(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7577447号
(P7577447)

(45)発行日　令和6年11月5日(2024.11.5)

(24)登録日　令和6年10月25日(2024.10.25)

(51)国際特許分類		FI		
C07K 14/705 (2006.01)		C07K	14/705	ZNA
C07K 19/00 (2006.01)		C07K	19/00	
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	

請求項の数　19　（全172頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-545353(P2019-545353)
(86)(22)出願日　平成30年2月15日(2018.2.15)
(65)公表番号　特表2020-508053(P2020-508053A)
(43)公表日　令和2年3月19日(2020.3.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/018445
(87)国際公開番号　WO2018/152375
(87)国際公開日　平成30年8月23日(2018.8.23)
審査請求日　令和3年1月29日(2021.1.29)
審判番号　不服2023-1997(P2023-1997/J1)
審判請求日　令和5年2月6日(2023.2.6)
(31)優先権主張番号　62/460,692
(32)優先日　平成29年2月17日(2017.2.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
最終頁に続く

(73)特許権者　518086619
デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド
Ｄｅｎａｌｉ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０， サウス サンフランシスコ， オイスター ポイント ブールバード １６１
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　操作されたポリペプチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

Ｎ末端からＣ末端に向かって、以下を含むＴｆＲポリペプチドコンストラクト：

（Ａ）（ａ）ＴｆＲアピカルドメインのＣ末端フラグメントを含む第１のポリペプチド；および

（ｂ）ＴｆＲアピカルドメインのＮ末端フラグメントを含む第２のポリペプチド、

ここで、前記第１のポリペプチドおよび前記第２のポリペプチドは、直列に融合されている；または

（Ｂ）（ａ）ＴｆＲアピカルドメインのＣ末端フラグメントを含む第１のポリペプチド、

（ｂ）リンカー、ここで、該リンカーはアミノ酸１～１０個の長さである、または、タンパク質ループドメインを含む；および

（ｃ）前記ＴｆＲアピカルドメインのＮ末端フラグメントを含む第２のポリペプチド、

ここで、前記第１のポリペプチド、前記リンカー、及び前記第２のポリペプチドが直列に融合されている、かつ、

ここで、前記（Ａ）または（Ｂ）の第１のポリペプチドは、TISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSE（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２７）の配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する配列を含み、かつ、

前記（Ａ）または（Ｂ）の第２のポリペプチドは、DKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQT（

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２８）の配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する配列を含む。

【請求項２】

（ａ）前記第１のポリペプチドの最後のアミノ酸が前記第２のポリペプチドの最初のアミノ酸と融合されている、かつ／または

（ｂ）前記ＴｆＲアピカルドメインの前記Ｃ末端フラグメントが、３５～５５個のアミノ酸を含み、かつ／もしくは前記ＴｆＲアピカルドメインの前記Ｎ末端フラグメントが、８５～１２０個のアミノ酸を含む、かつ／または

（ｃ）前記第１のポリペプチドが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２７の配列を含む、かつ／または

（ｄ）前記第２のポリペプチドが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２８の配列を含む、かつ／または

（ｅ）前記ＴｆＲアピカルドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０７または１０８の配列を含む、

請求項１に記載のＴｆＲコンストラクト。

【請求項３】

アレナウイルスに結合する、請求項１または２に記載のＴｆＲコンストラクト。

【請求項４】

以下を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のＴｆＲコンストラクト：

（Ａ）（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２７の配列に対して少なくとも９５％の配列同一性を有する配列を含む前記第１のポリペプチド；および

（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２８の配列に対して少なくとも９５％の配列同一性を有する配列を含む前記第２のポリペプチド；または

（Ｂ）（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２７の配列に対して少なくとも９５％の配列同一性を有する配列を含む前記第１のポリペプチド、

（ｂ）前記リンカー、および

（ｃ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２８の配列に対して少なくとも９５％の配列同一性を有する配列を含む前記第２のポリペプチド；または

（Ｃ）（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２７の配列を含む前記第１のポリペプチド、

（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２８の配列を含む前記第２のポリペプチド；または

（Ｄ）

（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２７の配列を含む前記第１のポリペプチド、

（ｂ）前記リンカー、および

（ｃ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２８の配列を含む前記第２のポリペプチド。

【請求項５】

（ａ）前記第１のポリペプチドがＣ末端において、SKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIK（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２９）の配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、もしくはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４３０～４３３のいずれかの配列を有するそのフラグメントを更に含む、

（ｂ）前記第２のポリペプチドがＣ末端において、KFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTP（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４３４）の配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、もしくはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４３５～４３８のいずれかの配列を有するそのフラグメントを更に含む、

（ｃ）前記第１のポリペプチドがＮ末端において、GFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４３９）の配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、もしくはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４４０～４４３のいずれかの配列を有するそのフラグメントを更に含む、

（ｄ）前記第２のポリペプチドがＮ末端において、SKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIV（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４４４）の配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、もしくはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４４５～４４８のいずれかの配列を有するそのフラグメントを更に含む、

（ｅ）前記第１のポリペプチドが、SSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDS

TCRMVTSESKNVKLTVSN（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４４９）の配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する配列を含む、かつ／または
（ｆ）前記第２のポリペプチドが、DSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELS（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５０）の配列に対して少なくとも９０％の配列同一性を有する配列を含む、
請求項１～４のいずれか１項に記載のＴｆＲコンストラクト。
【請求項６】
（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４４９の配列を有する前記第１のポリペプチドと、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５０の配列を有する前記第２のポリペプチドとを含み、前記第１のポリペプチドのＣ末端が前記第２のポリペプチドのＮ末端に融合されている、または
（ｂ）SSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSN（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５１）の配列を有する前記第１のポリペプチドと、DSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLS（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５２）の配列を有する前記第２のポリペプチドとを含み、前記第１のポリペプチドのＣ末端が前記第２のポリペプチドのＮ末端に融合されている、
請求項１～５のいずれか１項に記載のＴｆＲコンストラクト。
【請求項７】
（ｉ）前記リンカーが、Ｇ、ＧＧ、ＧＧＧ、もしくはＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５３）である；または
（ｉｉ）前記タンパク質のループドメインのＮ末端とＣ末端との間の距離が５Å未満である、
請求項１～６のいずれか１項に記載のＴｆＲコンストラクト。
【請求項８】
（ａ）精製ペプチドを更に含み、
（ｂ）切断ペプチドを更に含み、かつ／または
（ｃ）可溶性である、
請求項１～７のいずれか１項に記載のＴｆＲコンストラクト。
【請求項９】
（ｉ）前記精製ペプチドが、前記ＴｆＲコンストラクトのＮ末端もしくはＣ末端に融合されている；かつ／または
（ｉｉ）前記切断ペプチドが、前記ＴｆＲコンストラクトのＮ末端もしくはＣ末端に融合されている、
請求項８に記載のＴｆＲコンストラクト。
【請求項１０】
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０９、１１０、３０１、４６８、および４６９のうちのいずれか１つと少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＴｆＲコンストラクト。
【請求項１１】
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０９、１１０、３０１、４６８、および４６９のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む、請求項１０に記載のＴｆＲコンストラクト。
【請求項１２】
請求項１～１１のいずれか１項に記載のＴｆＲコンストラクトをコードするヌクレオチド配列を含む、単離ポリヌクレオチド。
【請求項１３】
請求項１２に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項１４】
請求項１２に記載のポリヌクレオチドまたは請求項１３に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項１５】
ＴｆＲのアピカルドメインに結合する物質を同定する方法であって、
（ａ）請求項１～１１のいずれか１項に記載のＴｆＲコンストラクトを前記物質と接触させる工程と、
（ｂ）前記物質が前記ＴｆＲコンストラクトに結合するかどうかを決定する工程と
を含む、
前記方法。
【請求項１６】
（ｉ）前記物質が、ポリペプチドもしくはタンパク質である、
（ｉｉ）前記物質が、改変Ｆｃポリペプチドもしくは改変Ｆｃポリペプチド二量体である、
（ｉｉｉ）前記物質が抗体である、かつ／または
（ｉｖ）前記決定する工程（ｂ）が、ＥＬＩＳＡもしくは表面プラズモン共鳴によって行われる、
請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
請求項１～１１のいずれか１項に記載のＴｆＲコンストラクトを作製する方法であって、直列に融合された第１のポリヌクレオチドと第２のポリヌクレオチドとを含む遺伝子を発現させることを含み、前記第１のポリヌクレオチドが前記ＴｆＲアピカルドメインの前記Ｃ末端フラグメントをコードし、前記第２のポリヌクレオチドが前記ＴｆＲアピカルドメインの前記Ｎ末端フラグメントをコードする、前記方法。
【請求項１８】
（ａ）（ｉ）発現されると、前記ＴｆＲアピカルドメインのＮ末端フラグメントの最初のアミノ酸が前記ＴｆＲアピカルドメインのＣ末端フラグメントの最後のアミノ酸と一次配列で連結されるように、前記第１のポリヌクレオチドと前記第２のポリヌクレオチドとが直列に融合される；または
（ｉｉ）前記遺伝子が、タンパク質リンカーをコードするリンカーポリヌクレオチドを更に含み、発現されると、前記ＴｆＲアピカルドメインのＮ末端フラグメントの最初のアミノ酸が前記リンカーの最後のアミノ酸と一次配列で連結され、前記リンカーの最初のアミノ酸が前記ＴｆＲアピカルドメインのＣ末端フラグメントの最後のアミノ酸と一次配列で連結される；または
（ｂ）（ｉ）発現されると、発現されたタンパク質が環状構造の形となるように、前記遺伝子が、直列な前記第１のポリヌクレオチド、及び前記第２のポリヌクレオチドをコードする；または
（ｉｉ）発現されると、発現されたタンパク質が環状構造の形となるように、前記遺伝子が、直列な前記第１のポリヌクレオチド、前記リンカーポリヌクレオチド、及び前記第２のポリヌクレオチドをコードする；かつ／または
（ｃ）前記発現されたタンパク質を精製して前記ＴｆＲコンストラクトを得ることを更に含む、
請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
請求項１７または１８に記載の方法に従って作製された、ＴｆＲコンストラクト。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
背景
血液脳関門（ＢＢＢ）は、末梢から脳内への大部分の巨大分子の通過を遮断し、それによりこれらの巨大分子の治療用途を制限する。血液脳関門の内皮を含む内皮で発現する受容体は、受容体に結合するリガンドの血液脳関門を通過する送達を媒介することができる。
【発明の概要】
【０００２】

概要

一態様において、本開示は、単量体のＴｆＲアピカルドメインを含む単離された組換えトランスフェリン受容体（ＴｆＲ）コンストラクトであって、ＴｆＲのプロテアーゼ様ドメインまたは螺旋ドメインを含まないコンストラクトを提供する。一実施形態では、コンストラクトは、保存されたエピトープまたは抗原を提示し、かつ／または天然のヒトＴｆＲのアピカルドメインのおよその３次元構造を保持するか、もしくは約２未満の平均二乗偏差（ＲＭＳＤ）を有する。一実施形態では、３次元構造は、Ｘ線結晶解析によって測定される。一実施形態では、コンストラクトは、ヒトＴｆＲアピカルドメインを含む。一実施形態では、本明細書に記載されるＴｆＲアピカルドメインコンストラクトと天然の完全長ＴｆＲのアピカルドメインとの間のＲＭＳＤは、約４未満、約３未満、または約２未満であり、約１～約２の範囲の間である。一実施形態では、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０９、１１０、３０１、４６８、及び４６９のうちのいずれか１つ（例えば、１０９、１１０、及び３０１）の配列を有するＴｆＲアピカルドメインコンストラクトのいずれか１つと、天然の完全長ＴｆＲのアピカルドメインとの間のＲＭＳＤは、約１．２である。

【０００３】

別の態様において、本開示は、ＴｆＲコンストラクトであって、（ａ）ＴｆＲアピカルドメインの第１の部分の配列を含む第１のポリペプチドと、（ｂ）任意選択的なリンカーと、（ｃ）ＴｆＲアピカルドメインの第２の部分の配列を含む第２のポリペプチドと、を含み、完全長のＴｆＲ配列に対して、ＴｆＲアピカルドメインの第１の部分の配列がＴｆＲアピカルドメインの第２の部分の配列のＣ末端側であり、第１のポリペプチド、任意選択的なリンカー、及び第２のポリペプチドが、直列に融合されている、ＴｆＲコンストラクトを特色とする。

【０００４】

いくつかの実施形態では、第２の部分の最後のアミノ酸は第１の部分の最初のアミノ酸と融合される。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチドの最初のアミノ酸は第１のポリペプチドの最後のアミノ酸と融合される。いくつかの実施形態では、第１のポリペプチドは、完全長ＴｆＲアピカルドメインのＣ末端フラグメントを含み、第２のポリペプチドは、完全長ＴｆＲアピカルドメインのＮ末端フラグメントを含む。

【０００５】

いくつかの実施形態では、ＴｆＲアピカルドメインの第１の部分は、２５～５５個のアミノ酸（例えば、３０～５５個、３５～５５個、４０～５５個、４５～５５個、５０～５５個、２５～５０個、２５～４５個、２５～４０個、２５～３５個、または２５～３０個のアミノ酸）を含む。いくつかの実施形態では、ＴｆＲアピカルドメインの第２の部分は、７５～１２０個のアミノ酸（例えば、８０～１２０個、８５～１２０個、９０～１２０個、９５～１２０個、１００～１２０個、１０５～１１０個、１１５～１２０個、７５～１１５個、７５～１１０個、７５～１０５個、７５～１００個、７５～９５個、７５～９０個、７５～８５個、または７５～８０個のアミノ酸）を含む。

【０００６】

いくつかの実施形態では、第１のポリペプチドは、
TISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSE (SEQ ID NO:427)

の配列に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第１のポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２７の配列に対して最大７個のアミノ酸の変化（例えば、１個、２個、３個、４個、５個、６個または７個のアミノ酸の挿入、欠失及び／または置換）を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチドは、
DKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRA
GKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQT (SEQ ID NO:428)

の配列に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第１のポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２８の配列に対して最大１６個のアミノ酸の変化（例えば、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、または１６個のアミノ酸の挿入、欠失及び／または置換）を有する配列を含む。

【０００７】

いくつかの実施形態では、ＴｆＲアピカルドメインは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０７または１０８の配列を含む。

【０００８】

いくつかの実施形態では、ＴｆＲコンストラクトは、アレナウイルス（例えば、マチュポウイルス）に結合する。

【０００９】

いくつかの実施形態では、ＴｆＲコンストラクトは、（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２７の配列に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）を有する配列を含む第１のポリペプチドと、（ｂ）任意選択的なリンカーと、（ｃ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２８の配列に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）を有する配列を含む第２のポリペプチドと、を含む。

【００１０】

いくつかの実施形態では、ＴｆＲコンストラクトは、（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２７の配列に対して最大７個のアミノ酸の変化（例えば、１個、２個、３個、４個、５個、６個または７個のアミノ酸の挿入、欠失及び／または置換）を有する配列を含む第１のポリペプチドと、（ｂ）任意選択的なリンカーと、（ｃ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２８の配列に対して最大１６個のアミノ酸の変化（例えば、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、または１６個のアミノ酸の挿入、欠失及び／または置換）を有する配列を含む第２のポリペプチドと、を含む。

【００１１】

いくつかの実施形態では、第１のポリペプチドはＣ末端において、配列
SKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIK (SEQ ID NO:429)

に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）または最大５個のアミノ酸の変化（例えば、１個、２個、３個、４個、または５個のアミノ酸の挿入、欠失及び／または置換）を有する配列、またはそのフラグメントを更に含む。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチドはＣ末端において、配列
KFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTP (SEQ ID NO:434)

に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）または最大５個のアミノ酸の変化（例えば、１個、２個、３個、４個、または５個のアミノ酸の挿入、欠失及び／または置換）を有する配列、またはそのフラグメントを更に含む。いくつかの実施形態では、第１のポリペプチドはＮ末端において、配列
GFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQ (SEQ ID NO:439)

に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）または最大５個のアミノ酸の変化（例えば、１個、２個、３個、４個、または５個のアミノ酸

の挿入、欠失及び／または置換）を有する配列、またはそのフラグメントを更に含む。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチドはＮ末端において、配列
SKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIV (SEQ ID NO:444)

に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）または最大５個のアミノ酸の変化（例えば、１個、２個、３個、４個、または５個のアミノ酸の挿入、欠失及び／または置換）を有する配列、またはそのフラグメントを更に含む。

【００１２】

特定の実施形態では、第１のポリペプチドは、配列
SSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSN
(SEQ ID NO:449)

に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）または最大１０個のアミノ酸の変化（例えば、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、または１０個のアミノ酸の挿入、欠失及び／または置換）を有する配列を含む。特定の実施形態では、第２のポリペプチドは、配列
DSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTP
VNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELS (SEQ ID NO:450)

に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）または最大２０個のアミノ酸の変化（例えば、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、または２０個のアミノ酸の挿入、欠失及び／または置換）を有する配列を含む。

【００１３】

いくつかの実施形態では、第１のポリペプチドは第２のポリペプチドと直列に直接融合される。特定の実施形態では、ＴｆＲコンストラクトは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４４９の配列を有する第１のポリペプチドと、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５０の配列を有する第２のポリペプチドとを含み、第１のポリペプチドのＣ末端は第２のポリペプチドのＮ末端に融合される。特定の実施形態では、ＴｆＲコンストラクトは、
SSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSN
(SEQ ID NO:451)

の配列を有する第１のポリペプチドと、
DSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLDSP
VNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLS (SEQ ID NO:452)

の配列を有する第２のポリペプチドとを含み、第１のポリペプチドのＣ末端は第２のポリペプチドのＮ末端に融合される。

【００１４】

いくつかの実施形態では、リンカーは、１～１０個のアミノ酸（例えば、１～８個、１～６個、１～４個、または１個もしくは２個のアミノ酸、例えば、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、または１０個のアミノ酸）を含むか、またはこれか

らなる。特定の実施形態では、リンカーは、Ｇ、ＧＧ、ＧＧＧ、またはＧＧＧＧ（ＳＥＱＩＤ　ＮＯ：４５３）である。特定の実施形態では、リンカーは、タンパク質ループドメインを含む。特定の実施形態では、タンパク質ループドメインのＮ末端とＣ末端との距離は５Å未満である。

【００１５】

いくつかの実施形態では、ＴｆＲコンストラクトは精製ペプチドを更に含む。例えば、精製ペプチドはＴｆＲコンストラクトのＮ末端またはＣ末端に融合することができる。

【００１６】

いくつかの実施形態では、ＴｆＲコンストラクトは切断ペプチドを更に含む。例えば、切断ペプチドはＴｆＲコンストラクトのＮ末端またはＣ末端に融合することができる。

【００１７】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載されるＴｆＲコンストラクトをコードするヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチドを特色とする。別の態様では、本開示は、上記に記載のポリヌクレオチドを含むベクターも特色とする。更なる態様では、本開示は、上記に記載のポリヌクレオチドまたは上記に記載のベクターを含む宿主細胞も特色とする。

【００１８】

別の態様では、本開示は、ＴｆＲのアピカルドメインに結合する物質を特定する方法を特色とする。本方法は、（ａ）本明細書に記載されるＴｆＲコンストラクトを物質と接触させる工程と、（ｂ）前記物質がＴｆＲコンストラクトに結合するかどうかを決定する工程と、を含む。

【００１９】

いくつかの実施形態では、物質は、ポリペプチドまたはタンパク質である。いくつかの実施形態では、物質は、改変Ｆｃポリペプチドまたは改変Ｆｃポリペプチド二量体である。更なる他の実施形態では、物質は抗体である。

【００２０】

いくつかの実施形態では、前記決定する工程（ｂ）は、ＥＬＩＳＡまたは表面プラズモン共鳴により行われる。

【００２１】

更に別の態様では、本開示は、組換えＴｆＲアピカルドメインコンストラクトを作製する方法であって、直列に融合された第１のポリヌクレオチドと第２のポリヌクレオチドとを含む遺伝子を発現させることを含み、第１のポリヌクレオチドが完全長のＴｆＲアピカルドメインのＣ末端フラグメントをコードし、第２のポリヌクレオチドが完全長のＴｆＲアピカルドメインのＮ末端フラグメントをコードする、方法を特色とする。

【００２２】

いくつかの実施形態では、発現されると、ドメインのＮ末端フラグメントの最初のアミノ酸がドメインのＣ末端フラグメントの最後のアミノ酸と一次配列で連結されるように、第１のポリヌクレオチドと第２のポリヌクレオチドとが直列に融合される。

【００２３】

いくつかの実施形態では、遺伝子が、任意選択的なタンパク質リンカーをコードする任意選択的なリンカーポリヌクレオチドを更に含み、発現されると、ドメインのＮ末端フラグメントの最初のアミノ酸がリンカーの最後のアミノ酸と一次配列で連結され、リンカーの最初のアミノ酸がドメインのＣ末端フラグメントの最後のアミノ酸と一次配列で連結される。

【００２４】

いくつかの実施形態では、発現されると、発現されたタンパク質が環状構造の形となるように、遺伝子は、直列な第１のポリヌクレオチド、任意選択的なリンカーポリヌクレオチド、及び第２のポリヌクレオチドをコードする。いくつかの実施形態では、本方法は、発現されたタンパク質を精製して単離された組換えＴｆＲアピカルドメインコンストラクトを得ることを更に含む。

【００２５】

本開示の一態様は、上記の方法に従って作製された、単離された組換えヒトＴｆＲアピカルドメインコンストラクトも含む。

【００２６】

別の態様は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０９、１１０、３０１、４６８、及び４６９（例えば、１０９、１１０、及び３０１）のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む、単離された組換えＴｆＲアピカルドメインコンストラクトを含む。

【００２７】

別の態様は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０９、１１０、３０１、４６８、及び４６９（例えば、１０９、１１０、及び３０１）のうちのいずれか１つと少なくとも約９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、単離された組換えＴｆＲアピカルドメインコンストラクトを含む。

【００２８】

別の態様において、本明細書では、血液脳関門（ＢＢＢ）を通過して能動的に輸送されることが可能なポリペプチドであって、（ａ）改変Ｆｃポリペプチド、またはそのフラグメントと、（ｂ）ＢＢＢ受容体に特異的に結合する改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメント内の第１の部位と、（ｃ）新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲＮ）に結合する第２の部位と、を含むポリペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、第２の部位は、天然のＦｃＲｎ結合部位である。いくつかの実施形態では、ＦｃＲｎ結合部位は、改変Ｆｃポリペプチド内にある。いくつかの実施形態では、ＦｃＲｎ結合部位は、血清中半減期を延ばす、天然Ｆｃ配列に対するアミノ酸の変化を含む。特定の実施形態では、アミノ酸の変化は、２５位のＴｙｒ、２７位のＴｈｒ、及び２９位のＧｌｕの置換を含み、各残基の位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる。あるいは、他の実施形態では、アミノ酸の変化は、２０１位のＬｅｕ、及び２０７位のＳｅｒの置換を含み、各残基の位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる。あるいは、更なる実施形態では、アミノ酸の変化は、２０７位のＳｅｒまたはＡｌａの置換を含み、各残基の位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる。

【００２９】

いくつかの実施形態では、改変Ｆｃポリペプチドまたはそのフラグメントは、天然のＦｃポリペプチドのアミノ酸配列（例えば少なくとも５０個の連続したアミノ酸）に対応した少なくとも５０個のアミノ酸（例えば、少なくとも６０個、７５個、９０個、または９５個のアミノ酸）を含む。特定の実施形態では、改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントは、天然のＦｃポリペプチドのアミノ酸配列に対応した少なくとも１００個のアミノ酸（例えば、少なくとも１２５個、１４０個、１５０個、１６０個、１７５個、または１８０個のアミノ酸）を含む。

【００３０】

いくつかの実施形態では、改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメント内の第１の部位は、Ｆｃポリペプチドのβシート内に少なくとも１個の改変されたアミノ酸を有する。特定の実施形態では、βシートはＣＨ２ドメイン内にある。特定の実施形態では、βシートはＣＨ３ドメイン内にある。いくつかの実施形態では、第１の部位は、少なくとも１個の溶媒露出アミノ酸の置換を含む。いくつかの実施形態では、第１の部位は、少なくとも２個の溶媒露出アミノ酸の置換を含み、ループ領域またはβシート内の２個の溶媒露出残基は、同じループ領域または同じβシート内にない。

【００３１】

いくつかの実施形態では、改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメント配列は、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のＣＨ２ドメイン配列に由来するものであってよい改変ＣＨ２ドメイン配列を含む。いくつかの実施形態では、ＣＨ２ドメインの改変は、（ａ）残基４７、４９、５６、５８、５９、６０、６１、６２、及び６３、（ｂ）残基３９、４０、４１、４２、４３、４４、６８、７０、７１、及び７２、（ｃ）残基４１、４２、４３、４４、４５、６５、６６、６７、６９、及び７３、ならびに（ｄ）残基４

５、４７、４９、９５、９７、９９、１０２、１０３、及び１０４からなる群から選択されるアミノ酸の組の中の少なくとも２個のアミノ酸の置換を含み、各残基の位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる。

【００３２】

いくつかの実施形態では、改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメント配列は、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のＣＨ３ドメイン配列に由来するものであってよい改変ＣＨ３ドメイン配列を含む。いくつかの実施形態では、ＣＨ３ドメインに対する改変は、（ａ）残基１５７、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１８６、１８９、及び１９４、ならびに（ｂ）残基１１８、１１９、１２０、１２２、２１０、２１１、２１２、及び２１３からなる群から選択されるアミノ酸の組の中の少なくとも２個のアミノ酸の置換を含み、各残基の位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる。

【００３３】

いくつかの実施形態では、改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントは、対応する野生型Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントと比較して少なくとも７５％のアミノ酸配列の同一性を有する。更なる実施形態では、同一性は、少なくとも８０％、９０％、９２％、または９５％である。

【００３４】

改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントは、エフェクター機能を有してもよく、または代替的な実施形態では、エフェクター機能を有さない。特定の実施形態では、改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントは、エフェクター機能を低下させる改変を含む。いくつかの実施形態では、エフェクター機能を低下させる改変は、７位のＬｅｕ、及び８位のＬｅｕの置換を含み、各残基の位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる。いくつかの実施形態では、エフェクター機能を低下させる改変は、１０２位のＰｒｏの置換を更に含み、残基の位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる。

【００３５】

更なる態様において、本明細書では、上記のパラグラフに記載されるポリペプチドまたはフラグメントを含む二量体タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、二量体タンパク質は、第１及び第２のポリペプチド鎖を含むヘテロ二量体であり、第１のポリペプチド鎖はＢＢＢ受容体に特異的に結合する第１の部位を含む。特定の実施形態では、第２のポリペプチド鎖は、ＢＢＢ受容体に特異的に結合する部位を含まない。いくつかの実施形態では、二量体タンパク質は、第１及び第２のポリペプチド鎖を含むホモ二量体であり、第１及び第２のポリペプチド鎖は、ＢＢＢ受容体に特異的に結合する部位をそれぞれ含む。

【００３６】

いくつかの実施形態では、ＢＢＢ受容体は、トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）、インスリン受容体、インスリン様成長因子受容体（ＩＧＦ－Ｒ）、低密度リポタンパク質受容体（ＬＤＬＲ）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１（ＬＲＰ１）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質２（ＬＲＰ２）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質８（ＬＲＰ８）、ＧＬＵＴ１、バシギン、ジフテリア毒素受容体、ヘパリン結合性上皮成長因子様成長因子（ＨＢ－ＥＧＦ）の膜結合前駆体、メラノトランスフェリン、及びバソプレシン受容体からなる群から選択される。特定の実施形態では、ＢＢＢ受容体はＴｆＲである。尚も他の実施形態では、ＢＢＢ受容体はＩＧＦ－Ｒである。

【００３７】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、受容体の内因性リガンドと結合について競合することなくＢＢＢ受容体に特異的に結合する。特定の実施形態では、ＢＢＢ受容体はトランスフェリン受容体であり、内因性リガンドがトランスフェリンである。

【００３８】

いくつかの実施形態では、上記のパラグラフに記載されるポリペプチドは、生物学的活性を有するポリペプチドを更に含む。特定の実施形態では、生物学的活性を有するポリペプチドは、治療活性を有するポリペプチドである。いくつかの実施形態では、生物学的活

性を有するポリペプチドの脳内への取り込みは、改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントが存在しない場合の生物学的活性を有するポリペプチドの取り込みと比較して少なくとも１０倍大きい。いくつかの実施形態では、生物学的活性を有するポリペプチドの脳内への取り込みは、改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントが存在しない場合の生物学的活性を有するポリペプチドの取り込みと比較して少なくとも約２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、１７倍、１８倍、１９倍、２０倍、またはそれ以上である。

【００３９】

更なる態様において、本明細書では、ＢＢＢを通過して能動的に輸送されることが可能なタンパク質であって、（ａ）抗原に結合することが可能な抗体可変領域配列、またはその抗原結合フラグメントと、（ｂ）改変Ｆｃポリペプチドを含むポリペプチド、またはそのフラグメントと、を含み、改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントが、ＢＢＢ受容体に特異的に結合する第１の結合部位と、新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）に結合する第２の結合部位とを有する、タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、抗体可変領域配列は、Ｆａｂドメインを含む。いくつかの実施形態では、Ｆａｂドメインは、タウタンパク質（例えば、ヒトタウタンパク質）またはそのフラグメントに結合する。タウタンパク質は、リン酸化タウタンパク質、非リン酸化タウタンパク質、タウタンパク質のスプライスアイソフォーム、Ｎ末端が切断されたタウタンパク質、Ｃ末端が切断されたタウタンパク質、及び／またはそれらのフラグメントであってよい。いくつかの実施形態では、Ｆａｂドメインは、β－セクレターゼ１（ＢＡＣＥ１）タンパク質（例えば、ヒトＢＡＣＥ１タンパク質）またはそのフラグメントに結合する。ＢＡＣＥ１タンパク質は、ＢＡＣＥ１タンパク質またはそのフラグメントのスプライスアイソフォームであってもよい。いくつかの実施形態では、Ｆａｂドメインは、骨髄細胞上に発現するトリガー受容体２（ＴＲＥＭ２）タンパク質（例えば、ヒトＴＲＥＭ２タンパク質）またはそのフラグメントに結合する。他の実施形態では、Ｆａｂドメインは、α－シヌクレインタンパク質（例えば、ヒトα－シヌクレインタンパク質）またはそのフラグメントに結合する。α－シヌクレインタンパク質は、モノマー性α－シヌクレイン、オリゴマー性α－シヌクレイン、α－シヌクレインフィブリル、可溶性α－シヌクレイン、及び／またはこれらのフラグメントであってよい。いくつかの実施形態では、抗体可変領域配列は、２個の抗体可変領域重鎖と２個の抗体可変領域軽鎖、またはそれらのそれぞれのフラグメントを含む。

【００４０】

いくつかの実施形態では、可変領域は、タウタンパク質（例えば、ヒトタウタンパク質）またはそのフラグメントに結合することができる。いくつかの実施形態では、可変領域は、リン酸化タウタンパク質、非リン酸化タウタンパク質、タウタンパク質のスプライスアイソフォーム、Ｎ末端が切断されたタウタンパク質、及び／またはＣ末端が切断されたタウタンパク質、またはそれらのフラグメントに結合することができる。いくつかの実施形態では、可変領域は、β－セクレターゼ１（ＢＡＣＥ１）タンパク質（例えば、ヒトＢＡＣＥ１タンパク質）またはそのフラグメントに結合することができる。いくつかの実施形態では、可変領域は、ＢＡＣＥ１タンパク質の１つ以上のスプライスアイソフォームまたはそのフラグメントに結合することができる。いくつかの実施形態では、可変領域は、ヒトの骨髄細胞上に発現するトリガー受容体２（ＴＲＥＭ２）タンパク質、またはそのフラグメントに結合することができる。いくつかの実施形態では、可変領域は、ヒトα－シヌクレインタンパク質またはそのフラグメントに結合することができる。いくつかの実施形態では、可変領域は、モノマー性ヒトα－シヌクレイン、オリゴマー性ヒトα－シヌクレイン、ヒトα－シヌクレインフィブリル、及び／または可溶性ヒトα－シヌクレイン、またはこれらのフラグメントに結合することができる。

【００４１】

いくつかの実施形態では、タンパク質は、ＢＢＢ受容体に結合する１個の改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントを含む。他の実施形態では、タンパク質は、ＢＢＢ受容体に結合する２個の改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントを含む。

【００４２】
いくつかの実施形態では、脳内へのタンパク質の取り込みは、（ａ）改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントを含むポリペプチドがない場合の同じタンパク質、または（ｂ）ＢＢＢ受容体との結合をもたらす改変を有さないＦｃポリペプチドまたはＦｃポリペプチドフラグメントを含むポリペプチドがある場合の同じタンパク質と比較して、少なくとも１０倍大きい。
【００４３】
更なる態様において、本明細書では、（ａ）上記のパラグラフに記載されるポリペプチドと、（ｂ）治療または診断物質とを含む結合体であって、血液脳関門を通過して輸送されることが可能な結合体が提供される。いくつかの実施形態では、治療または診断物質の脳への取り込みは、ポリペプチドの非存在下での治療または診断物質の取り込みに対して少なくとも１０倍、２０倍、３０倍、４０倍、または５０倍増加する。
[本発明1001]
単量体のトランスフェリン受容体（ＴｆＲ）アピカルドメインを含む単離された組換えＴｆＲコンストラクトであって、前記ＴｆＲのプロテアーゼ様ドメインまたは螺旋ドメインを含まない、前記ＴｆＲコンストラクト。
[本発明1002]
保存されたエピトープまたは抗原を提示し、かつ／または天然のヒトＴｆＲのアピカルドメインのおよその3次元構造を保持するか、もしくは約2未満の平均二乗偏差（ＲＭＳＤ）を有する、本発明1001のＴｆＲコンストラクト。
[本発明1003]
前記3次元構造がＸ線結晶解析により測定される、本発明1001または1002のＴｆＲコンストラクト。
[本発明1004]
（ａ）ＴｆＲアピカルドメインの第1の部分の配列を含む第1のポリペプチドと、
（ｂ）任意選択的なリンカーと、
（ｃ）前記ＴｆＲアピカルドメインの第2の部分の配列を含む第2のポリペプチドと
を含み、
完全長のＴｆＲ配列に対して、前記ＴｆＲアピカルドメインの前記第1の部分の配列が前記ＴｆＲアピカルドメインの前記第2の部分の配列のＣ末端側であり、
前記第1のポリペプチド、前記任意選択的なリンカー、及び前記第2のポリペプチドが直列に融合されている、
ＴｆＲコンストラクト。
[本発明1005]
前記第2の部分の最後のアミノ酸が前記第1の部分の最初のアミノ酸と融合されている、本発明1004のＴｆＲコンストラクト。
[本発明1006]
前記第1のポリペプチドが、完全長ＴｆＲアピカルドメインのＣ末端フラグメントを含み、前記第2のポリペプチドが、前記完全長ＴｆＲアピカルドメインのＮ末端フラグメントを含む、本発明1004または1005のＴｆＲコンストラクト。
[本発明1007]
前記第1のポリペプチドが、
TISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSE (SEQ ID NO:427)

の配列に対して少なくとも90％の配列同一性を有する配列を含む、本発明1004～1006のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1008]
前記第1のポリペプチドが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：427の配列に対して最大7個のアミノ酸の変化を有する配列を含む、本発明1004～1006のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1009]

前記第2のポリペプチドが、
DKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRA
GKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQT (SEQ ID NO:428)

の配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、本発明1004～1008のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1010]
前記第2のポリペプチドが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：428の配列に対して最大16個のアミノ酸の変化を有する配列を含む、本発明1004～1008のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1011]
前記ＴｆＲアピカルドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：107または108の配列を含む、本発明1001～1010のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1012]
アレナウイルスに結合する、本発明1001～1011のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1013]
（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：427の配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む前記第1のポリペプチドと、
（ｂ）前記任意選択的なリンカーと、
（ｃ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：428の配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む前記第2のポリペプチドと
を含む、本発明1004～1012のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1014]
（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：427の配列に対して最大7個のアミノ酸の変化を有する配列を含む前記第1のポリペプチドと、
（ｂ）前記任意選択的なリンカーと、
（ｃ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：428の配列に対して最大16個のアミノ酸の変化を有する配列を含む前記第2のポリペプチドと
を含む、本発明1004～1012のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1015]
前記第1のポリペプチドがＣ末端において、配列
SKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIK (SEQ ID NO:429)

に対して少なくとも90%の配列同一性もしくは最大5個のアミノ酸の変化を有する配列、またはそのフラグメントを更に含む、本発明1004～1014のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1016]
前記第2のポリペプチドがＣ末端において、配列
KFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTP (SEQ ID NO:434)

に対して少なくとも90%の配列同一性もしくは最大5個のアミノ酸の変化を有する配列、またはそのフラグメントを更に含む、本発明1004～1015のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1017]
前記第1のポリペプチドがＮ末端において、配列
GFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQ (SEQ ID NO:439)

に対して少なくとも90%の配列同一性もしくは最大5個のアミノ酸の変化を有する配列、またはそのフラグメントを更に含む、本発明1004～1016のいずれかのＴｆＲコンストラクト。

[本発明1018]
前記第2のポリペプチドがＮ末端において、配列
SKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIV (SEQ ID NO:444)

に対して少なくとも90％の配列同一性もしくは最大5個のアミノ酸の変化を有する配列、またはそのフラグメントを更に含む、本発明1004～1017のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1019]
前記第1のポリペプチドが、配列
SSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSN
(SEQ ID NO:449)

に対して少なくとも90％の配列同一性または最大10個のアミノ酸の変化を有する配列を含む、本発明1004～1018のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1020]
前記第2のポリペプチドが、配列
DSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTP
VNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELS (SEQ ID NO:450)

に対して少なくとも90％の配列同一性または最大20個のアミノ酸の変化を有する配列を含む、本発明1004～1019のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1021]
前記第1のポリペプチドが前記第2のポリペプチドと直列に直接融合されている、本発明1004～1020のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1022]
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：449の配列を有する前記第1のポリペプチドと、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：450の配列を有する前記第2のポリペプチドとを含み、前記第1のポリペプチドのＣ末端が前記第2のポリペプチドのＮ末端に融合されている、本発明1004～1021のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1023]
SSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSN
(SEQ ID NO:451)

の配列を有する前記第1のポリペプチドと、
DSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLDSP
VNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLS (SEQ ID NO:452)

の配列を有する前記第2のポリペプチドと
を含み、前記第1のポリペプチドのＣ末端が前記第2のポリペプチドのＮ末端に融合されている、本発明1004～1021のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1024]
前記リンカーがアミノ酸1～10個の長さである、本発明1004～1020、1022、及び1023のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1025]
前記リンカーが、Ｇ、ＧＧ、ＧＧＧ、またはＧＧＧＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：453）である、本発明1024のＴｆＲコンストラクト。

[本発明1026]
前記リンカーがタンパク質のループドメインを含む、本発明1004～1020、1022、及び1023のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1027]
前記タンパク質のループドメインのＮ末端とＣ末端との間の距離が5Å未満である、本発明1026のＴｆＲコンストラクト。
[本発明1028]
精製ペプチドを更に含む、本発明1001～1027のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1029]
前記精製ペプチドが、前記ＴｆＲコンストラクトのＮ末端またはＣ末端に融合されている、本発明1028のＴｆＲコンストラクト。
[本発明1030]
切断ペプチドを更に含む、本発明1001～1029のいずれかのＴｆＲコンストラクト。
[本発明1031]
前記切断ペプチドが、前記ＴｆＲコンストラクトのＮ末端またはＣ末端に融合されている、本発明1030のＴｆＲコンストラクト。
[本発明1032]
本発明1001～1031のいずれかのＴｆＲコンストラクトをコードするヌクレオチド配列を含む、単離ポリヌクレオチド。
[本発明1033]
本発明1032のポリヌクレオチドを含むベクター。
[本発明1034]
本発明1032のポリヌクレオチドまたは本発明1033のベクターを含む宿主細胞。
[本発明1035]
ＴｆＲのアピカルドメインに結合する物質を同定する方法であって、
（ａ）本発明1001～1031のいずれかのＴｆＲコンストラクトを前記物質と接触させる工程と、
（ｂ）前記物質が前記ＴｆＲコンストラクトに結合するかどうかを決定する工程と
を含む、前記方法。
[本発明1036]
前記物質が、ポリペプチドまたはタンパク質である、本発明1035の方法。
[本発明1037]
前記物質が、改変Ｆｃポリペプチドまたは改変Ｆｃポリペプチド二量体である、本発明1035または1036の方法。
[本発明1038]
前記物質が抗体である、本発明1035または1036の方法。
[本発明1039]
前記決定する工程（ｂ）が、ＥＬＩＳＡまたは表面プラズモン共鳴によって行われる、本発明1035～1038のいずれかの方法。
[本発明1040]
組換えＴｆＲアピカルドメインコンストラクトを作製する方法であって、直列に融合された第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとを含む遺伝子を発現させることを含み、前記第1のポリヌクレオチドが完全長のＴｆＲアピカルドメインのＣ末端フラグメントをコードし、前記第2のポリヌクレオチドが前記完全長のＴｆＲアピカルドメインのＮ末端フラグメントをコードする、前記方法。
[本発明1041]
発現されると、前記ドメインのＮ末端フラグメントの最初のアミノ酸が前記ドメインのＣ末端フラグメントの最後のアミノ酸と一次配列で連結されるように、前記第1のポリヌクレオチドと前記第2のポリヌクレオチドとが直列に融合される、本発明1040の方法。
[本発明1042]

前記遺伝子が、任意選択的なタンパク質リンカーをコードする任意選択的なリンカーポリヌクレオチドを更に含み、発現されると、前記ドメインのＮ末端フラグメントの最初のアミノ酸が前記リンカーの最後のアミノ酸と一次配列で連結され、前記リンカーの最初のアミノ酸が前記ドメインのＣ末端フラグメントの最後のアミノ酸と一次配列で連結される、本発明1040または1041の方法。

[本発明1043]

発現されると、発現されたタンパク質が環状構造の形となるように、前記遺伝子が、直列な前記第1のポリヌクレオチド、前記任意選択的なリンカーポリヌクレオチド、及び前記第2のポリヌクレオチドをコードする、本発明1040～1042のいずれかの方法。

[本発明1044]

前記発現されたタンパク質を精製して前記単離された組換えＴｆＲアピカルドメインコンストラクトを得ることを更に含む、本発明1040～1043のいずれかの方法。

[本発明1045]

本発明1040～1044のいずれかの方法に従って作製された、単離された組換えヒトＴｆＲアピカルドメインコンストラクト。

[本発明1046]

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：109、110、及び301のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を含む、単離された組換えＴｆＲアピカルドメインコンストラクト。

[本発明1047]

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：109、110、及び301のうちのいずれか1つと少なくとも約90％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離された組換えＴｆＲアピカルドメインコンストラクト。

【図面の簡単な説明】

【００４４】

【図１】図１Ａ～１Ｄは、４つのＣＨ２Ａ２クローンのファージＥＬＩＳＡの結果を示す。ＣＨ２Ａ２　Ｆｃ変異体をファージの表面に発現させ、プレートにコーティングした抗ｃ－Ｍｙｃ抗体９Ｅ１０（発現対照）、陰性対照、ヒトトランスフェリン受容体（ＴｆＲ）、及びカニクイザル（ｃｙｎｏ）ＴｆＲに対する結合について試験した。ｘ軸は、ファージ濃度の尺度であるファージ溶液のOD_{268}を示す。（図１Ａ）クローンＣＨ２Ａ２．５のＥＬＩＳＡの結果を示す。（図１Ｂ）クローンＣＨ２Ａ２．１のＥＬＩＳＡの結果を示す。（図１Ｃ）クローンＣＨ２Ａ２．４のＥＬＩＳＡの結果を示す。（図１Ｄ）クローンＣＨ２Ａ２．１６のＥＬＩＳＡの結果を示す。

【図２】図２Ａ及び２Ｂは、ヒトＴｆＲに結合したＣＨ２Ａ２クローンのファージＥＬＩＳＡの結果を示す。ファージをおおよそ結合EC_{50}でＴｆＲをコーティングしたＥＬＩＳＡプレートに加え、可溶性ホロＴｆまたは可溶性ＴｆＲを異なる濃度で加えた。データは、ＣＨ２Ａ２クローンが、プレートにコーティングされたＴｆＲに対する結合について可溶性ＴｆＲと競合したが、ホロＴｆとは競合しなかったことを示す。（図２Ａ）可溶性ホロＴｆを加えた実験の結果を示す。（図２Ｂ）可溶性ＴｆＲを加えた実験の結果を示す。

【図３】図３Ａ～３Ｄは、ホロＴｆの存在下または非存在下でのＴｆＲに対するＣＨ２Ｃクローンの結合を示す。（図３Ａ）ＴｆＲをＥＬＩＳＡプレートにコーティングし、ファージ上に提示されたクローンＣＨ２Ｃ．２３を大過剰量のホロＴｆ（５μＭ）の存在下または非存在下で加えたファージＥＬＩＳＡの結果を示す。（図３Ｂ）ヒトまたはカニクイザルのＴｆＲをコーティングしたＥＬＩＳＡプレートに対するＦｃ－Ｆａｂ融合体フォーマットのＣＨ２Ｃクローンの結合を示す。（図３Ｃ）ヒトＴｆＲ、カニクイザルＴｆＲ、ホロＴｆ、抗Ｍｙｃ、またはストレプトアビジンをＥＬＩＳＡプレートにコーティングし、ファージに提示されたクローンＣＨ２Ｃ．１７及びＣＨ２Ｃ．２２を異なる希釈度で、ホロＴｆの存在下または非存在下で加えたファージＥＬＩＳＡの結果を示す。これらのデータは、これらのクローンがＴｆＲに対する結合についてホロＴｆと競合しなかったことを示す。（図３Ｄ）５μＭのホロＴｆの存在下、ホロＴｆ単独の結合についてバックグラウンドを引いた、抗ストレプトアビジンセンサーにコーティングしたＴｆＲ－ビオチンに

対するクローンＣＨ２Ｃ．７の結合についてＯｃｔｅｔ（登録商標）（すなわち、バイオレイヤー干渉法）による動態トレースを示し、Ｔｆとの結合について競合は示さなかった。
【図４】図４Ａ及び４Ｂは、ホロＴｆの存在下または非存在下でのＴｆＲに対するＣＨ３Ｂクローンの結合を示す。（図４Ａ）ヒトＴｆＲ、カニクイザルＴｆＲ、ホロＴｆ、抗Ｍｙｃ、またはストレプトアビジンをＥＬＩＳＡプレートにコーティングし、ファージに提示されたクローンＣＨ３Ｂ．１１及びＣＨ３Ｂ．１２を異なる希釈度で、ホロＴｆの存在下または非存在下で加えたファージＥＬＩＳＡの結果を示す。これらのデータは、これらのクローンがＴｆＲに対する結合についてホロＴｆと競合しなかったことを示す。（図４Ｂ）ヒトまたはカニクイザルのＴｆＲをコーティングしたＥＬＩＳＡプレートに対するＣＨ３Ｂクローンの結合を示す。ＣＨ３Ｂクローン配列を含むＦｃ領域をＦａｂフラグメントに融合し、二量体フォーマットでアッセイした。
【図５】ＣＨ３Ｂクローンの成熟についてＮＮＫパッチライブラリーを示す。リボンはＣＨ３ドメインの骨格を示し、暗い表面は元のＣＨ３Ｂレジスターを表し、明るい表面のパッチは拡張されたレパートリーを表す。
【図６】３回の分取ラウンド後の結合集団の濃縮を示す、酵母でのＣＨ３Ｃクローンの選択のＦＡＣＳプロットを示す。分取ラウンド１及び２では、ビオチン化ＴｆＲを、酵母とインキュベートする前にストレプトアビジン－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７に予めロードした。分取ラウンド３では、ビオチン化ＴｆＲを最初に酵母とインキュベートし、二次検出用にストレプトアビジン－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７を加えた。すべての分取ラウンドで、酵母ディスプレイコンストラクト上のＣ末端Ｍｙｃタグに対するニワトリ抗ｃ－Ｍｙｃ抗体（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒより入手）を使用して発現を監視した。
【図７】図７Ａ～７Ｃは、ホロＴｆの存在下または非存在下でのＴｆＲに対するＣＨ３Ｃクローンの結合を示す。クローンは、Ｆｃ－Ｆａｂ融合体フォーマットでアッセイした。ＴｆＲに結合する可変領域を有する標準的抗体であるＡｂ２０４をこのアッセイの陽性対照として用いた。（図７Ａ）ＥＬＩＳＡプレートにコーティングしたヒトＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ変異体の結合を示す。（図７Ｂ）５μＭのホロＴｆの存在下でＥＬＩＳＡプレートにコーティングしたヒトＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ変異体の結合を示す。（図７Ｃ）ＥＬＩＳＡプレートにコーティングしたカニクイザルＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ変異体の結合を示す。
【図８】ヒトＴｆＲを内因性に発現する２９３Ｆ細胞に対するＣＨ３Ｃクローンの結合を示す。細胞を９６ウェルＶ底プレート中に分配し、Ｆｃ－Ｆａｂ融合結合タンパク質としてフォーマット化した異なる濃度のＣＨ３Ｃクローンを加えた。４℃で１時間のインキュベーション後、各プレートを遠心し、洗浄してから、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７二次抗体と、４℃で３０分間インキュベートした。細胞を更に洗浄した後、各プレートをＦＡＣＳＣａｎｔｏ（商標）ＩＩフローサイトメーターで読み取り、ＡＰＣ（６４７ｎｍ）チャンネルの蛍光中央値をＦｌｏｗＪｏ（登録商標）ソフトウェアを使用して求めた。
【図９】図９Ａ及び９Ｂは、ヒトＴｆＲを内因性に発現するＨＥＫ２９３細胞内へのＣＨ３Ｃ．３の内在化を示す。１μＭ濃度のＣＨ３Ｃ．３または対照を３７℃及び８％CO_2濃度で３０分間加えた後、細胞を洗浄し、透過処理し、抗ヒトＩｇＧ－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８二次抗体で染色した。更なる洗浄後、細胞を蛍光顕微鏡法でイメージングし、斑点の数を定量した。（図９Ａ）顕微鏡法のデータを示す。（図９Ｂ）ウェル当たりの斑点の数のグラフを示す。
【図１０】ＣＨ３Ｃソフトライブラリーの選択スキームを示す。初期ライブラリーをＭＡＣＳによりヒト（Ｈ）またはカニクイザル（Ｃ）ＴｆＲに対して分取した。次いで得られた酵母プールを分割し、それぞれを最初のＦＡＳ分取ラウンドと同様にヒトまたはカニクイザルＴｆＲに対して分取した。得られた各プールを別の分取ラウンド用に再び分割した。最後に、ＨＨＨ及びＣＣＣプールを別に維持し、両方の標的種がみられた他のプールを最終的にプールした。

【図１１】図１１Ａ及び１１Ｂは、ヒト及びカニクイザルＴｆＲに対する最初のソフトランダム化ライブラリーから特定されたＣＨ３Ｃクローンの結合を示す。陽性対照は高親和性の抗ＴｆＲ抗体であるＡｂ２０４、及び低親和性の抗ＴｆＲ抗体であるＡｂ０８４とした。（図１１Ａ）ヒトＴｆＲに対する結合を示す。（図１１Ｂ）カニクイザルＴｆＲに対する結合を示す。

【図１２】図１２Ａ及び１２Ｂは、ホロＴｆの存在下または非存在下でヒトＴｆＲに対する最初のソフトランダム化ライブラリーから特定されたＣＨ３Ｃクローンの結合を示す。クローンは、Ｆｃ－Ｆａｂ融合体フォーマットとした。高親和性の抗ＴｆＲ抗体であるＡｂ２０４をこのアッセイの陽性対照として用いた。（図１２Ａ）ＥＬＩＳＡプレートにコーティングしたヒトＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ変異体の結合を示す。（図１２Ｂ）５μＭのホロＴｆの存在下でＥＬＩＳＡプレートにコーティングしたヒトＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ変異体の結合を示す。

【図１３】２９３Ｆ細胞に対する最初のソフトランダム化ライブラリーから特定されたＣＨ３Ｃクローンの結合を示す。細胞を９６ウェルＶ底プレート中に分配し、Ｆｃ－Ｆａｂ融合タンパク質としてフォーマット化した異なる濃度のＣＨ３Ｃクローンを加えた。４℃で１時間のインキュベーション後、各プレートを遠心し、洗浄してから、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７二次抗体と、４℃で３０分間インキュベートした。細胞を更に洗浄した後、各プレートをＦＡＣＳＣａｎｔｏ（商標）ＩＩフローサイトメーターで読み取り、ＡＰＣ（６４７ｎｍ）チャンネルの蛍光中央値をＦｌｏｗＪｏ（登録商標）ソフトウェアを使用して求めた。

【図１４】図１４Ａ～１４Ｃは、ＣＨＯ－Ｋ１細胞に対する最初のソフトランダム化ライブラリーから特定されたＣＨ３Ｃクローンの結合を示す。細胞を９６ウェルＶ底プレート中に分配し、Ｆｃ－Ｆａｂ融合体としてフォーマット化した異なる濃度のＣＨ３Ｃクローンを加えた。４℃で１時間のインキュベーション後、各プレートを遠心し、洗浄してから、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７二次抗体と、４℃で３０分間インキュベートした。細胞を更に洗浄した後、各プレートをＦＡＣＳＣａｎｔｏ（商標）ＩＩフローサイトメーターで読み取り、ＡＰＣ（６４７ｎｍ）チャンネルの蛍光中央値をＦｌｏｗＪｏ（登録商標）ソフトウェアを使用して求めた。（図１４Ａ）ヒトＴｆＲを過剰発現したＣＨＯ－Ｋ１細胞を示す。（図１４Ｂ）カニクイザルＴｆＲを過剰発現したＣＨＯ－Ｋ１細胞を示す。（図１４Ｃ）ヒトＴｆＲを発現しないＣＨＯ－Ｋ１親細胞を示す。

【図１５】図１５Ａ及び１５Ｂは、ＴｆＲのアピカルドメインを示す。（図１５Ａ）ヒトＴｆＲタンパク質のアピカルドメインの位置を示す。挿入図は、ヒトＴｆＲとカニクイザルＴｆＲ間で異なる７個の残基の拡大図を示す。（図１５Ｂ）ヒトＴｆＲ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０７）とカニクイザルＴｆＲ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０８）間で異なる７個の残基を含む配列アラインメントを示す。コンセンサス配列はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２２である。

【図１６】図１６Ａ～１６Ｅは、ファージ上に提示されたアピカルドメインに対するＣＨ３Ｃクローンの結合を示す。（図１６Ａ）異なるＴｆＲアピカルドメイン変異体のＭｙｃ発現を示し、各変異体の発現レベルが同様かつ正規化されていたことを示す。（図１６Ｂ）野生型及び変異体ヒトＴｆＲアピカルドメインに対するＣＨ３Ｃ．１８の結合を示し、Ｒ２０８Ｇ変異体に対する低い結合を示す。（図１６Ｃ）野生型及び変異体ヒトＴｆＲアピカルドメインに対するＣＨ３Ｃ．３５の結合を示し、Ｒ２０８Ｇ変異体に対する低い結合を示す。（図１６Ｄ）野生型のヒト及びカニクイザルＴｆＲアピカルドメイン、ならびにＧ２０８Ｒ変異体カニクイザルアピカルドメインに対するＣＨ３Ｃ．１８の結合を示し、変異体に対する結合の回復を示す。（図１６Ｅ）野生型のヒト及びカニクイザルＴｆＲアピカルドメイン、ならびにＧ２０８Ｒ変異体カニクイザルアピカルドメインに対するＣＨ３Ｃ．３５の結合を示し、変異体に対する結合の回復を示す。

【図１７】図１７Ａ～１７Ｄは、変異した位置を野生型残基に戻すことによるＣＨ３Ｃ変異体のパラトープマッピングを示す。（図１７Ａ）復帰変異体についてヒトＴｆＲに対す

るＥＬＩＳＡ結合によるＣＨ３Ｃ．３５のパラトープマッピングを示す。（図１７Ｂ）復帰変異体についてカニクイザルＴｆＲに対するＥＬＩＳＡ結合によるＣＨ３Ｃ．３５のパラトープマッピングを示す。（図１７Ｃ）復帰変異体についてヒトＴｆＲに対するＥＬＩＳＡ結合によるＣＨ３Ｃ．１８のパラトープマッピングを示す。（図１７Ｄ）復帰変異体についてカニクイザルＴｆＲに対するＥＬＩＳＡ結合によるＣＨ３Ｃ．１８のパラトープマッピングを示す。

【図１８】図１８Ａ～１８Ｄは、ＣＨ３Ｃのコンセンサス変異ライブラリーの設計を示す。（図１８Ａ）ＣＨ３Ｃ．３５様配列に基づくコンセンサスライブラリーを示す。（図１８Ｂ）ＣＨ３Ｃ．１８様配列に基づくコンセンサスライブラリーを示す。（図１８Ｃ）ＣＨ３Ｃ．１８及びＣＨ３Ｃ．３５に基づくギャップライブラリーを示す。（図１８Ｄ）ＣＨ３Ｃ．１８に基づいた芳香族ライブラリーを示す。

【図１９】図１９Ａ～１９Ｅは、ヒトまたはカニクイザルＴｆＲに対するコンセンサス変異ライブラリーからのＣＨ３Ｃ変異体の結合ＥＬＩＳＡを示す。新たな変異体（すなわち、ＣＨ３Ｃ．３．２－１、ＣＨ３Ｃ．３．２－５、及びＣＨ３Ｃ．３．２－１９）がカニクイザル及びヒトＴｆＲに対して同様の結合EC_{50}値を有していたのに対して、親クローンＣＨ３Ｃ．１８及びＣＨ３Ｃ．３５はカニクイザルＴｆＲに対してヒトＴｆＲに有意に高いEC_{50}値を有していた。（図１９Ａ）ＣＨ３Ｃ．３．２－１のデータを示す。（図１９Ｂ）ＣＨ３Ｃ．３．２－１９のデータを示す。（図１９Ｃ）ＣＨ３Ｃ．３．２－５のデータを示す。（図１９Ｄ）ＣＨ３Ｃ．１８のデータを示す。（図１９Ｅ）ＣＨ３Ｃ．３５のデータを示す。

【図２０】ヒト（ＨＥＫ２９３）及びサル（ＬＬＣ－ＭＫ２）細胞におけるコンセンサス成熟ライブラリーからのＣＨ３Ｃ変異体の内在化を示す。ヒト及びカニクイザルＴｆＲに対して同様の親和性を有するクローンＣＨ３Ｃ．３．２－５及びＣＨ３Ｃ３．２－１９は、ヒトＴｆＲによりよく結合したクローンＣＨ３Ｃ．３５と比較して、サル細胞への有意に高い取り込みを示した。抗ＢＡＣＥ１抗体であるＡｂ１０７を陰性対照として使用した。（ＢＡＣＥ１はＨＥＫ２９３細胞でもＭＫ２細胞でも発現されない）。抗ＴｆＲ抗体であるＡｂ２０４を陽性対照として使用した。

【図２１】ＣＨ３構造上に示されたＮＮＫウォーク残基のマップを示す（出典ＰＤＢ　４Ｗ４Ｏ）。黒色の表面は、元のＣＨ３Ｃレジスターを示し、灰色の表面はＮＮＫウォーク構造に組み込まれた４４個の残基を示し、リボンは野生型の骨格を示す。

【図２２】ＮＮＫウォークライブラリーの３回の分取ラウンド後の濃縮された酵母集団を示す。酵母を抗ｃ－Ｍｙｃで染色し、発現（ｘ軸）、及びＴｆＲアピカルドメイン（２００ｎＭのカニクイザルまたは２００ｎＭのヒト）への結合（ｙ軸）について監視した。ここに示したデータは、両方のＴｆＲアピカルドメインのオーソログへの高い結合性を明らかに示している。

【図２３】図２３Ａ及び２３Ｂは、ＣＨ３Ｃ．３５．２１変異体のＦＡＣＳデータを示す。酵母を抗ｃ－Ｍｙｃで染色し、発現（ｘ軸）、及びヒトＴｆＲアピカルドメイン（２００ｎＭ）への結合（ｙ軸）について監視した。図２３Ａは、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２１のＦＡＣＳデータを示す。図２３Ｂは、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２１の１１個の位置を野生型に復帰変異させるか（ＦＡＣＳプロットの上列）、または２０種類すべてのアミノ酸のＮＮＫライブラリーとして発現させた（ＦＡＣＳプロットの下列、分取を行う前）変異体のＦＡＣＳデータを示す。

【図２４】図２４Ａ～２４Ｄは、ヒト及びカニクイザルＴｆＲに結合する二価及び一価のＣＨ３Ｃポリペプチドの ＥＬＩＳＡによる比較を示す。（図２４Ａ）ヒトＴｆＲに結合する二価のＣＨ３Ｃポリペプチドを示す。（図２４Ｂ）カニクイザルＴｆＲに結合する二価のＣＨ３Ｃポリペプチドを示す。（図２４Ｃ）ヒトＴｆＲに結合する一価のＣＨ３Ｃポリペプチドを示す。（図２４Ｄ）カニクイザルＴｆＲに結合する一価のＣＨ３Ｃポリペプチドを示す。

【図２５】図２５Ａ～２５Ｅは、一価のＣＨ３Ｃポリペプチドの細胞結合を示す。（図２５Ａ）２９３細胞を示す。（図２５Ｂ）図２５Ａに示される２９３細胞に対する結合の拡

大図を示す。（図２５Ｃ）ヒトＴｆＲを安定的にトランスフェクトしたＣＨＯ－Ｋ１細胞を示す。（図２５Ｄ）図２５Ｃに示されるヒトＴｆＲを安定的にトランスフェクトしたＣＨＯ－Ｋ１細胞に対する結合の拡大図を示す。（図２５Ｅ）カニクイザルＴｆＲを安定的にトランスフェクトしたＣＨＯ－Ｋ１細胞を示す。

【図２６】ＨＥＫ２９３細胞内の一価及び二価ＣＨ３Ｃポリペプチドの内在化を示す。

【図２７】図２７Ａ～２７Ｈは、ＣＨ３Ｃポリペプチドの結合速度論を示す。（図２７Ａ）ヒトＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ．３５．Ｎ１６３の結合のデータを示す。（図２７Ｂ）ヒトＴｆＲに対するＣＨＣ３．３５の結合のデータを示す。（図２７Ｃ）ヒトＴｆＲに結合するＣＨＣ３．３５．Ｎ１６３の一価の結合のデータを示す。（図２７Ｄ）ヒトＴｆＲに対するＣＨＣ３．３５の一価の結合のデータを示す。（図２７Ｅ）カニクイザルＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ．３５．Ｎ１６３の結合のデータを示す。（図２７Ｆ）カニクイザルＴｆＲに対するＣＨＣ３．３５の結合のデータを示す。（図２７Ｇ）カニクイザルＴｆＲに結合するＣＨＣ３．３５．Ｎ１６３の一価の結合のデータを示す。（図２７Ｈ）カニクイザルＴｆＲに対するＣＨＣ３．３５の一価の結合のデータを示す。

【図２８】図２８Ａ～２８Ｆは、ＣＨ３Ｃポリペプチドの結合速度論を示す。（図２８Ａ）ヒトＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ．３．２－１の結合のデータを示す。（図２８Ｂ）ヒトＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ．３．２－５の結合のデータを示す。（図２８Ｃ）ヒトＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ．３．２－１９の結合のデータを示す。（図２８Ｄ）カニクイザルＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ．３．２－１の結合のデータを示す。（図２８Ｅ）カニクイザルＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ．３．２－５の結合のデータを示す。（図２８Ｆ）カニクイザルＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ．３．２－１９の結合のデータを示す。

【図２９】図２９Ａ～２９Ｅは、ヒトＴｆＲ細胞外ドメインの存在下（下のトレース）または非存在下（上のトレース）でのｐＨ５．５におけるＦｃＲｎに対するポリペプチド－Ｆａｂ融合体の結合を示す。図２９Ａは、クローンＣＨ３Ｃ．３５のデータを示す。図２９Ｂは、クローンＣＨ３Ｃ．３５．１９のデータを示す。図２９Ｃは、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０のデータを示す。図２９Ｄは、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２１のデータを示す。図２９Ｅは、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２４のデータを示す。

【図３０】野生型マウスにおけるＣＨ３Ｃポリペプチドの薬物動態学（ＰＫ）分析を示す。すべてのポリペプチド－Ｆａｂ融合体は、より速いクリアランスを示したＣＨ３Ｃ．３．２－５を除き、野生型Ｆｃ－Ｆａｂ融合体（すなわち、抗ＲＳＶ抗体であるＡｂ１２２、及び抗ＢＡＣＥ１抗体であるＡｂ１５３）と同等のクリアランスを示した。

【図３１】マウスの脳組織における脳の薬物動態学／薬力学（ＰＫ／ＰＤ）データを示す。キメラｈｕＴｆＲヘテロ接合体マウス（ｎ＝４／群）に４２ｍｇ／ｋｇのＡｂ１５３または一価ＣＨ３Ｃ．３５．Ｎ１６３（「ＣＨ３Ｃ．３５．Ｎ１６３＿一価」として示される）のいずれかを静脈内投与し、野生型マウス（ｎ＝３）に５０ｍｇ／ｋｇの対照ヒトＩｇＧ１（「ｈｕＩｇＧ１」として示される）を静脈内投与した。棒グラフは平均±ＳＤを表す。

【図３２】図３２Ａ及び３２Ｂは、５０ｍｇ／ｋｇのポリペプチドによる処理の２４時間後にｈＴｆＲ$^{アピカル+/+}$マウスにみられるＩｇＧの濃度を示す。（図３２Ａ）血漿中のＩｇＧの濃度を示す。（図３２Ｂ）脳組織中のＩｇＧの濃度を示す。

【図３３】図３３Ａ及び３３Ｂは、アミロイドβタンパク質５０（Ａβ４０）の低下により測定される、２４時間後のｈＴｆＲ$^{アピカル+/+}$マウスに投与されたポリペプチドの標的結合を示す。（図３３Ａ）血漿中のＡβ４０濃度を示す。（図３３Ｂ）脳組織中のＡβ４０濃度を示す。

【図３４】ＣＨ３Ｃ．３．１８ＦｃとＴｆＲアピカルドメイン（ＡＤ）の複合体のサイズ分画のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す。レーン１：分子量マーカーレーン２：サイズ排除クロマトグラフィー後の低減されたＣＨ３Ｃ．１８Ｆｃ－ＡＤ複合体。

【図３５】図３５Ａ及び３５Ｂは、本発明のポリペプチドとトランスフェリン受容体との結合を示す。図３５Ａは、クローンＣＨ３Ｃ．１８とトランスフェリン受容体のアピカルドメインとの結合界面を示す。図３５Ｂは、図３５Ａに示される結合面の拡大図を示す。

【図３６】図３６Ａ及び３６Ｂは、ＣＨ３Ｃ．１８とＴｆＲアピカルドメインとの相互作用を示す。（図３６Ａ）ＴｆＲアピカルドメイン及びＣＨ３Ｃ．１８Ｆｃの構造アーキテクチャ（上）、ならびにＴｆＲアピカルドメイン及びＣＨ３Ｃ．１８Ｆｃの結合表面（５Å以内）（下）を示す。共複合体構造を解像度３．６Åで解像した。この構造では、ＣＨ３Ｃ．１８に結合したＴｆＲアピカルドメインのエピトープをみることができる。詳細には、アピカルドメインのＮ末端領域がＣＨ３Ｃ　Ｆｃ結合に関与しており、構造はＣＨ３Ｃ．１８Ｆｃ及びＴｆＲアピカルドメインの突然変異誘発データと符合している。また、ＣＨ３Ｃ．１８ライブラリーの側鎖はいずれもＴｆＲと接触している（５Å以内）。ＣＨ３Ｃ．１８ライブラリーの残基：Ｌ１５７、Ｈ１５９、Ｖ１６０、Ｗ１６１、Ａ１６２、Ｖ１６３、Ｐ１８６、Ｔ１８９、及びＷ１９４。非ライブラリー残基：Ｆ１９６及びＳ１５６。（図３６Ｂ）ＣＨ３Ｃ．１８ＦｃとＴｆＲアピカルドメインとの主要な相互作用を示す。ＣＨ３Ｃ．１８Ｆｃ上のＷ１６１とアピカルドメイン上のＲ２０８とのカチオン－π相互作用が中心的な結合相互作用である。ＣＨ３Ｃ．１８のＷ３８８またはアピカルドメインのＲ２０８の変異は、ＣＨ３Ｃ．１８Ｆｃとアピカルドメインとの結合を妨げる。これと一致して、ヒトからカニクイザルへのＦ２０８Ｇ変異は、カニクイザルの低い親和性を説明する。更に、ヒトアピカルドメインで保存されていない残基（Ｎ２９２及びＥ２９４（カニクイザルのＫ２９２及びＤ２９４））が近くにある。したがって、ＣＨ３Ｃ．１８ＦｃのＱ１９２を変異させることでヒト結合に対してカニクイザルの結合性を選択的に高めることができる。

【図３７】図３７Ａ及び３７Ｂは、本発明のポリペプチドとトランスフェリン受容体との結合を示す。図３７Ａは、クローンＣＨ３Ｃ．１８の残基（Ａ鎖）とトランスフェリン受容体のアピカルドメインの残基（Ｄ鎖）との間の水素結合及び非結合接触を示す。図３７Ｂは、本発明のポリペプチドとトランスフェリン受容体との結合を示す。クローンＣＨ３Ｃ．１８の残基（Ｂ鎖）とトランスフェリン受容体のアピカルドメインの残基（Ｃ鎖）との間の水素結合及び非結合接触を示す。

【図３８】ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４のアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２３～４２６）のアラインメントを示す。

【図３９】図３９Ａ～３９Ｃは、本発明のポリペプチドとトランスフェリン受容体との結合を示す。（図３９Ａ）ＴｆＲアピカルドメイン及びＣＨ３Ｃ．３５Ｆｃの構造アーキテクチャ（上）、ならびにＴｆＲアピカルドメイン及びＣＨ３Ｃ．３５Ｆｃの結合表面（５Å以内）（下）を示す。共複合体構造を解像度３．４Åで解像した。この構造では、ＣＨ３Ｃ．３５に結合したＴｆＲアピカルドメインのエピトープをみることができる。ＣＨ３Ｃ．３５ライブラリーの側鎖はいずれもＴｆＲと接触している（５Å以内）。ＣＨ３Ｃ．３５ライブラリーの残基：Ｙ１５７、Ｔ１５９、Ｅ１６０、Ｗ１６１、Ｓ１６２、Ｔ１８６、Ｅ１８９、及びＷ１９４。非ライブラリー残基：Ｆ１９６、Ｓ１５６、Ｑ１９２。（図３９Ｂ及び３９Ｃ）図３９Ａに示されるクローンＣＨ３Ｃ．３５とトランスフェリン受容体のアピカルドメインとの結合相互作用の拡大図を示す。

【図４０】図４０Ａは、ＣＨ３Ｃ．３５ＦｃとＴｆＲ－ＡＤとの複合体と、ＣＨ３Ｃ．１８ＦｃとＴｆＲ－ＡＤとの複合体との重ね合わせ構造を示す。図４０Ｂは、図４０Ａの重ね合わせ構造の拡大図を示す。

【図４１Ａ】本発明のポリペプチドとトランスフェリン受容体との結合を示す。クローンＣＨ３Ｃ．３５の残基（Ａ鎖）とトランスフェリン受容体のアピカルドメインの残基（Ｄ鎖）との間の水素結合及び非結合接触を示す。

【図４１Ｂ】本発明のポリペプチドとトランスフェリン受容体との結合を示す。クローンＣＨ３Ｃ．３５の残基（Ｂ鎖）とトランスフェリン受容体のアピカルドメインの残基（Ｃ鎖）との間の水素結合及び非結合接触を示す。

【図４２】図４２Ａ及び４２Ｂは、カニクイザルにおけるＡｂ１５３のＦａｂドメインに融合したＣＨ３Ｃ変異体を含むＦｃ－Ｆａｂ融合ポリペプチドの血漿ＰＫ及びＡβ４０低下を示す。（図４２Ａ）Ａｂ２１０及びＣＨ３Ｃ．３５．９：Ａｂ１５３が、対照ＩｇＧ（Ａｂ１２２）及びＡｂ１５３と比較してＴｆＲ介在性のクリアランスによって、より速

いクリアランスを示したことを示す。（図４２Ｂ）いずれもＢＡＣＥ１に結合してこれを阻害するＡｂ１５３、Ａｂ２１０、及びＣＨ３Ｃ．３５．９：Ａｂ１５３が、血漿中で有意なＡβ４０の低下を示したことを示す。

【図４３】図４３Ａ及び４３Ｂは、カニクイザルにおけるＡｂ１５３のＦａｂドメインに融合したＣＨ３Ｃ変異体を含むＦｃ－Ｆａｂ融合ポリペプチドによる脳脊髄液（ＣＳＦ）のＡβ及びｓＡＰＰβ／ｓＡＰＰαの有意な低下を示す。（図４３Ａ）Ａｂ２１０及びＣＨ３Ｃ．３５．９：Ａｂ１５３を投与した動物は、Ａｂ１５３及び対照ＩｇＧ（Ａｂ１２２）と比較してＣＳＦ中のＡβ４０の約７０％の低下を示したことを示す。（図４３Ｂ）Ａｂ２１０及びＣＨ３Ｃ．３５．９：Ａｂ１５３を投与した動物は、Ａｂ１５３及び対照ＩｇＧ（Ａｂ１２２）と比較してｓＡＰＰβ／ｓＡＰＰα比の約７５％の低下を示したことを示す。ｎ＝４／群。折れ線グラフは平均±ＳＥＭを表す。

【図４４】図４４Ａ及び４４Ｂは、抗ＢＡＣＥ１＿Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ３５．２１：Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ３５．２０：Ａｂ１５３、またはＣＨ３Ｃ３５：Ａｂ１５３ポリペプチド融合体の単回の５０ｍｇ／ｋｇの全身注射後のｈＴｆＲ$^{アピカル+／+}$ノックイン（ＫＩ）マウスの血漿（図４４Ａ）及び脳ライセート（図４４Ｂ）中のｈｕＩｇＧ１濃度を示す（平均±ＳＥＭ、ｎ＝５／群）。図４４Ｃは、抗ＢＡＣＥ１＿Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ３５．２１：Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ３５．２０：Ａｂ１５３、またはＣＨ３Ｃ３５：Ａｂ１５３ポリペプチド融合体の単回の５０ｍｇ／ｋｇの全身注射後のｈＴｆＲ$^{アピカル+／+}$ＫＩマウスの脳ライセート中の内因性マウスＡβの濃度を示す（平均±ＳＥＭ、ｎ＝５／群）。図４４Ｄは、抗ＢＡＣＥ１＿Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ３５．２１：Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ３５．２０：Ａｂ１５３、またはＣＨ３Ｃ３５：Ａｂ１５３ポリペプチド融合体の単回の５０ｍｇ／ｋｇの全身注射後のｈＴｆＲ$^{アピカル+／+}$ＫＩマウスの脳ライセート中のアクチンに対して正規化した脳ＴｆＲタンパク質のウェスタンブロットによる定量化を示す（平均±ＳＥＭ、ｎ＝５／群）。

【図４５】図４５Ａ及び４５Ｂは、抗ＢＡＣＥ１＿Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ．３５．２３：Ａｂ１５３、またはＣＨ３Ｃ．３５．２３．３：Ａｂ１５３ポリペプチド融合体の単回の５０ｍｇ／ｋｇの全身注射後のｈＴｆＲ$^{アピカル+／+}$ＫＩマウスの血漿（図４５Ａ）及び脳ライセート（図４５Ｂ）中のｈｕＩｇＧ１濃度を示す（平均±ＳＥＭ、ｎ＝５／群）。図４５Ｃは、抗ＢＡＣＥ１＿Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ．３５．２３：Ａｂ１５３、またはＣＨ３Ｃ．３５．２３．３：Ａｂ１５３ポリペプチド融合体の単回の５０ｍｇ／ｋｇの全身注射後のｈＴｆＲ$^{アピカル+／+}$ＫＩマウスの脳ライセート中の内因性マウスＡβの濃度を示す（平均±ＳＥＭ、ｎ＝５／群）。図４５Ｄは、抗ＢＡＣＥ１＿Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ．３５．２３：Ａｂ１５３、またはＣＨ３Ｃ．３５．２３．３：Ａｂ１５３ポリペプチド融合体の単回の５０ｍｇ／ｋｇの全身注射後のｈＴｆＲ$^{アピカル+／+}$ＫＩマウスの脳ライセート中のアクチンに対して正規化した脳ＴｆＲタンパク質のウェスタンブロットによる定量化を示す（平均±ＳＥＭ、ｎ＝４／群）。

【図４６】図４６Ａ～４６Ｄは、示されるタンパク質の単回の３０ｍｇ／ｋｇ用量の投与後のカニクイザルにおける２８日間のＰＫＰＤ実験を示す。図４６Ａ及び４６Ｂは、血清中の血清ｈｕＩｇＧ１及び血漿中の血漿Ａβ濃度を示し、経時的な投与化合物の末梢曝露及び血漿Ａβ濃度に対する結果的な影響を示す。図４６Ｃ及び４６Ｄは、投与後のカニクイザルのＣＳＦ中のＡβ及びｓＡＰＰβ／ｓＡＰＰαを示す（平均±ＳＥＭ、ｎ＝４～５／群）。

【図４７】図４７Ａ～４７Ｃは、示される各タンパク質の単回の３０ｍｇ／ｋｇ用量の投与後のカニクイザルにおける末梢血中の、投与前濃度に対する血中網状赤血球（図４７Ａ）、絶対血清鉄濃度（図４７Ｂ）、及び絶対赤血球数（図４７Ｃ）を示す（平均±ＳＥＭ、ｎ＝４～５／群）。

【図４８】図４８Ａ及び４８Ｂは、１４日間にわたる単回の１０ｍｇ／ｋｇ静脈内注射後のｈＦｃＲｎノックインマウスにおける、示される各タンパク質の末梢ＰＫ分析（血漿ｈｕＩｇＧ１濃度（図４８Ａ）及びクリアランス値（図４８Ｂ））を示す（平均±ＳＥＭ、ｎ＝３／群）。

【発明を実施するための形態】
【００４５】
詳細な説明
Ｉ．序論
本発明では、血液脳関門（ＢＢＢ）を通過して能動的に輸送され得るポリペプチドについて開示する。一態様では、本発明は、Ｆｃ領域内の特定のアミノ酸の組を改変することで血液脳関門受容体に結合することが可能なＦｃポリペプチドを作製することができるという発見に一部基づいたものである。本明細書に開示されるＦｃポリペプチドは、新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）に更に結合する。脳への送達が効果的である障害及び疾患を治療するためにこれらのポリペプチドを用いて治療剤（例えば、治療用ポリペプチド、抗体可変領域、及び小分子）を輸送することができる。本明細書では、単量体のＴｆＲアピカルドメインまたは完全長のＴｆＲ配列に対して環状に並べ替えられたＴｆＲアピカルドメインの１つ以上の部分を含むトランスフェリン受容体（ＴｆＲ）コンストラクトについても記載する。ＴｆＲコンストラクトは、任意選択的なリンカーによって互いに直列に融合されたＴｆＲアピカルドメインの２つの異なる部分で構成することができる。本明細書に記載されるＴｆＲコンストラクトは、アレナウイルス（例えば、マチュポウイルス）に結合することができる。
【００４６】
いくつかの実施形態では、ＣＨ３またはＣＨ２ドメインポリペプチドを置換することでＢＢＢ受容体、例えばトランスフェリン受容体に結合するポリペプチドを生成することができる。したがって、一態様では、本明細書において、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合に、アミノ酸の組（ｉ）１５７、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１８６、１８９、及び１９４、または（ｉｉ）１１８、１１９、１２０、１２２、２１０、２１１、２１２、及び２１３に複数の置換を有するＢＢＢ結合ポリペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、本発明のＢＢＢ結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合に、アミノ酸の組（ｉｉｉ）４７、４９、５６、５８、５９、６０、６１、６２、及び６３、（ｉｖ）３９、４０、４１、４２、４３、４４、６８、７０、７１、及び７２、（ｖ）４１、４２、４３、４４、４５、６５、６６、６７、６９、及び７３、または（ｖｉ）４５、４７、４９、９５、９７、９９、１０２、１０３、及び１０４に複数の置換を有する。ある組のアミノ酸位置の４個～すべてのいずれかを置換することができる。本開示の目的では、置換はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる。したがって、あるアミノ酸は、そのアミノ酸が天然に存在するＦｃポリペプチド内のその位置に存在する場合であっても、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の対応する位置のアミノ酸と異なる場合には置換とみなされる。
【００４７】
本明細書ではまた、組（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）、（ｉｖ）、（ｖ）、または（ｖｉ）の複数の位置に置換を有する変異体ポリペプチドを生成することによるＢＢＢ受容体結合ポリペプチドを生成する方法も提供される。かかる変異体は、本明細書に述べられるようにＢＢＢ受容体結合について分析し、結合性を高めるために更に変異させることができる。
【００４８】
更なる態様では、本明細書において、組成物をＢＢＢ受容体発現細胞にターゲティングする（例えば、組成物をその細胞に送達する、または組成物を血液脳関門のような内皮を通過して送達する）、治療方法及びＢＢＢ受容体結合ポリペプチドを使用する方法が提供される。
【００４９】
ＩＩ．定義
本明細書で使用される単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」には、内容によってそうでない旨が明確に示されない限り、複数の指示対象が含まれる。したがって、例えば、「ポリペプチド」と言った場合、２つ以上のそのような分子を含み得る、といった具合

である。
【００５０】
本明細書で使用するところの「約」及び「およそ」なる用語は、数値または範囲において特定される量を修飾して用いられる場合、その数値、及び例えば±２０％、±１０％、または±５％といった、当業者には周知のその値からの妥当な偏差が、記載される値の想定される意味の範囲内にあることを示す。
【００５１】
本発明との関連で使用するところの「トランスフェリン受容体」または「ＴｆＲ」とは、トランスフェリン受容体タンパク質１のことを指す。ヒトトランスフェリン受容体１のポリペプチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３５に記載されている。他の種由来のトランスフェリン受容体タンパク質１の配列も知られている（例えば、チンパンジー（アクセッション番号ＸＰ＿００３３１０２３８．１）、アカゲザル（ＮＰ＿００１２４４２３２．１）、イヌ（ＮＰ＿００１００３１１１．１）、ウシ（ＮＰ＿００１１９３５０６．１）、マウス（ＮＰ＿０３５７６８．１）、ラット（ＮＰ＿０７３２０３．１）、及びニワトリ（ＮＰ＿９９０５８７．１））。「トランスフェリン受容体」なる用語には、トランスフェリン受容体タンパク質１の染色体座の遺伝子によってコードされる例示的な参照配列（例えばヒト配列）の対立遺伝子変異体も包含される。完全長のトランスフェリン受容体タンパク質は、短いＮ末端細胞内領域、膜貫通領域、及び大きな細胞外ドメインを含んでいる。細胞外ドメインは、プロテアーゼ様ドメイン、螺旋状ドメイン、及びアピカルドメインの３つのドメインによって特徴付けられる。ヒトトランスフェリン受容体１のアピカルドメイン配列はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０７に記載されている。
【００５２】
本明細書で使用するところの「Ｆｃポリペプチド」なる用語は、構造ドメインとしてＩｇフォールドを特徴とする、天然に存在する免疫グロブリンの重鎖ポリペプチドのＣ末端領域ことを指す。Ｆｃポリペプチドは、少なくともＣＨ２ドメイン及び／またはＣＨ３ドメインを含む定常領域配列を含み、ヒンジ領域の少なくとも一部を含むことができる。一般的に、Ｆｃポリペプチドは、少なくともＣＨ２ドメイン及び／またはＣＨ３ドメインを含む定常領域配列を含み、ヒンジ領域の少なくとも一部を含むことができるが、可変領域は含まない。
【００５３】
「改変Ｆｃポリペプチド」とは、野生型の免疫グロブリン重鎖Ｆｃポリペプチド配列と比較して少なくとも１つの変異、例えば置換、欠失、または挿入を有するが、天然のＦｃポリペプチドの全体のＩｇフォールドまたは構造を保持しているＦｃポリペプチドのことを指す。
【００５４】
「ＦｃＲｎ」なる用語は、新生児Ｆｃ受容体のことを指す。ＦｃポリペプチドのＦｃＲｎとの結合によって、Ｆｃポリペプチドのクリアランスは低下し、血清中半減期が長くなる。ヒトＦｃＲｎタンパク質は、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）クラスＩタンパク質に似た約５０ｋＤａのサイズのタンパク質と、約１５ｋＤａのサイズのβ２マイクログロブリンとからなるヘテロ二量体である。
【００５５】
本明細書で使用するところの「ＦｃＲｎ結合部位」とは、ＦｃＲｎに結合するＦｃポリペプチドの領域のことを指す。ヒトＩｇＧでは、ＦｃＲｎ結合部位は、ＥＵ番号付けスキームを用いて番号付けした場合に、Ｌ２５１、Ｍ２５２、Ｉ２５３、Ｓ２５４、Ｒ２５５、Ｔ２５６、Ｍ４２８、Ｈ４３３、Ｎ４３４、Ｈ４３５、及びＹ４３６を含む。これらの位置は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の２４～２９位、２０１位、及び２０６～２０９位に相当する。
【００５６】
本明細書で使用するところの「天然ＦｃＲｎ結合部位」とは、ＦｃＲｎと結合し、ＦｃＲｎに結合する天然に存在するＦｃポリペプチドの領域と同じアミノ酸配列を有するＦｃ

ポリペプチドの領域のことを指す。
【００５７】
本明細書で使用するところの「ＣＨ３ドメイン」及び「ＣＨ２ドメイン」なる用語は、免疫グロブリンの定常領域ドメインポリペプチドのことを指す。ＩｇＧ抗体との関連において、ＣＨ３ドメインポリペプチドとは、ＥＵ番号付けスキームに従って番号付けした場合に約３４１位～約４４７位のアミノ酸のセグメントのことを指し、ＣＨ２ドメインポリペプチドとは、ＥＵ番号付けスキームに従って番号付けした場合に約２３１位～約３４０位のアミノ酸のセグメントのことを指す。ＣＨ２及びＣＨ３ドメインポリペプチドは、ＩＭＧＴ（ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ）番号付けスキームによって番号付けすることもでき、その場合、ＩＭＧＴ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ｃｈａｒｔ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ（ＩＭＧＴウェブサイト）に従えば、ＣＨ２ドメインの番号付けは１～１１０であり、ＣＨ３ドメインの番号付けは１～１０７である。ＣＨ２及びＣＨ３ドメインは、免疫グロブリンのＦｃ領域の一部である。ＩｇＧ抗体との関連において、Ｆｃ領域とは、ＥＵ番号付けスキームに従って番号付けした場合に、約２３１位～約４４７位までのアミノ酸のセグメントのことを指す。本明細書で使用するところの「Ｆｃ領域」なる用語は、抗体のヒンジ領域の少なくとも一部も含み得る。例示的なヒンジ領域配列は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２３４に記載されている。
【００５８】
「可変領域」なる用語は、生殖細胞系列の可変（Ｖ）遺伝子、多様性（Ｄ）遺伝子、または連結（Ｊ）遺伝子から誘導され（定常（Ｃμ及びＣδ）遺伝子セグメントからは誘導されない）、抗体に抗原と結合するためのその特異性を与える抗体重鎖または軽鎖内のドメインのことを指す。一般的に抗体可変領域は、３個の超可変「相補性決定領域」を間に挟んだ４個の保存された「フレームワーク」領域で構成されている。
【００５９】
本明細書で使用するところの「リンカー」なる用語は、２個の要素、例えばＴｆＲコンストラクト内の２個のポリペプチド間のペプチド連結要素またはタンパク質連結要素のことを指す。いくつかの実施形態では、リンカーは、１～１０個のアミノ酸（例えば、１～８個、１～６個、１～４個、または１個もしくは２個のアミノ酸、例えば、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、または１０個のアミノ酸）を含むことができる。他の実施形態では、リンカーは、タンパク質ループドメインであってよく、タンパク質ループドメインのＮ末端とＣ末端との間の距離は５Å未満である（例えば、４Å、３Å、２Å、または１Å未満の距離）。いくつかの実施形態では、タンパク質ループドメインは、８００個以下のアミノ酸（例えば、８００個、７８０個、７６０個、７４０個、７２０個、７００個、６８０個、６６０個、６４０個、６２０個、６００個、５８０個、５６０個、５４０個、５２０個、５００個、４８０個、４６０個、４４０個、４２０個、４００個、３８０個、３６０個、３４０個、３２０個、３００個、２８０個、２６０個、２４０個、２２０個、２００個、１８０個、１６０個、１４０個、１２０個、または１００個のアミノ酸）を有する球状タンパク質であってよい。
【００６０】
本明細書で使用するところの「精製ペプチド」なる用語は、ポリペプチドの精製、単離、または同定に使用することができる任意の長さのペプチドのことを指す。精製ペプチドは、ポリペプチドの精製及び／または例えば細胞ライセート混合物からのポリペプチドの単離に用いるためにそのポリペプチドに融合することができる。いくつかの実施形態では、精製ペプチドは、精製ペプチドに対して特異的親和性を有する別の部分と結合する。いくつかの実施形態では、精製ペプチドに特異的に結合するかかる部分は、マトリクス、樹脂、またはアガロースビーズなどの固体支持体に結合される。ＴｆＲコンストラクトを精製するために使用することができる精製ペプチドの例は、本明細書に更に詳細に述べる。
【００６１】
本明細書で使用するところの「切断ペプチド」なる用語は、特異的なプロテアーゼにより認識及び切断（すなわちペプチド主鎖の加水分解により）されるアミノ酸配列のことを

指す。プロテアーゼの特異性は、プロテアーゼによる切断配列の認識によるところが大きい。

【００６２】

本明細書で使用するところの「直列」とは、１つのポリペプチドのアミノ酸が、単一のポリペプチド内で別のポリペプチドのアミノ酸の後に配置されるようなポリペプチド同士の配列のことを指す。例えば、ＴｆＲコンストラクトは、直列に融合された第１のポリペプチド、任意選択的なリンカー、及び第２のポリペプチドを含むことができる（すなわち、第１のポリペプチドのＣ末端が任意選択的なリンカーのＮ末端に融合され、任意選択的なリンカーのＣ末端が第２のポリペプチドのＮ末端に融合されている）。

【００６３】

ＣＨ３及びＣＨ２ドメインに関して「野生型」、「天然」、及び「天然に存在する」なる用語は、本明細書では、天然に存在する配列を有するドメインのことを指して用いられる。

【００６４】

本発明との関連において、突然変異体ポリペプチドまたは突然変異体ポリヌクレオチドに関して「突然変異体」なる用語は、「変異体」と互換的に用いられる。所定の野生型ＣＨ３またはＣＨ２ドメイン参照配列に関して、変異体は、天然に存在する対立遺伝子変異体を含むことができる。「天然に存在しない」ＣＨ３またはＣＨ２ドメインとは、自然界で細胞内に存在せず、天然ＣＨ３ドメインまたはＣＨ２ドメインのポリヌクレオチドまたはポリペプチドの遺伝子改変（例えば、遺伝子操作技術または突然変異導入法を用いた）によって生成される変異体または突然変異体ドメインのことを指す。「変異体」は、野生型に対して少なくとも１つのアミノ酸変異を有するあらゆるドメインを含む。突然変異は、置換、挿入、及び欠失を含み得る。

【００６５】

「アミノ酸」なる用語は、天然に存在するアミノ酸及び合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣体のことを指す。

【００６６】

天然に存在するアミノ酸とは、遺伝子コードによってコードされるもの、及び、例えばヒドロキシプロリン、γ－カルボキシグルタミン酸、及びＯ－ホスホセリンなどの後で修飾されたアミノ酸である。「アミノ酸類似体」とは、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造（すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、及びＲ基に結合したα炭素）を有する化合物（例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムなど）のことを指す。かかる類似体は、修飾されたＲ基（例えばノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持している。「アミノ酸模倣体」とは、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様に機能する化合物のことを指す。

【００６７】

天然に存在するα－アミノ酸としては、これらに限定されるものではないが、アラニン（Ａｌａ）、システイン（Ｃｙｓ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ）、グルタミン酸（Ｇｌｕ）、フェニルアラニン（Ｐｈｅ）、グリシン（Ｇｌｙ）、ヒスチジン（Ｈｉｓ）、イソロイシン（Ｉｌｅ）、アルギニン（Ａｒｇ）、リシン（Ｌｙｓ）、ロイシン（Ｌｅｕ）、メチオニン（Ｍｅｔ）、アスパラギン（Ａｓｎ）、プロリン（Ｐｒｏ）、グルタミン（Ｇｌｎ）、セリン（Ｓｅｒ）、スレオニン（Ｔｈｒ）、バリン（Ｖａｌ）、トリプトファン（Ｔｒｐ）、チロシン（Ｔｙｒ）、及びこれらの組み合わせが挙げられる。天然に存在するα－アミノ酸の立体異性体としては、これらに限定されるものではないが、Ｄ－アラニン（Ｄ－Ａｌａ）、Ｄ－システイン（Ｄ－Ｃｙｓ）、Ｄ－アスパラギン酸（Ｄ－Ａｓｐ）、Ｄ－グルタミン酸（Ｄ－Ｇｌｕ）、Ｄ－フェニルアラニン（Ｄ－Ｐｈｅ）、Ｄ－ヒスチジン（Ｄ－Ｈｉｓ）、Ｄ－イソロイシン（Ｄ－Ｉｌｅ）、Ｄ－アルギニン（Ｄ－Ａｒｇ）、Ｄ－リシン（Ｄ－Ｌｙｓ）、Ｄ－ロイシン（Ｄ－Ｌｅｕ）、Ｄ－メチオニン（Ｄ－Ｍｅｔ

）、Ｄ－アスパラギン（Ｄ－Ａｓｎ）、Ｄ－プロリン（Ｄ－Ｐｒｏ）、Ｄ－グルタミン（Ｄ－Ｇｌｎ）、Ｄ－セリン（Ｄ－Ｓｅｒ）、Ｄ－スレオニン（Ｄ－Ｔｈｒ）、Ｄ－バリン（Ｄ－Ｖａｌ）、Ｄ－トリプトファン（Ｄ－Ｔｒｐ）、Ｄ－チロシン（Ｄ－Ｔｙｒ）、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【００６８】

本明細書では、アミノ酸は、それらの一般的に知られる３文字記号によるか、またはＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ生化学命名法委員会により推奨される１文字記号で呼称される。

【００６９】

「ポリペプチド」及び「ペプチド」なる用語は、本明細書では一本鎖のアミノ酸残基のポリマーを呼称するうえで互換的に使用される。かかる用語は、１つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学模倣体であるようなアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマー及び天然に存在しないアミノ酸ポリマーに適用される。アミノ酸ポリマーは、全体がＬ－アミノ酸であってもよく、全体がＤ－アミノ酸であってもよく、またはＬ－アミノ酸とＤ－アミノ酸との混合物であってもよい。

【００７０】

本明細書で使用するところの「タンパク質」とは、ポリペプチド、または一本鎖ポリペプチドの二量体（すなわち２個）もしくは多量体（すなわち３個以上）のことを指す。タンパク質の一本鎖ポリペプチド同士は、例えばジスルフィド結合のような共有結合、または非共有結合性相互作用によって結合することができる。

【００７１】

「保存的置換」、「保存的変異」、または「保存的に改変された変異体」なる用語は、あるアミノ酸の、類似の特性を有するものとして分類され得る別のアミノ酸による置換を生じる変化のことを指す。このようにして定義される保存的アミノ酸のグループのカテゴリーの例としては、Ｇｌｕ（グルタミン酸またはＥ）、Ａｓｐ（アスパラギン酸またはＤ）、Ａｓｎ（アスパラギンまたはＮ）、Ｇｌｎ（グルタミンまたはＱ）、Ｌｙｓ（リシンまたはＫ）、Ａｒｇ（アルギニンまたはＲ）、及びＨｉｓ（ヒスチジンまたはＨ）を含む「荷電／極性基」；Ｐｈｅ（フェニルアラニンまたはＦ）、Ｔｙｒ（チロシンまたはＹ）、Ｔｒｐ（トリプトファンまたはＷ）、及び（ヒスチジンまたはＨ）を含む「芳香族基」；ならびに、Ｇｌｙ（グリシンまたはＧ）、Ａｌａ（アラニンまたはＡ）、Ｖａｌ（バリンまたはＶ）、Ｌｅｕ（ロイシンまたはＬ）、Ｉｌｅ（イソロイシンまたはＩ）、Ｍｅｔ（メチオニンまたはＭ）、Ｓｅｒ（セリンまたはＳ）、Ｔｈｒ（スレオニンまたはＴ）、及びＣｙｓ（システインまたはＣ）を含む「脂肪族基」を挙げることができる。各グループ内にサブグループを特定することもできる。例えば、荷電または極性アミノ酸のグループは、Ｌｙｓ、Ａｒｇ及びＨｉｓを含む「正に荷電したサブグループ」、Ｇｌｕ及びＡｓｐを含む「負に荷電したサブグループ」、ならびにＡｓｎ及びＧｌｎを含む「極性サブグループ」を含むサブグループに更に分割することができる。別の例では、芳香族または環状基を、Ｐｒｏ、Ｈｉｓ及びＴｒｐを含む「窒素環サブグループ」、ならびにＰｈｅ及びＴｙｒを含む「フェニルサブグループ」を含むサブグループに更に分割することができる。更に別の例では、脂肪族基を、例えば、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｇｌｙ、及びＡｌａを含む「脂肪族非極性サブグループ」、ならびにＭｅｔ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、及びＣｙｓを含む「脂肪族弱極性サブグループ」などのサブグループに更に分割することができる。保存的変異のカテゴリーの例としては、上記のサブグループ内のアミノ酸のアミノ酸置換、例えば、これらに限定されるものではないが、正電荷を維持できるようにＬｙｓをＡｒｇに、またはその逆；負電荷を維持できるようにＧｌｕをＡｓｐに、またはその逆；遊離－ＯＨを維持できるようにＳｅｒをＴｈｒに、またはその逆；遊離－ＮＨ２を維持できるようにＧｌｎをＡｓｎに、またはその逆が挙げられる。いくつかの実施形態では、例えば活性部位において疎水性アミノ酸を天然に存在する疎水性アミノ酸に置換することで疎水性が保たれる。

【００７２】

２個以上のポリペプチド配列との関連で「同一」または「同一性」なる用語は、配列比

較アルゴリズムを用いて、またはマニュアルアラインメント及び目視による検査により測定した場合に比較ウインドウ、または指定された領域にわたって最大の一致となるように比較及びアラインした場合に特定の領域にわたって同じであるか、または例えば、少なくとも６０％同一性、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％もしくはそれ以上一致しているアミノ酸残基の特定の割合（％）を有する２個以上の配列またはサブ配列のことを指す。

【００７３】

ポリペプチドの配列比較では、一般的に１つのアミノ酸配列が、候補配列を比較する参照配列の役割を果たす。例えば、視覚的アラインメントまたは既知のアルゴリズムを用いた公開されているソフトウェアを使用するなど、当業者に利用可能な様々な方法を用いてアラインメントを行って最大のアラインメントを得ることができる。かかるプログラムとしては、ＢＬＡＳＴプログラム、ＡＬＩＧＮ、ＡＬＩＧＮ－２（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆ．）、またはＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）が挙げられる。最大のアラインメントを得るためにアラインメントで用いられるパラメータは、当業者によって決めることができる。本出願の目的におけるポリペプチド配列の配列比較では、デフォルトのパラメータを用いて２個のタンパク質配列をアラインするためのＢＬＡＳＴＰアルゴリズムの標準タンパク質ＢＬＡＳＴを用いる。

【００７４】

あるポリペプチド配列中の所定のアミノ酸残基を特定することとの関連で使用される場合、「～に対応する」、「～を基準として決められる」、または「～を基準として番号付けされる」なる用語は、所定のアミノ酸配列を特定の参照配列と最大限アラインして比較した場合にその参照配列の残基の位置を指す。したがって、例えば、あるポリペプチド中のアミノ酸残基は、その残基が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１と最適にアラインされた場合にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１中のそのアミノ酸とアラインする際にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１のアミノ酸１１４～２２０の領域中のアミノ酸に「対応する」。参照配列とアラインされるポリペプチドは、参照配列と同じ長さである必要はない。

【００７５】

本明細書で使用するところの「結合親和性」とは、２個の分子間、例えばポリペプチドの１個の結合部位とポリペプチドが結合する標的、例えばトランスフェリン受容体との間の非共有結合相互作用の強さのことを指す。したがって、例えば、この用語は、特に示されるかまたは文脈から明らかでない限り、ポリペプチドとその標的との間の１：１の相互作用のことを指す場合がある。結合親和性は、解離速度定数（k_d、時間$^{-1}$）を結合速度定数（k_a、時間$^{-1}M_{-1}$）で割ったもののことを指す平衡解離定数（K_D）を測定することにより定量化することができる。K_Dは、例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）システムなどの表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）法；ＫｉｎＥｘＡ（登録商標）などのカイネティック排除アッセイ；及びバイオレイヤー干渉法（例えば、ＦｏｒｔｅＢｉｏ（登録商標）Ｏｃｔｅｔ（登録商標）プラットフォームを使用）を使用して、複合体形成及び解離の速度論を測定することによって求めることができる。本明細書で使用するところの「結合親和性」には、ポリペプチドとその標的と間の１：１の相互作用を反映したもののように正式な結合親和性だけでなく、強い結合を反映し得るK_Dが計算された見かけ上の親和性も含まれる。

【００７６】

本明細書に記載される改変ＣＨ３及び／または改変ＣＨ２ドメインを含むポリペプチドについて言う場合、標的、例えばトランスフェリン受容体に「特異的に結合する」または「選択的に結合する」なる語句は、ポリペプチドが、構造的に異なる標的、例えばトランスフェリン受容体ファミリーではない標的と結合するよりも強いアフィニティー、強いアビディティー、及び／またはより長い時間で標的と結合する結合反応のことを指す。典型的な実施形態では、ポリペプチドは、同じ親和性アッセイ条件下でアッセイした場合に無関係の標的と比較してトランスフェリン受容体に対して少なくとも５倍、６倍、７倍、８

倍、９倍、１０倍、２０倍、２５倍、５０倍、または１００倍、またはそれよりも高い親和性を有する。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３及び／または改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、種間で保存された、例えば非ヒト霊長類とヒト種との間で保存されたトランスフェリン受容体上のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドはヒトトランスフェリン受容体だけに結合することができる。

【００７７】

本明細書で互換的に使用される「対象」、「個人」、及び「患者」なる用語は、これらに限定されるものではないが、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（例えば、ラット、マウス、及びモルモット）、ウサギ、ウシ、ブタ、ウマ、及び他の哺乳動物種を含む哺乳動物のことを指す。一実施形態では、患者はヒトである。

【００７８】

「治療」、「治療する」、及びこれに類する用語は、本明細書では、所望の薬理学的及び／または生理学的作用を得ることを一般的に意味して用いられる。「治療する」または「治療」は、軽減、寛解、患者の生存率の改善、生存期間もしくは生存率の増大、症状の消失または傷害、疾患、もしくは状態を患者にとってより耐容できるものとすること、変性もしくは低下の速度の遅延、または患者の物理的もしくは精神的な健康の改善などのあらゆる客観的もしくは主観的なパラメータを含む、傷害、疾患、または状態の治療もしくは改善における奏功のあらゆる兆候のことを指す場合がある。症状の治療または改善は、客観的または主観的なパラメータに基づいたものであってよい。治療の効果は、治療を受けていない個人または個人の集団と、または治療前もしくは治療期間の異なる時点において同じ患者と比較することができる。

【００７９】

「薬学的に許容される賦形剤」とは、これらに限定されないが、バッファー、担体、または防腐剤などの、ヒトまたは動物における使用に生物学的または薬理学的に適合した非活性医薬成分のことを指す。

【００８０】

本明細書で使用するところの薬剤の「治療量」または「治療有効量」とは、対象の疾患の症状を治療、緩和、軽減、またはその重症度を低減する薬剤の量である。薬剤の「治療量」または「治療有効量」は、患者の生存率を改善し、生存期間もしくは生存率を増大させ、症状を消失させ、傷害、疾患、もしくは状態をより耐容できるものとし、変性もしくは低下の速度を遅くし、または患者の物理的もしくは精神的な健康を改善することができる。

【００８１】

「投与する」なる用語は、薬剤、化合物、または組成物を生物学的作用が望ましい部位に送達する方法のことを指す。これらの方法としては、これらに限定されるものではないが、局所投与、非経口投与、静脈内投与、皮内投与、筋肉内投与、髄腔内投与、結腸投与、直腸投与、または腹腔内投与が挙げられる。一実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドは静脈内投与される。

【００８２】

ＩＩＩ．ＢＢＢを通過して輸送され得る改変ポリペプチド

一態様において、本明細書では、血液脳関門（ＢＢＢ）受容体に結合し、ＢＢＢを通過して輸送されることが可能な改変ポリペプチドが提供される。ＢＢＢ受容体はＢＢＢの内皮、ならびに他の種類の細胞及び組織で発現する。ＢＢＢ受容体への改変ポリペプチドの結合は、ポリペプチドの内在化を開始させ、ＢＢＢを通過して輸送することができる。かかる受容体としては、これらに限定されるものではないが、トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）、インスリン受容体、インスリン様成長因子受容体（ＩＧＦ－Ｒ）、低密度リポタンパク質受容体（ＬＤＬＲ）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１（ＬＲＰ１）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質２（ＬＲＰ２）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質８（ＬＲＰ８）、ＧＬＵＴ１、バシギン、ジフテリア毒素受容体、ヘパリン結合性上皮成長因子様成長因子（ＨＢ－ＥＧＦ）の膜結合前駆体、メラノトラン

スフェリン、及びバソプレシン受容体が挙げられる。いくつかの実施形態では、ＢＢＢ受容体はＴｆＲまたはＩＧＦ－Ｒである。

【００８３】

改変Ｆｃポリペプチド

特定の実施形態では、ＢＢＢを通過して輸送されることが可能な本明細書で提供されるポリペプチドは、ＢＢＢ受容体結合部位を有するように改変された（例えば、天然Ｆｃポリペプチドに対して１個以上のアミノ酸置換により）Ｆｃポリペプチドを含む。特定の実施形態では、置換は、溶媒露出アミノ酸の置換である。溶媒露出アミノ酸とは、ポリペプチドがインビボで機能する水性の生理学的液体環境と接触可能なポリペプチドの表面または表面に近いアミノ酸のことを指す。通常、溶媒露出残基では、側鎖の５０％よりも大きな部分が溶媒と接触するが、場合によっては側鎖の５０％未満、例えば２５％～４９％が露出している。溶媒露出アミノ酸としては、βシート、αヘリックス、及び／またはループ内に存在するものが挙げられる。

【００８４】

本発明に基づいて改変される溶媒露出アミノ酸は、典型的には、規定の３次元領域内で連続表面を構成することができるアミノ酸の組（本明細書ではレジスターとも称する）の中に存在するものである。溶媒露出アミノ酸は、例えば抗ＨＩＶ ＩｇＧ Ｂ１２（ｐｄｂ：１ＨＺＨ）のようなＩｇＧのモデルに基づいて特定することができる。各位置の残基の溶媒接触表面積（Å^2）は、Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＥＭＢＬ－ＥＢＩ）より提供されるプログラムＰＤＢｅＰＩＳＡを用いて計算することができる。この値を、それぞれの対応するアミノ酸について最大可能接触表面積に対して正規化することで各残基について「露出率（％）」を得ることができる。次に、高度に溶媒露出した残基を、ＩｇＧの構造に戻ってマッピングし、表面領域パッチを与える組に視覚的にグループ分けすることができる（例えば、残基約５～１５個、残基６～１２個、残基７～１２個、または残基８～１０個の組）。いくつかの実施形態では、かかる表面領域パッチは、合計で溶媒露出表面の６００～１５００Å^{2}となる。代替的な実施形態では、パッチの表面積は、合計で７５０～１０００Å^{2}となり得る。場合により、表面領域パッチが連続的、または半連続的となるように露出率が５０％未満である側鎖を有するアミノ酸残基が含まれてもよい。

【００８５】

免疫グロブリン内の例えばβシート、ループ、及びヘリックスのような二次構造は、ポリペプチド主鎖の二次構造を可視化するＰｙＭｏｌまたはＳｗｉｓｓＰＤＢ Ｖｉｅｗｅｒといったソフトウェアを使用して結晶構造から決定することができる。例えば、ＦｃｇａｍｍａＲＩ（ＰＤＢ ＩＤ番号４Ｗ４Ｏ）に結合させたＦｃポリペプチドの結晶構造の分析を用いて、どのアミノ酸が異なる構造的領域に当てはまるかを決定し、どのアミノ酸側鎖が溶媒露出し得るかを決定する助けとすることができる。表面領域パッチに対応する位置のアミノ酸残基の例示的な組としては、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１を基準として番号付けした場合に以下の６つの組、すなわち、（ｉ）１５７、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１８６、１８９、及び１９４；（ｉｉ）１１８、１１９、１２０、１２２、２１０、２１１、２１２、及び２１３；（ｉｉｉ）４７、４９、５６、５８、５９、６０、６１、６２、及び６３；（ｉｖ）３９、４０、４１、４２、４３、４４、６８、７０、７１、及び７２；（ｖ）４１、４２、４３、４４、４５、６５、６６、６７、６９、及び７３；ならびに（ｖｉ）４５、４７、４９、９５、９７、９９、１０２、１０３、及び１０４が挙げられる。かかるパッチに対する改変、及びＢＢＢ受容体結合ポリペプチドを作製するために改変（例えば置換）することができるアミノ酸の更なる例を本明細書で詳細に述べる。

【００８６】

本発明に基づいて改変することができるＦｃポリペプチドのアミノ酸残基、例えば溶媒露出表面残基は、本明細書ではＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１を基準として番号付けされる。例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のＦｃポリペプチドなどの任意のＦ

ｃポリペプチドが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の記載される位置の残基に対応する１つ以上の残基の組（例えば、溶媒露出残基）に改変（例えばアミノ酸置換）を有することができる。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のヒトＩｇＧ１のアミノ酸配列とヒトＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４とのアラインメントを図３８に示す。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の任意の特定の位置に対応するＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４の配列のそれぞれの位置は容易に決定することができる。

【００８７】

ＢＢＢ受容体と結合し、ＢＢＢを通過して輸送されることが可能な本発明の改変ポリペプチドは、天然Ｆｃ領域配列またはそのフラグメント、例えば少なくともアミノ酸５０個、または少なくともアミノ酸１００個、またはそれ以上の長さのフラグメントと少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、天然Ｆｃのアミノ酸配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のＦｃ領域の配列、すなわちＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のアミノ酸４～２２０である。いくつかの実施形態では、改変ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のアミノ酸４～２２０、またはそのフラグメント、例えば少なくともアミノ酸５０個、または少なくともアミノ酸１００個、またはそれ以上の長さのフラグメントと少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する。

【００８８】

いくつかの実施形態では、本発明の改変Ｆｃポリペプチドは、天然Ｆｃ領域のアミノ酸配列に対応した少なくとも５０個のアミノ酸、または少なくとも６０個、６５個、７０個、７５個、８０個、８５個、９０個、９５個以上、または少なくとも１００個、またはそれよりも多いアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、本発明は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のような天然Ｆｃ領域のアミノ酸配列に対応した少なくとも２５個の連続したアミノ酸、または少なくとも３０個、３５個、４０個、または４５個の連続したアミノ酸、または５０個の連続したアミノ酸、または少なくとも６０個、６５個、７０個、７５個、８０個、８５個、９０個、または９５個以上の連続したアミノ酸、または１００個以上の連続したアミノ酸を含む。

【００８９】

いくつかの実施形態では、本発明に基づく改変Ｆｃポリペプチドは、３９、４０、４１、４２、４３、４４、６８、７０、７１、及び７２を含むアミノ酸位置の組において少なくとも１個の置換、典型的には２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、または１０個の置換を含み、各位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められ、置換（複数可）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のそれぞれの位置に存在するアミノ酸残基に対するものである。

【００９０】

いくつかの実施形態では、本発明に基づく改変Ｆｃポリペプチドは、４７、４９、５６、５８、５９、６０、６１、６２、及び６３を含むアミノ酸位置の組において少なくとも１個の置換、典型的には２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、または９個の置換を含み、各位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められ、置換（複数可）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のそれぞれの位置に存在するアミノ酸残基に対するものである。

【００９１】

いくつかの実施形態では、本発明に基づく改変Ｆｃポリペプチドは、４１、４２、４３、４４、４５、６５、６６、６７、６９、及び７３を含むアミノ酸位置の組において少なくとも１個の置換、及び典型的には２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、または１０個の置換を含み、各位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められ、置換（複数可）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のそれぞれの位置に存在するアミノ酸残基に対するものである。

【００９２】

いくつかの実施形態では、本発明に基づく改変Ｆｃポリペプチドは、４５、４７、４９、９５、９７、９９、１０２、１０３、及び１０４を含むアミノ酸位置の組において少なくとも１個の置換、典型的には２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、または９個の置換を含み、各位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められ、置換（複数可）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のそれぞれの位置に存在するアミノ酸残基に対するものである。

【００９３】

いくつかの実施形態では、本発明に基づく改変Ｆｃポリペプチドは、１１８、１１９、１２０、１２２、２１０、２１１、２１２、及び２１３を含むアミノ酸位置の組において少なくとも１個の置換、典型的には２個、３個、４個、５個、６個、または７個の置換を含み、各位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められ、置換（複数可）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の各位置に存在するアミノ酸残基に対するものである。

【００９４】

いくつかの実施形態では、本発明に基づく改変Ｆｃポリペプチドは、１５７、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１８６、１８９、及び１９４を含むアミノ酸位置の組において少なくとも１個の置換、典型的には２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、または９個の置換を含み、ただし、各位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められ、置換（複数可）はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のそれぞれの位置に存在するアミノ酸残基に対するものである。

【００９５】

ＦｃＲｎ結合部位

ＢＢＢを通過して輸送されることが可能な本発明のポリペプチドは、ＦｃＲｎ結合部位を更に含む。いくつかの実施形態では、ＦｃＲｎ結合部位は、改変Ｆｃポリペプチドまたはそのフラグメント内にある。

【００９６】

いくつかの実施形態では、ＦｃＲｎ結合部位は、天然のＦｃＲｎ結合部位を含む。いくつかの実施形態では、ＦｃＲｎ結合部位は、天然のＦｃＲｎ結合部位のアミノ酸配列に対するアミノ酸の変化を含まない。いくつかの実施形態では、天然のＦｃＲｎ結合部位は、ＩｇＧ結合部位、例えばヒトＩｇＧ結合部位である。いくつかの実施形態では、ＦｃＲｎ結合部位は、ＦｃＲｎとの結合を変化させる改変を含む。

【００９７】

いくつかの実施形態では、ＦｃＲｎ結合部位は、例えば置換などの変異を有する１つ以上のアミノ酸残基を有し、かかる変異（複数可）は血清中半減期を長くするか、または血清中半減期を大きく低下させない（すなわち、同じ条件下でアッセイした場合に変異位置に野生型残基を有する対応するＢＢＢ受容体結合タンパク質と比較して血清中半減期を２５％以下低下させる）。いくつかの実施形態では、ＦｃＲｎ結合部位は、２４～２９位、２０１位、及び２０６～２０９位で置換された１つ以上のアミノ酸残基を有し、各位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる。

【００９８】

いくつかの実施形態では、ＦｃＲｎ結合部位は、改変ポリペプチドの血清中半減期を延ばす、天然ヒトＩｇＧ配列に対する１つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、変異、例えば置換を、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決めた場合の１７～３０位、５２～５７位、８０～９０位、１５６～１６３位、及び２０１～２０８位のうちの１つ以上に導入する（これらの位置は、ＥＵ番号付けを用いた場合の２４４～２５７位、２７９～２８４位、３０７～３１７位、３８３～３９０位、及び４２８～４３５位に相当する）。いくつかの実施形態では、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決めた場合の２４位、２５位、２７位、２８位、２９位、８０位、８１位、８２位、８４位、８５位、８７位、１５８位、１５９位、１６０位、１６２位、２０１位、２０６位、２０７位、または２０９位に１つ以上の変異を導入する（これらの位置は、ＥＵ番号付けを用いた場合の２５１位、２５２位、２５４位、２５５位、２５６位、３０７位、３０８位、３０９位、３１１位、３１２位、３１４位、３８５位、３８６位、３８７位、３８９位、４２８位、４３３位、４

３４位、または４３６位に相当する）。いくつかの実施形態では、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決めた場合の２５位、２７位、及び２９位のうちの１つ、２つ、または３つに変異を導入する（これらの位置は、ＥＵ番号付けを用いた場合の２５２位、２５４位、及び２５６位に相当する）。いくつかの実施形態では、変異は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅである。いくつかの実施形態では、本発明の改変Ｆｃポリペプチドは、Ｍ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅを更に含む。いくつかの実施形態では、改変Ｆｃポリペプチドは、ＥＵ番号付けに従った場合のＴ３０７、Ｅ３８０、及びＮ４３４位の１つ、２つ、または３つすべてに置換を含む（これらの位置は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ８０、Ｅ１５３、及びＮ２０７に相当する）。いくつかの実施形態では、変異は、Ｔ３０７Ｑ及びＮ４３４Ａ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のＴ８０Ｑ及びＮ２０７Ａ）である。いくつかの実施形態では、改変Ｆｃポリペプチドは、変異Ｔ３０７Ａ、Ｅ３８０Ａ、及びＮ４３４Ａ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のＴ８０Ａ、Ｅ１５３Ａ、及びＮ２０７Ａ）を含む。いくつかの実施形態では、改変Ｆｃポリペプチドは、Ｔ２５０位及びＭ４２８位に置換を含む（これらの位置は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ２３及びＭ２０１に相当する）。いくつかの実施形態では、Ｆｃポリペプチドは、変異Ｔ２５０Ｑ及び／Ｍ４２８Ｌ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のＴ２３Ｑ及びＭ２０１Ｌ）を含む。いくつかの実施形態では、改変Ｆｃポリペプチドは、Ｍ４２８位及びＮ４３４位に置換を含む（これらの位置は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２０１及びＮ２０７に相当する）。いくつかの実施形態では、改変Ｆｃポリペプチドは、置換Ｍ４２８Ｌ及びＮ４３４Ｓを含む（これらの位置は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２０１Ｌ及びＮ２０７Ｓに相当する）。いくつかの実施形態では、改変Ｆｃポリペプチドは、Ｎ４３４ＳまたはＮ４３４Ａの置換を含む（これらの置換は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＮ２０７ＳまたはＮ２０７Ａに相当する）。

【００９９】

ＩＶ．トランスフェリン受容体結合ポリペプチド

このセクションでは、血液脳関門（ＢＢＢ）受容体に結合し、トランスフェリン受容体を例示的なＢＢＢ受容体として用いてＢＢＢを通過して輸送されることが可能な、本発明に基づく改変Ｆｃポリペプチドの作製について述べる。

【０１００】

ＣＨ３トランスフェリン受容体結合ポリペプチド

いくつかの実施形態では、改変されるドメインはＩｇＧのＣＨ３ドメインのようなヒトＩｇＧのＣＨ３ドメインである。ＣＨ３ドメインは、いずれのＩｇＧのサブタイプ、すなわち、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４から得られるものであってもよい。ＩｇＧ抗体との関連において、ＣＨ３ドメインとは、ＥＵ番号付けスキームに従って番号付けした場合に、約３４１位～約４４７位までのアミノ酸のセグメントのことを指す。トランスフェリン受容体結合のための対応するアミノ酸位置の組を特定する目的でのＣＨ３ドメイン内の位置は、特に指定されない限り、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３を基準として決められるか、またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のアミノ酸１１４～２２０を基準として決められる。置換もまた、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められ、すなわち、あるアミノ酸は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の対応する位置のアミノ酸に対して置換であるとみなされる。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１は、部分的なヒンジ領域の配列であるＰＣＰをアミノ酸１～３として含んでいる。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準としたＣＨ３ドメイン内の位置の番号付けは、これらの最初の３個のアミノ酸を含む。

【０１０１】

上記に述べたように、本発明に基づいて改変することができるＣＨ３ドメインの残基の組は、本明細書ではＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けされる。例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のＣＨ３ドメインなどの任意のＣＨ３ドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の記載される位置の残基に対応する１つ以上の残基の組に改変（例えばアミノ酸置換）を有することができる。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のヒトＩｇＧ１の

アミノ酸配列とヒトＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４とのアラインメントを図３８に示す。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の任意の特定の位置に対応するＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４の配列のそれぞれの位置は容易に決めることができる。

【０１０２】

当業者には、例えばＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＤなどの他の免疫グロブリンアイソタイプのＣＨ２及びＣＨ３ドメインを、これらのドメイン内で上記に述べた組（ｉ）～（ｖｉ）に対応するアミノ酸を特定することにより同様に改変することができる点は理解される。改変は、例えば、非ヒト霊長類、サル、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、ニワトリなどの他の種に由来する免疫グロブリンからの対応するドメインに行うこともできる。

【０１０３】

一実施形態では、トランスフェリン受容体に特異的に結合する改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、トランスフェリン受容体のアピカルドメインと、完全長のヒトトランスフェリン受容体配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３５）の２０８位を含むエピトープにおいて結合するが、この位置は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０７に記載されるヒトトランスフェリン受容体のアピカルドメイン配列の１１位に対応している。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０７は、ヒトトランスフェリン受容体１のユニプロテイン（ｕｎｉｐｒｏｔｅｉｎ）配列Ｐ０２７８６（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３５）のアミノ酸１９８～３７８に対応している。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、トランスフェリン受容体のアピカルドメインと、完全長のヒトトランスフェリン受容体配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３５）の１５８、１８８、１９９、２０７、２０８、２０９、２１０、２１１、２１２、２１３、２１４、２１５、及び／または２９４位を含むエピトープにおいて結合する。改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、受容体に対するトランスフェリンの結合をブロックまたは他の形で阻害することなくトランスフェリン受容体に結合し得る。いくつかの実施形態では、トランスフェリンのＴｆＲに対する結合は、実質的に阻害されない。いくつかの実施形態では、トランスフェリンのＴｆＲに対する結合は、約５０％未満（例えば、約４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、または５％未満）阻害される。いくつかの実施形態では、トランスフェリンのＴｆＲに対する結合は、約２０％未満（例えば、約１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、または１％未満）阻害される。このような結合特異性を示す例示的なＣＨ３ドメインポリペプチドとしては、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のアミノ酸１１４～２２０を基準として決めた場合に１５７、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１８６、１８９、及び１９４位にアミノ酸置換を有するポリペプチドが挙げられる。

【０１０４】

ＣＨ３のトランスフェリン受容体と結合する組（ｉ）：１５７、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１８６、１８９、及び１９４

いくつかの実施形態では、本発明に基づく改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、１５７位、１５９位、１６０位、１６１位、１６２位、１６３位、１８６位、１８９位、及び１９４位（組ｉ）を含むアミノ酸位置の組に少なくとも３個または少なくとも４個、一般的には５個、６個、７個、８個、または９個の置換を含む。これらの位置に導入することができる例示的な置換を表６に示す。いくつかの実施形態では、１６１及び／または１９４位のアミノ酸は芳香族アミノ酸（例えば、Ｔｒｐ、Ｐｈｅ、またはＴｙｒ）である。いくつかの実施形態では、１６１位のアミノ酸はＴｒｐである。いくつかの実施形態では、１６１位のアミノ酸はＧｌｙである。いくつかの実施形態では、１９４位の芳香族アミノ酸はＴｒｐまたはＰｈｅである。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体に特異的に結合する改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、以下のようなＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に対する置換を有する少なくとも１つの位置を含む。すなわち、１５７位にＬｅｕ、Ｔｙｒ、Ｍｅｔ、またはＶａｌ；１

５９位にＬｅｕ、Ｔｈｒ、Ｈｉｓ、またはＰｒｏ；１６０位にＶａｌ、Ｐｒｏ、または酸性アミノ酸；１６１位に芳香族アミノ酸、例えばＴｒｐまたはＧｌｙ（例えばＴｒｐ）；１６２位にＶａｌ、Ｓｅｒ、またはＡｌａ；１８６位に酸性アミノ酸、Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｌｅｕ、Ｔｈｒ、またはＰｒｏ；１８９位にＴｈｒまたは酸性アミノ酸；または１９４位にＴｒｐ、Ｔｙｒ、Ｈｉｓ、またはＰｈｅ。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、上記の組の中の位置の１つ以上において特定のアミノ酸の保存的置換、例えば、同じ電荷に基づくグループ分け、疎水性に基づくグループ分け、側鎖の環構造に基づくグループ分け（例えば、芳香族アミノ酸）、またはサイズに基づくグループ分け、及び／または極性かまたは非極性かによるグループ分けの中のアミノ酸を含み得る。したがって、例えば、Ｉｌｅが１５７位、１５９位、及び／または１８６位に存在してよい。いくつかの実施形態では、１６０、１８６、及び１８９位のうちの１つ、２つ、またはそれぞれにおける酸性アミノ酸はＧｌｕである。他の実施形態では、１６０、１８６、及び１８９位のうちの１つ、２つ、またはそれぞれにおける酸性アミノ酸はＡｓｐである。いくつかの実施形態では、１５７、１５９、１６０、１６１、１６２、１８６、１８９、及び１９４位のうちの２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、または８つすべてがこのパラグラフで指定されるアミノ酸置換を有する。

【０１０６】

いくつかの実施形態では、組（ｉ）に改変を有するＣＨ３ドメインポリペプチドは、１６３位に天然のＡｓｎを含む。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、１６３位にＧｌｙ、Ｈｉｓ、Ｇｌｎ、Ｌｅｕ、Ｌｙｓ、Ｖａｌ、Ｐｈｅ、Ｓｅｒ、Ａｌａ、またはＡｓｐを含む。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、１５３、１６４、１６５、及び１８８を含む位置に１個、２個、３個、または４個の置換を更に含む。いくつかの実施形態では、１５３位にＴｒｐ、Ｔｙｒ、Ｌｅｕ、またはＧｌｎが存在してよい。いくつかの実施形態では、１６４位にＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ｇｌｎ、またはＰｈｅが存在してよい。いくつかの実施形態では、１６５位にＧｌｎ、Ｐｈｅ、またはＨｉｓが存在してよい。いくつかの実施形態では、１８８位にＧｌｎが存在してよい。

【０１０７】

特定の実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは以下のうちから選択される２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の位置を含む。すなわち、１５３位にＴｒｐ、Ｌｅｕ、またはＧｌｕ；１５７位にＴｙｒまたはＰｈｅ；１５９位にＴｈｒ；１６０位にＧｌｕ；１６１位にＴｒｐ；１６２位にＳｅｒ、Ａｌａ、Ｖａｌ、またはＡｓｎ；１６３位にＳｅｒまたはＡｓｎ；１８６位にＴｈｒまたはＳｅｒ；１８８位にＧｌｕまたはＳｅｒ；１８９位にＧｌｕ；及び／または１９４位にＰｈｅ。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは以下、すなわち、１５３位にＴｒｐ、Ｌｅｕ、またはＧｌｕ；１５７位にＴｙｒまたはＰｈｅ；１５９位にＴｈｒ；１６０位にＧｌｕ；１６１位にＴｒｐ；１６２位にＳｅｒ、Ａｌａ、Ｖａｌ、またはＡｓｎ；１６３位にＳｅｒまたはＡｓｎ；１８６位にＴｈｒまたはＳｅｒ；１８８位にＧｌｕまたはＳｅｒ；１８９位にＧｌｕ；及び／または１９４位にＰｈｅの１１個の位置のすべてを含む。

【０１０８】

特定の実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、１５７位にＬｅｕまたはＭｅｔを、１５９位にＬｅｕ、Ｈｉｓ、またはＰｒｏを、１６０位にＶａｌを、１６１位にＴｒｐを、１６２位にＶａｌまたはＡｌａを、１８６位にＰｒｏを、１８９位にＴｈｒを、及び／または１９４位にＴｒｐを含む。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、１６４位にＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ｇｌｎ、またはＰｈｅを更に含む。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、１５３位にＴｒｐ、Ｔｙｒ、Ｌｅｕ、またはＧｌｎを、及び／または１６５位にＧｌｎ、Ｐｈｅ、またはＨｉｓを更に含む。いくつかの実施形態では、１５３位にＴｒｐが存在し、及び／または１６５位にＧｌｎが存在する。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、１５３位にＴｒｐを有さない。

【０１０９】
他の実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、１５７位にＴｙｒを、１５９位にＴｈｒを、１６０位にＧｌｕまたはＶａｌを、１６１位にＴｒｐを、１６２位にＳｅｒを、１８６位にＳｅｒまたはＴｈｒを、１８９位にＧｌｕを、及び／または１９４位にＰｈｅを含む。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、１６３位に天然のＡｓｎを含む。特定の実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、１５３位にＴｒｐ、Ｔｙｒ、Ｌｅｕ、またはＧｌｎを、及び／または１８８位にＧｌｕを更に含む。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、１５３位にＴｒｐを、及び／または１８８位にＧｌｕを更に含む。
【０１１０】
更なる実施形態では、改変ＣＨ３ドメインは以下、すなわち、１８７位がＬｙｓ、Ａｒｇ、Ｇｌｙ、またはＰｒｏ、１９７位がＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ｇｌｕ、またはＬｙｓ、及び１９９位がＳｅｒ、Ｔｒｐ、またはＧｌｙ、から選択される１つ、２つ、または３つの位置を更に含む。
【０１１１】
いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインは、以下の置換のうちの１つ以上を含む。すなわち、１５３位にＴｙｒ、１５９位にＴｈｒ、１６１位にＴｒｐ、１６２位にＶａｌ、１８６位にＳｅｒまたはＴｈｒ、１８８位にＧｌｕ、及び／または１９４位にＰｈｅ。
【０１１２】
いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体に特異的に結合する改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～２９及び２３６～２９９のうちのいずれか１つのアミノ酸１１４～２２０と少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、かかる改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～２９及び２３６～２９９のうちのいずれか１つのアミノ酸１５７～１６３及び／または１８６～１９４を含む。いくつかの実施形態では、かかる改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～２９及び２３６～２９９のうちのいずれか１つのアミノ酸１５３～１６３及び／または１８６～１９４を含む。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～２９及び２３６～２９９のうちのいずれか１つのアミノ酸１５３～１６３及び／または１８６～１９９を含む。
【０１１３】
いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、パーセント同一性が１５７位、１５９位、１６０位、１６１位、１６２位、１６３位、１８６位、１８９位、及び１９４位の組を含まないことを条件として、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のアミノ酸１１４～２２０と少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～２９及び２３６～２９９のいずれか１つに記載されるアミノ酸１５７～１６３及び／またはアミノ酸１８６～１９４を含む。
【０１１４】
いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～２９及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの１５３、１５７、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１６４、１６５、１８６、１８７、１８８、１８９、１９４、１９７、及び１９９位に対応する位置のうちの少なくとも５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、または１６個が欠失も置換もされていないという条件で、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～２９及び２３６～２９９のうちのいずれか１つと少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する。
【０１１５】

いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～２９及び２３６～２９９のうちのいずれか１つと少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有し、また、以下の位置、すなわち、１５３位にＴｒｐ、Ｔｙｒ、Ｌｅｕ、Ｇｌｎ、またはＧｌｕ；１５７位にＬｅｕ、Ｔｙｒ、Ｍｅｔ、またはＶａｌ；１５９位にＬｅｕ、Ｔｈｒ、Ｈｉｓ、またはＰｒｏ；１６０位にＶａｌ、Ｐｒｏ、または酸性アミノ酸；１６１位に芳香族アミノ酸、例えばＴｒｐ；１６２位にＶａｌ、Ｓｅｒ、またはＡｌａ；１６３位にＳｅｒまたはＡｓｎ；１６４位にＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ｇｌｎ、またはＰｈｅ；１６５位にＧｌｎ、Ｐｈｅ、またはＨｉｓ；１８６位に酸性アミノ酸、Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｌｅｕ、Ｔｈｒ、またはＰｒｏ；１８７位にＬｙｓ、Ａｒｇ、ＧｌｙまたはＰｒｏ；１８８位にＧｌｕまたはＳｅｒ；１８９位にＴｈｒまたは酸性アミノ酸；１９４位にＴｒｐ、Ｔｙｒ、ＨｉｓまたはＰｈｅ；１９７位にＳｅｒ、Ｔｈｒ、ＧｌｕまたはＬｙｓ；及び、１９９位にＳｅｒ、Ｔｒｐ、またはＧｌｙのうちの少なくとも５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、または１６個を含む。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１６～１３０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１６～１３０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の１個または２個のアミノ酸が置換されている。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１６～１３０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の３個のアミノ酸が置換されている。

【０１１７】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３１～１３９のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３１～１３０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の１個または２個のアミノ酸が置換されている。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３１～１３９のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の３個または４個のアミノ酸が置換されている。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０３～３３９のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０３～３３９のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の１個または２個のアミノ酸が置換されている。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０３～３３９のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の３個のアミノ酸が置換されている。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３６、１３８、及び３４０～３４５のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３６、１３８、及び３４０～３４５のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の１個または２個のアミノ酸が置換されている。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３６、１３８、及び３４０～３４５のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の３個または４個のアミノ酸が置換されている。

【０１２０】

更なる実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～２９及び２３６～２９９のうちのいずれか１つのアミノ酸１５７～１９４、アミノ酸１５３～１９４、またはアミノ酸１５３～１９９を含む。更なる実施形態では、ポリペ

プチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～２９及び２３６～２９９のうちのいずれか１つのアミノ酸１５７～１９４と、または、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～２９及び２３６～２９９のうちのいずれか１つのアミノ酸１５３～１９４と、またはアミノ酸１５３～１９９と少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～２９及び２３６～２９９のうちのいずれか１つを含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端の最初の３個のアミノ酸「ＰＣＰ」を含まない、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～２９及び２３６～２９９のうちのいずれか１つを含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端の最初の３個のアミノ酸「ＰＣＰ」を含まずに決められた、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～２９及び２３６～２９９のうちのいずれか１つと少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。

【０１２２】

ＣＨ３のトランスフェリン受容体と結合する組（ｉｉ）：１１８、１１９、１２０、１２２、２１０、２１１、２１２、及び２１３

いくつかの実施形態では、本発明に基づく改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、１１８位、１１９位、１２０位、１２２位、２１０位、２１１位、２１２位、及び２１３位（組ｉｉ）を含むアミノ酸位置の組に少なくとも３個または少なくとも４個、一般的には５個、６個、７個、または８個の置換を含む。これらの位置に導入することができる例示的な置換を表５に示す。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、２１０位にＧｌｙを、２１１位にＰｈｅを、及び／または２１３位にＡｓｐを含む。いくつかの実施形態では、２１３位にＧｌｕが存在してよい。特定の実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、以下の位置に少なくとも１つの置換を含む。すなわち、１１８位にＰｈｅまたはＩｌｅ、１１９位にＡｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、またはＬｙｓ、１２０位にＴｙｒ、Ｍｅｔ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、またはＡｓｐ、１２２位にＴｈｒまたはＡｌａ、２１０位にＧｌｙ、２１１位にＰｈｅ、２１２位にＨｉｓ、Ｔｙｒ、Ｓｅｒ、またはＰｈｅ、または２１３位にＡｓｐ。いくつかの実施形態では、１１８、１１９、１２０、１２２、２１０、２１１、２１２、及び２１３位のうちの２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、または８つすべてがこのパラグラフで指定される置換を有する。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、上記の組の中の位置の１つ以上において特定のアミノ酸の保存的置換、例えば、同じ電荷に基づくグループ分け、疎水性に基づくグループ分け、側鎖の環構造に基づくグループ分け（例えば、芳香族アミノ酸）、またはサイズに基づくグループ分け、及び／または極性かまたは非極性かによるグループ分けの中のアミノ酸を含むことができる。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体に特異的に結合する改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０～４６のうちのいずれか１つのアミノ酸１１４～２２０と少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、かかる改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０～４６のうちのいずれか１つのアミノ酸１１８～１２２及び／またはアミノ酸２１０～２１３を含む。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、パーセント同一性が１１８位、１１９位、１２０位、１２２位、２１０位、２１１位、２１２位、及び２１３位の組を含まないことを条件として、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のアミノ酸１１４～２２０と少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を

有する。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０～４６のうちのいずれか１つに記載されるアミノ酸１１８～１２２及び／またはアミノ酸２１０～２１３を含む。

【０１２５】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４０～１５３のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４０～１５３のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の１個または２個のアミノ酸が置換されている。

【０１２６】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５４～１５７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５４～１５７のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の１個のアミノ酸が置換されているか、または２個のアミノ酸が置換されている。

【０１２７】

更なる実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０～４６のうちのいずれか１つのアミノ酸１１８～２１３を含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０～４６のうちのいずれか１つのアミノ酸１１８～２１３と少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０～４６のうちのいずれか１つを含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端の最初の３個のアミノ酸「ＰＣＰ」を含まない、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０～４６のうちのいずれか１つを含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端の最初の３個のアミノ酸「ＰＣＰ」を含まずに決められた、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０～４６のうちのいずれか１つ、またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０～４６のうちのいずれか１つと少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。

【０１２９】

ＣＨ２トランスフェリン受容体結合ポリペプチド

いくつかの実施形態では、改変されるドメインはＩｇＧのＣＨ２ドメインのようなヒトＩｇのＣＨ２ドメインである。ＣＨ２ドメインは、いずれのＩｇＧのサブタイプ、すなわち、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４から得られるものであってもよい。ＩｇＧ抗体との関連において、ＣＨ２ドメインとは、ＥＵ番号付けスキームに従って番号付けした場合に、約２３１位～約３４０位までのアミノ酸のセグメントのことを指す。トランスフェリン受容体結合のための対応するアミノ酸位置の組を特定する目的でのＣＨ２ドメイン内の位置は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２を基準として決められるか、またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のアミノ酸４～１１３を基準として決められる。置換もまた、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められ、すなわち、あるアミノ酸は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の対応する位置のアミノ酸に対して置換であるとみなされる。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１は、部分的なヒンジ領域の配列であるＰＣＰをアミノ酸１～３として含んでいる。これら３個の残基はＦｃ領域の一部ではないが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準としたＣＨ２ドメイン内の位置の番号付けは、これらの最初の３個のアミノ酸を含む。

【０１３０】

上記に述べたように、本発明に基づいて改変することができるＣＨ２ドメインの残基の組は、本明細書ではＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けされる。例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のＣＨ２ドメインなどの任意のＣＨ２ドメイン

が、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の記載される位置の残基に対応する１つ以上の残基の組に改変（例えばアミノ酸置換）を有することができる。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のヒトＩｇＧ１のアミノ酸配列とヒトＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４とのアラインメントを図３８に示す。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の任意の特定の位置に対応するＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４の配列のそれぞれの位置は容易に決めることができる。

【０１３１】

一実施形態では、トランスフェリン受容体に特異的に結合する改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、トランスフェリン受容体のアピカルドメイン内のエピトープに結合する。ヒトトランスフェリン受容体のアピカルドメインの配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０７に記載されており、これはヒトトランスフェリン受容体１のユニプロテイン（ｕｎｉｐｒｏｔｅｉｎ）配列Ｐ０２７８６のアミノ酸１９８～３７８に対応している。改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、受容体に対するトランスフェリンの結合をブロックまたは他の形で阻害することなくトランスフェリン受容体に結合し得る。いくつかの実施形態では、トランスフェリンのＴｆＲに対する結合は、実質的に阻害されない。いくつかの実施形態では、トランスフェリンのＴｆＲに対する結合は、約５０％未満（例えば、約４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、または５％未満）阻害される。いくつかの実施形態では、トランスフェリンのＴｆＲに対する結合は、約２０％未満（例えば、約１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、または１％未満）阻害される。

【０１３２】

ＣＨ２のトランスフェリン受容体と結合する組（ｉｉｉ）：４７、４９、５６、５８、５９、６０、６１、６２、及び６３

いくつかの実施形態では、本発明に基づく改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、４７位、４９位、５６位、５８位、５９位、６０位、６１位、６２位、及び６３位（組ｉｉｉ）を含むアミノ酸位置の組に少なくとも３個または少なくとも４個、一般的には５個、６個、７個、８個、または９個の置換を含む。これらの位置に導入することができる例示的な置換を表１に示す。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、６０位にＧｌｕを、及び／または６１位にＴｒｐを含む。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、以下の位置の少なくとも１つの置換、すなわち、４７位にＧｌｕ、Ｇｌｙ、Ｇｌｎ、Ｓｅｒ、Ａｌａ、Ａｓｎ、Ｔｙｒ、またはＴｒｐ、４９位にＩｌｅ、Ｖａｌ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｔｈｒ、Ａｌａ、またはＴｙｒ、５６位にＡｓｐ、Ｐｒｏ、Ｍｅｔ、Ｌｅｕ、Ａｌａ、Ａｓｎ、またはＰｈｅ、５８位にＡｒｇ、Ｓｅｒ、Ａｌａ、またはＧｌｙ、５９位にＴｙｒ、Ｔｒｐ、Ａｒｇ、またはＶａｌ、６０位にＧｌｕ、６１位にＴｒｐまたはＴｙｒ、６２位にＧｌｎ、Ｔｙｒ、Ｈｉｓ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｖａｌ、またはＡｓｐ、または、６３位にＬｅｕ、Ｔｒｐ、Ａｒｇ、Ａｓｎ、Ｔｙｒ、またはＶａｌを含む。いくつかの実施形態では、４７位、４９位、５６位、５８位、５９位、６０位、６１位、６２位、及び６３位のうちの２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、または９つすべてがこのパラグラフで指定される置換を有する。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、上記の組の中の位置の１つ以上において特定のアミノ酸の保存的置換、例えば、同じ電荷に基づくグループ分け、疎水性に基づくグループ分け、側鎖の環構造に基づくグループ分け（例えば、芳香族アミノ酸）、またはサイズに基づくグループ分け、及び／または極性かまたは非極性かによるグループ分けの中のアミノ酸を含むことができる。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、４７位にＧｌｕ、Ｇｌｙ、Ｇｌｎ、Ｓｅｒ、Ａｌａ、Ａｓｎ、またはＴｙｒ、４９位にＩｌｅ、Ｖａｌ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｔｈｒ、Ａｌａ、またはＴｙｒ、５６位にＡｓｐ、Ｐｒｏ、Ｍｅｔ、Ｌｅｕ、Ａｌａ、またはＡｓｎ、５８位にＡｒｇ、Ｓｅｒ、またはＡｌａ、５９位にＴｙｒ、Ｔｒｐ、Ａｒｇ、またはＶａｌ、６０位にＧｌｕ、６１位にＴｒｐ、６２位にＧｌｎ、Ｔｙｒ、Ｈｉｓ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、またはＶａｌ、及び／または６３位にＬｅｕ、Ｔｒｐ、Ａｒ

ｇ、Ａｓｎ、またはＴｙｒを含む。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、５８位にＡｒｇを、５９位にＴｙｒまたはＴｒｐを、６０位にＧｌｕを、６１位にＴｒｐを、及び／または６３位にＡｓｐまたはＴｒｐを含む。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体に特異的に結合する改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７～６２のうちのいずれか１つのアミノ酸４～１１３と少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、かかる改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７～６２のうちのいずれか１つのアミノ酸４７～４９及び／またはアミノ酸５６～６３を含む。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、本発明の改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、パーセント同一性が４７位、４９位、５６位、５８位、５９位、６０位、６１位、６２位、及び６３位の組を含まないことを条件として、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のアミノ酸４～１１３と少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７～６２のうちのいずれか１つに記載されるアミノ酸４７～４９及び／またはアミノ酸５６～６３を含む。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５８～１７１のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５８～１７１のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の１個のアミノ酸が置換されている。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７２～１８６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７２～１８６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の１個のアミノ酸が置換されているか、または２個のアミノ酸が置換されている。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７２～１８６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の３個または４個のアミノ酸が置換されている。

【０１３８】

更なる実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７～６２のうちのいずれか１つのアミノ酸４７～６３を含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７～６３のうちのいずれか１つのアミノ酸４７～６３と少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７～６２のうちのいずれか１つを含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端の最初の３個のアミノ酸「ＰＣＰ」を含まない、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７～６２のうちのいずれか１つを含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端の最初の３個のアミノ酸「ＰＣＰ」を含まずに決められた、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７～６２のうちのいずれか１つ、またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７～６２のうちのいずれか１つと少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。

【０１４０】

ＣＨ２のトランスフェリン受容体と結合する組（ｉｖ）：３９、４０、４１、４２、４３、４４、６８、７０、７１、及び７２

いくつかの実施形態では、本発明に基づく改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、３９位、４０位、４１位、４２位、４３位、４４位、６８位、７０位、７１位、及び７２位（組ｉｖ）を含むアミノ酸位置の組に少なくとも３個または少なくとも４個、一般的には５個、６個、７個、８個、９個、または１０個の置換を含む。これらの位置に導入することができる例示的な置換を表２に示す。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、４３位にＰｒｏを、６８位にＧｌｕを、及び／または７０位にＴｙｒを含む。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、以下の位置の少なくとも１つの置換、すなわち、３９位のＰｒｏ、Ｐｈｅ、Ａｌａ、Ｍｅｔ、またはＡｓｐ、４０位のＧｌｎ、Ｐｒｏ、Ａｒｇ、Ｌｙｓ、Ａｌａ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ、またはＴｙｒ、４１位のＴｈｒ、Ｓｅｒ、Ｇｌｙ、Ｍｅｔ、Ｖａｌ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、またはＬｅｕ、４２位のＰｒｏ、Ｖａｌ、Ａｌａ、Ｔｈｒ、またはＡｓｐ、４３位のＰｒｏ、Ｖａｌ、またはＰｈｅ、４４位のＴｒｐ、Ｇｌｎ、Ｔｈｒ、またはＧｌｕ、６８位のＧｌｕ、Ｖａｌ、Ｔｈｒ、Ｌｅｕ、またはＴｒｐ、７０位のＴｙｒ、Ｈｉｓ、Ｖａｌ、またはＡｓｐ、７１位のＴｈｒ、Ｈｉｓ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ａｓｎ、またはＶａｌ、または７２位のＴｙｒ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、Ｓｅｒ、またはＰｒｏを含む。いくつかの実施形態では、３９位、４０位、４１位、４２位、４３位、４４位、６８位、７０位、７１位、及び７２位のうちの２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、または１０個すべてがこのパラグラフで指定される置換を有する。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、上記の組の中の位置の１つ以上において特定のアミノ酸の保存的置換、例えば、同じ電荷に基づくグループ分け、疎水性に基づくグループ分け、側鎖の環構造に基づくグループ分け（例えば、芳香族アミノ酸）、またはサイズに基づくグループ分け、及び／または極性かまたは非極性かによるグループ分けの中のアミノ酸を含むことができる。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、３９位にＰｒｏ、Ｐｈｅ、またはＡｌａ、４０位にＧｌｎ、Ｐｒｏ、Ａｒｇ、Ｌｙｓ、Ａｌａ、またはＩｌｅ、４１位にＴｈｒ、Ｓｅｒ、Ｇｌｙ、Ｍｅｔ、Ｖａｌ、Ｐｈｅ、またはＴｒｐ、４２位にＰｒｏ、Ｖａｌ、またはＡｌａ、４３位にＰｒｏ、４４位にＴｒｐまたはＧｌｎ、６８位にＧｌｕ、７０位にＴｙｒ、７１位にＴｈｒ、Ｈｉｓ、またはＧｌｎ、及び／または７２位にＴｙｒ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、またはＳｅｒを含む。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、３９位にＭｅｔ、４０位にＬｅｕまたはＧｌｕ、４１位にＴｒｐ、４２位にＰｒｏ、４３位にＶａｌ、４４位にＴｈｒ、６８位にＶａｌまたはＴｈｒ、７０位にＨｉｓ、７１位にＨｉｓ、Ａｒｇ、またはＡｓｎ、及び／または７２位にＰｒｏを含む。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、３９位にＡｓｐ、４０位にＡｓｐ、４１位にＬｅｕ、４２位にＴｈｒ、４３位にＰｈｅ、４４位にＧｌｎ、６８位にＶａｌまたはＬｅｕ、７０位にＶａｌ、７１位にＴｈｒ、及び／または７２位にＰｒｏを含む。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体に特異的に結合する改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３～８５のうちのいずれか１つのアミノ酸４～１１３と少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、かかる改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３～８５のうちのいずれか１つのアミノ酸３９～４４及び／またはアミノ酸６８～７２を含む。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、本発明の改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、パーセント同一性が３９位、４０位、４１位、４２位、４３位、４４位、６８位、７０位、７１位、及び７２位の組を含まないことを条件として、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のアミノ酸４～１１３と少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３～８５のうちのいずれか１つに記載されるアミノ酸３９～４４及び／またはアミノ酸６８～７２を含む。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８７～２０４のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８７～２０４のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の１個または２個のアミノ酸が置換されている。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８７～２０４のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の３個のアミノ酸が置換されている。

【０１４７】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０５～２１５のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０５～２１５のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の１個のアミノ酸が置換されているか、または２個のアミノ酸が置換されている。

【０１４８】

更なる実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３～８５のうちのいずれか１つのアミノ酸３９～７２を含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３～８５のうちのいずれか１つのアミノ酸３９～７２と少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１４９】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３～８５のうちのいずれか１つを含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端の最初の３個のアミノ酸「ＰＣＰ」を含まない、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３～８５のうちのいずれか１つを含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端の最初の３個のアミノ酸「ＰＣＰ」を含まずに決められた、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３～８５のうちのいずれか１つ、またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３～８５のうちのいずれか１つと少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。

【０１５０】

ＣＨ２のトランスフェリン受容体と結合する組（ｖ）：４１、４２、４３、４４、４５、６５、６６、６７、６９、及び７３

いくつかの実施形態では、本発明に基づく改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、４１位、４２位、４３位、４４位、４５位、６５位、６６位、６７位、６９位、及び７３位（組ｖ）を含むアミノ酸位置の組に少なくとも３個または少なくとも４個、一般的には５個、６個、７個、８個、９個、または１０個の置換を含む。これらの位置に導入することができる例示的な置換を表３に示す。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、以下の位置の少なくとも１つの置換、すなわち、４１位のＶａｌまたはＡｓｐ、４２位のＰｒｏ、Ｍｅｔ、またはＡｓｐ、４３位のＰｒｏまたはＴｒｐ、４４位のＡｒｇ、Ｔｒｐ、Ｇｌｕ、またはＴｈｒ、４５位のＭｅｔ、Ｔｙｒ、またはＴｒｐ、６５位のＬｅｕまたはＴｒｐ、６６位のＴｈｒ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、またはＬｙｓ、６７位のＳｅｒ、

Ｌｙｓ、Ａｌａ、またはＬｅｕ、６９位のＨｉｓ、Ｌｅｕ、またはＰｒｏ、または、７３位のＶａｌまたはＴｒｐを含む。いくつかの実施形態では、４１位、４２位、４３位、４４位、４５位、６５位、６６位、６７位、６９位、及び７３位のうちの２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、または１０個すべてがこのパラグラフで指定される置換を有する。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、上記の組の中の位置の１つ以上において特定のアミノ酸の保存的置換、例えば、同じ電荷に基づくグループ分け、疎水性に基づくグループ分け、側鎖の環構造に基づくグループ分け（例えば、芳香族アミノ酸）、またはサイズに基づくグループ分け、及び／または極性かまたは非極性かによるグループ分けの中のアミノ酸を含むことができる。

【０１５１】

いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、４１位にＶａｌ、４２位にＰｒｏ、４３位にＰｒｏ、４４位にＡｒｇまたはＴｒｐ、４５位にＭｅｔ、６５位にＬｅｕ、６６位にＴｈｒ、６７位にＳｅｒ、６９位にＨｉｓ、及び／または７３位にＶａｌを含む。

【０１５２】

いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、４１位にＡｓｐ、４２位にＭｅｔまたはＡｓｐ、４３位にＴｒｐ、４４位にＧｌｕまたはＴｈｒ、４５位にＴｙｒまたはＴｒｐ、６５位にＴｒｐ、６６位にＶａｌ、Ｉｌｅ、またはＬｙｓ、６７位にＬｙｓ、Ａｌａ、またはＬｅｕ、６９位にＬｅｕまたはＰｒｏ、及び／または７３位にＴｒｐを含む。

【０１５３】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体に特異的に結合する改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６～９０のうちのいずれか１つのアミノ酸４～１１３と少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、かかる改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６～９０のうちのいずれか１つのアミノ酸４１～４５及び／またはアミノ酸６５～７３を含む。

【０１５４】

いくつかの実施形態では、本発明の改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、パーセント同一性が４１位、４２位、４３位、４４位、４５位、６５位、６６位、６７位、６９位、及び７３位の組を含まないものとして、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のアミノ酸４～１１３と少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６～９０のうちのいずれか１つに記載されるアミノ酸４１～４５及び／またはアミノ酸６５～７３を含む。

【０１５５】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１６～２２０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１６～２２０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の１個または２個のアミノ酸が置換されている。

【０１５６】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２１～２２４のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２１～２２４のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の１個のアミノ酸が置換されているか、または２個のアミノ酸が置換されている。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２１～２２４のうちのいずれか１つのアミノ酸

配列を含むが、配列中の３個または４個のアミノ酸が置換されている。
【０１５７】
更なる実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６～９０のうちのいずれか１つのアミノ酸４１～７３を含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６～９０のうちのいずれか１つのアミノ酸４１～７３と少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する配列を含むことができる。
【０１５８】
いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６～９０のうちのいずれか１つを含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端の最初の３個のアミノ酸「ＰＣＰ」を含まない、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６～９０のうちのいずれか１つを含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端の最初の３個のアミノ酸「ＰＣＰ」を含まずに決められた、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６～９０のうちのいずれか１つ、またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６～９０のうちのいずれか１つと少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。
【０１５９】
ＣＨ２の、トランスフェリン受容体と結合する組（ｖｉ）：４５、４７、４９、９５、９７、９９、１０２、１０３、及び１０４
いくつかの実施形態では、本発明に基づく改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、４５位、４７位、４９位、９５位、９７位、９９位、１０２位、１０３位、及び１０４位（組ｖｉ）を含むアミノ酸位置の組に少なくとも３個または少なくとも４個、一般的には５個、６個、７個、８個、または９個の置換を含む。これらの位置に導入することができる例示的な置換を表４に示す。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、１０３位にＴｒｐを含む。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、以下の位置に少なくとも１つの置換、すなわち、４５位にＴｒｐ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、またはＡｌａ；４７位にＴｒｐまたはＧｌｙ；４９位にＴｙｒ、Ａｒｇ、またはＧｌｕ；９５位にＳｅｒ、Ａｒｇ、またはＧｌｎ；９７位にＶａｌ、Ｓｅｒ、またはＰｈｅ；９９位にＩｌｅ、Ｓｅｒ、またはＴｒｐ；１０２位にＴｒｐ、Ｔｈｒ、Ｓｅｒ、Ａｒｇ、またはＡｓｐ；１０３位にＴｒｐ；及び、１０４位にＳｅｒ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、またはＶａｌを含む。いくつかの実施形態では、４５、４７、４９、９５、９７、９９、１０２、１０３、及び１０４位のうちの２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、または９つすべてがこのパラグラフで指定される置換を有する。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、上記の組の中の位置の１つ以上において特定のアミノ酸の保存的置換、例えば、同じ電荷に基づくグループ分け、疎水性に基づくグループ分け、側鎖の環構造に基づくグループ分け（例えば、芳香族アミノ酸）、またはサイズに基づくグループ分け、及び／または極性かまたは非極性かによるグループ分けの中のアミノ酸を含むことができる。
【０１６０】
いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、以下、すなわち、４５位がＴｒｐ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、またはＡｌａ、４７位がＴｒｐまたはＧｌｙ、４９位がＴｙｒ、Ａｒｇ、またはＧｌｕ、９５位がＳｅｒ、Ａｒｇ、またはＧｌｎ、９７位がＶａｌ、Ｓｅｒ、またはＰｈｅ、９９位がＩｌｅ、Ｓｅｒ、またはＴｒｐ、１０２位がＴｒｐ、Ｔｈｒ、Ｓｅｒ、Ａｒｇ、またはＡｓｐ、１０３位がＴｒｐ、及び、１０４位がＳｅｒ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、またはＶａｌ、から選択される２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、または９つの位置を含む。
【０１６１】
いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、４５位にＶａｌまたはＩｌｅ、４７位にＧｌｙ、４９位にＡｒｇ、９５位にＡｒｇ、９７位にＳｅｒ、９９位に

Ｓｅｒ、１０２位にＴｈｒ、Ｓｅｒ、またはＡｒｇ、１０３位にＴｒｐ、及び／または１０４位にＬｙｓまたはＡｒｇを含む。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体に特異的に結合する改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９１～９５のうちのいずれか１つのアミノ酸４～１１３と少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、かかる改変ＣＨ３ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９１～９５のうちのいずれか１つのアミノ酸４５～４９及び／またはアミノ酸９５～１０４を含む。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、本発明の改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、パーセント同一性が４５位、４７位、４９位、９５位、９７位、９９位、１０２位、１０３位、及び１０４位の組を含まないことを条件として、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１のアミノ酸４～１１３と少なくとも７０％の同一性、少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメインポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９１～９５のうちのいずれか１つに記載されるアミノ酸４５～４９及び／またはアミノ酸９５～１０４を含む。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２５～２２８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２５～２２８のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の１個または２個のアミノ酸が置換されている。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２９～２３３のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２９～２２３のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の１個のアミノ酸が置換されているか、または２個のアミノ酸が置換されている。他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２９～２３３のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含むが、配列中の３個、４個または５個のアミノ酸が置換されている。

【０１６６】

更なる実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９１～９５のうちのいずれか１つのアミノ酸４５～１０４を含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９１～９５のうちのいずれか１つのアミノ酸４５～１０４と少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有する配列を有することができる。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９１～９５のうちのいずれか１つを含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端の最初の３個のアミノ酸「ＰＣＰ」を含まない、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９１～９５のうちのいずれか１つを含む。更なる実施形態では、ポリペプチドは、アミノ末端の最初の３個のアミノ酸「ＰＣＰ」を含まずに決められた、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９１～９５のうちのいずれか１つ、またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９１～９５のうちのいずれか１つと少なくとも７５％の同一性、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。

【０１６８】

Ｖ．改変ＣＨ３またはＣＨ２ドメインポリペプチドを含むＦｃ領域内の更なる変異

ＢＢＢ受容体を結合してＢＢＢを通過する輸送を開始するように改変された、本明細書で提供されるＦｃポリペプチドは、例えば、血清安定性を高めるため、エフェクター機能を調節するため、グリコシル化に影響を及ぼすため、ヒトにおける免疫原性を低下させるため、及び／または、Ｆｃポリペプチドのノブ・アンド・ホール型のヘテロ二量化を可能とするためなど、更なる変異を含んでもよい。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、本発明に基づく改変Ｆｃポリペプチドは、対応する野生型Ｆｃポリペプチド（例えば、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のＦｃポリペプチド）と少なくとも約７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％のアミノ酸配列同一性を有する。

【０１７０】

本発明に基づく改変Ｆｃポリペプチドは、例えば、グリコシル化に影響を及ぼすため、血清半減期を長くするため、またはＣＨ３ドメインについては、改変ＣＨ３ドメインを構成するポリペプチドのノブ・アンド・ホール型のヘテロ二量化を可能とするためなど、指定されたアミノ酸の組の外側に導入される他の変異を有してもよい。一般的に、この方法では、第１のポリペプチドの界面に突起（「ノブ」）を、第２のポリペプチドの界面に対応した穴（「ホール」）を導入することで、突起が穴の中に位置してヘテロ二量体の形成を促し、ホモ二量体の形成を妨げることができることを伴う。突起は、第１のポリペプチドの界面の小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）に置換することによって形成される。突起と同じ、または同様の大きさの相補的な穴が、大きなアミノ酸側鎖をより小さなもの（例えば、アラニンまたはスレオニン）に置換することによって第２のポリペプチドの界面に形成される。このような更なる変異は、トランスフェリン受容体に対する改変ＣＨ３またはＣＨ２ドメインの結合に負の影響を及ぼさないポリペプチド内の位置に導入される。

【０１７１】

二量体化のためのノブ・アンド・ホール型のアプローチの例示的な一実施形態では、二量体化しようとする第１のＦｃポリペプチドサブユニットの、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の１３９位に対応する位置が、天然のスレオニンの代わりにトリプトファンを有し、二量体の第２のＦｃポリペプチドサブユニットが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の１８０位に対応する位置に天然のチロシンの代わりにバリンを有する。Ｆｃポリペプチドの第２のサブユニットは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の１３９位に対応する位置の天然のスレオニンがセリンに置換され、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の１４１位に対応する位置の天然のロイシンがアラニンに置換される置換を更に含んでもよい。

【０１７２】

本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチドは、ヘテロ二量体化のための他の改変（例えば、自然に帯電しているＣＨ３－ＣＨ３界面内の接触残基の静電的操作、または疎水性パッチ改変など）を有するように操作することもできる。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、血清半減期を延ばすための改変を導入することができる。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の２５位に対応する位置にＴｙｒを、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の２７位に対応する位置にＴｈｒを、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の２９位に対応する位置にＧｌｕを含むＣＨ２ドメインを含む。あるいは、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合にＭ２０１Ｌ及びＮ２０７Ｓの置換を含んでもよい。あるいは、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合にＮ２０７ＳまたはＮ２０７Ａの置換を含んでもよい。

【０１７４】

ＦｃのエフェクターＦｃのエフェクター機能

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチドは、エフェクター機能を有する（すなわち、これらのＦｃ領域は、エフェクター機能を媒介するエフェクター細胞で発現されたＦｃ受容体に結合する際に特定の生物学的機能を誘導する能力を有する）。エフェクター細胞としては、これらに限定されるものではないが、単核球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、好酸球、マスト細胞、血小板、Ｂ細胞、大顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、及び細胞傷害性Ｔ細胞が挙げられる。

【０１７５】

抗体エフェクター機能の例としては、これらに限定されるものではないが、Ｃ１ｑ結合及び補体依存性細胞傷害活性（ＣＤＣ）、Ｆｃ受容体結合、抗体依存性細胞介在性細胞障害活性（ＡＤＣＣ）、抗体依存性細胞介在性食作用（ＡＤＣＰ）、細胞表面受容体のダウンレギュレーション（例えば、Ｂ細胞受容体）、及びＢ細胞活性化が挙げられる。エフェクター機能は抗体クラスによって異なり得る。例えば、天然のヒトＩｇＧ１及びＩｇＧ３抗体は、免疫系細胞上に存在する適当なＦｃ受容体に結合する際にＡＤＣＣ及びＣＤＣ活性を誘発することができ、天然のヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４は、免疫細胞上に存在する適当なＦｃ受容体に結合する際にＡＤＣＰ機能を誘発することができる。

【０１７６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチドは、エフェクター機能を低下させる更なる改変を有することができる。あるいは、いくつかの実施形態では、本発明の改変ＣＨ２またはＣＨ３ドメインを含む改変Ｆｃ領域は、エフェクター機能を高める更なる改変を含むことができる。

【０１７７】

エフェクター機能を調節する例示的なＦｃポリペプチド変異としては、これらに限定されるものではないが、ＣＨ２ドメイン内の置換、例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の７及び８位に対応する位置における置換が挙げられる。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメイン内の置換は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の７及び８位のＡｌａを含む。いくつかの実施形態では、改変ＣＨ２ドメイン内の置換は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の７及び８位のＡｌａ、ならびに１０２位のＧｌｙを含む。

【０１７８】

エフェクター機能を調節する更なるＦｃポリペプチド変異としては、これらに限定されるものではないが、２３８、２６５、２６９、２７０、２９７、３２７及び３２９位における１つ以上の置換を含む（ＥＵ番号付けスキームでは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合に１１、３８、４２、４３、７０、１００、及び１０２位に相当する）。例示的な置換（ＥＵ番号付けスキームで番号付けした場合）には以下のものが含まれる。すなわち、３２９位は、プロリンがグリシンもしくはアルギニンまたはＦｃのプロリン３２９とＦｃγＲＩＩＩのトリプトファン残基Ｔｒｐ８７及びＴｒｐ１１０との間に形成されるＦｃ／Ｆｃγ受容体界面を壊すだけの充分な大きさを有するアミノ酸残基に置換された変異を有することができる。更なる例示的な置換としては、Ｓ２２８Ｐ、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｎ２９７Ａ、Ｎ２９７Ｄ、及びＰ３３１Ｓが挙げられる。複数の置換が存在してもよく、例えば、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域のＬ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域のＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ、ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域のＳ２２８Ｐ及びＬ２３５Ｅ、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域のＬ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域のＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＧ２３７Ａ、ヒトＩｇＧ２のＦｃ領域のＶ２３４Ａ及びＧ２３７Ａ、ヒトＩｇＧ４のＦｃ領域のＬ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、及びＥ３１８Ａ、ならびにヒトＩｇＧ４のＦｃ領域のＳ２２８Ｐ及びＬ２３６Ｅが挙げられる。いくつかの実施形態では、本発明の改変Ｆｃポリペプチドは、ＡＤＣＣを調節する１つ以上のアミノ酸置換（例えば、ＥＵ番号付けスキームに従って、Ｆｃ領域の２９８、３３３、及び／または３３４位の置換）を有することができる。

【０１７９】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチドは、ＡＤＣＣを増大または減少させる１つ以上のアミノ酸置換を有してもよく、またはＣ１ｑ結合及び／またはＣＤＣを変化させる変異を有してもよい。
【０１８０】
更なる変異を含む例示的なＦｃポリペプチド
本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチド（例えば、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．２、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．３、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．４、ＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２、ＣＨ３Ｃ．３５．２３のうちのいずれか１つ）は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、及び／または血清安定性を高める変異（例えば、（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ、または（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合の、Ｍ２０１Ｌを伴うかまたは伴わないＮ２０７Ｓ）を含む更なる変異を含むことができる。
【０１８１】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチド（例えば、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．２、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．３、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．４、ＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２、及びＣＨ３Ｃ．３５．２３のうちのいずれか１つ）は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列を有する改変Ｆｃポリペプチドは、ノブ変異を有するように改変することができる。
【０１８２】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチド（例えば、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．２、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．３、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．４、ＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２、及びＣＨ３Ｃ．３５．２３のうちのいずれか１つ）は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列を有する改変Ｆｃポリペプチドは、ノブ変異、及びエフェクター機能を調節する変異を有するように改変することができる。
【０１８３】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチド（例えば、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．２、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．３、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．４、ＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２、及びＣＨ３Ｃ．３５．２３のうちのいずれか１つ）は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９

９のうちのいずれか１つの配列を有する改変Ｆｃポリペプチドは、ノブ変異、及び血清安定性を高める変異を有するように改変することができる。

【０１８４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチド（例えば、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．２、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．３、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．４、ＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２、及びＣＨ３Ｃ．３５．２３のうちのいずれか１つ）は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列を有する改変Ｆｃポリペプチドは、ノブ変異、エフェクター機能を調節する変異、及び血清安定性を高める変異を有するように改変することができる。

【０１８５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチド（例えば、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．２、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．３、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．４、ＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２、及びＣＨ３Ｃ．３５．２３のうちのいずれか１つ）は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列を有する改変Ｆｃポリペプチドは、ホール変異を有するように改変することができる。

【０１８６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチド（例えば、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．２、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．３、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．４、ＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２及びＣＨ３Ｃ．３５．２３のうちのいずれか１つ）は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列を有する改変Ｆｃポリペプチドは、ホール変異、及びエフェクター機能を調節する変異を有するように改変することができる。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチド（例えば、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．２、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．３、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．４、ＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２、及びＣＨ３Ｃ．３５．２３のうちのいずれか１つ）は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少

なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列を有する改変Ｆｃポリペプチドは、ホール変異、及び血清安定性を高める変異を有するように改変することができる。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチド（例えば、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．２、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．３、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．４、ＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２、及びＣＨ３Ｃ．３５．２３のうちのいずれか１つ）は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４～９５及び２３６～２９９のうちのいずれか１つの配列を有する改変Ｆｃポリペプチドは、ホール変異、エフェクター機能を調節する変異、及び血清安定性を高める変異を有するように改変することができる。

【０１８９】

クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、及びＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４９の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４９の配列を有する。

【０１９０】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５０または３５１の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異及びエフェクター機能を調節する変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５０または３５１の配列を有する。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５２の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５２の配列を有する。

【０１９２】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５３または３５４の配列と少なく

とも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異、エフェクター機能を調節する変異、及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３５３または３５４の配列を有する。

【０１９３】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、ならびにＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３５５の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３５５の配列を有する。

【０１９４】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、ならびにＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３５６または３５７の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異及びエフェクター機能を調節する変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３５６または３５７の配列を有する。

【０１９５】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３５８の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３５８の配列を有する。

【０１９６】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３５９または３６０の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異、エフェクター機能を調節する変異、及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２０．１は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３５９または３６０の配列を有する。

【０１９７】

クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、及びＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３６１の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３６１の配列を有する。

【０１９８】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ノブ変異（例えば、

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６２または３６３の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異及びエフェクター機能を調節する変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６２または３６３の配列を有する。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６４の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６４の配列を有する。

【０２００】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６５または３６６の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異、エフェクター機能を調節する変異、及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６５または３６６の配列を有する。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６７の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６７の配列を有する。

【０２０２】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６８または３６９の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異及びエフェクター機能を調節する変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６８または３６９の配列を有する。

【０２０３】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７０の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異及び血清安

定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７０の配列を有する。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７１または３７２の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異、エフェクター機能を調節する変異、及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７１または３７２の配列を有する。

【０２０５】

クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、及びＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７３の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７３の配列を有する。

【０２０６】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７４または３７５の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異及びエフェクター機能を調節する変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７４または３７５の配列を有する。

【０２０７】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７６の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７６の配列を有する。

【０２０８】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７７または３７８の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異、エフェクター機能を調節する変異、及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７７または３７８の配列を有する。

【０２０９】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ホール変異（例えば

、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７９の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３７９の配列を有する。

【０２１０】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８０または３８１の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異及びエフェクター機能を調節する変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８０または３８１の配列を有する。

【０２１１】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８２の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８２の配列を有する。

【０２１２】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８３または３８４の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異、エフェクター機能を調節する変異、及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８３または３８４の配列を有する。

【０２１３】

クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、及びＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８５の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８５の配列を有する。

【０２１４】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８６または３８７の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異及びエフェクター機能を調節する変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．

２３．４は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８６または３８７の配列を有する。
【０２１５】
いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８８の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８８の配列を有する。
【０２１６】
いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８９または３９０の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異、エフェクター機能を調節する変異、及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３８９または３９０の配列を有する。
【０２１７】
いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９１の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９１の配列を有する。
【０２１８】
いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９２または３９３の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異及びエフェクター機能を調節する変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９２または３９３の配列を有する。
【０２１９】
いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９４の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９４の配列を有する。
【０２２０】
いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準

として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９５または３９６の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異、エフェクター機能を調節する変異、及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３．４は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９５または３９６の配列を有する。

【０２２１】

クローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、及びＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９７の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９７の配列を有する。

【０２２２】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９８または３９９の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異及びエフェクター機能を調節する変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９８または３９９の配列を有する。

【０２２３】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４００の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４００の配列を有する。

【０２２４】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０１または４０２の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異、エフェクター機能を調節する変異、及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０１または４０２の配列を有する。

【０２２５】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０３の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０３の配列を有する。

【０２２６】
いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０４または４０５の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異及びエフェクター機能を調節する変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０４または４０５の配列を有する。

【０２２７】
いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０６の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０６の配列を有する。

【０２２８】
いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０７または４０８の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異、エフェクター機能を調節する変異、及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１７．２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０７または４０８の配列を有する。

【０２２９】
クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３
いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、及びＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０９の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０９の配列を有する。

【０２３０】
いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１０または４１１の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異及びエフェクター機能を調節する変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１０または４１１の配列を有する。

【０２３１】
いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、血清安定性を高める変

異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１２の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１２の配列を有する。

【０２３２】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ノブ変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｗ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１３または４１４の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ノブ変異、エフェクター機能を調節する変異、及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１３または４１４の配列を有する。

【０２３３】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１５の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１５の配列を有する。

【０２３４】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１６または４１７の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異及びエフェクター機能を調節する変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１６または４１７の配列を有する。

【０２３５】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１８の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１８の配列を有する。

【０２３６】

いくつかの実施形態では、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ホール変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖ）、エフェクター機能を調節する変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＬ７Ａ、Ｌ８Ａ、及び／またはＰ１０２Ｇ（例えば、Ｌ７Ａ及びＬ８Ａ））、血清安定性を高める変異（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けした場合のＭ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅ）、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１９または４２０の配列と少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、または少

なくとも９５％の同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、ホール変異、エフェクター機能を調節する変異、及び血清安定性を高める変異を有するクローンＣＨ３Ｃ．３５．２３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１９または４２０の配列を有する。

【０２３７】

ＶＩ．ＢＢＢ受容体結合タンパク質のフォーマット

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチド及びＦｃＲｎ結合部位を含む本発明の改変ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドは、タンパク質二量体のサブユニットである。いくつかの実施形態では、二量体はヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、二量体はホモ二量体である。いくつかの実施形態では、二量体は、ＢＢＢ受容体に結合する１個のＦｃポリペプチドを含む（すなわちＢＢＢ受容体との結合について一価である）。いくつかの実施形態では、二量体は、ＢＢＢ受容体に結合する第２のポリペプチドを含む。第２のポリペプチドは二価のホモ二量体タンパク質を与えるように同じ改変Ｆｃポリペプチドを含むものでもよく、または本発明の第２の改変Ｆｃポリペプチドが第２のＢＢＢ受容体結合部位を与えてもよい。

【０２３８】

本発明のＢＢＢ受容体結合ポリペプチド及びポリペプチドを含む二量体または多量体タンパク質は、例えば、ポリペプチドのフォーマットに基づいた、広範囲の結合親和性を有することができる。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチドを含むポリペプチドは、１ｐＭ～１０μｍの範囲にわたるＢＢＢ受容体に対する親和性を有する。いくつかの実施形態では、親和性は一価のフォーマットで測定することができる。他の実施形態では、親和性は、例えば、改変Ｆｃポリペプチドを含むタンパク質二量体として、二価のフォーマットで測定することができる。

【０２３９】

ＢＢＢ受容体に対する結合を分析するために結合親和性、結合速度論、及び交差反応性を分析するための方法は当該技術分野では周知のものである。これらの方法としては、これらに限定されるものではないが、固相結合アッセイ（例えば、ＥＬＩＳＡアッセイ）、免疫沈降法、表面プラズモン共鳴（例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ））、速度論的排除アッセイ（ｋｉｎｅｔｉｃ　ｅｘｃｌｕｓｉｏｎ　ａｓｓａｙ）（例えば、ＫｉｎＥｘＡ（登録商標））、フローサイトメトリー、蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）、バイオレイヤー干渉法（例えば、Ｏｃｔｅｔ（登録商標）（ＦｏｒｔｅＢｉｏ，Ｉｎｃ．，Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ，ＣＡ））、及びウェスタンブロット分析が挙げられる。いくつかの実施形態では、結合親和性及び／または交差反応性を調べるためにＥＬＩＳＡが用いられる。ＥＬＩＳＡアッセイを行うための方法は当該技術分野では周知のものであり、下記実施例のセクションでも述べる。いくつかの実施形態では、結合親和性、結合速度論、及び／または交差反応性を調べるために表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）が用いられる。いくつかの実施形態では、結合親和性、結合速度論、及び／または交差反応性を調べるために速度論的排除アッセイが用いられる。いくつかの実施形態では、結合親和性、結合速度論、及び／または交差反応性を調べるためにバイオレイヤー干渉法が用いられる。ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドのＦｃＲｎ結合もこれらのタイプのアッセイを用いて評価することができる。ＦｃＲｎ結合は、通常は酸性条件下、例えばｐＨ約５～約６でアッセイされる。

【０２４０】

ＶＩＩ．ＢＢＢ受容体結合タンパク質結合体

いくつかの実施形態では、ＢＢＢの受容体に結合してＢＢＢを通過する輸送を開始する改変ポリペプチドは、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチドを含み、部分的または完全なヒンジ領域を更に含む。ヒンジ領域は、いずれの免疫グロブリンサブクラスまたはアイソタイプからのものであってもよい。例示的な免疫グロブリンのヒンジの１つとして、ＩｇＧ１のヒンジ領域（例えば、ヒトＩｇＧ１のヒンジのアミノ酸配列ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３４））などのＩｇＧヒンジ領域がある。更なる実施形態では、ヒンジまたは部分的なヒンジ領域を含むことができるポリペプチドを、

別の部分、例えば免疫グロブリンの可変領域と更に連結することにより、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチド－可変領域融合ポリペプチドが作製される。可変領域は、対象となる任意の抗原、例えば治療用の神経学的標的、または診断用の神経学的標的と結合することができる。

【０２４１】

いくつかの実施形態では、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチド（例えば、改変Ｆｃポリペプチド）は、リンカーを介して可変領域と連結される。上記のパラグラフに示したように、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチド（例えば改変Ｆｃポリペプチド）は、ヒンジ領域によって可変領域と連結することができる。いくつかの実施形態では、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチド（例えば、改変Ｆｃポリペプチド）は、ペプチドリンカーによって可変領域と連結することができる。ペプチドリンカーは、可変領域とＢＢＢ受容体結合ポリペプチドとの互いに対する回転を可能とするように構成することができ、及び／またはプロテアーゼによる消化に対して耐性を有するものである。いくつかの実施形態では、リンカーは、例えば、Ｇｌｙ、Ａｓｎ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｌａなどのアミノ酸を含む柔軟なリンカーであってよい。かかるリンカーは、周知のパラメータを用いて設計することができる。例えば、リンカーは、Ｇｌｙ－ＳｅｒリピートのようＡ繰り返し配列を有することができる。

【０２４２】

可変領域は、任意の抗体フォーマット、例えばＦａｂまたはｓｖＦｖのフォーマットとすることができる。いくつかの実施形態では、抗体可変領域配列は、２個の抗体可変領域重鎖と２個の抗体可変領域軽鎖、またはそれらのそれぞれのフラグメントを含む。

【０２４３】

いくつかの実施形態では、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチド（例えば、改変Ｆｃポリペプチド）と連結された可変領域は、タウタンパク質（例えば、ヒトタウタンパク質）またはそのフラグメントに結合することができる。いくつかの実施形態では、可変領域は、リン酸化タウタンパク質、非リン酸化タウタンパク質、タウタンパク質のスプライスアイソフォーム、Ｎ末端が切断されたタウタンパク質、Ｃ末端が切断されたタウタンパク質、及び／またはそれらのフラグメントに結合することができる。

【０２４４】

いくつかの実施形態では、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチド（例えば、改変Ｆｃポリペプチド）と連結された可変領域は、β－セクレターゼ１（ＢＡＣＥ１）タンパク質（例えば、ヒトＢＡＣＥ１タンパク質）またはそのフラグメントに結合することができる。いくつかの実施形態では、可変領域は、ＢＡＣＥ１タンパク質の１つ以上のスプライスアイソフォームまたはそのフラグメントに結合することができる。

【０２４５】

いくつかの実施形態では、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチド（例えば、改変Ｆｃポリペプチド）と連結された可変領域は、骨髄細胞上に発現するトリガー受容体２（ＴＲＥＭ２）タンパク質（例えば、ヒトＴＲＥＭ２タンパク質）またはそのフラグメントに結合することができる。

【０２４６】

いくつかの実施形態では、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチド（例えば、改変Ｆｃポリペプチド）と連結された可変領域は、α－シヌクレインタンパク質（例えば、ヒトα－シヌクレインタンパク質）またはそのフラグメントに結合することができる。いくつかの実施形態では、可変領域は、モノマー性α－シヌクレイン、オリゴマー性α－シヌクレイン、α－シヌクレインフィブリル、可溶性α－シヌクレイン、及び／またはこれらのフラグメントに結合することができる。

【０２４７】

ＢＢＢ受容体結合ポリペプチド（例えば、改変Ｆｃポリペプチド）は、対象となる抗原を標的化する免疫グロブリン可変領域以外のポリペプチドと連結することもできる。いくつかの実施形態では、かかるポリペプチドは、例えば上記に述べた柔軟なリンカーのようなペプチドリンカーを用いてＢＢＢ受容体結合ポリペプチドと連結される。

【０２４８】
いくつかの実施形態では、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドは、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドを発現している細胞を標的化するうえで望ましい、例えば治療ポリペプチドなどのポリペプチドと連結することができる。いくつかの実施形態では、ＢＢＢ受容体ポリペプチドは、ＢＢＢを通過して輸送するための生物学的活性を有するポリペプチド、例えば、可溶性タンパク質、例えば、受容体の細胞外ドメインもしくは成長因子、サイトカイン、または酵素と連結される。
【０２４９】
尚も他の実施形態では、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドは、タンパク質の精製に有用なペプチドまたはタンパク質、例えば、ポリヒスチジン、エピトープタグ、例えばＦＬＡＧ、ｃ－Ｍｙｃ、ヘマグルチニンタグなど、グルタチオンＳトランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、チオレドキシン、ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ、ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｇ、またはマルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）と連結することができる。場合により、ＢＢＢ結合ポリペプチドと融合されたペプチドまたはタンパク質は、第Ｘａ因子またはトロンビンの切断部位のようなプロテアーゼ切断部位を含むことができる。特定の実施形態では、連結は中枢神経系に存在する酵素によって切断可能なものである。
【０２５０】
ポリペプチド以外の物質をＢＢＢ受容体結合ポリペプチドと連結することもできる。かかる物質としては、細胞毒性剤、造影剤、ＤＮＡもしくはＲＮＡ分子、または化合物が挙げられる。いくつかの実施形態では、物質は、治療用または造影用の化合物である。いくつかの実施形態では、物質は小分子、例えば、１０００Ｄａ未満、７５０Ｄａ未満、または５００Ｄａ未満である。
【０２５１】
物質は、ポリペプチドまたは非ポリペプチドのいずれであっても、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端領域に連結するか、または、物質がＢＢＢ受容体結合ポリペプチドのＢＢＢ受容体及びＦｃＲｎ受容体に対する結合を妨げない限り、ポリペプチドの任意の領域に結合させることができる。
【０２５２】
異なる実施形態において、周知の化学架橋試薬及びプロトコールを用いて結合体を作製することができる。例えば、当業者には周知の、ポリペプチドを対象となる薬剤と架橋するうえで有用な多くの化学架橋剤が存在する。例えば、架橋剤は、分子を段階的に連結するために使用することができるヘテロ二官能性架橋剤である。ヘテロ二官能性架橋剤は、タンパク質を結合するためのより特異的な連結方法の設計を可能とし、それにより、ホモタンパク質ポリマーのような不要な副反応の発生を低減するものである。広範な種類のヘテロ二官能性架橋剤が当該技術分野で周知であり、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）またはその水溶性類似体であるＮ－ヒドロキシスルホスクシンイミド（スルホ－ＮＨＳ）、スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）、Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート（ＳＩＡＢ）、スクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（ＳＭＰＢ）、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）、４－スクシンイミジルオキシカルボニル－ａ－メチル－ａ－（２－ピリジルジチオ）－トルエン（ＳＭＰＴ）、Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、及びスクシンイミジル　６－［３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート］ヘキサノエート（ＬＣ－ＳＰＤＰ）が挙げられる。Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド部分を有するこれらの架橋剤は、より高い水溶性を一般的に有するＮ－ヒドロキシスルホスクシンイミド類似体として得ることができる。更に、連結鎖内にジスルフィド架橋を有するこれらの架橋剤は、代わりにアルキル誘導体として合成することもでき、これによりインビボでのリンカー切断の量を低減させることができる。ヘテロ二官能性架橋剤以外にも、ホモ二官能性及び光反応性架橋剤を含む、他の多くの架橋剤が存在する。スベリン酸ジスク

シンイミジル（ＤＳＳ）、ビスマレイミドヘキサン（ＢＭＨ）、及びピメルイミド酸ジメチル二塩酸塩（ＤＭＰ）は、有用なホモ二官能性架橋剤の例であり、ビス－［Ｂ－（４－アジドサリチルアミド）エチル］ジスルフィド（ＢＡＳＥＤ）、及びＮ－スクシンイミジル－６（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（ＳＡＮＰＡＨ）は、有用な光反応性架橋剤の例である。

【０２５３】

対象となる薬剤は、細胞毒性剤など、または化学的部分を含む治療剤であってよい。いくつかの実施形態では、薬剤は、ペプチドまたは小分子治療剤もしくは造影剤であってよい。

【０２５４】

ＶＩＩＩ．ＢＢＢ受容体に結合するようにＦｃポリペプチドを操作する方法

操作方法の概略

更なる態様では、ＢＢＢ受容体に対する結合特異性を有するようにＦｃポリペプチドを操作する方法を提供する。いくつかの実施形態では、Ｆｃポリペプチドの改変は、溶媒露出アミノ酸残基の組、例えば、本明細書で述べたような組（ｉ）及び／または組（ｉｉ）の様々なアミノ酸を置換することを含む。

【０２５５】

いくつかの実施形態では、本方法は、Ｆｃポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、溶媒露出表面アミノ酸の組の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個、またはすべての位置にアミノ酸の変化を有するように改変することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、Ｆｃポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、アミノ酸の２つ以上の組の所望の数の位置にアミノ酸の変化を有するように改変することを含む。所望の位置に導入されるアミノ酸を、ランダム化または部分ランダム化によって生成することによってある組の様々な位置にアミノ酸置換を有するＦｃポリペプチドのライブラリーを作製することができる。いくつかの実施形態では、Ｆｃポリペプチドは、完全なヒンジ領域の一部、または全体を含むことができる。

【０２５６】

変異Ｆｃポリペプチドを含むポリペプチドは、任意の数の系を用いて発現させることができる。例えば、いくつかの実施形態では、変異体ポリペプチドは、ディスプレイ系、例えば、ウイルスディスプレイ系、例えば酵母ディスプレイ系などの細胞表面ディスプレイ系、ｍＲＮＡディスプレイ系、またはポリソームディスプレイ系で発現させることができる。他の例示的な実施形態では、変異体ポリペプチドは宿主細胞から分泌される可溶性ポリペプチドとして発現される。周知の方法を用いてライブラリーをスクリーニングして対象となるＢＢＢ受容体に結合するポリペプチドを特定し、更にその特性分析を行って結合の反応速度論を調べることができる。その後、更なる変異を、最初のアミノ酸の組の各位置、または組の外側の他の位置、例えばパラトープの近くの溶媒露出アミノ酸のいずれかにおいて、選択されたクローンに導入することができる。

【０２５７】

操作方法の例示的な実施形態

野生型Ｆｃポリペプチド、またはそのフラグメント、例えばＣＨ２またはＣＨ３ドメインを有するＤＮＡ鋳型配列を作製することができる。いくつかの実施形態では、変異を導入した鋳型配列は、抗体可変領域を更にコードする。いくつかの実施形態では、鋳型配列は、所望の位置に変異を導入し、抗体可変領域なしで発現されるＦＣポリペプチドをコードする。

【０２５８】

発現系は、対象となるＢＢＢ受容体との結合について変異ポリペプチドをスクリーニングするうえで使用することができる任意の系であってよい。いくつかの実施形態では、鋳型配列は、ファージミドベクター内で作製される。特定の実施形態では、鋳型配列は、ファージのｐＩＩＩコートタンパク質に遺伝子操作によって融合される。

【０２５９】

いくつかの実施形態では、変異導入したＦｃポリペプチドは酵母ディスプレイベクター内で作製される。例えば、鋳型配列は、酵母細胞壁タンパク質Ａｇａ２ｐ、例えばＡｇａ２ｐのＮ末端またはＣ末端に融合させることができる。酵母株は、Ａｇａ２ｐコートタンパク質の誘導性発現を行うことができるものでよく、例えば、酵母株はＥＢＹ１００であってよい。

【０２６０】

いくつかの実施形態では、エラープローンＰＣＲのようなランダム突然変異誘発法を用いて所望のアミノ酸位置に変異を導入する。

【０２６１】

突然変異誘発を行った後、変異導入した核酸を、対象となるディスプレイ系に導入して発現させ、対象となるＢＢＢ受容体との結合についてスクリーニングする。任意の数のスクリーニング法を用いることができる。典型的な実施形態では、発現したタンパク質をＥＬＩＳＡを用いてスクリーニングする。

【０２６２】

対象となるＢＢＢ受容体に結合する選択されたＦｃポリペプチドに更なるラウンドの変異を行って、所望のアミノ酸の組、または特定の組について指定された位置の外側の位置に更なる変異を導入することができる。いくつかの実施形態では、「ＮＮＫ」ランダム化を用いて更なる変異を導入する。ＮＮＫランダム化では、Ｎが「Ａ、Ｃ、Ｇ、またはＴ」を、Ｋが「ＧまたはＴ」を指す、縮重ＮＮＫトリコドンを含むプライマーを用いる。例えば、ＮＮＫランダム化では、特定のアミノ酸の所定の混合物（例えば、７０％野生型）を得るために特定の比率でトリヌクレオチドを混合するか、または特定のアミノ酸について、または特定のアミノ酸に対する偏りがないようにトリヌクレオチドを混合する。ランダム化の領域に対応するＦｃ領域のフラグメントのＰＣＲ増幅を行ってから、例えばファージミドベクターのようなベクターにライゲートするためのエンドプライマーを用いてアセンブルすることによりライブラリーを作製する。あるいは、Ｋｕｎｋｅｌ突然変異誘発法または他の突然変異誘発法を用いて更なる変異を導入することにより所望の位置に多様性を導入することもできる。

【０２６３】

変異導入したＦｃポリペプチドの結合特性を様々なアッセイを用いて評価することができ、例えば、結合親和性及び／または交差反応性を、ＥＬＩＳＡ、表面プラズモン共鳴、結合平衡除外アッセイ、または干渉法アッセイによって調べることができる。

【０２６４】

所望の結合特性を有する改変されたＢＢＢ受容体結合ポリペプチドが特定されたならば、ポリペプチドをＢＢＢを通過する輸送、及び／または別の薬物動態学的パラメータについて更にスクリーニングする。輸送についてスクリーニングする方法は、動物モデルを用いて脳内へのＢＢＢ受容体ポリペプチドの取り込みを評価することを含む。取り込みは、例えば、ＢＢＢ受容体結合タンパク質に結合させた生物学的活性を有するタンパク質または他の物質のタンパク質濃度もしくは活性を測定するなど、様々なアッセイによって評価することができる。タンパク質濃度は、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドに特異的に結合する抗体、またはＢＢＢ受容体結合ポリペプチドに対して特異的な試薬に結合する二次試薬としての抗体を用いたイムノアッセイによって便宜よく測定することができる。いくつかの実施形態では、血液脳関門を通過する輸送は、脳に取り込まれるＢＢＢ受容体結合ポリペプチドに連結された物質の量を測定することによって評価される。上記に詳しく述べたように、かかる物質は、抗原に結合する免疫グロブリンの可変領域、酵素、または他のポリペプチド剤などのポリペプチドであってよい。ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドの血清中半減期のような更なるパラメータも動物モデルで評価することができる。

【０２６５】

いくつかの実施形態では、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドの輸送は、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドに連結された物質の脳内での生物学的活性を測定することにより評価することができる。例えば、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドに連結された酵素の活性を、脳また

は脳の領域における酵素活性について直接アッセイすることにより評価することができる。あるいは、酵素の活性は、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドによる輸送後に残留する脳内のその酵素の基質の濃度を測定することによって評価することもできる。いくつかの実施形態では、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドに連結された抗体治療薬の活性を、治療抗体が結合する標的抗原の濃度または活性を測定することによって評価することができる。本発明の改変Ｆｃポリペプチドによって媒介されるＢＢＢ受容体との結合は、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドに連結された生物学的活性物質の取り込みを、改変Ｆｃポリペプチドの非存在下での物質の取り込みと比較して、通常は少なくとも５倍、しばしば少なくとも１０倍、または少なくとも２０倍、またはそれ以上増大させる。

【０２６６】

ＩＸ．　ＴｆＲコンストラクト

本開示は、単量体のＴｆＲアピカルドメインを含む単離された組換えトランスフェリン受容体（ＴｆＲ）コンストラクトであって、ＴｆＲのプロテアーゼ様ドメインまたは螺旋ドメインを含まないコンストラクトも特色とする。一実施形態では、コンストラクトは、保存されたエピトープまたは抗原を提示し、かつ／または天然のヒトＴｆＲのアピカルドメインのおよその３次元構造を保持するか、もしくは約２未満のＲＭＳＤを有する。一実施形態では、３次元構造は、Ｘ線結晶解析によって測定される。一実施形態では、コンストラクトは、ヒトＴｆＲアピカルドメインを含む。

【０２６７】

更に、本開示は、完全長のＴｆＲ配列に対して環状に並べ替えられたＴｆＲアピカルドメインの１つ以上の部分を含むＴｆＲコンストラクトも特色とする。ＴｆＲコンストラクトは、任意選択的なリンカーによって互いに直列に融合されたＴｆＲアピカルドメインの２つの異なる部分で構成することができる。ＴｆＲコンストラクトは、（ａ）ＴｆＲアピカルドメインの第１の部分の配列を含む第１のポリペプチドと、（ｂ）任意選択的なリンカーと、（ｃ）ＴｆＲアピカルドメインの第２の部分の配列を含む第２のポリペプチドと、を含むことができ、完全長のＴｆＲ配列に対して、ＴｆＲアピカルドメインの第１の部分の配列は、ＴｆＲアピカルドメインの第２の部分の配列のＣ末端側であり、第１のポリペプチド、任意選択的なリンカー、及び第２のポリペプチドが、直列に融合されている（すなわち、第１のポリペプチドのＣ末端が任意選択的なリンカーのＮ末端に融合され、任意選択的なリンカーのＣ末端が第２のポリペプチドのＮ末端に融合されている）。特定の実施形態では、ＴｆＲコンストラクトはリンカーを含まない。したがって、ＴｆＲコンストラクト内の第１のポリペプチドは第２のポリペプチドと直接融合され得る。本明細書に記載されるＴｆＲコンストラクトは、アレナウイルス（例えば、マチュポウイルス）に結合することができる。

【０２６８】

ＴｆＲコンストラクトは、

TISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSE (SEQ ID NO:427)

の配列に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）を有する配列を含む第１のポリペプチドと、任意選択的なリンカーと、

DKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRA

GKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQT (SEQ ID NO:428)

の配列に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）を有する配列を含む第２のポリペプチドと、を含んでよく、第１のポリペプチド、任意選択的なリンカー、及び第２のポリペプチドは直列に融合されている。

【０２６９】

いくつかの実施形態では、第１のポリペプチドはＣ末端において、配列
SKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIK (SEQ ID NO:429)

に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）を有する配列、またはそのフラグメントを更に含む。非限定的な例として、第１のポリペプチドのＣ末端のフラグメントは、配列
SKNVK (SEQ ID NO:430), SKNVKLTVSN (SEQ ID NO:431), SKNVKLTVSNVLKEI (SEQ ID NO:432), またはSKNVKLTVSNVLKEIKILNI (SEQ ID NO:433)

を有する。いくつかの実施形態では、第１のポリペプチドはＮ末端において、配列
GFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQ (SEQ ID NO:439)

に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）を有する配列、またはそのフラグメントを更に含む。非限定的な例として、第１のポリペプチドのＮ末端のフラグメントは、配列
NIPVQ (SEQ ID NO:440), SSGLPNIPVQ (SEQ ID NO:441),
FPPSRSSGLPNIPVQ (SEQ ID NO:442),またはFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQ (SEQ ID NO:443)

を有する。

【０２７０】

いくつかの実施形態では、第２のポリペプチドはＣ末端において、配列
KFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTP (SEQ ID NO:434)

に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）を有する配列、またはそのフラグメントを更に含む。非限定的な例として、第２のポリペプチドのＣ末端のフラグメントは、配列
KFPIV (SEQ ID NO:435), KFPIVNAELS (SEQ ID NO:436), KFPIVNAELSFFGHA (SEQ ID NO:437),またはKFPIVNAELSFFGHAHLGTG (SEQ ID NO:438)

を有する。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチドはＮ末端において、配列
SKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIV (SEQ ID NO:444)

に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）を有する配列、またはそのフラグメントを更に含む。非限定的な例として、第２のポリペプチドのＮ末端のフラグメントは、配列
SVIIV (SEQ ID NO:445), DSAQNSVIIV (SEQ ID NO:446), KIQVKDSAQNSVIIV (SEQ ID NO:447),またはDQHFVKIQVKDSAQNSVIIV (SEQ ID NO:448)

を有する。

【０２７１】

いくつかの実施形態では、ＴｆＲコンストラクトの第１のポリペプチドは、配列

SSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSN
(SEQ ID NO:449)

に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第２のポリペプチドは、配列
DSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTP
VNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELS (SEQ ID NO:450)

に対して少なくとも９０％の配列同一性（例えば、少なくとも９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性）を有する配列を含む。特定の実施形態では、ＴｆＲコンストラクトは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４４９の配列を有する第１のポリペプチドと、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５０の配列を有する第２のポリペプチドとを含み、第１のポリペプチドのＣ末端は第２のポリペプチドのＮ末端に融合される。特定の実施形態では、ＴｆＲコンストラクトは、
SSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSN
(SEQ ID NO:451)

の配列を有する第１のポリペプチドと、
DSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLDSP
VNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLS (SEQ ID NO:452)

の配列を有する第２のポリペプチドとを含み、第１のポリペプチドのＣ末端は第２のポリペプチドのＮ末端に融合される。

【０２７２】

特定の実施形態では、本明細書に記載されるＴｆＲコンストラクトは、天然のフォールディングなどの改善された３次元構造、及び天然状態におけるのと同様の保存されたエピトープまたは抗原を提示するといった特性を有する。例えば、３次元空間において、ＴｆＲコンストラクトは、完全なトランスフェリン受容体の部分が複合体化する際の天然の折り畳み状態にあるトランスフェリン受容体のアピカルドメインをよく模倣した形で折り畳まれる。

【０２７３】

別の例では、本明細書に記載されるＴｆＲコンストラクトの構造的特徴は、ＴｆＲコンストラクトが、ファージ、酵母、及び／または真核細胞を含む他の細胞タイプなどの様々な細胞上に天然の３次元フォールディング状態で提示されることを可能とする。本明細書に記載されるＴｆＲコンストラクトが適正な天然のフォールディング状態で提示されることで、例えば、本明細書に記載されるような方法で、様々な疾患または障害を治療するために治療分子を投与する際にみられる自然の条件下においてインビボでトランスフェリン受容体のアピカルドメインに結合する高親和性タンパク質、抗体、または他の結合分子をＴｆＲコンストラクトを使用して同定する場合のスクリーニングの結果の改善につながる。例えば、トランスフェリン受容体のタンパク質全体が発現されて細胞表面上に提示される場合、タンパク質は二量体として提示され、これがアビディティー効果をもたらすことにより、ＴｆＲアピカルドメインに対して低いアフィニティーを有する結合タンパク質の特定につながる。本明細書に記載されるＴｆＲコンストラクトの構造的特徴は、アピカルドメインが細胞表面上に単量体として発現して提示されることを可能とすることで、結合分子とアピカルドメインとの間の単量体相互作用の研究及び特定を可能とし、より親和性

の高い分子の同定を可能とするものである。
【０２７４】
製造方法
本開示の別の態様は、単量体のＴｆＲアピカルドメインを含む単離された組換えトランスフェリン受容体（ＴｆＲ）コンストラクトであって、ＴｆＲのプロテアーゼ様ドメインまたは螺旋ドメインを含まないコンストラクトに関する。一実施形態では、コンストラクトは、保存されたエピトープまたは抗原を提示し、かつ／または天然のヒトＴｆＲのアピカルドメイン（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０７）のおよその３次元構造を保持するか、もしくは約２未満のＲＭＳＤを有する。別の実施形態では、３次元構造は、Ｘ線結晶解析によって測定される。３次元構造を決定するために用いられる方法の１つにＸ線結晶解析がある。結晶は、例えば２０％（ｖ／ｖ）エチレングリコールのような極性溶媒を添加した結晶化母液を用いて液体窒素中に直接浸漬することによるフラッシュ冷却を用いて調製することができる。Ｘ線強度データは、高速検出器（Ｒａｙｏｎｉｘ３００）を使用してＡＰＳ（ａｄｖａｎｃｅｄ　ｐｈｏｔｏｎ　ｓｏｕｒｃｅ）（Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｐｈｏｔｏｎ　Ｓｏｕｒｃｅ，Ａｒｇｏｎｎｅ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　ＬａｂｏｒａｔｏｒｙのＳＥＲ－ＣＡＴビーム線）で収集することができる。収集されたデータは、ＨＫＬ－２０００（ＨＫＬ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｉｎｃ．）プログラムを用いてインデックス付けし、積分し、スケーリングすることができる。複合体の結晶構造は、ＴｆＲアピカルドメイン単量体を初期探索モデルとして用いてＰＨＡＳＥＲによる分子置換により決定することができる。次いで、このモデルを、ＲＥＦＭＡＣを用いて剛体精密化に続いて制限精密化を行って精密化することができる。結晶学的計算はすべて、ＣＣＰ４プログラムのスイートを用いて行うことができる（Ｗｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ．Ｃｒｙｓｔ．Ｄ６７：２３５－２４２（２０１１））。電子密度への複合体のモデル構築は、グラフィックプログラムＣＯＯＴ を使用して行うことができる（Ｅｍｓｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ．Ｃｒｙｓｔ．Ｄ６６：４８６－５０１（２０１０））。
【０２７５】
別の実施形態では、本明細書に記載されるＴｆＲアピカルドメインコンストラクトと、対応する天然の完全長ＴｆＲとの間のエピトープ、抗原、またはおよその３次元構造の保存の程度を決定する。１つの例では、本明細書に記載されるヒトＴｆＲアピカルドメインコンストラクトを天然の完全長ヒトＴｆＲと比較する。かかる決定方法は、本明細書に記載されるＴｆＲアピカルドメインコンストラクト（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０９、１１０、３０１、４６８、及び４６９のいずれか（例えば、１０９、１１０、及び３０１））と、天然の完全長ＴｆＲ（例えば、ＰＤＢコード：３ＫＡＳのようなヒトＴｆＲ）内のアピカルドメインの結晶構造をアラインすることによって行うことができる。次いで、２つの構造間の平均二乗偏差（ＲＭＳＤ）を例えばＭＯＥ　ｖ２０１６．０８０２（Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ　Ｇｒｏｕｐ）を使用するなど、当該技術分野では周知の方法で決定することができる。
【０２７６】
一実施形態では、本明細書に記載されるＴｆＲアピカルドメインコンストラクトと天然の完全長ＴｆＲのアピカルドメインとの間のＲＭＳＤは、約４未満、約３未満、または約２未満であり、約１～約２の範囲の間である。
【０２７７】
一実施形態では、本明細書に記載されるＴｆＲアピカルドメインコンストラクトと天然の完全長ＴｆＲのアピカルドメインとの間のＲＭＳＤは、約１～約１．５の範囲の間である。
【０２７８】
一実施形態では、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０９、１１０、３０１、４６８、及び４６９のうちのいずれか１つ（例えば、１０９、１１０、及び３０１）の配列を有するＴｆＲアピカルドメインコンストラクトのいずれか１つと、天然の完全長ＴｆＲのアピカルドメインとの間のＲＭＳＤは、約１～約１．５の範囲の間である。１つの例では、ＲＭＳＤは、約

１．２である。
【０２７９】
別の態様は、組換えＴｆＲアピカルドメインコンストラクトを作製、精製、及び単離する方法に関する。本方法は、直列に融合された第１のポリヌクレオチド、任意選択的なリンカーポリヌクレオチド、及び第２のポリヌクレオチドを含むＴｆＲアピカルドメイン遺伝子を発現させることを含み、第１のポリヌクレオチドはドメインのＣ末端フラグメントをコードし、任意選択的なリンカーポリヌクレオチドは任意選択的なタンパク質リンカーをコードし、第２のポリヌクレオチドはドメインのＮ末端フラグメントをコードしている。一実施形態では、発現されると、ドメインのＮ末端フラグメントの最初のアミノ酸がＣ末端フラグメントの最後のアミノ酸と一次配列で連結されるように、各ポリヌクレオチドは直列に融合される。別の実施形態では、発現されると、ドメインのＮ末端フラグメントの最初のアミノ酸がリンカーの最後のアミノ酸と一次配列で連結され、リンカーの最初のアミノ酸がＣ末端フラグメントの最後のアミノ酸と一次配列で連結されるように、ＴｆＲアピカルドメイン遺伝子は任意選択的なリンカーを含む。別の実施形態では、発現されると、発現されたタンパク質が環状構造の形となるように、遺伝子は、直列な配列の第１のポリヌクレオチド、任意選択的なリンカーポリヌクレオチド、及び第２のポリヌクレオチドを含む。本方法は、発現されたタンパク質を精製して単離された組換えＴｆＲアピカルドメインコンストラクトを得ることを更に含む。
【０２８０】
１つの例では、タンパク質が発現されると、完全長ＴｆＲタンパク質及びその二量体化した形態にみられるようなドメインの保存されたおよその３次元構造及びフォールディングを示すように、ＴｆＲコンストラクト内の第２のポリペプチドのＮ末端フラグメントの最初のアミノ酸と、ＴｆＲコンストラクト内の第１のポリペプチドのＣ末端フラグメントの最後のアミノ酸とが、ＴｆＲのアピカルドメイン内、またはその近くに選択される。１つの例では、各アミノ酸は、３次元空間における互いに対するそれらの近接度に基づいて選択されるが、かかる近接度は、完全長トランスフェリン受容体の既知の結晶構造から（例えば、ＰＤＢコード１ＳＵＶ（分解能７．５Å）；Ｃｈｅｎｇ，Ｙ．，ｅｔ　ａｌ，Ｃｅｌｌ　１１６：５６５－５７６（２００４）または、２．４Åのより高い分解能では、ＰＤＭコード３ＫＡＳ；Ａｂｒａｈａｍ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１７：４３８－４４４（２０１０）、これらの文献をいずれもそれらの全容をあらゆる目的で参照により本明細書に援用する）、または、受容体のコンピュータモデルから、または、当業者には周知には周知の方法によって得ることができる。
【０２８１】
別の実施形態では、各アミノ酸は、アピカルドメインと受容体タンパク質の残りの部分との間の逆平行のβ鎖から選択される。別の例では、アミノ酸は、β鎖同士をつなぐ２個のポリペプチド領域、すなわちループから選択される。別の例では、アミノ酸は、β鎖同士をつなぐ２個のポリペプチド領域から選択され、ポリペプチド領域は、配列ＶＳＮを含むＣ末端領域と、配列ＫＤＳＡＱＮＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７１）を含むＮ末端領域とを含む。１つの例では、ＴｆＲコンストラクト内の第２のポリペプチドのＮ末端領域について選択されるアミノ酸は、Ｄ（配列ＤＳＡＱＮ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７２）のもの）であり、このアミノ酸がＴｆＲコンストラクト内の第１のポリペプチドのＣ末端領域の最後のアミノ酸であるＮ（配列ＬＴＶＳＮ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７３）のもの）と連結される。別の実施形態では、アミノ酸は、実施例２で更に述べられるようにして選択することで、それぞれ、ヒト及びカニクイザルのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０９及び１１０のアピカルドメインタンパク質を与える。
【０２８２】
したがって、別の実施形態では、組換えＴｆＲアピカルドメインコンストラクトを作製、精製、及び単離する方法は、（ｉ）Ｎ末端フラグメント及びＣ末端フラグメント、ならびに並べ替えするためのＴｆＲのアピカルドメイン内またはその近くのそれらの各アミノ酸を特定することと、（ｉｉ）Ｎ末端及びＣ末端フラグメント、ならびに各アミノ酸をコ

ードするポリヌクレオチドを含む遺伝子発現ベクターを設計することであって、発現されると、ドメインのＮ末端フラグメントの最初のアミノ酸がＣ末端フラグメントの最後のアミノ酸と一次配列で融合されるように、ポリヌクレオチド同士が融合されている、前記設計することと、（ｉｉｉ）アピカルドメインコンストラクトを発現させることと、を更に含む。

【０２８３】

他の実施形態では、本明細書に記載されるＴｆＲコンストラクトは、結合分子とＴｆＲアピカルドメインとの間の相互作用の、例えばＸ線結晶解析及び核磁気共鳴分光法を用いた詳細な研究を可能とする（完全長ＴｆＲ複合体が比較的大きな分子量を有するのに対してＴｆＲアピカルドメインコンストラクトはこれらの研究に充分な比較的低い分子量を有するために本明細書に記載されるコンストラクトでは可能となる）。

【０２８４】

リンカー

ＴｆＲコンストラクト内の２個のポリペプチド間のリンカーは、１～１０個のアミノ酸（例えば、１～８個、１～６個、１～４個、または１個もしくは２個のアミノ酸、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のアミノ酸）を含むことができる。適当なリンカーとしては、例えば、グリシン及びセリンのような柔軟なアミノ酸残基を含むリンカーが挙げられる。リンカーの例としては、これらに限定されるものではないが、G, GG, GGG,

GGGG (SEQ ID NO:453), GS, GGS, GSGS (SEQ ID NO:454), SGGG (SEQ ID NO:455),

GSGG (SEQ ID NO:456), GGSG (SEQ ID NO:457), 及び GGGS (SEQ ID NO:458)

が挙げられる。

【０２８５】

他の実施形態では、ＴｆＲコンストラクト内の２個のポリペプチド間のリンカーは、タンパク質ループドメインであってよく、タンパク質ループドメインのＮ末端とＣ末端との間の距離は５Å未満である（例えば、４Å、３Å、２Å、または１Å未満の距離）。いくつかの実施形態では、タンパク質ループドメインは球状タンパク質であってよい。いくつかの実施形態では、タンパク質ループドメインは８００個以下のアミノ酸を有することができる（例えば、８００個、７８０個、７６０個、７４０個、７２０個、７００個、６８０個、６６０個、６４０個、６２０個、６００個、５８０個、５６０個、５４０個、５２０個、５００個、４８０個、４６０個、４４０個、４２０個、４００個、３８０個、３６０個、３４０個、３２０個、３００個、２８０個、２６０個、２４０個、２２０個、２００個、１８０個、１６０個、１４０個、１２０個、または１００個のアミノ酸）。いくつかの実施形態では、タンパク質ループドメインは、８００個以下のアミノ酸（例えば、８００個、７８０個、７６０個、７４０個、７２０個、７００個、６８０個、６６０個、６４０個、６２０個、６００個、５８０個、５６０個、５４０個、５２０個、５００個、４８０個、４６０個、４４０個、４２０個、４００個、３８０個、３６０個、３４０個、３２０個、３００個、２８０個、２６０個、２４０個、２２０個、２００個、１８０個、１６０個、１４０個、１２０個、または１００個のアミノ酸）を有する球状タンパク質であってよい。タンパク質ループドメインは、５Å未満（例えば、４Å、３Å、２Å、または１Å未満の距離）の構造のＮ末端及びＣ末端を有する二次構造または三次構造を有することができる。いくつかの実施形態では、第１のポリペプチドのＣ末端がタンパク質ループドメインのＮ末端に融合され、第２のポリペプチドのＮ末端がタンパク質ループドメインのＣ末端に融合されるようにしてＴｆＲコンストラクトの第１のポリペプチドと第２のポリペプチドとの間にタンパク質ループドメインが挿入される場合、タンパク質ループドメインのＮ末端とＣ末端とが近接していることによって第１のポリペプチドと第２のポリペプチドとが互いに接近し、これにより、第１のポリペプチドのアミノ酸が第２のポリペプチドのアミノ酸と例えば水素結合を介して相互作用することができ、ＴｆＲコンストラク

トが例えばβシートのような二次構造を形成することができる。
【０２８６】
シグナルペプチド
ＴｆＲコンストラクトは、例えば、細胞（例えば、哺乳動物細胞などの真核細胞）内で発現される場合にコンストラクトの分泌を生じさせるシグナルペプチドなどのシグナルペプチドを更に含むことができる。当該技術分野では周知のいずれのシグナルペプチド（例えば、
MGWSCIILFLVATATGAYAG (SEQ ID NO:474)

）も本明細書に記載されるＴｆＲコンストラクトと組み合わせて使用することができる。シグナルペプチドは、適宜、コンストラクトのＮ末端またはＣ末端に結合させることができる。
【０２８７】
精製ペプチド
ＴｆＲコンストラクトは、例えば全細胞ライセート混合物からのＴｆＲコンストラクトの精製及び単離を促進する１つ以上の精製ペプチドを含んでもよい。いくつかの実施形態では、精製ペプチドは、精製ペプチドに対して特異的親和性を有する別の部分と結合する。いくつかの実施形態では、精製ペプチドに特異的に結合するかかる部分は、マトリクス、樹脂、またはアガロースビーズなどの固体支持体に結合される。ＴｆＲコンストラクトと融合することができる精製ペプチドの例としては、これらに限定されるものではないが、ヒスチジンペプチド、Ａｖｉタグ、ＦＬＡＧペプチド、ｍｙｃペプチド、及びヘマグルチニン（ＨＡ）ペプチドが挙げられる。ヒスチジンペプチド（ＨＨＨＨＨＨ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５９）またはＨＨＨＨＨＨＨＨＨＨ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６０））は、マイクロモル濃度の親和性でニッケル官能化アガロース親和性カラムに結合する。Ａｖｉタグ（ＧＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６１））は、酵素ＢｉｒＡによりビオチン化することができる。次いでビオチン化したＡｖｉタグはストレプトアビジンに結合し、精製を行うことができる。いくつかの実施形態では、ＦＬＡＧペプチドは、配列ＤＹＫＤＤＤＤＫ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６２）を有する。いくつかの実施形態では、ｍｙｃペプチドは、配列ＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６３）を有する。いくつかの実施形態では、ＨＡペプチドは、配列ＹＰＹＤＶＰＤＹＡ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６４）を有する。
【０２８８】
切断ペプチド
切断ペプチドとは、特定のプロテアーゼにより認識されて切断され得るアミノ酸配列のことを指す。例えば、切断ペプチドを精製ペプチドとＴｆＲコンストラクトの残りの部分との間に配置することにより、ＴｆＲコンストラクトが発現及び精製された後、切断ペプチドを切断して精製ペプチドを除去することができる。プロテアーゼが切断ペプチドに近接すると、プロテアーゼは切断ペプチドを認識して切断（すなわちペプチド主鎖の加水分解により）する。プロテアーゼ及び切断ペプチドのペアの例としては、これらに限定されるものではないが、ユビキチン様特異的プロテアーゼ１（Ｕｌｐ１）及びその切断配列であるＳｍｔ３
(MSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFAKRQG
KEMDSLRFLYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGS (SEQ ID NO:465)

、タバコエッチウイルス核封入体Ａ（ＴＥＶ）プロテアーゼ及びその切断配列であるＥＮＬＹＦＱＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６６）、ならびにＣ型肝炎ウイルスの非構造タンパク質３プロテアーゼドメイン（ＮＳ３　ＨＣＶ）及びその切断配列であるＤＥＭＥＥＣＳＱ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６７）が挙げられる。
【０２８９】

Ｘ．核酸、ベクター、及び宿主細胞

本明細書に記載される改変ＢＢＢ受容体結合ポリペプチド及びＴｆＲコンストラクトは、通常は組換え法を用いて調製される。したがって、いくつかの態様において、本発明は、本明細書に記載される改変Ｆｃポリペプチドまたはは、本明細書に記載される改変ＴｆＲコンストラクトのいずれかを含むポリペプチドのいずれかをコードする核酸配列を含む単離核酸、及び該ポリペプチドをコードする核酸を複製し、及び／または該ポリペプチドまたはＴｆＲコンストラクトを発現させるために使用される核酸が導入された宿主細胞を提供するものである。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、真核細胞、例えばヒト細胞である。

【０２９０】

別の態様では、本明細書に記載されるポリペプチドまたはＴｆＲコンストラクトをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが提供される。ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であってよい。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはＤＮＡである。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドはｃＤＮＡである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはＲＮＡである。

【０２９１】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは核酸コンストラクト内に含まれる。いくつかの実施形態では、コンストラクトは複製可能なベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミド、ウイルスベクター、ファージミド、酵母染色体ベクター、及び非エピソーム性の哺乳動物ベクターから選択される。

【０２９２】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、発現コンストラクト内の１つ以上の調節ヌクレオチド配列と機能的に連結される。一連の実施形態では、核酸発現コンストラクトは、表面発現ライブラリーとしての使用に適合される。いくつかの実施形態では、ライブラリーは、酵母での表面発現に適合される。いくつかの実施形態では、ライブラリーは、ファージでの表面発現に適合される。別の一連の実施形態では、核酸発現コンストラクトは、ミリグラムまたはグラム量でのポリペプチドまたはＴｆＲコンストラクトの単離を可能とする系でのポリペプチドまたはＴｆＲコンストラクトの発現に適合される。いくつかの実施形態では、系は哺乳動物細胞発現系である。いくつかの実施形態では、系は酵母細胞発現系である。

【０２９３】

組換えポリペプチドを製造するための発現ビヒクルとしては、プラスミド及び他のベクターが挙げられる。例えば、適当なベクターとしては以下の種類のプラスミド、すなわち、ｐＢＲ３２２由来プラスミド、ｐＥＭＢＬ由来プラスミド、ｐＥＸ由来プラスミド、ｐＢＴａｃ由来プラスミド、及び、大腸菌などの原核生物で発現させるためのｐＵＣ由来プラスミドが挙げられる。ｐｃＤＮＡＩ／ａｍｐ、ｐｃＤＮＡＩ／ｎｅｏ、ｐＲｃ／ＣＭＶ、ｐＳＶ２ｇｐｔ、ｐＳＶ２ｎｅｏ、ｐＳＶ２－ｄｈｆｒ、ｐＴｋ２、ｐＲＳＶｎｅｏ、ｐＭＳＧ、ｐＳＶＴ７、ｐｋｏ－ｎｅｏ、及びｐＨｙｇ由来ベクターは、真核生物のトランスフェクションに適した哺乳動物用発現ベクターの例である。あるいは、ウシパピローマウイルス（ＢＰＶ－１）などのウイルスの誘導体、またはエプスタイン・バール・ウイルス（ｐＨＥＢｏ、ｐＲＥＰ由来、及びｐ２０５）を真核生物におけるポリペプチドの一過性発現に使用することもできる。いくつかの実施形態では、バキュロウイルス発現系の使用により組換えポリペプチドを発現させることが望ましい場合もある。そのようなバキュロウイルス発現系としては、ｐＶＬ由来ベクター（ｐＶＬ１３９２、ｐＶＬ１３９３、及びｐＶＬ９４１など）、ｐＡｃＵＷ由来ベクター（ｐＡｃＵＷ１など）、及びｐＢｌｕｅＢａｃ由来ベクターが挙げられる。更なる発現系としては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、及び他のウイルス発現系が挙げられる。

【０２９４】

ベクターは、任意の適当な宿主細胞に形質転換することができる。いくつかの実施形態では、例えば細菌または酵母細胞のような宿主細胞を表面発現ライブラリーとしての使用に適合させることができる。一部の細胞では、ベクターは宿主細胞内で発現されて比較的

大量のポリペプチドまたはＴｆＲコンストラクトを発現する。そのような宿主細胞としては、哺乳動物細胞、酵母細胞、昆虫細胞、及び原核細胞が挙げられる。いくつかの実施形態では、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ベビーハムスター腎（ＢＨＫ）細胞、ＮＳ０細胞、Ｙ０細胞、ＨＥＫ２９３細胞、ＣＯＳ細胞、Ｖｅｒｏ細胞、またはＨｅｌａ細胞などの哺乳動物細胞である。

【０２９５】

トランスフェリン受容体結合ポリペプチドまたはＴｆＲコンストラクトをコードした発現ベクターをトランスフェクトした宿主細胞を、ポリペプチドまたはＴｆＲコンストラクトの発現を生じさせるような適当な条件下で培養することができる。ポリペプチドまたはＴｆＲコンストラクトは、細胞の混合物及びポリペプチドまたはＴｆＲコンストラクトを含有する培地から分泌させ、単離することができる。あるいは、ポリペプチドまたはＴｆＲコンストラクトを細胞質中、または膜画分中に保持し、細胞を回収、溶解して、所望の方法によってポリペプチドまたはＴｆＲコンストラクトを単離してもよい。

【０２９６】

ＸＩ．治療方法

本発明に基づくＢＢＢ受容体結合ポリペプチドは、多くの適応症で治療的に使用することができる。いくつかの実施形態では、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドは、ＢＢＢ受容体を発現する標的細胞型に治療剤を送達するために使用される。典型的な実施形態では、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドは、治療成分を、脳によって取り込まれるように例えば血液脳関門のような内皮を通過して輸送するために使用することができる。

【０２９７】

いくつかの実施形態では、本発明のＢＢＢ受容体結合ポリペプチドは、例えば、治療剤と結合させて治療剤を送達することで治療剤を脳または中枢神経系（ＣＮＳ）の疾患のような神経疾患を治療するために使用することができる。例示的な疾患としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、血管性認知症、レビー小体型認知症、ピック病、原発性年齢関連タウオパチー、または進行性核上性麻痺が挙げられる。いくつかの実施形態では、疾患は、タウオパチー、プリオン病（例えば、ウシ海綿状脳症、スクレイピー、クロイツフェルトヤコブ病、クールー病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、慢性消耗病、及び致死性家族性不眠症など）、球麻痺、運動ニューロン病、または神経系ヘテロ変性疾患（カナバン病、ハンチントン病、神経セロイドリポフスチノーシス、アレキサンダー病、トゥレット症候群、メンケス縮れ毛症候群、コケイン症候群、ハレルフォルデン・スパッツ症候群、ラフォラ疾患、レット症候群、肝レンズ核変性症、レッシュナイハン症候群、フリードライヒ運動失調症、脊髄性筋萎縮症、及びウンフェルリヒト・ルントボルク症候群など）であり得る。特定の実施形態では、疾患はＣＮＳの原発がんである。いくつかの実施形態では、疾患は脳に転移した転移性がんである。いくつかの実施形態では、疾患は脳卒中または多発性硬化症である。いくつかの実施形態では、患者は無症状の場合もあるが、脳またはＣＮＳの疾患に関連したマーカーを有する。いくつかの実施形態では、神経疾患を治療するための薬剤の製造における本発明のＢＢＢ受容体結合ポリペプチドの使用が提供される。

【０２９８】

いくつかの実施形態では、本方法は、対象に１つ以上の更なる治療剤を投与することを更に含む。例えば、脳または中枢神経系の疾患を治療するためのいくつかの実施形態では、本方法は、対象に神経保護剤、例えば、抗コリン作動薬、ドーパミン作動薬、グルタミン酸作動薬、ヒストン脱アセチル化酵素（ＨＤＡＣ）阻害薬、カンナビノイド、カスパーゼ阻害剤、メラトニン、抗炎症剤、ホルモン（例えば、エストロゲンまたはプロゲステロン）、またはビタミンを投与することを含むことができる。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に神経疾患の認知または行動症状の治療に使用するための薬剤（例えば、抗うつ剤、ドーパミンアゴニスト、または抗精神病薬）を投与することを含む。

【０２９９】

本発明のＢＢＢ受容体結合ポリペプチドは、治療有効量または用量で対象に投与される

。例示的な用量としては、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約５００ｍｇ／ｋｇ、または約０．１ｍｇ／ｋｇ～約２００ｍｇ／ｋｇ、または約１ｍｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇ～約５０ｍｇ／ｋｇの日用量の範囲を用いることができる。しかしながら、用量は、選択される投与経路、組成物の配合、患者の応答、状態の重症度、対象の体重、及び処方する医師の判断をはじめとするいくつかの因子によって異なり得る。用量は、個々の患者の必要に応じて時間と共に増量または減量させることができる。いくつかの実施形態では、患者に初期に低用量を投与し、その後、患者にとって耐容できる有効用量に増量する。有効量の決定は充分に当業者の能力の範囲内である。

【０３００】

異なる実施形態において、本発明のＢＢＢ受容体結合ポリペプチドは非経口投与される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは静脈内投与される。静脈内投与は、注入により、例えば約１０～３０分間にわたって、または少なくとも１時間、２時間、もしくは３時間にわたって行うことができる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、静脈内ボーラスとして投与される。注入とボーラス投与との組み合わせを用いることもできる。

【０３０１】

いくつかの非経口の実施形態では、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドは、腹腔内、皮下、皮内、または筋肉内投与される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは皮内または筋肉内投与される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、例えば硬膜外投与などにより髄腔内に投与されるか、または脳室内に投与される。

【０３０２】

他の実施形態では、トランスフェリン受容体結合ポリペプチドは、経口投与、肺内投与、鼻腔内投与、眼内投与、または局所投与することができる。肺内投与は、例えば、吸入器またはネブライザーを使用して、エアゾール化剤と配合して用いることもできる。

【０３０３】

ＶＩＩＩ．医薬組成物及びキット

別の態様では、本発明に基づくＢＢＢ受容体結合ポリペプチドを含む医薬組成物及びキットが提供される。

【０３０４】

医薬組成物

本発明で使用するための製剤を調製するためのガイダンスは、当業者には周知の医薬品及び製剤用の任意の数のハンドブックにみることができる。

【０３０５】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載されるトランスフェリン受容体結合ポリペプチドを含み、更に、１種類以上の薬学的に許容される担体及び／または賦形剤を含む。薬学的に許容される担体には、生理学的適合性を有し、好ましくは活性剤の活性を妨げない、または他の形で阻害しないあらゆる溶媒、分散媒、またはコーティングが含まれる。様々な薬学的に許容される賦形剤が周知である。

【０３０６】

いくつかの実施形態では、担体は、静脈内、髄腔内、脳室内、筋肉内、経口、腹腔内、経皮、局所、または皮下投与に適したものである。薬学的に許容される担体は、例えば組成物を安定させるかまたはポリペプチドの吸収を増大もしくは減少させる作用を有する１つ以上の生理学的に許容される化合物を含むことができる。生理学的に許容される化合物としては、例えば、グルコース、スクロース、またはデキストランなどの炭水化物、アスコルビン酸またはグルタチオンなどの酸化防止剤、キレート剤、低分子量タンパク質、活性剤のクリアランスもしくは加水分解を低減する組成物、または賦形剤もしくは他の安定化剤及び／またはバッファーを挙げることができる。他の薬学的に許容される担体及びそれらの製剤も当該技術分野で利用可能である。

【０３０７】

本明細書に記載される医薬組成物は、例えば、従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠製造、乳化、カプセル化、封入、または凍結乾燥プロセスにより、当業者には周知の方法で製造

することができる。以下の方法及び賦形剤はあくまで例示的なものであり、いかなる意味でも限定的なものではない。

【０３０８】

経口投与を行うには、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドは、当該技術分野では周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって製剤化することができる。かかる担体は、化合物を、治療される患者によって経口摂取される、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、エマルション、親油性及び親水性懸濁液、液剤、ゲル、シロップ剤、スラリー剤、及び懸濁液などとして製剤化することを可能とする。経口用の医薬製剤は、ポリペプチドを、固体賦形剤と混合し、得られた混合物を場合に応じて粉砕し、必要に応じて適当な助剤を加えた後、顆粒の混合物を処理して錠剤または糖衣コアを得ることによって得ることができる。適当な賦形剤としては、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトールを含む糖類などの充填剤；例えばトウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、及び／またはポリビニルピロリドンなどのセルロース調製物が挙げられる。必要に応じて、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸、もしくはアルギン酸ナトリウムなどのその塩などの崩壊剤を加えることができる。

【０３０９】

上記に開示したように、本明細書に記載されるＢＢＢ受容体結合ポリペプチドは、注射により、例えばボーラス注射または連続注入により非経口投与されるように製剤化することができる。注射用には、ポリペプチドを植物油または他の同様の油類、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸またはプロピレングリコールのエステルなどの水性または非水性溶媒中に、必要に応じて、可溶化剤、等張化剤、懸濁化剤、乳化剤、安定化剤、及び防腐剤などの従来の添加剤と共に、溶解、懸濁、または乳化することによってポリペプチドを製剤として配合することができる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、水溶液、好ましくはハンクス液、リンゲル液、または生理学的食塩水バッファーのような生理学的適合性を有するバッファー中に配合することができる。注射用の製剤は、単位剤形、例えば、防腐剤が添加されたアンプル中、または複数用量容器中で与えることができる。組成物は、油性または水性溶媒中の懸濁液、溶液、またはエマルションの形態などを取ることができ、懸濁化剤、安定化剤、及び／または分散剤などの配合剤を含むことができる。

【０３１０】

いくつかの実施形態では、ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドは、例えば、活性剤を含んだ固体疎水性ポリマーの半透性マトリクス中で、持続放出、制御放出、長期放出、タイミングを計った放出、または遅延放出製剤として送達用に調製される。持続放出材料の様々な種類が確立されており、当業者に周知である。長期放出製剤としては、フィルムコーティングされた錠剤、多粒子またはペレットシステム、親水性または親油性材料を用いたマトリクス技術、及び細孔形成賦形剤を含んだワックスベースの錠剤が挙げられる。持続放出送達システムは、それらの設計に応じて、時間単位または日単位で、例えば、４、６、８、１０、１２、１６、２０、２４時間またはそれ以上の時間にわたって化合物を放出することができる。通常、持続放出製剤は、天然に存在する、または合成ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドンのようなポリマー性ビニルピロリドン；カルボキシビニル親水性ポリマー；メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、及びヒドロキシプロピルメチルセルロースのような疎水性及び／または親水性ヒドロコロイド；ならびにカルボキシポリメチレンを使用して調製することができる。

【０３１１】

一般的に、インビボ投与に使用される医薬組成物は無菌である。滅菌処理は、例えば、熱滅菌、蒸気滅菌、滅菌濾過、または放射線照射などの当該技術分野では周知の方法によって行うことができる。

【０３１２】

本発明の医薬組成物の用量及び所望の薬剤濃度は、想定される特定の用途に応じて異な

り得る。適当な用量及び投与経路の決定は、充分に当業者の技能の範囲内にある。適当な用量については、上記のセクションＶＩＩでも述べられている。

【０３１３】

キット

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるＢＢＢ受容体結合ポリペプチドを含むキットが提供される。いくつかの実施形態では、キットは、脳または中枢神経系（ＣＮＳ）の疾患などの神経疾患の予防または治療に使用される。

【０３１４】

いくつかの実施形態では、キットは、１つ以上の更なる治療剤を更に含む。例えば、いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載されるＢＢＢ受容体結合ポリペプチドを含み、更に、神経疾患の治療に使用するための１つ以上の更なる治療剤を含む。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載される方法を実施するための説明（すなわち、プロトコール）を含む使用説明書を更に含む（例えば、血液脳関門を通過して組成物を投与するためにキットを使用するための指示）。使用説明書は通常は文書または印刷物を含むが、これらに限定されない。かかる使用説明書を格納し、これをエンドユーザーに伝達することが可能な任意の媒体が本明細書では考慮される。かかる媒体としては、これらに限定されるものではないが、電子的記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、及び光学媒体（例えばＣＤ－ＲＯＭ）などが挙げられる。かかる媒体は、そのような使用説明書を提供するインターネットサイトのアドレスを含んでもよい。

【実施例】

【０３１５】

ＸＩＩＩ．実施例

本発明を、特定の実施例によってより詳細に説明する。以下の実施例はあくまで例示の目的で示されるものにすぎず、本発明をいかなる形でも限定しようとするものではない。当業者には、実質的に同じ結果を生じるように変更または改変することができる様々な重要でないパラメータが容易に認識されよう。用いられる数値（例えば、量、温度など）に関して精度を確実とするべく努力に努めてはいるが、ある程度の実験的誤差及び偏差は存在し得る。本発明の実施では、特に断らない限りは、当該技術分野の技術の範囲内で、タンパク質化学、生化学、組換えＤＮＡ技術、及び薬理学の従来の方法を用いている。かかる技術は文献に充分な説明がなされている。更に、当業者には、特定のライブラリーに適用される操作の方法は、本明細書に記載される他のライブラリーにも適用できることが明らかなはずである。

【０３１６】

ＢＢＢ受容体結合ポリペプチドの作製を、ＴｆＲを例として用いて説明する。本明細書で説明する方法は、代替的なＢＢＢ受容体を標的として用いて実施することもできる。

【０３１７】

実施例１　ＴｆＲ標的の作製

トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）細胞外ドメイン（ＥＣＤ）をコードするＤＮＡ（ヒト（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３５）またはカニクイザル（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３００）ＴｆＲの残基１２１～７６０）を、Ｃ末端の切断可能なＨｉｓ及びＡｖｉタグを有する哺乳動物発現ベクターにクローニングした。このプラスミドをＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトし、発現させた。細胞外ドメインをＮｉ－ＮＴＡクロマトグラフィーを用いて回収した上清から精製した後、サイズ排除クロマトグラフィーにより凝集タンパク質を除去した。収率は培養物１Ｌ当たり約５ｍｇであった。タンパク質を１０ｍＭ　K_3PO_4（ｐＨ６．７）、１００ｍＭ　ＫＣｌ、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、及び２０％グリセロール中で保存し、－２０℃で凍結した。

【０３１８】

並べ替えた（ｐｅｒｍｕｔａｔｅｄ）ＴｆＲアピカルドメインをコードするＤＮＡ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０１）（ヒトまたはカニクイザルＴｆＲの残基３２６～３７９及び１９４～２９６）を、精製を行うためのＮ末端のＨｉｓタグ及びインビボでのビオチン化の

ためのＡｖｉタグを有するｐＥＴ２８ベクターにクローニングした。このプラスミドを、ＢｉｒＡ発現ベクターと共にＢＬ２１（ＤＥ３）細胞に同時形質転換した。細胞を対数期までＬＢ培地中、３７℃で増殖させた後、１ｍＭイソプロピル１－チオ－β－Ｄ－ガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）で誘導してから、１８℃で一晩培養した。細胞を溶解し、可溶性画分をＮｉ－ＮＴＡカラムにかけてアフィニティー精製した後、サイズ排除クロマトグラフィーを行って凝集タンパク質を除去した。収率は培養物１Ｌ当たり約１０ｍｇであった。タンパク質を５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、及び１ｍＭ　ＤＴＴ中で保存し、－２０℃で凍結した。

【０３１９】

精製したＴｆＲのＥＣＤをＥＺ－ｌｉｎｋ　ｓｕｌｆｏ－ＮＨＳ－ＬＣ－Ｂｉｏｔｉｎキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃより入手）を用いてビオチン化した。５倍モル過剰のビオチンを反応に使用した。過剰のビオチンをＰＢＳに対して重点的に透析することによって除去した。

【０３２０】

Ａｖｉタグを有するＴｆＲのＥＣＤ及びアピカルドメインを、ＢｉｒＡ－５００（Ａｖｉｄｉｔｙ，ＬＬＣより販売されるＢｉｒＡビオチン－タンパク質リガーゼ標準反応キット）を使用してビオチン化した。反応後、標識したタンパク質をサイズ排除クロマトグラフィーによって更に精製して過剰のＢｉｒＡ酵素を除去した。最終的な材料を１０ｍＭ　K_3PO_4（ｐＨ６．７）、１００ｍＭ　ＫＣｌ、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、及び２０％グリセロール中で保存し、－２０℃で凍結した。

【０３２１】

実施例２　操作されたトランスフェリン受容体結合ポリペプチドの設計及び特性分析

本実施例は、本明細書のポリペプチドの設計、作製、及び特性分析について述べる。本実施例の目的、及びクローン配列において同じであるアミノ酸同士を比較する目的で、「保存的」変異とは、特定されたクローンのすべてに生じるものとみなされる（保存的アミノ酸置換ではない）のに対し、「半保存的」変異とは、クローンの５０％超において生じるものである。

【０３２２】

特に断らない限り、このセクションにおけるアミノ酸残基の位置は、アミノ末端にヒンジ領域からの３つの残基ＰＣＰを有するヒトＩｇＧ１野生型Ｆｃ領域であるＳＥＱ　ＩＤＮＯ：１に基づいて番号付けされる。

【０３２３】

ポリペプチドＦｃ領域ドメインライブラリーの設計

改変を行うための特定の溶媒露出表面パッチを選択し、選択されたパッチのアミノ酸組成をランダム化によって変化させた表面提示ライブラリーを構築し、次に標準的な発現提示技術を用いて表面に提示された配列変異体を所望の機能性についてスクリーニングすることにより、新たな分子認識手段をポリペプチドＦｃ領域に組み込んだ。本明細書で使用するところの「ランダム化」なる用語には、部分ランダム化及び所定のヌクレオチドまたはアミノ酸混合比での配列変化が含まれる。ランダム化を行うために選択される一般的な表面露出パッチは、約６００～１５００$Å^2$の面積を有し、アミノ酸約７～１５個で構成されるものとした。

【０３２４】

クローンレジスター

以下の各レジスターは、本明細書に記載される方法に従って設計及び作製した。本明細書で使用するところの「レジスター」なる用語は、変化させることが可能な（例えば、レジスター内の列記された位置におけるアミノ酸の置換、挿入、及び／または欠失を生じるペプチドコーディング遺伝子配列への変異の導入により）連続表面を形成する一連の表面露出アミノ酸残基のことを指す。

【０３２５】

ＣＨ２レジスターＡ２ － 組（ｉｉｉ）

ＣＨ２Ａ２レジスター（表１）は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に記載されるヒトＩｇＧ１のＦｃ領域のアミノ酸配列を基準として番号付けした場合にアミノ酸位置４７、４９、５６、５８、５９、６０、６１、６２、及び６３を含むものであった。ＣＨ２Ａ２レジスターは、βシートに沿った表面、隣接した捻れ、及びこれに続くループを形成するように設計した。ＣＨ２Ａ２レジスターは、ＦｃγＲ及びＦｃＲｎ結合部位から効果的に取り除かれる。

【０３２６】

ＣＨ２レジスターＣ － 組（ｉｖ）

ＣＨ２Ｃレジスター（表２）は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に記載されるヒトＩｇＧ１のＦｃ領域のアミノ酸配列を基準として番号付けした場合にアミノ酸位置３９、４０、４１、４２、４３、４４、６８、７０、７１、及び７２を含むものであった。ＣＨ２Ｃレジスターは、ヒンジの近くの一連のループに沿った、ＣＨ２領域のＦｃγＲ結合部位に近接した溶媒露出残基を用いている。

【０３２７】

ＣＨ２レジスターＤ － 組（ｖ）

ＣＨ２Ｄレジスター（表３）は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に記載されるヒトＩｇＧ１のＦｃ領域のアミノ酸配列を基準として番号付けした場合にアミノ酸位置４１、４２、４３、４４、４５、６５、６６、６６、６９、及び７３を含むものであった。ＣＨ２Ｄレジスターは、ＣＨ２Ｃレジスターと似ており、ＣＨ２領域の上部の一連のループに沿った、ＦｃγＲ結合部位に近接した溶媒露出残基を用いている。ＣＨ２ＣとＣＨ２Ｄレジスターは主に、１個のループを共有しており、結合に用いられる第２のループが異なっている。

【０３２８】

ＣＨ２レジスターＥ３ － 組（ｖｉ）

ＣＨ２Ｅ３レジスター（表４）は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に記載されるヒトＩｇＧ１のＦｃ領域のアミノ酸配列を基準として番号付けした場合にアミノ酸位置４５、４７、４９、９５、９７、９９、１０２、１０３、及び１０４を含むものであった。ＣＨ２Ｅ３レジスターの各位置はやはりＦｃγＲ結合部位の近くにあるが、ループ残基の一部に加えてＦｃγＲ結合部位の近くのループに隣接したβシート上の溶媒露出残基も用いている。

【０３２９】

ＣＨ３レジスターＢ － 組（ｉｉ）

このＣＨ３Ｂレジスター（表５）は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に記載されるヒトＩｇＧ１のＦｃ領域のアミノ酸配列を基準として番号付けした場合にアミノ酸位置１１８、１１９、１２０、１２２、２１０、２１１、２１２、及び２１３を含むものであった。ＣＨ３Ｂレジスターは、２個の平行なβシート上の溶媒露出残基、及びＣＨ３領域のＣ末端の近くのいくつかのそれほど構造化されていない残基で大部分が構成されている。ＣＨ３Ｂレジスターは、ＦｃγＲ及びＦｃＲｎ結合部位から離れている。

【０３３０】

ＣＨ３レジスターＣ － 組（ｉ）

ＣＨ３Ｃレジスター（表６）は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に記載されるヒトＩｇＧ１のＦｃ領域のアミノ酸配列を基準として番号付けした場合にアミノ酸位置１５７、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１８６、１８９、及び１９４を含むものであった。ＣＨ３Ｃレジスターの各位置は、いずれもＦｃγＲ及びＦｃＲｎ結合部位から離れている２個のループの溶媒露出残基を含むことにより、連続表面を形成している。

【０３３１】

ファージディスプレイライブラリーの作製

野生型ヒトＦｃ配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）をコードする鋳型ＤＮＡを合成し、ファージミドベクターに組み込んだ。ファージミドベクターは、ｏｍｐＡまたはｐｅｌＢリーダー配列、ｃ－Ｍｙｃ及び６ｘＨｉｓエピトープタグに融合されたＦｃインサート、ならびにアンバー終止コドンに続くＭ１３コートタンパク質ｐＩＩＩを含むものであった。

【０３３２】

ランダム化を行うための対応する位置に「ＮＮＫ」三重コドンを含むプライマーを作製した（ただし、Ｎは任意のＤＮＡ塩基（すなわち、Ａ、Ｃ、ＧまたはＴ）であり、ＫはＧまたはＴである）。あるいは、「ソフト」ランダム化用のプライマーを用い、７０％が野生型塩基に一致し、１０％ずつが他の３つの塩基に一致した塩基のミックスをそれぞれのランダム化位置に使用した。ランダム化の各領域に相当するＦｃ領域のフラグメントのＰＣＲ増幅を行ってから、ＳｆｉＩ制限部位を含んだエンドプライマーを用いてアセンブルした後、ＳｆｉＩで消化してファージミドベクターにライゲートすることにより、ライブラリーを作製した。あるいは、Ｋｕｎｋｅｌ法による突然変異誘発を行うためのプライマーを使用した。Ｋｕｎｋｅｌ突然変異誘発を行う方法は、当業者には周知であろう。Ｋｕｎｋｅｌ産物のライゲート産物をＴＧ１株のエレクトロコンピテントな大腸菌細胞（Ｌｕｃｉｇｅｎ（登録商標）より入手したもの）に形質転換した。回復後の大腸菌細胞にＭ１３Ｋ０７ヘルパーファージを感染させ、一晩増殖させた後、ライブラリーファージを５％ＰＥＧ／ＮａＣｌで沈殿させ、１５％グリセロールを含むＰＢＳ溶液に再懸濁し、使用時まで凍結した。一般的なライブラリーサイズは、形質転換体約10^9～約10^{11}個の範囲であった。ｐＩＩＩ融合ＦｃとｐＩＩＩに結合されていない可溶性Ｆｃとの対合によってファージ上にＦｃ二量体を提示させた（後者はｐＩＩＩの手前のアンバー終止コドンのために生成される）。

【０３３３】

酵母ディスプレイライブラリーの作製

野生型ヒトＦｃ配列をコードする鋳型ＤＮＡを合成し、酵母ディスプレイベクターに組み込んだ。ＣＨ２及びＣＨ３ライブラリーについて、ＦｃポリペプチドをＡｇａ２ｐ細胞壁タンパク質上に提示させた。いずれのベクターも、Ｋｅｘ２切断配列を有するプレプロリーダーペプチド、及びＦｃの末端に融合されたｃ－Ｍｙｃエピトープタグを含んでいた。

【０３３４】

フラグメントの増幅をそのベクターについて相同末端を有するプライマーを用いて行った点以外は、ファージライブラリーについて述べたのと同様の方法を用いて酵母ディスプレイライブラリーをアセンブルした。新たに調製したエレクトロコンピテントな酵母（すなわちＥＢＹ１００株）に直線化したベクター及びアセンブルしたライブラリーインサートを電気穿孔法により導入した。電気穿孔法は当業者には周知のものであろう。選択的ＳＤ－ＣＡＡ培地中での回復後、酵母をコンフルエンスにまで増殖させ、２回分割した後、ＳＧ－ＣＡＡ培地に移すことによってタンパク質発現を誘導した。一般的なライブラリーサイズは、形質転換体約10^7～約10^9個の範囲であった。Ｆｃの二量体が、隣接して提示されたＦｃ単量体の対合によって形成された。

【０３３５】

ファージ選択の一般的方法

ファージ法は、Ｐｈａｇｅ Ｄｉｓｐｌａｙ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｂａｒｂａｓ，２００１）より採用した。更なるプロトコールの詳細は、この参照文献より入手することができる。

【０３３６】

プレート分取法

ヒトＴｆＲ標的をＭａｘｉＳｏｒｐ（登録商標）マイクロタイタープレート（通常、１～１０μｇ／ｍＬのＰＢＳ溶液を２００μＬ）に４℃で一晩コーティングした。特に断らない限り、すべての結合は室温で行った。ファージライブラリーを各ウェルに加え、一晩インキュベートして結合を行った。マイクロタイターウェルを０．０５％のＴｗｅｅｎ（登録商標）２０（ＰＢＳＴ）を含むＰＢＳでよく洗い、各ウェルを酸（通常、５００ｍＭ ＫＣｌ、または１００ｍＭ グリシン、ｐＨ２．７を含む５０ｍＭ ＨＣｌ）と３０分間インキュベートとすることにより結合したファージを溶出した。溶出されたファージを１Ｍ Ｔｒｉｓ（ｐＨ８）で中和し、ＴＧ１細胞及びＭ１３／ＫＯ７ヘルパーファージを用いて増幅し、５０μｇ／ｍＬのカルベニシリン及び５０μｇ／ｍＬのカナマイシンを含んだ２ＹＴ培地中、３７℃で一晩増殖させた。標的の入ったウェルから溶出されたファージの力

価を、標的の入っていないウェルから回収されたファージの力価と比較して濃縮度を評価した。次に結合の際のインキュベーション時間を短縮し、洗浄時間及び洗浄の回数を増やすことによって選択のストリンジェンシーを高めた。

【０３３７】

ビーズ分取法

ヒトＴｆＲの標的を、ＮＨＳ－ＰＥＧ４－ビオチン（Ｐｉｅｒｃｅ（商標）より入手したもの）を用いて遊離アミンを介してビオチン化した。ビオチン化反応には、３～５倍モル過剰のビオチン試薬をＰＢＳ中で用いた。反応をＴｒｉｓで停止した後、ＰＢＳ中に重点的に透析した。ビオチン化された標的をストレプトアビジンでコーティングした磁気ビーズ（すなわち、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒより入手したＭ２８０ストレプトアビジンビーズ）上に固定した。ファージディスプレイライブラリーを、標的をコーティングしたビーズと室温で１時間インキュベートした。この後、結合しなかったファージを除去し、ビーズをＰＢＳＴで洗浄した。結合したファージを、５００ｍＭ　ＫＣｌ（または０．１Ｍグリシン、ｐＨ２．７）を含む５０ｍＭ　ＨＣｌと３０分間インキュベートすることにより溶出した後、プレート分取について上記に述べたように中和して、増殖させた。

【０３３８】

３～５ラウンドのパニングを行った後、ファージ上で、または大腸菌のペリプラズム中に可溶性のＦｃを発現させることにより単一のクローンをスクリーニングした。かかる発現法は、当業者には周知のものであろう。個々のファージ上清またはペリプラズム抽出物を、標的または陰性対照をコーティングし、ブロッキングしたＥＬＩＳＡプレートに曝露した後、ペリプラズム抽出物についてはＨＲＰ結合ヤギ抗Ｆｃ（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈより入手したもの）を用いて、またはファージについては抗Ｍ１３（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて検出し、次いでＴＭＢ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒより入手したもの）で発色させた。ＯＤ４５０値がバックグラウンドの約５倍よりも大きいウェルを陽性クローンとみなしてシークエンシングし、その後、一部のクローンを可溶性Ｆｃフラグメントとして発現させるか、またはＦａｂフラグメントと融合させた。

【０３３９】

酵母選択の一般的方法

ビーズ分取（磁気細胞分離（ＭＡＣＳ））法

Ａｃｋｅｒｍａｎ，ｅｔ　ａｌ．２００９　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｐｒｏｇ．２５（３），７７４に記載されるのと同様にしてＭＡＣＳ及びＦＡＣＳ選択を行った。ストレプトアビジン磁気ビーズ（例えば、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒより販売されるＭ－２８０ストレプトアビジンビーズ）を、ビオチン化標的で標識し、酵母とインキュベートした（通常５～１０ｘのライブラリー多様性）。結合しなかった酵母を除去し、ビーズを洗浄し、結合した酵母を選択培地中で増殖させ、後の選択のラウンド用に誘導した。

【０３４０】

蛍光活性化細胞分取（ＦＡＣＳ）法

酵母を抗ｃ－Ｍｙｃ抗体で標識して発現及びビオチン化標的（分取ラウンドに応じて濃度が変化する）を監視した。一部の実験では、標的をストレプトアビジン－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７と予め混合して相互作用のアビディティーを高めた。他の実験では、結合後のビオチン化標的を検出し、ストレプトアビジン－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７で洗浄した。結合を有するシングレットの酵母をＦＡＣＳ　Ａｒｉａ　ＩＩＩ細胞分取装置を使用して分取した。分取した酵母を選択培地中で増殖させた後、後の選択ラウンド用に誘導した。

【０３４１】

濃縮された酵母集団が得られた後、酵母をＳＤ－ＣＡＡアガープレートに播種し、シングルコロニーを増殖させ、発現を誘導した後、上記に述べたようにして標識して標的に結合する傾向を決定した。次いで、陽性のシングルクローンを標的の結合についてシークエンシングした後、一部のクローンを可溶性のＦｃフラグメントとして発現させるか、また

はＦａｂフラグメントと融合させた。
【０３４２】
スクリーニングの一般的方法
　ＥＬＩＳＡによるスクリーニング
　クローンをパニングの結果産物から選択し、９６ウェルディープウェルプレートの個々のウェル中で増殖させた。各クローンに、自己誘導培地（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅより入手したもの）を用いてペリプラズムでの発現を誘導するか、またはファージ上における個々のＦｃ変異体のファージディスプレイのためにヘルパーファージを感染させた。培地を一晩増殖させ、遠心して大腸菌をペレット化した。ファージＥＬＩＳＡでは、ファージを含む上清を直接使用した。ペリプラズムでの発現では、ペレットを２０％スクロースに再懸濁した後、水で４：１に希釈し、４℃で１時間振盪した。プレートを遠心して固形物をペレット化し、上清をＥＬＩＳＡに使用した。
【０３４３】
　ＥＬＩＳＡプレートに標的をコーティングし（通常、０．５ｍｇ／ｍｌで一晩）、次いで１％ＢＳＡでブロッキングした後、ファージまたはペリプラズム抽出物を加えた。１時間のインキュベーションを行い、非結合タンパク質を洗い流した後、ＨＲＰ結合二次抗体（すなわち、可溶性Ｆｃまたはファージに提示されたＦｃに対してそれぞれ抗Ｆｃまたは抗Ｍ１３）を加え、３０分間インキュベートした。各プレートを再び洗浄した後、ＴＭＢ試薬で発色させ、２Ｎの硫酸でクエンチした。プレートリーダー（ＢｉｏＴｅｋ（登録商標））を用いて４５０ｎｍの吸光度を定量し、適用可能な場合にはＰｒｉｓｍソフトウェアを使用して結合曲線をプロットした。試験したクローンの吸光度シグナルを陰性対照（Ｆｃを欠いているファージまたはペリプラズム抽出物）と比較した。一部のアッセイでは、可溶性のホロトランスフェリンまたは他の競合物を結合ステップの間に、通常は大幅なモル過剰量（１０倍過剰超）で加える。
【０３４４】
　フローサイトメトリーによるスクリーニング
　Ｆｃ変異体ポリペプチド（ファージ上で、ペリプラズム抽出物中で、またはＦａｂフラグメントとの可溶性の融合体として発現させたもの）を、９６ウェルＶ底プレート中で細胞に加え（ＰＢＳ＋１％ＢＳＡ（ＰＢＳＡ）中、ウェル当たり約１００，０００細胞）、４℃で１時間インキュベートした。この後、各プレートを遠心し、培地を除去してから細胞をＰＢＳＡで１回洗浄した。二次抗体（典型的には、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒより入手したもの））を含むＰＢＳＡ中に細胞を再懸濁した。３０分後、プレートを遠心し、培地を除去し、細胞をＰＢＳＡで１～２回洗浄した後、プレートをフローサイトメーター（すなわち、ＦＡＣＳ　Ｃａｎｔｏ（商標）ＩＩフローサイトメーター）で読み取った。ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを使用して各条件について蛍光の中央値を計算し、結合曲線をＰｒｉｓｍソフトウェアを用いてプロットした。
【０３４５】
ＣＨ２Ａ２クローンの作製及び特性分析
　トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）に対するＣＨ２Ａ２ライブラリーによる選択
　ＣＨ２Ａ２に対するファージ及び酵母ライブラリーを上記に述べたようにしてＴｆＲに対してパニングし、分取した。上記の「ＥＬＩＳＡによるスクリーニング」と題したセクションで述べたように、ＥＬＩＳＡアッセイにおいて４ラウンドのファージパニング後に、ヒト及び／またはカニクイザル（ｃｙｎｏ）ＴｆＲに結合するクローンが特定された。代表的なクローンの配列は、１５個の固有の配列を含むグループ１（すなわち、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７～６１）、及び１個の固有の配列（すなわち、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６２）を含むグループ２の２つのグループに分類された。グループ１の配列は、６０～６１位に保存されたＧｌｕ－Ｔｒｐモチーフを有していた。他のいずれの位置にもコンセンサスはみられなかったが、５８位にはＡｒｇが高頻度でみられ、５９位にはＴｒｐまたはＴｙｒが高頻度でみられた。

【０３４６】
ＣＨ２Ａ２クローンの特性分析
個々のＣＨ２Ａ２変異体をファージの表面に発現させ、ＥＬＩＳＡによりヒトＴｆＲ、カニクイザルＴｆＲ、または無関連の対照に対する結合についてアッセイした。Ｆｃの発現を、Ｃ末端のｃ－Ｍｙｃエピトープタグに結合する抗Ｍｙｃ抗体９Ｅ１０に対してＥＬＩＳＡにより確認した。図１（Ａ）～（Ｄ）に示される４つの代表的クローンについてのデータは、これらのクローンはいずれもよく発現され、ヒトＴｆＲに結合したのに対して、いずれも無関連の対照には結合しなかったことを示した。グループ１の３つのクローンはカニクイザルＴｆＲにも結合したが、グループ２の１つのクローン（すなわち、クローン２Ａ２．１６）はヒトＴｆＲに特異的であった。

【０３４７】
第２のアッセイでは、ファージの濃度を一定に保ち（すなわち、おおよそＥＣ$_{50}$）、異なる濃度の可溶性競合物質（ホロトランスフェリンまたはヒトＴｆＲ）を加えた。図２（Ａ）及び（Ｂ）は、結合が、５μＭまでの濃度のホロトランスフェリンの添加によって大きく影響されなかったことを示している。これに対して、可溶性のヒトＴｆＲは、表面に吸着したヒトＴｆＲに対する結合について競合し、特異的な相互作用を示した。

【０３４８】
ＣＨ２Ａ２変異体は、抗ＢＡＣＥ１可変領域配列を含む発現ベクターにクローニングすることにより、抗ＢＡＣＥ１　ＦａｂフラグメントとのＦｃ融合体として発現される。２９３またはＣＨＯ細胞で発現させた後、得られたＣＨ２Ａ２－Ｆａｂ融合体をＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ及びサイズ排除クロマトグラフィーによって精製してから、ＥＬＩＳＡ、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ；すなわち、Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）装置を使用する）、バイオレイヤー干渉法（すなわち、Ｏｃｔｅｔ（登録商標）ＲＥＤシステムを使用）、細胞結合（例えば、フローサイトメトリー）、及び本明細書に記載される他の方法を用いて結合についてアッセイした。更に、得られたポリペプチド－Ｆａｂ融合体を、熱融解、凍結融解、及び熱加速変性によって安定性について特性分析を行った。

【０３４９】
ＣＨ２Ａ２クローンの更なる操作
ヒト及びカニクイザルＴｆＲに対する初期ヒットの結合親和性を高めるために２つの二次ライブラリーを構築した。第１のライブラリーは、グループ１のクローンに基づいて作製した。６０及び６１位の保存されたＥＷモチーフを不変に保ち、５８位の半保存的Ｒをソフトランダム化を用いて変異させた。その他のライブラリー位置（すなわち、４７位、４９位、５６位、５９位、６２位、及び６３位）は飽和突然変異導入によって変異させた。第２のライブラリーは、グループ２のクローンに基づいて構築した。このライブラリーは、最初のＣＨ２Ａ２ライブラリー位置のソフトランダム化により作製したが、クローン２Ａ２．１６（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６２）を鋳型として用いた（野生型Ｆｃ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）の代わりに）。どちらのライブラリーも、上記に述べた方法を用いてファージ及び酵母ディスプレイについて構築した。

【０３５０】
次に上記に述べた方法を用いてライブラリーをスクリーニングし、ＥＬＩＳＡによってヒトＴｆＲに結合したいくつかのクローンを特定した（表１）。

【０３５１】
ＣＨ２Ｃクローンの作製及び特性評価
トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）に対するＣＨ２Ｃライブラリーによる選択
ＣＨ２Ｃに対するファージ及び酵母ライブラリーを上記に述べたようにしてＴｆＲに対してパニングし、分取した。上記の「ＥＬＩＳＡによるスクリーニング」と題したセクションで述べたように、ＥＬＩＳＡアッセイにおいて４ラウンドのファージパニング（すなわち、グループ１及び４のクローン）後に、ヒト及び／またはカニクイザル（ｃｙｎｏ）ＴｆＲに結合するクローンが特定され、上記の「酵母選択の一般的方法」と題したセクションで述べたような酵母結合アッセイにより、４回または５回の酵母分取ラウンド（すな

わち、グループ２及び３のクローン）後に更なるクローンが特定された。代表的なクローンの配列は、１６個の固有の配列を含むグループ１（すなわちＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３～７８）、４個の固有の配列を含むグループ２（すなわちＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７９～８２）、２個の固有の配列を含むグループ３（すなわちＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８３～８４）、１個の固有の配列を含むグループ４（すなわちＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５）の４つのグループに分類された。グループ１の配列は、３９位に半保存的Ｐｒｏを、４２位に半保存的Ｐｒｏを、４３位に保存的Ｐｒｏを、４４位に半保存的Ｔｒｐを、６８位に半保存的Ｇｌｕを、７０位に保存的Ｔｙｒを有し、他のライブラリー位置では特定の傾向がほとんどなかった。グループ２の配列は、３９位に保存的Ｍｅｔを、４０位に半保存的Ｌを、４２位に保存的Ｐｒｏを、４３位に保存的Ｖａｌを、４４位に半保存的Ｐｒｏを、６８位に半保存的Ｔｈｒを、７０位に保存的Ｈｉｓを、７２位に保存的Ｐｒｏを有していた。２個のグループ３の配列同士は、位置６８においてのみ異なり、この位置にはＶａｌまたはＬｅｕが存在していた。グループ４は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８５に示される配列を有する１種類のクローン（すなわちＣＨ２Ｃ．２３）からなるものであった。

【０３５２】

ＣＨ２Ｃクローンの特性分析

ＣＨ２Ｃ変異体は、抗ＢＡＣＥ１ベンチマーク可変領域配列を含む発現ベクターにクローニングすることにより、ＦａｂフラグメントとのＦｃ融合体として発現させた。２９３またはＣＨＯ細胞で発現させた後、得られたポリペプチド－Ｆａｂ融合体をＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ及びサイズ排除クロマトグラフィーによって精製してから、ヒトまたはカニクイザルＴｆＲに対する結合についてアッセイした。図３（Ａ）に示されるように、グループ４のクローンＣＨ２Ｃ．２３はホロトランスフェリンと競合した。配列グループ１に属するクローンが、図３（Ｂ）にヒト及びカニクイザルＴｆＲに対する結合滴定で示されている。他の配列グループからの代表的なクローンを、ホロＴｆの存在下または非存在下での結合についてファージ上で試験し（図３（Ｃ）を参照）、クローンＣＨ２Ｃ．７を、バイオレイヤー干渉法によりホロトランスフェリンの存在下でヒトＴｆＲに対する結合について試験した（すなわち、Ｏｃｔｅｔ（登録商標）ＲＥＤシステムを使用。図３（Ｄ）を参照）。ほとんどのクローンはカニクイザルＴｆＲにある程度の交差反応性を示し、クローンＣＨ２Ｃ．２３を除いて、試験したクローンはホロＴｆと競合しなかった。

【０３５３】

ＣＨ２Ｃクローンの更なる操作

更なるライブラリーの設計及びスクリーニングについてＣＨ２Ａ２に関して上記に述べたのと同様の更なる操作方法を用いて、ＣＨ２Ｃクローンの親和性を高める。

【０３５４】

ＣＨ３Ｂクローンの作製及び特性分析

トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）に対するＣＨ３Ｂライブラリーによる選択

ＣＨ３Ｂに対するファージ及び酵母ライブラリーを上記に述べたようにしてＴｆＲに対してパニングし、分取した。上記の「ＥＬＩＳＡによるスクリーニング」と題したセクションで述べたように、ＥＬＩＳＡアッセイにおいて４ラウンドのファージパニング後に、ヒト及び／またはカニクイザルＴｆＲに結合するクローンが特定され、上記の「酵母選択の一般的方法」と題したセクションで述べたような酵母結合アッセイにより、４回または５回の酵母分取ラウンド後に更なるクローンが特定された。ファージ及び酵素の両方から特定された１７種類のクローン（すなわちＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０～４６）のすべては、関連した配列を有していた。すなわち、配列は、１１８位に半保存的Ｐｈｅを、１１９位に半保存的な負に帯電したＡｓｐまたはＧｌｕを、１２２位に半保存的Ｔｈｒを、２１０位に保存的Ｇを、２１１位に保存的Ｐｈｅを、２１２位に半保存的Ｈｉｓを、２１３位に保存的Ａｓｐを有していた。いくつかのクローンが、Ｔ１２３Ｉ変異を有していたが、この位置はライブラリーの設計で意図的に変異させておらず、組換えまたはＰＣＲのエラーによって導入されたものと考えられる。

【０３５５】

ＣＨ３Ｂクローンの特性分析

２種類の代表的なクローンＣＨ３Ｂ．１１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０）及びＣＨ３Ｂ．１２（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１）をファージの表面に発現させ、ホロＴｆの存在下または非存在下でヒト及びカニクイザルＴｆＲに対する結合について試験した。いずれのクローンも、ホロＴｆの添加によって影響されなかった（図４（Ａ））。更に、ＣＨ３Ｂ変異体を、抗ＢＡＣＥ１可変領域配列を含む発現ベクターにクローニングすることにより、Ｆａｂフラグメントとの融合体として発現させた。２９３またはＣＨＯ細胞で発現させた後、得られたポリペプチドーＦａｂ融合体をＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ及びサイズ排除クロマトグラフィーによって精製してから、ヒトまたはカニクイザルＴｆＲに対する結合についてアッセイした（図４（Ｂ））。いずれも両方のオーソログに対して特異的な結合を示した。

【０３５６】

ＣＨ３Ｂクローンの更なる操作

更なるライブラリーの設計及びスクリーニングについてＣＨ２Ａ２に関して上記に述べたものと同様の更なる操作方法を用いて、ＣＨ３Ｂクローンの親和性を高めることを行った。詳細には、パラトープの近くのいくつかの４～７個の一連の残基パッチを、図５に示されるような更なる多様化を行うために選択した（暗い表面は元のライブラリーのレジスターを表し、明るいパッチは新たに変異を導入した位置を表す）。クローンＣＨ３Ｂ．１２（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１）を開始点として使用した。飽和（すなわちＮＮＫ）変異導入について選択した残基は以下の通りである。

ＣＨ３Ｂパッチ１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０１）：アミノ酸位置１２７、１２８、１２９、１３１、１３２、１３３、及び１３４；

ＣＨ３Ｂパッチ２（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０２）：アミノ酸位置１２１、２０６、２０７、及び２０９；

ＣＨ３Ｂパッチ３（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０３）：アミノ酸位置１２５、２１４、２１７、２１８、２１９、及び２２０；

ＣＨ３Ｂパッチ４（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０４）：アミノ酸位置１１５、１１７、１４３、１７４、及び１７６；ならびに

ＣＨ３Ｂパッチ５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５）：アミノ酸位置１５５、１５７、１５８、１９３、１９４、及び１９５。

【０３５７】

各ライブラリーはＰＣＲ突然変異誘発を用いて作製し、上記の「ファージディスプレイライブラリーの作製」及び「酵母ディスプレイライブラリーの作製」と題したセクションで述べたようにして酵母及びファージに組み込んだ。上記に述べた方法を用いてライブラリーをスクリーニングし、ＥＬＩＳＡによってヒトＴｆＲに結合したいくつかのクローンを特定した（表５）。

【０３５８】

ＣＨ２Ｄクローンの作製及び特性評価

トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）に対するＣＨ２Ｄライブラリーによる選択

ＣＨ２Ｄに対するファージライブラリーを上記に述べたようにしてＴｆＲに対してパニングした。上記の「ＥＬＩＳＡによるスクリーニング」と題したセクションで述べたように、ＥＬＩＳＡアッセイにおいてヒト及び／またはカニクイザルＴｆＲに結合するクローンが特定された。５種類の固有のクローンが特定され、それぞれ２個及び３個の配列からなる２つの配列群に分類された（表３）。配列グループ１（すなわち、クローンＣＨ２Ｄ．１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８６）及びＣＨ２Ｄ．２（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８７））は、４０～４５位に保存的ＶＰＰＸＭ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１１）モチーフを、６４～６７位にＳＬＴＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１２）モチーフを、７３位にＶを有していた。４０位における変異は設計に含まれておらず、恐らくＰＣＲエラーまたは組換えによるものと思われる。配列グループ２（すなわち、クローンＣＨ２Ｄ．３（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８８）、ＣＨ２Ｄ．４（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８９）、及びＣＨ２Ｄ．５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９０））は、４１位に保存的Ｄを、４２位に半保存的Ｄを、４３位に保存的Ｗを、４４

位に半保存的Ｅを、４５位に保存的芳香族（ＷまたはＹ）を、６４～６５位に保存的ＰＷモチーフを、７３位に保存的Ｗを有していた。

【０３５９】

ＣＨ２Ｄクローンの特性分析及び更なる操作

更に、ＣＨ２Ｄ変異体を、抗ＢＡＣＥ１可変領域配列を含む発現ベクターにクローニングすることにより、Ｆａｂフラグメントとの融合体として発現させた。２９３またはＣＨＯ細胞で発現させた後、得られたポリペプチド－Ｆａｂ融合体をＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ及びサイズ排除クロマトグラフィーによって精製してから、本明細書で上記に述べた方法を用いてホロＴｆの存在下または非存在下でカニクイザル及びヒトＴｆＲに対する結合についてアッセイした。

【０３６０】

ＣＨ２Ｅ３クローンの作製及び特性分析

トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）に対するＣＨ２Ｅ３ライブラリーによる選択

ＣＨ２Ｅ３に対するファージライブラリーを上記に述べたようにしてＴｆＲに対してパニングした。上記の「ＥＬＩＳＡによるスクリーニング」と題したセクションで述べたように、ＥＬＩＳＡアッセイにおいてヒト及び／またはカニクイザルＴｆＲに結合するクローンが特定された。５個の配列から３つの配列グループが特定されたが、これらのグループのうちの２つはそれぞれ１個の固有の配列のみで構成されるものであった（表４）。配列グループ２は、３個の固有の配列（すなわち、クローンＣＨ２Ｅ３．２（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９２）、ＣＨ２Ｅ３．３（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９３）、及びＣＨ２Ｅ３．４（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９４））を有し、４５位に半保存的Ｖａｌを、４７位に保存的Ｇｌｙを、４９位に保存的Ａｒｇを、９５位に保存的Ａｒｇを、９７及び９９位に保存的Ｓｅｒを、１０３位に保存的Ｔｒｐを、１０４位にＡｒｇまたはＬｙｓを有していた。

【０３６１】

ＣＨ２Ｅ３クローンの特性分析及び更なる操作

ＣＨ２Ｅ３変異体を、抗ＢＡＣＥ１ベンチマーク可変領域配列を含む発現ベクターにクローニングすることにより、Ｆａｂフラグメントとの融合体として発現させた。２９３またはＣＨＯ細胞で発現させた後、得られたポリペプチド－Ｆａｂ融合体をＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ及びサイズ排除クロマトグラフィーによって精製してから、本明細書で上記に述べた結合の方法を用いてホロＴｆの存在下または非存在下でカニクイザル及びヒトＴｆＲに対する結合についてアッセイした。

【０３６２】

ＣＨ３Ｃクローンの作製及び特性分析

トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）に対するＣＨ３Ｃライブラリーによる選択

ＣＨ３Ｃに対する酵母ライブラリーを上記に述べたようにしてＴｆＲに対してパニングし、分取した。最初の３回の分取ラウンドの集団濃縮ＦＡＣＳプロットを図６に示す。更なる２ラウンドの分取後、１種類のクローンをシークエンシングし、４個の固有の配列（すなわち、クローンＣＨ３Ｃ．１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４）、ＣＨ３Ｃ．２（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５）、ＣＨ３Ｃ．３（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６）、及びＣＨ３Ｃ．４（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７））を特定した。これらの配列は、１６１位に保存的Ｔｒｐを有し、いずれも１９４位に芳香族残基（すなわち、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、またはＨｉｓ）を有していた。他の位置では高い多様性がみられた。

【０３６３】

第１世代ＣＨ３Ｃクローンの特性分析

ＣＨ３Ｃライブラリーから選択した４種類のクローンを、ＣＨＯまたは２９３細胞でＦａｂフラグメントとのＦｃ融合体として発現させ、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ及びサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した後、ＥＬＩＳＡによりホロＴｆの存在下または非存在下でカニクイザル及びヒトＴｆＲに対する結合についてスクリーニングした。図７に示されるように、各クローンはいずれもヒトＴｆＲに結合し、結合は過剰量（５μＭ）のホロＴｆの添加によって影響されなかった。しかしながら、各クローンはカニクイザルＴｆＲに

はそれほど結合しなかった。各クローンをヒトＴｆＲを内因性に発現する２９３Ｆ細胞に対する結合についても試験した。図８は、各クローンは２９３Ｆ細胞に結合したものの、全体的な結合は高親和性の陽性対照と比較して大幅に弱かったことを示している。

【０３６４】

次に、クローンＣＨ３Ｃ．３がＴｆＲ発現細胞内に内在化するかについて試験を行った。接着性ＨＥＫ２９３細胞を９６ウェルで約８０％コンフルエンスにまで増殖させ、培地を除去し、以下の各試料を１μＭの濃度で加えた。すなわち、ＣＨ３Ｃ．３抗ＴｆＲベンチマーク陽性対照抗体（Ａｂ２０４）、抗ＢＡＣＥ１ベンチマーク陰性対照抗体（Ａｂ１０７）、及びヒトＩｇＧアイソタイプ対照（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈより入手したもの）。細胞を３７℃及び８％CO_2濃度で３０分間インキュベートした後、洗浄し、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ（商標）Ｘ－１００で透過処理し、抗ヒトＩｇＧ－Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８二次抗体で染色した。更なる洗浄後、細胞をハイコンテント蛍光顕微鏡（すなわちＯｐｅｒａ　Ｐｈｅｎｉｘ（商標）システム）下でイメージングし、図９に示されるように細胞当たりの斑点の数を定量した。１μＭでは、クローンＣＨ３Ｃ．３は、抗ＴｆＲ陽性対照と同様の内在化の傾向を示したが、陰性対照は内在化を示さなかった。

【０３６５】

ＣＨ３Ｃクローンの二次操作

ヒトＴｆＲに対する初期のＣＨ３Ｃのヒットの親和性を改善し、カニクイザルＴｆＲに対する結合を導入する試みとして更なるライブラリーを作製した。ソフトランダム化のアプローチを用い、ＤＮＡオリゴを作製して最初の４つのヒットのそれぞれに基づいてソフト突然変異誘発を導入した。レジスターの第１の部分（ＷＥＳＸＧＸＸＸＸＹＫ；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１３）とレジスターの第２の部分（ＴＶＸＫＸＸＷＱＱＧＸＶ；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１４）を別々のフラグメントにより構築することにより、ソフトランダム化された各レジスターをＰＣＲ増幅でシャッフルした（例えば、クローンＣＨ３Ｃ．１からのレジスターの第１の部分が、クローンＣＨ３Ｃ．１、ＣＨ３Ｃ．２、ＣＨ３Ｃ．３、及びＣＨ３Ｃ．４からのレジスターの第２の部分と混合される、といった具合）。各フラグメントをすべて混合してから、表面発現及び選択を行うために酵母に導入した。

【０３６６】

選択スキームを図１０に示す。１ラウンドのＭＡＣＳと３ラウンドのＦＡＣＳの後、個々のクローンをシークエンシングした（クローンＣＨ３Ｃ．１７（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８）、ＣＨ３Ｃ．１８（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９）、ＣＨ３Ｃ．２１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０）、ＣＨ３Ｃ．２５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１）、ＣＨ３Ｃ．３４（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２）、ＣＨ３Ｃ．３５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３）、ＣＨ３Ｃ．４４（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４）、及びＣＨ３Ｃ．５１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５））。選択されたクローンは２つの大きな配列グループに分類された。グループ１のクローン（すなわち、クローンＣＨ３Ｃ．１８、ＣＨ３Ｃ．２１、ＣＨ３Ｃ．２５、及びＣＨ３Ｃ．３４）は、１５７位に半保存的ＬｅｕをＬｅｕまたは１５９位にＨｉｓを、１６０及び１６２位にそれぞれ保存的及び半保存的Ｖａｌを、１８６、１８９、及び１９４位にそれぞれ半保存的Ｐ－Ｔ－Ｗモチーフを有していた。グループ２のクローンは、１５７位に保存的Ｔｙｒを、１５９～１６３位にモチーフＴＸＷＳＸ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７０）を、１８６、１８９、及び１９４位にそれぞれ保存的モチーフＳ／Ｔ－Ｅ－Ｆを有していた。クローンＣＨ３Ｃ．１８及びＣＨ３．３５を、それぞれの配列グループの代表的な構成員として更なる実験で使用した。クローンＣＨ３Ｃ．５１は、そのレジスターの第１の部分はグループ１から、そのレジスターの第２の部分はグループ２からのものを有する点が着目された。

【０３６７】

ソフト突然変異誘発ライブラリーからのＣＨ３Ｃクローンの結合特性分析

ソフト突然変異誘発ライブラリーからの各クローンをＦｃ－Ｆａｂ融合ポリペプチドとして再フォーマット化し、上記に述べたようにして発現させ、精製した。図１２に示されるように、これらの変異体は、最初のライブラリーセレクションからの最も上のクローン

（ＣＨ３Ｃ．３）と比較してヒトＴｆＲに対する改善されたＥＬＩＳＡ結合を有し、また、ホロＴｆと競合もしなかった。下記表７に示されるＥＣ$_{50}$値は、ホロＴｆの存在または非存在によって実験の誤差の範囲を超えて大きく影響されなかった。

【０３６８】

（表７）ホロＴｆの存在下または非存在下でのＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ変異体のＥＬＩＳＡ結合のＥＣ$_{50}$値（ｎＭ）

クローン	-Tf	+Tf
CH3C.3	8.1	6.3
CH3C.17	5.3	17
CH3C.18	6.9	3.5
CH3C.25	51	48
CH3C.35	0.49	0.61
CH3C.51	160	36
Ab204	1.6	0.24

【０３６９】

注目すべき点として、クローンＣＨ３Ｃ．３５は、高親和性の抗ＴｆＲ対照抗体Ａｂ２０４と概ね同程度にヒトＴｆＲに結合した。図１３に示されるように、ソフトランダム化ライブラリーから選択された各クローンは、２９３Ｆ細胞に対しても改善された細胞結合を有していた。同様な細胞結合アッセイにおいて、これらのクローンを、その表面に高いレベルのヒトまたはカニクイザルＴｆＲを安定的に発現するＣＨＯ－Ｋ１細胞に対する結合について試験した。ソフトランダム化ライブラリーから選択された各クローンは、カニクイザルＴｆＲ（図１４（Ｂ））と同程度に、ヒトＴｆＲを発現する細胞に結合した（図１４（Ａ））が、親ＣＨＯ－Ｋ１細胞には結合しなかった（図１４（Ｃ））。その大きさ及び結合ＥＣ$_{50}$値は、ヒトＴｆＲと比較してカニクイザルＴｆＲでは大幅に低かった。データを下記表８に要約する。

【０３７０】

（表８）細胞に結合するＣＨ３ＣクローンのEC_{50}及び最大ＭＦＩ（蛍光強度中央値）値

クローン	**293F EC50 (nM)**	200nMでの 293F MFI	**CHO-huTfR EC_{50} (nM)**	200nMでの CHO-huTf MFI	**CHO-cyTfR EC_{50} (nM)**	200nMでの CHO-cyTfR MFI
CH3C.3	n.d.	1385	6.5	10296	n.d.	941
CH3C.17	n.d.	1556	4.2	13933	> 50	8205
CH3C.18	22	2100	2.3	22997	6.6	9614
CH3C.25	n.d.	314	17	11434	> 50	12515
CH3C.35	0.67	1481	2.6	22059	11	8292
CH3C.51	n.d.	784	27	11892	> 50	14455
Ab204	0.25	3404	1.8	35744	2.4	41041

【０３７１】

エピトープマッピング

操作されたＣＨ３Ｃ　Ｆｃ領域がＴｆＲのアピカルドメインに結合するかを調べるため、ＴｆＲアピカルドメイン（ヒト及びカニクイザルについてそれぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０７及び１０８）をファージの表面で発現させた。アピカルドメインを適正にフォールディングして提示するには、ループの１つを短縮する必要があり、配列を環状に並び替える必要がある（ファージ上で発現された配列は、ヒト及びカニクイザルでそれぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０９及び１１０として特定される）。クローンＣＨ３Ｃ．１８及びＣＨ３Ｃ．３５をＥＬＩＳＡプレートにコーティングし、上記に述べたファージＥＬＩＳＡプロトコールに従った。要約すると、１％ＰＢＳＡによる洗浄及びブロッキング後、ファージディスプレイの各希釈液を加え、室温で１時間インキュベートした。次いで各プレートを洗浄し、抗Ｍ１３－ＨＲＰを加え、更なる洗浄後、各プレートをＴＭＢ基質で発色させ、２ＮのH_2SO_4でクエンチした。このアッセイではＣＨ３Ｃ．１８及びＣＨ３Ｃ．３５の両方ともアピカルドメインに結合した。

【０３７２】

カニクイザルＴｆＲに対する結合はヒトＴｆＲに対する結合よりも大幅に弱いことが知られているため、カニクイザルとヒトのアピカルドメインのアミノ酸の相違の１つ以上が、結合の差の要因となっている可能性が高いと仮説を立てた。したがって、ヒトの残基を対応するカニクイザル残基に置き換えた６つの一連の点突然変異をヒトＴｆＲのアピカルドメインに導入した。これらの変異体をファージ上に提示させ、ファージ濃度をOD_{268}により正規化し、ＣＨ３Ｃ．１８及びＣＨ３Ｃ．３５に対する結合をファージＥＬＩＳＡ滴定により試験した（図１６（Ｂ）及び（Ｃ））。抗Ｍｙｃ抗体９Ｅ１０への捕捉は、すべての変異体の提示レベルが同様であったことを示した（図１６（Ａ））。ヒトＴｆＲ変異に対する結合によって、Ｒ２０８Ｇ変異の強い影響が明らかに示され、この残基がエピトープの重要部分であり、カニクイザル残基によってこの位置で負の影響が及ぼされることが示唆された。ファージに提示させたカニクイザルアピカルドメインにＧ２０８Ｒ変異を導入したところ、この変異がカニクイザルアピカルドメインに対する結合を著しく改善することが示された（図１６（Ｄ）及び（Ｅ））。これらの結果は、各ＣＨ３Ｃクローンがアピカルドメインに結合したこと、及び２０８位が結合に重要であるのに対して２４７、２９２、３６４、３７０、及び３７２位は重要度が大幅に低かったことを示すものである。

【０３７３】

パラトープマッピング

Ｆｃドメイン内のどの残基がＴｆＲへの結合に最も重要であるかを理解するため、各変異体のＴｆＲ結合レジスター内の１個の位置を野生型に復帰変異させた変異体ＣＨ３Ｃ．１８及びＣＨ３Ｃ．３５の一連のクローンを作製した。得られた変異体を組換えによりＣＨ３Ｃ　Ｆｃ－Ｆａｂ融合体として発現させ、ヒトまたはカニクイザルＴｆＲに対する結合について試験した（図１７）。ＣＨ３Ｃ．３５では、１６１及び１９４位は結合に絶対的に重要であり、これらのいずれかの野生型への復帰変異はヒトＴｆＲに対する結合を完全に消失させた。驚くべきことに、１６３位を野生型に復帰変異させることで、カニクイザルＴｆＲへの結合が顕著に上昇したのに対して、ヒトへの結合に影響はほとんどなかった。これに対して、残基１６３の野生型への復帰変異はＣＨ３Ｃ．１８ではほとんど影響がなかったが、この変異体では１８９及び１９４位の復帰変異がヒトＴｆＲへの結合を完全に消失させた。どちらの変異体においても、他の単一の復帰変異はヒトＴｆＲへの結合に若干の（負の）影響を示したのに対して、多くの場合でカニクイザルＴｆＲに対する結合は消失した。

【０３７４】

カニクイザルＴｆＲに対する結合を改善するための更なる操作

カニクイザルＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ変異体の親和性を更に高めるために更なるライブラリーを調製した。これらのライブラリーは、理論上の多様性に関しておよそ10^7種類よりも少ないクローンとなるように設計されており、酵母表面ディスプレイを用いて多様

性空間全体を網羅することが可能なものであった。これらのライブラリーの設計を図１８に示す。４つのライブラリーの設計を用い、すべてのライブラリーはＮＮＫまたは他の縮重コドン位置で縮重オリゴを使用して作製し、上記に述べたようにしてオーバーラップＰＣＲにより増幅した。

【０３７５】

第１のライブラリーは、ＣＨ３Ｃ．３５様配列のコンセンサスに基づいたものとした（図１８（Ａ））。この場合、１５７～１６１位をＹＧＴＥＷ（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１１５）として一定に保つ一方で、１６２、１６３、１８６、１８９、及び１９４位を飽和突然変異誘発を用いて変異させた。

【０３７６】

第２のライブラリーは、ＣＨ３Ｃ．１８様配列のコンセンサスに基づいたものとした（図１８（Ｂ））。この場合、１５７位をＬｅｕ及びＭｅｔに限定し、１５９位をＬｅｕ及びＨｉｓに限定し、１６０位をＶａｌとして一定に保ち、１６１位をＴｒｐ及びＧｌｙに限定し、１６２位をＶａｌ及びＡｌａに限定し、１６３位を完全にランダム化し、１６４位をレジスターに追加して完全にランダム化し、１８６位をソフトランダム化し、１８９位を完全にランダム化し、１９４位を芳香族アミノ酸及びＬｅｕに限定した。

【０３７７】

第３のライブラリーでは、新たなランダム化された位置をライブラリーに追加した（図１８（Ｃ））。ＣＨ３Ｃ．１８及びＣＨ３Ｃ．３５をそれぞれ出発レジスターとする２つのバージョンを作製し、次いで、Ｅ１５３、Ｅ１５５、Ｙ１６４、Ｓ１８８、及びＱ１９２の更なる位置を飽和突然変異誘発によりランダム化した。

【０３７８】

第４のライブラリーは、ＣＨ３Ｃ．１８の特定の位置を一定に保ったが、コンセンサスライブラリーよりも低いバイアスで他の位置を変異させた（図１８（Ｄ））。１６０、１６１、及び１８６位を固定し、１５７、１５９、１６２、１６３、及び１８９位を飽和突然変異誘発によりランダム化し、１９４位は変異させたが芳香族残基及びＬｅｕに限定した。

【０３７９】

上記に述べたようにして、各ライブラリーを酵母でカニクイザルＴｆＲに対して４～５ラウンド選択し、単一のクローンをシークエンシングしてポリペプチド－Ｆａｂ融合体に変換した。カニクイザルＴｆＲへの結合における最大の濃縮が第２のライブラリー（すなわちＣＨ３．１８親の誘導体）から観察されたが、ヒトＴｆＲへの結合に若干の低下もみられた。

【０３８０】

ＣＨ３Ｃ成熟クローンの結合の特性分析

上記に述べたようにして、精製したＣＨ３Ｃ Ｆｃ－Ｆａｂ融合変異体と、プレートにコーティングしたヒトまたはカニクイザルＴｆＲとの結合ＥＬＩＳＡを行った。ＣＨ３Ｃ．１８成熟ライブラリーからの変異体であるＣＨ３Ｃ３．２－１、ＣＨ３Ｃ．３．２－５、及びＣＨ３Ｃ．３．２－１９がヒト及びカニクイザルＴｆＲとおおよそ等しいEC_{50}値で結合したのに対して、親クローンのＣＨ３Ｃ．１８及びＣＨ３Ｃ．３５は、カニクイザルＴｆＲに対してヒトＴｆＲに、１０倍よりも高い結合を示した（図１９）。

【０３８１】

次に、新規なポリペプチドがヒト及びサルの細胞内に内在化するかについて試験を行った。「第１世代ＣＨ３Ｃクローンの特性分析」と題したセクションで上記に述べたプロトコールを用いて、ヒトＨＥＫ２９３細胞及びアカゲザルＬＬＣ－ＭＫ２細胞における内在化を試験した。図２０に示されるように、ヒト及びカニクイザルＴｆＲに対して同様に結合した変異体であるＣＨ３Ｃ．３．２－５及びＣＨ３Ｃ．３．２－１９は、ＣＨ３Ｃ．３５と比較して顕著に改善された内在化をＬＬＣ－ＭＫ２において示した。

【０３８２】

ＣＨ３Ｃクローンの更なる操作

更なる親和性成熟クローンであるＣＨ３Ｃ．１８及びＣＨ３Ｃ．３５に対する更なる操作において、骨格（すなわちレジスター以外の）位置に更なる変異を加えて、直接的相互作用、第２水和殻相互作用、または構造的安定化を介して結合を向上させた。これは、「ＮＮＫウォーク」または「ＮＮＫパッチ」ライブラリーの作製、及びこれらのライブラリーからの選択を行うことによって実現された。ＮＮＫウォークライブラリーでは、パラトープの近傍の残基に１つずつＮＮＫ変異を導入した。ＦｃｇＲＩに結合したＦｃ（ＰＤＢＩＤ：４Ｗ４Ｏ）の構造をみることにより、図２１に示されるように、元のライブラリーレジスターの近くの４４個の残基が調査の候補として特定された。詳細には、以下の残基、すなわち、Ｋ２１、Ｒ２８、Ｑ１１５、Ｒ１１７、Ｅ１１８、Ｑ１２０、Ｔ１３２、Ｋ１３３、Ｎ１３４、Ｑ１３５、Ｓ１３７、Ｋ１４３、Ｅ１５３、Ｅ１５５、Ｓ１５６、Ｇ１５８、Ｙ１６４、Ｋ１６５、Ｔ１６６、Ｄ１７２、Ｓ１７３、Ｄ１７４、Ｓ１７６、Ｋ１８２、Ｌ１８３、Ｔ１８４、Ｖ１８５、Ｋ１８７、Ｓ１８８、Ｑ１９１、Ｑ１９２、Ｇ１９３、Ｖ１９５、Ｆ１９６、Ｓ１９７、Ｓ１９９、Ｑ２１１、Ｓ２１３、Ｓ２１５、Ｌ２１６、Ｓ２１７、Ｐ２１８、Ｇ２１９、及びＫ２２０をＮＮＫ突然変異誘発の標的とした。Ｋｕｎｋｅｌ突然変異誘発を用いてこれらの４４種類のシングルポイントＮＮＫライブラリーを作製し、他の酵母ライブラリーについて上記に述べたように各産物をプールして電気穿孔法により酵母に導入した。

【０３８３】

これらのミニライブラリー（それぞれ１個の位置を変異させ、２０種類の変異体を生じる）の組み合わせによって小さいライブラリーが作製され、このライブラリーを、酵母表面ディスプレイを用いてより高い親和性の結合を生じる位置について選択した。ＴｆＲアピカルドメインタンパク質を用い、上記に述べたようにして選択を行った（図２２）。３ラウンドの分取の後、濃縮された酵母ライブラリーからのクローンをシークエンシングしたところ、特定の点突然変異がアピカルドメインタンパク質に対する結合を顕著に改善させるいくつかの「ホットスポット」位置が特定された。ＣＨ３Ｃ．３５では、これらの変異として、Ｅ１５３（Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｌｅｕ、またはＧｌｎに変異させた）及びＳ１８８（Ｇｌｕに変異させた）が含まれた。ＣＨ３Ｃ．３５の単一変異体及び複合変異体の配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１～２３、２３６～２４１、及び２９７～２９９に記載される。ＣＨ３Ｃ．１８では、これらの変異には、Ｅ１５３（Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、またはＬｅｕに変異させた）及びＫ１６５（Ｇｌｎ、Ｐｈｅ、またはＨｉｓに変異させた）が含まれた。ＣＨ３Ｃ．１８の単一変異体の配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４２～２４７に記載される。

【０３８４】

「ＮＮＫパッチ」アプローチは、ＣＨ３Ｂライブラリーについて上記に述べたものと似ているが、各パッチはＣＨ３Ｃレジスターに直接隣接している。クローンＣＨ３Ｃ．３５を出発点として使用して以下のライブラリーを作製した。すなわち、

ＣＨ３Ｃパッチ１：アミノ酸位置：Ｋ２１、Ｒ２８、Ｙ１６４、Ｋ１６５、及びＴ１６６。

ＣＨ３Ｃパッチ２：アミノ酸位置：Ｑ１１５、Ｒ１１７、Ｅ１１８、Ｑ１２０、及びＫ１４３。

ＣＨ３Ｃパッチ３：アミノ酸位置：Ｔ１３２、Ｋ１３３、Ｎ１３４、Ｑ１３５、及びＳ１３７。

ＣＨ３Ｃパッチ４：アミノ酸位置：Ｅ１５３、Ｅ１５５、Ｓ１５６、及びＧ１５８。

ＣＨ３Ｃパッチ５：アミノ酸位置：Ｄ１７２、Ｓ１７３、Ｄ１７４、Ｓ１７６、及びＫ１８２。

ＣＨ３Ｃパッチ６：アミノ酸位置：Ｌ１８３、Ｔ１８４、Ｖ１８５、Ｋ１８７、及びＳ１８８。

ＣＨ３Ｃパッチ７：アミノ酸位置：Ｑ１９１、Ｑ１９２、Ｇ１９３、Ｖ１９５、及びＦ１９６。

ＣＨ３Ｃパッチ８：アミノ酸位置：Ｓ１９７、Ｓ１９９、Ｑ２１１、Ｓ２１３、及びＳ２１５；ならびに

ＣＨ３Ｃパッチ９：アミノ酸位置：Ｌ２１６、Ｓ２１７、Ｐ２１８、Ｇ２１９、及びＫ２２０。
ＴｆＲアピカルドメインタンパク質を用い、上記に述べたようにして選択を行った。しかしながら、結合が向上したクローンは特定されなかった。
【０３８５】
ＣＨ３Ｃ．３５の親和性を改善するための更なる成熟ライブラリー
　ＮＮＫウォークライブラリーから変異の組み合わせを特定する一方でこれらの周辺にいくつかの更なる位置を追加するための更なるライブラリーを、上記の酵母ライブラリーについて述べたようにして作製した。このライブラリーでは、ＹｘＴＥＷＳＳ及びＴｘｘＥｘｘｘＦモチーフを一定に保ち、以下の６つの位置、すなわちＥ１５３、Ｋ１６５、Ｋ１８７、Ｓ１８８、Ｓ１９７、及びＳ１９９を完全にランダム化した。位置Ｅ１５３及びＳ１８８は、これらの位置がＮＮＫウォークライブラリーにおいて「ホットスポット」であったことから含めた。位置Ｋ１６５、Ｓ１９７、及びＳ１９９は、これらの位置が結合領域の位置を決定し得るコアの部分を構成することから含め、Ｋ１８７は、１８８位に隣接していることから選択した。
【０３８６】
　このライブラリーを、上記に述べたようにして、カニクイザルＴｆＲのアピカルドメインのみによって分取した。５ラウンドの後に濃縮されたプールをシークエンシングし、特定された固有のクローンのＣＨ３領域の配列はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４８～２６５に記載される。
【０３８７】
ＣＨ３Ｃ．３５．２１の元のレジスター内の許容される多様性及びホットスポットの調査
　次のライブラリーは、主要な結合パラトープ内の許容される多様性の全体像を調べるために設計した。用いたアプローチは、ＮＮＫウォークライブラリーと同様のものであった。元のレジスター位置（１５７、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１８６、１８９、及び１９４）のそれぞれ、ならびに２個のホットスポット（１５３及び１８８）をＮＮＫコドンで個々にランダム化することにより、酵母上で一連の単一位置飽和突然変異誘発ライブラリーを作製した。更に、それぞれの位置を個々に野生型残基に復帰変異させ、これらの個々のクローンを酵母上に提示させた。図２３は、野生型復帰変異及び単一位置のＮＮＫライブラリーと比較した親クローンＣＨ３Ｃ．３５．２１の結合を示す。１５３、１６２、１６３、及び１８８位は、野生型残基に復帰変異させた際にＴｆＲに対する相当の結合を維持した唯一の位置であった点が着目された（１８６位の野生型への復帰変異で若干の残留はあるものの大幅に消失した結合が認められた）。
【０３８８】
　単一位置のＮＮＫライブラリーを、ヒトＴｆＲアピカルドメインに対して３ラウンドで分取して、結合したもののうち、上位の約５％を回収し、次いで少なくとも１６種類のクローンを各ライブラリーからシークエンシングした。これらの結果は、ＣＨ３Ｃ．３５クローンと関連して、各位置でどのアミノ酸がヒトＴｆＲに対する結合を大きく低下させることなく許容され得るかを示している。以下に要約を示す。
位置１５３：Ｔｒｐ、Ｌｅｕ、またはＧｌｕ；
位置１５７：ＴｙｒまたはＰｈｅ；
位置１５９：Ｔｈｒのみ；
位置１６０：Ｇｌｕのみ；
位置１６１：Ｔｒｐのみ；
位置１６２：Ｓｅｒ、Ａｌａ、またはＶａｌ（野生型のＡｓｎ残基は若干の結合を維持するようにみえたが、その後のライブラリー分取ではそのようにみえなかった点が着目された）；
位置１６３：ＳｅｒまたはＡｓｎ；
位置１８６：ＴｈｒまたはＳｅｒ；
位置１８８：ＧｌｕまたはＳｅｒ；

位置１８９：Ｇｌｕのみ；及び
位置１９４：Ｐｈｅのみ
【０３８９】
上記の残基は、１個の変化として、または組み合わせでクローンＣＨ３Ｃ．３５内に置換された場合にＴｆＲアピカルドメインに対する結合を維持するパラトープの多様性を表す。これらの位置に変異を有するクローンが表９に示されており、これらのクローンのＣＨ３ドメインの配列はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３７～２４１、２６４、及び２６６～２９６に記載される。
【０３９０】
一価のポリペプチドＦａｂ融合体
一価のＴｆＲ結合ポリペプチド－Ｆａｂ融合体の作製
Ｆｃドメインは自然でホモ二量体を形成するが、一方のＦｃ単位がＴ１３９Ｗのノブ変異（ＥＵ番号付けスキームを用いた場合に３６６位に相当）を有し、他方のＦｃ単位がＴ１３９Ｓ、Ｌ１４１Ａ、及びＹ１８０Ｖのホール変異（ＥＵ番号付けスキームを用いた場合にそれぞれ３６６、３６８、及び４０７位に相当）を有する「ノブ・イン・ホール」として知られる一連の非対称的変異によって２個のＦｃフラグメントの選択的ヘテロ二量体化を生じ得る。いくつかの実施形態では、本発明の改変ＣＨ３ドメインは、１３９位にＴｒｐを含む。いくつかの実施形態では、本発明の改変ＣＨ３ドメインは、１３９位にＳｅｒを、１４１位にＡｌａを、１８０位にＶａｌを含む。ヘテロ二量体のＴｆＲ結合ポリペプチドを、２種類のプラスミド（すなわち、ノブＦｃとホールＦｃ）の一過性の同時トランスフェクションにより２９３またはＣＨＯ細胞で発現させる一方で、ポリペプチド－Ｆａｂ融合体を３種類のプラスミド（すなわち、ノブ－Ｆｃ－Ｆａｂ重鎖、ホール－Ｆｃ－Ｆａｂ－重鎖、及び一般的な軽鎖）の一過性の同時トランスフェクションにより発現させた。分泌されたヘテロ二量体ポリペプチドまたはポリペプチド－Ｆａｂ融合体の精製を、ホモ二量体におけるのと同じようにして行った（すなわち、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａを使用した２カラム精製に続いてサイズ排除クロマトグラフィーを行い、その後、必要に応じて濃縮及びバッファー交換を行う）。質量分析または疎水性相互作用クロマトグラフィーを用いて形成されたホモ二量体（例えば、ノブ－ノブ、またはホール－ホールで対合したＦｃ）に対するヘテロ二量体の量を決定した。典型的な調製物では、ポリペプチドの９５％超、しばしば９８％超がヘテロ二量体であった。明確さのため、この方法で作製されたすべての一価ＴｆＲ結合物（Ｆｃホモ二量体）を、ＺＺがポリペプチドの名前であるものとし、「．一価」が一価のＴｆＲ結合を示すものとして「ＺＺ．一価」と命名した。特に断らない限り、ヘテロ二量体ポリペプチド及びポリペプチド－Ｆａｂ融合体において、ＴｆＲ結合を与える変異には「ノブ」変異が含まれたのに対して、ＴｆＲに結合しないＦｃ領域は「ホール」領域とともに用いた。ある場合では、これらのコンストラクトには、Ｌ７Ａ／Ｌ８Ａ、Ｍ２５Ｙ／Ｓ２７Ｔ／Ｔ２９Ｅ、Ｎ２０７Ｓ、または改変されたＦｃγＲもしくはＦｃＲｎ結合に対してそれぞれＮ２０７Ｓ／Ｍ２０１Ｌなど、Ｆｃの特性を変化させる更なる変異も含まれていた。
【０３９１】
ＣＨ３Ｃ．モノＦｃポリペプチドの結合の特性分析
一価のＣＨ３Ｃポリペプチドの結合を、上記に述べた方法の改法を用いてＥＬＩＳＡで測定した。ストレプトアビジンをＰＢＳ中、１μｇ／ｍＬで一晩、９６ウェルＥＬＩＳＡプレートにコーティングした。洗浄後、プレートをＰＢＳ中、１％ＢＳＡでブロッキングした後、ビオチン化したヒトまたはカニクイザルＴｆＲを１μｇ／ｍＬで加え、３０分間インキュベートした。更に洗浄した後、ポリペプチドを各プレートに連続希釈で加え、１時間インキュベートした。各プレートを洗浄し、二次抗体（すなわち、抗κ－ＨＲＰ、１：５０００）を３０分間加え、プレートを再び洗浄した。各プレートをＴＭＢ基質で発色させ、２Ｎ　H_2SO_4でクエンチした後、ＢｉｏＴｅｋ（登録商標）プレートリーダーで４５０ｎｍの吸光度を読み取った。結果を図２４に示すが、これはスタンダード（すなわち、二価のＴｆＲ結合）と一価のＴｆＲ結合ポリペプチドとを直接比較したものである。

Ａｂ２０４は、高親和性の抗ＴｆＲ対照抗体である。

【０３９２】

ヒトＴｆＲを内因性に発現する２９３Ｆ細胞、及びヒトＴｆＲまたはカニクイザルＴｆＲを安定的にトランスフェクトしたＣＨＯ－Ｋ１細胞に対する結合について更に試験を行った（図２５）。

【０３９３】

一般的に、一価のポリペプチドでは二価のポリペプチドと比較してヒトＴｆＲに対して大幅に低下した結合が観察され、一価のポリペプチドではカニクイザルに対する結合は弱すぎてこれらのアッセイで検出されなかった。

【０３９４】

次に、ＣＨ３Ｃポリペプチドの一価のバージョンが、ヒトＴｆＲを発現するＨＥＫ２９３細胞内に内在化するかどうかについて試験した。内在化アッセイについて上記に述べた方法を用いた。二価と一価のポリペプチドを比較した図２６に示されるように、一価のペプチドも内在化することができたが、全体的なシグナルは、恐らくは結合アフィニティー／アビディティーの喪失のために対応する二価のバージョンよりも弱かった。

【０３９５】

バイオレイヤー干渉法によって測定したＣＨ３Ｃポリペプチドの結合速度論

結合速度論を、抗ＢＡＣＥ１　Ｆａｂに融合されたいくつかの一価及び二価ＣＨ３Ｃポリペプチド変異体について測定し、バイオレイヤー干渉法を用いてそれらの二価の相当物と比較した（すなわち、Ｏｃｔｅｔ（登録商標）ＲＥＤシステムを用いた）。ＴｆＲをストレプトアビジンセンサー上に捕捉し、次いでＣＨ３Ｃポリペプチドを結合させて洗い流した。センサーグラムを１：１の結合モデルにフィッティングしたところ、二価ポリペプチドのK_D（ａｐｐ）値は、ＴｆＲ二量体に対する強い結合を示した。結果を、表１０ならびに図２７及び２８に示す。

【０３９６】

（表１０）Ｏｃｔｅｔ（登録商標）ＲＥＤを用いたＣＨ３Ｃポリペプチドの速度論

ポリペプチド	K_D (app) (nM) [ヒトTfR]	K_D (app) (nM) [カニクイザルTfR]
CH3C.35.N163	67	374
CH3C.35.N163.一価	251	n.d.
CH3C.35	59	934
CH3C.35.一価	483	n.d.
CH3C.3.2-1	337	367
CH3C.3.2-5	270	385
CH3C.3.2-19	367	454

不検出＝低すぎる結合シグナルのために測定されず。

【０３９７】

一価のフォーマットに変換されたポリペプチドは、アビディティーの喪失により、有意に弱いK_D（ａｐｐ）値を有した。ＥＬＩＳＡによって上記でヒト及びカニクイザルＴｆＲに対して同様の結合を有することが示されたクローンＣＨ３Ｃ．３．２－１、ＣＨ３Ｃ．３．２－５、及びＣＨ３Ｃ．３．２－１９は、ヒトＴｆＲとカニクイザルＴｆＲ間で極めて近いK_D（ａｐｐ）値も有していた。これらのポリペプチドの一価の形態を試験することを試みたが、このアッセイにおける結合は弱すぎて速度論パラメータは計算できなか

った。

【０３９８】

実施例３　Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）を用いた更なるＣＨ３Ｃ変異体の結合の特性分析

組換えＴｆＲのアピカルドメインのクローン変異体の親和性をＢｉａｃｏｒｅ（商標）Ｔ２００装置を使用して表面プラズモン共鳴により測定した。Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）シリーズＳ　ＣＭ５のセンサーチップを抗ヒトＦａｂとともに固定化した（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅより販売されるヒトＦａｂ捕捉キット）。５μｇ／ｍＬのポリペプチド－Ｆａｂ融合体を各フローセル上に１分間捕捉させ、ヒトまたはカニクイザルアピカルドメインの連続３倍希釈液を流速３０μＬ／分で室温で注入した。各試料を４５秒間の結合及び３分間の解離により分析した。それぞれの注入後、１０ｍＭグリシン－ＨＣｌ（ｐＨ２．１）を用いてチップを再生した。結合応答を、無関連のＩｇＧを同様の密度で捕捉させたフローセルからのＲＵを引くことによって補正した。Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）Ｔ２００　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　ｖ３．１．を用いて平衡状態の応答を濃度に対してフィッティングすることによって、安定状態の親和性を得た。

【０３９９】

組換えＴｆＲ細胞外ドメイン（ＥＣＤ）のクローン変異体の親和性を求めるため、Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）シリーズＳ　ＣＭ５センサーチップをストレプトアビジンとともに固定化した。ビオチン化したヒトまたはカニクイザルＴｆＲのＥＣＤを各フローセル上に１分間捕捉させ、各クローン変異体の連続３倍希釈液を流速３０μＬ／分で室温で注入した。各試料を４５秒間の結合及び３分間の解離により分析した。結合応答を、同様の密度でＴｆＲ　ＥＣＤを有さないフローセルからのＲＵを引くことによって補正した。Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）Ｔ２００　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　ｖ３．１．を用いて平衡状態の応答を濃度に対してフィッティングすることによって、安定状態の親和性を得た。

【０４００】

結合親和性を表１１に要約する。親和性は安定状態のフィッティングにより得た。

【０４０１】

（表１１）更なるＣＨ３Ｃ変異体の結合親和性

クローン	ヒトTfR (uM)	カニクイザル TfR (μM)	ヒトアピカル TfR (uM)	カニクイザル アピカルTfR (uM)
CH3C.35.19.一価	0.4	5.9	0.37	5.6
CH3C.35.20.一価	0.25	6.7	0.17	8
CH3C.35.21.一価	0.1	2.1	0.12	2.2
CH3C.35.24.一価	0.29	3.3	0.23	3
CH3C.35.21.11.一価	0.24	4	0.13	2.2
CH3C.35.21.16.一価	0.18	1.8	0.12	1.9
CH3C.35.21.17.一価	0.3	2.9	0.13	2.6
CH3C.35.一価	0.61	>10	0.61	>10
CH3C.35.N153.一価	0.42	>10	0.95	>10
CH3C.35.二価	0.22	>2	試験せず	試験せず
CH3C.35.N153.二価	0.37	3.3	試験せず	試験せず
CH3C.3.2-19.二価	5.2	5.6	試験せず	試験せず
CH3C.35.19.二価	0.074	1.5	試験せず	試験せず
CH3C.35.20.二価	0.054	1.7	試験せず	試験せず
CH3C.35.21.二価	0.049	0.7	試験せず	試験せず
CH3C.35.24.二価	0.061	0.65	試験せず	試験せず

【０４０２】
実施例４　ＦｃＲｎに対するＣＨ３Ｃ変異体の結合特性
　ＦｏｒｔｅＢｉｏ（登録商標）ストレプトアビジンバイオセンサーを用いたＦｏｒｔｅＢｉｏ（登録商標）Ｏｃｔｅｔ（登録商標）ＲＥＤ３８４装置を使用してＦｃＲｎ結合アッセイを行った。ビオチン化した組換えＢＡＣＥ１をカイネティックバッファー（ＦｏｒｔｅＢｉｏ（登録商標）より入手したもの）中で１０μｇ／ｍＬの濃度に希釈し、個々のバイオセンサー上に１分間捕捉させた。次にベースラインをカイネティックバッファー中で１分間、確立した。１０μｇ／ｍＬのポリペプチド－Ｆａｂ融合体（抗ＢＡＣＥ１　Ｆａｂアームを含むもの）を、１μＭのヒトＴｆＲのＥＣＤの存在下または非存在下でセンサーチップに結合させた。固定化したポリペプチド－Ｆａｂ融合体に対する組換えヒトＦｃＲｎ（ｐＨ５．５）の結合を、３分間の結合及び３分間の分離を行って分析した。
【０４０３】
　これらの実験から得られたセンサーグラム（図２９）は、各ポリペプチド－Ｆａｂ融合体変異体が酸性ｐＨ（ｐＨ５．５）でＦｃＲｎと結合すること、及びＴｆＲとの結合がＦｃＲｎとの結合を顕著に阻害しなかったことを示している。
【０４０４】
実施例５　ＣＨ３Ｃ変異体の薬物動態学的／薬力学的特性分析
　本実施例では、マウスの血漿及び脳組織中での本発明のＣＨ３Ｃ変異体ポリペプチドの薬物動態学的／薬力学的（ＰＫ／ＰＤ）特性分析について述べる。
【０４０５】
野生型マウス血漿中でのＣＨ３Ｃの薬物動態学
　ポリペプチド－Ｆａｂ融合体はヒトＴｆＲにのみ結合し、マウスＴｆＲには結合しないことから、ＴｆＲ介在性クリアランスを有さないモデルにおけるインビボ安定性を示すために野生型マウスでいくつかのＣＨ３Ｃ変異体の薬物動態学（ＰＫ）を試験した。実験計画を下記表１２に示す。６～８週齢のC57Bl6マウスに静脈内投与し、表１２に示される時点において顎下瀉血により生存中瀉血が行われた。血液をＥＤＴＡ血漿チューブに採取し、１４，０００ｒｐｍで５分間遠心した後、血漿を後の分析用に単離した。
【０４０６】
　（表１２）ＰＫ実験計画

グループ	ポリペプチド	時点	N	用量 (IV)
1A/1B	Ab122	A = 30min, 24h, 4d B = 4h, 2d, 7d	A=2 B=3	12.3 mg/kg
2A/2B	Ab153	A = 30min, 24h, 4d B = 4h, 2d, 7d	A=2 B=3	11.4 mg/kg
3A/3B	CH3C.35.163 一価 (Ab153 融合体)	A = 30min, 24h, 4d B = 4h, 2d, 7d	A=2 B=3	11.4 mg/kg
4A/4B	CH3C.3.2-19 (Ab153 融合体)	A = 30min, 24h, 4d B = 4h, 2d, 7d	A=2 B=3	11.0 mg/kg
5A/5B	CH3C.3.2-5 (Ab153 融合体)	A = 30min, 24h, 4d B = 4h, 2d, 7d	A=2 B=3	10.5 mg/kg
6A/6B	CH3C.3.2-1 (Ab153 融合体)	A = 30min, 24h, 4d B = 4h, 2d, 7d	A=2 B=3	10.0 mg/kg

【０４０７】
Ａｂ１２２は、マウスで正常なＰＫを有する抗ＲＳＶ対照として使用した。Ａｂ１５３は、マウスで正常なＰＫを有する抗ＢＡＣＥ１対照として使用した。この実験では、Ａｂ１５３のＦａｂアームを各改変Ｆｃポリペプチドに融合した。
【０４０８】
マウス血漿中のポリペプチド濃度を、ジェネリックのヒトＩｇＧアッセイ（ＭＳＤ（登録商標）ヒトＩｇＧキット＃Ｋ１５０ＪＬＤ－４）を製造者の指示に従って使用して定量した。要約すると、予めコーティングしたプレートをＭＳＤ（登録商標）ＢｌｏｃｋｅｒＡで３０分間ブロッキングした。血漿試料を、Ｈａｍｉｌｔｏｎ（登録商標）ＮＩＭＢＵＳリキッドハンドリング装置を使用して１：２５００で希釈し、ブロッキングしたプレートに２重で加えた。投与溶液も同じプレート上で分析して適正な用量を確認した。標準曲線として０．７８～２００ｎｇ／ｍＬのＩｇＧを、４パラメータロジスティック回帰を用いてフィッティングした。図３０及び表１３は、これらのデータの分析結果を示す。大幅に速いクリアランス及び短い半減期を有していたＣＨ３Ｃ．３．２－５を除き、ＣＨ３Ｃポリペプチド変異体のすべてが、標準Ａｂ１２２と同等のクリアランス及び半減期の値を有していた。興味深い点として、この変異体はＣＨ３Ｃ．３．２－１９（Ｎ１６３Ｄ）の点変異体であり、後者は正常なＰＫプロファイルを有していた。
【０４０９】
（表１３）ＣＨ３Ｃポリペプチド－Ｆａｂ融合体のＰＫパラメータ

ポリペプチド	クリアランス（mg/日/kg）	半減期（日）
Ab122	6.12	9.12
Ab153	9.11	4.74
CH3C.35.N163 一価　(Ab153 融合体)	8.44	5.35
CH3C.3.2-19 (Ab153 融合体)	10.3	5.42
CH3C.3.2-5 (Ab153 融合体	21.0	1.90
CH3C.3.2-1 (Ab153 融合体)	9.25	4.65

【０４１０】

野生型マウスにおける更なるＰＫ実験

下記表１４の実験計画に従って野生型マウスで第２のＰＫ実験を行った（すべてのポリペプチド－Ｆａｂ融合体はＡｂ１５３　Ｆａｂと融合させたもの）。

【０４１１】

（表１４）

ポリペプチド	用量 (mg/kg)	時点	n/群
Ab153	10	0.5h, 1d, 4d, 7d	3
CH3C.35.21.一価	10	0.5h, 1d, 4d, 7d	3
CH3C.35.24.一価	10	0.5h, 1d, 4d, 7d	3
CH3C.35.21.16.一価	10	0.5h, 1d, 4d, 7d	3
CH3C.35.21.17.一価	10	0.5h, 1d, 4d, 7d	3
CH3C.35.20.二価	10	0.5h, 1d, 4d, 7d	3
CH3C.35.21.二価	10	0.5h, 1d, 4d, 7d	3

【０４１２】

マウス及び試料を上記の実験で述べたようにして処理した。データを表１５に示す。

【０４１３】

（表１５）ＣＨ３Ｃ．３５ポリペプチド－Ｆａｂ融合体のクリアランス値

試験ポリペプチド	クリアランス（mg/日/kg）
Ab153	9.53
CH3C.35.21.一価	8.99
CH3C.35.24.一価	9.00
CH3C.35.21.16.一価	11.6
CH3C.35.21.17.一価	10.9
CH3C.35.20.二価	7.13
CH3C.35.21.二価	11.6

【０４１４】

クリアランス値から明らかなように、これらのポリペプチド－Ｆａｂ融合体は、標準対照抗体と比較して野生型マウスで同様のクリアランスを示した。

【０４１５】

野生型マウスの脳組織における一価ＣＨ３Ｃ．３５．Ｎ１６３のＰＫ／ＰＤの評価

マウスＴｆｒｃ遺伝子内でヒトＴｆｒｃアピカルドメインを発現するトランスジェニックマウスを、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９技術を用いて作製した。得られたキメラＴｆＲを内

因性プロモーターの制御下でインビボで発現させた。

【０４１６】

キメラｈｕＴｆＲ^{アピカル}ヘテロ接合体マウス（ｎ＝４／群）に４２ｍｇ／ｋｇのＡｂ１５３または一価ＣＨ３Ｃ．３５．Ｎ１６３のいずれかを静脈内投与し、野生型マウス（ｎ＝３）に５０ｍｇ／ｋｇの対照ヒトＩｇＧ１を静脈内投与した。Ａｂ１５３は、マウスで正常なＰＫを有する対照として使用した。すべてのマウスを投与２４時間後にＰＢＳで灌流した。灌流に先立ち、血液をＥＤＴＡ血漿チューブ中に心穿刺により採取し、１４，０００ｒｐｍで５分間遠心した。次いで、後のＰＫ及びＰＤ分析用に血漿を単離した。灌流後の脳を摘出し、脳半球を分離して組織重量の１０倍のＰＢＳ中、１％ＮＰ－４０（ＰＫ用）または５Ｍ　ＧｕＨＣｌ（ＰＤ用）中でホモジナイズした。

【０４１７】

図３１は、脳のＰＫ実験の結果を示す。取り込みは、一価ＣＨ３Ｃ．３５．Ｎ１６３のグループで、Ａｂ１５３及び対照ヒトＩｇＧ１グループよりも大きかった。

【０４１８】

ｈＴｆＲ$^{アピカル＋／＋}$マウスにおけるポリペプチド－Ｆａｂ融合体の脳及び血漿中のＰＫＰＤ：ＣＨ３Ｃ．３５．２１及びＣＨ３Ｃ．３５．Ｎ１５３

表１６の実験計画に示されるようにして、ホモ接合体ｈＴｆＲ$^{アピカル＋／＋}$マウスに５０ｍｇ／ｋｇの抗ＢＡＣＥ１抗体Ａｂ１５３、抗ＴｆＲ／ＢＡＣＥ１二重特異性抗体Ａｂ１１６、Ａｂ１５３のＦａｂと融合したＣＨ３Ｃ．３５．２１．一価、またはＡｂ１５３のＦａｂと融合したＣＨ３Ｃ．３５．Ｎ１５３．一価のいずれかを静脈内注射した。この実験では、すべてのＦｃはエフェクター機能を除去するためのＬＡＬＡＰＧ変異を有していた。

【０４１９】

（表１６）シングルポイントの脳及び血漿ＰＫＰＤ実験の実験計画

ポリペプチド	hTfR 親和性 (nM)	用量 (mg/kg)	時点 (日目)	n/群
Ab153	n/a	50	1	8
Ab116	330	50	1	8
CH3C.35.21.一価	160	50	1	8
CH3C.35.N153.一価	370	50	1	8

【０４２０】

２４時間後、血液を心穿刺により採取し、マウスをＰＢＳで灌流した。脳組織を組織重量の１０倍のＰＢＳ中、１％ＮＰ－４０を含む溶解バッファー中でホモジナイズした。凝固を防止するために血液をＥＤＴＡチューブ中に採取し、１４，０００ｒｐｍで７分間遠心して血漿を単離した。マウス血漿及び脳ライセート中のポリペプチド濃度を、ジェネリックのヒトＩｇＧアッセイ（ＭＳＤヒトＩｇＧキット＃Ｋ１５０ＪＬＤ）を製造者の指示に従って使用して定量した。要約すると、予めコーティングしたプレートをＭＳＤ　Ｂｌｏｃｋｅｒ　Ａで３０分間ブロッキングした。血漿試料を、Ｈａｍｉｌｔｏｎ　Ｎｉｍｂｕｓリキッドハンドリング装置を使用して１：１０，０００で希釈し、ブロッキングしたプレートに２重で加えた。脳試料を１％ＮＰ４０溶解バッファー中でホモジナイズし、ライセートをＰＫ分析用に１：１０に希釈した。投与溶液も同じプレート上で分析して適正な用量を確認した。標準曲線として０．７８～２００ｎｇ／ｍＬのＩｇＧを、４パラメータロジスティック回帰を用いてフィッティングした。

【０４２１】

２４時間後のＴｆＲ結合ポリペプチドの血漿濃度は、抗ＢＡＣＥ１の濃度よりも低かったが、これは、末梢で発現したｈＴｆＲ^{アピカル}との結合を介したこの抗体のクリアランスによるものと考えられる（図３２（Ａ））。脳では、抗ＢＡＣＥ１と比較して抗ＴｆＲ／

ＢＡＣＥ１の濃度に有意な増加が認められた（図３２（Ｂ））。最大の増加はＣＨ３Ｃ．３５．２１．一価で観察されたが、脳での取り込みは、ＣＨ３Ｃ３５．Ｎ１５３．二価でも抗ＢＡＣＥと比較して有意に改善した。操作されたＴｆＲ結合ポリペプチドのこのような顕著な蓄積は、ＢＢＢにおけるＴｆＲ介在性トランスサイトーシスによるものであり、したがって、ＴｆＲとの結合性をＦｃ領域に遺伝子操作によって組み込むことの有用性を証明するものである。

【０４２２】

アミロイド前駆体タンパク質ＡＰＰの切断のＢＡＣＥ１阻害を、血漿及び脳における抗体活性の薬力学的指示値として用いた。脳組織を組織重量の１０倍の５Ｍグアニジン－ＨＣｌ中でホモジナイズし、次いでＰＢＳ中、０．２５％カゼインバッファー中で１：１０に希釈した。サンドイッチＥＬＩＳＡを用いて血漿及び脳ライセート中のマウスＡβ４０濃度を測定した。３８４ウェルＭａｘｉＳｏｒｐプレートに、Ａβ４０ペプチドのＣ末端に特異的なポリクローナル捕捉抗体（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ＃ＡＢＮ２４０）を一晩コーティングした。カゼインで希釈したグアニジン脳ライセートをＥＬＩＳＡプレート上で更に１：２に希釈し、検出抗体としてビオチン化Ｍ３．２を同時に加えた。血漿を１：５の希釈度で分析した。各試料を４℃で一晩インキュベートした後、ストレプトアビジン－ＨＲＰ、次いでＴＭＢ基質を加えた。標準曲線として０．７８～５０ｐｇ／ｍＬのｍｓＡβ４０を、４パラメータロジスティック回帰を用いてフィッティングした。

【０４２３】

すべてのポリペプチドで抗ＢＡＣＥ１　Ｆａｂアームが存在することにより、血漿中のアミロイドベータタンパク質（Ａβ）は、非処理の野生型マウスと比較してすべてのポリペプチドで同様の程度で低下した（図３３（Ａ））。抗ＢＡＣＥ１と比較して、ＴｆＲ結合ポリペプチドによる処置は、ｈＴｆＲ$^{アピカル+/+}$マウスにおけるＡβの大きな低下を生じ、脳におけるＢＡＣＥ１と標的の結合が得られたことを示した（図３３（Ｂ））。脳における標的結合のレベルは、操作したポリペプチド融合体と抗ＴｆＲ／ＢＡＣＥ１二重特異性抗体とで同様であった。

【０４２４】

ｈＴｆＲ$^{アピカル+/+}$マウスにおけるポリペプチド－Ｆａｂ融合体の脳及び血漿中のＰＫＰＤ：ＣＨ３Ｃ．３５．２１、ＣＨ３Ｃ．３５．２０、ＣＨ３Ｃ．３５、ＣＨ３Ｃ．３５．２３、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．３

ＰＫ及び脳での取り込みに対するＴｆＲ結合親和性の影響を評価するため、Ｂｉａｃｏｒｅによって測定されるアピカルヒトＴｆＲに対する結合親和性の異なる抗ＢＡＣＥ１Ａｂ１５３及びＴｆＲ結合ポリペプチド融合体（ＣＨ３Ｃ．３５．２１：Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ．３５．２０：Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ．３５：Ａｂ１５３融合体）を作製した。ヒトＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ．３５．２１：Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ．３５．２０：Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ．３５：Ａｂ１５３融合体の結合親和性はそれぞれ、１００ｎＭ、１７０ｎＭ、及び６２０ｎＭである。ｈＴｆＲアピカル$^{+/+}$マウスノックインマウスに、５０ｍｇ／ｋｇのＡｂ１５３または各ポリペプチド－Ｆａｂ融合体を全身投与し、血漿ＰＫ及び脳ＰＫＰＤを投与の１、３、及び７日後に評価した。脳及び血漿ＰＫＰＤ分析を上記のセクションで述べたようにして行った。末梢組織でのＴｆＲの発現により、ＣＨ３Ｃ．３５．２１：Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ．３５．２０：Ａｂ１５３、及びＣＨ３Ｃ．３５：Ａｂ１５３融合体は、Ａｂ１５３単独と比較して血漿中のより速やかなクリアランスを示したが、これは、標的介在性のクリアランスと一致し、インビボでのＴｆＲ結合を示すものである（図４４（Ａ））。印象的な点として、ＣＨ３Ｃ．３５．２１：Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ．３５．２０：Ａｂ１５３、及びＣＨ３Ｃ．３５：Ａｂ１５３融合体の脳内濃度は、Ａｂ１５３と比較して有意に増大し、同じ時点におけるＡｂ１５３がわずかに約３ｎＭであったのと比較して投与後１日目に３０ｎＭよりも高い最大脳内濃度が得られた（図４４（Ｂ））。ＣＨ３Ｃ．３５．２１：Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ．３５．２０：Ａｂ１５３、及びＣＨ３Ｃ．３５：Ａｂ１５３融合体の脳曝露の増大は、Ａｂ１５３を投与したマウスにおけるＡβ濃度と比較して、マウスの脳で約５５～６０％低い内因性のマウスＡβ濃度を生じた

（図４４（Ｃ））。ＣＨ３Ｃ．３５．２１：Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ．３５．２０：Ａｂ１５３、及びＣＨ３Ｃ．３５：Ａｂ１５３融合体の濃度が脳で高い状態に保たれた一方で、このようなより低い脳のＡβ濃度は維持され、７日目までに曝露が低減された際にＡｂ１５３で処置したマウスと同様の濃度に戻った。経時的な脳曝露の低下は、ＣＨ３Ｃ．３５．２１：Ａｂ１５３、ＣＨ３Ｃ．３５．２０：Ａｂ１５３、及びＣＨ３Ｃ．３５：Ａｂ１５３融合体の末梢曝露の低下と相関しており、インビボでの明確なＰＫ／ＰＤの関係を示した（図４４（Ａ）と４４（Ｃ）とを比較）。更に、全体の脳のＴｆＲ濃度は、この単回の高用量の投与後にＡｂ１５３処理マウスとポリペプチド－Ｆａｂ融合体処理マウスとで同等であり、脳におけるＴｆＲ発現に対して、ポリペプチド－Ｆａｂ融合体の脳曝露の増加が有意な影響を及ぼさないことを示している（図４４（Ｄ））。

【０４２５】

ＴｆＲ結合ポリペプチド－Ｆａｂ融合体のより広い親和性範囲でのＰＫと脳での取り込みとの関係を更に評価するため、ｈＴｆＲとの結合についてより広い親和性範囲を有する更なる融合体を作製した。ヒトＴｆＲに対するＣＨ３Ｃ．３５．２３：Ａｂ１５３及びＣＨ３Ｃ．３５．２３．３：Ａｂ１５３融合体の結合親和性は、それぞれ４２０ｎＭ及び１４４０ｎＭである。ｈＴｆＲアピカル$^{+}$／$^{+}$ノックインマウスに上記に述べたように投与を行った。血漿のＰＫ及び脳のＰＫＰＤを投与の１、４、７、及び１０日後に評価した。ポリペプチド－Ｆａｂ融合体の末梢でのＰＫはｈＴｆＲ親和性に依存しており、より親和性の高いＣＨ３Ｃ．３５．２３：Ａｂ１５３融合体は、大幅に低い親和性を有するＣＨ３Ｃ．３５．２３．３：Ａｂ１５３融合体と比較してより速やかなクリアランスを示した（図４５（Ａ））。ＣＨ３Ｃ．３５．２３：Ａｂ１５３及びＣＨ３Ｃ．３５．２３．３：Ａｂ１５３融合体はいずれも、Ａｂ１５３単独と比較して有意に高い脳曝露を有し、ＣＨ３Ｃ．３５．２３：Ａｂ１５３は投与後１日目に脳内で約３６ｎＭに達した（図４５（Ｂ））。血漿中濃度が同様であったにもかかわらず、ＣＨ３Ｃ．３５．２３．３：Ａｂ１５３融合体のこの最大の脳での取り込みは、ＣＨ３．３５．２３：Ａｂ１５３融合体の脳での取り込みよりも低く、これは恐らくは後者の融合体のｈＴｆＲに対する親和性が約３．５倍低いことによるものと考えられる。興味深い点として、親和性のより低い融合体が１０日目までにより持続した末梢曝露を与えたことから、その脳曝露も親和性のより高いＣＨ３Ｃ．３５．２３：Ａｂ１５３融合体よりも高かった。このことは、親和性のより低いＴｆＲ結合ポリペプチド－Ｆａｂ融合体では脳C_{max}はより低いがＰＫは経時的により持続するというトレードオフを示している。Ａβ４０の有意に低い濃度が、抗ＢＡＣＥ１単独と比較して抗ＢＡＣＥ１ポリペプチド融合体を投与したマウスの脳で観察された（図４５（Ｃ））。このＡβ４０低下の持続時間は、脳におけるｈｕＩｇＧ１曝露の経時的なレベルと一致していた（図４５（Ｂ））。印象的な点として、ＣＨ３Ｃ．３５：Ａｂ１５３融合体を投与したマウスは、単回投与の７～１０日後まで持続的な脳のＡβ４０の低下を示した。全体的な脳のＴｆＲ濃度は、ＣＨ３Ｃ．３５：Ａｂ１５３融合体に対してＡｂ１５３を投与したマウス間で投与後１日目に同等であった（図４５（Ｄ））。これらのデータは共に、ＴｆＲ結合ポリペプチド融合体が抗ＢＡＣＥ１の脳曝露を増大させることにより単回投与後に脳のＡβ４０を有意に低下させ得ることを示すものである。

【０４２６】

実施例６　ＣＨ３Ｃ．１８Ｆｃ及びトランスフェリン受容体アピカルドメインの結晶化

本実施例では、ＣＨ３Ｃ．１８とトランスフェリン受容体のアピカルドメイン（ＴｆＲ－ＡＤ）との間の結合界面の結晶化及び分析について述べる。

【０４２７】

発現

ヒトトランスフェリン受容体のアピカルドメイン（ＴｆＲ－ＡＤ）及び操作されたヒトＦｃ（ＣＨ３Ｃ．１８　Ｆｃ）を、Ｅｘｐｉ２９３細胞内で、２．５ｘ１０^{6}細胞／ｍＬの初期細胞密度で発現させた（それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０１及び３０２）。必要に応じて、２００ｍＬ以上の体積中で発現を行った。グリコシル化阻害剤であるキフネンシンをトランスフェクションの２０時間後に２５μＭの最終濃度で加えた。発現培養物を、

細胞生存率が顕著に低下するトランスフェクションの３～４日後に回収した。
【０４２８】
精製
発現させたＴｆＲ－ＡＤ及びＣＨ３Ｃ．１８　Ｆｃを、それぞれＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ及びＮｉ－ＮＴＡ樹脂を用いて精製した後、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００　２６／６０ゲル濾過カラムでサイズ排除クロマトグラフィーにかけた。以下のバッファーを使用した。
Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ洗浄バッファー：２０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ　ｐＨ７．４、１００ｍＭ　ＮａＣｌ；
Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ溶出バッファー：３０ｍＭグリシン、ｐＨ２．５（溶出液を１Ｍ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ９．０の入ったチューブに回収して溶出液を直ちに中和した）；
Ｎｉ－ＮＴＡ洗浄バッファー：３０ｍＭ　ＴｒｉｓｐＨ、１０ｍＭイミダゾール、及び２００ｍＭ　ＮａＣｌ；
Ｎｉ－ＮＴＡ溶出バッファー：３０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．０、２００ｍＭ　ＮａＣｌ、及び２５０ｍＭイミダゾール；ならびに
サイズ排除バッファー（ＳＥＣ）：３０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、２００ｍＭ　ＮａＣｌ、及び３％グリセロール。
【０４２９】
複合体の形成及び精製
精製したＴｆＲ－ＡＤ及びＣＨ３Ｃ．１８　Ｆｃを過剰量のアピカルドメインと混合し、室温で１時間インキュベートし、上記に述べたＳＥＣバッファーを使用してＳｕｐｅｒｄｅｘ２００　２６／６０ゲル濾過カラムでサイズ排除クロマトグラフィーを用いて複合体を精製した。サイジングによって、一方が複合体（保持容量＝１８０ｍｌ）に対応し、他方が過剰のアピカルドメイン（保持容量＝２４０ｍｌ）に対応した、２つの主要なピークが予想通り得られた。ピーク画分をクマシー染色したＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルによって分析した（図３４）。
【０４３０】
結晶化
シッティングドロップ蒸気拡散法により、１５℃及び室温（ＲＴ）で、８．５ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度で複合体の初期結晶化スクリーニングを行った。２５％ＰＥＧ３３５０、０．１Ｍ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．５、及び０．２Ｍ　$MgCl_2$を含む条件で細い針状の結晶のシャワーが観察された。これらの結晶を、２０％ＰＥＧ３３５０を用いた以外は同じ条件で種結晶として用いてマウントできるサイズの単一の細い針結晶を生成させた。
【０４３１】
Ｘ線データの収集
２０％（ｖ／ｖ）エチレングリコールを添加した結晶化母液を用いて液体窒素中に直接浸漬することによって結晶をフラッシュ冷却した。Ｒａｙｏｎｉｘ３００高速検出器を用い、Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｐｈｏｔｏｎ　Ｓｏｕｒｃｅ（ＡＰＳ）のＳＥＲ－ＣＡＴのビームラインでＸ線強度のデータを収集した。結晶は３．６Åに回折し、２個の複合体分子が非対称単位中にある六角形の空間群$P6_4$に属した（表１７）。データをＨＫＬ２０００プログラムを使用してインデックス付けし、積分して、スケーリングした。２個の結晶から収集したデータをマージして３．６Åのデータを生成した。
【０４３２】
（表１７）ＣＨ３Ｃ．１８　Ｆｃ－ＴｆＲ－ＡＤ複合体構造の結晶データ

名称/コード		CH3C.18 Fc-TfR-AD 複合体
セルの寸法	a (Å)	124.3
	b	124.3
	c	113.1
	α (°)	90.0
	β	90.0
	γ	120.0
空間群		$P6_4$
分解能範囲 (Å)	全体	50–3.6
	最外殻	3.71-3.6
固有反射の回数		11,259
完全性 (%)	(全体/最外殻)	95.9/74.1
$R_{マージ}$[1]	(全体/最外殻)	20/93
精密化統計値	分解能 (Å)	50-3.6
	R因子[2]/Rfree (%)	30/39

[1] $R_{マージ} = \Sigma_j(|I_h - \langle I \rangle_h|)/\Sigma I_h$、式中、$\langle I_h \rangle$は、対称等価(symmetry equivalent)上の平均強度。

[2] $R_{因子} = \Sigma |F_{観測値} - F_{計算値}| / \Sigma |F_{観測値}|$

【０４３３】

構造決定及び精密化

複合体の結晶構造を、ＣＨ３Ｃ．１８　Ｆｃの二量体及びＴｆＲ－ＡＤの単量体を初期探索モデルとして用いてＰＨＡＳＥＲによる分子置換により決定した。このモデルを、ＲＥＦＭＡＣを用いて剛体精密化に続いて制限精密化を行って精密化した。結晶学的計算はすべて、ＣＣＰ４プログラムスイートを用いて実行した（www.ccp4.ac.uk/）。グラフィックプログラムＣＯＯＴを使用して複合体の電子密度へのモデル構築を行った。複合体分子の電子密度は、特にＣＨ３Ｃ．１８　Ｆｃ－ＴｆＲ－ＡＤの界面において良好であった（２Ｆｏ－Ｆｃマップを１．２シグマレベルに合わせた）。モデル構築及び精密化を繰り返し行った後、データの低い分解能及び無秩序化したＣＨ２ドメインのため、高いＲ及びｆｒｅｅＲが認められた（Ｒ／ｆｒｅｅＲ＝０．３０／０．３９）。他の利用可能なＦｃ構造に見られたＣＨ２の無秩序は、ＣＨ２とＣＨ３ドメインとの間の柔軟なエルボー角によるものであった。

【０４３４】

結合界面の相互作用
　ＣＨ３Ｃ．１８　ＦｃとＴｆＲ－ＡＤとの結合界面が図３５（Ａ）及び図３５（Ｂ）ならびに図３６（Ａ）及び３６（Ｂ）に示されている。図３７（Ａ）及び図３７（Ｂ）に示されるように、
　ＣＨ３Ｃ．１８のＴｒｐ１５４と、ＴｆＲ－ＡＤのＡｒｇ２０８；
　ＣＨ３Ｃ．１８のＧｌｕ１５５と、ＴｆＲ－ＡＤのＡｒｇ２０８；
　ＣＨ３Ｃ．１８のＳｅｒ１５６と、ＴｆＲ－ＡＤのＡｒｇ２０８及びＬｅｕ２１２；
　ＣＨ３Ｃ．１８のＬｅｕ１５７と、ＴｆＲ－ＡＤのＳｅｒ１９９及びＡｓｎ２１５；
　ＣＨ３Ｃ．１８のＨｉｓ１５９と、ＴｆＲ－ＡＤのＬｙｓ１８８、Ｓｅｒ１９９、及びＡｒｇ２０８；
　ＣＨ３Ｃ．１８のＶａｌ１６０と、ＴｆＲ－ＡＤのＧｌｙ２０７及びＡｒｇ２０８；
　ＣＨ３Ｃ．１８のＴｒｐ１６１と、ＴｆＲ－ＡＤのＡｒｇ２０８、Ｖａｌ２１０、及びＬｅｕ２１２；
　ＣＨ３Ｃ．１８のＡｌａ１６２と、ＴｆＲ－ＡＤのＡｒｇ２０８；
　ＣＨ３Ｃ．１８のＶａｌ１６３と、ＴｆＲ－ＡＤのＬｅｕ２０９；
　ＣＨ３Ｃ．１８のＳｅｒ１８８と、ＴｆＲ－ＡＤのＴｙｒ２１１；
　ＣＨ３Ｃ．１８のＴｈｒ１８９と、ＴｆＲ－ＡＤのＴｙｒ２１１及びＬｅｕ２１２；
　ＣＨ３Ｃ．１８のＧｌｎ１９２と、ＴｆＲ－ＡＤのＬｙｓ１５８及びＧｌｕ２９４；
　ＣＨ３Ｃ．１８のＴｒｐ１９４と、ＴｆＲ－ＡＤのＬｅｕ２１２、Ｖａｌ２１３、Ｇｌｕ２１４、及びＡｓｎ２１５；ならびに
　ＣＨ３Ｃ．１８のＰｈｅ１９６と、ＴｆＲ－ＡＤのＡｒｇ２０８
の間で相互作用が認められた。
【０４３５】
　更に、実施例２の「パラトープマッピング」と題したセクションで述べ、また、図３７（Ａ）及び図３７（Ｂ）に示されるように、ＣＨ３Ｃレジスターの外側のいくつかの位置もＴｆＲに対する結合に関与している。
【０４３６】
並べ替えを行ったＴｆＲアピカルドメインコンストラクトと天然の完全長ＴｆＲとの間でのエピトープ及び３次元構造の保存レベルの決定
　並べ替えを行ったＴｆＲアピカルドメイン（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０１）に結合したＣＨ３Ｃ．１８　Ｆｃポリペプチドの３．６ÅのＸ線結晶構造を上記に述べたようにして解析した。並べ替えを行ったＴｆＲアピカルドメインと代表的な完全長ＴｆＲ構造（ＰＤＢコード：３ＫＡＳ）のアピカルドメインとの構造アラインメントによって、保存されたフォールド（並べ替えを行ったアミノ酸の外側）が明らかとなった。２つの構造間の平均二乗偏差（ＲＭＳＤ）は１．２４Åであった。ＴｆＲの残基１９４～２９７及び３２６～３７９を、並べ替えを行った構造中の対応する残基とアラインしてＲＭＳＤを計算した。構造アラインメント及びＲＭＳＤの計算は、ＭＯＥ ｖ２０１６．０８０２（Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ　Ｇｒｏｕｐ）で行った。１．２４Åの低いＲＭＳＤは保存されたアピカルドメインの３次元構造を反映しており、並べ替えを行った構造が天然のフォールドを維持し、結合のための保存されたエピトープまたは抗原を提示することができたことを示す。
【０４３７】
実施例７　ＣＨ３Ｃ．３５　Ｆｃ及びトランスフェリン受容体アピカルドメインの結晶化
　本実施例では、ＣＨ３Ｃ．３５とトランスフェリン受容体のアピカルドメイン（ＴｆＲ－ＡＤ）との間の結合界面の結晶化及び分析について述べる。
【０４３８】
発現
　ヒトトランスフェリン受容体のアピカルドメイン（ＴｆＲ－ＡＤ）及び操作されたヒトＦｃ（ＣＨ３Ｃ．３５　Ｆｃ）を、ＣＨＯ細胞内で、２．５ｘ１０^{6}細胞／ｍＬの初期細胞密度で発現させた（それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０１及び４２１）。必要に応じて、

５００ｍＬ以上の体積中で発現を行った。発現培養物を、細胞生存率が顕著に低下するトランスフェクションの３～４日後に回収した。

【０４３９】

精製

発現させたＴｆＲ－ＡＤ及びＣＨ３Ｃ．３５　Ｆｃを、それぞれＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ（Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔ）及びＮｉ－ＮＴＡ（Ｓｉｇｍａ）樹脂を用いて精製した後、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００　２６／６０ゲル濾過カラムでサイズ排除クロマトグラフィーにかけた。以下のバッファーを使用した。

Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ溶出バッファー：３０ｍＭグリシン、ｐＨ２．５（溶出液を１Ｍ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ９．０の入ったチューブに回収して溶出液を直ちに中和した）；

Ｎｉ－ＮＴＡ溶出バッファー：３０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．０、２００ｍＭ　ＮａＣｌ、及び２５０ｍＭイミダゾール；ならびに

サイズ排除バッファー（ＳＥＣ）：３０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、５０ｍＭ　ＫＣｌ、３％グリセロール、及び０．０１％アジ化ナトリウム。

【０４４０】

複合体の形成及び精製

精製したＴｆＲ－ＡＤ及びＣＨ３Ｃ．３５　Ｆｃを過剰量のアピカルドメインと混合し、室温で１時間インキュベートし、上記に述べたＳＥＣバッファーを使用してＳｕｐｅｒｄｅｘ２００　２６／６０ゲル濾過カラムでサイズ排除クロマトグラフィーを用いて複合体を精製した。

【０４４１】

結晶化

シッティングドロップ蒸気拡散法により、４℃、１５℃、及び室温（ＲＴ）で、複合体の初期結晶化スクリーニングを行った。２５％ＰＥＧ３３５０、０．１Ｍ　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ　ｐＨ６．５、及び０．２Ｍ　ＬｉＳＯ$_4$を含む条件で細い針状の結晶のシャワーが観察された。これらの結晶を、２０％ＰＥＧ３３５０を用いた以外は同じ条件で種結晶として用いて単一の細い針結晶を生成させ、シーディングを連続して４回繰り返してマウントできるサイズの結晶を生成させた。

【０４４２】

Ｘ線データの収集

２０％（ｖ／ｖ）エチレングリコールを添加した結晶化母液を用いて液体窒素中に直接浸漬することによって結晶をフラッシュ冷却した。ＰＩＬＡＴＵＳ検出器を用い、Ｄｉａｍｏｎｄ　Ｌｉｇｈｔ　Ｓｏｕｒｃｅ（ＤＬＳ）のＩＯ４ビームラインでＸ線強度のデータを収集した。５ミクロンのサイズのマイクロフォーカスビームをデータ収集に使用した。結晶は３．３８Åに回折し、２個の複合体分子が非対称単位中にある六角形の空間群Ｐ６$_4$に属した（表１８）。ＣＣＰ４スイートプログラム（Ｘｉａ２－ＸＤＳ及びＸＳＣＡＬＥ）を使用してデータをインデックス付けし、積分して、スケーリングした。

【０４４３】

（表１８）ＣＨ３Ｃ．３５　Ｆｃ－ＴｆＲ－ＡＤ複合体構造の結晶データ

名称/コード		CH3C.35 Fc-TfR-AD 複合体
セルの寸法	a (Å)	126.4
	b	126.4
	c	113.8
	α (°)	90.0
	β	90.0
	γ	120.0
空間群		$P6_4$
分解能範囲 (Å)	全体	50–3.38
	最外殻	3.44-3.38
固有反射の回数		14,541
完全性 (%)	(全体/最外殻)	100/99.7
$R_{マージ}$[1]	(全体/最外殻)	31/152
精密化統計値	分解能 (Å)	50-3.38
	R因子[2]/Rfree (%)	27/35

[1] $R_{マージ} = \Sigma_j(|I - \langle I \rangle_h|)/\Sigma I$、式中、$\langle I_h \rangle$は、対称等価(symmetry equivalent)上の平均強度。

[2] R因子 ＝ Σ |観測値-F計算値| / Σ |観測値|

【０４４４】

構造決定及び精密化

複合体の結晶構造を、ＣＨ３Ｃ．３５Ｆｃ－ＡＤ　ＴｆＲ複合体を探索モデルとして用いてＰＨＡＳＥＲによる分子置換により決定した。このモデルを、ＲＥＦＭＡＣを用いて剛体精密化に続いて制限精密化を行って精密化した。結晶学的計算はすべて、ＣＣＰ４プログラムスイートを用いて実行した。グラフィックプログラムＣＯＯＴを使用して複合体の電子密度へのモデル構築を行った。複合体分子の電子密度は、特にＣＨ３Ｃ．３５　Ｆｃ－ＴｆＲ－ＡＤの界面において良好であった。

【０４４５】

結合界面の相互作用

ＣＨ３Ｃ．３５　ＦｃとＴｆＲ－ＡＤとの結合界面が図３９（Ａ）～３９（Ｃ）に示されている。図３９（Ａ）は、３．４ÅにおけるＣＨ３Ｃ．３５　ＦｃとＴｆＲ－ＡＤとの複合体を示す。図３９（Ｂ）は、ＣＨ３Ｃ．３５　Ｆｃ内の残基Ｗ１６１がＴｆＲ－ＡＤ内の残基Ｌ２０９、Ｌ２１２、及びＹ２１１によって安定化されていることを示す。図３

９（Ｃ）は、ＣＨ３Ｃ．３５　Ｆｃ内の残基Ｅ１６０とＴｆＲ－ＡＤ内の残基Ｒ２０８間の中心的結合相互作用としての塩橋を示す。この相互作用は、改変ＦｃポリペプチドのヒトＴｆＲに対する結合親和性（２０８位のＡｒｇ）とカニクイザルＴｆＲに対する結合親和性（２０８位のＧｌｙ）との差を一部説明し得る。図４０（Ａ）は、ＣＨ３Ｃ．３５　ＦｃとＴｆＲ－ＡＤとの複合体と、ＣＨ３Ｃ．１８　ＦｃとＴｆＲ－ＡＤとの複合体（実施例６で述べたもの）とを重ね合わせた構造を示し、ＣＨ３Ｃ．１８とＣＨ３Ｃ．３５との間で大きなＦｃ骨格のコンフォメーション変化がみられないことを示している。図４０（Ｂ）は、図４０（Ａ）の重ね合わせ構造の拡大図を示す。ＣＨ３Ｃ．３５　Ｆｃ／ＴｆＲ－ＡＤ複合体のＴｆＲ－ＡＤ内の残基２０６～２１２は、ＣＨ３Ｃ．１８　Ｆｃ／ＴｆＲ－ＡＤ複合体のＴｆＲ－ＡＤ内の残基とは異なるコンフォメーションを取っていた。ＴｆＲ－ＡＤ内の残基Ｒ２０８は、ＣＨ３Ｃ．１８　Ｆｃ／ＴｆＲ－ＡＤ複合体の表面内に埋もれているようにみえるが、ＣＨ３Ｃ．３５　Ｆｃ／ＴｆＲ－ＡＤ複合体では溶媒に露出しているようにみえる。更に、ＣＨ３Ｃ．３５　Ｆｃ／ＴｆＲ－ＡＤ複合体のＴｆＲ－ＡＤの残基Ｌ２０９は、１８０°回転されて表面に結合しているようにみえるが、ＣＨ３Ｃ．１８　Ｆｃ／ＴｆＲ－ＡＤ複合体では表面から離れているようにみえる。

【０４４６】

図４１Ａ及び図４１Ｂに示されるように、

ＣＨ３Ｃ．３５のＴｈｒ１５９と、ＴｆＲ－ＡＤのＧｌｙ２０７、Ａｒｇ２０８、Ｌｙｓ１８８、及びＬｅｕ２０９；

ＣＨ３Ｃ．３５のＧｌｕ１６０と、ＴｆＲ－ＡＤのＡｒｇ２０８及びＬｅｕ２０９；

ＣＨ３Ｃ．３５のＳｅｒ１６２と、ＴｆＲ－ＡＤのＡｒｇ２０８及びＬｅｕ２０９；

ＣＨ３Ｃ．３５のＳｅｒ１５６と、ＴｆＲ－ＡＤのＬｅｕ２０９；

ＣＨ３Ｃ．３５のＴｒｐ１６１と、ＴｆＲ－ＡＤのＬｅｕ２０９、Ｔｙｒ２１１、及びＬｅｕ２１２；

ＣＨ３Ｃ．３５のＧｌｕ１８９と、ＴｆＲ－ＡＤのＴｙｒ２１１及びＬｅｕ２１２；

ＣＨ３Ｃ．３５のＰｈｅ１９４と、ＴｆＲ－ＡＤのＬｅｕ２１２、Ａｓｎ２１５、及びＶａｌ２１３；

ＣＨ３Ｃ．３５のＴｙｒ１５７と、ＴｆＲ－ＡＤのＬｅｕ２１２、Ａｓｎ２１５、及びＳｅｒ１９９；

ＣＨ３Ｃ．３５のＧｌｎ１９２と、ＴｆＲ－ＡＤのＶａｌ２１３及びＬｙｓ１５８；ならびに

ＣＨ３Ｃ．３５のＰｈｅ１９６と、ＴｆＲ－ＡＤのＶａｌ２１３及びＬｅｕ２１２

との間で相互作用が認められた。

【０４４７】

更に、実施例２の「パラトープマッピング」と題したセクションで述べ、また、図４１（Ａ）及び図４１（Ｂ）に示されるように、ＣＨ３Ｃレジスターの外側のいくつかの位置もＴｆＲに対する結合に関与している。

【０４４８】

実施例８　カニクイザルにおけるＣＨ３Ｃ変異体を含むＦｃ－Ｆａｂ融合ポリペプチドの薬物動態学的／薬力学的実験

本実施例では、カニクイザルにおける本発明のＣＨ３Ｃ変異体ポリペプチドを含むＦｃ－Ｆａｂ融合体の薬物動態学的／薬力学的実験（ＰＫ／ＰＤ）特性分析について述べる。

【０４４９】

実験計画

Ａｂ１２２（対照ＩｇＧとしての抗ＲＳＶ抗体）、Ａｂ１５３（抗ＢＡＣＥ１抗体）、Ａｂ２１０（抗ＴｆＲ／ＢＡＣＥ１二重特異性抗体）、または、Ａｂ１５３のＦａｂドメインに融合させたＣＨ３Ｃ変異体ポリペプチドを含むＦｃ－Ｆａｂ融合ポリペプチドの単一の３０ｍｇ／ｋｇ用量を、２～４歳の雄のカニクイザルに静脈内投与して血漿中ＰＫ、血漿中ＰＤ（Ａβ４０）、及び脳脊髄液（ＣＳＦ）中ＰＤ（Ａβ４０）を２９日間にわたって評価した（ｎ＝４／群）。ベースラインを確立するため、投与前のＣＳＦ及び血液試

料を投与７日前に各動物から採取した。投与後、ＣＳＦをＩＴ－Ｌカテーテルにより、投与の１２、２４、４８、７２、及び９６時間後に、また、実験日の８、１１、１５、１８、２２、２５、及び２９日目にＰＤ分析用に採取した。血液試料を、血漿及び血清中ＰＫ用に投与の０．２５、１、６、１２、２４、７２時間後、また、実験日の８、１１、１５、１８、２２、２５、及び２９日目に採取した。

【０４５０】

表１９は、実験計画のアウトラインを示したものである。「ＣＨ３Ｃ．３５．２１．１６：Ａｂ１５３」は、Ａｂ１５３のＦａｂドメインに融合させたクローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１６を含む一価のＦｃ－Ｆａｂ融合ポリペプチドである。「ＣＨ３Ｃ．３５．２１：Ａｂ１５３」は、Ａｂ１５３のＦａｂドメインに融合させたクローンＣＨ３Ｃ．３５．２１を含む一価のＦｃ－Ｆａｂ融合ポリペプチドである。「ＣＨ３Ｃ．３５．９：Ａｂ１５３」は、Ａｂ１５３のＦａｂドメインに融合させたクローンＣＨ３Ｃ．３５．２１を含む二価のＦｃ－Ｆａｂ融合ポリペプチドである。「ＣＨ３Ｃ．３５．８：Ａｂ１５３」は、Ａｂ１５３のＦａｂドメインに融合させたクローンＣＨ３Ｃ．３５．２０を含む二価のＦｃ－Ｆａｂ融合ポリペプチドである。「ＬＡＬＡＰＧ」は、抗体またはＦｃ－Ｆａｂ融合ポリペプチドが、Ｆｃ配列中に変異Ｌ７Ａ、Ｌ８Ａ、及びＰ１０２Ｇを有していることを示す（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けしたとき）。「ＬＡＬＡＰＧ．ＹＴＥ」は、Ｆｃ－Ｆａｂ融合ポリペプチドが、Ｆｃ配列中に変異Ｌ７Ａ、Ｌ８Ａ、Ｐ１０２Ｇ、Ｍ２５Ｙ、Ｓ２７Ｔ、及びＴ２９Ｅを有していることを示す（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けしたとき）。

【０４５１】

（表１９）

処置	アイソタイプ	カニクイザルTfR完全長の親和性 (nM)	カニクイザルTfRアピカルの親和性 (nM)	用量	N	材料 (mg)
Ab122 (対照 IgG)	huIgG1.LALAPG	--		30	4	750
Ab153	huIgG1.LALAPG	--		30	4	750
Ab210	huIgG1.LALAPG	52	140	30	4	750
CH3C.35.21.16:Ab153 (一価)	huIgG1.LALAPG	1800	1900	30	4	750
CH3C.35.21.16:Ab153 (一価)	huIgG1.LALAPG.YTE	1800	1900	30	4	750
CH3C.35.21:Ab153 (一価)	huIgG1.LALAPG.YTE	2100	2200	30	4	750
CH3C.35.9:Ab153 (二価)	huIgG1.LALAPG.YTE	700		30	4	750
CH3C.35.8:Ab153 (二価)	huIgG1.LALAPG.YTE	1700		30	4	750

【０４５２】

方法

ヒトＩｇＧのＰＫアッセイ

カニクイザル血清中の抗体またはＦｃ－Ｆａｂ融合ポリペプチドの濃度を、ヒトＩｇＧ特異的サンドイッチＥＬＩＳＡを用いて定量した。３８４ウェルＭａｘｉＳｏｒｐプレートに、ヒトＩｇＧのＦｃに特異的な抗体を一晩コーティングした。血清試料を１：１００、１：１，０００、１：１０，０００、及び１：１００，０００に希釈し、ブロッキングしたプレートに加えた。検出抗体は、ポリクローナル抗ヒトＩｇＧサル吸収抗体とした。

各抗体またはＦｃ－Ｆａｂ融合ポリペプチドに対して個々に標準曲線を作成し（４８～２０００００ｐｇ／ｍＬのＩｇＧ）、アッセイの血清中の定量下限（ＬＬＯＱ）は２０ｎｇ／ｍＬである。

【０４５３】

ＰＤアッセイ

カニクイザルＣＳＦ中の可溶性のＡＰＰα／β濃度を、ＭｅｓｏＳｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ（ＭＳＤ）ｍｕｌｔｉｐｌｅｘキット（ＭＳＤ＃Ｋ１５１２０Ｅ）を使用して測定した。２種類の異なる抗体がｓＡＰＰαまたはｓＡＰＰβのいずれかを特異的に捕捉し、次に、両方の被検物質を、ＳＵＬＦＯタグで標識した抗ＡＰＰマウスモノクローナル抗体で検出した。カニクイザルのＡβ４０濃度を、ＭＳＤ ｕｌｔｒａ－ｓｅｎｓｉｔｉｖｅキット（ＭＳＤ＃Ｋ１５１ＦＴＥ）を使用して測定した。このアッセイではｈｕＡβ特異的６Ｅ１０抗体を捕捉分子として使用し、ペプチドのＣ末端に対して特異的な抗Ａβ４０抗体を検出分子として用いた。いずれのアッセイも製造者の指示に従って行った。要約すると、予めコーティングしたプレートをＭＳＤ Ｂｌｏｃｋｅｒ Ａで１時間ブロッキングした。ＣＳＦ試料を１：５に希釈し、ブロッキングしたプレートに二重で加えた後、４℃で一晩インキュベートした。次に、それぞれの検出抗体を加え、各プレートをＳｅｃｔｏｒ Ｓ６００装置で読み取った。標準曲線として０．９２～３７５０ｐｇ／ｍＬのｈｕＡβ４０及び０．１～１００ｎｇ／ｍＬのｓＡＰＰα／βの両方を、４パラメータロジスティック回帰を用いてフィッティングした。このアッセイでは、Ａβ４０のＬＬＯＱは７３ｐｇ／ｍＬであり、ｓＡＰＰα／βでは０．５ｎｇ／ｍＬであった。

【０４５４】

結果

投与後最初の７日間からの中間の血漿ＰＫは、Ａｂ２１０及びＣＨ３Ｃ．３５．９：Ａｂ１５３で、それらの末梢におけるＴｆＲに対する結合のため、予想された標的介在性クリアランスを示した（図４２（Ａ））。Ａｂ１５３及びＡｂ２１０抗体の両方、ならびにＣＨ３Ｃ．３５．９：Ａｂ１５３は、対照ＩｇＧと比較して血漿中Ａβ４０の顕著で持続的な低下をもたらし（図４２（Ｂ））、これら３種類の分子のすべてが同程度にインビボのＢＡＣＥ１活性を阻害する能力を有することが確認された。ＣＳＦ中では、Ａｂ２１０及びＣＨ３Ｃ．３５．９：Ａｂ１５３の両方が、対照ＩｇＧと比較してＣＳＦ中のＡβ４０及びｓＡＰＰβ／ｓＡＰＰα比を、それぞれ約７０％及び約７５％にまで低下させる能力を有した（図４３（Ａ）及び４３（Ｂ））。ＴｆＲに結合しない抗ＢＡＣＥ１抗体であるＡｂ１５３は、対照ＩｇＧと比較してＣＳＦ中のＡβ４０及びｓＡＰＰβ／ｓＡＰＰα比に与えた影響は最小であった。これらの結果は、ＣＨ３Ｃ変異体ポリペプチド（例えば、クローンＣＨ３Ｃ．３５．９）によるＴｆＲへの結合が、抗ＢＡＣＥ１抗体のＦａｂドメインに融合させたＣＨ３Ｃ変異体ポリペプチドを含むＦｃ－Ｆａｂ融合体（例えば、ＣＨ３Ｃ．３５．９：Ａｂ１５３）のＣＮＳ中への浸透量を高めることによってＣＳＦ中のＡβ４０及びｓＡＰＰβ／ｓＡＰＰαの生成を阻害することを示すものである。

【０４５５】

血清中ＰＫ、血漿中Ａβ、及びＣＳＦ中Ａβ濃度を、単回投与後４週間にわたって更に評価した。マウスで観察された結果と同様、ＴｆＲに結合するＦｃ－Ｆａｂ融合体（ＣＨ３Ｃ．３５．２１．１６：Ａｂ１５３ ＬＡＬＡＰＧ、ＣＨ３Ｃ．３５．２１．１６：Ａｂ１５３ ＬＡＬＡＰＧＹＴＥ、及びＣＨ３Ｃ．３５．２１：Ａｂ１５３ ＬＡＬＡＰＧＹＴＥ）の末梢血清ＰＫは、末梢組織のＴｆＲに対する結合により、Ａｂ１２２及びＡｂ１５３と比較してより速やかなクリアランスを示した（図４６（Ａ））。Ａｂ１５３及びＣＨ３Ｃ：Ａｂ１５３融合体はいずれも、対照ＩｇＧ Ａｂ１２２と比較して血漿中Ａβ濃度を約５０％よりも大きく低下させた（図４６（Ｂ））。最大のＡβは、Ａｂ１５３とＣＨ３Ｃ：Ａｂ１５３融合体とで同様であり、Ｆｃの改変が、インビボでＡＰＰの切断を阻害する抗ＢＡＣＥ１ Ｆａｂの能力に影響しなかったことを示している（図４６（Ｂ））。血漿中Ａβの持続時間は、Ａｂ１５３及びＣＨ３Ｃ：Ａｂ１５３の曝露と経時的に相関していた。ＣＳＦ中では、３種類のＦｃ－Ｆａｂ融合体のすべてが、対照ＩｇＧ Ａｂ１

２２と比較してＡβ４０及びｓＡＰＰβ／ｓＡＰＰα比を約７０％にまで有意に低下させる能力を有したのに対して、Ａｂ１５３を投与した動物では有意な低下は認められなかった（図４６（Ｃ）及び４６（Ｄ））。これらの結果は、ＣＨ３Ｃ変異体ポリペプチド（例えば、クローンＣＨ３Ｃ．３５．２１．１６及びＣＨ３Ｃ．３５．２１）によるＴｆＲへの結合が、抗ＢＡＣＥ１抗体のＦａｂドメインに融合させたＣＨ３Ｃ変異体ポリペプチドを含むＦｃ－Ｆａｂ融合体（例えば、ＣＨ３Ｃ．３５．２１．１６：Ａｂ１５３及びＣＨ３Ｃ．３５．２１：Ａｂ１５３）のＣＮＳ中への浸透量を高めることによってＣＳＦ中のＡβ４０及びｓＡＰＰβ／ｓＡＰＰαの生成を阻害することを示すものである。

【０４５６】

未成熟赤血球ではＴｆＲが高レベルに発現していることから、末梢血の臨床病理学的な性質を実験期間の全体を通じて評価することによって網状赤血球数、血清鉄、及び赤血球数を評価した。血清鉄値の評価では、色素源としてＴＰＴＺ［２，４，６－トリ－（２－ピリジル）－５－トリアジン］を使用する方法の変法を用いた。酸性培地中、トランスフェリンに結合した鉄を遊離第二鉄イオンとアポトランスフェリンとに解離させた。塩酸とアスコルビン酸ナトリウムで第二鉄イオンを第一鉄状態に還元した。次いで、第一鉄イオンをＴＰＴＺと反応させて青色の複合体を形成させ、これを６００／８００ｎｍで重クロム酸塩を用いて測定した。吸光度の増加は、トランスフェリンに結合した鉄の存在量に正比例していた。これを、Ｂｅｃｋｍａｎ／Ｏｌｙｍｐｕｓ　ＡＵ６４０ｅ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎａｌｙｚｅｒで行った。絶対網状赤血球数及びＲＢＣの形態をＳｉｅｍｅｎｓ　Ａｄｖｉａ１２０自動血液検査システムにより分析した。Ｆｃ－Ｆａｂ融合体は、それらの投与前の値と比較して網状赤血球数に影響を及ぼさなかった（図４７（Ａ））。更に、血清鉄及び赤血球数も影響はみられなかった（図４７（Ｂ）及び４７（Ｃ））。これらのデータは共に、改変ＴｆＲ結合Ｆｃポリペプチド－Ｆａｂ融合体が、非ヒト霊長類において抗体の脳曝露を安全かつ効果的に増大させることで安定した薬力学的応答（すなわち、ＣＳＦ中のＡβの低下）を生じることを示すものである。

【０４５７】

実施例９　Ｍ２０１Ｌ及びＮ２０７Ｓ変異を有するＣＨ３Ｃ．３５の薬物動態学的分析

本実施例では、変異Ｍ２０１Ｌ及びＮ２０７ＳがＣＨ３Ｃ．３５と両立することについて述べる。

【０４５８】

血清安定性を高める変異である、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として番号付けしたＭ２０１Ｌ及びＮ２０７Ｓ（ＥＵ番号付けによればＭ４２８Ｌ／Ｎ４３４Ｓ、「ＬＳ」変異とも呼ばれる）が、ＴｆＲ結合Ｆｃ改変と両立するかどうかを評価するために、ヒトＦｃＲｎノックインマウスにＡｂ１５３＿ＬＡＬＡＰＧ、Ａｂ１５３＿ＬＡＬＡ．ＬＳ、ＣＨ３Ｃ．３５．２１：Ａｂ１５３＿ＬＡＬＡ．ＬＳ、またはＡｂ１５３＿ＬＡＬＡＰＧ．ＹＴＥを１０ｍｇ／ｋｇで投与した。１４日間にわたる血漿中ＰＫの評価は、血清安定性変異を有さないＡｂ１５３＿ＬＡＬＡＰＧと比較してＡｂ１５３＿ＬＡＬＡ．ＬＳ、ＣＨ３Ｃ．３５．２１：Ａｂ１５３＿ＬＡＬＡ．ＬＳ、及びＡｂ１５３＿ＬＡＬＡＰＧ．ＹＴＥにおいて同様の約２倍の改善を示した（図４８（Ａ）及び４８（Ｂ））。このことは、ＴｆＲ結合を生じるこれらの更なるＦｃの変異が、インビボでｈｕＩｇＧ１の半減期を改善するＬＳ変異の性質に影響しないことを示している。

【０４５９】

実施例１０　ＴｆＲコンストラクトの操作

本実施例では、配列４４９の配列を有する第１のポリペプチドと、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５０の配列を有する第２のポリペプチドとを含むＴｆＲコンストラクトの発現及び精製について述べる。

【０４６０】

ＴｆＲコンストラクトをコードするＤＮＡフラグメントとしてＨｉｓ１０－Ｓｍｔ３－Ａｖｉ－ＴｆＲを合成し、ｐＥＴ２８ベクターに挿入した。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６８の配列は、ヒトＴｆＲ配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４４９の配列を有する第１のポリペプチド

とＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５０の配列を有する第２のポリペプチド）を有するＨｉｓ１０－Ｓｍｔ３－Ａｖｉ－ＴｆＲをコードする。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６９の配列は、カニクイザルＴｆＲ配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５１の配列を有する第１のポリペプチドとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５２の配列を有する第２のポリペプチド）を有するＨｉｓ１０－Ｓｍｔ３－Ａｖｉ－ＴｆＲをコードする。ＴｆＲコンストラクトと大腸菌のビオチンリガーゼＢｉｒＡを同時発現させるため、プラスミドｐＡＣＹＣ－ＢｉｒＡを、ｐＥＴ２８－Ｈｉｓ１０－Ｓｍｔ３－Ａｖｉ－ＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ－ＴｆＲとともに大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）（Ｎｏｖａｇｅｎ）に形質転換した。培養物をカナマイシン（５０μｇ／ｍｌ）及びクロラムフェニコール（３５μｇ／ｍｌ）を含有するＬＢ培地中に３７℃で接種し、対数増殖期に維持した。培養物のＡ６００が０．６～０．８に達した時点で、培養物を氷上で３０分間冷却し、ＩＰＴＧを最終濃度１．０ｍＭにまで加え、培養物を常時振盪しながら１８℃で１６時間インキュベートした。細胞を遠心分離により回収し、－８０℃で保存した。

【０４６１】

その後のすべての操作は４℃で行った。６ＬのＬＢ培地からの細胞ペレットを２００ｍＬのバッファーＡ（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０％グリセロール）に懸濁し、ベンゾナーゼ（Ｓｉｇｍａ）を１：２００００の希釈度で加えた。懸濁液を少なくとも１時間にわたって静かに混合した。ライセートをマイクロフルイダイザーにかけ、Ｓｏｒｖａｌｌ　ＳＳ３４ローター内で１４，０００ｒｐｍで４５分間、遠心分離を行って不溶性物質を除去した。可溶性のサイトゾル画分を、バッファーＡで平衡化した５ｍｌのＨｉｓＴｒａｐ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にロードした。カラムを、バッファーＡに加えた２５ｍＭイミダゾール及び５０ｍＭイミダゾールで、それぞれ少なくとも２０カラム体積（ＣＶ）及び３ＣＶ洗浄した。結合したＴｆＲコンストラクトをバッファーＡに加えた１００～５００ｍＭイミダゾール勾配で８ＣＶ溶出した。ＴｆＲコンストラクトを含むピーク画分をプールし、２つの部分に分けた。プールした画分の半分はＴｆＲコンストラクトを更に精製するために使用し、残りの半分はＨｉｓ１０－Ｓｍｔ３タグを切断してＡｖｉ－ＴｆＲを精製するために使用した。

【０４６２】

タグを切断するため、Ｓｍｔ３特異的プロテアーゼＵｌｐ１（Ｓｕｍｏ　ｆｕｓｉｏｎ：プロテアーゼ）を１００：１のモル比で加え、４℃で一晩、インキュベートしてバッファーＣ（５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＤＴＴ）に対して透析した。このタンパク質混合物を濾過（０．２２μｍ）し、バッファーＣで平衡化した５ｍＬのＨｉｓＴｒａｐ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）上に再びロードした。切断されたＨｉｓ１０－Ｓｍｔ３タグ及びＵｌｐ１プロテアーゼは、バッファーＣで平衡化した５ｍｌのＨｉｓＴｒａｐ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）上にロードすることによって除去し、切断されたＡｖｉ－ＴｆＲを含むフロースルーを回収して濃縮した。Ｈｉｓ１０－Ｓｍｔ３を融合し、タグを切断したヒトＴｆＲのそれぞれをＨｉＬｏａｄ　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００　２６／６０及びＳｕｐｅｒｄｅｘ７５　１６／６０（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にそれぞれかけた。両方のカラムを平衡化し、バッファーＣを流した。調製物の純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により監視し、Ｉｎｓｔａｎｔ　Ｂｌｕｅ染色（Ｅｘｐｅｄｅｏｎ）で染色した。タンパク質の濃度を、各標的タンパク質の配列により決定された吸光係数を用いてＵＶ測定値によって決定した。標的タンパク質のインビボでのビオチン化を、ストレプトアビジン－ＨＲＰ（Ｓｉｇｍａ）でプローブしたウェスタンブロットにより確認した。

【０４６３】

ＸＩＶ．例示的な実施形態

本明細書で開示される主題に従って提供される例示的な実施形態には、これらに限定されるものではないが、請求項及び以下の各実施形態が含まれる。

【０４６４】

１．血液脳関門（ＢＢＢ）を通過して能動的に輸送されることが可能なポリペプチドであ

って、
（ａ）改変Ｆｃポリペプチド、またはそのフラグメントと、
（ｂ）ＢＢＢ受容体に特異的に結合する前記改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメント内の第１の部位と、
（ｃ）新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）に結合する第２の部位と
を含む、前記ポリペプチド。
【０４６５】
２．前記第２の部位が天然のＦｃＲｎ結合部位である、実施形態１に記載のポリペプチド。
【０４６６】
３．前記ＦｃＲｎ結合部位が、血清中半減期を延ばす、天然Ｆｃ配列に対するアミノ酸の変化を含む、実施形態１に記載のポリペプチド。
【０４６７】
４．前記アミノ酸の変化が、２５位のＴｙｒ、２７位のＴｈｒ、及び２９位のＧｌｕの置換を含み、前記各残基の位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる、実施形態３に記載のポリペプチド。
【０４６８】
５．前記アミノ酸の変化が、２０１位のＬｅｕ、及び２０７位のＳｅｒの置換を含み、前記各残基の位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる、実施形態３に記載のポリペプチド。
【０４６９】
６．前記アミノ酸の変化が、２０７位のＳｅｒまたはＡｌａの置換を含み、前記各残基の位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる、実施形態３に記載のポリペプチド。
【０４７０】
７．前記改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントが、天然のＦｃポリペプチドのアミノ酸配列に対応した少なくとも５０個のアミノ酸を含む、実施形態１～６のいずれか１つに記載のポリペプチド。
【０４７１】
８．前記少なくとも５０個のアミノ酸が連続している、実施形態７に記載のポリペプチド。
【０４７２】
９．前記改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントが、天然のＦｃポリペプチドのアミノ酸配列に対応した少なくとも１００個のアミノ酸を含む、実施形態７に記載のポリペプチド。
【０４７３】
１０．前記第１の部位が、前記Ｆｃポリペプチドのβシート内に少なくとも１個の改変されたアミノ酸を含む、実施形態１～９のいずれか１つに記載のポリペプチド。
【０４７４】
１１．前記βシートがＣＨ２ドメイン内にある、実施形態１０に記載のポリペプチド。
【０４７５】
１２．前記βシートがＣＨ３ドメイン内にある、実施形態１０に記載のポリペプチド。
【０４７６】
１３．前記第１の部位が、少なくとも１個の溶媒露出アミノ酸の置換を含む、実施形態１～１２のいずれか１つに記載のポリペプチド。
【０４７７】
１４．前記第１の部位が、ループ領域またはβシート内の少なくとも２個の溶媒露出アミノ酸の置換を含み、前記２個の溶媒露出残基は、同じループ領域または同じβシート内にない、実施形態１３に記載のポリペプチド。
【０４７８】
１５．前記改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメント配列が、改変ＣＨ２ドメイン配列を含む、実施形態１～１４のいずれか１つに記載のポリペプチド。
【０４７９】

１６．前記改変ＣＨ２ドメイン配列が、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のＣＨ２ドメイン配列に由来するものである、実施形態１５に記載のポリペプチド。
【０４８０】
１７．前記ＣＨ２ドメインに対する改変が、
（ａ）残基４７、４９、５６、５８、５９、６０、６１、６２、及び６３、
（ｂ）残基３９、４０、４１、４２、４３、４４、６８、７０、７１、及び７２、
（ｃ）残基４１、４２、４３、４４、４５、６５、６６、６７、６９、及び７３、ならびに、
（ｄ）残基４５、４７、４９、９５、９７、９９、１０２、１０３、及び１０４
からなる群から選択されるアミノ酸の組の中の少なくとも２個のアミノ酸の置換を含み、前記残基の位置がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる、実施形態１５または１６に記載のポリペプチド。
【０４８１】
１８．前記改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメント配列が、改変ＣＨ３ドメイン配列を含む、実施形態１～１４のいずれか１つに記載のポリペプチド。
【０４８２】
１９．前記改変ＣＨ３ドメイン配列が、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のＣＨ３ドメイン配列に由来するものである、実施形態１８に記載のポリペプチド。
【０４８３】
２０．前記ＣＨ３ドメインに対する改変が、
（ａ）残基１５７、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１８６、１８９、及び１９４、ならびに
（ｂ）残基１１８、１１９、１２０、１２２、２１０、２１１、２１２、及び２１３
からなる群から選択されるアミノ酸の組の中の少なくとも２個のアミノ酸の置換を含み、前記残基の位置がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる、実施形態１８または１９に記載のポリペプチド。
【０４８４】
２１．前記改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントが、前記対応する野生型Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントと比較して少なくとも７５％のアミノ酸配列の同一性を有する、実施形態１～２０のいずれか１つに記載のポリペプチド。
【０４８５】
２２．前記同一性が、少なくとも８０％、９０％、９２％、または９５％である、実施形態２１に記載のポリペプチド。
【０４８６】
２３．前記改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントが、エフェクター機能を有する、実施形態１～２２のいずれか１つに記載のポリペプチド。
【０４８７】
２４．前記改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントが、エフェクター機能を有さない、実施形態１～２２のいずれか１つに記載のポリペプチド。
【０４８８】
２５．前記改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントが、エフェクター機能を低下させる改変を含む、実施形態２４に記載のポリペプチド。
【０４８９】
２６．前記改変が、７位のＬｅｕ及び８位のＬｅｕの置換を含み、前記各残基の位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる、実施形態２５に記載のポリペプチド。
【０４９０】
２７．前記改変が、１０２位のＰｒｏの置換を更に含み、前記残基の位置はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１を基準として決められる、実施形態２６に記載のポリペプチド。
【０４９１】
２８．実施形態１～２７のいずれか１つに記載のポリペプチドまたはフラグメントを含む

二量体タンパク質。
【０４９２】
２９．第１及び第２のポリペプチド鎖を含むヘテロ二量体であり、前記第１のポリペプチド鎖がＢＢＢ受容体に特異的に結合する第１の部位を含む、実施形態２８に記載の二量体タンパク質。
【０４９３】
３０．前記第２のポリペプチド鎖が、ＢＢＢ受容体に特異的に結合する部位を含まない、実施形態２９に記載の二量体タンパク質。
【０４９４】
３１．第１及び第２のポリペプチド鎖を含むホモ二量体であり、前記第１及び第２のポリペプチド鎖が、ＢＢＢ受容体に特異的に結合する部位をそれぞれ含む、実施形態２８に記載の二量体タンパク質。
【０４９５】
３２．前記ＢＢＢ受容体が、トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）、インスリン受容体、インスリン様成長因子受容体（ＩＧＦ－Ｒ）、低密度リポタンパク質受容体（ＬＤＬＲ）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質１（ＬＲＰ１）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質２（ＬＲＰ２）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質８（ＬＲＰ８）、ＧＬＵＴ１、バシギン、ジフテリア毒素受容体、ヘパリン結合性上皮成長因子様成長因子（ＨＢ－ＥＧＦ）の膜結合前駆体、メラノトランスフェリン、及びバソプレシン受容体からなる群から選択される、実施形態１～２７のいずれか１つに記載のポリペプチド。
【０４９６】
３３．前記ＢＢＢ受容体がＴｆＲである、実施形態３２に記載のポリペプチド。
【０４９７】
３４．前記ＢＢＢ受容体がＩＧＦ－Ｒである、実施形態３２に記載のポリペプチド。
【０４９８】
３５．前記受容体の内因性リガンドと結合について競合することなく前記ＢＢＢ受容体に特異的に結合する、実施形態１～２７及び３２～３４のいずれか１つに記載のポリペプチド。
【０４９９】
３６．前記ＢＢＢ受容体がトランスフェリン受容体であり、前記内因性リガンドがトランスフェリンである、実施形態３５に記載のポリペプチド。
【０５００】
３７．生物学的活性を有するポリペプチドを更に含む、実施形態１～２７及び３２～３６のいずれか１つに記載のポリペプチド。
【０５０１】
３８．前記生物学的活性を有するポリペプチドが、治療活性を有するポリペプチドである、実施形態３７に記載のポリペプチド。
【０５０２】
３９．前記生物学的活性を有するポリペプチドの脳内への取り込みが、改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントが存在しない場合の前記生物学的活性を有するポリペプチドの取り込みと比較して少なくとも１０倍大きい、実施形態３７または３８に記載のポリペプチド。
【０５０３】
４０．ＢＢＢを通過して能動的に輸送されることが可能なタンパク質であって、
（ａ）抗原に結合することが可能な抗体可変領域配列、またはその抗原結合フラグメントと、
（ｂ）改変Ｆｃポリペプチドを含むポリペプチド、またはそのフラグメントと
を含み、前記改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントが、ＢＢＢ受容体に特異的に結合する第１の結合部位と、新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）に結合する第２の結合部位とを有

する、前記タンパク質。
【０５０４】
４１．前記抗体可変領域配列がＦａｂドメインを含む、実施形態４０に記載のタンパク質。
【０５０５】
４２．前記抗体可変領域配列が、２個の抗体可変領域重鎖と２個の抗体可変領域軽鎖、またはそれらのそれぞれのフラグメントを含む、実施形態４０または４１に記載のタンパク質。
【０５０６】
４３．前記ＢＢＢ受容体に結合する１個の改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントを含む、実施形態４０～４２のいずれか１つに記載のタンパク質。
【０５０７】
４４．前記ＢＢＢ受容体に結合する２個の改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントを含む、実施形態４０～４２のいずれか１つに記載のタンパク質。
【０５０８】
４５．前記脳内へのタンパク質の取り込みが、（ａ）改変Ｆｃポリペプチドまたはフラグメントを含むポリペプチドがない場合の同じタンパク質、または（ｂ）ＢＢＢ受容体との結合をもたらす改変を有さないＦｃポリペプチドまたはＦｃポリペプチドフラグメントを含むポリペプチドがある場合の同じタンパク質と比較して、少なくとも１０倍大きい、実施形態４０～４４のいずれか１つに記載のタンパク質。
【０５０９】
４６．（ａ）実施形態１～２７及び３２～３９のいずれか１つに記載のポリペプチドと、（ｂ）治療または診断物質とを含む結合体であって、前記血液脳関門を通過して輸送されることが可能である、前記結合体。
【０５１０】
４７．前記治療または診断物質の脳への取り込みが、前記ポリペプチドの非存在下での前記治療または診断物質の取り込みに対して少なくとも１０倍、２０倍、３０倍、４０倍、または５０倍増加する、実施形態４６に記載の結合体。
【０５１１】
不一致がある場合、表（例えば、表９）に記載される各クローンのアミノ酸置換が、配列表に記載される配列中にみられるアミノ酸に優先してそのクローンのレジスター位置におけるアミノ酸置換を決定する。
【０５１２】
本明細書に述べられる実施例及び実施形態はあくまで例示的な目的のものに過ぎず、これらを考慮することで様々な改変または変更が当業者に示唆され、かかる改変及び変更は本出願の趣旨及び範囲、ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれるものである点は理解されよう。本明細書に引用される配列アクセッション番号の配列をここに参照によって援用する。
【０５１３】
（表１）ＣＨ２Ａ２レジスターの位置及び変異

配列名	配列グループ	47	48	49	…	56	57	58	59	60	61	62	63
野生型	n/a	K	F	N	…	E	V	H	N	A	K	T	K
CH2A2.1	1	E	F	I	…	D	V	R	Y	E	W	Q	L
CH2A2.2	1	G	F	V	…	P	V	S	W	E	W	Y	W
CH2A2.3	1	Q	F	D	…	M	V	R	R	E	W	H	R
CH2A2.4	1	S	F	E	…	P	V	R	W	E	W	Q	W
CH2A2.5	1	A	F	T	…	P	V	R	W	E	W	Q	N
CH2A2.6	1	N	F	D	…	L	V	R	R	E	W	H	R
CH2A2.7	1	Q	F	V	…	A	V	R	W	E	W	I	R
CH2A2.8	1	E	F	I	…	E	V	A	W	E	W	F	W
CH2A2.9	1	G	F	A	…	N	V	R	V	E	W	Q	Y
CH2A2.10	1	G	F	V	…	E	V	R	R	E	W	V	R
CH2A2.11	1	S	F	D	…	L	V	R	R	E	W	Q	R
CH2A2.12	1	E	F	T	…	D	V	R	Y	E	W	Y	Y
CH2A2.13	1	Q	F	T	…	D	V	R	Y	E	W	V	R
CH2A2.14	1	Q	F	Y	…	N	V	R	R	E	W	H	R
CH2A2.15	1	Y	F	D	…	M	V	R	R	E	W	H	R
CH2A2.16	2	W	F	E	…	F	V	G	V	A	Y	D	V

【０５１４】

（表２）ＣＨ２Ｃレジスターの位置及び変異

配列名	配列グループ	39	40	41	42	43	44	…	68	69	70	71	72
野生型	n/a	V	S	H	E	D	P	…	Q	Y	N	S	T
CH2C.1	1	P	Q	T	P	P	W	…	E	Y	Y	T	Y
CH2C.2	1	P	P	S	P	P	W	…	E	Y	Y	S	N
CH2C.3	1	P	Q	T	P	P	W	…	E	Y	Y	S	N
CH2C.4	1	F	R	G	P	P	W	…	E	Y	Y	H	D
CH2C.5	1	P	Q	T	V	P	W	…	E	Y	Y	S	N
CH2C.6	1	P	K	M	P	P	W	…	E	Y	Y	T	Y
CH2C.7	1	P	P	V	P	P	W	…	E	Y	Y	S	N
CH2C.8	1	P	A	F	P	P	W	…	E	Y	Y	Q	N
CH2C.9	1	A	I	W	P	P	W	…	E	Y	Y	S	N
CH2C.10	1	P	P	V	A	P	W	…	E	Y	Y	S	S
CH2C.11	1	P	Q	M	P	P	Q	…	E	Y	Y	S	N
CH2C.12	1	P	Q	T	A	P	W	…	E	Y	Y	T	Y
CH2C.13	1	P	Q	T	P	P	Q	…	E	Y	Y	S	N
CH2C.14	1	P	Q	T	P	P	W	…	E	Y	Y	T	Y
CH2C.15	1	P	R	V	P	P	W	…	E	Y	Y	Q	N
CH2C.16	1	P	S	V	P	P	W	…	E	Y	Y	S	N
CH2C.17	2	M	L	W	P	V	P	…	V	Y	H	R	P
CH2C.18	2	M	L	W	P	V	P	…	T	Y	H	N	P
CH2C.19	2	M	E	W	P	V	T	…	T	Y	H	H	P
CH2C.20	2	M	L	W	P	V	P	…	T	Y	H	H	P
CH2C.21	3	D	D	L	T	F	Q	…	V	Y	V	T	P
CH2C.22	3	D	D	L	T	F	Q	…	L	Y	V	T	P
CH2C.23	4	A	Y	G	D	P	E	…	W	Y	D	V	P

【０５１５】

（表３）ＣＨ２Ｄレジスターの位置及び変異

配列名	配列グループ	41	42	43	44	45	…	65	66	67	68	69	70	71	72	73
野生型	n/a	H	E	D	P	E	…	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y
CH2D.1	1	V	P	P	R	M	…	L	T	S	Q	H	N	S	T	V
CH2D.2	1	V	P	P	W	M	…	L	T	S	Q	H	N	S	T	V
CH2D.3	2	D	M	W	E	Y	…	W	V	K	Q	L	N	S	T	W
CH2D.4	2	D	D	W	T	W	…	W	I	A	Q	P	N	S	T	W
CH2D.5	2	D	D	W	E	W	…	W	K	L	Q	L	N	S	T	W

【０５１６】

（表４）ＣＨ２Ｅ３レジスターの位置及び変異

配列名	配列グループ	45	46	47	48	49	…	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
野生型	n/a	E	V	K	F	N	…	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P
CH2E3.1	1	W	V	W	F	Y	…	S	V	V	N	I	A	L	W	W	S
CH2E3.2	2	V	V	G	F	R	…	R	V	S	N	S	A	L	T	W	K
CH2E3.3	2	V	V	G	F	R	…	R	V	S	N	S	A	L	S	W	R
CH2E3.4	2	I	V	G	F	R	…	R	V	S	N	S	A	L	R	W	R
CH2E3.5	3	A	V	G	F	E	…	Q	V	F	N	W	A	L	D	W	V

【０５１７】

（表５）ＣＨ３Ｂレジスターの位置及び変異

配列名	配列グループ	118	119	120	121	122	…	210	211	212	213
野生型	n/a	E	P	Q	V	Y	…	T	Q	K	S
CH3B.1	1	F	D	Y	V	T	…	G	F	H	D
CH3B.2	1	F	D	M	V	T	…	G	F	H	D
CH3B.3	1	F	E	Y	V	T	…	G	F	H	D
CH3B.4	1	F	E	M	V	T	…	G	F	H	D
CH3B.5	1	F	E	L	V	T	…	G	F	H	D
CH3B.6	1	F	E	I	V	T	…	G	F	H	D
CH3B.7	1	F	D	I	V	T	…	G	F	H	D
CH3B.8	1	F	D	Y	V	T	…	G	F	H	D
CH3B.9	1	F	G	M	V	T	…	G	F	H	D
CH3B.10	1	F	A	D	V	T	…	G	F	Y	D
CH3B.11	1	F	G	L	V	T	…	G	F	H	D
CH3B.12	1	F	D	Y	V	T	…	G	F	S	D
CH3B.13	1	I	D	Y	V	T	…	G	F	S	D
CH3B.14	1	F	K	D	V	T	…	G	F	F	D
CH3B.15	1	F	D	L	V	T	…	G	F	Y	D
CH3B.16	1	I	D	Y	V	T	…	G	F	S	D
CH3B.17	1	F	E	L	V	A	…	G	F	H	D

【０５１８】

（表６）ＣＨ３Ｃレジスターの位置及び変異

配列名	配列グループ	157	158	159	160	161	162	163	164	…	186	187	188	189	190	191	192	193	194
野生型	n/a	N	G	Q	P	E	N	N	Y	…	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N
CH3C.1		L	G	L	V	W	V	G	Y	…	A	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.2		Y	G	T	V	W	S	H	Y	…	S	K	S	E	W	Q	Q	G	Y
CH3C.3		Y	G	T	E	W	S	Q	Y	…	E	K	S	D	W	Q	Q	G	H
CH3C.4		V	G	T	P	W	A	L	Y	…	L	K	S	E	W	Q	Q	G	W
CH3C.17	2	Y	G	T	V	W	S	K	Y	…	S	K	S	E	W	Q	Q	G	F
CH3C.18	1	L	G	H	V	W	A	V	Y	…	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.21	1	L	G	L	V	W	V	G	Y	…	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.25	1	M	G	H	V	W	V	G	Y	…	D	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.34	1	L	G	L	V	W	V	F	S	…	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.35	2	Y	G	T	E	W	S	S	Y	…	T	K	S	E	W	Q	Q	G	F
CH3C.44	2	Y	G	T	E	W	S	N	Y	…	S	K	S	E	W	Q	Q	G	F
CH3C.51	1/2	L	G	H	V	W	V	G	Y	…	S	K	S	E	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.1-3	1	L	G	H	V	W	V	A	T	…	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.1-9	1	L	G	P	V	W	V	H	T	…	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.2-5	1	L	G	H	V	W	V	D	Q	…	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.2-19	1	L	G	H	V	W	V	N	Q	…	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.2-1	1	L	G	H	V	W	V	N	F	…	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W

【０５１９】

（表９）ＣＨ３Ｃ．３５．２１のレジスター内の許容される多様性の探索及びホットスポットの位置

	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165		184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196
野生型	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K		T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F
CH3C.35.20.1	.	.	.	.	.	.	F	.	T	E	W	S	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.20.2	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.20.3	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.20.4	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	.		.	.	S	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.20.5	.	.	.	.	.	.	F	.	T	E	W	A	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.20.6	.	.	.	.	.	.	F	.	T	E	W	V	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.21.a.1	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	S	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.21.a.2	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.21.a.3	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.21.a.4	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	.		.	.	S	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.21.a.5	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	A	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.21.a.6	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	V	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.23.1	.	.	.	.	.	.	F	.	T	E	W	S	.	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.23.2	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	.	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.23.3	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	.	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.23.4	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	.	.	.		.	.	S	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.23.5	.	.	.	.	.	.	F	.	T	E	W	A	.	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.23.6	.	.	.	.	.	.	F	.	T	E	W	V	.	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.24.1	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	S	.	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.24.2	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	.	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.24.3	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	.	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.24.4	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	.	.	.		.	.	S	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.24.5	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	A	.	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.24.6	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	V	.	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.21.17.1	.	.	L	.	.	.	F	.	T	E	W	S	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.21.17.2	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.21.17.3	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.21.17.4	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	.		.	.	S	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.21.17.5	.	.	L	.	.	.	F	.	T	E	W	A	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.21.17.6	.	.	L	.	.	.	F	.	T	E	W	V	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.20	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.21	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.22	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	.	.	.		.	.	T	.	.	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.23	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	.	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.24	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	.	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.21.17	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	.		.	.	T	.	E	E	.	.	.	.	F	.	.
CH3C.35.N390	.	.	.	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	.	.	.		.	.	T	.	.	E	.	.	.	.	F	.	.

【０５２０】

非公式な配列表

SEQ ID NO:	配列	説明
1	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	野生型ヒトFc配列 アミノ酸1～3（PCP）は ヒンジ領域由来のもの。
2	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAK	CH2ドメイン配列。 ヒンジ領域由来の３個の アミノ酸(PCP)をN末端 に含む。
3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	CH3 ドメイン配列
4	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGLVWVGYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVAK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.1
5	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTVWSHYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSK SEWQQGYVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.2
6	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSQYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVEK SDWQQGHVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.3
7	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESVGTPWALYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVLK SEWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.4
8	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTVWSKYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSK SEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.17
9	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGHVWAVYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.18
10	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGLVWVGYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.21
11	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESMGHVWVGYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSTWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.25

SEQ ID NO:	配列	説明
12	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGLVWVFSKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPKS TWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.34
13	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKS EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35
14	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSK SEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.44
15	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGHVWVGYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSK SEWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.51
16	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGHVWVATKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.3.1-3
17	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGPVWVHTKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.3.1-9
18	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGHVWVDQKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.3.2-5
19	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGHVWVNQKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.3.2-19
20	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGHVWVNFKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.3.2-1
21	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESLGHVWAVYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVP KSTWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.18.E153W (CH3C.35.13)
22	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGHVWAVYQTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.18.K165Q (CH3C.35.14)

SEQ ID NO:	配列	説明
23	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESLGHVWAVYQTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVP KSTWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.18.E153W. K165Q (CH3C.35.15)
24	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK SEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.E153W (CH3C.35.19)
25	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.S188E (CH3C.35.20)
26	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.E153W. S188E (CH3C.35.21)
27	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK SEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH3C.35.N163
28	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSSYQTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKS EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH3C.35.K165Q
29	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYQTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK SEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.N163. K165Q
30	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFDYVTTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFHDLSLSPGK	クローン CH3B.1
31	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFDMVTTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFHDLSLSPGK	クローン CH3B.2
32	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFEYVTTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFHDLSLSPGK	クローン CH3B.3
33	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFEMVTTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFHDLSLSPGK	クローン CH3B.4

SEQ ID NO:	配列	説明
34	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFELVTTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFHDLSLSPGK	クローンCH3B.5
35	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFEIVTTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFHDLSLSPGK	クローンCH3B.6
36	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFDIVTTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFHDLSLSPGK	クローンCH3B.7
37	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFDYVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFHDLSLSPGK	クローンCH3B.8
38	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFGMVTTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFHDLSLSPGK	クローンCH3B.9
39	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFADVTILPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFYDLSLSPGK	クローンCH3B.10
40	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFGLVTTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFHDLSLSPGK	クローンCH3B.11
41	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFDYVTTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFSDLSLSPGK	クローンCH3B.12
42	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRIDYVTTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFSDLSLSPGK	クローンCH3B.13
43	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFKDVTILPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFFDLSLSPGK	クローンCH3B.14
44	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFDLVTILPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFYDLSLSPGK	クローンCH3B.15

SEQ ID NO:	配列	説明
45	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRIDYVTTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFSDLSLSPGK	クローンCH3B.16
46	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFELVATLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFHDLSLSPGK	クローンCH3B.17
47	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVEFI WYVDGVDVRYEWQLPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH2A2.1
48	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVGF VWYVDGVPVSWEWYWPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH2A2.2
49	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF DWYVDGVMVRREWHRPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH2A2.3
50	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVSFE WYVDGVPVRWEWQWPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH2A2.4
51	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVAF TWYVDGVPVRWEWQNPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH2A2.5
52	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVNF DWYVDGVLVRREWHRPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH2A2.6
53	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF VWYVDGVAVRWEWIRPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH2A2.7
54	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVEFI WYVDGVEVAWEWFWPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH2A2.8
55	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVGF AWYVDGVNVRVEWQYPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH2A2.9

SEQ ID NO:	配列	説明
56	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVGF VWYVDGVEVRREWVRPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2A2.10
57	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVSF DWYVDGVLVRREWQRPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2A2.11
58	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVEFT WYVDGVDVRYEWYYPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2A2.12
59	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF TWYVDGVDVRYEWVRPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2A2.13
60	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF YWYVDGVNVRREWHRPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2A2.14
61	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVYF DWYVDGVMVRREWHRPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2A2.15
62	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVWF EWYVDGVFVGVAYDVPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2A2.16
63	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPQTPPWEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYTYYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.1
64	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPPSPPWEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYSNYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.2
65	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPQTPPWEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYSNYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.3
66	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDFRGPPWEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYHDYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.4

SEQ ID NO:	配列	説明
67	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPQTVPWEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYSNYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.5
68	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPKMPPWEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYTYYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.6
69	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPPVPPWEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYSNYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.7
70	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPAFPPWEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYQNYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.8
71	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDAIWPPWEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYSNYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.9
72	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPPVAPWEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYSSYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.10
73	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPQMPPQEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYSNYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.11
74	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPQTAPWEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYTYYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.12
75	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPQTPPQEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYSNYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.13
76	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPQTPPWEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYTYYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.14
77	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPRVPPWEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYQNYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.15

SEQ ID NO:	配列	説明
78	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDPSVPPWEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYYSNYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.16
79	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDMLWPVPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEVYHRPYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.17
80	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDMLWPVPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREETYHNPYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.18
81	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDMEWPVTEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREETYHNPYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.19
82	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDMLWPVPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREETYHHPYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.20
83	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDDDLTFQEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEVYVTPYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.21
84	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDDDLTFQEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREELYVTPYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.22
85	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDAYGDPEEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEWYDVPYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2C.23
86	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSVPPRMVKF NWYVDGVEVHNAKTKSLTSQHNSTVRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2D.1
87	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSVPPWMVKF NWYVDGVEVHNAKTKSLTSQHNSTVRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2D.2
88	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDMWEYVK FNWYVDGVEVHNAKTKPWVKQLNSTWRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2D.3

SEQ ID NO:	配列	説明
89	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDDWTWVK FNWYVDGVEVHNAKTKPWIAQPNSTWRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2D.4
90	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDDWEWVK FNWYVDGVEVHNAKTKPWKLQLNSTWRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2D.5
91	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPWVW FYWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCSVVNIALWWSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2E3.1
92	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPVVGF RWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCRVSNSALTWKIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2E3.2
93	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPVVGF RWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCRVSNSALSWRIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2E3.3
94	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPIVGFR WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CRVSNSALRWRIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2E3.4
95	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPAVGF EWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCQVFNWALDWVIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH2E3.5
96	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVXF XWYVDGVXVXXXXXXPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH2A2ライブラリー（Xはランダム化したアミノ酸位置を示す）
97	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDXXXXXXEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEXYXXXYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH2C ライブラリー（Xはランダム化したアミノ酸位置を示す）
98	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSXXXXXVKF NWYVDGVEVHNAKTKPXXXQXNSTXRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH2D ライブラリー（Xはランダム化したアミノ酸位置を示す）
99	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPXVXF XWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCXVXNXALXXXIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH2E3 ライブラリー（Xはランダム化したアミノ酸位置を示す）

SEQ ID NO:	配列	説明
100	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRXXXVXTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYXXXXLSLSPGK	CH3Bライブラリー (Xはランダム化した アミノ酸位置を示す)
101	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFDYVTTLPPXXXEXXXXQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFSDLSLSPGK	CH3B-パッチ１ ライブラリー(Xはランダム化したアミノ酸位置を示す)
102	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFDYXTTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALXXHXGFSDLSLSPGK	CH3B-パッチ２ ライブラリー(Xはランダム化したアミノ酸位置を示す)
103	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFDYVTTLXPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFSDXSLXXXX	CH3B-パッチ３ ライブラリー(Xはランダム化したアミノ酸位置を示す)
104	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGXPXFDYVTTLPPSRDELTKNQVSLTC LVXGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSXGXFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYGFSDLSLSPGK	CH3B-パッチ４ ライブラリー(Xはランダム化したアミノ酸位置を示す)
105	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRFDYVTTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWXSXXQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQXXXFSCSVMHEALHNHYGFSDLSLSPGK	CH3B-パッチ５ ライブラリー(Xはランダム化したアミノ酸位置を示す)
106	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESXGXXXXXYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVXK XXWQQGXVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH3Cライブラリー (Xはランダム化した アミノ酸位置を示す)
107	NSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDF EDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV NAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRA AAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVS	ヒトTfRアピカルドメイン
108	NSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDF EDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV KADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRA AAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVS	カニクイザルTfR アピカルドメイン
109	SSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKN VKLTVSNDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKL VHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVL IYMDQTKFPIVNAELSGP	ファージ上に提示させた、ループを切断した ヒトTfRアピカルドメイン
110	SSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKS VKLTVSNDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKL VHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVL IYMDQTKFPIVKADLSGP	ファージ上に提示させた、ループを切断した カニクイザル TfRアピカルドメイン
111	VPPXM	CH2D 保存配列
112	SLTS	CH2D 保存配列
113	WESXGXXXXXYK	第１の部分の CH3Cレジスター

SEQ ID NO:	配列	説明
114	TVXKXXWQQGXV	第２の部分の CH3Cレジスター
115	YGTEW	CH3C 保存配列
116	LGLVWVG	CH3C 改変結合配列
117	YGTVWSH	CH3C 改変結合配列
118	YGTEWSQ	CH3C 改変結合配列
119	VGTPWAL	CH3C 改変結合配列
120	YGTVWSK	CH3C 改変結合配列
121	LGHVWAV	CH3C 改変結合配列
122	MGHVWVG	CH3C 改変結合配列
123	LGLVGVF	CH3C 改変結合配列
124	YGTEWSS	CH3C 改変結合配列
125	YGTEWSN	CH3C 改変結合配列
126	LGHVWVG	CH3C 改変結合配列
127	LGHVWVA	CH3C 改変結合配列
128	LGPVWVH	CH3C 改変結合配列
129	LGHVWVD	CH3C 改変結合配列
130	LGHVWVN	CH3C 改変結合配列
131	AKSTWQQGW	CH3C 改変結合配列
132	SKSEWQQGY	CH3C 改変結合配列
133	EKSDWQQGH	CH3C 改変結合配列
134	LKSEWQQGW	CH3C 改変結合配列
135	SKSEWQQGF	CH3C 改変結合配列
136	PKSTWQQGW	CH3C 改変結合配列
137	DKSTWQQGW	CH3C 改変結合配列
138	TKSEWQQGF	CH3C 改変結合配列
139	SKSEWQQGW	CH3C 改変結合配列
140	FDYVT	CH3B 改変結合配列

SEQ ID NO:	配列	説明
141	FDMVT	CH3B 改変結合配列
142	FEYVT	CH3B 改変結合配列
143	FEMVT	CH3B 改変結合配列
144	FELVT	CH3B 改変結合配列
145	FEIVT	CH3B 改変結合配列
146	FDIVT	CH3B 改変結合配列
147	FGMVT	CH3B 改変結合配列
148	FADVT	CH3B 改変結合配列
149	FGLVT	CH3B 改変結合配列
150	IDYVT	CH3B 改変結合配列
151	FKDVT	CH3B 改変結合配列
152	FDLVT	CH3B 改変結合配列
153	FELVA	CH3B 改変結合配列
154	GHFD	CH3B 改変結合配列
155	GFYD	CH3B 改変結合配列
156	GFSD	CH3B 改変結合配列
157	GFFD	CH3B 改変結合配列
158	EFI	CH2A2 改変結合配列
159	GFV	CH2A2 改変結合配列
160	QFD	CH2A2 改変結合配列
161	SFE	CH2A2 改変結合配列
162	AFT	CH2A2 改変結合配列
163	NFD	CH2A2 改変結合配列
164	QFV	CH2A2 改変結合配列
165	GFA	CH2A2 改変結合配列
166	SFD	CH2A2 改変結合配列
167	EFT	CH2A2 改変結合配列

SEQ ID NO:	配列	説明
168	QFT	CH2A2 改変結合配列
169	QFY	CH2A2 改変結合配列
170	YFD	CH2A2 改変結合配列
171	WFE	CH2A2 改変結合配列
172	DVRYEWQL	CH2A2 改変結合配列
173	PVSWEWYW	CH2A2 改変結合配列
174	MVRREWHR	CH2A2 改変結合配列
175	PVRWEWQW	CH2A2 改変結合配列
176	PVRWEWQN	CH2A2 改変結合配列
177	LVRREWHR	CH2A2 改変結合配列
178	AVRWEWIR	CH2A2 改変結合配列
179	EVAWEWFW	CH2A2 改変結合配列
180	NVRVEWQY	CH2A2 改変結合配列
181	EVRREWVR	CH2A2 改変結合配列
182	LVRREWQR	CH2A2 改変結合配列
183	DVRYEWYY	CH2A2 改変結合配列
184	DVRYEWVR	CH2A2 改変結合配列
185	NVRREWHR	CH2A2 改変結合配列
186	FVGVAYDV	CH2A2 改変結合配列
187	PQTPPW	CH2C 改変結合配列
188	PPSPPW	CH2C 改変結合配列
189	FRGPPW	CH2C 改変結合配列
190	PQTVPW	CH2C 改変結合配列
191	PKMPPW	CH2C 改変結合配列
192	PPVPPW	CH2C 改変結合配列
193	PAFPPW	CH2C 改変結合配列
194	AIWPPW	CH2C 改変結合配列

SEQ ID NO:	配列	説明
195	PPVAPW	CH2C 改変結合配列
196	PQMPPQ	CH2C 改変結合配列
197	PQTAPW	CH2C 改変結合配列
198	PQTPPQ	CH2C 改変結合配列
199	PRVPPW	CH2C 改変結合配列
200	PSVPPW	CH2C 改変結合配列
201	MLWPVP	CH2C 改変結合配列
202	MEWPVT	CH2C 改変結合配列
203	DDLTFQ	CH2C 改変結合配列
204	AYGDPE	CH2C 改変結合配列
205	EYYTY	CH2C 改変結合配列
206	EYYSN	CH2C 改変結合配列
207	EYYHD	CH2C 改変結合配列
208	EYYQN	CH2C 改変結合配列
209	EYYSS	CH2C 改変結合配列
210	VYHRP	CH2C 改変結合配列
211	TYHNP	CH2C 改変結合配列
212	TYHHP	CH2C 改変結合配列
213	VYVTP	CH2C 改変結合配列
214	LYVTP	CH2C 改変結合配列
215	WYDVP	CH2C 改変結合配列
216	VPPRM	CH2D 改変結合配列
217	VPPWM	CH2D 改変結合配列
218	DMWEY	CH2D 改変結合配列
219	DDWTW	CH2D 改変結合配列
220	DDWEW	CH2D 改変結合配列
221	LTSQHNSTV	CH2D 改変結合配列

SEQ ID NO:	配列	説明
222	WVKQLNSTW	CH2D 改変結合配列
223	WIAQPNSTW	CH2D 改変結合配列
224	WKLQLNSTW	CH2D 改変結合配列
225	WVWFY	CH2E3 改変結合配列
226	VVGFR	CH2E3 改変結合配列
227	IVGFR	CH2E3 改変結合配列
228	AVGFE	CH2E3 改変結合配列
229	SVVNIALWWS	CH2E3 改変結合配列
230	RVSNSALTWK	CH2E3 改変結合配列
231	RVSNSALSWR	CH2E3 改変結合配列
232	RVSNSALRWR	CH2E3 改変結合配列
233	QVFNWALDWV	CH2E3 改変結合配列
234	EPKSCDKTHTCPPCP	ヒトIgG1ヒンジアミノ酸配列
235	MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLAVDEEENADNNTKANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFTGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAKSGVGTALLLKLAQMFSDMVLKDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFWGSGSHTLPALLENLKLRKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF	ヒトトランスフェリン受容体タンパク質1（TFR1）
236	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH3C.35.19
237	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.20

SEQ ID NO:	配列	説明
238	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21
239	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK SEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.22
240	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.23
241	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.24
242	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESLGHVWAVYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVP KSTWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH3C.18 変異体
243	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESLGHVWAVYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH3C.18 変異体
244	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVYWESLGHVWAVYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH3C.18 変異体
245	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGHVWAVYQTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH3C.18 変異体
246	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGHVWAVYFTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH3C.18 変異体
247	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGHVWAVYHTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH3C.18 変異体
248	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKS EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.1

SEQ ID NO:	配列	説明
249	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKS EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.2
250	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTRE EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.3
251	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTGE EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.4
252	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTRE EWQQGFVFSCWVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.5
253	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKE EWQQGFVFSCWVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.6
254	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTRE EWQQGFVFTCWVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.7
255	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTRE EWQQGFVFTCGVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.8
256	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTRE EWQQGFVFECWVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.9
257	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTRE EWQQGFVFKCWVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.10
258	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTPE EWQQGFVFKCWVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.11
259	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTR EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.12

SEQ ID NO:	配列	説明
260	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTG EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.13
261	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTR EEWQQGFVFTCWVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.14
262	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTG EEWQQGFVFTCWVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.15
263	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTR EEWQQGFVFTCGVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.16
264	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.17
265	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKE EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.18
266	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKE EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.20.1
267	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.20.2
268	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.20.3
269	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKE EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.20.4
270	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESFGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.20.5

SEQ ID NO:	配列	説明
271	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESFGTEWVSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.20.6
272	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C35.21.a.1
273	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.a.2
274	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWVSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.a.3
275	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.a.4
276	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESFGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.a.5
277	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESFGTEWVSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.a.6
278	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.23.1
279	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.23.2
280	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.23.3
281	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.23.4

SEQ ID NO:	配列	説明
282	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESFGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.23.5
283	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESFGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.23.6
284	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESFGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.24.1
285	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.24.2
286	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.24.3
287	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.24.4
288	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESFGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.24.5
289	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESFGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.24.6
290	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKE EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.17.1
291	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.17.2
292	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWVSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.17.3

SEQ ID NO:	配列	説明
293	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKE EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.17.4
294	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESFGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.17.5
295	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVLWESFGTEWVSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.21.17.6
296	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK SEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.N390
297	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESLGHVWVNQKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVP KSTWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.16
298	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESLGHVWVNQQTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPK STWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.17
299	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVWWESLGHVWVNQQTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVP KSTWQQGWVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.18
300	MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLGVDEEE NTDNNTKANGTKPKRCGGNICYGTIAVIIFFLIGFMIGYLGYCKGVEP KTECERLAGTESPAREEPEEDFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFT STIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQFREFKLSKVWRDQHFV KIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVH ANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIY MDQTKFPIVKADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLP NIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLT VSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAKSSVG TALLLKLAQMFSDMVLKDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEG YLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHP VTGRSLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDY PYLGTTMDTYKELVERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDTELNLD YERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRL TTDFRNAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPFRHVFW GSGSHTLSALLESLKLRRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANAL SGDVWDIDNEF	カニクイザルTfR
301	MGWSCIILFLVATATGAYAGTSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEG DCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNDSAQNSVIIVDKNGRLVY LVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIV RAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSASHHHHHH	Hisタグを付け、並べ替えたTfRアピカルドメイン

SEQ ID NO:	配列	説明
302	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGH VWAVYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	発現させたCH3C.18 Fc配列
303	EWESFGTEWSS	CH3C 改変結合配列
304	EWESYGTEWAS	CH3C 改変結合配列
305	EWESYGTEWVS	CH3C 改変結合配列
306	EWESYGTEWSS	CH3C 改変結合配列
307	EWESFGTEWAS	CH3C 改変結合配列
308	EWESFGTEWVS	CH3C 改変結合配列
309	WWESFGTEWSS	CH3C 改変結合配列
310	WWESYGTEWAS	CH3C 改変結合配列
311	WWESYGTEWVS	CH3C 改変結合配列
312	WWESYGTEWSS	CH3C 改変結合配列
313	WWESFGTEWAS	CH3C 改変結合配列
314	WWESFGTEWVS	CH3C 改変結合配列
315	EWESFGTEWSN	CH3C 改変結合配列
316	EWESYGTEWAN	CH3C 改変結合配列
317	EWESYGTEWVN	CH3C 改変結合配列
318	EWESYGTEWSN	CH3C 改変結合配列
319	EWESFGTEWAN	CH3C 改変結合配列
320	EWESFGTEWVN	CH3C 改変結合配列
321	WWESFGTEWSN	CH3C 改変結合配列
322	WWESYGTEWAN	CH3C 改変結合配列
323	WWESYGTEWVN	CH3C 改変結合配列
324	WWESYGTEWSN	CH3C 改変結合配列
325	WWESFGTEWAN	CH3C 改変結合配列
326	WWESFGTEWVN	CH3C 改変結合配列

SEQ ID NO:	配列	説明
327	LWESFGTEWSS	CH3C 改変結合配列
328	LWESYGTEWAS	CH3C 改変結合配列
329	LWESYGTEWVS	CH3C 改変結合配列
330	LWESYGTEWSS	CH3C 改変結合配列
331	LWESFGTEWAS	CH3C 改変結合配列
332	LWESFGTEWVS	CH3C 改変結合配列
333	WWESLGHVWAV	CH3C 改変結合配列
334	EWESLGHVWAV	CH3C 改変結合配列
335	LWESLGHVWAV	CH3C 改変結合配列
336	YWESLGHVWAV	CH3C 改変結合配列
337	EWESLGLVWVF	CH3C 改変結合配列
338	WWESLGHVWVN	CH3C 改変結合配列
339	EWESLGHVWVN	CH3C 改変結合配列
340	TKEEWQQGF	CH3C 改変結合配列
341	SKEEWQQGF	CH3C 改変結合配列
342	PKTSWQQGW	CH3C 改変結合配列
343	TREEWQQGF	CH3C 改変結合配列
344	TPEEWQQGF	CH3C 改変結合配列
345	TGEEWQQGF	CH3C 改変結合配列
346	TVXKXXWQQGXV	第２の部分のCH3C レジスター
347	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH3C.35.8 (YTE及びLALAPG変異を有するクローン CH3C.35.20)
348	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKE EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH3C.35.9 (YTE及びLALAPG変異を有するクローン CH3C.35.21)

SEQ ID NO:	配列	説明
349	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ変異を有する クローンCH3C.35.20.1
350	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びLALA変異を有する クローンCH3C.35.20.1
351	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びLALAPG変異を 有するクローン CH3C.35.20.1
352	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びYTE変異を有する クローンCH3C.35.20.1
353	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ、LALA、及びYTE変異 を有するクローン CH3C.35.20.1
354	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ、LALAPG、及びYTE 変異を有するクローン CH3C.35.20.1
355	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKE EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異を有する クローンCH3C.35.20.1
356	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKE EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びLALA変異を 有するクローン CH3C.35.20.1
357	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKE EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びLALAPG変異を 有するクローン CH3C.35.20.1
358	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKE EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びYTE変異を 有するクローン CH3C.35.20.1
359	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKE EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール、LALA、及び YTE変異を有するクローン CH3C.35.20.1

SEQ ID NO:	配列	説明
360	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKE EWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール、LALAPG、及びYTE変異を有するクローンCH3C.35.20.1
361	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ変異を有するクローンCH3C.35.23.2
362	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びLALA変異を有するクローンCH3C.35.23.2
363	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びLALAPG変異を有するクローンCH3C.35.23.2
364	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びYTE変異を有するクローンCH3C.35.23.2
365	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ、LALA、及びYTE変異を有するクローンCH3C.35.23.2
366	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ、LALAPG、及びYTE変異を有するクローンCH3C.35.23.2
367	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異を有するクローンCH3C.35.23.2
368	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びLALA変異を有するクローンCH3C.35.23.2
369	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びLALAPG変異を有するクローンCH3C.35.23.2
370	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びYTE変異を有するクローンCH3C.35.23.2

SEQ ID NO:	配列	説明
371	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール、LALA、及びYTE変異を有するクローンCH3C.35.23.2
372	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール、LALAPG、及びYTE変異を有するクローンCH3C.35.23.2
373	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ変異を有するクローンCH3C.35.23.3
374	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びLALA変異を有するクローンCH3C.35.23.3
375	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びLALAPG変異を有するクローンCH3C.35.23.3
376	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びYTE変異を有するクローンCH3C.35.23.3
377	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ、LALA、及びYTE変異を有するクローンCH3C.35.23.3
378	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ、LALAPG、及びYTE変異を有するクローンCH3C.35.23.3
379	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異を有するクローンCH3C.35.23.3
380	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びLALA変異を有するクローンCH3C.35.23.3
381	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びLALAPG変異を有するクローンCH3C.35.23.3

SEQ ID NO:	配列	説明
382	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びYTE変異を 有するクローン CH3C.35.23.3
383	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール、LALA、及び YTE変異を有するクローン CH3C.35.23.3
384	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール、LALAPG、及び YTE変異を有するクローン CH3C.35.23.3
385	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVS KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ変異を有する クローン CH3C.35.23.4
386	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVS KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びLALA変異を 有するクローン CH3C.35.23.4
387	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVS KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びLALAPG変異を 有するクローン CH3C.35.23.4
388	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVS KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びYTE変異を 有するクローン CH3C.35.23.4
389	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVS KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ、LALA、及びYTE変異 を有するクローン CH3C.35.23.4
390	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVS KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ、LALAPG、及び YTE変異を有するクローン CH3C.35.23.4
391	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVSK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異を有する クローン CH3C.35.23.4
392	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVSK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びLALA変異を 有するクローン CH3C.35.23.4

SEQ ID NO:	配列	説明
393	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVSK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びLALAPG変異を 有するクローン CH3C.35.23.4
394	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVSK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びYTE変異を 有するクローン CH3C.35.23.4
395	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVSK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール、LALA、及び YTE変異を有するクローン CH3C.35.23.4
396	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVSK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール、LALAPG、及び YTE変異を有するクローン CH3C.35.23.4
397	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ変異を有する クローン CH3C.35.21.17.2
398	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びLALA変異を 有するクローン CH3C.35.21.17.2
399	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びLALAPG変異を 有するクローン CH3C.35.21.17.2
400	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びYTE変異を 有するクローン CH3C.35.21.17.2
401	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ、LALA、及びYTE変異 を有するクローン CH3C.35.21.17.2
402	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ、LALAPG、及び YTE変異を有するクローン CH3C.35.21.17.2
403	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVLWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異を有する クローン CH3C.35.21.17.2

SEQ ID NO:	配列	説明
404	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVLWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びLALA変異を 有するクローン CH3C.35.21.17.2
405	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVLWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びLALAPG変異を 有するクローン CH3C.35.21.17.2
406	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVLWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びYTE変異を 有するクローン CH3C.35.21.17.2
407	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVLWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール、LALA、及び YTE変異を有するクローン CH3C.35.21.17.2
408	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVLWESYGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール、LALAPG、及び YTE変異を有するクローン CH3C.35.21.17.2
409	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ変異を有する クローン CH3C.35.23
410	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びLALA変異を 有するクローン CH3C.35.23
411	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びLALAPG変異を 有するクローン CH3C.35.23
412	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ及びYTE変異を 有するクローン CH3C.35.23
413	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ、LALA、及びYTE変異 を有するクローン CH3C.35.23
414	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVT KEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ、LALAPG、及び YTE変異を有するクローン CH3C.35.23

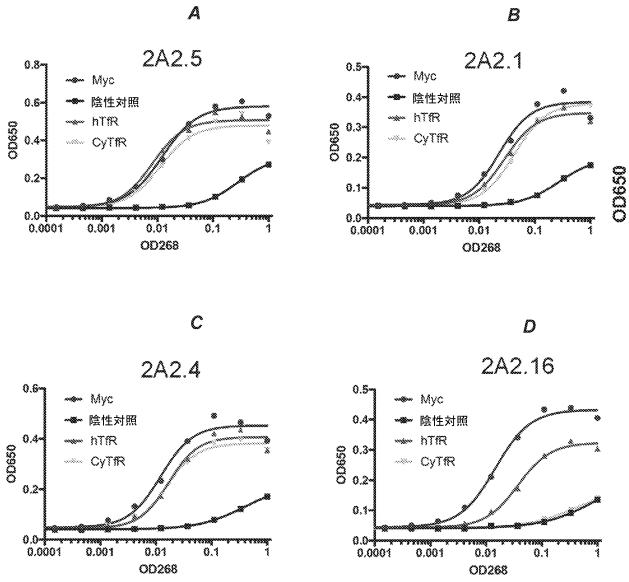
SEQ ID NO:	配列	説明
415	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異を有する クローン CH3C.35.23
416	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びLALA変異を 有するクローン CH3C.35.23
417	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びLALAPG変異を 有するクローン CH3C.35.23
418	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール及びYTE変異を 有するクローン CH3C.35.23
419	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール、LALA、及び YTE変異を有するクローン CH3C.35.23
420	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTK EEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール、LALAPG、及び YTE変異を有するクローン CH3C.35.23
421	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGT EWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	発現させた CH3C.35 Fc 配列
422	NSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDF EDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV NAXLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRA AAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSENKNVKLTVS X は、DまたはE	ヒトとカニクイザルの TfR間のコンセンサス配列
423	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	IGHG1_P01857
424	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVD KTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	IGHG2_P01859

SEQ ID NO:	配列	説明
425	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKV DKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPR CPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	IGHG3_P01860
426	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	IGHG4_P01861
427	TISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSE	ポリペプチド_1
428	DKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYT PVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQT	ポリペプチド_2
429	SKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIK	ポリペプチド_3
430	SKNVK	ポリペプチド_4
431	SKNVKLTVSN	ポリペプチド_5
432	SKNVKLTVSNVLKEI	ポリペプチド_6
433	SKNVKLTVSNVLKEIKILNI	ポリペプチド_7
434	KFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTP	ポリペプチド_8
435	KFPIV	ポリペプチド_9
436	KFPIVNAELS	ポリペプチド_10
437	KFPIVNAELSFFGHA	ポリペプチド_11
438	KFPIVNAELSFFGHAHLGTG	ポリペプチド_12
439	GFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQ	ポリペプチド_13
440	NIPVQ	ポリペプチド_14
441	SSGLPNIPVQ	ポリペプチド_15
442	FPPSRSSGLPNIPVQ	ポリペプチド_16
443	FNHTQFPPSRSSGLPNIPVQ	ポリペプチド_17
444	SKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIV	ポリペプチド_18
445	SVIIV	ポリペプチド_19
446	DSAQNSVIIV	ポリペプチド_20
447	KIQVKDSAQNSVIIV	ポリペプチド_21
448	DQHFVKIQVKDSAQNSVIIV	ポリペプチド_22
449	SSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKN VKLTVSN	ポリペプチド_23
450	DSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGT KKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTK FPIVNAELS	ポリペプチド_24
451	SSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKS VKLTVSN	ポリペプチド_25
452	DSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGT KKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTK FPIVKADLS	ポリペプチド_26
453	GGGG	リンカー_1
454	GSGS	リンカー_2
455	SGGG	リンカー_3
456	GSGG	リンカー_4
457	GGSG	リンカー_5

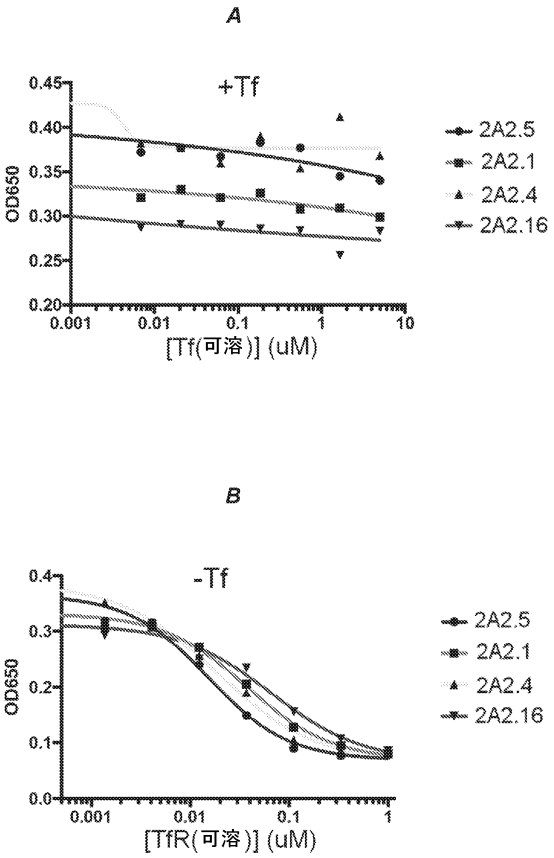
SEQ ID NO:	配列	説明
458	GGGS	リンカー_6
459	HHHHHH	精製ペプチド_1
460	HHHHHHHHHH	精製ペプチド_2
461	GLNDIFEAQKIEWHE	精製ペプチド_3
462	DYKDDDDK	精製ペプチド_4
463	EQKLISEEDL	精製ペプチド_5
464	YPYDVPDYA	精製ペプチド_6
465	MSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRL MEAFAKRQGKEMDSLRFLYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQ IGGS	Smt3
466	ENLYFQS	TEV切断配列
467	DEMEECSQ	NS3 HCV切断配列
468	MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRHMASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPE THINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFAKRQGKEMDSLRFLYDG IRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGSGLNDIFEAQKIEWHELEVL FQGPSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCRMVTS ESKNVKLTVSNDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATV TGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLN AIGVLIYMDQTKFPIVNAELS	ヒトTfRコンストラクト
469	MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRHMASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPE THINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRRLMEAFAKRQGKEMDSLRFLYDG IRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGSGLNDIFEAQKIEWHELEVL FQGPSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCKMVTS ENKSVKLTVSNDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATV TGKLVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLN AIGVLIYMDQTKFPIVKADLS	カニクイザルTfR コンストラクト
470	TXWSX	クローンモチーフ
471	KDSAQNS	N-末端配列
472	DSAQN	N-末端配列
473	LTVSN	C-末端配列
474	MGWSCIILFLVATATGAYAG	SEQ ID NO:301 のTfR アピカルドメインコンストラクトのシグナルペプチド

【図面】

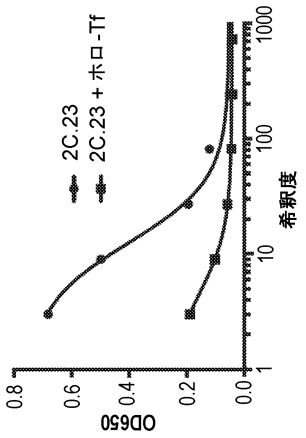
【図１】



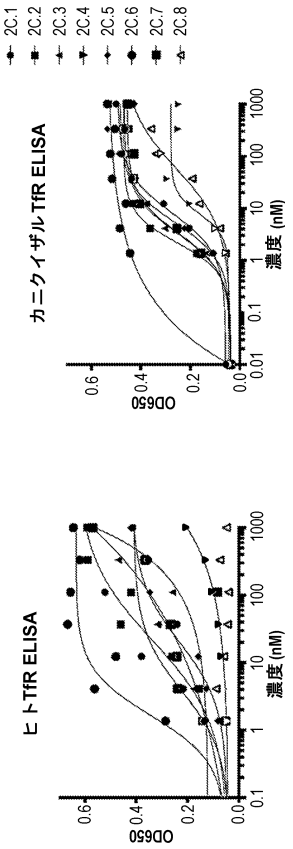
【図２】



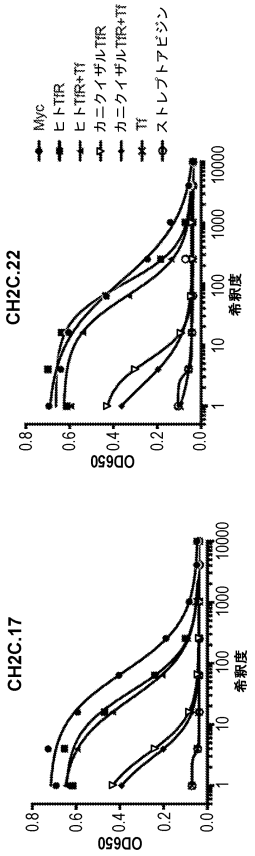
【図３Ａ】



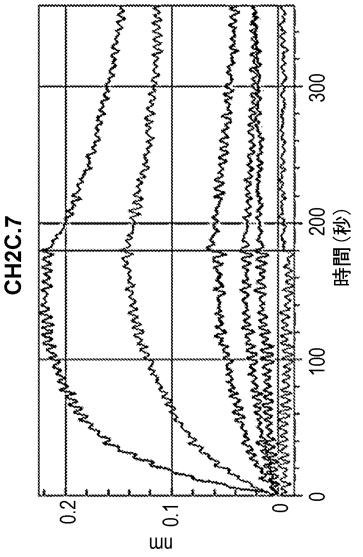
【図３Ｂ】



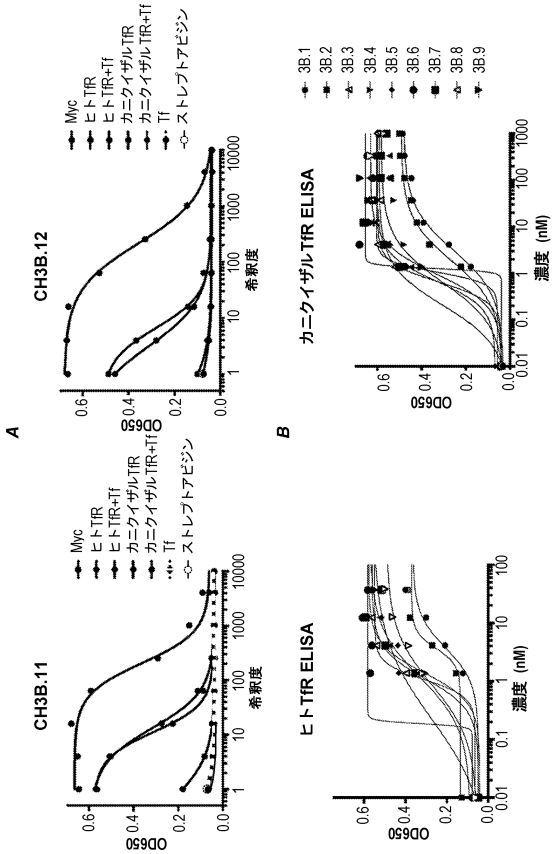
【図３Ｃ】


CH2C.22
CH2C.17
OD650
希釈度
Myc
ヒトTfR
ヒトTfR+Tf
カニクイザルTfR
カニクイザルTfR+Tf
Tf
ストレプトアビジン

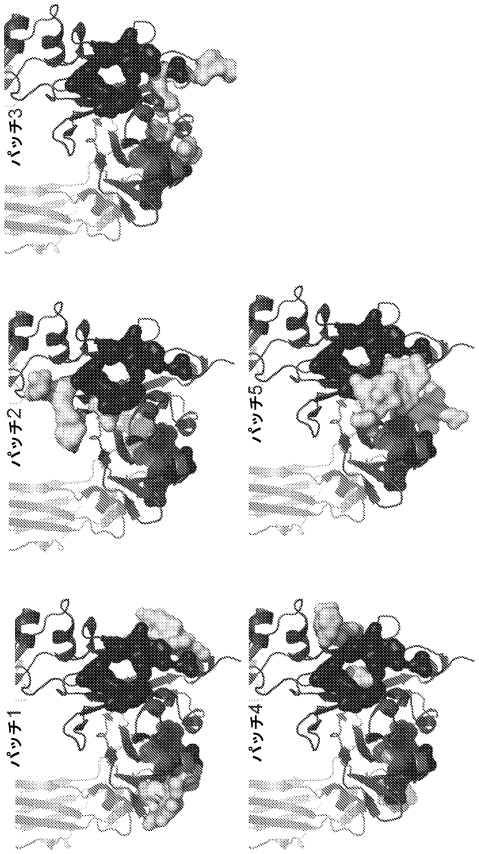
【図３Ｄ】


CH2C.7
RU
時間（秒）

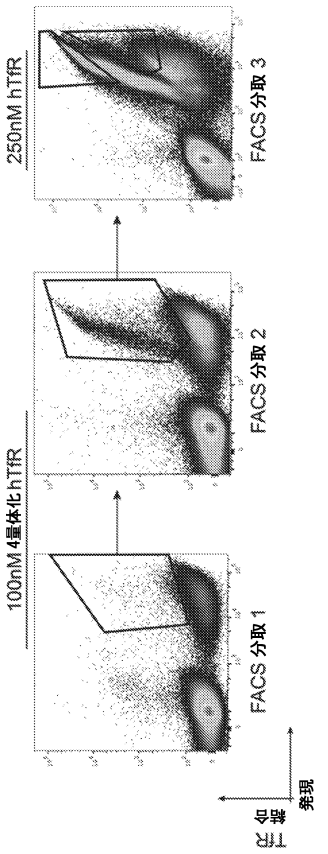
【図４】


A
CH3B.12
CH3B.11
B
カニクイザルTfR ELISA
ヒトTfR ELISA
3B.1
3B.2
3B.3
3B.4
3B.5
3B.6
3B.7
3B.8
3B.9
濃度（nM）

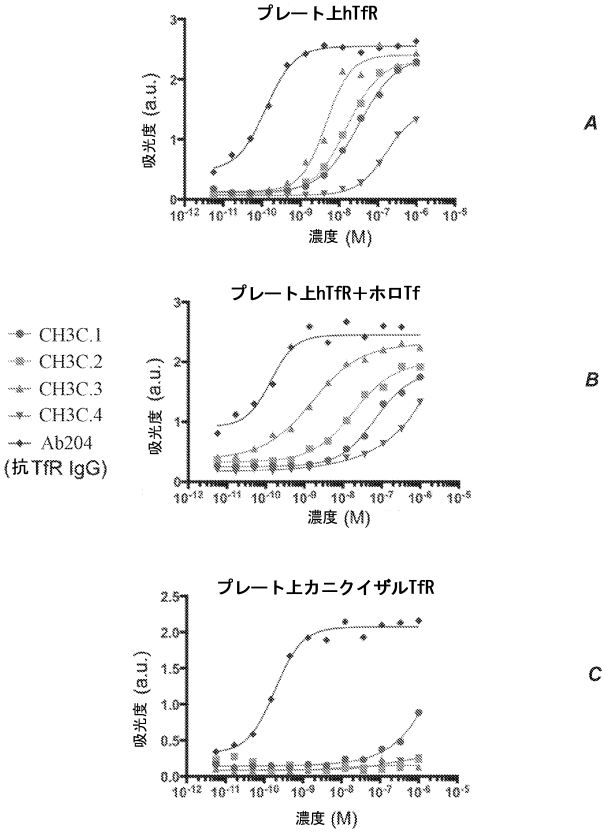
【図５】


パッチ1
パッチ2
パッチ3
パッチ4
パッチ5

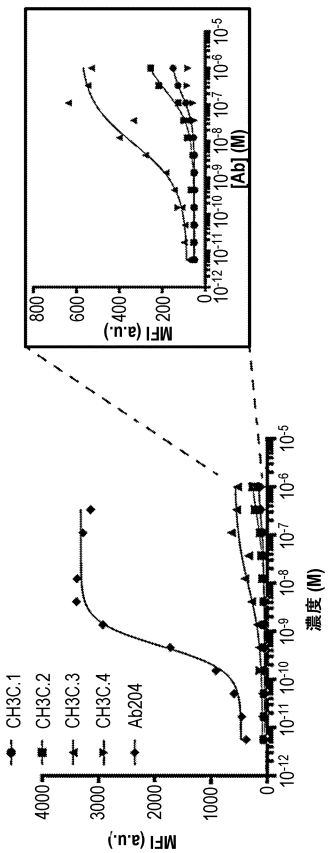
【図６】


250nM hTfR
FACS分取 3
FACS分取 2
100nM 4量体化hTfR
FACS分取 1
発現
下方

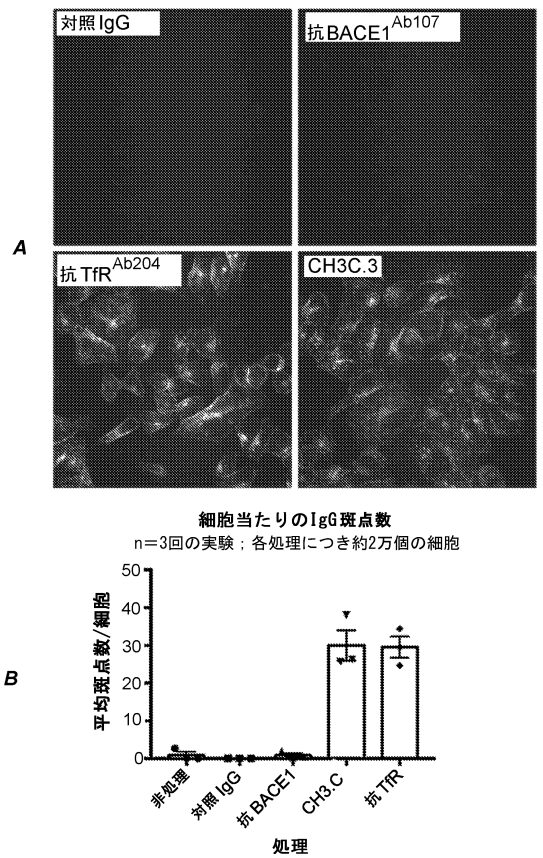
【図７】


プレート上hTfR
吸光度 (a.u.)
濃度 (M)
A
プレート上hTfR＋ホロTf
CH3C.1
CH3C.2
CH3C.3
CH3C.4
Ab204
(抗TfR IgG)
B
プレート上カニクイザルTfR
C

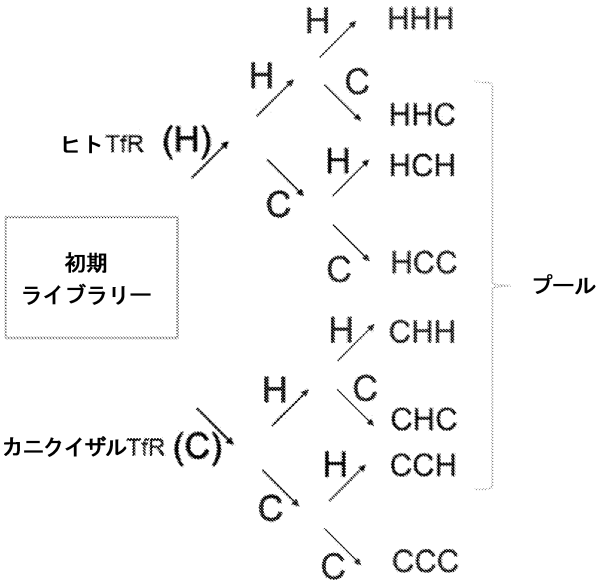
【図８】


MFI (a.u.)
[Ab] (M)
CH3C.1
CH3C.2
CH3C.3
CH3C.4
Ab204
濃度 (M)

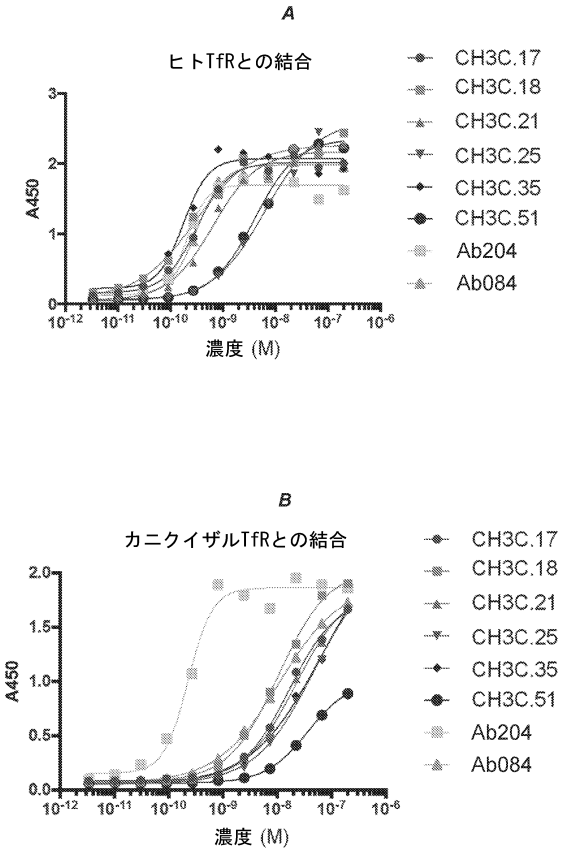
【図９】


対照IgG
抗BACE1Ab107
抗TfRAb204
CH3C.3
A
細胞当たりのIgG斑点数
n＝3回の実験；各処理につき約2万個の細胞
平均斑点数/細胞
非処理
対照IgG
抗BACE1
CH3.C
抗TfR
処理
B

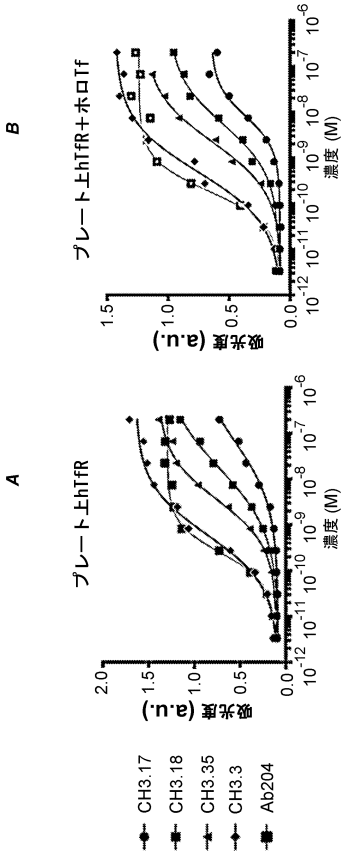
【図１０】



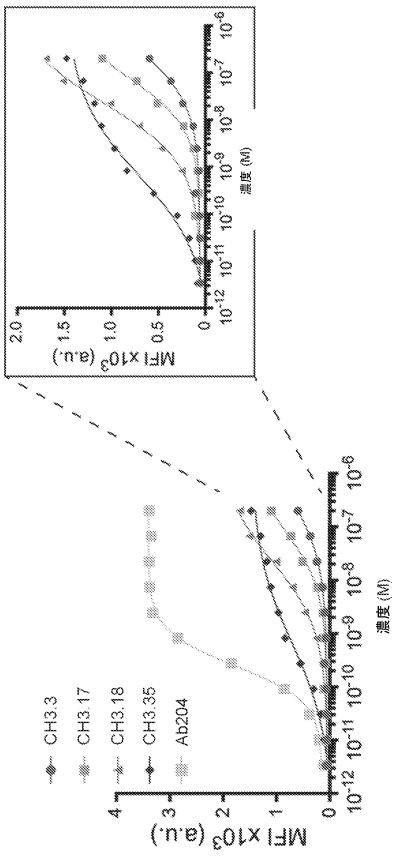
【図１１】



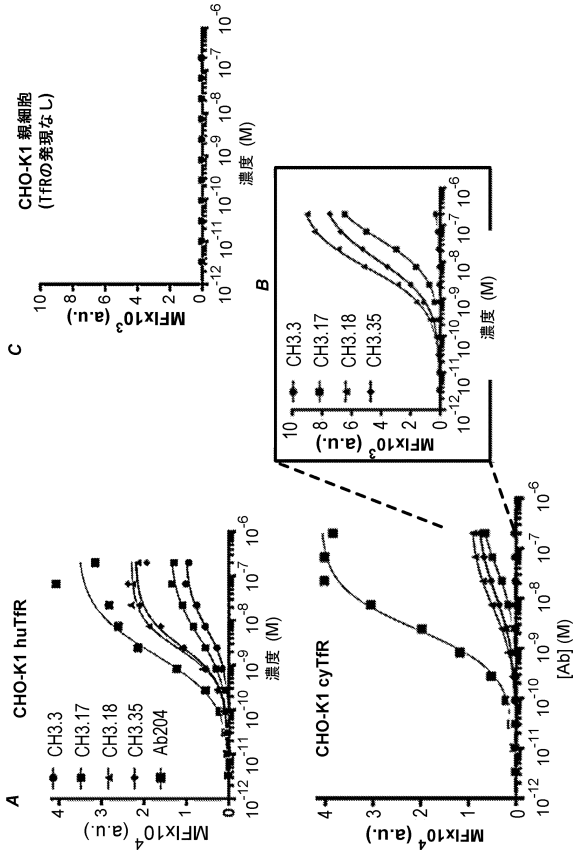
【図１２】



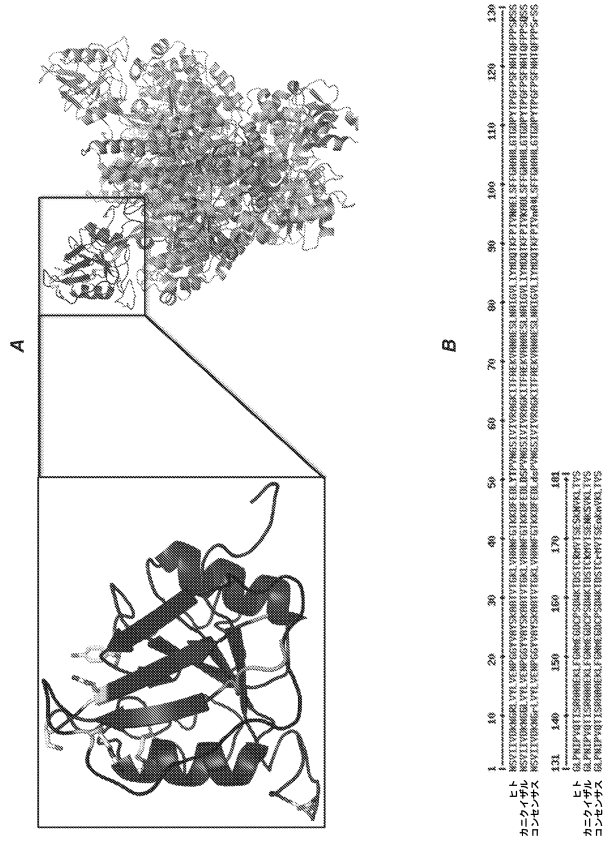
【図１３】



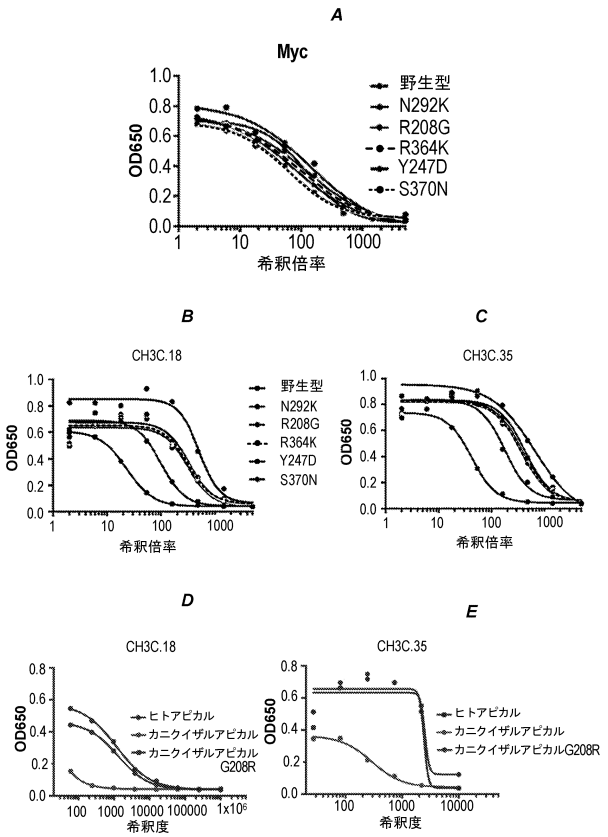
【図１４】



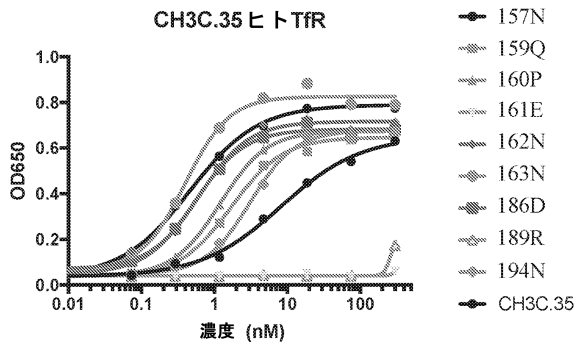
【図１５】



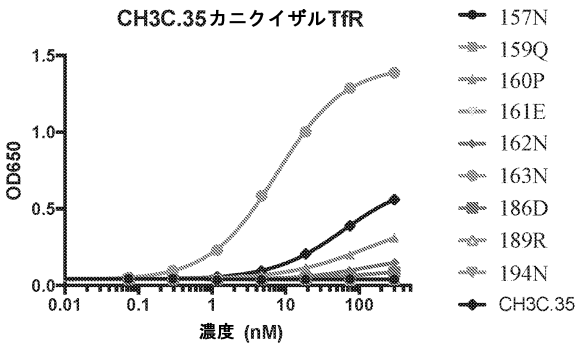
【図１６】



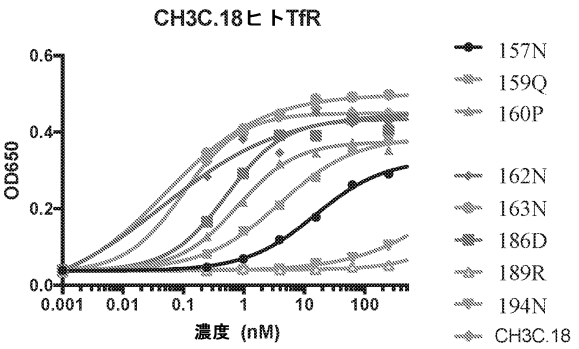
【図１７Ａ】



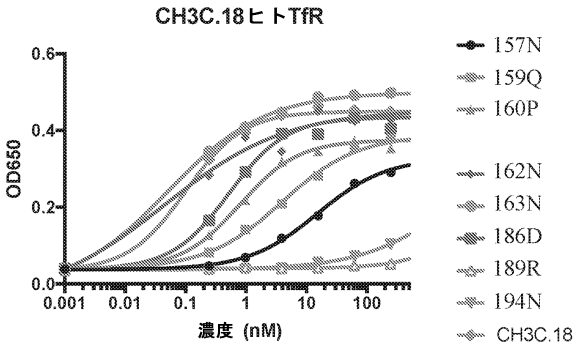
【図１７Ｂ】



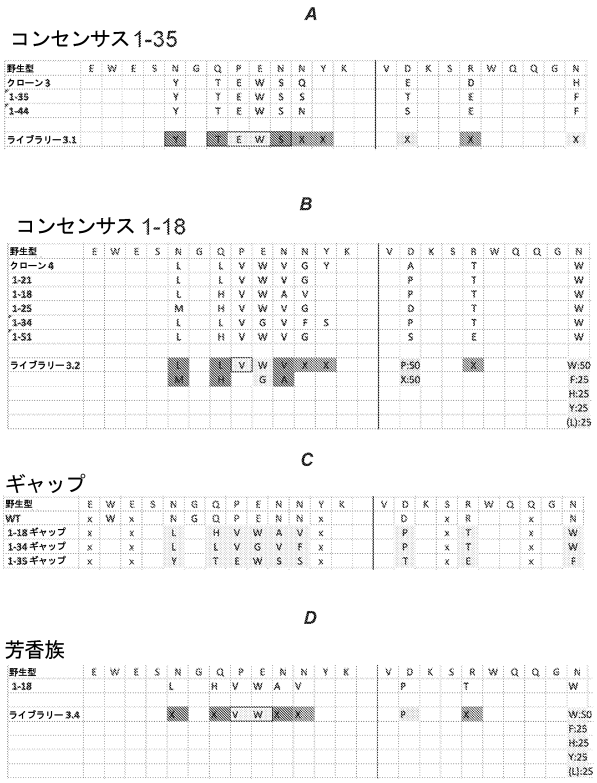
【図１７Ｃ】



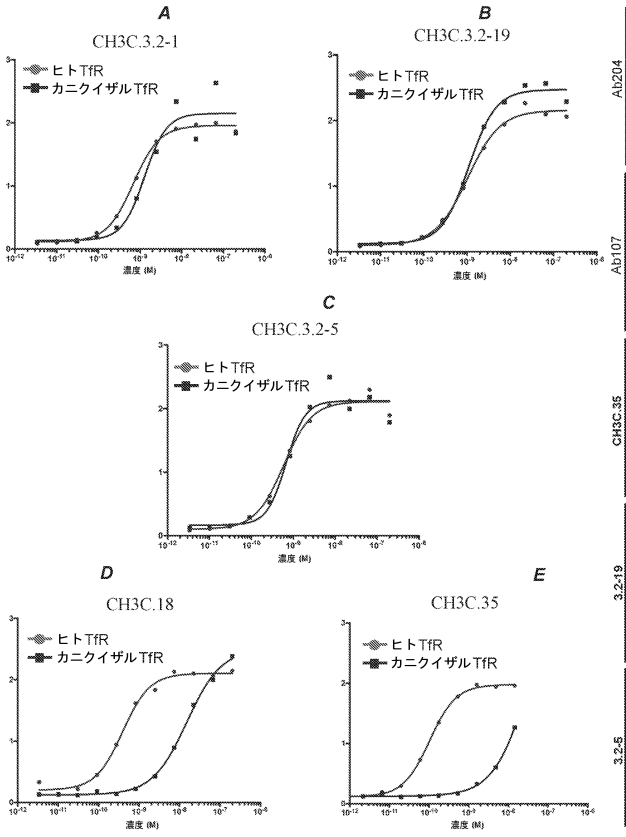
【図１７Ｄ】



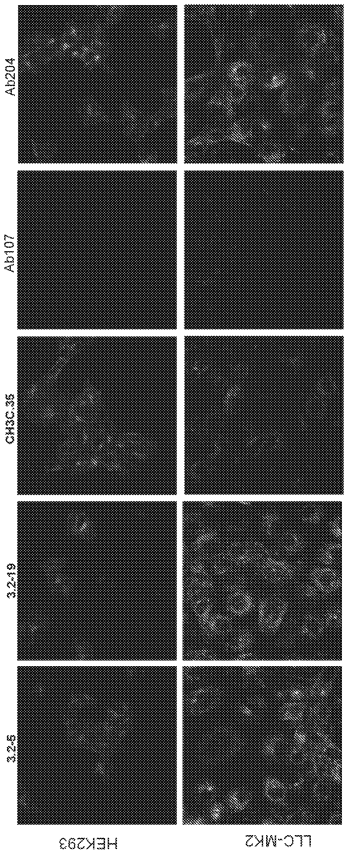
【図１８】



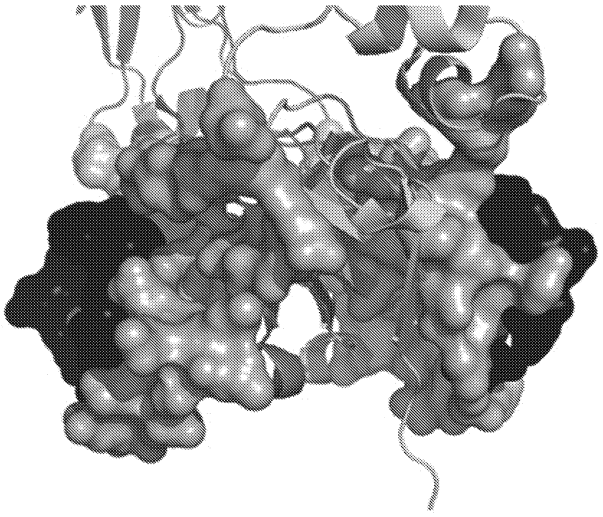
【図１９】



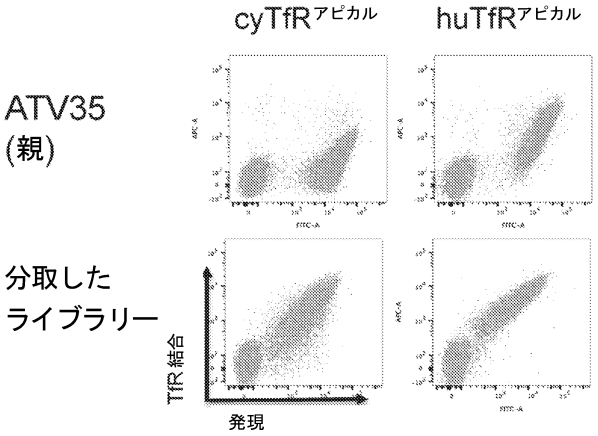
【図２０】



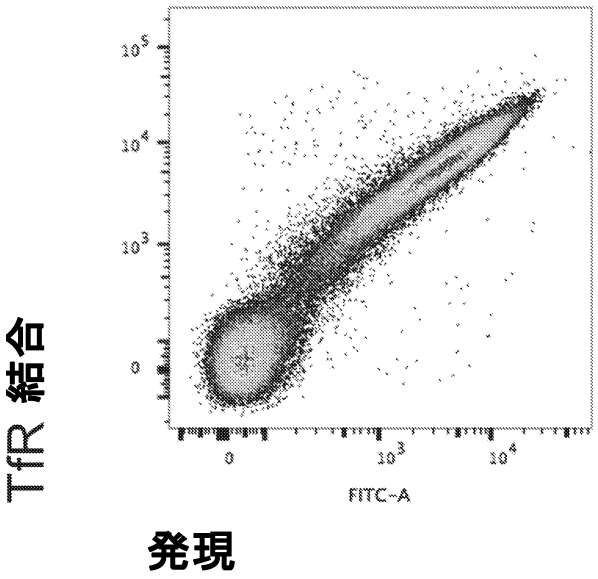
【図２１】



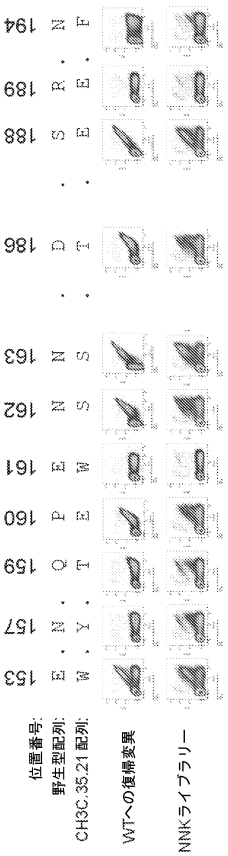
【図２２】



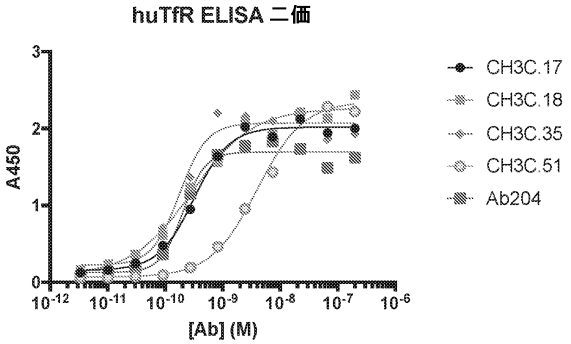
【図２３Ａ】



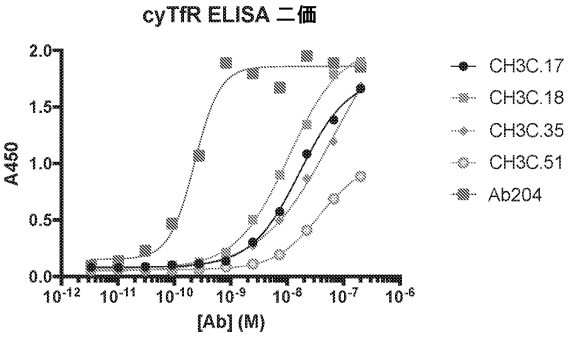
【図２３Ｂ】



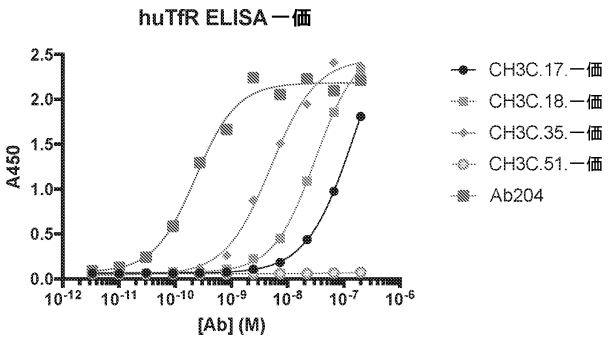
【図２４Ａ】



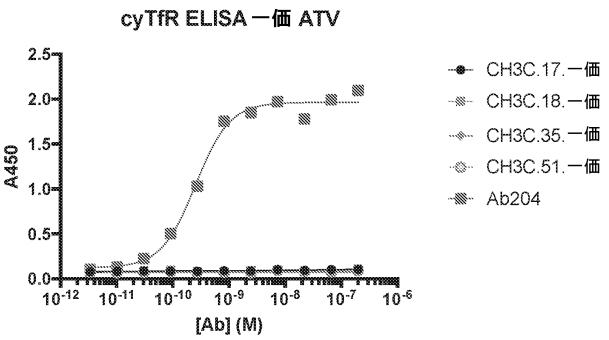
【図２４Ｂ】



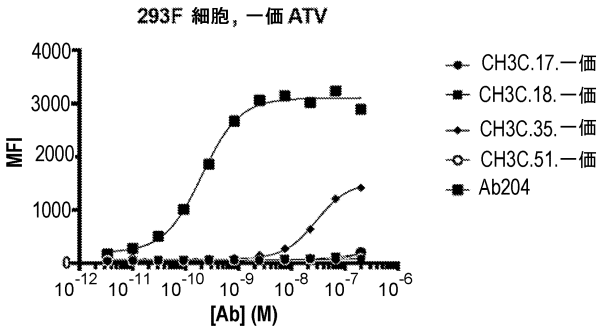
【図２４Ｃ】



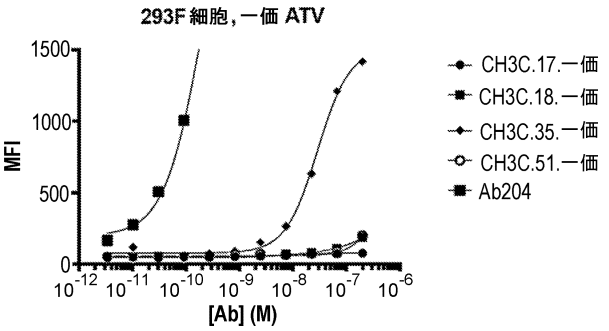
【図２４Ｄ】



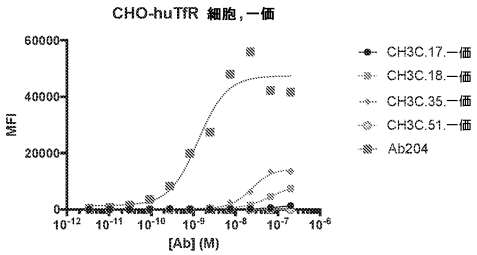
【図２５Ａ】



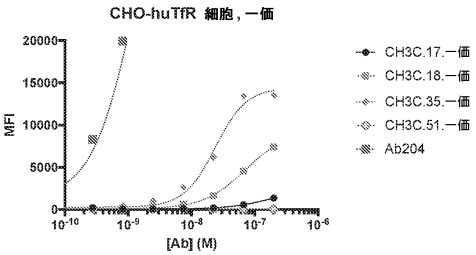
【図２５Ｂ】



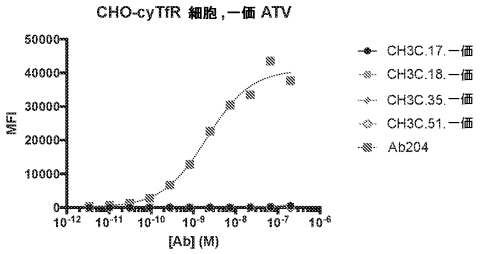
【図２５Ｃ】



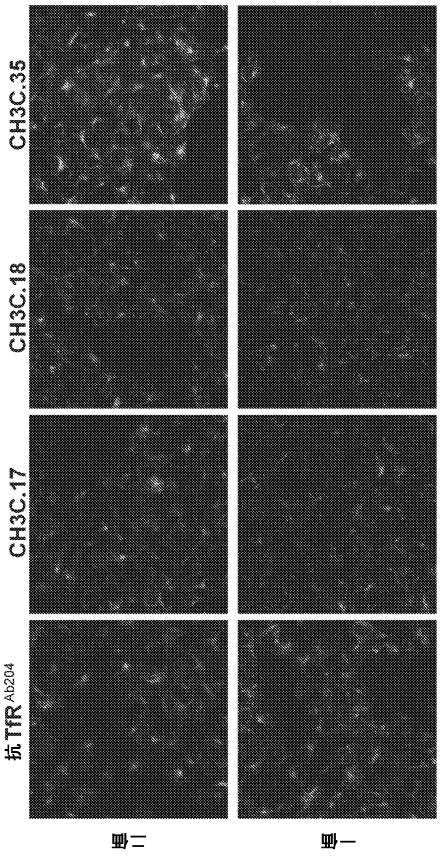
【図２５Ｄ】



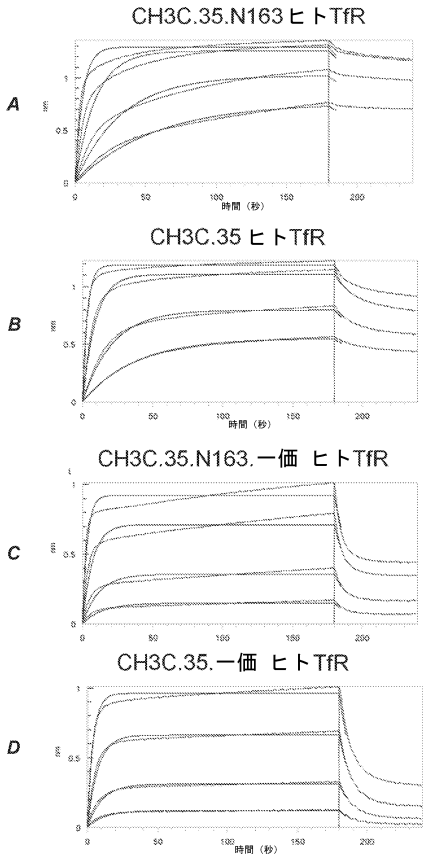
【図２５Ｅ】



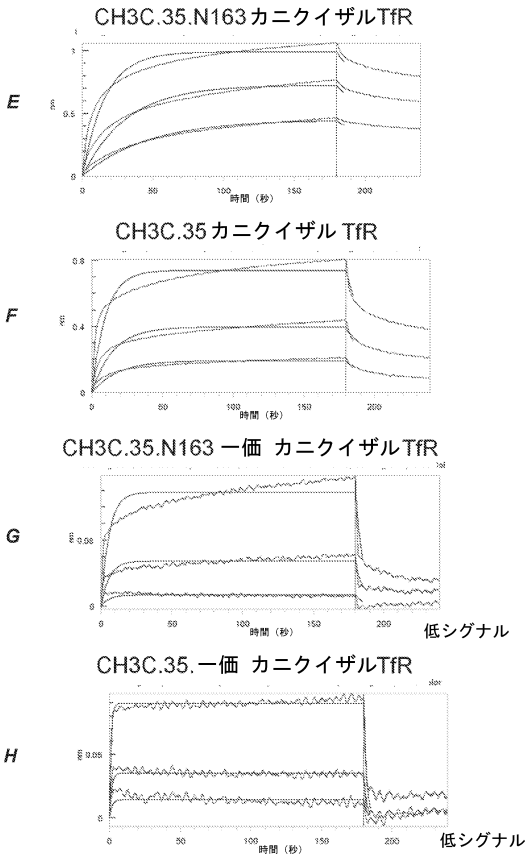
【図２６】



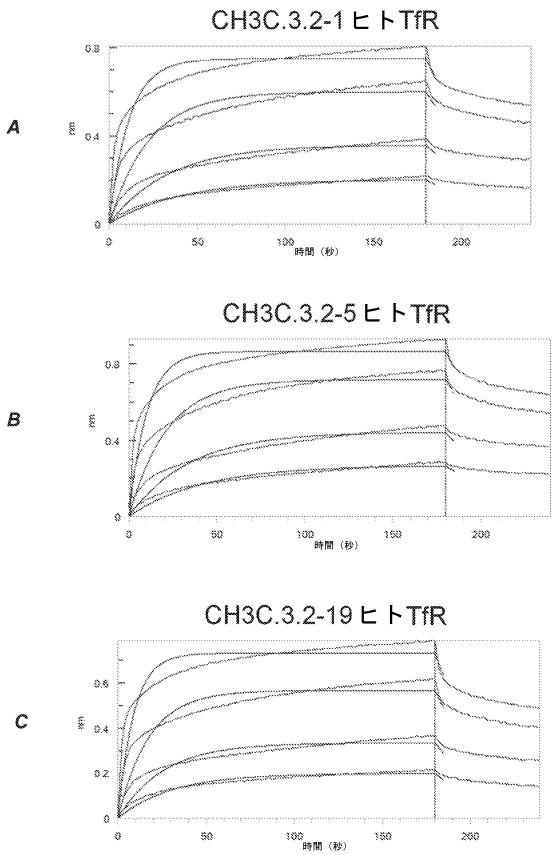
【図２７－１】



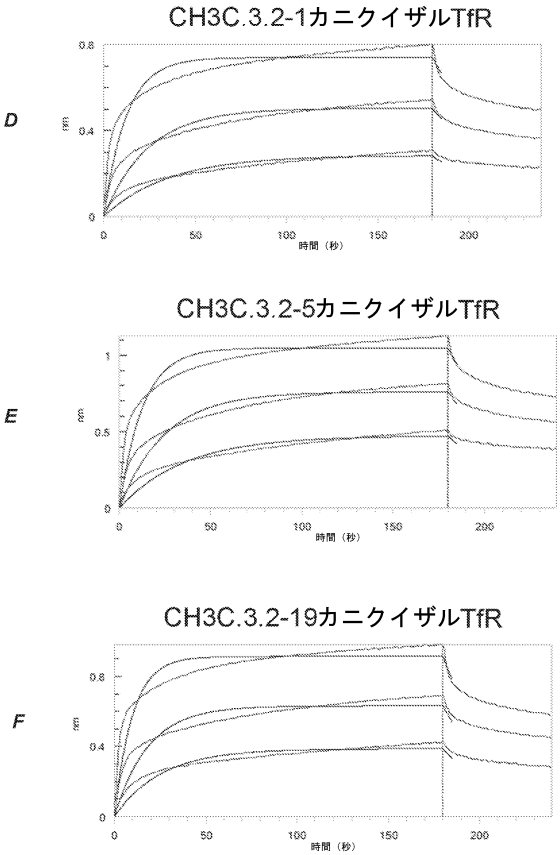
【図２７－２】



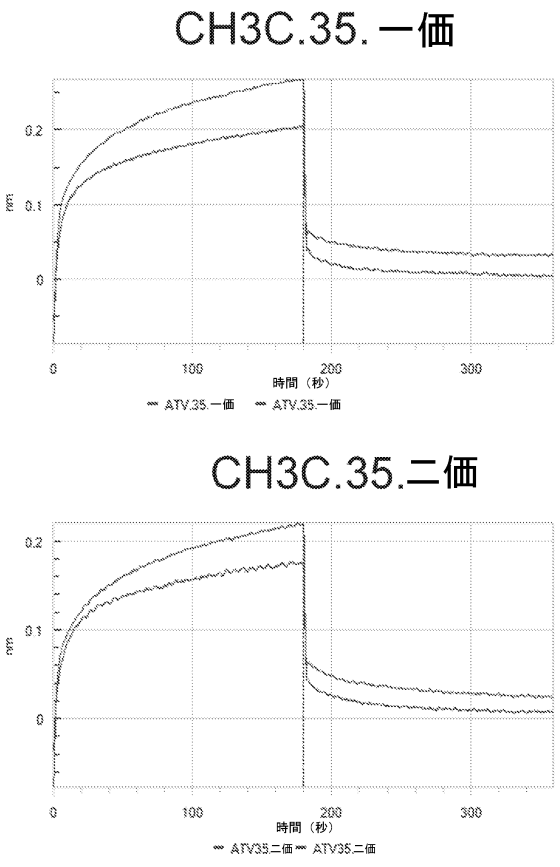
【図２８－１】



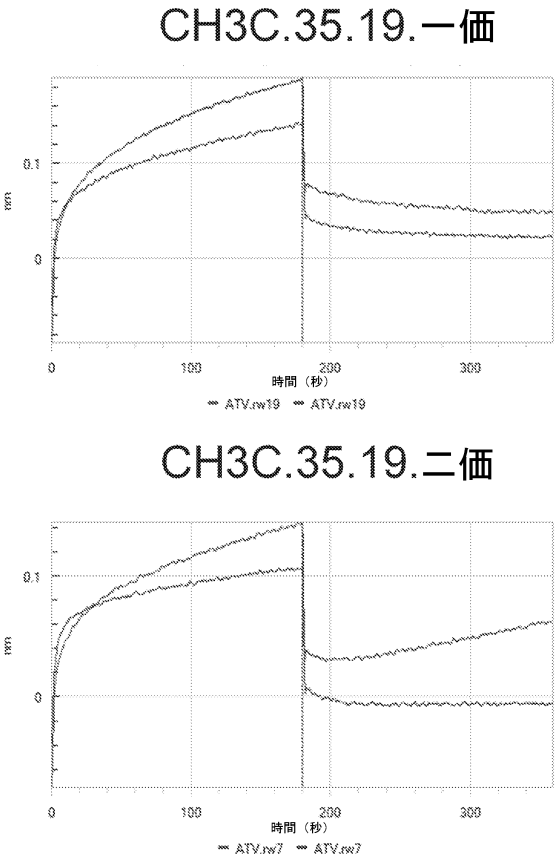
【図２８－２】



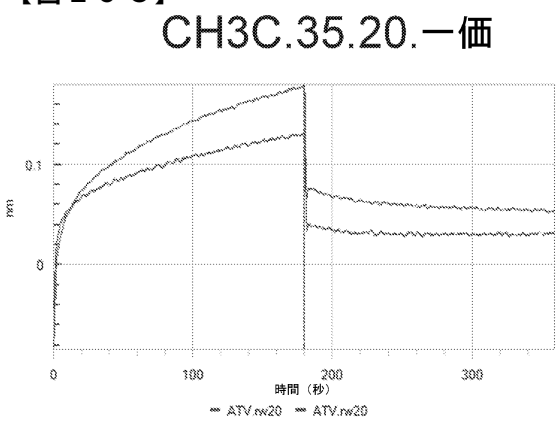
【図２９Ａ】

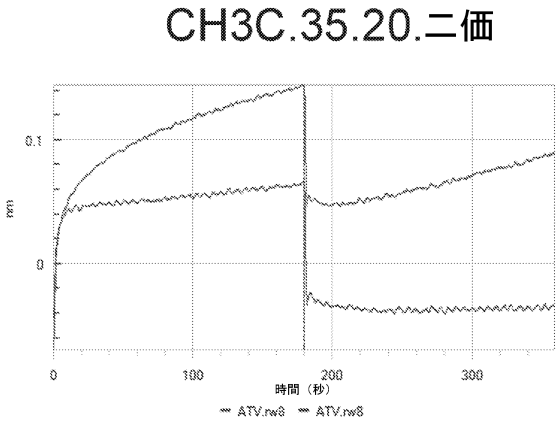


【図２９Ｂ】

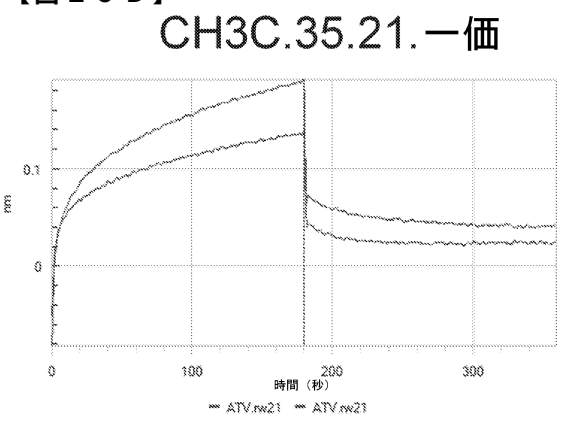


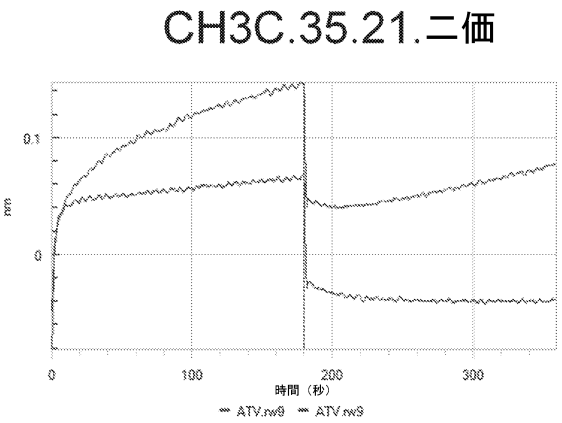
【図２９Ｃ】



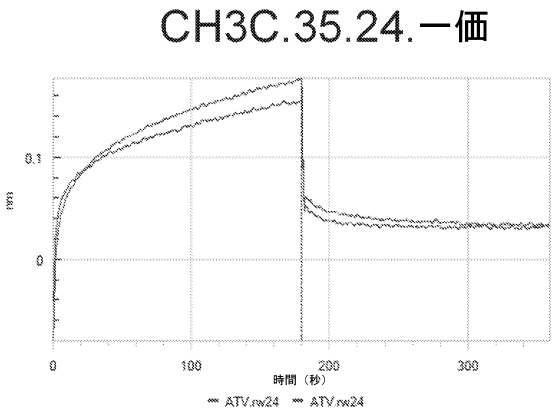


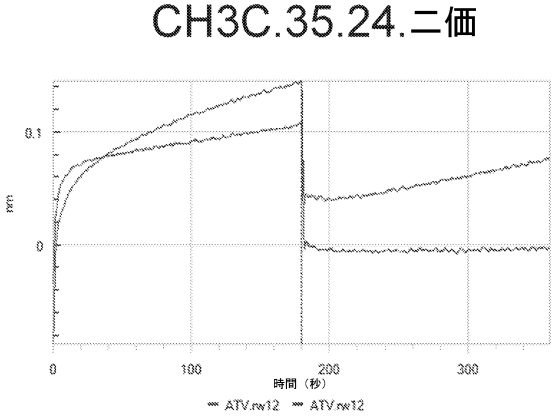
【図２９Ｄ】



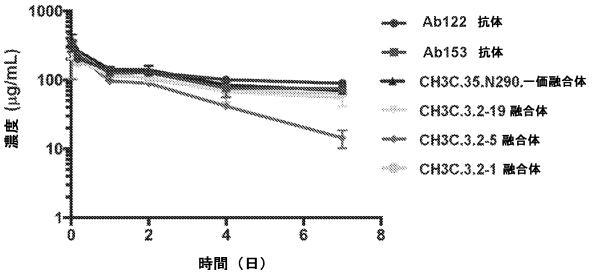


【図２９Ｅ】

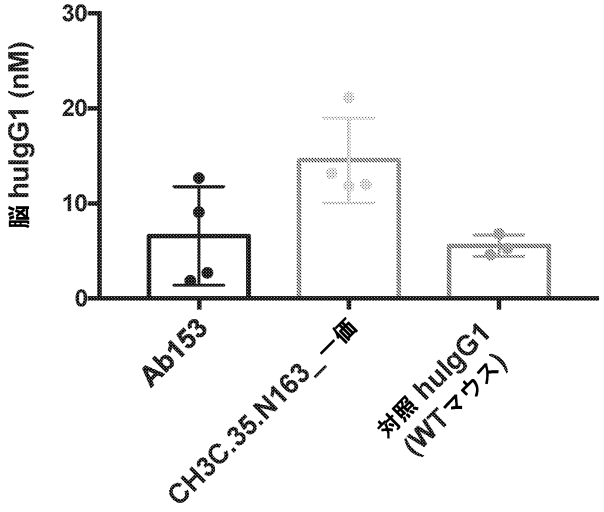




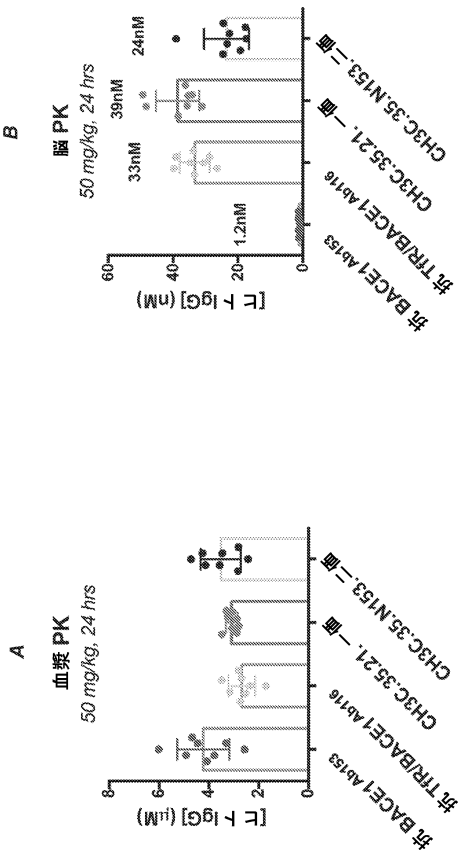
【図３０】



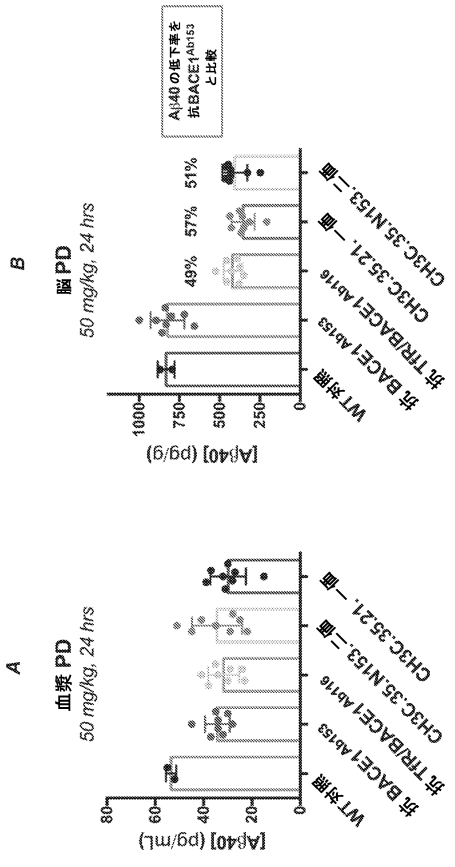
【図３１】



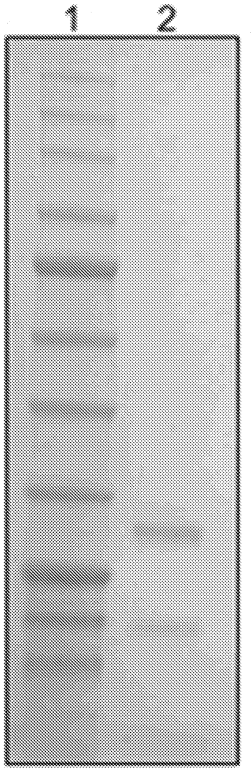
【図３２】



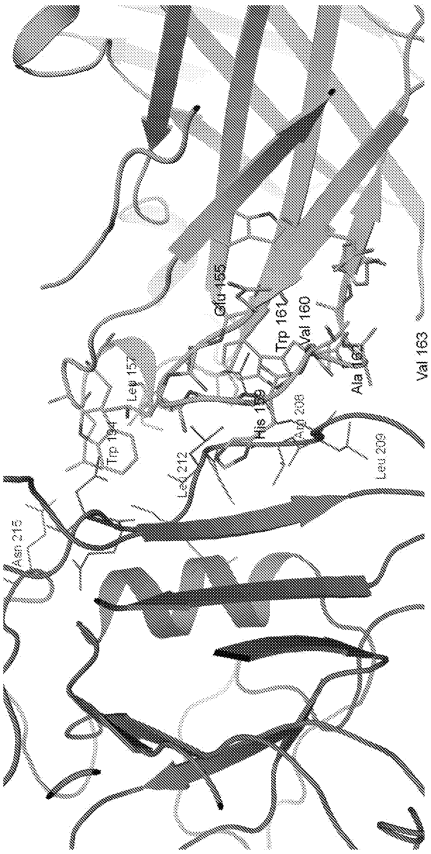
【図３３】



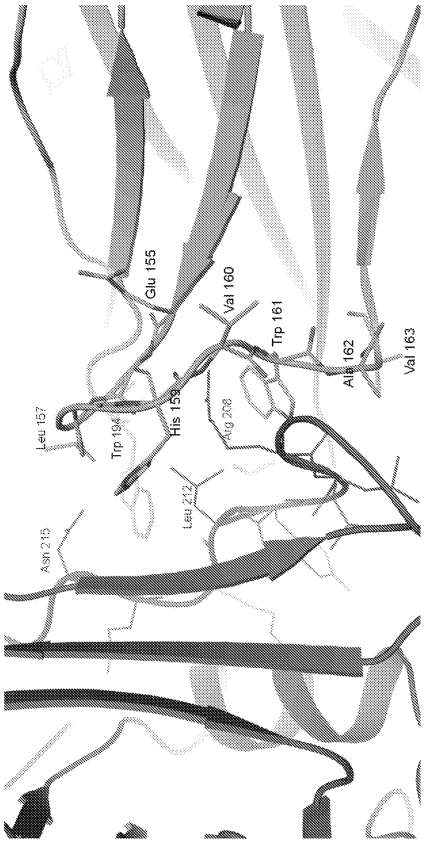
【図３４】



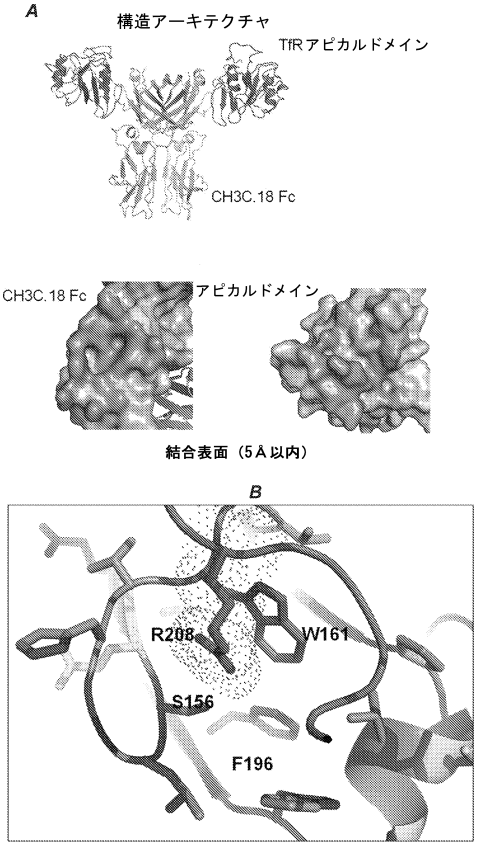
【図３５Ａ】



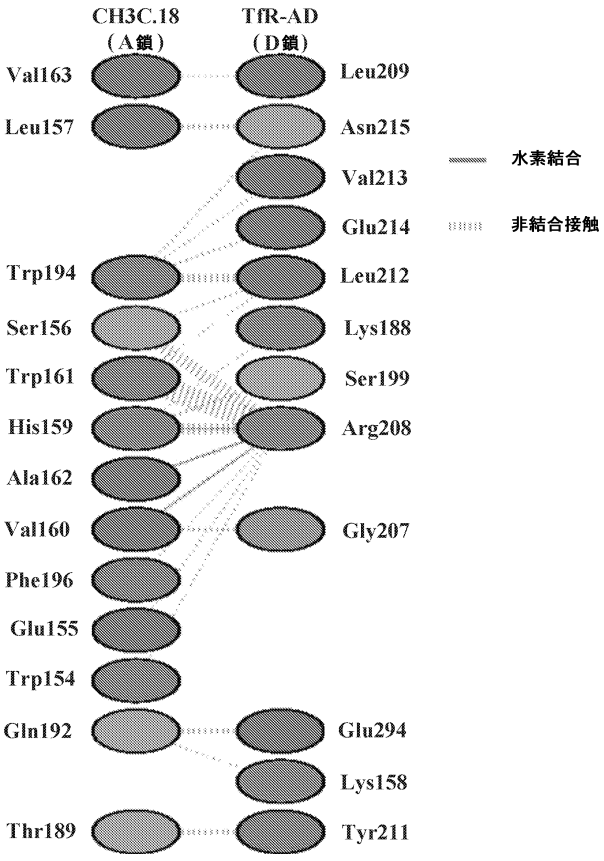
【図３５Ｂ】



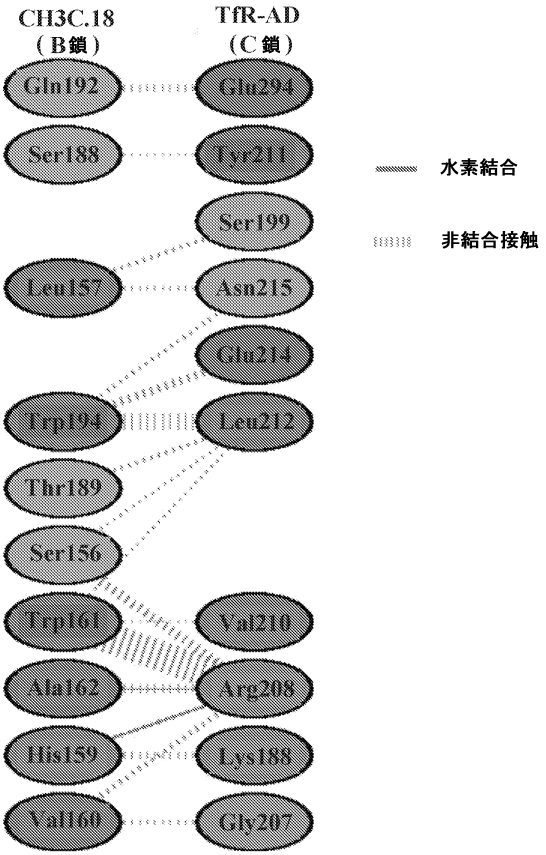
【図３６】



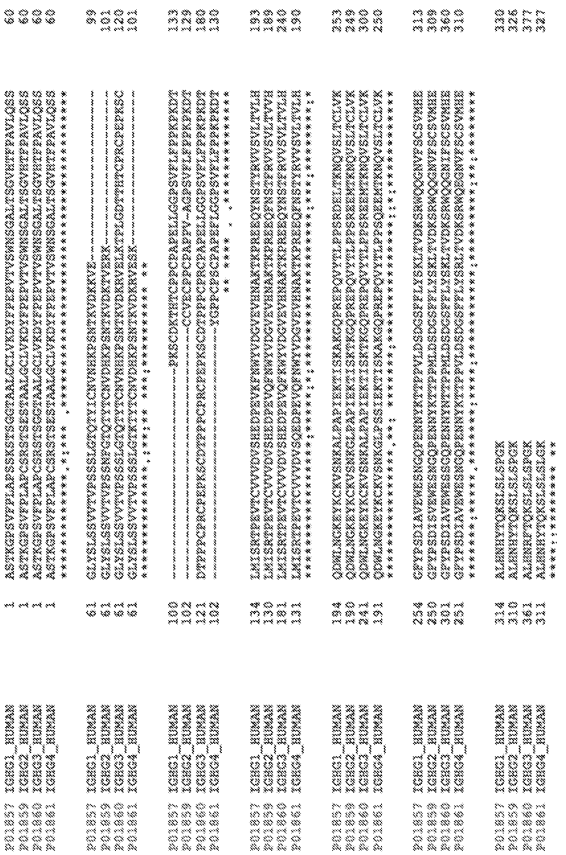
【図３７Ａ】



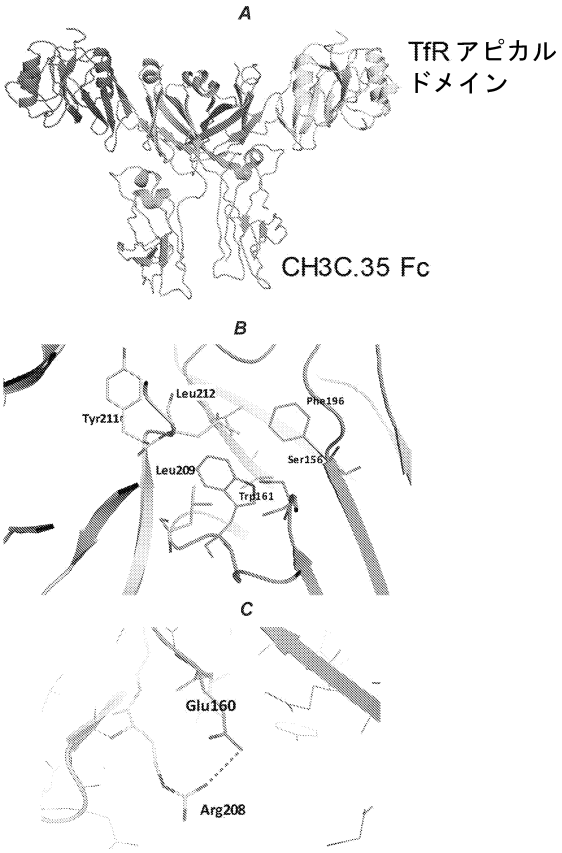
【図３７Ｂ】



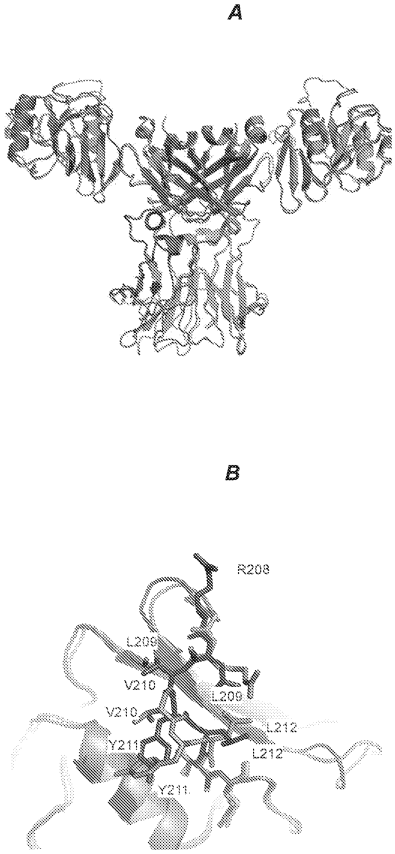
【図３８】



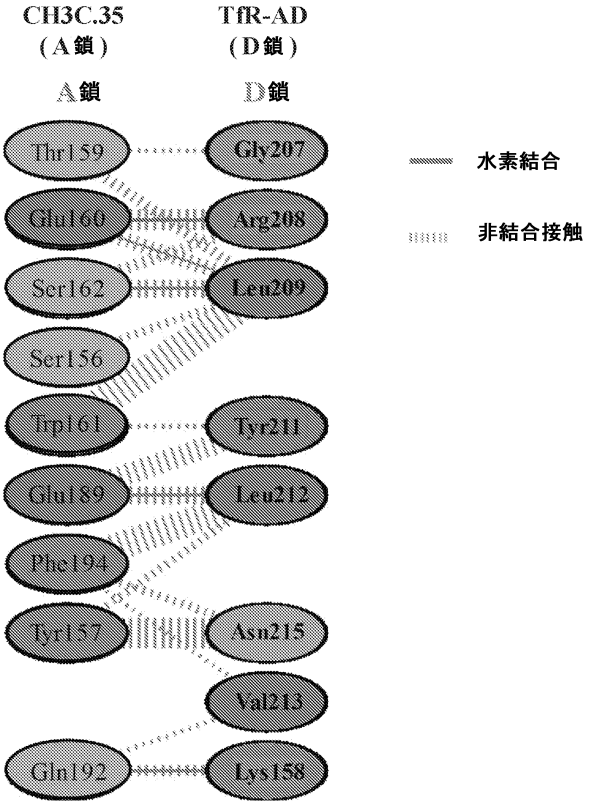
【図３９】



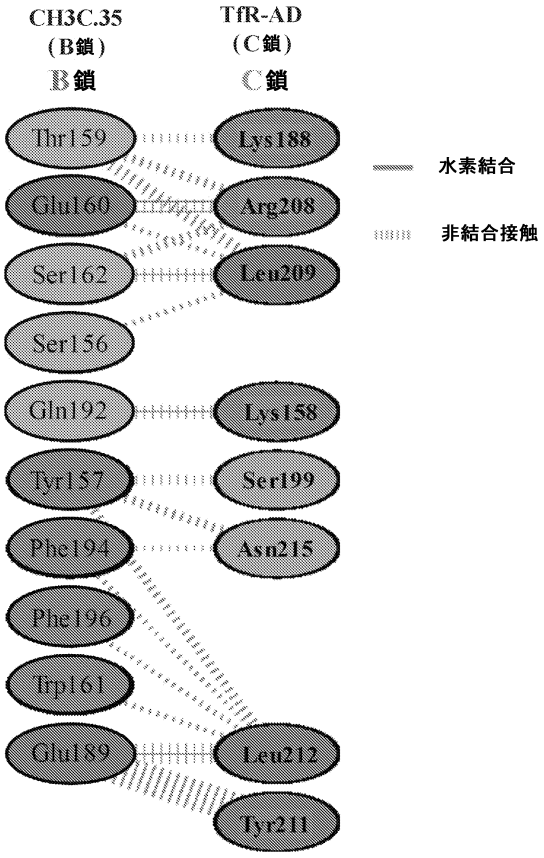
【図４０】



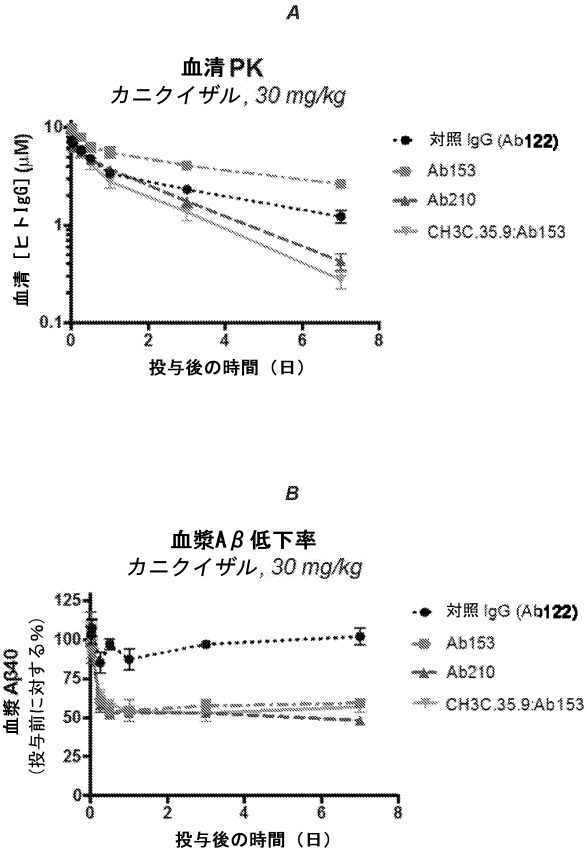
【図４１Ａ】



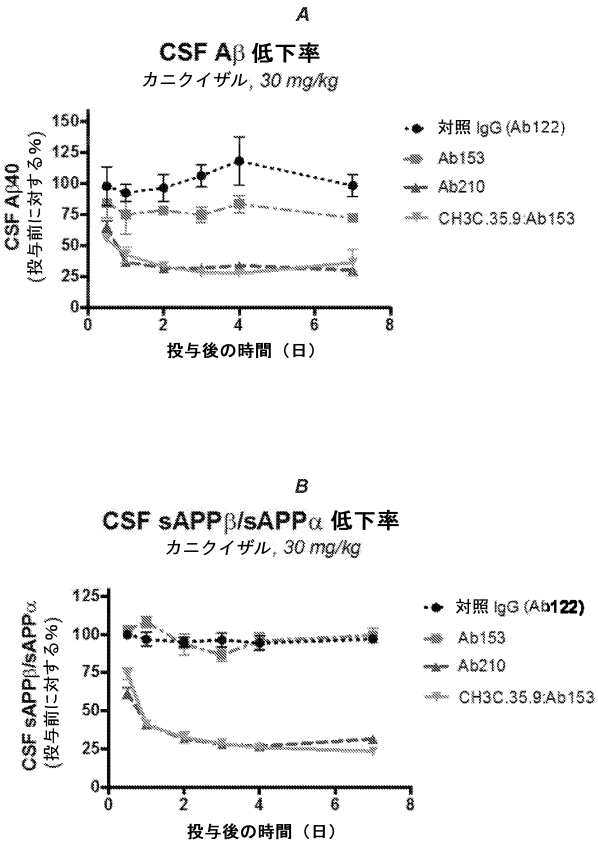
【図４１Ｂ】



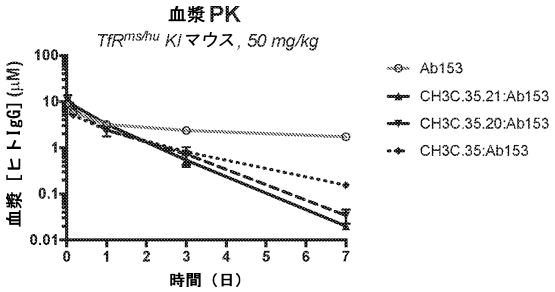
【図４２】



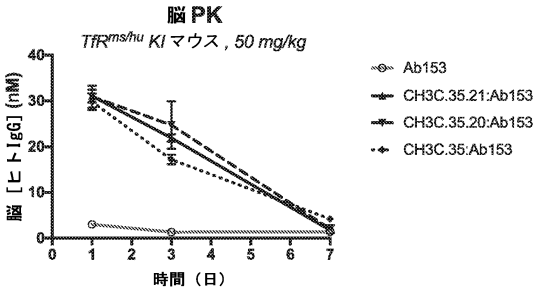
【図４３】



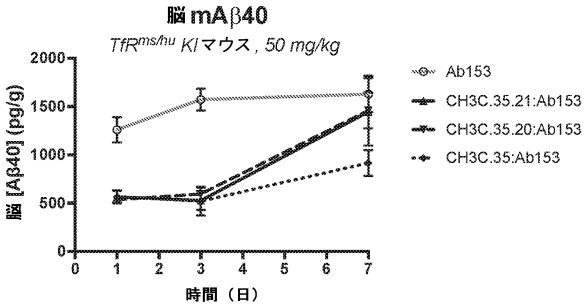
【図４４Ａ】



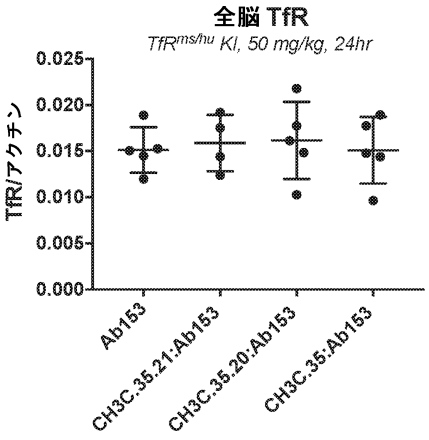
【図４４Ｂ】



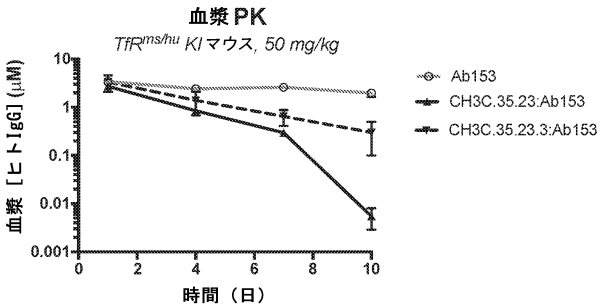
【図４４Ｃ】



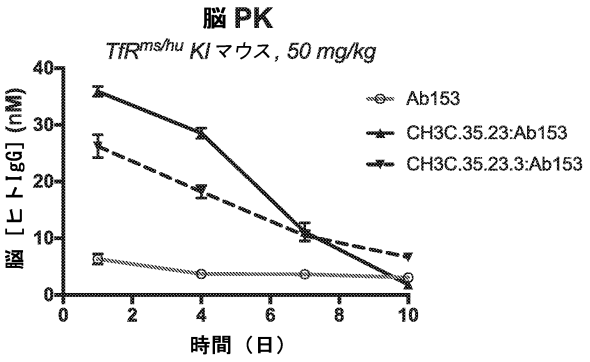
【図４４Ｄ】



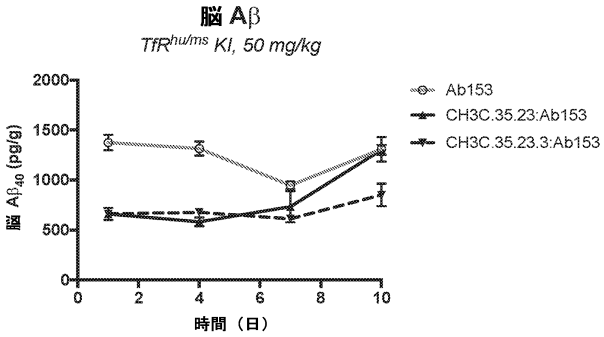
【図４５Ａ】



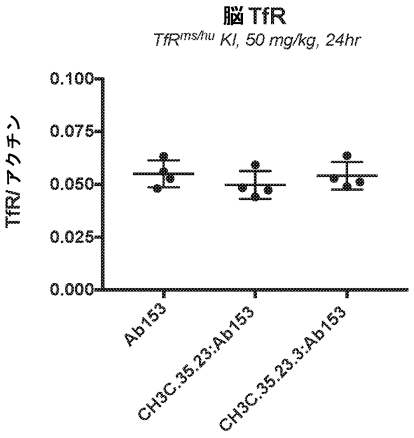
【図４５Ｂ】



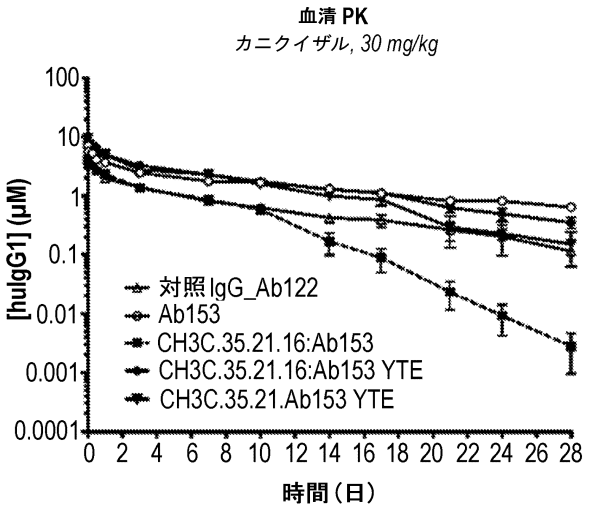
【図４５Ｃ】



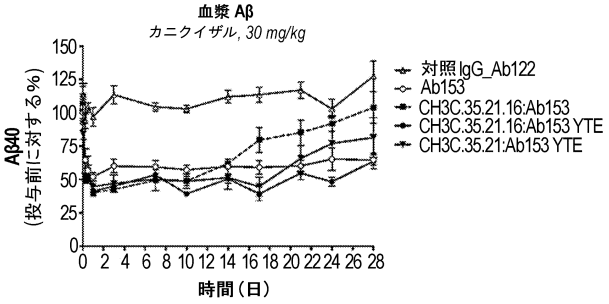
【図４５Ｄ】



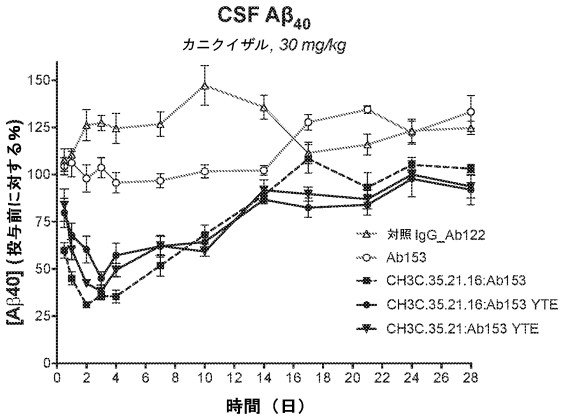
【図４６Ａ】



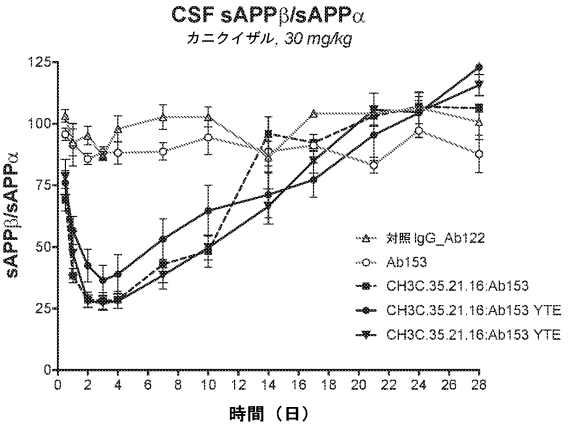
【図４６Ｂ】



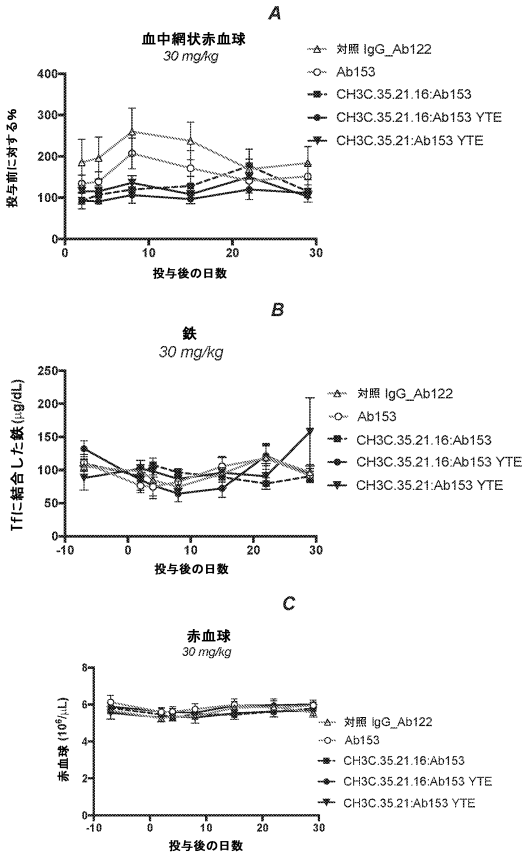
【図４６Ｃ】



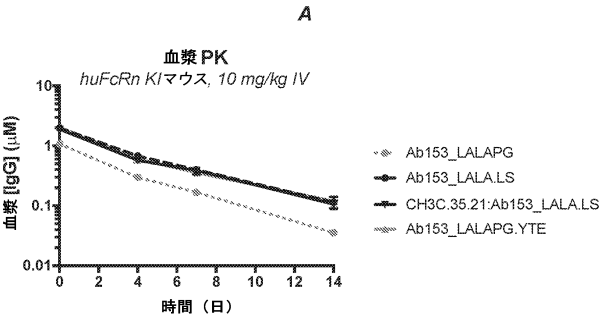
【図４６Ｄ】



【図４７】



【図４８】



B

クローン	クリアランス (mL/kg/日)
Ab153_LALAPG	17.9
Ab153_LALA.LS	8.1
CH3C.35.21:Ab153_LALA.LS	9.0
Ab153_LALAPG.YTE	8.4

【配列表】

0007577447000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10	
C12N	*15/12*	*(2006.01)*	C12N	15/12	
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z
C12P	*21/02*	*(2006.01)*	C12P	21/02	C
G01N	*21/41*	*(2006.01)*	G01N	21/41	１０１
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	G01N	33/53	N
G01N	*33/543*	*(2006.01)*	G01N	33/543	５９５
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	C07K	16/28	

(31)優先権主張番号　62/543,658
(32)優先日　平成29年8月10日(2017.8.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/543,819
(32)優先日　平成29年8月10日(2017.8.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/583,314
(32)優先日　平成29年11月8日(2017.11.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/583,426
(32)優先日　平成29年11月8日(2017.11.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤 利光
(74)代理人　100128048
弁理士　新見 浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林 智彦
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100114340
弁理士　大関 雅人
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(72)発明者　チェン シャオチェン
アメリカ合衆国 ９４０８０ カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント ブールバード １６１ デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内
(72)発明者　カリオリス ミハリス
アメリカ合衆国 ９４０８０ カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント ブールバード １６１ デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内
(72)発明者　ウェルズ ロバート シー.
アメリカ合衆国 ９４０８０ カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント ブールバード １６１ デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内

合議体
審判長　福井 悟

審判官　上條 肇
審判官　田中 耕一郎
(56)参考文献　Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，２０１２，Ｖｏｌ．８６，Ｎｏ．７，ｐ．４０２４－４０２８
Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２０１６，Ｖｏｌ．２９１，Ｎｏ．６，ｐ．２８２９－２８３６
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/00 - 15/90
C07K 1/00 - 19/00
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／Ｇｅｎｅｓｅｑ