

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7108535号
(P7108535)

(45)発行日 令和4年7月28日(2022.7.28)

(24)登録日 令和4年7月20日(2022.7.20)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/12 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/12	Z N A
C 0 7 K	19/00 (2006.01)		C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)		C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 P	21/02 (2006.01)		C 1 2 P	21/02	C
C 0 7 K	14/47 (2006.01)		C 0 7 K	14/47	

請求項の数 19 (全50頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-501349(P2018-501349)

(86)(22)出願日 平成28年7月15日(2016.7.15)

(65)公表番号 特表2018-532372(P2018-532372)

A)

(43)公表日 平成30年11月8日(2018.11.8)

(86)国際出願番号 PCT/EP2016/066909

(87)国際公開番号 WO2017/009456

(87)国際公開日 平成29年1月19日(2017.1.19)

審査請求日 令和1年7月12日(2019.7.12)

(31)優先権主張番号 15176740.7

(32)優先日 平成27年7月15日(2015.7.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

(73)特許権者 509029645

ピエリス ファーマシューティカルズ ゲ

ーエムベーハー

ドイツ連邦共和国 8 5 3 9 9 ハルベル

クモース ツエッペリンシュトラーセ 3

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 L A G - 3 に特異的な新規タンパク質

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

検出可能な親和性でLAG-3に結合する能力を有する、リポカリンムテインであって、SEQ ID NO: 7 ~ 22からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する、前記リポカリンムテイン。

【請求項2】

Kdを尺度として約500nM以下、約160nM以下、約30nM以下、または約1nM以下の親和性でLAG-3に結合する能力を有する、請求項1記載のリポカリンムテイン。

【請求項3】

ヒトLAG-3ともカニクイザルLAG-3 (SEQ ID NO:2) とも交差反応する、請求項1または2記載のリポカリンムテイン。

【請求項4】

Kdを尺度として約160nM以下の親和性でカニクイザルLAG-3 (SEQ ID NO:2) に結合する能力を有する、請求項1~3のいずれか一項記載のリポカリンムテイン。

【請求項5】

主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラスIIへのヒトLAG-3の結合を妨害する能力を有する、請求項1~4のいずれか一項記載のリポカリンムテイン。

【請求項6】

前記ムテインのアミノ酸配列が、以下の変異アミノ酸残基の組のうちの1つを含む、請求項1~5のいずれか一項記載のリポカリンムテイン:

(a) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp;
Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Leu 56 → Asp; Ser 58 →
Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala;
Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; および Cys 153 → Ser;

(b) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr;
Lys 52 → Asn; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 →
Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Ala; Gly 112 → Thr;
Lys 114 → Ala; および Lys 121 → Thr;

(c) Arg 26 → Phe; Glu 27 → Val; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Tyr;
Met 31 → Asp; Asn 32 → Val; Leu 33 → Pro; Leu 56 → Gln; Ser 58 → Trp; Arg 60 →
Glu; Cys 61 → Leu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Tyr; Leu 105 → Cys; His 106 → Val;
Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; および Cys 153 → Ser;

(d) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Thr; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Trp; Glu 30 → Trp;
Met 31 → Tyr; Asn 32 → Val; Leu 33 → Asp; Glu 34 → His; Leu 56 → Asn; Ile 57 →
Leu; Ser 58 → Trp; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys;
His 106 → Gln; Lys 108 → Trp; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; および Cys 153 → Ser;

10

20

30

40

50

(e) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp;
 Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 →
 Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala;
 Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; および Cys 153 → Ser;

(f) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp;
 Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 →
 Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala;
 Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; および Cys 153 → Ser; 10

(g) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp;
 Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Val 36 → Ala; Asn 48 →
 Asp; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Val 85 → Ala; Cys
 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114
 → Trp; Ser 140 → Gly; および Cys 153 → Ser;

(h) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp;
 Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 →
 Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Glu;
 Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; および Cys 153 → Ser; 20

(i) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp;
 Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Val 36 → Ala; Lys 52 →
 Glu; Val 53 → Ala; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys
 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114
 → Trp; および Cys 153 → Ser; 30

(j) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp;
 Met 31 → Val; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 →
 Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala;
 Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; および Cys 153 → Ser;

(k) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu;
 Asn 32 → Trp; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 →
 Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Tyr; Lys 108 → Thr;
 Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; および Lys 121 → Thr; 40

(l) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ala; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Val; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Ala; Gly 112 → Thr; Lys 114 → Ala; および Lys 121 → Thr;

(m) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Asp; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; および Lys 121 → Thr;

(n) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Glu; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; および Lys 121 → Thr;

(o) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Met; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; および Lys 121 → Thr; または

(p) Arg 26 → Phe; Glu 27 → Val; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Asn; Met 31 → Asp; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Pro; Leu 56 → Gln; Ser 58 → Trp; Arg 60 → Glu; Cys 61 → Pro; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Tyr; Leu 105 → Cys; His 106 → Thr; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; および Cys 153 → Ser

。

【請求項 7】

SEQ ID NO:7 ~ 22からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～6のいずれか一項記載のリポカリンムテイン。

【請求項 8】

前記ムテインが、有機分子、酵素標識、放射性標識、着色標識、蛍光標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、細胞増殖抑制作用物質、毒素、金属錯体、金属、およびコロイド金からなる群より選択される化合物にコンジュゲートされている、請求項1～7のいずれか一項記載のリポカリンムテインを含むコンジュゲート。

【請求項 9】

前記ムテインまたはコンジュゲートが、N末および/またはC末において、抗体、抗体 fragment、タンパク質、タンパク質ドメイン、ペプチド、またはリポカリンムテインからなる群より選択される融合パートナーに融合されている、請求項1～7のいずれか一項記載のリポカリンムテインまたは請求項8記載のコンジュゲートを含む、融合タンパク質。

【請求項 10】

前記ムテイン、コンジュゲート、または融合タンパク質が、ポリエチレングリコール分子、ヒドロキシエチルデンブン、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される、ムテイン、コンジュゲート、または融合タンパク質の

10

20

30

40

50

血清中半減期を延ばす化合物にコンジュゲートされている、請求項1～7のいずれか一項記載のリポカリンムテイン、請求項8記載のコンジュゲート、または請求項9記載の融合タンパク質を含む、コンジュゲート。

【請求項11】

請求項1～7のいずれか一項記載のリポカリンムテインまたは請求項9記載の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項12】

請求項11記載の核酸分子を含有する宿主細胞。

【請求項13】

ムテインまたは融合タンパク質をコードする核酸から出発してムテインまたは融合タンパク質が生産される、請求項1～7のいずれか一項記載のリポカリンムテインまたは請求項9記載の融合タンパク質を生産する方法。10

【請求項14】

LAG-3に結合するまたはLAG-3を検出するのに使用するための、請求項1～7のいずれか一項記載のリポカリンムテイン、請求項8もしくは10記載のコンジュゲート、または請求項9記載の融合タンパク質。

【請求項15】

対象における免疫応答を刺激するのに使用するための、請求項1～7のいずれか一項記載のリポカリンムテイン、請求項8もしくは10記載のコンジュゲート、または請求項9記載の融合タンパク質。20

【請求項16】

対象におけるTリンパ球増殖を誘発するのに使用するための、請求項1～7のいずれか一項記載のリポカリンムテイン、請求項8もしくは10記載のコンジュゲート、または請求項9記載の融合タンパク質。

【請求項17】

MHCクラスIIへのヒトLAG-3の結合を妨害するのに使用するための、請求項1～7のいずれか一項記載のリポカリンムテイン、請求項8もしくは10記載のコンジュゲート、または請求項9記載の融合タンパク質。

【請求項18】

請求項1～7のいずれか一項記載のリポカリンムテイン、請求項8もしくは10記載のコンジュゲート、または請求項9記載の融合タンパク質と薬学的に許容される賦形剤とを含む、薬学的組成物。30

【請求項19】

治療作用物質に連結された請求項1～7のいずれか一項記載のリポカリンムテイン、請求項8もしくは10記載のコンジュゲート、または請求項9記載の融合タンパク質を含む、イムノコンジュゲートまたは融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

I. 背景

リンパ球活性化遺伝子-3、すなわちLAG-3 (Cluster of Differentiation 223、すなわちCD223としても公知である) は免疫グロブリンスーパーファミリーの膜タンパク質である。LAG-3は構造的にも遺伝子的にもCD4と関連しており、それをコードする遺伝子は12番染色体の短腕の遠位部、CD4遺伝子の近くにあることから、LAG-3遺伝子は遺伝子重複によって進化した可能性が示唆される (Triebel et al., J Exp Med, 1990)。LAG-3は休止末梢血リンパ球上には発現しないが、活性化T細胞およびナチュラルキラー(NK)細胞上に発現し (Triebel et al., J Exp Med, 1990)、活性化B細胞上 (Kisielow et al., Eur J Immunol, 2005) および形質細胞様樹状細胞上 (Workman et al., J Immunol, 2009) にも発現すると報告されている。40

【0002】

CD4と同様に、LAG-3も主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスII分子に結合するが、その親和性は2倍高く、結合部位も異なる（Huard et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1997）。LAG-3による樹状細胞上のMHCクラスIIエンゲージメントは、樹状細胞のサイトカインプロファイルおよびケモカインプロファイルの変化につながる（Buisson and Triebel, Vaccine, 2003）。さらに、LAG-3は、樹状細胞によるIL-12およびTNF- の產生、ならびに同種異系T細胞による増殖およびIFN- 応答を刺激する樹状細胞の能力の増加によって証明されるとおり、樹状細胞の成熟を引き起こすことが報告されている（Andreae et al., J Immunol, 2002）。LAG-3シグナリングおよびMHCクラスIIの架橋は、ヒトCD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞の一次活性化における初期事象を阻害すると報告されている（Macon-Lemaitre and Triebel, Immunology, 2005）。これはT細胞の細胞増殖、活性化およびホメオスタシスを負に制御する。

【0003】

CTLA-4およびPD-1と同様に、LAG-3は阻害性免疫受容体である。T細胞応答の負の制御物質としてのLAG-3の大きな役割は、特にPD-1との関連において、ノックアウトマウスと標的特異的抗体の両方に基づく研究で、あざやかに証明されている（Woo et al., Cancer Res, 2012）。この研究では、二重抗LAG-3/抗PD-1抗体処置により、単一抗体処置にはほとんど抵抗性であった定着腫瘍を持つマウスの大半が治癒した。さらに、LAG-3/PD-1二重ノックアウトマウスは、複数の移植可能な腫瘍からの生残およびそれらのクリアランスに、著しい増加を示した。免疫チェックポイントとしての、PD-1とLAG-3との強力な協同的役割については、二重ノックアウトマウスが致死的自己炎症を著しく起こしやすいという事実により、さらに強い実験的裏づけが得られた。

【0004】

したがって当技術分野では、がん、臓器移植拒絶の処置もしくは予防、または自己免疫疾患もしくは自己炎症性疾患の処置に重要な用途を有しうる、T細胞、NK細胞、B細胞、および形質細胞様樹状細胞などのLAG-3⁺ リンパ球の応答を調節する化合物に、未だ満たされていないニーズが存在する。これに関連して、本開示は、LAG-3に特異的に結合し、それによって免疫応答を調節する、一群の新規化合物を提供する。そのような化合物はリポカリン由来のムテインである。リポカリンのムテインは、急速に拡大しつつある一群の治療薬であり、所望の標的に対して高い親和性と高い特異性とを呈するように構築することができる（例えば国際特許公開番号WO 99/16873、WO 00/75398、WO 03/029471、WO 05/19256参照）。

【発明の概要】

【0005】

II. 定義

以下の一覧では、本明細書の全体を通して使用される用語、語句、および略号を定義する。本明細書に列挙して定義する用語はいずれも、すべての文法形式を包含するものとする。

【0006】

本明細書において、「LAG-3」とは、別段の指定がある場合を除き、ヒトLAG-3 (huLAG-3) を意味し、ヒトLAG-3の変異体、アイソフォームおよび種ホモログを包含する。LAG-3は、「リンパ球活性化遺伝子3」、または「CD223 (cluster of differentiation 223)」としても公知であり、これらは相互可換的に使用される。ヒトLAG-3は、UniProt P 18627 (2009年7月7日のバージョン5) によって規定される完全長タンパク質、そのフラグメント、またはその変異体を意味する。カニクイザルLAG-3 (cyLAG-3) はカニクイザルのLAG-3を指す。cyLAG-3は、SEQ ID NO:2の位置1～428で示されるcyLAG-3の細胞外ドメインを指すために使用される場合もある。

【0007】

本明細書において、「検出可能な親和性」とは、通常はK_dまたはEC₅₀を尺度として、最大でも約10⁻⁵Mまたはそれ以下の親和性で、選択された標的に結合する能力を意味する（低いK_d値またはEC₅₀値ほど、高い結合活性を表す）。これより低い親和性は、一般に、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）などの一般的方法ではもはや測定することができず、

10

20

30

40

50

それゆえに、あまり重要ではない。

【 0 0 0 8 】

本明細書において、選択された標的（この場合はLAG-3）に対する本開示のタンパク質（例えばリポカリンのムテイン）またはその融合ポリペプチドの「結合親和性」は、当業者に公知の数多くの方法によって測定することができる（そして、それによりムテイン-リガンド複合体のK_d値が決定される）。そのような方法には、蛍光滴定、競合ELISA、等温滴定熱量測定（ITC）などの熱量測定法、および表面プラズモン共鳴（SPR）などがあるが、それらに限定されるわけではない。そのような方法は当技術分野において確立されており、その例を以下にも詳述する。

【 0 0 0 9 】

また、それぞれの結合物質とそのリガンドとの間の複合体形成は、それぞれの結合パートナーの濃度、競合物質の存在、使用する緩衝系のpHおよびイオン強度、ならびに解離定数K_dの決定に使用される実験方法（例えば蛍光滴定、競合ELISAまたは表面プラズモン共鳴であるが、これらはほんのいくつかの例にすぎない）、さらには実験データの評価に使用される数学的アルゴリズムなどといった、多種多様な因子の影響を受けることにも注意されたい。

10

【 0 0 1 0 】

それゆえに、所与のリガンドに対する特定のリポカリンムテインの親和性を決定するために使用される方法および実験装置に依存して、K_d値（それぞれの結合物質とその標的/リガンドとの間に形成される複合体の解離定数）が一定の実験範囲内で変動しうることは、当業者にとっては明らかである。これは、例えばそのK_d値が表面プラズモン共鳴（SPR）で決定されたか、競合ELISAで決定されたか、または直接ELISAで決定されたかなどに依存して、計測されるK_d値にはわずかな偏差、または許容誤差範囲が存在しうることを意味する。

20

【 0 0 1 1 】

本明細書にいう「ムテイン」、「変異（mutated）」実体（entity）（タンパク質であるか核酸であるかを問わない）、または「突然変異体（mutant）」とは、天然（野生型）の核酸またはタンパク質「リファレンス」スキヤフォールドと比較した、1つまたは複数のヌクレオチドまたはアミノ酸の交換、欠失、または挿入を指す。この用語は、本明細書に記載するムテインおよび変異体のフラグメントも包含する。本発明のリポカリンムテイン、そのフラグメントまたは変異体は、好ましくは、本明細書に記載するようにLAG-3に結合する機能を有する。

30

【 0 0 1 2 】

本開示のムテインに関する本明細書において使用する用語「フラグメント」は、N末および/またはC末が短縮された、すなわち少なくとも1つのN末および/またはC末アミノ酸を欠く、完全長成熟ヒト涙液リポカリン（hTlcまたはhTLPC）から誘導されるタンパク質またはペプチドに関する。そのようなフラグメントは、N末および/またはC末アミノ酸のうちの最大2個、最大3個、最大4個、最大5個、最大10個、最大15個、最大20個、最大25個、または最大30個（これらの間の数字をすべて含む）を欠きうる。具体例として、そのようなフラグメントは、4個のN末アミノ酸および2個のC末アミノ酸を欠きうる。フラグメントは、好ましくは、完全長涙液リポカリン（ムテイン）の機能的フラグメントであると理解され、これは、そのフラグメントが、好ましくは、そのフラグメントの元となっただ完全長涙液リポカリン（ムテイン）の結合ポケットを含むことを意味する。具体例として、そのような機能的フラグメントは、ネイティブ成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列の少なくともアミノ酸7～153を含みうる。そのようなフラグメントは、成熟リポカリンの一次配列のうちの少なくとも10個またはそれ以上、例えば20個もしくは30個またはそれ以上の連続アミノ酸を含むことができ、通常は、成熟リポカリンのイムノアッセイで検出可能である。一般に、本開示のリポカリンムテインの、または本開示による組み合わせの、または本明細書に記載する融合タンパク質の、対応タンパク質リガンドであるLAG-3に関する本明細書において使用する用語「フラグメント」は、N末および/ま

40

50

たはC末が短縮されたタンパク質またはペプチドリガンドであって、本開示のムテインによって認識されかつ/または結合されるという完全長リガンドの能力を保っているものに関する。

【0013】

本明細書において使用する用語「突然変異誘発」は、成熟リポカリンの所与の配列位置に本来存在するアミノ酸を、それぞれの天然ポリペプチド配列中のその特定位置には存在しない少なくとも1つのアミノ酸で置換することができるよう、実験条件が選ばれることを意味する。「突然変異誘発」という用語は、1つまたは複数のアミノ酸の欠失または挿入による配列セグメントの長さの(付加的)修飾も包含する。したがって、例えば、選ばれた配列位置にある1つのアミノ酸が、一続きになった3つのランダム突然変異で置き換えられて、野生型タンパク質のそれぞれのセグメントの長さと比較して2つのアミノ酸残基が挿入されたことになるのは、本開示の範囲内である。そのような挿入または欠失は、本開示において突然変異誘発の対象となりうるペプチドセグメントのいずれにおいても、互いに独立して導入されうる。本開示の例示的一態様では、数個の突然変異の挿入が、選ばれたリポカリンスキャフォールドのループAB中に導入されうる(国際特許出願公開第WO 2005/019256号参照。この特許出願は参考によりその全体が本明細書に組み入れられる)。

10

【0014】

「ランダム突然変異誘発」という用語は、前もって決定された单一アミノ酸(突然変異)が一定の配列位置に存在するのではなくて、突然変異誘発中に所定の配列位置に少なくとも2種類のアミノ酸が一定の確率で組み込まれることを意味する。

20

【0015】

「同一性」とは、配列間の類似性または関係性を測る配列の一特性である。本開示において使用する「配列同一性」または「同一性」という用語は、本開示のポリペプチドの配列を問題の配列と(相同)アラインメントした後の、それら2つの配列のうちの長い方の残基数を基準とした、ペアごとの同一残基のパーセンテージを意味する。配列同一性は、同一アミノ酸残基の数を残基の総数で割り、その結果に100を掛けることによって測られる。

【0016】

「相同性」という用語は、本明細書では、その通常の意味で使用され、本開示のポリペプチド(例えば本開示の任意のリポカリンムテイン)の直鎖アミノ酸配列において等価な位置にある同一アミノ酸ならびに保存的置換とみなされるアミノ酸(例えばアスパラギン酸残基によるグルタミン酸残基の交換)を包含する。

30

【0017】

配列相同性または配列同一性のパーセンテージは、ここでは、例えばプログラムBLASTP、バージョンblastp 2.2.5(2002年11月16日; Altschul, et al., Nucl. Acids Res. 1997参照)を使って決定することができる。この態様において、相同性のパーセンテージは、プロペプチド配列を含む全ポリペプチド配列のアラインメントに基づき(行列: BLOSUM 62;ギャップコスト: 11.1;カットオフ値は10⁻³に設定)、好ましくは野生型タンパク質スキャフォールドを、ペアワイズ比較におけるリファレンスとして使用する。これは、アラインメントのためにプログラムが選択したアミノ酸の総数で割った、BLASTPプログラム出力に結果として示される「ポジティブ(positive)」(相同アミノ酸)の数のパーセンテージとして計算される。

40

【0018】

具体的には、リポカリン(ムテイン)のアミノ酸配列のアミノ酸残基が、野生型リポカリンのアミノ酸中の一定の位置に対応するアミノ酸残基と異なるかどうかを決定するために、当業者は、例えば手作業によるアラインメント、またはBLAST2.0(Basic Local Alignment Search Toolの略)もしくはClustalWなどのコンピュータプログラム、または配列アラインメントを作成するのに適した他の任意の適切なプログラムを使ったアラインメントなど、当技術分野において周知の手段および方法を使用することができる。したがつ

50

て、リポカリンの野生型配列が「対象配列」または「リファレンス配列」となることができるのに対して、本明細書に記載する野生型リポカリンとは異なるリポカリンのアミノ酸配列は「クエリー配列」となる。「野生型配列」、「リファレンス配列」および「対象配列」という用語は、本明細書では相互可換的に使用される。好ましいリポカリンの野生型配列は、SEQ ID NO:1に示すhTlcの配列である。

【0019】

「ギャップ」とは、アミノ酸の付加または欠失の結果であるアラインメント中の空白をいう。したがって、厳密に同じ配列である2つのコピーは100%の同一性を有するが、それほど高度には保存されていなくて、欠失、付加、または置き換えを有する配列は、それより程度の低い配列同一性を有しうる。標準的なパラメータを使って配列同一性を決定するために、例えばBlast (Altschul, et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402)、Blast2 (Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410)、およびSmith-Waterman (Smith, et al. (1981) J. Mol. Biol. 147, 195-197)など、いくつかのコンピュータプログラムが利用可能であることは、当業者にはわかるであろう。

10

【0020】

本開示において使用する用語「変異体」は、置換、欠失、挿入または化学修飾などによるアミノ酸配列の修飾を含む、タンパク質またはペプチドの誘導体に関する。そのような修飾は、いくつかの態様では、タンパク質またはペプチドの機能性を低減しない。そのような変異体には、1つまたは複数のアミノ酸が各々のD-立体異性体で置き換えられているか、20種類の天然アミノ酸以外のアミノ酸、例えばオルニチン、ヒドロキシプロリン、シトルリン、ホモセリン、ヒドロキシリジン、ノルバリンなどで置き換えられている、タンパク質が含まれる。しかし、そのような置換は保存的であってもよく、すなわちアミノ酸残基は、化学的に類似するアミノ酸残基で置き換えられる。保存的置換の例は、以下のグループのメンバー間での置き換えである:1) アラニン、セリン、およびスレオニン; 2) アスパラギン酸およびグルタミン酸; 3) アスパラギンおよびグルタミン; 4) アルギニンおよびリジン; 5) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリン;ならびに6) フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。本開示のリポカリンムテインの、または本開示による組み合わせの、および/もしくは融合タンパク質の、対応タンパク質標的であるLAG-3に関連して本明細書において使用する用語「変異体」は、野生型LAG-3タンパク質、例えば本明細書に記載するとおりUniProtに登録されたLAG-3リファレンスタンパク質と比較して、1つまたは複数の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、40、50、60、70、80個またはそれ以上の、アミノ酸の置換、欠失および/または挿入を有する、LAG-3またはそのフラグメントに関する。LAG-3変異体は、好ましくは、野生型LAG-3、例えば本明細書に記載するとおりUniProtに登録されたヒトLAG-3リファレンスタンパク質に対して、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%または95%のアミノ酸同一性を有する。

20

【0021】

「ネイティブ配列」のリポカリンとは、自然から得られる対応ポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するリポカリンを意味する。したがってネイティブ配列リポカリンは、任意の生物からの、特に哺乳動物からの、それぞれの天然リポカリンのアミノ酸配列を有することができる。そのようなネイティブ配列ポリペプチドは、自然から単離するか、組換え手段または合成手段によって生産することができる。「ネイティブ配列」ポリペプチドという用語は、リポカリンの天然切断型または天然分泌型、リポカリンの天然変異体型、例えば選択的スプライス型または天然対立遺伝子変異体を、特に包含する。ポリペプチド「変異体」とは、ネイティブ配列ポリペプチドに対して少なくとも約50%、60%、70%、80%または少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有する、生物学的に活性なポリペプチドを意味する。そのような変異体には、例えば、ポリペプチドのN末またはC末において1つまたは複数のアミノ酸残基が付加されまたは欠失しているポリペプチドが含まれる。一般に変異体は、ネイティブ配列ポリペプチドに対して、少なくとも約70%の、例えば少なくとも約80%、例えば少なくとも約85%の、アミノ酸配列同一性、例えば少なくとも約9

30

40

50

0%のアミノ酸配列同一性、または少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。具体例として、本開示のhTlcムテインでは、タンパク質の生物学的機能に影響を及ぼすことなく、N末の最初の4アミノ酸残基(His-His-Leu-Leu, SEQ ID NO:55)およびC末の最後の2アミノ酸残基(Ser-Asp)を欠失させることができる。例えばSEQ ID NO:7~22。

【0022】

本開示において使用する場合、「位置」という用語は、本明細書に示すアミノ酸配列内でのアミノ酸の位置、または本明細書に示す核酸配列内でのヌクレオチドの位置を意味する。1つまたは複数のリポカリンムテインのアミノ酸配列位置との関連で本明細書において使用される「対応する」または「対応」という用語を理解するために、対応位置は、先行するヌクレオチド/アミノ酸の数だけでは決定されない。したがって、本開示によれば、置換されうる所与のアミノ酸の位置は、(突然変異体または野生型)リポカリン中の他のどこかにあるアミノ酸の欠失または付加ゆえに、変動しうる。同様に、本開示によれば、置換されうる所与のヌクレオチドの位置も、ムテインまたは野生型リポカリン5'-非翻訳領域(UTR)、例えばプロモーターおよび/または他の任意の制御配列もしくは制御遺伝子(エクソンおよびイントロンを含む)中の他のどこかにある欠失または追加ヌクレオチドゆえに、変動しうる。

【0023】

このように、本開示による「対応位置」に関して、ヌクレオチド/アミノ酸の位置は、類似の隣接ヌクレオチド/アミノ酸とは、表示される数字の点で異なりうるが、交換、欠失または付加されうる該隣接ヌクレオチド/アミノ酸も、当該1つまたは複数の「対応位置」によって含まれると理解されることが好ましい。

【0024】

加えて、本開示によるリファレンス配列に基づくリポカリンムテイン中の対応位置については、リポカリン間の高度に保存された全体的フォールディングパターンに照らして当業者には理解されるとおり、ヌクレオチド/アミノ酸の位置は、たとえそれらが表示される数字の点で異なっていたとしても、(突然変異体または野生型)リポカリン中の他のどこかにある位置と、構造的に対応すると理解されることが好ましい。

【0025】

「アルブミン」という用語は、ヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンまたはラット血清アルブミンなど、すべての哺乳動物アルブミンを包含する。

【0026】

非天然標的にして本明細書において使用する用語「有機分子」または「小有機分子」は、少なくとも2つの炭素原子を含むが、回転可能な炭素結合の数は好ましくは7または12を越えず、100~2000ダルトン、好ましくは100~1000ダルトンの範囲の分子量を有し、1つまたは2つの金属原子を含んでもよい有機分子を表す。

【0027】

本明細書において使用する「検出する」、「検出」、「検出可能な」または「検出すること」という単語は、定量的レベルおよび定性的レベルの両方で、ならびにそれらの組み合わせで、理解される。したがってこれは、関心対象の分子の定量的、半定量的および定性的測定を包含する。

【0028】

「対象」は脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。「哺乳動物」という用語は、本明細書では、哺乳動物に分類される任意の動物を指すために使用され、ヒト、家畜および農用動物、ならびに動物園動物、スポーツ動物、またはペット動物、例えばヒツジ、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ、ラット、ブタ、サル、例えばカニクイザルなどを含むが、ここでは具体例をいくつか挙げただけで、これらに限定されるわけではない。好ましくは、本明細書における哺乳動物はヒトである。

【0029】

「有効量」とは、有益な結果または所望の結果を達成するのに十分な量である。有効量は1回または複数回の投与で投与することができる。

【0030】

「試料」は、任意の対象から採取された生物学的試料と定義される。生物学的試料には、血液、血清、尿、糞便、精液、または組織が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

[本発明1001]

K_dを尺度として約500nM以下の親和性でLAG-3に結合する能力を有する、リポカリンムテイン。

[本発明1002]

K_dを尺度として約160nM以下の親和性でLAG-3に結合する能力を有する、本発明1001のリポカリンムテイン。

10

[本発明1003]

K_dを尺度として約30nM以下の親和性でLAG-3に結合する能力を有する、本発明1001のリポカリンムテイン。

[本発明1004]

K_dを尺度として約1nM以下の親和性でLAG-3に結合する能力を有する、本発明1001のリポカリンムテイン。

[本発明1005]

本質的に実施例5または実施例6に記載されるように、K_d値が表面プラズモン共鳴分析によって決定される、本発明1001～1004のいずれかのリポカリンムテイン。

20

[本発明1006]

ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列（SEQ ID NO:1）の配列位置14、25～34、36、48、52～53、55～58、60～61、66、79、85～86、101、104～106、108、110～112、114、121、140および153に少なくとも1つの変異アミノ酸残基を含む本発明1001～1005のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1007]

前記ムテインのアミノ酸配列が、ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列（SEQ ID NO:1）との比較において、以下の変異アミノ酸残基のうちの少なくとも1つを含む、本発明1006のリポカリンムテイン：Ser 14 Pro; Asp 25 Ser; Arg 26 Ser、Phe、Gly、Ala、AspまたはGlu; Glu 27 Asp、ValまたはThr; Phe 28 CysまたはAsp; Pro 29 Phe、LeuまたはTrp; Glu 30 Trp、AsnまたはTyr; Met 31 Ile、Val、Asp、LeuまたはTyr; Asn 32 Asp、Glu、Tyr、Trp、Val、ThrまたはMet; Leu 33 Asp、GluまたはPro; Glu 34 Val、TrpまたはHis; Val 36 Ala; Asn 48 Asp; Lys 52 Glu Ser、ArgまたはAsn; Val 53 Ala; Met 55 AlaまたはVal; Leu 56 Asp、GlnまたはAsn; Ile 57 Leu; Ser 58 Phe、TrpまたはAsp; Arg 60 PheまたはGlu; Cys 61 Trp、Pro、LeuまたはTrp; Ala 66 Asn; Ala 79 Glu; Val 85 Ala; Ala 86 Asp; Cys 101 SerまたはPhe; Glu 104 Tyr; Leu 105 CysまたはGly; His 106 Ala、Glu、Thr、Tyr、GlnまたはVal; Lys 108 Tyr、Phe、ThrまたはTrp; Val 110 GlyまたはAla; Arg 111 Pro; Gly 112 MetまたはThr; Lys 114 TrpまたはAla; Lys 121 Thr; Ser 140 Gly; およびCys 153 Ser。

30

[本発明1008]

約109nM以下のEC₅₀値でLAG-3に結合する、本発明1001～1007のいずれかのリポカリンムテイン。

40

[本発明1009]

本質的に実施例8または実施例9に記載されるように、EC₅₀値が蛍光活性化細胞選別によって測定される、本発明1008のリポカリンムテイン。

[本発明1010]

LAG-3がヒトLAG-3である、本発明1001～1009のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1011]

ヒトLAG-3ともカニクイザルLAG-3（SEQ ID NO:2）とも交差反応する、本発明1001～1010のいずれかのリポカリンムテイン。

50

[本発明1012]

K_d を尺度として約160nM以下の親和性でカニクイザルLAG-3 (SEQ ID NO:2)に結合する能力を有する、本発明1001～1011のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1013]

主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラスIIへのヒトLAG-3の結合を妨害する能力を有する、本発明1001～1112のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1014]

本質的に実施例11に記載されるように、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラスIIへのヒトLAG-3の結合を妨害する能力が蛍光活性化細胞選別によって分析される、本発明1013のリポカリンムテイン。

[本発明1015]

前記ムテインのアミノ酸配列が、以下のアミノ酸置換の組のうちの1つを含む、本発明1001～1014のいずれかのリポカリンムテイン：

(a) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(b) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Asn; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Ala; Gly 112 → Thr; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(c) Arg 26 → Phe; Glu 27 → Val; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Tyr; Met 31 → Asp; Asn 32 → Val; Leu 33 → Pro; Leu 56 → Gln; Ser 58 → Trp; Arg 60 → Glu; Cys 61 → Leu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Tyr; Leu 105 → Cys; His 106 → Val; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(d) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Thr; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Trp; Glu 30 → Trp; Met 31 → Tyr; Asn 32 → Val; Leu 33 → Asp; Glu 34 → His; Leu 56 → Asn; Ile 57 → Leu; Ser 58 → Trp; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Gln; Lys 108 → Trp; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

10

20

30

40

50

(e) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp;
 Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 →
 Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala;
 Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(f) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp;
 Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 →
 Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala;
 Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(g) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp;
 Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Val 36 → Ala; Asn 48 →
 Asp; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Val 85 → Ala; Cys
 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114
 → Trp; Ser 140 → Gly; Cys 153 → Ser;

(h) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp;
 Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 →
 Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Glu;
 Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(i) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp;
 Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Val 36 → Ala; Lys 52 →
 Glu; Val 53 → Ala; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys
 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114
 → Trp; Cys 153 → Ser;

(j) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp;
 Met 31 → Val; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 →
 Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala;
 Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(k) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu;
 Asn 32 → Trp; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 →
 Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Tyr; Lys 108 → Thr;
 Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

10

20

30

40

50

(l) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ala; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Val; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Ala; Gly 112 → Thr; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(m) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Asp; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(n) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Glu; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(o) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Met; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr; または

(p) Arg 26 → Phe; Glu 27 → Val; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Asn; Met 31 → Asp; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Pro; Leu 56 → Gln; Ser 58 → Trp; Arg 60 → Glu; Cys 61 → Pro; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Tyr; Leu 105 → Cys; His 106 → Thr; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser

—
[本発明1016]

SEQ ID NO:7～22からなる群またはそれらのフラグメントもしくは変異体からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1001～1015のいずれかのリポカリンムテイン

—
[本発明1017]

SEQ ID NO:7～22からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも85%の配列同一性を有する、本発明1001～1016のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1018]

有機分子、酵素標識、放射性標識、着色標識、蛍光標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、細胞増殖抑制作用物質、毒素、金属錯体、金属、およびコロイド金からなる群より選択される化合物にコンジュゲートされている、本発明1001～1017のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1019]

N末および/またはC末において、タンパク質、タンパク質ドメイン、またはペプチドである融合パートナーに融合されている、本発明1001～1018のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1020]

N末および/またはC末において、抗体または抗体フラグメントである融合パートナーに

10

20

30

40

50

融合されている、本発明1001～1019のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1021]

ムテインの血清中半減期を延ばす化合物にコンジュゲートされている、本発明1001～1020のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1022]

血清中半減期を延ばす化合物が、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロエチルデンプン(hydroethylstarch)、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH₃ドメイン、免疫グロブリンのCH₄ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される、本発明1021のリポカリンムテイン。

[本発明1023]

ポリアルキレングリコールがポリエチレン(PEG)またはその活性化誘導体である、本発明1022のリポカリンムテイン。

[本発明1024]

本発明1001～1023のいずれかのリポカリンムテインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

[本発明1025]

本発明1024の核酸分子を含む発現ベクター。

[本発明1026]

本発明1024の核酸分子を含有する宿主細胞。

[本発明1027]

ムテインまたはそのフラグメントをコードする核酸から出発して遺伝子工学の方法を使ってムテインが生産される、本発明1001～1023のいずれかのリポカリンムテインを生産する方法。

[本発明1028]

本発明1001～1023のいずれかの1つもしくは複数のリポカリンムテインまたは該ムテインを含む1つもしくは複数の組成物を適用する工程を含む、対象中のLAG-3に結合する方法。

[本発明1029]

本発明1001～1023のいずれかの1つもしくは複数のリポカリンムテインまたは該ムテインを含む1つもしくは複数の組成物を投与する工程を含む、対象における免疫応答を刺激する方法。

[本発明1030]

本発明1001～1023のいずれかの1つもしくは複数のリポカリンムテインまたは該ムテインを含む1つもしくは複数の組成物を適用する工程を含む、対象におけるTリンパ球増殖を誘発する方法。

[本発明1031]

本発明1001～1023のいずれかの1つもしくは複数のリポカリンムテインまたは該ムテインを含む1つもしくは複数の組成物を適用する工程を含む、対象におけるMHCクラスIIへのヒトLAG-3の結合を妨害する方法。

[本発明1032]

本質的に実施例11に記載するようにFACS分析において測定した場合に、MHCクラスIIを発現する細胞へのヒトLAG-3の結合と競合する、本発明1001～1023のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1033]

本発明1001～1023のいずれかのリポカリンムテインと薬学的に許容される賦形剤とを含む、薬学的組成物。

[本発明1034]

治療作用物質に連結された本発明1001～1023のいずれかのリポカリンムテインまたはそのフラグメントを含む、イムノコンジュゲートまたは融合タンパク質。

[本発明1035]

10

20

30

40

50

- (a) ムテインを、LAG-3を含有すると疑われる試験試料と接触させることによって、ムテインとLAG-3との間に複合体を形成させる工程、および
 (b) ムテインとLAG-3との間に複合体を適切なシグナルによって検出する工程を含む、
 LAG-3の結合/検出のための、本発明1001～1023のいずれかのムテインの使用。

[本発明1036]

本発明1001～1023のいずれかのムテインを含む、診断または分析キット。

[本発明1037]

本発明1001～1023のいずれかのムテインとLAG-3との複合体の形成が可能な条件下で、生物学的試料をムテインと接触させる工程を含む、生物学的試料中のLAG-3の存在を検出する方法。

10

[本発明1038]

ムテインとLAG-3との複合体を検出する工程をさらに含む、本発明1037の方法。

[本発明1039]

生物学的試料がヒトから単離される、本発明1037または本発明1038の方法。

[本発明1040]

前記試料が体液を含む、本発明1037～1039のいずれかの方法。

【図面の簡単な説明】

【0031】

III. 図面の説明

【図1-1】リポカリンムテインがフィトヘマグルチニン（PHA）刺激末梢血単核球（PBMC）に結合することを示す図である。蛍光活性化細胞選別（FACS）を使って、PHA刺激PBMC（黒い線）および非刺激PBMC（灰色の線）へのリポカリンムテイン（SEQ ID NO: 11～17、21および22）ならびにリファレンス分子（ベンチマーク抗LAG-3抗体、BMS 986016、SEQ ID NO:5および6）の結合を分析した。PHA刺激CD3陽性PBMCにはすべてのリポカリンムテインの明らかな結合が検出され、無刺激細胞への結合は観察されなかった。

20

【図1-2】リポカリンムテインがフィトヘマグルチニン（PHA）刺激末梢血単核球（PBMC）に結合することを示す図である。蛍光活性化細胞選別（FACS）を使って、PHA刺激PBMC（黒い線）および非刺激PBMC（灰色の線）へのリポカリンムテイン（SEQ ID NO: 11～17、21および22）ならびにリファレンス分子（ベンチマーク抗LAG-3抗体、BMS 986016、SEQ ID NO:5および6）の結合を分析した。PHA刺激CD3陽性PBMCにはすべてのリポカリンムテインの明らかな結合が検出され、無刺激細胞への結合は観察されなかった。

30

【図1-3】リポカリンムテインがフィトヘマグルチニン（PHA）刺激末梢血単核球（PBMC）に結合することを示す図である。蛍光活性化細胞選別（FACS）を使って、PHA刺激PBMC（黒い線）および非刺激PBMC（灰色の線）へのリポカリンムテイン（SEQ ID NO: 11～17、21および22）ならびにリファレンス分子（ベンチマーク抗LAG-3抗体、BMS 986016、SEQ ID NO:5および6）の結合を分析した。PHA刺激CD3陽性PBMCにはすべてのリポカリンムテインの明らかな結合が検出され、無刺激細胞への結合は観察されなかった。

40

【図1-4】リポカリンムテインがフィトヘマグルチニン（PHA）刺激末梢血単核球（PBMC）に結合することを示す図である。蛍光活性化細胞選別（FACS）を使って、PHA刺激PBMC（黒い線）および非刺激PBMC（灰色の線）へのリポカリンムテイン（SEQ ID NO: 11～17、21および22）ならびにリファレンス分子（ベンチマーク抗LAG-3抗体、BMS 986016、SEQ ID NO:5および6）の結合を分析した。PHA刺激CD3陽性PBMCにはすべてのリポカリンムテインの明らかな結合が検出され、無刺激細胞への結合は観察されなかった。

【図1-5】リポカリンムテインがフィトヘマグルチニン（PHA）刺激末梢血単核球（PBMC）に結合することを示す図である。蛍光活性化細胞選別（FACS）を使って、PHA刺激PBMC（黒い線）および非刺激PBMC（灰色の線）へのリポカリンムテイン（SEQ ID NO:

50

11～17、21および22)ならびにリファレンス分子(ベンチマーク抗LAG-3抗体、BMS 986016、SEQ ID NO:5および6)の結合を分析した。PHA刺激CD3陽性PBMCにはすべてのリポカリンムテインの明らかな結合が検出され、無刺激細胞への結合は観察されなかった。

【図2】リポカリンムテインがLAG-3への結合に関して主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII分子(LAG-3の天然リガンド)と競合することを示す図である。LAG-3特異的リポカリンムテイン(SEQ ID NO:7～10)(図2A)および最適化LAG-3特異的リポカリンムテイン(SEQ ID NO:11、12、14、17および21)(図2B)による、ヒト黒色腫細胞株A375上に発現したMHCクラスII分子へのhuLAG-3-Fc(ヒトIgG1 Fcフラグメントに融合されたヒトLAG-3細胞外ドメイン)の結合の用量依存的阻害が示されている。最適化リポカリンムテインとリファレンス分子(SEQ ID NO:5および6)とは、等しい濃度で、LAG-3/MHCクラスII分子結合に対する阻害効果を示した。陰性対照リポカリンムテイン(SEQ ID NO:3)は、MHCクラスII分子を発現するA375細胞へのhuLAG-3-Fc結合の測定可能な阻害をもたらさなかった。

【図3-1】野生型ヒト涙液リポカリン(hTlc)の直鎖ポリペプチド配列と比較した、一定のLAG-3特異的hTlcムテインのアミノ酸配列のアラインメントを描いた図である。hTlcの直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID NO:1)と比較すると、これらhTlc由来のLAG-3結合性ムテイン(hTlcムテインSEQ ID NO:7～22として列挙するもの)および陰性対照タンパク質(SEQ ID NO:3および4)では、最初の4つのN末アミノ酸残基(His、His、Leu、Leu、SEQ ID NO:55)および最後の2つのC末アミノ酸残基(Ser、Asp)が欠失している。

【図3-2】野生型ヒト涙液リポカリン(hTlc)の直鎖ポリペプチド配列と比較した、一定のLAG-3特異的hTlcムテインのアミノ酸配列のアラインメントを描いた図である。hTlcの直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID NO:1)と比較すると、これらhTlc由来のLAG-3結合性ムテイン(hTlcムテインSEQ ID NO:7～22として列挙するもの)および陰性対照タンパク質(SEQ ID NO:3および4)では、最初の4つのN末アミノ酸残基(His、His、Leu、Leu、SEQ ID NO:55)および最後の2つのC末アミノ酸残基(Ser、Asp)が欠失している。

【図3-3】野生型ヒト涙液リポカリン(hTlc)の直鎖ポリペプチド配列と比較した、一定のLAG-3特異的hTlcムテインのアミノ酸配列のアラインメントを描いた図である。hTlcの直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID NO:1)と比較すると、これらhTlc由来のLAG-3結合性ムテイン(hTlcムテインSEQ ID NO:7～22として列挙するもの)および陰性対照タンパク質(SEQ ID NO:3および4)では、最初の4つのN末アミノ酸残基(His、His、Leu、Leu、SEQ ID NO:55)および最後の2つのC末アミノ酸残基(Ser、Asp)が欠失している。

【発明を実施するための形態】

【0032】

IV. 開示の詳細な説明

本明細書にいう「リポカリン」は、複数(好ましくは4つ)のループにより一端においてペアワイズに接続されることで結合ポケットを規定している複数(好ましくは8つ)のストランドを含む円柱状のブリーツシート超二次構造領域を有する、重量が約18～20kDaの単量体型タンパク質と定義される。サイズ、形状、および化学的特徴が異なる標的を収容する能力をそれぞれが有するリポカリンファミリーメンバー間に、さまざまな異なる結合様式を生じさせるのは、他の点では剛直なリポカリンスキャフォールドにおけるループの多様性である(例えばSkerra, Biochim Biophys Acta, 2000, Flower et al., Biochim Biophys Acta, 2000, Flower, Biochem J, 1996に概説されている)。事実、リポカリンタンパク質ファミリーは、広範なリガンドに結合するように自然に進化しており、それらが共有する全体的配列保存のレベルは異常に低い(多くの場合、配列同一性は20%未満である)にもかかわらず、高度に保存された全体的フォールディングパターンを保っている。さまざまなリポカリンにおける位置間の対応は当業者には周知である(例えば

10

20

30

40

50

米国特許第7,250,297号を参照されたい)。

【0033】

上記のとおり、リポカリンは、その超二次構造、すなわち4つのループにより一端においてペアワイズに接続されることで結合ポケットを規定している8つのストランドを含む円柱状のプリーツシート超二次構造領域によって規定されるポリペプチドである。本開示は、本明細書において具体的に開示するリポカリンムテインに限定されない。この点に関して、本開示は、4つのループにより一端においてペアワイズに接続されることで結合ポケットを規定している8つのストランドを含む円柱状のプリーツシート超二次構造領域を有するリポカリンムテインであって、前記4つのループのうちの少なくとも3つのそれぞれの少なくとも1つのアミノ酸がリファレンス配列と比べて変異しており、LAG-3に検出可能な親和性で結合するのに有効であるリポカリンムテインに関する。 10

【0034】

一特定態様において、本明細書に開示するリポカリンムテインは、リポカリン-1、ヒト涙液プレアルブミンまたはフォン・エブネル腺タンパク質とも呼ばれるヒト涙液リポカリン(hTlcまたはhTLPC)のムテインである。本明細書において使用する用語「ヒト涙液リポカリン」または「hTlc」または「リポカリン-1」は、SWISS-PROT/UniProtデータバンクアクセッション番号P31025(アイソフォーム1)の成熟ヒト涙液リポカリンを指す。SWISS-PROT/UniProtデータバンクアクセッション番号P31025に示されるアミノ酸配列は、好ましい「リファレンス配列」として使用することができ、より好ましくは、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸配列がここで「リファレンス配列」として使用される。 20

【0035】

いくつかの態様において、LAG-3に検出可能な親和性で結合するリポカリンムテインは、リファレンス配列のネイティブシステイン残基の、別のアミノ酸、例えばセリン残基による、アミノ酸置換を、少なくとも1つは含みうる。他のいくつかの態様において、LAG-3に検出可能な親和性で結合するリポカリンムテインは、野生型リポカリンの1つまたは複数のアミノ酸を置換する1つまたは複数の非ネイティブシステイン残基を含みうる。さらなる一特定態様において、本開示によるリポカリンムテインは、システイン残基によるネイティブアミノ酸のアミノ酸置換を少なくとも2つは含み、それによって1つまたは複数のシステイン架橋を形成している。いくつかの態様において、該システイン架橋は少なくとも2つのループ領域を接続しうる。これらの領域の定義は、本明細書では、Flower(Biochem J, 1996), (Biochim Biophys Acta, 2000)およびBreustedt et al. (J Biol Chem, 2005)に従って使用される。関連態様において、本開示は、LAG-3に結合することによってLAG-3の下流シグナリング経路を活性化する能力を有する1つまたは複数のリポカリンムテインを教示する。 30

【0036】

LAG-3に向けられた、またはLAG-3に特異的な、本開示のタンパク質は、明確なタンパク質スキヤフォールド、好ましくはリポカリンスキヤフォールドに基づく多くの特異的結合タンパク質ムテインを包含する。交換され、欠失し、または挿入されるヌクレオチドまたはアミノ酸のそれぞれの数は、好ましくは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個またはそれ以上、例えば25、30、35、40、45または50個であり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または11個は好ましく、9、10または11個はさらに好ましい。ただし、本開示のタンパク質ムテインは、依然として、LAG-3に結合する能力を有することが好ましい。 40

【0037】

一局面において、本開示は、LAG-3に少なくとも検出可能な親和性で結合するさまざまなりポカリンムテインを包含する。この意味で、LAG-3は、野生型リポカリンの非天然リガンドであるとみなすことができ、ここで「非天然リガンド」とは、生理的条件下で野生型リポカリンに結合しない化合物を指す。野生型リポカリンを一定の配列位置における1つまたは複数の突然変異で工学的に操作することにより、本発明者らは、非天然リガンドであるLAG-3に対する高い親和性および高い特異性が可能であることを証明した。いくつか 50

の態様では、野生型リポカリン上の一定の配列位置をコードする1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11もしくは12個またはさらにそれ以上のヌクレオチドトリプレットにおいて、ヌクレオチドトリプレットの部分集合でこれらの位置における置換を行うことによって、ランダム突然変異誘発を実行しうる。

【0038】

さらに、本開示のリポカリンムテインは、リファレンスリポカリンの直鎖ポリペプチド配列の一定の配列位置に対応する配列位置のうちの任意の1つまたは複数に、例えば少なくとも任意の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個に、変異アミノ酸残基を有しうる。

【0039】

本開示のタンパク質は、変異アミノ酸配列位置以外では、「親」タンパク質スキャフォールド（リポカリンスキャフォールドなど）の野生型（天然）アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様において、本開示によるリポカリンムテインは、1つまたは複数の配列位置に1つまたは複数のアミノ酸突然変異も、そのような突然変異が当該ムテインの結合活性およびフォールディングを、少なくとも本質的には、阻止することも、妨害することもないのであれば、保持しうる。そのような突然変異は、確立された標準的方法（Sambrook and Russell, 2001, Molecular cloning: a laboratory manual）を使って、DNAレベルで非常に容易に実現することができる。アミノ酸配列改変の具体例は、挿入または欠失およびアミノ酸置換である。そのような置換は保存的でありうる。すなわち、アミノ酸残基は、特性が、とりわけ極性およびサイズに関して、化学的に類似しているアミノ酸残基で置き換えられる。保存的置換の例は、以下のグループのメンバー間での置き換えである：1) アラニン、セリン、およびスレオニン；2) アスパラギン酸およびグルタミン酸；3) アスパラギンおよびグルタミン；4) アルギニンおよびリジン；5) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリン；ならびに6) フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。他方、アミノ酸配列中に非保存的改変を導入することも可能である。加えて、単一のアミノ酸残基を置き換える代わりに、リファレンスリポカリン、好ましくはhTlcの一次構造のうちの1つまたは複数の連続アミノ酸を挿入または欠失させることも、それらの欠失または挿入が安定なフォールディングされた機能的なムテインをもたらす限りにおいて、可能である。そのようなムテインでは、例えば、ポリペプチドのN末またはC末において、1つまたは複数のアミノ酸残基を付加し、または欠失させる（例えばN末およびC末が切断されたhTlcムテイン）。一般にそのようなムテインは、hTlc (SEQ ID NO: 1) のアミノ酸配列に対して、およそ少なくとも70%、例えば少なくとも約80%、例えば少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有しうる。一具体例として、本開示は、成熟ヒト涙液リポカリンの配列のN末の最初の4アミノ酸残基 (His-His-Leu-Leu, SEQ ID NO: 55; 位置1～4) および/または成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列のC末の最後の2アミノ酸残基 (Ser-Asp; 位置157～158) を欠失させた、上に定義したhTlcムテイン (SEQ ID NO: 7～22) も包含する。

【0040】

本明細書において開示するリポカリンムテインのアミノ酸配列は、他のリポカリンとの配列同一性と比較した場合に、リファレンスリポカリン、好ましくはhTlcに対して高い配列同一性を有する。この一般的な状況において、本開示のリポカリンムテインのアミノ酸配列は、リファレンスリポカリンのアミノ酸配列に、少なくとも実質的に類似している。ただし、ギャップ（以下に定義する）が、アミノ酸の付加または欠失の結果としてアラインメント中に存在する可能性はある。リファレンスリポカリンの配列に実質的に類似する本開示のリポカリンムテインのそれぞれの配列は、いくつかの態様では、リファレンスリポカリンの配列に対して、少なくとも70%の同一性または配列相同性、少なくとも75%の同一性または配列相同性、少なくとも80%の同一性または配列相同性、少なくとも82%の同一性または配列相同性、少なくとも85%の同一性または配列相同性、少なくとも87%の同一性または配列相同性、または少なくとも90%の同一性もしくは配列相同性、例えば少なくとも95%の同一性または配列相同性を有する。ただし、改変された位置または配列

10

20

30

40

50

は保たれており、1つまたは複数のギャップが可能である。

【 0 0 4 1 】

本明細書において、本開示のリポカリンムテインは、それが、ある標的（例えばLAG-3）と1つまたは複数のリファレンス標的とを区別することができるのであれば、当該標的に「特異的に結合」する。結合特異性は絶対的特性ではなく相対的特性だからである。「特異的結合」は、例えばウェスタンプロット、ELISA試験、FACS、RIA (radioimmunoassay) 試験、ECL (electrochemiluminescence) 試験、免疫放射線測定法 (IRMA) 、IHC (ImmunoHistoChemistry) およびペプチドスキャンに従って決定することができる。

【 0 0 4 2 】

一態様において、本開示のリポカリンムテインは、そのN末および/またはそのC末において、ムテインの血清中半減期を延ばすタンパク質ドメインである融合パートナーに融合される。さらなる特定態様において、前記タンパク質ドメインは、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、またはアルブミン結合タンパク質である。

10

【 0 0 4 3 】

別の一態様において、本開示のリポカリンムテインは、ムテインの血清中半減期を延ばす化合物にコンジュゲートされる。より好ましくは、ムテインは、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロエチルデンプン (hydroethylstarch) 、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される化合物にコンジュゲートされる。

20

【 0 0 4 4 】

さらに別の一態様において、本開示は、本明細書において開示するリポカリンムテインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子に関する。本開示は該核酸分子を含有する宿主細胞を包含する。

【 0 0 4 5 】

A. LAG-3に特異的なリポカリンムテイン

一局面において、本開示は、ヒトLAG-3に結合するヒトリポカリンムテイン、およびそのようなムテインの有用な応用を提供する。本開示は、本明細書において記載するLAG-3結合タンパク質を作製する方法、ならびにそのようなタンパク質を含む組成物も提供する。本開示のLAG-3結合タンパク質およびその組成物は、試料中のLAG-3タンパク質を検出する方法において、または免疫応答を刺激もしくは阻害するための、対象におけるLAG-3の結合方法において、使用することができる。最後に本開示は、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラスII分子へのLAG-3の結合を阻害するために、LAG-3に対するリポカリンのムテインを使用する方法を提供する。本開示が提供する用途に付随するこれらの特徴を有するそのようなヒトリポカリンムテインが、以前に記載されたことはなかった。

30

【 0 0 4 6 】

1. LAG-3に特異的な例示的リポカリンムテイン

本開示の一態様は、 K_d を尺度として約500nM、300nM、100nM、15nM、10nM、1nM、さらにはそれ未満の、例えば0.36nMの親和性で、LAG-3、特にヒトLAG-3 (huLAG-3) に結合する能力を有するリポカリンムテインに関する。そのような親和性は、例えば、本質的に実施例5または実施例6に記載する表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析によって決定することができる。

40

【 0 0 4 7 】

別の一態様において、LAG-3結合性リポカリンムテインは、カニケイザルLAG-3 (cyLAG-3、SEQ ID NO:2) と交差反応してもよく、いくつかのさらなる態様では、 K_d を尺度として約160nM、120nM、30nM、20nM、10nM、さらにはそれ未満の、例えば9.3nMの親和性で、cyLAG-3 (SEQ ID NO:2) に結合する能力を有しうる。そのような親和性は、例えば、本質的に実施例6に記載するSPR分析によって決定することができる。

50

【 0 0 4 8 】

別の一態様において、本リポカリンムテインは、huLAG-3がトランスフェクトされたCHO細胞上のLAG-3に、約100nM以下、約50nM以下、約30nM以下、約10nM以下、約2nM以下のEC₅₀値で結合する能力を有する。EC₅₀値は、例えば、本質的に実施例8または実施例9に記載するように、蛍光活性化細胞選別(FACS)によって決定することができる。

【 0 0 4 9 】

本開示の別の一態様は、フィトヘマグルチニン(PHA)刺激末梢血単核球(PBMC)に結合する能力を有するリポカリンムテインを提供する。この結合は、例えば、本質的に実施例10に記載するように、FACS分析によって決定することができる。

【 0 0 5 0 】

いくつかの態様において、本リポカリンムテインは、MHCクラスII、例えば抗原提示細胞(APC)または腫瘍細胞上に発現するものへの、LAG-3の結合を阻害する能力を有する。阻害作用様式は、例えば、本質的に実施例11に記載するように、FACS分析によって決定することができる。

【 0 0 5 1 】

一局面において、本開示はLAG-3結合性hTlcムテインを提供する。

【 0 0 5 2 】

これに関連して、本開示は、K_dを尺度として約300nM以下、さらには約100nM以下の親和性で、LAG-3に結合する能力を有する、1つまたは複数のhTlcムテインを提供する。

【 0 0 5 3 】

いくつかの態様において、そのようなhTlcムテインは、hTlcの直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID NO:1)の位置14、25～34、36、48、52～53、55～58、60～61、66、79、85～86、101、104～106、108、110～112、114、121、140および153に対応する1つまたは複数の位置に変異アミノ酸残基を含む。

【 0 0 5 4 】

いくつかの特定態様において、そのようなhTlcムテインは、hTlcの直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID NO:1)の位置26～34、55～58、60～61、65、104～106および108に対応する1つまたは複数の位置に、変異アミノ酸残基を含有しうる。

【 0 0 5 5 】

さらなる特定態様において、そのようなhTlcムテインは、hTlcの直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID NO:1)の位置101、111、114および153に対応する1つまたは複数の位置に、変異アミノ酸残基をさらに含みうる。

【 0 0 5 6 】

いくつかのさらなる態様において、本hTlcムテインは、hTlcの直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID NO:1)の配列位置14、25～34、36、48、52～53、55～58、60～61、66、79、85～86、101、104～106、108、110～112、114、121、140および153に対応する1つまたは複数の配列位置に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または26個、さらにはそれ以上の変異アミノ酸残基を含むことができ、該ポリペプチドはLAG-3、特にhuLAG-3に結合する。

【 0 0 5 7 】

いくつかのさらなる態様において、本開示は、hTlcの直鎖ポリペプチド配列(SEQ ID N 0:1)との比較において、配列位置14、25～34、36、48、52～53、55～58、60～61、66、79、85～86、101、104～106、108、110～112、114、121、140、および153に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12個、さらにはそれ以上の変異アミノ酸残基を含むhTlcムテインであり、かつLAG-3、特にhLAG-3に結合する、ポリペプチドに関する。

【 0 0 5 8 】

いくつかの態様において、本開示によるリポカリンムテインは、ネイティブシスティン残基の、例えばセリン残基によるアミノ酸置換を、少なくとも1つ含みうる。いくつかの態

10

20

30

40

50

様において、本開示によるhTlcムテインは、位置61および/または153にあるネイティブシステイン残基の、セリン残基などの別のアミノ酸によるアミノ酸置換を含む。これとの関連において、システイン残基61および153によって形成される野生型涙液リポカリンの構造ジスルフィド結合 (Breustedt, et al., J Biol Chem, 2005参照) の(それぞれのナイープ核酸ライブラリーのレベルでの)除去が、安定にフォールディングされるだけでなく、所与の非天然リガンドに高い親和性で結合することもできるhTlcムテインを与えることがわかっていることに注意されたい。いくつかの特定態様において、本開示によるhTlcムテインは、アミノ酸置換Cys61 Ala、Phe、Lys、Arg、Thr、Asn、Gly、Gln、Asp、Asn、Leu、Tyr、Met、Ser、ProもしくはTrp、および/またはCys153 SerもしくはAlaを含む。そのような置換は、Cys61とCys153とを連結する天然ジスルフィド架橋の形成を防止するのに有用であり、よってムテインの取り扱いを容易にすることが判明している。ただし、LAG-3に結合し、かつCys61とCys153との間に形成されたジスルフィド架橋を有するhTlcムテインも、本発明の一部である。

【0059】

いくつかの態様では、構造ジスルフィド結合の排除により、本開示のムテインへの非天然人工ジスルフィド結合の(自発的)生成または計画的導入が可能になり、それによってムテインの安定性が増加するという、さらなる利点が得られる。例えば、いくつかの態様では、位置61、101および153にあるシステインコドンのうちの2つまたは3つすべてが、別のアミノ酸のコドンで置き換えられる。さらに、いくつかの態様において、本開示によるhTlcムテインは、位置101にあるネイティブシステイン残基の、セリン残基またはヒスチジン残基によるアミノ酸置換を含む。

【0060】

いくつかの態様において、本開示によるムテインは、hTlcのアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) に関して、位置28または105における、システイン残基によるネイティブアミノ酸のアミノ酸置換を含む。

【0061】

さらに、いくつかの態様において、本開示によるムテインは、hTlcのアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) に関して、位置111にあるネイティブアルギニン残基の、プロリン残基によるアミノ酸置換を含む。さらに、いくつかの態様において、本開示によるムテインは、hTlcのアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) に関して、位置114にあるネイティブリジン残基の、トリプトファン残基またはグルタミン酸によるアミノ酸置換を含む。

【0062】

いくつかの態様において、本開示によるLAG-3結合性hTlcムテインは、hTlcの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:1) の位置14、25~34、36、48、52~53、55~58、60~61、66、79、85~86、101、104~106、108、110~112、114、121、140、および153に対応する1つまたは複数の位置に、以下の変異アミノ酸残基のうちの1つまたは複数を含む:Ser 14 Pro; Asp 25 Ser; Arg 26 Ser、Phe、Gly、Ala、AspまたはGlu; Glu 27 Asp、ValまたはThr; Phe 28 CysまたはAsp; Pro 29 Phe、LeuまたはTrp; Glu 30 Trp、AsnまたはTyr; Met 31 Ile, Val、Asp、LeuまたはTyr; Asn 32 Asp、Glu、Tyr、Trp、Val、ThrまたはMet; Leu 33 Asp、GluまたはPro; Glu 34 Val、TrpまたはHis; Val 36 Ala; Asn 48 Asp; Lys 52 Glu、Ser、ArgまたはAsn; Val 53 Ala; Met 55 AlaまたはVal; Leu 56 Asp、GlnまたはAsn; Ile 57 Leu; Ser 58 Phe、TrpまたはAsp; Arg 60 PheまたはGlu; Cys 61 Trp、Pro、LeuまたはTrp; Ala 66 Asn; Ala 79 Glu; Val 85 Ala; Ala 86 Asp; Cys 101 SerまたはPhe; Glu 104 Tyr; Leu 105 CysまたはGly; His 106 Ala、Glu、Thr、Tyr、GlnまたはVal; Lys 108 Tyr、Phe、ThrまたはTrp; Val 110 GlyまたはAla; Arg 111 Pro; Gly 112 MetまたはThr; Lys 114 TrpまたはAla; Lys 121 Thr; Ser 140 GlyおよびCys 153 Ser。いくつかの態様において、本開示によるhTlcムテインは、hTlc (SEQ ID NO:1) のこれらの配列位置における変異アミノ酸残基を、2個以上、例えば3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個、さらにはそれ以上、例えば13、14、15、16

10

20

30

40

50

、17、18、19、20、21、22、23、24、25もしくは26個、またはすべて含む。

【0063】

いくつかのさらなる態様において、LAG-3結合性hTlcムテインは、hTlcの直鎖ポリペプチド配列（SEQ ID NO:1）との比較において、以下のアミノ酸置換の組のうちの1つを含む。

(a) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg

60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(b) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Asn; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Ala; Gly 112 → Thr; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;

(c) Arg 26 → Phe; Glu 27 → Val; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Tyr; Met 31 → Asp; Asn 32 → Val; Leu 33 → Pro; Leu 56 → Gln; Ser 58 → Trp; Arg 60 → Glu; Cys 61 → Leu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Tyr; Leu 105 → Cys; His 106 → Val; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(d) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Thr; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Trp; Glu 30 → Trp; Met 31 → Tyr; Asn 32 → Val; Leu 33 → Asp; Glu 34 → His; Leu 56 → Asn; Ile 57 → Leu; Ser 58 → Trp; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Gln; Lys 108 → Trp; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(e) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Asp; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(f) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(g) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Val 36 → Ala; Asn 48 → Asp; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Val 85 → Ala; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 140 → Gly; Cys 153 → Ser;

(h) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Glu; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

10

20

30

40

50

- (i) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Ile; Asn 32 → Glu; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Trp; Val 36 → Ala; Lys 52 → Glu; Val 53 → Ala; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;
- (j) Arg 26 → Ser; Glu 27 → Asp; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Phe; Glu 30 → Trp; Met 31 → Val; Asn 32 → Asp; Leu 33 → Glu; Glu 34 → Val; Leu 56 → Asp; Ser 58 → Phe; Arg 60 → Phe; Cys 61 → Trp; Cys 101 → Ser; Leu 105 → Cys; His 106 → Ala; Lys 108 → Phe; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser; 10
- (k) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Trp; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Tyr; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;
- (l) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Ala; Phe 28 → Asp; Met 31 → Leu; Asn 32 → Val; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Ala; Gly 112 → Thr; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr; 20
- (m) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Asp; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr;
- (n) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Glu; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Thr; Lys 52 → Ser; Met 55 → Ala; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr; 30
- (o) Ser 14 → Pro; Asp 25 → Ser; Arg 26 → Gly; Phe 28 → Asp; Asn 32 → Met; Lys 52 → Arg; Met 55 → Val; Ser 58 → Asp; Ala 66 → Asn; Ala 79 → Glu; Ala 86 → Asp; Cys 101 → Phe; Leu 105 → Gly; His 106 → Gln; Lys 108 → Thr; Val 110 → Gly; Gly 112 → Met; Lys 114 → Ala; Lys 121 → Thr; または
- (p) Arg 26 → Phe; Glu 27 → Val; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Leu; Glu 30 → Asn; Met 31 → Asp; Asn 32 → Tyr; Leu 33 → Pro; Leu 56 → Gln; Ser 58 → Trp; Arg 60 → Glu; Cys 61 → Pro; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Tyr; Leu 105 → Cys; His 106 → Thr; Lys 108 → Tyr; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser 40

【 0 0 6 4 】

残りの領域、すなわち配列位置14、25～34、36、48、52～53、55～58、60～61、66、79、85～86、101、104～106、108、110～112、114、121、140および153とは異なる領域において、本開示のhTlcムテインは、変異アミノ酸配列位置外では、野生型（天然）アミノ酸配列を含みうる。

【 0 0 6 5 】

さらなる態様において、本開示によるhTlcムテインは、hTlcの配列（SEQ ID NO:1）に対して、少なくとも70%の配列同一性または少なくとも70%の配列相同性を有する。具体例としてSEQ ID NO:14のムテインは、hTlcのアミノ酸配列（SEQ ID NO:1）に対し

て、約86%のアミノ酸配列同一性または配列相同意を有する。

【0066】

さらなる特定態様において、本開示のhTlcムテインは、SEQ ID NO:7～22のいずれか1つに示すアミノ酸配列、またはそのフラグメントもしくは変異体を含む。

【0067】

さらなる特定態様において、本開示のhTlcムテインは、SEQ ID NO:7～22からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%またはそれ以上の配列同一性を有する。

【0068】

本開示は、SEQ ID NO:7～22からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するhTlcムテインの構造ホログで、該hTlcムテインとの関係において約60%超、好ましくは65%超、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、92%超、最も好ましくは95%超のアミノ酸配列相同意または配列同一性を有する構造ホログも包含する。

10

【0069】

本開示によるhTlcムテインは、天然型のhTlc (SEQ ID NO: 1)の突然変異誘発を使って得ることができる。突然変異誘発のいくつかの態様において、置換（すなわち置き換え）は保存的置換である。しかしながら、リポカリンムテインがLAG-3に結合するその能力を保っており、かつ/または、それが、hTlcのアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 1)に対する少なくとも60%、例えば少なくとも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%またはそれ以上の配列同一性であるという点においてその時置換される配列に対して配列同一性を有する限り、非保存的置換、または下記の例示的置換からの1つまたは複数を含む、任意の置換が想定される。

20

【0070】

いくつかの特定態様において、本開示は、KDを尺度として約15nM以下の親和性でヒトLAG-3に結合するリポカリンムテインで、SEQ ID NO:11～13および21のいずれか1つのアミノ酸配列に対して少なくとも90%またはそれ以上、例えば95%の配列同一性を有するリポカリンムテインを提供する。

30

【0071】

2. LAG-3に特異的なリポカリンムテインの応用

本開示のLAG-3結合性リポカリンムテインには、医学において、数多くの可能な応用が存在する。

30

【0072】

さらなる一局面において、本開示は、試料中のLAG-3を検出するための、本明細書に開示するLAG-3結合性リポカリンムテインの使用、およびそれぞれの診断方法に関する。

【0073】

本開示は、LAG-3との複合体形成のための、ここに記載する1つまたは複数のLAG-3結合性リポカリンムテインの使用にも関係する。

【0074】

それゆえに、本開示の別の一局面において、本開示のリポカリンムテインは、LAG-3の検出に使用される。そのような使用は、1つまたは複数のムテインを、適切な条件下で、LAG-3を含有すると疑われる試料と接触させ、それによってムテインとLAG-3との間の複合体の形成を可能にする工程、および適切なシグナルによって複合体を検出する工程を含みうる。上で説明したように、検出可能なシグナルは、標識によって引き起こされるか、結合、すなわち複合体形成そのものによる物理的特性の変化によって引き起こされうる。一例は表面プラズモン共鳴であり、その値は、結合パートナー同士（そのうちの一方は、金箔などの表面に固定化されている）の結合中に変化する。

40

【0075】

本明細書において開示するLAG-3結合性リポカリンムテインは、LAG-3の分離にも使用しうる。そのような使用は、1つまたは複数のムテインを、適切な条件下で、LAG-3を含有すると思われる試料と接触させ、それによって、ムテインとLAG-3との間の複合体の形成

50

を可能にする工程、および複合体を試料から分離する工程を含みうる。

【 0 0 7 6 】

LAG-3の検出およびLAG-3の分離のための、本開示のムテインの使用では、ムテインおよび/もしくはLAG-3、またはそれらのドメインもしくはフラグメントを、適切な固相上に固定化しうる。

【 0 0 7 7 】

さらに別の局面において、本開示は、本開示によるLAG-3結合性リポカリンムテインを含む診断キットまたは分析キットを特徴とする。

【 0 0 7 8 】

さらに別の局面において、本開示では、診断におけるそれらの使用に加えて、本開示のムテインと薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物も考えられる。

10

【 0 0 7 9 】

さらにまた、本開示は、抗がん作用物質および/または免疫調節物質として使用するための、LAG-3に結合するヒトリポカリンムテインを提供する。したがって、LAG-3に結合するそのような本開示のリポカリンムテインは、がん、感染性疾患、および自己免疫疾患などのヒト疾患を処置または予防する方法において使用されることが想定される。したがって、がん、感染性疾患、および自己免疫疾患などのヒト疾患を処置または予防する必要がある対象において該ヒト疾患を処置または予防する方法であって、治療有効量の、LAG-3に結合する本発明のリポカリンムテインを、対象に投与する工程を含む方法も提供される。

【 0 0 8 0 】

20

B. 本開示のリポカリンムテイン

リポカリンは、リガンドに結合するように自然に進化したタンパク質結合分子である。リポカリンは、脊椎動物、昆虫、植物および細菌を含む多くの生物に見いだされる。リポカリンタンパク質ファミリーのメンバー (Pervaiz and Brew, FASEB J, 1987) は、典型的には、小さな分泌タンパク質であり、単一のポリペプチド鎖を有する。それらは一連の異なる分子認識特性、すなわち、さまざまなものとして疎水性の小分子（レチノイド、脂肪酸、コレステロール、プロスタグラジン、ビリベルジン、フェロモン、味物質、およびにおい物質など）への、および特異的細胞表面受容体へのそれらの結合、ならびにそれらの高分子複合体形成によって特徴づけられる。リポカリンは以前は主に輸送タンパク質として分類されていたが、リポカリンはさまざまな生理学的機能を果たすことが、現在では明らかになっている。それらには、レチノール輸送、嗅覚、フェロモンシグナリング、およびプロスタグラジンの合成における役割が含まれる。リポカリンは、免疫応答の制御および細胞ホメオスタシスの媒介にも関係づけられている（例えばFlower et al., *Biochim Biophys Acta*, 2000, Flower, *Biochem J*, 1996に概説されている）。

30

【 0 0 8 1 】

リポカリンが共有する全体的配列保存のレベルは異常に低く、多くの場合、配列同一性は20%未満である。それとは著しく対照的に、それらの全体的フォールディングパターンは高度に保存されている。リポカリン構造の中心的部分は、一周して閉じることで途切れなく水素結合した バレルを形成する単一の8ストランド逆平行 シートからなる。このバレルは中心に空洞を形成する。バレルの一端は、その底を横切るN末端ペプチドセグメントおよび ストランドを接続する3つのペプチドループによって、立体的にロックされている。 バレルの他端は溶媒に向かって開いており、4つのフレキシブルなペプチドループによって形成される標的結合部位を包含する。サイズ、形状、および化学的特徴が異なる標的を収容する能力をそれぞれが有するさまざまな結合様式を生じさせるのは、他の点では剛直なリポカリンスキャフォールドにおけるループの多様性である（例えばFlower et al., *Biochim Biophys Acta*, 2000, Flower, *Biochem J*, 1996に概説されている）。

40

【 0 0 8 2 】

LAG-3に結合する本開示のリポカリンムテインに関する本明細書において使用する場合、「に特異的」という用語は、当該リポカリンムテインが、LAG-3に向けられていること、LAG-3に結合すること、またはLAG-3と反応することを包含する。したがって、向けら

50

れていること、結合すること、または反応することは、当該リポカリンムテインがLAG-3に特異的に結合することを包含する。この文脈において「特異的に」という用語は、当該リポカリンムテインが、本明細書に記載するようにLAG-3タンパク質とは反応するが、他のタンパク質とは本質的に反応しないことを意味する。「他のタンパク質」という用語は、本明細書に開示するリポカリンが向けられているLAG-3と近縁または相同であるタンパク質を含む任意の非LAG-3タンパク質を包含する。しかし、ヒト以外の種、例えば「対象」の定義に関連して記載した種からのLAG-3タンパク質、フラグメントおよび/または変異体が、用語「他のタンパク質」によって除外されることはない。「本質的に結合しない」という用語は、本開示のリポカリンムテインが他のタンパク質に結合しないこと、すなわち30%未満、好ましくは20%未満、より好ましくは10%未満、特に好ましくは9、8、7、6または5%未満の交差反応性を示すことを意味する。リポカリンが本明細書において上に定義したように特異的に反応するかどうかは容易に、なかんずく、本開示のリポカリンムテインのLAG-3との反応と、該リポカリンの他のタンパク質との反応とを比較することによって、試験することができる。「特異的結合」は、例えばウェスタンプロット、ELISA、RIA、ECL、IRMA、FACS、IHCおよびペプチドスキャンに従って決定することもできる。10

【 0 0 8 3 】

本開示によるリポカリンムテインのアミノ酸配列は、他のリポカリンとのそのようなムテインの配列同一性と比較すると、リファレンスリポカリン、例えばhTlcに対して高い配列同一性を有する。この一般的な状況において、本発明による組み合わせのリポカリンムテインのアミノ酸配列は、対応する野生型リポカリンまたはリファレンスリポカリンのアミノ酸配列に、少なくとも実質的に類似している。対応するリファレンスリポカリンの配列に実質的に類似している本開示による組み合わせのリポカリンムテインのそれぞれの配列は、対応するリポカリンの配列に対して少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも82%、少なくとも85%、少なくとも87%、少なくとも90%の同一性、例えば少なくとも95%の同一性を有する。この点に関して、もちろん、本開示のリポカリンムテインは、比較すると、LAG-3に結合する能力を当該リポカリンムテインに与える本明細書に記載の置換を含有しうる。典型的には、リポカリンのムテインは、リファレンスリポカリンの配列と比較して、リポカリンのリガンド結合部位の開放端にある4つのループ（上記参照）中のアミノ酸の突然変異を、1つまたは複数含む。上で説明したとおり、これらの領域は、所望の標的に対するリポカリンムテインの結合特異性を決定するのに不可欠である。20

【 0 0 8 4 】

本開示のムテインは、リポカリンの標的結合部位を形成する4つのフレキシブルなペプチドループ外の領域にも突然変異を含有しうる。例えば本開示のムテインは、リポカリンの閉鎖端でストランドをつないでいる3つのペプチドループ（BC、DE、およびFGと呼ばれるもの）のうちの1つまたは複数に、1つまたは複数の突然変異を含有しうる。具体例として、涙液リポカリンまたはそれらのホモログのポリペプチドから誘導されるムテインは、N末端領域中および/または天然のリポカリン結合ポケットとは反対の位置にあるバレル構造の端部に配置された3つのペプチドループBC、DE、およびFG中の任意の配列位置に、1つ、2つ、3つ、4つまたはそれ以上の変異アミノ酸残基を有しうる。さらなる具体例として、涙液リポカリンまたはそのホモログのポリペプチドから誘導されるムテインは、涙液リポカリンの野生型配列と比較して、バレル構造の端部に配置されたペプチドループDE中に変異アミノ酸残基を有さなくてもよい。30

【 0 0 8 5 】

本開示によるリポカリンムテインは、そのようなリポカリンムテインがLAG-3に結合する能力を有するという条件の下で、対応するネイティブリポカリンと比較して、1つまたは複数の置換、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19個、またはさらに20個の置換を含む。例えば、リポカリンムテインは、例えばhTlcの野生型配列を有する野生型リポカリンの特異な位置に対応する位置（すなわち対応40

位置)に、置換を有することができる。いくつかの態様において、本開示による組み合わせのリポカリンムテインは、アルギニン残基によるネイティブアミノ酸のアミノ酸置換を、少なくとも2つ、例えば2、3、4、5個、またはさらにそれ以上含む。したがって、本明細書に記載する「リファレンスタンパク質」スキヤフォールドの核酸は、LAG-3に結合する能力を有するリポカリンムテインを生成させることを目的とする突然変異誘発の対象である。

【0086】

また、本開示のリポカリンムテインは、リポカリンムテインの生物学的活性(その標的、例えばLAG-3への結合)に影響を及ぼすことなく、そのN末端またはC末端に、好ましくはC末端に、SEQ ID NO:23などの異種アミノ酸配列、例えばStrep-tag II配列を含むことができる。

10

【0087】

同様に、本開示のリポカリンムテインは、それぞれの野生型涙液リポカリンと比較して、そのN末端の1、2、3、4個、もしくはそれ以上のアミノ酸、および/またはそのC末端の1、2個、もしくはそれ以上のアミノ酸を欠いてもよい。例えばSEQ ID NO:7~22。

【0088】

いくつかの態様において、置換(すなわち置き換え)は保存的置換である。しかしながら、リポカリンムテインがLAG-3に結合するその能力を保っており、かつ/または、それが、「リファレンス配列」と少なくとも60%、例えば少なくとも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%またはそれ以上同一であるという点においてその時置換される配列に対して同一性を有する限り、非保存的置換、または以下に列挙する例示的置換からの1つまたは複数を含む、任意の置換が想定される。

20

【0089】

保存的置換は、一般に、変異させるアミノ酸別に列挙し、それぞれの後に、保存的であると解釈することができる1つまたは複数の置き換えを記した以下の置換:

Ala → Gly, Ser, Val; Arg → Lys; Asn → Gln, His; Asp →

Glu; Cys → Ser; Gln → Asn; Glu → Asp; Gly → Ala; His → Arg, Asn, Gln; Ile → Leu, Val; Leu → Ile, Val; Lys → Arg, Gln, Glu; Met → Leu, Tyr, Ile; Phe → Met, Leu, Tyr; Ser → Thr; Thr → Ser; Trp → Tyr; Tyr → Trp, Phe; Val → Ile, Leu

30

である。他の置換も許容され、それらは実験的に決定することができるか、または他の公知の保存的もしくは非保存的置換に一致しうる。さらなる指針として、以下の8つのグループは、それが、典型的には互いに保存的置換を規定すると解釈することができるアミノ酸を含んでいる:

- a.アラニン(Ala)、グリシン(Gly);
- b.アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu);
- c.アスパラギン(Asn)、グルタミン(Gln);
- d.アルギニン(Arg)、リジン(Lys);
- e.イソロイシン(Ile)、ロイシン(Leu)、メチオニン(Met)、バリン(Val);
- f.フェニルアラニン(Phe)、チロシン(Tyr)、トリプトファン(Trp);
- g.セリン(Ser)、スレオニン(Thr)、および
- h.システイン(Cys)、メチオニン(Met)。

40

【0090】

そのような置換が生物学的活性の変化をもたらすのであれば、例えば以下のような、またはアミノ酸クラスに関してさらに後述するような、より実質的な変化を導入して、その生成物を所望の特徴についてスクリーニングしてもよい。そのようなより実質的な変化の例は、

50

Ala → Leu, Ile; Arg → Gln;

Asn → Asp, Lys, Arg, His; Asp → Asn; Cys → Ala; Gln → Glu; Glu → Gln; His → Lys; Ile → Met, Ala, Phe; Leu → Ala, Met, ノルロイシン; Lys → Asn; Met → Phe; Phe → Val, Ile, Ala; Trp → Phe; Tyr → Thr, Ser; Val → Met, Phe, Ala

である。

【 0 0 9 1 】

リポカリンの生物学的特性の実質的修飾は、(a) 置換領域中のポリペプチド主鎖の、例え
10 ばシートまたはらせんコンフォメーションなどの構造、(b) 標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または(c) 側鎖の嵩高さ、を維持するその効果が、著しく異なる置換を選択することによって実現される。天然残基は、共通する側鎖の特性に基づいてグループ分けすることができる：(1) 疎水性：ノルロイシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン；(2) 中性親水性：システイン、セリン、スレオニン；(3) 酸性：アスパラギン酸、グルタミン酸；(4) 塩基性：アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン；(5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：グリシン、プロリン；および(6) 芳香族：トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン。

【 0 0 9 2 】

非保存的置換ではこれらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスに交換することになるであろう。それぞれのリポカリンの適正なコンフォメーションの維持に関与しない任意のシステイン残基も、分子の酸化安定性を改善し、異常な架橋を防止するために、一般的にはセリンで置換しうる。逆に、リポカリンには、その安定性を改善するために、システイン結合を加えてよい。

【 0 0 9 3 】

突然変異は、上で考察した挿入を含めていずれも、確立された標準的方法を使って、核酸レベルで、例えはDNAレベルで、極めて容易に実現することができる。アミノ酸配列の改変の具体例は、挿入または欠失、ならびにアミノ酸置換である。そのような置換は保存的でありうる。すなわち、アミノ酸残基は、特性が、とりわけ極性およびサイズに関して、化学的に類似する特性を持つアミノ酸残基で置き換えられる。保存的置換の例は、以下のグループのメンバー間での置き換えである：1) アラニン、セリン、およびスレオニン；2) アスパラギン酸およびグルタミン酸；3) アスパラギンおよびグルタミン；4) アルギニンおよびリジン；5) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリン；ならびに6) フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。他方、アミノ酸配列中に非保存的改変を導入することも可能である。加えて、単一のアミノ酸残基を置き換える代わりに、涙液リポカリンの一次構造のうちの1つまたは複数の連續アミノ酸を挿入または欠失させることも、それらの欠失または挿入が安定なフォールディングされた／機能的ムテインをもたらす限りにおいて、可能である。

【 0 0 9 4 】

アミノ酸配列の修飾には、一定の制限酵素のための切断部位を組み入れることによって変異リポカリン遺伝子またはそのパートのサブクローニングを簡単にするための、単一アミノ酸位置の指定突然変異誘発が含まれる。加えて、LAG-3などの所与の標的に対するリポカリンムテインの親和性をさらに改善するために、これらの突然変異を組み入れることもできる。さらにまた、必要であれば、フォールディング安定性、血清中安定性、タンパク質耐性または水溶性を改善するため、または凝集傾向を低減するためなど、ムテインの一定の特徴を調節するために、突然変異を導入することができる。例えばジスルフィド架橋形成を防止するために天然のシステイン残基を他のアミノ酸に変異させることができる。例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、ビオチン、ペプチドまたはタンパク質などの他の化合物へのコンジュゲーションのために、または非天然のジスルフィド連結を形成させるために、新しい反応性基を導入する目的で、計画的に他のアミノ酸配列位置をシステインに変異させることも可能である。生成したチオ

10

20

30

40

50

ール部分は、例えばそれぞれのリポカリンムテインの血清中半減期を増加させる目的で、ムテインをPEG化またはHES化するために使用しうる。hTlcムテインのアミノ酸配列中にシステイン残基を導入するためのそのような突然変異の例示的選択肢には、置換Thr40 Cys、Glu73 Cys、Arg90 Cys、Asp95 Cys、およびGlu131 Cysが含まれる。アミノ酸位置40、73、90、95および/または131のいずれかの側部に生成したチオール部分は、例えばそれぞれのhTlcムテインの血清中半減期を増加させる目的で、ムテインをPEG化またはHES化するために使用しうる。

【0095】

いくつかの態様において、上記部分の1つを本開示のリポカリンムテインにコンジュゲートするのであれば、アミノ酸側鎖へのコンジュゲーションが有利である。適切なアミノ酸側鎖は、ヒトリポカリンのアミノ酸配列中に天然に存在するか、突然変異誘発によって導入することができる。適切な結合部位を突然変異誘発によって導入する場合、選択肢の1つは、適当な位置にあるアミノ酸のシステイン残基による置き換えである。例えばそのような突然変異には、ヒト涙液リポカリンの野生型配列におけるThr40 Cys、Glu73 Cys、Arg90 Cys、Asp95 CysまたはGlu131 Cys置換のうちの少なくとも1つが含まれる。これらの位置のいずれかに新しく作出されたシステイン残基は、次に、ムテインの血清中半減期を延ばす部分、例えばPEGまたはその活性化誘導体にムテインをコンジュゲートするために、利用することができる。

【0096】

別の一態様では、上記化合物の1つを本開示のリポカリンムテインにコンジュゲートするために適切なアミノ酸側鎖を提供する目的で、人工アミノ酸を突然変異誘発によって導入することができる。一般に、そのような人工アミノ酸は、より高い反応性を持ち、よって所望の化合物へのコンジュゲーションを容易にするように設計される。人工tRNAによって導入されうるそのような人工アミノ酸の一例は、パラアセチルフェニルアラニンである。

【0097】

本明細書に開示するムテインのいくつかの応用には、それらを融合タンパク質の形態で使用することが有利でありうる。いくつかの態様において、本開示のリポカリンムテインは、そのN末またはそのC末でタンパク質、タンパク質ドメインまたはペプチド、例えばシグナル配列および/またはアフィニティータグに融合される。

【0098】

Strep-tagまたはStrep-tag II (Schmidt et al., J Mol Biol, 1996)、c-mycタグ、FLAGタグ、HisタグまたはHAタグなどのアフィニティータグ、またはグルタチオン-S-トランسفェラーゼなどのタンパク質は、組換えタンパク質の容易な検出および/または精製を可能にし、これらは適切な融合パートナーのさらなる例である。最後に、発色性または蛍光性を持つタンパク質、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP) または黄色蛍光タンパク質 (YFP) も、本開示のリポカリンムテインにとって適切な融合パートナーである。

【0099】

一般に、本開示のリポカリンムテインは、化学的、物理的、光学的、または酵素的反応において検出可能な化合物またはシグナルを直接的または間接的に生成する任意の適当な化学物質または酵素で、標識することが可能である。物理的反応の、そして同時に光学的反応/マーカーの、一例は、照射時の蛍光の放射、または放射性標識を使った場合のX線の放射である。アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼは、発色性反応生成物の形成を触媒する酵素標識（同時に光学的標識）の例である。一般に、抗体によく使用される標識は（もっぱら免疫グロブリンのFc部分中の糖部分と共に使用するものを除けば）すべて、本発明のリポカリンムテインへのコンジュゲーションにも使用することができる。本発明のリポカリンムテインは、任意の適切な治療活性作用物質と、そのような作用物質を所与の細胞、組織または器官に標的送達するために、または、周囲の正常細胞に影響を及ぼすことなく細胞（例えば腫瘍細胞）を選択的にターゲティングするために、コンジュゲートすることもできる。そのような治療活性作用物質の例には、放射性核種、毒素、小有機分子および治療ペプチド（例えば細胞表面受容体の

10

20

30

40

50

アゴニスト/アンタゴニストとして作用するペプチド、または所与の細胞標的上のタンパク質結合部位に関して競合するペプチド)が包含される。ただし、本開示のリポカリンムテインは、治療上活性な核酸、例えばアンチセンス核酸分子、低分子干渉RNA、マイクロRNAまたはリボザイムなどとコンジュゲートすることもできる。そのようなコンジュゲートは当技術分野において周知の方法によって生産することができる。

【0100】

上記のように、本開示のリポカリンムテインは、いくつかの態様において、ムテインの血清中半減期を延ばす部分にコンジュゲートされうる(これについては、そのようなコンジュレーション戦略がCTLA-4に対する結合親和性を有するヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(hNGAL)のムテインに関して記述されている国際特許出願公開WO 2006/056464も参照されたい)。血清中半減期を延ばす部分は、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロキシエチルデンブン、脂肪酸分子、例えばパルミチン酸(Vajo and Duckworth, Pharmacol Rev, 2000)、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、またはアルブミン結合タンパク質、トランスフェリンでありうるが、これらはほんの一例にすぎない。アルブミン結合タンパク質は、細菌のアルブミン結合タンパク質、抗体、ドメイン抗体を含む抗体フラグメント(例えば米国特許第6,696,245号)、またはアルブミンに対する結合活性を持つリポカリンムテインでありうる。したがって、本開示のリポカリンムテインの半減期を延ばすための適切なコンジュレーションパートナーには、アルブミン結合タンパク質、例えば細菌のアルブミン結合ドメイン、例えば連鎖球菌プロテインGのもの(Konig and Skerra, J Immunol Methods, 1998)が包含される。コンジュレーションパートナーとして使用することができるアルブミン結合ペプチドの他の例は、例えば、米国特許出願公開第2003/0069395号またはDennisら(Biol Chem, 2002)に記載されている、Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cysコンセンサス配列を有するものであり、ここで、Xaa₁はAsp、Asn、Ser、Thr、またはTrpであり、Xaa₂はAsn、Gln、His、Ile、Leu、またはLysであり、Xaa₃はAla、Asp、Phe、Trp、またはTyrであり、Xaa₄はAsp、Gly、Leu、Phe、Ser、またはThrである。

【0101】

別の態様では、アルブミンそのもの(Osborn et al., J Pharmacol Exp Ther, 2002)またはアルブミンの生物学的活性フラグメントを、本開示のリポカリンムテインのコンジュレーションパートナーとして使用することができる。「アルブミン」という用語は、すべての哺乳動物アルブミン、例えばヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンまたはラットアルブミンを包含する。アルブミンまたはそのフラグメントは、米国特許第5,728,553号または欧州特許出願EP 0330451およびEP 0361991に記載されているように組換え生産することができる。組換えヒトアルブミン(例えばNovozymes Delta Ltd., 英国ノッティンガムの、Recombumin(登録商標))を、ムテインの半減期を延ばすために、本開示のリポカリンムテインにコンジュゲートまたは融合することができる。

【0102】

アルブミン結合タンパク質が抗体フラグメントである場合、それはドメイン抗体でありうる。ドメイン抗体(dAb)は、最適な安全性および効力製品プロファイルを作出するために、生物物理学的特性およびインビオ半減期の正確なコントロールが可能になるように操作される。ドメイン抗体は例えばDomantis Ltd.(英国ケンブリッジおよび米国マサチューセッツ州)から市販されている。

【0103】

本開示のリポカリンムテインの血清中半減期を延ばすための部分としてトランスフェリンを使用する場合は、ムテインを非グリコシル化トランスフェリンのN末、C末またはその両方に遺伝子融合することができる。非グリコシル化トランスフェリンは14~17日の半減期を有し、トランスフェリン融合タンパク質も同様に延長された半減期を有するであろう。トランスフェリン担体は、高いバイオアベイラビリティ、体内分布および循環安定性も提供する。この技術は、BioRexis(BioRexis Pharmaceutical Corporation、米国ペ

10

20

30

40

50

ンシルバニア州)から市販されている。タンパク質安定剤/半減期延長パートナーとして使用するための組換えヒトトランスフェリン(DeltaFerrin(商標))も、Novozymes Ltd.(英国ノッティンガム)から市販されている。

【0104】

本開示のリポカリンムテインの血清中半減期を延ばす目的で免疫グロブリンのFc部分を使用する場合は、Syntonix Pharmaceuticals, Inc(米国マサチューセッツ州)から市販されているSynFusion(商標)技術を使用しうる。このFc融合物技術の使用は、より長時間作用する生物製剤の作出を可能にし、例えば、薬物動態、溶解度、および生産効率を改善するために抗体のFc領域に連結された2コピーのムテインからなりうる。

【0105】

本開示のリポカリンムテインの半減期を延ばすためのさらにもう一つの代替策は、ムテインのN末またはC末に、構造化されていない長いフレキシブルなグリシンリッチ配列(例えば約20~80個の連続するグリシン残基を持つポリグリシン)を融合することである。例えば国際特許出願公開WO2007/038619に開示されているこのアプローチは、「rPEG」(組換えPEG)とも呼ばれている。

10

【0106】

PEGをコンジュゲーションパートナーとして使用する場合、このポリアルキレングリコールは、置換、無置換、直鎖または分岐鎖であることができる。また、それは活性化ポリアルキレン誘導体であることもできる。適切な化合物の例は、インターフェロンとの関係において国際特許出願公開WO 99/64016、米国特許第6,177,074号または米国特許第6,403,564号に記載されているPEG分子、または他のタンパク質、例えばPEG修飾アスパラギナーゼ、PEG-アデノシンデアミナーゼ(PEG-ADA)またはPEG-スーパーオキシドジスマターゼに関して記載されているポリエチレングリコール(PEG)分子である(Fuertges and Abuchowski, Journal of Controlled Release, 1990)。PEGのようなポリマーの分子量は、例えば約10,000、約20,000、約30,000または約40,000ダルトンの分子量を持つポリエチレングリコールなど、約300~約70,000ダルトンの範囲に及びうる。さらに、例えば米国特許第6,500,930号または同第6,620,413号に記載されているように、糖質オリゴマーおよび糖質ポリマー、例えばHESを、血清中半減期を延ばす目的で、本開示のムテインにコンジュゲートすることができる。

20

【0107】

加えて、本明細書において開示するリポカリンムテインは、本開示のリポカリンムテインに、酵素活性または他の標的に対する結合親和性などの新しい特徴を付与しうる部分に融合しうる。適切な融合パートナーの例は、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、プロテインGのアルブミン結合ドメイン、プロテインA、抗体もしくは抗体フラグメント、オリゴマー化ドメインまたは毒素である。

30

【0108】

特に、結果として生じる融合タンパク質の両方の「構成要素」が所与の治療標的に一緒に作用するように、本明細書において開示するリポカリンムテインを、独立した酵素活性部位と融合することが可能であるだろう。リポカリンムテインの結合ドメインを疾患原因標的に結合することで、酵素ドメインが標的の生物学的機能を無効にすることを可能にする。

40

【0109】

本開示は、本開示のリポカリンムテインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子(DNAおよびRNA)にも関係する。遺伝コードの縮重は、同じアミノ酸を指定する別のコドンによる一定のコドンの置換を可能にするので、本開示は、リポカリンムテインをコードする本明細書記載の具体的な核酸分子に限定されず、機能的ムテインをコードするヌクレオチド配列を含むすべての核酸分子を包含する。この点に関して、本開示は、SEQ ID NO:23~38および39~54に示す、いくつかの本開示のリポカリンムテインをコードするヌクレオチド配列を提供する。

【0110】

50

本開示による方法の別の一態様では、hTlcをコードする核酸分子をまず、hTlcの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:1) のアミノ酸配列位置14、25～34、36、48、52～53、55～58、60～61、66、79、85～86、101、104～106、108、110～112、114、121、140および153のうちの1つまたは複数における突然変異誘発に供する。次に、ヒト涙液リポカリンをコードする核酸分子を、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置101、111、114および153のうちの1つまたは複数における突然変異誘発にも供する。

【0111】

本開示は、表示した実験的突然変異誘発の配列位置以外に追加の突然変異を含む、本開示のリポカリンムテインをコードする核酸分子も包含する。そのような突然変異は許容されることが多い、例えばそれらがムテインのフォールディング効率、血清中安定性、熱安定性、処方安定性またはリガンド結合親和性の改善に寄与するのであれば、有利であると判明する場合さえある。10

【0112】

本願において開示する核酸分子は、この核酸分子の発現を可能にするための1つ（または複数の）制御配列に「機能的に連結され」うる。

【0113】

DNAなどの核酸分子は、それが、転写制御および/または翻訳制御に関する情報を含有する配列要素を含み、そのような配列がポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に「機能的に連結され」ているのであれば、「核酸分子を発現する能力を有する」または「ヌクレオチド配列の発現を可能にする」能力を有するという。機能的連結とは、制御配列要素と発現すべき配列とが遺伝子発現を可能にするような形で接続されている連結である。遺伝子発現に必要な制御領域の正確な性質は種間で変動しうるが、一般にこれらの領域はプロモーターを含み、原核生物の場合、それは、プロモーターそのもの、すなわち転写の開始を指示するDNA要素と、RNAに転写されたときに翻訳開始のシグナルを出すことになるDNA要素との両方を含有する。そのようなプロモーター領域は通常、転写および翻訳の開始に関する5'非コード配列、例えば原核生物における-35/-10ボックスおよびシャイン・ダルガノ配列、または真核生物におけるTATAボックス、CAAT配列、および5'キャッピング要素を含む。これらの領域は、エンハンサー要素またはリプレッサー要素、ならびにネイティブポリペプチドを宿主細胞の特定コンパートメントに導くための、翻訳されるシグナル配列およびリーダー配列も含むことができる。20

【0114】

加えて、3'非コード配列は、転写終結、ポリアデニル化などに関する制御要素を含有しうる。ただし、これらの終結配列が特定の宿主細胞において十分に機能しない場合には、それらをその細胞において機能的なシグナルで置換しうる。

【0115】

それゆえに、本開示の核酸分子は、プロモーター配列などの制御配列を含むことができる。いくつかの態様において、本開示の核酸分子はプロモーター配列および転写終結配列を含む。適切な原核生物プロモーターには、例えばtetプロモーター、lacUV5プロモーターまたはT7プロモーターなどがある。真核細胞における発現に有用なプロモーターの例は、SV40プロモーターまたはCMVプロモーターである。40

【0116】

本開示の核酸分子は、ベクター、または他の任意の種類のクローニング媒体、例えばプラスミド、ファージミド、ファージ、バキュロウイルス、コスミド、もしくは人工染色体の一部であることもできる。

【0117】

一態様では、核酸分子がファージミドに含まれる。ファージミドベクターとは、関心対象のcDNAに融合された、M13またはf1などの溶原性ファージの遺伝子間領域またはそれらの機能的部分をコードするベクターを表す。そのようなファージミドベクターと適当なヘルパーファージ（例えばM13K07、VCS-M13またはR408）とによる細菌宿主細胞の重感50

染後に、インタクトなファージ粒子が生産され、それによって、コードされている異種cDNAを、ファージ表面にディスプレイされたその対応ポリペプチドに物理的にカップリングすることが可能になる (Lowman, Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1997, Rodi and Makowski, Curr Opin Biotechnol, 1999)。

【0118】

そのようなクローニング媒体は、上述の制御配列および本明細書に記載のリポカリンムテインをコードする核酸配列の他にも、発現に使用される宿主細胞に適合する種に由来する複製配列およびコントロール配列、ならびに形質転換細胞またはトランسفェクト細胞に選択可能な表現型を付与する選択マーカーを含むことができる。当技術分野では数多くの適切なクローニングベクターが公知であり、市販されている。

10

【0119】

本明細書に記載するリポカリンムテインをコードするDNA分子、そして特に、そのようなムテインのコード配列を含有するクローニングベクターは、当該遺伝子を発現させる能力を有する宿主細胞中に形質転換することができる。形質転換は標準的技法を使って行うことができる。したがって本開示は、本明細書に開示する核酸分子を含有する宿主細胞にも向けられる。

【0120】

形質転換細胞は、本開示の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現に適した条件下で培養される。適切な宿主細胞は、原核細胞、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*) (*E. coli*) もしくは枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、または真核細胞、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、SF9またはHigh5昆虫細胞、不死化哺乳動物細胞株 (例えばHeLa細胞またはCHO細胞) または初代哺乳動物細胞であることができる。

20

【0121】

本開示は、本明細書に記載するリポカリンムテインの生産方法であって、ムテイン、ムテインのフラグメント、またはムテインと別のポリペプチド (例えば別のリポカリンムテインまたは抗体もしくは抗体フラグメント)との融合タンパク質が、ムテインをコードする核酸から出発して、遺伝子工学的方法を使って生産される方法にも関係する。本方法は、インビオで実行することができ、リポカリンムテインを、例えば細菌宿主細胞または真核宿主細胞中で生産し、次に、その宿主生物またはその培養物から単離することができる。タンパク質をインビトロで、例えばインビトロ翻訳系を使って生産することも可能である。

30

【0122】

リポカリンムテインをインビオで生産する場合は、そのようなムテインをコードする核酸を、組換えDNA技術 (上で既に概説したもの) を使って、適切な細菌宿主細胞または真核宿主細胞中に導入する。この目的には、まず、確立された標準的方法を使って、本明細書に記載するリポカリンムテインをコードする核酸分子を含むクローニングベクターで宿主細胞を形質転換する。次に、異種DNAの発現を可能とし、したがって対応ポリペプチドの合成を可能とする条件下で、宿主細胞を培養する。次に、ポリペプチドを細胞から、または培養培地から、回収する。

【0123】

いくつかの態様において、本願において開示するDNAなどの核酸分子は、本開示の融合タンパク質の発現が可能になるように、本開示の別の核酸分子に「機能的に連結され」うる。この点に関して、作動的連結とは、第1核酸分子の配列要素と、第2核酸分子の配列要素とが、単一ポリペプチドとしての融合タンパク質の発現を可能にするような形で、接続される連結である。

40

【0124】

加えて、いくつかの態様において、本開示のhTlcムテインの場合、Cys61とCys153との間の天然ジスルフィド結合を除去しうる。したがって、そのようなムテインは、還元性の酸化還元環境を有する細胞コンパートメント、例えばグラム陰性菌の細胞質中で、生産することができる。

50

【 0 1 2 5 】

本開示のリポカリンムテインが分子内ジスルフィド結合を含む場合は、適当なシグナル配列を使って、酸化性の酸化還元環境を有する細胞コンパートメントに新生ポリペプチドを向かわせることが好ましいであろう。そのような酸化性環境は、大腸菌などのグラム陰性菌のペリプラズムによって、またはグラム陽性菌の細胞外環境において、または真核細胞の小胞体の内腔において提供されうるものであり、通常は構造的ジスルフィド結合の形成に有利である。

【 0 1 2 6 】

ただし、宿主細胞の、好ましくは大腸菌の、サイトゾルにおいて本開示のムテインを生産することも可能である。その場合は、ポリペプチドを可溶性の折りたたまれた状態で直接的に得るか、封入体の形態で回収した後、インビトロで復元させることができる。さらなる選択肢は、酸化性の細胞内環境を有し、それゆえに、サイトゾルにおけるジスルフィド結合の形成を可能としうる、特別な宿主株の使用である (Venturi et al., J Mol Biol, 2002)。

10

【 0 1 2 7 】

しかし、本明細書に記載するリポカリンムテインは、必ずしも、遺伝子工学だけを使って作製または生産されるとは限らない。むしろ、そのようなムテインは、メリフィールド固相ポリペプチド合成などの化学合成によって得るか、インビトロでの転写および翻訳によって得ることもできる。例えば、分子モデリングを使って有望な突然変異を同定し、そのような突然変異を含むポリペプチドをインビトロで合成し、LAG-3に対する結合活性および他の所望の特性（例えば安定性）を調べることが可能である。ポリペプチド / タンパク質の固相および/または液相合成法は当技術分野において周知である（例えばBruckdorfer et al., Curr Pharm Biotechnol, 2004参照）。

20

【 0 1 2 8 】

別の一態様では、当業者に公知の確立された方法を使用するインビトロ転写/翻訳によって、本開示のリポカリンムテインを生産しうる。

【 0 1 2 9 】

本開示によって考慮されているがそのタンパク質配列または核酸配列が本明細書において明示的には開示されていないリポカリンムテインを調製するのに役立つ方法は、当業者には理解されるであろう。概要として、アミノ酸配列のそのような修飾には、例えば、一定の制限酵素のための切断部位を組み入れることによって変異リポカリン遺伝子またはそのペーツのサブクローニングを簡単にするための、單一アミノ酸位置の指定突然変異誘発が含まれる。加えて、リポカリンムテインのその標的（例えばLAG-3）に対する親和性をさらに改善するために、これらの突然変異を組み入れることもできる。さらにまた、必要であれば、フォールディング安定性、血清中安定性、タンパク質耐性または水溶性を改善するため、または凝集傾向を低減するためなど、ムテインの一定の特徴を調節するために、突然変異を導入することができる。例えばジスルフィド架橋形成を防止するために、天然のシステイン残基を別のアミノ酸に変異させうる。

30

【 0 1 3 0 】

本明細書において開示するリポカリンムテインおよびその誘導体は、抗体またはそのフラグメントと同様に、多くの分野において使用することができる。例えばリポカリンムテインは、酵素、抗体、放射性物質、または化学的活性もしくは明確な結合特徴を有する他の任意の基で標識するために使用することができる。そうすることにより、各々の標的またはそのコンジュゲートもしくは融合タンパク質を検出し、またはそれらと接触させることができる。加えて、本開示のリポカリンムテインは、確立された分析方法（例えばELISAまたはウェスタンプロット）によって、または顕微鏡法もしくはイムノセンソリックス（immunosensorics）によって、化学構造を検出するためにも役立ちうる。この点に関して、検出シグナルは、適切なムテインコンジュゲートまたは融合タンパク質の使用によって直接的に生成させるか、抗体を介して結合したムテインの免疫化学的検出によって間接的に生成させることができる。

40

50

【0131】

この開示のさらなる目的、利点、および特徴は、限定を意図しない以下の実施例および添付するその図面を検討すれば、当業者には明白になるであろう。したがって、例示的態様および随意の特徴によって本開示を具体的に開示するが、当業者は、本明細書に開示する、そこに体現されている開示の変更態様および変形態様を採用することができ、そのような変更態様および変形態様はこの開示の範囲内にあるとみなされることを理解すべきである。

【実施例】**【0132】****V. 実施例**

10

実施例1:カニクイザル由来の組換えLAG-3の生産および特徴づけ

C末端で、第Xa因子切断部位 (Ile-Glu-Gly-Arg、SEQ ID NO:56) とそれに続く (G4S) 3リンカーとを介してヒトIgG1 Fcフラグメントに融合された、カニクイザルLAG-3 (cytLAG-3) の細胞外ドメイン (cytLAG-3-Fc、SEQ ID NO:2) を発現させ、精製した。

【0133】**実施例2:LAG-3に特異的に結合するムテインの選択**

LAG-3タンパク質に特異的に結合するムテインの選択のために、ヒト涙液リポカリン (hTlc) に基づくナイーブファージミドライブラーを使用した。ファージディスプレイ選択中はヒトLAG-3 (huLAG-3) 融合タンパク質 (huLAG-3-Fc融合物、R&D Systems) を使用した。

20

【0134】

プロテインGまたはプロテインAのどちらかをコーティングした常磁性ビーズ上にhuLAG-3融合タンパク質を捕捉した。次に、ナイーブファージライブラーからの 2×10^{12} 個のファージミドを、標的で覆われたビーズと共にインキュベートした。次にビーズを磁石で単離した。0.1%Tweenを補足した $1 \times$ PBS (PBS/T) でビーズを洗浄することにより、結合していないファージミドを除去した。結合しているファージミドを、まず70mMトリエチルアミンで10分間溶出させた後、直ちに1M Tris-Cl pH6.0で上清を中和した。中間洗浄サイクル後に、残存ファージミドを100mMグリシンpH2.2で10分間溶出させ、次に0.5M Tris塩基で直ちに中和した。両方の溶出画分をプールし、それを使って、再増幅のために大腸菌 (E. coli) XL1-blue培養物を感染させた。30分間のインキュベーション後に遠心分離によって細菌を収集し、培地に再懸濁し、3枚の大きなLB/Am-ampicillin寒天プレートにプレーティングした。プレートを32℃で一晩インキュベートした。スーパーブロス (SB (Super Broth) 培地は、10g/L MOPS (3-(N-モルホリノ) プロパンスルホン酸)、32g/L Bactotryptone、20g/L 酵母エキスを含有し、pH7.0である) に100μg/mLアンピシリンを補足したもの (SB/Amp) 50mLを使って、感染細胞を寒天プレートから搔き取った。50mLのSB/Amp培地に適当な体積の細菌懸濁液を接種することで、OD₅₅₀を0.08にした。その培養物を、振とう器 (160rpm) 上、37℃で、OD₅₅₀が0.5になるまでインキュベートした後、ヘルパーファージ (VCSM13、Amersham Bioscience、 1.5×10^{11} pfu) に、15分間のインキュベーションおよび振とう器上、37℃で45分間のインキュベーションによって感染させた。次に、ヘルパーファージに感染した細菌を選択するために、カナマイシンを最終濃度が70μg/mlmLになるように添加した。最後に、25ng/mlmLアンヒドロテトラサイクリン (Acros Organics) の添加によって、pIII-Tlcムテインの発現を誘導した。

30

【0135】

24℃で15時間のインキュベーション後に、培養物の上清を遠心分離 ($5000 \times g$ 、20分) によって清澄化した。次に、上清を孔径0.22μmのポリエーテルスルホンメンブレンに通した。その濾液に、20% (w/v) PEG-8000および15% (w/v) NaClを含有する水溶液を加え、穏やかに混合した。その溶液を4℃および $5000 \times g$ で20分間遠心分離した。ファージミドを含有するペレットを、200mM ホウ酸、160mM NaClおよび1mM EDTAを含有する緩衝液に溶解した。不溶性粒子を遠心分離 ($5000 \times g$ 、5分) によって除去した。

40

50

上清を新鮮なチューブに移し、20% (w/v) PEG-8000および15% (w/v) NaClを含有する水溶液と混合した。その溶液を30分インキュベートし、次に、沈殿したファージミドを遠心分離 (5000 × g、5分) によって収集した。ファージミドを、50 mM ベンズアミジンを補足したPBSに再懸濁し、それを次のファージミド選択ラウンドに使用した。連続4ラウンドの選択を行った結果、4つの親リポカリンムテイン (SEQ ID NO:7、8、9、10)を得た。

【0136】

最適化LAG-3特異的ムテインを選択するために、親リポカリンムテインSEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8およびSEQ ID NO:9に基づき、選択された位置のバイアス付きランダム化 (biased randomization) またはエラープローンポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に基づく方法のどちらかを使って、追加のライブラリーを作製した。熱安定性および結合親和性が改善された最適化ムテインを選択するために、ファージミド選択は、上述のように、ただし初回ムテイン選択と比較して高いストリングエンシーで実行し、高温でのブレインキュベーション工程と制限的標的濃度とを伴った。10

【0137】

実施例3:ハイスループットELISAスクリーニングを使ったLAG-3に特異的に結合するムテインの同定

個々のコロニーを使って2×酵母エキス・トリプトン (YT) /Amp培地に接種し、それらを定常期まで一晩 (14~18時間) 成長させた。次に、定常期培養物から、50 μLの2×YT/Ampに接種し、37℃で3時間インキュベートした後、OD₅₉₅が0.6~0.8に達するまで22℃に移行させた。1.2 μg/mLアンヒドロテトラサイクリンを補足した2×YT/Ampを10 μL添加することによって、ムテインの生産を誘導した。培養物を翌日まで22℃でインキュベートした。PBS/T中の5% (w/v) BSA 40 μLを添加し、25℃で1時間インキュベートした時点で、培養物はスクリーニングアッセイに使用する準備が整った。20

【0138】

単離されたムテインの、LAG-3への結合を、この標的 (PBS中、1 μg/mL) をマイクロタイタープレートに4℃で一晩、直接コーティングすることによって試験した。2% BSAを含有するPBSTでプレートをプロッキングした後、BSAでプロッキングした培養物20 μLを(事前の加熱インキュベーションありまたはなしで)マイクロタイタープレートに加え、25℃で1時間インキュベートした。結合したムテインを、セイヨウワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートされた抗Strep-Tag抗体 (IBA) で、1時間のインキュベーション後に検出した。定量のために、20 μLのQuantaBlu蛍光原性ペルオキシダーゼ基質を加え、蛍光を励起波長330nmおよび放射波長420nmで決定した。30

【0139】

加えて、抗Strep-Tag抗体をコーティングしたマイクロタイタープレート上にStrep-tagを介してムテインを捕捉し、ビオチン化標的を加え、Extravidin-セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) (Sigma) によって検出する、逆スクリーニングフォーマットも適用した。あるいは、LAG-3-Fc融合タンパク質標的を加え、抗ヒトFc IgG-HRP (Dianova) によって検出した。40

【0140】

親和性と安定性が増加しているムテインを選択するために、i) 低減した抗原濃度で、および/またはii) MHCクラスIIと競合させて、および/またはiii) 標的プレートへの添加前にスクリーニング上清を60℃でインキュベートして、および/またはiv) 抗Strep-Tag抗体でコーティングされたマイクロタイタープレートにStrep-tagを介してムテインを捕捉し、異なる濃度の標的を加えて、Extravidin-HRP (Sigma) (Sigma Aldrich、ミズーリ州セントルイス) または抗ヒトFc IgG-HRP (Dianova) のどちらかによって検出する逆スクリーニングフォーマットを使って、スクリーニングを行った。

【0141】

次に、スクリーニング結果に基づいてクローンを配列決定し、さらなる特徴づけのためにムテインを選択した。50

【 0 1 4 2 】

実施例4:ムテインの発現

発現後にStrep-Tactinアフィニティークロマトグラフィーと、適宜、分取用サイズ排除クロマトグラフィーとを使って、ムテインを精製するために、SAリンカーとStrep-tag IIペプチド (WSHPQFEK、SEQ ID NO:58)とのC末配列SAWSHPQFEK (SEQ ID NO:57)を持つ選択されたムテインを、2YT/Amp培地中の大腸菌において発現させた。

【 0 1 4 3 】

実施例5:表面プラズモン共鳴 (SPR) によって決定される、ヒトLAG-3タンパク質に結合するムテインの親和性

表面プラズモン共鳴 (SPR) を使って、本明細書において開示する代表的なリポカリンムテインの結合動態および親和性を計測した。 10

【 0 1 4 4 】

huLAG-3-Fc (R&D Systems)へのリポカリンムテインSEQ ID NO:7、8、9、および10の結合を、Biacore T200計器 (GE Healthcare)を使って、表面プラズモン共鳴 (SPR) によって決定した。標準的アミンケミストリーを使って抗ヒトIgG Fc抗体 (GE Healthcare)をCM5センサーチップに固定化した。すなわち、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (EDC) およびN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を使って、チップ上のカルボキシル基を活性化した。次に、10mM酢酸ナトリウム (pH) 5中、濃度が25 μg/mLの抗ヒトIgG Fc抗体溶液 (GE Healthcare)を、5 μL/分の流速で、9000~14000レゾナンスユニット (RU) の固定化レベルが達成されるまで適用した。表面を横切るように1Mエタノールアミンの溶液を通過させることにより、残留未反応NHSエステルをブロッキングした。リファレンスチャネルを同様に処理した。次に、HBS-EP + 緩衝液中、0.5 μg/mLのLAG-3-Fcを、抗ヒトIgG-Fc抗体によって捕捉した。 20

【 0 1 4 5 】

親和性決定のために、HBS-EP + 緩衝液中に各ムテインの希釈液を4つ調製し、調製したチップ表面に、5000、2500、1250および625nMの濃度を使って適用した。結合アッセイは、180秒の接触時間、300秒の解離時間、および30 μL/分の流速で実行した。測定はすべて25 °で行った。チップ表面の再生は、3M MgCl₂を60秒間および10mMグリシン-HCl (pH 2)を180秒間、10 μL/分の流速で注入した後、ランニング緩衝液 (HBS-EP + 緩衝液)で追加洗浄し、120秒間の安定化期間を置くことによって達成した。タンパク質測定に先だって、コンディショニングのために、3回のスタートアップサイクルを行った。データをBiacore T200評価ソフトウェア (V2.0)で評価した。二重参照を使用し、生データの当てはめには1:1結合モデルを使用した。 30

【 0 1 4 6 】

結果を表1に要約する。このデータから、SEQ ID NO:7、8、9、および10のリポカリンムテインは、287~500nMのK_dでヒトLAG-3に結合すると結論することができる。

【 0 1 4 7 】

(表1)組換えヒトLAG-3-Fcに対するLAG-3特異的ムテインSEQ ID NO:7、8、9、および10の速度定数

	huLAG-3-Fc		
	k _{on} [1/Ms]	k _{off} [1/s]	K _d [nM]
SEQ ID NO: 7	1.00E+05	4.00E-02	287
SEQ ID NO: 8	3.00E+04	1.00E-02	354
SEQ ID NO: 9	2.00E+03	9.00E-04	500
SEQ ID NO: 10	7.00E+04	3.00E-02	391

【 0 1 4 8 】

実施例6:BiacoreにおけるSPRによって決定される、ヒトおよびカニクイザルLAG-3タン

40

50

パク質に結合する最適化ムテインの親和性

実施例5に記載した同方法を使って、huLAG-3-Fc (R&D) およびcyLAG-3-Fc (SEQ ID NO:2) への最適化リポカリンムテインの結合を決定した。

【 0 1 4 9 】

結果を表2に要約する。huLAG-3に対する親和性は、nM未満の領域から103nMまでの範囲にあった。cyLAG-3に対する親和性は、9.3nMから160nMまでの範囲にあった。

【 0 1 5 0 】

(表2) SPRによって決定される、組換えヒトおよびカニクイザルLAG-3に対する、LAG-3特異的ムテインの親和性

	huLAG-3-Fc			cyLAG-3-Fc		
	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_d [nM]	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_d [nM]
SEQ ID NO: 11	3.52E+06	1.99E-03	0.56	4.16E+06	1.08E-01	26.08
SEQ ID NO: 12	3.54E+06	1.92E-03	0.54	4.36E+06	9.53E-02	21.89
SEQ ID NO: 13	1.73E+06	8.45E-04	0.49	8.31E+05	1.03E-01	123.97
SEQ ID NO: 14	2.84E+06	1.02E-03	0.36	5.68E+06	9.28E-02	16.33
SEQ ID NO: 15	2.48E+06	1.23E-03	0.5	6.37E+06	1.29E-01	20.33
SEQ ID NO: 16	2.45E+06	2.38E-03	0.97	1.79E+06	5.02E-02	28.06
SEQ ID NO: 17	4.10E+04	6.12E-04	14.91	3.73E+04	8.66E-04	23.22
SEQ ID NO: 18	2.06E+04	2.12E-03	102.95	1.98E+04	3.16E-03	159.41
SEQ ID NO: 19	6.42E+04	7.24E-04	11.29	5.38E+04	7.55E-04	14.03
SEQ ID NO: 20	6.34E+04	9.32E-04	14.7	4.95E+04	9.14E-04	18.46
SEQ ID NO: 21	1.02E+05	7.25E-04	7.09	9.49E+04	1.04E-03	10.97
SEQ ID NO: 22	2.99E+04	2.63E-04	8.78	2.83E+04	2.63E-04	9.3

【 0 1 5 1 】

実施例7:ムテインの安定性評価

総合的安定性の一般指標であるリポカリンムテインの融解温度 (T_m) を決定するために、タンパク質濃度がPBS (Gibco) 中で1mg/mLのLAG-3特異的ムテインを、キャピラリー nanoDSC計器 (CSC 6300、TA Instruments) を使い、1 / 分で走査 (25 ~ 100) した。 T_m は、表示されたサーモグラムから、統合Nano Analyzeソフトウェアを使って算出した。

【 0 1 5 2 】

例示的リポカリンムテイン (SEQ ID NO:11 ~ 14 および 16) について、結果として得られた最大融解温度ならびに融解開始温度を、下記表3に列挙する。ほとんどすべてのリポカリンムテインが70 ~ 84 の範囲内の T_m を有し、これは、これらのムテインのそれぞれについて良好な総合的安定性を示している。

【 0 1 5 3 】

(表3) nanoDSCによって決定されたLAG-3特異的リポカリンムテインの T_m および融解開始温度

	T_m [°C]	融解開始 [°C]
SEQ ID NO: 11	81.0	58
SEQ ID NO: 12	82.2	58
SEQ ID NO: 13	72.1	50
SEQ ID NO: 14	83.9	70
SEQ ID NO: 16	83.0	62

10

20

30

40

50

【 0 1 5 4 】

貯蔵安定性を評価するために、PBS中、1 mg/mLの濃度で、または50%ヒト血漿中もしくは50%マウス血漿中、0.5 mg/mLの濃度で、LAG-3特異的ムテインを37 ℃で1週間インキュベートした。次に、定量ELISAを使って、活性ムテインを決定した。PBS中で貯蔵した試料については、単量体型タンパク質含量も、分析用サイズ排除クロマトグラフィーで追加測定した。SEQ ID NO:11、12、14、16、17、および21に関する例示的データを表4に示す。

【 0 1 5 5 】

次に、貯蔵したリポカリンムテインの活性を、384ウェルプレート (Greiner FLUOTRA C (商標) 600、黒平底、高結合能) 中で定量ELISA (qELISA) によって評価した。プレートの各ウェルを、PBS中、1 μg/mLの濃度のhuLAG-3-Fc (R&D Systems) 20 μLにより、4 ℃で一晩、コーティングした。洗浄後に、huLAG-3-Fc被覆ウェルを、100 μLのブロッキング緩衝液 (2% w/v BSAおよび0.1% v/v Tween-20を含む1×PBS) で、1時間ブロッキングした。次に、プレートを洗浄し、適当に希釀されたタンパク質標品、非ストレス負荷リファレンス試料およびストレス負荷試料の各20 μLを、ELISAプレートに別々に移した。プレートに結合したタンパク質を定量するために、ELISAプレートを洗浄し、残存する上清を捨て、20 μLのHRP標識抗hTlc抗体を、ブロッキング緩衝液中、前もって決定された最適濃度で加え、インキュベートした。洗浄後に、20 μLの蛍光原性HRP基質 (QuantaBlu、Pierce) を各ウェルに加え、反応を20~30分進行させた。蛍光マイクロプレートリーダー (Tecan) を使用し、Ex/Em 330/420nmで、プレート上の各ウェルの蛍光強度を読み取った。

10

20

【 0 1 5 6 】

別段の言明がある場合を除き、インキュベーション工程はすべて室温で1時間を行い、各インキュベーション工程後は、Bioteck ELx405 select CW洗浄機を使って、プレートを100 μLのPBS-T緩衝液 (PBS、0.05% Tween20) で5回洗浄した。

【 0 1 5 7 】

上述のELISAのために、典型的には0.017~1000ng/mLの範囲にわたる11の標準タンパク質希釀液を含む検量線を作成した。各試料について、検量線の直線範囲内にある3つの異なる独立した希釀液を調製した。希釀液には、1%ヒト血漿またはマウス血漿が補足されていてもよいブロッキング緩衝液を使用した。

30

【 0 1 5 8 】

検量線の当てはめは、4パラメータロジスティック (4PL) 非線形回帰モデルを使ってを行い、被験試料についてその検量線を使って活性タンパク質濃度を算出した。各試料について、同じ濃度および同じマトリックス中で貯蔵した非ストレス負荷試料を比較の基準にして、活性の回収百分率を決定した。

【 0 1 5 9 】

分析用サイズ排除クロマトグラフィーは、Superdex 75 5/150 GLカラム (GE Healthcare) を2本直列にしたAgilent HPLCシステムで行い、ランニング緩衝液として1×PBS (Gibco) を0.3 mL/分の流速で使用した。単量体の回収百分率は、非ストレス負荷リファレンス試料を比較の基準にして、各試料の単量体ピーク面積によって決定した。

40

【 0 1 6 0 】

例示的リポカリンムテイン (SEQ ID NO:11、12、14、16、17) は、試験したすべての条件下で安定であることが判明した。結果を表4に要約する。

【 0 1 6 1 】

(表4) LAG-3特異的リポカリンムテインの貯蔵安定性:qELISAにおける活性の回収および分析用SECにおける単量体含量によって評価した、PBS中37 ℃で1週間の貯蔵後ならびにヒト(hu) 血漿中およびマウス(mu) 血漿中37 ℃で1週間の貯蔵後の安定性; qELISAにおける安定 = 100 ± 15%; aSECにおける安定 = 100 ± 5%

50

1週間 PBS, 37°C		1週間 hu 血漿, 37°C	1週間 mu 血漿, 37°C
qELISAにおける活性の回収率(%)	aSECにおけるモノマー(%)	qELISAにおける活性の回収率(%)	
SEQ ID NO: 11	104	98	106
SEQ ID NO: 12	97	104	106
SEQ ID NO: 14	98	98	103
SEQ ID NO: 16	107	99	100
SEQ ID NO: 17	100	101	99
SEQ ID NO: 21	100	103	110

【0162】

実施例8:ヒトLAG-3を発現する細胞に結合するリポカリンムテインのFACS分析
huLAG-3が安定にトランスフェクトされたチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(CHO-huLAG-3)へのリポカリンムテインSEQ ID NO:7、8、および9の特異的結合を評価するために、本発明者らはFACS研究を使用した。SEQ ID NO:3を陰性対照として並行して試験した。細胞株は、Flp-Inシステム(Invitrogen)を製造者の説明書に従って使用することにより、作製した。モックトランスフェクトFlp-In CHO細胞を陰性対照とした。

10

【0163】

トランスフェクトCHO細胞は、10%ウシ胎仔血清(FCS、Biochrom)と500 μg/mLハイグロマイシンB(Roth)とを補足したハムF12培地(Invitrogen)中で維持した。細胞は、製造者の説明に従い、標準条件下(37°、5%CO₂雰囲気)、細胞培養フラスコ中で培養した。継代培養またはFACS実験のために接着細胞を解離させるためには、Accutase(PAA)を製造者の説明書に従って使用した。

20

【0164】

実験を行うために、LAG-3陽性およびLAG-3陰性Flp-In CHO細胞をリポカリンムテインと共にインキュベートし、結合したムテインを抗hTlc一次抗体および蛍光標識二次抗体を使って標識してから、以下に説明するようにFACS分析を使ってシグナルを検出した。

30

【0165】

5%ウシ胎仔血清を含有する氷冷PBS(PBS-FCS)中で、1ウェルあたり1×10⁵個の細胞を1時間プレインキュベートした。次に、典型的には5 μM～1nMの範囲にある、リポカリンムテイン(SEQ ID NO:7、8、および9)ならびに陰性対照リポカリンムテイン(SEQ ID NO:3)の希釈系列を細胞に加え、氷上で1時間インキュベートした。細胞を300×gでの遠心分離を使って氷冷PBS中で2回洗浄し、次にウサギ抗リポカリン一次抗体(ポリクローナルウサギ抗hTlc、Pieris)と共に氷上で30分インキュベートした。細胞を再び氷冷PBSで2回洗浄し、PBS-FCSに再懸濁し、フィコエリトリンで標識された二次抗ウサギ抗体(Jackson Immunologics)と共に氷上で30分インキュベートした。続いて細胞を洗浄し、Guava easyCyte HTフローサイトメーター(EMD Millipore)を使って分析した。典型的には、非生存細胞を排除するためにゲートを設定し、5,000イベントを記録した。

40

【0166】

CHO-huLAG-3細胞へのリポカリンの結合によって生成したFACSデータは、FlowJoソフトウェアを使って解析し、その結果得られた幾何平均蛍光はGraphpadを使ってプロットし、当てはめた。生成したEC₅₀を表5に要約する。

【0167】

(表5) huLAG-3がトランスフェクトされたCHO細胞へのLAG-3特異的リポカリンムテインの結合

50

CHO::huLAG-3 EC50 [nM]	
SEQ ID NO: 7	29
SEQ ID NO: 8	47
SEQ ID NO: 9	109

【 0 1 6 8 】

ムテインSEQ ID NO:7、8、および9は、huLAG-3を発現するCHO細胞への明らかな結合を示し、そのEC₅₀値は、nMを単位とするEC₅₀で2桁から3桁の下の方までの範囲にある。LAG-3に結合しない陰性対照リポカリンムテイン（SEQ ID NO:3）は、結合を何も示さなかった（データ省略）。モックトランスフェクトFlp-In CHO細胞ではリポカリンムテインの結合は検出されなかった（データ省略）。

10

【 0 1 6 9 】

実施例9:ヒトまたはカニクイザルLAG-3を発現する細胞に結合する最適化リポカリンムテインのFACS分析

5%ウシ胎仔血清を含有する氷冷PBS（PBS-FCS）中で、1ウェルあたり 5×10^4 個の細胞を1時間プレインキュベートした。次に、典型的には $5 \mu M \sim 0.01 nM$ の範囲にある、リポカリンムテイン（SEQ ID NO:11～17および19～21）ならびに陰性対照リポカリンムテイン（SEQ ID NO:3）の希釈系列を細胞に加え、氷上で1時間インキュベートした。細胞を $300 \times g$ での遠心分離を使って氷冷PBS中で2回洗浄し、次にウサギ抗リポカリン一次抗体（ポリクローナルウサギ抗hTlc、Pieris）と共に氷上で30分インキュベートした。細胞を再び氷冷PBSで2回洗浄し、PBS-FCSに再懸濁し、Alexafluor647で標識された抗体（Jackson Immunologics）と共に氷上で30分インキュベートした。次に細胞を洗浄し、Intelicyt IQueフローサイトメーター（Intelicyt）を使って分析した。LAG-3発現細胞へのリポカリンムテイン結合によって生成した蛍光データは、Forecytソフトウェアを使って分析し、その結果得られた幾何平均蛍光はGraphpadを使ってプロットし、当てはめた。生成した例示的なEC₅₀値を表6に要約する。

20

【 0 1 7 0 】

（表6）huLAG-3またはカニクイザルLAG-3がトランスフェクトされたCHO細胞へのLAG-3特異的リポカリンムテインおよびリファレンス分子（ベンチマーク抗LAG-3抗体、BM S986016、SEQ ID NO:5および6）の結合

30

	CHO::huLAG-3 EC50 : nM	CHO::cyLAG-3 EC50 : nM
SEQ ID NO: 11	0.37	19.88
SEQ ID NO: 12	0.78	29.28
SEQ ID NO: 13	0.26	26.09
SEQ ID NO: 14	0.25	19.14
SEQ ID NO: 15	0.54	10.39
SEQ ID NO: 16	0.36	32.83
SEQ ID NO: 5 および 6	0.26	21

40

【 0 1 7 1 】

実施例10:PHAプラストに結合するリポカリンムテインのFACS分析

フィトヘマグルチニン（PHA）で刺激したPBMCへのリポカリンムテインおよび陰性対照の結合を評価するために、FACS研究を使用した。

【 0 1 7 2 】

ポリスクリュース密度勾配（Biocoll 1.077g/mL、Biochrom）による遠心分離をBiochro

50

mのプロトコールに従って行うことにより、健常ボランティアドナーのヒト末梢血単核球（PBMC）をバフィーコートから単離した。精製されたPBMCを90%FCSと10%DMSOとからなる緩衝液に再懸濁し、液体窒素を使って直ちに凍結し、さらなる使用時まで液体窒素中に貯蔵した。

【0173】

アッセイのために、PBMCを融解し、10%FCSおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシン（Life Technologies）を補足した培養培地（RPMI 1640、Life Technologies）中で16時間培養した。PBMCを1mLあたり 2×10^6 細胞の密度にして、5μg/mL PHA-P（Sigma）により、37℃で3日間刺激した。無刺激のPBMCと同じ細胞密度にして、並行して培養した。

10

【0174】

5%ウシ胎仔血清を含有する氷冷PBS（PBS-FCS）中で、1ウェルあたり 1×10^5 個のPBMCを1時間インキュベートした。次に、典型的には、10μMまたは200nMのリポカリンムテインおよび陰性対照を細胞に加え、インキュベーションを氷上で1時間続けた。細胞を $300 \times g$ での遠心分離を使って氷冷PBSで2回洗浄し、次にウサギ抗リポカリン一次抗体（ポリクローナルウサギ抗hTlc、Pieris）と共に氷上で30分インキュベートした。細胞を再び氷冷PBSで2回洗浄し、PBS-FCSに再懸濁し、蛍光標識二次抗体およびフィコエリトリン抗CD3抗体と共に氷上で30分インキュベートした。次に細胞を洗浄し、Guava easyCyte HTフローサイトメーターを使って分析した。PBMCへのリポカリンの結合によって生成した蛍光データを、Flowjoソフトウェアを使って分析した。

20

【0175】

選択されたFACSドットプロットおよびヒストグラムを図1に掲載する。それぞれのプロットには、それぞれのリポカリンムテインのSEQ ID NO:11～17、21、および22が、リファレンス分子（SEQ ID NO:5および6）と共に示されている。PHA刺激CD3陽性PBMCへの、試験したすべてのリポカリンムテインおよびリファレンス分子の明らかな結合が検出され、無刺激細胞への結合は観察されなかった。陰性対照リポカリンムテイン（SEQ ID NO:3）は、PHA刺激CD3陽性PBMCへの結合を示さなかった（データ省略）。

【0176】

実施例11:MHCクラスII発現細胞へのヒトLAG-3およびリポカリンムテインの競合的結合のFACS分析

30

所与のリポカリンムテインがMHCクラスII陽性細胞上のMHCクラスIIへのLAG-3結合を妨害するかどうかを評価するために、競合FACS実験を利用した。この実験では、定濃度のヒトLAG-3-Fc融合物（huLAG-3-Fc、R&D system）と、各リポカリンムテインの希釈系列とを、MHCクラスII陽性ヒト細胞株A375と共にインキュベートし、蛍光標識抗IgG Fc抗体を使って、細胞に結合したhuLAG-3-Fcを検出した。このアッセイでは、huLAG-3とそのリガンドMHCクラスIIとの結合を妨害する競合リポカリンムテインが、MHCクラスII陽性細胞株A375へのhuLAG-3-Fc結合の低減をもたらす。

【0177】

黒色腫細胞株A375は10%ウシ胎仔血清（FCS、Biochrom）を補足したDMEM培地（Invitrogen）に維持した。細胞は、製造者の説明に従い、標準条件下（37℃、5%CO₂雰囲気）、細胞培養フラスコ中で培養した。継代培養またはFACS実験のために接着細胞を解離させるためには、Accutase（PAA Laboratories GmbH）を製造者の説明書に従って使用した。

40

【0178】

FACSアッセイのために、1ウェルあたり 1×10^5 個または 2.5×10^4 個のA375細胞をPBS-FCS中で1時間インキュベートした後、3nM huLAG-3-Fcと、5μMから0.1nMまでの範囲または1μMから0.01nMまでの範囲にわたるさまざまな濃度のLAG-3特異的リポカリンムテインを加えた。細胞を氷冷PBSで2回洗浄し、PBS-FCSに再懸濁し、フィコエリトリン標識抗ヒトIgG Fc抗体（Jackson Immunologics）と共に氷上で30分インキュベートした。次に細胞を洗浄し、Guava easyCyte HTフローサイトメーター（EMD Millipore

50

) またはIntelicity IQeフローサイトメーター (Intelicity) を使って分析した。A375 細胞へのhuLAG-3-Fc結合によって生成した蛍光データを、それぞれFlowJoソフトウェアまたはForecytソフトウェアを使って分析し、その結果得られた幾何蛍光平均を、 huLAG-3-Fc最大結合に対して正規化した。 huLAG-3-Fc結合のパーセントはGraphpadソフトウェアを使ってプロットし、当てはめた。SEQ ID NO:11～17および19～21のIC₅₀値を表7に要約し、選択された競合結合曲線を図2に掲載する。このデータは、試験したリポカリンムテインが、 huLAG-3の、ヒトMHCクラスII発現細胞上のそのリガンドMHCクラスIIへの結合と、競合することを示している。LAG-3に結合しない陰性対照リポカリンムテイン (SEQ ID NO:3) は、競合を何も示さなかった。図2参照。

【0179】

10

(表7) リポカリンムテインは、 huLAG-3の、 MHCクラスII発現細胞上のそのリガンドM HCクラスIIへの結合と競合する

	IC50 : nM
SEQ ID NO: 5 および 6	1.6
SEQ ID NO: 11	1.1
SEQ ID NO: 12	2.1
SEQ ID NO: 13	1.6
SEQ ID NO: 14	3
SEQ ID NO: 15	2.1
SEQ ID NO: 16	4.1
SEQ ID NO: 17	2.8
SEQ ID NO: 19	3.4
SEQ ID NO: 20	3.2
SEQ ID NO: 21	1.5

20

【0180】

本明細書に例示的に記載した態様は、本明細書において具体的に開示しない任意の1つまたは複数の要素、1つまたは複数の限定が存在しなくても、適切に実施しうる。したがって例えば「含む (comprising)」、「包含する (including)」、「含有する (containing)」などの用語は、拡大的、非限定的に解釈されるべきである。加えて、本明細書において使用する用語および表現は、説明のために使用されているのであって、限定のために使用されているのではなく、そのような用語および表現の使用には、示され記載された特徴またはその部分のいずれの等価物も排除しようという意図はなく、さまざまな変更態様が本願発明の範囲内で可能であると認識される。したがって、本態様を好ましい態様および隨意の特徴によって具体的に開示したが、当業者はその変更態様および変形態様を採ることができ、そのような変更態様および変形態様は本発明の範囲内にあるとみなされると理解すべきである。本明細書において記載した特許、特許出願、教科書および査読付き刊行物は、参考によりその全体が本明細書に組み入れられる。さらにより本明細書に組み入れられた参考文献における用語の定義または用法が、本明細書に掲載した当該用語の定義と一致しないか相反する場合は、本明細書に掲載した当該用語の定義が適用され、参考文献における当該用語の定義は適用されない。一般的開示に含まれる狭い種概念および下位類概念群のそれぞれも、本発明の一部を形成する。これには、削除された事項が本明細書に具体的に陳述されているかどうかに関わらず、類概念から任意の内容を除去するただし書きまたは消極的限定の付いた本発明の一般的記述が含まれる。加えて、特徴がマーカッシュ群で記載される場合、それによって本開示がそのマーカッシュ群の任意の個々の要素または任意の要素の部分群についても記載されることとは、当業者にはわかるであろう。さらなる態様は、以下の特許請求の範囲から明らかになるであろう。

30

【0181】

40

50

等価物:当業者は、本明細書に記載した本発明の具体的な態様に対する多くの等価物を認識するか、せいぜい日常的な実験を使って確かめることができるであろう。そのような等価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されるものとする。この明細書において言及した刊行物、特許および特許出願はすべて、あたかも個々の刊行物、特許または特許出願が参考により本明細書に組み込まれることを具体的かつ個別に示されたかのように、それと同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

【 0 1 8 2 】

非特許文献

1. TRIEBEL, F., JITSKUAWA, S., BAIXERAS, E., ROMAN-ROMAN, S., GENEVEE, C., VIEGAS-PEQUIGNOT, E. & HERCEND, T. 1990. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med*, 171, 1393-405.
2. KISIELOW, M., KISIELOW, J., CAPOFERRI-SOLLAMI, G. & KARJALAINEN, K. 2005. Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. *Eur J Immunol*, 35, 2081-8.
3. WORKMAN, C. J., WANG, Y., EL KASMI, K. C., PARDOLL, D. M., MURRAY, P. J., DRAKE, C. G. & VIGNALI, D. A. 2009. LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis. *J Immunol*, 182, 1885-91.
4. HUARD, B., MASTRANGELI, R., PRIGENT, P., BRUNIQUEL, D., DONINI, S., EL-TAYAR, N., MAIGRET, B., DREANO, M. & TRIEBEL, F. 1997. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 5744-9.
5. BUISSON, S. & TRIEBEL, F. 2003. MHC class II engagement by its ligand LAG-3 (CD223) leads to a distinct pattern of chemokine and chemokine receptor expression by human dendritic cells. *Vaccine*, 21, 862-8.
6. ANDREAE, S., PIRAS, F., BURDIN, N. & TRIEBEL, F. 2002. Maturation and activation of dendritic cells induced by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol*, 168, 3874-80.
7. MACON-LEMAITRE, L. & TRIEBEL, F. 2005. The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells. *Immunology*, 115, 170-8.
8. WOO, S. R., TURNIS, M. E., GOLDBERG, M. V., BANKOTI, J., SELBY, M., NIRSCHL, C. J., BETTINI, M. L., GRAVANO, D. M., VOGEL, P., LIU, C. L., TANGSOMBATVISIT, S., GROSSO, J. F., NETTO, G., SMELTZER, M. P., CHAUX, A., UTZ, P. J., WORKMAN, C. J., PARDOLL, D. M., KORMAN, A. J., DRAKE, C. G. & VIGNALI, D. A. 2012. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res*, 72, 917-27.
9. ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402.
10. SKERRA, A. 2000. Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 337-50.
11. FLOWER, D. R., NORTH, A. C. & SANSON, C. E. 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 9-24.
12. FLOWER, D. R. 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, 318 (Pt 1), 1-14.
13. FLOWER, D. R. 2000. Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 327-36.
14. BREUSTEDT, D. A., KORNDORFER, I. P., REDL, B. & SKERRA, A. 2005. The 1.8-A crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. *J Biol Chem*, 280, 484-93.
15. SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
16. PERVAIZ, S. & BREW, K. 1987. Homology and structure-function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *FASEB J*, 1, 209-14.
17. SCHMIDT, T. G., KOEPKE, J., FRANK, R. & SKERRA, A. 1996. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol*, 255, 753-66.
18. VAJO, Z. & DUCKWORTH, W. C. 2000. Genetically engineered insulin analogs: diabetes in the new millennium. *Pharmacol Rev*, 52, 1-9.
19. KONIG, T. & SKERRA, A. 1998. Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J Immunol Methods*, 218, 73-83.

10

20

30

40

50

20. DENNIS, M. S., ZHANG, M., MENG, Y. G., KADKHODAYAN, M., KIRCHHOFER, D., COMBS, D. & DAMICO, L. A. 2002. Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J Biol Chem*, 277, 35035-43.
21. OSBORN, B. L., OLSEN, H. S., NARDELLI, B., MURRAY, J. H., ZHOU, J. X., GARCIA, A., MOODY, G., ZARITSKAYA, L. S. & SUNG, C. 2002. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 540-8.
22. FUERTGES, F. & ABUCHOWSKI, A. 1990. The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins. *Journal of Controlled Release*, 11, 139-148.
23. LOWMAN, H. B. 1997. Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 26, 401-24. 10
24. RODI, D. J. & MAKOWSKI, L. 1999. Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr Opin Biotechnol*, 10, 87-93.
25. VENTURI, M., SEIFERT, C. & HUNTE, C. 2002. High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. *J Mol Biol*, 315, 1-8.
26. BRUCKDORFER, T., MARDER, O. & ALBERICIO, F. 2004. From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. *Curr Pharm Biotechnol*, 5, 29-43.

20

30

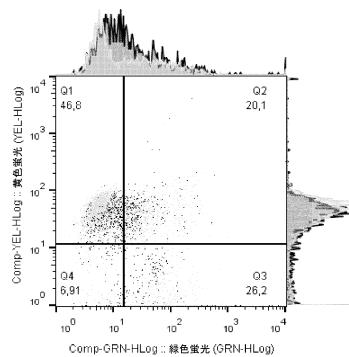
40

50

【図面】

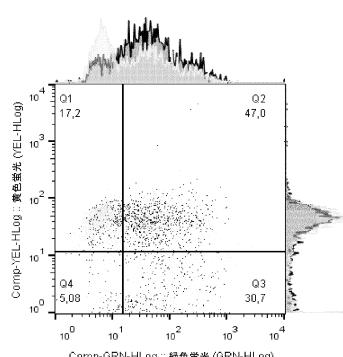
【図 1 - 1】

SEQ ID NOs: 5, 6



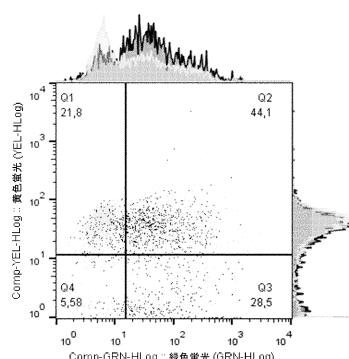
【図 1 - 2】

SEQ ID NO: 12

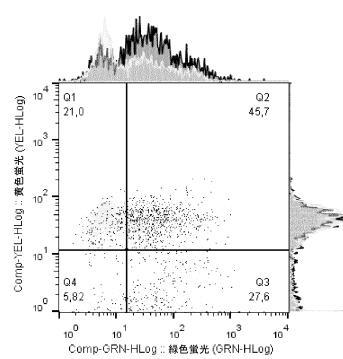


10

SEQ ID NO: 11



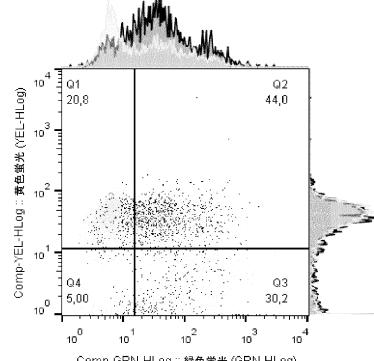
SEQ ID NO: 13



20

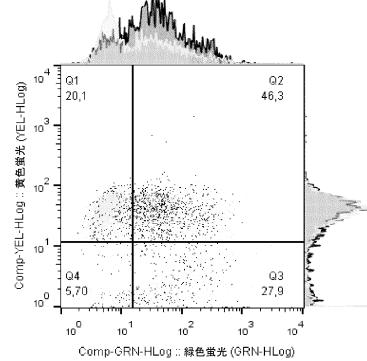
【図 1 - 3】

SEQ ID NO: 14



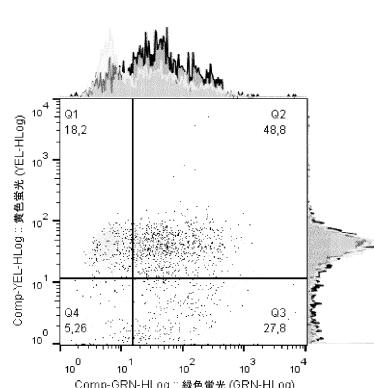
【図 1 - 4】

SEQ ID NO: 16

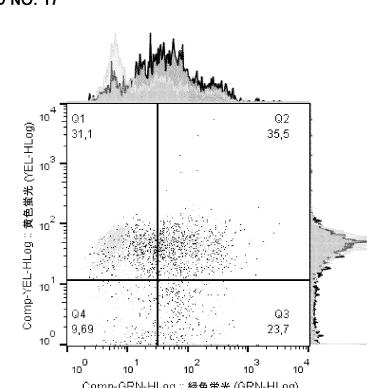


30

SEQ ID NO: 15



SEQ ID NO: 17

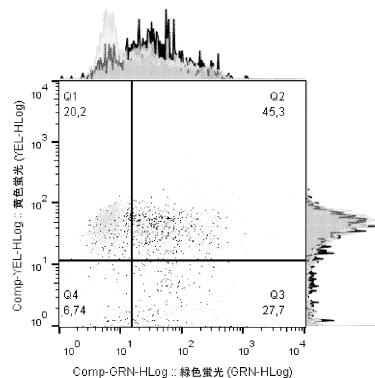


40

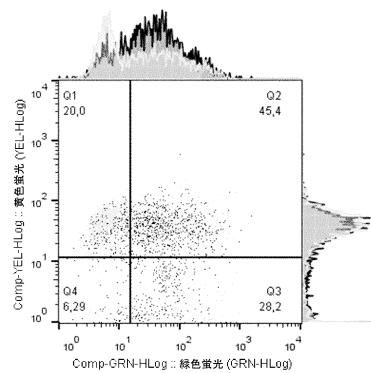
50

【図1-5】

SEQ ID NO: 21



SEQ ID NO: 22



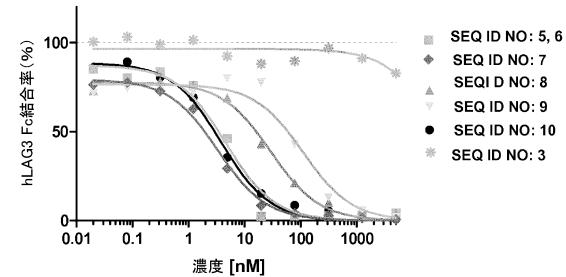
【図3-1】

SEQ ID NO:
SEQ ID NO: 1(ヒト尿波ポカリーン野生型)
SEQ ID NO: 3(陰性対照リボポカリーンムテイン)
SEQ ID NO: 4(陰性対照リボポカリーンムテイン)
SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 8
SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 10
SEQ ID NO: 11
SEQ ID NO: 12
SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 15
SEQ ID NO: 16
SEQ ID NO: 17
SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 20
SEQ ID NO: 21
SEQ ID NO: 22

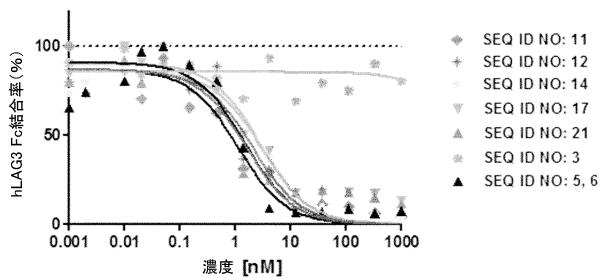
SEQ_ID	NO.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	SEQ_ID	NO.	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
SEQ_ID	NO. 1	A	M	T	V	D	R	F	P	E	M	N	L	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 1	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	C	E	G	L	H	G	K	P					
SEQ_ID	NO. 3	A	M	T	V	D	R	E	P	E	M	N	L	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 3	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	H	K	P				
SEQ_ID	NO. 4	A	M	T	V	D	R	E	P	E	M	N	L	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 4	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	H	K	P				
SEQ_ID	NO. 7	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	I	E	W	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 7	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	A	G	F	P			
SEQ_ID	NO. 8	A	M	T	V	S	G	E	D	P	E	M	P	E	T	L	E	S	V	T	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 8	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	H	T	P		
SEQ_ID	NO. 9	A	M	T	V	D	F	V	C	L	Y	D	V	P	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 9	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	Y	C	V	G	P			
SEQ_ID	NO. 10	A	M	T	V	D	E	T	C	W	Y	V	W	D	H	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 10	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	C	G	W	P				
SEQ_ID	NO. 11	A	M	T	V	D	T	S	D	C	F	W	I	D	D	V	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 11	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	C	A	G	P			
SEQ_ID	NO. 12	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	I	D	E	V	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 12	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	A	G	P			
SEQ_ID	NO. 13	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	I	E	W	S	A	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	D	L	E	SEQ_ID	NO. 13	G	G	K	H	A	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	A	G	F	P			
SEQ_ID	NO. 14	A	M	T	V	D	T	S	D	C	F	W	I	D	E	V	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 14	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	G	F	P		
SEQ_ID	NO. 15	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	I	E	W	S	A	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 15	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	A	G	F	P			
SEQ_ID	NO. 16	A	M	T	V	D	T	S	D	C	F	W	Y	D	E	V	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 16	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	A	G	F	P	
SEQ_ID	NO. 17	A	M	T	V	S	G	E	D	P	E	R	W	L	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 17	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	G	Y	P			
SEQ_ID	NO. 18	A	M	T	V	S	A	E	D	P	E	R	L	V	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 18	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	H	T	P			
SEQ_ID	NO. 19	A	M	T	V	D	S	D	D	E	P	E	M	P	E	T	L	E	S	V	T	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 19	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	G	T	P	
SEQ_ID	NO. 20	A	M	T	V	S	E	D	P	E	M	P	E	T	L	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 20	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	H	G	P		
SEQ_ID	NO. 21	A	M	T	V	S	G	E	D	P	E	M	N	L	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 21	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	C	G	O	G	P			
SEQ_ID	NO. 22	A	M	T	V	D	F	V	C	L	N	D	P	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO. 22	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	C	T	G	P					

【四 2】

A.



B.



【図 3 - 2】

SEQ ID NO:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	SEQ ID NO:	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
SEQ ID NO: 1 (ヒト源変異カルクレーン野生型)	H	H	I	L	A	S	D	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	L	K	SEQ ID NO: 1	A	K	V	T	M	L	I	S	G	R	C	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	A				
SEQ ID NO: 3 (陰性対照リボカルミンテイン)	A	S	D	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 3	A	K	V	T	M	L	I	S	G	R	S	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	A							
SEQ ID NO: 4 (陰性対照リボカルミンムイン)	A	S	D	E	I	Q	D	V	P	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 4	A	K	V	T	M	L	I	S	G	R	C	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	A							
SEQ ID NO: 7	A	S	D	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 7	A	K	V	T	M	D	I	F	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	A							
SEQ ID NO: 8	A	S	D	E	I	Q	D	V	P	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 8	A	R	V	T	A	L	I	D	G	R	C	Q	E	V	K	W	U	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	E						
SEQ ID NO: 9	A	S	D	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 9	A	K	V	T	M	Q	I	W	G	E	U	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	A							
SEQ ID NO: 10	A	S	D	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 10	A	K	V	T	M	Q	I	W	G	E	U	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	A							
SEQ ID NO: 11	A	S	D	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 11	A	K	V	T	M	D	I	F	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	A							
SEQ ID NO: 12	A	S	D	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 12	A	K	V	T	M	D	I	F	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	A							
SEQ ID NO: 13	A	S	D	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 13	A	K	V	T	M	D	I	F	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	A							
SEQ ID NO: 14	A	S	D	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 14	A	K	V	T	M	D	I	F	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	A							
SEQ ID NO: 15	A	S	D	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 15	A	E	T	M	D	I	F	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	A								
SEQ ID NO: 16	A	S	D	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 16	A	K	V	T	M	D	I	F	G	F	W	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	A							
SEQ ID NO: 17	A	S	D	E	I	Q	D	V	P	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 17	A	S	V	T	A	L	I	D	G	R	C	Q	E	V	K	N	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	E							
SEQ ID NO: 18	A	S	D	E	I	Q	D	V	P	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 18	A	S	V	T	A	L	I	D	G	R	C	Q	E	V	K	N	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	E							
SEQ ID NO: 19	A	S	D	E	I	Q	D	V	P	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 19	A	S	V	T	A	L	I	D	G	R	C	Q	E	V	K	N	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	E							
SEQ ID NO: 20	A	S	D	E	I	Q	D	V	P	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 20	A	S	V	T	A	L	I	D	G	R	C	Q	E	V	K	N	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	E							
SEQ ID NO: 21	A	S	D	E	I	Q	D	V	P	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 21	A	R	V	T	A	L	I	D	G	R	C	Q	E	V	K	N	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	E							
SEQ ID NO: 22	A	S	D	E	I	Q	D	V	S	G	T	W	Y	L	K	SEQ ID NO: 22	A	K	V	T	M	Q	I	W	G	E	U	Q	E	V	K	A	V	L	E	K	T	D	P	G	K	Y	T	A							

SEQ_ID	NO.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	SEQ_ID	NO.	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
SEQ_ID	NO.1	A	M	T	V	D	R	F	P	E	M	N	L	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.1	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	C	E	G	L	H	G	K	P					
SEQ_ID	NO.3	A	M	T	V	D	R	E	P	E	M	N	L	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.3	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	H	K	P				
SEQ_ID	NO.4	A	M	T	V	D	R	E	P	E	M	N	L	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.4	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	G	H	K	P				
SEQ_ID	NO.7	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	I	E	W	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.7	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	E	C	A	G	F	P			
SEQ_ID	NO.8	A	M	T	V	S	G	E	D	P	E	M	P	E	T	L	E	S	V	T	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.8	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	H	T	P		
SEQ_ID	NO.9	A	M	T	V	D	F	V	C	L	Y	D	V	P	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.9	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	Y	C	V	G	P			
SEQ_ID	NO.10	A	M	T	V	D	E	T	C	W	Y	W	V	D	H	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.10	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	C	G	W	P				
SEQ_ID	NO.11	A	M	T	V	D	T	S	D	C	F	W	I	D	D	V	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.11	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	C	A	G	P			
SEQ_ID	NO.12	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	I	D	E	V	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.12	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	C	A	G	P				
SEQ_ID	NO.13	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	I	E	W	S	A	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	D	L	E	SEQ_ID	NO.13	G	G	K	H	A	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	C	A	G	F	P				
SEQ_ID	NO.14	A	M	T	V	D	T	S	D	C	F	W	I	D	E	V	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.14	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	C	E	G	F	P		
SEQ_ID	NO.15	A	M	T	V	D	S	D	C	F	W	I	E	W	S	A	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.15	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	C	A	G	F	P				
SEQ_ID	NO.16	A	M	T	V	D	T	S	D	C	F	W	Y	D	E	V	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.16	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	C	A	G	F	P		
SEQ_ID	NO.17	A	M	T	V	S	G	E	D	P	E	M	P	E	T	L	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.17	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	G	T	P	
SEQ_ID	NO.18	A	M	T	V	S	A	E	D	P	E	M	P	E	T	L	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.18	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	H	T	P	
SEQ_ID	NO.19	A	M	T	V	D	S	D	D	E	P	E	M	P	E	T	L	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.19	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	G	T	P
SEQ_ID	NO.20	A	M	T	V	S	E	D	P	E	M	P	E	T	L	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.20	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	F	E	G	E	G	H	G	T		
SEQ_ID	NO.21	A	M	T	V	S	G	E	D	P	E	M	P	E	T	L	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.21	G	G	K	H	V	D	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	C	G	O	G	T	
SEQ_ID	NO.22	A	M	T	V	D	F	V	C	L	N	D	P	E	S	V	T	P	M	L	T	T	L	E	G	G	N	L	E	SEQ_ID	NO.22	G	G	K	H	V	A	Y	I	I	R	S	H	V	K	D	H	Y	I	F	Y	S	E	G	C	T	G	P					

【図 3 - 3】

SEQ ID NO: 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140
SEQ ID NO:1 R G V K L V G R D P K N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:3 P G V W L V G R D P K N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:4 R G V K L V G R D P T N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:7 P G V W L V G R D P K N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:8 R T V A L V G R D P T N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:9 P G V W L V G R D P K N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:10 P G V W L V G R D P K N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:12 P G V W L V G R D P K N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:13 P G V W L V G R D P K N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:14 P G V W L V G R D P K N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:15 P G V W L V G R D P K N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:16 P G V W L V G R D P K N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:17 R M V A L V G R D P T N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:18 R T V A L V G R D P T N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:19 R M V A L V G R D P T N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:20 R M V A L V G R D P T N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:21 R M V A L V G R D P T N N L E A L E D F E K A A G A R G L S
SEQ ID NO:22 P G V W L V G R D P K N N L E A L E D F E K A A G A R G L S

10

SEQ ID NO: 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158
SEQ ID NO:1 T E S I L I P R Q S E T C S P G S D
SEQ ID NO:3 T E S I L I P R Q S E T S S P G
SEQ ID NO:4 T E S I L I P R Q S E T C S P G
SEQ ID NO:7 T E S I L I P R Q S E T S S P G
SEQ ID NO:8 T E S I L I P R Q S E T C S P G
SEQ ID NO:9 T E S I L I P R Q S E T S S P G
SEQ ID NO:10 T E S I L I P R Q S E T S S P G
SEQ ID NO:11 T E S I L I P R Q S E T S S P G
SEQ ID NO:12 T E S I L I P R Q S E T S S P G
SEQ ID NO:13 T E S I L I P R Q S E T S S P G
SEQ ID NO:14 T E S I L I P R Q S E T S S P G
SEQ ID NO:15 T E S I L I P R Q S E T S S P G
SEQ ID NO:16 T E S I L I P R Q S E T S S P G
SEQ ID NO:17 T E S I L I P R Q S E T C S P G
SEQ ID NO:18 T E S I L I P R Q S E T C S P G
SEQ ID NO:19 T E S I L I P R Q S E T C S P G
SEQ ID NO:20 T E S I L I P R Q S E T C S P G
SEQ ID NO:21 T E S I L I P R Q S E T C S P G
SEQ ID NO:22 T E S I L I P R Q S E T S S P G

20

【配列表】

0007108535000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F	I		
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 K	47/60	(2017.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 K	47/61	(2017.01)	A 6 1 K	38/16
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/60
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/61
A 6 1 K	51/08	(2006.01)	A 6 1 K	47/64
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/68
G 0 1 N	33/68	(2006.01)	A 6 1 K	51/08
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02
			G 0 1 N	33/68
			A 6 1 P	35/00

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ローテ クリストィース

ドイツ連邦共和国 8 5 2 2 1 ダッハウ ハインリッヒ - ニコラウス - シュトラーセ 2 6

(72)発明者 アレアシュドルファー アンドレア

ドイツ連邦共和国 8 5 2 8 3 ヴォルンツアッハ モザルトシュトラーセ 2 0 エー

(72)発明者 ヴィーデンマン アレクサンダー

ドイツ連邦共和国 8 9 0 7 7 ウルム フュルステネッカーシュトラーセ 5

(72)発明者 ベル アイバ ラシダ シハム

ドイツ連邦共和国 8 0 4 6 9 ミュンヘン エアハルトシュトラーセ 1 5

(72)発明者 オルヴィル シェーン

ドイツ連邦共和国 8 5 3 5 4 フライジンク アム ヴァルトラント 2 3 エー

(72)発明者 アイヒナー ティモ

ドイツ連邦共和国 8 5 3 5 4 フライジンク ビスマルクシュトラーセ 2 2

審査官 中野 あい

(56)参考文献 特表 2 0 0 7 - 5 3 1 5 0 3 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 3 / 1 7 4 7 8 3 (WO , A 1)

国際公開第 2 0 1 4 / 0 7 6 3 2 1 (WO , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 1 2

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)