

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5179374号

(P5179374)

(45) 発行日 平成25年4月10日 (2013. 4. 10)

(24) 登録日 平成25年1月18日 (2013. 1. 18)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 16/24 (2006. 01)

C 0 7 K 16/24

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 29/00 (2006. 01)

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 31/04 (2006. 01)

A 6 1 P 31/04

請求項の数 10 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-546030 (P2008-546030)
 (86) (22) 出願日 平成18年12月20日 (2006. 12. 20)
 (65) 公表番号 特表2009-519720 (P2009-519720A)
 (43) 公表日 平成21年5月21日 (2009. 5. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2006/001940
 (87) 国際公開番号 W02007/070948
 (87) 国際公開日 平成19年6月28日 (2007. 6. 28)
 審査請求日 平成21年12月1日 (2009. 12. 1)
 (31) 優先権主張番号 2005907124
 (32) 優先日 平成17年12月20日 (2005. 12. 20)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)
 (31) 優先権主張番号 60/817, 272
 (32) 優先日 平成18年6月28日 (2006. 6. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500468537
 セファロン・オーストラリア・ピーティ
 ワイ・リミテッド
 オーストラリア・ニュー・サウス・ウェー
 ルズ・2 1 1 3・マクアリー・パーク・エ
 ッピング・ロード・3 7・レヴェル・2
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗炎症ドメイン抗体 (d A b)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトTNF- に結合し、DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGV
 PSRFGSGSGTDFTLTISLLQPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR (配列番号 8) ;
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFGSGSGTDFTLTISLLP
 EDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR (配列番号 9) ; および
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFGSGSGTDFTLTISLLP
 EDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR (配列番号 10)
 からなる配列群より選択される配列を有する、組換えドメイン抗体 (dAb)。

【請求項 2】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFGSGSGTDFTLTISLL
 LPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR (配列番号 10) ;
 の配列を有する、請求項 1 に記載の組換えdAb。

【請求項 3】

CDR1および/またはCDR3を改変して抗原結合を改善する、請求項 1 または 2 に記載の組
 換えdAb。

【請求項 4】

ヒトで低い免疫原性を有する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の組換えdAb。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のdAbをコードする、単離核酸分子。

10

20

【請求項 6】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の組換えドメイン抗体(dAb)を有効量、薬剤として許容しうる担体または希釈剤とともに含む、薬剤組成物。

【請求項 7】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の組換えdAb有効量と試料を接触させること、および結合したdAbの量を検出することを含む、試料中のヒトTNF- を検出する方法。

【請求項 8】

前記試料が生物試料である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

ヒト被験者のヒトTNF- 活性により特徴づけられる疾病を治療するための医薬の製造において、有効量の請求項 6 に記載の薬剤組成物を使用する方法。

10

【請求項 10】

ヒトTNF- 活性により特徴づけられる疾病が、
炎症、炎症疾患、ならびに敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性菌敗血、および有毒ショック症候群を含む敗血症；関節リウマチ、リウマチ性脊椎炎、変形性関節症、および痛風性関節炎を含む自己免疫疾患、アレルギー、多発性硬化症、自己免疫性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜炎、およびネフローゼ症候群；感染による発熱および筋肉症を含む伝染病、ならびに感染に続いておこる悪液質；移植片対宿主拒絶反応；腫瘍増殖または転移；成人呼吸窮迫症候群、ショック肺、慢性肺炎症性疾患、肺サルコイドーシス、肺線維症、および珪肺症を含む肺疾病；クローン病および潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患；心臓疾病；炎症性骨疾病、肝炎、凝固障害、火傷、再かん流傷害、ケロイド形成、および癒痕組織形成

20

からなる群より選択される、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明はヒトの治療に有用な組換えドメイン抗体(dAb)に関係する。より詳しくは、ヒトTNF- に結合するドメイン抗体(dAb)、およびヒトTNF- 活性により特徴づけられる疾病の治療における前記抗体の使用に関係する。

【背景技術】

30

【0002】

腫瘍壊死因子 (TNF-) は、ショックを和らげること、ならびに敗血症、感染症、自己免疫疾患、移植の拒絶反応、および移植片対宿主拒絶反応を含む、種々のヒトの疾患および疾病の病態生理学に関係している、単球およびマクロファージを含む無数の細胞タイプにより生産されるサイトカインである。

【特許文献 1】 国際出願PCT91/17271号**【特許文献 2】** 米国特許第5,427,908号**【特許文献 3】** 欧州特許第527,839号**【特許文献 4】** 国際出願PCT第99/36569号**【特許文献 5】** 米国特許第5,627,052号

40

【非特許文献 1】 Ehrlich PH et al, Clin Chem. 34:9 pg 1681-1688 (1988)**【非特許文献 2】** Ehrlich PH et al, Hybridoma 1987; 6:151-60**【非特許文献 3】** von Budingen H-C et al., Immunogenetics 2001; 53:557-563**【発明の開示】****【発明が解決しようとする課題】****【0003】**

ヒトTNF- により仲介される有害効果に対抗する努力の中で、ヒトTNF- に結合し、およびそれを中和する抗体が、TNF- 活性を阻害する手段として求められてきた。ヒトTNF- に対する最初期の抗体の一部は、ヒトTNF- に免疫性を与えられたマウスより採取されるリンパ球より調製されるハイブリドーマ細胞系統より分泌されるマウスモノクローナル

50

抗体であった。そのような抗体はヒトTNF- に結合し、およびそれを中和することに効果的であったが、マウス抗体のヒトへの投与に関わる問題、特にヒト抗マウス抗体(HAMA)反応と呼ばれる、マウス抗体に対する望まれない免疫応答のヒトにおける誘出により、in vivo治療におけるそれらの使用は制限されてきた。

【0004】

これらの問題を克服する試みの中で、マウス抗ヒトTNF- 抗体が、よりヒトに類似するように遺伝的に操作されてきている。例えば、ヒト/マウスキメラ抗体が製作されており、そこでマウスゲノム由来の抗体可変領域配列がヒトゲノム由来の抗体定常領域配列と組み合わされている。前記キメラ抗体は、親であるマウス抗体における結合の特徴、およびヒト定常領域と関連するエフェクター機能を提示する。これらのキメラ抗体はヒトの治療に使用されてきているにもかかわらず、それらは一部のマウス配列をいまだ保持し、それゆえ特に長期の期間投与されてそれゆえその治療適用が限られている場合、抗キメラ抗体反応をいまだにヒト受容者に引き出すかもしれない。

10

【0005】

ヒトTNF- に対するヒトモノクローナル抗体が、ヒトハイブリドーマ技術を使用して開発されている。しかしこのアプローチは、ヒト被験者の免疫化について倫理的、臨床的および免疫学的制限をこうむる。

【0006】

非ヒト霊長類抗体は構造的にヒト抗体に類似しているため、それらはヒトで耐用性があるのであろうと推測されている(Ehrlich PH et al, in vivo治療のためのヒトおよび霊長類モノクローナル抗体Clin Chem. 34:9 pg 1681-1688 (1988))。さらに、ヒト抗体はアカゲザルにおいて非免疫原性であるため(Ehrlich PH et al, アカゲザルはヒトモノクローナル抗体の多注入に反応する Hybridoma 1987; 6:151-60)、逆もまた適用され、霊長類抗体はヒトで非免疫原性であろうことは確からしい。

20

【0007】

新世界ザルのように、進化的に距離がある霊長類は、ヒト抗原に対する抗体を作製させられるために十分にヒトと異なるだけでなく、そのような霊長類由来抗体をヒトに導入した際に、抗抗体免疫反応を宿主が発生させないような、ヒト抗体に類似した抗体を有するために十分にヒトに類似している。新世界ザル(infraorder- Platyrrhini)は少なくとも53種を含み、それは旧キヌザル科(Callithricidae、現マーモセット亜科Callitrichinae)、および旧オマキザル科(Cebidae、現マーモセット科)の2個のファミリーに分割される。旧キヌザル科はマーモセットおよびタマリンからなる。旧オマキザル科はリスザル、ティティモンキー、クモザル、コモンウーリーモンキー、オマキザル、ヨザルまたはフクロウサル、およびホエザルを含む。

30

【0008】

以前の研究により、コモンマーモセット(Callithrix jacchus)マーモセットの発現イムノグロブリン(IGHV)重鎖レパートリーが特徴づけられている(von Budingen H-C et al., 新世界マーモセット、コモンマーモセットにおける発現イムノグロブリン重鎖レパートリーの特徴づけ Immunogenetics 2001; 53:557-563)ヒトIGHV対応物に対して、高度な配列類似を示す6種類のIGHV下位群が同定された。相補性決定領域(CDR)と比較された際に、フレームワーク領域はより保存されていた。コモンマーモセットとヒトIGHV配列の間の類似性の程度は、旧世界ザルとヒトの間よりも小さかった。

40

【0009】

<ドメイン抗体>

ドメイン抗体(dAb)は、抗体の最小機能結合単位であり、抗体の重鎖(V_H)または軽鎖(V_L)いずれかの可変領域に相当する。ドメイン抗体は、およそ13 kDaの分子量を有し、あるいは全長抗体のサイズの10分の1よりも小さい。

【0010】

イムノグロブリン軽鎖はカッパ またはラムダ 軽鎖と呼ばれ、重鎖はガンマ 、ミュー、デルタ 、アルファ 、またはイプシロン と呼ばれる。可変領域により抗体にそ

50

の特異性が与えられる。各可変領域の中に超可変(hypervariability)の領域があり、フレームワーク領域と呼ばれるより保存される領域に隣接した相補性決定領域(CDR)として別途知られる。各可変領域の中に、3個のCDRおよび4個のフレームワーク領域がある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

< 発明の概要 >

第一の態様において、ヒトTNF- に結合する組換えドメイン抗体(dAb)を本発明は提供し、前記dAbはイムノグロブリン重鎖または軽鎖可変ドメインを含み、前記可変ドメインは新世界ザルに由来する配列を有する少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含み、ここで前記CDRは、AATKLQS (配列番号1)、EASSLQS (配列番号2)、EASKLQS (配列番号3)、SASNLET (配列番号4) からなる群より選択される。

10

【0012】

第二の態様において、薬剤として許容しうる担体または希釈剤とともに、本発明の第一の態様による有効量のdAbを含む医薬組成物を本発明は提供する。

【0013】

第三の態様において、ヒトTNF- を検知するための診断適用で、本発明の第一の態様による有効量のdAbを使用することを本発明は提供する。

【0014】

第四の態様において、本発明の第二の態様による薬剤組成物を被験者に投与することを含む、ヒト被験者でヒトTNF- 活性により特徴づけられる疾病を治療する方法を本発明は提供する。

20

【0015】

第五の態様において、本発明の第一の態様のdAbをコードする核酸配列を本発明は提供する。

【発明の効果】

【0016】

第一の態様において、ヒトTNF- に結合する組換えドメイン抗体(dAb)を本発明は提供し、前記dAbはイムノグロブリン重鎖または軽鎖可変ドメインを含み、前記可変ドメインは新世界ザルに由来する配列を有する少なくとも1種類の相補性決定領域(CDR)を含み、ここで前記CDRは、AATKLQS (配列番号1)、EASSLQS (配列番号2)、EASKLQS (配列番号3)、SASNLET (配列番号4) からなる群より選択される。

30

【0017】

好ましくは、CDRはCDR2である。

【0018】

好ましい実施態様において、dAbは以下より選択される配列を有する：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR

[化合物145；配列番号7]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR

40

[化合物123；配列番号8]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR

[化合物100；配列番号9]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR

[化合物196；配列番号10]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKPPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR

[化合物134；配列番号50]

50

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR

[化合物 1 3 7 ; 配列番号 5 1]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLYSASNLETGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLLPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR

[化合物 1 2 1 ; 配列番号 5 2]

【 0 0 1 9 】

さらなる態様において、本発明の第一の態様のdAbをコードする核酸配列を本発明は提供する。

【 0 0 2 0 】

ここで「に結合する」の語は、例えばBIAcore(登録商標)表面プラズモン共鳴システムおよびBIAcore(登録商標)動力学的評価ソフトウェア(例えばバージョン2.1)を使用する表面プラズモン共鳴解析により測定される1 μ Mまたはそれより低い解離定数(K_d)を有する、イムノグロブリン可変領域による抗原の結合を指すと意図されている。特異的結合相互作用の対する親和性および解離定数(K_d)は、好ましくは約500 nMまたはより低い、より好ましくは約300 nMまたはより低い、および好ましくは少なくとも300 nMから50 pM、200 nMから50 pM、およびより好ましくは少なくとも100 nMから50 pM、75 nMから50 pM、10 nMから50 pMである。

【 0 0 2 1 】

ここで「可変ドメイン」の語は、イムノグロブリン重鎖または軽鎖可変ドメインに特徴的な配列を含み、抗原に特異的に結合する折りたたまれるペプチドドメインが意味される。ドメイン抗体またはdAbは、単一可変ドメインポリペプチドと同等である。

【 0 0 2 2 】

当業者であれば、ヒトに対する進化的関連のために、ヒトの配列に高度な相同性を共有する、ヒト、新世界ザル、または旧世界ザルの可変ドメイン配列のいずれかに可変ドメイン配列の残りが由来してよいことを理解するであろう。それゆえ、例えば上基配列より選択されるCDRは、ヒトまたは霊長類可変領域配列に移植されて野生型CDRを置換してよい。

【 0 0 2 3 】

従って、本発明はさらに、新世界ザルイムノグロブリン可変ドメイン遺伝子を増幅する方法、例えば新世界ザルリンパ球より抽出される核酸からの、重および軽鎖可変ドメイン遺伝子ファミリーに特異的なプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)にもとづく。例えば、重および軽鎖遺伝子(それぞれ V_H および V_L)の境界に関する情報を使用して、所与の抗原に結合することが既知である抗体をコードする、クローン化重および軽鎖に由来する可変ドメインを増幅させるPCRプライマーを設計することができる。増幅される可変ドメインはその後、単独または別のポリペプチド配列との融合物としてのいずれかで適切な発現ベクターに挿入される。発現可変ドメインはその後、所望の抗原に対する高親和結合についてスクリーニングされる。

【 0 0 2 4 】

V_H および V_L ドメインのレパートリーは、天然に存在するイムノグロブリン配列のレパートリー、または合成レパートリーであることができる。天然に存在するレパートリーは、例えば1種類またはそれ以上の霊長類より採取されるイムノグロブリン発現細胞より調製されるものである。そのようなレパートリーは、未使用である、すなわち新生イムノグロブリン発現細胞より調製される、または再配置される、すなわち例えば成獣霊長類B細胞より調製される。所望であれば、その後天然レパートリー、または標的抗原に結合するレパートリーのいずれかより同定されるクローンを突然変異生成させ、改善される結合特性を有するバリエーションを生産および選択するためにさらにスクリーニングにかける。

【 0 0 2 5 】

単一イムノグロブリン可変ドメインの合成レパートリーは、クローン化可変ドメインに多様性を人工的に導入することにより調製される。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 6 】

V_H および V_L ドメインのレパートリーを、所望の結合特異性および機能性質に対して、例えばファージディスプレイによりスクリーニングすることができる。バクテリオファージディスプレイライブラリおよびラムダファージ発現ライブラリを構築するための方法は、当業者に既知である。ファージディスプレイ技術は、当業者により詳細に記載されており、そのようなライブラリを作製し、スクリーニングするための方法および化合物、ならびにそれらの生産物を成熟させる親和性の例を、例えば以下に見出すことができる：Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982 ; Clarkson et al. (1991) Nature 352:624:628 ; Dower et al. 国際出願PCT91/17271号、米国特許第5,427,908号、米国特許番号第5,580,717号、および欧州特許第527,839号 ; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372 ; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373:1377 ; Gamad et al. 国際出願PCT第92/09690号 ; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580 ; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12 :725:734 ; Griffiths et al. 米国特許第5,885,793号、および欧州特許第589,877号 ; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896 ; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85 ; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137 ; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281 ; Knappik et al. (2000) J Mol Biol 296:57-86 ; Knappik et al. PCT国際公開第97/08320号 ; Ladner et al. 米国特許第5,223,409号、第5,403,484号、第5,571,698号、第5,837,500号、および欧州特許番号第436,597号 ; McCafferty et al. (1990) Nature 348:552- 554 ; McCafferty et al. 国際出願PCT第92/01047号、米国特許番号第5,969,108号、および欧州特許番号第589,877号 ; Salfeld et al. 国際出願PCT第97/29131号、米国仮出願第60/126,603 ; およびWinter et al. 国際出願PCT第92/20791号、および欧州特許番号第368,684号。

【 0 0 2 7 】

V_H および V_L ドメインを発現する組換えライブラリを、例えば酵母または細菌（国際出願PCT第99/36569号、および第98/49286号を参照）のような微生物の表面に発現することができる。

【 0 0 2 8 】

選択的リンパ球抗体法（Selective Lymphocyte Antibody Method）、または当業者にそれが呼ばれるようにSLAMは、高親和性抗体を迅速に作製する別の方法である。ファージディスプレイのアプローチと異なり、抗体全てが完全に二価である。新世界ザル抗体を作製するために、ヒト抗原、例えばTNF- α ポリペプチドで新世界ザルが免疫化される。免疫化に続き、細胞が除去され、個々の微小ウェル中で選択的に増殖させられる。ウェルから上清を除き、結合および機能両方について試験する。遺伝子配列を、それに続く操作、例えばヒト型化、Fabフラグメント、scFv、またはdAb作製のために回収することができる。それゆえ別の例は、SLAMおよびその派生法（Babcock, J.S. et al 1996, Proc.Natl. Acad. Sci, USA 93:7843-7848、米国特許第5,627,052号、および国際出願PCT第92/02551号）による本発明の抗体または抗体種の誘導体である。掬い取り(panning)のような上清を試験する代替法の使用のようなSLAMの応用は、本発明の範囲内にある。

【 0 0 2 9 】

ある発現システムにおいて、組換えペプチド/タンパク質ライブラリは、リボソーム（例えばRoberts, RW and Szostak, J.W.1997. Proc.Natl Acad.Sci. USA. 94:12297 - 123202、および国際出願PCT第98/31700号）上に提示される。それゆえ別の例は、（例えば抗体、または好ましくは抗原化細胞より調製される誘導体の、しかし限定されない）DNAライブラリの作製およびin vitro転写、タンパク質および「抗原化」mRNAがリボソーム上に残留するようなライブラリの翻訳、（例えばRSPへの結合による親和性選択、mRNA単離、（例えばポリメラーゼ連鎖反応または関連技術による）逆転写およびそれに続く増幅が関係する。さらに一連の選択および増幅を、このシステムにける体細胞変異の導入を通した親和性成熟、または当業者に既知である他の親和性成熟の方法に必要な応じて組み合わせることができる。

【 0 0 3 0 】

別の例において、本発明のドメイン抗体を作製するために、エマルジョン区画化技術を適用することが見られる。エマルジョン区画化において、*in vitro*および光学ソーティング法を、エマルジョン中にある油滴の中の水相中にある、翻訳されるタンパク質の共区画化および配列をコードするそのヌクレオチドの共区画化と組み合わせる（国際公開第99026711号および第0040712参照）。抗体の作製および選択のための主要な要素は、リボソームディスプレイの*in vitro*方法に本質的に類似している。

【0031】

複数の供給源、例えばデータベース、The National Centre for Biotechnology Information protein and nucleotide databases、The Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological InterestよりCDRを取得してよい。あるいは、 V_H および V_L ドメインレパートリー（例えば、Kabat EA and Wu TT, 軽鎖および重鎖の可変部位における相補性決定残基を決定する試み、Ann, NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971)参照）よりCDR領域を予想することができる。CDR配列はゲノムDNAまたはcDNAであってよい。

【0032】

置換CDRが可変領域配列に移植されてよい複数の方法が存在し、そのような方法は当業者に既知である。本発明の好ましい方法は、遺伝子変異導入に関するプライマーを介する可変領域ドメイン中のCDR2の置換に係る。この方法は、所望の変異をコードする合成オリゴヌクレオチドを、DNA合成を*in vitro*で開始するためのプライマーとして役立つ標的領域にアニールし、オリゴヌクレオチドをDNAポリメラーゼにより伸張して所望の変異を保持する二本鎖DNAを作製し、適切な発現ベクター中に配列をライゲーションおよびクローニングすることからなる。

【0033】

好ましくは、本発明によるドメイン抗体はヒトで低い免疫原性を有する。

【0034】

「低い免疫原性」の語に言及することにより、治療上有効性を達成するのに十分な時間抗体を連続投与することによる有効性を減少させるのに十分な程度の免疫応答をドメイン抗体がヒトにおいて引き起こすことが無いことが意味される。

【0035】

好ましくは、CDRが移植される可変領域配列は、図1で提供される「dAbアクセプター配列」（化合物128と示される）である。

【0036】

dAbアクセプター配列は、配列番号6で示されるアミノ酸配列からなる：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITICRASQSIDSYLHWYQQKPKAPKLLIYSASELQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR（配列番号6）

【0037】

この配列は配列番号5で示されるヌクレオチド配列によりコードされる：

【表1】

```
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCT CTG TCT CCA TCT GTA GCA GAC CGT GTC ACC
ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT GAT AGT TAT TTA CAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA
GGG AAA GGC CGT AAG CTC CTG ATC TAT AGT GCA TCC GAG TTG CAA AGT GGC GTC CCA TCA
CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT
GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG GTT CTG TGG CGT CCT TTT ACG TTC GGC CAA
GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CCG
```

【0038】

本発明の好ましいある実施態様において、以下のdAb（化合物145と示される）を生産するために、dAbアクセプター配列のCDR2配列（SASELQS；配列番号49）を置換するように、マーマセットCDR配列SASNLET（配列番号4）がdAbアクセプター配列に移植される：

10

20

30

40

50

< 化合物 1 4 5 >

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (配列番号 7)

【 0 0 3 9 】

それゆえ好ましいある実施態様において、ヒトTNF- に結合するdAbは、配列番号7のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 0 】

dAb配列が、その抗原結合特性を改善するために、親和性成熟にさらかけられてよいことは本発明の範囲内である。これは、CDR1およびCDR3内のあるアミノ酸残基の改変を必要とする。

【 0 0 4 1 】

例えば、配列番号7で示されるマーマセットCDR移植dAbは、< 材料と方法 > で試みられ、TNF結合に対して試験されるように親和性成熟されていた。さらなる好ましい実施態様において、ヒトTNF- に結合するdAbは、配列番号8または配列番号9のアミノ酸配列を含む。これらはそれぞれ化合物123および化合物100と示されており、それらの配列を以下に示す：

< 化合物 1 2 3 >

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (配列番号 8)

< 化合物 1 0 0 >

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLFIWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (配列番号 9)

【 0 0 4 2 】

特に好ましい実施態様において、ヒトTNF- に結合するdAbは、配列番号10のアミノ酸配列を含む。これは化合物196と示されており、配列が以下に提供される：

< 化合物 1 9 6 >

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (配列番号 1 0)

【 0 0 4 3 】

本発明によるdAbはさらに、それに連結されるイムノグロブリン定常領域 (Fc領域) を含んでよい。定常領域配列は、ヒトまたは霊長類配列に由来してよい。霊長類配列は、新世界ザルまたは旧世界ザル配列であってよい。適切な旧世界ザルは、または、ヒトに対して系統樹的に近接しているためにヒト定常領域配列に高度な相同性を共有する、チンパンジー、または他のヒト科の動物、例えばゴリラまたはオランウータンを含む。

【 0 0 4 4 】

(連結される定常領域を有するまたは有しない) dAbを、別の機能分子に誘導体化または結合することができる。例えば、化学共役、遺伝的融合、非共有結合またはその他により、他の抗体、検出剤、細胞毒性薬剤、医薬剤、および/あるいは (ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジン標識のような) 別の分子と抗体の結合を仲介することができるタンパク質またはペプチドのような1種類またはそれ以上の他の分子の実体に、dAbを機能的に結合することができる。dAbが誘導体化されてよい有用な検出剤は、蛍光化合物を含む。例示的な蛍光検出剤は、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリトリン、およびその類似物を含む。dAbをまた、アルカリフォスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、およびその類似物のような検出剤で誘導体化してもよい。dAbを検出酵素で誘導体化する際、検出反応生成物を生産することが、酵素が使用する付加剤を添加することにより検出される。dAbはまたビオチンで誘導体化されてもよく、アビジンまたはストレプトアビジンの間接測定を通して測定される。

【 0 0 4 5 】

本発明はまた、PEG (PEG) 化抗体ポリペプチドに対して相対的に、増強される半減期、

10

20

30

40

50

および活性（例えば結合活性）において失活を伴わない分解に対する抵抗を提供する、（そこに結合される定常領域を有するまたは有しない）ペグ化dAbにも拡大適用する。

【0046】

当業者に既知の方法を使用して、増強される半減期および分解抵抗特性を達成するために有用なポリマー分子（好ましくはペグ）にdAbを結合させることができる。本発明で利用されることができるポリマー部分は、合成的または天然存在であることができ、直鎖または分枝鎖ポリアルキレン、ポリアルケニレン、またはポリオキシアルキレンポリマー、あるいはホモまたはヘテロ多糖のような分枝または非分枝多糖を含むがそれに限定されない。本発明で使用されることができる合成ポリマーの好ましい例は、直鎖または分枝鎖ポリ（エチレングリコール）（ペグ）、ポリ（プロピレングリコール）、またはポリ（ビニルアルコール）、および誘導体、ならびにそれらの置換形態を含む。dAbへの結合に特に好ましい置換ポリマーは、メトキシ（ポリエチレングリコール）を含む置換ペグを含む。ペグに加えてまたはペグの位置で使用されることができる天然存在ポリマー部分は、ラクトース、アミロース、デキストラン、またはグリコーゲン、ならびに当業者に認識されるであろうそれらの誘導体を含む。

10

【0047】

ポリマー分子の誘導体化形態は、例えば、付加部分を有する誘導体または、ここで記載されるドメイン抗体ポリペプチドのアミノ酸残基との相互作用を許容するように存在する反応基を含む。そのような誘導体は、N-ヒドロキシルスクシンイミド(NHS)活性エステル、スクシンイミジルプロピオナートポリマー、ならびにマレイミド、ビニルスルホン、およびチオールのようなスルフヒドリル選択反応性薬剤を含む。本発明で有用なペグポリマーは直鎖分子であることができ、または複数のペグ部分が単一ポリマーに存在する分枝状であることができる。

20

【0048】

反応基（例えばMAL、NHS、SPA、VS、またはチオール）を、ペグポリマーに直接結合してもよく、リンカー分子を介してペグに結合してもよい。

【0049】

本発明で有用なポリマーのサイズは、500 Daから60 kDa、例えば1000 Daと60 kDaとの間、10 kDaと60 kDaとの間、20 kDaと60 kDaとの間、30 kDaと60 kDaとの間、40 kDaと60 kDaとの間、および50 kDaと60 kDaとの間までの範囲であることができる。本発明で利用されるポリマー、特にペグは、直鎖ポリマーであることができ、分枝構造を有してもよい。

30

【0050】

本発明で有用なポリマー（ペグ）分子を、当業者に既知の方法を使用するドメイン抗体に結合させることができる。ペグまたは他のポリマー部分を、本発明の抗体ポリペプチド単量体または多量体に結合する第一の工程は、ペグポリマーの水酸末端基を求電子含有官能基により置換することである。特に、ペグポリマーを、ドメイン抗体に存在するシステインまたはリジン残基のいずれかに結合する。システインまたはリジン残基は、天然に存在させることができ、または抗体ポリペプチド分子中に設計されることもできる。例えば、システイン残基を、dAbポリペプチドのC末端に組換えて設計させることができ、あるいはdAbまたは他の抗体ポリペプチド中の特異的溶媒接近可能位置の残基を、システインまたはリジンと置換させることができる。

40

【0051】

本発明によるdAbを、in vivoで半減期を増加させることができる1種類またはそれ以上の分子に結合させてよい。これらの分子を、抗原結合部位を妨げる/立体的に妨害するように、リンカーを介してdAbに結合させてよい。あるいは、それらを定常領域に結合させてよい。典型的には、そのような分子は、in vivoで天然に発生する、および内因性機構による分解または除去に抵抗するポリペプチドである。半減期を増加させる分子を、以下より選択してよい：

(a) 細胞外マトリックスからのタンパク質、例えばコラーゲン、ラミニン、インテグリン

50

およびフィブロネクチン；

(b) 血中に見出されるタンパク質、例えば

フィブリン、 α -2マクログロブリン、血清アルブミン、フィブリノゲンA、フィブリノゲンB、血清アミロイド蛋白質A、ヘプタグロビン(heptaglobin)、タンパク質、ユビキチン、ユーテログロブリン(uteroglobulin)、 α -2ミクログロブリン、プラスミノーゲン、リゾチーム、シスタチンC、 α -1抗トリプシンおよび膵臓キプシン(kypsin)阻害剤；

(c) 免疫血清タンパク質、例えばIgE、IgG、TgM；

(d) 輸送タンパク質、例えばレチノール結合タンパク質、 α -1ミクログロブリン

(e) デフェンシン、例えば α -デフェンシン1、好中球デフェンシン1、2、および3；

(f) 血液脳関門または神経組織中に見出されるタンパク質、例えばメラノコルチンレセプター、ミエリン、アスコルビン酸トランスポーター；

(g) トランスフェリンレセプター特異的リガンド-神経医薬融合タンパク質（米国特許第5977307号参照）；脳毛細血管内皮細胞、トランスフェリン、トランスフェリンレセプター、インスリン、インスリン様増殖因子1(IGF 1)レセプター、インスリン様増殖因子2(IGF 2)レセプター、インスリンレセプター；

(h) 腎臓に位置されるタンパク質、例えばポリシスチン、IV型コラーゲン、有機アニオントランスポーターK1、ハイマンの抗原(Heymann's antigen)；

(i) 肝臓に位置されるタンパク質、例えばアルコールデヒドロゲナーゼ、G250；

(j) 血液凝固第X因子；

(k) α -1抗トリプシン；

(1) HKF 1；

(m) 肺に位置されるタンパク質、例えば(IgAに結合する)分泌成分；

(n) 心臓に位置されるタンパク質、例えばHSP 27；

(o) 皮膚に位置されるタンパク質、例えばケラチン；

(p) 骨形態形成タンパク質(BMP)のような骨特異的タンパク質、例えばBMP-2、-4、-5、-6、-7(骨形成タンパク質(OP-1)とも呼ばれる)、および-8(OP-2)；

(q) 腫瘍特異的タンパク質、例えばヒトトロホブラスト抗原、ハーセプチンレセプター、エストロゲンレセプター、カテプシン、例えば(肝臓および脾臓で発見される)カテプシンB；

(r) 疾患特異的タンパク質、例えば活性化T細胞のみで発現される抗原：LAG-3(リンパ球活性化遺伝子)を含む；破骨細胞形成抑制因子リガンド(OPGL)、Nature 402, 304-309, 1999を参照；OX40(TNFレセプターファミリーの一員で、活性化T細胞のみで発現され、ヒトT細胞白血病ウィルスI型(HTLV-I)-生産細胞で特異的に発現上昇することが知られている唯一の副刺激T細胞分子である、J. Immunol. 2000 Jul 1;16561, 263-70参照)；キイロショウジョウバエのCG6512、ヒトパラプレギン(paraplegin)、ヒトFtsH、ヒトAFG3L2、マウスftsMを含む、(関節炎/癌に関連する)メタロプロテアーゼ、；酸性線維芽細胞増殖因子(FGF-1)、塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)、血管内皮増殖因子/血管透過因子(VEGF/VPF)、形質転換増殖因子- α (TGF- α)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、アンジオジェニン、インターロイキン3(IL-3)、インターロイキン8(IL-8)、血小板由来内皮細胞増殖因子(PD-ECGF)、胎盤増殖因子(PIGF)、ミッドカイン血小板由来増殖因子-BB(PDGF)、フラクタルカイン；

(s) ストレスタンパク質(熱ショックタンパク質)；

(t) Fc輸送に関するタンパク質；および

(u) 内因性タンパク質、例えば血清アルブミンに関する抗体、フラグメント、または誘導体。

【0052】

本発明のさらなる実施態様において、第一の態様によるdAbは、例えばヘテロまたはホモ二量体、ヘテロまたはホモ三量体、ヘテロまたはホモ四量体、あるいはそれ以上の数のヘテロまたはホモ多量体に多量体化されてよい。多量体化は抗原結合の強さを増強することができ、ここで結合の強さは、多数の結合部位における結合親和性の総計に関係づけら

10

20

30

40

50

れる。

【0053】

それゆえ、第一の態様によるドメイン抗体を本発明は提供し、ここでドメイン抗体は少なくとも1種類のさらなるドメイン抗体に結合されている。各dAbは、同一または異なる抗原に結合してよい。

【0054】

dAb多量体は、さらに1種類またはそれ以上の結合されるdAbを含んでよく、ここで各dAbは異なる抗原、いわゆる「二重特異的リガンド(dual-specific ligands)」を含む多重特異的リガンド(multi-specific ligands)に結合する。例えば、二重特異的リガンドは、一対の V_H ドメインまたは一対の V_L ドメインを含んでよい。そのような二重特異的リガンドは、Domantis Ltd.の名で国際公開2004/003019号(PCT/GB2003/002804)に記載されている。

【0055】

第二の態様において、本発明の第一の態様による有効量のdAbを、薬剤として許容しうる担体または希釈剤とともに含む薬剤組成物を本発明は提供する。

【0056】

「薬剤として許容しうる担体」は、生理学的に両立しうる、いずれかのおよび全ての溶媒、分散媒体、被覆剤、抗菌および抗細菌薬剤、等張および吸収遅延剤、ならびに類似物を含む。薬剤として許容しうる担体の例は、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、およびその類似物、ならびにそれらの組み合わせの1種類またはそれ以上を含む。多くの場合、等張剤、例えば糖、マンニトールのよう

【0057】

なポリアルコール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましい。湿潤または微量の補助基質のような薬剤として許容しうる基質は、乳化剤、保存剤またはバッファーである。

【0058】

組成物は、液体溶液（例えば注射可能および注入可能溶液）、分散液、または懸濁液のような液体、半固体および固体服用形態、錠剤、ピル、粉末、リボソーム、および坐薬を含む種々の形態であってよい。好ましくは組成物は、免疫化のために注射可能溶液の形態である。服用は、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内、経皮、髄腔内、および動脈内であってよい。

【0059】

無菌注射可能溶液を調製するためにまた無菌粉末としても組成物を配合してよい。例えばレシチンおよび/または界面活性剤のような被覆剤を使用することにより、溶液の適切な流動性を維持することができる。

【0060】

ある実施態様において、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達系を含む、制御徐放配合のように、急速徐放に対して化合物を保護するであろう担体とともに活性化化合物を調製してよい。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルソエステル、およびポリ乳酸のような、両立しうるポリマーを使用してよい。

【0061】

組成物をまた、経口投与のために配合してもよい。この実施態様において、錠剤中に圧縮して、硬質または軟質殻ゼラチンカプセル中に、または被験者の食事に直接取り込んで、dAbを封入してよい。

【0062】

組成物をまた直腸投与のために配合してもよい。

【0063】

補助活性化化合物もまた組成物中に取り込むことができる。1種類またはそれ以上の付加治療薬、例えば抗炎症化合物、可溶性TNF- レセプターまたはヒトTNF- 生産を阻害する化学薬剤、あるいはサイトカインまたは細胞表面分子のような他の標的に結合する抗体とともに、ドメイン抗体を共配合および/または共投与してよい。あるいは、タンパク質A、タンパク質C、タンパク質G、またはタンパク質Lのような可溶性免疫化学薬剤とドメイン抗体を共投与してよい。

【0064】

有効量は、本発明におけるdAbの薬剤としての有効量または予防的有效量を含んでよい。薬剤としての有効量は、所望の治療結果を達成するために、服用時および必要な時間の間、有効な量を指す。予防的有效量は、所望の予防結果を達成するために、服用時および必要な時間の間、有効な量を指す。

【0065】

好ましい実施態様において、組成物を哺乳類、好ましくはヒトまたは霊長類に投与してよい。

【0066】

第三の態様において本発明は、ヒトTNF- を検出するための診断上の応用における、本発明の第一の態様によるdAbの使用を提供する。

【0067】

例えば、本発明による抗ヒトTNF- dAbを、例えば酵素免疫測定吸着法(ELISA)、放射免疫測定、または組織免疫化学のような伝統的な免疫アッセイを使用して、血清または血漿のような生物学的検体中のヒトTNF- dAbを検出するために使用することができる。本発明による抗ヒトTNF- dAbを、検出可能な基質で標識される組換えヒトTNF- スタンダード、および非標識抗ヒトTNF- 抗体を使用する競合免疫アッセイにより生物学的液体中で測定することができる。

【0068】

本発明による抗ヒトTNF- dAbをまた、ヒト以外の種、例えばチンパンジー、マーモセット、アカゲザル、マウス、ブタからのTNF- を検出するために使用してもよい。

【0069】

本発明による抗ヒトTNF- dAbをまた、TNF- 活性を阻害することが望まれる細胞培養の応用で使用してもよい。

【0070】

第四の態様において本発明は、本発明の第二の態様による薬剤組成物を被験者に投与することを含む、ヒト被験者におけるヒトTNF- 活性により特徴づけられる疾病を治療するための方法を提供する。

【0071】

ヒトTNF- 活性により特徴づけられる疾病は、疾病に苦しむ被験者におけるTNF- の存在が、疾病の病態生理学の原因である、または疾病の悪化に寄与する要素であるかのいずれかであると示されている、または推測される、疾患および他の疾病を含むことが意図されている。好ましくはヒトTNF- 活性により特徴づけられる疾病は、以下からなる群より選択される：炎症、炎症疾患、ならびに敗血症性ショック、内毒素性ショック、グラム陰性菌敗血、および有毒ショック症候群を含む敗血症；関節リウマチ、リウマチ性脊椎炎、変形性関節症、および痛風性関節炎を含む自己免疫疾患、アレルギー、多発性硬化症、自己免疫性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜炎、およびネフローゼ症候群；感染による発熱および筋肉症を含む伝染病、ならびに感染に続いておこる悪液質；移植片対宿主拒絶反応；腫瘍増殖または転移；成人呼吸窮迫症候群、ショック肺、慢性肺炎症性疾患、肺サルコイドーシス、肺線維症、および珪肺症を含む肺疾病；クローン病および潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患；心臓疾病；炎症性骨疾病、肝炎、凝固障害、火傷、再かん流傷害、ケロイド形成、および瘢痕組織形成。

【 0 0 7 2 】

ここで「含む(comprise)」または「含む(comprises)」、「含んでいる(comprising)」のような変化は、記述される要素、整数、または工程、あるいは要素、整数、または工程の群の含有を暗示するが、他のいずれかの要素、整数、または工程、あるいは要素、整数、または工程の群の排除を暗示しないと理解される。

【 0 0 7 3 】

ここで言及される全ての文献は、言及されてここに取り込まれる。ここに含まれている文献、行為、材料、装置、物品またはその類似物のいずれの議論も、本発明のための内容を提供するためのみにある。これらのもののいずれかまたは全てが、先行技術の基礎の一部を形成する、あるいは、本出願の優先日以前にオーストラリアまたは別のどこかに存在したために、本発明に関係する分野で普通の一般知識であったことを承認すると受け取られることはない。

10

【 0 0 7 4 】

本発明の性質をより明確に理解するために、その好ましい形態が以下の非限定的実施例に言及していき記述されるであろう。

【 実施例 】

【 0 0 7 5 】

< 実施例 1 材料と方法 >

【 0 0 7 6 】

ヒトV リーダー配列および組換えシグナル配列(RSS)に基づく縮重プライマーは、Walt eおよびTomlinson, Antibody Engineering: A Practical Approach (1996)に由来した。生殖細胞V DNAの増幅に使用されるプライマーは以下のとおりである：

20

< プライマー-VK1BL >

AATCKCAGGTKCCAGATG (配列番号 1 1)

< プライマー-VK1BL35a >

GTTYRGGTTKKGTAACACT (配列番号 1 2)

< プライマー-VK1BL35b >

ATGMCTTGTTWACACTGTG (配列番号 1 3)。

【 0 0 7 7 】

ゲノムPCR (30サイクル) を、プライマー対VK1BLxVK1BL35aまたはVK1BLxVK1BL35bのいずれかと、Taqポリメラーゼを使用して実行した。クローン化される配列、および使用される前記2組のプライマーセットの間に重複が存在した。

30

【 0 0 7 8 】

PCR産物をInvitrogenのTOPO TAクローニングキット (カタログ番号 K4500-01) にクローニングし、ならびにM13フォワードおよびpUCリバースプライマーで配列解析した。フォワードおよびリバース方向で配列を確認した。鍵となる配列がPCRエラーを被らないために、PCRおよびクローニングプロセスを、マーモセット配列に対して2回繰り返した。ヌクレオチド (配列番号 1 4 から 2 4 および配列番号 3 6 から 4 1) ならびにアミノ酸 (配列番号 2 5 から 3 5 および配列番号 4 2 から 4 7) は、図 2 に与えられる。マーモセット配列 1、2、および3を確認した。配列 4、5、6、7、および8が最初のPCRのみで見られた。配列 9、10、および11が繰り返し (すなわち2番目の) PCRおよびクローニングで見られた。

40

【 0 0 7 9 】

< オリゴ合成およびアクセプター配列へのクローニング >

【 0 0 8 0 】

4つのCDR配列、すなわちフクロウサル配列 1 (配列番号 4 2) からのAATKLQS (配列番号 1)、フクロウサル配列 2 (配列番号 4 3) からのEASSLQS (配列番号 2)、マーモセット配列 1 (配列番号 2 5) からのEASKLQS (配列番号 3)、マーモセット配列 2 (配列番号 2 6) からのSASNLET (配列番号 4) が、図 2 に説明されて示されるアミノ酸配列より選択された。フクロウサル配列 5、YASSLQS (配列番号 4 8) が、アオテュス・ナンサ

50

イナアエ(*Aotus nancyinae*)(マのヨザル、Ma's night monkey)cDNA配列と同一であることが発見され、他の全ての配列は独自のものであった。

【0081】

発現ベクター(Domantis proprietary vector)中のアクセプター可変領域(抗TNFドメイン抗体)配列を、制限断片地図に示されるように、FR2ならびにCDR2の大部分を切除するKpnIおよびSmaIで順次切断した(25 µg)。その後ベクターを精製し、野生型FR2およびCDR2配列を切除した。

【0082】

オリゴ対(図4Aおよび4Bに示される、各500 pmol)を95°Cで5分間、その後65°Cで5分間インキュベートし、そして熱ブロック上でゆっくりと室温に達するようにすることにより、オリゴのアニールを実行した。その後、dNTP存在下でクレノー反応の間に重複を埋め合わせた。

【0083】

<親和性成熟>

【0084】

マーモセットCDR移植dAb化合物145(配列番号7)を、配列番号7の配列を1アミノ酸残基でそれぞれ多様化した14種の別個のライブラリを構築することにより、親和性成熟させた。選択される残基を以下に影付で示す。

【表2】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLFGLWYQOKPGKPKLLIYSASNLETG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLTPEDFATYYCQQGKATFPGQGTKVEIKR

【0085】

成熟ヒトIgレパートリーで多様化されることが既知であるCDR1およびCDR3中の残基、ならびに関係するdAb中で遺伝子変異導入後機能性タンパク質を生産することが観察されているフレームワーク残基に基づいて選択はなされる。選択される残基それぞれについて、相補的フォワードおよびリバースPCRプライマーはNKK縮重(NKK degeneracy)とともに設計され、2種類の最初のPCR反応をそれぞれ遺伝子変異導入プライマーおよび隣接プライマーで実行した。クリーンアップ後、前記2種類のPCR産物をアニールさせ、その後隣接プライマーのみを使用して増幅した(PCRの重複伸長によるスプライシング; Lowman H. L. および Clackson T. 編, Phage Display: A practical approach, Oxford University Press, Oxford, UK)。クローンを最初、固相TNFを使用するELISAによりスクリーニングし、陽性クローンを配列解析した。dAbタンパク質を、最良のクローンより精製し、レセプター結合アッセイおよびL929細胞毒性アッセイで効能を評価した。化合物100(配列番号9)および化合物123(配列番号8)において、親のdAb、化合物145(配列番号7)よりも相対的に改善されるTNF中和を有することが発見された。化合物100(配列番号9)および化合物123(配列番号8)の親和性増強置換を組み合わせることにより、L929細胞毒性アッセイでさらに効能が改善した抗TNF dAbがもたらされた(化合物196(配列番号10))。

【0086】

<結果>

<レセプター結合アッセイ(RBA)および細胞毒性アッセイにおける抗TNF dAbクローンの効能>

TNFがそのレセプターに結合するのを阻害する、およびL929細胞のTNF仲介細胞毒性を中和する、抗TNF dAbの能力を以下に示す:

【0087】

<レセプター結合アッセイ>

【0088】

選択される14の位置で多様化されるdAbを、組換えTNFレセプター1に対するTNFの結合を

阻害する能力について試験した。簡単には、マキソープ(Maxisorp)プレートを、30 mg/mlの抗ヒトFcマウスモノクローナル抗体(Zymed, San Francisco, USA)と一晩インキュベートした。0.05% Tween-20を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)でウェルを洗浄し、その後PBS中の1% BSAでブロッキングし、100 ng/ml TNFレセプター1 Fc融合タンパク質(R&D Systems, Minneapolis, USA)とインキュベートした。洗浄されたウェルに最終濃度10 ng/mlで添加されるTNFと、各dAbを混合した。TNF結合を、0.2 mg/mlビオチン化抗TNF抗体(HyCult biotechnology, Uden, Netherlands)で検出し、ストレプトアビジンで標識されたセイウワサビエルオキシダーゼ(Amersham Biosciences, UK)で1倍から500倍に希釈し、その後TMB基質(KPL, Gaithersburg, USA)とインキュベートした。HClの添加により反応を停止し、450nmで吸光度を計測した。抗TNF dAb活性により、TNF結合の低下、およびそれゆえにTNFのみの対照と比較される吸光度の減少がもたらされる(図5)。

10

【0089】

<L929細胞毒性アッセイ>

【0090】

化合物100(配列番号9)および化合物123(配列番号8)を含む、小ライブラリ多様性アプローチ(minilibrary diversification approach)により同定される抗TNF dAbをまた、マウスL929線維芽細胞の細胞毒性を中和する能力について試験した(Evans, T. (2000) Molecular Biotechnology 15, 243-248)。簡単には、マイクロリットルプレート中に設置されるL929細胞を、抗TNF dAb、100 pg/ml TNF、および1 mg/mlアクチノマイシンD(Sigma, Poole, UK)と一晩インキュベートした。490nmの吸光度を測定することにより細胞生存率を測定し、その後3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム(Promega, Madison, USA)とインキュベートした。抗TNF dAb活性により、TNF細胞毒性の低下、およびそれゆえにTNFのみの対照と比較される吸光度の増加がもたらされる。親のdAb 化合物145(配列番号7)と比較した結果が図6に表される。

20

【0091】

広く記述される本発明の精神または範囲から逸脱することなく、特定の実施態様で示される本発明に対して無数の変化および/または改変がなされてよいことが、当業者により理解されるであろう。それゆえ、本実施態様は、あらゆる点で例示的であり、制限的ではないと考慮される。

30

【図面の簡単な説明】

【0092】

【図1】アクセプターdAbのアミノ酸(配列番号6)、およびヌクレオチド配列(配列番号5)を示す。

【図2-1】11種のマーモセットおよび6種のフクロウサルV 遺伝子セグメントのヌクレオチド、およびアミノ酸配列を示す。

【図2-2】図2-1のの続きを表す。

【図2-3】図2-2のの続きを表す。

【図2-4】図2-3のの続きを表す。

【図2-5】図2-4のの続きを表す。

40

【図3】アクセプターdAbのアミノ酸(配列番号6)、およびヌクレオチド配列(両方の鎖; 配列番号5および5')を示す。CDR2を含む領域を切除するKpnIおよびSanDIの制限酵素切断部位を図中に示す。切除されるCDR2残基を下線で示す。

【図4】図2で示されるヌクレオチド(A; それぞれ、配列番号5、36、54から56、37、57から59、14、60から62、15、63から65)、およびアミノ酸(B; それぞれ、配列番号6、42、66から68、43、69から71、25、72から74、26、75から77)配列のクローニングおよび最終配列確認の間に使用されるオリゴヌクレオチドを示す配列アラインメントを示す。

【図5】TNFが組換えTNFレセプターに結合することを阻害するCDR2移植dAbの能力を示す。試験されるdAbは以下のとおりである: フクロウサル1(CDR=AATKLQS; 配列番号1),

50

フクロウサル 2 (CDR=EASSLQS ; 配列番号 2)、マーモセット 1 (CDR=EASKLQS ; 配列番号 3)、マーモセット 2 (CDR=SASNLET ; 配列番号 4)、およびアクセプター (CDR=SASELQS ; 配列番号 49)。

【図 6】アクセプター-dAb (化合物 145) に対して相対的な、マウス L929 線維芽細胞に対する TNF の細胞毒性活性を中和する化合物 100 および 123 の改善される能力を示す。

。

【図 1】

FIGURE 1

1 GAC ATO CAG AAG ACC CAG TCT GCA TCC TCT CYS TCT GCA TCT GTA 45
 1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val 15
 46 GGA GAC CTT CTC ACC ATC ACT TGC GCG GCA AGT CAG AUC ATT GAT 90
 5 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp 30
 91 AGT VAT TTA CAT TGC CAG CAG AAA CCA GCG AAA CCC CTT AGG 135
 31 Ser Tyr Leu His Thr Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys 45
 136 CTC CTG ATC TAT AGT GGA TCC GAG TGG CAA AGT GCG GTC CCA TCA 180
 46 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Gln Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser 60
 181 CTT TTC AGT GCG AGT GGA TCT GCG ACA CAT TTC ACT CTC ACC ATT 225
 61 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile 75
 226 AOC AGT CTC CAA CCG GAA CAT TTT GGT ACC TAC TAT CAA CAG 270
 76 Ser Ser Leu Gln Pro Gln Asp Phe Ala Thr Tyr Cys Gln Gln 90
 271 GTT GTC TGG CTT CTT TTT ACG TTC GAC CAA GCG ACC AAG GTG GAA 315
 15 91 Val Val Thr Arg Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln 105
 316 ATC AAA CCG 324
 106 Ile Lys Arg

【図 2 - 1】

<マーモセット配列>

マーモセット核酸配列 1 (配列番号 14)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAGTCACCATC
 ACTTGCCGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGACA
 GTCCCTAAGCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAGTGGGTGCCATCAAGGTTTCAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGACGCTGAAGATGCTGCA
 ACTTATTACTGTCTAG

マーモセット核酸配列 2 (配列番号 15)

GACATCCAGATGATCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGATCACCATC
 ACTTGCTGGCAAGTCAGGATATTAGCCACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAA
 GCCCTAAGCTCCTGATCTATAGTGCATCAAAATTTAGAAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGT
 GGAAGTGGATCCAGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCA
 ACATATTACTGTCAA

マーモセット核酸配列 3 (配列番号 16)

GACATCCAGATGACCCAGATCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGATCACCATC
 ACTTGCCGGCGCAAGTCAGGATATTAGCCACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAA
 GCCCTAAGCTCCTGATCTATGAGGCATCAAAATTTGCAAGTGGGTGCCATCAAGATTCAGC
 GGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCA
 ACATATTACTGTCAA

マーモセット核酸配列 4 (配列番号 17)

GACATCCAGATGATCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGATCACCATC
 ACTTGCTGGCAAGTCAGGATATTAGCCACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAA
 GCCCTAAGCTCCTGATCTATAGTGCATCAAAATTTAGGAACAGGGGTGCCATCAAGGTTTCAGT
 GGAAGTGGATCCAGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCA
 ACATATTACTGTCAA

マーモセット核酸配列 5 (配列番号 18)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAGTCACCATC
 ACTTGCCGGCGGTGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGACA
 GTCCCTAAGCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAGTGGGTGCCATCAAGGTTTCAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
 ACTTATTACTGTCTAG

【図 2 - 2】

マーモセット核酸配列 6 (配列番号 19)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGCAGAGTTACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGCATTAAGTAATTAATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGACA
ACTCCTAGGCTCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTACAAACTGGGATTCCTCTCTGGTTACG
GGCAGTGGATCTGGGACAGACTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATGCTGCA
ATTTATTACTGTCAA

マーモセット核酸配列 7 (配列番号 20)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGCATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGACA
GTCCCTAAGCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGTTCCCATCAAGGCTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTCTAG

マーモセット核酸配列 8 (配列番号 21)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGCATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGACA
GTCCCTAAGCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGTTCCCATCAAGGTTCTAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTCTAG

マーモセット核酸配列 9 (配列番号 22)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTACCGTCT
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGCATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGACA
GTCCCTAAGCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGTTCCCATCAAGGTTCTAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTCTAG

マーモセット核酸配列 10 (配列番号 23)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGCATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGACA
GTCCCTAAGCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGTTCCCATCAAGGTTCTAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTCTAG

【図 2 - 4】

マーモセットアミノ酸配列 10 (配列番号 34)

DIQMTQSPFSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTIVLPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCY

マーモセットアミノ酸配列 11 (配列番号 35)

DIQMTQSPFSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTIVPKPLIYEASKLQSGVPLRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCY

< フクロウサル配列 >

フクロウサル核酸配列 1 (配列番号 36)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGACAGGAGACAGAGTCACCATC
ACCTGCCAGGTGAGTCAGGGAATTAGCAGTGAATTAATCTTGGTATCAGCAGAAACCAAGGACA
GCCCTATGCTCTTGTATCTATGCTGCAACAAATTGCAAGTGGGAAATCCCATCTCGGTTTCAGT
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCT
ACTTATTACTGTCAA

フクロウサル核酸配列 2 (配列番号 37)

GACATCCAGATGACCCAGTCTGCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
ACTTGCCAGGCGAGTCAGGCAATTACCAAGTGAATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGACA
GCCCTAAGCTCTCTGATCTATGAGGCATCCAGTTTACAAAGCGAGGTCCCATCAAGGTTTCAGT
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGTA
ACTTATTACTGTCAA

フクロウサル核酸配列 3 (配列番号 38)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAAGACATTTACAAATTAATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGACA
ACTCTAGGCTCTTGTATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAACTGGGATTCCTCTCGGTTTCAGT
GGCAGTGGATCTGGGACAGACTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCC
ACTTATTACTGTCAA

フクロウサル核酸配列 4 (配列番号 39)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGCCTGCTGCATCTGTAGGAGACAAAGTACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGTAATTAAGCAGCTGGTATGCTGCTATCAGCAGAAACCAAGGACA
GCCCTAAGCTCTCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGTTCCCATCAAGGTTTCAGT
GGAAGTGGATCTGGGACAGATTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATCGCA
ACATATTACTGTCAA

【図 2 - 3】

マーモセット核酸配列 11 (配列番号 24)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGCATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGACA
GTCCCTAAGCCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGTTCCCATTAAGGTTTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTCTAG

マーモセットアミノ酸配列 1 (配列番号 25)

DIQMTQSPFSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTIVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCY

マーモセットアミノ酸配列 2 (配列番号 26)

DIQMTQSPFSLTASVGGDRVTITCWSQGISHWLAWYQQKPGKAPKLLIYASNLGTGVPSRFS
GSGSRDFTLTISSLQPEDAATYYCY

マーモセットアミノ酸配列 3 (配列番号 27)

DIQMTQSPFSLTASVGGDRVTITCRASQGISHWLAWYQQKPGKAPKLLIYASNLGTGVPSRFS
GSGSRDFTLTISSLQPEDAATYYCY

マーモセットアミノ酸配列 4 (配列番号 28)

DIQMTQSPFSLTASVGGDRVTITCWSQGISHWLAWYQQKPGKAPKLLIYASNLGTGVPSRFS
GSGSRDFTLTISSLQPEDAATYYCY

マーモセットアミノ酸配列 5 (配列番号 29)

DIQMTQSPFSLTASVGGKVTITCRACQDINKWLAWYQQKPGTIVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCY

マーモセットアミノ酸配列 6 (配列番号 30)

DIQMTQSPFSLTASVGGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKTPRLLIYAASSLQTGIPSRFS
GSGSGTDYTLTISSLQSEDAATYYCY

マーモセットアミノ酸配列 7 (配列番号 31)

DIQMTQSPFSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTIVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCY

マーモセットアミノ酸配列 8 (配列番号 32)

DIQMTQSPFSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTIVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCY

マーモセットアミノ酸配列 9 (配列番号 33)

DIQMTQSPFSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTIVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCY

【図 2 - 5】

フクロウサル核酸配列 5 (配列番号 40)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGACAAAGTACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGCAATTAGCAATAATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGACA
GCCCTAAGCCCCTGATCTATGCTGATCCAGTTTGCAAAGCGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACCACAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA
ACTTATTACTGTCAA

フクロウサル核酸配列 6 (配列番号 41)

GACACACAGATGATCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
ACTTGCCAGGCGAGTCAGAGTATTAGCAGCTGGTATGCTGATCAGCAGAAACCAAGGACA
GTCCCTAAGCCTCTGATCTATGAGCATCCAAATTTGCTAAGTGGGTTCCCATCAAGGTTTCAGT
GGCTGTGGATCTGGGACAGATTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA
ACTTATTACTGTCAA

フクロウサルアミノ酸配列 1 (配列番号 42)

DIQMTQSPFSLTASAGDRVTITCQSGISSELLWYQQKPGKAPMLLIYAATKLQSGIPSRFS
GHGSGTDFTLTISSLQPDFAATYYCY

フクロウサルアミノ酸配列 2 (配列番号 43)

DIQMTQSAFSLTASVGGDRVTITCQSGITBDLAWYQQKPGNASKLLIYEASSLQSEVPSPRFS
GSGSGRDFTLTISSLQPEDFVATYYCY

フクロウサルアミノ酸配列 3 (配列番号 44)

DIQMTQTPBSLSASVGGDRVTITCRASQDIYNLAWYQQKPGKTPRLLIYAASSLQTGIPSRFS
GSGSGTDYTLTISSLQPDFAATYYCY

フクロウサルアミノ酸配列 4 (配列番号 45)

DIQMTQTPBSLPASVGGKVTITCRASQGISHWLAWYQQKPGKAPKLLIHKASNLGTGVPSRFS
GSGSGDFTLTISSLQPEDAATYYCY

フクロウサルアミノ酸配列 5 (配列番号 46)

DIQMTQSPFSLTASVGGKVTITCRASQGISNNLAWYQQKPGKAPKPLIYASSLQSGVPSRFS
GSGSGADYTLTISSLQPEDFATYYCY

フクロウサルアミノ酸配列 6 (配列番号 47)

DIQMTQSPFSLTASVGGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGTIVPKPLIYDASKLLSGVPSRFS
GSGSGDFTLTISSLQPEDFATYYCY

【図 3】

【配列番号 6】

【配列番号 5】

【配列番号 53】

5

81

91

10

161

161

15

241

241

20

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

321

【図 4 A】

【配列番号 1】	アミノ酸配列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
----------	--------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

【図 4 B】

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

【配列表】

0005179374000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 21/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 17/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/02	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	P
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	

- (72)発明者 ベンジャミン・ピー・ウールヴェン
イギリス・C B 4・0 W G・ケンブリッジシャー・ケンブリッジ・ケンブリッジ・サイエンス・パーク・3 1 5
- (72)発明者 イアン・エム・トムリンソン
イギリス・C B 4・0 W G・ケンブリッジシャー・ケンブリッジ・ケンブリッジ・サイエンス・パーク・3 1 5
- (72)発明者 ジェニファー・エー・リー
イギリス・C B 4・0 W G・ケンブリッジシャー・ケンブリッジ・ケンブリッジ・サイエンス・パーク・3 1 5
- (72)発明者 アンソニー・ジェラルド・ドイル
オーストラリア・ニュー・サウス・ウェールズ・2 0 4 7・ドラモイン・プランケット・ストリート・6 ビー
- (72)発明者 フィリップ・アンソニー・ジェニングス
オーストラリア・ニュー・サウス・ウェールズ・2 0 7 4・ワラウィー・オズワルド・クロース・5

審査官 清水 晋治

- (56)参考文献 国際公開第 9 3 / 0 0 2 1 0 8 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 8 8 2 0 (WO, A 2)
国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 8 8 2 2 (WO, A 2)
国際公開第 2 0 0 4 / 1 0 1 7 9 0 (WO, A 1)
Nature biotechnology. 2005 Sep, Vol.23, No.9, p.1126-1136
Trends in biotechnology. 2003, Vol.21, No.11, p.484-490
Immunogenetics. 2001, Vol.53, No.7, p.557-563
Immunogenetics. 2005 Oct, Vol.57, No.9, p.655-664
Immunogenetics. 2005 May, Vol.57, No.3-4, p.210-218

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
C12N 15/00-15/90
C07K 14/00-19/00

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

UniProt/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq