

(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2020-535811

(P2020-535811A)

(43) 公表日 令和2年12月10日 (2020.12.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B O 6 4
C O 7 K 16/44 (2006.01)	C O 7 K 16/44	Z N A 4 B O 6 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C O 7 6
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	4 C O 8 5
C O 7 K 16/22 (2006.01)	C O 7 K 16/22	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-517953 (P2020-517953)	(71) 出願人	520102808
(86) (22) 出願日	平成30年9月27日 (2018.9.27)		エラスモーゲン リミテッド
(85) 翻訳文提出日	令和2年5月21日 (2020.5.21)		英国, アバディーンシャー, アバディーン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/076333		, フォレスターヒル ロード, フォレスタ
(87) 国際公開番号	W02019/063726		ーヒル ヘルス リサーチ コンプレック
(87) 国際公開日	平成31年4月4日 (2019.4.4)		ス, リバティー ビルディング
(31) 優先権主張番号	62/563, 948	(74) 代理人	110000671
(32) 優先日	平成29年9月27日 (2017.9.27)		八田国際特許業務法人
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(72) 発明者	ウバー, オビナ
(31) 優先権主張番号	62/667, 126		英国, アバディーンシャー, アバディーン
(32) 優先日	平成30年5月4日 (2018.5.4)		, フォレスターヒル ロード, フォレスタ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		ーヒル ヘルス リサーチ コンプレック
			ス, リバティー ビルディング, ケアオブ
			エラスモーゲン リミテッド
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的結合分子

(57) 【要約】

本発明は、V N A R を含むマルチドメイン特異的結合分子の形成に関する。腫瘍壊死因子アルファ (T N F) に結合する特異的結合ドメインをも提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

1 以上の特異的抗原の同一または異なるエピトープに結合する 2 以上の V N A R ドメインを含むマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 2】

前記マルチドメイン特異的結合分子中の前記 V N A R ドメインのうちの 1 以上が、モノマー V N A R と比較して、それらの標的に対するより高い結合親和性を示す、請求項 1 に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 3】

前記 V N A R ドメイン間にスペーサー配列をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

10

【請求項 4】

前記スペーサー配列が、結合分子において示される独立した機能を有する、請求項 3 に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 5】

前記スペーサー配列が、V N A R ドメインまたはその機能的断片である、請求項 4 に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 6】

前記スペーサー配列が、血清アルブミンに結合する V N A R またはその機能的断片である、請求項 5 に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

20

【請求項 7】

前記スペーサー配列が、ヒト血清アルブミンに結合する V N A R またはその機能的断片である、請求項 6 に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 8】

前記スペーサー配列が、配列番号 67、配列番号 67、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87 もしくは 88 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 60 % の配列同一性を有する機能的断片を有する、請求項 7 に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 9】

前記スペーサー配列が、免疫グロブリン F c 領域に由来する、請求項 4 に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

30

【請求項 10】

前記スペーサー配列が、ヒト免疫グロブリン F c 領域に由来する、請求項 9 に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 11】

1 以上の非 V N A R ドメインをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 12】

前記非 V N A R ドメインが、前記 V N A R ドメインの C 末端または N 末端にある、請求項 11 に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

40

【請求項 13】

前記非 V N A R ドメインの少なくとも 1 つが、T N F R 1 および免疫グロブリン F c を含む群から選択される、請求項 11 または 12 に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 14】

前記特異的抗原が、サイトカイン、成長因子、酵素、ホルモン、細胞表面結合分子 (cell surface associated molecule)、細胞表面膜成分、細胞内分子、細胞外マトリックス成分、間質抗原、血清タンパク質、骨格抗原、微生物抗原、または通常は免疫特権のある位置の抗原を含む群からのものであることをさらに特徴とする、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

50

【請求項 15】

以下のCDRおよび超可変領域(HV)を含むTNF - 特異的VNAR結合ドメイン：

CDR1：HCATSSまたはNCGLSSまたはNCALSS

HV2：TNEESISKG

HV4：SGSKSまたはEGSKS

CDR3：ECQYGLAEYDVまたはSWTQNWRCNSDVまたはYI PCIDELVYMISGTS GPIHDV

または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体。

【請求項 16】

10

前記VNAR結合ドメインが、配列番号2、7もしくは12のアミノ酸配列、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体を含む、請求項15に記載のTNF - 特異的VNAR結合ドメイン。

【請求項 17】

前記VNARDメインがヒト化または脱免疫化されている、請求項15または16に記載のTNF - 特異的VNAR結合ドメイン。

【請求項 18】

前記VNARDメインのうちの1以上が、配列番号2、7もしくは12を含む群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体を有する、請求項1に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

20

【請求項 19】

前記VNARDメインのうちの2以上が、配列番号2、7もしくは12を含む群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体を有する、請求項17に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 20】

前記VNARDメインのうちの1以上が、配列番号65もしくは66を含む群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体を有する、請求項1に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 21】

前記VNARDメインのうちの2以上が、配列番号65もしくは66を含む群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体を有する、請求項19に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

30

【請求項 22】

前記VNARDメインのうちの2以上が、配列番号2、7もしくは12を含む群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体を有する、請求項8に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 23】

前記VNARDメインのうちの2以上が、配列番号65もしくは66を含む群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体を有する、請求項8に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

40

【請求項 24】

前記VNARDメインのうちの2以上が、配列番号2、7もしくは12を含む群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体を有する、請求項10に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 25】

前記VNARDメインのうちの2以上が、配列番号65もしくは66を含む群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体を有する、請求項10に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 26】

ヒトに投与されると潜在的な免疫原性を減少させるように、1以上のアミノ酸配列位置

50

で修飾される、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の結合分子。

【請求項 2 7】

請求項 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の結合分子をコードするポリヌクレオチド配列を有する、単離された核酸。

【請求項 2 8】

宿主細胞が結合分子を産生するような条件下で請求項 2 6 に記載のポリヌクレオチドを含む前記宿主細胞を培養または維持することを含み、必要に応じて、前記結合分子を単離することをさらに含む、結合分子を調製する方法。

【請求項 2 9】

請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載のマルチドメイン特異的結合分子、および必要であれば少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

10

【請求項 3 0】

治療に使用するための、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載のマルチドメイン特異的結合分子。

【請求項 3 1】

それを必要とする患者における疾患の治療のための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の特異的抗原結合分子の使用。

【請求項 3 2】

治療を必要とする患者における疾患を治療する方法であって、前記患者に治療上有効な量の請求項 2 8 に記載の医薬組成物を投与することを含む方法。

20

【請求項 3 3】

T N F によって媒介される状態を治療するための方法であって、T N F に特異的に結合する請求項 2 8 に記載の組成物を治療上有効量投与することを含む方法。

【請求項 3 4】

I C O S L によって媒介される少なくとも 1 つの状態を治療するための方法であって、I C O S L に特異的に結合する請求項 2 8 に記載の組成物を有効量投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

30

発明の分野

本発明は、V N A R を含むマルチドメイン特異的結合分子(multi-domain specific binding molecule)の形成に関する。腫瘍壊死因子 (T N F) に結合する特異的結合ドメインも提供される。

【背景技術】

【0 0 0 2】

背景

疾病と闘うための、特定の、ますます効果的で、多様化した治療用兵器に関する探索では、無数の異なる様式が利用されてきた。伝統的な小分子から漸増的により大きな生物学的医薬品、例えば、単一結合ドメイン (1 0 ~ 1 5 k D a) から完全 I g G (~ 1 5 0 k D a) まで。潜在的な治療薬として現在研究されている単一ドメインとしては、多種多様な別個のタンパク質足場(protein scaffolds)があり、これらはすべて、関連する利点および欠点を伴う。

40

【0 0 0 3】

このような単一ドメイン足場は、異なる種のタンパク質のアレイに由来し得る。新規または新しい抗原レセプター (I g N A R) は軟骨魚(cartilaginous fish)の血清中で発見された約 1 6 0 k D a のホモ二量体タンパク質である(Greenberg A. S., et al., Nature, 1995. 374(6518): p. 168-173, Dooley, H., et al, Mol. Immunol, 2003. 40(1): p. 25-33; Muller, M.R., et al., mAbs, 2012. 4(6): p. 673-685)). 各分子は、単一の N 末端可変ドメイン (V N A R) および 5 つの定常ドメイン (C N A R) から構成される。

50

I g N A R ドメインは、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。V N A R は、免疫グロブリンおよび T 細胞レセプター可変ドメインにならびに細胞接着分子に対して構造的およびいくつかの配列類似性を有する密に折り畳まれたドメインであり、古典的な免疫グロブリンおよび T 細胞レセプターの N 末端可変ドメイン(N Variable terminal domain)に対する類似性によって V N A R と呼ばれる。V N A R は、免疫グロブリンに対して限定された配列相同性、例えば、V N A R とヒト軽鎖配列との間の 25 ~ 30 % 類似性を共有する(Dooley, H. and Flajnik, M. F., Eur. J. Immunol., 2005. 35(3): p. 936-945)。

【 0 0 0 4 】

Kovaleva M. et al Expert Opin. Biol. Ther. 2014. 14(10): p. 1527-1539 および Zie Ionka S. et al mAbs 2015. 7(1): p. 15-25 は、最近、V N A R の構造的特徴と生成の要約を提供し、これらは参照により組み込まれている。

10

【 0 0 0 5 】

V N A R は、古典的な免疫グロブリン抗体祖先から進化したとは思われない。V N A R の明確な構造的特徴は、従来の免疫グロブリン可変ドメインに存在する C D R 2 ループと等価な配列の切断、および I g N A R 構造に存在しない軽鎖ドメインとの会合を通常可能にする疎水性 V H / V L 界面残基の欠損、ならびに C D R 1 および 3 に N 末端で隣接するフレームワーク 1 および 3 領域におけるシステイン間のカノニカル免疫グロブリンスーパーファミリー架橋(canonical immunoglobulin superfamily bridge)に加えて追加のジスルフィド架橋を形成することが観察される C D R 領域における追加のシステイン残基のいくつかの V N A R サブタイプにおける存在である。

20

【 0 0 0 6 】

現在まで、I、I I および I I I として知られるサメ I g N A R の 3 つの定義されたタイプがある(図 1)。これらは、強い選択圧下であり、したがってほとんど置換されない非カノニカルシステイン残基(non-canonical cysteine residues)の位置に基づいて分類されている。

【 0 0 0 7 】

3 つのタイプは全て、36 番目の位置の不変トリプトファンと共に、標準免疫グロブリンフォールドを安定化する、35 および 107 番目の位置に古典的免疫グロブリンカノニカルシステインを有する(Kabat, E.A. et al. Sequences of proteins of immunological interest. 5th ed. 1991, Bethesda: US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH におけるように番号付け)。C D R 2 自体は定義されていないが、T C R H V 2 および H V 4 とより密接に比較される配列変異の領域は、それぞれフレームワーク 2 および 3 において定義されている。タイプ I には、フレームワーク 2 とフレームワーク 4 に生殖細胞系列でエンコードされたシステイン残基および C D R 3 内に偶数の追加のシステインとを有する。リゾチームに対しておよびリゾチームとの複合体中で単離されたタイプ I I g N A R の結晶構造研究により、これらのシステイン残基の寄与を決定することができた。フレームワーク 2 および 4 のシステインは双方とも、C D R 3 ループが H V 2 領域に向かってしっかりと保持される密に充填された構造を形成する C D R 3 中のものとジスルフィド架橋を形成する。今日まで、タイプ I I g N A R はコモリザメ(nurse shark)においてのみ同定されており、同じオーダーのメンバーを含む、他の全てのエラスモブランチは、タイプ I I またはこの型のパリエーションのみを有する。

30

40

【 0 0 0 8 】

タイプ I I I g N A R は、C D R 1 および C D R 3 にシステイン残基を有するものとして定義され、これらは、これらの 2 つの領域を近接して保持する分子内ジスルフィド結合を形成し、結合ポケットまたは溝に導く突出した C D R 3 (図 2)を生じる。タイプ I 配列は、一般的に、タイプ I I より長い C D R 3 を有し、それぞれ平均 21 および 15 残基である。これは、タイプ I C D R 3 中の 2 以上のシステイン残基がそれらのフレームワーク 2 および 4 カウンターパートと会合するための強い選択圧(selective pressure)に起因すると考えられる。体細胞突然変異の蓄積に関する研究により、タイプ I よりもタイ

50

ブ I I の C D R 1 により多数の突然変異が存在するが、タイプ I の H V 2 領域はタイプ I I よりも大きな配列変異を示すことが示される。この証拠は、抗原結合部位内のこれらの領域の決定された位置とよく相関する。

【 0 0 0 9 】

タイプ I I I として知られる第 3 の I g N A R 型が、新生児において同定されている。I g N A R ファミリーのこのメンバーは、V 遺伝子との D 1 および D 2 領域 (C D R 3 を形成する) の生殖細胞融合 (germline fusion) のため C D R 3 内の多様性を欠く。ほとんどすべての公知のクローンは、配列多様性をほとんどまたは全く有さない 1 5 残基の C D R 3 長を有する。

【 0 0 1 0 】

V N A R の別の構造型は、タイプ (I I I b または I V) と呼ばれ、2 つのカノニカルシステイン残基のみを有する。これまで、このタイプは、主にドッグフィッシュシャーク (dogfish shark) において見出されており (Liu, J.L., et al. Mol. Immunol. 2007. 44(7): p. 1775-1783; Kovalenko O.V., et al. J Biol Chem. 2013. 288(24): p. 17408-19)、ウォベゴングシャーク (wobbegong shark) 由来の半合成 V - N A R ライブラリーからも単離された (Streltsov, V.A. et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(34): p. 12444-12449)。

【 0 0 1 1 】

しかし、V N A R 配列から形成された合成ライブラリーから単離された特異的 V N A R が他のタンパク質に高い親和性で結合することができ (Shao C.Y. et al. Mol Immunol. 2007. 44(4): p. 656-65; WO2014/173959)、軟骨魚 (cartilaginous fish) が抗原および抗原に結合する得られた応答性 I g N A R で免疫化できるので、I g N A R が適応免疫系の一部である (Dooley, H., et al, Mol. Immunol, 2003. 40(1): p. 25-33; WO2003/014161) ことが示されている。I g N A R は、免疫グロブリンおよび T 細胞レセプターと類似の D および J 配列と V 様配列との組み合わせ結合 (combinatorial joining) のためのメカニズムを有することが示されている (Zielonka S. et al mAbs 2015. 7(1): p. 15-25 に要約されている)。

【 0 0 1 2 】

V N A R 結合表面は、他の天然免疫グロブリン中の可変ドメインとは異なり、F W 1 - C D R 1 - F W 2 - H V 2 - F W 3 a - H V 4 - F W 3 b - C D R 3 - F W 4 の順序で存在するフレームワーク配列 (intervening framework sequences) によって連結された、多様な 4 つの領域 : C D R 1、H V 2、H V 4 および C D R 3 に由来する (Stanfield, R. L., et al, Science, 2004. 305(5691): p. 1770-1773; Streltsov, V.A., et al, Protein Sci., 2005. 14(11): p. 2901-2909; Stanfield, R. L., et al., J Mol. Biol., 2007. 367(2): p. 358-372 をも参照)。天然の軽鎖パートナーの欠如および C D R 2 の欠如の組み合わせにより、V N A R は脊椎動物界における最小の天然に存在する結合ドメインとなる。

【 0 0 1 3 】

I g N A R は、ラクダ科 (ラクダ、ヒトコブラクダおよびラマ、Hamers-Casterman, C. et al. Nature, 1993. 363, 446-448; Wesolowski, J., et al., Med Microbiol Immunol, 2009. 198(3): p. 157-74) において見出される重鎖のみの免疫グロブリン (H C A b) といくつかの偶発的特徴を共有する。I g N A R とは異なり、H C A b は免疫グロブリンファミリーに明確に由来し、標準的な免疫グロブリンに対して有意な配列相同性を共有する。重要なことに、V N A R の 1 つの重要な区別としては、古典的な免疫グロブリンまたは H C A b とは異なり、分子がその進化のいかなる時点においてもパートナー軽鎖を有していないことがある。Flajnik M.F. et al PLoS Biol 2011. 9(8): e1001120 および Zielonka S. et al mAbs 2015. 7(1): p. 15-25 は、V N A R とラクダ科動物由来の免疫グロブリン由来 V_{H H} 単一結合ドメインとの間の類似性および差異、ならびにそれらの異なる進化的起源についてコメントしている。

【 0 0 1 4 】

古典的な免疫グロブリンの軽鎖および重鎖（それぞれV_LおよびV_H）に由来する結合ドメインは、一緒に連結して、免疫グロブリンV_LおよびV_Hドメインが短いペプチドリンカーによって結合するTraunecker et al. (Traunecker A, et al. EMBO J.1991. 10, p. 3655-36, Traunecker A, et al. Int J Cancer Suppl.7, 51-52; Neri D. J Mol Biol. 1995. 246(3): p. 367-73)、s c F v フォーマット(Bird et al., 1988; Huston et al., 1988)において、またはダイアボディとして(Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993. 90, 6444-6448; Holliger P. et al. Nat. Biotechnol. 15, 632-636。他の初期の例では、Mack M, et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995. 92, p. 7021-7025, Jost CR, et al Mol. Immunol. 1996. 33, p. 211-219を参照)で、二価または多価の二重特異性結合体を形成し得ることが示されている。T a n d a b s は、単一のポリペプチド鎖に連結された2対のV_LおよびV_Hドメインを含む(Kipriyanov S.M. et al., J. Mol. Biol. 293, 41-56、分子に対して二重特異性および二価を形成する)。

10

【0015】

さらに、V_HH は、一緒に連結して、二価または多価の二重特異性結合体を形成し得ることが示されている(Els Conrath et al. J Biol Chem. 2001. 276(10) p.7346-7350)。同様にして、T細胞レセプター由来の変域ドメインは免疫グロブリンs c F v に連結して、二重特異性フォーマットを形成し得る(McCormack E. et al. Cancer Immunol Immunother. 2013. 62(4): p. 773-85)。古典的免疫グロブリン由来の単一抗体変域ドメイン(d A B s : Ward E.S. et al. Nature 1989, 341, p. 544-546)もまた、二量体化され得る。二重特異性結合分子の全体的な概念およびそれらの開発における現在の進歩は最近、例えば、Kontermann R. mAbs 2012. 4(2): 185-197; Jost C. and Pluckthun A. Curr Opin Struct Biol. 2014. 27: p. 102-112; Spiess C. et al. Mol Immunol 2015. 67(2): 95-106によって概説されている。

20

【0016】

別々の分子上のエピトープを認識する二重特異性分子に加えて、同じタンパク質上の隣接するエピトープを認識する2つの抗体結合ドメインを連結する概念(ビパラトピック(b iparatopic))は、長い歴史を有する(Neri D. J Mol Biol. 1995. 246(3): p. 367-73を参照のこと)。ビパラトピックV_HH 分子が開示されている(例えば、Jahnichen S. et al Proc Natl Acad Sci U S A. 2010. 107(47): p. 20565-70; Roovers R.C. et al Int J Cancer. 2011 129(8): p. 2013-24)。

30

【0017】

しかし、V_HH とは異なり、V N A R は二量体融合分子を効率的に形成することができないかもしれないことが示唆されている(Simmons D.P. et al. Immunol Methods. 2006 315(1-2): p. 171-84)。(Bispecific Antibodies Kontermann R.E. Springer Publishing 2011のコメントもまた参照のこと; Strohl W.R. and Strohl L.M., Therapeutic Antibody Engineering, Woodhead Publishing 2012のp 3 2 2 / 3 2 3 のコメントも参照のこと)。

【発明の概要】

【0018】

発明の要約

40

本発明は、2以上のV N A R ドメインを含むマルチドメイン特異的結合分子の提供に関する。より詳細には、本発明は、二価および多価V N A R の提供に関する。本発明者らは、最近、当技術分野における一般的な理解に反して、実際に、V N A R の二量体、三量体および二重特異性融合体が形成され得ることを示した。

【0019】

最近、Muller M.R. et al mAbs 2012. 4(6): p. 673-685; WO2013/167883)は、1つのドメインがヒト血清アルブミン(H S A)に対する特異性を有するV N A R を含む二重特異的V N A R を開示し、これは、二価構造物が血清中でH S Aに結合して、これによりパートナードメインの生物学的半減期を延長することを可能にする。H S A 結合V N A R のN末端およびC末端の両方におけるV N A R の融合は、H S A 結合ドメインの機能の保持

50

と共に実証された。より最近では、WO 2014/173975で、B細胞、活性化単球および樹状細胞などの抗原提示細胞（APC）上で構成的に発現される細胞表面抗原であるICOSL（CD275）に結合することができ、B7ファミリーメンバー、ICOS（CD278）のリガンドであるVNARSを開示されている(Yoshinaga.S., K., et al., Int. Immunol., 2000. 12(10): p. 1439-1447)。これらのICOSL VNARのいくつかは、HSA結合VNARSに連結することができ、両方のドメインが機能性を保持することが示された。それぞれ異なる抗原（hICOSL、mICOSLおよびHSA）を認識する三量体を調製することができ、各ドメインは機能を保持することが示された。

【0020】

しかし、同じ抗原上の同じまたは異なるエピトープを認識する二重特異性または多重特異的VNARが形成され得ることは、以前に示されていない。さらに、そして予想外にも、この形態の二重特異性分子は、構成モノマー、またはモノマー形態自体、またはHSAを認識するVNARに結合したモノマーから形成される二価分子よりも改善された特性を示す。

【0021】

本発明は、多価または多重特異性エンティティに組み合わせられる能力を有し、そのマルチドメインエンティティ内で各ドメインが結合機能を保持する特異的VNARドメイン配列に関する。

【0022】

従って、本発明の第1の態様において、1以上の特異的抗原の同一または異なるエピトープに結合する2以上のVNARドメインを含むマルチドメイン特異的結合分子(multi-domain specific binding molecule)が提供される。

【0023】

特定の好ましい実施形態において、本発明の第1の態様のマルチドメイン特異的結合分子中のVNARは、特異的抗原上の同じ抗原に結合する。

【0024】

さらに好ましい実施形態において、マルチドメイン特異的結合分子のVNARは、特異的抗原上の異なるエピトープに結合する。これらの実施形態によるマルチドメイン特異的結合分子は、本明細書にさらに記載されるように、バイパラトピック分子(bi-paratopic molecule)と呼ぶことができる。

【0025】

一実施形態において、特異的VNAR結合ドメイン配列が多価または多重特異性エンティティに組み合わせられ(combine into)、そのマルチドメインエンティティ内で、各ドメインが結合機能を保持し、上記結合ドメインは単一の抗原上の異なるエピトープを認識する。

【0026】

本発明の好ましい実施形態は、結合特異性が単一の特異的抗原上の異なるエピトープに対するものであり、得られたエンティティが個々のVNAR結合ドメインと比較して改善された特性を示す2つ（またはそれ以上）の異なるVNARドメインを含む二重特異性または多重特異性結合分子である。改善された特性の例としては、モノマーVNARと比較してアゴニスト効果またはアンタゴニスト効果の増加がある。

【0027】

好ましくは、本発明のマルチドメイン特異的結合分子のVNARドメインは、スペーサー配列によって分離される。より好ましくは、前記スペーサー配列は、結合分子で示される独立した機能性を有する。一実施形態では、前記スペーサー配列は、VNARドメインまたはその機能的断片である。特定の例では、前記スペーサーは、ヒト血清アルブミンまたはICOSLなどの、血清アルブミンに結合するVNARまたはその機能的断片であり得る。特定の実施形態では、前記スペーサー配列は、配列番号：67、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87または88のいずれか1つのアミノ酸配列、またはそれと少なくとも60%の配列同一性を有する機能的断片を有する。さら

10

20

30

40

50

なる実施形態では、前記スペーサー配列は、以下に制限されないがヒト免疫グロブリンFc領域などの、免疫グロブリンのFc部分であってもよい。改善された特性は、例えば、VNARDメインを間隔をあけて(in space)受動的に分離することによって、または得られるエンティティについてインビボ半減期をより長くし得る血清アルブミン結合等のスペーサーの固有の特性によって、またはICOSL等の第2の治療的自己免疫標的(second therapeutic auto-immune target)の認識によって、または免疫グロブリンFc領域の場合には、免疫系または補体の細胞との結合(engagement)能の導入によって、スペーサーの特性に部分的または完全に由来し得る。

【0028】

スペーサー配列によって分離される2以上のVNARDメインを含む本発明のマルチドメイン特異的結合分子の実施形態は、本明細書では、Quad-Xフォーマット(Quad-X format)と呼ぶことができる。

10

【0029】

他の好ましい実施形態では、マルチドメイン特異的結合分子は、1以上の非VNARDメインをさらに含み得る。前記1以上の非VNARDメインは、VNARDメインに対して任意の位置に配置され得る。典型的には、および好ましい実施形態では、前記非VNARDメインは、VNARDメインに対してC末端またはN末端であろう。

【0030】

2以上のVNARDメインと、VNARDメインに対してC末端またはN末端にある非VNARDメインとを含む本発明のマルチドメイン特異的結合分子の実施形態は、本明細書では、Quad-Yフォーマット(Quad-Y format)と呼ぶことができる。

20

【0031】

例示的な非VNARDメインとしては、TNFR1および免疫グロブリンFcがあるが、これらに限定されない。

【0032】

特異的抗原(specific antigen)は、サイトカイン、成長因子、酵素、細胞表面関連分子(cell surface associated molecule)、細胞表面膜成分(cell-surface membrane component)、細胞内分子、細胞外マトリックス成分、間質抗原、血清タンパク質、骨格抗原(skeletal antigen)、微生物抗原、または通常は免疫特権のある位置(normally immune-privileged location)の抗原からなる群からであり得る。

30

【0033】

本発明のさらなる態様は、サイトカインを認識するVNARD結合ドメインの特定の組み合わせである。

【0034】

また、本発明によって、ヒトTNFを認識し、疾患を治療するために現在使用されている全ての他の十分に特徴付けられた抗TNF抗体およびVHHバインダーとは異なるエпитープに結合する特異的ドメインが提供される。

【0035】

従って、第2の態様において、本発明は、以下のCDRおよび超可変領域(HV)を含むTNF-特異的VNARD結合ドメイン、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体(functional variant thereof)を提供する：

40

【0036】

【化 1】

CDR1: HCATSS (配列番号68) またはNCGLSS (配列番号69) または
NCALSS (配列番号70)
HV2: TNEESISKG (配列番号71)
HV4: SGSKS (配列番号72) またはEGSKS (配列番号73)
CDR3: ECQYGLAEYDV (配列番号1) またはSWWTQNWRCNSNDV
(配列番号6) またはYIPCIDELVYMISSGGTSGPIHDV (配列番号11)

【0037】

10

特に好ましい実施形態では、TNF - 特異的VNAR結合ドメインは、配列番号2、7または12のアミノ酸配列、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体を含む。

【0038】

好ましい実施形態では、本発明のTNF - 特異的VNARドメインは、特異的抗原上の特異的エピトープに対する機能的結合活性は保持しながら、例えば、ヒト化、脱免疫化または類似の技術によって、インビボでの免疫原性の可能性を減少させるように、1以上のアミノ酸配列位置で修飾される。

【0039】

本発明の一実施形態は、TNF を認識し、本発明に概説される形態において、個々の結合ドメインよりも改善された機能的特性を提供する、得られるマルチドメイン結合分子へのVNAR結合ドメインの特定の組み合わせ(specific combination)である。TNF を認識すると主張されているVNARを産生できることが知られている(Camacho-Villegas T, et al MAbs. 2013. 5(1): P. 80-85; Bojalil R, et al BMC Immunol. 2013. 14:17; WO2011/056056; US20110129473; US20140044716)。しかし、これらのVNARは、二量体または二重特異性形態を形成するように連結されていない。さらに、単量体フォーマットのこれらのドメインは、ここで説明した単量体抗TNF VNARドメインよりも70倍から200倍効力が低い。

20

【0040】

したがって、本発明の第2の態様のTNF - 特異的VNAR結合ドメインは、第1の態様のマルチドメイン特異的結合分子における一方または両方のVNARドメインとして使用することができる。したがって、好ましい実施形態では、1以上のVNARドメインが配列番号2、7もしくは12からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体を有する、第1の態様のマルチドメイン特異的結合分子が提供される。他の好ましい実施形態では、2以上のVNARドメインが配列番号2、7もしくは12からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体を有する、第1の態様のマルチドメイン特異的結合分子が提供される。

30

【0041】

本発明の第1の態様の他の好ましい実施形態としては、配列番号65もしくは66からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体を有する1以上のVNARドメインを含む、第1の態様のマルチドメイン特異的結合分子がある。第1の態様のさらに別の実施形態としては、配列番号65もしくは66からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも60%の配列同一性を有するその機能的変異体を有する2以上のVNARドメインを含む、第1の態様のマルチドメイン特異的結合分子がある。

40

【0042】

本発明の第1の態様において使用される1以上のVNARドメインは、特異的抗原上の特異的エピトープに対する機能的結合活性を保持しながら、例えば、ヒト化、脱免疫化または類似の技術によって、インビボでの免疫原性を減少させるように、1以上のアミノ酸

50

配列位置で修飾され得る。

【0043】

本発明はまた、本明細書中に記載される任意の態様または実施形態による結合分子をコードするポリヌクレオチド配列を含む単離された核酸を提供する。さらに、本明細書では、前記ポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、該宿主細胞が結合分子を産生するような条件下で培養または維持することを含み、必要であれば前記結合分子を単離することをさらに含む、本発明に係る結合分子を調製する方法が提供される。

【0044】

本発明のさらなる態様によれば、特異的抗原結合分子および/または本発明の前記態様のマルチドメイン特異的結合分子を含む医薬組成物が提供される。

10

【0045】

本発明の医薬組成物は、任意の適切かつ薬学的に許容可能な担体、希釈剤、アジュバントまたは緩衝溶液を含み得る。本組成物は、さらなる薬学的に活性のある薬剤を含み得る。そのような担体としては、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、リボソーム、水、グリセロール、エタノールおよびこれらの組み合わせが挙げられ得るが、これらに限定されない。このような組成物は、示されるようなさらなる薬学的に活性のある薬剤を含み得る。追加の薬剤は、治療用化合物、例えば、抗炎症薬、細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤または抗生物質であってもよい。このような追加の薬剤はそれを必要とする患者への投与に適した形態で存在してもよく、このような投与は同時、別々、または連続であってもよい。上記成分は、必要に応じて説明書を含んでもよいキットの形態で調製することができる。

20

【0046】

医薬組成物は、例えば、とりわけ、経口、局所、静脈内、筋肉内、鼻腔内、または皮内経路による投与などの、患者の疾患を治療するのに有効な任意の有効で便利な様式で投与することができる。治療においてまたは予防として、活性のある薬剤は、注射可能な組成物として、例えば、好ましくは等張の、滅菌水性分散液として、個体に投与され得る。

【0047】

哺乳動物、特にヒトへの投与を目的として、活性のある薬剤の1日あたりの用量は、0.01mg/kg体重以上、典型的には約1mg/kg、2mg/kg、10mg/kgまたは100mg/kg以下であると予想される。いずれにせよ、医師は、個体の年齢、体重、性別および応答を含む因子に依存するであろう個体に最も適した実際の投薬量を決定するであろう。上記の用量は、平均的な場合の例示である。もちろん、より高い用量またはより低い用量が有益である場合もあり得、そのような場合も本発明の範囲内である。本発明はまた、使用説明書と共に本明細書に規定される医薬組成物を含むキットを提供する。

30

【0048】

本発明のさらなる態様によれば、医薬に使用するための先の態様の医薬組成物が提供される。このような使用は、上記に規定されるような本発明の医薬組成物の治療有効量の投与による、本発明の結合ドメインの標的抗原とそのリガンドパートナーとの間の相互作用に関連する疾患の治療のための方法を含む。本組成物は、本発明の少なくとも1つの特異的抗原結合分子(VNARDメイン)もしくはマルチドメイン特異的結合分子、またはこのような分子の組み合わせおよび/またはそのヒト化変異体を含み得る。

40

【0049】

本発明のこの態様によると、本発明の結合ドメインの標的抗原とそのリガンドパートナーとの間の相互作用に関連する疾患の治療のための医薬の製造に使用される組成物が提供される。

【0050】

このような組成物は、示されるようなさらなる薬学的に活性のある薬剤を含み得る。追加の薬剤は、治療化合物、例えば、抗炎症薬、細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤または抗生物質であってもよい。このような追加の薬剤はそれを必要とする患者への投与に適した形態

50

で存在してもよく、このような投与は同時、別々、または連続であってもよい。上記成分は、必要に応じて説明書を含んでもよいキットの形態で調製することができる。

【0051】

本発明によれば、医薬に使用される本発明の抗原特異的抗原結合分子(antigen specific antigen binding molecule)またはマルチドメイン特異的結合分子が提供される。従って、本発明のこの態様は、それを必要とする患者における疾患の治療のための医薬の製造における、本発明の抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン結合分子のそのような使用に及ぶ。本発明の抗原特異的抗原結合分子はまた、本発明の医薬組成物に関連して上記で規定されるような特異的結合分子またはマルチドメイン結合分子を含む融合タンパク質を調製するために使用され得る。このような使用はまた、本発明の抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン結合分子を含む、本明細書中に規定されるような医薬組成物の治療的に有効な用量の患者への投与を有する、治療を必要とする患者における疾患の治療方法を包含する。

10

【0052】

本明細書で使用される、「治療(treatment)」という用語は、ヒトまたは非ヒト動物に利益を与えることができる任意のレジメを含む。獣医学における「非ヒト動物」の治療は、ウマおよびコンパニオンアニマル(例えば、ネコおよびイヌ)を含む家畜、ならびにヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシおよびウマ科のメンバーを含む農場/農業動物の治療に及ぶ。治療は、任意の既存の状態または疾患に関する治療的処置であり得る、または予防的(予防的処置)であり得る。治療は、遺伝性または後天性疾患の治療であってもよい。治療は、急性または慢性状態の治療であってもよい。治療は、炎症および/または癌に関連する状態/疾患の治療であってもよい。本発明の抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン特異的結合分子は、以下に制限されないが、変形性関節症、強皮症、腎疾患、関節リウマチ、炎症性腸疾患、多発性硬化症、アテローム性動脈硬化症、または任意の炎症性疾患などの、疾患の治療に使用され得る。

20

【0053】

さらなる態様において、本発明は、TNF に特異的に結合する本発明の組成物の治療有効量の投与を含む、TNF によって媒介される状態を治療する方法を提供する。

【0054】

さらなる態様において、本発明は、ICOSL に特異的に結合する本発明の組成物の有効量の投与を含む、ICOSL によって媒介される少なくとも1つの状態を治療する方法を提供する。

30

【0055】

本発明のさらなる態様は、細胞表面分子を認識するVNAR結合ドメインの特定の組み合わせである。特定の実施形態では、マルチドメイン結合分子のVNARは、異なるクラスのリガンドまたは標的に結合する。本明細書に包含される1つの非限定的な例としては、少なくとも1つのVNARドメインが自己免疫疾患に関連する標的に結合し、少なくとも1つのVNARドメインが炎症応答に関連する標的に結合する、本発明の第1の態様のマルチドメイン特異的結合分子がある。

【0056】

本発明の特に好ましいマルチドメイン特異的抗原結合分子は、TNF に特異的なVNARおよびICOSL に特異的なVNARを含む。好ましくは、TNF に特異的なVNARが本発明の第2の態様のVNARである。

40

【0057】

本発明の1つの実施形態としては、ICOSL を認識し、本発明に概説されるフォーマットにおいて、個々の結合ドメインよりも改善された機能的特性を提供する、得られるマルチドメイン結合分子へのVNAR結合ドメインの特定の組み合わせがある。

【図面の簡単な説明】

【0058】

本出願では、下記の多数の図面を参照する：

50

【図 1】図 1 は、抗コモリザメ I g N A R ハイブリドマ抗体(anti-Nurse shark IgNAR hybridoma antibody)を用いた免疫処置されたコモリザメ血漿の抗 h T N F - I g N A R 滴定(Anti-hTNF-alpha IgNAR titration)を示す。免疫処置された動物、予備免疫、および出血 5 (bleed 5)後の血清の E L I S A 滴定、免疫処置されたコモリザメにおける抗 r h T N F - I g N A R 力価の結合 E L I S A 測定。検出は、G A 8 モノクローナル抗コモリザメ I g N A R 抗体を用いて行われ、抗マウス I g G - H R P 結合抗体を二次抗体として用いた。

【図 2】図 2 は、L 9 2 9 細胞における h T N F - 誘発細胞毒性の中和を示す。このアッセイでは、抗 T N F ドメイン (D 1 および C 4) および対照抗ヒト血清アルブミンドメイン (B A 1 1) の細胞バイオアッセイにおける h T N F - の活性の中和能を測定した。D 1 および C 4 ドメインは双方とも、同様のレベルの濃度依存性中和を示した (計算値については表 2 を参照のこと)。B A 1 1 対照は、h T N F を認識せず、最高濃度でも中和は観察されなかった。h T N F - + アクチノマイシン - D は、中和ドメインの非存在下では古典的な細胞毒性を示す対照として作用した。

【図 3】図 3 は、L 9 2 9 線維肉腫細胞株におけるインビトロの r h T N F 中和アッセイを示す。A . 1 x L D 8 0 [0 . 3 n g / m l r h T N F] の中和、1 回の実験あたり重複して n = 3 、 ± S E M ; B . 1 0 x L D 8 0 [3 n g / m l r h T N F] の中和、1 回の実験あたり重複して n = 2 、 ± S D 。T N F 3 0 - F c は、I g G F c に融合された免疫処置されたラクダ科から単離された抗 r h T N F V_{HH} ナノボディ (anti-rhTNF V_{HH} nanobody) の融合体である (Coppieters et al., Arthritis and Rheumatism, 2006, 54 (6): 1856-1866; Riechmann et al., J. Immunol. Methods, 1999. 231: 25-38)。A l b 8 - F c は、I g G F c に融合した、H S A を認識する V_{HH} ドメインである。2 V は、既知の標的を認識しないネガティブ対照である。2 V - F c は、2 V と I g G F c との融合体である。h T N F に特異的な結合剤 (D 1 、 C 4 および T N F - 3 0) のみが、遊離 h T N F の活性の中和を濃度依存的に示すことができた。中和能は、単量体から二価 F c フォーマットへの変換によって増強された。D 1 - F c と C 4 - F c との組み合わせは、D 1 - F c 単独または C 4 - F c 単独よりも優れた中和能をもたらした。(全ての計算された中和値について表 2 を参照のこと)。両方の対照、A l b - 8 および 2 V は、この二価 F c フォーマットにおいてさえ中和することができなかった。

【図 4】図 4 は、二価および二重特異性構築物のフォーマットの図である。

【図 5】図 5 は、二量体 V N A R および T N F - 3 0 V_{HH} 対照 (T N F 3 0 - T N F 3 0) の E L I S A 結合を示す。試験した V N A R ドメイン D 1 、 C 4 、 B 4 はすべて、両方の可能な配向 (例えば、C 4 - D 1 、 B 4 - D 1) において、それ自体と対になっているか (例えば、D 1 - D 1 、 C 4 - C 4 など)、または互いに対になっていた (例えば、D 1 - C 4 、 D 1 - B 4) 。E L I S A ランキングでは、D 1 - D 1 二量体対が最良 (飽和シグナルに到達するのに必要な最低濃度の V N A R) として、そして B 4 - C 4 および B 4 - B 4 がこの E L S A フォーマットにおいて最悪の性能として位置付けられた。数多くの V N A R 対が、V_{HH} 二量体対照よりも良好であった。

【図 6】図 6 は、V N A R 二量体対による T N F 中和を測定するための L 9 2 9 アッセイを示す。抗 T N F V N A R 二量体対である D 1 - D 1 、 D 1 - C 4 、 D 1 - B 4 および陽性対照である抗 T N F V_{HH} 二量体 (T N F 3 0 - T N F 3 0) の中和能を、適切なバイオアッセイを用いて評価した。このアッセイフォーマットにおいて最も強力な中和活性を示すドメイン対は、V N A R 対 D 1 - C 4 であった (中和の計算値については表 2 を参照のこと)。中和ドメインを含まない h T N F + アクチノマイシン - D 処置細胞は、適切な古典的非障害細胞毒性対照を提供した。

【図 7】図 7 は、三量体抗 h T N F - V N A R を用いた、L 9 2 9 細胞における h T N F 誘導細胞毒性の中和を示す。リード抗 h T N F V N A R 二量体 (lead anti-hTNF VNAR dimers) (D 1 - D 1 および D 1 - C 4) を、両方の二量体構築物の中央に抗 H S A ヒト化 V N A R (s o l o M E R (商標) B A 1 1) を組み込むことによって多価三量体構築物に再フォーマットして、それぞれ D 1 - B A 1 1 - D 1 および D 1 - B A 1 1 -

10

20

30

40

50

C4を得た。これらの多価三量体構築物およびHumira (Adalimumab) およびTNF30-BA11-TNF30のhTNFを中和能を、古典的L929アッセイで評価した。D1-BA11-C4構築物はAdalimumabと同等の中和能を示し、VHH三量体構築物、および抗hTNF二量体(D1-C4およびD1-D1)VNARよりも有意に改善された効力を示した(ND_{50} 計算値については表2を参照のこと)。

【図8】図8は、極性を有するCaco2細胞(Polarized Caco2 cells)におけるCaco2上皮透過性を示す。Caco-2細胞を、 10 ng/mL のTNF、LPSおよびIFN + / - 抗TNFタンパク質と共に18時間、処置、インキュベートした。 10 mg/mL のFITC-デキストラン [$3000 \sim 5000\text{ kDa}$] $5\text{ }\mu\text{L}$ を頂端チャンバー(apical chamber)に添加し、膜を横切って基底外側チャンバー(basolateral chamber)への輸送を、24時間後に測定した。VNAR/VHH単量体およびVNAR対照タンパク質による処理は 50 nM 濃度で行ったが、VNAR二量体(2Cおよび2D)およびAdalimumabによる処理は 25 nM で行った。BA11および2Vは非TNF結合性VNAR対照であり、B4は非中和TNF結合性VNARである。サイトカイン処理Caco-2細胞における、抗hTNF VNAR構築物(単量体D1、C4、B4; 二量体D1-D1、D1-C4; 三量体D1-BA11-D1、D1-BA11-C4)、VHH構築物TNF30、TNF30-TNF30、TNF30-BA11-TNF30、およびAdalimumabの腸壁機能不全(intestinal barrier dysfunction)の予防能を、この古典的アッセイを用いて評価した。VNARドメインD1-C4およびD1-BA11-C4は、Adalimumabに匹敵する有効性を示した。陰性対照であるBA11および2Vは、腸壁機能不全を予防することができなかった。

【図9】図9は、極性を有するCaco2細胞(Polarized Caco2 cells)における上皮抵抗性を示す。分化したCaco-2細胞を、 10 ng/mL のTNF およびIFN + / - 抗TNF と共に24時間、処置、インキュベートした。経上皮抵抗に関するサイトカイン処理の効果を、ボルトオームメーター(volt-ohm meter)を用いて測定した。抵抗は、処理中の表面積に対して正規化した($\text{ohm} \cdot \text{cm}^2$)。VNAR/VHH単量体およびVNAR対照タンパク質による処理は 50 nM 濃度で行ったが、VNAR二量体(2Cおよび2D)およびAdalimumabによる処理は 25 nM で行った。BA11および2Vは非TNF結合性VNAR対照であり、B4は非中和TNF結合性VNARである。[1回の処置あたり8回以上の反復で $n = 1 \pm \text{SD}$ 、GraphPad Prism 5を用いた一方向ANOVA(one-way ANOVA)、およびDunnett's post-hoc test]。抗hTNF VNARドメインの、サイトカイン処置Caco-2細胞における上皮抵抗性の回復効力を、等モル用量範囲でVHH TNF30および臨床的に利用可能なAdalimumabの効力と比較して調査した。抗hTNF二量体および三量体VNARドメインは、Adalimumabで観察された効果に匹敵する様式で上皮抵抗性を回復する有意な能力を示した。陰性対照BA11および2Vは、上皮抵抗性を回復しなかった。

【図10】図10は、ICOSL VNAR-Fc融合体のフォーマットを示す。

【図11】図11は、ICOSL ELISA結合データを示す。異なる抗ICOSL Quad-X(商標)構築物のヒトおよびマウスICOSリガンド双方への結合性ELISA。

【図12】図12は、TNF R1ドメイン、ICOSL VNARおよびヒトIgG Fcを組み込んだ本発明の多価および多重特異的VNARのフォーマットである。

【図13】図13は、TNF R1ドメイン、ICOSLを組み込んだ多価および多重特異的VNARの有効性データである。VNARおよびヒトIgG Fcは、さらなる改善された機能特性を提供する。VNAR-TNFR1 Fc二機能性構築物は、細胞を用いた中和アッセイにおいて特異的かつ強力な効力を示す。フォーマット1: 抗TNF s c Fvフォーマット2: 抗mICOSL VNAR(CC3)フォーマット3: 抗hICOSL s c Fvフォーマット4: 抗hICOSL VNAR(2D4)。

【図 1 4】図 1 4 は、V N A R T 4 3 ホーンシャーク(horn shark)クローンとV N A R コモリザメ(Nurse shark) D 1 および C 4 との間の h T N F - 結合プロフィールを示す。ホーンシャークのV N A R T 4 3 ならびにV N A R D 1 および C 4 の $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の h T N F 被覆ウェルへの結合性 E L I S A 。 T 4 3 クローンの結合プロフィールは、使用した実験濃度では決定できなかった。

【図 1 5】図 1 5 は、V N A R T 4 3 ホーンシャーク(horn shark)クローンならびにV N A R コモリザメ(Nurse shark) D 1 および C 4 の L 9 2 9 細胞における h T N F - 中和効力を示す。等モル用量範囲でのホーンシャーク(horn shark) T 4 3 V N A R と比較した抗 h T N F V N A R 単量体 D 1 および C 4 の中和効力の比較。T 4 3 ドメインは、いかなる用量依存性中和効果も示さず、h T N F およびアクチノマイシン - D で処置された保護されていない細胞と同様のプロフィールを有する(表 2 を参照のこと)。

【図 1 6】図 1 6 は、成功裏にヒト化された抗 h T N F - D 1 (D 1 s o l o M E R (商標)としても知られる)の結合プロフィールを示す。V N A R D 1 ドメインの多数の漸進的に改善されたフレームワークヒト化バージョン(progressively improved framework humanised versions)の結合プロフィール。D 1 - v 1、D 1 - v 2、D 1 - v 3、および D 1 - v 4 は、様々なヒト化の程度を表し、V N A R D 1 (w t) は、親の V N A R D 1 ドメインである。コモリザメフレームワークアミノ酸残基を D P K - 9 のもので置換すると、ヒト生殖細胞(human germline kappa)は、ヒト化 D 1 バージョンの h T N F 認識能を破壊しなかった。

【図 1 7】図 1 7 は、D 1 S o l o M E R TM の L 9 2 9 細胞における中和効力を示す。L 9 2 9 細胞における h T N F 媒介細胞毒性(hTNF mediated cytotoxicity)を中和する能力を、ヒト化 V N A R D 1 変異体で評価した。s o l o M E R D 1 - v 2 は、h T N F 誘導細胞毒性に対する中和力を保持した。

【図 1 8】図 1 8 は、ヒト I g G F c を組み込んだ本発明の多価および多重特異的 V N A R のフォーマットである。

【図 1 9】図 1 9 は、多価 / 多重特異的 V N A R - F c 構築物の h T N F - 結合プロフィールを示す。バイパトピック / 二重特異性(biparatopic/bispecific) D 1 - F c - C 4 (Q u a d - X (商標)) v s バイパトピック(biparatopic) V N A R F c 構築物 D 1 - F c および C 4 - F c の結合プロフィールを示す。抗 h T N F - V N A R Q u a d - X (商標) D 1 - F c - C 4 は、h T N F への結合性を保持し、結合性プロフィールが D 1 - F c および C 4 - F c に匹敵し、これらの比べてわずかに改善された。

【図 2 0】図 2 0 は、L 9 2 9 における多価 / 多重特異的 V N A R - F c 構築物の h T N F - 中和活性の評価を示す。V N A R Q u a d - X (商標) D 1 - F c - C 4 v s H u m i r a (A d a l i m u m a b) の中和能を、h T N F 媒介細胞毒性(hTNF mediated cytotoxicity)の L 9 2 9 細胞を用いたアッセイで評価する。V N A R Q u a d - X (商標) D 1 - F c - C 4 は、中和能力を保持し、H u m i r a と比較して優れた中和活性を示した(N D ₅₀ 値については表 2 を参照のこと)。

【図 2 1】図 2 1 は、抗マウス T N F - V N A R ; および抗 H S A s o l o M E R (商標) B A 1 1 または I C O S L V N A R ドメイン、A 5 またはマウス I g G 2 a F c を組み込んだ、本発明の多価バイ - パトピック(bi-paratopic) V N A R のフォーマットを示す。

【図 2 2】図 2 2 A は、バイ - パトピック抗マウス T N F - V N A R 構築物のマウス T N F - 結合プロフィールを示す。抗 I C O S リガンド V N A R A 5 または抗 H S A ヒト化 V N A R、s o l o M E R (商標) B A 1 1 のいずれかを組み込んだ多価 / 多重特異的三量体として V N A R 抗マウス T N F S 1 7 ドメインを再フォーマットする。両方の構築物は、マウス T N F - に対する認識を保持した。図 2 2 B は、バイ - パトピック抗マウス T N F - V N A R 構築物の H S A 結合プロフィールを示す。抗 I C O S リガンド V N A R A 5 または抗 H S A ヒト化 V N A R、s o l o M E R (商標) B A

10

20

30

40

50

11のいずれかを組み込んだ多価/多重特異的三量体としてVNAR抗マウスTNF S17ドメインを再フォーマットする。S17-BA11-S17は、HSAへの結合を保持し、陰性対照であるS17-A5-S17はHSAを認識しなかった。図22Cは、バイラトピック二量体/三量体抗ICOSL VNAR構築物のマウスICOSリガンド結合プロフィールを示す。マウスICOSリガンドへの再フォーマットされたS17-A5-S17およびA5-A5ホモ二量体の結合プロフィールから、S17-A5-S17として中央に抗マウスICOSリガンドVNAR A5を組み込んだ再フォーマットされた三量体構築物はマウスICOSリガンドへの結合を保持することが示された。

【図23】図23Aおよび図23Bは、それぞれ、バイ-パラトピックおよびIgG2a Fc融合抗マウスTNF-VNAR S17構築物のL929プロフィールにおけるマウスTNF-中和を示す。抗マウスTNF構築物(S17-A5-S17、S17-BA11-S17、S17-Fc)の中和効力を、マウスTNF媒介細胞毒性L929アッセイで評価した。三量体S17およびバイ-パラトピックS17-Fc構築物は双方とも、L929細胞におけるマウスTNF媒介細胞毒性に対する中和活性を示した。S17-A5-S17は、3つの構築物の中で最も高い効力を示した。BA11は、アッセイにおいて陰性対照であり、また、hTNF+アクチノマイシンDは、抗マウスTNF阻害剤/中和剤の非存在下で観察された古典的な細胞毒性効果を示した。細胞単独は、健全な未処置細胞を示す。

【図24】図24は、CHO系huICOS/組換えマウスICOSリガンド-Fc(ICOSL-Fc)中和(ブロックング)アッセイ-ELISA系(CHO-based huICOS/recombinant mouse ICOS Ligand-Fc (ICOSL-Fc) Neutralisation (blocking) Assay-ELISA based)を示す。このブロックングアッセイにおいて、多価VNAR構築物は、マウスICOSL-FcがCHO細胞上のその同族結合パートナー(cognate binding partner)であるICOSと相互作用するのをブロックする有意な能力を示した。これにより、細胞を用いたELISAフォーマットに抗ヒトFc-HRP抗体を用いてマウスICOSL-FcのFc部分が減少して/損なわれて検出された(leads to reduced/compromised detection)。A5-A5二量体は最も強力な遮断剤であり、S17-A5-S17がこれに続くが、S17単量体はこのアッセイでは陰性対照である。

【図25】図25は、抗hTNF-VNARとVHH TNF30およびHumira(登録商標)との結合交差反応性の相違を示す。この図は、VHH TNF30およびHumiraと比較したVNAR D1-C4の結合交差反応プロフィールを示す。VNAR D1-C4は、ヒト、イヌおよびカニクイザルのTNFのみに結合し;ヒト、イヌおよびカニクイザルのTNFへの結合を含むVHH TNF30はブタのTNFおよびヒトTNFに弱く結合する。Humiraは、ヒト、イヌ、カニクイザルおよびマウスのTNFに結合する。また、これらの抗TNFドメインの詳細な結合および中和プロフィールについては、表3Aおよび表3Bを参照のこと。

【図26】図26は、抗hTNF-VNAR四量体vs VHH TNF30二量体のBIACore™ T200エピトープビニング分析(epitope binning analysis)を示す。このエピトープビニングデータから、VNAR D1-C4がVHH TNF30ドメインによって認識されるのとは異なるhTNF分子上のエピトープを認識し、それと相互作用することが示される。このアッセイは、第1の結合ドメイン(この場合、そのKD値の100倍として決定される飽和濃度を用いたVNAR D1-C4)、次に第2の結合ドメイン(TNF30)で利用可能なエピトープ飽和に到達することを含む。

【図27】図27は、ELISAフォーマットにおけるQuad-X™およびQuad-Y™構築物によるhTNFへの機能的結合を示す。

【図28】図28は、L929における多価/多重特異的VNAR-Fc構築物のhTNF-中和活性の評価を示す。hTNF媒介細胞毒性のL929細胞を用いたアッセイにおけるVNAR Quad-X™ D1-Fc-C4、Quad-Y™ D1-C4-FcおよびC4-D1-F vs Humira(Adalimumab)の中和力を評価する。VNAR Quad-Y™構築物は中和能を保持し、D1-C4-Fc構

10

20

30

40

50

築物は 0.3 ng/ml または 3 ng/ml の $\text{TNF-}\alpha$ の存在下で $\text{Quad-X}^{\text{TM}}$ と同等の中和活性を示す (ND_{50} については表 2 を参照のこと)。

【図 29】図 29 は、実験 Tg197 マウスの体重増加に関する D1-Fc-C4 (Quad-X (商標)) および Humira (登録商標) の効果を示す。研究終了 (10 週齢) まで、3 週目から週 2 回処置した全群の平均体重は以下の通りであった: $\text{G1-ビヒクル} = 19.3 \pm 1.4 \text{ g}$ 、 G4-Humira (登録商標) $10 \text{ mg/kg} = 24.4 \pm 1.5 \text{ g}$ 、 G2-D1-Fc-C4 $3 \text{ mg/kg} = 24.1 \pm 1.5 \text{ g}$ 、 G5-D1-Fc-C4 $10 \text{ mg/kg} = 24.1 \pm 1.7 \text{ g}$ および G3-D1-Fc-D4 $30 \text{ mg/kg} = 23.4 \pm 1.4 \text{ g}$ 。3 週目の対照マウスは $9.8 \pm 0.2 \text{ g}$ の平均体重を有していた。エラーバーは、平均の標準誤差を示す。

10

【図 30】図 30 は、実験 Tg197 マウスのインビボ関節炎スコアに関する D1-Fc-C4 (Quad-X (商標)) および Humira (登録商標) の効果を示す。研究終了 (10 週齢) まで、3 週目から週 2 回処置した全群の平均インビボ疾患重篤度スコアは以下の通りであった: $\text{G1-ビヒクル} = 1.36 \pm 0.07$ 、 G4-Humira (登録商標) $10 \text{ mg/kg} = 0.25 \pm 0.05$ 、 G2-D1-Fc-C4 $3 \text{ mg/kg} = 0.17 \pm 0.04$ 、 G5-D1-Fc-C4 $10 \text{ mg/kg} = 0.17 \pm 0.04$ および G3-D1-Fc-D4 $30 \text{ mg/kg} = 0.17 \pm 0.04$ 。3 週目の対照マウスは、インビボ関節炎スコア $= 0.13 \pm 0.05$ であった。エラーバーは、平均の標準誤差を示す。

20

【図 31】図 31 は、実験 Tg197 マウスの関節炎組織病理学スコアに関する D1-Fc-C4 (Quad-X (商標)) および Humira (登録商標) の効果を示す。研究終了 (10 週齢) まで、3 週目から週 2 回処置した全群の平均関節炎組織病理学スコアは以下の通りであった: $\text{G1-ビヒクル} = 2.94 \pm 0.12$ 、 G4-Humira (登録商標) $10 \text{ mg/kg} = 0.42 \pm 0.07$ 、 G2-D1-Fc-C4 $3 \text{ mg/kg} = 0.41 \pm 0.03$ 、 G5-D1-Fc-C4 $10 \text{ mg/kg} = 0.50 \pm 0.05$ および G3-D1-Fc-D4 $30 \text{ mg/kg} = 0.42 \pm 0.07$ 。3 週目の対照マウスは、組織病理学スコア $= 1.22 \pm 0.10$ であった。エラーバーは、平均の標準誤差を示す。

30

【図 32】図 32 は、実験 Tg197 マウスのインビボ関節炎スコア対足首組織病理学スコアに関する D1-Fc-C4 (Quad-X (商標)) および Humira (登録商標) の効果の比較である。研究終了 (10 週齢) まで、3 週目から週 2 回処置した全群の平均疾患重篤度スコアは以下の通りであった: $\text{G1-ビヒクル} = 2.94 \pm 0.12$ (HS) および 1.36 ± 0.07 (AS)、 G4-Humira (登録商標) $10 \text{ mg/kg} = 0.42 \pm 0.07$ (HS) および 0.25 ± 0.05 (AS)、 G2-D1-Fc-C4 $3 \text{ mg/kg} = 0.41 \pm 0.03$ (HS) および 0.17 ± 0.04 (AS)、 G5-D1-Fc-C4 $10 \text{ mg/kg} = 0.50 \pm 0.05$ (HS) および 0.17 ± 0.04 (AS) および G3-D1-Fc-D4 $30 \text{ mg/kg} = 0.42 \pm 0.07$ (HS) および 0.17 ± 0.04 (AS) であった。エラーバーは、平均の標準誤差を示す。

40

【図 33】図 33 は、関節炎の Tg197 モデルの関節炎病理の改善における、 0.5 、 1 および 3 mg/kg の D1-Fc-C4 (Quad-X (商標)) ならびに 30 mg/kg の D1-BA11-C4 vs 1 mg/kg および 3 mg/kg の Humira (登録商標) の有効性評価である。

【図 34】図 34 は、関節炎の Tg197 モデルの平均群体重に関する、 0.5 、 1 および 3 mg/kg の D1-Fc-C4 (Quad-X (商標)) ならびに 30 mg/kg の D1-BA11-C4 vs 1 mg/kg および 3 mg/kg の Humira (登録商標) の効果を示す。

【図 35】図 35 は、インビボでの関節炎スコアおよび組織病理学スコアに関する異なる Humira (登録商標) 投薬レジメの効果を示す。これは、図 29 ~ 図 32 について記載されたものと同じの試験法を使用して、別個の実験として行われた。

50

【図 3 6】図 3 6 は、12 匹のラットを光受容体間レチノイド結合タンパク質 (IRBP) で免疫処置して、実験的自己免疫性ブドウ膜炎 (Experimental Auto-Immune Uveitis) (EAU) を誘導した。4 匹の動物それぞれに対し、8 日目、10 日目および 12 日目に、20 mg / kg の (げっ歯類タンパク質特異的) 抗 TNF V N A R - F c を腹腔内注射により処置した；4 匹の動物を同じ日にデキサメタゾンで腹腔内処置し、4 匹の動物を同様にビヒクルで処置した。0、7、10、12、13、および 14 日目に、ラットの眼の前眼部および後眼部の両方の光学コヒーレンストモグラフィー (Optical Coherence Tomography) (OCT) を行った。結果のあらゆる科学的偏りを最小限にするために、OCT 画像は、有効なスコアリングシステムを使用して全炎症について「実験内容を知らない観察者 (experimentally blinded observer)」によってスコアリングされた。実験はまた、ビヒクル対照および標準用量のデキサメタゾンステロイドを使用した陽性対照を含んだ。

10

【図 3 7】図 3 7 A および図 3 7 B は、L929 細胞における soloMER V N A R 二量体構築物の hTNF - 中和活性の評価を示す。

【図 3 8】図 3 8 は、L929 細胞における S17 - Fc vs S17 - Fc - S17 (Quad - X (商標)) 構築物の hTNF - 中和活性の評価を示す。S17 構築物に使用された Fc は、マウス IgG2a に由来する。

【図 3 9】図 3 9 A、図 3 9 B および図 3 9 C は、ヒトおよびマウス TNF - に対する S17 - Quad - X (商標) および D1 - C4 Quad - X (商標) の交差反応結合プロフィールを示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0059】

種々のヌクレオチドおよびアミノ酸配列が、以下のように本明細書中に提供される：

【0060】

【化2】

配列番号 1

T N F V N A R D 1 C D R 3 アミノ酸配列 ECQYGLAEYDV

配列番号 2

T N F V N A R D 1 アミノ酸配列 (C D R 1 および C D R 3 は一重下線)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSHCATSSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCASEECQYGLAEYDVYGGGTVVTVN

10

配列番号 3

H I S タグおよび M Y C タグ (二重下線) を有する T N F V N A R D 1 アミノ酸配列

(C D R 1 および C D R 3 は一重下線)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSHCATSSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCASEECQYGLAEYDVYGGGTVVTVNAAAAHHHHHHGAAESKLISEEDL

配列番号 4

T N F V N A R D 1 をコードするヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGCCACTGTGCAACCTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCGCTTCCGAGTG
CCAATATGGACTGGCAGAATATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCTGACTGTGAAT

20

配列番号 5

H I S タグおよび M Y C タグを有する T N F V N A R D 1 をコードするヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGCCACTGTGCAACCTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCGCTTCCGAGTG
CCAATATGGACTGGCAGAATATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCTGACTGTGAATGCGGCC
GCACATCATCATCACCATCACGGCGCCGCAGAATCAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG

30

配列番号 6

T N F V N A R C 4 C D R 3 アミノ酸配列 SWWTQNWRCNSDV

配列番号 7

T N F V N A R C 4 アミノ酸配列 (C D R 1 および C D R 3 は一重下線)

RVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSNCGLSSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETINEGSKSFSLRI
NDLTVEDSGTYRCKLSWWTQNWRCNSDVYGGGTVVTVN

40

配列番号 8

H I S タグおよび M Y C タグ (二重下線) を有する T N F V N A R C 4 アミノ酸配列

(C D R 1 および C D R 3 は一重下線)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSNCGLSSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETINEGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCKLSWWTQNWRCNSDVYGGGTVVTVNAAAAHHHHHHGAAESKLISEEDL

【 0 0 6 1 】

【化 3】

配列番号 9

TNF VNAR C4 をコードするヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGCAACTGTGGGTTGTCCAGCACGTAAGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAATTAACGAAGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGTTAAGCTG
GTGGACCCAGAAGTGGAGATGCTCAAATTCGGATGTATACGGAGGTGGCACTGTTCGTGACTGTG
AAT

配列番号 10

10

HIS タグおよびMYC タグを有する TNF VNAR D1 をコードするヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGCAACTGTGGGTTGTCCAGCACGTAAGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAATTAACGAAGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGTTAAGCTG
GTGGACCCAGAAGTGGAGATGCTCAAATTCGGATGTATACGGAGGTGGCACTGTTCGTGACTGTG
AATGCGGCCGCACATCATCATCACCGCGCCGCAGAATCAAACCTCATCTCAGAAGAGG
ATCTG

配列番号 11

20

TNF VNAR B4 CDR3 アミノ酸配列

YIPCIDELVYMISGGTSGPIHDV

配列番号 12

TNF VNAR B4 アミノ酸配列 (CDR1 および CDR3 は一重下線)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSNCALSSMYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCKVYIPCIDELVYMISGGTSGPIHDVYGGGTVVTVN

配列番号 13

30

HIS タグおよびMYC タグ (二重下線) を有する TNF VNAR B4 アミノ酸配列

(CDR1 および CDR3 は一重下線)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSNCALSSMYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCKVYIPCIDELVYMISGGTSGPIHDVYGGGTVVTVNAAHHHHHHGAAESKLISE
EDL

配列番号 14

TNF VNAR B4 をコードするヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGTAACTGTGCATTGTCCAGCATGTAAGTATCGCAAAAAATCTGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGGTATATAT
ACCTTGATCGATGAACTGGTATATATGATCAGTGGGGGTACCTCTGGCCCGATTCATGATGTAT
ACGGAGGTGGCACTGTTCGTGACTGTGAAT

40

【 0 0 6 2 】

【化 4】

配列番号 15

GCTAGGCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCTCGAGTGGACCAA
ACACC

配列番号 16

CGCGCCGGATCCGCCACCTCCGCTACCGCCACCTCCGCTACCGCCACCTCCGCTACCGCCACC
TCCATTACAGTCACGACAGTGCC

配列番号 17

GGTGGCGGATCCGGCGCGCACTCCGCTCGAGTGGACCAAACACCGC

10

配列番号 18

GTCCGGAATTCTCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTGCGGCCCC

配列番号 19

AATTCCCCTCTAGAAGGCGCGCACTCCGCTCGAGTGGACCAAACACCG

20

配列番号 20

H I S タグおよびMYC タグを有するTNF V N A R B 4 をコードする

ヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGTAACTGTGCATTGTCCAGCATGTACTGGTATCGCAAAAAATCTGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGGTATATAT
ACCTTGCATCGATGAACTGGTATATATGATCAGTGGGGGTACCTCTGGCCCCGATTCATGATGTAT
ACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGCGGCCGCACATCATCATCACCATCACGGCGCCGC
AGAATCAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG

30

配列番号 21

H I S タグおよびMYC タグ (二重下線) を有するTNF V N A R 二量体 D 1 - D 1

アミノ酸配列 (C D R 1 およびC D R 3 は一重下線、リンカーはイタリック体で示す)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSHCATSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCASEECQYGLAEYDVYGGTVTVNGGGGSGGGGSGGAHSARVDQTPQTITKE
TGESLTINCVLRDSHCATSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSLRINDLTVEDSGTY
RCASEECQYGLAEYDVYGGTVTVNAAHHHHHGAAESKLISEDL

【 0 0 6 3 】

【化 5】

配列番号 22

H I S タグおよびMYC タグを有するTNF VNAR 二量体 D1-D1をコードする

ヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGCCACTGTGCAACCTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
CTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCGCTTCCGAGTG
CCAATATGGACTGGCAGAATATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGGAGGT
GGCGGTAGCGGAGGTGGTGGCGGATCCGGCGCGCACTCCGCTCGAGTGGACCAAACACCGCA
AACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACTGTGTCCTACGAGATAGCCACTGTG
CAACCTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCAACAAACGAGGAGAGCATATCGAAA
GGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTCCTTTCTTTGAGAATTAATGATCTA
ACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCGCTTCCGAGTGCCAATATGGACTGGCAGAATATG
ATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGCGGCCGCACATCATCACCATCACGG
GGCCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG

10

配列番号 23

H I S タグおよびMYC タグ (二重下線) を有するTNF VNAR 二量体 C4-C4

アミノ酸配列 (CDR1およびCDR3は一重下線、リンカーはイタリック体で示す)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSNCGLSSTYWYRKKSSTNEESISKGGRYVETINEGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCKLSSWWTQNWRCNSDVYGGGTVVTVNGGGGSGGGGSGAHSARVDQTPQ
TITKETGESLTINCVLRDSNCGLSSTYWYRKKSSTNEESISKGGRYVETINEGSKSFSLRINDLTVED
SGTYRCKLSSWWTQNWRCNSDVYGGGTVVTVNAAHHHHHGAAEQKLISEDL

20

配列番号 24

H I S タグおよびMYC タグを有するTNF VNAR 二量体 C4-C4をコードする

ヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGCAACTGTGGGTTGTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAATTAACGAAGGATCAAAGTC
CTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGTTAAGCTG
GTGGACCCAGAACTGGAGATGCTCAAATTCGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTG
AACGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGTGGCGGATCCGGCGCGCACTCCGCTCGAGTGGACCA
AACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACTGTGTCCTACGAGATA
GCAACTGTGGGTTGTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCAACAAACGAGGAGAG
CATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAATTAACGAAGGATCAAAGTCCTTTCTTTGAGAAT
TAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGTTAAGCTGGTGGACCCAGAACT
GGAGATGCTCAAATTCGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAACGCGGCCGCACA
TCATCATCACCATCACGGGGCCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG

30

配列番号 25

H I S タグおよびMYC タグ (二重下線) を有するTNF VNAR 二量体 B4-B4

アミノ酸配列 (CDR1およびCDR3は一重下線、リンカーはイタリック体で示す)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSNCALSSMYWYRKKSSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCKVYIPCIDELVMISGGTSGPIHDVYGGGTVVTVNGGGGSGGGGSGAHSAR
VDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSNCALSSMYWYRKKSSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSLRI
NDLTVEDSGTYRCKVYIPCIDELVMISGGTSGPIHDVYGGGTVVTVNAAHHHHHGAAEQKLISEE
DL

40

【 0 0 6 4 】

【化 6】

配列番号 26

H I S タグおよびMYC タグを有するTNF VNAR 二量体 B4-B4を

コードするヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGTAAGTGTGCATTGTCCAGCATGTACTGGTATCGCAAAAAATCTGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGGTATATAT
ACCTTGCATCGATGAACTGGTATATATGATCAGTGGGGGTACCTCTGGCCCGATTCATGATGTAT
ACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGTGGCGGATCCG
GCGCGCACTCCGCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACT
GACCATCAACTGTGTCCTACGAGATAGTAAGTGTGCATTGTCCAGCATGTACTGGTATCGCAAAA
AATCTGGCTCAACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGC
GGATCAAAGTCCTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGC
AAGGTATATATACCTTGCATCGATGAACTGGTATATATGATCAGTGGGGGTACCTCTGGCCCGAT
TCATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGCGGCCGCACATCATCATCACCATC
ACGGGGCCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG

10

配列番号 27

H I S タグおよびMYC タグ (二重下線) を有するTNF VNAR 二量体 D1-C4

アミノ酸配列 (CDR1およびCDR3は一重下線、リンカーはイタリック体で示す)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSHCATSSTYWYRKKS GSTNEESISKGRYVETVNSGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCASECQYGLAEYDVYGGGT VVTVNNGGGGSGGGGSGAHSARVDQTPQTITKE
TGESLTINCVLRDSNCGLSSTYWYRKKS GSTNEESISKGRYVETINEGSKSFSLRINDLTVEDSGTYR
CKLSWWTQNWRCNSDVYGGGTVVTVNAAHHHHHHGAAEQKLISEDL

20

配列番号 28

H I S タグおよびMYC タグを有するTNF VNAR 二量体 D1-C4をコードする

ヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGCCACTGTGCAACCTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCGCTTCCGAGTG
CCAATATGGACTGGCAGAATATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGGAGGT
GGCGGTAGCGGAGGTGGTGGCGGATCCGGCGCGCACTCCGCTCGAGTGGACCAAACACCGCA
AACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACTGTGTCCTACGAGATAGCAACTGTG
GGTTGTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCAACAAACGAGGAGAGCATATCGAA
AGGTGGACGATATGTTGAAACAATTAACGAAGGATCAAAGTCCTTTTCTTTGAGAATTAATGATCT
AACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGTTAAGCTGGTGGACCCAGAACTGGAGATGC
TCAAATTCCGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAACGCGGCCGCACATCATCATCA
CCATCACGGGGCCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG

30

配列番号 29

H I S タグおよびMYC タグ (二重下線) を有するTNF VNAR 二量体 D1-B4

アミノ酸配列 (CDR1およびCDR3は一重下線、リンカーはイタリック体で示す)

ARVDQTPQTITKETGESLPINCVLRDSHCATSSTYWYRKKS GSTNEESISKGRYVETVNSGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCASECQYGLAEYDVYGGGT VVTVNNGGGGSGGGGSGAHSARVDQTPQTITKE
TGESLTINCVLRDSNCALSSMYWYRKKS GSTNEESISKGRYVETVNSGSKSFSLRINDLTVEDSGTY
RCKVYIPCIDELVYMISGGTSGPIHDVYGGGT VVTVNAAHHHHHHGAAEQKLISEDL

40

【 0 0 6 5 】

【化 7】

配列番号 30

H I S タグおよびMYC タグを有するTNF VNAR 二量体 D1-B4 ヌクレオチド

配列をコードするヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGCCACTGTGCAACCTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCGCTTCCGAGTG
CCAATATGGACTGGCAGAATATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGGAGGT
GGCGGTAGCGGAGGTGGTGGCGGATCCGGCGCGCACTCCGCTCGAGTGGACCAAACACCGCA
AACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACTGTGTCCTACGAGATAGTAACTGTG
CATTGTCCAGCATGTACTGGTATCGCAAAAAATCTGGCTCAACAAACGAGGAGAGCATATCGAAA
GGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTCCTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTA
ACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGGTATATACCTTGATCGATGAACTGGTATA
TATGATCAGTGGGGGTACCTCTGGCCCGATTGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACT
GTGAATGCGGCCGCACATCATCATCACCATCACGGGGCCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAAG
AGGATCTG

10

配列番号 31

TNF VNAR 二量体 B4-D1 アミノ酸配列 (His タグおよびMy c タグは
二重下線、CDR1 およびCDR3 は一重下線、リンカーはイタリック体で示す)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSNCALSSMYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCKVYIPCIDELVYMISGGTSGPIHDVYGGGTVVTVNNGGGSGGGGGSGAHSAR
VDQTPQTITKETGESLPINCVLRDSHCATSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSLRI
NDLTVEDSGTYRCASECQYGLAEYDVYGGGTVVTVNAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDL

20

配列番号 32

TNF VNAR 二量体 B4-D1 ヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGTAACTGTGCATTGTCCAGCATGTACTGGTATCGCAAAAAATCTGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGGTATATAT
ACCTTGATCGATGAACTGGTATATATGATCAGTGGGGGTACCTCTGGCCCGATTGATGTAT
ACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGTGGCGGATCCG
GCGCGCACTCCGCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACT
GACCATCAACTGTGTCCTACGAGATAGCCACTGTGCAACCTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAA
AATCGGGCTCAACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGC
GGATCAAAGTCCTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGC
GCTTCCGAGTGCCAATATGGACTGGCAGAATATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTG
TGAATGCGGCCGCACATCATCATCACCATCACGGGGCCGCAGAACAAAACTCATCTC
AGAAGAGGATCTG

30

【 0 0 6 6 】

【化 8】

配列番号 33

T N F V N A R 二量体 C 4 - B 4 アミノ酸配列 (H i s タグおよびM y c タグは
二重下線、C D R 1 およびC D R 3 は一重下線、リンカーはイタリック体で示す)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSNCGLSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETINEGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCKLSSWWTQNWRCSNSDVYGGGTVTVNGGGGSGGGGSGAHSARVDQTPQ
TITKETGESLTINCVLRDSNCALSSMYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSLRINDLTVED
SGTYRCKVYIPCIDELVYMISGGTSGPIHDVYGGGTVTVNAAAHHHHHHGAAEQKLISEED

配列番号 34

T N F V N A R 二量体 C 4 - B 4 ヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGCAACTGTGGGTTGTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAATTAACGAAGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGTTAAGCTG
GTGGACCCAGAACTGGAGATGCTCAAATTCGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTG
AACGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGTGGCGGATCCGGCGCGCACTCCGCTCGAGTGGACCA
AACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACTGTGTCCTACGAGATA
GTAAGTGTGCATTGTCCAGCATGTACTGGTATCGCAAAAAATCTGGCTCAACAAACGAGGAGAGC
ATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTCCTTTTCTTTGAGAATT
AATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGGTATATATACCTTGCATCGATGAA
CTGGTATATATGATCAGTGGGGGTACCTCTGGCCCGATTTCATGATGTATACGGAGGTGGCACTGT
CGTGACTGTGAATGCGGCCGCACATCATCATCACCATCACGGGGCCGCAGAACAAAACTCATC
TCAGAAAGAGGATCTG

配列番号 35

T N F V N A R 二量体 B 4 - C 4 アミノ酸配列 (H i s タグおよびM y c タグは
二重下線、C D R 1 およびC D R 3 は一重下線、リンカーはイタリック体で示す)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSNCALSSMYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCKVYIPCIDELVYMISGGTSGPIHDVYGGGTVTVNGGGGSGGGGSGAHSAR
VDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSNCGLSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETINEGSKSFSLRIN
DLTVEDSGTYRCKLSSWWTQNWRCSNSDVYGGGTVTVNAAAHHHHHHGAAEQKLISEED

配列番号 36

T N F V N A R 二量体 B 4 - C 4 ヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGTAACTGTGCATTGTCCAGCATGTACTGGTATCGCAAAAAATCTGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGGTATATAT
ACCTTGCATCGATGAACTGGTATATATGATCAGTGGGGGTACCTCTGGCCCGATTTCATGATGTAT
ACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGTGGCGGATCCG
GCGCGCACTCCGCTCGAGTGGACCAAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACT
GACCATCAACTGTGTCCTACGAGATAGCAACTGTGGGTTGTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAA
AATCGGGCTCAACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAATTAACGAA
GGATCAAAGTCCTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGC
AAGTTAAGCTGGTGGACCCAGAACTGGAGATGCTCAAATTCGATGTATACGGAGGTGGCACTG
TCGTGACTGTGAACGCGGCCGCACATCATCATCACCATCACGGGGCCGCAGAACAAAA
ACTCATCTCAGAAAGAGGATCTG

【 0 0 6 7 】

10

20

30

40

【化 9】

配列番号 37

H I S タグおよびMYC タグを有するTNF VNAR D1-B A 1 1 - C 4 アミノ酸配列
(H i s タグおよびM y c タグは二重下線、C D R 1 およびC D R 3 は一重下線、リンカーは
イタリック体で示す)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSHCATSSSTYWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCASECQYGLAEYDVYGGGTVVTVNNGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGAHSTR
VDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTDTSYPLYSTYWYRKNPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTKSFTLTIS
SLQPEDSATYYCRAMSTNIWTGDGAGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGAH/SARVDQTPQ
TITKETGESLTINCVLRDSNCGLSSSTYWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETINEGSKSFSLRINDLTVED
SGTYRCKLSWWTQNWRCNSDVGTVVTNHHHHHHHEQKLISEEDL

10

配列番号 38

H I S タグおよびMYC タグを有するTNF VNAR D1-B A 1 1 - C 4 をコードする
ヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGCCACTGTGCAACCTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCGCTTCCGAGTG
CCAATATGGACTGGCAGAATATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGGAGGT
GGCGGATCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGTGGAGCTCA
TTCAACAAGAGTGGACCAAAAGTCCAAGCTCTCTGTCCGCCAGTGTGGGCGACCGCGTGACCATC
ACCTGCGTCCTGACTGATACCAGCTATCCTCTGTACAGCACATACTGGTATCGGAAGAATCCCGG
TTCCAGCAACAAGGAGCAGATTTCCATCTCCGGCCGCTATAGTGAATCAGTCAACAAGGGGCTA
AGTCCTTTACCCTGACAATCAGTTCCCTGCAGCCCGAGGACTCCGCCACCTATTACTGCAGAGCT
ATGAGTACAAATATCTGGACCGGGGACGGAGCTGGTACCAAGGTGGAGATCAAGGGAGGTGGC
GGTTCCGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCGGGGCCCATTC
TGCTCGAGTGGACCAAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAAC
TGTGTCCTACGAGATAGCAACTGTGGGTTGTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTC
AACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAATTAACGAAGGATCAAAGT
CCTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGTTAAGCT
GGTGGACCCAGAACTGGAGATGCTCAAATTCCGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGT
GAATCATCACCATCACCATCACCATGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG

20

30

配列番号 39

H I S タグおよびMYC タグを有するTNF VNAR D1-B A 1 1 - D 1 アミノ酸配列
(H i s タグおよびM y c タグは二重下線、C D R 1 およびC D R 3 は一重下線、リンカーは
イタリック体で示す)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSHCATSSSTYWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCASECQYGLAEYDVYGGGTVVTVNNGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGAHSTR
VDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTDTSYPLYSTYWYRKNPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTKSFTLTIS
SLQPEDSATYYCRAMSTNIWTGDGAGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGAH/SARVDQTPQ
TITKETGESLTINCVLRDSHCATSSSTYWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSLRINDLTVED
SGTYRCASECQYGLAEYDVYGGGTVVTVNHHHHHHHEQKLISEEDL

40

【 0 0 6 8 】

【化 10】

配列番号 40

H I S タグおよびMYC タグを有するTNF V N A R D 1 - B A 1 1 - D 1 をコードする
ヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGCCACTGTGCAACCTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCGCTTCCGAGTG
CCAATATGGACTGGCAGAATATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGGAGGT
GGCGGATCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGTGGAGCTCA
TTCAACAAGAGTGGACCAAAGTCCAAGCTCTCTGTCCGCCAGTGTGGGCGACCGCGTGACCATC
ACCTGCGTCCTGACTGATACCAGCTATCCTCTGTACAGCACATACTGGTATCGGAAGAATCCCGG
TTCCAGCAACAAGGAGCAGATTTCCATCTCCGGCCGCTATAGTGAATCAGTCAACAAGGGGCACTA
AGTCCTTTACCCTGACAATCAGTTCCCTGCAGCCCGAGGACTCCGCCACCTATTACTGCAGAGCT
ATGAGTACAAATATCTGGACCGGGGACGGAGCTGGTACCAAGGTGGAGATCAAGGGAGGTGGC
GGTTCCGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCGGGGCCCATTC
TGCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGGCGAATCACTGACCATCAAC
TGTGTCCTACGAGATAGCCACTGTGCAACCTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTC
AACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGT
CCTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCGCTTCCGAGT
GCCAATATGGACTGGCAGAATATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATCATCAC
CATCACCATCACCATGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG

10

配列番号 41

H I S タグおよびMYC タグを有するTNF V N A R D 1 - B A 1 1 - B 4 アミノ酸配列
(H i s タグおよびM y c タグは二重下線、C D R 1 およびC D R 3 は一重下線、リンカーは
イタリック体で示す)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSHCATSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCASECQYGLAEYDVYGGGTVVTVNNGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGAHSTR
VDQSPSSLSASVGDRVTITCVLTDTSYPLYSTYWYRK NPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTKSFTLTIS
SLQPEDSATYYCRAMSTNIWTGDGAGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGAH SARVDQTPQ
TITKETGESLTINCVLRDSNCALSSMYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSLRINDLTVED
SGTYRCKVYIPCIDELVYMISGGTSGPIHDVYGGGTVVTVNHHHHHHHEQKLISEEDL

20

30

配列番号 42

H I S タグおよびMYC タグを有するTNF V N A R D 1 - B A 1 1 - B 4 をコードする
ヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGCCACTGTGCAACCTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCGCTTCCGAGTG
CCAATATGGACTGGCAGAATATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGGAGGT
GGCGGATCCGGGGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGTGGAGCTCA
TTCAACAAGAGTGGACCAAAGTCCAAGCTCTCTGTCCGCCAGTGTGGGCGACCGCGTGACCATC
ACCTGCGTCCTGACTGATACCAGCTATCCTCTGTACAGCACATACTGGTATCGGAAGAATCCCGG
TTCCAGCAACAAGGAGCAGATTTCCATCTCCGGCCGCTATAGTGAATCAGTCAACAAGGGGCACTA
AGTCCTTTACCCTGACAATCAGTTCCCTGCAGCCCGAGGACTCCGCCACCTATTACTGCAGAGCT
ATGAGTACAAATATCTGGACCGGGGACGGAGCTGGTACCAAGGTGGAGATCAAGGGAGGTGGC
GGTTCCGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCGGGGCCCATTC
TGCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGGCGAATCACTGACCATCAAC
TGTGTCCTACGAGATAGTAACTGTGCAATTGTCCAGCATGTACTGGTATCGCAAAAAATCTGGCTC
AACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGT
CCTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGGTATATA
TACCTTGATCGATGAAGTGGTATATATGATCAGTGGGGGTACCTCTGGCCCCGATTATGATGTA
TACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATCATCACCATCACCATCACCATGAACAAAACTCAT
CTCAGAAGAGGATCTG

40

50

【化 1 1】

配列番号 43

I C O S V N A R 2 D 4 - F c - 2 D 4 アミノ酸配列（リンカーはイタリック体で示す、Fc 部分は一重下線）

TRVDQTPRTATKETGESLTINCVLTDTDYGLFSTSWFRKNPGTTDWERMSIGGRYVESVNKGAKSFS
LRIKDLTVADSATYYCKAFTWPWEWPDWRFRPWYDGAGTVLTVNGGGGSGGGADQEPKSSDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTAAAATAAAAATAAAAATAAAATRVVDQTPRTATKETGESLTINCVLTD
DYGLFSTSWFRKNPGTTDWERMSIGGRYVESVNKGAKSFS
LRIKDLTVADSATYYCKAFTWPWEWPDWRFRPWYDGAGTVLTVN

10

配列番号 44

I C O S V N A R 2 D 4 - F c - 2 D 4 ヌクレオチド配列

ACACGTGTTGACCAGACACCGCGTACCGCAACCAAGAAACCGGTGAAAGCCTGACCATT
AATTGTGTTT TGACCGATAC CGATTATGGT TTGTTCTCCA CCAGCTGGTT TCGTAAAAAT
CCGGGTACAA CCGATTGGGA ACGTATGAGC ATTGGTGGTC GTTATGTTGA AAGCGTGAAT
AAAGGTGCCA AAAGCTTTAG CCTGCGCATT AAAGATCTGA CCGTTGCAGA TAGCGCAACC
TATTACTGTA AAGCATTAC TTGGCCGTGG GAATGGCCGG ACCGTTGGTT CCGTCCGTGG
TATGATGGTG CAGGCACCGT TCTGACCGTT AATGGCGGTG GTGGTTCTGG TGGTGGTGCT
GATCAGGAGC CCAAATCTTC TGACAAAAC CACACATGTC CACCGTGCCC AGCACCTGAA
CTCCTGGGTG GACCGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC
TCCCGGACCC CTGAGGTAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC
AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG
GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG
CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG
AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA
TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT
CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC
ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC
AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
AACCCTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCCCGGGTA AAACCGCCGC CGCCGCCACC
GCCGCCGCCG CCACCGCCGC CGCCGCCACC GCCGCGGCCG CCACACGTGT TGATCAGACA
CCGCGTACCG CAACCAAAGA AACCGGTGAA AGCCTGACCA TTAATTGTGT TCTGACCGAT
ACCGATTATG GTTTGTTCTC CACCAGCTGG TTTCGTAAAA ATCCGGGTAC AACCGATTGG
GAACGTATGA GCATTGGTGG TCGTTATGTT GAAAGCGTGA ATAAAGGTGC CAAAAGCTTT
AGCCTGCGCA TTAAAGATCT GACCGTTGCA GATAGCGCAA CCTATTACTG TAAAGCATTC
ACTTGCCCGT GGAATGGCC GGACCGTTGG TTCCGTCCGT GGTATGATGG TGCAGGCACC
GTTCTGACCG TTAAT

20

30

【 0 0 7 0 】

【化 1 2】

配列番号 45

I C O S V N A R 2 D 4 - F c - C C 3 アミノ酸配列（リンカーはイタリック体で示す、Fc 部分は一重下線）

TRVDQTPRTATKETGESLTINCVLTDTDYGLFSTSWFRKNPGTTDWERMSIGGRYVESVNKGAKSFS
LRIKDLTVADSATYYCKAFTWPWEWPDWRFPWYDGAGTVLTVNGGGGSGGGADQEPKSSDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKTAAAATAAAAATAAAAATAAATRVVDQTPRTATKETGESLTINCVLTD
EYGLFSTSWFRKNPGTTDWERMSIGGRYVESVNKGAKSFSLRIKDLTVADSATYYCKALGWWPPAF
PHWYDGAGTVLTVN

10

配列番号 46

I C O S V N A R 2 D 4 - F c - C C 3 ヌクレオチド配列

ACACGTGTTG ACCAGACACC GCGTACCGCA ACCAAAGAAA CCGGTGAAAG CCTGACCATT
AATTGTGTTT TGACCGATAC CGATTATGGT TTGTTCTCCA CCAGCTGGTT TCGTAAAAAT
CCGGGTACAA CCGATTGGGA ACGTATGAGC ATTGGTGGTC GTTATGTTGA AAGCGTGAAT
AAAGGTGCCA AAAGCTTTAG CCTGCGCATT AAAGATCTGA CCGTTGCAGA TAGCGCAACC
TATTACTGTA AAGCATTCAC TTGGCCGTGG GAATGGCCGG ACCGTTGGTT CCGTCCGTGG
TATGATGGTG CAGGCACCGT TCTGACCGTT AATGGCGGTG GTGGTTCTGG TGGTGGTGCT
GATCAGGAGC CCAAATCTTC TGACAAAAC CACACATGTC CACCGTGCCC AGCACCTGAA
CTCCTGGGTG GACCGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC
TCCCGGACCC CTGAGGTAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC
AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG
GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG
CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG
AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA
TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT
CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC
ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC
AAGAGCAGGT GGCAGCAGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
AACCACATA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCCCGGGTA AAACCGCCGC CGCCGCCACC
GCCGCCGCCG CCACCGCCGC CGCCGCCACC GCCCGGGCCG CCACACGTGT TGATCAGACA
CCGCGTACCG CAACCAAAGA AACCAGGTGAA AGCCTGACCA TTAATTGTGT TCTGACCGAT
ACCGAGTATG GTTTGTTCTC CACCAGCTGG TTTCGTAAAA ATCCGGGTAC AACCAGTTGG
GAACGTATGA GCATTGGTGG TCGTTATGTT GAAAGCGTGA ATAAAGGTGC CAAAAGCTTT
AGCCTGCGCA TTAAAGATCT GACCGTTGCA GATAGCGCAA CCTATTACTG TAAAGCACTG
GGTTGGTGGC CGCCGGCTTT CCCGCATTGG TATGATGGTG CAGGCACCGT TCTGACCGTT
AAT

20

30

配列番号 47

I C O S V N A R C C 3 - F c - 2 D 4 アミノ酸配列（リンカーはイタリック体で示す、Fc 部分は一重下線）

TRVDQTPRTATKETGESLTINCVLTDTEYGLFSTSWFRKNPGTTDWERMSIGGRYVESVNKGAKSFS
LRIKDLTVADSATYYCKALGWWPPAFPHWYDGAGTVLTVNGGGGSGGGGRTEPKSSDKTHTCPPC
PAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGKTAAAATAAAAATAAAAATAAATRVVDQTPRTATKETGESLTINCVLTDYGL
FSTSWFRKNPGTTDWERMSIGGRYVESVNKGAKSFSLRIKDLTVADSATYYCKAFTWPWEWPDWRFP
RWYDGAGTVLTVN

40

【 0 0 7 1 】

【化 1 3】

配列番号 48

I C O S V N A R C C 3 - F c - 2 D 4 ヌクレオチド配列

ACACGTGTTG ATCAGACACC GCGTACCGCA ACCAAAGAAA CCGGTGAAAG CCTGACCATT
 AATTGTGTTT TGACCGATAC CGAGTATGGT TTGTTCTCCA CCAGCTGGTT TCGTAAAAAT
 CCGGGTACAA CCGATTGGGA ACGTATGAGC ATTGGTGGTC GTTATGTTGA AAGCGTGAAT
 AAAGGTGCCA AAAGCTTTAG CCTGCGCATT AAAGATCTGA CCGTTGCAGA TAGCGCAACC
 TATTACTGTA AAGCACTGGG TTGGTGGCCG CCGGCTTTCC CGCATTGGTA TGATGGTGCA
 GGCACCGTTC TGACCGTTAA TGGCGGTGGT GGTTCTGGTG GTGGTGGTCG TACGGAGCCC
 AAATCTTCTG ACAAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAAGC CGCTGGGGCA
 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT
 GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC
 AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG
 GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGAGGAG
 ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAAAGACCAC GCCTCCCGTG
 CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA ACCGCCGCCG CCGCCACCGC CGCCGCCGCC
 ACCGCCGCCG CCGCCACCGC CGCGGCCGCC ACACGTGTTG ATCAGACACC GCGTACCGCA
 ACCAAAGAAA CCGGTGAAAG CCTGACCATT AATTGTGTTT TGACCGATAC CGATTATGGT
 TTGTTCTCCA CCAGCTGGTT TCGTAAAAAT CCGGGTACAA CCGATTGGGA ACGTATGAGC
 ATTGGTGGTC GTTATGTTGA AAGCGTGAAT AAAGGTGCCA AAAGCTTTAG CCTGCGCATT
 AAAGATCTGA CCGTTGCAGA TAGCGCAACC TATTACTGTA AAGCATTAC TGGCCGTGG
 GAATGGCCGG ACCGTTGGTT CCGTCCGTGG TATGATGGTG CAGGCACCGT TCTGACCGTT
 AAT

10

20

配列番号 49

I C O S V N A R C C 3 - F c - C C 3 アミノ酸配列（リンカーはイタリック体で示す、
 Fc 部分は一重下線）

TRVDQTPRTATKETGESLTINCVLTDTEYGLFSTSWFRKNPGTTDWERMSSIGGRYVESVNKGAKSFS
 LRIKDLTVADSATYYCKALGWWPPAFPHWYDGAGTVLTVNGGGGSGGGGRTEPKSSDKTHTCPPC
PAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGKTAAAAATAAAATAAAATAAAATRVDDQTPRTATKETGESLTINCVLTDTEYGL
 FSTSWFRKNPGTTDWERMSSIGGRYVESVNKGAKSFSRLIKDLTVADSATYYCKALGWWPPAFPHWY
 DGAGTVLTVN

30

【 0 0 7 2 】

【化 1 4】

配列番号 50

I C O S V N A R C C 3 - F c - C C 3 ヌクレオチド配列

ACACGTGTTG ATCAGACACC GCGTACCGCA ACCAAAGAAA CCGGTGAAAG CCTGACCATT
 AATTGTGTTT TGACCGATAC CGAGTATGGT TTGTTCTCCA CCAGCTGGTT TCGTAAAAAT
 CCGGGTACAA CCGATTGGGA ACGTATGAGC ATTGGTGGTC GTTATGTTGA AAGCGTGAAT
 AAAGGTGCCA AAAGCTTTAG CCTGCGCATT AAAGATCTGA CCGTTGCAGA TAGCGCAACC
 TATTACTGTA AAGCACTGGG TTGGTGGCCG CCGGCTTTCC CGCATTGGTA TGATGGTGCA
 GGCACCGTTC TGACCGTTAA TGGCGGTGGT GGTTCCTGGT GTGGTGGTTC TACGGAGCCC
 AAATCTTCTG ACAAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAAGC CGCTGGGGCA
 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT
 GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC
 AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG
 GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGAGGAG
 ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAAGACCAC GCCTCCCGTG
 CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA ACCGCCGCCG CCGCCACCGC CGCCGCCGCC
 ACCGCCGCCG CCGCCACCGC CGCGGCCGCC ACACGTGTTG ATCAGACACC GCGTACCGCA
 ACCAAAGAAA CCGGTGAAAG CCTGACCATT AATTGTGTTT TGACCGATAC CGAGTATGGT
 TTGTTCTCCA CCAGCTGGTT TCGTAAAAAT CCGGGTACAA CCGATTGGGA ACGTATGAGC
 ATTGGTGGTC GTTATGTTGA AAGCGTGAAT AAAGGTGCCA AAAGCTTTAG CCTGCGCATT
 AAAGATCTGA CCGTTGCAGA TAGCGCAACC TATTACTGTA AAGCACTGGG TTGGTGGCCG
 CCGGCTTTCC CGCATTGGTA TGATGGTGCA GGCACCGTTC TGACCGTTAA T

10

20

配列番号 51

H I S タグを有する S o l o M E RTM V N A R D 1 - v 1 アミノ酸配列

ARVDQSPSSLSASVGDRVITCVLRDSHCATSSTYWYRKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFS
 LRINDLTVEDSGTYRCASECQYGLAEYDVYGGGTKVEIKHHHHHH

配列番号 52

H I S タグを有する S o l o M E RTM V N A R D 1 - v 1 をコードするヌクレオチド配列

GCCCGCGTGGACCACTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCTCCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACC
 TGCGTGCTGCGCGACTCCCACTGCGCCACCTCCTCCACCTACTGGTACCGCAAGAAG
 TCCGGCTCCACCAACGAGGAGTCCATCTCCAAGGGGGGCGCTACGTGGAGACCGTGAAGTCC
 GGCTCCAAGTCTTCTCCCTGCGCATCAACGACCTGACCGTGGAGGACTCCGGCACC
 TACCGCTGCGCCTCCGAGTGCCAGTACGGCCTGGCCGAGTACGACGTGTACGGCGGCGGCACC
 AAGGTGGAGATCAAGCACCACCACCACCACCAC

30

配列番号 53

H I S タグを有する S o l o M E RTM V N A R D 1 - v 2 アミノ酸配列

ARVDQSPSSLSASVGDRVITCVLRDSHCATSSTYWYRKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFT
 LTISLQPEDFATYYCASECQYGLAEYDVYGGGTKVEIKHHHHHH

40

【 0 0 7 3 】

【化 1 5】

配列番号 54

H I S タグを有する S o l o M E RTM V N A R D 1 - v 2 をコードするヌクレオチド配列
NUCLEOTIDE SEQUENCE CODING FOR THE SoloMERTM VNAR D1-v2 WITH HIS TAG
GCCCCGCGTGGACCAAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACC
TGCGTGCTGCGCGACTCCCACTGCGCCACCTCCTCCACCTACTGGTACCGCAAGAAG
TCCGGCTCCACCAACGAGGAGTCCATCTCCAAGGGGGGCGCTACGTGGAGACCGTGAAGTCC
GGCTCCAAGTCCTTCACCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC
TACTACTGCGCCTCCGAGTGCCAGTACGGCCTGGCCGAGTACGACGTGTACGGCGGGCGGCACC
AAGGTGGAGATCAAGCACCACCACCACCACCAC

10

配列番号 55

H I S タグを有する S o l o M E RTM V N A R D 1 - v 3 アミノ酸配列
ARVDQSPSSLSASVGDRVITCVLRDSHCATSSSTYWYQQKPGKTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFT
LTISSLQPEDFATYYCASECQYGLAEYDVYGGGKVEIKHHHHHH

配列番号 56

H I S タグを有する S o l o M E RTM V N A R D 1 - v 3 をコードするヌクレオチド配列
GCCCCGCGTGGACCAAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACC
TGCGTGCTGCGCGACTCCCACTGCGCCACCTCCTCCACCTACTGGTACCGCAGAAG
CCCGGCAAGACCAACGAGGAGTCCATCTCCAAGGGGGGCGCTACGTGGAGACCGTGAAGTCC
GGCTCCAAGTCCTTCACCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC
TACTACTGCGCCTCCGAGTGCCAGTACGGCCTGGCCGAGTACGACGTGTACGGCGGGCGGCACC
AAGGTGGAGATCAAGCACCACCACCACCACCAC

20

配列番号 57

H I S タグを有する S o l o M E RTM V N A R D 1 - v 4 アミノ酸配列
ARVDQSPSSLSASVGDRVITCVLRDSHCATSSSTYWYRKPGSTNEESISKGGRFSGSGSSGSKSFT
LTISSLQPEDFATYYCASECQYGLAEYDVFGQGTKVEIKHHHHHH

配列番号 58

H I S タグを有する S o l o M E RTM V N A R D 1 - v 4 をコードするヌクレオチド配列
GCCCCGCGTGGACCAAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACC
TGCGTGCTGCGCGACTCCCACTGCGCCACCTCCTCCACCTACTGGTACCGCAAGAAG
CCCGGCTCCACCAACGAGGAGTCCATCTCCAAGGGGGGCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCTCC
GGCTCCAAGTCCTTCACCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC
TACTACTGCGCCTCCGAGTGCCAGTACGGCCTGGCCGAGTACGACGTGTTCGGCCAGGGCACC
AAGGTGGAGATCAAGCACCACCACCACCACCAC

30

【 0 0 7 4 】

【化 1 6】

配列番号 59

Q u a d - XTM D 1 - F c - C 4 アミノ酸配列 (Fc 部分は一重下線)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSHCATSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
 RINDLTVEDSGTYRCASECQYGLAEYDVYGGGT VVTVNGSGGGSGGGSGEPKSSDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGAHSARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRD
 SNCGLSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETINEGSKSFSLRINDLTVEDSGTYRCKLSWWTQNR
 CSNSDVYGGGT VVTN

10

配列番号 60

Q u a d - XTM D 1 - F c - C 4 をコードするヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
 GTGTCTACGAGATAGCCACTGTGCAACCTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
 ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
 CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCGCTTCCGAGTG
 CCAATATGGACTGGCAGAATATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCTGACTGTGAATGGATCC
 GGTGGTGGGTCCGGAGGAGGTGGCTCAGGAGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACCTCACACATGC
 CCACCGTGCCCGAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCCCAAAACCCA
 AGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
 AAGACCTTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
 GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCA
 GGAAGTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC
 GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
 CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG
 CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC
 CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
 AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGGAAAGGAGGTGGCGGTTCCGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGT
 GGCGGTAGCGGAGGTGGCGGTAGCGGGGCCATTCTGCTCGAGTGGACCAACACCGCAAACA
 ATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACTGTGTCTACGAGATAGCAACTGTGGGTT
 GTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCAACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGT
 GGACGATATGTTGAAACAATTAACGAAGGATCAAAGTCCTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACA
 GTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGTTAAGCTGGTGGACCCAGAACTGGAGATGCTCAA
 ATTCCGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCTGACTGTGAAT

20

30

配列番号 61

Q u a d - Y - D 1 C 4TM D 1 - C 4 - F c アミノ酸配列 (Fc 部分は一重下線)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSHCATSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
 RINDLTVEDSGTYRCASECQYGLAEYDVYGGGT VVTVNGGGSGGGSGGGAHSARVDQTPQTITKE
 TGESLTINCVLRDSNCGLSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETINEGSKSFSLRINDLTVEDSGTYR
 CKLSWWTQNRCSNSDVYGGGT VVTVNGGGSGGGSGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

40

【 0 0 7 5 】

【化 17】

配列番号 62

Q u a d - Y - D 1 C 4 TM アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
 GTGTCCTACGAGATAGCCACTGTGCAACCTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
 ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
 CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCGCTTCCGAGTG
 CCAATATGGACTGGCAGAATATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGGAGGT
 GGCGGTAGCGGAGGTGGTGGCGGATCCGGGGCGCACTCCGCTCGAGTGGACCAACACCGCA
 AACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACTGTGTCCTACGAGATAGCAACTGTG
 GGTGTCAGCAGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCAACAAACGAGGAGAGCATATCGAA
 AGGTGGACGATATGTTGAAACAATTAACGAAGGATCAAAGTCCTTTTCTTTGAGAATTAATGATCT
 AACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGTTAAGCTGGTGGACCCAGAAGTGGAGATGC
 TCAAATTCGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAACGGTGGTGGGTCCGGAGGAG
 GTGGCTCAGGAGAGCCCAAATCTAGCGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA
 ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCC
 CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTC
 AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
 AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
 AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGC
 CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA
 GAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
 GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGTGCTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT
 CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC
 GGGGAAA

10

20

配列番号 63

Q u a d - Y - C 4 D 1 TM C 4 - D 1 - F c アミノ酸配列 (Fc 部分は一重下線)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSNCGLSSTYWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETINEGSKSFSL
 RINDLTVEDSGTYRCKLSWWTQNWRCNSNDVYGGGTVVTVNGGGSGGGGSGAHSARVDQTPQ
 TITKETGESLTINCVLRDSHCATSSSTYWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSLRINDLTVED
 SGTYRCASECQYGLAEYDVYGGGTVVTVNGGGSGGGSGGEPKSSDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

30

【 0 0 7 6 】

【化 18】

配列番号 64

Q u a d - Y - C 4 D 1TM アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列

GCTCGAGTGGACCAAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGCAACTGTGGGTTGTCCAGCACGTAAGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAATTAACGAAGGATCAAAGTC
CTTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGTTAAGCTG
GTGGACCCAGAAGTGGAGATGCTCAAATTCGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTG
AACGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGTGGCGGATCCGGGGCGCACTCCGCTCGAGTGGACCA
AACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACTGTGTCCTACGAGATA
GCCACTGTGCAACCTCCAGCACGTAAGTATCGCAAAAAATCGGGCTCAACAAACGAGGAGAG
CATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTCCTTTTCTTTGAGAAT
TAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCGCTTCCGAGTGCCAATATGGACTGG
CAGAATATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGGTGGTGGGTCCGGAGGAGG
TGGCTCAGGAGAGCCCCAAATCTAGCGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA
ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA
ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGACCCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG
AACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT
CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
GGGAAA

10

20

配列番号 65 - 2D4

TRVDQTPRTATKETGESLTINCVLTDTDYGLFSTSWFRKNPGTTDWERMSIGGRYVESVNKGAKSFS
LRIKDLTVADSATYYCKAFTWPWEWPDWRFRPWYDGAGTVLTVN

配列番号 66 - CC3

TRVDQTPRTATKETGESLTINCVLTDTEYGLFSTSWFRKNPGTTDWERMSIGGRYVESVNKGAKSFS
LRIKDLTVADSATYYCKALGWPPAFPHWYDGAGTVLTVN

30

配列番号 67 - BA11

TRVDQSPSSLSASVGDRVITITCVLTDTSYPLYSTYWYRKNPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTKSFTL
TISSLQPEDSATYYCRAMSTNIWTGDGAGTKVEIK

【 0 0 7 7 】

【化 1 9】

配列番号 68- CDR1

HCAATSS

配列番号 69- CDR1

NCGLSS

配列番号 70- CDR1

NCALSS

10

配列番号 71- HV2

TNEESISKG

配列番号 72- HV4

SGSKS

配列番号 73- HV4

EGSKS

20

配列番号 74- NARF4For1

ATA ATC AAG CTT GCG GCC GCA TTC ACA GTC ACG ACA GTG CCA CCT C

配列番号 75- NARF4For2

ATA ATC AAG CTT GCG GCC GCA TTC ACA GTC ACG GCA GTG CCA TCT C

30

配列番号 76- NARF1Rev

ATA ATA AGG AAT TCC ATG GCT CGA GTG GAC CAA ACA CCG

配列番号 77- E06

TRVDQTPRTATRETGESLTINCVLTDTSYPLYSTYWYRKPNPGSSNKEQISISGRYVESVNKGTKSFSL
RIKDLTVADSATYICRAMGTNIWTGDGAGTVLTVN

【 0 0 7 8】

【化 2 0】

配列番号 78 - hE06v1.10

TRVDQSPSSLSASVGDRVITICVLTDTSYPLYSTYWYRKNPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTKSFTL
TISSLQPEDFATYYCRAMGTNIWTGDGAGTKVEIK

配列番号 79- AC9

TRVDQSPSSLSASVGDRVITICVLTDTSYPLYSTYWYRKNPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTKSSTL
TISSLQPEDFATYYCRAMGTNIWTGDGAGTKVEIK

配列番号 80- AD4

TRVDQSPSSLSASVGDRVITICVLTDTSYPLYSTYWYRKNPGSSNKEQISMSGRYSESVNKSTKSFTL
TISSLQPEDFATYYCRAMGTNIWTGDGAGTKVEIK

10

配列番号 81- AG11

TRVDQSPSSLSASVGDRVITICVLTDTSYPLYSTYWYRKNPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTKSFTL
TISSLQPEDFATYYCRAMGTNIWTGDGAGTKVETK

配列番号 82- AH7

TRVDQTPSSLSASVGDRVITICVLTDTSYPLYSTYWYRKNPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTKSSTL
TISSLQPEDFATYYCRAMGTNIWTGDGAGTKVEIK

20

配列番号 83- BB10

TRVDQSPSSLSASVGDRVITICVLTDTSYPLYSTYWYRKNPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTKSFTL
TISSLQPEDFATYYCRAMGTNFWTGDGAGTKVEIK

配列番号 84- BB11

TRVDQSPSSLSASVGDRVITICVLTDTSYPLYSTYWYRKNPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTKSFTL
TISSLQPEDFATYYCRAMATNIWTGDGAGTKVEIK

配列番号 85- BC3

TRVDQSPSSLSASVGDRVITICVLTDTSYPLYSTYWYRKNPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTKSFTL
TISSLQPEDFATYYCRAMGTNIWTGDGAGTKVEIK

30

配列番号 86- BD12

TRVDQSPSSLSASVGDRVITICVLTDTSYPLYSTYWYRKNPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTKNSFTL
TISSLQPEDFATYYCRAMGTNIWTGDGAGTKVEIK

配列番号 87 - BE4

TRVDQSPSSLSASVGDRVITICVLTDTSYSLYSTYWYRKNPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTKSFTL
TISSLQPEDFATYYCRAMGTNIWTGDGAGTKVEIK

配列番号 88 - BH4

TRVDQSPSSLSASVGDRVITICVLTDTSYPLYSTYWYRKNPGSSNKEQISISGRYSESVNKGTKSFTL
TISSLQPEDFATYYCRAMGTNLWTGDGAGTKVEIK

40

【 0 0 7 9】

【化 2 1】

配列番号 89-H I S タグを有する (G l y₄ S e r)₃ アミノ酸配列を有する T N F V N A R

二量体 D 1 - C 4 (リンカーはイタリック体で示し、タグは二重下線)

ARVDQTPQTITKETGESLTINCVLRDSDHCATSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
RINDLTVEDSGTYRCASECQYGLAEYDVYGGGT V V T V N G G G G S G G G G S G G G S A R V D Q T P Q T I T K
ETGESLTINCVLRDSNCGLSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETINEGSKSFSLRINDLTVEDSGTY
RCKLSWWTQNWRCNSNDVYGGGT V V T V N A A A HHHHHH

配列番号 90-H I S タグを有する (G l y₄ S e r)₃ ヌクレオチド配列を有する T N F

V N A R 二量体 D 1 - C 4

GCTCGAGTGGACCAACACCGCAAACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACT
GTGTCCTACGAGATAGCCACTGTGCAACCTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCA
ACAAACGAGGAGAGCATATCGAAAGGTGGACGATATGTTGAAACAGTTAACAGCGGATCAAAGTC
CTTTCTTTGAGAATTAATGATCTAACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCGCTTCCGAGTG
CCAATATGGACTGGCAGAATATGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAATGGAGGT
GGCGGTAGCGGAGGTGGTGGCGGATCCGGCGGTGGTTCCGCTCGAGTGGACCAACACCGCA
AACAATAACAAAGGAGACGGGCGAATCACTGACCATCAACTGTGTCCTACGAGATAGCAACTGTG
GGTTGTCCAGCACGTACTGGTATCGCAAAAAATCGGGCTCAACAAACGAGGAGAGCATATCGAA
AGGTGGACGATATGTTGAAACAATTAACGAAGGATCAAAGTCCTTTCTTTGAGAATTAATGATCT
AACAGTTGAAGACAGTGGCACGTATCGATGCAAGTTAAGCTGGTGGACCCAGAACTGGAGATGC
TCAAATTCGATGTATACGGAGGTGGCACTGTCGTGACTGTGAACGCGGCCGCACATCATCATCA
CCATCAC

10

20

配列番号 91-H I S タグを有する (G l y₄ S e r)₃ アミノ酸配列を有する T N F

s o l o M E RTM 二量体 D 1 v 2 - C 4 v 1 (リンカーはイタリック体で示し、タグは
二重下線)

ARVDQSPSSLSASVGDRVITITCVLRDSDHCATSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSL
LTISSLPEDFATYYCASECQYGLAEYDVYGGGT K V E I K G G G G S G G G G S G G G S A R V D Q S P S S L S A
SVGDRVITITCVLRDSNCGLSSTYWYRKKS GSTNEESISKGGRYVETINEGSKSFSLRINDLTVEDSGT
YRCKLSWWTQNWRCNSNDVYGGGT K V E I K A A A HHHHHH

配列番号 92-H I S タグを有する (G l y₄ S e r)₃ ヌクレオチド配列を有する T N F

s o l o M E RTM 二量体 D 1 v 2 - C 4 v 1

GCCCCGTGGACCAAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCTCCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACCC
TGCGTGCTGCGGACTCCCACTGCGCCACCTCCTCCACCTACTGGTACCGCAAGAAGTCCGGCT
CCACCAACGAGGAGTCCATCTCCAAGGGGGGCGCTACGTGGAGACCGTGAAGTCCGGCTCCA
AGTCCTTACCCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCGCCTC
CGAGTGCCAGTACGGCCTGGCCGAGTACGACGTGTACGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAA
GGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGTGGCGGATCCGGCGGTGGTTCCGCCCGCGTGACCATGAGT
CCCCCTCCTCCCTGTCCGCTCCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACCTGCGTGCTGCGGACT
CCAAGTGGCGCTGTCTCCACCTACTGGTACCGCAAGAAGTCCGGCTCCACCAACGAGGAGTC
CATCTCAAGGGCGGCGCTACGTGGAGACCATCAACGAGGGCTCCAAGTCTTCTCCCTGCGC
ATCAACGACCTGACCGTGGAGGACTCCGGCACCTACCGCTGCAAGCTGTCCTGGTGGACCCAGA
ACTGGCGCTGCTCCAAGTCCGACGTGTACGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGCGGCCG
CACATCATCATCACCATCAC

30

40

【 0 0 8 0 】

【化 2 2】

配列番号 93- H I S タグタグを有する (G l y₄ S e r)₅ アミノ酸配列を有する T N Fs o l o M E RTM 二量体 D 1 v 2 - C 4 v 1 (リンカーはイタリック体で示し、

タグは二重下線)

ARVDQSPSSLSASVGDRVITITCVLRDSHCATSSTYWYRKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFT
 LTISSLQPEDFATYYCASECQYGLAEYDVYGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSA
 RVDQSPSSLSASVGDRVITITCVLRDSNCGLSSTYWYRKSGSTNEESISKGGRYVETINEGSKSFSLR
 INDLTVEDSGTYRCKLSWWTQNWRCNSNDVYGGGTKVEIKAAAHHHHHH

配列番号 94- H I S タグタグを有する (G l y₄ S e r)₅ ヌクレオチド配列を有する T N Fs o l o M E RTM 二量体 D 1 v 2 - C 4 v 1

GCCCGCGTGGACCACTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACC
 TGCGTGCTGCGCGACTCCCACTGCGCCACCTCCTCCACCTACTGGTACCGCAAGAAGTCCGGCT
 CCACCAACGAGGAGTCCATCTCCAAGGGGGGCGCTACGTGGAGACCGTGAACCTCCGGCTCCA
 AGTCCTTCACCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCGCCTC
 CGAGTGCCAGTACGGCCTGGCCGAGTACGACGTGTACGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAA
 GGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGTTCAAGTGGCGGTGGTCTGGCGGTGGCGGTAGTG
 GCGGAGGTGGTAGTGCCCGCGTGGACCACTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACC
 GCGTGACCATCACTGCGTGTGCGCGACTCCAACTCGGCCTGTCTCCACCTACTGGTACCG
 CAAGAAGTCCGGCTCCACCAACGAGGAGTCCATCTCCAAGGGCGGCGCTACGTGGAGACCAT
 CAACGAGGGCTCCAAGTCTTCTCCCTGCGCATCAACGACCTGACCGTGGAGGACTCCGGCACC
 TACCGCTGCAAGCTGTCTGGTGGACCCAGAACTGGCGCTGCTCCAACCTCCGACGTGTACGGCG
 GCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGGCGGCGCACATCATCATCACCATCAC

配列番号 95- (G l y₄ S e r)₅ アミノ酸配列を有する T N F S 1 7 - Q u a d - XTM

(Fc 部分は一重下線)

ASVNQTPRTATKETGESLTINCVLTDTHAKVFTTSWFRKNPGTTDWERMSIGGRYVESVNKGAKSFS
 LRIKDLTVADSATYICRAGGYLSQPRVYWDVYGAGTVLTVNGGGSGGGGRTEPRGPTIKPCPPCKC
 PAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTHREDYNS
 TLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKQVTLT
 CMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL
 HNHHTTKSFSRTPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGAHSASVNQTPRTATKETGESLTINCVLTD
 THAKVFTTSWFRKNPGTTDWERMSIGGRYVESVNKGAKSFSLRIKDLTVADSATYICRAGGYLSQPR
 VYWDVYGAGTVLTVN

配列番号 96- (G l y₄ S e r)₅ ヌクレオチド配列を有する T N F S 1 7 - Q u a d - XTM

GCAAGCGTTAATCAGACACCGCGTACCGCAACCAAGAAACCGGTGAAAGCCTGACCATTAATTG
 TGTCTGACCGATACCCATGCTAAAGTTTTCACTACCAGCTGGTTTCGTAAAAATCCGGGTACAAC
 CGATTGGGAACGTATGAGCATTGGTGGTCGTTATGTTGAAAGCGTGAATAAAGGTGCCAAAAGCT
 TTAGCCTGCGCATTAAAGATCTGACCGTTGCAGATAGCGCAACCTATATCTGTCGTGCCGGTGGT
 TACCTGTCTCAGCCGCGTGTCTACTGGGATGTTTATGTTGCAGGCACCGTTCTGACCGTTAATGG
 CGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 TCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGA
 TCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 GGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACA
 CAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAAGTGCCTCCCATCCAGCACC
 AGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCAT
 CGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAAGTAAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCAC
 CAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCAAGACTTCATGCCTGAA
 GACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAAGT
 CCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGG
 AAAGAAATAGCTACTCTGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGC
 TTCTCCCGGACTCCGGGTAAAGGAGGTGGCGGTTCCGGAGGTGGCGGTAGCGGAGGTGGCGG
 TAGCGGAGGTGGCGGTAGCGGGGCCATTCTGCAAGCGTTAATCAGACACCGCGTACCGCAAC
 CAAAGAAACCGTGAAAGCCTGACCATTAATTGTGTTCTGACCGATACCATGCTAAAGTTTTAC
 TACCAGTGGTTTTCGTAAAAATCCGGGTACAAACCGATTGGGAACGTATGAGCATTGGTGGTGGT
 ATGTTGAAAGCGTGAATAAAGGTGCCAAAAGCTTTAGCCTGCGCATTAAAGATCTGACCGTTGCA
 GATAGCGCAACCTATATCTGTCGTGCCGGTGGTTACCTGTCTCAGCCGCGTGGTTACTGGGATGT
 TTATGGTGCAGGCACCGTTCTGACCGTTAAT

【0 0 8 1】

発明の詳細な説明

10

20

30

40

50

定義

アミノ酸は、本明細書では一文字コードもしくは3文字コードのいずれかとしてまたは両方として表される。

【0082】

「アフィニティー精製」という用語は、分子がパートナー部分に結合された(bind)または誘引された(attracted)ままで不純物から分離されることを可能にする組合せまたは複合体を形成するための、化学的パートナーまたは結合パートナーへの分子の特異的誘引または結合に基づく分子の精製を意味する。

【0083】

「相補性決定領域」またはCDR(すなわち、CDR1およびCDR3)という用語は、その存在が抗原結合に必要であるVNARDメインのアミノ酸残基を指す。各VNARは、典型的には、CDR1およびCDR3として同定されるCDR領域を有する。各相補性決定領域は、「相補性決定領域」のアミノ酸残基および/または「超可変ループ」(HV)のアミノ酸残基を含み得る。場合によっては、相補性決定領域は、CDR領域および超可変ループ両方のアミノ酸を含み得る。VNAR分子について一般に受け入れられている命名法によれば、CDR2領域は存在しない。

10

【0084】

「フレームワーク領域」(FW)は、CDR残基以外のVNAR残基である。各VNARは、典型的には、FW1、FW2、FW3a、FW3bおよびFW4として同定される5つのフレームワーク領域を有する。したがって、VNARDメインは、典型的には、N-末端からC-末端方向にFW1-CDR1-FW2-HV2-FW3a-HV4-FW3b-CDR3-FW4の構造を有する。

20

【0085】

「細胞」、「細胞株」、および「細胞培養物」は、(文脈上別段の指示がない限り)互換的に使用され、このような名称には細胞または細胞株のすべての子孫が含まれる。したがって、例えば、「形質転換体」および「形質転換細胞」のような用語には、初代対象細胞および移入(transfer)回数に関係なく上記に由来する培養物が含まれる。また、全ての子孫は、故意または不注意による突然変異により、DNAの内容が正確に同一であるとは限らないことは理解される。元の形質転換された細胞に付きスクリーニングされるのと同じの機能または生物学的活性を有する突然変異体子孫は含まれる。

30

【0086】

発現に言及する場合の、「制御配列」は、特定の宿主生物における作動可能に連結されたコード配列の発現に必要なDNA配列を意味する。例えば、原核生物に適した制御配列には、プロモーター、必要であればオペレーター配列、リボソーム結合部位などが含まれる。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーなどの制御配列を使用する。

【0087】

「コートタンパク質」という用語は、少なくともその一部がウイルス粒子の表面上に存在するタンパク質を意味する。機能的な観点から、コートタンパク質は宿主細胞におけるウイルスアセンブリプロセスの間にウイルス粒子と会合し、他の宿主細胞に感染するまでアセンブリされたウイルスと会合したままであるタンパク質である。

40

【0088】

特定のアッセイにおける化学エンティティの「検出限界」は、当該アッセイのバックグラウンドレベルを超えて検出され得る当該エンティティの最小濃度である。例えば、ファージELISAでは、特定の抗原結合断片を提示する特定のファージの「検出限界」は、特定のファージが抗原結合断片を提示しない対照ファージによって産生されるシグナルを超えるELISAシグナルを産生するファージ濃度である。

【0089】

「融合タンパク質」および「融合ポリペプチド」は、2つの部分と一緒に共有結合してなるポリペプチドを指し、この際、上記部分はそれぞれ異なる特性を有するポリペプチド

50

である。上記特性は、インビトロまたはインビボでの活性などの、生物学的特性であってもよい。上記特性はまた、標的抗原への結合性、反応の触媒作用などの、単純な化学的または物理的特性であってもよい。上記２つの部分は、単一のペプチド結合によってまたは１以上のアミノ酸残基を含むペプチドリナーを介して直接連結されてもよい。一般的に、上記２つの部分およびリンカーは、互いにリーディングフレームに存在するであろう。好ましくは、ポリペプチドの２つの部分は異種のまたは異なるポリペプチドから得られる。

【００９０】

本明細書における「融合タンパク質」という用語は、一般的な用語において、水素結合もしくは塩橋等の、化学的手段によって、またはタンパク質合成を介したペプチド結合によってまたはその両方によって一緒に結合された１以上のタンパク質を意味する。

10

【００９１】

「異種DNA」は、宿主細胞に導入される任意のDNAである。DNAは、ゲノムDNA、cDNA、合成DNAおよびこれらの融合物または組み合わせを含む種々の供給源に由来し得る。DNAとしては、宿主またはレシピエント細胞と同じ細胞もしくは細胞型由来のDNAまたは異なる細胞型由来のDNA、例えば、同種または異種供給源由来のDNAがあり得る。DNAは、必要に応じて、マーカーまたは選択遺伝子（例えば、抗生物質耐性遺伝子、温度耐性遺伝子など）を含み得る。

【００９２】

「高度に多様な位置(highly diverse position)」とは、既知および／または天然に存在する抗体または抗原結合断片のアミノ酸配列を比較した場合にある位置に表される多数の異なるアミノ酸を有する軽鎖および重鎖の変領域に位置するアミノ酸の位置をいう。高度に多様な位置は、典型的にはCDR領域にある。

20

【００９３】

「同一性」は、配列を比較することによって決定される、２以上のポリペプチド配列または２以上のポリヌクレオチド配列間の関係を記載する。同一性は、場合によっては、そのような配列のストリング間の一致によって決定される、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列間の配列関連性（相同性）の程度を意味する。２つのポリペプチド配列または２つのポリヌクレオチド配列間の同一性を測定するための多くの方法が存在するが、同一性を決定するために一般的に使用される方法は、コンピュータープログラムに体系化されている。２つの配列間の同一性を決定するための好ましいコンピュータープログラムとしては、GCGプログラムパッケージ(Devereux, et al., Nucleic Acids Res, 1984, 12, 387 BLASTP, BLASTN, and FASTA (Atschul et al., J. Molec. Biol. (1990) 215, 403)があるが、これらに限定されない。

30

【００９４】

好ましくは、タンパク質のアミノ酸配列は、HGM P(Human Genome Mapping Project)によって提供されるBLASTコンピュータープログラム(Atschul et al., J. Mol. Biol. 1990 215, 403-410)のデフォルトパラメーターを用いて、本明細書に開示されるアミノ酸配列に対して、アミノ酸レベルで少なくとも６０％の同一性を有する。

【００９５】

より好ましくは、タンパク質配列は、本明細書中に示されるアミノ酸配列に対して、核酸またはアミノ酸レベルで、少なくとも６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、さらにより好ましくは９５％（なおより好ましくは少なくとも９６％、９７％、９８％または９９％）の同一性を有し得る。

40

【００９６】

タンパク質はまた、HGM Pによって提供されるBLASTコンピュータープログラムのデフォルトパラメーターを使用して、本明細書中に開示される配列と、少なくとも６０％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有する配列を含み得る。

【００９７】

50

「ライブラリー」とは、複数のVNARもしくはVNAR断片配列またはこれらの配列をコードする核酸をいう。ライブラリーの起源は、多様性が天然のフレームワークもしくは天然のフレームワークの組み合わせになるように設計される性質を有する非天然の供給源もしくは合成由来であり得る、または免疫動物から抽出されたRNAから単離されたVNARDメインから例示されるような天然の供給源由来であり得る。

【0098】

「連結(ligation)」は、2つの核酸断片間にホスホジエステル結合を形成するプロセスである。2つの断片の連結を目的として、断片の末端は、互いに適合するものでなければならない。場合によっては、末端はエンドヌクレアーゼ消化後に直接適合するであろう。しかしながら、連結に適合させるために、まずエンドヌクレアーゼ消化後に一般的に生成される互い違いの末端(staggered ends)を平滑末端に変換する必要があるかもしれない。末端を平滑化するために、DNAを、4つのデオキシリボヌクレオチド三リン酸の存在下で、DNAポリメラーゼIまたはT4 DNAポリメラーゼのクレノウ断片約10単位を用いて、15で少なくとも15分間、適切な緩衝液中で処理する。次いで、DNAを、フェノール-クロロホルム抽出およびエタノール沈殿によってまたはシリカ精製によって精製する。一緒に連結されるDNA断片を、ほぼ等モル量で溶液中に仕込む。この溶液はまた、ATP、リガーゼ緩衝液、およびリガーゼ(例えば、0.5/igのDNAあたり約10単位のT4 DNAリガーゼ)を含むであろう。DNAをベクターに連結する場合には、ベクターを適切な制限エンドヌクレアーゼでの消化によってまず線状化する。次いで、線状化された断片を、細菌アルカリホスファターゼまたはウシ腸ホスファターゼで処理して、連結工程中の自己連結を防止する。

【0099】

「突然変異」は、野生型配列などの、参照ヌクレオチド配列に対するヌクレオチドの欠失、挿入、または置換である。

【0100】

「天然の」または「天然に存在する」VNARは、例えば、ex vivoで得られた組織源から等の、非合成源から、またはElasmobranchiiサブクラスの動物の血清から同定されたVNARを指す。これらのVNARとしては、天然または誘導された、任意のタイプの免疫応答で生成されたVNARがあり得る。天然のVNARはアミノ酸配列、およびこれらの抗体を構成するまたはコードするヌクレオチド配列を含む。本明細書で使用されるように、天然のVNARは「合成VNAR」とは異なり、合成VNARは、例えば、異なるアミノ酸による特定の位置の、1アミノ酸または1を超えるアミノ酸の置換、欠失、または付加によって、源または鋳型配列から変化させたVNAR配列を指し、前記異なるアミノ酸により源の抗体配列とは異なる抗体配列が提供される。

【0101】

「核酸構築物」との用語は、一般的に、DNA、cDNA、またはクローニングによって得られるまたは化学合成によって製造されるmRNAなどのRNAであり得る任意の長さの核酸を指す。DNAは、一本鎖または二本鎖であってもよい。一本鎖DNAは、コードセンス鎖であっても、または非コード鎖もしくはアンチセンス鎖であってもよい。治療用途を目的として、核酸構築物は、好ましくは処置される対象において発現され得る形態である。

【0102】

核酸に言及する場合の「作動可能に連結された(Operably linked)」とは、核酸が別の核酸配列と機能的な関係にあることを意味する。例えば、プレシーケンス(presequence)または分泌リーダー(secretory leader)のDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合には、ポリペプチドのDNAに作動可能に連結する；プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼす場合には、コード配列に作動可能に連結する；または、リボソーム結合部位は、翻訳を容易にするように位置する場合には、コード配列に作動可能に連結する。一般的に、「作動可能に連結された(Operably linked)」とは、連結されるDNA配列が隣接しており、そして分泌リーダーの場合に

は、付随しリーディングフレームにあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは必ずしも隣接している必要はない。便利な制限部位でのライゲーションによって連結が行われる。このような部位が存在しない場合には、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが従来のブラクティスに従って使用される。

【0103】

「ファージディスプレイ」は、それによって変異ポリペプチドがファージ（例えば、糸状ファージ）粒子の表面上のコートタンパク質の少なくとも一部への融合タンパク質としてディスプレイさせる技術である。ファージディスプレイ技術により、高い親和性で標的抗原に結合する配列について迅速かつ効率的に選別することができるランダムなタンパク質変異体の大きなライブラリーを調製できる。ファージ上のペプチドおよびタンパク質ライブラリーのディスプレイは、特異的結合特性を有するものについて何百万ものポリペプチドをスクリーニングするために使用できる。多価ファージディスプレイ法は、糸状ファージのコートタンパク質である p i l l、p V I I I、p V I、p V I I または p I X をコードする遺伝子への融合を介して小さなランダムなペプチドおよび小さなタンパク質をディスプレイするために使用されてきた。

10

【0104】

「ファージミド」は、細菌の複製起点、例えば、C o l E I、およびバクテリオファージの遺伝子間領域のコピーを有するプラスミドベクターである。ファージミドは、糸状バクテリオファージおよびラムドイドバクテリオファージなどの、任意の既知のバクテリオファージで使用され得る。このプラスミドはまた、一般的に、抗生物質耐性のための選択マーカーを含むであろう。これらのベクターにクローニングされた DNA のセグメントは、プラスミドとして増殖され得る。ファージ粒子の産生に必要な全ての遺伝子を有するこれらのベクターを有する細胞が提供されると、プラスミドの複製の様式はローリングサークル複製(rolling circle replication)に変化し、プラスミド DNA の 1 本鎖のコピーを生成し、ファージ粒子をパッケージする。ファージミドは、感染性または非感染性ファージ粒子を形成し得る。この用語は、異種ポリペプチドがファージ粒子の表面上にディスプレイされるように、遺伝子融合物として異種ポリペプチド遺伝子に連結されたファージコートタンパク質遺伝子またはその断片を含むファージミドを包含する。ファージミドディスプレイベクターの一例としては、p W R I L - 1 がある。

20

【0105】

「ファージベクター」という用語は、異種遺伝子を含み、複製可能なバクテリオファージの二本鎖複製形態を意味する。ファージベクターは、ファージ複製およびファージ粒子形成を可能にするファージ複製起点を有する。ファージは、好ましくは、M 1 3、f l、f d、P f 3 ファージもしくはその誘導体等の、糸状バクテリオファージ、またはラムダ、2 1、p h i 8 0、p h i 8 1 もしくはその誘導体等の、ラムドイドファージである。

30

【0106】

「タンパク質」という用語は、概して、ペプチド結合によって一緒に結合された複数のアミノ酸残基を意味する。それは、ペプチド、オリゴペプチド、オリゴマー、またはポリペプチドと交換可能に使用され、これらと同じ意味であり、糖タンパク質およびその誘導体を含む。「タンパク質」という用語は、タンパク質の断片、類似体、変異体および誘導体を包含すると解され、この際、断片、類似体、変異体または誘導体は参照タンパク質と本質的に同一の生物学的活性または機能を保持する。タンパク質類似体および誘導体の例としては、ペプチド核酸、および D A R P i n s（設計されたアンキリン反復タンパク質(Designed Ankyrin Repeat Proteins)）がある。本発明の「ポリペプチド」は本明細書で定義される T N F 特異的抗原結合分子である。

40

【0107】

タンパク質の断片、類似体、変異体または誘導体は、それが由来する元のタンパク質配列の長さに応じて、少なくとも 2 5、好ましくは少なくとも 3 0 もしくは 4 0、または 5 0 もしくは 1 0 0 以下、または 6 0 ~ 1 2 0 アミノ酸長であり得る。9 0 ~ 1 2 0、1 0 0 ~ 1 1 0 のアミノ酸の長さは、場合によっては便利であり得る。

50

【0108】

タンパク質の断片、誘導体、変異体または類似体は、(i) 1 以上のアミノ酸残基が保存または非保存アミノ酸残基（好ましくは、保存アミノ酸残基）で置換され、このような置換されたアミノ酸残基は遺伝暗号によってコードされているものであってもなくてもよいもの、または(ii) 1 以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの、または(iii) ポリペプチドの精製に使用されるリーダーまたは補助配列などの、追加のアミノ酸が成熟ポリペプチドに融合されているものであってもよい。このような断片、誘導体、変異体および類似体は、本明細書の示唆から当業者の範囲内に含まれるとみなされる。

【0109】

「オリゴヌクレオチド」は、既知の方法（固相技術を用いた、ホスホトリエステル、ホスファイト、またはホスホラミダイト化学など）によって化学的に合成される短鎖、一本鎖または二本鎖のポリデオキシヌクレオチドである。さらなる方法としては、遺伝子の全核酸配列が既知である、またはコード鎖に相補的な核酸の配列が利用可能である場合に使用されるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）がある。あるいは、標的アミノ酸配列が既知である場合には、各アミノ酸残基について既知であり、好ましいコード残基を使用して潜在的な核酸配列が推測し得る。オリゴヌクレオチドは、ポリアクリルアミドゲルまたは分子サイジングカラム(molecular sizing columns)でまたは沈殿によって精製することができる。DNA が非核酸不純物（極性、非極性、イオン性などであり得る）から分離される場合、DNA は「精製」される。

10

【0110】

本明細書中で使用される、「供給源(source)」または「鋳型(template)」VNAR は、その抗原結合配列が本明細書中に記載される基準に従う多様化が実施される鋳型配列として機能する、VNAR または VNAR 抗原結合断片を指す。抗原結合配列は、一般的に、VNAR 内に、好ましくはフレームワーク領域を含む、少なくとも 1 つの CDR を含むことが好ましい。

20

【0111】

「転写調節エレメント」は、以下の成分：エンハンサーエレメント、プロモーター、オペレーター配列、リプレッサー遺伝子、および転写終結配列のうちの 1 以上を含むであろう。

【0112】

「形質転換」とは、細胞が DNA を取り込んで「形質転換体」になる過程を意味する。DNA の取り込みは永続的であっても一過性であってもよい。「形質転換体」は、DNA に関連する表現型（例えば、DNA によってコードされるタンパク質によって与えられる抗生物質耐性）の発現によって証明されるように、DNA を取り込んで維持した細胞である。

30

【0113】

融合タンパク質（ポリペプチド）または異種ポリペプチド（ファージに対して異種）などの、出発または参照ポリペプチド（例えば、供給源 VNAR またはその CDR）の「変異体(variant)」または「突然変異体(mutant)」は、(1) 出発または参照ポリペプチドのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有し、(2) 天然または人工突然変異誘発のいずれかによって出発または参照ポリペプチドから誘導されたポリペプチドである。このような変異体としては、例えば、目的のポリペプチドのアミノ酸配列内の残基の欠失、および/または挿入および/または置換がある。例えば、（供給源 VNAR または抗原結合断片中の対応する位置に見出されるアミノ酸に関して）変異アミノ酸(variant amino acid)を有する配列をコードするノンランダムコドンセット(nonrandom codon set)を含むオリゴヌクレオチドを使用して生成される本発明の融合ポリペプチドは、供給源 VNAR または抗原結合断片に関して変異ポリペプチド(variant polypeptide)である。従って、変異 CDR (variant CDR) は、出発または参照ポリペプチド配列（供給源 VNAR または抗原結合断片のものなど）に関して変異配列を含む CDR を指す。本明細書において、変異アミノ酸は、出発または参照ポリペプチド配列（供給源 VNAR または抗原結合断片のもの

40

50

など)中の対応する位置のアミノ酸とは異なるアミノ酸を指す。欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせは、最終的な構築物が所望の機能的特徴を有することを条件として、最終的な変異体または突然変異体構築物に到達するためになされ得る。アミノ酸の変化はまた、グリコシル化部位の数または位置を変えるなど、ポリペプチドの翻訳後プロセスを変化させるものであってもよい。コートタンパク質、または供給源VNARのCDRなどの、「野生型」または「参照」配列または「野生型」または「参照」タンパク質/ポリペプチドの配列は、変異ポリペプチドが突然変異(mutation)の導入によって誘導される参照配列であってもよい。一般的に、所定のタンパク質の「野生型」配列は、天然で最も一般的な配列である。

【0114】

10

同様に、「野生型」遺伝子配列は、自然界で最も共通して見られる遺伝子の配列である。突然変異は、自然の過程によってまたは人為的な手段によって「野生型」遺伝子(したがって、それがコードするタンパク質)に導入することができる。このような過程の産物は、元の「野生型」タンパク質または遺伝子の「変異体」または「突然変異体」である。

【0115】

DNA操作、トランスフェクション方法および培養方法のための一般的な方法は、当業者に周知である。この点に関して、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition) Cold Spring Harbor Publishingを参照されたい。

【0116】

VNARの単離

20

VNARドメインは、標的免疫処置サメ由来の組織を用いて構築されたファージディスプレイライブラリーから得ることができる(Dooley, H., et al. Mol Immunol, 2003. 40(1): p. 25-33; Nuttall, S.D., et al, Proteins, 2004. 55(1): p. 187-97; and Dooley, H., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(6): p. 1846-51)、WO 2003/014161(参考として援用される)には、サメを免疫処置して、結合ドメインを得るための有用な方法が記載される。

【0117】

VNAR結合ドメインはまた、VNAR配列を含む合成ライブラリーから得られ得る。WO 2014/173959(参考として援用される)には、VNARライブラリーを開発して、結合ドメインを得るための有用な方法が記載される。

30

【0118】

さらに、CDR3を標的とする合成多様性を有するライブラリーを使用して、VNAR構造に基づく結合ドメインを得ることができている(Nuttall, S.D., et al. Mol Immunol, 2001. 38(4): p. 313-26; Nuttall, S.D., et al. Eur J Biochem, 2003. 270(17): p. 3543-54; Shao, C.Y., et al. Mol Immunol, 2007. 44(4): p. 656-65 and Liu, J.L., et al. BMC Biotechnol, 2007. 7: p. 78; WO2005/118629。

【0119】

本発明のVNARSは、ヒトに投与された場合に、潜在的な免疫原性を減少させるようにさらに適合され得る(ヒト化)。

【0120】

40

抗体可変ドメイン(antibody variable domains)のヒト化は、ヒト化形態がヒト被検者に投与された場合に望ましくない免疫学的反応を回避し得るように、治療的に有用な標的に対して、ヒト以外の種において、産生された抗体を改変するための当該分野で周知の技術である。ヒト化に関連する方法は、Almagro J.C and William Strohl W. Antibody Engineering: Humanization, Affinity Maturation, and Selection Techniques in Therapeutic Monoclonal Antibodiesに: Bench to Clinic. Edited by An J. 2009 John Wiley & Sons, IncからおよびStrohl W.R. and Strohl L.M., Therapeutic Antibody Engineering, Woodhead Publishing 2012に概説される。

【0121】

IgNARは免疫グロブリンと比較して異なる起源を有し、免疫グロブリン可変ドメイ

50

ンと比較して配列相同性が非常に少ないが、免疫グロブリン可変ドメインとIgNAR可変ドメインとの間にはいくつかの構造的類似性があり、その結果、類似のプロセスがVNARドメインに適用され得る。例えば、WO 2013/167883（参考として援用される）には、VNARのヒト化の説明が提供される、Kovalenko O.V., et al. J Biol Chem. 2013. 288(24): p. 17408-19をも参照のこと。

【0122】

タンパク質の発現

本発明の抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン特異的結合分子をコードする核酸配列は、核酸構築物中に存在し得る。このような核酸構築物は、ベクター、例えば、発現ベクターの形態であってもよく、とりわけ、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば、細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、ウイルス、例えばバキュロウイルス、SV40等の、パポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ボックスウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスに由来するベクター、ならびに、例えばコスミドおよびファージミドなどの、プラスミドおよびバクテリオファージ遺伝エレメントに由来するものなどの、これらの組み合わせに由来するベクターが挙げられる。一般的に、宿主でポリペプチドを発現させるために核酸を維持、増殖または発現させるのに適した任意のベクターを、この点において発現のために使用することができる。

10

【0123】

核酸構築物は、適切には、核酸の発現を制御するプロモーターまたは他の調節配列を適切に含み得る。核酸の発現を制御するプロモーターおよび他の調節配列は、同定されており、当該分野で既知である。当業者は、プロモーター全体または他の調節配列を利用する必要がないかもしれないことを知っているであろう。最小限の必須調節エレメントのみが必要とされ、そして実際、このようなエレメントは、キメラ配列または他のプロモーターを構築するために使用され得る。もちろん、必須の要件は、組織および/または時間的特異性を保持することである。プロモーターは、任意の適切な既知のプロモーター（例えば、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、CMV即時初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40プロモーター、またはレトロウイルスLTRのプロモーター（例えば、ラウス肉腫ウイルス（RSV）のプロモーター）、およびメタロチオニンプロモーター（例えば、マウスメタロチオニン-Iプロモーター）であり得る。プロモーターは、プロモーター活性にかかわる（compromised for）最小限（TATAエレメントなど、必要であればエンハンサーエレメントを含まない）、例えばCMVプロモーターの最小配列を含んでもよい。好ましくは、プロモーターは核酸配列に隣接する。

20

30

【0124】

本明細書中に記載されるように、核酸構築物は、ベクターの形態であり得る。ベクターは、しばしば、それらでトランスフェクトされた（または形質転換された）細胞の選択を可能にし、好ましくは、異種DNAを組み込むベクターを含む細胞の選択を可能にする、1以上の発現マーカを含む。適切な開始および停止シグナルが一般的に存在するであろう。

40

【0125】

ベクターは、pETなどの任意の適切な発現ベクターであってもよい。ベクターは、必要であれば追加の制御配列、例えば、選択マーカー（例えば、抗生物質耐性、蛍光など）、転写制御配列およびプロモーター（開始配列および終結配列を含む）を含み得る。

【0126】

プロモーターは、本発明の核酸配列によってコードされるタンパク質の発現を引き起こすのに適切なプロモーター（例えば、CMVプロモーター、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ（hPGK）プロモーター）であり得る。

【0127】

このようなベクターは、宿主細胞中に存在し得る。本発明の核酸構築物の発現のための

50

適切な宿主細胞の代表的な例としては、ウイルスベクターへの核酸のカプセル化を可能にするウイルスパッケージング細胞(virus packaging cells); *Streptococci*、*Staphylococci*、*E. coli*、*Streptomyces* および *Bacillus subtilis* 等の、細菌細胞; 酵母細胞、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、および *Aspergillus* 細胞などの、単一細胞; *Drosophila* S2 細胞および *Spodoptera Sf9* 細胞などの、昆虫細胞、CHO、COS、C127、3T3、PHK.293、ならびに Bowes メラノーマ細胞および他の適切なヒト細胞などの、動物細胞; ならびに植物細胞、例えば、*Arabidopsis thaliana* が挙げられる。適切には、宿主細胞は、CHO 細胞または HEK293 細胞などの、真核細胞である。

10

【0128】

宿主細胞への発現ベクターの導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、カチオン-脂質媒介トランスフェクション(cationic-lipid-mediated transfection)、エレクトロポレーション、トランスダクション、スクレーブロード(scrape loading)、弾道導入(ballistic introduction)、感染または他の方法によって達成され得る。このような方法は、Sambrook et al, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)などの、多くの標準的な実験室マニュアルに記載されている。

20

【0129】

成熟タンパク質は、適切なプロモーターの制御下で、哺乳動物細胞(CHO細胞、酵母、細菌、または他の細胞など)などの宿主細胞で発現され得る。無細胞翻訳系を用いて、本発明の第3の態様の核酸構築物に由来するRNAを用いてこのようなタンパク質を生産してもよい。原核生物および真核生物宿主と共に使用するための適切なクローニングおよび発現ベクターは、Sambrook et al, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)に記載される。

【0130】

本発明はまた、本明細書中に記載される本発明のポリヌクレオチドおよび/またはベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。本発明によれば、本発明の抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン特異的結合分子の製造方法であって、本明細書に規定されるように適切な宿主細胞中で前記分子をコードする核酸配列を発現させる工程を含む方法が提供される。

30

【0131】

タンパク質は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、レクチンおよび/またはヘパリンクロマトグラフィーを含む標準的な方法によって組換え細胞培養物から回収および精製することができる。治療を目的として、例えば、組換えベクターの形態の、核酸構築物を、Sambrook et al, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)に記載されるようなカラムクロマトグラフィー手段によるなどの、当技術分野で既知の技術によって精製することができる。

40

【0132】

したがって、本発明のこの態様は、宿主細胞での発現による融合タンパク質の組換え的産生、ペプチド結合(peptide bond linkage)、水素もしくは塩結合または化学的架橋の手段による発現融合タンパク質の精製を含む、本発明の融合タンパク質の調製方法に及ぶ。本発明のこの態様のいくつかの実施形態において、融合タンパク質は、ペプチドが可能である水素もしくは塩結合または多量体化、例えば、二量体化もしくは三量体化を使用して調製することができる。

50

【0133】

抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン特異的結合分子は、本明細書に記載されるように分子の生産のためのプロセスの間の精製および/または単離を補助し得る使用前に切断される追加のN末端またはC末端配列を含んでもよい。例えば、分子のC末端の(A1a)₃(His)₆。

【0134】

いくつかの、例えば、5～10、または1～5、または1～3、2、1、または0のアミノ酸残基が任意の組み合わせで置換、欠失、または付加されるタンパク質のアミノ酸配列を有する変異体、類似体、誘導体および断片もまた、本発明に含まれる。本発明のタンパク質の特性および活性を変化させないサイレント置換、付加および欠失がこれらの中で特に好ましい。また、本発明のタンパク質の特性が元の形態と比較して変異形態で保存される保存的置換も、この点で特に好ましい。また、変異体としては、本発明に係る抗原特異的抗原結合分子を含む融合タンパク質がある。

10

【0135】

上記したように、本発明の変異体の例としては、1以上のアミノ酸が1以上の他のアミノ酸で置換されているタンパク質がある。当業者は、種々のアミノ酸が類似の特性を有することを知っている。物質の1以上のこのようなアミノ酸は、しばしば、その物質の所望の活性を妨害または排除することなく、1以上の他のこのようなアミノ酸によって置換され得る。このような置換は、「非保存的」アミノ酸置換(“non-conservative” amino acid substitutions)と呼ばれ得る。

20

【0136】

したがって、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンのアミノ酸は、しばしば、互いに置換され得る(脂肪族側鎖を有するアミノ酸)。これらの可能な置換のうち、グリシンおよびアラニンが互いに置換するために使用され(それらは比較的短い側鎖を有するため)、バリン、ロイシンおよびイソロイシンが互いに置換するために使用される(それらは疎水性であるより大きな脂肪族側鎖を有するため)ことが好ましい。しばしば互いに置換され得る他のアミノ酸としては、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン(芳香族側鎖を有するアミノ酸); リジン、アルギニンおよびヒスチジン(塩基性側鎖を有するアミノ酸); アスパラギン酸およびグルタミン酸(酸性側鎖を有するアミノ酸); アスパラギンおよびグルタミン(アミド側鎖を有するアミノ酸); ならびにシステインおよびメチオニン(硫黄含有側鎖を有するアミノ酸)が挙げられる。この性質の置換はしばしば、「保存的」または「半保存的」アミノ酸置換と呼ばれる。

30

【0137】

アミノ酸の欠失または挿入はまた、上記の融合タンパク質のアミノ酸配列に対してなされ得る。従って、例えば、ポリペプチドの活性に対して実質的な効果を有さないまたは少なくともこのような活性を排除しないアミノ酸は欠失され得る。このような欠失は、活性は維持したままポリペプチドの全長および分子量を減少させることができるので、有利であり得る。これにより、特定の目的に必要なポリペプチドの量を減少させることができる。例えば、用量レベルを減少させることができる。

【0138】

上記の融合タンパク質の配列に対するアミノ酸の挿入もまた、なされ得る。これは、本発明の物質の特性を変化させるために(例えば、融合タンパク質に関して上記で説明したように、同定、精製または発現を補助するために)行うことができる。

40

【0139】

本発明の融合タンパク質の配列に対するアミノ酸の変更は、適切な技術を使用して、例えば、部位特異的突然変異誘発を使用することによって、なされ得る。

【0140】

本発明の範囲に含まれるアミノ酸の置換または挿入は、天然に存在するまたは天然に存在しないアミノ酸を使用してなされ得ると理解されるべきである。天然または合成アミノ酸が使用されるか否かにかかわらず、L-アミノ酸のみが存在することが好ましい。

50

【 0 1 4 1 】

本発明に係るタンパク質は、N末端および/またはC末端アミノ酸配列をさらに有し得る。このような配列は種々の理由（例えば、グリコシル化）のために提供され得る。

【 0 1 4 2 】

融合タンパク質は、本発明の抗原特異的抗原結合分子が融合タンパク質に構造エレメントを提供する異種ペプチドまたはタンパク質配列に融合されてなり得る。他の実施形態では、融合タンパク質は、本発明の抗原特異的抗原結合分子が生物学的活性を有する分子と融合されてなり得る。この分子は、ペプチドもしくはタンパク質配列、または別の生物学的に活性な分子であり得る。

【 0 1 4 3 】

例えば、抗原特異的抗原結合分子は、ポリアミノ酸配列、例えば、複数のヒスチジン残基もしくは複数のリジン残基（適切には2、3、4、5、もしくは6残基）、または免疫グロブリンドメイン（例えば、Fcドメイン）であり得る異種ペプチド配列に融合され得る。

【 0 1 4 4 】

異種ペプチド配列への言及には、他の哺乳動物種（例えば、マウスおよびヒト）由来の配列、ならびに他のVNARドメインに由来する異種ペプチド配列が含まれる。

【 0 1 4 5 】

融合タンパク質が本発明の抗原特異的抗原結合分子が生物学的活性を有する分子と融合されてなる場合、生物学的に活性な部分は、酵素、免疫グロブリン、サイトカインまたはその断片のような生物学的活性を有するペプチドまたはタンパク質であり得る。あるいは、生物学的に活性な分子は、抗生物質、抗癌剤、NSAID、ステロイド、鎮痛剤、毒素または他の薬学的に活性な薬剤であり得る。抗癌剤には、細胞傷害性または細胞増殖抑制性の薬剤が含まれ得る。

【 0 1 4 6 】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、本発明の抗原特異的抗原結合分子が別の免疫グロブリン可変または定常領域、または本発明の別の抗原特異的抗原結合分子に融合されてなり得る。換言すれば、可変長の本発明の抗原特異的抗原結合分子、例えば、二量体、三量体、四量体、またはより高い多量体の融合体（すなわち、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、または十量体、またはそれ以上）。特定の実施形態では、これは単量体VNARサブユニットの多量体として表すことができる。

【 0 1 4 7 】

本発明の融合タンパク質において、抗原特異的抗原結合分子は、融合タンパク質の他のエレメントに、直接融合されてもまたはリンカー部分を介して連結されてもよい。リンカーは、ペプチド、ペプチド核酸、またはポリアミド結合であり得る。適切なペプチドリinkerとしては、(Gly)₄、(Gly)₅、(Gly)₄Ser、(Gly)₄(Ser)(Gly)₄、またはそれらの組み合わせもしくはそれらの多量体（例えば、二量体、三量体、四量体またはそれ以上）などの、複数のアミノ酸残基、例えば、4、5、6、7、8、9、10、15、20または25アミノ酸を含み得る。例えば、好適なリンカーは(GGGGS)₃であってもよい。別のリンカーとしては、(Ala)₃(His)₆またはその多量体が挙げられる。HGMPによって提供されるBLASTコンピュータープログラムのデフォルトパラメーターを使用して、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%の同一性を有する配列もまた含まれる。

【 0 1 4 8 】

本発明に従って記載されるように構築されたベクターは、増幅および/または発現のために宿主細胞に導入される。ベクターは、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿などの標準的な形質転換法を用いて宿主細胞に導入することができる。ベクターがウイルスのような感染性粒子である場合には、ベクター自体が宿主細胞への侵入を提供する。標準的な手順による遺伝子融合物をコードする複製可能な発現ベクターを含む宿主細胞のトランスフェクションおよびファージ粒子の産生により、融合タンパク質がファージ粒子

10

20

30

40

50

の表面上に提示されるファージ粒子が提供される。

【0149】

複製可能な発現ベクターは、種々の方法を用いて宿主細胞に導入される。一実施形態では、ベクターは以下を使用して細胞に導入され得る：必要であれば約37で約6～48時間（またはOD600 = 0.6～0.8になるまで）、標準的な培養プロセス中で培養して細胞を成育させた後、プロセスを遠心分離して上清を除去する（例えば、デカントする）。最初の精製は、好ましくは緩衝溶液（例えば、1.0 mM HEPES pH 7.4）中で細胞ペレットを再懸濁した後、再遠心分離および上清除去を行うことによる。得られた細胞ペレットを希釈グリセロール（例えば、5～20% v/v）に再懸濁し、再び遠心分離して、細胞ペレットを形成し、上清を除去する。最終細胞濃度は、細胞ペレットを水または希釈グリセロール中に所望の濃度になるように再懸濁することによって得られる。

10

【0150】

エレクトロポレーション中により高いDNA濃度（約10倍）を使用することにより、形質転換効率を増加させ、宿主細胞に形質転換されるDNAの量を増加させる。また、高い細胞濃度を使用することにより、効率を増加させる（約10倍）。移入されたDNAの量が多いほど、より大きな多様性を有し、コンビナトリアルライブラリーのより多数の独特なメンバーを表すより大きなライブラリーが生成される。形質転換された細胞は、一般的に、抗生物質含有培地で成育することにより選択される。

20

【0151】

医薬組成物および用途

本発明によれば、本発明の抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン特異的結合分子の医薬組成物が提供される。このような組成物は、前記抗原特異的抗原結合分子を含む融合タンパク質を含む。

【0152】

医薬組成物はまた、治療用タンパク質に融合された本発明の抗原特異的抗原結合分子、またはその断片を含んでもよい。治療用タンパク質は、ホルモン、成長因子（例えば、TGF、上皮成長因子（EGF）、血小板由来成長因子（PDGF）、神経成長因子（NGF）、コロニー刺激因子（CSF）、肝細胞成長因子、インスリン様成長因子、胎盤成長因子）；分化因子；血液凝固因子（例えば、第V因子、第VII因子、第IX因子、フォンウィレブランド因子（VonWillebrand Factor）またはプロテインC）；または血液凝固カスケード由来の別のタンパク質（例えば、アンチトロンビン）；サイトカイン、例えば、インターロイキン（例えば、IL1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32もしくはIL-33）、またはインターフェロン（例えば、IFN-、IFN-およびIFN-）、腫瘍壊死因子（TNF）、IFN-誘導因子（IGIF）、骨形態形成タンパク質（BMP、例えば、BMP-1、BMP-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12、BMP-13）；インターロイキンレセプターアンタゴニスト（例えば、IL-1ra、IL-RII）；ケモカイン（例えば、MIP（マクロファージ炎症性タンパク質）、例えば、MIP1およびMIP1；MCP（単球走化性タンパク質）、例えば、MCP1、2または3；RANTES（活性化、正常なT細胞の発現と分泌で調節（regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted））；栄養因子；サイトカインインヒビター；サイトカインレセプター；酵素、例えば、フリーラジカル捕捉酵素（free-radical scavenging enzyme）、例えば、スーパーオキシドジスムターゼまたはカタラーゼまたはプロドラッグ変換酵素（例えば、アンジオテンシン変換酵素、デアミナーゼ、デヒドロゲナーゼ、レダクターゼ、キナーゼおよびホスファターゼ）；ペプチド模倣体

30

40

50

(peptide mimetic) ; プロテアーゼインヒビター ; メタロプロテイナーゼの組織インヒビター (T I M P 、例えば、T I M P 1、T I M P 2、T I M P 3またはT I M P 4) またはセルピン (serpin) (セリンプロテアーゼのインヒビター) であってもよい。

【 0 1 5 3 】

本発明の他の実施形態では、融合タンパク質中の治療用タンパク質は、抗体、または F a b、F c、F (a b ')₂ (化学的に連結された F (a b ')₂ 鎖を含む)、F a b '、s c F v (その多量体形態、すなわち、d i - s c F v、または t r i - s c F v を含む)、s d A b、または B i T E (二重特異性 T 細胞エンゲージャー) などの、その操作された断片であってもよい。抗体断片はまた、可変ドメインおよびその断片、ならびに他の V N A R 型断片 (I g N A R 分子) を含む。

10

【 0 1 5 4 】

医薬組成物は、多数の本発明の抗原特異的抗原結合分子、例えば、二量体、三量体、またはより高次の多量体、すなわち、2、3、4、5、6、7、または8量体が治療用タンパク質に融合されて構成され得る。

【 0 1 5 5 】

本発明の抗原特異的抗原結合分子の治療用タンパク質への融合は、タンパク質上の任意の好都合な部位で行われてもよく、N - 末端、C - 末端および / または N - / C - 末端融合であってもよい。本発明の一実施形態では、本発明の抗原特異的抗原結合分子の融合は、治療タンパク質の N 末端および C 末端の両方に対するものである。

20

【 0 1 5 6 】

本発明の医薬組成物は、適切かつ薬学的に許容できる担体、希釈剤、アジュバントまたは緩衝溶液を含み得る。組成物は、さらなる薬学的に活性のある薬剤を含み得る。そのような担体としては、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、リボソーム、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組み合わせが挙げられ得るが、これらに限定されない。

【 0 1 5 7 】

このような組成物は、示されるような追加の薬学的に活性のある薬剤を含み得る。追加の薬剤は、治療化合物、例えば、抗炎症薬、細胞傷害剤、細胞増殖抑制剤または抗生物質であってもよい。そのような追加の薬剤はそれを必要とする患者への投与に適した形態で存在してもよく、そのような投与は同時、別々、または連続であってもよい。成分は、必要に応じて説明書を含むことができるキットの形態で調製されてもよい。

30

【 0 1 5 8 】

医薬組成物は、例えば、とりわけ、経口、局所、静脈内、筋肉内、鼻腔内、または皮内経路による投与を含む、患者の疾患を治療するのに有効な任意の有効で便利な様式で投与することができる。治療においてまたは予防として、活性のある薬剤は、注射可能な組成物として、例えば、好ましくは等張の、無菌水性分散液として個体に投与され得る。

【 0 1 5 9 】

哺乳動物、特にヒトへの投与のために、活性のある薬剤の1日の用量は、0 . 0 1 m g / k g 体重以上、典型的には約 1 m g / k g 以上、2 m g / k g 以上または 4 m g / k g 以下であると予想される。いずれにせよ、医師が個体に最も適した実際の投薬量を決定するが、この量は個体の年齢、体重、性別および応答を含む因子に依存するであろう。上記の用量は、平均的な場合の例示である。もちろん、より高い用量またはより低い用量が有益である場合もあり得、そのような場合も本発明の範囲内である。

40

【 0 1 6 0 】

本発明によれば、医薬に使用するための本発明の抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン特異的結合分子が提供される。したがって、本発明のこの態様は、それを必要とする患者における疾患の治療のための医薬の製造における本発明の抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン特異的結合分子のそのような使用に及ぶ。本発明の抗原特異的抗原結合分子はまた、本発明の薬剤組成物に関連して上記で規定されるような特異的結合分子を含む融合タンパク質を調製するために使用できる。

50

【0161】

このような使用はまた、治療を必要とする患者における疾患の治療方法であって、本発明の抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン特異的結合分子を含む本明細書中に規定されるような医薬組成物の治療的に有効な投薬量を患者に投与することを含む方法を包含する。

【0162】

本明細書で使用される「治療(treatment)」という用語は、ヒトまたは非ヒト動物に利益を与えることができる任意のレジメを含む。獣医学における「非ヒト動物」の治療は、ウマを含む家畜およびコンパニオンアニマル(例えば、ネコおよびイヌ)およびヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシおよびウマ科のメンバーを含む農場/農業動物の治療に及ぶ。治療は、現在の症状(condition)または障害(disorder)に関する治療的処置であっても、または予防(予防的処置)であってもよい。治療は、遺伝性または後天性病気の治療であってもよい。治療は、急性または慢性状態の治療であってもよい。治療は、炎症および/または癌に関連する症状/障害であってもよい。本発明の抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン特異的結合分子は、変形性関節症、強皮症、腎疾患、関節リウマチ、炎症性腸疾患、多発性硬化症、アテローム性動脈硬化症、または任意の炎症性疾患を含むがこれらに限定されない障害の処置に使用され得る。

【0163】

本発明の抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン特異的結合分子はまた、患者における疾患状態の性質を調べるために使用され得る。抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン特異的結合分子は、X線、ガンマ線、またはPETスキャンニングなどの画像診断技術(imaging techniques)を用いて被検体の身体における疾患部位の画像を調製するために使用され得る。したがって、本発明は、適切に検出可能に標識された抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン特異的結合分子を被検体に投与し、続いて被検体の身体をスキャンすることを含む、被検体における疾患の部位を画像診断する(imaging)方法に及ぶことができる。あるいは、被検体に前記分子を投与することにより、分子の投与後に被検体からのサンプルを分析することによって、試験結果が得られ得る。このような実施形態は、本発明の抗原特異的抗原結合分子またはマルチドメイン特異的結合分子の投与を含む、被検体における病気(disease)または医学的状态の診断方法を含み得る。本発明のマルチドメイン特異的結合分子は、特に同じ抗原上の異なるエピトープを標的とする複数のVNARが使用される場合に、診断感度に関して特に有用であり得る。

【0164】

結合の測定

標的へのVNARの結合の検出および測定は、ELISAおよび表面プラズモン共鳴などの当該分野で周知の多くの方法で測定することができる。

【0165】

機能活性

本発明のVNARは、サイトカインなどの分子への結合及び当該分子の生物学的効果の中和、リガンド結合を妨げるレセプターへの結合、または結合後の生物学的効果を引き起こすことを含む、多くの方法で機能し得る。

【0166】

結合ドメインの機能的活性を測定する方法は、当該分野で知られている。

【0167】

以下の非限定的な実施例によって、本発明をさらに詳細に説明する。

【0168】

実施例1：特異的抗原結合VNARの単離

A. TNF結合VNAR

免疫処置および選択

コモリザメ(Nurse sharks) [Ginglymostoma cirratum] を、0.1% (w/v) トリカインメタンスルホネート(tricaine methanesulfonate) [MS-

10

20

30

40

50

222]を含む人工海水を含有する容器に入れた。所望のレベルの麻酔を行った後、コモリザメを免疫処置または採血(bleeding)のため取り出した。完全フロイントアジュバント[C F A]中に乳化させたh T N F [250 μ g]を、20ゲージ針を用いてサメの横ひれ(lateral fin)に注射した。リン酸緩衝生理食塩水(P B S)における可溶性抗原[試料0.45 μ M滅菌濾過]として、ブーストを4週間隔で尾静脈に静脈内投与した。血液サンプルを、尾静脈から200 μ lのブタヘパリン[P B S 中1000 U / m l]を含む30mlシリンジ中に集めた。血液サンプルを2000 rpmで10分間遠心して、血漿から血液細胞を分離した。血漿上清画分を、R N A安定化緩衝液を含む滅菌チューブ中に注意深く除去し、-80 で保存した。

【0169】

サメ血清中のh T N F 特異的I g N A Rの検出

E L I S Aプレートを1 μ g / m lのr h T N F でコーティングし、37 で1時間インキュベートした後、4% (w / v) M P B S 中で37 で1時間ブロッキングした。サメ血清[プレブリード(pre-bleed)、ブリード4および5]を、1 : 2希釈系列で所定のウェルに添加し、37 で1時間インキュベートした。プレートを、P B S 中で1 : 200の希釈率で100 μ l / ウェルの精製抗コモリザメ(Nurse shark) I g N A Rモノクローナル抗体[G A 8]と共にインキュベートした。結合シグナルは0.1% (v / v) T w e e n - 20 P B S (P B S T) 中で1 : 2000の希釈率で抗マウスI g G - H R Pを添加することによって生成し、室温で1時間インキュベートした。プレートを、各工程後にP B S Tで3回洗浄し、抗マウスI g G - 西洋ワサビペルオキシダーゼ(H R P)結合抗体[S i g m a]とのインキュベーション後にさらに3回P B Sで洗浄した。S u r e B l u e T M Bマイクロウェルペルオキシダーゼ基質(SureBlue TMB Microwell Peroxidase Substrate) [T h e r m o S c i e n t i f i c]を添加することによってプレートを発色させ、1 M H_2SO_4 で反応を停止させ、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの波長で吸光度を測定した。

【0170】

各追加免疫(boost)後に得られた血清を用いて結合性E L I S A (binding ELISA)によって、各免疫処置追加免疫(immunisation boost)後のr h T N F 特異的I g N A R応答を測定した。P B S 中のハイブリドーマ組織培養上清として希釈した、マウスモノクローナル抗コモリザメI g N A R抗体であるG A 8を検出抗体として使用した(Haines et al., 2005; Muller, et al. 2012)。結果から、ブリード4および5に示されるように、免疫処置後は経時的にI g N A Rが増加する説得力のある傾向が示され、また、プレブリードサンプルにおいて見られるバックグラウンド応答から、免疫処置前には有意なr h T N F 特異的I g N A R応答がないことが示唆された[図1]。

【0171】

P B Lからの全R N A単離およびP C R増幅

末梢血リンパ球[P B L]を、I g N A R応答が最もよかったブリード[ブリード5]の血漿から採取し、全R N Aを調製した。集めたP B Lからの全R N Aを、Superscript III First strand synthesis supermix [Invitrogen]を用いてc D N A合成用の鋳型として約2 μ g / μ lで使用した。フレームワーク特異的プライマーである、N A R F 4 F o r 1 [5' - A T A A T C A A G C T T G C G G C C G C A T T C A C A G T C A C G A C A G T G C C A C C T C - 3'] (配列番号74)およびN A R F 4 F o r 2 [5' - A T A A T C A A G C T T G C G G C C G C A T T C A C A G T C A C G G C A G T G C C A T C T C - 3'] (配列番号75)を用いて、c D N Aを得た(Dooley, H., et al, Mol. Immunol, 2003. 40(1): p. 25-33を参照のこと)。c D N A合成後、共通フレームワークワン特異的プライマー(common framework one specific primer)である、N A R F 1 R e v [5' - A T A A T A A G G A A T T C C A T G G C T C G A G T G G A C C A A A C A C C G - 3'] (配列番号76)を導入し、3段階ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)増幅プロトコールを用いてI g N A R V領域D N Aを増幅した。得られた約4

10

20

30

40

50

00塩基対のPCR産物を1.5%アガロースゲルで泳動し、NAR V領域を切り出し、精製した[QIAquick purification kit, QIAGEN]。精製したDNAを、制限酵素NcoIおよびNotI[New England Biolabs]を用いてプライマーコード制限部位[下線]で消化し、再精製した。

【0172】

ライブラリー構築

ファージミドベクターpHEN2を制限酵素NcoIおよびNotIで消化し、PCR精製し[QIAquick PCR purification]、同様に調製したPCR産物に連結した。連結した材料を、エレクトロポレーション-コンピテント大腸菌TG1細胞(Electroporation-competent E. coli TG1 cells)[Lucigen]に形質転換した。形質転換細胞を、2%グルコース[w/v]、100μg/mlアンピシリンを含有するTYE寒天プレート上に播種し、37℃で一晩成育させた。ライブラリーサイズを計算し、コロニーをプレートから掻き取り、ライブラリーストックのアリコートをして-80℃で保存した。

10

【0173】

ファージディスプレイの選択

OD₆₀₀が0.1に相当するライブラリーストックの単一アリコートを、2%グルコース[w/v]、100μg/mlアンピシリンを含有する2×TY増殖培地に添加し、37℃で対数中期[OD₆₀₀が0.4~0.6]になるまで増殖させた後、M13KO7ヘルパーファージ[New England Biolabs]で感染させた。ライブラリーの発現を、2×TY培地、0.2%グルコース、100μg/mlアンピシリンおよび50μg/mlカナマイシン中で、30℃で一晩行った。ファージをポリエチレングリコール(PEG)で培養上清から沈殿させ、バイオパニング(bio-panning)に使用した。ライブラリーを、Dynabeads(登録商標)M-280ストレプトアビジンビーズ[Dynabeads, Invitrogen]上に捕捉されたビオチン化rhTNF α に対してパニングした。ライブラリファージおよびDynabeads(登録商標)M-280ストレプトアビジンビーズを、別々に、室温で回転させながら、ブロック液[PBSにおいて、3%(w/v)ミルク、1%(w/v)BSA]で1時間予めブロックした。ビオチン化-rhTNF α [400nM]をブロックしたビーズに添加し、室温で回転させながら1時間インキュベートした。異なるチューブにおいて、ライブラリーファージを、予めブロックしたストレプトアビジンビーズと共に、室温で1時間回転させながらインキュベートした。Dynabeads磁気ラック(Dynabeads magnetic rack)を用いて非結合ファージを回収し、回収したファージをここでは非選択ファージと呼ぶ。室温で回転させながら、1時間、ブロックされたビーズと一緒にインキュベートすることにより、ファージを選択解除した(deselected)。ビオチン-rhTNF α 修飾ビーズを、室温で回転させながら、非選択ファージと1時間インキュベートした。ビーズを5×PBSTおよび5×PBSで洗浄した後、100mMトリエチルアミン(TEA)400μlで厳密に8分間溶出し、1M Tris-HCl(pH 7.5)200μlを添加することによって中和した。対数中期の大腸菌TG1細胞[10ml]を、37℃で30分間、400μlの溶出ファージで感染させた。次に、2%グルコース(w/v)、100μg/mlアンピシリンを含有するTYE寒天プレート上で37℃で一晩増殖させた。さらに3ラウンドの選択を行い、ビオチン-rhTNF α の濃度を200nMに低下させることにより、ラウンド3および4においてストリンジェンシーを増加させた。

20

30

40

【0174】

クローンのスクリーニングおよび選択

抗原結合モノクローナルファージの富化を、4%[w/v]ミルク-PBSでブロックした、1μg/mlのrhTNF α でコーティングしたELISAプレートを用いて評価した。結合は、抗M13-HRP結合モノクローナル抗体[GE Healthcare]を用いて検出した。また、ストレプトアビジンおよびHSA被覆ELISAプレートに対する選択性および特異性について、それぞれモノクローナルファージを分析した。

【0175】

50

ライブラリーを $r h T N F$ に対する 4 回の反復パニングに供した。バイオパニング抗原濃度はラウンド 1 およびラウンド 2 では一定に保ったが、高親和性バインダーを優先するために、次のラウンドのパニングでは半減した。陽性モノクローナルファージ結合体の富化(Enrichment)を、E L I S A による $r h T N F$ 結合に関するバイオパニングの各ラウンドの終わりに評価した。予め選択されたクローンからラウンド 2 までは抗原結合の着実な増加が観察され、ラウンド 3 および 4 後にモノクローナルファージ結合体の数が減少した。 $r h T N F$ モノクローナル結合体は、ラウンド 0 [予め選択されたライブラリ] での約 6 % [1 1 / 1 8 4] からラウンド 2 後の 9 9 . 4 6 % [1 8 3 / 1 8 4] にまで増加した。

【 0 1 7 6 】

10

ライブラリーパニングから多数のユニークな配列が同定された。これらには、D 1、C 4 および B 4 と称される V N A R がある。

【 0 1 7 7 】

【 化 2 3 】

	FW1	CDR1	FW2	HV2
D1	ARVDQTPQTITKETGESLTIN <u>C</u> VLRDS	H <u>C</u> ATSS	TYWYRKKSGS	TNEESISKG
C4	ARVDQTPQTITKETGESLTIN <u>C</u> VLRDS	N <u>C</u> GLSS	TYWYRKKSGS	TNEESISKG
B4	ARVDQTPQTITKETGESLTIN <u>C</u> VLRDS	N <u>C</u> ALSS	MYWYRKKSGS	TNEESISKG

20

	FW3a	HV4	FW3b
D1	GRYVETVN	SGSKS	FSLRINDLTVEDSGTYR <u>C</u> AS
C4	GRYVETIN	EGSKS	FSLRINDLTVEDSGTYR <u>C</u> KL
B4	GRYVETVN	SGSKS	FSLRINDLTVEDSGTYR <u>C</u> KV

	CDR3	FW4	
D1	E <u>C</u> QYGLAEY_____DV	YGGGTVVTVN	配列番号 2
C4	SWWTQNWR <u>C</u> SNS_____DV	YGGGTVVTVN	配列番号 7
B4	YIPC <u>I</u> DELVYMISGGTSGPIH_DV	YGGGTVVTVN	配列番号 12

30

【 0 1 7 8 】

C D R 1 および C D R 3 におけるシステイン (C) 残基 (二重下線) は、タイプ I I V N A R に典型的であり、F W 1 および F W 3 b におけるシステイン (一重下線) 間の標準的な免疫グロブリンスーパーファミリー架橋 (canonical Immunoglobulin superfamily bridge) に加えて第 2 のジスルフィド架橋を形成することが観察される。

【 0 1 7 9 】

T N F に結合する V N A R の発現

S H u f f l e 細胞の細胞質における可溶性 V N A R タンパク質の調製

モノクローナルファージスクリーニングから同定された目的の I g N A R V 領域インサートを、X b a I および E c o R I 制限酵素部位を介して発現ベクター p E T 2 8 b (+) (Novagen) にクローニングした。V N A R D N A を (Q I A p r e p m i n i p r e p k i t , Q I A G E N を用いて) 大腸菌 T G 1 培養物から調製し、i n - h o u s e d e s i g n e d p r i m e r p a i r X b a I _ _ N A R F W 1 _ _ # 1 2 7 (配列番号 2 6) および E c o R I _ _ s t o p _ _ m y c _ _ # 1 2 9 (配列番号 2 9) を用いて P C R 増幅して、それぞれクローニング部位 X b a I および E c o R I を導入する一方、プライマー配列番号 2 9 を組み込んだ c - m y c (p r i m e r S E Q I D 2 9 i n c o r p o r a t e d c - m y c) 、 6 x ヒスチジンタグおよび終止コドン V N A R 遺伝子配列に導入した。精製した V N A R D N A P C R 産物および p E T 2 8 b (+) プラスミド D N A を、5 0 U X b a I および 1 0 U E c o R I - H F で、3 7 で 2 時間消化した。消化サンプルを精製し、ライゲーションし、エレクトロコンピテン大腸菌 S H u f f l e (登録商標) T 7 E x p r e s s 細胞 [N

40

50

ew England Biolabs]に形質転換し、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンを含むTYE寒天プレート上で選択した。VNAR抗hTNF- α D1、C4およびB4融合タンパク質を、30でのIPTGでの誘導に際してSHuffle(登録商標)細胞の細胞質において発現させた。細胞を遠心分離によって回収し、細胞ペレットをBugbuster(商標)タンパク質抽出試薬[Novagen]で処理して、細胞を溶解し、可溶性タンパク質を放出させた。VNAR可溶性タンパク質を、ヘキサ-ヒスチジンテールを介して固定化金属アフィニティークロマトグラフィー[IMAC]によって精製し、 500 mM イミダゾール、 $\text{pH} 8$ でIMAC樹脂から溶出させた。タンパク質サンプルを、使用前にPBS($\text{pH} 7.4$)で透析した。タンパク質濃度をUltraspec 6300 pro UV/Visible spectrophotometer [Amersham, Biosciences]を用いて測定した。全精製タンパク質をクーマシーブルー染色SDS-PAGEで可視化した。精製されたVNAR単量体タンパク質は約 14 kDa の単一バンド[ヘキサヒスチジンおよびc-mycタグを含む]として移動し、タンパク質凝集は認められなかった。SDS-PAGEゲルに基づく純度は約90%と推定された。

10

【0180】

タンパク質の完全性および純度の決定

変性ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動[SDS-PAGE]を用いて、精製タンパク質の純度およびサイズを評価した。タンパク質サンプルを、5%-メルカプトエタノールを含有するNuPAGE(登録商標)LD5サンプルバッファー[Life Technologies]中で調製し、95に5分間加熱した。変性タンパク質サンプルを、MES-SDS泳動緩衝液に浸漬したNuPAGE(登録商標)4~12% Bis-Trisゲル[Life Technologies]上にのせ、電気泳動を、160ボルトで55分間行った。全範囲の組換えタンパク質分子量マーカー[GE Healthcare]を分子量ラダー標準物質として使用した。ゲルを蒸留水で洗浄し、クーマシーブルーで1時間染色した後、蒸留水中で一晩脱染色した。

20

【0181】

選択性および特異性の決定

結合の特異性および選択性を、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ビオチン-TNFおよびrhTNF、または $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ HSA、BSA、ストレプトアビジン、一本鎖DNA、サイクログロブリンもしくはリゾチームのいずれかで被覆したELISAプレートで測定した。ELISAプレートを4%[w/v]%のミルク-PBSで適切にブロッキングし、タンパク質サンプルを $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のトップ濃度でのせ、系列希釈を行った。抗c-myc-HRP結合モノクローナル抗体[Roche]を用いて、結合を検出した。

30

【0182】

また、より正確な結合データを得るために、BIAcore T200またはOctet RED96機器による表面プラズモン共鳴を用いて、特定の分子を測定した。

【0183】

BIAcoreTM T200 (GE Healthcare)

アミンカップリングは、リガンドをチップ表面に固定化するための非常に一般的なアプローチである。チップ表面は、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)および1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)による活性化後、リガンド上の利用可能な第一級アミン基(例えば、リジン)を介してリガンドを共有結合捕捉(covalent capturing)できる反応性スクシンイミドエステルを形成するカルボキシル基で誘導体化されたデキストランマトリックスを有する。

40

【0184】

TNFを 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液($\text{pH} 5.5$)で1/10倍に希釈し、活性化チップに注入した。「エイムフォー」ソフトウェア固定化ウィザード(“aim for” software immobilisation wizard)または特定の期間を使用して、200RUの固定化TNFを目指して(aim for)もよい。さらに、おそらく界面活性剤がリガンド活性に影響を及ぼし得ると考えられるので、泳動緩衝液を0.05% Tween 20が存在しないPBSに変更した。202RUの最終リガンド固定化レベルが得られた。

50

【0185】

スタートアップサイクルは、 $30\ \mu\text{l}$ /分の流速での60秒の緩衝液注入、続いて30秒の解離期間から構成された。抗TNF サンプルサイクルは、サンプルを $30\ \mu\text{l}$ /分で120秒注入した後、 $10\ \text{mM}$ グリシン(pH 2)を $30\ \mu\text{l}$ /分で60秒注入する再生工程を含んだ。最後に、次のサイクルを開始する前に、ベースライン平衡を可能にするために、各サイクルの終わりに120秒の安定化期間を含めた。

【0186】

スクリーニングした濃度系列および解離期間は可変であり、以下の通りであった：解離時間が600秒であったすべての単量体ドメインD1、C4、B4、TNF43およびTNF30を除いて、すべてのサンプルを、 $100\ \text{nM}$ のトップスタート濃度および1200秒解離時間でアッセイした。B4およびTNF43 VNARを、それぞれ $500\ \text{nM}$ および $5\ \mu\text{M}$ のトップスタート濃度でアッセイした。5つのブランクサンプルサイクルを含めて、二重参照データセットを生成するために使用した。

10

【0187】

ドメインに対する結合応答を、BIAcore(商標)T200評価ソフトウェアを使用して分析し、二重参照データを1:1ラングミュアモデルに適合させて、動力学および親和性の特徴を得た。

【0188】

OCTET(登録商標) RED96[Fortebio(商標)]

バイオレイヤ干渉法(Biolayer interferometry)(BLI)を用いて、平衡解離定数(K_D)を決定した。ディップアンドリードストレプトアビジンバイオセンサー(Dip and read streptavidin biosensors)を、PBS(pH 7.4)中で少なくとも30分間再水和した。センサーに $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のビオチン化hTNF- α をのせ、抗TNF- α VNARタンパク質を $100\ \text{nM}$ のトップ濃度で連続希釈し、一方、TNF43およびVNAR陰性対照を $1\ \mu\text{M}$ のトップ濃度でアッセイした。結合会合(Binding association)を10分間モニターし、続いて5分間の解離時間をモニターした。すべての抗TNF- α VNAR測定について、カーブフィットデータが複雑な多相曲線を示したので、動態データセットを2部位モデル(two-site model)を用いてフィッティングしたが、対照の抗TNF- α ナノボディ、TNF30については、質量輸送モデル(Mass Transport model)での1:1ラングミュア結合を用いた。

20

30

【0189】

得られたデータを表1に示す。表1から、試験した単量体VNARがTNF43 VNARと比較して、TNF- α に対して少なくとも500倍低い結合親和性を有することを示す。

【0190】

【表 1】

結合分子	K_a ($M^{-1}S^{-1}$)	K_d (S^{-1})	KD 【BIAcore T200】	KD [Octet ForteBio]
D1	1. 2E+03	2. 06E-02	50nM	1. 9nM
C4	2. 8E+05	3. 3E-02	70nM	6. 4nM
TNF30 VHH	5E+04	1. 6E-07	16nM	N/A
TNF43 VNAR	非常に弱い親和性 ー結合データは得られなかった。 試験した最高濃度 500nM			>1000nM
BB10	陰性対照ー結合データは得られなかった			>1000nM
D1-D1	5E+05	3. 16E-04	n/a	0. 6nM
D1-C4	1. 8E+05	1. 07E-04	5nM	0. 17nM
D1-B4	2. 7E+05	5E-04	n/a	15. 9nM
TNF30-TNF30	3E+04	3E-05	n/a	0. 4nM
D1-BA11-D1	1. 9E+06	2E-04	4nM	0. 1nM
D1-BA11-C4	2E+05	1. 6E-04	0. 6nM	0. 13nM
D1-BA11-B4	1. 7E+06	6E-03	n/a	0. 33nM
TNF30-BA11-TNF30	9E+04	1. 5E-05	0. 4nM	0. 38nM

表1:TNF VNAR SPR 結合データ

【0191】

インビトロでの中和試験

VNARドメインに関する中和能力および ND_{50} を決定するために、マウス線維肉腫細胞株L929 [ATCC、CCL-1]を、10%熱不活化ウシ胎仔血清[GIBCO]および $1 \mu g/ml$ アクチノマイシンD[R & D systems]を補充したダルベッコ改変イーグル培地[GIBCO]中で育成させた。それぞれのVNARクローンについて、1ウェルあたり5,000個の細胞を、5%の CO_2 および湿気を用いて、37℃で24時間、96ウェルプレート中で二連でインキュベートした。 LD_{50} [$0.25 ng/ml$ で $1 \times$]および $10 \times LD_{50}$ [$2.5 ng/ml$]の $rhTNF$ を、連続希釈したVNARタンパク質または細胞単独のいずれかを含むウェルに添加した。次いで、プレートを37℃で24時間、5%の CO_2 および湿気でインキュベートした。50 μL の1:20希釈WST-1細胞増殖剤[Roche]を添加し、5% CO_2 および湿気で37℃で4~8時間インキュベートすることによって、細胞毒性または細胞生存を測定した。吸光度を450~560nmで読み取った。

【0192】

$1 \mu g/ml$ のアクチノマイシンDの存在下でのTNFは、L929線維肉腫細胞において細胞毒性を引き起こし、この際、 LD_{50} は $0.25 \sim 0.3 ng/ml$ である。我々は、ナノモル濃度でのVNARタンパク質ドメインが $rhTNF$ の LD_{50} を最大10倍中和することができることを示した[図3]。この実験では、対照抗TNF抗体MAB210と比較するための二価分子を形成するために、VNARのC末端をペプチドリinkerによってIgG Fcドメインに結合させた。

【0193】

中和アッセイにおいて単ドメインとして測定した場合、D1およびC4 VNARは、TNF30 VHHナノボディほど有効ではなかった(図2)。これは、単一部位結合親和性と相関すると考えられる。しかしながら、混合物(図3)としてまたは二価もしくは二重特異性フォーマット(図xxxx)で組み合わせた場合、予想できなかったことに、

それらは二量体TNF30 VHHナノボディを超える改善された特性を示した。

【0194】

傍細胞フラックスアッセイ(Paracellular flux assay)

ヒト上皮結腸直腸腺癌細胞(Caco-2)を、10(% v/v)熱不活性化FBSおよび1(% v/v)ペニシリン-ストレプトマイシン(それぞれ、10,000単位/mlおよび10,000μg/ml)を補充したDMEM中で培養した。細胞をT75フラスコ中で90%コンフルエンスまで増殖させた後、24ウェルの0.4μm半透過性組織培養トランスウェルインサート(semipermeable tissue culture transwell inserts)(Corning Inc.)に播種した。10μlの細胞懸濁液を90μlの0.4%トリパンブルー排除色素(trypan blue exclusion dye)(Beckman Coulter)に懸濁し、カバースリップを取り付けた血球計上に混合物を注意深く移すことによって、生存細胞数を測定した。

【0195】

生存細胞数を測定した後、トランスウェルインサート当たり 1×10^5 個の細胞を100μlの最終DMEM容積に播種する一方、細胞を含まない600μlのDMEMを外側含有ウェル(outer containing wells)に移した。トランスウェルプレートを、5(% v/v)CO₂で37℃でインキュベートし、この際、使用済みのDMEM+10(% v/v)FBSを48時間毎に交換した。細胞増殖を、細胞が100%コンフルエンスに達するまで(通常、播種後5~7日間)、位相差顕微鏡(倍率40倍の対物レンズ)下でモニターした。Caco-2細胞をさらに21日間増殖させて分化させ、この際、使用済みの培地を分化まで48時間毎に交換した。

【0196】

10(% v/v)HI-FBSを含む100μlのDMEM中に極性を有する細胞(polarized cells)(頂端側(apical side))を含有する所定のインサートウェルを、抗TNF VNA Rタンパク質を含むまたは含まない10ng/mlのhTNF、IFN、LPSで処理した。処理細胞を、5(% v/v)CO₂で37℃で18時間インキュベートした。サイトカイン±抗TNF VNA Rと共に18時間インキュベートした後、処理細胞の位相差画像を得、続いて、Caco-2単層の頂端側(apical side)(インサートウェル)に5μlの10mg/mlフルオレセインイソチオシアネート標識デキストラン、分子量(3~5kDa)を添加した。FITC-デキストランを添加してから24時間後に、トランスウェルチャンバーの基底外側(basolateral side)の培地を回収した。

【0197】

蛍光強度を、Synergy HT(BioTek(登録商標))マイクロプレートリーダーを使用して、485nm励起および520nm発光波長で測定した。

【0198】

上皮抵抗性機能不全アッセイ

ヒト上皮結腸直腸腺癌細胞(Caco-2)を、10(% v/v)熱不活性化FBSおよび1(% v/v)ペニシリン-ストレプトマイシン(それぞれ、10,000単位/mlおよび10,000μg/ml)を補充したDMEM中で培養した。細胞をT75フラスコ中で90%コンフルエンスになるまで増殖させた後、12または24ウェルの0.4μm半透過性組織培養トランスウェルインサート(semipermeable tissue culture transwell inserts)(Corning Inc.)に播種した。細胞が完全に分化するまで、前記プロトコールと同様に行った。

【0199】

10(% v/v)HI-FBSを含む100μlのDMEM中に極性を有する細胞(polarized cells)(頂端側(apical side))を含有する所定のインサートウェルを、抗TNF VNA Rタンパク質を含むまたは含まない10ng/mlのhTNF、およびIFNで処理した。処理細胞を、5(% v/v)CO₂および湿気で37℃で24時間インキュベートした。サイトカイン±抗TNF VNA Rと共に24時間インキュベートした後、上皮間電気抵抗(transepithelial electrical resistance)(TEER)を、Millicell(登録商標)ERS-2 Epithelial(Volt/Ohm)メ

ーターおよびMERSSTX01プローブ(Merck Millipore)を使用して頂端チャンバー中で測定した。測定された抵抗値は、処理下の表面積に対して正規化された。

【0200】

12ウェルの組織培養トランスウェルインサートに、500 μ LのDMEMを含有するウェルあたり 5×10^6 個の細胞を播種し、外側ウェル(基底外側(basolateral side))が1.5 mLのDMEMを含有することに留意することが重要である。また、TEER測定中に、インサートウェルおよび外側ウェル中のDMEM容積を、それぞれ500 μ Lおよび1.5 mLに増加させて、ボルト-オームメーター電極(volt-ohm meter electrodes)が、ウェルの底部に触れることなく、培地中に完全に浸漬させた。

【0201】

B. ICOSL結合VNARS

ICOSL結合VNARS 2D4およびCC3の単離および特徴付けは、WO2014/173975およびWO2014/173959に開示されている。

【0202】

2. 多価および多重特異的VNARの形成

A. TNF結合ドメイン

図3から、D1-FcおよびC4-Fc分子の組み合わせが、二価形態で中和能力が増加することが示された。したがって、VNAR DNA1およびC4ならびに他の組み合わせを、二価または二重特異性融合体として調製し、融合体として一緒に組み合わせた場合、中和能力における同じ改善が見られることが示された。

【0203】

二量体および三量体の構築

図4は、二価および二重特異性構築物のフォーマットの図を提供する。

【0204】

2または3の別々のPCR反応を設定して、以下に列挙するオリゴヌクレオチドの組み合わせを用いて、N末端、中間末端(三量体の場合)、およびC末端VNARドメインを増幅し、各オリゴヌクレオチドは、それぞれ、精製および検出を容易にするための特異的/独特のクローニング部位、ならびに/または6xhisタグおよびc-mycタグを有する。

【0205】

10

20

30

【化 2 4】

二量体構築PCRオリゴ：

N末端断片オリゴヌクレオチド対：

X b a l _ F W 1 T N F _ # 1 2 7 : 配列番号 1 5

GCTAGGCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCTCG
AGTGGACCAAACACC

G S _ B a m H I _ R e v _ # 1 3 0 : 配列番号 1 6

CGCGCCGGATCCGCCACCTCCGCTACCGCCACCTCCGCTACCGCCACCTCCGCT
ACCGCCACCTCCATTACAGTCACGACAGTGCC

10

C末端オリゴヌクレオチド対：

G S _ B a m H I _ F o r _ # 1 3 2 : 配列番号 1 7

GGTGGCGGatccGGCGCGCACTCCGCTCGAGTGGACCAAACACCGC

E c o R I _ s t o p _ m y c _ # 1 2 9 : 配列番号 1 8

GTCCGGAATTCTCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTGCGGCCCC

20

【0 2 0 6】

三量体構築PCRオリゴヌクレオチド：ここでは、それぞれN末端およびC末端上のX b a 1 / B a m H 1 およびA P A 1 / E c o R 1 クローニング部位に隣接する中間断片としてB A 1 1 遺伝子を有するインハウス設計DNAカセット(in-house designed DNA cassette)を利用した。上記に列挙したオリゴヌクレオチド対、ならびにN末端フォワードオリゴヌクレオチド中のX b a 1 およびB s s H 1 1 部位の両方を有するオリゴヌクレオチドを、PCR増幅工程において利用することができ、これによりインハウス真核生物発現ベクター(in-house eukaryotic expression vector)、p E E E 2 A 中への三量体遺伝子をサブクローニングすることができる。それ以外は、全てのクローニングは、p E T 2 8 b (+) 発現ベクターで行われる。

30

【0 2 0 7】

【化 2 5】

X b a 1 / B s s H 1 1 - F W 1 N A R _ # 1 9 7 [三量体カセット] : 配列番号 1 9

AATTCCTCTAGAAAGGCGCGCACTCCGCTCGAGTGGACCAAACACCG

【0 2 0 8】

2 μ l の V N A R DNA (5 0 ~ 1 0 0 n g)、2 μ l のフォワードおよびリバースオリゴヌクレオチドプライマー(最終濃度 1 μ M)、5 μ l の 1 0 X T a q ポリメラーゼ緩衝液、0 . 2 5 μ l の T a q ポリメラーゼ(最終濃度 2 5 U / m l)、0 . 5 μ l の d N T P (最終濃度 0 . 1 m M)、および 3 8 . 2 5 μ l の H₂O を含む PCR 反応物(最終反応容積は 5 0 μ l)。PCR プログラムを、9 8 で 5 分間で開始した。次いで、9 4 で 3 0 秒間、5 6 で 3 0 秒間、7 2 で 1 分間を 3 0 サイクルを行った。7 2 で 5 分間の最終延長を行った。アンプリコンをアガロースゲル電気泳動によりチェックし、Q I A q u i c k PCR 精製キットを用いて精製した。溶出した DNA を適切な制限エンドヌクレアーゼで消化した。

40

【0 2 0 9】

大腸菌 S H u f f l e (E. coli SHuffle) (登録商標) T 7 発現細胞における二量体および三量体の発現

50

Xba I および EcoR I 制限酵素部位を介して発現ベクター pET28b (+) にクローニングされた VNAR 領域、および得られた VNAR 遺伝子を含む精製プラスミドを、エレクトロコンピテント (electrocompetent) 大腸菌 SHuffle (E. coli SHuffle) (登録商標) T7 発現細胞 [NEB] に形質転換し、50 µg/ml カナマイシンを含む TYE 寒天プレート上で選択した。抗 hTNF VNAR-D1、C4 および B4 融合タンパク質を、30 で IPTG で誘導した際に SHuffle 細胞の細胞質において発現させた。

【0210】

形質転換大腸菌 SHuffle (登録商標) T7 発現細胞の単一コロニーを、OD₆₀₀ が 0.4 ~ 0.6 になるまで (通常、37、250 回転/分で、4 ~ 6 時間のインキュベーション)、5 mL の 2 × TY - カナマイシン培地中で育成させた。この対数期培養物を用いて、カナマイシンおよび PO₄ 塩を含む 50 mL の TB 培地に接種し、OD₆₀₀ が 6.0 ~ 10.0 に達するまで 30、250 rpm で一晩インキュベートした。細胞を 4000 rpm、30 で 15 分間遠心分離し、次いで新鮮な TB - カナマイシン - PO₄ 塩培地に再懸濁し、30、250 rpm で 1 ~ 2 時間回復させた。最終 IPTG 濃度 1 mM を用いて細胞質タンパク質発現を誘導し、細胞を誘導後 12 ~ 16 時間、30、200 rpm でインキュベートした。6000 rpm、25 で 10 分間の遠心分離によって細胞を回収し、細胞ペレット湿重量を測定した。細胞ペレットを、5 mL/g の湿潤細胞ペースト Bug Buster (商標) タンパク質抽出試薬 + Benzona se (登録商標) (Novagen, UK) に再懸濁し、細胞懸濁液を 10 ~ 15 rpm、室温で 20 分間、振盪プラットフォームに置いた。細胞懸濁液を 6000 rpm、4 で 20 分間遠心分離し、上清中に収集した可溶性タンパク質を、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (immobilised metal affinity chromatography) (IMAC) レジン (ニッケル - ニトリロ三酢酸、Ni-NTA または Ni-セファロース) を用いたポリヒスチジンタグによるアフィニティー精製のために準備した。VNAR 融合タンパク質を、300 ~ 500 mM イミダゾール (pH 8.0) で溶出し、溶出物を PBS (1 L PBS / 1 mL 溶出タンパク質) (pH 7.4) に対して一晩透析した後、PBS を交換してさらに 3 ~ 4 時間透析した。タンパク質の質を SDS-PAGE によって評価し、Ultraspec 6300 pro uv/visible spectrophotometer (Amersham Biosciences, GE Healthcare) を用いて定量した。

【0211】

真核細胞発現のために、BA11 三量体カセットにクローニングしたドメインを、BssHII および EcoR I 酵素を用いて消化し、CMV プロモーターを用いて pEEE2A 真核発現ベクターにサブクローニングし、プラスミド増殖のために大腸菌株に形質転換した。VNAR 三量体遺伝子を含む単離・精製されたプラスミドベクターを、線状ポリエチレンイミン [PEI] と室温で 20 分間共インキュベートした。プラスミド DNA : PEI の混合物を、90% コンフルエンスの細胞増殖密度を有する HEK293 細胞を含む細胞培養フラスコに移した。トランスフェクトした HEK293 細胞を 37、5% v/v CO₂ で 5 ~ 7 日間インキュベートした。細胞培養上清を集め、IMAC 樹脂を用いて発現タンパク質を精製し、PBS に対して透析した。

【0212】

結合性および TNF 中和データ

図 5 は、二量体および二重特異性構築物の TNF への ELISA 結合性を示す。

【0213】

最初の ELISA データから、二重特異性 D1 - C4 構築物が TNF 30 ナノボディ二量体構築物と比較してアビディティ (avidity) (結合親和性と組み合わせた) が増加したことが示された。

【0214】

これらのいくつかを、後に、表面プラズモン共鳴における固定化 TNF への結合性について測定した。

10

20

30

40

50

【0215】

表1から、測定された二量体分子のうち、D1-C4二重特異性分子が、TNF30二価ナノボディ構築物と比較して優れた結合親和性（アビディティ(avidity)）を示したことが示される。

【0216】

図6は、二価TNFナノボディと比較した、多くの二価または二重特異的VNAR融合体についてのTNF中和データを示す。結合分子を、L929アッセイにおいてTNF中和について試験した場合、D1-C4二量体は、TNF30ナノボディ二量体構築物と同等またはそれより優れていた。この実験では、D1-D1二量体はD1-B4二量体よりも劣っていた。

10

【0217】

表1は、試験した三量体構築物についてのSPR結合データを示す。これから、TNF結合ドメイン間のスペーサーとして作用する、追加のドメインの導入がTNFに対する分子の相対親和性（アビディティ(avidity)）を有意に改善するように見えることが示される。

【0218】

TNF中和アッセイで測定した場合、D1-BA11-C4三量体構築物はadalimumabと同等であり、TNF30ナノボディ構築物よりも優れていた。このアッセイにおいて、D1ドメインを含む二価分子は、TNF30ナノボディ構築物と有効性が同等であった。

20

【0219】

図7は、種々のVNARフォーマットのTNF機能の中和能を測定した実験の結果を示す。

【0220】

表2は、中和データを要約する。スペーサードメインが含まれる場合、D1-BA11-D1およびD1-BA11-C4は双方とも中和能において10倍以上の改善を示し、D1-BA11-C4はadalimumabおよびMAB210とほぼ同等の効力を示す。また、TNF30-BA11-TNF30は、TNF30-TNF30二量体形態よりも改善を示すが、それほど顕著ではない。D1-C4構築物（配列番号27および28）のGlySerリンカー長は、(Gly4Ser)2から(Gly4Ser)3に延長され、その結果hTNF-中和能が改善した。

30

【0221】

これらの実験からのデータを表2に示す。さらなる比較データを表3に示す。

【0222】

【表 2】

結合分子	ND ₅₀ (nM) [$\geq n=3 \pm \text{SEM}$; 特記しない限り]
TNF43 【ホーンシャークVNAR】	7100nM (公開: Camacho-Villegas, Tanya, et al. MAbs 5(1): 2013; 米国特許第8, 496, 933号、2013年7月30日)
TNF43 【ホーンシャークVNAR】	500nMまでの濃度ではインビトロでの中和は見られなかった (100nMでの図15も参照)
D1	30 ± 3.5
C4	100 ± 0.1
TNF30 [VHH]	9.2 ± 2.1
D1-Fc	0.9 ± 0.14
C4-Fc	0.52 ± 0.2
TNF30-Fc	0.7 ± 0.07
D1-D1	7.0 ± 2.4
D1-C4	0.76 ± 0.06
D1-C4 (Gly ₄ BSer) ₃	$0.08 \pm 0.02^{***}$ (n=2、それぞれ3連)
D1-B4	8.0 ± 2.5
TNF30-TNF30	0.8 ± 0.27
Adalimumab	0.03 ± 0.009
D1-BA11-D1	0.38 ± 0.03
D1-BA11-C4	0.02 ± 0.09
TNF30-BA11-TNF30	0.3 ± 0.14
D1-Fc-C4(Quad-X TM)	0.002 ± 0.0011
D1-C4-Fc(Quad-Y TM)	0.005 ± 0.0005 (n=2 \pm SD)
C4-D1-Fc(Quad-Y TM)	0.012 ± 0.0016 (n=2 \pm SD)

表2: 0.3ng/ml(LD80)のhTNF- α (特記しない限り)を用いたTNF中和データ

【 0 2 2 3 】

【表 3 - 1】

A. 本発明者らによって得られた結合 (B) および中和 (N) データ

	ヒト (結合／中和) B／N	イヌ (B／N)	カニクイザル (B／N)	ラット (B／N)	マウス (B／N)	ウサギ (B／N)	ブタ (B／N)	ヒトTNF-β (B／N)
リード抗hTNF-α VNAR (D1及びC4)	+++／+++	+++／+++	+++／+++	-／-	-／-	-／-	-／-	-／-
ナノボディリード (VHH) TNF 30	+++／+++	+++／+++	+++／+++	-／-	-／-	-／-	++／-	++／-
Adalimumab (Humira)	+++／+++	+++／+++	+++／+++	-／-	++／++	-／-	-／-	-／-

注: +++は、強い結合／中和活性を示し; ++は、中程度を示し; +は、非常に弱い活性を示し;
-は、結合／中和活性が観察されなかったことを示す。

【 0 2 2 4 】

10

20

30

40

【表 3 - 2】

B. 文献[Assessment Report for Cimzia, European Medicines Agency (2009). Doc. Ref.: EMEA/664021/2009; Assessment Report for Simponi. European Medicines Agency (2009). Doc Ref.: EMEA/446762/2009; Assessment Report for Enbrel. European Medicines Agency (2008). Procedure No. EMEA/H/C/262/11/94; Scientific Discussion on Remicade, European Medicines Agency (2005) (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000240/WC500050885.pdf)
Last assessed on 21st Sept 2017; Scientific Discussion on Humira, European Medicines Agency (2004). (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000481/WC500050867.pdf).
Last assessed on 21st Sept 2017]で報告された臨床で使用できる抗hTNF- α 生物製剤(biologics)の交差反応データ

	ヒト (結合/中和) B/N	イヌ (B/N)	カニクイザル (B/N)	ラット (B/N)	マウス (B/N)	ウサギ (B/N)	ブタ (B/N)	ヒトTNF- β (B/N)
Adalimumab (Humira)	+ / +	+ / +	+ / +	- / -	+ / +	- / -	- / -	- / -
Infliximab (Remicade)	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
Etanercept (Enbrel)	+ / +	- / -	+ / +		+ / +			+ / +
Certolizumab (Cimzia)	+ / +	- / -	+ / +					
Golimumab (Simponi)	+ / +	+ / +	+ / +	- / -	- / -	+ / +		- / -

注: +/は、それぞれ、結合/中和を示すまたは示さないことを示す。

表3 市販の抗hTNF- α mAbおよび前臨床 VHH TNF30と比較した抗hTNF- α VNARリード構築物の交差反応性プロフィール

【 0 2 2 5 】

機能活性
背景

ヒト上皮結腸直腸腺癌細胞 (C a c o - 2) は、適切なプラットフォーム (例えば、プラスチックディッシュ、ニトロセルロースフィルター) 上で増殖させると、正常な腸細胞の形態学的特徴を発達させる。さらにコラーゲンコーティングされたポリカーボネートまたはポリエステル膜は、腸上皮輸送モデルシステムとしての C a c o - 2 単層に適してい

ることが示された(Wang, F., et al. Am. J. Path. 166.2 (2005): 409-419.; Hidalgo, I.J., et al Gastroenterology 1989. 96: 736-49.)。

【 0 2 2 6 】

上皮膜の主な機能としては、イヌリンおよびデキストランなどの親水性溶質に対する障壁の維持がある。この障壁は、以下に制限されないが、感染性、免疫媒介性および特発性疾患などの、腸上皮にかかわる特定の疾患で損なわれる(Clayburgh, D.R., et al Lab Invest. 2004. 84(3): 282-291; Wang, F., et al. Am. J. Path. 2005. 166(2): 409-419)。傍細胞透過性の増加および腸上皮抵抗性の減少として測定される、腸障壁機能不全(intestinal barrier dysfunction)は、クローン病等の、炎症性腸疾患(I B D)と密接に関連する(Irvine E.J. and Marshall J.K., Gastroenterology 2000. 119.6: 1740-1744.; Wyatt et al., The Lancet 1993. 341(8858): 1437-1439.)。また、その結果漏出流下痢(leak flux diarrhea)を生じる溶質の損失に寄与する、 I B Dにおける上皮タイトジャンクションタンパク質(epithelial tight junction proteins)の減少を支持する証拠がある(Schulzke J.D. et al., Ann N Y Acad Sci. 2009 1165:294-300; Schmitz H. et al., J. Cell Sci 1999. 112(1): 137-146)。最後に、インターフェロン - (I F N -)、 T N F およびリポ多糖(L P S)は、ヒト上皮細胞株において腸上皮障壁機能不全を相乗的に誘導することが示されている(Wang et al., J. Cell Science 1999. 112(1): 137-146; Schuerer-Maly C.C et al., Immunology 1994. 81(1): 85)。

10

【 0 2 2 7 】

抗 T N F 処置はクローン病における腸障壁機能不全を修復することが示されており(S uenaert P. et al., Am J Gastroenterol 2002. 97(8): 2000-2004)、ゆえに、我々は、我々の抗 T N F V N A Rドメインがインビトロで誘導されるこれらの機能不全を修復することを示すために、抗 T N F V N A Rドメインを試験した。我々は、二重特異性 / 多価 V N A Rドメインが、 V N A R単量体と比較した場合、これらの機能不全の予防により有効であると仮定した。

20

【 0 2 2 8 】

C a c o - 2細胞の極性を有する単層を横切る F I T C - デキストラン傍細胞流(FITC-Dextran paracellular flux across polarised monolayer of Caco-2 cells)

ヒト上皮結腸直腸腺癌細胞(C a c o - 2)を、 1 0 (% v / v) 熱不活性化 F B S および 1 % (v / v) ペニシリン - ストレプトマイシン(それぞれ、 1 0 , 0 0 0 単位 / m l および 1 0 , 0 0 0 μ g / m l)を補充した D M E M 中で培養した。細胞を T 7 5 フラスコ中で 9 0 % コンフルエンスまで増殖させた後、 2 4 ウェルの 0 . 4 μ m 半透性組織培養トランスウェルインサート(semipermeable tissue culture transwell inserts)(Corning Inc.)に播種した。 1 0 μ l の細胞懸濁液を 9 0 μ l の 0 . 4 % トリパンブルー排除色素(trypan blue exclusion dye)(Beckman Coulter)に懸濁し、この混合物をカバースリップを取り付けた血球計上に注意深く移した。

30

【 0 2 2 9 】

生存細胞数を測定した後、トランスウェルインサート当たり 1×10^5 個の細胞を 1 0 0 μ l の最終 D M E M 容積に播種する一方、細胞を含まない 6 0 0 μ l の D M E M を外側含有ウェル(outer containing wells)に移した。トランスウェルプレートを、 5 % (v / v) C O ₂ および湿気で 3 7 でインキュベートし、この際、使用済みの D M E M + 1 0 % (v / v) F B S を毎に交換した。細胞増殖を、細胞が 1 0 0 % コンフルエンスに達するまで(通常、播種後 5 ~ 7 日間)、位相差顕微鏡(倍率 4 0 倍の対物レンズ)下でモニターした。 C a c o - 2 細胞をさらに 2 1 日間増殖させて分化させ、この際、使用済みの培地を分化まで 4 8 時間毎に交換した。

40

【 0 2 3 0 】

1 0 % (v / v) H I - F B S を含む 1 0 0 μ l の D M E M 中に極性を有する細胞(頂端側)を含有する所定のインサートウェルを、抗 T N F V N A R タンパク質を含むまたは含まない 1 0 n g / m l の h T N F 、 I F N 、 L P S で処理した。処理細胞を、 5 % (v / v) C O ₂ および湿気で 3 7 で 1 8 時間インキュベートした。サイトカイン

50

±抗TNF VNARと共に18時間インキュベートした後、処理細胞の位相差画像を得、続いて、Caco-2単層の頂端側(apical side)(インサートウェル)に5μlの10mg/mlフルオレセインイソチシアネート標識デキストラン、分子量(3~5kDa)を添加した。FITC-デキストランを添加してから24時間後に、トランスウェルチャンバーの基底外側(basolateral side)の培地を回収した。

【0231】

蛍光強度を、Synergy HT(BioTek(登録商標))マイクロプレートリーダーを使用して、485nm励起および520nm発光波長で測定した。

【0232】

図8は、いくつかのTNF VNARマルチドメイン結合分子を比較した、Caco-2細胞の極性を有する単層(polarised monolayer)を横切る傍細胞流(paracellular flux)を測定する実験の透過性データを示す。この実験から、より低い濃度の二量体または三量体がチャレンジセル(challenged cells)のより高い保護レベルをもたらしたため、様々な二価および二重特異性形態が単量体形態よりも改善された機能を示すことが示される。

10

【0233】

極性を有するCaco-2細胞単層における上皮抵抗性機能不全アッセイ

ヒト上皮結腸直腸腺癌細胞(Caco-2)を、10(% v/v)熱不活性化FBSおよび1(% v/v)ペニシリン-ストレプトマイシン(それぞれ、10,000単位/mlおよび10,000μg/ml)を補充したDMEM中で培養した。細胞をT75フラスコ中で90%コンフルエンスになるまで増殖させた後、12または24ウェルの0.4μm半透過性組織培養トランスウェルインサート(semipermeable tissue culture transwell inserts)(Corning Inc.)に播種した。細胞が完全に分化するまで、セクション0に前記したプロトコールと同様に行った。

20

【0234】

10(% v/v)HI-FBSを含む200μlのDMEM中に極性を有する細胞(polarized cells)(頂端側(apical side))を含有する所定のインサートウェルを、抗TNF VNARタンパク質を含むまたは含まない10ng/mlのhTNF、およびIFNで処理した。処理細胞を、5(% v/v)CO₂および湿気で37で24時間インキュベートした。サイトカイン±抗TNF VNARと共に24時間インキュベートした後、上皮間電気抵抗(transepithelial electrical resistance)(TEER)を、Millicell(登録商標)ERS-2 Epithelial(Volt/Ohm)メーターおよびMERSTX01プローブ(Merck Millipore)を使用して頂端チャンバー中で測定した。測定された抵抗値は、処理下の表面積に対して正規化された。12ウェルの組織培養トランスウェルインサートに、500μLのDMEMを含有するウェルあたり5×10⁶個の細胞を播種し、外側ウェル(基底外側(basolateral side))が1.5mLのDMEMを含有することに留意することが重要である。また、TEER測定中に、インサートウェルおよび外側ウェル中のDMEM容積を、それぞれ500μlおよび1.5mlに増加させて、ボルト-オームメーター電極(volt-ohm meter electrodes)が、ウェルの底部に触れることなく、培地中に完全に浸漬させた。

30

【0235】

図9は、極性を有するCaco-2細胞における上皮抵抗性を測定するアッセイを示す。この実験から、種々の二価および二重特異性形態が単量体形態よりも改善された機能を示すことが示される。

40

【0236】

BICOSL結合ドメイン

多価形態の構築の構築および有効性データ

2D4およびCC3 Fc融合体

図10は、ICOSL VNAR(およびヒトIgG Fc、これはさらなる改善された機能的特性を提供する)を組み込んだ本発明の多価および多重特異的VNARのためのフォーマットを示す。

50

【0237】

方法

所定のVNAR単量体ドメインをPCR増幅し、真核生物発現ベクターにサブクローニングした。このクローニングは、ヒトIgG1FcをコードするDNA断片(このヒトIgG1Fc断片はまた、セリンに変異した軽鎖に通常ジスルフィド架橋する5プライム最多Cys残基(5 prime most Cys residue)を有する全長ヒトIgG1ヒンジ配列をコードした)の5'末端上に行った。

【0238】

PCR増幅に供する間、オリゴヌクレオチドを用いて、VNARドメインのカルボキシル末端とヒトIgG1ヒンジ領域のN末端残基との間にリンカー配列を挿入するアミノ酸残基、ならびに哺乳動物ベクター発現系と適合する制限エンドヌクレアーゼ部位を導入した。このプロセスによって導入されたリンカー配列は、下線を引いたRTアミノ酸残基をコードする核酸配列がBsiW1制限エンドヌクレアーゼ部位を導入するGGGGSGGGGGRT、または下線を引いたGADQアミノ酸残基のコードの使用がBcl1部位を導入するGGGGSGGGGADQのいずれかであった。これらの部位は双方とも、Fc真核生物発現ベクターの異なるバージョンにおけるクローニング部位と適合する。全てのアンプリコンの5'末端に、真核生物ベクター構築に適合する独特のBssHII部位を導入する。

10

【0239】

Fcのカルボキシル末端にリンカーVNARドメイン融合体を導入するためのDNA配列を設計し、これらの中間体断片の合成をGeneArt(Invitrogen)によって行った。これらの断片のN末端は、ヒトIgG1由来CH3領域内の天然に存在するBsrGI部位、およびベクター中のEcoR1部位を利用した。これらの構築物は、Fcドメインのカルボキシル末端とVNARドメインのアミノ末端との間に、アミノ酸配列TAAAAATAAAAAATAAAAAAを有するリンカーを導入した。リンカーの下線を引いた三重アラニン領域でのコードを使用することによりNotI制限部位の導入を可能にし、これは、さらなる二重特異的VNAR構築物を組み立てるためのその後のクローニング作業において利用され得る。

20

【0240】

血清を含まない培地を用いたHEK293細胞懸濁液におけるPEI仲介トランスフェクションおよび一時的発現後(Post PEI-mediated transfection and transient expression)、ELISAによりNARFc融合タンパク質の発現レベルを測定した。細胞残屑を除去するための最初の0.2μm濾過清澄化工程の後に、VNARFcタンパク質を精製するためのプロテインAアフィニティークロマトグラフィーを行った。アフィニティークロマトグラフィーを完成するための第2のクロマトグラフィー工程を、必要に応じて工程間で緩衝液を交換して、イオン交換クロマトグラフィーまたはサイズ排除クロマトグラフィーを使用して行った。Amicon限外濾過ユニットを用いてタンパク質を濃縮し、UV分光法によって最終タンパク質濃度を測定した。分析SECおよびSDS-PAGEを使用して、最終精製タンパク質の完全性(integrity)を決定した。

30

【0241】

ICOSL中和アッセイ

リガンド-レセプター中和アッセイを以下のようにして行った：ヒトICOSレセプターを発現するCHO細胞を、96ウェル細胞培養プレート(Greiner, Bio-One)のDMEM/F12+5%FBS培地中でコンフルエントになるまで増殖させた。1μg/mlのrmB7-H2/Fc(158-B7、R&D Systems)の計20μlを、DMEM/F12+2%FBS中の40μlの連続希釈抗ICOSL-VNAR-Fcと共に1時間プレインキュベートした後、細胞に添加した。16で1時間インキュベートした後、細胞をDMEM/F12+2%FBSで3回穏やかに洗浄し、同じ培地で1:10,000に希釈したヤギ抗ヒトFc-HRP(SIGMA)と共に16で40分間インキュベートした。細胞を洗浄し、TMB基質で発色させた。

40

50

【0242】

図11は、ELISA結合データを示し、ICOSL VNARSがこれらのフォーマットにおいてそれらの同族抗原に結合することを示す。

【0243】

図12は、TNF R1ドメイン、ICOSL VNARおよびヒトIgG Fcを組み込んだ本発明の多価および多重特異的VNARのフォーマットを示し、これらはさらなる改善された機能特性を提供する。

【0244】

図13は、TNF R1ドメイン、ICOSL VNARおよびヒトIgG Fcを組み込んだ本発明の多価および多重特異的VNARについての有効性のデータを示し、これはさらなる改善された機能特性を提供する。

【0245】

これらのデータから、融合体が、TNFR1を介してTNFに、およびVNARDメインを介してmICOSLおよびhICOSLに結合することができることが示される。これらの構築物は、mICOSLまたはhICOSLのそれらの同族のCHO発現レセプターへの結合を阻害することができる。

【0246】

これらのデータから、多価フォーマットに組み合わされたVNARがそれらの標的に結合することができ、上記分子が単量体VNARよりも改善された特性を示すことができることが示される。

【0247】

インビボでの前臨床研究

研究の背景

関節リウマチのTg197マウスモデルは、野生型および3'修飾ヒト腫瘍壊死因子(hTNF-)トランスジーンを保有し、発現するトランスジェニックマウス系である。これらのトランスジェニックマウスは、生物活性ヒトTNF-の過剰発現に依存して、4~7週齢で100%の発生率で慢性多発性関節炎を発症する(Keffner et al. 1991, EMO J., Vol. 10, pp. 4025-4031)。第1の抗TNF-治療抗体である、Remicade(登録商標)および他の抗TNF-生物製剤の治療効力の例示はTg197マウスモデルを使用して確立された(Shealy et al., 2002, Arthritis Research & Therapy, 4(5), p.R7; Shealy et al., 2010, MAbs (Vol. 2, No. 4, pp. 428-439). Taylor & Francis)。

【0248】

本研究の目的は、関節炎のTg197トランスジェニックマウスモデルにおける関節炎症状の予防における、Humira(登録商標)と比較した抗TNF-D1-Fc-C4(Quad-X(商標))の治療効果を評価することであった。

【0249】

方法

合計40匹のマウスを、5つの試験群、G1~G5の各々に割り当てた(表4)。この研究の目的のために、トランスジェニックマウスを、8匹のマウスからなる群に割り当て、それぞれに、試験化合物またはビヒクルバッファー(リン酸緩衝生理食塩水、PBS、pH 7.4)を、関節炎の確立前の、第3週齢から週2回、皮下に投与を開始して、第10週齢まで7週間にわたって継続した。トランスジェニックマウス(2匹の雄および2匹の雌)の未処置動物の追加の1群を、組織病理学的状態のために3週齢の対照マウスとして使用し、最初の用量投与の前に剖検した。

【0250】

最初の関節炎スコアリングを行う前に、マウスをグループに分けた。年齢および性別のバランスのとれた研究は、離乳時に同調した交配の異なる同腹仔からブールしたG1~G5群の8匹(4匹の雄および4匹の雌)のヘテロ接合性Tg197から構成された。異なる実験群へのマウスの割り当ては、研究の開始時に異なる群で体重が確実に等しく分布す

10

20

30

40

50

るように行った。インビボ関節炎スコアを表5に記載のように評価した。

【0251】

10週齢で、すべての動物を剖検し、各動物の血液（血清を単離し、-80℃で保存）および2つの足首関節を集めた。すべての実験動物の足関節を解剖し、石灰化し、さらに処理して関節炎の組織病理学的評価を行った。足首の組織病理学は、表6に記載される組織病理学スコアリングシステムに従って顕微鏡検査によって評価され、代表的な画像のみが結果セクションに含まれた。

【0252】

【表4】

表4:実験グループ

グループ番号 ¹	被験物質	用量 (mg/kg)	投与頻度 (週) ²	投与期間 (週)	投与容積 (ml/kg)	投与経路	動物数	屠殺時の年齢 (週) ³
G1	ビヒクル	0	2回/週	7	10	皮下 (s.c.)	8 (4♂/4♀)	10
G4	Humira (登録商標)	10	2回/週	7	10	皮下 (s.c.)	8 (4♂/4♀)	10
G2	被験物質 (D1-Fc-C4)	3	2回/週	7	10	皮下 (s.c.)	8 (4♂/4♀)	10
G5	被験物質 (D1-Fc-C4)	10	2回/週	7	10	皮下 (s.c.)	8 (4♂/4♀)	10
G3	被験物質 (D1-Fc-C4)	30	2回/週	7	10	皮下 (s.c.)	8 (4♂/4♀)	10
3週齢の 対照マウス	-	-	-	-	-	-	4 (2♂/2♀)	3

1. 本研究は、上記表に記載される群のランダムな順序を生じる盲検様式で実施した。
2. 投与は3週齢で開始した。
3. 1～5群の全てのマウスを、最後の用量投与から48時間後に剖検した。3週齢の対照動物を、最初の用量投与の直前の研究開始時に剖検した。

【0253】

【表5】

表5: インビボでの関節炎スコアの評価

関節スコア ¹	特性
0/疾患無し	関節炎なし(正常な外観、マウスは、一定時間、ワイヤーグリッドやケージのふたなどの倒立または傾斜した表面にくっついて自重を支えられる、全身の柔軟性/回避性(evasiveness)が正常、握力が最大)
0.5/軽度の疾患	関節炎を発症(軽度の関節の腫れ、他のすべてのパラメータは上記と同様)
1/軽度～中等度の疾患	軽度から中等度(腫れによる関節の歪み、足の炎症、他のすべてのパラメータは上記と同様)
1.5/中等度の疾患	中等度の関節炎(関節一足の腫れ、歪み+最後の指の内側への変形、ワイヤーグリッドやケージのふたなどの倒立または傾斜した表面に短時間支えてくっついていて、全身の柔軟性が低下、握力が低下)
2/中等度～重度の疾患	中等度から重度の関節炎(重篤な関節、足及び指の腫れ、関節一脚の変形、ワイヤーグリッドやケージのふたなどの倒立または傾斜した表面に支えてくっついていない、全身の柔軟性がない、握力がない、クライミング/摂食に影響がでている、移動しようとするときに震え始めるが、なんとか前方に動く)
2.5/重度の疾患	重度の関節炎(上記2と同様+前足の指の変形、マウスの動きに障害がある、震えて運きたがらない)
3/非常に重度の疾患	非常に重度の関節炎(強直が屈曲時に検出され、運動にかなり障害がある、マウスが瀕死、もはや震えではなく、マウスを横に傾けた場合、容易に回転/反転できない)

¹ 一部の評価のスコアリングに0.25をさらに追加すると、次により厳しい表現型に向かう傾向を示す、すなわち、次の重症度スケールの、全てではないが、1つの基準が存在する場合を意味する。例えば、「1.75」は、重度の腫れはあるが、関節の変形はなく、屈曲時にいくつかの強度を有する「1.5」を意味する。

【 0 2 5 4 】

群の平均スコアを有するインビボでの関節炎スコアを、結果セクションでグラフとして示す。

【 0 2 5 5 】

【表 6】

表6: 足関節における関節炎表現型をスコアリングするための累積組織病理学的基準

スコア ¹	疾患	基準
0	正常	病理が検出できない
1	軽度	滑膜の過形成および多形核浸潤が存在する。軽度の腱炎がみられることがある。
2	中等度	パンススおよび線維組織の形成および限局性軟骨下骨びらん
3	中等度～重度	軟骨破壊および骨びらん
4	重度	広範な軟骨破壊および骨びらん。骨輪郭構造が失われている

(Adapted from: Pettit, A.R., et al., 2001, The American journal of pathology, 159(5), pp.1689-1699; Mould,

A.W., et al., 2003, Arthritis & Rheumatology, 48(9), pp.2660-2669)

¹ 次に高いスコアのすべてではなく一部の特徴が存在する場合には、ハーフマークが付けられる。したがって、「2. 5」というスコアは、より多くの骨びらんが軟骨下病巣の外側および周囲に広がっているが、スコア「3」を正当化するほど広くはなく、また、軟骨破壊を伴わない、パンススおよび線維組織の形成および限局性軟骨下骨びらん(スコア2)を意味する。

【 0 2 5 6 】

グループ平均スコアを有する組織病理学的スコアを、結果のセクションで棒グラフとしておよび付録に表として示す。2.5倍の倍率での例示的な組織病理学的画像もまた、付録に提示される。

【 0 2 5 7 】

結果

Tg197 関節炎モデルに対する抗hTNF- α D1-Fc-C4 (Quad-X (商標))およびHumira (登録商標)の効力の評価を予防的投与計画に従って行った、すなわち、マウスがインビボ関節炎病理学および初期組織病理学的病変の軽度の証拠を示したマウスの3週齢で処置を開始した。10週齢まで、ビヒクル処置対照群G1におけるインビボでの関節炎スコアは3週齢の未処置動物と比較して劇的に増加したが、同じ年齢ではG1の動物において観察された組織病理学的病変が3週齢対照マウス群において観察されたものよりも統計的により重篤であった。

【 0 2 5 8 】

被験物質D1-Fc-C4 抗hTNF- α のインビボおよび組織病理学的ならびに体重関節炎症状における治療効果の有効性評価

・D1-Fc-C4被験物質の3、10および30mg/kg用量レジメにより、G1のビヒクル処置マウスと比較して、インビボおよび組織病理学的関節炎病理学において、Tg197の統計的に有意な強固な障害を与えられた。より具体的には、週に2回、7週間の期間にわたり14回の用量を投与した後、用量レジメは以下の結果をもたらした:

G2の動物の3mg/kgのD1-Fc-C4被験物質処置後のインビボでの約88%の障害および関節炎の組織病理スコアの約86%の障害

G5の動物の10mg/kgのD1-Fc-C4被験物質処置後のインビボでの約88%の有意な障害および関節炎の組織病理学的スコアの約83%の障害

G3の動物の30mg/kgのD1-Fc-C4被験物質処置後のインビボでの約88

10

20

30

40

50

%の有意な阻害および関節炎の組織病理学的スコアの約86%の阻害

・統計的有意性は3mg/kgおよび10mg/kg用量レジメにおいてのみ得られたが、G1のビヒクル処置マウスと比較して全ての用量レベルにおいてより多くの体重増加が見られた同様の知見が、D1-Fc-C4被験物質処置マウスの平均体重曲線において観察された。

【0259】

D1-Fc-C4被験物質の用量反応有効性評価

・3、10および30mg/kg用量のD1-Fc-D4被験物質による処置では、インビボでの関節炎評価および体重スコア、ならびにすべての用量が同様に作用し、それらの治療効果は統計的に区別されなかった(undifferentiated)組織病理学的評価によって示される用量依存的な応答効果を示さなかった。

10

【0260】

Humira(登録商標)のインビボおよび病理組織学的ならびに体重関節炎症状における治療効果の有効性評価

・Humira(登録商標)の10mg/kg用量レジメにより、G1のビヒクル処置マウスと比較して、インビボおよび組織学的関節炎病理学において、Tg197の強固な統計的に有意な阻害が与えられた。より具体的には、週2回、7週間の期間にわたり14回の容量を投与した後、我々は以下を観察した：

G4の動物の10mg/kgのHumira(登録商標)処置後のインビボでの約82%の阻害および関節炎の組織病理スコアの約86%の阻害

20

・G1のビヒクル処置マウスと比較してより多くの体重増加が見られた同様の知見が、Humira(登録商標)処置マウスの平均体重曲線において観察された。

【0261】

D1-Fc-C4被験物質とHumira(登録商標)との用量反応の比較

10mg/kg用量でのD1-Fc-C4試験物質とHumira(登録商標)との阻害効果の比較試験から、体重、インビボでの関節炎スコア及び組織病理学的評価を含む、全ての評価パラメータにおいて統計的に区別されないことが判明した。

【0262】

3週齢対照動物に対するD1-Fc-C4被験物質およびHumira(登録商標)の効果の組織病理学的比較

30

3、10および30mg/kgのD1-Fc-C4被験物質ならびに10mg/kg Humiraの阻害作用により、10週目でより組織病理学的病変が軽減し、3週齢の対照未処置動物と統計的に区別された。

【0263】

【表 7】

表7:平均群体重

平均群 体重 ¹ (g)	週 3	週 4	週 5	週 6	週 7	週 8	週 9	週 10
3 週齢の対照 マウス	9.8±0.2	-	-	-	-	-	-	-
G1-ビヒクル	10.0±0.5	12.8±0.8	17.0±0.8	18.4±0.8	18.1±1.0	18.8±1.2	19.6±1.3	19.3±1.4
G4-Humira® 10mg/kg	10.0±0.3	13.0±0.6	18.3±0.8	20.8±0.7	21.2±1.4	22.6±1.3	23.4±1.4	24.4±1.5
G2-D1-Fc-C4 3mg/kg	10.0±0.4	13.6±0.8	18.5±0.9	20.4±1.0	21.5±1.4	22.3±1.5	23.0±1.5	24.1±1.5
G5-D1-Fc-C4 10mg/kg	10.0±0.3	13.4±0.7	18.1±1.0	20.2±0.9	20.7±1.3	21.9±1.5	23.2±1.5	24.1±1.7
G3-D1-Fc-C4 30mg/kg	10.0±0.4	13.8±0.6	18.3±0.7	20.0±1.0	20.7±1.1	21.7±1.2	22.3±1.3	23.4±1.4

1. データは、平均±SEMとして示す

【 0 2 6 4 】

【表 8】

表8:平均群インビボでの関節炎スコア

平均群インビボで の関節炎スコア ¹	週 3	週 4	週 5	週 6	週 7	週 8	週 9	週 10
3 週齢の対照マウス	0.13 ±0.05	-	-	-	-	-	-	-
G1-ビヒクル	0.14 ±0.03	0.34 ±0.03	0.58 ±0.04	0.84 ±0.05	0.94 ±0.04	0.98 ±0.04	1.20 ±0.06	1.36 ±0.07
G4-Humira® 10mg/kg	0.17 ±0.04	0.28 ±0.04	0.23 ±0.05	0.19 ±0.04	0.33 ±0.04	0.25 ±0.05	0.28 ±0.04	0.25 ±0.05
G2-D1-Fc-C4 3mg/kg	0.13 ±0.04	0.20 ±0.03	0.17 ±0.04	0.17 ±0.04	0.19 ±0.04	0.17 ±0.03	0.16 ±0.03	0.17 ±0.04
G5-D1-Fc-C4 10mg/kg	0.19 ±0.04	0.20 ±0.04	0.17 ±0.03	0.28 ±0.03	0.25 ±0.03	0.27 ±0.03	0.25 ±0.02	0.17 ±0.04
G3-D1-Fc-C4 30mg/kg	0.09 ±0.03	0.17 ±0.04	0.17 ±0.04	0.19 ±0.05	0.22 ±0.04	0.22 ±0.04	0.20 ±0.03	0.17 ±0.04

1. データは、平均±SEMとして示す

【 0 2 6 5 】

【表 9】

表9:平均群関節炎組織病理スコア

平均群病理組織学スコア ¹	週3	週10
3週齢の対照マウス	1.22±0.10	-
G1-ビヒクル	-	2.94±0.12
G4-Humira® 10mg/kg	-	0.42±0.07
G2-D1-Fc-C4 3mg/kg	-	0.41±0.03
G5-D1-Fc-C4 10mg/kg	-	0.50±0.05
G3-D1-Fc-C4 30mg/kg	-	0.42±0.07

1. データは、平均±SEMとして示す

【0266】

さらに、マウスTNF- α を標的とするVNAR S17 Quad-X (商標) 構築物を用いたインビトロでの効力促進の第2の例示を行った。

【0267】

VNAR S17は、ヒトTNF- α に対する結合または中和活性を有さない特異的抗マウスTNF- α である。VNAR S17-Fcは、約8nMのインビトロ効力(ND50)を有するマウスTNF- α の強力な中和剤である。Quad-XTM構築物(S17-Fc-S17)として設計した場合、インビトロでの中和能は0.2nMにまで約40倍向上した(図30)。

【0268】

さらに、S17 Quad-XTMおよびD1-C4 Quad-XTM構築物がTNF- α の異なる種を認識することが示された(図31)。

【0269】

討論および結論

この研究の結果から、参照Humira (登録商標) およびD1-Fc-C4 (Quad-X (商標)) およびD1-BA11-C4抗hTNF- α 物質がTg197動物において観察される関節炎表現型を阻害し、これにより、ビヒクル処置動物と比較して、体重が増加しならびにインビボおよび組織病理学的関節炎病理学が軽減することが示される。

【0270】

参照Humira (登録商標) の治療効果は、10mg/kg用量で評価され(図29~図32)、ビヒクル処置マウスと比較した場合、インビボ関節炎および足首の組織病理学的評価の統計的に有意な阻害をもたらした。図33において、1mg/kgのHumira (登録商標) は、8週間で有意な疾患の改善(breakthrough)を示す。1mg/kg、3mg/kg、10mg/kgおよび30mg/kgのHumira (登録商標) の投薬レジメを用いた以前のTg197マウスモデル研究では、1mg/kg(図33)または3mg/kgのHumira (登録商標)(図35)のいずれかで処置されたマウスの群において有意な疾患の改善が存在することが示された。これらのマウス群は未処置群と同様の時間依存性疾患進行を有し、インビボ関節炎(AS)および組織病理学スコア(HS)は10mg/kgまたは30mg/kgのHumira (登録商標) のいずれかで処置した群よりも有意に高かった(図33)。

【0271】

D1-Fc-C4 (Quad-X (商標)) 被験物質は、全ての評価された用量、すなわち、0.5、1、3mg/kg、10mg/kgおよび30mg/kgが疾患の完全な制御を伴う類似のかつ統計的に区別できない治療効果を示したため、用量依存性応答を示さなかった。さらに、インビボでの関節炎および組織病理学的評価から、3mg/kg用

10

20

30

40

50

量の D 1 - F c - C 4 被験物質の治療効果が 1 0 m g / k g の H u m i r a (登録商標) の治療効果に統計的に匹敵することが明らかになった。また、1 0 週齢の 3 m g / k g の D 1 - F c - C 4 処置マウスにおいて、疾患改善の徴候は観察されず、8 週齢の 0 . 5 および 1 m g / k g の D 1 - F c - C 4 についても観察されなかった。

【 0 2 7 2 】

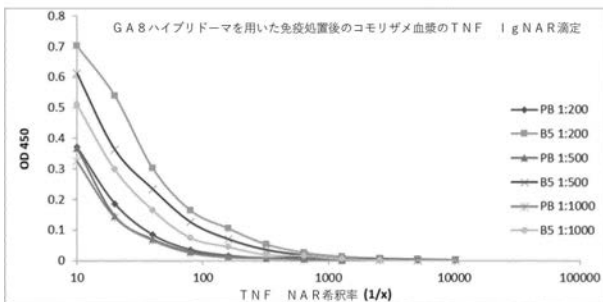
したがって、我々はさらに、D 1 - F c - C 4 抗 h T N F - ドメインが標準的な治療法である H u m i r a (登録商標) よりも、インビトロ (L 9 2 9 および C a c o 2 データ - 図 2、3、6 ~ 8、2 0、2 3 および 2 8) およびインビボ (図 2 9 ~ 3 5) 双方における T N F - の効果を中和する効果が大きいことを示した。また、我々は、非 F c ベースのタンデム多価 V N A R (non-Fc based tandem multivalent VNAR) である、D 1 - B A 1 1 - C 4 のインビボ有効性を示した (図 3 3 および図 3 4) 。

10

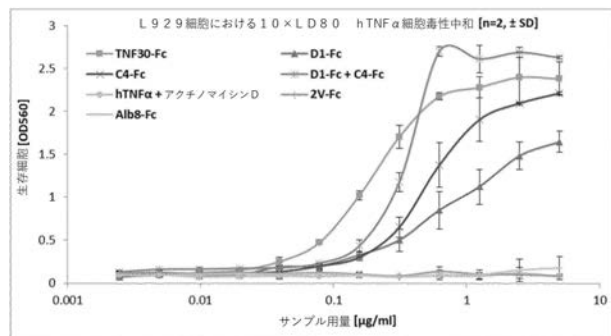
【 0 2 7 3 】

最後に、我々は、抗 T N F V N A R (D 1 - F c) がまた、F c 単独フォーマットで全身投与された場合、炎症性眼疾患のラットモデルにおいて (デキサメタゾンと同様の効力で) ブドウ膜炎を制御および治療し得ることを示すことができた (図 3 6) 。

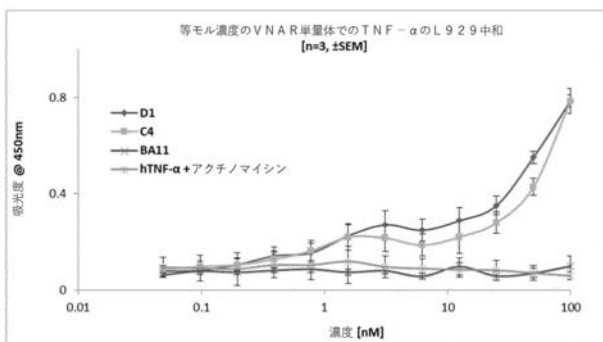
【 図 1 】



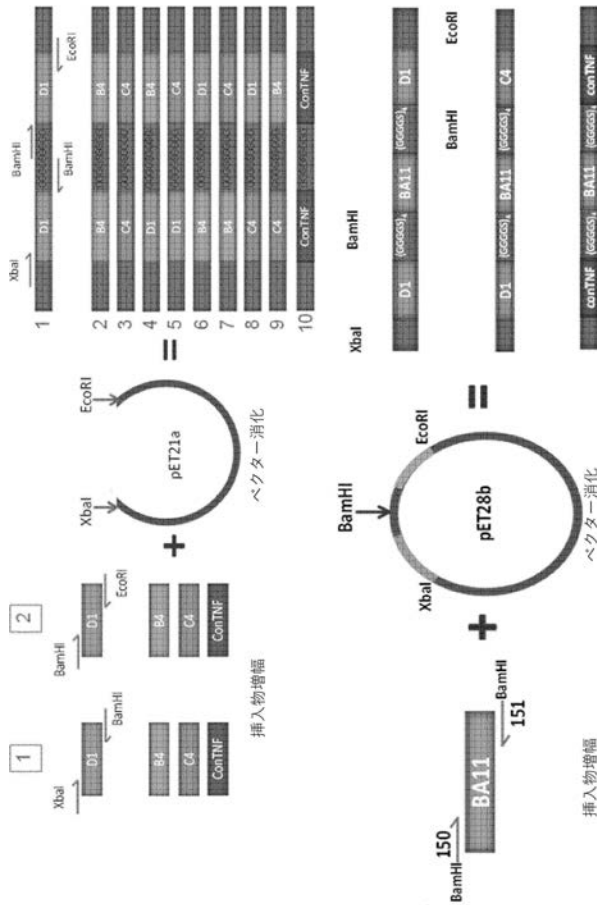
【 図 3 】



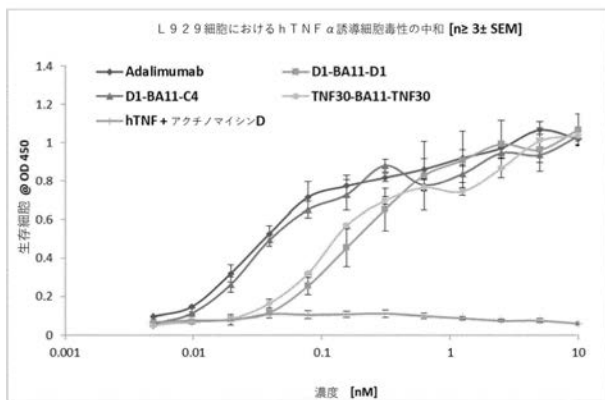
【 図 2 】



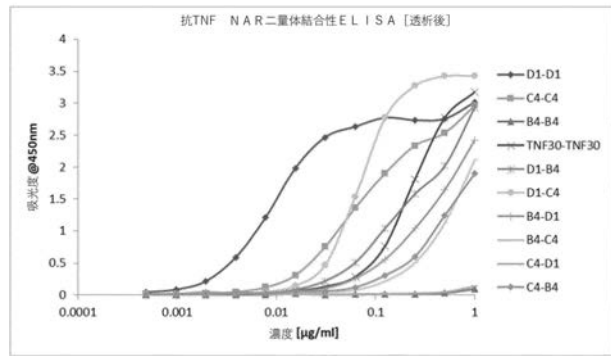
【図 4】



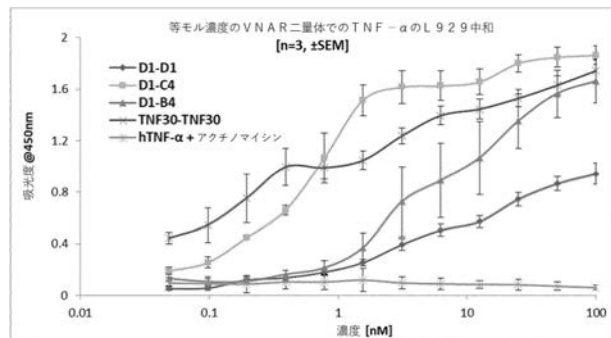
【図 7】



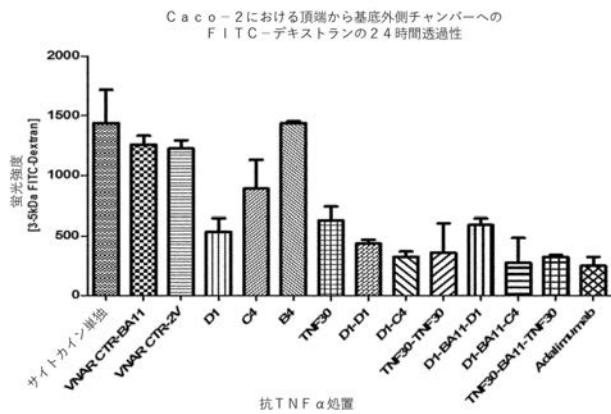
【図 5】



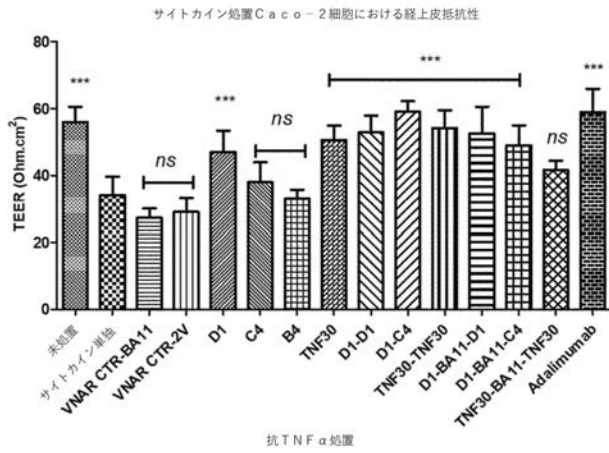
【図 6】



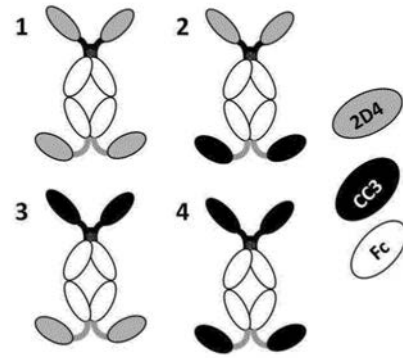
【図 8】



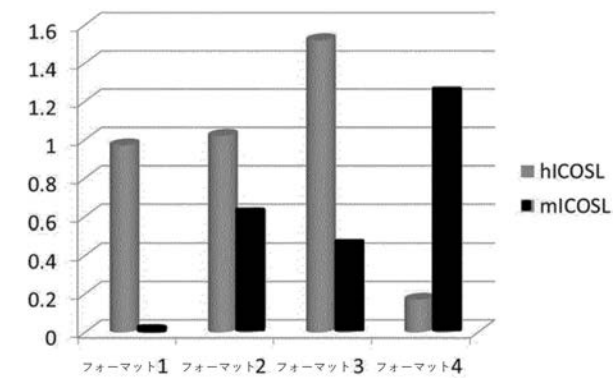
【図 9】



【図 10】

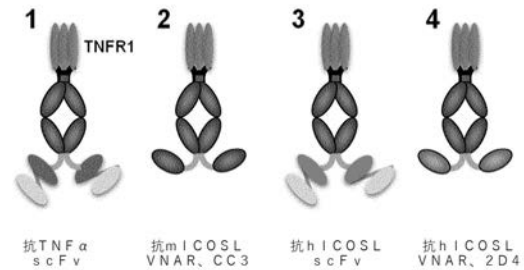


【図 11】

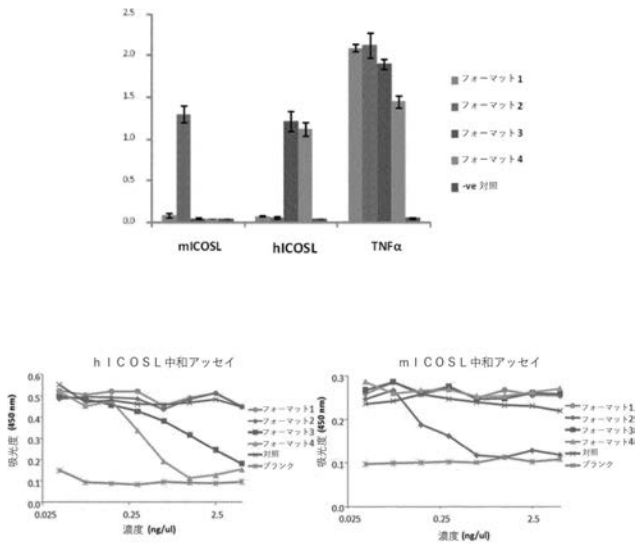


一過性トランスフェクト細胞(transiently transfected cell)の上清の1/8希釈を用いた、4種のVNAR-Fc組み合わせの抗hICOSLまたはmICOSL結合性ELISAデータ

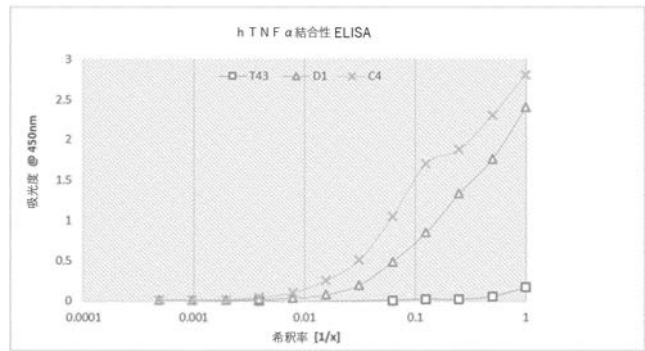
【図 12】



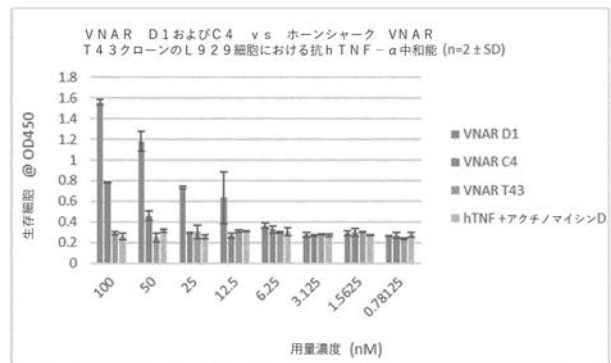
【図 13】



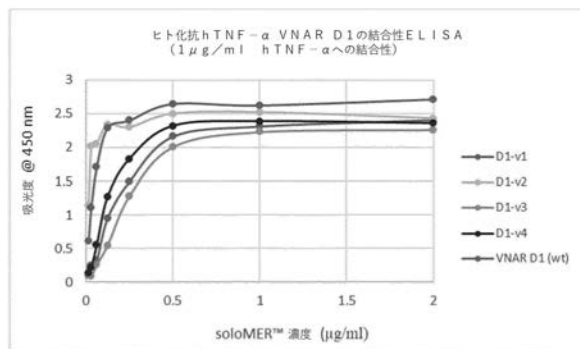
【図 14】



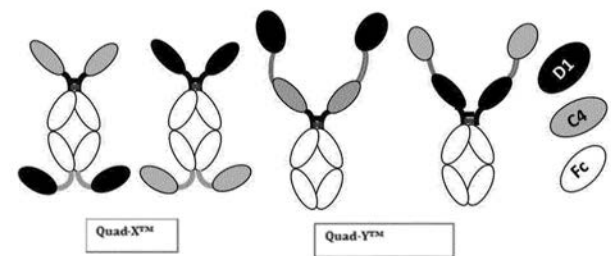
【図 15】



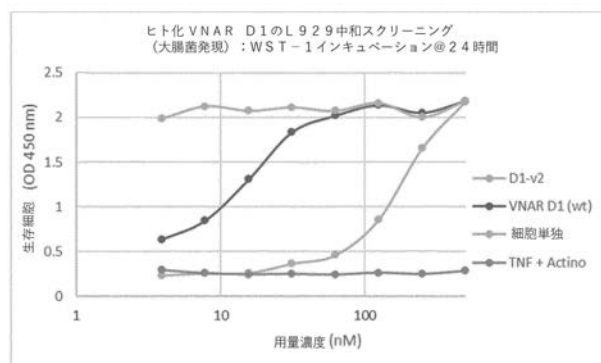
【図 16】



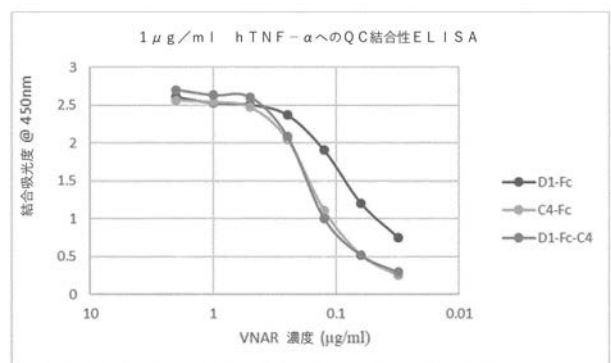
【図 18】



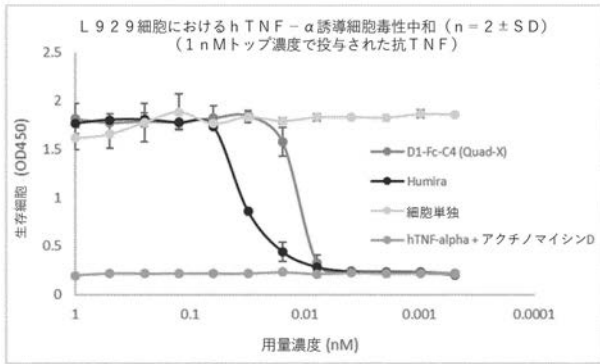
【図 17】



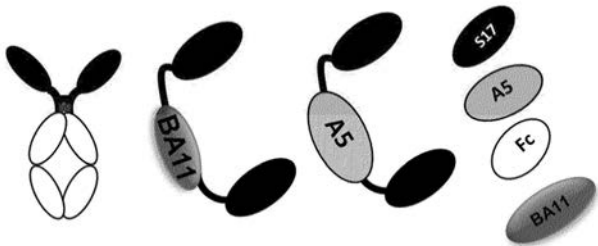
【図 19】



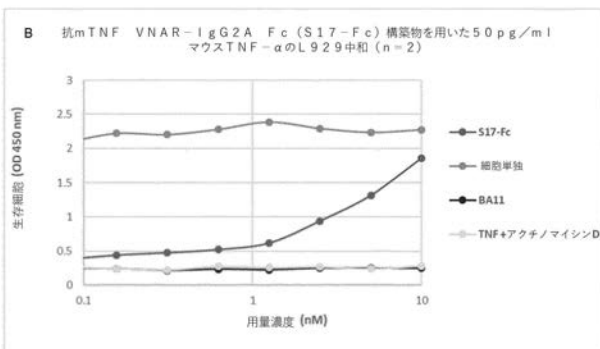
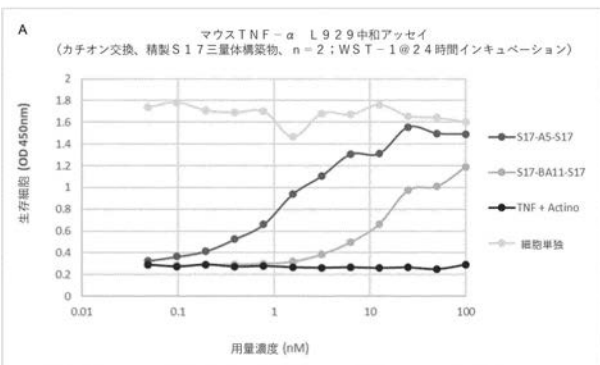
【図 20】



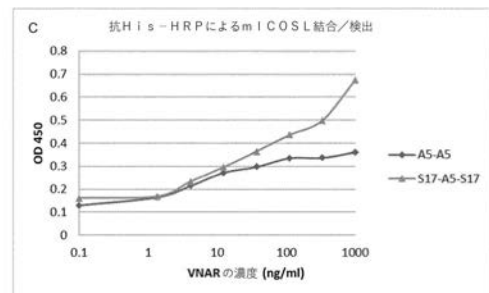
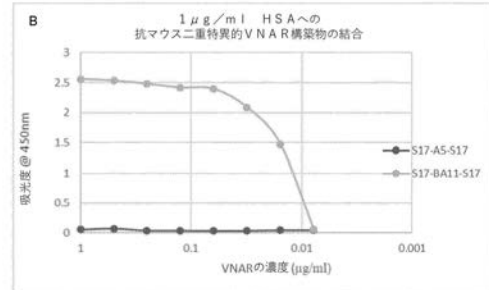
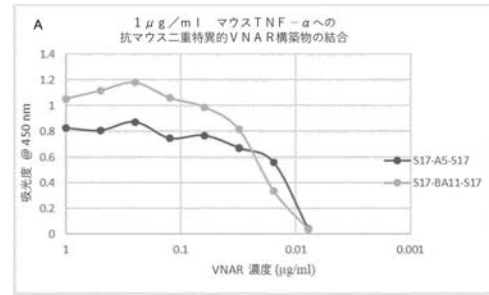
【図 21】



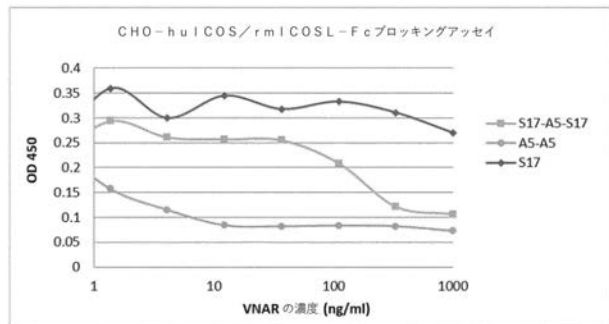
【図 23】



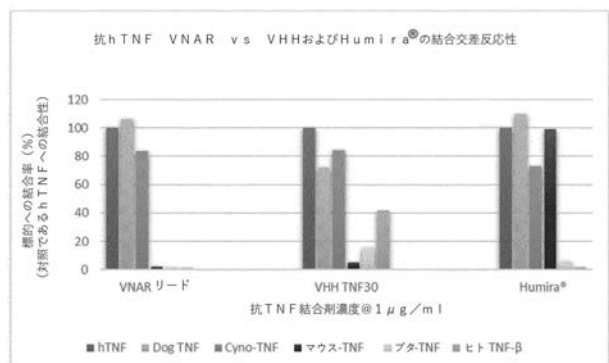
【図 22】



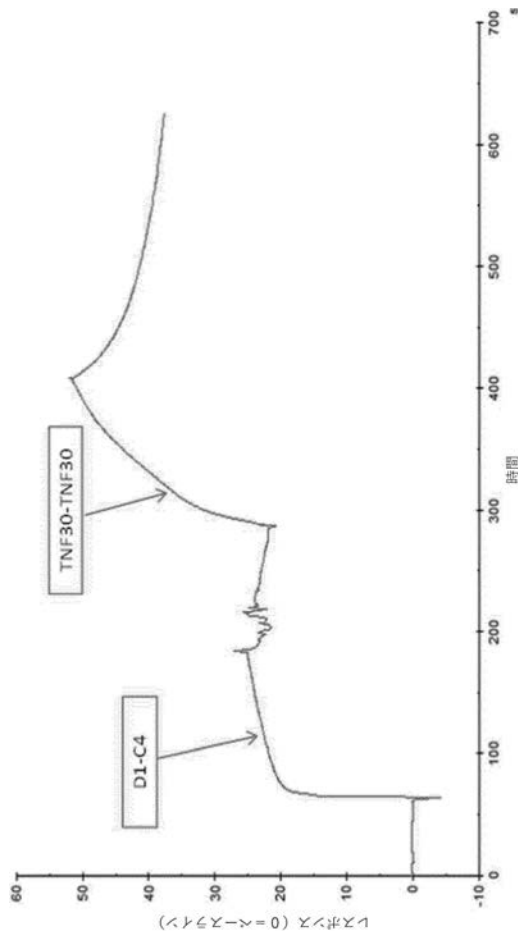
【図 24】



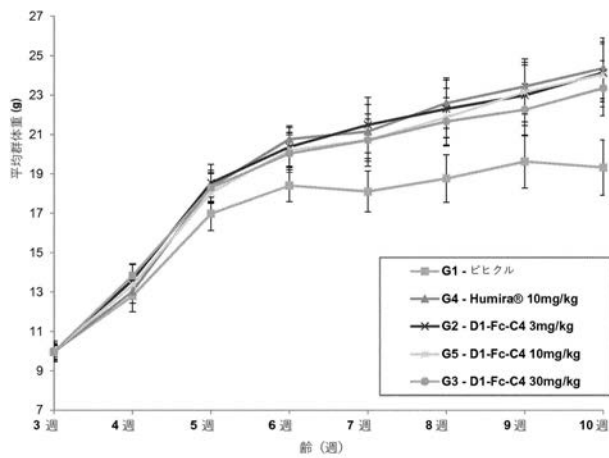
【図 25】



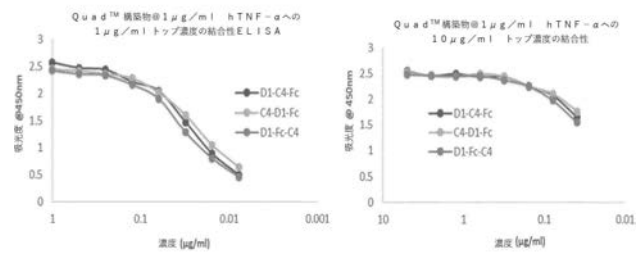
【図 26】



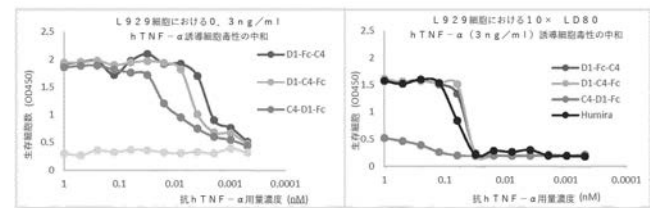
【図 29】



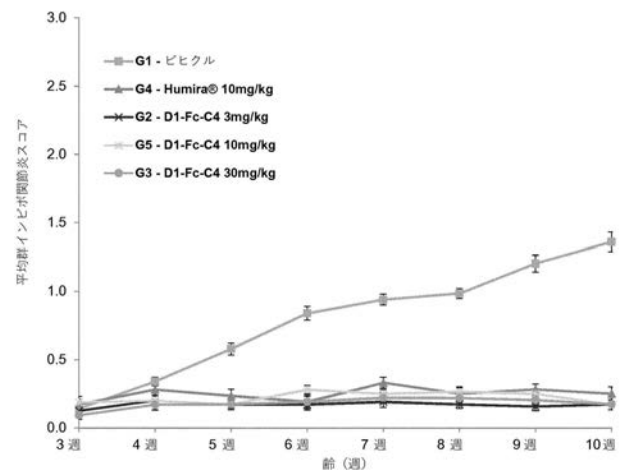
【図 27】



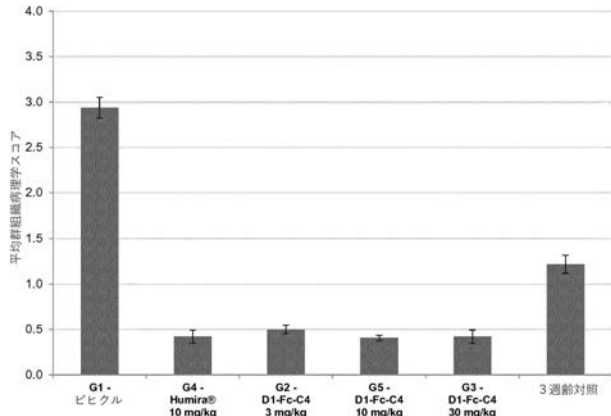
【図 28】



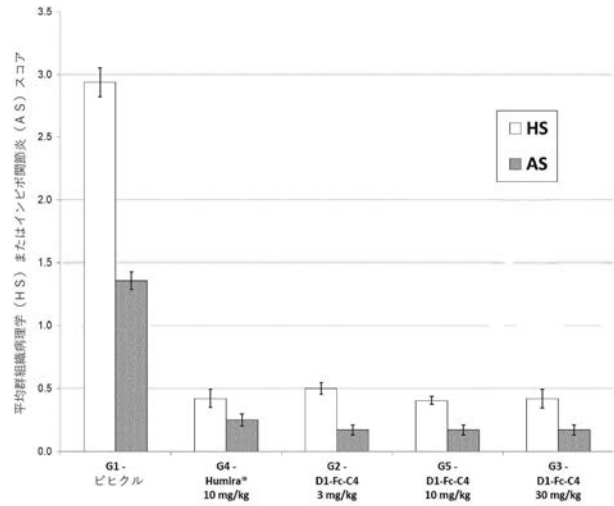
【図 30】



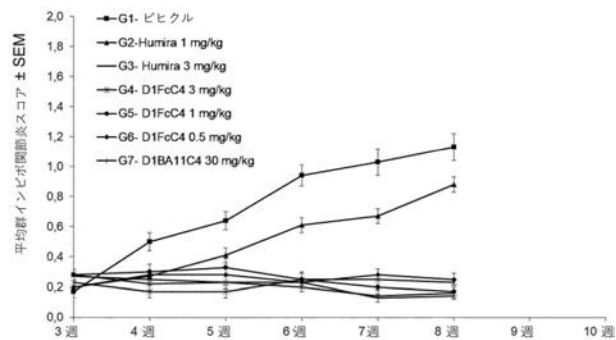
【図 3 1】



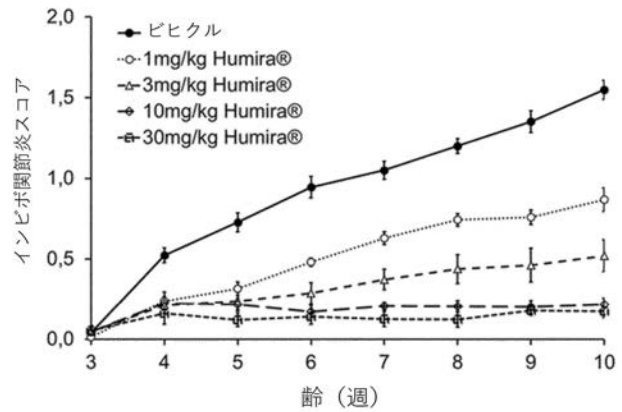
【図 3 2】



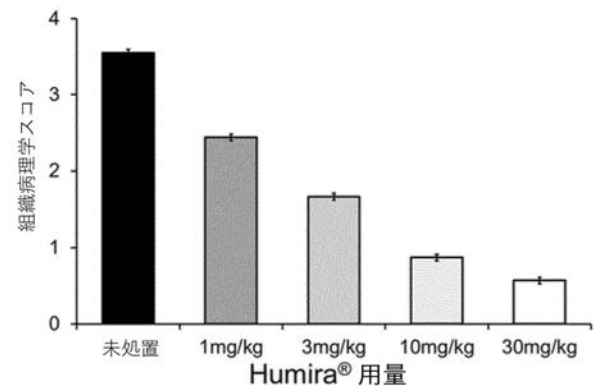
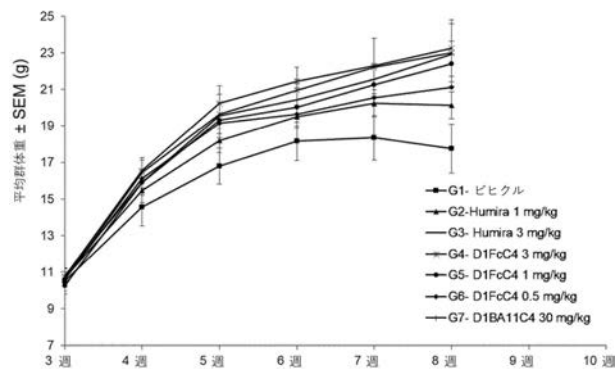
【図 3 3】



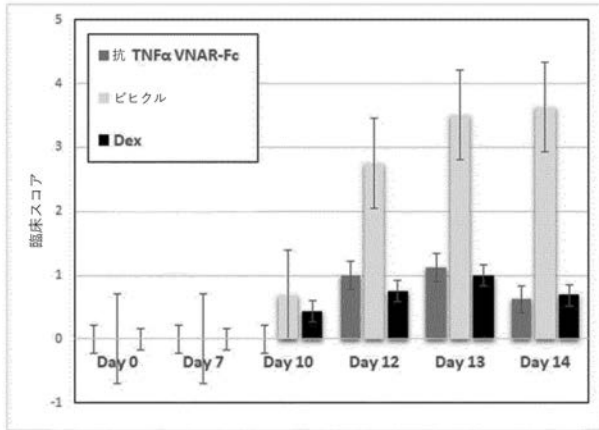
【図 3 5】



【図 3 4】



【図 36】



【図 37】

Figure 37A:

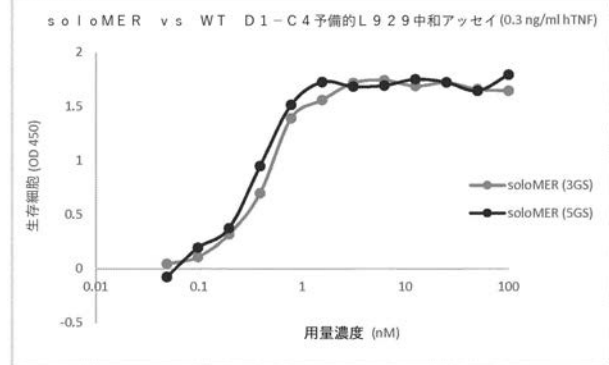
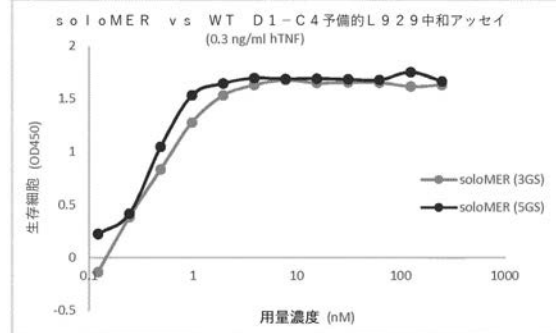
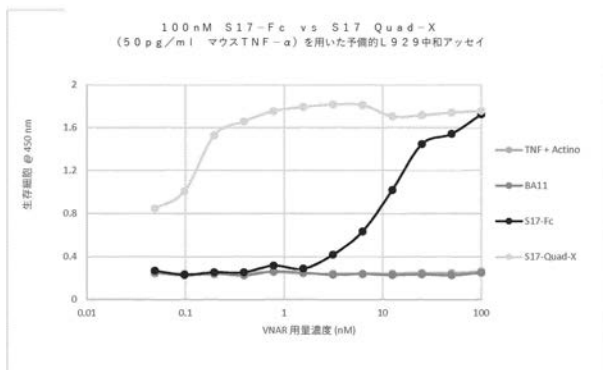


Figure 37B:



【図 38】



【図 39】

Figure 39A

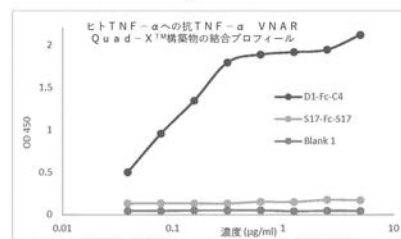


Figure 39B

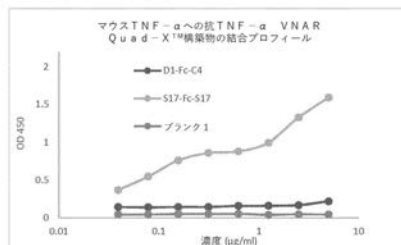
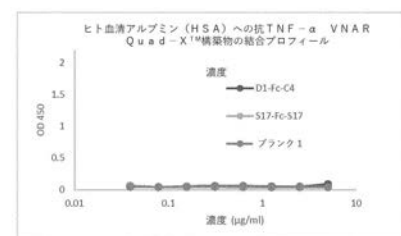


Figure 39C



【配列表】

2020535811000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/076333

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/18 C07K16/24 C07K16/28 A61K39/395 A61P37/06 C07K16/46 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/173975 A1 (UNIV ABERDEEN [GB]) 30 October 2014 (2014-10-30) page 43, lines 22-23 the whole document	1-8,14, 26-32
X	MUELLER MISCHA R ET AL: "Improving the pharmacokinetic properties of biologics by fusion to an anti-HSA shark VNAR domain", MABS, LANDES BIOSCIENCE, US, vol. 4, no. 6, 1 November 2012 (2012-11-01), pages 673-685, XP002700030, ISSN: 1942-0870, DOI: DOI:10.4161/MABS.22242 cited in the application the whole document ----- -/--	1-8,14, 27,28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 November 2018		Date of mailing of the international search report 26/02/2019
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 Bumb, Peter

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/076333

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016/137726 A1 (BARELLE CAROLINE [GB] ET AL) 19 May 2016 (2016-05-19) sequences 83,46,74,79,80,81,82,84,85,86,87,88,74 -----	8
A	KOVALENKO O V ET AL: "Atypical Antigen Recognition Mode of a Shark Immunoglobulin New Antigen Receptor (IgNAR) Variable Domain Characterized by Humanization and Structural Analysis", J. BIOL. CHEM., vol. 288, no. 24, 14 June 2013 (2013-06-14), pages 17408-17419, XP002700029, ISSN: 1083-351X, DOI: 10.1074/JBC.M112.435289 [retrieved on 2013-04-30] the whole document figure 3 -----	8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2018/076333

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.:
1-8, 14, 26-32(all 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/ EP2018/ 076333

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-8, 14, 26-32(all partially)

A multi-domain specific binding molecule comprising two or more VNAR domains which bind to the same or different epitopes of one or more specific antigens, further characterized in terms of their HSA-binding domain, i.e. comprising SEQ. 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87 or 88, or a functional fragment thereof having at least 60% sequence identity thereto.

2. claims: 9-13(completely); 1-8, 14, 26-32(partially)

A multi-domain specific binding molecule comprising two or more VNAR domains which bind to the same or different epitopes of one or more specific antigens, further characterized in terms of further comprising one or more non-VNAR-domains, e.g. an immunoglobulin Fc region or TNFR1.

3. claims: 15-19, 22, 24, 33(completely); 1, 8, 26-32(partially)

Either (a) a multi-domain specific binding molecule comprising two or more VNAR domains which bind to the same or different epitopes of one or more specific antigens or alternatively (b) a single-domain, mono-specific) VNAR-binding domain, further characterized in being specific for TNF-alpha, e.g. comprising CDR1, HV2, HV4, CDR3 or a functional variant thereof as per claim 15 or comprising SEQ. 2, 7 or 12 or a functional variant thereof with a sequence identity of at least 60%, e.g. for treating a condition mediated by TNF-alpha.

4. claims: 20, 21, 23, 25, 34(completely); 1, 8(partially)

Either (a) a multi-domain specific binding molecule comprising two or more VNAR domains which bind to the same or different epitopes of one or more specific antigens or alternatively (b) a single-domain, mono-specific) VNAR-binding domain, further characterized in being specific for ICOSL, i.e. used in a method of treating at least one condition mediated by ICOSL, e.g. comprising SEQ. 65 or 66 or a functional variant thereof with a sequence identity of at least 60%.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/076333

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014173975 A1	30-10-2014	AU 2014257549 A1	26-11-2015
		AU 2014257565 A1	26-11-2015
		CA 2909921 A1	30-10-2014
		CA 2909923 A1	30-10-2014
		CN 105492610 A	13-04-2016
		CN 105531370 A	27-04-2016
		EP 2989203 A2	02-03-2016
		EP 2989204 A1	02-03-2016
		JP 2016524463 A	18-08-2016
		JP 2016524592 A	18-08-2016
		KR 20160010466 A	27-01-2016
		KR 20160015220 A	12-02-2016
		RU 2015146418 A	26-05-2017
		RU 2015146419 A	26-05-2017
		US 2016068600 A1	10-03-2016
		US 2016176951 A1	23-06-2016
		WO 2014173959 A2	30-10-2014
		WO 2014173975 A1	30-10-2014

US 2016137726 A1	19-05-2016	AU 2013257848 A1	27-11-2014
		AU 2018201899 A1	12-04-2018
		AU 2018201901 A1	12-04-2018
		EP 2847229 A1	18-03-2015
		HK 1202556 A1	02-10-2015
		US 2013302250 A1	14-11-2013
		US 2016137726 A1	19-05-2016
		US 2017096475 A1	06-04-2017
		WO 2013167883 A1	14-11-2013

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 16/40	
C 0 7 K 16/26 (2006.01)	C 0 7 K 16/26	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/12 (2006.01)	C 0 7 K 16/12	
C 0 7 K 16/14 (2006.01)	C 0 7 K 16/14	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
	C 1 2 N 5/10	

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

(特許庁注 : 以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72)発明者 バレル , キャロライン

英国 , アバディーンシャー , アバディーン , フォレスターヒル ロード , フォレスターヒル ヘル
ス リサーチ コンプレックス , リバティー ビルディング , ケアオブ エラスモーゲン リミテ
ッド

(72)発明者 ポーター , アンドリュー

英国 , アバディーンシャー , アバディーン , フォレスターヒル ロード , フォレスターヒル ヘル
ス リサーチ コンプレックス , リバティー ビルディング , ケアオブ エラスモーゲン リミテ
ッド

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA02 CA05 CA06 CA08 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y
AB01 AC14 CA25 CA44
4C076 BB11 CC04 CC07 EE41 EE59 FF68
4C085 AA14 AA33 BB17 CC21 CC22 DD62 EE01 EE05 GG01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 FA72 FA74