

図2 Assemble PCRによるVL遺伝子とVH遺伝子の連結

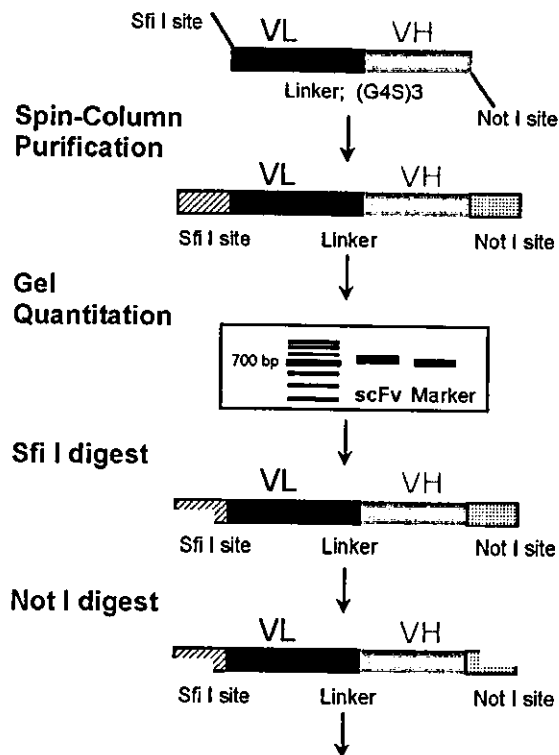


図3 scFv(一本鎖抗体)の制限酵素処理

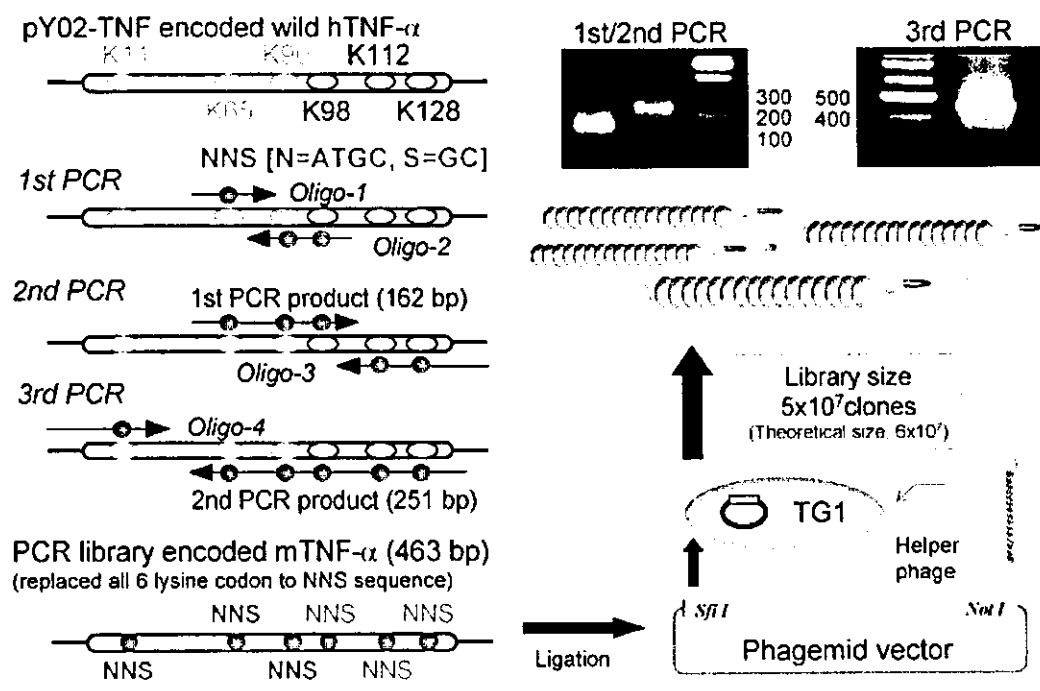


図4 TNF- $\alpha$ 中の全6個のリジン残基が他のアミノ酸に置換された構造変異体を表面提示したファージライブラリの作製

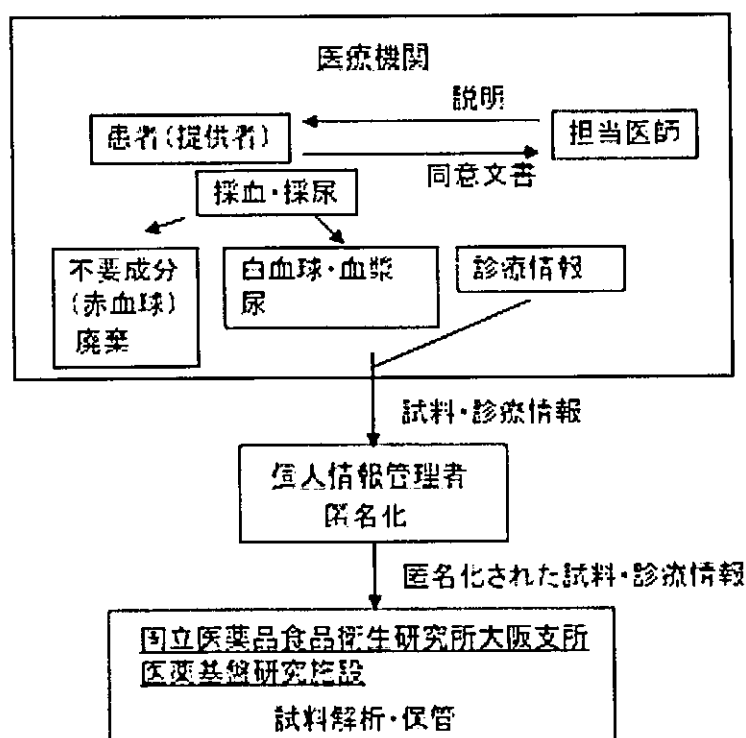


図5 臨床検体の受入体制

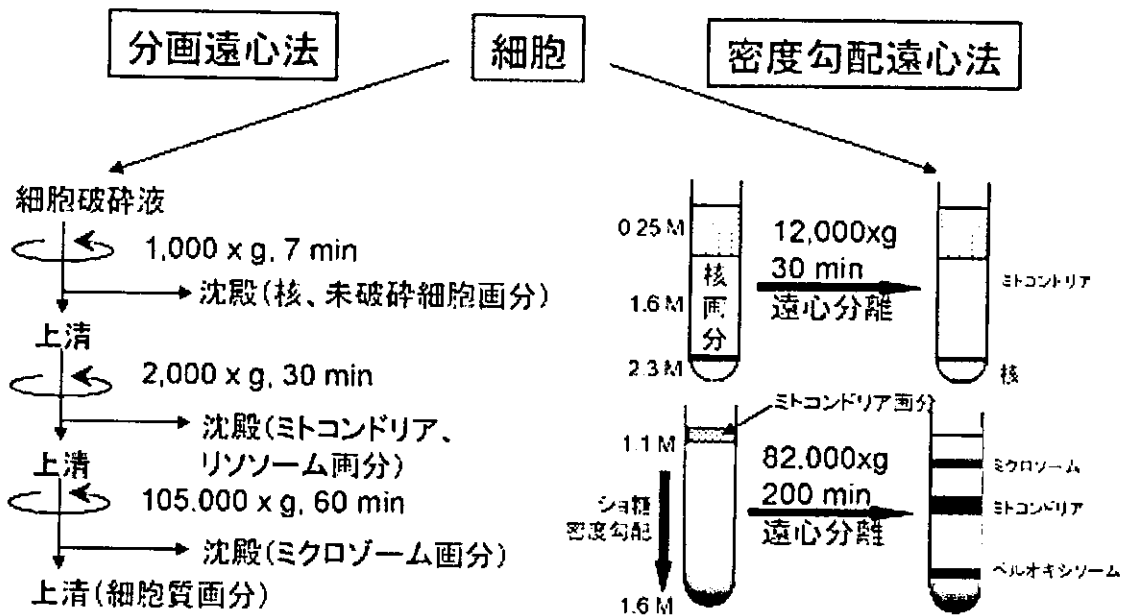
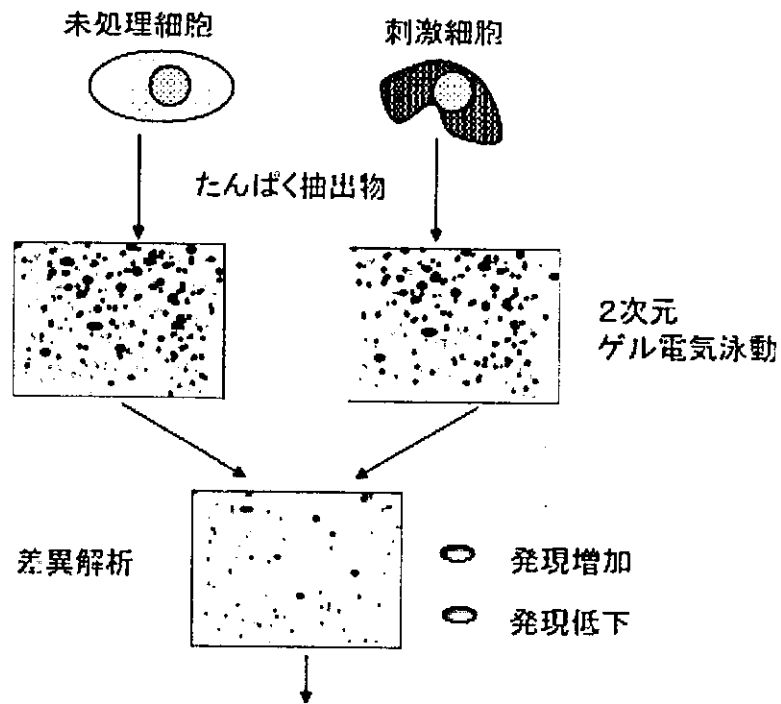


図6 組織・細胞からのたんぱく質の分離・抽出条件検討



発現変化の見られるたんぱく質をゲルから切り出し、MS解析により同定

図7 2次元ゲル電気泳動(2DGE)によるたんぱく質の分離・精製と比較評価

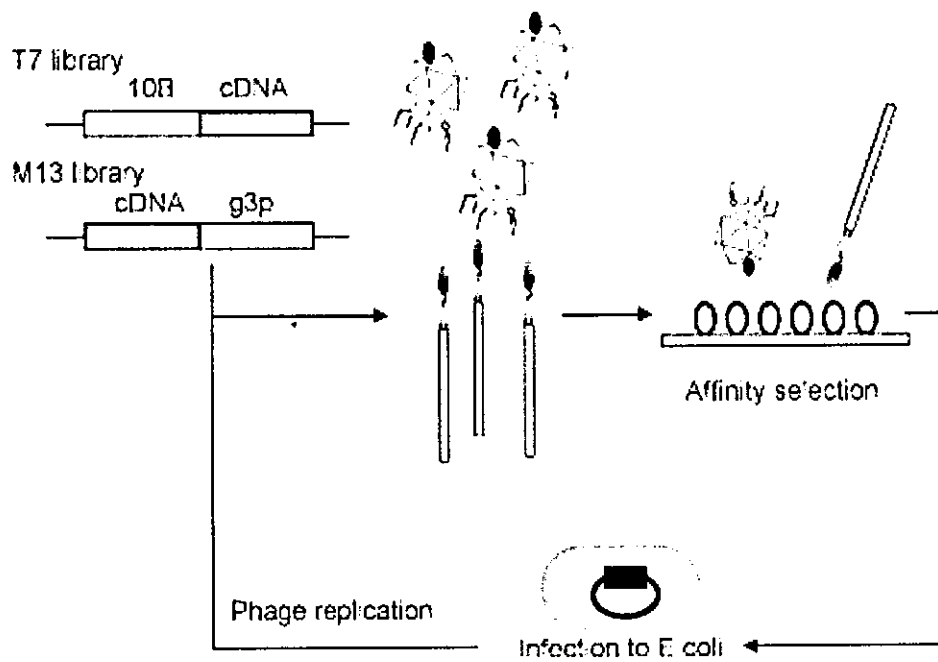


図8 疾患関連細胞cDNAファージディスプレイライブラリによる相互作用分子の探索

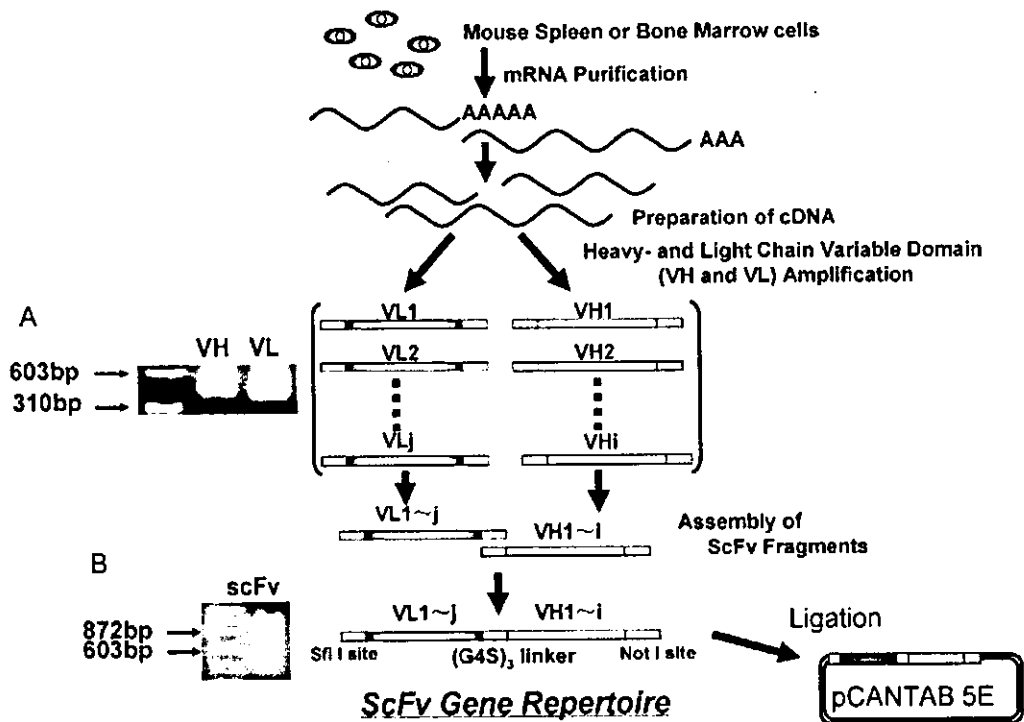


図9 マウスcDNAからのVL遺伝子とVH遺伝子の増幅

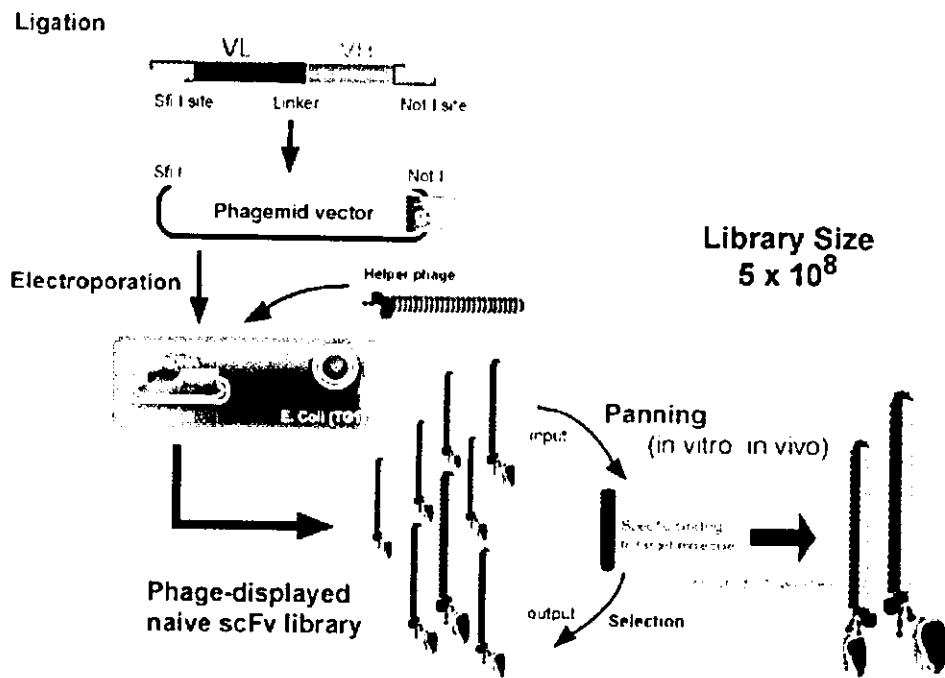


図10 ナイーブscFvを表面提示したファージライブラリの作製

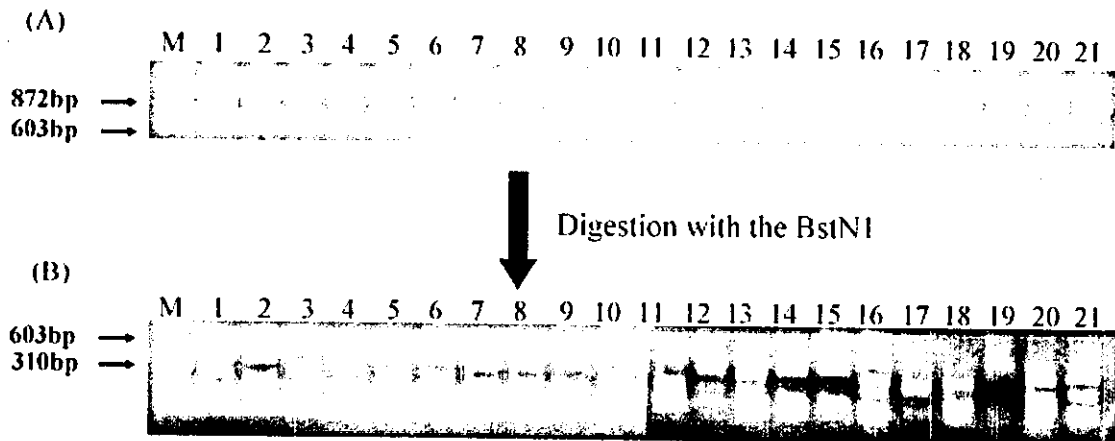


図11 BstNIによるscFv遺伝子のフィンガープリント解析

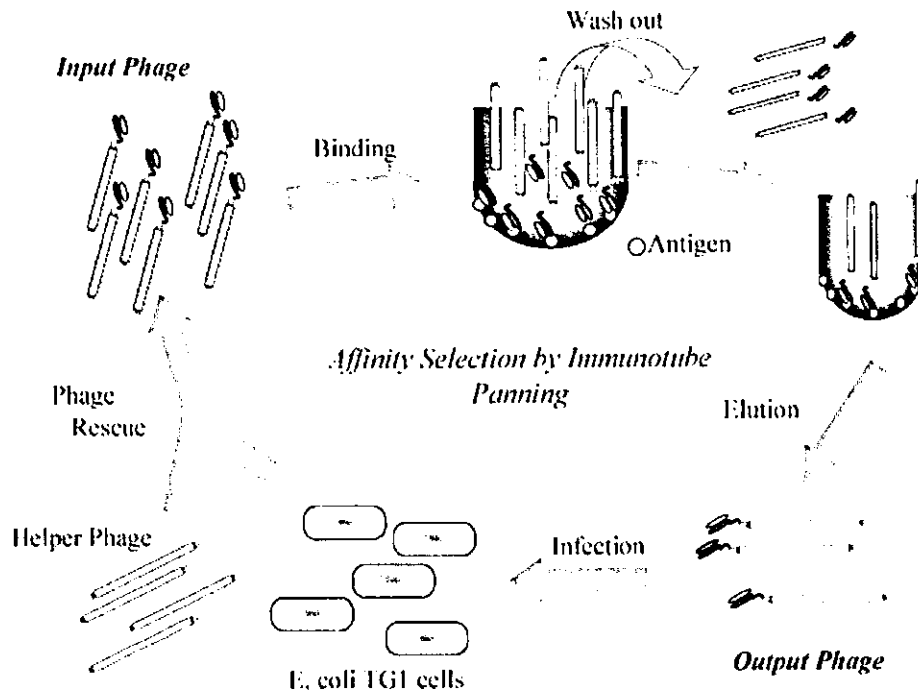


図12 種々抗原に対するパンニング

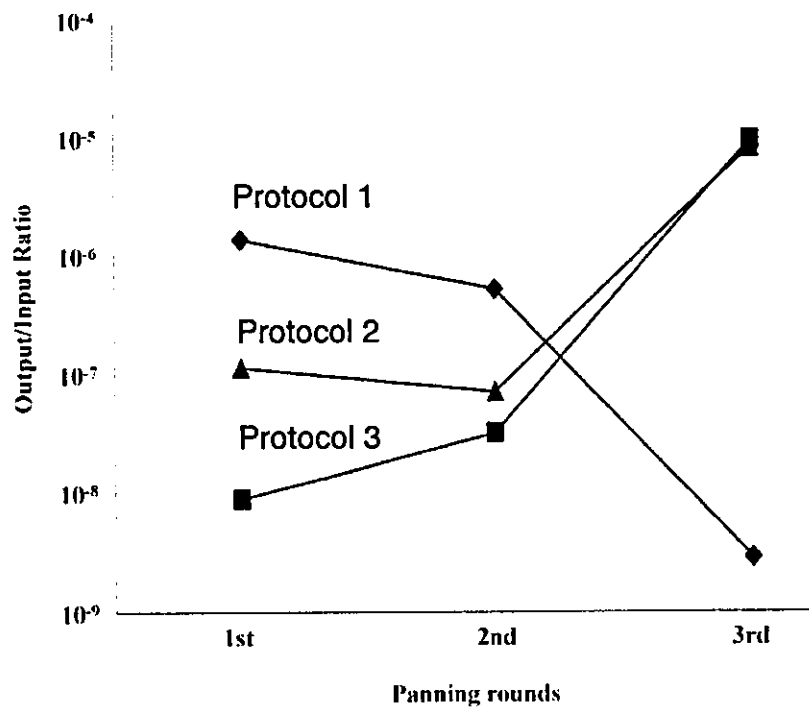


図13 パンニングによるルシフェラーゼに結合するscFv提示ファージの濃縮 (パンニング条件の設定)

Coated with Luciferase.  
 ↓  
 Blocked with Block Ace.  
 ↓  
 Added scFv displayed phage.  
 ↓  
 Detection : HRP/Anti-M13(phage coat protein)  
 Monoclonal Conjugate

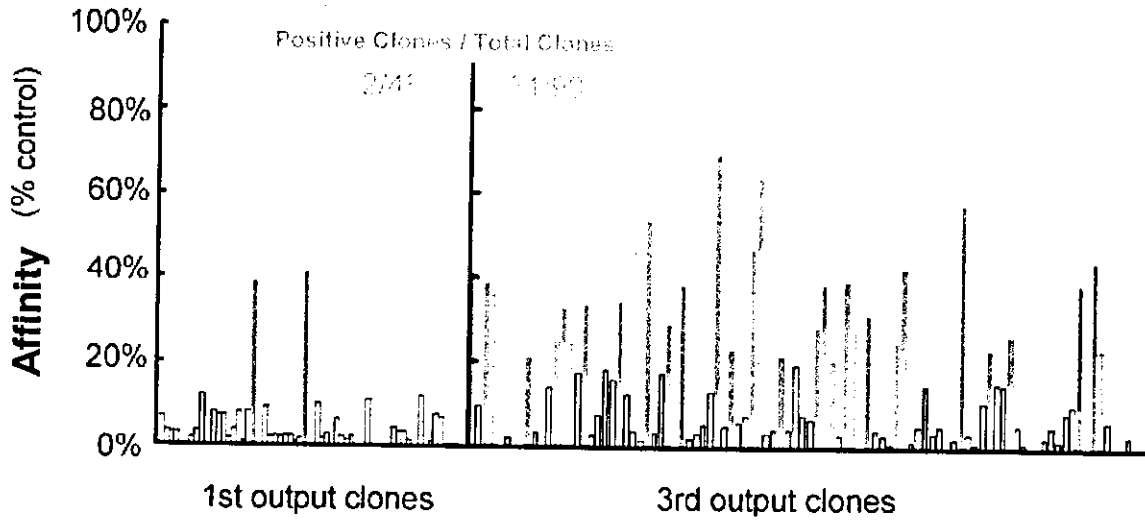


図14 ルシフェラーゼに対するファージELISA

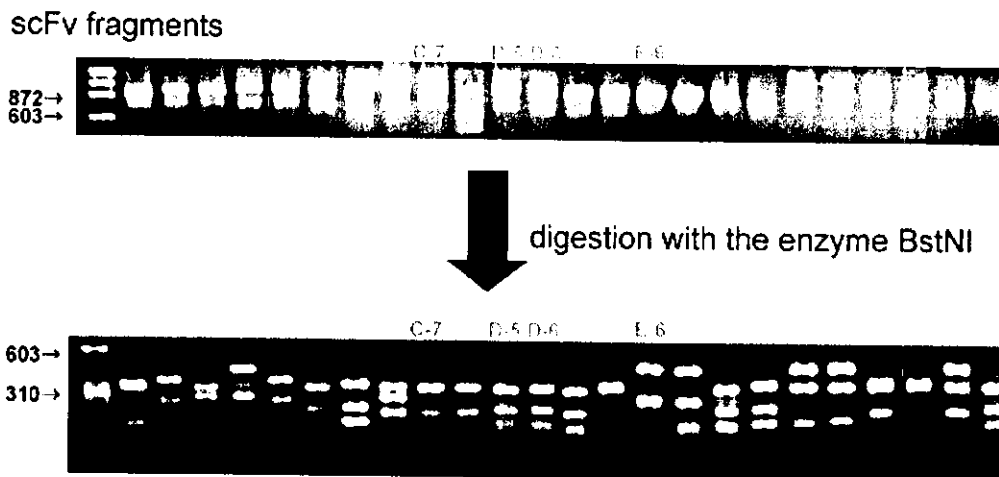


図15 BstNIを用いたフィンガープリント解析

表2 ルシフェラーゼに対する種々モノクローナルscFvのアミノ酸シーケンス

	VL							Linker
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	(G4S) <sub>3</sub>
C-7	DIQMMQSTSSLSASL GDRVITSC	RTSQDI NTYLN	WYQOKPDG TVKLLIY	YTSRL HS	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISN LEQEDIATYFC	QQGNTL PLT	FGAGTK LELKR	GGGSGGGG SGGGGS
D-5	DIVITQSPAILSVPGE RVSFSC	RASQSI GTSIH	WYQRTNG SPRLLE	YASE SIS	GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSV ESEDADYYC	QQSNS WPTT	FGAGTK LTVL	GGGSGGGG SGGGGS
D-6	DIQMTQSPVILSVSPE GERVSFSC	RASQSI GTSIH	WYQQRING PPRPLIK	YASE SIS	RIPSRFSGSGSGTDFTLSINSV ESEDADYYC	QQSNS WPALT	FGAGTK LEIKR	GGGSGGGG SGGGGS
E-6	DILLTQSPVILSVSPG ERVSFSC	RASQNI GTSIH	WYQQRING SPRLLIK	YASE SIS	RIPSRFSGSGSGTDFTLTINSV ESEDADYYC	QQSNS WPALT	FGAGTK LEIKR	GGGSGGGG SGGGGS

	VH						
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
C-7	EVMLVESGPELVKPGASVKISCK KASGYTFS	SYWMN	WMKQRP KGLEWIG	QIYPGDGET NYNGKFKG	KATLTADKSSSTAYMQLS SSLTSEDSAVYFCAS	FDGYYVDY	WGQGT TLQSS
D-5	QVQLQQSGPELARPWASVKISCK CAQFYTFS	RRVHFAIRD DTNYWMQ	WVKQRP QGLEWIG	AIYPGNGDT SYNQKFKG	KALTLTADKSSSTAYMQL LSSLTSEDSAVYFCAR	DPLVY	WGQGT TLTVSS
D-6	QVHVKQSGAELVKPGAAVKVSC CKASGYTFT	SYWMH	WVKQRP HGLEWIG	QIYPGDGDT NYNGEFGK	KALTLTVDKSSSTAYMQL LSSLTSEDSAVYFCAS	QSSYVFDY	WGQGT TLTVSS
E-6	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCK KASGYSFT	DYMN	WVKQSN KSLEWIG	VINPNYGTTS SYNQKFKG	KALTLTVDQSSSTAYMQL LSSLTSEDSAVYVYCTR	ENYYGSSY LYYAMDY	WGQGT TVTVSS

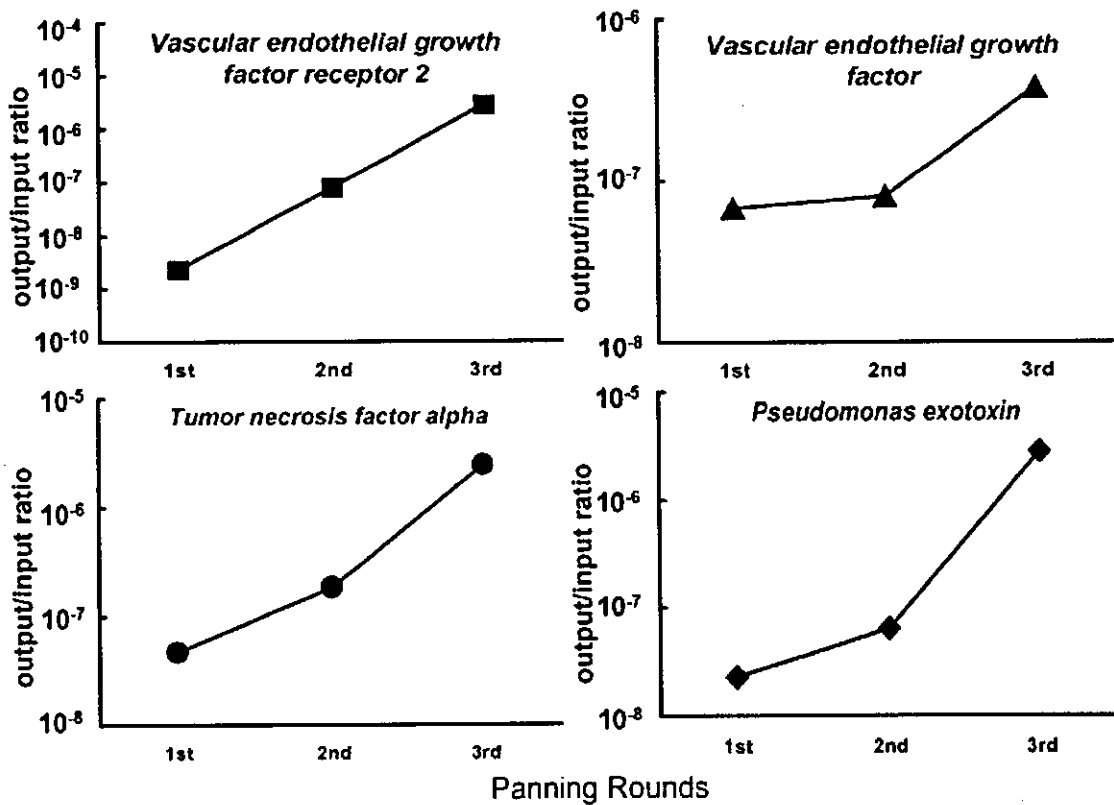


図16 ナイーブ抗体ライブラリを用いた種々抗原に対するscFvの単離



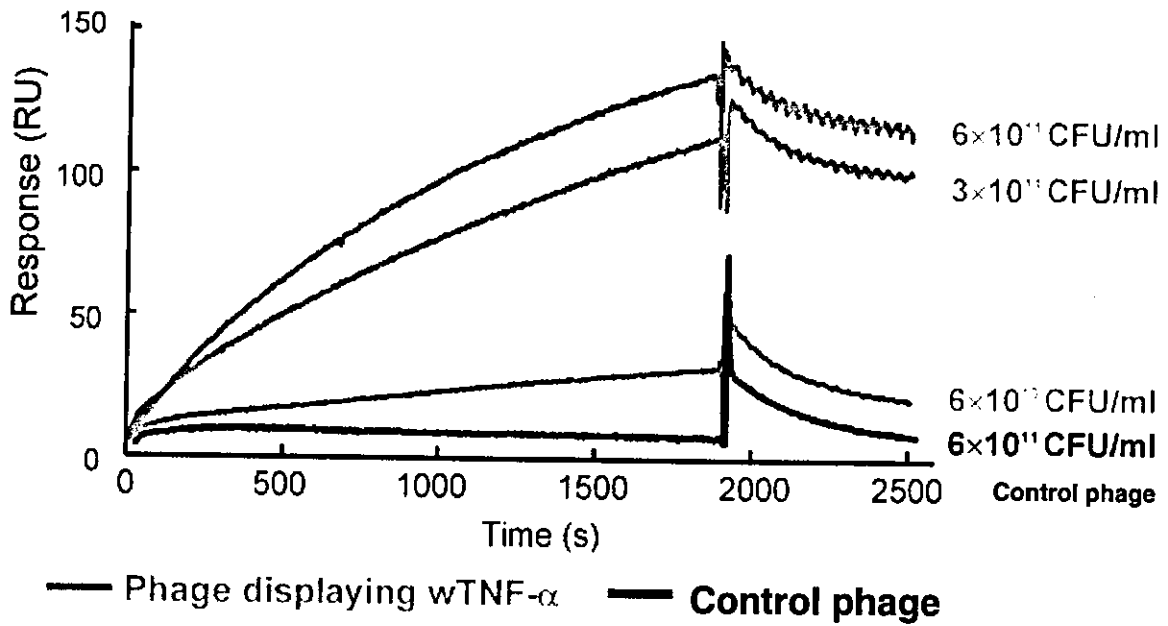
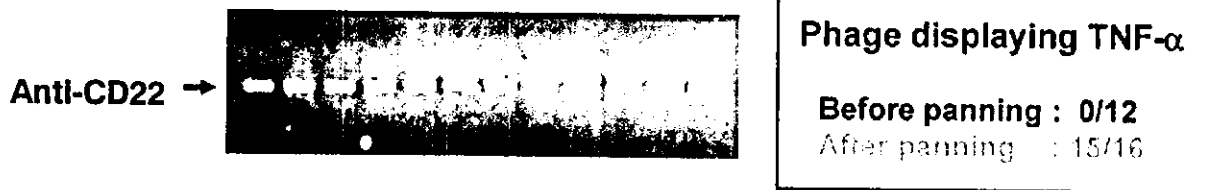


図17 BIAcoreによるパンニングの最適化

Before panning



After panning

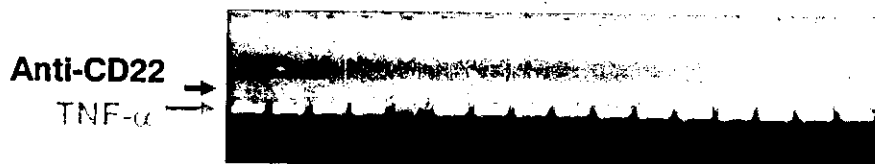


図18 TNFR1に対するパンニングによるwtTNF-α発現ファージの濃縮

表3 wtTNF- $\alpha$ と同等以上の生物活性やレセプター親和性を保持した  
リジン欠損TNF- $\alpha$

	Residue positions						pI
	17	86	90	98	112	128	
wTNF- $\alpha$	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	7.44
mTNF- $\alpha$ -K90R	Ala	Ser	Arg	Ala	Leu	Thr	4.96
mTNF- $\alpha$ -K90P	Ala	Ser	Pro	Ala	Leu	Thr	4.76

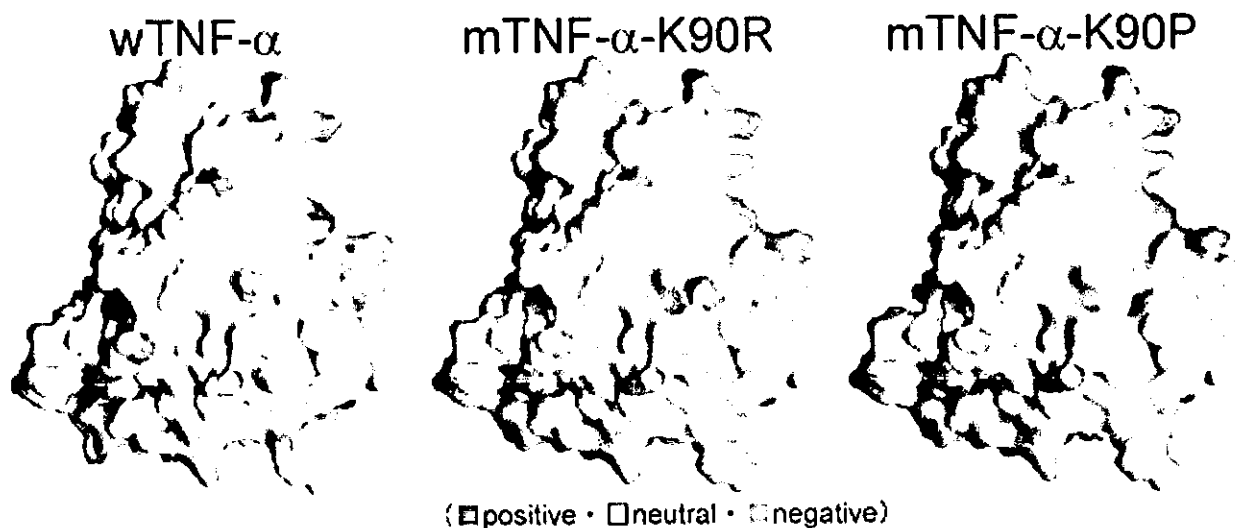


図19 GRASP法によるたんぱく質表面電荷予測

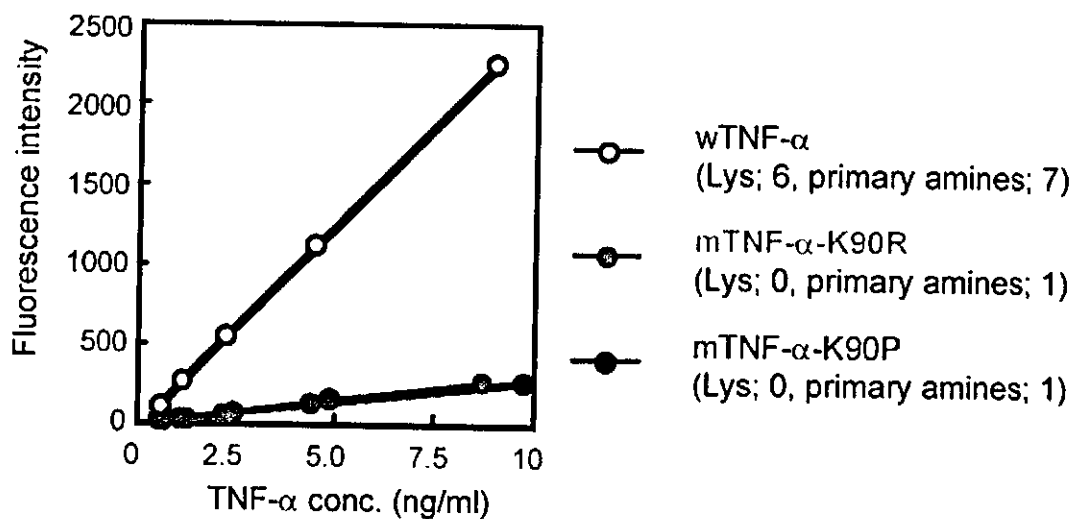


図20 フルオレスカミン法によるTNF- $\alpha$ の1級アミン測定

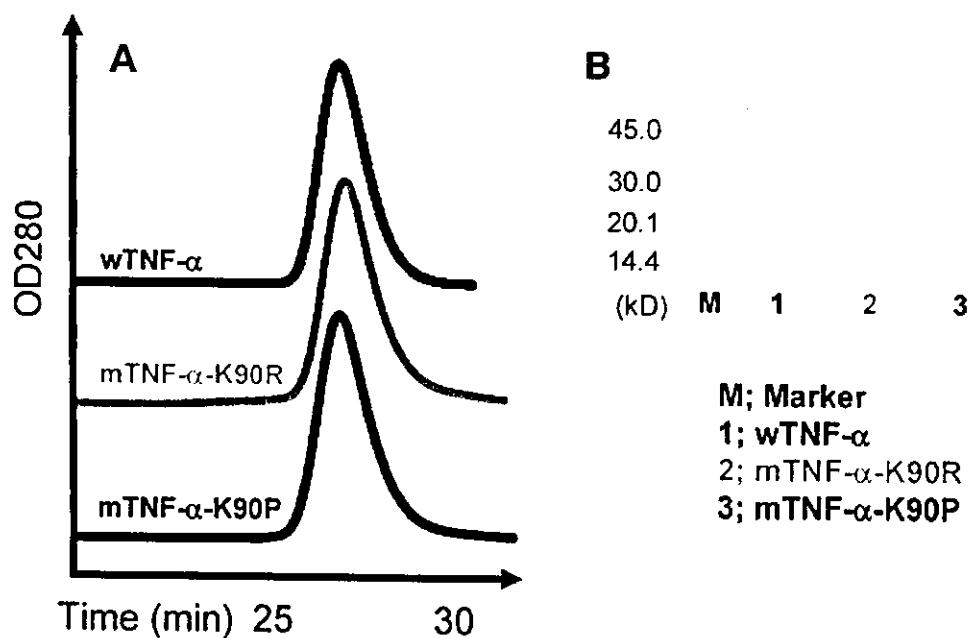
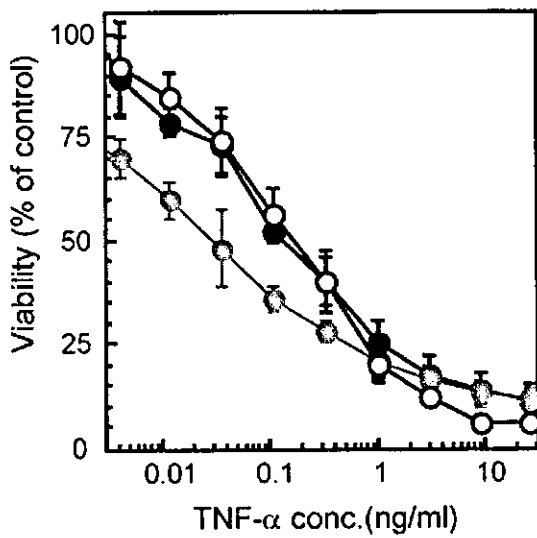


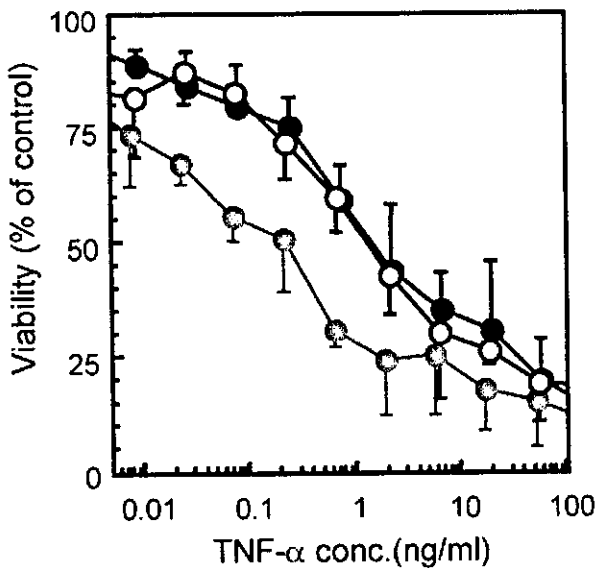
図21 リコンビナント・リジン欠損TNF- $\alpha$ のゲル濾過・SDS-PAGE解析



	EC50 <sup>1)</sup> (ng/ml)
○ wTNF-α	0.17
◐ mTNF-α-K90R	0.03
● mTNF-α-K90P	0.14

The specific bioactivity of lysine-deficient mTNF- $\alpha$ s was measured by cytotoxic assay using LM cells.  
1)The concentration of TNF- $\alpha$  required for 50% inhibition of LM cell viability.

図22A マウスTNFR1を介したリジン欠損TNF- $\alpha$  の生物活性(比活性)



	EC50 <sup>1)</sup> (ng/ml)
○ wTNF-α	1.28
◐ mTNF-α-K90R	0.12
● mTNF-α-K90P	1.40

The specific bioactivity of lysine-deficient mTNF- $\alpha$ s was measured by cytotoxic assay using LM cells.  
1)The concentration of TNF- $\alpha$  required for 50% inhibition of Hep2 cell viability.

図22B ヒトTNFR1を介したリジン欠損TNF- $\alpha$  の生物活性

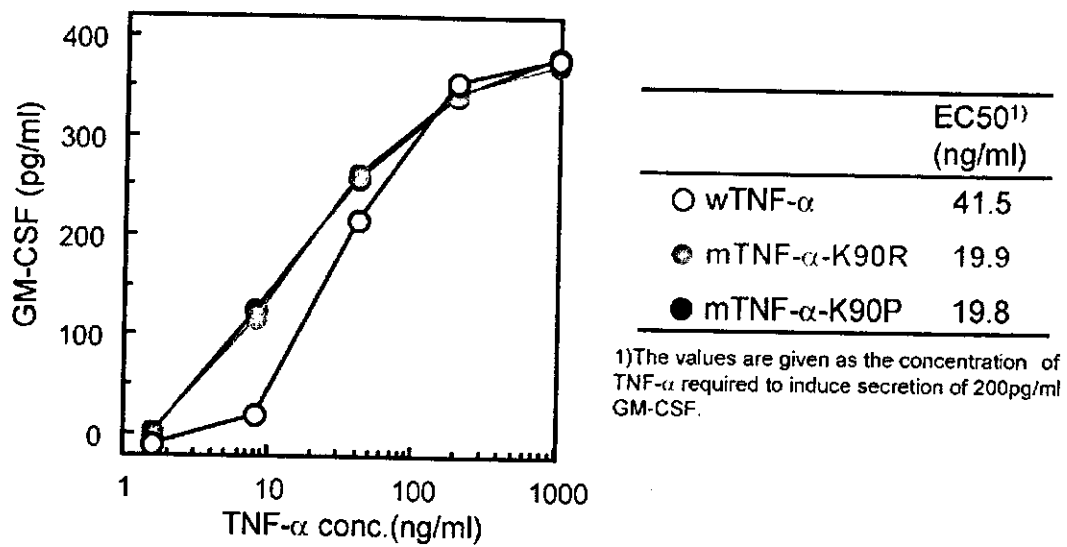


図23 ヒトTNFR2を介したリジン欠損TNF-αの生物活性

表4 リジン欠損TNF-αのヒトTNFR1に対する結合特性(解離定数)

	Ka <sup>1)</sup> ( $\times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	Kd <sup>2)</sup> ( $\times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ )	KD <sup>3)</sup> ( $\times 10^{-10} \text{M}$ )	Relative <sup>4)</sup> (%)
wTNF-α	9.7±0.2	1.94±0.08	1.98±0.04	100
mTNF-α-K90R	11.1±0.1	1.60±0.12	1.44±0.13	138
mTNF-α-K90P	12.0±0.4	1.62±0.22	1.35±0.23	147

1) Association rate constant

2) Dissociation rate constant

3) Equilibrium dissociation constant

4) Relative values for the KD were calculated from the  $\text{KD}(\text{wTNF-}\alpha)/\text{KD}(\text{lysine-deficient mTNF-}\alpha)$

Parameters were determined from equilibrium binding using BIA evaluation 3.0 program

表5 リジン欠損TNF- $\alpha$ のヒトTNFR2に対する結合特性(解離定数)

	Ka <sup>1)</sup> ( $\times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	Kd <sup>2)</sup> ( $\times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ )	KD <sup>3)</sup> ( $\times 10^{-10} \text{M}$ )	Relative <sup>4)</sup> (%)
wTNF- $\alpha$	4.09 $\pm$ 0.51	1.18 $\pm$ 0.24	2.87 $\pm$ 0.24	100
mTNF- $\alpha$ -K90R	5.31 $\pm$ 0.63	0.99 $\pm$ 0.31	1.92 $\pm$ 0.80	149
mTNF- $\alpha$ -K90P	5.42 $\pm$ 0.85	1.12 $\pm$ 0.31	2.16 $\pm$ 0.87	133

1) Association rate constant

2) Dissociation rate constant

3) Equilibrium dissociation constant

4) Relative values for the KD were calculated from the  $\text{KD}(\text{wTNF-}\alpha)/\text{KD}(\text{lysine-deficient mTNF-}\alpha)$   
Parameters were determined from equilibrium binding using BIA evaluation 3.0 program

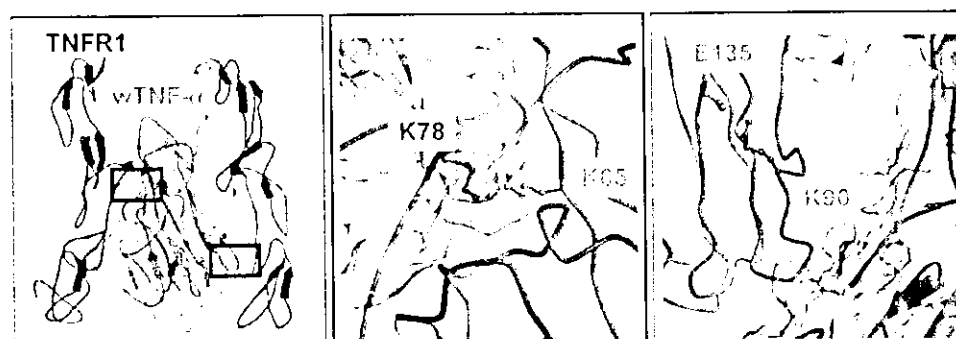


図24 wtTNF- $\alpha$ とヒトTNFR1の結合モデル

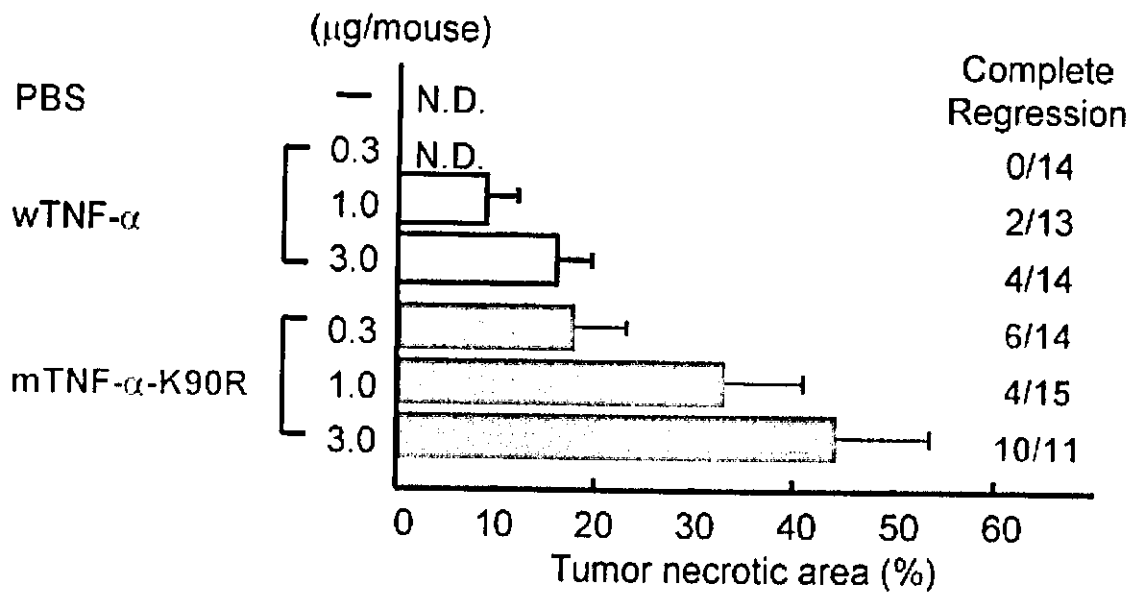


図25 mTNF-α-K90Rの*in vivo*における抗腫瘍効果

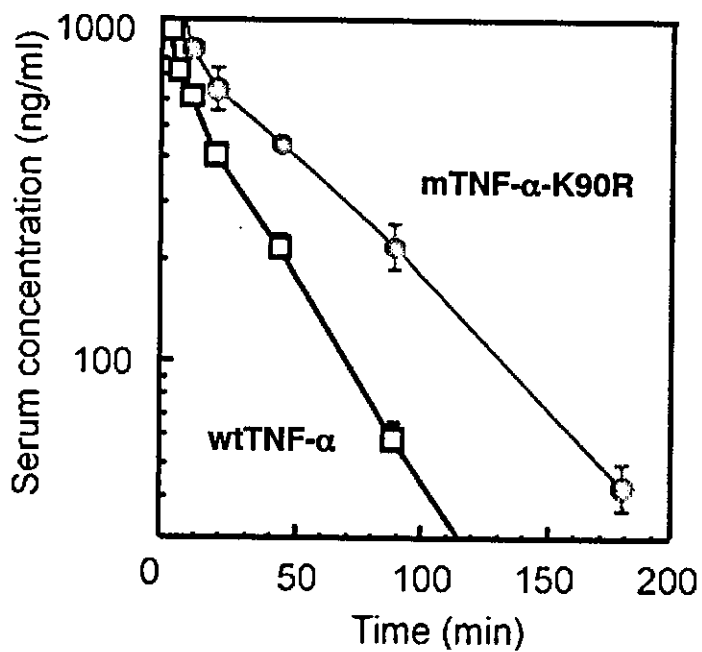


図26 mTNF-α-K90Rの静脈内投与後の血中動態

表6 mTNF- $\alpha$ -K90Rの血中動態パラメーター

	t1/2 (min)	AUC ( $\times 10^3 \text{ng} \cdot \text{min}/\text{ml}$ )	CLtotal ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )
□ wTNF- $\alpha$	12 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2	39 $\pm$ 4
○ mTNF- $\alpha$ -K90R	24 $\pm$ 5	62 $\pm$ 7	17 $\pm$ 2

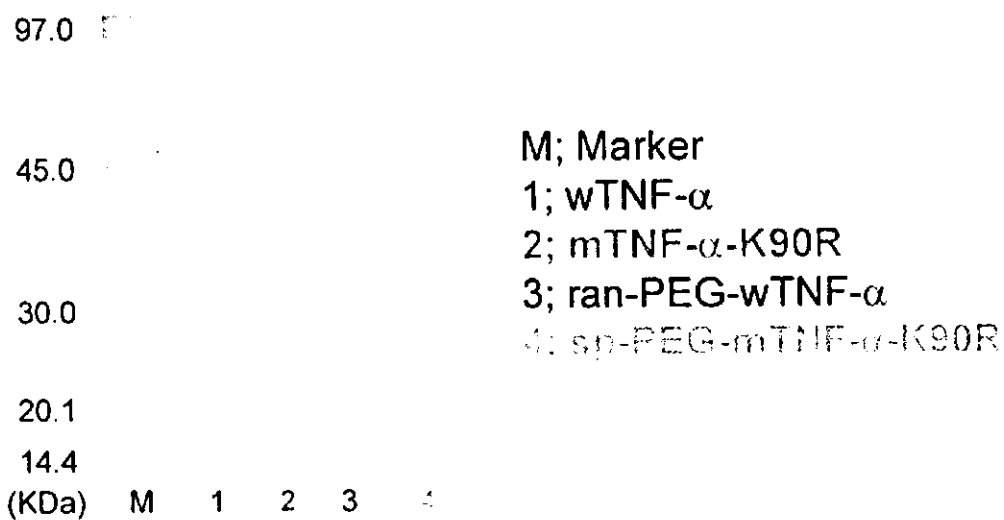


図27 wtTNF- $\alpha$ 及びmTNF- $\alpha$ -K90R のPEGylationとこれらのSDS-PAGE解析



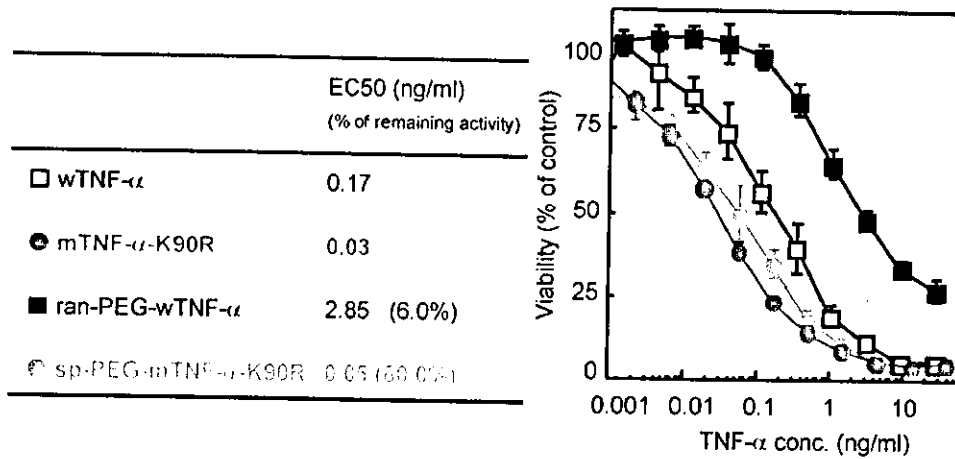


図28 N末端アミノ基を標的としたリジン欠損TNF- $\alpha$  のPEGylationとその生物活性

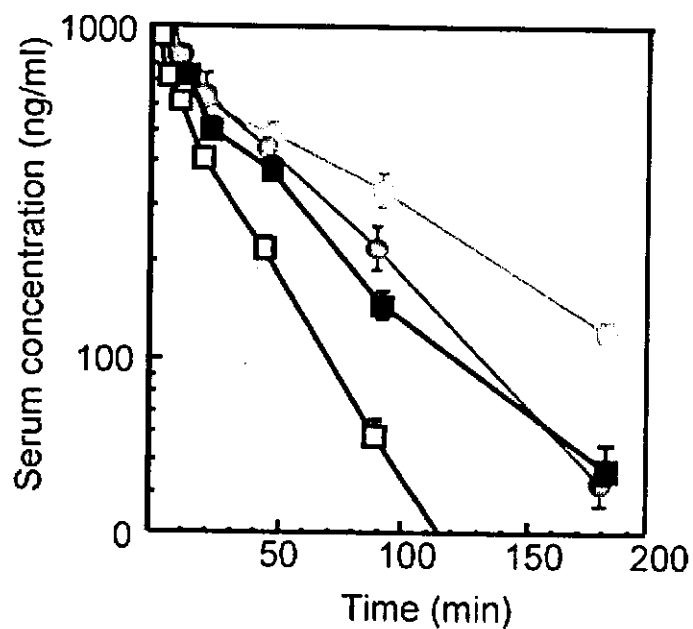


図29 sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R の静脈内投与後の血中濃度推移

表7 sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R の静脈内投与後の血中動態パラメーター

	t1/2 (min)	AUC ( $\times 10^3$ ng $\cdot$ min/ml)	CLtotal ( $\mu$ l/min)
□ wTNF- $\alpha$	12 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2	39 $\pm$ 4
● mTNF- $\alpha$ -K90R	24 $\pm$ 5	62 $\pm$ 7	17 $\pm$ 2
■ ran-PEG-wTNF- $\alpha$	24 $\pm$ 4	45 $\pm$ 2	22 $\pm$ 1
○ sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R	49 $\pm$ 16	85 $\pm$ 10	12 $\pm$ 1

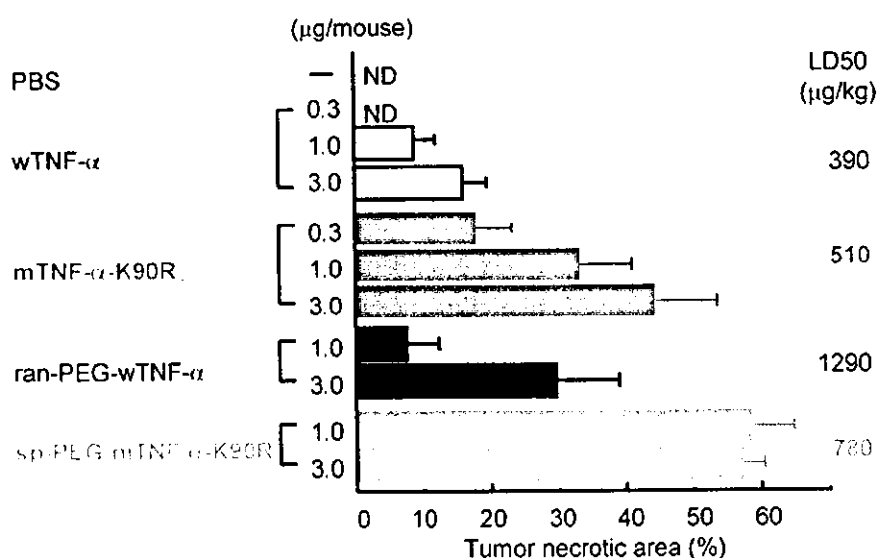


図30 sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90Rの*in vivo*における抗腫瘍効果 (腫瘍出血壊死誘導作用)

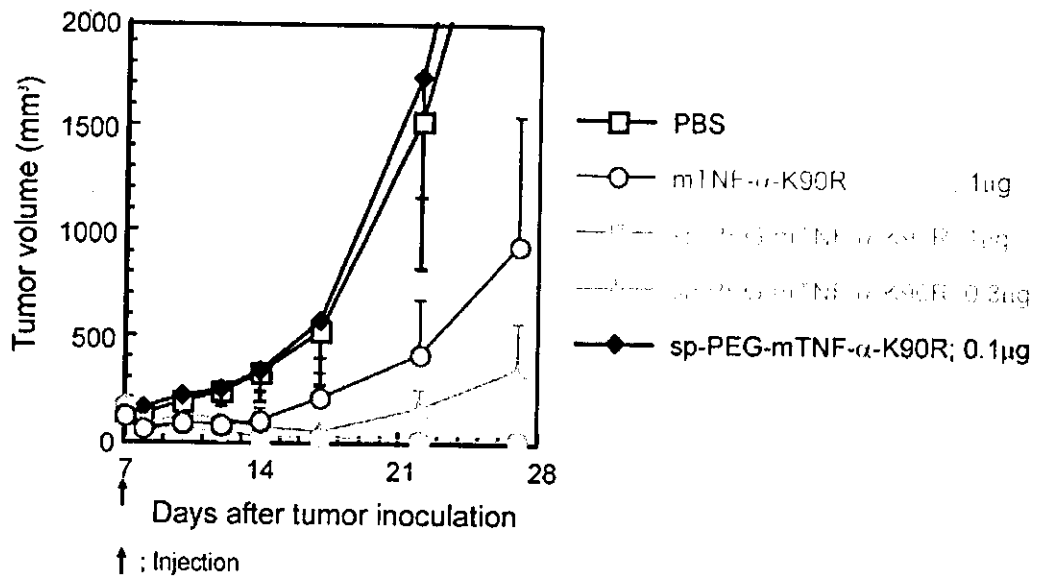


図31 sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90Rの*in vivo*における抗腫瘍効果

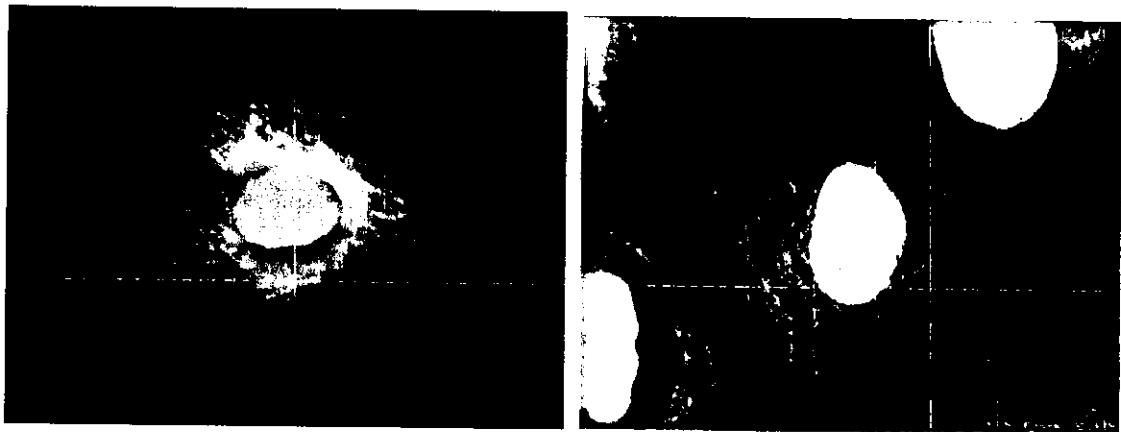


図32 半導体量子ドットによる染色法の確立

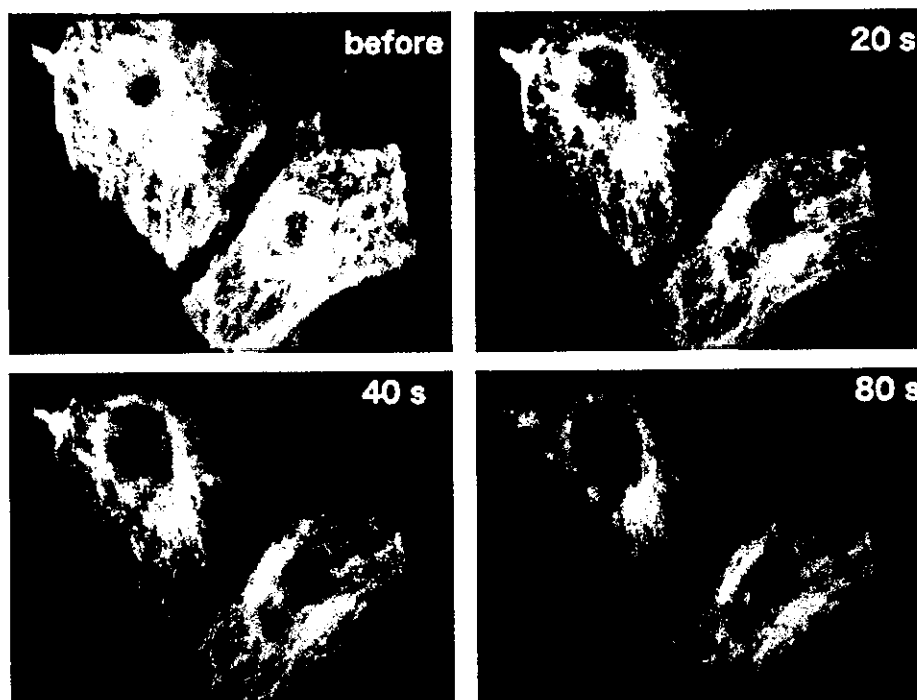


図33 半導体量子ドットの蛍光標識特性の評価