

(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2012-532619

(P2012-532619A)

(43) 公表日 平成24年12月20日(2012.12.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 142 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-520015 (P2012-520015)
 (86) (22) 出願日 平成22年7月14日 (2010.7.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年3月6日 (2012.3.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2010/060111
 (87) 国際公開番号 W02011/006914
 (87) 国際公開日 平成23年1月20日 (2011.1.20)
 (31) 優先権主張番号 61/226,094
 (32) 優先日 平成21年7月16日 (2009.7.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 397009934
 グラクソ グループ リミテッド
 GLAXO GROUP LIMITED
 イギリス ミドルセックス ユービー6
 Oエヌエヌ グリーンフォード パークレ
 ー アベニュー グラクソ ウェルカム
 ハウス (番地なし)
 Glaxo Wellcome Hous
 e, Berkeley Avenue G
 reenford, Middlesex
 UB6 ONN, Great Brita
 in
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TNFR1 を部分的に阻害するためのアンタゴニスト、用途および方法

(57) 【要約】

本発明は、抗腫瘍壊死因子1 (TNFR1、p55、CD120a、P60、TNF受容体スーパーファミリーのメンバー1A、TNFRSF1A) アンタゴニストに関し、これは関節炎、乾癬、クローン病、COPD、肺炎症状態および喘息等のTNFR1媒介性疾患または状態の治療および/または予防に有用な、TNFR1を部分的に阻害するTNFR1アンタゴニストである。本発明はさらに、このような抗TNFR1アンタゴニストを含むかまたは使用する、方法、用途、製剤、組成物および機器に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者における TNFR1 媒介性シグナル伝達を部分的に阻害することにより TNFR1 媒介性疾患または状態を治療および / または予防するために、TNFR1 媒介性疾患または状態を呈している患者へ投与するための抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR1 ; p55) アンタゴニストであって、該アンタゴニストは TNFR1 の非競合阻害剤であり、

100 nM の濃度の該アンタゴニストは、

(i) 免疫サンドイッチ法により測定された場合に標準的 MRC5 細胞アッセイ法において 100 pg / ml の TNF 濃度であるヒト TNF の存在下、該アッセイ法にて 50 % 超 ;

(i i) 免疫サンドイッチ法により測定された場合に標準的 MRC5 細胞アッセイ法において 2 ng / ml 以上の TNF 濃度であるヒト TNF の存在下、該アッセイ法にて 50 % 以下 ;

TNFR1 を阻害し、

ここで該アンタゴニストは、DOM1h - 574 - 156、DOM1h - 574 - 72、DOM1h - 574 - 109、DOM1h - 574 - 138、DOM1h - 574 - 162 および DOM1h - 574 - 180 から選択される免疫グロブリン単一可変ドメインへのヒト TNFR1 の結合を阻害する、
上記アンタゴニスト。

【請求項 2】

患者における TNFR1 媒介性シグナル伝達を部分的に阻害することにより TNFR1 媒介性疾患または状態を治療および / または予防するために、TNFR1 媒介性疾患または状態を呈している患者へ投与するための医薬品の製造における抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR1 ; p55) アンタゴニストの使用であって、該アンタゴニストは TNFR1 の非競合阻害剤であり、

100 nM の濃度の該アンタゴニストは、

(i) 免疫サンドイッチ法により測定された場合に標準的 MRC5 細胞アッセイ法において 100 pg / ml の TNF 濃度であるヒト TNF の存在下、該アッセイ法にて 50 % 超 ;

(i i) 免疫サンドイッチ法により測定された場合に標準的 MRC5 細胞アッセイ法において 2 ng / ml 以上の TNF 濃度であるヒト TNF の存在下、該アッセイ法にて 50 % 以下 ;

TNFR1 を阻害し、

ここで該アンタゴニストは、DOM1h - 574 - 156、DOM1h - 574 - 72、DOM1h - 574 - 109、DOM1h - 574 - 138、DOM1h - 574 - 162 および DOM1h - 574 - 180 から選択される免疫グロブリン単一可変ドメインへのヒト TNFR1 の結合を阻害する、
上記使用。

【請求項 3】

患者における TNFR1 媒介性疾患または状態を治療および / または予防するための方法であって、有効量の抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR1 ; p55) アンタゴニストを患者に投与することにより患者における TNFR1 媒介性シグナル伝達を部分的に阻害することを含み、該アンタゴニストは TNFR1 の非競合阻害剤であり、

(i) 免疫サンドイッチ法により測定された場合に標準的 MRC5 細胞アッセイ法において 100 pg / ml の TNF 濃度であるヒト TNF の存在下、該アッセイ法にて 50 % 超 ;

(i i) 免疫サンドイッチ法により測定された場合に標準的 MRC5 細胞アッセイ法において 2 ng / ml 以上の TNF 濃度であるヒト TNF の存在下、該アッセイ法にて 50 % 以下 ;

TNFR1 を阻害し、

10

20

30

40

50

ここで該アンタゴニストは、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 5 6、DOM 1 h - 5 7 4 - 7 2、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 0 9、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 3 8、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 6 2 および DOM 1 h - 5 7 4 - 1 8 0 から選択される免疫グロブリン単一可変ドメインへのヒト TNFR 1 の結合を阻害する、
上記方法。

【請求項 4】

アンタゴニストが DOM 1 h - 5 7 4 - 1 5 6、DOM 1 h - 5 7 4 - 7 2、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 0 9、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 3 8、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 6 2 または DOM 1 h - 5 7 4 - 1 8 0 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する免疫グロブリン可変ドメインを含む、請求項 1 に記載のアンタゴニスト、請求項 2 に記載の使用または請求項 3 に記載の方法。

10

【請求項 5】

患者における TNFR 1 媒介性シグナル伝達を部分的に阻害することにより TNFR 1 媒介性疾患または状態を治療および / または予防するために、TNFR 1 媒介性疾患または状態を呈している患者へ投与するための抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR 1 ; p 5 5) アンタゴニストであって、該アンタゴニストは TNFR 1 の非競合阻害剤であり、

1 0 0 n M の濃度の該アンタゴニストは、

(i) 標準的 L 9 2 9 細胞アッセイ法において 2 0 p g / m l 濃度のマウス TNF の存在下、該アッセイ法にて 5 0 % 超 ;

(i i) 標準的 L 9 2 9 細胞アッセイ法において 1 0 0 p g / m l 以上の濃度のマウス TNF の存在下、該アッセイ法にて 5 0 % 以下 ;

20

TNFR 1 を阻害し、

ここで該アンタゴニストは、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 5 6、DOM 1 m - 2 1 - 2 3、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 5 6、DOM 1 h - 5 7 4 - 7 2、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 0 9、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 3 8、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 6 2 および DOM 1 h - 5 7 4 - 1 8 0 から選択される免疫グロブリン単一可変ドメインへのマウス TNFR 1 の結合を阻害する、

上記アンタゴニスト。

【請求項 6】

患者における TNFR 1 媒介性シグナル伝達を部分的に阻害することにより TNFR 1 媒介性疾患または状態を治療および / または予防するために、TNFR 1 媒介性疾患または状態を呈している患者へ投与するための医薬品の製造における抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR 1 ; p 5 5) アンタゴニストの使用であって、該アンタゴニストは TNFR 1 の非競合阻害剤であり、

30

1 0 0 n M の濃度の該アンタゴニストは、

(i) 標準的 L 9 2 9 細胞アッセイ法において 2 0 p g / m l 濃度のマウス TNF の存在下、該アッセイ法にて 5 0 % 超 ;

(i i) 標準的 L 9 2 9 細胞アッセイ法において 1 0 0 p g / m l 以上の濃度のマウス TNF の存在下、該アッセイ法にて 5 0 % 以下 ;

40

TNFR 1 を阻害し、

ここで該アンタゴニストは、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 5 6、DOM 1 m - 2 1 - 2 3、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 5 6、DOM 1 h - 5 7 4 - 7 2、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 0 9、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 3 8、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 6 2 および DOM 1 h - 5 7 4 - 1 8 0 から選択される免疫グロブリン単一可変ドメインへのマウス TNFR 1 の結合を阻害する、

上記使用。

【請求項 7】

患者における TNFR 1 媒介性疾患または状態を治療および / または予防する方法であって、有効量の抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR 1 ; p 5 5) アンタゴニストを患者に投与することにより患者における TNFR 1 媒介性シグナル伝達を部分的に阻害する

50

ことを含み、該アンタゴニストはTNFR1の非競合阻害剤であり、

100nMの濃度の該アンタゴニストは、

(i) 標準的L929細胞アッセイ法において20pg/ml濃度のマウスTNFの存在下、該アッセイ法にて50%超；

(ii) 標準的L929細胞アッセイ法において100pg/ml以上の濃度のマウスTNFの存在下、該アッセイ法にて50%以下；

TNFR1を阻害し、

ここで該アンタゴニストは、DOM1h-574-156、DOM1m-21-23、DOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-162およびDOM1h-574-180から選択される免疫グロブリン単一可変ドメインへのマウスTNFR1の結合を阻害する、

上記方法。

【請求項8】

アンタゴニストがDOM1h-574-156またはDOM1m-21-23のアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する免疫グロブリン可変ドメインを含む、請求項5に記載のアンタゴニスト、請求項6に記載の使用または請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記状態が炎症状態、任意に慢性炎症状態である、請求項1～8のいずれか1項に記載のアンタゴニスト、使用または方法。

【請求項10】

前記状態が関節炎（任意に関節リウマチまたは若年性関節リウマチ）、強直性脊椎炎、骨関節炎、炎症腸疾患（任意にクローン病または潰瘍性大腸炎）および乾癬からなる群から選択される、請求項1～9のいずれか1項に記載のアンタゴニスト、使用または方法。

【請求項11】

請求項1または5に記載のアンタゴニストをコードする塩基配列を含む単離または組換え核酸。

【請求項12】

請求項11に記載の核酸を含むベクター。

【請求項13】

請求項11に記載の核酸、または請求項12に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項14】

請求項1または5に記載の抗TNFR1アンタゴニストおよび薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤もしくは希釈剤を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗腫瘍壊死因子1（TNFR1、p55、CD120a、P60、TNF受容体スーパーファミリーのメンバー1A、TNFRSF1A）アンタゴニストに関し、これは関節炎、乾癬、クローン病、COPD、肺炎状態および喘息等のTNFR1媒介性疾患または状態の治療および/または予防に有用な、TNFR1を部分的に阻害するTNFR1アンタゴニストである。本発明はさらに、このような抗TNFR1アンタゴニストを含むかまたは使用する、方法、用途、製剤、組成物および機器に関する。

【背景技術】

【0002】

TNFR1

TNFR1は、リガンドに結合する細胞外領域と、本質的なシグナル形質導入活性を欠くがシグナル形質導入分子と結合可能な細胞内ドメインを含む膜横断受容体である。TNFR1と結合TNFとの複合体は3つのTNFR1鎖および3つのTNF鎖を含む。（B

10

20

30

40

50

anner et al., Cell, 73(3) 431-445 (1993))。TNFリガンドは、3つのTNFR1鎖(I d)により結合している三量体として存在する。3つのTNFR1鎖は受容体リガンド複合体中で互いに凝集しており、この凝集は、TNFR1媒介性シグナル形質導入にとって必須である。実際、TNFR1に結合する多価剤(抗TNFR1抗体等)は、TNFの不在下でTNFR1凝集およびシグナル形質導入を誘発し得、一般にTNFR1アゴニストとして使用されている。(例えば、Belka et al., EMBO, 14(6):1156-1165 (1995); Mandik-Nayak et al., J. Immunol, 167:1920-1928 (2001)を参照のこと)。したがって、TNFR1に結合する多価剤は、TNFのTNFR1への結合をブロックするとしても、TNFR1のアンタゴニストとして一般に有効ではない。

10

【0003】

本段落の配列番号はWO2006038027に使用されるナンバリングを表す。TNFR1の細胞外領域は、13個のアミノ酸のアミノ末端セグメント(配列番号603のアミノ酸1~13(ヒト);配列番号604のアミノ酸1~13(マウス))、ドメイン1(配列番号603のアミノ酸14~53(ヒト);配列番号604のアミノ酸14~53(マウス))、ドメイン2(配列番号603のアミノ酸54~97(ヒト);配列番号604のアミノ酸54~97(マウス))、ドメイン3(配列番号603のアミノ酸98~138(ヒト);配列番号604のアミノ酸98~138(マウス))、およびドメイン4(配列番号603のアミノ酸139~167(ヒト);配列番号604のアミノ酸139~167(マウス))であり、これらの後に膜近位領域(配列番号603のアミノ酸168~182(ヒト);配列番号604のアミノ酸168~183(マウス))が続く。(Banner et al., Cell 73(3) 431-445 (1993) and Loetscher et al., Cell 61(2) 351-359 (1990)を参照のこと)。ドメイン2および3は結合リガンド(TNF、TNF)と接触する。(Banner et al., Cell, 73(3) 431-445 (1993))。TNFR1の細胞外領域はプレリガンド結合会合ドメインまたはPLADドメイン(配列番号603のアミノ酸1~53(ヒト);配列番号604のアミノ酸1~53(マウス))として称される領域も含む(米国政府、WO01/58953; Deng et al., Nature Medicine, doi: 10.1038/nm1304 (2005))。

20

30

【0004】

TNFR1は、ドメイン4または膜近位領域(配列番号603のアミノ酸168~182;配列番号604のアミノ酸168~183)にTNFR1のタンパク質分解等の過程を介してインビボ細胞表面から剥がれ、TNFR1の溶解形態を産生する。溶解性TNFR1は、TNFへの結合力を保持し、その結果、TNF活性の内生阻害剤として機能する。

【0005】

WO2006038027、WO2008149144およびWO2008149148は、抗TNFR1免疫グロブリン単一可変ドメインおよびこれらを含むアンタゴニストについて開示している。これらの文書は、TNFに媒介される状態の治療および/または予防のためのこのようなドメインおよびアンタゴニストの使用についても開示している。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】WO2006038027

【特許文献2】WO01/58953

【特許文献3】WO01/58953

【特許文献4】WO2008149148

50

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Banner et al., Cell, 73(3) 431-445 (1993)

【非特許文献2】Belka et al., EMBO, 14(6):1156-1165 (1995)

【非特許文献3】Mandik-Nayak et al., J. Immunol, 167:1920-1928 (2001)

【非特許文献4】Loetscher et al., Cell 61(2) 351-359 (1990)

【非特許文献5】Deng et al., Nature Medicine, doi: 10.1038/nm1304 (2005)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

10

本発明者らは、TNFR1の部分的阻害はTNFR1媒介性疾患および状態の治療および/または予防のために所望されるであろうことを認識した。

【0009】

本発明は、すべてのTNFを完全に阻害するのではなく、慢性炎症、例えば、関節炎中に見出される過剰量のTNFのみを阻害するアンタゴニストを提供する。

【0010】

したがって、本発明の1つの態様では、TNFR1媒介性疾患もしくは状態を呈している患者へ投与するための抗TNF受容体1型(TNFR1; p55)アンタゴニストを提供し、ここでアンタゴニストはTNFR1の非競合阻害剤であり、アンタゴニストは100nMの濃度でヒトTNFR1シグナル伝達を以下のように阻害する、

20

(i) 標準的MRC5細胞アッセイ法においてヒトTNFの存在下で50%超、ここでこのアッセイ法におけるTNF濃度は免疫サンドイッチ法を用いてIL-8分泌の阻害により100pg/mlと測定される、

ならびに

(ii) 標準的MRC5細胞アッセイ法においてヒトTNFの存在下で50%以下、ここでこのアッセイ法におけるTNF濃度は前記免疫サンドイッチ法により2ng/ml以上(例えば、5ng/ml)と測定される、

ここでアンタゴニストは、DOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-162およびDOM1h-574-180から選択される免疫グロブリン単一可変ドメインへのヒトTNFR1の結合を、1つまたは複数の以下の目的のために阻害する：

30

(a) 患者におけるTNFR1媒介性シグナル伝達を部分的に阻害することによって前記TNFR1媒介性疾患もしくは状態を治療および/もしくは予防するため。例えば、この目的は、患者におけるTNFR1媒介性シグナル伝達を部分的に阻害することによって患者における関節炎(例えば、関節リウマチ)を治療および/もしくは予防することである；

(b) 患者におけるTNFR1媒介性シグナル伝達を部分的に阻害するため；

(c) 患者における宿主免疫防御を阻害せず(もしくは実質的に阻害せず)患者におけるTNFを阻害するため。例えば；患者におけるマクロファージによる食作用および/もしくはマイコバクテリア殺傷を阻害せず(もしくは実質的に阻害せず)患者におけるTNFを阻害するため；

40

(d) 患者における宿主免疫防御を阻害せず(もしくは実質的に阻害せず)前記TNFR1媒介性疾患もしくは状態を治療および/もしくは予防するため。例えば患者におけるマクロファージによる食作用および/もしくはマイコバクテリア殺傷を阻害せず(もしくは実質的に阻害せず)前記TNFR1媒介性疾患もしくは状態を治療および/もしくは予防するため；

ならびに

(e) 患者におけるTNF媒介性抗感染性活性を阻害せず(もしくは実質的に阻害せず)前記TNFR1媒介性疾患もしくは状態を治療および/もしくは予防するため。例えば、この目的は、患者における結核のTNF媒介性抑制を阻害せず(もしくは実質的に

50

阻害せず)、前記TNFR1媒介性疾患もしくは状態を治療および/もしくは予防することである。例えば、この目的は、患者における潜伏結核を逆進させず(もしくは実質的に逆進させず)、前記TNFR1媒介性疾患もしくは状態を治療および/もしくは予防することである。例えば、この目的は、患者におけるTNF媒介性マイコバクテリウム(マイコバクテリウムボビスBCG等)感染を阻害せず(もしくは実質的に阻害せず)前記TNFR1媒介性疾患もしくは状態を治療および/もしくは予防することである。例えば、この目的は、患者における気道感染のTNF媒介性抑制を阻害せず(もしくは実質的に阻害せず)前記TNFR1媒介性疾患もしくは状態を治療および/もしくは予防することである。例えば、この目的は、患者における結核リスクを低下させつつ、前記TNFR1媒介性疾患もしくは状態を治療および/もしくは予防することである。例えば、この目的は、患者における気道感染等の感染リスクを低下させつつ、前記TNFR1媒介性疾患もしくは状態を治療および/もしくは予防することである。

10

【0011】

別の態様では、本発明は、上記目的(a)~(e)の1つもしくは複数のためのTNFR1媒介性疾患もしくは状態を呈している患者へ投与するための医薬品の製造における抗TNF受容体1型(TNFR1; p55)アンタゴニストの使用を提供し、ここでアンタゴニストはTNFR1の非競合阻害剤であり、アンタゴニストは100nMの濃度でヒトTNFR1シグナル伝達を以下のように阻害する、

(i)標準的MRC5細胞アッセイ法においてヒトTNFの存在下で50%超、ここでこのアッセイ法におけるTNF濃度は免疫サンドイッチ法を用いてIL-8分泌の阻害により100pg/mlと測定される、

20

ならびに

(ii)標準的MRC5細胞アッセイ法においてヒトTNFの存在下で50%以下、ここでこのアッセイ法におけるTNF濃度は前記免疫サンドイッチ法により2ng/ml以上(例えば、5ng/ml)と測定される、

ここでアンタゴニストは、DOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-162およびDOM1h-574-180から選択される免疫グロブリン単一可変ドメインへのヒトTNFR1の結合を阻害する。

【0012】

30

別の態様では、本発明は、上記目的(a)~(e)の1つもしくは複数のための方法を提供し、この方法は患者におけるTNFR1媒介性シグナル伝達を部分的に阻害する有効量の抗TNF受容体1型(TNFR1; p55)アンタゴニストを患者に投与することによりを含み、ここでアンタゴニストはTNFR1の非競合阻害剤であり、アンタゴニストは100nMの濃度でヒトTNFR1シグナル伝達を以下のように阻害する、

(i)標準的MRC5細胞アッセイ法においてヒトTNFの存在下で50%超、ここでこのアッセイ法におけるTNF濃度は免疫サンドイッチ法を用いてIL-8分泌の阻害により100pg/mlと測定される、

ならびに

(ii)標準的MRC5細胞アッセイ法においてヒトTNFの存在下で50%以下、ここでこのアッセイ法におけるTNF濃度は前記免疫サンドイッチ法により2ng/ml以上(例えば、5ng/ml)と測定される、

40

ここでアンタゴニストは、DOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-162およびDOM1h-574-180から選択される免疫グロブリン単一可変ドメインへのヒトTNFR1の結合を阻害する。

【0013】

本発明のアンタゴニスト、使用および方法の実施形態は以下のとおりである。MRC-5細胞はATCCから入手可能であり、ATCC寄託番号CCL-171下で寄託されている。一実施形態では、(i)および(ii)におけるMRC5細胞アッセイを37で

50

、各アッセイを任意選択として18時間実行する。一実施形態では、各アッセイにおいて、TNF を添加前にアンタゴニストをMRC5細胞で前インキュベートする（例えば、60分間）。この前インキュベーション時間は、上述した18時間のアッセイ時間として数えない。TNF は、任意の供給源由来であることができる。一実施形態では、TNF はPeprotech社由来である。ヒトTNF の配列は、以下のとおりである：

VRSSSRTPSD KPVAVHVANP QAEGLQLQWLN RRANALL
 ANG VELRDNLQLVV PSEGLYLIYS QVLFKGGQCP STH
 VLLTHTI SRIAVSYQTK VNLLSAIKSP CQRETPEGAE
 AKPWYEPIYL GGVFQLEKGD RLSAEINRPD YLDFAE
 SGQV YFGIIAL。

10

【0014】

一実施形態では、ヒトTNF は、アクチノマイシンD 0.05ng/mlの存在下で、マウスL929細胞の細胞溶解により測定した特異的な活性 2×10^7 単位/mgに相当するED₅₀を有する。

【0015】

一実施形態では、アンタゴニストは、前記選択された免疫グロブリン単一可変ドメインのヒトおよびマウスTNFR1への結合を阻害する。一実施形態では、アンタゴニストは、前記選択された免疫グロブリン単一可変ドメインのヒト、カニクイザルおよびマウスTNFR1への結合を阻害する。一実施形態では、アンタゴニストは、前記選択された免疫グロブリン単一可変ドメインのヒトおよびカニクイザルTNFR1への結合を阻害する。

20

【0016】

一実施形態では、使用されるヒトTNFR1は、以下の配列を有する。MIYPSGV
 IGLVPHLGDRDKRDSVCPQGKYIHPQNNNSICCTKCHKGT
 YLYNDPCPGPGQDTCRECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRK
 EMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNC
 SLCLNGTVHLSLQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKK
 SLECTKLCLLPQIENVKGTEDSG

一実施形態では、使用されるマウスTNFR1は、以下の配列を有する。MLMGIIH
 PSGVTGLVPSLGDREKRDSLCPQGKYVHSHKNNNSICCTKCH
 KGTLYLVSDCPSPGRDTVCRECEKGTFTASQNYLRQCLSC
 KTCRKEMSQVEISPCQADKDTVCGCKENQFQRYLSETHFQC
 VDCSPCFNGTVTIPCKETQNTVCNCHAGFFLRESECVPCS
 HCKKNEECMKLCLPPPLANVTNPQDS

30

一実施形態では、使用されるカニクイザルTNFR1は、以下の配列を有する。DSV
 CPQGKYIHPQNNNSVCCTKCHKGTLYLYNDPCPGPGQDTCRE
 CESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDTV
 CCGCRKNQYRYWSENLFQCFNCSSLCLNGTVHLSLQEKQN
 TVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKKTLECTKLCLPQTENVK
 GTEDSG

一実施形態では、前記選択された免疫グロブリン単一可変ドメインは、DOM1h-574-156である。

40

【0017】

一実施形態では、アンタゴニストは、DOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-162またはDOM1h-574-180のアミノ酸配列と少なくとも80%等しいアミノ酸配列を有する免疫グロブリン単一可変ドメインを含む。例えば、アミノ酸配列は、DOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-162またはDOM1h-574-180のアミノ酸配列と少なくとも85、90、95、96、97、98もしくは99%等しいか、または100%等しい。

50

【 0 0 1 8 】

本発明の別の態様では、TNFR1 媒介性疾患もしくは状態を呈している患者へ投与するための抗TNF 受容体1型 (TNFR1 ; p55) アンタゴニストを提供し、ここでアンタゴニストはTNFR1 の非競合阻害剤であり、アンタゴニストは100 nM の濃度でマウスTNFR1 シグナル伝達を以下のように阻害する、

(i) 標準的L929細胞アッセイ法においてマウスTNF の存在下で50%超、ここでこのアッセイ法におけるTNF 濃度は20 pg/mlである、ならびに

(i i) 標準的L929細胞アッセイ法においてマウスTNF の存在下で50%以下、ここでこのアッセイ法におけるTNF 濃度は100 pg/ml以上である、

ここでアンタゴニストは、DOM1h-574-156 ; DOM1m-21-23、DOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-162およびDOM1h-574-180から選択される免疫グロブリン単一可変ドメインへのマウスTNFR1 の結合を、1つまたは複数の以下の目的のために阻害する；

(a) 患者におけるTNFR1 媒介性シグナル伝達を部分的に阻害することによって前記TNFR1 媒介性疾患もしくは状態を治療および/もしくは予防するため。例えば、この目的は、患者におけるTNFR1 媒介性シグナル伝達を部分的に阻害することによって患者における関節炎 (例えば、関節リウマチ) を治療および/もしくは予防することである；

(b) 患者におけるTNFR1 媒介性シグナル伝達を部分的に阻害するため；

(c) 患者における宿主免疫防御を阻害せず (もしくは実質的に阻害せず) 患者におけるTNF を阻害するため；

(d) 患者における宿主免疫防御を阻害せず (もしくは実質的に阻害せず) 前記TNFR1 媒介性疾患もしくは状態を治療および/もしくは予防するため；

ならびに

(e) 患者におけるTNF 媒介性抗感染性活性を阻害せず (もしくは実質的に阻害せず) 前記TNFR1 媒介性疾患もしくは状態を治療および/もしくは予防するため。

【 0 0 1 9 】

別の態様では、本発明は、上記目的 (a) ~ (e) の1つもしくは複数のためのTNFR1 媒介性疾患もしくは状態を呈している患者へ投与するための医薬品の製造における抗TNF 受容体1型 (TNFR1 ; p55) アンタゴニストの使用を提供し、ここでアンタゴニストはTNFR1 の非競合阻害剤であり、アンタゴニストは100 nM の濃度でマウスTNFR1 を以下により阻害する、

(i) 標準的L929細胞アッセイ法においてマウスTNF の存在下で50%超、ここでこのアッセイ法におけるTNF 濃度は20 pg/mlである、ならびに

(i i) 標準的L929細胞アッセイ法においてマウスTNF の存在下で50%以下、ここでこのアッセイ法におけるTNF 濃度は100 pg/ml以上である、

ここでアンタゴニストは、DOM1h-574-156 ; DOM1m-21-23、DOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-162およびDOM1h-574-180から選択される免疫グロブリン単一可変ドメインへのマウスTNFR1 の結合を阻害する。

【 0 0 2 0 】

別の態様では、本発明は、上記目的 (a) ~ (e) の1つもしくは複数のための方法を提供し、この方法は有効量の抗TNF 受容体1型 (TNFR1 ; p55) アンタゴニストを患者に投与することにより患者におけるTNFR1 媒介性シグナル伝達を部分的に阻害することを含み、ここでアンタゴニストはTNFR1 の非競合阻害剤であり、アンタゴニストは100 nM の濃度でマウスTNFR1 を以下により阻害する、

(i) 標準的L929細胞アッセイ法においてマウスTNF の存在下で50%超、ここでこのアッセイ法におけるTNF 濃度は20 pg/mlである、ならびに

(i i) 標準的 L 9 2 9 細胞アッセイ法においてマウス T N F の存在下で 5 0 % 以下、ここでこのアッセイ法における T N F 濃度は 1 0 0 p g / m l 以上である、

ここでアンタゴニストは、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6 ; D O M 1 m - 2 1 - 2 3、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6、D O M 1 h - 5 7 4 - 7 2、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 0 9、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 3 8、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 6 2 および D O M 1 h - 5 7 4 - 1 8 0 から選択される免疫グロブリン単一可変ドメインへのマウス T N F R 1 の結合を阻害する。

【 0 0 2 1 】

一実施形態では、アンタゴニストは、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6、D O M 1 h - 5 7 4 - 7 2、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 0 9、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 3 8、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 6 2 または D O M 1 h - 5 7 4 - 1 8 0 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 等しいアミノ酸配列を有する免疫グロブリン単一可変ドメインを含む。例えば、アミノ酸配列は、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6、D O M 1 h - 5 7 4 - 7 2、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 0 9、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 3 8、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 6 2 または D O M 1 h - 5 7 4 - 1 8 0 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8 もしくは 9 9 % 等しいか、または 1 0 0 % 等しい。一実施形態では、アンタゴニストは、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6 または D O M 1 m - 2 1 - 2 3 のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 等しいアミノ酸配列を有する免疫グロブリン単一可変ドメインを含む。例えば、アミノ酸配列は、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6 または D O M 1 m - 2 1 - 2 3 のアミノ酸配列と少なくとも 8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8 もしくは 9 9 % 等しいか、または 1 0 0 % 等しい。

10

20

【 0 0 2 2 】

L 9 2 9 細胞は A T C C から入手可能であり、A T C C 寄託番号 A T C C C C L - 1 下で寄託されている。一実施形態では、(i) および (i i) における L 9 2 9 細胞アッセイを 3 7 で、各アッセイを任意選択として 1 8 時間実行する。一実施形態では、各アッセイにおいて、T N F を添加前にアンタゴニストを L 9 2 9 細胞で前インキュベートする (例えば、6 0 分間の前インキュベーション)。この前インキュベーション時間は、上述した 1 8 時間のアッセイ時間として数えない。T N F は、任意の供給源由来であることができる。一実施形態では、T N F は、R & D S y s t e m s 社由来である。マウス T N F の配列は、以下のとおりである

30

M L R S S S Q N S S D K P V A H V V A N H Q V E E Q L E W L S Q R A N A L
L A N G M D L K D N Q L V V P A D G L Y L V Y S Q V L F K G Q G C P D Y
V L L T H T V S R F A I S Y Q E K V N L L S A V K S P C P K D T P E G A E
L K P W Y E P I Y L G G V F Q L E K G D Q L S A E V N L P K Y L D F A E
S G Q V Y F G V I A L

一実施形態では、マウス T N F は、アクチノマイシン D 0 . 0 2 ~ 0 . 0 5 n g / m l の存在下で、マウス L 9 2 9 細胞の細胞溶解により測定した特異的な活性 > 1 × 1 0 ⁷ 単位 / m g に相当する E D ₅₀ を有する。

【 0 0 2 3 】

本発明の任意の態様のアンタゴニスト、使用および方法の実施形態は、以下のとおりである。

40

【 0 0 2 4 】

一実施形態では、アンタゴニストは、前記選択された免疫グロブリン単一可変ドメインのヒトおよびマウス T N F R 1 への結合を阻害する。一実施形態では、アンタゴニストは、前記選択された免疫グロブリン単一可変ドメインのヒト、カニクイザルおよびマウス T N F R 1 への結合を阻害する。

【 0 0 2 5 】

一実施形態では、使用されるヒト T N F R 1 は、以下の配列を有する M I Y P S G V I G L V P H L G D R E K R D S V C P Q G K Y I H P Q N N S I C C T K C H K G T Y L Y N D C P G P G Q D T D C R E C E S G S F T A S E N H L R H C L S C S K C R K E

50

M G Q V E I S S C T V D R D T V C G C R K N Q Y R H Y W S E N L F Q C F N C S L
C L N G T V H L S C Q E K Q N T V C T C H A G F F L R E N E C V S C S N C K K S
L E C T K L C L P Q I E N V K G T E D S G

一実施形態では、使用されるマウスTNFR1は、以下の配列を有するMLMGIHP
S G V T G L V P S L G D R E K R D S L C P Q G K Y V H S K N N S I C C T K C H K
G T Y L V S D C P S P G R D T V C R E C E K G T F T A S Q N Y L R Q C L S C K T
C R K E M S Q V E I S P C Q A D K D T V C G C K E N Q F Q R Y L S E T H F Q C V
D C S P C F N G T V T I P C K E T Q N T V C N C H A G F F L R E S E C V P C S H
C K K N E E C M K L C L P P P L A N V T N P Q D S

一実施形態では、使用されるカニクイザルTNFR1は、以下の配列を有するDSVC
P Q G K Y I H P Q N N S V C C T K C H K G T Y L Y N D C P G P G Q D T D C R E C
E S G S F T A S E N H L R H C L S C S K C R K E M G Q V E I S S C T V D R D T V
C G C R K N Q Y R Y Y W S E N L F Q C F N C S L C L N G T V H L S C Q E K Q N T
V C T C H A G F F L R E N E C V S C S N C K K T L E C T K L C L P Q T E N V K G
T E D S G

一実施形態では、前記選択された免疫グロブリン単一可変ドメインは、DOM1h-574-156である。

【0026】

一実施形態では、アンタゴニストは、前記選択された免疫グロブリン単一可変ドメインのTNFR1への結合を少なくとも50%、例えば、少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98または99%阻害する。例えば、アンタゴニストは、前記選択された免疫グロブリン単一可変ドメインのTNFR1への結合を全(100%)阻害する。前記選択された免疫グロブリン単一可変ドメインのTNFR1への結合の阻害を測定する競合ELISAおよび競合BIACORETM実験を本発明のアンタゴニストの存在下でどのように実施するかに関する詳細についてはWO2006038027を参照されたい。WO2006038027におけるガイダンスは主にドメイン等のアンタゴニスト(例えば、dAb等の単一可変ドメインアンタゴニスト)を考慮して提供されるが、そのガイダンスは本明細書に開示する本発明の任意のアンタゴニストと使用するために容易に適応できることを、当業者である対象者は理解するであろう。

【0027】

MRC5アッセイは、TNF 媒介性IL-8放出を機能的に阻害する標準的アッセイであり、例えば、以下の実験項目で指定した様式で実行する。標準的L929アッセイはTNF 誘発性細胞毒の阻害により測定した、TNFR1阻害を提供する。標準的カニクイザルKIアッセイ法においてTNF 誘発性IL-8分泌の阻害により測定した、TNFR1阻害を提供する。TNFR1アンタゴニストのための標準的アッセイの詳細については、当技術分野、例えばWO2006038027、WO2008149144およびWO2008149148において知られている。詳細については以下の実験項目でも提示する。

【0028】

既知の免疫サンドイッチ法を使用でき、これらは当業者である対象者にとって明らかであろう。例えば、免疫サンドイッチ法は、熱量検出を用いるELISA、蛍光検出を用いるApplied Biosystems 8200細胞検出系(FMAT)、および電気化学発光検出を用いるMeso Scale Discovery(MSD)から選択される

本明細書のアッセイに使用されるTNF 濃度は従来技術により測定できる。例えば、測定は、L929細胞毒アッセイにおいて機能的活性を試験することにより実施できる。

【0029】

本発明のいずれかの態様の1例では、患者は、哺乳動物、例えば、ヒト、マウスまたはカニクイザルである。

【0030】

本発明の一実施形態または任意の態様では、アンタゴニストは、抗体またはその抗原結合断片、例えばTNFR1に対する結合特異性を有する一価抗原結合断片（例えば、scFv、Fab、Fab'、dAb）である。他のアンタゴニストの例は、TNFR1に結合する、WO2006059110、WO2006038027およびWO2008149148に記載のアンタゴニストまたはリガンドである。例えば、アンタゴニストは、PLADペプチドからなるかまたはそれを含むことができる。リガンドは、TNFR1に対する結合特異性を有する免疫グロブリン単一可変ドメインもしくはドメイン抗体（dAb）、またはこのようなdAbの相補性決定領域を適切な形態で含み得る。いくつかの実施形態では、リガンドは、TNFR1に対する結合特異性を有する免疫グロブリン単一可変ドメインまたはdAbから本質的になる、またはそれらからなるdAbモノマーである。他の実施形態では、リガンドは、dAb（またはdAbのCDR）を適切な形態（抗体形態等）で含むポリペプチドである。

10

【0031】

いずれかの態様のアンタゴニスト、使用または方法の一実施形態では、前記状態は、炎症状態、任意選択として慢性炎症状態である。例えば、状態は、関節炎（任意選択として関節リウマチまたは若年性関節リウマチ）、強直性脊椎炎、骨関節炎、炎症腸疾患（任意選択としてクローン病または潰瘍性大腸炎）および乾癬からなる群から選択される。本発明の文脈において処置可能な他の疾患および状態の例は、SLE、エリテマトーデス、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病、COPD、MSおよび他の説明の適応症であり、前記慢性閉塞性肺疾患は、慢性気管支炎、慢性閉塞性気管支炎および肺気腫からなる群から選択され、前記肺炎は細菌性肺炎であり、前記細菌性肺炎はブドウ球菌性肺炎である。

20

【0032】

一実施形態では、疾患は呼吸疾患である。例えば、呼吸疾患は、肺炎症、慢性閉塞性肺疾患、急性肺障害（ALI）、喘息、肺炎、過敏性肺炎、好酸球増加を伴う肺湿潤物、環境性肺疾患、肺炎、気管支拡張症、嚢胞性線維症、間質性肺炎、原発性高血圧症、肺血栓塞栓症、胸膜障害、縦隔障害、隔膜障害、換気低下、過呼吸、睡眠時無呼吸、急性呼吸促進症候群、中皮腫、肉腫、移植片拒絶、移植片対宿主病、肺癌、アレルギー性鼻炎、アレルギー、石綿症、アスペルギルス腫、こうじかび病、気管支拡張症、慢性気管支炎、肺気腫、好球性肺炎、特発性肺線維症、浸潤性肺炎球菌疾患、インフルエンザ、非結核性抗酸菌、胸水、塵肺症、ニューモシスチス症、肺炎、肺放線菌症、肺胞タンパク症、肺炭疽、肺水腫、肺塞栓症、肺炎症、肺ヒスチオサイトーシスX、肺高血圧、肺ノカルジア症、肺結核症、肺静脈の閉塞性疾患、リウマチ性肺疾患、サルコイドーシス、およびウェゲナー肉芽腫症からなる群から選択される。本発明は、本発明の任意の態様のTNFR1アンタゴニストを含む肺送達機器を提供する。機器の1例は、吸入または鼻腔内投与機器である。本発明は、本発明の任意の態様のTNFR1アンタゴニストを含む経口製剤も提供する。製剤の1例は、錠剤、丸剤、カプセル、液体またはシロップである。

30

【0033】

別の態様では、本発明は、本発明によるアンタゴニストをコードするヌクレオチド配列を含む単離または組換え核酸を提供する。ヌクレオチド配列は、一実施形態では、WO2006038027、WO2008149148またはWO2006059110に開示の抗TNFR1アンタゴニスト（例えば、免疫グロブリン単一可変ドメイン）または任意のこのようなヌクレオチド配列をコードする本明細書の任意のヌクレオチド配列である。

40

【0034】

別の態様では、本発明は、本発明の核酸を含むベクターを提供する。

【0035】

別の態様では、本発明は、本発明の核酸、またはベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0036】

別の態様では、本発明は、本発明の抗TNFR1アンタゴニストならびに薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤もしくは希釈剤を含む医薬組成物を提供する。

50

【0037】

いずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、抗TNF 受容体1型(TNFR1; p55)免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなり、この単一可変ドメインは、以下の変異(Kabatによるナンバリング)を1つもしくは複数含む、DOM1h-574-14の変異体である

30位は、LもしくはFである、

52位は、AもしくはTである、

52a位は、DもしくはEである、

54位は、AもしくはRである、

57位は、R、KもしくはAである、

60位は、D、S、TもしくはKである、

61位は、E、HもしくはGである、

62位は、AもしくはTである、

100位は、R、G、N、K、Q、V、A、D、SもしくはVである、ならびに

101位は、A、Q、N、E、V、HもしくはKである。

10

【0038】

一実施形態では、可変ドメインは本発明の他のいずれかの態様または実施形態の1つまたは複数の特徴を有し、本文の開示は、例えば本明細書の特許請求の範囲に組み込むためにこのような特徴の組み合わせが可能であると解釈される。

20

【0039】

任意選択として、単一可変ドメインは、以下の変異(Kabatによるナンバリング)を1つもしくは複数含む、DOM1h-574-14の変異体である

30位は、LもしくはFである、

52位は、AもしくはTである、

52a位は、Dである、

54位は、Aである、

57位は、Rである、

60位は、D、SもしくはTである、

61位は、Hである、

62位は、Aである、

100位は、V、A、R、G、NもしくはKである、ならびに

101位は、E、V、K、A、QもしくはNである。

30

【0040】

いずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、101位(Kabatによるナンバリング)にバリンを含む抗TNF 受容体1型(TNFR1; p55)免疫グロブリン重鎖単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなる。一実施形態では、可変ドメインは本発明の他のいずれかの態様または実施形態の1つまたは複数の特徴を有し、本文の開示は、例えば本明細書の特許請求の範囲に組み込むためにこのような特徴の組み合わせが可能であると解釈される。

40

【0041】

いずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、30G、44D、45P、55D、56R、94Iおよび98R(ナンバリングはKabatによる)のうち1つまたは複数を含む抗TNF 受容体1型(TNFR1; p55)免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなり、この単一可変ドメインのアミノ酸配列はあるいはDOM1h-574のアミノ酸配列と等しい。一実施形態では、可変ドメインは、ヒト、マウスまたはカニクイザルTNFR1と結合するために提供される。一実施形態では、可変ドメインは本発明の他のいずれかの態様または実施形態の1つまたは複数の特徴を有し、本文の開示は、例えば本明細書の特許請求の範囲に組み込むためにこのような特徴の組み合わせが可能であると解釈される。

50

【0042】

いずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、DOM 1 h - 5 7 4 - 7 2、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 5 6、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 0 9、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 3 2、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 3 5、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 3 8、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 6 2 または DOM 1 h - 5 7 4 - 1 8 0 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 等しいアミノ酸配列を含む抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR 1 ; p 5 5) 免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなる。この実施形態は、細胞アッセイ法において TNFR 1 (例えば、少なくともヒト TNFR 1) の強力な中和剤である可変ドメインを提供する。

【0043】

一実施形態では、可変ドメインは本発明の他のいずれかの態様または実施形態の 1 つまたは複数の特徴を有し、本文の開示は、例えば本明細書の特許請求の範囲に組み込むためにこのような特徴の組み合わせが可能であると解釈される。

10

【0044】

いずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 0 9、DOM 1 h - 5 7 4 - 9 3、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 2 3、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 2 5、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 2 6、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 2 9、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 3 3、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 3 7、または DOM 1 h - 5 7 4 - 1 6 0 のアミノ酸配列と少なくとも 9 4 % 等しいアミノ酸配列を含む抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR 1 ; p 5 5) 免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなる。この実施形態は、タンパク質分解性の安定した可変ドメインを提供する。一実施形態では、可変ドメインは本発明の他のいずれかの態様または実施形態の 1 つまたは複数の特徴を有し、本文の開示は、例えば本明細書の特許請求の範囲に組み込むためにこのような特徴の組み合わせが可能であると解釈される。

20

【0045】

いずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、DOM 1 h - 5 7 4 - 7 2、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 0 9、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 2 5、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 2 6、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 3 3、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 3 5、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 3 8、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 3 9、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 5 5、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 5 6、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 6 2、または DOM 1 h - 5 7 4 - 1 8 0 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 等しいアミノ酸配列を含む抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR 1 ; p 5 5) 免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなる。この実施形態は、ヒト TNFR 1 と高い親和性で結合し、任意にマウス TNFR 1 に対しても所望の親和性を示す可変ドメインを提供する。一実施形態では、可変ドメインは本発明の他のいずれかの態様または実施形態の 1 つまたは複数の特徴を有し、本文の開示は、例えば本明細書の特許請求の範囲に組み込むためにこのような特徴の組み合わせが可能であると解釈される。

30

【0046】

いずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、ヒト、マウスまたはカニクイザル TNFR 1 と結合する抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR 1 ; p 5 5) 免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなり、この単一可変ドメインは、下表 1 2 に示す DOM 1 h - 5 7 4 を除く DOM 1 h 配列の任意の 1 つのヌクレオチド配列と少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8 または 9 9 % 等しいヌクレオチド配列によりコードされる。一実施形態では、可変ドメインは本発明の他のいずれかの態様または実施形態の 1 つまたは複数の特徴を有し、本文の開示は、例えば本明細書の特許請求の範囲に組み込むためにこのような特徴の組み合わせが可能であると解釈される。

40

【0047】

いずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、ヒト、マウスまたはカニクイザル TNFR 1 と結合する抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR 1 ; p 5 5) 免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなり、この単一可変ドメインは、DOM 1 h - 5 7 4 - 7 2、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 0 9、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 3 8、DOM 1 h

50

- 574 - 156、DOM1h - 574 - 162またはDOM1h - 574 - 180のヌクレオチド配列と少なくとも80、85、90、95、96、97、98または99%等しいヌクレオチド配列によりコードされる。一実施形態では、可変ドメインは本発明の他のいずれかの態様または実施形態の1つまたは複数の特徴を有し、本文の開示は、例えば本明細書の特許請求の範囲に組み込むためにこのような特徴の組み合わせが可能であると解釈される。

【0048】

いずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、DOM1h - 574 - 72、DOM1h - 574 - 109、DOM1h - 574 - 138、DOM1h - 574 - 156、DOM1h - 574 - 162およびDOM1h - 574 - 180のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列と等しいか、選択されたアミノ酸配列とアミノ酸位置が25以下異なり、選択されたアミノ酸配列のCDR1配列と少なくとも50%等しいCDR1配列を有するアミノ酸配列を含む抗TNF受容体1型(TNFR1; p55)免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなる。一実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは、選択されたアミノ酸配列のCDR2配列と少なくとも50%等しいCDR2配列を含む。一実施形態では、免疫グロブリン単一可変は、選択されたアミノ酸配列のCDR3配列と少なくとも50%等しいCDR3配列を含む。一実施形態では、可変ドメインは本発明の他のいずれかの態様または実施形態の1つまたは複数の特徴を有し、本文の開示は、例えば本明細書の特許請求の範囲に組み込むためにこのような特徴の組み合わせが可能であると解釈される。

10

20

【0049】

いずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、DOM1h - 574 - 72、DOM1h - 574 - 109、DOM1h - 574 - 138、DOM1h - 574 - 156、DOM1h - 574 - 162およびDOM1h - 574 - 180のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列と等しいか、選択されたアミノ酸配列とアミノ酸位置が25以下異なり、選択されたアミノ酸配列のCDR2配列と少なくとも50%等しいCDR2配列を有するアミノ酸配列を含む抗TNF受容体1型(TNFR1; p55)免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなる。一実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは、選択されたアミノ酸配列のCDR3配列と少なくとも50%等しいCDR3配列を含む。一実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは、DOM1h - 574 - 72のCDR1配列と少なくとも50%等しいCDR1配列を含む。一実施形態では、可変ドメインは本発明の他のいずれかの態様または実施形態の1つまたは複数の特徴を有し、本文の開示は、例えば本明細書の特許請求の範囲に組み込むためにこのような特徴の組み合わせが可能であると解釈される。

30

【0050】

いずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、DOM1h - 574 - 72、DOM1h - 574 - 109、DOM1h - 574 - 138、DOM1h - 574 - 156、DOM1h - 574 - 162およびDOM1h - 574 - 180のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列と等しいか、選択されたアミノ酸配列とアミノ酸位置が25以下異なり、選択されたアミノ酸配列のCDR3配列と少なくとも50%等しいCDR3配列を有するアミノ酸配列を含む抗TNF受容体1型(TNFR1; p55)免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなる。一実施形態では、可変ドメインは本発明の他のいずれかの態様または実施形態の1つまたは複数の特徴を有し、本文の開示は、例えば本明細書の特許請求の範囲に組み込むためにこのような特徴の組み合わせが可能であると解釈される。

40

【0051】

いずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、プロテアーゼ耐性抗TNF受容体1型(TNFR1; p55)免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなり、この単一可変ドメインは以下でインキュベート時にプロテアーゼ耐性である

(i) 少なくとも10マイクログラム/mlプロテアーゼの濃度(c)、37で、少

50

なくとも1時間の時間 (t) ; または

(i i) 少なくとも40マイクログラム / m l プロテアーゼの濃度 (c ')、30 で、少なくとも1時間の時間 (t)

ここで可変ドメインは、DOM 1 h - 574 - 126またはDOM 1 h - 574 - 133のアミノ酸配列と少なくとも94%等しいアミノ酸配列を含み、任意選択として、101位 (K a b a t ナンバリング) にバリンを含む。一実施形態では、可変ドメインは本発明の他のいずれかの態様または実施形態の1つまたは複数の特徴を有し、本文の開示は、例えば本明細書の特許請求の範囲に組み込むためにこのような特徴の組み合わせが可能であると解釈される。

【0052】

一実施形態では、アンタゴニストは、抗体定常ドメイン、任意に抗体Fc領域、任意にFcのN末端が可変ドメインのC末端に結合 (任意に直接結合) している本明細書に記載の抗TNFR1免疫グロブリン単一可変ドメインを含むポリペプチドを含むかまたはそれらからなる。

【0053】

一実施形態では、アンタゴニストは、本明細書に記載の抗TNFR1免疫グロブリン単一可変ドメインおよび任意に血清アルブミン (SA) に特異的に結合する少なくとも1つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含む多重特異性リガンドを含むかまたはそれらからなる。一実施形態では、多重特異性リガンドは、本明細書に開示の「DMS」と標識した任意の構築物、例えば、DMS 0111、0112、0113、0114、0115、0116、0117、0118、0121、0122、0123、0124、0132、0133、0134、0135、0136、0162、0163、0168、0169、0176、0177、0182、0184、0186、0188、0189、0190、0191、0192、5519、5520、5521、5522、5525および5527の任意の1つのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列であるかまたはそれらを含む。一実施形態では、多重特異性リガンドは、本明細書に開示の任意のDMSのヌクレオチド配列によりコードされたアミノ酸配列、例えば、DMS 0111、0112、0113、0114、0115、0116、0117、0118、0121、0122、0123、0124、0132、0133、0134、0135、0136、0162、0163、0168、0169、0176、0177、0182、0184、0186、0188、0189、0190、0191、0192、5519、5520、5521、5522、5525および5527の任意の1つのヌクレオチド配列であるかまたはそれらを含む。一実施形態では、本発明は、抗TNFR1免疫グロブリン単一可変ドメインおよび抗SA単一可変ドメインを含む多重特異性リガンドを含む本発明のアンタゴニストをコードする核酸を提供し、この核酸は、本明細書に開示の任意のDMSのヌクレオチド配列、例えば、DMS 0111、0112、0113、0114、0115、0116、0117、0118、0121、0122、0123、0124、0132、0133、0134、0135、0136、0162、0163、0168、0169、0176、0177、0182、0184、0186、0188、0189、0190、0191、0192、5519、5520、5521、5522、5525および5527の任意の1つのヌクレオチド配列を含む。このような核酸を含むベクター、ならびにこのようなベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0054】

一実施形態では、本発明は、以下を含む多重特異性リガンドを含むかまたはそれらからなる本発明のアンタゴニストを提供する、

(i) DOM 1 h - 574 - 156のアミノ酸配列と少なくとも93%等しいアミノ酸配列を含む抗TNF 受容体1型 (TNFR1 ; p 55) 免疫グロブリン単一可変ドメイン、(i i) 抗血清アルブミン (SA) に特異的に結合する少なくとも1つのSA免疫グロブリン単一可変ドメインであり、この抗SA単一可変ドメインは、DOM 7 h - 11 - 3配列と少なくとも80%等しいアミノ酸配列を含む、(i i i) 任意にリンカーが抗T

10

20

30

40

50

N F R 1 単一可変ドメインと抗 S A 単一可変ドメイン間に提供される。

【 0 0 5 5 】

一実施形態では、本発明は、以下を含む多重特異性リガンドを含むかまたはそれらからなる本発明のアンタゴニストを提供する、

(i) D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6 のアミノ酸配列と少なくとも 9 3 % 等しいアミノ酸配列を含む抗 T N F 受容体 1 型 (T N F R 1 ; p 5 5) 免疫グロブリン単一可変ドメイン、 (i i) 抗血清アルブミン (S A) に特異的に結合する少なくとも 1 つの S A 免疫グロブリン単一可変ドメインであり、この抗 S A 単一可変ドメインは、D O M 7 h - 1 4 - 1 0 配列と少なくとも 8 0 % 等しいアミノ酸配列を含む、 (i i i) 任意にリンカーが抗 T N F R 1 単一可変ドメインと抗 S A 単一可変ドメイン間に提供される場合、このリンカーはアミノ酸配列 A S T 、任意に A S T S G P S を含む。

10

【 0 0 5 6 】

一実施形態では、本発明は、本発明の、経口送達、患者の消化管送達、患者の肺 (p u l m o n a r y) 送達、肺 (l u n g) 送達または全身送達のための T N F 受容体 1 型 (T N F R 1 ; p 5 5) アンタゴニストを提供する。

【 0 0 5 7 】

一実施形態では、本発明は、ヒト、マウスまたはカニクイザル T N F R 1 に結合する本発明の T N F 受容体 1 型 (T N F R 1 ; p 5 5) アンタゴニストを提供し、このアンタゴニストは D O M 1 h - 5 7 4 - 7 2 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 0 9 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 3 8 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 6 2 および D O M 1 h - 5 7 4 - 1 8 0 の C D R 1 配列と少なくとも 5 0 % 等しい C D R 1 配列を有する。

20

【 0 0 5 8 】

一実施形態では、本発明は、ヒト、マウスまたはカニクイザル T N F R 1 に結合する本発明の T N F 受容体 1 型 (T N F R 1 ; p 5 5) アンタゴニストを提供し、このアンタゴニストは D O M 1 h - 5 7 4 - 7 2 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 0 9 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 3 8 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 6 2 および D O M 1 h - 5 7 4 - 1 8 0 の C D R 2 配列と少なくとも 5 0 % 等しい C D R 2 配列を有する。

【 0 0 5 9 】

一実施形態では、本発明は、ヒト、マウスまたはカニクイザル T N F R 1 に結合する本発明の T N F 受容体 1 型 (T N F R 1 ; p 5 5) アンタゴニストを提供し、このアンタゴニストは D O M 1 h - 5 7 4 - 7 2 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 0 9 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 3 8 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 6 2 および D O M 1 h - 5 7 4 - 1 8 0 の C D R 3 配列と少なくとも 5 0 % 等しい C D R 3 配列を有する。

30

【 0 0 6 0 】

一実施形態では、本発明は、ヒト、マウスまたはカニクイザル T N F R 1 に結合する本発明の T N F 受容体 1 型 (T N F R 1 ; p 5 5) アンタゴニストを提供し、このアンタゴニストは D O M 1 h - 5 7 4 - 7 2 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 0 9 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 3 8 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6 、 D O M 1 h - 5 7 4 - 1 6 2 および D O M 1 h - 5 7 4 - 1 8 0 から選択される単一可変ドメインの C D R 1 、 C D R 2 、および / または C D R 3 配列を含む免疫グロブリン単一可変ドメインを含む。

40

【 0 0 6 1 】

一実施形態では、本発明は、炎症状態の治療および / または予防のための本発明の T N F R 1 アンタゴニストを提供する。

【 0 0 6 2 】

一実施形態では、本発明は、炎症状態の治療および / または予防のための医薬品の製造における本発明の T N F R 1 アンタゴニストの使用を提供する。

【 0 0 6 3 】

1 つの態様では、本発明のいずれかの態様または実施形態の抗 T N F R 1 アンタゴニスト、単一可変ドメイン、ポリペプチドまたは多重特異性リガンドは、N S I C C T K C H K G T Y L Y 、 N S I C C T K C H K G T Y L 、 C R K N Q Y R H Y W S E N L F および

50

N Q Y R H Y W S E N L F Q C F からの群から選択される T N F R 1 のエピトープ配列の 1 つまたは複数を標的とするために提供される。

【 0 0 6 4 】

1 つの態様では、本発明のいずれかの態様または実施形態の抗 T N F R 1 アンタゴニスト、単一可変ドメイン、ポリペプチドまたは多重特異性リガンドは、上述の任意の状態または疾患を治療および / または予防するための N S I C C T K C H K G T Y L Y、N S I C C T K C H K G T Y L、C R K N Q Y R H Y W S E N L F および N Q Y R H Y W S E N L F Q C F からの群から選択される T N F R 1 のエピトープ配列の 1 つまたは複数を標的とするために提供される。

【 0 0 6 5 】

1 つの態様では、本発明は、患者における上述の任意の状態または疾患を治療および / または予防する方法を提供し、この方法は、患者における N S I C C T K C H K G T Y L Y、N S I C C T K C H K G T Y L、C R K N Q Y R H Y W S E N L F および N Q Y R H Y W S E N L F Q C F からの群から選択される T N F R 1 のエピトープ配列の 1 つまたは複数を標的とする本発明のいずれかの態様または実施形態の抗 T N F R 1 アンタゴニスト、単一可変ドメイン、ポリペプチドまたは多重特異性リガンドを患者に投与することを含む。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 6 】

【 図 1 】 ナイーブ選択由来の d A b のヒト T N F R 1 に対する B I A c o r e 結合。ビオチン化ヒト T N F R 1 を S A B I A c o r e チップ上に被覆した。ナイーブ選択由来の 4 つの精製した d A b (D O M 1 h - 5 0 9、D O M 1 h - 5 1 0、D O M 1 h - 5 4 9 および D O M 1 h - 5 7 4) をヒト T N F R 1 上に注入して結合を測定した。各 d A b に対応する曲線を矢印で示す。

【 図 2 】 ナイーブ選択由来の d A b のヒト T N F R 1 に対する M R C 5 細胞アッセイ。ナイーブ選択由来の 4 つの精製した d A b (D O M 1 h - 5 0 9、D O M 1 h - 5 1 0、D O M 1 h - 5 4 9 および D O M 1 h - 5 7 4) および対照 d A b (D O M 1 h - 1 3 1 - 5 1 1) の T N F 媒介性 I L - 8 放出の機能的阻害について、M R C 5 細胞アッセイ法で解析した。記載のようにアッセイを実施し、各 d A b に対応する曲線を矢印で示す。グラフは、観察された中和パーセンテージに対して d A b 濃度をプロットしている。

【 図 3 】 ナイーブ選択由来の d A b のヒト T N F R 1 に対する受容体結合アッセイ。ナイーブ選択由来の 4 つの精製した d A b (D O M 1 h - 5 0 9、D O M 1 h - 5 1 0、D O M 1 h - 5 4 9 および D O M 1 h - 5 7 4) および対照 d A b (D O M 1 h - 1 3 1 - 5 1 1) を受容体結合アッセイにおいてアッセイし、T N F との競合を測定した。陽性対照 d A b は、T N F と競合して完全な阻害曲線を示すことが知られている。選択された抗 T N F R 1 d A b は、T N F の受容体への結合を阻害しない。記載のようにアッセイを実施し、各 d A b に対応する曲線を矢印で示す。 %。

【 図 4 】 ヒト T N F R 1 に対する成熟変異導入試験からの d A b の M R C 5 細胞アッセイ。ナイーブ選択由来の 3 つの精製した d A b (D O M 1 h - 5 7 4 - 7、D O M 1 h - 5 7 4 - 8 および D O M 1 h - 5 7 4 - 1 0) および対照 d A b (D O M 1 h - 1 3 1 - 5 1 1) を M R C 5 細胞アッセイ法において T N F 媒介性 I L - 8 放出の機能的阻害について解析した。記載のようにアッセイを実施し、各 d A b に対応する曲線を矢印で示す。グラフは、観察された中和パーセンテージに対して d A b 濃度をプロットしている。図 2 に示す親 D O M 1 h - 5 7 4 に比べ、これらの d A b は、M R C 5 細胞アッセイ法において増大した効能を示す。

【 図 5 A 】 D O M 1 h - 5 7 4 変異導入ライブラリから特定された d A b およびそれらの続く組換えのアミノ酸配列比較。改善された D O M 1 h - 5 7 4 d A b の成熟変異導入選択試験により、D O M 1 h - 5 7 4 - 7、D O M 1 h - 5 7 4 - 8、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 0、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 1、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 2 および D O M 1 h - 5 7 4 - 1 3 における親和性改善に關与する位置を特定した。これらの変異の組換え (V 3

10

20

30

40

50

0 G、G 4 4 D、L 4 5 P、G 5 5 D、H 5 6 RおよびK 9 4 I)によりDOM 1 h - 5 7 4 - 1 4 ~ DOM 1 h - 5 7 4 - 1 9が得られた。DOM 1 h - 5 7 4に対して特定の位置にアミノ酸に差がない場合は、「 . 」で示す。CDRは下線および太字で示す。(第一の下線の配列はCDR 1、第二の下線の配列はCDR 2および第三の下線の配列はCDR 3)。

【図 5 B】(図 5 Aの続き)

【図 5 C】(図 5 Bの続き)

【図 6】ヒト、カニクイザル、イヌおよびマウス由来のTNFR 1の細胞外ドメインのアミノ酸配列比較。配列比較によりヒトTNFR 1およびマウスTNFR 1間の配列保存が限られていることが強調される。ヒトECD TNFR 1に対して特定の位置にアミノ酸に差がない場合は、「 . 」で示す。

10

【図 7】BIAcoreにより測定した、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 6およびDOM 1 h - 1 3 1 - 2 0 6のイヌTNFR 1への結合のモニタリング。BIAcore SAチップをビオチン化イヌTNFR 1で被覆した。続いて、精製したdAb DOM 1 h - 5 7 4 - 1 6およびDOM 1 h - 1 3 1 - 2 0 6、各100 nMをイヌTNFR 1上に注入した。痕跡から、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 6では有意な結合が示され、対してDOM 1 h - 1 3 1 - 2 0 6では限られた結合のみが観察されたことが明らかである。

【図 8】BIAcoreにより測定した、精製したDOM 1 h - 5 7 4 - 1 6のマウスTNFR 1への結合のモニタリング。BIAcore SAチップをビオチン化マウスTNFR 1で被覆した。続いて、精製したdAb DOM 1 h - 5 7 4 - 1 6、1 μMをマウスTNFR 1上に注入した。痕跡から、DOM 1 h - 5 7 4 - 1 6のマウスTNFR 1への結合がはっきりと示される。

20

【図 9】マウスL 9 2 9細胞アッセイ法におけるDOM 1 h - 5 7 4 - 1 6の機能活性。アクチノマイシンの存在下で、TNF の細胞毒作用からマウスL 9 2 9細胞を保護する能力を試験することにより、精製したDOM 1 h - 5 7 4 - 1 6(黒線、三角)とマウスTNFR 1との機能的交差反応性をアッセイした。陽性対照として、マウスTNFR 1結合dAb、DOM 1 m - 2 1 - 2 3(灰色線、四角)を含み、これらは活性であることが示された。グラフは、TNF 活性の中和パーセンテージに対してdAb濃度をプロットしている。実施例に記載のようにアッセイを実施した。

【図 10】カニクイザルCYNOM - K 1細胞アッセイ法におけるDOM 1 h - 5 7 4 - 1 6の機能活性。精製したDOM 1 h - 5 7 4 - 1 6(灰色点線、三角)のカニクイザルTNFR 1との機能的交差反応性を、TNF への反応においてCYNOM - K 1細胞からのIL - 8放出を阻害する能力を試験することによりアッセイした。実施例に記載のようにアッセイを実施した。陽性対照として、DOM 1 h - 1 3 1 - 5 1 1(黒線、四角)を含んだ。両dAbは完全な中和を示した。グラフは、TNF 活性の中和パーセンテージに対してdAb濃度をプロットしている。

30

【図 11 A】親和性成熟中に特定したDOM 1 h - 5 7 4系統由来の最も強力なdAbのアミノ酸配列比較。MRC 5細胞アッセイ法において最高効能のdAbのアミノ酸配列を親DOM 1 h - 5 7 4、親和性成熟開始のために用いた鑄型(DOM 1 h - 5 7 4 - 1 4)および増大した効力が特定された初期dAb(DOM 1 h - 5 7 4 - 7 2)と共に列挙する。DOM 1 h - 5 7 4に対して特定の位置にアミノ酸に差がない場合は、「 . 」で示す。CDRは下線および太字で示す。(第一の下線の配列はCDR 1、第二の下線の配列はCDR 2および第三の下線の配列はCDR 3)。

40

【図 11 B】(図 11 Aの続き)

【図 11 C】(図 11 Bの続き)

【図 12 A】親和性成熟中に特定したDOM 1 h - 5 7 4系統由来の最もプロテアーゼに安定なdAbのアミノ酸配列比較。これらのdAbのアミノ酸配列を最もトリプシン消化耐性であることが示された親和性成熟後に特定した。配列比較目的のため、親dAb DOM 1 h - 5 7 4も含んだ。DOM 1 h - 5 7 4に対して特定の位置にアミノ酸に差がない場合は、「 . 」で示す。CDRは下線および太字で示す。(第一の下線の配列はCDR

50

1、第二の下線の配列はCDR2および第三の下線の配列はCDR3)。

【図12B】(図12Aの続き)

【図12C】(図12Bの続き)

【図13A】詳細な特性決定のために選択したdAbのアミノ酸配列比較。配列比較には、詳細な特性決定のために選択した12のdAbならびにDOM1h-574(親dAb)および系統の特性決定のため早くから用いたDOM1h-574-16を含んだ。DOM1h-574に対して特定の位置にアミノ酸に差がない場合は、「・」で示す。CDRは下線および太字で示す。(第一の下線の配列はCDR1、第二の下線の配列はCDR2および第三の下線の配列はCDR3)。

【図13B】(図13Aの続き)

【図13C】(図13Bの続き)

【図14】BIAcoreによるDOM1h-574-16およびDOM1h-131-511のエピトープマッピング。BIAcore SAチップをビオチン化ヒトTNFR1で被覆した。この表面全体にDOM1h-131-511およびDOM1h-574-16を注入した(各200nM、続いて再生注入(提示せず))。各dAbに対して結合したRU数を測定した。続いて、同一濃度のDOM1h-131-511を注入し、直後にDOM1h-574-16を注入した。はっきりと見られるように、DOM1h-574-16の第二の注入の結合単位数は第一の注入と同じであり、dAbは非競合エピトープと結合することを示す。

【図15】BIAcoreによるDOM1h-574-16およびMAB225(R&D Systems社)のエピトープマッピング。BIAcore SAチップをビオチン化ヒトTNFR1で被覆した。表面全体にDOM1h-574-16を注入して結合を定量化した。再生後(提示せず)、MAB225を注入し、続いてDOM1h-574-16を再注入した。DOM1h-574-16に対する結合レベルは、MAB225の不在下で見られたものに近似し、結合エピトープはMAB225と競合しないことを示す。

【図16】BIAcoreによるDOM1h-574-16およびmAbクローン4.12のエピトープマッピング。BIAcore SAチップをビオチン化ヒトTNFR1で被覆した。表面全体にクローン4.12(Invitrogen社、Zymed)を注入して結合を定量化した。再生後(提示せず)、DOM1h-574-16を注入し、続いてクローン4.12を再注入した。第二のクローン4.12注入にて観察された結合レベルは、DOM1h-574-16の不在下で観察されたレベルより約20%少ない。この結果は、ヒトTNFR1上の結合エピトープに対する競合は限られていることを示す。DOM1h-574-16およびクローン4.12はわずかに重複したエピトープを有し得る。注入直前直後のRUシグナルの跳躍は緩衝液の跳躍であり、これは差し引いていない。

【図17】BIAcoreによるDOM1h-574-16およびDOM1h-510のエピトープマッピング。BIAcore SAチップをビオチン化ヒトTNFR1で被覆した。表面全体にDOM1h-510を注入して結合を定量化した。続いて、DOM1h-574-16を注入してからDOM1h-510を再注入した。明らかに、第二のDOM1h-510注入は、はるかに弱い結合を示し、DOM1h-510が競合エピトープに結合していることを示す。

【図18】BIAcoreによるDOM1h-574-16およびDOM1m-21-23のエピトープマッピング。BIAcore SAチップをビオチン化マウスTNFR1で被覆した。表面全体にDOM1h-574-16を注入して結合を定量化した。続いて、DOM1m-21-23を注入してからDOM1h-574-16を再注入した。第二の注入後のDOM1h-574-16の結合RU数はDOM1m-12-23の不在下で観察されたものに近似する。これは、マウスTNFR1上の結合エピトープはDOM1m-21-23とDOM1h-574-16で異なることを示す。

【図19】BIAcoreによるTNFR1の線型ペプチド断片へのDOM1h-574-16のエピトープマッピング。4チャンネルのBIAcore SAチップを4つのビ

10

20

30

40

50

オチン化ペプチドの1つでそれぞれ被覆した。ペプチドは以下であった：1) Forte Bio上で結合を示さず、陰性対照としての役割を果たすヒトTNFR1のペプチド断片、A3 (SGSGND CPGPGQDTDCREC)、2) ドメイン-1ペプチドD2 (SGSGNS ICCTKCHKGTLY)、3) ドメイン-3ペプチドD5 (SGSGCRKNQYRHYWSENL F) および4) 重複ドメイン-3ペプチドE5 (SGSGNQYRHYWSENL FQCF)。DOM1h-574-16 (2.5 μM) を全4つのペプチド上に流し、結合量を測定した。DOM1h-574-16の結合は対照ペプチドA3上で観察されず、対してdAbは3つの他のペプチドに結合した。図において、異なるペプチドに対応する痕跡はペプチド識別子で示す。

【図20】BIAcoreによるTNFR1の4つの線型ペプチド断片へのDOM1m-21-23の結合の評価。4チャンネルのBIAcore SAチップを4つのビオチン化ペプチドの1つでそれぞれ被覆した。ペプチドは以下であった：1) Forte Bio上でDOM1h-574-16への結合を示さず、陰性対照としての役割を果たすヒトTNFR1のペプチド断片、A3 (SGSGND CPGPGQDTDCREC)、2) ドメイン-1ペプチドD2 (SGSGNS ICCTKCHKGTLY)、3) ドメイン-3ペプチドD5 (SGSGCRKNQYRHYWSENL F) および4) 重複ドメイン-3ペプチドE5 (SGSGNQYRHYWSENL FQCF)。DOM1m-21-23もこれらのペプチドに結合するかどうかを確立するために、DOM1m-21-23 (2.5 μM) を全4つのペプチドに注入した。図に見ることができるよう、DOM1m-21-23は4つのペプチドのいずれへの結合も示さなかった。曲線は互いに重なっている。

【図21】BIAcoreによるTNFR1の線型ペプチド断片へのDOM1h-131-511のエピトープマッピング。4チャンネルのBIAcore SAチップを4つのビオチン化ペプチドの1つでそれぞれ被覆した。ペプチドは以下であった：1) Forte Bio上でDOM1h-574-16への結合を示さず陰性対照としての役割を果たすヒトTNFR1のペプチド断片、A3 (SGSGND CPGPGQDTDCREC)、2) ドメイン-1ペプチドD2 (SGSGNS ICCTKCHKGTLY)、3) ドメイン-3ペプチドD5 (SGSGCRKNQYRHYWSENL F) および4) 重複ドメイン-3ペプチドE5 (SGSGNQYRHYWSENL FQCF)。DOM1h-131-511 (2.5 μM) を全4つのペプチド上に流し、結合量を測定した。図に見ることができるよう、DOM1h-131-511は4つのペプチドのいずれへの結合も示さなかった。曲線はほぼ重なり、矢印で示され、ペプチド数に対応する。

【図22】マウス血清アルブミン(MSA)に直列で融合したDOM0100-Albuda bの結合のBIAcore解析。EDC/NHS化学によりMSA (Sigma-Alldrich) を製造メーカーの説明書に従って用いて、BIAcore CM5チップ上に被覆した。続いて、抗TNFR1dAb-リンカー-Albuda b (N末端からC末端方向) からそれぞれなり、表6に特定されたDMS構築物を1 μMでMSA表面に注入し、結合をモニタリングした。BIAcore痕跡に見ることができるよう、DMS0192およびDMS0188の全体の動態は最高であり、対してDMS0182およびDMS0184はMSAに対して最も弱い結合剤であった。各DMSクローンに対応するBIAcore痕跡を矢印で示す。

【図23】ヒト血清アルブミン(HSA)に直列で融合したDOM0100-Albuda bの結合のBIAcore解析。EDC/NHS化学によりHSA (Sigma-Alldrich) を製造メーカーの説明書に従って用いて、BIAcore CM5チップ上に被覆した。続いて、それぞれ抗TNFR1dAb-リンカー-Albuda b (N末端からC末端方向) からなり、表6に特定されたDMS構築物を1 μMでHSA表面に注入し、結合をモニタリングした。BIAcore痕跡に見ることができるよう、DMS0189およびDMS0190の全体の動態は最高であり、対して図に示す他のDMSクローン (DMS0182、DMS0184、DMS0186およびDMS0188) は近似し、これらのHSAへの親和性は有意に弱かった。各DMSクローンに対応するBIAc

10

20

30

40

50

ore 痕跡を矢印で示す。

【図 24】マウスにおける DOM 0100 - AlbuDAb 融合の PK。マウスに DMS 0168 (2.5 mg/kg、静脈内)、DMS 0169 (2.5 mg/kg、静脈内) または DMS 0182 (10 mg/kg、腹腔内) を投与した。各時点 (0.17、1、4、12、24、48 および 96 時間) でマウス 3 匹を屠殺し、それぞれ DOM 0100 - AlbuDAb 融合レベルで血清を解析した。各 DOM 0100 - AlbuDAb 融合の平均量を各時点で測定して時間に対してプロットした、DMS 0168 (灰色点線)、DMS 0182 (黒点線) および DMS 0169 (黒線) (対応する線を矢印でも示す)。WinNonlin 解析パッケージ (例えばバージョン 5.1 (Pharsight 社、マウンテンビュー、カリフォルニア 94040、米国から入手可能) のノンコンパートメント解析 (NCA) を用いて、各分子の終末半減期を測定した。終末半減期は、DMS 0182 で 5.9 時間、DMS 0168 で 15.4 時間および DMS 0169 で 17.8 時間であった。腹腔内投薬の故に、DMS 0182 曲線は DMS 0168 および DMS 0169 で観察された形と異なる。

【図 25】生理食塩水および DMS 0169 で処理中、Tg197/hp55KI マウスの関節炎スコア。本試験に用いた遺伝子導入マウス系統は、Tg197 (ヒト TNF 過剰発現) と hp55 (ヒト TNFR1 のノックイン、p55 としても知られている) の交配種であり、これは自然に関節炎を発現する。6 週目から 15 週目まで、各群 12 匹のマウスを 10 mg/kg の DMS 0169 または生理食塩水のいずれかで週 2 回処理した。各週で、マウス 1 匹当たり後肢 2 本の関節の関節炎スコア、平均関節炎スコア、および標準誤差を測定し、マウス 12 匹を時間でプロットした。明らかに、DMS 0169 で処理した動物における関節炎の発現は少なかった。

【図 26】生理食塩水および DMS 0169 で処理中の Tg197/hp55KI マウスの体重。本試験に用いた遺伝子導入マウス系統は、Tg197 (ヒト TNF 過剰発現) と hp55 (ヒト TNFR1 のノックイン、p55 としても知られている) の交配種であり、これは自然に関節炎を発現する。6 週目から 15 週目まで、各群 12 匹のマウスを 10 mg/kg の DMS 0169 または生理食塩水のいずれかで週 2 回処理した。各週でマウスを測定し、平均データをプロットした (エラーバーは、標準誤差を示す)。図から、DMS 0169 が生理食塩水で処理した動物に比べて、統計的に有意ではないが重い傾向にあることが明らかである。

【図 27】15 週目、生理食塩水および DMS 0169 で処理後の Tg197/hp55KI マウスの組織学および関節炎スコア。本試験に用いた遺伝子導入マウス系統は、Tg197 (ヒト TNF 過剰発現) と hp55 (ヒト TNFR1 のノックイン、p55 としても知られている) の交配種であり、これは自然に関節炎を発現する。6 週目から 15 週目まで、各群 12 匹のマウスを 10 mg/kg の DMS 0169 または生理食塩水のいずれかで週 2 回処理した。15 週目、マウスを屠殺して関節炎スコア (黒棒) と関節の組織学 (白棒) の両方をスコア化した (Keffeler et al., EMBO, J. 10, p4025 (1991))。各群は 12 匹の動物からなり、標準誤差を算出した。処理群間の統計的有意差を示す ($p < 0.001$)。

【図 28】競合抗 TNFR1 dAb と非競合抗 TNFR1 dAb のための受容体結合アッセイ (RBA)。用量範囲の競合 dAb DOM1h-131-511 (1.3 pM ~ 100 nM、黒色実線) または非競合 dAb DOM1h-574-10 (0.2 nM ~ 16.3 μM、灰色ひし形) のいずれかを TNFR1 含有ビーズでインキュベートし、続いて TNF でインキュベーションした。観察された TNF の TNFR1 への結合阻害パーセンテージに対して dAb 用量をプロットしている。

【図 29】競合抗 TNFR1 dAb と非競合抗 TNFR1 dAb のための MRC-5 細胞アッセイ。用量範囲の競合 dAb DOM1h-131-511 (0.1 nM ~ 100 nM、黒色実線および四角) または非競合 dAb DOM1h-574-10 (0.14 nM ~ 14 μM、暗灰色点線、白ひし形) のいずれかを TNF の存在下で MRC5 細胞でインキュベートした。一晚インキュベーション後、培地を吸引してその中の IL-8 レベ

10

20

30

40

50

ルを測定した。この量を逆算して、d A b 不在下の I L - 8 レベルを決定した。d A b 濃度を I L - 8 放出の中和パーセンテージに対してプロットした。

【図 3 0】M R C - 5 細胞アッセイ法における競合的抗 T N F R 1 d A b による 4 つの異なる T N F 濃度の阻害。T N F の 4 つの異なる濃度を用いて標準的 M R C 5 細胞アッセイを行い、細胞および用量範囲の D O M 1 h - 1 3 1 - 5 1 1 を刺激した。使用した T N F 濃度は、1 0 p g / m l (黒点線、白ひし形)、5 0 p g / m l (灰色実線、灰色三角)、2 0 0 p g / m l (暗灰色点線、白三角)および 2 0 0 0 p g / m l (黒色実線、黒色四角)であった。結果を、使用した各濃度の T N F の各線で I L - 8 分泌阻害パーセンテージに対する d A b 濃度としてプロットしている。

【図 3 1】M R C - 5 細胞アッセイ法における非競合抗 T N F R 1 d A b による 4 つの異なる T N F 濃度の阻害。T N F の 4 つの異なる濃度を用いて標準的 M R C 5 細胞アッセイを行い、細胞および用量範囲の D O M 1 h - 5 7 4 - 1 3 8 を刺激した。使用した T N F 濃度は、1 0 p g / m l (黒点線、白ひし形)、5 0 p g / m l (灰色実線、灰色三角)、2 0 0 p g / m l (暗灰色点線、白三角)および 2 0 0 0 p g / m l (黒色実線、黒色四角)であった。結果を、使用した各濃度の T N F の各線で I L - 8 分泌阻害パーセンテージに対する d A b 濃度としてプロットしている。

【図 3 2】競合抗マウス T N F R 1 d A b と非競合抗マウス T N F R 1 d A b によるマウス L 9 2 9 細胞におけるマウス T N F 誘発性細胞毒の阻害。2 つの異なるマウス T N F 濃度、2 0 p g / m l (実線)または 1 0 0 p g / m l (点線)ならびに 2 つの異なる d A b、D O M 1 m - 1 5 - 1 2 (競合 d A b、灰色線)および D O M 1 m - 2 1 - 2 3 (非競合 d A b、黒線)を用いて標準的 L 9 2 9 マウスアッセイを行った。細胞のインキュベートに使用した d A b 濃度を L 9 2 9 細胞上のマウス T N F の細胞毒作用の中和パーセンテージに対してプロットしている。

【発明を実施するための形態】

【0 0 6 7】

本明細書において本発明は実施形態を参照しながら簡明な明細書記述がなされるように記述されている。実施形態は、本発明を逸脱することなく種々に組み合わせまたは分離してしてもよいことは意図されており、また、理解されるべきである。

【0 0 6 8】

別に定義されていなければ、本明細書に使われているすべての技術と専門用語は、当業者(例えば、細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、ハイブリダイゼーション技術、および生化学の分野)により共通に理解されているものと同じ意味を有する。標準的な技術は、分子、遺伝、および生化学の手法(一般的には、Sambrook et al., Molecular Cloning: Laboratory Manual, 第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. and Ausubel et al., 分子生物学における簡易手法(1999)第4版, John Wiley & Sons, Inc.を参照されたい。これらは参照して本明細書に組み込まれる)および化学的手法で使われている。

【0 0 6 9】

本明細書に記述されている免疫グロブリン単一可変ドメイン(d A b)は、相補性決定ドメイン(CDR 1、CDR 2およびCDR 3)を含む。CDRとフレームワーク(FR)ドメインの位置とナンバリング方式は、Kabatt等により決定されてきた(Kabatt, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991))。本明細書で開示しているV_HとV_L(V) d A bのCDR(CDR 1、CDR 2、CDR 3)のアミノ酸配列は、よく知られたKabattのアミノ酸配列ナンバリング方式とCDRの定義に従えば当業者は容易にわかるであろう。Kabattのナンバリング方式に従って可変

10

20

30

40

50

長、挿入を有する重鎖 C D R - H 3 は、残基 H 1 0 0 と H 1 0 1 の間で K までの文字でナンバリングされる（すなわち、H 1 0 0、H 1 0 0 A . . . H 1 0 0 K、H 1 0 1）。あるいは、A b M または次のコンタクト方法に従って、C D R は C h o t h i a 方式を用いて決定してもよい（C h o t h i a e t a l . , (1 9 8 9) 免疫グロブリン超可変ドメインの構造；N a t u r e 3 4 2 , p 8 7 7 - 8 8 3）。適切な C D R 決定方法については <http://www.bioinf.org.uk/abs/> を参照。

【 0 0 7 0 】

一旦各残基がナンバリングされれば、続く C D R 定義に適用できる（「 - 」は K a b a t 方式で同じ残基を意味する）：

K a b a t 配列多様性に基づいて最もよく使われる方法

10

（ K a b a t ナンバリングを使って）：

CDRH1 : 31 - 35 / 35 A / 35 B

CDRH2 : 50 - 65

CDRH3 : 95 - 102

CDRL1 : 24 - 34

CDRL2 : 50 - 56

CDRL3 : 89 - 97

C h o t h i a - 構造のループドメインの位置に基づいて

（ C h o t h i a ナンバリングを使って）：

20

CDRH1 : 26 - 32

CDRH2 : 52 - 56

CDRH3 : 95 - 102

CDRL1 : 24 - 34

CDRL2 : 50 - 56

CDRL3 : 89 - 97

A b M - K a b a t と C h o t h i a の中間

（ K a b a t ナンバリングを使って）： （ C h o t h i a ナンバリングを使って）：

CDRH1 : 26 - 35 / 35 A / 35 B 26 - 35

CDRH2 : 50 - 58 -

CDRH3 : 95 - 102 -

30

CDRL1 : 24 - 34 -

CDRL2 : 50 - 56 -

CDRL3 : 89 - 97 -

C o n t a c t - 結晶構造と抗原との接触残基予測に基づいて

（ K a b a t ナンバリングを使って）： （ C h o t h i a ナンバリングを使って）：

CDRH1 : 30 - 35 / 35 A / 35 B 30 - 35

CDRH2 : 47 - 58 -

CDRH3 : 93 - 101 -

CDRL1 : 30 - 36 -

CDRL2 : 46 - 55 -

CDRL3 : 89 - 96 -

40

本明細書で使われている用語「腫瘍壊死因子受容体 1 (T N F R 1) アンタゴニスト」または「抗 T N F R 1 アンタゴニスト」等は、T N F R 1 に結合し T N F R 1 の機能（すなわち、1 つまたは複数の機能）を阻害し得る薬剤（例えば分子や化合物）を指す。例えば、T N F R 1 アンタゴニストは T N F R 1 への T N F の結合を阻害し、および / または、T N F R 1 に媒介されるシグナル変換を阻害することができる。したがって、T N F R 1 媒介過程と細胞反応（例えば、標準的 L 9 2 9 細胞毒アッセイ法における T N F 誘発性細胞死）は T N F R 1 アンタゴニストにより阻害され得る。

50

【0071】

本明細書で使われている「ペプチド」は、ペプチド結合で結合した約2～約50アミノ酸を指す。

【0072】

本明細書で使われている「ポリペプチド」は、ペプチド結合で結合した少なくとも約50アミノ酸を指す。ポリペプチドは通常三次構造を含み、折り畳まれて機能ドメインを形成している。

【0073】

本明細書で使われている「プロテアーゼ分解に耐性がある」ペプチドまたはポリペプチド（例えばドメイン抗体（dAb））は、プロテアーゼ活性好適条件下でプロテアーゼとインキュベートした場合プロテアーゼにより実質的に分解されない。ポリペプチド（例えば、dAb）は、約25%以下、約20%以下、約15%以下、約14%以下、約13%以下、約12%以下、約11%以下、約10%以下、約9%以下、約8%以下、約7%以下、約6%以下、約5%以下、約4%以下、約3%以下、約2%以下、約1%以下であるか、または、実質的にタンパク質がプロテアーゼ活性好適温度（例えば37または50）で約1時間プロテアーゼとインキュベート後にプロテアーゼにより分解されていない場合、ポリペプチド（例えばdAb）は実質的に分解されていないことになる。タンパク質分解は本明細書に記載の任意の適切な方法を用いて、例えば、SDS-PAGEにより、または機能的アッセイ（例えば、リガンド結合）により評価できる。

【0074】

本明細書で使われている「ディスプレイシステム」は、物理的、化学的または機能特性等の所望特性を基準にして選択する目的で、ポリペプチドやペプチドのコレクションにアクセス可能なシステムを指す。ディスプレイシステムはポリペプチドやペプチドの適切なレパートリー（例えば、溶液の形で、適切なキャリア上に固定されて）であってもよい。また、ディスプレイシステムは、細胞発現システム（例えば、形質転換、感染、核酸導入、または形質導入等を行った細胞の核酸発現ライブラリ、および細胞表面へのコード化ポリペプチドのディスプレイ）あるいは、無細胞発現システム（例えば、エマルジョン分画とディスプレイ）を採用してもよい。代表的なディスプレイシステムでは、核酸のコード機能および核酸によりコードされたポリペプチドやペプチドの物理的、化学的、および/または、機能特性を結合する。このようなディスプレイシステムが採用されると、所望の物理的、化学的、および/または、機能特性を有するポリペプチドやペプチドが選択でき、選択されたポリペプチドやペプチドをコードする核酸が容易に単離、回収できる。核酸のコード機能およびポリペプチドやペプチドの物理的、化学的、および/または、機能特性を結合している多くのディスプレイシステムが当技術分野において知られており、例えば、バクテリオファージディスプレイ（ファージディスプレイ、例えばファージミドディスプレイ）、リボソームディスプレイ、エマルジョン分画とディスプレイ、酵母ディスプレイ、ピューロマイシンディスプレイ、細菌ディスプレイ、プラスミド上のディスプレイ、共有結合ディスプレイ等（例えば、EP 0 436 597（Dyax）、米国特許第6,172,197号（McCafferty et al.）、米国特許第6,489,103号（Griffiths et al.）参照）がある。

【0075】

本明細書で使われている「レパートリー」は、アミノ酸配列の多様性で特徴付けられるポリペプチドやペプチドのコレクションを指す。それぞれのレパートリーのメンバーは、共通の構造特性（例えば、共通のコア構造）、および/または共通の機能特性（例えば、共通のリガンド（例えば、リガンド属（generic ligand）や標的リガンド、TNFR1）に結合する能力）等の共通の特徴を有する。

【0076】

本明細書で使われている「機能的」は、特異的アビディティ等の生物学的活性を有するポリペプチドやペプチドの特徴を説明する。例えば、用語「機能的ポリペプチド」は、抗原結合部位により標的抗原に結合する抗体またはその抗原結合断片を含む。

10

20

30

40

50

【0077】

本明細書で使われている「リガンド属」は、所与のレパートリーの機能的メンバーの実質的部分（例えば、実質的に全部）に結合するリガンドを指す。リガンド属（例えば、共通リガンド属）は、メンバーが共通標的リガンドに対し結合特異性を持っていなくても、所与のレパートリーの多くのメンバーと結合可能である。通常、ポリペプチド上の機能的リガンド属結合部位が存在する（リガンド属に結合する能力で示されるように）と、ポリペプチドは正しく折り込まれ、機能する。リガンド属の適切な例には、超抗原や、レパートリーの一部の実質的な機能的メンバー上に発現したエピソードに結合した抗体等を含む。

【0078】

「超抗原」は、これらタンパク質の標的リガンド結合部位から離れた部位で、免疫グロブリン超分子群のメンバーと相互作用するリガンド属を指す技術用語である。ブドウ球菌エンテロトキシンは、T細胞受容体と相互作用する超抗原の例である。抗体と結合する超抗原には、IgG定常部と結合するGタンパク質（Bjorck and Kronvall, J. Immunol., 133:969 (1984)）、TgG定常部やV_Hドメインと結合するAタンパク質（Forsgren and Sjoquist, J. Immunol., 97:822 (1966)）、およびV_Lドメインと結合するLタンパク質（Bjorck, J. Immunol., 140:1194 (1988)）が含まれる。

【0079】

本明細書で使われている「標的リガンド」は、ポリペプチドまたはペプチドにより特異的にまたは選択的に結合するリガンドを指す。例えば、ポリペプチドが抗体またはその抗原結合断片である場合、標的リガンドは、任意の所望の抗原またはエピトープであり得る。標的抗原への結合は、機能的ポリペプチドまたはペプチドに依存する。

【0080】

本明細書で使われている抗体は、IgG、IgM、IgA、IgDやIgE、または断片（例えば、Fab、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド結合Fv、scFv、閉構造多重特異性抗体、ジスルフィド結合scFv、二重特異性抗体）、あるいは、抗体を天然に産生する任意の種から誘導されるか、または組換え型DNA技術により作製されるか、または、例えば血清、B細胞、ハイブリドーマ、トランスフェクト細胞、酵母、およびバクテリアから単離するか、のいずれかのものを指す。

【0081】

本明細書で使われている「抗体フォーマット」、「フォーマットにする」またはその類似形は、その構造上の抗原に対する結合特異性を与えるために1つまたは複数の抗体可変ドメインが組み込まれている任意の適切なポリペプチド構造を指す。多様な好適抗体フォーマットが当技術分野において知られており、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、単鎖抗体、二重特異性抗体、抗体重鎖、抗体軽鎖、抗体重鎖および/もしくは軽鎖のホモ二量体・ヘテロ二量体、上記いずれかの抗原結合断片（例えばFv断片（単鎖Fv（scFv）、ジスルフィド結合Fv等）、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片）、単一抗体可変ドメイン（例えば、dAb、V_H、V_HH、V_L）、および上記いずれかの改変型（例えば、ポリエチレングリコール、または他の適切なポリマーやヒト化V_HHの共有結合による改変））がある。

【0082】

「免疫グロブリン単一可変ドメイン」という語句は、他のV領域またはドメインに依存的に抗原またはエピトープに特異的に結合する抗体可変ドメイン（V_H、V_HH、V_L）を指す。免疫グロブリン単一可変ドメインは、単一免疫グロブリン可変ドメイン（すなわち、ここでは、免疫グロブリン単一可変ドメインは追加の可変ドメインの抗原と独立に結合する）による抗原結合が必要でない他の可変部位または可変ドメインを伴ったフォーマット（例えば、ホモまたはヘテロマルチマー）で存在してもよい。「ドメイン抗体」または「dAb」は、本明細書でこの用語が使われる場合は、「免疫グロブリン単一可変ドメ

10

20

30

40

50

イン」である。「単一免疫グロブリン可変ドメイン」は、本明細書でこの用語が使われる場合は、「免疫グロブリン単一可変ドメイン」と同じである。「単一抗体可変ドメイン」または「抗体単一可変ドメイン」は、本明細書でこの用語が使われる場合は、「免疫グロブリン単一可変ドメイン」と同じである。免疫グロブリン単一可変ドメインは、一実施形態では、ヒト抗体可変ドメインであるが、げっ歯類（例えば、WO 00 / 2 9 0 0 4 に開示されており、その内容全体は参照により本明細書に組み込まれる）、テンジクザメ、およびラクダ科動物の V_{HH} d A b 等の他の種からの単一抗体可変ドメインも含有する。ラクダ科動物の V_{HH} は、ラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダおよびグアナコ等の種から得られた免疫グロブリン単一可変ドメインポリペプチドで、生来軽鎖が欠けている重鎖抗体を産生する。 V_{HH} は、ヒト化可能である。

10

【0083】

「ドメイン」は、他のタンパク質とは独立に三次構造を保持している折り畳みタンパク質構造である。一般的には、ドメインはタンパク質個々の固有の機能特性に關与し、多くの場合、他のタンパク質、および / またはドメインの機能を失うことなく付加、削除、または他のタンパク質への移動が可能である。「単一抗体可変ドメイン」は、抗体可変ドメインの配列特性を含む折り畳みポリペプチドドメインを意味する。したがって、これは、抗体可変ドメインおよび修飾可変ドメインの全体を含むが、例えば1つまたは複数のループが抗体可変ドメインの特徴でない配列により置換され、あるいは、切断された、またはNまたはC末端拡張を含む抗体可変ドメイン、ならびに、少なくとも部分的には全長ドメイン時の結合活性および特異性を保持している可変ドメインの折り畳み断片、により置換された場合が含まれる。

20

【0084】

用語「ライブラリ」は、ヘテロポリペプチド、またはヘテロ核酸の混合物を指す。ライブラリは、単一ポリペプチドまたは核酸配列を有するメンバーから構成されている。この点では、ライブラリはレパートリーの同義語である。ライブラリメンバー間の配列の差はライブラリに存在する多様性によるものである。ライブラリは、ポリペプチドまたは核酸の単純な混合物の形を取ってもよく、または、核酸のライブラリで形質転換した生物または細胞の形、例えばバクテリア、ウイルス、動物または植物等、を取ってもよい。一実施形態では、各生物または細胞が、1つまたは限定された数のみのライブラリメンバーを含むようにする。一実施形態では、核酸は発現ベクター中に組み込まれ、核酸によりコードされたポリペプチドを発現させる。1つの態様では、ライブラリは、宿主生物母集団の形を取って、各生物が発現して対応するポリペプチドメンバーを産生する核酸の形の単一メンバー発現ベクターの1つまたは複数のコピーを含んでもよい。このように、宿主生物母集団は、多様なポリペプチドの大きなレパートリーをコードする可能性を有している。

30

【0085】

「ユニバーサルフレームワーク」は、Kabataの定義（“Sequences of Proteins of Immunological Interest”, US Department of Health and Human Services）による配列に保存されている抗体のドメインに対応する単一抗体フレームワーク配列、または、ChothiaとLeskにより定義（（1987）J. Mol. Biol. 196: 910 - 917）されているヒト生殖細胞系免疫グロブリンレパートリーや構造を指す。ライブラリおよびレパートリーは単一フレームワークまたは一連の当該フレームワークを使用し得る。これを使って超可変ドメインのみを変化させることにより実質的にほとんどの結合特異性を導出可能であることが明らかになっている。

40

【0086】

本明細書で使われている用語「用量」は、被験者に一度に全投与（単位用量）するか、または2回以上の回数にわけ一定の時間間隔で投与するリガンドの量を指す。例えば、用量は1日（24時間）（1日量）、2日、1週、2週、3週、または1ヶ月または2ヶ月以上のコース（例えば、1回投与、または2回以上の投与で）で被験者に投与するリガンドの量（例えば、リガンドは、TNFR1に結合する免疫グロブリン単一可変ドメイン）

50

を指してもよい。投与間隔は任意の所望間隔とすることができる。

【0087】

本明細書で使われている「流体力学的サイズ」は、水溶液中の分子の拡散から求めた分子（例えば、タンパク質分子、リガンド）の見かけ上の大きさを指す。溶液中のタンパク質の拡散や運動を適切に処理してタンパク質の見かけ上の大きさを導き出すことができ、この方式ではタンパク質粒子の大きさが「ストークス半径」または「流体力学的半径」として得られる。タンパク質の「流体力学的サイズ」は、質量と形状（立体配座）に依存する。すなわち、同じ分子質量の2つのタンパク質がその全立体配座に依存して異なる流体力学的サイズを持ち得るということである。

【0088】

本明細書で使われている用語「競合する」は、第一の標的のそのコグネイトの標的結合ドメインへの結合が、コグネイト標的に対し特異的な第二の結合ドメインが存在する場合に、阻害されることを意味する。例えば、結合ドメインの物理的ブロックにより、または標的に対する親和性やアビディティが低下するような結合ドメインの構造もしくは環境の変化により、結合が立体的に阻害され得る。競合的ELISA法および競合的BIACore法の実験により第1と第二の結合ドメインの間での競合を測定する方法の詳細については、WO2006038027を参照されたい。

【0089】

2つの配列間の「相同性」または「配列同一性」または「類似性」（本明細書ではこれらの用語は同義的に使われている）の計算は次のように行う。最適な比較のために配列を配列比較する（例えば、最適な配列比較のために第1および第2のアミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、また、比較のために非相同配列を無視することができる）。一実施形態では、比較のために配列比較される参照配列の長さは、その参照配列の長さの少なくとも30%、任意選択で少なくとも40%、任意選択で少なくとも50%、任意選択で少なくとも60%、任意選択で少なくとも70%、80%、90%、または100%である。その後、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列のある位置が、第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められている場合には、それらの分子はその位置で同一である（本明細書で使われているアミノ酸または核酸の「相同性」は、アミノ酸または核酸の「同一性」と同等である）。2つの配列間の同一性パーセントは、これら2つの配列の最適な配列比較のために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮して、これらの配列により共有される同一位置の数の関数である。

【0090】

本明細書で定義されるアミノ酸およびヌクレオチド配列の配列比較、ならびに相同性、類似性または同一性は、任意選択として、デフォルトパラメーターを用いて、アルゴリズムBLAST2 Sequencesにより作製し、決定してもよい（Tatusova, T. A. et al., FEMS Microbiol Lett, 174: 187-188 (1999)）。

【0091】

本発明によるTNFの部分的阻害の長所

TNFは、炎症、免疫学的および病態生理学的反応に関与する十分に立証された多面的サイトカインである。過剰なTNF産生は関節リウマチ等の炎症疾患の病因の1つであり、患者の治療において抗TNF抗体を用いたTNFの阻害が非常に有効である。しかしながら、TNFは、宿主免疫防御においてもIFNと協調してマクロファージによる食作用を増大してマイコバクテリア殺傷を高めることによって重要な役割を果たす。TNFのこの追加活性の重要性は、TNF阻害剤の治療を受けた個体は気道感染発現、特に結核再発リスクを上昇させたという疫学的な証拠により強調される。TNFのこの二重の役割のため、発明者らはTNFR1の部分的阻害について研究した。なぜなら、TNFの不完全阻害は感染感受性低下に有益であり得るためである。細菌負荷に対す

10

20

30

40

50

る残留遊離溶解性TNF 効果の最も広範囲にわたるモデリングについては、Marino et al (2007)により公開されている。本出願に開示のモデルにより、感染制御のために必要な溶解性TNF は非常にわずかであることが示唆される。本議論において、Marino et alは、それらの主な所見：「...抗TNF療法を曝露の可能性が高い領域に使用すると、無数の一次結核事象に至る可能性が高く、sTNFは微量でさえも感染制御に必須である」を繰り返し述べている。Guler et alによるマウスにおけるマイコバクテリウムボビスBCG感染に対する細胞媒介性免疫に対するTNF の総合的および部分的な中和作用の比較試験においても非常に類似した結論に至った。この実験的な研究において、TNFR1を各種レベルで発現するトランスジェニックマウスを用いてTNF レベル制御が成し遂げられた。彼らは「...TNFの総中和により[BCG感染]感受性が上昇し、TNFの部分的な阻害により肉芽腫形成およびマクロファージ活性が高まった」と結論した。これらの結果は、マウスTNF に対するモノクローナル抗体およびTNF 受容体(TNFR)融合分子を中和するTNF を比較する慢性マウス結核モデルにおいてPlessner et alにより模倣された。Plessner et alは彼らの試験から、「...TNFの完全な中和は宿主の感染制御を維持させる」と結論した。

10

【0092】

参考文献：

1: Marino S, Sud D, Plessner H, Lin PL, Chan J, Flynn JL, Kirschner DE.

20

Differences in reactivation of tuberculosis induced from anti-TNF treatments are based on bioavailability in granulomatous tissue.

PLoS Comput Biol. 2007 Oct;3(10):1909-24. Epub 2007 Aug 22.

2: Plessner HL, Lin PL, Kohno T, Louie JS, Kirschner D, Chan J, Flynn JL.

30

Neutralization of tumor necrosis factor (TNF) by antibody but not TNF receptor fusion molecule exacerbates chronic murine tuberculosis.

J Infect Dis. 2007 Jun 1;195(11):1643-50. Epub 2007 Apr 23.

3: Guler R, Ollerios ML, Vesin D, Parapanov R, Garcia I.

40

Differential effects of total and partial neutralization of tumor necrosis factor on cell-mediated immunity to Mycobacterium bovis BCG infection.

Infect Immun. 2005 Jun;73(6):3668-76.

TNFR1 (例えば、ヒトTNFR1)中和を細胞アッセイ、例えば標準的MRC5アッセイにおいてTNF 誘発性IL-8分泌の阻害により測定する；または標準的L929アッセイにおいてTNF 誘発性細胞毒の阻害により測定する；標準的カニクイザルKIAッセイにおいてTNF 誘発性IL-8分泌の阻害により測定する。TNFR1アンタゴニストのための標準的アッセイの詳細については、当技術分野、例えばWO2006038027、WO2008149144およびWO2008149148において知られている。詳細については以下の実験項目でも提示する。一実施形態では、本発明のアン

50

タゴニストは、下表 11 に示す DOM 1 h 可変ドメイン（任意選択として DOM 1 h - 574 を除く）の任意の 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 95、96、97、98 もしくは 99 % 等しいアミノ酸配列を含む抗 TNF 受容体 1 型（TNFR 1；p 55）免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなる。一実施形態では、本発明のアンタゴニストは、DOM 1 h - 574 - 89 ~ DOM 1 h - 574 - 179 の任意の 1 つのアミノ酸配列と少なくとも 95、96、97、98 または 99 % 等しいアミノ酸配列を含む抗 TNF 受容体 1 型（TNFR 1；p 55）免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなる。

【0093】

一実施形態では、本発明のアンタゴニストは、DOM 1 h - 574 - 109、DOM 1 h - 574 - 93、DOM 1 h - 574 - 123、DOM 1 h - 574 - 125、DOM 1 h - 574 - 126 または DOM 1 h - 574 - 129、DOM 1 h - 574 - 133、DOM 1 h - 574 - 137 または DOM 1 h - 574 - 160 のアミノ酸配列と等しい、または少なくとも 94、95、96、97、98 もしくは 99 % 等しいアミノ酸配列を含む抗 TNF 受容体 1 型（TNFR 1；p 55）免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなる。この態様は、タンパク質分解性の安定した可変ドメインを提供する。プロテアーゼ安定性に関しては、上の議論を参照されたい。

【0094】

一実施形態では、本発明のアンタゴニストは、DOM 1 h - 574 - 72、DOM 1 h - 574 - 109、DOM 1 h - 574 - 125、DOM 1 h - 574 - 126、DOM 1 h - 574 - 133、DOM 1 h - 574 - 135 または DOM 1 h - 574 - 138、DOM 1 h - 574 - 139、DOM 1 h - 574 - 155、DOM 1 h - 574 - 156、DOM 1 h - 574 - 162 または DOM 1 h - 574 - 180 のアミノ酸配列と等しい、または少なくとも 95、96、97、98 もしくは 99 % 等しいアミノ酸配列を含む抗 TNF 受容体 1 型（TNFR 1；p 55）免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれらからなる。この実施形態は、ヒト TNFR 1 と高い親和性で結合し、任意にマウス TNFR 1 に対しても所望の親和性を示す可変ドメインを提供する。

【0095】

アンタゴニスト、例えば、単一可変ドメインは、TNFR 1 の非競合阻害剤である。一実施形態では、TNFR 1 アンタゴニストは、（例えば、標準的な受容体結合アッセイ法において）TNFR 1（例えば、ヒト TNFR 1）に結合するが、TNF の TNFR 1 への結合と競合または阻害しない（または実質的に競合もしくは阻害しない）。この実施形態では、1 例では、アンタゴニスト（例えば、抗 TNFR 1 可変ドメインまたは PLAD ペプチド）は TNFR 1、例えば、ヒト TNFR 1 のドメイン 1 に特異的に結合する。この実施形態では、1 例では、アンタゴニストは TNFR 1、例えば、ヒト TNFR 1 の PLAD に特異的に結合する。

【0096】

一実施形態では、本発明のいずれかの態様のアンタゴニストは、

（i）表面プラズモン共鳴で測定した解離定数（KD）が 500 pM 以下、400 pM 以下、350 pM 以下、300 pM 以下、250 pM 以下、200 pM 以下、もしくは 150 pM 以下（または約 500 pM 以下、約 400 pM 以下、約 350 pM 以下、約 300 pM 以下、約 250 pM 以下、約 200 pM 以下、もしくは約 150 pM 以下）でヒト TNFR 1 に；または

（ii）表面プラズモン共鳴で測定した解離定数（KD）が 500 pM 以下、400 pM 以下、350 pM 以下、300 pM 以下、250 pM 以下、200 pM 以下、もしくは 150 pM 以下（または約 500 pM 以下、約 400 pM 以下、約 350 pM 以下、約 300 pM 以下、約 250 pM 以下、約 200 pM 以下、もしくは約 150 pM 以下）で非ヒト霊長類 TNFR 1（例えば、カニクイザル、赤毛猿もしくはヒヒ TNFR 1）に；または

（iii）表面プラズモン共鳴で測定した解離定数（KD）が 7 nM 以下、6 nM 以下

10

20

30

40

50

、5 nM以下、4 nM以下、3 nM以下、2 nM以下、もしくは1 nM以下（または約7 nM以下、約6 nM以下、約5 nM以下、約4 nM以下、約3 nM以下、約2 nM以下、もしくは約1 nM以下）でマウスTNFR1に

特異的に結合する結合部位を含む。1例では、可変ドメインは(i)および

(ii)；(i)および(iii)；(i)、(ii)および(iii)、または(i)および(iii)により特異的に結合する。

【0097】

一実施形態では、本発明のいずれかの態様のアンタゴニストは、

(a) 表面プラズモン共鳴で測定した解離速度(off-rate)定数(Koff)が $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下、もしくは $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下、もしくは $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下（または約 $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下、もしくは約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下、もしくは約 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下）でヒトTNFR1に；

(b) 表面プラズモン共鳴で測定した解離速度(off-rate)定数(Koff)が $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下、もしくは $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下（または約 $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下、約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下、もしくは約 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下）で非ヒト霊長類TNFR1（例えば、カニクイザル、赤毛猿またはヒヒTNFR1）に；または

(c) 表面プラズモン共鳴で測定した解離速度(off-rate)定数(Koff)が $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以下、もしくは $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下（または約 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以下、もしくは約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下）でマウスTNFR1に、

特異的に結合する結合部位を含む抗TNFR1単一可変を含むかまたはそれからなる。1例では、可変ドメインは(a)および(b)；(a)および(c)；(a)、(b)および(c)、または(b)および(c)により特異的に結合する。

【0098】

一実施形態では、本発明のいずれかの態様のアンタゴニストは、

(a') 表面プラズモン共鳴で測定した会合速度(on-rate)定数(Kon)が $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、 $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、 $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、 $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、もしくは $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上（または約 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、約 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、約 $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、約 $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、約 $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、もしくは約 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上）でヒトTNFR1に；

(b') 表面プラズモン共鳴で測定した会合速度(on-rate)定数(Kon)が $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、 $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、 $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、 $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、もしくは $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上（または約 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、約 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、約 $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、約 $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、約 $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、もしくは約 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上）で非ヒト霊長類TNFR1（例えば、カニクイザル、赤毛猿またはヒヒTNFR1）に；または

(c') 表面プラズモン共鳴で測定した会合速度(on-rate)定数(Kon)が $0.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、もしくは $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上（または約 $0.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、約 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上、もしくは約 $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以上）でマウスTNFR1に、

特異的に結合する結合部位を含む抗TNFR1単一可変を含むかまたはそれからなる。1例では、アンタゴニストは、(a')および(b')；(a')および(c')；(a')、(b')および(c')、または(b')および(c')により特異的に結合する。

【0099】

一実施形態では、本発明のいずれかの態様のアンタゴニストは、ヒト、カニクイザルおよび任意にイヌTNFR1に特異的に結合する単一可変ドメインを含むかまたはそれからなる。特異的結合は、10マイクロモル以下の解離定数Kdで表され、1マイクロモル以下のKdも任意に選択可能である。抗原結合タンパク質の抗原、またはエピトープに対す

10

20

30

40

50

る特異的結合は、例えば、放射性免疫検定法（R I A）、等のスキャッチャード解析、および／または競合的結合アッセイ、E L I S A等の酵素免疫測定法、およびサンドイッチ競合的アッセイ、およびこれらの様々な変種、を含む適切なアッセイによって測定可能である。1例では、アンタゴニストはマウスT N F R 1にも特異的に結合する。

【0100】

本発明のいずれかの態様の一実施形態では、本発明のアンタゴニストは、例えば標準的細胞アッセイ法（例えば、本明細書またはW O 2 0 0 6 0 3 8 0 2 7、W O 2 0 0 8 1 4 9 1 4 4もしくはW O 2 0 0 8 1 4 9 1 4 8に記載のもの）において、ヒト、カニクイザルおよび任意にイヌT N F R 1のD O M 1 h - 5 7 4 - 7 2、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 0 9、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 3 8、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 6 2またはD O M 1 h - 5 7 4 - 1 8 0への結合を阻害する単一可変ドメインを含むかまたはそれからなる。本発明のいずれかの態様の一実施形態では、単一可変ドメインは、例えば標準的な受容体結合アッセイ（例えば、本明細書またはW O 2 0 0 6 0 3 8 0 2 7、W O 2 0 0 8 1 4 9 1 4 4もしくはW O 2 0 0 8 1 4 9 1 4 8に記載のもの）において、ヒト、マウス、カニクイザルおよび任意にイヌT N F R 1のD O M 1 h - 5 7 4 - 7 2、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 0 9、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 3 8、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 6 2またはD O M 1 h - 5 7 4 - 1 8 0への結合を阻害する。1例では、これらの実施形態における「阻害する」とは、全阻害（100%阻害）であっても実質的（少なくとも90%、95%、98%、または99%）な阻害であってもよい。

10

20

【0101】

本発明のいずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、標準的M R C 5アッセイ法においてT N F 誘発性I L - 8分泌の阻害により測定したN D 5 0が5、4、3、2または1 n M以下（または約5、約4、約3、約2または約1 n M以下）でT N F R 1（例えば、ヒトT N F R 1）を中和する。

【0102】

本発明のいずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、標準的L 9 2 9アッセイ法においてT N F 誘発性細胞毒の阻害により測定したN D 5 0が150、100、50、40、30もしくは20 n M以下；または（約）150～10 n M；または（約）150～20 n M；または（約）110～10 n M；または（約）110～20 n MでT N F R 1（例えば、マウスT N F R 1）を中和する。

30

【0103】

本発明のいずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、標準的カニクイザルK IアッセイにおいてT N F 誘発性I L - 8分泌の阻害により測定したN D 5 0が5、4、3、2もしくは1 n M以下；または（約）5～（約）1 n MでT N F R 1（例えば、カニクイザルT N F R 1）を中和する。

【0104】

本発明のいずれかの態様の一実施形態では、アンタゴニストは、末端、任意にC末端に、システイン残基を含む単一可変ドメインを含むかまたはそれからなる。例えば、システイン残基は、例えば、マレイミド結合を用いてP E Gを可変ドメインに結合させるために使用できる（例えば、W O 0 4 0 8 1 0 2 6を参照のこと）。本発明のいずれかの態様の一実施形態では、単一可変ドメインは、ポリアルキレングリコール部分、任意にポリエチレングリコール部分に結合している。適切なP E G部分ならびに接合方法および試験については、例えば、W O 0 4 0 8 1 0 2 6を参照されたい。これらの開示は、（例えば以下の特許請求の範囲に含まれる特異性P E Gの）開示を提供するために本明細書に組み込まれる。

40

【0105】

アンタゴニストは、D O M 1 h - 5 7 4 - 7 2、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 0 9、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 3 8、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6、D O M 1 h - 5 7 4 - 1 6 2およびD O M 1 h - 5 7 4 - 1 8 0のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列と等しいか、

50

選択されたアミノ酸配列とアミノ酸位置が 25、20、15、10 もしくは 5 以下異なり、選択されたアミノ酸配列の CDR1 配列と等しいか、少なくとも 50、60、70、80、90、95 もしくは 98% 等しい CDR1 配列を有するアミノ酸配列を含む抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR1; p55) 免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれからなる。一実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは、選択されたアミノ酸配列の CDR3 配列と等しいか、少なくとも 50、60、70、80、90、95 もしくは 98% 等しい CDR3 配列を含む。

【0106】

アンタゴニストは、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-156、DOM1h-574-162 および DOM1h-574-180 を含むかまたはそれらからなるか、選択されたアミノ酸配列とアミノ酸位置が 25、20、15、10 もしくは 5 以下異なり、選択されたアミノ酸配列の CDR2 配列と等しいか、少なくとも 50、60、70、80、90、95 もしくは 98% 等しい CDR2 配列を有するアミノ酸配列を含む抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR1; p55) 免疫グロブリン単一可変ドメインを提供する。一実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは、選択されたアミノ酸配列の CDR2 配列と等しいか、少なくとも 50、60、70、80、90、95 もしくは 98% 等しい CDR2 配列を含む。さらに、または代替的に、一実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは、選択されたアミノ酸配列の CDR3 配列と等しいか、少なくとも 50、60、70、80、90、95 もしくは 98% 等しい CDR3 配列を含む。さらに、または代替的に、一実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは、選択されたアミノ酸配列の CDR1 配列と等しいか、少なくとも 50、60、70、80、90、95 もしくは 98% 等しい CDR1 配列を含む。

【0107】

アンタゴニストは、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-156、DOM1h-574-162 および DOM1h-574-180 のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列と等しいか、選択されたアミノ酸配列とアミノ酸位置が 25、20、15、10 もしくは 5 以下異なり、選択されたアミノ酸配列の CDR3 配列と等しいか、少なくとも 50、60、70、80、90、95 もしくは 98% 等しい CDR3 配列を有するアミノ酸配列を含む抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR1; p55) 免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれからなる。

【0108】

アンタゴニストは、プロテアーゼ耐性抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR1; p55) 免疫グロブリン単一可変ドメインを含むかまたはそれからなり、この単一可変ドメインは以下でインキュベート時にプロテアーゼ耐性である

(i) 少なくとも 10 マイクログラム / ml プロテアーゼの濃度 (c)、37 で、少なくとも 1 時間の時間 (t) ; または

(ii) 少なくとも 40 マイクログラム / ml プロテアーゼの濃度 (c')、30 で、少なくとも 1 時間の時間 (t)

ここで可変ドメインは、DOM1h-574-126 または DOM1h-574-133 のアミノ酸配列と少なくとも 94、95、96、97、98 または 99% 等しいアミノ酸配列を含み、任意選択として、101 位 (Kababtat ナンバリング) にバリンを含む。別の態様では、本発明は、プロテアーゼ耐性抗 TNF 受容体 1 型 (TNFR1; p55) 免疫グロブリン単一可変ドメインを提供し、この単一可変ドメインは以下でインキュベート時にプロテアーゼ耐性である

(i) 少なくとも 10 マイクログラム / ml プロテアーゼの濃度 (c)、37 で、少なくとも 1 時間の時間 (t) ; または

(ii) 少なくとも 40 マイクログラム / ml プロテアーゼの濃度 (c')、30 で、少なくとも 1 時間の時間 (t)

ここで可変ドメインは、DOM1h-574、DOM1h-574-93、DOM1h-574-123、DOM1h-574-125、DOM1h-574-126、DOM1h-574-129、DOM1h-574-133、DOM1h-574-137またはDOM1h-574-160のアミノ酸配列と少なくとも70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98または99%等しいアミノ酸配列、および任意選択として、101位(Kabatナンバリング)にバリンを含む。

【0109】

プロテアーゼ耐性抗TNFR1可変ドメインは非競合可変ドメインである(すなわち、TNFのTNFR1への結合を(実質的に)阻害しない)。非競合可変ドメインに関する上の議論(これらの実施形態にも適用される)を参照のこと。

10

【0110】

これらの実施形態の1例では、濃度(cまたはc')は少なくとも100または1000マイクログラム/mlプロテアーゼである。一実施形態では、時間(t)は1、3もしくは24時間または一晩である。1例では、可変ドメインは、

(i)および濃度(c)が10または100マイクログラム/mlプロテアーゼであり、時間(t)が1時間である条件下で耐性である。1例では、可変ドメインは、(ii)および濃度(c')が40マイクログラム/mlプロテアーゼであり、時間(t)が3時間である条件下で耐性である。一実施形態では、プロテアーゼはトリプシン、エラスターゼ、ロイコザイムおよびパンクレアチンから選択される。一実施形態では、プロテアーゼはトリプシンである。一実施形態では、可変ドメインはトリプシン耐性であり、エラスターゼ、ロイコザイムおよびパンクレアチンから選択される他のプロテアーゼの少なくとも1つである。一実施形態では、可変ドメインは、

20

(i)または(ii)条件下でインキュベート後、TNFR1に特異的に結合する。一実施形態では、

(i)または(ii)条件下でインキュベート後、ELISAで読みとった可変ドメインのOD₄₅₀は少なくとも0.404である。一実施形態では、

(i)または(ii)条件下でインキュベート後、可変ドメインはタンパク質Aまたはタンパク質Lに特異的に結合する。一実施形態では、

(i)または(ii)条件下でインキュベート後、可変ドメインはゲル電気泳動において実質的に単一のバンドを示す。一実施形態では、単一可変ドメインのT_mは少なくとも50である。プロテアーゼ耐性に関する詳細については、WO2008149144およびWO2008149148で見つけることができる。

30

【0111】

1つの態様では、本発明のアンタゴニストは、本明細書に記載の抗TNFR1免疫グロブリン単一可変ドメインを含むポリペプチドおよびエフェクター基または抗体定常ドメイン、任意に抗体Fc領域(任意にFcのN末端が、可変ドメインのC末端に結合(任意に直接結合)している)を含むかまたはそれらからなる。WO04058820に記載の任意の「エフェクター基」をこの実施形態に使用でき、WO04058820のエフェクター基の説明、およびその刊行物に開示されている可変ドメインへのそれらの結合方法は参照により明示的に本明細書に組み込まれ、(例えば、本明細書の特許請求の範囲に)使用できる本明細書の説明を提供する。一実施形態では、ポリペプチドは、DOM1h-574-16またはDOM1h-574-72のFc融合物を含む。

40

【0112】

1つの態様では、本発明のアンタゴニストは、本明細書に記載の免疫グロブリン単一可変ドメインおよび任意に血清アルブミン(SA)に特異的に結合する少なくとも1つの免疫グロブリン単一可変ドメインを含む多重特異性リガンドを含むかまたはそれらからなる。驚くべきことに、本発明者らは、このような抗TNFR1単一可変ドメインの抗SA単一可変ドメインへの融合は、(抗TNFR1dAb単量体単独より)改善された半減期という利点を提供するが、TNFR1結合親和性(KD)改善という便益も付加するというところを見出した。この所見は、従来技術においてこれまで開示されていない。この観点か

50

ら、可変ドメイン単量体として提供時（すなわち、抗TNFR1可変ドメインがフォーマットされない、例えば、PEG化しないかまたは抗体定常領域（Fc領域等）に融合せず、任意の他のドメインに融合しない場合）、抗TNFR1免疫グロブリン単一可変ドメインよりも半減期が長く、TNFR1結合（例えば、ヒトTNFR1結合）におけるKDの低いリガンドを提供するため、このような抗TNFR1免疫グロブリン単一可変ドメインおよび抗SA（例えば、抗ヒトSA）免疫グロブリン単一可変ドメインを含む多重特異性リガンドを含む本発明のアンタゴニストを提供する。一実施形態では、多重特異性リガンドはTNFR1の単量体のKDより少なくとも2倍低いKDでTNFR1（例えば、ヒトTNFR1）に結合する。さらにまたは代替的に、一実施形態では、多重特異性リガンドは単量体の半減期の少なくとも5、10、20、30、40、50または100倍の半減期を有する。さらにまたは代替的に、一実施形態では、例えば抗SAドメインがヒトSAと動物由来のSA間で交差反応する場合、多重特異性リガンドは、男性において、（例えばヒト志願者において経験的に測定するかまたは動物系（マウス、イヌおよび/または非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル、ヒヒ、赤毛猿）等のリガンドの半減期から外挿することにより、当業者が精通している従来技術を用いて算出される）少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25日間の終末半減期を有する。

10

【0113】

一実施形態では、本発明によるアンタゴニストの $t_{1/2}$ 半減期は2.5時間以上（または約2.5時間以上）の範囲内である。一実施形態では、範囲の下端は3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、10時間、11時間、または12時間（または約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約10時間、約11時間、もしくは約12時間）である。加えて、または代替的に、 $t_{1/2}$ 半減期は21日間または25日間以内（または約21日間もしくは約25日間以内）である。一実施形態では、範囲の上端は12時間、24時間、2日間、3日間、5日間、10日間、15日間、19日間、20日間、21日間または22日間（または約12時間、約24時間、約2日間、約3日間、約5日間、約10日間、約15日間、約19日間、約20日間、約21日間もしくは約22日間）である。例えば、本発明によるアンタゴニストは12～60時間（または約12～約60時間）の範囲内の $t_{1/2}$ 半減期を有する。さらなる一実施形態では、 $t_{1/2}$ 半減期は12～48時間（または約12～約48時間）の範囲内に収まる。さらなる一実施形態では、 $t_{1/2}$ 半減期は12～26時間（または約12～約26時間）の範囲内に収まる。

20

30

【0114】

2区画モデリング使用の代替法として、終末半減期を測定するために使用できる無隔壁モデリングの使用に当業者は精通するであろう（この観点から、本明細書で使われている用語「終末半減期」とは、無隔壁モデリングを用いて測定した終末半減期を意味する）。WinNonlin解析パッケージ、例えばバージョン5.1（Pharsight社、マウンテンビュー、カリフォルニア94040、米国から入手可能）を、例えば、この方法で曲線をモデリングするために使用できる。この場合、一実施形態では、アンタゴニストは、少なくとも（または少なくとも約）8時間、10時間、12時間、15時間、28時間、20時間、1日間、2日間、3日間、7日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間、21日間、22日間、23日間、24日間または25日間の終末半減期を有する。一実施形態では、この範囲の上端は、24時間、48時間、60時間または72時間または120時間（または約24時間、約48時間、約60時間もしくは約72時間もしくは約120時間）である。例えば、終末半減期は、例えば、男性で8時間～60時間、または8時間～48時間または12～120時間（または約8時間～約60時間、もしくは約8時間～約48時間もしくは約12～約120時間）である。

40

【0115】

上の基準に加えて、または上の基準と代替的に、本発明によるアンタゴニストは、1 mg·min/ml以上（または約1 mg·min/ml以上）の範囲内のAUC値（曲線

50

下面積)を有する。一実施形態では、範囲の下端は、5、10、15、20、30、100、200または300 mg・min/ml (または約5、約10、約15、約20、約30、約100、約200もしくは約300 mg・min/ml)である。加えて、または代替的に、本発明によるアンタゴニストは、最大(または最大約)600 mg・min/mlの範囲内のAUCを有する。一実施形態では、範囲の上端は、500、400、300、200、150、100、75または50 mg・min/ml (または約500、約400、約300、約200、約150、約100、約75もしくは約50 mg・min/ml)である。有益に可変ドメインまたはアンタゴニストは以下からなる群から選択される範囲のAUCを有する：15~150 mg・min/ml、15~100 mg・min/ml、15~75 mg・min/ml、および15~50 mg・min/ml (または約15~約150 mg・min/ml、約15~約100 mg・min/ml、約15~約75 mg・min/ml、および約15~約50 mg・min/ml)。

【0116】

1つまたは複数の本明細書に引用したt_{1/2}、t_{1/2α}および終末半減期ならびにAUCは、ヒトおよび/または動物(例えば、マウスまたは非ヒト霊長類、例えば、ヒヒ、赤毛猿、カニクイザル)において、血清アルブミン、例えばマウスおよび/またはヒト血清アルブミン(SA)に特異的に結合するPEGまたは単一可変ドメイン(または結合部分)のいずれかに結合した1つまたは複数の抗TNFR1単一可変ドメイン(または本明細書に定義した他の結合部分)を提供することにより得ることができる。PEGサイズは、少なくとも(または少なくとも約)20 kDa、例えば、30、40、50、60、70または80 kDaであり得る。一実施形態では、PEGは40 kDa、例えば2×20 kDa PEGである。一実施形態では、本明細書に引用したt_{1/2}、t_{1/2α}および終末半減期またはAUCを得るため、抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインに結合した抗TNFR1免疫グロブリン単一可変ドメインを含むアンタゴニストを提供する。一実施形態では、PEGは、40 kDa、例えば2×20 kDa PEGである。例えば、アンタゴニストは、わずか1つのこのような抗TNFR1可変ドメイン、例えばわずか1つの抗SA可変ドメインに結合した1つのこのようなドメインを含む。一実施形態では、本明細書に引用したt_{1/2}、t_{1/2α}および終末半減期もしくはAUCを得るために、PEG、例えば、40~80 kDa PEG、例えば、40 kDa PEGに結合した抗TNFR1免疫グロブリン単一可変ドメインを含むアンタゴニストを提供する。例えば、アンタゴニストは、わずか1つのこのような抗TNFR1可変ドメイン、例えば40 kDa PEGに結合した1つのこのようなドメインを含む。

【0117】

多重特異性リガンドの一実施形態では、リガンドは、DOM7h-11、DOM7h-11-3、DOM7h-11-12、DOM7h-11-15、DOM7h-14、DOM7h-14-10、DOM7h-14-18またはDOM7m-16の配列と等しいか、少なくとも80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98もしくは99%等しいアミノ酸配列を含む抗SA(例えば、HSA)単一可変ドメインを含む。代替的にまたは追加的に、一実施形態では、多重特異性リガンドは、抗TNFR1単一可変ドメインと抗SA単一可変ドメイン間に提供されたリンカーを含み、このリンカーはアミノ酸配列AST、任意にASTSGPSを含む。例えば、リガンドは、(N末端からC末端方向で)DOM1h-574-16-AST-DOM7h-11;またはDOM1h-574-72-ASTSGPS-DOM7m-16;またはDOM1h-574-72-ASTSGPS-DOM7h-11-12を含む。

【0118】

1つの態様では、本発明のアンタゴニストは、以下を含む多重特異性リガンドを含むかまたはそれらからなり、

(i) DOM1h-574-156のアミノ酸配列と等しいか、少なくとも93、94、95、96、97、98もしくは99%等しいアミノ酸配列を含む抗TNF受容体1型(TNFR1; p55)免疫グロブリン単一可変ドメイン、(ii)抗血清アルブミン

10

20

30

40

50

(S A) に特異的に結合する少なくとも 1 つの S A 免疫グロブリン単一可変ドメインであり、この抗 S A 単一可変ドメインは、D O M 7 h - 1 1 - 3 の配列と等しいか、少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 もしくは 9 9 % 等しいアミノ酸配列を含む、および (i i i) 任意にリンカーが抗 T N F R 1 単一可変ドメインと抗 S A 単一可変ドメイン間に提供される場合、このリンカーはアミノ酸配列 A S T、任意に A S T S G P S を含む。例えば、リガンドは、任意に A S T または A S T S G P S により結合する D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6 および D O M 7 h - 1 1 - 3 を含む。この例では、リガンドは、患者への血管内、皮下、筋肉内、腹腔内または吸入投与用に任意に適用される。1 例では、リガンドは、(投与前に、任意に希釈剤と混合する) 乾燥粉末剤または凍結乾燥組成物として提供される。

10

【0119】

1 つの態様では、本発明のアンタゴニストは、以下を含む多重特異性リガンドを含むかまたはそれらからなり、

(i) D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6 のアミノ酸配列と等しいか、少なくとも 9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 もしくは 9 9 % 等しいアミノ酸配列を含む抗 T N F 受容体 1 型 (T N F R 1 ; p 5 5) 免疫グロブリン単一可変ドメイン、(i i) 抗血清アルブミン (S A) に特異的に結合する少なくとも 1 つの S A 免疫グロブリン単一可変ドメインであり、この抗 S A 単一可変ドメインは、D O M 7 h - 1 4 - 1 0 の配列と等しいか、少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8 もしくは 9 9 % 等しいアミノ酸配列を含む、および (i i i) 任意にリンカーが抗 T N F R 1 単一可変ドメインと抗 S A 単一可変ドメイン間に提供される場合、リンカーはアミノ酸配列 A S T、任意に A S T S G P S を含む。例えば、リガンドは、A S T または A S T S G P S により任意に結合した D O M 1 h - 5 7 4 - 1 5 6 および D O M 7 h - 1 4 - 1 0 を含む。この例では、リガンドは、任意に患者への血管内、皮下、筋肉内、腹腔内または吸入投与用に適応する。1 例では、リガンドは、(投与前に、任意に希釈剤と混合する) 乾燥粉末剤または凍結乾燥組成物として提供される。

20

【0120】

例えば、本発明のアンタゴニストは、T N F R 1 結合 1 価である。例えば、本発明のアンタゴニストは、標準的 S E C - M A L L S により測定した 1 価または実質的に 1 価である。実質的 1 価は、標準的 S E C - M A L L S により測定した非 1 価形態で存在するアンタゴニストは 5、4、3、2 または 1 % 以下であることにより示される。

30

【0121】

一実施形態では、本発明のアンタゴニストは、第一および第二の抗 T N F R 1 免疫グロブリン単一可変ドメインを含み、この各可変ドメインは本明細書に記載のとおりである。第一および第二の免疫グロブリン単一可変ドメインは、1 例では同一である。別の例ではそれらは異なる。

【0122】

1 例では、本発明のアミノ酸配列またはアンタゴニストにおける各抗 T N F R 1 単一可変ドメインは D O M 1 h - 5 7 4 - 1 6 または D O M 1 h - 5 7 4 - 7 2 と同じアミノ酸配列である。

40

【0123】

1 つの態様では、本発明は、経口送達、患者の消化管送達、患者の肺 (p u l m o n a r y) 送達、肺 (l u n g) 送達または全身送達のための、本発明のいずれかの態様による、抗 T N F R 1 可変ドメインを含む T N F 受容体 1 型 (T N F R 1 ; p 5 5) アンタゴニストを提供する。別の態様では、本発明は、経口送達のための医薬品の製造における本発明のいずれかの態様の T N F R 1 アンタゴニストの使用を提供する。別の態様では、本発明は、患者の消化管送達のための医薬品の製造における本発明のいずれかの態様の T N F R 1 アンタゴニストの使用を提供する。アンタゴニストまたは可変ドメインの 1 例は、トリプシン、エラスターゼおよび / またはパンクレアチン耐性である。

【0124】

50

1つの態様では、本発明は、肺送達のための医薬品の製造における本発明のいずれかの態様のTNFR1アンタゴニストの使用を提供する。別の態様では、本発明は、患者の肺送達のための医薬品の製造における本発明のいずれかの態様のTNFR1アンタゴニストの使用を提供する。アンタゴニストまたは可変ドメインの1例では、ロイコザイム耐性である。

【0125】

1つの態様では、本発明は、経口送達、あるいは患者の消化管または患者の肺(lung)もしくは肺(pulmonary)組織への医薬品の送達方法を提供し、この方法は、製薬的有効量の本発明のTNFR1アンタゴニストを患者に投与することを含む。

【0126】

1つの態様では、本発明は、ヒト、マウスまたはカニクイザルTNFR1に結合する本発明のTNF受容体1型(TNFR1; p55)アンタゴニストを提供し、このアンタゴニストはDOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-156、DOM1h-574-162およびDOM1h-574-180のCDR1配列と等しいか、少なくとも50、60、70、80、90、95もしくは98%等しいCDR1配列を有する。任意選択として、アンタゴニストは、選択された配列のCDR2配列と等しいか、少なくとも50、60、70、80、90、95もしくは98%等しいCDR2配列も有する。任意選択として、さらにまたは代替的に、アンタゴニストは、選択された配列のCDR3配列と等しいか、少なくとも50、60、70、80、90、95もしくは98%等しいCDR3配列も有する。

【0127】

1つの態様では、本発明は、ヒト、マウスまたはカニクイザルTNFR1に結合する本発明のTNF受容体1型(TNFR1; p55)アンタゴニストを提供し、このアンタゴニストはDOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-156、DOM1h-574-162およびDOM1h-574-180のCDR2配列と等しいか、少なくとも50、60、70、80、90、95もしくは98%等しいCDR2配列を有する。任意選択として、アンタゴニストは、選択された配列のCDR3配列と等しいか、少なくとも50、60、70、80、90、95もしくは98%等しいCDR3配列も有する。

【0128】

1つの態様では、本発明は、ヒト、マウスまたはカニクイザルTNFR1に結合する本発明のTNF受容体1型(TNFR1; p55)アンタゴニストを提供し、このアンタゴニストはDOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-156、DOM1h-574-162およびDOM1h-574-180のCDR3配列と等しいか、少なくとも50、60、70、80、90、95もしくは98%等しいCDR3配列を有する。

【0129】

1つの態様では、本発明は、ヒト、マウスまたはカニクイザルTNFR1に結合する本発明のTNF受容体1型(TNFR1; p55)アンタゴニストを提供し、このアンタゴニストはDOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-156、DOM1h-574-162およびDOM1h-574-180から選択される単一可変ドメインのCDR1、CDR2、および/またはCDR3配列を含む免疫グロブリン単一可変ドメインを含む。

【0130】

本発明は、炎症状態の治療および/または予防のためのいずれかの態様のTNFR1アンタゴニストを提供する。本発明は、炎症状態の治療および/または予防のための医薬品の製造におけるいずれかの態様のTNFR1アンタゴニストの使用を提供する。アンタゴニストまたは使用の一実施形態では、状態は、関節炎、多発性硬化症、炎症腸疾患および慢性閉塞性肺疾患からなる群から選択される。1例では、関節炎は、関節リウマチまたは若年性関節リウマチである。1例では、炎症腸疾患は、クローン病および潰瘍性大腸炎か

10

20

30

40

50

らなる群から選択される。1例では、慢性閉塞性肺疾患は、慢性気管支炎、慢性閉塞気管支炎および気腫からなる群から選択される。1例では、肺炎は細菌性肺炎である。1例では、細菌性肺炎はブドウ球菌性肺炎である。

【0131】

本発明は、呼吸疾患の治療および/または予防のためのいずれかの態様のTNFR1アンタゴニストを提供する。本発明は、呼吸疾患の治療および/または予防のための医薬品の製造におけるいずれかの態様のTNFR1アンタゴニストの使用を提供する。1例では、呼吸疾患は、肺炎症、慢性閉塞性肺疾患、急性肺障害(ALI)、喘息、肺炎、過敏性肺炎、好酸球増加を伴う肺湿潤物、環境性肺疾患、肺炎、気管支拡張症、嚢胞性線維症、間質性肺炎、原発性高血圧症、肺血栓塞栓症、胸膜障害、縦隔障害、隔膜障害、換気低下、過呼吸、睡眠時無呼吸、急性呼吸促進症候群、中皮腫、肉腫、移植片拒絶、移植片対宿主病、肺癌、アレルギー性鼻炎、アレルギー、石綿症、アスペルギルス腫、こうじかび病、気管支拡張症、慢性気管支炎、肺気腫、好球性肺炎、特発性肺線維症、浸潤性肺炎球菌疾患、インフルエンザ、非結核性抗酸菌、胸水、塵肺症、ニューモシスチス症、肺炎、肺放線菌症、肺胞タンパク症、肺炭疽、肺水腫、肺塞栓症、肺炎症、肺ヒスチオサイトーシスX、肺高血圧、肺ノカルジア症、肺結核症、肺静脈の閉塞性疾患、リウマチ性肺疾患、サルコイドーシス、およびウェゲナー肉芽腫症からなる群から選択される。

【0132】

1つの態様では、本発明のいずれかの態様の抗TNFR1は、NSICCTKCHKGTLY、NSICCTKCHKGTLYL、CRKNQYRHYWSENLFおよびNQYRHYWSENLFQCFからなる群から選択されるTNFR1のエピトープ配列の1つまたは複数を標的とするために提供される。1例では、抗TNFR1アンタゴニストは、NSICCTKCHKGTLYLを標的とするために提供される。1例では、抗TNFR1アンタゴニストは、NSICCTKCHKGTLYLを標的とするために提供される。1例では、抗TNFR1アンタゴニストは、CRKNQYRHYWSENLFを標的とするために提供される。1例では、抗TNFR1アンタゴニストは、NQYRHYWSENLFQCFを標的とするために提供される。1例では、抗TNFR1アンタゴニストは、CRKNQYRHYWSENLFおよびNQYRHYWSENLFQCFを標的とするために提供される。1例では、抗TNFR1アンタゴニストは、NSICCTKCHKGTLYL、CRKNQYRHYWSENLFおよびNQYRHYWSENLFQCFを標的とするために提供される。1例では、抗TNFR1アンタゴニストは、NSICCTKCHKGTLYL、CRKNQYRHYWSENLFおよびNQYRHYWSENLFQCFを標的とするために提供される。1例では、このような標的は上述の任意の状態または疾患を治療および/または予防するためである。1つの態様では、本発明は、患者における上述の任意の状態または疾患を治療および/または予防する方法を提供し、この方法は、先に述べたいずれかの実施形態に記載のとおり、TNFR1のエピトープ配列の1つまたは複数を標的とする本発明の抗TNFR1アンタゴニストを患者に投与することを含む。

【0133】

ポリペプチド、dAbおよびアンタゴニスト

ポリペプチド、リガンド、dAb、リガンドまたはアンタゴニストは、大腸菌またはPichia種(例えば、P.pastoris)に発現し得る。一実施形態では、リガンドまたはdAb単量体は大腸菌またはPichia種(例えば、P.pastoris)中に発現時、少なくとも約0.5mg/Lの量で分泌される。本明細書に記載のリガンドおよびdAb単量体は、大腸菌またはPichia種(例えば、P.pastoris)中に発現時に分泌し得るが、それらは大腸菌またはPichia種を用いない任意の適切な方法(化学合成法または生物学的産生法等)を用いて産生し得る。

【0134】

一部の実施形態では、ポリペプチド、リガンド、dAb、リガンドまたはアンタゴニストはラクダ科免疫グロブリン可変ドメイン、またはラクダ科生殖系列抗体遺伝子セグメント、例えば108位、37位、44位、45位および/もしくは47位によりコードされ

10

20

30

40

50

る免疫グロブリン可変ドメインに独特な1つもしくは複数のフレームワークアミノ酸を含まない。一実施形態では、抗TNFR1可変ドメインは、Kabattによる44位にG残基を含み、任意に他の位置、例えば37位または103位に1つまたは複数のラクダ科特異性アミノ酸を含む。

【0135】

本発明によるTNFR1のアンタゴニストは、1価であっても多価であってもよい。一実施形態では、アンタゴニストは1価であり、TNFR1と相互作用する1つの結合部位、本明細書に記載のポリペプチドまたはdAbにより提供された結合部位を含む。1価アンタゴニストは1つのTNFR1と結合し、受容体の活性化およびシグナル形質導入に至り得る細胞表面上のTNFR1の架橋または凝集を誘発しなくてもよい。

10

【0136】

他の実施形態では、TNFR1のアンタゴニストは多価である。TNFR1の多価アンタゴニストはTNFR1の特定の結合部位のコピーを2つ以上含んでもよく、TNFR1と結合する2つ以上の異なる結合部位、本明細書に記載のポリペプチドまたはdAbにより提供された少なくとも1つの結合部位を含んでもよい。例えば、本明細書に記載のように、TNFR1のアンタゴニストは、TNFR1と結合する本明細書に記載の特定のポリペプチドもしくはdAbのコピーを2つ以上、またはTNFR1と結合する本明細書に記載の異なるポリペプチドもしくはdAbを2つ以上含む二量体、三量体もしくは多量体であり得る。一実施形態では、TNFR1の多価アンタゴニストは標準的細胞アッセイ法において(TNFR1のアゴニストとして作用する)TNFR1を実質的に刺激しない(すなわち、アッセイ法において、1nM、10nM、100nM、1μM、10μM、100μM、1000μMまたは5,000μMの濃度で存在時、TNF(100pg/ml)により誘発されるTNFR1媒介性活性は約5%以下である)。

20

【0137】

特定の実施形態では、TNFR1の多価アンタゴニストはTNFR1の所望のエピトープまたはドメインの結合部位を2つ以上含む。例えば、TNFR1の多価アンタゴニストはTNFR1のドメイン1の同一エピトープに結合する結合部位を2つ以上含み得る。

【0138】

他の実施形態では、TNFR1の多価アンタゴニストは、TNFR1の異なるエピトープまたはドメインに結合する本明細書に記載のポリペプチドまたはdAbにより提供された結合部位を2つ以上含む。一実施形態では、このような多価アンタゴニストはWO2006038027に記載の標準的L929細胞毒アッセイまたは標準的MRC5またはHELAIIL-8アッセイにおいて約1nM、または約10nM、または約100nM、または約1μM、または約10μMの濃度で存在時にTNFR1を刺激しない。

30

【0139】

TNFのTNFR1への結合を阻害しないTNFR1のアンタゴニストは、試料中TNFR1と結合するため、または試料中TNFR1を検出、定量化もしくは測定するために使用することができ、TNFR1への結合について試料中TNFと競合しないため、診断薬としての用途を有する。したがって、試料中のTNFR1が存在するかどうか、またはTNFR1がどの程度存在するかについて正確に測定することができる。

40

【0140】

他の実施形態では、アンタゴニストはTNFR1と結合し、標準的細胞アッセイ法においてTNFR1活性とND₅₀100nMで拮抗し、dAbは当該アッセイ法において10μMの濃度でTNFR1活性を5%刺激する。

【0141】

具体的な実施形態では、アンタゴニストは、標準的細胞アッセイ法において、(TNFR1のアゴニストとして作用する)TNFR1を実質的に刺激しない(すなわち、当該アッセイ法において、1nM、10nM、100nM、1μM、10μM、100μM、1000μMまたは5,000μMの濃度で存在時、TNF(100pg/ml)により誘発されるTNFR1媒介性活性は約5%以下である)。

50

【 0 1 4 2 】

特定の実施形態では、本発明のアンタゴニストは、有効量を投与時、慢性炎症性疾患モデルにおいて効果的である。一般に有効量は、約 1 mg / kg ~ 約 10 mg / kg (例えば、約 1 mg / kg、約 2 mg / kg、約 3 mg / kg、約 4 mg / kg、約 5 mg / kg、約 6 mg / kg、約 7 mg / kg、約 8 mg / kg、約 9 mg / kg、または約 10 mg / kg) である。慢性炎症性疾患モデル (WO 2006038027 に記載のものを参照のこと) はヒトにおける治療的有効性を予測することが当業者により認識されている。

【 0 1 4 3 】

具体的な実施形態では、アンタゴニストは、標準的マウスコラーゲン誘発性関節炎モデルにおいて効果的である (モデルの詳細については、WO 2006038027 を参照のこと)。例えば、有効量のアンタゴニストの投与は、標準的マウスコラーゲン誘発性関節炎モデルにおいて 4 肢加重の平均関節炎スコアを、例えば、適切な対照に比べ約 1 ~ 約 16、約 3 ~ 約 16、約 6 ~ 約 16、約 9 ~ 約 16、または約 12 ~ 約 16 減らし得る。別の例では、有効量のアンタゴニストの投与は、標準的マウスコラーゲン誘発性関節炎モデルにおいて、関節炎症状の発現を、例えば、適切な対照に比べ約 1 日間、約 2 日間、約 3 日間、約 4 日間、約 5 日間、約 6 日間、約 7 日間、約 10 日間、約 14 日間、約 21 日間または約 28 日間遅延化し得る。別の例では、有効量のアンタゴニストの投与により、標準的マウスコラーゲン誘発性関節炎モデルにおいて 4 肢加重の平均関節炎スコアは 0 ~ 約 3、約 3 ~ 約 5、約 5 ~ 約 7、約 7 ~ 約 15、約 9 ~ 約 15、約 10 ~ 約 15、約 12 ~ 約 15、または約 14 ~ 約 15 となり得る。

【 0 1 4 4 】

他の実施形態では、アンタゴニストは、マウス ARE の関節炎モデルにおいて効果的である (モデルの詳細については WO 2006038027 を参照のこと)。例えば、有効量のアンタゴニストの投与は、マウス ARE の関節炎モデルにおいて、平均関節炎スコアを、例えば、適切な対照に比べ約 0.1 ~ 約 2.5、約 0.5 ~ 約 2.5、約 1 ~ 約 2.5、約 1.5 ~ 約 2.5、または約 2 ~ 約 2.5 減らし得る。別の例では、有効量のアンタゴニストの投与は、マウス ARE の関節炎モデルにおいて、関節炎症状の発現を、例えば、適切な対照に比べ約 1 日間、約 2 日間、約 3 日間、約 4 日間、約 5 日間、約 6 日間、約 7 日間、約 10 日間、約 14 日間、約 21 日間または約 28 日間遅延化し得る。別の例では、有効量のアンタゴニストの投与は、マウス ARE の関節炎モデルにおいて、平均関節炎スコアは 0 ~ 約 0.5、約 0.5 ~ 約 1、約 1 ~ 約 1.5、約 1.5 ~ 約 2、または約 2 ~ 約 2.5 となり得る。

【 0 1 4 5 】

他の実施形態では、アンタゴニストは、マウス ARE の炎症腸疾患 (IBD) モデルにおいて効果的である (モデルの詳細については WO 2006038027 を参照のこと)。例えば、有効量のアンタゴニストの投与は、マウス ARE の IBD モデルにおいて、平均急性および / または慢性炎症スコアを、例えば、適切な対照に比べ約 0.1 ~ 約 2.5、約 0.5 ~ 約 2.5、約 1 ~ 約 2.5、約 1.5 ~ 約 2.5、または約 2 ~ 約 2.5 減らし得る。別の例では、有効量のアンタゴニストの投与は、マウス ARE の IBD モデルにおいて、IBD 症状の発現を、例えば、適切な対照に比べ約 1 日間、約 2 日間、約 3 日間、約 4 日間、約 5 日間、約 6 日間、約 7 日間、約 10 日間、約 14 日間、約 21 日間または約 28 日間遅延化し得る。別の例では、有効量のアンタゴニストの投与は、マウス ARE の IBD モデルにおいて、平均急性および / または慢性炎症スコアは 0 ~ 約 0.5、約 0.5 ~ 約 1、約 1 ~ 約 1.5、約 1.5 ~ 約 2、または約 2 ~ 約 2.5 となり得る。

【 0 1 4 6 】

他の実施形態では、アンタゴニストは、マウスのデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性 IBD モデルにおいて効果的である (モデルの詳細については WO 2006038027 を参照のこと)。例えば、有効量のアンタゴニストの投与は、マウス DSS の I

B Dモデルにおいて、平均重症度スコアを、例えば、適切な対照に比べ約0.1～約2.5、約0.5～約2.5、約1～約2.5、約1.5～約2.5、または約2～約2.5減らし得る。別の例では、有効量のアンタゴニストの投与は、マウスDSSのIBDモデルにおいて、IBD症状の発現を、例えば、適切な対照に比べ約1日間、約2日間、約3日間、約4日間、約5日間、約6日間、約7日間、約10日間、約14日間、約21日間または約28日間遅延化し得る。別の例では、有効量のアンタゴニストの投与は、マウスDSSのIBDモデルにおいて、平均重症度スコアは0～約0.5、約0.5～約1、約1～約1.5、約1.5～約2、または約2～約2.5となり得る。

【0147】

具体的な実施形態では、アンタゴニストは、マウス喫煙の慢性閉塞性肺疾患(COPD)モデルにおいて効果的である(モデルの詳細についてはWO2006038027およびWO2007049017を参照のこと)。例えば、有効量のリガンドの投与は、COPD症状の発現を適切な対照に比べ減らし得るかまたは遅延化し得る。

【0148】

TNFR1のアンタゴニスト(例えば、リガンド、抗体またはその結合タンパク質)の疾患に対する保護または疾患の治療における有効性をスクリーニングするために使用できる動物モデル系が入手可能である。感受性マウスにおける全身性エリテマトーデス(SLE)の試験方法は当技術分野において知られている(Knight et al. (1978) J. Exp. Med., 147: 1653; Reinersten et al. (1978) New Eng. J. Med., 299: 515)。重症筋無力症(MG)は、SJL/J雌マウスにおいて別の種由来の溶解性AchRタンパク質によって疾患を誘発することにより試験される(Lindstrom et al. (1988) Adv. Immunol., 42: 233)。関節炎は、感受性系統マウスにII型コラーゲンを注入することにより誘発される(Stuart et al. (1984) Ann. Rev. Immunol., 42: 233)。感受性ラットにマイコバクテリア熱ショックタンパク質を注入することによりアジュバント関節炎が誘発されるモデルについて記載されている(Van Eden et al. (1988) Nature, 331: 171)。甲状腺炎は、記載されているようにマウスにチログロブリンを投与して誘発される(Maron et al. (1980) J. Exp. Med., 152: 1115)。インシュリン依存性糖尿病(IDDM)は、Kanasawa et al. (1984) Diabetologia, 27: 113に記載されているもの等、ある系統のマウスにおいて自然に発現するかまたは誘発することができる。マウスおよびラットにおけるEAEは、ヒトのMSモデルとしての役割を果たす。このモデルでは、ミエリン塩基性タンパク質の投与により脱髄疾患が誘発される(Paterson (1986) Textbook of Immunopathology, Mischer et al., eds., Grune and Stratton, New York, pp. 179-213; McFarlin et al. (1973) Science, 179: 478; およびSato et al. (1987) J. Immunol., 138: 179を参照のこと)。

【0149】

一般的には、当該アンタゴニストは、薬学的に適切なキャリアと共に精製形態で使用する。典型的に、これらのキャリアとしては、水性もしくはアルコール性/水溶液、エマルジョンまたは懸濁液、生理食塩水および/もしくは緩衝液を含む任意のものが挙げられる。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウムならびに乳酸塩リンガーが挙げられる。必要な場合、懸濁液中にポリペプチド複合体を保つため、生理学的に許容可能な適切なアジュバントを増粘剤(カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチンおよびアルギン酸塩等)から選択できる。

【0150】

10

20

30

40

50

静脈内ビヒクルは、流体および栄養補充液および電解質補充液（リンガーデキストロースに基づくもの等）を含む。保存料および他の追加剤（抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤および不活性気体等）も存在し得る（Mac k （1982） Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版）。徐放製剤を含む様々な適切な製剤を使用できる。

【0151】

本発明のアンタゴニストは、他剤と別々に投与する組成物として用いても他剤と配合して用いてもよい。他剤としては、様々な免疫治療剤（シクロスポリン、メトトレキサート、アドリマイシンまたはシスプラチン等）、および免疫毒素を挙げることができる。医薬組成物は、投与前に貯蔵されていたかどうかを問わず、本発明のアンタゴニストと併用した様々な細胞毒もしくは他剤の「混合物」を含んでもよいし、異なる特異性を有する本発明によるアンタゴニスト（異なる標的抗原またはエピトープを用いて選択されたアンタゴニスト等）の組み合わせさえも含んでもよい。

10

【0152】

本発明による医薬組成物の投与経路は当業者に一般に知られている任意のものでよい。療法（免疫療法が挙げられるが、これに限定されない）において、標準的な技術に従い、本発明のその選択されたりガンドを任意の患者に投与できる。

【0153】

投与は、非経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、経皮、経肺、または適切に、カテーテルによる直接注入を含む任意の適切な方法であってよい。投与量および投与頻度は、患者の年齢、性別および状態、他の薬剤の同時投与、禁忌ならびに臨床医が考慮する他の変数に依存する。投与は、適応があれば、局所投与（例えば、肺投与（例えば、鼻腔内投与）による肺への局所送達）であっても全身投与であってもよい。

20

【0154】

本発明のアンタゴニストは、保存用に凍結乾燥して使用前に適切なキャリア中で再構成できる。この技術は有効であることが従来の免疫グロブリンで示されており、当技術分野で知られている凍結乾燥および再構成技術を用いてよい。凍結乾燥および再構成により様々な程度で抗体活性が損失する可能性があり（例えば従来の免疫グロブリンであるIgM抗体は、IgG抗体よりも活性損失度が大きい傾向がある）、これを補うために使用レベルを上方調整する必要がある場合があることが当業者により理解されるであろう。

30

【0155】

当該アンタゴニストまたはその混合物を含む組成物は、予防的および/または治療的処置において投与できる。ある治療的適応では、選択された細胞集団の少なくとも部分的阻害、抑制、調節、死滅化、または他のいくつかの測定可能な変数を達成するための適量は、「治療的有效量」として定義する。この投与量に達するために必要な量は疾患の重症度および患者自体の免疫系の全体状態に依存するが、一般に0.005~10.0mgのリガンド、例えばdAbまたはアンタゴニスト/kg体重の範囲であり、0.05~2.0mg/kg/回の用量がより一般に使用される。予防的適応では、当該アンタゴニストまたはその混合物を含む組成物は、疾患の発現を予防、阻害または遅延化するため（例えば、寛解もしくは静止状態を持続するため、または急性期を予防するため）類似したまたはわずかに低い投与量で投与してもよい。熟練臨床医は疾患を治療、抑制または予防するために適切な投薬間隔を決定できるであろう。慢性炎症性疾患を治療、抑制または予防するためにTNFR1のアンタゴニストを投与時、1日当たり最大4回、週2回、週1回、隔週、月1回、または隔月で、例えば、約10μg/kg~約80mg/kg、約100μg/kg~約80mg/kg、約1mg/kg~約80mg/kg、約1mg/kg~約70mg/kg、約1mg/kg~約60mg/kg、約1mg/kg~約50mg/kg、約1mg/kg~約40mg/kg、約1mg/kg~約30mg/kg、約1mg/kg~約20mg/kg、約1mg/kg~約10mg/kg、約10μg/kg~約10mg/kg、約10μg/kg~約5mg/kg、約10μg/kg~約2.5mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg

40

50

/ k g、約 6 m g / k g、約 7 m g / k g、約 8 m g / k g、約 9 m g / k g または約 10 m g / k g の用量で投与できる。具体的な実施形態では、慢性炎症性疾患を治療、抑制または予防するために T N F R 1 のアンタゴニストを隔週または月 1 回、約 10 μ g / k g ~ 約 10 m g / k g (例えば、約 10 μ g / k g、約 100 μ g / k g、約 1 m g / k g、約 2 m g / k g、約 3 m g / k g、約 4 m g / k g、約 5 m g / k g、約 6 m g / k g、約 7 m g / k g、約 8 m g / k g、約 9 m g / k g または約 10 m g / k g) の用量で投与する。

【 0 1 5 6 】

本明細書に記載の組成物を用いて実施した治療または療法は、治療前に存在するこのような症状と比較して、またはこのような組成物で治療しない個体 (ヒトまたはモデル動物) もしくは他の適切な対照のこのような症状と比較して、1 つまたは複数の症状が (例えば、少なくとも 10 % または臨床評価尺度の少なくとも 1 点) 低減した場合、「効果的」とであるとみなされる。症状は当然、標的の疾患または障害に応じて変わるが、熟練臨床医または専門家により測定できる。このような症状は、例えば、疾患または障害の 1 つまたは複数の生化学的指標レベル (例えば、疾患と関連する酵素または代謝産物レベル、患部細胞数等) をモニタリングすることにより、物理的徴候 (例えば、炎症、腫瘍サイズ等) をモニタリングすることにより、または承認された臨床評価尺度、例えば、拡大障害状態尺度 (多発性硬化症向け)、アービン炎症腸疾患質問票 (腸機能、全身症状、社会的機能および感情状態に関する生活の質を評価する 32 点評価、スコア範囲 32 ~ 224 点、スコアが高いほど良好な生活の質を示す)、生活の質関節リウマチ尺度、または当技術分野で知られている他の承認された臨床評価尺度により測定できる。疾患または障害症状の少なくとも 10 % または所与の臨床尺度の 1 点以上の持続した (例えば、1 日以上、またはより長い) 低減は、「効果的」治療の指標である。同様に、本明細書に記載の組成物を用いて実施した予防は、1 つまたは複数の症状の発現または重症度がこの組成物で治療しない類似した個体 (ヒトまたは動物モデル) のこのような症状と比較して遅延化、低減または根絶した場合、「効果的」である。

【 0 1 5 7 】

本発明によるアンタゴニストまたはその混合物を含む組成物を、哺乳動物内で選択する標的細胞集団の改変、不活性化、死滅化または除去を補助するための予防的および治療的処置において使用できる。加えて、本明細書に記載のポリペプチドの選択されたレパートリーは、細胞のヘテロ集団由来の標的細胞集団を死滅させる、枯渇させるかあるいは効果的に除去するために体外またはインビトロで選択的に使用できる。哺乳動物由来の血液は、体外でリガンドと組み合わせ、それによって標準的な技術に従い哺乳動物に戻すために血液中の望ましくない細胞を死滅させるかあるいは除去できる。

【 0 1 5 8 】

本発明によるアンタゴニストを含む組成物は、哺乳動物内で選択する標的細胞集団の改変、不活性化、死滅化または除去を補助する予防的および治療的処置において使用できる。

【 0 1 5 9 】

抗 T N F R 1 アンタゴニスト (例えば、d A b 単量体) は、1 つまたは複数の追加の治療薬または活性剤と共に投与およびまたは製剤化できる。アンタゴニスト (例えば、d A b) は、追加の治療薬と投与時、追加薬の投与前、投与と同時にまたは投与後に投与できる。一般的には、アンタゴニストと追加薬は、治療効果を重ねる方法で投与する。

【 0 1 6 0 】

本発明の方法または使用の一実施形態では、本発明による T N F R 1 のアンタゴニストの治療的有効量または投与量を、それらが必要な哺乳動物へ投与することを含む慢性炎症性疾患を治療、抑制、または予防する方法または使用を提供する。

【 0 1 6 1 】

本発明の方法または使用の一実施形態では、本発明による T N F R 1 のアンタゴニストの治療的有効量または投与量を、それらが必要な哺乳動物へ投与することを含む関節炎 (

10

20

30

40

50

例えば、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎）を治療、抑制、または予防する方法または使用を提供する。

【 0 1 6 2 】

本発明の方法または使用の一実施形態では、本発明による T N F R 1 のアンタゴニストの治療的有効量または投与量を、それらが必要な哺乳動物へ投与することを含む乾癬を治療、抑制、または予防する方法または使用を提供する。

【 0 1 6 3 】

本発明の方法または使用の一実施形態では、本発明による T N F R 1 のアンタゴニストの治療的有効量または投与量を、それらが必要な哺乳動物へ投与することを含む炎症腸疾患（例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎）を治療、抑制、または予防する方法または使用を提供する。

10

【 0 1 6 4 】

本発明の方法または使用の一実施形態では、本発明による T N F R 1 のアンタゴニストの治療的有効量または投与量を、それらが必要な哺乳動物へ投与することを含む慢性閉塞性肺疾患（例えば、慢性気管支炎、慢性閉塞気管支炎、気腫）を治療、抑制、または予防する方法または使用を提供する。

【 0 1 6 5 】

本発明の方法または使用の一実施形態では、本発明による T N F R 1 のアンタゴニストの治療的有効量または投与量を、それらが必要な哺乳動物へ投与することを含む肺炎（例えば、細菌性肺炎（ブドウ球菌性肺炎等））を治療、抑制、または予防する方法または使用を提供する。

20

【 0 1 6 6 】

本発明の方法または使用の一実施形態では、慢性閉塞性肺疾患、および肺炎に加えて他の肺疾患を治療、抑制、または予防する方法を提供する。本発明に従い治療、抑制または予防し得る他の肺疾患は、例えば、嚢胞性線維症および喘息（例えば、ステロイド耐性喘息）を含む。したがって、別の実施形態では、本発明は、本発明による T N F R 1 のアンタゴニストの治療的有効量または投与量を、それらが必要な哺乳動物へ投与することを含む肺疾患（例えば、嚢胞性線維症、喘息）を治療、抑制、または予防する方法または使用を提供する。

【 0 1 6 7 】

具体的な実施形態では、T N F R 1 のアンタゴニストは吸入（例えば、気管支内、鼻腔内または経口吸入、鼻腔内点滴）等の肺送達または全身送達（例えば、非経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下）で投与される。

30

【 0 1 6 8 】

本発明の方法または使用の一実施形態では、本発明による T N F R 1 のアンタゴニストの治療的有効量または投与量を、それらが必要な哺乳動物へ投与することを含む敗血性ショックを治療、抑制、または予防する方法または使用を提供する。

【 0 1 6 9 】

本発明のさらなる態様では、本発明によるポリペプチド、リガンド、d A b もしくは T N F R 1 のアンタゴニストならびに薬学的に許容可能なキャリア、希釈剤もしくは賦形剤を含む組成物を提供する。

40

【 0 1 7 0 】

さらに、本発明は、本発明によるポリペプチド、リガンド、d A b もしくは T N F R 1 のアンタゴニストまたは組成物を用いる疾患の治療方法を提供する。一実施形態では、疾患は癌または炎症性疾患、例えば関節リウマチ、喘息もしくはクローン病である。

【 0 1 7 1 】

本発明のさらなる態様では、本発明によるポリペプチド、単一可変ドメイン、リガンドもしくはアンタゴニストならびに薬学的に許容可能なキャリア、希釈剤もしくは賦形剤を含む組成物を提供する。

【 0 1 7 2 】

50

具体的な実施形態では、ポリペプチド、リガンド、単一可変ドメイン、アンタゴニストまたは組成物は吸入（例えば、気管支内、鼻腔内または経口吸入、鼻腔内点滴）等の肺送達または全身送達（例えば、非経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下）で投与される。

【0173】

本発明の1つの態様では、本発明によるポリペプチド、単一可変ドメイン（例えば、DOM10-53-616）、組成物、またはアンタゴニストを含む肺送達機器を提供する。この機器は、吸入器、または鼻腔内投与機器であってもよい。

【0174】

他の実施形態では、アンタゴニストは、ポリアルキレングリコール部分、血清アルブミンまたはこれらの断片のような半減期延長部分、トランスフェリン受容体またはそのトランスフェリン結合部分、もしくは体内で半減期を延長するポリペプチドのための結合部位を含む部分、をさらに含む。一部の実施形態では、半減期延長部分は、体内で半減期を延長するポリペプチドのための結合部位を含む部分である。このポリペプチドは、アフィボディ、SpAドメイン、LDL受容体クラスAドメイン、EGFドメイン、およびアビマーからなる群から選ばれる。

10

【0175】

他の実施形態では、半減期延長部分は、ポリエチレングリコール部分である。一実施形態では、アンタゴニストは、ポリエチレングリコール部分（任意選択として、部分の大きさが約20～約50kDa、任意選択として約40kDa直鎖、または分岐PEGである）に結合している本発明の単一可変ドメインを含む（成分として含有を選択してもよい）。dAbと結合部分のペグ化に関する詳細についてはWO04081026を参照されたい。一実施形態では、アンタゴニストはPEGに結合したdAb単量体から成る。ここで、dAb単量体は本発明による単一可変ドメインであり、DOM10-53-546（配列番号2）；DOM10-53-567（配列番号3）；DOM10-53-568（配列番号4）；ならびにDOM10-53-616（配列番号5）も任意に選択できる。このアンタゴニストは、炎症性疾患、肺疾患（例えば、喘息、インフルエンザ、COPD）、または癌の治療用に提供されるが、任意選択で静脈内投与用としてもよい。

20

【0176】

他の実施形態では、半減期延長部分は抗体または抗体断片（例えば、免疫グロブリン単一可変ドメイン）で、血清アルブミンまたは新生児Fc受容体のための結合部位を含む。

30

【0177】

また、本発明は、アンタゴニストおよび生理学的に受容可能なキャリアを含む組成物（例えば、医薬組成物）に関する。一部の実施形態では、組成物は、静脈内、筋肉内、腹腔内、動脈内、硬腔内、関節内、皮下投与、肺、鼻腔内、腔、直腸への投与、のための賦形剤を含む。

【0178】

また、本発明は、本発明の組成物（例えば、医薬組成物）を含む薬剤送達機器に関する。一部の実施形態では、薬剤送達機器は、複数の治療的有効量のアンタゴニストを含む。

【0179】

他の実施形態では、薬剤送達機器は、非経口送達機器、静脈内送達機器、筋肉内送達機器、腹腔内送達機器、経皮的送達機器、肺送達機器、動脈内送達機器、硬腔内送達機器、関節内送達機器、皮下送達機器、鼻腔内送達機器、腔送達機器、直腸内送達機器、注射器、経皮吸収機器、カプセル、タブレット、噴霧器、吸引器、霧吹き、エアロゾル投与器、噴霧器（ミスター）、ドライパウダー吸入器、定量吸入器、定量噴霧器、定量噴霧器（定量ミスター）、定量霧吹き、およびカテーテル、からなる群より選択される。

40

【0180】

本発明のアンタゴニストは、本明細書に記載されているようなフォーマットにすることができる。例えば、それは体内血清半減期を調整するフォーマットにできる。本明細書に記載されているように、必要に応じ、リガンドがさらに毒素、または毒素部分を含むことも可能である。一部の実施形態では、アンタゴニストは、フリーラジカル生成剤（例えば

50

、セレンウム含有毒素)または放射性核種等の表面活性毒素を含む。他の実施形態では、毒素、または毒素成分は、細胞内標的に対し結合特異性のある結合部位を有するポリペプチドドメイン(例えばdAb)である。特定の実施形態では、アンタゴニストは、TNFR1(例えば、ヒトTNFR1)に対する結合特異性を有するIgG様フォーマットである。

【0181】

1つの態様では、アンタゴニストは、本明細書に記載の抗TNFR1単一可変ドメインを含む融合タンパク質を提供する。可変ドメインは、例えばペプチドやポリペプチド、またはタンパク質と融合できる。一実施形態では、可変ドメインは、例えばモノクローナル抗体等の抗体、または抗体断片と融合する。一般的に、融合は、単一核酸配列から融合産物を発現させるか、または、単一可変ドメインを含むポリペプチドを発現させ、次いで従来技術を使って、このペプチドをより大きなタンパク質や抗体のフォーマットに組みあ

10

【0182】

一実施形態では、アンタゴニスト、または融合タンパク質は、抗体定常ドメイン、例えば、抗体Fcを含み、この場合、FcのN末端が本明細書に記載の抗TNFR1単一可変ドメインのC末端に結合(直接結合も任意選択できる)していることも任意に選択可能である。一実施形態では、アンタゴニスト、または融合タンパク質は、半減期延長部分、例えば、ポリエチレングリコール部分、血清アルブミンやその断片、トランスフェリン受容体やそのトランスフェリン結合部、または生体内半減期を延長するポリペプチドへの結合部位を含む抗体や抗体断片を含む。半減期延長部分は、血清アルブミン、または新生児Fc受容体に対する結合部位を含む抗体や抗体断片であってもよい。半減期延長部分は、dAb、抗体または抗体断片であってもよい。一実施形態では、アンタゴニスト、または融合タンパク質は、アンタゴニストや融合タンパク質に含まれる可変ドメインがさらに、ポリアルキレングリコール部分を含むように作られている。ポリアルキレングリコール部分は、ポリエチレングリコール部分であってもよい。これ以上のことは後で議論される。

20

【0183】

ここで、WO2006038027を参照するが、これは抗TNFR1免疫グロブリン単一可変ドメインを開示している。本文書の開示はその全体が本明細書に組み込まれ、特に使用、フォーマット、選択方法、製造法、製剤化方法、および抗TNFR単一可変ドメイン、リガンド、アンタゴニスト等のアッセイを提供する。これにより、これらの開示が、本明細書の特許請求の範囲に組み込まれる明確な記述を与えることを含め、本発明の内容に具体的かつ明確に適用できる。

30

【0184】

本発明の抗TNFR1アンタゴニストは免疫グロブリン単一可変ドメインであり、任意選択として、ヒト可変ドメインであっても、またはヒトフレームワーク領域(例えばDP47またはDPK9フレームワーク領域)を含むか、もしくは、それから派生した可変ドメインである。特定の実施形態では、本明細書記載の可変ドメインはユニバーサルフレームワークを基準にしている。

40

【0185】

特定の実施形態では、TNFR1に対して結合特異性のある結合部位を有するポリペプチドドメイン(例えば、免疫グロブリン単一可変ドメイン)は、凝集、折り畳み可逆性に抵抗する(WO04101790を参照されたい。この教示は参照により本明細書に組み込まれる)。

【0186】

核酸分子、ベクターおよび宿主細胞

また、本発明は、本明細書記載のアンタゴニストをコードする単離された、および/または、組換え型の核酸分子を提供する。

【0187】

1つの態様では、本発明は、免疫グロブリン単一可変ドメインを含む本発明に従ったア

50

ンタゴニストをコードする単離、または組換え型核酸を提供する。一実施形態では、核酸はDOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-162またはDOM1h-574-180を含む。一実施形態では、核酸はDOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-132、DOM1h-574-135、DOM1h-574-138、DOM1h-574-162またはDOM1h-574-180のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸はDOM1h-574-109、DOM1h-574-93、DOM1h-574-123、DOM1h-574-125、DOM1h-574-126またはDOM1h-574-129、DOM1h-574-133、DOM1h-574-137またはDOM1h-574-160のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸はDOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-125、DOM1h-574-126、DOM1h-574-133、DOM1h-574-135またはDOM1h-574-138、DOM1h-574-139、DOM1h-574-155、DOM1h-574-162またはDOM1h-574-180のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸はDOM1h-574-126またはDOM1h-574-133のヌクレオチド配列を含む。

【0188】

1つの態様では、本発明は単離された、または本発明のアンタゴニストをコードする組換え型核酸を提供し、ここで核酸はDOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-162またはDOM1h-574-180のヌクレオチド配列に対し少なくとも80、85、90、95、98または99%等しいヌクレオチド配列を含み、また、核酸が、TNFR1に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを含むポリペプチドをコードする。1つの態様では、本発明は本発明のアンタゴニストをコードする単離された、または組換え型核酸を提供し、ここで核酸はDOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-132、DOM1h-574-135、DOM1h-574-138、DOM1h-574-162またはDOM1h-574-180のヌクレオチド配列に対し少なくとも80、85、90、95、98または99%等しいヌクレオチド配列を含み、また、核酸が、TNFR1に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを含むポリペプチドをコードする。1つの態様では、本発明は本発明のアンタゴニストをコードする単離された、または組換え型核酸を提供し、ここで核酸はDOM1h-574-109、DOM1h-574-93、DOM1h-574-123、DOM1h-574-125、DOM1h-574-126またはDOM1h-574-129、DOM1h-574-133、DOM1h-574-137またはDOM1h-574-160のヌクレオチド配列に対し少なくとも80、85、90、95、98または99%等しいヌクレオチド配列を含み、また、核酸が、TNFR1に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを含むポリペプチドをコードする。1つの態様では、本発明は本発明のアンタゴニストをコードする単離された、または組換え型核酸を提供し、ここで核酸はDOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-125、DOM1h-574-126、DOM1h-574-133、DOM1h-574-135またはDOM1h-574-138、DOM1h-574-139、DOM1h-574-155、DOM1h-574-162またはDOM1h-574-180のヌクレオチド配列に対し少なくとも80、85、90、95、98または99%等しいヌクレオチド配列を含み、また、核酸が、TNFR1に

10

20

30

40

50

特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを含むポリペプチドをコードする。

【0189】

1つの態様では、本発明は、本発明の核酸を含むベクターを提供する。1つの態様では、本発明は、本発明の核酸、またはベクターを含む宿主細胞を提供する。本発明のアンタゴニストを含むポリペプチドを産生する方法および核酸またはベクターの発現に適切な条件下で宿主細胞を維持し、それにより免疫グロブリン単一可変ドメインを含むアンタゴニストポリペプチドが産生される方法が提供される。任意選択として、この方法がさらにポリペプチドを単離するステップを含み、また、任意選択として、標準的MRC5、L929またはカニクイザルKIAッセイにおいて、単離ポリペプチドよりも改善された親和性(KD)やTNFR1中和のND₅₀を有する変異体(例えば突然変異体)を産生するステップを含む。

10

【0190】

本明細書で「単離された」と呼んでいる核酸は、それらの元(例えば、細胞中に、またはライブラリのように核酸の混合物中にある状態)のゲノムDNAまたは細胞性DNAの核酸から分離された核酸であり、本明細書に記載された方法、または他の適切な方法により得られた核酸を含み、また、本質的に純粋な核酸、化学的合成により作られた核酸、生物学的・化学的方法の組み合わせにより作られた核酸、および単離された組換え型核酸(例えば、Daugherty, B. L. et al., Nucleic Acid Res., 19(9): 2471-2476 (1991); Lewis, A. P. and J. S. Crowe, Gene, 101: 297-302 (1991)を参照のこと)を含む。

20

【0191】

本明細書で「組換え型」と呼んでいる核酸は、組換えDNA手法により作られた核酸であり、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)および/または制限酵素を使ってベクターにクローニングする等の人工組換え法による手順により生成した核酸を含む。

【0192】

特定の実施形態では、単離された、および/または組換え型核酸は本明細書に記載されたアンタゴニストをコードするヌクレオチド配列を含み、アンタゴニストの、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%、のアミノ酸配列が本明細書で開示のTNFR1に結合するdAbのアミノ酸配列、例えば、DOM1h-574-156、DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-162またはDOM1h-574-180に等しい。ヌクレオチド配列の同一性は、選択したTNFR1dAbをコードするヌクレオチド配列全長にわたり決定可能である。

30

【0193】

また、本発明は、本発明の組換え型核酸分子を含むベクターを提供する。特定の実施形態では、ベクターは発現ベクターであり、本発明の組換え型核酸に機能的に連結された1つまたは複数の発現制御因子、または配列を含む。また、本発明は、本発明の組換え型核酸分子、またはベクターを含む組換え型宿主細胞を提供する。適切なベクター(例えば、プラスミド、ファージミド)、発現制御因子、宿主細胞および本発明の組換え型宿主細胞を産生する方法は当技術分野においてよく知られており、実施例を本明細書で詳述する。

40

【0194】

適切な発現ベクターはいくつかの成分、例えば、複写起点、選択可能なマーカー遺伝子、1つもしくは複数の発現制御因子、転写調節因子(例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター)、ならびに/または1つもしくは複数の翻訳シグナル、シグナル配列、またはリーダー配列、等を含むことが可能である。発現制御因子およびシグナル配列は、存在する場合、ベクターまたは他の供給源により提供できる。例えば、抗体鎖をコードするクローン核酸の転写、および/または翻訳調節配列は直接発現に使用できる。

50

【0195】

プロモーターは所望の宿主細胞での発現に供することができる。プロモーターは構成型であっても誘導型であってもよい。例えば、プロモーターは、抗体、抗体鎖、またはこれらの一部をコードする核酸に機能的に連結されていて、核酸を直接転写することができる。種々の適切なプロモーターが、原核生物宿主用（例えば、大腸菌用 *lac*、*tac*、*T3*、*T7* プロモーター）および真核生物宿主用（例えば、サルウイルス 40 の初期や後期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス末端反復プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター）として入手可能である。

【0196】

さらに、通常、発現ベクターはベクターを持っている宿主細胞を選別するために選択可能なマーカーを含み、さらに複製可能な発現ベクターの場合には、複製起点を含む。抗生物質耐性や薬剤耐性を与える産物をコードする遺伝子は、よく用いられる選択マーカーであり、原核生物細胞（例えば、ラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン耐性）、）テトラサイクリン耐性用 *Tet* 遺伝子）および真核生物細胞（例えば、ネオマイシン（*G418* やジェネテシン）、*gpt*（ミコフェノール酸）、アンピシリン、またはハイグロマイシン耐性遺伝子）で使用する。ジヒドロ葉酸還元酵素マーカー遺伝子は、多様な宿主中のメトトレキサートの選択を可能とする。宿主の栄養要求性マーカー（例えば、*LEU2*、*URA3*、*HIS3*）は、酵母の選択マーカーとして使われることが多い。ウイルスベクター（例えば、バキュロウイルス）、またはファージベクターの使用、および、レトロウイルスベクターのような宿主細胞のゲノムへ統合可能なベクターの使用もまた意図されているものである。哺乳動物細胞および原核生物細胞（大腸菌）、昆虫細胞（ショウジョウバエ *Schnieder S2* 細胞、*Sf9*）および酵母（*P. methanolicus*、*P. pastoris*、*S. cerevisiae*）での発現に適切な発現ベクターは、当技術分野においてよく知られている。

【0197】

適切な宿主細胞は、大腸菌、枯草菌等の細菌性細胞、および/または他の適切な細菌を含む原核生物細胞であってもよく、また、真菌細胞や酵母細胞（例えば、*Pichia pastoris*、*Aspergillus* sp.、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Neurospora crassa*）、または他の下等真核細胞および昆虫由来（例えば、ショウジョウバエ *Schnieder S2* 細胞、*Sf9* 昆虫細胞（*WO94/26087*（*O'Connor*））のような高等真核生物、哺乳動物（例えば、*COS-1*（*ATCC* 寄託番号 *CRL-1650*）および *COS-7*（*ATCC* 寄託番号 *CRL-1651*）等のコス細胞、*CHO*（例えば、*ATCC* 寄託番号 *CRL-9096*、*CHODG44*（*Urlaub, G. and Chasin, L.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(7):4216-4220 (1980)*）、*293*（*ATCC* 寄託番号 *CRL-1573*）、*HeLa*（*ATCC* 寄託番号 *CCL-2*）、*CV1*（*ATCC* 寄託番号 *CCL-70*）、*WOP*（*Dailey, L., et al., J. Virol., 54:739-749 (1985)*）、*3T3*、*293T*（*Pear, W. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:8392-8396 (1993)*）*NS0* 細胞、*SP2/0*、*HuT 78* 細胞等、または植物（例えば、たばこ）を含む真核生物細胞であってもよい。（例えば、*Ausubel, F.M. et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc. (1993)*を参照のこと）。一部の実施形態では、宿主細胞は単離された宿主細胞であり、多細胞生物（例えば、植物または動物）の一部ではない。特定の実施形態では、宿主細胞は非ヒト宿主細胞である。

【0198】

また、本発明は、組換え核酸の発現に適切な条件下で、本発明の組換え核酸を含む組換

10

20

30

40

50

え宿主細胞の維持を含み、本発明のアンタゴニストの製造法を提供する。これにより、組換え核酸が発現し、アンタゴニストが産生される。一部の実施態様では、この方法がさらにアンタゴニストの単離を含む。

【0199】

本発明の実施形態に適用可能な開示詳細に関しては、WO2006038027を参照されたい。例えば、関連開示は、免疫グロブリン単一可変ドメインベースリガンドの調製、ライブラリベクターシステム、ライブラリ構築、単一可変ドメインの結合、リガンドの特性決定、リガンドの構造、骨格、タンパク質足場、基準の配列の多様性、アッセイおよび治療と診断用組成物とその使用法、ならびに定義「機能的に連結された」、「ナイプ」、「予防」、「抑制」、「治療」、「効果的」および「治療的有效量」に関する。

10

【0200】

フォーマット

半減期の延長は、免疫グロブリンの生体内適用において有用である。サイズが小さい抗体では特に、また、抗体断片では殊更に有用である。このような断片(F_{vs} 、ジスルフィド結合 F_{vs} 、 F_{ab} 、 scF_{vs} 、 dAb)は身体から急速な除去作用を受ける。このように、それが身体の大抵の部分に早く到達できて、素早く産生でき、容易に扱えても、生体内での短い持続性だけのためにその生体内での適用には、限界があった。本発明の一実施態様では、体内でのリガンドの半減期延長、および、その結果、体内でのアンタゴニストの機能活性のより長い持続時間を提供することによりこの問題が解決されている。

20

【0201】

薬物動態解析およびリガンドの半減期の測定方法は当業者によく知られている。詳細については、Kenneth, et al: Chemical Stability of Pharmaceuticals: Handbook for PharmacistsおよびPeters et al, Pharmacokinetic analysis: Practical Approach (1996)で見られるであろう。また、 $t_{\alpha}(t)$ 、 $t_{\beta}(t)$ 半減期、曲線下面積(AUC)等の薬物動態パラメーターについて記述されている次の文献を参照のこと: "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, published by Marcel Dekker, 改訂第2版(1982)。半減期およびAUCの定義を上に表示する。

30

【0202】

一実施形態では、本発明は、15分以上の範囲の $t_{1/2}$ 半減期を有する本発明によるアンタゴニストまたはアンタゴニストを含む組成物を提供する。一実施態様では、前記範囲の下端が30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、10時間、11時間、または12時間である。さらに追加して、または、その代わりに、本発明によるアンタゴニストまたは組成物は、12時間までの範囲の $t_{1/2}$ 半減期を有することになる。一実施形態では、前記範囲の上端が11、10、9、8、7、6、または5時間である。適切な範囲の実施例は、1~6時間、2~5時間、または3~4時間である。

【0203】

一実施形態では、本発明は、本発明による約2.5時間以上の範囲の $t_{1/2}$ 半減期を有するアンタゴニストまたはアンタゴニストを含む組成物を提供する。一実施態様では、前記範囲の下端が約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約10時間、約11時間、または約12時間である。一実施形態では、さらに追加して、またはその代わりに、本発明によるアンタゴニストまたは組成物が21日までの範囲の $t_{1/2}$ 半減期を有する。一実施形態では、前記範囲の上端が約12時間、約24時間、約2日、約3日、約5日、約10日、約15日、または約20日である。一実施形態では、本発明に従ってアンタゴニストまたは組成物は、約12~約60時間の範囲の $t_{1/2}$ 半減期を有する。さらなる実施形態では、その範囲は、約12~48時間の範囲である。またさらなる実施形態では、その範囲は12~26時間の範囲である。

40

【0204】

50

上記基準に追加して、またはその代わりに、本発明は、本発明に従って約 1 mg/ml 以上の範囲の AUC 値（曲線下面積）を有するアンタゴニストまたは組成物を提供する。一実施形態では、前記範囲の下端が約 5、約 10、約 15、約 20、約 30、約 100、約 200、約 300 $\text{mg} \cdot \text{min/ml}$ である。追加して、またはその代わりとして、本発明によるアンタゴニストまたは組成物が約 600 $\text{mg} \cdot \text{min/ml}$ までの範囲の AUC を有する。一実施形態では、前記範囲の下端が約 5、約 10、約 15、約 20、約 30、約 100、約 200、または約 300 $\text{mg} \cdot \text{min/ml}$ である。追加して、またはその代わりとして、本発明に従ってアンタゴニストまたは組成物は、600 $\text{mg} \cdot \text{min/ml}$ までの範囲の AUC を有する。一実施形態では、前記範囲の上端が約 500、約 400、約 300、約 200、約 150、約 100、約 75、または約 50 $\text{mg} \cdot \text{min/ml}$ である。一実施形態では、本発明によるアンタゴニストは、下記の事項からなる群から選ばれた範囲の AUC を有する：約 15 ~ 約 100 $\text{mg} \cdot \text{min/ml}$ 、約 15 ~ 約 75 $\text{mg} \cdot \text{min/ml}$ 、約 15 ~ 約 50 $\text{mg} \cdot \text{min/ml}$ 。

【0205】

本発明のポリペプチドと dAb、およびこれらを含むアンタゴニストは、例えば、PRG 基、血清アルブミン、トランスフェリン、トランスフェリン受容体または少なくともそのトランスフェリン結合部、抗体 F_c ドメインの付加により、または、抗体ドメインへの接合により、さらに大きな流体力学的サイズを持つようにフォーマットすることが可能である。例えば、より大きな抗体の抗原結合断片として、または抗体（例えば、Fab、Fab'、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 、IgG、scFv としてフォーマットされた）としてフォーマットされたポリペプチド dAb およびアンタゴニスト。

【0206】

本発明のアンタゴニスト（例えば、dAb 単量体、マルチマー）の流体力学的サイズは、当技術分野においてよく知られた方法により求めることができる。例えば、ゲル濾過クロマトグラフィーを使ってアンタゴニストの流体力学的サイズを求めてもよい。架橋アガロースマトリックスのような流体力学的サイズ測定に適したゲル濾過マトリックスはよく知られ、容易に入手可能である。

【0207】

アンタゴニストリガンドフォーマットのサイズ（例えば、dAb に結合した PEG 部分のサイズ）は所望の用途に依存して変わり得る。例えば、リガンドが血液循環から抜け出て周辺細胞組織に入ることが意図されている場合、流体力学的サイズを小さく保ち、血流からの溢出を促進する。あるいは、リガンドを体循環中に長時間残すことが望まれる場合は、例えば Ig 様タンパク質としてフォーマットすることにより、リガンドサイズを増やすことが可能である。

【0208】

生体内で半減期を延長する抗原またはエピトープを標的にすることによる半減期の延長
本明細書に記載されているように、本発明の TNFR1 結合ポリペプチド、dAb、またはアンタゴニストを、生体内で半減期を延長する抗原とエピトープを結合した結合ドメイン（例えば、抗体または抗体断片）に接合または会合させることにより、アンタゴニストリガンドの流体力学的サイズおよびその血清中半減期も増加させることができる。例えば、TNFR1 結合薬剤（例えばポリペプチド）は、抗血清アルブミンや抗新生児 F_c 受容体抗体または抗体断片、例えば抗 SA または抗新生児 F_c 受容体 dAb、Fab、Fab' または scFv に、あるいは、抗 SA アフィボディまたは抗新生児 F_c 受容体アフィボディ、または抗 SA アビマー、または、これに限定されるものではないが、以下に示す群から選択された足場を含む抗 SA 結合ドメインへ接合または結合することができる：CTLA-4、リポカリン、DpA、アフィボディ、アビマー、GroEl およびフィブロネクチン（これらの結合ドメインの開示については、WO2008096158 を参照されたい。ここに示されたドメインと配列は参照により本明細書に組み込まれ、本明細書の開示の一部を形成する）。接合とは、血清アルブミンに結合した結合ドメインに結合（共有結合的あるいは非共有結合的に）した本発明のポリペプチド、dAb、またはアン

タゴニストを含む組成物を指す。

【0209】

生体内での血清中半減期を延長する適切なポリペプチドには、例えば、トランスフェリン受容体特異的なリガンド神経医薬剤融合タンパク質（米国特許第5,977,307号を参照されたい。この中の教示は参照により本明細書に組み込まれる）、脳毛細血管内皮細胞受容体、トランスフェリン、トランスフェリン受容体（例えば、可溶性トランスフェリン受容体）、インシュリン、インシュリン様成長因子1（IGF1）受容体、インシュリン様成長因子2（IGF2）受容体、インシュリン受容体、血液凝固第X因子、1抗トリプシン、およびHNF1が含まれる。さらに、血清中半減期を延長する適切なポリペプチドには、1糖タンパク質（オロソムコイド；AAG）、1アンチキモトリプシン（ACT）、1ミクログロブリン（タンパク質HC；AIM）、アンチトロンビンI（ATI）、アポリポタンパク質A-1（ApoA-1）、アポリポタンパク質B（ApoB）、セルロプラスミン（Cp）、補体成分C3（C3）、補体成分C4（C4）、C1エステラーゼ阻害剤（C1INH）、C反応性タンパク質（CRP）、フェリチン（FER）、ヘモペキシン（HPX）、リポタンパク質（a）（Lp（a））、マンノース結合タンパク質（MBP）、ミオグロビン（Myo）、プレアルブミン（トランスチレチン；PAL）、レチノール結合タンパク質（RMP）、およびリユーマチ因子（RF）が含まれる。

10

【0210】

細胞外マトリックスからの適切なタンパク質には、例えば、コラーゲン、ラミニン、インテグリン、およびフィブロネクチンが含まれる。コラーゲンは、細胞外マトリックスの主要タンパク質である。約15の型のコラーゲン分子が現在知られており、身体の別々の部位で見ついている。例えば、骨、皮膚、腱、靱帯、角膜、内臓器官で見つかったI型コラーゲン（身体コラーゲンの90%に達する）または、軟骨、椎間板、脊索、および眼球ガラス体液で見つかったII型コラーゲン。

20

【0211】

血液からの適切なタンパク質には、例えば、血漿タンパク質（例えば、フィブリン、2マクログロブリン、血清アルブミン、フィブリノゲン（例えば、フィブリノゲンA、フィブリノゲンB）血清アミロイドタンパク質A、ハプトプロビン、プロフィリン、ユビキチン、）、ウテログロブリンおよび2ミクログロブリン）、酵素および酵素阻害剤（例えば、プラスミノゲン、リゾチーム、シスタチンC、1抗トリプシンおよび膵臓トリプシン阻害剤）、免疫グロブリンタンパク質（例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、免疫グロブリン軽鎖（/））等の免疫システムタンパク質、輸送タンパク質（例えば、レチノール結合タンパク質、1ミクログロブリン）、ディフェンシン（例えば、ディフェンシン1、好中球ディフェンシン1、好中球ディフェンシン2、および好中球ディフェンシン3）等が含まれる。

30

【0212】

血液脳関門または神経組織で認められる適切なタンパク質には、例えば、メラノコルチン受容体、ミエリン、アスコルビン酸塩トランスポーター等が含まれる。

【0213】

また、生体内での血清中半減期を延長する適切なポリペプチドには、腎臓に局在化したタンパク質（例えば、ポリシスチン、IV型コラーゲン、有機アニオン輸送体K1、ハイマン抗原）、肝臓に局在化したタンパク質（例えば、アルコール脱水素酵素、G250）、肺に局在化したタンパク質（例えば、IgAに結合する分泌成分）、心臓に局在化したタンパク質（例えば、拡張型心筋症に関連したHSP27）、皮膚に局在化したタンパク質（例えば、ケラチン）、形質転換増殖因子スーパーファミリータンパク質（骨形成活性（例えば、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8）を示す）のサブセットである形態形成タンパク質（BMP）等の骨特異的タンパク質、腫瘍特異性タンパク質（例えば、トロホブラスト抗原、ハーセプチン受容体、エストロゲン受容体、カテプシン（例えば、肝臓と脾臓で認められるカテプシンB））が含まれる。

40

50

【0214】

適切な疾患特異性タンパク質には、例えば、LAG-3（リンパ球活性化遺伝子）、オステオプロテジェリンリガンド（OPGL；Nature 402, 304-309（1999）参照）、OX40（TNF受容体ファミリーのメンバーで、活性化T細胞上で発現しヒトT細胞白血病ウイルスI型（HTLV-I）産生細胞中で特異的に発現上昇している；Immunol. 165（1）：263-70（2000）参照）を含む活性T細胞上にのみ発現する抗原が含まれる。また、適切な疾患特異性タンパク質には、例えば、ショウジョウバエCG6512、ヒトパラブレギン、ヒトFtsH、ヒトAFG3L2、ネズミftsHを含む金属プロテアーゼ（関節炎／癌に関連）；を含む血管新生増殖因子、酸性線維芽細胞増殖因子（EGF-1）、塩基性線維芽細胞増殖因子（EGF-2）、血管内皮増殖因子／血管透過性因子（VEGF／VPF）、形質転換増殖因子（TGF）、腫瘍壊死因子（TNF）、アンギオジェニン、インターロイキン-3（IL-3）、インターロイキン-8（IL-8）、血小板由来内皮細胞増殖因子（PD-ECGF）、胎盤増殖因子（PLGF）、ミッドカイン血小板由来増殖因子BB（PDGF）、およびフラクタルカインも含まれる。

10

【0215】

また、生体内での血清中半減期を延長する適切なポリペプチドには、熱ショックタンパク質（HSP）のようなストレスタンパク質も含まれる。HSPは、通常は、細胞内で見つかる。それが細胞外で見つかる場合は、細胞が死滅し内容物をはき出したという指標になる。このプログラムにない細胞の死（壊死）は外傷、疾患、傷害のとき起こり、細胞外HSPは免疫系からの反応を誘発する。細胞外HSPに対する結合により本発明の組成物の疾患部位への局在化が生じる可能性がある。

20

【0216】

F_c輸送にかかわる適切なタンパク質には、例えば、Brambell受容体（FcRBとしても知られている）が含まれる。このFc受容体は送達に潜在的に有用な2つの機能を有する。その機能は（1）胎盤経路で母から子供へIgGの移送、（2）IgGの分解からの保護と、その結果の血清中半減期の延長、である。受容体はエンドソームからIgGを再生利用すると考えられている。（Holliger et al, Nat Biotechnol 15（7）：632-6（1997）参照）。

30

【0217】

血清アルブミンに結合するdAb

一実施形態で本発明は、TNFR1に結合したアンタゴニスト（例えば、抗TNFR1 dAb（第一のdAb）を含む二重特異性リガンド）および血清アルブミン（SA）に結合した第二のdAbを提供し、第二のdAbが表面プラズモン共鳴で測定したKD値の、約1 nM～約1、約2、約3、約4、約5、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約100、約200、約300、約400、もしくは約500 μM（すなわち、 $\times 10^{-9}$ ～ 5×10^{-4} M）、または、約100 nM～約10 μM、または、約1～約5 μM、または、約3～約70 nM、または、約10 nM～約1、約2、約3、約4、もしくは約5 μMでSAに結合している。例えば、表面プラズモン共鳴により測定して約30～約70 nMである。一実施形態では、第一のdAb（またはdAb単量体）はSA（例えば、HSA）と表面プラズモン共鳴で測定したKD値の約1、約50、約70、約100、約150、約200、約300 nM、または、約1、約2、もしくは約3 μMで結合している。一実施形態では、第一の抗SA dAbと第二のTNFR1対応dAbを含む二重特異性リガンドに関して、第二のdAbのその標的に対する親和性（例えば、BIAcore等を使って表面プラズモン共鳴で測定したKDおよび／またはK_d）が、SAに対する第一のdAbの親和性の約1～約1000000倍（例えば、約1000～約1000000、または約1000～1000000、または約100000～100000000倍）である。一実施形態では、血清アルブミンは、ヒト血清アルブミン（HSA）である。例えば、第一のdAbはSAと約10 μMの親和性で結合し、他方第二のdAbはその標的と約100 pMの親和性で結合する。一実施形態では、清アルブミンは、ヒト血

40

50

清アルブミン (HSA) である。一実施形態では、第一の dAb は SA (例えば HSA) と KD 値約 50、例えば、約 70、約 100、約 150、または約 200 nM で結合する。二重特異性リガンドの詳細については、WO 03 002 609、WO 04 003 019、WO 2008 096 158 および WO 04 058 821 で見つけることができる。

【0218】

一実施形態で、本発明のアンタゴニストリガンドは、表面プラズモン共鳴で測定して KD 値約 1 nM ~ 約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 10、約 20、約 30、約 40、約 50、約 60、約 70、約 100、約 200、約 300、約 400、または約 500 μ M (すなわち、 $\times 10^{-9}$ ~ 5×10^{-4} M)、または、約 100 nM ~ 約 10 μ M、または、約 1 ~ 約 5 μ M、または、約 3 ~ 約 70 nM、または、約 10 nM ~ 約 1、約 2、約 3、約 4、約 5 μ M で血清アルブミン (SA) と結合している dAb を含む。例えば、表面プラズモン共鳴で測定して約 30 ~ 約 70 nM である。一実施形態では、第一の dAb (または dAb 単量体) は、表面プラズモン共鳴で測定して KD 値約 1、約 50、約 70、約 100、約 150、約 200、約 300 nM または約 1、約 2 または約 3 μ M で SA (例えば、HSA) と結合する。一実施形態では、第一および第二の dAb はリンカー、例えば 1 ~ 4 アミノ酸、または 1 ~ 3 のアミノ酸、または 3 を超えるアミノ酸、4、5、6、7、8、9、10、15、または 20 を超えるアミノ酸のリンカー、で結合されている。一実施形態では、より長いリンカー (アミノ酸が 3 を超える) が有効性 (アンタゴニストの 1 つあるいは両方の dAb の KD) を高めるために使われる。

【0219】

アンタゴニストの具体的な実施形態では、dAb はヒト血清アルブミンに結合し、以下からなる群から選択された dAb とアルブミンへの結合において競合する：DOM7h-11、DOM7h-11-3、DOM7h-11-12、DOM7h-11-15、DOM7h-14、DOM7h-14-10、DOM7h-14-18 および DOM7m-16。

【0220】

アンタゴニストの具体的な実施形態では、dAb はヒト血清アルブミンに結合し、以下からなる群から選択された dAb とアルブミンへの結合において競合する：

MSA-16、MSA-26 (この配列の開示については WO 04 003 019 参照。この配列と対応する核酸は参照により本明細書に組み込まれ、本明細書の開示の一部を構成する)、DOM7m-16 (配列番号 473)、DOM7m-12 (配列番号 474)、DOM7m-26 (配列番号 475)、DOM7r-1 (配列番号 476)、DOM7r-3 (配列番号 477)、DOM7r-4 (配列番号 478)、DOM7r-5 (配列番号 479)、DOM7r-7 (配列番号 480)、DOM7r-8 (配列番号 481)、DOM7h-2 (配列番号 482)、DOM7h-3 (配列番号 483)、DOM7h-4 (SEQ ID NO: 484)、DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485)、DOM7h-1 (SEQ ID NO: 486)、DOM7h-7 (配列番号 487)、DOM7h-22 (配列番号 489)、DOM7h-23 (配列番号 490)、DOM7h-24 (配列番号 491)、DOM7h-25 (配列番号 492)、DOM7h-26 (配列番号 493)、DOM7h-21 (配列番号 494)、DOM7h-27 (配列番号 495)、DOM7h-8 (配列番号 496)、DOM7r-13 (配列番号 497)、DOM7r-14 (配列番号 498)、DOM7r-15 (配列番号 499)、DOM7r-16 (配列番号 500)、DOM7r-17 (配列番号 501)、DOM7r-18 (配列番号 502)、DOM7r-19 (配列番号 503)、DOM7r-20 (配列番号 504)、DOM7r-21 (配列番号 505)、DOM7r-22 (配列番号 506)、DOM7r-23 (配列番号 507)、DOM7r-24 (配列番号 508)、DOM7r-25 (配列番号 509)、DOM7r-26 (配列番号 510)、DOM7r-27 (配列番号 511)、DOM7r-28 (配列番号 512)、DOM7r-29 (配列番号 513)、DOM7r-30 (配列番号 514)、DOM7r-31 (配列番号 515)、DOM7r-32 (配列番号 516)、DOM7r-33 (配列番号 517) (この配列

10

20

30

40

50

の開示についてはW O 2 0 0 7 0 8 0 3 9 2 参照。この配列と対応する核酸は参照により本明細書に組み込まれ、本明細書の開示の一部を構成する。本項の配列番号はW O 2 0 0 7 0 8 0 3 9 2 中に記載されている)、

d A b 8 (d A b 1 0)、d A b 1 0、d A b 3 6、d A b 7 r 2 0 (D O M 7 r 2 0)、d A b 7 r 2 1 (D O M 7 r 2 1)、d A b 7 r 2 2 (D O M 7 r 2 2)、d A b 7 r 2 3 (D O M 7 r 2 3)、d A b 7 r 2 4 (D O M 7 r 2 4)、d A b 7 r 2 5 (D O M 7 r 2 5)、d A b 7 r 2 6 (D O M 7 r 2 6)、d A b 7 r 2 7 (D O M 7 r 2 7)、d A b 7 r 2 8 (D O M 7 r 2 8)、d A b 7 r 2 9 (D O M 7 r 2 9)、d A b 7 r 2 9 (D O M 7 r 2 9)、d A b 7 r 3 1 (D O M 7 r 3 1)、d A b 7 r 3 2 (D O M 7 r 3 2)、d A b 7 r 3 3 (D O M 7 r 3 3)、d A b 7 r 3 3 (D O M 7 r 3 3)、
d A b 7 h 2 2 (D O M 7 h 2 2)、d A b 7 h 2 3 (D O M 7 h 2 3)、d A b 7 h 2 4 (D O M 7 h 2 4)、d A b 7 h 2 5 (D O M 7 h 2 5)、d A b 7 h 2 6 (D O M 7 h 2 6)、d A b 7 h 2 7 (D O M 7 h 2 7)、d A b 7 h 3 0 (D O M 7 h 3 0)、d A b 7 h 3 1 (D O M 7 h 3 1)、d A b 2 (d A b s 4、7、4 1)、d A b 4、d A b 7、d A b 1 1、d A b 1 2 (d A b 7 m 1 2)、d A b 1 3 (d A b 1 5)、d A b 1 5、d A b 1 6 (d A b 2 1、d A b 7 m 1 6)、d A b 1 7、d A b 1 8、d A b 1 9、d A b 2 1、d A b 2 2、d A b 2 3、d A b 2 4、d A b 2 5 (d A b 2 6、d A b 7 m 2 6)、d A b 2 7、d A b 3 0 (d A b 3 5)、d A b 3 1、d A b 3 3、d A b 3 4、d A b 3 5、d A b 3 8 (d A b 5 4)、d A b 4 1、d A b 4 6 (d A b s 4 7、5 2 and 5 6)、d A b 4 7、d A b 5 2、d A b 5 3、d A b 5 4、d A b 5 5、
d A b 5 6、d A b 7 m 1 2、d A b 7 m 1 6、d A b 7 m 2 6、d A b 7 r 1 (D O M 7 r 1)、d A b 7 r 3 (D O M 7 r 3)、d A b 7 r 4 (D O M 7 r 4)、d A b 7 r 5 (D O M 7 r 5)、d A b 7 r 7 (D O M 7 r 7)、d A b 7 r 8 (D O M 7 r 8)、d A b 7 r 1 3 (D O M 7 r 1 3)、d A b 7 r 1 4 (D O M 7 r 1 4)、d A b 7 r 1 5 (D O M 7 r 1 5)、d A b 7 r 1 6 (D O M 7 r 1 6)、d A b 7 r 1 7 (D O M 7 r 1 7)、d A b 7 r 1 8 (D O M 7 r 1 8)、d A b 7 r 1 9 (D O M 7 r 1 9)、d A b 7 h 1 (D O M 7 h 1)、d A b 7 h 2 (D O M 7 h 2)、d A b 7 h 6 (D O M 7 h 6)、d A b 7 h 7 (D O M 7 h 7)、d A b 7 h 8 (D O M 7 h 8)、d A b 7 h 9 (D O M 7 h 9)、d A b 7 h 1 0 (D O M 7 h 1 0)、d A b 7 h 1 1 (D O M 7 h 1 1)、d A b 7 h 1 2 (D O M 7 h 1 2)、d A b 7 h 1 3 (D O M 7 h 1 3)、d A b 7 h 1 4 (D O M 7 h 1 4)、d A b 7 p 1 (D O M 7 p 1)、およびd A b 7 p 2 (D O M 7 p 2) (この配列の開示についてはW O 2 0 0 8 0 9 6 1 5 8 参照。この配列と対応する核酸は参照により本明細書に組み込まれ、本明細書の開示の一部を構成する)。代替名をd A bの後に括弧で示している。例えば、d A b 8には代替名d A b 1 0があり、表記はd A b 8 (d A b 1 0)となる。

【 0 2 2 1 】

特定の実施形態では、d A bはヒト血清アルブミンに結合し、そのアミノ酸配列の少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%が、下記からなる群から選択されたd A bのアミノ酸配列と同等性を有するアミノ酸配列を含む：D O M 7 h - 1 1、D O M 7 h - 1 1 - 3、D O M 7 h - 1 1 - 1 2、D O M 7 h - 1 1 - 1 5、D O M 7 h - 1 4、D O M 7 h - 1 4 - 1 0、D O M 7 h - 1 4 - 1 8およびD O M 7 m - 1 6。

【 0 2 2 2 】

特定の実施形態では、d A bはヒト血清アルブミンに結合し、そのアミノ酸配列の少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%が、下記からなる群から選択されたd A bのアミノ酸配列と同等性を有するアミノ酸配列を含む：

M S A - 1 6、M S A - 2 6、

DOM7m-16 (配列番号473)、DOM7m-12 (配列番号474)、DOM7m-26 (配列番号475)、DOM7r-1 (配列番号476)、DOM7r-3 (配列番号477)、DOM7r-4 (配列番号478)、DOM7r-5 (配列番号479)、DOM7r-7 (配列番号480)、DOM7r-8 (配列番号481)、DOM7h-2 (配列番号482)、DOM7h-3 (配列番号483)、DOM7h-4 (配列番号484)、DOM7h-6 (配列番号485)、DOM7h-1 (配列番号)、DOM7h-7 (配列番号487)、DOM7h-22 (配列番号489)、DOM7h-23 (配列番号490)、DOM7h-24 (配列番号491)、DOM7h-25 (配列番号492)、DOM7h-26 (配列番号493)、DOM7h-21 (配列番号494)、DOM7h-27 (配列番号495)、DOM7h-8 (配列番号496)、DOM7r-13 (配列番号497)、DOM7r-14 (配列番号498)、DOM7r-15 (配列番号499)、DOM7r-16 (配列番号500)、DOM7r-17 (配列番号501)、DOM7r-18 (配列番号502)、DOM7r-19 (配列番号503)、DOM7r-20 (配列番号)、DOM7r-21 (配列番号505)、DOM7r-22 (配列番号506)、DOM7r-23 (配列番号)、DOM7r-24 (配列番号508)、DOM7r-25 (配列番号509)、DOM7r-26 (配列番号510)、DOM7r-27 (配列番号511)、DOM7r-28 (配列番号512)、DOM7r-29 (配列番号513)、DOM7r-30 (配列番号514)、DOM7r-31 (配列番号515)、DOM7r-32 (配列番号516)、DOM7r-33 (配列番号517) (本項の配列番号はWO2007080392中に記載されている)

dAb8、dAb10、dAb36、dAb7r20、dAb7r21、dAb7r22、dAb7r23、dAb7r24、dAb7r25、dAb7r26、dAb7r27、dAb7r28、dAb7r29、dAb7r30、dAb7r31、dAb7r32、dAb7r33、dAb7h21、dAb7h22、dAb7h23、dAb7h24、dAb7h25、dAb7h26、dAb7h27、dAb7h30、dAb7h31、dAb2、dAb4、dAb7、dAb11、dAb12、dAb13、dAb15、dAb16、dAb17、dAb18、dAb19、dAb21、dAb22、dAb23、dAb24、dAb25、dAb26、dAb27、dAb30、dAb31、dAb33、dAb34、dAb35、dAb38、dAb41、dAb46、dAb47、dAb52、dAb53、dAb54、dAb55、dAb56、dAb7m12、dAb7m16、dAb7m26、dAb7r1、dAb7r3、dAb7r4、dAb7r5、dAb7r7、dAb7r8、dAb7r13、dAb7r14、dAb7r15、dAb7r16、dAb7r17、dAb7r18、dAb7r19、dAb7h1、dAb7h2、dAb7h6、dAb7h7、dAb7h8、dAb7h9、dAb7h10、dAb7h11、dAb7h12、dAb7h13、dAb7h14、dAb7p1、およびdAb7p2。

【0223】

例えば、ヒト血清アルブミンに結合しているdAbは、そのアミノ酸配列の少なくとも90%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%が、DOM7h-11-3またはDOM7h-14-10のアミノ酸配列と同等性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

【0224】

例えば、ヒト血清アルブミンに結合しているdAbは、そのアミノ酸配列の少なくとも90%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%が、DOM7h-2 (配列番号482)、DOM7h-3 (配列番号483)、DOM7h-4 (配列番号484)、DOM7h-6 (配列番号485)、DOM7h-1 (配列番号486)、DOM7h-7 (配列番号487)、DOM7h-8 (配列番号496)、DOM7r-13 (配列番号497)、DOM7r-14 (配列番号498)、DOM7h

- 2 2 (配列番号 4 8 9)、DOM 7 h - 2 3 (配列番号 4 9 0)、DOM 7 h - 2 4 (配列番号 4 9 1)、DOM 7 h - 2 5 (配列番号 4 9 2)、DOM 7 h - 2 6 (配列番号 4 9 3)、DOM 7 h - 2 1 (配列番号 4 9 4) もしくは DOM 7 h - 2 7 (配列番号 4 9 5) (本項の配列番号は WO 2 0 0 7 0 8 0 3 9 2 中に記載されている)、または、

d A b 8、d A b 1 0、d A b 3 6、d A b 7 h 2 1、d A b 7 h 2 2、d A b 7 h 2 3、A b 7 h 2 4、A b 7 h 2 5、A b 7 h 2 6、d A b 7 h 2 7、d A b 7 h 3 0、d A b 7 h 3 1、d A b 2、d A b 4、d A b 7、d A b 1 1、d A b 1 2、d A b 1 3、d A b 1 5、d A b 1 6、d A b 1 7、d A b 1 8、d A b 1 9、d A b 2 1、d A b 2 2、d A b 2 3、d A b 2 4、d A b 2 5、d A b 2 6、d A b 2 7、d A b 3 0、d A b 3 1、d A b 3 3、d A b 3 4、d A b 3 5、d A b 3 8、d A b 4 1、d A b 4 6、d A b 4 7、d A b 5 2、d A b 5 3、d A b 5 4、d A b 5 5、d A b 5 6、d A b 7 h 1、d A b 7 h 2、d A b 7 h 6、d A b 7 h 7、d A b 7 h 8、d A b 7 h 9、d A b 7 h 1 0、d A b 7 h 1 1、d A b 7 h 1 2、d A b 7 h 1 3 もしくは d A b 7 h 1 4 のアミノ酸配列と同等性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

【 0 2 2 5 】

特定の実施形態では、d A b はヒト血清アルブミンに結合し、そのアミノ酸配列の少なくとも約 8 0 %、または少なくとも約 8 5 %、または少なくとも約 9 0 %、または少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 6 %、または少なくとも約 9 7 %、または少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % が、下記からなる群から選択された d A b のアミノ酸配列と同等性を有するアミノ酸配列を含む：

DOM 7 h - 2 (配列番号 4 8 2)、DOM 7 h - 6 (配列番号 4 8 5)、DOM 7 h - 1 (配列番号 4 8 6)、DOM 7 h - 7 (配列番号 4 8 7)、DOM 7 h - 8 (配列番号 4 9 6)、DOM 7 h - 2 2 (配列番号 4 8 9)、DOM 7 h - 2 3 (配列番号 4 9 0)、DOM 7 h - 2 4 (配列番号 4 9 1)、DOM 7 h - 2 5 (配列番号 4 9 2)、DOM 7 h - 2 6 (配列番号 4 9 3)、DOM 7 h - 2 1 (配列番号 4 9 4)、DOM 7 h - 2 7 (配列番号 4 9 5) (本項の配列番号は WO 2 0 0 7 0 8 0 3 9 2 中に記載されている)、

d A b 7 h 2 1、d A b 7 h 2 2、d A b 7 h 2 3、A b 7 h 2 4、A b 7 h 2 5、A b 7 h 2 6、d A b 7 h 2 7、d A b 7 h 3 0、d A b 7 h 3 1、d A b 2、d A b 4、d A b 7、d A b 3 8、d A b 4 1、d A b 7 h 1、d A b 7 h 2、d A b 7 h 6、d A b 7 h 7、d A b 7 h 8、d A b 7 h 9、d A b 7 h 1 0、d A b 7 h 1 1、d A b 7 h 1 2、d A b 7 h 1 3、および d A b 7 h 1 4。

【 0 2 2 6 】

さらに詳細な実施形態では、d A b は、ヒト血清アルブミンに結合し、下記からなる群から選択されたアミノ酸配列を有する V_H d A b である：

DOM 7 h - 2 (配列番号 4 8 2)、DOM 7 h - 6 (配列番号 4 8 5)、DOM 7 h - 1 (配列番号 4 8 6)、DOM 7 h - 7 (配列番号 4 8 7)、DOM 7 h - 8 (配列番号 4 9 6) (本項の配列番号は WO 2 0 0 7 0 8 0 3 9 2 中に記載されている)、

d A b 2、d A b 4、d A b 7、d A b 3 8、d A b 4 1、d A b 5 4、d A b 7 h 1、d A b 7 h 2、d A b 7 h 6、d A b 7 h 7、d A b 7 h 8、d A b 7 h 9、d A b 7 h 1 0、d A b 7 h 1 1、d A b 7 h 1 2、d A b 7 h 1 3 および d A b 7 h 1 4。

【 0 2 2 7 】

さらに詳細な実施形態では、d A b は、ヒト血清アルブミンに結合し、d A b 7 h 3 0 および d A b 7 h 3 1 から選択されたアミノ酸配列を有する V_H d A b である。

【 0 2 2 8 】

さらに詳細な実施形態では、d A b は、d A b 7 h 1 1 または d A b 7 h 1 4 である。一例では、d A b は DOM 7 h - 1 1 - 3 である。別の例では、d A b は DOM 7 h - 1 4 - 1 0 である。

【 0 2 2 9 】

他の実施形態では、d A b、リガンド、またはアンタゴニストはヒト血清アルブミンに

10

20

30

40

50

結合し、前出のいずれかのアミノ酸配列の1つ、2つ、または3つのCDR、例えば、DOM7h-11-3、DOM7h-14-10、dAb7h11またはdAb7h14の1つ、2つ、または3つのCDRを含む。

【0230】

血清アルブミンに結合する適切なラクダ科動物 V_{HH} としては、WO2004/041862 (Ablynx N.V.社) およびWO2007080392 (これらに開示されている V_{HH} 配列および対応する核酸は参照により本明細書に組み込まれ、本明細書の開示の一部を構成する) で開示されたものが含まれ、配列A (配列番号518)、配列B (配列番号519)、配列C (配列番号520)、配列D (配列番号521)、配列E (配列番号522)、配列F (配列番号523)、配列G (配列番号524)、配列H (配列番号525)、配列I (配列番号526)、配列J (配列番号527)、配列K (配列番号528)、配列L (配列番号529)、配列M (配列番号530)、配列N (配列番号531)、配列O (配列番号532)、配列P (配列番号533)、配列Q (配列番号534)がある。これらの配列番号はWO2007080392またはWO2004/041862 (Ablynx N.V.社) で引用されたものに対応する。特定の実施形態では、ラクダ科動物 V_{HH} はヒト血清アルブミンに結合し、そのアミノ酸配列の少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%が、WO2007080392で開示されたALB1、または、配列番号518~534のいずれかと同じアミノ酸配列を含む。これらの配列番号はWO2007080392またはWO2004/041862で引用されたものに対応する。

10

20

【0231】

一部の実施形態では、アンタゴニストは、血清アルブミン (例えば、ヒト血清アルブミン) との結合を目指して本明細書で開示されたいずれかの抗血清アルブミンと競合する抗血清アルブミンdAbを含む。

【0232】

別の実施態様では、アンタゴニストは、SA (例えば、ヒトSA) に対し特異的な結合部分を含み、ここで、この部分はWO2008096158に記載されているように非免疫グロブリン配列を含む。これらの結合部分、その製造法と選択法 (例えば、多様なライブラリからの) および配列の開示は、参照により本明細書の開示の一部として本明細書に組み込まれる。

30

【0233】

半減期延長部分への接合 (例えばアルブミン)

一実施形態では、1つまたは複数の半減期延長部分 (例えば、アルブミン、トランスフェリンと断片、および。それらの類似体) が、本発明のTNFR1結合アンタゴニストと接合または会合する。TNFR1結合フォーマットでの使用のために適切なアルブミン、アルブミン断片、またはアルブミン変異体の実例は、WO2005077042に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれ本明細書の開示の一部を構成する。特に、下記のアルブミン、アルブミン断片、またはアルブミン変異体は本発明に使用できる：

40

- ・配列番号1 (WO2005077042に記載。この配列は参照により明示的に本明細書に組み込まれる) ；

- ・WO2005077042に記載の配列番号1のアミノ酸1~287を成分とするか、または含むアルブミン断片または変異体；

- ・アルブミン、または、これらのアルブミン断片やアルブミン変異体で、次の配列からなる群より選択したアミノ酸配列を含む：(a) WO2005077042記載の配列番号1のアミノ酸54~61；(b) WO2005077042記載の配列番号1のアミノ酸76~89；(c) WO2005077042記載の配列番号1のアミノ酸92~100；(d) WO2005077042記載の配列番号1のアミノ酸170~176；(e)

50

）WO 2 0 0 5 0 7 7 0 4 2 記載の配列番号 1 のアミノ酸 2 4 7 ~ 2 5 2 ; (f) WO 2 0 0 5 0 7 7 0 4 2 記載の配列番号 1 のアミノ酸 2 6 6 ~ 2 7 7 ; (g) WO 2 0 0 5 0 7 7 0 4 2 記載の配列番号 1 のアミノ酸 2 8 0 ~ 2 8 8 ; (h) WO 2 0 0 5 0 7 7 0 4 2 記載の配列番号 1 のアミノ酸 3 6 2 ~ 3 6 8 ; (i) WO 2 0 0 5 0 7 7 0 4 2 記載の配列番号 1 のアミノ酸 4 3 9 ~ 4 4 7 ; (j) WO 2 0 0 5 0 7 7 0 4 2 記載の配列番号 1 のアミノ酸 4 6 2 ~ 4 7 5 ; (k) WO 2 0 0 5 0 7 7 0 4 2 記載の配列番号 1 のアミノ酸 4 7 8 ~ 4 8 6 ; および (l) WO 2 0 0 5 0 7 7 0 4 2 記載の配列番号 1 のアミノ酸 5 6 0 ~ 5 6 6 。

【 0 2 3 4 】

T N F R 1 結合フォーマットでの使用のために適切なアルブミン、アルブミン断片、および類似体の実例はWO 0 3 0 7 6 5 6 7 に記載されている。この開示は参照により本明細書に組み込まれ、本明細書の開示の一部を構成する。特に、下記のアルブミン、断片または変異体は本発明に使用できる：

・WO 0 3 0 7 6 5 6 7 記載のヒト血清アルブミン（この配列情報は参照により明示的に本明細書に組み込まれる）。図 3 に一例を示す。

【 0 2 3 5 】

・5 8 5 アミノ酸の単一非グルコシル化ポリペプチド鎖を含むヒト血清アルブミン（H A）で分子量 6 6、5 0 0（Meloun, et al., FEBS Letters 5 8 : 1 3 6（1 9 7 5）; Behrens, et al., Fed. Proc. 3 4 : 5 9 1（1 9 7 5）; Lawn, et al., Nucleic Acids Research 9 : 6 1 0 2 - 6 1 1 4（1 9 8 1）; Minghetti, et al., J. Biol. Chem. 2 6 1 : 6 7 4 7（1 9 8 6）参照）

・アルブミンの多形変異体または類似体または断片（Weitkamp, et al., Ann. Hum. Genet. 3 7 : 2 1 9（1 9 7 3）に記載されている）

・アルブミン断片または変異体（EP 3 2 2 0 9 4 に記載されている）。例えば、H A（1 - 3 7 3）、H A（1 - 3 8 8）、H A（1 - 3 8 9）、H A（1 - 3 6 9）、および H A（1 - 4 1 9）ならびに、1 - 3 6 9 と 1 ~ 4 1 9 の間の断片。

【 0 2 3 6 】

・アルブミン断片または変異体（EP 3 9 9 6 6 6 に記載されている）。例えば、H A（1 - 1 7 7）および H A（1 - 2 0 0）、および、H A（1 - X）間の断片。ここで X は 1 7 8 ~ 1 9 9 の任意の数字。

【 0 2 3 7 】

（1 つまたは複数の）半減期延長部分（例えば、アルブミン、トランスフェリンおと断片、およびその類似体）が、本発明の T N F R 1 結合アンタゴニストをフォーマットするために使われる場合は、T N F R 1 結合部分（例えば、抗 T N F R 1 d A b）に任意の適切な方法を使って接合可能である。接合法としては、例えば、融合タンパク質をコードしている単一ヌクレオチド構築物を使って直接融合する等の方法があり、この場合、融合タンパク質は、T N F R 1 結合部分の N または C 末端位置に半減期延長部分をもつ単一ポリペプチド鎖としてコードされている。あるいは、接合は、部分間でペプチドリナーを使って達成可能である。例えば、ペプチドリナーは、WO 0 3 0 7 6 5 6 7 または WO 2 0 0 4 0 0 3 0 1 9 に記載されている（このリンカーの開示は、参照により本開示に組み込まれ本発明での使用のための実例を提供する）。通常、生体内血清中半減期を延長するポリペプチドは本来生体内で発生するもので、生体（例えばヒト）から望ましくない物質を除く内因性機構による分解または除去に抵抗性をしめす。例えば、生体内で血清中半減期を延長するポリペプチドは、細胞外マトリックスからのタンパク質、血液中で見つかったタンパク質、血液脳関門で見つかったタンパク質、または神経組織中、腎臓に局在化しているタンパク質、肝臓、肺、心臓、皮膚または骨、ストレスタンパク質、疾患特異性タンパク質、または、F_c 輸送に関わるタンパク質から選択可能である。

10

20

30

40

50

【0238】

本発明の本開示全体に記載の実施形態では、本発明のアンタゴニスト中の抗TNFR1単一可変ドメイン(「dAb」)を使用する代わりに、手慣れた受け取り側が、TNFR1に結合した本発明のdAbの1つ以上、または全3つのCDR(例えば、適切なタンパク質足場や骨格上にグラフトしたCDR、例えば、アフィボディ、SpA足場、LDL受容体クラスAドメイン、またはEGFドメイン)を含むポリペプチドまたはドメインを使用できるということが意図されている。したがって、本開示は全体としてdAbの代わりにこのドメインを使ったアンタゴニストの開示を提供すると理解されるべきである。この点に関しては、タンパク質足場に基づく多様なライブラリの産生、ならびにこのようなライブラリ由来ドメインの選択および特性決定法の詳細について、WO2008096158を参照されたい。この開示は参照により組み込まれる。

10

【0239】

したがって、一実施形態では、本発明のアンタゴニストは、TNFR1や適切なフォーマットのこのdAbの相補性決定領域に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインまたはドメイン抗体(dAb)を含む。アンタゴニストはこのdAbからなる、または、基本的にこのdAbからなるポリペプチドであってもよい。アンタゴニストは、抗体フォーマット(例えば、IgG様フォーマット、scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂)等の適切なフォーマットのdAb(またはdAbのCDR)であっても、TNFR1に結合したdAb、および他の標的タンパク質、抗原、またはエピトープ(例えば血清アルブミン)に結合した第二のdAbを含む二重特異性リガンドであってもよい。

20

【0240】

ポリペプチド、dAb、およびアンタゴニストは、当技術分野において知られている多様な適切な抗体フォーマットとしてフォーマットされていてもよい。これらの抗体フォーマットの例としては、次のものがある。IgG様フォーマット、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、単鎖抗体、二重特性抗体、抗体重鎖、抗体軽鎖、抗体重鎖および/または軽鎖のホモ二量体とヘテロ二量体、前出のいずれかの抗原結合断片(例えば、F_v断片(例えば、単鎖F_v(scF_v)、ジスルフィド結合F_v)、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片)、単一可変ドメイン(例えばV_H、V_L)、dAb、および前出のいずれかの修飾バージョン(例えば、ポリアルケングリコール(例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリブチレングリコール)、または他の適切なポリマーの共有結合により修飾された)。

30

【0241】

一部の実施形態では、本発明は、IgG様フォーマットのアンタゴニストを提供する。このようなフォーマットは、通常のIgG分子4鎖構造(2つの重鎖と2つの軽鎖)を有し、1つまたは複数の可変領域(V_Hおよび/またはV_L)が本発明のdAbで置換されている。一実施形態では、各可変領域(2V_H領域と2V_L領域)はdAbまたは単一可変ドメインで置換されており、そのうちの少なくとも1つが本明細書に記載の抗TNFR1 dAbである。IgG様フォーマットに含まれているdAbまたは単一可変ドメインは、同じ特異性でも異なる特異性でも持つことが可能である。一部の実施形態では、IgG様フォーマットは4価であり、1つ(抗TNFR1のみ)、2つ(例えば、抗TNFR1と抗SA)、3つ、または4つの特異性を有することが可能である。例えば、IgG様フォーマットは、モノ特異性であり、同じ特異性の4つのdAbを含む；二重特異性であり、同じ特異性の3つのdAbと、異なる特異性の別のdAbを含む；二重特異性であり、同じ特異性の2つのdAbと、共通するが異なる特異性を有する2つのdAbを含む；三重特異性であり、同じ特異性の第一のdAbおよび第二のdAbと、異なる特異性の第三のdAb、ならびに第一、第二および第三のdAbとは異なる特異性の第四のdAbを含む；または四重特異性であり、それぞれ異なる特異性の4つのdAbを含むことができる。IgG様フォーマット(例えば、Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv、scFv)の抗原結合断片は調製できる。一実施形態では、IgG様フォーマットまたは抗原結合断片はTNFR1に対して1価であり得る。補体活性化および/または抗体依存性細胞毒

40

50

(A D C C) 機能が所望される場合、リガンドは、I g G 1 様フォーマットであってよい。所望の場合、I g G 様フォーマットは、F c 受容体との結合および/または補体との結合能を最小限に抑えるために変異定常領域(変異型 I g G 重鎖定常領域)を含んでよい。(例えば、Winter et al., 英国特許第 2, 209, 757 B 号; Morrison et al., WO 89/07142; Morgan et al., WO 94/29351、1994 年 12 月 22 日を参照のこと)。

【0242】

本発明のリガンド(例えば、ポリペプチド、d A b およびアンタゴニスト)は第二の免疫グロブリン単一可変ドメインに直接融合した第一の免疫グロブリン単一可変ドメインを含む融合タンパク質としてフォーマットし得る。所望の場合、このようなフォーマットは、さらに半減期延長部分を含み得る。例えば、リガンドは、血清アルブミンに結合する免疫グロブリン単一可変ドメインに直接融合した、第二の免疫グロブリン単一可変ドメインに直接融合した第一の免疫グロブリン単一可変ドメインを含み得る。

10

【0243】

一般的には、標的に対する結合特異性を有する結合部位のあるポリペプチドドメインの方向、およびリガンドがリンカーを含むかどうかは設計選択の問題である。しかしながら、いくつかの方向は、リンカーの有無を問わず、他の方向よりも優れた結合特性を提供し得る。本発明により包含されるすべての方向(例えば、d A b 1 - リンカー - d A b 2 ; d A b 2 - リンカー - d A b 1)は、所望の結合特性を提供する方向を含むリガンドであり、スクリーニングにより容易に特定できる。

20

【0244】

ポリペプチドおよび d A b (d A b 単量体、二量体および三量体を含む)は、C_H2 ドメインと C_H3 ドメインの一方または両方、および任意にヒンジ領域を含む抗体 F c 領域に結合し得る。例えば、単一ヌクレオチド配列として F c 領域に結合したリガンドをコードするベクターをこのようなポリペプチドを調製するために用いてよい。

【0245】

本発明はさらに、前述の d A b 単量体の二量体、三量体およびポリマーを含むかまたはそれらからなるアンタゴニストを提供する。

【0246】

例証

30

抗 T N F R 1 d A b のナイーブ選択

T N F 受容体 1 (p 5 5) のシグナル伝達を阻害するための 2 つの異なる機序について記載されている(WO 2 0 0 6 0 3 8 0 2 7)。第一の機序は、T N F のその受容体への結合と直接競合するエピトープにてドメイン抗体の T N F R 1 への結合によるシグナル伝達の阻害からなる。この競合は、例えば受容体を固体支持体に被覆するインビトロ受容体結合アッセイ法において測定し得、受容体への結合におけるビオチン化 T N F とドメイン抗体との競合を、例えばストレプトアビジン - H R P を用いて残りのビオチン化 T N F 結合の測定値を介して測定する。競合 T N F R 1 阻害剤は、T N F シグナルを残さずに T N F のその受容体への結合をブロックする。逆に、非競合 T N F R 1 阻害剤は T N F の受容体への結合に対してほとんど影響を与えず、μ M 濃度の阻害 d A b の存在下でさえビオチン化 T N F の継続した読み出しに至る。しかしながら、機能的細胞アッセイ法、例えば低レベルの T N F (10 ~ 200 p g / m l、18 時間)で刺激時、I L - 8 を放出するヒト M R C 5 線維芽細胞系では、競合阻害剤と非競合阻害剤の両方とも、I L - 8 分泌を用量依存的に減らす。後者は、細胞ベース系において両種類の阻害剤の機能活性を示す。したがって具体的な目的は細胞アッセイ法において T N F R 1 に結合してその機能活性を阻害するドメイン抗体を単離することであったが、これらのドメイン抗体は T N F の T N F R 1 への結合と(実質的に)競合すべきではない。

40

【0247】

非競合 T N F R 1 結合 d A b を単離するため、このサブクラスの d A b を豊富にするように選択戦略を設計した。アプローチは、D o m a n t i s 社の 4 G および 6 G ナイーブ

50

ファージライブラリ、4 GのためのG A S 1リーダー配列から発現するファージライブラリディスプレイ抗体単一可変ドメイン(W O 2 0 0 5 0 9 3 0 7 4を参照のこと)および追加で6 Gのための熱/冷却前選択(W O 0 4 1 0 1 7 9 0を参照のこと)の使用からなる。これらのファージライブラリを、第1ラウンドで、2 0 0 n M ビオチン化ヒトT N F R 1 (R & D S y s t e m s 社、カタログ番号6 3 6 - R 1 / C F) でインキュベートし、E Z - L I N K N H S - L C - L C - B i o t i n (P i e r c e 社カタログ番号2 1 3 4 3) を製造メーカーの説明書に従って用いてビオチン化し、続いてストレプトアビジン被覆磁気ビーズ上でブルダウンした。第2および第3ラウンドにて、ファージをT N F R 1 (2 0 0 n M - 第2ラウンド、7 5 n M - 第3ラウンド) で前インキュベートし、次いでビオチン化T N F (P e p r o t e c h 社カタログ番号3 0 0 - 0 1 A) (2 0 0 n M - 第2ラウンド、7 5 n M - 第3ラウンド) で前インキュベートし、続いてストレプトアビジン被覆磁気ビーズ上でブルダウンした。全ラウンドにおいて、増幅前に、ビーズを洗浄して結合の弱いファージを除去し、結合ファージをトリプシン消化により溶解した。理論的には、T N F の存在下でT N F R 1 に結合できるd A b は、T N F の競合物質をブルダウンせずに特に豊富化される。なぜなら、このエピトープは、T N F の磁気ビーズへの結合に必要とされるからである。この実験設計を用いて、ファージ選択を3ラウンド行い、第2ラウンドと第3ラウンドの両方をp D O M 5 大腸菌発現ベクター中にクローン化し(P C T / E P 2 0 0 8 / 0 6 7 7 8 9 を参照のこと)、続いてd A b 発現およびT N F R 1 結合のためのB I A c o r e 上^{T M}上のスクリーニングを行った。p D O M 5 ベクターは、p U C 1 1 9 ベースベクターである。タンパク質の発現はL a c Z プロモーターにより促進される。G A S 1 リーダー配列(W O 2 0 0 5 / 0 9 3 0 7 4 を参照のこと)は大腸菌の周辺質および培養上清への単離された、溶解性d A b の分泌を確実にする。d A b はこのベクター中でS a l I / N o t I にクローン化し、d A b のC 末端にm y c タグを付加する。結合d A b を5 0 m L 尺度で発現させ、機能的特性決定のために親和性精製した。これは標準的なM R C 5 細胞アッセイ(下記)におけるT N F 媒介性シグナル伝達阻害の測定ならびに受容体結合アッセイ(下記)におけるT N F のT N F R 1 への結合阻害からなる。6 0 0 0 上清スクリーニングにより、多くのT N F R 1 結合剤が得られた。しかしながら、大部分は、無関係なエピトープに結合して、その結果、細胞アッセイもしくは受容体結合アッセイのいずれにおいても活性を有さないか、または受容体結合アッセイにおいて示されるように競合するかのいずれかであった。それにもかかわらず、この大部分は、1) B I A c o r e 上でT N F R 1 と結合する(図1)、2) M R C 5 細胞アッセイ法においてT N F を阻害する(図2)、一方で3) 受容体結合アッセイにおいてT N F 競合を示さない(図3)、d A b の配列解析により5 つの独特なd A b が特定された。これら5 つのd A b は以下であった: D O M 1 h - 5 0 9、D O M 1 h - 5 1 0、D O M 1 h - 5 4 3、D O M 1 h - 5 4 9 およびD O M 1 h - 5 7 4。

【0248】

選択されたd A b の成熟変異導入試験

D O M 1 h - 5 0 9、D O M 1 h - 5 1 0、D O M 1 h - 5 4 3、D O M 1 h - 5 4 9 およびD O M 1 h - 5 7 4 の成熟度を決定するために、G e n e m o r p h I I キット(S t r a t a g e n e 社(サンディエゴ、米国)カタログ番号2 0 0 5 5 0) を製造メーカーの説明書に従って用いてd A b 変異体のP C R 変異導入ライブラリを生成した。配列解析により、これらのライブラリの平均変異率はアミノ酸レベルで2 . 4 % であることが示された。これらのライブラリをファージベクターp D O M 4 中にクローン化し、ファージ上に発現させた。p D O M 4 は、線維状ファージ(f d) ディスプレイベクターであり、これはm y c タグ付きf d ベクターに基づき、タンパク質配列は、制限部位間でクローン化してタンパク質遺伝子I I I 融合物を得ることができる。d A b をコードする遺伝子をS a l I / N o t I 断片としてクローン化した。

【0249】

減量ビオチン化ヒトT N F R 1 (R & D S y s t e m s 社)(5 0 n M (第1ラウンド)、5 n M (第2ラウンド) および0 . 5 n M (第3ラウンド)) とのインキュベート

の連続3ラウンド中、改善された結合剤を選択した。3ラウンドの選択後、dAb遺伝子
を大腸菌発現ベクターpDOM5中にクローン化し、発現させ、結合動態の改善のため上
清をBIAcoreによりスクリーニングした。全5つの親系統から誘導される変異型を
スクリーニングしたが、DOM1h-574系統由来のdAbのみ、BIAcore上で
スクリーニング時、解離率の有意な改善を示した。MRC5細胞アッセイ法において解離
率が最も顕著に改善したdAbを精製して特性決定した(表1および図4)。最良のdA
bは以下である: DOM1h-574-7、DOM1h-574-8、DOM1h-57
4-10、DOM1h-574-11、DOM1h-574-12およびDOM1h-5
74-13。これらのdAb評価から、我々は判断力を働かせて親和性改善に特に関与し
得る位置および変異を特定した: V30G、G44D、L45P、G55D、H56Rお
よびK94I(Kabatナンバリング)。付加的な効果を模索し、我々はこれらの特異
的変異を単一dAb中に一体化した新規dAb変異型を生成した。DOM1h-574
鋳型を用いて遺伝子操作した新規変異型は以下であった: DOM1h-574-14(G5
5D、H56RおよびK94I)、DOM1h-574-15(G55DおよびK94I
)、DOM1h-574-16(L45P、G55D、H56RおよびK94I)、DO
M1h-574-17(L45P、G55DおよびK94I)、DOM1h-574-1
8(V30G、G44D、G55D、H56RおよびK94I)およびDOM1h-57
4-19(V30G、G44D、G55DおよびK94I)(図5)。

10

【0250】

MRC5細胞アッセイ法における効能およびBIAcore上のTNFR1親和性のた
めのこれらの変異型の特性決定により、さらなる改善を特定した(表1)。最も強力なd
AbはDOM1h-574-16であった。

20

【表1】

有益な変異の再組み合わせを介してDOM1h-574親および試験成熟中に特定され
て構築されたdAbのMRC5細胞アッセイ法におけるBIAcore親和性および効能
の概要。DOM1h-574-16はBIAcore上の最高親和性とMRC5細胞アッ
セイ法における最高効能とを組み合わせる。値を測定しなかった場合、(ND)と示す。

	BIAcore K_D (nM)	MRC-5 ND_{50} (nM)
DOM1h-574	210	2200
DOM1h-574-7	48	580
DOM1h-574-8	5.7	10
DOM1h-574-10	19	100
DOM1h-574-11	200	800
DOM1h-574-12	23	130
DOM1h-574-13	44	300
DOM1h-574-14	ND	ND
DOM1h-574-15	20	300
DOM1h-574-16	1.0	8
DOM1h-574-17	8.4	20
DOM1h-574-18	4.1	17
DOM1h-574-19	ND	140

30

40

【0251】

DOM1h-574-16の種間交差反応

抗TNFR1dAbの有意な利点は異種間の交差反応である。マウス、イヌ、カニクイ
ザルおよびヒト間のTNFR1細胞外ドメイン配列の限られた保存(図6)を考慮し、類
似した親和性を有するこれら異種のTNFR1を認識するために任意の抗体または単一可
変ドメインが優れている。したがって、我々はBIAcore上でマウスTNFR1に対
するDOM1h-574-16の結合能を試験した(R&D Systems社カタログ
番号425-R1-050/CF)、イヌTNFR1(R&D Systems社カタロ

50

グ番号 4017 - TR - 025 / CF) およびヒト TNFR1 (R&D Systems 社)。これらの各実験において、EZ-LINK NHS-LC-LC-Biotin (Pierce 社カタログ番号 21343) を製造メーカーの説明書に従って用いて TNFR1 をビオチン化し、続いてビオチン化 TNFR1 をストレプトアビジン被覆 BIAcore チップへ結合させた。続いて、DOM1h-574-16 をヒト、マウスおよびイヌ TNFR1 上に注入し、BIAcore 上で結合をモニタリングした。異種への結合例を図 7 および 8 に示し、結果の概要を表 2 に示す。明らかに、DOM1h-57-16 は、我々より先に記載された (WO2008149148) 競合抗 TNFR1 dAb DOM1h-131-206 (マウス TNFR1 への結合は事実上なく、イヌ TNFR1 へは非常に弱い結合のみを示した) とは対照的に、異種の TNFR1 へ高親和性結合を示した。

10

【表 2】

BIAcore により測定した、DOM1h-131-206 および DOM1h-574-16 のマウス、イヌおよびヒト TNFR1 結合親和性。* = BIAcore により測定するには不良すぎの親和性 (μM 超)

	マウス TNFR1 (K_D)	イヌ TNFR1 (K_D)	ヒト TNFR1 (K_D)
DOM1h-131-206	ND*	500 nM 超	0.47 nM
DOM1h-574-16	20 nM	20 nM	1 nM

20

【0252】

次に、マウス細胞 (L929) の TNF 媒介性細胞毒を阻害し、カニクイザル細胞 (CYNOM-K1) の TNF 媒介性 IL-8 放出を阻害する DOM1h-574-16 の効果を評価した。標準的マウス L929 および CYNOM-K1 細胞アッセイの両方を、既報 (WO2006038027) および上記のとおり実施した。簡単に述べると、マウス L929 細胞を 20 pg/ml マウス TNF で、アクチノマイシンの存在下、および用量範囲の DOM1h-574-16 で一晚インキュベートした。18 時間後、細胞生存能を確認して DOM1h-574-16 濃度に対してプロットした。カニクイザル CYNOM-K1 細胞アッセイ法において、用量範囲の DOM1h-574-16 の存在下、細胞を TNF (200 pg/ml) で 18 時間刺激した。インキュベート後、培地を除去して IL-8 レベルを測定した。中和パーセンテージを DOM1h-574-16 濃度に対してプロットした。両細胞種類において、DOM1h-574-16 は TNF 媒介性作用を効果的に阻害できた。その効能はマウス標準的 L929 細胞ベースアッセイにおいて約 250 nM、カニクイザル CYNOM-K1 アッセイにおいて約 10 nM であった (図 9 および 10)。これらの結果は、細胞ベースアッセイにおいて DOM1h-574-16 の機能的、種間交差反応性を示す。

30

【0253】

DOM1h-574 の親和性成熟

40

本試験成熟および組み合わせ変異体の結果に基づき、さらなる親和性成熟の鑄型として DOM1h-574-14 を用いることを決定した。この特定の dAb は最も強力ではなかったが、生殖系列 DP47 フレームワークに比べていかなるフレームワーク変異も有さなかったために選択された。親和性成熟のため、DOM1h-574-14 の CDR を以下のオリゴヌクレオチドを用いて CDR を増幅することにより無作為化した: AS1029 および AS339 (CDR1)、AS1030 および AS339 (CDR2) ならびに AS1031 および AS339 (CDR3)。以下のオリゴヌクレオチドの組み合わせを用いて各ライブラリの第二の PCR 断片を行った: AS1031' および AS9 (CDR1)、AS1032 および AS9 (CDR2)、AS1033 および AS9 (CDR3)。SOE PCR (Horton et al. Gene, 77, p61 (19

50

89))を用いて、2つのCDR1 PCR生成物を組み合わせてCDR1ライブラリを作製し、CDR2生成物を組み合わせてCDR2ライブラリを作製し、CDR3生成物を組み合わせてCDR3ライブラリを作製した。すべての反応においてSOE生成物をネステッドプライマーAS639とAS65で増幅し、WO2006018650に記載のpIE2aA²ベクター中にSalI/NotIを結紮した。無作為化オリゴヌクレオチド(AS1029、AS1030およびAS1031)は固定位置(大文字で示す、オリゴヌクレオチドの100%が指定のヌクレオチドをこの位置に有する)および混合したヌクレオチド組成物(小文字で示す、オリゴヌクレオチドの85%がこの位置に優性ヌクレオチドを有し、15%が他の3つのヌクレオチド間に同等の分割を有する)からなる。DNA-ディスプレイ構築物pIE2aA²を用いて3つの異なるライブラリを調製した。ライブラリのアリコートを用いて大腸菌を形質転換して配列した。親クローンと比較して、親和性成熟ライブラリはCDR全体に多くの変異を含んだ。インビトロのエマルジョン中の区画化およびscArc DNA結合タンパク質を介したDNAディスプレイを用いて選択を実施した(WO2006018650を参照のこと)。計13ラウンドの選択を実行する間、ライブラリは別々に保った。20、15、10、8および5 nMビオチン化ヒトTNFR1(R&D Systems社)の均衡選択の5ラウンド後、7ラウンドの解離速度(off-rate)選択を最大150分間、非標識hTNFR1を競合物質として用いて行った。。選択過程のライブラリ適応度はリアルタイムPCRによりアッセイした。使用した方法の本質は以下である: qPCRによる多クローン性集団適応度のインビトロ滴定は、溶液状態におけるインビトロ発現反応後に表面結合抗原により捕獲したdAb-scArcタンパク質との複合体中のDNAをコードする量を測定することにより多クローン性dAb集団の平均親和性の半定量的測定値を提供する(遺伝子表現型と関連なし)。回収した入力DNAの分画が高いほど、多クローン性dAb集団はより強力である。適切な基準点は、親クローンが非関連抗原で被覆した非特異性表面に結合し、標的抗原で被覆した表面へ特異的結合するレベルである。

10

20

30

40

50

【0254】

異なる段階の選択中にDNA鋳型を回収し、0.1 mg/ml RNA溶液で1.7 nM濃度に希釈した。インビトロ発現反応を0.3 µlの100 mM酸化グルタチオン、0.05 µlの340 nM抗HA mAb 3F10(Roche社から入手)および0.5 µlの1.7 nM DNA鋳型を補充したEcoPro T7大腸菌抽出物10 µl容積中で実施した。

【0255】

Strep ThermoFastプレートウェルをビオチン化hTNFR1標的抗原(0.1 µlの30 µMストック/ウェル)またはBSA陰性対照(0.1 µlの2 mg/mlストック/ウェル)で室温で1時間被覆し、続いて緩衝液C(10 mMトリス、100 mM KCl、0.05% Tween 20、5 mM MgCl₂および0.1 mM EDTA)で3回洗浄する。

【0256】

インビトロ発現反応を25 で3時間インキュベートし、次いで緩衝液Cを用いて100 µlに希釈し、先にビオチン化hTNFR1またはBSAで被覆したStrep ThermoFastプレートウェル(ABgene、英国)に2つの50 µlアリコートとして適用し、室温でさらに1時間インキュベートし、緩衝液Cで3回洗浄して、結合していないDNAを除去する。

【0257】

オリゴヌクレオチドAS79およびAS80ならびにiQ SYBR Green Supermix(Bio-Rad Laboratories、カタログ番号170-8880)を製造メーカーの説明書に従って用いて結合DNA分子を増幅した。増幅サイクルは以下であった: 2分94、続いて15秒94、30秒60 および30秒72の40サイクル。DNA量をBioRad MiniOpticonリアルタイムPCR機械(Bio-Rad Laboratories、Hercules CA)上で定量

化し、Bio-Rad Laboratoriesにより提供されたOpticon Moni-torバージョン3.1.32(2005)ソフトウェアを用いて解析した。既知のDNA濃度の試料からの標準曲線は、500~5×10⁸分子/反応の範囲を網羅した。

【0258】

選択の第10ラウンドまで、各ラウンドが先行ラウンドより多くのDNAを回収するにつれライブラリ適応度は増したが、これは平均結合dAb数が増加したことを示唆する。この時点以降、リアルタイムPCRにより測定したDNA回収レベルに上昇は見られず、選択の追加ラウンドはdAb親和性においてさらなる改善を有意に生じなかったことが示唆される。第10および第13ラウンドの選択された集団をクローン化し、配列し、発現させて、未精製形態の解離定数率をBIAcoreでアッセイした。ライブラリの多様性は大いに低減し、BIAcore dAb上清スクリーニングにより測定した改善された(2~3倍の)解離定数率を示すいくつかのクローンが見出された。これらの改善されたdAbのDNAシーケンシングによりDOM1h-574-25~DOM1h-574-40を特定した。

10

【0259】

ライブラリの多様性は大いに低減し、BIAcore dAb上清スクリーニングにより測定した改善された(2~3倍の)解離定数率を示すいくつかのクローンが見出された。これらの改善されたdAbのDNAシーケンシングによりDOM1h-574-25~DOM1h-574-40を特定した。

20

【0260】

これらのdAbに基づき特定された有益な変異を下にCDRごとに分けて列挙する：

CDR1：V30は、I、LまたはFに有益に変異している。

CDR2：S52は、AまたはTに有益に変異している、

N52aは、DまたはEに有益に変異している、

G54は、AまたはRに有益に変異している、

T57は、R、KまたはAに有益に変異している、

A60は、D、S、TまたはKに有益に変異している、

D61は、E、HまたはGに有益に変異している、

S62は、AまたはTに有益に変異している、

CDR3：E100は、Q、V、A、DまたはSに有益に変異している、

D101は、E、V、HまたはKに有益に変異している。

30

【0261】

第一に、クローンDOM1h-574-30、-31、-38および-39のCDR1+2をクローンDOM1h-574-25、-26、-27および-28のCDR3とミニライブラリ中で組換えた。これらのdAbは、BIAcore親和性の改善が最も大きいdAbを代表し、したがってこれらのdAbの組み合わせが親和性の向上した新規配列を特定する最適な機会であるため、これらのdAbを選択した。生成した組換えdAbはDOM1h-574-65~DOM1h-574-79およびDOM1h-574-84~DOM1h-574-88：配列番号：...~...]であり、このうちDOM1h-574-72が最も強力であった。続いて、クローンDOM1h-574-89~DOM1h-574-93、DOM1h-574-109~DOM1h-574-149、およびDOM1h-574-151~DOM1h-574-180において、残りの変異の有用性を評価するためにこのdAbを使用した。これらのクローンのほとんどを発現させ、精製して、BIAcore上の結合、MRC5細胞アッセイ法における効能およびトリプシン消化耐性により測定したプロテアーゼ安定性についてアッセイした。プロテアーゼ安定性は、dAb 1mg/mlのPBS溶液を減量トリプシン(Promega社、V511A

40

50

トリプシン)とインキュベートすることにより測定した。5つの異なる濃度のトリプシン(34、17、8.5、4.25および2.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$)ならびにトリプシンを欠く対照でインキュベートを実施した。37で3時間インキュベート後、ローディング染料を添加することによりタンパク質分解反応を停止し、LabChip 90システム(Caliper Life Sciences)上で残った非切断dAb量を測定した。最も改善されたクローンの効能は、親和性成熟のために使用される開始dAbであるDOM1h-574-14の約30倍改善された。MRC5細胞アッセイ法において最も強力であったものは以下である: DOM1h-574-109、DOM1h-574-132、DOM1h-574-135、DOM1h-574-138、DOM1h-574-156、DOM1h-574-162およびDOM1h-574-180(図11)。

10

【0262】

驚くべきことに、一方の親和性/効能の構造決定因子と他方のプロテアーゼ安定性は異なることを見出した。列挙した変異のほとんどは親和性をBIAcoreにより測定したサブnMの範囲で改善した一方、トリプシン耐性も低減した(dAbのプロテアーゼ安定性を決定するために適したアッセイの詳細については、WO2008149143およびWO2008149148を参照のこと)。他方、変異D101V(Kabatナンバリング)は、dAb親和性が他に試験した任意の配列に比べて約2倍低減したにもかかわらず、最良のプロテアーゼ安定性と非常に高頻度に関連した。最もプロテアーゼの安定したdAbは以下である: DOM1h-574-93、DOM1h-574-123、DOM1h-574-125、DOM1h-574-126、DOM1h-574-129、DOM1h-574-133、DOM1h-574-137およびDOM1h-574-160(図12)。

20

【0263】

最も有望なDOM0100 dAbの特性決定

BIAcore結合およびMRC5細胞アッセイ効力データに基づき、12個のDOM0100 dAb部分集合をTNFR1への結合動態、細胞アッセイ法における効能および生物物理学的特性のさらなる特性決定のために選択した。これらすべての実験において、dAbを大腸菌中で発現させ、流線型タンパク質Aを使用し、続いてPBS溶液中で透析して精製した。この特性決定のために用いた12個のdAbは以下であった: DOM1h-574-72、DOM1h-574-109、DOM1h-574-126、DOM1h-574-133、DOM1h-574-135、DOM1h-574-138、DOM1h-574-139、DOM1h-574-155、DOM1h-574-156、DOM1h-574-162およびDOM1h-574-180。ある実験において、DOM1h-574-16を参照として含んだ(図13)。

30

【0264】

結合特性DOM0100 dAb(抗TNFR1dAb)

BIAcoreにより異なるdAbの会合および解離率を測定し、このようにしてヒトTNFR1とマウスTNFR1の両方に対する結合親和性を確立した。実験を行い、それぞれの種のビオチン化TNFR1(R&D Systems社)を用いて、ストレプトアビジン被覆BIAcoreチップにカップリング後、濃度範囲のdAbを注入した。結果を表3に要約する。すべてのdAbがヒトTNFR1への高い結合親和性($KD < 350 \text{ pM}$)ならびにマウスTNFR1への良好な親和性($KD < 7 \text{ nM}$)を示す。ヒトTNFR1とマウスTNFR1間のdAb親和性差が約20倍であることはマウスTNFR1とヒトTNFR1間の限定的な配列相同を考慮すると非常に驚くべきことであり、受容体において高度に保存されたモチーフの標的が示唆され得る。

40

【表 3】

ヒトTNFR1とマウスTNFR1のためのDOM0100 dAbの会合および解離のBIAcore解析。最も強力な抗ヒトTNFR1 dAbは、最も強力な抗マウスTNFR1 dAbでもある傾向がある（例えばDOM1h-574-138およびDOM1h-574-156）。

DOM0100 dAb	ヒト			マウス		
	<i>K_{on}</i>	<i>K_{off}</i>	<i>KD</i>	<i>K_{on}</i>	<i>K_{off}</i>	<i>KD</i>
	($\times 10^5$ $M^{-1} s^{-1}$)	($\times 10^{-5}$ s^{-1})	(pM)	($\times 10^5$ $M^{-1} s^{-1}$)	($\times 10^{-4}$ s^{-1})	(nM)
DOM1h-574-72	2.5	8.4	350	1.0	6.8	6.9
DOM1h-574-109	2.4	5.5	230	1.2	3.3	2.8
DOM1h-574-126	3.8	7.9	210	1.6	6.8	4.4
DOM1h-574-133	2.6	8.8	340	1.4	7.5	5.2
DOM1h-574-135	2.5	5.2	210	1.1	4.5	3.8
DOM1h-574-138	2.5	3.8	150	1.3	3.0	2.4
DOM1h-574-139	1.4	3.7	270	0.7	3.0	4.4
DOM1h-574-155	2.4	4.3	180	1.1	3.3	3.7
DOM1h-574-156	3.0	4.3	150	1.4	3.0	2.1
DOM1h-574-162	2.9	4.4	150	1.4	3.4	2.5
DOM1h-574-180	2.7	4.1	150	1.2	3.2	2.7

【0265】

DOM0100 dAbの生物物理学的特性

DOM0100 dAbの生物物理学的特性（プロテアーゼ安定性、熱安定性および溶液中状態等）についてさらに特性決定した。プロテアーゼ安定性は、dAb 1mg/mlのPBS溶液を減量トリプシン（Promega社、V511Aトリプシン）とインキュベートすることにより測定した。5つの異なる濃度のトリプシン（34、17、8.5、4.25および2.13 $\mu g/ml$ ）ならびにトリプシンを欠く対照でインキュベートを実施した。37℃で3時間インキュベート後、ローディング染料を添加することによりタンパク質分解反応を停止し、LabChip 90システム（Caliper Life Sciences）上で残った非切断dAb量を測定した。量は、対照反応において存在する量のパーセンテージとして定量化した。これを表4に要約する。示差走査熱量測定（DSC）機器（Microcal社、マサチューセッツ）を用いてDOM0100 dAbの熱安定性を測定した。dAb 1mg/mlのPBS溶液を機器中でインキュベートして融点を測定した。結果を表4に要約する。最終的に、サイズ排除クロマトグラフィーおよびマルチアングルレーザ光散乱（SEC-MALLS）を用いてdAbの溶液中状態を測定した。dAbをSEC-MALLS 1mg/mlのPBS溶液に注入して主要ピークの質量を測定した。DOM0100 dAbは、それらの溶液中状態に基づき単

量体または二量体のいずれか 2 群に分割できた。概要については表 4 を参照されたい。

【表 4】

DOM0100 dAb の生物物理学的特性の概要。目的とする dAb 特性の組み合わせは、受容体架橋およびそれに続くアゴニズムもしくは活性欠如を回避するための、高いトリプシン安定性、高い熱安定性および単量体溶液中状態である。34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシンで 37℃ で 3 時間インキュベート後に残った活性を、t0 の活性パーセンテージとして表に列挙する。融点 (Tm) を DSC により測定し、溶液中状態を SEC-MALLS により測定した。最もトリプシン安定している dAb (DOM1h-574-133) は二量体であるため好ましくないことが表で示される。特性の最良の組み合わせを有する dAb は以下である：DOM1h-574-109、DOM1h-574-156 および DOM1h-574-162。値を測定しなかった場合、(ND) と示す。

DOM0100 dAb	トリプシン安定性 (残った活性%)	Tm ℃	溶液中状態
DOM1h-574-72	15	56	単量体 (70%)
DOM1h-574-109	23	55.2	単量体 (70%)
DOM1h-574-125	ND	53.5 / 57.2	不良データ
DOM1h-574-126	50	55.4 / 59.6	不良データ
DOM1h-574-133	60	57.6 / 59.6	二量体 (90%)
DOM1h-574-135	5	51.5	単量体 (90%)
DOM1h-574-138	17	54 / 6.9	単量体/二量体均衡
DOM1h-574-139	2	52.1 / 55.1	不良データ
DOM1h-574-155	7	53	単量体 (75%)
DOM1h-574-156	12	55	単量体 (90%)
DOM1h-574-162	10	54.2	単量体 (90%)
DOM1h-574-180	5	53.2	単量体 (75%)

10

20

30

【0266】

DOM0100 dAb の機能的特性決定

DOM0100 dAb の機能活性および種間交差反応性について、下記のヒト MRC-5 細胞アッセイ、マウス L929 細胞系およびカニクイザル CYNOM-K1 細胞系を用いて特性決定した。ヒト TNFR1 シグナル伝達の機能的阻害のため、ヒト線維芽細胞系 MRC-5 を用量範囲の dAb でインキュベートしてから、200 pg/ml TNF (Peprotech 社) で 18 時間刺激した。この刺激後、培地を除去して、TNF への反応中に細胞により産生された、培地中 IL-8 レベルを ABI8200 (Applied Biosystems 社) を用いて測定した。dAb の IL-8 分泌ブロック能は、dAb がいかにうまく TNFR1 媒介性シグナル伝達を阻害するかの機能的読み出しである。MRC5 細胞アッセイ法における 12 個の DOM0100 dAb の試験結果を表 5 に示す。マウス L929 細胞系を用いて機能的マウス交差反応性を決定し、12 個の DOM0100 dAb による TNF 誘発性細胞毒からの保護レベルを評価した。

40

50

このアッセイでは、細胞を用量範囲の d A b で再インキュベートし、続いてアクチノマイシンの存在下で T N F を刺激する。一晚インキュベート後、細胞の生存能を測定し、d A b 濃度に対してプロットする。D O M 0 1 0 0 d A b は T N F 細胞毒から保護し、N D 5 0 値は 2 0 ~ 4 0 n M の範囲となった。ヒト M R C 5 細胞とマウス L 9 2 9 細胞間で観察された D O M 0 1 0 0 d A b の効能差は、B I A c o r e により測定した親和性差と類似した桁数である。

【 0 2 6 7 】

最終的に、C Y N O M - K 1 細胞系を用いて d A b のカニクイザル交差反応性を試験した。簡単に述べると、d A b を平底細胞培養プレート中、C Y N O M - K 1 細胞 (E C A C C 9 0 0 7 1 8 0 9) (5 × 1 0 3 細胞 / ウェル) で 3 7 ° で 1 時間インキュベートした。組換えヒト T N F (P e p r o t e c h 社) を添加し (最終濃度 2 0 0 p g / m l) 、プレートを 1 8 ~ 2 0 時間インキュベートした。次いで培養上清中に分泌された I L - 8 レベルを D u o S e t E L I S A d e v e l o p m e n t システム (R & D S y s t e m s 社、カタログ番号 D Y 2 0 8) を製造メーカーの説明書 (文書番号 7 5 0 3 6 4 . 1 6 バージョン 1 1 / 0 8) に従って用いて測定した。I L - 8 分泌阻害パーセンテージに対して d A b 濃度をプロットすることにより N D 5 0 を測定した。D O M 0 1 0 0 d A b の結果を表 5 に示す。

【表 5】

異種の細胞ベースアッセイ法におけるDOM0100 dAb機能活性の概要。提示した値はすべてそれぞれの細胞アッセイ法において決定したND50値（nM）であり、NDは未測定を表す。MRC5アッセイ法におけるDOM0100 dAb間差は制限されるが、マウスおよびカニクイザル細胞アッセイ法において観察されたものと同じ傾向があった。種全体で、DOM1h-574-156、DOM1h-574-109およびDOM1h-574-138は最も強力なdAbである。

DOM0100 dAb	ヒト MRC5 nM	マウス L929 nM	カニクイザル CYNOM-K1 nM
DOM1h-574-72	2.7	46	2.3
DOM1h-574-109	1.8	20	2.3
DOM1h-574-126	1.9	35	1.2
DOM1h-574-133	2.1	110	1.7
DOM1h-574-135	1.8	47	1.5
DOM1h-574-138	1.4	23	1.2
DOM1h-574-139	1.1	28	1.8
DOM1h-574-155	2.1	67	1.6
DOM1h-574-156	0.9	22	ND
DOM1h-574-162	1.2	27	ND
DOM1h-574-180	1.9	34	ND

10

20

30

【0268】

DOM0100 dAbのエピトープマッピング

DOM0100 dAbのTNFR1上の結合エピトープが活性機序と相関し得るため、TNFR1中のどの残基がDOM0100 dAbにより認識されるかを確立するために複数の試みが行われた。2つの実験アプローチ：1) BIAcoreエピトープ競合および2) 部分的に重複するペプチドを用いたペプチドスキャン、を選択してエピトープを確立した。

40

【0269】

1) BIAcoreエピトープ競合：

TNFR1上の単エピトープにおいて、2つの異なる抗体または抗体断片間で競合するかを決定するための定性的アプローチは、BIAcoreにより行い得る（Malmborg, J. Immunol. Methods 183, p7 (1995)）。この目的のため、ビオチン化TNFR1は、BIAcore SAチップ上に被覆し、続いて任意の競合抗体（断片）の不在下で異なるdAbまたは抗体を連続注入して各抗体結合レベルを確立する。続いて、同じ濃度の抗体（断片）を用いて反復注入するが、今度は抗体の注入直後に競合を決定する。結合抗体（断片）は、共鳴単位（RU）において定量

50

化し、第二の抗体の存在および不在下で比較する。2つの抗体（断片）間で競合しない場合、RU結合数は他の抗体の存在および不在下で同一となる。逆に、競合する場合、第二の抗体（断片）注入中にRU結合はほとんどないかまたはない。DOM1h-574-16において、TNF競合dAb（DOM1h-131-511（WO2008149144を参照のこと））およびmAb（mAb225（R&D Systems社；カタログ番号MAB225））の存在および不在下で共鳴単位結合数は変化せず、記載のdAbおよびmAbにとって新規のエピトープを示す（図14および15）。TNFR1は、4つのシステイン豊富ドメインからなる多ドメイン受容体である。ドメイン2および3はTNF結合に関与し（Banner et al., Cell, 73, p431（1993））、対してプレリガンド会合ドメイン（PLAD）としても知られている第一ドメインは、TNF結合前に受容体の前会合を促進する（Chan et al., Science, vol 288, p2351（2000））。BIAcore上の既知のPLAD結合mAbクローン4.12（Invitrogen社、カタログ番号Zymed 33-0100により供給）との競合は非常に制限され、クローン4.12結合RU数は、DOM0100 dAb（DOM1h-574-16）の存在下で非存在下に比べて最大20%減少することを示す（図16）。これは、DOM1h-574-16により認識された大部分のエピトープはクローン4.12により認識されないことを示す。DOM1h-574-16との完全な競合を示したdAbは、選択中に単離された別のDOM0100 dAb：DOM1h-510のみであった（図17）。DOM0100 dAbがマウスTNFR1への交差反応結合を示すため、BIAcoreチップに被覆したマウスTNFR1上で同一実験を施行して、抗マウスTNFR1、非競合dAb DOM1m-21-23と競合するかどうかを確立できた（WO2006038027を参照のこと）。際立つことに、DOM1m-21-23とDOM0100 dAb DOM1h-574-16間には競合が見られない（図18）。マウスと交差反応するDOM1h-574 dAbの独特な特性は、新規エピトープは、任意の有意なマウス/ヒト交差反応を示す上記dAbまたは抗体（DOM1h-131-511、mAB225、クローン4.12およびDOM1m-21-23）のいずれとしても認識されてはならないことも強調する。

【0270】

2) TNFR1のペプチドスキャン。

【0271】

TNFR1上の任意の線型エピトープが我々のDOM1h-574 dAb系統により認識されることを確立するため、15merペプチドスキャン（3残基でそれぞれ補正）を合成してTNFR1の完全な細胞外ドメインを覆った。これらのペプチドはそれぞれビオチン基を含み、これらはForteBio Octet機器（Menlo Park、カリフォルニア、米国）の異なるセンサーチップにカップリングするために使用した。ForteBio Octet機器は分子の相互作用のリアルタイム測定を可能とするバイオレイヤー インターフェロメトリー（Bio-Layer Interferometry（BLI））、非標識、バイオセンサー技術を用いる。Octet機器はバイオセンサーまで白色光を下に放ち、反射光を収集する。バイオセンサーチップに結合した分子数の変化はいずれも反射光のこの干渉パターンをシフトさせ、リアルタイムで測定される。我々の実験では、全57チップを異なるペプチドで被覆し、DOM1h-574-16 dAbでインキュベートしてdAbの各チップへの結合をモニタリングした。3つを除いて、チップの大部分は確実な結合を示さなかった。3つのペプチドは、いかなる結合も示さない陰性対照ペプチドと共にBioForte Octet上で、ストレプトアビジン被覆BIAcoreチップにカップリングさせ、これらのペプチドに対するDOM1h-574-16、DOM1h-131-511およびDOM1m-21-23の結合を測定した（図19、20および21）。DOM0100 dAb（DOM1h-574-16）のみが任意の3つの特異性ペプチドへの結合を示し、残りのdAbはいずれの結合も示さなかった。陰性ペプチド対照上では、いずれのdAbに対する結合も観察されなかった

。3つのTNFR1ペプチドは2群：1)ドメイン1に位置するペプチド1(N S I C C T K C H K G T Y L Y)と、2)TNFR1のドメイン3で重複しているペプチド2(C R K N Q Y R H Y W S E N L F)および3(N Q Y R H Y W S E N L F Q C F)に分割できた。特にペプチド1については、注目に値することに、一番最後の残基を除き、この配列はマウスとヒトTNFR1間で十分に保存されているTNFR1中の15の連続アミノ酸残基のストレッチのみに対応する(この保存されているストレッチは配列：N S I C C T K C H K G T Y Lを有する)。このエピトープへの結合はDOM1h-574系統において観察されたマウス交差反応性を説明する。

【0272】

インビボ半減期延長のためのDOM0100 dAbのフォーマット

10

慢性炎症障害(例えばRAおよび乾癬等)の治療において有用であるDOM0100 dAbについて、dAbが全身に送達されて長期間活性化することが望ましい。これを達成するために多くの異なるアプローチ(例えばPEG部分のdAbへの添加、血清アルブミン結合dAb(A1budAbTM)との遺伝的融合物としてのdAb発現、またはIgGのFc部分との遺伝的融合を含む)が利用可能である。DOM0100 dAb DOM1h-574-16において、PEGとA1budAb融合の両方を試験した。

【0273】

1)40K(40KDa)線型PEGとの接合による半減期延長。

この目的のため、dAbのC末端に遊離システインを有するDOM1h-574-16の変異型を作製した。大腸菌中で変異型を発現させ、流線型タンパク質Aを用いて精製した。マレイミド化学(WO04081026を参照のこと)を用いて、40K線型PEG(DOWpharma社)をこのDOM1h-574-16変異型のC末端およびFPLCカラム上に流して清浄した反応物に接合した。この分子をDMS0162と名付けた。PEG接合によるDMS0162の半減期延長効果をラットPK試験において評価した。3匹の雌Sprague-Dawleyラットに標的用量2.5mg/kgタンパク質を静脈内投与した。血液試料を投与後0.17、1、4、8、24、48、72、96、120および168時間にラットから採取し、アッセイして血中DMS0162量を測定した。DMS0162試料をTNFR1-捕獲およびヤギ抗hfAb検出ELISAで試験した。アッセイの生データを各血清試料中の薬剤濃度に変換した。各時点の平均μg/mL値を次いでノンコンパートメント解析(NCA)を用いてWinNonlin解析パッケージ、例えばバージョン5.1(Pharsight社、マウンテンビュー、カリフォルニア94040、米国から入手可能)で解析した。これらのデータにより、ラットにおけるDMS0162の平均終末半減期は20.4時間であった。

20

30

【0274】

2)A1budAbとの遺伝的融合を介した半減期延長

a)A1budAbと融合した抗TNFR1dAbの機能的特性決定

既に我々はdAbのPK半減期をインビボで延長するためにアルブミン結合dAb(A1budAb)との遺伝的融合の使用について記載済みである(例えば、WO04003019、WO2006038027、WO2008149148を参照のこと)。これらの融合の所望の態様は以下である：

40

1)A1budAbの融合は、TNFR1結合dAbの結合親和性に実質的に影響を与えない、

2)異種由来のアルブミンに対するA1budAbの親和性は、PK半減期延長が期待できるものであるべきである。

【0275】

異なるA1budAbとDOM1h-574-16との対合を評価するために、表6に対合を列挙した(構築物はN末端からC末端方向で、抗TNFR1dAb(すなわち、DOM0100 dAb)-リンカー-A1budAb-mycであった)。DMS0184を除いたすべてが、検出目的のために恐らく使用し得るmycタグをC末端に含む。

【表 6】

MRC5細胞アッセイ法における抗TNFR1dAb/AlbudaAb融合のBIAcore解離速度(off-rate)変数および抗TNFR1dAb効能。DMS0184を除く列挙したすべてのdAb/AlbudaAb融合物がAlbudaAbのC末端にmycタグを含む。一部の場合、BIAcoreにより血清アルブミンへの結合が観察されず(NB)、他の場合では測定しなかった(ND)。MRC5アッセイ法において、一部のデータは呼び値を正当化する上で十分な頻度の測定を行わなかった(ND*)。

DMS	DOM010	リンカー	Albuda	Koff	Koff	ND50
	0 dAb		b C末端d	MS	f H	(MRC
	N末端dAb		Ab	A S ⁻¹	S A S	5) nM
DMS0	DOM1h-	AST	DOM7h-	0.75	0.17	6
182	574-16		11			
DMS0	DOM1h-	ASTS	DOM7h-	0.72	0.16	19
184	574-16	GPS	11			
DMS0	DOM1h-	AST	DOM7h-	0.08	0.12	20
186	574-16		11-12			
DMS0	DOM1h-	ASTS	DOM7h-	0.08	0.12	17
188	574-16	GPS	11-12			
DMS0	DOM1h-	AST	DOM7h-	0.13	0.01	ND*
189	574-16		11-3		7	
DMS0	DOM1h-	ASTS	DOM7h-	0.16	0.01	ND*
190	574-16	GPS	11-3		9	
DMS0	DOM1h-	AST	DOM7m-	0.11	NB	ND*
191	574-16		16			
DMS0	DOM1h-	ASTS	DOM7m-	0.09	NB	ND*
192	574-16	GPS	16			
DMS0	DOM1h-	ASTS	DOM7h-	0.00	0.00	12
163	574-16	GPS	11-15	62	24	
DMS0	DOM1h-	ASTS	DOM7m-	ND	ND	16
168	574-72	GPS	16			
DMS0	DOM1h-	ASTS	DOM7h-	ND	ND	2.7
169	574-72	GPS	11-12			

【0276】

すべてのAlbudaAbの配列を以下に示す。DOM7h-11およびDOM7m-16のヌクレオチドおよびアミノ酸配列については本明細書に開示している。

【0277】

発現および精製後、BIAcore上ですべての構築物のマウス血清アルブミンとヒト血清アルブミンの両方への結合について試験した。解離速度(off-rate)を測定してAlbudaAb間の融合分子の半減期延長における適応性を識別するために用いた。リンカーはAlbudaAbのアルブミンに対する親和性に対してほとんど影響を与えないのに対し、dAbとそれらのアルブミンの親和性間には有意差があった。マウス結合のために最良のAlbudaAbはDOM7h-11-15であり、DOM7m-16およびDOM7h-11-12が続いた(図22)。しかしながら、DOM7m-16は、ヒトアルブミンに対して結合を示さず、対してDOM7h-11-15とDOM7h-11-3はヒトアルブミン結合において最良の対合であった(図23)。アッセイ法には変動が見られたが、一般に、ヒトMRC-5細胞アッセイ法における親和性には、DOM7h-11系統の任意のAlbudaAbとの融合時、単量体DOM1h-574-16と同じdAbにおいて得られたND50値の質の低下は限られていた。しかしながら、DOM1h-

574-72との対合時およびDOM7h-11-12との比較時、Albuda DOM7m-16の影響が見られた。DOM7m-16対合は、MRC-5細胞アッセイ法において、融合物の抗TNFR1部分における効能を有意に低下し、これは同じ抗TNFR1dAbをDOM7h-11-12と対合時には見られなかった。これらの結果は、DOM7h-11系統由来のAlbudaとの対合の利点を強調する（例えば、抗血清アルブミンdAbはDOM7h-11のアミノ酸配列と少なくとも80、90または95%等しいアミノ酸配列を有する）。

【0278】

b) 異なるDOM0100-Albuda融合のためのマウスPK

PEGの代替法は、血清アルブミンを認識するドメイン抗体(Albuda)との遺伝的融合物としてのDOM0100 dAbの発現である。このアプローチを評価するために、DOM1h-574-16、アラニンセリントレオニン(AST)リンカーおよびDOM7h-11、続いてmycタグ(DMS0182)からなる遺伝的構築物を作製した。この構築物を大腸菌発現ベクターpDOM5に結紮し、大腸菌株HB2151に形質転換して発現させた。固体支持体にカップリングしたタンパク質Lを用いてDMS0182を上清から精製してから、流線型タンパク質Aにより任意の遊離単量体を除去した。DMS0182を3匹の雌Sprague-Dawleyラットに用量5mg/kgで静脈内投与した。投与後0.17、1、4、8、24、48、72、96、120および168時間に血液試料を採取した。血清試料を調製してから、これらを3つの別々のELISAにおいて試験した：1)ウサギ抗ヒト鎖検出で捕獲したヤギ抗myc、2)TNFR1-Fc検出で捕獲したヤギ抗myc、ならびに3)ヤギ抗fAb検出で捕獲したTNFR1。アッセイの生データを各血清試料中の薬剤濃度に変換した。各時点の平均μg/mL値を次いでノンコンパートメント解析(NCA)を用いてWinNonlin解析した。DMS0182を3つの記載のアッセイで平均終末半減期5.2~6.4時間で試験した。

【0279】

同じDMS0182を用いてPK追加試験を行い、今回はマウスに10mg/kg腹腔内投与した。マウス3匹を以下の各時点で出血させた：0.17、1、4、12、24、48および96時間。前述のアッセイを用いた血清解析により、マウスにおけるDMS0182の血清半減期は約5.9時間であることが特定された(図24)。明らかにAlbuda DOM7h-11の添加は、dAbの半減期を、これまでに遊離dAbをマウスおよびラットに注入時に見られた半減期(T1/2約20分、例えば、W004003019、W004003019を参照のこと)よりも延長した。しかしながら、半減期のさらなる改善は有益である。ラットおよびマウスアルブミンのDOM7h-11の結合親和性試験により、DOM1h-574-16に融合時、BIACoreにより測定した1μM超の親和性を特定した。したがって、これらの直列融合のために使用されるAlbudaならびにリンカーの両方を変化させた。異なるDOM0100 dAb(DOM1h-574-72)、異なるリンカー(ASTSGPS)、2つの異なるAlbuda(DOM7m-16およびDOM7h-11-12)(両方ともmycタグが続く)からなる2つの新規遺伝的構築物、それぞれDMS0168およびDMS0169を作製した(構築物はN末端からC末端方向で、抗TNFR1dAb(すなわち、DOM0100 dAb)-リンカー-Albuda-mycであった)。これらの構築物をpDOM5中にクローン化し、大腸菌中で発現させ、タンパク質Lおよびタンパク質Aを用いて精製した。MSAへの結合について両方をBIACore上で解析し、有意な改善を観察した(両構築物において約200nMのマウスアルブミン結合親和性に至る)。半減期延長に対する改善されたアルブミン結合の効果を決定するため、DMS0168およびDMS0169をマウスに2.5mg/kg静脈内投与し、続いてマウス3匹を以下の各時点で出血させた：0.17、1、4、8、24、48、96および168時間。これら両分子の血清半減期はELISAベース方法における血清中の融合タンパク質の定量化により測定した；ヤギ抗mycを捕獲のために使用し、続いてTNFR1-Fcで検出し、抗ヒト-

Fc/HRPを介して読みとった。この方法の他に、高密度のヒトTNFR1で被覆したチップへの結合を介したDMS0169のBIACore定量化を用いてデータをプロットし、マウスの終末半減期を算出した。DMS0168の終末半減期は15.4時間(ELISA)であり、DMS0169の終末半減期は17.8時間(ELISA)または22.0時間(BIACore社)のいずれかであった(図24)。これらの半減期は両方とも、DOM0100 dAbをDOM7h-11に融合時の半減期に比べて有意に延長し、Alb dAb融合物の終末半減期に対するアルブミンの増大した親和性の影響を強調する。

【0280】

DOM0100 - Alb dAb融合物の機能的特性決定および生物物理学的特性

抗アルブミンdAbに融合した抗TNFR1 dAbの最適フォーマットを決定するため、単一抗TNFR1 dAbを採取し(DOM1h-574-72)、3つの異なるリンカー(AST、ASTSGPSおよび(GGGGS)₃)を用いて4つの異なるAlb dAb(DOM7h-11-3、DOM7h-11-12、DOM7h-14-10およびDOM7h-14-18)と対合させた。これらの構築物はいずれもmycタグを含まなかった。全12の構築物を大腸菌中に発現させ、タンパク質Lの2つのステップ過程を用いて精製後、タンパク質Aを精製して発現レベルを定量化した。加えて、SEC-MALLSを用いて分子の溶液中状態を測定した。結果を表7に要約する。結果の解析によりいくつかの立派な事項が観察された: 1) DOM1h-574-72とDOM7h-11系統dAbとの対合ではDOM7h-14系統対合時に比べて発現レベルが有意に高かった、2) DOM7h-11対合では単量体溶液中状態が観察され、対してDOM7h-14対合では単量体/二量体の均衡に至った。単量体溶液中状態は、これらの分子は受容体架橋を誘発して、その結果、受容体を活性化する(アゴニズム)かまたは阻害剤活性を中和する可能性が低いため、好ましい。さらに、単量体溶液中状態は、これらの分子はサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により解析時に凝集が少なく、より不純物のない傾向にあるため、発現観点からも望ましい。DOM7h-11 Alb dAbとの対合はDOM7h-14 Alb dAb対合に比べ、高い発現レベルおよび単量体溶液中状態の高いパーセンテージに至るといふ所見から、DOM7h-11対合の方が好ましい。

10

20

【表 7】

発現と溶液中状態に最適なリンカーと A l b u d A b の組み合わせを評価するために生成した融合分子の組み合わせの概要。3つの異なるリンカー、アミノ酸組成物により示される、A S T、A S T S G P S、ならびに4つのグリシンと1つのセリンの3反復 ($(G_4S)_3$) からなるグリシン-セリンリンカーを用いた。S E C - M A L L S を用いて溶液中状態を決定し、単量体または単量体/二量体均衡のいずれかとして示した。いくつかの A l b u d A b 融合物の発現は低く、溶液中状態を決定するには不十分な材料であり、これらを (N D) と示す。

DMS	DOM010	リンカー	A l b u d A b	発現 (mg / 1)	S E C - M A L L S	
	0 d A b					10
DMS 0 111	DOM1h-574-72	A S T	DOM7h-11-3	12	単量体 (95%)	
DMS 0 112	DOM1h-574-72	A S T	DOM7h-11-12	11	単量体 (95%)	
DMS 0 113	DOM1h-574-72	A S T	DOM7h-14-10	0	N D	
DMS 0 114	DOM1h-574-72	A S T	DOM7h-14-18	1	N D	
DMS 0 115	DOM1h-574-72	A S T S G P S	DOM7h-11-3	26	単量体 (98%)	20
DMS 0 116	DOM1h-574-72	A S T S G P S	DOM7h-11-12	15	単量体	
DMS 0 117	DOM1h-574-72	A S T S G P S	DOM7h-14-10	9	単量体/二量体均衡	
DMS 0 118	DOM1h-574-72	A S T S G P S	DOM7h-14-18	3	単量体/二量体均衡	
DMS 0 121	DOM1h-574-72	(G_4S) ₃	DOM7h-11-3	14	単量体 (98%)	30
DMS 0 122	DOM1h-574-72	(G_4S) ₃	DOM7h-11-12	12	単量体 (98%)	
DMS 0 123	DOM1h-574-72	(G_4S) ₃	DOM7h-14-10	5	単量体/二量体均衡	
DMS 0 124	DOM1h-574-72	(G_4S) ₃	DOM7h-14-18	7	単量体/二量体均衡	40

【0281】

さらに、精製した融合分子の親和性および効能を、それぞれ B I A c o r e T 1 0 0 および M R C 5 細胞アッセイを用いて測定した。B I A c o r e T 1 0 0 は、高感度の B I A c o r e バージョンであり、理想的には高い親和性結合剤の決定に適している (P a p a l i a e t a l . , A n a l B i o c h e m . 359, p112 (2006))。ビオチン化ヒト T N F R 1 をチップに被覆し、各12の A l b u d A b 融合物をこの表面上に4つの異なる濃度 (2、10、50および250 nM) で通過させた。本目的は、対合が抗 T N F R 1 d A b (D O M 1 h - 5 7 4 - 7 2) の標的に対する結合親和性に対して任意の有意な効果を有するかどうか確立することである。下表 8 に見る

ことができるように、対合間およびそれらのB I A c o r eによる親和性に対する効果に有意差はなかった。他の対合の3倍高い親和性を示したD O M 7 h - 1 4 - 1 8対合(D M S 0 1 1 8およびD M S 0 1 2 4)を除き、すべての組み合わせの親和性は類似した。しかし、驚くべきことに、すべてのA l b u d A b融合分子中のD O M 1 h - 5 7 4 - 7 2にて、非融合D O M 1 h - 5 7 4 - 7 2 d A bに比べ少なくとも2~3倍の親和性(K D)改善が観察された。この改善は、対合のために用いたA l b u d A bにかかわらず観察され、D O M 7 h - 1 4 - 1 8との対合で最も大きかった。異なる対合が抗T N F R 1 d A bの機能活性に影響を与えるか確立するために用いた第二の実験は、M R C 5細胞アッセイであった(表8)。M R C 5アッセイでは、より著しい対合間差が観察され、最良の効能はD O M 7 h - 1 1 - 3およびD O M 7 h - 1 1 - 1 2対合において観察され、対してD O M 7 h - 1 4 - 1 0(D M S 0 1 1 7)対合は効力を有意に減少した。

【表8】

3つの異なるリンカーを用いた4つの異なるA l b u d A bとのD O M 1 h - 5 7 4 - 7 2の対合のB I A c o r e T 1 0 0およびM R C 5解析。D M Sクロンの組成物については、表7を参照されたい。不十分な材料の故、すべての構築物の親和性定数を測定はしなかった(ND)。全体的にA l b u d A b対合後、B I A c o r e上にて親和性にヒットは観察されなかった。M R C 5アッセイ法において、D O M 7 h - 1 1 - 3とD O M 7 h - 1 1 - 1 2の対合で最も一致したデータが得られた。

DMS	B I A c o r e K o n (M ⁻¹ s ⁻¹)	B I A c o r e k o f f (s ⁻¹)	B I A c o r e K D (nM)	M R C 5 (N D 5 0 nM)
DMS 0 1 1 1	3. 7 E+5	6. 2 E-5	0. 1 7	1. 6
DMS 0 1 1 2	4. 0 E+5	5. 5 E-5	0. 1 4	1. 3
DMS 0 1 1 4	ND	ND	ND	3. 7
DMS 0 1 1 5	3. 6 E+5	5. 8 E-5	0. 1 6	1. 7
DMS 0 1 1 6	3. 7 E+5	5. 4 E-5	0. 1 4	1. 7
DMS 0 1 1 7	ND	ND	ND	2 5. 9
DMS 0 1 1 8	6. 4 E+5	4. 9 E-5	0. 0 7 6	1. 4
DMS 0 1 2 1	3. 0 E+5	6. 0 E-5	0. 2	1. 8
DMS 0 1 2 2	ND	ND	ND	1. 5
DMS 0 1 2 3	ND	ND	ND	5. 0
DMS 0 1 2 4	4. 5 E+5	3. 5 E-5	0. 0 7 7	1. 9
D O M 1 h - 5 7 4 - 7 2	2. 0 E+5	1. 1 E-4	0. 5 3	2. 7

【0282】

両単量体D O M 1 h - 5 7 4抗T N F R 1 d A bおよびA l b u d A bとの対合の生物物理学的および機能的特性決定結果を用いて、5つの融合分子の部分集合を構築し、発現させ、精製して、特性決定した。これら5つのそれぞれは以下の抗T N F R 1 d A bの1

つを含む：DOM1h-574-109、DOM1h-574-138、DOM1h-574-156、DOM1h-574-162およびDOM1h-574-180、それぞれASTリンカーを用いてDOM7h-11-3と対合した。構築物は、抗TNFR1dAbであった（すなわち、N末端からC末端方向でDOM0100 dAb-リンカー-Albu dAb、これらの構築物のいずれもタグを含まなかった）。発現した分子の溶液中状態についてSEC-MALLS上で、熱安定性についてDSC上で、ヒトTNFR1およびマウスTNFR1に対する親和性についてBIAcore上で、ならびに機能活性についてMRC5細胞アッセイ法で特性決定した。

【0283】

これら5つの直列融合分子の生物物理学的特性決定により、すべての融点が55超であり、溶液中単量体であることが示された（表9）。高い融点は、分子の下流プロセッシング中および保存中の両方で有益である分子の増大した安定性の指標である。さらに、患者においてインビボ医薬品として機能時、分解されるには感度を弱くすることにより分子の安定に有益であり得、その結果、その終末半減期が延長される。

【表9】

半減期延長のためのDOM7h-11-3 Albu dAbと抗TNFR1dAbとの好ましい組み合わせの概説。精製後、これらの融合分子の熱安定性（DSC）および溶液中状態（SEC-MALLS）を試験した。すべて単量体であり、DMS0133およびDMS0134の融点が最も高かった。

DMS	N末端からC末端方向で示した組成物	DSC (°C)	SEC-MALLS
DMS0132	DOM1h-574-109/AST /DOM7h-11-3	58.2/ 58.9	98%単量体
DMS0133	DOM1h-574-138/AST /DOM7h-11-3	59.0/ 59.4	98%単量体
DMS0134	DOM1h-574-156/AST /DOM7h-11-3	58.9/ 59.3	98%単量体
DMS0135	DOM1h-574-162/AST /DOM7h-11-3	58.0/ 58.7	98%単量体
DMS0136	DOM1h-574-180/AST /DOM7h-11-3	57.8/ 58.0	98%単量体

【0284】

BIAcoreによる抗TNFR1親和性の特性決定ならびにヒトMRC5および標準的マウスL929細胞アッセイ法における機能活性（表10）により、制限されるdAb間差が示された。しかしながら、融点、溶液中状態、発現、BIAcore、ヒトMRC5細胞アッセイおよび標準的マウスL929細胞アッセイ法におけるから全データを総合した結果、DMS0133およびDMS0134が好ましい組み合わせとして明らかになった。これら2つの融点が最も高く、これらはヒト細胞およびマウス細胞の機能的アッセイにおいて最も強力な組み合わせに属す。細胞アッセイ法における機能活性は、好ましい分子決定のための主要な駆動体である。

【表 10】

5つの最良の抗TNFR1/AlbuDAb融合分子の機能的特性決定および発現。精製後に発現レベルを測定した。親和性をBIAcoreにより測定し、機能活性をヒトMRC5および標準的マウスL929細胞アッセイ法における両方で測定した。発現はDMS0132、DMS0135およびDMS0134において最良で、細胞アッセイ法において最も強力な組み合わせはDMS0133、DMS0134およびDMS0135であった。

DMS	発現 (mg / l)	B I A c o r e o n (M ⁻¹ s ⁻¹)	B I A c o r e o f f (s ⁻¹)	B I A c o r e K D (n M)	MRC5 ND50 (nM)	L929 ND50 (nM)
DMS0132	12	1.9E+05	4.6E-05	0.25	1.04	6.8
DMS0133	6	3.6E-05	3.6E-05	0.20	0.99	4.2
DMS0134	9	1.9E+05	4.9E-05	0.26	0.96	5.8
DMS0135	11	1.8E+05	5.7E-05	0.32	1.17	5.9
DMS0136	3	1.9E+05	5.5E-05	0.30	1.97	5.4

10

20

【0285】

マウスの関節リウマチモデルにおけるDOM0100のインビボ有効性の実証

記載の抗TNFR1dAbの活性は有用であり、疾患を改変し得ることを示すため、マウスの関節リウマチモデルを、DOM1h-574-72-ASTSGPS-DOM7h-11-12-mycタグ(N末端からC末端方向)に融合したDMS0169で処理した。このマウスモデルは、ヒトTNFが過剰発現し(Tg197)、マウスTNFR1をコードする遺伝子がヒトTNFR1(hp55)遺伝子と置換されている遺伝子導入マウスモデルである。経時的に、これらのマウスは自然発生関節炎を発現し、これは処理中に関節サイズを測定することによりスコア化し(臨床スコア)、15週後に関節の組織学的解析を実施する(Keffer et al., EMBO.J., 10, p4025 (1991))。加えて、マウスの全身の健康は週1回測定する体重から推測し得る。6週目以降、マウス12匹を週2回10mg/kgのDMS0169または生理食塩水注射(対照群)のいずれかで処理した。6週目から15週目まで週1回、各マウスの臨床スコアと体重の両方をスコア化した(図25および26)。15週間後、マウスを屠殺して関節炎症の組織学的解析を行った(図27)。両臨床スコアに対するDMS0169の効果および組織学は非常に有意であり(p<0.001)、対してDMS0169で処理したマウスの体重は生理食塩水で処理した対照動物に比べて好ましく、関節リウマチにおけるDMS0169の治療的便益の可能性が示された。

30

【実施例】

40

【0286】

実施例1

TNFR1の部分的阻害:

競合抗TNFR1dAbと非競合抗TNFR1dAb間の区別

TNF受容体1(TNFR1、p55)を介したシグナル伝達は、TNFの受容体への結合の競合的阻害を介して直接的に、または阻害剤の存在に影響されないTNFの受容体への結合における非競合機序により間接的に阻害できる。非競合阻害剤の作用機序は、TNFR1のドメイン-1への結合により受容体の前リガンド集合をブロックすることにより生じ得る。これら2つのクラスのTNFR1-シグナル伝達阻害剤間を区別するため、受容体結合アッセイおよび細胞ベースのTNF誘発性サイトカイン放出アッセイが

50

ら組み合わせた情報を使用できる。

【0287】

簡単に述べると、標準的な受容体結合アッセイ TNFR1 - Fc 融合 (R&D Systems 社 (カタログ番号 372 - RI) において、配列は抗 IgG ビーズ上で被覆されたヒト TNFR1 (Leu30 - Thr211 & Asp41 - Thr211) - IEGRMD - ヒト IgG1 (Pro100 - Lys330) - 6His タグ) であり、TNFR1 を指向とする濃度範囲 (例えば 0.01 nM ~ 10 μM) のドメイン抗体でインキュベートする。続いて TNF を追加し、次いでビオチン化抗 TNF α 抗体および蛍光標識ストレプトアビジンを添加する。各測定は、ABI 8200 細胞検出アッセイ (FMAT) において測定し、使用した対応する dAb 濃度に対してプロットする。dAb 以外の TNFR1 のアンタゴニストおよび阻害剤のために類似の方法を使用できる。抗 TNFR1 dAb が TNF の受容体への結合と競合する場合、蛍光は dAb 濃度が上昇するにつれて低減し、結果的に阻害が観察される。逆に言えば、抗 TNFR1 dAb が TNF の受容体への結合と競合しない場合、dAb 濃度が上昇しても蛍光は変化せず、阻害は観察されない。したがって、抗 TNFR1 dAb は標準的 RBA において TNF の受容体 1 への結合を阻害する能力に基づき分類できる。

10

【0288】

競合的抗ヒト TNFR1 dAb の 1 例は重鎖 (Vh) dAb DOM1h - 131 - 511 であり、非競合抗 TNFR1 dAb の 1 例は Vh dAb DOM1h - 574 - 10 である。両 dAb を、dAb のために使用した標準的な大腸菌発現ベクター内にクローン化し、OnEx (Novagen) で自己誘導後に大腸菌培養培地内で発現させた。DOM1h - 574 - 10 のために使用した発現ベクターは、その活性に影響を与えない myc - タグを含有する dAb を生じた。両方を単一工程においてタンパク質 A ストリームラインを用いて精製し、細胞アッセイ実験のために緩衝液を PBS に交換した。図 28 に見ることができるように、RBA において競合 dAb DOM1h - 131 - 511 は TNF の TNFR1 への結合を阻害し、一方 DOM1h - 574 - 10 は TNF の TNFR1 への結合に対して影響がなかった。

20

【0289】

しかしながら、TNF の受容体への結合を阻害する能力を欠く dAb は TNFR1 を介した TNF 阻害媒介性シグナル伝達の阻害においても機能的活性を欠き得る。したがって、RBA は、サイトカイン放出の dAb 媒介性阻害が測定される TNF 誘発細胞アッセイと組み合わせるべきである。使用した特異的な細胞アッセイは標準的な MRC - 5 細胞アッセイである。簡単に述べると、このアッセイにおいて、ヒト線維芽細胞系 MRC - 5 をプレートし、用量範囲の抗 TNFR1 dAb で前インキュベートしてから低用量 TNF (200 pg/ml) を添加した。37 で TNF と 18 時間インキュベーション後、培養上清を吸引し、IL - 8 ABI 8200 細胞検出アッセイ (FMAT) を用いて IL - 8 放出を測定した。dAb が機能的に活性であるためには、TNF 媒介性シグナル伝達を阻害して、それにより TNF 刺激反応において MRC - 5 細胞により IL - 8 分泌レベルが低減しなければならない。図 29 に見ることができるように、競合 dAb (DOM1h - 131 - 511) と非競合抗 TNFR1 dAb (DOM1h - 574 - 10) は両方とも TNF 媒介性シグナル伝達を阻害でき、したがって TNF 阻害剤として機能的に活性である。

30

40

【0290】

実施例 2

非競合 TNFR1 阻害剤は、より高い濃度の TNF 刺激の部分的阻害を示す。

図 29 に見ることができるように、非競合、抗 TNFR1 dAb で TNF 媒介性シグナル伝達の阻害は 100% に達しなかった。この部分的阻害をさらに詳しく研究するため、効能が競合 dAb (DOM1h - 131 - 511) に近い高親和性かつ非競合 dAb (DOM1h - 574 - 138) を選択して標準的な MRC - 5 細胞アッセイを改変した。アッセイの改変は、MRC - 5 細胞を刺激する 4 つの異なる濃度の TNF を用いたアッ

50

セイの反復実施からなった。ヒトTNF はPeprotech社(カタログ番号300-01A)から供給され、10pg/ml、50pg/ml、200pg/mlおよび2000pg/mlの濃度で細胞を刺激するために使用した。これらの濃度は、細胞のTNF- α に対する最大反応を約10%、50%、95%および100%引き起こしたために選択された。TNF 媒介性シグナル伝達の阻害を算出するため、細胞によるTNF- α 誘発性IL-8放出を定量化して、各TNF 濃度で得られる最大IL-8放出パーセンテージとして表した(例えば; TNF- α シグナル伝達阻害% = ((特定のdAb希釈でのIL-8放出/最大IL-8放出) × 100)。アッセイの他のすべての態様を標準的なMRC-5アッセイに記載のとおり保持した。驚くべきことに、この実験設計を用いてTNFR1の競合阻害剤と非競合阻害剤を比較時、非常にはっきりした差が存在した。競合dAb DOM1h-131-511は刺激に使用したすべてのTNF 濃度で100%阻害に至った一方(図30)、非競合dAb DOM1h-574-138の阻害レベルはTNF 濃度上昇と共に低下を示した(図31)。DOM1h-574-138において、10pg/mlで刺激時、TNF 媒介性シグナル伝達の阻害はほぼ完全であった(図31)。しかしながら、TNF 濃度を2ng/mlに上昇時、TNF 媒介性サイトカイン放出のわずか30%阻害が検出された。競合抗TNFR1dAbと非競合抗TNFR1dAbのこれらの対照的な結果から、高レベルTNF が存在時に非競合dAbはTNF の部分的阻害剤であることが示唆される。結果的に、高いTNF 濃度にて、このクラスの阻害剤は残留TNF シグナル伝達を阻害しないまま残し、これは患者における残留TNF 、例えば潜伏TB再発のTNF 媒介性阻害において有望な(有益な)作用の可能性を残す。したがって、我々は、TNFR1媒介性疾患または状態を治療する非競合TNFR1アンタゴニストの使用はTNF のこのような有望な作用を保持できる点で有益であり得ることを確信する。

【0291】

実施例3

マウスL929細胞における非競合抗マウスTNFR1でのTNF 細胞毒の部分的阻害

抗ヒトTNFR1dAbに観察されたものに類似する効果は、競合抗マウスTNFR1dAbおよび非競合抗マウスTNFR1dAbにも観察された。これらの実験において、2つの異なる抗マウスTNFR1dAbを使用した。競合dAbはdAb DOM1m-15-12であり、非競合dAbはdAb DOM1m-21-23であった。両dAbをpUCベースのベクター(pDOM5)内にクローン化し、大腸菌による培養培地内への分泌を介して発現させてから、タンパク質L(DOM1m-15-12)またはタンパク質A(DOM1m-21-23)のいずれかをを用いた単一工程により精製した。dAbのクローニング、発現および精製の方法については、WO2006038027およびWO2008149148に記載されている。両dAbを標準的なマウスL929細胞アッセイ法において試験した。このアッセイのため、刺激のために使用するマウスTNF 濃度を変更することにより一点改変した。TNF (R&D Systems社カタログ番号410-MT)を20pg/mlまたは100pg/mlのいずれかで使用し、これらはL929細胞内で細胞毒をそれぞれ60%および75%生じる濃度に相当した。抗ヒトTNFR1dAbで観察された結果に類似して、競合的抗マウスTNFR1dAb(DOM1m-15-12)により両濃度でTNF 刺激の完全阻害が得られ、一方、非競合dAb(DOM1m-21-23)は使用した両濃度で部分的阻害を示し、高いマウスTNF 濃度の方で阻害パーセンテージは低かった(図32)。

【0292】

標準的MRC-5 IL-8放出アッセイ

以下のMRC-5細胞アッセイ法において、ヒトTNFR1と結合するあるdAbの活性を評価した。アッセイはMRC-5細胞中のTNF によるIL-8分泌の誘発に基づき、HUVEC中のIL-1によるIL-8誘発について説明しているAlceson, L. et al. Journal of Biological Chemist

ry 271:30517-30523 (1996)に記載の方法から適用される。H U V E C細胞系の代わりにM R C - 5細胞を用いてヒトT N F によるI L - 8誘発を評価することによりd A b活性をアッセイした。簡単に述べると、M R C - 5細胞(A T C C 寄託番号C C L - 171)をマイクロタイタープレート(5×10^3 細胞/ウェル)中にプレートし、細胞を用量範囲のd A bで1時間ブレインキュベートしてから固定量(200 pg/ml)のヒトT N F を添加した。一晚インキュベート後(37 で18時間)、I L - 8 A B I 8200細胞検出アッセイ(F M A T)を用いて培養上清を吸引してI L - 8放出を測定した。I L - 8 F M A Tアッセイには、R & D S y s t e m s 社からの検出および捕獲試薬を用いた。ビーズ、ヤギ抗マウスI g G (H & L)被覆したポリスチレン粒子 $0.5\% \text{ w/v}$ $6 \sim 8 \mu\text{m}$ (S p h e r o t e c h 社、カタログ番号M P - 60 - 5)を、捕獲抗体マウスモノクローナル抗ヒトI L - 8抗体(R & D S y s t e m s 社、カタログ番号M A B 208)で被覆した。検出のため、ビオチン化ヤギ抗ヒトI L - 8抗体(R & D S y s t e m s 社、カタログ番号B A F 208)およびS t r e p t a v i d i n A l e x a f l u o r 647(M o l e c u l a r P r o b e s 、カタログ番号S 32357)を用いた。組換えヒトI L - 8(R & D S y s t e m s 社、カタログ番号208 - I L)を標準として用いた。抗T N F R 1 d A b活性は、T N F のみでインキュベートした対照ウェルと比べて上清中へのI L - 8分泌を低減した。

10

【0293】

標準的L929細胞毒アッセイ

20

抗T N F R 1 d A bの、マウスL929線維芽細胞(A T C C C C L - 1)上でT N F の細胞毒活性を中和する能力についても試験した(E v a n s , T . (2000) M o l e c u l a r B i o t e c h n o l o g y 15 , 243 - 248)。簡単に述べると、マイクロタイタープレート(1×10^4 細胞/ウェル)中にプレートしたL929細胞を抗T N F R 1 d A b、 20 pg/ml T N F および 1 mg/ml アクチノマイシンD(S i g m a、プール、英国、カタログ番号A9415)で一晩インキュベートした。[3 - (4 , 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 5 - (3 - カルボキシメトキシフェニル) - 2 - (4 - スルホフェニル) - 2 H - テトラゾリウム(P r o m e g a 社、マディソン、米国、カタログ番号G3581)でインキュベート後、 490 nm で吸光度を読みとって細胞生存能を測定した。抗T N F R 1 d A b活性は、T N F 単独の対照に比べて、T N F 細胞毒を低減し、したがって吸光度は増大する。

30

【0294】

標準的な受容体結合アッセイ

受容体結合アッセイ法において、ヒトT N F R 1に対するd A bの効能を測定した。このアッセイでT N F のT N F R 1への結合および溶解性d A bによるこの相互作用ブロック能を測定する。ヤギ抗ヒトI g G (S p h e r o t e c h、カタログ番号HUP - 60 - S)で前被覆したビーズ上でT N F R 1 - F c融合(R & D S y s t e m s 社、カタログ番号372 - R I)を捕獲する。受容体被覆したビーズをT N F (10 ng/ml 、P e p r o t e c h 社 カタログ番号300 - 01A)、d A b、ビオチン接合体抗T N F (H y c u l t B i o t e c h n o l o g y カタログ番号H M 2027)およびS t r e p t a v i d i n A l e x a F l u o r 647(M o l e c u l a r P r o b e s、(I n v i t r o g e n) カタログ番号32357)で黒色側面透明底384ウェルプレートでインキュベートした。6時間後、プレートをA B I 8200細胞検出システムで読み取り、ビーズ結合蛍光を測定した。d A bがT N F のT N F R 1への結合をブロックする場合、蛍光強度は低減する。

40

【0295】

A B I 8200解析ソフトウェアを用いてデータを解析した。濃度効果曲線および効力($E C_{50}$)値をG r a p h P a d P r i s mおよび可変傾斜のS字形用量反応曲線を用いて測定した。

【0296】

50

標準的なカニクイザルCYNOM-K1アッセイ

抗TNFR1dAbの効能をCYNOM-K1細胞アッセイ法において試験した。簡単に述べると、dAbを平底細胞培養プレート中、CYNOM-K1細胞(ECACC 90071809)(5×10³細胞/ウェル)で37℃で1時間インキュベートした。組換えヒトTNF(Peprotech社)を添加し(最終濃度200pg/ml)、プレートを18~20時間インキュベートした。次いで培養上清中に分泌されたIL-8レベルをDuoSet ELISA developmentシステム(R&D Systems社、カタログ番号DY208)を製造メーカーの説明書(文書番号750364.16バージョン11/08)に従って用いて測定した。IL-8分泌阻害パーセンテージに対してdAb濃度をプロットすることによりND50を測定した。

10

【0297】

アミノ酸配列

>DOM1h-509

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSQYRMHWVRQAPGK SLEWVSSIDTRGSSTYYADPVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKAVTMFSPFFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-510

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFADYGMWRVRQAPGK GLEWVSSITRTGRVTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKWRNRHGEYLADFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-543

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFMRYRMHWVRQAPGK GLEWVSSIDSNGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKDRTERSPVFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-549

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVDYEMHWVRQAPGK GLEWVSSISESGTTTTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKRRFSASTFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYSMGWVRQAPGK GLEWVSQISNTGGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKYTGHWEPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-1

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYSMGWVRQAPGK GLEWVSQISNTGGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKYTGRWEPYDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-2

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYSMGWVRQAPGK GLEWVSQISNTGGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKYTGRWEPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-4

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYSMGWVRQAPGK GLEWVSQISNTGGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKYTGRWEPFEYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-7

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYSMGWVRQAPGK GLEWVSQISNTGGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-8

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYSMGWVRQAPGK GPEWVSQISNTGGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-9

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYSMGWVRQAPGK GLEWVSQISNTGGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
MQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-10

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFCKYSMGWVRQAPGK DLEWVSQISNTGGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-11

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYSMGWVRQAPGK GLEWVSQISNTGGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKYTGRWEPFDHWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-12

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYSMGWVRQAPGK GLEWVSQISNTGDHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKYTGRWEPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-13

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYSMGWVRQAPGK GLEWVSQISNTGDRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKYTGRWEPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-14

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYSMGWVRQAPGK GLEWVSQISNTGDRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-15

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYSMGWVRQAPGK GLEWVSQISNTGDHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFDYWGQGLVTVSS

10

20

30

40

>DOM1h-574-16
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEPPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-17
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPWVSQISNTGDHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEPPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-18
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGKYSMGWVRQAPGKDLEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEPPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-19
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGKYSMGWVRQAPGKDLEWVSQISNTGDHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEPPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-25
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEPPFVYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-26
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEPPFEYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-27
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-28
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-29
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWRPFYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-30
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKLEWVSQIANTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAAYYCAIYTG RWEPPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-31
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEPPFNYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-32
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWAPFEYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-33
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNSLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFDN WGQGLVTVSS

>DOM1h-574-35
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFITYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEPPFYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-36
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEPPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-37
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEPPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-38
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISDTGDRITYYDDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEPPFDYWGQGLVTVSS

>DOM1h-574-39
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTGDRITYYADAVKGRFTISRDN SKNTLY

10

20

30

40

LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWEPFDYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-40
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTGDRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWEPFKYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-53
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTGERRYYADSVKGRFTISRDNPKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWEPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-54
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVNYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTGDRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWEPYEWGQGLVTVTS
>DOM1h-574-65
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIANTGDRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWEPFVYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-66
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIANTGDRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWKPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-67
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIANTGDRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWPFYEWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-68
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIANTGDRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWPFYEWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-69
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIANTGDRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWAPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-70
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAVYTGWRWEPFVYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-71
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWKPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-72
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWPFYEWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-73
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWPFYEWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-74
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWAPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-75
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTGDRYYDDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWEPFVYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-76
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTGDRYYDDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWKPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-77
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTGDRYYDDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWPFYEWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-78
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTGDRYYDDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWPFYEWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-79

10

20

30

40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTGDRRYDDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-84
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTGDRRYADAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-85
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTGDRRYADAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWKPFYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-86
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTGDRRYADAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-87
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTGDRRYADAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWRPFYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-88
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTGDRRYADAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-90
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLKFSMGWVRQAPGKGLEWVSQIANTGDRRYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-91
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-92
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTGDRRYDDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-93
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTGDRRYDDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-94
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIANTGDRRYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAAYYCAIYTGRWPDFDYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-95
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIANTGDRRYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAAYYCAIYTGRWPDFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-96
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWPDFDYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-97
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWPDFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-98
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTGDRRYDDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWPDFDYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-99
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTGDRRYDDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWPDFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-100
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKPEWVSQISAWGDRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFDYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-101
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKPEWVSQISDGGQRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFDYWGQGLTVTVSS

10

20

30

40

>DOM1h-574-102
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGPEWVSQISDSGYRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWEPFDYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-103
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGPEWVSQISDGGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWEPFDYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-104
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGPEWVSQISDKGTRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWEPFDYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-105
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGPEWVSQISETGRRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWEPFDYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-106
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQINNTGSTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWEPFDYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-107
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGPEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWVPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-108
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGPEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWAPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-109
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWVPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-110
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWAPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-111
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYDDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWRPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-112
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYTHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWAPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-113
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRRYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWAPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-114
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQILNTADRTYYDHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWAPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-115
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYDHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWAPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-116
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRRYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWAPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-117
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRRYYDHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIY TGRWAPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-118
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAVYTGRWVSFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-119
EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY

10

20

30

40

LQMNSLRAEDTAVYYCALYTGRWVSFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-120
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAVYTGRWVPFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-121
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCALYTGRWVPFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-122
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIANTADRRYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-123
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRRYYADAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-124
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTGDRYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-125
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIANTADRRYYADAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-126
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIANTGDRYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-127
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRRYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-128
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIANTADRRYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-129
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIVNTGDRYYADAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-130
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIANTGDRYYADAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-131
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYDHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-132
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYDHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWRPFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-133
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYDHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-134
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYSHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-135
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYTHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-137
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYTDHAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLTVTVSS
>DOM1h-574-138

10

20

30

40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-139
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-140
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIADTGDRRYDDSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-141
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRRYYDDSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-142
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTGDRRYDHSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-143
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTGDRRYDDAVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-144
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIADTADRRYYDDSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-145
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIADTGDRRYDHSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-146
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIADTGDRRYDDAVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-147
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWGPFFVYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-148
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFAYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-149
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWGPFFQYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-150
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFQYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-151
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-152
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFQYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-153
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFQYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-154
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTGDRRYDHSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-155
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGLVTVSS

10

20

30

40

>DOM1h-574-156
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-157
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYDHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWRPFYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-158
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYDHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWRPFYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-159
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYDHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-160
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYDHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWEPFVYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-161
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYSHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-162
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYSHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-163
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYTHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-164
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYTHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-165
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-166
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-167
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTGDRRYDHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-168
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTGDRRYDHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWAPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-169
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIADTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-170
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-171
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIADTADRTYYDHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-172
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIADTADRTYYDHAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGRWVPFEYWGQGT LVTVSS

>DOM1h-574-173
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIADTADRRYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY

10

20

30

40

LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWAPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-174
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRRYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWAPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-175
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIADTADRRYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWAPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-176
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRRYYDHAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWAPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-177
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIADTADRRYYDHAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWAPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-178
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQIADTADRRYYDHSV KGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWAPFEYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-179
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRRYYDDAVKGRFTITRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWEPFVYWGQGLVTVSS
>DOM1h-574-180
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISDTADRTYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWVPFEYWGQGLVTVSS
>DMS0111
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSV KGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWVPFEYWGQGLVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASRP IGTTL SWYQQ
KPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR
>DMS0112
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSV KGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWVPFEYWGQGLVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASRP IGTML SWYQQ
KPGKAPKLLILFGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR
>DMS0113
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSV KGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWVPFEYWGQGLVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQW IGSQLSWYQQ
KPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQGTKVEIKR
>DMS0114
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSV KGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWVPFEYWGQGLVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQW IGSQLSWYQQ
KPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLMKPMTFGQGTKVEIKR
>DMS0115
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSV KGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWVPFEYWGQGLVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASRPI GTTLS
WYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR
>DMS0116
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSV KGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWVPFEYWGQGLVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASRPI GTMLS
WYQQKPGKAPKLLILFGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR
>DMS0117
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSV KGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWVPFEYWGQGLVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQW IGSQLS
WYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQGTKVEIKR
>DMS0118
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSV KGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTGWRWVPFEYWGQGLVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQW IGSQLS

10

20

30

40

WYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLMKPMTFGQGTKVEIKR
>DMS0121
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLTVTVSSASGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR
ASRPIGTTL SWYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKV
EIKR
>DMS0122
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLTVTVSSASGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR
ASRPIGTMLS WYQQKPGKAPKLLILFGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKV
EIKR
>DMS0123
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLTVTVSSASGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR
ASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQGTKV
EIKR
>DMS0124
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLTVTVSSASGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR
ASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLMKPMTFGQGTKV
EIKR
>DMS0132
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLTVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTTL SWYQQ
KPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR
>DMS0133
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLTVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTTL SWYQQ
KPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR
>DMS0134
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLTVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTTL SWYQQ
KPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR
>DMS0135
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYSHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLTVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTTL SWYQQ
KPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR
>DMS0136
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHAVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLTVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTTL SWYQQ
KPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR
>DMS0162
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGP EWVSQISNTGDRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLTVTVSC-40K 線状 PEG
>DMS0163
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGP EWVSQISNTGDRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLTVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTMLS
WYQQKPGKAPKLLILAFSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKRAAAEQK
LISEEDLN
>DMS0163 タグなし
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGP EWVSQISNTGDRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLTVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTMLS
WYQQKPGKAPKLLILAFSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

10

20

30

40

>DMS0168

EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLTVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQSI IKHLK
WYQQKPGKAPKLLIYGASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQQGARWPQTFGQGTKVEIKRAAAEQK
LISEEDLN

>DMS0168 タグなし

EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLTVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQSI IKHLK
WYQQKPGKAPKLLIYGASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQQGARWPQTFGQGTKVEIKR

>DMS0169

EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLTVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASRPIGTMLS
WYQQKPGKAPKLLILFGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKRAAAEQK
LISEEDLN

>DMS0169 タグなし

EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLTVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASRPIGTMLS
WYQQKPGKAPKLLILFGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS0176

EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGP EWVSQISNTGDRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLTVTVSSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASRPIGTTL SWYQQKPG
KAPKLLIWFGRSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS0177

EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGP EWVSQISNTGDRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLTVTVSSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQWIGS QLSWYQQKPG
KAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR

>DMS0182

EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGP EWVSQISNTGDRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLTVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASRPIGTTL SWYQQ
KPGKAPKLLIWFGRSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKRAAAEQKLISE
EDLN

>DMS0182 タグなし

EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGP EWVSQISNTGDRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLTVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASRPIGTTL SWYQQ
KPGKAPKLLIWFGRSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS0184

EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGP EWVSQISNTGDRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLTVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASRPIGTTL
WYQQKPGKAPKLLIWFGRSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS0186

EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGP EWVSQISNTGDRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLTVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASRPIGTMLS WYQQ
KPGKAPKLLILFGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKRAAAEQKLISE
EDLN

>DMS0186 タグなし

EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGP EWVSQISNTGDRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLTVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASRPIGTMLS WYQQ
KPGKAPKLLILFGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS0188

EVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYS MGWVRQAPGKGP EWVSQISNTGDRTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLTVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASRPIGTMLS
WYQQKPGKAPKLLILFGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKRAAAEQK
LISEEDLN

10

20

30

40

>DMS0188 タグなし

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRP IGTMLS
WYQQKPGKAPKLLILFGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS0189

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRP IGTTL SWYQQ
KPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKRAAAEQKLISE
EDLN

>DMS0189 タグなし

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRP IGTTL SWYQQ
KPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS0190

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRP IGTTL S
WYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKRAAAEQK
LISEEDLN

>DMS0190 タグなし

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRP IGTTL S
WYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS0191

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI I KHLK WYQQ
KPGKAPKLLIYGASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGTRWPQTFGQGTKVEIKRAAAEQKLISE
EDLN

>DMS0191 タグなし

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI I KHLK WYQQ
KPGKAPKLLIYGASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGTRWPQTFGQGTKVEIKR

>DMS0192

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI I KHLK
WYQQKPGKAPKLLIYGASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGARWPQTFGQGTKVEIKRAAAEQK
LISEEDLN

>DMS0192 タグなし

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGPEWVSQISNTGDRITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWEFPDYWGQGLVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI I KHLK
WYQQKPGKAPKLLIYGASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGARWPQTFGQGTKVEIKR

>DMS5519

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRP IGTMLS
WYQQKPGKAPKLLILAFSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS5520

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTGCHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKYTGHWEPFDYWGQGLVTVSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRP IGTTL S
WYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS5521

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG RWPFEYWGQGLVTVSSASTDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRP IGTML SWYQQ
KPGKAPKLLILAFSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS5522

10

20

30

40

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG R WVPFEYWGQGT LVT VSSASTDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASRP IGTMLS WYQQ
KPGKAPKLLILAFSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKRAAAEQKLISE
EDLN

>DMS5522 タグなし

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG R WVPFEYWGQGT LVT VSSASTDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASRP IGTMLS WYQQ
KPGKAPKLLILAFSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DMS5525

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTGGHTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKYTGHWEPFDYWGQGT LVT VSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASRP IGTMLS
WYQQKPGKAPKLLILAFSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

10

>DMS5527

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVKYSMGWVRQAPGKGLEWVSQISNTADRTYYAHSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAIYTG R WVPFEYWGQGT LVT VSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASRP IGTMLS
WYQQKPGKAPKLLILFGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DOM7h-11

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASRP IGTTL SWYQQKPGKAPKLLIWFGR LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ
EDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DOM7h-11-3

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASRP IGTTL SWYQQKPGKAPKLLILWNSRIQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ
EDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

20

>DOM7h-11-12

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASRP IGTMLS WYQQKPGKAPKLLILFGSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ
EDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DOM7h-11-15

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASRP IGTMLS WYQQKPGKAPKLLILAFSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ
EDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

>DOM7h-14

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQWIGS QLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ
EDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR

>DOM7h-14-10

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQWIGS QLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ
EDFATYYCAQGLRHPKTFGQGTKVEIKR

30

>DOM7h-14-18

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQWIGS QLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ
EDFATYYCAQGLMKPMTFGQGTKVEIKR

>DOM7m-16

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIKHLK WYQQKPGKAPKLLIYGASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ
EDFATYYCQGARWPQTFGQGTKVEIKR

>DOM1h-131-511

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETMVWRQAPGKGLEWVSHIPPVQDPFYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCALLPKRGPWFYWGQGT LVT VSS

>DOM1m-21-23

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNRYSMGWL RQAPGKGLEWVSRIDSYGRGTYYEDPVKGRFSISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKISQFGSNAFDYWGQGT QVT VSS

40

>DOM1m-15-12

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQYIHTSVQWYQQKPGKAPKLLIYGSSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ
EDFATYYCQNHYSPTFYGQGTKVEIKR

ヌクレオチド配列

>DOM1h-509

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTAGTCAGTATAGGATGCATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGAGTCTAGAGTGGGTCTCAAGTATTGATACTA

GGGGTTCGTCTACATACTACGCAGACCCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGCTGTGACGATGTTTTCTCCTTTTTT
TGACTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-510

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGCTGATTATGGGATGCGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCATCTATTACGCGGA
CTGGTCGTGTTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAATGGCGGAATCGGCATGGTGAGTATCT
TGCTGATTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-543

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTATGAGGTATAGGATGCATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCATCGATTGATTCTA
ATGGTTCTAGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCGTACGGAGCGTTCGCCGGTTTT
TGACTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-549

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTGATTATGAGATGCATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCATCTATTAGTGAGA
GTGGTACGACGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAACGTCGTTTTCTGCTTCTACGTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGGTCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAATATACGGGTCATTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-1

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGGTCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTATGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-2

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGGTCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-4

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGGTCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-7

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGGTCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-8

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT

10

20

30

40

CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CGGGTGGTCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACAGTCTCGAGC

>DOM1h-574-9

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CGGGTGGTCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATATCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
ATGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-10

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CGGGTGGTCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-11

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTAGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CGGGTGGTCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAATATACGGGTGCTTGGGAGCCTTTTGA
CCACTGGGGTCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-12

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CGGGTGATCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAATATACGGGTGCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-13

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAATATACGGGTGCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-14

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-15

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CGGGTGATCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-16

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACAGTCTCGAGC

>DOM1h-574-17

10

20

30

40

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGATCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACAGTCTCGAGC

>DOM1h-574-18

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGATCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-19

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGATCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-25

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGATCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-26

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGATCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-27

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGATCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGAAGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-28

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGATCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-29

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGATCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-30

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGATCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGCATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

10

20

30

40

>DOM1h-574-31

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATTCTCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTAA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-32

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATTCTCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

10

>DOM1h-574-33

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATTCTCCGCGACAATTCCAAGAACTCGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGTGCCTTTTGA
CAACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-35

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTATTACGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATTCTCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTCA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

20

>DOM1h-574-36

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGGTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATTCTCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-37

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATTCTCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAAGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

30

>DOM1h-574-38

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATTCTCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-39

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACGCGGTGAAGGGCCGGTTACCATTCTCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

40

>DOM1h-574-40

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATTCTCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTAA

GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-53

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTAGTAACTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGAGCGTAGATACTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGGTGGGAGCCTTTTGA
ATACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-54

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAACTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGGTGGGAGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

10

>DOM1h-574-65

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGATAATCCAAGAACACACTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGGTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-66

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGGTGGGAGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

20

>DOM1h-574-67

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-68

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

30

>DOM1h-574-69

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGTCGGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-70

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGGTATATACGGGTCGGTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

40

>DOM1h-574-71

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTGTAT

CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGAAGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-72

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-73

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGAGGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-74

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-75

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-76

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGAAGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-77

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-78

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGAGGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-79

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-84

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA

10

20

30

40

CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACGCGGTGAAGGGGCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-85

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACGCGGTGAAGGGGCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGAAGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-86

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGCTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACGCGGTGAAGGGGCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAAGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-87

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACGCGGTGAAGGGGCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGAGGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-88

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACGCGGTGAAGGGGCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-90

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTGAAGTTTTTCGATGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGCTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-91

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTGAAGTATTCGATGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-92

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTTCAAGTATTCGATGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-93

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTTGAAGTATTCGATGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-94

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT

10

20

30

40

CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGCATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGCCCCGACTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-95

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGCATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGCCCCGACTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

10

>DOM1h-574-96

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGCCCCGACTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-97

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGCCCCGACTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

20

>DOM1h-574-98

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGCCCCGACTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-99

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGCCCCGACTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

30

>DOM1h-574-100

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGCCT
GGGGTGACAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-101

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGACG
GCGGTGACAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

40

>DOM1h-574-102

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGACT
CCGGTTACCGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-103

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGACG
GGGGTACGCGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-104

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGACA
AGGGTACGCGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

10

>DOM1h-574-105

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGAGA
CCGGTTCGAGGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-106

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTAACAATA
CGGGTTCGACCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

20

>DOM1h-574-107

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-108

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

30

>DOM1h-574-109

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-110

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

40

>DOM1h-574-111

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGATGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGAGGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-112

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-113

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CTGCTGATCGCAGATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

10

>DOM1h-574-114

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGATCACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-115

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGATCACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

20

>DOM1h-574-116

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-117

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGATCACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

30

>DOM1h-574-118

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGGTATATACTGGGCGTGGGTGTCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-119

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGTATATACTGGGCGTGGGTGTCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

40

>DOM1h-574-120

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGGTATATACTGGGCGTGGGTGCCTTTTGA

GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-121

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCAATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-122

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGAATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-123

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCAATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGCAGACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-124

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCGGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCAATA
CGGGCGATCGTAGATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-125

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGAATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGCAGACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-126

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-127

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCAATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-128

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGAATA
CGGCTGATCGTAGATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-129

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGTGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT

10

20

30

40

CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-130

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTAAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGAATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGCAGACCGGTGAAGGGCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-131

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTAAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGATCACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

10

>DOM1h-574-132

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTAAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGATCACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-133

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTAAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGATCACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

20

>DOM1h-574-134

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTAAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACTCAGTCACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-135

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTAAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

30

>DOM1h-574-137

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTAAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACACAGACCGGTGAAGGGCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-138

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

40

>DOM1h-574-139

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTGAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA

CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-140

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGGATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-141

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGGATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGATGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-142

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGGATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATCACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGGAACCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-143

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGGATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATGACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-144

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGGATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGATGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-145

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGGATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATCACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-146

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGGATA
CGGGTGATCGTAGATACTACGATGACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-147

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTGTAAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTGCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGGGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-148

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT

10

20

30

40

CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTTCGTTGGGTGCCTTTTGC
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-149

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTTCGTTGGGACCTTTTCA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-150

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTTCGTTGGGAGCCTTTTCA
GTACTGGGGTCAGGGAACCTCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-151

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTTCGTTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-152

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTTCGTTGGGCGCCTTTTCA
GTACTGGGGTCAGGGAACCTCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-153

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTTCGTTGGGTGCCTTTTCA
GTACTGGGGTCAGGGCACCTCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-154

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CCGGTGATCGTAGATACTACGATCACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTTCGTTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-155

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTGAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-156

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTCAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-157

10

20

30

40

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTGAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGATCACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGAGGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-158

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGATCACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGAGGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

10

>DOM1h-574-159

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGATCACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGAGGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-160

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTGAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGATCACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGAGGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

20

>DOM1h-574-161

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTGAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACTCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-162

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACTCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

30

>DOM1h-574-163

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACACACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-164

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTGAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACACACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

40

>DOM1h-574-165

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-166

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTGAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-167

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTGAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CCGGTGATCGTAGATACTACGATCACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACTATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

10

>DOM1h-574-168

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTCAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CCGGTGATCGTAGATACTACGATCACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACTATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-169

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTGAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

20

>DOM1h-574-170

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-171

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTGAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGATCACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

30

>DOM1h-574-172

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTGAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGATCACGCGGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-173

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTGAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

40

>DOM1h-574-174

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTGAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-175

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-176

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGATCAGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-177

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGATCAGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-178

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGATCACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-179

GAGGTGCAGCTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTCAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTAGATACTACGATGACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCACCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGGAGCCTTTTGT
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1h-574-180

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DMS0111

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTTGGAATTCGCTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

>DMS0112

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT

10

20

30

40

CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCGATTGGGACGATGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTTGTGTTGGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>DMS0113

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTT
TGAGGCATCCTAAGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

10

>DMS0114

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTC
TTATGAAGCCTATGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

20

>DMS0115

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCGATTGGGACGATGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCTTTGGAATTTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

30

>DMS0116

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCGATTGGGACGATGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCTTTGGAATTTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>DMS0117

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT

40

GTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>DMS0118

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGGCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTGCTCAGGGTCTTATGAAGCCTATGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

10

>DMS0121

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTG
GCGGATCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGG
GCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTTGGAA
TTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
TGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTG
GAAATCAAACGG

20

>DMS0122

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTG
GCGGATCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGG
GCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTTGGT
TTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
TGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTG
GAAATCAAACGG

30

>DMS0123

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTG
GCGGATCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGG
GCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCG
TTCTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
TGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTG
GAAATCAAACGG

40

>DMS0124

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTG
GCGGATCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGG
GCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCG
TTCTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
TTCTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC

TGCAACCTGAAGATTTTGTACGTACTACTGTGCTCAGGGTCTTATGAAGCCTATGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTG
GAAATCAAACGG

>DMS0132

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAACTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCGAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAGCCCTAAGTCTCTGATCCTTTGGAATTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGTACGTACTACTGTGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

10

>DMS0133

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTTCAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCGAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTGGGCGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAGCCCTAAGTCTCTGATCCTTTGGAATTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGTACGTACTACTGTGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

20

>DMS0134

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTTCAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCGAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAGCCCTAAGTCTCTGATCCTTTGGAATTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGTACGTACTACTGTGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

30

>DMS0135

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTTTCAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACTCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCGAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAGCCCTAAGTCTCTGATCCTTTGGAATTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGTACGTACTACTGTGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

>DMS0136

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAACTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTCCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACGCGGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCGAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAGCCCTAAGTCTCTGATCCTTTGGAATTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGTACGTACTACTGTGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

40

>DMS0162

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTCAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACAGTCTCGTGT

>DMS0163

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTCAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACAGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCTCGATTGGGACGATGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTGCTTTTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GCGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGGGCGGCCGAGAACAAAA
CTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT

>DMS0163 タグなし

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTCAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACAGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCTCGATTGGGACGATGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTGCTTTTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GCGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

>DMS0168

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTCAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTATTAAGCATTAAAG
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTCAACAGGGGGCTCGGTGGCCTCAGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGGGCGGCCGAGAACAAAA
CTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT

>DMS0168 タグなし

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTCAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTATTAAGCATTAAAG
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTCAACAGGGGGCTCGGTGGCCTCAGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

>DMS0169

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTCAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC

CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCTGATCTTGTGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGGGCGGCCGAGAACAAAA
CTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT

>DMS0169 タグなし

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTACAGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCTGATCTTGTGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

10

>DMS0176

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTACAGGAACCTGGTCACAGTCTCGAGCGCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
TAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGG
AAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTGGTTTGGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGG
GACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATC
CTACGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

20

>DMS0177

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTACAGGAACCTGGTCACAGTCTCGAGCGCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG
TAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGG
AAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGG
GACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTGGCGCGTTGC
CTAGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

30

>DMS0182

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTACAGGAACCTGGTCACAGTCTCGAGCGCTAGCACCAGCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTGGTTTGGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGGGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAA
GAGGATCTGAAT

40

>DMS0182 タグなし

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTACAGGAACCTGGTCACAGTCTCGAGCGCTAGCACCAGCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAG

AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTGGTTTGGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

>DMS0184

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACAGTCTCGAGCGCTAGCACCAAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTGGTTTGGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

10

>DMS0186

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACAGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTTGTGGTTTGGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGGGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAA
GAGGATCTGAAT

20

>DMS0186 タグなし

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACAGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTTGTGGTTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

30

>DMS0188

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACAGTCTCGAGCGCTAGCACCAAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTTGTGGTTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGGGCGGCCGAGAACAAAA
CTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT

40

>DMS0188 タグなし

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTCAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACAGTCTCGAGCGCTAGCACCAAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTTGTGGTTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG

TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>DMS0189

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCAAGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCTGCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTTGGAATTCCTGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGGCGCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAA
GAGGATCTGAAT

>DMS0189 タグなし

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCAAGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCTGCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTTGGAATTCCTGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>DMS0190

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCAAGTCTCGAGCGCTAGCACCGAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCTGCGATTGGGACGACGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTTGGAATTCCTGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGGCGCGCAGAACAAAA
CTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT

>DMS0190 タグなし

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCAAGTCTCGAGCGCTAGCACCGAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCTGCGATTGGGACGACGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTTGGAATTCCTGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

>DMS0191

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTGCTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCAAGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCTGAGCATTATTAAGCATTTAAAGTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGGGGA

CTCGGTGGCCTCAGACGTTGGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGGGCGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAA
GAGGATCTGAAT

>DMS0191 タグなし

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTATTAAGCATTAAAGTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAGTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGGGGA
CTCGGTGGCCTCAGACGTTGGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

10

>DMS0192

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGTGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTATTAAGCATTAAAG
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAGC
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTCAACAGGGGGCTCGGTGGCCTCAGACGTTGGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGGGCGGCCGAGAACAAAA
CTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT

20

>DMS0192 タグなし

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGTCCAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGATCGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACGGGTCGTTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGTGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTATTAAGCATTAAAG
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAGC
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTCAACAGGGGGCTCGGTGGCCTCAGACGTTGGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

>DMS5519

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTGCTTTTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAGC
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GCGCGCAGGCTGGGACGATCCTACGACGTTGGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

30

>DMS5520

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTGAATA
CGGGTGGTCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAATATACGGGTCATTGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTTGGAATTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAGC
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTGCGCAGGCTGGGACGATCCTACGACGTTGGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

40

>DMS5521

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTCAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTGCTTTTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGCGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

>DMS5522

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTCAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTGCTTTTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGCGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGGGCGCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAA
GAGGATCTGAAT

>DMS5522 タグなし

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTCAATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT
CTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTGCTTTTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTTCAGTGGCAG
TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGCGCGCAGGCTG
GGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

>DMS5525

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGTTAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTCAATA
CGGGTGGTCATACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAATATACGGGTCAATGGGAGCCTTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCCTTGCTTTTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GCGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

>DMS5527

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTTCAAGTATTTCGATGGGGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAGATTTTCGGATA
CTGCTGATCGTACATACTACGCACACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCTGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGATATATACTGGGCGTTGGGTGCCTTTTGA
GTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGT
TGGTACCAGCAGAAACAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTTGTTTGGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACG
TTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACT
GTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

>DOM7h-11

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCG

10

20

30

40

TCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTGGTTTGGTTCCCGGT
TGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
ACGG

>DOM7h-11-3

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCG
TCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCTTTGGAATTCCTCGT
TGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
ACGG

10

>DOM7h-11-12

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCG
TCCGATTGGGACGATGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCTTTGTTTGGTTCCCGGT
TGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
ACGG

>DOM7h-11-15

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCG
TCCGATTGGGACGATGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCTTGCTTTTCCCGTT
TGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGCGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
ACGG

20

>DOM7h-14

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCTCGT
TGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGCTGCGCGCTTGCCTAGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
ACGG

>DOM7h-14-10

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCTCGT
TGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGCTTTGAGGCATCCTAAGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
ACGG

30

>DOM7h-14-18

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCTCGT
TGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGCTTTATGAAGCCTATGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
ACGG

>DOM7m-16

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GAGCATTATTAAGCATTTAAAGTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCCGGT
TGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGGGGGCTCGGTGGCCTCAGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
ACGG

40

>DOM1h-131-511

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATTCCCCCGG
TTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATCCAAGAACACGCTATAT
CTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGTGTCTTCCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTGA
CTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1m-21-23

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT
CACCTTTAATAGGTATAGTATGGGGTGGCTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACGGATTGATTCTT
ATGGTCGTGGTACATACTACGAAGACCCCGTGAAGGGCCGGTTACAGCATCTCCGCGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCCGTATATTACTGTGCGAAAATTTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTT
TGACTACTGGGGTCAGGGAACCCAGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM1m-15-12

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GTATATTCATACGAGTGTACAGTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTATGGGTCTGCCAGGT
TGCATAGTGGGGTCCCATCACGTTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGAATCATTATAGTCCTTTTACGTACGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAA
ACGG

10

オリゴヌクレオチド配列

AS9:CAGGAAACAGCTATGACCATG

AS65:TTGTAAAACGACGGCCAGTG

AS339:TTCAGGCTGCGCAACTGTTG

AS639:CGCCAAGCTTGCATGCAAATTC

AS1029:CCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTgtTaagtaTtcGatgggGTGGGTCCGCCAGG

AS1030:

TCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAcagatttcgaatacgggtgatcgtaataCtaCgcagactccgtgaagggcC
GGTTCACCATCTCCC

20

AS1031:

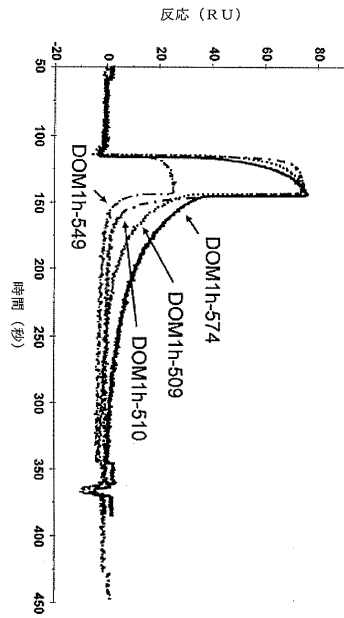
GAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGatAtaTacgggtcgttgGgagccttttgactaCTGGGGTCAGGGAACCCTGGT
C

AS1031':AAAGGTGAATCCGGAGGCTGCACAGG

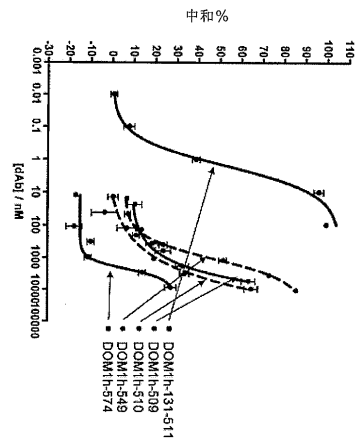
AS1032:TGAGACCCACTCTAGACCCTTCCCTGGA

AS1033:CGCACAGTAATATACCGCGGTGTCCTC

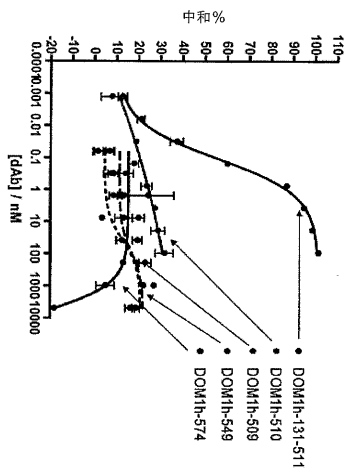
【図 1】



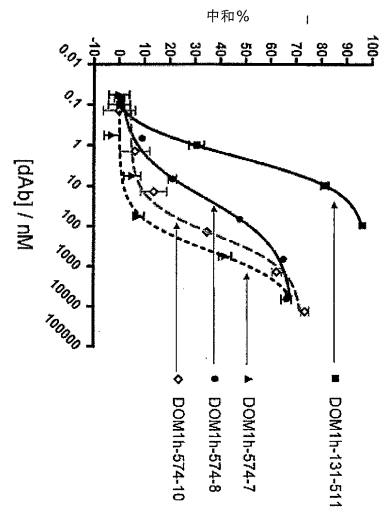
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【図 5 A】

K a b a t残基	S	C	A	A	S	G	F	T	F	V	G	K	L	L	S	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L
DOM1h-574
DOM1h-574-10
DOM1h-574-11
DOM1h-574-12
DOM1h-574-13
DOM1h-574-14
DOM1h-574-15
DOM1h-574-16
DOM1h-574-17
DOM1h-574-18
DOM1h-574-19
DOM1h-574-7
DOM1h-574-8

【図 5 B】

K a b a t 残基	P	G	K	C	D
DOM1h-574
DOM1h-574-10
DOM1h-574-11
DOM1h-574-12
DOM1h-574-13
DOM1h-574-14
DOM1h-574-15
DOM1h-574-16
DOM1h-574-17
DOM1h-574-18
DOM1h-574-19
DOM1h-574-7
DOM1h-574-8

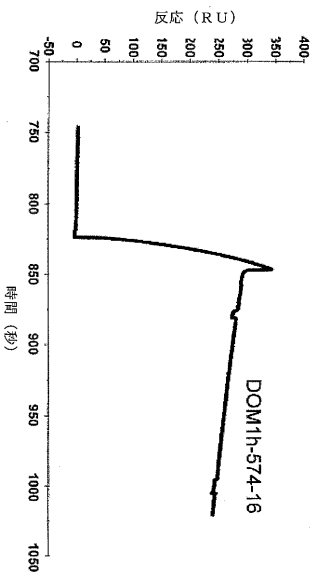
【図 5 C】

K a b a t 残基	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	K	I	L	E	I
DOM1h-574
DOM1h-574-10
DOM1h-574-11
DOM1h-574-12
DOM1h-574-13
DOM1h-574-14
DOM1h-574-15
DOM1h-574-16
DOM1h-574-17
DOM1h-574-18
DOM1h-574-19
DOM1h-574-7
DOM1h-574-8

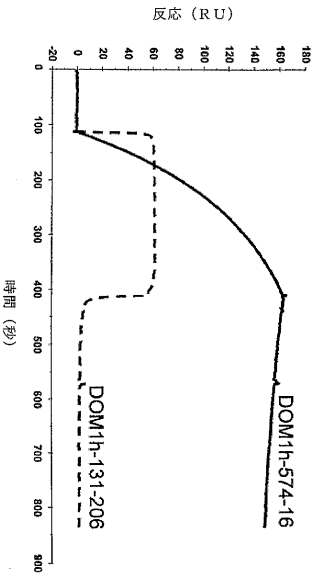
【図 6】

ヒトECD TNFR1	MGLSTVPDLLLPVLVLLVGVITPSGVIGLVPHLGDRKR
カンクイザルECD TNFR1	P.R.
イヌECD TNFR1	A.L.E.S.TA.FRN.V.S.
マウスECD TNFR1	.
ヒトECD TNFR1	DSVCPQGGKIHFQNHSCCTKCHKGTLYLNDCCPGGQDT
カンクイザルECD TNFR1	AIL.
イヌECD TNFR1	BD.VS.S.R.V
マウスECD TNFR1	L.V.SK.
ヒトECD TNFR1	CRECSGSPFASENHLRHCLSCSKCKEMGQVEISSCTVD
カンクイザルECD TNFR1	N.T.Q.Q.N.P.Y
イヌECD TNFR1	K.T.Q.Y.KZ.S.P.QA.
マウスECD TNFR1	.
ヒトECD TNFR1	RDVTVCGRKHQYRHYVSENLTQCFCNCSLCINGTVLSCQE
カンクイザルECD TNFR1	X.
イヌECD TNFR1	F.T.N.QI.
マウスECD TNFR1	K.KE.FQR.S.TH.VD.P.F.TIP.K.
ヒトECD TNFR1	KQNTVCTCHAGFFLRNECVSCSNCKKSLCTRLCLP-QI
カンクイザルECD TNFR1	I.H.V.WT.G.PV
イヌECD TNFR1	E.N.S.F.H.NE.M.FPL
マウスECD TNFR1	.

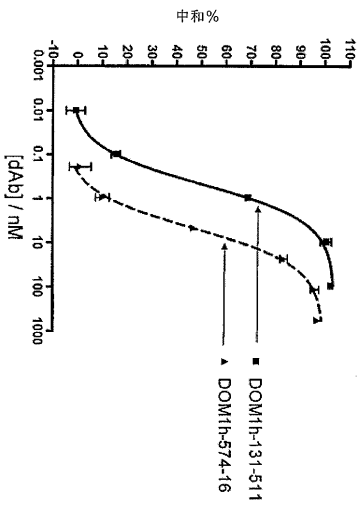
【図 8】



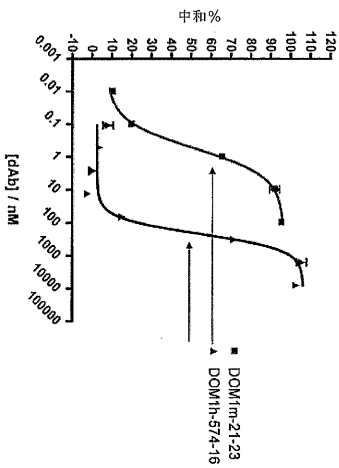
【図 7】



【図 10】



【図 9】



【 図 1 1 A 】

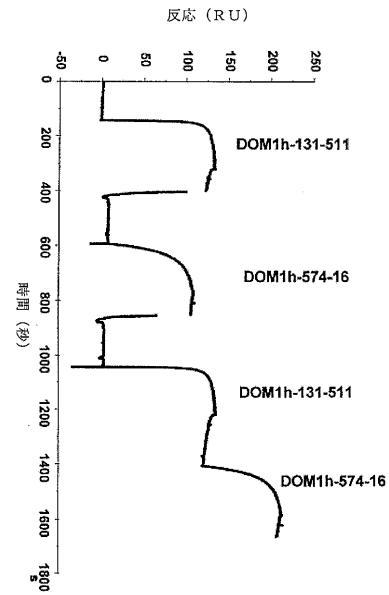
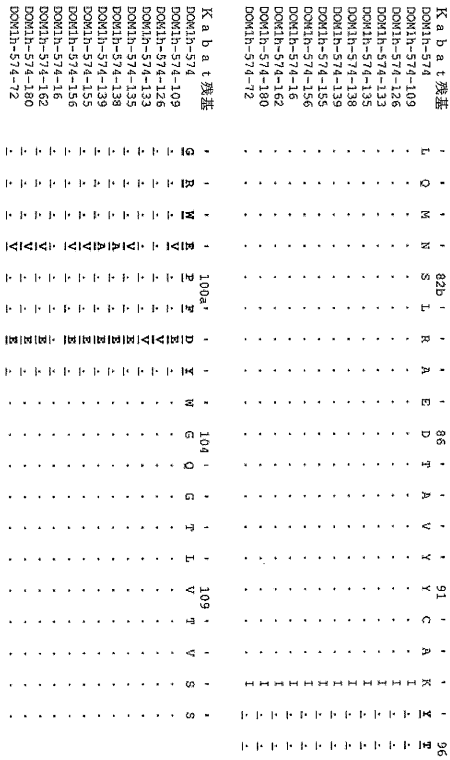
[illegible]

【 図 1 1 C 】

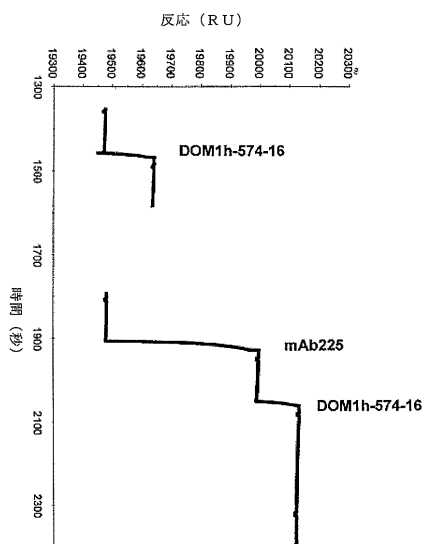
K a b a t 殘基	104a ¹	104 ²	109 ³	91 ⁴	96 ⁵
DONh-574-72	—	—	—	—	—
DONh-574-109	—	—	—	—	—
DONh-574-132	—	—	—	—	—
DONh-574-138	—	—	—	—	—
DONh-574-144	—	—	—	—	—
DONh-574-156	—	—	—	—	—
DONh-574-162	—	—	—	—	—
DONh-574-180	—	—	—	—	—
DONh-574-192	—	—	—	—	—
DONh-574-198	—	—	—	—	—
DONh-574-204	—	—	—	—	—
DONh-574-210	—	—	—	—	—
DONh-574-216	—	—	—	—	—
DONh-574-222	—	—	—	—	—
DONh-574-228	—	—	—	—	—
DONh-574-234	—	—	—	—	—
DONh-574-240	—	—	—	—	—
DONh-574-246	—	—	—	—	—
DONh-574-252	—	—	—	—	—
DONh-574-258	—	—	—	—	—
DONh-574-264	—	—	—	—	—
DONh-574-270	—	—	—	—	—
DONh-574-276	—	—	—	—	—
DONh-574-282	—	—	—	—	—
DONh-574-288	—	—	—	—	—
DONh-574-294	—	—	—	—	—
DONh-574-300	—	—	—	—	—
DONh-574-306	—	—	—	—	—
DONh-574-312	—	—	—	—	—
DONh-574-318	—	—	—	—	—
DONh-574-324	—	—	—	—	—
DONh-574-330	—	—	—	—	—
DONh-574-336	—	—	—	—	—
DONh-574-342	—	—	—	—	—
DONh-574-348	—	—	—	—	—
DONh-574-354	—	—	—	—	—
DONh-574-360	—	—	—	—	—
DONh-574-366	—	—	—	—	—
DONh-574-372	—	—	—	—	—
DONh-574-378	—	—	—	—	—
DONh-574-384	—	—	—	—	—
DONh-574-390	—	—	—	—	—
DONh-574-396	—	—	—	—	—
DONh-574-402	—	—	—	—	—
DONh-574-408	—	—	—	—	—
DONh-574-414	—	—	—	—	—
DONh-574-420	—	—	—	—	—
DONh-574-426	—	—	—	—	—
DONh-574-432	—	—	—	—	—
DONh-574-438	—	—	—	—	—
DONh-574-444	—	—	—	—	—
DONh-574-450	—	—	—	—	—
DONh-574-456	—	—	—	—	—
DONh-574-462	—	—	—	—	—
DONh-574-468	—	—	—	—	—
DONh-574-474	—	—	—	—	—
DONh-574-480	—	—	—	—	—
DONh-574-486	—	—	—	—	—
DONh-574-492	—	—	—	—	—
DONh-574-498	—	—	—	—	—
DONh-574-504	—	—	—	—	—
DONh-574-510	—	—	—	—	—
DONh-574-516	—	—	—	—	—
DONh-574-522	—	—	—	—	—
DONh-574-528	—	—	—	—	—
DONh-574-534	—	—	—	—	—
DONh-574-540	—	—	—	—	—
DONh-574-546	—	—	—	—	—
DONh-574-552	—	—	—	—	—
DONh-574-558	—	—	—	—	—
DONh-574-564	—	—	—	—	—
DONh-574-570	—	—	—	—	—
DONh-574-576	—	—	—	—	—
DONh-574-582	—	—	—	—	—
DONh-574-588	—	—	—	—	—
DONh-574-594	—	—	—	—	—
DONh-574-600	—	—	—	—	—
DONh-574-606	—	—	—	—	—
DONh-574-612	—	—	—	—	—

[illegible][illegible]

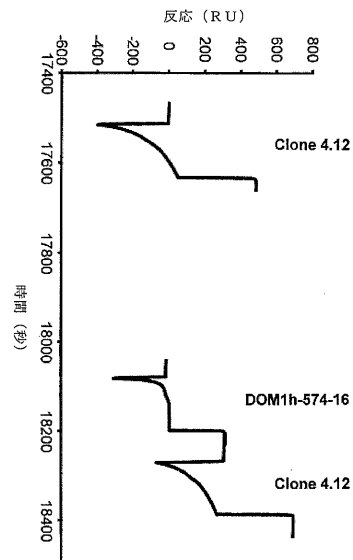
【 図 1 4 】



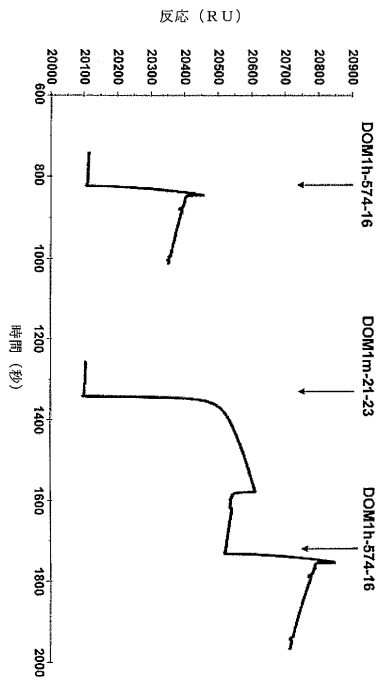
【 図 1 5 】



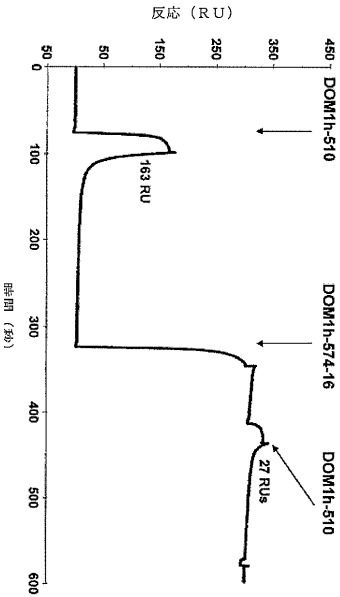
【 ㄨ 1 6 】



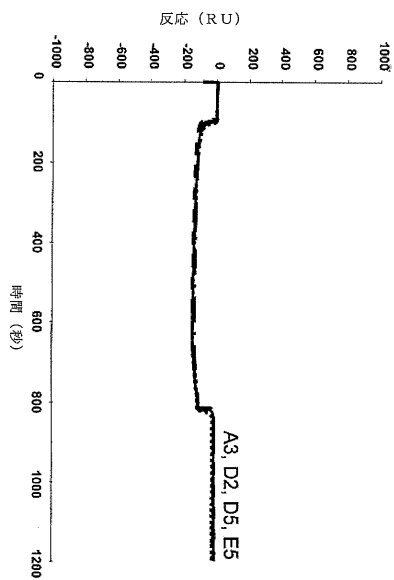
【図 18】



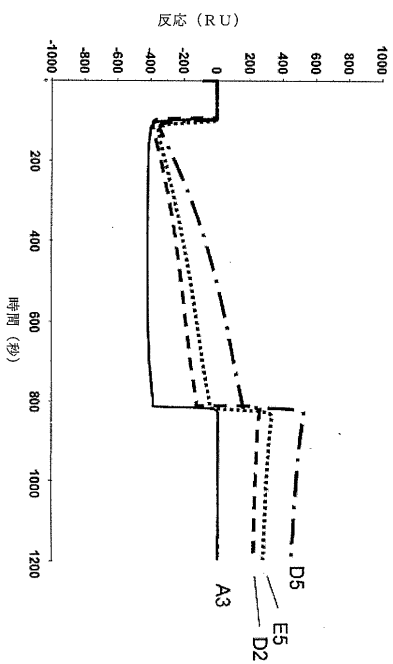
【図 17】



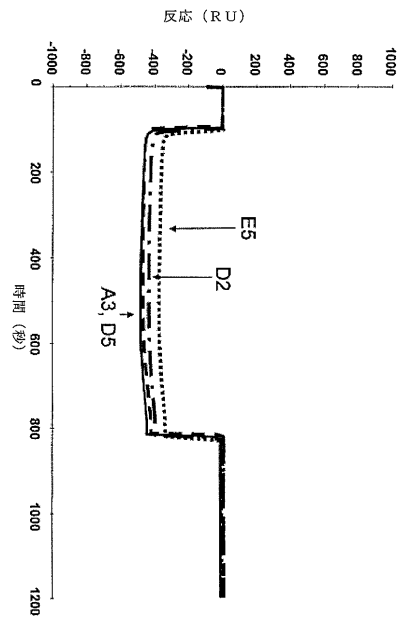
【図 20】



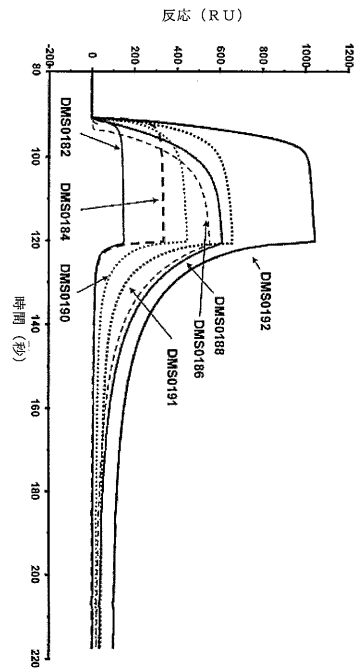
【図 19】



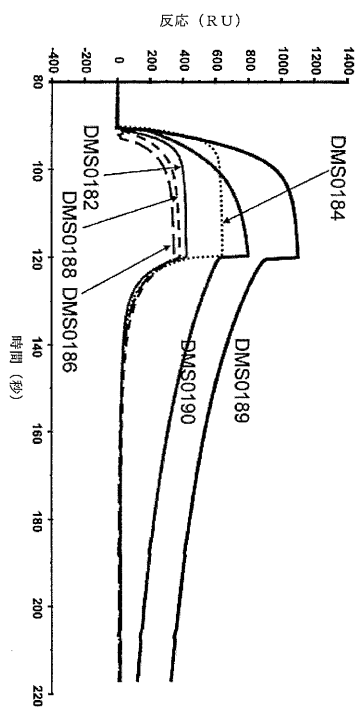
【図 2 1】



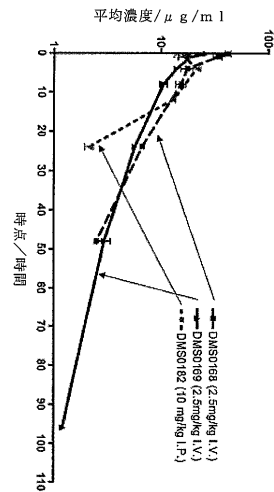
【図 2 2】



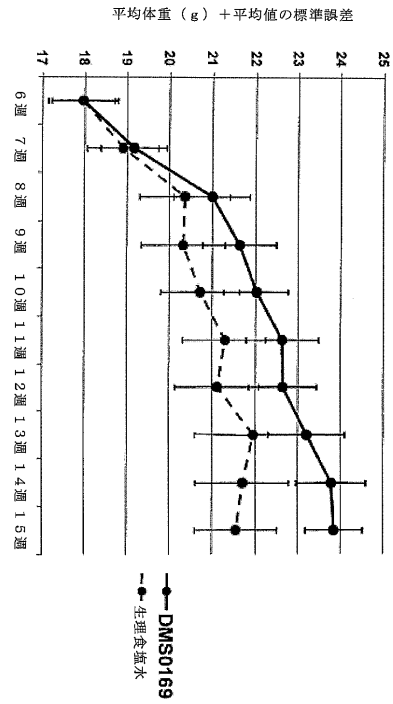
【図 2 3】



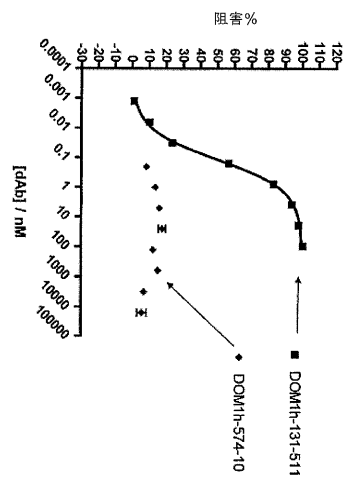
【図 2 4】



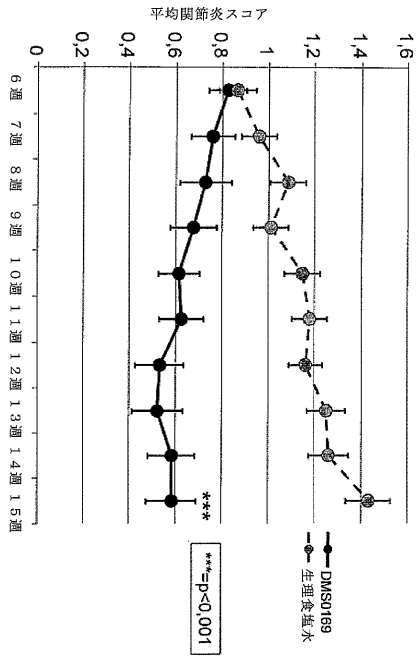
【図 26】



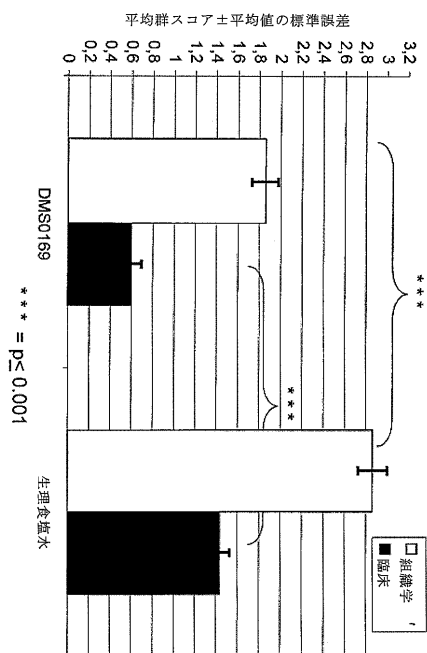
【図 28】



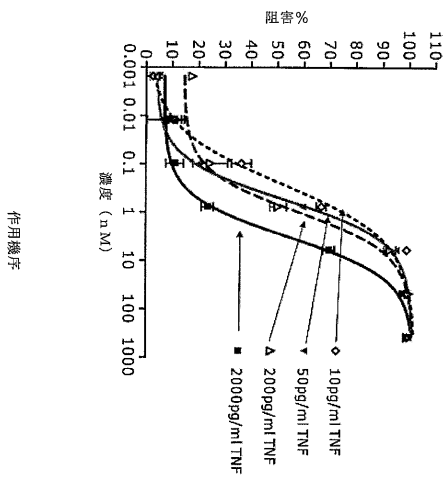
【図 25】



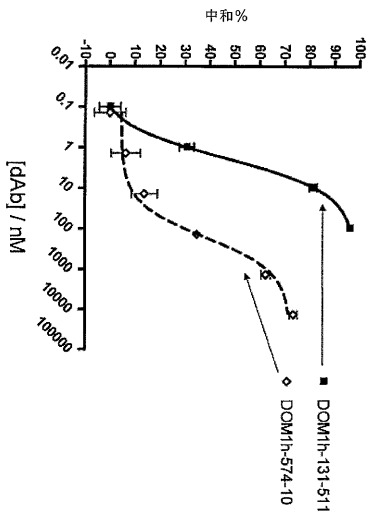
【図 27】



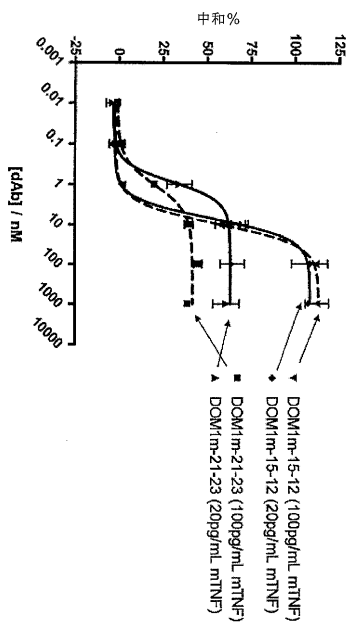
【図 30】



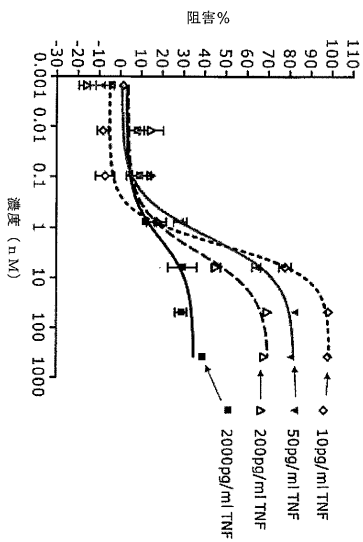
【図 29】



【図 32】



【図 31】



【配列表】

2012532619000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/060111

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/395 A61P29/00 A61P37/00 C07K16/18 C07K16/28 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/038027 A2 (DOMANTIS LTD [GB]; BREWIS NEIL D [GB]; WOOLVEN BENJAMIN P [GB]; HOLMES) 13 April 2006 (2006-04-13) page 41, lines 1-10 page 44 - page 48 page 127 - page 135; claims 1-241; figure 271; examples 1,2,6,9-12,15; sequence 628 -----	1-14
E	WO 2010/094720 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB]; DUFFIELD STEPHEN [GB]; ENEVER CAROLYN [GB]; LIU) 26 August 2010 (2010-08-26) page 93, line 26 - page 117, line 14 -----	1-14
A	WO 2008/096158 A2 (DOMANTIS LTD [GB]; TOMLINSON IAN [GB]; JESPER LAURENT [GB]; CLUBE JAS) 14 August 2008 (2008-08-14) examples 12-15 -----	1-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
4 July 2011		13/09/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Cilensek, Zoran

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/060111**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-14(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2010/ 060111

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-14(partially)

An anti-TNF α receptor type 1 (TNFR1; p55) antagonist for administration to a patient suffering from a TNFR1-mediated disease or condition, wherein the antagonist is a non-competitive inhibitor of TNFR1, wherein the antagonist comprises an immunoglobulin single variable domain DOM1h-574-156.

2. claims: 1-7, 9-14(all partially)

Idem as item 1, wherein the single variable domain is DOM1h-574-72.

3. claims: 1-7, 9-14(all partially)

Idem as item 1, wherein the single variable domain is DOM1h-574-109.

4. claims: 1-7, 9-14(all partially)

Idem as item 1, wherein the single variable domain is DOM1h-574-138

5. claims: 1-7, 9-14(all partially)

Idem as item 1, wherein the single variable domain is DOM1h-574-162.

6. claims: 1-7, 9-14(all partially)

Idem as item 1, wherein the single variable domain is DOM1h-574-180.

7. claims: 5-14(partially)

Idem as item 1, wherein the single variable domain is DOM1m-21-23.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/060111

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006038027	A2	13-04-2006	NONE
WO 2010094720	A2	26-08-2010	NONE
WO 2008096158	A2	14-08-2008	AR 065260 A1 27-05-2009
		AU 2008212682 A1 14-08-2008	
		CA 2677069 A1 14-08-2008	
		CL 4232008 A1 24-10-2008	
		CN 101965364 A 02-02-2011	
		EA 200900955 A1 30-04-2010	
		EP 2139918 A2 06-01-2010	
		JP 2010518062 A 27-05-2010	
		KR 20090114445 A 03-11-2009	
		US 2009259026 A1 15-10-2009	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
	A 6 1 P 11/06	

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

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74)代理人 100122389

弁理士 新井 栄一

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(72)発明者 ストープ , アドリアーン アラート

イギリス国 シービー 4 0 ダブリュジー ケンブリッジシャー , ケンブリッジ , ケンブリッジ
サイエンス パーク 3 1 5 , ドマンティス リミテッド

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA63

4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

4C084 AA17 NA14 ZA892 ZA962 ZB112 ZB152

4C085 AA14 BB17 BB41 CC22 CC23 GG01

4H045 AA11 BA10 CA40 DA50 EA20 FA74