

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532604

(P2004-532604A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004. 10. 28)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A 4 B O 2 4
C O 7 K 1/14	C O 7 K 1/14	4 B O 6 5
C O 7 K 1/16	C O 7 K 1/16	4 H O 4 5
C O 7 K 5/04	C O 7 K 5/04	Z N A
C O 7 K 5/06	C O 7 K 5/06	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 378 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-521507 (P2002-521507)	(71) 出願人	502352519 ダイアックス コーポレーション アメリカ合衆国 O 2 1 3 9 マサチュー セッツ州, ケンブリッジ, テクノロジー スクエア 3 0 0, 8 ティーエイチ フロ アー
(86) (22) 出願日	平成13年8月17日 (2001. 8. 17)		
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月13日 (2003. 2. 13)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/025891		
(87) 国際公開番号	W02002/016412		
(87) 国際公開日	平成14年2月28日 (2002. 2. 28)		
(31) 優先権主張番号	60/226, 489	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成12年8月18日 (2000. 8. 18)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B リンパ球刺激因子タンパク質 (B L y S) のための結合性ポリペプチド

(57) 【要約】

B リンパ球刺激因子 (B L y S) タンパク質または B L y S 様ポリペプチドと結合する、特定のアミノ酸配列を含んでなる結合性ポリペプチドを開示する。かかる結合性ポリペプチドは、血液、組織サンプル、馴らし培地などの溶液または混合物中に含まれる B L y S タンパク質または B L y S 様ポリペプチドを検出または単離する本発明の方法において使用される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

次のアミノ酸配列：A s p - X a a - L e u - T h r （配列番号446）（式中、X a aはP r o, S e r, T h r, P h e, L e u, T y r, C y sまたはA l aである）を含んでなるBリンパ球刺激因子（B L y S）結合性ポリペプチド。

【請求項2】

X a aがP r oまたはS e rである、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】

前記ポリペプチドが次のアミノ酸配列：

X₁ - X₂ - A s p - X₄ - L e u - T h r - X₇ - L e u - X₉ - X₁₀ （配列番号 10
448）

（式中、

X₁はT r p, G l u, L y s, C y s, L e u, A l a, A r g, G l yまたはS e rであり；

X₂はT y r, P h e, G l u, C y sまたはA s nであり；

X₄はP r o, S e r, T h r, P h e, L e u, T y r, C y sまたはA l aであり；

X₇はL y s, A s n, G l n, G l yまたはA r gであり；

X₉はT r p, S e r, T h r, A r g, C y s, T y rまたはL y sであり；

X₁₀はL e u, P h e, V a l, I l eまたはH i sである） 20

を含んでなる、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】

前記ポリペプチドが次のアミノ酸配列：

T r p - T y r - A s p - P r o - L e u - T h r - L y s - L e u - T r p - L e u
（配列番号436）

を含んでなる、請求項3に記載のポリペプチド。

【請求項5】

前記ポリペプチドが次のアミノ酸配列：

A l a - X₂ - X₃ - X₄ - A s p - X₆ - L e u - T h r - X₉ - L e u - X₁₁ - X₁₂ - X₁₃ - X₁₄ （配列番号447） 30

（式中、

X₂はA r g以外の任意のアミノ酸であり；

X₃はT r p, G l u, L y s, C y s, L e u, A l a, A r g, G l yまたはS e rであり；

X₄はT y r, P h e, G l u, C y sまたはA s nであり；

X₆はP r o, S e r, T h r, P h e, L e u, T y r, C y sまたはA l aであり；

X₉はL y s, A s n, G l n, G l yまたはA r gであり；

X₁₁はT r p, S e r, T h r, A r g, C y s, T y rまたはL y sであり；

X₁₂はL e u, P h e, V a l, I l eまたはH i sであり； 40

X₁₃はP r o, L e u, H i s, S e r, A r g, A s n, G l n, T h r, V a l, A l a, C y s, I l e, P h eまたはT y rであり；

X₁₄はA s p, G l u, A s n, V a l, H i s, G l n, A r g, G l y, S e r, T y r, A l a, C y s, L y s, I l e, T h rまたはL e uである）
を含んでなる、請求項3に記載のポリペプチド。

【請求項6】

表14に示した配列番号186～435からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項3に記載のポリペプチド。

【請求項7】

表15に示した配列番号437～444からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んで 50

なる、請求項 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

下記のアミノ酸配列：

Ala-Gly-Lys-Glu-Pro-Cys-Tyr-Phe-Tyr-Trp-Glu-Cys-Ala-Val-Ser-Gly (配列番号 450) ;
 Ala-Gly-Val-Pro-Phe-Cys-Asp-Leu-Leu-Thr-Lys-His-Cys-Phe-Glu-Ala-Gly (配列番号 451) ;
 Gly-Ser-Ser-Arg-Leu-Cys-His-Met-Asp-Glu-Leu-Thr-His-Val-Cys-Val-His-Phe-Ala-Pro (配列番号 452) ; 10
 Gly-Asp-Gly-Gly-Asn-Cys-Tyr-Thr-Asp-Ser-Leu-Thr-Lys-Leu-His-Phe-Cys-Met-Gly-Asp-Glu (配列番号 453) ;
 Gly-Tyr-Asp-Val-Leu-Thr-Lys-Leu-Tyr-Phe-Val-Pro-Gly-Gly (配列番号 454) ;
 Trp-Thr-Asp-Ser-Leu-Thr-Gly-Leu-Trp-Phe-Pro-Asp-Gly-Gly (配列番号 455) ;
 Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Asp (配列番号 186) ;
 Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Asp (配列番号 456) ; 20
 Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu (配列番号 457) ;
 Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Val (配列番号 189) ;
 Ala-Asn-Trp-Phe-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Asp (配列番号 309) ;
 Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Ser-Leu-Pro-Asp (配列番号 458) ;
 Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Phe-Pro-Asp (配列番号 353) ; 30
 Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Ser-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Asp (配列番号 327) ;

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

下記の式のうちの 1 つに従うアミノ酸配列を含んでなる B L y S 結合性ポリペプチド：

(H) Cys-X₂-Phe-X₄-Trp-Glu-Cys (配列番号 8)

(式中、

X₂ は Phe, Trp または Tyr であり；

X₄ は Pro または Tyr である)； 40

(I) Cys-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-Cys (配列番号 9)

(式中、

X₂ は Asp, Ile, Leu または Tyr であり；

X₃ は Arg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Tyr または Val であり；

X₄ は His, Leu, Lys または Phe であり；

X₅ は Leu, Pro または Thr であり；

X₆ は Arg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, Met または Trp であり；

X₇ は Ala, Asn, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, M 50

e t, P h e, S e r, T r p, T y rまたはV a lである) ;

(J) C y s - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - C y s (配列番号10)

(式中、

X₂ はA s n, A s p, P r o, S e rまたはT h rであり ;

X₃ はA r g, A s p, I l e, L e u, M e t, P r oまたはV a lであり ;

X₄ はA l a, I l e, L e u, P r o, T h rまたはV a lであり ;

X₅ はA s n, H i s, I l e, L e u, L y s, P h eまたはT h rであり ;

X₆ はA s n, G l u, G l y, H i s, L e u, L y s, M e t, P r oまたはT h rであり ;

X₇ はA r g, A s n, A s p, G l n, G l u, G l y, I l e, L y s, M e t, P r o, S e rまたはT r pであり ; 10

X₈ はA r g, G l u, G l y, L y s, P h e, S e r, T r pまたはT y rである) ;

(K) C y s - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - C y s (配列番号11)

(式中、

X₂ はA s p, G l n, H i s, I l e, L e u, L y s, M e t, P h eまたはT h rであり ;

X₃ はH i s, I l e, L e u, M e t, P h e, P r o, T r pまたはT y rであり ; 20

X₄ はA s p, H i s, L e uまたはS e rであり ;

X₅ はA l a, A r g, A s p, G l u, L e u, P h e, P r oまたはT h rであり ;

X₆ はA l a, A r g, A s nまたはL e uであり ;

X₇ はI l e, L e u, M e t, P r o, S e rまたはT h rであり ;

X₈ はA l a, A r g, A s n, G l y, H i s, L y s, S e rまたはT y rであり ;

X₉ はA l a, A r g, A s n, G l n, L e u, M e t, S e r, T r p, T y rまたはV a lである) ;

(L) C y s - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁ - C y s (配列番号12) 30

(式中、

X₂ はA r g, A s n, G l n, G l u, H i s, L e u, P h e, P r o, T r p, T y rまたはV a lであり ;

X₃ はA r g, A s p, G l n, G l y, I l e, L y s, P h e, T h r, T r pまたはT y rであり ;

X₄ はA l a, A r g, A s p, G l u, G l y, L e u, S e rまたはT y rであり ;

X₅ はA s p, G l n, G l u, L e u, M e t, P h e, P r o, S e rまたはT y rであり ; 40

X₆ はA s p, L e u, P r o, T h rまたはV a lであり ;

X₇ はA r g, G l n, H i s, I l e, L e u, L y s, M e t, P h e, T h r, T r pまたはT y rであり ;

X₈ はA l a, A r g, A s n, G l n, G l u, H i s, L e u, L y s, M e tまたはT h rであり ;

X₉ はA l a, A s n, G l n, G l y, L e u, L y s, P h e, P r o, T h r, T r pまたはT y rであり ;

X₁₀ はA l a, A r g, G l n, H i s, L y s, M e t, P h e, P r o, T h r, T r pまたはT y rであり ;

X₁₁ はA r g, G l n, G l u, G l y, H i s, L e u, M e t, P h e, 50

Pro, Ser, Thr, TyrまたはValである)。

【請求項10】

(a) 前記ポリペプチドが式: Cys-X₂-Phe-X₄-Trp-Glu-Cys (配列番号8) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される: X₂がTyr; X₄がPro; またはそのような選択の組合せである;

(b) 前記ポリペプチドが式: Cys-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-Cys (配列番号9) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される: X₂がAspまたはLeu; X₃がGluまたはLeu; X₄がHisまたはLeu; X₅がThrまたはPro; X₆がLys; またはそのような選択の組合せである; 10

(c) 前記ポリペプチドが式: Cys-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-Cys (配列番号10) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される: X₂がAsp; X₃がIle; X₄がValまたはLeu; X₅がThr; X₆がLeu; X₈がSer; またはそのような選択の組合せである;

(d) 前記ポリペプチドが式: Cys-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-Cys (配列番号11) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される: X₄がAsp; X₅がGluまたはPro; X₆がLeu; X₇がThr; またはそのような選択の組合せである; 20

(e) 前記ポリペプチドが式: Cys-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-Cys (配列番号12) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される: X₂がTrp, TyrまたはVal; X₃がAsp; X₄がAsp; X₅がLeu; X₆がLeuまたはThr; X₇がLysまたはThr; X₈がArgまたはLeu; X₉がThrまたはTrp; X₁₀がMetまたはPhe; X₁₁がVal; またはそのような選択の組合せである; 請求項9に記載のポリペプチド。

【請求項11】

下記の式のアミノ酸配列を含んでなるBLYS結合性ポリペプチド:

(A) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-Phe-X₇-Trp-Glu-Cys-X₁₁-X₁₂-X₁₃ (配列番号1) 30

(式中、

X₁はAla, Asn, LysまたはSerであり;

X₂はAla, Glu, Met, SerまたはValであり;

X₃はAla, Asn, LysまたはProであり;

X₅はPhe, TrpまたはTyrであり;

X₇はProまたはTyrであり;

X₁₁はAla, Gln, His, PheまたはValであり;

X₁₂はAsn, Gln, Gly, His, SerまたはValであり;

X₁₃はAla, Asn, Gly, Ile, ProまたはSerである); 40

(B) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-Cys-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (配列番号2)

(式中、

X₁はAla, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Valであるか、または存在せず;

X₂はAla, Asn, Asp, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, TyrまたはValであり;

X₃はAla, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, I 50

I l e, L e u, L y s, M e t, P h e, P r o, S e r, T r p, T y rまたはValであり；

X₅はAsp, I l e, L e uまたはT y rであり；

X₆はA r g, A s p, G l u, H i s, I l e, L e u, L y s, P h e, P r o, T y rまたはValであり；

X₇はH i s, L e u, L y sまたはP h eであり；

X₈はL e u, P r oまたはT h rであり；

X₉はA r g, A s n, G l y, H i s, I l e, L y s, M e tまたはT r pであり；

X₁₀はA l a, G l n, G l u, G l y, H i s, I l e, L e u, M e t, P h e, S e r, T r p, T y rまたはValであり； 10

X₁₂はA s p, G l n, G l u, G l y, I l e, L e u, L y s, P h e, S e r, T r p, T y rまたはValであり；

X₁₃はA l a, A r g, A s n, A s p, G l n, G l u, G l y, H i s, L e u, L y s, M e t, P h e, P r o, S e r, T h r, T r p, T y rまたはValであり；

X₁₄はA l a, A r g, A s n, A s p, G l n, G l u, G l y, H i s, I l e, L e u, L y s, P h e, P r o, T r p, T y r, V a lであるか、または存在しない)；

(C) X₁ - X₂ - X₃ - C y s - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁ - C y s - X₁₃ - X₁₄ - X₁₅ (配列番号3) 20

(式中、

X₁はA l a, A r g, A s n, A s p, L e u, L y s, P h e, P r o, S e rまたはT h rであり；

X₂はA s n, A s p, G l n, H i s, I l e, L y s, P r o, T h rまたはT r pであり；

X₃はA l a, A r g, A s n, G l n, G l u, H i s, P h e, P r oまたはT h rであり；

X₅はA s n, A s p, P r o, S e rまたはT h rであり；

X₆はA r g, A s p, I l e, L e u, M e t, P r oまたはV a lであり； 30

X₇はA l a, I l e, L e u, P r o, T h rまたはV a lであり；

X₈はA s n, H i s, I l e, L e u, L y s, P h eまたはT h rであり；

X₉はA s n, G l u, G l y, H i s, L e u, L y s, M e t, P r oまたはT h rであり；

X₁₀はA r g, A s n, A s p, G l n, G l u, G l y, I l e, L y s, M e t, P r o, S e rまたはT r pであり；

X₁₁はA r g, G l u, G l y, L y s, P h e, S e r, T r pまたはT y rであり；

X₁₃はG l n, G l u, I l e, L e u, P h e, P r o, S e r, T y rまたはV a lであり； 40

X₁₄はA s n, G l y, I l e, P h e, P r o, T h r, T r pまたはT y rであり；

X₁₅はA s n, A s p, G l u, L e u, L y s, M e t, P r oまたはT h rである)；

(D) X₁ - X₂ - X₃ - C y s - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁ - X₁₂ - C y s - X₁₄ - X₁₅ - X₁₆ (配列番号4)

(式中、

X₁はA s n, A s p, H i s, L e u, P h e, P r o, S e r, T y rであるか、または存在せず；

X₂はA r g, A s n, A s p, H i s, P h e, S e rまたはT r pであり； 50

X_3 は Asn, Asp, Leu, Pro, Ser または Val であり ;
 X_5 は Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe または Thr であり ;
 X_6 は His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp または Tyr であり ;
 X_7 は Asp, His, Leu または Ser であり ;
 X_8 は Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro または Thr であり ;
 X_9 は Ala, Arg, Asn または Leu であり ;
 X_{10} は Ile, Leu, Met, Pro, Ser または Thr であり ; 10
 X_{11} は Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser または Tyr であり ;
 X_{12} は Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr または Val であり ;
 X_{14} は Asp, Gly, Leu, Phe, Tyr または Val であり ;
 X_{15} は Asn, His, Leu, Pro または Tyr であり ;
 X_{16} は Asn, Asp, His, Phe, Ser または Tyr である) ;
(E) $X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - Cys - X_{16} - X_{17} - X_{18}$ (配列番号 5)
(式中、 20
 X_1 は Arg, Asp, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr であるか、または存在せず ;
 X_2 は Ala, Arg, Asn, Asp, Gly, Pro, Ser であるか、または存在せず ;
 X_3 は Arg, Asn, Gln, Glu, Gly, Lys, Met, Pro, Trp または Val であり ;
 X_5 は Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr または Val であり ;
 X_6 は Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, Trp または Tyr であり ; 30
 X_7 は Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser または Tyr であり ;
 X_8 は Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser または Tyr であり ;
 X_9 は Asp, Leu, Pro, Thr または Val であり ;
 X_{10} は Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp または Tyr であり ;
 X_{11} は Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Met または Thr であり ;
 X_{12} は Ala, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp または Tyr であり ; 40
 X_{13} は Ala, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp または Tyr であり ;
 X_{14} は Arg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr または Val であり ;
 X_{16} は Arg, Asp, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, Ser または Trp であり ;
 X_{17} は Arg, Asn, Asp, Gly, His, Phe, Pro, Ser, Trp または Tyr であり ;
 X_{18} は Ala, Arg, Asn, Asp, His, Leu, Phe または Trp 50

である) ;

(F) $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12}$ (配列番号6)

(式中、

X_1 はAla, Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, TyrまたはValであり;

X_2 はAla, Arg, Gln, His, Ile, Leu, Phe, Thr, TrpまたはTyrであり;

X_3 はAla, Asp, Lys, Phe, Thr, TrpまたはTyrであり;

X_4 はArg, Asp, Gln, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, TyrまたはValであり;

X_5 はAsp, Leu, Lys, Phe, Pro, SerまたはValであり;

X_6 はHis, Ile, Leu, Pro, SerまたはThrであり;

X_7 はArg, Gly, His, Leu, Lys, MetまたはThrであり;

X_8 はAla, Arg, Asn, Ile, Leu, Lys, MetまたはThrであり;

X_9 はAla, Asn, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Leu, Met, Ser, Trp, TyrまたはValであり;

X_{10} はIle, Leu, Phe, Ser, Thr, Trp, TyrまたはValであり;

X_{11} はAla, Arg, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Pro, Ser, Thr, Trp, TyrまたはValであり;

X_{12} はArg, Asp, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, TyrまたはValである);

(G) $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13}$ (配列番号7)

(式中、

X_1 はAsp, Gln, Glu, Gly, His, Lys, MetまたはTrpであり;

X_2 はArg, Gln, His, Ile, LeuまたはProであり;

X_3 はAsp, Gly, Ile, Lys, Thr, TyrまたはValであり;

X_4 はAsn, Asp, Gln, Glu, Met, Pro, SerまたはTyrであり;

X_5 はAsn, Asp, His, Ile, Leu, Met, Pro, ThrまたはValであり;

X_6 はAsp, Glu, His, Leu, Lys, ProまたはValであり;

X_7 はArg, Asn, Gln, His, Ile, Leu, Met, ProまたはThrであり;

X_8 はGln, Gly, His, Leu, Met, SerまたはThrであり;

X_9 はAsn, Gln, Gly, His, Leu, Lys, SerまたはThrであり;

X_{10} はAla, Gly, Ile, Leu, Lys, MetまたはPheであり;

X_{11} はAla, Glu, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, TyrまたはValであり;

X_{12} はArg, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, TyrまたはValであり;

X_{13} はArg, Asn, Glu, His, Ile, Ser, Thr, TrpまたはValである)。

【請求項12】

(a) 前記ポリペプチドが式:

$X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - \text{Phe} - X_7 - \text{Trp} - \text{Glu} - \text{Cys} - X_{11} - X_{12} - X_{13}$ (配列番号1) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される: X_3 が Lys ; X_5 が Tyr ; X_7 が Pro ; X_{11} が Ala , Gln , His , Phe または Val ; X_{12} が Asn , Gln , Gly , His , Ser または Val ; X_{13} が Ala , Asn , Gly , Ile , Pro または Ser ; またはそのような選択の組合せである;

(b) 前記ポリペプチドが式:

$X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - \text{Cys} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$ (配列番号2) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される: X_3 が Asp ; X_5 が Asp または Leu ; X_6 が Glu または Leu ; X_7 が His または Leu ; X_8 が Thr または Pro ; X_9 が Lys ; またはそのような選択の組合せである; 10

(c) 前記ポリペプチドが式:

$X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - \text{Cys} - X_{13} - X_{14} - X_{15}$ (配列番号3) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される: X_3 が Ala ; X_5 が Asp ; X_6 が Ile ; X_7 が Val または Leu ; X_8 が Thr ; X_9 が Leu ; X_{11} が Ser ; X_{13} が Val ; X_{15} が Glu または Pro ; またはそのような選択の組合せである;

(d) 前記ポリペプチドが式:

$X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - \text{Cys} - X_{14} - X_{15} - X_{16}$ (配列番号4) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される: X_1 が Ser ; X_2 が Arg ; X_3 が Asn または Asp ; X_7 が Asp ; X_8 が Glu または Pro ; X_9 が Leu ; X_{10} が Thr ; X_{14} が Leu ; X_{15} が His , Leu または Pro ; X_{16} が Asp または Ser ; またはそのような選択の組合せである; 20

(e) 前記ポリペプチドが式:

$X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - \text{Cys} - X_{16} - X_{17} - X_{18}$ (配列番号5) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される: X_1 が Arg ; X_2 が Asn , Asp , Gly または Pro ; X_3 が Gly または Met ; X_5 が Trp , Tyr または Val ; X_6 が Asp ; X_7 が Asp ; X_8 が Leu ; X_9 が Leu または Thr ; X_{10} が Lys または Thr ; X_{11} が Arg または Leu ; X_{12} が Thr または Trp ; X_{13} が Met または Phe ; X_{14} が Val ; X_{16} が Met ; X_{17} が Arg , His または Tyr ; X_{18} が Asn または His ; またはそのような選択の組合せである; 30

(f) 前記ポリペプチドが式:

$X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12}$ (配列番号6) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される: X_1 が Gly , Tyr または Val ; X_2 が His または Tyr ; X_3 が Asp または Tyr ; X_4 が Asp または Gln ; X_5 が Leu または Ser ; X_6 が Leu または Thr ; X_7 が Lys または Thr ; X_8 が Leu または Lys ; X_9 が Met または Ser ; X_{10} が Thr または Leu ; X_{11} が Pro または Thr ; X_{12} が Arg または Pro ; またはそのような選択の組合せである; 40

(g) 前記ポリペプチドが式:

$X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13}$ (配列番号7) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される: X_1 が Glu または Lys ; X_2 が His または Pro ; X_3 が Tyr ; X_4 が Asp または Gln ; X_5 が Asn または Thr ; X_6 が Asp または Pro ; X_7 が Ile または Pro ; X_8 が Leu または Thr ; X_9 が Lys ; X_{10} が Gly または Met ; X_{11} が Ala または Thr ; X_{12} が Arg または H 50

i s ; X₁₃ が H i s ; またはそのような選択の組合せである ;
請求項 11 に記載の B L y S 結合性ポリペプチド。

【請求項 13】

表 1 ～ 8 に示した配列番号 20 ～ 162 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 11 に記載の B L y S 結合性ポリペプチド。

【請求項 14】

下記のアミノ酸配列：

A G K E P C Y F Y W E C A V S G P G P E G G G K （配列番号 163）

A G V P F C D L L T K H C F E A G P G P E G G G K （配列番号 164）

G S S R L C H M D E L T H V C V H F A P P G P E G G G K （配列番号 165）

G D G G N C Y T D S L T K L H F C M G D E P G P E G G G K （配列番号 166）

G Y D V L T K L Y F V P G G P G P E G G G K （配列番号 167）

W T D S L T G L W F P D G G P G P E G G G K （配列番号 168）

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 11 に記載の B L y S 結合性ポリペプチド。

【請求項 15】

アミノ酸配列： A s p - X a a - L e u - T h r （配列番号 446）（式中、X a a は P r o , S e r , T h r , P h e , L e u , T y r , C y s または A l a である）を含んでなる B L y S 結合性ポリペプチドをコードする外因性 DNA を発現する組換えバクテリオファージ。

【請求項 16】

X a a が P r o または S e r である、請求項 15 に記載のバクテリオファージ。

【請求項 17】

前記ポリペプチドが下記のアミノ酸配列：

A l a - G l y - L y s - G l u - P r o - C y s - T y r - P h e - T y r - T r p - G l u - C y s - A l a - V a l - S e r - G l y （配列番号 450）；

A l a - G l y - V a l - P r o - P h e - C y s - A s p - L e u - L e u - T h r - L y s - H i s - C y s - P h e - G l u - A l a - G l y （配列番号 451）；

G l y - S e r - S e r - A r g - L e u - C y s - H i s - M e t - A s p - G l u - L e u - T h r - H i s - V a l - C y s - V a l - H i s - P h e - A l a - P r o （配列番号 452）；

G l y - A s p - G l y - G l y - A s n - C y s - T y r - T h r - A s p - S e r - L e u - T h r - L y s - L e u - H i s - P h e - C y s - M e t - G l y - A s p - G l u （配列番号 453）；

G l y - T y r - A s p - V a l - L e u - T h r - L y s - L e u - T y r - P h e - V a l - P r o - G l y - G l y （配列番号 454）；

T r p - T h r - A s p - S e r - L e u - T h r - G l y - L e u - T r p - P h e - P r o - A s p - G l y - G l y （配列番号 455）；

A l a - A s n - T r p - T y r - A s p - P r o - L e u - T h r - L y s - L e u - T r p - L e u - P r o - A s p （配列番号 186）；

T r p - T y r - A s p - P r o - L e u - T h r - L y s - L e u - T r p - L e u - P r o - A s p （配列番号 456）；

T r p - T y r - A s p - P r o - L e u - T h r - L y s - L e u - T r p - L e u （配列番号 457）；

A l a - A s n - T r p - T y r - A s p - P r o - L e u - T h r - L y s - L e u - T r p - L e u - P r o - V a l （配列番号 189）；

A l a - A s n - T r p - P h e - A s p - P r o - L e u - T h r - L y s - L e u - T r p - L e u - P r o - A s p （配列番号 309）；

A l a - A s n - T r p - T y r - A s p - P r o - L e u - T h r - L y s - L e u - S e r - L e u - P r o - A s p （配列番号 458）；

Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Phe-Pro-Asp (配列番号353) ;

Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Ser-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Asp (配列番号327) ;

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項15に記載のバクテリオファージ。

【請求項18】

前記ポリペプチドが次のアミノ酸配列：

$X_1 - X_2 - \text{Asp} - X_4 - \text{Leu} - \text{Thr} - X_7 - \text{Leu} - X_9 - X_{10}$ (配列番号448)

10

(式中、

X_1 は Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly または Ser であり；

X_2 は Tyr, Phe, Glu, Cys または Asn であり；

X_4 は Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys または Ala であり；

X_7 は Lys, Asn, Gln, Gly または Arg であり；

X_9 は Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr または Lys であり；

X_{10} は Leu, Phe, Val, Ile または His である)

を含んでなる、請求項15に記載のバクテリオファージ。

20

【請求項19】

前記ポリペプチドが次のアミノ酸配列：

Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu (配列番号436)

を含んでなる、請求項18に記載のバクテリオファージ。

【請求項20】

前記ポリペプチドが次のアミノ酸配列：

Ala- $X_2 - X_3 - X_4 - \text{Asp} - X_6 - \text{Leu} - \text{Thr} - X_9 - \text{Leu} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$ (配列番号447)

30

(式中、

X_2 は Arg 以外の任意のアミノ酸であり；

X_3 は Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly または Ser であり；

X_4 は Tyr, Phe, Glu, Cys または Asn であり；

X_6 は Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys または Ala であり；

X_9 は Lys, Asn, Gln, Gly または Arg であり；

X_{11} は Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr または Lys であり；

X_{12} は Leu, Phe, Val, Ile または His であり；

X_{13} は Pro, Leu, His, Ser, Arg, Asn, Gln, Thr, Val, Ala, Cys, Ile, Phe または Tyr であり；

40

X_{14} は Asp, Glu, Asn, Val, His, Gln, Arg, Gly, Ser, Tyr, Ala, Cys, Lys, Ile, Thr または Leu である)

を含んでなる、請求項18に記載のバクテリオファージ。

【請求項21】

前記ポリペプチドが表14に示した配列番号186～435からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項18に記載のバクテリオファージ。

【請求項22】

下記の式のアミノ酸配列を含んでなる B L y S 結合性ポリペプチドをコードする外因性 DNA を発現する組換えバクテリオファージ：

50

(A) $X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - \text{Phe} - X_7 - \text{Trp} - \text{Glu} - \text{Cys} - X_{11} - X_{12} - X_{13}$ (配列番号1)

(式中、

X_1 はAla, Asn, LysまたはSerであり;

X_2 はAla, Glu, Met, SerまたはValであり;

X_3 はAla, Asn, LysまたはProであり;

X_5 はPhe, TrpまたはTyrであり;

X_7 はProまたはTyrであり;

X_{11} はAla, Gln, His, PheまたはValであり;

X_{12} はAsn, Gln, Gly, His, SerまたはValであり;

X_{13} はAla, Asn, Gly, Ile, ProまたはSerである);

(B) $X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - \text{Cys} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$ (配列番号2)

(式中、

X_1 はAla, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Valであるか、または存在せず;

X_2 はAla, Asn, Asp, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, TyrまたはValであり;

X_3 はAla, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, TyrまたはValであり;

X_5 はAsp, Ile, LeuまたはTyrであり;

X_6 はArg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, TyrまたはValであり;

X_7 はHis, Leu, LysまたはPheであり;

X_8 はLeu, ProまたはThrであり;

X_9 はArg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, MetまたはTrpであり;

X_{10} はAla, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, TyrまたはValであり;

X_{12} はAsp, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Phe, Ser, Trp, TyrまたはValであり;

X_{13} はAla, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, TyrまたはValであり;

X_{14} はAla, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr, Valであるか、または存在しない);

(C) $X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - \text{Cys} - X_{13} - X_{14} - X_{15}$ (配列番号3)

(式中、

X_1 はAla, Arg, Asn, Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, SerまたはThrであり;

X_2 はAsn, Asp, Gln, His, Ile, Lys, Pro, ThrまたはTrpであり;

X_3 はAla, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Phe, ProまたはThrであり;

X_5 はAsn, Asp, Pro, SerまたはThrであり;

X_6 は Arg, Asp, Ile, Leu, Met, Pro または Val であり ;
 X_7 は Ala, Ile, Leu, Pro, Thr または Val であり ;
 X_8 は Asn, His, Ile, Leu, Lys, Phe または Thr であり ;
 X_9 は Asn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Pro または Thr であり ;

X_{10} は Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, Ser または Trp であり ;

X_{11} は Arg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, Trp または Tyr であり ;

X_{13} は Gln, Glu, Ile, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr または Val であり ; 10

X_{14} は Asn, Gly, Ile, Phe, Pro, Thr, Trp または Tyr であり ;

X_{15} は Asn, Asp, Glu, Leu, Lys, Met, Pro または Thr である) ;

(D) $X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - Cys - X_{14} - X_{15} - X_{16}$ (配列番号 4)

(式中、

X_1 は Asn, Asp, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr であるか、または存在せず ; 20

X_2 は Arg, Asn, Asp, His, Phe, Ser または Trp であり ;

X_3 は Asn, Asp, Leu, Pro, Ser または Val であり ;

X_5 は Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe または Thr であり ;

X_6 は His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp または Tyr であり ;

X_7 は Asp, His, Leu または Ser であり ;

X_8 は Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro または Thr であり ;

X_9 は Ala, Arg, Asn または Leu であり ; 30

X_{10} は Ile, Leu, Met, Pro, Ser または Thr であり ;

X_{11} は Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser または Tyr であり ;

X_{12} は Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr または Val であり ;

X_{14} は Asp, Gly, Leu, Phe, Tyr または Val であり ;

X_{15} は Asn, His, Leu, Pro または Tyr であり ;

X_{16} は Asn, Asp, His, Phe, Ser または Tyr である) ;

(E) $X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - Cys - X_{16} - X_{17} - X_{18}$ (配列番号 5) 40

(式中、

X_1 は Arg, Asp, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr であるか、または存在せず ;

X_2 は Ala, Arg, Asn, Asp, Gly, Pro, Ser であるか、または存在せず ;

X_3 は Arg, Asn, Gln, Glu, Gly, Lys, Met, Pro, Trp または Val であり ;

X_5 は Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr または Val であり ;

X_6 は Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, T 50

r p または T y r であり；

X₇ は A l a, A r g, A s p, G l u, G l y, L e u, S e r または T y r であり；

X₈ は A s p, G l n, G l u, L e u, M e t, P h e, P r o, S e r または T y r であり；

X₉ は A s p, L e u, P r o, T h r または V a l であり；

X₁₀ は A r g, G l n, H i s, I l e, L e u, L y s, M e t, P h e, T h r, T r p または T y r であり；

X₁₁ は A l a, A r g, A s n, G l n, G l u, H i s, L e u, L y s, M e t または T h r であり；

10

X₁₂ は A l a, A s n, G l n, G l y, L e u, L y s, P h e, P r o, T h r, T r p または T y r であり；

X₁₃ は A l a, A r g, G l n, H i s, L y s, M e t, P h e, P r o, T h r, T r p または T y r であり；

X₁₄ は A r g, G l n, G l u, G l y, H i s, L e u, M e t, P h e, P r o, S e r, T h r, T y r または V a l であり；

X₁₆ は A r g, A s p, G l y, H i s, L y s, M e t, P h e, P r o, S e r または T r p であり；

X₁₇ は A r g, A s n, A s p, G l y, H i s, P h e, P r o, S e r, T r p または T y r であり；

20

X₁₈ は A l a, A r g, A s n, A s p, H i s, L e u, P h e または T r p である)；

(F) X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁ - X₁₂ (配列番号6)

(式中、

X₁ は A l a, A r g, G l y, H i s, L e u, L y s, M e t, P h e, T r p, T y r または V a l であり；

X₂ は A l a, A r g, G l n, H i s, I l e, L e u, P h e, T h r, T r p または T y r であり；

X₃ は A l a, A s p, L y s, P h e, T h r, T r p または T y r であり；

30

X₄ は A r g, A s p, G l n, L y s, M e t, P h e, P r o, S e r, T y r または V a l であり；

X₅ は A s p, L e u, L y s, P h e, P r o, S e r または V a l であり；

X₆ は H i s, I l e, L e u, P r o, S e r または T h r であり；

X₇ は A r g, G l y, H i s, L e u, L y s, M e t または T h r であり；

X₈ は A l a, A r g, A s n, I l e, L e u, L y s, M e t または T h r であり；

X₉ は A l a, A s n, A r g, A s p, G l u, G l y, H i s, L e u, M e t, S e r, T r p, T y r または V a l であり；

X₁₀ は I l e, L e u, P h e, S e r, T h r, T r p, T y r または V a l であり；

40

X₁₁ は A l a, A r g, G l y, H i s, I l e, L e u, L y s, P r o, S e r, T h r, T r p, T y r または V a l であり；

X₁₂ は A r g, A s p, H i s, L e u, L y s, M e t, P h e, P r o, S e r, T r p, T y r または V a l である)； または

(G) X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁ - X₁₂ - X₁₃ (配列番号7)

(式中、

X₁ は A s p, G l n, G l u, G l y, H i s, L y s, M e t または T r p であり；

50

X_2 は Arg, Gln, His, Ile, Leu または Pro であり ;
 X_3 は Asp, Gly, Ile, Lys, Thr, Tyr または Val であり ;
 X_4 は Asn, Asp, Gln, Glu, Met, Pro, Ser または Tyr であり ;
 X_5 は Asn, Asp, His, Ile, Leu, Met, Pro, Thr または Val であり ;
 X_6 は Asp, Glu, His, Leu, Lys, Pro または Val であり ;
 X_7 は Arg, Asn, Gln, His, Ile, Leu, Met, Pro または Thr であり ;
 X_8 は Gln, Gly, His, Leu, Met, Ser または Thr であり ; 10
 X_9 は Asn, Gln, Gly, His, Leu, Lys, Ser または Thr であり ;
 X_{10} は Ala, Gly, Ile, Leu, Lys, Met または Phe であり ;
 X_{11} は Ala, Glu, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr または Val であり ;
 X_{12} は Arg, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Tyr または Val であり ;
 X_{13} は Arg, Asn, Glu, His, Ile, Ser, Thr, Trp または Val である) 。

【請求項 23】

20

(a) 前記ポリペプチドが式：

$X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - Phe - X_7 - Trp - Glu - Cys - X_{11} - X_{12} - X_{13}$ (配列番号 1) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される： X_3 が Lys； X_5 が Tyr； X_7 が Pro； X_{11} が Ala, Gln, His, Phe または Val； X_{12} が Asn, Gln, Gly, His, Ser または Val； X_{13} が Ala, Asn, Gly, Ile, Pro または Ser；またはそのような選択の組合せである；

(b) 前記ポリペプチドが式：

$X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - Cys - X_{12} - X_{13} - X_{14}$ (配列番号 2) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される： X_3 が Asp； X_5 が Asp または Leu； X_6 が Glu または Leu； X_7 が His または Leu； X_8 が Thr または Pro； X_9 が Lys；またはそのような選択の組合せである； 30

(c) 前記ポリペプチドが式：

$X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - Cys - X_{13} - X_{14} - X_{15}$ (配列番号 3) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される： X_3 が Ala； X_5 が Asp； X_6 が Ile； X_7 が Val または Leu； X_8 が Thr； X_9 が Leu； X_{11} が Ser； X_{13} が Val； X_{15} が Glu または Pro；またはそのような選択の組合せである；

(d) 前記ポリペプチドが式：

40

$X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - Cys - X_{14} - X_{15} - X_{16}$ (配列番号 4) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される： X_1 が Ser； X_2 が Arg； X_3 が Asn または Asp； X_7 が Asp； X_8 が Glu または Pro； X_9 が Leu； X_{10} が Thr； X_{14} が Leu； X_{15} が His, Leu または Pro； X_{16} が Asp または Ser；またはそのような選択の組合せである；

(e) 前記ポリペプチドが式：

$X_1 - X_2 - X_3 - Cys - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - Cys - X_{16} - X_{17} - X_{18}$ (配列番号 5) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される： X_1 が Arg； X_2 50

がAsn, Asp, GlyまたはPro; X₃がGlyまたはMet; X₅がTrp, TyrまたはVal; X₆がAsp; X₇がAsp; X₈がLeu; X₉がLeuまたはThr; X₁₀がLysまたはThr; X₁₁がArgまたはLeu; X₁₂がThrまたはTrp; X₁₃がMetまたはPhe; X₁₄がVal; X₁₆がMet; X₁₇がArg, HisまたはTyr; X₁₈がAsnまたはHis; またはそのような選択の組合せである;

(f) 前記ポリペプチドが式:

X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁ - X₁₂ (配列番号6) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される: X₁がGly, TyrまたはVal; X₂がHisまたはTyr; X₃がAspまたはTyr; X₄がAspまたはGln; X₅がLeuまたはSer; X₆がLeuまたはThr; X₇がLysまたはThr; X₈がLeuまたはLys; X₉がMetまたはSer; X₁₀がThrまたはLeu; X₁₁がProまたはThr; X₁₂がArgまたはPro; またはそのような選択の組合せである;

(g) 前記ポリペプチドが式:

X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁ - X₁₂ - X₁₃ (配列番号7) のアミノ酸配列を含んでなり、下記のアミノ酸位置が独立して次のように選択される: X₁がGluまたはLys; X₂がHisまたはPro; X₃がTyr; X₄がAspまたはGln; X₅がAsnまたはThr; X₆がAspまたはPro; X₇がIleまたはPro; X₈がLeuまたはThr; X₉がLys; X₁₀がGlyまたはMet; X₁₁がAlaまたはThr; X₁₂がArgまたはHis; X₁₃がHis; またはそのような選択の組合せである;

請求項22に記載の組換えバクテリオファージ。

【請求項24】

BLySまたはBLyS様ポリペプチドを含むと予想される溶液中のBLySまたはBLyS様ポリペプチドを検出する方法であって、

(a) 該溶液に請求項1、9または11に記載のポリペプチドを接触させること、

(b) 該ポリペプチドとBLySまたはBLyS様ポリペプチドとの間に結合が起こっているか否かを調べること、

を含んでなる上記方法。

【請求項25】

BLySまたはBLyS様ポリペプチドを精製する方法であって、

(a) 固相支持体に請求項1、9または11に記載のポリペプチドを固定化すること、

(b) BLySまたはBLyS様ポリペプチドを含む溶液を該支持体と接触させること、

(c) 該溶液を該支持体から分離すること、

を含んでなる上記方法。

【請求項26】

(a) クロマトグラフマトリックス材料、および、そこに固定化された、(b) 請求項1、9または11に記載のBLyS結合性ポリペプチドを含むBLyS結合性分子、を含んでなるBLyS分離媒体。

【請求項27】

(a) クロマトグラフマトリックス材料、および、そこに固定化された、(b) 表1～8および14に示した配列番号20～162および186～435からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むBLyS結合性ポリペプチドを含むBLyS結合性分子、を含んでなる、請求項26に記載のBLyS分離媒体。

【請求項28】

BLySまたはBLyS様ポリペプチドを、それを含有する溶液から分離する方法であって、

(a) 該溶液を請求項26に記載の分離媒体と接触させること、

- (b) 結合してない物質を除くこと、
 (c) 結合したB L y SまたはB L y S様ポリペプチドを該分離媒体から溶出すること、
 を含んでなる上記方法。

【請求項 29】

アミノ酸配列： A s p - X a a - L e u - T h r （配列番号 446）（式中、X a a はP r o, S e r, T h r, P h e, L e u, T y r, C y sまたはA l aである）を含んでなるB L y S結合性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 30】

X a aがP r oまたはS e rである、請求項 29に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 31】

前記ポリペプチドが次のアミノ酸配列：

X₁ - X₂ - A s p - X₄ - L e u - T h r - X₇ - L e u - X₉ - X₁₀ （配列番号 448）

（式中、

X₁ はT r p, G l u, L y s, C y s, L e u, A l a, A r g, G l yまたはS e rであり；

X₂ はT y r, P h e, G l u, C y sまたはA s nであり；

X₄ はP r o, S e r, T h r, P h e, L e u, T y r, C y sまたはA l aであり；

20

X₇ はL y s, A s n, G l n, G l yまたはA r gであり；

X₉ はT r p, S e r, T h r, A r g, C y s, T y rまたはL y sであり；

X₁₀ はL e u, P h e, V a l, I l eまたはH i sである）

を含んでなる、請求項 29に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 32】

前記ポリペプチドが次のアミノ酸配列：

T r p - T y r - A s p - P r o - L e u - T h r - L y s - L e u - T r p - L e u （配列番号 436）を含んでなる、請求項 31に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 33】

前記ポリペプチドが次のアミノ酸配列：

30

A l a - X₂ - X₃ - X₄ - A s p - X₆ - L e u - T h r - X₉ - L e u - X₁₁ - X₁₂ - X₁₃ - X₁₄ （配列番号 447）

（式中、

X₂ はA r g以外の任意のアミノ酸であり；

X₃ はT r p, G l u, L y s, C y s, L e u, A l a, A r g, G l yまたはS e rであり；

X₄ はT y r, P h e, G l u, C y sまたはA s nであり；

X₆ はP r o, S e r, T h r, P h e, L e u, T y r, C y sまたはA l aであり；

X₉ はL y s, A s n, G l n, G l yまたはA r gであり；

40

X₁₁ はT r p, S e r, T h r, A r g, C y s, T y rまたはL y sであり；

X₁₂ はL e u, P h e, V a l, I l eまたはH i sであり；

X₁₃ はP r o, L e u, H i s, S e r, A r g, A s n, G l n, T h r, V a l, A l a, C y s, I l e, P h eまたはT y rであり；

X₁₄ はA s p, G l u, A s n, V a l, H i s, G l n, A r g, G l y, S e r, T y r, A l a, C y s, L y s, I l e, T h rまたはL e uである）

を含んでなる、請求項 31に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 34】

表 14 に示した配列番号 186～435 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードする、請求項 31に記載のポリヌクレオチド。

50

【請求項 35】

下記の式の B L y S 結合性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド：

(A) $X_1 - X_2 - X_3 - C y s - X_5 - P h e - X_7 - T r p - G l u - C y s - X_{11} - X_{12} - X_{13}$ (配列番号 1)

(式中、

X_1 は A l a, A s n, L y s または S e r であり；

X_2 は A l a, G l u, M e t, S e r または V a l であり；

X_3 は A l a, A s n, L y s または P r o であり；

X_5 は P h e, T r p または T y r であり；

X_7 は P r o または T y r であり；

X_{11} は A l a, G l n, H i s, P h e または V a l であり；

X_{12} は A s n, G l n, G l y, H i s, S e r または V a l であり；

X_{13} は A l a, A s n, G l y, I l e, P r o または S e r である)；

(B) $X_1 - X_2 - X_3 - C y s - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - C y s - X_{12} - X_{13} - X_{14}$ (配列番号 2)

(式中、

X_1 は A l a, A s p, G l n, G l u, G l y, H i s, I l e, L e u, L y s, M e t, P h e, P r o, S e r, T h r, T r p, T y r, V a l であるか、または存在せず；

X_2 は A l a, A s n, A s p, G l n, G l y, H i s, I l e, L e u, L y s, M e t, P h e, P r o, S e r, T h r, T r p, T y r または V a l であり；

X_3 は A l a, A r g, A s n, A s p, G l n, G l u, G l y, H i s, I l e, L e u, L y s, M e t, P h e, P r o, S e r, T r p, T y r または V a l であり；

X_5 は A s p, I l e, L e u または T y r であり；

X_6 は A r g, A s p, G l u, H i s, I l e, L e u, L y s, P h e, P r o, T y r または V a l であり；

X_7 は H i s, L e u, L y s または P h e であり；

X_8 は L e u, P r o または T h r であり；

X_9 は A r g, A s n, G l y, H i s, I l e, L y s, M e t または T r p であり；

X_{10} は A l a, G l n, G l u, G l y, H i s, I l e, L e u, M e t, P h e, S e r, T r p, T y r または V a l であり；

X_{12} は A s p, G l n, G l u, G l y, I l e, L e u, L y s, P h e, S e r, T r p, T y r または V a l であり；

X_{13} は A l a, A r g, A s n, A s p, G l n, G l u, G l y, H i s, L e u, L y s, M e t, P h e, P r o, S e r, T h r, T r p, T y r または V a l であり；

X_{14} は A l a, A r g, A s n, A s p, G l n, G l u, G l y, H i s, I l e, L e u, L y s, P h e, P r o, T r p, T y r, V a l であるか、または存在しない)；

(C) $X_1 - X_2 - X_3 - C y s - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - C y s - X_{13} - X_{14} - X_{15}$ (配列番号 3)

(式中、

X_1 は A l a, A r g, A s n, A s p, L e u, L y s, P h e, P r o, S e r または T h r であり；

X_2 は A s n, A s p, G l n, H i s, I l e, L y s, P r o, T h r または T r p であり；

X_3 は A l a, A r g, A s n, G l n, G l u, H i s, P h e, P r o また

10

20

30

40

50

はThrであり；

X₅はAsn, Asp, Pro, SerまたはThrであり；

X₆はArg, Asp, Ile, Leu, Met, ProまたはValであり；

X₇はAla, Ile, Leu, Pro, ThrまたはValであり；

X₈はAsn, His, Ile, Leu, Lys, PheまたはThrであり；

X₉はAsn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, ProまたはThrであり；

X₁₀はArg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, SerまたはTrpであり；

X₁₁はArg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, TrpまたはTyrであり； 10

X₁₃はGln, Glu, Ile, Leu, Phe, Pro, Ser, TyrまたはValであり；

X₁₄はAsn, Gly, Ile, Phe, Pro, Thr, TrpまたはTyrであり；

X₁₅はAsn, Asp, Glu, Leu, Lys, Met, ProまたはThrである)；

(D) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-Cys-X₁₄-X₁₅-X₁₆ (配列番号4)

(式中、

20

X₁はAsn, Asp, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyrであるか、または存在せず；

X₂はArg, Asn, Asp, His, Phe, SerまたはTrpであり；

X₃はAsn, Asp, Leu, Pro, SerまたはValであり；

X₅はAsp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, PheまたはThrであり；

X₆はHis, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, TrpまたはTyrであり；

X₇はAsp, His, LeuまたはSerであり；

X₈はAla, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, ProまたはThrであり； 30

X₉はAla, Arg, AsnまたはLeuであり；

X₁₀はIle, Leu, Met, Pro, SerまたはThrであり；

X₁₁はAla, Arg, Asn, Gly, His, Lys, SerまたはTyrであり；

X₁₂はAla, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, TyrまたはValであり；

X₁₄はAsp, Gly, Leu, Phe, TyrまたはValであり；

X₁₅はAsn, His, Leu, ProまたはTyrであり；

X₁₆はAsn, Asp, His, Phe, SerまたはTyrである)； 40

(E) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-Cys-X₁₆-X₁₇-X₁₈ (配列番号5)

(式中、

X₁はArg, Asp, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyrであるか、または存在せず；

X₂はAla, Arg, Asn, Asp, Gly, Pro, Serであるか、または存在せず；

X₃はArg, Asn, Gln, Glu, Gly, Lys, Met, Pro, TrpまたはValであり；

X₅はArg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, T 50

rp, TyrまたはValであり;

X₆はArg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, TrpまたはTyrであり;

X₇はAla, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, SerまたはTyrであり;

X₈はAsp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, SerまたはTyrであり;

X₉はAsp, Leu, Pro, ThrまたはValであり;

X₁₀はArg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, TrpまたはTyrであり;

10

X₁₁はAla, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, MetまたはThrであり;

X₁₂はAla, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, TrpまたはTyrであり;

X₁₃はAla, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, TrpまたはTyrであり;

X₁₄はArg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, TyrまたはValであり;

X₁₆はArg, Asp, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, SerまたはTrpであり;

20

X₁₇はArg, Asn, Asp, Gly, His, Phe, Pro, Ser, TrpまたはTyrであり;

X₁₈はAla, Arg, Asn, Asp, His, Leu, PheまたはTrpである);

(F) X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁ - X₁₂ (配列番号6)

(式中、

X₁はAla, Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, TyrまたはValであり;

X₂はAla, Arg, Gln, His, Ile, Leu, Phe, Thr, TrpまたはTyrであり;

30

X₃はAla, Asp, Lys, Phe, Thr, TrpまたはTyrであり;

X₄はArg, Asp, Gln, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, TyrまたはValであり;

X₅はAsp, Leu, Lys, Phe, Pro, SerまたはValであり;

X₆はHis, Ile, Leu, Pro, SerまたはThrであり;

X₇はArg, Gly, His, Leu, Lys, MetまたはThrであり;

X₈はAla, Arg, Asn, Ile, Leu, Lys, MetまたはThrであり;

X₉はAla, Asn, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Leu, Met, Ser, Trp, TyrまたはValであり;

40

X₁₀はIle, Leu, Phe, Ser, Thr, Trp, TyrまたはValであり;

X₁₁はAla, Arg, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Pro, Ser, Thr, Trp, TyrまたはValであり;

X₁₂はArg, Asp, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, TyrまたはValである);

(G) X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁ - X₁₂ - X₁₃ (配列番号7)

(式中、

50

X_1 は Asp, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Met または Trp であり ;
 X_2 は Arg, Gln, His, Ile, Leu または Pro であり ;
 X_3 は Asp, Gly, Ile, Lys, Thr, Tyr または Val であり ;
 X_4 は Asn, Asp, Gln, Glu, Met, Pro, Ser または Tyr であり ;
 X_5 は Asn, Asp, His, Ile, Leu, Met, Pro, Thr または Val であり ;
 X_6 は Asp, Glu, His, Leu, Lys, Pro または Val であり ;
 X_7 は Arg, Asn, Gln, His, Ile, Leu, Met, Pro または Thr であり ;
 X_8 は Gln, Gly, His, Leu, Met, Ser または Thr であり ;
 X_9 は Asn, Gln, Gly, His, Leu, Lys, Ser または Thr であり ;
 X_{10} は Ala, Gly, Ile, Leu, Lys, Met または Phe であり ;
 X_{11} は Ala, Glu, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr または Val であり ;
 X_{12} は Arg, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Tyr または Val であり ;
 X_{13} は Arg, Asn, Glu, His, Ile, Ser, Thr, Trp または Val である) 。

【請求項 36】

B L y S 標的のための結合性分子を同定する方法であって、請求項 1、9 または 11 に記載の B L y S 結合性ポリペプチドを利用して B L y S または B L y S 様ポリペプチドとの複合体を形成させ、該複合体を 1 種以上の潜在的 B L y S 標的結合性分子と接触させ、該 1 種以上の潜在的 B L y S 標的結合性分子が B L y S 結合性ポリペプチドと競合して該 B L y S または B L y S 様ポリペプチドとの複合体を形成するか否かを判定する、各ステップを含んでなる上記方法。

【請求項 37】

少なくとも 10^3 のポリペプチドの集団から構成され、該集団のポリペプチドが次のアミノ酸配列：

$\text{Ala} - X_2 - X_3 - X_4 - \text{Asp} - X_6 - \text{Leu} - \text{Thr} - X_9 - \text{Leu} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$ (配列番号 449)

(式中、

X_2 は任意のアミノ酸であり ;

X_3 は任意のアミノ酸であり ;

X_4 は任意のアミノ酸であり ;

X_6 は任意のアミノ酸であり ;

X_9 は任意のアミノ酸であり ;

X_{11} は任意のアミノ酸であり ;

X_{12} は任意のアミノ酸であり ;

X_{13} は任意のアミノ酸であり ;

X_{14} は任意のアミノ酸である)

を含んでなる、B L y S 親和性成熟ライブラリー。

【請求項 38】

次の配列：

G C T N N N N N N N N N G A T N N N C T T A C T N N N C T C N N N N
 N N N N N N N (配列番号 185)

を含んでなる、多様な B L y S 結合性ポリペプチドをコードする DNA 鋳型。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の利用分野

本発明は、Bリンパ球刺激因子タンパク質（B L y S）と結合するポリペプチドに関する。そのようなポリペプチドは、例えば、B L y Sの検出、単離および／または精製に使用することができる。本発明はまた、これらのB L y S結合性ポリペプチドをコードする核酸分子、これらの核酸を含有するベクターおよび宿主細胞、ならびに該ポリペプチドの産生方法に関する。

【0002】

発明の背景

Bリンパ球刺激因子（B L y S）は腫瘍壊死因子（「TNF」）スーパーファミリーのメンバーであり、*in vivo*でも*in vitro*でもB細胞の増殖と分化を誘導する（Mooreら, *Science*, 285:260-263 (1999)）。B L y Sは、その単球特異的な遺伝子およびタンパク質発現パターンならびにBリンパ球へのその特異的受容体分布および生物学的活性により、I L-2、I L-4、I L-5、I L-6、I L-7、I L-13、I L-15、C D 4 0 L、C D 2 7 L（C D 7 0）などの他のB細胞増殖・分化因子と区別される。B L y S発現はナチュラルキラー（「NK」）細胞、T細胞またはB細胞上には検出されず、骨髄由来の細胞に限られる。休止している単球でのB L y Sの発現はインターフェロン γ （I F N γ ）によりアップレギュレートされる。B L y Sをコードする遺伝子は染色体13q34にすでにマップされている。

【0003】

B L y Sは285アミノ酸からなるタイプII膜結合型ポリペプチドおよび152アミノ酸からなる可溶性ポリペプチドとして発現される（Mooreら, 1999, 前掲）。膜結合型のB L y Sはアミノ酸残基47および73間にわたる推定上の膜貫通ドメインをもつ。可溶型のB L y SのNH₂末端は膜結合型のB L y SのAla¹³⁴で始まる。可溶型と膜結合型のどちらのタンパク質もホモ三量体を形成している。可溶性の組換えB L y Sは、マウス脾性B細胞の*in vitro*増殖を誘導し、かつこれらの細胞上の細胞表面受容体と結合することが見出されている（Mooreら, 1999, 前掲）。可溶性B L y Sをマウスに投与すると、C D 4 5 R^{d u l l}、L y 6 D^{b r i g h t}（ThBとしても知られる）B細胞の割合が増加し、また、血清I g MおよびI g Aレベルも増加することがわかった（Mooreら, 1999, 前掲）。こうして、B L y Sはその受容体分布においても生物学的活性においてもB細胞向性を示す。

【0004】

その発現パターンと生物学的活性に基づき、B L y SはB細胞と単球または分化したその子孫との間のシグナル交換に関与していると提案された。B L y S受容体およびリガンドの制限された発現パターンからは、B L y Sは、T細胞依存的抗原活性化におけるC D 4 0およびC D 4 0 Lと同様の様式で、T細胞非依存的応答の調節因子として機能しうることが示唆される。

【0005】

したがって、B L y Sと特異的に結合する分子は、B L y Sサイトカインの研究において、商業量および医学的に純粋な量でのB L y Sの製造・精製において、また、新しい治療薬と診断薬の開発において、様々な用途を見出すであろう。

【0006】

発明の概要

本発明は、Bリンパ球刺激因子タンパク質（B L y S）および／またはB L y S様ポリペプチドと特異的に結合する新規なポリペプチドおよびポリペプチドのファミリーを提供する。特に、本発明は、ヒトB L y S（配列番号173および／または174）またはヒト単球上に発現されるB L y S；マウスB L y S（配列番号175および／または176）またはマウス単球上に発現されるB L y S；ラットB L y S（配列番号177、178、179および／または180に示される可溶型、あるいは、例えばラット単球の表面にある、膜結合型のいずれか）；またはサルB L y S（例えば、配列番号181および／また

は182のサルB L y Sポリペプチド、可溶型のサルB L y S、またはサル単球上に発現されるB L y S)、好ましくはヒトB L y S、のポリペプチドもしくはポリペプチド断片と特異的に結合するポリペプチドを包含する。

【0007】

特定の好ましい実施形態において、本発明のB L y S結合性ポリペプチドは高い親和性をもってB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと結合する。他の実施形態では、本発明のB L y S結合性ポリペプチドはB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと可逆的に結合する。さらに別の実施形態では、本発明のB L y S結合性ポリペプチドはB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと不可逆的に結合する。

【0008】

本発明に従う特定のポリペプチドに含まれるシステイン残基はジスルフィド結合を形成すると考えられ、このジスルフィド結合のため、これらのシステイン残基を含むポリペプチドは非還元条件下で安定したループ構造を形成するだろう。本発明の特に好適なB L y S結合性ポリペプチドは、B L y SまたはB L y S様ポリペプチドと結合する安定したループ構造やその他の構造を形成するアミノ酸配列を含むポリペプチド分子である。

【0009】

特定の実施形態において、本発明は、配列番号1～12、20～172、および186～444（好ましくは、上記した、また、表1～8、14、15ならびに下記の実施例2、5、6に記載する配列番号163～172または436～444）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、あるいは、からなるB L y S結合性ポリペプチドに関する。ここに記載する単離されたB L y S結合性ポリペプチドの配列の解析は、テトラペプチドA s p - X a a - L e u - T h r（配列番号446）を含むポリペプチドについての強い選択を示し、それゆえに、最も広範な形態において、本発明は、ポリペプチドA s p - X a a - L e u - T h r（配列番号446）（式中、X a aはP r o, S e r, T h r, P h e, L e u, T y r, C y sまたはA l aであり、好ましくは、P r oまたはS e rである）を含んでなる、B L y Sと結合可能なポリペプチドに関する。

【0010】

表1～8に示した特定のB L y S結合性ポリペプチドに基づいて、7つのコンセンサス配列（配列番号1～7）が決定された。特定の実施形態では、本発明のB L y S結合性ポリペプチドはこれらの配列を1つ以上含んでなる。そのような好適なB L y S結合性ポリペプチドには、不変のC y s残基間で環状構造またはループ構造を形成する可能性があり、下記のA～E（配列番号1～5）から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、あるいは、からなるポリペプチドが含まれる：

(A) $X_1 - X_2 - X_3 - C y s - X_5 - P h e - X_7 - T r p - G l u - C y s - X_{11} - X_{12} - X_{13}$ （配列番号1）

（式中、

X_1 はA l a, A s n, L y sまたはS e rであり；

X_2 はA l a, G l u, M e t, S e rまたはV a lであり；

X_3 はA l a, A s n, L y sまたはP r o（好ましくは、L y s）であり；

X_5 はP h e, T r pまたはT y r（好ましくは、T y r）であり；

X_7 はP r oまたはT y r（好ましくは、P r o）であり；

X_{11} はA l a, G l n, H i s, P h eまたはV a lであり；

X_{12} はA s n, G l n, G l y, H i s, S e rまたはV a lであり；

X_{13} はA l a, A s n, G l y, I l e, P r oまたはS e rである）；

ただし、該ポリペプチドはB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと結合する；

【0011】

(B) $X_1 - X_2 - X_3 - C y s - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - C y s - X_{12} - X_{13} - X_{14}$ （配列番号2）

（式中、

X_1 はA l a, A s p, G l n, G l u, G l y, H i s, I l e, L e u, L 50

ys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Valであるか、または存在せず；

X₂はAla, Asn, Asp, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, TyrまたはValであり；

X₃はAla, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, TyrまたはVal（好ましくは、Asp）であり；

X₅はAsp, Ile, LeuまたはTyr（好ましくは、AspまたはLeu）であり；

10

X₆はArg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, TyrまたはVal（好ましくは、GluまたはLeu）であり；

X₇はHis, Leu, LysまたはPhe（好ましくは、HisまたはLeu）であり；

X₈はLeu, ProまたはThr（好ましくは、ThrまたはPro）であり；

X₉はArg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, MetまたはTrp（好ましくは、Lys）であり；

X₁₀はAla, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, TyrまたはValであり；

X₁₂はAsp, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Phe, Ser, Trp, TyrまたはValであり；

20

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

X₁₄はAla, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr, Valであるか、または存在しない）；

ただし、該ポリペプチドはB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと結合する；
【0012】

(C) X₁ - X₂ - X₃ - Cys - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁ - Cys - X₁₃ - X₁₄ - X₁₅ （配列番号3）

30

（式中、

X₁はAla, Arg, Asn, Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, SerまたはThrであり；

X₂はAsn, Asp, Gln, His, Ile, Lys, Pro, ThrまたはTrpであり；

X₃はAla, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Phe, ProまたはThr（好ましくは、Ala）であり；

X₅はAsn, Asp, Pro, SerまたはThr（好ましくは、Asp）であり；

40

X₆はArg, Asp, Ile, Leu, Met, ProまたはVal（好ましくは、Ile）であり；

X₇はAla, Ile, Leu, Pro, ThrまたはVal（好ましくは、ValまたはLeu）であり；

X₈はAsn, His, Ile, Leu, Lys, PheまたはThr（好ましくは、Thr）であり；

X₉はAsn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, ProまたはThr（好ましくは、Leu）であり；

X₁₀はArg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, SerまたはTrpであり；

50

X_{11} は Arg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, Trp または Tyr (好ましくは、Ser) であり；

X_{13} は Gln, Glu, Ile, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr または Val (好ましくは、Val) であり；

X_{14} は Asn, Gly, Ile, Phe, Pro, Thr, Trp または Tyr であり；

X_{15} は Asn, Asp, Glu, Leu, Lys, Met, Pro または Thr (好ましくは、Glu または Pro) である；

ただし、該ポリペプチドは BLyS および／または BLyS 様ポリペプチドと結合する；

【0013】

10

(D) $X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - \text{Cys} - X_{14} - X_{15} - X_{16}$ (配列番号4)

(式中、

X_1 は Asn, Asp, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr であるか、または存在せず (好ましくは、Ser)；

X_2 は Arg, Asn, Asp, His, Phe, Ser または Trp (好ましくは、Arg) であり；

X_3 は Asn, Asp, Leu, Pro, Ser または Val (好ましくは、Asn または Asp) であり；

X_5 は Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe または Thr であり； 20

X_6 は His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp または Tyr であり；

X_7 は Asp, His, Leu または Ser (好ましくは、Asp) であり；

X_8 は Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro または Thr (好ましくは、Glu または Pro) であり；

X_9 は Ala, Arg, Asn または Leu (好ましくは、Leu) であり；

X_{10} は Ile, Leu, Met, Pro, Ser または Thr (好ましくは、Thr) であり；

X_{11} は Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser または Tyr であり； 30

X_{12} は Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr または Val であり；

X_{14} は Asp, Gly, Leu, Phe, Tyr または Val (好ましくは、Leu) であり；

X_{15} は Asn, His, Leu, Pro または Tyr (好ましくは、His、Leu または Pro) であり；

X_{16} は Asn, Asp, His, Phe, Ser または Tyr (好ましくは、Asp または Ser) である；

ただし、該ポリペプチドは BLyS および／または BLyS 様ポリペプチドと結合する； 40

【0014】

(E) $X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - \text{Cys} - X_{16} - X_{17} - X_{18}$ (配列番号5)

(式中、

X_1 は Arg, Asp, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr であるか、または存在せず (好ましくは、Arg)；

X_2 は Ala, Arg, Asn, Asp, Gly, Pro, Ser であるか、または存在せず (好ましくは、Asn、Asp、Gly または Pro)；

X_3 は Arg, Asn, Gln, Glu, Gly, Lys, Met, Pro, Trp または Val (好ましくは、Gly または Met) であり； 50

X_5 は Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr または Val (好ましくは、Trp、Tyr または Val) であり；
 X_6 は Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、Asp) であり；
 X_7 は Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser または Tyr (好ましくは、Asp) であり；
 X_8 は Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser または Tyr (好ましくは、Leu) であり；
 X_9 は Asp, Leu, Pro, Thr または Val (好ましくは、Leu または Thr) であり；
 X_{10} は Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、Lys または Thr) であり；
 X_{11} は Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Met または Thr (好ましくは、Arg または Leu) であり；
 X_{12} は Ala, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、Thr または Trp) であり；
 X_{13} は Ala, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、Met または Phe) であり；
 X_{14} は Arg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr または Val (好ましくは、Val) であり；
 X_{16} は Arg, Asp, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, Ser または Trp (好ましくは、Met) であり；
 X_{17} は Arg, Asn, Asp, Gly, His, Phe, Pro, Ser, Trp または Tyr (好ましくは、Arg、His または Tyr) であり；
 X_{18} は Ala, Arg, Asn, Asp, His, Leu, Phe または Trp (好ましくは、His または Asn) である)；
 ただし、該ポリペプチドは B L y S および／または B L y S 様ポリペプチドと結合する。

10

20

30

40

50

【0015】

さらなる好適な実施形態には、下記の F および G (配列番号 6 および 7) から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、あるいは、からなる線状ポリペプチドが含まれる：

(F) $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12}$ (配列番号 6)

(式中、

X_1 は Ala, Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Tyr または Val (好ましくは、Gly、Tyr または Val) であり；
 X_2 は Ala, Arg, Gln, His, Ile, Leu, Phe, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、His または Tyr) であり；
 X_3 は Ala, Asp, Lys, Phe, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、Asp または Tyr) であり；
 X_4 は Arg, Asp, Gln, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr または Val (好ましくは、Asp または Gln) であり；
 X_5 は Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser または Val (好ましくは、Leu または Ser) であり；
 X_6 は His, Ile, Leu, Pro, Ser または Thr (好ましくは、Leu または Thr) であり；
 X_7 は Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met または Thr (好ましくは、Lys または Thr) であり；
 X_8 は Ala, Arg, Asn, Ile, Leu, Lys, Met または Thr (好ましくは、Leu または Lys) であり；
 X_9 は Ala, Asn, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Leu, M

e t, S e r, T r p, T y rまたはV a l (好ましくは、M e tまたはS e r)であり；

X₁₀はI l e, L e u, P h e, S e r, T h r, T r p, T y rまたはV a l (好ましくは、T h rまたはL e u)であり；

X₁₁はA l a, A r g, G l y, H i s, I l e, L e u, L y s, P r o, S e r, T h r, T r p, T y rまたはV a l (好ましくは、P r oまたはT h r)であり；

X₁₂はA r g, A s p, H i s, L e u, L y s, M e t, P h e, P r o, S e r, T r p, T y rまたはV a l (好ましくは、A r gまたはP r o)である)；

ただし、該ポリペプチドはB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと結合する； 10

【0016】

(G) X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁ - X₁₂ - X₁₃ (配列番号7)

(式中、

X₁はA s p, G l n, G l u, G l y, H i s, L y s, M e tまたはT r p (好ましくは、G l uまたはL y s)であり；

X₂はA r g, G l n, H i s, I l e, L e uまたはP r o (好ましくは、H i sまたはP r o)であり；

X₃はA s p, G l y, I l e, L y s, T h r, T y rまたはV a l (好ましくは、T y r)であり； 20

X₄はA s n, A s p, G l n, G l u, M e t, P r o, S e rまたはT y r (好ましくは、A s pまたはG l n)であり；

X₅はA s n, A s p, H i s, I l e, L e u, M e t, P r o, T h rまたはV a l (好ましくは、A s nまたはT h r)であり；

X₆はA s p, G l u, H i s, L e u, L y s, P r oまたはV a l (好ましくは、A s pまたはP r o)であり；

X₇はA r g, A s n, G l n, H i s, I l e, L e u, M e t, P r oまたはT h r (好ましくは、I l eまたはP r o)であり；

X₈はG l n, G l y, H i s, L e u, M e t, S e rまたはT h r (好ましくは、L e uまたはT h r)であり； 30

X₉はA s n, G l n, G l y, H i s, L e u, L y s, S e rまたはT h r (好ましくは、L y s)であり；

X₁₀はA l a, G l y, I l e, L e u, L y s, M e tまたはP h e (好ましくは、G l yまたはM e t)であり；

X₁₁はA l a, G l u, H i s, I l e, L e u, M e t, S e r, T h r, T r p, T y rまたはV a l (好ましくは、A l aまたはT h r)であり；

X₁₂はA r g, G l n, G l u, G l y, H i s, I l e, L y s, T y rまたはV a l (好ましくは、A r gまたはH i s)であり；

X₁₃はA r g, A s n, G l u, H i s, I l e, S e r, T h r, T r pまたはV a l (好ましくは、H i s)である)； 40

ただし、該ポリペプチドはB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと結合する。

【0017】

前記ポリペプチドはN-末端とC-末端のいずれか一方または両方に追加のアミノ酸が結合されていてもよい。

【0018】

ループ構造を形成する可能性があるポリペプチドを含むライブラリー (すなわち、T N 6、T N 7、T N 8、T N 9、T N 10およびT N 12と称するライブラリー) の分離物からの配列情報および結合データを検討すると、ループ構造を形成しうる一連のB L y S結合性ポリペプチドが同定される。特定の実施形態において、本発明のB L y S結合性ポリペプチドは下記のH～L (配列番号8～12) から選択されるアミノ酸配列を含んでなる 50

、あるいは、からなる：

(H) Cys - X₂ - Phe - X₄ - Trp - Glu - Cys (配列番号8)

(式中、

X₂ はPhe, TrpまたはTyr (好ましくは、Tyr) であり；

X₄ はProまたはTyr (好ましくは、Pro) である)；

【0019】

(I) Cys - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - Cys (配列番号9)

(式中、

X₂ はAsp, Ile, LeuまたはTyr (好ましくは、AspまたはLeu) であり；

X₃ はArg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, TyrまたはVal (好ましくは、GluまたはLeu) であり；

X₄ はHis, Leu, LysまたはPhe (好ましくは、HisまたはLeu) であり；

X₅ はLeu, ProまたはThr (好ましくは、ThrまたはPro) であり；

X₆ はArg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, MetまたはTrp (好ましくは、Lys) であり；

X₇ はAla, Asn, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, TyrまたはValである)；

【0020】

(J) Cys - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - Cys (配列番号10)

(式中、

X₂ はAsn, Asp, Pro, SerまたはThr (好ましくは、Asp) であり；

X₃ はArg, Asp, Ile, Leu, Met, ProまたはVal (好ましくは、Ile) であり；

X₄ はAla, Ile, Leu, Pro, ThrまたはVal (好ましくは、ValまたはLeu) であり；

X₅ はAsn, His, Ile, Leu, Lys, PheまたはThr (好ましくは、Thr) であり；

X₆ はAsn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, ProまたはThr (好ましくは、Leu) であり；

X₇ はArg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, SerまたはTrpであり；

X₈ はArg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, TrpまたはTyr (好ましくは、Ser) である)；

【0021】

(K) Cys - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - Cys (配列番号11)

(式中、

X₂ はAsp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, PheまたはThrであり；

X₃ はHis, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, TrpまたはTyrであり；

X₄ はAsp, His, LeuまたはSer (好ましくは、Asp) であり；

X₅ はAla, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, ProまたはThr (好ましくは、GluまたはPro) であり；

X₆ はAla, Arg, AsnまたはLeu (好ましくは、Leu) であり；

X₇ はIle, Leu, Met, Pro, SerまたはThr (好ましくは、Thr) であり；

10

20

30

40

50

X_8 は Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser または Tyr であり；

X_9 は Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr または Val である）；

【0022】

(L) Cys- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} -Cys (配列番号 12)

(式中、

X_2 は Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr または Val (好ましくは、Trp、Tyr または Val) であり； 10

X_3 は Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、Asp) であり；

X_4 は Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser または Tyr (好ましくは、Asp) であり；

X_5 は Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser または Tyr (好ましくは、Leu) であり；

X_6 は Asp, Leu, Pro, Thr または Val (好ましくは、Leu または Thr) であり；

X_7 は Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、Lys または Thr) であり； 20

X_8 は Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Met または Thr (好ましくは、Arg または Leu) であり；

X_9 は Ala, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、Thr または Trp) であり；

X_{10} は Ala, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、Met または Phe) であり；

X_{11} は Arg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr または Val (好ましくは、Val) である）；

ただし、前記ポリペプチドは BLyS および／または BLyS 様ポリペプチドと結合する 30

【0023】

本発明のさらに好適な実施形態において、BLyS 結合性ポリペプチドは下記のアミノ酸配列 M (配列番号 447) を含んでなる：

(M) Ala- X_2 - X_3 - X_4 -Asp- X_6 -Leu-Thr- X_9 -Leu- X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} (配列番号 447)

(式中、

X_2 は Asn, Ser, Tyr, Asp, Phe, Ile, Gln, His, Pro, Lys, Leu, Met, Thr, Val, Glu, Ala, Gly, Cys または Trp (すなわち、Arg 以外の任意のアミノ酸；好ましくは、Asn) であり； 40

X_3 は Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly または Ser (好ましくは、Trp) であり；

X_4 は Tyr, Phe, Glu, Cys または Asn (好ましくは、Tyr) であり；

X_6 は Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys または Ala (好ましくは、Pro または Ser) であり；

X_9 は Lys, Asn, Gln, Gly または Arg (好ましくは、Lys) であり；

X_{11} は Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr または Lys (好ましくは、Trp) であり； 50

X_{12} は Leu, Phe, Val, Ile または His (好ましくは、Leu) であり；

X_{13} は Pro, Leu, His, Ser, Arg, Asn, Gln, Thr, Val, Ala, Cys, Ile, Phe または Tyr (すなわち、Asp, Glu, Gly, Lys, Met または Trp ではない；好ましくは、Pro) であり；

X_{14} は Asp, Glu, Asn, Val, His, Gln, Arg, Gly, Ser, Tyr, Ala, Cys, Lys, Ile, Thr または Leu (すなわち、Phe, Met, Pro または Trp ではない；好ましくは、Asp, Val または Glu) である)。

【0024】

10

好適な実施形態は下記の式 N のコア配列を含んでなるポリペプチドである：

(N) $X_1 - X_2 - Asp - X_4 - Leu - Thr - X_7 - Leu - X_9 - X_{10}$ (配列番号 448)

(式中、

X_1 は Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly または Ser (好ましくは、Trp) であり；

X_2 は Tyr, Phe, Glu, Cys または Asn (好ましくは、Tyr) であり；

X_4 は Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys または Ala (好ましくは、Pro または Ser) であり；

20

X_7 は Lys, Asn, Gln, Gly または Arg (好ましくは、Lys) であり；

X_9 は Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr または Lys (好ましくは、Trp) であり；

X_{10} は Leu, Phe, Val, Ile または His (好ましくは、Leu) である)。

【0025】

本発明に従う特に好適な B L y S 結合性ポリペプチドは、次のコアペプチド：

Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu (配列番号 436)

30

を含んでなる。

【0026】

上記の B L y S 結合性ポリペプチドは、N-およびC-末端のいずれか一方または両方に追加のアミノ酸が結合されていてもよい。

【0027】

本発明のさらなる実施形態は、少なくとも 10^3 のポリペプチド、好ましくは、少なくとも 10^6 のポリペプチド、より好ましくは、少なくとも 10^9 またはそれ以上のポリペプチドの集団から構成され、該集団のポリペプチドが次のアミノ酸配列：

Ala- X_2 - X_3 - X_4 -Asp- X_6 -Leu-Thr- X_9 -Leu- X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} (配列番号 449)

40

(式中、

X_2 は任意のアミノ酸であり；

X_3 は任意のアミノ酸であり；

X_4 は任意のアミノ酸であり；

X_6 は任意のアミノ酸であり；

X_9 は任意のアミノ酸であり；

X_{11} は任意のアミノ酸であり；

X_{12} は任意のアミノ酸であり；

X_{13} は任意のアミノ酸であり；

X_{14} は任意のアミノ酸である)

50

を含んでなる、B L y S 親和性成熟ライブラリーに関する。

【0028】

好適な B L y S 親和性成熟ライブラリーは、可変アミノ酸位置（すなわち、配列番号 449 における 2、3、4、6、9、11、12、13 および 14 位）が無作為に多様化されるのではなく、不均化的に所定の単一アミノ酸となるように作製される。そのようなライブラリーは、次の DNA 鋳型：

G C T N N N N N N N N N G A T N N N C T T A C T N N N C T C N N N N
N N N N N N N N N （配列番号 185）

（式中、それぞれの可変塩基（N）は A、C、G または T であるが、それぞれの場合に 1 つの塩基は所与の塩基位置で約 11 倍多く存在しうる）

に適合する多様なポリヌクレオチドの発現により作製することができる。そのような 1 つの DNA 鋳型は、以下の実施例 6 で述べるが、DNA 配列のヌクレオチドが下記の割合となるように作製される。

【0029】

DNA 鋳型 (配列番号 185)		塩基の割合			
コドン	塩基位置	A	C	G	T
2	4	79%	7%	7%	7%
	5	79%	7%	7%	7%
	6	7%	7%	7%	79%
3	7	7%	7%	7%	79%
	8	7%	7%	79%	7%
	9	7%	7%	79%	7%
4	10	7%	7%	7%	79%
	11	79%	7%	7%	7%
	12	7%	7%	7%	79%
6	16	7%	7%	7%	79%
	17	7%	79%	7%	7%
	18	7%	7%	7%	79%
9	25	79%	7%	7%	7%
	26	79%	7%	7%	7%
	27	7%	7%	79%	7%
11	31	7%	7%	7%	79%
	32	7%	7%	79%	7%
	33	7%	7%	79%	7%
12	34	7%	79%	7%	7%
	35	7%	7%	7%	79%
	36	7%	7%	7%	79%
13	37	7%	79%	7%	7%
	38	7%	79%	7%	7%
	39	7%	7%	7%	79%
14	40	7%	7%	79%	7%
	41	79%	7%	7%	7%
	42	7%	7%	7%	79%

10

20

30

40

50

【0030】

また、本発明のB L y S結合性ポリペプチドは、アミノ末端（N-末端）キャッピング基または官能基（例えば、アセチル基）をもっているとしてもよく、こうした基は、例えば、望ましくない反応からアミノ末端アミノ基をブロックしたり、B L y S結合性ポリペプチドを別の分子、マトリックス、樹脂もしくは固相支持体に連結させるのに有用である。本発明のB L y S結合性ポリペプチドはまた、カルボキシ末端（C-末端）キャッピング基または官能基（例えば、アミド基）をもっているとしてもよく、こうした基は、例えば、望ましくない反応からC-末端カルボキシル基をブロックしたり、該結合性ポリペプチドを別の分子

、マトリックス、樹脂もしくは固相支持体にコンジュゲートさせるのに有用な官能基を提供する。好ましくは、N-および／またはC-末端のキャッピング基はポリペプチドリナー分子である。本発明のB L y S結合性ポリペプチドを固相支持体またはクロマトグラフィーマトリックス材料に固定するのに有用な、特に好適なC-末端リンカー分子は、次のアミノ酸配列 P r o - G l y - P r o - G l u - G l y - G l y - G l y - L y s （配列番号13）を含んでなる。もう一つの有用なC-末端リンカー、例えば、ペプチドをフルオレセイン化するためのリンカーは、G l y - G l y - L y sである（表15参照）。

【0031】

本発明はさらに、B L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと結合する能力を保持しながら、例えば分子の安定性を高めるまたは減ずるように、改変されているB L y S結合性ポリペプチドを包含する。本発明の改変されたB L y S結合性ポリペプチドの例は、2つのシステイン残基のうち一方が非天然アミノ酸で置換されているポリペプチドである。この非天然アミノ酸は、残りのシステイン側鎖と縮合して安定なチオエーテル橋を形成することができ、その結果、環状のB L y S結合性ポリペプチドが生成する。このような合成ペプチドの環状チオエーテル分子は、例えば、P C T国際公開W O 97/46251（参照により本明細書に組み入れるものとする）に記載されるような、当分野で公知の技法を用いてルーチンに製造することができる。

【0032】

別の実施形態において、本発明は、マトリックス、樹脂または固相支持体に結合された、連結された、あるいは、付着された本発明のB L y S結合性ポリペプチドを提供する。ポリペプチドをマトリックス、樹脂または固相支持体に結合、連結または付着させるための技法は当分野で周知である。これらの物質に適するマトリックス、樹脂または固相支持体は、B L y S結合性ポリペプチドが普通に結合、連結または付着するものであれば、当分野で知られたどのような組成のものであってもよく、例えば、クロマトグラフィー用の樹脂やマトリックス（例えば、S E P H A R O S E - 4 F F アガロースビーズ）、プラスチック製マイクロタイタープレートのウェルの壁面や底面（例えば、固相酵素免疫検定法（E L I S A）で用いるもの）、またはシリカを基材としたバイオチップなどがあり、これらに限らない。本発明の結合性ポリペプチドを固定するための固相支持体として有用な材料には、ポリアクリルアミド、アガロース、シリカ、ニトロセルロース、紙、プラスチック、ナイロン、金属、およびこれらの組合せが含まれるが、これらに限るものではない。本発明のB L y S結合性ポリペプチドは、当分野で公知の技法を用いて、非共有結合あるいは共有結合によってマトリックス、樹脂または固相支持体に固定させることができる。好ましくは、本発明のB L y S結合性ポリペプチドを、S E P H A R O S E - 4 F F アガロースのようなクロマトグラフィー材料に固定させる。より一層好適な実施形態では、本発明のB L y S結合性ポリペプチドを、リンカー分子によってクロマトグラフィー材料に連結させる。本発明に従う好適なリンカー分子は次のアミノ酸配列 P r o - G l y - P r o - G l u - G l y - G l y - G l y - L y s （配列番号13）を含むポリペプチドである。最も好ましくは、本発明のアフィニティークロマトグラフィー材料は、アミノ酸配列 P r o - G l y - P r o - G l u - G l y - G l y - G l y - L y s （配列番号13）を有するポリペプチドリナー分子によりクロマトグラフィー材料に連結された、配列番号163～172からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むB L y S結合性ポリペプチドを含んでなる。マトリックス、樹脂または他の固相支持体に結合、連結または付着させた本発明のB L y S結合性ポリペプチドは、B L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドを検出、単離および精製する方法で用いられ、特に、アフィニティークロマトグラフィーによってB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドを精製するのに有用である。

【0033】

特定の好ましい実施形態では、本発明のB L y S結合性ポリペプチドまたは該結合性ポリペプチドを展示するファージは、天然の可溶性三量体の形をしたB L y Sタンパク質と不

10

20

30

40

50

可逆的に結合する。

【0034】

特定の好ましい実施形態では、本発明の B L y S 結合性ポリペプチドまたは該結合性ポリペプチドを展示するファージは、天然の可溶性三量体の形をした B L y S タンパク質と可逆的に結合する。

【0035】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明の B L y S 結合性ポリペプチドをコードする単離された核酸（好ましくは、DNA）を含んでなる組成物を包含する。特定の実施形態では、本発明の核酸分子は、配列番号 1～12、20～172、および 186～444 に示されるような本発明の B L y S 結合性ポリペプチドをコードする。付加的な実施形態では、本発明の核酸分子は、配列番号 1～12、20～172、および 186～444 のアミノ酸配列を含むポリペプチドの変異体または断片をコードする。さらに付加的な実施形態では、本発明の核酸分子は B L y S 結合性ポリペプチドをコードし、該核酸の相補鎖は、表 1～8 および 14 ならびに実施例 2、5 および 6 に記載されるポリペプチド（配列番号 1～12、20～172、および 186～444）をコードするポリヌクレオチド配列と、ストリンジェントな条件下（例えば、6x 塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）中約 45℃でのフィルター結合 DNA へのハイブリダイゼーションと、その後の 0.2x SSC／0.1% SDS 中約 50～65℃での 1 回以上の洗浄）、高度にストリンジェントな条件下（例えば、6x SSC 中約 45℃でのフィルター結合核酸へのハイブリダイゼーションと、その後の 0.1x SSC／0.2% SDS 中約 68℃での 1 回以上の洗浄）、または、当業者に公知のその他のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする（例えば、Ausubel, F. M. ら編, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. および John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 6.3.1-6.3.6 および 2.10.3 を参照のこと）。

10

20

【0036】

本発明はまた、本発明の B L y S 結合性ポリペプチド（ならびにその断片および変異体）をコードする単離された核酸分子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む宿主細胞、ならびに該ベクターおよび宿主細胞を作製する方法に関する。本発明はさらに、該組換えベクターを使用して、B L y S 結合性ポリペプチドを組換え法により生産することを提供する。

30

【0037】

本発明の B L y S 結合性ポリペプチド、核酸、形質転換宿主細胞、ならびに、遺伝子操作したウイルスおよびファージ（例えば、組換えファージ）は、B L y S の検出、単離および精製を含むがこれらに限らない用途を有する。

【0038】

本発明の別の実施形態では、B L y S 結合性ポリペプチドをファージ表面に展示する組換えバクテリオファージも提供される。そのようなファージは当分野で公知の技法を用いてルーチンに作製することができ、例えば、スクリーニング試薬や B L y S を検出するための試薬として有用である。

40

【0039】

別の実施形態において、本発明の B L y S 結合性ポリペプチドは溶液中の B L y S または B L y S 様ポリペプチドを検出または単離するために使用される。この種の溶液としては、B L y S または B L y S 様ポリペプチドを水やバッファー溶液に懸濁または溶解したもの、ならびに、個体に由来する体液および／または細胞、生物学的液体、生体組織、体細胞、細胞系、組織培養物、または B L y S もしくは B L y S 様ポリペプチドを含みうる他の供給源（例えば、細胞培養基、細胞抽出物、組織ホモジネートなど）が含まれるが、これらに限定されない。生物学的液体としては、血清、血漿、リンパ液、血液、血液画分、尿、滑液、脊髄液、唾液および粘液が挙げられ、これらに限らない。

50

【0040】

別の実施形態において、本発明は、溶液中に含まれるB L y Sタンパク質および／またはB L y S様ポリペプチドを検出する方法を提供し、この方法は、該溶液を本発明のB L y S結合性ポリペプチドと接触させ、B L y S結合性ポリペプチドへのB L y SまたはB L y S様ポリペプチドの結合を検出することを含んでなる。B L y S結合性ポリペプチドは遊離であっても固定されていてもよい。好ましくは、B L y S結合性ポリペプチドは固相表面、クロマトグラフィー材料またはプラスチック製マイクロタイターアッセイプレートのウェルに固定されたポリペプチドである。

【0041】

本発明の別の実施形態は、B L y Sタンパク質および／またはB L y S様ポリペプチドを、それを含む溶液から単離する方法であり、この方法は、 10

(a) 該溶液をB L y S結合性ポリペプチドと、B L y S結合性ポリペプチドへのB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドの結合を可能にする条件下で接触させること、

(b) B L y S結合性ポリペプチド（およびそれに結合されたB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチド）を該溶液の残部から分離すること、
を含んでなる。

【0042】

本発明のさらなる実施形態は、B L y Sタンパク質および／またはB L y S様ポリペプチドを、それを含む溶液から単離する方法であり、この方法は、 20

(a) 該溶液をB L y S結合性ポリペプチドと、B L y S結合性ポリペプチドへのB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドの結合を可能にする条件下で接触させること、

(b) B L y S結合性ポリペプチドとB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドとから形成された複合体を、該溶液の他の成分から分離すること、

(c) B L y S結合性ポリペプチドをB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドから解離させること、

(d) 解離させたB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドを回収すること、
を含んでなる。

【0043】

別の実施形態において、本発明は、B L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドを検出または単離する方法で使用するための、本発明の結合性ポリペプチドを含んでなるキットを提供する。 30

【0044】

定義

本発明を明確に理解しやすくするために、以下の用語を定義する：

「組換え」という用語は、非天然に改変されたまたは操作された核酸、外因性核酸でトランスフェクトされた宿主細胞、あるいは、単離された核酸（通常はDNA）の操作または宿主細胞の形質転換もしくはトランスフェクションにより、非天然に発現されるポリペプチド分子を説明するために用いられる。「組換え」は、特に、遺伝子工学的手法を用いて *i n v i t r o*で構築されている核酸分子を包含する用語であり、そして分子、構築物、ベクター、細胞、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを説明するための形容詞としての用語「組換え」の使用は、特に、天然に存在するそのような分子、構築物、ベクター、細胞、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを除外するものである。 40

【0045】

「バクテリオファージ」という用語は、核酸コアと、いくつかの異なるタンパク質分子の集合により構成された防御シェルとを含む細菌ウイルスとして定義される。「バクテリオファージ」と「ファージ」は同義語であり、本明細書では相互交換可能に用いられる。

【0046】

本明細書では「親和性リガンド」という用語が時々用いられるが、この用語は本発明のB 50

BLyS 結合性ポリペプチドと同義である。

【0047】

本明細書で用いる「BLyS タンパク質」とは、膜結合型（例えば、配列番号 173）と可溶型（例えば、配列番号 174）の両者を含むものとする。BLyS タンパク質は単量体、二量体、三量体または多量体であってよい。好ましくは、BLyS タンパク質はホモ三量体である。

【0048】

本明細書で用いる「BLyS 様タンパク質」とは、天然 BLyS、組換え全長 BLyS、ならびに、その断片および変異体、例えば、改変されたもしくはトランケートされた天然 BLyS または組換え全長 BLyS を包含し、これらの BLyS および BLyS 様タンパク質は BLyS 機能活性を保持するものである。本発明の組成物によって特異的に結合され得る BLyS または BLyS 断片としては、限定するものではないが、ヒト BLyS（配列番号 173 および／または 174）またはヒト単球上に発現される BLyS；マウス BLyS（配列番号 175 および／または 176）またはマウス単球上に発現される BLyS；ラット BLyS（配列番号 177、178 および／または 180 に示される可溶型と、例えばラット単球の表面上の、膜結合型）；またはサル BLyS（例えば、配列番号 181 および／または 182 のサル BLyS ポリペプチド、可溶型のサル BLyS、またはサル単球上に発現される BLyS）、あるいは、それらの断片を挙げることができる。好ましくは、本発明の組成物はヒト BLyS（配列番号 173 および／または 174）またはその断片と結合するものである。BLyS および BLyS 様ポリペプチドは、以下の活性を含むがこれらに限らない天然または全長 BLyS の機能活性を少なくとも 1 つ保持する：BLyS 受容体（例えば、TACI（GenBank 登録番号 AAC51790）および BCMA（GenBank 登録番号 NP_001183））への結合、B 細胞増殖の刺激、B 細胞による免疫グロブリン分泌の刺激、BLyS 受容体シグナル伝達カスケードの刺激、および／または、抗 BLyS 抗体もしくは他の BLyS 結合性ポリペプチドとの結合。BLyS または BLyS 様ポリペプチドの機能活性を調べるために用いられるアッセイは、当業者が容易に決めることができる（例えば、Moore ら、1999、前掲に開示されたアッセイを参照のこと）。「BLyS 様ポリペプチド」には、BLyS の全部または一部が他のポリペプチドに融合または結合されている融合ポリペプチドも含まれる。融合ポリペプチドである BLyS 様ポリペプチドは、BLyS の少なくとも 1 つの機能活性、好ましくは、B リンパ球を刺激する能力（例えば、Moore ら、Science, 285:260-263 (1999) を参照のこと）、BLyS 受容体（例えば、TACI または BCMA）と結合する能力、および／または、抗 BLyS 抗体もしくは他の BLyS 結合性ポリペプチドによって結合される能力を保持する。BLyS 融合ポリペプチドは、BLyS の遺伝子もしくは他のポリヌクレオチドコード配列またはその断片を、他のタンパク質またはポリペプチドのコード配列と、リーディングフレームを合わせて連結させる（再結合させる）組換え DNA 法により作製することができる。その後、得られる組換え DNA 分子を各種のプラスミドまたはファージ発現ベクター（適切な真核または原核宿主細胞における融合タンパク質分子の発現を可能にするもの）のいずれかに挿入する。BLyS 融合ポリペプチドは合成法でも半合成法でも調製することができる。

【0049】

「BLyS 標的」または「BLyS 標的タンパク質」という用語が本明細書において用いられることがあるが、この用語は BLyS および／または BLyS 様ポリペプチドを包含する。したがって、本発明の BLyS 結合性ポリペプチドは「BLyS 標的タンパク質」と結合し、そのため「BLyS 標的タンパク質」との結合、その検出、除去および／または精製に使用することができる。

【0050】

本明細書中で用いる「結合性ポリペプチド」とは、別の分子、ポリペプチド、ペプチド擬似体または形質転換体と結合して複合体を形成することができるあらゆるポリペプチドを

指す。

【0051】

「B L y S 結合性ポリペプチド」はB L y S 標的タンパク質と結合しうる本発明の分子である。本発明のB L y S 結合性ポリペプチドの非限定的な例として、本明細書に記載のアミノ酸配列（配列番号1～12、20～172および186～444参照）を有するポリペプチドが挙げられる。「B L y S 結合性ポリペプチド」という用語はまた、本明細書に記載の特定のアミノ酸配列（配列番号1～12、20～172および186～444参照）を有するポリペプチドのB L y S 結合性断片および変異体（誘導体を含む）をも包含する。本明細書に記載するアミノ酸配列の「変異体」とは、B L y S と結合するが、本明細書で特定されるB L y S 結合性ポリペプチドと同一のまたは類似したアミノ酸配列を必ずしも含まないポリペプチドを意味する。本明細書で特定されるB L y S 結合性ポリペプチドの変異体である本発明のB L y S 結合性ポリペプチドは、下記の要件の少なくとも1つを満たすものである：（a） 本明細書に開示するB L y S 結合性ポリペプチド配列のアミノ酸配列（配列番号1～12、20～172および186～444）に対して少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも55%、少なくとも60%、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%、少なくとも95%、少なくとも99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、あるいは、からなるポリペプチド、（b） スクレオチド配列によりコードされるポリペプチドであって、該スクレオチド配列の相補配列が、ストリンジェントな条件下で、本明細書に開示するB L y S 結合性ポリペプチド配列をコードするスクレオチド配列（例えば、配列番号1～12、20～172および186～444のアミノ酸配列をコードする核酸配列）とハイブリダイズするもの、および／または、本明細書に開示するB L y S 結合性ポリペプチド配列の、少なくとも5個のアミノ酸残基、少なくとも10個のアミノ酸残基、少なくとも15個のアミノ酸残基、もしくは少なくとも20個のアミノ酸残基からなる断片。本発明のB L y S 結合性ポリペプチドはまた、様々な用途のために改変されているポリペプチドを包含するが、ただし、そのような改変がB L y S 標的と結合する能力を排除しないことを条件とする。考えられる改変の具体的な例としては、C-末端またはN-末端アミノ酸の置換、あるいは、B L y S 結合剤をクロマトグラフィー材料または他の固相支持体に結合させるためのペプチド鎖の伸長などがあり、これらに限らない。その他の考えられる置換として、通常はジスルフィド結合を形成している一対のシステイン残基の一方または両方を、反応性側鎖をもつ非天然のアミノ酸で置換することがあり、かかる置換は、これらのアミノ酸位置に以前のジスルフィド結合よりも安定した結合を形成することを目的としている。そのような改変型の結合性ポリペプチドもすべて、その改変型ポリペプチドがB L y S および／またはB L y S 様ポリペプチドと結合する能力を保持する限り、本発明のB L y S 結合性ポリペプチドと見なされ、溶液中に含まれるB L y S またはB L y S 様ポリペプチドを検出したり、該溶液から該ポリペプチドを単離・精製するなど、本明細書に記載の種々の方法において使用することができる。本発明のB L y S 結合性ポリペプチドには、本明細書に開示する特定のB L y S 結合性ポリペプチド配列（例えば、配列番号1～12、20～172および186～444）の変異体も含まれ、かかる変異体は、これらのポリペプチド配列の一つに対応するアミノ酸配列を有するが、そのポリペプチド配列がB L y S と結合する分子を提供する置換、付加または欠失により改変されている。したがって、B L y S 結合性ポリペプチドには、一次アミノ酸配列として、特定のB L y S 結合性ポリペプチド配列の全部または一部を含むポリペプチドが含まれ、例えば、該配列内の残基が機能的に等しいアミノ酸残基で置換されていて、結果的に機能的に活性のあるペプチドをもたらす改変配列などである。例えば、該配列内の1個以上のアミノ酸残基を同様の極性をもつ別のアミノ酸残基（機能的同等物として作用して、結果的にサイレント変化をもたらす）で置換することができる。該配列内のアミノ酸の保存的置換は、そのアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択しうる。例えば、無極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン

10

20

30

40

50

、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンがある。極性中性アミノ酸としては、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンがある。正に荷電した（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、リシン、およびヒスチジンがある。負に荷電した（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸とグルタミン酸がある。そのようなB L y S結合性ポリペプチドは、化学的ペプチド合成により、あるいは、B L y S結合性ポリペプチドをコードするが突然変異を起こしている核酸からの組換え生産により調製することができる。当分野で公知の突然変異誘発法はどれも使用することができ、例えば、化学的突然変異誘発法、in v i t r o部位特異的突然変異誘発法（H u t c h i n s o nら、J. B i o l. C h e m., 253: 6551 (1978)）、T A B. R T M. リンカー（P h a r m a c i a）の使用などがあるが、これらに限らない。 10

【0052】

本明細書で採用され、理解されるように、2つのアミノ酸配列もしくは2つの核酸配列の相同性パーセントまたは同一性パーセントは、K a r l i nおよびA l t s c h u l（P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A, 87: 2264-2268 (1990)）のアルゴリズムをK a r l i nおよびA l t s c h u l（P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A, 90: 5873-5877 (1993)）に記載のように改変したものを用いて決定される。そのようなアルゴリズムはA l t s c h u lら（J. M o l. B i o l., 215: 403-410 (1990)）のN B L A S TおよびX B L A S Tプログラムに組み込まれる。B L A S Tヌクレオチド検索をN B L A S Tプログラムにより実行すると、本明細書に開示する核酸分子に相同なヌクレオチド配列が得られる。B L A S Tタンパク質検索をX B L A S Tプログラムにより実行すると、基準ポリペプチドに相同なアミノ酸配列が得られる。比較のためにギャップを入れたアラインメントを得るためには、A l t s c h u lら（N u c l e i c A c i d s R e s., 25: 3389-3402 (1997)）に記載されるとおりにG a p p e d B L A S Tを利用する。B L A S TおよびG a p p e d B L A S Tプログラムを使用する場合は、それぞれのプログラム（例えば、X B L A S TおよびN B L A S T）のデフォルトパラメーターを用いる。を参照のこと。あるいはまた、2つのアミノ酸配列もしくは2つの核酸配列の同一性パーセントは、いったん配列同士を最適な比較のためにアラインメントしてから（例えば、第2のアミノ酸または核酸配列との最適なアラインメントのために第1のアミノ酸または核酸配列の配列中にギャップを導入してから）決定することができる。その後、対応するアミノ酸位置もしくはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列中の1つの位置が第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められている場合、それらの分子はその位置において同一である。2つの配列間の同一性パーセントはそれらの配列によって共有される同一位置の数の関数である（すなわち、同一性% = 重複する同一位置の数 / 位置の総数 × 100%）。ある実施形態においては、2つの配列が同じ長さである。 20 30

【0053】

本明細書で用いる「ポリペプチド」とは、2個以上のアミノ酸残基がペプチド結合によって連結されている直鎖、分岐鎖、または環状（例えば、ループ構造を含む）のポリマーを指す。「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸残基のどのような特定の上限にも限定されない。かくして、本明細書に開示するアミノ酸配列を含んでなる本発明のB L y S親和性リガンドは、適切には「B L y S結合性ポリペプチド」と呼ばれる。なぜなら、かかる結合性ポリペプチドは、たとえそのような分子がペプチド結合に関与してもしなくてもよいアミノ酸以外の付加的な成分または基（例えば、N-末端および／またはC-末端のキャッピング基または官能基）を1個以上含むものであると、ペプチド結合により一緒に保持されるアミノ酸残基を2個以上含むからである。本発明のポリペプチドは1価、2価、3価または多価であってよく、配列番号1～12、20～172、および186～444のアミノ酸配列を有するB L y S結合性ポリペプチドおよび／またはその断片もしくは変異体を1本以上含んでいてもよい。本明細書で用いる「ペプチド」という用語は「ポリ 40 50

ペプチド」と同じ意味を有する。

【0054】

「供給流」：本発明のB L y S結合性ポリペプチドが結合するB L y SおよびB L y S様ポリペプチドは当分野で公知の方法により調製することができ、かかる方法として、限定するものではないが、化学合成；形質転換宿主細胞による生産；天然に存在する細胞または組換えにより形質転換された細菌、酵母、真菌、昆虫細胞、植物細胞および哺乳動物細胞による培地への分泌；遺伝子操作生物（例えば、トランスジェニック哺乳動物）による生産；および非遺伝子操作生物による生産がある。B L y SまたはB L y S様ポリペプチドを生産された状態のままで含むか、またはそれが生産溶液中に存在することがわかっている溶液、サンプルまたは混合物を「供給流」と呼ぶことがある。

10

【0055】

「結合する」という用語は、結合性ポリペプチドが所与の標的を認識してそれと結合するという、標準的手法による測定を意味する。そのような標準的手法として、限定するものではないが、アフィニティークロマトグラフィー、平衡透析、ゲル濾過、固相酵素免疫検定法（E L I S A）、F A C S分析、および、直接結合測定または他の結合物質との競合アッセイのいずれかによる、結合から生じる分光学的変化（例えば、蛍光異方性を用いる）のモニタリングなどがある。

【0056】

「特異性」とは、他の標的に比して、ある標的に対してより高い結合親和性を有する本発明の結合性ポリペプチドを指す。かくして、「B L y S標的タンパク質特異性」という用語は、B L y S標的タンパク質ではない別の分子と比べて、B L y S標的タンパク質に対してより高い親和性を有する分子を指す。

20

【0057】

その他の用語は以下の本文中で必要に応じて定義される。

【0058】

詳細な説明

本発明はB L y Sのための新規な結合性分子を提供する。そのような結合性分子は、組織中、または溶液もしくは系中に含まれるB L y SまたはB L y S様ポリペプチドの効率的な検出および単離を可能にする。本明細書に開示するB L y S結合性ポリペプチドは、B L y S標的を固定化するためにも使用され、また、B L y S標的タンパク質を含む溶液または系からそれを分離する手段を提供する。本発明の好適な結合性分子は高い親和性（すなわち、低濃度で作用）でもってB L y Sと結合する。

30

【0059】

B L y S結合性ポリペプチド

本発明は、Bリンパ球刺激因子タンパク質（B L y S）および／またはB L y S様ポリペプチドと特異的に結合する新規なポリペプチドならびにポリペプチドのファミリーを提供する。特に、本発明は、ヒトB L y S（配列番号173および／または174）またはヒト単球上に発現されるB L y S；マウスB L y S（配列番号175および／または176）またはマウス単球上に発現されるB L y S；ラットB L y S（配列番号177、178、179および／または180に示される可溶型、あるいは、例えばラット単球の表面にある、膜結合型のいずれか）；またはサルB L y S（例えば、配列番号181および／または182のサルB L y Sポリペプチド、可溶型のサルB L y S、またはサル単球上に発現されるB L y S）、好ましくはヒトB L y S、のポリペプチドもしくはポリペプチド断片と特異的に結合するポリペプチドを包含する。

40

【0060】

特定の好ましい実施形態において、本発明のB L y S結合性ポリペプチドは高い親和性でもってB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと結合する。他の実施形態では、本発明のB L y S結合性ポリペプチドはB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと可逆的に結合する。さらに別の実施形態では、本発明のB L y S結合性ポリペプチドはB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと不可逆的に結合する。

50

【0061】

ポリペプチドに含まれるシステイン残基はジスルフィド結合を形成すると考えられ、このジスルフィド結合のため、これらのシステイン残基を含むポリペプチドは非還元条件下で安定したループ構造を形成するだろう。本発明の特に好適なB L y S結合性ポリペプチドは、B L y SまたはB L y S様ポリペプチドと結合する安定したループ構造やその他の構造を形成するアミノ酸配列を含むポリペプチド分子である。

【0062】

特定の実施形態において、本発明は、配列番号1～12、20～172、および186～444（好ましくは、上記した、また、表1～8、14、15ならびに下記の実施例2、5、6に記載する配列番号163～172または436～444）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、あるいは、からなるB L y S結合性ポリペプチドに関する。ここに記載する単離されたB L y S結合性ポリペプチドの配列の解析は、テトラペプチドA s p - X a a - L e u - T h r（配列番号446）を含むポリペプチドについての強い選択を示し、それゆえに、最も広範な形態において、本発明は、ポリペプチドA s p - X a a - L e u - T h r（配列番号446）（式中、X a aはP r o, S e r, T h r, P h e, L e u, T y r, C y sまたはA l aであり、好ましくは、P r oまたはS e rである）を含んでなる、B L y Sと結合可能なポリペプチドに関する。

【0063】

表1～8に示した特定のB L y S結合性ポリペプチドに基づいて、7つのコンセンサス配列（配列番号1～7）が決定された。特定の実施形態では、本発明のB L y S結合性ポリペプチドはこれらの配列を1つ以上含んでなる。そのような好適なB L y S結合性ポリペプチドには、不変のC y s残基間で環状構造またはループ構造を形成する可能性があり、下記のA～E（配列番号1～5）から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、あるいは、からなるポリペプチドが含まれる：

(A) $X_1 - X_2 - X_3 - C y s - X_5 - P h e - X_7 - T r p - G l u - C y s - X_{11} - X_{12} - X_{13}$ （配列番号1）

（式中、

X_1 はA l a, A s n, L y sまたはS e rであり；

X_2 はA l a, G l u, M e t, S e rまたはV a lであり；

X_3 はA l a, A s n, L y sまたはP r o（好ましくは、L y s）であり；

X_5 はP h e, T r pまたはT y r（好ましくは、T y r）であり；

X_7 はP r oまたはT y r（好ましくは、P r o）であり；

X_{11} はA l a, G l n, H i s, P h eまたはV a lであり；

X_{12} はA s n, G l n, G l y, H i s, S e rまたはV a lであり；

X_{13} はA l a, A s n, G l y, I l e, P r oまたはS e rである）；

ただし、該ポリペプチドはB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと結合する；

【0064】

(B) $X_1 - X_2 - X_3 - C y s - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - C y s - X_{12} - X_{13} - X_{14}$ （配列番号2）

（式中、

X_1 はA l a, A s p, G l n, G l u, G l y, H i s, I l e, L e u, L y s, M e t, P h e, P r o, S e r, T h r, T r p, T y r, V a lであるか、または存在せず；

X_2 はA l a, A s n, A s p, G l n, G l y, H i s, I l e, L e u, L y s, M e t, P h e, P r o, S e r, T h r, T r p, T y rまたはV a lであり；

X_3 はA l a, A r g, A s n, A s p, G l n, G l u, G l y, H i s, I l e, L e u, L y s, M e t, P h e, P r o, S e r, T r p, T y rまたはV a l（好ましくは、A s p）であり；

X_5 はA s p, I l e, L e uまたはT y r（好ましくは、A s pまたはL e u）であ

10

20

30

40

50

り；

X₆ は Arg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Tyr または Val (好ましくは、Glu または Leu) であり；

X₇ は His, Leu, Lys または Phe (好ましくは、His または Leu) であり；

X₈ は Leu, Pro または Thr (好ましくは、Thr または Pro) であり；

X₉ は Arg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, Met または Trp (好ましくは、Lys) であり；

X₁₀ は Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, Tyr または Val であり；

X₁₂ は Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Phe, Ser, Trp, Tyr または Val であり；

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

X₁₄ は Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val であるか、または存在しない)；

ただし、該ポリペプチドは B L y S および／または B L y S 様ポリペプチドと結合する；

【0065】

(C) X₁ - X₂ - X₃ - C y s - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁ - C y s - X₁₃ - X₁₄ - X₁₅ (配列番号3)

(式中、

X₁ は Ala, Arg, Asn, Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser または Thr であり；

X₂ は Asn, Asp, Gln, His, Ile, Lys, Pro, Thr または Trp であり；

X₃ は Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Phe, Pro または Thr (好ましくは、Ala) であり；

X₅ は Asn, Asp, Pro, Ser または Thr (好ましくは、Asp) であり；

X₆ は Arg, Asp, Ile, Leu, Met, Pro または Val (好ましくは、Ile) であり；

X₇ は Ala, Ile, Leu, Pro, Thr または Val (好ましくは、Val または Leu) であり；

X₈ は Asn, His, Ile, Leu, Lys, Phe または Thr (好ましくは、Thr) であり；

X₉ は Asn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Pro または Thr (好ましくは、Leu) であり；

X₁₀ は Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, Ser または Trp であり；

X₁₁ は Arg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, Trp または Tyr (好ましくは、Ser) であり；

X₁₃ は Gln, Glu, Ile, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr または Val (好ましくは、Val) であり；

X₁₄ は Asn, Gly, Ile, Phe, Pro, Thr, Trp または Tyr であり；

X₁₅ は Asn, Asp, Glu, Leu, Lys, Met, Pro または Thr (好ましくは、Glu または Pro) である)；

ただし、該ポリペプチドは B L y S および／または B L y S 様ポリペプチドと結合する；

【0066】

(D) $X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - \text{Cys} - X_{14} - X_{15} - X_{16}$ (配列番号4)

(式中、

X_1 は Asn, Asp, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr であるか、または存在せず (好ましくは、Ser) ;

X_2 は Arg, Asn, Asp, His, Phe, Ser または Trp (好ましくは、Arg) であり ;

X_3 は Asn, Asp, Leu, Pro, Ser または Val (好ましくは、Asn または Asp) であり ;

X_5 は Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe または Thr であり ;

X_6 は His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp または Tyr であり ;

X_7 は Asp, His, Leu または Ser (好ましくは、Asp) であり ;

X_8 は Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro または Thr (好ましくは、Glu または Pro) であり ;

X_9 は Ala, Arg, Asn または Leu (好ましくは、Leu) であり ;

X_{10} は Ile, Leu, Met, Pro, Ser または Thr (好ましくは、Thr) であり ;

X_{11} は Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser または Tyr であり ;

X_{12} は Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr または Val であり ;

X_{14} は Asp, Gly, Leu, Phe, Tyr または Val (好ましくは、Leu) であり ;

X_{15} は Asn, His, Leu, Pro または Tyr (好ましくは、His、Leu または Pro) であり ;

X_{16} は Asn, Asp, His, Phe, Ser または Tyr (好ましくは、Asp または Ser) である) ;

ただし、該ポリペプチドは BLyS および / または BLyS 様ポリペプチドと結合する ;

【0067】

(E) $X_1 - X_2 - X_3 - \text{Cys} - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - \text{Cys} - X_{16} - X_{17} - X_{18}$ (配列番号5)

(式中、

X_1 は Arg, Asp, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr であるか、または存在せず (好ましくは、Arg) ;

X_2 は Ala, Arg, Asn, Asp, Gly, Pro, Ser であるか、または存在せず (好ましくは、Asn、Asp、Gly または Pro) ;

X_3 は Arg, Asn, Gln, Glu, Gly, Lys, Met, Pro, Trp または Val (好ましくは、Gly または Met) であり ;

X_5 は Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr または Val (好ましくは、Trp、Tyr または Val) であり ;

X_6 は Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、Asp) であり ;

X_7 は Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser または Tyr (好ましくは、Asp) であり ;

X_8 は Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser または Tyr (好ましくは、Leu) であり ;

X_9 は Asp, Leu, Pro, Thr または Val (好ましくは、Leu または T

10

20

30

40

50

h r) であり；

X₁₀ は Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、Lys または Thr) であり；

X₁₁ は Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Met または Thr (好ましくは、Arg または Leu) であり；

X₁₂ は Ala, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、Thr または Trp) であり；

X₁₃ は Ala, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、Met または Phe) であり；

X₁₄ は Arg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr または Val (好ましくは、Val) であり； 10

X₁₆ は Arg, Asp, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, Ser または Trp (好ましくは、Met) であり；

X₁₇ は Arg, Asn, Asp, Gly, His, Phe, Pro, Ser, Trp または Tyr (好ましくは、Arg、His または Tyr) であり；

X₁₈ は Ala, Arg, Asn, Asp, His, Leu, Phe または Trp (好ましくは、His または Asn) である)；

ただし、該ポリペプチドは B L y S および／または B L y S 様ポリペプチドと結合する。

【0068】

さらなる好適な実施形態には、下記の F および G (配列番号 6 および 7) から選択される アミノ酸配列を含んでなる、あるいは、からなる線状ポリペプチドが含まれる： 20

(F) X₁ - X₂ - X₃ - X₄ - X₅ - X₆ - X₇ - X₈ - X₉ - X₁₀ - X₁₁ - X₁₂ (配列番号 6)

(式中、

X₁ は Ala, Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Tyr または Val (好ましくは、Gly、Tyr または Val) であり；

X₂ は Ala, Arg, Gln, His, Ile, Leu, Phe, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、His または Tyr) であり；

X₃ は Ala, Asp, Lys, Phe, Thr, Trp または Tyr (好ましくは、Asp または Tyr) であり； 30

X₄ は Arg, Asp, Gln, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr または Val (好ましくは、Asp または Gln) であり；

X₅ は Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser または Val (好ましくは、Leu または Ser) であり；

X₆ は His, Ile, Leu, Pro, Ser または Thr (好ましくは、Leu または Thr) であり；

X₇ は Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met または Thr (好ましくは、Lys または Thr) であり；

X₈ は Ala, Arg, Asn, Ile, Leu, Lys, Met または Thr (好ましくは、Leu または Lys) であり； 40

X₉ は Ala, Asn, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr または Val (好ましくは、Met または Ser) であり；

X₁₀ は Ile, Leu, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr または Val (好ましくは、Thr または Leu) であり；

X₁₁ は Ala, Arg, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr または Val (好ましくは、Pro または Thr) であり；

X₁₂ は Arg, Asp, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr または Val (好ましくは、Arg または Pro) である)； 50

ただし、該ポリペプチドはB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと結合する；
【0069】

(G) $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13}$ (配列番号7)

(式中、

X_1 はA s p, G l n, G l u, G l y, H i s, L y s, M e tまたはT r p (好ましくは、G l uまたはL y s) であり；

X_2 はA r g, G l n, H i s, I l e, L e uまたはP r o (好ましくは、H i sまたはP r o) であり；

X_3 はA s p, G l y, I l e, L y s, T h r, T y rまたはV a l (好ましくは、T y r) であり； 10

X_4 はA s n, A s p, G l n, G l u, M e t, P r o, S e rまたはT y r (好ましくは、A s pまたはG l n) であり；

X_5 はA s n, A s p, H i s, I l e, L e u, M e t, P r o, T h rまたはV a l (好ましくは、A s nまたはT h r) であり；

X_6 はA s p, G l u, H i s, L e u, L y s, P r oまたはV a l (好ましくは、A s pまたはP r o) であり；

X_7 はA r g, A s n, G l n, H i s, I l e, L e u, M e t, P r oまたはT h r (好ましくは、I l eまたはP r o) であり；

X_8 はG l n, G l y, H i s, L e u, M e t, S e rまたはT h r (好ましくは、L e uまたはT h r) であり； 20

X_9 はA s n, G l n, G l y, H i s, L e u, L y s, S e rまたはT h r (好ましくは、L y s) であり；

X_{10} はA l a, G l y, I l e, L e u, L y s, M e tまたはP h e (好ましくは、G l yまたはM e t) であり；

X_{11} はA l a, G l u, H i s, I l e, L e u, M e t, S e r, T h r, T r p, T y rまたはV a l (好ましくは、A l aまたはT h r) であり；

X_{12} はA r g, G l n, G l u, G l y, H i s, I l e, L y s, T y rまたはV a l (好ましくは、A r gまたはH i s) であり；

X_{13} はA r g, A s n, G l u, H i s, I l e, S e r, T h r, T r pまたはV a l (好ましくは、H i s) である) ； 30

ただし、該ポリペプチドはB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと結合する。

【0070】

前記ポリペプチドはN-末端とC-末端のいずれか一方または両方に追加のアミノ酸が結合されているてもよい。

【0071】

ループ構造を形成する可能性があるポリペプチドを含むライブラリー (すなわち、T N 6、T N 7、T N 8、T N 9、T N 10およびT N 12と称するライブラリー) の分離物からの配列情報および結合データを検討すると、ループ構造を形成しうる一連のB L y S結合性ポリペプチドが同定される。特定の実施形態において、本発明のB L y S結合性ポリペプチドは下記のH~L (配列番号8~12) から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、あるいは、からなる； 40

(H) C y s - X_2 - P h e - X_4 - T r p - G l u - C y s (配列番号8)

(式中、

X_2 はP h e, T r pまたはT y r (好ましくは、T y r) であり；

X_4 はP r oまたはT y r (好ましくは、P r o) である) ；

【0072】

(I) C y s - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - C y s (配列番号9)

(式中、

X_2 はA s p, I l e, L e uまたはT y r (好ましくは、A s pまたはL e u) であ 50

り；

X_3 は Arg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Tyr または Val (好ましくは、Glu または Leu) であり；

X_4 は His, Leu, Lys または Phe (好ましくは、His または Leu) であり；

X_5 は Leu, Pro または Thr (好ましくは、Thr または Pro) であり；

X_6 は Arg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, Met または Trp (好ましくは、Lys) であり；

X_7 は Ala, Asn, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, Tyr または Val (である)；

10

【0073】

(J) Cys- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 -Cys (配列番号 10)

(式中、

X_2 は Asn, Asp, Pro, Ser または Thr (好ましくは、Asp) であり；

X_3 は Arg, Asp, Ile, Leu, Met, Pro または Val (好ましくは、Ile) であり；

X_4 は Ala, Ile, Leu, Pro, Thr または Val (好ましくは、Val または Leu) であり；

X_5 は Asn, His, Ile, Leu, Lys, Phe または Thr (好ましくは、Thr) であり；

20

X_6 は Asn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Pro または Thr (好ましくは、Leu) であり；

X_7 は Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, Ser または Trp であり；

X_8 は Arg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, Trp または Tyr (好ましくは、Ser) である)；

【0074】

(K) Cys- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 -Cys (配列番号 11)

30

(式中、

X_2 は Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe または Thr であり；

X_3 は His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp または Tyr であり；

X_4 は Asp, His, Leu または Ser (好ましくは、Asp) であり；

X_5 は Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro または Thr (好ましくは、Glu または Pro) であり；

X_6 は Ala, Arg, Asn または Leu (好ましくは、Leu) であり；

X_7 は Ile, Leu, Met, Pro, Ser または Thr (好ましくは、Thr) であり；

40

X_8 は Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser または Tyr であり；

X_9 は Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr または Val (である)；

【0075】

(L) Cys- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} -Cys (配列番号 12)

(式中、

X_2 は Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, T

50

r p, TyrまたはVal (好ましくは、Trp、TyrまたはVal) であり；
 X₃ はArg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, TrpまたはTyr (好ましくは、Asp) であり；
 X₄ はAla, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, SerまたはTyr (好ましくは、Asp) であり；
 X₅ はAsp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, SerまたはTyr (好ましくは、Leu) であり；
 X₆ はAsp, Leu, Pro, ThrまたはVal (好ましくは、LeuまたはThr) であり；
 X₇ はArg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, TrpまたはTyr (好ましくは、LysまたはThr) であり；
 X₈ はAla, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, MetまたはThr (好ましくは、ArgまたはLeu) であり；
 X₉ はAla, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, TrpまたはTyr (好ましくは、ThrまたはTrp) であり；
 X₁₀ はAla, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, TrpまたはTyr (好ましくは、MetまたはPhe) であり；
 X₁₁ はArg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, TyrまたはVal (好ましくは、Val) である)；
 ただし、前記ポリペプチドはB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと結合する。

【0076】

本発明のさらに好適な実施形態において、B L y S結合性ポリペプチドは下記のアミノ酸配列M (配列番号447) を含んでなる：

(M) Ala-X₂-X₃-X₄-Asp-X₆-Leu-Thr-X₉-Leu-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (配列番号447) (式中、
 X₂ はAsn, Ser, Tyr, Asp, Phe, Ile, Gln, His, Pro, Lys, Leu, Met, Thr, Val, Glu, Ala, Gly, CysまたはTrp (すなわち、Arg以外の任意のアミノ酸；好ましくは、Asn) であり；
 X₃ はTrp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, GlyまたはSer (好ましくは、Trp) であり；
 X₄ はTyr, Phe, Glu, CysまたはAsn (好ましくは、Tyr) であり；
 X₆ はPro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, CysまたはAla (好ましくは、ProまたはSer) であり；
 X₉ はLys, Asn, Gln, GlyまたはArg (好ましくは、Lys) であり；
 X₁₁ はTrp, Ser, Thr, Arg, Cys, TyrまたはLys (好ましくは、Trp) であり；
 X₁₂ はLeu, Phe, Val, IleまたはHis (好ましくは、Leu) であり；
 X₁₃ はPro, Leu, His, Ser, Arg, Asn, Gln, Thr, Val, Ala, Cys, Ile, PheまたはTyr (すなわち、Asp, Glu, Gly, Lys, MetまたはTrpではない；好ましくは、Pro) であり；
 X₁₄ はAsp, Glu, Asn, Val, His, Gln, Arg, Gly, Ser, Tyr, Ala, Cys, Lys, Ile, ThrまたはLeu (すなわち、Phe, Met, ProまたはTrpではない；好ましくは、Asp, ValまたはGlu) である)。

【0077】

好適な実施形態は下記の式Nのコア配列を含んでなるポリペプチドである：

(N) $X_1 - X_2 - Asp - X_4 - Leu - Thr - X_7 - Leu - X_9 - X_{10}$ (配列番号448)

(式中、

X_1 は Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly または Ser (好ましくは、Trp) であり；

X_2 は Tyr, Phe, Glu, Cys または Asn (好ましくは、Tyr) であり；

X_4 は Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys または Ala (好ましくは、Pro または Ser) であり；

X_7 は Lys, Asn, Gln, Gly または Arg (好ましくは、Lys) であり；

X_9 は Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr または Lys (好ましくは、Trp) であり；

X_{10} は Leu, Phe, Val, Ile または His (好ましくは、Leu) である)。

【0078】

本発明に従う特に好適な B L y S 結合性ポリペプチドは、次のコアペプチド：

Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu (配列番号436)

を含んでなる。

【0079】

上記の B L y S 結合性ポリペプチドは、N-およびC-末端のいずれか一方または両方に追加のアミノ酸が結合されていてもよい。

【0080】

また、本発明の B L y S 結合性ポリペプチドは、アミノ末端(N-末端)キャッピング基または官能基(例えば、アセチル基)をもっているように、こうした基は、例えば、望ましくない反応からアミノ末端アミノ基をブロックしたり、B L y S 結合性ポリペプチドを別の分子、マトリックス、樹脂もしくは固相支持体に連結させたりするのに有用である。

本発明の B L y S 結合性ポリペプチドはまた、カルボキシ末端(C-末端)キャッピング基または官能基(例えば、アミド基)をもっているように、こうした基は、例えば、望ましくない反応からC-末端カルボキシル基をブロックしたり、該結合性ポリペプチドを別の分子、マトリックス、樹脂もしくは固相支持体にコンジュゲートさせたりするのに有用な官能基を提供する。好ましくは、N-および/またはC-末端のキャッピング基はポリペプチドリinker分子である。本発明の B L y S 結合性ポリペプチドを固相支持体またはクロマトグラフマトリックス材料に固定するのに有用な、特に好適なC-末端リinker分子は、次のアミノ酸配列 Pro-Gly-Pro-Glu-Gly-Gly-Gly-Lys (配列番号13) を含んでなる。もう一つの有用なC-末端リinker、例えば、ペプチドをフルオレセイン化するためのリinkerは、Gly-Gly-Lysである(表15参照)。

【0081】

本発明はさらに、B L y S および/または B L y S 様ポリペプチドと結合する能力を保持しながら、例えば分子の安定性を高めるまたは減ずるように、改変されている B L y S 結合性ポリペプチドを包含する。本発明の改変された B L y S 結合性ポリペプチドの例は、2つのシステイン残基のうち一方が非天然アミノ酸で置換されているポリペプチドである。この非天然アミノ酸は、残りのシステイン側鎖と縮合して安定なチオエーテル橋を形成することができ、その結果、環状の B L y S 結合性ポリペプチドが生成する。このような合成ペプチドの環状チオエーテル分子は、例えば、PCT国際公開WO 97/46251 (参照により本明細書に組み入れるものとする)に記載されるような、当分野で公知の技法を用いてルーチンに製造することができる。

10

20

30

40

50

【0082】

別の実施形態において、本発明は、マトリックス、樹脂または固相支持体に結合された、連結された、あるいは、付着された本発明のB L y S結合性ポリペプチドを提供する。ポリペプチドをマトリックス、樹脂または固相支持体に結合、連結または付着させるための技法は当分野で周知である。これらの物質に適するマトリックス、樹脂または固相支持体は、B L y S結合性ポリペプチドが普通に結合、連結または付着するものであれば、当分野で知られたどのような組成のものであってもよく、例えば、クロマトグラフィー用の樹脂やマトリックス（例えば、S E P H A R O S E - 4 F F アガロースビーズ）、プラスチック製マイクロタイタープレートのウェルの壁面や底面（例えば、固相酵素免疫検定法（E L I S A）で用いるもの）、またはシリカを基材としたバイオチップなどがあり、これらに限らない。本発明の結合性ポリペプチドを固定するための固相支持体として有用な材料には、ポリアクリルアミド、アガロース、シリカ、ニトロセルロース、紙、プラスチック、ナイロン、金属、およびこれらの組合せが含まれるが、これらに限るものではない。本発明のB L y S結合性ポリペプチドは、当分野で公知の技法を用いて、非共有結合あるいは共有結合によってマトリックス、樹脂または固相支持体に固定させることができる。好ましくは、本発明のB L y S結合性ポリペプチドを、S E P H A R O S E - 4 F F アガロースのようなクロマトグラフィー材料に固定させる。より一層好適な実施形態では、本発明のB L y S結合性ポリペプチドを、リンカー分子によってクロマトグラフィー材料に連結させる。本発明に従う好適なリンカー分子は次のアミノ酸配列 P r o - G l y - P r o - G l u - G l y - G l y - G l y - L y s （配列番号13）を含むポリペプチドである。最も好ましくは、本発明のアフィニティークロマトグラフィー材料は、アミノ酸配列 P r o - G l y - P r o - G l u - G l y - G l y - G l y - L y s （配列番号13）を有するポリペプチドリナー分子によりクロマトグラフィー材料に連結された、配列番号163～172からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むB L y S結合性ポリペプチドを含んでなる。マトリックス、樹脂または他の固相支持体に結合、連結または付着させた本発明のB L y S結合性ポリペプチドは、B L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドを検出、単離および精製する方法で用いられ、特に、アフィニティークロマトグラフィーによってB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドを精製するのに有用である。

【0083】

特定の好ましい実施形態では、本発明のB L y S結合性ポリペプチドまたは該結合性ポリペプチドを展示するファージは、天然の可溶性三量体の形をしたB L y Sタンパク質と不可逆的に結合する。

【0084】

特定の好ましい実施形態では、本発明のB L y S結合性ポリペプチドまたは該結合性ポリペプチドを展示するファージは、天然の可溶性三量体の形をしたB L y Sタンパク質と可逆的に結合する。

【0085】

本発明のB L y S結合性ポリペプチドは高い親和性でもってB L y S標的タンパク質と結合する。特定の実施形態では、本発明のB L y S結合性ポリペプチドは、 5×10^{-2} M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-4} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、または 10^{-5} M以下の解離定数つまり K_D でB L y S標的タンパク質と結合する。より好ましくは、本発明のB L y S結合性ポリペプチドは、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、または 10^{-15} Mより小さいかまたはそれに等しい解離定数つまり K_D でB L y S標的タンパク質と結合する。

【0086】

特定の好ましい実施形態においては、本発明のB L y S結合性ポリペプチドはB L y Sおよび／またはB L y S様ポリペプチドと可逆的に結合して、特定の放出条件下で、結合し

た B L y S タンパク質を活性形態（好ましくは、天然の可溶性三量体の形態）で放出する。特定の実施形態では、本発明の B L y S 結合性ポリペプチドは、 10^{-10} s^{-1} 、 $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 、 10^{-9} s^{-1} 、 $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 、 10^{-8} s^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 、 10^{-7} s^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、 10^{-6} s^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 10^{-5} s^{-1} 、 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 10^{-4} s^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 10^{-3} s^{-1} 、 $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、 10^{-2} s^{-1} 、 $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、または 10^{-1} s^{-1} より大きいかまたはそれに等しいオフ速度（off-rate）つまり k_{off} で B L y S 標的タンパク質と結合する。

【0087】

K_D およびオフ速度を決定するための結合実験はいくつかの条件下で行うことができ、例えば、限定するものではないが、[pH 6.0, 0.01% Tween 20]、[pH 6.0, 0.1% ゼラチン]、[pH 5.0, 0.01% Tween 20]、[pH 9.0, 0.1% Tween 20]、[pH 6.0, 15% エチレングリコール, 0.01% Tween 20]、[pH 5.0, 15% エチレングリコール, 0.01% Tween 20]、および [pH 9.0, 15% エチレングリコール, 0.01% Tween 20] などである。これらの溶液を調製するためのバッファーは当業者によって容易に決定することができ、最終溶液の所望 pH に大きく依存する。低 pH 溶液（ $\text{pH} < 5.5$ ）は、例えば、クエン酸バッファー、グリシン-HCl バッファー、またはコハク酸バッファー中に調製する。高 pH 溶液は、例えば、トリス-HCl、リン酸バッファー、または重炭酸ナトリウムバッファー中に調製する。例えば、最適な pH および／または塩濃度を測定することを目的として K_D およびオフ速度を決定するために、いくつかの条件を用いてもよい。

【0088】

特定の実施形態において、本発明の B L y S 結合性ポリペプチドは、好ましくは天然の可溶性三量体の形をした、B L y S および／または B L y S 様ポリペプチドと可逆的に結合する。

【0089】

好適な実施形態では、本発明の B L y S 結合性ポリペプチドは、天然の可溶性三量体形態の B L y S とのみ可逆的に結合する。

【0090】

特定の実施形態において、本発明の B L y S 結合性ポリペプチドは、好ましくは天然の可溶性三量体の形をした、B L y S および／または B L y S 様ポリペプチドと不可逆的に結合する。

【0091】

好適な実施形態では、本発明の B L y S 結合性ポリペプチドは、天然の可溶性三量体形態の B L y S とのみ不可逆的に結合する。

【0092】

いくつかのスクリーニングまたはアッセイ法では、単離された B L y S 結合性ポリペプチドを使う代わりに、特定の B L y S 結合性ポリペプチドを展示する組換えバクテリオファージを使用することが可能で、より便利である。そのような方法には、ファージに基づく E L I S A プロトコルおよび結合性ポリペプチドを展示するファージのクロマトグラフィー材料への固定化が含まれる。かかるスクリーニングアッセイおよび手順は当分野でルーチンであり、本発明の組換えバクテリオファージを使用する方法に容易に適合させることができる。

【0093】

本発明はまた、B L y S との結合について、本明細書に開示する B L y S 結合性ポリペプチド（例えば、配列番号 163～168 のアミノ酸配列を有するポリペプチド）の結合を競合的に阻害する B L y S 結合性ポリペプチドを包含する。競合的阻害は当分野で公知のどのような方法で測定してもよく、例えば、本明細書に記載する競合結合アッセイを用いる。好ましい実施形態において、該ポリペプチドは、本明細書に開示する B L y S 結合性

ポリペプチド（例えば、配列番号163～168のアミノ酸配列を有するポリペプチド）のB L y Sへの結合を、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%だけ競合的に阻害する。より好ましい実施形態では、B L y S結合性ポリペプチドは、本明細書に開示するB L y S結合性ポリペプチド（例えば、配列番号163～168のアミノ酸配列を有するポリペプチド）の天然の可溶性三量体形態のB L y Sへの結合を、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%だけ競合的に阻害する。

【0094】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明のB L y S結合性ポリペプチドをコードする単離された核酸（好ましくは、DNA）を含む組成物を包含する。特定の実施形態では、本発明の核酸分子は配列番号1～12、20～172、および186～444に示された本発明のB L y S結合性ポリペプチドをコードする。さらなる実施形態では、本発明の核酸分子は配列番号1～12、20～172、および186～444のアミノ酸配列を有するポリペプチドのポリペプチド変異体または断片をコードする。さらに追加の実施形態では、本発明の核酸分子は、B L y S結合性ポリペプチドをコードし、該核酸の相補鎖が表1～8ならびに実施例2および5に記載されるポリペプチド（配列番号1～12、20～172、および186～444）をコードするポリヌクレオチド配列と、ストリンジェントな条件下（例えば、6x塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）中約45℃でのフィルター結合DNAへのハイブリダイゼーションと、その後の0.2xSSC／0.1% SDS中約50～65℃での1回以上の洗浄）、高度にストリンジェントな条件下（例えば、6xSSC中約45℃でのフィルター結合核酸へのハイブリダイゼーションと、その後の0.1xSSC／0.2% SDS中約68℃での1回以上の洗浄）、または、当業者に公知のその他のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする（例えば、Ausubel, F. M. 編, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. およびJohn Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 6.3.1-6.3.6および2.10.3を参照のこと）。

【0095】

本発明はまた、本発明のB L y S結合性ポリペプチド（ならびにその断片および変異体）をコードする単離された核酸分子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む宿主細胞、ならびに該ベクターおよび宿主細胞を作製する方法に関する。本発明はさらに、該組換えベクターを使用して、B L y S結合性ポリペプチドを組換え法により生産することを提供する。

【0096】

本発明のB L y S結合性ポリペプチド、核酸、形質転換宿主細胞、ならびに、遺伝子操作したウイルスおよびファージ（例えば、組換えファージ）は、B L y Sの検出、単離および精製を含むがこれらに限らない用途を有する。

【0097】

本発明の別の実施形態では、B L y S結合性ポリペプチドをファージ表面に展示する組換えバクテリオファージも提供される。そのようなファージは当分野で公知の技法を用いてルーチンに作製することができ、例えば、スクリーニング試薬やB L y Sを検出するための試薬として有用である。

【0098】

B L y S結合性ポリペプチドの生産と修飾

本発明のB L y S結合性ポリペプチドは当業界で公知の化学合成法、半合成法、および組換えDNA法で生産することができる。

【0099】

特定の実施形態においては、本発明のB L y S結合性ポリペプチドは当業界で公知の化学的もしくは半合成的方法によって生産される（K e l l e y ら、「遺伝子工学の原理と方法（G e n e t i c E n g i n e e r i n g P r i n c i p l e s a n d M e t h o d s）」中、S e t l o w, J. K. 編、(P l e n u m P r e s s, N Y., 1990), 第12巻, p p. 1-19; S t e w a r t ら、「固相ペプチド合成（S o l i d - P h a s e P e p t i d e S y n t h e s i s）」W. H. F r e e m a n C o., S a n F r a n c i s c o, 1989を参照のこと）。これらの方法の1つの利点は、非天然アミノ酸残基をB L y S結合性ポリペプチドの配列内に組み入れることができることである。

【0100】

好ましい実施形態においては、本発明のB L y S結合性ポリペプチドは化学的に合成される（例えば、M e r r i f i e l d, J. A m. C h e m. S o c., 85:2149 (1963); H o u g h t e n, P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A, 82:5132 (1985)を参照のこと）。例えば、固相法でポリペプチドを合成し、樹脂から切り離し、分取高速液体クロマトグラフィーで精製することができる（例えばC r e i g h t o n, 「タンパク質：構造と分子的性質（P r o t e i n s : S t r u c t u r e s a n d M o l e c u l a r P r o p e r t i e s）」(W. H. F r e e m a n a n d C o., N. Y., 1983), p p. 50-60を参照のこと）。またB L y S結合性ポリペプチドはペプチド合成機を用いて合成することもできる。合成ポリペプチドの組成はアミノ酸分析もしくは配列決定分析で確認することができる（例えば、エドマン分解法：C r e i g h t o n, 「タンパク質：構造と分子的性質（P r o t e i n s : S t r u c t u r e s a n d M o l e c u l a r P r o p e r t i e s）」(W. H. F r e e m a n a n d C o., N. Y., 1983), p p. 34-49を参照のこと）。さらに、所望により、本発明のB L y S結合性ポリペプチドは非古典的アミノ酸もしくは化学的アミノ酸類似体を含むものとすることができ、それは化学合成の際に本発明のB L y S結合性ポリペプチド中に置換もしくは付加として慣例的に導入することができる。非古典的アミノ酸としては、限定はされないが、通常のアミノ酸のD-異性体、2, 4-ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸（4 A b u）、2-アミノ酪酸（A b u）、6-アミノヘキサン酸（ ϵ -A h x）、2-アミノイソ酪酸（A i b）、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、 t -ブチルグリシン、 t -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン（b A l a）、フルオロアミノ酸、デザイナー（d e s i g n e r）アミノ酸、例えば β -メチルアミノ酸、C α -メチルアミノ酸、N α -メチルアミノ酸、および一般のアミノ酸類似体が挙げられる。さらに、そのようなアミノ酸はD体（右旋性）もしくはL体（左旋性）とすることができる。

【0101】

固相ペプチド合成は推定上のポリペプチドのカルボキシ（C）末端で保護アミノ酸を適切な樹脂へカップリングさせることによって開始され、その樹脂はC末端アミノ酸のカルボキシル基と反応して後に容易に切断される結合を形成するもので、例えばクロロメチル樹脂、ブロモメチル樹脂などのハロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、アミノメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂または t -アルキルオキシカルボニルヒドラジド樹脂が挙げられる。 α -アミノ保護基を、例えば塩化メチレン中のトリフルオロ酢酸（T F A）で除去し、中和を例えばT E Aで行った後、合成の次のサイクルへ進めることができる。次いで残存する α -アミノ酸および、必要に応じて側鎖が保護されたアミノ酸を順次所望の順番で縮合によってカップリングさせて樹脂に連結された中間化合物を得る。あるいは、伸長しつつある固相のポリペプチド鎖に付加する前に、いくつかのアミノ酸を互いにカップリングさせてオリゴペプチドを形成させておくことができる。

【0102】

2つのアミノ酸間の、または1つのアミノ酸とペプチドとの間、またはペプチドとペプチ

10

20

30

40

50

ドとの間の縮合は当業界で公知の縮合方法に従って行うことができ、そのような方法としては、限定はされないが、アジド法、混合酸無水物法、DCC（ジシクロヘキシルカルボジイミド）法、活性型エステル法（p-ニトロフェニルエステル法、BOP〔ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート〕法、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル法）、ならびにウッドワード（Woodward）試薬 K 法が挙げられる。

【0103】

ペプチドの化学合成に通常行われる方法は、適切な保護基もしくはキャッピング基を用いて種々のアミノ酸残基の反応性側鎖基をその部位で保護もしくはキャッピング（ブロッキング）し、それはそのポリペプチド鎖が完全に組み立てられた後に最終的に除去される。また通常行われる方法は、アミノ酸もしくは断片のα-アミノ基を、その本体がそのカルボキシル基の位置で反応する間、保護もしくはキャッピングし、その後にα-アミノ保護基を選択的に除去してその位置で引き続き反応が起こるようにすることである。従って、合成の間に中間化合物が生産され、それにはペプチド鎖中に各アミノ酸残基が所望の配列で並べられて含まれ、様々なそれらの残基は側鎖保護基もしくはキャッピング基を有している。次いで、アミノ酸側鎖上のこれらの保護基もしくはキャッピング基は、精製後に所望の産物が生産されるように、実質的に同時に除去される。

10

【0104】

アミノ酸中に見出されるα-およびε-アミノ側鎖基のための典型的な保護基、キャッピング基、もしくはブロッキング基としては例えば、ベンジルオキシカルボニル（Z）、イソニコチニルオキシカルボニル（iNOC）、O-クロロベンジルオキシカルボニル〔Z（NO₂）〕、p-メトキシベンジルオキシカルボニル〔Z（OMe）〕、t-ブトキシカルボニル（Boc）、t-アミイオキシカルボニル（t-amyoxy carbonyl：Aoc）、イソボルニルオキシカルボニル、アダマチルオキシカルボニル、2-（4-ピフェニル）-2-プロピルオキシカルボニル（Bpoc）、9-フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）、メチルスルホニルエトキシカルボニル（Msc）、トリフルオロアセチル、フタリル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル（NPS）、ジフェニルホスフィノチオイル（Ppt）、ジメチルオホスフィノチオイル（Mpt）などが挙げられる。

20

【0105】

アミノ酸のカルボキシル基のための保護基、キャッピング基、もしくはブロッキング基としては例えば、ベンジルエステル（OBzl）、シクロヘキシルエステル（Chx）、4-ニトロベンジルエステル（ONb）、t-ブチルエステル（Obut）、4-ピリジルメチルエステル（OPic）などが挙げられる。また、必要に応じて特定のアミノ酸、例えばアルギニン、システイン、およびセリンなどの側鎖基が適切な保護基で保護されていることが通常は望ましい。例えば、アルギニンのグアニジノ基は、ニトロ、p-トルエンスルホニル、ベンジルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、p-メトキシベンゼンスルホニル、4-メトキシ-2, 6-ジメチルベンゼンスルホニル（Mds）、1, 3, 5-トリメチルフェニルスルホニル（Mts）などで保護することができる。システインのチオール基は、p-メトキシベンジル、トリフェニルメチル、アセチルアミノメチルエチルカルバモイル、4-メチルベンジル、2, 4, 6-トリメチルベンジル（Tmb）などで保護することができ、セリンのヒドロキシル基はベンジル、t-ブチル、アセチル、テトラヒドロピラニルなどで保護することができる。

30

40

【0106】

所望のアミノ酸配列が完成した後、中間体ポリペプチドは樹脂支持体から試薬、例えば液状HFおよび1種以上のチオール含有スカベンジャーなどを用いた処理によって除去されるが、このような試薬は樹脂および残存している側鎖保護基のすべてからペプチド分子を切り離す。HFで切断した後、そのタンパク質配列をエーテルで洗い、多量の希酢酸中に移し、pHを水酸化アンモニウムで約8.0に調整し攪拌する。pHを調整すると該ポリペプチドは所望のコンホメーション配置を取る。

50

【0107】

例示としてであって限定するものではないが、本発明のポリペプチドは下記のとおりにより化学的に合成し精製することができる：ペプチドはRainin Symphony Multiplex Peptide Synthesizerを用いてN- α -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル、すなわちFmoc固相ペプチド合成化学を利用することによって合成することができる。1個のアミノ酸をペプチド樹脂伸長鎖へとカップリングさせるために用いられる標準的なサイクルには、一般的に：(1) ペプチド樹脂をN, N-ジメチルホルムアミド(DMF)で30秒間、3回洗い；(2) アミノ末端上のFmoc保護基をDMF中の20%のピペリジンで2回、各15分間洗うことで脱保護することによって除去し、そのプロセスの間にペプチド樹脂間の定着が起こることを防止するために10秒間に1秒間、反応容器に窒素をバブリング(bubbling)させて、混合を行う；(3) ペプチド樹脂をDMFで30秒間、3回洗う；(4) ペプチド樹脂へのアミノ酸のカップリングを、適切なアミノ酸のFmoc誘導体の250mM溶液と活性化剤混合物の等量を添加することによって行うが、その活性化剤混合物は400mM N-メチルモルホリンと250mM (2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-yl)-1, 3, 3-тетраметилулоиумгексафлуорофосфат (HBTU)をDMF中に含むものからなる；(5) その溶液を45分間混合させる；および(6) ペプチド樹脂をDMFで30秒間、3回洗うことが含まれる。所望のペプチドを生産するためにこのサイクルを必要に応じて適切なアミノ酸を順番に用いて繰り返すことができる。このサイクルプログラムの例外としては、アミノ酸のカップリングがそれらの疎水性性質のために困難であることが予測される場合、もしくは合成の間にヘリックス形成に関与することが予測される場合である。それらの場合には、上述のサイクルは対象のアミノ酸を「二重カップリング(double couple)」させるため、最初の45分間のカップリングステップの完了直後に2回目のステップ4を繰り返すという改変を加えることができる。さらに、ペプチド合成の初回カップリングステップにおいて、より効率的なカップリングを行う目的で、初回のDMFでの洗浄での混合時間を延長して30秒間3回の洗浄の代わりに15分間を3回の洗浄を行って樹脂を膨潤させることができる。

【0108】

ペプチド合成後、ペプチドは樹脂から下記の方法で切り離すことができる：(1) ペプチド樹脂をDMFで30秒間3回洗う；(2) アミノ末端上のFmoc保護基をDMF中の20%のピペリジンで2回、各15分間洗うことによって除去する；(3) ペプチド樹脂をDMFで30秒間、3回洗う；ならびに(4) 95%のトリフルオロ酢酸(TFA)、2.4%の水、2.4%のフェノール、および0.2%のトリイソプロピルシランからなる切断用カクテルをペプチド樹脂と2時間混合し、次いで、切断用カクテル中のペプチドを樹脂から過して取り、2倍量のエチルエーテルを添加して溶液からペプチドを沈殿させる。具体的には、ペプチドを単離するためにエーテル-ペプチド溶液を-20℃で20分間置き、次いで6,000 x Gで5分間遠心分離してペプチドをペレットとし、そのペプチドをエチルエーテルで3回洗って残存している切断カクテルの成分を除去することができる。最終的なペプチド産物を、0.1%のTFAからなる一次溶媒および80%のアセトニトリルと0.1%のTFAからなる溶出バッファーを用いて逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)で精製することができる。次いで精製したペプチドは凍結乾燥して粉末とすることができる。

【0109】

他の特定の実施形態においては、本明細書に記載のBlyS結合性ポリペプチドの分枝バージョン(version)が提供され、それは例えば、BlyS結合性ポリペプチド配列内の1個以上のアミノ酸を、1つ以上のアミノ酸とペプチド結合を形成することのできる遊離の側鎖を有するアミノ酸もしくはアミノ酸類似体と置換することによって提供される(従って「分枝」を形成することができる)。

【0110】

分枝したペプチドは、天然のもしくは合成のいずれのアミノ酸を、ペプチド鎖中の天然の

もしくは合成のいずれのアミノ酸と、共有結合で連結させるための当業界で公知のいかなる方法でも調製することができ、そのペプチド鎖は、ペプチド鎖に共有結合で結合させようとするアミノ酸上のアミノ基もしくはカルボキシル基と反応することのできる側鎖基を有する。とりわけ、遊離のアミノ側鎖基を有するアミノ酸、例えば限定はされないが、ジアミノ酪酸、リシン、アルギニン、オルニチン、ジアミノプロピオン酸、およびシトルリンなどをペプチド中に組み入れて、あるアミノ酸がこれらのアミノ酸とともに、例えば、その残基の遊離のアミノ側鎖基とペプチド結合を形成することによって、分枝を形成させることができる。あるいは、遊離のカルボキシル側鎖基を有するアミノ酸、例えば限定はされないが、グルタミン酸、アスパラギン酸、およびホモシトルリンなどをペプチド中に組み入れて、あるアミノ酸がこれらのアミノ酸とともに、例えば、その残基の遊離のカルボキシル側鎖基とペプチド結合を形成することによって、分枝を形成させることができる。分枝を形成するアミノ酸はペプチド鎖中のあるアミノ酸の側鎖基といかなるタイプの共有結合でも連結することもでき、そのような結合としては、限定はされないが、ペプチド結合、エステル結合、およびジスルフィド結合が挙げられる。特定の1実施形態においては、上述のものなどの分枝点を形成することのできるアミノ酸は、B L y S 結合性ポリペプチド配列を含んでいるペプチド内部のB L y S 結合性ポリペプチドの残基と置換される。

10

20

30

40

50

【0111】

分枝したペプチドは当業界で公知のいかなる方法によっても調製することができる。例えば、限定はしないが、分枝ペプチドは下記のとおり調製することができる：(1) ペプチド鎖の主鎖から分枝するアミノ酸はN α -t-ブチルオキシカルボニル(Boc)で保護されたアミノ酸のペンタフルオロフェニル(Opfp)エステルとして購入することができ、この分枝アミノ酸が付着されることとなる主鎖内の残基はN-Fmoc- α - γ -ジアミノ酪酸とすることができる；(2) Bocで保護されたアミノ酸のジアミノ酪酸とのカップリングは、各前駆体5gをDMF 150mLならびにピリジン2.25mLおよびジメチルアミノピリジン50mg含有のフラスコ中に添加し、その溶液を24時間混合することによって行われる；(3) 次にそのペプチドをカップリング反応物150mLから抽出することができるが、その抽出は反応物をジクロロメタン(dichloromethane; DCM) 400mLおよび0.12N HCl 200mLと1Lの分液漏斗中で混合し、相の分離を起こさせ、底部の水相を保存し、上部の層を0.12N HCl 200mLでさらに2回再抽出して行う；(4) ペプチドを含有している溶液に硫酸マグネシウム2~5gを添加して脱水し、硫酸マグネシウムをろ過して除き、残留溶液を蒸発させて容量を約2~5mLとすることができる；(5) 次にそのジペプチドに酢酸エチルおよび次に2倍量のヘキサンを添加して沈殿させ、次いでろ過して集め、冷ヘキサンで2回洗う；および(6) その結果得られたる液を凍結乾燥して所望のジペプチドの軽粉末形態を得ることができる。この方法で調製された分枝ペプチドは分枝の位置のアミノ酸がジアミノ酪酸で置換されているだろう。ジアミノ酪酸以外のアミノ酸もしくはアミノ酸類似体での置換を含む分岐ペプチドは、上述の方法と類似の方法で、N-Fmocをカップリングした形態のアミノ酸もしくはアミノ酸類似体を用いて調製することができる。

【0112】

好ましい1実施形態においては、本発明のB L y S 結合性ポリペプチドは環状ペプチドである。環状化は、例えば、限定はされないが、2個のシステイン残基間のジスルフィド結合を介して、もしくはアミド連鎖を介して行うことができる。例えば、限定はされないが、ジスルフィド架橋の形成は(1)精製したペプチドを0.01M 酢酸アンモニウム、pH 7.5中に0.1~0.5mg/mLの濃度で溶解し；(2)この溶解したペプチドに0.01M フェリシアン化カリウムを溶液の色が淡黄色となるまで滴下添加し、その溶液を24時間混合する；(3)環状ペプチドを濃縮して溶液5~10mLとし、逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)でそのペプチドを再精製し、最後にそのペプチドを凍結乾燥することによって達成できる。該ペプチドが2つの適切な位置のシステイン残基を含有していないような特定の1実施形態においては、システイン残基を、アミ

ノ末端および／もしくはカルボキシ末端および／または内部に、その環状化しようとするペプチドが、その残基がジスルフィド架橋を形成しうる間隔となるように2個のシステイン残基を含有するように導入することができる。あるいは、環状ペプチドは、例えば限定はされないが、下記のプロトコルを用いてアミド連鎖を生成して得ることができる：アリルで保護されたアミノ酸、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、もしくはグルタミンなどを第1のアミノ酸としてペプチド中に組み込み、次いで残りのアミノ酸をカップリングする。アリル保護基はペプチド樹脂を、5%の酢酸および2.5%のN-メチルモルホリンを含有するクロロホルム溶液中でテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(0)溶液と2時間混合することによって除去することができる。ペプチド樹脂を、DMF中の0.5%のN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)および0.5%のナトリウムジエチルジチオカバメートで3回洗うことができる。ペプチド鎖上のアミノ末端のFmoc基は、DMF中の20%のピペリジンで2回、各15分インキュベートして除去し、DMFで3回、各30秒間洗うことができる。活性化剤混合物、DMF中のN-メチルモルホリンおよびHBTUをカラム上に置き、遊離のアミノ末端を、アリル基の除去によって生じたカルボキシル基とカップリングさせてペプチドを環状化することができる。そのペプチドを樹脂から上述の化学的ペプチド合成の一般的説明で述べたとおり切断し、そのペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)で精製することができる。環状化しようとするペプチドがアリルで保護されたアミノ酸を含有していないような特定の1実施形態においては、アリルで保護されたアミノ酸を、そのペプチドの配列中のアミノ末端、カルボキシ末端、またはペプチド内部に、そのペプチドが環状化されうるように、導入することができる。

【0113】

さらに、ある特定の実施形態においては、本発明のBlyS結合性ポリペプチドがアミノ末端(N末端)および／もしくはカルボキシ末端(C末端)キャッピング基を有するかもしくは保持したものとして生産されることが好ましく、そのキャッピング基は使用中にN末端もしくはC末端のアミノ酸を望ましくない化学反応から保護することができるか、または結合性ポリペプチドをさらにコンジュゲーションもしくは操作することを可能にすることができる、例えばその結合性ポリペプチドをクロマトグラフ用の支持体樹脂もしくはマトリックスとコンジュゲートさせる、またはその結合性ポリペプチドと樹脂もしくは支持体とをつなぐために別のペプチドにコンジュゲートさせることができる。そのようなN末端基およびC末端基はまた、結合性ポリペプチドを標識する、もしくはタグを付するために用いることができ、それによって結合している複合体を検出する、もしくは結合性ポリペプチドの位置(BlyS標的タンパク質に結合しているのか、またはしていないのか)を、例えば分離方法の何らかの時点で、示すことができる。従って、検出もしくは分離法で用いるための最終形態で合成された本発明のBlyS結合性ポリペプチドはN末端および／もしくはC末端キャッピング基を含有し得る。本発明の結合性ポリペプチド中に存在しうるもしくは保持しうる特に好ましいN末端キャッピング基は、アセチル基(Ac)である。本発明の結合性ポリペプチド中に存在しうるもしくは保持しうる、特に好ましいC末端キャッピング基は、アミド基である。さらに好ましい1実施形態においては、本発明のBlyS結合性ポリペプチドはN末端キャッピング基としてアセチル基を有し、かつC末端キャッピング基としてアミド基を有するものである。

【0114】

本発明のBlyS結合性ポリペプチドはまた、ペプチド合成を業務としている企業(例えば、BACHEM Bioscience, Inc., King of Prussia, PA; Quality Controlled Biochemicals, Inc., Hopkinton, MA)によって商業的に調製されたものとして行うことができる。

【0115】

本発明のBlyS結合性ポリペプチドをコードする核酸配列は当業界で周知の技法を用いて生産および単離することができる。1例では、本発明のBlyS結合性ポリペプチドを

コードする核酸は、B L y S 結合性ポリペプチドのアミノ酸配列についての知識に基づいて化学的に合成される（好ましくはその配列はそのポリペプチドが発現されることとなる宿主系に最適なコドンとしたものである）。別の1例では、B L y S 結合性ポリペプチドをコードする核酸は、発現ライブラリー（例えば、ファージディスプレイライブラリー）をスクリーニングしてB L y S 結合性ポリペプチドを発現しているファージを同定し、その同定したライブラリーのメンバーからB L y S 結合性ポリペプチドコード核酸配列を単離（例えば、そのポリペプチドコード配列にフランキングするプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応法を介して）することによって得られる。

【0116】

本発明はまた、本発明のB L y S 結合性ポリペプチドをコードする核酸配列を含んでいるベクター、その組換えベクターで遺伝子操作された、もしくは別の手段で本発明のポリペプチドを生産するように操作された宿主細胞、およびB L y S 結合性ポリペプチドもしくはその断片の組換えによる、または化学的もしくは合成技法による生産にも関する。

【0117】

従って、本発明では、B L y S 結合性ポリペプチドはまた、組換え発現技法によっても得ることができる（例えば、Sambrookら、1989、「分子クローニング、実験室マニュアル（Molecular Cloning, A Laboratory Manual）」、第2版、Glover, D. M.（編）、（Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989）；「DNAクローニング：実際的なアプローチ（DNA Cloning: A Practical Approach）」（MRL Press, Ltd., Oxford, U. K., 1985）、第I, II巻を参照のこと）。

【0118】

組換えB L y S 結合性ポリペプチドを生産させるために、B L y S 結合性ポリペプチドをコードする核酸配列はプロモーターと機能しうる形で連結され、その配列からB L y S 結合性ポリペプチドが生産されることとなる。例えば、ベクターを細胞中に導入することができ、その細胞中でそのベクターもしくはその一部分が発現され、B L y S 結合性ポリペプチドが生産される。好ましい1実施形態においては、RNAポリメラーゼの供給源がDNA依存性RNAポリメラーゼであれば該核酸はDNAであるが、またポリメラーゼの供給源がRNA依存性RNAポリメラーゼであれば、または逆転写酵素が細胞中に存在しているかもしくは提供されて、DNAをRNAから生産する場合には、該核酸をRNAとすることができる。そのようなベクターは、それが所望のRNAを生産することとなるように転写されうるものである限りは、エピソームに留まることができ、または染色体に組み込まれたようにすることができる。そのようなベクターは当業界において標準的な組換えDNA技術法によって構築することができる。ベクターとしては、バクテリオファージ、プラスミド、ウイルス、レトロウイルス、または当業界で公知のその他のものとすることができ、それらは細菌、真菌、植物、昆虫もしくは哺乳動物の細胞中での複製および発現に用いられる。レトロウイルスベクターは複製能のあるもの、もしくは複製が欠失しているものとすることができる。後者の場合には、ウイルスの増殖は通常は補足性を有する宿主細胞中でのみ起こるだろう。ベクター構築物の宿主細胞中への導入は当業界で公知の技法によって行うことができ、そのようなものとしては、限定はされないが、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、陽イオン性脂質介在トランスフェクション、電気穿孔法、形質導入、感染またはその他の方法が挙げられる。そのような方法は、例えば、Davisら、「分子生物学の基礎的方法（Basic Methods In Molecular Biology）」（1986）などの多数の標準的な実験室マニュアルに述べられている。

【0119】

通常は、組換え発現ベクターには複製起点、および宿主細胞の形質転換を可能とする、例えば、大腸菌（E. coli）のアンピシリン耐性遺伝子およびS. cerevisiae）のTRP1遺伝子などの選択マーカー、ならびに下流の構造配

列の転写を指令する高度に発現される遺伝子由来のプロモーターが含まれるだろう。そのようなプロモーターは、数ある中で解糖系酵素、例えば、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、 α 因子、酸性ホスファターゼ、もしくは熱ショックタンパク質をコードするオペロン由来のものとすることができる。異種の構造配列は適切な相で翻訳開始および終結配列、および好ましくは、翻訳されたタンパク質の細胞周辺腔もしくは細胞外培地への分泌を指令することのできるリーダー配列を有する形でアセンブルされる。任意で、その異種配列は、所望の特性を備えた、N末端の同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードすることができ、その所望の特性とは、例えば、発現された組換え産物の安定化もしくは精製の単純化である。

【0120】

10

1 実施形態においては、本発明の B L y S 結合性ポリペプチドをコードする核酸は、適切な異種の調節エレメント (例えば、プロモーターもしくはエンハンサー)、例えば、少数の例を挙げると、 λ ファージ P L プロモーター、大腸菌 (*E. coli*) の *lac*、*trp*、*phoA*、および *tac* プロモーター、SV40 初期および後期プロモーター、ならびにレトロウイルスの LTR のプロモーターなどと、機能しうる形で連結されている。その他の適切なプロモーターも当業者であればわかるであろう。

【0121】

示したとおり、発現ベクターには好ましくは少なくとも1種の選択マーカーが含まれるだろう。そのようなマーカーとしては、真核細胞の培養ではジヒドロ葉酸レダクターゼ、G418、もしくはネオマイシン耐性、大腸菌 (*E. coli*) およびその他の細菌の培養ではテトラサイクリン、カナマイシン、もしくはアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。適切な宿主の代表的な例としては、限定はされないが、大腸菌 (*E. coli*)、ストレプトミセス (*Streptomyces*)、およびネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 細胞；酵母細胞 (例えば、サッカロミセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、もしくはピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) (ATCC 寄託番号 201178)) などの真菌細胞；ショウジョウバエ (*Drosophila*) S2 およびスポドプテラ (*Spodoptera*) Sf9 細胞などの昆虫細胞；CHO、COS、293、NSO、および Bowes 黒色腫細胞などの動物細胞；ならびに植物細胞が挙げられる。上述の宿主細胞用として適切な培地および培養条件は当業界で公知である。

20

30

【0122】

宿主細胞は、哺乳動物細胞 (例えば、ヒト由来細胞) などの高等真核細胞、もしくは酵母細胞などの下等真核細胞とすることができ、または、宿主細胞は細菌細胞などの原核細胞とすることができる。宿主株は、挿入された本発明の B L y S ポリペプチドをコードする核酸配列の発現をモジュレートする、または所望の特定の様式で B L y S 結合性ポリペプチドを修飾およびプロセッシングするものを選択することができる。特定のプロモーターからの発現は特定の誘導物質の存在によって増強することができる；このようにして遺伝子操作されたポリペプチドの発現を制御することができる。さらに、種々の宿主細胞はタンパク質の翻訳および翻訳後のプロセッシングならびに改変 (例えば、リン酸化、切断) のための特性と特定の機構を有している。発現された外来タンパク質の所望の改変とプロセッシングを確保するために適切な細胞系を選択することができる。宿主細胞内での発現のための適切なベクターとプロモーターの選択は周知の方法であり、発現ベクターの構築、そのベクターの宿主内への導入、宿主内での発現のために必要な技法は当業界では慣例的な技術である。

40

【0123】

細菌での使用に有用な発現ベクターは、所望のタンパク質をコードする構造的 DNA 配列と適切な翻訳開始および終結シグナルとを機能しうるリーディング相中に、機能的プロモーターと共に挿入することによって構築される。そのベクターは好ましくは、ベクターの維持を確実にし、および、所望により宿主内での増幅を提供するために、1 種以上の表現型選択マーカーおよび1個の複製起点を含んでなるだろう。形質転換のための適切な原核

50

生物宿主としては、他のものも選択することができるが、大腸菌、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、ネズミチフス菌、ならびにシュードモナス (*Pseudomonas*)、ストレプトミセスおよびブドウ球菌 (*Staphylococcus*) 属内の様々な種が挙げられる。非限定的な例ではあるが、代表的なものとして、細菌での使用に有用な発現ベクターは、周知のクローニングベクターである pBR322 (ATCC 37017) の遺伝子エレメントを含んでなる市販のプラスミド由来の選択マーカーと細菌性の複製起点を含んでなるものとすることができる。そのような市販のベクターとしては、例えば、pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)、および GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) が挙げられる。これらの pBR322 「骨格」セクションは適切なプロモーターおよび発現されるべき構造配列と組み合わされる。ベクターの中で細菌で使用するために好ましいものとしては、pHE4-5 (ATCC 寄託番号 209311) およびその変異体、pQE70、pQE60、および pQE-9 (これらは QIAGEN Inc. から入手できる) ; pBS ベクター、Phagescript ベクター、Bluescript ベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A (Stratagene から入手できる) ; および ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (これらは Pharmacia から入手できる) がある。酵母系で用いるために好ましい発現ベクターとしては、限定はされないが、pYES2、pYD1、pTEF1/Zeo、pYES2/GS、pPICZ、pGAPZ、pGAPZ α 、pPIC9、pPIC3.5、pHIL-D2、pHIL-S1、pPIC3.5K、pPIC9K、および PAO815 (これらはすべて Invitrogen, Carlsbad, CA から入手できる) が挙げられる。好ましい真核生物ベクターとしては、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、および pSG (これらは Stratagene から入手できる) ; pSVK3、pBPV、pMSG、および pSVL (Pharmacia から入手できる) がある。その他の適切なベクターについては、当業者であれば容易にわかるであろう。

【0124】

適切な宿主株を形質転換し、その宿主株を適切な細胞密度まで増殖させた後、適切な手段 (例えば、温度シフトもしくは化学的誘導) で選択プロモーターを誘導させ、細胞をさらなる期間培養する。細胞を、典型的には遠心分離して回収し、物理的もしくは化学的手段で破壊し、その結果得られる粗抽出物をさらに精製するために保持する。

【0125】

タンパク質の発現に用いる微生物細胞は、都合のよい任意の方法で破壊することができ、そのような方法としては、凍結-融解サイクル、超音波処理、機械的破壊または細胞溶解剤の使用が含まれ、そのような方法は当業者に周知である。

【0126】

1 実施形態においては、酵母のピキア・パストリスが真核生物系での BLYS 結合性ポリペプチドの発現に用いられる。ピキア・パストリスはメチロトロフ酵母でメタノールを唯一の炭素源として代謝することができる。メタノール代謝経路の主要ステップは、O₂ を用いたメタノールからホルムアルデヒドへの酸化である。この反応はアルコールオキシダーゼという酵素によって触媒される。メタノールを唯一の炭素源として代謝するために、ピキア・パストリスは高レベルのアルコールオキシダーゼを生成しなければならないが、それは部分的には、アルコールオキシダーゼの O₂ に対する親和性が比較的低いことによるものである。その結果、主な炭素源としてメタノールに依存している増殖培地中では、2つのアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1) のうちの方のプロモーター領域が非常に活性である。メタノールの存在下で AOX1 遺伝子から生産されたアルコールオキシダーゼはピキア・パストリス中の可溶性タンパク質の総量の約 30% まで含む。Ellis ら, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1111-21 (1985); Koutz ら, *Yeast*, 5:167-77 (1989); Tschopp ら, *Nucl. Acids Res.*, 15:3859-76 (1987) を参照のこと。この

ように、例えば本発明の B L y S 結合性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドなどの異種コード配列は、A O X 1 調節配列のすべてもしくは一部分の転写調節下で、メタノールの存在下で培養させたピキア酵母中で極めて高いレベルで発現される。

【0127】

1 例においては、本明細書に示すとおり、プラスミドベクター p P I C 9 K が本発明の B L y S 結合性ポリペプチドをコードする DNA のピキア酵母系内での発現に用いられ、本質的には、「ピキアプロトコール：分子生物学における方法 (P i c h i a P r o t o c o l s : M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y)」, D. R. H i g g i n s と J. C r e g g 編 (T h e H u m a n a P r e s s, T o t o w a, N. J., 1998) に述べられているとおりである。この発現ベクターは多重クローニグ部位の上流に位置するピキア・パストリスアルカリホスファターゼ (P H O) 分泌シグナルペプチド (すなわち、リーダー) に連結された強力な A O X 1 プロモーターによって、本発明の B L y S 結合性ポリペプチドの発現と分泌を可能にする。 10

【0128】

当業者であれば容易に理解されたとおり、提示された発現構築物が、必要に応じてインフレームの A U G を含む転写、翻訳、分泌 (所望により) などのための適切な位置にあるシグナルを提供するものである限りは、p P I C 9 K の代わりに p Y E S 2、p Y D 1、p T E F 1 / Z e o、p Y E S 2 / G S、p P I C Z、p G A P Z、p G A P Z α 、p P I C 9、p P I C 3. 5、p H I L - D 2、p H I L - S 1、p P I C 3. 5 K、および P A O 8 1 5 など、他の多数の酵母ベクターを用いることができる。 20

【0129】

1 実施形態においては、例えば、本発明の B L y S 結合性ポリペプチドをコードする核酸などの異種コード配列の高レベルの発現は、本発明の異種核酸配列を発現ベクター、例えば p G A P Z もしくは p G A P Z α などヘクローニングし、メタノール不在下で酵母培養物を増殖させることによって行うことができる。

【0130】

本発明のポリペプチドをコードする DNA の高等真核生物による転写は、そのベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増加される。エンハンサーは、プロモーターに作用して転写を増加させる通常は約 10 ~ 300 b p の DNA のシス作用性エレメントである。例としては、複製起点の 100 b p ~ 270 b p 後期側にある S V 40 エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側にあるポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。 30

【0131】

組換えタンパク質を発現するために種々の哺乳動物細胞培養系も用いることができる。哺乳動物発現系の例としては、サルの腎臓線維芽細胞の C O S - 7 系 (これは G l u z m a n (C e l l, 23:175 (1981)) によって記載されている) ならびに適合性ベクターを発現することのできるその他の細胞系、例えば、C 1 2 7、3 T 3、C H O、2 9 3、N S O、H e L a、および B H K 細胞系が挙げられる。哺乳動物発現ベクターは、複製起点、適切なプロモーターおよびエンハンサー、ならびにまたリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与部位および受容部位、転写終結配列、および 5 ' フランキング非転写配列で任意に必要なものをも含むだろう。S V 40 スプライス由来の DNA 配列、およびポリアデニル化部位は必要とされる非転写遺伝子エレメントを提供するために用いることができる。 40

【0132】

本明細書に記載の宿主細胞は、従来の方法で該組換え配列によってコードされる遺伝子産物を生産させるために用いることができる。あるいは、無細胞翻訳系も本発明の DNA 構築物由来の RNA を用いて本発明のポリペプチドを生産させるために用いることができる。

【0133】

本発明のポリペプチドは、改変された形態、例えば融合タンパク質 (ペプチド結合を介し 50

て異種タンパク質配列（異なるタンパク質の）と連結されたポリペプチドを含んでなる）などで発現もしくは合成することができ、そのようなポリペプチドには、分泌シグナルのみならず、さらなる異種機能的領域をも含むことができる。そのような融合タンパク質は、本発明のポリヌクレオチドと所望のアミノ酸配列をコードする所望の核酸配列とを当業界で公知の方法によって適切なリーディングフレーム中でお互いに連結し、当業界で公知の方法によってその融合タンパク質産物を発現させることによって作製することができる。あるいは、そのような融合タンパク質はタンパク質合成技法、例えばペプチド合成機を用いて作製することができる。このように、例えば、追加のアミノ酸からなる領域、特に荷電したアミノ酸をポリペプチドのN末端に付加して、精製中の、またはその後の取り扱いと保管中の、宿主細胞における安定性と持続性を改善することができる。また、ペプチド部分をそのポリペプチドに付加して精製を容易にすることができる。そのような領域はそのポリペプチドの最終調製の前に除去することができる。特にポリペプチドにペプチド部分を付加して分泌もしくは排出を生じさせること、安定性を改善すること、ならびに精製を容易にすることは、当業界ではよく知られた、慣例的な技法である。特にヘキサヒスチジンポリペプチドについては言及しておくが、これは特に例えばpQEBекター（QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311）で提供されるタグが例としてあげられるが、多数のものが市販されている。Gentzら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 821-824 (1989)に記載されているとおり、例えば、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の都合のよい精製を提供する。精製に有用なその他のペプチドタグとしては、限定はされないが、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質由来のエピトープに対応するヘマグルチニン「HA」タグ（Wilsonら, Cell, 37: 767 (1984)）、および「フラッグ（flag）」タグ（DYKDDDDK（配列番号183）、Stratagene, La Jolla, CA）が挙げられる。

【0134】

1実施形態においては、本発明のBlyS結合性ポリペプチドをコードする核酸をpelBペクチン酸リアーゼシグナル配列と融合させてグラム陰性細菌中でのそのようなポリペプチドの発現と精製の効率を向上させることができる。米国特許第5,576,195号および第5,846,818号を参照すればよく、これらの内容は本明細書にその全体を参照により組み入れる。

【0135】

本発明のポリペプチドには、化学合成法の産物、組換え技法で原核生物もしくは真核生物宿主から生産された産物が含まれ、そのような宿主としては例えば、細菌、酵母、高等植物、昆虫、および哺乳動物細胞が挙げられる。組換え生産法に用いる宿主の如何によって、本発明のポリペプチドは糖鎖が付加されるか、もしくは付加されない場合がある。さらに、本発明のポリペプチドには場合によって宿主が介在するプロセスの結果として、開始修飾メチオニン残基も含まれうる。

【0136】

本発明は合成もしくは翻訳中もしくはその後に、例えば糖鎖付加、アセチル化、ベンジル化、リン酸化、アミド化、PEG化、ホルミル化、既知の保護基／ブロッキング基による誘導体化、タンパク質分解切断、抗体分子との連結、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、PEG化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、ユビキチン化などによって修飾されるBlyS結合性ポリペプチドを包含する。（例えば、Creighton, 「タンパク質：構造と分子的性質（Proteins: Structures and Molecular Properties）」, 第2版（W. H. Freeman and Co. N. Y., 1992）；「翻訳後のタンパク質の共有結合による修飾（Posttranslational Covalent Modification of Proteins）」, Johnson編（Academic Press, New York, 1983）, pp. 1-12；Seifterら, Meth. Enzymol., 182: 626-6

46 (1990); Rattanら, Ann. NY Acad. Sci., 663: 48-62 (1992)を参照のこと)。特定の実施形態においては、該ペプチドはN末端でアセチル化され、および／またはC末端でアミド化されたものである。

【0137】

さらに別の実施形態においては、相互作用する能力のある、例えばポリペプチド中の2個のシステイン残基などの残基を2個以上含有する本発明のB L y S結合性ポリペプチドは、酸化条件下、またはこれらの残基の相互作用を促進するその他の条件下（例えば、ジスルフィド架橋形成）で処理することができる。

【0138】

さらに、本発明に包含されるB L y S結合性ポリペプチドの修飾には、例えば、既知の技法で行われる非常に多数の化学的修飾のいずれのものも含まれ、そのようなものとしては限定はされないが、臭化シアンでの特異的な化学的切断、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、NaBH₄、アセチル化、ホルミル化、酸化、還元、ツニカマイシンの存在下での代謝的合成などが挙げられる。

【0139】

本発明に包含される翻訳後／合成後の修飾としてはさらに、例えば、N結合型もしくはO結合型炭化水素鎖、N末端もしくはC末端のプロセッシング、アミノ酸骨格への化学的部分の付加、N結合型もしくはO結合型炭化水素鎖の化学的修飾、および原核生物宿主細胞での発現の結果としてのN末端メチオニン残基の付加もしくは欠失が挙げられる。

【0140】

本発明によって提供されるものとしてはまた、さらに別の利点、例えば親和性の増加、オフ速度 (off-rate)、溶解性、安定性、およびin vivoもしくはin vitroでのポリペプチドの循環時間の低減、または免疫原性の低減などをもたらしことができる本発明のB L y S結合性ポリペプチドの化学修飾された誘導体がある（米国特許第4, 179, 337号を参照のこと）。誘導体化のための化学的部分は、ポリエチレングリコール、エチレングリコール／プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなどの水溶性ポリマーから選択することができる。該ポリペプチドは分子内のランダムな位置で、または分子内のあらかじめ定められた位置で修飾することができ、付加される化学的部分を1、2、3個もしくはそれ以上含むことができる。

【0141】

該ポリマーはどのような分子量でもよく、分枝したものもしくは分枝していないものとすることができる。ポリエチレングリコールについては、取り扱いと製造の容易性から好ましい分子量は約1 kDa～約100 kDaである（「約」という用語はポリエチレングリコールの調製において、示した分子量よりも重い分子がいくらかあり、軽い分子がいくらかあるだろうことを示している）。所望の治療プロファイルの如何によって（例えば、所望の徐放性の持続時間、もしあるとすれば生物学的活性に及ぼす影響、取り扱いの容易性、抗原性の程度もしくは欠如、およびその他のポリエチレングリコールの治療用タンパク質もしくは類似体に及ぼす既知の影響）、他のサイズを用いることができる。例えば、ポリエチレングリコールの平均分子量は、約200、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10,000、10,500、11,000、11,500、12,000、12,500、13,000、13,500、14,000、14,500、15,000、15,500、16,000、16,500、17,000、17,500、18,000、18,500、19,000、19,500、20,000、25,000、30,000、35,000、40,000、50,000、55,000、60,000、65,000、70,000、75,000、80,000、85,000、90,000、95,000、もしくは100,000 kDaであってよい。

【0142】

上述のとおり、該ポリエチレングリコールは分枝構造を有するものとすることができる。分枝ポリエチレングリコールについては、例えば、米国特許第5,643,575号；Morpurgoら, Appl. Biochem. Biotechnol., 56: 59-72 (1996)；Vorobjevら, Nucleosides Nucleotides, 18: 2745-2750 (1999)；およびCalicetiら, Bioconj. Chem., 10: 638-646 (1999)に述べられており、これらの各々の開示は本明細書に参照により組み入れる。

【0143】

該ポリエチレングリコール分子（もしくはその他の化学的部分）は該ポリペプチドの機能的ドメインに及ぼす影響を考慮してB L y S結合性ポリペプチドへ付着させなければならない。当業者が利用しうる付着方法は多数あり、例えば、E P 0 4 0 1 3 8 4（P E GをG-C S Fにカップリングさせるもの）が挙げられるが（本明細書に参照により組み入れる）、M a l i kら, Exp. Hematol., 20: 1028-1035 (1992)（トレシルクロリド（t r e s y l c h l o r i d e）を用いたG M-C S FのP E G化について報告したもの）をも参照のこと。例えば、ポリエチレングリコールは、反応基、例えば遊離のアミノ基もしくはカルボキシル基を介してアミノ酸残基と共有結合で結合することができる。反応基はそれに対して活性化ポリエチレングリコール分子が結合しうるものである。遊離のアミノ基を有するアミノ酸残基としては、例えば、リシン残基およびN末端アミノ酸残基が挙げられうる；遊離のカルボキシル基を有するアミノ酸残基としては、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、およびC末端アミノ酸残基が挙げられうる。スルフヒドリル基もポリエチレングリコール分子を付着させるための反応基として用いることができる。好ましい1実施形態においては、ポリエチレングリコール分子は、例えばN末端もしくはリシン側鎖のアミノ基への付着などで、アミノ基に付着される。

【0144】

上記で示唆したとおり、ポリエチレングリコールは、多数あるアミノ酸残基のいずれかとの連結を介してポリペプチドに付着させることができる。例えば、ポリエチレングリコールは、リシン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、もしくはシステイン残基への共有結合を介してポリペプチドと連結することができる。ポリエチレングリコールを、該ポリペプチドの特定のアミノ酸残基（例えば、リシン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、もしくはシステイン）と、または該ポリペプチドの2つ以上のタイプのアミノ酸残基（例えば、リシン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、およびそれらの組み合わせ）に付着させるためには1種以上の反応化学を利用することができる。

【0145】

N末端で化学修飾されたタンパク質が特に所望される場合もある。説明としてポリエチレングリコールを用いると、種々のポリエチレングリコール分子（分子量、分枝などによって）、反応混合物中のポリエチレングリコール分子のポリペプチド分子に対する比率、行おうとするP E G化反応のタイプ、および選択されたN末端P E G化ポリペプチドを得るための方法から選択することができる。N末端P E G化調製物を得るための方法（すなわち、必要に応じてこの部分を他のモノP E G化部分から分離すること）は、P E G化ポリペプチド分子の集団からN末端がP E G化された物質を精製することによるものでありうる。タンパク質の選択的N末端修飾は、ある特定のタンパク質の誘導体化に利用しうる第一級アミノ基の種々のタイプの反応性に差があること（リシン対N末端）を利用した還元的アルキル化によって行うことができる。適切な反応条件下では実質的にN末端でのタンパク質の選択的な誘導体化がカルボニル基を含んでいるポリマーを用いて行える。

【0146】

上述のとおり、本発明のポリペプチドのP E G化はかなり多数の手段によって達成できる。例えば、ポリエチレングリコールはタンパク質に直接的、もしくは介在リンカーによってのいずれかで付着させることができる。ポリエチレングリコールをタンパク質にリンカ

ーなしで付着させるシステムは、Delgadoら, Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys., 9:249-304 (1992); Francisら, Intern. J. of Hematol., 68:1-18 (1998); 米国特許第4,002,531号; 米国特許第5,349,052号; WO 95/06058; およびWO 98/32466に述べられており、これらの各々の開示は本明細書に参照により組み入れる。

【0147】

介在リンカーなしにポリペプチドのアミノ酸残基へポリエチレングリコールを直接的に付着させるシステムの1つは、トレシル化 (tressylated) MPEGを用いるものであるが、それはトレシルクロリド ($\text{ClSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$) を用いてモノメトキシポリエチレングリコール (MPEG) を修飾することによって生産される。タンパク質をトレシル化MPEGと反応させると、ポリエチレングリコールはポリペプチドのアミン基へ直接的に付着される。このように、本発明は、本発明のポリペプチドを2,2,2-トリフルオロエタンスルホニル基を有するポリエチレングリコール分子と反応させることによって生産されるポリペプチド-ポリエチレングリコールコンジュゲートを含んでいる。

10

【0148】

またポリエチレングリコールはポリペプチドに多数の様々な介在リンカーを用いて付着させることもできる。例えば、米国特許第5,612,460号 (これはその開示の全体を本明細書中に参照により組み入れる) は、ポリエチレングリコールをポリペプチドに連結するためのウレタンリンカーについて開示している。またポリエチレングリコールがポリペプチドにリンカーによって付着されているポリペプチド-ポリエチレングリコールコンジュゲートは、ポリペプチドとMPEG-スクシニミジルスクシネート、1,1'-カルボニルジイミダゾールで活性化したMPEG、MPEG-2,4,5-トリクロロフェニルカーボネート、MPEG-p-ニトロフェノールカーボネート、および種々のMPEG-スクシネート誘導体などの化合物との反応によって生産することもできる。その他の多数のポリエチレングリコール誘導体、およびポリエチレングリコールをポリペプチドに付着させる反応化学は、WO 98/32466に述べられており、その開示全体は本明細書中に参照により組み入れる。本明細書に記載の反応化学を用いて生産したPEG化BlyS結合性ポリペプチド産物は本発明の範囲内に含まれる。

20

【0149】

また本発明の各ポリペプチドに付着されるポリエチレングリコール部分の数 (すなわち、置換の程度) は変えることができる。例えば、本発明のPEG化ポリペプチドは、平均して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、17、20個もしくはそれ以上のポリエチレングリコール分子と連結することができる。同様に、置換の程度の平均も例えば、ポリペプチド1分子あたりポリエチレングリコール部分1~3、2~4、3~5、4~6、5~7、6~8、7~9、8~10、9~11、10~12、11~13、12~14、13~15、14~16、15~17、16~18、17~19、もしくは18~20個などの範囲内にありうる。置換の程度を測定するための方法は、例えば、Delgadoら, Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys., 9:249-304 (1992) で論じられている。

30

40

【0150】

BlyS結合性ポリペプチド多量体、コンジュゲート、および融合物

本発明は多価のBlyS結合性ポリペプチドを包含する。BlyS結合性ポリペプチドは単量体、二量体、三量体、もしくはより高次の多量体とすることができる。好ましい1実施形態においては、多価のBlyS結合性ポリペプチドはホモ三量体である。別の好ましい1実施形態においては、ホモ三量体のBlyS結合性ポリペプチドは単一のホモ三量体BlySと結合する。

【0151】

別の好ましい1実施形態においては、単量体もしくは多量体のBlyS結合性ポリペプチドは別のポリペプチドもしくはその他の化合物とコンジュゲートする。例えば、BlyS

50

結合性ポリペプチドは放射性化合物、もしくはその他の毒性化合物とコンジュゲートさせて、B L y Sを発現している細胞を標的として破壊させることができる。

【0152】

本発明はまた、1個以上のB L y S結合性ポリペプチドと1個以上の非B L y S結合性ポリペプチドもしくはその他の化学的部分とを含んでなるヘテロ多量体をも包含する。そのようなヘテロ多量体は、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、もしくはより高次の多量体とすることができる。ヘテロB L y S結合性多量体はB L y Sを発現している細胞、および異種の非B L y S結合性ポリペプチドもしくはその他の化学的部分に対する受容体を、標的とし、結合し、阻害し、および／もしくは応答を活性化するために用いることができる。そのような活性化される応答としては例えば、アポトーシス、もしくはその他の生物学的および化学的に介在された形態の細胞の破壊が挙げられうる。またヘテロB L y S結合性多量体を用いて、B L y Sを発現している細胞を標的として所望の分子もしくは化合物をその細胞に導入することができる。例えば、ヘテロB L y S結合性多量体は、放射性化合物もしくはその他の毒性化合物とコンジュゲートさせてB L y Sを発現している細胞を死滅させることができる。別の1例として、ヘテロB L y S結合性およびアデノウイルス結合性多量体は、B L y Sを発現している細胞を特異的に標的としてアデノウイルスが介在する遺伝子治療をその細胞中に導入するために用いうる。

【0153】

B L y S結合性ポリペプチド多量体は当業界で公知の方法を用いてホモ多量体およびヘテロ多量体として融合もしくはコンジュゲートすることができる。好ましい1実施形態においては、B L y S結合性ポリペプチドはホモ多量体として連結され、その1個もしくは複数のリンカーは各B L y S結合性ポリペプチドが同時に個々のB L y S分子と結合しうるのに十分な長さで柔軟性を与えている。別の好ましい1実施形態においては、B L y S結合性ポリペプチドはヘテロ多量体として連結され、その1個もしくは複数のリンカーは各B L y S結合性ポリペプチドが同時に個々のB L y S分子と結合しうるのに十分な長さで柔軟性を与え、異種のポリペプチドもしくは化学的部分は同時にその標的と結合することができる。適切なリンカー分子の多数の例については当業界で公知である。(例えば、Todorovskaら, J. Immunol. Methods, 248(1-2): 47-66(2001); Mehvar, J. Control Release, 69(1): 1-25(2000); Francisら, Int. J. Hematol., 68(1): 1-18(1998)を参照のこと)。特定の実施形態においては、該リンカーは次のものからなる群から選択されるメンバーである: (a) ペプチドリンカー; (b) グルタメートリンカー; および (c) ポリエチレングリコールリンカー。本発明の方法に従って用いられるリンカーの長さは当業界で公知の技法を用いて慣例的に測定することができる。特定の実施形態においては、リンカーは5~60オングストロームの長さである。他の実施形態においては、リンカーは10~50、10~40、10~30、もしくは10~20オングストロームの長さである。さらに別の実施形態においては、リンカーは約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、もしくは100オングストロームの長さである。この文脈で「約」とは、列挙した長さおよび／もしくはそれより数オングストローム(5、4、3、2、もしくは1オングストローム)長いもしくは短い長さのものを含んでいる。他の実施形態においては、リンカーは少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、もしくは100オングストロームの長さである。

【0154】

好ましい1実施形態においては、B L y S結合性ポリペプチドはヒト血清アルブミン(HA)と融合させることができる。例えば、米国特許出願第09/833,245号、2001年4月12日出願、を参照すればよく、これは本明細書に参照により組み入れる。1実施形態においては、該アルブミン融合タンパク質はN末端部分としてHA、およびC末端部分としてB L y S結合性ポリペプチドを含んでなるものである。別の1実施形態にお

いては、該アルブミン融合タンパク質はC末端部分としてHA、およびN末端部分としてB L y S結合性ポリペプチドを含んでなるものである。

【0155】

他の実施形態においては、該アルブミン融合タンパク質はアルブミンのN末端およびC末端の双方に融合させたB L y S結合性ポリペプチドを有している。好ましい1実施形態においては、N末端およびC末端に融合させたB L y S結合性ポリペプチドが同一のB L y S結合性ポリペプチドである。別の好ましい1実施形態においては、N末端およびC末端で融合させたB L y S結合性ポリペプチドは異なるB L y S結合性ポリペプチドである。別の好ましい1実施形態においては、それぞれB L y S結合性ポリペプチドはHAのN末端もしくはC末端のいずれかに融合され、異なる（非B L y S結合性）ポリペプチドがC末端もしくはN末端のいずれかに融合されている。

【0156】

B L y S結合性ポリペプチドがHAのN末端および／もしくはC末端に融合されているアルブミン融合タンパク質に加えて、また本発明のB L y S結合性ポリペプチド／アルブミン融合タンパク質はB L y S結合性ポリペプチドをHAの1つもしくは複数の内部領域に挿入することによって生産することもできる。例えば、HA分子のタンパク質の配列内には、 α -ヘリックスの末端部から開始部までの間に多数のループもしくはターンが存在しており、それはジスルフィド結合によって安定化されている（米国特許出願第09/833,245号の図9～11を参照のこと）。HAの結晶構造から決定されたループ（米国特許出願第09/833,245号の図13）（PDB識別名 1A06、1BJ5、1BKE、1BM0、1E7E～1E7I、および1UOR）は、その大部分が分子の本体の外へと延ばす。これらのループは、治療的活性を有するペプチド（特に機能的であるために二次構造が必要なもの）もしくは治療用タンパク質の挿入もしくは内部の融合に有用であり、本質的には特定の生物学的活性を有するアルブミン分子が生成される。

【0157】

その内部に本発明の結合性ポリペプチドが挿入されて本発明のアルブミン融合タンパク質を生成しうるヒトアルブミン構造中のループとしては次のものが挙げられる：Val54-Asn61、Thr76-Asp89、Ala92-Glu100、Gln170-Ala176、His247-Glu252、Glu266-Glu277、Glu280-His288、Ala362-Glu368、Lys439-Pro447、Val462-Lys475、Thr478-Pro486、およびLys560-Thr566。より好ましい実施形態においては、本発明のポリペプチドは、成熟ヒト血清アルブミン（配列番号445）のVal54-Asn61、Gln170-Ala176、および／もしくはLys560-Thr566ループ中に挿入される。

【0158】

特定の実施形態においては、本発明のB L y S結合性ポリペプチドは、放射性金属イオン（そのようなイオンとしては限定はされないが ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{90}Y 、 ^{166}Ho 、および ^{153}Sm が挙げられる）をポリペプチドとコンジュゲートさせるために有用な大環状キレート化剤に付着される。好ましい1実施形態においては、本発明のB L y S結合性ポリペプチドに付着した大環状キレート化剤と会合した放射性金属イオンは ^{111}In である。別の好ましい1実施形態においては、本発明のB L y S結合性ポリペプチドに付着した大環状キレート化剤と会合した放射性金属イオンは ^{90}Y である。特定の実施形態においては、大環状キレート化剤は、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸（DOTA）である。他の特定の実施形態においては、DOTAが1個のリンカー分子を介して本発明のB L y S結合性ポリペプチドに付着している。DOTAをポリペプチドとコンジュゲートさせるために有用なリンカー分子の例は当業界では一般的に知られている—例えば、DeNardora, Clin. Cancer Res., 4(10):2483-90(1998); Petersonら, Bioconjug. Chem., 10(4):553-7(1999); およびZimmermanら, Nucl. Med. Biol., 26(8):943-5

0 (1999) を参照されたい。これらはそれらの全体を本明細書中に参照により組み入れる。さらに、米国特許第 5, 652, 361 号および第 5, 756, 065 号は、抗体にコンジュゲートさせることのできるキレート化剤、およびそのキレート化剤の作製法と使用法について開示しているものであるが、これらはそれらの全体を本明細書中に参照により組み入れる。米国特許第 5, 652, 361 号および第 5, 756, 065 号はキレート化剤を抗体とコンジュゲートさせることに焦点を当ててはいるが、当業者であれば、キレート化剤を他のポリペプチドとコンジュゲートさせるためにそれらに開示されている方法を適用することは容易にできるであろう。

【0159】

本発明の B L y S 結合性ポリペプチドは既知の方法によって回収し精製することができるが、そのような方法としては、限定はされないが、硫酸アンモニウムもしくはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンもしくは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーが挙げられる。最も好ましいのは、高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）を精製に用いることである。

【0160】

B L y S 結合性ポリペプチドは検出可能な標識を用いて修飾することもでき、そのような標識としては限定はされないが、B L y S 標的の検出と単離のための、酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、陽電子放射金属、非放射性常磁性金属イオン、および親和性標識が挙げられる。検出可能な物質は、本発明のポリペプチドと直接的に、もしくは当業界で公知の技法を用いて中間物（例えば当業界で公知のリンカーなど）を介して間接的に、カップリングもしくはコンジュゲートさせることができる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、もしくはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチン、およびアビジン／ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ビオチン、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、もしくはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としてはルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ；適切な放射性物質の例としては、放射性金属イオン、例えば、 ^{213}Bi などの α 放射体、またはその他の放射性同位元素、例えばヨウ素 (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、炭素 (^{14}C)、硫黄 (^{35}S)、トリチウム (^3H)、インジウム ($^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、およびテクネチウム ($^{99\text{Tc}}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、タリウム (^{201}Tl)、ガリウム (^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、パラジウム (^{103}Pd)、モリブデン (^{99}Mo)、キセノン (^{133}Xe)、フッ素 (^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 、および ^{117}Tl などが挙げられる。

【0161】

特定の 1 実施形態においては、本発明の B L y S 結合性ポリペプチドはビオチンで標識される。

【0162】

本発明の結合性ポリペプチドと組換えバクテリオファージの使用

本明細書に記載の B L y S 結合性ポリペプチドは、溶液中の B L y S 標的タンパク質の検出、単離、もしくは除去に特に有用である。そのような溶液は、B L y S および／もしくは B L y S 様ポリペプチドを水もしくは水性バッファー中に含む単純な分散液もしくは溶液とすることができ、または、例えば血液およびその他の体液、組織ホモジネート、細胞

抽出物、もしくは生検サンプルなどのより複雑な溶液、および B L y S もしくは B L y S 様ポリペプチドを含有する細胞培養培地とすることができる。体液としては、限定はされないが、血清、血漿、リンパ液、血液、血液の画分、尿、滑液、髄液、唾液、および粘液が挙げられる。

【0163】

1 実施形態においては、本発明は溶液中の B L y S タンパク質および／もしくは B L y S 様ポリペプチドを検出するための方法を提供し、その方法は、溶液を本発明の B L y S 結合性ポリペプチドと接触させ、B L y S 結合性ポリペプチドに対する B L y S もしくは B L y S 様ポリペプチドの結合を検出することを含んでなるものである。B L y S 結合性ポリペプチドは遊離の状態とすることができ、または固定化された状態とすることもできる。好ましくは、B L y S 結合性ポリペプチドは固体表面もしくはクロマトグラフ材料、またはプラスチックのマイクロタイターアッセイディッシュのウェル上に固定化されたポリペプチドである。

10

【0164】

本発明の別の 1 実施形態は、B L y S タンパク質および／もしくは B L y S 様ポリペプチドを、それを含有する溶液から単離する方法であり、その方法は：

(a) その溶液を、B L y S および／もしくは B L y S 様ポリペプチドが B L y S 結合性ポリペプチドと結合しうる条件下で B L y S 結合性ポリペプチドと接触させ、

(b) B L y S および／もしくは B L y S 様ポリペプチドを回収する、ことを含んでなる。

20

【0165】

本発明のさらに別の 1 実施形態は、B L y S タンパク質および／もしくは B L y S 様ポリペプチドを、それを含有する溶液から単離する方法であり、その方法は：

(a) その溶液を、B L y S および／もしくは B L y S 様ポリペプチドが B L y S 結合性ポリペプチドと結合しうる条件下で B L y S 結合性ポリペプチドと接触させ、

(b) B L y S 結合性ポリペプチドと B L y S および／もしくは B L y S 様ポリペプチドとによって形成される複合体（単一もしくは複数）を溶液中の他の成分から分離する、ことを含んでなる。

【0166】

好ましくは、このような方法にはさらに次のステップをも含める：

30

(c) B L y S 結合性ポリペプチドを B L y S および／もしくは B L y S 様ポリペプチドから解離させ、そして

(d) 解離した B L y S および／もしくは B L y S 様ポリペプチドを回収する。

【0167】

本発明はまた、B L y S および／もしくは B L y S 様ポリペプチドを検出する方法、もしくは単離する方法で使用するための、本発明の結合性ポリペプチドを含むキットをも提供する。

【0168】

本発明に従えば、B L y S 標的タンパク質の検出もしくは単離は、B L y S 標的タンパク質を含有する溶液を B L y S 結合性ポリペプチドと接触させることを含んでなるものである。特定の適用の如何によって、B L y S 結合性ポリペプチドは溶液中に遊離の状態とすることができ、または固相支持体もしくはクロマトグラフ材料上に固定化された状態とすることができる。B L y S 標的タンパク質と結合性ポリペプチドとの間の結合が可能となるように十分な時間をかけ、溶液中もしくは混合物中の非結合性成分を除去もしくは洗い流す。次いで結合性ポリペプチドと B L y S 標的タンパク質との間の結合性複合体の形成の検出は、例えば結合性ポリペプチド上の標識（それは結合性複合体の 1 成分である）からのシグナルを検出することによって行うことができる。標識は標準的な方法によって検出しうるシグナルを生じるような標識であればいかなるものでもよく、そのようなものとしては、蛍光標識、放射性化合物、もしくは基質と反応して検出可能なシグナルを生ずる酵素などがある。そのような適切な標識については上述している。本発明のファージ結合

40

50

性ポリペプチド、すなわちその表面に B L y S 結合性ポリペプチドを展示している組換えファージは、B L y S および／もしくは B L y S 様ポリペプチドと複合体を形成することができ、その複合体は反応試験管中で沈殿物もしくは沈降物として検出でき、それは沈殿させた後もしくは遠心分離後に視覚的に検出しうる。あるいは、サンドイッチタイプのアッセイを用いることができ、そのアッセイでは B L y S 結合性ポリペプチドは固相支持体上、例えばプラスチック管もしくはウェルなどの上に固定化されるか、またはアガロースビーズなどのクロマトグラフ支持体マトリックス上に固定化され、次いで、B L y S 標的を含むと予想される溶液を固定化された結合性ポリペプチドと接触させ、非結合性物質もしくは成分を除去もしくは洗い流す。

【0169】

本発明の結合性ポリペプチドは、B L y S および／もしくは B L y S 様ポリペプチドの検出および／もしくは単離をアフィニティークロマトグラフィー法で行うのに特に有用である。従来法のカロマトグラフィーのいずれでも利用することができる。好ましくは、本発明の B L y S 結合性ポリペプチドは例えばクロマトグラフィーカラムにパッキングするのに適した固相支持体上に固定される。次いで固定化された B L y S 結合性ポリペプチド親和性リガンドを、結合性ポリペプチド／B L y S (もしくは B L y S 様ポリペプチド)複合体の形成に都合のよい条件下で、ローディングするか、もしくは供給流と接触させることができる。非結合性物質を洗い流すことができる。適切な洗浄条件の例は当業者であれば容易に定めることができ、そのような条件の例としては、限定はされないが、[P B S / 0.01% の T w e e n 20, pH 7.2] および [1 M N a C l / 10 m M T r i s, pH 7.5] が挙げられる。T r i s 洗浄バッファーがおそらく好ましいが、それはリン酸塩が 50% のエチレングリコール中で沈殿することができるからである。一般的には、限定するものではないが、洗浄バッファーは pH 7.0 であり、任意で 0.0 ~ 1.5 M の N a C l を含んでいるが、より好ましくは 1 M N a C l を含む。さらに、洗浄バッファーは任意で緩和な界面活性剤、例えば、T w e e n 20、T w e e n 80、もしくは N P - 80 などを含むことができる。B L y S もしくは B L y S 様ポリペプチドは B L y S 結合性ポリペプチドから、結合性複合体の解離に好都合な溶液条件を導入することによって溶出することができる。適切な溶出液は当業者であれば容易に定めることができ、そのような溶出液としては、限定はされないが、[50% のエチレングリコール / 100 m M N a O A c] が挙げられる。非限定的な例示としては、本発明の目的に 30

【0170】

あるいは、B L y S 標的を含む溶液と B L y S 結合性ポリペプチドとを混合し、次いで B L y S 標的と結合性ポリペプチドとの複合体を単離することによるバッチクロマトグラフィーを行うことができる。このタイプの分離を行うための多数の方法が知られている。例えば、結合性ポリペプチドをビーズなどの固相支持体上に固定化し、次いでろ過によって供給流から B L y S 標的とともに分離することができる。別の 1 例においては、B L y S 結合性ポリペプチドはそれ自体の親和性タグ、例えばポリ H i s テイルもしくはストレプトアビジン結合領域などで修飾し、それを用いて、固定化した金属アフィニティークロマトグラフ樹脂もしくはストレプトアビジンをコーティングした基質を用いて複合体を形成させた後、結合性ポリペプチドを単離することができる。分離後は、B L y S 標的を溶出条件下で結合性ポリペプチドから放出させ、精製された形態で回収することができる。

【0171】

B L y S もしくは B L y S 様ポリペプチドを生産する方法により、通常供給流中の B L y

10

20

30

40

50

SもしくはB L y S様ポリペプチドが得られるが、供給流にはさらに不純物（B L y S 標的との関係で）が含まれる。本発明の目的の1つは、B L y S結合性ポリペプチドおよびB L y S結合性ポリペプチドを含んでなる調製物（アフィニティークロマトグラフィー媒体もしくは表面など）を生産することであり、これらによって供給流からのB L y S 標的タンパク質の迅速で高度に特異的な精製が可能となる。本明細書の方法で得られたB L y S結合性ポリペプチドは、特定の供給流からB L y S 標的タンパク質を単離するために、当業界で公知の条件および技法を用いて、もしくは慣例的に改変して、容易に適合させることができる。B L y Sの別の代替生産方法を用いる場合には、同じレベルの精製を達成するために、異なる供給流を生産すること、B L y S結合性ポリペプチドおよび／もしくは条件の異なるセットが必要となる場合がある。B L y S結合性ポリペプチドおよび／もしくは条件の新たなセットは、本明細書に概説した方法に従って、もしくはそれを改変して、そうでなければ当業界で公知の方法によって、容易に得ることができる。

10

【0172】

キット

また本発明は、B L y Sの存在のスクリーニングおよび／または液体、例えば体液（例えば、血液、血清、もしくは滑液）中のB L y S濃度の定量に有用でありうるアッセイキットをも対象としたものである。

【0173】

本発明の特定の1実施形態においては、アッセイキットは、本発明のB L y S結合性ポリペプチドの1個以上の容器、および任意で、B L y S 標的／B L y S結合性ポリペプチド相互作用の存在もしくはその不在を測定するための検出手段を含んでなるものを意図している。キットはさらに任意で、例えば対照もしくは標準として用いることのできるB L y Sタンパク質を含んでいる。B L y S結合性ポリペプチドは、遊離の状態、または宿主細胞の表面もしくはバクテリオファージの表面上に発現させたものとすることができる。

20

【0174】

特定の1実施形態においては、B L y S結合性ポリペプチドもしくはB L y Sタンパク質のいずれかが標識される。本明細書でさらに述べるとおり、本発明には様々な標識を用いることができ、そのような標識としては限定はされないが、従来手段によって認識ユニットをビオチンヘコンジュゲートさせることが挙げられる。あるいは、標識は、例えば、発蛍光団（f l u o r o g e n）、酵素、エピトープ、色素原、もしくは放射性核種を含んでなるものとすることができる。好ましくは、ビオチンが共有結合でB L y S結合性ポリペプチドもしくはB L y Sタンパク質のいずれかにコンジュゲートされる。好ましくはB L y S結合性ポリペプチドは固相支持体上に固定化される。その標識を検出するために用いる検出手段は、標識の性質の如何によって変わり、当業界で公知のいかなる手段でもよく、例えば、放射性核種を検出するためのフィルム；酵素の存在を検出するための検出可能なシグナルを生ずる酵素基質；エピトープの存在を検出するための抗体、その他が挙げられる。

30

【0175】

B L y S結合性分子をスクリーニングするための方法

本発明はまた、B L y Sと結合するポリペプチドおよび非ポリペプチドを同定するためのスクリーニング方法、およびそれによって同定されたB L y S結合性分子をも包含する。

40

【0176】

この方法は下記のステップを含んでなる：

- (a) B L y Sタンパク質もしくはB L y S様タンパク質を複数の分子と接触させ；および
- (b) B L y Sタンパク質もしくはB L y S様タンパク質と結合する分子を同定する。

【0177】

B L y Sタンパク質もしくはB L y S様タンパク質を複数の分子と接触させるステップは多数の方法で行うことができる。たとえば、B L y Sタンパク質もしくはB L y S様タンパク質を固相支持体上に固定化し、複数の分子を含有する溶液をその固定化したB L y S

50

タンパク質もしくはB L y S様タンパク質と接触させることが考えられうる。このような方法はアフィニティークロマトグラフィー法と同種のものであり、その方法では親和性マトリックスは固定化されたB L y Sタンパク質もしくはB L y S様ポリペプチドを含んでなるものである。B L y Sタンパク質もしくはB L y S様ポリペプチドに対する選択的親和性を有する分子は親和性選択によって精製することができる。固相支持体の性質、B L y Sタンパク質もしくはB L y S様ポリペプチドの固相支持体への付着のプロセス、溶媒、および親和性による単離もしくは選択の条件は、大部分は従来から用いられてきたものであり、当業者には周知である。

【0178】

あるいは、複数の種類のポリペプチドを、ポリペプチドのサブセットもしくは個々のポリペプチドを含んでなる実質的な分離画分へと分離することもできる。例えば、複数の種類のポリペプチドを、ゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィー、もしくは当業者に公知のポリペプチドを分離するための類似の方法によって分離することができる。個々のポリペプチドはまた、形質転換した宿主細胞によってその外表面上もしくはその周辺で発現されるような方法（例えば、組換えファージ）で生産させることができる。次いで、個々の単離体をB L y Sタンパク質もしくはB L y S様ポリペプチドによって「プロービング」することができ、それは任意で発現に必要な誘導物質の存在下で行うことができ、それによってB L y Sタンパク質もしくはB L y S様タンパク質と個々のクローンとの間の選択的親和性相互作用が起こっていればそのことを測定できる。B L y Sタンパク質もしくはB L y S様タンパク質を、個々のポリペプチドを含んでなる各画分と接触させる前に、さらに都合よく行うためにそのポリペプチドをまず固相支持体に移すことができる。そのような固相支持体は、単にニトロセルロースもしくはナイロン製のものなどのフィルター膜の一片でよい。このようなやり方で、陽性のクローンを発現ライブラリーの形質転換された宿主細胞の集合から同定することができ、それはB L y Sタンパク質もしくはB L y S様タンパク質に対して選択的親和性を有するポリペプチドをコードするDNA構築物を持ったものである。さらに、B L y Sタンパク質もしくはB L y S様タンパク質に対して選択的親和性を有するポリペプチドのアミノ酸配列は従来の手段で直接的に決定することができる、または、該ポリペプチドをコードするDNAのコード配列はより都合よく決定することができる場合が多い。次いで、その一次配列を対応するDNA配列から推定することができる。アミノ酸配列がそのポリペプチド自体から決定されるものである場合には、マイクロシーケンシング（microsequencing）技法を用いることができる。そのシーケンシング技法には、質量分析が含まれうる。

【0179】

特定の状況下では、選択的親和性相互作用の存在を測定もしくは検出しようと試みる前に、結合してないB L y Sタンパク質もしくはB L y S様タンパク質、あるいは結合してないポリペプチドを、B L y Sタンパク質もしくはB L y S様タンパク質と複数の種類のポリペプチドとの混合物から洗い流すことが望ましいかもしれない。そのような洗浄ステップは、B L y Sタンパク質もしくはB L y S様タンパク質または複数の種類のポリペプチドが固相支持体に結合している場合には特に望ましい場合がある。

【0180】

この方法で提供される複数の分子は、種々のライブラリー、例えば、ランダムもしくはコンビナトリアルペプチドもしくは非ペプチドライブラリーなどによって提供され、それらのライブラリーをB L y Sと特異的に結合する分子についてスクリーニングすることができる。用いることができる当業界で公知の多数のライブラリーがあり、それらとしては例えば、化学合成ライブラリー、組換えライブラリー（例えば、ファージディスプレイライブラリー）、およびin vitroでの翻訳に基づくライブラリーが挙げられる。化学合成ライブラリーの例については、Fodorら、Science、251:767-773（1991）；Houghtenら、Nature、354:84-86（1991）；Lamら、Nature、354:82-84（1991）；Medynski、Bio/Technology、12:709-710（1994）；Ga

10

20

30

40

50

llopら, J. Medicinal Chemistry, 37(9):1233-1251(1994); Ohlmeyerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:10922-10926(1993); Erbら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:11422-11426(1994); Houghtenら, Biotechniques, 13:412(1992); Jayawickremeら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:1614-1618(1994); Salmonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11708-11712(1993); PCT公開第WO 93/20242号; ならびにBrennerおよびLerner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5381-5383(1992)中に述べられている。 10

【0181】

ファージディスプレイライブラリーの例は、ScottおよびSmith, Science, 249:386-390(1990); Devlinら, Science, 249:404-406(1990); Christianら, J. Mol. Biol., 227:711-718(1992); Lenstra, J. Immunol. Meth., 152:149-157(1992); Kayら, Gene, 128:59-65(1993); およびPCT国際公開第WO 94/18318号(1994年8月18日付)中に述べられている。

【0182】

in vitroでの翻訳に基づくライブラリーとしては、限定はされないが、PCT国際公開第WO 91/05058号(1991年4月18日付); およびMattheakisら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:9022-9026(1994)中に述べられているものが挙げられる。 20

【0183】

非ペプチドライブラリーの例としては、ベンゾジアゼピンライブラリー(例えば、Buninら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4708-4712(1994)を参照のこと)を適応して用いることができる。またペプチド(peptoid)ライブラリー(Simonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:9367-9371(1992)を参照のこと)も用いることができる。用いるライブラリーの別の例としては、ペプチド中のアミド官能基が過メチル化されて化学的に転換されたコンビナトリアルライブラリーを生成したものが挙げられ、それはOstreshら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:11138-11142(1994))によって述べられている。 30

【0184】

本発明に有用な非ペプチドライブラリーの多様性はきわめて大きい。例えば、EckerおよびCrookeは、Bio/Technology, 13:351-360(1995)で、種々のライブラリーの基本を成す化学種としてベンゾジアゼピン、ヒダントイン、ピペラジンジオン、ピフェニル、糖類似体、 β -メルカプトケトン、アリアル酢酸、アシルピペリシン、ベンゾピラン、クバン、キサントシン、アミンイミド、およびオキサゾロンを列挙している。 40

【0185】

非ペプチドライブラリーは、おおまかに2つのタイプ: 修飾されたモノマーおよびオリゴマーに分類することができる。修飾されたモノマーライブラリーは、比較的単純な骨格構造をとり、それに様々な官能基が付加される。その骨格は既知の有用な薬理活性を有する分子であることが多い。例えば、骨格はベンゾジアゼピン構造とすることができる。

【0186】

非ペプチドオリゴマーライブラリーは、モノマーの配列によって異なる新しい分子形状を創出するように集められた、多数のモノマーを利用する。用いられたモノマー単位には、カルバメート、ピロリノンおよびモルホリノがある。ペプチドは α 炭素ではなく α ミノ 50

基に側鎖が結合しているペプチド様オリゴマーであるが、これが非ペプチドオリゴマーライブラリーのもう1つのバージョンの基本となる。第1の非ペプチドオリゴマーライブラリーは1種類のモノマーを利用しており、したがって反復主鎖を含有した。最近のライブラリーは2種類以上のモノマーを使用するため、それによってライブラリーにさらに柔軟性が与えられる。

【0187】

ライブラリーのスクリーニングは、よく知られた様々な方法のいずれかによって達成することができる。例えば、下記の参考文献を参照されたい（ペプチドライブラリーのスクリーニングを公表している）：ParmleyおよびSmith, 1989, Adv. Exp. Med. Biol., 251:215-218; ScottおよびSmith, 1990, Science, 249:386-390; Fowlkesら、1992, Bio Techniques, 13:422-427; Oldenburgら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5393-5397; Yuら、1994, Cell, 76:933-945; Staudtら、1988, Science, 241:577-580; Bockら、1992, Nature, 355:564-566; Tuerkら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6988-6992; Ellingtonら、1992, Nature, 355:850-852; 米国特許第5,096,815号、米国特許第5,225,409号および米国特許第5,198,346号、いずれもLadnerら; RebarおよびPabo, 1993, Science, 263:671-673; およびPCT国際公開WO 94/18318。

【0188】

特定の実施形態において、BLySに結合する分子を同定するスクリーニングは、ライブラリーのメンバーを、固相に固定化されたBLySタンパク質またはBLyS様タンパク質と接触させることによって実施することができる。このようなスクリーニング法は、「パニング」法と称されるが、例えばParmleyおよびSmith, 1988, Gene, 73:305-318; Fowlkesら、1992, Bio Techniques, 13:422-427; PCT国際公開WO 94/18318; および本文に引用された参考文献に記載されている。

【0189】

別の実施形態では、酵母において相互作用タンパク質を選択する2ハイブリッド系（FieldsおよびSong, 1989, Nature, 340:245-246; Chienら、1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582）を用いて、BLySまたはBLyS様タンパク質に特異的に結合する分子を同定することができる。

【0190】

BLyS標的タンパク質と結合する能力をもつ新しい結合成分を得るための別のスクリーニング法は、競合アッセイを用いるものであるが、このアッセイではBLyS標的を本発明のBLyS結合性ポリペプチド（好ましくは、標識したもの）に結合させた後、この複合体を1以上の試験成分と接触させる。本明細書に開示された既知のBLyS結合性物質の存在下でBLyS標的との結合について効果的に拮抗することができる試験成分が、良好な新BLyS結合成分となるであろう。

【0191】

BLyS標的タンパク質と特異的に結合するポリペプチドは、好都合なことに、あらゆるペプチドライブラリーから選択することができる。こうしたライブラリーには、ランダムペプチドライブラリー、コンビナトリアルペプチドライブラリー、またはバイアスをかけたペプチドライブラリーがある。本明細書で使用される「バイアスをかけた」（biased）という用語は、ライブラリーを作製する方法を操作して、結果として得られる分子コレクション（この場合ペプチドであるが）の多様性を支配する1以上のパラメーターを制限することを意味する。

【0192】

したがって、真にランダムなペプチドライブラリーは、ペプチドの所定の位置に特定のアミノ酸を見いだす確率が20種のアミノ酸すべてについて同じであるようなペプチドコレクションをもたらすと考えられる。しかしながら、例えばリシンが5アミノ酸ごとに存在すること、あるいはデカペプチドライブラリーの4、8および9位がアルギニンのみを含むように確定すること、を特定することによって、ライブラリーにバイアスを導入することができる。安定なループ構造を示すように設計されたライブラリーに関しては、ペプチド配列は2つの不変のシステイン残基を包含するように設計され、他のすべてのアミノ酸位置はシステイン残基を除く1以上のアミノ酸残基とすることができる（後述の実施例1を参照されたい）。明らかに、様々なタイプのバイアスを考慮することができ、本発明はどのような特定のバイアスにも限定されない。さらに、本発明は、例えばファージディスプレイペプチドライブラリー、およびDNA挿入断片を保持するラムダファージベクターを含んでなるDNA構築物を利用したライブラリーといった、特定のタイプのペプチドライブラリーを包含する。

10

【0193】

前述のように、B L y S結合性分子がポリペプチドである場合には、このポリペプチドは約6から60個未満までのアミノ酸残基を有することができるが、約6から約10個までのアミノ酸残基が望ましく、最も望ましいのは約6から約22個までである。別の実施形態においては、B L y S結合性ポリペプチドは15～100個の範囲のアミノ酸を有し、または20～50個のアミノ酸を含有する。

20

【0194】

選択されたB L y S結合性ポリペプチドは、上記のように化学合成または組換え発現によって調製することができる。

【0195】

本明細書に開示した特定のB L y S結合性ポリペプチドは、特定のあらかじめ選択された結合特性を示すB L y S結合性ポリペプチドを同定するファージディスプレイ法によって単離された。これらのB L y S結合性ポリペプチドは、はじめに、9種のファージディスプレイライブラリー、すなわちファージ表面に外来組換えポリペプチドを発現するように形質転換された組換えバクテリオファージの集団、をスクリーニングすることによって単離された。B L y Sのような特定の標的に対する新規ポリペプチド結合部分を単離するために、例えばファージディスプレイ法を使用するといったペプチドライブラリーのスクリーニングは特に有利である。というのは、非常に数多く（例えば、 5×10^9 ）の結合可能性のある化合物を試験することができ、好結果の結合性物質を短時間で単離することができるためである。

30

【0196】

可能性のある結合性ポリペプチドのファージライブラリーを作製し、B L y S結合性ポリペプチドであるそのライブラリーのメンバーを求めてスクリーニングするために、ライブラリーで展示されるポリペプチドの構造鋳型として機能する候補結合ドメインを選択する。ファージライブラリーはこのような鋳型すなわち「親結合ドメイン」のポリペプチド類似体からなっている。親結合ドメインは、天然に存在するポリペプチド分子または合成のタンパク質もしくはポリペプチド、またはタンパク質のポリペプチド領域もしくはドメインである。親結合ドメインは、親結合ドメインと標的タンパク質との既知の相互作用に関する知見に基づいて選択することができるが、これは絶対に重要というわけではない。実際、親結合ドメインが標的に対して親和性を有することは不可欠ではない。なぜならば、非常に多数のポリペプチド類似体（「ライブラリー」）をそこから生じさせることができる構造を提供することを、目的としているためである。このポリペプチド類似体の多様性は、B L y S標的タンパク質に関して望ましい結合・放出特性（および選択された何か他の特性）を示す1以上の結合性ポリペプチドを包含すると考えられる。

40

【0197】

親結合ドメインとして機能する正確なポリペプチドに関する知見、または親結合ドメイン

50

が属するタンパク質またはドメインのクラスに関する知見は、B L y S 結合性タンパク質がB L y S 標的タンパク質と最適に結合する条件、ならびにB L y S 結合性ポリペプチドがB L y S 標的タンパク質を最適に放出する条件を決定するうえで有用であると考えられる。同様に、結合ドメインおよびB L y S 標的タンパク質間の既知の相互作用を考慮して、例えば結合および／または放出条件下で相互作用を助けるように、結合および／または放出条件を選択することができ、あるいは、そうした既知の相互作用を考慮することなく、選択することもできる。また、望ましい結合および／または放出条件を考慮に入れて親結合ドメインを選択することができるが、そうでない選択も可能である。ライブラリーの結合ドメイン類似体が、提案されたまたは所望の結合もしくは放出条件下で不安定ならば、有用な結合性ポリペプチドはまったく得られないことが理解されよう。

10

【0198】

親結合ドメインを選択するときに、最も重要な考慮すべき事項は、いかにしてその類似体ドメインをB L y S 標的タンパク質に提示するか、すなわち、どのような形でB L y S 標的とポリペプチド類似体を相互に接触させるか、である。好ましい実施形態においては、例えば、ポリペプチド類似体をコードする合成DNAを、M13ファージのような微生物の表面に該ドメインを展示させる複製可能な遺伝子パッケージに挿入することによって、ポリペプチド類似体を生成することができる。これに用いられる方法は、K a y ら、P h a g e D i s p l a y o f P e p t i d e s a n d P r o t e i n s : A L a b o r a t o r y M a n u a l (A c a d e m i c P r e s s , I n c . ; S a n D i e g o 1996) および米国特許第5, 223, 409号(L a d n e r ら)に記載され、参考として本明細書に含めるものとする。ファージディスプレイライブラリーを作製するために、構造化されていない直鎖状のペプチドではなく、親結合ドメインまたは鋳型として構造化されたポリペプチドを使用することが望ましい。タンパク質ドメインもしくはポリペプチド分子の表面残基の変異は通常、タンパク質の全体的な構造もしくは一般的な性質(例えば、大きさ、安定性および変性温度)にはほとんど影響がない;ところが同時に、表面残基の変異は分子の結合特性に大いに影響を及ぼす可能性がある。ポリペプチドセグメントがより強固に拘束されているほど、特定の標的と結合しにくくなる。しかしながら、結合しさえすれば、その結合はより強固で、より特異的となる可能性が高い。したがって、親ポリペプチドが構造化性を有するような親結合ドメインを選択することが望ましく、ひいては、ライブラリーのポリペプチド類似体のために、ある程度堅固なフレーム

20

30

【0199】

ドメイン類似体のライブラリーを作製するための鋳型または親ドメインとして使用されるタンパク質ドメインは、比較的小さなタンパク質またはポリペプチドからなるペプチド分子であることが望ましい。低分子量ポリペプチドは、高分子量タンパク質よりもいくつかの利点を提供する:第1に、結合部位当たりの質量が減少する。低分子量の非常に安定なタンパク質ドメイン、例えばK u n i t z ドメイン(〜7キロダルトン、k D a)、K a z a l ドメイン(〜7 k D a)、C u c u r b i d a m a x i m a トリプシンインヒビター(C M T I)ドメイン(〜3.5 k D a)、およびエンドセリン(〜2 k D a)は、抗体(150 k D a)または一本鎖s c F v 抗体(30 k D a)よりもはるかに高いグラム当たりの結合を示すと考えられる。第2に、非特異的結合に利用される分子表面が少ないため、非特異的結合が低下する。第3に、低分子量ポリペプチドは、もっと大きなタンパク質や抗体には実行不可能な方法で、独自の結合部位を有するように操作することができる。例えば、低分子量タンパク質およびポリペプチドは、クロマトグラフィーマトリックスへの連結に適した部位にだけリシンを有するように操作することができる。これは抗体には実行不可能である。第4に、拘束されたポリペプチドの構造は、あるフレームワークから別のフレームワークに移すときに(構造ドメインはそのまま)、その機能性を維持する可能性が高い。例えば、結合ドメイン構造は、ファージ上に展示されるような、ライブラリーでのディスプレイのために用いられるフレームワークから、該展示フレームワークから分離されたもしくはクロマトグラフィー基体に固定化された単離タンパク質へと

40

50

移し変えできる可能性が高い。

【0200】

特定の実施形態では、本発明のB L y S結合性ポリペプチドは固定化される。本発明のB L y S結合性ポリペプチド分子は、例えばクロマトグラフィーの支持体に固定化されて、有効なB L y S分離またはアフィニティークロマトグラフィー媒体を形成する。固定化された本発明のB L y S結合性ポリペプチドは、溶液からB L y S標的タンパク質を検出、単離または除去するという用途があるが、それらに限定されない。例えば、マトリックス、樹脂、または支持体に固定化できるB L y S結合性ポリペプチド分子を生成する1つの方法は、適当な結合ドメイン鑄型を選択することにより、クロマトグラフィー樹脂または基体にB L y S結合性ポリペプチドを共有結合させてアフィニティークロマトグラフィー樹脂を形成するために利用できる1個以上のアミノ酸を有するB L y S結合性ペプチド分子を生成させることを伴う。同様に、ペプチド分子のN-末端アミノ基またはC-末端カルボキシル基は、これを不活性にするキャッピング基、または支持体との結合を可能にする官能基を付加することによって修飾することができる。例えば、タンパク質ドメインのC-末端カルボキシル基は、アルデヒド官能性基体または他のアミン反応性基体と反応させるために、アミドまたはヒドラジド($-NH-NH_2$)基に変換することができる。この方法は好ましい。本発明のB L y S結合性ポリペプチド分子をクロマトグラフィー材料に結合するために有用な、B L y S結合性ポリペプチドのもう1つの好ましい修飾は、アミノ酸配列P r o - G l y - P r o - G l u - G l y - G l y - G l y - L y s (配列番号13)を含んでなる、もしくは同配列からなる、ポリペプチドリンカーである。

10

20

【0201】

本発明に含まれるB L y S結合性ポリペプチドを得るためのスクリーニング法の非限定的な例では、ファージディスプレイライブラリーにおけるファージは、固相支持体上に固定化されたB L y S標的タンパク質と接触させて、これと結合させることが可能である。非結合性ポリペプチドを展示するファージは、B L y S標的タンパク質と結合したファージから分離される。当技術分野で公知の様々な技法のいずれかを応用して、結合したファージを固定化B L y Sタンパク質から解離させて、さらにそのファージおよび／またはその核酸成分を回収し、かつ／または増幅することができる。こうした方法を用いて、集団の中でおよそ2千万に1つのB L y S結合性ファージを同定することができる。1～2千万またはそれ以上の可能性のある結合性ペプチド分子をそれぞれ展示するライブラリーは、高親和性B L y S結合性ポリペプチドを探しだすために迅速にスクリーニングされる。

30

【0202】

スクリーニングの回を重ねるごとに、有効な結合性ポリペプチドのみが残るまで集団の多様性が低下し、すなわちこのプロセスが収束する。一般的に、ファージディスプレイライブラリーは、いくつかの密接に関連した結合性ポリペプチド(1千万のうち、10～50の異なる結合性ポリペプチド)を含有するものである。収束の兆候には、密接に関連した配列の増大した結合性(ファージ力価で測定)および回収が含まれる。結合性ポリペプチド分子の最初の1セットが同定された後、その配列情報を利用して、例えばB L y Sの異なった型(例えばB L y Sの膜型および可溶性型)とその断片の識別、または供給流におけるB L y Sと、密接に関連した不純物との識別といった、さらに他に望ましい性質を有するメンバーに対してバイアスをかけた別のライブラリーを設計することができる。

40

【0203】

このような方法によって、多数の可能性のある結合性ポリペプチドをスクリーニングすることが可能になるばかりでなく、實際上、結合・溶出サイクルを反復し、特定の基準に合致したポリペプチド類似体を展示するファージをスクリーニングするための第2のバイアスをかけたライブラリーを構築することができる。上記の方法を用いて、バイアスのかかったポリペプチド類似体ライブラリーをスクリーニングし、スクリーニング条件下でB L y S標的タンパク質に対して強固に結合する、すなわち高い親和性を有するメンバーを明らかにすることができる。

【0204】

50

本発明において、標的 B L y S タンパク質分子はビオチン化後、ストレプトアビジンをコートした磁性粒子に結合させた。異なる設計の 9 種のファージディスプレイライブラリーを、固定化 B L y S と結合する能力についてスクリーニングした。各ライブラリーは、M 1 3 ファージが展示する、異なる長さ全体構造を有する多様性に富んだペプチドを特徴とした：T N 6 / 6 と称するライブラリー (2×10^8 変異体) は、ヘキサマーリング構造を形成するために内部に 2 つの不変システインを有する、多様性に富んだ 1 2 - m e r を展示した。T N 7 / 4 と称するライブラリー (2.3×10^9 変異体) は、ヘプタマーリング構造を形成するために内部に 2 つの不変システインを有する、多様性に富んだ 1 3 - m e r を展示した。T N 8 / 9 と称するライブラリー (5×10^9 変異体) は、オクタマーリング構造を形成するために内部に 2 つの不変システインを有する、多様性に富んだ 1 4 - m e r を展示した。T N 9 / 4 と称するライブラリー (3.2×10^9 変異体) は、ノナマーリング構造を形成するために内部に 2 つの不変システインを有する、多様性に富んだ 1 6 - m e r を展示した。T N 1 0 / 9 と称するライブラリー (2.5×10^9 変異体) は、デカマーリング構造を形成するために内部に 2 つの不変システインを有する、多様性に富んだ 1 6 - m e r を展示した。T N 1 2 / 1 と称するライブラリー (1.4×10^9 変異体) は、ドデカマーリング構造を形成するために内部に 2 つの不変システインを有する、多様性に富んだ 1 8 - m e r を展示した。約 2×10^8 の多様なアミノ酸配列を有する S u b s t r a t e P h a g e L i b r a r y # 2 と称するライブラリーは、1 3 の連続したアミノ酸からなる展示ポリペプチド内に直鎖状のペプチド多様化領域を含むように設計され、その展示ペプチド設計では、システイン以外のあらゆるアミノ酸残基を各位置に存在させた。最後に、それぞれ P h D 7 および P h D 1 2 という 2 つの市販の直鎖状ファージディスプレイライブラリーもスクリーニングした (N e w E n g l a n d B i o l a b s)。P h D 7 ライブラリーは直鎖状ランダム配列 7 - m e r を展示し、P h D 1 2 ライブラリーはランダム配列 1 2 - m e r を展示した。

10

20

30

40

50

【0205】

B L y S 結合性ファージを P h D 7 以外のすべてのファージから単離して集めた。

【0206】

ライブラリースクリーニングから単離した配列を分析した後、B L y S 結合性ペプチドのいくつかのファミリーが規定された (上記コンセンサス配列 A - G および H - L を参照されたい)。第 1 回スクリーニングから得た B L y S 結合性「ヒット」のアミノ酸配列を表 1 ~ 8 (下記) に示す。

【0207】

B L y S 標的に対してさらに一層高い親和性を有する B L y S 結合性ポリペプチドを得るために、P h D 1 2 ライブラリーの高親和性の多様な例を基をもとにして、特殊化したライブラリー、すなわち B L y S 親和性成熟ライブラリー、を作製した (実施例 6 参照)。このライブラリーは、B L y S に高い親和性を示す可能性の高いポリペプチドが多く含まれる集団を与えるように設計された。このようなライブラリーからの選択は、可溶性 B L y S の可溶性溶離液または他の B L y S 結合性ポリペプチドとの長期の競合によって、B L y S に対して最も高い親和性を有するポリペプチド以外のすべてを排除するように実施された。親和性成熟ライブラリーの 4 回のスクリーニングから、高親和性 B L y S 結合性ポリペプチドの大ファミリーが単離され、それらのアミノ酸配列を表 1 4 (下記) に示す。

【0208】

本発明の B L y S 結合性ポリペプチド、およびそのようなポリペプチドを含んでなるファージは、上記のように B L y S および B L y S 様ポリペプチドを検出し単離することを包含する用途を有するが、用途はこれに限定されない。

【0209】

本発明による B L y S 結合性ポリペプチドの単離およびその使用は、下記でさらに説明される。下記の実施例に含まれる特定のパラメーターは、発明の実施を説明することを意図したものであり、決して本発明の範囲を限定するために提示されるのではない。

【0210】

実施例1：ファージディスプレイライブラリーのスクリーニング

96ウェルプレートと比べて結合能が優れているため、スクリーニング時に標的を提示するために、ストレプトアビジンをコートした磁性ビーズ (Dynal M-280) を選択した。ビーズのビオチン化抗体に対する結合能は、製造業者が記載するとおりビーズmgあたり5~10 μ gであった。本研究および次のスクリーニングのために、ビーズ1mgあたり5 μ gのビオチン化組換えBLyS (Human Genome Science, Inc. より入手) が割り当てられた。このビオチン化BLySの量は、ビーズの飽和に関して、標的の10倍過剰に相当する。未結合のBLySを洗浄して除去した。Mab 16C9 (マウス抗BLyS、Human Genome Science) 一次抗体、および二次抗体としてヤギ抗マウスHRPコンジュゲートを用いて検出することによって、結合したビオチン化BLySを確認した。関連性のないモノクローナル抗体 (抗TNF α) を用いて、非特異的結合の対照とするため別の1セットのビーズを探索した。呈色試薬TMBを使用し、アッセイをOD 630 nmで読み取った。

10

【0211】

9種のライブラリー、TN6/6、TN7/4、TN8/9、TN9/4、TN10/9、TN12/1、Substrate Phage Library #2、PhD7、およびPhD12を、BLyS結合性物質を求めてスクリーニングした。これらのライブラリーの構成は下記の通りである：

TN6/6ファージディスプレイライブラリーは、Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (配列番号14) の構造を有するポリペプチド鋳型に基づいてループ構造を形成する可能性をもつ、多様性に富んだペプチドを展示する組換えM13ファージから構成され、 2.0×10^8 のペプチド多様性を提供した。

20

【0212】

TN7/4ファージディスプレイライブラリーは、Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (配列番号15) の構造を有するポリペプチド鋳型に基づいてループ構造を形成する可能性をもつ、多様性に富んだペプチドを展示する組換えM13ファージから構成され、 2.3×10^9 のペプチド多様性を提供した。

30

【0213】

TN8/9ファージディスプレイライブラリーは、Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (配列番号16) の構造を有するポリペプチド鋳型に基づいてループ構造を形成する可能性をもつ、多様性に富んだペプチドを展示する組換えM13ファージから構成され、 5×10^9 のペプチド多様性を提供した。

【0214】

TN9/4ファージディスプレイライブラリーは、Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (配列番号17) の構造を有するポリペプチド鋳型に基づいてループ構造を形成する可能性をもつ、多様性に富んだペプチドを展示する組換えM13ファージから構成され、 3.2×10^9 のペプチド多様性を提供した。

40

【0215】

TN10/9ファージディスプレイライブラリーは、Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (配列番号18) の構造を有するポリペプチド鋳型に基づいてループ構造を形成する可能性をもつ、多様性に富んだペプチドを展示する組換えM13ファージから構成され、 2.5×10^9 のペプチド多様性を提供した。

【0216】

TN12/1ファージディスプレイライブラリーは、Xaa-Xaa-Xaa-Cys-

50

X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a - X a a -
C y s - X a a - X a a - X a a (配列番号19)の構造を有するポリペプチド鑄型に基
づいてループ構造を形成する可能性をもつ、多様性に富んだペプチドを展示する組換えM
13ファージから構成され、 1.4×10^9 のペプチド多様性を提供した。

【0217】

S u b s t r a t e P h a g e L i b r a r y #2は、約80アミノ酸からなるポリ
ペプチド挿入断片を展示する組換えM13ファージから構成されるが、このポリペプチド
は2つのストレプトアビジン結合ドメイン、13アミノ酸からなる直鎖状の多様性に富ん
だセグメント(Cys以外のすべてのアミノ酸を各位置に配置することが可能である)、
およびXa因子切断部位を有し、これらはペプチドリンカーで連結された。このライブラ
リーは、 2×10^8 展示ポリペプチドの多様性を提供した。 10

【0218】

ライブラリーPhD7およびPhD12は、ランダム化された直鎖状7-および12-ア
ミノ酸ペプチドを展示する組換えM13ファージから構成されるが、これらは市販品をN
e w E n g l a n d B i o l a b sから購入した。

【0219】

各回のスクリーニングの前に、5等分したストレプトアビジンビーズにライブラリーを添
加して10分間結合させておくことによって、ファージライブラリーまたはファージライ
ブラリープールから、ストレプトアビジンビーズに結合可能なファージを枯渇させた。枯
渇させたライブラリーをストレプトアビジン磁気ビーズ上のビオチン化B L y Sに添加し 20
、室温で1時間結合させた。1回目のスクリーニングのために、最初からプールされてい
たPhD7およびPhD12以外のすべてのライブラリーは、別々にしておいた。結合後
、ビーズを7回洗浄し、結合しているファージをクエン酸緩衝溶液とともにpH2.0で
10分間インキュベートして、溶出した。溶出されたファージを2 M T r i s - H C l
pH 8.0で中和し、大腸菌X L - 1 B l u e M R F 'に感染させた。感染した細胞
を大きな寒天平板に塗布し、当技術分野で公知の標準的なファージ技法を用いて、次回の
出発材料を産生させた。スクリーニングの回ごとに、回収されたインプットの比率をそれ
ぞれのライブラリー(ライブラリープール)について算出した。これは、回収されたファ
ージ数を初発ファージ数で割ったものに等しい。インプットの回収率が全ファージの $1 \times$
 10^{-2} に達した後は、スクリーニングのそれ以上の回数を重ねなかった。2回目のスク 30
リーニングのためのプールAは、TN6/6、TN7/4およびTN8/9の1回目のア
ウトプットの混合物である。2回目のためのプールBは、TN9/4、TN10/9およ
びTN12/1の1回目のアウトプットの混合物である。プールAおよびプールBについ
ての2回目のスクリーニング後、インプットの回収率は 1×10^{-2} と同等またはそれよ
り大であったので、それ以上の回数を重ねなかった。S u b s t r a t e P h a g e L
i b r a r y #2およびPhDプールに関しては、3回目のスクリーニングが必要であ
った。

【0220】

スクリーニングの終わりに、それぞれのファージ分離株をランダムに選択して、E L I S
AによってB L y Sへの結合を調べた。同分離株をDNA配列解析に供し、展示されたペ 40
プチドのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を特定した。また、分離株は、C H O
上清およびS f 9上清(H u m a n G e n o m e S c i e n c e s , I n cから提供
された)の供給流中で組換えB L y Sと結合する能力についても調べた。

【0221】

各分離株は、標準E L I S A法によってB L y Sとの結合について調べたが、この場合、
結合ファージはモノクローナル抗ファージ抗体/HPRコンジュゲートを用いて検出した
。TNライブラリープールAおよびプールBから分離されたファージの約90%が、スト
レプトアビジン単独に対するバックグラウンド結合を超えて $3 \times$ から $12 \times$ までの範囲の
B L y Sに対する結合シグナルを有していた。S u b s t r a t e P h a g e L i b r
a r yからのファージ分離株は、同様であるがやや低い結合シグナルを示した。 50

【0222】

可能性のあるプロセス供給流において、B L y S 標的を認識する B L y S 結合性ポリペプチドの能力を評価するために、ファージの結合性を2つの供給流において測定した：B L y S を加えた C H O および S f 9 上清。標準条件である P B S + T w e e n ではなく C H O 上清または S f 9 上清のいずれかにおいて、ファージを B L y S と結合させた。他のすべての洗浄ステップは標準 E L I S A 条件と同様であった。P B S + T w e e n、C H O 上清、および S f 9 上清における B L y S 結合性ポリペプチドと B L y S との結合は、すべての条件下で極めて類似していた。いくつかの単離された B L y S 結合性ポリペプチドは C H O 上清において最大 50 % の結合低下を示した。S f 9 上清において B L y S と結合する単離された B L y S 結合性ポリペプチドは、標準条件下での結合と有意な差はなかった。P h D および S u b s t r a t e P h a g e L i b r a r y で単離されたペプチドも、供給流において比較した。注目すべきことに、こうした単離ペプチドのいくつかは標準条件よりも供給流においてより高い結合を示した。

【0223】

展示されたペプチドのアミノ酸配列は、ファージ分離株の D N A 挿入断片の配列決定から導かれた。ファージ分離株から得られた配列データはライブラリーごとにグループ分けし、類似性の程度によって分類された。B L y S 結合性ファージ分離株のペプチドを下記の表 1 ~ 8 に示す。これらのペプチドは、ファージディスプレイ融合 / ペプチドをコードする遺伝子の様々な領域にわたる D N A 配列の翻訳に相当する。

【0224】

【表 1】

表 1

TN6/6 ライブラリー-BLyS 結合性配列

ファージ分離株	アミノ酸配列	配列番号
453-01-B06	HLRCWSTNCRYD	20
453-01-A04	VMDCLINRCDTV	21

【0225】

【表 2】

表 2

TN7/4 ライブラリー-BLyS 結合性配列

ファージ分離株	アミノ酸配列	配列番号
453-01-B04	KSKCFFPWECQQA	22
453-01-D11	AMKCYFPWECANG	23
453-01-A05	NVACYFPWECCHP	24
453-01-D01	NAPCYFPWECFSI	25
453-01-D03	SVNCWFPWECVGN	26
453-01-A08	KEPCYFYWECAVS	27

【0226】

【表 3】

10

20

30

40

表 3

TN8/9 ライブラリー-BLyS 結合性配列

ファージ分離株	アミノ酸配列	配列番号
453-01-D04	DTNCDLLTKMCGPQ	28
453-01-C06	GTPCDLLTKLCLLW	29
453-01-D10	MSECDLLTKICLMG	30
453-01-B07	VPFCDLLTKHCFEA	31
453-01-B09	VPFCDLLTKHCFEA	32
453-01-C02	WSACDLLTKQCVQV	33
453-01-A06	-DGCDLTKICGMK	34
453-01-B03	KSWCDLTKVCFDP	35
453-01-B11	KWMCDLTKQCQYV	36
453-01-A02	MKYCDLTKICVGW	37
453-01-B05	YFQCDLTKMCWQK	38
453-01-A11	AMHCDKLTKHCKFH	39
453-01-A03	VPYCDLTKICQW-	40
453-01-A07	EVFCDVLTKVCFHD	41
453-01-C09	KPKCDVLTKMCDWL	42
453-01-B02	TQHCDVLTKQCFIT	43
453-01-C01	GHFCDRLTKYCFEP	44
453-01-A09	HIQCDRLTKSCLSV	45
453-01-D05	IKACDILTKVCWPP	46
453-01-A01	QFDCDPLTKYCGEF	47
453-01-C07	KMYCDHLTGycWPE	48
453-01-C11	MQSCDILTGycFKR	49
453-01-D12	GPWCDILTGFCIAQ	50
453-01-C04	SVRCDLLTGWCFVW	51
453-01-B10	PADCPLTNICFWK	52
453-01-D02	TNVCPLTNVCFMN	53
453-01-C05	EHWCDDLTHLCFRL	54
453-01-D08	GYWCDVLTNNCWKI	55
453-01-C10	LYNCDYLTRLCFEP	56
453-01-C08	HVDCLLHPKACYKY	57
453-01-D07	VQDCLLHPKACQMQ	58
453-01-D09	KFDCLLKPMFCSNH	59
453-01-C12	FADCLIHPKSKPL	60
453-01-D06	HGNCYPFPWECESK	61
453-01-B01	MIIVLLLLRFAISR	62
453-01-A12	SLLVIFLLIGAGSL	63

10

20

30

【 0 2 2 7 】

【 表 4 】

表 4

TN9/4 ライブラリー-BLyS 結合性配列

ファージ分離株	アミノ酸配列	配列番号
453-01-G06	FHPCDMLTGIWCQPN	64
453-01-H01	SKRCDLLTKMWCETE	65
453-01-F02	TKFCDRLTMPKCVWK	66
453-01-E03	NTFCPDPLTGRCVNP	67
453-01-E11	DWTCDFLFHRECIFE	68
453-01-H09	PQPCDLLFEKKCSIK	69
453-01-H02	RWHCDMLINPSCLPD	70
453-01-E04	KIQCDIVNLSSCVYP	71
453-01-G11	LNACDIVHPNYCSGM	72
453-01-F01	AKACDIVNLESCEYL	73
453-01-H06	RQACSIITPWGCPIP	74
453-01-F10	ADNCTVATLDFCYWT	75
453-01-E05	KPECNITKPQFCFGE	76

10

【 0 2 2 8 】

【 表 5 】

表 5

TN10/9 ライブラリー-BLyS 結合性配列

ファージ分離株	アミノ酸配列	配列番号
453-01-H07	-NNCQWDELTSMDPF	77
453-01-F05	SRLCHMDELTHVCVHF	78
453-01-F09	SRPCQIDELTKACFYN	79
453-01-G09	DRVCKLDFLTYNCLNH	80
453-01-F04	HSNCIMDLLTNRCFYD	81
453-01-H03	PFNCFHDPLTGLCLHS	82
453-01-F03	YDSCTYDRLTKQCYPS	83
453-01-F07	FHDCMYDALLGYCLPY	84
453-01-G08	NRSCDPLTRPKSCGL	85
453-01-G04	LSNCDWDDLIRQCLHD	86
453-01-E01	FWDCLFHPNSRYCVLS	87
453-01-E10	SRDCLLSPAMAWCGLD	88

20

30

【 0 2 2 9 】

【 表 6 】

表 6

TN12/1 ライブラリー-BLyS 結合性配列

ファージ分離株	アミノ酸配列	配列番号
453-01-H05	GGNCYTDSLTKLHFCMGD	89
453-01-H04	--MCPRDELTKAKLCNWH	90
453-01-G03	PNQCQDDLTQWYSCHYH	91
453-01-F11	FDMCFDALTKQNFYCRFH	92
453-01-F06	RNMCVDRLTKLQHGCEGA	93
453-01-G07	DPECLTSFDRLTKMCWPW	94
453-01-H11	DDECHYDYLTHYMRCDYR	95
453-01-G05	FGGCNIDLLTNTMMCHRN	96
453-01-G10	HGPCYWDELTMQWHCNHH	97
453-01-H12	GAMCVDLLTYTFRPCMYA	98
453-01-E07	SNKCWDELTHAWAECGRF	99
453-01-E09	RPVCYKGYDILTQCMPW	100
453-01-G01	PSRCWFDLLFNKFVCKRN	101
453-01-H08	RSGCVYDMLLMTMYCPSN	102
453-01-H10	SNRCEGDQLMRPPSCRHL	103
453-01-F08	YRMCWDDLLRGFVCDHF	104
453-01-E06	HDGCYDELLYRWTRCEHR	105
453-01-E08	WAWCFDELVQRYFTCFDH	106
453-01-E02	LPECRQYFPWEKQVCSYW	107

10

20

【 0 2 3 0 】

【 表 7 】

表 7

PhD 12 ライブラリー-BLyS 結合性配列

ファージ分離株	アミノ酸配列	配列番号
453-02-B05	VHYDSLTKMWTR	108
453-02-D09	FTDPLTKMSLHS	109
453-02-C12	GYDVLTKLYFVP	110
453-02-A05	YYDRLTKLYSSM	111
453-02-B06	L?KDPLTKLYIS	112
453-02-A04	GYDVLTKL?FVP	113
453-02-B03	RLYDPLTKLVLS	114
453-02-B01	MFDPLTKIAFPA	115
453-02-D04	FYDSLTKTNLRD	116
453-02-B02	GIYDKLTRAWLP	117
453-02-B08	KYDPLTRAR?PL	118
453-02-D06	YIDQLTRLSLPS	119
453-02-A09	HqTFDILTRLHF	120
453-02-B04	WQFDVLTRSWTP	121
453-02-A02	GAAYDHLTRTWL	122
453-02-D05	YFDQLTHLSIKK	123
453-02-A06	AWDPLTMLVLPW	124
453-02-D03	ALWMDPLTGAF	125
453-02-B12	WQFDVLT?SWTP	126
453-02-A01	WTDPLTHMEIYH	127
453-02-C04	WTDSLTGFWFPD	128
453-02-C05	YTDPLTGIV?PF	129
453-02-D08	YWDKLTMHLGV	130
453-02-D02	YYDFLTRTVLPS	131
453-02-A03	RLDPLSKNDFPR	132
453-02-A11	LRYPPLKKS?IY	133
453-02-D07	LRYPPLKSYIY	134
453-02-A07	YFDQFTHLSIKK	135
453-02-C08	YFDQ?THLSIKK	136

10

20

【 0 2 3 1 】

【 表 8 】

30

表 8

Substrate Phage Library BlyS 結合性配列

ファージ分離株	アミノ酸配列	配列番号
453-02-E04	EHYYTDPLTGARI	137
453-02-F01	EHY?TDPLTGARI	138
453-02-E09	EHYSTDPLTGARI	139
453-02-E07	EHYYTDPL?G?RI	140
453-02-G05	EHYYTDPL?G?R?	141
453-02-G09	EHYYTDPL?GAR?	142
453-02-E06	EH?YTDPLNGAR?	143
453-02-E05	EHYYNDPLNGAR?	144
453-02-F04	?H?YNDPLNGAR?	145
453-02-G07	KPYYPDITKMTTHH	146
453-02-F06	KPYYPDITKMSHH	147
453-02-E08	KPYYPDISKMTTHH	148
453-02-G08	KP??DPISKMTTHH	149
453-02-E01	QIGYDELTKAWVT	150
453-02-G02	QLGYDELTKAWVT	151
453-02-H06	KIDEL?MQNI I IW	152
453-02-F08	DHTDPLIQGLTKR	153
453-02-H01	WHDPLKMHMFHHE	154
453-02-F03	KHIDMETGLILQN	155
453-02-G03	MQVDPETGLKYEH	156
453-02-E03	?LDQHVN???YQS	157
453-02-F10	E???T??LTGAR?	158
453-02-F02	GPYNI?RL?GEr?	159
453-02-E02	HIKMLHQGSFVGV	160
453-02-H08	HPTNT??HQ?VYS	161
453-02-H05	HRGQV??LNGMv?	162

? = アミノ酸不明 (すべての表で)

小文字 = ほぼ同定されたアミノ酸であるが、完全には特定されていない

10

20

30

【0 2 3 2】

いくつかの基準に基づいて、さらに特徴を明らかにするために少数のファージ分離株を選択したが、その基準とは、E L I S A シグナルの強さ（すなわち、10分後に $OD_{630} \geq 0.8$ ）、同一の配列が発見される回数、および反復配列モチーフの存在である。選択されたファージ分離株の特徴の一部を下記に示す。分離株に何回も見いだされる配列モチーフに下線を付している。

【0 2 3 3】

ファージ分離株	# ELISA	シグナル	配列	配列番号
TN7-01-A08	1	1.2	KEPCYFYWECAVS	27
TN7-01-D11	2	1.0	AMKCYFPWECANG	23
TN7-01-B04	2	0.8	KSKCFFPWECQQA	22
TN8-01-C08	2	1.2	HVDCLLHPKACYKY	57
TN8-01-B07	2	1.4	VPFCDLLTKHCFEA	31
TN9-01-G06	1	1.2	FHPCDMLTGIWCQPN	64
TN9-01-G11	1	0.8	LNACDIVHPNYCSGM	72
TN10-01-F05	1	1.0	SRLCHMDELTHVCVHF	78
TN12-01-H05	1	1.0	GGNCYTDSLTKLHFCMGD	89
PhD-02-B02	4	0.6	GIYDKLTRAFLP	117
PhD-02-B05	9	0.6	VHYDSLTKMWTR	108
PhD-02-C12	3	0.8	GYDVLTKLYFVP	110
PhD-02-D05	3	0.8	YFDQLTHLSIKK	123
PhD-02-C04	1	1.0	WTDSLTGLWFPD	128

10

20

【0234】

B L y S 結合性ポリペプチドを B L y S 精製のための親和性リガンドとして利用できる、可能性のある溶出条件を見いだすために、様々な放出条件（下記参照）を調べた。放出研究のために、ストレプトアビジン上に固定化されたビオチン化 B L y S を含有するウェルに一定数のファージを加えた。ファージを結合させた後、それぞれのファージ分離株を次に、様々なバッファーを用いて5分間の洗浄を2回行うことによってウェルから「溶出」させた。ウェルを標準洗浄バッファーで洗浄し、結合したファージを標準的なファージ E L I S A で検出した。溶出条件は、低い pH での放出を基にして選択されたが、これはスクリーニング時に用いられた機序であり、さらに別の溶出条件が、B L y S 産物が少なくとも数時間は安定であることが分かっている条件に基づいて選択された。様々な溶出条件は、P B S pH 7.0、クエン酸緩衝溶液 pH 5.0、クエン酸緩衝溶液 pH 3.0、クエン酸緩衝溶液 pH 2.0、1 M グアニジン pH 7.0、および 1 M 尿素 pH 7.0 とした。ファージ分離株の一部の結合は標準条件下（P B S pH 7.0）で減少した。これは、これらの実験がそれ以前のすべての実験で用いられた細菌の一晩培養上清ではなく濃縮されたファージ調製物で行われたために生じたのかもしれない。ファージの濃縮に使用されるポリエチレングリコールは、こうした分離株の結合を妨げると考えられている。このような放出研究のために選択されたファージ分離株の最初のシグナルは、O D 630nm が 0.5 以上であった。全体として、結合しているファージを放出させるために 1 M 尿素 pH 7.0 が最適のバッファーであると思われた。

30

40

【0235】

実施例 2： B L y S 結合性ポリペプチドの S e p h a r o s e - 4 F F ビーズへの固定化

上記の結果に基づいて、6 種の展示ファージ配列を以後の研究のために選択した：

T N 7 - 0 1 - A 0 8 （配列番号 27）、T N 8 - 0 1 - B 0 7 （配列番号 31）、T N 1 0 - 0 1 - F 0 5 （配列番号 78）、T N 1 2 - 0 1 - H 0 5 （配列番号 89）、P h D - 0 2 - C 0 4 （配列番号 128）、および P h D - 0 2 - C 1 2 （配列番号 110）。適当な B L y S 親和性リガンドを開発するために、同定された展示ペプチドは、わずかな修飾を加えて、製造供給メーカーに注文して合成された：

ファージディスプレイ鑄型の多様性に富んだ領域に対応する配列の最初のアミノ酸に遊離

50

アミンが残されるのを避けるために、リーダーの2つのアミノ酸をそれぞれの結合性ペプチドのN末端に付加した；N末端をアセチル化して、ペプチドが当該位置を介してクロマトグラフィーマトリックスに固定化されるのを防止した；C末端リンカーを付加した（すなわち、-PGPEGGGK；配列番号13）；さらに、ペプチドに内在するすべてのリシンを次の基でブロックした：i v D d e（すなわち、1-（4，4-ジメチル-2，6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン）-3-メチルブチル-L-リシン）。この基は、合成し終わったペプチドでは完全な状態であるが、固定化もしくはフルオレセイン標識化後には除去される。別の修飾として、内部にリシンを有するペプチドはまた、C末端ヒドラジド官能基を付して合成したが、これは活性化アルデヒドクロマトグラフィー媒体に固定化可能である。

10

【0236】

ペプチドをリガンド濃度 $2 \mu\text{mol}/\text{ml}$ となるように NHS-活性化 Sepharose-4 Fast Flow アガロース媒体（Pharmacia）に固定化した。媒体上のペプチドの実際のリガンド濃度は $0.76 \mu\text{mol}/\text{ml}$ から $1.98 \mu\text{mol}/\text{ml}$ の範囲であったが、これは固定化されたペプチドのアミノ酸分析によって定量された。1つを除くすべてのペプチドが $100 \text{mM KH}_2\text{PO}_4 / 150 \text{mM NaCl} / 0.05\% \text{ Tween } 20$ 、pH 7.5 という水性条件で固定化された。溶解性の理由により、ペプチド DX217（下記表9を参照されたい）は、 $30\% \text{ ジメチルホルムアミド (DMF)} / 100 \text{mM KH}_2\text{PO}_4 / 150 \text{mM NaCl} / 0.05\% \text{ Tween } 20$ 、pH 7.5 中で固定化された。固定化反応は室温で2時間進行させ、次に pH 7.5 バッファーで短時間洗浄した。さらに Fast Flow Sepharose 媒体を室温で一晩攪拌しておき、残存する NHS エステルを加水分解した後、媒体を洗浄して未結合ペプチドをすべて除去した。2% ヒドラジン / DMF 溶液を用いて i v D d e-リシンを含有するリガンドを脱ブロックした。次に媒体を水性バッファーでさらに洗浄し、カラムに充填するまで 4°C で保存した。表9は、合成ペプチドの配列および測定されたアガロース媒体上のそれらの濃度を示す。

20

【0237】

【表9】

表9: 親和性リガンドとしての BLYS 結合性ポリペプチド			
ペプチド名	分離株源	配列 (可能性のあるジスルフィドループに下線)	配列番号
DX212	01-A08	Ac-AGKEPCYFYWECAVSGPGPEGGGK	163
DX214	01-B07	Ac-AGVPFCDLLTKHCFEAGPGPEGGGK	164
DX216	01-F-5	Ac-GSSRLCHMDELTHVCVHFAPPGPEGGGK	165
DX217	01-H05	Ac-GDGGNCYTDSLTKLHFCMGDEPGPEGGGK	166
DX219	02-C12	Ac-GYDVLTKLYFVPGGPGPEGGGK	167
DX221	02-C04	Ac-WTDSLTLGWFPDGGPGPEGGGK	168

30

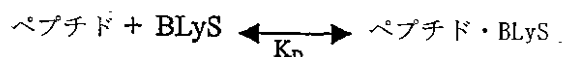
40

【0238】

BLYS-リガンド親和性の定量（方法の概略）

合成ペプチドと BLYS（溶液中、遊離）との間の解離定数を蛍光異方性（FA）によって測定した。この実験では、フルオレセイン標識ペプチドの濃度を一定に保ち、BLYS タンパク質濃度を変化させた。観察される異方性の変化を非線形回帰によって下記の方程式に当てはめて、見かけの K_D を得た。

【0239】



$$r_{obs} = r_{free} + (r_{bound} - r_{free}) \frac{(K_D + \text{BLyS} + P) - \sqrt{(K_D + \text{BLyS} + P)^2 - 4 \cdot \text{BLyS} \cdot P}}{2 \cdot P}$$

式において：

r_{obs} = 観察された異方性、 r_{free} = 遊離ペプチドの異方性、 r_{bound} = 結合ペプチドの異方性、 K_D = 解離定数、 BLyS = 全 BLyS 濃度、および P = 全フルオレセイン標識ペプチド濃度。 10

【0240】

ウェル当たり $10 \sim 20 \mu\text{l}$ の容量中に 50 nM フルオレセイン標識ペプチドおよび様々な濃度の BLyS を含有する結合反応を、 384 ウェルマイクロプレートで行った。反応は、Tecan Polarion 蛍光偏光プレートリーダーを用いてアッセイした。 $100 \mu\text{M}$ 非標識ペプチドの存在下および非存在下で、 50 nM フルオレセイン標識ペプチドおよび $1 \sim 2 \mu\text{M}$ BLyS を用いて、ペプチド間相互の競合に関する実験を行った。一次結合バッファー [15 mM クエン酸ナトリウム、 120 mM NaCl 、 0.01% Tween 20] を用いて $\text{pH} 6.0$ で、さらに 200 mM 炭酸水素ナトリウム、 125 mM 塩化ナトリウムを用いて $\text{pH} 9.0$ で、 K_D 測定値への pH の影響を検討した。 BLyS 結合性ポリペプチドの解離定数を測定した他のバッファーには下記がある：[$\text{pH} 6.0$ 、 0.01% Tween]、[$\text{pH} 6.0$ 、 0.1% ゼラチン]、[$\text{pH} 5.0$ 、 0.01% Tween]、[$\text{pH} 9.0$ 、 0.1% Tween]、[$\text{pH} 6.0$ 、 15% エチレングリコール、 0.01% Tween]、[$\text{pH} 5.0$ 、 15% エチレングリコール、 0.01% Tween]、および [$\text{pH} 9.0$ 、 15% エチレングリコール、 0.01% Tween]。6種のペプチドのすべて (DX212、DX214、DX216、DX217、DX219、およびDX221) がほぼ同等の親和性をもって溶液中の BLyS に結合した ($K_D = 0.4 \sim 3 \mu\text{M}$)。相互競合に関する実験は、すべてのペプチドが、 BLyS 結合性に対して互いに競合することを実証したが、これはすべてのペプチドが BLyS 上の同一部位に結合することを示唆する。 20 30

【0241】

実施例3： 固定化された BLyS 結合性ポリペプチドのクロマトグラフィーによるスクリーニング

6種のアフィニティー媒体のクロマトグラフィー性能を評価するために逆相分析アッセイを用いた。

【0242】

6種のアフィニティー媒体 (Sephacrose-4 Fast Flowに結合している BLyS 結合性ポリペプチド) および対照カラム (加水分解 $\text{NH}_4\text{S}-\text{Sephacrose-4 Fast Flow}$) を $3 \times 50 \text{ mm}$ ガラス製 Omnitrap カラム ($350 \mu\text{l}$) に充填した。すべてのカラムは、Watson/Marlow 101 ru ペリスタル型ポンプを用いて、 $200 \mu\text{l}/\text{min}$ ($170 \text{ cm}/\text{hr}$) で試験した。このような構成装置は、制約なしに、数多くの洗浄、タンパク質および溶出の条件を使用することを可能にした。検出は、Waters Millennium ワークステーションに接続した Waters 2487 UV/VIS 検出器を用いて、 214 nm および 280 nm で行った。 40

【0243】

$\text{PBS}/0.01\%$ Tween 20, $\text{pH} 7.2$ 中 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製 BLyS を用いた初期スクリーニングでは、対照カラムの素通り画分で 65% の回収率を示した (合計で 1 ml , $30 \mu\text{g}$)。しかしながら、同様に実験した場合、すべてのカラムが溶液から定量的に BLyS を結合したが、タンパク質を放出しないことが直ちに判明した。そ 50

ここで、考えられうる多数の溶出条件で試験し、B L y Sの放出を214 nmおよび280 nmでモニターした。UV吸収に基づいてB L y Sの溶出が予想される画分を集め、確認のため逆相クロマトグラフィーで分析した。試験した条件を表10（下記）に示す。

【0244】

【表10】

表 10: クロマトグラフィー溶出条件、B L y S アフィニティー媒体			
カオトロピック塩	他の塩および pH	他のバッファーおよび pH	有機溶媒
1M 尿素, pH 7	1M NaCl, pH 7 および 5	30 mM H ₃ PO ₄ , pH 2	50% エチレングリコール, pH 4
2M 尿素	2M NaCl, pH 7 および 5	200 mM NaCO ₃ , pH 10	50% エチレングリコール, pH 7
4M 尿素, pH 7	2M MgCl ₂ , pH 7.6	50-100 mM NaOAc, pH 5	20% エタノール
2M グアニジン, pH 7	2M CaCl ₂ , pH 6	2M イミダゾール, pH 6	50% エタノール
	1M クエン酸, pH 6	0.6M ヒスチジン, pH 6	18% プタノール
		1M アルギニン, pH 6	30% グリセロール
		100 mM EGTA, EDTA	
		1M ソルビトール, pH 7	

10

【0245】

DX214、DX216、DX217、DX219、およびDX221アフィニティー媒体で作られたカラムは、pH 2のバッファー（30 mM H₃PO₄ / 150 mM NaCl, pH 2）の存在下でB L y Sを放出するにすぎない。これらのカラムからの回収率は30%から65%であった。これに対して、DX212アフィニティー媒体は、50%エチレングリコール、pH 4（50%エチレングリコール / 100 mM 酢酸ナトリウム、pH 4）を用いた、または50%エチレングリコール、pH 5（50%エチレングリコール / 100 mM 酢酸ナトリウム、pH 5）を用いた溶出で、良好な回収率でB L y Sを放出した。

20

【0246】

溶出条件がB L y Sを天然の三量体型に維持することに有効であるかどうかを判定するために、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を用いて、天然のB L y S、ならびにpH 2および50%エチレングリコール / 100 mM 酢酸ナトリウム、pH 5の両方に曝したB L y Sをアッセイした。pH 2でのインキュベーション後のB L y SのSEC分析から、2つの新ピークの存在が明らかになったが、これらのサイズは見かけ上の多量体および単量体型に相当し、天然型の三量体の証拠はなかった。50%エチレングリコール中でのインキュベーションの結果は、16%の多量体であったが、そのほかは三量体を維持した。50%エチレングリコール（pH 5.0）でDX212カラムから溶出された物質に関するその後のSECの結果は、多量体を示さなかった。

30

【0247】

実施例4： 細胞培養上清からのB L y Sの捕捉

細胞培養上清からB L y Sを精製するDX212、DX219、およびDX214アフィニティーカラムの能力を調べた。CHOおよびSf9細胞系由来の凍結融解細胞培養上清にB L y Sを約40 μg / mlスパイクした。およそ100 μgのB L y S（合計2.5 ml）を各カラムにローディングした。Sf9素通りサンプル中のB L y Sレベルは逆相HPLCアッセイで検出できなかった。溶出バッファー [50%エチレングリコール、100 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.0] でB L y Sを溶出した。この実験から得られたB L y Sタンパク質の回収率は、29.4%から完全回収までの範囲であり、純度は76%から96.5%の間であった。

40

【0248】

実施例5： 他のB L y S結合性ペプチドの合成

ひとたび有望なB L y S結合性ポリペプチドが単離されたならば、1個または数個のアミ

50

ノ酸残基を置換させ、付加し、あるいはポリペプチドから欠失することによって、そのペプチドの改良を行うことができる。アミノ酸置換は保存的または非保存的とすることができる。保存的アミノ酸置換には、例えば、芳香族残基（例えば、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシン）を相互に置換、疎水性残基（例えば、ロイシン、イソロイシンおよびバリン）を相互に置換、極性残基（例えばグルタミンおよびアスパラギン）を相互に置換、酸性残基（例えばアルギニン、リシンおよびヒスチジン）を相互に置換、および小残基（例えばアラニン、セリン、スレオニン、メチオニンおよびグリシン）を相互に置換することが挙げられる。さらに、非古典的アミノ酸、化学的アミノ酸類似体、または化学修飾した古典的アミノ酸を、置換または付加として本発明の B L y S 結合性ポリペプチドに導入することができる。非古典的アミノ酸には、通常のアミノ酸の D-異性体、2, 4-ジアミノ酪酸 (D b u)、4-アミノ酪酸 (b A b u)、2-アミノ酪酸 (A b u)、6-アミノヘキサン酸 (イプシロン-A h x)、2-アミノイソ酪酸 (A i b)、3-アミノイソ酪酸 (b A i b)、3-アミノプロパン酸 (b A l a)、オルニチン (O r n)、ノルロイシン (N l e)、ノルバリン (N v a)、3-ヒドロキシプロリン (3 H y p)、4-ヒドロキシプロリン (4 H y p)、サルコシン (M e G l y)、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、フルオロアミノ酸、デザイナーアミノ酸（例えばβ-メチルアミノ酸、Cα-メチルアミノ酸、Nα-メチルアミノ酸）、および一般にアミノ酸類似体があるが、それに限定されない。一例として、D X 2 1 2 の配列を基にして4つの修飾ペプチドを設計した：

10

20

1. A c - A G K (A c) E P C Y F Y W E C A V S G P G P E G G G K (配列番号 1 6 9) — 内部リシン側鎖のアセチル化；
2. A c - A G R E P C Y F Y W E C A V S G P G P E G G G K (配列番号 1 7 0) — アルギニン置換；
3. A c - A G Q E P C Y F Y W E C A V S G P G P E G G G K (配列番号 1 7 1) — グルタミン置換；
4. A c - A G N l e E P C Y F Y W E C A V S G P G P E G G G K (配列番号 1 7 2) — ノルロイシン置換。

【0249】

実施例 6： B L y S 結合性ポリペプチドの親和性成熟

30

高親和性の B L y S 結合性ポリペプチドを同定するために、14 残基のうち 5 カ所に一定のアミノ酸残基を有する 14-mer 直鎖状ペプチド鑄型配列を中心として、B L y S 親和性成熟ライブラリー (B L y S A f f i n i t y M a t u r a t i o n L i b r a r y : B A M L) を設計した。不変の 5 残基のうち 3 残基は、拘束されたペプチドライブラリーおよび直鎖状ペプチドライブラリーの両方から単離された高度に保存された D x L T テトラペプチドアミノ酸モチーフ (配列番号 4 4 6) に相当する。この 14-mer の設計は、残りの 9 位置のそれぞれでアミノ酸の変更を可能としたが、これらの位置のそれぞれで特定のアミノ酸が優先して選択された。新たに単離されたペプチドの B L y S に対する結合親和性の分析を、直接および間接ファージ E L I S A ならびに蛍光異方性によって評価した。

40

【0250】

B A M L は、1 位 (A l a)、5 位 (A s p)、7 位 (L e u)、8 位 (T h r) および 10 位 (L e u) に確定された残基を有する 14-mer 直鎖状 (拘束されない) 鑄型ペプチド配列に基づいて設計された。B A M L 鑄型における 3~14 位のアミノ酸配列は、P h D 1 2 直鎖状ポリペプチドライブラリーから単離された結合性ポリペプチドに最もよく類似している (上記表 7 を参照されたい)。1 位の残基 (A l a に確定) および 2 位の残基 (可変) は、B L y S 結合性配列の長さおよび提示を延長するために含められた。5~8 位は拘束されたペプチドライブラリーおよび直鎖状ペプチドライブラリーの両方から単離されたペプチドに見いだされる D x L T モチーフに相当する (上記表 1~8 を参照されたい)。疎水性アミノ酸 (L, M, I, A および G) がもとの単離ペプチドの 8

50

5 %で10位に見いだされたので、単離ペプチドの42 %に存在するLeu残基をBAML鑄型ペプチドのその位置に定めた。

【0251】

表11は14-mer BAML鑄型配列の設計を示す。

【0252】

【表11】

表 11: BAML 鑄型配列 (14-mer)														
アミノ酸位置														配列番号
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	n	w	y	D	s	L	T	k	L	w	l	p	d	184

10

【0253】

表11を参照すると、大文字は鑄型の1, 5, 7, 8, および10位の特定された残基を示す。小文字は、その位置に望ましいアミノ酸を示すが、14-merをコードする多様性に富んだDNA鑄型の設計は、これらの位置でいくつかの配列変化を可能にする。

【0254】

表12はBAMLペプチドを生成させるために用いられる多様性に富んだDNA鑄型の設計を示す。

20

【0255】

【表12】

表 12: BAML DNA 鑄型配列 (14-mer)														
コドン位置														
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
コドン*														
GCT	eez	zjj	zez	GAT	zqz	CTT	ACT	eej	CTC	zjj	qzz	qqz	jez	

* コドンの配列は配列番号185である。

30

【0256】

表12を参照すると、BAML 14-mer鑄型において確定されているアミノ酸に対するヌクレオチドコード配列は大文字で示す。多様性に富んだDNA鑄型における「e」、「j」、「q」および「z」の文字は、それぞれ、各位置に対するインプットdNTP中に存在するヌクレオシド塩基の特定の混合物を表す：

j = 79 % グアニン、7 % シトシン、7 % アデニン、7 % チミン

q = 7 % グアニン、79 % シトシン、7 % アデニン、7 % チミン

e = 7 % グアニン、7 % シトシン、79 % アデニン、7 % チミン

z = 7 % グアニン、7 % シトシン、7 % アデニン、79 % チミン

40

このDNA鑄型のコドンは、配列番号184に示す各位置で、コードされる変更可能なアミノ酸を望ましいアミノ酸に変えるように設計された(表11、小文字)。ファージ分離株を後で配列決定すると、どの特定位置でも、望ましい残基が44 %から70 %の頻度で存在することが分かった。

【0257】

DNA鑄型に適合する合成DNA配列を大規模PCRで増幅した。増幅されたDNAはM13ファージ発現ベクター(MANPベクター、Dyax Corp., Cambridge, MA)に挿入するために制限酵素で消化し、この挿入断片を有するベクターを用いてエレクトロポレーションによってM13ファージを形質転換し、BAMLを作製した。組換えファージを集め、PEG沈澱によって精製し、力価を測定した。BAMLにおい

50

て 1.6×10^9 形質転換体から、全体で 3.2×10^{13} PFU が増幅された。

【0258】

BAML のスクリーニング

表 13 に概略したように、元の BAML ライブラリーから始める 2 段階競合法を用いて、4 回のスクリーニングを行い、最も親和性の高い BLyS 結合性ポリペプチドを BAML から単離した。スクリーニングの前に、増幅した BAML を Seradyn ストレプトアビジンコート磁気ビーズ (MG-SA, Seradyn, Indianapolis, IN) と接触させて、ビーズ結合性ファージおよびストレプトアビジン結合性ファージを除去した。

【0259】

BAML をスクリーニングするために、ファージを、 $200 \mu\text{l}$ PBS, pH 7.4, Tween-20 (0.1%) 中にビオチン化 BLyS (b-BLyS) を含む溶液中でインキュベートし、ファージ/b-BLyS 結合複合体を作製した。第 1 の競合ステップで、非標識 BLyS ($1 \sim 2 \mu\text{M}$) を溶液中のファージ/b-BLyS 結合複合体混合物に添加し、 $1 \sim 20$ 時間インキュベートした (表 13 参照)。非標識 BLyS とインキュベートした後に溶液中に残存するファージ/b-BLyS 複合体を短時間 (回転装置上で 10 分) の MG-SA ストレプトアビジンビーズ ($50 \mu\text{l}$) とのインキュベーションによって捕捉した。ストレプトアビジンビーズ上にファージ/b-BLyS 複合体を捕捉した後、結合していない画分を除去し、ビーズを 1 ml PBS-Tween 20 で $15 \sim 20$ 回洗浄した後、第 2 の競合ステップを行った。1 回目の競合ステップから得られたファージ/非標識 BLyS 複合体のみを集め、ビーズに捕捉されたファージ/b-BLyS 複合体とともに 2 回目のスクリーニングのためのインプットファージ画分として用いたが、その後の各回のスクリーニングにおいては、さらなるスクリーニングのために第 1 競合ステップの後、ビーズに結合したファージのみを集め、ファージ/非標識 BLyS 複合体は廃棄した。

【0260】

第 2 競合ステップに関しては、競合ペプチドは上記の初期スクリーニングで PhD 12 ライブラリーから単離された BLyS 結合性ポリペプチドに基づいたポリペプチド (DX 221; 配列番号 168) とした。第 1 競合インキュベーションステップ後に集められた、ストレプトアビジンに結合しているファージ/b-BLyS 複合体を、 $300 \mu\text{l}$ PBS-Tween-20 (0.1%) 中の $50 \mu\text{M}$ DX 221 BLyS 結合性ポリペプチド ($K_D = 3 \mu\text{M}$) の溶液で連続的に希釈した。DX 221 とともにファージ/b-BLyS 複合体の一連の短時間インキュベーション (1 回のスクリーニング当たり $3 \sim 4$ 、1 時間) を行った後、一晚 (O/N) (1、2 および 4 回目) から 3 日間 (3 回目) の最後のインキュベーションを行った (表 13)。4 回目の第 2 競合ステップでは、DX 221 とのインキュベーションの前に 67 nM BLyS との 1 時間のインキュベーションを行った。4 回目で DX 221 競合ステップ後に残存するストレプトアビジンビーズに結合したファージ/b-BLyS 結合複合体をさらに分析するために集めた。

【0261】

【表 13】

表 13: BLyS 親和性成熟ライブラリー (BAML) スクリーニング条件

スクリーニング の回	インプット ファージ ¹	b-BLyS ²	第1親合 インキュ ベーション 時間(時間)	競合物質 (BLyS)	第2親合 インキュ ベーション 時間(時間)	ペプチド溶出
1	1.5x10 ¹¹	100nM	2	2μM	1	50 μM DXZ21, 4 × 1hr, その後 O/N
2	2x10 ¹⁰	100nM	1	1μM	20	50 μM DXZ21, 3 × 1hr, その後 O/N
3	6.5x10 ¹⁰	100pM	16	1μM	3	50 μM DXZ21, 4 × 1hr, その後 3 日間
4	6.0x10 ¹⁰	10pM	16	1μM	2	67 nM BLyS, 1hr; 50 μM DXZ21 + 67 nM BLyS 3 × 1hr, O/N, その後さらに 4hrs

- 1 1 回目のためのインプットファージは元の BAML とした;
2 回目のために、一晚 (最終) ペプチド溶出液からのアウトプットファージ
および 1 回目からのビーズ結合ファージを増幅した;
3 回目のために、2 回目からのビーズに結合したアウトプットファージを増幅した;
4 回目のために、3 回目からのビーズに結合したアウトプットファージを増幅した。
すべての増幅ファージサンプルは、溶液中でビオチン-BLyS とともに
インキュベートする前に、ストレプトアビジンビーズ上で前処理した。
- 2 b-BLyS = ビオチン化 BLyS

10

【0262】

ELISA 分析

2、3 および 4 回目の上記スクリーニングから得られた約 400 の BAML 分離株を直接
および間接ファージ ELISA アッセイによって分析した。

【0263】

間接ファージ ELISA については、Immulon-2HB プレート (Dynex Technologies, Inc., Chantilly, VA) を、PBS で希釈
した 1 μg/ml Immunopure ストレプトアビジン (Pierce, Rockford, IL) 100 μl でコートした。連続 10 倍希釈した b-BLyS (0 ~ 0
・ 1 μg/ml PBS 溶液) 100 μl をストレプトアビジンでコートしたウェルに固
定化した (37 °C、1 時間)。洗浄後、個々のファージプラークを感染させた大腸菌の 1
~ 25 μl の一晚培養物を適当なウェルに加え、1 時間インキュベートし、続いて PBS
- Tween-20 で 10 回洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼと結合した抗 M13
抗体 (PBS - Tween-20 中に 1 : 10, 000) をウェルに添加し (室温、30
分)、呈色試薬 TMB を使用して、プレートを OD 630 nm で読み取った。

20

30

【0264】

固定化された BLyS に結合している個々のファージ分離株は、配列を決定し、その配列
を分析した。BAML BLyS 結合性 14-mer 展示ペプチドのユニーク配列を表 1
4 に示す。

【0265】

ペプチドの分析は、1 つのモチーフ: W₃ Y D P L T K L W L₁₂ (配列番号 436) (下付添え字は 14-mer 展示ペプチド配列におけるアミノ酸位置を示す) の前後に、有
意な配列「崩壊」(collapse)を示す。この最も多数のコアモチーフは、元の B
AML 鋳型に由来する 4 つの確定された残基、すなわち 5 位の A s p (D)、7 位の L e
u (L)、8 位の T h r (T)、および 10 位の L e u (L)、を含む。さらに元の B A
M L 鋳型配列に由来する 6 個の望ましい残基のうち 5 個がこのモチーフに含まれていた (表 11 参照)。

40

【0266】

4 回目の分離株の 73% (197 のうち 143) がこのコアモチーフ (配列番号 436)
を含んでいた。10-mer コアモチーフ内の単一残基の置換が 4 位 (Y → F) と 12 位
(L → F、I、または V) に集中し、12 位の置換は L e u に代わる疎水性残基であった
。

【0267】

残りの変更可能な 3 カ所の残基について (すなわち 2、13 および 14)、選択はそれほ
ど厳密なものではなかったが、ある程度の優先性は明らかで、ライブラリーに組み込まれ

50

ているか、選択の回を重ねても存続しているかのいずれかである。例えば、4回目の分離株において、51%が2位にA s nを含み、77%が13位にP r oを含み、さらに32%が14位にA s pを含んでいた。14位におけるV a l (27%)またはG l u (19%)の存在は、B A M Lの14位でのこれらの理論的な割合(それぞれ4%)と比較して、4回目の分離株ではもっとも高度に選択されたものに入る。

【0268】

表14の配列は、コア配列(配列番号436)からの相違の程度にしたがってグループ分けされている。

【0269】

【表14】

表 14: BAML ファージ分離株の配列 (2, 3, 4 回目より)														
14-mer アミノ酸位置														配列番号
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	n	w	y	D	s	L	T	k	L	w	l	p	d	コンセンサス ; 184
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	187
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	G	188
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	189
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	S	D	190
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	N	D	191
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	T	192
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	193
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	N	194
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	V	D	195
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	D	196
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	D	197
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	H	198
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	V	199
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	D	200
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	E	201
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	E	202
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	R	203
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	A	D	204
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Y	205
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	I	206
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	I	D	207
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	D	208
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	209
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	E	210
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	V	211
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	212
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	213
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	Q	214
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	215
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	V	216
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	G	217
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	Y	218
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Y	219
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	Y	220
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	D	221
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	222
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	G	223
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	H	224
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	T	225
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	V	226
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	Y	Y	227
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	S	D	228
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	229
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	D	230
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	G	231

10

20

30

40

A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Q	232
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Y	233
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	H	234
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	235
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	I	236
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	237
A	F	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	V	238
A	F	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	239
A	F	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	E	240
A	F	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	241
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	242
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	243
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	D	244
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	D	245
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	F	246
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	D	247
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	R	248
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	249
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	A	250
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	A	V	251
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	G	252
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	V	253
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	H	254
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	E	255
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	S	D	256
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	257
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	A	D	258
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	S	259
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	G	260
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Y	261
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	S	G	262
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	263
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	264
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	265
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	K	266
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	267
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	268
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	Q	269
A	E	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	D	270
A	E	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	271
A	E	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Y	272
A	L	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	273
A	L	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	274
A	L	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	G	275
A	L	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	G	276
A	M	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	277
A	M	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	Q	V	278
A	M	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	G	279
A	A	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	280
A	A	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	A	D	281
A	A	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	D	282

10

20

30

40

A	H	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	D	283
A	H	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	284
A	H	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	D	285
A	H	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	286
A	P	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	D	287
A	P	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	288
A	Q	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	289
A	Q	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Y	290
A	Q	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	R	291
A	K	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	292
A	K	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	293
A	K	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	294
A	K	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	N	G	295
A	W	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	296
A	V	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	D	297
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	Y	E	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	Y	298
A	T	K	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	299
A	T	L	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	G	300
A	I	R	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Y	301
A	E	R	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	H	302
A	D	R	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Q	303
A	N	S	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	304
A	I	L	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	305
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Q	306
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	307
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	T	D	308
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	309
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	G	310
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	311
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	312
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	N	313
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	S	E	314
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	H	D	315
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	V	D	316
A	Y	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	317
A	Y	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	318
A	Y	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	319
A	Q	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	320
A	H	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	321
A	T	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	322
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	Y	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	V	323
A	Y	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	H	D	324

10

20

30

40

A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	I	P	D	325
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	V	326
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	D	327
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	A	D	328
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	A	329
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	Y	E	330
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	G	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	D	331
A	V	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	T	D	332
A	N	W	Y	D	A	L	T	K	L	W	L	P	V	333
A	Y	W	Y	D	T	L	T	K	L	W	L	P	N	334
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	F	W	Y	D	P	L	T	N	L	W	L	L	E	335
A	Y	W	Y	D	P	L	T	G	L	W	L	L	V	336
A	Y	W	Y	D	P	L	T	G	L	W	L	L	Y	337
A	Y	W	Y	D	P	L	T	G	L	W	L	R	V	338
A	Y	W	Y	D	P	L	T	E	L	W	L	R	L	339
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	M	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	L	P	D	340
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	L	L	V	341
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	L	T	V	342
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	L	L	V	343
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	L	L	L	344
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	R	L	L	E	345
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	R	L	L	V	346
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	R	L	I	V	347
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	Y	L	P	D	348
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	G	L	L	V	349
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	T	L	L	V	350
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	L	L	P	N	351
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	352
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	353
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	S	D	354
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	V	355
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	V	356
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	K	357
A	K	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	358
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	L	E	359
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	A	360
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	361
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	E	362
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	363

10

20

30

40

A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	G	364
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	H	365
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	V	366
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	367
A	G	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	368
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	T	369
A	K	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	A	370
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	F	D	371
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	A	D	372
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	Y	373
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	R	D	374
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	D	375
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	A	376
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	N	377
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	E	378
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	Q	379
A	E	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	K	380
A	Q	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	V	381
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	Y	382
A	L	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	Y	383
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	G	384
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	I	P	Y	385
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	I	P	G	386
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	I	P	Y	387
A	K	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	I	P	Y	388
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	I	P	N	389
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	I	P	Q	390
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	S	W	Y	D	P	L	T	N	L	W	V	P	D	391
A	Y	E	Y	D	P	L	T	N	L	W	L	L	Y	392
A	Y	W	Y	D	P	L	T	N	L	S	L	L	V	393
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	I	L	E	394
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	I	P	Y	395
A	H	W	F	D	P	L	T	Q	L	K	I	R	V	396
A	Y	W	C	D	P	L	T	K	L	C	I	L	E	397
A	N	S	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	Y	398
A	N	L	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	Y	399
A	N	W	Y	D	A	L	T	K	L	W	L	H	D	400
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	F	P	D	401
A	T	S	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	A	402
A	C	W	Y	D	S	L	T	K	L	C	H	R	E	403
A	I	G	N	D	P	L	T	K	L	W	I	P	Y	404
A	N	W	Q	D	C	L	T	K	L	C	L	A	G	405
A	Y	W	F	D	P	L	T	N	L	W	L	L	E	406
A	Y	W	Y	D	P	L	T	N	L	S	L	L	V	407
A	N	C	F	D	S	L	T	R	L	W	L	C	D	408

10

20

30

40

A	C	A	Y	D	A	L	T	K	L	C	L	P	A	409
A	N	W	Y	D	P	L	T	N	L	S	L	L	L	410
A	Y	W	Y	D	P	L	T	Q	L	S	L	L	V	411
A	Y	R	Y	D	A	L	T	G	L	W	L	L	Y	412
A	Y	W	N	D	P	L	T	K	L	K	L	R	L	413
A	Y	W	Y	D	P	L	T	Q	L	S	L	L	V	414
A	Y	R	Y	D	A	L	T	G	L	W	L	L	Y	415
A	Y	R	Y	D	S	L	T	N	L	W	L	L	Y	416
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	I	L	E	417
A	S	C	Y	D	P	L	T	K	L	C	F	P	V	418
A	F	W	F	D	P	L	T	G	L	W	L	L	E	419
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	H	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	I	R	V	420
A	P	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	F	P	S	421
A	N	C	Y	D	T	L	T	K	L	W	L	T	C	422
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	S	L	P	D	423
A	Y	A	Y	D	F	L	T	Q	L	S	L	P	D	424
A	F	R	Y	D	S	L	T	G	L	W	L	R	Y	425
A	N	C	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	C	426
A	N	G	Y	D	L	L	T	N	L	S	V	S	D	427
A	N	W	Y	D	P	L	T	R	L	W	I	P	V	428
A	L	K	F	D	Y	L	T	K	L	W	L	P	D	429
A	Y	R	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	G	430
A	Y	C	Y	D	S	L	T	K	L	W	I	P	D	431
A	S	W	E	D	S	L	T	K	L	W	L	S	K	432
A	Y	W	Y	D	S	L	T	G	L	S	L	L	V	433
A	Y	W	Y	D	P	L	T	Y	L	R	L	R	V	434
A	K	C	Y	D	S	L	T	N	L	W	L	C	D	435

10

20

30

40

50

【0270】

BAML分離株のELISAシグナルのほとんどすべてが、初期スクリーニングで単離されたものより高かった（実施例1参照）。比較のために、ペプチド453-01-B07（配列番号31）（ $K_D = 700 \text{ nM}$ ）を参照（陽性対照）として用いた。陰性対照のMAEX（挿入断片を持たないM13ファージ）は、試験したいかなる濃度でも、b-BLySと結合しなかった。

【0271】

直接ファージELISAに関しては、測定されたシグナルは、規定数のファージが様々な濃度のb-BLySと結合する能力を反映する。直接ファージELISAアッセイによって試験したペプチドは、間接ファージELISAアッセイで測定されたBLySに対する高い親和性に基づいて選択された。このアッセイのために、Immulon-2HBプレート（0または1000 ngの抗Fd抗体（Sigma, St Louis, MO）でコートした。洗浄（PBS-Tween-20）後、ファージ希釈液を添加して有効な抗体を飽和させ、1時間インキュベートして、洗浄し、次に100 μl のb-BLyS 10倍希釈液（0~1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）とともに室温で1時間インキュベートした。ストレプトアビジン-HRP（PBS-Tween-20中に1:1000; Endogen, Woburn, MA）をウェルに添加し、1時間インキュベートして、TMBで発色させ、OD 630 nmで読み取った。

【0272】

蛍光異方性によるBAMLペプチドの K_D の測定

配列解析によって同定された10-merコア構造モチーフもしくはそのモチーフの1カ所が変異した変異体を有するいくつかのペプチドを、短いGly-Gly-Lysリンカー配列を伴って合成し、そのC末端リシンをフルオレセインで標識した。これらのペプチ

ドを下記の表 15 に示すが、これらは、B L y S に関する解離定数を決定するために、固相合成法によって合成された。D X 8 1 5 および D X 8 7 6 ポリペプチドは D X 8 1 4 (配列番号 1 8 6) から 2 つの N 末端アミノ酸の欠失、またはコアペプチド (3 ~ 1 2 位) の N 末端および C 末端の 2 つのアミノ酸の欠失によって誘導された。D X 8 1 6、D X 8 1 7、D X 8 1 9 および D X 8 2 2 は他の B A M L 単離物 (それぞれ、配列番号 1 8 9、3 0 9、3 5 3、3 2 7) に対応する。D X 8 1 8 は配列番号 3 4 0 の単離物に対応するが、ただし 2 位の M e t が A s n に置換されている。いくつかの B L y S 結合性 B A M L ペプチドの K_D を蛍光異方性によって測定したが、これは前述のように行った。- G G K リンカーを持たない D X 8 2 2 の配列 (配列番号 3 2 7 を参照) は、B A M L 鑄型配列 (表 1 1 参照) に一致する。D X 8 2 2 に見いだされる B A M L コンセンサス配列は、初期スクリーニングで単離されたもっとも親和性の高い結合性ペプチドの 1 つ (4 5 3 - 0 1 - B 0 7、配列番号 3 1) と比較して、結果的に B L y S への結合親和性を 1 0 倍以上高めた。

10

【0 2 7 3】

【表 1 5】

表 15: 合成 B L y S 結合性ポリペプチドの解離定数			
ペプチド	配列	配列番号	K_D (nM)
DX814	Ac-ANWYDPLTKLWLDPDGGK-fitc	437	26 ± 7
DX815	Ac-WYDPLTKLWLDPDGGK-fitc	438	31 ± 13
DX876	Ac-WYDPLTKLWLGGK-fitc	439	171 ± 90
DX816	Ac-ANWYDPLTKLWLPVGGK-fitc	440	44 ± 15
DX817	Ac-ANWFDPLTKLWLDPDGGK-fitc	441	32 ± 26
DX818	Ac-ANWYDPLTKLSLPDGGK-fitc	442	342 ± 108
DX819	Ac-ANWYDPLTKLWFPDGGK-fitc	443	69 ± 38
DX822	Ac-ANWYDSLTKLWLDPDGGK-fitc	444	79 ± 54

20

30

【0 2 7 4】

B A M L 単離ペプチドの解析により、2 位の配列保存 (B A M L 鑄型では可変、表 1 1 参照) が失われたことが明らかになった。B A M L 配列における 1 位と 2 位の N 末端残基が B L y S との結合に必要なかどうかを調べるために、3 ~ 1 4 残基のみを含む D X 8 1 4 のトランケート型 (D X 8 1 5 ; 表 1 5 参照) を合成し、蛍光異方性によって分析した。D X 8 1 5 に関する K_D は D X 8 1 4 と区別がつかなかったもので、1 位と 2 位の残基は B L y S に対する高親和性結合に必要なでないことが示唆された。さらに最小コア (残基 1 ~ 1 0、D X 8 7 6) まで D X 8 1 4 をトランケートすると、 K_D は 1 7 1 nM に増加したが、これは 1 4 - m e r の 1 3 位の P r o および / または 1 4 位の A s p が高親和性 B L y S 結合性に寄与することを示す。その位置での D X 8 1 6 における V a l の置換は K_D にほとんど影響しなかった (表 1 5 参照)。B L y S 結合性ポリペプチド D X 2 2 1 (A c - W T D S L T G L W F P D G G P G P E G G G K ; $K_D = 3 \mu M$; 配列番号 1 6 8) を、配列が最も近い B A M L ペプチド (D X 8 1 6、A c - A N W Y D P L T K L W F P D G G K ; $K_D = 6 9 n M$; 配列番号 4 4 3) と比較すると、4 位 (T → Y)、6 位 (S → P)、および 9 位 (G → K) の 3 カ所で相違が見られたが、このことはこれらの残基が結合親和性に寄与することを示す。

40

【0 2 7 5】

合成された B A M L ペプチドは、一次分離株由来のペプチド (実施例 1 参照) よりも 2 桁低い、ナノモル値域の K_D 値を示した。フェニルアラニン置換 (F₄ → Y₄ ; F_{1 2} → L

50

_{1 2} ; 表 1 7) は、もっとも多く見られるコア配列のマイナーな変異であるが、こうした変化は合成ペプチドの解離定数に有意な影響を与えることはできなかった。しかしながら、1 1 位の変化 ($W_{1 1} \rightarrow S_{1 1}$; D X 8 1 8) は、結果として、親和性が D X 8 1 4 と比べて約 1 0 倍低下した。

【0 2 7 6】

上の記述を受けて、あらゆる溶液中または溶液からの B L y S もしくは B L y S 様ポリペプチド (B L y S 標的タンパク質) の検出または分離を可能にするアフィニティー結合性ポリペプチドにとって重要な特徴を正しく認識することができる。ある特定の溶液または供給流に適合した、本発明の結合性ポリペプチドに関する追加の実施形態および別法が、先の記述を研究することによって明らかとなるであろう。例えば、上記で検討された B L y S 結合性ポリペプチドと結合しているスパーサーまたはリンカーはどれも、本発明のさらなる B L y S 結合性ポリペプチドを生成するために、除去または置換することが可能である。また、*i n v i v o* 治療への応用に適した、非常に親和性の高いポリペプチド B L y S 標的結合物質は、例えば、B A M L から単離されたペプチドの中から選択することにより、類似のポリペプチドを同様に厳密な条件下で B A M L もしくは他のペプチドライブラリーから選択することにより、または、上記のポリペプチド結合分子 (例えば、B L y S 結合性に寄与する重要な構造モチーフを有するもの) を設計することにより、調製することができる。このような実施形態および明白な別法はいずれも、上記の特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲に含めるものとする。

10

【0 2 7 7】

前記の文献はすべて、その全体を参考として本明細書に組み入れるものとする。

20

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/16412 A2

- (51) International Patent Classification: **C07K 7/00**
- (21) International Application Number: PCT/US01/25891
- (22) International Filing Date: 17 August 2001 (17.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/226,489 18 August 2000 (18.08.2000) US
- (71) Applicant: **DYAX CORP.** [US]; Suite 623, One Kendall Square, Cambridge, MA 02139 (US).
- (72) Inventors: **BELTZER, James, P.**; 801 North Road, Carlisle, MA 01741 (US). **POTTER, M., Daniel**; 176 High Street, Acton, MA 01720 (US). **FLEMING, Tony, J.**; 83 Arcadia Avenue, Waltham, MA 02452 (US). **LADNER, Robert, Charles**; 3827 Green Valley, Ijamsville, MD 21754 (US).
- (74) Agents: **YANKWICH, Leon, R.** et al.; Yankwich & Associates, 130 Bishop Allen Drive, Cambridge, MA 02139 (US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/16412 A2

(54) Title: BINDING POLYPEPTIDES FOR B LYMPHOCYTE STIMULATOR PROTEIN (BLYS)

(57) Abstract: Binding polypeptides comprising specific amino acid sequences are disclosed that bind B Lymphocyte Stimulator (BlyS) protein or BlyS-like polypeptides. The binding polypeptides can be used in methods of the invention for detecting or isolating BlyS protein or BlyS-like polypeptides in solutions or mixtures, such as blood, tissue samples, or conditioned media.

WO 02/16412

PCT/US01/25891

5 BINDING POLYPEPTIDES FOR B LYMPHOCYTE STIMULATOR PROTEIN
(BLyS)

FIELD OF THE INVENTION

10 The present invention relates to polypeptides that bind to B lymphocyte stimulator protein (BLyS). Such polypeptides have uses for example, in the detection, isolation, and/or purification of BLyS. The invention also relates to nucleic acid molecules encoding these BLyS binding polypeptides, vectors and host cells containing these nucleic acids, and methods for producing the same.

15

BACKGROUND OF THE INVENTION

B lymphocyte stimulator (BLyS) is a member of the tumor necrosis factor ("TNF") superfamily that induces both *in vivo* and *in vitro* B cell proliferation and differentiation (Moore et al., Science, 285: 260-263 (1999)). BLyS is distinguishable
20 from other B cell growth and differentiation factors such as IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-13, IL-15, CD40L, or CD27L (CD70) by its monocyte-specific gene and protein expression pattern and its specific receptor distribution and biological activity on B lymphocytes. BLyS expression is not detected on natural killer ("NK") cells, T cells or B cells, but is restricted to cells of myeloid origin. BLyS expression on resting monocytes
25 is upregulated by interferon-gamma (IFN-gamma). The gene encoding BLyS has been mapped to chromosome 13q34.

BLyS is expressed as a 285 amino acid type II membrane-bound polypeptide and a soluble 152 amino acid polypeptide (Moore et al., 1999, *supra*). The membrane-bound form of BLyS has a predicted transmembrane spanning domain between amino acid
30 residues 47 and 73. The NH₂-terminus of the soluble form of BLyS begins at Ala¹³⁴ of the membrane-bound form of BLyS. Both the soluble and membrane-bound forms of the protein form homotrimers. Soluble recombinant BLyS has been shown to induce *in vitro* proliferation of murine splenic B cells and to bind to a cell-surface receptor on these cells

WO 02/16412

PCT/US01/25891

(Moore et al., 1999, *supra*). Soluble BLyS administration to mice has been shown to result in an increase in the proportion of CD45R^{dull}, Ly6D^{bright} (also known as ThB) B cells and an increase in serum IgM and IgA levels (Moore et al., 1999, *supra*). Thus, BLyS displays a B cell tropism in both its receptor distribution and biological activity.

Based on its expression pattern and biological activity, BLyS has been suggested to be involved in the exchange of signals between B cells and monocytes or their differentiated progeny. The restricted expression patterns of BLyS receptor and ligand suggest that BLyS may function as a regulator of T cell-independent responses in a manner analogous to that of CD40 and CD40L in T cell-dependent antigen activation.

Accordingly, molecules that specifically bind BLyS would find a variety of uses in the study of the BLyS cytokine, in the manufacture and purification of BLyS in commercial and medically pure quantities, and in the development new therapeutic or diagnostic reagents.

15 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides new polypeptides and families of polypeptides that specifically bind to B lymphocyte stimulator protein (BLyS) and/or BLyS-like polypeptides. In particular, the invention encompasses polypeptides that specifically bind to a polypeptide or polypeptide fragment of human BLyS (SEQ ID NOS:173 and/or 174) or BLyS expressed on human monocytes; murine BLyS (SEQ ID NOS:175 and/or 176) or BLyS expressed on murine monocytes; rat BLyS (either the soluble forms as given in SEQ ID NOS:177, 178, 179 and/or 180 or in a membrane associated form, e.g., on the surface of rat monocytes); or monkey BLyS (e.g., the monkey BLyS polypeptides of SEQ ID NOS:181 and/or 182, the soluble form of monkey BLyS, or BLyS expressed on monkey monocytes), preferably human BLyS.

In specific preferred embodiments, the BLyS binding polypeptides of the invention bind BLyS and/or BLyS-like polypeptides with high affinity. In other embodiments, the BLyS binding polypeptides of the invention reversibly bind BLyS and/or BLyS-like polypeptides. In still other embodiments, the BLyS binding polypeptides of the invention irreversibly bind BLyS and/or BLyS-like polypeptides.

The cysteine residues in certain polypeptides according to the invention are believed to form a disulfide bond, which would cause the polypeptide containing these cysteine residues to form a stable loop structure under non-reducing conditions.

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Especially preferred BLYS binding polypeptides of the invention are polypeptide molecules that comprise amino acid sequences that form stable loop structures or other stable structures that bind BLYS or BLYS-like polypeptides.

In specific embodiments, the invention relates to BLYS binding polypeptides comprising, or alternatively consisting of, an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:1-12, 20-172, and 186-444, preferably SEQ ID NOs:163-172 or 436-444 as referred to above and in Tables 1-8, 14 and 15 and in Examples 2, 5 and 6 below. Analysis of the sequences of the BLYS binding polypeptides isolated as described herein shows a strong selection for polypeptides containing the tetrapeptide Asp-Xaa-Leu-Thr (SEQ ID NO:446), and therefore in its broadest aspects, the present invention relates to polypeptides capable of binding to BLYS comprising the polypeptide Asp-Xaa-Leu-Thr (SEQ ID NO:446), where Xaa is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala (preferably Pro or Ser).

Seven consensus sequences (SEQ ID NOs:1-7) have been determined based on the specific BLYS binding polypeptides shown in Tables 1-8. In specific embodiments, BLYS binding polypeptides of the invention comprise one or more of these sequences. Such preferred BLYS binding polypeptides include polypeptides with the potential to form a cyclic or loop structure between invariant Cys residues comprising, or alternatively consisting of, an amino acid sequence selected from A-E (SEQ ID NOs:1-5):

(A) $X_1-X_2-X_3-Cys-X_5-Phe-X_7-Trp-Glu-Cys-X_{11}-X_{12}-X_{13}$ (SEQ ID NO:1), wherein

X_1 is Ala, Asn, Lys, or Ser;

X_2 is Ala, Glu, Met, Ser, or Val;

X_3 is Ala, Asn, Lys, or Pro (preferably Lys);

X_5 is Phe, Trp, or Tyr (preferably Tyr);

X_7 is Pro or Tyr (preferably Pro);

X_{11} is Ala, Gln, His, Phe, or Val;

X_{12} is Asn, Gln, Gly, His, Ser, or Val; and

X_{13} is Ala, Asn, Gly, Ile, Pro, or Ser,

wherein said polypeptide binds BLYS and/or BLYS-like polypeptides; or

(B) $X_1-X_2-X_3-Cys-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-Cys-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ (SEQ ID NO:2),

wherein

WO 02/16412

PCT/US01/25891

- X₁ is Ala, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val,
or is absent;
X₂ is Ala, Asn, Asp, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or
Val;
5 X₃ is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr,
or Val (preferably Asp);
X₅ is Asp, Ile, Leu, or Tyr (preferably Asp or Leu);
X₆ is Arg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Tyr, or Val (preferably Glu or Leu);
X₇ is His, Leu, Lys, or Phe (preferably His or Leu);
10 X₈ is Leu, Pro, or Thr (preferably Thr or Pro);
X₉ is Arg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, Met, or Trp (preferably Lys);
X₁₀ is Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val;
X₁₂ is Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val;
X₁₃ is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp,
15 Tyr, or Val; and
X₁₄ is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val, or is
absent,
wherein said polypeptide binds BLyS and/or BLyS-like polypeptides; or
(C) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-Cys-X₁₃-X₁₄-X₁₅ (SEQ ID
20 NO:3),
wherein
X₁ is Ala, Arg, Asn, Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, or Thr;
X₂ is Asn, Asp, Gln, His, Ile, Lys, Pro, Thr, or Trp;
X₃ is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Phe, Pro, or Thr (preferably Ala);
25 X₅ is Asn, Asp, Pro, Ser, or Thr (preferably Asp);
X₆ is Arg, Asp, Ile, Leu, Met, Pro, or Val (preferably Ile);
X₇ is Ala, Ile, Leu, Pro, Thr, or Val (preferably Val or Leu);
X₈ is Asn, His, Ile, Leu, Lys, Phe, or Thr (preferably Thr);
X₉ is Asn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr (preferably Leu);
30 X₁₀ is Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, Ser, or Trp;
X₁₁ is Arg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, Trp, or Tyr (preferably Ser);
X₁₃ is Gln, Glu, Ile, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr, or Val (preferably Val);
X₁₄ is Asn, Gly, Ile, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr; and

WO 02/16412

PCT/US01/25891

X₁₅ is Asn, Asp, Glu, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr (preferably Glu or Pro),
wherein said polypeptide binds BLyS and/or BLyS-like polypeptides; or

(D) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-Cys-X₁₄-X₁₅-X₁₆

(SEQ ID NO:4),

5 wherein

X₁ is Asn, Asp, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr, or is absent (preferably Ser);

X₂ is Arg, Asn, Asp, His, Phe, Ser, or Trp (preferably Arg);

X₃ is Asn, Asp, Leu, Pro, Ser, or Val (preferably Asn or Asp);

X₅ is Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, or Thr;

10 X₆ is His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, or Tyr;

X₇ is Asp, His, Leu, or Ser (preferably Asp);

X₈ is Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro, or Thr (preferably Glu or Pro);

X₉ is Ala, Arg, Asn, or Leu (preferably Leu);

X₁₀ is Ile, Leu, Met, Pro, Ser, or Thr (preferably Thr);

15 X₁₁ is Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser, or Tyr;

X₁₂ is Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X₁₄ is Asp, Gly, Leu, Phe, Tyr, or Val (preferably Leu);

X₁₅ is Asn, His, Leu, Pro, or Tyr (preferably His, Leu or Pro); and

X₁₆ is Asn, Asp, His, Phe, Ser, or Tyr, (preferably Asp or Ser),

20 wherein said polypeptide binds BLyS and/or BLyS-like polypeptides; or

(E) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-Cys-X₁₆-X₁₇-

X₁₈ (SEQ ID NO:5),

wherein

X₁ is Arg, Asp, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or is absent (preferably Arg);

25 X₂ is Ala, Arg, Asn, Asp, Gly, Pro, Ser, or is absent (preferably Asn, Asp, Gly, or Pro);

X₃ is Arg, Asn, Gln, Glu, Gly, Lys, Met, Pro, Trp or Val (preferably Gly or Met);

X₅ is Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr, or Val (preferably Trp, Tyr, or Val);

X₆ is Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr (preferably Asp);

30 X₇ is Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, or Tyr (preferably Asp);

X₈ is Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, or Tyr (preferably Leu);

X₉ is Asp, Leu, Pro, Thr, or Val (preferably Leu or Thr);

X₁₀ is Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp or Tyr (preferably Lys or Thr);

WO 02/16412

PCT/US01/25891

- X₁₁ is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Met, or Thr (preferably Arg or Leu);
 X₁₂ is Ala, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr (preferably Thr or Trp);
 X₁₃ is Ala, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr (preferably Met or Phe);
 X₁₄ is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, or Val (preferably Val);
 5 X₁₆ is Arg, Asp, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, or Trp (preferably Met);
 X₁₇ is Arg, Asn, Asp, Gly, His, Phe, Pro, Ser, Trp or Tyr, (preferably Arg, His, or Tyr);
 and
 X₁₈ is Ala, Arg, Asn, Asp, His, Leu, Phe, or Trp (preferably His or Asn),
 wherein said polypeptide binds BLyS and/or BLyS-like polypeptides.
- 10 Additional preferred embodiments include linear polypeptides comprising, or alternatively consisting of, an amino acid sequence selected from F and G (SEQ ID NOs:6 and 7):
- (F) X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂ (SEQ ID NO:6),
 wherein
- 15 X₁ is Ala, Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Tyr, or Val (preferably Gly, Tyr, or Val);
 X₂ is Ala, Arg, Gln, His, Ile, Leu, Phe, Thr, Trp, or Tyr (preferably His or Tyr);
 X₃ is Ala, Asp, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr (preferably Asp or Tyr);
 X₄ is Arg, Asp, Gln, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr, or Val (preferably Asp or Gln);
 20 X₅ is Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, or Val (preferably Leu or Ser);
 X₆ is His, Ile, Leu, Pro, Ser, or Thr (preferably Leu or Thr);
 X₇ is Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, or Thr (preferably Lys or Thr);
 X₈ is Ala, Arg, Asn, Ile, Leu, Lys, Met, or Thr (preferably Leu or Lys);
 X₉ is Ala, Asn, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val (preferably Met
 25 or Ser);
 X₁₀ is Ile, Leu, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val (preferably Thr or Leu);
 X₁₁ is Ala, Arg, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val (preferably Pro or Thr); and
 X₁₂ is Arg, Asp, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or Val (preferably Arg or
 30 Pro),
 wherein said polypeptide binds BLyS and/or BLyS-like polypeptides; or
- (G) X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃ (SEQ ID NO:7),
 wherein

WO 02/16412

PCT/US01/25891

- X_1 is Asp, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Met, or Trp (preferably Glu, Lys);
 X_2 is Arg, Gln, His, Ile, Leu, or Pro (preferably His or Pro);
 X_3 is Asp, Gly, Ile, Lys, Thr, Tyr or Val (preferably Tyr);
 X_4 is Asn, Asp, Gln, Glu, Met, Pro, Ser, or Tyr (preferably Asp or Gln);
5 X_5 is Asn, Asp, His, Ile, Leu, Met, Pro, Thr or Val (preferably Asn or Thr);
 X_6 is Asp, Glu, His, Leu, Lys, Pro, or Val (preferably Asp or Pro);
 X_7 is Arg, Asn, Gln, His, Ile, Leu, Met, Pro, or Thr (preferably Ile or Pro);
 X_8 is Gln, Gly, His, Leu, Met, Ser, or Thr (preferably Leu or Thr);
 X_9 is Asn, Gln, Gly, His, Leu, Lys, Ser, or Thr (preferably Lys);
10 X_{10} is Ala, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, or Phe (preferably Gly or Met);
 X_{11} is Ala, Glu, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val (preferably Ala or Thr);
 X_{12} is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Tyr, or Val (preferably Arg or His); and
 X_{13} is Arg, Asn, Glu, His, Ile, Ser, Thr, Trp, or Val (preferably His),
wherein said polypeptide binds BLyS and/or BLyS-like polypeptides.
15 Said polypeptides may have additional amino acids attached at either or both of
the N- and C-terminal ends.
Examination of the sequence information and binding data from the isolates of
libraries containing polypeptides with the potential to form loop structures (i.e., libraries
designated TN6, TN7, TN8, TN9, TN10 and TN12) identifies a series of BLyS binding
20 polypeptides that may form loop structures. In specific embodiments, BLyS binding
polypeptides of the invention comprise, or alternatively consist of, an amino acid
sequence selected from H-L (SEQ ID NOs:8-12):
(H) Cys- X_2 -Phe- X_4 -Trp-Glu-Cys (SEQ ID NO:8),
wherein
25 X_2 is Phe, Trp, or Tyr (preferably Tyr); and
 X_4 is Pro or Tyr (preferably Pro); or
(I) Cys- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 -Cys (SEQ ID NO:9),
wherein
 X_2 is Asp, Ile, Leu, or Tyr (preferably Asp or Leu);
30 X_3 is Arg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Tyr, or Val (preferably Glu or Leu);
 X_4 is His, Leu, Lys, or Phe (preferably His or Leu);
 X_5 is Leu, Pro, or Thr (preferably Thr or Pro);
 X_6 is Arg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, Met, or Trp (preferably Lys); and

WO 02/16412

PCT/US01/25891

X₇ is Ala, Asn, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val; or

(J) Cys-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-Cys (SEQ ID NO:10),

wherein

X₂ is Asn, Asp, Pro, Ser, or Thr (preferably Asp);

5 X₃ is Arg, Asp, Ile, Leu, Met, Pro, or Val (preferably Ile);

X₄ is Ala, Ile, Leu, Pro, Thr, or Val (preferably Val or Leu);

X₅ is Asn, His, Ile, Leu, Lys, Phe, or Thr (preferably Thr);

X₆ is Asn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr (preferably Leu);

X₇ is Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, Ser, or Trp;

10 X₈ is Arg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, Trp, or Tyr (preferably Ser); or

(K) Cys-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-Cys (SEQ ID NO:11),

wherein

X₂ is Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, or Thr;

X₃ is His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, or Tyr;

15 X₄ is Asp, His, Leu, or Ser (preferably Asp);

X₅ is Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro, or Thr (preferably Glu or Pro);

X₆ is Ala, Arg, Asn, or Leu (preferably Leu);

X₇ is Ile, Leu, Met, Pro, Ser, or Thr (preferably Thr);

X₈ is Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser, or Tyr;

20 X₉ is Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val; or

(L) Cys-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-Cys (SEQ ID NO: 12),

wherein

X₂ is Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr, or Val (preferably Trp, Tyr, or Val);

25 X₃ is Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr (preferably Asp);

X₄ is Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, or Tyr (preferably Asp);

X₅ is Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, or Tyr (preferably Leu);

X₆ is Asp, Leu, Pro, Thr, or Val (preferably Leu or Thr);

X₇ is Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp or Tyr (preferably Lys or Thr);

30 X₈ is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Met, or Thr (preferably Arg or Leu);

X₉ is Ala, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr (preferably Thr or Trp);

X₁₀ is Ala, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr (preferably Met or Phe);

X₁₁ is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, or Val (preferably Val);

WO 02/16412

PCT/US01/25891

wherein said polypeptides bind BLyS and/or BLyS-like polypeptides.

In additional preferred embodiments of the present invention, BLyS binding polypeptides comprise the following amino acid sequence M (SEQ ID NO:447):

(M) Ala-X₂-X₃-X₄-Asp-X₆-Leu-Thr-X₉-Leu-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (SEQ ID NO:447),
wherein

X₂ is Asn, Ser, Tyr, Asp, Phe, Ile, Gln, His, Pro, Lys, Leu, Met, Thr, Val, Glu, Ala, Gly, Cys, or Trp (i.e., any amino acid except Arg; preferably Asn);
X₃ is Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly, or Ser (preferably Trp);
X₄ is Tyr, Phe, Glu, Cys, Asn (preferably Tyr);
X₆ is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala (preferably Pro or Ser);
X₉ is Lys, Asn, Gln, Gly, or Arg (preferably Lys);
X₁₁ is Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr, or Lys (preferably Trp);
X₁₂ is Leu, Phe, Val, Ile, or His (preferably Leu);
X₁₃ is Pro, Leu, His, Ser, Arg, Asn, Gln, Thr, Val, Ala, Cys, Ile, Phe, or Tyr (i.e., not Asp, Glu, Gly, Lys, Met, or Trp; preferably Pro); and
X₁₄ is Asp, Glu, Asn, Val, His, Gln, Arg, Gly, Ser, Tyr, Ala, Cys, Lys, Ile, Thr or Leu (i.e., not Phe, Met, Pro, or Trp; preferably Asp, Val or Glu).

Preferred embodiments are polypeptides comprising a core sequence of the formula N:

(N) X₁-X₂-Asp-X₄-Leu-Thr-X₇-Leu-X₉-X₁₀ (SEQ ID NO:448),
wherein

X₁ is Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly, or Ser (preferably Trp);
X₂ is Tyr, Phe, Glu, Cys, Asn (preferably Tyr);
X₄ is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala (preferably Pro or Ser);
X₇ is Lys, Asn, Gln, Gly, or Arg (preferably Lys);
X₉ is Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr, or Lys (preferably Trp); and
X₁₀ is Leu, Phe, Val, Ile, or His (preferably Leu).

Especially preferred BLyS binding polypeptides according to the present invention comprise the core peptide Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu (SEQ ID NO:436).

WO 02/16412

PCT/US01/25891

The BLyS binding polypeptides described above may have additional amino acids attached at either or both of the N- and C-terminal ends.

A further embodiment of the present invention relates to a BLyS affinity maturation library, comprising a population of at least 10^3 polypeptides, preferably at least 10^6 polypeptides, more preferably at least 10^9 or more polypeptides, wherein the polypeptides of said population comprise the amino acid sequence:

Ala-X₂-X₃-X₄-Asp-X₆-Leu-Thr-X₉-Leu-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (SEQ ID NO:449), wherein

- 10 X₂ is any amino acid;
- X₃ is any amino acid;
- X₄ is any amino acid;
- X₆ is any amino acid;
- X₉ is any amino acid;
- 15 X₁₁ is any amino acid;
- X₁₂ is any amino acid;
- X₁₃ is any amino acid; and
- X₁₄ is any amino acid.

A preferred BLyS affinity maturation library will be produced such that the variable amino acid positions (i.e., positions 2, 3, 4, 6, 9, 11, 12, 13 and 14 in SEQ ID NO:449) will not be randomly variegated but will disproportionately be a single selected amino acid. Such a library may be produced by expression of a multiplicity of polynucleotides fitting the DNA template:

GCT NNN NNN NNN GAT NNN CTT ACT NNN CTC NNN NNN NNN NNN (SEQ ID NO:185), where each variable base (N) is A or C or G or T but one base in each instant is approximately 11-fold more probable at a given base position. One such DNA template, discussed in Example 6 below, is prepared so that the nucleotides of the DNA sequences are in the following proportions:

30

WO 02/16412

PCT/US01/25891

in DNA template (SEQ ID NO:185)		Proportion of Bases at Position			
Codon	Base Position	A	C	G	T
2	4	79%	7%	7%	7%
	5	79%	7%	7%	7%
	6	7%	7%	7%	79%
3	7	7%	7%	7%	79%
	8	7%	7%	79%	7%
	9	7%	7%	79%	7%
4	10	7%	7%	7%	79%
	11	79%	7%	7%	7%
	12	7%	7%	7%	79%
6	16	7%	7%	7%	79%
	17	7%	79%	7%	7%
	18	7%	7%	7%	79%
9	25	79%	7%	7%	7%
	26	79%	7%	7%	7%
	27	7%	7%	79%	7%
11	31	7%	7%	7%	79%
	32	7%	7%	79%	7%
	33	7%	7%	79%	7%
12	34	7%	79%	7%	7%
	35	7%	7%	7%	79%
	36	7%	7%	7%	79%
13	37	7%	79%	7%	7%
	38	7%	79%	7%	7%
	39	7%	7%	7%	79%
14	40	7%	7%	79%	7%
	41	79%	7%	7%	7%
	42	7%	7%	7%	79%

BLYS binding polypeptide molecules of the invention may also have an amino terminal (N-terminal) capping or functional group, such as an acetyl group, which, for

WO 02/16412

PCT/US01/25891

example, blocks the amino terminal amino group from undesirable reactions or is useful in linking the BLYS binding polypeptide to another molecule, matrix, resin, or solid support. BLYS binding polypeptides of the invention may also have a carboxy terminal (C-terminal) capping or functional group, such as an amide group, which, for example, blocks the C-terminal carboxyl group from undesirable reactions or provides a functional group useful in conjugating the binding polypeptide to other molecules, matrices, resins, or solid supports. Preferably, the N- and/or C-terminal capping groups are polypeptide linker molecules. An especially preferred C-terminal linker molecule that is useful for immobilizing a BLYS binding polypeptide of the invention to a solid support or chromatographic matrix material comprises the amino acid sequence Pro-Gly-Pro-Glu-Gly-Gly-Lys (SEQ ID NO:13). Another useful C-terminal linker, e.g., for fluoresceinating peptides, is Gly-Gly-Lys (see Table 15).

The invention also encompasses BLYS binding polypeptides that have been modified, for example, to increase or decrease the stability of the molecule, while retaining the ability to bind BLYS and/or BLYS-like polypeptides. An example of a modified BLYS binding polypeptide of the invention is a polypeptide in which one of two cysteine residues is substituted with a non-naturally occurring amino acid that is capable of condensing with the remaining cysteine side chain to form a stable thioether bridge, thereby generating a cyclic BLYS binding polypeptide. Such cyclic thioether molecules of synthetic peptides may be routinely generated using techniques known in the art, e.g., as described in PCT publication WO 97/46251, incorporated herein by reference.

In another embodiment, the invention provides BLYS binding polypeptides of the invention attached, coupled, linked or adhered to a matrix or resin or solid support. Techniques for attaching, linking or adhering polypeptides to matrices, resins and solid supports are well known in the art. Suitable matrices, resins or solid supports for these materials may be any composition known in the art to which a BLYS binding polypeptide of the invention could be attached, coupled, linked, or adhered, including but not limited to, a chromatographic resin or matrix, such as SEPHAROSE-4 FF agarose beads, the wall or floor of a well in a plastic microtiter dish, such as used in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), or a silica based biochip. Materials useful as solid supports on which to immobilize binding polypeptides of the invention include, but are not limited to, polyacrylamide, agarose, silica, nitrocellulose, paper, plastic, nylon, metal,

WO 02/16412

PCT/US01/25891

and combinations thereof. A BLyS binding polypeptide of the invention may be immobilized on a matrix, resin or solid support material by a non-covalent association or by covalent bonding, using techniques known in the art. Preferably, a BLyS binding polypeptide of the invention is immobilized on a chromatography material such as

5 SEPHAROSE-4 FF agarose. In an even more preferred embodiment, a BLyS binding polypeptide of the invention is coupled to a chromatography material using a linker molecule. A preferred linker molecule according to the present invention is a polypeptide comprising the amino acid sequence Pro-Gly-Pro-Glu-Gly-Gly-Gly-Lys (SEQ ID NO:13). Most preferably, the affinity chromatography material of the invention

10 comprises a BLyS binding polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:163-172, which is linked to a chromatography material by a polypeptide linker molecule having the amino acid sequence Pro-Gly-Pro-Glu-Gly-Gly-Gly-Lys (SEQ ID NO:13). BLyS binding polypeptides of the invention attached, coupled, linked or adhered to a matrix or resin or other solid support are useful

15 for methods of detecting, isolating and purifying BLyS and/or BLyS like polypeptides, particularly for purification of BLyS and/or BLyS like polypeptides by affinity chromatography.

In certain preferred embodiments, the BLyS binding polypeptides of the present invention or phage displaying such binding polypeptides, irreversibly bind the BLyS

20 protein in its native, soluble trimeric form.

In certain preferred embodiments, the BLyS binding polypeptides of the present invention or phage displaying such binding polypeptides, reversibly bind the BLyS protein in its native, soluble trimeric form.

In a further embodiment, the present invention encompasses a composition of

25 matter comprising isolated nucleic acids, preferably DNA, encoding a BLyS binding polypeptide of the invention. In a specific embodiment, nucleic acid molecules of the invention encode a BLyS binding polypeptide of the invention as provided in SEQ ID NOs:1-12, 20-172, and 186-444. In additional embodiments, nucleic acid molecules of the invention encode a polypeptide variant or fragment of a polypeptide comprising an

30 amino acid sequence of SEQ ID NOs:1-12, 20-172, and 186-444. In a further additional embodiment, nucleic acid molecules of the invention encode a BLyS binding polypeptide, the complementary strand of which nucleic acid hybridizes to a polynucleotide sequence encoding a polypeptide described in Tables 1-8 and 14 and in Examples 2, 5 and 6 (SEQ

WO 02/16412

PCT/US01/25891

ID NOs: 1-12, 20-172, and 186-444), under stringent conditions, e.g., hybridization to filter-bound DNA in 6x sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45° C followed by one or more washes in 0.2xSSC/0.1% SDS at about 50-65° C, under highly stringent conditions, e.g., hybridization to filter-bound nucleic acid in 6xSSC at about 45° C
 5 followed by one or more washes in 0.1xSSC/0.2% SDS at about 68° C, or under other stringent hybridization conditions which are known to those of skill in the art (see, for example, Ausubel, F.M. et al., eds., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York at pages 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3).

10 The present invention also relates to recombinant vectors, which include the isolated nucleic acid molecules encoding the BLyS binding polypeptides of the present invention (as well as fragments and variants thereof), and to host cells containing the recombinant vectors, as well as to methods of making such vectors and host cells. The invention further provides for the use of such recombinant vectors in the production of
 15 BLyS binding polypeptides by recombinant techniques.

The BLyS binding polypeptides, nucleic acids, transformed host cells, and genetically engineered viruses and phage of the invention (e.g., recombinant phage), have uses that include, but are not limited to, the detection, isolation, and purification of BLyS.

In another embodiment of the invention, recombinant bacteriophage displaying
 20 BLyS binding polypeptides on their surfaces are also provided. Such phage may be routinely generated using techniques known in the art and are useful, for example, as screening reagents and reagents for detecting BLyS.

In another embodiment, a BLyS binding polypeptide of the invention is used to detect or isolate BLyS or BLyS-like polypeptides in a solution. Such solutions include,
 25 but are not limited to, BLyS or BLyS-like polypeptides suspended or dissolved in water or a buffer solution as well as any fluid and/or cell obtained from an individual, biological fluid, body tissue, body cell, cell line, tissue culture, or other source which may contain BLyS or BLyS-like polypeptides, such as, cell culture medium, cell extracts, and tissue homogenates. Biological fluids include, but are not limited to, sera, plasma, lymph,
 30 blood, blood fractions, urine, synovial fluid, spinal fluid, saliva, and mucous.

In another embodiment, the present invention provides a method for detecting BLyS protein and/or BLyS-like polypeptide in a solution comprising, contacting the solution with a BLyS binding polypeptide of the invention and detecting binding of BLyS

WO 02/16412

PCT/US01/25891

or BLyS-like polypeptide to the BLyS binding polypeptide. The BLyS binding polypeptide may be either free or immobilized. Preferably, the BLyS binding polypeptide is a polypeptide immobilized on a solid surface or chromatographic material or the well of a plastic microtiter assay dish.

- 5 Another embodiment of the present invention is a method for isolating BLyS protein and/or BLyS-like polypeptide from a solution containing it, comprising:
- (a) contacting the solution with a BLyS binding polypeptide under conditions that permit binding of the BLyS and/or BLyS-like polypeptides to BLyS binding polypeptides, and
 - 10 (b) separating BLyS binding polypeptides (and BLyS and/or BLyS-like polypeptides bound thereto) from the rest of the solution.

A further embodiment of the present invention is a method for isolating BLyS protein and/or BLyS-like polypeptide from a solution containing it, comprising:

- 15 (a) contacting the solution with a BLyS binding polypeptide under conditions that permit binding of the BLyS and/or BLyS-like polypeptides to BLyS binding polypeptides,
- (b) separating the complex(es) formed by the BLyS binding polypeptide and BLyS and/or BLyS-like polypeptides from other components of the solution,
- 20 (c) dissociating the BLyS binding polypeptide from the BLyS and/or BLyS-like polypeptides, and
- (d) recovering the dissociated, BLyS and/or BLyS-like polypeptides.

In another embodiment, the invention provides kits containing a binding polypeptide of the invention for use in methods of detecting or isolating BLyS and/or BLyS-like polypeptides.

DEFINITIONS

In order that the invention may be clearly understood, the following terms are defined:

- 30 The term "recombinant" is used to describe non-naturally altered or manipulated nucleic acids, host cells transfected with exogenous nucleic acids, or polypeptide molecules that are expressed non-naturally, through manipulation of isolated nucleic acid (typically, DNA) and transformation or transfection of host cells. "Recombinant" is a term that

WO 02/16412

PCT/US01/25891

specifically encompasses nucleic acid molecules that have been constructed *in vitro* using genetic engineering techniques, and use of the term "recombinant" as an adjective to describe a molecule, construct, vector, cell, polypeptide or polynucleotide specifically excludes naturally occurring such molecules, constructs, vectors, cells, polypeptides or polynucleotides.

The term "bacteriophage" is defined as a bacterial virus containing a nucleic acid core and a protective shell built up by the aggregation of a number of different protein molecules. The terms "bacteriophage" and "phage" are synonymous and are used herein interchangeably.

The term "affinity ligand" is sometimes used herein and is synonymous with BLyS binding polypeptides of the invention.

The term "BLyS protein" as used herein encompasses both the membrane (e.g., SEQ ID NO:173) and soluble forms (e.g., SEQ ID NO:174). BLyS protein may be monomeric, dimeric, or trimeric or multivalent. Preferably, BLyS proteins are homotrimeric.

The term "BLyS-like polypeptide" as used herein encompasses natural BLyS or full-length recombinant BLyS as well as fragments and variants thereof, such as, a modified or truncated form of natural BLyS or full-length recombinant BLyS, which BLyS and BLyS-like polypeptide retain a BLyS functional activity. BLyS or BLyS fragments that may be specifically bound by the compositions of the invention include, but are not limited to, human BLyS (SEQ ID NOs:173 and/or 174) or BLyS expressed on human monocytes; murine BLyS (SEQ ID NOs:175 and/or 176) or BLyS expressed on murine monocytes; rat BLyS (either the soluble forms as given in SEQ ID NOs:177, 178, 179 and/or 180 or in a membrane associated form, e.g., on the surface of rat monocytes); or monkey BLyS (e.g., the monkey BLyS polypeptides of SEQ ID NOS:181 and/or 182, the soluble form of monkey BLyS, or BLyS expressed on monkey monocytes) or fragments thereof. Preferably compositions of the invention bind human BLyS (SEQ ID NOs:173 and/or 174) or fragments thereof. BLyS and BLyS-like polypeptides retain at least one functional activity of the natural or full-length BLyS, including but not limited to the following activities: binding to BLyS receptor (e.g., TACI (GenBank accession number AAC51790), and BCMA (GenBank accession number NP_001183)), stimulating B cell proliferation, stimulating immunoglobulin secretion by B cells, stimulating the BLyS receptor signaling cascade and/or being bound by an anti-BLyS antibody or other BLyS

WO 02/16412

PCT/US01/25891

binding polypeptide. Assays that can be used to determine the functional activities of BLyS or BLyS like polypeptides can readily be determined by one skilled in the art (e.g., see assays disclosed in Moore et al., 1999, *supra*) "BLyS-like polypeptides" also include fusion polypeptides in which all or a portion of BLyS is fused or conjugated to another polypeptide.

5 BLyS-like polypeptides that are fusion polypeptides retain at least one functional activity of BLyS, preferably the ability to stimulate B lymphocytes (see, for example, Moore et al., *Science*, 285: 260-263 (1999)), to bind the BLyS receptors (e.g., TACI or BCMA), and/or to be bound by an anti-BLyS antibody or other BLyS binding polypeptide. BLyS fusion polypeptides may be made by recombinant DNA techniques in which a gene or other

10 polynucleotide coding sequence for BLyS or a fragment thereof is ligated in-frame (recombined) with the coding sequence of another protein or polypeptide. The resulting recombinant DNA molecule is then inserted into any of a variety of plasmid or phage expression vectors, which enable expression of the fusion protein molecule in an appropriate eukaryotic or prokaryotic host cell. BLyS fusion polypeptides may be generated by

15 synthetic or semi-synthetic procedures as well.

The terms "BLyS target" or "BLyS target protein" are sometimes used herein and encompass BLyS and/or BLyS-like polypeptides. Thus, the BLyS binding polypeptides of the invention bind "BLyS target proteins" and can be used to bind, detect, remove, and/or purify "BLyS target proteins."

20 The term "binding polypeptide" is used herein to refer to any polypeptide capable of forming a binding complex with another molecule, polypeptide, peptidomimetic or transformant.

A "BLyS binding polypeptide" is a molecule of the invention that can bind BLyS target protein. Non-limiting examples of BLyS binding polypeptides of the invention are the

25 polypeptide molecules having an amino acid sequence described herein (see SEQ ID NOs:1-12, 20-172, and 186-444). The term BLyS binding polypeptide also encompasses BLyS binding fragments and variants (including derivatives) of polypeptides having the specific amino acid sequences described herein (SEQ ID NOs:1-12, 20-172, and 186-444). By "variant" of an amino acid sequence as described herein is meant a polypeptide that binds

30 BLyS, but does not necessarily comprise an identical or similar amino acid sequence of a BLyS binding polypeptide specified herein. BLyS binding polypeptides of the invention which are variants of a BLyS binding polypeptide specified herein satisfy at least one of the following: (a) a polypeptide comprising, or alternatively consisting of, an amino acid

WO 02/16412

PCT/US01/25891

sequence that is at least 30%, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 99%, or 100% identical to the amino acid sequence of a BLYS binding polypeptide sequence disclosed herein (SEQ ID NOs:1-12, 20-172, and 186-444), (b) a polypeptide encoded by a nucleotide sequence, the complementary sequence of which hybridizes under stringent conditions to a nucleotide sequence encoding a BLYS binding polypeptide disclosed herein (e.g., a nucleic acid sequence encoding the amino acid sequence of SEQ ID NOs:1-12, 20-172, and 186-444), and/or a fragment of a BLYS binding polypeptide disclosed herein, of at least 5 amino acid residues, at least 10 amino acid residues, at least 15 amino acid residues, or at least 20 amino acid residues. BLYS binding polypeptides of the invention also encompass polypeptide sequences that have been modified for various applications provided that such modifications do not eliminate the ability to bind a BLYS target. Specific, non-limiting examples of modifications contemplated include C-terminal or N-terminal amino acid substitutions or peptide chain elongations for the purpose of linking the BLYS binder to a chromatographic material or other solid support. Other substitutions contemplated herein include substitution of one or both of a pair of cysteine residues that normally form disulfide links, for example with non-naturally occurring amino acid residues having reactive side chains, for the purpose of forming a more stable bond between those amino acid positions than the former disulfide bond. All such modified binding polypeptides are also considered BLYS binding polypeptides according to this invention so long as the modified polypeptides retain the ability to bind BLYS and/or BLYS-like polypeptides, and therefore, may be used in one or more of the various methods described herein, such as, to detect, purify, or isolate BLYS or BLYS-like polypeptides in or from a solution. BLYS binding polypeptides of the invention also include variants of the specific BLYS binding polypeptide sequences disclosed herein (e.g., SEQ ID NOs:1-12, 20-172, and 186-444) which have an amino acid sequence corresponding to one of these polypeptide sequences, but in which the polypeptide sequence is altered by substitutions, additions or deletions that provide for molecules that bind BLYS. Thus, the BLYS binding polypeptides include polypeptides containing, as a primary amino acid sequence, all or part of the particular BLYS binding polypeptide sequence including altered sequences in which functionally equivalent amino acid residues are substituted for residues within the sequence, resulting in a peptide which is functionally active. For example, one or more amino acid residues within the sequence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

can be substituted by another amino acid of a similar polarity which acts as a functional equivalent, resulting in a silent alteration. Conservative substitutions for an amino acid within the sequence may be selected from other members of the class to which the amino acid belongs. For example, the nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan and methionine. The polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine and histidine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid. Such BLYS binding polypeptides can be made either by chemical peptide synthesis or by recombinant production from a nucleic acid encoding the BLYS binding polypeptide which nucleic acid has been mutated. Any technique for mutagenesis known in the art can be used, including but not limited to, chemical mutagenesis, in vitro site-directed mutagenesis (Hutchinson et al., *J. Biol. Chem.*, 253:6551 (1978)), use of TAB.RTM. linkers (Pharmacia), etc.

As used and understood herein, percent homology or percent identity of two amino acid sequences or of two nucleic acid sequences is determined using the algorithm of Karlin and Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2264-2268 (1990)), modified as in Karlin and Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5877 (1993)). Such an algorithm is incorporated into the NBLAST and XBLAST programs of Altschul et al. (*J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990)). BLAST nucleotide searches are performed with the NBLAST program to obtain nucleotide sequences homologous to a nucleic acid molecule described herein. BLAST protein searches are performed with the XBLAST program to obtain amino acid sequences homologous to a reference polypeptide. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST is utilized as described in Altschul et al. (*Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402 (1997)). When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (e.g., XBLAST and NBLAST) are used. See, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Alternatively, the percent identity of two amino acid sequences or of two nucleic acid sequences can be determined once the sequences are aligned for optimal comparison purposes (e.g., gaps can be introduced in the sequence of a first amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment with a second amino acid or nucleic acid sequence). The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid

WO 02/16412

PCT/US01/25891

residue or nucleotide at the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position. The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences (i.e., % identity = number of identical overlapping positions/total number of positions × 100%). In one embodiment, the two sequences are the same length.

The term "polypeptide", as used herein, refers to a linear, branched, or cyclic (e.g., containing a loop structure) polymer of two or more amino acid residues linked with a peptide bond. The term "polypeptide" is not restricted to any particular upper limit of amino acid residues. Thus, the BLYS affinity ligands of the invention that comprise an amino acid sequence described herein are properly referred to as "BLYS binding polypeptides" because such binding polypeptides contain at least two amino acid residues held together by a peptide bond, even though such molecules may also contain one or more additional moieties or groups that are not amino acids, such as N-terminal and/or C-terminal capping or functional groups, and that may or may not be involved in a peptide bond. The polypeptides of the invention may be monovalent, divalent, trivalent, or multivalent and may comprise one or more of the BLYS binding polypeptides having the amino acid sequence of SEQ ID NOs:1-12, 20-172, and 186-444 and/or fragments or variants thereof. The term "peptide" is used herein to have the same meaning as "polypeptide."

"Feed stream": BLYS and BLYS-like polypeptides that are bound by a BLYS binding polypeptide of this invention may be produced by any method known in the art, including, but not limited to, chemical synthesis; production in transformed host cells; secretion into culture medium by naturally occurring cells or recombinantly transformed bacteria, yeasts, fungi, insect cells, plant cells, and mammalian cells; production in genetically engineered organisms (for example, transgenic mammals); and production in non-genetically engineered organisms. The solution, sample, or mixture that contains a BLYS or BLYS-like polypeptide as it is produced or is found present in a production solution will sometimes be referred to as the "feed stream".

The term "binding" refers to the determination by standard techniques that a binding polypeptide recognizes and binds to a given target. Such standard techniques include, but are not limited to, affinity chromatography, equilibrium dialysis, gel filtration, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), FACS analysis, and the monitoring of spectroscopic changes that result from binding, e.g., using fluorescence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

anisotropy, either by direct binding measurements or competition assays with another binder.

The term "specificity" refers to a binding polypeptide of the invention that has a higher binding affinity for one target over another. Thus, the term "BLyS target protein specificity" refers to a molecule having a higher affinity for BLyS target protein as compared with another molecule that is not a BLyS target protein.

Other terms are defined as necessary in the text below.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides novel binding moieties for BLyS. Such binding moieties make possible the efficient detection and isolation of BLyS or BLyS-like polypeptides in tissues or in a solution or system that contains BLyS or BLyS-like polypeptides. The BLyS binding polypeptides disclosed herein can also be used to immobilize BLyS targets and provide a means of removing BLyS target proteins from solutions or systems containing them. The preferred binding moieties of the present invention bind BLyS with high affinity, i.e., acting at low concentrations.

BLyS Binding Polypeptides

The present invention provides new polypeptides and families of polypeptides that specifically bind to B lymphocyte stimulator protein (BLyS) and/or BLyS-like polypeptides. In particular, the invention encompasses polypeptides that specifically bind to a polypeptide or polypeptide fragment of human BLyS (SEQ ID NOS:173 and/or 174) or BLyS expressed on human monocytes; murine BLyS (SEQ ID NOS:175 and/or 176) or BLyS expressed on murine monocytes; rat BLyS (either the soluble forms as given in SEQ ID NOS:177, 178, 179 and/or 180 or in a membrane associated form, e.g., on the surface of rat monocytes); or monkey BLyS (e.g., the monkey BLyS polypeptides of SEQ ID NOS:181 and/or 182, the soluble form of monkey BLyS, or BLyS expressed on monkey monocytes); preferably human BLyS.

In specific preferred embodiments, the BLyS binding polypeptides of the invention bind BLyS and/or BLyS-like polypeptides with high affinity. In other embodiments, the BLyS binding polypeptides of the invention reversibly bind BLyS and/or BLyS-like polypeptides. In still other embodiments, the BLyS binding polypeptides of the invention irreversibly bind BLyS and/or BLyS-like polypeptides.

WO 02/16412

PCT/US01/25891

The cysteine residues in polypeptides are believed to form a disulfide bond, which would cause the polypeptide containing these cysteine residues to form a stable loop structure under non-reducing conditions. Especially preferred BLyS binding polypeptides of the invention are polypeptide molecules that comprise amino acid sequences that form

5 stable loop structures or other stable structures that bind BLyS or BLyS-like polypeptides.

In specific embodiments, the invention relates to BLyS binding polypeptides comprising, or alternatively consisting of, an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1-12, 20-172, and 186-444, preferably SEQ ID NOs: 163-172 or 436-444 as referred to above and in Tables 1-8, 14 and 15 and in

10 Examples 2, 5 and 6 below. Analysis of the sequences of the BLyS binding polypeptides isolated as described herein shows a strong selection for polypeptides containing the tetrapeptide Asp-Xaa-Leu-Thr (SEQ ID NO:446), and therefore in its broadest aspects, the present invention relates to polypeptides capable of binding to BLyS comprising the polypeptide Asp-Xaa-Leu-Thr (SEQ ID NO:446), where Xaa is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu,

15 Tyr, Cys, or Ala (preferably Pro or Ser).

Seven consensus sequences (SEQ ID NOs:1-7) have been determined based on the specific BLyS binding polypeptides shown in Tables 1-8. In specific embodiments, BLyS binding polypeptides of the invention comprise one or more of these sequences. Such preferred BLyS binding polypeptides include polypeptides with the potential to

20 form a cyclic or loop structure between invariant Cys residues comprising, or alternatively consisting of, an amino acid sequence selected from A-E (SEQ ID NOs:1-5):

(A) $X_1-X_2-X_3-Cys-X_5-Phe-X_7-Trp-Glu-Cys-X_{11}-X_{12}-X_{13}$ (SEQ ID NO:1), wherein

X_1 is Ala, Asn, Lys, or Ser;

25 X_2 is Ala, Glu, Met, Ser, or Val;

X_3 is Ala, Asn, Lys, or Pro (preferably Lys);

X_5 is Phe, Trp, or Tyr (preferably Tyr);

X_7 is Pro or Tyr (preferably Pro);

X_{11} is Ala, Gln, His, Phe, or Val;

30 X_{12} is Asn, Gln, Gly, His, Ser, or Val; and

X_{13} is Ala, Asn, Gly, Ile, Pro, or Ser,

wherein said polypeptide binds BLyS and/or BLyS-like polypeptides; or

WO 02/16412

PCT/US01/25891

- (B) $X_1-X_2-X_3-Cys-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-Cys-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ (SEQ ID NO:2),
 wherein
 X_1 is Ala, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val,
 5 or is absent;
 X_2 is Ala, Asn, Asp, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val;
 X_3 is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or Val (preferably Asp);
 10 X_5 is Asp, Ile, Leu, or Tyr (preferably Asp or Leu);
 X_6 is Arg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Tyr, or Val (preferably Glu or Leu);
 X_7 is His, Leu, Lys, or Phe (preferably His or Leu);
 X_8 is Leu, Pro, or Thr (preferably Thr or Pro);
 X_9 is Arg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, Met, or Trp (preferably Lys);
 15 X_{10} is Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val;
 X_{12} is Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val;
 X_{13} is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val; and
 X_{14} is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val, or is
 20 absent,
 wherein said polypeptide binds BLYS and/or BLYS-like polypeptides; or
 (C) $X_1-X_2-X_3-Cys-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-Cys-X_{13}-X_{14}-X_{15}$ (SEQ ID NO:3),
 wherein
 25 X_1 is Ala, Arg, Asn, Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, or Thr;
 X_2 is Asn, Asp, Gln, His, Ile, Lys, Pro, Thr, or Trp;
 X_3 is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Phe, Pro, or Thr (preferably Ala);
 X_5 is Asn, Asp, Pro, Ser, or Thr (preferably Asp);
 X_6 is Arg, Asp, Ile, Leu, Met, Pro, or Val (preferably Ile);
 30 X_7 is Ala, Ile, Leu, Pro, Thr, or Val (preferably Val or Leu);
 X_8 is Asn, His, Ile, Leu, Lys, Phe, or Thr (preferably Thr);
 X_9 is Asn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr (preferably Leu);
 X_{10} is Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, Ser, or Trp;

WO 02/16412

PCT/US01/25891

- X₁₁ is Arg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, Trp, or Tyr (preferably Ser);
 X₁₃ is Gln, Glu, Ile, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr, or Val (preferably Val);
 X₁₄ is Asn, Gly, Ile, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr; and
 X₁₅ is Asn, Asp, Glu, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr (preferably Glu or Pro);
 5 wherein said polypeptide binds BLYS and/or BLYS-like polypeptides; or
 (D) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-Cys-X₁₄-X₁₅-X₁₆
 (SEQ ID NO:4),
 wherein
 X₁ is Asn, Asp, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr, or is absent (preferably Ser);
 10 X₂ is Arg, Asn, Asp, His, Phe, Ser, or Trp (preferably Arg);
 X₃ is Asn, Asp, Leu, Pro, Ser, or Val (preferably Asn or Asp);
 X₅ is Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, or Thr;
 X₆ is His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, or Tyr;
 X₇ is Asp, His, Leu, or Ser (preferably Asp);
 15 X₈ is Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro, or Thr (preferably Glu or Pro);
 X₉ is Ala, Arg, Asn, or Leu (preferably Leu);
 X₁₀ is Ile, Leu, Met, Pro, Ser, or Thr (preferably Thr);
 X₁₁ is Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser, or Tyr;
 X₁₂ is Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val;
 20 X₁₄ is Asp, Gly, Leu, Phe, Tyr, or Val (preferably Leu);
 X₁₅ is Asn, His, Leu, Pro, or Tyr (preferably His, Leu or Pro); and
 X₁₆ is Asn, Asp, His, Phe, Ser, or Tyr, (preferably Asp or Ser),
 wherein said polypeptide binds BLYS and/or BLYS-like polypeptides; or
 (E) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-Cys-X₁₆-X₁₇-
 25 X₁₈ (SEQ ID NO:5),
 wherein
 X₁ is Arg, Asp, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or is absent (preferably Arg);
 X₂ is Ala, Arg, Asn, Asp, Gly, Pro, Ser, or is absent (preferably Asn, Asp, Gly, or Pro);
 X₃ is Arg, Asn, Gln, Glu, Gly, Lys, Met, Pro, Trp or Val (preferably Gly or Met);
 30 X₅ is Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr, or Val (preferably Trp, Tyr, or
 Val);
 X₆ is Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr (preferably Asp);
 X₇ is Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, or Tyr (preferably Asp);

WO 02/16412

PCT/US01/25891

- X₈ is Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, or Tyr (preferably Leu);
 X₉ is Asp, Leu, Pro, Thr, or Val (preferably Leu or Thr);
 X₁₀ is Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp or Tyr (preferably Lys or Thr);
 X₁₁ is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Met, or Thr (preferably Arg or Leu);
 5 X₁₂ is Ala, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr (preferably Thr or Trp);
 X₁₃ is Ala, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr (preferably Met or Phe);
 X₁₄ is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, or Val (preferably Val);
 X₁₆ is Arg, Asp, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, or Trp (preferably Met);
 X₁₇ is Arg, Asn, Asp, Gly, His, Phe, Pro, Ser, Trp or Tyr, (preferably Arg, His, or Tyr);
 10 and
 X₁₈ is Ala, Arg, Asn, Asp, His, Leu, Phe, or Trp (preferably His or Asn),
 wherein said polypeptide binds BLyS and/or BLyS-like polypeptides.
 Additional preferred embodiments include linear polypeptides comprising, or
 alternatively consisting of, an amino acid sequence selected from F and G (SEQ ID
 15 NOs:6 and 7):
 (F) X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂ (SEQ ID NO:6),
 wherein
 X₁ is Ala, Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Tyr, or Val (preferably Gly, Tyr, or
 Val);
 20 X₂ is Ala, Arg, Gln, His, Ile, Leu, Phe, Thr, Trp, or Tyr (preferably His or Tyr);
 X₃ is Ala, Asp, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr (preferably Asp or Tyr);
 X₄ is Arg, Asp, Gln, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr, or Val (preferably Asp or Gln);
 X₅ is Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, or Val (preferably Leu or Ser);
 X₆ is His, Ile, Leu, Pro, Ser, or Thr (preferably Leu or Thr);
 25 X₇ is Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, or Thr (preferably Lys or Thr);
 X₈ is Ala, Arg, Asn, Ile, Leu, Lys, Met, or Thr (preferably Leu or Lys);
 X₉ is Ala, Asn, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val (preferably Met
 or Ser);
 X₁₀ is Ile, Leu, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val (preferably Thr or Leu);
 30 X₁₁ is Ala, Arg, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val (preferably Pro or
 Thr); and
 X₁₂ is Arg, Asp, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or Val (preferably Arg or
 Pro),

WO 02/16412

PCT/US01/25891

wherein said polypeptide binds BLyS and/or BLyS-like polypeptides; or

(G) $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}$ (SEQ ID NO:7),

wherein

X_1 is Asp, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Met, or Trp (preferably Glu, Lys);

5 X_2 is Arg, Gln, His, Ile, Leu, or Pro (preferably His or Pro);

X_3 is Asp, Gly, Ile, Lys, Thr, Tyr or Val (preferably Tyr);

X_4 is Asn, Asp, Gln, Glu, Met, Pro, Ser, or Tyr (preferably Asp or Gln);

X_5 is Asn, Asp, His, Ile, Leu, Met, Pro, Thr or Val (preferably Asn or Thr);

X_6 is Asp, Glu, His, Leu, Lys, Pro, or Val (preferably Asp or Pro);

10 X_7 is Arg, Asn, Gln, His, Ile, Leu, Met, Pro, or Thr (preferably Ile or Pro);

X_8 is Gln, Gly, His, Leu, Met, Ser, or Thr (preferably Leu or Thr);

X_9 is Asn, Gln, Gly, His, Leu, Lys, Ser, or Thr (preferably Lys);

X_{10} is Ala, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, or Phe (preferably Gly or Met);

X_{11} is Ala, Glu, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val (preferably Ala or Thr);

15 X_{12} is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Tyr, or Val (preferably Arg or His); and

X_{13} is Arg, Asn, Glu, His, Ile, Ser, Thr, Trp, or Val (preferably His),

wherein said polypeptide binds BLyS and/or BLyS-like polypeptides.

Said polypeptides may have additional amino acids attached at either or both of the N- and C-terminal ends.

20 Examination of the sequence information and binding data from the isolates of libraries containing polypeptides with the potential to form loop structures (i.e., libraries designated TN6, TN7, TN8, TN9, TN10 and TN12) identifies a series of BLyS binding polypeptides that may form loop structures. In specific embodiments, BLyS binding polypeptides of the invention comprise, or alternatively consist of, an amino acid

25 sequence selected from H-L (SEQ ID NOs:8-12):

(H) $Cys-X_2-Phe-X_4-Trp-Glu-Cys$ (SEQ ID NO:8),

wherein

X_2 is Phe, Trp, or Tyr (preferably Tyr); and

X_4 is Pro or Tyr (preferably Pro); or

30 (I) $Cys-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-Cys$ (SEQ ID NO:9),

wherein

X_2 is Asp, Ile, Leu, or Tyr (preferably Asp or Leu);

X_3 is Arg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Tyr, or Val (preferably Glu or Leu);

WO 02/16412

PCT/US01/25891

- X_4 is His, Leu, Lys, or Phe (preferably His or Leu);
 X_5 is Leu, Pro, or Thr (preferably Thr or Pro);
 X_6 is Arg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, Met, or Trp (preferably Lys); and
 X_7 is Ala, Asn, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val; or
 5 (J) Cys- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 -Cys (SEQ ID NO:10),
 wherein
 X_2 is Asn, Asp, Pro, Ser, or Thr (preferably Asp);
 X_3 is Arg, Asp, Ile, Leu, Met, Pro, or Val (preferably Ile);
 X_4 is Ala, Ile, Leu, Pro, Thr, or Val (preferably Val or Leu);
 10 X_5 is Asn, His, Ile, Leu, Lys, Phe, or Thr (preferably Thr);
 X_6 is Asn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr (preferably Leu);
 X_7 is Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, Ser, or Trp;
 X_8 is Arg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, Trp, or Tyr (preferably Ser); or
 (K) Cys- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 -Cys (SEQ ID NO:11),
 15 wherein
 X_2 is Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, or Thr;
 X_3 is His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, or Tyr;
 X_4 is Asp, His, Leu, or Ser (preferably Asp);
 X_5 is Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro, or Thr (preferably Glu or Pro);
 20 X_6 is Ala, Arg, Asn, or Leu (preferably Leu);
 X_7 is Ile, Leu, Met, Pro, Ser, or Thr (preferably Thr);
 X_8 is Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser, or Tyr;
 X_9 is Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val; or
 (L) Cys- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} -Cys (SEQ ID NO: 12),
 25 wherein
 X_2 is Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr, or Val (preferably Trp, Tyr, or Val);
 X_3 is Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr (preferably Asp);
 X_4 is Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, or Tyr (preferably Asp);
 30 X_5 is Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, or Tyr (preferably Leu);
 X_6 is Asp, Leu, Pro, Thr, or Val (preferably Leu or Thr);
 X_7 is Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp or Tyr (preferably Lys or Thr);
 X_8 is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Met, or Thr (preferably Arg or Leu);

WO 02/16412

PCT/US01/25891

X₉ is Ala, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr (preferably Thr or Trp);
 X₁₀ is Ala, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr (preferably Met or Phe);
 X₁₁ is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, or Val (preferably Val);
 wherein said polypeptides bind BLYS and/or BLYS-like polypeptides.

5 In additional preferred embodiments of the present invention, BLYS binding polypeptides comprise the following amino acid sequence M (SEQ ID NO:447):

(M) Ala-X₂-X₃-X₄-Asp-X₆-Leu-Thr-X₉-Leu-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (SEQ ID NO:447),

wherein

10 X₂ is Asn, Ser, Tyr, Asp, Phe, Ile, Gln, His, Pro, Lys, Leu, Met, Thr, Val, Glu, Ala, Gly, Cys, or Trp (i.e., any amino acid except Arg; preferably Asn);
 X₃ is Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly, or Ser (preferably Trp);
 X₄ is Tyr, Phe, Glu, Cys, Asn (preferably Tyr);
 15 X₆ is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala (preferably Pro or Ser);
 X₉ is Lys, Asn, Gln, Gly, or Arg (preferably Lys);
 X₁₁ is Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr, or Lys (preferably Trp);
 X₁₂ is Leu, Phe, Val, Ile, or His (preferably Leu);
 X₁₃ is Pro, Leu, His, Ser, Arg, Asn, Gln, Thr, Val, Ala, Cys, Ile, Phe, or Tyr (i.e., not Asp,
 20 Glu, Gly, Lys, Met, or Trp; preferably Pro); and
 X₁₄ is Asp, Glu, Asn, Val, His, Gln, Arg, Gly, Ser, Tyr, Ala, Cys, Lys, Ile, Thr or Leu (i.e., not Phe, Met, Pro, or Trp; preferably Asp, Val or Glu).

Preferred embodiments are polypeptides comprising a core sequence of the formula N:

25 (N) X₁-X₂-Asp-X₄-Leu-Thr-X₇-Leu-X₉-X₁₀ (SEQ ID NO:448),

wherein

X₁ is Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly, or Ser (preferably Trp);
 X₂ is Tyr, Phe, Glu, Cys, Asn (preferably Tyr);
 30 X₄ is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala (preferably Pro or Ser);
 X₇ is Lys, Asn, Gln, Gly, or Arg (preferably Lys);
 X₉ is Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr, or Lys (preferably Trp); and
 X₁₀ is Leu, Phe, Val, Ile, or His (preferably Leu).

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Especially preferred BLyS binding polypeptides according to the present invention comprise the core peptide Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu (SEQ ID NO:436).

5 The BLyS binding polypeptides described above may have additional amino acids attached at either or both of the N- and C-terminal ends.

BLyS binding polypeptide molecules of the invention may also have an amino terminal (N-terminal) capping or functional group, such as an acetyl group, which, for example, blocks the amino terminal amino group from undesirable reactions or is useful in linking the BLyS binding polypeptide to another molecule, matrix, resin, or solid support. BLyS binding polypeptides of the invention may also have a carboxy terminal (C-terminal) capping or functional group, such as an amide group, which, for example, blocks the C-terminal carboxyl group from undesirable reactions or provides a functional group useful in conjugating the binding polypeptide to other molecules, matrices, resins, or solid supports. Preferably, the N- and/or C-terminal capping groups are polypeptide linker molecules. An especially preferred C-terminal linker molecule that is useful for immobilizing a BLyS binding polypeptide of the invention to a solid support or chromatographic matrix material comprises the amino acid sequence Pro-Gly-Pro-Glu-Gly-Gly-Lys (SEQ ID NO:13). Another useful C-terminal linker, e.g., for fluoresceinating peptides, is Gly-Gly-Lys (see Table 15).

20 The invention also encompasses, BLyS binding polypeptides that have been modified, for example, to increase or decrease the stability of the molecule, while retaining the ability to bind BLyS and/or BLyS-like polypeptides. An example of a modified BLyS binding polypeptide of the invention is a polypeptide in which one of two cysteine residues is substituted with a non-naturally occurring amino acid that is capable of condensing with the remaining cysteine side chain to form a stable thioether bridge, thereby generating a cyclic BLyS binding polypeptide. Such cyclic thioether molecules of synthetic peptides may be routinely generated using techniques known in the art and described, e.g., in PCT publication WO 97/46251, incorporated herein by reference.

30 In another embodiment, the invention provides BLyS binding polypeptides of the invention attached, coupled, linked or adhered to a matrix or resin or solid support. Techniques for attaching linking or adhering polypeptides to matrices, resins and solid supports are well known in the art. Suitable matrices, resins or solid supports for these materials may be any composition known in the art to which binding polypeptides are

WO 02/16412

PCT/US01/25891

commonly attached, coupled, linked, or adhered, including but not limited to, a chromatographic resin or matrix, such as SEPHAROSE-4 FF agarose beads, the wall or floor of a well in a plastic microtiter dish, such as used in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), or a silica based biochip. Materials useful as solid supports on which to immobilize binding polypeptides of the invention include, but are not limited to, polyacrylamide, agarose, silica, nitrocellulose, paper, plastic, nylon, metal, and combinations thereof. A BLyS binding polypeptide of the invention may be immobilized on a matrix, resin or solid support material by a non-covalent association or by covalent bonding, using techniques known in the art. Preferably, a BLyS binding polypeptide of the invention is immobilized on SEPHAROSE-4 FF agarose chromatographic material. More preferably, a BLyS binding polypeptide of the invention is coupled to a chromatography material such as SEPHAROSE-4FF (agarose). In an even more preferred embodiment, a BLyS binding polypeptide of the invention is coupled to a chromatography material using a linker molecule. A preferred linker molecule according to the present invention is a polypeptide comprising the amino acid sequence Pro-Gly-Pro-Glu-Gly-Gly-Gly-Lys (SEQ ID NO:13). Most preferably, the affinity chromatography material of the invention comprises a BLyS binding polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:163-172, which is linked to a chromatography material by a polypeptide linker molecule having the amino acid sequence Pro-Gly-Pro-Glu-Gly-Gly-Gly-Lys (SEQ ID NO:13). BLyS binding polypeptides of the invention attached, coupled, linked or adhered to a matrix or resin or solid support are useful for methods of detecting, isolating and purifying BLyS and/or BLyS like polypeptides, particularly for purification of BLyS and/or BLyS like polypeptides by affinity chromatography.

In certain preferred embodiments, the BLyS binding polypeptides of the present invention or phage displaying such binding polypeptides, irreversibly bind the BLyS protein in its native, soluble trimeric form.

In certain preferred embodiments, the BLyS binding polypeptides of the present invention or phage displaying such binding polypeptides, reversibly bind the BLyS protein in its native, soluble trimeric form.

BLyS binding polypeptides of the invention bind BLyS target protein with high affinity. In specific embodiments, BLyS binding polypeptides of the invention bind BLyS target proteins with a dissociation constant or K_D of less than or equal to 5×10^{-2}

WO 02/16412

PCT/US01/25891

M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, or 10^{-5} M. More preferably, BLYS binding polypeptides of the invention bind BLYS target proteins with a dissociation constant or K_D less than or equal to 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, or 10^{-8} M. Even more preferably, BLYS binding polypeptides of the invention bind BLYS target proteins with a dissociation constant or K_D less than or equal to 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, or 10^{-15} M.

In certain preferred embodiments, BLYS binding polypeptides of the invention reversibly bind BLYS and/or BLYS-like polypeptides and release bound BLYS protein in an active form, preferably in the native soluble trimeric form, under specific release conditions. In specific embodiments, BLYS binding polypeptides of the invention bind BLYS target proteins with off-rates or k_{off} greater than or equal to 10^{-10} s^{-1} , $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, 10^{-9} s^{-1} , $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, 10^{-8} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, 10^{-7} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 10^{-3} s^{-1} , $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, or 10^{-1} s^{-1} .

Binding experiments to determine K_D and off-rates can be performed in a number of conditions including, but not limited to, [pH 6.0, 0.01% Tween 20], [pH 6.0, 0.1% gelatin], [pH5.0, 0.01% Tween 20], [pH9.0, 0.1% Tween 20], [pH6.0, 15% ethylene glycol, 0.01 % Tween20], [pH5.0, 15% ethylene glycol, 0.01 % Tween 20], and [pH9.0, 15% ethylene glycol, 0.01 % Tween 20]. The buffers in which to make these solutions can readily be determined by one of skill in the art, and depend largely on the desired pH of the final solution. Low pH solutions (< pH 5.5) can be made, for example, in citrate buffer, glycine-HCl buffer, or in succinic acid buffer. High pH solutions can be made, for example, in Tris-HCl, phosphate buffers, or sodium bicarbonate buffers. A number of conditions may be used to determine K_D and off-rates for the purpose of determining, for example, optimal pH and/or salt concentrations.

In certain embodiments, BLYS binding polypeptides of the invention reversibly bind BLYS and/or BLYS-like polypeptides, preferably in the native soluble, trimeric form.

In preferred embodiments, BLYS binding polypeptides of the invention reversibly bind only the native soluble, trimeric form of BLYS.

In certain embodiments, BLYS binding polypeptides of the invention irreversibly bind BLYS and/or BLYS-like polypeptides, preferably in the native soluble, trimeric form.

In preferred embodiments, BLYS binding polypeptides of the invention irreversibly bind only the native soluble, trimeric form of BLYS.

WO 02/16412

PCT/US01/25891

In some screening or assay procedures, it is possible and more convenient to use recombinant bacteriophage that display a particular BLyS binding polypeptide instead of using isolated BLyS binding polypeptide. Such procedures include phage-based ELISA protocols and immobilization of phage displaying a binding polypeptide to chromatographic materials. Such screening assays and procedures are routine in the art and may be readily adapted for procedures using the recombinant bacteriophage of the present invention.

The invention also encompasses BLyS binding polypeptides that competitively inhibit the binding of a BLyS binding polypeptide disclosed herein (e.g., a polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NOS:163-168) for binding to BLyS. Competitive inhibition can be determined by any suitable method known in the art, for example, using the competitive binding assays described herein. In preferred embodiments, the polypeptide competitively inhibits the binding of a BLyS binding polypeptide disclosed herein (e.g., a polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NOS:163-168) to BLyS by at least 95%, at least 90%, at least 85%, at least 80%, at least 75%, at least 70%, at least 60%, or at least 50%. In a more preferred embodiment, the BLyS binding polypeptide competitively inhibits the binding of a BLyS binding polypeptide disclosed herein (e.g., a polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NOS:163-168) to the native soluble trimeric form of BLyS, by at least 95%, at least 90%, at least 85%, at least 80%, at least 75%, at least 70%, at least 60%, or at least 50%.

In a further embodiment, the present invention encompasses a composition of matter comprising isolated nucleic acids, preferably DNA, encoding a BLyS binding polypeptide of the invention. In a specific embodiment, nucleic acid molecules of the invention encode a BLyS binding polypeptide of the invention as provided in SEQ ID NOS:1-12, 20-172, and 186-444. In additional embodiments, nucleic acid molecules of the invention encode a polypeptide variant or fragment of a polypeptide having an amino acid sequence of SEQ ID NOS:1-12, 20-172, and 186-444. In a further additional embodiment, nucleic acid molecules of the invention encode a BLyS binding polypeptide, the complementary strand of which nucleic acid hybridizes to a polynucleotide sequence encoding a polypeptide described in Tables 1-8 and in Examples 2 and 5 (SEQ ID NOS:1-12, 20-172, and 186-444), under stringent conditions, e.g., hybridization to filter-bound DNA in 6x sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45° C followed by one or more washes in 0.2xSSC/0.1% SDS at about 50-65° C, under highly stringent conditions, e.g.,

WO 02/16412

PCT/US01/25891

hybridization to filter-bound nucleic acid in 6xSSC at about 45° C followed by one or more washes in 0.1xSSC/0.2% SDS at about 68° C, or under other stringent hybridization conditions which are known to those of skill in the art (see, for example, Ausubel et al., eds., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York at pages 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3).

The present invention also relates to recombinant vectors that include the isolated nucleic acid molecules encoding the BLyS binding polypeptides of the present invention (as well as fragments and variants thereof), and to host cells containing the recombinant vectors, as well as to methods of making such vectors and host cells. The invention further provides for the use of such recombinant vectors in the production of BLyS binding polypeptides by recombinant techniques.

The BLyS binding polypeptides, nucleic acids, transformed host cells, and genetically engineered viruses and phage of the invention (e.g., recombinant phage), have uses that include, but are not limited to, the detection, isolation, and purification of BLyS.

In another embodiment of the invention, recombinant bacteriophage displaying BLyS binding polypeptides on their surfaces are also provided. Such phage may be routinely generated using techniques known in the art and are useful, for example, as screening reagents and reagents for detecting BLyS.

20 Production and Modification of BLyS Binding Polypeptides

BLyS binding polypeptides of the invention may be produced by chemical synthesis, semi-synthetic methods, and recombinant DNA methodologies known in the art.

In certain embodiments, BLyS binding polypeptides of the present invention are produced by chemical or semi-synthetic methodologies known in the art (see, Kelley et al. in *Genetic Engineering Principles and Methods*, Setlow, J.K., ed. (Plenum Press, NY., 1990), vol. 12, pp. 1-19; Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman Co., San Francisco, 1989). One advantage of these methodologies is that they allow for the incorporation of non-natural amino acid residues into the sequence of the BLyS binding polypeptide.

In preferred embodiments, BLyS binding polypeptides of the invention are chemically synthesized (see, e.g., Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149 (1963); Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 5132 (1985)). For example, polypeptides can

be synthesized by solid phase techniques, cleaved from the resin, and purified by preparative high performance liquid chromatography (see, e.g., Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Co., N.Y., 1983), pp. 50-60). BLYS binding polypeptides can also be synthesized by use of a peptide synthesizer. The composition of the synthetic polypeptides may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the Edman degradation procedure; see Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Co., N.Y., 1983), pp. 34-49). Furthermore, if desired, BLYS binding polypeptides of the invention may contain non-classical amino acids or chemical amino acid analogs, which can routinely be introduced during chemical synthesis as a substitution or addition into the BLYS binding polypeptides of the invention. Non-classical amino acids include, but are not limited to, the D-isomers of the common amino acids, 2,4-diaminobutyric acid, alpha-aminoisobutyric acid, 4-aminobutyric acid (4Abu), 2-aminobutyric acid (Abu), 6-aminohexanoic acid (epsilon-Ahx), 2-aminoisobutyric acid (Aib), 3-amino propionic acid, ornithine, norleucine, norvaline, hydroxyproline, sarcosine, citrulline, homocitrulline, cysteine acid, t-butylglycine, t-butylalanine, phenylglycine, cyclohexylalanine, beta-alanine (bAla), fluoro-amino acids, designer amino acids such as beta-methyl amino acids, Calpha-methyl amino acids, Nalpha-methyl amino acids, and amino acid analogs in general. Furthermore, the amino acid can be D (dextrorotary) or L (levorotary).

20 Solid phase peptide synthesis begins at the carboxy (C) terminus of the putative polypeptide by coupling a protected amino acid to a suitable resin, which reacts with the carboxyl group of the C-terminal amino acid to form a bond that is readily cleaved later, for example, a halomethyl resin such as chloromethyl resin, bromomethyl resin, hydroxymethyl resin, aminomethyl resin, benzhydrylamine resin, or t-alkyloxycarbonyl-hydrazide resin. After removal of the α -amino protecting group with, for example, trifluoroacetic acid (TFA) in methylene chloride and neutralization with, for example TEA, the next cycle in the synthesis is ready to proceed. The remaining α -amino and, if necessary, side-chain-protected amino acids are then coupled sequentially in the desired order by condensation to obtain an intermediate compound connected to the resin.

30 Alternatively, some amino acids may be coupled to one another forming an oligopeptide prior to addition to the growing solid phase polypeptide chain.

The condensation between two amino acids, or an amino acid and a peptide, or a peptide and a peptide can be carried out according to condensation methods known in the

WO 02/16412

PCT/US01/25891

art, including but not limited to, the azide method, mixed acid anhydride method, DCC (dicyclohexylcarbodiimide) method, active ester method (p-nitrophenyl ester method, BOP [benzotriazole-1-yl-oxy-tris (dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate] method, N-hydroxysuccinic acid imido ester method), and Woodward reagent K method.

5 Common to chemical synthesis of peptides is the protection or capping (blocking) of the reactive side chain groups of the various amino acid residues with suitable protecting or capping groups at that site until the group is ultimately removed after the polypeptide chain has been completely assembled. Also common is the protection or capping of the α -amino group on an amino acid or a fragment while that entity reacts at
10 the carboxyl group followed by the selective removal of the α -amino-protecting group to allow subsequent reaction to take place at that location. Accordingly, during synthesis, intermediate compounds are produced which includes each of the amino acid residues located in the desired sequence in the peptide chain with various of these residues having side-chain protecting or capping groups. These protecting or capping groups on amino
15 acid side chains are then removed substantially at the same time so as to produce the desired resultant product following purification.

The typical protective, capping, or blocking groups for α - and ϵ -amino side chain groups found in amino acids are exemplified by benzyloxycarbonyl (Z), isonicotinylloxycarbonyl (iNOC), O-chlorobenzyloxycarbonyl [Z(NO₂)], p-
20 methoxybenzyloxycarbonyl [Z(OMe)], t-butoxycarbonyl (Boe), t-amylloxycarbonyl (Aoc), isobornylloxycarbonyl, adamantylloxycarbonyl, 2-(4-biphenyl)-2-propyloxycarbonyl (Bpoc), 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), methylsulfonylloxycarbonyl (Msc), trifluoroacetyl, phthalyl, formyl, 2-nitrophenylsulphenyl (NPS), diphenylphosphinothioyl (Ppt), dimethylphosphinothioyl (Mpt), and the like.

25 Protective, capping, or blocking groups for the carboxyl group of amino acids include, for example, benzyl ester (OBzl), cyclohexyl ester (Chx), 4-nitrobenzyl ester (ONb), t-butyl ester (Obut), 4-pyridylmethyl ester (OPic), and the like. It is usually also desirable that side chain groups of specific amino acids such as arginine, cysteine, and serine, are protected by a suitable protective group as occasion demands. For example,
30 the guanidino group in arginine may be protected with nitro, p-toluenesulfonyl, benzyloxycarbonyl, adamantylloxycarbonyl, p-methoxybenzenesulfonyl, 4-methoxy-2,6-dimethylbenzenesulfonyl (Mds), 1,3,5-trimethylphenylsulfonyl (Mts), and the like. The

WO 02/16412

PCT/US01/25891

thiol group in cysteine may be protected with p-methoxybenzyl, triphenylmethyl, acetylaminoethyl ethylcarbamoyl, 4-methylbenzyl, 2,4,6-trimethylbenzyl (Tmb), etc., and the hydroxyl group in the serine can be protected with benzyl, t-butyl, acetyl, tetrahydropyranyl, etc.

5 After the desired amino acid sequence has been completed, the intermediate polypeptide is removed from the resin support by treatment with a reagent, such as liquid HF and one or more thio-containing scavengers, which cleaves the peptide molecule from the resin and all the remaining side-chain protecting groups. Following HF cleavage, the protein sequence is washed with ether, transferred to a large volume of dilute acetic acid,
10 and stirred at pH adjusted to about 8.0 with ammonium hydroxide. Upon pH adjustment, the polypeptide takes its desired conformational arrangement.

By way of example but not by way of limitation, polypeptides of the invention can be chemically synthesized and purified as follows: Peptides can be synthesized by employing the N- α -9-fluorenylmethyloxycarbonyl or Fmoc solid phase peptide
15 synthesis chemistry using a Rainin Symphony Multiplex Peptide Synthesizer. The standard cycle used for coupling of an amino acid to the peptide-resin growing chain generally includes: (1) washing the peptide-resin three times for 30 seconds with N,N-dimethylformamide (DMF); (2) removing the Fmoc protective group on the amino terminus by deprotection to with 20% piperidine in DMF by two washes for 15 minutes
20 each, during which process mixing is effected by bubbling nitrogen through the reaction vessel for one second every 10 seconds to prevent peptide-resin settling; (3) washing the peptide-resin three times for 30 seconds with DMF; (4) coupling the amino acid to the peptide resin by addition of equal volumes of a 250 mM solution of the Fmoc derivative of the appropriate amino acid and an activator mix consisting of 400 mM N-
25 methylmorpholine and 250 mM (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) in DMF; (5) allowing the solution to mix for 45 minutes; and (6) washing the peptide-resin three times for 30 seconds of DMF. This cycle can be repeated as necessary with the appropriate amino acids in sequence to produce the desired peptide. Exceptions to this cycle program are amino acid couplings predicted to be
30 difficult by nature of their hydrophobicity or predicted inclusion within a helical formation during synthesis. For these situations, the above cycle can be modified by repeating step 4 a second time immediately upon completion of the first 45 minute coupling step to "double couple" the amino acid of interest. Additionally, in the first

WO 02/16412

PCT/US01/25891

coupling step in peptide synthesis, the resin can be allowed to swell for more efficient coupling by increasing the time of mixing in the initial DMF washes to three 15 minute washes rather than three 30 second washes.

After peptide synthesis, the peptide can be cleaved from the resin as follows: (1) washing the peptide-resin three times for 30 seconds with DMF; (2) removing the Fmoc protective group on the amino terminus by washing two times for 15 minutes in 20% piperidine in DMF; (3) washing the peptide-resin three times for 30 seconds with DMF; and (4) mixing a cleavage cocktail consisting of 95% trifluoroacetic acid (TFA), 2.4% water, 2.4% phenol, and 0.2% triisopropylsilane with the peptide-resin for two hours, then filtering the peptide in the cleavage cocktail away from the resin, and precipitating the peptide out of solution by addition of two volumes of ethyl ether. Specifically, to isolate the peptide, the ether-peptide solution can be allowed to sit at -20° C for 20 minutes, then centrifuged at 6,000 × G for 5 minutes to pellet the peptide, and the peptide can be washed three times with ethyl ether to remove residual cleavage cocktail ingredients. The final peptide product can be purified by reversed phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) with the primary solvent consisting of 0.1% TFA and the eluting buffer consisting of 80% acetonitrile and 0.1% TFA. The purified peptide can then be lyophilized to a powder.

In other specific embodiments, branched versions of the BLYS binding polypeptides described herein are provided, e.g., by substituting one or more amino acids within the BLYS binding polypeptide sequence with an amino acid or amino acid analog with a free side chain capable of forming a peptide bond with one or more amino acids (and thus capable of forming a "branch").

Branched peptides may be prepared by any method known in the art for covalently linking any naturally occurring or synthetic amino acid to any naturally occurring or synthetic amino acid in a peptide chain which has a side chain group able to react with the amino or carboxyl group on the amino acids so as to become covalently attached to the peptide chain. In particular, amino acids with a free amino side chain group, such as, but not limited to, diaminobutyric acid, lysine, arginine, ornithine, diaminopropionic acid and citrulline, can be incorporated into a peptide so that an amino acid can form a branch therewith, for example, by forming a peptide bond to the free amino side group, from that residue. Alternatively, amino acids with a free carboxyl side chain group, such as, but not limited to, glutamic acid, aspartic acid and homocitrulline,

WO 02/16412

PCT/US01/25891

can be incorporated into the peptide so that an amino acid can form a branch therewith, for example, by forming a peptide bond to the free carboxyl side group, from that residue. The amino acid forming the branch can be linked to a side chain group of an amino acid in the peptide chain by any type of covalent bond, including, but not limited to, peptide
 5 bonds, ester bonds and disulfide bonds. In a specific embodiment, amino acids, such as those described above, that are capable of forming a branch point, are substituted for BLyS binding polypeptide residues within a peptide including a BLyS binding polypeptide sequence.

Branched peptides can be prepared by any method known in the art. For example,
 10 but not by way of limitation, branched peptides can be prepared as follows: (1) the amino acid to be branched from the main peptide chain can be purchased as an N-alpha-tert-butylloxycarbonyl (Boc) protected amino acid pentafluorophenyl (Opfp) ester and the residue within the main chain to which this branched amino acid will be attached can be an N-Fmoc-alpha-gamma-diaminobutyric acid; (2) the coupling of the Boc protected
 15 amino acid to diaminobutyric acid can be achieved by adding 5 grams of each precursor to a flask containing 150 ml DMF, along with 2.25 ml pyridine and 50 mg dimethylaminopyridine and allowing the solution to mix for 24 hours; (3) the peptide can then be extracted from the 150 ml coupling reaction by mixing the reaction with 400 ml dichloromethane (DCM) and 200 ml 0.12N HCl in a 1 liter separatory funnel, and allowing
 20 the phases to separate, saving the bottom aqueous layer and re-extracting the top layer two more times with 200 ml 0.12N HCl; (4) the solution containing the peptide can be dehydrated by adding 2-5 grams magnesium sulfate, filtering out the magnesium sulfate, and evaporating the remaining solution to a volume of about 2-5 ml; (5) the dipeptide can then be precipitated by addition of ethyl acetate and then 2 volumes of hexanes and then
 25 collected by filtration and washed two times with cold hexanes; and (6) the resulting filtrate can be lyophilized to achieve a light powder form of the desired dipeptide. Branched peptides prepared by this method will have a substitution of diaminobutyric acid at the amino acid position which is branched. Branched peptides containing an amino acid or amino acid analog substitution other than diaminobutyric acid can be
 30 prepared analogously to the procedure described above, using the N-Fmoc coupled form of the amino acid or amino acid analog.

In a preferred embodiment, the BLyS binding polypeptide of the invention is a cyclic peptide. Cyclization can be, for example, but not by way of limitation, via a

WO 02/16412

PCT/US01/25891

disulfide bond between two cysteine residues or via an amide linkage. For example, but not by way of limitation, disulfide bridge formation can be achieved by (1) dissolving the purified peptide at a concentration of between 0.1-0.5 mg/ml in 0.01 M ammonium acetate, pH 7.5; (2) adding to the dissolved peptide 0.01 M potassium ferricyanide

5 dropwise until the solution appears pale yellow in color and allowing this solution to mix for 24 hours; (3) concentrating the cyclized peptide to 5-10 ml of solution, repurifying the peptide by reverse phase-high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) and finally lyophilizing the peptide. In a specific embodiment, in which the peptide does not contain two appropriately situated cysteine residues, cysteine residues can be introduced at the

10 amino-terminus and/or carboxy-terminus and/or internally such that the peptide to be cyclized contains two cysteine residues spaced such that the residues can form a disulfide bridge. Alternatively, a cyclic peptide can be obtained by generating an amide linkage using, for example but not limited to, the following protocol: An allyl protected amino acid, such as aspartate, glutamate, asparagine or glutamine, can be incorporated into the

15 peptide as the first amino acid, and then the remaining amino acids are coupled on. The allyl protective group can be removed by a two hour mixing of the peptide-resin with a solution of tetrakis(triphenylphosphine) palladium (0) in a solution of chloroform containing 5% acetic acid and 2.5% N-methylmorpholine. The peptide resin can be washed three times with 0.5% N,N-diisopropylethylamine (DIEA) and 0.5% sodium

20 diethyldithiocarbamate in DMF. The amino terminal Fmoc group on the peptide chain can be removed by two incubations for 15 minutes each in 20% piperidine in DMF, and washed three times with DMF for 30 seconds each. The activator mix, N-methylmorpholine and HBTU in DMF, can be brought onto the column and allowed to couple the free amino terminal end to the carboxyl group generated by removal of the

25 allyl group to cyclize the peptide. The peptide can be cleaved from the resin as described in the general description of chemical peptide synthesis above and the peptide purified by reverse phase-high pressure liquid chromatography (RP-HPLC). In a specific embodiment, in which the peptide to be cyclized does not contain an allyl protected amino acid, an allyl protected amino acid can be introduced into the sequence of the

30 peptide, at the amino-terminus, carboxy-terminus or internally, such that the peptide can be cyclized.

In addition, according to certain embodiments, it is preferable that the BLYS binding polypeptides of the invention are produced having or retaining an amino terminal

WO 02/16412

PCT/US01/25891

(N-terminal) and/or a carboxy terminal (C-terminal) capping group, which may protect the N-terminal or C-terminal amino acid from undesirable chemical reactions during use or which may permit further conjugations or manipulations of the binding polypeptide, for example, in conjugating the binding polypeptide to a chromatographic support resin or matrix or to another peptide to tether the binding polypeptide to a resin or support. Such N-terminal and C-terminal groups may also be used to label or tag the binding polypeptide to detect bound complexes or to locate the binding polypeptide (whether bound or unbound to a BLyS target protein) for example, at some point in a separation procedure. Accordingly, a BLyS binding polypeptide of the invention synthesized in its final form for use in a detection or separation procedure may contain an N-terminal and/or a C-terminal capping group. A particularly preferred N-terminal capping group, which may be present or retained in binding polypeptides of the invention, is an acetyl group (Ac). A particularly preferred C-terminal capping group, which may be present or retained in binding polypeptides of the invention, is an amide group. In a further preferred embodiment, the BLyS binding polypeptides of the invention have an acetyl group as an N-terminal capping group and an amide group as a C terminal capping group.

The BLyS binding polypeptides of the invention may also be prepared commercially by companies providing polypeptide synthesis as a service (e.g., BACHEM Bioscience, Inc., King of Prussia, PA; Quality Controlled Biochemicals, Inc., Hopkinton, MA).

The nucleic acid sequence encoding a BLyS binding polypeptide of the invention can be produced and isolated using well-known techniques in the art. In one example, nucleic acids encoding the BLyS binding polypeptides of the invention are chemically synthesized based on knowledge of the amino acid sequence of the BLyS binding polypeptide (preferably the sequence is codon optimized to the host system in which the polypeptide will be expressed). In another example, nucleic acids encoding a BLyS binding polypeptide are obtained by screening an expression library (e.g., a phage display library) to identify phage expressing BLyS binding polypeptides, and isolating BLyS binding polypeptide encoding nucleic acid sequences from the identified library member (e.g., via polymerase chain reaction methodology using primers flanking the polypeptide encoding sequences).

The present invention also relates to vectors which include nucleic acid sequences encoding the BLyS binding polypeptides of the invention, host cells which are genetically

engineered with the recombinant vectors, or which are otherwise engineered to produce the polypeptides of the invention, and the production of BLyS binding polypeptides, or fragments thereof, by recombinant, chemical or synthetic techniques.

Thus, according to the present invention, BLyS binding polypeptides can also be
5 obtained by recombinant expression techniques. (See, e.g., Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Glover, D. M. (ed.), (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); DNA Cloning: A Practical Approach (MRL Press, Ltd., Oxford, U.K., 1985), Vols. I, II.

To produce a recombinant BLyS binding polypeptide, a nucleic acid sequence
10 encoding the BLyS binding polypeptide is operatively linked to a promoter such that the BLyS binding polypeptide is produced from said sequence. For example, a vector can be introduced into a cell, within which cell the vector or a portion thereof is expressed, producing the BLyS binding polypeptides. In a preferred embodiment, the nucleic acid is DNA if the source of RNA polymerase is DNA-directed RNA polymerase, but the
15 nucleic acid may also be RNA if the source of polymerase is RNA-directed RNA polymerase or if reverse transcriptase is present in the cell or provided to produce DNA from the RNA. Such a vector can remain episomal or, become chromosomally integrated, as long as it can be transcribed to produce the desired RNA. Such vectors can be constructed by recombinant DNA technology methods standard in the art. Vectors can
20 be bacteriophage, plasmid, viral, retroviral, or others known in the art, used for replication and expression in bacterial, fungal, plant, insect or mammalian cells. Retroviral vectors may be replication competent or replication defective. In the latter case, viral propagation generally will occur only in complementing host cells. Introduction of the vector construct into the host cell can be effected by techniques known in the art which include,
25 but are not limited to, calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, infection or other methods. Such methods are described in many standard laboratory manuals, such as Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986).

Generally, recombinant expression vectors will include origins of replication and
30 selectable markers permitting transformation of the host cell, e.g., the ampicillin resistance gene of *E. coli* and *S. cerevisiae* TRP1 gene, and a promoter derived from a highly-expressed gene to direct transcription of a downstream structural sequence. Such promoters can be derived from operons encoding glycolytic enzymes such as

3-phosphoglycerate kinase (PGK), a-factor, acid phosphatase, or heat shock proteins, among others. The heterologous structural sequence is assembled in appropriate phase with translation initiation and termination sequences, and preferably, a leader sequence capable of directing secretion of translated protein into the periplasmic space or
5 extracellular medium. Optionally, the heterologous sequence can encode a fusion protein including an N-terminal identification peptide imparting desired characteristics, for example, stabilization or simplified purification of expressed recombinant product.

In one embodiment, the nucleic acid encoding a BLYS binding polypeptide of the invention is operatively associated with an appropriate heterologous regulatory element
10 (e.g., promoter or enhancer), such as, the phage lambda PL promoter, the *E. coli lac*, *trp*, *phoA*, and *tac* promoters, the SV40 early and late promoters, and promoters of retroviral LTRs, to name a few. Other suitable promoters will be known to the skilled artisan.

As indicated, the expression vectors will preferably include at least one selectable marker. Such markers include dihydrofolate reductase, G418 or neomycin resistance for
15 eukaryotic cell culture and tetracycline, kanamycin or ampicillin resistance genes for culturing in *E. coli* and other bacteria. Representative examples of appropriate hosts include, but are not limited to, bacterial cells, such as *E. coli*, *Streptomyces* and *Salmonella typhimurium* cells; fungal cells, such as yeast cells (e.g., *Saccharomyces cerevisiae* or *Pichia pastoris* (ATCC Accession No. 201178)); insect cells such as
20 *Drosophila* S2 and *Spodoptera Sf9* cells; animal cells such as CHO, COS, 293, NSO and Bowes melanoma cells; and plant cells. Appropriate culture mediums and conditions for the above-described host cells are known in the art.

The host cell can be a higher eukaryotic cell, such as a mammalian cell (e.g., a human derived cell), or a lower eukaryotic cell, such as a yeast cell, or the host cell can be
25 a prokaryotic cell, such as a bacterial cell. The host strain may be chosen which modulates the expression of the inserted nucleic acid sequences encoding the BLYS polypeptides of the invention, or modifies and processes the BLYS binding polypeptide in the specific fashion desired. Expression from certain promoters can be elevated in the presence of certain inducers; thus expression of the genetically engineered polypeptide
30 may be controlled. Furthermore, different host cells have characteristics and specific mechanisms for the translational and post-translational processing and modification (e.g., phosphorylation, cleavage) of proteins. Appropriate cell lines can be chosen to ensure the desired modifications and processing of the foreign protein expressed. Selection of

appropriate vectors and promoters for expression in a host cell is a well-known procedure and the requisite techniques for expression vector construction, introduction of the vector into the host and expression in the host are routine skills in the art.

- Useful expression vectors for bacterial use are constructed by inserting a structural
- 5 DNA sequence encoding a desired protein together with suitable translation initiation and termination signals in operable reading phase with a functional promoter. The vector will preferably comprise one or more phenotypic selectable markers and an origin of replication to ensure maintenance of the vector and to, if desirable, provide amplification within the host. Suitable prokaryotic hosts for transformation include *E. coli*, *Bacillus*
- 10 *subtilis*, *Salmonella typhimurium*, and various species within the genera *Pseudomonas*, *Streptomyces*, and *Staphylococcus*, although others may also be employed as a matter of choice. As a representative, but nonlimiting example, useful expression vectors for bacterial use can comprise a selectable marker and bacterial origin of replication derived from commercially available plasmids comprising genetic elements of the well-known
- 15 cloning vector pBR322 (ATCC 37017). Such commercial vectors include, for example, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). These pBR322 "backbone" sections are combined with an appropriate promoter and the structural sequence to be expressed. Among vectors preferred for use in bacteria are pHE4-5 (ATCC Accession No. 209311) and variations thereof, pQE70, pQE60 and pQE-9, available from QIAGEN, Inc.; pBS vectors,
- 20 Phagescript vectors, Bluescript vectors, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, available from Stratagene; and ptc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRITS available from Pharmacia. Preferred expression vectors for use in yeast systems include, but are not limited to, pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalpha, pPIC9,
- 25 pPIC3.5, pPHL-D2, pPHL-S1, pPIC3.5K, pPIC9K, and PAO815 (all available from Invitrogen, Carlsbad, CA). Among preferred eukaryotic vectors are pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 and pSG available from Stratagene; and pSVK3, pBPV, pMSG and pSVL (available from Pharmacia). Other suitable vectors will be readily apparent to the skilled artisan.
- 30 Following transformation of a suitable host strain and growth of the host strain to an appropriate cell density, the selected promoter is induced by appropriate means (e.g., temperature shift or chemical induction) and cells are cultured for an additional period.

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Cells are typically harvested by centrifugation, disrupted by physical or chemical means, and the resulting crude extract retained for further purification.

Microbial cells employed in expression of proteins can be disrupted by any convenient method, including freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or
5 use of cell lysing agents, such methods are well known to those skilled in the art.

In one embodiment, the yeast *Pichia pastoris* is used to express a BLyS binding polypeptide in a eukaryotic system. *Pichia pastoris* is a methylotrophic yeast which can metabolize methanol as its sole carbon source. A main step in the methanol
10 metabolization pathway is the oxidation of methanol to formaldehyde using O₂. This reaction is catalyzed by the enzyme alcohol oxidase. In order to metabolize methanol as its sole carbon source, *Pichia pastoris* must generate high levels of alcohol oxidase due, in part, to the relatively low affinity of alcohol oxidase for O₂. Consequently, in a growth medium depending on methanol as a main carbon source, the promoter region of one of the two alcohol oxidase genes (*AOX1*) is highly active. In the presence of methanol,
15 alcohol oxidase produced from the *AOX1* gene comprises up to approximately 30% of the total soluble protein in *Pichia pastoris*. See, Ellis et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:1111-21 (1985); Koutz et al., *Yeast*, 5:167-77 (1989); Tschopp et al., *Nucl. Acids Res.*, 15:3859-76 (1987). Thus, a heterologous coding sequence, such as, for example, a polynucleotide encoding a BLyS binding polypeptide of the present invention, under the transcriptional
20 regulation of all or part of the *AOX1* regulatory sequence is expressed at exceptionally high levels in *Pichia* yeast grown in the presence of methanol.

In one example, the plasmid vector pPIC9K is used to express DNA encoding a BLyS binding polypeptide of the invention, as set forth herein, in a *Pichea* yeast system essentially as described in "*Pichia* Protocols: Methods in Molecular Biology," D.R.
25 Higgins and J. Cregg, eds. (The Humana Press, Totowa, N.J., 1998). This expression vector allows expression and secretion of a BLyS binding polypeptide of the invention by virtue of the strong *AOX1* promoter linked to the *Pichia pastoris* alkaline phosphatase (PHO) secretory signal peptide (i.e., leader) located upstream of a multiple cloning site.

Many other yeast vectors may be used in place of pPIC9K, such as, pYES2,
30 pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalpha, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, and PAO815, as one skilled in the art would readily appreciate,

WO 02/16412

PCT/US01/25891

as long as the proposed expression construct provides appropriately located signals for transcription, translation, secretion (if desired), and the like, including an in-frame AUG as required.

In one embodiment, high-level expression of a heterologous coding sequence, such as, for example, a nucleic acid encoding a BLyS binding polypeptide of the invention, may be achieved by cloning the heterologous nucleic acid sequence of the invention into an expression vector such as, for example, pGAPZ or pGAPZalpha, and growing the yeast culture in the absence of methanol.

Transcription of the DNA encoding the polypeptides of the present invention by higher eukaryotes is increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are *cis*-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp that act on a promoter to increase its transcription. Examples including the SV40 enhancer on the late side of the replication origin bp 100 to 270, a cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers.

Various mammalian cell culture systems can also be employed to express recombinant protein. Examples of mammalian expression systems include the COS-7 lines of monkey kidney fibroblasts, described by Gluzman (*Cell*, 23:175 (1981)), and other cell lines capable of expressing a compatible vector, for example, the C127, 3T3, CHO, 293, NSO, HeLa and BHK cell lines. Mammalian expression vectors will comprise an origin of replication, a suitable promoter and enhancer, and also any necessary ribosome binding sites, polyadenylation site, splice donor and acceptor sites, transcriptional termination sequences, and 5' flanking nontranscribed sequences. DNA sequences derived from the SV40 splice, and polyadenylation sites may be used to provide the required nontranscribed genetic elements.

The host cells described herein may be used in a conventional manner to produce the gene product encoded by the recombinant sequence. Alternatively, cell-free translation systems can also be employed to produce the polypeptides of the invention using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention.

The polypeptides of the invention may be expressed or synthesized in a modified form, such as a fusion protein (comprising the polypeptide joined via a peptide bond to a heterologous protein sequence (of a different protein)), and may include not only secretion signals, but also additional heterologous functional regions. Such a fusion

WO 02/16412

PCT/US01/25891

protein can be made by ligating polynucleotides of the invention and the desired nucleic acid sequence encoding the desired amino acid sequence to each other, by methods known in the art, in the proper reading frame, and expressing the fusion protein product by methods known in the art. Alternatively, such a fusion protein can be made by protein
5 synthetic techniques, e.g., by use of a peptide synthesizer. Thus, for instance, a region of additional amino acids, particularly charged amino acids, may be added to the N-terminus of the polypeptide to improve stability and persistence in the host cell, during purification, or during subsequent handling and storage. Also, peptide moieties may be added to the polypeptide to facilitate purification. Such regions may be removed prior to
10 final preparation of the polypeptide. The addition of peptide moieties to polypeptides to engender secretion or excretion, to improve stability and to facilitate purification, among others, are familiar and routine techniques in the art. Particular mention is made of the hexa-histidine polypeptide, such as the tag provided in a pQE vector (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), among others, many of which are
15 commercially available. As described in Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824 (1989), for instance, hexa-histidine provides for convenient purification of the fusion protein. Other peptide tags useful for purification include, but are not limited to, the hemagglutinin"HA" tag, which corresponds to an epitope derived from the influenza hemagglutinin protein (Wilson et al., Cell, 37:767 (1984)) and the "flag" tag
20 (DYKDDDDK, (SEQ ID NO:183) Stratagene, La Jolla, CA).

In one embodiment, nucleic acids encoding a BLyS binding polypeptides of the invention may be fused to the pelB pectate lyase signal sequence to increase the efficiency to expression and purification of such polypeptides in Gram-negative bacteria. See, U.S. Patent Nos. 5,576,195 and 5,846,818, the contents of which are herein
25 incorporated by reference in their entireties.

Polypeptides of the present invention include products of chemical synthetic procedures, and products produced by recombinant techniques from a prokaryotic or eukaryotic host, including, for example, bacterial, yeast, higher plant, insect and mammalian cells. Depending upon the host employed in a recombinant production
30 procedure, the polypeptides of the present invention may be glycosylated or may be non-glycosylated. In addition, polypeptides of the invention may also include an initial modified methionine residue, in some cases as a result of host-mediated processes.

WO 02/16412

PCT/US01/25891

The invention encompasses BLyS binding polypeptides which are modified during or after synthesis or translation, e.g., by glycosylation, acetylation, benzylation, phosphorylation, amidation, pegylation, formylation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to an antibody molecule, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, pegylation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, ubiquitination, etc. (See, for instance, Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties, 2d Ed. (W.H. Freeman and Co., N.Y., 1992); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, Johnson, ed. (Academic Press, New York, 1983), pp. 1-12; Seifter et al., Meth. Enzymol., 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann. NY Acad. Sci., 663:48-62 (1992).) In specific embodiments, the peptides are acetylated at the N-terminus and/or amidated at the C-terminus.

In further embodiments, BLyS binding polypeptides of the invention containing two or more residues that have the potential to interact, such as for example, two cysteine residues in a polypeptide, may be treated under oxidizing conditions or other conditions that promote interaction of these residues (e.g., disulfide bridge formation).

Further BLyS binding polypeptide modifications encompassed by the invention include, for example, any of numerous chemical modifications carried out by known techniques, including but not limited to specific chemical cleavage by cyanogen bromide, trypsin, chymotrypsin, papain, V8 protease, NaBH₄, acetylation, formylation, oxidation, reduction, metabolic synthesis in the presence of tunicamycin, etc.

Additional post-translational /post-synthesis modifications encompassed by the invention include, for example, e.g., N-linked or O-linked carbohydrate chains, processing of N-terminal or C-terminal ends), attachment of chemical moieties to the amino acid backbone, chemical modifications of N-linked or O-linked carbohydrate chains, and addition or deletion of an N-terminal methionine residue as a result of procaryotic host cell expression.

Also provided by the invention are chemically modified derivatives of BLyS binding polypeptides of the invention which may provide additional advantages such as increased affinity, decreased off-rate, solubility, stability and *in vivo* or *in vitro* circulating time of the polypeptide, or decreased immunogenicity (see, U.S. Patent No. 4,179,337). The chemical moieties for derivitization may be selected from water soluble polymers such as polyethylene glycol, ethylene glycol/propylene glycol copolymers,

WO 02/16412

PCT/US01/25891

carboxymethylcellulose, dextran, polyvinyl alcohol and the like. The polypeptides may be modified at random positions within the molecule, or at predetermined positions within the molecule and may include one, two, three or more attached chemical moieties.

The polymer may be of any molecular weight, and may be branched or
 5 unbranched. For polyethylene glycol, the preferred molecular weight is between about 1 kDa and about 100 kDa (the term "about" indicating that in preparations of polyethylene glycol, some molecules will weigh more, some less, than the stated molecular weight) for ease in handling and manufacturing. Other sizes may be used, depending on the desired therapeutic profile (e.g., the duration of sustained release desired, the effects, if any, on
 10 biological activity, the ease in handling, the degree or lack of antigenicity and other known effects of the polyethylene glycol to a therapeutic protein or analog). For example, the polyethylene glycol may have an average molecular weight of about 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10,000, 10,500, 11,000, 11,500, 12,000, 12,500, 13,000,
 15 13,500, 14,000, 14,500, 15,000, 15,500, 16,000, 16,500, 17,000, 17,500, 18,000, 18,500, 19,000, 19,500, 20,000, 25,000, 30,000, 35,000, 40,000, 50,000, 55,000, 60,000, 65,000, 70,000, 75,000, 80,000, 85,000, 90,000, 95,000, or 100,000 kDa.

As noted above, the polyethylene glycol may have a branched structure.

Branched polyethylene glycols are described, for example, in U.S. Patent No. 5,643,575; Morpurgo et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 56:59-72 (1996); Vorobjev et al.,
 20 Nucleosides Nucleotides, 18:2745-2750 (1999); and Caliceti et al., Bioconjug. Chem., 10:638-646 (1999), the disclosures of each of which are incorporated herein by reference.

The polyethylene glycol molecules (or other chemical moieties) should be attached to the B1yS binding polypeptide with consideration of effects on functional
 25 domains of the polypeptide. There are a number of attachment methods available to those skilled in the art, e.g., EP 0 401 384, herein incorporated by reference (coupling PEG to G-CSF), see also Malik et al., Exp. Hematol., 20:1028-1035 (1992) (reporting pegylation of GM-CSF using tresyl chloride). For example, polyethylene glycol may be covalently
 30 bound through amino acid residues via a reactive group, such as, a free amino or carboxyl group. Reactive groups are those to which an activated polyethylene glycol molecule may be bound. The amino acid residues having a free amino group may include, for example, lysine residues and the N-terminal amino acid residues; those having a free carboxyl group may include aspartic acid residues, glutamic acid residues, and the

WO 02/16412

PCT/US01/25891

C-terminal amino acid residue. Sulfhydryl groups may also be used as a reactive group for attaching the polyethylene glycol molecules. In a preferred embodiment, the polyethylene glycol molecule is attached at an amino group, such as attachment at the N-terminus or to a lysine side chain amino group.

5 As suggested above, polyethylene glycol may be attached to polypeptides via linkage to any of a number of amino acid residues. For example, polyethylene glycol can be linked to a polypeptide via covalent bonds to lysine, histidine, aspartic acid, glutamic acid, or cysteine residues. One or more reaction chemistries may be employed to attach polyethylene glycol to specific amino acid residues (e.g., lysine, histidine, aspartic acid, 10 glutamic acid, or cysteine) of the polypeptide or to more than one type of amino acid residue (e.g., lysine, histidine, aspartic acid, glutamic acid, cysteine and combinations thereof) of the polypeptide.

One may specifically desire proteins chemically modified at the N-terminus.

Using polyethylene glycol as an illustration, one may select from a variety of 15 polyethylene glycol molecules (by molecular weight, branching, etc.), the proportion of polyethylene glycol molecules to polypeptide molecules in the reaction mix, the type of pegylation reaction to be performed, and the method of obtaining the selected N-terminally pegylated polypeptide. The method of obtaining the N-terminally pegylated preparation (i.e., separating this moiety from other monopegylated moieties if necessary) 20 may be by purification of the N-terminally pegylated material from a population of pegylated polypeptide molecules. Selective N-terminal modification of proteins may be accomplished by reductive alkylation which exploits differential reactivity of different types of primary amino groups (lysine versus the N-terminus) available for derivatization in a particular protein. Under the appropriate reaction conditions, substantially selective 25 derivatization of the protein at the N-terminus with a carbonyl group containing polymer is achieved.

As indicated above, pegylation of the polypeptides of the invention may be accomplished by any number of means. For example, polyethylene glycol may be attached to the protein either directly or by an intervening linker. Linkerless systems for 30 attaching polyethylene glycol to proteins are described in Delgado et al., Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys., 9:249-304 (1992); Francis et al., Intern. J. of Hematol., 68:1-18 (1998); U.S. Patent No. 4,002,531; U.S. Patent No. 5,349,052; WO 95/06058; and WO 98/32466, the disclosures of each of which are incorporated herein by reference.

WO 02/16412

PCT/US01/25891

One system for attaching polyethylene glycol directly to amino acid residues of polypeptides without an intervening linker employs tresylated MPEG, which is produced by the modification of monomethoxy polyethylene glycol (MPEG) using tresylchloride ($\text{ClSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$). Upon reaction of protein with tresylated MPEG, polyethylene glycol is directly attached to amine groups of the polypeptide. Thus, the invention includes polypeptide-polyethylene glycol conjugates produced by reacting polypeptides of the invention with a polyethylene glycol molecule having a 2,2,2-trifluoroethane sulphonyl group.

Polyethylene glycol can also be attached to polypeptides using a number of different intervening linkers. For example, U.S. Patent No. 5,612,460, the entire disclosure of which is incorporated herein by reference, discloses urethane linkers for connecting polyethylene glycol to polypeptides. Polypeptide-polyethylene glycol conjugates wherein the polyethylene glycol is attached to the polypeptide by a linker can also be produced by reaction of polypeptides with compounds such as MPEG-succinimidylsuccinate, MPEG activated with 1,1'-carbonyldiimidazole, MPEG-2,4,5-trichlorophenylcarbonate, MPEG-p-nitrophenolcarbonate, and various MPEG-succinate derivatives. A number of additional polyethylene glycol derivatives and reaction chemistries for attaching polyethylene glycol to polypeptides are described in WO 98/32466, the entire disclosure of which is incorporated herein by reference. Pegylated BLyS binding polypeptide products produced using the reaction chemistries set out herein are included within the scope of the invention.

The number of polyethylene glycol moieties attached to each polypeptide of the invention (i.e., the degree of substitution) may also vary. For example, the pegylated polypeptides of the invention may be linked, on average, to 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, or more polyethylene glycol molecules. Similarly, the average degree of substitution may range within ranges such as 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19, or 18-20 polyethylene glycol moieties per polypeptide molecule. Methods for determining the degree of substitution are discussed, for example, in Delgado et al., *Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys.*, 9:249-304 (1992).

BLyS Binding Polypeptide Multimers, Conjugates and Fusions

The present invention encompasses multivalent BLyS binding polypeptides. BLyS binding polypeptides may be monomeric, dimeric, trimeric, or higher-order

WO 02/16412

PCT/US01/25891

multimers. In a preferred embodiment multivalent BLyS binding polypeptides are homotrimeric. In another preferred embodiment a homotrimeric BLyS binding polypeptide binds a single homotrimeric BLyS.

In another preferred embodiment, monomeric or multimeric BLyS binding polypeptides are conjugated with another polypeptide or other chemical compound. For example, BLyS binding polypeptide(s) may be conjugated to a radioactive or other toxic compound so as to target and destroy cells expressing BLyS.

The present invention also encompasses heteromeric multimers comprised of one or more BLyS binding polypeptides and one or more non-BLyS binding polypeptides or other chemical moieties. Such heteromeric multimers may be monomeric, dimeric, trimeric, tetrameric, pentameric, or higher-order multimers. Heteromeric BLyS binding multimers may be used to target, bind, inhibit, and/or activate responses in cells expressing BLyS and receptors for the heterologous, non-BLyS binding polypeptide or other chemical moiety. Such activated responses may include, for example, apoptosis or other biologically and chemically mediated forms of cell destruction. Heteromeric BLyS binding multimers may also be used to target BLyS expressing cells so as to introduce a desired molecule or compound to the cells. For example, a heteromeric BLyS binding multimer may be conjugated with a radioactive or otherwise toxic compound so as to kill BLyS expressing cells. As an alternative example, a heteromeric BLyS binding and Adenovirus-binding multimer could be used to specifically target and introduce adenovirus-mediated gene therapeutics into BLyS expressing cells.

BLyS binding polypeptide multimers may be fused or conjugated as homopolymers and heteropolymers using methods known in the art. In a preferred embodiment BLyS binding polypeptides are linked as homomultimers wherein the linker or linkers provide sufficient length and flexibility such that each BLyS binding polypeptide may simultaneously bind an individual BLyS molecule. In another preferred embodiment BLyS binding polypeptides are linked as heteromultimers wherein the linker or linkers provide sufficient length and flexibility such that each BLyS binding polypeptide may simultaneously bind individual BLyS molecules and the heterologous polypeptide or chemical moiety may simultaneously bind to its target. Numerous examples of suitable linker molecules are known in the art. (See, for example, Todorovska et al., *J. Immunol. Methods*, 248(1-2):47-66 (2001); Mehvar, *J. Control Release*, 69(1):1-25 (2000); Francis et. al., *Int. J. Hematol.*, 68(1):1-18 (1998).) In

WO 02/16412

PCT/US01/25891

specific embodiments, the linker is a member selected from the group consisting of: (a) a peptide linker; (b) a glutamate linker; and (c) a polyethylene glycol linker. The length of linkers to be used according to the methods of the invention may routinely be determined using techniques known in the art. In specific embodiments, the linker is 5-60 angstroms in length. In other embodiments, the linker is 10-50, 10-40, 10-30, or 10-20 angstroms in length. In further embodiments, the linker is about 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, or 100 angstroms in length. In this context "about" includes the recited length, and/or lengths that are larger or smaller by several (5, 4, 3, 2, or 1) angstroms. In other embodiments, the linker is at least 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, or 100 angstroms in length.

In a preferred embodiment, BLYS binding polypeptides may be fused with human serum albumin (HA). See, e.g., U.S. application Serial No. 09/833,245, filed April 12, 2001, which is hereby incorporated by reference herein. In one embodiment, the albumin fusion protein comprises HA as the N-terminal portion, and a BLYS binding polypeptide as the C-terminal portion. In another embodiment the albumin fusion protein comprise HA as the C-terminal portion, and a BLYS binding polypeptide as the N-terminal portion.

In other embodiments, the albumin fusion protein has a BLYS binding polypeptide fused to both the N-terminus and the C-terminus of albumin. In one preferred embodiment, the BLYS binding polypeptides fused at the N- and C- termini are the same BLYS binding polypeptides. In another preferred embodiment, the BLYS binding polypeptides fused at the N- and C-termini are different BLYS binding polypeptides. In another preferred embodiment, a BLYS binding polypeptide is fused at either the N- or C-terminus of HA and a different (non-BLYS binding) polypeptide is fused at either the C- or N- terminus, respectively.

In addition to albumin fusion proteins in which the BLYS binding polypeptide(s) is (are) fused to the N-terminus and/or C-terminus of HA, BLYS binding polypeptide/albumin fusion proteins of the invention may also be produced by inserting the BLYS binding polypeptide into an internal region or regions of HA. For instance, within the protein sequence of the HA molecule a number of loops or turns exist between the end and beginning of α -helices, which are stabilized by disulphide bonds (see Figures 9-11 in U.S. application Serial No. 09/833,245). The loops, as determined from the crystal structure of HA (Fig. 13 of U.S. application Serial No. 09/833,245) (PDB identifiers 1AO6, 1BJ5, 1BKE, 1BM0, 1E7E to 1E7I and 1UOR) for the most part extend

WO 02/16412

PCT/US01/25891

away from the body of the molecule. These loops are useful for the insertion, or internal fusion, of therapeutically active peptides (particularly those requiring a secondary structure to be functional) or therapeutic proteins, to essentially generate an albumin molecule with specific biological activity.

5 Loops in human albumin structure into which binding polypeptides of the invention may be inserted to generate albumin fusion proteins of the invention include: Val54-Asn61, Thr76-Asp89, Ala92-Glu100, Gln170-Ala176, His 247 - Glu252, Glu 266 - Glu277, Glu 280-His288, Ala362-Glu368, Lys439-Pro447, Val462-Lys475, Thr478-Pro486, and Lys560-Thr566. In more preferred embodiments, polypeptides of the
10 invention are inserted into the Val54-Asn61, Gln170-Ala176, and/or Lys560-Thr566 loops of mature human serum albumin (SEQ ID NO:445).

 In specific embodiments, BLYS binding polypeptides of the invention are attached to macrocyclic chelators useful for conjugating radiometal ions, including but not limited to, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ¹⁶⁶Ho, and ¹⁵³Sm, to polypeptides. In a preferred embodiment, the
15 radiometal ion associated with the macrocyclic chelators attached to BLYS binding polypeptides of the invention is ¹¹¹In. In another preferred embodiment, the radiometal ion associated with the macrocyclic chelator attached to BLYS binding polypeptides of the invention is ⁹⁰Y. In specific embodiments, the macrocyclic chelator is 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA). In other specific
20 embodiments, the DOTA is attached to the BLYS binding polypeptides of the invention via a linker molecule. Examples of linker molecules useful for conjugating DOTA to a polypeptide are commonly known in the art - see, for example, DeNardo et al., Clin. Cancer Res., 4(10):2483-90 (1998); Peterson et al., Bioconjug. Chem., 10(4):553-7 (1999); and Zimmerman et al., Nucl. Med. Biol., 26(8):943-50 (1999), which are hereby
25 incorporated by reference in their entirety. In addition, U.S. Patents 5,652,361 and 5,756,065, which disclose chelating agents that may be conjugated to antibodies, and methods for making and using them, are hereby incorporated by reference in their
30 entirety. Though U.S. Patents 5,652,361 and 5,756,065 focus on conjugating chelating agents to antibodies, one skilled in the art would be readily able to adapt the method disclosed therein in order to conjugate chelating agents to other polypeptides.

 The BLYS binding polypeptides of the invention can be recovered and purified by known methods which include, but are not limited to, ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography,

WO 02/16412

PCT/US01/25891

phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography ("HPLC") is employed for purification.

5 The BLYS binding polypeptides may also be modified with a detectable label, including, but not limited to, an enzyme, prosthetic group, fluorescent material, luminescent material, bioluminescent material, radioactive material, positron emitting metal, nonradioactive paramagnetic metal ion, and affinity label for detection and isolation of BLYS target. The detectable substance may be coupled or conjugated either
10 directly to the polypeptides of the invention or indirectly, through an intermediate (such as, for example, a linker known in the art) using techniques known in the art. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, beta-galactosidase, glucose oxidase or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable
15 fluorescent materials include biotin, umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin; and examples of suitable radioactive material include a radioactive metal ion, e.g., alpha-emitters such as,
20 for example, ^{213}Bi , or other radioisotopes such as, for example, iodine (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbon (^{14}C), sulfur (^{35}S), tritium (^3H), indium ($^{115\text{m}}\text{In}$, $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{112}In , ^{111}In), and technetium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{99\text{m}}\text{Te}$), thallium (^{201}Tl), gallium (^{68}Ga , ^{67}Ga), palladium (^{103}Pd), molybdenum (^{99}Mo), xenon (^{135}Xe), fluorine (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn ,
25 ^{75}Se , ^{113}Sn , and ^{117}Tm .

In a specific embodiment, BLYS binding polypeptides of the invention are labeled with biotin.

Uses of the Binding Polypeptides and Recombinant Bacteriophage of the Invention

30 The BLYS binding polypeptides described herein are especially useful to detect, isolate, or remove BLYS target proteins in solutions. Such solutions may be simple dispersions or solutions of BLYS and/or BLYS-like polypeptide in water or aqueous buffer or more complex solutions, such as, a blood and other biological fluids, tissue

WO 02/16412

PCT/US01/25891

homogenates cell extracts, or biopsy samples, and cell culture media containing BLYS or BLYS-like polypeptides. Biological fluids include, but are not limited to sera, plasma, lymph, blood, blood fractions urine, synovial fluid, spinal fluid, saliva, and mucous.

In one embodiment, the present invention provides a method for detecting a BLYS protein and/or a BLYS-like polypeptide in a solution comprising contacting the solution with a BLYS binding polypeptide of the invention and detecting binding of BLYS or BLYS-like polypeptide to the BLYS binding polypeptide. The BLYS binding polypeptide may be either free or immobilized. Preferably, the BLYS binding polypeptide is a polypeptide immobilized on a solid surface or chromatographic material or the well of a plastic microtiter assay dish.

Another embodiment of the present invention is a method for isolating BLYS protein and/or BLYS-like polypeptide from a solution containing it, comprising:

- (a) contacting the solution with a BLYS binding polypeptide under conditions that permit binding of BLYS and/or BLYS-like polypeptides to BLYS binding polypeptide, and
- (b) recovering the BLYS and/or BLYS-like polypeptides.

A further embodiment of the present invention is a method for isolating BLYS protein and/or BLYS-like polypeptide from a solution containing it, comprising:

- (a) contacting the solution with a BLYS binding polypeptide under conditions that permit binding of BLYS and/or BLYS-like polypeptides to BLYS binding polypeptide, and
 - (b) separating the complex(es) formed by the BLYS binding polypeptide and BLYS and/or BLYS-like polypeptides from other components of the solution.
- Preferably such method also includes the further steps of:
- (c) dissociating the BLYS binding polypeptide from the BLYS and/or BLYS-like polypeptides, and
 - (d) recovering the dissociated, BLYS and/or BLYS-like polypeptide.

The invention also provides for kits containing a binding polypeptide of the invention for use in methods of detecting or isolating BLYS and/or BLYS-like polypeptides.

According to the invention, detection or isolation of BLYS target proteins comprises contacting a solution containing a BLYS target protein with a BLYS binding polypeptide. Depending on the particular application, the BLYS binding polypeptide may

WO 02/16412

PCT/US01/25891

be free in solution or immobilized on a solid support or chromatographic material. Sufficient time is allowed to permit binding between the BLyS target protein and the binding polypeptides, and non-binding components in the solution or mixture are removed or washed away. The formation of a binding complex between the binding
5 polypeptide and the BLyS target protein can then be detected, for example, by detecting the signal from a label on the binding polypeptide, which is one component of the binding complex. A label may be any label that generates a signal that can be detected by standard methods, such as a fluorescent label, a radioactive compound, or an enzyme that reacts with a substrate to generate a detectable signal. Suitable such labels are discussed
10 above. A phage binding polypeptide according to the invention, that is, a recombinant phage displaying a BLyS binding polypeptide on its surface, may form a complex with BLyS and/or BLyS-like polypeptides that is detectable as a precipitate or sediment in a reaction tube, which can be detected visually after settling or centrifugation. Alternatively, a sandwich-type assay may be used, wherein a BLyS binding polypeptide
15 is immobilized on a solid support such as a plastic tube or well, or a chromatographic support matrix such as agarose beads, then the solution suspected of containing the BLyS target is contacted with the immobilized binding polypeptide and non-binding materials or components are removed or washed away.

The binding polypeptides according to this invention are particularly useful for
20 detection and/or isolation of BLyS and/or BLyS-like polypeptides by affinity chromatography methods. Any conventional method of chromatography may be employed. Preferably, a BLyS binding polypeptide of the invention will be immobilized on a solid support suitable, for example, for packing a chromatography column. The immobilized BLyS binding polypeptide affinity ligand can then be loaded or contacted
25 with a feed stream under conditions favorable to formation of binding polypeptide/BLyS (or BLyS-like polypeptide) complexes. Non-binding materials can be washed away. Examples of suitable wash conditions can readily be determined by one of skill in the art and include but are not limited to [PBS/0.01% Tween 20, pH7.2] and [1M NaCl/10mM Tris, pH7.5]. Tris wash buffers may be preferable since phosphates can precipitate in 50%
30 ethylene glycol. In general, non-limiting terms, wash buffers are pH7.0, optionally containing 0.0 to 1.5 M NaCl, more preferably 1M NaCl. Additionally, wash buffers may optionally contain a mild detergent, such as, for example, Tween 20, Tween 80, or NP-80. BLyS or BLyS-like polypeptide can be eluted from the BLyS binding polypeptide by

WO 02/16412

PCT/US01/25891

introducing solution conditions that favor dissociation of the binding complex. Suitable elution solutions can readily be determined by one of skill in the art and include but are not limited to [50% ethylene glycol/100mM NaOAc]. By way of non-limiting example, useful elution buffers, for the purposes of the present invention contain 40-60% ethylene glycol, preferably 50% ethylene glycol.; and 50-100mM NaOAc with a pH in the range of pH 4 – pH7, more preferably, pH 4 – pH 6 and most preferably pH 4.5 – pH 5.5. Preferably, a fast flow affinity chromatographic technique is used to bind the molecules and from which purified BLyS or BLyS-like polypeptides are eluted.

Alternatively, batch chromatography can be carried out by mixing a solution containing the BLyS target and the BLyS binding polypeptide, then isolating complexes of the BLyS target and the binding polypeptides. For this type of separation, many methods are known. For example, the binding polypeptide may be immobilized on a solid support such as beads, then separated from the feed stream along with the BLyS target by filtration. In another example, the BLyS binding polypeptide may be modified with its own affinity tag, such as a polyHis tail or streptavidin binding region, which can be used to isolate the binding polypeptide after complexes have formed using an immobilized metal affinity chromatographic resin or streptavidin-coated substrate. Once separated, the BLyS target can be released from the binding polypeptide under elution conditions and recovered in a purified form.

Methods of producing BLyS or a BLyS-like polypeptides usually yield BLyS or BLyS-like polypeptides in a feed stream that additionally contains impurities (with respect to the BLyS target). One purpose of the present invention is to produce BLyS binding polypeptides and preparations (such as affinity chromatography media or surfaces) comprising BLyS binding polypeptides that allow rapid and highly specific purification of BLyS target proteins from a feed stream. BLyS binding polypeptides obtained herein may easily be tailored to isolate BLyS target protein from a particular feed stream, using or routinely modifying conditions and techniques known in the art. If an alternate production method for BLyS is used, producing a different feed stream, a different set of BLyS binding polypeptides and/or conditions may be necessary to achieve the same level of purification. The new set of BLyS binding polypeptides and/or conditions can be readily obtained following or modifying procedures outlined herein, or otherwise known in the art.

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Kits

The present invention is also directed to an assay kit which can be useful in screening for the presence of BLyS and/or quantitating BLyS concentrations in a fluid, such as, for example, a biological fluid (e.g., blood, serum, or synovial fluid).

- 5 In a particular embodiment of the present invention, an assay kit is contemplated which comprises in one or more containers of BLyS binding polypeptide(s) according to the invention and, optionally, a detection means for determining the presence of a BLyS target/BLyS binding polypeptide interaction or the absence thereof. The kit further optionally contains BLyS protein that may be used, for example as a control or standard.
- 10 The BLyS binding polypeptide may be free or expressed on the surface of a host cell or on the surface of a bacteriophage.

- In a specific embodiment, either the BLyS binding polypeptide or the BLyS protein is labeled. As further discussed herein, a wide range of labels can be used in accordance with the present invention, including but not limited to conjugating the
- 15 recognition unit to biotin by conventional means. Alternatively, the label may comprise, e.g., a fluorogen, an enzyme, an epitope, a chromogen, or a radionuclide. Preferably, the biotin is conjugated by covalent attachment to either the BLyS binding polypeptide or the BLyS protein. Preferably, the BLyS binding polypeptide is immobilized on a solid support. The detection means employed to detect the label will depend on the nature of
- 20 the label and can be any known in the art, e.g., film to detect a radionuclide; an enzyme substrate that gives rise to a detectable signal to detect the presence of an enzyme; antibody to detect the presence of an epitope, etc.

Methods of Screening for BLyS Binding Molecules

- 25 The present invention also encompasses screening methods for identifying polypeptides and nonpolypeptides that bind BLyS, and the BLyS binding molecules identified thereby.

This method comprises the steps of:

- (a) contacting a BLyS protein or BLyS-like protein with a plurality of molecules;
- 30 and
- (b) identifying a molecule that binds the BLyS protein or BLyS-like protein.

The step of contacting the BLyS protein or BLyS-like protein with the plurality of molecules may be effected in a number of ways. For example, one may contemplate

immobilizing the BLyS protein or BLyS-like protein on a solid support and bringing a solution of the plurality of molecules in contact with the immobilized BLyS protein or BLyS-like protein. Such a procedure would be akin to an affinity chromatographic process, with the affinity matrix being comprised of the immobilized BLyS protein or BLyS-like polypeptide. The molecules having a selective affinity for the BLyS protein or BLyS-like polypeptide can then be purified by affinity selection. The nature of the solid support, process for attachment of the BLyS protein or BLyS-like polypeptide to the solid support, solvent, and conditions of the affinity isolation or selection are largely conventional and well known to those of ordinary skill in the art.

Alternatively, one may also separate a plurality of polypeptides into substantially separate fractions comprising a subset of or individual polypeptides. For instance, one can separate the plurality of polypeptides by gel electrophoresis, column chromatography, or like method known to those of ordinary skill for the separation of polypeptides. The individual polypeptides can also be produced by a transformed host cell in such a way as to be expressed on or about its outer surface (e.g., a recombinant phage). Individual isolates can then be "probed" by the BLyS protein or BLyS-like polypeptide, optionally in the presence of an inducer should one be required for expression, to determine if any selective affinity interaction takes place between the BLyS protein or BLyS-like protein and the individual clone. Prior to contacting the BLyS protein or BLyS-like protein with each fraction comprising individual polypeptides, the polypeptides could first be transferred to a solid support for additional convenience. Such a solid support may simply be a piece of filter membrane, such as one made of nitrocellulose or nylon. In this manner, positive clones could be identified from a collection of transformed host cells of an expression library, which harbor a DNA construct encoding a polypeptide having a selective affinity for BLyS protein or BLyS-like protein. Furthermore, the amino acid sequence of the polypeptide having a selective affinity for the BLyS protein or BLyS-like protein can be determined directly by conventional means or the coding sequence of the DNA encoding the polypeptide can frequently be determined more conveniently. The primary sequence can then be deduced from the corresponding DNA sequence. If the amino acid sequence is to be determined from the polypeptide itself, one may use microsequencing techniques. The sequencing technique may include mass spectroscopy.

In certain situations, it may be desirable to wash away any unbound BLyS protein or BLyS-like protein, or alternatively, unbound polypeptides, from a mixture of the BLyS

WO 02/16412

PCT/US01/25891

protein or BLYS-like protein and the plurality of polypeptides prior to attempting to determine or to detect the presence of a selective affinity interaction. Such a wash step may be particularly desirable when the BLYS protein or BLYS-like protein or the plurality of polypeptides is bound to a solid support.

5 The plurality of molecules provided according to this method may be provided by way of diversity libraries, such as random or combinatorial peptide or nonpeptide libraries which can be screened for molecules that specifically bind to BLYS. Many libraries are known in the art that can be used, e.g., chemically synthesized libraries, recombinant (e.g., phage display libraries), and *in vitro* translation-based libraries.

10 Examples of chemically synthesized libraries are described in Fodor et al., Science, 251:767-773 (1991); Houghten et al., Nature, 354:84-86 (1991); Lam et al., Nature, 354:82-84 (1991); Medynski, BioTechnology, 12:709-710 (1994); Gallop et al., J. Medicinal Chemistry, 37(9):1233-1251 (1994); Ohlmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:10922-10926 (1993); Erb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:11422-11426

15 (1994); Houghten et al., Biotechniques, 13:412 (1992); Jayawickreme et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:1614-1618 (1994); Salmon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11708-11712 (1993); PCT Publication No. WO 93/20242; and Brenner and Lerner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5381-5383 (1992).

20 Examples of phage display libraries are described in Scott and Smith, Science, 249:386-390 (1990); Devlin et al., Science, 249:404-406 (1990); Christian et al., J. Mol. Biol., 227:711-718 (1992); Lenstra, J. Immunol. Meth., 152:149-157 (1992); Kay et al., Gene, 128:59-65 (1993); and PCT Publication No. WO 94/18318 dated Aug. 18, 1994.

In vitro translation-based libraries include but are not limited to those described in

25 PCT Publication No. WO 91/05058 dated Apr. 18, 1991; and Mattheakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:9022-9026 (1994).

By way of examples of nonpeptide libraries, a benzodiazepine library (see, e.g., Bunin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4708-4712 (1994)) can be adapted for use. Peptoid libraries (see, Simon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:9367-9371 (1992))

30 can also be used. Another example of a library that can be used, in which the amide functionalities in peptides have been permethylated to generate a chemically transformed combinatorial library, is described by Ostresh et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:11138-11142 (1994)).

The variety of non-peptide libraries that are useful in the present invention is great. For example, Ecker and Crooke, Bio/Technology, 13:351-360 (1995) list benzodiazepines, hydantoins, piperazinediones, biphenyls, sugar analogs, beta-mercaptoketones, arylacetic acids, acylpiperidines, benzopyrans, cubanes, xanthines, aminitides, and oxazolones as among the chemical species that form the basis of various libraries.

Non-peptide libraries can be classified broadly into two types: decorated monomers and oligomers. Decorated monomer libraries employ a relatively simple scaffold structure upon which a variety functional groups is added. Often the scaffold will be a molecule with a known useful pharmacological activity. For example, the scaffold might be the benzodiazepine structure.

Non-peptide oligomer libraries utilize a large number of monomers that are assembled together in ways that create new molecular shapes that depend on the order of the monomers. Among the monomer units that have been used are carbamates, pyrrolinones, and morpholinos. Peptoids, peptide-like oligomers in which the side chain is attached to the alpha amino group rather than the alpha carbon, form the basis of another version of non-peptide oligomer libraries. The first non-peptide oligomer libraries utilized a single type of monomer and thus contained a repeating backbone. Recent libraries have utilized more than one monomer, giving the libraries added flexibility.

Screening the libraries can be accomplished by any of a variety of commonly known methods. See, e.g., the following references, which disclose screening of peptide libraries: Parmley and Smith, 1989, Adv. Exp. Med. Biol., 251:215-218; Scott and Smith, 1990, Science, 249:386-390; Fowlkes et al., 1992, BioTechniques, 13:422-427; Oldenburg et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5393-5397; Yu et al., 1994, Cell, 76:933-945; Staudt et al., 1988, Science, 241:577-580; Bock et al., 1992, Nature, 355:564-566; Tuerk et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6988-6992; Ellington et al., 1992, Nature, 355:850-852; U.S. Pat. No. 5,096,815, U.S. Pat. No. 5,223,409, and U.S. Pat. No. 5,198,346, all to Ladner et al.; Rebar and Pabo, 1993, Science, 263:671-673; and CT Publication No. WO 94/18318.

In a specific embodiment, screening to identify a molecule that binds BLYS can be carried out by contacting the library members with a BLYS protein or BLYS-like protein immobilized on a solid phase and harvesting those library members that bind to the BLYS protein or BLYS-like protein. Examples of such screening methods, termed "panning"

WO 02/16412

PCT/US01/25891

techniques are described by way of example in Parmley and Smith, 1988, Gene, 73:305-318; Fowlkes et al., 1992, BioTechniques, 13:422-427; PCT Publication No. WO 94/18318; and in references cited herein.

In another embodiment, the two-hybrid system for selecting interacting proteins in yeast (Fields and Song, 1989, Nature, 340:245-246; Chien et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582) can be used to identify molecules that specifically bind to BLYS or BLYS-like proteins.

An alternative screening method for obtaining new binding moieties capable of binding to BLYS target proteins is to employ a competition assay, in which a BLYS target is bound to a BLYS binding polypeptide according to the present invention, preferably labeled, and then the complex is exposed to one or more test moieties. Successful new BLYS binding moieties will be test moieties capable of effectively competing for binding to the BLYS target in the presence of a known BLYS binder disclosed herein.

Polypeptides specifically binding BLYS target proteins can be conveniently selected from any peptide library, including random peptide libraries, combinatorial peptide libraries, or biased peptide libraries. The term "biased" is used herein to mean that the method of generating the library is manipulated so as to restrict one or more parameters that govern the diversity of the resulting collection of molecules, in this case peptides.

Thus, a truly random peptide library would generate a collection of peptides in which the probability of finding a particular amino acid at a given position of the peptide is the same for all 20 amino acids. A bias can be introduced into the library, however, by specifying, for example, that a lysine occur every fifth amino acid or that positions 4, 8, and 9 of a decapeptide library be fixed to include only arginine. For libraries designed to display a stable loop structure, a peptide sequence may be designed to include two invariant cysteine residues, with all other amino acid positions permitting one or more amino acid residues but excluding cysteine residues. (See, Example 1, *infra*.) Clearly, many types of biases can be contemplated, and the present invention is not restricted to any particular bias. Furthermore, the present invention contemplates specific types of peptide libraries, such as phage displayed peptide libraries and those that utilize a DNA construct comprising a lambda phage vector with a DNA insert.

As mentioned above, in the case of a BLYS binding molecule that is a polypeptide, the polypeptide may have about 6 to less than about 60 amino acid residues, preferably

WO 02/16412

PCT/US01/25891

about 6 to about 10 amino acid residues, and most preferably, about 6 to about 22 amino acids. In another embodiment, a BLyS binding polypeptide has in the range of 15-100 amino acids, or 20-50 amino acids.

5 The selected BLyS binding polypeptide can be produced by chemical synthesis or recombinant expression, as described above.

The specific BLyS binding polypeptides disclosed herein were isolated using phage display technology, to identify BLyS binding polypeptides exhibiting particular preselected binding properties. These BLyS binding polypeptides were isolated initially by screening nine phage display libraries, that is, populations of recombinant
10 bacteriophage transformed to express an exogenous recombinant polypeptide on their surface. In order to isolate new polypeptide binding moieties for a particular target, such as BLyS, screening of peptide libraries, for example using phage display techniques, is especially advantageous, in that very large numbers (e.g., 5×10^9) of potential binders can be tested and successful binders isolated in a short period of time.

15 In order to prepare a phage library of potential binding polypeptides to screen for members of the library that are BLyS binding polypeptides, a candidate binding domain is selected to serve as a structural template for the polypeptides to be displayed in the library. The phage library is made up of polypeptide analogues of this template or "parental binding domain." The parental binding domain is a polypeptide molecule that
20 may be a naturally occurring or synthetic protein or polypeptide, or polypeptide region or domain of a protein. The parental binding domain may be selected based on knowledge of a known interaction between the parental binding domain and a target protein, but this is not critical. In fact, it is not essential that the parental binding domain have any affinity for a target at all because its purpose is to provide a structure from which a multiplicity of
25 polypeptide analogues (a "library") can be generated, which multiplicity of polypeptide analogues will include one or more binding polypeptides that exhibit the desired binding and release properties with respect to BLyS target proteins (and any other properties selected).

30 Knowledge of the exact polypeptide that will serve as the parental binding domain, or knowledge of a class of proteins or domains to which the parental binding domain belongs can be useful in determining the conditions under which BLyS binding polypeptides optimally bind BLyS target proteins as well as the conditions under which BLyS binding polypeptides optimally release BLyS target proteins. Similarly, the

WO 02/16412

PCT/US01/25891

binding and/or release conditions may be selected with regard to known interactions between a binding domain and the BLyS target protein, for example, to favor the interaction under the binding and/or release conditions, or they may be selected without regard to such known interactions. Likewise, the parental binding domain can be selected taking into account a desired binding and/or release condition or not. It is understood that if the binding domain analogues of a library are unstable under a proposed or desired binding or release condition, no useful binding polypeptides may be obtained.

In selecting the parental binding domain, the most important consideration is how the analogue domains will be presented to the BLyS target protein, that is, in what conformations the BLyS target and the polypeptide analogues will contact one another. In preferred embodiments, for example, the polypeptide analogues will be generated by insertion of synthetic DNA encoding the polypeptide analogue into a replicable genetic package, resulting in display of the domain on the surface of a microorganism, such as M13 phage, using techniques as described in Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual (Academic Press, Inc., San Diego 1996) and U.S. Patent No. 5,223,409 (Ladner et al.), incorporated herein by reference. For formation of phage display libraries, it is preferred to use structured polypeptides as the parental binding domain or template, as opposed to unstructured, linear peptides. Mutation of surface residues in a protein domain or polypeptide molecule will usually have little effect on the overall structure or general properties (such as size, stability, and temperature of denaturation) of the protein; while at the same time mutation of surface residues may profoundly affect the binding properties of the molecule. The more tightly a polypeptide segment is constrained, the less likely it is to bind to any particular target. If it does bind, however, the binding is likely to be tighter and more specific. Thus, it is preferred to select a parental binding domain wherein the parental polypeptide has structure and, thereby in turn, select a structure for the polypeptide analogues of the library, which is constrained within a framework having some degree of rigidity.

Preferably the protein domain that is used as the template or parental domain for generating the library of domain analogues will be a peptide molecule that is a relatively small protein or polypeptide. Small polypeptides offer several advantages over large proteins: First, the mass per binding site is reduced. Highly stable protein domains having low molecular weights, for example, Kunitz domains (~7 kilodaltons, kDa), Kazal domains (~7 kDa), *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor (CMTI) domains (~3.5 kDa), and

WO 02/16412

PCT/US01/25891

endothelin (~2 kDa), can show much higher binding per gram than do antibodies (150 kDa) or single chain scFv antibodies (30 kDa). Second, the possibility of non-specific binding is reduced because there is less molecular surface available for nonspecific binding. Third, small polypeptides can be engineered to have unique tethering sites in a way that is impracticable for larger proteins or antibodies. For example, small proteins and polypeptides can be engineered to have lysines only at sites suitable for tethering to a chromatography matrix. This is not feasible for antibodies. Fourth, a constrained polypeptide structure is more likely to retain its functionality when transferred (with the structural domain intact) from one framework to another. For instance, the binding domain structure is likely to be transferable from the framework used for presentation in a library, such as displayed on a phage, to an isolated protein removed from the presentation framework or immobilized on a chromatographic substrate.

In specific embodiments, the BLyS binding polypeptides of the invention are immobilized. BLyS binding polypeptide molecules according to the invention may be immobilized, for example, on chromatographic support materials to form efficient BLyS separation or affinity chromatographic media. Immobilized BLyS binding polypeptides of the invention have uses that include, but are not limited to, detecting, isolating or removing BLyS target proteins from solutions. One strategy for generating BLyS binding polypeptide molecules that can be immobilized, for example, on matrices, resins, or supports, involves selecting appropriate binding domain templates such that BLyS binding polypeptide molecules are generated that have one or more amino acids that may be used to covalently link the BLyS binding polypeptide to a chromatographic resin or substrate to form an affinity resin. Similarly, the N-terminal amino group or the C-terminal carboxyl group of a peptide molecule may be modified by adding a capping group to render it inert or a functional group, which permits linkage to a support medium. For example, the C-terminal carboxyl group of a protein domain may be converted to an amide or a hydrazide (-NH-NH₂) group for reaction with an aldehyde-functional substrate or other amine-reactive substrate. This technique is preferred. Another preferred modification of BLyS binding polypeptides useful for linking a BLyS binding polypeptide molecule of the invention to a chromatography material is a polypeptide linker comprising, or alternatively consisting of, the amino acid sequence Pro-Gly-Pro-Glu-Gly-Gly-Gly-Lys (SEQ ID NO:13).

WO 02/16412

PCT/US01/25891

In one non-limiting example of a screening procedure to obtain BLyS binding polypeptides encompassed by the invention, the phage in a phage display library are contacted with and allowed to bind a BLyS target protein that is immobilized on a solid support. Those phage that display non-binding polypeptides are separated from those that bind the BLyS target protein. Any of various techniques known in the art may be applied to dissociate the bound phage from the immobilized BLyS protein, and to collect and/or amplify the phage and/or their nucleic acid contents. Using these techniques it is possible to identify a BLyS binding phage that is about 1 in 20 million in the population. Libraries, displaying 10-20 million or more potential binding peptide molecules each, are rapidly screened to find high-affinity BLyS binding polypeptides.

In each round of screening, the diversity of a population falls until only efficient binding polypeptides remain, that is, the process converges. Typically, a phage display library will contain several closely related binding polypeptides (10 to 50 different binding polypeptides out of 10 million). Indications of convergence include increased binding (measured by phage titers) and recovery of closely related sequences. After a first set of binding polypeptide molecules is identified, the sequence information can be used to design other libraries biased for members having additional desired properties, for example, discrimination between different forms of BLyS (e.g., the membrane form and the soluble form of BLyS) and fragments thereof, or discrimination between BLyS and closely related impurities in a feed stream.

Such techniques make it possible not only to screen a large number of potential binding polypeptides, but make it practical to repeat the binding and elution cycles and to build secondary, biased libraries for screening polypeptide analogue-displaying phage that meet specific criteria. Using these techniques, a polypeptide analogue biased library may be screened to reveal members that bind tightly, that is, have high affinity for BLyS target protein, under the screening conditions.

In the present invention target BLyS protein molecules were biotinylated and then bound to streptavidin-coated magnetic particles. Nine phage display libraries of different design were screened for the ability to bind the immobilized BLyS. Each library was characterized by M13 phage displaying variegated peptides of different lengths and overall structure: A library designated TN6/6 (2×10^8 variants) displayed a variegated 12-mer with two internal invariant cyteines to form a hexamer loop structure. A library designated TN7/4 (2.3×10^9 variants) presented a variegated 13-mer having two internal

WO 02/16412

PCT/US01/25891

invariant cyteines to form a heptamer loop structure. A library designated TNS/9 (5×10^9 variants) displayed a variegated 14-mer with two internal invariant cyteines to form an octamer loop structure. A library designated TN9/4 (3.2×10^9 variants) presented a variegated 16-mer having two internal invariant cyteines to form a nonamer loop structure. A library designated TN10/9 (2.5×10^9 variants) displayed a variegated 16-mer with two internal invariant cyteines to form a decamer loop structure. A library designated TN12/1 (1.4×10^9 variants) presented a variegated 18-mer having two internal invariant cyteines to form a dodecamer loop structure. A library designated as Substrate Phage Library #2, having a diversity of about 2×10^8 amino acid sequences, was designed to include a linear peptide-variegated region in the display polypeptide consisting of 13 consecutive amino acids, and the display polypeptide design allowed any amino acid residue except cysteine to occur at each position. Finally, two commercially available linear phage display libraries were also screened, designated PhD 7 and PhD 12, respectively (New England Biolabs). The PhD 7 library displayed a linear random-sequence 7-mer; the PhD 12 library displayed a random-sequence 12-mer.

BLyS binding phage were isolated and collected from all of the libraries except PhD 7.

After analysis of the sequences isolated from the library screenings, several families of BLyS binding peptides were defined (see, consensus sequences A-G and H-L, above). The amino acid sequences of the BLyS-binding "hits" from the first rounds of screening are set forth in Tables 1-8 (*infra*).

In order to obtain BLyS binding polypeptides having an even higher affinity for BLyS targets, a specialized library was prepared, i.e., a BLyS affinity maturation library, based on variegation of high affinity exemplars of the PhD 12 library (see Example 6). This library was designed to provide a population enriched with polypeptides likely to show high affinity for BLyS. The selections from this library were performed to eliminate, by prolonged competition with soluble eluants of soluble BLyS or other BLyS binding polypeptides, all but the polypeptides having the highest affinity for BLyS. A large family of high affinity BLyS binding polypeptides was isolated from four rounds of screening the affinity maturation library, and their amino acid sequences appear in Table 14 (*infra*).

BLyS binding polypeptides according to the invention and phage comprising such polypeptides have uses that include, but are not limited to, detecting and isolating BLyS and BLyS-like polypeptides, as described above.

Isolation of BLyS binding polypeptides and their use in accordance with this invention will be further illustrated below. The specific parameters included in the following examples are intended to illustrate the practice of the invention, and they are not presented to in any way limit the scope of the invention.

Example 1: Screening of Phage Display Libraries

Streptavidin-coated magnetic beads (DynaM-280) were chosen for presentation of the target during screening because of their superior binding capacity compared to that of a 96 well plate. The binding capacity of the beads for biotinylated antibodies was 5-10 µg/mg of beads as stated by the manufacturer. For this study and the screening to follow, 5 µg of biotinylated recombinant BLyS (obtained from Human Genome Sciences, Inc.) was allowed for each mg of beads. This amount of biotinylated BLyS represents a 10-fold excess of target, for saturation of the beads. Unbound BLyS was washed away. Bound biotinylated BLyS was confirmed with detection using Mab 16C9 (murine anti-BLyS, Human Genome Sciences) primary antibody and a goat anti-mouse HRP conjugate as the secondary antibody. An irrelevant monoclonal antibody (anti-TNFα) was used to probe a second set of beads to control for nonspecific binding. The color reagent TMB was used and the assay read at OD 630 nm.

Nine libraries, TN6/6, TN7/4, TN8/9, TN9/4, TN10/9, TN12/1, Substrate Phage #2, Phd7, and Phd12, were screened for BLyS binders. The makeup of these libraries was as follows:

The TN6/6 phage display library was composed of recombinant M13 phage displaying variegated peptides with the potential to form loop structures based on a polypeptide template having the structure Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:14) and providing 2.0×10^8 peptide diversity.

The TN7/4 phage display library was composed of recombinant M13 phage displaying variegated peptides with the potential to form loop structures based on a polypeptide template having the structure Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:15) and providing 2.3×10^9 peptide diversity.

WO 02/16412

PCT/US01/25891

- The TN8/9 phage display library was composed of recombinant M13 phage displaying variegated peptides with the potential to form loop structures based on a polypeptide template having the structure Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:16) and providing about 5×10^9 peptide diversity.
- 5 The TN9/4 phage display library was composed of recombinant M13 phage displaying variegated peptides with the potential to form loop structures based on a polypeptide template having the structure Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:17) and providing about 3.2×10^9 peptide diversity.
- 10 The TN10/9 phage display library was composed of recombinant M13 phage displaying variegated peptides with the potential to form loop structures based on a polypeptide template having the structure Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:18) and providing 2.5×10^9 peptide diversity.
- 15 The TN12/1 phage display library was composed of recombinant M13 phage displaying variegated peptides with the potential to form loop structures based on a polypeptide template having the structure Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:19) and providing 1.4×10^9 peptide diversity.
- 20 Substrate Phage Library #2 was composed of recombinant M13 phage displaying a polypeptide insert of approximately 80 amino acids, having two streptavidin binding domains, a linear variegated segment of thirteen amino acids where all amino acids except Cys were permitted at each position, and a Factor Xa cleavage site, linked together with peptide linkers. This library provided a diversity of 2×10^8 display polypeptides.
- 25 Libraries PhD7 and PhD12 were composed of recombinant M13 phage displaying randomized linear seven- and twelve-amino acid peptides, obtained commercially from New England Biolabs.
- Prior to each round of screening, phage libraries or phage library pools were depleted of phage capable of binding the streptavidin beads by sequentially adding the
- 30 libraries to 5 separate aliquots of streptavidin beads and allowing them to bind for 10 minutes. The depleted libraries were added to biotinylated BLyS on streptavidin magnetic beads and allowed to bind for 1 hour at room temperature. For round 1 of the

WO 02/16412

PCT/US01/25891

screening, all the libraries were kept separate except PhD7 and PhD12 which were pooled from the beginning. After binding, the beads were washed 7 times and bound phage were incubated for 10 minutes with citrate buffered saline at pH 2.0 to elute. The eluted phage were neutralized with 2 M Tris-HCl pH 8.0 and allowed to infect *E. coli* XL-1 Blue MRF'. The infected cells were spread on a large agar plate and standard phage techniques known in the art were used to produce the starting material for the next round. For each round of screening the fraction of input recovered was calculated for each library (library pool). This is equal to the number of phage recovered divided by the number on starting phage. No further rounds of screening were done after the fraction of input recovered reached 1×10^{-2} total phage. Pool A for round 2 of screening was a mixture of TN6/6, TN7/4 and TN8/9 round 1 outputs. Pool B for round 2 was a mixture of TN9/4, TN10/9, and TN12/1 round 1 outputs. After round 2 on Pool A and Pool B the fraction of input recovered was equal to or greater than 1×10^{-2} and no further rounds were done. For the Substrate Phage Library #2 and the PhD pool a third round of screening was required.

At the conclusion of screening individual phage isolates were randomly selected and tested by ELISA for binding to BLyS. The same isolates were submitted for DNA sequence analysis to identify the nucleotide and deduced amino acid sequence of the displayed peptide. Isolates were also tested for their ability to bind to recombinant BLyS in feed streams of CHO supernatant and Sf9 supernatant (supplied by Human Genome Sciences, Inc.).

Each isolate was tested for binding to BLyS by standard ELISA techniques where bound phage were detected with a monoclonal anti-phage antibody/HRP conjugate. Approximately 90% of the isolates from the TN libraries Pool A and Pool B had binding signals on BLyS ranging from 3x to 12x above the background binding on streptavidin alone. Isolates from the Substrate Phage Library showed similar but slightly lower binding signals.

To assess the ability of the BLyS binding polypeptides to recognize the BLyS target in potential process feed streams, phage binding was determined in two feed streams: CHO and Sf9 supernatants spiked with BLyS protein. Phage were allowed to bind to BLyS in either CHO supernatant or Sf9 supernatant rather than the standard conditions of PBS plus Tween. All other wash steps were the same as the standard ELISA conditions. The binding of BLyS binding polypeptides to BLyS in PBS+Tween,

WO 02/16412

PCT/US01/25891

CHO supernatant, and Sf9 supernatant binding was very similar under all conditions. Several BLyS binding polypeptide isolates demonstrated reduced binding of up to 50% in the CHO supernatant. Isolates of BLyS binding polypeptides binding to BLyS in the Sf9 supernatant was not significantly different from binding under the standard conditions.

- 5 The PhD and Substrate Phage Library isolates were also compared in the feed streams. Remarkably, several of these isolates exhibited greater binding in the feed streams than under the standard conditions.

- Amino acid sequences of the displayed peptides were derived from sequencing the phage isolate DNA inserts. Sequence data from the phage isolates were grouped by library and sorted according to the degree of similarity. The BLyS binding phage isolate peptides are shown in Tables 1-8 below. These peptides represent the translation of the DNA sequences across the varied regions of the genes encoding the phage display fusion/peptide.

15 Table 1

TN6/6 Library BLyS-binding Sequences

Phage Isolate	Amino Acid Sequence	SEQ ID NO:
453-01-B06	HLRCWSTNCRYD	20
453-01-A04	VMDCLINRCDTV	21

20

Table 2

TN7/4 Library BLyS-binding Sequences

Phage Isolate	Amino Acid Sequence	SEQ ID NO:
25 453-01-B04	KSKCFFPWECQQA	22
453-01-D11	AMKCYFPWECANG	23
453-01-A05	NVACYFPWECCHP	24
453-01-D01	NAPCYFPWECFST	25
453-01-D03	SVNCWFPWECVGN	26
30 453-01-A08	KEPCYFPWECVGS	27

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Table 3
TN8/9 Library BLyS-binding Sequences

Phage Isolate	Amino Acid Sequence	SEQ ID NO:
453-01-D04	DTNCDLLTKMCGPQ	28
5 453-01-C06	GTPCDLLTKLCLLW	29
453-01-D10	MSECDLLTKICLMG	30
453-01-B07	VPFCDLLTKHCFEA	31
453-01-B09	VPFCDLLTKHCFEA	32
453-01-C02	WSACDLLTKQCVQV	33
10 453-01-A06	-DGCDELTKICGMK	34
453-01-B03	KSWCDELTKVCFDP	35
453-01-B11	KWMCDELTKQCQYV	36
453-01-A02	MKYCDELTKICVGW	37
453-01-B05	YFQCDLTKMCWQK	38
15 453-01-A11	AMHCDLTKHCKPH	39
453-01-A03	VPYCDLTKICQW-	40
453-01-A07	EVFCDVLTVCVFD	41
453-01-C09	KPKCDVLTVMCDWL	42
453-01-B02	TQHCDVLTQCFIT	43
20 453-01-C01	GHFCDRLTKYCFEP	44
453-01-A09	HIQCDRLTKSCLSV	45
453-01-D05	IKACDILTKVCWPP	46
453-01-A01	QFDCDPLTKYCGEP	47
453-01-C07	KMYCDHLTKYCNPE	48
25 453-01-C11	MQSCDILTKYCPKR	49
453-01-D12	GPWCDILTKGFLAQ	50
453-01-C04	SVRCDDLTKGCPVW	51
453-01-B10	PADCDPLTKICFWK	52
453-01-D02	TNVCDDLTKNCFMN	53
30 453-01-C05	EHWCDDLTKLCFRL	54
453-01-D08	GYWCDDLTKNCKWI	55
453-01-C10	LYNCDYLTKLCFEP	56
453-01-C08	HVDCDLTKPKACYKY	57
453-01-D07	VQDCDLTKPKACQMQ	58
35 453-01-D09	KPDCLLTKPMFCSNH	59
453-01-C12	FADCLLTKPKSCKPL	60
453-01-D06	HGNCYPPFWECESK	61
453-01-B01	MIIVLLLRFAISR	62
40 453-01-A12	SLLVIFLLIGAGSL	63

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Table 4

TN9/4 Library BlyS-binding Sequences

	Phage Isolate	Amino Acid Sequence	SEQ ID NO:
	453-01-G06	FHECDMLTGIWCQPN	64
5	453-01-H01	SKRCDLLTKMWCETE	65
	453-01-F02	TKFCDRLTMPKCVWK	66
	453-01-E03	NTFCPDPLTGRCVNP	67
	453-01-E11	DWTCDDLPHRECI FE	68
	453-01-H09	PQPCDLLFEKKCSIK	69
10	453-01-H02	RWHCDMLINPSCCLPD	70
	453-01-E04	KIQCDIVNLSVCVYP	71
	453-01-G11	LNACDIVHNPYCSGM	72
	453-01-F01	AKACDIVNLSCEYL	73
	453-01-H06	RQACSIITPWGCP IP	74
15	453-01-F10	ADNCTVATLDFCYWT	75
	453-01-E05	KPECNITKPQFCFGE	76

Table 5

TN10 Library BlyS-binding Sequences

	Phage Isolate	Amino Acid Sequence	SEQ ID NO:
	453-01-H07	-NNCQWDELTSMDPF	77
	453-01-F05	SRICHDELTHVCVHF	78
	453-01-F09	SRPCQIDELTKACFYN	79
25	453-01-G09	DRVCKLDFTYNCLNH	80
	453-01-F04	HSNCIMDLLTNRCFYD	81
	453-01-H03	PFNCFHDFLTGLCLHS	82
	453-01-F03	YDSCTYDRLTKQCYPS	83
	453-01-F07	FHDCMYDALLGYCLFY	84
30	453-01-G08	NRSCDPLTRPKSCGL	85
	453-01-G04	LSNCDWDDLIRQCLHD	86
	453-01-E01	FWDCLFHPNSRYCVLS	87
	453-01-E10	SRDCLLSPAMAWCGLD	88

35

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Table 6		
TN12/1 Library BlyS-binding Sequences		
Phage Isolate	Amino Acid Sequence	SEQ ID NO:
453-01-H05	GGNCYTDSLTKLHFCMGD	89
5 453-01-H04	--MCPDPLTKAKLCNWH	90
453-01-G03	PNQCQDDLTKQWYSCHYH	91
453-01-F11	FDMCFDALTKQNFYCRFH	92
453-01-F06	RNMCVDRLLTKLQHGCEGA	93
453-01-G07	DPECLTSFDRLLTKMCWPW	94
10 453-01-H11	DDECHYDYLTHYMRCDYR	95
453-01-G05	FGGCNIDLLTNMTCNRN	96
453-01-G10	HGPCYDDELLTMQWCHNH	97
453-01-H12	GAMCVDELLTYTFRPCMYA	98
453-01-E07	SNKCWDELTHAWAECGRF	99
15 453-01-E09	RPVCYKGYDILLTTCMPW	100
453-01-G01	PSRCWFDELLNKFVCKRN	101
453-01-H08	RSGCVYDMLMTMYCPSN	102
453-01-H10	SNRCBGDQLMRPPSCRHL	103
453-01-F08	YRMCWDDLLRGFVCDPH	104
20 453-01-E06	HDGCYDELLYRWTRCBHR	105
453-01-E08	WAWCFDELVQRYFTCFDH	106
453-01-E02	LPBCRQYFPWEKQVCSYW	107

25

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Table 7		
PhD 12 Library BlyS-binding Sequences		
Phage Isolate	Amino Acid Sequence	SEQ ID NO:
453-02-B05	VHYDSLTKMWTR	108
5 453-02-D09	FTDPLTKMSLHS	109
453-02-C12	GYDVLTKLYFVP	110
453-02-A05	YYDRLTKLYSSM	111
453-02-B06	L?KDPLTKLYIS	112
453-02-A04	GYDVLTKL?FVP	113
10 453-02-B03	RLYDPLTKLVLS	114
453-02-B01	MFDPLTKIAFPA	115
453-02-D04	FYDSLTKTNLRD	116
453-02-B02	GIYDKLTRAWLP	117
453-02-B08	KYDPLTRAR?PL	118
15 453-02-D06	YIDQLTRLRLPS	119
453-02-A09	HqTFDILTRLHF	120
453-02-B04	WQFDVLTRSWTP	121
453-02-A02	GAAYDHLTRTWL	122
453-02-D05	YFDQLTHLSIKK	123
20 453-02-A06	AWDPLTMLVLPW	124
453-02-D03	ALWMDPLTGGLAF	125
453-02-B12	WQFDVLT?SWTP	126
453-02-A01	WTDPLTHMEIYH	127
453-02-C04	WTDPLTGLWFPD	128
25 453-02-C05	YTDPLTGIV?PF	129
453-02-D08	YWDKLTMLHLGV	130
453-02-D02	YYDFLTRITVLPS	131
453-02-A03	RLDPLSKNDPPR	132
453-02-A11	LRYPPLKSYIY	133
30 453-02-D07	LRYPPLKSYIY	134
453-02-A07	YFDQFTHLSIKK	135
453-02-C08	YFDQ?THLSIKK	136

35

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Table 8
Substrate Phage Library BLYS-binding Sequences

Phage Isolate	Amino Acid Sequence	SEQ ID NO:
453-02-B04	EHYYTDPLTGARI	137
5 453-02-F01	EHY?TDPLTGARI	138
453-02-B09	EHYSTDPLTGARI	139
453-02-B07	EHYYTDPL?G?RI	140
453-02-G05	EHYYTDPL?G?R?	141
453-02-G09	EHYYTDPL?GAR?	142
10 453-02-B06	EH?YTDPLNGAR?	143
453-02-B05	EHYYNDPLNGAR?	144
453-02-F04	?H?YNDPLNGAR?	145
453-02-G07	KPYDPIITKMTHH	146
453-02-F06	KPYDPIITKMTHH	147
15 453-02-B08	KPYDPIITKMTHH	148
453-02-G08	KP??DPIITKMTHH	149
453-02-B01	QIGYDELTKAWVT	150
453-02-G02	QLGYDELTKAWVT	151
453-02-H06	KIDEL?MQNIIIW	152
20 453-02-F08	DHTDPLIQGLTKR	153
453-02-H01	WHDPLKMHFHHE	154
453-02-F03	KHIDMETGLILQN	155
453-02-G03	MQVDPETGLKYEH	156
453-02-B03	?LDQHVN??YQS	157
25 453-02-F10	E??T??LTGAR?	158
453-02-F02	GPYNI?RL?GER?	159
453-02-B02	HIKMLHQGSFVG	160
453-02-H08	HPINT??HQ?VYS	161
453-02-H05	HRGQV??LNGMV?	162
30 ?= amino acid unknown (all tables)		

lower case = amino acid identity probable but not completely characterized

A small number of phage isolates were selected for further characterization based upon several criteria: the strength of the ELISA signal (i.e., $OD_{630} \geq 0.8$ after 10 min.),

35 the number of times the identical sequence was found, and the presence of a recurrent sequence motif. Some characteristics of the phage isolates that were selected are shown below. Sequence motifs found multiple times in the isolates are underlined.

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Isolate	#	ELISA signal	Sequence	SEQ ID NO:
TN7-01-A08	1	1.2	KEPCYFYWECAVS	27
5 TN7-01-D11	2	1.0	AMKCYFPWECANG	23
TN7-01-B04	2	0.8	KSKCFPPWECQQA	22
TN8-01-C08	2	1.2	HVDCLLHFKACYKY	57
TN8-01-B07	2	1.4	VPFCDLLTKHCPEA	31
TN9-01-G06	1	1.2	FHPCDMLTGIWCQPN	64
10 TN9-01-G11	1	0.8	LNACDIVHPNYCSGM	72
TN10-01-F05	1	1.0	SRLCHMDLTHVCVHF	78
TN12-01-H05	1	1.0	GGNCYTDSLTKLHFCMGD	89
PhD-02-B02	4	0.6	GIYDKLTRANLP	117
PhD-02-B05	9	0.6	VHYDSLTKMWTR	108
15 PhD-02-C12	3	0.8	GVDVLTSLYFVP	110
PhD-02-D05	3	0.8	YFDQLTHLSIKK	123
PhD-02-C04	1	1.0	WTDSLTGLWFFD	128

Various release conditions (see below) were tested, in order to discover possible elution conditions where the BLYS binding polypeptides could be used as affinity ligands for BLYS purification. For release studies, a constant number of phage were applied to wells containing biotinylated BLYS immobilized on streptavidin. After allowing the phage to bind, each phage isolate was then "eluted" from the well with two five-minute washes using various buffers. Wells were washed with standard wash buffer, and bound phage were detected with a standard phage ELISA. Elution conditions were selected based on low pH release, which was the mechanism employed during screening, and alternative elution conditions based on conditions where the BLYS product was known to be stable for at least several hours. The various elution conditions were: PBS pH 7.0, citrate buffered saline pH 5.0, citrate buffered saline pH 3.0, citrate buffered saline pH 2.0, 1 M Guanidine pH 7.0, and 1 M urea pH 7.0. Binding of several of the isolates was reduced under the standard conditions (PBS pH 7.0). This may have occurred because these experiments were performed with concentrated phage preparations rather than the overnight bacterial supernatants used for all previous experiments. It is believed that the polyethylene glycol used to concentrate the phage interfered with the binding of these

WO 02/16412

PCT/US01/25891

isolates. For the purposes of these release studies, the phage isolates selected had a starting signal of 0.5 OD 630 nm or greater. Overall, 1 M urea, pH 7.0 appeared to be the best buffer to release bound phage.

5 Example 2: Immobilization of BLYS Binding Polypeptides on Sepharose-4FF Beads

On the basis of the above results, six display phage sequences were chosen for further study:

TN7-01-A08 (SEQ ID NO:27), TN8-01-B07 (SEQ ID NO:31), TN10-01-F05 (SEQ ID NO:78), TN12-01-H05 (SEQ ID NO:89), PhD-02-C04 (SEQ ID NO:128), and PhD-02-C12 (SEQ ID NO:110). In order to develop a suitable BLYS affinity ligand, the identified display peptides were synthesized to order by a commercial vendor, with slight modifications:

Two amino acids of leader were added to each binding peptide at the N-terminus, in order to avoid leaving a free amine at the first amino acid of the sequence corresponding to the variegated region of the phage display template; the N-terminus was acetylated to prevent immobilization of the peptide to the chromatographic matrix through that position; a C-terminal linker was added (i.e., -PGPEGGGK; SEQ ID NO:13); and any internal lysines in the peptide were blocked with the group: ivDde (i.e., 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-methyl butyl-L-lysine). This group was intact on the finished synthesized peptides and was removed after immobilization or fluorescein labeling. As an alternative modification, peptides with internal lysines were also synthesized with C-terminal hydrazide functional groups, which could be immobilized onto activated aldehyde chromatographic media.

The peptides were immobilized onto NHS-activated SEPHAROSE-4 Fast Flow agarose media (Pharmacia) at ligand densities targeted to 2 $\mu\text{mol/ml}$. Actual ligand densities of peptides on the media ranged from 0.76 $\mu\text{mol/ml}$ to 1.98 $\mu\text{mol/ml}$, as determined by amino acid analysis of immobilized peptide. All but one peptide was immobilized in aqueous conditions of 100mM KH_2PO_4 /150mM NaCl/0.05% Tween 20, pH 7.5. For solubility reasons, the peptide DX217 (see, Table 9, below) was immobilized in 30% dimethyl formamide(DMF)/100mM KH_2PO_4 /150mM NaCl/0.05% Tween 20, pH 7.5. Immobilization reactions were allowed to proceed for 2 hours at ambient temperature, followed by brief washing with pH 7.5 buffer. The Fast Flow SEPHAROSE

WO 02/16412

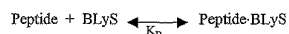
PCT/US01/25891

media was then allowed to tumble at ambient temperature overnight to hydrolyze remaining NHS esters after which the media was washed to remove any unbound peptide. A solution of 2% hydrazine/DMF was used to de-block ligands containing ivDde-lysine. Media was then further washed with aqueous buffers and stored at 4°C until packed into columns. Table 9 shows the sequences of the synthesized peptides and their measured densities on the agarose media.

Table 9: BLYS Binding Peptides Synthesized as Affinity Ligands			
Peptide Name	Isolate source	Sequence (potential disulfide loop underlined)	SEQ ID NO:
DX212	01-A08	Ac-AGKEPCYFYWECAVSGPGPEGGGK	163
DX214	01-B07	Ac-AGVPFCDLLTKHCFEAGPGPEGGGK	164
DX216	01-F-5	Ac-GSSRLCHMDELTHVCVHFAPPPEGGGK	165
DX217	01-H05	Ac-GDGGNCYTDSLTKLHFCMGDEFGPEGGGK	166
DX219	02-C12	Ac-GYDVLTLYFVPGGPGPEGGGK	167
DX221	02-C04	Ac-WTDSLTLGLWFPDGGPGPEGGGK	168

BLYS-Ligand Affinity Determination (Overview of Procedure)

Dissociation constants between the synthetic peptides and BLYS (free in solution) were measured by fluorescence anisotropy (FA). In these experiments, the concentration of the fluorescein-labeled peptide is held constant and the BLYS protein concentration was varied. The observed change in anisotropy is fit to the following equation via nonlinear regression to obtain the apparent K_D .



$$r_{\text{obs}} = r_{\text{free}} + (r_{\text{bound}} - r_{\text{free}}) \frac{(K_D + \text{BLYS} + P) - \sqrt{(K_D + \text{BLYS} + P)^2 - 4 \cdot \text{BLYS} \cdot P}}{2 \cdot P}$$

where:

r_{obs} = observed anisotropy, r_{free} = anisotropy of free peptide, r_{bound} = anisotropy of bound peptide, K_D = dissociation constant, BLYS = total BLYS concentration, and P = total fluorescein labeled peptide concentration.

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Binding reactions containing 50 nM fluorescein-labeled peptide and a varied concentration of BLyS in a volume between 10 and 20 μ L per well were performed in 384 well microplates. Reactions were assayed using a Tecan Polarion fluorescence polarization plate reader. Cross-competition studies between peptides were performed using 50 nM fluorescein-labeled peptide and 1-2 μ M BLyS in the presence and absence of 100 μ M unlabeled peptide. The influence of pH on the observed K_D was investigated at pH 6.0 using the primary binding buffer [15 mM sodium citrate, 120 mM NaCl, 0.01% Tween 20] and at pH 9.0 using 200mM sodium bicarbonate, 125 mM sodium chloride. Other buffers in which dissociation constants of BLyS Binding polypeptides were determined include: [pH 6.0, 0.01% Tween], [pH 6.0, 0.1% gelatin], [pH5.0, 0.01% Tween], [pH9.0, 0.1% Tween], [pH6.0, 15% ethylene glycol, 0.01 % Tween], [pH5.0, 15% ethylene glycol, 0.01 % Tween], and [pH9.0, 15% ethylene glycol, 0.01 % Tween]. All six of the peptides (DX212, DX214, DX216, DX217, DX219, and DX221) bound BLyS in solution with approximately the same affinity ($K_D = 0.4 - 3 \mu$ M). Cross-competition studies demonstrated that all peptides compete with each other for BLyS binding, which suggests that they all bind to the same site on BLyS.

Example 3: Chromatographic Screening of Immobilized BLyS Binding Polypeptides

A reversed phase analytical assay was used in the assessment of the chromatographic performance of the six affinity media.

The six affinity media (BLyS binding polypeptides bound to SEPHAROSE 4 Fast Flow) and a control column, (hydrolyzed NHS-SEPHAROSE 4 Fast Flow) were packed into 3 x 50 mm glass Omnifit columns (350 μ L). All columns were tested at 200 μ L/min (170cm/hr) using a Watson/Marlow 101 ru peristaltic pump. This setup allowed free use of numerous wash, protein and elution conditions. Detection was made using a Waters 2487 UV/VIS detector at 214 nm and 280 nm connected to a Waters Millennium workstation.

Initial screens with purified BLyS at 30 μ g/ml in PBS/0.01%Tween 20, pH 7.2 showed 65% recovery in the flow-through of the control column (1ml, 30 μ g total). However, it was immediately clear that all of the columns, when tested in the same manner, bound BLyS quantitatively from solution, but did not release the protein. The columns were then tested with an array of possible elution conditions and monitored at

WO 02/16412

PCT/US01/25891

214nm and 280nm for release of BLYS. Fractions indicating possible BLYS elution based on UV absorbance were collected and analyzed by reversed phase chromatography for confirmation. Conditions tested are shown in Table 10 (below).

Table 10: Chromatographic Elution Conditions, BLYS Affinity Media			
Chaotropic Salts	Other Salts and pH	Other Buffers and pH	Organic Solvents
1M urea, pH 7	1 M NaCl, pH 7 and 5	30 mM H ₃ PO ₄ , pH 2	50% ethylene glycol, pH 4
2M urea	2 M NaCl, pH 7 and 5	200 mM NaCO ₃ , pH 10	50% ethylene glycol, pH 7
4M urea, pH 7	2 M MgCl ₂ , pH 7.6	50-100 mM NaOAc, pH 5	20% ethanol
2M guanidine, pH 7	2 M CaCl ₂ , pH 6	2M imidazole, pH 6	50% ethanol
	1 M citrate, pH 6	0.6M Histidine, pH 6	18% butanol
		1M Arginine, pH6	30% glycerol
		100mM EGTA, EDTA	
		1 M sorbitol, pH 7	

5

Columns made with DX214, DX216, DX217, DX219 and DX221 affinity media would only release BLYS in the presence of pH 2 buffer (30 mM H₃PO₄/150mM NaCl, pH 2). Recoveries from these columns ranged between 30 % and 65%. In contrast, DX212 affinity media released BLYS with good recoveries on elution with 50% ethylene glycol, pH 4 (50% ethylene glycol/100mM sodium acetate, pH 4) or with 50% ethylene glycol, pH 5 (50% ethylene glycol/100mM sodium acetate, pH 5).

To determine if the elution conditions were effective at maintaining BLYS in its native trimeric form, size exclusion chromatography (SEC) was used to assay native BLYS and BLYS exposed to both pH 2 and 50% ethylene glycol/100 mM sodium acetate, pH 5. SEC analysis of BLYS following incubation at pH 2 revealed the presence of two new peaks, corresponding in size to apparent multimer and monomer forms, with no evidence of the native trimer. Incubation in 50% ethylene glycol resulted in 16% multimer, but otherwise maintained trimer. Later SEC results on material eluted from the DX212 column with 50% ethylene glycol (pH 5.0) did not show the multimer.

20

Example 4: Capture of BLyS from Cell Culture Supernatants

The DX212, DX219, and DX214 affinity columns were tested for their ability to purify BLyS from cell culture supernatants. BLyS, at approximately 40 µg/ml, was spiked into thawed cell culture supernatants from CHO and Sf9 cell lines. Approximately 100 µg BLyS (2.5 ml total) was loaded onto each column. Levels of BLyS in Sf9 flow-through samples could not be determined in the reversed phase HPLC assay. BLyS was eluted with elution buffer [50% ethylene glycol, 100mM NaAc, pH5.0]. BLyS protein recovery from these experiments ranged from 29.4% to complete recovery, with purities ranging from 76% to 96.5%.

Example 5: Synthesis of Further BLyS Binding Peptides

Once a promising BLyS binding polypeptide has been isolated, improvements to that polypeptide can be made by changing, adding or removing individual or multiple amino acid residues from the polypeptide. Amino acid substitutions can be conservative or non conservative. Conservative amino acids exchanges include, for example, the exchange of aromatic residues (e.g., phenylalanine, tryptophan, and tyrosine) for one another, the exchange of hydrophobic residues (e.g., leucine, isoleucine, and valine) for one another, the exchange of polar residues (e.g., glutamine and asparagine) for one another, the exchange of acidic residues (e.g., arginine, lysine, and histidine) for one another, and the exchange of small residues (e.g., alanine, serine, threonine, methionine, and glycine) for one another, the exchange of aromatic residues for one another. Additionally, nonclassical amino acids, chemical amino acid analogs, or chemically modified classical amino acids can be introduced as a substitution or addition to a BLyS binding polypeptide of the invention. Non-classical amino acids include, but are not limited to, the D-isomers of the common amino acids, 2,4-diaminobutyric acid (Dbu), 4-aminobutyric acid (bAbu), 2-aminobutyric acid (Abu), 6-amino hexanoic acid (epsilon-Alx), 2-aminoisobutyric acid (Aib), 3-aminoisobutyric acid (bAib), 3-aminopropanoic acid (bAla), ornithine (Orn), norleucine (Nle), norvaline (Nva), 3-hydroxyproline (3Hyp), 4-hydroxyproline (4Hyp), sarcosine (MeGly), citrulline, homocitrulline, cysteic acid, t-butylglycine, t-butylalanine, phenylglycine, cyclohexylalanine, fluoro-amino acids, designer amino acids such as β-methyl amino acids, Cα-methyl amino acids, Nα-methyl amino acids, and amino acid

WO 02/16412

PCT/US01/25891

analogues in general. By way of example, four modified peptides based on the DX212 sequence have been designed:

1. Ac-AGK(Ac)EPCYFYWECAVSGPGPEGGGK (SEQ ID NO: 169) -- internal lysine side chain acetylated;
- 5 2. Ac-AGREPCYFYWECAVSGPGPEGGGK (SEQ ID NO: 170) -- arginine substitution;
3. Ac-AGQEPYFYWECAVSGPGPEGGGK (SEQ ID NO: 171) -- glutamine substitution;
4. Ac-AGNleEPCYFYWECAVSGPGPEGGGK (SEQ ID NO: 172) -- norleucine
- 10 substitution.

Example 6: Affinity Maturation of BLyS Binding Polypeptides

In order to identify high affinity BLyS-binding polypeptides, a BLyS Affinity Maturation Library (BAML) was designed around a 14-mer linear peptide template sequence having fixed amino acid residues at 5 of the 14 positions. 3 of the 5 fixed residues corresponded to a highly conserved DxLT tetrapeptide amino acid motif (SEQ ID NO:446) isolated from both the constrained and linear peptide libraries. The design of the 14-mer allowed for some amino acid variation at each of the remaining 9 positions, however, preference was given for a particular amino acid at each of these positions.

20 Analysis of binding affinity of the newly isolated peptides for BLyS was evaluated by direct and indirect phage ELISA and fluorescence anisotropy.

BAML was designed on a 14-mer linear (non-constrained) template peptide sequence having fixed residues at positions 1 (Ala), 5 (Asp), 7 (Leu), 8 (Thr), and 10 (Leu). The amino acid sequence of positions 3-14 in the BAML template most closely resembles a binding polypeptide isolated from the PhD 12 linear polypeptide library (see Table 7, *supra*). Residues at position 1 (fixed Ala) and position 2 (variable) were included to extend the length and presentation of the BLyS-binding sequence. Positions 5-8 correspond to the DxLT motif found in peptide isolates from both the constrained and linear peptide libraries (see Tables 1-8, *supra*). Since hydrophobic amino acids (L, M, I, A, and G) were found at position 10 in 85% of the original isolates, a Leu residue, occurring in 42% of the isolates, was fixed at that position in the BAML template peptide.

30

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Table 11 shows the design of the 14-mer BAML template sequence.

Table 11: BAML template sequence (14-mer)														SEQ ID NO:
amino acid position														
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	n	w	y	D	s	L	T	k	L	w	l	p	d	184

Referring to Table 11, the upper case letters indicate the fixed residues at positions 1, 5, 7, 8, and 10 of the template. Lower case letters designate preferred amino acids at those positions, however the design of the variegated DNA template encoding the 14-mer allows for some sequence variation at these positions.

Table 12 shows the design of the variegated DNA template used to generate the BAML peptides.

Table 12: BAML DNA template sequence (14-mer)													
codon position													
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
codons*													
GCT	eez	zjj	zez	GAT	zqz	CTT	ACT	eej	CTC	zjj	qzz	qqz	jez

* The sequence of codons is SEQ ID NO:185.

10

Referring to Table 12, the nucleotide coding sequences for the fixed amino acids in the BAML 14-mer template are shown in upper case letters. The letters "e", "j", "q", and "z" in the variegated DNA template each represent a particular mixture of nucleoside bases present in the input dNTPs for each position:

- 15 j = 79% guanine, 7% cytosine, 7% adenine, 7% thymine
 q = 7% guanine, 79% cytosine, 7% adenine, 7% thymine
 e = 7% guanine, 7% cytosine, 79% adenine, 7% thymine
 z = 7% guanine, 7% cytosine, 7% adenine, 79% thymine.

20 The codons of the DNA template were designed to skew the encoded variable amino acid toward the preferred amino acid at each position shown in SEQ ID NO:184 (Table 11, lower case). Later sequencing of phage isolates showed that, at any particular position, preferred residues occurred at a frequency of from 44% to 70%.

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Synthetic DNA sequences fitting the DNA template were amplified by large scale PCR. The amplified DNAs were restriction digested for insertion into a M13 phage expression vector (MANP vector, Dyax Corp., Cambridge, MA), and vectors bearing the inserts were used to transform M13 phage by electroporation, to produce the BAML.

- 5 Recombinant phage were collected and purified by PEG precipitation and titered. A total of 3.2×10^{13} PFU were amplified in BAML from 1.6×10^9 transformants.

Screening BAML

- As outlined in Table 13, a two-step competition method, starting with the original
10 BAML library, was used over 4 rounds of screening to isolate the highest affinity BLyS-binding polypeptides from the BAML. Prior to screening, the amplified BAML was contacted with Seradyn streptavidin-coated magnetic beads (MG-SA, Seradyn, Indianapolis, IN), to remove bead- and streptavidin-binding phage.

- For screening BAML, phage were incubated in solution with biotinylated BLyS
15 (b-BLyS) in 200 μ l PBS, pH 7.4, Tween-20 (0.1%), to form phage/b-BLyS binding complexes. For the first competition step, unlabeled BLyS (1-2 μ M) was added to the phage/b-BLyS binding complex mixture in solution and incubated for 1-20 hrs. (See Table 13.) The phage/b-BLyS complexes remaining in solution after incubation with unlabeled BLyS were captured by brief (10 min. on rotator) incubation with MG-SA
20 streptavidin beads (50 μ l). After capture of the phage/b-BLyS complexes on streptavidin beads, the unbound fraction was removed and beads were washed 15-20 times with 1 ml PBS-Tween 20 prior to the second competition step. The phage/unlabeled BLyS complexes from the round 1 competition step only, were collected and used as a fraction of the input phage for the second round of screening along with the bead-captured
25 phage/b-BLyS complexes, however, in each subsequent round of screening only the bead-associated phage were collected after the first competition step for further screening, and the phage/unlabeled BLyS complexes were discarded.

- For the second competition step, the competitor peptide was a polypeptide
(DX221; SEQ ID NO:168) based on a BLyS-binding polypeptide isolated from the PhD
30 12 library in the initial screenings described above. The phage/b-BLyS complexes bound to streptavidin, collected after the first competition incubation step, were serially diluted with 50 μ M DX221 BLyS-binding peptide ($K_D = 3 \mu$ M) in 300 μ l PBS-Tween-20 (0.1%).

WO 02/16412

PCT/US01/25891

A series of short incubations (3-4 per round, for 1 hour) of the phage/b-BLyS complexes with DX221 followed by a final incubation of from overnight (O/N, for rounds 1, 2, and 4) to 3 days (for round 3). (See Table 13.) The second competition step in round 4 included an incubation with 67 nM BLyS for 1 hour prior to incubation with DX221. The streptavidin bead-associated phage/b-BLyS binding complexes remaining after the DX221 competition step in round 4 were collected for further analysis.

Table 13: BLyS affinity maturation library (BAML) screening conditions						
Screening Round	Input phage ¹	b-BLyS ²	First Competition Incubation Time (hrs)	Competitor (BLyS)	Second Competition Incubation Time (hrs)	Peptide Elutions
1	1.5×10^{11}	100nM	2	2 μ M	1	50 μ M DX221, 4 $\times$ 1hr, then O/N
2	2×10^{10}	100nM	1	1 μ M	20	50 μ M DX221, 3 $\times$ 1hr, then O/N
3	6.5×10^{10}	100pM	16	1 μ M	3	50 μ M DX221, 4 $\times$ 1hr, then 3 days
4	6.0×10^{10}	10pM	16	1 μ M	2	67 nM BLyS, 1hr; 50 μ M DX221 + 67 nM BLyS 3 $\times$ 1hr, O/N, then add ¹ 4hrs

- ¹ Input phage for round 1 was original BAML; for round 2 was amplified output phage from overnight (final) peptide elution and bead-associated phage from round 1; for round 3 was amplified bead-associated output phage from round 2; and for round 4 was amplified bead-associated output phage from round 3.
- All amplified phage samples were pre-cleared on streptavidin beads before incubation with biotin-BLyS in solution.
- ² b-BLyS = biotinylated BLyS

ELISA Analysis

- Approximately four hundred BAML isolates from rounds 2, 3 and 4 of the above screening were analyzed by direct and indirect phage ELISA assays.

For indirect phage ELISA, Immulon-2HB plates (Dynex Technologies, Inc., Chantilly, VA) were coated with 100 μ l of 1 μ g/ml Immopure streptavidin (Pierce,

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Rockford, IL) diluted in PBS. 100 µl of a series of 10-fold dilutions of b-BLyS (0-0.1 µg/ml in PBS) were immobilized in the streptavidin-coated wells (1hr, 37°C). After washing, 1-25 µl of overnight culture of *E. coli* infected with the individual phage plaques were added to the appropriate wells and incubated for 1 hour, followed by 10 washes with PBS-Tween-20. Anti-M13 antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:10,000 in PBS-Tween-20) was added to the wells (30 min., room temperature), the color reagent TMB was used and the plates read at OD 630 nm.

Individual phage isolates binding to immobilized BLyS were sequenced and the sequences analyzed. The unique sequences of the BAML BLyS-binding 14-mer display peptides are shown in Table 14.

Analysis of the peptides reveals a significant sequence "collapse" around one motif: W₃YDPLTKLWL₁₂ (SEQ ID NO:436) (subscripts indicate amino acid position in the 14-mer display peptide sequence). This most numerous core motif includes the four fixed residues from the original BAML template, i.e., Asp (D) at position 5, Leu (L) at position 7, Thr (T) at position 8, and Leu (L) at position 10. In addition, 5 of the 6 preferred residues from the original BAML template sequence were included in this motif (see Table 11).

73% (143 of 197) of the round 4 isolates included this core motif (SEQ ID NO:436). Single residue substitutions within the 10-mer core motif centered on positions 4 (Y → F) and 12 (L → F, I, or V), with the substitutions at position 12 being alternative hydrophobic residues for Leu.

For the three remaining variable positions (i.e., 2, 13, and 14), selection was not as stringent, although some preferences were apparent, being either built into the library or persisting through rounds of selection. For example, in round 4 isolates, 51% included Asn at position 2; 77% included Pro at position 13; and 32% included Asp at position 14. The presence of Val (27%) or Glu (19%) at position 14 was among the most highly selected in the round 4 isolates, in comparison to their theoretical proportion (4% each) at position 14 in BAML.

The sequences in Table 14 are grouped according to their degree of difference from the core sequence (SEQ ID NO:436).

WO 02/16412

PCT/US01/25891

14-mer amino acid position														SEQ ID NO:
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	n	w	y	D	s	L	T	K	L	w	l	p	d	consensus; 184
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	187
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	G	188
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	189
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	S	D	190
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	N	D	191
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	T	192
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	193
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	N	194
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	V	D	195
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	D	196
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	D	197
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	H	198
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	V	199
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	D	200
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	E	201
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	E	202
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	R	203
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	A	D	204
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Y	205
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	I	206
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	I	D	207
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	D	208
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	F	D	209
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	E	210
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	V	211
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	212
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	213
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	Q	214
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	215
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	V	216
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	G	217
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	Y	218
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Y	219
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	Y	220
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	D	221
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	222
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	G	223
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	H	224
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	F	T	225
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	V	226
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	Y	Y	227
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	S	D	228
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	229
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	D	230
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	G	231

WO 02/16412

PCT/US01/25891

A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Q	232
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Y	233
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	H	234
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	235
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	I	236
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	237
A	F	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	V	238
A	F	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	239
A	F	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	E	240
A	F	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	241
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	242
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	243
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	D	244
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	D	245
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	F	246
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	D	247
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	R	248
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	249
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	A	250
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	A	V	251
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	G	252
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	V	253
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	H	254
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	E	255
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	S	D	256
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	257
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	A	D	258
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	S	259
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	G	260
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Y	261
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	S	G	262
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	263
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	264
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	265
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	K	266
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	267
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	268
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	Q	269
A	E	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	D	270
A	E	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	271
A	E	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Y	272
A	L	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	273
A	L	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	274
A	L	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	R	G	275
A	L	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	G	276
A	M	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	277
A	M	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	Q	V	278
A	M	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	G	279
A	A	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	280
A	A	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	A	D	281
A	A	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	D	282

WO 02/16412

PCT/US01/25891

A	H	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	D	283
A	H	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	284
A	H	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	D	285
A	H	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	286
A	P	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	H	D	287
A	P	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	288
A	Q	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	289
A	Q	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Y	290
A	Q	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	R	291
A	K	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	292
A	K	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	293
A	K	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	294
A	K	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	N	G	295
A	W	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	296
A	V	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	T	D	297
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	Y	E	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	L	Y	298
A	T	K	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	299
A	T	L	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	G	300
A	I	R	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Y	301
A	E	R	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	H	302
A	D	R	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Q	303
A	N	S	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	304
A	I	L	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	305
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	Q	306
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	307
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	T	D	308
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	309
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	G	310
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	E	311
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	312
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	N	313
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	S	E	314
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	H	D	315
A	N	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	V	D	316
A	Y	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	317
A	Y	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	318
A	Y	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	A	319
A	Q	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	320
A	H	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	321
A	T	W	F	D	P	L	T	K	L	W	L	P	V	322
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	Y	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	V	323
A	Y	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	H	D	324

WO 02/16412

PCT/US01/25891

A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	I	P	D	325
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	V	326
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	D	327
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	A	D	328
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	A	329
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	Y	E	330
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	G	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	D	331
A	V	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	T	D	332
A	N	W	Y	D	A	L	T	K	L	W	L	P	V	333
A	Y	W	Y	D	T	L	T	K	L	W	L	P	N	334
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	F	W	Y	D	P	L	T	N	L	W	L	L	E	335
A	Y	W	Y	D	P	L	T	G	L	W	L	L	V	336
A	Y	W	Y	D	P	L	T	G	L	W	L	L	Y	337
A	Y	W	Y	D	P	L	T	G	L	W	L	R	V	338
A	Y	W	Y	D	P	L	T	E	L	W	L	R	L	339
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	M	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	L	P	D	340
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	L	L	V	341
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	L	T	V	342
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	L	L	V	343
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	L	L	L	344
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	R	L	L	E	345
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	R	L	L	V	346
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	R	L	I	V	347
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	Y	L	P	D	348
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	G	L	L	V	349
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	T	L	L	V	350
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	L	L	P	N	351
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	352
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	353
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	S	D	354
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	V	355
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	V	356
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	K	357
A	K	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	358
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	L	E	359
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	A	360
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	361
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	E	362
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	363

WO 02/16412

PCT/US01/25891

A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	G	364
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	H	365
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	V	366
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	367
A	G	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	368
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	T	369
A	K	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	A	370
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	D	371
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	A	372
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	Y	373
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	R	D	374
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	D	375
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	A	376
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	N	377
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	E	378
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	Q	379
A	E	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	K	380
A	Q	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	V	381
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	Y	382
A	L	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	Y	383
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	G	384
A	S	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	I	P	Y	385
A	D	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	I	P	G	386
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	I	P	Y	387
A	K	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	I	P	Y	388
A	I	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	I	P	N	389
A	T	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	I	P	Q	390
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	S	W	Y	D	P	L	T	N	L	W	V	P	D	391
A	Y	E	Y	D	P	L	T	N	L	W	L	L	Y	392
A	Y	W	Y	D	P	L	T	N	L	S	L	L	V	393
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	I	L	E	394
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	I	F	Y	395
A	H	W	F	D	P	L	T	Q	L	K	I	R	V	396
A	Y	W	C	D	P	L	T	K	L	C	I	L	E	397
A	N	S	Y	D	P	L	T	K	L	W	F	P	Y	398
A	N	L	Y	D	P	L	T	K	L	W	V	P	Y	399
A	N	W	Y	D	A	L	T	K	L	W	L	H	D	400
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	F	P	D	401
A	T	S	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	A	402
A	C	W	Y	D	S	L	T	K	L	C	H	R	E	403
A	I	G	N	D	P	L	T	K	L	W	I	P	Y	404
A	N	W	Q	D	C	L	T	K	L	C	L	A	G	405
A	Y	W	F	D	P	L	T	N	L	W	L	L	E	406
A	Y	W	Y	D	P	L	T	N	L	S	L	L	V	407
A	N	C	F	D	S	L	T	R	L	W	L	C	D	408

WO 02/16412

PCT/US01/25891

A	C	A	Y	D	A	L	T	K	L	C	L	P	A	409
A	N	W	Y	D	P	L	T	N	L	S	L	L	L	410
A	Y	W	Y	D	P	L	T	Q	L	S	L	L	V	411
A	Y	R	Y	D	A	L	T	G	L	W	L	L	Y	412
A	Y	W	N	D	P	L	T	K	L	K	L	R	L	413
A	Y	W	Y	D	P	L	T	Q	L	S	L	L	V	414
A	Y	R	Y	D	A	L	T	G	L	W	L	L	Y	415
A	Y	R	Y	D	S	L	T	N	L	W	L	L	Y	416
A	Y	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	I	L	E	417
A	S	C	Y	D	P	L	T	K	L	C	F	P	V	418
A	F	W	F	D	P	L	T	G	L	W	L	L	E	419
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
A	N	W	Y	D	P	L	T	K	L	W	L	P	D	186
A	H	W	Y	D	P	L	T	K	L	S	I	R	V	420
A	P	W	Y	D	S	L	T	K	L	W	F	P	S	421
A	N	C	Y	D	T	L	T	K	L	W	L	T	C	422
A	N	W	Y	D	S	L	T	K	L	S	L	P	D	423
A	Y	A	Y	D	F	L	T	Q	L	S	L	P	D	424
A	F	R	Y	D	S	L	T	G	L	W	L	R	Y	425
A	N	C	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	C	426
A	N	G	Y	D	L	L	T	N	L	S	V	S	D	427
A	N	W	Y	D	P	L	T	R	L	W	I	P	V	428
A	L	K	F	D	Y	L	T	K	L	W	L	P	D	429
A	Y	R	Y	D	S	L	T	K	L	W	L	P	G	430
A	Y	C	Y	D	S	L	T	K	L	W	I	P	D	431
A	S	W	E	D	S	L	T	K	L	W	L	S	K	432
A	Y	W	Y	D	S	L	T	G	L	S	L	L	V	433
A	Y	W	Y	D	P	L	T	Y	L	R	L	R	V	434
A	K	C	Y	D	S	L	T	N	L	W	L	C	D	435

- Nearly all of the ELISA signals of the BAML isolates were higher than those isolated in the initial screen (see Example 1). For comparison, peptide 453-01-B07 (SEQ ID NO:31) ($K_D = 700\text{nM}$) was used as a reference (positive control). Negative control
- 5 MAEX (M13 phage with no insert) did not bind b-BLyS at any concentration tested.

- For direct phage ELISA, the signal measured is a reflection of the ability of a set number of phage to bind to various concentrations of b-BLyS. Peptides tested by the direct phage ELISA assay were chosen based on high affinity for BLyS as determined in the indirect phage ELISA assay. For this assay, Immulon-2HB plates were coated with 0
- 10 or 1000ng anti-Fd antibody (Sigma, St. Louis, MO). After washing (PBS-Tween-20), phage dilutions were added to saturate the available antibody and incubated for 1 hour, washed, then incubated with 100 μl of 10-fold dilutions of b-BLyS (0-1 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hour at room temperature. Streptavidin-HRP (1:1000 in PBS-tween-20; Endogen, Woburn,

WO 02/16412

PCT/US01/25891

MA) was added to the wells and incubated for 1 hour, developed using TMB and reading at OD 630 nm.

Determination of BAML Peptide K_D by Fluorescence Anisotropy.

Several peptides containing the 10-mer core structural motif or single-position variants of that motif identified by sequence analysis were synthesized with a short Gly-Gly-Lys linker sequence and the C-terminal lysine was labeled with fluorescein. These peptides, shown in Table 15, below, were synthesized by solid phase synthesis for determination of dissociation constant with respect to BLYS. The DX815 and DX876 polypeptides were derived from DX814 (SEQ ID NO:186) by deletion of two N-terminal amino acids or the two amino acids N-terminal and C-terminal to the core peptide at (positions 3-12). DX816, DX817, DX819, and DX822 correspond to other BAML isolates (SEQ ID NOs:189, 309, 353, 327, respectively). DX818 corresponds to isolate SEQ ID NO:340, except that Asn has been substituted for Met at position 2. The K_D of several BLYS binding BAML peptides was determined by fluorescence anisotropy, performed as previously described. The sequence of DX822 without the -GGK linker (see SEQ ID NO:327) matches the BAML template sequence (see Table 11). The BAML consensus sequence found in DX822 resulted in a more than 10-fold improvement in binding affinity for BLYS, as compared to one of the highest affinity binders isolated in the initial screen (453-01-B07, SEQ ID NO:31).

Peptide	Sequence	SEQ ID NO:	K_D (nM)
DX814	Ac-ANWYDPLTKLWLPDGGK-fite	437	26 ± 7
DX815	Ac-WYDPLTKLWLPDGGK-fite	438	31 ± 13
DX876	Ac-WYDPLTKLWLGGK-fite	439	171 ± 90
DX816	Ac-ANWYDPLTKLWLPVGGK-fite	440	44 ± 15
DX817	Ac-ANWFDPLTKLWLPDGGK-fite	441	32 ± 26
DX818	Ac-ANWYDPLTKLSLPDGGK-fite	442	342 ± 108
DX819	Ac-ANWYDPLTKLWFPDGGK-fite	443	69 ± 38
DX822	Ac-ANWYDSLTKLWLPDGGK-fite	444	79 ± 54

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Analysis of the BAML isolates revealed a lack of sequence conservation at position 2 (varied in the BAML template, see Table 11). To examine whether the N-terminal residues at positions 1 and 2 in the BAML sequence were necessary for binding to BLyS, a truncated version of DX814 comprising only residues 3-14 (DX815; see Table 5 15) was synthesized and analyzed by fluorescence anisotropy. The K_D for DX815 was indistinguishable from that of DX814, suggesting that residues 1-2 are not required for high affinity binding to BLyS. Further truncation of DX814 to the minimal core (residues 1-10, DX876) increased the K_D to 171 nM, indicating a contribution from Pro at position 13 and/or Asp at position 14 of the 14-mer to high affinity BLyS binding. Substitution of 10 Val in DX816 at that position had little effect on the K_D (see Table 15). In comparing the BLyS-binding polypeptide DX221 (Ac-WTDSLTLGLWFPDGGPGPEGGGK; K_D = 3 μ M; SEQ ID NO:168) with the BAML peptide closest in sequence (DX819, Ac-ANWYDPLTKLWFPDGGK; K_D = 69 nM; SEQ ID NO:443), differences are seen at three positions 4 (T $\rightarrow$ Y), 6 (S $\rightarrow$ P), and 9 (G $\rightarrow$ K), indicating the contribution of these 15 residues in binding affinity.

The synthesized BAML peptides exhibited K_D values in the low nanomolar range, two orders of magnitude lower than primary isolate-derived peptides (see Example 1). Phenylalanine substitutions (F₄ $\rightarrow$ Y₄; F₁₂ $\rightarrow$ L₁₂; Table 17) were the most common minor variations to the core sequence and these changes failed to significantly affect the 20 dissociation constants of the synthesized peptides. A change at position 11 (W₁₁ $\rightarrow$ S₁₁; DX818), however, resulted in an approximately 10-fold decrease in affinity compared to DX814.

Following the foregoing description, the characteristics important for affinity binding polypeptides permitting detection or separation of BLyS or BLyS-like 25 polypeptides (BLyS target protein) in or from any solution can be appreciated. Additional binding polypeptide embodiments of the invention and alternative methods adapted to a particular solution or feed stream will be evident from studying the foregoing description. For instance, any spacer or linker sequences associated with BLyS binding polypeptides discussed above may be removed or substituted to yield additional BLyS 30 binding polypeptides of this invention. Also, very high affinity polypeptide BLyS target binders suitable for in vivo therapeutic applications may be prepared, e.g., by selecting among the peptides isolated from the BAML, by selecting similar polypeptides under

WO 02/16412

PCT/US01/25891

similarly stringent conditions from BAML or other peptide library, or by designing a polypeptide binding molecule following the descriptions above, e.g., of important structural motifs contributing to BLYS binding properties. All such embodiments and obvious alternatives are intended to be within the scope of this invention, as defined by
5 the claims that follow.

The publications referred to above are hereby incorporated by reference in their entireties.

WO 02/16412

PCT/US01/25891

CLAIMS:

1. A B Lymphocyte Stimulator (BLyS) binding polypeptide comprising the amino acid sequence: Asp-Xaa-Leu-Thr (SEQ ID NO:446), wherein Xaa is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala.

2. The polypeptide according to Claim 1, wherein Xaa is Pro or Ser.

3. The polypeptide according to Claim 1, wherein said polypeptides comprises the amino acid sequence: X₁-X₂-Asp-X₄-Leu-Thr-X₇-Leu-X₉-X₁₀ (SEQ ID NO:448), wherein

X₁ is Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly, or Ser;

X₂ is Tyr, Phe, Glu, Cys, Asn;

X₄ is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala;

X₇ is Lys, Asn, Gln, Gly, or Arg;

X₉ is Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr, or Lys; and

X₁₀ is Leu, Phe, Val, Ile, or His.

4. The polypeptide according to Claim 3, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence: Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu (SEQ ID NO:436).

5. The polypeptide according to Claim 3, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence: Ala-X₂-X₃-X₄-Asp-X₆-Leu-Thr-X₉-Leu-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (SEQ ID NO:447), wherein

X₂ is any amino acid except Arg;

X₃ is Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly, or Ser;

X₄ is Tyr, Phe, Glu, Cys, Asn;

X₆ is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala;

X₉ is Lys, Asn, Gln, Gly, or Arg;

X₁₁ is Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr, or Lys;

X₁₂ is Leu, Phe, Val, Ile, or His;

WO 02/16412

PCT/US01/25891

X₁₃ is Pro, Leu, His, Ser, Arg, Asn, Gln, Thr, Val, Ala, Cys, Ile, Phe, or Tyr; and
X₁₄ is Asp, Glu, Asn, Val, His, Gln, Arg, Gly, Ser, Tyr, Ala, Cys, Lys, Ile, Thr or Leu.

6. The polypeptide according to Claim 3, comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 186-435 as depicted in Table 14.

7. The polypeptide according to Claim 3, comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 437-444 as depicted in Table 15.

8. The polypeptide according to Claim 1, comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
Ala-Gly-Lys-Glu-Pro-Cys-Tyr-Phe-Tyr-Trp-Glu-Cys-Ala-Val-Ser-Gly (SEQ ID NO:450);
Ala-Gly-Val-Pro-Phe-Cys-Asp-Leu-Leu-Thr-Lys-His-Cys-Phe-Glu-Ala-Gly (SEQ ID NO:451);
Gly-Ser-Ser-Arg-Leu-Cys-His-Met-Asp-Glu-Leu-Thr-His-Val-Cys-Val-His-Phe-Ala-Pro (SEQ ID NO:452);
Gly-Asp-Gly-Gly-Asn-Cys-Tyr-Thr-Asp-Ser-Leu-Thr-Lys-Leu-His-Phe-Cys-Met-Gly-Asp-Glu (SEQ ID NO:453);
Gly-Tyr-Asp-Val-Leu-Thr-Lys-Leu-Tyr-Phe-Val-Pro-Gly-Gly (SEQ ID NO:454);
Trp-Thr-Asp-Ser-Leu-Thr-Gly-Leu-Trp-Phe-Pro-Asp-Gly-Gly (SEQ ID NO:455);
Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Asp (SEQ ID NO:186);
Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Asp (SEQ ID NO:456);
Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu (SEQ ID NO:457);
Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Val (SEQ ID NO:189);
Ala-Asn-Trp-Phe-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Asp (SEQ ID NO:309);
Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Ser-Leu-Pro-Asp (SEQ ID NO:458);
Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Phe-Pro-Asp (SEQ ID NO:353);
Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Ser-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Asp (SEQ ID NO:327).

9. A BLYS binding polypeptide comprising an amino acid sequence according to one of the following formulae:

(H) Cys-X₂-Phe-X₄-Trp-Glu-Cys (SEQ ID NO:8),

WO 02/16412

PCT/US01/25891

wherein

X₂ is Phe, Trp, or Tyr; and

X₄ is Pro or Tyr; or

(I) Cys-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-Cys (SEQ ID NO:9),

wherein

X₂ is Asp, Ile, Leu, or Tyr;

X₃ is Arg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Tyr, or Val;

X₄ is His, Leu, Lys, or Phe;

X₅ is Leu, Pro, or Thr;

X₆ is Arg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, Met, or Trp; and

X₇ is Ala, Asn, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val; or

(J) Cys-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-Cys (SEQ ID NO:10),

wherein

X₂ is Asn, Asp, Pro, Ser, or Thr;

X₃ is Arg, Asp, Ile, Leu, Met, Pro, or Val;

X₄ is Ala, Ile, Leu, Pro, Thr, or Val;

X₅ is Asn, His, Ile, Leu, Lys, Phe, or Thr;

X₆ is Asn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr;

X₇ is Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, Ser, or Trp;

X₈ is Arg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, Trp, or Tyr; or

(K) Cys-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-Cys (SEQ ID NO:11),

wherein

X₂ is Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, or Thr;

X₃ is His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, or Tyr;

X₄ is Asp, His, Leu, or Ser;

X₅ is Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro, or Thr;

X₆ is Ala, Arg, Asn, or Leu;

X₇ is Ile, Leu, Met, Pro, Ser, or Thr;

X₈ is Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser, or Tyr;

X₉ is Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val; or

(L) Cys-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-Cys (SEQ ID NO:12),

wherein

X₂ is Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr, or Val;

WO 02/16412

PCT/US01/25891

X_3 is Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr;
 X_4 is Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, or Tyr;
 X_5 is Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, or Tyr;
 X_6 is Asp, Leu, Pro, Thr, or Val;
 X_7 is Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp or Tyr;
 X_8 is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Met, or Thr;
 X_9 is Ala, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr;
 X_{10} is Ala, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr; and
 X_{11} is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, or Val.

10. The polypeptide according to Claim 9, wherein

(a) said polypeptide comprises an amino acid sequence of the formula:

Cys- X_2 -Phe- X_4 -Trp-Glu-Cys (SEQ ID NO:8), and the following amino acid positions are independently selected as follows: X_2 is Tyr; X_4 is Pro; or combinations of such selections; or

(b) said polypeptide comprises an amino acid sequence of the following formula:

Cys- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 -Cys (SEQ ID NO:9), and the following amino acid positions are independently selected as follows: X_2 is Asp or Leu; X_3 is Glu or Leu; X_4 is His or Leu; X_5 is Thr or Pro; X_6 is Lys; or combinations of such selections; or

(c) said polypeptide comprises an amino acid sequence of the following formula:

Cys- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 -Cys (SEQ ID NO:10), and the following amino acid positions are independently selected as follows: X_2 is Asp; X_3 is Ile; X_4 is Val or Leu; X_5 is Thr; X_6 is Leu; X_8 is Ser; or combinations of such selections; or

(d) said polypeptide comprises an amino acid sequence of the following formula:

Cys- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 -Cys (SEQ ID NO:11), and the following amino acid positions are independently selected as follows: X_4 is Asp; X_5 is Glu or Pro; X_6 is Leu; X_7 is Thr; or combinations of such selections; or

(e) said polypeptide comprises an amino acid sequence of the following formula:

Cys- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} -Cys (SEQ ID NO:12), and the following amino acid positions are independently selected as follows: X_2 is Trp, Tyr, or Val; X_3 is Asp; X_4 is Asp; X_5 is Leu; X_6 is Leu or Thr; X_7 is Lys or Thr; X_8 is Arg

WO 02/16412

PCT/US01/25891

or Leu; X₉ is Thr or Trp; X₁₀ is Met or Phe; X₁₁ is Val; or combinations of such selections.

11. A BLYS binding polypeptide comprising an amino acid sequence of the following formula:

(A) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-Phe-X₇-Trp-Glu-Cys-X₁₁-X₁₂-X₁₃ (SEQ ID NO:1),

wherein

X₁ is Ala, Asn, Lys, or Ser;

X₂ is Ala, Glu, Met, Ser, or Val;

X₃ is Ala, Asn, Lys, or Pro;

X₅ is Phe, Trp, or Tyr;

X₇ is Pro or Tyr;

X₁₁ is Ala, Gln, His, Phe, or Val;

X₁₂ is Asn, Gln, Gly, His, Ser, or Val; and

X₁₃ is Ala, Asn, Gly, Ile, Pro, or Ser; or

(B) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-Cys-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (SEQ ID NO:2),

wherein

X₁ is Ala, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val, or is absent;

X₂ is Ala, Asn, Asp, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val;

X₃ is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X₅ is Asp, Ile, Leu, or Tyr;

X₆ is Arg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Tyr, or Val;

X₇ is His, Leu, Lys, or Phe;

X₈ is Leu, Pro, or Thr;

X₉ is Arg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, Met, or Trp;

X₁₀ is Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X₁₂ is Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X₁₃ is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val; and

WO 02/16412

PCT/US01/25891

X₁₄ is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val, or is absent; or

(C) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-Cys-X₁₃-X₁₄-X₁₅ (SEQ ID NO:3),

wherein

X₁ is Ala, Arg, Asn, Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, or Thr;

X₂ is Asn, Asp, Gln, His, Ile, Lys, Pro, Thr, or Trp;

X₃ is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Phe, Pro, or Thr;

X₅ is Asn, Asp, Pro, Ser, or Thr;

X₆ is Arg, Asp, Ile, Leu, Met, Pro, or Val;

X₇ is Ala, Ile, Leu, Pro, Thr, or Val;

X₈ is Asn, His, Ile, Leu, Lys, Phe, or Thr;

X₉ is Asn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr;

X₁₀ is Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, Ser, or Trp;

X₁₁ is Arg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, Trp, or Tyr;

X₁₃ is Gln, Glu, Ile, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr, or Val;

X₁₄ is Asn, Gly, Ile, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr; and

X₁₅ is Asn, Asp, Glu, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr; or

(D) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-Cys-X₁₄-X₁₅-X₁₆ (SEQ ID NO:4),

wherein

X₁ is Asn, Asp, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr, or is absent;

X₂ is Arg, Asn, Asp, His, Phe, Ser, or Trp;

X₃ is Asn, Asp, Leu, Pro, Ser, or Val;

X₅ is Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, or Thr;

X₆ is His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, or Tyr;

X₇ is Asp, His, Leu, or Ser;

X₈ is Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro, or Thr;

X₉ is Ala, Arg, Asn, or Leu;

X₁₀ is Ile, Leu, Met, Pro, Ser, or Thr;

X₁₁ is Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser, or Tyr;

X₁₂ is Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X₁₄ is Asp, Gly, Leu, Phe, Tyr, or Val;

WO 02/16412

PCT/US01/25891

X₁₅ is Asn, His, Leu, Pro, or Tyr; and

X₁₆ is Asn, Asp, His, Phe, Ser, or Tyr; or

(E) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-Cys-X₁₆-X₁₇-X₁₈

(SEQ ID NO:5),

wherein

X₁ is Arg, Asp, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or is absent;

X₂ is Ala, Arg, Asn, Asp, Gly, Pro, Ser, or is absent;

X₃ is Arg, Asn, Gln, Glu, Gly, Lys, Met, Pro, Trp or Val;

X₅ is Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr, or Val;

X₆ is Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr;

X₇ is Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, or Tyr;

X₈ is Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, or Tyr;

X₉ is Asp, Leu, Pro, Thr, or Val;

X₁₀ is Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp or Tyr;

X₁₁ is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Met, or Thr;

X₁₂ is Ala, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr;

X₁₃ is Ala, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr;

X₁₄ is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, or Val;

X₁₆ is Arg, Asp, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, or Trp;

X₁₇ is Arg, Asn, Asp, Gly, His, Phe, Pro, Ser, Trp or Tyr; and

X₁₈ is Ala, Arg, Asn, Asp, His, Leu, Phe, or Trp; or

(F) X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂ (SEQ ID NO:6),

wherein

X₁ is Ala, Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Tyr, or Val;

X₂ is Ala, Arg, Gln, His, Ile, Leu, Phe, Thr, Trp, or Tyr;

X₃ is Ala, Asp, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr;

X₄ is Arg, Asp, Gln, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr, or Val;

X₅ is Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, or Val;

X₆ is His, Ile, Leu, Pro, Ser, or Thr;

X₇ is Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, or Thr;

X₈ is Ala, Arg, Asn, Ile, Leu, Lys, Met, or Thr;

X₉ is Ala, Asn, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X₁₀ is Ile, Leu, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val;

WO 02/16412

PCT/US01/25891

X₁₁ is Ala, Arg, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val; and

X₁₂ is Arg, Asp, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or Val; or

(G) X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃ (SEQ ID NO:7),

wherein

X₁ is Asp, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Met, or Trp;

X₂ is Arg, Gln, His, Ile, Leu, or Pro;

X₃ is Asp, Gly, Ile, Lys, Thr, Tyr or Val;

X₄ is Asn, Asp, Gln, Glu, Met, Pro, Ser, or Tyr;

X₅ is Asn, Asp, His, Ile, Leu, Met, Pro, Thr or Val;

X₆ is Asp, Glu, His, Leu, Lys, Pro, or Val;

X₇ is Arg, Asn, Gln, His, Ile, Leu, Met, Pro, or Thr;

X₈ is Gln, Gly, His, Leu, Met, Ser, or Thr;

X₉ is Asn, Gln, Gly, His, Leu, Lys, Ser, or Thr;

X₁₀ is Ala, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, or Phe;

X₁₁ is Ala, Glu, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val;

X₁₂ is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Tyr, or Val; and

X₁₃ is Arg, Asn, Glu, His, Ile, Ser, Thr, Trp, or Val.

12. The BLYS binding polypeptide according to Claim 11, wherein

(a) said polypeptide includes an amino acid sequence of the following formula:

X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-Phe-X₇-Trp-Glu-Cys-X₁₁-X₁₂-X₁₃ (SEQ ID NO:1), and the

following amino acid positions are independently selected as follows: X₃ is Lys; X₅ is

Tyr; X₇ is Pro; X₁₁ is Ala, Gln, His, Phe, or Val; X₁₂ is Asn, Gln, Gly, His, Ser, or Val;

X₁₃ is Ala, Asn, Gly, Ile, Pro, or Ser; or combinations of such selections; or

(b) said polypeptide includes an amino acid sequence of the following formula:

X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-Cys-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (SEQ ID NO:2), and the

following amino acid positions are independently selected as follows: X₃ is Asp; X₅ is

Asp or Leu; X₆ is Glu or Leu; X₇ is His or Leu; X₈ is Thr or Pro; X₉ is Lys; or

combinations of such selections; or

(c) said polypeptide includes an amino acid sequence of the following formula:

X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-Cys-X₁₃-X₁₄-X₁₅ (SEQ ID NO:3), and the

following amino acid positions are independently selected as follows: X₃ is Ala; X₅ is

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Asp; X₆ is Ile; X₇ is Val or Leu; X₈ is Thr; X₉ is Leu; X₁₁ is Ser; X₁₃ is Val; X₁₅ is Glu or Pro; or combinations of such selections; or

(d) said polypeptide includes an amino acid sequence of the following formula:

X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-Cys-X₁₄-X₁₅-X₁₆ (SEQ ID NO:4),

and the following amino acid positions are independently selected as follows: X₁ is Ser;

X₂ is Arg; X₃ is Asn or Asp; X₇ is Asp; X₈ is Glu or Pro; X₉ is Leu; X₁₀ is Thr; X₁₄ is Leu;

X₁₅ is His, Leu, or Pro; X₁₆ is Asp or Ser; or combinations of such selections; or

(e) said polypeptide includes an amino acid sequence of the following formula:

X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-Cys-X₁₆-X₁₇-X₁₈ (SEQ ID

NO:5), and the following amino acid positions are independently selected as follows: X₁

is Arg; X₂ is Asn, Asp, Gly, or Pro; X₃ is Gly or Met; X₅ is Trp, Tyr, or Val; X₆ is Asp;

X₇ is Asp; X₈ is Leu; X₉ is Leu or Thr; X₁₀ is Lys or Thr; X₁₁ is Arg or Leu; X₁₂ is Thr or

Trp; X₁₃ is Met or Phe; X₁₄ is Val; X₁₆ is Met; X₁₇ is Arg, His, or Tyr; X₁₈ is Asn or His;

or combinations of such selections; or

(f) said polypeptide includes an amino acid sequence of the following formula:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂ (SEQ ID NO:6), and the following

amino acid positions are independently selected as follows: X₁ is Gly, Tyr, or Val; X₂ is

His or Tyr; X₃ is Asp or Tyr; X₄ is Asp or Gln; X₅ is Leu or Ser; X₆ is Leu or Thr; X₇ is

Lys or Thr; X₈ is Leu or Lys; X₉ is Met or Ser; X₁₀ is Thr or Leu; X₁₁ is Pro or Thr; X₁₂ is

Arg or Pro; or combinations of such selections; or

(g) said polypeptide includes an amino acid sequence of the following formula:

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃ (SEQ ID NO:7), and the following

amino acid positions are independently selected as follows: X₁ is Glu or Lys; X₂ is His or

Pro; X₃ is Tyr; X₄ is Asp or Gln; X₅ is Asn or Thr; X₆ is Asp or Pro; X₇ is Ile or Pro; X₈ is

Leu or Thr; X₉ is Lys; X₁₀ is Gly or Met; X₁₁ is Ala or Thr; X₁₂ is Arg or His; X₁₃ is His;

or combinations of such selections.

13. The BLyS binding polypeptide according to Claim 11, comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 20-162 as depicted in Tables 1-8.

14. The BLyS binding polypeptide according to Claim 11, comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

WO 02/16412

PCT/US01/25891

AGKEPCYFYWECAVSGPGPEGGGK (SEQ ID NO:163),
AGVPFCDLLTKHCFEAGPGPEGGGK (SEQ ID NO:164),
GSSRLCHMDELTHVCVHFAPPPEGGGK (SEQ ID NO:165),
GDGGNCYTDSLTKLHFCMGDEPGPEGGGK (SEQ ID NO:166),
GYDVLTKLYFVPGPGPEGGGK (SEQ ID NO:167), and
WTDSLTGLWFPDGGPGPEGGGK, (SEQ ID NO:168).

15. A recombinant bacteriophage expressing exogenous DNA encoding a BLyS binding polypeptide comprising an amino acid sequence: Asp-Xaa-Leu-Thr (SEQ ID NO:446), wherein Xaa is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala.

16. The bacteriophage according to Claim 15, wherein Xaa is Pro or Ser.

17. The bacteriophage according to Claim 15, wherein said polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of:

Ala-Gly-Lys-Glu-Pro-Cys-Tyr-Phe-Tyr-Trp-Glu-Cys-Ala-Val-Ser-Gly (SEQ ID NO:450);
Ala-Gly-Val-Pro-Phe-Cys-Asp-Leu-Leu-Thr-Lys-His-Cys-Phe-Glu-Ala-Gly (SEQ ID NO:451);
Gly-Ser-Ser-Arg-Leu-Cys-His-Met-Asp-Glu-Leu-Thr-His-Val-Cys-Val-His-Phe-Ala-Pro (SEQ ID NO:452);
Gly-Asp-Gly-Gly-Asn-Cys-Tyr-Thr-Asp-Ser-Leu-Thr-Lys-Leu-His-Phe-Cys-Met-Gly-Asp-Glu (SEQ ID NO:453);
Gly-Tyr-Asp-Val-Leu-Thr-Lys-Leu-Tyr-Phe-Val-Pro-Gly-Gly (SEQ ID NO:454);
Trp-Thr-Asp-Ser-Leu-Thr-Gly-Leu-Trp-Phe-Pro-Asp-Gly-Gly (SEQ ID NO:455);
Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Asp (SEQ ID NO:186);
Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Asp (SEQ ID NO:456);
Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu (SEQ ID NO:457);
Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Val (SEQ ID NO:189);
Ala-Asn-Trp-Phe-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Asp (SEQ ID NO:309);
Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Ser-Leu-Pro-Asp (SEQ ID NO:458);
Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Phe-Pro-Asp (SEQ ID NO:353);
Ala-Asn-Trp-Tyr-Asp-Ser-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu-Pro-Asp (SEQ ID NO:327).

WO 02/16412

PCT/US01/25891

18. The bacteriophage according to Claim 15, wherein said polypeptides comprises the amino acid sequence: X_1 - X_2 -Asp- X_4 -Leu-Thr- X_7 -Leu- X_9 - X_{10} (SEQ ID NO:448), wherein

X_1 is Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly, or Ser;

X_2 is Tyr, Phe, Gln, Cys, Asn;

X_4 is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala;

X_7 is Lys, Asn, Gln, Gly, or Arg;

X_9 is Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr, or Lys; and

X_{10} is Leu, Phe, Val, Ile, or His.

19. The bacteriophage according to Claim 18, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence: Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu (SEQ ID NO:436).

20. The bacteriophage according to Claim 18, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence: Ala- X_2 - X_3 - X_4 -Asp- X_6 -Leu-Thr- X_9 -Leu- X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} (SEQ ID NO:447), wherein

X_2 is any amino acid except Arg;

X_3 is Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly, or Ser;

X_4 is Tyr, Phe, Gln, Cys, Asn;

X_6 is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala;

X_9 is Lys, Asn, Gln, Gly, or Arg;

X_{11} is Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr, or Lys;

X_{12} is Leu, Phe, Val, Ile, or His;

X_{13} is Pro, Leu, His, Ser, Arg, Asn, Gln, Thr, Val, Ala, Cys, Ile, Phe, or Tyr; and

X_{14} is Asp, Glu, Asn, Val, His, Gln, Arg, Gly, Ser, Tyr, Ala, Cys, Lys, Ile, Thr or Leu.

21. The bacteriophage according to Claim 18, wherein said polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 186-435 as depicted in Table 14.

WO 02/16412

PCT/US01/25891

22. A recombinant bacteriophage expressing exogenous DNA encoding a BLyS binding polypeptide comprising an amino acid sequence of the formula:

(A) $X_1-X_2-X_3-Cys-X_5-Phe-X_7-Trp-Glu-Cys-X_{11}-X_{12}-X_{13}$ (SEQ ID NO:1),

wherein

X_1 is Ala, Asn, Lys, or Ser;

X_2 is Ala, Glu, Met, Ser, or Val;

X_3 is Ala, Asn, Lys, or Pro;

X_5 is Phe, Trp, or Tyr;

X_7 is Pro or Tyr;

X_{11} is Ala, Gln, His, Phe, or Val;

X_{12} is Asn, Gln, Gly, His, Ser, or Val; and

X_{13} is Ala, Asn, Gly, Ile, Pro, or Ser; or

(B) $X_1-X_2-X_3-Cys-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-Cys-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ (SEQ ID

NO:2),

wherein

X_1 is Ala, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val, or is absent;

X_2 is Ala, Asn, Asp, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val;

X_3 is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X_5 is Asp, Ile, Leu, or Tyr;

X_6 is Arg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Tyr, or Val;

X_7 is His, Leu, Lys, or Phe;

X_8 is Leu, Pro, or Thr;

X_9 is Arg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, Met, or Trp;

X_{10} is Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X_{12} is Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X_{13} is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val; and

X_{14} is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val, or is absent; or

WO 02/16412

PCT/US01/25891

(C) $X_1-X_2-X_3-Cys-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-Cys-X_{13}-X_{14}-X_{15}$ (SEQ ID NO:3),

wherein

X_1 is Ala, Arg, Asn, Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, or Thr;

X_2 is Asn, Asp, Gln, His, Ile, Lys, Pro, Thr, or Trp;

X_3 is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Phe, Pro, or Thr;

X_5 is Asn, Asp, Pro, Ser, or Thr;

X_6 is Arg, Asp, Ile, Leu, Met, Pro, or Val;

X_7 is Ala, Ile, Leu, Pro, Thr, or Val;

X_8 is Asn, His, Ile, Leu, Lys, Phe, or Thr;

X_9 is Asn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr;

X_{10} is Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, Ser, or Trp;

X_{11} is Arg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, Trp, or Tyr;

X_{13} is Gln, Glu, Ile, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr, or Val;

X_{14} is Asn, Gly, Ile, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr; and

X_{15} is Asn, Asp, Glu, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr; or

(D) $X_1-X_2-X_3-Cys-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-Cys-X_{14}-X_{15}-X_{16}$ (SEQ ID NO:4),

wherein

X_1 is Asn, Asp, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr, or is absent;

X_2 is Arg, Asn, Asp, His, Phe, Ser, or Trp;

X_3 is Asn, Asp, Leu, Pro, Ser, or Val;

X_5 is Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, or Thr;

X_6 is His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, or Tyr;

X_7 is Asp, His, Leu, or Ser;

X_8 is Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro, or Thr;

X_9 is Ala, Arg, Asn, or Leu;

X_{10} is Ile, Leu, Met, Pro, Ser, or Thr;

X_{11} is Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser, or Tyr;

X_{12} is Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X_{14} is Asp, Gly, Leu, Phe, Tyr, or Val;

X_{15} is Asn, His, Leu, Pro, or Tyr; and

X_{16} is Asn, Asp, His, Phe, Ser, or Tyr; or

WO 02/16412

PCT/US01/25891

(E) $X_1-X_2-X_3-Cys-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-Cys-X_{16}-X_{17}-X_{18}$
(SEQ ID NO:5),

wherein

X_1 is Arg, Asp, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or is absent;
 X_2 is Ala, Arg, Asn, Asp, Gly, Pro, Ser, or is absent;
 X_3 is Arg, Asn, Gln, Glu, Gly, Lys, Met, Pro, Trp or Val;
 X_5 is Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr, or Val;
 X_6 is Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr;
 X_7 is Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, or Tyr;
 X_8 is Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, or Tyr;
 X_9 is Asp, Leu, Pro, Thr, or Val;
 X_{10} is Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp or Tyr;
 X_{11} is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Met, or Thr;
 X_{12} is Ala, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr;
 X_{13} is Ala, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr;
 X_{14} is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, or Val;
 X_{16} is Arg, Asp, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, or Trp;
 X_{17} is Arg, Asn, Asp, Gly, His, Phe, Pro, Ser, Trp or Tyr; and
 X_{18} is Ala, Arg, Asn, Asp, His, Leu, Phe, or Trp; or

(F) $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$ (SEQ ID NO:6),

wherein

X_1 is Ala, Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Tyr, or Val;
 X_2 is Ala, Arg, Gln, His, Ile, Leu, Phe, Thr, Trp, or Tyr;
 X_3 is Ala, Asp, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr;
 X_4 is Arg, Asp, Gln, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr, or Val;
 X_5 is Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, or Val;
 X_6 is His, Ile, Leu, Pro, Ser, or Thr;
 X_7 is Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, or Thr;
 X_8 is Ala, Arg, Asn, Ile, Leu, Lys, Met, or Thr;
 X_9 is Ala, Asn, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val;
 X_{10} is Ile, Leu, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val;
 X_{11} is Ala, Arg, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val; and
 X_{12} is Arg, Asp, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or Val; or

WO 02/16412

PCT/US01/25891

(G) $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}$ (SEQ ID NO:7),

wherein

 X_1 is Asp, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Met, or Trp; X_2 is Arg, Gln, His, Ile, Leu, or Pro; X_3 is Asp, Gly, Ile, Lys, Thr, Tyr or Val; X_4 is Asn, Asp, Gln, Glu, Met, Pro, Ser, or Tyr; X_5 is Asn, Asp, His, Ile, Leu, Met, Pro, Thr or Val; X_6 is Asp, Glu, His, Leu, Lys, Pro, or Val; X_7 is Arg, Asn, Gln, His, Ile, Leu, Met, Pro, or Thr; X_8 is Gln, Gly, His, Leu, Met, Ser, or Thr; X_9 is Asn, Gln, Gly, His, Leu, Lys, Ser, or Thr; X_{10} is Ala, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, or Phe; X_{11} is Ala, Glu, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val; X_{12} is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Tyr, or Val; and X_{13} is Arg, Asn, Glu, His, Ile, Ser, Thr, Trp, or Val.

23. The recombinant bacteriophage according to Claim 22, wherein

(a) said polypeptide comprises an amino acid sequence of the following formula:

 $X_1-X_2-X_3-Cys-X_4-Phe-X_5-Trp-Glu-Cys-X_{11}-X_{12}-X_{13}$ (SEQ ID NO:1), and the following amino acid positions are independently selected as follows: X_3 is Lys; X_5 is Tyr; X_7 is Pro; X_{11} is Ala, Gln, His, Phe, or Val; X_{12} is Asn, Gln, Gly, His, Ser, or Val; X_{13} is Ala, Asn, Gly, Ile, Pro, or Ser; or combinations of such selections; or

(b) said polypeptide comprises an amino acid sequence of the following formula:

 $X_1-X_2-X_3-Cys-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-Cys-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ (SEQ ID NO:2), and the following amino acid positions are independently selected as follows: X_3 is Asp; X_5 is Asp or Leu; X_6 is Glu or Leu; X_7 is His or Leu; X_8 is Thr or Pro; X_9 is Lys; or combinations of such selections; or

(c) said polypeptide comprises an amino acid sequence of the following formula:

 $X_1-X_2-X_3-Cys-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-Cys-X_{13}-X_{14}-X_{15}$ (SEQ ID NO:3), and the following amino acid positions are independently selected as follows: X_3 is Ala; X_5 is Asp; X_6 is Ile; X_7 is Val or Leu; X_8 is Thr; X_9 is Leu; X_{11} is Ser; X_{13} is Val; X_{15} is Glu or Pro; or combinations of such selections; or

(d) said polypeptide comprises an amino acid sequence of the following formula:

WO 02/16412

PCT/US01/25891

$X_1-X_2-X_3-Cys-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-Cys-X_{14}-X_{15}-X_{16}$ (SEQ ID NO:4), and the following amino acid positions are independently selected as follows: X_1 is Ser; X_2 is Arg; X_3 is Asn or Asp; X_7 is Asp; X_8 is Glu or Pro; X_9 is Leu; X_{10} is Thr; X_{14} is Leu; X_{15} is His, Leu, or Pro; X_{16} is Asp or Ser; or combinations of such selections; or

(e) said polypeptide comprises an amino acid sequence of the following formula: $X_1-X_2-X_3-Cys-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-Cys-X_{16}-X_{17}-X_{18}$ (SEQ ID NO:5), and the following amino acid positions are independently selected as follows: X_1 is Arg; X_2 is Asn, Asp, Gly, or Pro; X_3 is Gly or Met; X_5 is Trp, Tyr, or Val; X_6 is Asp; X_7 is Asp; X_8 is Leu; X_9 is Leu or Thr; X_{10} is Lys or Thr; X_{11} is Arg or Leu; X_{12} is Thr or Trp; X_{13} is Met or Phe; X_{14} is Val; X_{16} is Met; X_{17} is Arg, His, or Tyr; X_{18} is Asn or His; or combinations of such selections; or

(f) said polypeptide comprises an amino acid sequence of the following formula: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$ (SEQ ID NO:6), and the following amino acid positions are independently selected as follows: X_1 is Gly, Tyr, or Val; X_2 is His or Tyr; X_3 is Asp or Tyr; X_4 is Asp or Gln; X_5 is Leu or Ser; X_6 is Leu or Thr; X_7 is Lys or Thr; X_8 is Leu or Lys; X_9 is Met or Ser; X_{10} is Thr or Leu; X_{11} is Pro or Thr; X_{12} is Arg or Pro; or combinations of such selections; or

(g) said polypeptide comprises an amino acid sequence of the following formula: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}$ (SEQ ID NO:7), and the following amino acid positions are independently selected as follows: X_1 is Glu or Lys; X_2 is His or Pro; X_3 is Tyr; X_4 is Asp or Gln; X_5 is Asn or Thr; X_6 is Asp or Pro; X_7 is Ile or Pro; X_8 is Leu or Thr; X_9 is Lys; X_{10} is Gly or Met; X_{11} is Ala or Thr; X_{12} is Arg or His; X_{13} is His; or combinations of such selections.

24. A method for detecting BLyS or a BLyS-like polypeptide in a solution suspected of containing it comprising:

- (a) contacting said solution with a polypeptide according to any of Claims 1, 9 or 11, and
- (b) determining whether binding has occurred between said polypeptide and BLyS or a BLyS-like polypeptide.

25. A method for purifying BLyS or a BLyS-like polypeptide comprising:

- (a) immobilizing a binding polypeptide according to any of Claims 1, 9 or 11 on a solid support;

WO 02/16412

PCT/US01/25891

- (b) contacting a solution containing BLyS or a BLyS-like polypeptide with said support; and, thereafter,
- (c) separating the solution from said support.

26. BLyS separation media comprising:

- (a) a chromatographic matrix material, and, immobilized thereon,
- (b) a BLyS binding molecule comprising a BLyS binding polypeptide as defined in any of Claims 1, 9 or 11.

27. The BLyS separation media according to Claim 26, comprising:

- (a) a chromatographic matrix material, and, immobilized thereon,
- (b) a BLyS binding molecule comprising a BLyS binding polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:20-162 and 186-435, as depicted in Tables 1-8 and 14.

28. A method for separating BLyS or a BLyS-like polypeptide from a solution containing it comprising:

- (a) contacting said solution with separation media as defined in Claim 26,
- (b) removing unbound material, and
- (c) eluting bound BLyS or BLyS-like polypeptide from said separation media.

29. A polynucleotide encoding a BLyS binding polypeptide comprising the amino acid sequence: Asp-Xaa-Leu-Thr (SEQ ID NO:446), wherein Xaa is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala.

30. The polynucleotide according to Claim 29, wherein Xaa is Pro or Ser.

31. The polynucleotide according to Claim 29, wherein said polypeptides comprises the amino acid sequence: X₁-X₂-Asp-X₄-Leu-Thr-X₇-Leu-X₉-X₁₀ (SEQ ID NO:448), wherein

X₁ is Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly, or Ser;

X₂ is Tyr, Phe, Glu, Cys, Asn;

X₄ is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala;

WO 02/16412

PCT/US01/25891

X₇ is Lys, Asn, Gln, Gly, or Arg;

X₉ is Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr, or Lys; and

X₁₀ is Leu, Phe, Val, Ile, or His.

32. The polynucleotide according to Claim 31, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence: Trp-Tyr-Asp-Pro-Leu-Thr-Lys-Leu-Trp-Leu (SEQ ID NO:436).

33. The polynucleotide according to Claim 31, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence: Ala-X₂-X₃-X₄-Asp-X₆-Leu-Thr-X₉-Leu-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (SEQ ID NO:447),

wherein

X₂ is any amino acid except Arg;

X₃ is Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly, or Ser;

X₄ is Tyr, Phe, Glu, Cys, Asn;

X₆ is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala;

X₉ is Lys, Asn, Gln, Gly, or Arg;

X₁₁ is Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr, or Lys;

X₁₂ is Leu, Phe, Val, Ile, or His;

X₁₃ is Pro, Leu, His, Ser, Arg, Asn, Gln, Thr, Val, Ala, Cys, Ile, Phe, or Tyr; and

X₁₄ is Asp, Glu, Asn, Val, His, Gln, Arg, Gly, Ser, Tyr, Ala, Cys, Lys, Ile, Thr or Leu.

34. The polynucleotide according to Claim 31, encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 186-435 as depicted in Table 14.

35. A polynucleotide encoding a BLyS binding polypeptide of the formula:

(A) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-Phe-X₇-Trp-Glu-Cys-X₁₁-X₁₂-X₁₃ (SEQ ID NO:1),

wherein

X₁ is Ala, Asn, Lys, or Ser;

X₂ is Ala, Glu, Met, Ser, or Val;

X₃ is Ala, Asn, Lys, or Pro;

X₅ is Phe, Trp, or Tyr;

WO 02/16412

PCT/US01/25891

X₇ is Pro or Tyr;

X₁₁ is Ala, Gln, His, Phe, or Val;

X₁₂ is Asn, Gln, Gly, His, Ser, or Val; and

X₁₃ is Ala, Asn, Gly, Ile, Pro, or Ser; or

(B) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-Cys-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (SEQ ID NO:2),

wherein

X₁ is Ala, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val, or is absent;

X₂ is Ala, Asn, Asp, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val;

X₃ is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X₅ is Asp, Ile, Leu, or Tyr;

X₆ is Arg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Tyr, or Val;

X₇ is His, Leu, Lys, or Phe;

X₈ is Leu, Pro, or Thr;

X₉ is Arg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, Met, or Trp;

X₁₀ is Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X₁₂ is Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X₁₃ is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val; and

X₁₄ is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val, or is absent; or

(C) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-Cys-X₁₃-X₁₄-X₁₅ (SEQ ID NO:3),

wherein

X₁ is Ala, Arg, Asn, Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, or Thr;

X₂ is Asn, Asp, Gln, His, Ile, Lys, Pro, Thr, or Trp;

X₃ is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Phe, Pro, or Thr;

X₅ is Asn, Asp, Pro, Ser, or Thr;

X₆ is Arg, Asp, Ile, Leu, Met, Pro, or Val;

X₇ is Ala, Ile, Leu, Pro, Thr, or Val;

X₈ is Asn, His, Ile, Leu, Lys, Phe, or Thr;

X₉ is Asn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr;

WO 02/16412

PCT/US01/25891

X₁₀ is Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, Ser, or Trp;

X₁₁ is Arg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, Trp, or Tyr;

X₁₃ is Gln, Glu, Ile, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr, or Val;

X₁₄ is Asn, Gly, Ile, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr; and

X₁₅ is Asn, Asp, Glu, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr; or

(D) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-Cys-X₁₄-X₁₅-X₁₆ (SEQ ID NO:4),

wherein

X₁ is Asn, Asp, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr, or is absent;

X₂ is Arg, Asn, Asp, His, Phe, Ser, or Trp;

X₃ is Asn, Asp, Leu, Pro, Ser, or Val;

X₅ is Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, or Thr;

X₆ is His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, or Tyr;

X₇ is Asp, His, Leu, or Ser;

X₈ is Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro, or Thr;

X₉ is Ala, Arg, Asn, or Leu;

X₁₀ is Ile, Leu, Met, Pro, Ser, or Thr;

X₁₁ is Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser, or Tyr;

X₁₂ is Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X₁₄ is Asp, Gly, Leu, Phe, Tyr, or Val;

X₁₅ is Asn, His, Leu, Pro, or Tyr; and

X₁₆ is Asn, Asp, His, Phe, Ser, or Tyr; or

(E) X₁-X₂-X₃-Cys-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-Cys-X₁₆-X₁₇-X₁₈

(SEQ ID NO:5),

wherein

X₁ is Arg, Asp, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or is absent;

X₂ is Ala, Arg, Asn, Asp, Gly, Pro, Ser, or is absent;

X₃ is Arg, Asn, Gln, Glu, Gly, Lys, Met, Pro, Trp or Val;

X₅ is Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr, or Val;

X₆ is Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr;

X₇ is Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, or Tyr;

X₈ is Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, or Tyr;

X₉ is Asp, Leu, Pro, Thr, or Val;

WO 02/16412

PCT/US01/25891

X₁₀ is Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp or Tyr;

X₁₁ is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Met, or Thr;

X₁₂ is Ala, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr;

X₁₃ is Ala, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr;

X₁₄ is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, or Val;

X₁₆ is Arg, Asp, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, or Trp;

X₁₇ is Arg, Asn, Asp, Gly, His, Phe, Pro, Ser, Trp or Tyr; and

X₁₈ is Ala, Arg, Asn, Asp, His, Leu, Phe, or Trp; or

(F) X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂ (SEQ ID NO:6),

wherein

X₁ is Ala, Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Tyr, or Val;

X₂ is Ala, Arg, Gln, His, Ile, Leu, Phe, Thr, Trp, or Tyr;

X₃ is Ala, Asp, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr;

X₄ is Arg, Asp, Gln, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr, or Val;

X₅ is Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, or Val;

X₆ is His, Ile, Leu, Pro, Ser, or Thr;

X₇ is Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, or Thr;

X₈ is Ala, Arg, Asn, Ile, Leu, Lys, Met, or Thr;

X₉ is Ala, Asn, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val;

X₁₀ is Ile, Leu, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val;

X₁₁ is Ala, Arg, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val; and

X₁₂ is Arg, Asp, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or Val; or

(G) X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃ (SEQ ID NO:7),

wherein

X₁ is Asp, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Met, or Trp;

X₂ is Arg, Gln, His, Ile, Leu, or Pro;

X₃ is Asp, Gly, Ile, Lys, Thr, Tyr or Val;

X₄ is Asn, Asp, Gln, Glu, Met, Pro, Ser, or Tyr;

X₅ is Asn, Asp, His, Ile, Leu, Met, Pro, Thr or Val;

X₆ is Asp, Glu, His, Leu, Lys, Pro, or Val;

X₇ is Arg, Asn, Gln, His, Ile, Leu, Met, Pro, or Thr;

X₈ is Gln, Gly, His, Leu, Met, Ser, or Thr;

X₉ is Asn, Gln, Gly, His, Leu, Lys, Ser, or Thr;

WO 02/16412

PCT/US01/25891

X₁₀ is Ala, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, or Phe;

X₁₁ is Ala, Glu, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val;

X₁₂ is Arg, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Tyr, or Val; and

X₁₃ is Arg, Asn, Glu, His, Ile, Ser, Thr, Trp, or Val.

36. A method for identifying a binding molecule for a BLyS target comprising the steps of utilizing a BLyS binding polypeptide according to any of Claims 1, 9 or 11 to form a complex with BLyS or a BLyS-like polypeptide, contacting said complex with one or more potential BLyS target binding molecules, and determining whether said one or more potential BLyS target binding molecules competes with said BLyS binding polypeptide to form a complex with said BLyS or BLyS-like polypeptide.

37. A BLyS affinity maturation library, comprising a population of at least 10³ polypeptides, wherein the polypeptides of said population comprise the amino acid sequence:

Ala-X₂-X₃-X₄-Asp-X₆-Leu-Thr-X₉-Leu-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄ (SEQ ID NO:449),

wherein

X₂ is any amino acid;

X₃ is any amino acid;

X₄ is any amino acid;

X₆ is any amino acid;

X₉ is any amino acid;

X₁₁ is any amino acid;

X₁₂ is any amino acid;

X₁₃ is any amino acid; and

X₁₄ is any amino acid.

38. A DNA template encoding a multiplicity of BLyS binding polypeptides, comprising the sequence:

GCT NNN NNN NNN GAT NNN CTT ACT NNN CTC NNN NNN NNN NNN (SEQ ID NO:185).

WO 02/16412

PCT/US01/25891

SEQUENCE LISTING

<110> Dyax Corp.
Beltzer, James P.
Potter, M. Daniel
Fleming, Tony J.
Ladner, Robert Charles

<120> BINDING POLYPEPTIDES FOR B LYMPHOCYTE STIMULATOR PROTEIN (BLyS)

<130> Dyx-018.1 PCT; DYX-018.1 US

<140> not yet assigned
<141> 2001-08-17

<160> 458

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X1 is Ala, Asn, Lys, or Ser;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X2 is Ala, Glu, Met, Ser, or Val;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X3 is Ala, Asn, Lys, or Pro (preferably Lys);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X5 is Phe, Trp, or Tyr (preferably Tyr);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X7 is Pro or Tyr (preferably Pro);

WO 02/16412

PCT/US01/25891

```

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X11 is Ala, Gln, His, Phe, or Val;

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X12 is Asn, Gln, Gly, His, Ser, or Val;

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X13 is Ala, Asn, Gly, Ile, Pro, or Ser,

<400> 1
Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Pro Xaa Thr Gly Cys Xaa Xaa Xaa
1          5          10

<210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X1 is Ala, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro,
      Ser, Thr, Trp, Tyr, Val, or is absent;

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X2 is Ala, Asn, Asp, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro,
      Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val;

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X3 is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met,
      Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or Val (preferably Asp);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X5 is Asp, Ile, Leu, or Tyr (preferably Asp or Leu);

```

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X6 is Arg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Tyr, or Val (preferably Glu or Leu);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X is His, Leu, Lys, or Phe

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X is Leu, Pro, or Thr

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X is Arg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, Met, or Trp

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X10 is Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val;

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X12 is Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val;

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X13 is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val;

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X14 is Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val, or is absent

<400> 2

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X1 is Ala, Arg, Asn, Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, or Thr;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X2 is Asn, Asp, Gln, His, Ile, Lys, Pro, Thr, or Trp;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X3 is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Phe, Pro, or Thr (preferably Ala);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X5 is Asn, Asp, Pro, Ser, or Thr (preferably Asp);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X6 is Arg, Asp, Ile, Leu, Met, Pro, or Val (preferably Ile);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X7 is Ala, Ile, Leu, Pro, Thr, or Val (preferably Val or Leu);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X8 is Asn, His, Ile, Leu, Lys, Phe, or Thr (preferably Thr);

<220>
<221> MISC_FEATURE

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<222> (9)..(9)
<223> X9 is Asn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr (preferably Leu);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X10 is Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, Ser, or Trp;

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X11 is Arg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, Trp, or Tyr (preferably Ser);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X13 is Gln, Glu, Ile, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr, or Val (preferably Val);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X14 is Asn, Gly, Ile, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr;

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X15 is Asn, Asp, Glu, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr (preferably Glu or Pro);

<400> 3

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X1 is Asn, Asp, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Tyr, or is absent (prefe

WO 02/16412

PCT/US01/25891

rably Ser);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X2 is Arg, Asn, Asp, His, Phe, Ser, or Trp (preferably Arg);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X3 is Asn, Asp, Leu, Pro, Ser, or Val (preferably Asn or Asp);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X5 is Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, or Thr;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X6 is His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, or Tyr;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X7 is Asp, His, Leu, or Ser (preferably Asp);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X8 is Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro, or Thr (preferably Glu or Pro);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X9 is Ala, Arg, Asn, or Leu (preferably Leu);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X10 is Ile, Leu, Met, Pro, Ser, or Thr (preferably Thr);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X11 is Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser, or Tyr;

WO 02/16412

PCT/US01/25891

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X12 is Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X14 is Asp, Gly, Leu, Phe, Tyr, or Val (preferably Leu);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> X15 is Asn, His, Leu, Pro, or Tyr (preferably His, Leu or Pro);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X16 is Asn, Asp, His, Phe, Ser, or Tyr, (preferably Asp or Ser),

<400> 4
Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
1          5          10          15

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X1 is Arg, Asp, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or is absent (preferably Arg);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X2 is Ala, Arg, Asn, Asp, Gly, Pro, Ser, or is absent (preferably Asn, Asp, Gly, or Pro);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X3 is Arg, Asn, Gln, Glu, Gly, Lys, Met, Pro, Trp or Val (preferably

```

WO 02/16412

PCT/US01/25891

bly Gly or Met);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X5 is Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr, or Val (preferably Trp, Tyr, or Val);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X is Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, Trp, or Tyr

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X7 is Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, or Tyr (preferably Asp);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X8 is Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, or Tyr (preferably Leu);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X9 is Asp, Leu, Pro, Thr, or Val (preferably Leu or Thr);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X is Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, or Tyr

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X11 is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Met, or Thr (preferably Arg or Leu);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X12 is Ala, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr (preferably Thr or Trp);

<220>
<221> MISC FEATURE

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<222> (13)..(13)
<223> X13 is Ala, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr (preferably Met or Phe);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X14 is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, or Val (preferably Val);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X16 is Arg, Asp, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, or Trp (preferably Met);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> X is Arg, Asn, Asp, Gly, His, Phe, Pro, Ser, Trp, or Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X18 is Ala, Arg, Asn, Asp, His, Leu, Phe, or Trp (preferably His or Asn);

<400> 5

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X1 is Ala, Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Tyr, or Val (preferably Gly, Tyr, or Val);

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X2 is Ala, Arg, Gln, His, Ile, Leu, Phe, Thr, Trp, or Tyr (preferably His or Tyr);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X3 is Ala, Asp, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr (preferably Asp or Tyr);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X4 is Arg, Asp, Gln, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr, or Val (preferably Asp or Gln);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X5 is Asp, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, or Val (preferably Leu or Ser);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X6 is His, Ile, Leu, Pro, Ser, or Thr (preferably Leu or Thr);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X7 is Arg, Gly, His, Leu, Lys, Met, or Thr (preferably Lys or Thr);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X8 is Ala, Arg, Asn, Ile, Leu, Lys, Met, or Thr (preferably Leu or Lys);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X9 is Ala, Asn, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val (preferably Met or Ser);

<220>
<221> MISC_FEATURE

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<222> (10)..(10)
 <223> X10 is Ile, Leu, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val (preferably Thr or Leu);

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> X11 is Ala, Arg, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val (preferably Pro or Thr);

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> X12 is Arg, Asp, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, or Val (preferably Arg or Pro);

<400> 6
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BLyS binding polypeptide

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X1 is Asp, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Met, or Trp (preferably Glu, Lys);

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X2 is Arg, Gln, His, Ile, Leu, or Pro (preferably His or Pro);

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X3 is Asp, Gly, Ile, Lys, Thr, Tyr or Val (preferably Tyr);

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> X4 is Asn, Asp, Gln, Glu, Met, Pro, Ser, or Tyr (preferably Asp or Gln);

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X5 is Asn, Asp, His, Ile, Leu, Met, Pro, Thr or Val (preferably Asn or Thr);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X6 is Asp, Glu, His, Leu, Lys, Pro, or Val (preferably Asp or Pro);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X7 is Arg, Asn, Gln, His, Ile, Leu, Met, Pro, or Thr (preferably Ile or Pro);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X8 is Gln, Gly, His, Leu, Met, Ser, or Thr (preferably Leu or Thr);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X9 is Asn, Gln, Gly, His, Leu, Lys, Ser, or Thr (preferably Lys);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X10 is Ala, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, or Phe (preferably Gly or Met);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X11 is Ala, Glu, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr, or Val (preferably Ala or Thr);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X12 is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Tyr, or Val (preferably Arg or His);

WO 02/16412

PCT/US01/25891

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X13 is Arg, Asn, Glu, His, Ile, Ser, Thr, Trp, or Val (preferably
      His),

<400> 7

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1          5          10

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X2 is Phe, Trp, or Tyr (preferably Tyr);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X4 is Pro or Tyr (preferably Pro);

<400> 8

Cys Xaa Pro Xaa Thr Gly Cys
1          5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X2 is Asp, Ile, Leu, or Tyr (preferably Asp or Leu);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X3 is Arg, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Tyr, or Val (

```

WO 02/16412

PCT/US01/25891

preferably Glu or Leu);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X4 is His, Leu, Lys, or Phe (preferably His or Leu);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X5 is Leu, Pro, or Thr (preferably Thr or Pro);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X6 is Arg, Asn, Gly, His, Ile, Lys, Met, or Trp (preferably Lys);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X7 is Ala, Asn, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Trp, Tyr, or Val;

<400> 9
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X2 is Asn, Asp, Pro, Ser, or Thr (preferably Asp);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X3 is Arg, Asp, Ile, Leu, Met, Pro, or Val (preferably Ile);

<220>
<221> MISC_FEATURE

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<222> (4)..(4)
<223> X4 is Ala, Ile, Leu, Pro, Thr, or Val (preferably Val or Leu);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X5 is Asn, His, Ile, Leu, Lys, Phe, or Thr (preferably Thr);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X6 is Asn, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Pro, or Thr (preferably Leu);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X7 is Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ile, Lys, Met, Pro, Ser, or Trp;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X8 is Arg, Glu, Gly, Lys, Phe, Ser, Trp, or Tyr (preferably Ser);

<400> 10
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
1 5

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X2 is Asp, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, or Thr;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X3 is His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, or Tyr;

<220>

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X4 is Asp, His, Leu, or Ser (preferably Asp);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X5 is Ala, Arg, Asp, Glu, Leu, Phe, Pro, or Thr (preferably Glu or Pro);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X6 is Ala, Arg, Asn, or Leu (preferably Leu);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X7 is Ile, Leu, Met, Pro, Ser, or Thr (preferably Thr);

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X8 is Ala, Arg, Asn, Gly, His, Lys, Ser, or Tyr;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X9 is Ala, Arg, Asn, Gln, Leu, Met, Ser, Trp, Tyr, or Val;

<400> 11
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
1 5 10

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X2 is Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr, or Val (preferably Trp, Tyr, or Val);

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X3 is Arg, Asp, Gln, Gly, Ile, Lys, Phe, Thr, Trp or Tyr (preferably Asp);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X4 is Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, or Tyr (preferably Asp);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X5 is Asp, Gln, Glu, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, or Tyr (preferably Leu);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X6 is Asp, Leu, Pro, Thr, or Val (preferably Leu or Thr);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X7 is Arg, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp or Tyr (preferably Lys or Thr);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X8 is Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Met, or Thr (preferably Arg or Leu);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X9 is Ala, Asn, Gln, Gly, Leu, Lys, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr (preferably Thr or Trp);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X10 is Ala, Arg, Gln, His, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, or Tyr (preferably Met or Phe);

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (11)..(11)

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<223> X11 is Arg, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr
, or Val (preferably Val);

<400> 12

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
1 5 10

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> c-terminal linker

<400> 13

Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
1 5

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> phage display library template

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(3)

<223> X is any amino acid except Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(8)

<223> X is any amino acid except Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(12)

<223> X is any amino acid except Cys

<400> 14

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 15

WO 02/16412

PCT/US01/25891

```
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> phage display library template

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(3)
<223> X is any amino acid except Cys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(9)
<223> X is any amino acid except Cys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(13)
<223> X is any amino acid except Cys

<400> 15
Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
1          5          10

<210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> phage display library template

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(14)
<223> X is any amino acid except Cys

<400> 16
Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
1          5          10

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
```

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<223> phage display library template

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(3)

<223> X is any amino acid except Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(11)

<223> X is any amino acid except Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(15)

<223> X is any amino acid except Cys

<400> 17

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> phage display library template

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(3)

<223> X is any amino acid except Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(12)

<223> X is any amino acid except Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(16)

<223> X is any amino acid except Cys

<400> 18

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 19
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> phage display library template

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(3)
<223> X is any amino acid except Cys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(14)
<223> X is any amino acid except Cys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(18)
<223> X is any amino acid except Cys

<400> 19

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa

<210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 20

His Leu Arg Cys Trp Ser Thr Asn Cys Arg Tyr Asp
1 5 10

<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 21

Val Met Asp Cys Leu Ile Asn Arg Cys Asp Thr Val
1 5 10

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 22

Lys Ser Lys Cys Phe Phe Pro Trp Glu Cys Gln Gln Ala
1 5 10

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 23

Ala Met Lys Cys Tyr Phe Pro Trp Glu Cys Ala Asn Gly
1 5 10

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 24

Glu Asn Val Ala Cys Tyr Phe Pro Trp Glu Cys His His Pro
1 5 10

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<400> 25

Asn Ala Pro Cys Tyr Phe Pro Trp Glu Cys Phe Ser Ile
1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 26

Ser Val Asn Cys Trp Phe Pro Trp Glu Cys Val Gly Asn
1 5 10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 27

Lys Glu Pro Cys Tyr Phe Tyr Trp Glu Cys Ala Val Ser
1 5 10

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 28

Asp Thr Asn Cys Asp Leu Leu Thr Lys Met Cys Gly Pro Gln
1 5 10

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<400> 29

Gly Thr Pro Cys Asp Leu Leu Thr Lys Leu Cys Leu Leu Trp
1 5 10

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 30

Met Ser Glu Cys Asp Leu Leu Thr Lys Ile Cys Leu Met Gly
1 5 10

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 31

Val Pro Phe Cys Asp Leu Leu Thr Lys His Cys Phe Glu Ala
1 5 10

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 32

Val Pro Phe Cys Asp Leu Leu Thr Lys His Cys Phe Glu Ala
1 5 10

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 33

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Trp Ser Ala Cys Asp Leu Leu Thr Lys Gln Cys Val Gln Val
1 5 10

<210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 34

Asp Gly Cys Asp Glu Leu Thr Lys Ile Cys Gly Met Lys
1 5 10

<210> 35
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 35

Lys Ser Trp Cys Asp Glu Leu Thr Lys Val Cys Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 36
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 36

Lys Trp Met Cys Asp Glu Leu Thr Lys Gln Cys Gln Tyr Val
1 5 10

<210> 37
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 37

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Met Lys Tyr Cys Asp Glu Leu Thr Lys Ile Cys Val Gly Trp
1 5 10

<210> 38
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 38

Tyr Phe Gln Cys Asp Glu Leu Thr Lys Met Cys Trp Gln Lys
1 5 10

<210> 39
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 39

Ala Met His Cys Asp Lys Leu Thr Lys His Cys Lys Phe His
1 5 10

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 40

Val Pro Tyr Cys Asp Lys Leu Thr Lys Ile Cys Gln Trp
1 5 10

<210> 41
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 41

Glu Val Phe Cys Asp Val Leu Thr Lys Val Cys Phe His Asp

WO 02/16412

PCT/US01/25891

1 5 10

<210> 42
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 42
Lys Pro Lys Cys Asp Val Leu Thr Lys Met Cys Asp Trp Leu
1 5 10

<210> 43
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 43
Thr Gln His Cys Asp Val Leu Thr Lys Gln Cys Phe Thr Ile
1 5 10

<210> 44
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 44
Gly His Phe Cys Asp Arg Leu Thr Lys Tyr Cys Phe Glu Pro
1 5 10

<210> 45
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 45
His Ile Gln Cys Asp Arg Leu Thr Lys Ser Cys Leu Ser Val
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 46
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 46
Ile Lys Ala Cys Asp Ile Leu Thr Lys Val Cys Trp Pro Pro
1 5 10

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 47
Gln Phe Asp Cys Asp Pro Leu Thr Lys Tyr Cys Gly Glu Phe
1 5 10

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 48
Lys Met Tyr Cys Asp His Leu Thr Gly Tyr Cys Trp Pro Glu
1 5 10

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 49
Met Gln Ser Cys Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Cys Phe Lys Arg
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 50
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 50
Gly Pro Trp Cys Asp Ile Leu Thr Gly Phe Cys Leu Ala Gln
1 5 10

<210> 51
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 51
Ser Val Arg Cys Asp Leu Leu Thr Gly Trp Cys Pro Val Trp
1 5 10

<210> 52
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 52
Pro Ala Asp Cys Asp Pro Leu Thr Asn Ile Cys Phe Trp Lys
1 5 10

<210> 53
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 53
Thr Asn Val Cys Asp Pro Leu Thr Asn Val Cys Phe Met Asn
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 54
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 54
Glu His Trp Cys Asp Asp Leu Thr His Leu Cys Phe Arg Leu
1 5 10

<210> 55
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 55
Gly Tyr Trp Cys Asp Val Leu Thr Asn Asn Cys Trp Lys Ile
1 5 10

<210> 56
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 56
Leu Tyr Asn Cys Asp Tyr Leu Thr Arg Leu Cys Phe Glu Pro
1 5 10

<210> 57
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 57
His Val Asp Cys Leu Leu His Pro Lys Ala Cys Tyr Lys Tyr
1 5 10

<210> 58

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 58

Val Gln Asp Cys Leu Leu His Pro Lys Ala Cys Gln Met Gln
1 5 10

<210> 59
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 59

Lys Phe Asp Cys Leu Leu Lys Pro Met Phe Cys Ser Asn His
1 5 10

<210> 60
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 60

Phe Ala Asp Cys Leu Ile His Pro Lys Ser Cys Lys Pro Leu
1 5 10

<210> 61
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 61

His Gly Asn Cys Tyr Pro Phe Pro Trp Glu Cys Glu Ser Lys
1 5 10

<210> 62
<211> 14

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 62
Met Ile Ile Val Leu Leu Leu Leu Arg Phe Ala Ile Ser Arg
1 5 10

<210> 63
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 63
Ser Leu Leu Val Ile Phe Leu Leu Ile Gly Ala Gly Ser Leu
1 5 10

<210> 64
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 64
Phe His Pro Cys Asp Met Leu Thr Gly Ile Trp Cys Gln Pro Asn
1 5 10 15

<210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 65
Ser Lys Arg Cys Asp Leu Leu Thr Lys Met Trp Cys Glu Thr Glu
1 5 10 15

<210> 66
<211> 15
<212> PRT

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 66

Thr	Lys	Phe	Cys	Asp	Arg	Leu	Thr	Met	Pro	Lys	Cys	Val	Trp	Lys
1				5					10					15

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 67

Asn	Thr	Phe	Cys	Pro	Asp	Pro	Leu	Thr	Gly	Arg	Cys	Val	Asn	Pro
1				5					10					15

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 68

Asp	Trp	Thr	Cys	Asp	Pro	Leu	Phe	His	Arg	Glu	Cys	Ile	Phe	Glu
1				5					10					15

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 69

Pro	Gln	Pro	Cys	Asp	Leu	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Cys	Ser	Ile	Lys
1				5					10					15

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 70
Arg Trp His Cys Asp Met Leu Ile Asn Pro Ser Cys Leu Pro Asp
1 5 10 15
<210> 71
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 71
Lys Ile Gln Cys Asp Ile Val Asn Leu Ser Ser Cys Val Tyr Pro
1 5 10 15
<210> 72
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 72
Leu Asn Ala Cys Asp Ile Val His Pro Asn Tyr Cys Ser Gly Met
1 5 10 15
<210> 73
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 73
Ala Lys Ala Cys Ser Ile Val Asn Leu Glu Ser Cys Glu Tyr Leu
1 5 10 15
<210> 74
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 74
Arg Gln Ala Cys Ser Ile Ile Thr Pro Trp Gly Cys Pro Ile Pro
1 5 10 15
<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 75
Ala Asp Asn Cys Thr Val Ala Thr Leu Asp Phe Cys Tyr Trp Thr
1 5 10 15
<210> 76
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 76
Lys Pro Glu Cys Asn Ile Thr Lys Pro Gln Phe Cys Phe Gly Glu
1 5 10 15
<210> 77
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 77
Asn Asn Cys Gln Trp Asp Glu Leu Thr Ser Met Cys Asp Pro Phe
1 5 10 15
<210> 78
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 78

Ser Arg Leu Cys His Met Asp Glu Leu Thr His Val Cys Val His Phe
1 5 10 15

<210> 79

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 79

Ser Arg Pro Cys Gln Ile Asp Glu Leu Thr Lys Ala Cys Phe Tyr Asn
1 5 10 15

<210> 80

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 80

Asp Arg Val Cys Lys Leu Asp Phe Leu Thr Tyr Asn Cys Leu Asn His
1 5 10 15

<210> 81

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 81

His Ser Asn Cys Ile Met Asp Leu Leu Thr Asn Arg Cys Phe Tyr Asp
1 5 10 15

<210> 82

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<400> 82

Pro Phe Asn Cys Phe His Asp Pro Leu Thr Gly Leu Cys Leu His Ser
1 5 10 15

<210> 83

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 83

Tyr Asp Ser Cys Thr Tyr Asp Arg Leu Thr Lys Gln Cys Tyr Pro Ser
1 5 10 15

<210> 84

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 84

Phe His Asp Cys Met Tyr Asp Ala Leu Leu Gly Tyr Cys Leu Pro Tyr
1 5 10 15

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 85

Asn Arg Ser Cys Asp Pro Leu Thr Arg Pro Lys Ser Cys Gly Leu
1 5 10 15

<210> 86

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<400> 86

Leu Ser Asn Cys Asp Trp Asp Asp Leu Ile Arg Gln Cys Leu His Asp
1 5 10 15

<210> 87

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 87

Phe Trp Asp Cys Leu Phe His Pro Asn Ser Arg Tyr Cys Val Leu Ser
1 5 10 15

<210> 88

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 88

Ser Arg Asp Cys Leu Leu Ser Pro Ala Met Ala Trp Cys Gly Leu Asp
1 5 10 15

<210> 89

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 89

Gly Gly Asn Cys Tyr Thr Asp Ser Leu Thr Lys Leu His Phe Cys Met
1 5 10 15

Gly Asp

<210> 90

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<223> BLYS binding polypeptide
<400> 90
Met Cys Pro Arg Asp Pro Leu Thr Lys Ala Lys Leu Cys Asn Trp His
1 5 10 15

<210> 91
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide
<400> 91
Pro Asn Gln Cys Gln Asp Asp Leu Thr Lys Gln Trp Tyr Ser Cys His
1 5 10 15

Tyr His

<210> 92
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide
<400> 92
Phe Asp Met Cys Phe Asp Ala Leu Thr Lys Gln Asn Phe Tyr Cys Arg
1 5 10 15

Phe His

<210> 93
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide
<400> 93
Arg Asn Met Cys Val Asp Arg Leu Thr Lys Leu Gln His Gly Cys Glu
1 5 10 15

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Gly Ala

<210> 94
<211> 18
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 94

Asp Pro Glu Cys Leu Thr Ser Phe Asp Arg Leu Thr Lys Met Cys Trp
1 5 10 15

Pro Trp

<210> 95
<211> 18
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 95

Asp Asp Glu Cys His Tyr Asp Tyr Leu Thr His Tyr Met Arg Cys Asp
1 5 10 15

Tyr Arg

<210> 96
<211> 18
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 96

Phe Gly Gly Cys Asn Ile Asp Leu Leu Thr Asn Thr Met Met Cys His
1 5 10 15

Arg Asn

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 97
<211> 18
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 97

His Gly Pro Cys Tyr Trp Asp Glu Leu Thr Met Gln Trp His Cys Asn
1 5 10 15

His His

<210> 98
<211> 18
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 98

Gly Ala Met Cys Val Asp Leu Leu Thr Tyr Thr Phe Arg Pro Cys Met
1 5 10 15

Tyr Ala

<210> 99
<211> 18
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 99

Ser Asn Lys Cys Trp Asp Glu Leu Thr His Ala Trp Ala Glu Cys Gly
1 5 10 15

Arg Phe

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 100
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 100

Arg Pro Val Cys Tyr Lys Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Gln Cys Met
1 5 10 15

Pro Trp

<210> 101
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 101

Pro Ser Arg Cys Trp Phe Asp Leu Leu Phe Asn Lys Phe Val Cys Lys
1 5 10 15

Arg Asn

<210> 102
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 102

Arg Ser Gly Cys Val Tyr Asp Met Leu Leu Met Thr Met Tyr Cys Pro
1 5 10 15

Ser Asn

<210> 103
<211> 18
<212> PRT

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 103

Ser Asn Arg Cys Glu Gly Asp Gln Leu Met Arg Pro Pro Ser Cys Arg
1 5 10 15

His Leu

<210> 104

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 104

Tyr Arg Met Cys Trp Trp Asp Asp Leu Leu Arg Gly Phe Val Cys Asp
1 5 10 15

Phe His

<210> 105

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 105

His Asp Gly Cys Tyr Asp Glu Leu Leu Tyr Arg Trp Thr Arg Cys Glu
1 5 10 15

His Arg

<210> 106

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 106

Trp Ala Trp Cys Phe Asp Glu Leu Val Gln Arg Tyr Phe Thr Cys Phe
 1 5 10 15

Asp His

<210> 107

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 107

Leu Pro Glu Cys Arg Gln Tyr Phe Pro Trp Glu Lys Gln Val Cys Ser
 1 5 10 15

Tyr Trp

<210> 108

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 108

Val His Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Met Trp Thr Arg
 1 5 10

<210> 109

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 109

Phe Thr Asp Pro Leu Thr Lys Met Ser Leu His Ser
 1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 110
<211> 12
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 110
Gly Tyr Asp Val Leu Thr Lys Leu Tyr Phe Val Pro
1 5 10

<210> 111
<211> 12
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 111
Tyr Tyr Asp Arg Leu Thr Lys Leu Tyr Ser Ser Met
1 5 10

<210> 112
<211> 12
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (2).,(2)
<223> X is unknown

<400> 112
Leu Xaa Lys Asp Pro Leu Thr Lys Leu Tyr Ile Ser
1 5 10

<210> 113
<211> 12
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X is unknown

<400> 113

Gly Tyr Asp Val Leu Thr Lys Leu Xaa Phe Val Pro
1 5 10

<210> 114
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 114

Arg Leu Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Val Leu Ser
1 5 10

<210> 115
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 115

Met Phe Asp Pro Leu Thr Lys Ile Ala Phe Pro Ala
1 5 10

<210> 116
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 116

Phe Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Thr Asn Leu Arg Asp
1 5 10

<210> 117
<211> 12
<212> PRT

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Blys binding polypeptide

<400> 117

Gly Ile Tyr Asp Lys Leu Thr Arg Ala Trp Leu Pro
1 5 10

<210> 118

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Blys binding polypeptide

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X is unknown

<400> 118

Lys Tyr Asp Pro Leu Thr Arg Ala Arg Xaa Pro Leu
1 5 10

<210> 119

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Blys binding polypeptide

<400> 119

Tyr Ile Asp Gln Leu Thr Arg Leu Ser Leu Pro Ser
1 5 10

<210> 120

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Blys binding polypeptide

<400> 120

His Gln Thr Phe Asp Ile Leu Thr Arg Leu His Phe
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 121
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 121
Trp Gln Phe Asp Val Leu Thr Arg Ser Trp Thr Pro
1 5 10

<210> 122
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 122
Gly Ala Ala Tyr Asp His Leu Thr Arg Thr Trp Leu
1 5 10

<210> 123
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 123
Tyr Phe Asp Gln Leu Thr His Leu Ser Ile Lys Lys
1 5 10

<210> 124
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 124
Ala Trp Asp Pro Leu Thr Met Leu Val Leu Pro Trp
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 125
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 125
Ala Leu Trp Met Asp Pro Leu Thr Gly Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 126
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X is unknown

<400> 126
Trp Gln Phe Asp Val Leu Thr Xaa Ser Trp Thr Pro
1 5 10

<210> 127
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 127
Trp Thr Asp Pro Leu Thr His Met Glu Ile Tyr His
1 5 10

<210> 128
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<400> 128

Trp Thr Asp Ser Leu Thr Gly Leu Trp Phe Pro Asp
1 5 10

<210> 129
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X is unknown

<400> 129

Tyr Thr Asp Pro Leu Thr Gly Ile Val Xaa Pro Phe
1 5 10

<210> 130
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 130

Tyr Trp Asp Lys Leu Thr Met Leu His Leu Gly Val
1 5 10

<210> 131
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 131

Tyr Tyr Asp Phe Leu Thr Arg Thr Val Leu Pro Ser
1 5 10

<210> 132
<211> 12
<212> PRT

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 132

Arg Leu Asp Pro Leu Ser Lys Asn Asp Phe Pro Arg
1 5 10

<210> 133

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X is unknown

<400> 133

Leu Arg Tyr Asp Pro Leu Leu Lys Ser Xaa Ile Tyr
1 5 10

<210> 134

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 134

Leu Arg Tyr Asp Pro Leu Leu Lys Ser Tyr Ile Tyr
1 5 10

<210> 135

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 135

Tyr Phe Asp Gln Phe Thr His Leu Ser Ile Lys Lys
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 136
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X is unknown

<400> 136

Tyr Phe Asp Gln Xaa Thr His Leu Ser Ile Lys Lys
1 5 10

<210> 137
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 137

Glu His Tyr Tyr Thr Asp Pro Leu Thr Gly Ala Arg Ile
1 5 10

<210> 138
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X is unknown

<400> 138

Glu His Tyr Xaa Thr Asp Pro Leu Thr Gly Ala Arg Ile
1 5 10

<210> 139

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 139

Glu His Tyr Ser Thr Asp Pro Leu Thr Gly Ala Arg Ile
1 5 10

<210> 140
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X is unknown

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X is unknown

<400> 140

Glu His Tyr Tyr Thr Asp Pro Leu Xaa Gly Xaa Arg Ile
1 5 10

<210> 141
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X is unknown

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X is unknown

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X is unknown

<400> 141

Glu His Tyr Tyr Thr Asp Pro Leu Xaa Gly Xaa Arg Xaa
1 5 10

<210> 142
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X is unknown

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X is unknown

<400> 142

Glu His Tyr Tyr Thr Asp Pro Leu Xaa Gly Ala Arg Xaa
1 5 10

<210> 143
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X is unknown

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<223> X is unknown

<400> 143

Glu His Xaa Tyr Thr Asp Pro Leu Asn Gly Ala Arg Xaa
1 5 10

<210> 144

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> X is unknown

<400> 144

Glu His Tyr Tyr Asn Asp Pro Leu Asn Gly Ala Arg Xaa
1 5 10

<210> 145

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> X is unknown

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X is unknown

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> X is unknown

<400> 145

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Xaa His Xaa Tyr Asn Asp Pro Leu Asn Gly Ala Arg Xaa
1 5 10

<210> 146
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 146

Lys Pro Tyr Tyr Asp Pro Ile Thr Lys Met Thr His His
1 5 10

<210> 147
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 147

Lys Pro Tyr Tyr Asp Pro Ile Thr Lys Met Ser His His
1 5 10

<210> 148
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 148

Lys Pro Tyr Tyr Asp Pro Ile Ser Lys Met Thr His His
1 5 10

<210> 149
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(4)

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<223> X is unknown

<400> 149

Lys Pro Xaa Xaa Asp Pro Ile Ser Lys Met Thr His His
1 5 10

<210> 150

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 150

Gln Ile Gly Tyr Asp Glu Leu Thr Lys Ala Trp Val Thr
1 5 10

<210> 151

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 151

Gln Leu Gly Tyr Asp Glu Leu Thr Lys Ala Trp Val Thr
1 5 10

<210> 152

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> X is unknown

<400> 152

Lys Ile Asp Glu Leu Xaa Met Gln Asn Ile Ile Ile Trp
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 153
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 153
Asp His Thr Asp Pro Leu Ile Gln Gly Leu Thr Lys Arg
1 5 10

<210> 154
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 154
Trp His Asp Pro Leu Lys His Met His Phe His His Glu
1 5 10

<210> 155
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 155
Lys His Ile Asp Met Glu Thr Gly Leu Ile Leu Gln Asn
1 5 10

<210> 156
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 156
Met Gln Val Asp Pro Glu Thr Gly Leu Lys Tyr Glu His
1 5 10

<210> 157

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X is unknown

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(10)
<223> X is unknown

<400> 157

Xaa Leu Asp Gln His Val Asn Xaa Xaa Xaa Tyr Gln Ser
1 5 10

<210> 158
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(4)
<223> X is unknown

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(7)
<223> X is unknown

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X is unknown

<400> 158

Glu Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Leu Thr Gly Ala Arg Xaa
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

```
<210> 159
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X is unknown

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X is unknown

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X is unknown

<400> 159
Gly Pro Tyr Asn Ile Xaa Arg Leu Xaa Gly Glu Arg Xaa
1          5          10

<210> 160
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 160
His Ile Lys Met Leu His Gln Gly Ser Phe Val Gly Val
1          5          10

<210> 161
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(7)
```


WO 02/16412

PCT/US01/25891

<223> X is unknown

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X is unknown

<400> 161

His Pro Thr Asn Thr Xaa Xaa His Gln Xaa Val Tyr Ser
1 5 10

<210> 162

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(7)

<223> X is unknown

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> X is unknown

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> X is unknown

<400> 162

His Arg Gly Gln Val Xaa Xaa Leu Asn Gly Met Val Xaa
1 5 10

<210> 163

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 163

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Ala Gly Lys Glu Pro Cys Tyr Phe Tyr Trp Glu Cys Ala Val Ser Gly
 1 5 10 15

Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20

<210> 164
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BLyS binding polypeptide

<400> 164

Ala Gly Val Pro Phe Cys Asp Leu Leu Thr Lys His Cys Phe Glu Ala
 1 5 10 15

Gly Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25

<210> 165
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BLyS binding polypeptide

<400> 165

Gly Ser Ser Arg Leu Cys His Met Asp Glu Leu Thr His Val Cys Val
 1 5 10 15

His Phe Ala Pro Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25

<210> 166
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BLyS binding polypeptide

<400> 166

Gly Asp Gly Gly Asn Cys Tyr Thr Asp Ser Leu Thr Lys Leu His Phe
 1 5 10 15

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Cys Met Gly Asp Glu Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25

<210> 167
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BLYS binding polypeptide

<400> 167

Gly Tyr Asp Val Leu Thr Lys Leu Tyr Phe Val Pro Gly Gly Pro Gly
 1 5 10 15

Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20

<210> 168
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BLYS binding polypeptide

<400> 168

Trp Thr Asp Ser Leu Thr Gly Leu Trp Phe Pro Asp Gly Gly Pro Gly
 1 5 10 15

Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20

<210> 169
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> modified BLYS binding polypeptide

<400> 169

Ala Gly Lys Glu Pro Cys Tyr Phe Tyr Trp Glu Cys Ala Val Ser Gly
 1 5 10 15

Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 170
<211> 24
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> modified BlyS binding polypeptide

<400> 170
Ala Gly Arg Glu Pro Cys Tyr Phe Tyr Trp Glu Cys Ala Val Ser Gly
1 5 10 15

Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
20

<210> 171
<211> 24
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> modified BlyS binding polypeptide

<400> 171

Ala Gly Gln Glu Pro Cys Tyr Phe Tyr Trp Glu Cys Ala Val Ser Gly
1 5 10 15

Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
20

<210> 172
<211> 25
<212> PPT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> modified BlyS binding polypeptide

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X is norleucine

<400> 172
Ala Gly Asn Xaa Glu Pro Cys Tyr Phe Tyr Trp Glu Cys Ala Val Ser
1 5 10 15

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Gly Pro Gly Pro Glu Gly Gly Gly Lys
 20 25

<210> 173
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 173

Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
 20 25 30

Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
 35 40 45

Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
 50 55 60

Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
 65 70 75 80

Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
 85 90 95

Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
 100 105 110

Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
 115 120 125

Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln
 130 135 140

Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys
 145 150 155 160

Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser
 165 170 175

Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr

WO 02/16412

PCT/US01/25891

180 185 190
 Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met
 195 200 205
 Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu
 210 215 220
 Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
 225 230 235 240
 Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly
 245 250 255
 Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu
 260 265 270
 Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 275 280 285

 <210> 174
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

 <400> 174
 Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
 1 5 10 15
 Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
 20 25 30
 Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
 50 55 60
 Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
 65 70 75 80
 Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
 85 90 95

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
 100 105 110
 Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
 115 120 125
 Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Gly Ser Tyr
 130 135 140
 Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu Glu
 145 150 155 160
 Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe Ile
 165 170 175
 Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His Leu
 180 185 190
 Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val
 195 200 205
 Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn Asn
 210 215 220
 Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu Leu
 225 230 235 240
 Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly Asp
 245 250 255
 Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 260 265
 <210> 175
 <211> 309
 <212> PPT
 <213> mouse
 <400> 175
 Met Asp Glu Ser Ala Lys Thr Leu Pro Pro Cys Leu Cys Phe Cys
 1 5 10 15
 Ser Glu Lys Gly Glu Asp Met Lys Val Gly Tyr Asp Pro Ile Thr Pro

WO 02/16412

PCT/US01/25891

```

      20              25              30
Gln Lys Glu Glu Gly Ala Trp Phe Gly Ile Cys Arg Asp Gly Arg Leu
  35              40              45
Leu Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Ser Phe Thr Ala
  50              55              60
Met Ser Leu Tyr Gln Leu Ala Ala Leu Gln Ala Asp Leu Met Asn Leu
  65              70              75              80
Arg Met Glu Leu Gln Ser Tyr Arg Gly Ser Ala Thr Pro Ala Ala Ala
  85              90              95
Gly Ala Pro Glu Leu Thr Ala Gly Val Lys Leu Leu Thr Pro Ala Ala
 100              105              110
Pro Arg Pro His Asn Ser Ser Arg Gly His Arg Asn Arg Arg Ala Phe
 115              120              125
Gln Gly Pro Glu Glu Thr Glu Gln Asp Val Asp Leu Ser Ala Pro Pro
 130              135              140
Ala Pro Cys Leu Pro Gly Cys Arg His Ser Gln His Asp Asp Asn Gly
 145              150              155              160
Met Asn Leu Arg Asn Ile Ile Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp
 165              170              175
Ser Asp Thr Pro Thr Ile Arg Lys Gly Thr Tyr Thr Phe Val Pro Trp
 180              185              190
Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Asn Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys
 195              200              205
Ile Val Val Arg Gln Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Ser Gln Val Leu
 210              215              220
Tyr Thr Asp Pro Ile Phe Ala Met Gly His Val Ile Gln Arg Lys Lys
 225              230              235              240
Val His Val Phe Gly Asp Gln Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys
 245              250              255

```


WO 02/16412

PCT/US01/25891

Ile Gln Asn Met Pro Lys Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala
 260 265 270

Gly Ile Ala Arg Leu Glu Glu Gly Asp Glu Ile Gln Leu Ala Ile Pro
 275 280 285

Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Arg Asn Gly Asp Asp Thr Phe Phe Gly
 290 295 300

Ala Leu Lys Leu Leu
 305

<210> 176
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> mouse

<400> 176

Met Asp Glu Ser Ala Lys Thr Leu Pro Pro Pro Cys Leu Cys Phe Cys
 1 5 10 15

Ser Glu Lys Gly Glu Asp Met Lys Val Gly Tyr Asp Pro Ile Thr Pro
 20 25 30

Gln Lys Glu Glu Gly Ala Trp Phe Gly Ile Cys Arg Asp Gly Arg Leu
 35 40 45

Leu Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Ser Ser Phe Thr Ala
 50 55 60

Met Ser Leu Tyr Gln Leu Ala Ala Leu Gln Ala Asp Leu Met Asn Leu
 65 70 75 80

Arg Met Glu Leu Gln Ser Tyr Arg Gly Ser Ala Thr Pro Ala Ala Ala
 85 90 95

Gly Ala Pro Glu Leu Thr Ala Gly Val Lys Leu Leu Thr Pro Ala Ala
 100 105 110

Pro Arg Pro His Asn Ser Ser Arg Gly His Arg Asn Arg Arg Ala Phe
 115 120 125

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Gln Gly Pro Glu Glu Thr Glu Gln Asp Val Asp Leu Ser Ala Pro Pro
 130 135 140

Ala Pro Cys Leu Pro Gly Cys Arg His Ser Gln His Asp Asp Asn Gly
 145 150 155 160

Met Asn Leu Arg Asn Arg Thr Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser
 165 170 175

Phe Lys Arg Gly Asn Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Val Val
 180 185 190

Arg Gln Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Ser Gln Val Leu Tyr Thr Asp
 195 200 205

Pro Ile Phe Ala Met Gly His Val Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val
 210 215 220

Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn
 225 230 235 240

Met Pro Lys Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala
 245 250 255

Arg Leu Glu Glu Gly Asp Glu Ile Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn
 260 265 270

Ala Gln Ile Ser Arg Asn Gly Asp Asp Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys
 275 280 285

Leu Leu
 290

<210> 177
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> rat

<400> 177

Ala Val Gln Ala Asp Leu Met Ser Leu Arg Met Glu Leu Gln Ser Tyr
 1 5 10 15

Arg Ser Ser Ala Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala Pro Gly Leu Ser Ala
 20 25 30

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Gly Val Lys Leu Pro Thr Pro Ala Ala Pro Gly Pro His Asn Ser Ser
 35 40 45
 Arg Gly Gln Arg Asn Arg Arg Ala Phe Gln Gly Pro Glu Glu Thr Glu
 50 55 60
 Gln Asp Val Asp Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Ser Leu Pro Gly Asn
 65 70 75 80
 Cys His Ala Ser His His Asp Glu Asn Gly Leu Asn Leu Arg Thr Ile
 85 90 95
 Ile Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Asn Thr Pro Thr Ile
 100 105 110
 Arg Lys Gly Thr Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg
 115 120 125
 Gly Asn Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Val Val Arg Gln Thr
 130 135 140
 Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Ser Gln Val Leu Tyr Thr Asp Pro Ile Phe
 145 150 155 160
 Ala Met Gly His Val Ile Gln Arg Lys Lys Ile His Val Phe Gly Asp
 165 170 175
 Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Lys
 180 185 190
 Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu
 195 200 205
 Glu Gly Asp Glu Ile Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile
 210 215 220
 Ser Arg Asn Gly Asp Asp Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 225 230 235
 <210> 178
 <211> 220
 <212> PRT

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<213> rat

<400> 178

Ala Val Gln Ala Asp Leu Met Ser Leu Arg Met Glu Leu Gln Ser Tyr
 1 5 10 15

Arg Ser Ser Ala Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala Pro Gly Leu Ser Ala
 20 25 30

Gly Val Lys Leu Pro Thr Pro Ala Ala Pro Gly Pro His Asn Ser Ser
 35 40 45

Arg Gly Gln Arg Asn Arg Arg Ala Phe Gln Gly Pro Glu Glu Thr Glu
 50 55 60

Gln Asp Val Asp Leu Ser Ala Thr Pro Val Pro Ser Leu Pro Gly Asn
 65 70 75 80

Cys His Ala Ser His His Asp Glu Asn Gly Leu Asn Leu Arg Thr Arg
 85 90 95

Thr Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Asn Ala
 100 105 110

Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Val Val Arg Gln Thr Gly Tyr Phe
 115 120 125

Phe Ile Tyr Ser Gln Val Leu Tyr Thr Asp Pro Ile Phe Ala Met Gly
 130 135 140

His Val Ile Gln Arg Lys Lys Ile His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser
 145 150 155 160

Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Lys Thr Leu Pro
 165 170 175

Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp
 180 185 190

Glu Ile Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Arg Asn
 195 200 205

Gly Asp Asp Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu

WO 02/16412

PCT/US01/25891

210

215

220

<210> 179
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> rat
 <400> 179
 Ala Val Gln Ala Asp Leu Met Ser Leu Arg Met Glu Leu Gln Ser Tyr
 1 5 10 15
 Arg Ser Ser Ala Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala Pro Gly Leu Ser Ala
 20 25 30
 Gly Val Lys Leu Pro Thr Pro Ala Ala Pro Gly Pro His Asn Ser Ser
 35 40 45
 Arg Gly Gln Arg Asn Arg Arg Ala Phe Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val
 50 55 60
 Ile Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Asn Thr Pro Thr Ile
 65 70 75 80
 Arg Lys Gly Thr Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg
 85 90 95
 Gly Asn Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Val Val Arg Gln Thr
 100 105 110
 Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Ser Gln Val Leu Tyr Thr Asp Pro Ile Phe
 115 120 125
 Ala Met Gly His Val Ile Gln Arg Lys Lys Ile His Val Phe Gly Asp
 130 135 140
 Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Lys
 145 150 155 160
 Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu
 165 170 175
 Glu Gly Asp Glu Val Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile
 180 185 190

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Ser Arg Asn Gly Asp Asp Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 195 200 205

 <210> 180
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> rat

 <400> 180

 Ala Val Gln Ala Asp Leu Met Ser Leu Arg Met Glu Leu Gln Ser Tyr
 1 5 10 15

 Arg Ser Ser Ala Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala Pro Gly Leu Ser Ala
 20 25 30

 Gly Val Lys Leu Pro Thr Pro Ala Ala Pro Gly Pro His Asn Ser Ser
 35 40 45

 Arg Gly Gln Arg Asn Arg Arg Ala Phe Gln Gly Pro Glu Glu Thr Gly
 50 55 60

 Thr Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Asn Ala
 65 70 75 80

 Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Val Val Arg Gln Thr Gly Tyr Phe
 85 90 95

 Phe Ile Tyr Ser Gln Val Leu Tyr Thr Asp Pro Ile Phe Ala Met Gly
 100 105 110

 His Val Ile Gln Arg Lys Lys Ile His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser
 115 120 125

 Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Lys Thr Leu Pro
 130 135 140

 Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp
 145 150 155 160

 Glu Ile Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Arg Asn
 165 170 175

 Gly Asp Asp Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu

WO 02/16412

PCT/US01/25891

180 185

<210> 181
<211> 243
<212> PRT
<213> monkey

<400> 181

Lys Asp Arg Lys Leu Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15

Cys Cys Leu Met Val Val Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly
20 25 30

Asp Leu Ala Ser Leu Arg Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys
35 40 45

Leu Pro Ala Arg Ala Arg Ala Pro Lys Ala Gly Leu Gly Glu Ala Pro
50 55 60

Ala Val Thr Ala Gly Leu Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu
65 70 75 80

Gly Asn Ser Ser Gln Ser Ser Arg Asn Lys Arg Ala Ile Gln Gly Ala
85 90 95

Glu Glu Thr Val Ile Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu
100 105 110

Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu
115 120 125

Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu Glu Gln Lys Glu Asn Lys Ile Leu
130 135 140

Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr
145 150 155 160

Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His
165 170 175

Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln
180 185 190

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile
 195 200 205

Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu
 210 215 220

Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu
 225 230 235 240

Lys Leu Leu

<210> 182
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> monkey

<400> 182

Tyr Gln Val Ala Ala Val Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg Ala Glu
 1 5 10 15

Leu Gln Ser His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Arg Ala Arg Ala Pro
 20 25 30

Lys Ala Gly Leu Gly Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu Lys Ile
 35 40 45

Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Ser Ser Arg
 50 55 60

Asn Lys Arg Ala Ile Gln Gly Ala Glu Glu Thr Val Ile Gln Asp Cys
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly Ser
 85 90 95

Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu
 100 105 110

Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe
 115 120 125

Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His

WO 02/16412 PCT/US01/25891

130 135 140

Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu
 145 150 155 160

Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn
 165 170 175

Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu
 180 185 190

Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly
 195 200 205

Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 210 215

<210> 183
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> epitope tag

<400> 183

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 184
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> consensus BLyS binding polypeptide

<400> 184

Ala Asn Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
 1 5 10

<210> 185
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<223> coding sequence for BlyS affinity maturation library template

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(12)

<223> N=A or G or C or T

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(18)

<223> N=A or G or C or T

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(27)

<223> N=A or G or C or T

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(42)

<223> N=A or G or C or T

<400> 185

gctnnnnnnn ngatnnnct tactnnnctc nnnnnnnnnn nn

42

<210> 186

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 186

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 187

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 187

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Glu
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 188
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Blys binding polypeptide

<400> 188
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Gly
1 5 10

<210> 189
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Blys binding polypeptide

<400> 189
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10

<210> 190
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Blys binding polypeptide

<400> 190
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Ser Asp
1 5 10

<210> 191
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Blys binding polypeptide

<400> 191
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Asn Asp
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 192
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Blys binding polypeptide

<400> 192
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Thr
1 5 10

<210> 193
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Blys binding polypeptide

<400> 193
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 194
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Blys binding polypeptide

<400> 194
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asn
1 5 10

<210> 195
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Blys binding polypeptide

<400> 195
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Val Asp
1 5 10

<210> 196

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 196
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu His Asp
1 5 10

<210> 197
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 197
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Thr Asp
1 5 10

<210> 198
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 198
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro His
1 5 10

<210> 199
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 199
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Thr Val
1 5 10

<210> 200
<211> 14

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BLyS binding polypeptide
<400> 200
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Leu Asp
1 5 10
<210> 201
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BLyS binding polypeptide
<400> 201
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Leu Glu
1 5 10
<210> 202
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BLyS binding polypeptide
<400> 202
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu His Glu
1 5 10
<210> 203
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BLyS binding polypeptide
<400> 203
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Arg
1 5 10
<210> 204
<211> 14
<212> PRT

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 204

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Ala Asp
1 5 10

<210> 205

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 205

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Tyr
1 5 10

<210> 206

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 206

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Ile
1 5 10

<210> 207

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 207

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Ile Asp
1 5 10

<210> 208

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 208
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Arg Asp
1 5 10
<210> 209
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 209
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10
<210> 210
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 210
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Leu Glu
1 5 10
<210> 211
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 211
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Arg Val
1 5 10
<210> 212
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 212
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Glu
1 5 10
<210> 213
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 213
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10
<210> 214
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 214
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu His Gln
1 5 10
<210> 215
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 215
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Ala
1 5 10
<210> 216
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 216

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Arg Val
1 5 10

<210> 217

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 217

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Gly
1 5 10

<210> 218

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 218

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Arg Tyr
1 5 10

<210> 219

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 219

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Tyr
1 5 10

<210> 220

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<400> 220
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Leu Tyr
1 5 10

<210> 221
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 221
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Arg Asp
1 5 10

<210> 222
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 222
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10

<210> 223
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 223
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Leu Gly
1 5 10

<210> 224
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<400> 224

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Thr His
1 5 10

<210> 225

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 225

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Thr
1 5 10

<210> 226

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 226

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Leu Val
1 5 10

<210> 227

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 227

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Tyr Tyr
1 5 10

<210> 228

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 228

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Ser Asp
1 5 10

<210> 229
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 229

Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 230
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 230

Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu His Asp
1 5 10

<210> 231
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 231

Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Gly
1 5 10

<210> 232
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 232

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Gln
1 5 10

<210> 233
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 233

Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Tyr
1 5 10

<210> 234
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 234

Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro His
1 5 10

<210> 235
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 235

Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10

<210> 236
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 236

Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Ile

WO 02/16412

PCT/US01/25891

1 5 10

<210> 237
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 237

Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Glu
1 5 10

<210> 238
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 238

Ala Phe Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Arg Val
1 5 10

<210> 239
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 239

Ala Phe Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Glu
1 5 10

<210> 240
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 240

Ala Phe Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Leu Glu
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 241
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 241
Ala Phe Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10

<210> 242
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 242
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Glu
1 5 10

<210> 243
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 243
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 244
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 244
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu His Asp
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 245
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 245
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Thr Asp
1 5 10

<210> 246
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 246
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Phe
1 5 10

<210> 247
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 247
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Leu Asp
1 5 10

<210> 248
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 248
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Arg
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 249
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 249
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 250
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 250
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Thr Ala
1 5 10

<210> 251
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 251
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Ala Val
1 5 10

<210> 252
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 252
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Gly
1 5 10

<210> 253

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Blys binding polypeptide

<400> 253
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Arg Val
1 5 10

<210> 254
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Blys binding polypeptide

<400> 254
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro His
1 5 10

<210> 255
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Blys binding polypeptide

<400> 255
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Arg Glu
1 5 10

<210> 256
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Blys binding polypeptide

<400> 256
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Ser Asp
1 5 10

<210> 257
<211> 14

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 257
Ala Thr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Ala
1 5 10
<210> 258
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 258
Ala Thr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Ala Asp
1 5 10
<210> 259
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 259
Ala Thr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Thr Ser
1 5 10
<210> 260
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 260
Ala Thr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Gly
1 5 10
<210> 261
<211> 14
<212> PRT

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 261

Ala Thr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Tyr
1 5 10

<210> 262

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 262

Ala Thr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Ser Gly
1 5 10

<210> 263

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 263

Ala Thr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10

<210> 264

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 264

Ala Thr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 265

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 265
Ala Asp Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10

<210> 266
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 266
Ala Asp Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Lys
1 5 10

<210> 267
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 267
Ala Asp Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 268
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 268
Ala Asp Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Glu
1 5 10

<210> 269
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 269
Ala Asp Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu His Gln
1 5 10
<210> 270
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 270
Ala Glu Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Arg Asp
1 5 10
<210> 271
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 271
Ala Glu Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10
<210> 272
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 272
Ala Glu Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Tyr
1 5 10
<210> 273
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 273

Ala Leu Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 274

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 274

Ala Leu Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 275

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 275

Ala Leu Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Arg Gly
1 5 10

<210> 276

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 276

Ala Leu Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Leu Gly
1 5 10

<210> 277

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<400> 277

Ala Met Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 278

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 278

Ala Met Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Gln Val
1 5 10

<210> 279

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 279

Ala Met Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Leu Gly
1 5 10

<210> 280

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 280

Ala Ala Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 281

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<400> 281

Ala Ala Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Ala Asp
1 5 10

<210> 282

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 282

Ala Ala Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Leu Asp
1 5 10

<210> 283

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 283

Ala His Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Thr Asp
1 5 10

<210> 284

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 284

Ala His Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10

<210> 285

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 285

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Ala His Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu His Asp
1 5 10

<210> 286
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 286

Ala His Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 287
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 287

Ala Pro Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu His Asp
1 5 10

<210> 288
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 288

Ala Pro Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10

<210> 289
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 289

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Ala Gln Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Glu
1 5 10

<210> 290
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 290

Ala Gln Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Tyr
1 5 10

<210> 291
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 291

Ala Gln Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Arg
1 5 10

<210> 292
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 292

Ala Lys Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 293
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 293

Ala Lys Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val

WO 02/16412

PCT/US01/25891

1 5 10

<210> 294
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 294
Ala Lys Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10

<210> 295
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 295
Ala Lys Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Asn Gly
1 5 10

<210> 296
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 296
Ala Trp Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 297
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 297
Ala Val Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Thr Asp
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 298
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 298

Ala Tyr Glu Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Leu Tyr
1 5 10

<210> 299
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 299

Ala Thr Lys Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 300
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 300

Ala Thr Leu Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Gly
1 5 10

<210> 301
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 301

Ala Ile Arg Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Tyr
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 302
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 302
Ala Glu Arg Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro His
1 5 10

<210> 303
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 303
Ala Asp Arg Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Gln
1 5 10

<210> 304
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 304
Ala Asn Ser Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Glu
1 5 10

<210> 305
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 305
Ala Ile Leu Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 306
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 306
Ala Asn Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Gln
1 5 10

<210> 307
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 307
Ala Asn Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10

<210> 308
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 308
Ala Asn Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Thr Asp
1 5 10

<210> 309
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 309
Ala Asn Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 310

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 310
Ala Asn Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Gly
1 5 10

<210> 311
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 311
Ala Asn Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Glu
1 5 10

<210> 312
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 312
Ala Asn Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 313
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 313
Ala Asn Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asn
1 5 10

<210> 314
<211> 14

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 314
Ala Asn Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Ser Glu
1 5 10

<210> 315
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 315
Ala Asn Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu His Asp
1 5 10

<210> 316
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 316
Ala Asn Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Val Asp
1 5 10

<210> 317
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 317
Ala Tyr Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 318
<211> 14
<212> PRT

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 318

Ala Tyr Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10

<210> 319
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 319

Ala Tyr Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 320
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 320

Ala Gln Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 321
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 321

Ala His Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 322
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 322
Ala Thr Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10

<210> 323
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 323
Ala Tyr Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10

<210> 324
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 324
Ala Tyr Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu His Asp
1 5 10

<210> 325
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 325
Ala Asn Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Ile Pro Asp
1 5 10

<210> 326
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 326
Ala Asn Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10
<210> 327
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 327
Ala Asn Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10
<210> 328
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 328
Ala Asn Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu Ala Asp
1 5 10
<210> 329
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 329
Ala Asn Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Ala
1 5 10
<210> 330
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 330

Ala Asn Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu Tyr Glu
1 5 10

<210> 331

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 331

Ala Gly Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 332

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 332

Ala Val Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu Thr Asp
1 5 10

<210> 333

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 333

Ala Asn Trp Tyr Asp Ala Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val
1 5 10

<210> 334

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<400> 334

Ala Tyr Trp Tyr Asp Thr Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asn
1 5 10

<210> 335

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 335

Ala Phe Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Asn Leu Trp Leu Leu Glu
1 5 10

<210> 336

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 336

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Gly Leu Trp Leu Leu Val
1 5 10

<210> 337

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 337

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Gly Leu Trp Leu Leu Tyr
1 5 10

<210> 338

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<400> 338

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Gly Leu Trp Leu Arg Val
1 5 10

<210> 339

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Blys binding polypeptide

<400> 339

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Glu Leu Trp Leu Arg Leu
1 5 10

<210> 340

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Blys binding polypeptide

<400> 340

Ala Met Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Ser Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 341

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Blys binding polypeptide

<400> 341

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Ser Leu Leu Val
1 5 10

<210> 342

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Blys binding polypeptide

<400> 342

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Ser Leu Thr Val
1 5 10

<210> 343
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 343

Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Ser Leu Leu Val
1 5 10

<210> 344
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 344

Ala Asp Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Ser Leu Leu Leu
1 5 10

<210> 345
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 345

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Arg Leu Leu Glu
1 5 10

<210> 346
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 346

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Ala Asp Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Arg Leu Leu Val
1 5 10

<210> 347
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 347

Ala Asp Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Arg Leu Ile Val
1 5 10

<210> 348
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 348

Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Tyr Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 349
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 349

Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Gly Leu Leu Val
1 5 10

<210> 350
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 350

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Thr Leu Leu Val

WO 02/16412

PCT/US01/25891

1 5 10

<210> 351
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 351

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Leu Leu Pro Asn
1 5 10

<210> 352
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 352

Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Asp
1 5 10

<210> 353
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 353

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Asp
1 5 10

<210> 354
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 354

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Ser Asp
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 355
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 355
Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Val
1 5 10

<210> 356
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 356
Ala Asp Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Val
1 5 10

<210> 357
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 357
Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Lys
1 5 10

<210> 358
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 358
Ala Lys Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Asp
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 359
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 359

Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Leu Glu
1 5 10

<210> 360
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 360

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Ala
1 5 10

<210> 361
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 361

Ala Thr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Asp
1 5 10

<210> 362
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 362

Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Glu
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 363
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 363
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Asp
1 5 10

<210> 364
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 364
Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Gly
1 5 10

<210> 365
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 365
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro His
1 5 10

<210> 366
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 366
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Val
1 5 10

<210> 367

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 367

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Asp
1 5 10

<210> 368
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 368

Ala Gly Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Asp
1 5 10

<210> 369
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 369

Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Thr
1 5 10

<210> 370
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 370

Ala Lys Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Ala
1 5 10

<210> 371
<211> 14

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 371
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Phe Asp
1 5 10

<210> 372
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 372
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Ala Asp
1 5 10

<210> 373
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 373
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Tyr
1 5 10

<210> 374
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 374
Ala Asp Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Arg Asp
1 5 10

<210> 375
<211> 14
<212> PRT

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 375

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Val Pro Asp
1 5 10

<210> 376

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 376

Ala Asp Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10

<210> 377

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 377

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Val Pro Asn
1 5 10

<210> 378

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 378

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Val Pro Glu
1 5 10

<210> 379

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 379
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Val Pro Gln
1 5 10

<210> 380
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 380
Ala Glu Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Val Pro Lys
1 5 10

<210> 381
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 381
Ala Gln Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Val Pro Val
1 5 10

<210> 382
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide
<400> 382
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Val Pro Tyr
1 5 10

<210> 383
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 383

Ala Leu Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Val Pro Tyr
1 5 10

<210> 384

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 384

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Val Pro Gly
1 5 10

<210> 385

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 385

Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Ile Pro Tyr
1 5 10

<210> 386

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 386

Ala Asp Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Ile Pro Gly
1 5 10

<210> 387

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 387

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Ile Pro Tyr
1 5 10

<210> 388

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 388

Ala Lys Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Ile Pro Tyr
1 5 10

<210> 389

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 389

Ala Ile Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Ile Pro Asn
1 5 10

<210> 390

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

<400> 390

Ala Thr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Ile Pro Gln
1 5 10

<210> 391

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BlyS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<400> 391

Ala Ser Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Asn Leu Trp Val Pro Asp
1 5 10

<210> 392

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 392

Ala Tyr Glu Tyr Asp Pro Leu Thr Asn Leu Trp Leu Leu Tyr
1 5 10

<210> 393

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 393

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Asn Leu Ser Leu Leu Val
1 5 10

<210> 394

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 394

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Ser Ile Leu Glu
1 5 10

<210> 395

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<400> 395

Ala Asn Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Ile Pro Tyr
1 5 10

<210> 396

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 396

Ala His Trp Phe Asp Pro Leu Thr Gln Leu Lys Ile Arg Val
1 5 10

<210> 397

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 397

Ala Tyr Trp Cys Asp Pro Leu Thr Lys Leu Cys Ile Leu Glu
1 5 10

<210> 398

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 398

Ala Asn Ser Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Tyr
1 5 10

<210> 399

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 399

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Ala Asn Leu Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Val Pro Tyr
1 5 10

<210> 400
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 400

Ala Asn Trp Tyr Asp Ala Leu Thr Lys Leu Trp Leu His Asp
1 5 10

<210> 401
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 401

Ala Asn Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Asp
1 5 10

<210> 402
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 402

Ala Thr Ser Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 403
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 403

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Ala Cys Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Cys His Arg Glu
1 5 10

<210> 404
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 404

Ala Ile Gly Asn Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Ile Pro Tyr
1 5 10

<210> 405
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 405

Ala Asn Trp Gln Asp Cys Leu Thr Lys Leu Cys Leu Ala Gly
1 5 10

<210> 406
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 406

Ala Tyr Trp Phe Asp Pro Leu Thr Asn Leu Trp Leu Leu Glu
1 5 10

<210> 407
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 407

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Asn Leu Ser Leu Leu Val

WO 02/16412

PCT/US01/25891

1 5 10

<210> 408
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 408
Ala Asn Cys Phe Asp Ser Leu Thr Arg Leu Trp Leu Cys Asp
1 5 10

<210> 409
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 409
Ala Cys Ala Tyr Asp Ala Leu Thr Lys Leu Cys Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 410
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 410
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Asn Leu Ser Leu Leu Leu
1 5 10

<210> 411
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 411
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Gln Leu Ser Leu Leu Val
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 412
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 412
Ala Tyr Arg Tyr Asp Ala Leu Thr Gly Leu Trp Leu Leu Tyr
1 5 10

<210> 413
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 413
Ala Tyr Trp Asn Asp Pro Leu Thr Lys Leu Lys Leu Arg Leu
1 5 10

<210> 414
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 414
Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Gln Leu Ser Leu Leu Val
1 5 10

<210> 415
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLYS binding polypeptide

<400> 415
Ala Tyr Arg Tyr Asp Ala Leu Thr Gly Leu Trp Leu Leu Tyr
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 416
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 416

Ala Tyr Arg Tyr Asp Ser Leu Thr Asn Leu Trp Leu Leu Tyr
1 5 10

<210> 417
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 417

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Ser Ile Leu Glu
1 5 10

<210> 418
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 418

Ala Ser Cys Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Cys Phe Pro Val
1 5 10

<210> 419
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 419

Ala Phe Trp Phe Asp Pro Leu Thr Gly Leu Trp Leu Leu Glu
1 5 10

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<210> 420
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 420
Ala His Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Ser Ile Arg Val
1 5 10

<210> 421
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 421
Ala Pro Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Ser
1 5 10

<210> 422
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 422
Ala Asn Cys Tyr Asp Thr Leu Thr Lys Leu Trp Leu Thr Cys
1 5 10

<210> 423
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 423
Ala Asn Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Ser Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 424

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 424

Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Leu Thr Gln Leu Ser Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 425
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 425

Ala Phe Arg Tyr Asp Ser Leu Thr Gly Leu Trp Leu Arg Tyr
1 5 10

<210> 426
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 426

Ala Asn Cys Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Cys
1 5 10

<210> 427
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 427

Ala Asn Gly Tyr Asp Leu Leu Thr Asn Leu Ser Val Ser Asp
1 5 10

<210> 428
<211> 14

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 428

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Arg Leu Trp Ile Pro Val
1 5 10

<210> 429
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 429

Ala Leu Lys Phe Asp Tyr Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 430
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 430

Ala Tyr Arg Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Gly
1 5 10

<210> 431
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 431

Ala Tyr Cys Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Ile Pro Asp
1 5 10

<210> 432
<211> 14
<212> PRT

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 432

Ala Ser Trp Glu Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu Ser Lys
1 5 10

<210> 433

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 433

Ala Tyr Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Gly Leu Ser Leu Leu Val
1 5 10

<210> 434

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 434

Ala Tyr Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Tyr Leu Arg Leu Arg Val
1 5 10

<210> 435

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLyS binding polypeptide

<400> 435

Ala Lys Cys Tyr Asp Ser Leu Thr Asn Leu Trp Leu Cys Asp
1 5 10

<210> 436

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<223> core peptide of high affinity BLyS binders
<400> 436
Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu
1 5 10

<210> 437
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide
<400> 437
Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp Gly Gly
1 5 10 15

Lys

<210> 438
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide
<400> 438
Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp Gly Gly Lys
1 5 10 15

<210> 439
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide
<400> 439
Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Gly Gly Lys
1 5 10

<210> 440

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 440

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Val Gly Gly
1 5 10 15

Lys

<210> 441
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 441

Ala Asn Trp Phe Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp Gly Gly
1 5 10 15

Lys

<210> 442
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 442

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Ser Leu Pro Asp Gly Gly
1 5 10 15

Lys

<210> 443
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 443

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Phe Pro Asp Gly Gly
 1 5 10 15

Lys

<210> 444

<211> I7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLYS binding polypeptide

<400> 444

Ala Asn Trp Tyr Asp Ser Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp Gly Gly
 1 5 10 15

Lys

<210> 445

<211> 585

<212> PRT

<213> HomoSapiens

<400> 445

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
290 295 300

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
 305 310 315 320
 Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
 325 330 335
 Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
 340 345 350
 Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
 355 360 365
 Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
 580 585

<210> 446
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> recurring structural motif of BLyS binding polypeptides

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala

<400> 446

Asp Xaa Leu Thr
 1

<210> 447
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BLyS binding polypeptide

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X2 is any amino acid except Arg;

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X3 is Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly, or Ser;

<220>

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X4 is Tyr, Phe, Glu, Cys, Asn;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X6 is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X9 is Lys, Asn, Gln, Gly, or Arg;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X11 is Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr, or Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X12 is Leu, Phe, Val, Ile, or His;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X13 is Pro, Leu, His, Ser, Arg, Asn, Gln, Thr, Val, Ala, Cys, Ile, Phe, or Tyr;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X14 is Asp, Glu, Asn, Val, His, Gln, Arg, Gly, Ser, Tyr, Ala, Cys, Lys, Ile, Thr or Leu.

<400> 447
Ala Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Leu Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 448
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X1 is Trp, Glu, Lys, Cys, Leu, Ala, Arg, Gly, or Ser;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X2 is Tyr, Phe, Glu, Cys, Asn;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X4 is Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Tyr, Cys, or Ala;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X7 is Lys, Asn, Gln, Gly, or Arg;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X9 is Trp, Ser, Thr, Arg, Cys, Tyr, or Lys;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X10 is Leu, Phe, Val, Ile, or His.

<400> 448

Xaa Xaa Asp Xaa Leu Thr Xaa Leu Xaa Xaa
1 5 10

<210> 449
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS affinity maturation library template

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(4)
<223> X is any amino acid;

<220>

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X is any amino acid;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> X is any amino acid;

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(14)
<223> X is any amino acid;

<400> 449

Ala Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Leu Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 450
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 450

Ala Gly Lys Glu Pro Cys Tyr Phe Tyr Trp Glu Cys Ala Val Ser Gly
1 5 10 15

<210> 451
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BlyS binding polypeptide

<400> 451

Ala Gly Val Pro Phe Cys Asp Leu Leu Thr Lys His Cys Phe Glu Ala
1 5 10 15

Gly

<210> 452
<211> 20

WO 02/16412

PCT/US01/25891

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 452
Gly Ser Ser Arg Leu Cys His Met Asp Glu Leu Thr His Val Cys Val
1 5 10 15

His Phe Ala Pro
20

<210> 453
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 453
Gly Asp Gly Gly Asn Cys Tyr Thr Asp Ser Leu Thr Lys Leu His Phe
1 5 10 15

Cys Met Gly Asp Glu
20

<210> 454
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 454
Gly Tyr Asp Val Leu Thr Lys Leu Tyr Phe Val Pro Gly Gly
1 5 10

<210> 455
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 455

WO 02/16412

PCT/US01/25891

Trp Thr Asp Ser Leu Thr Gly Leu Trp Phe Pro Asp Gly Gly
1 5 10

<210> 456
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 456

Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu Pro Asp
1 5 10

<210> 457
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 457

Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Trp Leu
1 5 10

<210> 458
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BLyS binding polypeptide

<400> 458

Ala Asn Trp Tyr Asp Pro Leu Thr Lys Leu Ser Leu Pro Asp
1 5 10

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/016412 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/705, 5/113, G01N 33/68, C12N 15/12, C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/US01/25891
- (22) International Filing Date: 17 August 2001 (17.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/226,489 18 August 2000 (18.08.2000) US
- (71) Applicant: DYAX CORP. [US]; Suite 623, One Kendall Square, Cambridge, MA 02139 (US).
- (81) Designated States (*national*): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) Inventors: BELTZER, James, P., 801 North Road, Carlisle, MA 01741 (US); POTTER, M., Daniel, 176 High Street, Acton, MA 01720 (US); FLEMING, Tony, J., 83 Arcadia Avenue, Waltham, MA 02452 (US); LADNER, Robert, Charles, 3827 Green Valley, Hamsville, MD 21754 (US).
- (74) Agents: YANKWICH, Leon, R. et al.; Yankwich & Associates, 201 Broadway, Cambridge, MA 02139 (US).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 26 June 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/016412 A3

(54) Title: BINDING POLYPEPTIDES FOR B LYMPHOCYTE STIMULATOR PROTEIN (BLYS)

(57) Abstract: Binding polypeptides comprising specific amino acid sequences are disclosed that bind B Lymphocyte Stimulator (BlyS) protein or BlyS-like polypeptides. The binding polypeptides can be used in methods of the invention for detecting or isolating BlyS protein or BlyS-like polypeptides in solutions or mixtures, such as blood, tissue samples, or conditioned media.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/25891
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 C07K5/113 G01N33/68 C12N15/12 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K G01N C12N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) CHEM ABS Data, WPI Data, EPO-Internal, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0 98 50547 A (SCHERING CORPORATION) 12 November 1998 (1998-11-12) the entire document, particularly pages 21, 35-37, 43, 44, 51-59 and SEQ ID NO 12 ---	1-3, 15, 16, 18, 24-31, 36
X	US 5 795 724 A (HILLMAN ET AL.) 18 August 1998 (1998-08-18) claims 1, 7; figure 1A --- -/--	1, 2, 15, 16, 29, 30
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 December 2002		Date of mailing of the international search report 02.04.2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2010, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Schmidt, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/25891

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VANDENBERGHE I ET AL.: "The primary Structures of the Low-Redox Potential Diheme Cytochromes c from the Phototrophic Bacteria Rhodobacter sphaeroides and Rhodobacter adriaticus Reveal a New Structural Family of c-Type Cytochromes" BIOCHEMISTRY, vol. 37, no. 38, 1998, pages 13075-13081, XP002222890 abstract; figure 1A ---	1,2,15, 16,29,30
X	MALVAR T ET AL.: "The CCR4 Protein From Saccharomyces cerevisiae Contains a Leucine-Rich Repeat Region Which Is Required for Its Control of ADH2 Gene Expression" GENETICS, vol. 132, December 1992 (1992-12), pages 951-962, XP000940641 figure 2 ---	1-3,15, 16,18, 29-31
X	KOO BT ET AL.: "Cloning of a novel crystal protein gene cry1K from Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 134, 1995, pages 159-164, XP000561795 page 160; figure 1 ---	1-3,15, 16,18, 29-31
A	YAN M ET AL.: "Identification of a receptor for BlyS demonstrates a crucial role in humoral immunity" NATURE IMMUNOLOGY, vol. 1, no. 1, July 2000 (2000-07), pages 37-41, XP002222891 the whole document ---	
A	XIA X-Z ET AL.: "TAC1 Is a TRAF-interacting Receptor for TALL-1, a Tumor Necrosis Factor Family Member Involved in B Cell Regulation" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 192, no. 1, 3 July 2000 (2000-07-03), pages 137-143, XP000982104 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In international application No. PCT/US 01/25891
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2.	☒ Claims Nos.: 1,2,8,14-17,24-30,36-38 (partially) because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3.	☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
see additional sheet		
1.	☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2.	☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-7, 15-16, 18-21, 29-34, 37, 38 COMPLETELY 8, 14, 17, 24-28, 36 PARTIALLY	
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/US 01/25891

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1,2,8,14-17,24-30,36-38 (partially)

The initial phase of the search revealed 12761 documents (polypeptide within the meaning of claim 1) and 4214 documents (polypeptide within the meaning of claim 2) relevant to the issue of novelty for claims 1,2,15,16,29 and 30. So many documents were retrieved that it is impossible to determine which parts of the claims may be said to define subject-matter for which protection might legitimately be sought (Article 6 PCT).

For these reasons, a meaningful search over the whole breadth of the claims is impossible.

Consequently, the search has been restricted to the first subject and to those polypeptides, polynucleotides, bacteriophages, the BlyS affinity maturation library, the DNA template and methods relating to the compounds comprising SEQ ID NO 448 and SEQ ID NOS 164-168.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International Application No. PCT/US 01/25891

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-7,15,16,18-21,29-34,37,38 (completely) and 8,14,17,24-28,36 (partially)

polypeptides comprising SEQ ID NOs 446 polynucleotides and bacteriophages thereof and their methods
2. Claims: 8-14,17,22-28,35,36 (all partially)

polypeptides comprising SEQ ID NOs 1 and 8, polynucleotides and bacteriophages thereof and their methods
3. Claims: 9-13,22-28,35,36 (all partially)

polypeptides comprising SEQ ID NOs 2 and 9, polynucleotides and bacteriophages thereof and their methods
4. Claims: 9-13,22-28,35,36 (all partially)

polypeptides comprising SEQ ID NOs 3 and 10, polynucleotides and bacteriophages thereof and their methods
5. Claims: 9-13,22-28,35,36 (all partially)

polypeptides comprising SEQ ID NOs 4 and 11, polynucleotides and bacteriophages thereof and their methods
6. Claims: 9-13,22-28,35,36 (all partially)

polypeptides comprising SEQ ID NOs 5 and 12, polynucleotides and bacteriophages thereof and their methods
7. Claims: 9-13,22-28,35,36 (all partially)

polypeptides comprising SEQ ID NO 6, polynucleotides and bacteriophages thereof and their methods
8. Claims: 9-13,22-28,35,36 (all partially)

polypeptides comprising SEQ ID NO 7, polynucleotides and bacteriophages thereof and their methods

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/US 01/25891

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9850547	A	12-11-1998	AU 740333 B2	01-11-2001
			AU 7175498 A	27-11-1998
			BR 9808747 A	11-07-2000
			CN 1263555 T	16-08-2000
			EP 0980429 A2	23-02-2000
			JP 2002514083 T	14-05-2002
			NO 995458 A	08-11-1999
			NZ 338073 A	28-09-2001
			PL 336635 A1	03-07-2000
			SK 146599 A3	11-07-2000
			WO 9850547 A2	12-11-1998
			US 2003032090 A1	13-02-2003
			HU 0001462 A2	28-07-2000
US 5795724	A	18-08-1998	US 6017744 A	25-01-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 7/08	C 0 7 K 7/08	
C 0 7 K 14/00	C 0 7 K 14/00	
C 1 2 N 7/00	C 1 2 N 7/00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,R O,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ベルツァー, ジェイムス, ピー.

アメリカ合衆国 0 1 7 4 1 マサチューセッツ州, カーライスル, ノース ロード 8 0 1

(72)発明者 ポッター, エム., ダニエル

アメリカ合衆国 0 1 7 2 0 マサチューセッツ州, アクトン, ハイ ストリート 1 7 6

(72)発明者 フレミング, トニー, ジェイ.

アメリカ合衆国 0 2 4 5 2 マサチューセッツ州, ウォルサム, アルカディア アヴェニュー
8 3

(72)発明者 ラドナー, ロバート, チャールズ

アメリカ合衆国 2 1 7 5 4 メリーランド州, ヤムズヴィル, グリーン バレー 3 8 2 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 CA05 DA05 DA20 EA03 GA11 HA08
HA11

4B065 AA98X AB01 BA01 CA24 CA44 CA46

4H045 AA10 AA30 BA09 BA13 BA15 BA16 BA17 BA18 EA20 EA50

EA54 FA33 FA74