

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5901517号
(P5901517)

(45) 発行日 平成28年4月13日 (2016. 4. 13)

(24) 登録日 平成28年3月18日 (2016. 3. 18)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 19/00 (2006. 01)
 A 6 1 K 39/395 (2006. 01)
 C 1 2 N 1/15 (2006. 01)
 C 1 2 N 1/19 (2006. 01)
 C 1 2 N 1/21 (2006. 01)

C O 7 K 19/00 Z N A
 A 6 1 K 39/395 H
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21

請求項の数 15 (全 103 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-512354 (P2012-512354)
 (86) (22) 出願日 平成22年5月26日 (2010. 5. 26)
 (65) 公表番号 特表2012-527877 (P2012-527877A)
 (43) 公表日 平成24年11月12日 (2012. 11. 12)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2010/057231
 (87) 国際公開番号 W02010/136483
 (87) 国際公開日 平成22年12月2日 (2010. 12. 2)
 審査請求日 平成25年5月24日 (2013. 5. 24)
 (31) 優先権主張番号 61/181, 893
 (32) 優先日 平成21年5月28日 (2009. 5. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 397009934
 グラクソ グループ リミテッド
 GLAXO GROUP LIMITED
 イギリス ミドルセックス ティーダブリ
 ュ8 9 ジーエス プレントフォード グ
 レイト ウェスト ロード 980
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100122389
 弁理士 新井 栄一
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原結合性タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 つ以上のエピトープ結合ドメインに連結したタンパク質足場を含む抗原結合性タンパク質であって、該抗原結合性タンパク質は少なくとも 2 つの抗原結合部位を有し、そのうちの少なくとも 1 つはエピトープ結合ドメインに由来し、少なくとも 1 つは V H / V L ドメイン対に由来し、該エピトープ結合ドメインが、配列番号 7 8 で示される配列またはその複合 (multiples) を含むペプチドリンカーによって該タンパク質足場に連結された、抗原結合性タンパク質。

【請求項 2】

該リンカーが (T G L D S P)_n (G S)_m (ここで、n = 1 ~ 10、かつ、m = 0 ~ 4) である、請求項 1 に記載の抗原結合性タンパク質。

【請求項 3】

少なくとも 1 つのエピトープ結合ドメインが免疫グロブリン単一可変ドメイン (d A b) である、請求項 1 または 2 に記載の抗原結合性タンパク質。

【請求項 4】

該免疫グロブリン単一可変ドメインがヒト d A b である、請求項 3 に記載の抗原結合性タンパク質。

【請求項 5】

該抗原結合性タンパク質が 2 つ以上の抗原に対する特異性を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗原結合性タンパク質。

【請求項 6】

第 1 の結合部位が抗原上の第 1 のエピトープに対する特異性を有し、第 2 の結合部位が同じ抗原上の第 2 のエピトープに対する特異性を有する、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の抗原結合性タンパク質。

【請求項 7】

該抗原結合性タンパク質が I L - 1 3 に結合可能な、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の抗原結合性タンパク質。

【請求項 8】

該抗原結合性タンパク質が I L - 1 3 および I L - 4 に結合可能な、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗原結合性タンパク質。

10

【請求項 9】

該タンパク質足場が I g 足場である、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗原結合性タンパク質。

【請求項 10】

該エピトープ結合ドメインのうちの少なくとも 1 つがヒト血清アルブミンに結合する、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の抗原結合性タンパク質。

【請求項 11】

医療における使用のための、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の抗原結合性タンパク質。

【請求項 12】

20

請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の抗原結合性タンパク質の重鎖および軽鎖をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドを含む、形質転換またはトランスフェクトされた単離された組換え宿主細胞。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の宿主細胞を培養して前記抗原結合性タンパク質を単離する工程を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の抗原結合性タンパク質の生産方法。

【請求項 14】

請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の抗原結合性タンパク質および製薬上許容可能な担体を含む医薬組成物。

【請求項 15】

30

タンパク質足場に連結した際のエピトープ結合ドメインの結合親和性を改善する方法であって、該エピトープ結合ドメインはリンカーを用いずにタンパク質足場に直接連結された場合に、裸のエピトープ結合ドメインとしてのその結合親和性に比べて低い結合親和性を有するものであり、該タンパク質足場と該エピトープ結合ドメインの間にペプチドリンカーを付加する工程を含み、該ペプチドリンカーが配列番号 78 で示される配列またはその複合 (multiples) を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

本発明は、抗原結合性タンパク質において用いるのに好適なリンカー、ある特定の抗原結合性タンパク質、ならびにこのようなタンパク質の作製方法およびその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体を治療用途に用いることは周知である。

【0003】

抗体は、少なくとも 2 つの重鎖と 2 つの軽鎖を含むヘテロ多量体糖タンパク質である。I g M を除いて、通常、インタクト抗体は約 150 K d a のヘテロテトラマー糖タンパク質であり、2 つの同じ軽鎖 (L) と 2 つの同じ重鎖 (H) により構成される。通常、各軽鎖は 1 つの共有結合性ジスルフィド結合により重鎖と結合するが、免疫グロブリンアイソ

50

タイプによって重鎖間のジスルフィド結合の数は変化する。それぞれ重鎖と軽鎖は鎖内ジスルフィド架橋も有している。各重鎖には、一端に可変ドメイン（VH）があり、続いていくつかの定常領域がある。各軽鎖は、可変ドメイン（VL）と、他端に定常領域を有する。軽鎖の定常領域は重鎖の最初の定常領域と並び、また、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並んでいる。ほとんどの脊椎動物種由来の抗体の軽鎖は、定常領域のアミノ酸配列に基づいて、カッパとラムダと呼ばれる2つのタイプの1つに割り当てられる。ヒト抗体は、重鎖の定常領域のアミノ酸配列によって、5つの異なるクラス、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMに割り当てられる。IgGとIgAは、さらにサブクラス、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、およびIgA1、IgA2に細分化することができる。種変異体はマウスとラットで認められ、少なくともIgG2aとIgG2bがある。可変ドメインは、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる特別の変異性を示す特定の領域によって、抗体に結合特異性を付与する。可変領域の中で、より保存される領域はフレームワーク領域（FR）と呼ばれる。インタクトな重鎖と軽鎖の可変ドメインはそれぞれ3つのCDRによって連結されている4つのFRを含む。各鎖の中のCDRはFR領域によって互いに接近して置かれ、他方の鎖のCDRと共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。定常領域は、抗体の抗原への結合に直接関係しないが、抗体依存性細胞性細胞毒性（ADCC）への関与、Fcγ受容体への結合による食作用、新生児のFc受容体（FcRn）による半減期／クリアランス速度、および補体カスケードのC1qコンポーネントによる補体依存性細胞毒性、等種々のエフェクター機能を示す。

【0004】

2つの抗原結合部位があり、その両方が同じエピトープに特異的であるのが、IgG抗体の構造の特徴である。従って、それらは一重特異性である。

【0005】

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性がある抗体である。そのような抗体を作る方法は、当業者には既知である。本来、二重特異性抗体の組み換え産生は、2つのH鎖が異なる結合特異性を有する2つの免疫グロブリンH鎖L鎖ペアの同時発現に基づいている。Millstein et al, Nature 305 537-539 (1983), WO93/08829 and Trautner et al EMBO, 10, 1991, 3655-3659参照。HとL鎖の任意組み合わせが可能のために、組み合わせ可能な10種の異なる抗体構造の混合物が産生され、その内の1つだけが所望の結合特異性を有する。別のアプローチでは、少なくともヒンジ部、CH2およびCH3領域の一部を含む重鎖定常領域に、所望の結合特異性を備えた可変ドメインを融合させる方法が含まれる。軽鎖結合に必要な部位を含んでいるCH1領域が、少なくとも1つの融合体中に存在するのが好ましい。DNAコードしたこれらの融合体、また、所望ならそのL鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物へ同時導入する。しかし2つあるいは3つすべての鎖のコード配列を1つの発現ベクトルに挿入することも可能である。1つのアプローチでは、二重特異性抗体は、1つのアーム中に一つ目の結合特異性を有するH鎖と、他方のアーム中に二つ目の結合特異性を提供するH-L鎖ペアとで構成される。WO94/04690参照。また、Suresh et al Methods in Enzymology 121, 210, 1986も参照のこと。別のアプローチでは、単ドメイン結合部位を含む抗体分子を含んでいる（WO2007/095338に記述）。

【発明の概要】

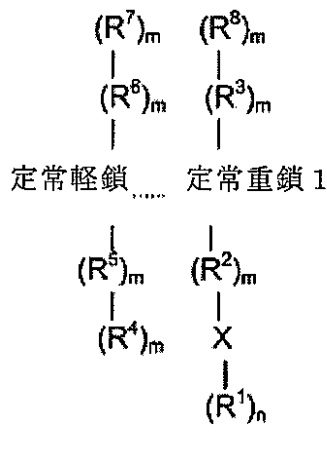
【0006】

本発明は、特に、1つまたは複数のエピトープ結合ドメインに連結されたタンパク質足場を含む抗原結合性タンパク質に関し、この抗原結合性タンパク質は少なくとも2つの抗原結合部位を有し、そのうちの少なくとも1つがエピトープ結合ドメインに由来し、少なくとも1つがペアード（対になった）VH/VLドメインに由来する。

【0007】

本発明はさらに、2つ以上の式I：

【化 1】



10

【0008】

の構造を含む少なくとも1つのホモ二量体を含む抗原結合性タンパク質に関し、

式中、Xは、定常重鎖ドメイン2および定常重鎖ドメイン3を含む定常抗体領域を表し

；

R¹、R⁴、R⁷およびR⁸はエピトープ結合ドメインから独立に選択されたドメインを表し；

R²は、定常重鎖1およびエピトープ結合ドメインからなる群から選択されたドメインを表し；

20

R³は、ペアードV_Hおよびエピトープ結合ドメインからなる群から選択されたドメインを表し；

R⁵は、定常軽鎖およびエピトープ結合ドメインからなる群から選択されたドメインを表し；

R⁶は、ペアードV_Lおよびエピトープ結合ドメインからなる群から選択されたドメインを表し；

nは、0、1、2、3および4から独立に選択された整数を表し；

mは、0および1から独立に選択された整数を表し、

定常重鎖1および定常軽鎖ドメインが会合しており、

30

少なくとも1つのエピトープ結合ドメインが存在し、

さらに、R³がペアードV_Hドメインを表す場合は、R⁶はペアードV_Lドメインを表して、2つのドメインが一緒になって抗原に結合できるようにし；

さらに、エピトープ結合ドメインが本発明のリンカーによって該分子の残りの部分に連結される。

【0009】

本発明は、モノクローナル抗体、または1つもしくは複数の1つ以上のドメイン抗体に連結された断片を含む構造に基づくIgG、ならびにそのようなタンパク質の作製方法およびその使用に関する。

【0010】

40

また、本発明は、本明細書記載のうちのいずれかの抗原結合性タンパク質の重鎖をコードしたポリヌクレオチド配列、および本明細書記載のうちのいずれかの抗原結合性タンパク質の軽鎖をコードしたポリヌクレオチドを提供する。このポリヌクレオチドは、等価のポリペプチド配列に対応するコード配列を示すが、このポリヌクレオチド配列を、開始コドン、適切なシグナル配列および停止コドンと共に発現ベクターに挿入することができることは理解されるであろう。本発明はさらに組み換え型の形質転換または形質移入した宿主細胞を提供し、この宿主細胞は本明細書記載のいずれかの抗原結合性構築物の重鎖、および軽鎖をコードした1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む。

【0011】

さらに、本発明は本明細書記載のいずれかの抗原結合性タンパク質物の産生方法を提供

50

し、この方法は、第1および第2のベクターを含む宿主細胞を無血清培地中で培養するステップを含み、前記第1のベクターが本明細書記載のいずれかの抗原結合性タンパク質の重鎖をコードしたポリヌクレオチドを含み、前記第2のベクターが本明細書記載のいずれかの抗原結合性タンパク質の軽鎖をコードしたポリヌクレオチドを含む。

【0012】

本発明はさらに本明細書記載の抗原結合性タンパク質および製薬上許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。

【0013】

本発明はまた、配列番号85で示される重鎖配列と配列番号3で示される軽鎖配列、または配列番号86で示される重鎖配列と配列番号3で示される軽鎖配列、または配列番号2で示される重鎖配列と配列番号87で示される軽鎖配列、または配列番号2で示される重鎖配列と配列番号88で示される軽鎖配列、または配列番号85で示される重鎖配列と配列番号87で示される軽鎖配列、または配列番号85で示される重鎖配列と配列番号88で示される軽鎖配列、または配列番号86で示される重鎖配列と配列番号87で示される軽鎖配列、または配列番号86で示される重鎖配列と配列番号88で示される軽鎖配列を含むmAb dAbを提供する。

【0014】

定義

本明細書で使われる用語「タンパク質足場」は、限定されるものではないが、免疫グロブリン(Ig)足場、例えば、IgG足場を含み、これは4鎖または2鎖抗体であってもよく、または抗体のFc領域のみを含んでもよく、あるいは1つまたは複数の抗体由来の定常領域を含んでもよい。また、この定常領域は、ヒトまたは霊長類起源であっても、ヒトまたは霊長類定常領域の人工キメラであってもよい。このようなタンパク質足場は、1つまたは複数の定常領域の他に抗原結合性部位を含んでもよい。例えば、タンパク質足場がIgG全体を含む場合もある。このようなタンパク質足場は、他のタンパク質ドメイン、例えばエピトープ結合ドメインまたはScFvドメイン、等の抗原結合部位を有するタンパク質ドメインに結合可能である。

【0015】

「ドメイン」は、他のタンパク質とは独立した三次構造を有する折り畳まれたタンパク質構造である。通常、ドメインは領域タンパク質の多様な機能特性の原因であり、多くの場合、タンパク質および／またはドメインの残りの部分の機能を失うことなく、他のタンパク質に付加、除去または移動可能である。「単一抗体可変ドメイン」は、抗体可変ドメインに特徴的な配列を含む、折り畳みポリペプチド領域である。従って、これは完全抗体可変ドメイン、および、例えば、1つまたは複数のループが抗体可変ドメインの特徴を有しない配列、または切断された抗体可変ドメインやNやC末端延長部を含む抗体可変ドメインにより置換された修飾可変ドメイン、ならびに少なくとも全長領域の結合活性と特異性を保持している可変ドメインの折り畳まれた断片を含む。

【0016】

語句「免疫グロブリン単一可変ドメイン」は、別の可変領域またはドメインとは独立に、抗原またはエピトープに特異的に結合する抗体可変ドメイン(V_H 、 V_{HH} 、 V_L)を指す。免疫グロブリン単一可変ドメインは、他の異なる可変領域または可変ドメインと共に、ある種のフォーマット(例えば、ホモまたはヘテロ多量体)で存在できる。この場合、他の領域またはドメインは、単一免疫グロブリン可変ドメインによる抗原結合には要求されていない(すなわち、免疫グロブリン単一可変ドメインは新たな可変ドメインとは独立に抗原に結合する)。本明細書で使われる場合、「ドメイン抗体」または「dAb」は、抗原に結合が可能な「免疫グロブリン単一可変ドメイン」と同じである。免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト抗体可変ドメインであってもよいが、例えばげっ歯類(例はWO00/29004で開示)、テンジクザメおよびラクダの V_{HH} dAb、等他の種由来の単一抗体可変ドメインを含んでもよい。ラクダ V_{HH} はラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダ、およびグアナコ等の種由来の免疫グロブリン単一可変ドメインポリペプチ

ドであり、これは元々軽鎖の欠けた重鎖抗体を産生する。この V_{HH} 領域は、当業者に利用可能な標準的な方法によりヒト化されてもよく、この領域も本発明による「ドメイン抗体」と考えられる。本明細書で使われる「 V_H 」はラクダ V_{HH} ドメインを含む。NARVは、テンジクザメを含む軟骨魚類で特定された別のタイプの免疫グロブリン単一可変ドメインである。また、これらの領域は、新規抗原受容体可変領域（通常、 $V(NAR)$ またはNARVと省略）としても知られる。詳細は、Mol. Immunol. 44, 656-665 (2006) およびUS 20050043519A参照。

【0017】

用語「エピトープ結合ドメイン」は、別の可変領域またはドメインとは独立に、抗原またはエピトープに特異的に結合するドメインを指す。これは、免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えばヒト、ラクダ（ナノボディ）またはサメの免疫グロブリン単一可変ドメインであってもよく、または非免疫グロブリンドメイン、例えば、下記を含む群から選択された足場の誘導体であってもよい：CTLA-4 (Evi body)；リポカリン；プロテインA由来分子、例えばプロテインAのZ-領域（アフィボディ、SpA）、A-領域（アビマー／マキシボディ (Maxi body)）；熱ショックタンパク質、例えばGroELとGroES；トランスフェリン（トランスボディ (Trans-body)）；アンキリンリピートタンパク質（DARPin）；ペプチドアプタマー；C-タイプレクチン領域（テトラネクチン）；ヒト γ クリスタリンおよびヒトユビキチン (affilin)；PDZドメイン；ヒトプロテアーゼ阻害剤のスコーピオントキシンクニッツタイプドメイン；およびフィブロネクチン（アドネクチン (adnectin)）；これらは天然のリガンド以外のリガンドに結合させるためにタンパク質工学による操作が行われたものである。

【0018】

CTLA-4（細胞毒性Tリンパ球関連抗原4）は主にCD4+T細胞上に発現するCD28ファミリー受容体である。その細胞外ドメインは可変ドメイン様Ig折畳を有する。抗体のCDRに対応するループは、異種の配列と置換することにより異なる結合特性を付与することができる。異なる結合特異性を有するように操作されたCTLA-4分子は、Evi bodyとして知られている。詳細は、Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)を参照のこと。

【0019】

リポカリンは細胞外タンパク質ファミリーで、ステロイド、ビリル、レチノイドおよび脂質、等の小さな疎水性の分子を輸送する。これらは、円錐形構造の開口端に多くのループがある強固な β -シート二次構造を有し、これは別の標的抗原に結合するように操作できる。アンチカリンはサイズが160-180アミノ酸で、リポカリン由来である。詳細は、Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000), US 7250297B1およびUS 20070224633を参照のこと。

【0020】

アフィボディは、黄色ブドウ球菌のプロテインA由来の足場で、抗原結合するように操作できる。このドメインは約58のアミノ酸からなる3つのらせん状束で構成される。ライブラリは表面残基の無作為化により生成されている。詳細は、Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004) およびEP 1641818A1を参照のこと。

【0021】

アビマーは、A-ドメイン足場ファミリー由来の多ドメインタンパク質である。約35アミノ酸の未変性ドメインは、明確なジスルフィド結合構造をとっている。多様性は、A-ドメインファミリー中の天然突然変異の混ぜ合わせにより生成されている。詳細は、Nature Biotechnology 23 (12), 1556-1561 (2005) and Expert Opinion on Investigational Drugs 16 (6), 909-917 (June 2007)を参照のこと。

と。

【0022】

トランスフェリンは、単量体血清輸送糖タンパク質である。トランスフェリンは許容表面ループに挿入する操作により別の標的抗原に結合させることができる。操作したトランスフェリン足場の例には、トランスボディがある。詳細は、J. Biol. Chem. 274, 24066-24073 (1999) 参照。

【0023】

設計アンキリンリピートタンパク質 (DARPin) は、膜内在性タンパク質の細胞骨格への連結を媒介するタンパク質ファミリーであるアンキリン由来である。アンキリンの一つの繰り返し単位は33残基のモチーフで、2つの α -螺旋と β -回転とで構成される。これらは、各繰り返し中の一つ目の α -らせんと β -回転の残基を無作為化することにより標的抗原に結合するよう操作できる。これらの結合面は、分子の数を増やすことにより増加させることができる (親和性成熟の方法)。詳細は、J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) と J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) および US 20040132028 A1 参照。

【0024】

フィブロネクチンは、抗原に結合させるように操作可能な足場である。アドネクチンは、ヒトIII型フィブロネクチン (FN3) における15繰り返し単位のうちの10番目のドメインの天然アミノ酸配列骨格からなる。 β -サンドイッチの一端の3つのループは操作によりアドネクチンに特異的に治療標的を認識させることができる。詳細は、Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005), US 20080139791, WO2005056764 および US 6818418 B1 参照。

【0025】

ペプチドアダプターはコンビナトリアル認識分子で、定常性足場タンパク質で構成され、このタンパク質の典型的例には、活性部位に挿入された制限付き可変ペプチドループを含むチオレドキシン (TrxA) がある。詳細は、Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005) 参照。

【0026】

マイクロボディは、長さ25-50アミノ酸の自然発生のマイクロタンパク質由来で、3-4システインブリッジを含む。マイクロタンパク質の例には、Kalata B1、コトキシシンおよびノッティンがある。マイクロタンパク質は、ループを有し、これは、マイクロタンパク質全体の折り畳みに影響を与えないで25アミノ酸まで含有するように操作できる。操作されたノッティンドメインの詳細については、WO2008098796 参照。

【0027】

他のエピトープ結合ドメインには、別の標的抗原の結合特性を操作するための足場として使われてきたタンパク質、例えばヒト γ -クリスタリンおよびヒトユビキチン (affilin)、ヒトプロテアーゼ阻害剤のkunitzタイプドメイン、Ras-結合タンパク質AF-6のPDZドメイン、サソリ毒 (カリブドトキシシン)、C-タイプレクチンドメイン (テトラネクチン) がある (これらは、Handbook of Therapeutic Antibodies (2007, edited by Stefan Dubel) の7章 Non-Antibody Scaffolds および Protein Science 15:14-27 (2006) でレビューされている)。本発明のエピトープ結合ドメインは、これらの代替タンパク質ドメインに由来してもよい。

【0028】

本明細書で使われる用語「ペアード V_H ドメイン」、「ペアード V_L ドメイン」、および「ペアード V_H/V_L ドメイン」は、それらのパートナー可変ドメインペアとペアの場合のみ抗原に特異的に結合する抗体可変ドメインを指す。いずれの対形成でも常に1つの

10

20

30

40

50

V_H と1つの V_L があり、用語「ペアード V_H ドメイン」は V_H パートナーを指し、用語「ペアード V_L ドメイン」は V_L パートナーを指し、用語「ペアード V_H/V_L ドメイン」は2つのドメインを一緒に表す。

【0029】

本発明の一実施形態では、抗原結合部位は、少なくとも、 K_d 値1mMで抗原に結合し、例えばBiacore（登録商標）、例えば実施例7に記載されているBiacore（登録商標）で測定して K_d 値10nM、1nM、500pM、200pM、100pM、で各抗原に結合する。

【0030】

本明細書で使われる用語「抗原結合部位」は、抗原に特異的に結合可能なタンパク質上の部位を指し、単一ドメイン、例えばエピトープ結合ドメインであっても、標準的抗体上に認められるペアード V_H/V_L ドメインであってもよい。本発明の一部の態様では、単一鎖Fv（ScFv）ドメインは抗原結合性部位を提供できる。

【0031】

用語「mAb/dAb」および「dAb/mAb」は、本明細書では本発明の抗原結合性タンパク質を指す。この2つの用語は、本明細書では相互に置き換え可能な使い方が可能で、同じ意味が意図されている。

【0032】

用語「定常重鎖1」は本明細書では、免疫グロブリン重鎖のCH1ドメインを指す。

【0033】

用語「定常軽鎖」は本明細書では、免疫グロブリン軽鎖の定常ドメインを指す。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】ELISAで決定された、GSおよびGS（TVAAPSGS） $n=1-4$ リンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質（BPC2201、2202、2203、2209およびBPC2210）の、ヒトIL-4に対する結合を示すグラフである。

【図2】ELISAで決定された、GSおよびGS（TVAAPSGS） $n=1-4$ リンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質（BPC2201、2202、2203、2209およびBPC2210）の、ヒトIL-13に対する結合を示すグラフである。

【図3】ELISAで決定された、（PAS） $n=1-3$ GSおよび（G₄S） $n=1-3$ リンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質（BPC2204～BPC2208およびBPC2220）の、ヒトIL-4に対する結合を示すグラフである。

【図4】ELISAで決定された、（PAS） $n=1-3$ GSおよび（G₄S） $n=1-3$ リンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質（BPC2204～BPC2208およびBPC2220）の、ヒトIL-13に対する結合を示すグラフである。

【図5】ELISAで決定された、（PAVPPP） $n=1-3$ GS、（TVSDVP） $n=1-2$ GSおよび（TGLDSP） $n=1-3$ GSリンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質（BPC2211～BPC2215およびBPC2217～BPC2219）の、ヒトIL-4に対する結合を示すグラフである。

【図6】ELISAで決定された、（PAVPPP） $n=1-3$ GS、（TVSDVP） $n=1-2$ GSおよび（TGLDSP） $n=1-3$ GSリンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質（BPC2211～BPC2215およびBPC2217～BPC2219）の、ヒトIL-13に対する結合を示すグラフである。

【図7】ELISAで決定された、GSおよびGS（TVAAPSGS） $n=1-4$ 、（PAS） $n=1-3$ GSおよび（G₄S） $n=1-3$ リンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質（BPC2221～BPC2231）の、ヒトIL-4に対する結合を示すグラフである。

【図8】ELISAで決定された、GSおよびGS（TVAAPSGS） $n=1-4$ 、（

10

20

30

40

50

PAS)_{n=1-3}GSおよび(G₄S)_{n=1-3}リンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質(BPC2221~BPC2231)の、ヒトIL-13に対する結合を示すグラフである。

【図9】ELISAで決定された、(PAVPPP)_{n=1-3}GSおよびTVSDVPGSおよび(TGLDSP)_{n=2-3}GSリンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質(BPC2234~BPC2237、BPC2241およびBPC2242)の、ヒトIL-4に対する結合を示すグラフである。

【図10】ELISAで決定された、(PAVPPP)_{n=1-3}GSおよびTVSDVPGSおよび(TGLDSP)_{n=2-3}GSリンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質(BPC2234~BPC2237、BPC2241およびBPC2242)の、ヒトIL-13に対する結合を示すグラフである。

10

【図11】ELISAで決定された、精製mAb dAb(BPC1085、BPC1086およびBPC1087)の、ヒトIL-4に対する結合を示すグラフである。IL-4対照mAbは「パスコリズマブ」と表示されている。

【図12】TF-1細胞バイオアッセイにおける、ヒトIL-4に対する精製mAb dAb(BPC1085、BPC1086およびBPC1087)によるヒトIL-4の中和を示すグラフである。IL-4対照mAbは「パスコリズマブ」と表示されている。

【図13】TF-1細胞バイオアッセイにおける、ヒトIL-13に対する精製mAb dAb(BPC1085、BPC1086およびBPC1087)によるヒトIL-13の中和を示すグラフである。IL-4対照mAbは「パスコリズマブ」と表示されている。

20

【図14】ELISAで決定された、BPC2651、BPC2652およびBPC2653のTNF α に対する結合を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0035】

本発明は、1つまたは複数のエピトープ結合ドメインに連結したタンパク質足場を含む抗原結合性タンパク質であって、少なくとも2つの抗原結合部位を有し、そのうちの少なくとも1つはエピトープ結合ドメインに由来し、少なくとも1つはペアードVH/VLドメインに由来する抗原結合性タンパク質に関する。

【0036】

このような抗原結合性タンパク質は、タンパク質足場を含み、この足場は、例えばIgG等のIg足場、例えば1つまたは複数のエピトープ結合ドメインに結合するモノクローナル抗体、例えばドメイン抗体を含み、結合タンパク質少なくとも2つの抗原結合部位を有し、そのうちの少なくとも1つがエピトープ結合ドメインに由来する。また、本発明はこれを産生する方法およびその使用、特に治療での使用に関する。

30

【0037】

本発明の抗原結合性タンパク質はmAb dAbまたはdAb mAbとも呼ばれる。

【0038】

一実施形態では、本発明の抗原結合性タンパク質のタンパク質足場は、Ig足場、例えばIgG足場またはIgA足場である。IgG足場は、抗体の全てのドメイン(すなわち、CH1、CH2、CH3、V_H、V_L)を含んでもよい。本発明の抗原結合性タンパク質はIgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはIgG4PEから選択されたIgG足場を含んでもよい。

40

【0039】

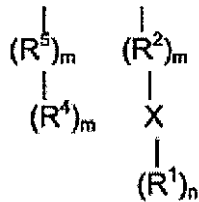
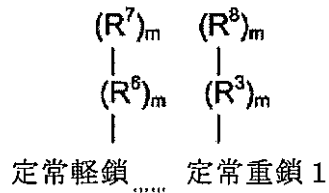
本発明の抗原結合性タンパク質は少なくとも2つの抗原結合部位を有し、例えば2つの結合部位のうち、一つ目の結合部位は抗原上の第1のエピトープに特異性を有し、二つ目の結合部位は同じ抗原上の第2のエピトープに特異性を有する。さらなる実施形態では、4つの抗原結合部位、または6つの抗原結合部位、または8つの抗原結合部位、または10個以上の抗原結合部位が存在する。一実施形態では、抗原結合性タンパク質は2つ以上の抗原、例えば2つの抗原、または3つの抗原、または4つの抗原に対して特異性を有する。

50

【0040】

別の態様では、本発明は、2つ以上の式 I の構造を含むホモ二量体の少なくとも1つを含む抗原結合性タンパク質に関する：

【化2】



(I)

10

【0041】

式中、Xは、定常重鎖ドメイン2および定常重鎖ドメイン3を含む定常抗体領域を表し；

20

R¹、R⁴、R⁷およびR⁸はエピトープ結合ドメインから独立に選択されたドメインを表し；

R²は、定常重鎖1およびエピトープ結合ドメインからなる群から選択されたドメインを表し；

R³は、ペアードV_Hおよびエピトープ結合ドメインからなる群から選択されたドメインを表し；

R⁵は、定常軽鎖およびエピトープ結合ドメインからなる群から選択されたドメインを表し；

R⁶は、ペアードV_Lおよびエピトープ結合ドメインからなる群から選択されたドメインを表し；

30

nは、0、1、2、3および4から独立に選択された整数を表し；

mは、0および1から独立に選択された整数を表し、

定常重鎖1および定常軽鎖ドメインが会合しており、

少なくとも1つのエピトープ結合ドメインが存在し、

さらに、R³がペアードV_Hドメインを表す場合は、R⁶はペアードV_Lドメインを表して、2つのドメインが一緒になって抗原に結合できるようにする。

【0042】

一実施形態では、R⁶はペアードV_Lを表し、R³はペアードV_Hを表す。

【0043】

さらなる実施形態では、R⁷とR⁸のどちらか、または両方がエピトープ結合ドメインを表す。

40

【0044】

またさらなる実施形態では、R¹とR⁴のどちらか、または両方がエピトープ結合ドメインを表す。

【0045】

一実施形態では、R⁴が存在する。

【0046】

一実施形態では、R¹、R⁷およびR⁸はエピトープ結合ドメインを表す。

【0047】

一実施形態では、R¹、R⁷、R⁸およびR⁴はエピトープ結合ドメインを表す。

50

【0048】

一実施形態では、 $(R^1)_n$ 、 $(R^2)_m$ 、 $(R^4)_m$ および $(R^5)_m = 0$ 、すなわち存在せず、 R^3 はペアード V_H ドメインであり、 R^6 はペアード V_L ドメインであり、 R^8 は $V_H d A b$ であり、および R^7 は $V_L d A b$ である。

【0049】

別の実施形態では、 $(R^1)_n$ 、 $(R^2)_m$ 、 $(R^4)_m$ および $(R^5)_m$ は0、すなわち存在せず、 R^3 はペアード V_H ドメインであり、 R^6 はペアード V_L ドメインであり、 R^8 は $V_H d A b$ であり、および $(R^7)_m = 0$ すなわち存在しない。

【0050】

別の実施形態では、 $(R^2)_m$ および $(R^5)_m$ は0、すなわち存在せず、 R^1 は $d A b$ であり、 R^4 は $d A b$ であり、 R^3 はペアード V_H ドメインであり、 R^6 はペアード V_L ドメインであり、 $(R^8)_m$ と $(R^7)_m = 0$ 、すなわち存在しない。

10

【0051】

本発明の一実施形態では、エピトープ結合ドメインは免疫グロブリン単一可変ドメインである。

【0052】

本明細書記載の抗原結合性タンパク質はいずれも1つまたは複数の抗原を中和することができることは、理解されるであろう。

【0053】

本発明の抗原結合性タンパク質に関連して本明細書で使われる用語「中和する」およびその文法的変形体は、本発明の抗原結合性タンパク質の存在下、このような抗原結合性タンパク質の無い場合の標的の活性に比較して、全体的または部分的に標的の生物活性が低下することを意味する。限定されないが、中和は、リガンドのブロック、受容体を活性化するリガンドの阻害、受容体の発現低下、またはエフェクター機能への作用のうちの1つまたは複数であってもよい。

20

【0054】

中和のレベルはいくつかの方法、例えば、下記の実施例および方法、例えば、受容体に対するリガンドの結合の阻害を測定するアッセイで示されるような任意のアッセイの使用により測定可能である。このようなアッセイでは、リガンドの中和は、中和作用のある抗原結合性タンパク質の存在下でリガンドとその受容体の間の結合性の低下を評価することにより測定することができる。

30

【0055】

中和のレベルは、例えば、実施例4.3または4.4に記載されるように実施可能なTF1アッセイで測定することができる。このアッセイでは、IL-4、IL-13またはこれらサイトカインの両方の中和は、中和作用のある抗原結合性タンパク質の存在下でTF1細胞増殖の阻害を評価することにより測定することができる。

【0056】

中和を評価する他の方法、例えば中和する抗原結合性タンパク質の存在下、リガンドとその受容体間の結合低下を評価することにより測定する方法は、当業者には既知であり、例えば、ELISAリガンド受容体阻害アッセイまたはBiacore（商標）アッセイがある。

40

【0057】

本発明の別の態様では、少なくとも実質的に本明細書で例示されているものと等価な中和活性を有する抗原結合性タンパク質、例えば、実施例2で示されるIL-13/4結合アッセイにおいてBPC2201、BPC2202、BPC2203、BPC2209、BPC2210、BPC2204～BPC2208およびBPC2220の中和活性を保持する抗原結合性タンパク質が提供される。

【0058】

本発明の抗原結合性タンパク質は、例えば、IL-13に結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはIL-13に結合するペアード V_H/V_L を含むIL-13に対

50

して特異性を有するものを含む。抗原結合性タンパク質は I L - 1 3 に結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は I L - 1 3 に結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0059】

一実施形態では、本発明の抗原結合性タンパク質は、例えば、I L - 1 3、I L - 5 および I L - 4 から選択される 2 つ以上の抗原に結合可能な場合、I L - 1 3 および I L - 4 に結合可能な場合、I L - 1 3 および I L - 5 に結合可能な場合、または I L - 5 および I L - 4 に結合可能な場合のように 2 つ以上の抗原に対して特異性を有する。一実施形態では、本発明の抗原結合性タンパク質は、例えば、I L - 1 3、I L - 5 および I L - 4 から選択される 2 つ以上の抗原に結合可能な場合、例えば、I L - 1 3 および I L - 4 に同時に結合可能な場合、または I L - 1 3 および I L - 5 に同時に結合可能な場合、または I L - 5 および I L - 4 に同時に結合可能な場合のように 2 つ以上の抗原に対して特異性を有する。

10

【0060】

本明細書記載の抗原結合性タンパク質はいずれも、例えば実施例 3 に記載されたような適切なアッセイを使った化学量論的解析により測定することにより、同時に 2 つ以上の抗原に結合可能であってもよいことは理解されよう。

【0061】

本発明の抗原結合性タンパク質の例には、重鎖の C 末端もしくは N 末端、または軽鎖の C 末端もしくは N 末端に結合した、I L - 4 に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗 I L - 4 免疫グロブリン単一可変ドメインを有する I L - 1 3 抗体がある。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖の N 末端に結合した、I L - 4 エピトープ結合ドメインを有する I L - 1 3 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖の N 末端に結合した I L - 4 エピトープ結合ドメインを有する I L - 1 3 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖の C 末端に結合した I L - 4 エピトープ結合ドメインを有する I L - 1 3 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖の C 末端に結合した I L - 4 エピトープ結合ドメインを有する I L - 1 3 抗体が含まれる。また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖の C 末端および／または N 末端、および／または、軽鎖の C 末端および／または N 末端に結合した 1 つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。本発明で用いられる I L - 1 3 抗体には、配列番号 2 8 で示される重鎖配列および配列番号 2 7 で示される軽鎖配列を含むものが含まれる。

20

30

【0062】

このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖の C 末端もしくは N 末端、または軽鎖の C 末端もしくは N 末端に結合した、I L - 1 3 に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗 I L - 1 3 免疫グロブリン単一可変ドメインを有する I L - 4 抗体がある。

【0063】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖の N 末端に結合した I L - 1 3 エピトープ結合ドメインを有する I L - 4 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖の N 末端に結合した I L - 1 3 エピトープ結合ドメインを有する I L - 4 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖の C 末端に結合した I L - 1 3 エピトープ結合ドメインを有する I L - 4 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖の C 末端に結合した I L - 1 3 エピトープ結合ドメインを有する I L - 4 抗体が含まれる。また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖の C 末端および／または N 末端、および／または、軽鎖の C 末端および／または N 末端に結合した 1 つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。

40

【0064】

本発明で用いられる I L - 4 抗体には、配列番号 2 で示される重鎖配列および配列番号 3 で示される軽鎖配列を含むものが含まれる。

50

【0065】

このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、IL-5に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗IL-5免疫グロブリン単一可変ドメインを有するIL-13抗体がある。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のN末端に結合したIL-5エピトープ結合ドメインを有するIL-13抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のN末端に結合したIL-5エピトープ結合ドメインを有するIL-13抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のC末端に結合したIL-5エピトープ結合ドメインを有するIL-13抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したIL-5エピトープ結合ドメインを有するIL-13抗体が含まれる。また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖のC末端および／またはN末端、および／または、軽鎖のC末端および／またはN末端に結合した1つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。

10

【0066】

このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、IL-13に対する特異性エピトープ結合ドメイン、例えば、抗IL-13免疫グロブリン単一可変ドメインを有するIL-5抗体がある。

【0067】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のN末端に結合したIL-13エピトープ結合ドメインを有するIL-5抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のN末端に結合したIL-13エピトープ結合ドメインを有するIL-5抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のC末端に結合したIL-13エピトープ結合ドメインを有するIL-5抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したIL-13エピトープ結合ドメインを有するIL-5抗体が含まれる。また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖のC末端および／またはN末端、および／または、軽鎖のC末端および／またはN末端に結合した1つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。本発明で用いられるIL-5抗体には、配列番号91で示される重鎖配列および配列番号92で示される軽鎖配列を含むものが含まれる。

20

【0068】

このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、IL-5に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗IL-5免疫グロブリン単一可変ドメインを有するIL-4抗体がある。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のN末端に結合したIL-5エピトープ結合ドメインを有するIL-4抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のN末端に結合したIL-5エピトープ結合ドメインを有するIL-4抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のC末端に結合したIL-5エピトープ結合ドメインを有するIL-4抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したIL-5エピトープ結合ドメインを有するIL-4抗体が含まれる。また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖のC末端および／またはN末端、および／または、軽鎖のC末端および／またはN末端に結合した1つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。

30

40

【0069】

このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、IL-4に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗IL-4免疫グロブリン単一可変ドメインを有するIL-5抗体がある。

【0070】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のN末端に結合したIL-4エピトープ結合ドメインを有するIL-5抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖の

50

N末端に結合した I L-4 エピトープ結合ドメインを有する I L-5 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖の C 末端に結合した I L-4 エピトープ結合ドメインを有する I L-5 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖の C 末端に結合した I L-4 エピトープ結合ドメインを有する I L-5 抗体が含まれる。また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖の C 末端および／または N 末端、および／または、軽鎖の C 末端および／または N 末端に結合した 1 つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。

【0071】

本発明はまた、I L-4、I L-13 および I L-5 に結合可能な三重特異性結合性タンパク質も提供する。

10

【0072】

このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖の C 末端もしくは N 末端、または軽鎖の C 末端もしくは N 末端に結合した、I L-4 に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗 I L-4 免疫グロブリン単一可変ドメイン、ならびに重鎖の C 末端もしくは N 末端、または軽鎖の C 末端もしくは N 末端に結合した、I L-13 に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗 I L-13 免疫グロブリン単一可変ドメインを有する I L-5 抗体がある。

【0073】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖の N 末端に結合した I L-4 エピトープ結合ドメイン、および軽鎖の N 末端に結合した I L-13 エピトープ結合ドメインを有する I L-5 抗体が含まれる。

20

【0074】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖の N 末端に結合した I L-4 エピトープ結合ドメイン、および軽鎖の C 末端に結合した I L-13 エピトープ結合ドメインを有する I L-5 抗体が含まれる。

【0075】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖の N 末端に結合した I L-4 エピトープ結合ドメイン、および重鎖の C 末端に結合した I L-13 エピトープ結合ドメインを有する I L-5 抗体が含まれる。

【0076】

30

本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖の N 末端に結合した I L-4 エピトープ結合ドメイン、および軽鎖の C 末端に結合した I L-13 エピトープ結合ドメインを有する I L-5 抗体が含まれる。

【0077】

本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖の N 末端に結合した I L-4 エピトープ結合ドメイン、および重鎖の C 末端に結合した I L-13 エピトープ結合ドメインを有する I L-5 抗体が含まれる。

【0078】

本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖の N 末端に結合した I L-4 エピトープ結合ドメイン、および重鎖の N 末端に結合した I L-13 エピトープ結合ドメインを有する I L-5 抗体が含まれる。

40

【0079】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖の C 末端に結合した I L-4 エピトープ結合ドメイン、および軽鎖の C 末端に結合した I L-13 エピトープ結合ドメインを有する I L-5 抗体が含まれる。

【0080】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖の C 末端に結合した I L-4 エピトープ結合ドメイン、および軽鎖の N 末端に結合した I L-13 エピトープ結合ドメインを有する I L-5 抗体が含まれる。

【0081】

50

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のC末端に結合したI L-4エピトープ結合ドメイン、および重鎖のN末端に結合したI L-13エピトープ結合ドメインを有するI L-5抗体が含まれる。

【0082】

本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したI L-4エピトープ結合ドメイン、および重鎖のC末端に結合したI L-13エピトープ結合ドメインを有するI L-5抗体が含まれる。

【0083】

本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したI L-4エピトープ結合ドメイン、および重鎖のN末端に結合したI L-13エピトープ結合ドメインを有するI L-5抗体が含まれる。

10

【0084】

本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したI L-4エピトープ結合ドメイン、および軽鎖のN末端に結合したI L-13エピトープ結合ドメインを有するI L-5抗体が含まれる。

【0085】

また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖のC末端および／またはN末端、および／または、軽鎖のC末端および／またはN末端に結合した1つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。

【0086】

20

本発明の抗原結合性タンパク質には、I L-18に対する特異性を有するもの、例えば、I L-18に結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはI L-18に結合するペアードVH/VLを含むものが含まれる。

【0087】

抗原結合性タンパク質は、I L-18に結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、I L-18に結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0088】

本発明はまた、I L-4、I L-13およびI L-18に結合可能な三重特異性結合タンパク質も提供する。

【0089】

30

このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端I L-18に結合した、I L-4に対する特異性エピトープ結合ドメイン、例えば、抗I L-4免疫グロブリン単一可変ドメイン、および重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、I L-13に対する特異性エピトープ結合ドメイン、例えば、抗I L-13免疫グロブリン単一可変ドメインを有する抗体がある。

【0090】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のN末端に結合したI L-4エピトープ結合ドメイン、および軽鎖のN末端に結合したI L-13エピトープ結合ドメインを有するI L-18抗体が含まれる。

40

【0091】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のN末端に結合したI L-4エピトープ結合ドメイン、および軽鎖のC末端に結合したI L-13エピトープ結合ドメインを有するI L-18抗体が含まれる。

【0092】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のN末端に結合したI L-4エピトープ結合ドメイン、および重鎖のC末端に結合したI L-13エピトープ結合ドメインを有するI L-18抗体が含まれる。

【0093】

本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のN末端に結合したI L-4エピトープ結合

50

ドメイン、および軽鎖のC末端に結合したIL-13エピトープ結合ドメインを有するIL-18抗体が含まれる。

【0094】

本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のN末端に結合したIL-4エピトープ結合ドメイン、および重鎖のC末端に結合したIL-13エピトープ結合ドメインを有するIL-18抗体が含まれる。

【0095】

本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のN末端に結合したIL-4エピトープ結合ドメイン、および重鎖のN末端に結合したIL-13エピトープ結合ドメインを有するIL-18抗体が含まれる。

10

【0096】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のC末端に結合したIL-4エピトープ結合ドメイン、および軽鎖のC末端に結合したIL-13エピトープ結合ドメインを有するIL-18抗体が含まれる。

【0097】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のC末端に結合したIL-4エピトープ結合ドメイン、および軽鎖のN末端に結合したIL-13エピトープ結合ドメインを有するIL-18抗体が含まれる。

【0098】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のC末端に結合したIL-4エピトープ結合ドメイン、および重鎖のN末端に結合したIL-13エピトープ結合ドメインを有するIL-18抗体が含まれる。

20

【0099】

本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したIL-4エピトープ結合ドメイン、および重鎖のC末端に結合したIL-13エピトープ結合ドメインを有するIL-18抗体が含まれる。

【0100】

本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したIL-4エピトープ結合ドメイン、および重鎖のN末端に結合したIL-13エピトープ結合ドメインを有するIL-18抗体が含まれる。

30

【0101】

本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したIL-4エピトープ結合ドメイン、および軽鎖のN末端に結合したIL-13エピトープ結合ドメインを有するIL-18抗体が含まれる。

【0102】

また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖のC末端および／またはN末端、および／または、軽鎖のC末端および／またはN末端に結合した1つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。

【0103】

本発明の抗原結合性タンパク質には、TNF α に対する特異性を有するもの、例えば、TNF α に結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはTNF α に結合するペアーD VH/VLを含むものが含まれる。

40

【0104】

抗原結合性タンパク質は、TNF α に結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、TNF α に結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0105】

一実施形態では、本発明の抗原結合性タンパク質は、例えば、TNF α 、EGFRおよびVEGFから選択される2つ以上の抗原に結合可能な場合、例えば、TNF α およびEGFRに結合可能な場合、またはTNF α およびVEGFに結合可能な場合、またはEGFRおよびVEGFに結合可能な場合のように2つ以上の抗原に対して特異性を有する

50

。このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、EGFRに対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗EGFR免疫グロブリン単一可変ドメインを有するTNF α 抗体がある。

【0106】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のN末端に結合したEGREピトープ結合ドメインを有するTNF α 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のN末端に結合したEGFRエピトープ結合ドメインを有するTNF α 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のC末端に結合したEGFRエピトープ結合ドメインを有するTNF α 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したEGFRエピトープ結合ドメインを有するTNF α 抗体が含まれる。また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖のC末端および／またはN末端、および／または、軽鎖のC末端および／またはN末端に結合した1つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。

10

【0107】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のN末端に結合したTNF α エピトープ結合ドメインを有するEGFR抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のN末端に結合したTNF α エピトープ結合ドメインを有するEGFR抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のC末端に結合したTNF α エピトープ結合ドメインを有するEGFR抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したTNF α エピトープ結合ドメインを有するEGFR抗体が含まれる。また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖のC末端および／またはN末端、および／または、軽鎖のC末端および／またはN末端に結合した1つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。

20

【0108】

このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、VEGFに対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗VEGF免疫グロブリン単一可変ドメインを有するTNF α 抗体がある。

【0109】

本発明の抗原結合性タンパク質は、例えばTNF α に結合可能な場合のように2つ以上の抗原に対して、また、例えばTNF α およびIL-4に結合可能な場合、またはTNF α およびIL-13に結合可能な場合、またはTNF α およびIL-13およびIL-4に結合可能な場合のようにIL-4およびIL-13から選択される一方または両方の抗原に対して特異性を有してもよい。このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、TNF α に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗TNF α アドネクチンを有するIL-13抗体がある。このような抗原結合性タンパク質の他の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、TNF α に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗TNF α アドネクチンを有するIL-4抗体がある。

30

40

【0110】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のN末端に結合したVEGFエピトープ結合ドメインを有するTNF α 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のN末端に結合したVEGFエピトープ結合ドメインを有するTNF α 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のC末端に結合したVEGFエピトープ結合ドメインを有するTNF α 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したVEGFエピトープ結合ドメインを有するTNF α 抗体が含まれる。また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖のC末端および／またはN末端、および／または、軽鎖のC末端および／またはN末端に結合した

50

1つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。

【0111】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のN末端に結合したTNF α エピトープ結合ドメインを有するVEGF抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のN末端に結合したTNF α エピトープ結合ドメインを有するVEGF抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のC末端に結合したTNF α エピトープ結合ドメインを有するVEGF抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したTNF α エピトープ結合ドメインを有するVEGF抗体が含まれる。また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖のC末端および／またはN末端、および／または、軽鎖のC末端および／またはN末端に結合した1つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。

10

【0112】

本発明の抗原結合性タンパク質には、CD-20に対する特異性を有するもの、例えば、CD-20に結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはCD-20に結合するペアードVH/VLを含むものが含まれる。

【0113】

抗原結合性タンパク質は、CD-20に結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、CD-20に結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0114】

また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖のC末端および／またはN末端、および／または、軽鎖のC末端および／またはN末端に結合した1つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。

20

【0115】

本発明の抗原結合性タンパク質には、IL1R1に対する特異性を有するもの、例えば、IL1R1に結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはIL1R1に結合するペアードVH/VLを含むものが含まれる。

【0116】

抗原結合性タンパク質は、IL1R1に結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、IL1R1に結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0117】

一実施形態では、本発明の抗原結合性タンパク質は、例えば、IL1R1および第2の抗原に結合可能な場合、例えば、IL1R1およびVEGFに結合可能な場合のような2つ以上の抗原に対する特異性を有する。このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、VEGFに対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗VEGF免疫グロブリン単一可変ドメインを有するIL1R1抗体がある。

30

【0118】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のN末端に結合したVEGFエピトープ結合ドメインを有するIL1R1抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のN末端に結合したVEGFエピトープ結合ドメインを有するIL1R1抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のC末端に結合したVEGFエピトープ結合ドメインを有するIL1R1抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したVEGFエピトープ結合ドメインを有するIL1R1抗体が含まれる。また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖のC末端および／またはN末端、および／または、軽鎖のC末端および／またはN末端に結合した1つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。

40

【0119】

本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のN末端に結合したIL1R1エピトープ結合ドメインを有するVEGF抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のN末端に結合したIL1R1エピトープ結合ドメインを有するVEGF抗体が含まれる

50

。本発明の抗原結合性タンパク質には、重鎖のC末端に結合したI L 1 R 1 エピトープ結合ドメインを有するV E G F 抗体が含まれる。本発明の抗原結合性タンパク質には、軽鎖のC末端に結合したI L 1 R 1 エピトープ結合ドメインを有するV E G F 抗体が含まれる。また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖のC末端および／またはN末端、および／または、軽鎖のC末端および／またはN末端に結合した1つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。

【0120】

本発明の抗原結合性タンパク質には、E G F Rに対する特異性を有するもの、例えば、E G F Rに結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはE G F Rに結合するペアーD V H / V Lを含むものが含まれる。

10

【0121】

抗原結合性タンパク質は、E G F Rに結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、E G F Rに結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0122】

一実施形態では、本発明の抗原結合性タンパク質は、例えば、E G F R、I G F - 1 R、V E G F R 2 およびV E G F から選択される2つ以上の抗原に結合可能な場合、例えば、E G F R およびI G F - 1 R に結合可能な場合、またはE G F R およびV E G F に結合可能な場合、またはV E G F およびI G F - 1 R に結合可能な場合、またはE G F R およびV E G F R 2 に結合可能な場合、またはI G F - 1 R およびV E G F R 2 に結合可能な場合、またはV E G F およびV E G F R 2 に結合可能な場合、またはE G F R、I G F - 1 R およびV E G F R 2 に結合可能な場合、またはV E G F、I G F - 1 R およびV E G F R 2 に結合可能な場合、またはE G F R、V E G F およびV E G F R 2 に結合可能な場合、またはE G F R、V E G F およびI G F 1 R に結合可能な場合のように2つ以上の抗原に対して特異性を有する。このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、V E G F R 2 に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗V E G F R 2 アドネクチンを有するE G F R 抗体がある。

20

【0123】

このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、V E G F に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗V E G F 免疫グロブリン単一可変ドメインを有するE G F R 抗体がある。

30

【0124】

このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、E G F R に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗E G F R 免疫グロブリン単一可変ドメインを有するV E G F 抗体がある。

【0125】

このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、V E G F に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗V E G F リポカリンを有するI G F - 1 R 抗体がある。

40

【0126】

このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、V E G F R 2 に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗V E G F R 2 アドネクチンを有するI G F - 1 R 抗体がある。

【0127】

本発明の抗原結合性タンパク質には、I L - 2 3 に対する特異性を有するもの、例えば、I L - 2 3 に結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはI L - 2 3 に結合するペアーD V H / V L を含むものが含まれる。

【0128】

50

抗原結合性タンパク質は、I L-23に結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、I L-23に結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0129】

一実施形態では、本発明の抗原結合性タンパク質は、例えば、T H17タイプのサイトカイン、例えば、I L-17、I L-22またはI L-21から選択される2つ以上の抗原に結合可能な場合、例えば、I L-23およびI L-17に結合可能な場合、またはI L-23およびI L-21に結合可能な場合、またはI L-23およびI L-22に結合可能な場合のように2つ以上の抗原に対して特異性を有する。このような抗原結合性タンパク質の例には、重鎖のC末端もしくはN末端、または軽鎖のC末端もしくはN末端に結合した、I L-17に対する特異性を有するエピトープ結合ドメイン、例えば、抗I L-17免疫グロブリン単一可変ドメインを有するI L-23抗体がある。

10

【0130】

本発明の抗原結合性タンパク質には、P D G F R α に対する特異性を有するもの、例えば、P D G F R α に結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはP D G F R α に結合するペアードV H/V Lを含むものが含まれる。抗原結合性タンパク質は、P D G F R α に結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、P D G F R α に結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0131】

本発明の抗原結合性タンパク質には、F G F R 1に対する特異性を有するもの、例えば、F G F R 1に結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはF G F R 1に結合するペアードV H/V Lを含むものが含まれる。抗原結合性タンパク質は、F G F R 1に結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、F G F R 1に結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

20

【0132】

本発明の抗原結合性タンパク質には、F G F R 3に対する特異性を有するもの、例えば、F G F R 3に結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、F G F R 3に結合するペアードV H/V Lを含むものが含まれる。抗原結合性タンパク質は、F G F R 3に結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、F G F R 3に結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0133】

30

本発明の抗原結合性タンパク質には、V E G F R 2に対する特異性を有するもの、例えば、V E G F R 2に結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはV E G F R 2に結合するペアードV H/V Lを含むものが含まれる。抗原結合性タンパク質は、V E G F R 2に結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、V E G F R 2に結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0134】

本発明の抗原結合性タンパク質には、V E G F R 3に対する特異性を有するもの、例えば、V E G F R 3に結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはV E G F R 3と結合するペアードV H/V Lを含むものが含まれる。抗原結合性タンパク質には、V E G F R 3に結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質には、V E G F R 3に結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

40

【0135】

本発明の抗原結合性タンパク質には、V E カドヘリンに対する特異性を有するもの、例えば、V E カドヘリンに結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはV E カドヘリンと結合するペアードV H/V Lを含むものが含まれる。抗原結合性タンパク質は、V E カドヘリンに結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、V E カドヘリンに結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0136】

本発明の抗原結合性タンパク質には、ニューロピリンに対する特異性を有するもの、例えば、ニューロピリンに結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはニューロピ

50

リンと結合するペアードVH/VLを含むものが含まれる。抗原結合性タンパク質は、ニューロピリンに結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、ニューロピリンに結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0137】

本発明の抗原結合性タンパク質には、Flt-3に対する特異性を有するもの、例えば、Flt-3に結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはFlt-3と結合するペアードVH/VLを含むものが含まれる。抗原結合性タンパク質は、Flt-3に結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、Flt-3に結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0138】

本発明の抗原結合性タンパク質には、ronに対する特異性を有するもの、例えば、ronに結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはronと結合するペアードVH/VLを含むものが含まれる。抗原結合性タンパク質は、ronに結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、ronに結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0139】

本発明の抗原結合性タンパク質には、Trp-1に対する特異性を有するもの、例えば、Trp-1に結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはTrp-1と結合するペアードVH/VLを含むものが含まれる。抗原結合性タンパク質は、Trp-1に結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、Trp-1に結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0140】

一実施形態では、本発明の抗原結合性タンパク質は、癌に関連する2つ以上の抗原に結合可能な場合、例えば、PDGFR α 、FGFR1、FGFR3、VEGFR2、VEGFR3、IGF1R、EGFRおよびVEGF、VEカドヘリン、ニューロピリン、Flt-3、ron、Trp-1、CD-20から選択される2つ以上の抗原に結合可能な場合、例えば、PDGFR α およびFGFR1に結合可能な場合、またはPDGFR α およびVEGFに結合可能な場合、またはPDGFR α およびFGFR3に結合可能な場合、またはPDGFR α およびVEGFR2に結合可能な場合、またはPDGFR α およびVEGFR3に結合可能な場合、またはPDGFR α およびIGF1Rに結合可能な場合、またはPDGFR α およびEGFRに結合可能な場合、またはPDGFR α およびVEGFに結合可能な場合、またはPDGFR α およびVEカドヘリンに結合可能な場合、またはPDGFR α およびニューロピリンに結合可能な場合、またはPDGFR α およびFlt-3に結合可能な場合、またはPDGFR α およびronに結合可能な場合、またはPDGFR α およびTrp-1に結合可能な場合、またはPDGFR α およびCD-20に結合可能な場合、またはFGFR1およびFGFR3に結合可能な場合、またはFGFR1およびVEGFR2に結合可能な場合、またはFGFR1およびVEGFR3に結合可能な場合、またはFGFR1およびIGF1Rに結合可能な場合、またはFGFR1およびEGFRに結合可能な場合、またはFGFR1およびVEGFに結合可能な場合、またはFGFR1およびVEカドヘリンに結合可能な場合、またはFGFR1およびニューロピリンに結合可能な場合、またはFGFR1およびFlt-3に結合可能な場合、またはFGFR1およびronに結合可能な場合、またはFGFR1およびTrp-1に結合可能な場合、またはFGFR1およびCD-20に結合可能な場合、またはFGFR3およびVEGFR2に結合可能な場合、またはFGFR3およびVEGFR3に結合可能な場合、またはFGFR3およびIGF1Rに結合可能な場合、またはFGFR3およびEGFRに結合可能な場合、またはFGFR3およびVEGFに結合可能な場合、またはFGFR3およびVEカドヘリンに結合可能な場合、またはFGFR3およびニューロピリンに結合可能な場合、またはFGFR3およびFlt-3に結合可能な場合、またはFGFR3およびronに結合可能な場合、またはFGFR3およびTrp-1に結合可能な場合、またはFGFR3およびCD-20に結合可能な場合、またはVEGFR2およびVEG

10

20

30

40

50

FR 3に結合可能な場合、またはVEGFR 2およびIGF 1 Rに結合可能な場合、またはVEGFR 2およびEGFRに結合可能な場合、またはVEGFR 2およびVEGFに結合可能な場合、またはVEGFR 2およびVEカドヘリンに結合可能な場合、またはVEGFR 2およびニューロピリンに結合可能な場合、またはVEGFR 2およびFlt-3に結合可能な場合、またはVEGFR 2およびronに結合可能な場合、またはVEGFR 2およびTrp-1に結合可能な場合、またはVEGFR 2およびCD-20に結合可能な場合、またはVEGFR 3およびIGF-1 Rに結合可能な場合、またはVEGFR 3およびEGFRに結合可能な場合、またはVEGFR 3およびVEGFに結合可能な場合、またはVEGFR 3およびVEカドヘリンに結合可能な場合、またはVEGFR 3およびニューロピリンに結合可能な場合、またはVEGFR 3およびFlt-3に結合可能な場合、またはVEGFR 3およびTrp-1に結合可能な場合、またはVEGFR 3およびCD-20に結合可能な場合、またはIGF 1 RおよびEGFRに結合可能な場合、またはIGF 1 RおよびVEGFに結合可能な場合、またはIGF 1 RおよびVEカドヘリンに結合可能な場合、またはIGF 1 Rおよびニューロピリンに結合可能な場合、またはIGF 1 RおよびFlt-3に結合可能な場合、またはIGF 1 Rおよびronに結合可能な場合、またはIGF 1 RおよびTrp-1に結合可能な場合、またはIGF 1 RおよびCD-20に結合可能な場合、またはEGFRおよびVEGFに結合可能な場合、またはEGFRおよびVEカドヘリンに結合可能な場合、またはEGFRおよびニューロピリンに結合可能な場合、またはEGFRおよびFlt-3に結合可能な場合、またはEGFRおよびronに結合可能な場合、またはEGFRおよびTrp-1に結合可能な場合、またはEGFRおよびCD-20に結合可能な場合、またはVEGFおよびVEカドヘリンに結合可能な場合、またはVEGFおよびニューロピリンに結合可能な場合、またはVEGFおよびFlt-3に結合可能な場合、またはVEGFおよびronに結合可能な場合、またはVEGFおよびTrp-1に結合可能な場合、またはVEGFおよびCD-20に結合可能な場合、またはVEカドヘリンおよびニューロピリンに結合可能な場合、またはVEカドヘリンおよびFlt-3に結合可能な場合、またはVEカドヘリンおよびronに結合可能な場合、またはVEカドヘリンおよびTrp-1に結合可能な場合、またはVEカドヘリンおよびCD-20に結合可能な場合、またはニューロピリンおよびFlt-3に結合可能な場合、またはニューロピリンおよびronに結合可能な場合、またはニューロピリンおよびTrp-1に結合可能な場合、またはニューロピリンおよびCD-20に結合可能な場合、またはFlt-3およびronに結合可能な場合、またはFlt-3およびCD-20に結合可能な場合、またはronおよびTrp-1に結合可能な場合、またはronおよびCD-20に結合可能な場合、およびまたはTrp-1およびCD-20に結合可能な場合などのように2つ以上の抗原に対して特異性を有する。

【0141】

また、このような抗原結合性タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖のC末端および／またはN末端、および／または、軽鎖のC末端および／またはN末端に結合した1つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインをさらに有してもよい。

【0142】

本発明の抗原結合性タンパク質には、β-アミロイドに対する特異性を有するもの、例えば、β-アミロイドに結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはβ-アミロイドと結合するペアードVH/VLを含むものが含まれる。

【0143】

抗原結合性タンパク質は、β-アミロイドに結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、β-アミロイドに結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0144】

本発明の抗原結合性タンパク質には、CD-3に対する特異性を有するもの、例えば、CD-3に結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはCD-3と結合するペア

10

20

30

40

50

ードVH/VLを含むものが含まれる。

【0145】

抗原結合性タンパク質は、CD-3に結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、CD-3に結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0146】

本発明の抗原結合性タンパク質には、gpIIb/IIに対する特異性を有するもの、例えば、gpIIb/IIaに結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはgpIIb/IIaと結合するペアードVH/VLを含むものが含まれる。

【0147】

抗原結合性タンパク質は、gpIIb/IIaに結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、gpIIb/IIaに結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

10

【0148】

本発明の抗原結合性タンパク質には、TGFβに対する特異性を有するもの、例えば、TGFβに結合可能なエピトープ結合ドメインを含むか、またはTGFβと結合するペアードVH/VLを含むものが含まれる。

【0149】

抗原結合性タンパク質は、TGFβに結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合性タンパク質は、TGFβに結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【0150】

20

本発明の一実施形態では、ADCCおよび/または補体活性化またはエフェクター機能を低減させるような抗体となる、定常領域を含み本明細書記載の発明に従った抗原結合性タンパク質が提供される。このような一実施形態では、重鎖定常領域は、IgG2またはIgG4アイソタイプの本来の無効化定常領域または変異IgG1定常領域を含んでもよい。適切な修飾の例は、EP0307434に記載されている。一例では、位置235および237（EUインデックスナンバリング）のアラニン残基の置換が含まれる。

【0151】

一実施形態では、本発明の抗原結合性タンパク質は、例えばADCCおよびCDC活性の1つまたは両方が可能なFc機能を保持する。このような抗原結合性タンパク質は、軽鎖上、例えば、軽鎖のC末端上にエピトープ結合ドメインを含んでもよい。

30

【0152】

また、本発明は、エピトープ結合ドメインを抗体の軽鎖上、特に、エピトープ結合ドメインを軽鎖のC末端上に配置することにより抗原結合性タンパク質のADCCおよびCDC機能を維持する方法を提供する。このようなADCCおよびCDC機能は、当業者に既知の任意の適切なアッセイによって測定可能である。

【0153】

本発明は、また、エピトープ結合ドメインを抗体の重鎖上、特に、エピトープ結合ドメインを重鎖のC末端上に配置することにより抗原結合性タンパク質のCDC機能を低減させる方法を提供する。このようなCDC機能は、当業者に既知の任意の適切なアッセイによって測定可能である。

40

【0154】

さらなる実施形態では、本発明の抗原結合性タンパク質は、VEGF、IGF-1RおよびEGFRから選択される2つ以上の抗原に結合可能であり、例えば、EGFRおよびVEGF、またはEGFRおよびIGF1R、またはIGF1RおよびVEGFに結合可能であり、あるいは例えばTNFおよびIL1-Rに結合可能である。IGF-1R結合部位を含む本発明の実施形態では、本発明の抗原結合性タンパク質のIGF-1R結合部位は、タンパク質足場にペアードVH/VLドメインを含んでもよい。

【0155】

一実施形態では、抗原結合性タンパク質は、免疫グロブリン単一可変ドメインであるエピトープ結合ドメインを含み、例えば、エピトープ結合ドメインは、ヒトV_Hまたはヒト

50

V_L であっても、ラクダ V_{HH} （ナノボディ）またはサメdAb（NARV）であってもよい。

【0156】

一実施形態では、抗原結合性タンパク質は、下記の群から選択される非免疫グロブリン足場、例えば、非免疫グロブリンドメインの誘導体であるエピトープ結合ドメインを含む：CTLA-4（EviBody）；リポカリン；プロテインA由来分子例えばプロテインAのZドメイン（アフィボディ、SpA）、Aドメイン（アビマー／マキシボディ）；GroELやGroES等の熱ショックタンパク質；トランスフェリン（トランスボディ）；アンキリンリピートタンパク質（DARPin）；ペプチドアプタマー；C-タイプレクチンドメイン（テトラネクチン）；ヒト γ クリスタリンおよびヒトユビキチン（affilin）；PDZドメイン；ヒトプロテアーゼ阻害剤のスコーピオントキシンユニットタイプドメイン；およびフィブロネクチン（アドネクチン）；これは天然のリガンド以外のリガンドに結合させるためにタンパク質工学による操作が行われたものである。

10

【0157】

本発明の抗原結合性タンパク質は、アドネクチンであるエピトープ結合ドメインに結合したタンパク質足場、例えば、重鎖のC末端に結合したアドネクチンを有するIgG足場を含んでもよく、またはアドネクチンに結合したタンパク質足場、例えば、重鎖のN末端に結合したアドネクチンを有するIgG足場を含んでもよく、または、アドネクチンに結合したタンパク質足場、例えば、軽鎖のC末端に結合したアドネクチンを有するIgG足場を含んでもよく、または、アドネクチンに結合したタンパク質足場、例えば、軽鎖のN末端に結合したアドネクチンを有するIgG足場を含んでもよい。

20

【0158】

他の実施形態では、抗原結合性タンパク質は、タンパク質足場、例えばCTLA-4であるエピトープ結合ドメインに結合したIgG足場、例えば、重鎖のN末端に結合したCTLA-4を有するIgG足場を含んでもよく、または、例えば、重鎖のC末端に結合したCTLA-4を有するIgG足場を含んでもよく、または、例えば、軽鎖のN末端に結合したCTLA-4を有するIgG足場を含んでもよく、または、軽鎖のC末端に結合したCTLA-4を有するIgG足場を含んでもよい。

【0159】

他の実施形態では、抗原結合性タンパク質は、タンパク質足場、例えばリポカリンであるエピトープ結合ドメインに結合したIgG足場、例えば、重鎖のN末端に結合したリポカリンを有するIgG足場を含んでもよく、または、例えば、重鎖のC末端に結合したリポカリンを有するIgG足場を含んでもよく、または、例えば、軽鎖のN末端に結合したリポカリンを有するIgG足場を含んでもよく、または、軽鎖のC末端に結合したリポカリンを有するIgG足場を含んでもよい。

30

【0160】

他の実施形態では、抗原結合性タンパク質は、タンパク質足場、例えばSpAであるエピトープ結合ドメインに結合したIgG足場、例えば、重鎖のN末端に結合したSpAを有するIgG足場を含んでもよく、または、例えば、重鎖のC末端に結合したSpAを有するIgG足場を含んでもよく、または、例えば、軽鎖のN末端に結合したSpAを有するIgG足場を含んでもよく、または、軽鎖のC末端に結合したSpAを有するIgG足場を含んでもよい。

40

【0161】

他の実施形態では、抗原結合性タンパク質は、タンパク質足場、例えばアフィボディであるエピトープ結合ドメインに結合したIgG足場、例えば、重鎖のN末端に結合したアフィボディを有するIgG足場を含んでもよく、または、例えば、重鎖のC末端に結合したアフィボディを有するIgG足場を含んでもよく、または、例えば、軽鎖のN末端に結合したアフィボディを有するIgG足場を含んでもよく、または、軽鎖のC末端に結合したアフィボディを有するIgG足場を含んでもよい。

【0162】

50

他の実施形態では、抗原結合性タンパク質は、タンパク質足場、例えばa f f i m e rであるエピトープ結合ドメインに結合したI g G足場、例えば、重鎖のN末端に結合したa f f i m e rを有するI g G足場を含んでもよく、または、例えば、重鎖のC末端に結合したa f f i m e rを有するI g G足場を含んでもよく、または、例えば、軽鎖のN末端に結合したa f f i m e rを有するI g G足場を含んでもよく、または、軽鎖のC末端に結合したa f f i m e rを有するI g G足場を含んでもよい。

【0163】

他の実施形態では、抗原結合性タンパク質は、タンパク質足場、例えばG r o E Lであるエピトープ結合ドメインに結合したI g G足場、例えば、重鎖のN末端に結合したG r o E Lを有するI g G足場を含んでもよく、または、例えば、重鎖のC末端に結合したG r o E Lを有するI g G足場を含んでもよく、または、例えば、軽鎖のN末端に結合したG r o E Lを有するI g G足場を含んでもよく、または、軽鎖のC末端に結合したG r o E Lを有するI g G足場を含んでもよい。

10

【0164】

他の実施形態では、抗原結合性タンパク質は、タンパク質足場、例えばトランスフェリンであるエピトープ結合ドメインに結合したI g G足場、例えば、重鎖のN末端に結合したトランスフェリンを有するI g G足場を含んでもよく、または、例えば、重鎖のC末端に結合したトランスフェリンを有するI g G足場を含んでもよく、または、例えば、軽鎖のN末端に結合したトランスフェリンを有するI g G足場を含んでもよく、または、軽鎖のC末端に結合したトランスフェリンを有するI g G足場を含んでもよい。

20

【0165】

他の実施形態では、抗原結合性タンパク質は、タンパク質足場、例えばG r o E Sであるエピトープ結合ドメインに結合したI g G足場、例えば、重鎖のN末端に結合したG r o E Sを有するI g G足場を含んでもよく、または、例えば、重鎖のC末端に結合したG r o E Sを有するI g G足場を含んでもよく、または、例えば、軽鎖のN末端に結合したG r o E Sを有するI g G足場を含んでもよく、または、軽鎖のC末端に結合したG r o E Sを有するI g G足場を含んでもよい。

【0166】

他の実施形態では、抗原結合性タンパク質は、タンパク質足場、例えばD A R P i nであるエピトープ結合ドメインに結合したI g G足場、例えば、重鎖のN末端に結合したD A R P i nを有するI g G足場を含んでもよく、または、例えば、重鎖のC末端に結合したD A R P i nを有するI g G足場を含んでもよく、または、例えば、軽鎖のN末端に結合したD A R P i nを有するI g G足場を含んでもよく、または、軽鎖のC末端に結合したD A R P i nを有するI g G足場を含んでもよい。

30

【0167】

他の実施形態では、抗原結合性タンパク質は、タンパク質足場、例えばペプチドアプタマーであるエピトープ結合ドメインに結合したI g G足場、例えば、重鎖のN末端に結合したペプチドアプタマーを有するI g G足場を含んでもよく、または、例えば、重鎖のC末端に結合したペプチドアプタマーを有するI g G足場を含んでもよく、または、例えば、軽鎖のN末端に結合したペプチドアプタマーを有するI g G足場を含んでもよく、または、軽鎖のC末端に結合したペプチドアプタマーを有するI g G足場を含んでもよい。

40

【0168】

本発明の一実施形態では、4つのエピトープ結合ドメイン、例えば4つのドメイン抗体があり、2つのエピトープ結合ドメインが同じ抗原に対し特異性を有してもよく、あるいは抗原結合性タンパク質中に存在する全てのエピトープ結合ドメインが同じ抗原に対し特異性を有してもよい。

【0169】

本発明のタンパク質足場は、リンカーを使ってエピトープ結合ドメインに連結される。適切なリンカーの例は、1アミノ酸～150アミノ酸の長さ、または1アミノ酸～140アミノ酸、例えば、1アミノ酸～130アミノ酸、または1～120アミノ酸、または1

50

～80アミノ酸、または1～50アミノ酸、または1～20アミノ酸、または1～10アミノ酸、または5～18アミノ酸のアミノ酸配列であってもよい。このような配列は、それ自身の三次構造を有してもよく、例えば、本発明のリンカーが単一可変ドメインを含んでもよい。一実施形態では、リンカーのサイズは、単一可変ドメインと同等である。適切なリンカーは、サイズが1～20オングストロームであってもよく、例えば、15オングストローム未満、または10オングストローム未満、または5オングストローム未満であってもよい。

【0170】

本発明の一実施形態では、少なくとも1つのエピトープ結合ドメインは、配列番号51～78、112～114で示されるもののいずれか1つを含むリンカー、またはこのようなリンカーの複合で、Ig足場に直接結合している。

10

【0171】

別の実施形態では、少なくとも1つのエピトープ結合ドメインは、配列番号53～60、配列番号62～72、配列番号74、配列番号76～78、配列番号112～114で示されるもののいずれか1つを含むリンカー、またはこのようなリンカーの複合で、Ig足場に直接結合している。

【0172】

本発明の抗原結合性タンパク質で使用するリンカーは、単体でも他のリンカーとの組み合わせでも、1つまたは複数のGS残基のセット、例えば、「GSPAS」または「PASGS」または「GSPASGS」を含んでもよい。

20

【0173】

一実施形態では、エピトープ結合ドメインは、リンカー「(PAS)_n(GS)_m」によりIg足場に結合している。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインは、リンカー「(GGGGS)_p(GS)_m」によりIg足場に結合している。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインは、リンカー「(TVAAP S)_p(GS)_m」によりIg足場に結合している。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインは、リンカー「(TVAAPSGS)_p」によりIg足場に結合している。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインは、リンカー「(PAVPP P)_n(GS)_m」によりIg足場に結合している。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインは、リンカー「(TVSDVP)_n(GS)_m」によりIg足場に結合している。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインは、リンカー「(TGLDSP)_n(GS)_m」によりIg足場に結合している。この全ての実施形態で、 $n = 1 \sim 10$ 、および $m = 0 \sim 4$ 、および $p = 2 \sim 10$ である。

30

【0174】

このようなリンカーの例には、(PAS)_n(GS)_m (ここで $n = 1$ および $m = 1$ (配列番号58))、(PAS)_n(GS)_m (ここで $n = 2$ および $m = 1$ (配列番号59))、(PAS)_n(GS)_m (ここで $n = 3$ および $m = 1$ (配列番号60))、(PAS)_n(GS)_m (ここで $n = 4$ および $m = 1$)、(PAS)_n(GS)_m (ここで $n = 2$ および $m = 0$)、(PAS)_n(GS)_m (ここで $n = 3$ および $m = 0$)、(PAS)_n(GS)_m (ここで $n = 4$ および $m = 0$)がある。

【0175】

このようなリンカーの例には、(GGGGS)_p(GS)_m (ここで $p = 2$ および $m = 0$ (配列番号62))、(GGGGS)_p(GS)_m (ここで $p = 3$ および $m = 0$ (配列番号63))、(GGGGS)_p(GS)_m (ここで $p = 4$ および $m = 0$)がある。

40

【0176】

このようなリンカーの例には、(TVAAP S)_p(GS)_m (ここで $p = 2$ および $m = 1$ (配列番号112))、(TVAAP S)_p(GS)_m (ここで $p = 3$ および $m = 1$ (配列番号113))、(TVAAP S)_p(GS)_m (ここで $p = 4$ および $m = 1$ (配列番号114))、(TVAAP S)_p(GS)_m (ここで $p = 2$ および $m = 0$)、(TVAAP S)_p(GS)_m (ここで $p = 3$ および $m = 0$)、(TVAAP S)_p(GS)_m (ここで $p = 4$ および $m = 0$)がある。

50

【0177】

このようなリンカーの例には、 $(GS)_m (TVAAPSGS)_p$ (ここで $p = 2$ および $m = 1$ (配列番号 53))、 $(GS)_m (TVAAPSGS)_p$ (ここで $p = 3$ および $m = 1$ (配列番号 54))、または $(GS)_m (TVAAPSGS)_p$ (ここで $p = 4$ および $m = 1$ (配列番号 55))、 $(GS)_m (TVAAPSGS)_p$ (ここで $p = 5$ および $m = 1$ (配列番号 56))、 $(GS)_m (TVAAPSGS)_p$ (ここで $p = 6$ および $m = 1$ (配列番号 57)) がある。

【0178】

このようなリンカーの例には、 $(PAVPPPP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 1$ および $m = 1$ (配列番号 64))、 $(PAVPPPP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 2$ および $m = 1$ (配列番号 65))、 $(PAVPPPP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 3$ および $m = 1$ (配列番号 66))、 $(PAVPPPP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 4$ および $m = 1$)、 $(PAVPPPP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 2$ および $m = 0$)、 $(PAVPPPP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 3$ および $m = 0$)、 $(PAVPPPP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 4$ および $m = 0$) がある。

【0179】

このようなリンカーの例には、 $(TVSDVP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 1$ および $m = 1$ (配列番号 67))、 $(TVSDVP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 2$ および $m = 1$ (配列番号 68))、 $(TVSDVP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 3$ および $m = 1$ (配列番号 69))、 $(TVSDVP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 4$ および $m = 1$)、 $(TVSDVP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 2$ および $m = 0$)、 $(TVSDVP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 3$ および $m = 0$)、 $(TVSDVP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 4$ および $m = 0$) がある。

【0180】

このようなリンカーの例には、 $(TGLDSP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 1$ および $m = 1$ (配列番号 70))、 $(TGLDSP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 2$ および $m = 1$ (配列番号 71))、 $(TGLDSP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 3$ および $m = 1$ (配列番号 72))、 $(TGLDSP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 4$ および $m = 1$)、 $(TGLDSP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 2$ および $m = 0$)、 $(TGLDSP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 3$ および $m = 0$)、 $(TGLDSP)_n (GS)_m$ (ここで $n = 4$ および $m = 0$) がある。

【0181】

一実施形態では、本発明の抗原結合性タンパク質は、ヒト血清アルブミンに結合可能な少なくとも 1 つのエピトープ結合ドメインを含む。

【0182】

一実施形態では、少なくとも 3 つの抗原結合部位があり、例えば 4 または 5 または 6 または 8 または 10 抗原結合部位があり、この抗原結合性タンパク質は少なくとも 3 または 4 または 5 または 6 または 8 または 10 抗原に結合可能であり、例えば、3 または 4 または 5 または 6 または 8 または 10 抗原に同時に結合可能である。

【0183】

また、本発明は、配列番号 85 で示される重鎖配列および配列番号 3 で示される軽鎖配列、または配列番号 86 で示される重鎖配列および配列番号 3 で示される軽鎖配列、または配列番号 2 で示される重鎖配列および配列番号 87 で示される軽鎖配列、または配列番号 2 で示される重鎖配列および配列番号 88 で示される軽鎖配列、または配列番号 85 で示される重鎖配列および配列番号 87 で示される軽鎖配列、または配列番号 85 で示される重鎖配列および配列番号 88 で示される軽鎖配列、または配列番号 86 で示される重鎖配列および配列番号 87 で示される軽鎖配列、または配列番号 86 で示される重鎖配列および配列番号 88 で示される軽鎖配列を含む $mAb dAb$ も提供する。配列番号 85～88 に用いられるリンカーがいずれも、本明細書に記載の他の任意のリンカーまたはリンカーの組み合わせ、特に、リンカーの「GS」部分で置換することができる。

【0184】

一実施形態では、本発明は、タンパク質足場に連結した際のエピトープ結合ドメインの効力を改善する方法を提供し、該エピトープ結合ドメインはリンカーを用いずにタンパク質足場に直接連結された場合に、裸のエピトープ結合ドメインとして、すなわち、タンパク質足場に連結されない場合の、その効力に比べて低い効力を有するものであり、該方法は、該タンパク質足場と該エピトープ(eptiope)結合ドメインの間にペプチドリンカーを付加する工程を含み、該ペプチドリンカーは少なくとも10のアミノ酸を含むか、あるいはペプチドリンカーは10アミノ酸～50アミノ酸の間、または10アミノ酸～40アミノ酸の間、または10アミノ酸～36アミノ酸の間、または12アミノ酸～50アミノ酸の間、または12～40アミノ酸の間、または12～36アミノ酸の間である。一実施形態では、ペプチドリンカーは、リンカー「TVAAP_S」の1回または複数回の繰り返し、例えば、「(TVAAP_S)_p(GS)_m」を含み、例えば、リンカーは、「(GS)_m(TVAAP_SGS)_p」(ここでm=0～4およびp=2～10)、「(PAS)_n(GS)_m」(ここでn=2～10およびm=0～4)、「(GGGG_S)_p(GS)_m」(ここでm=0～4およびp=2～10)、「(PAVP_{PP})_n(GS)_m」(ここでn=2～10およびm=0～4)、「(TVSDVP)_n(GS)_m」(ここでn=2～10およびm=0～4)、および「(TGLDSP)_n(GS)_m」(ここで、n=2～10およびm=0～4)から選択される。

10

【0185】

本方法の一実施形態では、タンパク質足場はIg足場である。Ig足場は、抗体のFcドメインを含んでもよい。本方法のこのような一実施形態では、タンパク質足場は抗体である。本方法のこのような別の実施形態では、タンパク質足場は免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含む、ここで、重鎖はCH1-CH2-CH3を含み、軽鎖はCLを含む。本発明の言うこのようなさらに別の実施形態では、タンパク質足場は可溶性受容体、すなわち、抗体のFcドメインと融合した受容体であり、例えば、可溶性受容体は、B7に結合可能な分子であるCTLA-4の細胞外ドメインと融合した免疫グロブリンから構成される融合タンパク質であるアバタセプト(Orenciaとして市販)；関節リウマチ(RA)および他の炎症性症状の医療で用いるために開発されている、哺乳動物細胞発現系で生産された可溶性組み換えヒトp75腫瘍壊死因子TNF受容体(TNFR2)とヒトIgG1 Fc部分の融合タンパク質であるエタネルセプト(Enbrel)；ならびにサイトカインBlySおよびAPRILに結合し、それによって活性化される、Bリンパ球TACI受容体の受容体部分を含む組み換え融合タンパク質であるアタセプトから選択可能である。可溶性タンパク質は、TACI受容体の細胞外ドメインとヒトIgG1のFc部分の融合物を含む。TACI受容体は、TNF受容体ファミリーのメンバーである。アタセプトは過剰量のBlySおよびAPRILと結合してそれらのB細胞との結合を妨げ、それにより、B細胞の成熟および抗体生産を調節する。アタセプトは自己免疫疾患の治療のために開発されている。

20

30

【0186】

一実施形態では、エピトープ結合ドメインは、免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えば、ヒトdAb、またはラクダVHH単一可変ドメイン(ナノボディ)である。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインは、非Igドメイン、例えば、本明細書に記載の非Igドメインである。

40

【0187】

一実施形態では、融合タンパク質に関してエピトープ結合ドメインの効力を改善する方法は、

- (i) 裸のエピトープ結合ドメインの元の効力を測定する工程、
- (ii) 結合ドメインをタンパク質足場、例えば、抗体に結合させる工程、
- (iii) タンパク質足場に直接結合されている際のエピトープ結合ドメインの効力を測定する工程、
- (iv) タンパク質足場に結合されている際の効力が元の効力よりも低ければ、エピト

50

ープ結合ドメインとタンパク質足場の間に少なくとも10アミノ酸を含むペプチドリッカーを付加する工程を含む。

【0188】

別の実施形態では、融合タンパク質に関してヒトdAbの効力を改善する方法は、

(i) 裸のヒトdAbの元の効力を測定する工程、

(ii) ヒトdAbを抗体と遺伝的に融合させる工程、

(iii) タンパク質足場に直接結合されている際のエピトープ結合ドメインの効力を測定する工程、

(iv) タンパク質足場に結合されている際の効力が元の効力よりも低ければ、エピトープ結合ドメインとタンパク質足場の間に少なくとも10アミノ酸を含むペプチドリッカーを付加する工程を含む。

【0189】

エピトープ結合ドメインの効力は、当技術分野で公知のアッセイ、例えば、実施例7に記載されているものなどのBIACore（商標）アッセイによって評価可能な結合親和性、すなわち、エピトープ結合ドメインの抗原と結合する能力を評価することによって測定することができる。あるいは、エピトープ結合ドメインの効力は、好適な細胞に基づく中和アッセイ、例えば、実施例4.3または4.4に記載されるように実施可能なTF1アッセイによって測定することもできる。このアッセイにおけるIL-4、IL-13またはこれらのサイトカインの両方の中和は、中和作用のある抗原結合性タンパク質の存在下でTF1細胞増殖の阻害を評価することにより測定することができる。

【0190】

一実施形態では、本明細書に記載の方法は、タンパク質足場に結合した際の効力が、BIACoreまたは好適な細胞に基づく中和アッセイによって測定した場合に、元の効力の50%以内となるように、エピトープ結合ドメインの効力を修復することができる。別の実施形態では、修復される効力は元の効力の40%以内、または元の効力の30%以内、または元の効力の20%以内、または元の効力の20%以内、または元の効力の15%以内、または元の効力の10%以内である。別の実施形態では、タンパク質足場に結合された際の結合親和性は、元の結合親和性と実質的に同じである。

【0191】

本発明はまた、医療における使用のための、例えば、癌、または喘息、関節リウマチもしくは骨関節炎などの炎症性疾患を治療するための薬剤の製造における使用のための抗原結合性タンパク質を提供する。

【0192】

本発明は、癌、または喘息、関節リウマチもしくは骨関節炎などの炎症性疾患に罹患した患者の治療方法を提供し、この方法には、本発明の抗原結合性タンパク質を治療量投与するステップを含む。

【0193】

本発明の抗原結合性タンパク質は、癌、または喘息、関節リウマチもしくは骨関節炎などの炎症性疾患の治療に使用可能である。

【0194】

本発明の抗原結合性タンパク質は、何らかのエフェクター機能を有する。例えば、タンパク質足場がエフェクター機能を有する抗体由来のFc領域を含む場合、タンパク質足場がIgG1由来のCH2およびCH3を含む場合などである。エフェクター機能のレベルは、既知の技術、例えば、CH2ドメインの変異により変えてもよい。例えば、IgG1 CH2ドメインが239および332および330から選択された位置に1つまたは複数の変異を有する場合、その抗体が強化されたエフェクター機能を有するように、例えば、その変異はS239DおよびI332EおよびA330Lから選択され、および／または、例えば、本発明の抗原結合性タンパク質のグリコシレーションプロファイルを変え

てFc領域のフコシル化を減少させるように変えることができる。

【0195】

本発明に使われるタンパク質足場は、抗体の全てのドメインを含む全モノクローナル抗体足場を含み、または、本発明のタンパク質足場は、一価抗体のような従来にない構造を含んでもよい。このような一価抗体は、重鎖のヒンジ部がホモ二量体化しないように修飾されたペアード重鎖と軽鎖を含んでもよい（このような一価抗体は、W02007059782に記述されている）。他の一価抗体は、機能的可変領域とCH1領域が欠けた第2の重鎖と二量体化するペアード重鎖／軽鎖を含んでもよい。この場合、ホモ二量体よりもヘテロ二量体を形成するように第1と第2の重鎖を修飾して、2つの重鎖と1つの軽鎖を有する一価抗体ができる（このような一価抗体は、W02006015371に記載されている）。このような一価抗体は、本発明のエピトープ結合ドメインが結合できるタンパク質足場を提供可能である。

10

【0196】

本発明に使われるエピトープ結合ドメインは、別の可変領域またはドメインと独立して、抗原またはエピトープに特異的に結合するドメインであり、これは、ドメイン抗体であっても、または下記の群から選択された足場の誘導体であるドメインであってもよい：CTLA-4（Evi body）；リポカイン；プロテインA誘導分子、例えばプロテインAのZドメイン（アフィボディ、SpA）、Aドメイン（アビマー／マキシボディ）；熱ショックタンパク質、例えばGroELおよびGroES；トランスフェリン（トランスボディ）；アンキリンリピートタンパク質（DARPin）；ペプチドアダプター；Cタイプレクチンドメイン（テトラネクチン）；ヒトγクリスタリンおよびヒトユビキチン（affilin）；PDZドメイン；ヒトプロテアーゼ阻害剤のスコーピオントキシンクニッツタイプドメイン；およびフィブロネクチン（アドネクチン）：これらは天然のリガンド以外のリガンドに結合させるためにタンパク質工学による操作が行われたものである。一実施形態では、これはドメイン抗体であってもよく、また他の適切なドメイン、例えば、CTLA-4、リポカリン、SpA、アフィボディ、アビマー、GroEL、トランスフェリン、GroESおよびフィブロネクチンからなる群から選択されたドメインであってもよい。一実施形態では、これは免疫グロブリン単一可変ドメイン、アフィボディ、アンキリンリピートタンパク質（DARPin）およびアドネクチンから選択されてもよい。別の実施形態では、これは、アフィボディ、アンキリンリピートタンパク質（DARPin）およびアドネクチンから選択されてもよい。別の実施形態では、これは、ドメイン抗体、例えば、ヒト、ラクダまたはサメ（NARV）のドメイン抗体から選択されたドメイン抗体であってもよい。

20

30

【0197】

エピトープ結合ドメインは、1つまたは複数の位置でタンパク質足場に結合可能である。これらの位置には、タンパク質足場のC末端およびN末端、例えば、IgGの重鎖のC末端および／または軽鎖のC末端、または例えばIgGの重鎖のN末端および／または軽鎖のN末端が挙げられる。

【0198】

一実施形態では、第1のエピトープ結合ドメインがタンパク質足場に結合し、第2のエピトープ結合ドメインが第1のエピトープ結合ドメインに結合する。例えばタンパク質足場がIgG足場の場合は、第1のエピトープ結合ドメインはIgG足場の重鎖のC末端に結合してもよく、そのエピトープ結合ドメインがそのC末端の位置で第2のエピトープ結合ドメインに結合してもよい。または例えば、第1のエピトープ結合ドメインは、IgG足場の軽鎖のC末端に結合してもよく、その第1のエピトープ結合ドメインは、そのC末端の位置で第2のエピトープ結合ドメインにさらに結合してもよい。または例えば、第1のエピトープ結合ドメインは、IgG足場の軽鎖のN末端に結合してもよく、その第1のエピトープ結合ドメインはそのN末端の位置で第2のエピトープ結合ドメインにさらに結合してもよい。または例えば、第1のエピトープ結合ドメインは、IgG足場の重鎖のN末端に結合してもよく、その第1のエピトープ結合ドメインは、そのN末端の位置で第2

40

50

のエピトープ結合ドメインにさらに結合してもよい。

【0199】

エピトープ結合ドメインがドメイン抗体である場合は、一部のドメイン抗体が足場内の特定の位置に適合することがある。

【0200】

本発明で使用するドメイン抗体は、通常のIgGの重鎖および／または軽鎖のC末端で結合可能である。さらに、一部の免疫グロブリン単一可変ドメインは、通常の抗体の重鎖および軽鎖の両方のC末端に結合できる。

【0201】

免疫グロブリン単一可変ドメインのN末端が抗体定常ドメイン（C_H3またはC_Lのいずれか）に融合している構築物の場合、ペプチドリンカーは、免疫グロブリン単一可変ドメインが抗原に結合するのを支援することができる。事実、免疫グロブリン単一可変ドメインのN末端は、抗原結合活性に関わる相補性決定領域（CDRS）の近傍に配置される。従って、短いペプチドリンカーは、エピトープ結合ドメインおよびタンパク質足場に対する定常ドメインの間のスペーサーとして作用し、これにより免疫グロブリン単一可変ドメインCDRをより容易に抗原に近づけることができ、従って高い親和性での結合が可能となる。

【0202】

免疫グロブリン単一可変ドメインがIgGに結合する環境は、融合しようとする抗体鎖によって異なる：

IgG足場の抗体軽鎖のC末端で融合する場合は、各免疫グロブリン単一可変ドメインが抗体ヒンジとFc部の近くに配置されることが期待される。このような免疫グロブリン単一可変ドメインは相互に大きく離れていると思われる。通常の抗体では、Fab断片間の角度、および各Fab断片とFc部間の角度は非常に大きく変動する。mAb dAbの場合はFab断片間の角度は大きくは異ならないが、一方、各FabとFc部間の角度には、ある程度の角度制約が観察されることがある。

【0203】

IgG足場の抗体重鎖のC末端で融合した場合、各免疫グロブリン単一可変ドメインはFc部のC_H3ドメインの近くに配置されることが期待される。これはFc受容体（例えば、FcγRI、II、IIIおよびFcRn）へのFc結合特性に影響することは期待できない。理由は、これらの受容体が、C_H2ドメイン（FcγRI、IIおよびIIIクラスの受容体の場合）またはC_H2およびC_H3ドメイン間のヒンジ（例えば、FcRn受容体の場合）と結合しているからである。このような抗原結合性タンパク質の別の特徴は、両免疫グロブリン単一可変ドメインが相互に空間的に接近していることが期待され、適切なリンカーにより与えられた柔軟性があるという条件下、これらのdAbはホモ二量体さえ形成でき、従って、Fc部の「ジップド（zipped）」四次構造化を促進し、この抗原結合性タンパク質の安定性を高めることができる。

【0204】

このような構造の考察は、エピトープ結合ドメインに結合する最も適切な位置、例えば、免疫グロブリン単一可変ドメインのタンパク質足場（例えば、抗体）上の位置、の選択の助けとなり得る。

【0205】

抗原のサイズ、その局在化（血液中または細胞表面上）、その四次構造（単量体または多量体）は変動可能である。通常の抗体は、ヒンジ部が存在することによりアダプター構築物として機能するように元々設計されているが、Fab断片の先端での2つの抗原結合部位の方向は大きく変動でき、従って抗原の分子特性とその環境への適応が可能である。対照的に、抗体または他のタンパク質足場に結合した免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えばヒンジ部を有しない抗体を含むタンパク質足場は、直接的あるいは間接的に構造的柔軟性に乏しい場合がある。

【0206】

免疫グロブリン単一可変ドメインの溶液中結合状態と方法の理解も有益である。インビトロでdAbは単量体での存在が多く、溶液中ではホモ二量体か多量体が多いという根拠が蓄積されてきた(Reiter et al. (1999) J Mol Biol 290 p685-698; Ewert et al (2003) J Mol Biol 325, p531-553, Jespers et al (2004) J Mol Biol 337 p893-903; Jespers et al (2004) Nat Biotechnol 22 p1161-1165; Martin et al (1997) Protein Eng. 10 p607-614; Sepulveda et al (2003) J Mol Biol 333 p355-365)。これはIgドメインに関してインビボで観察された多量体発生、例えば、ベンスジョーンズタンパク質(免疫グロブリン軽鎖の二量体(Epp et al (1975) Biochemistry 14 p4943-4952; Huan et al (1994) Biochemistry 33 p14848-14857; Huang et al (1997) Mol Immunol 34 p1291-1301)およびアミロイド線維(James et al. (2007) J Mol Biol. 367:603-8)を強く想起させる。

【0207】

例えば、溶液中では二量体化する傾向のdAbを軽鎖のC末端よりもFc部のC末端に結合させることが望ましいという可能性もある。Fc部のC末端への結合により本発明の抗原結合性タンパク質との関連で、これらのdAbが二量体化するからである。

【0208】

本発明の抗原結合性タンパク質は、単一抗原に特異的な抗原結合部位を含んでもよく、2つ以上の抗原または単一抗原上の2つ以上のエピトープに対し特異的な抗原結合部位を有してもよく、また、抗原結合部位のそれぞれが同じまたは異なる抗原上の別々のエピトープに対し特異的であってもよい。

【0209】

抗原結合部位はそれぞれ、サイトカイン、成長因子、サイトカイン受容体、成長因子受容体、酵素(例えば、プロテアーゼ)、酵素の補因子、DNA結合タンパク質、脂質および炭水化物を含むヒトまたは動物タンパク質などの抗原に対して結合特異性を有し得る。サイトカイン、成長因子、サイトカイン受容体、成長因子受容体およびその他のタンパク質を含む好適な標的としては、限定されるものではないが：ApoE、Apo-SAA、BDNF、カルジオトロフィン-1、CEA、CD40、CD40リガンド、CD56、CD38、CD138、EGF、EGF受容体、ENA-78、エオタキシン、エオタキシン-2、エクソダス-2、FAP α 、FGF-酸性、FGF-塩基性、繊維芽細胞成長因子-10、FLT3リガンド、フラクタルカイン(CX3C)、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF- β 1、ヒト血清アルブミン、インスリン、IFN- γ 、IGF-I、IGF-II、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1受容体、IL-1受容体1型、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8(72a. a.)、IL-8(77a. a.)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18(IGIF)、インヒビン α 、インヒビン β 、IP-10、ケラチノサイト成長因子-2(KGF-2)、KGF、レプチン、LIF、リンホタクチン、ミュー管障害物質、単球コロニー障害因子、単球走化性タンパク質、M-CSF、c-fms、v-fmsMDC(67a. a.)、MDC(69a. a.)、MCP-1(MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC(67a. a.)、MDC(69a. a.)、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-3 α 、MIP-3 β 、MIP-4、骨髄前駆体障害因子-1(MPIF-1)、NAP-2、ニューロツリン、神経成長因子、 β -NGF、NT-3、NT-4、オンコスタチンM、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1 α 、SDF1 β 、SCF、SCGF、幹細胞因子(SCF)、TARC、TGF- α 、TGF- β 、TGF- β 2、TGF- β 3、腫瘍壊死因子(TNF)、TN

F- α 、TNF- β 、TNF受容体I、TNF受容体II、TNF α -1、TPO、VEGF、VEGF A、VEGF B、VEGF C、VEGF D、VEGF受容体1、VEGF受容体2、VEGF受容体3、GCP-2、GRO/MGSA、GRO- β 、GRO- γ 、HCC1、1-309、HER 1、HER 2、HER 3、HER 4、血清アルブミン、vWF、アミロイドタンパク質（例えば、アミロイド α ）、MMP12、PDK1、IgEおよび本明細書に開示される他の標的が挙げられる。当然のことながら、このリストはけして網羅的なものではない。

【0210】

いくつかの実施形態では、プロテアーゼ耐性ペプチドまたはポリペプチドは、肺組織の標的、例えば、TNFR1、IL-1、IL-1R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-8R、IL-9、IL-9R、IL-10、IL-12、IL-12R、IL-13、IL-13R α 1、IL-13R α 2、IL-15、IL-15R、IL-16、IL-17R、IL-17、IL-18、IL-18R、IL-23、IL-23R、IL-25、CD2、CD4、CD11a、CD23、CD25、CD27、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD56、CD138、ALK5、EGFR、FcER1、TGF β 、CCL2、CCL18、CEA、CR8、CTGF、CXCL12（SDF-1）、キマーゼ、FGF、フリン、エンドセリン-1、エオタキシン（例えば、エオタキシン、エオタキシン-2、エオタキシン-3）、GM-CSF、ICAM-1、ICOS、IgE、IFN α 、1-309、インテグリン、L-セレクトリン、MIF、MIP4、MDC、MCP-1、MMP、好中球エラスターゼ、オステオポンチン、OX-40、PARC、PD-1、RANTES、SCF、SDF-1、siglec8、TARC、TGF β 、トロンビン、Tim-1、TNF、TRANCE、トリプターゼ、VEGF、VLA-4、VCAM、 α 4 β 7、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR8、 α v β 6、 α v β 8、cMET、CD8、vWF、アミロイドタンパク質（例えば、アミロイド α ）、MMP12、PDK1およびIgEからなる群から選択される標的に結合する。

【0211】

特に、本発明の抗原結合性タンパク質は、IL-13、IL-5およびIL-4に関連する疾患、例えば、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、クローン病、COPD、繊維性疾患または障害（特発性肺繊維症、進行性全身性硬化症、肝繊維症など）、肝肉芽腫、住血吸虫症、リーシュマニア症、細胞周期調節疾患（ホジキン病など）、B細胞慢性リンパ球性白血病の治療に有用であり得、例えば、これらのタンパク質は喘息の治療の有用であり得る。

【0212】

本発明の抗原結合性タンパク質は、IGF-1R、VEGFおよびEGFRなどの成長因子にカレンする疾患、例えば、癌または関節リウマチの治療に有用であり得、このような治療が有用であり得る癌のタイプの例としては、乳癌、前立腺癌(prostate cancer)、肺癌および骨髄腫がある。

【0213】

本発明の抗原結合性タンパク質は、TNFに関連する疾患、例えば、関節炎、例えば、関節リウマチまたは骨関節炎の治療に有用であり得る。

【0214】

本発明の抗原結合性タンパク質は、IL1-Rに関連する疾患、例えば、関節炎、例えば、関節リウマチまたは骨関節炎の治療に有用であり得る。

【0215】

本発明の抗原結合性タンパク質は、CD-20に関連する疾患、例えば、乾癬、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡、神経変性疾患、例えば、多発性硬化症、好中球駆動性疾患、例えば、COPD、ウェゲナー脈管炎、嚢胞性繊維症、シェーグレン症候群、慢性移植拒絶、1型糖尿病、移植片対宿主病、喘息、アレルギー性疾患、アトピー性皮膚炎、湿疹性皮膚炎、アレルギー性

10

20

30

40

50

鼻炎、他の自己免疫疾患（甲状腺炎、脊椎関節症、強直性脊椎炎、ブドウ膜炎、多発性軟骨炎(polychonritis)もしくは硬皮症を含む）などの自己免疫疾患、または癌、例えば、B細胞リンパ腫または成熟B細胞新生物（CLLもしくはSLLなど）の治療に有用であり得る。

【0216】

本発明の抗原結合性タンパク質は、IL-17およびIL-23に関連する疾患、例えば、乾癬、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡、神経変性疾患、例えば、多発性硬化症、好中球駆動性疾患、例えば、COPD、ウェゲナー脈管炎、嚢胞性繊維症、シェーグレン症候群、慢性移植拒絶、1型糖尿病、移植片対宿主病、喘息、アレルギー性疾患、アトピー性皮膚炎、湿疹性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、他の自己免疫疾患（甲状腺炎、脊椎関節症、強直性脊椎炎、ブドウ膜炎、多発性軟骨炎（polychonritis）もしくは硬皮症を含む）の治療に有用であり得る。

10

【0217】

本発明の抗原結合性タンパク質は、本発明の抗原結合性タンパク質のためのコード配列を含む発現ベクターを有する宿主細胞の形質移入により産生可能である。発現ベクターまたは組換えプラスミドは、宿主細胞での複製および発現、および／または宿主細胞からの分泌を制御できる通常の制御配列の操作環境にこれらの抗原結合性タンパク質のコード配列を置くことにより産生可能である。調節配列には、プロモーター配列、例えば、CMVプロモーター、および他の既知抗体から得られるシグナル配列が含まれる。同様にして、相補的抗原結合性タンパク質の軽鎖または重鎖をコードしたDNA塩基配列を有する第2の発現ベクターを産生できる。特定の実施形態では、この第2の発現ベクターは、コード配列と選択可能なマーカーに関することを除いて第1の発現ベクターに同じであり、従って各ポリペプチド鎖が機能的に発現していることを可能な限り確実にする。あるいは、抗原結合性タンパク質のための重鎖と軽鎖コード配列を単一のベクター上、例えば、同じベクター中の2つの発現カセットに置いてよい。

20

【0218】

選択された宿主細胞は、第1と第2のベクターの両方を使って通常の技術により同時形質移入され（または、単純に単一のベクターで形質移入され）、組換えまたは合成された軽鎖と重鎖の両方を含む本発明の形質移入した宿主細胞が作られる。この形質移入した細胞は、次に通常の技術により培養され本発明の操作された抗原結合性タンパク質が産生される。組換え重鎖および／または軽鎖の会合を含む抗原結合性タンパク質はアッセイ、例えば、ELISAやRIA、により培養物からスクリーニングされる。同様の通常の技術を採用して、他の抗原結合性タンパク質を構築することが可能である。

30

【0219】

本方法で採用されたクローニングおよびサブクローニングステップのための適切なベクター、および、本発明の組成物の作成は当業者により選択され得る。例えば、通常のクローニングベクターのpUCシリーズを使用可能である。1つのベクター、pUC19、は市販品で、Ame r s h a m（バッキンガムシャー州、英国）またはPh a r m a c i a（ウプサラ、スウェーデン）、等のサプライハウスから入手可能である。

40

【0220】

さらに、容易に複製可能で、多くのクローニングサイトおよび選択可能な遺伝子（例えば、抗生物質耐性）を有し、容易に操作できる、いずれのベクターもクローニングの目的に使用可能である。従って、クローニングベクターの選択は本発明における制約因子ではない。

【0221】

また、発現ベクターを、異種のDNA塩基配列、例えば哺乳動物のジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(DHFR)の発現を増幅するのに適した遺伝子により特徴づけることができる。他のベクター配列には、ポリAシグナル配列、例えば、ウシ成長ホルモン(BGH)由来の配列、およびβ-グロビンプロモータ配列(beta glob pro)が含まれる。本

50

明細書で有用な発現ベクターは、当業者によく知られた技術により合成可能である。

【0222】

このようなベクターの構成要素、例えば、レプリコン、選択遺伝子、エンハンサー、プロモーター、シグナル配列、等、は市販または天然の入手源から入手してもよく、また、選択宿主中の組換えDNAの生成物の発現および／または分泌の誘導に使用される既知手順により合成してもよい。哺乳動物、細菌、昆虫、酵母、および真菌の発現に関して当業界で既知の多くのタイプの他の適切な発現ベクターもこの目的に選択してもよい。

【0223】

また本発明は、本発明の抗原結合性タンパク質のコード配列を含む組換えプラスミドを形質移入された細胞株を包含する。これらクローニングベクターのクローニングと他の操作に有用な宿主細胞もまた従来からあるものである。しかし、種々の大腸菌株由来の細胞は、本発明の抗原結合性タンパク質作成におけるクローニングベクターや他のステップの複製に使うことができる。

10

【0224】

本発明の抗原結合性タンパク質の発現のための適切な宿主細胞または細胞株には、哺乳動物細胞、例えば、NS0、Sp2/0、CHO（例えば、DG44）、COS、HEK、繊維芽細胞（例えば、3T3）、および骨髓細胞が含まれる。例えば、これはCHOまたは骨髓細胞中で発現させてもよい。ヒト細胞を使って、分子をグリコシレーションパターンで修飾させてもよい。あるいは、他の真核細胞株を採用してもよい。哺乳動物宿主細胞の選択および形質転換、培養、増幅、スクリーニングと生成物産生および精製の方法は、当業者には既知である。例えば、前述の Sambrook et al を参照。

20

【0225】

細菌細胞は、組換えFabの発現のため、または本発明の他の実施形態のために適切な宿主細胞として有用であり得る（例えば、Plueckthun, A., Immunol. Rev., 130:151-188 (1992) 参照）。しかし、細菌細胞で発現したタンパク質は、折り畳まれていないまたは不適切に折り畳まれた形式または非グリコシル化形式になる傾向があるため、細菌細胞中で産生されたいずれの組換えFabも抗原結合能力の保持の観点でスクリーニングしなければならなくなる。細菌細胞で発現された分子が正しく折り畳まれた形式で産生された場合は、その細菌細胞は望ましい宿主となるだろう。あるいは、別の実施形態で、分子が細菌宿主中で発現され、その後再折り畳みが可能である。例えば、発現に使われる種々の大腸菌株は、バイオテクノロジーの分野で宿主細胞としてよく知られている。種々の枯草菌、ストレプトマイセス属、他の桿菌等の株もまたこの方法に採用できる。

30

【0226】

所望の場合は、当業者に既知の酵母細胞株もまた、昆虫細胞、例えば、ショウジョウバエと鱗翅類、およびウイルス発現システムと同様に、宿主細胞として入手可能である。例えば、Miller et al., Genetic Engineering, 8:277-298, Plenum Press (1986)、および本明細書に引用の文献を参照のこと。

【0227】

ベクターが作成される一般的な方法、本発明の宿主細胞を産生するために必要な形質移入方法、およびこのような宿主細胞から本発明の抗原結合性タンパク質を産生するために必要な培養方法は全て従来からの技術であってもよい。典型的には、本発明の培養方法は無血清培養方法で、通常細胞を無血清懸濁液中で培養する。同様に、本発明の抗原結合性タンパク質を一度産生した後、細胞培養内容物を当分野の標準的手法、例えば、硫酸塩析法、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動法等により精製してもよい。このような技術は、当該分野の技術の範囲内にあり本発明を制限するものではない。例えば、改変抗体の調製に関しては、WO 99/58679およびWO 96/16990に記載されている。

40

【0228】

50

抗原結合性タンパク質のさらに別の発現法では、遺伝子組み換え動物中での発現を使用してもよい。この例は、U.S. Patent No. 4, 873, 316に記載されている。これは、動物カゼインプロモータを使った発現システムであり、このプロモーターは、遺伝子導入で哺乳動物に取り込んだ場合、雌のミルク中に所望の組換えタンパク質を産生させる。

【0229】

本発明のさらなる態様では、本発明の抗体を産生する方法を提供し、この方法は本発明の抗体の軽鎖および／または重鎖をコードしたベクターで形質転換または形質移入した宿主細胞を培養し、これにより産生された抗体を回収するステップを含む。

【0230】

本発明に従って、本発明の抗原結合性タンパク質を産生する方法が提供され、この方法は、

- (a) 抗原結合性タンパク質の重鎖をコードした第1のベクターを提供するステップ；
- ；
- (b) 抗原結合性タンパク質の軽鎖をコードした第2のベクターを提供するステップ；
- ；
- (c) 哺乳動物宿主細胞（例えば、CHO）を前記第1と第2のベクターで形質転換するステップ；
- (d) 抗原結合性タンパク質を前記宿主細胞から前記培地へ分泌を促す条件下で、ステップ(c)の宿主細胞を培養するステップ；
- (e) 分泌されたステップ(d)の抗原結合性タンパク質を回収するステップ、を含む。

【0231】

所望の方法で発現された後、抗原結合性タンパク質物のインビトロ活性を適切なアッセイにより調査する。現在よく使われるELISAアッセイ方式を採用し、標的に対する抗原結合性タンパク質の定性および定量評価を行う。さらに、他のインビトロアッセイを使って、通常のクリアランス機序にも拘らず体の中に残留している抗原結合性タンパク質を評価するために実施されるヒトの臨床試験の前に中和性能を確認してもよい。

【0232】

治療の用量と持続時間は、ヒトの循環系における本発明の分子の相対的持続時間に関係しており、治療条件と患者の全体的健康状態に基づいて当業者により調節可能である。最大の治療効果を得るためには、長期間にわたる（例えば、4～6ヶ月間）反復投薬（例えば、週一回または2週間に一回）が必要となる場合があることが想定される。

【0233】

本発明の治療薬の投与方法は、宿主に薬剤を送達する任意の適切なルートであってよい。本発明の抗原結合性タンパク質、および医薬組成物は、非経口投与、すなわち、皮下（s.c.）、髄腔内、腹腔内、筋肉内（i.m.）、静脈内（i.v.）、または鼻腔内の投与に特に有用である。

【0234】

本発明の治療薬は、有効量の本発明の抗原結合性タンパク質を製薬上許容可能な担体中の有効成分として含む医薬組成物として調製されてもよい。本発明の予防薬では、抗原結合性タンパク質を含む水性懸濁液または水溶液は、注射の準備ができた形で生理的pHに緩衝させることができる。非経口投与用組成物は、通常、本発明の抗原結合性タンパク質の溶液、または製薬上許容可能な担体、例えば、水性担体、に溶解したその混合溶液を含む。種々の水性担体、例えば、0.9%食塩水、0.3%グリシン等を用いてもよい。これらの溶液は、無菌状態で、通常、粒子状物質の無い状態にされる。これらの溶液は、通常よく知られた滅菌技術（例えば、濾過）により無菌にされる。組成物は、適切な生理学的条件に必要とされるpH調節剤および緩衝剤等のような製薬上許容可能な補助物質を含んでもよい。このような製剤処方での本発明の抗原結合性タンパク質の濃度は様々であってよく、すなわち、重量%で約0.5%未満、通常、約1%または少なくとも約1%か

10

20

30

40

50

ら15～20%までになり、また選択された具体的な投与方法に従って主に流体容量、粘性、等に基づいて選択される。

【0235】

従って、本発明の筋肉内注射用医薬組成物は、1mLの無菌緩衝水、および約1ng～約100mg、例えば、約50ng～約30mg、または約5mg～約25mg、の本発明の抗原結合性タンパク質を含むように調製され得る。同様に、本発明の点滴静注用医薬組成物は、約250mlの無菌リンゲル液、および約1～約30mg、または約5mg～約25mgの1ml当たりのリンゲル液中の本発明の抗原結合性タンパク質を含むように調製され得る。非経口投与組成物を調製する実際の方法は既知で、当業者には明らかであり、詳細は、例えば、Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, イーストン、ペンシルベニア州、に記載されている。本発明の静脈内投与可能な抗原結合性タンパク質製剤の調製については、Lasmar U and Parkins D "The formulation of Biopharmaceutical products", Pharma. Sci. Tech. today, page 129-137, Vol.3 (3rd April 2000), Wang, W "Instability, stabilisation and formulation of liquid protein pharmaceuticals", Int. J. Pharm 185 (1999) 129-188, Stability of Protein Pharmaceuticals Part A and B ed Ahern T.J., Manning M. C., New York, NY: Plenum Press (1992), Akers, M. J. "Excipient-Drug interactions in Parenteral Formulations", J. Pharm Sci 91 (2002) 2283-2300, Imamura, K et al "Effects of types of sugar on stabilization of Protein in the dried state", J Pharm Sci 92 (2003) 266-274, Izutsu, Kkojima, s. "Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying", J Pharm. Pharmacol, 54 (2002) 1033-1039, Johnson, R, "Mannitol-sucrose mixtures-versatile formulations for protein lyophilization", J. Pharm. Sci, 91 (2002) 914-922, Ha, E Wang W, Wang Y. j. "Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability", J. Pharm Sci, 91, 2252-2264, (2002)を参照のこと。この全内容は参照により本明細書に組み込まれ、具体的に参照される。

【0236】

一実施形態では、医薬品として用いる場合、本発明の治療薬はユニット剤形として存在する。適切な治療有効量は当業者には容易に決定可能である。適切な用量は患者の体重により計算され、例えば、0.01～20mg/kg、例えば0.1～20mg/kg、例えば1～20mg/kg、例えば10～20mg/kgまたは例えば1～15mg/kg、例えば10～15mg/kgの範囲であってもよい。本発明を使用してヒトを有効に治療する条件は、適切な用量は0.01～1000mg、例えば0.1～1000mg、例えば0.1～500mg、例えば500mg、例えば0.1～100mg、または0.1～80mg、または0.1～60mg、または0.1～40mg、または例えば1～100mg、または1～50mg、の範囲内の本発明の抗原結合性タンパク質であってもよく、これらは非経口、例えば、皮下、静脈内、または筋肉内に投与できる。このような用量は必要なら、医師により選択された適切な時間間隔で反復してもよい。

【0237】

本明細書記載の抗原結合性タンパク質は、貯蔵用に冷凍乾燥が可能で、使用に先立ち適切な担体中で再構成できる。この技術は、通常の免疫グロブリンで有効であることが示されており、既知技術の凍結乾燥と再構成技術を用いることができる。

【0238】

当技術分野で既知のいくつかの方法を使って本発明に使われるエピトープ結合ドメインを見つけることが可能である。

【0239】

用語「ライブラリ」は、異種のポリペプチドまたは核酸の混合物を指す。ライブラリは、それぞれ単一ポリペプチドまたは核酸配列を有するメンバーからなる。この点で、「ライブラリ」は「レパートリー」と同義である。ライブラリメンバー間の配列の差異は、ライブラリ中に存在する多様性の原因である。ライブラリはポリペプチドまたは核酸の単純な混合物の形を取ってもよく、また、核酸のライブラリで形質転換された生命体または細胞の形、例えば、細菌、ウイルス、動物、または植物等の形であってもよい。一実施例では、それぞれの生命体または細胞は1つのみまたは限られた数のライブラリメンバーを含む。核酸によってコードされたポリペプチドを発現させるためには、核酸が発現ベクターの中に組み込まれるのが好ましい。従って一態様では、ライブラリは宿主生物の集合体の形を取ることができ、各生命体は、対応するポリペプチドメンバーを産生するように発現可能な核酸形式で単一ライブラリメンバーを含む発現ベクターのコピーを1つまたは複数を含んでもよい。従って、この宿主生物の集合体は多様なポリペプチドの大きなレパートリーをコードする可能性を有している。

【0240】

「ユニバーサルフレームワーク」は、Kabataの定義（“Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 米国保健社会福祉省）の配列中に保存された抗体領域に対応する単一抗体フレームワーク配列、またはChothiaとLeskの定義（Chothia and Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917）によるヒト生殖細胞系列免疫グロブリンレパートリーまたは構造に対応する単一抗体フレームワーク配列である。これは、単一フレームワークでも、これらのフレームワークの集合体であってもよく、たとえ高頻度可変領域のみの変異であっても、実質的にあらゆる結合特異性の誘導も許容することが認められてきた。

【0241】

本明細書で定義された、アミノ酸およびヌクレオチド配列の整合性と相同性、類似性または同一性は、一実施形態では、デフォルトのパラメーターを使ってBLAST2 Sequenceアルゴリズムにより調製および測定される（Tatusova, T. A. et al., FEMS Microbiol Lett, 174:187-188 (1999)）。

【0242】

エピトープ結合ドメインおよび抗原結合部位はそれぞれ、サイトカイン、成長因子、サイトカイン受容体、成長因子受容体、酵素（例えば、プロテアーゼ）、酵素の補因子、DNA結合タンパク質、脂質および炭水化物を含むヒトまたは動物タンパク質などの一般リガンドまたは任意の所望の標的リガンドに対して結合特異性を有し得る。サイトカイン、成長因子、サイトカイン受容体、成長因子受容体およびその他のタンパク質を含む好適な標的としては、限定されるものではないが：ApoE、Apo-SAA、BDNF、カルジトロフィン-1、CEA、CD40、CD40リガンド、CD56、CD38、CD138、EGF、EGF受容体、ENA-78、エオタキシン、エオタキシン-2、エクソダス-2、FAPα、FGF-酸性、FGF-塩基性、繊維芽細胞成長因子-10、FLT3リガンド、フラクタルカイン（CX3C）、GDNF、G-CSF、GM-CSF、GF-β1、ヒト血清アルブミン、インスリン、IFN-γ、IGF-I、IGF-II、IL-1α、IL-1β、IL-1受容体、IL-1受容体1型、IL-2、IL-

3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8 (72 a. a.)、IL-8 (77 a. a.)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18 (IGIF)、インヒビン α 、インヒビン β 、IP-10、ケラチノサイト成長因子-2 (KGF-2)、KGF、レプチン、LIF、リンホタクチン、ミューラー管障害物質、単球コロニー障害因子、単球走化性タンパク質、M-CSF、c-fms、v-fmsMDC (67 a. a.)、MDC (69 a. a.)、MCP-1 (MCAF)、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MDC (67 a. a.)、MDC (69 a. a.)、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-3 α 、MIP-3 β 、MIP-4、骨髄前駆体障害因子-1 (MPIF-1)、NAP-2、ニュールツリン、神経成長因子、 β -NGF、NT-3、NT-4、オンコスタチンM、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1 α 、SDF1 β 、SCF、SCGF、幹細胞因子 (SCF)、TARC、TGF- α 、TGF- β 、TGF- β 2、TGF- β 3、腫瘍壊死因子 (TNF)、TNF- α 、TNF- β 、TNF受容体I、TNF受容体II、TNIL-1、TPO、VEGF、VEGF A、VEGF B、VEGF C、VEGF D、VEGF受容体1、VEGF受容体2、VEGF受容体3、GCP-2、GRO/MGSA、GRO- β 、GRO- γ 、HCC1、1-309、HER 1、HER 2、HER 3、HER 4、血清アルブミン、vWF、アミロイドタンパク質 (例えば、アミロイド α)、MMP12、PDK1、IgEおよび本明細書に開示される他の標的が挙げられる。当然のことながら、このリストはけして網羅的なものではない。

【0243】

いくつかの実施形態では、結合は、例えば、TNFR1、IL-1、IL-1R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-8R、IL-9、IL-9R、IL-10、IL-12、IL-12R、IL-13、IL-13R α 1、IL-13R α 2、IL-15、IL-15R、IL-16、IL-17R、IL-17、IL-18、IL-18R、IL-23、IL-23R、IL-25、CD2、CD4、CD11a、CD23、CD25、CD27、CD28、CD30、CD40、CD40L、CD56、CD138、ALK5、EGFR、FcER1、TGFb、CCL2、CCL18、CEA、CR8、CTGF、CXCL12 (SDF-1)、キマーゼ、FGF、フリリン、エンドセリン-1、エオタキシン (例えば、エオタキシン-2、エオタキシン-3)、GM-CSF、ICAM-1、ICOS、IgE、IFNa、I-309、インテグリン、L-セ렉チン、MIF、MIP4、MDC、MCP-1、MMP、好中球エラスターゼ、オステオポンチン、OX-40、PARC、PD-1、RANTES、SCF、SDF-1、siglec8、TARC、TGFb、トロンビン、Tim-1、TNF、TRANCE、トリプターゼ、VEGF、VLA-4、VCAM、 α 4 β 7、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR8、 α v β 6、 α v β 8、cMET、CD8、vWF、アミロイドタンパク質 (例えば、アミロイド α)、MMP12、PDK1およびIgEからなる群から選択される標的などの、肺組織の標的に対するものである。

【0244】

ディスプレイシステム (例えば、核酸のコード化機能、および、核酸によりコードされたペプチドまたはポリペプチドの機能特性とリンクしたディスプレイシステム) が、本明細書記載の方法中、例えば、dAbまたは他のエピトープ結合ドメインの選択において使われた場合、選択されたペプチドまたはポリペプチドをコードした核酸のコピー数を増幅または増大することは、好都合なことが多い。これは、本明細書記載の方法や他の適切な方法を使って追加のラウンドのため、あるいは、追加のレパートリー (例えば、親和性成熟レパートリー) を調製するために、十分な量の核酸および/またはペプチドまたはポリペプチドを得る効率的な手段を提供する。従って、一部の実施形態では、エピトープ結合ドメイン選択方法は、ディスプレイシステム (例えば、ファージディスプレイのような、核酸のコーディング機能および核酸によりコードされたペプチドまたはポリペプチドの機

能特性とリンクしたディスプレイ)の使用を含み、選択されたペプチドまたはポリペプチドをコードした核酸のコピー数を増幅または増大するステップをさらに含む。核酸は、任意の適切な方法、例えば、ファージ増幅、細胞増殖またはポリメラーゼ連鎖反応、を使って増幅可能である。

【0245】

一実施例では、この方法は核酸のコーディング機能および核酸によりコードされたポリペプチドの物理的、化学的、および/または機能的特性にリンクしたディスプレイシステムを用いる。このようなディスプレイシステムは、複数の複写可能な遺伝子パッケージ (genetic package)、例えば、バクテリオファージまたは細胞 (細菌) を含むことができる。ディスプレイシステムは、ライブラリ、例えば、バクテリオファージディスプレイライブラリを含んでもよい。バクテリオファージディスプレイはディスプレイシステムの一例である。

10

【0246】

多くの適切なバクテリオファージディスプレイシステム (例えば、一価のディスプレイおよび多価のディスプレイシステム) が記載されている (例えば Griffiths et al., U.S. Patent No. 6, 555, 313 B1 (参照により本明細書に組み込まれる); Johnson et al., U.S. Patent No. 5, 733, 743 (参照により本明細書に組み込まれる); McCafferty et al., U.S. Patent No. 5, 969, 108 (参照により本明細書に組み込まれる); Mulligan-Kehoe, U.S. Patent No. 5, 702, 892 (参照により本明細書に組み込まれる); Winter, G. et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994); Soumillon, P. et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 47 (2-3):175-189 (1994); Castagnoli, L. et al., Comb. Chem. High Throughput Screen, 4 (2):121-133 (2001)、参照)。バクテリオファージディスプレイシステムで表示されるペプチドまたはポリペプチドは、あらゆる適切なバクテリオファージ、例えば、線状ファージ (例えば、fd、M13、F1)、溶菌ファージ (例えば、T4、T7、ラムダ)、またはRNAファージ (例えば、MS2)、上でも表示可能である。

20

30

【0247】

通常、適切なファージコートタンパク質 (例えば、fd pIII タンパク質) との融合タンパク質としてペプチドまたはファージポリペプチドのレパートリーを表示するファージライブラリが作成または提供される。融合タンパク質は、ペプチドまたはポリペプチドファージコートタンパク質の先端、または所望なら内部位置にペプチドまたはポリペプチドを表示できる。例えば、表示されたペプチドまたはポリペプチドは、pIII のアミノ末端からドメイン1まで存在可能である (pIII のドメイン1はN1とも呼ばれる)。表示されたポリペプチドは、直接pIIIに (例えば、pIII のドメイン1のN末端) またはリンカーを使ってpIIIに融合可能である。所望なら、融合体はタグ (例えば、myc エピトープ、His タグ) をさらに含むこともできる。ファージコートタンパク質との融合タンパク質として表示されたペプチドまたはポリペプチドのレパートリーを含むライブラリは、任意の適切な方法を用いて制作可能である。例えば、表示されたペプチドまたはポリペプチドをコードしたファージベクターライブラリやファージミドベクターを、適切な宿主細菌中に導入し、その結果得られた細菌を培養して (例えば、適切なヘルパーファージを使って、または必要ならプラスミドを補完して) ファージを産生する。ファージライブラリは、培養物から任意の適切な方法、例えば、沈降法および遠心分離法、により回収可能である。

40

【0248】

ディスプレイシステムは任意の多様な所望量を含むペプチドまたはポリペプチドのレパートリーを含むこともできる。例えば、このレパートリーは生命体、生命体のグループ、

50

所望組織または所望細胞型により発現された自然発生のポリペプチドに対応するアミノ酸配列のペプチドまたはポリペプチドを含むことも、または、ランダムなアミノ酸配列またはランダム化されたアミノ酸配列を有するペプチドまたはポリペプチドを含むこともできる。希望するなら、このポリペプチドは、共通のコアまたは足場を共有することができる。例えば、レパートリーまたはライブラリ中の全ポリペプチドが、プロテインA、プロテインL、プロテインG、フィブロネクチンドメイン、アンチカリン、CTLA4、所望の酵素（例えば、ポリメラーゼ、セルラーゼ）、または免疫グロブリンスーパーファミリー由来のポリペプチド、例えば、抗体または抗体断片（例えば、抗体可変ドメイン）から選択された足場をベースにすることも可能である。このようなレパートリーやライブラリ中のポリペプチドは、ランダムなアミノ酸配列またはランダム化されたアミノ酸配列の規定領域および共通アミノ酸配列の領域を含むことができる。特定の実施形態では、レパートリー中の全てまたは実質的に全てのポリペプチドが所望のタイプ、例えば、所望の酵素（例えば、ポリメラーゼ）または所望の抗体の抗原結合断片（例えば、ヒトV_HまたはヒトV_L）、である。一部の実施形態では、ポリペプチドディスプレイシステムはポリペプチドのレパートリーを含み、その中の各ポリペプチドは抗体可変ドメインを含む。例えば、レパートリー中の各ポリペプチドはV_H、V_LまたはF_v（例えば、単鎖F_v）を含んでもよい。

10

【0249】

アミノ酸配列の多様性を、任意の適切な方法を使って、ペプチドまたはポリペプチドまたは足場の任意の所望の領域に導入可能である。例えば、アミノ酸配列の多様性は、任意の適切な変異誘発性（例えば、低忠実性PCR、オリゴヌクレオチド媒介または部位特異的変異、NNKコドンを使った多様化）または任意の他の適切な方法を使って、多様化ポリペプチドをコードした核酸ライブラリを調製することにより、標的部位、例えば抗体可変ドメインの相補性決定領域または疎水性ドメインに導入可能である。所望なら、多様化すべきポリペプチドの領域をランダム化できる。

20

【0250】

レパートリーを構成するポリペプチドのサイズは、概して選択可能であり、均一なポリペプチドサイズは必要ではない。レパートリー中のポリペプチドは、少なくとも三次構造を有する（少なくとも1つのドメインを形成する）ことができる。

【0251】

選択／単離／回収

エピトープ結合ドメインまたはドメインの集合体は、適切な方法を使って、レパートリーまたはライブラリ（例えば、ディスプレイシステム中の）から選択、単離、および／または回収可能である。例えば、ドメインは選択可能な特性（例えば、物理的特性、化学的特性、機能特性）に基づいて選択または単離される。適切な選択可能な特性には、レパートリー中のペプチドまたはポリペプチドの生物活性、例えば、一般的リガンド（例えば、スーパー抗原）に対する結合性、標的リガンド（例えば、抗原、エピトープ、基質）に対する結合性、抗体に対する結合性（例えば、ペプチドまたはポリペプチド上に発現したエピトープ経由）、および触媒能力が含まれる（例えば、Tomlinson et al., WO 99/20749; WO 01/57065; WO 99/58655 参照）。

30

40

【0252】

一部の実施形態では、実質的に全てのドメインが共通の選択可能特性を共有するペプチドまたはポリペプチドのライブラリまたはレパートリーから、プロテアーゼ耐性ペプチドまたはポリペプチドが選択および／または単離される。例えば、ドメインは、実質的に全てのドメインに共通の一般的リガンドに結合するライブラリまたはレパートリー、共通の標的リガンドに結合するライブラリまたはレパートリー、共通の抗体に結合する（またはそれによって結合される）ライブラリまたはレパートリー、または共通の触媒能力を有するライブラリまたはレパートリーから選択することができる。このタイプの選択は、所望の生物活性を有する親ペプチドまたはポリペプチドに基づいたレパートリーまたはドメイ

50

ンを調製する際、例えば免疫グロブリン単一可変ドメインの親和性成熟を行う場合、特に有用である。

【0253】

共通の一般的リガンドへの結合性に基づいた選択では、元のライブラリまたはレパートリーの要素である全てまたは実質的に全てのドメインを含むドメインコレクションまたは集合体が得られる。例えば、標的リガンドまたは一般的リガンドに結合しているドメイン、例えばプロテインA、プロテインLまたは抗体は、パニングまたは適切な親和性マトリックスを使って選択、単離、および／または回収できる。パニングは、リガンド（例えば、一般的リガンド、標的リガンド）の溶液を適切な容器（例えば、チューブ、ペトリ皿）に加え、リガンドを容器の壁表面上に沈着または被覆させることにより達成できる。過剰リガンドを洗い流し、ドメインを容器に加え、この容器をペプチドまたはポリペプチドが固定化されたリガンドと結合するのに適した条件下で維持する。非結合ドメインは、洗い流され、結合ドメインは、任意の適切な方法、例えば、削り取りやpHを下げることによって回収できる。

10

【0254】

適切なリガンド親和性マトリックスは、通常、固体担体またはビーズ（例えば、アガロース）を含み、これにリガンドを共有結合的または非共有結合的に連結させる。親和性マトリックスは、ドメインがマトリックス上のリガンドに結合するための適切な条件下、バッチプロセス、カラムプロセスまたは任意の他の適切なプロセスを使って、ペプチドまたはポリペプチド（例えば、プロテアーゼとインキュベートされたレパートリー）と結合させることができる。親和性マトリックスと結合しないドメインは洗い流し、結合したドメインは、低pHバッファー、マイルドな変性剤（例えば、尿素）、またはリガンドとの結合で競合するペプチドまたはドメインで溶出等の任意の適切な方法で溶出し、回収できる。一実施例では、ビオチン化した標的リガンドは、レパートリー中のドメインが標的リガンドに結合するための適切な条件下、レパートリーと結合する。結合ドメインは、固定化されたアビジンストレプトアビジン（例えば、ビーズ上の）を使って回収される。

20

【0255】

一部の実施形態では、一般的または標的リガンドは、抗体またはその抗体の抗原結合断片である。ライブラリまたはレパートリーのペプチドまたはポリペプチド中で実質的に保存されたペプチドまたはポリペプチドの構造的特徴と結合する抗体または抗原結合断片は、特に一般的リガンドとして有用である。プロテアーゼ耐性ペプチドまたはポリペプチドの単離、選択および／または回収のためのリガンドとしての使用に適した抗体と抗原結合断片は、モノクローナルまたはポリクローナルであってもよく、任意の適切な方法で調製できる。

30

【0256】

ライブラリ／レパートリー

プロテアーゼエピトープ結合ドメインをコードおよび／または含むライブラリは、任意の適切な方法を使って調製または入手可能である。ライブラリは、目的のドメインまたは足場（例えば、ライブラリから選択されたドメイン）に基づいてドメインをコードするように設計することも、本明細書記載の方法を使って別のライブラリから選択することも可能である。例えば、ドメインが豊富なライブラリは、適切なポリペプチドディスプレイシステムを使って調製可能である。

40

【0257】

所望のタイプのドメインのレパートリーをコードしたライブラリは、任意の適切な方法を使って容易に作成可能である。例えば、所望のタイプのポリペプチド（例えば、免疫グロブリン可変ドメイン）をコードした核酸配列を得ることができ、例えば、エラープロンポリメラーゼ連鎖反応（PCR）システムを使ってまたは化学的変異誘発により（Deng et al., J. Biol. Chem., 269:9533 (1994)）、または細菌の突然変異誘発株を使って（Low et al., J. Mol. Biol., 260:359 (1996)）核酸を増幅することにより、それぞれが1つまた

50

は複数の変異を含む核酸のコレクションが調整可能である。

【0258】

他の実施形態では、核酸の特定の領域を多様化の標的にすることができる。選択位置を変異させる方法も当業者にはよく知られており、これには、例えば、PCRを使ってまたは使わないで、ミスマッチなオリゴヌクレオチドまたは変性オリゴヌクレオチドを使用する場合が含まれる。例えば、合成抗体ライブラリは、抗原結合ループに対する変異を標的にして作られている。ランダム化または半ランダム化抗体H3およびL3領域を、生殖細胞系列免疫グロブリンV遺伝子セグメントに付加して、変異フレームワーク領域を有する大ライブラリが構築されている (Hoogenboom and Winter (1992) *supra*; Nissim et al. (1994) *supra*; Griffiths et al. (1994) *supra*; DeKruif et al. (1995) *supra*)。このような多様化は、他の抗原結合ループを一部または全て含むまでに拡張されている (Cramer et al. (1996) *Nature Med.*, 2:100; Riechmann et al. (1995) *Bio/Technology*, 13:475; Morphosys, WO 97/08320, *supra*)。他の実施形態では、核酸の特定の領域を多様化の標的にでき、例えば、2段階PCR戦略では1回目のPCR生成物を「メガプライマー」として用いる (例えば、Landt, O. et al., *Gene* 96:125-128 (1990) 参照)。標的の多様化は、例えば、SOE PCRを使っても達成できる (例えば、Horton, R.M. et al., *Gene* 77:61-68 (1989) 参照)。

【0259】

選択位置での配列多様性は、ポリペプチドの配列を特定するコード配列を変え、多くのアミノ酸 (例えば20全部またはそのサブセット) をその位置に組み込むことにより得ることができる。IUPAC命名法を使って説明すると、最も用途の広いコドン>NNKであり、これはTAG停止コドンならびに全アミノ酸をコードする。NNKコドンは、必要な多様性を導入するために使用可能である。同じ目的を有する他のコドン例えばNNNも使用でき、これは追加の停止コドンTGAとTAAを作成する。このような標的化手法は、標的領域中の全配列空間を調査対象にすることができる。

【0260】

一部のライブラリは、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであるドメイン (例えば、抗体またはその一部) を含む。例えば、ライブラリは既知の主鎖構造を有するドメインを含むことができる (例えば、Tomlinson et al., WO 99/20749 参照)。ライブラリは適切なプラスミドまたはベクター中で調製できる。本明細書で使われるベクターは、異種のDNAを細胞の中に導入し、その発現および/または複製をするのに使われる個別要素を指す。任意の適切なベクターを使うことができ、これにはプラスミド (例えば、細菌性プラスミド)、ウイルスまたはバクテリオファージベクター、人工染色体、およびエピソードベクターが含まれる。このようなベクターは、単純クローニングおよび突然変異生成のために使うことができ、または、発現ベクターは、ライブラリの発現を促進するために使うことができる。ベクターおよびプラスミドは、通常1つまたは複数のクローニング部位 (例えば、ポリリンカー)、複製開始点、および少なくとも1つの選択可能なマーカー遺伝子を含む。発現ベクターは、ポリペプチドの転写と翻訳を促進するエレメント、例えば、エンハンサー、プロモーター、転写終結信号、シグナル配列、等をさらに含むことができる。これらのエレメントは、かかる発現ベクターが発現に適切な条件下で維持された場合 (例えば、適切な宿主細胞中で)、ポリペプチドが発現し、産生されるように、ポリペプチドをコードしたクローン化挿入断片に作動可能にリンクして配置することが可能である。

【0261】

クローニングおよび発現ベクターは、通常、1つまたは複数の選択宿主細胞中でベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。典型的には、クローニングベクター中では、これ

は、ベクターが宿主染色体DNAとは独立に複製するのを可能にし、しかも複製開始点または自己複製配列を含む配列である。このような配列は、種々の細菌、酵母およびウイルスでよく知られている。プラスミド pBR322 由来の複製開始点は、大抵のグラム陰性細菌に対し適切で、2 ミクロンプラスミド開始点は、酵母に適切であり、また種々のウイルス開始点（例えば、SV40、アデノウイルス）は、哺乳動物細胞中のクローニングベクターに有用である。コス細胞のような高レベル複製が可能な哺乳動物細胞で使われるのでなければ、通常、複製開始点は哺乳動物の発現ベクターには必要でない。

【0262】

クローニングまたは発現ベクターは、選択可能マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含むことができる。このようなマーカー遺伝子は、選択培養培地中で成長した形質転換宿主細胞の生存または成長に必要なタンパク質をコードしている。従って、選択遺伝子を含むベクターで形質転換されなかった宿主細胞は、その培地中で生存しないことになる。典型的な選択遺伝子は、抗生物質と他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートまたはテトラサイクリンに耐性を付与し、栄養要求性欠如を補完し、または成長培地中で得られない重要な栄養素を補給するタンパク質をコードしている。

10

【0263】

適切な発現ベクターは多くの要素を含むことができる。例えば、複製開始点、選択可能マーカー遺伝子、1つまたは複数の発現調節エレメント、例えば、転写調節エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター）および／または1つまたは複数の翻訳信号、シグナル配列またはリーダー配列、等を含むことができる。発現調節エレメントおよび信号またはリーダー配列は、もしそれが存在するならば、ベクターまたは他のソースから供給を受けることができる。例えば、抗体鎖をコードしたクローン化核酸の転写および／または翻訳調節配列は、発現促進に使用可能である。

20

【0264】

プロモーターは、所望の宿主細胞中での発現のために組み込んでもよい。プロモーターは、構成的であっても誘導可能であってもよい。例えば、プロモーターは、核酸の転写を命令できるように、抗体、抗体鎖またはその一部をコードした核酸に作動可能にリンクされてもよい。種々の適切な原核生物用プロモーター（例えば、 β -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーターシステム、アルカリフォスファターゼ、トリプトファン（trp）プロモーターシステム、大腸菌用の lac、T3、T7 プロモーター）および真核生物（例えば、シミアンウイルス40初期または後期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス末端反復配列プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、EG-1a プロモーター）宿主が入手可能である。

30

【0265】

さらに、発現ベクターは、通常、ベクターを保持している宿主細胞の選択に用いる選択可能マーカーを含み、複製可能な発現ベクターの場合には、複製開始点を含む。抗生物質または薬剤耐性を付与する産物をコードした遺伝子は、共通の選択可能マーカーであり、原核生物（例えば、 β -ラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン耐性）、テトラサイクリン耐性用 Tet 遺伝子）および真核細胞（例えば、ネオマイシン（G418またはジェネチン）、gpt（ミコフェノール酸）、アンピシリン、またはヒグロマイシン耐性遺伝子）で使用可能である。ジヒドロ葉還元酵素標識遺伝子は、種々の宿主中でメトトレキサートの選択を可能にする。宿主の栄養要求性マーカーの遺伝子産物をコードした遺伝子（例えば、LEU2、URA3、HIS3）は、酵母中の選択可能マーカーとして使われることが多い。ウイルス（例えば、バキュロウイルス）またはファージベクター、および宿主細胞のゲノムに統合可能なベクター、例えば、レトロウイルスベクター、の使用もまた意図されている。

40

【0266】

原核生物（例えば、大腸菌等の細菌細胞）または哺乳動物細胞中での発現に適切な発現ベクターには、例えば、pETベクター（例えば、pET-12a、pET-36、pET-37、pET-39、pET-40、Novagen 他）、ファージベクター（例え

50

ば、pCANTAB5E、Pharmacia)、pRIT2T (プロテインA融合ベクター、Pharmacia)、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pCDNA3.1、pRc/RSV、pEF-1 (Invitrogen、Carlsbad、CA)、pCMV-SCRIPT、pFB、pSG5、pXT1 (Stratagene、La Jolla、CA)、pCDEF3 (Goldman、L.A., et al., Biotechniques、21:1013-1015 (1996))、pSVSPORT (Gibco BRL、Rockville、MD)、pEF-Bos (Mizushima、s., et al., Nucleic Acids Res., 18:5322 (1990))等、が挙げられる。種々の発現宿主、例えば、原核細胞 (大腸菌)、昆虫細胞 (Drosophila Schneider S2細胞、Sf9) 10、酵母 (P. methanolicus、P. pastoris、S. cerevisiae) および哺乳動物細胞 (例えば、コス細胞) での使用に適切な発現ベクターが入手可能である。

【0267】

ベクターのいくつかの例は、ポリペプチドライブラリメンバーに対応するヌクレオチド配列の発現を可能とする発現ベクターである。従って、一般のおよび／または標的リガンドの選択は、ポリペプチドライブラリメンバーを発現する単一クローンの別々の増殖と発現により行われる。上述のように、具体的な選択ディスプレイシステムは、バクテリオファージディスプレイである。従って、ファージまたはファージミドベクターは使用可能である。例えば、ベクターは大腸菌複製開始点 (二本鎖複製用) および、ファージ複製起点 (一本鎖DNAの産生用) を有するファージミドベクターであってもよい。このようなベクターの操作および発現は、当業者にはよく知られている (Hoogenboom and Winter (1992) supra; Nissim et al. (1994) supra)。簡単に述べれば、ベクターは、ファージミドおよび発現カセット上流のラックプロモーターに選択性を付与するβ-ラクタマーゼ遺伝子を含むことができる。この遺伝子は、適切なリーダー配列、多重クローニング部位、1つまたは複数のペプチドタグ、1つまたは複数のTAG停止コドンおよびファージタンパク質pIIIを含むことができる。従って、ベクターは、大腸菌の種々の抑制因子および非抑制因子株を使って、また、グルコース、イソプロピルチオβ-Dガラクトシド (isopropylthio-β-D-galactoside) (IPTG) またはVCSM13等のヘルパーファージを添加して、発現のないプラスミドとして複製することができ、大量のポリペプチドライブラリメンバーのみ、または産物ファージ (この内の一部はポリペプチド-pIII融合体で、その表面に少なくとも1つのコピーを含む)、を産生することができる。 20 30

【0268】

抗体可変ドメインは、標的リガンド結合部位および／または一般的リガンド結合部位を含んでもよい。特定の実施形態では、一般的リガンド結合部位は、プロテインA、プロテインLまたはプロテインG等のスーパー抗原のための結合部位である。可変ドメインは、任意の所望の可変ドメイン、例えば、ヒトVH (例えば、V_H1a、V_H1b、V_H2、V_H3、V_H4、V_H5、V_H6)、ヒトVλ (例えば、Vλ1、Vλ11、Vλ111 40、Vλ1V、VλV、VλVIまたはVκ1) またはヒトVK (例えば、Vκ2、Vκ3、Vκ4、Vκ5、Vκ6、Vκ7、Vκ8、Vκ9またはVκ10) に基づくものであってもよい。

【0269】

またさらなる技術カテゴリーには、人工区分によるレパートリーの選択が含まれ、これは遺伝子とその遺伝子産物との結びつきを可能にする。例えば、所望の遺伝子産物をコードした核酸が油中水乳剤を使って形成されたマイクロカプセル中で選択できる選択システムが、WO99/02671、WO00/40712およびTawfik & Griffiths (1998) Nature Biotechnol 16(7), 652-6に記載されている。所望の活性を有する遺伝子産物をコードした遺伝因子がマイ 50

クロカプセル中に区分けされ、次に、転写、および／または翻訳されてそれぞれの遺伝子産物（RNAまたはタンパク質）をマイクロカプセル内に産生する。引き続き、所望の活性を有する遺伝子産物を産生する遺伝因子が選別される。この手法によって、種々の方法で所望の活性を検出することにより目的の遺伝子産物を選択できる。

【0270】

エピトープ結合ドメインの特徴づけ

ELISAを含む当業者に周知の方法によって、特異的抗原またはエピトープへのドメインの結合を試験することができる。一例として、結合は、モノクローナルファージELISAを用いて試験される。

【0271】

ファージELISAは、任意の適切な手順に従って行われ得る。例示的なプロトコルを以下に説明する。

【0272】

各選別で産出したファージ集団は、「ポリクローナル」ファージ抗体を同定するため、選択した抗原またはエピトープへの結合についてELISAによってスクリーニングすることができる。これら集団由来の単一の感染バクテリアコロニーからのファージを、「モノクローナル」ファージ抗体を同定するため、ELISAによってスクリーニングすることができる。抗原またはエピトープへの結合に関して可溶性抗体断片のスクリーニングもまた所望され、これもまた、例えばC-またはN-末端タグに対する試薬を用いてELISAによって実施することができる（例えばWinter et al., (1994）

Ann. Rev. Immunology 12, 433～55およびそこで引用された文献を参照のこと）。

【0273】

PCR産物のゲル電気泳動（Marks et al., 1991, 上記；Nissim et al., 1994, 上記）、プロービング（Tomlinson et al., 1992 J. Mol. Biol. 227, 776）またはベクターDNAのシーケンスにより、選択したファージモノクローナル抗体の多様性を評価することができる。

【0274】

E. dAbの構造

dAbが、本明細書に記載したファージディスプレイ技術に用いて選択したV遺伝子レパートリーから選択される場合には、これらの可変ドメインは普遍的なフレームワーク領域を含み、本明細書で定義したような特定の一般的リガンドによって認識されるようになる。普遍的なフレームワーク、一般的リガンドなどの使用については国際公開第99/20749に記載されている。

【0275】

V遺伝子レパートリーが使用される場合には、ポリペプチド配列における多様性が可変ドメインの構造的ループ内に局在する場合もある。それぞれの可変ドメインとその相補対との相互作用を高めるために、DNAシャッフリングまたは変異生成によって、各可変ドメインのポリペプチド配列を変化させてもよい。DNAシャッフリングは当業者に周知であり、例えばStemmer, 1994, Nature, 370:389～391および米国特許第6,297,053号に記載され、この両方は引用することにより本明細書に組み入れられる。突然変異生成のその他の方法もまた当業者に周知である。

【0276】

dAb構築物作成で使用される足場

i. 主鎖構造の選択

免疫グロブリンスーパーファミリーの全てのメンバーは、ポリペプチド鎖について類似した折り畳み部分を共有する。例えば、抗体はそれらの一次配列に関しては高度に多様化しているが、配列の比較および結晶学的な構造は予想に反して、6つの抗体の抗原結合ループのうちの5つ（H1、H2、L1、L2、L3）が限られた数の主鎖構造、または標準的な構造をとることを明らかにした（Chothia and Lesk (1987）

J. Mol. Biol. 196:901; Chothia et al. (1989) Nature, 342:877)。ループ長および鍵となる残基の解析はさらに、大部分のヒト抗体に見られるH1、H2、L1、L2およびL3の主鎖構造の予測を可能にした(Chothia et al. (1992) J. Mol. Biol., 227:799; Tomlinson et al. (1995) EMBO J., 14:4628; Williams et al. (1996) J. Mol. Biol., 264:220)。H3領域は、(Dセグメントの使用により)配列、長さおよび構造においてはより多様であるが、ループおよび抗体フレームワークの鍵となる位置における特定の残基の長さおよび存在または残基の型次第では、短いループ長においてはH3領域もまた限られた数の主鎖構造を形成する(Martin et al. (1996) J. Mol. Biol., 263:800; Shirai et al. (1996) FEBS Letters, 399:1)。

10

【0277】

dAbは V_H ドメインライブラリおよび/または V_L ドメインライブラリなどのドメインライブラリから有利に構築される。1つの態様においては、メンバーの主鎖構造が分かるように特定のループ長および鍵となる残基を選択して、ドメインライブラリを設計する。都合の良いことに、これらは天然に見られる免疫グロブリンスーパーファミリーの実際の構造であり、上記で議論されたような機能を果たさない可能性を最小限にする。生殖細胞系V遺伝子セグメントは、抗体またはT細胞受容体ライブラリを構築するための1つの好適な基礎フレームワークとして機能するが、その他の配列もまた有用である。変異も低頻度で生じ得るが、機能性メンバーの少数が、その機能に影響を及ぼさない程度に変化した主鎖構造を有する可能性がある程度である。

20

【0278】

標準的な構造の理論も、リガンドによってコードされる異なる主鎖構造の数の評価、リガンド配列に基づく主鎖構造の予測、および標準的な構造に影響を及ぼさない多様化のための残基の選択に役立つ。ヒト V_K ドメインにおいては、L1ループは4つの標準的な構造のうちの1つをとることができ、L2ループは単一の標準的な構造を有し、ヒト V_K ドメインの90%がL3ループのために4つまたは5つの標準的な構造のうちの1つをとることができることが知られている(Tomlinson et al. (1995) 上記)；従って、 V_K ドメインのみにおいて、異なる標準的な構造が結合し、異なる種類的主鎖構造を作り出すことが可能である。 V_L ドメインがL1、L2およびL3ループの異なる種類の標準的な構造をコードし、 V_K および V_L ドメインがH1およびH2ループのいくつかの標準的な構造をコードする任意の V_H ドメインと対合することが可能なので、これら5つのループで見られる標準的な構造の組み合わせの数は非常に多くなる。このことは、様々な種類の結合特異性を生産するためには、主鎖構造の多様性の生成が必須である可能性を示唆する。しかしながら、予想に反し、実質的に全ての抗原を標的とするのに十分な多様性を生成するには、主鎖構造における多様性は必要ではないことが、単一の既知の主鎖構造に基づいて抗体ライブラリを構築することにより見いだされた。さらに驚くべきことに、単一的主鎖構造はコンセンサス構造である必要もなく、単一の天然に生じる構造を全ライブラリの基礎として用いることが可能である。従って、一つの特定の態様においては、dAbは単一の既知の主鎖構造を有する。

30

40

【0279】

選択された単一的主鎖構造が、問題となる免疫グロブリンスーパーファミリータイプの分子間ではありふれたものであってもよい。その構造をとる膨大な数の天然に生じる分子が観察される場合、その構造はありふれたものとなる。従って、1つの態様においては、天然に生じる免疫グロブリンドメインのそれぞれの結合ループについて異なる主鎖構造を個別に検討し、その後、主鎖構造の所望の組み合わせを有する天然に生じる可変ドメインが異なるループのために選択される。何も得られなかった場合には、最も近似した等価物を選択することができる。異なるループにおける主鎖構造の所望の組み合わせは、所望の主鎖構造をコードする生殖細胞系遺伝子セグメントを選択することにより作成できる。一例

50

として、選択した生殖細胞系遺伝子セグメントは、天然にしばしば発現するものであり、特に、全ての天然の生殖細胞系遺伝子セグメント中で最も頻繁に発現するものであってもよい。

【0280】

ライブラリの設計においては、6つの抗原結合ループそれぞれについて異なる主鎖構造の頻度を個別に検討してもよい。H1、H2、L1、L2およびL3においては、天然に生じる分子の抗原結合ループの20%から100%の範囲の特定の構造が選択される。典型的には、その観察される頻度は35%超（すなわち35%から100%の間）、理想的には、50%超または65%超である。H3ループの大部分が標準的な構造を有さないため、標準的な構造を示すかかるループ間でありふれた主鎖構造を選択するのが好ましい。従って、ループのそれぞれにおいては、天然のレパートリーにおいて最も頻繁に観察される構造が選択される。ヒト抗体においては、それぞれのループにおける最も一般的な標準的な構造（CS）は以下の通りである：H1-CS1（発現レパートリーの79%）、H2-CS3（46%）、L1-V_κのCS2（39%）、L2-CS1（100%）、L3-V_κのCS1（36%）（計算ではκ：λ率が70：30であると推定される。Hodget al. (1967) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 48:133）。標準的な構造を有するH3ループについては、94番の残基から101番の残基である塩橋を有する7つの残基のCDR3の長さ（Kabata et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest, U. S. Department of Health and Human Services）が最も一般的であることが見いだされた。EMBLデータライブラリには、この構造を形成するために必要とされる長さのH3および鍵となる残基を有するヒト抗体配列が少なくとも16あり、およびタンパク質データバンク中には、抗体モデリングの基礎として使用可能な少なくとも2つの結晶学的な構造が存在する（2cgrおよび1tet）。最も頻繁に発現する生殖細胞系遺伝子セグメントの標準的な構造の組み合わせは、V_Hセグメント3-23（DP-47）、J_HセグメントJH4b、V_κセグメントO2/O12（DPK9）およびJ_κセグメントJ_κ1である。V_HセグメントDP45およびDP38もまた適している。これらのセグメントをさらに、所望の単一の主鎖構造を有するライブラリを構築するための基礎として、組み合わせることによって使用することができる。

【0281】

また別の方法としては、単離において、それぞれの結合ループについて天然に生じる異なる主鎖構造の頻度に基づいて単一の主鎖構造を選択する代わりに、天然に生じる主鎖構造の組み合わせの頻度が、単一の主鎖構造を選択するための基礎として使用される。抗体の場合には、例えば、任意の2つ、3つ、4つ、5つ、6つの抗原結合ループについて、天然に生じる標準的な構造の組み合わせの頻度を決定することができる。ここで、選択される構造は天然に生じる抗体においてありふれたものであってもよく、かつ、天然のレパートリーにおいて最も頻繁に見られるものであってもよい。従って、ヒト抗体においては、例えば、5つの抗原結合ループであるH1、H2、L1、L2およびL3の天然の組み合わせについて検討する場合には、最も頻繁にみられる標準的な構造の組み合わせを決定し、その後、単一の主鎖構造を選択するための基礎として、H3ループにおける最も一般的な構造とそれを組み合わせる。

【0282】

標準的な配列の多様化

選択された複数の既知の主鎖構造または単一の既知の主鎖構造を選択したので、分子の結合部位を多様化することによりdAbを構築し、構造的および／または機能的多様性を有するレパートリーを生成することができる。このことは、構造および／又機能の面で十分な多様性を有する変異が生成され、幅のある活性を提供することができることを意味する。

【0283】

所望の多様性は、典型的には、1つ以上の位置において選択した分子を多様化することにより生成される。変化させる位置は、ランダムであってもよいし、または選択してもよい。多様化は、内在性アミノ酸を任意のアミノ酸または、天然若しくは合成のアナログにより置換し、ランダム化によって非常に膨大な数の変異を生成するか、または内在性アミノ酸を1つ以上の定義されたアミノ酸サブセットにより置換し、限定数の変異を生成することにより達成できる。

【0284】

それらの変異を導入する様々な方法が報告されている。分子をコードする遺伝子中にランダムな突然変異を導入するためには、変異性PCR (Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol., 226:889)、化学的突然変異生成 (Deng et al. (1994) J. Biol. Chem., 269:9533) またはバクテリアの突然変異誘発遺伝子株 (Low et al. (1996) J. Mol. Biol., 260:359) を用いることができる。選択した位置に変異を導入するための方法も当該分野においては周知であり、これらにはPCRの使用を介したまたは介さない、ミスマッチオリゴヌクレオチドまたは変性オリゴヌクレオチドの使用が含まれる。例えば、複数の合成抗体ライブラリが抗原結合ループに対するターゲティング突然変異によって作出された。ヒト破傷風トキソイド結合FabのH3領域が、新しい種類の結合特性を作出するためにランダム化された (Barbas et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457)。変異のないフレームワーク領域を有する巨大ライブラリを生産するために、H3およびL3領域のランダム化またはセミランダム化が生殖細胞系V遺伝子セグメントに付加された (Hoogenboom & Winter (1992) J. Mol. Biol., 227:381; Barbas et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457; Nissim et al. (1994) EMBOJ., 13:692; Griffiths et al. (1994) EMBOJ., 13:3245; De Kruijff et al. (1995) J. Mol. Biol., 248:97)。それらの変異は、いくつかまたは全てのその他の抗原結合ループを含むように拡大された (Cramer et al. (1996) Nature Med., 2:100; Riechmann et al. (1995) Bio/Technology, 13:475; Morpho sys, 国際公開第97/08320号、上記)。

【0285】

ループランダム化はH3だけで約 10^{15} を超える構造を作り出し、その他の5つのループについても類似した数の変異を生成する可能性があるため、全ての可能な組み合わせを発現するライブラリを構築するのに現在の形質転換技術を用いることも、無細胞系を用いることさえも適してはいない。例えば、これまでに構築された最も巨大なライブラリのうちの1つにおいては、この設計のライブラリにおいて可能な多様性のただ1つの画分である、 6×10^{10} の異なる抗体が生成された (Griffiths et al. (1994) 上記)。

【0286】

1つの実施形態においては、分子の所望の機能を作り出すまたは変化させることに直接関係している残基のみが多様化される。多くの分子においては、その機能は標的に結合させることであり、従って多様性は、分子の全体的パッキングまたは選択した主鎖構造の維持にとって重要な残基を変化させるのを避けながら、標的結合部位に集中させる必要がある。

【0287】

1つの態様においては、抗原結合部位におけるそれらの残基のみが多様化されたdAbライブラリが使用される。これらの残基は特にヒト抗体レパートリーにおいて多様であり、かつ、高品質な抗体/抗原複合体と接触することが知られている。例えば、L2においては、50および53番目の位置は天然に生じる抗体で多様であり、抗原との結合が観察

されることが知られている。これとは対照的に、標準的な方法では、Kabat et al.(1991, 上記)によって定義された対応する相補性決定領域(CDR1)において全ての残基、すなわちライブラリにおいて2つが変化したのに対し7残基余りを多様化させなければならないだろう。これは、抗原結合特性の範囲を作り出すのに必要な機能的多様性の面で、大幅な改善である。

【0288】

天然においては、抗体の多様性は、生殖細胞系V、DおよびJ遺伝子セグメントの体細胞組換えによるナイーブ初代レパートリーの作成(いわゆる生殖細胞系および接合多様性)、ならびにその結果生じた再構成V遺伝子の体細胞超変異という2つの過程の結果である。ヒト抗体配列の解析により、初代レパートリーにおける多様性が抗原結合部位の中心に集中していること、一方で体細胞超変異は初代レパートリーにおいて高度に保存される抗原結合部位の末端の領域にまで多様性を広げることが示された(Tomlinson et al. (1996) J. Mol. Biol., 256:813を参照のこと)。この相補性はおそらく配列間隔を探すための効果的な方法として発展したものであろう。これは明かに抗体に特有なものではあるが、他のポリペプチドレパートリーに対しても容易に適用可能である。多様化した残基は、標的への結合部位を形成する残基のサブセットである。標的結合部位における異なる(重複を含む)残基のサブセットは、必要に応じて選択の異なる段階において多様化される。

【0289】

抗体レパートリーの例においては、初代「ナイーブ」レパートリーは、抗原結合部位のいくつかの(しかし全てではない)残基が多様化された場合に作り出される。この文脈で本明細書で使用される場合、「ナイーブ」または「ダミー」という用語は、予め決められた標的を有さない抗体分子を意味する。これらの分子は、多様な抗原刺激に曝されていない胎児および新生児患者の場合と同様に、免疫多様化を受けていない患者の免疫グロブリン遺伝子によってコードされる分子に類似する。このレパートリーはその後、抗原またはエピトープの種類によって選択される。必要に応じて、さらなる多様性をその後、最初のレパートリーにおいて多様化された領域の外側に導入することができる。この成熟したレパートリーは、改変した機能、特異性または親和性用に選択できる。

【0290】

本明細書において記載された配列は、実質的に同一な配列、例えば少なくとも90%同一な配列、本明細書で記載された配列と例えば少なくとも91%、または少なくとも92%、または少なくとも93%、または少なくとも94%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%同一な配列を含むことを理解されたい。

【0291】

核酸については、「実質的な同一性」という用語は、2つの核酸またはその指示された配列を、最適にアラインメントまたは比較した場合に、適切なヌクレオチドの挿入または欠損を含めて、少なくとも約80%のヌクレオチドが、通常は少なくとも約90%から95%、少なくとも約98%から99.5%のヌクレオチドが同一であることを示す。また、実質的な同一性は、選択的なハイブリダイゼーションの条件下でセグメントが相補鎖にハイブリダイズする場合にも存在する。

【0292】

ヌクレオチドおよびアミノ酸配列については、「同一」という用語は、適切な挿入または欠損を含めて最適にアラインメントおよび比較した場合の2つの核酸またはアミノ酸配列の同一性の度合いを意味する。また、実質的な同一性は、選択的なハイブリダイゼーションの条件下でDNAセグメントが相補鎖にハイブリダイズする場合にも存在する。

【0293】

2つの配列間の同一性のパーセンテージは、その2つの配列を最適にアラインメントするために導入が必要とされるギャップおよびそれぞれのギャップの長さを考慮した場合に、その配列が共有している同一の位置の数の関数である(すなわち、%同一性=同一の位置

の数／全位置の数×100)。2つの配列間の配列の比較および同一性のパーセンテージの決定は、以下の限定しない実施例に記載した数学的アルゴリズムを用いて行うことができる。

【0294】

2つのヌクレオチド配列間の同一性のパーセンテージは、NWSgapdna.CMPマトリックスならびに40、50、60、70、または80のギャップウェイトおよび1、2、3、4、5、または6の長さウェイトを使用してGCGソフトウェア中のGAPプログラムを用いて決定することができる。2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の同一性のパーセンテージもまたALIGNprogram(version 2.0)に組み込まれたE.Meyers and W. Miller (Comput. Appl. 10

Biosci., 4:11~17 (1988))のアルゴリズムを用い、PAM120ウェイト残基表、12のギャップ長ペナルティおよび4のギャップペナルティを使用して決定することができる。加えて、2つのアミノ酸配列間の同一性のパーセンテージはGCGソフトウェア中のGAPプログラム中に組み込まれたNeedleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444~453 (1970))のアルゴリズムを用い、Blossum62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれかおよび16、14、12、10、8、6、または4のギャップウェイトと1、2、3、4、5、または6の長さウェイトを使用して決定することができる。

【0295】

一例として、本発明のポリヌクレオチド配列は、参照配列と同一、すなわち100%同一であってもよく、または参照配列と比較した特定の整数までのヌクレオチド変異を含んでもよい。それらの変異は、少なくとも1つのヌクレオチド欠損、転位および塩基転換を含む置換、または挿入からなる群から選択される。ここで前記変異は、参照ヌクレオチド配列の5'末端もしくは3'末端の位置に存在してもよいし、または参照配列中のヌクレオチド間に個々に、またはこれらの末端間のいずれかの位置に、参照配列内の1以上の隣接した群に散在して存在してもよい。ヌクレオチド変異の数は、参照配列中のヌクレオチドの総数とそれぞれの同一性パーセンテージの数字上のパーセンテージ(100で割る)とを掛け、その積を参照配列中のヌクレオチドの総数から引くことによって求める。すなわち： 20

【数1】

$$nn \leq xn - (xn \cdot y)$$

【0296】

式中、nnはヌクレオチド変異の数、xnは参照配列中のヌクレオチドの総数、およびyは、50%の場合には0.50、60%の場合には0.60、70%の場合には0.70、80%の場合には0.80、85%の場合には0.85、90%の場合には0.90、95%の場合には0.95、97%の場合には0.97、または100%の場合には1.00であり、ここでxnとyの積が整数でない場合には、xnから引く前に、最も近い整数まで切り捨てる。参照配列のポリヌクレオチド配列の変異は、このコード配列中にナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト突然変異を作り出す場合があり、これにより、 40
そのような変異の後にはそのポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが変化する。

【0297】

同様に、別の例では、本発明のポリペプチド配列は、配列番号5によってコードされる参照配列と同一、すなわち100%同一であってもよく、または同一性のパーセンテージが100%未満になるように、参照配列と比較した特定の整数までのアミノ酸変異を含んでもよい。それらの変異は、少なくとも1つのアミノ酸欠損、保存的置換および非保存的置換を含む置換、または挿入からなる群から選択される。ここで前記変異は、参照ポリペプチド配列のアミノ末端もしくはカルボキシ末端の位置に存在してもよいし、または参照配列中のアミノ酸間に個々に、またはこれらの末端間のいずれかの位置に、参照配列内 50

の1以上の隣接した群に散在して存在してもよい。指定された同一性のパーセンテージにおけるアミノ酸変異の数は、配列番号5によってコードされるポリペプチド配列中のアミノ酸の総数とそれぞれの同一性のパーセンテージの数字上のパーセンテージ（100で割る）とを掛け、その積を、配列番号5によってコードされるポリペプチド配列中のアミノ酸の数から引くことによって求める。すなわち：

【数2】

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y)$$

【0298】

式中、 n_a はアミノ酸変異の数、 x_a は配列番号5によってコードされるポリペプチド配列中のアミノ酸の総数、および y は、例えば70%の場合には0.70、80%の場合には0.80、85%の場合には0.85などであり、ここで x_a と y の積が整数でない場合には、 x_a から引く前に、最も近い整数まで切り捨てる。

【実施例】

【0299】

実施例1：種々のリンカーを用いた二重特異性抗原結合性タンパク質の設計および構築

抗IL-13 dAb DNA配列（DOM10-53-616、配列番号1）を、クローニングを助けるために5'末端にBamHI部位を、そして3'末端にEcoRI部位を含むように、PCRによって改変した。このPCR産物を抗IL4抗体の重鎖をコードしている哺乳動物発現ベクター中にクローニングし、抗IL-13 dAbを、GSリンカーを介して重鎖のC末端に融合させた（配列番号4、二重特異性抗体BPC2201の重鎖）。

【0300】

TVAAPSLリンカーをコードしているフォワードおよびリバースプライマーを、上記のベクターのBamHI部位へのクローニングを助けるために、BglIIおよびBamHI付着末端を用いて設計した。この方法により、CH3ドメインのC末端とDOM-10-53-616抗IL-13ドメイン抗体のN末端の間にTVAAPSGSLリンカー配列を連続的に導入することができた。得られた発現ベクターは配列番号5および配列番号6（それぞれBPC2202およびBPC2203の重鎖）をコードしている。

【0301】

抗IL-4 mAb重鎖のDNA配列の3'末端を、種々のリンカー配列を組み込むためにPCRによって改変した。得られたPCR断片をHindIIIおよびBamHIで制限酵素処理し、これもまたHindIIIおよびBamHIで制限酵素処理した配列番号4をコードしている発現ベクター中にクローニングした。得られた哺乳動物発現ベクターは、種々のリンカーでDOM-10-53-616に、CH3ドメインのC末端とDOM10-53-616抗IL-13 dAbのN末端の間に融合された抗IL-4 mAbの重鎖をコードしている。この方法で、BPC2204-2215およびBPC2217-2220の重鎖（配列番号7～8および11～21および23～25）をコードする発現ベクターを生成した。

【0302】

BPC2201-2210およびBPC2220の重鎖（配列番号4～8および11～16）をコードしているプラスミドを基本構築物として用い、別の構築物を生成した。第1段階で、DOM-10-53-616抗IL-13ドメイン抗体（配列番号1）をコードしているDNA配列を、BamHIおよびEcoRIを用いた制限酵素クローニングにより、DOM-9-155-154抗IL-4 dAb（配列番号26）をコードしているDNA配列で置換した。第2段階で、抗IL4抗体の重鎖可変ドメインをコードしているDNA配列を、HindIIIおよびSpeIを用いた制限酵素クローニングにより、抗IL13抗体の可変ドメインをコードしているDNA配列で置換した。得られた発現ベクターは重鎖ドメイン抗体融合タンパク質配列番号29～33および36～41をコードしている。

【0303】

BPC2211-2214、2218および2219の重鎖（配列番号17～20、24および25）をコードしているプラスミドを基本構築物として用い、別の構築物を生成した。第1段階で、DOM-10-53-616抗IL-13ドメイン抗体（配列番号1）をコードしているDNA配列を、BamHIおよびEcoRIを用いた制限酵素クローニングにより、DOM-9-155-154抗IL-4 dAb（配列番号26）をコードしているDNA配列で置換した。第2段階で、抗IL4抗体の重鎖可変ドメインをコードしているDNA配列を、HindIIIおよびSpeIを用いた制限酵素クローニングにより、抗IL13抗体の可変ドメインをコードしているDNA配列で置換した。得られた発現ベクターは、重鎖ドメイン抗体融合タンパク質配列番号42～45、49および50をコードしている。

10

【0304】

重鎖のCH3ドメインとドメイン抗体の間に種々のリンカーを含む、別の重鎖ドメイン抗体融合タンパク質を設計した。これらを配列番号9、10、22、34～35および42～50に挙げる。別の抗IL-4ドメイン抗体配列を配列番号80～82に示す。別の抗IL-13ドメイン抗体配列を配列番号83に示す。リンカーを、配列番号51～78および112～114に挙げる。

【表 1】

設計された抗体および二重特異性抗原結合性タンパク質の概要

これら全てを構築し、*で示されたもの、すなわち、BPC2232、2233、2243、2244、2245、2238、2239および2240以外は発現した。

識別名	重鎖の配列番号	軽鎖の配列番号	リンカー
抗 IL-4 mAb	3	2	無
抗 IL-13 mAb (586またはA1L1とも記載)	28	27	無
BPC 2201	4	2	GS
BPC 2202	5	2	GS(TVAAPSGS) ₁
BPC 2203	6	2	GS(TVAAPSGS) ₂
BPC 2209	7	2	GS(TVAAPSGS) ₃
BPC 2210	8	2	GS(TVAAPSGS) ₄
BPC 2232*	9	2	GS(TVAAPSGS) ₅
BPC 2233*	10	2	GS(TVAAPSGS) ₆
BPC 2208	11	2	(PAS) ₁ GS
BPC 2204	12	2	(PAS) ₂ GS
BPC 2205	13	2	(PAS) ₃ GS
BPC 2206	14	2	(G ₄ S) ₁
BPC 2207	15	2	(G ₄ S) ₂
BPC 2220	16	2	(G ₄ S) ₃
BPC 2211	17	2	(PAVPPP) ₁ GS
BPC 2212	18	2	(PAVPPP) ₂ GS
BPC 2213	19	2	(PAVPPP) ₃ GS
BPC 2214	20	2	(TVSDVP) ₁ GS
BPC 2215	21	2	(TVSDVP) ₂ GS
BPC 2243*	22	2	(TVSDVP) ₃ GS
BPC 2217	23	2	(TGLDSP) ₁ GS
BPC 2218	24	2	(TGLDSP) ₂ GS
BPC 2219	25	2	(TGLDSP) ₃ GS
BPC2221	29	27	GS
BPC2222	30	27	GS(TVAAPSGS) ₁
BPC2223	31	27	GS(TVAAPSGS) ₂
BPC2230	32	27	GS(TVAAPSGS) ₃
BPC2231	33	27	GS(TVAAPSGS) ₄
BPC2244*	34	27	GS(TVAAPSGS) ₅
BPC2245*	35	27	GS(TVAAPSGS) ₆
BPC2229	36	27	(PAS) ₁ GS
BPC2224	37	27	(PAS) ₂ GS
BPC2225	38	27	(PAS) ₃ GS
BPC2226	39	27	(G ₄ S) ₁
BPC2227	40	27	(G ₄ S) ₂
BPC2228	41	27	(G ₄ S) ₃
BPC 2234	42	27	(PAVPPP) ₁ GS
BPC 2235	43	27	(PAVPPP) ₂ GS

10

20

30

40

BPC 2236	44	27	(PAVPPP) ₃ GS
BPC 2237	45	27	(TVSDVP) ₁ GS
BPC 2238*	46	27	(TVSDVP) ₂ GS
BPC 2239*	47	27	(TVSDVP) ₃ GS
BPC 2240*	48	27	(TGLDSP) ₁ GS
BPC 2241	49	27	(TGLDSP) ₂ GS
BPC 2242	50	27	(TGLDSP) ₃ GS
BPC 2246	29	2	GS
BPC 2247	30	2	GS(TVAAPSGS) ₁
BPC 2248	31	2	GS(TVAAPSGS) ₂
BPC 2249	32	2	GS(TVAAPSGS) ₃
BPC 2250	33	2	GS(TVAAPSGS) ₄
BPC 2251	36	2	(PAS) ₁ GS
BPC 2252	37	2	(PAS) ₂ GS
BPC 2253	38	2	(PAS) ₃ GS
BPC 2254	39	2	(G ₄ S) ₁
BPC 2255	40	2	(G ₄ S) ₂
BPC 2256	41	2	(G ₄ S) ₃

10

20

【0305】

表1に示される二重特異性抗原結合性タンパク質の重鎖および相当する軽鎖をコードしている発現プラスミドを、293-fectin (Invitrogen、12347019)を用いてHEK293-6E細胞中に一過的に同時形質移入した。形質移入24時間後まで各細胞培養に栄養としてトリプトンを添加し、3～7日後に細胞を回収した。場合によっては、この上清を結合アッセイおよびBIACoreにおいて試験品として用いた。他の場合では、結合実験を行う前にプロテインAカラムを用いて二重特異性抗原結合性タンパク質を精製した。

【0306】

上清をGyrosまたはBeckman Coulter IMMAGE比濁計で定量した。

30

【0307】

実施例2：IL-4およびIL-13結合ELISA

96ウェル高結合プレートを重ね炭酸水中5μg/mlのIL-4またはIL-13のいずれかでコーティングし、4℃で一晩保存した。このプレートを0.05%のTween 20を含むリン酸緩衝食塩水(PBS)またはトリス緩衝食塩水(TBS)で2回洗った。200μLのブロッキング溶液(PBS緩衝液中に3%BSA)をそれぞれのウェルに加え、そしてこのプレートを室温で少なくとも1時間インキュベートした。その後、再び洗浄工程を行った。上清または精製抗体(mAb)をプレート間で、ブロッキング溶液で連続的に希釈した。1時間インキュベートした後、プレートを洗った。ヤギ抗ヒトカッパ軽鎖特異的ペルオキシダーゼ結合抗体(Sigma、A7164)をブロッキング溶液で1μg/mLとなるように希釈し、50μLをそれぞれのウェルに加えた。プレートを1時間～1時間半の間インキュベートした。再度洗浄工程を行った後、50μLのOPD(σ-フェニレンジアミン二塩酸塩)SigmaFast基質溶液をそれぞれのウェルに加え、そして15分後に、25μLの3M硫酸を加えることによって反応を停止させた。VersaMax Tunable Microplate Reader(Molecular Devices)を利用し、標準的なエンドポイントプロトコルを用いて490nmで吸光度を測定した。

40

【0308】

図1および図2は、ELISAによってそれぞれ測定された、ヒトIL-4およびヒト

50

IL-13に対する、GSおよびGS (TVAAPSGS) $n = 1 - 4$ リンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質 (BPC2201、2202、2203、2209およびBPC2210) のいくつかの独立したアッセイの結合結果を示す。BPC1001 (IL-13およびIL-4に結合する陽性対照二重特異性抗原結合性タンパク質) は、IL-4およびIL-13に対する結合を示した。対照的に、陰性対照抗体 (IL-4もIL-13も認識しない標識されたハイブリッド) は、ヒトIL-4またはIL-13には結合しないことを示した。この実験では、二重特異性抗原結合性タンパク質は全て、ヒトIL-4およびヒトIL-13に対して同等の結合活性を示す。

【0309】

図3および図4は、ELISAによってそれぞれ測定された、ヒトIL-4およびヒトIL-13に対する、(PAS) $n = 1 - 3$ GSおよび(G₄S) $n = 1 - 3$ リンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質 (BPC2204~BPC2208およびBPC2220) のいくつかの独立したアッセイの結合結果を示す。BPC1001 (IL-13およびIL-4に結合する陽性対照二重特異性抗原結合性タンパク質) は、IL-4およびIL-13に対する結合を示した。対照的に、陰性対照抗体 (IL-4もIL-13も認識しない標識されたハイブリッド) は、ヒトIL-4またはIL-13には結合しないことを示した。この実験では、二重特異性抗原結合性タンパク質は全て、ヒトIL-4およびヒトIL-13に対して同等の結合活性を示す。

【0310】

図5および図6は、ELISAによってそれぞれ測定された、ヒトIL-4およびヒトIL-13に対する、(PAVPPP) $n = 1 - 3$ GS、(TVSDVP) $n = 1 - 2$ GSおよび(TGLDSP) $n = 1 - 3$ GSリンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質 (BPC2211~BPC2215およびBPC2217~BPC2219) の結合結果を示す。BPC1001 (IL-13およびIL-4に結合する陽性対照二重特異性抗原結合性タンパク質) は、IL-4およびIL-13に対する結合を示した。対照的に、陰性対照抗体 (IL-4もIL-13も認識しない標識されたハイブリッド) は、ヒトIL-4またはIL-13には結合しないことを示した。この実験では、二重特異性抗原結合性タンパク質は全て、ヒトIL-4およびヒトIL-13に対して同等の結合活性を示す。

【0311】

図7および8は、ELISAによってそれぞれ測定された、ヒトIL-4およびヒトIL-13に対する、GSおよびGS (TVAAPSGS) $n = 1 - 4$ 、(PAS) $n = 1 - 3$ GSおよび(G₄S) $n = 1 - 3$ リンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質 (BPC2221~2231) の結合結果を示す。BPC1001 (IL-13およびIL-4に結合する陽性対照二重特異性抗原結合性タンパク質) は、IL-4およびIL-13に対する結合を示した。対照的に、陰性対照抗体 (IL-4もIL-13も認識しない標識されたハイブリッド) は、ヒトIL-4またはIL-13には結合しないことを示した。この実験では、二重特異性抗原結合性タンパク質は全て、ヒトIL-13に対して同等の結合活性を示す。これに比べ、GS (TVAAPSGS) ₁ リンカーからGS (TVAAPSGS) ₂₋₄ リンカーへとリンカーサイズが大きくなった場合、IL-4

【0312】

図9および10は、ELISAによってそれぞれ測定された、ヒトIL-4およびヒトIL-13に対する、(PAVPPP) $n = 1 - 3$ GSおよびTVSDVPGSおよび(TGLDSP) $n = 2 - 3$ GSリンカーを有する精製二重特異性抗原結合性タンパク質 (BPC2234~BPC2237、BPC2241およびBPC2242) の結合結果を示す。BPC1001 (IL-13およびIL-4に結合する陽性対照二重特異性抗原結合性タンパク質) は、IL-4およびIL-13に対する結合を示した。対照的に、陰性対照抗体 (IL-4もIL-13も認識しない標識されたハイブリッド) は、ヒトIL-4またはIL-13には結合しないことを示した。この実験では、二重特異性抗原結合性

10

20

30

40

50

タンパク質は全て、ヒト I L - 1 3 に対して同等の結合活性を示す。これに比べ、ヒト I L - 4 結合 E L I S A では、リンカーが長くなるにつれ、I L - 4 に対する二重特異性抗原結合性タンパク質の d A b 部分の結合活性が高まる傾向が見られた。

【0313】

実施例 3：抗原結合性タンパク質の化学量論性評価（B i a c o r e（商標）を用いる）

この実施例は予測上のものである。この実施例は、本発明の抗原結合性タンパク質が試験可能な付加的アッセイを行うための指針となる。

【0314】

抗ヒト I g G を、最初にアミンカップリングによって C M 5 バイオセンサーチップ上に固定化する。抗原結合性タンパク質をこの表面上に捕捉する。その後、単一濃度の I L - 1 3 または I L - 4 を通過させる。この濃度は、結合表面および観察される結合シグナルを最大の R - m a x に達するまで飽和させるのに十分な濃度である。その後、化学量を下記の式を用いて算出する：

【数 3】

$$\text{Stoich} = \text{Rmax} * \text{Mw（リガンド）} / \text{Mw（被分析物）} * \text{R（固定もしくは補足されたりガンド）}$$

【0315】

同時に 1 つ以上の被分析物の結合について化学量を算出する場合には、異なる抗原を飽和抗原濃度で順番に通過させ、その後上述の通りに化学量を算出する。この試験は B i a c o r e 3 0 0 0 を利用し、H B S - E P ランニングバッファーを用いて 2 5 ° C で行うことができる。

【0316】

実施例 4：C D R H 3 変異体抗 I L - 1 3 m A b および突然変異 d A b を含む抗原結合性タンパク質（B P C 1 0 8 5、B P C 1 0 8 6 および B P C 1 0 8 7）の構築および試験

4. 1 構築および発現

抗 I L - 1 3 m A b および抗 I L - 4 d A b からなる重鎖をコードしているプラスミドを基本構築物として用い、別のプラスミド構築物を生成した。2 段階のクローニング法が必要であった。第 1 段階で、H 鎖の抗 I L 1 3 m A b 成分の V H をコードしている DNA 配列を、H i n d I I I および S p e I を用いた制限酵素クローニングにより、別のヒト化抗 I L 1 3 抗体の V H（配列番号 9 3）をコードしている DNA 配列で置換した。第 2 段階で、この m A b d A b の抗 I L 4 d A b（D O M 9 - 1 5 5 - 1 5 4、配列番号 2 6）成分における K a b a t 8 9 番のロイシンをコードしているコドン、グルタミンへの部位特異的突然変異誘発によって変異させた。結果として生成された重鎖 DNA 配列の全てを配列番号 9 8 ~ 1 0 0 に示す。表 2 は構築および発現された分子の一覧を示す。

【表 2】

構築および発現された抗体の概要

識別名	別称	リンカー	分子の説明	タンパク質 配列番号
BPC1085	829H-GS (TVAAPSGS) ₂ -154 (89Q)または 829H-GS (TVAAPSGS) ₂ -256	GS (TVAAPSGS) ₂	H鎖: 抗ヒト IL-13 mAb 重鎖 Y100B_V - GS (TVAAPSGS) ₂ -DOM9-1 55-256	98
			L鎖: 抗ヒト IL-13 mAb 軽鎖	27
BPC1086	829H-GS (TVAAPSGS) ₃ -154 (89Q)または 829H-GS (TVAAPSGS) ₃ -256	GS (TVAAPSGS) ₃	H鎖: 抗ヒト IL-13 mAb 重鎖 Y100B_V - GS (TVAAPSGS) ₃ -DOM9-1 55-256	99
			L鎖: 抗ヒト IL-13 mAb 軽鎖	27
BPC1087	829H-GS (TVAAPSGS) ₄ -154 (89Q)または 829H-GS (TVAAPSGS) ₄ -256	GS (TVAAPSGS) ₄	H鎖: 抗ヒト IL-13 mAb 重鎖 Y100B_V - GS (TVAAPSGS) ₄ -DOM9-1 55-256	100
			L鎖: 抗ヒト IL-13 mAb 軽鎖	27

【0317】

BPC1085、BPC1086およびBPC1087 mAb dAbをコードしている重鎖および軽鎖発現プラスミドを、293fectin (Invitrogen、12347019)を用いてHEK 2936E細胞中に同時形質移入した。24時間後に各細胞培養に栄養としてトリプトンを添加し、72時間後に細胞を回収した。結合アッセイで試験する前にプロテインAカラムを用いて抗体を精製した。

【0318】

BPC1085、BPC1086およびBPC1087 mAb dAbを、プロテインAアフィニティーを用いて精製した。AKTA Xpressシステムにて1mlプロテインAカラムを用い(GE Healthcare)、カラムをPBS (Gibco/Invitrogen)で平衡化し、Pierce IgG eluteを用いて抗体を溶出した。溶出した画分を1M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液(一般に5~10% v/v)を用いて中和した。溶出した抗体画分をプールし、サイズ排除クロマトグラフィーにより凝集を分析し、分光光度計を用いてOD_{280nm}で読み取りを行うことにより定量した。

【0319】

これらを、表3に記載されている等価物mAb dAb(2222、2223、2230および2231)と比較した。これらは、

i) 89番が、BPC2222、BPC2223、BPC2230およびBPC2231では「L」であり、BPC1085、BPC1086およびBPC1087では「Q」であること以外、BPC1085、BPC1086およびBPC1087に用いたものと同一のdAb、

ii) 同じリンカー、

iii) 100Bが、BPC2222、BPC2223、BPC2230およびBPC2231では「Y」であり、BPC1085、BPC1086およびBPC1087では「V」であること以外、BPC1085、BPC1086およびBPC1087に用いた

ものと同一の I L - 1 3 m A b 配列を含む。

【表 3】

識別名	mAb	リンカー	dAb	重鎖	軽鎖
BPC2222	A1L1	GS(TVAAPSGS) ₁	DOM9-155-154	30	27
BPC2223	A1L1	GS(TVAAPSGS) ₂	DOM9-155-154	31	27
BPC2230	A1L1	GS(TVAAPSGS) ₃	DOM9-155-154	32	27
BPC2231	A1L1	GS(TVAAPSGS) ₄	DOM9-155-154	33	27

【0320】

BPC2222、2223、2230および2231 mAb dAbを、プロテインA親和性を用いて精製した。AKTA Xpressシステムにて1mlプロテインAカラムを用い（GE Healthcare）、カラムをPBS（Gibco/Invitrogen）で平衡化し、Pierce IgG eluteを用いて抗体を溶出した。溶出した画分を1M トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝液（一般に5～10% v/v）を用いて中和した。溶出した抗体画分をプールし、サイズ排除クロマトグラフィーにより凝集を分析し、分光光度計を用いてOD_{280nm}で読み取りを行うことにより定量した。

【0321】

BPC2222、2223、2230および2231は、10分前に溶出する凝集材料で30～40%の間の凝集を示した。

【0322】

BPC2222、2223、2230および2231に比べ、構築物BPC1085、1086および1087は、サイズ排除クロマトグラフィーによって評価した場合、低レベルの凝集を示した。

【0323】

4. 2 I L - 4 結合 E L I S A

以下の方法に従った直接的結合ELISAで、精製BPC1085、BPC1086およびBPC1087 mAb dAbの、IL-4に対する結合を調べた。

【0324】

96ウェル高結合プレートを、NaHCO₃中5μg/mlのヒトIL-4（GSKにて作製）でコーティングし、4℃で一晩保存した。このプレートを0.05%のTween 20（TBST）を含むトリス緩衝食塩水で2回洗った。100μLのブロッキング溶液（TBST緩衝液中に1%BSA）をそれぞれのウェルに加え、そしてこのプレートを室温で少なくとも1時間インキュベートした。精製mAb dAbをプレート間で、ブロッキング溶液で連続的に希釈した。1時間インキュベートした後、プレートを3回洗った。ヤギ抗ヒトカッパ軽鎖特異的ペルオキシダーゼ結合抗体（Sigma A7164）をブロッキング溶液で1μg/mLとなるように希釈し、50μLをそれぞれのウェルに加えた。プレートを1時間インキュベートした。再度3回洗浄工程を行った後、50μLのOPD（σ-フェニレンジアミン二塩酸塩）SigmaFast基質溶液をそれぞれのウェルに加え、そして約15分後に、25μLの3M硫酸を加えることによって反応を停止させた。VersaMax Tunable Microplate Reader（Molecular Devices）を利用し、標準的なエンドポイントプロトコルを用いて490nmで吸光度を測定した。

【0325】

実験は、精製材料であった陽性対照（抗 I L - 4 m a b）および抗 I L 1 3 陰性対照 m A b 以外は、組織培養上清から直接 m A b d A b を用いて行った。

【0326】

これらのデータを図 1 1 に示す。E L I S A の結果から、これらの精製 m A b d A b が I L - 4 と結合することが確認された。また、陽性対照抗 I L - 4 m A b および B P C 2 2 3 1 も I L - 4 と結合することが示されたが、陰性対照 m A b （抗 I L - 1 3 m A b）は I L - 4 と結合しないことが示された。このことから、この E L I S A において、G S （T V A A P S G S）から G S （T V A A P S G S）_{2 - 4} へとリンカー長が増すと、d A b 効力が高まることが示唆された。

【0327】

10

4. 3 T F - 1 細胞増殖バイオアッセイにおける I L - 4 の中和

精製 B P C 1 0 8 5、B P C 1 0 8 6 および B P C 1 0 8 7 m A b d A b を、T F - 1 細胞バイオアッセイにおいてヒト I L - 4 の中和に関して試験した。

【0328】

T F - 1 細胞は、ヒト I L - 4 を含むいくつかの異なるサイトカインに応答して増殖する。従って、これらの細胞の I L - 4 に対する応答を用いて I L - 4 の生物活性を測定することができ、続いて、m A b d A b の I L - 4 中和効力（I L - 4 生物活性の阻害）を測定するためのアッセイが開発された。

【0329】

このアッセイは、無菌条件下、96 ウェル組織培養プレートで行い、全ての試験を 2 回 20
行った。組み換え大腸菌（E. C o l i）により発現されたヒト I L - 4 およそ 2. 2 n g / m l を種々の希釈率の m A b d A b （通常、3 倍希釈で滴定された 5 6 0 n M ~ 0. 0 0 9 n M）とともに総量 1 2 0 μ l で、3 7 ° C にて 1 時間プレインキュベートした。陰性対照として無関連特異性の抗体も同様に滴定した（抗 I L 1 3 m A b）。次に、これらのサンプル 5 0 μ l を、無菌 96 ウェル組織培養プレートにて、5 0 μ l の T F - 1 細胞（濃度 2 x 1 0⁵ 細胞 / m l）に加えた。従って、最終 1 0 0 μ l アッセイ量には、種々の希釈率の m A b d A b （3 倍希釈で滴定された終濃度 2 7 0 n M ~ 0. 0 0 5 n M）、組み換え大腸菌により発現されたヒト I L - 4 （終濃度 1. 1 n g / m l）および T F - 1 細胞（終濃度 1 x 1 0⁵ 細胞 / m l）が含まれた。アッセイプレートを、加湿 C O₂ インキュベーター内で 3 7 ° C にておよそ 4 日間インキュベートした。次に、細胞増殖の量 30
を P r o m e g a からの「C e l l T i t r e 9 6（登録商標）N o n - R a d i o a c t i v e C e l l P r o l i f e r a t i o n A s s a y」（カタログ番号 G 4 1 0 0）を用い、製造業者の説明書の通りに測定した。96 ウェルプレート内のサンプルの吸光度を 5 7 0 n m で読み取った。これらのデータを E x c e l スプレッドシートに入力し、2 反復の試験ウェルの値の平均を求め、平均バックグラウンド値（m A b - d A b 無し、I L - 4 無しの試験ウェル）を差し引いた。

【0330】

組み換え大腸菌により発現されたヒト I L - 4 の生物活性を中和する m A b d A b の能力は、定義された量のヒト I L - 4 （1. 1 n g / m l）の生物活性を 5 0 % 中和するのに必要な m A b - d A b の濃度（= N D₅₀）として表した。必要な m A b d A b の濃度 40
が低いほど、中和能は高い。本明細書に示される N D₅₀ データ（表 4）は、E x c e l の R o b o s a g e 機能を用いて算出した。これらのデータを図 1 2 にグラフで示す。

【0331】

抗 I L - 4 m A b および D O M 9 - 1 5 5 - 1 5 4（配列番号 2 6）を、T F - 1 細胞バイオアッセイにおけるヒトおよびカニクイザル I L - 4 の中和に関する陽性対照として含めた。さらに、無関連の抗原に対して特異性を有する d A b（ダミー d A b）も、T F - 1 細胞バイオアッセイにおけるヒトまたはカニクイザル I L - 4 の中和に関する陰性対照として含めた。

【0332】

これらを数回繰り返し、図 1 2 にこれらの実験のうち 1 つの結果を示す。このデータセ 50

ットからND₅₀値を算出した。ND₅₀値は、IL-4の生物活性を50%中和することができるmAb dAbまたはmAbまたはdAbの濃度である。平均ND₅₀値および試験回数(n)を表4に示す。

【表4】

分子	平均ND ₅₀ 値と標準偏差(nM)	反復回数
BPC1085	9.21	3
BPC1086	4.32	3
BPC1087	3.59	3
抗IL-4 mAb	1.95	2
DOM9-155-154	0.98	2
陰性対照 dAb	中和しなかった	2

【0333】

これらのデータから、精製BPC1085、BPC1086およびBPC1087 mAb dAbが、ヒトおよびカニクイザルIL-4の生物活性を中和したことが確認される。抗IL-4 mAbおよびDOM9-155-154はまたヒトおよびカニクイザルIL-4の生物活性も中和したが、同じバイオアッセイにおいて、陰性dAb（ダミーdAb）は中和しないことが示された。

【0334】

3種類のmAb dAbは全て良好な効力を示し、この効力の違いを採取できないより複雑なELISAにもかかわらず、この中和アッセイから、リンカー長が増すほどdAb効力が増すという明白な傾向があることが明らかであった。陰性対照抗IL-4 mAbは、同じバイオアッセイで中和を示さなかった。

【0335】

4.4 TF-1細胞増殖バイオアッセイにおけるヒトIL-13の中和

精製BPC1085、BPC1086およびBPC1087 mAb dAbを、TF-1細胞バイオアッセイにおいてヒトIL-13の中和に関して以下のように試験した。

【0336】

TF-1細胞は、ヒトIL-13を含むいくつかの異なるサイトカインに応答して増殖する。従って、これらの細胞のIL-13に対する応答を用いてIL-13の生物活性を測定することができ、続いて、mAb dAbのIL-13中和効力（IL-13生物活性の阻害）を測定するためのアッセイが開発された。

【0337】

このアッセイは、無菌条件下、96ウェル組織培養プレートで行い、全ての試験を2回行った。組み換え大腸菌（E. Coli）により発現されたヒトIL-13およそ14 ng/mlを種々の希釈率のmAb dAb（通常、3倍希釈で滴定された560 nM～0.009 nM）とともに総量120 μlで、37℃にて1時間プレインキュベートした。陰性対照として無関連特異性の抗体およびdAbも同様に滴定した（それぞれ抗IL-4 mAbおよびDOM9-155-154）。次に、これらのサンプル50 μlを、無菌96ウェル組織培養プレートにて、50 μlのTF-1細胞（濃度2 x 10⁵細胞/ml）に加えた。従って、最終100 μlアッセイ量には、種々の希釈率のmAb dAb（3倍希釈で滴定された終濃度270 nM～0.005 nM）、組み換え大腸菌により発現されたヒトIL-13（終濃度7 ng/ml）およびTF-1細胞（終濃度1 x 10⁵細胞/ml）が含まれた。アッセイプレートを、加湿CO₂インキュベーター内で37℃にておよそ4日間インキュベートした。次に、細胞増殖の量をPromegaからの「Cell Titre 96（登録商標）Non-Radioactive Cell Proliferation Assay」（カタログ番号G4100）を用い、製造業者の説明書の通りに測定した。96ウェルプレート内のサンプルの吸光度を570 nmで読み取った

。これらのデータをExcelスプレッドシートに入力し、2反復の試験ウェルの値の平均を求め、平均バックグラウンド値（mAb-dAb無し、IL-13無しの試験ウェル）を差し引いた。

【0338】

組み換え大腸菌により発現されたヒトIL-13の生物活性を中和するmAb dAbの能力は、定義された量のヒトIL-13（7 ng/ml）の生物活性を50%中和するのに必要なmAb-dAbの濃度（=ND₅₀）として表した。必要なmAb dAbの濃度が低いほど、中和能は高い。本明細書に示されるND₅₀データ（表5）は、ExcelのRobosage機能を用いて算出した。これらのデータを図12にグラフで示す。

【0339】

抗IL-13 mAbを、TF-1細胞バイオアッセイにおけるヒトIL-13の中和に関する陽性対照として含めた。さらに、抗IL-4 mAbも陰性対照として含めた。

【0340】

図13は、TF-1細胞中和アッセイの結果を示す。このデータセットからND₅₀値を算出した。ND₅₀値は、IL-13の生物活性を50%中和することができるmAb dAb、mAbまたはdAbの濃度である。平均ND₅₀値および試験回数を表5に示す。

【表5】

分子	平均 ND ₅₀ 値と標準偏差 (nM)	反復回数
BPC1085	0.88	1
BPC1086	1.01	1
BPC1087	1.14	1
抗 IL-13 mAb	5.01	1
抗 IL-4 mAb	中和しなかった	1

【0341】

これらのデータから、精製BPC1085、BPC1086およびBPC1087 mAb dAbが、ヒトおよびカニクイザルIL-13の生物活性を中和したことが確認される。陰性対照抗IL-4 mAbは同じバイオアッセイにおいて中和しないことが示された。

【0342】

実施例5：DOM10-53-616 dAbを含むmAb dAb

5.1 抗IL13 mAb-抗IL4 dAbの発現分析

実施例1に記載のようにBPC2202、BPC2203、BPC2209およびBPC2210をコードする重鎖および軽鎖発現プラスミドを、293fectin（Invitrogen、12347019）を用いてHEK 2936E細胞に同時形質移入し、小規模に発現させて抗体分子を生産した。分子を組織培養上清から直接評価し、Gyro1 labワークステーションを用いて定量した。

【0343】

BPC2202、BPC2203、BPC2209およびBPC2210は全て十分に発現した。

【0344】

本発明者らは、別の抗IL-13 dAb配列（DOM10-176-535-配列番号97）を用いて等価なmAb dAbの作製を試みた。しかしながら、発現すると、これらの分子は凝集性が高かったことから、さらなる試験に用いるには十分でなかった。

【0345】

5.2 DOM10-53-616を含むmAb dAbのストレッサー試験

BPC2202、BPC2203、BPC2209、BPC2210をPBSまたは5

10

20

30

40

50

0 mM酢酸緩衝液に入れ、37℃で最大14日間インキュベートした。次に、それらを目に見える沈殿の存在、可溶性凝集塊および溶液中での分子の濃度の維持に関して分析した。

【0346】

その後の分析では、PBSおよび酢酸溶液の両方で、これらの分子の溶液中でのタンパク質濃度の低下が示唆され、これはエッペンドルフ管の壁面にタンパク質が吸着したためであると思われた。

【0347】

BPC2210もまた酢酸緩衝溶液中ではタンパク質濃度の低下を示したが、PBS溶液中で2週間インキュベートした後のタンパク質濃度はやや増加していた（これは、細菌の混入によるものであった可能性がある）。

【0348】

実施例6：種々のリンカー長を有する抗IL4／抗TNFα mAb-dAb構築物の設計および構築

抗TNFα dAb DNA配列を、オーバーラッピングオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCRにより生成した。PCR産物を、抗IL4抗体の重鎖を含む哺乳動物発現ベクター中にクローニングし、抗TNFα dAbを、TVAAPSGSリンカーを介して重鎖のC末端に融合させた（配列番号103および104、BPC2626の重鎖のDNAおよびタンパク質配列）。BPC2626の重鎖を基本構築物として用い、種々のリンカー（TVAAPSGS×2、TVAAPSGS×3、TVAAPSGS×4）をクローニングし、それぞれBPC2651、BPC2652およびBPC2653の重鎖を生成した（配列番号106および107、108および109、110および111、それぞれBPC2651、BPC2652およびBPC2653のDNAおよびタンパク質配列）。

【0349】

BPC2626、BPC2651、BPC2652およびBPC2653の重鎖および対応する軽鎖をコードする発現プラスミドを、HEK 293-6E細胞中に一過的に同時形質移入した。形質移入24時間に各細胞培養に栄養としてトリプトンを添加し、3～7日後に細胞を回収した。活性を評価する前に、プロテインAカラムを用いてmAb dAbを精製した。作製および発現した構築物を表6に示す。

【表6】

抗体 ID	説明	配列番号 ポリヌクレオチド 配列	配列番号 アミノ酸 配列
BPC2626	PascoH-TVAAPSGS-PEP1-5-19 重鎖	104	103
	軽鎖	3	105
BPC2651	PascoH-GS (TVAAPSGS) ₂ -PEP1-5-19 重鎖	106	107
	軽鎖	3	105
BPC2652	PascoH-GS (TVAAPSGS) ₃ -PEP1-5-19 重鎖	108	109
	軽鎖	3	105
BPC2653	PascoH-GS (TVAAPSGS) ₄ -PEP1-5-19 重鎖	110	111
	軽鎖	3	105

【0350】

6. 1 TNFα 結合 ELISA

96ウェル高結合プレートを用いたリン酸緩衝食塩水中1 μg/mlのTNFα (R&D S

10

20

30

40

50

systems、210-TA-010/CF)でコーティングし、4℃で一晩保存した。このプレートを0.05%のTween20を含むトリス緩衝食塩水で2回洗った。100μLのブロッキング溶液(0.05%のTween-20緩衝液を含むトリス緩衝食塩水中に)をそれぞれのウェルに加え、そしてこのプレートを室温で少なくとも1時間インキュベートした。その後、再び洗浄工程を行った。精製二重特異性抗体および陰性対照抗体をプレート間で、ブロッキング溶液で連続的に希釈した。1時間インキュベートした後、プレートを洗った。ヤギ抗ヒトカップ軽鎖特異的ペルオキシダーゼ結合抗体H23(Sigma、A7164)をブロッキング溶液で1μg/mLとなるように希釈し、50μLをそれぞれのウェルに加えた。プレートを1時間~1時間半の間インキュベートした。再度洗浄工程を行った後、50μLのOPD(σ-フェニレンジアミン二塩酸塩)SigmaFast基質溶液をそれぞれのウェルに加え、そして15分後に、25μLの3M硫酸を加えることによって反応を停止させた。VersaMax Tunable Microplate Reader(Molecular Devices)を利用し、標準的なエンドポイントプロトコルを用いて490nmで吸光度を測定した。

10

【0351】

図14はTNFα結合ELISAの結果を示し、これにより、BPC2626、BPC2651、BPC2652およびBPC2653がTNFαに結合し、結合活性の増大がリンカー長の増加に相関していたことが確認される。陰性対照抗体は標的に対する結合を示さなかった。リンカー長が増すほどdAb効力が増大する傾向が見て取れた。

20

【0352】

6.2 IL4結合ELISA

これらの構築物をIL-4に対する結合に関して試験したが、このアッセイの技術的問題のために、それらが全て結合したということが、本発明者らが示すことができる唯一の結論である。

【0353】

実施例7：Biacore(商標)分析により評価した際の、種々のリンカー長を有するmAbs dAb(BPC2221~2231)の、IL-13およびIL-4に対する親和性方法

抗ヒトIgG(GE Healthcare/Biacore)を、第一級アミンカップリングによってCM5チップ上に固定化し、この表面を供試抗体分子の捕捉面として用いた。組み換え大腸菌により発現されたヒトIL4およびヒトIL13を256、64、16、4および1nMで用い、0nM(すなわち緩衝液のみ)を結合曲線の二重参照に用いた。抗ヒトIgG表面の再生では、100mMリン酸を注入した後、3M MgCl₂を注入した。アッセイは、ランニングバッファーとしてHBS-E Pを用いて25℃で行った。データをBiacore T100分析ソフトウェアに固有の1:1モデルに当てはめた。

30

【0354】

ヒトIL13に対する結合の結果を表7に示し、ヒトIL4に対する結合の結果を表8に示す。

40

【表 7】

分子名	ka (M/s)	kd (1/s)	KD (nM)
BPC2221	1.049E+6	3.441E-4	0.328
BPC2222	1.108E+6	3.543E-4	0.320
BPC2223	1.410E+6	4.012E-4	0.285
BPC2224	1.156E+6	3.053E-4	0.264
BPC2225	1.178E+6	3.336E-4	0.283
BPC2226	1.105E+6	2.997E-4	0.271
BPC2227	1.082E+6	3.261E-4	0.301
BPC2228	1.071E+6	3.364E-4	0.314
BPC2229	1.066E+6	3.307E-4	0.310
BPC2230	1.067E+6	3.316E-4	0.311
BPC2231	1.099E+6	3.454E-4	0.314

10

【表 8】

分子名	ka (M/s)	kd (1/s)	KD (nM)
BPC2221	7.268E+4	3.444E-4	4.74
BPC2222	5.723E+4	4.774E-4	8.34
BPC2223	5.856E+6	8.860E-8	0.00002
BPC2224	2.414E+4	7.553E-4	31.3
BPC2225	4.811E+4	3.498E-5	0.727
BPC2226	4.212E+6	3.253E-6	0.0008
BPC2227	1.573E+5	2.552E-4	1.62
BPC2228	3.199E+5	1.646E-4	0.515
BPC2229	3.457E+4	2.150E-4	6.22
BPC2230	2.835E+4	3.576E-4	12.6
BPC2231*	5.342E+6	7.332E-6	0.001

20

* 解離速度測定不能、分析不能、極めて強固な結合

30

** B P C 2 2 2 9 に対する当てはめが適切でないために、実際の速度の値は計算値よりも劣ると思われる。

【0355】

I L 4 の結合では、実施の質が全体的に低く、最高濃度においてチップ表面への非特異的結合があったということで分析が適切でなかった。

【0356】

実施例 8 : B I A c o r e (商標) 分析により評価した際の、616 d A b を含む m A b d a b の、I L - 1 3 および I L - 4 に対する結合親和性

それぞれ D O M 1 0 - 5 3 - 6 1 6 抗 I L - 1 3 ドメイン抗体 (配列番号 1) を含む m A b d A b B P C 2 2 0 1 ~ 2 2 1 5、B P C 2 2 1 7 ~ 2 2 2 0 および B P C 2 2 4 3 を B I A c o r e によって試験した。全ての m A b d A b が I L - 1 3 および I L - 4 の両方に結合したが、結合が極めて強固で解離速度が測定できなかった。

40

【0357】

実施例 9 : B I A c o r e (商標) 分析により評価した際の、種々のリンカー長を有する m A b d A b (B P C 2 2 1 1 ~ 2 2 3 1 および B P C 2 2 3 4 ~ 2 2 3 7 および B P C 2 2 4 1 - 2 2 4 2) の、I L - 1 3 および I L - 4 に対する結合親和性

方法

抗ヒト I g G (G E H e a l t h c a r e / B i a c o r e) を、第一級アミンカップリングによって C M 5 チップ上に固定化し、この表面を供試抗体分子の捕捉面として用

50

いた。組み換え大腸菌により発現されたヒト I L 4 は 2 5 6、6 4、1 6、4 および 1 n M で用い、組み換え大腸菌により発現されたヒト I L 1 3 は 2 5 6 n M のみで用い、0 n M (すなわち緩衝液のみ) を I L 4 結合と I L 1 3 結合の両方の結合曲線の二重参照に用いた。抗ヒト I g G 表面の再生では、1 0 0 m M リン酸を注入した後、3 M M g C l₂ を注入した。アッセイは、ランニングバッファーとして H B S - E P を用いて 2 5 °C で行った。データを B i a c o r e T 1 0 0 分析ソフトウェアに固有の 1 : 1 モデルに当てはめた。

【 0 3 5 8 】

ヒト I L 1 3 およびヒト I L 4 に対する結合の結果を表 9 に示す。

【表 9】

分子名/被分析物	ka (M/s)	kd (1/s)	KD (nM)	データの質
BPC2221 / IL4	7.07E+04	5.92E-04	8.368	Ok
BPC2221 / IL13	1.29E+06	4.52E-04	0.350	Yes
BPC2222 / IL4	6.52E+04	1.29E-04	1.980	Ok
BPC2222 / IL13	2.13E+06	6.04E-04	0.284	Ok
BPC2223 / IL4	1.30E+07	1.07E-04	0.008	No
BPC2223 / IL13	1.38E+06	4.51E-04	0.327	Yes
BPC2224 / IL4	2.52E+04	1.55E-03	61.370	Ok
BPC2224 / IL13	1.43E+06	4.74E-04	0.332	Yes
BPC2225 / IL4	5.78E+04	1.11E-04	1.912	Ok
BPC2225 / IL13	1.40E+06	4.77E-04	0.341	Yes
BPC2226 / IL4	2.86E+04	1.44E-03	50.130	Ok
BPC2226 / IL13	1.37E+06	4.55E-04	0.333	Yes
BPC2227 / IL4	2.07E+05	3.05E-04	1.476	Ok
BPC2227 / IL13	1.30E+06	4.68E-04	0.360	Yes
BPC2228 / IL4	4.24E+05	2.28E-04	0.539	Ok
BPC2228 / IL13	1.40E+06	4.82E-04	0.344	Yes
BPC2229 / IL4	3.17E+04	8.28E-04	26.080	Ok
BPC2229 / IL13	1.36E+06	4.71E-04	0.347	Yes
BPC2230 / IL4	1.86E+07	1.92E-04	0.010	Ok
BPC2230 / IL13	1.34E+06	4.51E-04	0.336	Yes
BPC2231 / IL4	1.92E+07	2.54E-04	0.013	Ok
BPC2231 / IL13	1.34E+06	4.67E-04	0.348	Yes
BPC2234 / IL4	2.73E+05	8.49E-05	0.312	Ok
BPC2234 / IL13	1.45E+06	4.49E-04	0.310	Yes
BPC2235 / IL4	9.71E+05	9.32E-05	0.096	Ok
BPC2235 / IL13	1.43E+06	4.72E-04	0.331	Yes
BPC2236 / IL4	5.46E+06	9.23E-05	0.017	Ok
BPC2236 / IL13	1.40E+06	4.73E-04	0.339	Yes
BPC2237 / IL4	2.06E+05	2.80E-04	1.359	Ok
BPC2237 / IL13	1.36E+06	4.42E-04	0.326	Yes
BPC2241 / IL4	6.17E+05	2.40E-04	0.389	Ok
BPC2241 / IL13	1.43E+06	4.37E-04	0.306	Yes
BPC2242 / IL4	3.45E+06	2.17E-04	0.063	Ok
BPC2242 / IL13	1.43E+06	4.57E-04	0.321	Yes

【 0 3 5 9 】

最高濃度の組み換え大腸菌により発現されたヒト I L 4 でいくらかの非特異的結合が見

10

20

30

40

50

られ、これがデータの質に影響した。

【0360】

実施例10：BIAcore（商標）分析により評価した際の、種々のリンカー長を有する原型IL-13 mAb CDRH3を含むmAb dAb（BPC2222、BPC2223およびBPC2230-2231）の、IL-13およびIL-4に対する結合親和性

方法

プロテインAを、第一級アミンカップリングによってC1チップ上に固定化し、この表面を供試抗体分子の捕捉面として用いた。組み換え大腸菌により発現されたヒトIL13は256、64、16、4および1nMで用い、組み換え大腸菌により発現されたヒトIL4は64、16、4、1および0.25nMで用い、0nM（すなわち緩衝液のみ）をIL4結合とIL13結合の両方の結合曲線の二重参照に用いた。プロテインA表面の再生には100mMリン酸を用いた。アッセイは、ランニングバッファーとしてHBS-E Pを用いて25℃で行った。データをBiacore T100分析ソフトウェアに固有の1:1モデルに当てはめた。

【0361】

ヒトIL13に対する結合の結果を表10に示し、ヒトIL4に対する結合の結果を表11に示す。

【表10】

分子名	ka (M/s)	kd (1/s)	KD (nM)
BPC2222	1.31E+06	4.93E-04	0.376
BPC2223	1.32E+06	4.90E-04	0.372
BPC2230	1.31E+06	4.88E-04	0.373
BPC2231	1.30E+06	5.13E-04	0.394

【表11】

分子名	ka (M/s)	kd (1/s)	KD (nM)
BPC2222	1.06E+05	1.09E-04	1.027
BPC2223	8.59E+06	1.56E-04	0.018
BPC2230*	2.48E+07	2.48E-04	0.010
BPC2231*	4.03E+07	2.31E-04	0.006

* BPC2230および2231の結合速度はBiacoreの感度を超えているが、本発明者らがこのデータを正確に分析できないという事実は、IL4との相互作用が速い結合速度を持った高親和性である可能性があることを示唆する。

【0362】

実施例11：BIAcore（商標）分析により評価した際の、種々のリンカー長を有する原型IL-13 mAb CDRH3を含むmAb dAb（BPC2222、BPC2231）および種々のリンカー長を有する変異体抗IL-13 mAb CDRH3を含むmAb dAb（BPC1085～1087）の、IL-13およびIL-4に対する結合親和性

方法

プロテインAを、第一級アミンカップリングによってCM5チップ上に固定化し、この表面を供試抗体分子の捕捉面として用いた。組み換え大腸菌により発現されたヒトIL1

3は256 nMのみで用い、組み換え大腸菌により発現されたヒトIL4は64、16、4および1 nMで用い、0 nM（すなわち緩衝液のみ）をIL4結合とIL13結合の両方の結合曲線の二重参照に用いた。プロテインA表面の再生には、50 mM NaOHを用いた。アッセイは、ランニングバッファーとしてHBS-E Pを用いて25℃で行った。データをBiacore T100分析ソフトウェアに固有の1:1モデルに当てはめた。

【0363】

ヒトIL13に対する結合を表12に示し、ヒトIL4に対する結合の結果を表13に示す。

【表12】

分子名	ka(M/s)	kd(1/s)	KD (nM)
BPC2222	1.64E+05	5.15E-05	0.314
BPC2231	5.36E+08	1.16E-03	0.002
BPC1085	1.87E+07	8.97E-04	0.048
BPC1086	7.99E+07	1.64E-03	0.021
BPC1087	9.86E+07	1.79E-03	0.018

【0364】

BPC1086およびBPC1087の結合速度はBiacoreの感度を超えているが、本発明者らがこのデータを正確に分析できないという事実は、IL4との相互作用が速い結合速度を持った高親和性である可能性があることを示唆する。

【表13】

分子名	ka(M/s)	kd(1/s)	KD (nM)
BPC2222	1.44E+06	4.44E-04	0.308
BPC2231	1.56E+06	4.95E-04	0.316
BPC1085	1.20E+06	6.39E-05	0.053
BPC1086	1.28E+06	6.57E-05	0.051
BPC1087	1.13E+06	6.42E-05	0.057

【0365】

実施例12：mAb dAbのストレッサー試験

いくつかのmAb dAbをPBSまたは50 mM酢酸緩衝液中に入れ、最大14日間37℃でインキュベートした。次に、それらを目に見える沈殿の存在、可溶性凝集塊および溶液中での分子の濃度の維持に関して分析した。

【0366】

これらの結果は、突然変異型dAbを含むmAb dAb（BPC1085、1086、1087）が非変異型dAbを含むmAb dAb（BPC2222、2223、2230、2231）と同様に挙動し、両カテゴリーのmAb dAbが、溶液中のタンパク質濃度に変化が無いことで示されるように、PBSおよび酢酸緩衝液の両方で、37℃にて2週間のインキュベーション期間にわたって安定であると思われた。さらに、溶液中での凝集レベル関する変化は全く、またはほとんど見られず、沈殿も見られなかった。

【0367】

実施例 13：ラットおよびカニクイザル P K に対するリンカー長の効果

B P C 1 0 8 5、B P C 1 0 8 6 および B P C 1 0 8 7 の薬物動態を、ラットへの I V 投与の後に独立した試験で調べた。また、カニクイザルでも I V 投与後に B P C 1 0 8 5 の P K を調べた。

【0368】

ラットにおける 3 種類の分子全ての P K およびサルにおける B P C 1 0 8 5 の P K は、標準的な m A b の P K と一致することが分かった。

【0369】実施例 14

いくつかの異なる長さのリンカーを有する、異なる標的に対する m A b d a b のパネルを発現させた。未同定の上清を数種の E L I S A 結合実験にかけたところ、これらの予備的結果は、リンカー長の違いによって本明細書に記載されているものと同様の傾向を示唆する。

10

【0370】

いくつかの異なる長さのリンカーを有する、異なる標的に対する m A b d a b の第 2 のパネルを発現させた。未同定の上清を数種の E L I S A 結合実験にかけたところ、これらの予備的結果は、d A b およびリンカー長の違いによる変動を示唆する。

【表 1 4】

配列表

説明	配列 ID(配列番号)	
	アミノ酸配列	DNA配列
DOM10-53-616 抗 IL-13 ドメイン抗体	1	
抗 IL-4 mAb 重鎖	2	
抗 IL-4 mAb 軽鎖	3	105
PascoH-GS-DOM10-53-616	4	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-GS(TVAAPSGS) ₁ -DOM10-53-616	5	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-GS(TVAAPSGS) ₂ -DOM10-53-616	6	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-GS(TVAAPSGS) ₃ -DOM10-53-616	7	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-GS(TVAAPSGS) ₄ -DOM10-53-616	8	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-GS(TVAAPSGS) ₅ -DOM10-53-616	9	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-GS(TVAAPSGS) ₆ -DOM10-53-616	10	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(PAS) ₁ GS-DOM10-53-616	11	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(PAS) ₂ GS-DOM10-53-616	12	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(PAS) ₃ GS-DOM10-53-616	13	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(G ₄ S) ₁ -DOM10-53-616	14	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(G ₄ S) ₂ -DOM10-53-616	15	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(G ₄ S) ₃ -DOM10-53-616	16	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(PAVPPP) ₁ GS-DOM10-53-616	17	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(PAVPPP) ₂ GS-DOM10-53-616	18	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(PAVPPP) ₃ GS-DOM10-53-616	19	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(TVSDVP) ₁ GS-DOM10-53-616	20	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(TVSDVP) ₂ GS-DOM10-53-616	21	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(TVSDVP) ₃ GS-DOM10-53-616	22	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(TGLDSP) ₁ GS-DOM10-53-616	23	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(TGLDSP) ₂ GS-DOM10-53-616	24	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-(TGLDSP) ₃ GS-DOM10-53-616	25	
DOM9-155-154 抗 IL-4 ドメイン抗体	26	
抗 IL-13 抗体(586)軽鎖	27	
抗 IL-13 抗体(586)重鎖	28	
抗 IL-13 mAb 重鎖-GS-DOM9-155-154	29	
抗 IL-13 mAb 重鎖-GS(TVAAPSGS) ₁ -DOM9-155-154	30	
抗 IL-13 mAb 重鎖-GS(TVAAPSGS) ₂ -DOM9-155-154	31	
抗 IL-13 mAb 重鎖-GS(TVAAPSGS) ₃ -DOM9-155-154	32	
抗 IL-13 mAb 重鎖-GS(TVAAPSGS) ₄ -DOM9-155-154	33	
抗 IL-13 mAb 重鎖-GS(TVAAPSGS) ₅ -DOM9-155-154	34	
抗 IL-13 mAb 重鎖-GS(TVAAPSGS) ₆ -DOM9-155-154	35	
抗 IL-13 mAb 重鎖-(PAS) ₁ GS-DOM9-155-154	36	
抗 IL-13 mAb 重鎖-(PAS) ₂ GS-DOM9-155-154	37	
抗 IL-13 mAb 重鎖-(PAS) ₃ GS-DOM9-155-154	38	
抗 IL-13 mAb 重鎖-(G ₄ S) ₁ -DOM9-155-154	39	
抗 IL-13 mAb 重鎖-(G ₄ S) ₂ -DOM9-155-154	40	
抗 IL-13 mAb 重鎖-(G ₄ S) ₃ -DOM9-155-154	41	
抗 IL-13 mAb 重鎖-(PAVPPP) ₁ GS-DOM9-155-154	42	

10

20

30

40

抗 IL-13 mAb 重鎖-(PAVPPP) ₂ GS-DOM9-155-154	43	
抗 IL-13 mAb 重鎖-(PAVPPP) ₃ GS-DOM9-155-154	44	
抗 IL-13 mAb 重鎖-(TVSDVP) ₁ GS-DOM9-155-154	45	
抗 IL-13 mAb 重鎖-(TVSDVP) ₂ GS-DOM9-155-154	46	
抗 IL-13 mAb 重鎖-(TVSDVP) ₃ GS-DOM9-155-154	47	
抗 IL-13 mAb 重鎖-(TGLDSP) ₁ GS-DOM9-155-154	48	
抗 IL-13 mAb 重鎖-(TGLDSP) ₂ GS-DOM9-155-154	49	
抗 IL-13 mAb 重鎖-(TGLDSP) ₃ GS-DOM9-155-154	50	
GS	51	
GS (TVAAPSGS) ₁	52	
GS (TVAAPSGS) ₂	53	
GS (TVAAPSGS) ₃	54	
GS (TVAAPSGS) ₄	55	
GS (TVAAPSGS) ₅	56	
GS (TVAAPSGS) ₆	57	
(PAS) ₁ GS	58	
(PAS) ₂ GS	59	
(PAS) ₃ GS	60	
(G ₄ S) ₁	61	
(G ₄ S) ₂	62	
(G ₄ S) ₃	63	
(PAVPPP) ₁ GS	64	
(PAVPPP) ₂ GS	65	
(PAVPPP) ₃ GS	66	
(TVSDVP) ₁ GS	67	
(TVSDVP) ₂ GS	68	
(TVSDVP) ₃ GS	69	
(TGLDSP) ₁ GS	70	
(TGLDSP) ₂ GS	71	
(TGLDSP) ₃ GS	72	
TVAAPSGS リンカー	73	
PAS リンカー	74	
TVAAPS リンカー	75	
PAVPPP リンカー	76	
TVSDVP リンカー	77	
TGLDSP リンカー	78	
586H-TVAAPSGS-154 重鎖	79	
DOM9-155-25	80	
DOM9-155-147	81	
DOM9-112-210	82	
DOM10-53-474	83	
実施例シグナルペプチド	84	
DOM10-53-616 dAb-GSTVAAPS-抗ヒト IL-4 mAb 重鎖	85	
DOM10-53-616 dAb-GSASTKGPS-抗ヒト IL-4 mAb 重鎖	86	
DOM10-53-616 dAb-GSTVAAPS-抗ヒト IL-4 mAb 軽鎖	87	
DOM10-53-616 dAb-GSASTKGPS-抗ヒト IL-4 mAb 軽鎖	88	
抗ヒト IL-4 mAb 軽鎖-TVAAPS-DOM10-53-616 dAb	89	
抗ヒト IL-4 mAb 重鎖-TVAAPS-DOM10-53-616 dAb	90	

10

20

30

40

IL-5 mAb 重鎖	91	
IL-5 mAb 軽鎖	92	
Anti IL13 ヒト化変異体 A1 Y100B Val (重鎖)	93	
829H-(TVAAPS) ₂ GS-154 L89Q	94	
829H-(TVAAPS) ₃ GS-154 L89Q	95	
829H-(TVAAPS) ₄ GS-154 L89Q	96	
DOM10-176-535	97	
829H-GS (TVAAPSGS) ₂ -154 L89Q	98	
829H-GS (TVAAPSGS) ₃ -154 L89Q	99	
829H-GS (TVAAPSGS) ₄ -154 L89Q	100	
抗ヒト IL-4 DOM9-155-256	101	
抗ヒト IL-4 DOM9-155-256、CDRH3	102	
PascoH-TVAAPSGS-PEP1-5-19 重鎖	104	103
PascoH-GS (TVAAPS) ₂ - PEP1-5-19 重鎖	107	106
PascoH-GS (TVAAPS) ₃ - PEP1-5-19 重鎖	109	108
PascoH-GS (TVAAPS) ₄ - PEP1-5-19 重鎖	111	110
(TVAAPS) ₂ GS リンカー	112	
(TVAAPS) ₃ GS リンカー	113	
(TVAAPS) ₄ GS リンカー	114	

10

20

【0371】

配列番号 1

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

配列番号 2

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

30

配列番号 3

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

40

配列番号 4

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

50

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

10

配列番号 5

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

20

配列番号 6

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

30

40

配列番号 7

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

50

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

配列番号 8

10

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

20

配列番号 9

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

30

40

配列番号 10

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

50

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

10

配列番号 1 1

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

20

配列番号 1 2

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

30

40

配列番号 1 3

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

50

WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDS DGS FFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK PAS PAS PAS GS G V Q L L E S G G G L V Q P G G S L
 RLSCAASGFVFPWYDMGWVRQAPGKGLEWVSSIDWHGKIT
 YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAT
 AEDEPGYDYWGQGT L V T V S S

配列番号 1 4

QVTLRESGPALVKPTQTTLTLTCTFSGFSLSLSTSGMGVSWIR
 QPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSR LTI SKDTSRNQV
 VLTMTNMDPVD TATYYCARRET V FYWYFDVWGRGTLVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDS DGS FFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK GGGGS G V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A
 S G F V F P W Y D M G W V R Q A P G K G L E W V S S I D W H G K I T Y Y A D S V
 K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A T A E D E P G
 Y D Y W G Q G T L V T V S S

配列番号 1 5

QVTLRESGPALVKPTQTTLTLTCTFSGFSLSLSTSGMGVSWIR
 QPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSR LTI SKDTSRNQV
 VLTMTNMDPVD TATYYCARRET V FYWYFDVWGRGTLVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDS DGS FFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK GGGGS G V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R
 L S C A A S G F V F P W Y D M G W V R Q A P G K G L E W V S S I D W H G K I T Y
 Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A T A
 E D E P G Y D Y W G Q G T L V T V S S

配列番号 1 6

QVTLRESGPALVKPTQTTLTLTCTFSGFSLSLSTSGMGVSWIR
 QPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSR LTI SKDTSRNQV
 VLTMTNMDPVD TATYYCARRET V FYWYFDVWGRGTLVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD

ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLLES GGGGLVQP
 GGSRLRLSCAASGFVFPWYDMGWVRQAPGKGLEWVSS IDWH
 GKITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY
 YCATAEDEPGYDYWGQGGLVTVSS

配列番号 17

QVTLRESGPALVKPTQTTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIR
 QPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSR LTI SKDTSRNQV
 VLTMTNMDPVD TATYYCARRET VFYWYFDVWGRGTLVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSLSPGKPAVPPPGSGVQLLES GGGGLVQPGGSRLRLS
 CAASGFVFPWYDMGWVRQAPGKGLEWVSS IDWHGKITYYA
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATAED
 EPGYDYWGQGGLVTVSS

10

20

配列番号 18

QVTLRESGPALVKPTQTTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIR
 QPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSR LTI SKDTSRNQV
 VLTMTNMDPVD TATYYCARRET VFYWYFDVWGRGTLVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSLSPGKPAVPPPPPAVPPPGSGVQLLES GGGGLVQPG
 GSLRLSCAASGFVFPWYDMGWVRQAPGKGLEWVSS IDWHG
 KITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
 CATAEDEPGYDYWGQGGLVTVSS

30

配列番号 19

QVTLRESGPALVKPTQTTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIR
 QPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSR LTI SKDTSRNQV
 VLTMTNMDPVD TATYYCARRET VFYWYFDVWGRGTLVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY

40

50

TQKSLSLSPGKPAVPPPPAVPPPPAVPPPGSGVQLLESGG
GLVQPGGSLRLSCAASGFVFPWYDMGWVRQAPGKGLEWVS
SIDWHGKITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCATAEDEPGYDYWGQGT LVTVSS

配列番号 20

QVTLRESGPALVKPTQTLLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIR
QPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSR LTI SKDTSRNQV
VLTMTNMDPVD TATYYCARRET V FYWYFDVWGRGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSSGLYSLSSVVTVPSSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGKTVSDVPGSGVQLLESGGGGLVQPGGSLRLS
CAASGFVFPWYDMGWVRQAPGKGLEWVSSSIDWHGKITYYA
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATAED
EPGYDYWGQGT LVTVSS

10

20

配列番号 21

QVTLRESGPALVKPTQTLLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIR
QPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSR LTI SKDTSRNQV
VLTMTNMDPVD TATYYCARRET V FYWYFDVWGRGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSSGLYSLSSVVTVPSSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGKTVSDVPTVSDVPGSGVQLLESGGGGLVQPG
GSLRLSCAASGFVFPWYDMGWVRQAPGKGLEWVSSSIDWHG
KITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
CATAEDEPGYDYWGQGT LVTVSS

30

配列番号 22

QVTLRESGPALVKPTQTLLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIR
QPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNP SLKSR LTI SKDTSRNQV
VLTMTNMDPVD TATYYCARRET V FYWYFDVWGRGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSSGLYSLSSVVTVPSSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGKTVSDVPTVSDVPTVSDVPGSGVQLLESGG
GLVQPGGSLRLSCAASGFVFPWYDMGWVRQAPGKGLEWVS

40

50

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

配列番号 2 3

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

10

配列番号 2 4

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

20

30

配列番号 2 5

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

40

50

配列番号 2 6

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

配列番号 2 7

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

10

配列番号 2 8

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

20

配列番号 2 9

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

30

40

配列番号 3 0

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

50

PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK GSTVAAPSGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVITITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSLQ
GGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQEGWGP
PTFGQGGTKVEIKR

配列番号 3 1

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHYDDYYAMDYWGQGT L
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAP
ELLGGPSVFLLFPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK GSTVAAPSGSTVAAPSGSDIQMTQS
PSSLSASVGDRVITITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLL
IAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY
CLQEGWGPPTFGQGGTKVEIKR

10

20

配列番号 3 2

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHYDDYYAMDYWGQGT L
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAP
ELLGGPSVFLLFPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK GSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSG
SDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASRPISDWLHWYQQK
PGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCLQEGWGPPTFGQGGTKVEIKR

30

配列番号 3 3

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHYDDYYAMDYWGQGT L
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAP
ELLGGPSVFLLFPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL

40

50

HNHYTQKSLSLSPGKGSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSG
 STVAAPSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRPISD
 WLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDF
 TLTISSSLQPEDFATYYCLQEGWGPPTFGQGTKVEIKR

配列番号 3 4

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
 PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCARSITYDDYHYDDYYAMDYWGQGT
 LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPL
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGKGSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSG
 STVAAPSGSTVAAPSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
 RASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQEGWGPPTFGQGTK
 VEIKR

10

20

配列番号 3 5

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
 PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCARSITYDDYHYDDYYAMDYWGQGT
 LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPL
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGKGSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSG
 STVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSGSDIQMTQSPSSLSASV
 GDRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSLQ
 GGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQEGWGP
 PTFGQGTKVEIKR

30

配列番号 3 6

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
 PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCARSITYDDYHYDDYYAMDYWGQGT
 LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPL
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL

40

50

HNHYTQKSLSLSPGKPASGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVT
ITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSSLQGGVPS
RFSGSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQEGWGPPTFGQ
GTKVEIKR

配列番号 37

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVRQA
PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHYDDYYAMDYWGQGT L
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGKPASPASGSDIQMTQSPSSLSASVGD
RVTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSSLQGG
VPSRFSGSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQEGWGPPT
FGQGGTKVEIKR

10

20

配列番号 38

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVRQA
PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHYDDYYAMDYWGQGT L
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGKPASPASPASGSDIQMTQSPSSLSAS
VGD RVTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSL
QGGVPSRFSGSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQEGW
GPPTFGQGGTKVEIKR

30

配列番号 39

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWVRQA
PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHYDDYYAMDYWGQGT L
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGKGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVT
ITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSSLQGGVPS

40

50

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

配列番号 4 0

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

10

配列番号 4 1

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

20

30

配列番号 4 2

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

40

50

配列番号 4 3

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
 PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHYDDYYAMDYWGQGT
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK PAVPPPPAVPPPGSD IQMTQSPSS
 SASVGDRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWA
 SSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCLQE
 GWGPPTFGQGGTKVEIKR

10

配列番号 4 4

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
 PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHYDDYYAMDYWGQGT
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK PAVPPPPAVPPPPPAVPPPGSD IQMT
 QSPSSLSASVGDRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPK
 LLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFAT
 YYCLQEGWGPPTFGQGGTKVEIKR

20

30

配列番号 4 5

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
 PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHYDDYYAMDYWGQGT
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK TVSDVPGSD IQMTQSPSSLSASVG
 DRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSLQGG
 VPSRFSGSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFATYYCLQEGWGPPT
 FGQGGTKVEIKR

40

配列番号 4 6

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA

50

PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHYDDYYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK TVSDVPTVSDVPGSD IQMTQSPSS
LSASVGDRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPKGKAPKLLIAWA
SSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQE
GWGPPTFGQGTKVEIKR

10

配列番号 4 7

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHYDDYYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK TVSDVPTVSDVPTVSDVPGSD IQMT
QSPSSLSASVGDRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPKGKAPK
LLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFAT
YYCLQEGWGPPTFGQGTKVEIKR

20

30

配列番号 4 8

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHYDDYYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK TGLDSPGSD IQMTQSPSSLSASVG
DRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPKGKAPKLLIAWASSLQGG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQEGWGPPT
FGQGTKVEIKR

40

配列番号 4 9

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHYDDYYAMDYWGQGT

50

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

10

配列番号 5 0

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

20

配列番号 5 1

G S

30

配列番号 5 2

G S T V A A P S G S

配列番号 5 3

G S T V A A P S G S T V A A P S G S

配列番号 5 4

G S T V A A P S G S T V A A P S G S T V A A P S G S

配列番号 5 5

G S T V A A P S G S T V A A P S G S T V A A P S G S T V A A P S G S

配列番号 5 6

G S T V A A P S G S T V A A P S G S T V A A P S G S T V A A P S G S T V A A P S
 G S

40

配列番号 5 7

G S T V A A P S G S T V A A P S G S T V A A P S G S T V A A P S G S T V A A P S
 G S T V A A P S G S

配列番号 5 8

P A S G S

配列番号 5 9

P A S P A S G S

配列番号 6 0

P A S P A S P A S G S

50

配列番号 6 1

G G G G S

配列番号 6 2

G G G G S G G G G S

配列番号 6 3

G G G G S G G G G S G G G G S

配列番号 6 4

P A V P P P G S

配列番号 6 5

P A V P P P P A V P P P G S

10

配列番号 6 6

P A V P P P P A V P P P P A V P P P G S

配列番号 6 7

T V S D V P G S

配列番号 6 8

T V S D V P T V S D V P G S

配列番号 6 9

T V S D V P T V S D V P T V S D V P G S

配列番号 7 0

T G L D S P G S

20

配列番号 7 1

T G L D S P T G L D S P G S

配列番号 7 2

T G L D S P T G L D S P T G L D S P G S

配列番号 7 3

T V A A P S G S

配列番号 7 4

P A S

配列番号 7 5

T V A A P S

30

配列番号 7 6

P A V P P P

配列番号 7 7

T V S D V P

配列番号 7 8

T G L D S P

配列番号 7 9 = 5 8 6 H - T V A A P S - 1 5 4 (H鎖)

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

40

50

VPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQEGWGPPT
FGQGTKVEIKR

配列番号80=DOM9-155-25

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRPISDWLHWYQQKP
GKAPKLLIAWASTLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQ
PEDFATYYCLQEGWGPPTFGQGTKVEIKR

配列番号81=DOM9-155-147

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASRPISDWLHWYQQKP
GKAPKLLIAWASSLYEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQ
PEDFATYYCLQEGWGPPTFGQGTKVEIKR

10

配列番号82=DOM9-112-210

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNFGMGWVRQA
PGKGLEWVSWIISSGTETYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKSLGRFDYWGQGT LVT VSS

配列番号83=DOM10-53-474

GVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAWYDMGWVRQA
PGKGLEWVSSIDWHGEVTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCATAEDEPGYDYWGQGT LVT VSS

配列番号84（実施例シグナルペプチド配列）

MGWSCIIILFLVATATGVHS

20

配列番号85=616-TVAAPS-抗ヒトIL-4 mAb重鎖

GVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVFPWYDMGWVRQA
PGKGLEWVSSIDWHGKITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCATAEDEPGYDYWGQGT LVT VSSSGS
TVAAPSQVTLRESGPALVKPTQTTLTLCTFSGFSLSSTSGM
GVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKD
TSRNQVVL TMTNMDPVD TATYYCARRET VFYWFYFDVWGRG
TLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYF
PEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

30

配列番号86=616-ASTKG-抗ヒトIL-4 mAb重鎖

GVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVFPWYDMGWVRQA
PGKGLEWVSSIDWHGKITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCATAEDEPGYDYWGQGT LVT VSSSGS
ASTKGPSQVTLRESGPALVKPTQTTLTLCTFSGFSLSSTSG
MGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISK
DTSRNQVVL TMTNMDPVD TATYYCARRET VFYWFYFDVWGR
GTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY
FPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

40

50

NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS C SVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 87 = 616 - GSTVAAPS - 抗ヒトIL-4 mAb 軽鎖

GVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASG FVFPWYDMGWVRQA
PGKGLEWVSS IDWHGKITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCATAEDEPGYDYWGQGT LVTVSSGS
TVAAPSDIVLTQSPSSLSASVGD RVTITCKASQSVDYDGD
SYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGIPSRFSGSGSGTD
FTFTISS LQPED IATYYCQQSNEDPPTFGQGT KVEIKRTV
AAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLT LSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

10

配列番号 88 = 616 - GSTASTKG - 抗ヒトIL-4 mAb 軽鎖

GVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASG FVFPWYDMGWVRQA
PGKGLEWVSS IDWHGKITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCATAEDEPGYDYWGQGT LVTVSSGS
ASTKGPSDIVLTQSPSSLSASVGD RVTITCKASQSVDYDGD
DSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGIPSRFSGSGSGT
DFTFTISS LQPED IATYYCQQSNEDPPTFGQGT KVEIKRT
VAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLT LSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

20

配列番号 89 = 抗ヒトIL-4 mAb 軽鎖 - TVAAPS - 616

DIVLTQSPSSLSASVGD RVTITCKASQSVDYDGD SYMNWY
QQKPGKAPKLLIYAASNLESGIPSRFSGSGSGTDFTFTIS
SLQPED IATYYCQQSNEDPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGECTVAAPSGVQLLES GGGGLVQPGG
SLRLSCAASG FVFPWYDMGWVRQAPGKGLEWVSS IDWHGK
ITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ATAEDEPGYDYWGQGT LVTVSS

30

配列番号 90 = 抗ヒトIL-4 mAb 重鎖 - TVAAPS - 616 (重鎖)

QVTLRES GPALVKPTQTLLTCTFS GFSLSSTSGMGVSWIR
QPPGKGLEWLAHIYWD DDKRYNPSLKSRLTISKDT SRNQV
VLTMTNMDPVD TATYYCARRET VFYWFYFDVWGRGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPPELLG
GPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS C SVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK TVAAPSGVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCA
ASG FVFPWYDMGWVRQAPGKGLEWVSS IDWHGKITYYADSV
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATAEDEP
GYDYWGQGT LVTVSS

40

配列番号 91 = 抗IL-5 mAb 重鎖

QVTLRES GPALVKPTQTLLTCTVSG FSLTSYSVHWVRQP

50

PGKGLEWLGV I WASGGTDYNSALMSRLSISKDTSRNQVVL
 TMTNMDPVD TATYYCARDPPSSLLRLDYWGRGTLVTVSSA
 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

10

配列番号92 = 抗IL-5 mAb軽鎖

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLA
 WYQQKPGQP P KLLIYGASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLT
 ISSLQAEDVAVYYCQNVHSFPFTFGGGTKLEIKRTVAAPS
 VFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNFYPREAKVQWKVDNAL
 QSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
 EVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

配列番号93

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
 PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHVDDYYAMDYWGQGT
 LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
 PELLGGPSVFLLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK

20

30

配列番号94 = (829H-(TVAAAPS)₂GS-154 L89Q)

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
 PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHVDDYYAMDYWGQGT
 LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
 PELLGGPSVFLLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGKTVAAPSTVAAPSGSDIQMTQSPSSL
 SASVGDRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLLI
 AWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQPEDFAT
 YYCQQEGWGPPTFTGQGTKEIKR

40

配列番号95 = 829H-(TVAAAPS)₃GS-154 L89Q

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
 PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY

50

MELSSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHVDDYYAMDYWGQGT L
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGKTVAAPSTVAAPSTVAAPSGSDIQMT
 QSPSSLSASVGDRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPK
 LLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFAT
 YYCQQEGWGPPPTFGQGGTKVEIKR

10

配列番号 96 = 829H - (TVAAPS) ₄GS - 154 L89Q

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHVVRQA
 PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHVDDYYAMDYWGQGT L
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGKTVAAPSTVAAPSTVAAPSTVAAPSG
 SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPISDWLHWYQQK
 PGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQ
 PEDFATYYCQQEGWGPPPTFGQGGTKVEIKR

20

配列番号 97

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGPYLNWYQQK P
 GKAPKPLIYMGYWAPSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQ P
 EDFATYYCQQDLYPPTFGQGGTKVEIKR

30

配列番号 98

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHVVRQA
 PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
 MELSSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHVDDYYAMDYWGQGT L
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGKGSTVAAPSGSTVAAPSGSDIQMTQS
 PSSLSASVGDRVTITCRASRPISDWLHWYQQKPGKAPKLL
 IAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYY
 CQQEGWGPPPTFGQGGTKVEIKR

40

配列番号 99

50

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHVDDYYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
P
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGKGSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSG
SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPISDWLHWYQQK
PGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQEGWGPPTFGQGGTKVEIKR

10

配列番号100

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGFYIKDTYMHWRQA
PGQGLEWMGTIDPANGNTKYVPKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARS IYDDYHVDDYYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
P
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGKGSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSG
STVAAPSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPISD
WLHWYQQKPGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDF
TLTIS
SLQPEDFATYYCQQEGWGPPTFGQGGTKVEIKR

20

30

配列番号101

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPISDWLHWYQQK
PGKAPKLLIAWASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQEGWGPPTFGQGGTKVEIKR

配列番号102

QQEGWGPPT

配列番号103 BPC2626重鎖のポリヌクレオチド配列

CAGGTGACCCCTGAGGGAGAGCGGCCCCCGCCCTGGGTGAAGC
CCACCCAGACCCCTGACCCCTGACCTGCACCTTCAGCGGCTT
TAGCCTCAGCACCTCCGGCATGGGCGTGAGCTGGATCAGG
CAGCCACCCGGCAAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCCCACTCT
ACTGGGACGACGACAAGAGGTACAACCCAGCCTGAAGAG
CCGGCTGACCATCAGCAAAGGATACCAGCAGGAACCAAGGTG
GTGCTGACCATGACCAACATGGACCCCGTGACACCGCTA
CCTACTACTGCGCCAGGAGGGAGACCGTCTTCTACTGGTA
CTTCGACGTGTGGGGAAGGGGACACACTAGTGACCGTGTCC
AGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCC
CCAGCAGCAAAGAGCACCAAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGG
CTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTG

40

50

TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCT
 TCCCCGCGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCGCTGTACAGCCTGAG
 CAGCGTGGTGACCGTGCCCAAGCAGCAGCCTGGGCACCCAG
 ACCTACATCTGTAAACGTGAACCAACAAGCCCCAGCAACACCA
 AGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGAC
 CCACACCTGCCCCCCTGCCCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGA
 GGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCTCCCCCAAGCCTAAGGACA
 CCCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGTGTGGT
 GGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCTGAGGTGAAGTTCAAC
 TGGTACGTGGACGGCGTGAGAGGTGCACAATGCCAAGACCA
 AGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGGTGGT
 GTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGC
 AAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTG
 CCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC
 CAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCCTGGTGA
 AGGGCTTCTACCCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
 CAACGGGCCAGCCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCT
 GTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTCTGTACAGCAAGC
 TGACCGGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTT
 CAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTAC
 ACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCTGGCAAGACCCTGG
 CCGCCCCCTCGGGATCCGACATCCAGATGACTCAGAGCCC
 CAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGCGGCGATAGGTGACCATT
 CCTGCAGGGGCCAGCCAGAGCATCGACAGCTACCTGCCTG
 GTACCAGCAGAAAGCCCCGGAAGAGCCCCCAAGCTCCTGATC
 TACAGCGCCAGCGAGCTGCAGAGCGGCGTGCTAGCAGGT
 TTTCTTGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCAACCTGACCAT
 CTCCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTTCGCCACCTACTACTGC
 CAGCAGGTCGTGTGGAGGCCCTTCAACCTTCGGCCAGGGCA
 CCAAGGTGGAGATCAAGAGG

10

20

30

配列番号104 BPC2626重鎖のタンパク質配列

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMGVSWIR
 QPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSRNQV
 VLTMTNMDPVDATYYCARRETVFYWYFDVWGRGTLVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHY
 TQKSLSLSPGKTVAAPSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVI
 TCRASQSIDSYLHWYQQKPKAPKLLIYSASELQSGVPSR
 FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQG
 TKVEIKR

40

配列番号105 軽鎖のポリヌクレオチド配列

GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCCTCTTCCCTGAGCGCAA
 GCGTGGGCGAタグGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGA

50

GCGTGGA CTACGACGGCGACAGCTACATGAACTGGTACCA
GCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCCAAACTGCTGATCTACGCC
GCCAGCAACCTCGAGTCAGGCATTCCCAGCAGGTTTAGCG
GCAGCGGGCAGCGGCACCGACTTCACTTCACAATCAGCAG
CCTGCAAGCCCCGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAGCAG
AGCAACGAGGACCCCTCCCACTTTCGGACAGGGCACCAAGG
TCGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCAGCGTGTTTCA
CTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCC
AGCGTGGTGTTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGG
CCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGG
CAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGAC
TCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCCTGTGAGGTGAC
CCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC
CGGGGCGAGTG C

10

配列番号106 BPC2651重鎖のポリヌクレオチド配列

CAGGTGACCCCTGAGGGAGAGCGGGCCCCCGCCCTGGTGAAGC
CCACCCAGACCCCTGACCCCTGACCTGCACCTTTCAGCGGGCTT
TAGCCTCAGCACCTCCGGCATGGGGCGTGAGCTGGATCAGG
CAGCCACCCGGCAAAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCCCCACATCT
ACTGGGACGACGACAAGAGGTACAACCCAGCCTGAAGAG
CCGGCTGACCATCAGCAAGGATACCAGCAGGAACCAAGGTG
GTGCTGACCATGACCAACATGGACCCCCGTGGACACCGCTA
CCTACTACTGCGCCAGGAGGGAGACCGTCTTCTACTGGTA
CTTCGACGTGTGGGGAAGGGGGCACACTAGTGACCGTGTTCC
AGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCC
CCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGGCGGCACAGCCGCCCTGGG
CTGCCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTG
TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCT
TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCCTGTACAGCCTGAG
CAGCGTGGTGACCGTGCCCAAGCAGCAGCCTGGGCACCCAG
ACCTACATCTGTAAAGTGAAACCAAGCCCCAGCAACACCA
AGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGAC
CCACACCTGCCCCCCCTGCCCTGCCCCCCGAGCTGCTGGGA
GGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCTAAGGACA
CCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGT
GGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCTGAGGTGAAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGAGAGGTGCACAATGCCAAGACCA
AGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGT
GTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAAGGATTGGCTGAACGGC
AAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCCTG
CCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC
CAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCCTGGTGA
AGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
CAACGGCCAGCCCCGAGAACAACTACAAGACCAACCCCCCT
GTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTCTGTACAGCAAGC
TGACC GTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTT
CAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTAC
ACCCAGAAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCTGGCAAGGGATCTA

20

30

40

50

CCGTGGCAGCACCATCCGGATCTACCGTAGCAGCACCATC
CGGATCCGACATCCAGATGACTCAGAGCCCCAGCAGCCTG
AGCGCCAGCGTGGGCGATAGGTGACCATTAACCTGCAGGGC
CAGCCAGAGCATCGACAGCTACCTGCACTGGTACCAGCAG
AAGCCCCGGAAGGCCCCCAAGCTCCTGATCTACAGCGCCA
GCGAGCTGCAAGAGCGGCGTGCCTAGCAGGTTTTCTGGCAG
CGGCAGCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCTCCAGCCTG
CAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGTTCG
TGTGGAGGCCCTTCACCTTCGGGCCAGGGCACCAAGGTGGA
GATCAAGAGG

10

配列番号107 BPC2651重鎖のタンパク質配列

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMGVSWIR
QPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSRNQV
VLTMTNMDPVDATYYCARRET V FYWYFDVWGRGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGKGSTVAAPSGSTVAAPSGSDIQMTQSPSSL
SASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPKGAPKLLIYSA
SELQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQV
VWRPFTTFGQGGTKVEIKR

20

配列番号108 BPC2652重鎖のポリヌクレオチド配列

CAGGTGACCCCTGAGGGAGAGCGGGCCCCGCCCTGGTGAAGC
CCACCCAGACCCCTGACCCCTGACCTGCACCTTCAGCGGGCTT
TAGCCTCAGCACCTCCGGCATGGGCGTGAGCTGGATCAGG
CAGCCACCCGGCAAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCCCAACATCT
ACTGGGACGACGACAAGAGGTACAACCCCAAGCCTGAAGAG
CCGGGCTGACCATCAGCAAGGATACCAGCAGGAACCAAGGTG
GTGCTGACCATGACCAACATGGACCCCGTGACACCGCTA
CCTACTACTGCGCCAGGAGGGAGACCGTCTTCTACTGGTA
CTTCGACGTGTGGGGAAGGGGCAACACTAGTGACCGTGTCC
AGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGGCC
CCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGGCGGCACAGCCGCCCTGGG
CTGCCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTG
TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCT
TCCCCGCCGTGTGCTGACAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAG
CAGCGTGGTGAACCGTGCCCAAGCAGCAGCCTGGGCAACCCAG
ACCTACATCTGTAAACGTGAACCAACAAGCCCAAGCAACACCA
AGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGAC
CCACACCTGCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGA
GGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCTAAGGACA
CCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGT
GGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCTGAGGTGAAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGAGGAGGTGCACAATGCCAAGACCA
AGCCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGT

30

40

50

GTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAAGGATTGGCTGAACGGC
AAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTG
CCCCATATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC
CAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTG
AGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
CAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCT
GTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGC
TGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTT
CAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTAC
ACCCAGAAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCTGGCAAGGGATCTA
CCGTGGCAGCACCATCAGGATCTACCGTGGCAGCACCATC
AGGTTCAACAGTAGCTGCTCCTTCTGGATCCGACATCCAG
ATGACTCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCG
ATAGGTGACCATTACCTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCGAC
AGCTACCTGCACCTGGTACCAGCAGAAGCCCCGGAAGGGCC
CCAAGCTCCTGATCTACAGCGCCAGCGAGCTGCAGAGCGG
CGTGCCTAGCAGGTTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCACCGAC
TTCACCCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG
CCACCTACTACTGCCAGCAGGTCTGTGTGGAGGCCCTTCAC
CTTCGGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGAGG

10

20

配列番号109 BPC2652重鎖のタンパク質配列

QVTLRESGPALVKPTQTLLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIR
QPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSRNQV
VLTMTNMDPVDATYYCARRETVFYWYFDVWGRGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSLSPGKGSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSGSDIQ
MTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSIDSYLHWYQQKPKGA
PKLLIYSASELQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF
ATYYCQQVWVRPFTFGQGGTKVEIKR

30

配列番号110 BPC2653重鎖のポリヌクレオチド配列

CAGGTGACCCCTGAGGGAGAGCGGGCCCCGCCCCTGGTGAAAGC
CCACCCAGACCCCTGACCCCTGACCTGCACCTTCAGCGGCTT
TAGCCTCAGCACCTCCGGCATGGGCGTGAGCTGGATCAGG
CAGCCACCCGGCAAGAGGCCCTGGAGTGGCTGGCCCACTCT
ACTGGGACGACGACAAGAGGTACAACCCAGCCTGAAGAG
CCGGCTGACCATCAGCAAGGATACCAGCAGGAACCAGGTG
GTGCTGACCATGACCAACATGGACCCCGTGGACACCGCTA
CCTACTACTGCGCCAGGAGGGAGACCGTCTTCTACTGGTA
CTTCGACGTGTGGGGGAAGGGGGCACACTAGTGACCGTGTCC
AGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCTGGGCC
CCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGG
CTGCCTGGTGAAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTG

40

50

TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCT
TCCCCGCGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCGCTGTACAGCCTGAG
CAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAG
ACCTACATCTGTAAACGTGAACCAACAAGCCCCAGCAACACCA
AGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGAC
CCACACCTGCCCCCCTGCCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGA
GGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCTCCCCCAAGCCTAAGGACA
CCCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGTGTGGT
GGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCTGAGGTGAAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGAGAGGTGCACAATGCCAAGACCA
AGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGGTGGT
GTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGC
AAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTG
CCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC
CAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGA
AGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
CAACGGGCCAGCCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCT
GTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGC
TGACCCTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTT
CAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTAC
ACCCAGAAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCTGGCAAGGGATCTA
CCGTGGCAGCACCATCAGGATCTACCGTGGCAGCACCATC
AGGTTCAACAGTAGCTGCTCCTTCTTGGTTCAACAGTAGCT
GCTCCTTCTGGATCCGACATCCAGATGACTCAGAGCCCCA
GCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGGTGACCATTACC
TGCAGGGCCAGCCAGAGCATCGACAGCTACCTGCCTGGT
ACCAGCAGAAGCCCCGGAAGGGCCCCCAAGCTCCTGATCTA
CAGCGCCAGCGAGCTGCAGAGCGGGCGTGCTAGCAGGTTT
TCTGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCAACCCTGACCATCT
CCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCA
GCAGGTTCGTGTGGAGGCCCTTCAACCTTCGGCCAGGGGCACC
AAGGTGGAGATCAAGAGG

配列番号111 BPC2653重鎖のタンパク質配列

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMGVSWIR
QPPGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSRNQV
VLTMTNMDPVDATYYCARRETVFYWYFDVWGRGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGKGSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSGSTVA
APSGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSIDSYLHW
YQQKPKGAPKLLIYSASELQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGGTKVEIKR

配列番号112

TVAAPSTVAAPSGS

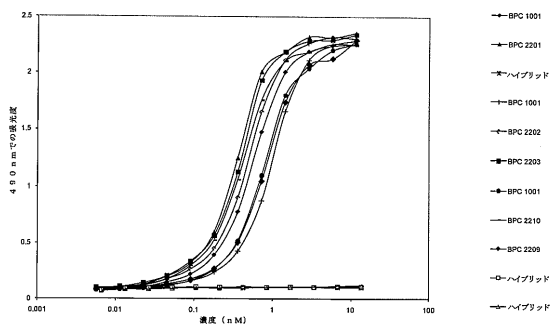
配列番号113

TVAAPSTVAAPSTVAAPSGS

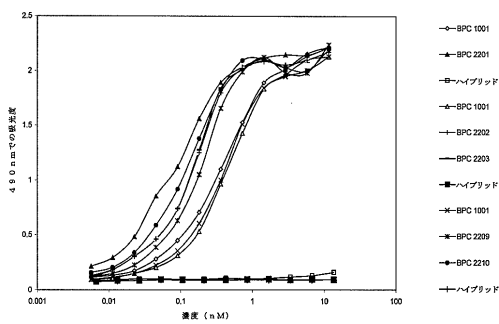
配列番号114

TVAAPSTVAAPSTVAAPSTVAAPSGS

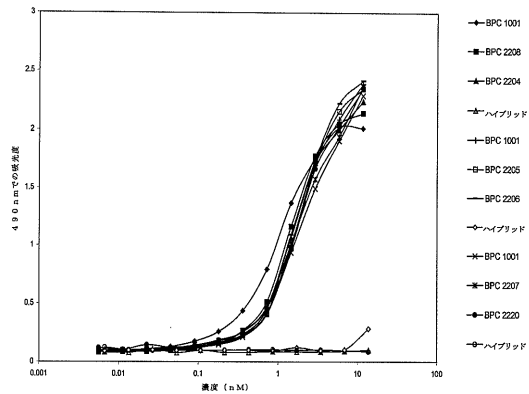
【図1】



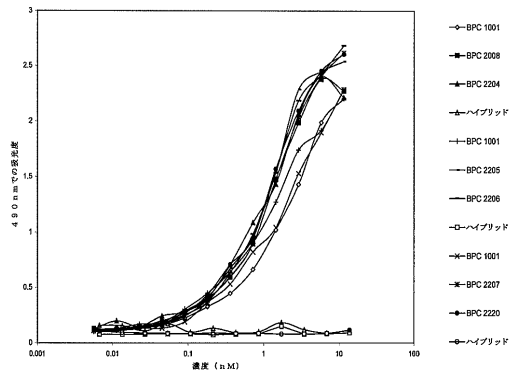
【図2】



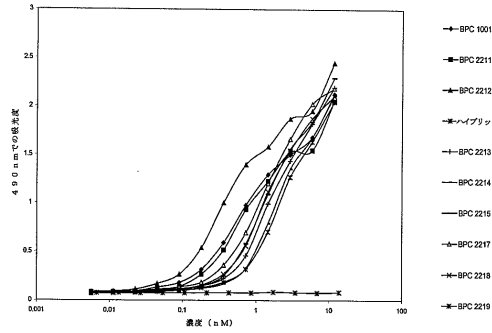
【図3】



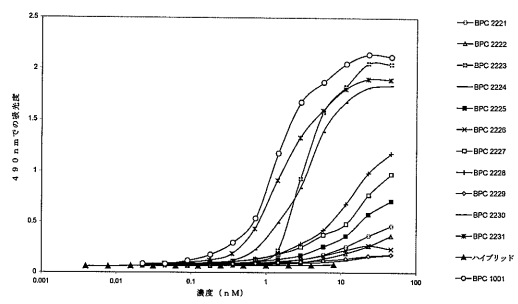
【図4】



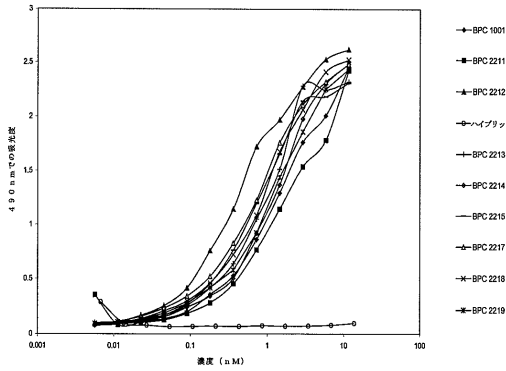
【図 5】



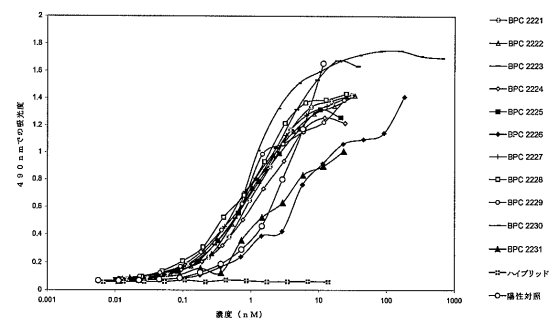
【図 7】



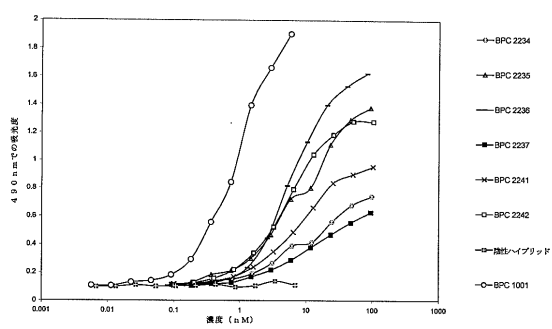
【図 6】



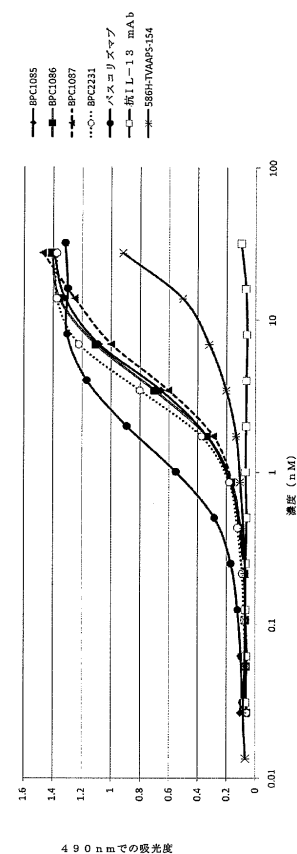
【図 8】



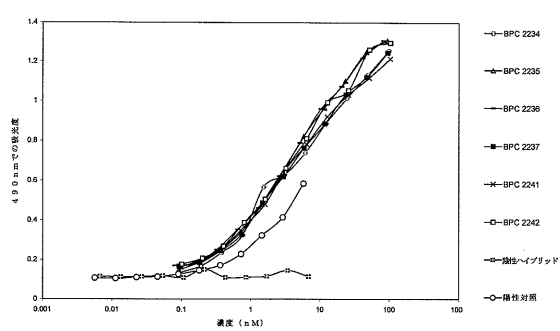
【図 9】



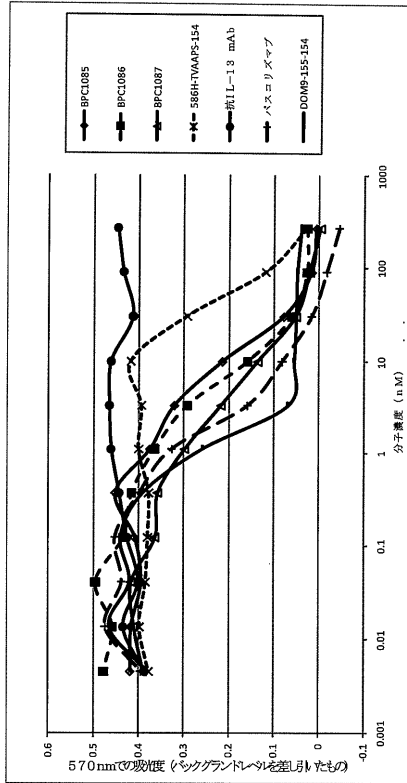
【図 11】



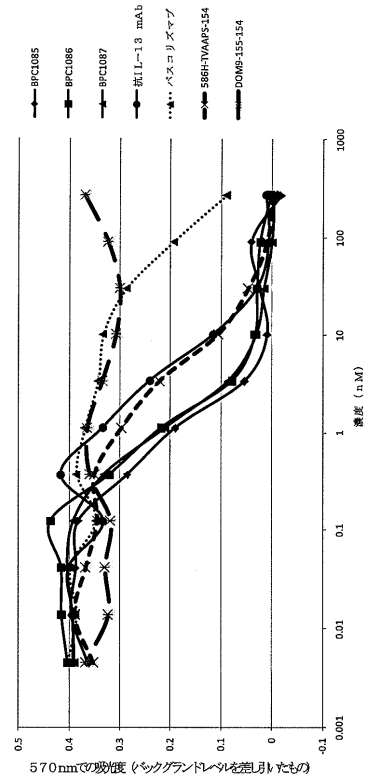
【図 10】



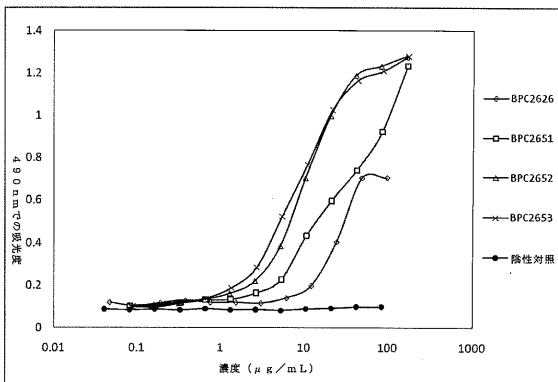
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



【配列表】

0005901517000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 0 7 K	16/24	(2006.01)	C 0 7 K 16/24
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K 16/18
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

- (72)発明者 ハンブリン, ポール アンドリュウ
イギリス国 エスジー1 2 エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン
- (72)発明者 ルイス, アラン ピーター
イギリス国 エスジー1 2 エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン
- (72)発明者 オレッキオ, マーティン, アニバル
イギリス国 エスジー1 2 エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン
- (72)発明者 パーマー, ラダ シャー
イギリス国 エスジー1 2 エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン

審査官 竹内 祐樹

- (56)参考文献 国際公開第2009/040562 (WO, A1)
特表2009-518024 (JP, A)
J. Mol. Biol., 1995, 246(3), pp.367-373
J. Mol. Biol., 2003, 329(1), pp.1-8
FEBS Lett., 1997, 414(3), pp.521-526
J. Immunol. Methods, 2007, 318(1-2), pp.65-74

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 15/00-15/90
C 0 7 K 16/00-19/00
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN)