

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7104703号

(P7104703)

(45)発行日 令和4年7月21日(2022.7.21)

(24)登録日 令和4年7月12日(2022.7.12)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

Z N A

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 18 (全80頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-531773(P2019-531773)

(86)(22)出願日 平成29年12月13日(2017.12.13)

(65)公表番号 特表2020-513744(P2020-513744
A)

(43)公表日 令和2年5月21日(2020.5.21)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/065973

(87)国際公開番号 WO2018/111973

(87)国際公開日 平成30年6月21日(2018.6.21)

審査請求日 令和2年11月30日(2020.11.30)

(31)優先権主張番号 62/434,017

(32)優先日 平成28年12月14日(2016.12.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 509087759

ヤンセン バイオテック, インコーポレ
ーテッドアメリカ合衆国ペンシルベニア州190
44 ホーシャム・リτζビユードライブ
800/850

(74)代理人 100127926

弁理士 結田 純次

(74)代理人 100140132

弁理士 竹林 則幸

(72)発明者

レベッカ・ホーキンス

アメリカ合衆国ペンシルベニア州194
77. スプリング・ハウス・マッキーン
・ロード1400

(72)発明者

スティーブン・ジェイコブス

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 8 A 結合フィブロネクチン I I I 型ドメイン

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号40～269のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、単離したC D 8 A 結合 F N 3 ドメイン。

【請求項2】

前記単離したC D 8 A 結合 F N 3 ドメインが、検出可能な標識、細胞傷害剤、半減期延長分子、キレート剤、ポリエチレングリコール、または、核酸から選択される、第2の分子にコンジュゲートしている、請求項1に記載の単離したC D 8 A 結合 F N 3 ドメイン。

【請求項3】

前記検出可能な標識が、放射性同位体、磁性ビーズ、金属ビーズ、コロイド粒子、蛍光染料、電子密度の高い試薬、酵素、ビオチン、ジゴキシゲニン、または、ハプテンである、請求項2に記載の単離したC D 8 A 結合 F N 3 ドメイン。

【請求項4】

前記単離したC D 8 A 結合 F N 3 ドメインが、配列番号1の位置54に対応する残基に、システイン置換を有する、請求項1に記載の単離したC D 8 A 結合 F N 3 ドメイン。

【請求項5】

前記単離したC D 8 A 結合 F N 3 ドメインが、酵素結合免疫スポット (E L I S P O T) アッセイで測定されるように、インビトロで、C D 8 + T 細胞を活性化しない、請求項1に記載の単離したC D 8 A 結合 F N 3 ドメイン。

【請求項6】

前記単離したCD8A結合FN3ドメインが、表面プラズモン共鳴で測定されるように、0.02～6.6 nMの間の親和性(K_D)で、ヒトCD8Aタンパク質に結合する、請求項1に記載の単離したCD8A結合FN3ドメイン。

【請求項7】

前記単離したCD8A結合FN3ドメインのN末端にメチオニンをさらに含む、請求項1に記載の単離したCD8A結合FN3ドメイン。

【請求項8】

前記半減期延長部分が、CD8結合分子、アルブミン、アルブミン変異体、アルブミン結合分子、ポリエチレングリコール(PEG)、CD8、CD8変異体、または、免疫グロブリンのFc領域の少なくとも一部である、請求項2に記載の単離したCD8A結合FN3ドメイン。

10

【請求項9】

請求項1に記載の単離したCD8A結合FN3ドメインをコードする単離したポリヌクレオチド。

【請求項10】

請求項9に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項11】

請求項10に記載のベクターを含む単離した宿主細胞。

【請求項12】

ヒトCD8Aタンパク質に対して特異的に結合する単離したCD8A結合FN3ドメインを製造する方法であって、前記単離したCD8A結合FN3ドメインを発現する条件下で請求項11に記載の単離した宿主細胞を培養し、及び、前記単離したCD8A結合FN3ドメインを精製する、ことを含む前記方法。

20

【請求項13】

請求項1に記載の単離したCD8A結合FN3ドメインを含む診断キット。

【請求項14】

請求項1に記載の単離したCD8A結合FN3ドメインを含む診断薬または捕捉剤。

【請求項15】

前記単離したCD8A結合FN3ドメインが、配列番号1の残基位置54に対応する、システイン置換を有する、請求項14に記載の診断薬または捕捉剤。

30

【請求項16】

前記置換システインが、Zr-89、または、I-124にコンジュゲートしている、請求項15に記載の診断薬。

【請求項17】

生物学的試料に含まれるCD8発現細胞を検出する方法であって、前記生物学的試料を請求項15に記載の診断薬で処理し、及び、そのような診断薬のCD8A結合FN3ドメインへの前記生物学的試料の結合を評価する、ことを含む前記方法。

【請求項18】

前記置換システインが、Zr-89、または、I-124にコンジュゲートしている、請求項17に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出をした配列表を含み、そして、その全内容を、本明細書の一部を構成するものとして援用する。2017年12月5日に作成した前出のASCIIコピーは、JBI5112WOPCT_SL.txtの名称を付しており、その大きさは、266,978バイトである。

【0002】

技術分野

50

本発明は、分化クラスター 8 a (CD8a) に対して特異的に結合するフィブロネクチン III 型 (FN3) ドメインに関する。かような FN3 ドメインは、例えば、医用画像、診断、及び、薬物療法に使用し得る。かような分子の製造方法、及び、それらを含む診断薬も提供する。

【背景技術】

【0003】

がん免疫療法が急速な進歩を遂げている分野では、最近、幾つかの新たに FDA 承認を受けた免疫療法があり、現在では、ずっと数多くの療法が、様々ながんについて、臨床試験が行われている。さらに、細胞性、小分子、抗体ベースの免疫療法、及び、それらの組み合わせを、臨床解釈について、前臨床的に厳密に試験をしている。動的腫瘍微小環境及び腫瘍不均一性は、前臨床試験及び臨床試験の双方における重要なトピックとなっている（非特許文献 1；非特許文献 2；非特許文献 3）が、原発性病変、及び、転移性癌の免疫状態の変化をモニターする能力には限りがある。全血由来のリンパ球、または、異種腫瘍由来の生検をモニターする現在の方法は、その多くが、免疫細胞の数及び局在性に関する全身的变化を惹起するものであるが、治療的介入に対する免疫応答のモニターに必要であると考えられる動的及び空間的情報は反映していない。したがって、実験的治療期間での免疫細胞の数または局在性について、全身的变化、及び、腫瘍内での変化の双方を非侵襲的にモニターできる分子画像法は、免疫療法メカニズムの動態の理解を高めて、臨床的免疫療法応答を予測、及び／または、評価する解釈可能な方法の提供も可能にする。

【0004】

腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の分析は、腫瘍免疫微小環境の重要性、及び、細胞傷害性 CD8+T 細胞の存在が、乳癌、肺癌、卵巣癌、悪性黒色腫、及び、大腸癌での全生存を予測できる、ことを実証している（非特許文献 4 及び、非特許文献 5 の文献で検討がされている）。腫瘍免疫微小環境を変化させる免疫療法の最近の臨床的成功として、T 細胞受容体 (TCR) -、または、キメラ抗原受容体形質導入細胞傷害性 T 細胞の養子細胞移入 (ACT)（非特許文献 6；非特許文献 7）、CD137 (4-1BB)、及び、CD40 を標的とするアゴニスト抗体（非特許文献 8；非特許文献 9；非特許文献 10）、及び、チェックポイント阻害剤 CTLA-4、PD-1、及び、PD-L1 の抗体遮断（非特許文献 11；非特許文献 12；非特許文献 13）があり、治療に対する腫瘍の免疫応答を非侵襲的にモニターする能力が、最も重要になってきている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【文献】 1 Hanahan D, Weinberg RA. *Cell* 2011; 144: 646-74

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. *Nature* 2008; 454: 436-44

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. *Science* 2011; 331: 1565-70

Pages F, et al., *Oncogene* 2010; 29: 1093-102.

Gooden MJ, et al., *Br J Cancer* 2011; 105: 93-103

Johnson LA, et al. *Blood* 2009; 114: 535-46

Rosenberg SA. *Sci Transl Med* 2012; 4: 127ps8

Melelo I, et al., *Clin Cancer Res* 2013; 19: 997-1008

Melero I, et al., *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 95-106

Vinay DS, and Kwon BS. *Mol Cancer Ther* 2012; 11: 1062-70

Callahan MK, and Wolchok JD. *J Leukoc Biol* 2013; 94: 41-53

10

20

30

40

50

Shin DS, and Ribas A. Curr Opin Immunol 2015 ; 33 C : 23 - 35

Topalian SL, et al., Cancer Cell 2015 ; 27 : 450 - 61

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、CD8A結合フィブロネクチンIII型（FN3）ドメインを含む。提供したFN3ドメインをコードすることができる関連ポリヌクレオチド、提供したFN3ドメインを発現する細胞、ならびに、関連ベクターも記載している。さらに、提供したFN3ドメインを使用する方法も記載している。例えば、本発明のFN3ドメインは、CD8+T細胞の存在及び存在量を、非侵襲的かつ定量的にモニターするために使用することができる。

【0007】

幾つかの実施形態では、本発明は、単離したFN3ドメインを含み、当該FN3ドメインは、配列番号35を含むヒトCD8Aに結合する。その他の実施形態では、当該CD8A特異的FN3ドメインは、ヒトCD8A、及び、カニクイザルCD8Aに結合する。さらに他の実施形態では、当該CD8A特異的FN3ドメインは、配列番号1のTencn配列に基づいている。さらなる実施形態では、当該CD8A特異的FN3ドメインは、配列番号4のTencn27配列に基づいている。幾つかの実施形態では、当該アルブミン特異的FN3ドメインは、配列番号2、3、5、6、7、または、8の配列を含むライブラリーから単離する。幾つかの実施形態では、当該CD8A特異的FN3ドメインは、酵素結合免疫スポット（ELISPOT）アッセイで測定されるように、インビトロで、CD8+T細胞を活性化しない。幾つかの実施形態では、当該CD8A特異的FN3ドメインは、表面プラズモン共鳴で測定されるように、約0.02～約6.6nMの間の親和性（KD）で、ヒトCD8Aに結合する。その他の実施形態では、当該CD8A特異的FN3ドメインは、配列番号79、81、83、89、122、及び、68の残基位置54で、システイン置換を有する。その他の実施形態では、当該CD8A特異的FN3ドメインは、配列番号40～269のアミノ酸配列を含む。その他の実施形態では、当該CD8A特異的FN3ドメインは、検出可能な標識にコンジュゲートしている。

【0008】

記載した当該CD8A特異的FN3ドメインに加えて、記載したFN3ドメインをコードすることができるポリヌクレオチド配列も提供する。本明細書に記載した当該CD8A特異的FN3ドメインを発現する細胞と同様に、記載したポリヌクレオチドを含むベクターも提供する。開示したベクターを発現することができる細胞も記載している。これらの細胞を、哺乳動物細胞（293F細胞、CHO細胞など）、昆虫細胞（Sf7細胞など）、酵母細胞、植物細胞、または、細菌細胞（E.coliなど）とし得る。記載したFN3ドメインの製造方法も提供する。

【0009】

また、本発明は、記載した当該CD8A特異的FN3ドメインを、診断目的のための様々な分子にコンジュゲートし、または、会合する方法を含む。例えば、Zr-89、または、I-124は、CD8+T細胞の存在を検出することができる診断薬の創製のための理想的な融合パートナーである。このように、当該CD8A特異的FN3ドメインは、CD8Aをバイオマーカーとして使用するがん診断において有用性を有する。

【0010】

本発明の別の実施形態は、生物学的試料でのCD8A発現細胞を検出する方法であって、記載した当該CD8A特異的FN3ドメインを含む診断薬で当該生物学的試料を処理することを含む。これらの方法を、実施例に提供している。

【0011】

本発明の範囲内には、開示した当該CD8A特異的FN3ドメインを含むキットがある。

このキットは、本明細書で提供した当該CD8A特異的FN3ドメインを使用する方法、または、当業者に公知のその他の方法を実行するために使用し得る。幾つかの実施形態では、記載した当該キットは、本明細書に記載のFN3ドメイン、及び、生物学的試料でのヒトCD8Aの存在を検出するために使用する試薬を含み得る。本明細書に記載したように、記載した当該キットは、本明細書に記載の1つ以上のFN3ドメイン、及び、未使用時に当該FN3ドメインを入れるための容器、固体支持体に固定した当該FN3ドメインの使用説明書、及び／または、FN3ドメインの検出可能な標識形態を含み得る。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】CD8S365-DFOコンジュゲートは、T細胞をデノボで活性化せず、そして、24時間のINF γ ELISPOTアッセイで、T細胞の抗原依存性活性化を調節しない。CMV反応性T細胞を、CMVペプチドの非存在下（A）または存在下（B）で、365-DFOで処理した。第2のM1反応性ドナーもまた、M1ペプチドの非存在下（C）または存在下（D）で試験した。

10

【図2】CD8S365-DFOコンジュゲートは、T細胞をデノボで活性化せず、そして、6日間のIFN γ MSDアッセイで、T細胞の抗原依存性活性化を調節しない。CMV反応性T細胞を、CMVペプチドの非存在下（A）または存在下（B）で、365-DFOで処理した。

【図3】[124I]-IPEMの粗分取HPLCトレース。Waters 1525 Binary HPLCポンプ、Waters 2489二重波長UV/可視検出器（ $\lambda=214$ 及び254nm）、Bioscan Flow Count放射線検出器（B-FC-2000）、及び、Atlantis T3、100オングストローム、5 μ m、150 $\times$ 4.6mmのHPLCカラムを使用して、分取HPLCを実施した。使用した溶出プロファイルは、以下の通りであった。溶媒A=H₂O（0.1%AcOH（v/v））、溶媒B=MeCN（0.1%AcOH（v/v））、流速=1.5mL/分、初期=80%A、20分=0%A（線形勾配）。254nm（上方のグラフ）、及び、214nm（中央のグラフ）のUV-visトレースでの複数の小分子吸光度は、粗反応混合物での不純物、及び、副生成物の存在を示す。放射性トレース（下方のグラフ）は、放射標識不純物に起因する予想ベースラインピークも示している。

20

【図4】[124I]-IPEMの分析HPLCトレース。Waters 1525 Binary HPLCポンプ、Waters 2707オートサンプラー、Waters 2489二重波長UV/可視検出器（ $\lambda=214$ 及び280nm）、Bioscan Flow Count放射線検出器（B-FC-2000）、及び、Phenomenex Kinetex 5 μ m XB-C18 100オングストローム、150 $\times$ 4.6mmHPLCカラムを使用して、分析HPLCを実施した。使用した溶出プロファイルは、以下の通りであった。溶媒A=H₂O（0.1%TFA（v/v））、溶媒B=MeCN（0.1%TFA（v/v））、流速=1mL/分、初期=90%A、15分=0%A（線形勾配）。分析的に純粋な[I-124]IPEMは、単一の放射性ピークを示しており（下方のグラフ）、滑らかなベースラインは、精製の成功を確認するものである。[I-124]IPEMは、小さな有機分子であるので、280nm（上方のグラフ）、及び、214nm（中央のグラフ）では吸収が認められない。

30

40

【図5】精製した[124I]-IPEM CD8S365のラジオTLC。iTLC-SGプレート（Agilent、カタログ番号SGI0001）を、Bioscan AR-2000ラジオ-TLC画像スキャナーで読み取った。この放射線TLCプレート（図3）を、1 μ LのNaI（0.1M）と共スポットし、そして、溶離液としてクエン酸（0.5mM、pH=5）を用いて発色させた。原点=20mm、及び、溶媒先端=100mm。この放射線TLC溶離液を、96mgのクエン酸（Spectrum カタログ番号CL131）を、25mLのTrace Select H₂Oに溶解し、次いで、Na₂CO₃を加えて（245 μ L、2M）調製し、そのpHを、ストリップでチェックした（pH=5）。

50

【図6】精製した[124I]-IPEMの分析HPLCトレース。Waters 1525 Binary HPLCポンプ、Waters 2707オートサンプラー、Waters 2489二重波長UV/可視検出器($\lambda=214$ 及び 280 nm)、Bioscan Flow Count放射線検出器(B-FC-2000)、及び、Phenomenex Kinetex $5\text{ }\mu\text{m}$ XB-C18 100オングストローム、 $150\times 4.6\text{ mm}$ HPLCカラムを使用して、分析HPLCを実施した。使用した溶出プロファイルは、以下の通りであった。溶媒A= H_2O (0.1% TFA (v/v))、溶媒B=MeCN (0.1% TFA (v/v))、流速= 1 mL/分 、初期= 90% A、15分= 0% A (線形勾配)。280 nmでの生体分子(CD8S)吸光度(上方のグラフ)、及び、214 nmでの小分子(I124-IPEM)吸光度(中央のグラフ)は、コンジュゲーション反応が成功したことを確認している。UV及び放射線トレース(下方のグラフ)は、分析的に純粋な試料を示している。

10

【図7】IPEM CD8S365のMALDI-MS (理論値分子量= 10786.12)。MALDI-MS分析を、Bruker Ultraflex Xtreme MALDI TOF/TOFを陽イオンモード(線形検出器)で使用して、Biointerfacs Instituteで実施した。シナピン酸の飽和溶液を、TA30溶媒(30:70 (v/v) MeCN:0.1% TFAの水)で調製した。試料($c=0.397\text{ mg/mL}$)を、マトリックス溶液と1:1の比で混合し、そして、 $1\text{ }\mu\text{L}$ をプレート上にスポットした。タンパク質溶液を、外部標準として使用した。

【図8】[124I]-IPEM CD8S365と冷スタンダードとの共注入。Waters 1525 Binary HPLCポンプ、Waters 2707オートサンプラー、Waters 2489二重波長UV/可視検出器($\lambda=214$ 及び 280 nm)、Bioscan Flow Count放射線検出器(B-FC-2000)、及び、Phenomenex Kinetex $5\text{ }\mu\text{m}$ XB-C18 100オングストローム、 $150\times 4.6\text{ mm}$ HPLCカラムを使用して、分析HPLCを実施した。使用した溶出プロファイルは、以下の通りであった。溶媒A= H_2O (0.1% TFA (v/v))、溶媒B=MeCN (0.1% TFA (v/v))、流速= 1 mL/分 、初期= 90% A、15分= 0% A (線形勾配)。冷試料と共注入すると、UVピークの重なりは完全なものとなり(上方と中央のグラフ)、生成物の分子的同一性が確認できる(すなわち、ヨウ素がヨウ素-124に置き換わっている以外は、冷標識物と放射標識物とは同一である)。

20

30

【図9】注射の2時間後に撮影した、I-124で放射標識したCD8S365-IPEM 5を示す代表的なPET画像。この画像は、最大値投影像(前後方向)であり、脾臓は、十字線の中心にある。脾臓の下方にある臓器は腎臓であり、そして、この画像は、頭が上になるように調整してある。甲状腺への取り込みは、当該タンパク質が、幾ばくか脱ヨウ素化した証拠である。

【図10】Zr-89またはI-124のいずれかで標識した各抗CD8A FN3ドメインについての非ヒト霊長類における血液放射能についての時間-活性曲線。

【図11】Zr-89またはI-124のいずれかで標識した各センチリンについてのNHPでの臓器放射能についての時間-活性曲線。図11Aは、腎臓、肝臓、脾臓を示しており、一方で、図11Bは、脾臓に注目をしている。[124I]-IPEM CD8S365の24時間の時点は、技術的な問題のために欠落している。同位体の残留に起因する腎臓でのZr-89の大きな取り込みは、I-124のデータでは、ほとんど認められない。

40

【図12】非ヒト霊長類から採取した血液での3日目までのCD8 T細胞枯渇の確認(12A)。CD4(12B)、及び、CD3 T細胞(12C)での変化も示している。

【図13】CD8枯渇動物での注射の2時間後に撮影した、I-124で放射標識した365抗CD8A FN3ドメインを示す代表的なPET画像。この画像は、最大値投影像(前後方向)である。このものは、脾臓が明確に腎臓の上に認められる図9での非枯渇動物と比較する。

【図14】[124I]-IPEM CD8S365を投与した後の枯渇動物、及び、非

50

枯渴動物の双方についてのカニクイザルにおける血液放射能についての時間－活性曲線。

【図 1 5 A】枯渴動物、及び、非枯渴動物の双方についてのカニクイザルにおける臓器放射能についての時間－活性曲線。1 5 A は、腎臓、肝臓、脾臓を示しており、一方で、図 1 5 B は、脾臓に注目をしている。

【図 1 5 B】枯渴動物、及び、非枯渴動物の双方についてのカニクイザルにおける臓器放射能についての時間－活性曲線。1 5 A は、腎臓、肝臓、脾臓を示しており、一方で、図 1 5 B は、脾臓に注目をしている。

【図 1 6】注射の 3 時間後に撮影した、I－1 2 4 で放射標識した C D 8 S 3 6 5－I P E M を示す、同じように処置をした 2 匹のマウスの代表的な P E T 画像。この画像は、C T スキャンに重ね合わせた 3 D 最大値投影像である。腫瘍（h u C D 8 + を過剰発現するようにトランスフェクトした H E K－2 9 3－l u c から形成した）、及び、その他の器官を、矢印で示した。甲状腺への取り込みは、当該タンパク質が、幾ばくか脱ヨウ素化した証拠である。

10

【図 1 7】H E K－2 9 3－l u c C D 8 +、または、H E K－2 9 3 親腫瘍のいずれかを保有するマウスにおける血中放射能についての時間－活性曲線。

【図 1 8】H E K－2 9 3－l u c C D 8 +、または、H E K－2 9 3 親腫瘍のいずれかを保有するマウスにおける腫瘍放射能についての時間－活性曲線。

【図 1 9】移植細胞の数に応じた、H E K 2 9 3 C D 8 過剰発現細胞における I－1 2 4 標識 C D 8 S 3 6 5 の取り込み。

【発明を実施するための形態】

20

【0 0 1 3】

定義

本明細書、及び、特許請求の範囲を通して、説明の態様に関する様々な用語を使用している。そのような用語には、特に断りの無い限りは、当該技術分野における通常の意味を付与する。具体的に定義をしたその他の用語は、本明細書で提供した定義と符合するように解釈する。

【0 0 1 4】

本明細書、及び、添付した特許請求の範囲で使用する単数形「a」、「an」、及び、「the」は、その内容を具体的に明示していない限りは、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「ある細胞」という言及は、2 つ以上の細胞の組み合わせなどを含む。

30

【0 0 1 5】

数量や持続時間などの測定可能な数値を指す場合に本明細書で使用する用語「約」とは、特定の値から $\pm 10\%$ までの変動を含んでおり、そのような変動が、開示した方法の実施に適している、ことを意味する。特に断りの無い限り、本明細書、及び、特許請求の範囲で使用している成分の量、分子量などの特性、反応条件などを示すあらゆる数字は、すべての場合において、用語「約」によって修飾される、と理解すべきである。したがって、特に断りの無い限り、以下の明細書、及び、添付した特許請求の範囲に記載の数値パラメータは、本発明で取得することが必要とされる所望の特性に応じて変化し得る近似値である。少なくとも最小限で、かつ、特許請求の範囲に対する均等論の適用を制限する試みとしてではなく、各数値パラメータは、少なくとも、報告された有効桁数を考慮し、そして、通常の丸め処理を行う、ものと解釈されるべきである。

40

【0 0 1 6】

本発明の広範な範囲を説明する数値範囲及びパラメータは近似値であるにもかかわらず、特定の実施例に記載されている数値は、可能な限り正確に報告している。しかしながら、いずれの数値にあっても、それらの個々の試験測定値に認められる標準偏差から必然的に生じる特定の誤差を本質的に含む。

【0 0 1 7】

「単離した」とは、生物学的成分（核酸、ペプチド、または、タンパク質など）を、その成分が天然に存在している生物でのその他の生物学的成分、すなわち、その他の染色体、ならびに、染色体外の D N A、及び、R N A、そして、タンパク質から実質的に分離、生

50

成、または、精製した、ことを意味する。したがって、「単離した」核酸、ペプチド、及び、タンパク質は、標準的な精製方法で精製した核酸及びタンパク質を含む。「単離した」核酸、ペプチド、及び、タンパク質を、組成物の一部とすることができ、そして、そのような組成物が、当該核酸、ペプチド、または、タンパク質の本来の環境の一部ではない場合には、なおも単離することができる。また、この用語は、宿主細胞における組織発現で調製した核酸、ペプチド、及び、タンパク質、ならびに、化学合成した核酸も含む。本明細書で使用する「単離した」FN3ドメインは、異なる抗原特異性を有するその他のFN3ドメインを実質的に含まないFN3ドメインを指すことを意図している（例えば、ヒト血清アルブミンに対して特異的に結合する単離したFN3ドメインは、ヒト血清アルブミン以外の抗原に対して特異的に結合するFN3ドメイン実質的に含まない）。しかしながら、ヒト血清アルブミンのエピトープ、アイソフォーム、または、変異体に対して特異的に結合する単離したFN3ドメインは、例えば、その他の種（血清アルブミン種相同体など）に由来するその他の関連抗原に対する交差反応性を有し得る。

【0018】

本明細書で使用する用語「フィブロネクチンIII型（FN3）ドメイン」（FN3ドメイン）は、フィブロネクチン、テネイシン、細胞内細胞骨格タンパク質、サイトカイン受容体、及び、原核細胞酵素を含むタンパク質に高頻度で認められるドメインのことを指す（Bork and Doolittle, Proc Nat Acad Sci USA 89: 8990-8994, 1992; Meinke et al., J Bacteriol 175: 1910-1918, 1993; Watanabe et al., J Biol Chem 265: 15659-15665, 1990）。代表的なFN3ドメインとして、ヒトテネイシンCに存在する15個の異なるFN3ドメイン、ヒトフィブロネクチン（FN）に存在する15個の異なるFN3ドメイン、及び、例えば、米国特許第8,278,419号に記載の非天然の合成FN3ドメインがある。個々のFN3ドメインは、ドメイン番号とタンパク質の名称、例えば、テネイシンの3番目のFN3ドメイン（TN3）、または、フィブロネクチンの10番目のFN3ドメイン（FN10）で呼ばれる。

【0019】

本明細書で使用する「センチリン」は、ヒトテネイシンCに存在する15個の異なるFN3ドメインのコンセンサス配列に基づいたFN3ドメインのことを指す。

【0020】

用語「捕捉剤」は、特定の種類の細胞に結合し、そして、その他の細胞から当該細胞を単離することを可能とする物質のことを指す。捕捉剤の例として、磁気ビーズ、磁性流体、カプセル化試薬などがあるが、これらに限定されない。

【0021】

用語「生物学的試料」は、血液、組織、骨髄、唾液などのことを指す。

【0022】

用語「診断試薬」は、生物学的試料を分析するために使用することができるあらゆる物質のことを指し、当該物質は、単一の物質として流通させてもよく、または、診断キット内のその他の物質と組み合わせて流通させてもよい。

【0023】

本明細書で使用する用語「置換する」、または、「置換した」、または、「突然変異する」、または、「突然変異した」は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列での1つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドを、変化、欠失させるか、または、1つ以上のアミノ酸もしくはヌクレオチドを挿入することで、その配列の変異体を生成することを指す。

【0024】

本明細書で使用する用語「ランダム化する」、または、「ランダム化した」、または、「多様化した」、または、「多様化する」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に対して少なくとも1つの置換、挿入、または、欠失を行うことを指す。

【0025】

本明細書で使用する「変異体」は、例えば、置換、挿入、または、欠失などの1つ以上の

10

20

30

40

50

修飾を受けた、参照ポリペプチドまたは参照ポリヌクレオチドとは異なるポリペプチドまたはポリヌクレオチドのことを指す。

【0026】

本明細書で使用する用語「特異的に結合する」または「特異的な結合」は、所定の抗原と、約 1×10^{-6} M以下、例えば、約 1×10^{-7} M以下、約 1×10^{-8} M以下、約 1×10^{-9} M以下、約 1×10^{-10} M以下、約 1×10^{-11} M以下、約 1×10^{-12} M以下、または、約 1×10^{-13} M以下の解離定数 (K_D) で結合する本発明のFN3ドメインの能力のことを指す。一般的に、本発明のFN3ドメインは、例えば、Protein Instrument (BioRad) を使用した表面プラズモン共鳴によって測定した場合に、非特異的抗原 (例えば、BSAまたはカゼイン) に対する K_D よりも少なくとも10倍低い K_D で、所定の抗原 (すなわち、ヒトCD8A) に結合する。しかしながら、ヒトCD8Aに特異的に結合する本発明の単離したFN3ドメインは、その他の関連する抗原、例えば、Macaca Fascicularis (カニクイザル、cyno)、または、Pan troglodytes (チンパンジー) などのその他の種に由来する同じ所定の抗原 (オルソログ) に対して交差反応性を有し得る。

10

【0027】

用語「ライブラリー」は、変異体のコレクションのことを指す。このライブラリーは、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの変異体で構成し得る。

【0028】

本明細書で使用する用語「CD8A」または「CD8」は、例えば、NCBI参照配列、NP_001139345.1、NP_0011759.3、及び、NP_741969.1に記載されたヒトCD8アルファタンパク質を特異的に含む。また、CD8Aも、科学文献において、CD8a分子、MAL、p32、Leu2、T細胞表面糖タンパク質CD8アルファ鎖、CD8抗原、アルファポリペプチド (p32)、Leu2 Tリンパ球抗原、OKT8 T細胞抗原、T細胞抗原Leu2、Tリンパ球分化抗原T8/Leu-2、及び、T8 T細胞抗原として公知である。

20

【0029】

本明細書で使用する「Tencon」は、配列番号1に示され、かつ、米国特許出願公開第2010/0216708号に記載の合成フィブロネクチンIII型 (FN3) ドメインのことを指す。

30

【0030】

用語「ベクター」は、生物学的系内で複製し得る、または、こうした系間を移動することができるポリヌクレオチドのことを意味する。ベクターポリヌクレオチドは、一般的に、複製起点、ポリアデニル化シグナル、または、選択マーカーなどの要素を含んでおり、それらは、生物系でのこれらのポリヌクレオチドの複製または維持を促進するように機能する。そのような生物学的系の例として、細胞、ウイルス、動物、植物、及び、ベクターの複製を可能にする生物学的要素を利用して再構成した生物学的系がある。ベクターを構成するポリヌクレオチドは、DNAもしくはRNA分子、または、これらのハイブリッド分子とし得る。

【0031】

用語「発現ベクター」は、生物学的系または再構成した生物学的系において利用可能で、当該発現ベクターに存在するポリヌクレオチド配列がコードするポリペプチドの翻訳を指示するベクターを意味する。

40

【0032】

用語「ポリヌクレオチド」は、糖-リン酸骨格鎖、または、その他の同等の共有結合要素を介して共有結合したヌクレオチドの鎖を含む分子を意味する。二本鎖及び一本鎖のDNA及びRNAが、ポリヌクレオチドの典型例である。

【0033】

用語「ポリペプチド」または「タンパク質」は、ペプチド結合により連結されてポリペプチドを生成する、少なくとも2つのアミノ酸残基を含む分子を意味する。約50個に満た

50

ないアミノ酸からなる小さいポリペプチドのことを、「ペプチド」と称し得る。

【0034】

本明細書で使用する用語「～と組み合わせて」は、2つ以上の治療薬が、対象に対して、混合物の状態で一緒に、それぞれ単独の作用物質として同時に、または、それぞれ単独の作用物質としてあらゆる順番で順次に投与できる、ことを意味する。

【0035】

物質の組成

本発明は、ヒトCD8A結合FN3ドメイン、及び、検出可能な標識にコンジュゲートしたCD8A結合FN3ドメインを提供する。本発明は、本発明のFN3ドメインをコードするポリヌクレオチド、または、その相補的核酸、ベクター、宿主細胞、ならびに、それらを作製、及び、使用する方法を提供する。

10

【0036】

CD8A結合分子

本発明は、CD8Aに対して特異的に結合し、任意に、検出可能な標識にコンジュゲートするフィブロネクチンIII型(FN3)ドメインを提供する。これらの分子は、前臨床用途、それに、CD8Aをバイオマーカーとして使用するがん診断において広範に使用し得る。本発明は、本発明のFN3ドメインをコードするポリヌクレオチド、または、その相補的核酸、ベクター、宿主細胞、ならびに、それらを作製、及び、使用する方法を提供する。

【0037】

本発明のFN3ドメインは、CD8Aと強い親和性で結合し、そして、CD8発現細胞内を局在化することができ、それにより、腫瘍微小環境に診断試薬を送達するための効率的な方法を提供する。

20

【0038】

本発明のある実施形態は、配列番号35のアミノ酸配列を含むヒトCD8Aに特異的に結合する単離したFN3ドメインである。

【0039】

本明細書に記載の本発明の幾つかの実施形態では、本発明のFN3ドメインは、配列番号271のアミノ酸配列を有するカニクイザルCD8Aと交差反応する。

【0040】

本発明のFN3ドメインは、ヒト、*Macaca Fascicularis*、及び／または、*Pan troglodytes*のCD8Aと、当業者によって実施される表面プラズモン共鳴により測定した場合に、約 1×10^{-7} M未満、例えば、約 1×10^{-8} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 1×10^{-11} M未満、約 1×10^{-12} M未満、または、約 1×10^{-13} Mの解離定数(K_D)で結合し得る。特定のFN3ドメイン-抗原相互作用について測定した親和性は、異なる条件下(例えば、浸透圧、pH)で測定した場合には変化する可能性がある。したがって、親和性、及び、その他の抗原結合パラメータ(例えば、 K_D 、 K_{on} 、 K_{off})の測定は、足場タンパク質、及び、抗原の標準化溶液、ならびに、本明細書に記載の緩衝液などの標準化緩衝液を用いて行われる。

30

【0041】

幾つかの実施形態では、CD8A結合FN3ドメインは、当該分子のN末端に連結した開始メチオニン(Met)を含む。

【0042】

幾つかの実施形態では、CD8A結合FN3ドメインは、当該FN3ドメインに連結したシステイン(Cys)を含む。

40

【0043】

N末端Met、及び／または、Cysの付加は、第2の分子の発現、及び／または、コンジュゲートを促進し得る。

【0044】

50

本発明の別の実施形態は、ヒトCD8Aに対して特異的に結合し、そして、当該CD8A特異的FN3ドメインが、インビトロで、CD8+ T細胞を活性化しない、単離したFN3ドメインである。CD8+ T細胞活性化は、標準的方法を用いて測定し得る。例えば、酵素結合免疫スポット（ELISPOT）アッセイを使用し得る。このELISPOTアッセイは、サンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）技術を使用し得る。当該インターフェロナーガンマ抗体を、PVDf（ポリビニリデンジフルオリド）で支持したマイクロプレート上にプレコートする。適切に刺激した細胞（細胞+ペプチド、FN3ドメインなど）をウェルにピペットで入れ、そして、そのマイクロプレートを、加湿した、37℃のCO₂インキュベーターに、特定の期間入れておく。このインキュベーション期間に、当該分泌細胞の直近にある固定化インターフェロナーガンマ抗体は、分泌されたインターフェロナーガンマに結合する。あらゆる細胞や未結合物質を洗い流した後、2番目のビオチン化インターフェロナーガンマ抗体をウェルに添加する。あらゆる未結合ビオチン化抗体を除去するための洗浄の後に、ストレプトアビジンに結合したアルカリホスファターゼを添加する。続いて、未結合酵素を洗浄して除去し、そして、基質溶液（BCIP/NBT）を添加する。青黒色の沈殿物が形成され、そして、インターフェロナーガンマ局在部位にスポットとして出現し、個々の各スポットは、個々のインターフェロナーガンマ分泌細胞を表す。これらのスポットは、自動ELISPOTリーダーシステムで、または、実体顕微鏡を使用して手動で計数することができる。本発明の単離したCD8A結合FN3ドメインは、実施例に記載したように、1 μMの濃度で試験した場合に、インビトロで、CD8+ T細胞を活性化しない。

【0045】

本明細書に記載の本発明の幾つかの実施形態では、当該単離したFN3ドメインは、配列番号40～269のアミノ酸配列を含む。

【0046】

本明細書に記載の本発明の幾つかの実施形態では、当該CD8A特異的FN3ドメインは、配列番号79、81、83、89、122、及び、68の残基位置54で、システイン置換を有する。

【0047】

タンパク質配列へのシステインの導入をもたらし得る置換は、標準的な化学的性質を使用して、細胞傷害剤、検出可能な標識、半減期延長分子、キレート剤、ポリエチレングリコール、及び／または、核酸などの小分子を、FN3ドメインに化学的に結合するために利用し得る。

【0048】

幾つかの実施形態では、ヒトCD8Aに対して特異的に結合するFN3ドメインは、ヒトCD8Aへの結合について、配列番号229～234のFN3ドメインと競合する。FN3ドメインは、周知のインビトロ方法を用いて、ヒトCD8Aと結合するための参照分子との競合について評価し得る。例示的な方法では、ヒトCD8Aを組換え発現するHEK細胞を、非標識参照分子と、4℃で、15分間インキュベートし、続いて、過剰の蛍光標識試験FN3ドメインと、4℃で、45分間インキュベートし得る。PBS/BSAで洗浄した後、標準的な方法を用いて、フローサイトメトリーで蛍光を測定し得る。別の例示的な方法では、ヒトCD8Aの細胞外部分を、ELISAプレートの表面にコーティングし得る。過剰の非標識参照分子を約15分間添加し、続いて、ビオチン化試験FN3ドメインを添加し得る。PBS/Tweenで洗浄した後に、試験ビオチン化FN3ドメインの結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合ストレプトアビジンを使用して検出し、そして、シグナルは、標準的な方法を使用して検出し得る。競合アッセイにおいて、参照分子は標識し得るものであり、また、試験FN3ドメインは標識しなくともよい、ことは自明である。当該参照分子が、当該試験FN3ドメインの結合を阻害する場合、または、当該試験FN3ドメインが、当該参照分子の結合を、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、もしくは、100%阻害する場合、当該試験FN3ドメインは、当該参照分子と競合し得る。

【0049】

幾つかの実施形態では、本発明のヒトCD8Aに対して特異的に結合する単離したFN3ドメインは、放射性金属に結合することができるキレート剤にコンジュゲートし、そして、腫瘍分布を評価するための造影剤として、腫瘍内部のCD8-T細胞の存在、及び／または、がん治療の有効性の診断に使用し得る。

【0050】

幾つかの実施形態では、当該CD8A特異的FN3ドメインを、腎臓、及び／または、肝臓のクリアランスを介して、血液から除去する。

【0051】

Tencon配列に基づいたライブラリーからのCD8A結合FN3ドメインの単離
Tencon（配列番号1）は、ヒトテネニンC由来の15個のFN3ドメインのコンセンサス配列からデザインした、天然に存在しないフィブロネクチンIII型（FN3）ドメインである（Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012; 米国特許出願公開第2010/0216708号）。Tenconの結晶構造は、FN3ドメインの特徴である7本のベータ鎖をつなぐ6回表面露出ループを示し、各ベータ鎖は、A、B、C、D、E、F、及び、Gと呼ばれており、各ループは、AB、BC、CD、DE、EF、及び、FGループと呼ばれている（Bork and Doolittle, Proc Natl Acad Sci USA 89:8990-8992, 1992; 米国特許第6,673,901号）。これらのループ、または、各ループ内の選択された残基を、フィブロネクチンIII型（FN3）ドメインのライブラリーを構築するためにランダム化し得るものであり、これらを用いて、CD8Aに結合する新規の分子を選択し得る。表1は、Tencon（配列番号1）の各ループ、及び、ベータ鎖の位置、及び、配列を示す。

【0052】

したがって、後述するライブラリーTCL1またはTCL2などの、Tencon配列に基づいてデザインしたライブラリーは、ランダム化FGループ、または、ランダム化BC及びFGループを有し得る。Tencon BCループは、長さがアミノ酸7個であり、このため、1、2、3、4、5、6、または、7個のアミノ酸を、BCループで多様化させて、Tencon配列に基づいてデザインしたライブラリーにおいてランダム化し得る。Tencon FGループは、長さがアミノ酸7個であり、このため、1、2、3、4、5、6、または、7個のアミノ酸を、FGループで多様化させて、Tencon配列に基づいてデザインしたライブラリーにおいてランダム化し得る。Tenconライブラリーにおけるループでのさらなる多様性は、ループでの残基の挿入、及び／または、欠失によって達成し得る。例えば、FG及び／またはBCループを、アミノ酸1〜22個だけ伸長させてもよく、または、アミノ酸1〜3個だけ減らしてもよい。TenconにおけるFGループは、長さがアミノ酸7個であり、抗体重鎖における対応するループは、4〜28個の残基の範囲である。最大の多様性を提供するために、FGループを、4〜28個の残基の抗体CDR3の長さの範囲に対応するように、配列ならびに長さを多様化し得る。例えば、追加の1、2、3、4、または、5個のアミノ酸によって、ループを伸長させることで、FGループの長さをさらに多様化させることができる。

【0053】

また、Tencon配列に基づいてデザインしたライブラリーは、FN3ドメインの側面を形成するランダム化した代替表面を有してもよく、それらは、2本以上のベータ鎖と、少なくとも1つのループとを含み得る。そのような1つの代替表面は、C及びFのベータ鎖、ならびに、CD及びFGループのアミノ酸によって形成される（C-CD-F-FG表面）。Tenconの代替的なC-CD-F-FG表面に基づいたライブラリーのデザインは、米国特許出願公開第2013/0226834号に記載されている。また、Tencon配列に基づいてデザインしたライブラリーは、残基位置11、14、17、37、46、73、または、86（残基の番号は、配列番号1に対応して付与する）に置換を有しており、かつ、改善された熱安定性を示すTencon変異体などのTencon変

異体に基づいてデザインしたライブラリーを含む。代表的な *Tencon* 変異体が、米国特許出願公開第 2011/0274623 号に記載されており、そして、配列番号 1 の *Tencon* と比較して、E11R、L17A、N46V、及び、E86I の置換を有する *Tencon* 27（配列番号 4）を含む。

【0054】

【表 1】

表 1. *Tencon* のトポロジー

FN3 ドメイン	<i>Tencon</i> (配列番号 1)
A 鎖	1 - 12
AB ループ	13 - 16
B 鎖	17 - 21
BC ループ	22 - 28
C 鎖	29 - 37
CD ループ	38 - 43
D 鎖	44 - 50
DE ループ	51 - 54
E 鎖	55 - 59
EF ループ	60 - 64
F 鎖	65 - 74
FG ループ	75 - 81
G 鎖	82 - 89

【0055】

Tencon、及び、その他の FN3 配列に基づいたライブラリーは、ランダムな、または、所定のアミノ酸のセットを用いて、選択した残基位置でランダム化し得る。例えば、ランダムな置換を有するライブラリーでの変異体を、天然に存在する 20 種すべてのアミノ酸をコードする NNK コドンを用いて作製し得る。その他の多様化スキームでは、アミノ酸 Ala、Trp、Tyr、Lys、Thr、Asn、Lys、Ser、Arg、Asp、Glu、Gly、及び、Cys をコードするために、DVK コドンを使用し得る。あるいは、20 種すべてのアミノ酸残基を生じさせ、そして、同時に停止コドンの頻度を低減するために、NNS コドンを使用することもできる。多様化させる位置で偏ったアミノ酸分布を有する FN3 ドメインのライブラリーは、例えば、Slonomics（登録商標）技術（<http://www.sloning.com>）を用いて合成し得る。この技術は、何千もの遺伝子合成プロセスにおいて十分な万能構成単位として機能する、既製の二本鎖トリプレットのライブラリーを使用する。このトリプレットのライブラリーは、あらゆる所望の DNA 分子を構築するのに必要な、すべての考え得る配列組合せを示す。コドン指定は、周知の IUB コードによる。

【0056】

本発明のヒト CD8A に特異的に結合する FN3 ドメインは、足場タンパク質をコードする DNA 断片を、cis ディスプレイを用いて、RepA をコードする DNA 断片にライゲートして、各タンパク質が、それをコードする DNA と安定的に会合している、インビ

トロ翻訳後に形成されるタンパク質-DNA複合体のプールを生成することで、Tenc onライブラリーなどのFN3ライブラリーを生成させ（米国特許第7,842,476号; Odegrip et al., Proc Natl Acad Sci USA 101, 2806-2810, 2004）、そして、このライブラリーを、当該技術分野で周知であり、また、実施例に記載されている、あらゆる方法によって、CD8Aに対する特異的結合についてアッセイすることで、単離することができる。使用できる例示的な周知の方法は、ELISA、サンドイッチイムノアッセイ、ならびに、競合的及び非競合的アッセイである（例えば、Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照されたい）。CD8Aに特異的に結合する同定されたFN3ドメインは、それらのCD8A活性の阻害、内在化、安定性、及び、その他の所望の特性について、さらに特徴付けが行われる。

【0057】

本発明のヒトCD8Aに特異的に結合するFN3ドメインは、ライブラリーを作製するために鑄型として、あらゆるFN3ドメインを用いること、及び、本明細書で提供した方法を用いて、ヒトCD8Aに特異的に結合する分子についてライブラリーをスクリーニングすることで、生成し得る。使用し得る例示的なFN3ドメインは、テネインCの3番目のFN3ドメイン（TN3）（配列番号145）、フィブコン（配列番号146）、及び、フィブロネクチンの10番目のFN3ドメイン（FN10）（配列番号147）である。標準的なクローニング及び発現技術を用いて、インビトロで、ライブラリーを発現または翻訳させるために、ベクターにおいてライブラリーをクローニングするか、または、ライブラリーの二本鎖cDNAカセットを合成する。例えば、リボソームディスプレイ（Hanes and Pluckthun, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 4937-4942, 1997）、mRNAディスプレイ（Roberts and Szostak, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 12297-12302, 1997）、または、その他の無細胞系（米国特許第5,643,768号）を使用することができる。FN3ドメイン変異体のライブラリーは、例えば、あらゆる好適なバクテリオファージの表面に表示された融合タンパク質として発現し得る。バクテリオファージの表面に融合ポリペプチドを提示する方法は、周知である（米国特許出願公開第2011/0118144号、国際特許公開第WO2009/085462号、米国特許第6,969,108号、米国特許第6,172,197号、米国特許第5,223,409号、米国特許第6,582,915号、米国特許第6,472,147号）。

【0058】

本明細書に記載した本発明の幾つかの実施形態では、ヒトCD8Aに特異的に結合するFN3ドメインは、配列番号1のTenc on配列、または、配列番号4のTenc on27の配列に基づいたものであり、配列番号1、または、配列番号4は、任意に、残基位置11、14、17、37、46、73、及び／または、86に置換を有する。

【0059】

本発明のヒトCD8Aに特異的に結合するFN3ドメインは、熱安定性を改善するため、ならびに、熱によるフォールディング及びアンフォールディングの可逆性などの特性を改善するために改変し得る。タンパク質、及び、酵素の見かけの熱安定性を高めるために、非常に類似した高熱安定性配列との比較に基づいた合理的デザイン、ジスルフィド架橋を安定化するデザイン、アルファヘリックス性を強化する変異、塩架橋の改変、タンパク質の表面電荷の変化、定方向進化、及び、コンセンサス配列の組成を含む、幾つかの方法が適用されている（Lehmann and Wyss, Curr Opin Biotechnol, 12, 371-375, 2001）。高い熱安定性は、発現したタンパク質の収率を増加させ、溶解度または活性を改善し、免疫原性を減少させ、製造におけるコールドチェーンの必要性を最小限にし得る。Tenc on（配列番号1）の熱安定性を改善するために置換し得る残基は、11、14、17、37、46、73、または、86番目の残基位置であり、そして、米国特許出願公開第2011/0274623号に記載されて

いる。これらの残基に対応する置換を、本発明の分子を含むFN3ドメインに組み込み得る。

【0060】

タンパク質安定性、及び、タンパク質不安定性の測定は、タンパク質完全性の同じ、または、異なる態様として見るができる。タンパク質は、熱、紫外線、または、電離放射線、溶液の場合には周囲の浸透圧モル濃度及びpHの変化、小さな孔寸法での濾過によって負荷される力学的剪断力、紫外線放射、ガンマ線照射によるなどの電離放射線、化学的もしくは熱脱水、または、タンパク質構造の破壊を引き起こし得るその他のあらゆる作用もしくは力に起因する変性に対して、感受性がある、または、「不安定」である。分子の安定性は、標準的な方法を用いて決定することができる。例えば、分子の安定性は、標準的な方法を用いて、分子の半分がアンフォールドされる摂氏温度(°C)である、熱融解(「T_m」)温度を測定することで決定することができる。一般的には、T_mが高いほど、分子はより安定している。熱に加えて、化学環境もまた、タンパク質が特定の三次元構造を維持する能力を変化させる。

【0061】

ある実施形態では、本発明のヒトCD8Aに特異的に結合するFN3ドメインは、T_mの増大によって測定した場合に、改変前の同じドメインと比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または、95%以上の安定性の増大を示しうる。

【0062】

化学変性も同様に、様々な方法で、測定することができる。化学変性剤として、塩酸グアニジニウム、チオシアン酸グアニジニウム、尿素、アセトン、有機溶媒(DMF、ベンゼン、アセトニトリル)、塩類(硫酸アンモニウム、臭化リチウム、塩化リチウム、臭化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化ナトリウム)、還元剤(例えば、ジチオスレイトール、ベーターメルカプトエタノール、ジニトロチオベンゼン、及び、水素化ホウ素ナトリウムなどの水素化物)、非イオン性、及び、イオン性洗浄剤、酸(例えば、塩酸(HCl)、酢酸(CH₃COOH)、ハロゲン化酢酸)、疎水性分子(例えば、リン脂質)、及び、標的化変性剤がある。変性の程度の定量化は、標的分子の結合能力など、機能的特性の喪失、または、凝集傾向、これまで溶媒が到達できなかった残基の露出、または、ジスルフィド結合の破壊もしくは形成などの物理化学的特性に依存させることができる。

【0063】

本発明のFN3ドメインは、例えば、価数を増加させ、そして、標的分子結合の結合力を増加させる手段として、または、2つ以上の異なる標的分子に同時に結合する二重特異性もしくは多重特異性の足場を作製する手段として、単量体、二量体、または、多量体として作製し得る。当該二量体及び多量体は、例えば、アミノ酸リンカー、例えば、ポリグリシン、グリシン、及び、セリン、または、アラニン及びプロリンを含むリンカーを含めて、単一特異性、二重特異性、または、多重特異性タンパク質足場を連結させることによって作製し得る。代表的なリンカーとして、(GS)₂、(配列番号272)、(GGGS)₂(配列番号273)、(GGGGGS)₅(配列番号274)、(AP)₂(配列番号275)、(AP)₅(配列番号276)、(AP)₁₀(配列番号277)、(AP)₂₀(配列番号278)、及び、A(EAAAK)₅AAA(配列番号279)がある。当該二量体、及び、多量体は、NからC-方向に互いに連結し得る。ポリペプチドを、新規の連結した融合ポリペプチドに連結するための天然に存在するペプチドリinker、及び、人工ペプチドリinkerの使用は、文献において周知である(Hallemwell et al., J Biol Chem 264, 5260-5268, 1989; Alfthan et al., Protein Eng. 8, 725-731, 1995; Robinson & Sauer, Biochemistry 35, 109-116, 1996; 米国特許第5,856,456号)。

【0064】

診断薬

本発明では、本発明のCD8A特異的FN3ドメインは、検出可能な標識を含み得る。ある実施形態では、当該検出可能な標識は、FN3ドメインにコンジュゲートしているキレート剤と複合体を形成し得る。別の実施形態では、当該検出可能な標識は、FN3ドメインにコンジュゲートしているリンカーにコンジュゲートしているキレート剤と複合体を形成し得る。さらに別の実施形態では、当該検出可能な標識は、FN3ドメインにコンジュゲートしているリンカーに結合し得る。さらに別の実施形態では、検出可能な標識は、第2の分子によって特異的に結合する当該標識の能力によって、本発明のペプチドに間接的に結合し得る。このタイプの間接的に付着した標識の例として、第2の分子であるストレプトアビジンによって特異的に結合することができるビオチン標識がある。単一、二重、または、多重標識が、有利であり得る。本明細書で使用する「検出可能な標識」とは、本発明のFN3ドメインに結合したときに、FN3ドメインを検出可能にするあらゆるタイプの標識である。検出可能な標識はまた、細胞に対して毒性、または、細胞傷害性とし得る。一般的に、検出可能な標識として、発光分子、化学発光分子、蛍光色素、発蛍光団、蛍光消光剤、着色分子、放射性同位体、放射性核種、シンチラント、金属原子などの質量標識（質量変化を介した検出用）、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、プロテインA、プロテインG、抗体またはその断片、Grb2、ポリヒスチジン、Ni²⁺、フラッグタグ、mycタグ、重金属、酵素、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、電子供与体／受容体、アクリジニウムエステル、及び、比色基質がある。特定の実施形態では、当該検出可能な標識は、放射性核種である。当業者であれば、本発明の実施において使用し得る、上記していないその他の有用な標識を、容易に認識する。

【0065】

検出可能な標識は、シグナル伝達機が検出できるシグナルを発する。幾つかの事例では、当該検出可能な標識が放射性核種である場合などでは、当該検出可能な標識は、自発的にシグナルを発することができる。その他の事例では、当該検出可能な標識が緩和性金属である場合などでは、当該検出可能な標識は、外部場から刺激を受けた結果としてシグナルを発する。シグナルの例として、ガンマ線、X線、可視光、赤外線エネルギー、及び、電波があるが、これらに限定されない。シグナル変換機の例として、SPECT/CT装置、PETスキャナー、蛍光光度計、及び、磁気共鳴画像（MRI）装置を装備したガンマカメラがあるが、これらに限定されない。したがって、当該検出可能な標識は、磁気共鳴画像法、シンチグラフィ画像法、超音波、または、蛍光を用いて検出することができる標識を含む。

【0066】

好適な発蛍光団としては、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、フルオレセインチオセミカルバジド、ローダミン、Texas Red、CyDyes（例えば、Cy3、Cy5、Cy5.5）、Alexa Fluors（例えば、Alexa488、Alexa555、Alexa594、Alexa647）、近赤外（NIR）（700～900nm）蛍光染料、ならびに、カルボシアニン、及び、アミノスチリル染料があるが、これらに限定されない。本発明のFN3ドメインは、当該技術分野において周知の技術を用いて、作用物質を発蛍光団で標識することで、蛍光検出のために標識することができる（例えば、Lohse et al., Bioconj Chem 8:503-509（1997）を参照のこと）。例えば、多くの公知の染料は、NH₂-末端アミノ酸残基に結合することができる。あるいは、フルオレセインなどの蛍光色素を、ペプチドリンカーのリジン残基に結合させることができる。

【0067】

放射性核種を、 γ 放射性放射性核種、Auger放射性放射性核種、 β 放射性放射性核種、アルファ放射性放射性核種、または、陽電子放射性放射性核種とし得る。放射性核種を、検出可能な標識、及び／または、細胞傷害剤とし得る。適切な放射性核種の例として、炭素-11、窒素-13、酸素-15、フッ素-18、フルオロデオキシグルコース-18、リン-32、スカンジウム-47、銅-64、65及び67、ガリウム-67及び6

8、臭素－75、77及び80m、ルビジウム－82、ストロンチウム－89、ジルコニウム－89、イットリウム－86及び90、ルテニウム－95、97、103、及び、105、レニウム－99m、101、105、186、及び、188、テクネチウム－99m、ロジウム－105、水銀－107、パラジウム－109、インジウム－111、銀－111、インジウム－113m、ランタニド－114m、錫－117m、テルル－121m、122m、及び、125m、ヨウ素－122、123、124、125、126、131、及び、133、プラセオジウム－142、プロメチウム－149、サマリウム－153、ガドリニウム－159、ツリウム－165、167、及び、168、ジスプロシウム－165、ホルミウム－166、ルテチウム－177、レニウム－186、及び、188、イリジウム192、白金－193、及び、195m、金－199、タリウム－201、チタン－201、アスタチン－211、ビスマス－212、及び、213、鉛－212、ラジウム－223、アクチニウム－225、ならびに、それらから誘導した窒化物または酸化物形態があるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、放射性核種を、銅－64、ジルコニウム－89、イットリウム－90、インジウム－111、及び、ルテチウム－177からなる群から選択する。別の特定の実施形態では、放射性核種を、イットリウム－90、インジウム－111、及び、ルテチウム－177からなる群から選択する。例示的な実施形態では、放射性核種は、ジルコニウム－89である。

【0068】

様々な金属原子を、検出可能な標識として使用し得る。当該金属原子は、一般的には、20以上の原子番号を有する金属からなる金属原子の群から選択し得る。例えば、当該金属原子は、カルシウム原子、スカンジウム原子、チタン原子、バナジウム原子、クロム原子、マンガン原子、鉄原子、コバルト原子、ニッケル原子、銅原子、亜鉛原子、ガリウム原子、ゲルマニウム原子、ヒ素原子、セレン原子、臭素原子、クリプトン原子、ルビジウム原子、ストロンチウム原子、イットリウム原子、ジルコニウム原子、ニオブ原子、モリブデン原子、テクネチウム原子、ルテニウム原子、ロジウム原子、パラジウム原子、銀原子、カドミウム原子、インジウム原子、錫原子、アンチモン原子、テルル原子、ヨウ素原子、キセノン原子、セシウム原子、バリウム原子、ランタン原子、ハフニウム原子、タンタル原子、タングステン原子、レニウム原子、オスミウム原子、イリジウム原子、白金原子、金原子、水銀原子、タリウム原子、鉛原子、ビスマス原子、フランシウム原子、ラジウム原子、アクチニウム原子、セリウム原子、プラセオジウム原子、ネオジウム原子、プロメチウム原子、サマリウム原子、ユーロピウム原子、ガドリニウム原子、テルビウム原子、ジスプロシウム原子、ホルミウム原子、エルビウム原子、ツリウム原子、イッテルビウム原子、ルテチウム原子、トリウム原子、プロトアクチニウム原子、ウラン原子、ネプツニウム原子、プルトニウム原子、アメリシウム原子、キュリウム原子、ベルケリウム原子、カリホルニウム原子、アインスタイニウム原子、フェミウム原子、メンデレビウム原子、ノベリウム原子、または、ローレンシウム原子とし得る。幾つかの実施形態では、当該金属原子は、20を超える原子番号を有するアルカリ金属を含む群から選択し得る。その他の実施形態では、当該金属原子は、20を超える原子番号を有するアルカリ土類金属を含む群から選択し得る。ある実施形態では、当該金属原子は、ランタニドを構成する金属の群から選択し得る。別の実施形態では、当該金属原子は、アクチニドを構成する金属の群から選択し得る。さらに別の実施形態では、当該金属原子は、遷移金属を構成する金属の群から選択し得る。さらに別の実施形態では、当該金属原子は、卑金属を構成する金属の群から選択し得る。その他の実施形態では、当該金属原子は、金原子、ビスマス原子、タンタル原子、及び、ガドリニウム原子を含む群から選択し得る。好ましい実施形態では、当該金属原子は、53（すなわち、ヨウ素）～83（すなわち、ビスマス）の原子番号を有する金属を含む群から選択し得る。別の実施形態では、当該金属原子は、磁気共鳴画像法に適した原子とし得る。別の代替の実施形態では、当該金属原子は、CTのX線エネルギー帯にK端を有する金属からなる群から選択し得る。好ましい金属原子として、マンガン、鉄、ガドリニウム、金、及び、ヨウ素があるが、これらに限定されない。

【0069】

当該金属原子は、 $+1$ 、 $+2$ 、または、 $+3$ 酸化状態の形態の金属イオンとし得る。例えば、 Ba^{2+} 、 Bi^{3+} 、 Cs^{+} 、 Ca^{2+} 、 Cr^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Cr^{6+} 、 Co^{2+} 、 Co^{3+} 、 Cu^{+} 、 Cu^{2+} 、 Cu^{3+} 、 Ga^{3+} 、 Gd^{3+} 、 Au^{+} 、 Au^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 F^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mn^{3+} 、 Mn^{4+} 、 Mn^{7+} 、 Hg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ni^{3+} 、 Ag^{+} 、 Sr^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Sn^{4+} 、及び、 Zn^{2+} があるが、これらに限定されない。当該金属原子は、金属酸化物を含み得る。例えば、金属酸化物の例として、酸化鉄、酸化マンガン、または、酸化ガドリニウムがあるが、これらに限定されない。追加の例は、磁鉄鉱、磁赤鉄鉱、または、それらの組み合わせを含み得る。

【0070】

本発明では、キレート剤を含むFN3ドメインに、放射性核種または金属原子を組み込み得る。FN3ドメインーキレート剤錯体への当該放射性核種または金属原子の組み込みは、一般的に、配位化学の分野における様々な方法で達成し得る。

【0071】

半減期延長部分

本発明のヒトCD8Aに特異的に結合するFN3ドメインは、例えば、共有結合性相互作用を介してその他のサブユニットを組み込み得る。本発明のある態様では、本発明のFN3ドメインは、半減期延長部分をさらに含む。代表的な半減期延長部分として、アルブミン、アルブミン変異体、アルブミン結合タンパク質、及び／または、ドメイン、トランスフェリン、ならびに、それらの断片及び類似体、及び、Fc領域がある。

【0072】

ポリエチレングリコール(PEG)分子、例えば、PEG5000またはPEG20,000など、異なる鎖長の脂肪酸及び脂肪酸エステル、例えば、ラウリル酸塩、ミリスチン酸塩、ステアリン酸塩、アラキジン酸塩、ベヘン酸塩、オレイン酸塩、アラキドン酸塩、オクタン二酸、テトラデカン二酸、オクタデカン二酸、ドコサン二酸など、ポリリジン、オクタン、炭水化物(デキストラン、セルロース、オリゴ糖、または、多糖)などのさらなる部分を、所望の特性を得るために、本発明のFN3ドメインに組み込み得る。これらの部分は、タンパク質足場コード配列との直接融合体とし得るものであり、また、標準的なクローニング及び発現技術で作製し得る。あるいは、周知の化学カップリング法を用いて、組換え生産した本発明の分子に、それらの部分を結合し得る。

【0073】

例えば、システイン残基を、分子のC末端に組み込むか、または、分子のヒトCD8A結合面から離間する方向に面した残基位置にシステインを組み込んで、周知の方法を用いて、PEG化基をシステインに結合させることで、本発明のFN3ドメインにPEG化部分を付加し得る。さらなる部分を組み込んだ本発明のFN3ドメインは、幾つかの公知のアッセイによって、官能性について比較し得る。例えば、Fcドメイン、及び／または、Fcドメイン変異体の組み込みに起因して変化した特性を、FcγRI、FcγRII、FcγRIII、もしくは、FcRn受容体などの可溶性型受容体を用いるFc受容体結合アッセイで、または、例えば、ADCCもしくはCDCを測定する周知の細胞系アッセイで、または、インビボモデルにおける本発明の分子の薬物動態特性を評価してアッセイし得る。

【0074】

ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞

本発明は、本発明のヒトCD8Aに特異的に結合するFN3ドメインをコードする核酸を、単離したポリヌクレオチドとして、または、発現ベクターの一部として、または、直鎖DNA配列の一部として提供するものであり、インビトロでの転写／翻訳のために使用する直鎖DNA配列、当該組成物の真核生物、原核生物、または、フィラメントファージ発現、分泌、及び／または、出現と適合するベクター、または、それらの標的化突然変異源を含む。特定のポリヌクレオチドの例を、本明細書に開示しているが、遺伝コードの縮重、または、特定の発現系におけるコドンの選択性を考慮すると、本発明のFN3ドメイン

10

20

30

40

50

をコードする他のポリヌクレオチドも、本発明の範囲内に含まれる。

【0075】

本発明のある実施形態は、配列番号40～269のアミノ酸配列を含むヒトCD8Aに特異的に結合するFN3ドメインをコードする単離したポリヌクレオチドである。

【0076】

本発明のポリヌクレオチドは、自動ポリヌクレオチド合成装置での固相ポリヌクレオチド合成などの化学合成によって製造し得るものであり、完全な一本鎖または二本鎖分子に構築し得る。あるいは、本発明のポリヌクレオチドは、PCRに続いて、通常のクローニングを行うなどのその他の技術で製造し得る。所定の公知の配列のポリヌクレオチドを製造または作り出す技術は、当該技術分野において周知である。

【0077】

本発明のポリヌクレオチドは、プロモーターまたはエンハンサー配列、イントロン、ポリアデニル化シグナル、RepA結合を促進するcis配列など、少なくとも1つの非コード配列を含み得る。また、ポリヌクレオチド配列は、例えば、タンパク質の精製または検出を容易にするヒスチジンタグまたはHAタグなどのマーカーまたはタグ配列、シグナル配列、RepA、Fcなどの融合タンパク質パートナー、または、pIXもしくはpIEIなどのバクテリオファージコートタンパク質をコードする、さらなるアミノ酸をコードするさらなる配列を含み得る。

【0078】

本発明の別の実施形態は、少なくとも1つの本発明のポリヌクレオチドを含むベクターである。そのようなベクターは、プラスミドベクター、ウイルスベクター、バキュロウイルス発現ベクター、トランスポゾンに基づいたベクター、または、あらゆる手段によって所定の生物または遺伝子的バックグラウンドに本発明のポリヌクレオチドを導入するのに適したその他のあらゆるベクターとし得る。そのようなベクターは、そのようなベクターによるコードを受けるポリペプチドの発現を制御、調節、誘発、または、許容することができる核酸配列要素を含む発現ベクターとし得る。そのような要素は、転写エンハンサー結合部位、RNAポリメラーゼ開始部位、リボソーム結合部位、及び、所定の発現系においてコードしたポリペプチドの発現を促進するその他の部位を含み得る。そのような発現系は、当該技術分野において公知の細胞に基づく系、または、無細胞系であり得る。

【0079】

本発明の別の実施形態は、本発明のベクターを含む宿主細胞である。本発明のヒトCD8Aに特異的に結合するFN3ドメインは、任意に、当該技術分野で周知の細胞株、混合細胞株、不死化細胞、または、不死化細胞のクローン集団によって産生させることができる。例えば、Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001)を参照されたい。

【0080】

発現用に選択した宿主細胞は、哺乳動物起源とし得るものであり、または、COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、HeG2、SP2/0、HeLa、骨髄腫、リンパ腫、酵母、昆虫、もしくは、植物細胞、または、それらのあらゆる誘導體、不死化、もしくは、形質転換細胞から選択し得る。あるいは、当該宿主細胞は、ポリペプチドをグリコシル化できない種または生物、例えば、BL21、BL21 (

10

20

30

40

50

DE3)、BL21-GOLD(DE3)、XL1-Blue、JM109、HMS174、HMS174(DE3)、及び、天然の、もしくは、遺伝子操作した*E. coli* spp、*Klebsiella* spp、または、*Pseudomonas* spp株のいずれか、などの原核細胞または生物から選択し得る。

【0081】

本発明の別の実施形態は、本発明のヒトCD8Aに特異的に結合する単離したFN3ドメインを製造する方法であって、本発明の単離した宿主細胞を、ヒトCD8Aに特異的に結合する単離したFN3ドメインが発現されるような条件下で培養し、及び、当該FN3ドメインを精製する、ことを含む方法である。

【0082】

ヒトCD8Aに特異的に結合する当該FN3ドメインは、周知の方法、例えば、プロテインA精製、硫酸アンモニウム、または、エタノール沈殿、酸抽出、陰イオン、もしくは、陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、及び、レクチンクロマトグラフィー、または、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって、組換え細胞培養物から精製し得る。

【0083】

ヒトCD8Aを検出するためのキット

本明細書では、生物学的試料でのCD8Aを検出するためのキットを提供する。これらのキットは、本明細書に記載のCD8A特異的FN3ドメインの1つ以上、及び、キットの使用説明書を含む。

【0084】

提供したCD8A特異的FN3ドメインは、溶液中にあり、凍結乾燥され、基板、担体、もしくは、プレートに固定され、または、検出可能に標識し得る。

【0085】

また、記載したキットは、本明細書に記載した方法を実施するために有用なさらなる構成要素を含み得る。例として、当該キットは、対象由来の試料、コントロール試料もしくは参照試料、例えば、緩慢に進行するがんを保有する対象、及び／または、がんを保有しない対象に由来する試料を取得するための手段、1つ以上の試料区画、及び／または、本発明の方法の実施、及び、組織特異的コントロールもしくは標準についての説明書を含み得る。

【0086】

CD8Aのレベルを決定する手段は、例えば、CD8Aのレベルを決定するためのアッセイにおいて使用する緩衝液、または、その他の試薬をさらに含むことができる。当該説明書は、例えば、アッセイの実施に関する印刷した説明書、及び／または、CD8Aのレベルの評価についての説明書とすることができる。

【0087】

また、記載したキットは、対象から試料を単離するための手段を含み得る。これらの手段は、対象から体液または組織を取得するために使用することができる装置、または、試薬の1つ以上の品目を含むことができる。また、対象から試料を取得するための手段は、血液試料から血清などの血液成分を単離するための手段を含み得る。好ましくは、当該キットは、ヒト対象について使用するようデザインする。

【0088】

本発明のヒトCD8A結合FN3ドメインの使用

本発明のヒトCD8Aに対して特異的に結合するFN3ドメインは、バイオマーカーとしてCD8Aを使用して、細胞、組織、器官、体液、または、一般的には、宿主において、ヒトの疾患または特定の病変を診断するために使用し得る。本発明の方法は、あらゆる分類に属する動物患者に使用し得る。そのような動物の例として、ヒト、齧歯類、イヌ、ネコ、及び、家畜などの哺乳動物を含む。

【0089】

実施形態

本発明は、以下の実施形態も提供するが、これらに限定されない。

【0090】

1) 配列番号35のアミノ酸配列を含むヒトCD8Aタンパク質に対して特異的に結合する、単離したFN3ドメイン。

【0091】

2) 前記FN3ドメインが、配列番号271のアミノ酸配列を含むカニクイザルCD8Aタンパク質と交差反応する、実施形態1に記載の単離したFN3ドメイン。

【0092】

3)

a) 前記FN3ドメインが、配列番号1のTencn配列に基づくものであり、

b) 前記FN3ドメインが、配列番号4のTencn27配列に基づくものであり、及び／または

c) 前記FN3ドメインを、配列番号2、3、5、6、7、または、8の配列を含むライブラリーから単離する、実施形態2に記載の単離したFN3ドメイン。

【0093】

4) 前記FN3ドメインが、第2の分子にコンジュゲートしている、実施形態3に記載の単離したFN3ドメイン。

【0094】

5) 前記第2の分子が、検出可能な標識である、実施形態4に記載の単離したFN3ドメイン。

【0095】

6) 前記検出可能な標識が、放射性同位体、磁性ビーズ、金属ビーズ、コロイド粒子、蛍光染料、電子密度の高い試薬、酵素、ビオチン、ジゴキシゲニン、または、ハプテンである、実施形態5に記載の単離したFN3ドメイン。

【0096】

7) 前記FN3ドメインが、配列番号79、81、83、89、122、及び、68に対応する残基位置54に、システイン置換を有する、実施形態3に記載の単離したFN3ドメイン。

【0097】

8) 前記FN3ドメインが、酵素結合免疫スポット(ELISPOT)アッセイで測定されるように、インビトロで、CD8+ T細胞を活性化しない、実施形態3に記載の単離したFN3ドメイン。

【0098】

9) 前記FN3ドメインが、ヒトCD8Aタンパク質への結合について、配列番号229～234の1つのアミノ酸配列を含む前記FN3ドメインと競合する、実施形態3に記載の単離したFN3ドメイン。

【0099】

10) 前記FN3ドメインが、実施例3に記載した条件で実施した表面プラズモン共鳴で測定されるように、約0.02～約6.6nMの間の親和性(K_D)で、ヒトCD8Aタンパク質に結合する、実施形態3に記載の単離したFN3ドメイン。

【0100】

11) 前記FN3ドメインが、配列番号40～269のアミノ酸配列のいずれか1つを含む、実施形態3に記載の単離したFN3ドメイン。

【0101】

12) 前記FN3ドメインのN末端にメチオニンをさらに含む、実施形態11に記載の単離したFN3ドメイン。

【0102】

13) 前記FN3ドメインが、半減期延長部分に結合している、実施形態3に記載の単離したFN3ドメイン。

10

20

30

40

50

【0103】

14) 前記半減期延長部分が、CD8結合分子、ポリエチレングリコール(PEG)、CD8、CD8変異体、または、免疫グロブリンのFc領域の少なくとも一部である、実施形態13に記載の単離したFN3ドメイン。

【0104】

15) 実施形態3に記載のFN3ドメインをコードする単離したポリヌクレオチド。

【0105】

16) 実施形態15に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【0106】

17) 実施形態16に記載のベクターを含む単離した宿主細胞。

【0107】

18) ヒトCD8Aタンパク質に対して特異的に結合するFN3ドメインを製造する方法であって、前記FN3ドメインを発現する条件下で実施形態17に記載の単離した宿主細胞を培養し、及び、前記FN3ドメインを精製する、ことを含む前記方法。

【0108】

19) 実施形態3に記載のFN3ドメインを含む診断キット。

【0109】

20) 実施形態3に記載のFN3ドメインを含む診断薬または捕捉剤。

【0110】

21) 前記前記FN3ドメインが、配列番号79、81、83、89、122、及び／または、68に対応する残基位置54に、システイン置換を有する、実施形態20に記載の診断薬または捕捉剤。

【0111】

22) 前記置換システインが、Zr-89、または、I-124にコンジュゲートしている、実施形態21に記載の診断薬。

【0112】

23) 生物学的試料に含まれるCD8発現細胞を検出する方法であって、前記生物学的試料を実施形態20に記載の診断試薬で処理し、及び、そのような診断薬のFN3ドメインへの前記生物学的試料の結合を評価する、ことを含む前記方法。

【0113】

24) 前記診断薬が、配列番号79、81、83、89、122、及び／または、68の残基位置54に、システイン置換を有し、かつ、前記置換システインが、Zr-89、または、I-124にコンジュゲートしている、実施形態23に記載の方法。

【実施例】

【0114】

以下の実施例は、先行する開示を補足し、かつ、本明細書に記載の趣旨の理解を深めるために提供する。これらの実施例は、記載した趣旨を限定するものと見なすべきではない。本明細書に記載した実施例及び実施形態は、例示目的のものに過ぎず、そして、そのことを考慮した様々な変更または改変は当業者に自明の事項であり、また、そのようなことは、本発明の本質的な範囲内のものであり、かつ、本発明の本質的な範囲から逸脱せずに実施することができる。

【0115】

実施例1. ランダム化したループを有するTENCONライブラリーの構築

Tencon(配列番号1)は、ヒトテネイシンC由来の15個のFN3ドメインのコンセンサス配列からデザインした、免疫グロブリン様足場であるフィブロネクチンIII型(FN3)ドメインである(Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012; 米国特許第8,278,419号)。Tenconの結晶構造は、7個のペーター鎖を連結する6個の表面露出ループを示す。これらのループ、または、各ループで選択した残基をランダム化することで、フィブロネクチンIII型(FN3)ドメインのライブラリ

10

20

30

40

50

ーを構築することができ、このライブラリーを用いて、特異的標的に結合する新規分子を選択することができる。

【0116】

Tencon:

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEK
VGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVKGGHRS
NPLSAEFTT (配列番号1):

【0117】

当該Tencon足場、及び、様々なデザイン手法を用いて、様々なライブラリーを生成した。一般的に、ライブラリーTCL1及びTCL2は、良好な結合分子を生成した。TCL1及びTCL2ライブラリーの生成については、国際特許公開第WO2014081944A2号に詳細に記載されている。

【0118】

TCL1ライブラリーの構築

cisディスプレイシステムで使用するために、Tencon (配列番号1) のFGループだけをランダム化するようにデザインしたライブラリー、TCL1を構築した (Jacobset al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012)。このシステムでは、Tacプロモーター、Tenconライブラリーコード配列、RepAコード配列、cis要素、及び、ori要素の配列を組み込んだ一本鎖DNAを作製する。インビトロ転写／翻訳系で発現させると、それをコードしたDNAに対してcisで結合したTencon-RepA融合タンパク質の複合体を産生する。次に、標的分子に結合する複合体を単離して、後述するようにして、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅する。

【0119】

cisディスプレイで使用するためのTCL1ライブラリーの構築は、PCRの連続ラウンドによって行われ、最終的に直鎖状の二本鎖DNA分子が、2つの半分子として産生され、当該5'末端断片は、プロモーターとTencon配列とを含み、一方で、3'末端断片は、repA遺伝子とcis及びori要素とを含む。これらの2つの半分子同士を制限酵素消化によって結合させて、完全な構築物を生成する。TenconのFGループであるKGGHRSN (配列番号32) だけに、ランダムなアミノ酸を組み込んで、TCL1ライブラリーをデザインした。このライブラリーの構築にはNNSコドンを使用し、これにより、20種類すべてのアミノ酸と、1個の終止コドンとを、FGループに組み入れられると考えられる。このTCL1ライブラリーは、さらなる多様性を付与するために、それぞれが7~12残基の異なるランダム化FGループの長さを有する、6個の個別のサブライブラリーを含む。

【0120】

TCL1ライブラリー (配列番号2)

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEK
VGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVX7-12P
LSAEFTT;

配列中、

X1、X2、X3、X4、X5、X6、X7は、あらゆるアミノ酸であり、及び、X8、X9、X10、X11、及び、X12は、あらゆるアミノ酸であり、または、削除されている。

【0121】

TCL2ライブラリーの構築

TenconのBC及びFGループの両方をランダム化し、かつ、それぞれの位置のアミノ酸の分布を厳密に制御したTCL2ライブラリーを構築した。表2は、TCL2ライブラリーの所望のループ位置でのアミノ酸分布を示す。デザインしたアミノ酸分布には、2つの目的がある。まず、このライブラリーを、Tencon結晶構造の解析、及び／また

10

20

30

40

50

は、ホモロジーモデリングに基づいて、Tencnのフォールディング及び安定性にとって構造的に重要となると予想された残基に偏らせた。例えば、29番目の位置は、Tencnが折り畳まれる際に疎水性コアに埋もれるので、疎水性アミノ酸のサブセットだけになるように固定した。第2の層のデザインとしては、高親和性の結合分子を効率よく生成するため、抗体の重鎖HCDR3に選択的に認められる残基の分布に近くなるようにアミノ酸分布を偏らせた(Birtalan et al., J Mol Biol 377: 1518-28, 2008; Olson et al., Protein Sci 16: 476-84, 2007)。この目標のため、表1の「デザインした分布」は、以下の分布、すなわち、6%アラニン、6%アルギニン、3.9%アスパラギン、7.5%アスパラギン酸、2.5%グルタミン酸、1.5%グルタミン、15%グリシン、2.3%ヒスチジン、2.5%イソロイシン、5%ロイシン、1.5%リジン、2.5%フェニルアラニン、4%プロリン、10%セリン、4.5%トレオニン、4%トリプトファン、17.3%チロシン、及び、4%バリンのことを指す。この分布には、メチオニン、システイン、及び、終止コドンは含まれない。

【0122】

TCL2ライブラリー (配列番号3)

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈SFL
IQYQESEKVGAEINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIY
GVX₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃SX₁₄X₁₅LSAEFTT;

配列中、

X₁は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valである、

X₂は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valである、

X₃は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valである、

X₄は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valである、

X₅は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valである、

X₆は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valである、

X₇は、Phe、Ile、Leu、Val、または、Tyrである、

X₈は、Asp、Glu、または、Thrである、

X₉は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valである、

X₁₀は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valである、

X₁₁は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valである、

X₁₂は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile

、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valである、

X₁₃は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valである、

X₁₄は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valである、及び

X₁₅は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valである。

10

【0123】

【表2】

表1.

残基位置*	WT残基	TCL2ライブラリーでの分布
22	T	デザインした分布
23	A	デザインした分布
24	P	50% P + デザインした分布
25	D	デザインした分布
26	A	20% A + 20% G + デザインした分布
27	A	デザインした分布
28	F	20% F、20% I、20% L、20% V、 20% Y
29	D	33% D、33% E、33% T
75	K	デザインした分布
76	G	デザインした分布
77	G	デザインした分布
78	H	デザインした分布
79	R	デザインした分布
80	S	100% S
81	N	デザインした分布
82	P	50% P + デザインした分布

20

30

*残基番号、配列番号1のTenc on配列に基づいて付与する

【0124】

続いて、これらのライブラリーを、野生型Tenc onと比較して、置換E11R/L17A/N46V/E86Iを組み込む安定化したTenc onフレームワーク（Tenc on27：配列番号4）でライブラリーを構築すること（米国特許第8,569,227号）、ならびに、BC及びFGループにおいてランダム化する位置を変えること、を含む様々な方法で改良した。Tenc on27は、国際特許出願第WO2013049275号に記載されている。これより、Tenc onのFGループだけ（ライブラリーTCL9）、または、BC及びFGループの組み合わせ（ライブラリーTCL7）をランダム化するようにデザインした新たなライブラリーを作製した。これらのライブラリーは、cisディスプレイシステムでの使用を目的として構築したものである（Odegrip et al., Proc Natl Acad Sci USA 101:2806-2810, 2004）。このデザインの詳細は、後述する。

40

50

【0125】

安定化 *Tencon* (*Tencon27*) (配列番号4)

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

【0126】

T C L 7 (ランダム化 F G 及び B C ループ) (配列番号5)

L P A P K N L V V S R V T E D S A R L S W X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ F
D S F L I Q Y Q E S E K V G E A I V L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T
V S I Y G V X₁₀ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅ X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ S N P L
S A I F T T ;

10

配列中、

X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、及び、X₁₆は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、W、または、Yであり、及び

X₇、X₈、X₉、X₁₇、X₁₈、及び、X₁₉は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、W、Yであり、または、削除されている。

【0127】

T C L 9 (ランダム化 F G ループ) (配列番号6)

L P A P K N L V V S R V T E D S A R L S W T A P D A A F D S F L I Q Y Q E S E K
V G E A I V L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I Y G V X₁ X₂ X₃
X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ S N P L S A I F T T ;

20

X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、及び、X₇は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、W、または、Yであり、及び

X₈、X₉、X₁₀、X₁₁、及び、X₁₂は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、W、Yであり、または、削除されている。

【0128】

ライブラリー構築のため、ランダム化した B C ループ (長さは 6 ~ 9 個分の位置)、または、F G ループ (長さは 7 ~ 12 個分の位置) をコードする DNA 断片を、S l o n o m i c s 技術 (S l o n i n g B i o t e c h n o l o g y G m b H) を使用して合成して、ライブラリーのアミノ酸分布を制御し、そして、終止コドンを除いた。B C ループ、または、F G ループをランダム化した DNA 分子の 2 つの異なるセットを別々に合成し、その後、P C R を用いて結合させることで、完全なライブラリー産物を生成した。

30

【0129】

F G ループライブラリー (T C L 9) の構築

F G ループ内のコドンランダム化以外、5' T a c プロモーターと、それに続く、*Tencon* の完全な遺伝子配列からなる合成 DNA 分子のセットを作製した (配列番号 26 ~ 31)。F G ループのランダム化については、システイン及びメチオニンを除くすべてのアミノ酸を同比率でコードした。多様化した部分の長さは、これらの部分が、F G ループ内の 7、8、9、10、11、または、12 個のアミノ酸をコードするようなものとした。それぞれの長さの変異体のサブライブラリーを、2 u g のスケールで個別に合成し、次いで、オリゴ S l o n i n g - F O R (配列番号 9)、及び、S l o n i n g - R e v (配列番号 10) を使用する P C R で増幅した。

40

【0130】

ライブラリーの 3' 末端断片は、P s p O M I 制限部位、r e p A 遺伝子のコード領域、ならびに、c i s 及び o r i 要素を含む、ディスプレイ用の要素を含んだ一定の DNA 配列である。鋳型としてのプラスミド (p C R 4 B l u n t) (I n v i t r o g e n) を、M 13 フォワードプライマー、及び、M 13 リバースプライマーと共に使用して、P C R 反応を行って、この断片を増幅した。得られた P C R 産物を、P s p O M I で一晚消化し、そして、ゲル精製した。ライブラリー DNA の 5' 部分を、r e p A 遺伝子を含む 3' D

50

NAにライゲートするために、2 pmol (約540 ng~560 ng)の5'末端DNAを、NotI及びPspOMI酵素、ならびに、T4リガーゼの存在下で、37℃で、一晚、等モル量(約1.25 µg)の3' repA DNAとライゲートした。このライゲートしたライブラリー産物を、オリゴPOP2250(配列番号11)、及び、DidLi g Rev(配列番号12)を使用して、12サイクルのPCR反応で増幅した。それぞれのサブライブラリーについて、12回のPCR反応で得たDNAを加え合わせ、そして、Qiagenスピンカラムで精製した。TCL9のそれぞれのサブライブラリーの収率は、32~34 µgの範囲であった。

【0131】

FG/BCループライブラリー(TCL7)の構築

このTCL7ライブラリーは、ランダム化したTencnBC及びFGループを有するライブラリーを提供する。このライブラリーでは、6~9個のアミノ酸の長さのBCループを、7~12個のアミノ酸の長さのランダム化したFGループとコンビナトリアルに混合した。合成Tencn断片BC6、BC7、BC8、及び、BC9(配列番号13~16)を、BCループが、6、7、8、または、9個のランダム化したアミノ酸で置換されるように、残基VXまでの、かつ、残基VXを含むタンパク質のN末端部分をコードしたTencn遺伝子を含むように製造した。これらの断片は、L17A、N46V、及び、E83I突然変異(CEN5243)の発見よりも前に合成されたものであるが、これらの突然変異は、後述する分子生物学的ステップで導入した。この断片を、ランダム化したFGループをコードする断片と結合するため、以下のステップを行った。

【0132】

まず、TacプロモーターとTencnの5'配列を、アミノ酸A17をコードするヌクレオチドまでコードしたDNA断片(130mer-L17A、配列番号17)を、オリゴPOP2222ext(配列番号18)、及び、LS1114(配列番号19)を使用したPCRで作製した。これは、L17A突然変異が、ライブラリーに含まれるように行った(CEN5243)。次に、ランダム化したBCループを含むTencnの残基R18-V75をコードしたDNA断片を、鋳型としてのBC6、BC7、BC8、または、BC9と、オリゴとしてLS1115(配列番号20)、及び、LS1117(配列番号21)とを使用したPCRで増幅した。このPCRのステップによって、3'末端にBsaI部位を導入した。続いて、これらのDNA断片を、プライマーとしてオリゴPOP2222ext、及び、LS1117を使用した重複PCRで連結した。得られた240bpのPCR産物をプールし、そして、QiagenPCR精製キットで精製した。精製したDNAを、BsaI-HFで消化し、そして、ゲル精製した。

【0133】

FGループをコードした断片を、鋳型としてのFG7(配列番号31)、FG8(配列番号30)、FG9(配列番号29)、FG10(配列番号28)、FG11(配列番号27)、及び、FG12(配列番号26)を、オリゴヌクレオチドSDG10(配列番号22)、及び、SDG24(配列番号23)と共に使用したPCRで増幅して、BsaI制限部位、ならびに、N46V及びE86I変異を組み込んだ(CEN5243)。

【0134】

消化したBC断片とFG断片とを、スリーウェイライゲーションを用いて、単一の工程で互いにライゲートした。それぞれのライゲーション反応で、2つのBCループの長さ、2つのFGループの長さとを組み合わせた4つのライゲーション反応を、16個の可能な組み合わせで準備した。各ライゲーションは、約300 ngの全BC断片と、300 ngのFG断片を含んでいた。次いで、これら4つのライゲーションプールを、オリゴPOP2222(配列番号24)、及び、SDG28(配列番号25)を使用したPCRで増幅した。次いで、7.5 µgのそれぞれの反応産物を、NotIで消化し、そして、QiagenPCR精製カラムで精製した。このDNAの5.2 µgを、PspOMIで消化した等モル量のRepAのDNA断片(約14 µg)とライゲートし、そして、生成物を、オリゴPOP2222を使用したPCRで増幅した。

【0135】

実施例2：別の結合表面を有するTENCONライブラリーの生成

特定のライブラリーデザインにおいてランダム化する残基の選択は、形成される相互作用表面の全体の形状を定める。BC、DE、及び、FGループをランダム化したライブラリーからマルトース結合タンパク質(MBP)に結合するように選択した足場タンパク質を含むFN3ドメインのX線結晶解析は、MBPの活性部位に嵌まり込み、大きく湾曲した界面を有していることを示した(Koide et al., Proc Natl Acad Sci USA 104:6632-6637, 2007)。これに対して、MBPに結合するように選択したアンキリン繰り返し足場タンパク質は、より平坦な相互作用表面を有しており、また、活性部位から離間したMBPの外表面に結合することが認められた(Binz et al., Nat Biotechnol 22:575-582, 2004)。これらの結果は、足場分子の結合表面の形状(湾曲と平坦)が、どの標的タンパク質が、または、それらの標的タンパク質上の特定のエピトープが、足場によって効果的に結合されるかを決定し得る、ことを示唆している。タンパク質結合用のFN3ドメインを含んだタンパク質足場の遺伝子操作に関して報告をした研究は、標的に結合するための隣接したループを遺伝子操作し、これにより、湾曲した結合表面をもたらすことに頼っている。この手法は、こうした足場によってアクセス可能な標的及びエピトープの数を制限し得る。

【0136】

Tencon、及び、その他のFN3ドメインは、分子の互いに反対側の面に存在する2組のCDR様ループを有しており、第1の組は、BC、DE、及び、FGループによって形成されており、そして、第2の組は、AB、CD、及び、EFループによって形成されている。これら2つのループの組は、FN3構造の中心を形成するベーター鎖によって分離されている。Tenconの像を90°回転させると、代わりとなる表面が可視化することができる。このわずかに凹んだ表面は、CDループ及びFGループと、2個の逆平行のベーター鎖である、C及びFベーター鎖とによって形成されており、また、本明細書ではC-CD-F-FG表面と称している。このC-CD-F-FG表面は、表面を形成する残基のサブセットをランダム化することで、タンパク質足場相互作用表面のライブラリーをデザインするための鋳型として使用することができる。ベーター鎖は、繰り返し構造を有しており、1つおきの残基の側鎖が、当該タンパク質の表面に露出している。このため、ベーター鎖内の一部またはすべての表面露出残基をランダム化することで、ライブラリーを作製することができる。ベーター鎖内の適当な残基を選択することで、Tencon足場の本来の安定性の低下を最小限に抑える一方で、その他のタンパク質と相互作用するための固有の足場表面を提供すべきである。

【0137】

ライブラリーTCL14(配列番号7)は、Tencon27足場内でデザインした(配列番号4)。

【0138】

このライブラリーを構築するために用いた方法の完全な説明は、米国特許出願公開第2013/0226834号に記載されている。

【0139】

TCL14ライブラリー(配列番号7)：

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁IX₂YX₃EX₄X₅X₆X₇GEAIVLTVPGSERSYDLTGKPGTEYX₈VX₉IX₁₀GVKGGX₁₁X₁₂SX₁₃PLSAIFTT；

配列中、

X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₁₀、X₁₁、X₁₂、及び、X₁₃は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、W、Y、または、Mである。

【0140】

Tencon27のC-CD-F-FG表面を形成する2本のベーター鎖は、C鎖が、S3

0、L32、Q34、Q36、F鎖が、E66、T68、S70、Y72、及び、V74の全部で9個の表面露出残基を有しているのに対して、CDループは、S38、E39、K40、V41、G42、及び、E43の6個の可能な残基を有し、そして、FGループは、K75、G76、G77、H78、R79、S80、及び、N81の7個の可能な残基を有している。選択した残基は、22個の残基すべてがランダム化された場合のライブラリーよりも大きな理論上の大きさが故に、TCL14のデザインに含まれるように選択した。

【0141】

ランダム化を行うために、C鎖のL32、Q34、及び、Q36、CDループのS38、E39、K40、及び、V41、F鎖のT68、S70、及び、Y72、FGループのH78、R79、及び、N81の13個のTenc onの位置を選択した。C及びF鎖において、S30及びE66は、CD及びFGループを超えてすぐの位置にあり、また、C-C-D-F-FG表面の一部とは明確に認められないので、ランダム化しなかった。CDループでは、G42及びE43は、柔軟性を付与するグリシンはループ領域において貴重な存在となるものであり、そして、E43は、当該表面の接合部に位置することから、ランダム化しなかった。FGループでは、K75、G76、G77、及び、S80は除外した。当該グリシンを、上記した理由で除外したのに対して、結晶構造を注意深く調べたところ、S80はコアと主要な接点を形成して、安定的なFGループの形成を補助することが判明した。K75は、C-C-D-F-FG表面の表面から離れる方向に面しており、また、ランダム化の候補としてはさほど重要とは認められなかった。上記した残基は、当初のTCL14のデザインではランダム化しなかったが、デノボ選択用、または、例えば、選択したTCL14の標的特異的なヒットについての親和性成熟ライブラリー用にさらなる多様性を付与するため、後出のライブラリーのデザインでは、これらを含めることができる。

【0142】

TCL14の製造に続いて、3つのさらなるTenc onライブラリーの同様のデザインを製造した。これら2つのライブラリー、TCL19、TCL21、及び、TCL23を、TCL14と同じ位置（上記を参照されたい）でランダム化したが、これらの位置に存在するアミノ酸の分布を変えた（表2）。TCL19及びTCL21は、システイン及びメチオニンだけを除いて、すべての位置で、18種類の天然アミノ酸の等しい分布（それぞれ、5.55%）を有するようにデザインした。TCL23は、表2に示したように、それぞれのランダム化した位置が、機能性抗体のHCDR3ループ（Birtalan et al., J Mol Biol 377:1518-1528, 2008）に認められるアミノ酸分布に近似するようにデザインした。TCL21ランダム化と同様に、システイン及びメチオニンは除外した。

【0143】

その他のライブラリーの可能性のある標的結合表面を拡張するために、第3のさらなるライブラリーを構築した。このライブラリー、TCL24では、TCL14、TCL19、TCL21、及び、TCL23のライブラリーと比較して、4つのさらなるTenc onの位置をランダム化した。これらの位置は、D鎖のN46及びT48と、G鎖のS84及びI86とを含む。位置46、48、84、及び、86は、詳細には、これらの残基の側鎖が、ベーター鎖D及びGから表面露出しており、そして、C及びF鎖のランダム化した部分に構造的に隣接して位置するため、標的タンパク質との結合のためにアクセス可能な表面積が大きくなるので、選択をした。TCL24の各位置で用いたアミノ酸分布は、表2でTCL19及びTCL21について説明したものと同一である。

【0144】

TCL24ライブラリー（配列番号8）

L P A P K N L V V S R V T E D S A R L S W T A P D A A F D S F X₁ I X₂ Y X₃ E
X₄ X₅ X₆ X₇ G E A I X₈ L X₉ V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y X₁₀ V
X₁₁ I X₁₂ G V K G G X₁₃ X₁₄ S X₁₅ P L X₁₆ A X₁₇ F T T ;

配列中、

X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₁₀、X₁₁、X₁₂、及び、X₁₃は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、または、Wである。

【0145】

【表3】

表2. T C L 2 1、T C L 2 3、及び、T C L 2 4のランダム化した各位置でのアミノ酸頻度 (%)。

アミノ酸	T C L 1 9	T C L 2 1	T C L 2 3	T C L 2 4
A l a	5. 6	5. 6	6. 0	5. 6
A r g	5. 6	5. 6	6. 0	5. 6
A s n	5. 6	5. 6	3. 9	5. 6
A s p	5. 6	5. 6	7. 5	5. 6
C y s	0. 0	0. 0	0. 0	0. 0
G l n	5. 6	5. 6	1. 5	5. 6
G l u	5. 6	5. 6	2. 5	5. 6
G l y	5. 6	5. 6	1 5. 0	5. 6
H i s	5. 6	5. 6	2. 3	5. 6
I l e	5. 6	5. 6	2. 5	5. 6
L e u	5. 6	5. 6	5. 0	5. 6
L y s	5. 6	5. 6	1. 5	5. 6
M e t	0. 0	0. 0	0. 0	0. 0
P h e	5. 6	5. 6	2. 5	5. 6
P r o	5. 6	5. 6	4. 0	5. 6
S e r	5. 6	5. 6	1 0. 0	5. 6
T h r	5. 6	5. 6	4. 5	5. 6
T r p	5. 6	5. 6	4. 0	5. 6
T y r	5. 6	5. 6	1 7. 3	5. 6
V a l	5. 6	5. 6	4. 0	5. 6

【0146】

T C L 2 1、T C L 2 3、及び、T C L 2 4ライブラリーの作製

アミノ酸分布を制御するため、C o l i b r aライブラリー技術 (I s o g e n i c a) を使用して、T C L 2 1ライブラリーを作製した。アミノ酸分布を制御するため、S l o n o m i c s技術 (M o r p h o s y s) を使用して、T C L 1 9、T C L 2 3、及び、T C L 2 4遺伝子断片を作製した。最初の合成の後に、P C Rを用いて各ライブラリーを増幅した後、ループライブラリーに関して先述したC I Sディスプレイシステム (O d e g r i p e t a l. , P r o c N a t l A c a d S c i U S A 1 0 1 : 2 8 0 6 - 2 8 1 0 , 2 0 0 4) を使用する選択に用いるために、R e p Aの遺伝子とライゲートした。

【0147】

実施例3：C D 8 Aに結合するフィブロネクチンI I I型 (F N 3) ドメインの選択

【0148】

ヒトC D 8アルファ抗原のデザイン及び製造

2つのヒトCD8アルファ (Swiss Prot P01732) 構築物を、HEK細胞から発現及び精製して、CISディスプレイパニング用の組換えタンパク質を産生した (表3)。

【0149】

【表4】

表3：抗原として使用するために生成したCD8A構築物

構築物	配列番号	説明
CD8W7	35	ヒトIgG1のFc断片に融合したヒトCD8アルファ残基22-167
CD8W13	36	ヒトIgG1のFc断片に融合したヒトCD8アルファ残基22-182

10

【0150】

各構築物は、マウスIgGカップ分泌シグナルを含むようにデザインしており、そして、ヒトIgG1のFc断片に融合した。このCD8アルファ及びFc断片配列は、フラッグ及びポリヒスチジンタグ配列を含有するリンカーで連結した。

【0151】

これらのタンパク質をコードするプラスミドを、一過性トランスフェクションによって、HEK 293-Exp1細胞にトランスフェクトし、そして、培養上清を、6000×gの遠心分離で回収し、次いで、0.2ミクロンフィルターで清澄化した。上清を、HiTrap MabSure Selectカラム (GE Healthcare) にロードし、そして、CD8Aタンパク質を、0.1M酢酸ナトリウム、pH3.5、に溶出し、そして、2M Tris、pH7を添加して中和した。次いで、それぞれの試料を、No Weight EZ-Link-Sulfo-NHS-LC-Biotinビオチン化キット (Thermo Scientific) を用いたビオチン化のために、pH7.4のPBSで透析した。

20

【0152】

ライブラリースクリーニング

30

Cisディスプレイを用いて、TCL18、TCL19、TCL21、TCL23、及び、TCL24ライブラリーからCD8アルファ結合ドメインを選択した。ビオチン化CD8W7及びCD8W13をパニングに使用した。インビトロ転写及び翻訳 (ITT) を行うため、3µgのライブラリーDNAを、0.1mMの完全アミノ酸、1X S30プレミクス成分、及び、15µLのS30エクストラクト (Promega) を用いて、50µLの全体積で、30℃で、インキュベートした。1時間後、375µLのブロッキング溶液 (0.1% Casein (Thermo Fisher, Rockford, IL)、100mg/mlのHerring Sperm DNA (Promega, Madison, WI)、1mg/mLのヘパリン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)) を加え、そして、反応物を、氷上で、15分間、インキュベートした。選択のために、ビオチン化抗原を、400nM (ラウンド1)、200nM (ラウンド2及び3)、及び、100nM (ラウンド4及び5) の濃度で添加した。ニュートラビジン磁気ビーズ (Thermo Fisher, Rockford, IL) (ラウンド1、3、5)、または、ストレプトアビジン磁気ビーズ (Promega, Madison, WI) (ラウンド2及び4) を用いて、結合ライブラリーメンバーを回収し、そして、これらのビーズを、500µLのPBSTで5~14回、続いて、500µLのPBSで2回洗浄することで、未結合のライブラリーメンバーを除去した。改善した親和性を有する足場分子を同定するために、さらなる選択ラウンドを実施した。すなわち、ラウンド5からのアウトプットを、上記したようにして調製し、そして、以下の変更を伴うさらなる反復ラウンドに供した。ビオチン化標的濃度を、25nM (ラウンド6及び7)、または、2.

40

50

5 nM (ラウンド8及び9) にまで減少させ、そして、過剰の非ビオチン化標的タンパク質の存在下で、さらに1時間洗浄を行った。これらの変更の目的は、潜在的に速いオン速度と遅いオフ速度を持つバインダーとを同時に選択して、実質的に低い K_D をもたらすことにある。

【0153】

パニングした後に、選択したFN3ドメインを、オリゴTcon6 (配列番号33)、及び、Tcon5shortE86I (配列番号34) を用いたPCRで増幅し、pET15-LICにアニーリングしてサブクローニングし、そして、標準的な分子生物学的技術を用いたE. coliでの可溶性発現に向けて、BL21-GOLD (DE3) 細胞 (Agilent, Santa Clara, CA) に形質転換した。単一クローンを拾い上げ、そして、37°Cで、96ディープウェルプレートで、アンピシリンを含む1mLのLBで、飽和まで増殖させた。翌日、25 µLを、96ディープウェルプレートの新しい1mL LB-Amp培地に移し、37°Cで、2時間、増殖させた。IPTGを、1mMの最終濃度で添加し、そして、タンパク質発現を、30°Cで、16時間誘導した。細胞を、遠心分離して回収し、続いて、0.2mg/mLの最終Chicken Egg White Lysozyme (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を補充したBugbuster HT (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) で溶解した。細胞を、遠心分離により約16時間後に回収し、そして、-20°Cで凍結した。細胞溶解は、各ペレットを、0.6mLのBugBuster (登録商標) HT溶解緩衝液 (Novagen EMD Biosciences) にて、室温で、45分間、振盪しながらインキュベートすることで達成した。

【0154】

CD8Aに結合するFN3ドメインの選択

ニュートラアビジンコートプレートを、Starting Block T20 (Pierce) で、1時間、ブロックした後に、ビオチン化CD8W7もしくはCD8W13 (パニングと同じ抗原)、または、ネガティブコントロール (ヒトFc) で、1時間、コートした。これらのプレートを、TBSTですすぎ、そして、希釈した溶解物を、1時間、プレートに塗布した。さらにすすぎを行った後に、ウェルを、HRPコンジュゲート抗FN3ドメイン抗体 (PAB25) で、1時間、処理し、次いで、POD (Roche) でアッセイした。バックグラウンドよりも少なくとも10倍強いシグナルを有するFN3ドメイン分子を、さらなる分析のために選択した。

【0155】

CD8Aに結合する同定したFN3ドメインの小規模発現及び精製

生化学的結合ELISAによって同定したユニークヒットから単離したクローンを、96ウェルブロックプレートでの増殖のために単一ヒットプレートに合わせ、クローンを、振盪しながら、37°Cで、一晩、1mLの培養物 (選択のためにカナマイシンを補充したLB培地) で増殖させた。96ブロックプレートでのタンパク質発現のために、カナマイシンを補充した1mLのTB培地に、50 µLの一晩培養物を接種し、そして、OD₆₀₀ = 0.6~1まで、300 rpmで連続的に振盪しながら、37°Cで、増殖させた。目標のODに達したら、IPTGを1mMまで添加してタンパク質発現を誘導し、プレートを、一晩増殖のために、30°C (300 rpm) に移した。一晩培養物を遠心分離して細胞を回収し、細菌ペレットを、用時まで、-80°Cで保存した。ペレットを、BugBuster (登録商標) HT溶解緩衝液 (Novagen EMD Biosciences) で溶解し、そして、His MultiTrap (商標) HPプレート (GE Healthcare) での浄化溶解液を、His-タグしたセンチリンで精製し、次いで、20mMリン酸ナトリウム、500mM塩化ナトリウム、及び、250mMイミダゾールを含む緩衝液、pH 7.4で溶出した。精製した試料を、PD MultiTrap (商標) G-25プレート (GE Healthcare) を用いた分析のために、PBS pH 7.4に交換した。

【0156】

10

20

30

40

50

サイズ排除クロマトグラフィー分析

サイズ排除クロマトグラフィーを用いて、抗CD8アルファFN3ドメイン分子の凝集状態を測定した。各精製FN3ドメインのアリコート（10μL）を、Superdex 75 5/150カラム（GE Healthcare）に、流速0.3mL/分で、PBS pH7.4を移動相として注入した。カラムからの溶出液を、280nmの吸光度でモニターした。各実験でのコントロールとして、野生型Tenconを充てた。Agilent ChemStationソフトウェアを使用して、溶出プロファイル进行分析した。同じ実験でのテネイシンコンセンサタンパク質の溶出プロファイルと同様の溶出プロファイルを示したタンパク質だけを、さらなる特徴決定のために考慮した。パニング、ELISAスクリーニング、及び、サイズ排除クロマトグラフィー分析の後に、バックグラウンドの10倍を超える強さで組換えヒトCD8アルファに結合し、そして、SECによる凝集体が認められない、合計で190個の独特な抗ヒトCD8アルファFN3ドメインを単離した（表4、配列番号40～228、及び、70）。

【0157】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 4. E L I S Aスクリーニングから同定したCD8A結合FN3ドメインの概要

クローンの 識別表示	配列 番号	ヒト T細胞 結合 2 uM (MFI)	ヒト T細胞 結合 0.2 uM (MFI)	kd (1/秒)	カニクイ ザルT細 胞結合 2 uM (MFI)	カニクイ ザルT細 胞結合 0.2 uM (MFI)	
P282AR9P1356_A10	40	4258	2093	2.91E-04	10584	3122	10
P282AR9P1356_A4	41	16674	4380	8.61E-05	26447	8632	
P282AR9P1356_A6	42	10835	3441	9.73E-05	31432	5783	
P282AR9P1356_B9	43	17158	3670	2.95E-04	36397	5437	
P282AR9P1356_D3	44	5963	2403	1.58E-04	13852	3365	
P282AR9P1356_H1	45	14696	3234	1.14E-04	46317	5699	20
P282AR9P1356_H6	46	6646	2642	8.08E-05	14393	3205	
P282BR9P1357_A9	47	3117	1074	5.90E-04	7281	1940	
P282BR9P1357_B2	48	5931	2875	1.00E-04	17974	3841	
P282BR9P1357_C10	49	9779	2901	4.58E-04	24476	5110	
P282BR9P1357_C4	50	16809	4224	1.27E-04	41586	7064	
P282BR9P1357_D12	51	15269	3899	8.76E-05	40450	7364	
P282BR9P1357_D2	52	9606	1568	1.05E-03	25843	2525	
P282BR9P1357_E5	53	6726	2587	2.10E-04	10563	4101	
P282BR9P1357_G9	54	12733	2803	3.04E-04	41492	4635	
P282BR9P1357_H3	55	11142	3033	2.85E-04	27090	5701	30
P282CR9P1358_C2	56	10086	1059	1.13E-03	55786	7047	
P282CR9P1358_C5	57	2706	511	9.99E-04	25688	1831	
P282CR9P1358_D10	58	28650	2764	3.11E-04	74051	4072	
P282CR9P1358_F11	59	6420	749	1.35E-03	62412	6585	
P282CR9P1358_F5	60	24427	3072	6.37E-04	85691	13667	
P282DR9P1359_A12	61	32222	5952	8.12E-05	88032	15491	
P282DR9P1359_A7	62	38382	8764	7.54E-04	83943	22803	
P282DR9P1359_A8	63	21124	2113	6.38E-04	70263	7766	
P282DR9P1359_B2	64	22228	2726	6.38E-04	60866	4472	
P282DR9P1359_C10	65	27822	2879	9.91E-04	98481	15134	40
P282DR9P1359_C11	66	18176	1288	2.16E-03	19916	457	
P282DR9P1359_C12	67	15106	944	9.78E-04	66538	3636	
P282DR9P1359_C5	68	31017	5551	1.74E-04	95679	14183	
P282DR9P1359_D12	69	4540	542	1.93E-03	37139	1746	
P282DR9P1359_E11	70	40607	7578	2.65E-04	104291	33144	

【 0 1 5 8 】

【表 6】

P282DR9P1359_E2	71	28491	4824	2.06E-03	77725	10939
P282DR9P1359_E3	72	4307	349	2.63E-03	52426	1625
P282DR9P1359_E5	73	24100	1954	1.01E-03	81183	13601
P282DR9P1359_E6	74	20507	1262	1.71E-03	61734	5065
P282DR9P1359_E8	75	26074	2919	1.19E-03	80973	16948
P282DR9P1359_F11	76	35639	6592	5.54E-04	86740	16146
P282DR9P1359_F2	77	18415	3047	7.22E-04	38228	4031
P282DR9P1359_F3	78	6343	646	1.06E-03	48861	3084
P282DR9P1359_F5	79	48931	8483	9.02E-05	113733	34709
P282DR9P1359_F6	80	19937	3782	3.89E-04	73219	10680
P282DR9P1359_F7	81	38323	6932	3.65E-04	96456	26331
P282DR9P1359_G4	82	26568	2670	5.17E-04	78619	6006
P282DR9P1359_G7	83	37626	6129	1.14E-04	69085	8769
P282DR9P1359_H5	84	919	278	4.49E-03	2252	500
P282ER9P1360_A9	85	23379	5344	1.33E-04	64694	8732
P282ER9P1360_C1	86	25874	6291	1.81E-04	64813	9679
P282ER9P1360_C4	87	19202	3459	1.07E-03	33427	3896
P282ER9P1360_C6	88	25942	5079	1.75E-04	52783	7579
P282ER9P1360_C8	89	30578	6013	1.56E-04	66829	10220
P282ER9P1360_D11	90	36755	3210	1.42E-04	76564	1937
P282ER9P1360_E4	91	26889	5030	1.91E-04	60757	6867
P282ER9P1360_F11	92	22442	3863	2.25E-04	48653	4407
P282ER9P1360_G10	93	26951	7046	2.07E-03	62701	22641
P282ER9P1360_G7	94	25438	5869	2.21E-04	69709	9921
P282ER9P1360_H10	95	2513	506	1.04E-03	27063	1887
P282ER9P1360_H2	96	15165	3479	2.69E-04	44563	4535
P282ER9P1360_H3	97	19992	4271	2.42E-04	65994	6441
P282FR9P1361_A3	98	7670	1661	7.57E-04	8476	740
P282FR9P1361_A5	99	32752	5213	1.92E-04	63541	8108
P282FR9P1361_C7	100	8538	1575	2.24E-03	11639	896
P282FR9P1361_D3	101	6881	1028	5.02E-03	14762	764
P282FR9P1361_E12	102	15794	1130	1.09E-03	63536	15052
P282FR9P1361_F1	103	5498	801	1.26E-03	9869	1392
P282FR9P1361_F11	104	2189	382	2.13E-03	2289	384
P282FR9P1361_F2	105	4610	498	4.96E-03	10883	462
P282FR9P1361_F3	106	5157	674	1.07E-02	9709	513
P282FR9P1361_F7	107	7001	1107	1.14E-03	1705	353
P282FR9P1361_G9	108	859	297	6.53E-03	3746	666
P282FR9P1361_H4	109	13056	3736	3.17E-04	26273	2504
P282FR9P1361_H5	110	5730	698	5.77E-03	11794	637

10

20

30

40

【 0 1 5 9 】

【表 7】

P283AR9P1362_A3	111	5535	1400	1.53E-03	17345	3533
P283AR9P1362_A4	112	6314	2539	3.02E-04	21218	4402
P283AR9P1362_B10	113	15380	3703	1.39E-04	35686	8380
P283AR9P1362_B2	114	13649	3505	1.60E-04	38828	6479
P283AR9P1362_B8	115	5737	1576	6.48E-04	12886	2271
P283AR9P1362_C12	116	7064	2616	9.94E-05	14808	3832
P283AR9P1362_C6	117	15965	4147	1.09E-03	17494	5690
P283AR9P1362_C7	118	10957	2792	1.86E-04	19690	5515
P283AR9P1362_D2	119	8650	2758	2.53E-04	17182	5333
P283AR9P1362_D3	120	9498	3484	1.25E-04	34619	6052
P283AR9P1362_D4	121	9832	2977	9.72E-05	25671	4101
P283AR9P1362_D6	122	13686	3664	2.64E-05	33547	7721
P283AR9P1362_D7	123	17327	3354	1.18E-04	27491	4849
P283AR9P1362_E9	124	6178	2010	3.27E-04	15869	2837
P283AR9P1362_F12	125	8970	2623	7.28E-05	26333	3794
P283AR9P1362_F2	126	9619	1366	2.11E-03	26443	5518
P283AR9P1362_F8	127	9195	3167	1.12E-04	23735	4571
P283AR9P1362_G11	128	12690	3531	1.02E-04	32484	6826
P283AR9P1362_G3	129	18512	4307	9.45E-05	35268	9198
P283AR9P1362_H11	130	5734	2268	1.80E-04	11588	3655
P283BR9P1363_A10	131	7886	2753	3.60E-04	27790	4105
P283BR9P1363_A8	132	11285	2536	3.53E-04	24234	3453
P283BR9P1363_B2	133	8358	2399	2.08E-04	14846	2819
P283BR9P1363_B6	134	14534	3453	2.69E-04	37691	6839
P283BR9P1363_C4	135	9073	2247	4.09E-04	23387	3266
P283BR9P1363_C8	136	16541	3739	3.35E-04	37175	9082
P283BR9P1363_D11	137	8692	2890	4.95E-04	20572	11630
P283BR9P1363_E4	138	10790	2498	3.29E-04	17702	2469
P283BR9P1363_E6	139	8239	2079	1.36E-03	16784	3715
P283BR9P1363_F2	140	14473	3274	2.88E-04	33286	5278
P283BR9P1363_F4	141	11933	2963	1.55E-04	20245	4479
P283BR9P1363_F6	142	10632	3229	8.21E-05	31568	4571
P283BR9P1363_G2	143	9640	3226	1.22E-04	15899	5383
P283BR9P1363_G5	144	14798	3307	1.40E-04	24945	4430
P283BR9P1363_G7	145	4639	2340	4.01E-05	7212	3022
P283DR9P1364_A4	146	9491	1024	1.09E-03	48337	6653
P283DR9P1364_A7	147	8985	435	1.97E-03	39870	2641
P283DR9P1364_B1	148	1477	666	1.56E-03	8617	746
P283DR9P1364_B11	149	4255	451	1.30E-03	22852	1590
P283DR9P1364_B4	150	45452	6062	1.09E-04	96492	20238

10

20

30

40

【0 1 6 0】

【表 8】

P283DR9P1364_C10	151	4936	649	1.29E-03	34234	2713
P283DR9P1364_D11	152	32293	4223	5.14E-04	70431	16240
P283DR9P1364_D8	153	656	244	6.61E-03	2484	365
P283DR9P1364_D9	154	42285	5245	4.30E-04	88300	19979
P283DR9P1364_E3	155	1285	317	2.53E-03	9128	887
P283DR9P1364_E5	156	17625	1269	8.25E-04	55654	5091
P283DR9P1364_E7	157	5394	442	2.43E-03	28732	2241
P283DR9P1364_E8	158	14321	1181	7.56E-04	59328	5510
P283DR9P1364_E9	159	4295	548	1.90E-03	19688	2096
P283DR9P1364_F2	160	39164	6252	1.61E-04	91474	16946
P283DR9P1364_F6	161	17215	1831	1.00E-03	33767	3161
P283DR9P1364_F8	162	6305	458	1.74E-03	36659	1302
P283DR9P1364_G10	163	6291	409	2.53E-03	10920	769
P283DR9P1364_G9	164	9892	401	7.79E-03	47097	2796
P283DR9P1364_H1	165	29248	3033	6.13E-04	54014	10610
P283DR9P1364_H11	166	11479	834	9.64E-04	60609	9459
P283DR9P1364_H6	167	2623	268	2.30E-03	6002	418
P283DR9P1364_H9	168	32763	4057	2.71E-04	54593	4556
P283ER9P1365_A1	169	25512	3862	4.67E-04	9676	1365
P283ER9P1365_A7	170	18513	1315	7.86E-04	36568	2960
P283ER9P1365_B6	171	22998	3397	2.88E-04	30081	2692
P283ER9P1365_C1	172	8004	644	1.15E-03	23975	1884
P283ER9P1365_E2	173	20011	2867	3.11E-04	17177	1905
P283ER9P1365_F4	174	24065	2596	2.16E-04	43243	2038
P283ER9P1365_G1	175	1280	318	3.67E-03	489	383
P283ER9P1365_G3	176	12481	2916	2.50E-03	3480	1470
P283ER9P1365_H3	177	17965	953	3.75E-04	19560	436
P283FR9P1366_A1	178	8782	516	2.26E-03	39384	1650
P283FR9P1366_A5	179	27649	3598	5.85E-04	67839	10945
P283FR9P1366_A9	180	1717	252	3.94E-03	8809	580
P283FR9P1366_B7	181	11365	899	1.15E-03	51186	4668
P283FR9P1366_C2	182	40957	4319	4.91E-04	89242	19288
P283FR9P1366_C3	183	1823	407	2.07E-03	4628	1044
P283FR9P1366_C4	184	33821	3754	5.36E-04	63373	10200
P283FR9P1366_C6	185	4541	483	1.43E-03	26242	1675
P283FR9P1366_D12	186	27793	1528	1.76E-03	87643	8143
P283FR9P1366_D6	187	32924	4554	5.09E-04	79621	10399
P283FR9P1366_D7	188	7517	566	3.54E-04	41434	2581
P283FR9P1366_D8	189	3394	413	1.34E-03	28181	2296
P283FR9P1366_E11	190	4594	567	1.41E-03	14194	1469

10

20

30

40

【 0 1 6 1 】

【表 9】

P283FR9P1366_F5	191	6880	720	1.04E-03	46414	4695
P283FR9P1366_F8	192	3970	369	4.03E-03	26970	2269
P283FR9P1366_F9	193	33559	6295	4.94E-04	84279	24622
P283FR9P1366_G1	194	3605	650	8.72E-04	39796	4981
P283FR9P1366_G5	195	8450	261	7.05E-04	36380	369
P283FR9P1366_G8	196	6857	574	1.08E-03	37144	3126
P283FR9P1366_H10	197	25020	2414	6.30E-04	75192	13854
P283FR9P1366_H11	198	18896	2331	1.39E-03	37386	3659
P283FR9P1366_H3	199	7671	632	1.21E-03	40770	3173
P283FR9P1366_H5	200	3137	252	3.18E-03	5091	477
P283FR9P1366_H6	201	43937	7129	2.05E-04	81542	18993
P283FR9P1366_H7	202	13778	567	1.77E-03	24435	1238
P283FR9P1366_H8	203	24942	4544	1.75E-04	61256	17144
P283FR9P1366_H9	204	8570	693	1.98E-03	36501	2877
P283GR7P1367_A11	205	11326	1029	6.35E-04	66691	5666
P283GR7P1367_B4	206	8302	446	5.18E-03	396	367
P283GR7P1367_B7	207	10865	739	1.27E-03	37518	3134
P283GR7P1367_B9	208	11242	1092	1.16E-03	2924	442
P283GR7P1367_C9	209	10989	896	2.21E-03	66977	5553
P283GR7P1367_E5	210	10014	1333	1.24E-03	3189	533
P283GR7P1367_F5	211	4565	601	1.08E-03	28950	2051
P283GR7P1367_G8	212	1463	450	3.85E-03	21031	1421
P283GR7P1367_H2	213	1621	390	2.35E-03	4207	864
P283GR7P1367_H8	214	5269	303	9.74E-03	20918	930
P283GR7P1367_H9	215	1714	434	1.47E-03	6121	918
P283HR7P1368_A10	216	13632	3233	5.13E-04	42326	4772
P283HR7P1368_B12	217	13399	1538	4.53E-05	18650	826
P283HR7P1368_C3	218	12727	2215	3.49E-04	13326	1306
P283HR7P1368_D1	219	14077	2312	1.66E-03	7850	1408
P283HR7P1368_D2	220	15246	1907	1.30E-03	11132	950
P283HR7P1368_D4	221	28979	6850	2.35E-04	52999	23549
P283HR7P1368_F10	222	18836	2661	1.65E-04	16121	1019
P283HR7P1368_F6	223	14325	3510	1.80E-04	20580	3541
P283HR7P1368_G1	224	31276	4940	2.15E-03	69817	11559
P283HR7P1368_G10	225	8122	753	1.45E-03	23790	2660
P283HR7P1368_G11	226	19305	2647	3.73E-04	14857	1343
P283HR7P1368_H1	227	15389	2460	5.52E-04	17285	1974
P283HR7P1368_H8	228	22758	1612	7.63E-04	35932	4888
Tencon25-His	270	341	219		337	336

10

20

30

40

【0162】

ヒト及びカニクイザルドナー由来のT細胞に対する結合についてのスクリーニング

ヒト及びカニクイザルドナー初代CD8⁺T細胞に対する190個のELISAヒットの結合を、フローサイトメトリーによって評価した。このFN3ドメイン分子を、PBSで2μM及び0.2μMに希釈し、96ウェルフォーマットで、ヒトまたはカニクイザルドナーCD8⁺T細胞と共にインキュベートした。4℃で、1時間後、これらの細胞をPBSで1回洗浄した後、抗FN3ドメイン抗体(PAB25)溶液に再懸濁した。このインキュベートの後、これらの細胞を、PBSで2回洗浄し、そして、PEコンジュゲート二次抗体、及び、生存色素を添加した。最後に、細胞を洗浄し、BD Canto Instrument

50

を用いたフローサイトメトリー分析のために、PBSに再懸濁した。細胞を生細胞上でゲートし、結合したセンチリンの蛍光強度中央値（PEチャンネル）を、Cytobankソフトウェアを使用して計算した。結果を、表4にまとめている。

【0163】

抗ヒトCD8アルファセンチリンのオフ速度分析

精製した抗CD8A FN3ドメインを、さらなる特徴決定をすべく、最も遅いオフ速度を有するクローンを選択するために、Proteon表面プラズモン共鳴装置を使用して、オフ速度分析に供した。測定したオフ速度は、表4に示したように、 2.64×10^{-5} から 1.07×10^{-2} 秒⁻¹の範囲であった。

【0164】

ヤギ抗ヒトFc IgG (Jackson immunoresearch、カタログ番号109-005-098)を、PBST (PBS、0.005% Tween)における30 μ l/分の流速を有するチップでの垂直方向の6つすべてのリガンドチャンネルに、アミンカップリング (pH 5.0) を介して、10 μ g/ml、pH 5.0で、GLCセンサーチップに直接に固定した。固定したGAH-Fc IgG密度は、異なるチャンネル間で、1%未満の変動で、平均約6000応答単位 (Ru) であった。自社のヒトCD8A-Fcを、30 μ l/分の流速で、5分間、10、5、2.5 μ g/mlの3つの異なるリガンド密度で、垂直方向に捕捉した。すべてのFN3ドメインを、3 μ Mの濃度に正規化し、そして、水平方向での結合について試験した。スクリーニングスループットを最大にするために、6つ全ての分析物チャンネルを、FN3ドメインに使用した。ランニング緩衝液としてPBSTを用いて、100 μ l/分の流速で、15分間、解離相をモニターした。表面の再生は、0.85%リン酸の短パルス (100 μ l/分で18秒の接触時間) で達成した。データ解析は、Bio-Rad ProteOn Managerソフトウェア (バージョン3.1.0.6) を用いて行った。生のデータは、スポット間 (空のチップ表面、固定または捕捉したタンパク質は無い) シグナルの減算によって二重に参照して、プレコーティングしたGAH-Fc IgG表面へのFN3ドメインの非特異的結合を補正し、続いて、hCD8A-Fcが捕捉されなかった空のチャンネルL6を使用して二重に補正をした。処理をした結合データを、1:1の単純なLangmuir結合モデルに局所的に適合させて、捕捉したhCD8A-Fcに結合する各FN3ドメインについての k_{off} を抽出した。

【0165】

実施例4：抗CD8A FN3ドメインの遺伝子操作

酸化 (メチオニンまたはトリプトファン)、脱アミド化 (NS)、異性化 (DG) 及び、クリッピング (DP) の翻訳後修飾の危険性を排除するために、幾つかの突然変異を、抗CD8A候補の上位候補にデザインした。プロリンは、ベータ鎖を不安定化させる可能性があるため、ベータ鎖に認められるプロリン残基もまた突然変異させた (Chiba T., et al. J Biol Chem. 2003; 278: 47016-24)。FN3ドメインライブラリーデザイン位置に由来する残基のみを、突然変異について考慮した。親分子の類似の化学的性質 (例えば、トリプトファンからチロシン) を模倣するか、または、その位置でその他のCD8A FN3ドメインに認められるアミノ酸で、PTMリスクのあるアミノ酸を置換するために、変異体配列を選択した。遺伝子操作した配列の全リストを、表5に示す。各変異体と組換えCD8アルファとの間の解離速度を、表面プラズモン共鳴で測定して、相対的結合強度を推定した。

【0166】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 5. CD8A センチリン変異体の解離速度。変異体は、親分子にしたがって分類する。

試料	k_d (1/秒)	突然変異	配列番号
P282DR9P1359_C5	1.47E-04	親	68
CD8S402	4.84E-05	D40P	266
CD8S396	1.52E-04	W32Y	260
CD8S398	4.43E-04	W32S	262
CD8S397	6.60E-04	W32Q	261
CD8S399	1.34E-03	W38Y	263
CD8S401	1.27E-02	W38I	265
CD8S400	2.26E-02	W38L	264
CD8S404	3.09E-02	P36A	268
P282DR9P1359_F5	5.78E-05	親	79
CD8S371	1.94E-04	W48Y	235
CD8S377	4.00E-04	W81E	241
CD8S374	4.03E-04	W81Y	238
CD8S372	5.71E-04	W48L	236
CD8S375	8.30E-04	W81L	239
CD8S376	8.46E-04	W81S	240
CD8S373	4.03E-03	W48I	237
P282DR9P1359_G7	1.06E-05		83
CD8S379	4.97E-05	D43S	243
CD8S378	5.80E-05	D43E	242
CD8S388	7.54E-05	N81Q	252
CD8S387	1.25E-04	W83E	251
CD8S381	2.00E-04	W70F	245
CD8S383	7.47E-04	W74Y	247
CD8S380	1.21E-03	W70Y	244
CD8S382	2.47E-01	W70S	246
P282ER9P1360_C8	1.79E-04	親	89
CD8S390	1.52E-04	W68Y	254
CD8S389	1.84E-04	W68F	253
CD8S391	3.20E-04	W68H	255
CD8S405	1.14E-03	P48T	269
P282DR9P1359_F7	3.39E-04	親	81
CD8S403	1.33E-04	P36A	267
CD8S392	1.55E-03	W38Y	256
CD8S395	1.89E-03	W38H	259
CD8S393	2.55E-03	W38L	257
CD8S394	3.55E-03	W38I	258

【0167】

表 5 に示したデータから、変化する可能性のリスクを抑制する数多くの突然変異が、親分子のそれと類似の解離速度を維持することは明らかである。突然変異体 CD8S402 (DP 部位の除去)、CD8S390 (Trp 残基の除去)、及び、CD8S403 (ベータ鎖からの Pro の除去) は、親の適切な分子よりも遅い解離速度をもたらし、このことは、強固な結合を示す。その他の数多くの変異は、親分子と同様に結合を維持し、したがって、これらの分子は、進行過程での CMC 関連リスクが少ないので、親よりも好ましいものとし得る。

【0168】

10

20

30

40

50

実施例 5：CD8A 結合 FN3 ドメインの親和性測定

19 個の抗 CD8A 候補を、組換えヒト CD8 アルファに対する結合の完全な動態分析のために選択した。これらの候補を、1) ヒト T 細胞に対する強力な相対的結合、2) カニクイザル T 細胞に対する強力な相対的結合、3) 2 μ M と比較して、0.2 μ M での細胞結合の最小減少、4) SEC を介した凝集体がないこと、5) オフ速度が、2.07 E^{-3} 秒 $^{-1}$ 未満であること、6) 配列ファミリーに関する配列多様性、及び、7) 潜在的に変化する可能性の課題（酸化、アミド分解、クリッピング、及び、疎水性）を有する配列の相対的傾向の基準を用いて、上記した陽性ヒット（表 4）から選択した。

【0169】

hCD8A-Fc に結合する、上位の 19 個の候補、後に上位 6 候補の繰り返しの親和性を、koff スクリーニングの場合と同様の条件下で、GLC センサーチップを使用して、ProteOn XPR36 機器（Bio-Rad）で測定した。ヤギ抗ヒト Fc 抗体を、PBST（PBS、0.005% Tween）における 30 μ L/分の流速を有するチップでの垂直方向の 6 つすべてのリガンドチャンネルに、標準アミンカップリングを介して、10 μ g/mL、pH 5.0 で、当該チップに直接に固定して、各々のリガンドチャンネルにて、平均で 6200 の RU を達成した。次いで、ヒト CD8A-Fc を、200 ~ 1200 応答単位の範囲の 5 つの表面密度で捕捉し、6 番目のチャンネルを、GAH-Fc IgG 表面に対する空のチャンネルコントロールとして残した。捕捉した hCD8A-Fc 表面の水平方向に同時に 5 つの異なる濃度の抗 CD8A FN3 ドメイン（3 倍希釈系列で希釈した 1 μ M）を、流動緩衝液 PBST のみを含む第 6 の分析物チャンネルと共に流すことで、結合を測定した。すべての相互作用を、結合時間及び解離時間が、それぞれ 4 分、30 分である 100 μ L/分の流速で測定した。リガンド表面の再生を、0.85% リン酸の 1 回の短いパルス（100 μ L/分で 18 秒間の接触時間）で達成した。データ解析を、Bio-Rad ProteOn Manager ソフトウェア（バージョン 3.1.0.6）を用いて行った。生のデータは、スポット間（空のチップ表面、固定または捕捉したタンパク質は無い）シグナルの減算によって二重に参照して、FN3 ドメインのプレコーティングした GAH-Fc IgG 表面への非特異的結合を補正し、続いて、

（リガンドの解離から生じるあらゆるベースラインドリフトを経時的に補正するために）緩衝液ブランク応答を使用して、二重に参照をした。抗 CD8A FN3 ドメイン結合データを、1:1 の単純な Langmuir 結合モデルに首尾良く適合しないことが複数の分析で一貫して認められており、このことは、試薬の問題、及び／または、本質的に複雑な結合メカニズムのいずれもが、単純な 1:1 結合モードを使用して解明することができない、ことを示している。hCD8A-Fc フォーマットの GAH-Fc 捕捉が、潜在的な実験的アーチファクト（アミンカップリングに起因するリガンド活性損失、及び／または、人工エピトープ／異種リガンド集団など）の導入において、その他のフォーマットと比較して、最も攪乱が小さいと仮定すると、ここで報告されている GAH-Fc 捕捉実験の結果は、数多くの事例で不適合な 1:1 の Langmuir 適合が認められているにもかかわらず、最も信頼のおける ProteOn SPR データを表している。リガンドタンパク質集団における異質性、または、Fc 融合タンパク質での 2 hCD8A 単量体に対して結合する各々の FN3 ドメインについての潜在的に異なるメカニズムのいずれかに起因する 2 つの異なるリガンド種を仮定してデータを適合させるために、異種リガンドモデルを選択した。この場合、各々の抗 CD8A FN3 ドメインは、別々の親和性を有するので、結果として得られるセンサーグラムは、各々の FN3 ドメイン結合について報告された 2 組の速度定数を有する、2 つの独立した反応の合計を反映する。

【0170】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 6：上位 6 個の抗 CD8A FN3 ドメイン候補についての動的親和性の概要。

注記：親和性、 $K_D = k_d / k_a$ 。

試料 (配列番号)	低親和性集団			高親和性集団		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/秒)	K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/秒)	K_D (nM)
P282DR9P1359_F5 (79)	3.48E+04	6.60E-05	6.6	3.80E+05	1.42E-05	0.04
P282DR9P1359_F7 (81)	4.03E+04	3.65E-04	12	4.04E+05	7.99E-05	0.5
P282DR9P1359_G7 (83)	6.84E+04	5.51E-05	2.1	2.76E+05	1.49E-05	0.05
P282ER9P1360_C8 (89)	3.09E+04	9.52E-05	4.1	2.18E+05	4.71E-05	0.2
P283AR9P1362_D6 (122)	5.62E+04	3.12E-05	0.98	1.55E+05	1.00E-06	0.03
P282DR9P1359_C5 (68)	1.92E+04	1.27E-04	6.5	3.00E+05	5.79E-06	0.02

【0171】

実施例 6：DFO 及び 89ZR を有する抗 CD8A FN3 ドメインの標識

抗 CD8A FN3 ドメインを、マレイミド含有キレート剤または PET 標識のコンジュゲーションのために、単一のシステイン残基を含むように修飾した。残基 E54 からシステインへの突然変異を有するクローン P282DR9P1359_F5、P282DR9P1359_F7、P282DR9P1359_G7、P282ER9P1360_C8、P283AR9P1362_D6、及び、P282DR9P1359_C5 をコードする合成プラスミド DNA を、DNA2.0 で合成した（表 7）。E54 は、この残基で変異したその他の FN3 ドメインの結合親和性、安定性、及び、発現レベルの維持を実証した以前の研究に基づいて、変異の位置として選択した（Goldberg S. et al. Protein Engineering Design and Selection 2016 印刷版発行前の電子版）。

【0172】

10

20

30

40

50

【表 12】

表 7：修飾した抗CD8A FN3ドメイン分子

当初のクローン	配列番号	E54Cを有する クローン	配列番号
P282DR9P1359_F5	79	CD8S368	229
P282DR9P1359_F7	81	CD8S367	230
P282DR9P1359_G7	83	CD8S370	231
P282ER9P1360_C8	89	CD8S365	232
P283AR9P1362_D6	122	CD8S369	233
P282DR9P1359_C5	68	CD8S366	234

10

【0173】

遊離システインで修飾した抗CD8A FN3ドメインに放射性金属をキレート化するために、デフェロキサミン (DFO) に結合させた。0.5 mL の 100~500 μ M の抗CD8A FN3ドメイン溶液を、10 μ L の 500 mM TCEP (Sigma、カタログ番号 646547) と合わせ、窒素で穏やかにフラッシュし、そして、室温で、1 時間インキュベートした。氷上で、10 分間、インキュベートし、そして、16,000 $\times$ g 以上で遠心分離してタンパク質をペレット化する前に、各管に 1.0 mL の飽和硫酸アンモニウム (4.02 M) を添加して、3.2 M の最終濃度にした。得られたペレットを再懸濁し、そして、100 mM のリン酸ナトリウム pH 7.2、及び、1 mM の EDTA を補充した 1.0 mL の 3.2 M 硫酸アンモニウムで洗浄をした後に、改めて遠心分離した。2 回目の遠心分離工程の後に、得られたペレットを、100 mM のリン酸ナトリウム 7.0、1 mM の EDTA に溶解し、そして、10 μ L の 50 mM DFO 溶液と混合して、5:1 の DFO 対抗CD8A の最終モル比にした。この反応を、室温で、30 分間、進行させた後に、5.0 マイクロリットルのブターメルカプトエタノールで急冷した。Zeba 7k カラム (Pierce カatalog番号 89889) などの脱塩カラムを通過させる、上記したような 2 回目の硫酸アンモニウム沈殿を含む様々な方法によって、または、ニッケル-NTA 樹脂 (Qiagen 番号 30450) を用いた精製で、過剰の DFO を最終的に除去した。抗CD8A FN3ドメイン-DFO コンジュゲートを、さらなる分析に供するために、1 $\times$ PBS で製剤した。

20

30

【0174】

DFO へのコンジュゲーションの後に、組換えヒトCD8アルファに対する各々の抗CD8A FN3ドメインの結合を、前述したようにして、表面プラズモン共鳴で評価した。E54 から Cys への変異、及び、DFO へのコンジュゲーションの後に、すべての試料は、ヒトCD8A に対する強固な結合を保持していた (表 8)。

【0175】

40

50

【表 13】

表 8. DFOコンジュゲーション後の結合親和性

試料	低親和性集団			高親和性集団		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/秒)	K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/秒)	K_D (nM)
CD8S365-DF0	4.41E+03	4.29E-05	9.73	6.80E+04	4.18E-05	0.6
CD8S366-DF0	5.85E+03	1.06E-04	18.2	7.95E+04	7.01E-05	0.9
CD8S367-DF0	1.09E+04	9.75E-04	89.1	8.45E+04	1.31E-04	1.55
CD8S368-DF0	7.32E+03	9.98E-05	13.6	1.08E+05	2.53E-05	0.23
CD8S369-DF0	2.87E+03	$\leq 1 \text{ E-}05$	≤ 3.4	3.73E+04	$\leq 1 \text{ E-}05$	≤ 0.3
CD8S370-DF0	5.91E+03	7.65E-05	13	4.64E+04	$\leq 2\text{E-}05$	≤ 0.3

【0176】

実施例 7：抗 CD8A FN3 ドメインのヒト及びカニクイザル T 細胞に対する結合
 19 個の選択した抗 CD8A FN3 ドメインについて、全用量応答結合曲線を作成した。
 各々の候補を、PBS で、20 μ M に希釈し、続いて、1：3 希釈系列で、11 点または
 18 点の用量反応曲線を作成した。ヒトまたはカニクイザルの CD8+ T 細胞を、希
 釈した FN3 ドメインと共に、4℃で、1 時間、インキュベートした。細胞を、PBS で
 、1 回洗浄し、そして、抗センチリン抗体 (PAB25) と共に、4℃で、1 時間、イン
 キュベートした。これらの細胞を、PBS で、2 回洗浄し、続いて、PE 二次抗体、抗 C
 D3-PacB、抗 CD4-APC、及び、生存色素とインキュベートした。最後に、細胞
 を洗浄し、BD Canto Instrument を用いたフローサイトメトリー分析
 のために、PBS で再懸濁した。CD8 T 細胞を、生存 CD3+CD4-細胞と定義し
 た。結合したセンチリンの蛍光強度の中央値 (PE チャネル)、及び、Cytobank
 ソフトウェアを使用して陽性染色を示す細胞の % を計算した。結果を、Prism を用い
 てグラフ化し、そして、EC50 値を、4 パラメーター用量反応可変勾配方程式を用いて
 計算した。

【0177】

MesoScale Discovery-Cell Affinity Technology (MSD-CAT) に基づいた平衡細胞結合アッセイを行って、一次ヒト細胞傷害
 性 T 細胞表面 CD8A 受容体に対して結合する上位 6 つの抗 CD8A 候補の親和性を決定
 した。50 pM の一定濃度の各抗 CD8A FN3 ドメインを、10 種の異なる濃度の一
 次細胞傷害性 CD8 T 細胞 (縦列 2 ~ 11) と一緒にプレインキュベートした。結合測定
 の前に細胞生存率を調べたところ、有効な分析には 85 % を超える生存率が望まれた。こ
 れらの細胞は、異なるドナーに由来するので、ドナー間の変動の場合には、同じドナーの
 細胞のみを一緒に組み合わせた。それぞれの個々の抗 CD8A FN3 ドメイン結合を、
 同じドナー由来の細胞を用いて、反復して測定した。細胞、及び、FN3 ドメインを、回
 転子上で、4℃で、一晚、インキュベートして平衡に至らしめた。インキュベートの後、
 これらの細胞を、細胞結合抗 CD8A FN3 ドメインと共に遠心沈降させ、そして、上
 清での未結合 (遊離) 抗 CD8A FN3 ドメインを、MSD アッセイを用いて定量し、
 ここで、ビオチン化組換え hCD8A-Fc タンパク質を、ストレプトアビジン MSD プ
 レートで、一晚、約 16 時間、4℃としたアッセイ緩衝液にて、0.6 μ g/mL で捕捉
 した。プレートをブロッキングした後に、遊離抗 CD8A FN3 ドメインを含む上清を
 プレートに添加し、1 時間インキュベートした後に、1.6 μ g/mL の SulfoTag
 pAb139 (自社製) 検出を行った。1 列目を、FN3 ドメイン及び hCD8A を

含まない緩衝液コントロール（プレートバックグラウンド結合コントロール）とし、ならびに、12列目を、hCD8Aを含まないFN3ドメイン単独のコントロール（100%遊離／未結合）とした。マウス抗hCD8A mAb（mIgG1k、BD Biosciences、カタログ番号555364、クローンRPA-T8）を、ポジティブコントロールとした。Tencon27を、ネガティブコントロールとして、最初のアッセイ検証で使い、有意な結合は観察されなかったため、細胞の利用可能性が故に、後の細胞結合には含めなかった。1：4のストックをH2Oに希釈することで、MSD Read Bufferを添加した後に、これらのプレートを、MSD Sector Imager 6000（商標）Readerで、直ちに発光レベルを読み取った。

【0178】

生のMSDデータを、エクスポートし、そして、可変勾配関数を用いた非線形フィットを用いるPrismで分析をして、Bmax及びHill slope値を導出した。収束したBmax値と、-1.5~-0.5（理想的には、-1.0）の範囲内のhill slopeを有するものだけを、さらなる解析のために考慮する。次いで、結合データを、Bmax値を用いて正規化して、正規化%遊離FN3ドメインを計算した。細胞当たり50,000受容体の表面CD8密度を、受容体濃度計算に使用した。1：1結合モデルについて「正規化データのための溶液親和性方程式」を用いて親和性を決定するために、最高CD8細胞濃度で、<20%の遊離センチリンの飽和基準が必要であった。

【0179】

抗CD8A FN3ドメインは、0.167~2.81nMの範囲の親和性で、初代細胞に結合した（表9）。

【0180】

【表14】

表9：上位6つの抗CD8A FN3ドメイン候補についてのEC₅₀値の概要

クローンの 識別記号 (配列番号)	ヒトT細胞に対する 結合、フローサイト メトリーでの EC50 (nM)	カニクイザルT細胞 に対する結合、フロー サイトメトリーでの EC50 (nM)	ヒトT細胞に対する、 MSD-CATでの 親和性 (nM)
CD8S365 (232)	556.0	123.6	0.167
CD8S366 (234)	162.7	69.5	0.123
CD8S367 (230)	194.5	50.8	0.225
CD8S368 (229)	154.7	70.0	0.459
CD8S369 (233)	124.2	72.3	2.81
CD8S370 (231)	208.7	67.6	0.869

【0181】

実施例8：ヒトT細胞の活性化

デノボ活性化

抗CD8A FN3ドメインが、T細胞を活性化するかどうかを決定するために、フローサイトメトリーアッセイを実施して、T細胞活性化マーカーの変化をモニターした。6つ

の抗CD8A FN3ドメインを、T細胞活性化について評価した。当該FN3ドメインを、1 μ Mまたは10 nMのいずれかで、培地に含まれるヒトpan-T細胞と、二重に、4日間、インキュベートすることで、デノボでの活性化を評価した。2名の別個のドナーについて試験を行った。プレート結合抗CD3を、0.1 μ g/mL、及び、0.01 μ g/mLの2つの用量で、ポジティブコントロールとして使用した。PBSを、ネガティブコントロールとして使用した。次いで、細胞を生存色素で染色し、そして、次の抗体のパネル、すなわち、CD4-FITC、CD3-PerCP-Cy5.5、CD69-PacB、CD45RA-BV605、CD25-BV650、CD127-PE、及び、CD137-PE-Cy7で染色した。CD8+細胞を、生存CD3+CD4-細胞と定義し、そして、各々のT細胞活性化マーカーについてプロファイルした。蛍光強度の中央値を、FlowJoソフトウェアを用いて計算し、そして、複製値を平均化した。結果を、表10A（ドナー022）、及び、10B（ドナー146）にまとめている。365、366、367、368、及び、370では、1 μ Mの最高用量レベルで試験した2名のドナーの1名の上に、T細胞活性化マーカーの小さな変化が認められた。これらの変化は、10 nMの投与量では、双方のドナーでは認められておらず、このことは、これらの分子が、関連する濃度で、T細胞をデノボで活性化しないことを示唆している。369の分子は、双方のドナーにおいて、最高用量レベルで、CD137発現を有意に活性化しているものと考えられる。

【0182】

10

20

30

40

50

【表 15】

表 10 : ドナー 022 (A) 及びドナー 146 (B) に関する CD8+ T 細胞での様々な T 細胞活性化マーカーについての中央蛍光強度 (MFI) 値

A

ドナー	試料 (配列 番号)	抗-CD8A FN3 濃縮物 μ M	抗-CD3 ug/mL	CD45RA MFI	CD25 MFI	CD69 MFI	CD127 MFI	CD137 MFI
022	PBS コント ロール	0	0	12856	571	223	651	296
022	PBS コント ロール	0	0.01	13133	707	403	517	343
022	PBS コント ロール	0	0.1	11394	1333	1694	158	529
022	CD8S366 (234)	1	0	15054	949	477	425	310
022	CD8S366 (234)	0.01	0	13336	814	230	586	301
022	CD8S368 (229)	1	0	12992	858	698	367	329
022	CD8S368 (229)	0.01	0	15262	677	276	489	306
022	CD8S367 (230)	1	0	15409	796	401	511	297
022	CD8S367 (230)	0.01	0	13666	723	261	502	312
022	CD8S370 (231)	1	0	12946	916	572	376	353
022	CD8S370 (231)	0.01	0	14973	776	353	435	331
022	CD8S365 (232)	1	0	13935	904	562	367	328
022	CD8S365 (232)	0.01	0	15156	697	243	504	323
022	CD8S369 (233)	1	0	13661	783	440	441	5122
022	CD8S369 (233)	0.01	0	16513	717	251	596	416
022	TenCon	1	0	14920	702	284	447	334

【0183】

10

20

30

40

50

【表 16】

B

ドナー	試料 (配列 番号)	抗-CD8A FN3 濃縮物 μM	抗-CD3 $\mu\text{g/mL}$	CD45RA MFI	CD25 MFI	CD69 MFI	CD127 MFI	CD137 MFI
146	PBS	0	0	7172	627	61	1313	500
146	PBS	0	0.01	8076	681	153	1296	617
146	PBS	0	0.1	5171	1462	1100	139	798
146	CD8S366 (234)	1	0	8531	673	95	1368	589
146	CD8S366 (234)	0.01	0	9414	623	74	1615	559
146	CD8S368 (229)	1	0	8386	691	96	1301	561
146	CD8S368 (229)	0.01	0	9147	628	82	1424	586
146	CD8S367 (230)	1	0	8167	660	95	1322	581
146	CD8S367 (230)	0.01	0	8734	586	77	1479	571
146	CD8S370 (231)	1	0	8590	737	86	1362	583
146	CD8S370 (231)	0.01	0	7934	635	71	1526	559
146	CD8S365 (232)	1	0	8344	813	85	1238	586
146	CD8S365 (232)	0.01	0	8460	628	80	1355	605
146	CD8S369 (233)	1	0	8778	681	92	1369	5690
146	CD8S369 (233)	0.01	0	7862	591	74	1498	784
146	TenCon	1	0	7325	609	78	1198	574
146	TenCon	0.01	0	7764	596	66	1281	530

【0184】

Pan T細胞活性化

抗CD8A FN3ドメインが、pan-活性化T細胞におけるT細胞活性化のマーカーに影響を及ぼし得るかどうかを決定するために、当該抗CD8A FN3ドメインもまた、低用量のプレート結合CD3と組み合わせて評価した。このアッセイでは、最適以下の濃度（ $0.01 \mu\text{g/mL}$ ）のプレート結合抗CD3を使用して、 $1 \mu\text{M}$ または 10 nM の抗CD8Aの存在下で、T細胞を活性化した。4日後に、これらの細胞を、上記したのと同じパネル及びゲート戦略を用いて評価した。2名の独立したドナーについて試験をした。蛍光強度の中央値を、FlowJoソフトウェアを用いて計算し、そして、複製値を平均化した。結果を、表11A（ドナー022）、及び、11B（ドナー146）にまとめている。

【0185】

10

20

30

40

50

【表 17】

表 11 A 及び B : プレート結合 CD 3 の存在下でのドナー 022 (A) 及びドナー 146 (B) に関する CD 8 + T 細胞での様々な T 細胞活性化マーカーについての中央蛍光強度 (MFI) 値。

A

ドナー	試料 (配列 番号)	抗-CD8A FN3 濃縮物 μ M	抗-CD3 μ g/mL	CD45RA MFI	CD25 MFI	CD69 MFI	CD127 MFI	CD137 MFI
022	PBS コントロール	0	0	12856	571	223	651	296
022	PBS コントロール	0	0.01	13133	707	403	517	343
022	PBS コントロール	0	0.1	11394	1333	1694	158	529
022	CD8S366 (234)	1	0.01	11918	892	1005	369	376
022	CD8S366 (234)	0.01	0.01	13417	1068	848	384	399
022	CD8S368 (229)	1	0.01	11311	1147	1279	260	428
022	CD8S368 (229)	0.01	0.01	13441	760	599	499	348
022	CD8S367 (230)	1	0.01	13271	1135	1127	367	385
022	CD8S367 (230)	0.01	0.01	14521	960	636	483	362
022	CD8S370 (231)	1	0.01	15138	1103	890	407	378
022	CD8S370 (231)	0.01	0.01	14230	875	612	431	355
022	CD8S365 (232)	1	0.01	14395	1112	907	380	407
022	CD8S365 (232)	0.01	0.01	14006	1175	1063	297	430
022	CD8S369 (233)	1	0.01	13735	877	759	464	5457
022	CD8S369 (233)	0.01	0.01	13864	842	617	450	498
022	TenCon	1	0.01	14687	791	553	408	358
022	TenCon	0.01	0.01	13090	759	630	464	368

【0186】

10

20

30

40

50

【表 18】

B

ドナー	試料 (配列 番号)	抗-CD8A FN3濃縮 物 μ M	抗-CD3, μ g/mL	CD45RA MFI	CD25 MFI	CD69 MFI	CD127 MFI	CD137 MFI
146	PBS コント ロール	0	0	12856	571	223	651	296
146	PBS コント ロール	0	0.01	13133	707	403	517	343
146	PBS コント ロール	0	0.1	11394	1333	1694	158	529
146	CD8S366 (234)	1	0.01	6798	876	163	1095	632
146	CD8S366 (234)	0.01	0.01	8589	775	158	1077	637
146	CD8S368 (229)	1	0.01	6576	945	175	1105	662
146	CD8S368 (229)	0.01	0.01	7608	843	200	950	678
146	CD8S367 (230)	1	0.01	6447	897	173	1088	672
146	CD8S367 (230)	0.01	0.01	7899	801	175	1031	655
146	CD8S370 (231)	1	0.01	7327	992	169	1055	687
146	CD8S370 (231)	0.01	0.01	8676	790	183	946	675
146	CD8S365 (232)	1	0.01	6624	977	172	1059	670
146	CD8S365 (232)	0.01	0.01	7902	843	193	985	659
146	CD8S369 (233)	1	0.01	7660	933	165	1149	7114
146	CD8S369 (233)	0.01	0.01	7892	854	187	989	842
146	TenCon	1	0.01	8352	829	170	1026	658
146	TenCon	0.01	0.01	7627	761	185	1043	673

【0187】

サイトカイン応答

活性化マーカーで観察された変化のいずれかが、サイトカイン産生の変化をもたらすかどうかを決定するために、2つの抗CD8A FN3ドメインを用いて、抗原依存性T細胞活性化アッセイをも実施した。1セットのアッセイについて、CMV反応性、または、M1反応性のヒトPBMCのいずれかを解凍し、そして、6ウェルプレートで、37℃で、一晚静置した。翌日、PBMCをピペティングにより回収し、計数し、そして、10 μ g/mL ペプチドの存在下または非存在下で、IFN γ Mabtech ELISpot プレートにプレーティングした。1 μ Mの抗CD8A FN3-DFOコンジュゲートをウェルに添加し、そして、それらのプレートを、37℃で、約24時間、静置してインキュベートした。これらの細胞を除去し、そして、当該プレートを、PBSで5回洗浄した。供給を受けた検出抗体を添加し、そして、プレートを、2時間、インキュベートした。プレートを再度洗浄し、そして、キット基質を各ウェルに加えた。プレートを水に潜らせ

て反応を停止させる前に、プレートを、約5分間、展開した。プレートを、暗所で、一晚、逆さまにして乾燥させた。プレートを、AID EliSpot Readerで読み取り、そして、スポットカウントを、AID EliSpotソフトウェアを使用して生成した。結果を、Prismでグラフ化した。結果は、図1にまとめている。このアッセイでは、培地単独またはペプチドの非存在下での非CD8A結合TenConコントロールと比較して、365-DFOは、IFN γ スポットの個数を増加させない(図1A、1C)。ペプチド及びCD3を、ポジティブコントロールとして含む。ペプチドの存在下では、ペプチド単独または非CD8A結合TenConを有するペプチドと比較して、当該365-DFOは、IFN γ スポットの数を変化させない(図1B、1D)。培地を、ネガティブコントロールとして含む、そして、CD3を、ポジティブコントロールとして含む。これらの結果は、センチリンが、T細胞活性化に影響を及ぼさないことを示唆している。

【0188】

これらの結果を長期アッセイにおいて確認するために、IFN- γ レベルも、6日間の活性化アッセイにおいて測定した。この研究のために、CMV反応性PBMCを、0.25 μ g/mLのpp65ペプチドの存在下または非存在下で、1 μ Mで抗CD8A FN3ドメインと共に3連でインキュベートした。細胞を、37°Cで、6日間、インキュベートした。各時点で、細胞を遠心分離し、そして、上清を回収した。分析するまで、試料を、-80°Cで保存した。解凍した試料は、一重のMeso Scale Discovery (MSD)に基づくELISAを用いて、IFN- γ について分析をした。このアッセイのために、製造業者の説明書に従って標準曲線を作成した。試料及び標準を、プレコート96ウェルMSDプレートに添加した。2時間インキュベートした後、キット検出抗体を加えた。さらに2時間インキュベートした後、プレートを3回洗浄し、続いて、供給を受けた読取用緩衝液を添加した。プレートを、MSD Sector Imager 6000プレートリーダーで読み取った。生のMSDデータファイルを、MSD Discovery Workbenchソフトウェアを使用して作成した標準曲線に対して分析した。これらの分析データは、Tibco Spotfireプログラムを用いてグラフ化した。結果を、図2にまとめている。このアッセイにおいて、ペプチドが存在しない培地単独と比較して、365-DFOは、培地へのIFN γ の分泌を増加させない(図2A)。CMVペプチドを、ポジティブコントロールとして含む。ペプチドの存在下では、ペプチド単独と比較して、365-DFOは、IFN γ 分泌量も変化させない(図2B)。培地を、ネガティブコントロールとして含む。これらの結果は、センチリンが、T細胞活性化に影響を及ぼさないことを示唆している。

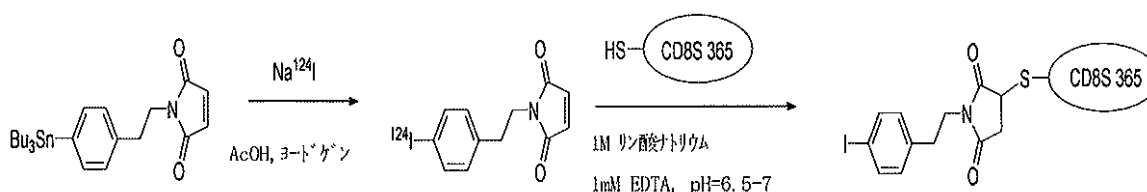
【0189】

実施例9：I124/I125を有する抗CD8A FN3ドメインの標識

CD8S365をヨウ素-124で放射標識して、[¹²⁴I]-IPEM CD8S365を製造する現在の方法(スキーム1)は、文献(Bioconjugate Chem. 1991, 2, 435-440; ChemistryOpen 2015, 4, 174-182)の手順に依拠した。

【0190】

【化1】



スキーム1：[¹²⁴I]-IPEM CD8S365の合成

【0191】

1. 5 mLのエッペンドルフ型バイアルに、Na¹²⁴I溶液 ($\leq 13 \mu\text{L}$ 、 $\leq 2.5 \text{ mCi}$)、AcOH (当該溶液を酸性化するための $5 \mu\text{L}$)、1-(4-(トリブチルスタニル)フェネチル)-1H-ピロール-2,5-ジオン ($75 \mu\text{L}$ 、MeCNに 1.00 mg/mL)、及び、ヨードゲン ($5 \mu\text{L}$ 、MeCNに 1.00 mg/mL) 溶液の順に加えた。反応を、室温で、5分間、放置した。

【0192】

粗反応混合物を、0.5 mLの20% EtOH/H₂Oで希釈し、そして、分取HPLCで直接に精製し、保持時間は、14.4分であった (図3)。この [¹²⁴I] -IPEMを、Sigma-Cote (商標) で前処理した (その後、3 mLの70% EtOH、続いて、3 mLのH₂Oですすいだ) 1ドラムのバイアルに回収し、分取HPLCから回収した総量は $< 750 \mu\text{L}$ であった。

【0193】

次いで、当該精製画分のアリコート (約5~25 μCi) を、分析HPLCに注入した (図4、保持時間=11.7分)。

【0194】

当該精製した [¹²⁴I] -IPEMを、次いで、周囲温度で、 $< 100 \mu\text{L}$ の体積にまで真空濃縮した。

【0195】

リン酸ナトリウム緩衝液 (1.0 Mリン酸ナトリウム、1 mM EDTA、pH=6.86) を加えて ($\geq 25 \mu\text{L}$)、pHを約6.5~7にした (検査紙で確認した)。最後に、新たに還元したCD8S 365 (100 mMリン酸ナトリウム緩衝液、1 mM EDTA、pH=6.86で、濃度約 4.57 mg/mL) を、適切な量で加えて、標的比活性を達成した (すなわち、 25 mCi/mg の標的比活性の場合には、 2.0 mCi の [¹²⁴I] -IPEMを回収し、そして、 $17.5 \mu\text{L}$ のセンチリンを、約 4.57 mg/mL の濃度で加えた)。コンジュケーション反応を、周囲温度で、60分間放置し、そして、反応の進行をチェックして、iTLCで、変換が90%を超えたことを確認した。

【0196】

精製は、反応溶液を、PBS/10% EtOH (1 mL、pH=7) で希釈して、当該反応溶液を、1ドラムバイアルからVivaspin 65 kDa MWCO遠心分離フィルターに移す (前処理については別表を参照されたい)、ことから構成されていた。移動後、当該反応エッペンドルフを、PBS/10% EtOH ($2 \times 1 \text{ mL}$ 、pH=7) ですすぎ、そして、洗液をフィルターに加えた。粗反応混合物を、 4000 rpm 、 20°C で、30分間、遠心分離した。遠心分離後は、 $< 500 \mu\text{L}$ の溶液が残存しており、放射TLCによって、 $> 95\%$ の放射化学的純度 (RCP) を有することが認められた (図5)。精製した [¹²⁴I] -IPEM CD8S 365を、 $500 \mu\text{L}$ 未満の体積であれば、 $500 \mu\text{L}$ の体積になるまでPBS/10% EtOHで希釈し、そして、Millex-GV 0.22 μm の親水性Durapore (PVDF) メンブランを通して濾過した。

【0197】

プロトコルからの放射化学的収率は、放射TLCによる放射化学的純度が $\geq 95\%$ のRCP) のものは、約50%である。分析逆相HPLCを用いて、タンパク質濃度、及び、最終生成物の比活性を決定した。 $\lambda = 280 \text{ nm}$ のUVにおける保持時間=7.3分のピークの平均積分を使用して、検量線からタンパク質濃度を推定した (代表例については図6)。非放射性冷却標準IPEM CD8S 365 (図7に示すMALDI分析) との同時注入も行った (図8を参照されたい)。細菌内毒素濃度は、LAL試薬水で10倍希釈したEndosafe (登録商標) ポータブル試験システムを使用して測定した。

【0198】

実施例10：カニクイザルにおけるCD8発現の検出

2つの抗CD8A FN3分子 (CD8S365、及び、CD8S368) を、非ヒト霊長類 (NHP) におけるPET画像化のために選択した。当該抗CD8A分子を、Zr-

10

20

30

40

50

89 (Zevacor, Somerset, NJ)、または、I-124 (CPDC, Hamilton, Canada、及び、Zevacor, Somerset, NJ)のいずれかで放射標識した。約1~2mCiの放射標識抗CD8A分子(複数可)を、イソフルランを含む酸素で麻酔をしながら、メスのNHP(カニクイザル)の伏在静脈に注射した。各々の動物を、ベッドを動かして動物の全身を(頭から下腹部まで)収容して、大口径microPET Focus 220 PETスキャナー(Siemens, Knoxville, TN)でスキャンした。各スキャンは、約1時間続き、そして、これらの画像は、注射の15分後、2時間後、及び、24時間後に得た。PET画像は、2D最大尤度予測最大化(ML-EM)アルゴリズムを使用して、ボクセルサイズ1.898×1.898×0.796mm、寸法128×128×475の3D画像に再構成した。注射とは反対側の脚の伏在静脈から複数の時点で血液試料を採取し、そして、血中放射能をウェルカウンターで計数した。

【0199】

PET画像を、PMOD v3.7ソフトウェア(PMOD, Zurich, Switzerland)を用いて分析した。関心領域は、脾臓、腎臓、肝臓などの臓器の周囲に手書きで描写した。総数を、組織1グラム当たりのパーセント注射用量の単位(%ID/g)に変換する一方で、血中放射能を、%IDとして表した。代表的なPET画像を、図9に示す。

【0200】

各NHP、及び、各抗CD8A FN3ドメイン分子(Zr-89またはI-124のいずれかで標識したもの)の血中動態を表11に示し、また、図10にまとめている。同じ動物、及び、抗CD8A分子について、臓器での生体内分布を、表12に示しており(単位は、%ID/gである)、そして、図11にまとめている。Zr-89で標識した分子は、排泄器官において放射性同位体の残留を示しており、このことは、腎臓において大きなバックグラウンドシグナルを引き起こしてしまい、その他の近くの組織を潜在的に覆い隠してしまった。このことは、I-124で標識した分子では、ほとんど認められなかった。脾臓の取り込みは、すべての時点において、2つの異なる分子と2つの異なる放射性同位体との間で、非常に類似していた。

【0201】

【表19】

表11. Zr-89またはI-124のいずれかで放射標識した各センチリンの血中動態(入力値は、%IDである)。

時間 (時間)	365 Zr- 89	時間 (時間)	368 Zr- 89	時間 (時間)	365 I- 124	時間 (時間)	368 I- 124
0.38	32.49	0.25	75.64	0.40	73.53	0.33	50.56
0.62	17.62	0.50	44.01	0.65	44.59	0.57	37.07
1.18	9.03	0.75	32.06	0.92	29.79	0.87	19.33
2.00	6.12	1.00	24.20	1.13	24.51	1.17	16.01
3.70	3.77	1.50	18.82	2.00	17.14	1.37	12.84
24.00	1.36	2.00	14.22	3.33	10.92	2.07	12.18
		3.33	8.40			3.88	8.20
		24.00	1.94			23.03	1.24

【0202】

同じ動物、及び、抗CD8A分子について、器官の生体内分布を表12に示しており(単位は、%ID/gである)、そして、図11にまとめている。

【0203】

【表20】

表12. Zr-89またはI-124のいずれかで標識した、異なるセンチリンの臓器取り込み（入力値は、%ID/gである）。

365 Zr-89			
時間（時間）	腎臓	脾臓	肝臓
0.25時間	0.641	0.0386	0.0620
2時間	0.624	0.0218	0.0513
24時間	0.633	0.0136	0.0354

10

368 Zr-89			
時間（時間）	腎臓	脾臓	肝臓
0.25時間	0.575	0.0345	0.0740
2時間	0.664	0.0307	0.0688
24時間	0.931	0.0294	0.0508

20

365 I-124			
時間（時間）	腎臓	脾臓	肝臓
0.25時間	0.104	0.0324	0.0291
2時間	0.065	0.0222	0.0142
24時間	技術的問題が故に回収していない		

368 I-124			
時間（時間）	腎臓	脾臓	肝臓
0.25時間	0.292	0.0357	0.0439
2時間	0.140	0.0271	0.0241
24時間	0.0089	0.0022	0.0029

30

【0204】

実施例11：カニクイザルにおける抗CD8A FN3ドメインの特異性

抗CD8A分子の特異性を試験するために、同カニクイザルを、キメラCD8枯渇抗体（CM-T807マウスV／ヒトFc抗CD8抗体）で処理して、画像化する前にCD8＋T細胞を減少させた。画像化する3日前に、10mg/kgのCD8枯渇抗体を、動物の皮下に投与した。枯渇の前後に、各動物から採取した血液試料に含まれるCD8＋T細胞のパーセンテージを測定することで、CD8枯渇を確認した（図12）。

40

【0205】

イソフルランを含む酸素で麻酔しながら、放射標識した[I-124]CD8S365抗CD8 FN3ドメイン分子の約1～2mCiを、メスのNHP（カニクイザル）の伏在静脈に注射した。各々の動物を、ベッドを動かして動物の全身を（頭から下腹部まで）収容して、大口径microPET Focus 220 PETスキャナー（Siemens, Knoxville, TN）でスキャンした。各スキャンは、約1時間続き、そして、これらの画像は、注射の15分後、2時間後、及び、24時間後に得た。PET画像は、2D最大尤度予測最大化（MLEM）アルゴリズムを使用して、ボクセルサイズ1.

50

898×1.898×0.796mm、寸法128×128×475の3D画像に再構成した。注射とは反対側の脚の伏在静脈から複数の時点で血液試料を採取し、そして、血中放射能をウェルカウンターで計数した。

【0206】

PET画像を、PMOD v3.7ソフトウェア(PMOD, Zurich, Switzerland)を用いて分析した。関心領域は、脾臓、腎臓、肝臓などの臓器の周囲に手書きで描写した。総数を、組織1グラム当たりのパーセント注射用量の単位(%ID/g)に変換する一方で、血中放射能を、%IDとして表した。代表的なPET画像を、枯渴動物について図13に示しており、このものは、図9の非枯渴動物に認められる脾臓シグナルの完全な欠如を示している。

10

【0207】

枯渴時と非枯渴時の各NHPの血中動態を図14に示しており、また、臓器の取り込みを図15に示している。枯渴動物と非枯渴動物との間での血中動態には、ほとんど差異が認められない。最も早い時点での脾臓の取り込みは、血流が支配的であるが故に、枯渴状態と非枯渴状態とでは類似している。しかしながら、遅い時点(2時間)では、枯渴動物における脾臓の取り込みは、非枯渴動物にて認められる取り込みの半分にも達しておらず、そして、本質的にバックグラウンドレベルであり、放射標識したセンチリンのCD8A特異性を実証している。

【0208】

実施例12：CD8過剰発現腫瘍におけるPET画像の感度及び特異性

20

抗CD8A FN3ドメイン分子、及び、PETを用いて検出可能な細胞の最小数を決定するために、異なる数のCD8過剰発現細胞を用いて、マウスで試験を実施した。4～5週齢のメスのNOD-scid IL2rynuLL(NSG)マウス(JAX Laboratory)を使用し、そして、7～10日間、順応させた。これらのマウスを、12時間の明暗周期(06:30の時間に点灯)の下、温度19～22℃で、IVCケージに収容した。マウスには、標準的なオートクレーブ処理をした実験用固形飼料と水を自由に与えた。マウスに耳タグを付け、そして、試験開始の5～7日前に尾に入れ墨を入れて、各動物を識別した。

【0209】

HEK-293親細胞株、及び、HEK-293-Luc CD8+過剰発現細胞株を、2D培養として維持した。HEK-293-Luc CD8+発現細胞と、HEK-293親細胞とを様々な比率で含有し、培地とカルテックスとが1:1であり、合計で106個の腫瘍細胞を含む混合物を、マウスの皮下に移植した。腫瘍が触知可能になり、約10～14日で、200～300mm³の大きさになれば、[E-124]CD8-S365を使用して、ヒトCD8+細胞を視覚化した。

30

【0210】

HEK-293-Luc CD8+細胞のルシフェラーゼ発現は、IVIS Spectrum光学イメージャー(Perkin Elmer)での生物発光画像を使用して、インビボで、定量化した。ピーク発光を同定するために、150mg/kgのD-ルシフェリンを注射した直後に、動的光学画像を行った。

40

【0211】

イソフルランを含む酸素で麻酔しながら、約0.2～0.5mCiの放射標識抗CD8A FN3ドメイン分子を尾静脈に注射した。各々の動物を、Inveon microPET-CTスキャナー(Siemens, Knoxville, TN)で、20分間、静的スキャンした。これらの画像は、トレーサー注射の2～3時間後に得た。PET画像は、2D最大尤度予測最大化(ML-EM)アルゴリズムを使用して、ボクセルサイズ0.776×0.776×0.796mm、寸法128×128×159の3D画像に再構成した。

【0212】

PET画像を、PMOD v3.7ソフトウェア(PMOD, Zurich, Switz

50

erland) を用いて分析した。関心領域は、腫瘍、及び、その他の臓器、脾臓、腎臓、肝臓などの臓器の周囲に手書きで描写した。総数を、組織1グラム当たりのパーセント注射用量の単位(%ID/g)に変換した。代表的なPET画像を、図16に示す。ルシフェラーゼ発現は、Living Image v4.4ソフトウェア(Perkin Elmer)において関心領域を描画して定量化した。発光は、光子/秒/cm²/ステラジアン単位で測定した。

【0213】

CD8+ HEK293細胞、及び、親細胞の双方についての血液、及び、腫瘍での放射標識した抗CD8A FN3ドメイン分子の時間-活性曲線を、図17及び図18に示す。親と比較して、CD8発現細胞における抗CD8A FN3結合の有意な増加が認められており、一方で、血液活性は、双方において同じである。CD8+ HEK293細胞による抗CD8A FN3の取り込みを、移植細胞の数に応じて、図19に示す。これらのデータに基づいて、最低レベルの検出は、約 7.5×10^6 個の細胞であると推定される。

【0214】

配列表

配列番号1=当初のTencn配列

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEK
VGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVKGGHRS
NPLSAEFTT

【0215】

配列番号2=TCL1ライブラリー

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEK
VGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGV(X)7-1
2PLSAEFTT;

配列中、

X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇は、あらゆるアミノ酸であり、及び、X₈、X₉、X₁₀、X₁₁、及び、X₁₂は、あらゆるアミノ酸であるか、または、削除されている。

【0216】

配列番号3=TCL2ライブラリー

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈SFL
IQYQESEK VGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIY
GVX₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃SX₁₄X₁₅LSAEFTT;

配列中、

X₁は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valであり、

X₂は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valであり、

X₃、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Val、

X₄は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valであり、

X₅は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valであり、

X₆は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、

Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valであり、

X₇は、Phe、Ile、Leu、Val、または、Tyrであり、

X₈は、Asp、Glu、または、Thrであり、

X₉は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valであり、

X₁₀は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valであり、

X₁₁は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valであり、

X₁₂は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valであり、

X₁₃は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valであり、

X₁₄は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valであり、及び

X₁₅は、Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、または、Valである。

【0217】

配列番号4＝安定化したTencon (Tencon 27)

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFLIQYQESEK
VGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVKGGHRS
NPLSAIFTT

【0218】

配列番号5＝TCL7 (FG及びBCループ)

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉F
DSFLIQYQESEK VGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYT
VSIYGVX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉SNPL
SAIFTT;

配列中、

X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、及び、X₁₆は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、W、または、Yであり、及び

X₇、X₈、X₉、X₁₇、X₁₈、及び、X₁₉は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、W、Yであり、または、削除されている。

【0219】

配列番号6＝TCL9 (FGループ)

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFLIQYQESEK
VGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVS IYGVX₁X₂X₃
X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂SNPLSAIFTT;

配列中、

X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、及び、X₇は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、W、または、Yであり、及び

X₈、X₉、X₁₀、X₁₁、及び、X₁₂は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、W、Yであり、または、削除されている。

【0220】

配列番号7=TCL14ライブラリー

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁IX₂YX₃E
X₄X₅X₆X₇GEAIVLTVPGSERSYDLTGKPGTEYX₈VX₉I
X₁₀GVKGGX₁₁X₁₂SX₁₃PLSAIFTT;

配列中、

X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₁₀、X₁₁、X₁₂、及び、X₁₃は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、W、Y、または、Mである。

10

【0221】

配列番号8=TCL24ライブラリー

TCL24ライブラリー (配列番号8)

LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁IX₂YX₃E
X₄X₅X₆X₇GEAIX₈LX₉VPGSERSYDLTGKPGTEYX₁₀V
X₁₁IX₁₂GVKGGX₁₃X₁₄SX₁₅PLX₁₆AX₁₇FTT;

配列中、

X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₁₀、X₁₁、X₁₂、及び、X₁₃は、A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、V、または、Wである。

20

【0222】

配列番号9=Sloning-FOR

GTGACACGGCGGTTAGAAC

【0223】

配列番号10=Sloning-REV

GCCTTTGGGAAGCTTCTAAG

【0224】

配列番号11=POP2250

CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATAC

【0225】

配列番号12=DigLigRev

CATGATTACGCCAAGCTCAGAA

【0226】

配列番号13=BC9

GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAA
CCCCATCCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAA
TGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAA
CAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGT
TTCTGAAGTTACCGAAGACTCTCTGCGTCTGTCTTGGNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTYGACTCTTTCCTGA
TCCAGTACCAGGAATCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCAA
CCTGACCGTTCCGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACC
GGTCTGAAACCGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACG
GTGTTCTTAGAAGCTTCCCAAAGGC

40

【0227】

配列番号14=BC8

GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAA
CCCCATCCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAA
TGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAA
CAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGT

50

TTCTGAAGTTACCGAAGACTCTCTGCGTCTGTCTTGGNNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTYGACTCTTTCCTGATCC
 AGTACCAGGAATCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCAACCT
 GACCGTTCCGGGTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGT
 CTGAAACCGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTG
 TTCTTAGAAGCTTCCCAAAGGC

【0228】

配列番号15=BC7

GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAA
 CCCCATCCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAA
 TGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAA
 CAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGT
 TTCTGAAGTTACCGAAGACTCTCTGCGTCTGTCTTGGNNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTYGACTCTTTCCTGATCCAGT
 ACCAGGAATCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCAACCTGAC
 CGTTCCGGGTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTCTG
 AAACCGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTTT
 TTAGAAGCTTCCCAAAGGC

10

【0229】

配列番号16=BC6

GTGACACGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAA
 CCCCATCCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAA
 TGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAA
 CAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGT
 TTCTGAAGTTACCGAAGACTCTCTGCGTCTGTCTTGGNNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNTTYGACTCTTTCCTGATCCAGTACC
 AGGAATCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCAACCTGACCGT
 TCCGGGTCTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTCTGAAA
 CCGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTTCTTA
 GAAGCTTCCCAAAGGC

20

【0230】

配列番号17=130mer-L17A

CGGCGGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCCCAT
 CCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTG
 GAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGGAT
 CTACCATGCTG

30

【0231】

配列番号18=POP222ext

CGG CGG TTA GAA CGC GGC TAC AAT TAA TAC

【0232】

配列番号19=LS1114

CCA AGA CAG ACG GGC AGA GTC TTC GGT AAC GCG
 AGA AAC AAC CAG GTT TTT CGG CGC CGG CAG CAT
 GGT AGA TCC TGT TTC

40

【0233】

配列番号20=LS1115

CCG AAG ACT CTG CCC GTC TGT CTT GG

【0234】

配列番号21=LS1117

CAG TGG TCT CAC GGA TTC CTG GTA CTG GAT CAG

50

G A A A G A G T C G A A

【0235】

配列番号22=SDG10

C A T G C G G T C T C T T C C G A A A A G T T G G T G A A G C G A T C G T C C
T G A C C G T T C C G G G T

【0236】

配列番号23=SDG24

G G T G G T G A A G A T C G C A G A C A G C G G G T T A G

【0237】

配列番号24=POP2222

C G G C G G T T A G A A C G C G G C T A C

【0238】

配列番号25=SDG28

A A G A T C A G T T G C G G C C G C T A G A C T A G A A C C G C T G C C A C C G
C C G G T G G T G A A G A T C G C A G A C

【0239】

配列番号26=FG12

G T G A C A C G G C G G T T A G A A C G C G G C T A C A A T T A A T A C A T A A
C C C C A T C C C C C T G T T G A C A A T T A A T C A T C G G C T C G T A T A A
T G T G T G G A A T T G T G A G C G G A T A A C A A T T T C A C A C A G G A A A
C A G G A T C T A C C A T G C T G C C G G C G C C G A A A A A C C T G G T T G T
T T C T C G C G T T A C C G A A G A C T C T G C G C G T C T G T C T T G G A C C
G C G C C G G A C G C G G C G T T C G A C T C T T T C C T G A T C C A G T A C C
A G G A A T C T G A A A A A G T T G G T G A A G C G A T C G T G C T G A C C G T
T C C G G G T T C T G A A C G T T C T T A C G A C C T G A C C G G T C T G A A A
C C G G G T A C C G A A T A C A C C G T T T C T A T C T A C G G T G T T N N N N
N T C T A A C C C
G C T G T C T G C G A T C T T C A C C A C C G G C G G T C A C C A T C A C C A T
C A C C A T G G C A G C G G T T C T A G T C T A G C G G C C G C A A C T G A T C
T T G G C

【0240】

配列番号27=FG11

G T G A C A C G G C G G T T A G A A C G C G G C T A C A A T T A A T A C A T A A
C C C C A T C C C C C T G T T G A C A A T T A A T C A T C G G C T C G T A T A A
T G T G T G G A A T T G T G A G C G G A T A A C A A T T T C A C A C A G G A A A
C A G G A T C T A C C A T G C T G C C G G C G C C G A A A A A C C T G G T T G T
T T C T C G C G T T A C C G A A G A C T C T G C G C G T C T G T C T T G G A C C
G C G C C G G A C G C G G C G T T C G A C T C T T T C C T G A T C C A G T A C C
A G G A A T C T G A A A A A G T T G G T G A A G C G A T C G T G C T G A C C G T
T C C G G G T T C T G A A C G T T C T T A C G A C C T G A C C G G T C T G A A A
C C G G G T A C C G A A T A C A C C G T T T C T A T C T A C G G T G T T N N N N
N T C T A A C C C G C T
G T C T G C G A T C T T C A C C A C C G G C G G T C A C C A T C A C C A T C A C
C A T G G C A G C G G T T C T A G T C T A G C G G C C G C A A C T G A T C T T G
G C

【0241】

配列番号28=FG10

G T G A C A C G G C G G T T A G A A C G C G G C T A C A A T T A A T A C A T A A
C C C C A T C C C C C T G T T G A C A A T T A A T C A T C G G C T C G T A T A A
T G T G T G G A A T T G T G A G C G G A T A A C A A T T T C A C A C A G G A A A

CAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGT
TTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCGTCTGTCTTGGACC
GCGCCGGACGCGGCGTTTCGACTCTTTCTGATCCAGTACC
AGGAATCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGT
TCCGGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTCTGAAA
CCGGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTTNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTCTAACCCGCTGTCTC
TGCGATCTTCAACCACCGGCGGTCACCATCACCATCACCAT
GGCAGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCGCAACTGATCTTGGC
【0242】

10

配列番号 29 = FG9

GTGACACGGCGGGTTAGAACGCGGGCTACAATTAAATACATAA
CCCCATCCCCCTGTTGACAATTAAATCATCGGCTCGTATAA
TGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAA
CAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGT
TTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCGTCTGTCTTGGACC
GCGCCGGACGCGGCGTTTCGACTCTTTCTGATCCAGTACC
AGGAATCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGT
TCCGGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTCTGAAA
CCGGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTTNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTCTAACCCGCTGTCTGC
GATCTTCAACCACCGGCGGTCACCATCACCATCACCATGGC
AGCGGTTCTAGTCTAGCGGCCGCAACTGATCTTGGC
【0243】

20

配列番号 30 = FG8

GTGACACGGCGGGTTAGAACGCGGGCTACAATTAAATACATAA
CCCCATCCCCCTGTTGACAATTAAATCATCGGCTCGTATAA
TGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAA
CAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGT
TTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCGTCTGTCTTGGACC
GCGCCGGACGCGGCGTTTCGACTCTTTCTGATCCAGTACC
AGGAATCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGT
TCCGGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTCTGAAA
CCGGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTTNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTCTAACCCGCTGTCTGCGAT
CTTCAACCACCGGCGGTCACCATCACCATCACCATGGCAGC
GGTTCTAGTCTAGCGGCCGCAACTGATCTTGGC
【0244】

30

配列番号 31 = FG7

GTGACACGGCGGGTTAGAACGCGGGCTACAATTAAATACATAA
CCCCATCCCCCTGTTGACAATTAAATCATCGGCTCGTATAA
TGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAA
CAGGATCTACCATGCTGCCGGCGCCGAAAAACCTGGTTGT
TTCTCGCGTTACCGAAGACTCTGCGCGTCTGTCTTGGACC
GCGCCGGACGCGGCGTTTCGACTCTTTCTGATCCAGTACC
AGGAATCTGAAAAAGTTGGTGAAGCGATCGTGCTGACCGT
TCCGGGGTTCTGAACGTTCTTACGACCTGACCGGTCTGAAA
CCGGGGTACCGAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTTNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTCTAACCCGCTGTCTGCGATCTT
CACCAACCGGCGGTCACCATCACCATCACCATGGCAGCGGT

40

50

TCTAGTCTAGCGGCCGCAACTGATCTTGGC

【0245】

配列番号32 TenconのFGループ

KGGHRSN

【0246】

配列番号33=Tcon 6

AAGAAGGAGAACCGGTATGCTGCCGGCGCCGAAAAAC

【0247】

配列番号34=Tcon5E86Ishort

GAG CCG CCG CCA CCG GTT TAA TGG TGA TGG TGA
TGG TGA CCA CCG GTG GTG AAG ATC GCA GAC AG

【0248】

>配列番号35 CD8W7

SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPR
GAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLT
LSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTP
APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAGSGSGSDYKDDDDK
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0249】

>配列番号36 CD8W13

SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPR
GAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLT
LSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTP
APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC
DGGGGSDYKDDDDKGGGGSHHHHHHDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

【0250】

>配列番号37 mIgGKシグナルペプチド

Metdtllllwvlllwvpgstg

【0251】

>配列番号38 ヒトFc

DkthtcppcpapeLLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0252】

>配列番号39 リンカー配列

Ggggsdykdddkgggshhhhhh

10

20

30

40

50

【 0 2 5 3 】

【表 2 1】

クローンの 識別表示	配列 番号	アミノ酸配列
P282AR9P1356_A10	40	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWHTATNSFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVYNPTGRPVSSNPL SAIFTT
P282AR9P1356_A4	41	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVKRPNSFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVYEGRPVWSNPLS AIFTT
P282AR9P1356_A6	42	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWSKTDSSFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVYIEGNPVFSNPLS AIFTT
P282AR9P1356_B9	43	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPEGDRPFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVKWEGNRPVASNPL SAIFTT
P282AR9P1356_D3	44	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTRHETSFDSFLIQYRESEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVYDAAGNPKYSNPL SAIFTT
P282AR9P1356_H1	45	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWIPNSSFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVDFPVGFPSHSNPL SAIFTT
P282AR9P1356_H6	46	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWRKRANSFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVYDQHGPRVWSNPL SAIFTT
P282BR9P1357_A9	47	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKANRTDLHFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVYDGGQPLYSN PLSAIFTT
P282BR9P1357_B2	48	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWNPSDPQRFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVKWEGNRPVASN LSAIFTT
P282BR9P1357_C10	49	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWWSNDNRPIFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVKWEGNRPVASN LSAIFTT
P282BR9P1357_C4	50	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPFVSNKPHFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVKWEGNRPVASN PLSAIFTT
P282BR9P1357_D12	51	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWGQYITAFSFSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVAFQGGKPTWSNP LSAIFTT
P282BR9P1357_D2	52	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWIKDGHPRHFSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVYDRGQLISSNP LSAIFTT
P282BR9P1357_E5	53	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWWPRYQRPFSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDIEWIGNRPIASN LSAIFTT
P282BR9P1357_G9	54	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPIASQIHSPFSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVKYDIDSRP ISSNPLSAIFTT
P282BR9P1357_H3	55	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKKREYQDPGFSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVDDVKWEGNRPVASN PLSAIFTT

【 0 2 5 4 】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

P282CR9P1358_C2	56	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIAYPEWPSNGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVFIWGVKGGAFSNPLSAIFTT
P282CR9P1358_C5	57	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIAYPEWPPDSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVFIWGVKGGPLSHPLSAIFTT
P282CR9P1358_D10	58	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLISYPEYPPPGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVFIWGVKGGTDSWPLSAIFTT
P282CR9P1358_F11	59	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIAYPEWPIFEGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVFIWGVKGGEQSSPLSAIFTT
P282CR9P1358_F5	60	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWISYPEWPPDGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVFIWGVKGGETSAPLSAIFTT
P282DR9P1359_A12	61	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPEAAFDSEFIAYPEWPPPREAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVFIWGVKGGESISWPLSAIFTT
P282DR9P1359_A7	62	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFRIGYPELEKLGGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVFIWGVKGGENSWPLSAIFT T
P282DR9P1359_A8	63	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFRIAYPEWPVQGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVFIWGVKGGELSPPLSAIFTT
P282DR9P1359_B2	64	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIAYTEWPIPYEEA GQEGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVSIWGVKGGPNSQL SAIFTT
P282DR9P1359_C10	65	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIVYPEWPTDGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVFIWGVKGGNQSWPLSAIFTT
P282DR9P1359_C11	66	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIAYPEFPPPGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVFIWGVKGGTDSWPLSAIFTT
P282DR9P1359_C12	67	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYISYPEWPPVGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVFIWGVKGGALSVPLSAIFTT
P282DR9P1359_C5	68	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWITYPEWPPDGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVFIWGVKGGELISPLSAIFTT
P282DR9P1359_D12	69	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFRIAYPETATWGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVFIWGVKGGFESAPLSAIFTT
P282DR9P1359_E11	70	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYISYPEWPPVGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVFIWGVKGGAI STPLSAIFTT
P282DR9P1359_E2	71	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIFYPEIVTWGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVNIWGVKGGDNSWPLSAIFTT
P282DR9P1359_E3	72	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIAYPELPLGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVFIWGVKGGVESFPLSAIFTT
P282DR9P1359_E5	73	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAISYPEWPPVGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVFIWGVKGGLYSAPLSAIFTT
P282DR9P1359_E6	74	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIAYPEWPPVQGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVFIWGVKGGTPSWPLSAIFTT
P282DR9P1359_E8	75	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFQIAYPEWPPVIGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVFIWGVKGGYTSWPLSAIFTT
P282DR9P1359_F11	76	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIFYPELPIHGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVNITGVKGGDFSWPLSAIFTT
P282DR9P1359_F2	77	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAYPEALHPGYGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVFIWGVKGGQKSWPLSAIFT TGGHHHDHH
P282DR9P1359_F3	78	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYITYPEWPPVQGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVFIWGVKGGTESEPLSAIFTT
P282DR9P1359_F5	79	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFQIAYPEWPPPGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVFIWGVKGGVESWPLSAIFTT
P282DR9P1359_F6	80	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIAYPEWPTTGEAI

10

20

30

40

【0 2 5 5】

【表 2 3】

		VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIWGVKGGDHSAPLSAIFTT
P282DR9P1359_F7	81	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIAYPEWPPQGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGVKGGSYAPLSAIFTT
P282DR9P1359_G4	82	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFEIAYPEWPPQGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIQGVKGGDPSFPLSAIFTTG GNHHHHH
P282DR9P1359_G7	83	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAITYIEKEHIEDGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWPIWGVKGGANSWPLSAIFT T
P282DR9P1359_H5	84	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAYPEALHPGYGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGVKGGTNSEPLSAIFT T
P282ER9P1360_A9	85	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGILYYEPVDSGEAI TLPVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWVITGVKGGAPSTPLGAIFTT
P282ER9P1360_C1	86	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGILYYEPVDSGEAI TLPVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWVITGVKGGAPSTPLGAIFTT
P282ER9P1360_C4	87	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGITYYEPNHGGEAI SLSVPGSERSYDPTGLKPGTEYVWVITGVKGGAPSTPLGAIFTT
P282ER9P1360_C6	88	LSAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGILYYEPVDSGEAI TLPVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWVITGVKGGAPSTPLGAIFTT
P282ER9P1360_C8	89	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGILYYEPVDSGEAI TLPVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWVITGVKGGAPSTPLGTIFTT
P282ER9P1360_D11	90	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGILYYEPVDSGEAI TLPVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIWGVKGGYPSIPLGAFTT
P282ER9P1360_E4	91	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGILYYEPVDSGEAI TLPVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWVITGVKGGAPSTPLGAIFTT
P282ER9P1360_F11	92	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFSIAYVEAELVGEAI QLVVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWVILGVKGGNPSNPLGASFTT
P282ER9P1360_G10	93	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIYVVEQHPFGEAI PLFVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVGIRGVKGGNFSTPLIAHFTT
P282ER9P1360_G7	94	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGILYYEPVDSGEAI TLPVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWVITGVKGGAPSTPLGAILTT
P282ER9P1360_H10	95	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFEIYYPEWPFAGEAI GLPVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGVKGGELSEPLTAQFTT
P282ER9P1360_H2	96	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFSIAYVEAELVGEAI QLVVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWVILGVKGGNPSNPLGASFTTT
P282ER9P1360_H3	97	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFSIAYVEAELVGEAI QLVVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWVILGVKGGNPSNPLGASFTT
P282FR9P1361_A3	98	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIYAEYGYPGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVAIWGVKGGNRSYPLSAIFTT
P282FR9P1361_A5	99	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGILYYEPVDSGEAI TLPVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWVITGVKGGAPSTPLGAIFTT
P282FR9P1361_C7	100	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIYHYEGGDGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVAIWGVKGGDVSYPPLSAIFTT
P282FR9P1361_D3	101	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIYAEYGYPGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLNPGTEYDVAISGVKGGPRSYPLSAIFTT
P282FR9P1361_E12	102	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSLITYWESPYAGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYGVFILGVKGGYPSAPLSAIFTT
P282FR9P1361_F1	103	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIYAEYGYSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVAIWGVKGGVRSYPLSAIFTT
P282FR9P1361_F11	104	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIYREYGGSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVAIWGVKGGVRSYPLSAIFTT

10

20

30

40

【0 2 5 6】

【表 2 4】

P282FR9P1361_F2	105	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDIWIYAEGYPGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVAISGKGGPRSYPLSAIFTT
P282FR9P1361_F3	106	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDIWIYAEGYPGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVAISGAKGGPRSYPLSAIFTT
P282FR9P1361_F7	107	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIWYREYATGEAIV LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVVITGVKGGYPSYPLSAIFTT
P282FR9P1361_G9	108	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPGITYWESPYAGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYGVFILGVKGGYPSAPLSAIFTT
P282FR9P1361_H4	109	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIWIYAEGYSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVAIYGVKGGSPSYPLSAIFTT
P282FR9P1361_H5	110	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDIWIYAEGYPGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVAISGVKGGPRSYPLSAIFTT
P283AR9P1362_A3	111	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKRIDSPFDSFLIQYQSEKVGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVGVKYDIDSRPISSNPL SAIFTT
P283AR9P1362_A4	112	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWIGHDSGFDSPFIQYQSEKVGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVGVKYDIDSRPISSNPL SAIFTT
P283AR9P1362_B10	113	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWKRRWDSFDSFLIQYQSEKVGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVGVWVFNGLPHHSNPLS AIFTT
P283AR9P1362_B2	114	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAKHPNSFDSFLIQYQSEKVGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVGVVNNLNNPLFSNPL SAIFTT
P283AR9P1362_B8	115	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWWTSPLPFDSFLIQYQSEKVGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVGVKYDIDSRPISSNPL SAIFTT
P283AR9P1362_C12	116	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAKNLHSFDSFLIQYQSEKVGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVGVKYDIDSRPISSNPL SAIFTT
P283AR9P1362_C6	117	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYPSDPPFDSFLIQYQSEKVGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVPNYHSRRSYYSNPLS AIFTT
P283AR9P1362_C7	118	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVKRATSFDSFLIQYQSEKVGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVGVRYNEGQPIWSNPLS AIFTT
P283AR9P1362_D2	119	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQRPKSGFFDSFLIQYQSEKVGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVGVKYDIDSRPISSNP LSAIFTT
P283AR9P1362_D3	120	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPVESNAFDSFLIQYQSEKVGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVGVVEYDQHGRPRWSNPL SAIFTT
P283AR9P1362_D4	121	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVREHDSFDSFLIQYQSEKVGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVGVKYDIDSRPISSNPL SAIFTT
P283AR9P1362_D6	122	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAKRPGAFDSFLIQYQSEKVGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVGVKYDIDSRPISSNPL SAIFTT
P283AR9P1362_D7	123	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVKRATSFDSFLIQYQSEKVGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVGVKYDIDSRPISSNPL SAIFTT
P283AR9P1362_E9	124	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVSPWGFDSFLIQYQSEKVGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVGVKYDIDSRPISSNPL

【 0 2 5 7 】

10

20

30

40

【表 2 5】

		SAIFTT
P283AR9P1362_F12	125	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWARNITSFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKYDIDSRP ISSNPL SAIFTT
P283AR9P1362_F2	126	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWRKKDHPFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKYDIDSRP ISSNPL SAIFTT
P283AR9P1362_F8	127	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWGYHGHFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKWE GNRPVASNPLS AIFTT
P283AR9P1362_G11	128	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWRKEATSFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKYDIDSRP ISSNPL SAIFTT
P283AR9P1362_G3	129	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVKRATSFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKWE GNRPVASNPLS AIFTT
P283AR9P1362_H11	130	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPKIQGHFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKYDIDSRP ISSNP LSAIFTT
P283BR9P1363_A10	131	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQRADDILPYFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKYDIDSRP ISSNPLSAIFTT
P283BR9P1363_A8	132	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWVRSDTARFFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKYDIDSRP ISSNPLSAIFTT
P283BR9P1363_B2	133	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWASTVDPHPRFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKYDIDSRP ISSNPLSAIFTT
P283BR9P1363_B6	134	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQRHSDAHLFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKWE GNRPVASNPLSAIFTT
P283BR9P1363_C4	135	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPIVNTPLHFD SFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVQYTATGQPERSNPLSAIFTT
P283BR9P1363_C8	136	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAKTSDLHPLFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKWE GNRPVASNPLSAIFTT
P283BR9P1363_D11	137	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWNKKHDCQPTFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVVYEGSY PASSNPLSAIFTT
P283BR9P1363_E4	138	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWIKSETSQPAFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKWE GNRPVASNPLSAIFTT
P283BR9P1363_E6	139	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYARKFISPFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKWE GNRPVASNPLSAIFTT
P283BR9P1363_F2	140	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYRPDNRAGAFDSFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKYDIDSRP ISSNPLSAIFTT
P283BR9P1363_F4	141	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWERIVQTPHFD SFLIQYQSEKVG EAI VLTVPGSESYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKWEGNRPVASNPLSAIFTT

10

20

30

40

【 0 2 5 8】

【表 2 6】

P283BR9P1363_F6	142	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPPEAVTATSFDSFLIQYQSESEKVG EAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKWE GNRPVASN PLSAIFTT
P283BR9P1363_G2	143	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWPKNQTNRHFD SFLIQYQSESEKVG AIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKWE GNRPVASN LSAIFTT
P283BR9P1363_G5	144	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWYRATTPAPHFDSFLIQYQSESEKVG EAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKWE GNRPVASN PLSAIFTT
P283BR9P1363_G7	145	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWSAKKFPRHFD SFLIQYQSESEKVG AIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGV DVKWE GNRPVASN LSAIFTT
P283DR9P1364_A4	146	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYPEWVPVQGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFV I IYGVKGGDWSEPLSAIFTT
P283DR9P1364_A7	147	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFRIAYPEWVPVRGDAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYWV I IQGVKGGTDSFPLSAIFTT
P283DR9P1364_B1	148	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYITYPEIPLGGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFV I IYGVKGGLLSSPLSAIFTT
P283DR9P1364_B11	149	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYISYPEWEQLGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFV I IYGVKGGALSAPLSAIFTT
P283DR9P1364_B4	150	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAISYPEWPPPGGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYWV I IYGVKGGDQSWPLSAIFTT
P283DR9P1364_C10	151	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFQIAYPEWPKDGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYAVFIWGVKGGVYSNPLSAIFTT
P283DR9P1364_D11	152	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIAYPEWPPKGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFV I IYGVKGGIHSAPLSAIFTT
P283DR9P1364_D8	153	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFQIAYPETPIQGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFV I IHGVKGGITSFPLSAIFTT
P283DR9P1364_D9	154	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGISYPEWPLGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYWV I IFGVKGGERSWPLSAIFTT
P283DR9P1364_E3	155	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIAYPELPIGGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFV I IRGVKGGTSPPLSAIFTT
P283DR9P1364_E5	156	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWISYPEWVPVGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYWV I IQGVKGGKLSWPLSAIFTT
P283DR9P1364_E7	157	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAYPEWVPVRGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYWV I IYGVKGGDRSNPLSAIFTT
P283DR9P1364_E8	158	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFSIAYPEWVPVHGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFV I IYGVKGGVLSEPLSAIFTT
P283DR9P1364_E9	159	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIAYPEWPTKGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFV I IYGVKGGWRSFPLSAIFTT
P283DR9P1364_F2	160	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIAYPEWVPVGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFV I IQGVKGGFGSFPLSAIFTT
P283DR9P1364_F6	161	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIAYPEREQDKWGE AIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYWV I IQGVKGGRPSTPLSAILT T
P283DR9P1364_F8	162	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIAYPEWPPGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFV I IYGVKGGWTSPLSAIFTT
P283DR9P1364_G10	163	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFSIAYPEWPGGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFV I IFGVKGGQSWPLSAIFTT
P283DR9P1364_G9	164	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIYYPEWVPVGEAI VLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYWV NISGVKGGEYSFPLSAIFTT
P283DR9P1364_H1	165	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFQISYPEWVPVHGEAI

10

20

30

40

【 0 2 5 9 】

【表 2 7】

		VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVIIWGVKGGQSWPLSAIFTT
P283DR9P1364_H11	166	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIAYPELPLGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIWGVKGGDRSEPLSAIFTT
P283DR9P1364_H6	167	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFIIAYPETPVRGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIIGVKGGQESFPLSAIFTT
P283DR9P1364_H9	168	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFSISYIEYPEIPGGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVPIWGVKGGIQSWPLSAIFT T
P283ER9P1365_A1	169	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIAYVEWWHRGEAI SLPVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVITGVKGGIPSHPLGAIIFTT
P283ER9P1365_A7	170	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIPYWESEVYGEAI ALPVPGSERSYDLTGLKPGTEYQVSIIGVKGGVYSQPLAAIFTT
P283ER9P1365_B6	171	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIYAEPPVTGEAI SLSVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVIIIGVKGGINSYPLGAIIFTT
P283ER9P1365_C1	172	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIPYWESEVYGEAI ALPVTGSERSYDLTGLKPGTEYQVSIIGVKGGVYSQPLAAIFTT
P283ER9P1365_E2	173	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIPYRESEFRGEAI ALPVPGSERSYDLTGLKPGTKYRVIIIGVKGGESQPLAAIFTT
P283ER9P1365_F4	174	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIPYRESEFRGEAI ALPVPGSERSYDLTGLKPGTKYSVIIIGVKGGESQPLGAIIFTT
P283ER9P1365_G1	175	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIPYRESEFRGEAI ALSVPGSERSYDLTGLKPGTKYRVIIIGVKGGESQPLGAIIFTT
P283ER9P1365_G3	176	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGISYYEAWPNGEAI QLSVPGSERSYDLTGLKPGTEYHVIIIGVKGGEPHPLGAIIFTT
P283ER9P1365_H3	177	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIPYRESEFRGEAI ALPVPGSERSYDLTGLKPGTKYRVIIIGVKGGESQPLSAIFTT
P283FR9P1366_A1	178	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWITYPEWPPVGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVFIWGVKGGDASEPLSAIFTT
P283FR9P1366_A5	179	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIAYPEWPTRGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIWGVKGGSPSPPLSAIFTT
P283FR9P1366_A9	180	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAYPEWPGPGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVPIWGVKGGELSEPLSAIFTT
P283FR9P1366_B7	181	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWITYPEWPNVGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVIIWGVKGGVESPPPLSAIFTT
P283FR9P1366_C2	182	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKISYPEWPPEGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVFIWCVKGGESHWPLSAIFTT
P283FR9P1366_C3	183	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIAYPEWPDGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIWGVKGGILSPPLSAIFTT
P283FR9P1366_C4	184	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAYPEWPPVRGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVIIIGVKGGEDSWPLSAIFTT
P283FR9P1366_C6	185	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFSIAYPEWPVYGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIWGVKGGNYSPLSAIFTT
P283FR9P1366_D12	186	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIAYPEWPLGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVIIIGVKGGDQSWPLSAIFTT
P283FR9P1366_D6	187	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIFYPELVFPGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVNISGVKGGESHWPLSAIFTT
P283FR9P1366_D7	188	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFSIAYPELVKGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIWGVKGGTYSGPLSAIFTT
P283FR9P1366_D8	189	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFEIAYPEIPIAGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIWGVKGGDWSPLSAIFTT
P283FR9P1366_E11	190	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIAYPEWPPVGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVIIIGVKGGNISWPLSAIFTT

【0 2 6 0】

10

20

30

40

【表 28】

P283FR9P1366_F5	191	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDIGYPEWPIKGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVIIWGVKGGDRSEPLSAIFTT
P283FR9P1366_F8	192	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFAIAYPEIAKWGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIYGVKGGVHSFPLSAIFTT
P283FR9P1366_F9	193	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDHIFYPELPIAGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVNISGVKGGYESWPLSAIFTT
P283FR9P1366_G1	194	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFYISYPELPVEGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVIIWGVKGGATSEPLSAIFTT
P283FR9P1366_G5	195	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFIAYPEYPALGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIIGVKGGDESFPPLSAIFTT
P283FR9P1366_G8	196	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFIAYPELPIGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIYGVKGGIHSAPLSAIFTT
P283FR9P1366_H10	197	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFNIAYPEWPPEGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIYGVKGGHLSAPLSAIFTT
P283FR9P1366_H11	198	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFIQYLETAPDGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVWIPGVKGGAFSPLSAIFTT
P283FR9P1366_H3	199	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFAIAYPEWPIKGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVIIYGVKGGVFSEPLSAIFTT
P283FR9P1366_H5	200	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFIYIENKVNGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYHVTIGVKGGTESNTLSAIFTT
P283FR9P1366_H6	201	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFIAYPEWPTGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVIIIFGVKGGERSWPLSAIFTT
P283FR9P1366_H7	202	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFIAYPEYPALGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIAGVKGGIQSWPLSAIFTT
P283FR9P1366_H8	203	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFYISYPEWPGSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVFIWCVKGGWLSAPLSAIFTT
P283FR9P1366_H9	204	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFEIAYPEWPVNGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVIIWGVKGGVNSYPLSAIFTT
P283GR7P1367_A11	205	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFIAYPEWPTDGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIYGVKGGSYSEPLSAIFTT
P283GR7P1367_B4	206	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDSILYYELPPSGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIFGVKGGDNSFPLSAIFTT
P283GR7P1367_B7	207	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFIAYPEWPTDGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIYGVKGGHWSYPLSAIFTT
P283GR7P1367_B9	208	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFEIWHYHEYHPRGEAI VLTVPSSERSYDLTGLKPGTEYDVVISGVKGGHWSYPLSAIFTT
P283GR7P1367_C9	209	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFLIGYPEWPLGGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVIIYGVKGGEYSDPLSAIFTT
P283GR7P1367_E5	210	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFEIWHYHEYHPRGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVVISGVKGGHWSYPLSAIFTT
P283GR7P1367_F5	211	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFIAYPEWPTDGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIYGVKGGALSRLSAIFTT
P283GR7P1367_G8	212	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFYIAYPEYVWGGEAT SLGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIITGVKGGLSYPLS AIFTT
P283GR7P1367_H2	213	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFIAYPEWPTDGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIYGVKGGGRSYPLSAIFTT
P283GR7P1367_H8	214	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDSINYWEEDPAGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYRVLIGVKGGHGSPLSAIFTT
P283GR7P1367_H9	215	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFIAYPEWPTDGEAI VLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIYGVKGGGRSAPLSAIFTT
P283HR7P1368_A10	216	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFIYFLEPPRGEAI

【0261】

10

20

30

40

【表 29】

		PLEVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVDIRGVKGGDHSPLWAYFTT	
P283HR7P1368_B12	217	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIGYVEFTRAGEAI SLSVPGSERSYDLTGLKPGTEYHVVIIGVKGGEP SHPLGAPFTT	
P283HR7P1368_C3	218	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIGYAEPAVTGEAI SLSVPGSKRSYDLTGLKPGTEYVVVIIGVKGGINSYPLGASFTT	
P283HR7P1368_D1	219	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGISYYEWAPNGEAI QLSVPGSERSYDLTGLKPGTEYHVVIIGVKGGEP SHPLGAPFTT	
P283HR7P1368_D2	220	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFNSFGIGYAEPAVTGEAI SLSVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVVIIGVKGGINSYPLGASFTT	
P283HR7P1368_D4	221	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIWCVEPIPEGEAI PLFVPGSERSYDLTGLKPGTEYRVGIRGVKGGTFSSPLAAPFTT	
P283HR7P1368_F10	222	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIPYRESEFRGEAI ALPVPGSERSYDLTGLKPGTKYRVIIIGVKGGFSSQPLGAIFTT	
P283HR7P1368_F6	223	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIGYIEWVHRGEAI SLHVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVAIIGVKGGEPSTPLGAPFTT	
P283HR7P1368_G1	224	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLITYWEIEPEGEAI FLGVPGSERSYDLTGLKPGTEYRVQINGVKGGTISYPLFAGFTT	
P283HR7P1368_G10	225	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIAYVEWWHRGEAI SLPVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVTILGVKGGIISTPLGASFTT	
P283HR7P1368_G11	226	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIGYAEPAVTGEAI SLSVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVVIIGVKGGINSYPLGASFTT	
P283HR7P1368_H1	227	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIAYIETARWGEAI SLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVVIIGVKGGTPSHPLGAPFTT	
P283HR7P1368_H8	228	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGITYLDPNRGEAIS LNVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVVIIGVKGGINSYPLGASFTT	
CD8S368	229	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFQIAYPEWPPPGGEAI VLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVIIIGVKGGVESWPLSAIFTT	
CD8S367	230	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIAYPEWPPQGEAI VLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVIIIGVKGGSYSAPLSAIFTT	
CD8S370	231	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAITYIEKEHIEDGE AIVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYVWPIWGVKGGANSWPLSAIFT T	
CD8S365	232	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGILYYEPVDSGEAI TLPVPGSCRSYDLTGLKPGTEYVWVITGVKGGAPSTPLGTIFTT	
CD8S369	233	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWAKRPGAFDSFLIQYQESEKVGGEAI VLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVVDVKYDIDSRPISSNPL SAIFTT	
CD8S366	234	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWITYPEWPDPGGEA IVLTVPGSCRSYDLTGLKPGTEYFVIIIGVKGGEIYSPLSAIFTT	
クローン	配列番号	親	配列
CD8S371	235	P282DR9P1359_F5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFQIAYPEYPPPGGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYFVIIIGVK GGVESWPLSAIFTT
CD8S372	236	P282DR9P1359_F5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFQIAYPELPPPGGEAIVLTV

【0262】

10

20

30

40

50

【表 3 0】

			GSERSYDLTGLKPGTEYFVIIQGVK GGVESWPLSAIFTT
CD8S373	237	P282DR9P1359_F5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFQIAYPEIPPPGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFVIIQGVK GGVESWPLSAIFTT
CD8S374	238	P282DR9P1359_F5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFQIAYPEWPPPGGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFVIIQGVK GGVESYPLSAIFTT
CD8S375	239	P282DR9P1359_F5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFQIAYPEWPPPGGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFVIIQGVK GGVESLPLSAIFTT
CD8S376	240	P282DR9P1359_F5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFQIAYPEWPPPGGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFVIIQGVK GGVESSPLSAIFTT
CD8S377	241	P282DR9P1359_F5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFQIAYPEWPPPGGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFVIIQGVK GGVESEPLSAIFTT
CD8S378	242	P282DR9P1359_G7	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAITYIEKEHIEEGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVWPIWG VKGGANSWPLSAIFTT
CD8S379	243	P282DR9P1359_G7	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAITYIEKEHIESGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVWPIWG VKGGANSWPLSAIFTT
CD8S380	244	P282DR9P1359_G7	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAITYIEKEHIEDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVWPIWG VKGGANSWPLSAIFTT
CD8S381	245	P282DR9P1359_G7	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAITYIEKEHIEDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYFVPIWG VKGGANSWPLSAIFTT
CD8S382	246	P282DR9P1359_G7	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAITYIEKEHIEDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVPIWG VKGGANSWPLSAIFTT
CD8S383	247	P282DR9P1359_G7	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAITYIEKEHIEDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVWPIYG VKGGANSWPLSAIFTT
CD8S384	248	P282DR9P1359_G7	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAITYIEKEHIEDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVWPIFG VKGGANSWPLSAIFTT
CD8S385	249	P282DR9P1359_G7	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAITYIEKEHIEDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVWPISG

10

20

30

40

【0 2 6 3】

【表 3 1】

			VKGGANSWPLSAIFTT
CD8S386	250	P282DR9P1359_G7	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAITYIEKEHIEDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVWPIWG VKGGANSYPLSAIFTT
CD8S387	251	P282DR9P1359_G7	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAITYIEKEHIEDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVWPIWG VKGGANSEPLSAIFTT
CD8S388	252	P282DR9P1359_G7	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAITYIEKEHIEDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVWPIWG VKGGAQSWPLSAIFTT
CD8S389	253	P282ER9P1360_C8	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFGILYYEPVDSGEAITLPVP GSERSYDLTGLKPGTEYFVVITGVK GGAPSTPLGTIFTT
CD8S390	254	P282ER9P1360_C8	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFGILYYEPVDSGEAITLPVP GSERSYDLTGLKPGTEYVYVITGVK GGAPSTPLGTIFTT
CD8S391	255	P282ER9P1360_C8	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFGILYYEPVDSGEAITLPVP GSERSYDLTGLKPGTEYHVITGVK GGAPSTPLGTIFTT
CD8S392	256	P282DR9P1359_F7	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAIAYPEYPPQGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGVK GGSYSAPLSAIFTT
CD8S393	257	P282DR9P1359_F7	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAIAYPELPPQGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGVK GGSYSAPLSAIFTT
CD8S394	258	P282DR9P1359_F7	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAIAYPEIPPQGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGVK GGSYSAPLSAIFTT
CD8S395	259	P282DR9P1359_F7	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAIAYPEHPPQGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGVK GGSYSAPLSAIFTT
CD8S396	260	P282DR9P1359_C5	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFYITYPEWPDPGGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGV KGGEIYSPLSAIFTT
CD8S397	261	P282DR9P1359_C5	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFQITYPEWPDPGGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGV KGGEIYSPLSAIFTT
CD8S398	262	P282DR9P1359_C5	LPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFSITYPEWPDPGGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGV

【0 2 6 4】

10

20

30

40

50

【表 3 2】

			KGGEIYSPLSAIFTT
CD8S399	263	P282DR9P1359_C5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFWITYPEYDPGGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGV KGGEIYSPLSAIFTT
CD8S400	264	P282DR9P1359_C5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFWITYPELPDPGGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGV KGGEIYSPLSAIFTT
CD8S401	265	P282DR9P1359_C5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFWITYPEIPDPGGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGV KGGEIYSPLSAIFTT
CD8S402	266	P282DR9P1359_C5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFWITYPEWPPPGGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGV KGGEIYSPLSAIFTT
CD8S403	267	P282DR9P1359_F7	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFAIAYAEPWPQGEAIVLTV GSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGV GGSYSAPLSAIFTT
CD8S404	268	P282DR9P1359_C5	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFWITYAEWPDGGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYFVVIYGV KGGEIYSPLSAIFTT
CD8S405	269	P282ER9P1360_C8	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPD AAFDSFGILYYEPVDSGEAITLTV GSERSYDLTGLKPGTEYWVVITGVK GGAPSTPLGTIFTT

【0265】

配列番号 270 Tencon25

LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEK
VGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVKGGHRS
NPLSAIFTT

【0266】

配列番号 271 カニクイザルCD8アルファ

MRNQAPGRPKGATSPPLPTGSRAPPVAPELRAEPRPGER
VMAPPVTALLPLVLLLHAARPQNQFRVSPLGRTWNLGETV
ELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGTAARPTFLLYLSQNKPK
AAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLRDFRQENEGYYFCSALS
NSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT TASQPLSL
RPEACRPAAGGSVNTRGLDFACDIYIWAPLAGACGVLLLS
LVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKS GGGKPSLS DRYV

10

20

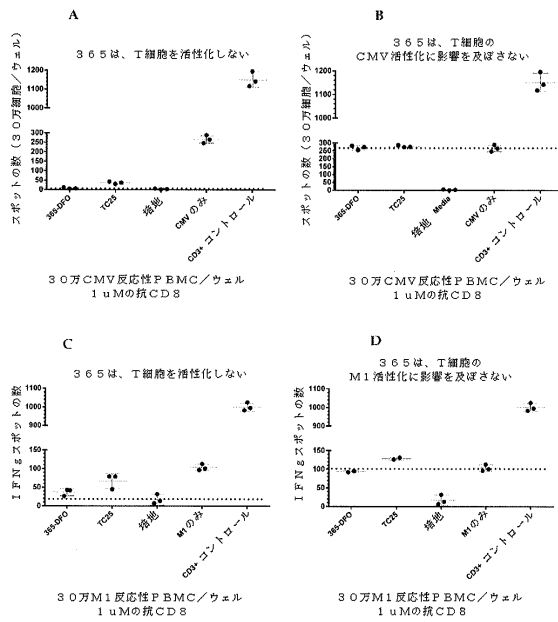
30

40

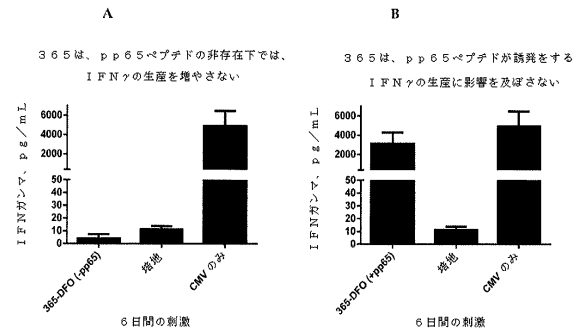
50

【図面】

【図 1】



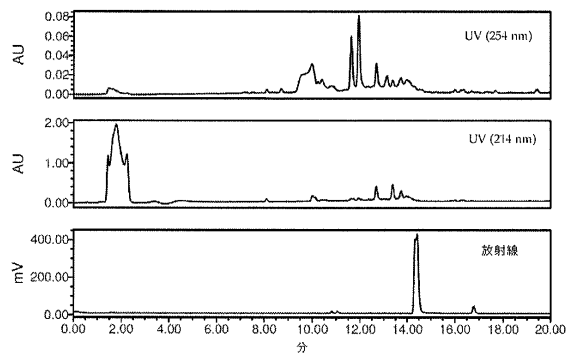
【図 2】



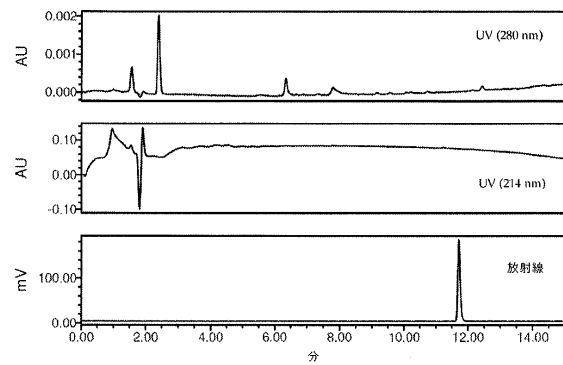
10

20

【図 3】



【図 4】

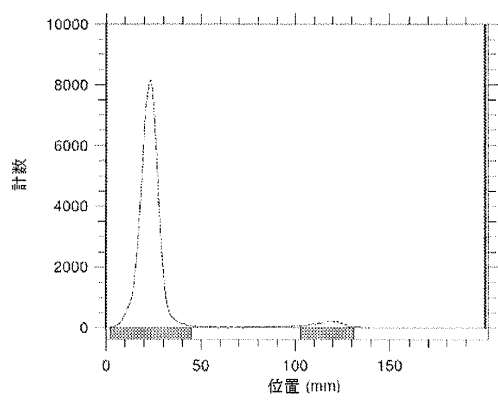


30

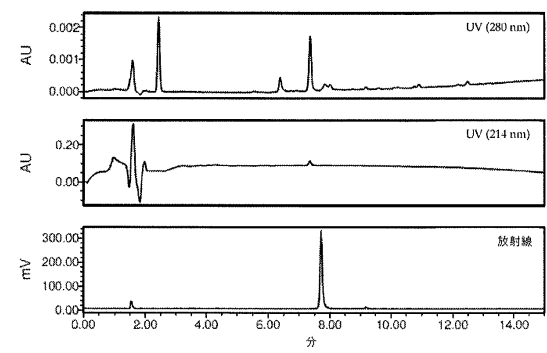
40

50

【図 5】

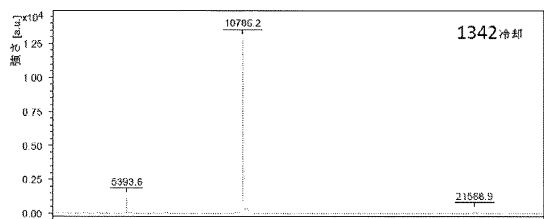


【図 6】

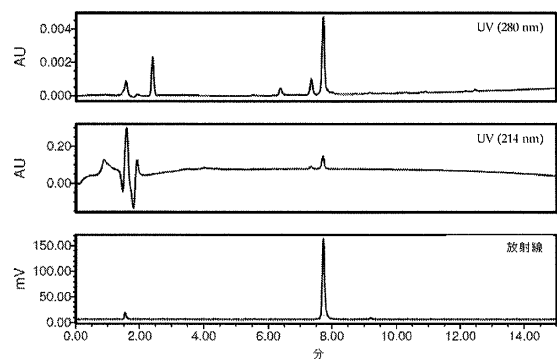


10

【図 7】



【図 8】



20

30

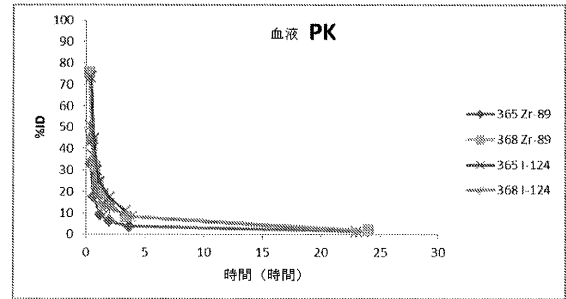
40

50

【図 9】

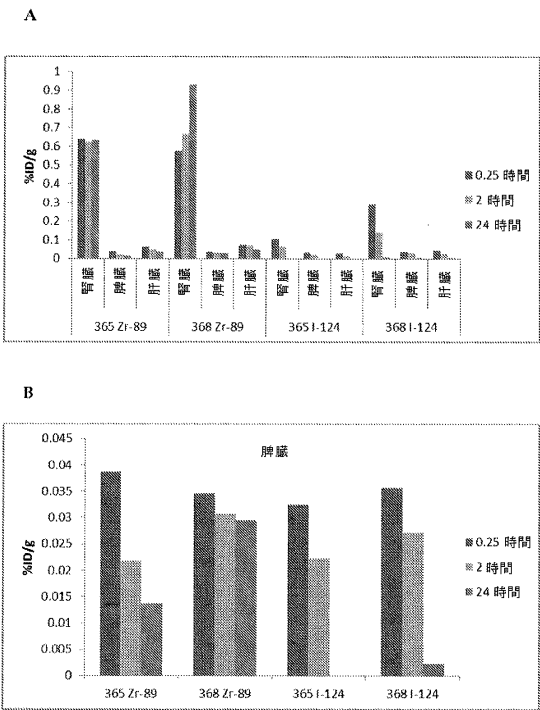


【図 10】

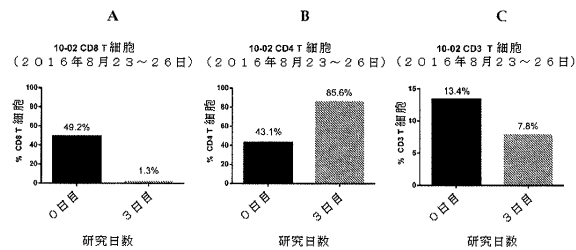


10

【図 11】



【図 12】



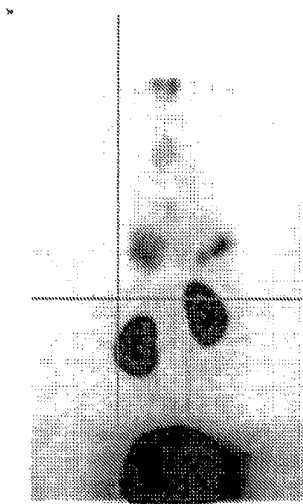
20

30

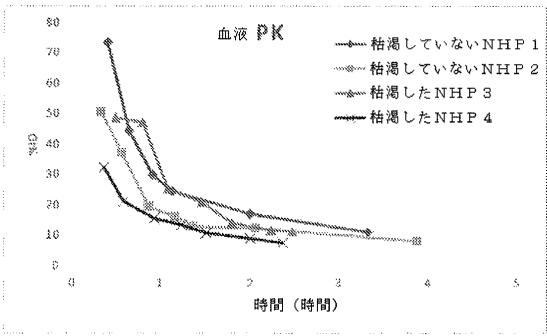
40

50

【図 1 3】

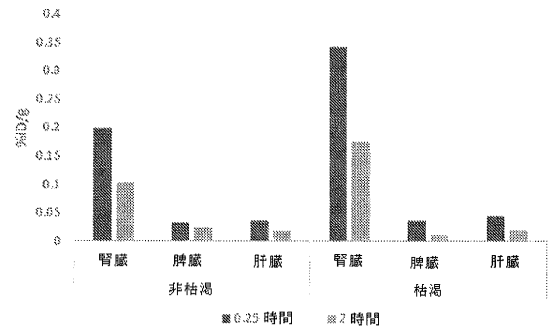


【図 1 4】

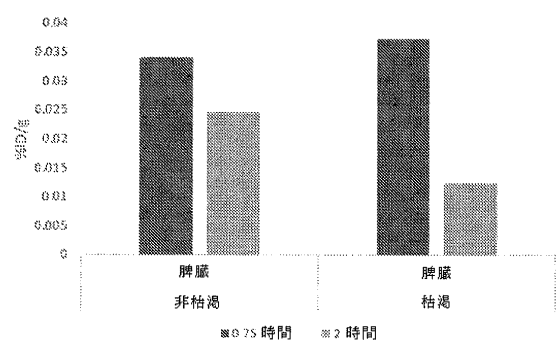


10

【図 1 5 A】



【図 1 5 B】



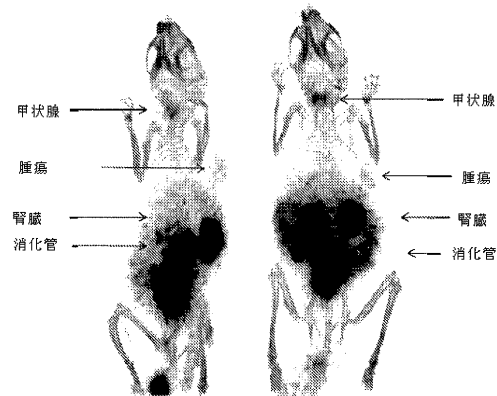
20

30

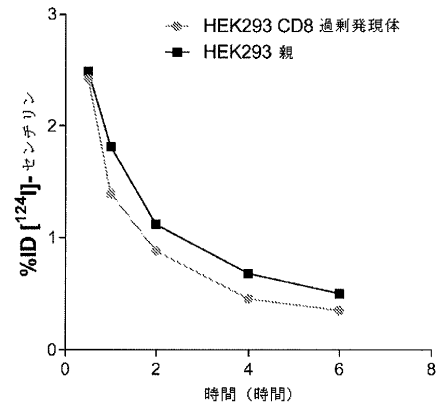
40

50

【図 16】

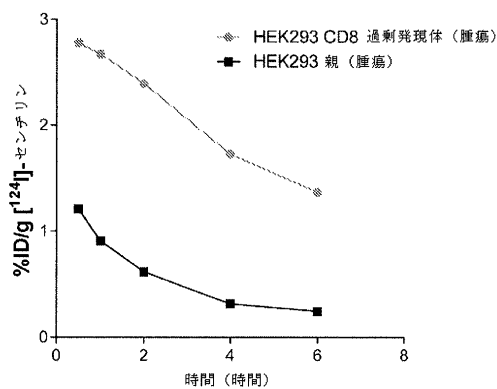


【図 17】

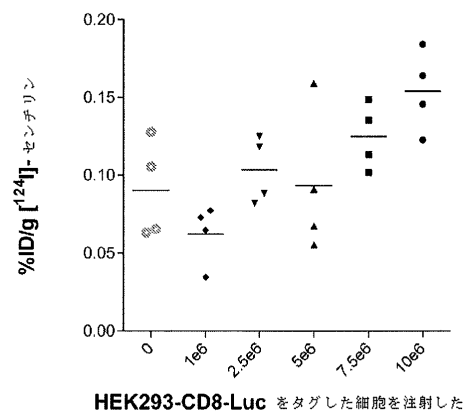


10

【図 18】



【図 19】



20

【配列表】

0007104703000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 0 7 K	14/78	(2006.01)	C 0 7 K	14/78	
A 6 1 K	51/08	(2006.01)	A 6 1 K	51/08	2 0 0
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/64	
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	47/60	(2017.01)	A 6 1 K	47/60	

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 4 7 7 . スプリング・ハウス・マッキーン・ロード 1 4 0 0

(72)発明者 マニユエル・セプルベダ

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 4 7 7 . スプリング・ハウス・マッキーン・ロード 1 4 0 0

審査官 天野 皓己

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 6 / 0 8 6 0 3 6 (WO, A 2)
 特表 2 0 1 4 - 5 3 0 0 1 4 (JP, A)
 国際公開第 2 0 1 5 / 0 5 7 5 4 5 (WO, A 2)
 米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 1 9 1 5 4 3 (US, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - **C 1 2 N** 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 / 0 0 - **C 0 7 K** 1 9 / 0 0
G 0 1 N 3 3 / 5 3
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q