in the art, and methods can be found, for example, in "Monoclonal Antibody-toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet," Thorpe *et al.* (1982) *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic Press, pp. 168-190; Vitatta (1987) *Science* 238:1098-1104; and Winter and Milstein (1991) *Nature* 349:293-299. Suitable toxins include, but are not limited to, ricin, radionuclides, pokeweed antiviral protein, Pseudomonas exotoxin A, diphtheria toxin, ricin A chain, fungal toxins such as restrictocin and phospholipase enzymes. See, generally, "Chimeric Toxins," Olsnes and Pihl, *Pharmac. Ther.* 15:355-381 (1981); and "Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy," eds. Baldwin and Byers, pp. 159-179, 224-266, Academic Press (1985).

145 The chemically functional moieties can be made recombinantly for instance by creating a fusion gene encoding the Abu and the functional moiety. Alternatively, the Abu can be chemically bonded to the moiety by any of a variety of well-established chemical procedures. For example, when the moiety is a protein, the linkage may be by way of heterobifunctional cross linkers, e.g., SPDP, carbodiimide glutaraldehyde, or the like. The moieties may be covalently linked, or conjugated, through a secondary reagent, such as a second antibody, protein A, or a biotin-avidin complex. Paramagnetic moieties and the conjugation thereof to antibodies are well-known in the art. See, e.g., Miltenyi *et al.* (1990) *Cytometry* 11:231-238.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Preparation of Antigen-Binding Units (Abus):

- 146 The subject Abus can be prepared by recombinant DNA technology, synthetic chemistry techniques, or a combination thereof. For instance, sequences encoding the desired components of the Abus, including VL, VH and the heterodimerization sequences are typically assembled and fragments ligated into an expression vector. These sequences may be assembled from other vectors encoding the desired protein sequence, from PCR-generated fragments using respective template nucleic acids, or by assembly of synthetic oligonucleotides encoding the desired sequences. However, all nucleic acid sequences encoding the Abus are preferably assembled by in-frame fusion of coding sequences. Flexons, described above, can be included between various components and domains in order to enhance the ability of the individual components to assume configurations relatively independently of each other. To produce Nsc Abus, the L and H chain can be formed separately and then assembled, or assembled *in vivo* by an expression system for both chains. Such expression systems can be created by transfecting a suitable cell with a vector comprising separate transcribable regions for the L and H chain, or by co-transfected the same cell with vectors for each chain.
- 147 The assembled Abus can be isolated using a variety of protein purification techniques known in the art. Generally, the Abu is isolated from culture media as secreted polypeptides, although they can be recovered from host cell lysates or bacterial periplasm, when directly produced without signal peptides. If the Abus are membrane-bound, they be solubilized by suitable detergent solutions commonly employed by artisans in the field. The recovered Abus may be further purified by salt precipitation (e.g., with ammonium sulfate), ion exchange chromatography (e.g. on a cationic or anionic exchange column run at neutral pH and eluted with step gradients of increasing ionic strength), gel filtration chromatography (including gel filtration HPLC), and chromatography on tag-affinity column, or on affinity resins such as protein A, protein G, hydroxyapatite, and anti-immunoglobulin.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Polynucleotides and Vectors of the Present Invention

- 148 The invention provides various polynucleotides that encode the Abus of the invention. The invention polynucleotides are characterized, in part, by the unique heterodimerization sequences contained therein as detailed above. Such heterodimerization sequences enable efficient assembly of and screening for Abus, such as those that specifically bind to a desired antigen. Such sequences also facilitate display of heteromultimers on living biological entities including phages, bacteria, other prokaryotic or eukaryotic cells. Preferred heterodimerization sequences shown in SEQ ID NOS. 2 and 4.
- 149 In one embodiment, this invention provides isolate polynucleotides that encode the subject Nsc Abus. In one aspect of this embodiment, the recombinant polynucleotide comprises a coding sequence that encodes the light-chain polypeptide of a subject Nsc Abu. In another aspect, the recombinant polynucleotide comprises a coding sequence that encodes the heavy-chain polypeptide of a Nsc Abu. In yet another aspect, the recombinant polynucleotide comprises two separate coding sequences, one of which codes for the light-chain polypeptide, and the other codes for the heavy-chain.
- 150 Nucleotide sequences corresponding to various regions of L or H chains of an existing antibody can be readily obtained and sequenced using convention techniques including but not limited to hybridization, PCR, and DNA sequencing. Hybridoma cells that produce monoclonal antibodies serve as a preferred source of antibody nucleotide sequences. A vast number of hybridoma cells producing an array of monoclonal antibodies may be obtained from public or private repositories. The largest depository agent is American Type Culture Collection (<http://www.atcc.org>), which offers a diverse collection of well-characterized hybridoma cell lines. Alternatively, antibody nucleotides can be obtained from immunized or non-immunized rodents or humans, and from organs such as spleen and peripheral blood lymphocytes. Specific techniques applicable for extracting and synthesizing antibody nucleotides are described in Orlandi *et al.*(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **86**: 3833-3837; Larrick *et al.* (1989) *Biochem.*

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Biophys. Res. Commun. **160**:1250-1255; Sastry *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **86**: 5728-5732; and U.S Patent No. 5,969,108.

151 The antibody nucleotide sequences may also be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant regions in place of the homologous non-human sequences. In that manner, chimeric antibodies are prepared that retain the binding specificity of the original antibody.

152 It is also understood that the polynucleotides embodied in the invention include those coding for functional equivalents and fragments thereof of the exemplified polypeptides. Functionally equivalent polypeptides include those that enhance, decrease or not significantly affect properties of the polypeptides encoded thereby. Functional equivalents may be polypeptides having conservative amino acid substitutions, analogs including fusions, and mutants.

153 Due to the degeneracy of the genetic code, there can be considerable variation in nucleotides of the L and H sequences, as well as the heterodimerization sequences suitable for construction of the polynucleotide and vectors of the present invention. Sequence variants may have modified DNA or amino acid sequences, one or more substitutions, deletions, or additions, the net effect of which is to retain the desired antigen-binding activity. For instance, various substitutions can be made in the coding region that either do not alter the amino acids encoded or result in conservative changes. These substitutions are encompassed by the present invention. Conservative amino acid substitutions include substitutions within the following groups: glycine, alanine; valine, isoleucine, leucine; aspartic acid, glutamic acid; asparagine, glutamine; serine, threonine; lysine, arginine; and phenylalanine, tyrosine. While conservative substitutions do effectively change one or more amino acid residues contained in the polypeptide to be produced, the substitutions are not expected to interfere with the antigen-binding activity of the resulting Abus to be produced. Nucleotide substitutions that do not alter the amino acid residues encoded are useful for optimizing gene expression in different systems. Suitable substitutions are known to those of skill in the art and are made, for instance, to reflect preferred codon usage in the expression systems.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

154 Where desired, the recombinant polynucleotides may comprise heterologous sequences that facilitate detection of the expression and purification of the gene product. Examples of such sequences are known in the art and include those encoding reporter proteins such as β -galactosidase, β -lactamase, chloramphenicol acetyltransferase (CAT), luciferase, green fluorescent protein (GFP) and their derivatives. Other heterologous sequences that facilitate purification may code for epitopes such as Myc, HA (derived from influenza virus hemagglutinin), His-6, FLAG, or the Fc portion of immunoglobulin, glutathione S-transferase (GST), and maltose-binding protein (MBP).

155 The polynucleotides can be conjugated to a variety of chemically functional moieties described above. Commonly employed moieties include labels capable of producing a detectable signal, signal peptides, agents that enhance immunologic reactivity, agents that facilitate coupling to a solid support, vaccine carriers, bioreponse modifiers, paramagnetic labels and drugs. The moieties can be covalently linked polynucleotide recombinantly or by other means known in the art.

156 The polynucleotides of the invention can comprise additional sequences, such as additional encoding sequences within the same transcription unit, controlling elements such as promoters, ribosome binding sites, and polyadenylation sites, additional transcription units under control of the same or a different promoter, sequences that permit cloning, expression, and transformation of a host cell, and any such construct as may be desirable to provide embodiments of this invention.

157 The polynucleotides embodied in this invention can be obtained using chemical synthesis, recombinant cloning methods, PCR, or any combination thereof. Methods of chemical polynucleotide synthesis are well known in the art and need not be described in detail herein. One of skill in the art can use the sequence data provided herein to obtain a desired polynucleotide by employing a DNA synthesizer or ordering from a commercial service.

158 Polynucleotides comprising a desired sequence can be inserted into a suitable vector which in turn can be introduced into a suitable host cell for replication and amplification. Accordingly, the invention encompasses a variety of vectors comprising

WO 03/012069

PCT/US02/24582

one or more of the polynucleotides of the present invention. Also provided is a selectable library of expression vectors comprising at least one vector encoding the subject Abus.

159 Vectors of the present invention are generally categorized into cloning and expression vectors. Cloning vectors are useful for obtaining replicate copies of the polynucleotides they contain, or as a means of storing the polynucleotides in a depository for future recovery. Expression vectors (and host cells containing these expression vectors) can be used to obtain polypeptides produced from the polynucleotides they contain. Suitable cloning and expression vectors include any known in the art, e.g., those for use in bacterial, mammalian, yeast, insect and phage display expression systems.

160 Suitable cloning vectors can be constructed according to standard techniques, or selected from a large number of cloning vectors available in the art. While the cloning vector selected may vary according to the host cell intended to be used, useful cloning vectors will generally have the ability to self-replicate, may possess a single target for a particular restriction endonuclease, or may carry marker genes. Suitable examples include plasmids and bacterial viruses, e.g., pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, pUC18, mp18, mp19, phage DNAs (including filamentous and non-filamentous phage DNAs), and shuttle vectors such as pSA3 and pAT28. These and other cloning vectors are available from commercial vendors such as Clontech, BioRad, Stratagene, and Invitrogen.

161 Expression vectors containing these nucleic acids are useful to obtain host vector systems to produce proteins and polypeptides. It is implied that these expression vectors must be replicable in the host organisms either as episomes or as an integral part of the chromosomal DNA. Suitable expression vectors include plasmids, viral vectors, including phagemids, adenoviruses, adeno-associated viruses, retroviruses, cosmids, etc. A number of expression vectors suitable for expression in eukaryotic cells including yeast, avian, and mammalian cells are known in the art. One example of an expression vector is pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA), in which transcription is driven by the cytomegalovirus (CMV) early promoter/enhancer. Two types of particularly useful

WO 03/012069

PCT/US02/24582

expression vectors for expressing the subject Abus are the phage display vector and bacterial display vector.

162 The techniques for constructing phage display vectors are well established in the art (see review article by Winter G. *et al.* (1994) *Ann. Rev. Immunol.* **12**:433-55). Both filamentous and non-filamentous phage sequences are applicable for constructing a display vector. Filamentous phage vectors are preferred because the genomes of many representative phages of this class have been sequenced, and their genomes are found to be much smaller than that of non-filamentous phages. Representative phages of this class include M13, f1, fd, Ifl, Ike, Xf, Pfl, and Pf3. The phage vector typically is constructed to express heteromultimers, e.g. antibody peptides, by fusion to a part or all of a phage coat protein. Suitable coat proteins include pIII, VIII, VI, VII and IX of M13. The heteromultimer sequence must be inserted into the phage vector in such a way that the integrity of the expressed phage coat is not undermined, and the heteromultimer is preferably biologically functional.

163 For constructing pIII fusion vector, commonly employed fusion sites are located at the amino terminus, in between the flexible spacer between the two domains of pIII (Smith *et al.* *Science* **288**:1315-17), or any other alternative fusion sites described in U.S. Patent Nos. 5,969,108, 5,837,500. The pIII fusion and other proteins of the phage can be encoded entirely within the same phage replicon or on different replicons. When at least two replicons are used, the pIII fusion is generally encoded on a phagemid, a plasmid containing a phage origin of replication. Phagemids can be packaged into phage particles by "rescue" with a helper phage such as M13KO7, which provides all the phage proteins, including pIII, but due to a defect origin is itself poorly packaged in competition with the phagemids. Other multivalent helper phages (e.g. M13ΔgIII) that lack or contain altered pIII to enhance the package efficiency can also be employed (Rondot *et al.* *Nature Biotechnology* **19**:75-78).

164 Similar constructions can be made with other filamentous phage. Pf3 is a well-known filamentous phage that infects *Pseudomonas aeruginosa* cells that harbor an IncP-1 plasmid. The entire genome has been sequenced and the genetic signals involved in

WO 03/012069

PCT/US02/24582

replication and assembly are characterized. The major coat protein of PF3 is unusual in having no signal peptide to direct its secretion. The sequence has charged residues ASP₇, ARG₃₇, LYS₄₀, and PHE₄₄-COO⁻ which is consistent with the amino terminus being exposed. To construct a display PF3 vector, it is generally desirable to engineer a signal sequence known to cause secretion in *P. aeruginosa* fused in-frame to a gene fragment encoding a heterologous polypeptide, which in turn is fused in-frame with a DNA encoding the mature PF3 coat protein.

165 The same general construction scheme applies to generating display vectors containing sequences derived from non-filamentous phages including bacteriophage X174, λ, T4 and T7 phages. A wealth of information on the structures of these non-filamentous phages is known in the art. One skilled in the art can readily generate a corresponding display vector that expresses the subject heteromultimers using the unique heterodimerization sequences without undue experimentation.

166 In addition to phage display vector, another class of preferred vector is bacterial display vector. The general scheme outlined above is equally applicable for constructing such vectors. Briefly, the vectors facilitate expression of a heteromultimer, Abus in particular, as a fusion with a bacterial surface protein. Prior research has revealed a vast number of bacterial surface proteins applicable for expressing such fusions. Non-limiting examples of bacterial surface proteins are LamB (Bremer *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1984) **81**:3830-34; *Gene* (1987) **52**:165-73); OmpA (Prog Biophys Molec Biol (1987) 49:89-115); OmpC; OmpF (Pages *et al.* *Biochemimie* (1990) 72:169-76); PhoE (van der Ley *et al.* *J. Biol. Chem.* **261**:12222-5); pilin (So *et al.* *Curr Top in Microbiol & Immunol* (1985) **118**:13-28); pldA (de Geus *et al.* *EMBO J.* (1984) **3**(8): 1799-1802) and their homologs. Characterization of these and other surface proteins, and the methods of using these proteins for displaying heterologous polypeptides are detailed in U.S. Patent No. 5,837,500 as well as the references cited therein.

167 The vectors of the present invention generally comprises a transcriptional or translational control sequences required for expressing the Abus. Suitable transcription or translational control sequences include but are not limited to replication origin,

WO 03/012069

PCT/US02/24582

promoter, enhancer, repressor binding regions, transcription initiation sites, ribosome binding sites, translation initiation sites, and termination sites for transcription and translation.

168 As used herein, a "promoter" is a DNA region capable under certain conditions of binding RNA polymerase and initiating transcription of a coding region located downstream (in the 3' direction) from the promoter. It can be constitutive or inducible. In general, the promoter sequence is bounded at its 3' terminus by the transcription initiation site and extends upstream (5' direction) to include the minimum number of bases or elements necessary to initiate transcription at levels detectable above background. Within the promoter sequence is a transcription initiation site, as well as protein binding domains responsible for the binding of RNA polymerase. Eukaryotic promoters will often, but not always, contain "TATA" boxes and "CAT" boxes.

169 The choice of promoters will largely depend on the host cells in which the vector is introduced. For animal cells, a variety of robust promoters, both viral and non-viral promoters, are known in the art. Non-limiting representative viral promoters include CMV, the early and late promoters of SV40 virus, promoters of various types of adenoviruses (e.g. adenovirus 2) and adeno-associated viruses. It is also possible, and often desirable, to utilize promoters normally associated with a desired light or heavy chain gene, provided that such control sequences are compatible with the host cell system.

170 Suitable promoter sequences for other eukaryotic cells include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase, or other glycolytic enzymes, such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase. Other promoters, which have the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytchrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, and the

WO 03/012069

PCT/US02/24582

aforementioned glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization.

171 In certain preferred embodiments, the vectors of the present invention use strong enhancer and promoter expression cassettes. Examples of such expression cassettes include the human cytomegalovirus immediately early (HCMV-IE) promoter (Boshart *et al.*, *Cell* **41**: 521,(1985)), the β-actin promoter (Gunning *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **84**: 5831), the histone H4 promoter (Guild *et al.*(1988), *J. Viral.* **62**: 3795), the mouse metallothionein promoter (McIvor *et al.* (1987), *Mol. Cell. Biol.* **7**: 838), the rat growth hormone promoter (Millet *et al.* (1985), *Mol. Cell Biol.* **5**: 431), the human adenosine deaminase promoter (Hantzapoulos *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3519), the HSV tk promoter 25 (Tabin *et al.* (1982) *Mol. Cell. Biol.* **2**: 426), the α-1 antitrypsin enhancer (Peng *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8146), and the immunoglobulin enhancer/promoter (Blankenstein *et al.* (1988) *Nucleic Acid Res.* **16**: 10939), the SV40 early or late promoters, the Adenovirus 2 major late promoter, or other viral promoters derived from polyoma virus, bovine papilloma virus, or other retroviruses or adenoviruses. The promoter and enhancer elements of immunoglobulin (Ig) genes confer marked specificity to B lymphocytes (Banerji *et al.* (1983) *Cell* **33**: 729; Gillies *et al.* (1983) *Cell* **33**: 717; Mason *et al.* (1985) *Cell* **41**: 479), while the elements controlling transcription of the B-globin gene function only in erythroid cells (van Assendelft *et al.* (1989) *Cell* **56**:969).

172 Cell-specific or tissue-specific promoters may also be used. A vast diversity of tissue specific promoters have been described and employed by artisans in the field. Exemplary promoters operative in selective animal cells include hepatocyte-specific promoters and cardiac muscle specific promoters. Depending on the choice of the recipient cell types, those skilled in the art will know of other suitable cell-specific or tissue-specific promoters applicable for the construction of the expression vectors of the present invention.

173 Using well-known restriction and ligation techniques, appropriate transcriptional control sequences can be excised from various DNA sources and integrated in operative

WO 03/012069

PCT/US02/24582

relationship with the intact selectable fusion genes to be expressed in accordance with the present invention.

174 In constructing the subject vectors, the termination sequences associated with the exogenous sequences are also inserted into the 3' end of the sequence desired to be transcribed to provide polyadenylation of the mRNA and/or transcriptional termination signal. The terminator sequence preferably contains one or more transcriptional termination sequences (such as polyadenylation sequences) and may also be lengthened by the inclusion of additional DNA sequence so as to further disrupt transcriptional read-through. Preferred terminator sequences (or termination sites) of the present invention have a gene that is followed by a transcription termination sequence, either its own termination sequence or a heterologous termination sequence. Examples of such termination sequences include stop codons coupled to various polyadenylation sequences that are known in the art, widely available, and exemplified below. Where the terminator comprises a gene, it can be advantageous to use a gene which encodes a detectable or selectable marker; thereby providing a means by which the presence and/or absence of the terminator sequence (and therefore the corresponding inactivation and/or activation of the transcription unit) can be detected and/or selected.

175 In addition to the above-described elements, the vectors may contain a selectable marker (for example, a gene encoding a protein necessary for the survival or growth of a host cell transformed with the vector), although such a marker gene can be carried on another polynucleotide sequence co-introduced into the host cell. Only those host cells into which a selectable gene has been introduced will survive and/or grow under selective conditions. Typical selection genes encode protein(s) that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, G418, methotrexate, etc.; (b) complement auxotrophic deficiencies; or (c) supply critical nutrients not available from complex media. The choice of the proper marker gene will depend on the host cell, and appropriate genes for different hosts are known in the art.

176 In a preferred embodiment, the vector is a shuttle vector, capable of replicating in at least two unrelated expression systems. In order to facilitate such replication, the

WO 03/012069

PCT/US02/24582

vector generally contains at least two origins of replication, one effective in each expression system. Typically, shuttle vectors are capable of replicating in a eukaryotic expression system and a prokaryotic expression system. This enables detection of protein expression in the eukaryotic host (the expression cell type) and amplification of the vector in the prokaryotic host (the amplification cell type). Preferably, one origin of replication is derived from SV40 and one is derived from pBR322 although any suitable origin known in the art may be used provided it directs replication of the vector. Where the vector is a shuttle vector, the vector preferably contains at least two selectable markers, one for the expression cell type and one for the amplification cell type. Any selectable marker known in the art or those described herein may be used provided it functions in the expression system being utilized.

177 The vectors embodied in this invention can be obtained using recombinant cloning methods and/or by chemical synthesis. A vast number of recombinant cloning techniques such as PCR, restriction endonuclease digestion and ligation are well known in the art, and need not be described in detail herein. One of skill in the art can also use the sequence data provided herein or that in the public or proprietary databases to obtain a desired vector by any synthetic means available in the art.

Host Cells of the Present Invention:

178 The invention provides host cells transfected with the vectors or a library of the expression vectors described above. The expression vectors can be introduced into a suitable prokaryotic or eukaryotic cell by any of a number of appropriate means, including electroporation, microprojectile bombardment; lipofection, infection (where the vector is coupled to an infectious agent), transfection employing calcium chloride, rubidium chloride, calcium phosphate, DEAE-dextran, or other substances. The choice of the means for introducing vectors will often depend on features of the host cell.

179 For most animal cells, any of the above-mentioned methods is suitable for vector delivery. Preferred animal cells are vertebrate cells, preferably mammalian cells, capable of expressing exogenously introduced gene products in large quantity, e.g. at the

WO 03/012069

PCT/US02/24582

milligram level. Non-limiting examples of preferred cells are NIH3T3 cells, COS, HeLa, and CHO cells.

180 The animal cells can be cultured in a variety of media. Commercially available media such as Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) are suitable for culturing the host cells. In addition, animal cells can be grown in a defined medium that lacks serum but is supplemented with hormones, growth factors or any other factors necessary for the survival and/or growth of a particular cell type. Whereas a defined medium supporting cell survival maintains the viability, morphology, capacity to metabolize and potentially, capacity of the cell to differentiate, a defined medium promoting cell growth provides all chemicals necessary for cell proliferation or multiplication. The general parameters governing mammalian cell survival and growth *in vitro* are well established in the art. Physicochemical parameters which may be controlled in different cell culture systems are, e.g., pH, pO₂, temperature, and osmolarity. The nutritional requirements of cells are usually provided in standard media formulations developed to provide an optimal environment. Nutrients can be divided into several categories: amino acids and their derivatives, carbohydrates, sugars, fatty acids, complex lipids, nucleic acid derivatives and vitamins. Apart from nutrients for maintaining cell metabolism, most cells also require one or more hormones from at least one of the following groups: steroids, prostaglandins, growth factors, pituitary hormones, and peptide hormones to proliferate in serum-free media (Sato, G.H., *et al.* in "Growth of Cells in Hormonally Defined Media", Cold Spring Harbor Press, N.Y., 1982). In addition to hormones, cells may require transport proteins such as transferrin (plasma iron transport protein), ceruloplasmin (a copper transport protein), and high-density lipoprotein (a lipid carrier) for survival and growth *in vitro*. The set of optimal hormones or transport proteins will vary for each cell type. Most of these hormones or transport proteins have been added exogenously or, in a rare case, a mutant cell line has been found which does not require a particular factor. Those skilled in the art will know of other factors required for maintaining a cell culture without undue experimentation.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

181 For plant cells, a variety of vector delivery techniques is available in the art. The host cells may be in the form of whole plants, isolated cells or protoplasts. Illustrative procedures for introducing vectors into plant cells include Agrobacterium-mediated plant transformation, protoplast transformation, gene transfer into pollen, injection into reproductive organs and injection into immature embryos. As is evident to one skilled in the art, each of these methods has distinct advantages and disadvantages. Thus, one particular method of introducing vectors into a particular plant species may not necessarily be the most effective for another plant species.

182 Agrobacterium tumefaciens-mediated transfer is a widely applicable system for introducing vectors into plant cells because the vector can be introduced into whole plant tissues, bypassing the need for regeneration of an intact plant from a protoplast. The use of Agrobacterium-mediated expression vectors to introduce vector into plant cells is well known in the art. This technique makes use of a common feature of *Agrobacterium* which colonizes plants by transferring a portion of their DNA (the T-DNA) into a host cell, where it becomes integrated into nuclear DNA. The T-DNA is defined by border sequences which are 25 base pairs long, and any DNA between these border sequences is transferred to the plant cells as well. The insertion of a recombinant plant viral nucleic acid between the T-DNA border sequences results in transfer of the recombinant plant viral nucleic acid to the plant cells, where the recombinant plant viral nucleic acid is replicated, and then spreads systemically through the plant.

183 Because not all plants are natural hosts for Agrobacterium, alternative methods such as transformation of protoplasts may be employed to introduce the subject vectors into the host cells. For certain monocots, transformation of the plant protoplasts can be achieved using methods based on calcium phosphate precipitation, polyethylene glycol treatment, electroporation, and combinations of these treatments.

184 In addition to protoplast transformation, particle bombardment is an alternative and convenient technique for delivering the invention vectors into a plant host cell. Specifically, the plant cells may be bombarded with microparticles coated with a plurality of the subject vectors. Bombardment with DNA-coated microprojectiles has

WO 03/012069

PCT/US02/24582

been successfully used to produce stable transformants in both plants and animals (see, for example, Sanford *et al.* (1993) *Methods in Enzymology*, 217:483-509).

Microparticles suitable for introducing vectors into a plant cell are typically made of metal, preferably tungsten or gold. These microparticles are available for example, from BioRad (e.g., Bio-Rad's PDS-1000/He). Those skilled in the art will know that the particle bombardment protocol can be optimized for any plant by varying parameters such as He pressure, quantity of coated particles, distance between the macrocarrier and the stopping screen and flying distance from the stopping screen to the target.

185 Vectors can also be introduced into plants by direct DNA transfer into pollen as described by Zhou *et al.*, *Methods in Enzymology*, 101:433 (1983); D. Hess, *Intern Rev. Cytol.*, 107:367 (1987); Luo *et al.*, *Plant Mol. Biol. Reporter*, 6:165 (1988). Alternatively, the vectors can be injected into reproductive organs of a plant as described by Pena *et al.*, *Nature*, 325:274 (1987).

186 Other techniques for introducing nucleic acids into a plant cell include:

- (a) Hand Inoculations. Hand inoculations are performed using a neutral pH, low molarity phosphate buffer, with the addition of celite or carborundum (usually about 1%). One to four drops of the preparation is put onto the upper surface of a leaf and gently rubbed.
- (b) Mechanized Inoculations of Plant Beds. Plant bed inoculations are performed by spraying (gas-propelled) the vector solution into a tractor-driven mower while cutting the leaves. Alternatively, the plant bed is mowed and the vector solution sprayed immediately onto the cut leaves.
- (c) High Pressure Spray of Single Leaves. Single plant inoculations can also be performed by spraying the leaves with a narrow, directed spray (50 psi, 6-12 inches from the leaf) containing approximately 1% carborundum in the buffered vector solution.
- (d) Vacuum Infiltration. Inoculations may be accomplished by subjecting a host organism to a substantially vacuum pressure environment in order to facilitate infection.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

187 Other suitable host cells for cloning and expressing the subject vectors are prokaryotes and eukaryotic microbes such as fungi or yeast cells. Suitable prokaryotes for this purpose include bacteria including Gram-negative and Gram-positive organisms. Representative members of this class of microorganisms are Enterobacteriaceae (e.g. *E. coli*), Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella (e.g. *Salmonella typhimurium*), Serratia (e.g., *Serratia marcescens*), Shigella, Neisseria (e.g. *Neisseria meningitidis*) as well as Bacilli (e.g. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*). Preferably, the host cell secretes minimal amounts of proteolytic fragments of the expressed Abus. Commonly employed fungi (including yeast) host cells are *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), species of *Candida* including *C. albicans* and *C. glabrata*, *C. maltosa*, *C. utilis*, *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Neurospora crassas*, *Aspergillus nidulans*, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), *Pichia pastoris*, and *Yarrowia lipolytica*.

188 Once introduced into a suitable host cell, expression of the Abus can be determined using any nucleic acid or protein assay known in the art. For example, the presence of transcribed mRNA of L or H chain, or the Sc Abu can be detected and/or quantified by conventional hybridization assays (e.g. Northern blot analysis), amplification procedures (e.g. RT-PCR), SAGE (U.S. Patent No. 5,695,937), and array-based technologies (see e.g. U.S. Pat. Nos. 5,405,783, 5,412,087 and 5,445,934), using probes complementary to any region of Abu polynucleotide.

189 Expression of the vector can also be determined by examining the Abu expressed. A variety of techniques are available in the art for protein analysis. They include but are not limited to radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunoradiometric assays), "sandwich" immunoassays, immunoradiometric assays, in situ immunoassays (using e.g., colloidal gold, enzyme or radioisotope labels), western blot analysis, immunoprecipitation assays, immunofluorescent assays, and PAGE-SDS.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Uses of the polynucleotides, vectors and host cells of the present invention:

- 190 The polynucleotides and vectors of this invention have several specific uses. They are useful, for example, in expression systems for the production of both Sc and Nsc Abus. The polynucleotides are also useful as primers to effect amplification of desired polynucleotides. Furthermore, the polynucleotides of this invention are also useful in pharmaceutical compositions including vaccines, diagnostics, and drugs.
- 191 The host cells of this invention can be used, *inter alia*, as repositories of the subject polynucleotides, vectors, or as vehicles for producing and screening desired Abus based on their antigen binding specificities.
- 192 Accordingly, the invention provides a method of identifying a Nsc Abu that is immunoreactive with a desired antigen. The method involves the following steps: (a) preparing a genetically diverse repertoire of Abus, wherein the repertoire comprises at least one subject Abu; (b) contacting the repertoire of antigen binding units with the desired antigen; (c) detecting a specific binding between Abus and the antigen, thereby identifying the Abu that is immunoreactive with the desired antigen.
- 193 The ability of an Abu to specifically bind to a desired antigen can be tested by a variety of procedures well established in the art. See Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Gherardi *et al.* (1990) *J. Immunol. Meth.* **126**:61-68. Typically, Abus exhibiting desired binding specificities can be detected directly by immunoassays, for example, by reacting labeled Abus with the antigens that are immobilized on a solid support or substrate. In general, the substrate to which the antigen is adhered is fabricated with material exhibiting a low level of non-specific binding during immunoassay. A preferred solid support is made from one or more of the following types of materials: plastic polymers, glass, cellulose, nitrocellulose, semi-conducting material, and metal. Preferably, the substrate is petri dish, chromatography beads, magnetic beads, and the like.
- 194 For such solid-phase assay, the unreacted Abus are removed by washing. In a liquid-phase assay, however, the unreacted Abus are removed by some other separation technique, such as filtration or chromatography. After binding the antigen to the labeled

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Abus, the amount of bound label is determined. A variation of this technique is a competitive assay, in which the antigen is bound to saturation with an original binding molecule. When a population of the subject Abu is introduced to the complex, only those that exhibit higher binding affinity will be able to compete, and thus remain bound to the antigen.

195 Alternatively, specific binding to a given antigen can be assessed by cell sorting, which involves presenting the desired antigen on the cells to be sorted, then labeling the target cells with Abus that are coupled to detectable agents, followed by separating the labeled cells from the unlabeled ones in a cell sorter. A sophisticated cell separation method is fluorescence-activated cell sorting (FACS). Cells traveling in single file in a fine stream are passed through a laser beam, and the fluorescence of each cell bound by the fluorescently labeled Abu is then measured.

196 Subsequent analysis of the eluted Abus may involve protein sequencing for delineating the amino acid sequences of the L and H chains. Based on the deduced amino acid sequences, the cDNA encoding the antibody polypeptides can then be obtained by recombinant cloning methods including PCR, library screening, homology searches in existing nucleic acid databases, or any combination thereof. Commonly employed databases include but are not limited to GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, SWISS-PROT, EST, STS, GSS, and HTGS.

197 When the repertoire of Abu is displayed on phage or bacterial particles, selection is preferably performed using affinity chromatography. The method typically proceeds with binding a repertoire of phage Abus to an antigen coated plates, column matrices, cells or to biotinylated antigen in solution followed by capture. The phages or bacteria bound to the solid phase are washed and then eluted by soluble hapten, acid or alkali. Alternatively, increasing concentrations of antigen can be used to dissociate the Abus from the affinity matrix. For certain Abus with extremely high affinity or avidity to the antigen, efficient elution may require high pH or mild reducing solution as described in WO 92/01047.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

- 198 To avoid potential difficulties in recovering the bound Abus with the desired binding specificities, protease cleavage sites may be introduced between the heterodimerization sequences and the phage coat protein employed for displaying the Abus. Cleavage sites applicable for this purpose include but are not limited to Factor X, trypsin, and thrombin recognition sites. After binding the phage repertoire to an affinity matrix and washing the non-specific phages, the remaining phages that display the Abus with the desired affinity can be collected by washing the antigen-affinity matrix with protease under conditions suitable for digestion at the cleavage site. Such digestion would release the Abus from the phage particles.
- 199 An alternative procedure to the above is to take the affinity matrix which has retained the strongly bound phage or bacterial particles and extract their nucleic acids, for example by boiling in SDS solution. Extracted nucleic acids can be used to directly transform E. coli host cells or alternatively the antibody encoding sequences can be amplified by PCR using suitable primers.
- 200 The efficiency of selection is likely to depend on a combination of several factors, including the kinetics of dissociation during washing, and whether multiple Abus on a single phage or bacterium can simultaneously bind to antigens on a solid support. For example, antibodies with fast dissociation kinetics (and weak binding affinities) should be retained by use of short washes, multivalent display and a high coating density of antigen at the solid support. Conversely, the selection of Abus with slow dissociation kinetics (and good binding affinities) should be favored by use of long washes, monovalent phages, and a low coating density of antigen.
- 201 Where desired, the repertoire of Abus can be pre-selected against an unrelated antigen to counter-select the undesired Abus. The repertoire may also be pre-selected against a related antigen in order to isolate, for example, anti-idiotypic Abus.
- 202 The subject Abu repertoire enables rapid isolation of Abus with desired specificities. Many of the isolated Abus would be expected to be difficult or impossible to obtain through conventional hybridoma or transgenic animal technology.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Kits comprising the vectors of the present invention

- 203 The present invention also encompasses kits containing the vectors of this invention in suitable packaging. Kits embodied by this invention include those that allow generation of Abus reconstituted via pairwise affinity of a unique heterodimerization sequence pair as described herein.
- 204 Each kit necessarily comprises the reagents which render the delivery of vectors into a host cell possible. The selection of reagents that facilitate delivery of the vectors may vary depending on the particular transfection or infection method used. The kits may also contain reagents useful for generating labeled polynucleotide probes or proteinaceous probes for detection of Abus. Each reagent can be supplied in a solid form or dissolved/suspended in a liquid buffer suitable for inventory storage, and later for exchange or addition into the reaction medium when the experiment is performed. Suitable packaging is provided. The kit can optionally provide additional components that are useful in the procedure. These optional components include, but are not limited to, buffers, capture reagents, developing reagents, labels, reacting surfaces, means for detection, control samples, instructions, and interpretive information.
- 205 Further illustration of the development and use of Abus, polynucleotides, vectors and host cells according to this invention are provided in the Example section below. The examples are provided as a guide to a practitioner of ordinary skill in the art, and are not meant to be limiting in any way.

EXAMPLES**Construction of Non-Single-Chain Antigen-Binding Units: Coiled-Coil Fv (ccFv)**

- 206 As described above, the Fv fragment is the smallest antibody fragment containing the whole antigen-binding site. Composed of the two variable regions of heavy and light chain (VH and VL), Fv is located at the "upper" tips of the Y-shaped immunoglobulin molecule. The Fv fragments have very low interaction energy between their two VH and VL fragments, and are often too unstable for many applications at physiological

WO 03/012069

PCT/US02/24582

condition. In a naturally occurring immunoglobulin (e.g. Ig), an interchain disulfide bond located in the constant domains CH1 and CL is used to link the VH and VL. This linkage makes a stabilized antigen-binding fragment Fab with a molecular weight 50 kDa. It has been shown that the VH and VL fragments can also be artificially held together by a short peptide linker between the carboxyl terminus of one fragment and amino-terminus of another to form a single-chain Fv antibody fragment (scFv). The scFv antigen-binding unit is only half the size of Fab. However, some scFv proteins are also unstable. The polypeptide linker in scFv can interfere with binding in some cases. An interchain disulfide bond has also been introduced into the framework regions in VH and VL to form a disulfide-stabilized Fv (dsFv). The dsFv configuration also has profound limitations. The introduction of two Cys residues into the antigen-binding variable regions may change the intrachain disulfide bond in VH or VL, therefore interfere with antigen binding.

207 We have devised a new strategy to stabilize VH and VL heterodimer. We have designed and used a unique heterodimerization sequence pair to create a Fab-like, functional artificial Fv fragment, namely coiled-coil Fv fragment (ccFv). The heterodimerization pair were derived from the heterodimeric receptors GABA_B receptors 1 and 2. The pair of sequences forms a coiled-coil structure and mediates the functional heterodimerization of GABA_B-R1 and GABA_B-R2 receptors.

208 Distinguished from previously characterized coiled-coil leucine zippers from the *Fos* and *Jun* proteins, the C-terminal coiled coil of GABA_B-R1 and GABA_B-R2 receptors do not form detectable homodimers under physiological conditions (e.g. *in vivo*); nor do they form homodimers at physiological body temperatures. Research by Kuner *et al.* and White *et al.* (*Science* (1999) **283**: 74-77); *Nature* (1998) **396**: 679-682)) have demonstrated the heterodimerization specificity of GABA_B-R1 and GABA_B-R2 *in vivo*. In fact, White *et al.* were able to clone GABA_B-R2 from yeast cells based on the exclusive specificity of this heterodimeric receptor pair. *In vitro* studies by Kammerer *et al. supra* has shown that neither GABA_B-R1 nor GABA_B-R2 C-terminal sequences is capable of forming homodimers in physiological buffer conditions when assayed at

WO 03/012069

PCT/US02/24582

physiological body temperatures (see Table 1 of Kammerer). However, none of these researchers who were involved in the original isolation of the GABA_B-R2 gene and the characterization of the coiled-coil sequences describe or even suggest the use of this unique heterodimerization sequences for construction of heteromultimers such as antigen-binding units.

209 We have modified the carboxyl terminus of GR1 and GR2 domains by adding a flexon "SerArgGlyGlyGly" to the amino-terminus of GR1 and GR2 domains to provide additional flexibility to the V regions. To further stabilize ccFv, we have introduced a pair of cysteine residues by adding "ValGlyGlyCys" spacer at the C-termini of the coiled coil. The GR1 and GR2 domains are fused to the carboxyl terminus of VH and VL fragment, respectively. The VH-GR1 and VL-GR2 fusions were expressed in *E. coli* and displayed by phage. As shown in Figures 10-11, functional heterodimeric ccFv Abus stabilized by the parallel coiled-coil helix were generated. Since the coiled-coil heterodimerization sequences are about half the size of CH1 and CL domains, the ccFv (approximately 35 kDa) is smaller than the conventional Fab fragments (approximately 50 kDa). Because of the small size, the ccFvs and its derivatives are potentially more useful for clinical applications such as tumor and tissue penetration. More efficient expression and display of ccFv is expected. Furthermore, the specific assembly of VH and VL regions due to the pairwise affinity of the unique heterodimerization sequences makes the construction of a robust, vast diverse repertoire of Abs more feasible.

Materials and Methods:

210 Bacterial and phage strain: *Escherichia coli* TG1 (*supE Δ(hsdM-mcrB)5(rk)m*^r*k*)^m^r*k* *McrB*)*thi* *Δ(lac-proAB / F' traD36, LacI^r Δ(lacZ)M15J* was used for plasmid DNA and phage production; K07 helper phage and HRP-conjugated anti-M13 antibody from Phamersham Pharmacia Biotech; pbluescript SK(+) from Stratagene; Anti-HA antibody from Santa Cruz Biotechnology.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Example 1: Vector construction

pABMX1 and pABMX2 Vectors:

211 The phagemid display vector pABMX1 and pABMX2 were derived from pbluescript SK(+). A unique AgeI restriction site was introduced immediately after lac promoter by PCR-based site-directed mutagenesis with a set of primer (pBS-SKa: 5'GGAATTGTGAGCGGATAACAATTACCGGTACACAGGAAACAGCTATGA CCATG-3' and pBS-SKb 5'CATGGTCATAGCTGTTCCCTGTTGACCGGTAATTGTTATCCGTCACAAT TCC-3'), and the Xhol and KpnI sites were deleted by cutting and blunt end ligation. Afterwards, the synthetic DNA fragments flanked by AgeI site at 5' and BglII/EcoRI sites at 3', containing translation enhance sequence EP from T7 phage gene10 (TTAACTTAA), ribosome binding sequence S/D (TAAGGAGG), fd phage gene8 leader sequence with HindIII site (ATGAAAAAGCTTTAGTCCTCAAAGCCTCCGTAGCCGTTGCTCCCTCGTTCC GATGCTAACGCTTCGCT, for pABMX1) or pelB leader sequence (ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTA TTACTCGCGGCCAGCCGGCATGGCG, for pABMX2) and HA-(His)₆-tag (DHtag)(TATCCATACGACGTACCAGACTACGCAGGAGGTACCAACATCATCA CC ATTAG), were cloned into modified pbluescript SK(+). The resulting vectors are designated pABMX1 and pABMX2 (see Fig. 3A-B for restriction maps and sequences). Heterologous sequences encoding heterooligomers such as Nsc Abus were further subcloned into these vectors for periplasmic expression.

pABMD1 and pABMD2 vectors:

WO 03/012069

PCT/US02/24582

212 A PCR-amplified fd gene III (or gene 3) fragment flanked by BglII and SalI sites was inserted into pABMX1 and pABMX2 vectors (see Fig. 4). The heterologous sequence to be displayed can be inserted after the leader sequences. The lac promoter drives expression of the pIII capsid fusion, which in turn can be displayed on phage surface after superinfection by helper phage such as KO7.

PABMX5 and pABMX6 vectors:

213 These two vectors were derived from pABMX1 and pABMX2. A synthetic DNA fragment flanked by XbaI/Ascl site at 5' and MluI/XhoI/NotI sites at 3', containing the ribosome binding sequence S/D (TAAGGAGG) and Gene 3 leader sequence (ATGAAA AAATTATTATTTCGAATTCCCTTT AGTTGTTC CTT TCTATTCTCACTCCGCT), was inserted into pABMX1 and pABMX2 by XbaI/NotI sites. Afterward, the GR1 domain coding sequence (Fig. 2) was subcloned into Xba/Ascl sites, and GR2 domain coding sequence (Fig. 2) was inserted into XhoI/NotI site. Then the VH and VL domain were inserted before GR1 and GR2 sequence respectively. A schematic representation of the vectors pABMX5 and pABMX6 are shown as Fig. 5A. These vectors express two proteins: VH-GR1 and VL-GR2 under one lac promoter.

pABMD5 and pABMD6 vector:

214 The ccFv DNA fragments from vector pABMX5 and pABMX6 vectors were subcloning into pABMD1 and pABMD2 to yield vectors pABMD5 and pABMD6 (see Fig. 6A-B for restriction maps and sequences). These vectors express two proteins: VH-GR1 and VL-GR2-pIII fusions. The expressed VH-GR1 and VL-GR2-pIII fusions are secreted into periplasmic space, where dimerization takes place via the coiled-coil

WO 03/012069

PCT/US02/24582

domain heterodimerization. The assembled Abu is then displayed on phage surface upon superinfection of helper phages such as KO7.

Example 2: Expression of Functional ccFv

215 Antibody variable domains from antibody AM1 were subcloned into pABMX6 vector to expression ccFv fragment. The vector was then introduced into either TG1 cells or BL21 cells. The transformed bacteria in 500 ml 2xYT containing approximately 100 ug/ml carbenicillin and 0.1% glucose from a single colony was grew to OD₆₀₀ = 0.7 (approximately), at 37°C. 1 mM of IPTG was added for 4 hrs inductions at 30°C. The bacterial pellet was collected for periplasmic and osmotic shock preparation. The pellet was resuspended in 12.5 ml PPB buffer (200 mg/ml sucrose, 1mM EDTA, 30 mM Tris-HCl, pH 8.0) with 1.25 ml protease inhibitor cocktail from Sigma, and put on ice for 20 min. The supernatant was collected by spinning. The pellet was resuspended in 5 mM MgSO₄, and incubated on ice for 20 min. The MgSO₄ and PPB supernatants were combined, and dialyzed against PBS. After loading to a 1ml of Ni-NTA column, the His-tag proteins were purified by 350 mM imidazole elution. Figure 10A shows that the purified ccFv has an electrophoretic mobility of 35 kDa on a non-reducing gel. When analyzed under reducing condition, two subunits corresponding to VL and VH were observed. The upper band was confirmed as VL-His-tag fusion by Western blot analysis.

216 To measure the binding specificity of soluble AM1-ccFv, ELISA assay was carried out. The AM1 antigens (0.2-1ug/well) were coated on ELISA plates for overnight at 4 °C. After 5% milk/PBS blocking, antibody solution in 5% milk/PBS was added to the ELISA plate, and incubated for 1-2 hr at room temperature. The unbound Abus were washed out. Figure 10B shows specific binding of AM1-ccFv to its antigen. The control contains 5% milk in PBS. This result confirms the assembly of functional ccFv by the coiled-coil GABA_B R1/R2 heterodimerization sequences.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Example 3: Display of Functional ccFv

- 217 Display of antibody by a genetic package is a powerful tool to enrich and isolate specific Abu from large libraries. To analyze whether ccFv can be utilized in a phage display system, we have constructed a phagemid vector by subcloning ccFv gene of AM1 antibody into pABMD6 vector. TG1 cells carrying the phagemid vectors were superinfected by KO7 helper phage. The infected TG1 cells were grown in 2xYT/Amp/Kan at 30 °C overnight. The phagemid particles were precipitated by PEG/NaCl from culture supernatants twice, and resuspended in PBS. The antibody displayed on phage was detected by antigen binding activity via phage ELISA assay. Briefly, the antigens were first coated on ELISA plates. After 5% milk/PBS blocking, the phage solution was added to ELISA plates. The phage bound to antigen was detected by incubation with HRP-conjugated anti-M13 antibody. The substrate ABTS [2,2'Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] was used for measurement of HRP activity. The anti-HA tag antibody was also used to detect the proteins displayed on phage particle. The anti-HA antibody was coated on 96-well plates (2 ug/each well). The phages bound to anti-HA antibody coated on ELISA plate were detected by HRP-conjugated anti-M13 antibody.
- 218 The single-chain antibody phage was also prepared for comparing the ccFv and scFv phage-display. As shown in Figure 11A-B, the binding capability of ccFv phages is comparable to that of the conventional scFv phages. For certain ccFv expressing phages, their binding capability is almost one order of magnitude higher than phages expressing conventional scFv (Figure 11B). Thus, ccFv is a functional Abu even when displayed on a phage particle.

Expression of Single-Chain Antigen-Binding Units:Example 4: Expression of conventional scFv

- 219 The AM2-scFv was subcloning into soluble expression vector pABMX1 at the HindIII/NotI sites. The periplasmic preparation was carried out as outlined above. A 30 kDa antibody protein purified from NI-NTA column was confirmed by SDS-PAGE

WO 03/012069

PCT/US02/24582

analysis, and was tested for its antigen-binding specificity using ELISA. The AM2 antigens were first coated onto ELISA plates at a concentration of 0.2 ug/well. Different amounts of AM2-scFv fragments were incubated with the antigen. Bound AM2-scFv fragments were detected by the anti-HA-tag antibody. The experiment revealed a dose-dependent binding of AM2-scFv to its the AM2 antigen (Figure 8).

Example 5: Display of conventional scFv on phage

220 The AM2-scFv fragment was first subcloning into phagemid vector pABMD1 at the HindIII/NotI sites. TG1 cells carrying this phagemid vector were infected by the helper phage K07. The phages were purified from the supernatants. Phage ELISA assay was subsequently performed to detect AM2-scFv displayed on the phage particles. Because the coat pIII gene is tagged with HA-tag, the fusion can be detected with anti-HA antibodies. ELISA assay using AM2 antigen and anti-HA antibodies confirmed that the displayed scFv was capable of specifically binding to the corresponding antigens (Figure 9). The control involves phages displaying unrelated antibodies that are not HA tagged.

Expression of the Subject Antigen-Binding Units in Eukaryotic Cells:

Example 6: Expression of ccFv in yeast

221 The yeast vector pAMEX7 carrying both VL and VH sequences that are linked to the subject heterodimerization sequences is constructed. Competent yeast cells, e.g. AH109 cell, are prepared and transformed with pAMEX7 vectors according to any method known in the art. The transformed yeast cells are cultured under conditions suitable for protein expression. Such conditions are well known to artisans in the field and hence are not detailed herein. The expressed ccFv Abus are harvested using conventional methods known in the art and/or procedures described herein. The antigen binding capability of the harvest ccFv are determined by ELISA according to the protocols described above.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Enrichment and Identification of ccFv Phage Exhibiting Desired Binding**Specificity:**Example 7: Enrichment of AM2-ccFv phages from a model library

222 To demonstrate that ccFv-displayed phages with desired binding specificity can be selected and ultimately enriched from background phages, we performed panning of AM2-ccFv phages from a model library. The model library was prepared by mixing AM2-ccFv phages with unrelated AM1-ccFv displayed phages at a ratio of 1:10⁶ or 1:10⁷. Two rounds of panning of the libraries against specific protein antigen that was coated on Nunc Maxisorb 96-well plate were carried out. After blocking with 5% milk in PBS, 1X10¹² library phages in 2% milk/PBS were added to the well, and incubated for 2 hours at room temperature. Phage solution was then discarded, and the wells were washed 5 times with PBST (0.05% Tween-20 in PBS) and 5 times with PBS. Bound phages were eluted with 100 mM triethylamine, and were added to TG1 culture for infection. The phages prepared from infected TG1 cells were used for next round of panning and ELISA against immobilized protein antigen of AM2-ccFv. After each round panning, the ratio of AM2-ccFv phage to background phage AM1-ccFv phage was also determined by PCR analysis of randomly picked clones via a pair of primers that were specifically designed for AM2-ccFv only (a band of ~1 kb PCR product could be visualized on 1% agarose gel), but not AM1-ccFv (no PCR product). As shown in Figure 20, ELISA against immobilized protein antigen of AM2-ccFv was performed. Phages from second round panning yielded much higher OD405 readings as compared to that of the first round, suggesting that AM2-ccFv phages were successfully selected and enriched during panning. PCR analysis in Figure 21 showed 1% agarose gel image from PCR products of randomly picked clones. The results indicated that the occurrence rate of AM2-ccFv phage was 4.4% from the 1: 10⁷ library after first round of panning, whereas after second round of panning, the occurrence reached 100%.

Example 8: Library screening using phage library displaying functional ccFv

WO 03/012069

PCT/US02/24582

223 Screening a phage library with a large number of Abus, all of which are capable of binding to a desired antigen but each Abu differs in certain regions of the critical binding domain, allows one to identify and further design antibody with even higher affinity. To demonstrate that ccFv can be used efficiently as a vehicle for antibody library screening, we constructed a library of AM2 in the format of ccFv. The framework structure of AM2 consisted of a VH and a VL region, each was subcloned in to corresponding positions of vector pABMD6 as described above. Briefly, VH was linked to the N-terminus of GR1, and VL was linked to the N-terminus of GR2, respectively. GR2 in turn fused to pIII in order to display the ccFv antibody fragment to the surface of the phage particle (See Examples 1, 3, and 7). In order to select phages high affinity binders through ccFv phage library panning, CDR3 of VH was constructed as a library which contains multiple options of residues at multiple positions. The library was prepared through standard synthesis of degenerative DNA oligo franking restriction sites at both ends so that it could be subcloned into its position of AM2 after PCR amplification and restriction digestion. Figure 22 illustrated the design of the degenerative DNA oligo, its amplification primers and directions. The diversity of the library was designed to be approximately 1×10^6 species in total. After ligation, the library was electroporated into TG1 competent cells. The transformants were then harvested and rescued by KO7 helper phage before phage particles of the library were collected as described in above example. To "pan" the library, recombinant antigen was immobilized onto Nunc Maxisorb 96-well plate in 0.05 M NaHCO₃ pH9.6 buffer at 4°C overnight. An aliquot of the library phage containing 10^{12} phage particles diluted in PBS buffer with 2% milk was added to the well that was coated with the antigen. After incubating at 37°C for 2 hours, the well was washed and phage was eluted as described in example 3 and 7. The eluted phages were used to infect TG1 cells, then rescued by KO7 helper phage. After growing overnight at 30°C, the phages were amplified in TG1 cells and ready to be harvested for the next round of panning. Prior studies have shown that the rate of dissociation, k_{off} , contributes most significantly for the affinity of this particular antibody, whereas K_{on} is relatively constant. Thus, in order to select phages

WO 03/012069

PCT/US02/24582

with high binding affinity,, off-rate panning, a procedure of prolonged wash to select survival phages, was designed to specifically select those phages that have slower K_{off} . A total of 7 consecutive rounds of panning were conducted for this library.

224 After the 5th and the 7th panning, individual clones were randomly picked to prepared phages for ELISA using the same protein antigen in phage panning. ELISA was performed using 96-well microtiter plate following the procedures described in example 7 above. As shown in Figure 23, all clones selected at the 5th and 7th rounds positively reacted with the antigen. Note that negative control were set at positions H10, 11, 12 of the 5th round and H11, 12 of the 7th round, all of which were below 0.05 OD₄₀₅.

225 The clones that showed positive reactivity in ELISA of the 7th panning were then randomly picked for sequencing and residues on CDR3 of VH were mapped in Figure 24. Consensus on the positions targeted by the library was then identified. Protein expression of a clone that represented the consensus sequence and the wild type (the original AM2) was performed and the proteins were subsequently used in determination of their K_{off} in binding with immobilized protein antigen using BiaCore (surface plasmon resonance). As shown in Figure 25, the AM2 variant selected from the library has significantly slower K_{off} .

WO 03/012069

PCT/US02/24582

CLAIMS

What is claimed is:

1. A non-single-chain antigen-binding unit comprising:
 - (a) a light (L) chain polypeptide comprising a light (L) chain variable region fused in-frame to a first heterodimerization sequence;
 - (b) a heavy (H) chain polypeptide comprising a heavy (H) chain variable region fused in-frame to a second heterodimerization sequence;
wherein the L chain and the H chain polypeptides dimerize via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences; and wherein at least one of the heterodimerization sequences is essentially incapable of forming a homodimer under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperatures.
2. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 1, wherein both of the first and second heterodimerization sequences are essentially incapable of forming homodimers under physiological buffer conditions and at physiological body temperatures.
3. A non-single-chain antigen-binding unit comprising:
 - (a) a light (L) chain polypeptide comprising a light (L) chain variable region fused in-frame to a first heterodimerization sequence;
 - (b) a heavy (H) chain polypeptide comprising a heavy (H) chain variable region fused in-frame to a second heterodimerization sequence;
wherein the L chain and the H chain polypeptides dimerize via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences, said first

WO 03/012069

PCT/US02/24582

and second heterodimerization sequences comprising heterodimeric receptor sequences that mediate heterodimerization of the receptors.

4. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 1 or 3, wherein the first and second heterodimerization sequences form a coiled-coil dimer.
5. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 1 or 3, wherein the L and the H chain polypeptides dimerize via non-covalent pairwise affinity of the two heterodimerization sequences.
6. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 4, wherein the L chain polypeptide further comprises a flexon that is flanked by the L chain variable region and the first heterodimerization sequence.
7. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 4, wherein the H chain polypeptide further comprises a flexon sequence that is flanked by the H chain variable region and the second heterodimerization sequence.
8. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 4, wherein both the first and the second heterodimerization sequences are linked to at least one cysteine residue.
9. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 4, wherein the antigen-binding unit is multivalent.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

10. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 4, wherein the antigen-binding unit is multispecific.
11. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 10, wherein the antigen-binding unit is bispecific.
12. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 10, wherein the antigen-binding unit is trispecific.
13. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 4, wherein the L chain polypeptide comprises sequences derived from a human light chain.
14. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 4, wherein the H chain polypeptide comprises sequences derived from a human heavy chain.
15. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 4, wherein the antigen-binding unit is conjugated to a chemically functional moiety.
16. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 15, wherein the moiety is selected from the group consisting of signal peptides, agents that enhance immunologic reactivity, agents that facilitate coupling to a solid support, vaccine carriers, bioresponse modifiers, toxins, detectable labels, paramagnetic labels, and drugs.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

17. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 4, wherein the first and second heterodimerization sequences are derived from C-terminal sequences of GABA_B receptor 1 and GABA_B receptor 2, respectively.
18. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 4, wherein the first heterodimerization sequence is a heterodimerization sequence comprising a GABA_B receptor 1 polypeptide of at least 30 amino acid residues that is essentially identical to a linear peptide sequence of comparable length depicted in SEQ ID NO. 2 and wherein the second heterodimerization sequence is a heterodimerization sequence comprising a GABA_B receptor 2 polypeptide of at least 30 amino acid residues that is essentially identical to a linear peptide sequence of comparable length depicted in SEQ ID NO. 4, wherein said first and second heterodimerization sequences are linked to cysteine residues.
19. The non-single-chain antigen-binding unit of claim 4, wherein the first heterodimerization sequence is a heterodimerization sequence comprising a GABA_B receptor 1 polypeptide of at least 30 amino acid residues that is essentially identical to a linear peptide sequence of comparable length depicted in SEQ ID NO. 4; and wherein the second heterodimerization sequence is a heterodimerization sequence comprising a GABA_B receptor 2 polypeptide of at least 30 amino acid residues that is essentially identical to a linear peptide sequence of comparable length depicted in SEQ ID NO. 2, wherein said first and second heterodimerization sequences are linked to cysteine residues.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

20. A single-chain antigen-binding unit comprising a light (L) chain variable region and a heavy (H) chain variable region connected by a first and a second heterodimerization sequence spanning the distance between the C-terminus of one of the region to the N-terminus of the other region, wherein the two regions form an intra-molecular dimer via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences; and wherein at least one of the heterodimerization sequences is essentially incapable of forming a homodimer under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperatures.
21. The single-chain antigen-binding unit of claim 20, wherein both of the first and second heterodimerization sequences are essentially incapable of forming homodimers under physiological buffer conditions and at physiological body temperatures.
22. A single-chain antigen-binding unit comprising a light (L) chain variable region and a heavy (H) chain variable region connected by a first and a second heterodimerization sequence spanning the distance between the C-terminus of one of the region to the N-terminus of the other region, wherein the two regions form an intra-molecular dimer via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences, said first and second heterodimerization sequences comprising heterodimeric receptor sequences that mediate heterodimerization of the receptors.
23. The single-chain antigen-binding unit of claim 20 or 22, wherein the first and second heterodimerization sequences form a coiled-coil dimer.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

24. The single-chain antigen-binding unit of claim 20 or 22, wherein the first and second heterodimerization sequences dimerize via non-covalent pairwise affinity.
25. The single-chain antigen-binding unit of claim 23, wherein the antigen-binding unit is conjugated to a chemically functional moiety.
26. The single-chain antigen-binding unit of claim 23, wherein the L chain variable region comprises sequences derived from a human light chain.
27. The single-chain antigen-binding unit of claim 23, wherein the H chain variable region comprises sequences derived from a human heavy chain.
28. The single-chain antigen-binding unit of claim 23, wherein the first and second heterodimerization sequences are derived from C-terminal sequences of GABA_B receptor 1 and GABA_B receptor 2, respectively.
29. The single-chain antigen-binding unit of claim 23, wherein the first heterodimerization sequence is a heterodimerization sequence comprising a GABA_B receptor 1 polypeptide of at least 30 amino acid residues that is essentially identical to a linear peptide sequence of comparable length depicted in SEQ ID NO. 2; and wherein the second heterodimerization sequence is a heterodimerization sequence comprising a GABA_B receptor 2 polypeptide of at least 30 amino acid residues that is essentially identical to a linear peptide sequence of comparable length depicted in SEQ ID NO. 4,

WO 03/012069

PCT/US02/24582

wherein said first and second heterodimerization sequences are linked to cysteine residues.

30. The single-chain antigen-binding unit of claim 23, wherein the first heterodimerization sequence is a heterodimerization sequence comprising a GABA_B receptor 1 polypeptide of at least 30 amino acid residues that is essentially identical to a linear peptide sequence of comparable length depicted in SEQ ID NO. 4; and wherein the second heterodimerization sequence is a heterodimerization sequence comprising a GABA_B receptor 2 polypeptide of at least 30 amino acid residues that is essentially identical to a linear peptide sequence of comparable length depicted in SEQ ID NO. 2, wherein said first and second heterodimerization sequences are linked to cysteine residues.

31. A recombinant polynucleotide comprising a coding sequence that encodes L chain polypeptide of claim 1.

32. A recombinant polynucleotide comprising a coding sequence that encodes the H chain polypeptide of claim 1.

33. A recombinant polynucleotide comprising a first coding sequence that encodes the L chain polypeptide of claim 1, and a second coding sequence that encodes the H chain of polypeptide of claim 1.

34. A recombinant polynucleotide comprising a coding sequence that encodes the L chain polypeptide of claim 3.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

35. A recombinant polynucleotide comprising a coding sequence that encodes the H chain polypeptide of claim 3.

36. A recombinant polynucleotide comprising a first coding sequence that encodes the L chain polypeptide of claim 3, and a second coding sequence that encodes the H chain of polypeptide of claim 3.

37. A recombinant polynucleotide comprising a coding sequence that encodes the single-chain antigen-binding unit of claim 20.

38. A recombinant polynucleotide comprising a coding sequence that encodes the single-chain antigen-binding unit of claim 22.

39. A vector comprising the recombinant polynucleotide of any one of claims 31-38.

40. The vector of claim 39, wherein the vector is an expression vector.

41. The vector of claim 39, wherein the vector is a phage display vector.

42. A selectable library of expression vectors encoding a repertoire of antigen binding units, comprising more than one vector of claim 39.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

43. The selectable library of claim 39, wherein the vector is a phage display vector.

44. A host cell comprising the recombinant polynucleotides of any one of claims 31-38.

45. The host cell of claim 44, wherein the recombinant polynucleotide encoding the L chain polypeptide and the polynucleotide encoding the H chain polypeptide, are present in a single vector.

46. The host cell of claim 44, wherein the recombinant polynucleotide encoding the L chain polypeptide and the polynucleotide encoding the H chain polypeptide, are present in separate vectors.

47. The host cell of claim 44, wherein the host cell is a eukaryotic cell.

48. The host cell of claim 44, wherein the host cell is a prokaryotic cell.

49. A method of producing a non-single-chain antigen-binding unit, comprising:

- (a) expressing in a host cell a first recombinant polynucleotide encoding a light (L) chain polypeptide comprising a light (L) chain variable region fused in-frame to a first heterodimerization sequence, and a second recombinant polynucleotide encoding a heavy (H) chain polypeptide comprising a heavy (H) chain variable region fused in-frame to a second heterodimerization sequence; wherein the L chain

WO 03/012069

PCT/US02/24582

and the H chain polypeptides dimerize via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences; and wherein at least one of the heterodimerization sequences is essentially incapable of forming a homodimer under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperatures; and optionally

(b) isolating the antigen-binding unit expressed in the host cell.

50. A method of claim 49, wherein both of the first and second heterodimerization sequences are essentially incapable of forming homodimers under physiological buffer conditions and at physiological body temperatures.

51. A method of producing a non-single-chain antigen-binding unit, comprising:

(a) expressing in a host cell a first recombinant polynucleotide encoding a light (L) chain polypeptide comprising a light (L) chain variable region fused to a first heterodimerization sequence, and a second recombinant polynucleotide encoding a heavy (H) chain polypeptide comprising a heavy (H) chain variable region fused to a second heterodimerization sequence; wherein the L chain and the H chain polypeptides dimerize via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences, said first and second heterodimerization sequences comprising heterodimeric receptor sequences that mediate heterodimerization of the receptors; and optionally

(b) isolating the antigen-binding unit expressed in the host cell.

52. The method of claim 49 or 51, wherein the non-single-chain antigen-binding expressed in step (a) is displayed on surface of the host cell.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

53. The method of claim 49 or 51, wherein the non-single-chain antigen-binding expressed in step (a) is displayed on a phage particle.

54. The method of claim 49 or 51, wherein the host cell is a eukaryotic cell.

55. The method of claim 49 or 51, wherein the host cell is a prokaryotic cell.

56. The method of claim 49 or 51, wherein the first and second heterodimerization sequences form a coiled-coil dimer.

57. The method of claim 49 or 51, wherein the L chain and the H chain polypeptides dimerize via non-covalent pairwise affinity.

58. The method of claim 56, wherein the L chain polypeptide further comprises a flexon that is flanked by the L chain variable region and the first heterodimerization sequence.

59. The method of claim 56, wherein the H chain polypeptide further comprises a flexon sequence that is flanked by the H chain variable region and the second heterodimerization sequence.

60. The method of claim 56, wherein both the first and the second heterodimerization sequences are linked to at least one cysteine residue.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

61. The method of claim 56, wherein the non-single-chain antigen-binding unit is multivalent.
62. The method of claim 56, wherein the non-single-chain antigen-binding unit is multispecific.
63. The method of claim 62, wherein the non-single-chain antigen-binding unit is bispecific.
64. The method of claim 62, wherein the non-single-chain antigen-binding unit is trispecific.
65. The method of claim 56, wherein the L chain polypeptide comprises sequences derived from a human light chain.
66. The method of claim 56, wherein the H chain polypeptide comprises sequences derived from a human heavy chain.
67. A method of producing a non-single-chain antigen-binding unit, comprising:
 - (a) preparing a first recombinant polynucleotide encoding a light (L) chain polypeptide comprising a light (L) chain variable region fused in-frame to a first heterodimerization sequence, and a second recombinant polynucleotide encoding a heavy (H) chain polypeptide comprising a heavy (H) chain variable region fused in-frame to a second heterodimerization sequence; wherein the L chain and the H chain polypeptides dimerize via pairwise

WO 03/012069

PCT/US02/24582

affinity of the first and second heterodimerization sequences; and wherein at least one of the heterodimerization sequences is essentially incapable of forming a homodimer under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperatures; and

(b) allowing the first and second polypeptides to dimerize via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences.

68. The method of claim 67, wherein step (b) comprises dimerizing the first and the second polypeptides *in vitro*.

69. A method of producing a single-chain antigen-binding unit, comprising:

(a) expressing in a host cell a polynucleotide comprising a coding sequence that encodes the single-chain antigen-binding unit of claim 20 or 22; and

optionally

(b) isolating the single-chain antigen-binding unit expressed in the host cell.

70. The method of claim 69, wherein the polynucleotide is contained in a phage display vector.

71. A method of displaying a chimeric heteromultimer comprising at least two polypeptides on a surface of a host cell, the method comprising:

expressing in the host cell

(a) a first recombinant polynucleotide encoding a first polypeptide fused in-frame to a first heterodimerization sequence and a surface presenting sequence;

(b) a second recombinant polynucleotide encoding a second polypeptide fused in-frame to a second heterodimerization sequence;

WO 03/012069

PCT/US02/24582

wherein the first and second polypeptides dimerize via pairwise affinity of the first and second heterodimerization sequences; wherein at least one of the heterodimerization sequences is essentially incapable of forming a homodimer under physiological buffer conditions and/or at physiological body temperatures.

72. The method of claim 71, wherein both of the first and second heterodimerization sequences are essentially incapable of forming homodimers under physiological buffer conditions and at physiological body temperatures.
73. The method of claim 71, wherein the first and second heterodimerization sequences form a coiled-coil dimer.
74. The method of claim 71, wherein the first and second polynucleotides are expressed by a single phage display vector.
75. The method of claim 71, wherein the first and second polynucleotides are expressed by separate phage display vectors.
76. The method of claim 71, wherein the host cell is a prokaryotic cell.
77. The method of claim 71, wherein the host cell is a eukaryotic cell.
78. The method of claim 71, wherein the chimeric heteromultimer is a non-single-chain antigen-binding unit.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

79. A chimeric heteromultimer displayed on the surface of the host cell according to the method of claim 71.

80. A method of identifying a non-single-chain antigen-binding unit that is immunoreactive with a desired antigen, comprising:

- (a) preparing a genetically diverse repertoire of antigen-binding units, wherein the repertoire comprises more than one antigen-binding unit of claim 1 or 3;
- (b) contacting the repertoire of antigen binding units with the desired antigen;
- (c) detecting a specific binding between antigen binding units and the antigen, thereby identifying the antigen-binding unit that is immunoreactive with the desired antigen.

81. The method of claim 80, wherein the repertoire of antigen-binding units are prepared by expressing a library of vectors encoding a plurality of the antigen-binding units.

82. The method of claim 80, wherein the library of vectors comprises a plurality of phage vectors.

83. A method of identifying a single-chain antigen-binding unit that is immunoreactive with a desired antigen, comprising:

- (a) preparing a genetically diverse repertoire of single-chain antigen-binding units, wherein the repertoire comprises at least one antigen-binding unit of claim 20 or 22;
- (b) contacting the repertoire of antigen-binding units with the desired antigen;

WO 03/012069

PCT/US02/24582

detecting a specific binding between antigen-binding units and the antigen, thereby identifying the single-chain antigen-binding unit that is immunoreactive with the desired antigen.

84. The method of claim 83, wherein the repertoire of antigen-binding units are prepared by expressing a library of vectors encoding a plurality of the antigen-binding units.

85. The method of claim 83, wherein the library of vectors comprises a plurality of phage vectors.

86. A kit comprising a vector of claim 39 in suitable packaging.

87. A non-single-chain antigen-binding unit of claim 1 or 3, wherein said first and second heterodimerization sequences comprise heterodimeric receptor sequences of growth factor receptors.

88. A non-single-chain antigen-binding unit of claim 1 or 3, wherein said first and second heterodimerization sequences comprise heterodimeric receptor sequences of G-protein-coupled receptors.

89. A non-single-chain antigen-binding unit of claim 1 or 3, wherein said first and second heterodimerization sequences comprise heterodimeric receptor sequences of neurotransmitters.

90. A non-single-chain antigen-binding unit of claim 1 or 3, wherein said first and second heterodimerization sequences comprise heterodimeric receptor sequences of nuclear hormone receptors.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

91. A non-single-chain antigen-binding unit of claim 1 or 3, wherein the antigen-binding unit is a ccFv fragment.

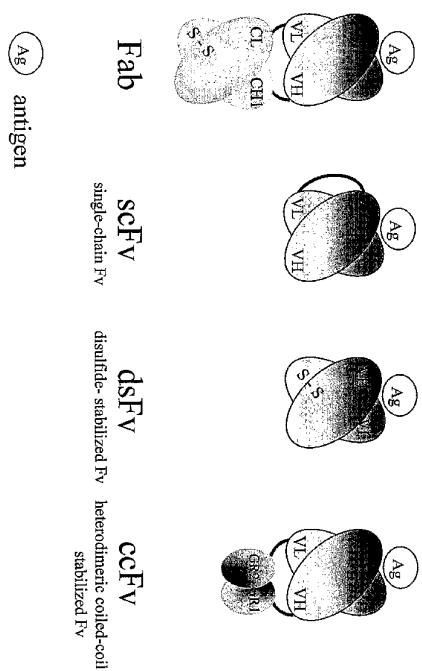
92. A non-single-chain antigen-binding unit of claim 1, wherein the physiological body temperatures are at about 37°C.

93. A non-single-chain antigen-binding unit of claim 1, wherein said first and second heterodimerization sequences are essentially incapable of forming homodimers when mixed in equimolar.

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Fig. 1



Antigen-binding units

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Sequences of coiled-coil domain in ccFV

GRI Sequence Range: 1 to 146 (**Nucleic acid sequence - SEQ ID NO: 1**)
(Amino acid sequence - SEQ ID NO: 2)

	XbaI	10	20	30	40	50
<u>TCTTAA</u>	AG	GG	GG	GG	GG	GG
S R G G G B E K S R L L E K B	70	80	90	100	110	120
CGTGACGTCGGAAAGAACATGTCTGAGAAGAGGAGGTCTCTGAGA	R E L E K I T A E K E E R V S E	110	130	140	150	160
TGCGCCACTCAGTCAGTCAGGAGTTATAAGCGCGGCC	L R H Q L Q S V G G C * *					

GR2 Sequence Range: 1 to 140 (nucleic acid sequence - SEQ ID NO: 3) (amino acid sequence - SEQ ID NO: 4)

XhoI	10	20	30	40	50
TCTCAGGCGCTGGTGTGAAACACCCGCTGGGGCTTACAGATGAAA					
S R G G G T S R I E G L Q S E N					
60	70	80	90	100	
CCATGAGCTGCGAATGAAATCACAGCTGTTAAAGCTTGTTGAGG					
H R L R M K I T E L D K D L E E					
110 120 130 140	NotI				
TCACCATGAGCTGCGAAGCTGGGGCTGGCG					
V T M Q L Q D V G G C A A A					

Fig. 2

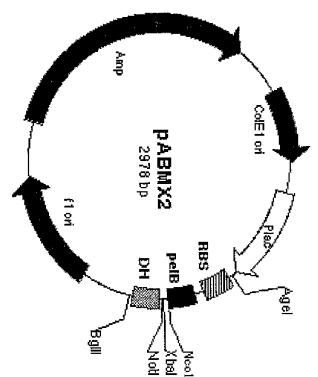
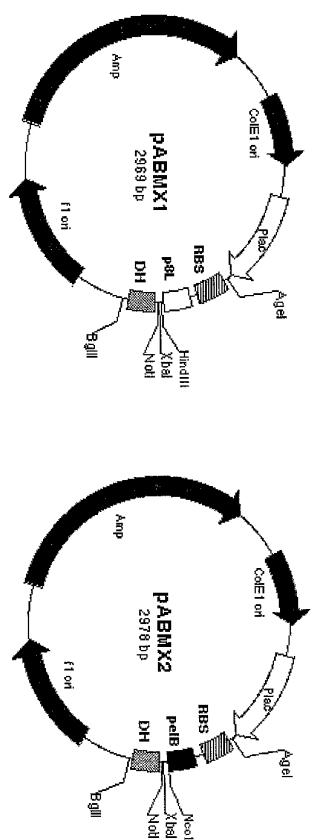
WO 03/012069

PCT/US02/24582

Vectors for antibody expression

Sheet 3 of 31

Fig. 3A



WO 03/012069

PCT/US02/24582

PABMX1 vector: sequence from *AgeI* to *BglII* (nucleic acid sequence - SEQ ID NO: 5)
 (Amino acid sequence - SEQ ID NO: 6)

<i>lac</i> promoter/ <i>lac</i> OI ATATGGAGGATAACAATT ACCGGT TCTT TAACTTAG TAGGAGG ATTAAGAA <i>P8</i> Leader M K K S L V L K A S V A V A T L V P M L S F A S R <i>NdeI</i> <u>GCAGCGCT</u> TAFCATACAGACGACGATACGCA GGAGGT CATTACCATATCACCAT TAG <u>AGATCT</u> A A A Y P Y D V P D Y A G G H H H H H H H H H H H H * R S	<i>AgeI</i> <i>EP</i> <i>SD</i> <i>HindIII</i> <i>XbaI</i> <i>BglII</i> <i>HA-tag</i> <i>His-tag</i> <i>BglII</i> <i>AgatCT</i>
---	--

PABMX2 vector: sequence from *AgeI* to *BglII* (nucleic acid sequence - SEQ ID NO: 7)
 (Amino acid sequence - SEQ ID NO: 8)

<i>lac</i> promoter/ <i>lac</i> OI ATATGGAGGATAACAATT ACCGGT TCTT TAACTTAG TAGGAGG ATTAAGAA <i>peB</i> Leader M K Y L L P T A A G L L L A Q P M A A L Q A S R <i>NdeI</i> <u>GCAGCGCT</u> TAFCATACAGACGACGATACGCA GGAGGT CATTACCATATCACCAT TAG <u>AGATCT</u> A A A Y P Y D V P D Y A G G H H H H H H H H H H H H * R S	<i>AgeI</i> <i>EP</i> <i>SD</i> <i>NoI</i> <i>PstI</i> <i>XbaI</i> <i>BglII</i> <i>HA-tag</i> <i>His-tag</i> <i>BglII</i> <i>AgatCT</i>
--	---

Sheet 4 of 31

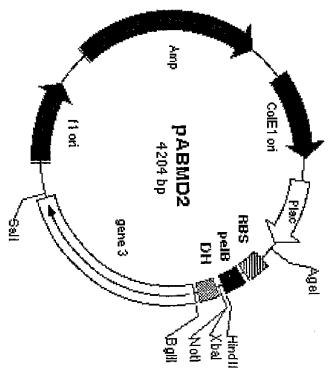
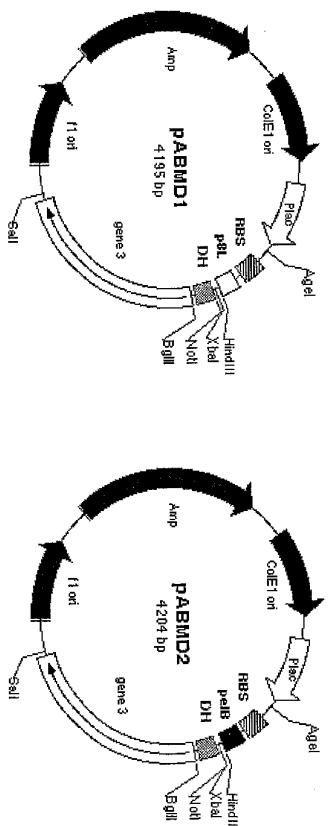
Fig. 3B

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Vectors for antibody display

Fig. 4A



WO 03/012069

PCT/US02/24582

PABMD1 vector: sequence from *AgeI* to *Sall* (Nucleic acid sequence - SEQ ID NO: 9)
 (Amino acid sequence - SEQ ID NO: 10)

lac promoter/ <i>lac OI</i> <i>P₈</i> Leader <i>ATTCGGGAGCGGATAACAATT</i> <i>M</i> <i>K</i> <i>K</i> <i>S</i> <i>L</i> <i>V</i> <i>L</i> <i>K</i> <i>A</i> <i>S</i> <i>V</i> <i>A</i> <i>V</i> <i>A</i> <i>T</i> <i>L</i> <i>V</i> <i>P</i> <i>M</i> <i>L</i> <i>S</i> <i>F</i> <i>A</i> <i>S</i> <i>R</i> <i>NolI</i> <i>GCCTGGCGCT</i> <i>TATCATAACGACGACTACGACTAGCA</i> <i>GAGGT</i> <i>CATCACCATCATCACCAT</i> <i>TAG</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>Y</i> <i>P</i> <i>D</i> <i>V</i> <i>P</i> <i>D</i> <i>Y</i> <i>A</i> <i>G</i> <i>G</i> <i>H</i> <i>H</i> <i>H</i> <i>H</i> <i>H</i> <i>H</i> * <i>R</i> <i>S</i> <i>Gene 3</i> <i>GAGGCGGT</i> <i>ACTCTTGAAGCTTGTTAGCAAA</i> ---- <i>GCTAACATCTGGTATAGGAGCTTA</i> <i>GTCGAC</i>	<i>AgeI</i> <i>EP</i> <i>SD</i> <i>HindII</i> <i>XbaI</i> <i>TCAGA</i> <i>His-tag</i> <i>BglII</i> <i>Amber stop</i> <i>AGATCT</i> <i>R</i> <i>S</i> <i>Sall</i> <i>GTCGAC</i>
---	--

PABMD2 vector: sequence from *AgeI* to *Sall* (Nucleic acid sequence - SEQ ID NO: 11)
 (Amino acid sequence - SEQ ID NO: 12)

lac promoter/ <i>lac OI</i> <i>P₈</i> Leader <i>ATTCGGGAGCGGATAACAATT</i> <i>M</i> <i>K</i> <i>Y</i> <i>L</i> <i>L</i> <i>P</i> <i>T</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>G</i> <i>L</i> <i>L</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>Q</i> <i>P</i> <i>A</i> <i>M</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>L</i> <i>Q</i> <i>A</i> <i>S</i> <i>R</i> <i>NolI</i> <i>HA-tag</i> <i>GCCTGGCGCT</i> <i>TATCATAACGACGACTACGACTACCA</i> <i>GGAGGT</i> <i>CATCACCATCATCACCAT</i> <i>TAG</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>A</i> <i>Y</i> <i>P</i> <i>D</i> <i>V</i> <i>P</i> <i>D</i> <i>Y</i> <i>A</i> <i>G</i> <i>G</i> <i>H</i> <i>H</i> <i>H</i> <i>H</i> <i>H</i> <i>H</i> * <i>R</i> <i>S</i> <i>Gene 3</i> <i>GGAGGCGGT</i> <i>ACTCTTGAAGCTTGTTAGCAAA</i> ---- <i>GCTAACATCTGGTATAGGAGCTTA</i> <i>GTCGAC</i>	<i>AgeI</i> <i>EP</i> <i>SD</i> <i>NcoI</i> <i>PstI</i> <i>XbaI</i> <i>TCAGA</i> <i>His-tag</i> <i>BglII</i> <i>Amber stop</i> <i>AGATCT</i> <i>R</i> <i>S</i> <i>Sall</i> <i>GTCGAC</i>
--	---

Fig. 4B

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Vectors for ccFv expression

Sheet 7 of 31

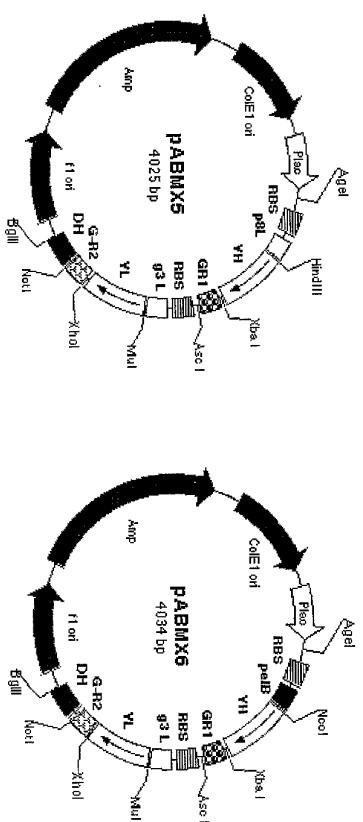


Fig. 5A

WO 03/012069

PCT/US02/24582

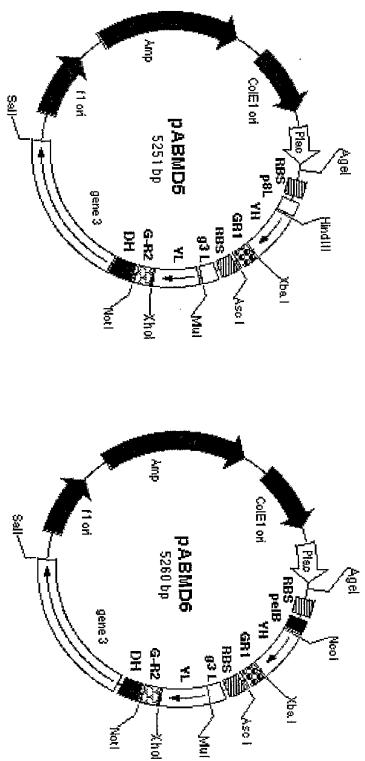
PABMX5 vector: sequence from p8 leader to DH-tag
 (Nucleic acid sequence - SEQ ID NO: 13)
 (Amino acid sequence - SEQ ID NO: 14)

Fig. 5B

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Vectors for ccFv display



Sheet 9 of 31

Fig. 6A

WO 03/012069

PCT/US02/24582

PARMD5 vector: sequence from **HindIII** to **SalI**(Nucleic acid sequence - SEQ ID NO: 17)
(Amino acid sequence - SEQ ID NO: 18)

P8 Leader
ATGAAAGAACCTTTCTCAAGCTCGTAGCCCTTAACCTACGCCGTCATGCTTGTCTCTGCCT
M K S L V L K A S V A V A T L V P M I S F A HindIII XbaI
[] GR1 [] ggcgcgcacaaATTCACTAGAGAGTTAACTT ATGAAAATATATTATGGCATTCCTTCTCT
Ascl SD M K K L L F A I P L V V P P1 Leader
[] Mlu NheI Nol H4-tag
TTCATTCCTCACCCCTACGGT [] VL [] TCTCGA [] GR2 [] CGCGCGGTTAACACGACGAGCTAGCA
F Y S H S A T R S R A A Y P Y D V P D Y A Histag Gene 3 Sall
GAGGCTCATCACCATCACAT TAG GGAGCGGT ACTGTTGAAGTGT---CTGGTAAAGGACTCTAA GTCGAC
G G H H H H H * G G G T V E S C --- L R N K E S *

PABMX6 vector: sequence from **pE8** leader to **DH-ttag** (Nucleic acid sequence - SEQ ID NO: 19)

(Amino acid sequence - SEQ ID NO: 20)

pE8 Leader
ATGAAAGAACCTTTCTCAAGCTCGTAGCTTGTCTCTGCCT
M K Y L L P T A A A G L I I L I A A Q P A M A NdeI XbaI
[] GR1 [] ggcgcgcacaaATTCACTAGAGAGTTAACTT ATGAAAATATATTATGGCATTCCTTCTCT
Ascl SD P1 Leader
[] Mlu NheI Nol H4-tag
TTCATTCCTCACCCCTACGGT [] VL [] TCTCGA [] GR2 [] CGCGCGGTTAACACGACGAGCTAGCA
F Y S H S A T R S R A A Y P Y D V P D Y A Histag Gene 3 Sall
GAGGCTCATCACCATCACAT TAG GGAGCGGT ACTGTTGAAGTGT---CTGGTAAAGGACTCTAA GTCGAC
G G H H H H H * G G G T V E S C --- L R N K E S *

Sheet 10 of 31

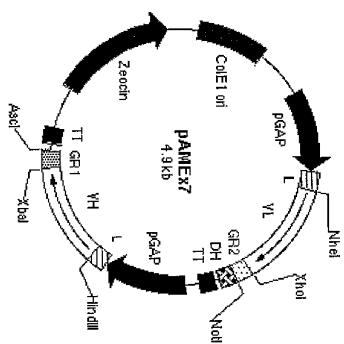
Fig. 6B

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Fig. 7

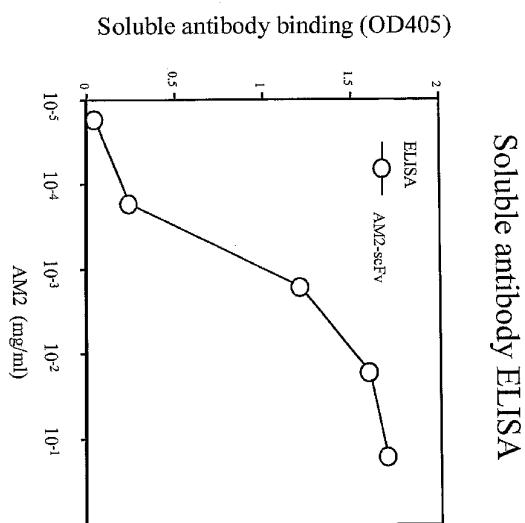
Vector for ccfFv expression in Yeast



WO 03/012069

PCT/US02/24582

Fig. 8



WO 03/012069

PCT/US02/24582

AM2-scFv display on phage by pABMD1 vector

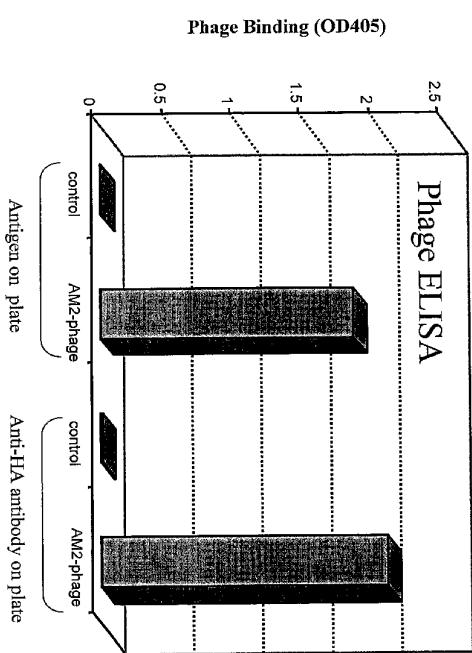


Fig. 9

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Soluble AM1-ccFv antibody expression in E. coli

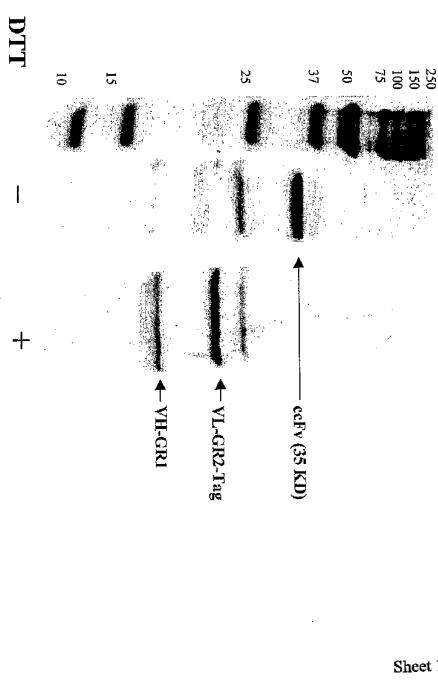
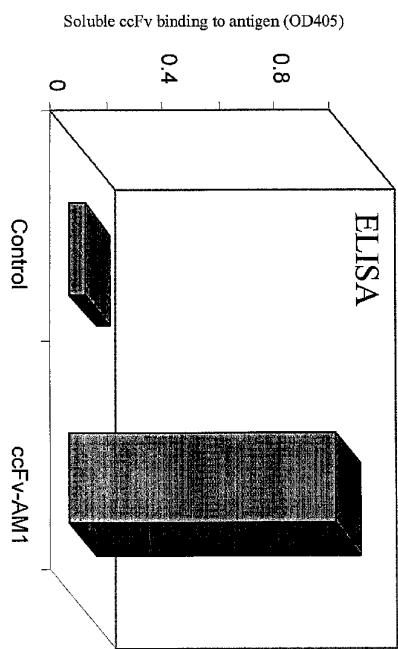


Fig. 10A

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Fig. 10B



Soluble AM1-ccFv antibody binds to antigen

WO 03/012069

PCT/US02/24582

AM1-ccFv Antibody display on phage

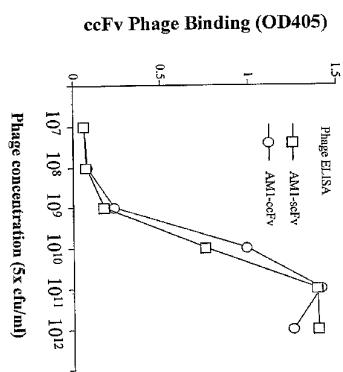
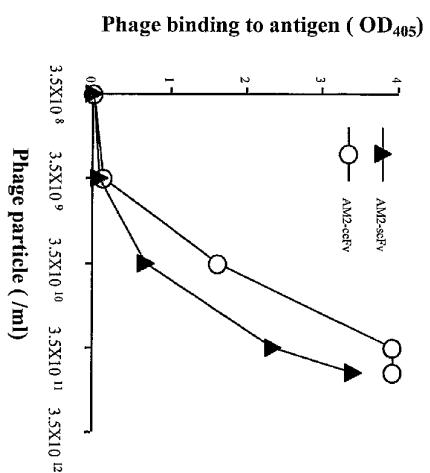


Fig. 11A

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Comparison of antigen binding capability of AM2-ccFv and AM2-scFv
displayed on phage particles



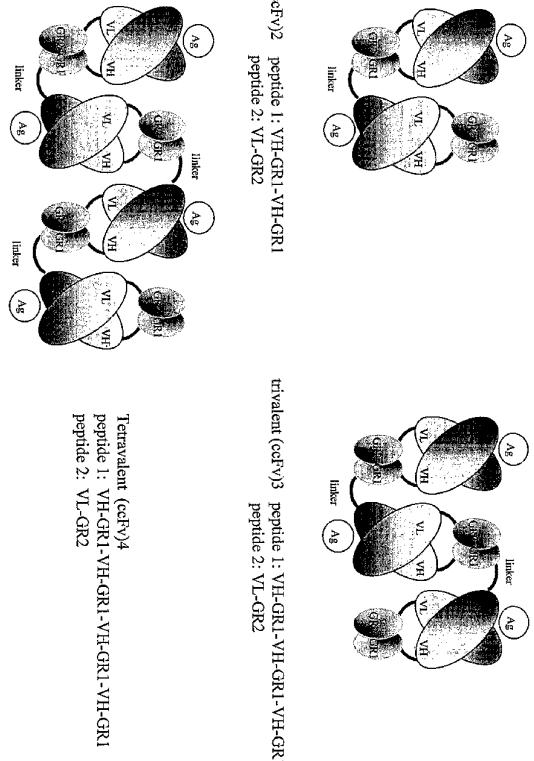
Sheet 17 of 31

Fig. 11B

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Multi-valent ccFv antibody



Sheet 18 of 31

Fig. 12

WO 03/012069

PCT/US02/24582

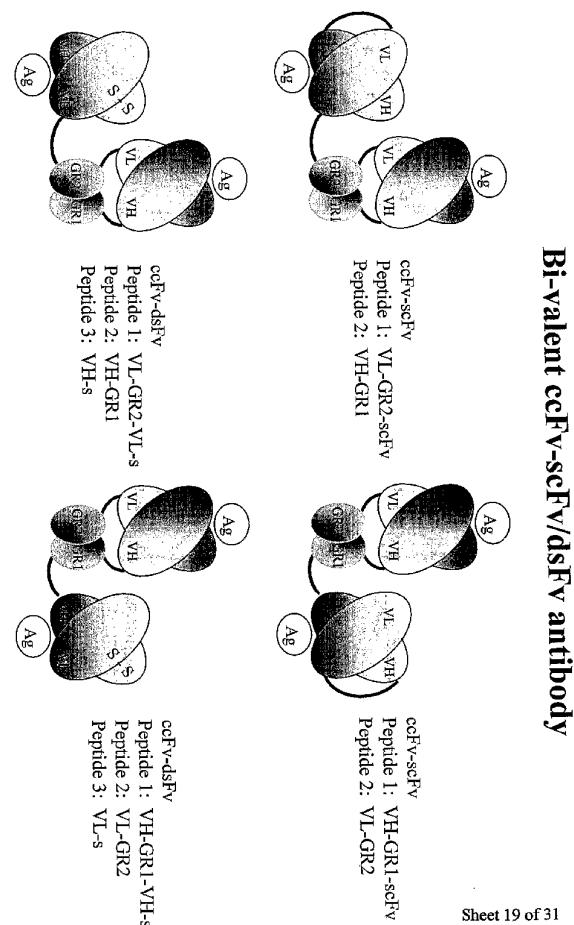


Fig. 13

ccFv-dsFv

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Tri-valent ccFv-scFv/dsFv antibody

Sheet 20 of 31

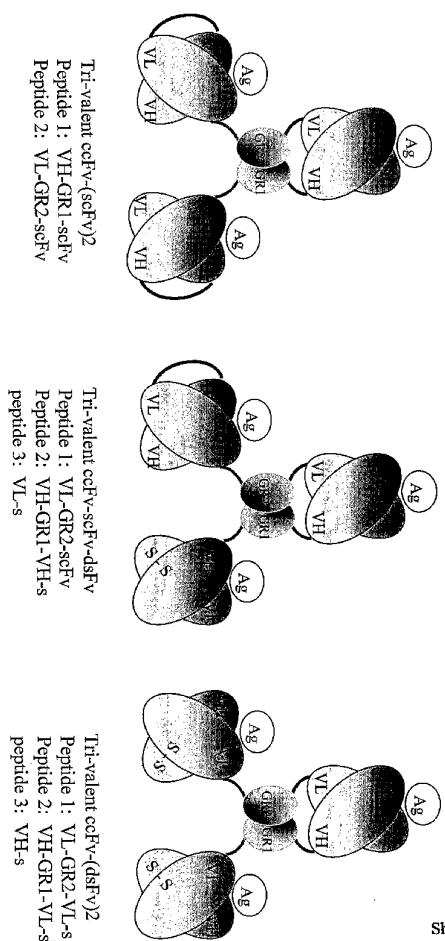
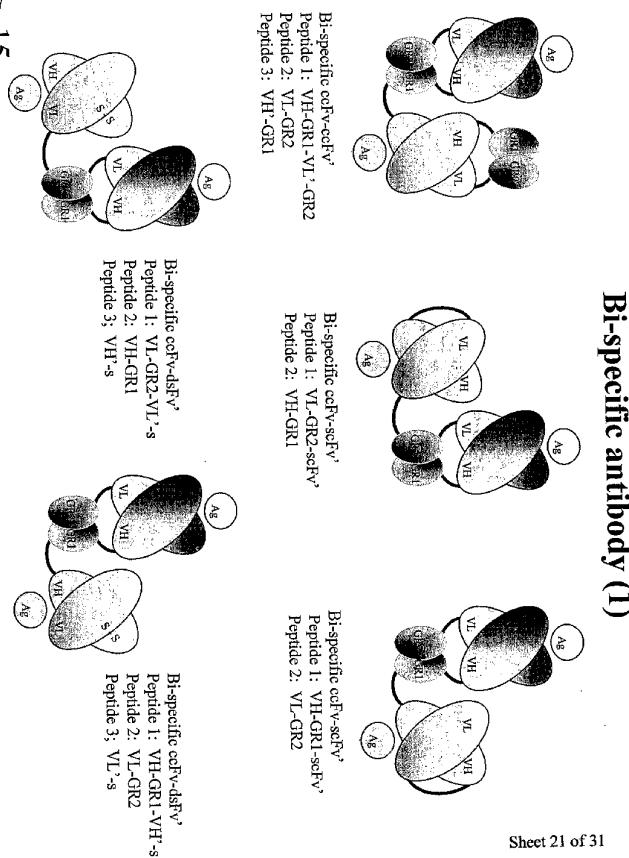


Fig. 14

WO 03/012069

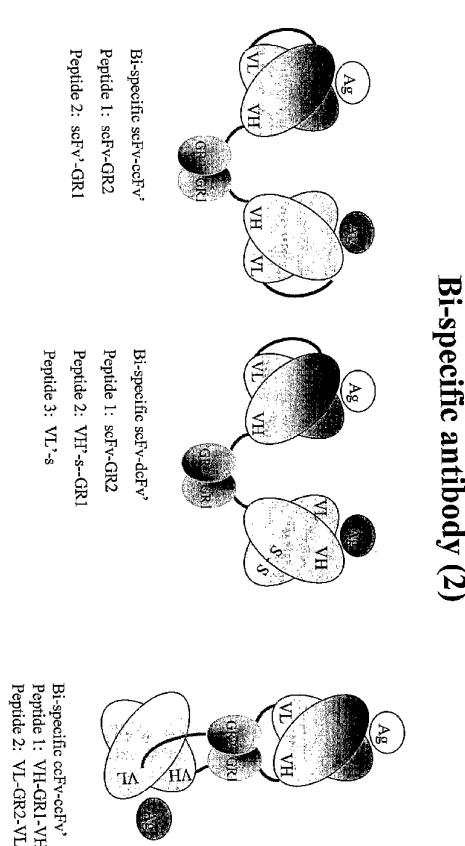
PCT/US02/24582

Fig. 15



WO 03/012069

PCT/US02/24582

**Fig. 16**

WO 03/012069

PCT/US02/24582

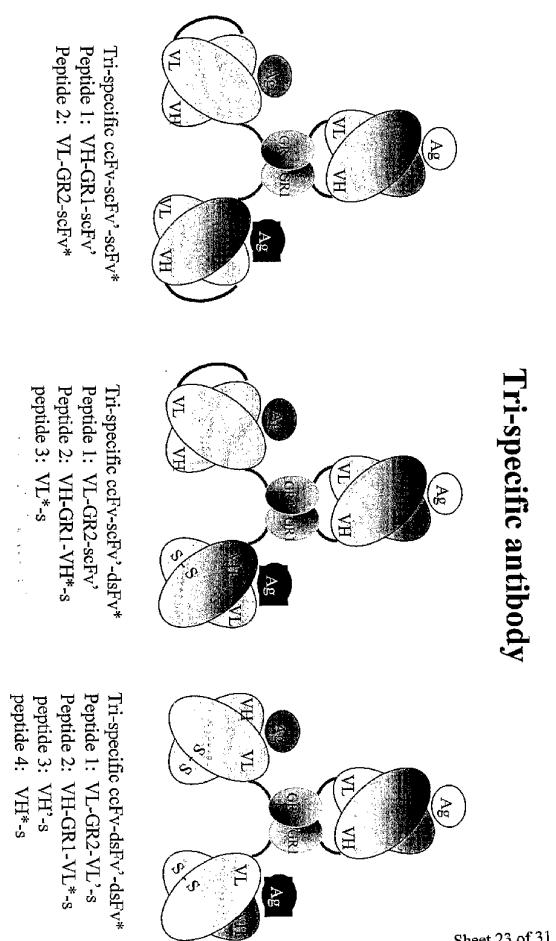
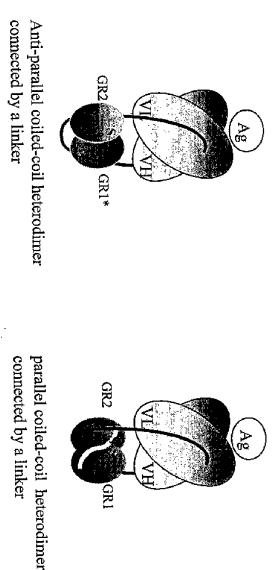


Fig. 17

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Single-chain ccFv antibody



Anti-parallel coiled-coil heterodimer
connected by a linker

Fig. 18

WO 03/012069

PCT/US02/24582

ccFv display and its use in antibody library construction

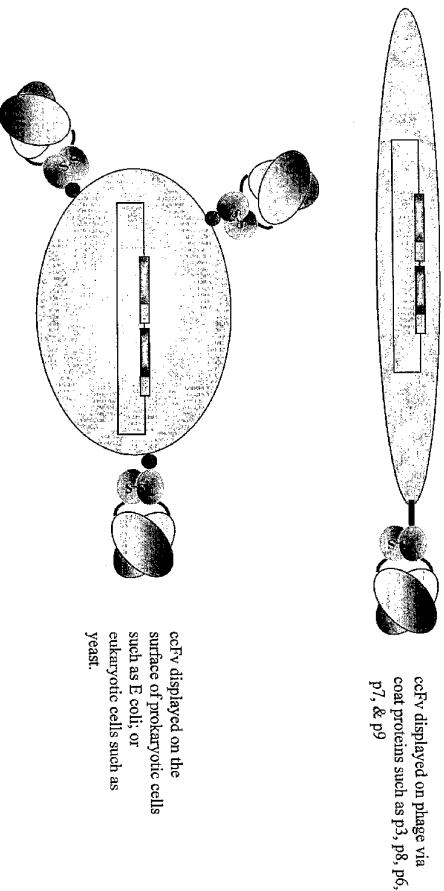


Fig. 19

WO 03/012069

PCT/US02/24582

**Enrichment of phages displaying AM2-ccFv
in panning of “model library”**

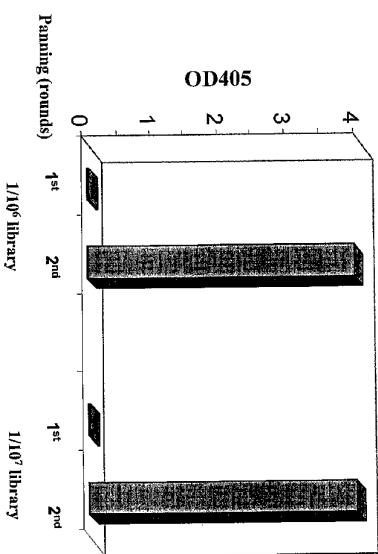


Fig. 20

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Enrichment of AM2-ccFv phage in panning of “model library”

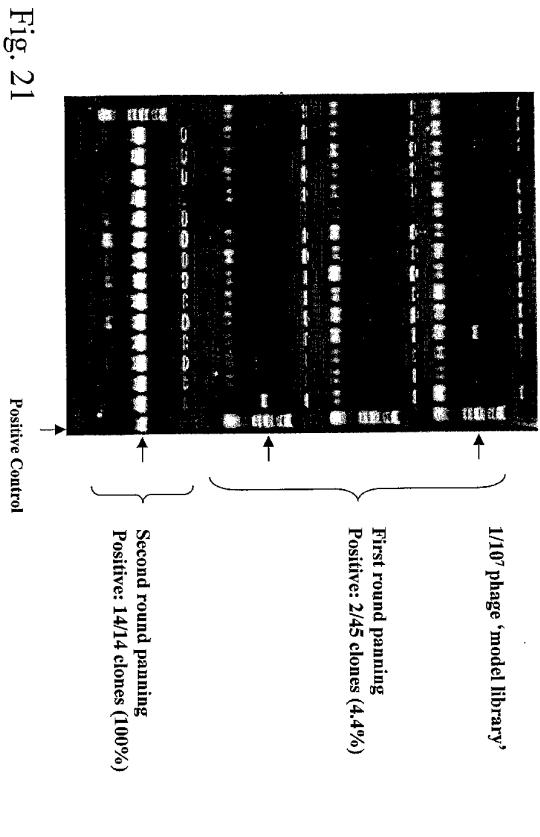


Fig. 21

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Phage library design of CDR3 of antibody AM2-ccFv



Sheet 28 of 31

Fig. 22

WO 03/012069

PCT/US02/24582

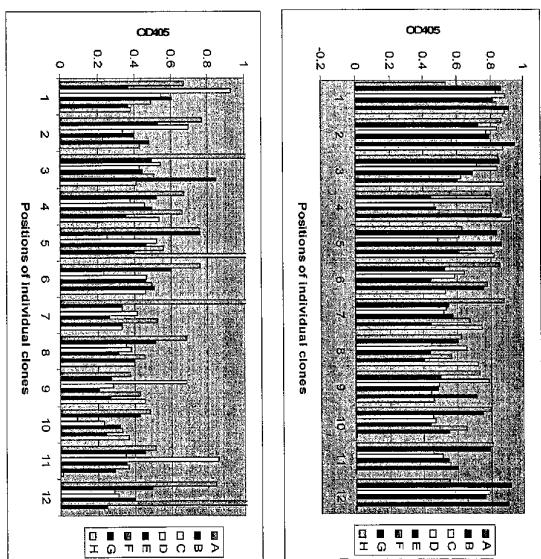
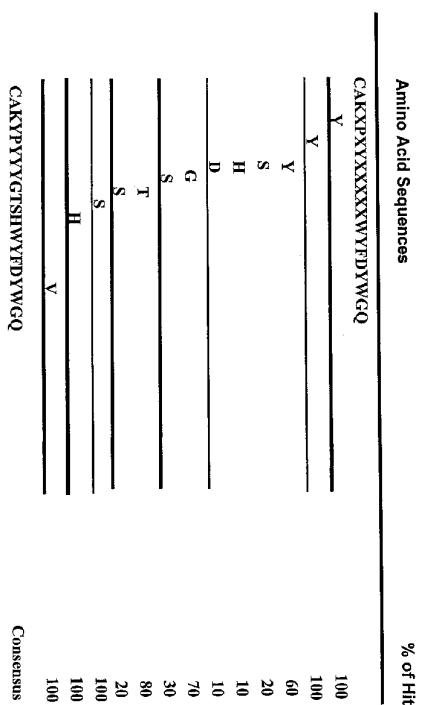
ELISA of the ccFv variants selected from panning of CDR3 VH library of AM2

Fig. 23

WO 03/012069

PCT/US02/24582

The ccFv variants selected from panning of CDR3 VH library of AM2



Sheet 30 of 31

Fig. 24

WO 03/012069

PCT/US02/24582

AM2 variant has slower K_{off} as compared to wild type AM2

Sheet 31 of 31

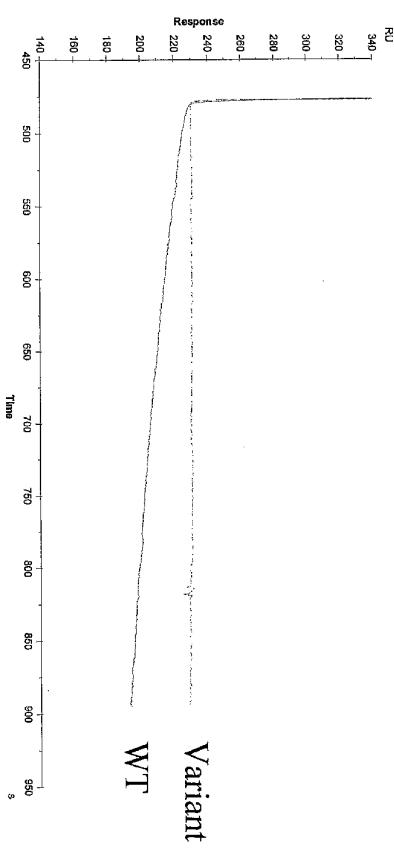


Fig. 25

WO 03/012069

PCT/US02/24582

SEQUENCE LISTING

<110> ZBONG, Pingyu et al.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR GENERATING
CHIMERIC HETEROMULTIMERS

<130> 13403.0004.00PC00

<140> To Be Assigned

<141>

<160> 30

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 146

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(132)

<400> 1	48
tct aga sgt gga gga ggt gag gag aag tcc cgg ctg ttg gag aag gag	
Ser Arg Gly Gly Gly Glu Lys Ser Arg Leu Leu Glu Lys Glu	
1 5 10 15	

aac cgt gaa ctg gaa aag atc att gct gag aaa gag gag cgt gtc tct	96
Asn Arg Glu Leu Glu Lys Ile Ile Ala Glu Lys Glu Arg Val Ser	
20 25 30	

gaa ctg cgc cat caa ctc cag tct gta gga ggt tgt taataggcg	142
Glu Leu Arg His Gln Leu Gln Ser Val Gly Gly Cys	
35 40	

cgcc	146
------	-----

<210> 2

<211> 44

<212> PRF

<213> Homo sapiens

<400> 2	
Ser Arg Gly Gly Gly Glu Glu Lys Ser Arg Leu Leu Glu Lys Glu	
1 5 10 15	
Asn Arg Glu Leu Glu Lys Ile Ile Ala Glu Lys Glu Arg Val Ser	
20 25 30	
Glu Leu Arg His Gln Leu Gln Ser Val Gly Gly Cys	
35 40	

<210> 3	
<211> 140	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	

WO 03/012069

PCT/US02/24582

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(140)

tct	cgt	ggg	ggg	gga	aca	tcc	cgc	ctg	gag	ggc	cta	cag	tca	gaa		48	
Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Ser	Arg	Leu	Glu	Gly	Leu	Gln	Ser	Glu		
1		5				10						15					
aac	cat	cgc	ctg	cga	atg	aag	atc	aca	gag	ctg	gat	aaa	gac	ttg	gaa		96
Asn	His	Arg	Leu	Arg	Met	Lys	Ile	Thr	Glu	Leu	Asp	Lys	Asp	Leu	Glu		
20							25						30				
gag	gtc	acc	atg	cag	ctg	cag	gtc	gga	ggg	tgc	gct	gcc	gc			140	
Glu	Val																
													45				

<210> 4
<211> 46
<212> PRT
<213> Homo sapiens

Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Ser	Arg	Leu	Glu	Gly	Leu	Gln	Ser	Glu		48
1		5				10						15					
His	Arg	Leu	Arg	Met	Lys	Ile	Thr	Glu	Leu	Asp	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu		
20							25						30				
Val	Thr	Met	Gln	Leu	Gln	Asp	Val	Gly	Gly	Cys	Ala	Ala	Ala				
35							40						45				

<210> 5
<211> 203
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Bluescript vector

aat	tgt	gag	cgg	ata	aca	att	tac	egg	tcc	ttt	taa	ctt	tag	taa	gga		48
gga	att	aaa	aaa	tga	aaa	agt	ctt	tag	tcc	tca	aag	cct	ccg	tag	ccg		96
ttg	cta	ccc	tcg	tcc	cga	tgc	taa	gct	tgc	ttt	ctt	ctt	gag	ccg	ccg	ctt	144
atc	cat	acg	acg	tac	cag	act	acg	cag	gag	gtc	atc	acc	atc	atc	acc		192
att	aga	gat	ct														203

<210> 6
<211> 45
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Bluescript

Met	Lys	Lys	Ser	Leu	Val	Leu	Lys	Ala	Ser	Val	Ala	Val	Ala	Thr	Leu		48
1		5				10						15					
Val	Pro	Met	Leu	Ser	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Tyr	Pro	Tyr	Asp		96
20							25						30				
Val	Pro	Asp	Tyr	Ala	Gly	Gly	His	His	His	His	His	His					

WO 03/012069

PCT/US02/24582

35	40	45
<210> 7		
<211> 212		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Bluescript vector		
<400> 7		
aat tgt gag cgg ata aca att tac cgg ttc ttt taa ctt tag taa gga	48	
gga att aaa aaa tga aat acc tat tgc cta cgg cag cgg ctg gat tgt	96	
tat tac tcc cgg ccc agc cgg cca tgg cgg ccc tgc agg cct cta gag	144	
cgg cgg ctt atc cat acg acg tac cag act acg cag gag gtc atc acc	192	
atc atc acc att aga gat ct	212	
<210> 8		
<211> 48		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Bluescript		
<400> 8		
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala		
1 5 10 15		
Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Leu Gln Ala Ser Arg Ala Ala Tyr		
20 25 30		
Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly His His His His His		
35 40 45		
<210> 9		
<211> 272		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Bluescript vector		
<400> 9		
aat tgt gag cgg ata aca att tac cgg ttc ttt taa ctt tag taa gga	48	
gga att aaa aaa tga aaa aat ctt tag tcc tca aag cct cgg tag cgg	96	
ttg cta ccc tog ttc cga tgc taa gct tcc cta gag cgg cgg ctt	144	
atc cat acg acg tac cag act acg cag gag gtc atc acc atc acc	192	
att aya gat ctg gag gcg gta ctg ttg aad gtt gtt tag caa aa	236	
g cta aca tac tgc gta att agg ayt ctt aag tcg ac	272	
<210> 10		
<211> 67		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> BlueScript vector		
<400> 10		
Met Lys Lys Ser Leu Val Leu Lys Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu		
1 5 10 15		
Val Pro Met Leu Ser Phe Ala Ser Arg Ala Ala Ala Tyr Pro Tyr Asp		

WO 03/012069

PCT/US02/24582

20 25 30
 Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly His His His His His His Arg Ser Gly
 35 40 45
 Gly Gly Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Ala Asn Ile Leu Arg Asn
 50 55 60
 Lys Glu Ser
 65

<210> 11
 <211> 281
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Bluescript vector

<400> 11
 aat tgt gag cgg ata aca att tac cgg ttc ttt taa ctt tag taa gga 48
 gga att aaa aaa tga aat acc tat tgc cta cgg cgg cog ctg gat tgt 96
 tat tac tcg cgg ccc agc cgg cca tgg cgg ccc tgc agg cct cta gag 144
 cgg cgg ctt atc cat acg acg tac cag act acc cag gag gtc atc acc 192
 atc atc acc att aga gat ctg gag cgg gta ctg ttg aaa gtt gtt tag 240
 caa a ag cta aca tac tgc gta ata agg agt ctt aag tcg ac 281

<210> 12
 <211> 70
 <212> PRTE
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Bluescript vector

<400> 12
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Ala Leu Gln Ala Ser Arg Ala Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly His His His His His His
 35 40 45
 Arg Ser Gly Gly Gly Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Ala Asn Ile
 50 55 60
 Leu Arg Asn Lys Glu Ser
 65 70

<210> 13
 <211> 501
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)....(501)
 <223> Bluescript vector

<400> 13
 atg aaa aag ttt tta gtc ctc aac gcc tcc gta gcc gtt gct acc ctc 48
 Met Lys Lys Ser Leu Val Leu Lys Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu
 1 5 10 15
 gtt ccg atg cta agc ttc gct tct aga ggt gga gga ggt gag gag aag 96
 Val Pro Met Leu Ser Phe Ala Ser Arg Gly Gly Glu Glu Lys

WO 03/012069

PCT/US02/24582

20	25	30	
tcc egg ctg ttg gag aag gag aac cgt gaa ctg gaa aag atc att got Ser Arg Leu Leu Glu Lys Glu Asn Arg Glu Leu Glu Lys Ile Ala 35 40 45			144
gag aaa gag gag cgt gtc tct gaa ctg cgc cat caa ctc cag tct gta Glu Lys Glu Glu Arg Val Ser Glu Leu Arg His Gln Leu Gln Ser Val 50 55 60			192
gga ggt tgt taa tag ggc gcg cca caa ttt cac agt aag gag gtt taa Gly Gly Cys * * Gly Ala Pro Gln Phe His Ser Lys Glu Val * 65 70 75			240
ctt atg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat Leu Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Pro Phe Tyr 80 85 90			288
tct cac tcc gct acg cgt tot cga gga ggt gga aca tcc cgc ctg Ser His Ser Ala Thr Arg Ser Arg Gly Gly Thr Ser Arg Leu 95 100 105			336
gag ggc cta cag tca gaa aac cat cgc ctg cga atg aag atc aca gag Glu Gly Leu Gln Ser Glu Asn His Arg Leu Arg Met Lys Ile Thr Glu 110 115 120 125			384
ctg gat aaa gag ttg gaa gag gtc acc atg cag ctg cag gag gtc gga Leu Asp Lys Asp Leu Glu Glu Val Thr Met Gln Leu Gln Asp Val Gly 130 135 140			432
ggt tgc gcg gcc gct tat cca tac gag cta gta cca gag tac gca gga ggt Gly Cys Ala Ala Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly 145 150 155			480
cat cac cat cat cac cat tag His His His His His * 160			501
 <210> 14 <211> 163 <212> PRT <213> Artificial Sequence			
 <220> <223> Bluescript vector			
 <400> 14 Met Lys Ser Leu Val Leu Lys Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu 1 5 10 15 Val Pro Met Leu Ser Phe Ala Ser Arg Gly Gly Gly Glu Lys 20 25 30 Ser Arg Leu Leu Glu Lys Glu Asn Arg Glu Leu Glu Lys Ile Ile Ala 35 40 45 Glu Lys Glu Glu Arg Val Ser Glu Leu Arg His Gln Leu Gln Ser Val 50 55 60 Gly Gly Cys Gly Ala Pro Gln Phe His Ser Lys Glu Val Leu Met Lys 65 70 75 80 Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser 85 90 95 Ala Thr Arg Ser Arg Gly Gly Thr Ser Arg Leu Glu Gly Leu			

WO 03/012069

PCT/US02/24582

```

100          105          110
Gln Ser Glu Asn His Arg Leu Arg Met Lys Ile Thr Glu Leu Asp Lys
115          120          125
Asp Leu Glu Glu Val Thr Met Gln Leu Gln Asp Val Gly Gly Cys Ala
130          135          140
Ala Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly His His His
145          150          155          160
His His His

<210> 15
<211> 498
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(498)
<223> Bluescript vector

<400> 15
atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc ggg 48
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu
1           5           10           15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Ser Arg Gly Gly Gly Glu Lys Ser
20          25          30
gcc cag ccg gcc atg gcg tct aga ggt gga gga ggt gag gag aag tcc 96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Ser Arg Gly Gly Gly Glu Lys Ser
35          40          45
ogg ctg ttg gag aag aac cgt gaa ctg gaa aag atc att gct gag 144
Arg Leu Leu Lys Glu Lys Asn Arg Glu Leu Glu Lys Ile Ile Ala Glu
35          40          45
aaa gag gag cgt gtc tct gaa ctg cgc cat caa ctc cgt cag tct gta gga 192
Lys Glu Arg Val Ser Glu Leu Arg His Glu Leu Glu Ser Val Gly
50          55          60
sgt tgt taa tag ggc gcg cca caa ttt cac agt aag gag gtt taa ctt 240
Gly Cys * * Gly Ala Pro Gln Phe His Ser Lys Glu Val * Leu
65          70          75
atg aaa aaa tta tta ttc goa att cct tta gtt gtt cct ttc tat tct 288
Met Lys Lys Ieu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser
80          85          90
cac tcc gct acg cgt tct cga gga ggt ggt gga aca tcc cgc ctg gag 336
His Ser Ala Thr Arg Ser Arg Gly Gly Gly Thr Ser Arg Leu Glu
95          100          105
ggc cta cag tca gaa aac cat cgc ctg cga atg aag att aca gag ctg 384
Gly Leu Gln Ser Glu Asn His Arg Leu Arg Met Lys Ile Thr Glu Leu
110          115          120          125
gat aaa gag ttg gaa gag gtc acc atg cag ctg cag gag gtc gga ggt 432
Asp Lys Asp Leu Glu Glu Val Thr Met Gln Leu Gln Asp Val Gly Gly
130          135          140
tgc gcg gcc gct tat cca tac gag gta cca gac tac gca gga ggt cat 480
Cys Ala Ala Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly His
145          150          155

```

WO 03/012069

PCT/US02/24582

cac cat cat cac cat tag	498
His His His His *	
160	
<210> 16	
<211> 162	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Bluescript vector	
<400> 16	
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala	
1 5 10 15	
Ala Gln Pro Ala Met Ala Ser Arg Gly Gly Gly Glu Glu Lys Ser	
20 25 30	
Arg Leu Leu Glu Lys Glu Asn Arg Glu Leu Glu Lys Ile Ile Ala Glu	
35 40 45	
Lys Glu Glu Arg Val Ser Glu Leu Arg His Gln Leu Gln Ser Val Gly	
50 55 60	
Gly Cys Gly Ala Pro Gln Phe His Ser Lys Glu Val Leu Met Lys Lys	
65 70 75 80	
Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser Ala	
85 90 95	
Thr Arg Ser Arg Gly Gly Gly Thr Ser Arg Leu Glu Gly Leu Gln	
100 105 110	
Ser Glu Asn His Arg Leu Arg Met Lys Ile Thr Glu Leu Asp Lys Asp	
115 120 125	
Leu Glu Glu Val Thr Met Gln Leu Gln Asp Val Gly Gly Cys Ala Ala	
130 135 140	
Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly His His His His	
145 150 155 160	
His His	
<210> 17	
<211> 552	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<221> CDS	
<222> (1)...(543)	
<223> Bluescript vector	
<400> 17	
atg aaa aag tct tta gtc ctc aaa gcc tcc gta gcc gtt gct acc ctc	48
Met Lys Ser Leu Val Leu Lys Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu	
1 5 10 15	
gtt ccg atg cta agc ttc gct tct aga ggt gga gga ggt gag gag aag	96
Val Pro Met Leu Ser Phe Ala Ser Arg Gly Gly Gly Glu Glu Lys	
20 25 30	
tcc ccg ctg ttg gag aag gag aac cgt gaa aag atc att gct	144
Ser Arg Leu Leu Glu Lys Glu Asn Arg Glu Leu Glu Lys Ile Ile Ala	
35 40 45	
gag aaa gag gag cgt gtc tot gaa ctg cgc cat caa ctc cag tct gta	192

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Glu Lys Glu Glu Arg Val Ser Glu Leu Arg His Gln Leu Gln Ser Val
 50 55 60

gga ggt tgt taa tag ggc gcg cca caa ttt cac act aag gag gtt taa 240
 Gly Gly Cys * * Ala Pro Gln Phe His Ser Lys Glu Val *
 65 70 75

ctt atg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat 288
 Leu Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr
 80 85 90

tct cac tcc gct acg cgt tct cga gga ggt ggt gga aca tcc cgc ctg 336
 Ser His Ser Ala Thr Arg Ser Arg Gly Gly Thr Ser Arg Leu
 95 100 105

gag ggc cta cag tca gaa aac cat cgc ctg cga atg aag atc aca gag 384
 Glu Gly Leu Gln Ser Glu Asn His Arg Leu Arg Met Lys Ile Thr Glu
 110 115 120 125

ctg gat aaa gac ttg gaa gag gtc acc atg cag ctg cag gac gtc gga 432
 Leu Asp Lys Asp Leu Glu Glu Val Thr Met Gln Leu Gln Asp Val Glu
 130 135 140

ggt tgc gcg gcc gct tat cca tac gac cca gac tac gca gga ggt 480
 Gly Cys Ala Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly
 145 150 155

cat cac cat cac cat tag gga ggc ggt act gtt gaa agt tgt cts 528
 His His His His His * Gly Gly Thr Val Glu Ser Cys Leu
 160 165 170

cgt aat aag gag tct taagtcgac 552
 Arg Asn Lys Glu Ser
 175

<210> 18
<211> 185
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Bluescript vector

<400> 18
Met Lys Ser Leu Val Leu Lys Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu
 1 5 10 15
Val Pro Met Leu Ser Phe Ala Ser Arg Gly Gly Gly Glu Glu Lys
 20 25 30
Ser Arg Leu Leu Lys Glu Asn Arg Glu Leu Glu Lys Ile Ile Ala
 35 40 45
Glu Lys Glu Glu Arg Val Ser Glu Leu Arg His Gln Leu Gln Ser Val
 50 55 60
Gly Gly Cys Gly Ala Pro Gln Phe His Ser Lys Glu Val Leu Met Lys
 65 70 75 80
Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser
 85 90 95
Ala Thr Arg Ser Arg Gly Gly Gly Thr Ser Arg Leu Glu Gly Leu
 100 105 110
Gln Ser Glu Asn His Arg Leu Arg Met Lys Ile Thr Glu Leu Asp Lys
 115 120 125

WO 03/012069

PCT/US02/24582

Asp Leu Glu Glu Val Thr Met Gln Leu Gln Asp Val Gly Gly Cys Ala
 130 135 140
 Ala Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly His His His
 145 150 155 160
 His His His Arg Ser Gly Gly Gly Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys
 165 170 175
 Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser
 180 185

<210> 19
<211> 549
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
*
<220>
<221> CDS
<222> (1)...(540)
<223> Bluescript vector

<400> 19
atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc gcg 48
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
gcc cag ccg gcc atg ggg tct aga ggt gga ggt gag gag aag tcc 96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Ser Arg Gly Gly Gly Glu Lys Ser
 20 25 30
cgg ctg ttg gag aag gag aac cgt gaa ctc aag att gtc gag 144
Arg Leu Leu Lys Glu Asn Arg Glu Leu Glu Lys Ile Ile Ala Glu
 35 40 45
aaa gag gag cgt tct gaa ctg cgc cat caa ctc cag tct gta gga 192
Lys Glu Glu Arg Val Ser Glu Leu Arg His Gln Leu Gln Ser Val Gly
 50 55 60
ggg tgt taa tag ggc gcg cca caa ttt cac agt aag gag gtt taa ctt 240
Gly Cys * * Gly Ala Pro Gln Phe His Ser Lys Glu Val * Leu
 65 70 75
atg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat tct 288
Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser
 80 85 90
cac tcc gct acg cgt tct cga gga ggt ggt gga aca tcc cgc ctg gag 336
His Ser Ala Thr Arg Ser Arg Gly Gly Thr Ser Arg Leu Glu
 95 100 105
ggc cta cag tca gaa aac cat cgc ctg cga atg aag atc aca gag ctg 384
Gly Leu Gln Ser Glu Asn His Arg Leu Arg Met Lys Ile Thr Glu Leu
 110 115 120 125
gat aaa gac ttg gaa gag gtc acc atg cag ctg cag gag gtc gga ggt 432
Asp Lys Asp Leu Glu Glu Val Thr Met Gln Leu Gln Asp Val Gly Gly
 130 135 140
tgc gcg gcc gct tat cca tac gac gta cca gac tac gca gga ggt cat 480
Cys Ala Ala Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly His
 145 150 155
cac cat cat cac cat tag gga ggc ggt act gtt gaa agt tgt ctg cgt 528

WO 03/012069

PCT/US02/24582

His His His His His * Gly Gly Gly Thr Val Glu Ser Cys Leu Arg
 160 165 170

aat aag gag tct taagtgcac 549
 Asn Lys Glu Ser
 175

<210> 20
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Bluescript vector

<400> 20
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Ser Arg Gly Gly Gly Glu Glu Lys Ser
 20 25 30
 Arg Leu Leu Glu Lys Glu Asn Arg Glu Leu Glu Lys Ile Ile Ala Glu
 35 40 45
 Lys Glu Glu Arg Val Ser Glu Leu Arg His Gln Leu Gln Ser Val Gly
 50 55 60
 Gly Cys Gly Ala Pro Gln Phe His Ser Lys Glu Val Leu Met Lys Lys
 65 70 75 80
 Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser Ala
 85 90 95
 Thr Arg Ser Arg Gly Gly Gly Thr Ser Arg Leu Glu Gly Leu Glu
 100 105 110
 Ser Glu Asn His Arg Leu Arg Met Lys Ile Thr Glu Leu Asp Lys Asp
 115 120 125
 Leu Glu Glu Val Thr Met Gln Leu Gln Asp Val Gly Gly Cys Ala Ala
 130 135 140
 Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly His His His
 145 150 155 160
 His His Arg Ser Gly Gly Gly Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Ala
 165 170 175
 Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser
 180

<210> 21
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 21
 ggaatttgtga gcggataaca atttaccgggt cacacaggaa acagctatga ccatg 55

<210> 22
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

WO 03/012069

PCT/US02/24582

<400> 22						
catggtcata	gctgtttcct	gtgtgaccgg	taaaattgtta	tccgctcaca	attcc	55
<210> 23						
<211> 9						
<212> DNA						
<213> Viral						
<400> 23						
ttaacttta						9
<210> 24						
<211> 8						
<212> DNA						
<213> Viral						
<400> 24						
taaggagg						8
<210> 25						
<211> 68						
<212> DNA						
<213> Viral						
<400> 25						
atgaaaaaagt	ctttagtcct	caaagctcc	gtagccgttg	ctccctcggt	ccgatgtcaa	60
gcttcgtt						68
<210> 26						
<211> 66						
<212> DNA						
<213> Viral						
<400> 26						
atgaaaatacc	tattgcotac	ggcagccgct	ggattgttat	tactcgccgc	ccagccggcc	60
atggcg						66
<210> 27						
<211> 54						
<212> DNA						
<213> Artificial Sequence						
<220>						
<223> Phage						
<400> 27						
tatccatacg	acgtacoaga	otacgcagga	ggtcatcacc	atcatcacca	ttag	54
<210> 28						
<211> 57						
<212> DNA						
<213> Artificial Sequence						
<220>						
<223> Phage						
<400> 28						
atgaaaaaaaaat	tattattcgc	aattccttta	gttgttcctt	tctattctca	ctccgct	57
<210> 29						
<211> 4						

WO 03/012069

PCT/US02/24582

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Bluescript

<400> 29
Val Gly Gly Cys
1

<210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Bluescript

<400> 30
Gly Gly Gly Gly
1

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 February 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/012069 A3(51) International Patent Classification⁵: C07K 16/00. (74) Agent: WONG, Karen; HOWRIE SIMON ARNOLD & WHITTE LLP, 301 Ravenswood Avenue, Menlo Park, CA 94025 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/24582

(22) International Filing Date: 31 July 2002 (31.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/21,144 1 August 2001 (01.08.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): AB-MAXIS, INC. [US/US]; 453 Ravelendale Drive, Suite B, Mountain View, CA 94043 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WANG, Cailli [CN/US]; 95 Judah Street, Apartment 1, San Francisco, CA 94122 (US); ZHONG, Pingyu [US/US]; 1475 Tyler Parkway, Mountain View, CA 94040 (US); LIU, Shengjiang [US/US]; 535 Devonshire Court, Mountain View, CA 94043 (US); LIU, Peizhi [US/US]; 545 Dawn Drive, Sunnyvale, CA 94087 (US); LI, Shengfeng [US/US]; 1114 Ladera Way, Belmont, CA 94003 (US); WANG, Xinwei [CN/US]; 7221 Via Vida, San Jose, CA 95129 (US).

(81) Designated States (national): AL, AG, AL, AM, AT, AU,

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,

GM, IIR, HU, ID, IL, IN, IS, JR, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SL, SG, SI,

SK, SI, TJ, TM, TR, TI, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,

ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,

KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

Bunessian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

European patent (AT, BI, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, BI,

ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,

GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
6 November 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/012069 A3

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR GENERATING CHIMERIC HETEROMULTIMERS

(57) Abstract: The present invention provides a technique for specific assembly of monomeric polypeptides to form a heteromultimer. This technique is particularly useful for generating a genetically diverse repertoire of heteromultimers such as antigen-binding units. The invention also provides both non-single-chain and single-chain antigen-binding units that are assembled by the technique described herein. The present invention also provides recombinant polynucleotides, vectors, host cells, and kits for producing the subject antigen-binding units. Further provided by the invention are methods of using the subject antigen-binding units.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/24582
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07K 16/00; C12N 1/500; 15/63; G01N 33/53; US CL : 530/387.3; 536/23.53; 435/320.1, 69.5, 69.7, 7.1, 325, 326 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/387.3; 536/23.53; 435/320.1, 69.5, 69.7, 7.1, 325, 326		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	PLUCKTHUN et al. New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. Immunotechnology. 1997, Vol.3, pages 83-105, especially Figure 3.	20-21, 23-27 ----- 37, 39, 40, 69
P,X	ARNDT et al. Helix-stabilized Fv 9bsFv antibody fragments: Substituting the constant domains of a Fab fragment for a heterodimeric coiled coil domain. J. Mol Biol. 07 Sept 2001, Vol.312, pages 221-228, especially Figure 1.	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		See parent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</p> <p>"C" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		
<p>Date of the actual completion of the international search 08 May 2003 (08.05.2003)</p>		<p>Date of mailing of the international search report 26 JUN 2003</p>
<p>Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/U.S. Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230</p>		<p>Authorized officer <i>Valerie Bell-Harris Jr.</i> Larry R. Helms Telephone No. (703) 308-0196</p>

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	PCT/US02/24582

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
CAPLUS, MEDLINE, WEST, USPATFULL, PIR, SWISSPROT, GENEMBLE, BIOSIS
Search terms: Fv, coiled-coil, dimerization domain, jun, fos, light chain, heavy chain, hsfv, helix stabilized Fv, label, GABA receptor, SEQ ID NO:2, 4, neurotransmitters, nuclear hormone receptors, ccFv, inventors names.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N,0,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ワン,カイリ

アメリカ合衆国,カリフォルニア 94122,サンフランシスコ,ジュダー ストリート 95
アパートメント 1

(72)発明者 ツォン,ピンユ

アメリカ合衆国,カリフォルニア 94040,マウンテン ビュー,タイラー パークウェイ
1475

(72)発明者 リウ,シェンジャン

アメリカ合衆国,カリフォルニア 94043,マウンテン ビュー,デボンシャー コート 5
35

(72)発明者 ルオ,ペイツイ

アメリカ合衆国,カリフォルニア 94087,サニーベイル,ドーン ドライブ 545

(72)発明者 リ,シェンフェン

アメリカ合衆国,カリフォルニア 94003,ベルモント,ラデラ ウェイ 1114

(72)発明者 ワン,シンウェイ

アメリカ合衆国,カリフォルニア 95129,サンノゼ,ビア ピコ 7221

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA61 BA63 CA02 CA07 DA06 EA03 EA04
FA02 FA18 GA11 HA01 HA03 HA14 HA15
4B064 AG01 AG27 CA02 CA12 CC24 CE02 CE03 CE12 DA01 DA13
4B065 AA26X AA90Y AA93Y AA98X AA98Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25
CA44 CA46
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20
EA50 FA74 GA26