(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2013-538566
(P2013-538566A)
(43)公表日　平成25年10月17日(2013.10.17)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B024
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18	ZNA	4B064
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4C085
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4H045
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	Y	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 89 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-523643 (P2013-523643)
(86)(22)出願日　平成23年8月12日 (2011.8.12)
(85)翻訳文提出日　平成25年4月5日 (2013.4.5)
(86)国際出願番号　PCT/EP2011/063999
(87)国際公開番号　WO2012/020143
(87)国際公開日　平成24年2月16日 (2012.2.16)
(31)優先権主張番号　61/373,397
(32)優先日　平成22年8月13日 (2010.8.13)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　513032275
グラクソスミスクライン、インテレクチュアル、プロパティー、ディベロップメント、リミテッド
GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED
イギリス国ミドルセックス、ブレントフォード、グレート、ウエスト、ロード、９８Ｏ
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節

最終頁に続く

(54)【発明の名称】改良された抗血清アルブミン結合変異体

(57)【要約】
本発明は、抗血清アルブミン免疫グロブリン単一可変ドメインの改良された変異体、ならびにそのような変異体を含むリガンドおよび薬物コンジュゲート、組成物、核酸、ベクターおよび宿主に関する。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
アミノ酸配列の28、29、30、31、32、36、46、49、50、51、53、67、68、90、91、92、93又は94位のうちの少なくとも一つにアミノ酸置換を含んでなる、DOM7h-11(配列番号125)若しくはDOM7h-14(配列番号123)の抗血清アルブミン(SA)免疫グロブリン単一可変ドメイン変異体又はDOM7h-11(配列番号125)若しくはDOM7h-14(配列番号123)のアミノ酸配列と少なくとも96、97、98又は99%同一なアミノ酸配列を有する誘導体。
【請求項２】
アミノ酸配列の30、31、32、49、50、51、53、67、91又は94位のうちの少なくとも一つにアミノ酸置換を含む、請求項1に記載の抗血清アルブミン(SA)免疫グロブリン単一可変ドメイン変異体。
【請求項３】
アミノ酸配列の28、29、30、31、32、36、46、49、50、51、53、67、68、90、91、92、93又は94位のうちの少なくとも一つにアミノ酸置換を含んでなる、DOM7h-11-3(配列番号2)若しくはDOM7h-11-15(配列番号1)若しくはDOM7h-11-12(配列番号157)の抗血清アルブミン(SA)免疫グロブリン単一可変ドメイン変異体又はDOM7h-11-13(配列番号2)若しくはDOM7h-11-15(配列番号1)のアミノ酸配列と少なくとも96、97、98又は99%同一なアミノ酸配列を有する誘導体。
【請求項４】
アミノ酸配列の30、31、32、49、50、51、53、67、91又は94位のうちの少なくとも一つにアミノ酸置換を含む、請求項3に記載の抗血清アルブミン(SA)免疫グロブリン単一可変ドメイン変異体。
【請求項５】
アミノ酸配列のGly30、Thr31、Met32、Leu49、Ala50、Phe51、Arg53、Ser67、Ala91又はHis94位のうちの少なくとも一つにアミノ酸置換を含んでなる、DOM7h-11-15(配列番号1)の抗血清アルブミン(SA)免疫グロブリン単一可変ドメイン変異体又はDOM7h-11-15(配列番号1)のアミノ酸配列と少なくとも96、97、98又は99%同一なアミノ酸配列を有する誘導体。
【請求項６】
アミノ酸配列のGly30、Thr31、Thr32、Leu49、Trp50、Asn51、Arg53、Ser67、Ala91又はHis94位のうちの少なくとも一つにアミノ酸置換を含んでなる、DOM7h-11-3(配列番号2)の抗血清アルブミン(SA)免疫グロブリン単一可変ドメイン変異体又はDOM7h-11-3(配列番号2)のアミノ酸配列と少なくとも96、97、98又は99%同一なアミノ酸配列を有する誘導体。
【請求項７】
置換が保存的アミノ酸置換である、請求項1から6のいずれかに記載の変異体。
【請求項８】
DOM7h-11-15(配列番号1)の変異体であり、DOM7h-11-15(配列番号1)と比較して、以下:
アミノ酸:
Gly30位=Pro、Ala
Thr31位=Ser
Thr32位=Ser
Leu49位=ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、Phe
Trp50位=Tyr、Phe
Asn51位=Gln
Arg53位=Lys、Gln、Asn
Ser67位=Thr、Ala、Cys
Ala91位=Val、Leu、Ile
His94位=Asn、Gln、Lys、Arg
から選択される少なくとも一つの突然変異を含む、請求項7に記載の変異体。

【請求項９】
DOM7h-11-3(配列番号2)の変異体であり、DOM7h-11-15(配列番号2)と比較して、以下:
アミノ酸
Gly30位=Pro、Ala
Thr31位=Ser
Thr32位=Ser
Leu49位=ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、Phe
Trp50位=Tyr、Phe
Asn51位=Gln
Arg53位=Lys、Gln、Asn
Ser67位=Thr、Ala、Cys
Ala91位=Val、Leu、Ile
His94位=Asn、Gln、Lys、Arg
から選択される少なくとも一つの突然変異を含む、請求項7に記載の変異体。
【請求項１０】
置換が非保存的アミノ酸置換である、請求項1から6のいずれかに記載の変異体。
【請求項１１】
SAが、ヒト血清アルブミン(HSA)である、請求項1から10のいずれかに記載の変異体。
【請求項１２】
HSA(配列番号81に記載されているアミノ酸配列を有する)のアミノ酸227、228、229、230、232、233、263、307、308、309、314、317、318、321、322、325、326、329及び333によって定義される境界面の少なくとも一部を含むエピトープに結合するHSA結合部分。
【請求項１３】
HSAのアミノ酸228、230、308、309、317、318、321、322、325、326及び329によって定義される境界面の少なくとも一部を含む、請求項12に記載のHSA結合部分。
【請求項１４】
表面プラズモン共鳴によって決定される、約0.1から約10000nMまで、場合により約1から約6000nMまでの解離定数(KD)でヒトSAに特異的に結合する結合部位を含む、請求項1から13のいずれかに記載の変異体又は結合部分。
【請求項１５】
表面プラズモン共鳴によって決定される、約1.5×10^{-4}から約$0.1sec^{-1}$まで、場合により約3×10^{-4}から約$0.1sec^{-1}$までの解離速度定数(K_d)でヒトSAに特異的に結合する結合部位を含む、請求項1から14のいずれかに記載の変異体又は結合部分。
【請求項１６】
表面プラズモン共鳴によって決定される、約2×10^{6}から約$1\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$まで、場合により約$1\times10^{6}$から約$2\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$までの結合速度定数($K_a$)でヒトSAに特異的に結合する結合部位を含む、請求項1から15のいずれかに記載の変異体又は結合部分。
【請求項１７】
表面プラズモン共鳴によって決定される、約0.1から約10000nMまで、場合により約1から約6000nMまでの解離定数(KD)でカニクイザルSAに特異的に結合する結合部位を含む、請求項1から16のいずれかに記載の変異体又は結合部分。
【請求項１８】
表面プラズモン共鳴によって決定される、約1.5×10^{-4}から約$0.1sec^{-1}$まで、場合により約3×10^{-4}から約$0.1sec^{-1}$までの解離速度定数(K_d)でカニクイザルSAに特異的に結合する結合部位を含む、請求項1から17のいずれかに記載の変異体又は結合部分。
【請求項１９】
表面プラズモン共鳴によって決定される、約2×10^{6}から約$1\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$まで、場合により約$1\times10^{6}$から約$5\times10^{3}M^{-1}sec^{-1}$までの結合速度定数($K_a$)でカニクイザルSAに特異的に結合する結合部位を含む、請求項1から18のいずれかに記載の変異体又は結合部分。
【請求項２０】

請求項1から19のいずれかに記載の任意の抗SA変異体又はSA結合部分及びSA以外の標的抗原に特異的に結合する結合部分を含む多重特異性リガンド。

【請求項２１】

請求項1から20のいずれかに記載の変異体又は結合部分を含む融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物。

【請求項２２】

請求項1から21のいずれかに記載の変異体、融合タンパク質又はリガンド及び薬学的に許容される賦形剤、担体、添加剤又はビヒクルを含む組成物。

【請求項２３】

請求項1から22のいずれかに記載の変異体、結合部分、多重特異性リガンド又は融合タンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む核酸。

【請求項２４】

患者の疾患又は障害を治療又は予防する方法であって、少なくとも1用量の、本発明の任意の態様又は実施形態による変異体を前記患者に投与するステップを含む方法。

【請求項２５】

抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインの親和性成熟のための方法であって、抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインを取得するステップと、抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインのアミノ酸配列の28、29、30、31、32、36、46、49、50、51、53、67、68、90、91、92、93又は94位のうちのいずれか一つのアミノ酸において突然変異を導入するステップとを含む方法。

【請求項２６】

30、31、32、49、50、51、53、67、91若しくは94位のアミノ酸配列におけるアミノ酸のいずれか一つにおいて突然変異を導入するステップを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項２７】

抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインの結合親和性を改変する方法であって、抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインのアミノ酸配列の30、31、32、49、50、51、53、67、91又は94位のうちのいずれか一つのアミノ酸に突然変異を起こさせるステップを含む方法。

【請求項２８】

SA結合部分を同定する方法であって、アミノ酸213～229、231～238、321～331、334～342若しくは348～357;又は213～219、222～228、231～238、311～218、321～324、329～333若しくは347～357;又は321～326若しくは329～331によって定義されるHSAの部分を取得するステップであって、アミノ酸残基への言及が配列番号81において記載されているアミノ酸への言及であるステップと、結合アッセイ又はスクリーニングにおいて前記部分を使用するステップとを含む方法。

【請求項２９】

DOM7h-11-3(配列番号2)を含む抗血清アルブミン(SA)免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項３０】

DOM7h-11-12(配列番号157)を含む抗血清アルブミン(SA)免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項３１】

DOM7h-11-15(配列番号1)を含む抗血清アルブミン(SA)免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、抗血清アルブミン免疫グロブリン単一可変ドメインの改良された変異体、ならびにそのような変異体を含むリガンドおよび薬物コンジュゲート、組成物、核酸、ベクターおよび宿主に関する。本発明はまた、こうした抗血清アルブミン免疫グロブリン単一可変ドメインにより結合される血清アルブミン中のエピトープの同定および血清アルブミ

ンと接触するそうした抗血清アルブミン免疫グロブリン単一可変ドメイン内の具体的なアミノ酸残基に関する。

【背景技術】

【０００２】

WO04003019およびWO2008/096158は、治療上有用な半減期を有する抗血清アルブミン(SA)結合成分、例えば抗SA免疫グロブリン単一可変ドメイン(dAb)を開示している。これらの公報は、単量体の抗SA dAbだけでなく、そのようなdAbを含む多重特異性リガンド、例えば抗SA dAbと標的抗原(TNFR1など)に特異的に結合するdAbとを含むリガンドを開示している。2種以上の動物種に由来する血清アルブミンに特異的に結合する結合成分、例えばヒト/マウス交差反応性抗SA dAbが開示されている。

【０００３】

WO05118642およびWO2006/059106は、薬物の半減期を増加するために、その薬物に抗SA結合成分、例えば抗SA免疫グロブリン単一可変ドメイン、をコンジュゲート化または会合させるという概念を開示している。タンパク質、ペプチドおよびNCE(新規化学物質)の薬物が開示され、かつ例示されている。WO2006/059106は、インスリン分泌増強薬、例えばグルカゴン様ペプチド(GLP)-1などのインクレチンホルモン、の半減期を高めるために、この概念を使用することを開示している。

【０００４】

Holt et al,“Anti-Serum albumin domain antibodies for extending the half-lives of short lived drugs”, Protein Engineering, Design & Selection, vol 21, no 5, pp283-288, 2008をも参照されたい。

【０００５】

WO2008/096158には、優れた抗SA dAbであるDOM7h-11およびDOM7h-14の名称を与えられた分子が開示されている。PCT/EP2010/060112はVH AlbudAbおよびその親和性成熟誘導体を記載している。DOM7h-11もしくはDOM7h-14または改善されたVH AlbudAb(商標)の変異体であり、かつ血清アルブミン、好ましくはヒトおよび非ヒト種由来のアルブミンに特異的に結合する、改良されたdAbを提供することが望ましく、こうした改良型のdAbは、疾患の動物モデルにおいて、ならびにヒトの治療および/または診断において有用性があると考えられる。また、相対的に中程度の親和性から高度の親和性の抗SA結合成分(dAb)の選択肢を与えることも望ましいと考えられる。そのような成分は薬物に連結させることが可能であり、抗SA結合成分は意図された最終用途に応じて選択される。それによって、薬物は、抗SA結合成分の選択に応じて、慢性または急性の適応症を治療および/または予防するために、より良く調整することができるようになるだろう。さらに、単量体状態であるか、または溶液中で実質的にそのような状態である抗SA dAbを提供することが望ましいと考えられる。このことは、抗SA dAbがTNFR1などの細胞表面受容体に特異的に結合する結合成分(例えば、dAb)と、その受容体に拮抗することを目的として、連結される場合に、特に有利であろう。抗SA dAbの単量体状態は、多量体を形成する可能性が低いので、受容体架橋の機会を減らすのに有用である。多量体は、細胞表面上の受容体(例えば、TNFR1)に結合してそれらを架橋し、したがって、受容体アゴニズムおよび有害な受容体シグナル伝達の可能性を高めると考えられる。

【０００６】

SAは豊富な血清タンパク質であり、ヒト血清アルブミン（HSA）はいくつかの慣用される薬物(例えばワルファリン，ジアゼパム，イブプロフェン)(例えばGhuman et al. J. Mol. Biol. 2005, 353, 38052に記載)に結合することで知られている。既知のHSA-薬剤相互作用を妨害しない抗SA結合部分を提供することは有用である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００７】

【特許文献１】WO04003019

【特許文献２】WO2008/096158

【特許文献３】WO05118642
【特許文献４】WO2006/059106
【特許文献５】PCT/EP2010/060112
【非特許文献】
【０００８】
【非特許文献１】Protein Engineering, Design & Selection, vol 21, no 5, pp. 283-288, 2008
【非特許文献２】J. Mol. Biol. 2005, 353, 38052
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
改良された抗SA dAbは、PCT/EP2010/052008及びPCT/EP2010/052007に記載されている。PCT/EP2010/060112は、V_H AlbudAb及び親和性成熟したその誘導体を記載している。
【００１０】
本明細書に記載されているように、抗SA dAbとSAとの間の結合相互作用は、三つの異なる技術を使用して同定された。したがって本発明者らは、改良された抗SA dAbとHSAのドメインIIとの間の特異的相互作用を同定し、こうして抗SA dAbによる結合に関与しているHSA内の残基及び結合相互作用に関与している抗SA dAbの残基を同定した。SAと相互作用する抗SA dAbの残基は、表22A及びBに記載されている。顕著な相互作用は、表22Aにおいて同定されており、一方、境界面における追加の残基は、表22Bにおいて同定されている。これらの表において同定されている残基のうちのいずれか一つが、SAとの相互作用を提供し得る。これらの残基は、変異体のSA結合を改変するために改変されていてもよい。
【課題を解決するための手段】
【００１１】
したがって、本発明の第一の態様において、アミノ酸配列の28、29、30、31、32、36、46、49、50、51、53、67、68、90、91、92、93又は94位のうちの少なくとも一つにアミノ酸置換を含む、DOM7h-11(配列番号125)若しくはDOM7h-14(配列番号123)の抗血清アルブミン(SA)免疫グロブリン単一可変ドメイン変異体、又はDOM7h-11(配列番号125)若しくはDOM7h-14(配列番号123)のアミノ酸配列と少なくとも96、97、98又は99%同一なアミノ酸配列を有する誘導体が提供される。アミノ酸配列の28、29、30、31、32、36、46、49、50、51、53、67、68、90、91、92、93又は94位は、挙げられている配列番号において記載されている配列における位置であり、これらの配列番号において示されている配列において記載されている残基に対応する。適切には、変異体は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16又は17のアミノ酸突然変異を含む。顕著な相互作用は、表22Aにおいて記載されている。したがって、一実施形態において、変異体は、アミノ酸配列の30、31、32、49、50、51、53、67、91又は94位のうちの少なくとも一つにアミノ酸置換を含む。適切には、変異体は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のアミノ酸突然変異を含む。そのような置換は、抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインDOM7h-11-3(配列番号2)、DOM7h-11-15(配列番号1)又はDOM7h14-10(配列番号83)中のこれらの位置において見出されるアミノ酸を提供すること、又は等価な保存的置換であってもよい。適切には、そのような置換は、SAへの結合親和性を改良するのに役立ち得る。一実施形態において、変異体は、DOM7h-11-3、DOM7h-11-15又はDOM7h-14-10から選択される単一可変ドメインではない。別の実施形態において、変異体は、PCT/EP2010/052008及びPCT/EP2010/052007において記載されている単一可変ドメインではない。
【００１２】
別の態様において、アミノ酸配列の28、29、30、31、32、36、46、49、50、51、53、67、68、90、91、92、93又は94位のうちの少なくとも一つにアミノ酸置換を含む、DOM7r-31(配列番号71)若しくはDOM7r-92(配列番号75)の抗血清アルブミン(SA)免疫グロブリン単一可変ドメイン変異体、又はDOM7r-31(配列番号71)若しくはDOM7r-92(配列番号75)のアミノ酸配列と少なくとも96、97、98又は99%同一なアミノ酸配列を有する誘導体が提供される

。一実施形態において、変異体は、単一可変ドメインDOM7r-92-4ではない。別の実施形態において、変異体は、PCT/EP2010/060112において記載されている単一変異体ドメインではない。

【００１３】

別の態様において、本発明は、アミノ酸配列の28、29、30、31、32、36、46、49、50、51、53、67、68、90、91、92、93又は94位のうちの少なくとも一つにアミノ酸置換を含む、DOM7h-11-3(配列番号2)若しくはDOM7h-11-15(配列番号1)の抗血清アルブミン(SA)免疫グロブリン単一可変ドメイン変異体、又はDOM7h-11-3(配列番号2)若しくはDOM7h-11-15(配列番号1)のアミノ酸配列と少なくとも96、97、98又は99%同一なアミノ酸配列を有する誘導体を提供する。適切には、変異体は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16又は17のアミノ酸突然変異を含む。この態様の一実施形態において、変異体は、アミノ酸配列の30、31、32、49、50、51、53、67、91又は94位のうちの少なくとも一つにアミノ酸置換を含む。適切には、変異体は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のアミノ酸突然変異を含む。

【００１４】

表22A又は22Bにおいて同定されている残基のいずれかにおけるアミノ酸置換は、抗SA dAbの結合特性の改変を可能にし得る。重要なことに、置換を行って、SAへの結合親和性を改変して、特定の用途のための所望の親和性を達成することができる。

【００１５】

したがって、本発明の任意の態様の実施形態は、良好な抗血清アルブミン親和性を有する抗SA dAb変異体を提供する。変異体の選択により、所望の治療的及び/又は予防的環境に従って半減期を調整することが可能となる。例えば、一実施形態において、血清アルブミンに対する変異体の親和性は比較的高く、その結果、変異体は、例えば慢性若しくは持続性の疾患、状態、毒性又は別の慢性の適応の治療及び/又は予防において有用である製品中への組み入れに有用となる。一実施形態において、血清アルブミンに対する変異体の親和性は比較的弱く、その結果、変異体は、例えば急性の疾患、状態、毒性又は別の急性の適応の治療及び/又は予防において有用である製品中への組み入れに有用となる。一実施形態において、血清アルブミンに対する変異体の親和性は中程度であり、その結果、変異体は、例えば急性若しくは慢性の疾患、状態、毒性又は別の急性又は慢性の適応の治療及び/又は予防において有用である製品中への組み入れに有用となる。

【００１６】

血清アルブミンに対して適度に高い親和性及び特異性を有する分子は、所望の治療効果を有するために十分に長く循環中にとどまることが考えられる(Tomlinson、Nature Biotechnology 22、521～522(2004))。この点で、高親和性抗SA変異体は、その種の血清アルブミンに一致している血漿循環中にとどまる(WO2008096158)。循環に入れば、AlbudAb(商標)変異体(AlbudAbは、抗血清アルブミンdAb又は免疫グロブリン単一可変ドメインである)に融合した治療薬は、それがNCE、ペプチド又はタンパク質のいずれであっても、結果としてその標的に対してより長く作用し、より長い持続的な治療効果を示すことができる。このことは、頻繁に投薬する必要なく慢性又は持続性の疾患を標的化することを可能とする。

【００１７】

弱い親和性(しかしSAへの特異性)を有する変異体は、血漿循環中に短時間(例えば、数時間又は数日間)のみとどまり、急性疾患に関与する治療標的を、融合した治療薬によって特異的に標的化することを可能にする。

【００１８】

このようにして、適度なアルブミン結合親和性及び/又は血清半減期を有する抗SA変異体を選ぶことによって、治療的疾患分野に合わせて抗SA含有製品を調整することが可能である。

【００１９】

一実施形態において、本発明は、アミノ酸配列のGly30、Thr31、Met32、Leu49、Ala50

、Phe51、Arg53、Ser67、Ala91又はHis94位のうちの少なくとも一つにアミノ酸置換を含む、DOM7h-11-15(配列番号1)の抗血清アルブミン(SA)免疫グロブリン単一可変ドメイン変異体、又はDOM7h-11-15(配列番号1)のアミノ酸配列と少なくとも96、97、98又は99%同一なアミノ酸配列を有する誘導体を提供する。

【００２０】

一実施形態において、置換が保存的アミノ酸置換である、本発明の任意の態様又は実施形態による変異体が提供される。適した保存的アミノ酸置換は当業者に知られており、本明細書において以下の本文中に例示される。適切には、保存的アミノ酸置換は、SAとの同様の接触相互作用を維持する。そのような保存的アミノ酸置換は、親分子への同様の結合親和性が維持されることを可能にし得る。

【００２１】

したがって、一実施形態において、変異体は、DOM7h-11-15と比較して、以下:

Gly30位=Pro、Ala
Thr31位=Ser
Thr32位=Ser
Leu49位=ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、Phe
Trp50位=Tyr、Phe
Asn51位=Gln
Arg53位=Lys、Gln、Asn
Ser67位=Thr、Ala、Cys
Ala91位=Val、Leu、Ile
His94位=Asn、Gln、Lys、Arg

から選択される少なくとも一つの突然変異を含む。

【００２２】

別の実施形態において、アミノ酸配列のGly30、Thr31、Thr32、Leu49、Trp50、Asn51、Arg53、Ser67、Ala91又はHis94位のうちの少なくとも一つにアミノ酸置換を含む、DOM7h-11-3(配列番号2)の抗血清アルブミン(SA)免疫グロブリン単一可変ドメイン変異体、又はDOM7h-11-3(配列番号2)のアミノ酸配列と少なくとも96、97、98又は99%同一なアミノ酸配列を有する誘導体が提供される。

【００２３】

適切には、変異体は、DOM7h-11-3と比較して、以下:

Gly30位=Pro、Ala
Thr31位=Ser
Thr32位=Ser
Leu49位=ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、Phe
Trp50位=Tyr、Phe
Asn51位=Gln
Arg53位=Lys、Gln、Asn
Ser67位=Thr、Ala、Cys
Ala91位=Val、Leu、Ile
His94位=Asn、Gln、Lys、Arg

から選択される少なくとも一つの突然変異を含むような保存的置換を含む。

【００２４】

本発明の任意の態様又は実施形態の別の実施形態において、置換は保存的置換ではない。SAへの結合に関与していることが知られている残基のうちの一つに非保存的置換/突然変異を導入することは、SAへの親和性を減少させる又は別の方法で変更させ得る一つの方法である。

【００２５】

本発明の任意の態様又は実施形態の一実施形態において、SAは、動物、例えば、哺乳動物、例えば、ヒト以外の霊長類(例えば、ヒヒ、アカゲザル又はカニクイザルなど)、マウ

ス、ヒト、ウサギ、ラット、イヌ、ネコ又はブタ由来のSAである。一実施形態において、SAはヒトSA(HSA)である。

【００２６】

別の態様において、本発明は、HSA(配列は配列番号81において示されている)のアミノ酸227、228、229、230、232、233、263、307、308、309、314、317、318、321、322、325、326、329及び333によって定義される境界面の少なくとも一部を含むエピトープに結合するHSA結合部分を提供する。一実施形態において、結合部分は、HSAのアミノ酸228、230、308、309、317、318、321、322、325、326及び329によって定義される境界面の少なくとも一部を含むエピトープに結合する。本発明において抗SA dAbによって例示される抗HSA結合部分と相互作用するHSAの残基は、表22A及びBにおいて記載されている。顕著な相互作用は、表22Aにおいて同定されており、一方、境界面における追加の残基は、表22Bにおいて同定されている。これらの表において同定されている残基のうちのいずれか一つが、HSAとHSA結合部分との間の相互作用を提供し得る。

【００２７】

適切には、結合部分は、アミノ酸配列の28、29、30、31、32、36、46、49、50、51、53、67、68、90、91、92、93又は94位において配列番号1又は2において同定されるアミノ酸を含んでいてもよく、これらのアミノ酸はSAへの結合を可能にする。しかしながら、これらのアミノ酸は、非免疫グロブリンタンパク質足場の誘導体であるドメインの一部であってもよい。一実施形態において、結合部分は抗体である。適切には、結合部分は、抗SA免疫グロブリン単一可変ドメイン抗体である。

【００２８】

一実施形態において、本発明の任意の態様又は実施形態による変異体又は結合部分は、表面プラズモン共鳴によって決定される、約0.1から約10000nMまで、場合により約1から約6000nMまでの解離定数(KD)でヒトSAに特異的に結合する結合部位を含む。別の実施形態において、本発明の任意の態様又は実施形態による変異体又は結合部分は、表面プラズモン共鳴によって決定される、約1.5×10^{-4}から約$0.1sec^{-1}$まで、場合により約3×10^{-4}から約$0.1sec^{-1}$までの解離速度定数(K_d)でヒトSAに特異的に結合する結合部位を含む。別の実施形態において、本発明の任意の態様又は実施形態による変異体又は結合部分は、表面プラズモン共鳴によって決定される、約2×10^{6}から約$1\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$まで、場合により約$1\times10^{6}$から約$2\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$までの結合速度定数($K_a$)でヒトSAに特異的に結合する結合部位を含む。さらなる実施形態において、本発明の任意の態様又は実施形態による変異体又は結合部分は、表面プラズモン共鳴によって決定される、約0.1から約10000nMまで、場合により約1から約6000nMまでの解離定数(KD)でカニクイザルSAに特異的に結合する結合部位を含む。またさらなる実施形態において、本発明の任意の態様又は実施形態による変異体又は結合部分は、表面プラズモン共鳴によって決定される、約1.5×10^{-4}から約$0.1sec^{-1}$まで、場合により約3×10^{-4}から約$0.1sec^{-1}$までの解離速度定数(K_d)でカニクイザルSAに特異的に結合する結合部位を含む。別の実施形態は、変異体が、表面プラズモン共鳴によって決定される、約2×10^{6}から約$1\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$まで、場合により約$1\times10^{6}$から約$5\times10^{3}M^{-1}sec^{-1}$までの結合速度定数($K_a$)でカニクイザルSAに特異的に結合する結合部位を含む、本発明の任意の態様又は実施形態による変異体又は結合部分を提供する。

【００２９】

本発明の一態様は、上述した通りの任意の抗SA変異体又はSA結合部分及びSA以外の標的抗原に特異的に結合する結合部分を含む多重特異性リガンドを提供する。

【００３０】

本発明の一態様は、本発明による任意の変異体又は結合部分を含む、融合タンパク質、コンジュゲート又は組成物を提供する。例えば、本発明は、上述した通りの任意の変異体又は結合部分へ、融合又はコンジュゲートした(NCEについて)ポリペプチド、タンパク質、ペプチド又はNCE薬物を含む、例えば、ペプチド又はNCE(新規化学物質)薬物との融合タンパク質又は融合体を提供する。一実施形態において、変異体又は結合部分は、それらを融合製品において有用にするパートナーに融合又はコンジュゲートした場合に、親和性の

わずかな低下のみをもたらす。本発明の一態様は、任意の前述の態様の変異体、融合タンパク質又はリガンド及び薬学的に許容される賦形剤、担体、添加剤又はビヒクルを含む組成物を提供する。

【００３１】

本発明の別の態様は、本発明の任意の態様又は実施形態による変異体、結合部分、多重特異性リガンド又は融合タンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。

【００３２】

別の態様は、本発明によるDOM7h-11、DOM7h-14、DOM7h-11-3若しくはDOM7h-11-15変異体のヌクレオチド配列、又は前記選択された配列と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。さらなる態様は、本発明の核酸を含むベクター及びそのようなベクターを含む単離宿主細胞を提供する。

本発明の一態様は、患者の疾患又は障害を治療又は予防する方法であって、少なくとも1用量の、本発明の任意の態様又は実施形態による変異体又は結合部分を前記患者に投与するステップを含む方法を提供する。本発明は、医薬として使用するための本発明による変異体又は結合部分をさらに提供する。

【００３３】

本発明の別の態様において、抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインの親和性成熟のための方法であって、抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインを取得するステップと、抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインのアミノ酸配列の28、29、30、31、32、36、46、49、50、51、53、67、68、90、91、92、93又は94位のうちのいずれか一つのアミノ酸において突然変異を導入するステップとを含む方法が提供される。一実施形態において、抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインは、DOM7h-11又はDOM7h-14のアミノ酸配列である又はそれから得られる。抗SA免疫グロブリン単一可変ドメイン分子を得るための方法が、例えば、PCT/EP2010/052008及びPCT/EP2010/052007において記載されている。一実施形態において、成熟はin silicoであってもよい。適したin silicoの方法は、例えば、Barderasら(2008)、PNAS、105、26、9029～9034ページにおいて記載されている。好ましくは、方法は、30、31、32、49、50、51、53、67、91若しくは94位のアミノ酸配列におけるアミノ酸のいずれか一つにおいて突然変異を導入するステップを含む。

【００３４】

別の態様は、抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインの結合親和性を改変する方法であって、抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインのアミノ酸配列の30、31、32、49、50、51、53、67、91又は94位のうちのいずれか一つのアミノ酸に突然変異を起こさせるステップを含む方法を提供する。適切には、抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインは、DOM7h-11又はDOM7h-14誘導体である。突然変異は、上述した通りの保存的又は非保存的アミノ酸置換を導入することであってもよい。

【００３５】

これらの態様において、適切には、親の抗SA免疫グロブリン単一可変ドメインと比較した場合に、成熟配列のSAへの結合親和性を改変するために、これらの位置のいずれか一つにおける突然変異が選ばれる。

【００３６】

本発明者らは、抗SA結合部分が結合することができる、血清アルブミンの特異的領域を同定した。有利には、この領域は、結合部分が結合することができる領域であり、結合相互作用が血清アルブミンの別の薬物結合特性に影響を及ぼさないように既知の薬物結合部位のいずれも妨害することなく、結合している部分の半減期を増加させるのに役立つ。同定された結合部分を使用して、この領域に優先的に結合する結合部分を同定することができる。

【００３７】

したがって、本発明の別の態様において、SA結合部分を同定する方法であって、アミノ酸213～229、231～238、321～331、334～342若しくは348～357;又は213～219、222～228

、231～238、311～218、321～324、329～333若しくは347～357;又は321～326若しくは329～331によって定義されるHSAの部分を取得するステップであって、アミノ酸残基への言及が配列番号81において記載されているアミノ酸への言及であるステップと、結合アッセイ又はスクリーニングにおいて前記部分を使用するステップとを含む方法が提供される。別の態様において、抗HSA結合剤を生成するための方法であって、アミノ酸213～229、231～238、321～331、334～342若しくは348～357;又は213～219、222～228、231～238、311～218、321～324、329～333若しくは347～357;又は321～326若しくは329～331によって定義されるHSAの部分を取得するステップであって、アミノ酸残基への言及が配列番号81において記載されているアミノ酸への言及であるステップと、スクリーニング又はアッセイにおいてこれらの部分を使用するステップとを含む方法が提供される。

【００３８】

適切には、抗HSA結合部分は、本明細書において記載されている結合エピトープを含むHSAの一部を使用して得ることができる。一実施形態において、方法は、HSAのアミノ酸228、230、308、309、317、318、321、322、325、326及び329によって定義される結合境界面の少なくとも一部を含むHSAポリペプチドを提供するステップを含む。

【図面の簡単な説明】

【００３９】

【図１Ａ】DOM7h-11変異体dAbのアミノ酸配列アライメント。特定の位置の「・」は、DOM7h-11でその位置に見られるのと同じアミノ酸を示す。CDRは下線と太字で示される(第1の下線配列がCDR1であり、第2の下線配列がCDR2であり、そして第3の下線配列がCDR3である)。

【図１Ｂ】DOM7h-11変異体dAbのアミノ酸配列アライメント。特定の位置の「・」は、DOM7h-11でその位置に見られるのと同じアミノ酸を示す。CDRは下線と太字で示される(第1の下線配列がCDR1であり、第2の下線配列がCDR2であり、そして第3の下線配列がCDR3である)。

【図２Ａ】DOM7h-11変異体の動態パラメータ。KD単位 = nM; Kd単位 = sec^{-1}; Ka単位 = M^{-1} sec^{-1}。表記A e-BはA×10^{-B}を意味し、Ｃｅ DはC×10^{D}を意味する。下の例により支持される、さまざまな動物種における全体的な動態範囲が示される。また、選択範囲が特定の治療セッティング(急性または慢性の適応症、症状もしくは疾患、ならびに慢性期と急性期の両方に用いられる「中間」)で用いるために提供される。高度親和性のdAbおよびこれらを含む製品は慢性期に有用である。中等度の親和性のdAbおよびこれらを含む製品は中間期に有用である。低度親和性のdAbおよびこれらを含む製品は急性期に有用である。ここでの親和性は、血清アルブミンに対する親和性である。抗血清アルブミンdAbおよび融合タンパク質のさまざまな例が記載されており、これらは開示された範囲を支持する。こうした例の多くは、ヒトおよび1種以上の非ヒト動物(例えば、ヒトとカニクイザルおよび/またはマウス)で好ましい動態を有する。dAbまたはそれを含む製品の選択は、本発明によれば、治療処置されるセッティング(例えば、慢性または急性)に応じて、調整することができる。

【図２Ｂ】DOM7h-11変異体の動態パラメータ。KD単位 = nM; Kd単位 = sec^{-1}; Ka単位 = M^{-1} sec^{-1}。表記A e-BはA×10^{-B}を意味し、Ｃｅ DはC×10^{D}を意味する。下の例により支持される、さまざまな動物種における全体的な動態範囲が示される。また、選択範囲が特定の治療セッティング(急性または慢性の適応症、症状もしくは疾患、ならびに慢性期と急性期の両方に用いられる「中間」)で用いるために提供される。高度親和性のdAbおよびこれらを含む製品は慢性期に有用である。中等度の親和性のdAbおよびこれらを含む製品は中間期に有用である。低度親和性のdAbおよびこれらを含む製品は急性期に有用である。ここでの親和性は、血清アルブミンに対する親和性である。抗血清アルブミンdAbおよび融合タンパク質のさまざまな例が記載されており、これらは開示された範囲を支持する。こうした例の多くは、ヒトおよび1種以上の非ヒト動物(例えば、ヒトとカニクイザルおよび/またはマウス)で好ましい動態を有する。dAbまたはそれを含む製品の選択は、本発明によれば、治療処置されるセッティング(例えば、慢性または急性)に応じて、調整するこ

とができる。
【図２Ｃ】DOM7h-11変異体の動態パラメータ。KD単位 = nM; Kd単位 = sec^{-1}; Ka単位 = M^{-1} sec^{-1}。表記A e-BはA×10^{-B}を意味し、Ｃｅ DはC×10^{D}を意味する。下の例により支持される、さまざまな動物種における全体的な動態範囲が示される。また、選択範囲が特定の治療セッティング(急性または慢性の適応症、症状もしくは疾患、ならびに慢性期と急性期の両方に用いられる「中間」)で用いるために提供される。高度親和性のdAbおよびこれらを含む製品は慢性期に有用である。中等度の親和性のdAbおよびこれらを含む製品は中間期に有用である。低度親和性のdAbおよびこれらを含む製品は急性期に有用である。ここでの親和性は、血清アルブミンに対する親和性である。抗血清アルブミンdAbおよび融合タンパク質のさまざまな例が記載されており、これらは開示された範囲を支持する。こうした例の多くは、ヒトおよび1種以上の非ヒト動物(例えば、ヒトとカニクイザルおよび/またはマウス)で好ましい動態を有する。dAbまたはそれを含む製品の選択は、本発明によれば、治療処置されるセッティング(例えば、慢性または急性)に応じて、調整することができる。
【図２Ｄ】DOM7h-11変異体の動態パラメータ。KD単位 = nM; Kd単位 = sec^{-1}; Ka単位 = M^{-1} sec^{-1}。表記A e-BはA×10^{-B}を意味し、Ｃｅ DはC×10^{D}を意味する。下の例により支持される、さまざまな動物種における全体的な動態範囲が示される。また、選択範囲が特定の治療セッティング(急性または慢性の適応症、症状もしくは疾患、ならびに慢性期と急性期の両方に用いられる「中間」)で用いるために提供される。高度親和性のdAbおよびこれらを含む製品は慢性期に有用である。中等度の親和性のdAbおよびこれらを含む製品は中間期に有用である。低度親和性のdAbおよびこれらを含む製品は急性期に有用である。ここでの親和性は、血清アルブミンに対する親和性である。抗血清アルブミンdAbおよび融合タンパク質のさまざまな例が記載されており、これらは開示された範囲を支持する。こうした例の多くは、ヒトおよび1種以上の非ヒト動物(例えば、ヒトとカニクイザルおよび/またはマウス)で好ましい動態を有する。dAbまたはそれを含む製品の選択は、本発明によれば、治療処置されるセッティング(例えば、慢性または急性)に応じて、調整することができる。
【図３】H/D交換データから可能なDOM7h-11-3エピトープとして同定されたHSAの配列セグメント。
【図４Ａ】DOM7h11-15と複合体形成したHSAの全体構造。HSAおよびDOM7h11-15はリボン表現で概略的に描写されている。鎖AおよびCはHSAであり、鎖BおよびDはDOM7h-11-15である。図４Ａは非対称単位を示す。
【図４Ｂ】図４Ｂは３つの異なる配向での、生物学的に意義のある複合体を示す。
【図４Ｃ】図４Ｃは2.0σで形成された最終モデルのフェーズから計算されたDOM7h-11-15の電子密度マップを示す。
【図５】HSAとDOM7h-11-15との間の接触残基を示すグリッドである。
【図６】DOM7h-11系統のAlbudAbのアライメントを示す。
【図７－１】HSA とDOM7h-11-15との相互作用の詳細を示す。
【図７－２】HSA とDOM7h-11-15との相互作用の詳細を示す。
【図７－３】HSA とDOM7h-11-15との相互作用の詳細を示す。
【図７－４】HSA とDOM7h-11-15との相互作用の詳細を示す。
【図７－５】HSA とDOM7h-11-15との相互作用の詳細を示す。
【図８】直交する手法からのエピトープデータの比較を示す。HSAは表面表現で下塗りされており、黒いパッチは各手法を用いて同定されたエピトープ領域を示す。
【図９】DOM7h-11-15結合部位に対する脂質キャリアーポケットの位置を示す。HSA骨格はチューブとして描写されており、脂質分子は暗い球であり、DOM7h-11-15の電子密度は暗いメッシュで示されている。1E7G.pdbはHSA/DOM7h-11-15結晶構造のペプチド骨格と構造的にアライメントされ、これにより脂質部分をキャリアーポケット(FA1-FA7: 脂肪酸結合部位)に重ね合わせた。
【図１０－１】核酸及びアミノ酸配列を示す。

【図１０－２】核酸及びアミノ酸配列を示す。
【図１０－３】核酸及びアミノ酸配列を示す。
【図１０－４】核酸及びアミノ酸配列を示す。
【図１０－５】核酸及びアミノ酸配列を示す。
【図１０－６】核酸及びアミノ酸配列を示す。
【図１０－７】核酸及びアミノ酸配列を示す。
【図１０－８】核酸及びアミノ酸配列を示す。
【図１０－９】核酸及びアミノ酸配列を示す。
【図１０－１０】核酸及びアミノ酸配列を示す。
【図１０－１１】核酸及びアミノ酸配列を示す。
【図１０－１２】核酸及びアミノ酸配列を示す。
【図１０－１３】核酸及びアミノ酸配列を示す。
【図１０－１４】核酸及びアミノ酸配列を示す。
【図１０－１５】核酸及びアミノ酸配列を示す。
【発明を実施するための形態】
【００４０】
本明細書では、本発明は、明確かつ簡潔な明細書を記載することができるように、実施形態に関連して、説明されている。実施形態は、本発明から逸脱することなく、さまざまに組み合わせたり、分離したりできることが意図されており、また、そのように理解されるべきである。
【００４１】
他に定義がない限り、本明細書中で用いるすべての技術用語および科学用語は、当業者(例えば、細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、ハイブリダイゼーション技術および生化学の分野の当業者)が一般に理解しているものと同じ意味を有する。分子遺伝学的および生化学的方法(一般的には、参照により本明細書に組み入れられるSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.およびAusubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 第4版, John Wiley & Sons, Inc.を参照のこと)ならびに化学的方法については標準的な技術が使用される。
【００４２】
「患者」とは、任意の動物、例えば哺乳動物、例えば非ヒト霊長類(ヒヒ、アカゲザルもしくはカニクイザル)、マウス、ヒト、ウサギ、ラット、イヌ、ネコまたはブタである。一実施形態では、患者がヒトである。
【００４３】
本明細書中で用いる「抗体」とは、IgG、IgM、IgA、IgDもしくはIgE、またはフラグメント(Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv、ジスルフィド結合したFv、scFv、閉鎖立体配座の多重特異性抗体、ジスルフィド結合したscFv、ダイアボディなど)を指し、天然で抗体を産生するどの種に由来するか、または組換えDNA技術によって作製されるか、または血清、B細胞、ハイブリドーマ、トランスフェクトーマ、酵母もしくは細菌から単離されるかどうかを問わない。
【００４４】
本明細書中で用いる「抗体フォーマット」とは、1つ以上の抗体可変ドメインが抗原に対する結合特異性をポリペプチド構造に付与するように組み込まれ得る、任意の適切なポリペプチド構造を指す。さまざまな適切な抗体フォーマットが当技術分野で知られており、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体、抗体重鎖、抗体軽鎖、抗体重鎖および/または軽鎖のホモ二量体およびヘテロ二量体、前述のいずれかの抗原結合フラグメント(例えば、Fvフラグメント(例：一本鎖Fv (scFv)、ジスルフィド結合Fv)、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、$F(ab')_2$フラグメント)、単一抗体可変ドメイン(例えば、dAb、V_H、V_{HH}、V_L)、および前述のいずれかの改変型(例えば、ポリエチレングリコールもしくは他の適切なポリマーの共有結合により改変されたもの、また

はヒト化V_{HH})などである。

【００４５】

用語「免疫グロブリン単一可変ドメイン」とは、異なるV領域またはドメインから独立して、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、他の可変領域または可変ドメインと共にフォーマット(例えば、ホモまたはヘテロ多量体)で存在することができるが、その場合、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とって必要とされない(すなわち、その場合、免疫グロブリン単一可変ドメインは追加の可変ドメインから独立して抗原に結合する)。「ドメイン抗体」または「dAb」は、本明細書中で用いる「免疫グロブリン単一可変ドメイン」という用語と同じである。「単一免疫グロブリン可変ドメイン」は、本明細書中で用いる「免疫グロブリン単一可変ドメイン」という用語と同じである。「単一抗体可変ドメイン」または「抗体単一可変ドメイン」は、本明細書中で用いる「免疫グロブリン単一可変ドメイン」という用語と同じである。免疫グロブリン単一可変ドメインは、一実施形態では、ヒト抗体の可変ドメインであるが、げっ歯類(例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み入れられるWO 00/29004に開示される)、テンジクザメおよびラクダ科動物のV_{HH} dAbなど、他の種に由来する単一抗体可変ドメインをも包含する。ラクダ科動物V_{HH}は、もともと軽鎖を欠いている重鎖抗体を産生するラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダ、およびグアナコなどの種に由来する免疫グロブリン単一可変ドメインポリペプチドである。V_{HH}はヒト化することができる。

【００４６】

「ドメイン」とは、タンパク質の残りの部分から独立した三次構造を有する、折りたたまれたタンパク質構造のことである。一般的に、ドメインはタンパク質の個別の機能的特性に関与しており、多くの場合、そのタンパク質の残部の機能および/またはそのドメインの機能を失うことなく、他のタンパク質に付加、移動または転移することができる。「単一抗体可変ドメイン」とは、抗体可変ドメインに特徴的な配列を含む、折りたたまれたポリペプチドドメインである。したがって、それには、完全な抗体可変ドメインおよび改変された可変ドメイン、例えば1つ以上のループが抗体可変ドメインに特徴的でない配列によって置換されたもの、あるいはトランケートされているかまたはN末端もしくはC末端の延長部を有する抗体可変ドメイン、ならびに全長ドメインの少なくとも結合活性および特異性を保持する折りたたまれた可変ドメインのフラグメントが含まれる。

【００４７】

本出願において、用語「予防」および「予防する」は、疾患または症状の誘導に先立って保護組成物を投与することを含む。「治療」および「治療する」は、疾患または症状の徴候が明らかになった後で保護組成物を投与することを含む。「抑制」または「抑制する」は、誘導事象の後で、しかし疾患または症状の臨床的出現の前に、該組成物を投与することを意味する。

【００４８】

本明細書中で用いる用語「用量」は、一度に全部(単位用量)、または特定の時間間隔で2回以上、被験者に投与されるリガンドの量を意味する。例えば、用量は、1日(24時間)(1日量)、2日間、1週間、2週間、3週間、または1ヶ月以上にわたって(例えば、単回投与により、または2回以上の投与により)被験者に投与されるリガンド(例えば、標的抗原に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを含むリガンド)の量を指すことができる。投与と投与の間隔は希望する任意の時間であり得る。用量に言及するときの用語「薬学的に有効な」とは、所望の効果を提供するのに十分な、リガンド、ドメインまたは医薬活性剤の量を意味する。「有効」である量は、個体の年齢および全身状態、特定の薬物または医薬活性剤などに応じて、被験者ごとに異なるだろう。したがって、すべての患者に適用できる正確な「有効」量を指定することが常に可能とは限らない。しかしながら、個々のケースにおける適切な「有効」用量は、ルーチンワーク的な実験を用いることにより、当業者が決定することができる。

【００４９】

薬物動態の解析方法およびリガンド(例えば、単一可変ドメイン、融合タンパク質、または多重特異性リガンド)の半減期の測定方法は当業者によく知られている。詳細は、Kenneth, A et al: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for PharmacistsおよびPeters et al, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996)に見いだすことができる。また、tαおよびtβ半減期、曲線下面積(AUC)などの薬物動態パラメータについて記載している“Pharmacokinetics”, M Gibaldi & D Perron, 発行Marcel Dekker, 第2改訂版 (1982)をも参照されたい。必要に応じて、本明細書中に引用されたすべての薬物動態パラメータおよび値は、ヒトの値であると解釈されるべきである。必要に応じて、本明細書中に引用されたすべての薬物動態パラメータおよび値は、マウスまたはラットまたはカニクイザルの値であると解釈されるべきである。

【００５０】

半減期(t1/2αおよびt1/2β)とAUCは、時間に対するリガンドの血清濃度の曲線から求めることができる。例えば、その曲線をモデル化するために、WinNonlin解析パッケージ、例えばバージョン5.1 (Pharsight社(Mountain View, CA94040, 米国)から入手可能)を用いることができる。2コンパートメントモデルを使用する場合、第1相(α相)では、リガンドが、若干の排出を伴って、患者の体内に主に分布していく。第2相(β相)は、リガンドが全身にいきわたり、そしてリガンドが患者から消失されるにつれて血清濃度が低下していく時の相である。tα半減期は第1相の半減期であり、そしてtβ半減期は第2相の半減期である。かくして、一実施形態では、本発明との関連で、可変ドメイン、融合タンパク質またはリガンドは、(約)15分またはそれ以上の範囲のtα半減期を有する。一実施形態では、その範囲の下端は(約)30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、10時間、11時間または12時間である。さらに、あるいはこれとは別に、本発明による可変ドメイン、融合タンパク質またはリガンドは、最大12時間(または約12時間)までの範囲のtα半減期をもつだろう。一実施形態では、その範囲の上端は(約)11、10、9、8、7、6または5時間である。適切な範囲の例は(約)1～6時間、2～5時間または3～4時間である。

【００５１】

一実施形態において、本発明は、(約)2.5時間またはそれ以上の範囲のtβ半減期を有する本発明による可変ドメイン、融合タンパク質またはリガンドを提供する。一実施形態では、その範囲の下端は(約)3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、10時間、11時間もしくは12時間である。さらに、あるいはこれとは別に、tβ半減期は最大で(約)21または25日間である。一実施形態では、その範囲の上端は(約)12時間、24時間、2日間、3日間、5日間、10日間、15日間、19日間、20日間、21日間または22日間である。例えば、本発明による可変ドメイン、融合タンパク質またはリガンドは12～60時間(または約12～60時間)の範囲のtβ半減期をもつだろう。さらなる実施形態では、それは12～48時間(または約12～48時間)の範囲である。さらに別の実施形態では、それは12～26時間(または約12～26時間)の範囲である。

【００５２】

2コンパートメントモデルに代わる手段として、当業者はノンコンパートメントモデルの使用に精通しており、このモデルを用いて終末半減期を求めることができる(これに関連して、本明細書中で用いる用語「終末半減期」とは、ノンコンパートメントモデルを用いて測定された終末半減期を意味する)。例えば、この方法でその曲線をモデル化するために、WinNonlin解析パッケージ、例えばバージョン5.1 (Pharsight社(Mountain View, CA94040, 米国)から入手可能)を使用することができる。この場合、一実施形態では、単一可変ドメイン、融合タンパク質またはリガンドは、少なくとも(または少なくとも約)8時間、10時間、12時間、15時間、28時間、20時間、1日間、2日間、3日間、7日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間、21日間、22日間、23日間、24日間または25日間の終末半減期を有する。一実施形態では、この範囲の上端は(約)24時間、48時間、60時間、72時間または120時間である。例えば、終末半減期は、例えばヒトでは、(約)8～60時間、8～48時間または12～120時間である。

【００５３】
さらに、あるいは上記の基準とは別に、本発明による可変ドメイン、融合タンパク質またはリガンドは、(約)1mg.min/mlまたはそれ以上の範囲のAUC値(曲線下面積)を有する。一実施形態では、その範囲の下端は(約)5、10、15、20、30、100、200または300mg.min/mlである。さらに、あるいは別に、本発明による可変ドメイン、融合タンパク質またはリガンドは、最大(約)600mg.min/mlまでの範囲のAUCを有する。一実施形態では、その範囲の上端は(約)500、400、300、200、150、100、75または50mg.min/mlである。有利には、可変ドメイン、融合タンパク質またはリガンドは、以下からなる群より選択される(およその)範囲のAUCをもつだろう：15～150mg.min/ml、15～100mg.min/ml、15～75mg.min/ml、および15～50mg.min/ml。

【００５４】
「表面プラズモン共鳴」：競合アッセイを用いて、ヒト血清アルブミンなどの特定の抗原またはエピトープが、本明細書に記載の血清アルブミン結合リガンド(特定のdAbなど)への結合について、カニクイザル血清アルブミンなどの別の抗原またはエピトープと競合するかどうかを調べることができる。同様に、競合アッセイを用いて、dAbなどの第1のリガンドが、標的抗原またはエピトープへの結合について、dAbなどの第2のリガンドと競合するかどうかを調べることができる。本明細書中で用いる用語「競合する」とは、2つ以上の分子間の特異的結合相互作用をいくらかでも妨げることができる分子、化合物、好ましくはタンパク質、などの物質を指す。語句「競合的に阻害しない」とは、物質、例えば分子、化合物、好ましくはタンパク質が、2つ以上の分子間の特異的結合相互作用を測定可能な程度または有意な程度には妨げないことを意味する。2つ以上の分子間の特異的結合相互作用には、好ましくは、単一可変ドメインとそのコグネイトのパートナーまたは標的との特異的結合相互作用が含まれる。妨害または競合する分子は、別の単一可変ドメインであってもよいし、それはコグネイトのパートナーまたは標的と構造的および/または機能的に類似する分子であってもよい。

【００５５】
用語「結合成分」とは、異なるエピトープまたは抗原結合ドメインから独立して、ある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。結合成分はドメイン抗体(dAb)であってもよいし、天然のリガンド以外のリガンドに結合する非免疫グロブリンタンパク質スカフォールド、例えば、CTLA-4、リポカリン、SpA、アドネクチン、アフィボディ、アビマー(avimer)、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より選択されるスカフォールド、の誘導体であるドメインであってもよい(本発明の場合には、その成分は血清アルブミンに結合する)。タンパク質スカフォールドの例、およびレパートリーから抗原またはエピトープに特異的な結合ドメインを選択するための方法を開示する、WO2008/096158を参照されたい(実施例17～25参照)。WO2008/096158のこれらの具体的な開示は、本発明で使用するために本明細書中に明確に記載されているかのように、参照により本明細書に明示的に組み入れられ、そしてそのような開示のどの部分も本明細書中の1つ以上の請求項に組み入れることができるものとする。ある態様において、本発明は本明細書に記載するようにSAと相互作用する及び／又はSAへの結合を可能とするアミノ酸を含む結合成分を提供し、ここで該相互作用するアミノ酸は、別のまたは非免疫グロブリンスキャフォールドとして提供される。

【００５６】
一実施形態において、本発明の任意の態様または実施形態にしたがい同定されたこれらの位置の任意の位置での変異は、本明細書中の実施例の項に例示された残基への変異である。別の実施形態では、変異は例示された残基の保存的アミノ酸置換に対するものである。

【００５７】
保存的アミノ酸置換は当業者によく知られており、以下の表に例示される：

アミノ酸置		
もとの残基	例示的置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe,	Leu
	ノルロイシン	
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met,	Ile
	Ala, Phe	
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ-	Arg
	ブチル酸, Gln, Asn	
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala,	Leu
	ノルロイシン	

保存的アミノ酸置換はまた、非天然のアミノ酸残基、例えばペプチドミメティック、および化学的ペプチド合成により組み込むことができるアミノ酸部分の他の反転または逆転形態に関係してもよい。

【００５８】

一実施形態において、前記変異体は次の動態特性の1つ以上を含む：
(a) 変異体は、表面プラズモン共鳴で測定して、(約)0.1～(約)10000nM、必要に応じて(約)1～(約)6000nMの解離定数(KD)で、ヒトSAに特異的に結合する結合部位を含む；
(b) 変異体は、表面プラズモン共鳴で測定して、(約)1.5×10^{-4}～(約)$0.1sec^{-1}$、必要に応じて(約)3×10^{-4}～(約)$0.1sec^{-1}$のオフ速度定数(K_d)で、ヒトSAに特異的に結合する結合部位を含む；
(c) 変異体は、表面プラズモン共鳴で測定して、(約)2×10^{6}～(約)$1\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$、必要に応じて(約)$1\times10^{6}$～(約)$2\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$のオン速度定数($K_a$)で、ヒトSAに特異的に結合する結合部位を含む；
(d) 変異体は、表面プラズモン共鳴で測定して、(約)0.1～(約)10000nM、必要に応じて(約)1～(約)6000nMの解離定数(KD)で、カニクイザルSAに特異的に結合する結合部位を含む；
(e) 変異体は、表面プラズモン共鳴で測定して、(約)1.5×10^{-4}～(約)$0.1sec^{-1}$、必要に応じて(約)3×10^{-4}～(約)$0.1sec^{-1}$のオフ速度定数(K_d)で、カニクイザルSAに特異的に結合する結合部位を含む；
(f) 変異体は、表面プラズモン共鳴で測定して、(約)2×10^{6}～(約)$1\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$、必要に応じて(約)$1\times10^{6}$～(約)$5\times10^{3}M^{-1}sec^{-1}$のオン速度定数($K_a$)で、カニクイザルSAに特異的に結合する結合部位を含む；
(g) 変異体は、表面プラズモン共鳴で測定して、(約)1～(約)10000nM、必要に応じて(約)20～(約)6000nMの解離定数(KD)で、ラットSAに特異的に結合する結合部位を含む；
(h) 変異体は、表面プラズモン共鳴で測定して、(約)2×10^{-3}～(約)$0.15sec^{-1}$、必要に応じて(約)9×10^{-3}～(約)$0.14sec^{-1}$のオフ速度定数(K_d)で、ラットSAに特異的に結合する結合部位を含む；
(i) 変異体は、表面プラズモン共鳴で測定して、(約)2×10^{6}～(約)$1\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$、必要に応じて(約)$1\times10^{6}$～(約)$3\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$のオン速度定数($K_a$)で、ラットSAに特異的に結合する結合部位を含む；
(j) 変異体は、表面プラズモン共鳴で測定して、(約)1～(約)10000nMの解離定数(KD)で、マウスSAに特異的に結合する結合部位を含む；
(k) 変異体は、表面プラズモン共鳴で測定して、(約)2×10^{-3}～(約)$0.15sec^{-1}$のオフ速度定数(K_d)で、マウスSAに特異的に結合する結合部位を含む；および/または
(l) 変異体は、表面プラズモン共鳴で測定して、(約)2×10^{6}～(約)$1\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$、必要に応じて(約)$2\times10^{6}$～(約)$1.5\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$のオン速度定数($K_a$)で、マウスSAに特異的に結合する結合部位を含む。

【００５９】

必要に応じて、変異体は以下を有する：
I: (a)と(d)に記載のKD、(b)と(e)に記載のK_d、および(c)と(f)に記載のK_a；または
II: (a)と(g)に記載のKD、(b)と(h)に記載のK_d、および(c)と(i)に記載のK_a；または
III:(a)と(j)に記載のKD、(b)と(k)に記載のK_d、および(c)と(l)に記載のK_a；または
IV: IおよびIIに記載の動態；または
V: IおよびIIIに記載の動態；または
VI: I、IIおよびIIIに記載の動態。

【００６０】

本発明はまた、本発明の上記態様または実施形態のいずれかの変異体を含むリガンドを提供する。例えば、リガンドは二重特異性リガンドであり得る(二重特異性リガンドの例についてはWO04003019を参照されたい)。一態様では、本発明は、本発明の上記態様または実施形態のいずれかの抗SA変異体と、SA以外の標的抗原に特異的に結合する結合成分とを含む、多重特異性リガンドを提供する。その結合成分は標的に特異的に結合するどのような結合成分であってもよく、例えば、その成分は抗体、抗体フラグメント、scFv、Fab、dAb、または非免疫グロブリンタンパク質スカフォールドを含む結合成分である。そのような成分はWO2008/096158に詳しく開示されている(実施例17～25参照、その開示内容は

参照により本明細書に組み入れられる)。非免疫グロブリンスカフォールドの例は、CTLA-4、リポカリン、ブドウ球菌プロテインA(spA)、アフィボディ(Affibody(商標))、アビマー(Avimer(商標))、アドネクチン、GroELおよびフィブロネクチンである。

【００６１】

一実施形態では、抗標的結合成分と抗SA単一変異体との間にリンカーが配置され、そのリンカーはアミノ酸配列AST、必要に応じてASTSGPSを含む。代替リンカーはWO2007085814に記載されており(参照により本明細書に組み入れられる)、また、WO2008/096158に記載されており(135頁12行～140頁14行の文脈を参照されたい；その開示内容およびリンカーのすべての配列は、本発明で使用するために本明細書中に明確に記載されているかのように、参照により本明細書に明示的に組み入れられ、そしてそのような開示内容のどの部分も本明細書中の1つ以上の請求項に組み入れることができるものとする)、またWO2009/068649に記載されている。

【００６２】

多重特異性リガンドの一実施形態において、標的抗原はポリペプチド、タンパク質もしくは核酸、またはその一部とすることができ、天然に存在しても合成のものでもよい。これに関して、本発明のリガンドは、その標的抗原に結合してアンタゴニストまたはアゴニスト(例えば、EPO受容体アゴニスト)として作用することができる。当業者であれば、その選択肢が大規模で多様であることを理解するであろう。それらは、例えば、ヒトもしくは動物のタンパク質、サイトカイン、サイトカイン受容体(ここでサイトカイン受容体はサイトカインのための受容体を含む)、酵素、酵素の補因子、またはDNA結合タンパク質であり得る。

【００６３】

本明細書において用いる「腫瘍壊死因子受容体1(TNFR1)のアンタゴニスト」または「抗-TNFR1アンタゴニスト」等の用語は、TNFR1に結合し、TNFR1の機能（すなわち１以上の機能）を阻害し得る薬剤（例えば分子、化合物）を言う。例えばTNFR1のアンタゴニストはTNFαのTNFR1への結合を阻害する及び／又はTNFR1を介したシグナル伝達を阻害することができる。したがってTNFR1-仲介プロセスおよび細胞応答(例えば標準L929細胞毒性アッセイにおけるTNFα-誘発細胞死)はTNFR1のアンタゴニストにより阻害することができる。

【００６４】

一実施形態において、多重特異性リガンドは本発明の抗SA dAb変異体と抗TNFR1結合成分(例えば、抗TNFR1 dAb)を含む。場合により、前記リガンドは、受容体の架橋の可能性を減らすために、ただ1つの抗TNFR1結合成分(例えば、dAb)を有する。抗TNFR1 dAbは、例えばWO2006/038027, WO2007/049017, WO2008149148およびWO2010/081787(このPCT出願に開示される、そのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は、本発明で使用するために本明細書中に明確に記載されているかのように、参照により本明細書に明示的に組み入れられ、そしてそのような開示のどの部分も本明細書中の1つ以上の請求項に組み入れることができるものとする)に開示される。

【００６５】

一実施形態において、本発明のリガンドは、1つ以上のポリペプチドに直接または間接的に融合された本発明の変異体を含む融合タンパク質である。例えば、その融合タンパク質は、WO2005/118642(その開示内容は参照により本明細書に組み入れられる)に開示されるような「薬物融合体」であってよく、それは本発明の変異体とそのPCT出願に明示されるポリペプチド薬物とを含む。

【００６６】

本明細書中で用いる「薬物」とは、個体の生物学的標的分子に結合するおよび/または該標的分子の機能を変更することによって有益な、治療上のまたは診断上の効果を生み出すために、個体に投与することができる任意の化合物(例えば、有機小分子、核酸、ポリペプチド)を指す。標的分子は個体のゲノムによってコードされる内因性の標的分子(例えば、個体のゲノムによってコードされる酵素、受容体、増殖因子、サイトカイン)であってもよいし、病原体のゲノムによってコードされる外因性の標的分子(例えば、ウイルス

、細菌、真菌、線虫または他の病原体のゲノムによってコードされる酵素)であってもよい。本発明の抗SA dAb変異体を含む融合タンパク質およびコンジュゲートで使用するための適切な薬物は、WO2005/118642およびWO2006/059106に開示されている(これらの全開示内容は、具体的な薬物の全リストを含めて、そのリストが本明細書中に明確に記載されているかのように、参照により本明細書に組み入れられ、そしてそのように組み入れることは本明細書の請求項に含めるための具体的な薬物の開示を提供するものとする)。例えば、その薬物はグルカゴン様ペプチド1(GLP-1)もしくはその変異体、インターフェロンα2bもしくはその変異体、またはエキセンディン-4もしくはその変異体であり得る。

【００６７】

一実施形態において、本発明は、WO2005/118642およびWO2006/059106に定義されかつ開示された薬物コンジュゲートを提供し、該コンジュゲートは本発明の変異体を含む。一例では、薬物が変異体に共有結合で結合される(例えば、変異体と薬物は単一のポリペプチドの部分として発現される)。これとは別に、一例では、薬物が変異体に非共有結合で結合または会合される。薬物は変異体と直接または間接的に(例えば、適切なリンカーを介しておよび/または相補的結合パートナー(例：ビオチンとアビジン)の非共有結合を介して)共有結合または非共有結合で結合され得る。相補的結合パートナーを用いる場合には、結合パートナーの一方を薬物に直接または適切なリンカー成分を介して共有結合で結合させることができ、また、その相補的結合パートナーを変異体に直接または適切なリンカー成分を介して共有結合で結合させることができる。薬物がポリペプチドまたはペプチドである場合、その薬物成分を融合タンパク質とすることができ、その場合にポリペプチドまたはペプチド薬物およびポリペプチド結合成分は連続したポリペプチド鎖の個別の部分(成分)である。本明細書に記載されるように、ポリペプチド結合成分とポリペプチド薬物成分はペプチド結合を介して相互に直接結合されてもよいし、あるいは適切なアミノ酸またはペプチドもしくはポリペプチドリンカーを介して連結されてもよい。

【００６８】

血清アルブミンに特異的に結合する、本発明の1つの単一可変ドメイン変異体を含むリガンド(単量体)、または2つ以上の単一可変ドメインを含むリガンド(本明細書中で定義される多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、および二重特異性リガンド)は、以下から選択される1つ以上の成分をさらに含むことができるが、好ましくはそれらに限定されるものではない：標識、タグ、追加の単一可変ドメイン、dAb、抗体、抗体フラグメント、マーカーおよび薬物。これらの成分の1つ以上は、単一可変ドメイン(免疫グロブリンまたは非免疫グロブリンのいずれかの単一可変ドメイン)を含むリガンドのCOOH末端もしくはN末端に、またはN末端とCOOH末端の両方に位置づけることができる。これらの成分の1つ以上は、1つの単一可変ドメインを含むリガンド(単量体)または2つ以上の単一可変ドメインを含むリガンド(本明細書中で定義される多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、および二重特異性リガンド)の、血清アルブミンに特異的に結合する単一可変ドメインのCOOH末端もしくはN末端、またはN末端とCOOH末端の両方に位置づけることができる。これらの末端の一方または両方に位置づけられるタグの非限定的な例としては、HA、hisまたはmycタグが挙げられる。1つ以上のタグ、標識および薬物を含めて、これらの成分は、血清アルブミンに結合する、1つの単一可変ドメインを含むリガンド(単量体)または2つ以上の単一可変ドメインを含むリガンド(本明細書中で定義される多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、および二重特異性リガンド)に、上で説明したように直接またはリンカーを介して、結合させることができる。

【００６９】

本明細書にはまた、本明細書に記載の変異体、融合タンパク質、コンジュゲートまたはリガンドのいずれかをコードする単離された核酸、例えば、血清アルブミンに特異的に結合する、またはヒト血清アルブミンと少なくとも1種の非ヒト血清アルブミンの両方に特異的に結合する、本発明の1つの単一可変ドメイン変異体を含むリガンド(単量体)もしくは2つ以上の単一可変ドメイン変異体を含むリガンド(本明細書中で定義される多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、および二重特異性リガンド)またはその機能的に活性な

フラグメントをコードする単離された核酸が包含される。さらに、本明細書には、ベクターおよび/または発現ベクター、該ベクターを含む宿主細胞、例えば、ベクターで形質転換された植物もしくは動物細胞および/または細胞株、前記ベクターによってコードされる、血清アルブミンに特異的に結合する、1つの単一可変ドメイン変異体(単量体)または2つ以上の単一可変ドメイン変異体(例えば、本明細書中で定義される多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、および二重特異性リガンド)を含む1つ以上の変異体、融合タンパク質もしくはリガンド、またはそのフラグメントを発現および/または産生させる方法を包含し、その方法は、場合によって、1つ以上の変異体、融合タンパク質もしくはリガンド、またはそのフラグメントが発現されるように宿主細胞を培養し、任意で、血清アルブミンに特異的に結合する、1つの単一可変ドメイン変異体(単量体)または2つ以上の単一可変ドメイン変異体(本明細書中で定義される多量体、融合タンパク質、コンジュゲート、および二重特異性リガンド)を含むリガンドを宿主細胞の培養培地から回収することを含む。また、本明細書に記載のリガンドを、血清アルブミン(血清アルブミンおよび/または非ヒト血清アルブミンを含む)、および/または血清アルブミン以外の1つ以上の標的(ここで、その標的は生物学的活性分子を含み、先に挙げた動物タンパク質、サイトカインを含む)と接触させる方法が包含され、そして前記接触がin vitroである方法だけでなく、本明細書に記載の変異体、融合タンパク質またはリガンドのいずれかを個々の宿主動物または細胞にin vivoおよび/またはex vivoで投与する方法も包含される。好ましくは、血清アルブミンおよび/または非ヒト血清アルブミンに対する単一可変ドメイン(免疫グロブリンまたは非免疫グロブリン)と、血清アルブミン以外の1つ以上の標的に対する1つ以上のドメインとを含む、本明細書に記載のリガンドを投与することは、その抗標的リガンドの半減期(Tβおよび/または終末半減期を含む)を高めるだろう。前記変異体、融合タンパク質もしくは単一ドメイン含有リガンドまたはそのフラグメント(その機能性フラグメントを含む)をコードする核酸分子は、本明細書において企図される。前記核酸分子をコードするベクター(発現ベクターを含むが、好ましくはそれに限定されない)は本明細書中で企図され、これらの発現ベクターの1つ以上を含む細胞株または生物に由来する宿主細胞も同様に企図される。また、上記の核酸、ベクターおよび宿主細胞のいずれかを含むが、好ましくはそれらに限定されない、任意の変異体、融合タンパク質またはリガンドの生産方法も企図される。

【００７０】

本発明の一態様は、本発明による変異体、または本発明の多重特異性リガンド、または本発明の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列または選択された前記配列に対して少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98または99％同一であるヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。

【００７１】

本発明の一態様は、本発明の核酸を含むベクターを提供する。本発明の一態様は、該ベクターを含む単離された宿主細胞を提供する。

【００７２】

ライブラリーベクター系、単一可変ドメインの組み合わせ、二重特異性リガンドの特性解析、二重特異性リガンドの構造、二重特異性リガンドの構築に用いるスカフォールド、抗血清アルブミンdAbおよび多重特異性リガンドおよび半減期増強リガンドの使用、ならびに抗血清アルブミンdAbを含む組成物および製剤の詳細については、WO2008/096158を参照されたい。これらの開示内容は、本発明の変異体、リガンド、融合タンパク質、コンジュゲート、核酸、ベクター、宿主および組成物に関する指針を含めて、本発明で使用するための指針を与えるために、参照により本明細書に組み入れられる。

【００７３】

配列

表１：DOM7h-11変異体dAbのアミノ酸配列

DOM7h-11-15 (配列番号1)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTMLSWYQQKPGKAPKLLILAFSRLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

DOM7h-11-3 (配列番号2)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTTLSWYQQKPGKAPKLLILWNSRLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

DOM7h-11-12 (配列番号157)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTMLSWYQQKPGKAPKLLILFGSRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

表２：DOM7h-11変異体dAbのヌクレオチド配列

DOM7h-11-15 (配列番号3)

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGT
CACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCG TCCGATTGGG ACGATGTTAA GTTGGTACCA G
CAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCCTTGCT TTTTCCCGTT TGCAAAG
TGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CC

ATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGCGCGCAG GCTGGGA
CGC ATCCTACGAC GTTCGGCCAA GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

DOM7h-11-3 (配列番号4)

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGT
CACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCG TCCGATTGGG ACGACGTTAA GTTGGTACCA G
CAGAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCCTTTGG AATTCCCGTT TGCAAAG
TGG GGTCCCATCA CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CC
ATCAGCAG TCTGCAACCT GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCGCAG GCTGGGAC
GC ATCCTACGAC GTTCGGCCAA GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

DOM7h-11-12 (配列番号158)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCA
CCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGTTGGTACCAGCAGA
AACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTTGTTTGGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGT
CCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGT
CTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGA
CGTTCGGCCAA GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

表５：抗血清アルブミンdAb (DOM7h)融合体
(ラット研究で使用):-

DOM7h-14/Exendin-4融合体　DMS番号7138

アミノ酸配列(配列番号5)

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGSGGGGSGGGGSDIQ
MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR

ヌクレオチド配列(配列番号6)

CATGGTGAAGGAACATTTACCAGTGACTTGTCAAAACAGATGGAAGAGGAGGCAGTG
CGGTTATTTATTGAGTGGCTTAAGAACGGAGGACCAAGTAGCGGGGCACCTCCGCCA
TCGGGTGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTCGGACA
TCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCAT
CACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCA
TCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGC
AACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTGCGGCGTTGCCTAGGACGTT
CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

DOM7h-14-10/Exendin-4融合体 DMS番号7139

アミノ酸配列(配列番号7)

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGSGGGGSGGGGSDIQ
MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQGTKVEIKR

ヌクレオチド配列(配列番号8)

CATGGTGAAGGAACATTTACCAGTGACTTGTCAAAACAGATGGAAGAGGAGGCAGTG
CGGTTATTTATTGAGTGGCTTAAGAACGGAGGACCAAGTAGCGGGGCACCTCCGCCA
TCGGGTGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTCGGACA
TCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCAT
CACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCA
TCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGC
AACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGACGTT
CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

DOM7h-11/Exendin-4融合体 DMS番号7142

アミノ酸配列(配列番号9)

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGSGGGGSGGGGSDIQ
MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTTLSWYQQKPGKAPKLLIWFGSRLQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

ヌクレオチド配列(配列番号10)

CATGGTGAAGGAACATTTACCAGTGACTTGTCAAAACAGATGGAAGAGGAGGCAGTG
CGGTTATTTATTGAGTGGCTTAAGAACGGAGGACCAAGTAGCGGGGCACCTCCGCCA
TCGGGTGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTCGGACA
TCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCAT
CACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTGGTTTGGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCC
ATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTG
CAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGT
TCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

DOM7h-11-15/Exendin-4融合体 DMS番号7143

アミノ酸配列(配列番号11)

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSGGGGGSGGGGSGGGGSDIQ
MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTMLSWYQQKPGKAPKLLILAFSRLQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

ヌクレオチド配列(配列番号12)

CATGGTGAAGGAACATTTACCAGTGACTTGTCAAAACAGATGGAAGAGGAGGCAGTG
CGGTTATTTATTGAGTGGCTTAAGAACGGAGGACCAAGTAGCGGGGCACCTCCGCCA
TCGGGTGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTCGGACA
TCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCAT
CACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGATGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCTTGCTTTTTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA
TCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGC
AACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGCGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTT
CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

DOM7h14-10/ G4SC-NCE融合体
DOM7h14-10/G4SCをコードするアミノ酸配列(配列番号13)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQGTKVEIKRGGGGSC

C末端システインは、新しい化学的物質（医薬化合物、NCE）に、例えばマレイミド連結を用いて連結されうる。

【００７４】

DOM7h14-10/G4SCをコードするヌクレオチド配列(配列番号14)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCA
CCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAA
ACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGT
CCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGT
CTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGA
CGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGGGTGGCGGAGGGGGTTCCTGT

DOM7h14-10/TVAAPSC融合体
アミノ酸配列(配列番号15)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQGTKVEIKRTVAAPSC

C末端システインは、新しい化学的物質（医薬化合物、NCE）に、例えばマレイミド連結を用いて連結されうる。

【００７５】

ヌクレオチド配列(配列番号16)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCA
CCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAA

ACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGT
CCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGT
CTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGA
CGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGACCGTCGCTGCTCCATCTTGT

(マウス研究で使用):-
DOM7h-11/DOM1m-21-23融合体　DMS番号5515
アミノ酸配列(配列番号17)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNRYSMGWLRQAPGKGLEWVSRIDSYGRGT
YYEDPVKGRFSISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKISQFGSNAFDYWGQGTQVT
VSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTTLSWYQQKPGKAPKLLIWFG
SRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

アミノ酸とmycタグ配列 (配列番号18)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNRYSMGWLRQAPGKGLEWVSRIDSYGRGT
YYEDPVKGRFSISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKISQFGSNAFDYWGQGTQVT
VSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTTLSWYQQKPGKAPKLLIWFG
SRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKRAAA
EQKLISEEDLN

ヌクレオチド配列(配列番号19)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCG
TCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAATAGGTATAGTATGGGGTGGCTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACGGATTGATTCTTATGGTCGTGGT
ACATACTACGAAGACCCCGTGAAGGGCCGGTTCAGCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCCGTATATTACT
GTGCGAAAATTTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCA
GGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTC
TCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT
CGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAG
CTCCTGATCTGGTTTGGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCA
GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGC
TACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCGGCCAAGGGACCAA
GGTGGAAATCAAACGG

ヌクレオチドとmycタグ配列 (配列番号20)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCG
TCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAATAGGTATAGTATGGGGTGGCTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACGGATTGATTCTTATGGTCGTGGT
ACATACTACGAAGACCCCGTGAAGGGCCGGTTCAGCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCCGTATATTACT
GTGCGAAAATTTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCA
GGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTC
TCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT
CGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAG
CTCCTGATCTGGTTTGGTTCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCA
GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGC
TACGTACTACTGTGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCGGCCAAGGGACCAA
GGTGGAAATCAAACGGGCGGCCGCAGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAA
TTAA

DOM7h-11-15/DOM1m-21-23融合体　DMS番号5517

アミノ酸配列(配列番号21)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNRYSMGWLRQAPGKGLEWVSRIDSYGRGT
YYEDPVKGRFSISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKISQFGSNAFDYWGQGTQVT
VSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTMLSWYQQKPGKAPKLLILAF
SRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

アミノ酸とヌクレオチドとmycタグ配列(配列番号22)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNRYSMGWLRQAPGKGLEWVSRIDSYGRGT
YYEDPVKGRFSISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKISQFGSNAFDYWGQGTQVT
VSSASTSGPSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTMLSWYQQKPGKAPKLLILAF
SRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKRAAA
EQKLISEEDLN

ヌクレオチド配列(配列番号23)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCG
TCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAATAGGTATAGTATGGGGTGGCTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACGGATTGATTCTTATGGTCGTGGT
ACATACTACGAAGACCCCGTGAAGGGCCGGTTCAGCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCCGTATATTACT
GTGCGAAAATTTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCA
GGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTC
TCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT

CGTCCGATTGGGACGATGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAG
CTCCTGATCCTTGCTTTTTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCA
GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGC
TACGTACTACTGCGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCGGCCAAGGGACCAA
GGTGGAAATCAAACGG

ヌクレオチドとmycタグ配列(配列番号24)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCG
TCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAATAGGTATAGTATGGGGTGGCTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACGGATTGATTCTTATGGTCGTGGT
ACATACTACGAAGACCCCGTGAAGGGCCGGTTCAGCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCCGTATATTACT
GTGCGAAAATTTCTCAGTTTGGGTCAAATGCGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCA
GGTCACCGTCTCGAGCGCTAGCACCAGTGGTCCATCGGACATCCAGATGACCCAGTC
TCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT
CGTCCGATTGGGACGATGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAG
CTCCTGATCCTTGCTTTTTCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCA
GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGC
TACGTACTACTGCGCGCAGGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCGGCCAAGGGACCAA
GGTGGAAATCAAACGGGCGGCCGCAGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAA
TTAA

上記表中でmyc-tag分子が示されている場合、これは実施例におけるPK研究で用いたものである。myc-tagのない配列が示されている場合は、実施例におけるPK研究はmyc-tagを付けた物質では行っていない。すなわち、記載したタグ付けされていない構築物で研究を行った。

【００７６】

（実施例）

例証

実験の項でのすべての番号付けはKabatに従うものである(Kabat, E.A. National Institutes of Health (US) & Columbia University. Sequences of proteins of immunological interest, edn 5 (US Dept. Of Health and Human Services Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991))。

【００７７】

DOM7h-11, DOM7h-14およびDOM7r変異体の誘導について説明する。

【００７８】

実施例１：Vk親和性成熟選択

HSA(ヒト血清アルブミン)およびRSA(ラット血清アルブミン)抗原はSigma社から入手した(本質的に脂肪酸不含、約99%(アガロースゲル電気泳動)、凍結乾燥粉末、カタログ番号はそれぞれA3782およびA6414)。

【００７９】

上記2種の抗原のビオチン化産物は、EZ Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce社、カタログ番号21331)を用いることにより作製した。遊離のビオチン試薬の除去は、サンプルをPD10脱塩カラムに2回通過させ、その後1000倍過剰量のPBSに対して4℃で一晩透析することによって行った。得られた産物を質量分析で検査したところ、分子あたり1～2個のビオチンが観察された。

【００８０】
親和性成熟ライブラリー：
エラープローン・ライブラリーとCDRライブラリーは両方とも、DOM7h-11およびDOM7h-14親dAbを用いて作製した(DOM7h-11およびDOM7h-14の配列についてはWO2008/096158を参照されたい)。CDRライブラリーをpDOM4ベクター中に作製し、そしてエラープローン・ライブラリーをpDOM33ベクター中に作製した(プロテアーゼ処理の有無にかかわらず選択を可能にするため)。ベクターpDOM4は、遺伝子IIIシグナルペプチド配列が酵母糖脂質アンカー型表面タンパク質(GAS)シグナルペプチドに置換されている、Fdファージベクターの誘導体である。また、それはリーダー配列と遺伝子IIIの間にc-mycタグをも含み、これにより遺伝子IIIがインフレームに戻される。このリーダー配列はファージディスプレイベクター内でも他の原核生物発現ベクター内でもよく機能し、広く一般的に使用することができる。pDOM33は、dAb-ファージ融合体をタンパク質分解酵素トリプシンに対して耐性にする、c-mycタグが除去されたpDOM4ベクターの改変型である。これは、タンパク質分解酵素に比較的安定しているdAbを選択するためのファージ選択におけるトリプシンの使用を可能にする(WO2008149143を参照されたい)。
【００８１】
エラープローン成熟ライブラリーの場合は、成熟させるdAbをコードするプラスミドDNAを、GENEMORPH(登録商標)II RANDOM MUTAGENESIS KIT(ランダムでユニークな突然変異誘発キット、Stratagene社)を用いて、PCRにより増幅した。その産物をSal IとNot Iで消化して、切断したファージベクターpDOM33とのライゲーション反応に使用した。CDRライブラリーの場合は、NNKまたはNNSコドンを含む縮重オリゴヌクレオチドを用いてPCR反応を行い、親和性成熟させるdAb中の必要な位置を多様化した。次にアセンブリPCRを用いて、多様化された完全長のインサートを作製した。そのインサートをSal IとNot Iで消化して、複数残基の変異導入のためのpDOM4および単一残基の変異導入のためのpDOM5とのライゲーション反応に使用した。pDOM5ベクターは、タンパク質の発現がLacZプロモーターによって駆動される、pUC119ベースの発現ベクターである。GAS1リーダー配列(WO 2005/093074参照)が、分離された可溶性dAbを大腸菌のペリプラズムおよび培養上清に確実に分泌させる。dAbはこのベクター内のSalI/NotIにクローニングされ、それによりdAbのC末端にmycタグが付加される。Sal IとNot Iを用いるこのプロトコルは、結果的にN末端にSTアミノ酸配列を含めることになる。
【００８２】
その後、いずれかの方法により生成されたライゲーション産物を用いて、大腸菌TB1株をエレクトロポレーションにより形質転換し、形質転換された細胞を15μg/mlテトラサイクリン含有2×TY寒天上にプレートすると、5×10^{7}クローンを上回るライブラリーサイズが得られた。
【００８３】
エラープローン・ライブラリーは次の平均変異率およびサイズを有していた：DOM7h-11 (dAbあたり2.5変異)、サイズ：6.1×10^{8}；DOM7h-14 (dAbあたり2.9変異)、サイズ：5.4×10^{8}。
【００８４】
各CDRライブラリーは4アミノ酸の多様性を有する。2つのライブラリーがCDR1とCDR3のそれぞれのために作製され、そして1つのライブラリーがCDR2のために作製された。各ライブラリー内で多様化された位置は次のとおりである(アミノ酸はVKダミーDPK9配列に基づく)：

ライブラリーサイズ

	DOM7h-11	DOM7h-14
1 - Q27, S28, S30, S31 (CDR1)	8.8×10^7	5.8×10^7
2 - S30, S31, Y32, N34 (CDR1)	4.6×10^8	4.2×10^8
3 - Y49, A50, A51, S53 (CDR2)	3.9×10^8	2.4×10^8
4 - Q89, S91, Y92, S93 (CDR3)	1.8×10^8	2.5×10^8
5 - Y92, Y93, T94, N96 (CDR3)	4.0×10^8	3.3×10^8

【００８５】

実施例２：選択戦略

3つのファージ選択戦略がVκ AlbudAb(商標)(抗血清アルブミンdAb)の親和性成熟のために採用された。

【００８６】

1) HSAのみに対する選択：

HSAに対する選択を3ラウンド実施した。エラープローン・ライブラリーと各CDRライブラリーはすべてのラウンドで個々のプールとして選択された。第1ラウンドの選択は、1mg/mlでイムノチューブ(immunotube)に受動的にコーティングしたHSAに対して行った。ラウンド2は100nM HSAに対して実施し、ラウンド3は10nM (CDR選択)または20もしくは100nM (エラープローン選択)のHSAに対して、両方とも可溶性選択として実施し、続いて第4ラウンドの選択をエラープローン・ライブラリーで1.5nM HSAに対して可溶性選択として実施した。エラープローン・ライブラリーは0.1MグリシンpH2.0を用いて溶出してから、1M Tris pH8.0で中和した。CDRライブラリーは1mg/mlトリプシンで溶出してから、対数期TG1細胞に感染させた。第3ラウンドの各選択物はスクリーニングのためにpDOM5にサブクローニングした。可溶性選択ではビオチン化HSAを使用した。

【００８７】

2) HSAに対するトリプシン選択：

親クローンと比べて増加したプロテアーゼ耐性をもち、かつ潜在的に改善された生物物理学的特性をもつdAbを選択するために、ファージ選択においてトリプシンを使用した(WO2008149143を参照されたい)。4ラウンドの選択をHSAに対して実施した。エラープローン・ライブラリーの第1ラウンドの選択は、トリプシンを用いることなく、1mg/mlで受動的にコーティングされたHSAに対して実施した；第2ラウンドは、20μg/mlトリプシンを用いて、1mg/mlで受動的にコーティングされたHSAに対して37℃で1時間実施した；第3ラウンドの選択は、20μg/mlまたは100μg/mlトリプシンを用いて、100nM HSAに対して、ビオチン化HSAを用いる可溶性選択として、37℃で1時間実施した。最終ラウンドの選択は、100μg/mlトリプシンを用いて、100nM HSAに対して、ビオチン化HSAを用いる可溶性選択として、37℃で一晩実施した。

【００８８】

3) HSA(ラウンド1)およびRSA(ラウンド2～4)に対するクロスオーバー選択：

第1ラウンドの選択は、1mg/mlで受動的にコーティングされたHSAまたは1μM HSA(可溶性選択)に対して実施し、その後さらに3ラウンドの可溶性選択を、ビオチン化RSAに対して、ラウンド1では1μM、ラウンド2では100nM、そしてラウンド3では20nM、10nMまたは1nMの濃度で実施した。

【００８９】

スクリーニング戦略および親和性判別：

それぞれの場合に選択後、適切なラウンドの選択から得られたファージDNAのプールをQIAfilter midiprepキット(Qiagen社)により調製し、そのDNAを制限酵素Sal1およびNot1で消化し、そして濃縮されたV遺伝子を、mycタグ付きdAbを発現する可溶性発現ベクターpDOM5の対応する部位にライゲートする(PCT/EP2008/067789を参照されたい)。ライゲートされたDNAを用いて大腸菌HB 2151細胞を電気的に形質転換し、続いて抗生物質カルベニシリンを含む寒天プレート上で一晩増殖させる。得られたコロニーを抗原結合について個別に

評価する。それぞれの場合に、少なくとも96のクローンをHSA、CSA(カニクイザル血清アルブミン)、MSA(マウス血清アルブミン)およびRSAへの結合についてBIAcore(商標)(表面プラズモン共鳴)で試験した。MSA抗原はSigma社から入手し(本質的に脂肪酸不含、約99%(アガロースゲル電気泳動)、凍結乾燥粉末、カタログ番号A3559)、CSAはprometic blue樹脂(Amersham社)を用いてカニクイザル血清アルブミンから精製した。可溶性dAbフラグメントは96ウェルプレートでONEX培養培地(Novagen社)中の細菌培養により37℃で一晩産生させた。可溶性dAbを含む培養上清を遠心分離して、高密度HSA、CSA、MSAおよびRSA CM5チップへの結合についてBIAcoreで分析した。クローンは、オフ速度スクリーニングにより、これらすべての動物種の血清アルブミンに結合することが判明した。これらのクローンの配列を決定して、ユニークなdAb配列を明らかにした。

【００９０】

DOM7h11-15は親と96.3%同一性を有した(アミノ酸レベルで)。DOM7h-11-3は親と97.2%同一性を有した(アミノ酸レベルで)。

【００９１】

DOM7h-14-10は親と96.3%同一性を有した(アミノ酸レベルで)。

【００９２】

dAbは、2.5L振とうフラスコ内でOnex培地にて30℃、250rpmで48時間にわたり細菌上清として発現させた。dAbは、プロテインLアガロースへの吸着とその後の10mMグリシンpH2.0を用いた溶出によって培養培地から精製した。BIAcoreによるHSA、CSA、MSAおよびRSAへの結合は、１μM、500nMおよび50nMの3つの濃度の精製タンパク質を用いて確認した。各血清アルブミンへのAlbudAbの結合親和性(K_D)を調べるために、精製dAbを5000nM～39nMのアルブミン濃度範囲(5000nM、2500nM、1250nM、625nM、312nM、156nM、78nM、39nM)にわたってBIAcoreで分析した。

【００９３】

[表６]

AlbudAb	SA への親和性(K_D) (nM)	Kd	Ka
	ラット		
DOM7h-14	60	2.095E-01	4.00E+06
DOM7h-14-10	4	9.640E-03	4.57E+06
DOM 7h-11	2100	1.00E-01	4.80E+04
DOM 7h-11-3	10000 (88000)	(7.18e-1)	(8.11e3)
DOM 7h-11-15	20	2.10E-02	1.10E+06
	カニクイザル		
DOM 7h-14	66	9.65E-02	1.50E+06
DOM 7h-14-10	9	1.15E-02	1.60E+06
DOM 7h-11	1000	6.82E-01	8.00E+05
DOM 7h-11-3	670 (200)	9.6E-02 (1.5e-1)	2.90E+05 (7.26e5)
DOM 7h-11-15	3	5.57E-03	5.80E+06
	マウス		
DOM 7h-14	12	4.82E-02	4.10E+06
DOM 7h-14-10	30	3.41E-02	1.29E+06
DOM 7h-11	5000	9.00E-01	
DOM 7h-11-3	≥10000 (36000)	(6.12e-1)	(1.67e4)
DOM 7h-11-15	10	9.40E-03	1.10E+06
	ヒト		
DOM 7h-14	33	4.17E-02	1.43E+06

DOM 7h-14-10	12	1.39E-02	1.50E+06
DOM 7h-11	2800	6.41E-01	7.00E+05
DOM 7h-11-3	32 (130)	1.6E-02 (2.35e-2)	6.50E+05 (1.86e5)
DOM 7h-11-15	1	1.84E-03	2.00E+06

＊かっこ内の値は２回の独立したSPR実験から導かれた。

【００９４】

DOM7h-14から誘導されたすべての変異体は、マウス、ラット、ヒトおよびカニクイザルの血清アルブミンに対して交差反応性である。DOM7h-14-10は、親に比較して、ラット、カニクイザルおよびヒト血清アルブミンに対する親和性が改善している。

【００９５】

DOM7h-11-3はCSAおよびHSAに対して改善された親和性を有した。DOM7h-11-15はRSA，MSA，CSAおよびHSAに対して改善された親和性を有した。

【００９６】

実施例３：主要なDOM7h-11系統クローンの起源

DOM7h-11-3：CDR2ライブラリー(Y49、A50、A51、S53)を用いてHSAに対して実施された親和性成熟から、ラウンド3出力10nM HSAで得られた。

DOM7h-11-15：CDR2ライブラリー(Y49、A50、A51、S53)を用いて、ラウンド1としてHSAに対して、続いて追加の3ラウンドの選択としてRSAに対して実施されたクロスオーバー選択から、1nM RSAによるラウンド3選択で得られた。

【００９７】

[表７]：CDR配列（カバットによる、参照は上記のとおり）

AlbudAb	CDR		
	CDR1	CDR2	CDR3
DPK9 Vk ダミー	SQSISSYLN (配列番号 25)	YAASSLQS (配列番号 26)	QQSYSTPNT (配列番号 27)
DOM7h-11	SRPIGTTLS (配列番号 28)	WFGSRLQS (配列番号 29)	AQAGTHPTT (配列番号 30)
DOM 7h-11-15	SRPIGTMLS (配列番号 31)	LAFSRLQS (配列番号 32)	AQAGTHPTT (配列番号 33)
DOM 7h-11-3	SRPIGTTLS (配列番号 34)	LWFSRLQS (配列番号 35)	AQAGTHPTT (配列番号 36)

【００９８】

実施例４：鍵となるDOM7h-14系統クローンの起源

DOM7h-14-10：CDR3ライブラリを使用したHSAに対して行われた親和性成熟より、(Y92，Y93，T94，N96)、第３ラウンドの出力。

【００９９】

[表８]：CDR配列(カバットによる；参照は上記のとおり)

AlbudAb	CDR		
	CDR1	CDR2	CDR3
DOM 7h-14	SQWIGSQLS (配列番号 37)	MWRSSLQS (配列番号 38)	AQGAALPRT (配列番号 39)
DOM 7h-14-10	SQWIGSQLS (配列番号 40)	MWRSSLQS (配列番号 41)	AQGLRHPKT (配列番号 42)

【０１００】

実施例５：発現および生物物理学的特性解析

2.5L振とうフラスコ内でのルーチンの細菌発現レベルは、Onex培地で30℃、250rpmにて48時間培養した後に測定された。生物物理学的特性はSEC MALLSおよびDSCにより測定された。

【０１０１】

SEC MALLS(多角度レーザー光散乱を装備したサイズ排除クロマトグラフィー)は、溶液中の高分子を特性解析するための非侵襲的な手法である。簡単に説明すると、タンパク質(ダルベッコPBSバッファー中の濃度1mg/mL)を0.5ml/分で、その流体力学的特性に従って、サイズ排除クロマトグラフィー(カラム：TOSOH Biosciences社製のTSK3000；Pharmacia社製のS200)により分離する。分離後、そのタンパク質が光を散乱させる傾向を、多角度レーザー光散乱(MALLS)検出器を用いて測定する。タンパク質が検出器を通過している間の散乱光の強度を角度の関数として測定する。この測定を、屈折率(RI)検出器を用いて測定したタンパク質濃度と組み合わせると、適切な式(解析ソフトウェアAstra v.5.3.4.12の必須部分)を用いるモル質量の計算が可能となる。

【０１０２】

DSC(示差走査熱量測定)：簡単に説明すると、タンパク質(PBS中1mg/mL)を180℃/時の一定速度で加熱し、熱変性に伴う検出可能な熱変化を測定する。転移中間点($_{app}T_m$)が測定されるが、これはタンパク質の50％がその天然のコンフォメーションをとり、残りの50％が変性されるときの温度として説明される。ここでは、検査したタンパク質のほとんどが完全にはリフォールディングしないため、見かけの転移中間点($_{app}T_m$)をDSCにより測定した。Tmが高ければ高いほど、その分子は安定している。アンフォールディング曲線を非2状態方程式によって解析した。用いたソフトウェアパッケージはOrigin(登録商標)v7.0383であった。

【０１０３】

[表９]

AlbudAb	生物物理学的パラメータ	
	SEC MALLS	DSC Tm(°C)
DOM7h-14	M	60
DOM 7h-14-10	M	59
DOM 7h-11	M	66.9-72.2
DOM 7h-11-3	M (95%)*	66.6/70.5
DOM 7h-11-15	M (<5%D)	58.5-60.5

＊ある別の試験では、９５％より低かったとはいえ、単量体が主にSEC MALLSで検出された。

【０１０４】

表9に示したすべてのクローンについて、大腸菌において15～119mg/Lの範囲で発現レベルが観察された。

【０１０５】

DOM7h-14およびDOM7h-11変異体に関しては、親和性成熟の間中、有益な生物物理学的パラメータ(SEC MALLSで測定された溶液中での単量体状態、およびDSCで測定された55℃を超えるappTm)と発現レベルが維持された。単量体状態は、それが二量体化を回避し、かつ細胞表面受容体のような標的を架橋しうる製品のリスクを回避するので、有利である。

【０１０６】

実施例６：ラット、マウスおよびカニクイザルにおける血清半減期の測定

AlbudAbであるDOM7h-14-10, DOM7h-11およびDOM7h-11-15をpDOM5ベクターにクローニングした。各AlbudAb(商標)について、20～50mg量を大腸菌において発現させ、細菌の培養上清からプロテインLアフィニティ樹脂を用いて精製し、100mMグリシンpH2により溶出した。そのタンパク質を1mg/mLより高濃度へと濃縮し、PBSにバッファー交換し、Qスピンカラム(Vivascience社)を使ってエンドトキシンを枯渇させた。ラットの薬物動態(PK)解析のために、化合物あたり3匹のラットを用いて、AlbudAbを2.5mg/kgで単回静脈注射として投与した。血清サンプルを0.16、1、4、12、24、48、72、120、168時間で採取した。血清レベルの分析は、以下に記載した方法に従って抗myc ELISAにより行った。

【０１０７】

マウスのPKのために、DOM7h-11およびDOM7h-11-15を3匹の被験体の用量群につき2.5mg/kgで単回静脈注射として投与し、血清サンプルを10分; 1h; 8h; 24h; 48h; 72h; 96hで採取した。血清レベルの分析は、以下に記載した方法に従って抗myc ELISAにより行った。

【０１０８】

カニクイザルのPKのために、DOM7h-14-10およびDOM7h-11-15を用量群あたり3匹の雌カニクイザルに2.5mg/kgで単回静脈注射として投与し、血清サンプルを0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、24、48、96、144、192、288、336、504時間で採取した。血清レベルの分析は、以下に記載した方法に従って抗myc ELISAにより行った。

【０１０９】

抗myc ELISA法：

血清中のAlbudAb濃度を抗myc ELISA法で測定した。簡単に説明すると、ヤギ抗mycポリクローナル抗体(1：500；Abcam社、カタログ番号ab9132)をNunc 96ウェルMaxisorpプレートに一晩コーティングして、5% BSA/PBS＋1% Tweenを用いてブロッキングした。血清サンプルを既知濃度の標準と共に希釈範囲で添加した。次に、結合されたmycタグ付きAlbudAbを、ウサギポリクローナル抗Vk(1：1000；社内試薬、血液をプールして使用前にプロテ

インAで精製した)とその後に抗ウサギIgG HRP抗体(1：10,000; Sigma社、カタログ番号A2074)を用いて検出した。アッセイの各段階の間に3×PBS＋0.1% Tween20、続いて3×PBSを用いてプレートを洗浄した。最終洗浄後にTMB (SureBlue TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate、KPL社、カタログ番号52-00-00)を添加して発色させた。これを1M HClで停止させてから、そのシグナルを450nmでの吸光度により測定した。

【０１１０】

生のELISAデータから、未知サンプルの濃度を標準曲線に対する内挿によって、希釈係数を考慮に入れて確定した。各時点からの平均濃度結果を反復値から求めて、WinNonLin解析パッケージ(例えば、バージョン5.1、Pharsight社(Mountain View, CA94040, 米国)から入手可能)に入力した。ノンコンパートメントモデルを用いてデータをフィットさせ、そこでPKパラメータをそのソフトウェアで概算して終末半減期を得た。投薬情報および時点は、各PKプロファイルの終末相を反映するように選択された。

【０１１１】

表１０: 単一AlbudAb(商標)PK

種	AlbudAb	アルブミンK_D (nM)	PK パラメータ			
			AUC h x µg/ml	CL ml/h/kg	t1/2 h	Vz ml/kg
ラット	**DOM7h-14***	60				
	DOM7h-14-10	4	2134.6	1.2	42.1	71.2
	DOM 7h-11	2100	320.1	7.8	23.3	263.9
	DOM 7h-11-15	20	843.4	3.0	30.3	130.7
マウス	**DOM 7h-11**	5000	304.7	8.2	18.3	216.8
	DOM 7h-11-15	10	499.2	5.0	33.7	243.4
カニクイザル	**DOM 7h-14***	66			217.5	
	DOM 7h-14-10	9	6174.6	0.4	200.8	117.8
	DOM 7h-11*	3300			135.1	
	DOM 7h-11-15	3	4195	0.6	198.1	170.3

＊過去のデータ

【０１１２】

ラット、マウスおよびカニクイザルの実験から得られた薬物動態パラメータはノンコン

パートメントモデルを用いてフィットさせた。注釈：AUC：投薬時から無限大に外挿される曲線下面積；CL：クリアランス；t1/2：血中濃度が半分になる時間；Vz：終末相に基づいた分布容積。

【０１１３】

DOM7h-11-15は、親に比較して、ラットとマウスで改善されたAUCおよびt1/2を有する。DOM7h-11-15はまた、親に比べて、カニクイザルでも改善されたAUCおよびt1/2を有する。このAUC/t1/2の改善は、血清アルブミンに対するin vitro KDの改善と相関している。

【０１１４】

実施例７：AlbudAb(商標) IFN融合体

クローニングおよび発現：

単一AlbudAbと同様に、親和性成熟させたVk AlbudAbをインターフェロンα2b(IFNα2b)に連結して、AlbudAbの有用なPKが融合タンパク質として維持されるかどうかを調べた。

【０１１５】

インターフェロンα2bアミノ酸配列

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQ
QIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYF
QRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

(配列番号43)

インターフェロンα2bヌクレオチド配列：

TGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCA
CAGATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCC
CCAGGAGGAGTTTGGCAACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCCTCCATGA
GATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGAT
GAGACCCTCCTAGACAAATTCTACACTGAACTCTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAG
CCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCCTGATGAAGGAGGACTCC
ATTCTGGCTGTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAAATA
CAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTCAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTCTTTGTCA
ACAAACTTGCAAGAAAGTTTAAGAAGTAAGGAA

(配列番号44)

【０１１６】

IFNα2bはTVAAPSリンカー領域を介してAlbudAbに連結させた(WO2007085814を参照されたい)。その構築物をSOE-PCR (Horton et al. Gene, 77, p61 (1989)の方法によるシングルオーバーラップエクステンション)によりクローニングした。AlbudAbおよびIFN配列のPCR増幅は、TVAAPSリンカー領域で約15塩基対のオーバーラップをもつプライマーを用いて別々に実施した。用いたプライマーは次のとおりである：

IFNα2b SOEフラグメント5' GCCCGGATCCACCGGCTGTGATCTG (配列番号45)

IFNα2b SOEフラグメント3' GGAGGATGGAGACTGGGTCATCTGGATGTC (配列番号46)

Vk SOEフラグメント5' GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC (配列番号47)

myc タグも導入するためのVk SOEフラグメント3’ GCGCAAGCTTTTATTAATTCAGATCCTCTTC TGAGATGAGTTTTTGTTCTGCGGCCGCCCGT TTGATTTCCACCTTGGTCCC (配列番号48)

これらの断片を別々に精製し、続いてフランキングプライマーのみを用いてSOE(シングルオーバーラップエクステンションPCR伸長)反応でアセンブリした。

【０１１７】

IFNα2b SOEフラグメント5' GCCCGGATCCACCGGCTGTGATCTG (配列番号49)

myc も導入するためのVk SOEフラグメント3’ GCGCAAGCTTTTATTAATTCAGATCCTCTTC TGAGATGAGTTTTTGTTCTGCGGCCGCCCGT TTGATTTCCACCTTGGTCCC (配列番号50)

アセンブリしたPCR産物は制限酵素BamHIおよびHindIIIを用いて消化し、その遺伝子を

哺乳動物発現ベクターpDOM50内の対応する部位にライゲートさせた。このベクターは、細胞培地への発現を促進するためのN末端V-J2-CマウスIgG分泌リーダー配列を有するpTT5誘導体である。

【０１１８】

リーダー配列(アミノ酸)：

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

（配列番号51）

リーダー配列(ヌクレオチド)：

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGATCCAC
CGGGC

（配列番号52）

【０１１９】

プラスミドDNAはQIAfilter megaprep (Qiagen社)を用いて調製した。1μg DNA/mlを293-FectinでHEK293E細胞にトランスフェクトし、無血清培地中で増殖させた。タンパク質を5日間の培養で発現させ、プロテインLアフィニティ樹脂を用いて培養上清から精製して、100mMグリシンpH2で溶出した。そのタンパク質を1mg/mlより高濃度に濃縮し、PBSにバッファー交換し、そしてQスピンカラム(Vivascience社)を用いてエンドトキシンを枯渇させた。

【０１２０】

表１１：myc-有りおよび無しでのインターフェロンα2b-AlbudAb配列
(アミノ酸配列およびヌクレオチド配列として)
以下の融合体では、インターフェロンα2bはAlbudAbに対してN末端側である

	aa + myc	nt + myc	aa no tag	nt no tag
DMS7321	CDLPQTHSLGSRRTL	TGCGACTTGCCA	CDLPQTHSLGS	TGCGACTTGCCA
(IFNα2b-	MLLAQMRRISLFSCL	CAGACACATAGT	RRTLMLLAQM	CAGACACATAGT
DOM7h-	KDRHDFGFPQEEFG	TTGGGATCAAGA	RRISLFSCLKD	TTGGGATCAAGA
14)	NQFQKAETIPVLHEMI	AGAACATTGATG	RHDFGFPQEE	AGAACATTGATG
	QQIFNLFSTKDSSAA	TTATTAGCACAAA	FGNQFQKAETI	TTATTAGCACAA
	WDETLLDKFYTELYQ	TGCGTAGAATTT	PVLHEMIQQIF	ATGCGTAGAATT
	QLNDLEACVIQGVGV	CTTTGTTCTCTTG	NLFSTKDSSAA	TCTTTGTTCTCTT
	TETPLMKEDSILAVRK	TCTAAAGGACCG	WDETLLDKFYT	GTCTAAAGGACC
	YFQRITLYLKEKKYSP	TCACGACTTCGG	ELYQQLNDLEA	GTCACGACTTCG
	CAWEVVRAEIMRSFS	ATTCCCTCAGGA	CVIQGVGVTET	GATTCCCTCAGG
	LSTNLQESLRSKETV	AGAGTTTGGAAA	PLMKEDSILAV	AAGAGTTTGGAA
	AAPSDIQMTQSPSSL	CCAATTCCAAAA	RKYFQRITLYLK	ACCAATTCCAAA
	SASVGDRVTITCRAS	AGCAGAAACTAT	EKKYSPCAWE	AAGCAGAAACTA

	QWIGSQLSWYQQKP	TCCTGTCTTGCA	VVRAEIMRSFS	TTCCTGTCTTGC
	GKAPKLLIMWRSSLQ	CGAAATGATCCA	LSTNLQESLRS	ACGAAATGATCC
	SGVPSRFSGSGSGT	GCAAATATTCAAT	KETVAAPSDIQ	AGCAAATATTCA
	DFTLTISSLQPEDFAT	TTGTTTTCTACAA	MTQSPSSLSAS	ATTTGTTTTCTAC
	YYCAQGAALPRTFGQ	AGGACTCATCAG	VGDRVTITCRA	AAAGGACTCATC
	GTKVEIKR	CCGCTTGGGATG	SQWIGSQLSW	AGCCGCTTGGGA
	AAAEQKLISEEDLN*	AAACTCTGTTAG	YQQKPGKAPK	TGAAACTCTGTT
	(SEQ ID NO:53)	ATAAATTCTACAC	LLIMWRSSLQS	AGATAAATTCTA
		TGAACTATATCAA	GVPSRFSGSG	CACTGAACTATA
		CAACTGAACGAT	SGTDFTLTISSL	TCAACAACTGAA
		CTAGAGGCTTGC	QPEDFATYYCA	CGATCTAGAGGC
		GTTATTCAGGGT	QGAALPRTFG	TTGCGTTATTCA
		GTAGGAGTTACT	QGTKVEIKR	GGGTGTAGGAGT
		GAAACTCCCCTA	(SEQ ID NO:55)	TACTGAAACTCC
		ATGAAAGAAGAT		CCTAATGAAAGA
		TCAATTCTAGCC		AGATTCAATTCTA
		GTTAGAAAATACT		GCCGTTAGAAAA
		TTCAGCGTATCA		TACTTTCAGCGT
		CATTGTATTTAAA		ATCACATTGTATT
		GGAAAAGAAATA		TAAAGGAAAAGA
		CTCCCCATGTGC		AATACTCCCCAT
		ATGGGAGGTGGT		GTGCATGGGAG
		TAGAGCAGAAAT		GTGGTTAGAGCA
		TATGAGGTCCTT		GAAATTATGAGG
		CTCTCTTTCTACG		TCCTTCTCTCTTT
		AATTTGCAAGAAT		CTACGAATTTGC
		CTTTGAGATCTAA		AAGAATCTTTGA
		GGAAACCGTCGC		GATCTAAGGAAA
		TGCTCCATCTGA		CCGTCGCTGCTC
		CATCCAGATGAC		CATCTGACATCC
		CCAGTCTCCATC		AGATGACCCAGT
		CTCCCTGTCTGC		CTCCATCCTCCC
		ATCTGTAGGAGA		TGTCTGCATCTG
		CCGTGTCACCAT		TAGGAGACCGTG
		CACTTGCCGGGC		TCACCATCACTT
		AAGTCAGTGGAT		GCCGGGCAAGT
		TGGGTCTCAGTT		CAGTGGATTGGG

		ATCTTGGTACCA GCAGAAACCAGG GAAAGCCCCTAA GCTCCTGATCAT GTGGCGTTCCTC GTTGCAAAGTGG GGTCCCATCACG TTTCAGTGGCAG TGGATCTGGGAC AGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGT CTGCAACCTGAA GATTTTGCTACG TACTACTGTGCT CAGGGTGCGGC GTTGCCTAGGAC GTTCGGCCAAGG GACCAAGGTGGA AATCAAACGG**GC** **GGCCGCAGAAC** **AAAAACTCATCT** **CAGAAGAGGAT** **CTGAATTAA** (SEQ ID NO:54)		TCTCAGTTATCTT GGTACCAGCAGA AACCAGGGAAAG CCCCTAAGCTCC TGATCATGTGGC GTTCCTCGTTGC AAAGTGGGGTCC CATCACGTTTCA GTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATT TCACTCTCACCA TCAGCAGTCTGC AACCTGAAGATT TTGCTACGTACT ACTGTGCTCAGG GTGCGGCGTTG CCTAGGACGTTC GGCCAAGGGAC CAAGGTGGAAAT CAAACGG (SEQ ID NO:56)
DMS732 (IFNα2b-DOM7h-14-10)	CDLPQTHSLGSRRTL MLLAQMRRISLFSCL KDRHDFGFPQEEFG NQFQKAETIPVLHEMI QQIFNLFSTKDSSAA WDETLLDKFYTELYQ QLNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRK YFQRITLYLKEKKYSP CAWEVVRAEIMRSFS LSTNLQESLRSKETV AAPSDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRAS	TGCGACTTGCCA CAGACACATAGT TTGGGATCAAGA AGAACATTGATG TTATTAGCACAAA TGCGTAGAATTT CTTTGTTCTCTTG TCTAAAGGACCG TCACGACTTCGG ATTCCCTCAGGA AGAGTTTGGAAA CCAATTCCAAAA AGCAGAAACTAT	CDLPQTHSLGS RRTLMLLAQM RRISLFSCLKD RHDFGFPQEE FGNQFQKAETI PVLHEMIQQIF NLFSTKDSSAA WDETLLDKFYT ELYQQLNDLEA CVIQGVGVTET PLMKEDSILAV RKYFQRITLYLK EKKYSPCAWE	TGCGACTTGCCA CAGACACATAGT TTGGGATCAAGA AGAACATTGATG TTATTAGCACAA ATGCGTAGAATT TCTTTGTTCTCTT GTCTAAAGGACC GTCACGACTTCG GATTCCCTCAGG AAGAGTTTGGAA ACCAATTCCAAA AAGCAGAAACTA

	QWIGSQLSWYQQKP	TCCTGTCTTGCA	VVRAEIMRSFS	TTCCTGTCTTGC
	GKAPKLLIMWRSSLQ	CGAAATGATCCA	LSTNLQESLRS	ACGAAATGATCC
	SGVPSRFSGSGSGT	GCAAATATTCAAT	KETVAAPSDIQ	AGCAAATATTCA
	DFTLTISSLQPEDFAT	TTGTTTTCTACAA	MTQSPSSLSAS	ATTTGTTTTCTAC
	YYCAQGLRHPKTFG	AGGACTCATCAG	VGDRVTITCRA	AAAGGACTCATC
	QGTKVEIKR	CCGCTTGGGATG	SQWIGSQLSW	AGCCGCTTGGGA
	AAAEQKLISEEDLN*	AAACTCTGTTAG	YQQKPGKAPK	TGAAACTCTGTT
	(SEQ ID NO:57)	ATAAATTCTACAC	LLIMWRSSLQS	AGATAAATTCTA
		TGAACTATATCAA	GVPSRFSGSG	CACTGAACTATA
		CAACTGAACGAT	SGTDFTLTISSL	TCAACAACTGAA
		CTAGAGGCTTGC	QPEDFATYYCA	CGATCTAGAGGC
		GTTATTCAGGGT	QGLRHPKTFG	TTGCGTTATTCA
		GTAGGAGTTACT	QGTKVEIKR	GGGTGTAGGAGT
		GAAACTCCCCTA	(SEQ ID NO:59)	TACTGAAACTCC
		ATGAAAGAAGAT		CCTAATGAAAGA
		TCAATTCTAGCC		AGATTCAATTCTA
		GTTAGAAAATACT		GCCGTTAGAAAA
		TTCAGCGTATCA		TACTTTCAGCGT
		CATTGTATTTAAA		ATCACATTGTATT
		GGAAAAGAAATA		TAAAGGAAAAGA
		CTCCCCATGTGC		AATACTCCCCAT
		ATGGGAGGTGGT		GTGCATGGGAG
		TAGAGCAGAAAT		GTGGTTAGAGCA
		TATGAGGTCCTT		GAAATTATGAGG
		CTCTCTTTCTACG		TCCTTCTCTCTTT
		AATTTGCAAGAAT		CTACGAATTTGC
		CTTTGAGATCTAA		AAGAATCTTTGA
		GGAAACCGTCGC		GATCTAAGGAAA
		TGCTCCATCTGA		CCGTCGCTGCTC
		CATCCAGATGAC		CATCTGACATCC
		CCAGTCTCCATC		AGATGACCCAGT
		CTCCCTGTCTGC		CTCCATCCTCCC
		ATCTGTAGGAGA		TGTCTGCATCTG
		CCGTGTCACCAT		TAGGAGACCGTG
		CACTTGCCGGGC		TCACCATCACTT
		AAGTCAGTGGAT		GCCGGGCAAGT
		TGGGTCTCAGTT		CAGTGGATTGGG

		ATCTTGGTACCA GCAGAAACCAGG GAAAGCCCCTAA GCTCCTGATCAT GTGGCGTTCCTC GTTGCAAAGTGG GGTCCCATCACG TTTCAGTGGCAG TGGATCTGGGAC AGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGT CTGCAACCTGAA GATTTTGCTACG TACTACTGTGCT CAGGGTTTGAGG CATCCTAAGACG TTCGGCCAAGGG ACCAAGGTGGAA ATCAAACGG**GCG GCCGCAGAACA AAAACTCATCTC AGAAGAGGATCT GAATTAA** (SEQ ID NO:58)		TCTCAGTTATCTT GGTACCAGCAGA AACCAGGGAAAG CCCCTAAGCTCC TGATCATGTGGC GTTCCTCGTTGC AAAGTGGGGTCC CATCACGTTTCA GTGGCAGTGGAT CTGGGACAGATT TCACTCTCACCA TCAGCAGTCTGC AACCTGAAGATT TTGCTACGTACT ACTGTGCTCAGG GTTTGAGGCATC CTAAGACGTTCG GCCAAGGGACC AAGGTGGAAATC AAACGG (SEQ ID NO:60)
DMS7325 (IFNα2b-DOM7h-11)	CDLPQTHSLGSRRTL MLLAQMRRISLFSCL KDRHDFGFPQEEFG NQFQKAETIPVLHEMI QQIFNLFSTKDSSAA WDETLLDKFYTELYQ QLNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRK YFQRITLYLKEKKYSP CAWEVVRAEIMRSFS LSTNLQESLRSKETV AAPSDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRAS	TGCGACTTGCCA CAGACACATAGT TTGGGATCAAGA AGAACATTGATG TTATTAGCACAAA TGCGTAGAATTT CTTTGTTCTCTTG TCTAAAGGACCG TCACGACTTCGG ATTCCCTCAGGA AGAGTTTGGAAA CCAATTCCAAAA AGCAGAAACTAT	CDLPQTHSLGS RRTLMLLAQM RRISLFSCLKD RHDFGFPQEE FGNQFQKAETI PVLHEMIQQIF NLFSTKDSSAA WDETLLDKFYT ELYQQLNDLEA CVIQGVGVTET PLMKEDSILAV RKYFQRITLYLK EKKYSPCAWE	TGCGACTTGCCA CAGACACATAGT TTGGGATCAAGA AGAACATTGATG TTATTAGCACAA ATGCGTAGAATT TCTTTGTTCTCTT GTCTAAAGGACC GTCACGACTTCG GATTCCCTCAGG AAGAGTTTGGAA ACCAATTCCAAA AAGCAGAAACTA

	RPIGTTLSWYQQKPG	TCCTGTCTTGCA	VVRAEIMRSFS	TTCCTGTCTTGC
	KAPKLLIWFGSRLQS	CGAAATGATCCA	LSTNLQESLRS	ACGAAATGATCC
	GVPSRFSGSGSGTD	GCAAATATTCAAT	KETVAAPSDIQ	AGCAAATATTCA
	FTLTISSLQPEDFATY	TTGTTTTCTACAA	MTQSPSSLSAS	ATTTGTTTTCTAC
	YCAQAGTHPTTFGQ	AGGACTCATCAG	VGDRVTITCRA	AAAGGACTCATC
	GTKVEIKR	CCGCTTGGGATG	SRPIGTTLSWY	AGCCGCTTGGGA
	AAAEQKLISEEDLN*	AAACTCTGTTAG	QQKPGKAPKLL	TGAAACTCTGTT
	(SEQ ID NO:61)	ATAAATTCTACAC	IWFGSRLQSGV	AGATAAATTCTA
		TGAACTATATCAA	PSRFSGSGSG	CACTGAACTATA
		CAACTGAACGAT	TDFTLTISSLQP	TCAACAACTGAA
		CTAGAGGCTTGC	EDFATYYCAQA	CGATCTAGAGGC
		GTTATTCAGGGT	GTHPTTFGQG	TTGCGTTATTCA
		GTAGGAGTTACT	TKVEIKR (SEQ	GGGTGTAGGAGT
		GAAACTCCCCTA	ID NO:63)	TACTGAAACTCC
		ATGAAAGAAGAT		CCTAATGAAAGA
		TCAATTCTAGCC		AGATTCAATTCTA
		GTTAGAAAATACT		GCCGTTAGAAAA
		TTCAGCGTATCA		TACTTTCAGCGT
		CATTGTATTTAAA		ATCACATTGTATT
		GGAAAAGAAATA		TAAAGGAAAAGA
		CTCCCCATGTGC		AATACTCCCCAT
		ATGGGAGGTGGT		GTGCATGGGAG
		TAGAGCAGAAAT		GTGGTTAGAGCA
		TATGAGGTCCTT		GAAATTATGAGG
		CTCTCTTTCTACG		TCCTTCTCTCTTT
		AATTTGCAAGAAT		CTACGAATTTGC
		CTTTGAGATCTAA		AAGAATCTTTGA
		GGAAACCGTCGC		GATCTAAGGAAA
		TGCTCCATCTGA		CCGTCGCTGCTC
		CATCCAGATGAC		CATCTGACATCC
		CCAGTCTCCATC		AGATGACCCAGT
		CTCCCTGTCTGC		CTCCATCCTCCC
		ATCTGTAGGAGA		TGTCTGCATCTG
		CCGTGTCACCAT		TAGGAGACCGTG
		CACTTGCCGGGC		TCACCATCACTT
		AAGTCGTCCGAT		GCCGGGCAAGT
		TGGGACGACGTT		CGTCCGATTGGG

		AAGTTGGTACCA GCAGAAACCAGG GAAAGCCCCTAA GCTCCTGATCTG GTTTGGTTCCCG GTTGCAAAGTGG GGTCCCATCACG TTTCAGTGGCAG TGGATCTGGGAC AGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGT CTGCAACCTGAA GATTTTGCTACG TACTACTGTGCG CAGGCTGGGAC GCATCCTACGAC GTTCGGCCAAGG GACCAAGGTGGA AATCAAACGG**GC** **GGCCGCAGAAC** **AAAAACTCATCT** **CAGAAGAGGAT** **CTGAATTAA** (SEQ ID NO:62)		ACGACGTTAAGT TGGTACCAGCAG AAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTC CTGATCTGGTTT GGTTCCCGGTTG CAAAGTGGGGTC CCATCACGTTTC AGTGGCAGTGGA TCTGGGACAGAT TTCACTCTCACC ATCAGCAGTCTG CAACCTGAAGAT TTTGCTACGTAC TACTGTGCGCAG GCTGGGACGCAT CCTACGACGTTC GGCCAAGGGAC CAAGGTGGAAAT CAAACGG (SEQ ID NO:64)
DMS7327 (IFNα2b- DOM7h- 11-15)	CDLPQTHSLGSRRTL MLLAQMRRISLFSCL KDRHDFGFPQEEFG NQFQKAETIPVLHEMI QQIFNLFSTKDSSAA WDETLLDKFYTELYQ QLNDLEACVIQGVGV TETPLMKEDSILAVRK YFQRITLYLKEKKYSP CAWEVVRAEIMRSFS LSTNLQESLRSKETV AAPSDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRAS	TGCGACTTGCCA CAGACACATAGT TTGGGATCAAGA AGAACATTGATG TTATTAGCACAAA TGCGTAGAATTT CTTTGTTCTCTTG TCTAAAGGACCG TCACGACTTCGG ATTCCCTCAGGA AGAGTTTGGAAA CCAATTCCAAAA AGCAGAAACTAT	CDLPQTHSLGS RRTLMLLAQM RRISLFSCLKD RHDFGFPQEE FGNQFQKAETI PVLHEMIQQIF NLFSTKDSSAA WDETLLDKFYT ELYQQLNDLEA CVIQGVGVTET PLMKEDSILAV RKYFQRITLYLK EKKYSPCAWE	TGCGACTTGCCA CAGACACATAGT TTGGGATCAAGA AGAACATTGATG TTATTAGCACAA ATGCGTAGAATT TCTTTGTTCTCTT GTCTAAAGGACC GTCACGACTTCG GATTCCCTCAGG AAGAGTTTGGAA ACCAATTCCAAA AAGCAGAAACTA

	RPIGTMLSWYQQKP	TCCTGTCTTGCA	VVRAEIMRSFS	TTCCTGTCTTGC
	GKAPKLLILAFSRLQS	CGAAATGATCCA	LSTNLQESLRS	ACGAAATGATCC
	GVPSRFSGSGSGTD	GCAAATATTCAAT	KETVAAPSDIQ	AGCAAATATTCA
	FTLTISSLQPEDFATY	TTGTTTTCTACAA	MTQSPSSLSAS	ATTTGTTTTCTAC
	YCAQAGTHPTTFGQ	AGGACTCATCAG	VGDRVTITCRA	AAAGGACTCATC
	GTKVEIKR	CCGCTTGGGATG	SRPIGTMLSWY	AGCCGCTTGGGA
	AAAEQKLISEEDLN*	AAACTCTGTTAG	QQKPGKAPKLL	TGAAACTCTGTT
	(SEQ ID NO:65)	ATAAATTCTACAC	ILAFSRLQSGV	AGATAAATTCTA
		TGAACTATATCAA	PSRFSGSGSG	CACTGAACTATA
		CAACTGAACGAT	TDFTLTISSLQP	TCAACAACTGAA
		CTAGAGGCTTGC	EDFATYYCAQA	CGATCTAGAGGC
		GTTATTCAGGGT	GTHPTTFGQG	TTGCGTTATTCA
		GTAGGAGTTACT	TKVEIKR (SEQ	GGGTGTAGGAGT
		GAAACTCCCCTA	ID NO:67)	TACTGAAACTCC
		ATGAAAGAAGAT		CCTAATGAAAGA
		TCAATTCTAGCC		AGATTCAATTCTA
		GTTAGAAAATACT		GCCGTTAGAAAA
		TTCAGCGTATCA		TACTTTCAGCGT
		CATTGTATTTAAA		ATCACATTGTATT
		GGAAAAGAAATA		TAAAGGAAAAGA
		CTCCCCATGTGC		AATACTCCCCAT
		ATGGGAGGTGGT		GTGCATGGGAG
		TAGAGCAGAAAT		GTGGTTAGAGCA
		TATGAGGTCCTT		GAAATTATGAGG
		CTCTCTTTCTACG		TCCTTCTCTCTTT
		AATTTGCAAGAAT		CTACGAATTTGC
		CTTTGAGATCTAA		AAGAATCTTTGA
		GGAAACCGTCGC		GATCTAAGGAAA
		TGCTCCATCTGA		CCGTCGCTGCTC
		CATCCAGATGAC		CATCTGACATCC
		CCAGTCTCCATC		AGATGACCCAGT
		CTCCCTGTCTGC		CTCCATCCTCCC
		ATCTGTAGGAGA		TGTCTGCATCTG
		CCGTGTCACCAT		TAGGAGACCGTG
		CACTTGCCGGGC		TCACCATCACTT
		AAGTCGTCCGAT		GCCGGGCAAGT
		TGGGACGATGTT		CGTCCGATTGGG

		AAGTTGGTACCA GCAGAAACCAGG GAAAGCCCCTAA GCTCCTGATCCT TGCTTTTTCCCGT TTGCAAAGTGGG GTCCCATCACGT TTCAGTGGCAGT GGATCTGGGACA GATTTCACTCTCA CCATCAGCAGTC TGCAACCTGAAG ATTTTGCTACGTA CTACTGCGCGCA GGCTGGGACGC ATCCTACGACGT TCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAA TCAAACGG**GCGG** **CCGCAGAACAA** **AAACTCATCTCA** **GAAGAGGATCTG** **AATTAA** (SEQ ID NO:66)		ACGATGTTAAGT TGGTACCAGCAG AAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTC CTGATCCTTGCT TTTTCCCGTTTG CAAAGTGGGGTC CCATCACGTTTC AGTGGCAGTGGA TCTGGGACAGAT TTCACTCTCACC ATCAGCAGTCTG CAACCTGAAGAT TTTGCTACGTAC TACTGCGCGCAG GCTGGGACGCAT CCTACGACGTTC GGCCAAGGGAC CAAGGTGGAAAT CAAACGG (SEQ ID NO:68)

（表中SEQ ID NO:は、配列番号）

太字で強調されたアミノ酸およびヌクレオチド配列はクローニング部位およびMYCタグを示す。＊は遺伝子の終端における終止コドンを示す。

【０１２１】

親和性判別および生物物理学的特性解析：

AlbudAb-IFNα2b融合タンパク質の各血清アルブミンへの結合親和性(KD)を判別するために、精製された融合タンパク質を、HBS-EP BIAcoreバッファー中5000nM～39nM（5000nM、2500nM、1250nM、625nM、312nM、156nM、78nM、39nM)の融合タンパク質濃度を用いて、アルブミン(一級アミンカップリングによりCM5チップに固定化した；BIAcore社)に対してBIAcoreで解析した。

【０１２２】

[表１２] SAへの親和性

AlbudAb	融合	SA への親和性 (nM)	Kd	Ka
		ラット		
DOM7h-14	IFNα2b	350	4.500E-02	1.28E+05
DOM7h-14-10	IFNα2b	16	4.970E-03	5.90E+05
DOM 7h-11	IFNα2b	6000	7.500E-01	nd
DOM 7h-11-15	IFNα2b	200	1.660E-02	1.50E+05
		カニクイザル		
DOM 7h-14	IFNα2b	60	1.32E-02	5.0E+05
DOM 7h-14-10	IFNα2b	19	7.05E-03	4.50E+05
DOM 7h-11	IFNα2b	3300	3.59E-01	1.20E+05
DOM 7h-11-15	IFNα2b	15	4.86E-03	3.60E+05
		マウス		
DOM 7h-14	IFNα2b	240	3.21E-02	1.50E+06
DOM 7h-14-10	IFNα2b	60	3.45E-02	6.86E+05
DOM 7h-11	IFNα2b	6000	1.55E-01	nd
DOM 7h-11-15	IFNα2b	28	6.69E-03	2.80E+05
		ヒト		
DOM 7h-14	IFNα2b	244	2.21E-02	9.89E+04
DOM 7h-14-10	IFNα2b	32	6.58E-03	3.48E+05
DOM 7h-11	IFNα2b	670	2.02E-01	7.00E+05
DOM 7h-11-15	IFNα2b	10	1.87E-03	3.50E+05

IFNα2bをAlbudAb変異体に連結させると、すべての場合に、血清アルブミンに結合する

AlbudAbの親和性は減少する。DOM7h-14-10およびDOM7-11-15は、親に比べて、種を越えて血清アルブミンに対し改善された結合親和性を保持する。

【０１２３】

表１３：生物学的特性解析

生物学的特性解析は、単一AlbudAbについて上述したようにSEC MALLSおよびDSCにより実施した。

【０１２４】

AlbudAb	融合体	DMS 番号	生物物理的パラメータ	
			SEC MALLS	DSC Tm(°C)
DOM 7h-14	IFNα2b	DMS7321	M/D	58-65
DOM 7h-14-10	IFNα2b	DMS7322	M/D	55-65
DOM 7h-11	IFNα2b	DMS7325	M/D	65.8-66.2
DOM 7h-11-15	IFNα2b	DMS7327	M/D	56.3-66.2

M/DはSEC MALLSで検出された単量体／二量体平衡を示す。

【０１２５】

表13に示したすべてのクローンの発現は、HEK293において17.5～54mg/Lの範囲で観察された。

【０１２６】

IFNα2b-DOM7h-14およびIFNα2b-DOM7h-11変異体に関しては、有益な生物物理学的パラメータおよび発現レベルが親和性成熟の間ずっと維持された。

【０１２７】

AlbudAb-IFNα2b融合体のPK判別

AlbudAb IFNα2b融合体であるDMS7321（IFNα2b-DOM7h-14）DMS7322（IFNα2b-DOM7h-14-10），DMS7325（IFNα2b-DOM7h-11），DMS7327（IFNα2b-DOM7h-11-15)をHEK293細胞において20～50mg量でmycタグ付きで発現させ、プロテインLアフィニティ樹脂を用いて培養上清から精製して、100mMグリシンpH2で溶出した。タンパク質を1mg/mLより高濃度へと濃縮し、ダルベッコPBSにバッファー交換し、Qスピンカラム(Vivascience社)を使ってエンドトキシンを枯渇させた。

【０１２８】

ラットのPKについては、化合物あたり3匹のラットを用いて、IFN-AlbudAbを2.0mg/kgで単回静脈注射として投与した。血清サンプルを0.16、1、4、8、24、48、72、120、168時間で採取した。血清レベルの分析は、EASY ELISAを用いてメーカーの指示に従って行った(GE Healthcare社、カタログ番号RPN5960)。

【０１２９】

マウスのPKについては、DMS7322（IFN2b-DOM7h-14-10）DMS7325（IFN2b-DOM7h-11），DMS7327（IFN2b-DOM7h-11-15)(すべてmycタグ付き)を3匹の被験体の用量群につき2.0mg/kgで単回静脈注射として投与し、血清サンプルを10分；1h；8h；24h；48h；72h；96hで採取した。血清レベルの分析は、EASY ELISAを用いてメーカーの指示に従って行った(GE Healthcare社、カタログ番号RPN5960)。

【０１３０】

[表１４]

種	AlbudAb	融合体	アルブミンK$_D$ (nM)	PKパラメータ(平均結果)			
				AUC h x ug/ml	CL ml/h/kg	t1/2 h	Vz ml/kg
ラット	**7h-14**	IFNα2b	350	832.1	2.4	27	94.5
	7h-14-10	IFNα2b	16	1380.7	1.5	35.8	75.2
	7h-11	IFNα2b	6000	327.9	6.5	11	101.9
	7h-11-15	IFNα2b	200	1118.7	1.8	39.5	103.6
	7h-11-12	IFNα2b	1700	747.1	2.8	25.8	104.7
マウス	**7h-14**	IFNα2b	240	761.2	2.6	30.4	115.3
	7h-14-10	IFNα2b	60	750.5	2.7	30.9	118.6
	7h-11	IFNα2b	6000	493.9	4.0	8.8	51.2
	7h-11-15	IFNα2b	28	971.8	2.1	33.6	99.6

ラットおよびマウスの実験から得られた薬物動態パラメータはノンコンパートメントモデルを用いてフィットさせた。注釈：AUC：投薬時から無限大に外挿される曲線下面積；CL：クリアランス；t1/2：血中濃度が半分になる時間；Vz：終末相に基づいた分布容積。

【０１３１】

IFNα2b-AlbudAbをラットとマウスで試験した。ラットとマウスの両方で、すべてのIFNα2b-DOM7h-11変異体融合タンパク質に関して、t1/2は親に比べて改善される。t1/2の改善は、血清アルブミンに対するin vitro K_Dの改善と相関する。IFNα2b-DOM7h-14-10変異体に関しては、血清アルブミンに対するin vitro K_Dの改善はまた、ラットにおいてt1/2の改善に相関していた。

【０１３２】

すべてのIFNα2b-AlbudAb融合タンパク質は、単一AlbudAbに比べて、RSAへの結合が5～10倍減少する。この効果はDOM7h-11系列(5倍のみの減少)よりもDOM7h-14系列に対して顕著(すなわち、10倍)である。

【０１３３】

実施例８： AlbudAbとタンパク質、ペプチドおよびNCEとのさらなる融合体

他の化学物質、すなわちドメイン抗体(dAb)、ペプチドおよびNCEに融合させた各種AlbudAbについて試験した。結果を表15に示す。

【０１３４】

[表１５]

種	AlbudAb	融合体	アルブミン K_D (nM)	PK パラメータ			
				AUC h x ug/ml	CL ml/h/kg	t1/2 h	Vz ml/kg
ラット	DOM7h-14	Exendin-4	2400	18	57.1	11	901.9
	DOM7h-14-10	Exendin-4	19	43.6	23.1	22.1	740.3
	DOM7h-11	Exendin-4	2400	6.1	168	7.1	1684.1
	DOM7h-11-15	Exendin-4	273	36.3	27.6	19.3	765.7
別実験において	DOM7h-11-15	Exendin-4	130	試験せず	試験せず	試験せず	試験せず
	DOM7h14-10	NCE-GGGGSC	62				
	DOM7h14-10	NCE-TVAAPSC	35				
ヒト	DOM7h-14	NCE	204				
マウス	DOM7h-11	DOM1m-21-23		234	10.7	4.7	72.5
	DOM7h-11-15	DOM1m-21-23		1008	2.5	17.4	62.4

注釈：DOM1m-21-23は抗TNFR1 dAbであり、エキセンディン-4は39アミノ酸長のペプチド(GLP-1アゴニスト)である。NCE、NCE-GGGGSCおよびNCE-TVAAPSCについては以下で説明する。

【０１３５】

以前に、抗TNFR1 dAbのPK半減期をin vivoで引き延ばすためにアルブミン結合dAb (AlbudAb)との遺伝子融合体を使用することが記載された(例えば、WO04003019、WO2006038027、WO2008149148を参照されたい)。これらのPCT出願に記載されるプロトコルを参照されたい。上記の表において、DOM1m-21-23は抗マウスTNFR1 dAbである。

【０１３６】

エキセンディン-4と血清アルブミンに結合するDOM7h-14(または他のAlbudAb)との遺伝子融合体を作製するために、エキセンディン-4-リンカー- AlbudAb配列をpTT-5ベクター(CNRC社(カナダ)から入手可能)にクローニングした。いずれの場合にも、エキセンディン-4はその構築物の5'末端側にあって、dAbは3'末端側にあった。リンカーは$(G_4S)_3$リンカーとした。エンドトキシンフリーのDNAをアルカリ溶菌法(Qiagen CA社から入手可能な、エンドトキシンフリーのプラスミドGigaキットを使用する)により大腸菌で調製し、HEK293E細胞(CNRC社(カナダ)から入手可能)をトランスフェクトするために使用した。フラスコあたり250mlのHEK293E細胞(1.75×10^6個/ml)に、フラスコあたり333μlの293fectin (Invitrogen社)と250μgのDNAを用いてトランスフェクションを行い、30℃で5日間発現させた。上清を遠心分離によって回収し、プロテインLでのアフィニティ精製によって精製した。タンパク質を樹脂にバッチ結合させ、カラムに充填して、10倍カラム容量のPBSで洗浄した。タンパク質を50mlの0.1MグリシンpH2で溶出し、Tris pH8により中和した。予測されたサイズのタンパク質がSDS-PAGEゲル上に同定された。

【０１３７】

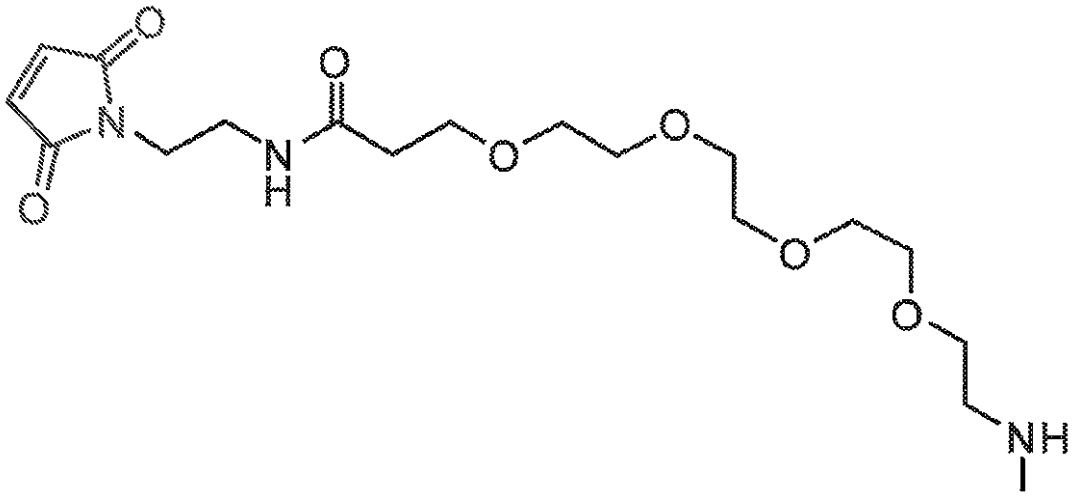
NCE Albudab(商標)融合体：

新規化学物質(NCE) AlbudAb融合体について試験した。NCEである小分子ADAMTS-4阻害剤は、AlbudAbへのコンジュゲーションのためにPEGリンカー(PEG 4リンカー(すなわち、マレイミドの前の4個のPEG分子))とマレイミド基をもつように合成した。AlbudAbへのNCEのコンジュゲーションは、アミノ酸位置R108Cの人工的に導入されたシステイン残基を介して、またはAlbudAbの末端に導入された5アミノ酸(GGGGSC)もしくは6アミノ酸(TVAAPSC)スペーサーの後に行った。簡単に説明すると、AlbudAbをTCEP (Pierce社、カタログ番号77720)で還元し、PD10カラム(GE healthcare社)を用いて25mM Bis-Tris、5mM EDTA、10%(v/v)グリセロールpH6.5中に脱塩した。5倍モル過剰のマレイミド活性化NCEを、最終濃度が10%(v/v)を超えないようにDMSOに添加した。この反応を室温で一晩インキュベートし、20 mM Tris pH7.4中に十分に透析した。

【０１３８】

PEGリンカー：

【化１】



【０１３９】

配列：

DOM7h-14 R108C:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQGTKVEIKC

(配列番号69)

【０１４０】

ヌクレオチド:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCA
CCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCAGCAGAA
ACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGT
CCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGT
CTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGA
CGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAATGC

(配列番号70)

【０１４１】

DOM7h-14-10/TVAAPSCおよびDOM7h-14-10/GGGGSC（すなわちDOM7h-14-10/G4SC)の配列については表５を参照のこと。

【０１４２】

NCE-AlbudAbのDOM7h-14-10 GGGGSCおよびDOM7h14-10 TVAAPSCは、化学物質に融合させたとき、BIAcoreで測定して、RSAに対するin vitro親和性(K_D)が5～10倍減少する。

【０１４３】

dAb-Albudab融合体：

RSAに対して最高の親和性をもつ2種のDOM7h-11 AlbudAbは、非融合AlbudAbに比べて、治療用ドメイン抗体(DOM1m-21-23)に融合させたとき、BIAcore上でRSAに対する親和性が2倍減少する。DOM7h-11クローンは、非融合のとき(約5μM)と同様に、融合させたとき(2.8μM)にもマイクロモルK_Dを示す。

【０１４４】

エキセンディン4-AlbudAb融合体：

AlbudAbのペプチドへの融合がRSA結合能に及ぼす効果は、結合が4倍しか減少しないDOM7h-14-10は別として、約10倍である。しかし、その効果は、DOM7h-11系列に対して見られるよりもDOM7h-14系列(DOM7h-14-10を除く)に対して顕著である。

【０１４５】

上記のすべてのデータに関して、融合体のt1/2は、動物種のSAに対する親和性の改善とともに増加した。

【０１４６】

一般的に、AlbudAb-治療薬は、AlbudAb-薬物融合体が血清アルブミンへの結合について0.1nM～10mMの親和性範囲(K_D)を示すとき、(疾患、症状もしくは徴候の治療および/または予防に)治療上適していると分類される。

【０１４７】

AlbudAbおよびAlbudAb融合体(タンパク質-AlbudAb、例えばIFNα2b-DOM7h-14-10；ペプチド-AlbudAb、例えばエキセンディン-4-DOM7h-14-10；dAb-AlbudAb、例えばDOM1m21-23-DOM7h11-15；NCE-AlbudAb、例えばADAMTS-4-DOM7h-14-10)の治療範囲は次のように説明される：慢性または急性の疾患、症状もしくは徴候の治療に有用な親和性(K_D)範囲が示される。また、「中間」と区分された親和性範囲も示される。この範囲内に入るAlbudAbおよび融合体は、慢性または急性の疾患、症状もしくは徴候に対して有用である。このように、血清アルブミンに対するAlbudAbまたは融合体の親和性は、対処すべき疾患、症状もしくは徴候に応じて調整または選択することができる。上述したように、本発明は、さまざまな親和性をもつAlbudAbを提供し、各AlbudAbを「高度親和性」、「中等度親和性」または「低度親和性」と分類することを可能にするので、当業者は目下の治療に応じて本発明の適切なAlbudAbを選択できるようになる。図2を参照されたい。

【０１４８】

実施例９：

PCT/EP2010/060112はVH AlbudAbおよびその親和性成熟誘導体を記載する。

【０１４９】

VH AlbudAb配列は次のとおりである。

DOM7r31アミノ酸　配列番号71

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFRHYRMGWVRQAPGKGLEWVSWIRPDGTFT
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSYMGDRFDYWGQGTLVTVS
S

【０１５０】

DOM7r31核酸　配列番号72

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCG
TCTCTCCTGTACAGCCTCCGGATTCACCTTTAGGCATTATCGTATGGGTTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCATGGATTCGTCCGGATGGTACGTTT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAATCTTATATGGGTGATAGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCGAGCG

【０１５１】

DOM7r-31-14アミノ酸　配列番号73

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFRHYRMGWVRQAPGKGLEWVSWIRPDGTFT
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSYMADRFDYWGQGTLVTVS
S

【０１５２】

DOM7r-31-14核酸　配列番号74

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCG
TCTCTCCTGTACAGCCTCCGGATTCACCTTTAGGCATTATCGTATGGGTTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCATGGATTCGTCCGGATGGTACGTTT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAATCTTATATGGCTGATAGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTC
GAGC

【０１５３】

DOM7h-92アミノ酸　配列番号75

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFANATMSWVRQAPGKGLEWVSDIDQVGHAT
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYSWHPDLFDYWGQGTLVTV
SS

【０１５４】

DOM7r-92核酸　配列番号76

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCG
TCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGGGAATTATAGGATGACTTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAACTATTTCTCCTTTGGGTACGTATA
CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAGA
ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAAGGGCGTTGGTCGATTTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCG
TCTCGAGC

【０１５５】

DOM7r-92-4アミノ酸　配列番号77

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDTSSMLWVRQAPGKGLEWVSVIHQSGTPTY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFPSTHGKFDYWGQGTLVTVSS

【０１５６】

DOM7r-92-4核酸　配列番号78

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCG
TCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGATACGAGTAGTATGTTGTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGTTATTCATCAGAGTGGTACGCCT
ACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATTCCAAG
AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACT
GTGCGAAATTTCCGTCTACTCATGGTAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGT
CACCGT
CTCGAGC

【０１５７】

親和性決定：

各血清アルブミンに対するVH AlbudAbの結合親和性(KD)を決定するために、精製された融合体タンパク質をアルブミン（CM5チップ上への一級アミンにより固定化、BIAcore）でのBIAcoreにより分析したが、これにはHBS-EP BIAcoreバッファー中での融合体タンパク質濃度5000nM～39nM (5000nM, 2500nM, 1250nM, 625nM, 312nM, 156nM, 78nM, 39nM)を上記のように用いた。MALLSデータは上記のように取得した。結果を以下の表に示す。

【０１５８】

[表１６Ａ]

	RSA	HSA	CSA	MSA*
	KD (M)	KD (M)	KD (M)	KD (M)
DOM7r-92-4	2.6E-07	1.3E-07	9.8E-08	1.1E-07

【０１５９】

[表１６Ｂ]

	HSA	CSA	RSA	MSA	MALLS
DOM7r-92 FLAG OD	200nM	170nM	500nM	2000nM	13+22kDa 二量体

【０１６０】

[表１６Ｃ]

	HSA KD (nM)	RSA KD (nM)	CSA KD (nM)	MSA KD (nM)	MALLS
	KD	KD	KD	KD	
7r-31	速い結合/解離	速い結合/解離	速い結合/解離	速い結合/解離	M
7r31-14	208, 360, 1330, 1950	103, 90.2, 370	結合なし	6, 12, 12, 14.2	M

【０１６１】

上記の値は、複数の独立した測定値を表す。

【０１６２】

実施例１０：AlbudAbによるHSAエピトープマッピングの概要

HSAに対するAlbudAb Vk分子のエピトープを、三つの直交技術:水素重水素交換質量分析、部位特異的突然変異誘発及びX線結晶解析による構造決定を使用して決定した。

【０１６３】

1.0 水素重水素(H/D)交換によるエピトープマッピング

1.1 タンパク質調製

HSAのドメイン2(HSAのアミノ酸残基188～384と定義される;HSAドメイン2のアミノ酸及

びDNA配列についてそれぞれ配列番号79及び80;完全長HSAのアミノ酸及びDNA配列についてそれぞれ配列番号81及び82)を、pPICZα発現系(Invitrogen)を使用してピキア属(Pichia)において発現させ、製造業者の使用説明書に従ってPrometic Technologies Mimetic Blue(商標)を使用して精製した。DOM7h-11-3、DOM7h-14-10及びDOM7r-92-4(それぞれ、アミノ酸について配列番号:2、45、46及びDNA配列について4、47、48)を、自己誘導発現系を使用して大腸菌(E coli)HB2151株において発現させた。場合によっては、クローニング戦略は、追加のN及びC末端残基をもたらした(例えば、配列番号:121及び122を参照されたい)。発現させたAlbudAbを、清澄化した上清から、確立されたプロトコールを使用してプロテイン-L(DOM7h-11-3及びDOM7h-14-10)又はプロテイン-A(DOM7h-92-4)アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。

【０１６４】

HSAドメイン2及びAlbudAbの最終的なタンパク質調製物の発現及び精製を、SDS-PAGE分析によって確認した。

【０１６５】

1.2 実験方法及び一般的原理

エピトープマッピングのためのH/D交換摂動の使用に関する方法及び原理は、Hamuroら(2003)、J. Biomol. Tech. 2003、14、171～182; 及びCoalesら(2009)、Rapid Communications in Mass Spectrometry 2009年3月;23(5):639～47による総説において論じられている。HSAのエピトープマッピングのために、AlbudAbの存在下及び非存在下における抗原のH/D交換分析を行った。AlbudAbが存在しない場合の交換の速度と比較して各AlbudAbの存在下において交換がより遅いHSAの領域は、HSA上のエピトープを定義するとみなす。エピトープを同定するために、第一に、抗原のタンパク質分解断片の同定、第二に、H/D交換反応の摂動の決定を必要とする。適した方法は、例えば、US 6,291,189、US6,331,400及びUS7,280,923において記載されている。

【０１６６】

各H/D交換反応後、HSAをペプシンで消化した。消化された混合物をHPLCによって分離した。各HSA消化断片を次いで、質量分析によって分析して、H/D交換反応時の重水素導入の程度を決定した。HSA配列の最適な適用範囲を得るために、最大限可能な数の消化断片を追跡した。AlbudAbの存在下におけるH/D交換実験のために、抗原及び抗体の混合物を一緒に消化した。複合体のペプシン消化断片混合物は、AlbudAb及びHSA断片の両方を含有していた。

【０１６７】

HSAに対して過剰量のAlbudAbを使用したため、大量のAlbudAb起源のペプチドが、イオン競合によって抗原起源のペプチドの質量検出を妨げる可能性がある。このため最小限の可能な量の過剰の抗体を使用した。

【０１６８】

199μMのDOM7h-11-3、199μMのDOM7h-14-10、547μMのDOM7r-92-4及び45μMのHSAのストック溶液を、H/D交換実験において使用した。24μlのHSAストック+36μlのDOM7h-11-3;49.5μlのHSAストック+10.5μlのDOM7r-92-4;74μlのHSAストック+20μlのDOM7h-14-10を使用して、複合体形成混合物を作製した(それぞれ1:6.7、1:1.2、1:2.6の比に等しいHSA:DOM7h-11-3=17.9μM:119.4μM;HSA:DOM7h-14-10=35.0μM:42.0μM;HSA:DOM7r-92-4=37.1μM:95.7μMの最終濃度)。対照反応では、HSA又はAlbudAbのいずれかをPBSと置き換えた。

【０１６９】

10μlのHSA+DOM7h-11-3複合体形成混合物を、D_2Oで作製した10μlのPBSに添加した;5又は8μlのHSA:DOM7h-14-10複合体形成混合物を、D_2Oで作製した12又は15μlのPBSに添加した;5μlのHSA+DOM7r-92-4複合体形成混合物を、D_2Oで作製した15μlのPBSに添加した。すべての重水素化反応を、500秒間0℃でインキュベートした。インキュベーション後、すべての20μlの複合体形成混合物を、30μlのクエンチング溶液(2M尿素、1M TCEP pH3.0)と混合した。45μlのクエンチした反応混合物を、専有のタンパク質分解/HPLCシステムに注

入し、断片を質量分析によって分析した。

【０１７０】

1.3　摂動結果

断片を同定し、データをデコンボリューション処理し、専有のソフトウェア(ExSAR)を使用して可視化した。H/D交換摂動データに基づくエピトープヒットの概要を、下記の表17において強調している。

【０１７１】

表17:(A)DOM7h-11-3、(B)DOM7h-14-10及び(C)DOM7r-92-4複合体形成を有する及び有さない、比較したHSAの各セグメントにおける重水素化レベルの差異

[表１７]

(A)	Incubation Time (Seconds)						
Peptide	30	100	300	1000	3000	10000	Average
189-198	9%	-7%	7%	-1%	-2%	6%	2%
189-200	2%	5%	3%	3%	-2%	2%	2%
203-210	-2%	2%	0%	0%	5%	0%	1%
203-213	8%	5%	1%	1%	-1%	6%	3%
213-219	-9%	-25%	-32%	-35%	-39%	-32%	-29%
216-219	-12%	-20%	-28%	-36%	-43%	-42%	-30%
220-228	-35%	-31%	-31%	-18%	-19%	-8%	-24%
222-228	-38%	-36%	-40%	-26%	-15%	-3%	-26%
231-238	-17%	-41%	-51%	-54%	-58%	-33%	-42%
231-250	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
237-250	-4%	-8%	-5%	-3%	-1%	-1%	-4%
237-251	0%	-5%	-8%	-4%	-1%	3%	-3%
237-252	-1%	-5%	-4%	-4%	-1%	-2%	-3%
253-260	10%	-6%	5%	-3%	-1%	-1%	1%
266-284	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
269-289	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
269-292	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
292-302	-2%	-5%	-2%	-3%	2%	-9%	-3%
292-305	5%	5%	1%	3%	-1%	-5%	1%
295-305	-2%	-2%	0%	4%	-2%	2%	0%
301-305	2%	-1%	-11%	-1%	-1%	6%	-1%
311-318	-24%	-18%	-10%	-1%	0%	0%	-9%
311-326	-24%	-24%	-27%	-19%	-13%	-7%	-19%
312-326	-28%	-24%	-29%	-18%	-15%	-9%	-21%
321-326	-20%	-20%	-29%	-25%	-23%	-17%	-22%
329-330	-1%	-7%	-18%	-29%	-46%	-56%	-26%
329-331	-4%	-8%	-9%	-26%	-39%	-48%	-22%
332-333	2%	5%	-4%	-2%	-14%	-27%	-7%
334-342	-8%	-20%	-15%	-22%	-31%	-31%	-21%
336-345	0%	-2%	-8%	-12%	-9%	-11%	-7%
344-346	-2%	4%	-1%	-9%	-5%	-8%	-4%
345-346	2%	0%	1%	-7%	-6%	-15%	-4%
347-349	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
348-349	-10%	-18%	-30%	-31%	-30%	-20%	-23%
348-357	-24%	-33%	-41%	-39%	-37%	-28%	-34%
349-357	-27%	-33%	-43%	-41%	-40%	-30%	-36%
373-384	2%	1%	0%	3%	-2%	6%	2%
376-384	4%	3%	1%	-1%	1%	3%	2%
380-384	-5%	-2%	-4%	8%	-3%	5%	0%

【０１７２】

(B)	Incubation Time (Seconds)						
Peptide	30	100	300	1000	3000	10000	Average
189-198	-6%	2%	6%	9%	-4%	8%	3%
189-200	-4%	3%	4%	6%	-6%	4%	1%
203-210	-4%	1%	4%	6%	-6%	3%	1%
203-213	1%	3%	5%	5%	-6%	4%	2%
213-219	-14%	-26%	-32%	-50%	-51%	-49%	-37%
216-219	-17%	-28%	-36%	-55%	-60%	-65%	-44%
220-228	-63%	-47%	-47%	-51%	-42%	-25%	-46%
222-228	-62%	-55%	-52%	-55%	-40%	-26%	-48%
231-238	-23%	-28%	-43%	-56%	-55%	-48%	-42%
231-250	-4%	-15%	-15%	-23%	-26%	-22%	-18%
237-250	-9%	-3%	-1%	-3%	-4%	3%	-3%
237-251	-3%	-1%	-2%	-1%	-6%	2%	-2%
237-252	-5%	-4%	-4%	5%	-1%	5%	-1%
253-260	-5%	1%	-1%	-7%	-5%	7%	-2%
266-284	-13%	-7%	2%	5%	-2%	10%	-1%
269-289	-9%	-4%	-8%	0%	-7%	4%	-4%
269-292	0%	2%	-3%	6%	-3%	3%	1%
292-302	-9%	-4%	-3%	12%	-5%	6%	-1%
292-305	-5%	1%	-4%	5%	-5%	3%	-1%
295-305	-7%	-1%	-1%	13%	-8%	7%	1%
301-305	5%	-3%	1%	10%	-2%	-5%	1%
311-318	-27%	-23%	-17%	-5%	-7%	7%	-12%
311-326	-30%	-26%	-25%	-19%	-19%	-7%	-21%
312-326	-27%	-22%	-22%	-18%	-20%	-9%	-20%
321-326	-9%	-13%	-18%	-13%	-18%	-11%	-14%
329-330	-5%	-15%	-13%	-35%	-43%	-67%	-30%
329-331	-3%	-7%	-10%	-23%	-31%	-56%	-22%
332-333	-2%	0%	-2%	-14%	-18%	-55%	-15%
334-342	-7%	-7%	-11%	-18%	-23%	-35%	-17%
336-345	-5%	-7%	-5%	-9%	-15%	-13%	-9%
344-346	4%	5%	-1%	-7%	-9%	-14%	-4%
345-346	3%	-2%	2%	-2%	-8%	-29%	-6%
347-349	-11%	-15%	-15%	-41%	-47%	-50%	-30%
348-349	-7%	-18%	-20%	-40%	-43%	-35%	-27%
348-357	-28%	-36%	-43%	-60%	-50%	-44%	-44%
349-357	-31%	-33%	-41%	-62%	-57%	-54%	-46%
373-384	-5%	-1%	-1%	5%	-5%	7%	0%
376-384	-1%	1%	4%	9%	-4%	4%	2%
380-384	-3%	-2%	-2%	8%	-7%	0%	-1%

【０１７３】

(C)	Incubation Time (Seconds)						
Peptide	30	100	300	1000	3000	10000	Average
189-198	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
189-200	1%	-6%	-4%	1%	-2%	-1%	-2%
203-210	-20%	-21%	-12%	-16%	-16%	-14%	-17%
203-213	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
213-219	-5%	-9%	-15%	-21%	-28%	-32%	-18%
216-219	-8%	-11%	-16%	-24%	-24%	-30%	-19%
220-228	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
222-228	-29%	-28%	-22%	-16%	-3%	-5%	-17%
231-238	-1%	2%	-6%	-8%	-11%	-13%	-6%
231-250	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
237-250	2%	4%	3%	0%	-1%	1%	2%
237-251	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
237-252	0%	-4%	-2%	-4%	1%	-2%	-2%
253-260	1%	-11%	2%	-6%	-3%	4%	-2%
266-284	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
269-289	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
269-292	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
292-302	1%	-5%	-10%	-6%	6%	5%	-2%
292-305	-4%	0%	2%	15%	-4%	-4%	1%
295-305	6%	-1%	-4%	-4%	-4%	3%	-1%
301-305	-8%	-4%	8%	8%	4%	-12%	-1%
311-318	-25%	-19%	-9%	-6%	-8%	-1%	-11%
311-326	-26%	-28%	-23%	-21%	-9%	-6%	-19%
312-326	-24%	-25%	-20%	-15%	-7%	-6%	-16%
321-326	-14%	-22%	-27%	-30%	-16%	-15%	-21%
329-330	-26%	-23%	-19%	-36%	-33%	-47%	-31%
329-331	-7%	-7%	-8%	-10%	-18%	-44%	-16%
332-333	-1%	5%	-4%	4%	-1%	-15%	-2%
334-342	14%	9%	2%	-5%	4%	-6%	3%
336-345	2%	4%	-3%	3%	-1%	0%	1%
344-346	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
345-346	4%	4%	3%	3%	4%	-11%	1%
347-349	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
348-349	2%	-8%	-14%	2%	-2%	-13%	-6%
348-357	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
349-357	-1%	-7%	-2%	-3%	-2%	-6%	-4%
373-384	6%	0%	4%	6%	3%	5%	4%
376-384	2%	1%	-1%	3%	0%	-3%	0%
380-384	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected

(incubation time(seconds)：インキュベーション時間(秒)、not detected：検出されず)

【０１７４】

表17(A)、(B)及び(C)においてまとめたデータに基づいて、重水素化の顕著な摂動(平均して20%を超える)を示したセグメントは、エピトープを定義し得ると結論付けた。同定された配列セグメントを、図3において強調している。

【０１７５】

2.0　アラニンスキャニング部位特異的突然変異誘発(SDM)

アラニンスキャニングのためのSDMの標的残基を、三つの基準:(1)上記のH/D交換摂動データ、(2)以前に公開されているHSAの結晶構造に基づく側鎖の表面アクセシビリティ(1BKE.pdb(RCSB Protein DataBank))及び(3)側鎖の電荷又は大きさ、に基づいて選択した。

【０１７６】

2.1 アラニン突然変異体のクローニング及び発現

HSAの野生型鋳型を、標準的な分子生物学プロトコールを使用して、哺乳動物発現ベクター中にPCRクローニングした。ニッケルアフィニティー精製のために、6-ヒスチジンタグを配列(WT HSA-His_6構築物のアミノ酸及びDNA配列についてそれぞれ配列番号:25及び34)のC末端に融合させた。WT発現構築物を作製するためにPCR増幅で使用したプライマー対は、TB147及びTB148(それぞれ配列番号85及び86)であった。

【０１７７】

突然変異体を、標準的な分子生物学プロトコールに従って、WT HSA-His_6構築物を突然変異誘発のための鋳型として使用して作製した。それらを構築するために使用したアラニン突然変異体及び突然変異誘発オリゴ対のリストを、下記の表18において列挙している。

【０１７８】

[表１８]

表 18:HSA 突然変異体を作製するためのプライマー対。

K225A	TB153	GAGCCAGAGATTTCCCGCCGCTGAGTTTGCAGAAG	センス	配列番号:87
	TB154	CTTCTGCAAACTCAGCGGCGGGAAATCTCTGGCTC	アンチセンス	配列番号:88
E227A	TB155	GAGATTTCCCAAAGCTGCCTTTGCAGAAGTTTCCAAG	センス	配列番号:89
	TB156	CTTGGAAACTTCTGCAAAGGCAGCTTTGGGAAATCTC	アンチセンス	配列番号:90
E230A	TB157	CCAAAGCTGAGTTTGCAGCCGTTTCCAAGTTAGTGAC	センス	配列番号:91
	TB158	GTCACTAACTTGGAAACGGCTGCAAACTCAGCTTTGG	アンチセンス	配列番号:92
D314A	TB159	GATTTTGTTGAAAGTAAGGCCGTTTGCAAAAACTATG	センス	配列番号:93
	TB160	CATAGTTTTTGCAAACGGCCTTACTTTCAACAAAATC	アンチセンス	配列番号:94
K317A	TB161	GAAAGTAAGGATGTTTGCGCCAACTATGCTGAGGCAAAGG	センス	配列番号:95
	TB162	CCTTTGCCTCAGCATAGTTGGCGCAAACATCCTTACTTTC	アンチセンス	配列番号:96
V325A	TB163	GCTGAGGCAAAGGATGCCTTCCTGGGCATGTTTTTG	センス	配列番号:97
	TB164	CAAAAACATGCCCAGGAAGGCATCCTTTGCCTCAGC	アンチセンス	配列番号:98
M329A	TB165	GGATGTCTTCCTGGGCGCCTTTTTGTATGAATATG	センス	配列番号:99
	TB166	CATATTCATACAAAAAGGCGCCCAGGAAGACATCC	アンチセンス	配列番号:100
K351A	TB167	GCTGCTGCTGAGACTTGCCGCCACATATGAAACCACTCTAG	センス	配列番号:101
	TB168	CTAGAGTGGTTTCATATGTGGCGGCAAGTCTCAGCAGCAGC	アンチセンス	配列番号:102

【０１７９】

配列を確認したクローンを、製造業者のプロトコールに従ってMillipore Montageキットを使用して作製したプラスミドDNAミニプレップから選択した。構築物のアミノ酸及びDNA配列を、下記の表19においてまとめている。

【０１８０】

[表１９]

表 19:作製した HSA 突然変異体のリスト

HSA-His6	アミノ酸	DNA
WT	配列番号 103	配列番号 112
K225A	配列番号 104	配列番号 113
E227A	配列番号 105	配列番号 114
E230A	配列番号 106	配列番号 115
D314A	配列番号 107	配列番号 116
K317A	配列番号 108	配列番号 117
V325A	配列番号 109	配列番号 118
M329A	配列番号 110	配列番号 119
K351A	配列番号 111	配列番号 120

【０１８１】

His_6タグ付きWT HSA及び突然変異体を、一過性トランスフェクション技術を使用して哺乳動物HEK293-6E細胞において発現させた。突然変異体及びWT HSAを、確立されたプロトコールに従ってニッケルアフィニティークロマトグラフィーを使用して、清澄化した発現上清から精製した。精製した突然変異体のSDS-PAGE分析は、95%を超える純度を示した。

【０１８２】

2.2 アラニン突然変異体のBIAcore分析

2.2.1 BIAcoreの実験方法

手短に述べると、WT HSA及び突然変異体を、Biacore 3000(GE Healthcare)においてCM5 Biacoreチップ上に固定した。これは、すべての四つのフローセルをEDC/NHSでまず活性化すること、次いで、酢酸塩緩衝液pH4.5中のWT HSA又は突然変異体を注入することによって実施された。次いで、すべての四つのフローセルにわたって、チップ上の結合していない部位をエタノールアミンの注入によってブロックした。各試料についての固定化のレベルを、下記の表20においてまとめている。

【０１８３】

[表２０]

表 20:BIAcore CM5 チップ調製。

チップ１	Fc2	E227A HSA	312RUs
	Fc4	WT HSA	293RUs
チップ２	Fc2	D314A HSA	369RU
	Fc3	K225A HSA	143RU
	Fc4	E230A HSA	339RU
チップ３	Fc2	M324A HSA	167RU
	Fc3	V325A HSA	147RU
	Fc4	WT HSA	304RU
チップ４	Fc2	K317A HSA	305RU
	Fc3	K351A HSA	165RU
	Fc4	WT HSA	223RU

【０１８４】

2.2.2 BIAcoreデータ

HBS-EP緩衝液を使用した流速は、40uL/分であり、精製したdAbタンパク質を、1分間、濃度5000nMで注入し、その後、移動相中の連続的な1:2希釈で7回さらに注入した。

【０１８５】

平衡結合定数(KD)の分析及び決定を、標準的な手順を使用して実施した。

【０１８６】

[表２１Ａ]

	DOM7h-14-10myc		DOM7h-11-15myc		DOM7h-11-3myc	
HSA 突然変異体	nM	x倍の結合減少	nM	x倍の結合減少	nM	x倍の結合減少
K225A	2.34E-09	0.31	1.17E-09	0.53	2.41E-08	0.90375
E227A	3.33E-08	4.44	7.91E-09	3.58	1.46E-07	5.475
E230A	1.50E-08	2.00	2.45E-08	11.09	8.00E-07	30
D314A	5.35E-09	0.71	4.45E-09	2.01	1.78E-08	0.6675
M329A	5.65E-09	0.75	5.72E-09	2.59	6.52E-07	24.45
WT	**7.5E-09**		**2.21E-09**		**2.66667E-08**	

【０１８７】

[表２１Ｂ]

HSA 突然変異体	DOM7r92-4myc		DOM7r31-14myc	
	nM	x倍の結合減少	nM	x倍の結合減少
K225A	3.49E-08	0.71	2.49E-08	0.44
E227A	1.28E-07	2.62	結合なし	88.81
E230A	4.06E-06	83.03	3.97E-07	7.05
D314A	3.45E-08	0.71	5.20E-08	0.92
M329A	2.75E-08	0.56	4.93E-07	8.76
WT	**4.89E-08**		**5.63E-08**	

【０１８８】

2.2.3 BIAcore分析及び結論

DOM7h-14-10:単独で上記の残基のいずれに突然変異誘発を行っても結合の顕著な減少は観察されなかった。

【０１８９】

DOM7h-11-15:DOM7h-11-15のE230Aへの結合のいくらか顕著な減少が観察される(WTに対して11倍の結合の減少)。このことは、HSA上の残基230が、ヒト血清アルブミンへの特異的結合において顕著な寄与を果たすことを示唆する。

【０１９０】

DOM7h-11-3:二つの残基(E230及びM324)について、アラニンに突然変異誘発を行うと結合の顕著な減少が観察された。このことは、これらの二つの残基が、抗体/抗原相互作用への重要な寄与を果たすことを示唆する。

【０１９１】

DOM7r92-4:E230Aについて結合の顕著な減少が観察された。

【０１９２】

DOM7r31-14:E227Aについて結合の顕著な減少が観察された。

【０１９３】

3 DOM7h-11-15/HSA複合体の結晶構造

3.1 タンパク質調製

商業用供給源の脂肪酸フリーHSAを、SDS-PAGEによって判断して95%を超える純度まで、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。

【０１９４】

DOM7h-11-15(アミノ酸及びDNA配列についてそれぞれ配列番号1及び配列番号2)を、自己誘導発現系を使用して大腸菌BL21DE3株において発現させた。DOM7h-11-15を、プロテインLアフィニティークロマトグラフィーによって、確立されたプロトコールを使用して、清澄化した上清から精製した。これを、イオン交換クロマトグラフィーによって、確立されたプロトコールを使用してHi-Trap SPカラムを使用してさらに精製した。

【０１９５】

HSAをDOM7h-11-15と混合し、複合体をサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。タンパク質を、結晶化スクリーニングの前に20mM Tris-Cl pH 8.0中で濃縮した。

【０１９６】

3.2 結晶化

HSA/DOM7h-11-15複合体に対して、シッティングドロップ法を使用して約1200の条件で結晶化スクリーニングを行った。

【０１９７】

3.3 X線回折データ収集及び処理

HSA/DOM7h-11-15結晶を、凍結防止処理後に液体窒素中で瞬時に凍結させた。結晶を、データ収集の間100Kで維持した。SWISS LIGHT SOURCE(スイス放射光施設)(SLS、Villigen、スイス)でX線回折データを収集した。

【０１９８】

例えば、Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010年2月1日;66(Pt2):125～132において概説されているXDS及びXSCALE(Kabsch)を使用して、データを処理した。結晶は、非対称単位中の二つの複合体HSA/DOM7h-11-15で空間群$P2_12_12_1$に属していた。

【０１９９】

データ収集統計を、下記の表22においてまとめている。

【０２００】

表22:HSA/DOM7h-11-15複合体結晶についてのデータ収集及び処理統計

複合体	HSA-DOM7h11-15
X線源	PXI/X06SA (SLS[1])
波長[Å]	1.000
検出器	PILATUS 6M
温度[K]	100
空間群	$P\ 2_1\ 2_1\ 2_1$
格子: a; b; c [Å]	102.15; 110.00; 141.34
α; β; γ [°]	90.0; 90.0; 90.0
分解能[Å][2]	2.50 (2.91-2.66)
特有の反射[2]	55,052 (10,796)
多重度[2]	5.3 (5.5)
完全性[%][2]	98.7 (100.0)
R_{sym}[%] [2,3]	10.0 (43.9)
R_{meas} [%] [2,4]	11.1 (48.3)
平均(I)/シグマ[2,5]	12.17 (4.63)

[1]SWISS LIGHT SOURCE(SLS、Villigen、スイス)

[2]括弧内の数字は、R_{sym}=43.9%での分解能ビンに相当する。

【数１】

$$^{3}\ R_{rim}=\frac{\sum_{h}\sum_{i}^{n_h}\left|\hat{I}_h-I_{h,i}\right|}{\sum_{h}\sum_{i}^{n_h}I_{h,i}} \qquad \text{ここで } \hat{I}_h=\frac{1}{n_h}\sum_{i}^{n_h}I_{h,i}$$

【０２０１】

(式中、$I_{h,i}$は、hのi番目の測定の強度値である)

【数２】

$$^{4}\ R_{meas}=\frac{\sum_{h}\sqrt{\frac{n_h}{n_h-1}}\sum_{i}^{n_h}\left|\hat{I}_h-I_{h,i}\right|}{\sum_{h}\sum_{i}^{n_h}I_{h,i}} \qquad \text{ここで } \hat{I}_h=\frac{1}{n_h}\sum_{i}^{n_h}I_{h,i}$$

【０２０２】

(式中、$I_{h,i}$は、hのi番目の測定の強度値である)

[5]独立反射から計算した

【０２０３】

3.4　構造決定及びモデル精密化

構造決定及びモデル精密化を行って、DOM7h-11-15と複合体形成しているHSAの画像を作成した。

【０２０４】

複合体の構造を、分子置換によって決定した。HSAに結合しているDOM7h11-15は、HSA分子のみから決定した位相の最初のマップにおいて明瞭な電子密度を示し、差マップを使用した抗体ドメインの明白な配置を可能にした。その後のモデル構築及び精密化は、CCP4及びCOOTのソフトウェアパッケージを用いて標準的なプロトコールに従って実施した(例えば、Collaborative Computational Project、Number 4. 1994年.「The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography」、Acta Cryst. D50、760～763;及び「Coot: model-building tools for molecular graphics」、Emsley P、Cowtan K Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 60:2126～2132 Part 12 Sp.Iss. 2004年12月1日を参照されたい)。精密化統計を、表23においてまとめている。

【０２０５】

最終的なモデルのRamachandranプロットは、最も好まれる領域においてすべての残基の91.5%、追加の許容領域において8.1%、一般に許容される領域(generously allowed)において残基の0.4%を示し、許容されない領域においては残基を示さない(モデリング統計を、表23においてまとめている)。

【０２０６】

[表２３]

表23:HSA/DOM7h-11-15構造についての精密化及びモデリング統計

複合体	HSA-DOM7h11-15
分解能[Å]	86.71-2.50
反射数(実行/テスト)	54,062 / 989
R_{cryst}[%]	23.8
R_{free}[2] [%]	28.5
原子の総数:	
タンパク質	10,881
水	103
リガンド	-
サルフェート	60
1,2-エタンジオール	16
理論的形状からの偏差:[3]	
結合長[Å]	0.008
結合角[°]	1.06
結合したB's[4][Å^2]	1.7
Ramachandranプロット:[5]	
最も好まれる領域	92.0
追加の許容される領域	7.7
一般に許容される領域	0.3
許容されない領域	0.0

[1]シグマカットオフなしのREFMAC5において定義される値
[2]試験セットは、1.8%の測定された反射を含有する
[3]Rootは、幾何学的標的値の偏差の2乗を意味する
[4]プログラムMOLEMANを用いて計算した
[5]プログラムPROCHECKを用いて計算した

【０２０７】

3.5 構造分析

3.5.1 全体の構造

DOM7h11-15と複合体形成しているHSAの構造を、図4において表す。図4Aは、HSA及びDOM7h-11-15のそれぞれにつき2コピーを含有する非対称単位を示す。HSA及びDOM7h-11-15のそれぞれにつき1分子からなる、生物学的に関連する単位を、二つの方向から図4Bにおいて示す。

【０２０８】

3.5.2 エピトープ及びパラトープ

HSA-Albudab結合境界面における残基を、残基番号によるフォーマットで図5において示す(この図は、鎖A(HSA)と鎖B(DOM7h-11-15)の間の4.5Å以内のすべての残基間接触を列挙する)。すべての顕著な相互作用対に、黒塗りの菱形で印を付けている。顕著とみなされるものについての相互作用のタイプを、表22において列挙している。

【０２０９】

[表２２Ａ]

表 22A:HSA と DOM7h-11-15 の間の相互作用のリスト

HSA			DOM7h-11-15			相互作用
鎖	残基番号	残基タイプ	鎖	残基番号	残基タイプ	
A	228	(PHE)	B	49	(LEU)	疎水性
A	228	(PHE)	B	91	(ALA)	疎水性
A	230	(GLU)	B	94	(HIS)	1 H 結合 SC-SC
A	308	(ASP)	B	53	(ARG)	3 H 結合全て SC-SC
A	309	(PHE)	B	51	(PHE)	疎水性
A	317	(LYS)	B	67	(SER)	1 H 結合 SC-MC
A	318	(ASN)	B	31	(THR)	2 H 結合 MC-SC, SC-SC
A	321	(GLU)	B	30	(GLY)	1 H 結合 MC-SC
A	322	(ALA)	B	32	(MET)	疎水性
A	325	(VAL)	B	32	(MET)	疎水性
A	325	(VAL)	B	91	(ALA)	疎水性
A	326	(PHE)	B	32	(MET)	疎水性
A	326	(PHE)	B	51	(PHE)	疎水性
A	329	(MET)	B	32	(MET)	疎水性
A	329	(MET)	B	49	(LEU)	疎水性
A	329	(MET)	B	50	(ALA)	疎水性
A	329	(MET)	B	51	(PHE)	疎水性
A	329	(MET)	B	91	(ALA)	疎水性

【０２１０】

HSAに結合している二つのDOM7h-11-15残基を除いてすべてが、CDR1、2及び3のものである。パラトープを形成している残基を、下記の図6においてアラインメントで示しており、ここで、DOM7h-11-3、DOM7h11-15は、Vkダミー(VKDUM-1)に対してアラインメントされている。下記の表22Bは、4.5Å以内のAlbudAb-HSA境界面における追加の残基を列挙している。

【０２１１】

[表２２Ｂ]

表 22B:境界面における追加の残基の表

HSA			DOM7h-11-15		
鎖	残基番号	残基番号	鎖	残基番号	残基番号
A	227	(GLU)	B	36	(TYR)
A	227	(GLU)	B	46	(LEU)
A	228	(PHE)	B	92	(GLY)
A	229	(ALA)	B	36	(TYR)
A	229	(ALA)	B	92	(GLY)
A	229	(ALA)	B	93	(THR)
A	229	(ALA)	B	94	(HIS)
A	232	(SER)	B	92	(GLY)
A	233	(LYS)	B	94	(HIS)
A	263	(TYR)	B	94	(HIS)
A	307	(ALA)	B	53	(ARG)
A	308	(ASP)	B	51	(PHE)
A	314	(ASP)	B	31	(THR)
A	317	(LYS)	B	30	(GLY)
A	317	(LYS)	B	68	(GLY)
A	318	(ASN)	B	29	(ILE)
A	318	(ASN)	B	30	(GLY)
A	318	(ASN)	B	32	(MET)
A	318	(ASN)	B	51	(PHE)
A	321	(GLU)	B	28	(PRO)
A	321	(GLU)	B	29	(ILE)
A	321	(GLU)	B	68	(GLY)
A	322	(ALA)	B	29	(ILE)
A	325	(VAL)	B	90	(GLN)
A	332	(TYR)	B	49	(LEU)
A	333	(GLU)	B	49	(LEU)

【０２１２】

表22において列挙されている顕著な相互作用は、図7及び中のパネルにおいてさらに詳述されている。これらの図において、相互作用する残基を棒状に描写し、任意の水素結合を破線として描写している。それらの相互作用する側鎖についての対応する電子密度はまた、網目として示している(1.5σ間隔)。

【０２１３】

4.0　結論

三つの直交技術を使用して、HSAに対するDOM7h-11系統のエピトープを決定した。すべての技術の結果は、エピトープを形成するHSAの領域に関する情報を提供する。H/D交換摂動データは可能な残基の範囲を与え、アラニンスキャニングデータ及び結晶構造は、単一の残基レベルに関するより詳細な情報を提供する。下記の図8は、各技術が提供したデータの詳細レベル及び特異性をまとめている。

【０２１４】

結晶構造に基づいて、DOM7h-11-15のHSAへの結合は、HSAにおける脂質担体ポケットをブロックもせず、塞ぎもしないと述べることもまた可能である。これらの結合ポケットは、全身輸送のための多くの治療化合物によって利用されるため、このことは治療的用途にとって特に有意義である。したがって、DOM7h-11-15とともにフォーマット化された任意の潜在的なバイオ医薬品は、HSA-薬物相互作用及び輸送を妨げないことが予期される。DO

M7h-11-15エピトープに対する薬物/脂質担体ポケット位置を、図9において詳述している。DOM7h-14-10及びDOM7r-92-4のH/D交換摂動データで観察される同様のエピトープに基づいて、これらのAlbudAb(商標)もまた、HSA-薬物相互作用及び輸送を妨げないことが予期される。

【０２１５】

配列の表

同定記号	配列番号	
	アミノ酸	核酸
DOM7h-11-15	1	3
DOM7h-11-3	2	4
DOM7h-14/Exendin-4 融合体	5	6
DOM7h-14-10/Exendin-4 融合体	7	8
DOM7h-11/Exendin-4 融合体	9	10
DOM7h-11-15/Exendin-4 融合体	11	12
DOM7h14-10/ G4SC-NCE 融合体	13	14
DOM7h14-10/TVAAPSC 融合体	15	16
DOM7h-11/DOM1m-21-23 融合体	17	19
DOM7h-11/DOM1m-21-23 融合体 + myc tag	18	20
DOM7h-11-15/DOM1m-21-23 融合体	21	23
DOM7h-11-15/DOM1m-21-23 融合体+ myc tag	22	24
DPK9 Vk ダミー CDRs 1-3	25-27	-
DOM7h-11 CDRs 1-3	28-30	-
DOM 7h-11-15 CDRs 1-3	31-33	-
同定記号	配列番号	
	アミノ酸	核酸
DOM 7h-11-3 CDRs 1-3	34-36	-
DOM 7h-14 CDRs 1-3	37-39	-
DOM 7h-14-10 CDRs 1-3	40-42	-
インターフェロンα2b	43	44
IFNα2b SOE フラグメント 5'	-	45
IFNα2b SOE フラグメント 3'	-	46
Vk SOE フラグメント 5'	-	47
myc タグも導入するための Vk SOE フラグメント 3'	-	48
IFNα2b SOE フラグメント 5'	-	49
myc タグも導入するため Vk SOE フラグメント 3'	-	50
リーダー配列	51	

【０２１６】

		52
DMS7321 (IFNα2b-DOM7h-14) + myc	53	54
DMS7321 (IFNα2b-DOM7h-14) タグ無し	55	56
DMS732 (IFNα2b-DOM7h-14-10) + myc	57	58
DMS732 (IFNα2b-DOM7h-14-10) タグ無し	59	60
DMS 7325 (IFNα2b-DOM7h-11) + myc	61	62
DMS 7325 (IFNα2b-DOM7h-11) タグ無し	63	64
DMS 7327 (IFNα2b-DOM7h-11-15) + myc	65	66
DMS 7327 (IFNα2b-DOM7h-11-15) タグ無し	67	68
DOM7h-14 R108C	69	70
DOM7r31	71	72
DOM7r-31-14	73	74
DOM7h-94	75	76
DOM7r-92-4	77	78
HSA のドメイン 2	79	80
全長 HSA	81	82
同定記号	配列番号	
	アミノ酸	核酸
DOM 7H-14-10	83	84
PRIMER TB147	-	85
PRIMER TB148	-	86
TB153	-	87
TB154	-	88
TB155	-	89
TB156	-	90
TB157	-	91
TB158	-	92
TB159	-	93
TB160	-	94

【０２１７】

TB161	-	95
TB162	-	96
TB163	-	97
TB164	-	98
TB165	-	99
TB166	-	100
TB167	-	101
TB168	-	102
HSA-His6 WT	103	112
HSA-His6 K225A	104	113
HSA-His6 E227A	105	114
HSA-His6 E230A	106	115
HSA-His6 D314A	107	116
HSA-His6 K317A	108	117
HSA-His6 V325A	109	118
HSA-His6 M329A	110	119
HSA-His6 K351A	111	120
DOM 7h-11-13	121	122
DOM7H-14	123	124
DOM7H-11	125	126

【０２１８】

実施例１１：DOM7h-14-10変異体の配列

本発明の別の実施形態において、下記に抗血清アルブミン免疫グロブリン単一可変ドメインDOM7h-14のいくつかの変異体のアミノ酸およびヌクレオチド配列を列記する。

【０２１９】

DOM7h-14-56（配列番号127）.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPMLLIMW
SSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQ
GTKVEIKW

【０２２０】

DOM7h-14-65（配列番号128）.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMW
RSALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQ
GTKVEIKW

【０２２１】

DOM7h-14-74（配列番号129）.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMW
RSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTYGK
GTKVENKW

【０２２２】

DOM7h-14-76（配列番号130）.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMW
RSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLKHPKTYGQ
GTKVEIKW

【０２２３】

DOM7h-14-82（配列番号131）.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMW
RSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGMRHPKTFGQ
GTKVEIKW

【０２２４】

DOM7h-14-100（配列番号132）.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMW
RSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTYGQ
GTKVENKW

【０２２５】

DOM7h-14-101（配列番号133）.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMW
RSALQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQ
GTKVEIKW

【０２２６】

DOM7h-14-109（配列番号134）.

DIQMTQSPSSLFASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMW
RSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRKPKTFGQ
GTKVKIKW

【０２２７】

DOM7h-14-115（配列番号135）.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMW
RSALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTYGQ
GTKVEIKW

【０２２８】

DOM7h-14-116（配列番号136）.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMW
RSALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRYPKTFGQ
GTKVEIKW

【０２２９】

DOM7h-14-119（配列番号137）.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMW
RSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTYGQ
GTKVEIKR

【０２３０】

DOM7h-14-120（配列番号138）.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMW
RSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTYGQ
GTKVENKR

【０２３１】

DOM7h-14-121（配列番号139）.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMW
RSALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQ
GTKVEIKR

【０２３２】

DOM7h-14-122（配列番号140）.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMW
RSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTYGK
GTKVEIKR

【０２３３】

DOM7h-14-123（配列番号141）.

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMW
RSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTYGK
GTKVENKR

【０２３４】

DOM7h-14-56（配列番号142）.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTATGCTCCTGATCATGTGG
AGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAATGG

【０２３５】

DOM7h-14-65（配列番号143）.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGG
CGTTCCGCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAATGG

【０２３６】

DOM7h-14-74（配列番号144）.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGG
CGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGACGTACGGCAAA
GGGACCAAGGTGGAAAACAAATGG

【０２３７】

DOM7h-14-76（配列番号145）.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGG
CGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAAGCATCCTAAGACGTACGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAATGG

【０２３８】

DOM7h-14-82（配列番号146）.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGG
CGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTATGAGGCATCCTAAGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAATGG

【０２３９】

DOM7h-14-100（配列番号147）.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGG
CGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGCGGCATCCTAAGACGTACGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAAACAAATGG

【０２４０】

DOM7h-14-101（配列番号148）.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGG
CGTTCCGCGTTACAAAATGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAATGG

【０２４１】

DOM7h-14-109（配列番号149）.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTTTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGG
CGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGAAACCTAAGACTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGAAAATCAAATGG

【０２４２】

DOM7h-14-115（配列番号150）.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGG
CGTTCCGCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAAACGTACGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAATGG

【０２４３】

DOM7h-14-116（配列番号151）.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGG
CGTTCCGCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGTATCCTAAGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAATGG

【０２４４】

DOM7h-14-119（配列番号152）.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGG
CGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGCGGCATCCTAAGACGTACGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

【０２４５】

DOM7h-14-120（配列番号153）.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGG
CGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGCGGCATCCTAAGACGTACGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAAACAAACGG

【０２４６】

DOM7h-14-121（配列番号154）.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGG
CGTTCCGCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

【０２４７】

DOM7h-14-122（配列番号155）.

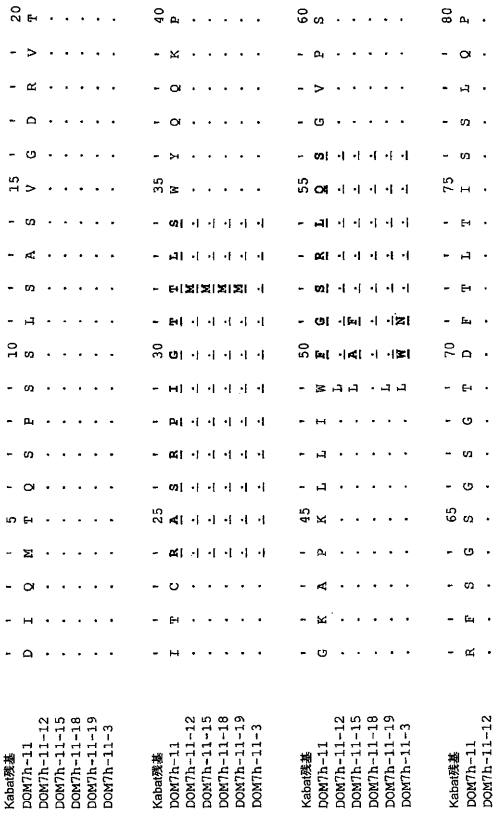
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGG
CGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGACGTACGGCAAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

【０２４８】

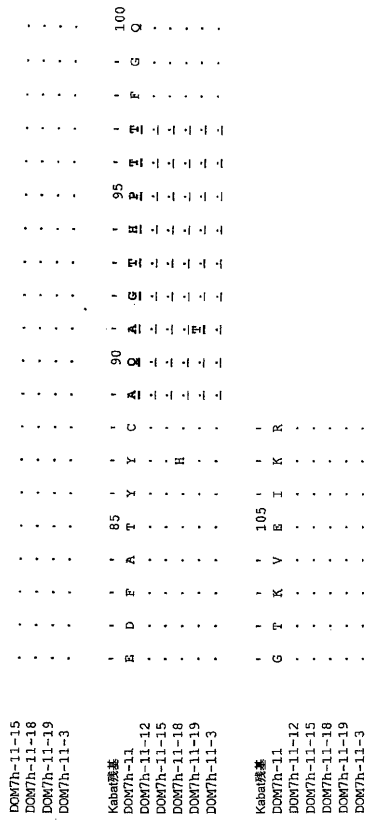
DOM7h-14-123（配列番号156）.

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTAT
CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGG
CGTTCCTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG
CTACGTACTACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGACGTACGGCAAA
GGGACCAAGGTGGAAAACAAACGG

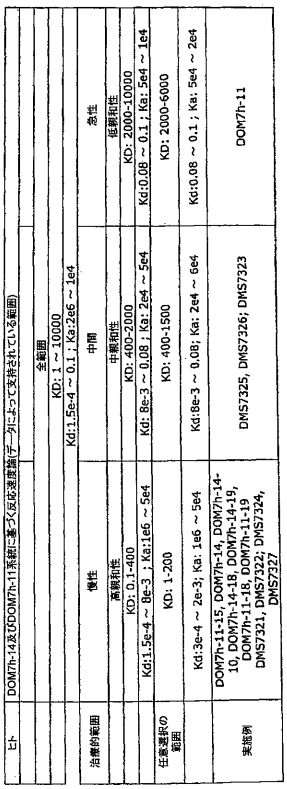
【図１Ａ】



【図１Ｂ】

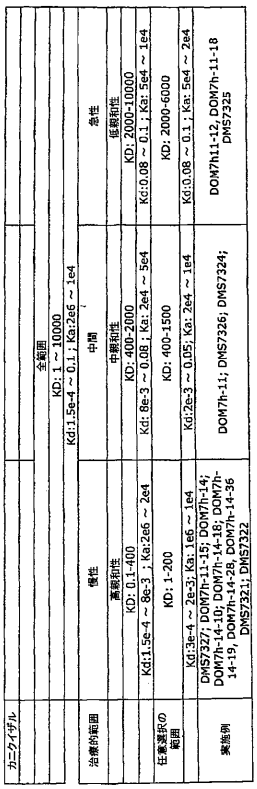


【図２Ａ】



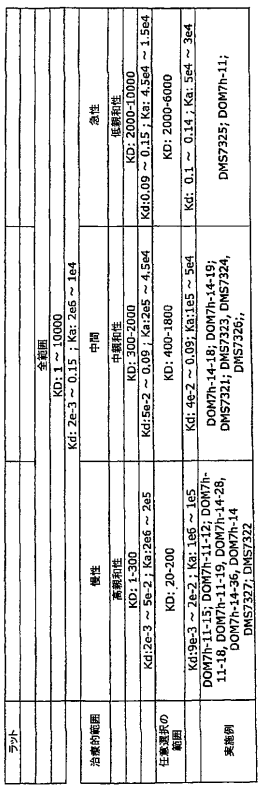
ヒト	DOM7h-14及びDOM7h-11系統に基づく反応速度論データ列によって支持されている範囲)		
	全範囲		
	KD: 1 ~ 10000		
	Kd:1.5e-4 ~ 0.1 ; Ka:2e6 ~ 1e4		
治療的範囲	慢性	中間	急性
	高親和性	中親和性	低親和性
	KD: 0.1-400	KD: 400-2000	KD: 2000-10000
	Kd:1.5e-4 ~ 8e-3 ; Ka:1e6 ~ 5e4	Kd: 8e-3 ~ 0.08 ; Ka: 2e4 ~ 5e4	Kd:0.08 ~ 0.1 ; Ka: 5e4 ~ 1e4
任意選択の範囲	KD: 1-200	KD: 400-1500	KD: 2000-6000
	Kd:3e-4 ~ 2e-3; Ka: 1e6 ~ 5e4	Kd:8e-3 ~ 0.08; Ka: 2e4 ~ 6e4	Kd:0.08 ~ 0.1 ; Ka: 5e4 ~ 2e4
実施例	DOM7h-11-15, DOM7h-14, DOM7h-14-10, DOM7h-14-18, DOM7h-14-19, DOM7h-11-18, DOM7h-11-19, DOM7h-14-28, DOM7h-14-36, DMS7321, DMS7322; DMS7324, DMS7327	DMS7325, DMS7326; DMS7323	DOM7h-11

【図２Ｂ】



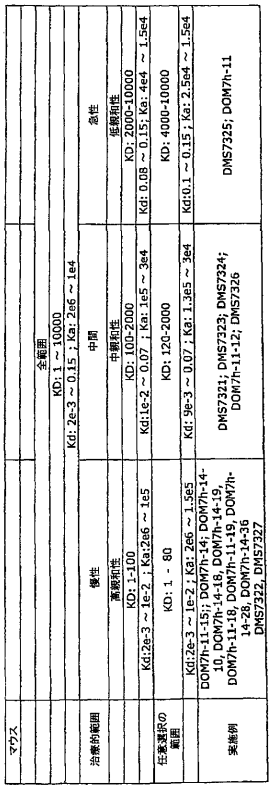
カニクイザル			
	全範囲		
	KD: 1 ~ 10000		
	Kd:1.5e-4 ~ 0.1 ; Ka:2e6 ~ 1e4		
治療的範囲	慢性	中間	急性
	高親和性	中親和性	低親和性
	KD: 0.1-400	KD: 400-2000	KD: 2000-10000
	Kd:1.5e-4 ~ 8e-3 ; Ka:2e6 ~ 2e4	Kd: 8e-3 ~ 0.08 ; Ka: 2e4 ~ 5e4	Kd:0.08 ~ 0.1 ; Ka: 5e4 ~ 1e4
任意選択の範囲	KD: 1-200	KD: 400-1500	KD: 2000-6000
	Kd:3e-4 ~ 2e-3; Ka: 1e6 ~ 1e4	Kd:2e-3 ~ 0.05; Ka: 2e4 ~ 1e4	Kd:0.08 ~ 0.1 ; Ka: 5e4 ~ 2e4
実施例	DMS7327; DOM7h-11-15; DOM7h-14; DOM7h-14-10; DOM7h-14-18; DOM7h-14-19, DOM7h-14-28, DOM7h-14-36 DMS7321; DMS7322	DOM7h-11; DMS7326; DMS7324;	DOM7h11-12, DOM7h-11-18 DMS7325

【図２Ｃ】



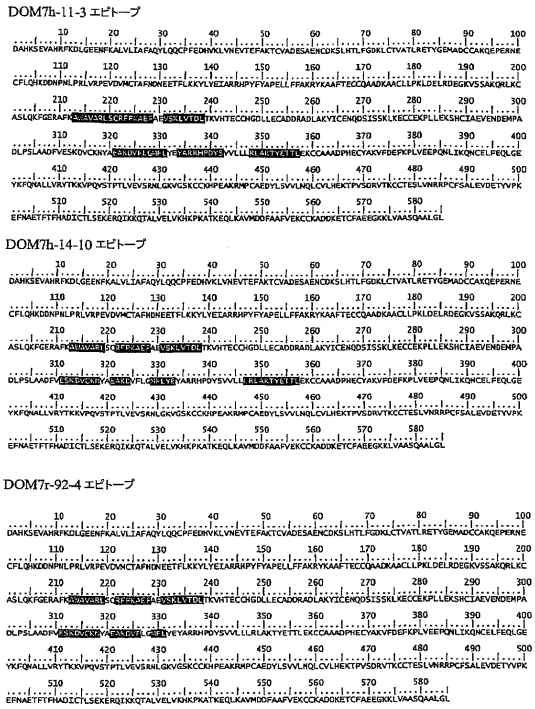
ラット			
	全範囲		
	KD: 1 ~ 10000		
	Kd: 2e-3 ~ 0.15 ; Ka: 2e6 ~ 1e4		
治療的範囲	慢性	中間	急性
	高親和性	中親和性	低親和性
	KD: 1-300	KD: 300-2000	KD: 2000-10000
	Kd:2e-3 ~ 5e-2 ; Ka:2e6 ~ 2e5	Kd:5e-2 ~ 0.09 ; Ka:2e5 ~ 4.5e4	Kd:0.09 ~ 0.15 ; Ka: 4.5e4 ~ 1.5e4
任意選択の範囲	KD: 20-200	KD: 400-1800	KD: 2000-6000
	Kd:9e-3 ~ 2e-2 ; Ka: 1e6 ~ 1e5	Kd: 4e-2 ~ 0.09; Ka:1e5 ~ 5e4	Kd: 0.1 ~ 0.14 ; Ka: 5e4 ~ 3e4
実施例	DOM7h-11-15; DOM7h-11-12; DOM7h-11-18, DOM7h-11-19, DOM7h-14-28, DOM7h-14-36, DOM7h-14 DMS7327; DMS7322	DOM7h-14-18; DOM7h-14-19; DMS7321; DMS7323, DMS7324, DMS7326;,	DMS7325; DOM7h-11;

【図２Ｄ】

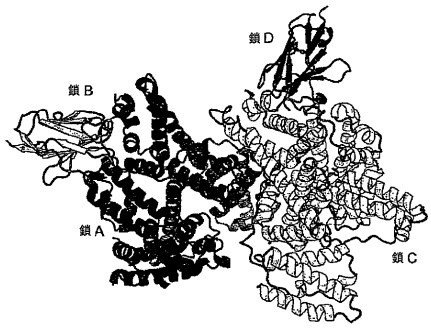


マウス			
	全範囲		
	KD: 1 ~ 10000		
	Kd: 2e-3 ~ 0.15 ; Ka: 2e6 ~ 1e4		
治療的範囲	慢性	中間	急性
	高親和性	中親和性	低親和性
	KD: 1-100	KD: 100-2000	KD: 2000-10000
	Kd:2e-3 ~ 1e-2 ; Ka:2e6 ~ 1e5	Kd:1e-2 ~ 0.07 ; Ka: 1e5 ~ 3e4	Kd: 0.08 ~ 0.15; Ka: 4e4 ~ 1.5e4
任意選択の範囲	KD: 1 - 80	KD: 120-2000	KD: 4000-10000
	Kd:2e-3 ~ 1e-2 ; Ka: 2e6 ~ 1.5e5	Kd: 9e-3 ~ 0.07 ; Ka: 1.3e5 ~ 3e4	Kd:0.1 ~ 0.15 ; Ka: 2.5e4 ~ 1.5e4
実施例	DOM7h-11-15;; DOM7h-14; DOM7h-14-10, DOM7h-14-18, DOM7h-14-19, DOM7h-11-18, DOM7h-11-19, DOM7h-14-28, DOM7h-14-36 DMS7322, DMS7327	DMS7321; DMS7323; DMS7324; DOM7h-11-12; DMS7326	DMS7325; DOM7h-11

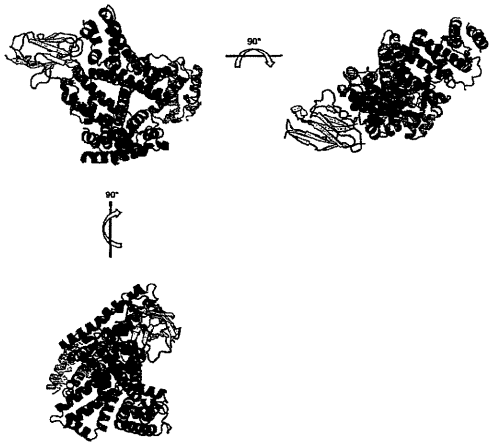
【図３】



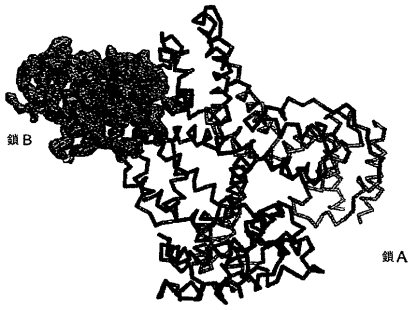
【図４Ａ】



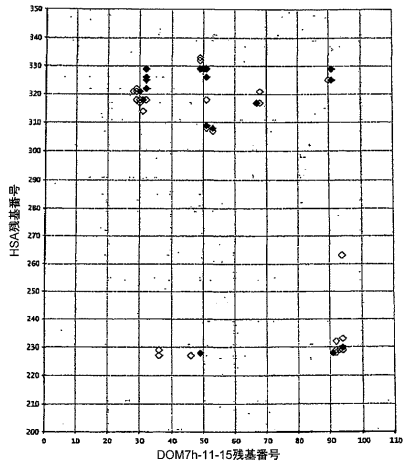
【図４Ｂ】



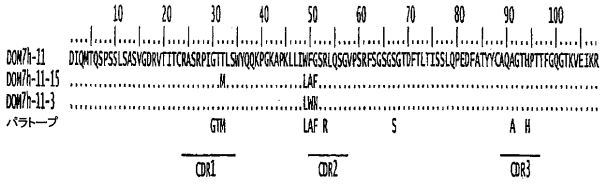
【図４Ｃ】



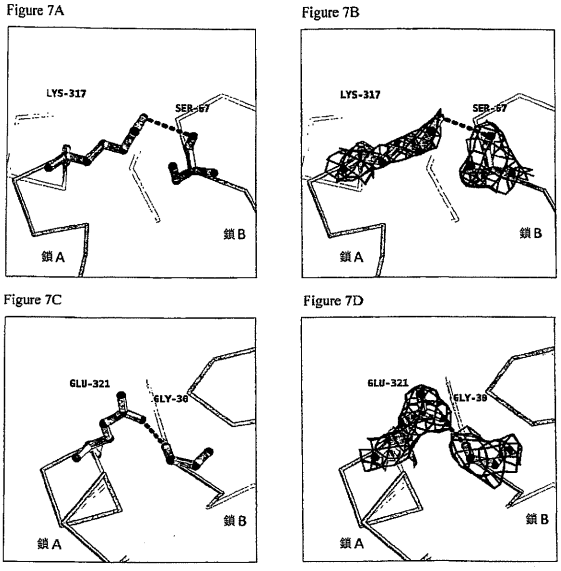
【図５】



【図６】



【図７－１】



【図７－２】

Figure 7E

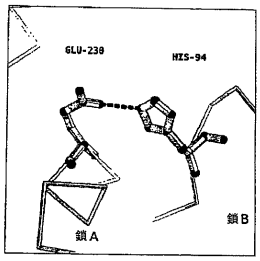


Figure 7F

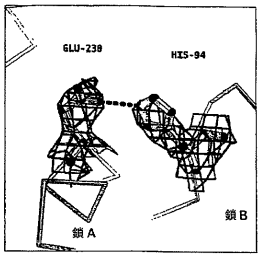


Figure 7G

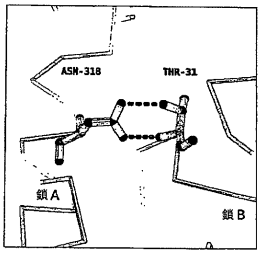
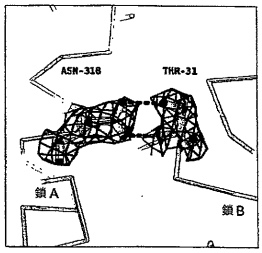


Figure 7H



【図７－３】

Figure 7I

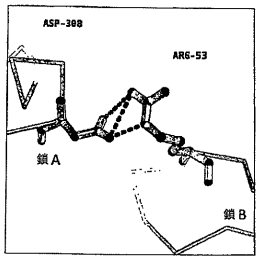


Figure 7J

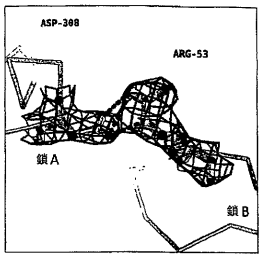


Figure 7K

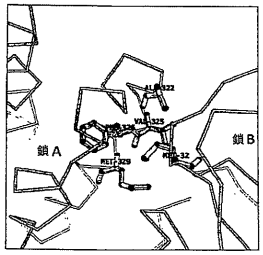
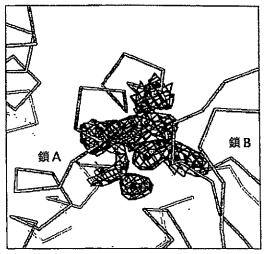


Figure 7L



【図７－４】

Figure 7M

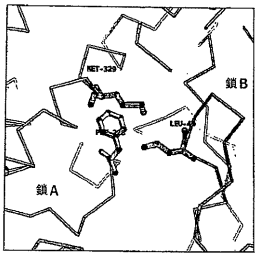


Figure 7N

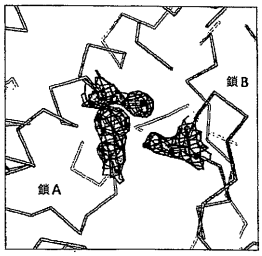


Figure 7O

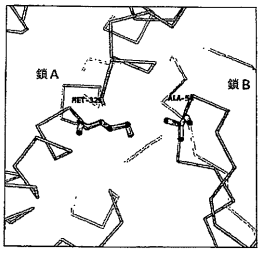
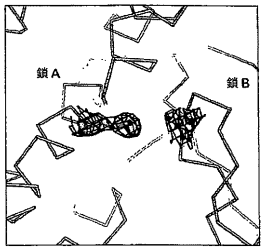


Figure 7P



【図７－５】

Figure 7Q

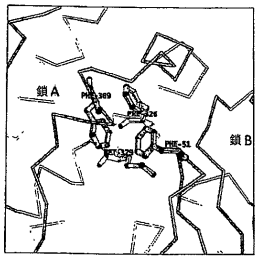


Figure 7R

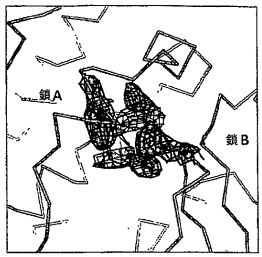


Figure 7S

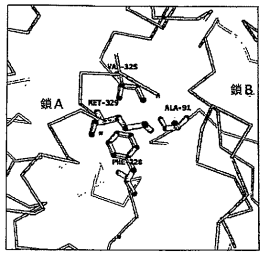
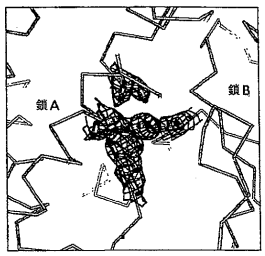
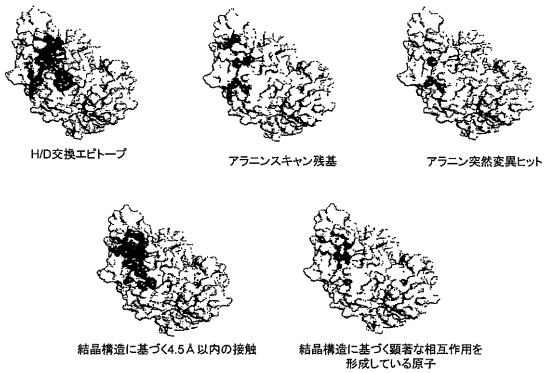


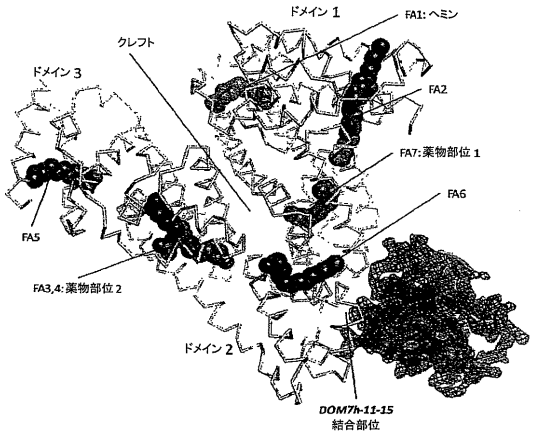
Figure 7T



【図８】



【図９】



【図１０－１】

HSAのドメイン2アミノ酸配列番号79

EGKVSSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHT
ECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA
DLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETT
LEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP

HSAのドメイン2核酸配列番号80

GAAGGGAAGGTTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCCAGTCTCCAAAAA
TTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTT
CCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAAAGTCC
ACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGACAGGGCGGACC
TTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAAACTGAAGGAATG
CTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGGAAAATGA
TGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTTGAAAGTAAGGAT
GTTTGCAAAAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGCATGTTTTTGTATG
AATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAA
GACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATG
CTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCT

全長HSAアミノ酸配列番号81

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD
ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL
PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC
QAADKAACLLPKLDELRDEGKVSSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFP
KAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARR
HPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCEL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF
TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADD
KETCFAEEGKKLVAASQAALGL

全長HSA核酸配列番号82

GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAAT
TTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGA
AGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCT
GATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAAT
TATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGC
AAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCC
AAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCAT
GACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACAT

【図１０－２】

CCTTACTTTTATGCCCCGGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTT
TACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGAT
GAACTTCGGGATGAAGGGAAGGTTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCC
AGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTG
AGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATC
TTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGA
CAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAA
ACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGA
AGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTT
GAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGC
ATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCT
GAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGA
TCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAG
CCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACA
AATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAAC
TCCAACTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTG
TAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGT
CCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCAC
CAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAA
GTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATG
CAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCAC
TTGTTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTG
TTATGGATGATTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGA
GACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA
GGCTTA

DOM7H-14-10アミノ酸配列番号83

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQGTKVEIKR

DOM7H-14-10核酸配列番号84

TCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG
ACCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTG
GTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCTC
GTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC
ACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTC
AGGGTTTGAGGCATCCTAAGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC
GG

【図１０－３】

プライマーTB147配列番号85

TAACAAGAATAATGGGATCCACCGGCGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATC
GG

プライマーTB148配列番号86

GCGCGCGCGCGCTTCAAGCTTTCATTAATGGTGATGGTGATGATGTAAGCCTAAG
GCAGCTTGACTTGCAGCAACAAGTTTTTTACCC

プライマーTB153配列番号87

GAGCCAGAGATTTCCCGCCGCTGAGTTTGCAGAAG

プライマーTB154配列番号88

CTTCTGCAAACTCAGCGGCGGGAAATCTCTGGCTC

プライマーTB155配列番号89

GAGATTTCCCAAAGCTGCCTTTGCAGAAGTTTCCAAG

プライマーTB156配列番号90

CTTGGAAACTTCTGCAAAGGCAGCTTTGGGAAATCTC

プライマーTB157配列番号91

CCAAAGCTGAGTTTGCAGCCGTTTCCAAGTTAGTGAC

プライマーTB158配列番号92

GTCACTAACTTGGAAACGGCTGCAAACTCAGCTTTGG

プライマーTB159配列番号93

GATTTTGTTGAAAGTAAGGCCGTTTGCAAAAACTATG

プライマーTB160配列番号94

CATAGTTTTTGCAAACGGCCTTACTTTCAACAAAATC

プライマーTB161配列番号95

GAAAGTAAGGATGTTTGCGCCAACTATGCTGAGGCAAAGG

プライマーTB162配列番号96

CCTTTGCCTCAGCATAGTTGGCGCAAACATCCTTACTTTC

【図１０－４】

プライマーTB163配列番号97

GCTGAGGCAAAGGATGCCTTCCTGGGCATGTTTTTG

プライマーTB164配列番号98

CAAAAACATGCCCAGGAAGGCATCCTTTGCCTCAGC

プライマーTB165配列番号99

GGATGTCTTCCTGGGCGCCTTTTTGTATGAATATG

プライマーTB166配列番号100

CATATTCATACAAAAAGGCGCCCAGGAAGACATCC

プライマーTB167配列番号101

GCTGCTGCTGAGACTTGCCGCCACATATGAAACCACTCTAG

プライマーTB168配列番号102

CTAGAGTGGTTTCATATGTGGCGGCAAGTCTCAGCAGCAGC

HSA-His6 WT 配列番号103

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD
ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL
PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC
QAADKAACLLPKLDELRDEGKVSSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFP
KAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARR
HPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCEL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF
TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADD
KETCFAEEGKKLVAASQAALGLHHHHHH

HSA-His6 K225A 配列番号104

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD
ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL
PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC
QAADKAACLLPKLDELRDEGKVSSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFP
AAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARR

【図１０－５】

HPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCEL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF
TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADD
KETCFAEEGKKLVAASQAALGLHHHHHH

HSA-His6 E227A 配列番号105

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD
ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL
PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC
QAADKAACLLPKLDELRDEGKVSSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFP
KAAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARR
HPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCEL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF
TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADD
KETCFAEEGKKLVAASQAALGLHHHHHH

HSA-His6 E230A 配列番号106

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD
ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL
PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC
QAADKAACLLPKLDELRDEGKVSSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFP
KAEFAAVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARR
HPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCEL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF
TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADD
KETCFAEEGKKLVAASQAALGLHHHHHH

HSA-His6 D314A 配列番号107

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD
ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL
PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC
QAADKAACLLPKLDELRDEGKVSSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFP
KAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKAVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARR
HPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCEL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE

【図１０－６】

DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF
TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADD
KETCFAEEGKKLVAASQAALGLHHHHHH

HSA-His6 K317A 配列番号108

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD
ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL
PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC
QAADKAACLLPKLDELRDEGKVSSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFP
KAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCANYAEAKDVFLGMFLYEYARR
HPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCEL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF
TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADD
KETCFAEEGKKLVAASQAALGLHHHHHH

HSA-His6 V325A 配列番号109

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD
ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL
PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC
QAADKAACLLPKLDELRDEGKVSSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFP
KAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDAFLGMFLYEYARR
HPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCEL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF
TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADD
KETCFAEEGKKLVAASQAALGLHHHHHH

HSA-His6 M329A 配列番号110

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD
ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL
PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC
QAADKAACLLPKLDELRDEGKVSSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFP
KAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGAFLYEYARR
HPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCEL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF

【図１０－７】

TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADD
KETCFAEEGKKLVAASQAALGLHHHHHH

HSA-His6 K351A 配列番号111

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD
ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL
PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECC
QAADKAACLLPKLDELRDEGKVSSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFP
KAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
PLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARR
HPDYSVVLLRLAATYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCEL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAE
DYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETF
TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADD
KETCFAEEGKKLVAASQAALGLHHHHHH

HSA-His6 WT 配列番号112

GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAAT
TTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGA
AGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCT
GATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAAT
TATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGC
AAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCC
AAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCAT
GACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACAT
CCTTACTTTTATGCCCCGGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTT
TACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGAT
GAACTTCGGGATGAAGGGAAGGTTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCC
AGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTG
AGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATC
TTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGA
CAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAA
ACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGA
AGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTT
GAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGC
ATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCT
GAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGA
TCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAG
CCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACA
AATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAAC
TCCAACTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTG

【図１０－８】

TAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGT
CCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCAC
CAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAA
GTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATG
CAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCAC
TTGTTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTG
TTATGGATGATTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGA
GACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA
GGCTTACATCATCACCATCACCATT

HSA-His6 K225A 配列番号113

GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAAT
TTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGA
AGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCT
GATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAAT
TATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGC
AAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCC
AAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCAT
GACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACAT
CCTTACTTTTATGCCCCGGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTT
TACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGAT
GAACTTCGGGATGAAGGGAAGGTTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCC
AGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTG
AGCCAGAGATTTCCCGCCGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATC
TTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGA
CAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAA
ACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGA
AGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTT
GAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGC
ATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCT
GAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGA
TCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAG
CCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACA
AATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAAC
TCCAACTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTG
TAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGT
CCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCAC
CAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAA
GTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATG
CAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCAC
TTGTTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTG
TTATGGATGATTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGA
GACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA
GGCTTACATCATCACCATCACCATT

【図１０－９】

GACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA
GGCTTACATCATCACCATCACCATT

HSA-His6 E227A 配列番号114

GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAAT
TTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGA
AGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCT
GATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAAT
TATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGC
AAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCC
AAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCAT
GACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACAT
CCTTACTTTTATGCCCCGGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTT
TACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGAT
GAACTTCGGGATGAAGGGAAGGTTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCC
AGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTG
AGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGCCTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATC
TTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGA
CAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAA
ACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGA
AGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTT
GAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGC
ATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCT
GAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGA
TCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAG
CCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACA
AATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAAC
TCCAACTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTG
TAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGT
CCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCAC
CAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAA
GTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATG
CAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCAC
TTGTTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTG
TTATGGATGATTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGA
GACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA
GGCTTACATCATCACCATCACCATT

HSA-His6 E230A 配列番号115

GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAAT
TTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGA

【図１０－１０】

AGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCT
GATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAAT
TATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGC
AAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCC
AAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCAT
GACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACAT
CCTTACTTTTATGCCCCGGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTT
TACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGAT
GAACTTCGGGATGAAGGGAAGGTTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCC
AGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTG
AGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATC
TTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGA
CAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAA
ACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGA
AGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTT
GAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGC
ATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCT
GAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGA
TCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAG
CCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACA
AATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAAC
TCCAACTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTG
TAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGT
CCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCAC
CAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAA
GTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATG
CAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCAC
TTGTTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTG
TTATGGATGATTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGA
GACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA
GGCTTACATCATCACCATCACCATT

HSA-His6 D314A 配列番号116

GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAAT
TTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGA
AGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCT
GATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAAT
TATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGC
AAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCC
AAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCAT
GACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACAT
CCTTACTTTTATGCCCCGGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTT

【図１０－１１】

TACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGAT
GAACTTCGGGATGAAGGGAAGGTTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCC
AGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTG
AGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATC
TTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGA
CAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAA
ACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGA
AGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTG
AGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATC
TTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGA
CAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAA
ACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGA

HSA-His6 K317A 配列番号117

GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAAT
TTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGA
AGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCT
GATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAAT
TATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGC
AAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCC
AAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCAT
GACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACAT
CCTTACTTTTATGCCCCGGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTT
TACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGAT
GAACTTCGGGATGAAGGGAAGGTTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCC
AGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTG
AGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATC
TTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGA
CAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAA
ACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGA

【図１０－１２】

AGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTT
GAAAGTAAGGATGTTTGCGCCAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGC
ATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCT
GAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGA
TCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAG
CCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACA
AATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAAC
TCCAACTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTG
TAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGT
CCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCAC
CAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAA
GTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATG
CAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCAC
TTGTTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTG
TTATGGATGATTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGA
GACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA
GGCTTACATCATCACCATCACCATT

HSA-His6 V325A 配列番号118

GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAAT
TTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGA
AGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCT
GATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAAT
TATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGC
AAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCC
AAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCAT
GACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACAT
CCTTACTTTTATGCCCCGGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTT
TACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGAT
GAACTTCGGGATGAAGGGAAGGTTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCC
AGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTG
AGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATC
TTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGA
CAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAA
ACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGA
AGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTT
GAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACTATGCTGAGGCAAAGGATGCCTTCCTGGGC
ATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCT
GAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGA
TCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAG
CCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACA
AATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAAC

【図１０－１３】

TCCAACTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTG
TAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGT
CCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCAC
CAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAA
GTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATG
CAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCAC
TTGTTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTG
TTATGGATGATTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGA
GACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA
GGCTTACATCATCACCATCACCATT

HSA-His6 M329A 配列番号119

GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAAT
TTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGA
AGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCT
GATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAAT
TATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGC
AAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCC
AAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCAT
GACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACAT
CCTTACTTTTATGCCCCGGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTT
TACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGAT
GAACTTCGGGATGAAGGGAAGGTTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCC
AGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTG
AGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATC
TTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGA
CAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAA
ACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGA
AGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTT
GAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACTATGCTGAGGCAAAGGATGCCTTCCTGGGC
ATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCT
GAGACTTGCCAAGACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGA
TCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAG
CCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACA
AATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAAC
TCCAACTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTG
TAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGT
CCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCAC
CAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAA
GTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATG
CAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCAC
TTGTTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTG

【図１０－１４】

TTATGGATGATTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGA
GACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA
GGCTTACATCATCACCATCACCATT

HSA-His6 K351A 配列番号120

GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAAT
TTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGA
AGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCT
GATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAAT
TATGCACAGTTGCAACTCTTCGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGC
AAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGATGACAACCC
AAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCAT
GACAATGAAGAGACATTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACAT
CCTTACTTTTATGCCCCGGAACTCCTTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTT
TACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGAT
GAACTTCGGGATGAAGGGAAGGTTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGTGCC
AGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCATGGGCAGTAGCTCGCCTG
AGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGAGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATC
TTACCAAAGTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTGCTGATGA
CAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCTGTGAAAATCAAGATTCGATCTCCAGTAA
ACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTCTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGA
AGTGGAAAATGATGAGATGCCTGCTGACTTGCCTTCATTAGCTGCTGATTTTGTT
GAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACTATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCCTGGGC
ATGTTTTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCGTGCTGCTGCT
GAGACTTGCCGCCACATATGAAACCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGA
TCCTCATGAATGCTATGCCAAAGTGTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAG
CCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTTTTGAGCAGCTTGGAGAGTACA
AATTCCAGAATGCGCTATTAGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAAC
TCCAACTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAATGTTG
TAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGCAGAAGACTATCTATCCGTGGT
CCTGAACCAGTTATGTGTGTTGCATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCAC
CAAATGCTGCACAGAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTCAGCTCTGGAA
GTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATG
CAGATATATGCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCAC
TTGTTGAGCTTGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTG
TTATGGATGATTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGA
GACCTGCTTTGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA
GGCTTACATCATCACCATCACCATT

DOM 7H-11-13配列番号121

【図１０－１５】

STDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTTLSWYQQKPGKAPKLLILWNSRLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKRAAA

DOM 7H-11-13配列番号122

TCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG
ACCGTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTG
GTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCCTTTGGAATTCCCGT
TTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA
CTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCA
GGCTGGGACGCATCCTACGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACG
GGCGGCCGCA

DOM7h-14 配列番号123

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR

DOM7h-14 配列番号124

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTG
TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTGGTACCA
GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTCCTCGTTGCA
AAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
ACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCTCAGGGTG
CGGCGTTGCCTAGGACGTTCGGCCAA GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

DOM7h-11配列番号125

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPIGTTLSWYQQKPGKAPKLLIWFGSRLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQAGTHPTTFGQGTKVEIKR

DOM7h-11配列番号126

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTG
TCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCGTCCGATTGGGACGACGTTAAGTTGGTACCA
GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTGGTTTGGTTCCCGGTTGCAA
AGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA
CCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGCGCAGGCTGG
GACGCATCCTACGACGTTCGGCCAA GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGG

【配列表】
2013538566000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/063999

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/18 C12N15/13
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/063818 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB]; ENEVER CAROLYN [GB]; JESPERS LAURENT [GB]; PUPEC) 10 June 2010 (2010-06-10) page 76	1,2,7, 10-24
X	WO 2008/096158 A2 (DOMANTIS LTD [GB]; TOMLINSON IAN [GB]; JESPERS LAURENT [GB]; CLUBE JAS) 14 August 2008 (2008-08-14)	3-9
Y	figure 24	29-31

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 October 2011	07/11/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Wagner, René

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/063999

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495, ISSN: 0167-7799, DOI: 10.1016/J.TIBTECH.2003.08.007 page 486	29-31
Y,P	T. TANAKA ET AL: "Single Domain Intracellular Antibodies from Diverse Libraries: EMPHASIZING DUAL FUNCTIONS OF LMO2 PROTEIN INTERACTIONS USING A SINGLE VH DOMAIN", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 286, no. 5, 4 February 2011 (2011-02-04), pages 3707-3716, XP55010535, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M110.188193 the whole document	29-31
Y	WARK K L ET AL: "Latest technologies for the enhancement of antibody affinity", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 58, no. 5-6, 7 August 2006 (2006-08-07), pages 657-670, XP024892147, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2006.01.025 [retrieved on 2006-08-07] the whole document	29-31
Y	KOIDE ET AL: "Exploring the Capacity of Minimalist Protein Interfaces: Interface Energetics and Affinity Maturation to Picomolar KD of a Single-domain Antibody with a Flat Paratope", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 373, no. 4, 3 October 2007 (2007-10-03), pages 941-953, XP022285569, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2007.08.027 the whole document	29-31

-/--

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/063999

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE GENST ERWIN ET AL: "Chemical basis for the affinity maturation of a camel single domain antibody", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, THE AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, INC, US, vol. 279, no. 51, 17 December 2004 (2004-12-17), pages 53593-53601, XP002456205, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M407843200 the whole document	29-31
A	WO 2008/149146 A2 (DOMANTIS LTD [GB]; STEWARD MICHAEL [GB]; PUPECKA MALGORZATA [GB]; TOML) 11 December 2008 (2008-12-11) the whole document	1-31
A,P	WO 2011/039096 A1 (GLAXO GROUP LTD [GB]; HAMILTON BRUCE [GB]; HERRING CHRISTOPHER [GB]; P) 7 April 2011 (2011-04-07) the whole document	1-31
A,P	WO 2010/094722 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB]; DE ANGELIS ELENA [GB]; ENEVER CAROLYN [GB]; LIU) 26 August 2010 (2010-08-26) the whole document	1-31
A,P	WO 2011/006915 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB]; COULSTOCK EDWARD [GB]; DE ANGELIS ELENA [GB]; LI) 20 January 2011 (2011-01-20) the whole document	1-31

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2011/063999

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010063818 A2	10-06-2010	AU 2009324037 A1	10-06-2010
		CA 2745448 A1	10-06-2010
		EP 2364326 A2	14-09-2011
		US 2011229458 A1	22-09-2011
WO 2008096158 A2	14-08-2008	AR 065260 A1	27-05-2009
		AU 2008212682 A1	14-08-2008
		CA 2677069 A1	14-08-2008
		CL 4232008 A1	24-10-2008
		CN 101965364 A	02-02-2011
		EA 200900955 A1	30-04-2010
		EP 2139918 A2	06-01-2010
		JP 2010518062 A	27-05-2010
		KR 20090114445 A	03-11-2009
		US 2009259026 A1	15-10-2009
WO 2008149146 A2	11-12-2008	CN 101848935 A	29-09-2010
		WO 2008149143 A2	11-12-2008
		WO 2008149144 A2	11-12-2008
		JP 2010528645 A	26-08-2010
		JP 2010528646 A	26-08-2010
		JP 2010529840 A	02-09-2010
		US 2010254972 A1	07-10-2010
		US 2010260763 A1	14-10-2010
		US 2010254995 A1	07-10-2010
		US 2011086019 A1	14-04-2011
WO 2011039096 A1	07-04-2011	NONE	
WO 2010094722 A2	26-08-2010	AR 075506 A1	06-04-2011
		CA 2753130 A1	26-08-2010
		UY 32452 A	30-09-2010
WO 2011006915 A2	20-01-2011	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	*(2006.01)*	G01N	33/53	D	
G01N 33/566	*(2006.01)*	G01N	33/566		
G01N 33/543	*(2006.01)*	G01N	33/543	595	

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

(74)代理人 100122389
弁理士 新井 栄一
(74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
(72)発明者 アルラナンサム, ハレン
イギリス国 シービー４ ０ダブリュジー ケンブリッジシャー ケンブリッジ, ケンブリッジ サイエンス パーク ３１５, ドマンティス リミテッド
(72)発明者 バトゥワンガラ, ティル ディヌク
イギリス国 シービー４ ０ダブリュジー ケンブリッジシャー ケンブリッジ, ケンブリッジ サイエンス パーク ３１５, ドマンティス リミテッド
(72)発明者 デ アンジェリス, エレナ
イギリス国 シービー４ ０ダブリュジー ケンブリッジシャー ケンブリッジ, ケンブリッジ サイエンス パーク ３１５, ドマンティス リミテッド
(72)発明者 エネバー, キャロライン
イギリス国 シービー４ ０ダブリュジー ケンブリッジシャー ケンブリッジ, ケンブリッジ サイエンス パーク ３１５, ドマンティス リミテッド
(72)発明者 リウ, ハイクン
イギリス国 シービー４ ０ダブリュジー ケンブリッジシャー ケンブリッジ, ケンブリッジ サイエンス パーク ３１５, ドマンティス リミテッド
(72)発明者 シェーン, オリバー
イギリス国 シービー４ ０ダブリュジー ケンブリッジシャー ケンブリッジ, ケンブリッジ サイエンス パーク ３１５, ドマンティス リミテッド

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA41 CA06 CA07 DA03 DA06 EA04 GA11 GA14 HA01
HA06
4B064 AG27 CA19 CE12 DA01
4C085 AA14 BB44 DD62 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2013538566A5	公开(公告)日	2014-09-18
申请号	JP2013523643	申请日	2011-08-12
[标]申请(专利权)人(译)	葛兰素集团有限公司		
申请(专利权)人(译)	葛兰素史克，知识产权，房地产，开发，有限的		
[标]发明人	アルラナンサムハレン バトゥワンガラティルディヌク デアンジェリスエレナ エネバーキャロライン リウハイクン シェーンオリバー		
发明人	アルラナンサム,ハレン バトゥワンガラ,ティル ディヌク デ アンジェリス,エレナ エネバー,キャロライン リウ,ハイクン シェーン,オリバー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C07K16/46 C12P21/08 A61K39/395 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/543		
CPC分类号	C07K16/18 C07K16/2878 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/569 C07K2317/90 C07K2317/92 C07K2317/94 C07K2319/00 C07K2319/21 C07K2319/41		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/18.ZNA C07K16/46 C12P21/08 A61K39/395.Y G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/543.595		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA41 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA14 4B024/HA01 4B024/HA06 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CE12 4B064/DA01 4C085/AA14 4C085/BB44 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	61/373397 2010-08-13 US		
其他公开文献	JP2013538566A		

摘要(译)

本发明涉及抗血清白蛋白免疫球蛋白单可变结构域的改进变体，以及包含此类变体，组合物，核酸，载体和宿主的配体和药物缀合物。