

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6140712号
(P6140712)

(45) 発行日 平成29年5月31日(2017.5.31)

(24) 登録日 平成29年5月12日(2017.5.12)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
A 61 K	47/50	(2017.01)	A 61 K	47/48	
A 61 K	47/42	(2017.01)	A 61 K	47/42	
A 61 K	38/00	(2006.01)	A 61 K	37/02	
A 61 P	37/02	(2006.01)	A 61 P	37/02	

請求項の数 15 (全 146 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-535807 (P2014-535807)
(86) (22) 出願日	平成24年10月10日 (2012.10.10)
(65) 公表番号	特表2015-501147 (P2015-501147A)
(43) 公表日	平成27年1月15日 (2015.1.15)
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/059477
(87) 國際公開番号	W02013/055745
(87) 國際公開日	平成25年4月18日 (2013.4.18)
審査請求日	平成27年10月9日 (2015.10.9)
(31) 優先権主張番号	61/546,028
(32) 優先日	平成23年10月11日 (2011.10.11)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	504333972 メディミューン、エルエルシー アメリカ合衆国 20878 メリーラン ド州、ゲイサーズバーグ、ワン メディミ ューン ウェイ
(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(74) 代理人	100169971 弁理士 菊田 尚子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C D 4 O L 特異的 T n 3 由来足場およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 2 つの C D 4 O L 特異的モノマーサブユニットを含む T n 3 足場であって、各モノマーサブユニットは、A、B、C、D、E、F、およびGと命名される 7 つのベータ鎖、ならびに A B、B C、C D、D E、E F、および F G と命名される 6 つのループ領域を含み、

ここで A ベータ鎖のアミノ酸配列は配列番号 1 1 であり、B ベータ鎖のアミノ酸配列は配列番号 1 2 であり、C ベータ鎖のアミノ酸配列は配列番号 1 4 であり、D ベータ鎖のアミノ酸配列は配列番号 1 5 であり、E ベータ鎖のアミノ酸配列は配列番号 1 6 であり、F ベータ鎖のアミノ酸配列は配列番号 1 7 であり、そして G ベータ鎖のアミノ酸配列は配列番号 1 8 であり、

A B ループのアミノ酸配列は配列番号 4 であり、B C ループのアミノ酸配列は配列番号 8 6 であり、C D ループのアミノ酸配列は配列番号 6 であり、D E ループのアミノ酸配列は配列番号 9 6 であり、E F ループのアミノ酸配列は配列番号 8 であり、および F G ループのアミノ酸配列は配列番号 1 3 9 であり、

前記 T n 3 足場は、C D 4 O L に特異的に結合する、前記 T n 3 足場。

【請求項 2】

タンデムに連結されている 2 つの C D 4 O L 特異的モノマーサブユニットを含む、請求項 1 に記載の T n 3 足場。

【請求項 3】

10

20

C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットがペプチドリンカーにより連結されている、請求項 2 に記載の T n 3 足場。

【請求項 4】

前記足場が C D 4 0 L に結合し、C D 4 0 L の C D 4 0 への結合を妨害するおよび／または C D 4 0 媒介シグナリングを破壊する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の T n 3 足場。

【請求項 5】

前記 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットの少なくとも 1 つが、タンパク質、ペプチド、タンパク質ドメイン、リンカー、薬物、毒素、細胞傷害剤、造影剤、放射性核種、放射性化合物、有機ポリマー、無機ポリマー、ポリエチレングリコール (P E G) 、ビオチン、アルブミン、ヒト血清アルブミン (H S A) 、H S A F c R n 結合部分、抗体、抗体のドメイン、抗体断片、单鎖抗体、ドメイン抗体、アルブミン結合ドメイン、酵素、リガンド、受容体、結合ペプチド、非 F n I I I 足場、エピトープタグ、組換えポリペプチドポリマーおよびサイトカインからなる群から選択される異種部分に融合またはコンジュゲートしている、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の T n 3 足場。 10

【請求項 6】

前記 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットの少なくとも 1 つが、P E G にコンジュゲートしているか、またはヒト血清アルブミン (H S A) に融合している、請求項 5 に記載の T n 3 足場。 20

【請求項 7】

前記 H S A が、H S A バリアントである、請求項 6 に記載の T n 3 足場。

【請求項 8】

前記 H S A バリアントが、配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列を有するか、または前記 H S A バリアントが、4 0 7 、 4 1 5 、 4 6 3 、 5 0 0 、 5 0 6 、 5 0 8 、 5 0 9 、 5 1 1 、 5 1 2 、 5 1 5 、 5 1 6 、 5 2 1 、 5 2 3 、 5 2 4 、 5 2 6 、 5 3 5 、 5 5 0 、 5 5 7 、 5 7 3 、 5 7 4 、および 5 8 0 からなる群から選択される位置における全長成熟 H S A 中の位置に対して番号付与される少なくとも 1 つのアミノ酸置換を除いて、配列番号 1 3 3 または 1 3 8 を有する全長成熟 H S A の配列またはその断片を含み；前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が、5 7 3 位におけるリジン (K) のグルタミン酸 (E) への置換を含まず、前記 T n 3 足場が、前記 H S A バリアントにコンジュゲートしていない T n 3 足場の血漿半減期よりも長い血漿半減期を有する、請求項 7 に記載の T n 3 足場。 30

【請求項 9】

配列番号 1 3 4 、 1 3 5 、 1 4 4 、 1 4 5 、 1 4 6 および 2 0 8 からなる群から選択される配列を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の T n 3 足場。

【請求項 10】

C D 4 0 L 発現細胞を請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の T n 3 足場と接触させることを含む C D 4 0 媒介シグナリング応答を変化させる方法であって、前記 T n 3 足場は、C D 4 0 L に結合し、C D 4 0 媒介シグナリングを破壊する、前記方法。

【請求項 11】

前記 C D 4 0 媒介シグナリング応答が、T 依存性免疫応答である、請求項 1 0 に記載の方法。 40

【請求項 12】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の T n 3 足場をコードする単離核酸分子。

【請求項 13】

請求項 1 2 に記載の核酸分子を含む発現ベクターを含む宿主細胞を、前記核酸分子によりコードされる T n 3 足場が発現される条件下で培養することを含む、T n 3 足場を產生する方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の T n 3 足場および薬学的に許容可能な賦形剤を含む組成物。 50

【請求項 15】

- 1) 自己免疫疾患の予防、治療、改善、または管理が必要とされる患者における自己免疫疾患を予防、治療、改善、または管理する方法；または
- 2) 自己免疫疾患有する患者に投与されるコルチコステロイドの頻度または量を低減させる方法であって、前記自己免疫疾患が、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および精巣炎、シェーグレン症候群、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性および他の網膜症、水晶体後線維増殖症、加齢性黄斑変性、血管新生性緑内障、血管腫、甲状腺過形成（グレーブス病を含む）、角膜および他の組織移植、ならびに慢性炎症、敗血症、関節リウマチ、腹膜炎、クローン病、再灌流損傷、敗血症、内毒素ショック、囊胞性線維症、心内膜炎、乾癬、関節炎（例えば、乾癬性関節炎）、アナフィラキシーショック、臓器虚血、再灌流損傷、脊髄損傷および同種移植片拒絶反応、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー皮膚炎、慢性疲労免疫機能不全症候群（C F I D S）、慢性炎症性脱髓多発性神経障害、チャーグストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、C R E S T 症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛・線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（I T P）、I g A 神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエル病、混合性結合組織病、多発性硬化症、1型または免疫介在性糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、ステイツフマン症候群、全身性エリテマトーデス、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、例えば、疱疹状皮膚炎血管炎、白斑およびウェゲナー肉芽腫症からなる群から選択される、前記方法において使用するための、請求項14に記載の組成物。10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照30

本出願は、部分的には、2011年10月11日に出願された米国仮特許出願第61/546,028号明細書、2010年4月13日に出願された米国仮特許出願第61/323,708号明細書；2011年4月12日に出願された国際出願第PCT/US2011/032184号明細書；2011年4月12日に出願された国際出願第PCT/US2011/032188号明細書；および2008年10月10日に出願されたPCT出願第PCT/US2008/012398号明細書に関連し、国際公開第2009/058379A2号パンフレットとして公開された主題を含有する。上記参考出願のそれぞれは、参考により全体として本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の参照40

本出願は、2012年10月3日に作成され、232キロバイトのサイズを有する表題「CD40L-101W01_SL.txt」のテストファイル（test file）としてEFS-Webを介するアプリケーションを用いて提出された配列表を参照により組み込む。

【0003】

本発明は、一般に、抗体模倣体の分野、具体的には、例えば、新規結合特性を有する産物の生成に有用なヒトテネイシンCの第3フィプロネクチンII型ドメインに由来する足場に関する。特に、本発明は、CD40L特異的Tn3足場、そのような足場を作製する方法、ならびに全身性エリテマトーデスならびに他の自己免疫および/または炎症障害の診断および治療に使用する方法に関する。50

【背景技術】**【0004】**

本発明は、例えば、自己免疫および／または炎症障害の治療に有用なCD40Lに結合するCD40L特異的タンパク質足場に関する。

【0005】

所望の標的エピトープに特異的に結合し得る生体分子は、治療、研究、および医用診断ツールとして非常に重要である。このクラスの分子の周知の例は、抗体である。ほとんど全ての構造的エピトープに特異的に親和性を有して結合する抗体を選択することができる。しかしながら、古典的な抗体は、構造的に複雑なヘテロテトラマー分子であり、単純な真核系中で発現させるのは困難である。結果として、ほとんどの抗体は、複雑で高価な哺乳動物細胞発現系を使用して產生される。10

【0006】

相対的に定義された三次元構造を有し、一般にタンパク質足場と称されるタンパク質は、遺伝子操作産物の設計のための試薬として使用することができる。このような足場が有用な1つの特定の領域は、抗体模倣体設計の分野である。抗体模倣体、すなわち、小分子非抗体タンパク質治療薬は、抗体および抗体断片の利点、例えば、標的の高親和性結合ならびに低免疫原性および毒性を利用する一方、不十分な点の一部、例えば、抗体断片が凝集し全長IgGよりも安定性が低い傾向を回避する。

【0007】

これらの欠点は、抗体ネイティブフォールドの一部の除去により作出される抗体断片を使用することにより対処することができる。しかしながら、これは、通常、疎水性環境、例えば、可変および定常ドメイン間の界面に埋もれているアミノ酸残基が溶媒に曝される場合、凝集を引き起こすことが多い。足場ベース抗体模倣体の一例は、門およびタンパク質クラスにわたり、例えば、哺乳動物血液および構造タンパク質において広く見出されるドメインであるフィブロネクチンII型ドメイン(FnIII)の構造に基づく。ヒトテネイシンCの第3FnIIIドメインに由来するFnIII足場の設計および使用は、PCT出願PCT/US2011/032184号明細書およびPCT/US2011/032188号明細書に記載されており、その両方は参照により全体として本明細書に組み込まれる。20

【0008】

CD40Lは、主として活性化T細胞(例として、Th0、Th1、およびTh2サブタイプ上で発現される分子のTNFファミリーのメンバーであり、このファミリーの他のメンバーと類似のホモトリマーを形成する。さらに、CD40Lは、マスト細胞、および活性化好塩基球および好酸球上で発現されることも見出されている。CD40Lは、抗原提示細胞(APC)上のCD40受容体(CD40R)に結合し、標的細胞型に応じて多くの効果をもたらす。一般に、CD40Lは、共刺激分子の役割を担い、APC上のMHC分子によるT細胞受容体刺激に伴いAPCにおける活性化を誘導する。30

【0009】

CD40LによるCD40受容体を介するシグナリングは、CD40受容体担持細胞の活性化および最適なCD4+T細胞のプライミングをもたらすイベントのカスケードを開始させる。より具体的には、CD40LとCD40受容体とのコグネット相互作用は、B細胞の抗体分泌細胞およびメモリーB細胞への分化を促進する(Burkly, In A dv. Exp. Med. Bio., Vol. 489., D. M. Monroe, U. Heden, M. R. Hoffman, C. Negrier, G. F. Savidge, and G. C. I. White, eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001, p. 135)。さらに、CD40LとCD40受容体との相互作用は、マクロファージおよび樹状細胞の活性化ならびにナチュラルキラー細胞および細胞傷害性Tリンパ球の生成を介して細胞媒介免疫を促進する(Burkly、前掲参照)。40

【0010】

50

CD40LとCD40受容体との相互作用は、いくつかの実験誘導自己免疫疾患、例えば、コラーゲン誘導関節炎、実験的アレルギー性脳脊髄炎、卵巣炎、大腸炎、薬物誘導性ループス腎炎において重要であることが示されている。具体的には、これらのモデルの全てにおける疾患誘導を抗原投与時においてCD40Lアンタゴニストにより遮断することができる事が示されている。抗CD40Lアンタゴニストを使用する疾患の遮断は、自発性自己免疫疾患、例として、インスリン依存性糖尿病およびループス腎炎の動物モデル、ならびに移植片対宿主病、移植、肺線維症、およびアテローム性動脈硬化症疾患モデルにおいても確認されている。

【0011】

CD40L遮断を介するCD40L / CD40R経路の破壊は、多くの自己免疫介在性疾患（例えば、限定されるものではないが、全身性エリテマトーデス（SLE）、関節リウマチ（RA）、多発性硬化症（MS）、炎症性腸疾患（IBD）および同種移植片拒絶反応において有益であることが示されている。例えば、抗CD40L抗体による治療は、コラーゲン誘導関節炎マウスモデルにおいて腎炎を予防または改善した（Mohanty et al. J. Immuno. 154: 1470）。さらに、抗CD40L抗体は、腎炎が樹立されたSNF1マウスにおいて腎機能を保存した（Kalled et al. J. Immuno. 160: 2158）。CD40Lレベルは、非ヒトおよびヒトの両方において臨床疾患重症度（すなわち、炎症の低減）、および標的組織の損傷と密接に相關する。

【0012】

SLEは、進行性および場合により致死性の自己免疫疾患である。ループスの多様な症候は、発疹および関節炎から貧血および血小板減少症からさらには精神病に及ぶ。多くの免疫系のアームが腎臓、皮膚、脳疾患および血栓症をもたらす炎症プロセスに関与することを示す明確な証拠が存在する。SLEの1つの特徴的な特性はB細胞トレランスの損失であり、自己抗体がこの疾患有する患者において顕著である。ループス腎疾患において、抗二本鎖DNA自己抗体は、抗体ヌクレオソーム複合体を形成し得、腎糸球体基底膜中に沈降する。これらの免疫複合体は、次いで補体を活性化し、糸球体腎炎をもたらし得る。

【0013】

CD40RおよびCD40Lの発現は、SLEを有する患者において上昇することが見出されている。共刺激シグナルの増加は、SLEにおいて見出される病理学的炎症応答に寄与する可能性が高い。SLE T細胞は、自己抗原に対する活性化の閾値の低減に伴う、自発的に増加した活性化を有する。さらに、これらの細胞は、さらなる抗原性刺激に低応答性であり、アポトーシスに耐性であり、活性化後の生存率の増加を有し、多くの変化した細胞内シグナリング経路を有する。T細胞CD40LによるAPC上でのCD40R活性化後、APCおよびT細胞の両方が活性化され、サイトカインを産生し、SLEにおいて病原性自己抗体の産生および組織損傷（ループス腎炎）に寄与する。CD40R / CD40L経路の遮断は、ループスモデルマウスにおける疾患の遮断において単独または組合せで有効である。SLEを有する患者において、ヒト化CD40L抗体は、抗dsDNAおよびB細胞、タンパク尿を低減させ、SLE疾患重症度を改善した。

【0014】

しかしながら、従来の抗体によるCD40Lの標的化は、顕著な安全性の懸念を生じさせている。例えば、慢性難治性特発性血小板減少性紫斑病（ITP）を罹患する患者における抗CD40L抗体5c8（BIOGEN（登録商標））を用いる試験は、血栓閉塞性合併症が報告されたため、保留された（Davidson et al. Arthritis Rheum., 43: S271）。さらに、CD40Lに対して指向される代替抗体を用いる追加の試験は、他の血栓性関連合併症を生じさせた（Davis et al. Arthritis Rheum., 43: S281; Schuler, Transplantation, 77: 717）。CD40Lの抗体指向アンタゴニズムにより合併症が生じるため、非抗体代替物によりCD40Lを標的化およびアンタゴナイズする要求は満たされてない。したがって

10

20

30

40

50

、Tn3ベース足場によるCD40Lの標的化は、Fab2および/またはFc媒介血小板凝集ならびに下流の副作用を回避することによる魅力的な代替策である。

【0015】

本明細書における参照文献の引用および考察は、それらが本発明に対する先行技術であることを認めるものと解釈すべきではない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

【特許文献1】PCT出願PCT/US2011/032184号明細書

【特許文献2】PCT/US2011/032188号明細書

10

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】Burkly, In Adv. Exp. Med. Bio., Vol. 489., D.M. Monroe, U. Hedner, M.R. Hoffman, C. Negrier, G.F. Savidge, and G.C.I. White, eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001, p. 135

【非特許文献2】Mohan et al. J. Immuno. 154: 1470

【非特許文献3】Kalled et al. J. Immuno. 160: 2158

【非特許文献4】Davidson et al. Arth Rheu, 43: S271

20

【非特許文献5】Davis et al. Arth Rheu, 43: S281; Schuler, Transplantation, 77: 717

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含むTn3足場であって、モノマーサブユニットは、A、B、C、D、E、F、およびGと命名される7つのペータ鎖、ならびにAB、BC、CD、DE、EF、およびFGと命名される6つのループ領域を含み、CD40Lに特異的に結合するTn3足場を提供する。一部の実施形態において、Tn3足場は、単一のCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。他の実施形態において、Tn3足場は、タンデムに連結されている2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。一部の具体的な実施形態において、Tn3足場は、直接連結されている2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。

30

【0019】

一部の実施形態において、2つのCD40L特異的モノマーサブユニットは、リンカーにより連結されている。他の実施形態において、リンカーは、フレキシブルペプチドリンカーであり得るペプチドリンカーを含む。一部の実施形態において、ペプチドリンカーは、(G_mX)_n配列(式中、Xは、セリン(S)、アラニン(A)、グリシン(G)、Leu(L)、イソロイシン(I)、またはバリン(V)であり；mおよびnは、整数値であり；mは、1、2、3または4であり；nは、1、2、3、4、5、6、または7である)を含む。一部の実施形態において、ペプチドリンカーは、配列番号131、配列番号132、配列番号142または配列番号143を含む。

40

【0020】

一部の実施形態において、2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含むTn3足場のCD40Lへの結合は、単一のCD40L特異的モノマーサブユニットを含むTn3足場のそれと比べて改善される。他の実施形態において、2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含むTn3足場のCD40Lへの結合は、標的にに対する作用を単一のCD40L特異的モノマーサブユニットを含むTn3足場のそれと比べて改善する。他の実施形態において、Tn3足場のCD40Lへの結合の改善は、結合親和性の改善、結合アビディティーの改善、またはその両方である。ある実施形態において、2つのCD40

50

L特異的モノマーサブユニットを含むTn3足場のCD40Lへの結合親和性およびTn3足場タンパク質安定性は、単一のCD40L特異的モノマーサブユニットを含むTn3足場のそれらと比べて改善される。一部の実施形態において、2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含むTn3足場のCD40Lについての結合アビディティーおよびTn3足場タンパク質安定性は、単一のCD40L特異的モノマーサブユニットを含むTn3足場のそれらと比べて改善される。

【0021】

一部の実施形態において、Tn3足場中の少なくとも1つのCD40L特異的モノマーサブユニットは、リンカーに、または異種部分に結合している。他の実施形態において、Tn3足場中のリンカーまたは異種部分は、CD40L特異的モノマーサブユニットのN末端またはC末端にコンジュゲートしている。ある実施形態において、Tn3足場中のCD40L特異的モノマーサブユニットに結合しているリンカーは、一部の実施形態においてはフレキシブルペプチドリンカーであり得るペプチドリンカーを含む。このペプチドリンカーは、ある実施形態において、(G_mX)_n配列(式中、Xは、セリン(S)、アラニン(A)、グリシン(G)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、またはバリン(V)であり；mおよびnは、整数であり；mは、1、2、3または4であり；nは、1、2、3、4、5、6、または7である)を含み得る。一部の実施形態において、Tn3足場中のCD40L特異的モノマーサブユニットに結合しているペプチドリンカーは、配列番号131、配列番号132、配列番号142、または配列番号143を含む。

【0022】

一部の実施形態において、Tn3足場は、機能的部分を含むリンカーを含む。一部の実施形態において、この機能的部分は、免疫グロブリンまたはその断片である。ある実施形態において、この免疫グロブリンまたはその断片は、Fcドメインを含む。一部の実施形態において、このFcドメインは、少なくとも1つのFcR媒介エフェクター機能を誘導し得ない。一部の実施形態において、この少なくとも1つのFcR媒介エフェクター機能は、ADCCである。

【0023】

一部の実施形態において、Tn3足場は、異種部分に結合している少なくとも1つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。一部の実施形態において、この異種部分は、タンパク質、ペプチド、タンパク質ドメイン、リンカー、薬物、毒素、細胞傷害剤、造影剤、放射性核種、放射性化合物、有機ポリマー、無機ポリマー、ポリエチレングリコール(PEG)、ビオチン、アルブミン、ヒト血清アルブミン(HSA)、HSA-FcR_n結合部分、抗体、抗体のドメイン、抗体断片、单鎖抗体、ドメイン抗体、アルブミン結合ドメイン、酵素、リガンド、受容体、結合ペプチド、非FnIII足場、エピトープタグ、組換えポリペプチドポリマー、サイトカイン、および前記部分の2つ以上の組合せからなる群から選択される組成物を含む。

【0024】

一部の実施形態において、Tn3足場は、PEGにコンジュゲートしている少なくとも1つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。一部の実施形態において、Tn3足場は、アルブミンにコンジュゲートしている少なくとも1つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。ある実施形態において、このアルブミンは、ヒト血清アルブミン(HSA)である。他の実施形態において、このHSAは、バリアントHSAである。一部の具体的な実施形態において、バリアントHSAのアミノ酸配列は、配列番号133である。他の実施形態において、バリアントHSAは、ネイティブHSAまたはネイティブHSA断片と比較して少なくとも1つの改善された特性を有する。ある実施形態において、改善された特性は、ネイティブHSAまたはネイティブHSA断片の血漿半減期と比較して変化した血漿半減期である。一部の実施形態において、変化した血漿半減期は、ネイティブHSAまたはネイティブHSA断片の血漿半減期と比較して長い血漿半減期である。他の実施形態において、変化した血漿半減期は、ネイティブHSAまたはネイティブHSA断片の血漿半減期と比較して短い血漿半減期である。

10

20

30

40

50

【0025】

一部の実施形態において、Tn3足場は、HSAドメインIII中の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むHSAバリアントに融合している。他の実施形態において、Tn3足場は、全長成熟HSA(配列番号133または138)の配列またはその断片を含むHSAバリアントに融合しており、但し、407、415、463、500、506、508、509、511、512、515、516、521、523、524、526、535、550、557、573、574、および580からなる群から選択される位置における全長成熟HSA中の位置に対して番号付与される少なくとも1つのアミノ酸置換を除き；少なくとも1つのアミノ酸置換は、573位におけるリジン(K)のグルタミン酸(E)への置換を含まず、Tn3足場は、このようなHSAバリアントにコンジュゲートしていないTn3足場の血漿半減期よりも長い血漿半減期を有する。10

【0026】

一部の実施形態において、Tn3足場は、HSAバリアントに融合しており、全長成熟HSA中の位置に対して番号付与される少なくとも1つのアミノ酸置換は、463、508、523、および524からなる群から選択される位置におけるものであり、前記Tn3足場は、前記HSAバリアントにコンジュゲートしていないTn3足場の血漿半減期よりも長い血漿半減期を有する。一部の実施形態において、HSAバリアントは、全長成熟HSA(配列番号133または138)の配列またはその断片を含み、但し、(a)407位におけるロイシン(L)のアスパラギン(N)またはチロシン(Y)への置換；(b)415位におけるバリン(V)のトレオニン(T)への置換；(c)463位におけるロイシン(L)のアスパラギン(N)への置換；(d)500位におけるリジン(K)のアルギニン(R)への置換；(e)506位におけるトレオニン(T)のチロシン(Y)への置換；(f)508位におけるトレオニン(T)のアルギニン(R)への置換；(g)509位におけるフェニルアラニン(F)のメチオニン(M)またはトリプトファン(W)への置換；(h)511位におけるアラニン(A)のフェニルアラニン(F)への置換；(i)512位におけるアスパラギン酸(D)のチロシン(Y)への置換；(j)515位におけるトレオニン(T)のグルタミン(Q)への置換；(k)516位におけるロイシン(L)のトレオニン(T)またはトリプトファン(W)への置換；(l)521位におけるアルギニン(R)のトリプトファン(W)への置換；(m)523位におけるイソロイシン(I)のアスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、グリシン(G)、リジン(K)、またはアルギニン(R)への置換；(n)524位におけるリジン(K)のロイシン(L)への置換；(o)526位におけるグルタミン(Q)のメチオニン(M)への置換；(p)535位におけるヒスチジン(H)のプロリン(P)への置換；(q)550位におけるアスパラギン酸(D)のグルタミン酸(E)への置換；(r)557位におけるリジン(K)のグリシン(G)への置換；(s)573位におけるリジン(K)のフェニルアラニン(F)、ヒスチジン(H)、プロリン(P)、トリプトファン(W)、またはチロシン(Y)への置換；(t)574位におけるリジン(K)のアスパラギン(N)への置換；(u)580位におけるグルタミン(Q)のリジン(K)への置換；および(v)前記置換の2つ以上の組合せからなる群から選択される全長成熟HSA中の位置に対して番号付与される少なくとも1つのアミノ酸置換を除き、前記Tn3足場は、前記HSAバリアントにコンジュゲートしていないTn3足場の血漿半減期よりも長い血漿半減期を有する。3040

【0027】

一部の実施形態において、Tn3足場は、全長成熟HSA(配列番号133または138)の配列またはその断片を含むHSAバリアントに融合しており、但し、(a)463位におけるロイシン(L)のアスパラギン(N)への置換；(b)508位におけるトレオニン(T)のアルギニン(R)への置換；(c)523位におけるイソロイシン(I)のアスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、グリシン(G)、リジン(K)、またはアルギニン(R)への置換；(d)524位におけるリジン(K)のロイシン(L)への置換；および(e)前記置換の2つ以上の組合せからなる群から選択される全長成熟HSA中的位置に対して番号付与される少なくとも1つのアミノ酸置換を除き、前記Tn3足場は、前記HSAバリアントにコンジュゲートしていないTn3足場の血漿半減期よりも長い血漿半減期を有する。50

A中の位置に対して番号付与される少なくとも1つのアミノ酸置換を除き、前記Tn3足場は、前記HSAバリアントにコンジュゲートしていないTn3足場の血漿半減期よりも長い血漿半減期を有する。

【0028】

一部の実施形態において、Tn3足場は、少なくとも2つの同一のCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。他の実施形態において、Tn3足場は、少なくとも2つの異なるCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。一部の実施形態において、Tn3足場は、CD40受容体アゴニストである。他の実施形態において、Tn3足場は、CD40受容体アンタゴニストである。

【0029】

一部の実施形態において、Tn3足場は、同一のCD40Lエピトープに特異的に結合する少なくとも2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。他の実施形態において、Tn3足場は、異なるCD40Lエピトープに特異的に結合する少なくとも2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。一部の実施形態において、これらの異なるCD40Lエピトープは、非重複エピトープである。他の実施形態において、これらの異なるCD40Lエピトープは、重複エピトープである。

【0030】

一部の実施形態において、Tn3足場は、少なくとも2つのCD40L分子に結合する。他の実施形態において、Tn3足場は、少なくとも2つのCD40L分子に結合するCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。

【0031】

一部の実施形態において、Tn3足場の少なくとも1つのCD40L特異的モノマーサブユニットのベータ鎖は、配列番号3のベータ鎖と少なくとも90%の配列同一性を有する。他の実施形態において、Tn3足場は、配列番号11を含むAベータ鎖を含み、または少なくとも1つの突然変異を除き配列番号11を含むAベータ鎖を含むCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。他の実施形態において、Tn3足場は、配列番号12を含むBベータ鎖を含み、または少なくとも1つの突然変異を除き配列番号12を含むBベータ鎖を含むCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。一部の実施形態において、Tn3足場は、配列番号13もしくは14を含むCベータ鎖を含み、または少なくとも1つの突然変異を除き配列番号13もしくは14を含むCベータ鎖を含むCD40L特異的モノマーサブユニットを含み、配列番号13のシステインも配列番号14のシステインも置換されていない。他の実施形態において、Tn3足場は、配列番号15を含むDベータ鎖を含み、または少なくとも1つの突然変異を除き配列番号15を含むDベータ鎖を含むCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。

【0032】

一部の実施形態において、Tn3足場は、配列番号16を含むEベータ鎖を含み、または少なくとも1つの突然変異を除き配列番号16を含むEベータ鎖を含むCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。他の実施形態において、Tn3足場は、配列番号17を含むFベータ鎖を含み、または少なくとも1つの突然変異を除き配列番号17を含むFベータ鎖を含むCD40L特異的モノマーサブユニットを含み、配列番号17のシステインは置換されていない。一部の実施形態において、Tn3足場は、配列番号18を含むGベータ鎖を含み、または少なくとも1つの突然変異を除き配列番号18を含むGベータ鎖を含むCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。

【0033】

一部の実施形態において、Tn3足場は、アミノ酸配列：

I E V (X_{A B})_n A L I T W (X_{B C})_n C E L X₁ Y G I (X_{C D})_n T T I D L (X_{D E})_n Y S I (X_{E F})_n Y E V S L I C (X_{F G})_n K E T F T T
(式中、X_{A B}、X_{B C}、X_{C D}、X_{D E}、X_{E F}、およびX_{F G}は、それぞれA B、B C、C D、D E、E F、およびF Gループの配列中に存在するアミノ酸残基を表し；X₁は、アミノ酸残基AまたはTを表し；ループの長さnは、2から26の整数である)

10

20

30

40

50

を含む CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含む。

【0034】

一部の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、ABループの配列は、配列番号4または配列番号136を含み、CDループの配列は、配列番号6を含み、EFループの配列は、配列番号8または配列番号137を含む。他の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、および168からなる群から選択される配列を含む。10 一部の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、DEループの配列は、配列番号94、95、96、97、98、および169からなる群から選択される配列を含む。一部の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、FGループの配列は、配列番号9、99、139、および170からなる群から選択される配列を含む。

【0035】

他の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、および174からなる群から選択される配列を含む。20 ある実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、DEループの配列は、配列番号118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、および175からなる群から選択される配列を含む。他の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、FGループの配列は、配列番号129、130、および177からなる群から選択される配列を含む。20 ある実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、ABループの配列は、配列番号4および136からなる群から選択される配列を含む。

【0036】

一部の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号83を含み、DEループの配列は、配列番号94を含み、FGループの配列は、配列番号9または139を含む。他の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号83を含み、DEループの配列は、配列番号94を含み、FGループの配列は、配列番号99を含む。30 他の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号84を含み、DEループの配列は、配列番号95を含み、FGループの配列は、配列番号9または139を含む。

【0037】

一部の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号85を含み、DEループの配列は、配列番号94を含み、FGループの配列は、配列番号9または139を含む。40 一部の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号86を含み、DEループの配列は、配列番号96を含み、FGループの配列は、配列番号9または139を含む。一部の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号87を含み、DEループの配列は、配列番号97を含み、FGループの配列は、配列番号9または139を含む。

【0038】

一部の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号88を含み、DEループの配列は、配列番号95を含み、FGループの配列は、配列番号9または139を含む。他の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号89を含み、DEループの配列は、配列番号94を含み、FGループの配列は、配列番号9または139を含む。50 一部の実施形態において、Tn3足場は、CD 40 L 特異的モノマーサブユニットを含む。

ノマーサブユニットを含み、B C ループの配列は、配列番号 9 0 を含み、D E ループの配列は、配列番号 9 4 を含み、F G ループの配列は、配列番号 9 または 1 3 9 を含む。

【 0 0 3 9 】

他の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号91を含み、DEループの配列は、配列番号95を含み、FGループの配列は、配列番号9または139を含む。一部の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号92を含み、DEループの配列は、配列番号98を含み、FGループの配列は、配列番号9または139を含む。他の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号93を含み、DEループの配列は、配列番号94を含み、FGループの配列は、配列番号9または139を含む。

10

〔 0 0 4 0 〕

一部の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号100を含み、DEループの配列は、配列番号118を含み、FGループの配列は、配列番号129を含む。他の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号101を含み、DEループの配列は、配列番号119を含み、FGループの配列は、配列番号129を含む。一部の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号102を含み、DEループの配列は、配列番号120を含み、FGループの配列は、配列番号129を含む。他の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号103を含み、DEループの配列は、配列番号121を含み、FGループの配列は、配列番号129を含む。一部の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、ABループの配列は、配列番号136を含む。

20

〔 0 0 4 1 〕

一部の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号104を含み、DEループの配列は、配列番号122を含み、FGループの配列は、配列番号129を含む。他の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号105を含み、DEループの配列は、配列番号121を含み、FGループの配列は、配列番号129を含む。他の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号106を含み、DEループの配列は、配列番号123を含み、FGループの配列は、配列番号129を含む。一部の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、ABループの配列は、配列番号136を含む。

30

【 0 0 4 2 】

ある実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号107を含み、DEループの配列は、配列番号123を含み、FGループの配列は、配列番号129を含む。他の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号108を含み、DEループの配列は、配列番号118を含み、FGループの配列は、配列番号129を含む。一部の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、BCループの配列は、配列番号109を含み、DEループの配列は、配列番号123を含み、FGループの配列は、配列番号129を含む。一部の実施形態において、BCループの配列は、配列番号110を含み、DEループの配列は、配列番号121を含み、FGループの配列は、配列番号129を含む。一部の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、ABループの配列は、配列番号136を含む。

40

【 0 0 4 3 】

一部の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含

50

み、B C ループの配列は、配列番号 1 1 1 を含み、D E ループの配列は、配列番号 1 2 3 を含み、F G ループの配列は、配列番号 1 3 0 を含む。他の実施形態において、T n 3 足場は、C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含み、B C ループの配列は、配列番号 1 0 8 を含み、D E ループの配列は、配列番号 1 2 1 を含み、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 を含む。一部の実施形態において、T n 3 足場は、C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含み、B C ループの配列は、配列番号 1 1 2 を含み、D E ループの配列は、配列番号 1 2 4 を含み、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 を含む。一部の実施形態において、T n 3 足場は、C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含み、B C ループの配列は、配列番号 1 1 3 を含み、D E ループの配列は、配列番号 1 2 5 を含み、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 を含む。一部の実施形態において、T n 3 足場は、C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含み、A B ループの配列は、配列番号 1 3 6 を含む。
10

【 0 0 4 4 】

一部の実施形態において、T n 3 足場は、C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含み、B C ループの配列は、配列番号 1 1 4 を含み、D E ループの配列は、配列番号 1 1 8 を含み、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 を含む。他の実施形態において、T n 3 足場は、C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含み、B C ループの配列は、配列番号 1 1 5 を含み、D E ループの配列は、配列番号 1 2 6 を含み、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 を含む。一部の実施形態において、T n 3 足場は、C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含み、B C ループの配列は、配列番号 1 1 6 を含み、D E ループの配列は、配列番号 1 2 7 を含み、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 を含む。一部の実施形態において、T n 3 足場は、C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含み、B C ループの配列は、配列番号 1 1 7 を含み、D E ループの配列は、配列番号 1 2 8 を含み、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 を含む。一部の実施形態において、T n 3 足場は、C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含み、A B ループの配列は、配列番号 1 3 6 を含む。
20

【 0 0 4 5 】

一部の実施形態において、T n 3 足場は、配列番号 2 0 、 2 2 、 2 4 、 2 6 、 2 8 、 3 0 、 3 2 、 3 4 、 3 6 、 3 8 、 4 0 、 4 2 および 1 4 6 からなる群から選択される配列を含む C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む。一部の実施形態において、T n 3 足場は、アミノ酸配列：

I E V K D V T D T T A L I T W X₁ D X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ C E L T Y G I K
D V P G D R T T I D L W X₉ H X₁₀ A X₁₁ Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C
R X₁₂ G D M S S N P A K E T F T T (配列番号 1 6 7)
30

(式中、(a) X₁ は、アミノ酸残基セリン(S)またはロイシン(L)を表し；(b) X₂ は、アミノ酸残基アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)を表し；(c) X₃ は、アミノ酸残基ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、バリン(V)、フェニルアラニン(F)またはトリプトファン(W)を表し；(d) X₄ は、アミノ酸残基アラニン(A)、グリシン(G)、グルタミン酸(E)またはアスパラギン酸(D)を表し；(e) X₅ は、アミノ酸残基グルタミン酸(E)、ロイシン(L)、グルタミン(Q)、セリン(S)、アスパラギン酸(D)またはアスパラギン(N)を表し；(f) X₆ は、アミノ酸残基フェニルアラニン(F)またはチロシン(Y)を表し；(g) X₇ は、アミノ酸残基イソロイシン(I)、バリン(V)、ヒスチジン(H)、グルタミン酸(E)またはアスパラギン酸(D)を表し；(h) X₈ は、アミノ酸残基グリシン(G)、トリプトファン(W)またはバリン(V)を表し；(i) X₉ は、アミノ酸残基トリプトファン(W)、フェニルアラニン(F)またはチロシン(Y)を表し；(j) X₁₀ は、アミノ酸残基セリン(S)、グルタミン(Q)、メチオニン(M)またはヒスチジン(H)を表し；(k) X₁₁ は、アミノ酸残基トリプトファン(W)またはヒスチジン(H)を表し；(l) X₁₂ は、アミノ酸残基アルギニン(R)またはセリン(S)を表す)
40
を含む C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む。

【 0 0 4 6 】

一部の実施形態において、T n 3 足場は、配列番号 4 4 、 4 6 、 4 8 、 5 0 、 5 2 、 5 50

4、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、および82からなる群から選択される配列を含むCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。

【0047】

一部の実施形態において、Tn3足場は、アミノ酸配列：

I E V X₁ D V T D T T A L I T W X₂ X₃ R S X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ C E L
X₁₁ Y G I K D V P G D R T T I D L X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅ Y V H Y S I G N L K
P D T X₁₆ Y E V S L I C L T T D G T Y X₁₇ N P A K E T F T T (配列番号171)
)

(式中、

10

- (a) X₁ は、アミノ酸残基リジン (K) またはグルタミン酸 (E) を表し；
 - (b) X₂ は、アミノ酸残基トレオニン (T) またはイソロイシン (I) を表し；
 - (c) X₃ は、アミノ酸残基アスパラギン (N) またはアラニン (A) を表し；
 - (d) X₄ は、アミノ酸残基セリン (S)、ロイシン (L)、アラニン (A)、フェニルアラニン (F) またはチロシン (Y) を表し；
 - (e) X₅ は、アミノ酸残基チロシン (Y)、アラニン (A)、グリシン (G)、バリン (V)、イソロイシン (I) またはセリン (S) を表し；
 - (f) X₆ は、アミノ酸残基チロシン (Y)、セリン (S)、アラニン (A) またはヒスチジン (H) を表し；
 - (g) X₇ は、アミノ酸残基アスパラギン (N)、アスパラギン酸 (D)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；
 - (h) X₈ は、アミノ酸残基ロイシン (L)、フェニルアラニン (F)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；
 - (i) X₉ は、アミノ酸残基ヒスチジン (H)、プロリン (P)、セリン (S)、ロイシン (L) またはアスパラギン酸 (D) を表し；
 - (j) X₁₀ は、アミノ酸残基グリシン (G)、フェニルアラニン (F)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；
 - (k) X₁₁ は、アミノ酸残基アラニン (A) またはトレオニン (T) を表し；
 - (l) X₁₂ は、アミノ酸残基セリン (S)、アスパラギン (N)、グルタミン酸 (E)、アスパラギン (R) またはアスパラギン酸 (D) を表し；
 - (m) X₁₃ は、アミノ酸残基セリン (S)、グルタミン (Q)、トレオニン (T)、アスパラギン (N) またはアラニン (A) を表し；
 - (n) X₁₄ は、アミノ酸残基プロリン (P)、バリン (V)、イソロイシン (I) またはアラニン (A) またはアミノ酸無しを表し；
 - (o) X₁₅ は、アミノ酸残基イソロイシン (I) またはアミノ酸無しを表し；
 - (p) X₁₆ は、アミノ酸残基グルタミン酸 (E) またはリジン (K) を表し；
 - (q) X₁₇ は、アミノ酸残基セリン (S) またはアスパラギン (N) を表す)
- を含むCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。

30

【0048】

一部の実施形態において、Tn3足場は、配列番号134、135、205、206、207および208からなる群から選択される配列を含む。他の実施形態において、Tn3足場は、配列番号134、135、205、206、207および208からなる群から選択される配列からなる。

40

【0049】

一部の実施形態において、Tn3足場は、配列番号201、202、203、および204からなる群から選択される配列を含む。一部の実施形態において、Tn3足場は、配列番号201、202、203、および204からなる群から選択される配列からなる。一部の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、前記CD40L特異性は、ヒトCD40Lに関する。一部の実施形態において、Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットを含み、前記CD40L特異性は、膜結

50

合 C D 4 0 L (配列番号 1)、可溶性 C D 4 0 L (配列番号 2)、またはその断片に向かられる。一部の具体的な実施形態において、T n 3 足場は、C D 4 0 L に結合し、C D 4 0 L の C D 4 0 への結合を妨害する。

【 0 0 5 0 】

本発明はまた、C D 4 0 L 発現細胞を T n 3 足場と接触させることを含み C D 4 0 L 発現細胞の活性を変化させる方法であって、T n 3 足場は、C D 4 0 L に結合し、C D 4 0 L の C D 4 0 への結合を妨害する方法を提供する。一部の実施形態において、T n 3 足場は、約 1 μ M 以下、または約 5 0 0 n M 以下、または約 1 0 0 n M 以下、または約 5 0 n M 以下、または約 2 5 n M 以下、または約 1 0 n M 以下、または約 5 n M 以下、または約 2 n M 以下の親和性 (K_d) で C D 4 0 L に結合する。

10

【 0 0 5 1 】

一部の実施形態において、T n 3 足場は、配列番号 2 の 1 4 2 から 1 5 5、2 0 0 から 2 3 0、または 2 4 7 から 2 5 1 位に局在するアミノ酸を含む C D 4 0 L エピトープに特異的に結合する C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含み、一部の実施形態において、T n 3 足場は、C D 4 0 L アミノ酸 E 1 4 2、Y 1 4 6、M 1 4 8、N 1 5 1、L 1 5 5、R 2 0 0、R 2 0 3、および E 2 3 0 と相互作用する C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む。他の実施形態において、T n 3 足場は、C D 4 0 L アミノ酸 R 2 0 3、I 2 0 4、V 2 4 7、H 2 4 9、および T 2 5 1 と相互作用する C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む。他の実施形態において、T n 3 足場は、第 1 の C D 4 0 L 分子中に局在する C D 4 0 L アミノ酸 E 1 4 2、Y 1 4 6、M 1 4 8、N 1 5 1、L 1 5 5 と、および第 2 の C D 4 0 L 分子中に局在する C D 4 0 L アミノ酸 R 2 0 0、R 2 0 3、および E 2 3 0 と相互作用する C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む。他の実施形態において、T n 3 足場は、第 1 の C D 4 0 L 分子中に局在する C D 4 0 L アミノ酸 R 2 0 3 および I 2 0 4 と、および第 2 の C D 4 0 L 分子中に局在する C D 4 0 L アミノ酸 V 2 4 7、H 2 4 9、および T 2 5 1 と相互作用する C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む。

20

【 0 0 5 2 】

本発明はまた、1 つ以上の C D 4 0 L 特異的モノマーを含むポリペプチド、例として、限定されるものではないが、本明細書に記載の血清アルブミン融合体を提供する。

【 0 0 5 3 】

30

本発明はまた、C D 4 0 L 特異的 T n 3 足場をコードする単離核酸分子、C D 4 0 L 特異的 T n 3 足場を含むコードする核酸分子を含む発現ベクター、およびこののようなベクターを含む宿主細胞を提供する。本発明はまた、核酸分子によりコードされる C D 4 0 L 特異的 T n 3 足場が発現される条件下で宿主細胞を培養することを含む、T n 3 足場を產生する方法を提供する。

【 0 0 5 4 】

本発明はまた、C D 4 0 L 特異的 T n 3 足場および薬学的に許容可能な賦形剤を含む医薬組成物を提供する。本発明はまた、C D 4 0 L 特異的 T n 3 足場を含む有効量の医薬組成物を投与することを含む、自己免疫疾患の予防、治療、改善、または管理が必要とされる患者における自己免疫疾患を予防、治療、改善、または管理する方法を提供する。

40

【 0 0 5 5 】

本発明はまた、C D 4 0 L 特異的 T n 3 足場を含む治療有効量の医薬組成物を患者に投与することを含む、自己免疫を有する患者に投与されるコルチコステロイドの頻度および量を低減させる方法を提供する。

【 0 0 5 6 】

C D 4 0 L 特異的 T n 3 足場の投与により治療される自己免疫疾患は、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および精巣炎、シェーグレン症候群、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性および他の網膜症、水晶体後線維増殖症、加齢性黄斑変性、血管新生性緑内障、血管腫、甲状腺過形成（グレーブス病を含む）、角膜お

50

および他の組織移植、ならびに慢性炎症、敗血症、関節リウマチ、腹膜炎、クローン病、再灌流損傷、敗血症、内毒素ショック、囊胞性線維症、心内膜炎、乾癬、関節炎（例えば、乾癬性関節炎）、アナフィラキシーショック、臓器虚血、再灌流損傷、脊髄損傷および同種移植片拒絶反応。自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルーピ膚炎、慢性疲労免疫機能不全症候群（C F I D S）、慢性炎症性脱髓多発性神経障害、チャーグストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、C R E S T 症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛 - 線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（I T P）、I g A 神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、1型または免疫介在性糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティツフマン症候群、全身性エリテマトーデス、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎 / 巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、例えば、疱疹状皮膚炎血管炎、白斑およびウェガナー肉芽腫症であり得る。

【0057】

一部の具体的な実施形態において、C D 4 0 L 特異的T n 3 足場の投与により治療される自己免疫疾患は、全身性エリテマトーデス（S L E）である。

【0058】

C D 4 0 L 特異的T n 3 足場により治療する方法は、追加の治療法、例えば、免疫療法、生物療法、化学療法、放射線療法、または小分子薬物療法をさらに含み得る。

【0059】

本発明はまた、可溶性C D 4 0 L（配列番号2）との複合体中の配列番号20からなるT n 3 足場を含むタンパク質結晶であって、P 2₁ 2₁ 2₁ 斜方晶空間群およびa = 85.69、b = 90.64、c = 95.56の単位格子寸法、+/-0.1%における結晶格子を有するタンパク質結晶を提供する。一部の実施形態において、結晶の非対称単位は、C D 4 0 LのトリマーおよびT n 3 足場の3つの分子を含む。他の実施形態において、結晶は、構造座標の決定のためのX線を3.2以下の値の分解能に回折させる。

【0060】

本発明はまた、可溶性C D 4 0 L（配列番号2）との複合体中の配列番号68からなるT n 3 足場を含むタンパク質結晶であって、P 2₁ 3 立方晶空間群およびa = b = c = 97.62の単位格子寸法、+/-0.1%における結晶格子を有するタンパク質結晶を提供する。一部の実施形態において、結晶の非対称単位は、1つのC D 4 0 L分子および1つのT n 3 足場分子を含む。他の実施形態において、結晶は、構造座標を決定するためのX線を2.7以下の値の分解能に回折させる。

【0061】

本発明はまた、可溶性C D 4 0 L（配列番号2）との複合体中の配列番号28または146からなるT n 3 足場を含むタンパク質結晶であって、P 3 2 1 空間群およびa = 95.53、b = 93.53、c = 66.69の単位格子寸法、+/-0.1%における結晶格子を有するタンパク質結晶を提供する。一部の実施形態において、結晶の非対称単位は、1つのC D 4 0 L分子および1つのT n 3 足場分子を含む。他の実施形態において、結晶は、構造座標を決定するためのX線を2.8以下の値の分解能に回折させる。

【0062】

本発明はまた、可溶性C D 4 0 L（配列番号2）との複合体中の配列番号68および配列番号28または146からなる2つの異なるT n 3 足場を含むタンパク質結晶であって、P 2₁ 立方晶空間群およびa = 80.32、b = 143.48、c = 111.27、= 98.22の単位格子寸法、+/-0.1%における結晶格子を有するタンパク質結晶を提供する。一部の実施形態において、結晶の非対称単位は、2つのC D 4 0 L

10

20

30

40

50

トリマーおよび6つのそれぞれのTn3足場分子を含む。他の実施形態において、結晶は、構造座標を決定するためのX線を1.9以下 の値の分解能に回折させる。

【0063】

一部の実施形態において、タンパク質結晶は、シッティングドロップ蒸気拡散を使用することにより產生される。本発明はまた、(a) CD40Lとの複合体中のCD40L特異的モノマーサブユニットを含むTn3足場を含むある容量の液体を、沈殿剤を含むある容量のリザーバー溶液と混合すること；および(b)工程(a)において得られた混合物を密閉容器中で、タンパク質結晶が形成するまで結晶化に好適な条件下でインキュベートすることを含む、タンパク質結晶を作製する方法を提供する。一部の実施形態において、タンパク質結晶を產生する方法は、シッティングドロップ蒸気拡散を使用することを含む。

【0064】

一部の実施形態において、タンパク質結晶を作製する方法は、配列番号20、配列番号28、配列番号68または配列番号146のCD40L特異的Tn3モノマーサブユニットを含む結晶を产生するために使用される。

【0065】

本発明はまた、(a)データを、CD40Lと複合体化されたCD40L特異的モノマーサブユニットを含むTn3足場のタンパク質結晶の一部の構造についてのグラフ三次元表示に変換するための；および(b)前記グラフ三次元表示の表示をもたらすための、機械可読命令が符号化されたデータ保存材料を含む機械可読データ保存媒体を提供する。一部の実施形態において、このようなTn3足場は、配列番号20、配列番号28、配列番号68または配列番号146を含む。他の実施形態において、このようなタンパク質結晶は、

(a)可溶性CD40L(配列番号2)との複合体中の配列番号20からなるTn3足場を含むタンパク質結晶であって、P₂₁2₁2₁斜方晶空間群およびa = 85.69、b = 90.64、c = 95.56の単位格子寸法、+/-0.1%における結晶格子を有するタンパク質結晶；

(b)可溶性CD40L(配列番号2)との複合体中の配列番号68からなるTn3足場を含むタンパク質結晶であって、P₂₁3立方晶空間群およびa = b = c = 97.62の単位格子寸法、+/-0.1%における結晶格子を有するタンパク質結晶；または

(c)配列番号20からなるTn3足場および配列番号68からなるTn3足場を含むタンパク質結晶であって、両方のTn3足場は、可溶性CD40L(配列番号2)との複合体中に存在するタンパク質結晶

(d)可溶性CD40L(配列番号2)との複合体中の配列番号28または146からなるTn3足場を含むタンパク質結晶であって、P₃21空間群およびa = 95.53、b = 93.53、c = 66.69の単位格子寸法、+/-0.1%における結晶格子を有するタンパク質結晶

(e)可溶性CD40L(配列番号2)との複合体中の配列番号68および配列番号28または146からなる2つ異なるTn3足場を含むタンパク質結晶であって、P₂₁立方晶空間群およびa = 80.32、b = 143.48、c = 111.27、= 98.22の単位格子寸法、+/-0.1%における結晶格子を有するタンパク質結晶である。

【0066】

本発明を説明する目的のため、本発明のある実施形態を図面に示す。しかしながら、本発明は、図面中に示される実施形態の正確な配置および手段に限定されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1A】D10G4.1/PBMC(末梢血单核細胞)アッセイを使用して計測されたネズミCD40L(MuCD40L)誘導CD86発現の阻害を示す。M13マウスCD40L特異的Tn3足場、そのM31親和性最適化バリアント(約20倍の親和性改善)

10

20

30

40

50

、抗 C D 4 0 L M R 1 モノクローナル抗体、および陰性対照をアッセイした。 I C ₅₀ 値も示す。

【図 1 B】ネズミ N f k B アッセイにおける C D 4 0 L 阻害を示す。アッセイは、ネズミ C D 4 0 R を発現し、N f k B - ルシフェラーゼレポーター構築物を含有する N I H T 3 T 細胞を使用する。 C D 4 0 L の添加は、M R 1 抗 C D 4 0 L 抗体、および M 3 1 C D 4 0 L 特異的 T n 3 足場の両方により阻害される（ルシフェラーゼ活性により計測される）シグナリングをもたらす。

【図 2 A】 C D 4 0 L 特異的タンデム二価 T n 3 足場および血清アルブミン（ S A ）融合構築物の設計を示す。

【図 2 B】精製一価 M 1 3 構築物（ C D 4 0 L 特異的 T n 3 構築物）、または 2 つの M 1 3 T n 3 モノマーサブユニットを結合する 1 、 3 、 5 もしくは 7 つの G l y ₄ S e r 単位（ G S と示す）を含有するリンカーを有するタンデム二価足場の S D S - P A G E 分析を示す。一価 M 1 3 構築物をレーン 2 に流し、1 つの G S 単位を有するダイマー構築物（ C 1 ）をレーン 3 および 7 に流し、3 つの G S 単位を有するダイマー構築物（ C 2 ）をレーン 4 および 8 に流し、5 つの G S 単位を有するダイマー構築物（ C 3 ）をレーン 5 および 9 に流し、7 つの G S 単位を有するダイマー構築物（ C 4 ）をレーン 6 および 1 0 に流した。試料を非還元条件（レーン 2 ~ 6 ）または還元条件（レーン 7 ~ 1 0 ）のいずれかで流した。

【図 2 C】ネズミ C D 4 0 L 特異的一価（ M 1 3 ）または二価タンデム足場（ 1 、 3 、 5 または 7 つの G l y ₄ S e r 単位を含有するリンカーを有する二価足場に対応する M 1 3 - x G S - M 1 3 （式中、 x は、 1 、 3 、 5 または 7 である））による、バイオセンサーチップ上に固定化されたネズミ C D 4 0 受容体へのネズミ C D 4 0 L 結合の競合阻害を示す。種々の構築物についての半最大阻害濃度（ I C ₅₀ ）も示す。

【図 2 D】 B 細胞上のネズミ C D 4 0 L 誘導 C D 8 6 発現に対するネズミ C D 4 0 L 特異的 T n 3 一価（ M 1 3 ）および二価タンデム足場の阻害効果を示す。全ての T n 3 構築物について、および M R 1 抗ネズミ C D 4 0 L 抗体についての I C ₅₀ 値を提供する。

【図 3 A】 H E K 2 9 3 細胞中のマウス血清アルブミン（ M S A ）に融合しているネズミ C D 4 0 L 特異的タンデム二価 T n 3 足場の高い発現レベルを示す。これらの構築物は、 T n 3 足場単位間のリンカー中の 1 つの（ G ₄ S ）リピートおよび T n 3 足場と M S A との間のリンカー中の 3 つの（ G ₄ S ）リピートを有する。さらに、構築物は、潜在的な N 結合グリコシル化部位を除去するように M 1 3 および M 3 1 足場のそれぞれの中に N 4 9 Q 突然変異を含有する。形質移入 3 または 6 日後に採取された 1 0 μ l の培養上清を、既知量の精製タンパク質とともに S D S - P A G E ゲル上に流した。発現レベルは、形質移入 6 日後に 2 0 0 m g / l と推定した。精製は、 C 末端 H i s タグを介する I M A C により実施した。

【図 3 B】 D 1 0 G 4 . 1 / P B M C 細胞アッセイを使用して計測されたネズミ C D 4 0 L (M u C D 4 0 L) 誘導 C D 8 6 発現の阻害を示す。 C D 4 0 L 特異的タンデム二価 T n 3 足場（ M 1 3 - 1 G S - M 1 3 ）、マウス血清アルブミン（ M S A ）に融合している同一の構築物（ M 1 3 - 1 G S - M 1 3 - M S A ）、および M R 1 抗ネズミ C D 4 0 L モノクローナル抗体をアッセイした。全ての構築物についての I C ₅₀ 値を提供する。

【図 3 C】 D 1 0 G 4 . 1 / P B M C 細胞アッセイを使用して計測されたネズミ C D 4 0 L (M u C D 4 0 L) 誘導 C D 8 6 発現の阻害を示す。マウス血清アルブミン（ M S A ）に融合している C D 4 0 L 特異的タンデム二価 T n 3 足場（ M 1 3 - 1 G S - M 1 3 ）（ M 1 3 - 1 G S - M 1 3 - M S A ）、 M S A にコンジュゲートしている M 1 3 足場の親和性成熟バリアント（ M 3 1 M o n o - M S A ）、 M S A にコンジュゲートしている M 3 1 親和性最適化バリアントを含むタンデム二価足場（ M 3 1 - 1 G S - M 3 1 - M S A ）、ネズミ C D 4 0 L に結合しない陰性対照タンデム二価足場（ D 1 - 1 G S - D 1 - M S A ）、および M R 1 モノクローナル抗体をアッセイした。 I C ₅₀ 値を提供する。

【図 4 A】 E L I S A により測定されたマウスにおけるいくつかのネズミ C D 4 0 L 特異的構築物の薬物動態を示す。それぞれの構築物についての血漿半減期（ t _{1/2} ）値を示

10

20

30

40

50

す。

【図4B】ELISAにより測定されたカニクイザルにおけるヒトCD40L特異的342-HSAおよび463位におけるLeuのAsnによる置換(L463N)および524位におけるLysのLeuによる置換(K524L)を含む342-HSAバリアントの薬物動態を示す。

【図5A】ヒツジ赤血球(SRBC)免疫化アッセイからの胚中心(GC)におけるB細胞成熟を示す。MR1モノクローナル抗ネズミCD40L抗体をアッセイした。

【図5B】ヒツジ赤血球(SRBC)免疫化アッセイからの胚中心(GC)におけるB細胞成熟を示す。MSAに融合しているM31由来一価および二価構築物をアッセイした。MSAにコンジュゲートしているD1-D1二価構築物を陰性対照として使用した。 10

【図5C】ヒツジ赤血球(SRBC)免疫化アッセイからの末梢(非GC)におけるB細胞成熟を示す。MSAに融合しているM31由来一価および二価構築物をアッセイした。MSAにコンジュゲートしているD1-D1二価構築物を陰性対照として使用した。

【図5D】ヒツジ赤血球(SRBC)免疫化アッセイからのCD4陽性細胞の割合(%CD4)および数(#CD4)を示す。MSAに融合しているM31由来一価および二価構築物、ならびにMR1抗CD40Lモノクローナル抗体をアッセイした。MSAにコンジュゲートしているD1-D1二価構築物を陰性対照として使用した。

【図5E】ヒツジ赤血球(SRBC)免疫化アッセイからのCD44hi陽性細胞の割合(%CD44hi)および数(#CD44hi)を示す。MSAに融合しているM31由来一価および二価構築物、ならびにMR1抗CD40Lモノクローナル抗体をアッセイした。MSAにコンジュゲートしているD1-D1二価構築物を陰性対照として使用した。 20

【図5F】ヒツジ赤血球(SRBC)免疫化アッセイからの抗SRBC IgGの量を示す。MSAに融合しているM31由来一価および二価構築物をアッセイした。MSAにコンジュゲートしているD1-D1二価構築物を陰性対照として使用した。

【図5G】KLH特異的T細胞依存性抗体応答(TDAR)モデルからの抗KLH IgM力価を示す。HSAに融合している342由来一価および二価構築物をアッセイした。

【図5H】KLH特異的T細胞依存性抗体応答(TDAR)モデルからの抗KLH IgG力価を示す。HSAに融合している342由来一価および二価構築物をアッセイした。

【図6A】Jurkat D1.1細胞により刺激されたCD19陽性ヒトPBM C上のヒトCD40L誘導CD86発現に対するヒトCD40L特異的一価Tn3モノマー足場309および311の阻害効果を示す。 30

【図6B】ヒトCD40L刺激B細胞増殖に対するヒトCD40L特異的一価Tn3モノマー足場309および311の阻害効果を示す。

【図6C】T/B細胞共培養物中の形質細胞数に対するヒトCD40L特異的一価Tn3モノマー足場309および311の阻害効果を示す。Tn3足場309は、FACSにより活性化初代T細胞に結合することも示された(データ示さず)。D1足場('Neg Tn3')を対照として使用した。aCD40L(RE)およびaCD40L(Bio)(Biogen製5c8抗ヒトCD40Lモノクローナル抗体)と命名されるCD40Lに対する2つのモノクローナル抗体も対照として使用した。

【図7A】ヒトCD40L特異的一価Tn3足場309および311が類似の生物物理学的特性を有することを示す。両方の足場は、SECにより計測されるとおり単分散される。

【図7B】ヒトCD40L特異的一価Tn3足場309および311が類似の生物物理学的特性を有することを示す。両方の足場は、示差走査熱量測定(DSC)により計測されるとおり親Tn3足場(グラフ中でTn3(野生型)と命名)と類似の熱安定性を有する。

【図8A】Jurkat D1.1細胞により刺激されたCD19陽性ヒトPBM C上のヒトCD40L誘導CD86発現の阻害を示す。一価(311)および二価(311_3GSおよび311_7GS)ヒトCD40L特異的Tn3足場をアッセイした。それぞれの構築物についてのIC₅₀値を示す。 50

【図8B】Jurkat D1.1細胞により刺激されたCD19陽性ヒトPBM C上のヒトCD40L誘導CD86発現の阻害を示す。一価(309)および二価(309_3GSおよび309_7GS)ヒトCD40L特異的Tn3足場、ならびにBiogen製5c8抗ヒトCD40Lモノクローナル抗体をアッセイした。それぞれの構築物および抗体についてのIC₅₀値を示す。

【図9A】代表的なヒト血清アルブミン(HSA)に融合しているヒトCD40L特異的タンデム二価Tn3足場の設計を示す。「GGGGG」(配列番号148)および「GGGGA」(配列番号149)は、「GGGGS」リンカー(配列番号147)の代替リンカーである。

【図9B】IEXカラム上で293F細胞からの試験精製を示す。ショルダー分画(メジャーピークの<10%)は、リンカー中に存在するセリン残基に結合しているO-グリコシル化タンパク質を含有する。
10

【図9C】Jurkat D1.1細胞により刺激されたCD19陽性ヒトPBM C上のヒトCD40L誘導CD86発現の阻害を示す。二価(309)ヒトCD40L特異的Tn3足場、HSAに融合している同一足場、およびBiogen製5c8抗ヒトCD40Lモノクローナル抗体をアッセイした。

【図9D】Jurkat D1.1細胞により刺激されたCD19陽性ヒトPBM C上のヒトCD40L誘導CD86発現の阻害を示す。3つの二価(309)ヒトCD40L特異的Tn3足場を試験した。3つ(G₄S)リピートがヒトCD40L特異的サブユニット(本実施例における309)間のリンカー中に存在した一方、309サブユニットとHSAとの間のリンカーは1から3つの(G₄S)リピートで変動させた。Biogen製5c8抗ヒトCD40Lモノクローナル抗体もアッセイした。
20

【図10A】CD40L結合に対する309(左パネル)および311(右パネル)のループ配列の突然変異の効果を示す。結合は、結合アッセイにおけるシグナル強度を示す。WTは、元のリード配列(親Tn3配列)を有するバリエントである一方、BC、DEおよびFGは、BC、DE、またはFGループ配列をヒトテネイシンC中に存在する親Tn3配列に変化させたバリエントを示す。

【図10B】Jurkat D1.1細胞により刺激されたCD19陽性ヒトPBM C上のヒトCD40L誘導CD86発現により計測された親和性最適化足場のパネルの阻害プロファイルを示す。ヒトCD40L特異的Tn3クローン309モノマーを親和性最適化した。親和性最適化モノマーは、クローン340からクローン349として設計される。クローン309wtFG構築物は、親Tn3足場のFGループにより置き換えられているFGループ全体を有した。5c8抗CD40Lモノクローナル抗体もアッセイした。
30

【図10C】Jurkat D1.1細胞により刺激されたCD19陽性ヒトPBM C上のヒトCD40L誘導CD86発現により計測された阻害プロファイルを示す。ヒトCD40L特異的Tn3 311モノマー、そのK4Eバリエント、および陰性対照のプロファイルを示す。

【図10D】は、Jurkat D1.1細胞により刺激されたCD19陽性ヒトPBM C上のヒトCD40L誘導CD86発現により計測された阻害プロファイルを示す。ヒトCD40L特異的Tn3 311K4Eモノマー、親和性最適化311K4E_12モノマー、および5c8抗CD40Lモノクローナル抗体のプロファイルを示す。2つの構築物および抗体についてのIC₅₀も提示する。
40

【図11A】親CD40L特異的Tn3足場309、309FGwtバリエント、および親和性最適化バリエント340から349の多重配列アラインメントを示す。アミノ酸残基1から42を図11Aに示し、アミノ酸残基43から83を図11Bに示す。バリアントループを陰影により示す。コンセンサスアミノ酸配列を、多重配列アラインメント下方に提示する。アラインされた配列は、Tn3足場クローン309(配列番号20)、309FGwt(配列番号22)、340(配列番号24)、341(配列番号26)、342(配列番号28)、343(配列番号30)、344(配列番号32)、345(配列番号34)、346(配列番号36)、347(配列番号38)、348(配列番号40)
50

)、および349(配列番号42)のアミノ酸配列に対応する。

【図11B】親CD40L特異的Tn3足場309、309FGwtバリアント、および親和性最適化バリアント340から349の多重配列アラインメントを示す。アミノ酸残基1から42を図11Aに示し、アミノ酸残基43から83を図11Bに示す。バリアントループを陰影により示す。コンセンサスアミノ酸配列を、多重配列アラインメント下方に提示する。アラインされた配列は、Tn3足場クローン309(配列番号20)、309FGwt(配列番号22)、340(配列番号24)、341(配列番号26)、342(配列番号28)、343(配列番号30)、344(配列番号32)、345(配列番号34)、346(配列番号36)、347(配列番号38)、348(配列番号40)、および349(配列番号42)のアミノ酸配列に対応する。

【図12A】親CD40L特異的Tn3足場311、311K4Eバリアント、および親和性最適化バリアント311K4E_1から311K4E_21の多重配列アラインメントを示す。アミノ酸残基1から44を図12Aに示し、アミノ酸残基45から87を図12Bに示す。バリアントループを陰影により示す。陰影が付されたループ外側のアミノ酸変動を枠で囲む。コンセンサス配列を、多重配列アラインメント下方に提示する。アラインされた配列は、Tn3足場クローン311(配列番号44)、311K4E(配列番号46)、311K4E_1(配列番号48)、311K4E_2(配列番号50)、311K4E_2(配列番号52)、311K4E_3(配列番号54)、311K4E_4(配列番号56)、311K4E_5(配列番号58)、311K4E_7(配列番号60)、311K4E_8(配列番号62)、311K4E_9(配列番号64)、311K4E_10(配列番号66)、311K4E_11(配列番号68)、311K4E_12(配列番号70)、311K4E_13(配列番号72)、311K4E_14(配列番号74)、311K4E_15(配列番号76)、311K4E_16(配列番号78)、311K4E_19(配列番号80)、311K4E_20(配列番号82)、および311K4E_21(配列番号84)のアミノ酸配列に対応する。

【図12B】親CD40L特異的Tn3足場311、311K4Eバリアント、および親和性最適化バリアント311K4E_1から311K4E_21の多重配列アラインメントを示す。アミノ酸残基1から44を図12Aに示し、アミノ酸残基45から87を図12Bに示す。バリアントループを陰影により示す。陰影が付されたループ外側のアミノ酸変動を枠で囲む。コンセンサス配列を、多重配列アラインメント下方に提示する。アラインされた配列は、Tn3足場クローン311(配列番号44)、311K4E(配列番号46)、311K4E_1(配列番号48)、311K4E_2(配列番号50)、311K4E_2(配列番号52)、311K4E_3(配列番号54)、311K4E_4(配列番号56)、311K4E_5(配列番号58)、311K4E_7(配列番号60)、311K4E_8(配列番号62)、311K4E_9(配列番号64)、311K4E_10(配列番号66)、311K4E_11(配列番号68)、311K4E_12(配列番号70)、311K4E_13(配列番号72)、311K4E_14(配列番号74)、311K4E_15(配列番号76)、311K4E_16(配列番号78)、311K4E_19(配列番号80)、311K4E_20(配列番号82)、および311K4E_21(配列番号84)のアミノ酸配列に対応する。

【図13】ヒトCD40受容体を発現し、NfkB-ルシフェラーゼレポーター構築物を含有するHEK293細胞を使用するヒトNfkB阻害アッセイを示す。ヒトCD40Lの添加は、CD40L結合分子により阻害することができる(ルシフェラーゼ活性により計測される)シグナリングをもたらす。CD40L特異的Tn3足場340および342、ならびに5c8抗CD40Lモノクローナル抗体をアッセイした。

【図14】24時間抗CD3/28活性化ヒトCD4+T細胞へのヒトCD40特異的Tn3足場の結合を示す。HSAに融合している一価342足場(342-HSAと命名)およびHSAに融合している二価342足場(342-342-HSAと命名)をアッセイした。

【図15】3日目における初代ヒトT/B細胞増殖の阻害を示す。HSAに融合している

10

20

30

40

50

一価 340 足場 (340-HSA)、HSA に融合している一価 342 足場 (342-HSA)、および HSA に融合している二価 342 足場 (342-342-HSA) をアッセイした。それぞれの構築物についての I C₅₀ 値を示す。

【図 16 A】洗浄血小板に対する凝集アッセイを示す。グラフは、ドナーについての代表的な ADP 誘導凝集陽性対照 (それぞれ、上の 3 つのトレース) ADP : 0 . 5 μM、1 μM、および 2 μM) を、5c8 モノクローナル抗体 (600 nM) および可溶性ヒト CD40L (200 nM) の免疫複合体 (IC) とともに示す。

【図 16 B】洗浄血小板に対する凝集アッセイを示す。グラフは、事前形成された 309-309 二価足場 (HSA に融合していない) および可溶性 CD40L の免疫複合体を使用した場合の凝集の欠損を示す。ヒト CD40L (可溶性形態) の濃度を 600 nM に一定に保持し、足場構築物の濃度を 200 nM から 800 nM に変動させた。

【図 16 C】洗浄血小板に対する凝集アッセイを示す。グラフは、事前形成された HSA に融合している 342 一価足場および可溶性ヒト CD40L の免疫複合体を使用した場合の凝集の欠損を示す。ヒト CD40L (可溶性形態) の濃度を 600 nM に一定に保持し、足場構築物の濃度を 100 nM から 400 nM に変動させた。グラフは、Biogen 5c8 モノクローナル抗体および可溶性ヒト CD40L の免疫複合体により誘導された急速な凝集も示す。

【図 17 A】CD40L 特異的 Tn3 309 モノマー足場との複合体中の可溶性 CD40L の結晶構造のリボン表示を示す。CD40L は、トリマー (ポリペプチド A、B および C) を形成する。それぞれの 309 足場 (ポリペプチド D、E および F、丸印) は、2 つの CD40L ポリペプチドと接触する。それぞれの 309 足場と第 1 および第 2 の CD40L ポリペプチドとの間の特異的接觸を列記する。これは、構造の「トップダウン」図である。

【図 17 B】CD40L 特異的 Tn3 311K4E_12 モノマー足場との複合体中の可溶性 CD40L の結晶構造のリボン表示を示す。CD40L は、トリマー (ポリペプチド A、B および C) を形成する。それぞれの 311K4E_12 モノマー足場 (ポリペプチド D、E および F、丸印) は、2 つの CD40L ポリペプチドと接觸する。それぞれの 311K4E_12 モノマー足場と第 1 および第 2 の CD40L ポリペプチドとの間の特異的接觸を列記する。これは、構造の「トップダウン」図である。

【図 17 C】311K4E_12 および 309 足場 (丸印) が、CD40L トリマー複合体の異なる部分中に局在する異なるエピトープに結合することを説明するリボン表示を示す。両方の足場は、CD40 受容体と相互作用する同一の溝中で結合する。これは、構造の「側面」図である。

【図 17 D】CD40L 特異的 Tn3 342 モノマー足場との複合体中の可溶性 CD40L の結晶構造のリボン表示を示す。1 つのみの CD40L および 1 つの 342 モノマー足場を示す。342 モノマー足場と第 1 の CD40L ポリペプチドとの間の特異的接觸を列記する。

【図 17 E】342 および 311K4E_12 足場が、CD40L トリマー複合体の異なる部分中に局在する異なるエピトープに同時に結合し得ることを説明するリボン表示を示す。両方の足場は、CD40 受容体と相互作用する同一の溝中で結合する。これは、構造の「側面」図である。

【図 18 A】図 17 A に示される CD40L 特異的 Tn3 311K4E_12 モノマー足場 (配列番号 68) および可溶性 CD40L (配列番号 2) 分子により形成されるトリマー中のアミノ酸間の接觸の局在を示す。それぞれの足場は、2 つの CD40L 分子と接觸する。CD40L 配列 (配列番号 2) を示す。点線下線 = 細胞質ドメイン；実線下線 = シグナルアンカー II 型膜タンパク質；二重下線 = Tn3 足場と共に結晶化した部分；暗色陰影 = Tn3 に接觸する第 1 の CD40L 上の残基；淡色陰影 = Tn3 に接觸する第 2 の CD40L 上の残基。

【図 18 B】図 17 B に示される CD40L 特異的 Tn3 309 モノマー足場および CD40L トリマー中のアミノ酸間の接觸の局在を示す。それぞれの足場は、2 つの CD40L

10

20

30

40

50

0 L 分子と接触する。CD40L配列(配列番号2)を示す。点線下線=細胞質ドメイン；実線下線=シグナルアンカーII型膜タンパク質；二重下線=Tn3足場と共に結晶化した部分；暗色陰影=Tn3に接触する第1のCD40L上の残基；淡色陰影=Tn3に接触する第2のCD40L上の残基；二重に囲まれた残基は、野生型FGループを有するクローン中で保存されていない可能性が高い309足場のFGループと接触する。

【図19】パネルAは、サイズ排除Superdex200 10/300GLカラムからのTn3足場(309または311K4E_12)、CD40Lおよびそれら間の複合体の溶出の例示的クロマトグラムを示す。パネルBは、309-CD40L複合体の結晶を示す。示される結晶は、最大0.15×0.15×0.1mmの寸法に成長した。パネルCは311K4E_12-CD40Lの複合体の結晶を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0068】

定義

本発明を詳細に記載する前に、本発明は、具体的な組成物またはプロセス工程が変動し得るため、それらに限定されないことを理解すべきである。本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が特に明記しない限り、複数参照対象を含むことに留意しなければならない。「a」(また「an」)という用語、ならびに「1つ以上の」、および「少なくとも1つの」という用語は、本明細書において同義に使用することができる。

【0069】

20

さらに、本明細書において使用される「および/または」は、他方を含め、または含めない、2つの規定の特性または構成要素のそれぞれの具体的開示と解釈すべきである。したがって、本明細書の語句、例えば、「Aおよび/またはB」において使用される「および/または」という用語は、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」(単独)、および「B」(単独)を含むことが意図される。同様に、語句、例えば、「A、B、および/またはC」において使用される「および/または」という用語は、以下の実施形態のそれを包含することが意図される：A、B、およびC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A(単独)；B(単独)；およびC(単独)。

【0070】

30

特に定義の無い限り、本明細書において使用される全ての技術および科学用語は、本発明が関連する分野の当業者により一般に理解されているものと同一の意味を有する。例えば、Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; およびOxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Pressは、本発明において使用されている多くの用語の一般的辞書を当業者に提供する。

40

【0071】

単位、接頭辞、および記号は、それらの国際単位系(SI)により認められた形態で示される。数値の範囲は、範囲を定義する数値を含む。特に記載の無い限り、アミノ酸配列は、左から右へアミノからカルボキシの方向へ記述される。本明細書において提供される表題は、本発明の種々の態様または実施形態を限定するものではなく、それらは明細書への全体としての参照により把握することができる。したがって、直後に定義される用語は、明細書への全体としての参照により、より完全に定義される。

【0072】

実施形態が、本明細書において「～を含む」という用語を用いて記載される場合は常に、「～からなる」および/または「本質的に～からなる」の用語で記載される他の点で類似する。

50

似の実施形態も提供されることが理解される。

【0073】

アミノ酸は、本明細書において、IUPAC-IUB生化学命名法委員会(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)により推奨されているそれらの一般に公知の3文字記号または1文字記号のいずれかにより参照される。同様に、ヌクレオチドは、それらの一般に認められている1文字コードにより参照される。

【0074】

本明細書において使用される「エピトープ」という用語は、本発明の足場に結合し得るタンパク質決定因子を指す。エピトープは、通常、化学的に活性な表面分子集団、例えば、アミノ酸または糖側鎖からなり、通常、特異的三次元構造特性、および特異的電荷特性を有する。立体構造および非立体構造エピトープは、変性溶媒の存在下で立体構造エピトープへの結合が失われ、非立体構造エピトープへの結合は失われない点で区別される。10

【0075】

「フィブロネクチンIII型(FnIII)ドメイン」、「FnIIIドメイン」および「FnIII足場」という用語は、ヒトフィブロネクチンIII型ドメインに相同なポリペプチドを指し、これは少なくとも7つのベータ鎖を有し、それらのベータ鎖は2つのベータシート間に分布し、それら自体で互いに集合してタンパク質のコアを形成し、さらにベータ鎖を相互に連結する溶媒露出ループを含有する。ベータシートサンドイッチのそれぞれの端部に少なくとも3つのこのようなループが存在し、この端部は、ベータ鎖の方向に垂直なタンパク質の境界である。ある特定の実施形態において、FnIIIドメインは、A B、B C、C D、D E、E F、およびF Gと命名される6つのループ領域に結合しているA、B、C、D、E、F、およびGと命名される7つのベータ鎖を含み、ループ領域は、それぞれのベータ鎖を連結する。20

【0076】

本明細書において使用される「Tn3足場」という用語は、少なくとも1つのFnIII足場を含み、Aベータ鎖は、配列番号11を含み、Bベータ鎖は、配列番号12を含み、Cベータ鎖は、配列番号13または14を含み、Dベータ鎖は、配列番号15を含み、Eベータ鎖は、配列番号16を含み、Fベータ鎖は、配列番号17を含み、ベータ鎖Gは、配列番号18を含み、少なくとも1つのループは、「親Tn3足場」中のループの非天然バリエントである分子を指す。ある実施形態において、Tn3分子のベータ鎖の1つ以上は、Cベータ鎖(例えば、配列番号13のシステインも14のシステインも)およびFベータ鎖(配列番号17)のシステイン残基が置換されていないことを除き少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。30

【0077】

本明細書において使用される「親Tn3」という用語は、配列番号3を含むFnIII足場、すなわち、ヒトテネイシンCの第3FnIIIドメインに由来する熱安定化システイン遺伝子操作FnIII足場を指す。

【0078】

「マルチマー」または「マルチマー足場」という用語は、会合する少なくとも2つのFnIII足場を含む分子を指す。マルチマー足場を形成する足場は、それぞれの足場が独立して機能することを可能とするリンクを介して結合していくよい。40

【0079】

「モノマー」、「モノマーサブユニット」または「モノマー足場」という用語は、1つのみのFnIII足場を含む分子を指す。

【0080】

本明細書において使用される「CD40L特異的モノマーサブユニット」という用語は、CD40Lまたはその断片、例えば、CD40Lの可溶性形態に特異的に結合する、「親Tn3」に由来するTn3モノマーを指す。

【0081】

50

「DNA」という用語は、2つ以上の共有結合している天然または改変デオキシリボヌクレオチドの配列を指す。

【0082】

「融合タンパク質」という用語は、(i)第2の異なるタンパク質(すなわち、「異種」タンパク質)に結合している(i)本発明の1つ以上の足場を含むタンパク質を指す。

【表1】

表1:「親Tn3」の構成要素の配列および配列番号

名称/簡単な説明	配列	配列番号
Tn3	IEVKDVTDTTALITWFKPLAEI DG <u>C</u> ELTYGIKDVPGDRTTIDLT EDENQYSIGNLKPDEYEVS <u>L</u> <u>C</u> RRGDMSSNPAKETFTT (ジスルフィド結合のcys残基を下線により示す)	3
テネイシンCの第3FnIII、ABループ(Tn3)	KDVTDTT	4
テネイシンCの第3FnIII、BCループ(Tn3)	FKPLAEIDG	5
テネイシンCの第3FnIII、CDループ(Tn3)	KDVPGDR	6
テネイシンCの第3FnIII、DEループ(Tn3)	TEDENQ	7
テネイシンCの第3FnIII、EFループ(Tn3)	GNLKPDE	8
テネイシンCの第3FnIII、FGループ(Tn3)	RRGDMSSNPA	9
テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖A(Tn3)	RLDAPSQIEV	10
テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖A(Tn3) N-末端トランケーション	IEV	11
テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖B(Tn3)	ALITW	12
テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖C(Tn3) バリエント)	CELAYGI	13
テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖C(Tn3)	CELTYGI	14
テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖D(Tn3)	TTIDL	15
テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖E(Tn3)	YSI	16
テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖F(Tn3)	YEVSLIC	17
テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖G(Tn3)	KETFTT	18

10

20

30

【0083】

本発明において「異種部分」という用語は、本発明の足場への組成物の添加を示すために使用され、その組成物は、FnIIIドメインの通常の部分ではない。例示的な異種部分には、タンパク質、ペプチド、タンパク質ドメイン、リンカー、薬物、毒素、造影剤、放射性化合物、有機および無機のポリマー、ならびにFnIIIドメイン自体に固有ではない活性を提供し得る任意の他の組成物、例として、限定されるものではないが、ポリエチレンギリコール(P EG)、細胞傷害剤、放射性核種、造影剤、ビオチン、ダイマー化ドメイン(例えば、ロイシンジッパードメイン)、ヒト血清アルブミン(HSA)もしくはそのFcRn結合部分、抗体のドメインもしくは断片(例えば、抗体可変ドメイン、CH1ドメイン、Cカッпадドメイン、Cラムダドメイン、CH2、またはCH3ドメイン)、单鎖抗体、ドメイン抗体、アルブミン結合ドメイン、IgG分子、酵素、リガンド、受容体、結合ペプチド、非FnIII足場、エピトープタグ、組換えポリペプチドポリマー、サイトカインなどが含まれる。

40

【0084】

本明細書において使用される「リンカー」という用語は、2つ以上の足場を結合または

50

これらを連結する任意の分子集合体を指す。リンカーは、機能が足場中のモジュール間の「スペーサー」として作用することである分子であり得、または追加の機能を有する分子（すなわち、「機能的部分」）でもあり得る。「異種部分」の定義に含まれる分子もリンカーとして機能し得る。

【0085】

「結合している」および「融合している」という用語は、同義に使用される。これらの用語は、あらゆる手段、例として、化学的コンジュゲーションまたは組換え手段により2つ以上の足場、異種部分、またはリンカーと一緒に結合することを指す。

【0086】

「ドメイン」または「タンパク質ドメイン」という用語は、多くの場合、タンパク質の残部と独立して安定な三次元構造にフォールドし得、特定の機能を付与することができるタンパク質の領域を指す。この構造は、元のタンパク質内のドメインの機能に関連する規定の機能、例えば、酵素活性、別の分子についての認識モチーフの作出またはタンパク質が、タンパク質の特定の環境中で存在するために必要な構造構成要素を提供することを維持する。タンパク質ファミリーおよび関連タンパク質スーパーファミリーの両方の中で、タンパク質ドメインは、進化的に保存された領域であり得る。マルチマー足場の構成要素を記載する場合、「ドメイン」、「モノマー足場」、「モノマーサブユニット」および「モジュール」という用語は同義に使用することができる。「ネイティブF n I I I ドメイン」は、生物によりコードされる任意の非組換えF n I I I ドメインを意味する。

【0087】

「タンパク質配列」または「アミノ酸配列」は、アミノ末端からカルボキシル末端方向のポリペプチド中のアミノ酸成分の直鎖状表示を意味し、その表示中で相互に隣接する残基は、ポリペプチドの一次構造中で連続する。

【0088】

「核酸」という用語は、任意の2つ以上の共有結合しているヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体または誘導体を指す。本明細書において使用されるこの用語には、限定されるものではないが、DNA、RNA、およびPNAが含まれる。「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、本明細書において同義に使用される。

【0089】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単一の核酸および複数の核酸を包含することが意図され、単離核酸分子または構築物、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)またはプラスミドDNA(pDNA)を指す。「単離」核酸またはポリヌクレオチドという用語は、自然環境から取り出された核酸分子、DNAまたはRNAを指す。例えば、ベクター中に含有される例えば本発明の足場をコードする組換えポリヌクレオチドは、本発明の目的のために単離されているとみなされる。単離ポリヌクレオチドのさらなる例には、異種宿主細胞中に維持された組換えポリヌクレオチドまたは溶液中の（部分的にまたは実質的に）精製されたポリヌクレオチドが含まれる。単離RNA分子には、本発明のポリヌクレオチドのインビボまたはインビトロRNA転写物が含まれる。本発明による単離ポリヌクレオチドまたは核酸には、合成により產生されたそのような分子がさらに含まれる。さらに、ポリヌクレオチドまたは核酸は、調節エレメント、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、または転写ターミネーターであり得、またはそれらを含み得る。

【0090】

「薬学的に許容可能な」という用語は、顕著な医学的悪影響を示さず動物（例えば、哺乳動物）に投与することができる化合物またはタンパク質を指す。

【0091】

「生理学的に許容可能な担体」という用語は、治療されている宿主に顕著な有害な影響を与えることなく、ともに投与される化合物の治療特性を保持する担体を指す。1つの例示的な生理学的に許容可能な担体は、生理食塩水である。他の生理学的に許容可能な担体およびその配合物は当業者には公知であり、例えば、参照により本明細書に組み込まれるRemington's Pharmaceutical Sciences, (18th ed i

10

20

30

40

50

tion), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, Pa. に記載されている。

【0092】

「ポリペプチド」は、長さ、翻訳後修飾、または機能にかかわらず、アミド結合（ペプチド結合）により直鎖状に結合している2つ以上のアミノ酸の任意の配列を意味する。「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、本明細書において同義に使用される。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、またはオリゴペプチドは、「ポリペプチド」の定義内に含まれ、「ポリペプチド」という用語は、これらの用語のいずれかに代え、またはそれらと同義的に使用することができる。「ポリペプチド」という用語は、ポリペプチドの発現後修飾、例として、限定されるものではないが、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護／遮断基による誘導体化、タンパク分解性開裂、または非天然アミノ酸による修飾の産物を指すことも意図される。ポリペプチドは、天然生物源に由来し得、または組換え技術により產生することができるが、必ずしも指定された核酸配列から翻訳される必要はない。ポリペプチドは、任意の様式で、例として化学合成により生成することができる。10

【0093】

本発明のポリペプチドとして、上記のポリペプチドの断片、誘導体、類似体、またはバリアント、およびそれらの任意の組合せも含まれる。バリアントは、天然でも非天然でもよい。非天然バリアントは、当分野において公知の変異誘発技術を使用して产生することができる。バリアントポリペプチドは、保存的もしくは非保存的アミノ酸置換、欠失、または付加を含み得る。「誘導体」として、20種の標準アミノ酸の1つ以上の天然アミノ酸誘導体を含有するペプチドも含まれる。20

【0094】

「ランダム化された」または「突然変異した」は、テンプレート配列に対して1つ以上のアミノ酸変化、例として、欠失、置換または付加を含むことを意味する。「ランダム化する」または「突然変異させる」は、このようなアミノ酸変化を配列中に導入するプロセスを意味する。ランダム化または突然変異は、一般に、核酸コード配列の意図的、プラインド、または自発的配列変化を介して達成することができ、任意の技術、例えば、PCR、エラープローンPCR、または化学的DNA合成により行うことができる。「ランダム化する」、「ランダム化された」、「突然変異させる」、「突然変異した」などの用語は、本明細書において同義に使用される。30

【0095】

「コグネット」または「コグネット非突然変異タンパク質」は、バリアントタンパク質がランダム化または突然変異導入される場合のバリアントタンパク質中に導入されたアミノ酸突然変異を除き、バリアントタンパク質に対する配列が同一であるタンパク質を意味する。

【0096】

「RNA」は、2つ以上の共有結合している天然または改変リボヌクレオチドの配列を意味する。この用語に含まれる改変RNAの一例は、ホスホロチオエートRNAである。

【0097】

本明細書において使用される1つまたは複数の「本発明の足場」という用語は、マルチマー-Tn3足場およびモノマー-Tn3足場を指す。「標的」という用語は、本発明の特異的足場により認識される化合物を指す。「標的」および「抗原」という用語は、本明細書において同義に使用される。例えば、本明細書において使用される「特異的に結合する」または「特異的結合」という用語中の「特異的」という用語は、本発明のTn3足場が1つ以上の抗原結合ドメインを介して1つ以上の抗原に結合する相対的親和性を指し、その結合は1つ以上の抗原結合ドメインと1つ以上の抗原の間のいくらかの相補性を必要とする。この定義によれば、本発明のTn3足場は、ランダムな非関連エピトープに結合するよりも容易にエピトープに結合する場合、そのエピトープに「特異的に結合する」と言われる。4050

【0098】

「親和性成熟」足場は、変化を有さない親 Tn3 足場と比較してエピトープについての Tn3 足場の親和性の改善をもたらす一般にループ中の 1つ以上の変化を有する足場である。

【0099】

本明細書において使用される「親和性」という用語は、本発明のある Tn3 足場の個々のエピトープへの結合の強度の尺度を指す。

【0100】

本明細書において使用される「アビディティー」という用語は、本発明の Tn3 足場集団とあるエピトープとの間の複合体の全体的安定性、すなわち、機能的に組み合わされた複数の Tn3 足場の抗原との結合強度を指す。アビディティーは、個々の抗原結合ドメインの特異的エピトープとの親和性、およびさらには本発明の足場の価数の両方に関連する。10

【0101】

「標的に対する作用」という用語は、本発明の Tn3 足場の 1つ以上の標的への結合、およびこのようないくつかの結合から得られる生物学的效果を指す。この点に関して、Tn3 足場中の複数の抗原結合単位は、種々の標的および / またはエピトープと相互作用し得、例えば、2つの標的を物理的により接近させ、区別される標的との相互作用を介して代謝カスケードを誘発させるなどし得る。CD40L に関して、「標的に対する作用」は、例えば、CD40L の 1つ以上の生物学的活性の向上、刺激または活性化により達成される効果を指す。20

【0102】

本明細書において使用される「価数」という用語は、潜在的な抗原結合モジュールの数、例えば、多くの本発明の足場中の FnIII モジュールの数を指す。本発明の Tn3 足場が 2つ以上の抗原結合モジュールを含む場合、それぞれの結合モジュールは、例えば、同一の標的または異なる標的中の同一エピトープまたは異なるエピトープに特異的に結合し得る。

【0103】

本明細書において使用される「ジスルフィド結合」という用語は、2つの硫黄原子間で形成された共有結合を含む。アミノ酸システインは、第 2 のチオール基とジスルフィド結合または架橋を形成し得るチオール基を含む。30

【0104】

「免疫グロブリン」および「抗体」という用語は、生化学的に区別することができる種々の広範なクラスのポリペプチドを含む。当業者は、重鎖がガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンに分類されることを認識する。抗体の「クラス」をそれぞれ IgG、IgM、IgA、IgG、または IgE として決定するのは、この鎖の性質である。これらのクラスのそれぞれの改変形は、当業者には容易に識別可能である。本明細書において使用される「抗体」という用語には、限定されるものではないが、インタクト抗体、改変抗体、抗体 VL または VL ドメイン、CH1 ドメイン、Cカッパドメイン、Cラムダドメイン、Fc ドメイン（以下参照）、CH2、または CH3 ドメインが含まれる。40

【0105】

本明細書において使用される「Fc ドメイン」ドメインという用語は、抗体定常領域の一部を指す。慣習的に、Fc ドメインという用語は、抗体の対合された CH2、CH3 およびヒンジ領域を包含するプロテアーゼ（例えば、パパイン）開裂産物を指す。本開示に関して、Fc ドメインまたは Fc という用語は、產生の手段にかかわらず、免疫グロブリンポリペプチドの CH2、CH3 およびヒンジ領域の全部または一部を含む任意のポリペプチド（またはこのようなポリペプチドをコードする核酸）を指す。

【0106】

本明細書において使用される「改変抗体」という用語には、非天然の、例えば、少なくとも 2つの重鎖部分を含むが、2つの完全な重鎖を含まない抗体（例えば、ドメイン欠失50

抗体またはミニボディーのような)となるように変化させた合成形態の抗体; 2つ以上の抗原または単一抗原の異なるエピトープに結合するように変化させた多重特異的形態の抗体(例えば、二重特異性、三重特異性など)が含まれる)。さらに、「改変抗体」という用語には、多価形態の抗体(例えば、三価、四価など、同一抗原の3つ以上のコピーに対する抗体)が含まれる(例えば、Antibody Engineering, Kortemann & Dubel, eds., 2010, Springer Protocols, Springer参照)。

【0107】

「インビオ半減期」という用語は、その通常の意味、すなわち、ポリペプチドの生物学的活性の50%が身体/標的器官中に依然として存在する時間、またはポリペプチドの活性がその初期値の50%になる時間の意味で使用される。機能的インビオ半減期を測定する代替法として、「血清半減期」、すなわち、クリアランスされる前、ポリペプチド分子の50%が血漿または血流中を循環する時間を測定することができる。血清半減期の測定は、機能的インビオ半減期の測定よりも簡単なことが多く、血清半減期の大きさは、通常、機能的インビオ半減期の大きさの良好な指標である。血清半減期の代替用語には、「血漿半減期」、循環(circulating)半減期、循環(circulatory)半減期、血清クリアランス、血漿クリアランス、およびクリアランス半減期が含まれる。保持すべき機能は、通常、凝血促進性、タンパク分解性、補因子結合、受容体結合活性、または特定のタンパク質に関連する他の型の生物学的活性から選択される。

【0108】

機能的インビオ半減期または血漿半減期に関する「増加した」という用語は、ポリペプチドの関連する半減期が参考分子(例えば、非改変ポリペプチド)のそれと比べて同等の条件下で測定して統計的に有意に増加することを示すために使用される。

【0109】

機能的インビオ半減期または血漿半減期に関する「減少した」という用語は、ポリペプチドの関連する半減期が参考分子(例えば、非改変ポリペプチド)のそれと比べて同等の条件下で測定して統計的に有意に減少することを示すために使用される。

【0110】

本明細書において使用される「発現」という用語は、遺伝子が生化学物質、例えば、本発明の足場またはその断片を産生するプロセスを指す。このプロセスは細胞内の遺伝子の機能的存在の任意の顕在化、例として、限定されるものではないが、遺伝子ノックダウンならびに一過的発現および安定的発現の両方を含む。限定されるものではないが、それは遺伝子の1つ以上のmRNAへの転写、およびこのようなmRNAの1つ以上のポリペプチドへの翻訳を含む。最終所望産物が生化学物質である場合、発現は、その生化学物質および任意の前駆体の作出を含む。

【0111】

「発現産物」は、核酸、例えば、遺伝子の転写により產生されるメッセンジャーRNA、またはポリペプチドのいずれかであり得る。本明細書に記載の発現産物は、転写後修飾、例えば、ポリアデニル化を受けた核酸、または転写後修飾、例えば、メチル化、グリコシリ化、脂質付加、他のタンパク質サブユニットとの会合、タンパク分解性開裂などを受けたポリペプチドをさらに含む。

【0112】

本明細書において使用される「ベクター」または「発現ベクター」という用語は、本発明により宿主細胞中に導入し、所望発現産物を発現させるためのビヒクルとして使用されるベクターを意味するために使用される。当業者に公知であるとおり、このようなベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルスおよびレトロウイルスからなる群から容易に選択することができる。一般に、本発明に適合するベクターは、選択マーカー、所望核酸のクローニングを容易にするための適切な制限酵素部位、ならびに真核または原核細胞中への流入能および/またはその中の複製能を含む。

【0113】

10

20

30

40

50

「宿主細胞」という用語は、組換えDNA技術を使用して構築され、少なくとも1つの発現産物をコードするベクターを保有する細胞を指す。組換え宿主から発現産物を単離するプロセスの記載において、特に明記の無い限り、「細胞」および「細胞培養物」という用語は、発現産物の源を示すために同義に使用され、すなわち、「細胞」からの発現産物の回収は、遠心沈殿全細胞からの回収、または培地および懸濁細胞の両方を含有する細胞培養物からの回収のいずれかを意味する。

【0114】

本明細書において使用される「治療する」または「治療」という用語は、治療法上の治療および防止または予防措置の両方を指し、その目的は、対象における不所望な生理学的变化または障害、例えば、炎症性疾患または病態の進行を予防し、または減速させる（弱める）ことである。有益または所望臨床的結果には、限定されるものではないが、検出可能か検出不可能かにかかわらず、症状の軽減、疾患の程度の縮小、病状の安定化（すなわち、悪化しない）、疾患進行の遅滞化または遅延、病状の改善または緩和、および寛解（部分または完全を問わない）が含まれる。

10

【0115】

「治療」という用語は、治療を受けていない場合に予期される生存に比べての生存の延長も意味する。治療が必要とされる者には、既に病態もしくは障害を有する者および病態もしくは障害を有する傾向がある者、または病態もしくは障害を予防すべき者が含まれる。

【0116】

20

「対象」、「個体」、「動物」、「患者」、または「哺乳動物」という用語は、診断、予後診断、または治療が望まれる任意の個体、患者または動物、特に、哺乳動物の対象を指す。哺乳動物の対象には、ヒト、ドメスティックアニマル、家畜、および動物園の動物、競技用動物または愛玩動物、例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ、雌ウシなどが含まれる。

【0117】

本明細書において使用される「CD40L」という用語は、限定されるものではないが、T細胞の表面上で発現されたCD40L、組換え発現されたCD40L、大腸菌(E.coli)または他の好適な組換えタンパク質発現系から発現および精製されたCD40L、非グリコシル化CD40L、ならびにCD40Lの可溶性断片を指す。本明細書において使用される「CD40L」は、MegacD40L(商標)は、2つのトリマーCD40リガンドがACRP30/アディポネクチンのコラーゲンドメインを介して人工的に結合している高活性構築物である。この構築物は、インビボでのCD40Lの天然膜支援凝集を極めて効率的にシミュレートする。これは、[CD40L+エンハンサー]組合せ(Alexis biochemicals)の簡易で均等に強力な代替物を提供する。「CD40L」という用語は、CD40Lのモノマー形態およびオリゴマー形態、例えば、トリマーCD40Lを指す。

30

【0118】

「CD40L」という用語は、全長CD40Lおよび可溶性断片、例えば、タンパク質分解から得られるCD40Lの細胞外ドメイン形態の両方を指す。ヒトCD40L(Swissprot:P29965)の膜結合および可溶性形態のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号1および配列番号2に示す。

40

【0119】

「CD40Lアンタゴニスト」または「アンタゴニスト」という用語は、最も広い意味で使用され、それには、インビトロ、インサイチュー、またはインビボにおいてCD40Lの1つ以上の生物学的活性を部分的または完全に阻害し、減少させまたは不活性化させる任意の分子、および生物学的に活性なそのバリアントが含まれる。例えば、CD40Lアンタゴニストは、CD40Lへのその結合の結果として、インビボ、インビトロまたはインサイチューにおいて1つ以上のCD40L分子、またはCD40もしくは他の標的に結合している1つ以上のCD40L分子の1つ以上の生物学的活性を部分的または完全に

50

阻害し、減少させまたは不活性化させるように機能し得る。

【 0 1 2 0 】

「C D 4 0 L アゴニスト」または「アゴニスト」という用語は、最も広い意味で使用され、それには、インビトロ、インサイチュー、またはインビボにおいて C D 4 0 L の 1 つ以上の生物学的活性を部分的または完全に向上させ、刺激しまたは活性化させる任意の分子、および生物学的に活性なそのバリアントが含まれる。例えば、C D 4 0 L アゴニストは、C D 4 0 L へのその結合の結果として、インビボ、インビトロまたはインサイチューにおいて 1 つ以上の C D 4 0 L 分子、または C D 4 0 R もしくは他の標的に結合している 1 つ以上の C D 4 0 L 分子の 1 つ以上の生物学的活性を部分的または完全に向上させ、刺激しまたは活性化させるように機能し得る。

10

【 0 1 2 1 】

本明細書において使用される「結晶」という用語は、原子が三次元で周期的に繰り返すパターンで配置され、典型的には格子を形成する物質の固体状態の一形態を指す。

【 0 1 2 2 】

本明細書において使用される「空間群対称性」という用語は、結晶格子の並進対称性を点群対称性と組み合わせる結晶の全対称性を指す。「空間群」は、格子群を識別する大文字（P、A、Fなど）に続く回転および反射要素がらせん軸および映進面を含むように拡張される点群記号により指定される。所与の空間群についての点群対称性は、空間群の格子中心記号を除去し、全てのらせん軸を類似の回転軸により置き換え、全ての映進面を鏡面により置き換えることにより決定することができる留意されたい。空間群についての点群対称性は、その逆格子の真の対称性を説明する。

20

【 0 1 2 3 】

本明細書において使用される「単位格子」という用語は、規則的な繰り返しパターンで配置される結晶中の原子を意味し、それにおいて最小繰り返し単位が単位格子と称される。構造全体を、3つの長さ（a、b、およびc）および3つの角度（ α 、 β 、および γ ）により特性決定される単位格子の情報から再構築することができる。量aおよびbは、格子の底辺の長さであり、 α は、これら2辺間の角度である。量cは、単位格子の高さである。角度 β および γ は、単位格子の底辺と垂直辺との間の角度を説明する。

【 0 1 2 4 】

本明細書において使用される「機械可読データ保存媒体」という用語は、機械可読データが符号化されたデータ保存材料であって、機械がこのようなデータを使用するための命令によりプログラムされ、データを所望のフォーマット、例えば、分子または分子複合体のグラフ三次元表示で表示し得るデータ保存材料を意味する。

30

【 0 1 2 5 】

「X線回折パターン」という用語は、結晶中の分子または原子の周期的集合体のX線散乱から得られるパターンを意味する。X線結晶学は、X線が結晶により回折される事実を利用する技術である。X線は、同等サイズの原子の電子雲により散乱される適正な波長（オングストローム範囲、約 10^{-8} cm）を有する。結晶中の分子または原子の周期的集合体のX線散乱から得られる回折パターンに基づき、電子密度を再構築することができる。追加の位相情報は、回折データからまたは再構築を完了させるための補足回折実験から抽出することができる（結晶学の位相問題）。モデルを実験的電子密度に進行的に組み込み、データに対してリファインして正確な分子構造を取得する。X線構造座標は、空間中の点の特有の構成を定義する。当業者は、タンパク質またはタンパク質・リガンド複合体、またはその一部についての構造座標の集合が相対的な点集合を定義し、次いでそれが三次元中の構成を定義することを理解する。類似または同一の構成を、全く異なる座標の集合により定義することができ、但し、座標間の距離および角度が本質的に同一のままであることを条件とする。さらに、点の構成は、座標間の距離をスカラー因子により増加または減少させる一方、角度を本質的に同一に保持することにより定義することができる。

40

【 0 1 2 6 】

本明細書において使用される「結晶構造」という用語は、結晶質材料中の繰り返し原子

50

または分子単位の三次元または格子間隔配置を指す。結晶質材料の結晶構造は、X線結晶学的方法により決定することができ、例えば、“Principles of Protein X-Ray Crystallography” by Jan Drenth, Springer Advanced Texts in Chemistry, Springer Verlag, 2nd ed., February 1991, ISBN: 0387985875、および“Introduction to Macromolecular Crystallography” by Alexander McPherson, Wiley-Liss, Oct. 18, 2002, ISBN: 0471251224 参照。

【0127】

10

「エフェクター機能」という用語は、抗体または抗体のFc領域（ネイティブFc領域またはアミノ酸配列バリエントFc領域）に起因する抗体断片のそれらの生物学的活性を指し、抗体アイソタイプにより変動する。抗体エフェクター機能の例には、C1q結合および補体依存性細胞傷害；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞障害（ADCC）；貪食；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方調節；およびB細胞活性化が含まれる。

【0128】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ADCC」という用語は、ある細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）上に存在するFc受容体（FcR）上に結合した分泌Igが、それらの細胞傷害性エフェクターカélèbre細胞が抗原担持標的細胞に特異的に結合し、続いて標的細胞を細胞毒素により殺傷することを可能とする細胞傷害の形態を指す。

20

【0129】

「Fc受容体」または「FcR」という用語は、抗体のFc領域に結合する受容体を説明する。FcRは、ネイティブ配列ヒトFcRであり得る。FcRは、IgG抗体（ガンマ受容体）に結合し得、それにはFcRI、FcRIIおよびFcRIIIサブクラスの受容体、例として、これらの受容体のアレルバリエントおよび代替スプライシング形態が含まれる。この用語には、新生児受容体FcRnも含まれる。

【0130】

30

「コンセンサス配列」という用語は、複数の配列がアラインされた後に特定位置における最も共通するアミノ酸を示すタンパク質配列を指す。コンセンサス配列は、関連配列が互いに比較される多重配列アライメントの結果を表す手法である。コンセンサス配列は、それぞれに位置におけるアライメント内でどの残基が最も豊富であるか、およびそれぞれの位置における変動性の程度を示す。

【0131】

緒言

CD40L（CD154、CD40リガンド、gp39またはTBA Mとしても公知）は、33kDaのII型膜糖タンパク質（Swiss-Protアクセション番号P29965）である。さらに、より短い18kDaのCD40L可溶性形態が存在する（sCD40Lまたは可溶性CD40Lとしても公知）。これらのCD40Lの可溶性形態は、膜結合タンパク質のタンパク質分解プロセシングにより生成されるが、可溶性種の細胞活性は、より高次のオリゴマー化（例えば、トリマー化）を除き弱い。

40

【0132】

本発明は、CD40Lに結合し得る組換え非天然タンパク質足場（Tn3足場）のファミリーを提供する。特に、本明細書に記載のタンパク質は、抗体可変領域の相補性決定領域（「CDR」）に相似の定義されたループをディスプレイするために使用することができる。これらのループは、ランダム化または制限進化（restricted evolution）に供して多数の標的化合物に結合し得る多様性を生成することができる。Tn3足場は、モノマーとして使用することができ、またはCD40Lに結合し得るマルチマー足場にアセンブルすることができる。

50

【0133】

具体的な実施形態において、本発明は、疾患、例えば、限定されるものではないが、自己免疫疾患の予防改善、検出、診断、またはモニタリングに有用なCD40L特異的結合剤を提供する。他の具体的な実施形態において、本発明のCD40L特異的Tn3足場は、自己免疫疾患および病態の治療に有用である。一部の実施形態において、自己免疫疾患には、限定されるものではないが、全身性エリテマトーデス（SLE）、関節リウマチ（RA）、多発性硬化症（MS）、炎症性腸疾患（IBD）および同種移植片拒絶反応が含まれ得る。

【0134】

本発明のTn3足場は、少なくとも1つの非天然分子内ジスルフィド結合が遺伝子操作されたヒトテネイシンCの第3FnIIIドメインに由来するCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。本発明のTn3足場を構成するモノマーサブユニットは、互いに独立して正確にフォールドし、それらの結合特異性および親和性を保持し、モノマー足場のそれぞれは、その機能特性を保持する。モノマーサブユニットが高い価数のマルチマーTn3足場にアセンブルされる場合、モノマーサブユニットは、互いに独立して正確にフォールドし、それらの結合特異性および親和性を保持し、モノマーのそれぞれはその機能特性を保持する。

10

【0135】

2つ以上のモノマーサブユニットを含む本発明のTn3足場は、複数のエピトープに結合し得、例えば、(i) 単一標的中の複数のエピトープに結合、(ii) 複数の標的中の単一エピトープに結合、(iii) 1つの標的の異なるサブユニット上に局在する複数のエピトープに結合、または(iv) 複数の標的上の複数のエピトープに結合し得、したがってアビディティを増加させる。

20

【0136】

さらに、リンカーを介する複数のモノマー間の距離を変動させる可能性に起因して、マルチマーTn3足場は、表面上（同一細胞 / 表面上または異なる細胞 / 表面中）の複数の標的分子に結合し得る。本発明のTn3マルチマー足場は、2つ以上の標的へのそれらの自発結合能の結果として、複数の経路をモジュレートするため、細胞表面上の受容体を架橋するため、別個の細胞上の細胞表面受容体を結合させるため、および / または標的分子もしくは細胞を基質に結合させるために使用することができる。

30

【0137】

さらに、本発明は、規定の標的についての足場の親和性が突然変異を介してモジュレートされる親和性成熟足場を提供する。さらに、本発明は、本発明の足場を産生する方法および所望の物理化学的、薬理学的、または免疫学的特性を有するように足場を遺伝子操作する方法を提供する。さらに、本発明は、治療、防止、および診断使用のための、このような足場および方法についての使用を提供する。

【0138】

FnIII構造モチーフ

本発明のTn3足場は、生物およびウイルス、ならびに多数のタンパク質クラスの3つ全ての領域にわたり広く見出されているドメインであるIII型フィブロネクチンモジュール（FnIII）の構造をベースとする。具体的な実施形態において、本発明の足場は、ヒトテネイシンCの第3FnIIIドメインに由来する（国際公開第2009/058379号パンフレットとして公開されている国際出願第国際出願第PCT/US2008/012398号明細書；国際公開第2011/130324号パンフレットとして公開されているPCT/US2011/032184号明細書；および国際公開第2011/30328号パンフレット参照として公開されている国際出願第PCT/US2011/032188号明細書）。

40

【0139】

1つの具体的な実施形態において、本発明のTn3足場は、親Tn3足場に由来するCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。モノマーの全三次元フォールドは、ラクダ

50

およびラクダ科（例えば、ラマ）の単一ドメイン抗体中で抗原認識単位全体を含む最小機能抗体断片の重鎖の可変領域（V H）のそれと密接に関連する。

【0140】

本発明の Tn3 モノマーサブユニットおよびテネイシン C からのネイティブ FnIII ドメインは、同一の三次元構造、すなわち、6つのループ領域により連結されている、一方の側面上の3つのベータ鎖（A、B、およびE）および他方の側面上の4つのベータ鎖（C、D、F、およびG）を有するベータサンドイッチ構造を特徴とする。これらのループ領域は、それぞれのループのNおよびC末端に連結されているベータ鎖に従って命名される。したがって、ABループは、ベータ鎖AB間に局在し、BCループは、鎖BC間に局在し、CDループは、ベータ鎖CD間に局在し、DEループは、ベータ鎖DE間に局在し、EFループは、ベータ鎖EF間に局在し、FGループは、ベータ鎖FG間に局在する。FnIII ドメインは、高い親和性で特異的標的に結合し得るタンパク質足場の多様なプールの生成を容易にする、ランダム化トレラントな溶媒露出ループを有する。10

【0141】

本発明の一態様において、Tn3 モノマーサブユニットは、抗体可変領域の相補性決定領域（CDR）に相似のループの1つ以上をランダム化するように設計される指向進化に供される。このような指向進化アプローチは、関心対象の標的、例えば、CD40Lについて高い親和性を有する抗体様分子の産生をもたらす。

【0142】

さらに、一部の実施形態において、本発明に記載の Tn3 足場は、定義される露出ループ（例えば、既にランダム化され、標的結合に基づき選択されたループ）をディスプレイしてこのような導入ループに結合する分子の進化を指向するために使用することができる。この型の選択は、任意の個々の CDR 様ループについての、または非線形エピトープ結合部分に合わされた2つもしくは3つ全ての CDR 様ループの認識についての認識分子を同定するために実施することができる。特異的標的結合を付与し得る3つのループ（BC、DE、およびFGと命名）の組は、それぞれ BC 鎖間； DE 鎖間、および FG ベータ鎖間に及ぶ。ヒトテネイシン C の第3 FnIII ドメインの BC、DE、および FG ループは、それぞれ 9、6、および 10 アミノ酸残基長である。これらのループの長さは、抗体重鎖中に見出されるコグネット抗原認識ループの狭い範囲内、すなわち、それぞれ 7~10、4~8、および 4~28 アミノ酸長に収まる。同様に、ループの第2の組である AB、CD、および EF ループ（それぞれ、7、7、および 8 アミノ酸長）は、それぞれ AB ベータ鎖間； CD ベータ鎖間； および EF ベータ鎖間に及ぶ。2030

【0143】

Tn3 モノマー足場中のループは、ランダム化され、標的への高親和性結合について選択されると、抗体中のコグネット CDR ループの接触に等価の標的との接触をなし得る。したがって、一部の実施形態において、AB、CD、および EF ループは、ランダム化され、1つ以上の標的、例えば、CD40Lへの高親和性結合について選択される。一部の実施形態において、このランダム化および選択プロセスを BC、DE、および FG ループのランダム化と並行して実施することができる一方、他の実施形態において、このランダム化および選択プロセスは連続して実施される。40

【0144】

CD40L 特異的モノマーサブユニット

本発明は、複数のループ領域に結合している複数のベータ鎖ドメインを含む CD40L 特異的組換え非天然 Tn3 足場であって、前記ループ領域の1つ以上は、野生型 Tn3（配列番号3）（表1参照）中のコグネットループからの少なくとも1つのアミノ酸の欠失、置換または付加により変動する Tn3 足場を提供する。

【0145】

新規結合特性を有する改善された CD40L 特異的 Tn3 モノマーサブユニットを生成するため、親 Tn3 は、アミノ酸付加、欠失または置換に供される。CD40L 特異的 Tn3 モノマーサブユニットの配列を親 Tn3 の配列と比較する場合、ベータ鎖およびループ

10

20

30

40

50

の同一の定義が利用されることが理解される。一部の実施形態において、本発明の C D 4 0 L 特異的 T n 3 モノマーサブユニットは、アミノ酸配列：

I E V (X A B) n A L I T W (X B C) n C E L X 1 Y G I (X C D) n T T I D L (X D E) n Y S I (X E F) n Y E V S L I C (X F G) n K E T F T T
(式中、

(a) X A B 、 X B C 、 X C D 、 X D E 、 X E F 、 および X F G は、それぞれ A B 、 B C 、 C D 、 D E 、 E F 、 および F G ループの配列中に存在するアミノ酸残基を表し；

(b) X 1 は、アミノ酸残基アラニン (A) またはトレオニン (T) を表し；

(c) ループの長さ n は、2 から 26 の整数である)

を含む。

【表2】

表2:これらの試験において使用される Tn3 クローンのループ配列

クローン	AB ループ 配列番号	BC ループ 配列番号	CD ループ 配列番号	DE ループ 配列番号	EF ループ 配列番号	FG ループ 配列番号*
Tn3	4	5	6	7	8	9
309FGwt	4	83	6	94	8	9
309	4	83	6	94	8	99
340	4	84	6	95	8	9
341	4	85	6	94	8	9
342	4	86	6	96	8	9
343	4	87	6	97	8	9
344	4	88	6	95	8	9
345	4	89	6	94	8	9
346	4	90	6	94	8	9
347	4	91	6	95	8	9
348	4	92	6	98	8	9
349	4	93	6	94	8	9
309FGwt コンセンサス	4	168	6	169	8	170
311	4	100	6	118	8	129
311K4E	136	100	6	118	137	129
311K4E_1	136	101	6	119	8	129
311K4E_2	136	102	6	120	8	129
311K4E_3†	136	103	6	121	8	129
311K4E_4†	136	104	6	122	8	129
311K4E_5†	136	105	6	121	8	129
311K4E_7	136	106	6	123	8	129
311K4E_8†	136	107	6	123	8	129
311K4E_9	136	108	6	118	8	129
311K4E_10†	136	109	6	123	8	129
311K4E_11	136	110	6	121	8	129
311K4E_12†	136	111	6	123	8	130
311K4E_13	136	108	6	121	8	129
311K4E_14	136	112	6	124	8	129
311K4E_15	136	113	6	125	8	129
311K4E_16	136	114	6	118	8	129
311K4E_19	136	115	6	126	8	129
311K4E_20	136	116	6	127	8	129
311K4E_21	136	117	6	128	8	129
311 コンセンサス	173	174	6	175	176	177

* 配列 CELAYGI (配列番号 14)を有する C ベータ鎖を含むクローン、全ての他のクローンは、

配列 CELTYGI (配列番号 13)を有する C ベータ鎖を含む。

* 309 ファミリーにおける一部のバリエント、例えば、342において、FG ループは、配列番号 139 により置き換えることができる。

** 311 ファミリーにおける一部のバリエントにおいて、BC ループは、21 位におけるチロシンを置き換えるように遺伝子操作することができる。置換アミノ酸残基は、短い側鎖を有し得ることが具体的に企図される。

【0146】

一部の実施形態において、本発明の CD40L 特異的 Tn3 モノマーサブユニットは、

10

20

30

40

50

アミノ酸配列：

$I E V (X_{A B})_n A L I T W (X_{B C})_n C E L X_1 Y G I (X_{C D})_n T T I D L (X_{D E})_n Y S I (X_{E F})_n Y E V S L I C (X_{F G})_n K E T F T T$

(式中、

(a) $X_{A B}$ 、 $X_{B C}$ 、 $X_{C D}$ 、 $X_{D E}$ 、 $X_{E F}$ 、および $X_{F G}$ は、それぞれAB、BC、CD、DE、EF、およびFGループの配列中に存在するアミノ酸残基を表し；

(b) X_1 は、アミノ酸残基アラニン(A)またはトレオニン(T)を表し；

(c) ループの長さnは、2から26の整数である)

からなる。

【0147】

10

一実施形態において、CD40L特異的Tn3モノマー足場のベータ鎖は、親Tn3足場(配列番号3)のベータ鎖と少なくとも90%の配列同一性を有する。配列同一性のこのような割合を計算するため、当分野において公知の方法を適用してアミノ酸配列をアライアンする。配列同一性の割合は、(a)配列アラインメント中で同一であるベータ鎖中に局在するアミノ酸の数と、(b)ベータ鎖中に局在するアミノ酸の総数との比として定義される。

【0148】

20

一実施形態において、ABループの配列は、配列番号4または配列番号136を含む。別の実施形態において、CDループの配列は、配列番号6を含む。別の実施形態において、EFループの配列は、配列番号8または配列番号137を含む。一実施形態において、ABループの配列は、配列番号4または配列番号136からなる。別の実施形態において、CDループの配列は、配列番号6からなる。別の実施形態において、EFループの配列は、配列番号8または配列番号137からなる。

【0149】

一実施形態において、BCループの配列は、配列番号83、84、85、86、87、88、89、90、91、92および93からなる群から選択される配列を含む。別の実施形態において、BCループの配列は、配列番号83、84、85、86、87、88、89、90、91、92および93からなる群から選択される配列からなる。

【0150】

30

一実施形態において、DEループの配列は、配列番号94、95、96、97および98からなる群から選択される配列を含む。別の実施形態において、DEループの配列は、配列番号94、95、96、97および98からなる群から選択される配列からなる。

【0151】

一実施形態において、FGループの配列は、配列番号9、99、および139からなる群から選択される配列を含む。別の実施形態において、FGループの配列は、配列番号9、99、および139からなる群から選択される配列からなる。

【0152】

40

一実施形態において、BCループの配列は、配列番号100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116および117からなる群から選択される配列を含む。別の実施形態において、BCループの配列は、配列番号100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116および117からなる群から選択される配列からなる。

【0153】

一部の実施形態において、DEループの配列は、配列番号118、119、120、121、122、123、124、125、126、127および128からなる群から選択される配列を含む。他の実施形態において、DEループの配列は、配列番号118、119、120、121、122、123、124、125、126、127および128からなる群から選択される配列からなる。

【0154】

50

は、配列番号 1 2 4 からなり、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 からなる。

【 0 1 8 2 】

一部の実施形態において、A B ループの配列は、配列番号 1 3 6 を含み、B C ループの配列は、配列番号 1 1 3 を含み、D E ループの配列は、配列番号 1 2 5 を含み、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 を含む。他の実施形態において、A B ループの配列は、配列番号 1 3 6 からなり、B C ループの配列は、配列番号 1 1 3 からなり、D E ループの配列は、配列番号 1 2 5 からなり、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 からなる。

【 0 1 8 3 】

一部の実施形態において、A B ループの配列は、配列番号 1 3 6 を含み、B C ループの配列は、配列番号 1 1 4 を含み、D E ループの配列は、配列番号 1 1 8 を含み、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 を含む。他の実施形態において、A B ループの配列は、配列番号 1 3 6 からなり、B C ループの配列は、配列番号 1 1 4 からなり、D E ループの配列は、配列番号 1 1 8 からなり、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 からなる。10

【 0 1 8 4 】

一部の実施形態において、A B ループの配列は、配列番号 1 3 6 を含み、B C ループの配列は、配列番号 1 1 5 を含み、D E ループの配列は、配列番号 1 2 6 を含み、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 を含む。他の実施形態において、A B ループの配列は、配列番号 1 3 6 からなり、B C ループの配列は、配列番号 1 1 5 からなり、D E ループの配列は、配列番号 1 2 6 からなり、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 からなる。

【 0 1 8 5 】

一部の実施形態において、A B ループの配列は、配列番号 1 3 6 を含み、B C ループの配列は、配列番号 1 1 6 を含み、D E ループの配列は、配列番号 1 2 7 を含み、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 を含む。他の実施形態において、A B ループの配列は、配列番号 1 3 6 からなり、B C ループの配列は、配列番号 1 1 6 からなり、D E ループの配列は、配列番号 1 2 7 からなり、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 からなる。20

【 0 1 8 6 】

一部の実施形態において、A B ループの配列は、配列番号 1 3 6 を含み、B C ループの配列は、配列番号 1 1 7 を含み、D E ループの配列は、配列番号 1 2 8 を含み、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 を含む。他の実施形態において、A B ループの配列は、配列番号 1 3 6 からなり、B C ループの配列は、配列番号 1 1 7 からなり、D E ループの配列は、配列番号 1 2 8 からなり、F G ループの配列は、配列番号 1 2 9 からなる。30

【 0 1 8 7 】

一部の実施形態において、B C ループの配列は、配列番号 1 7 4 を含み、D E ループの配列は、配列番号 1 7 5 を含み、F G ループの配列は、配列番号 1 7 7 を含む。他の実施形態において、B C ループの配列は、配列番号 1 7 4 からなり、D E ループの配列は、配列番号 1 7 5 からなり、F G ループの配列は、配列番号 1 7 7 からなる。

【 0 1 8 8 】

一部の実施形態において、C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、配列番号 2 0 、 2 2 、 2 4 、 2 6 、 2 8 、 3 0 、 3 2 、 3 4 、 3 6 、 3 8 、 4 0 、 4 2 および 1 4 6 からなる群から選択される配列を含む。他の実施形態において、C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、配列番号 2 0 、 2 2 、 2 4 、 2 6 、 2 8 、 3 0 、 3 2 、 3 4 、 3 6 、 3 8 、 4 0 、 4 2 および 1 4 6 からなる群から選択される配列からなる。40

【 0 1 8 9 】

一部の実施形態において、C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、配列番号 2 8 または 1 4 6 を含む。他の実施形態において、C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、配列番号 2 8 または 1 4 6 からなる。

【 0 1 9 0 】

一部の実施形態において、本発明のC D 4 0 L 特異的T n 3 モノマーサブユニットは、アミノ酸配列：

I E V K D V T D T T A L I T W X ₁ D X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ C E L T Y G I K50

D V P G D R T T I D L W X₉ H X₁₀ A X₁₁ Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C
R X₁₂ G D M S S N P A K E T F T T (配列番号 167)

(式中、

- (a) X₁ は、アミノ酸残基セリン (S) またはロイシン (L) を表し；
- (b) X₂ は、アミノ酸残基アスパラギン酸 (D) またはグルタミン酸 (E) を表し；
- (c) X₃ は、アミノ酸残基ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、バリン (V)、フェニルアラニン (F) またはトリプトファン (W) を表し；
- (d) X₄ は、アミノ酸残基アラニン (A)、グリシン (G)、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) を表し；
- (e) X₅ は、アミノ酸残基グルタミン酸 (E)、ロイシン (L)、グルタミン (Q)、セリン (S)、アスパラギン酸 (D) またはアスパラギン (N) を表し；
- (f) X₆ は、アミノ酸残基フェニルアラニン (F) またはチロシン (Y) を表し；
- (g) X₇ は、アミノ酸残基イソロイシン (I)、バリン (V)、ヒスチジン (H)、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) を表し；
- (h) X₈ は、アミノ酸残基グリシン (G)、トリプトファン (W) またはバリン (V) を表し；
- (i) X₉ は、アミノ酸残基トリプトファン (W)、フェニルアラニン (F) またはチロシン (Y) を表し；
- (j) X₁₀ は、アミノ酸残基セリン (S)、グルタミン (Q)、メチオニン (M) またはヒスチジン (H) を表し；
- (k) X₁₁ は、アミノ酸残基トリプトファン (W) またはヒスチジン (H) を表し；
- (l) X₁₂ は、アミノ酸残基アルギニン (R) またはセリン (S) を表す）
を含む。

【0191】

一部の実施形態において、本発明の CD40L 特異的 TN3 モノマーサブユニットは、アミノ酸配列：

I E V K D V T D T T A L I T W X₁ D X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ C E L T Y G I K
D V P G D R T T I D L W X₉ H X₁₀ A X₁₁ Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C
R X₁₂ G D M S S N P A K E T F T T (配列番号 167)

(式中、

- (a) X₁ は、アミノ酸残基セリン (S) またはロイシン (L) を表し；
- (b) X₂ は、アミノ酸残基アスパラギン酸 (D) またはグルタミン酸 (E) を表し；
- (c) X₃ は、アミノ酸残基ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、バリン (V)、フェニルアラニン (F) またはトリプトファン (W) を表し；
- (d) X₄ は、アミノ酸残基アラニン (A)、グリシン (G)、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) を表し；
- (e) X₅ は、アミノ酸残基グルタミン酸 (E)、ロイシン (L)、グルタミン (Q)、セリン (S)、アスパラギン酸 (D) またはアスパラギン (N) を表し；
- (f) X₆ は、アミノ酸残基フェニルアラニン (F) またはチロシン (Y) を表し；
- (g) X₇ は、アミノ酸残基イソロイシン (I)、バリン (V)、ヒスチジン (H)、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) を表し；
- (h) X₈ は、アミノ酸残基グリシン (G)、トリプトファン (W) またはバリン (V) を表し；
- (i) X₉ は、アミノ酸残基トリプトファン (W)、フェニルアラニン (F) またはチロシン (Y) を表し；
- (j) X₁₀ は、アミノ酸残基セリン (S)、グルタミン (Q)、メチオニン (M) またはヒスチジン (H) を表し；
- (k) X₁₁ は、アミノ酸残基トリプトファン (W) またはヒスチジン (H) を表し；
- (l) X₁₂ は、アミノ酸残基アルギニン (R) またはセリン (S) を表す）
からなる。

10

20

30

40

50

【0192】

一部の実施形態において、CD40L特異的モノマーサブユニットは、配列番号44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、および82からなる群から選択される配列を含む。一部の実施形態において、CD40L特異的モノマーサブユニットは、配列番号44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、および82からなる群から選択される配列からなる。

【0193】

一部の実施形態において、本発明のCD40L特異的Tn3モノマーサブユニットは、アミノ酸配列：

I E V X₁ D V T D T T A L I T W X₂ X₃ R S X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ C E L
X₁₁ Y G I K D V P G D R T T I D L X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅ Y V H Y S I G N L K
P D T X₁₆ Y E V S L I C L T T D G T Y X₁₇ N P A K E T F T T (配列番号171)
)

(式中、

(a) X₁ は、アミノ酸残基リジン (K) またはグルタミン酸 (E) を表し；
(b) X₂ は、アミノ酸残基トレオニン (T) またはイソロイシン (I) を表し；
(c) X₃ は、アミノ酸残基アスパラギン (N) またはアラニン (A) を表し；
(d) X₄ は、アミノ酸残基セリン (S)、ロイシン (L)、アラニン (A)、フェニルアラニン (F) またはチロシン (Y) を表し；
(e) X₅ は、アミノ酸残基チロシン (Y)、アラニン (A)、グリシン (G)、バリン (V)、イソロイシン (I) またはセリン (S) を表し；
(f) X₆ は、アミノ酸残基チロシン (Y)、セリン (S)、アラニン (A) またはヒスチジン (H) を表し；
(g) X₇ は、アミノ酸残基アスパラギン (N)、アスパラギン酸 (D)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；
(h) X₈ は、アミノ酸残基ロイシン (L)、フェニルアラニン (F)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；
(i) X₉ は、アミノ酸残基ヒスチジン (H)、プロリン (P)、セリン (S)、ロイシン (L) またはアスパラギン酸 (D) を表し；
(j) X₁₀ は、アミノ酸残基グリシン (G)、フェニルアラニン (F)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；

(k) X₁₁ は、アミノ酸残基アラニン (A) またはトレオニン (T) を表し；
(l) X₁₂ は、アミノ酸残基セリン (S)、アスパラギン (N)、グルタミン酸 (E)、アスパラギン (R) またはアスパラギン酸 (D) を表し；
(m) X₁₃ は、アミノ酸残基セリン (S)、グルタミン (Q)、トレオニン (T)、アスパラギン (N) またはアラニン (A) を表し；
(n) X₁₄ は、アミノ酸残基プロリン (P)、バリン (V)、イソロイシン (I) またはアラニン (A) またはアミノ酸無しを表し；
(o) X₁₅ は、アミノ酸残基イソロイシン (I) またはアミノ酸無しを表し；
(p) X₁₆ は、アミノ酸残基グルタミン酸 (E) またはリジン (K) を表し；
(q) X₁₇ は、アミノ酸残基セリン (S) またはアスパラギン (N) を表す) を含む。

【0194】

一部の実施形態において、本発明のCD40L特異的Tn3モノマーサブユニットは、アミノ酸配列：

I E V X₁ D V T D T T A L I T W X₂ X₃ R S X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ C E L
X₁₁ Y G I K D V P G D R T T I D L X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅ Y V H Y S I G N L K
P D T X₁₆ Y E V S L I C L T T D G T Y X₁₇ N P A K E T F T T (配列番号171)
)

(式中、

- (a) X_1 は、アミノ酸残基リジン (K) またはグルタミン酸 (E) を表し；
 - (b) X_2 は、アミノ酸残基トレオニン (T) またはイソロイシン (I) を表し；
 - (c) X_3 は、アミノ酸残基アスパラギン (N) またはアラニン (A) を表し；
 - (d) X_4 は、アミノ酸残基セリン (S)、ロイシン (L)、アラニン (A)、フェニルアラニン (F) またはチロシン (Y) を表し；
 - (e) X_5 は、アミノ酸残基チロシン (Y)、アラニン (A)、グリシン (G)、バリン (V)、イソロイシン (I) またはセリン (S) を表し；
 - (f) X_6 は、アミノ酸残基チロシン (Y)、セリン (S)、アラニン (A) またはヒスチジン (H) を表し；
 - (g) X_7 は、アミノ酸残基アスパラギン (N)、アスパラギン酸 (D)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；
 - (h) X_8 は、アミノ酸残基ロイシン (L)、フェニルアラニン (F)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；
 - (i) X_9 は、アミノ酸残基ヒスチジン (H)、プロリン (P)、セリン (S)、ロイシン (L) またはアスパラギン酸 (D) を表し；
 - (j) X_{10} は、アミノ酸残基グリシン (G)、フェニルアラニン (F)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；
 - (k) X_{11} は、アミノ酸残基アラニン (A) またはトレオニン (T) を表し；
 - (l) X_{12} は、アミノ酸残基セリン (S)、アスパラギン (N)、グルタミン酸 (E)、アスパラギン (R) またはアスパラギン酸 (D) を表し；
 - (m) X_{13} は、アミノ酸残基セリン (S)、グルタミン (Q)、トレオニン (T)、アスパラギン (N) またはアラニン (A) を表し；
 - (n) X_{14} は、アミノ酸残基プロリン (P)、バリン (V)、イソロイシン (I) またはアラニン (A) またはアミノ酸無しを表し；
 - (o) X_{15} は、アミノ酸残基イソロイシン (I) またはアミノ酸無しを表し；
 - (p) X_{16} は、アミノ酸残基グルタミン酸 (E) またはリジン (K) を表し；
 - (q) X_{17} は、アミノ酸残基セリン (S) またはアスパラギン (N) を表す)
- からなる。

【0195】

一部の実施形態において、CD40L特異的モノマー足場は、ベータ鎖の1つ以上が、CおよびFベータ鎖（それぞれ配列番号13または14；および配列番号17）中のシステイン残基が置換され得ないことを除き少なくとも1つのアミノ酸置換を含むTn3モジュールを含む。

【0196】

CD40L特異的モノマーサブユニットの種々のベータ鎖を連結するループは、長さおよび/または配列多様性についてランダム化することができる。一実施形態において、CD40L特異的モノマーサブユニットは、長さおよび/または配列多様性についてランダム化された少なくとも1つのループを有する。一実施形態において、CD40L特異的モノマーサブユニットの少なくとも1つのループは、一定に保持される一方、少なくとも1つの追加のループは、長さおよび/または配列多様性についてランダム化される。別の実施形態において、ループAB、CD、およびEFの少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つまたは少なくとも6つのループが、長さおよび/または配列多様性についてランダム化される。一実施形態において、CD40L特異的モノマーサブユニットの少なくとも1つのループは、一定に保持される一方、少なくとも1つの追加のループは、長さおよび/または配列多様性についてランダム化される。別の実施形態において、ループAB、CD、およびEFのの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てが一定に保持される一方、ループBC、DE、およびFGの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てが長さまたは配列多様性についてランダム化される。別の実施形態において、ループAB、CD、およびEFののの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つ全てがランダム化される一方、ループBC、DE、およびFGのうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てが長さおよび/または配列多様性についてラ

10

20

30

40

50

ンダム化される。さらに別の実施形態において、ループ A B、C D、E F、B C、D E、および F G の少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つのループ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つ、または 6 つ全てが長さまたは配列多様性についてランダム化される。

【 0 1 9 7 】

一部の実施形態において、ループ内の 1 つ以上の残基が一定に保持される一方、他の残基が長さおよび / または配列多様性についてランダム化される。一部の実施形態において、ループ内の 1 つ以上の残基が所定の限られた数の異なるアミノ酸に保持される一方、他の残基が長さおよび / または配列多様性についてランダム化される。したがって、本発明の C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、縮重コンセンサス配列および / または 1 つ以上の不变アミノ酸残基を有する 1 つ以上のループを含み得る。10

【 0 1 9 8 】

一実施形態において、本発明の C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、ランダム化された A B ループを含む。別の実施形態において、本発明の C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、ランダム化された B C ループを含む。一実施形態において、本発明の C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、ランダム化された C D ループを含む。一実施形態において、本発明の C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、ランダム化された D E ループを含む。一実施形態において、本発明の C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、ランダム化された E F ループを含む。20

【 0 1 9 9 】

ある実施形態において、本発明の C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、ヒトテネイシン C の第 3 F n I I I ドメインのコグネット F G ループよりも短い少なくとも 1 つのアミノ酸残基であるように保持され、さらに 1 つ以上の位置においてランダム化された F G ループを含む。20

【 0 2 0 0 】

具体的な実施形態において、ループ B C、D E、および F G の少なくとも 1 つは、ランダム化され、A ベータ鎖は、配列番号 1 0 または 1 1 を含み、B ベータ鎖は、配列番号 1 2 を含み、C ベータ鎖は、配列番号 1 3 または 1 4 を含み、D ベータ鎖は、配列番号 1 5 を含み、E ベータ鎖は、配列番号 1 6 を含み、F ベータ鎖は、配列番号 1 7 を含み、G ベータ鎖は、配列番号 1 8 を含み、A B ループは、配列番号 4 または 1 3 6 を含み、C D ループは、配列番号 6 を含み、E F ループは、配列番号 8 または 1 3 7 を含む。30

【 0 2 0 1 】

他の具体的な実施形態において、ループ A B、C D、および E F の少なくとも 1 つは、ランダム化され、A ベータ鎖は、配列番号 1 0 または 1 1 を含み、B ベータ鎖は、配列番号 1 2 を含み、C ベータ鎖は、配列番号 1 3 または 1 4 を含み、D ベータ鎖は、配列番号 1 5 を含み、E ベータ鎖は、配列番号 1 6 を含み、F ベータ鎖は、配列番号 1 7 を含み、G ベータ鎖は、配列番号 1 8 を含み、B C ループは、配列番号 5 を含み、D E ループは、配列番号 7 を含み、F G ループは、配列番号 9 または 1 3 9 を含む。

【 0 2 0 2 】

足場安定性の向上40

本発明の T n 3 足場の安定性は、多くの異なるアプローチにより増加させることができる。一部の実施形態において、本発明の T n 3 足場は、N および / または C 末端領域の伸長により安定化することができる。N および / または C 末端領域は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 または 11 個以上のアミノ酸だけ伸長することができる。他の実施形態において、本発明の T n 3 足場は、本明細書に記載のとおり血清半減期を増加させる変化を導入することにより安定化することができる。さらに別の実施形態において、本発明の T n 3 足場は、足場の疎水性コアを安定化するための少なくとも 1 つのアミノ酸残基の付加、欠失または置換を含む。

【 0 2 0 3 】

本発明の T n 3 足場は、国際特許出願第 P C T / U S 2 0 1 1 / 0 3 2 1 8 4 号明細書50

に開示のとおり、非天然ジスルフィド結合を遺伝子操作することにより有効に安定化することができる。一部の実施形態において、本発明の足場は、PCT公開国際公開第2009/058379号パンフレットに記載のとおり、非天然ジスルフィド結合を含む。ジスルフィド結合の遺伝子操作に好適な候補位置を同定するためにバイオインフォマティクスアプローチを利用することができる。

【0204】

一実施形態において、本発明のTn3モノマー足場は、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つの非天然分子内ジスルフィド結合を含む。一実施形態において、本発明のTn3モノマーサブユニットは、少なくとも1つの非天然分子内ジスルフィド結合を含み、前記少なくとも1つの非天然ジスルフィド結合は、モノマーを安定化する。さらに別の実施形態において、本発明のTn3足場は、少なくとも1つの非天然ジスルフィド結合を含み、結合は、2つの区別されるモノマーまたはマルチマーTn3足場間に局在し、すなわち、ジスルフィド結合は、分子間ジスルフィド結合である。例えば、ジスルフィド結合は、区別される足場（例えば、2つのCD40L特異的モノマー足場）、Tn3足場およびリンカー、Tn3足場およびFcドメイン、またはTn3足場および抗体もしくはその断片を結合させ得る。10

【0205】

一部の実施形態において、本発明のTn3足場は、Tn3モノマーサブユニットおよび単離異種部分、Tn3モノマーサブユニットおよび同一のTn3足場に融合もしくはコンジュゲートしている異種部分、またはTn3モノマーサブユニットおよび異なるTn3足場に融合もしくはコンジュゲートしている異種部分を結合させる少なくとも1つの非天然分子間ジスルフィド結合を含む。20

【0206】

同一の実施形態において、本発明のTn3足場は、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つまたはそれを超えるモノマーサブユニットのTn3マルチマー足場を形成するジスルフィド結合を含む。

【0207】

別の実施形態において、本発明のTn3足場は、Nおよび/またはC末端領域の伸長を含み得る。一実施形態において、本発明のTn3足場は、本明細書に記載のとおり血清半減期を増加させるための変化を含む。さらに別の実施形態において、本発明の足場は、足場の疎水性コアを安定化するための少なくとも1つのアミノ酸残基の付加、欠失または置換を含む。30

【0208】

安定性の計測

単離され、またはマルチマーTn3足場の一部としての本発明のTn3モノマーサブユニットの安定性は、当分野において周知の技術、例えば、熱(T_m)およびカオトロピック変性（例えば、尿素、またはグアニジン塩による処理）、プロテアーゼ処理（例えば、サーモリシンによる処理）またはタンパク質安定性を測定する当分野において認められた別の方針により容易に計測することができる。タンパク質安定性を計測するために使用される技術の包括的考察は、例えば、“Current Protocols in Molecular Biology”および“Current Protocols in Protein Science” by John Wiley and Sons. 2007に見出すことができる。40

【0209】

マルチマーTn3足場

本発明の一態様は、タンデムに連結されている少なくとも2つの本発明のTn3モノマーサブユニットを含むTn3マルチマー足場であって、モノマーの少なくとも1つは、CD40L特異的モノマーサブユニットであるTn3マルチマー足場を提供する。このようなマルチマーTn3足場は、複数のフォーマットにアセンブルすることができる。具体的な態様において、本発明は少なくとも2つのCD40L特異的モノマーサブユニットがペ50

ペプチドリンカーを介してタンデムに連結されているマルチマーTn3足場を提供する。一部の実施形態において、マルチマーTn3足場は、標的結合の価数および／もしくはアビディティー、または標的の他の作用の増加を示す。一部の実施形態において、複数のモノマーサブユニットが同一標的に結合する場合に標的結合の価数および／またはアビディティーの増加が達成される。一部の実施形態において、価数の増加により、標的にに対する特異的作用、例えば、標的タンパク質のダイマー化の増加が改善される。

【0210】

具体的な実施形態において、本発明のマルチマーTn3足場は、タンデムに連結されている少なくとも2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含み、それぞれのCD40L特異的モノマーサブユニットは、少なくとも1つの標的に結合し、それぞれのCD40L特異的モノマーサブユニットは、複数のループ領域に結合している複数のベータ鎖を含み、少なくとも1つのループは、親Tn3足場（配列番号3）中のコグネットループの非天然バリアントである。10

【0211】

一実施形態において、マルチマーTn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニット間の共有結合を介して、例えば、CD40L特異的モノマーサブユニットを直接結合させることにより、またはリンカー、例えば、ペプチドリンカーを含めることにより生成される。特定の例において、共有結合Tn3足場は、CD40L特異的モノマーサブユニットをコードする融合遺伝子を構築することにより、またはシステイン残基についてのコドンをCD40L特異的モノマーサブユニット中へ遺伝子操作し、ジスルフィド結合形成を発現産物間で生じさせることにより生成される。20

【0212】

一実施形態において、本発明のマルチマーTn3足場は、いかなる追加の介在アミノ酸も有さない、互いに直接連結されている少なくとも2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。別の実施形態において、本発明のマルチマーTn3足場は、リンカー、例えば、ペプチドリンカーを介してタンデムに連結されている少なくとも2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。

【0213】

具体的な実施形態において、本発明のマルチマーTn3足場は、ペプチドリンカーを介してタンデムに連結されている少なくとも2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含み、ペプチドリンカーは、1から約1000、または1から約500、または1から約250、または1から約100、または1から約50、または1から約25個のアミノ酸を含む。具体的な実施形態において、本発明のマルチマーTn3足場は、ペプチドリンカーを介してタンデムに連結されている少なくとも2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含み、ペプチドリンカーは、1から約20、または1から約15、または1から約10、または1から約5個のアミノ酸を含む。30

【0214】

具体的な実施形態において、本発明のマルチマーTn3足場は、リンカー、例えば、ペプチドリンカーを介してタンデムに連結されている少なくとも2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含み、リンカーは、機能的部分である。機能的部分は、マルチマーTn3足場の所望の機能および／または特徴に基づき選択される。例えば、精製に有用な機能的部分（例えば、ヒスチジンタグ）は、リンカーとして使用することができる。リンカーとして有用な機能的部分には、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール（PEG）、細胞傷害剤、放射性核種、造影剤、ビオチン、ダイマー化ドメイン、ヒト血清アルブミン（HSA）またはそのFcRn結合部分、抗体のドメインまたは断片、单鎖抗体、ドメイン抗体、アルブミン結合ドメイン、IgG分子、酵素、リガンド、受容体、結合ペプチド、非Tn3足場、エピトープタグ、組換えポリペプチドポリマー、サイトカインなどが含まれる。リンカーとして使用することができる具体的なペプチドリンカーおよび機能的部分は、以下に開示される。40

【0215】

具体的な実施形態において、機能的部分は、免疫疾患またはその断片である。一部の実施形態において、免疫グロブリンまたはその断片は、Fcドメインを含む。一部の実施形態において、Fcドメインは、少なくとも1つのFc-R媒介エフェクター機能、例えば、ADCC(抗体依存性細胞媒介性傷害)を誘導し得ない。Fcドメインは、少なくとも1つのFc-R媒介エフェクター機能を低減させまたは排除するように変化させることができることが当分野において公知であり、例えば、米国特許第5,624,821号明細書および米国特許第6,737,056号明細書参照。

【0216】

一部の実施形態において、マルチマーTn3足場は、1つ以上のリンカーを介して連結されている少なくとも2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを含み、それぞれのCD40L特異的モノマーサブユニット間に挟まれるリンカーは、同一のリンカーでも異なるリンカーでもよい。一部の実施形態において、リンカーは、複数のリンカーを含み得、それらは同一のリンカーでも異なるリンカーでもよい。一部の実施形態において、複数のリンカーが鎖状に連結されている場合、一部または全部のリンカーが機能的部分であり得る。

10

【0217】

足場結合化学量論

一部の実施形態において、モノマーまたはマルチマーTn3足場は、単一のCD40L分子上または異なるCD40L標的分子上の異なるエピトープであり得る、異なるエピトープに特異的なCD40L特異的モノマーサブユニットを含み得る。一部の実施形態において、マルチマーTn3足場は、それぞれのサブユニットが1つ以上のCD40L分子上の1つ以上の異なるエピトープを標的化するCD40L特異的モノマーサブユニットを含み得る。

20

【0218】

他の実施形態において、モノマーまたはマルチマーTn3足場は、同一のCD40L分子上の2つ以上の異なるエピトープに結合し得る。一部の実施形態において、異なるエピトープは、非重複エピトープである。他の実施形態において、異なるエピトープは、重複エピトープである。

【0219】

さらに別の具体的な実施形態において、モノマーまたはマルチマーTn3足場は、CD40L分子上の1つ以上のエピトープに結合し、第2のCD40L分子上の1つ以上のエピトープにさらに結合し得る。一部の実施形態において、異なる標的分子は、オリゴマー複合体、例えば、トリマーCD40L複合体の一部である。

30

【0220】

さらに別の具体的な実施形態において、モノマーまたはマルチマーTn3足場は、CD40Lトリマー上の単一のエピトープに結合し得る。さらに別の具体的な実施形態において、モノマーまたはマルチマーTn3足場は、少なくとも2つのCD40Lトリマー上の同一のエピトープに結合し得る。

【0221】

ある実施形態において、モノマーまたはマルチマーTn3足場は、隣接細胞表面上のCD40L分子の2つ以上のコピー上の同一のエピトープに結合し得る。ある実施形態において、モノマーまたはマルチマーTn3足場は、溶液中のCD40L分子の2つ以上のコピー上の同一のエピトープに結合し得る。一部の実施形態において、モノマーまたはマルチマーTn3足場は、同一または異なる結合親和性および/またはアビディティでCD40L上の同一のエピトープまたは異なるエピトープに結合し得る。

40

【0222】

別の実施形態において、モノマーまたはマルチマーTn3足場は、CD40Lの1つ以上のコピー上のエピトープに結合し、標的にに対する所望の作用を達成したまま向上(例えば、相乗的に)させ、例えば、受容体への結合を妨害し、またはオリゴマー化を妨害し得る。

50

【0223】

さらに、本発明のモノマーまたはマルチマーTn3足場が複数のCD40L特異的モノマーサブユニット、例えば、それぞれのモノマーがCD40L上の異なるエピトープを標的化する異なるモノマーを含む場合、このようなモノマーサブユニットは、ある生物学的効果を達成したまま向上させるためにあるパターンまたは空間配向に従って配置することができる。モノマーサブユニットのこのような組合せをアセンブルし、続いて当分野において公知の方法を使用して評価することができる。

【0224】

融合体

本発明は、少なくとも1つのCD40L特異的モノマーサブユニットが異種部分に融合して1つ以上のTn3足場を提供する。これに関して、異種部分は、スペーサーとして足場を結合させるために使用されるのではなく、Tn3足場に追加の機能を提供し得る。一部の実施形態において、異種部分は、リンカーとしても機能し得る。本発明は、1つ以上の異種部分、例として、限定されるものではないが、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、核酸分子、小分子、模倣剤、合成薬物、無機分子、および有機分子にコンジュゲートまたは融合しているTn3足場の使用を包含する。したがって、本発明は、1つ以上のCD40L特異的Tn3モノマー、例として、限定されるものではないが、本明細書に記載の融合タンパク質を含むポリペプチドを提供する。

10

【0225】

本発明は、異種タンパク質またはポリペプチドまたはその断片に組換え融合または化学的にコンジュゲートしているTn3足場の使用を包含する。コンジュゲーションには、共有結合および非共有結合コンジュゲーションの両方が含まれる。一部の実施形態において、Tn3足場は、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも500、または少なくとも1000個のアミノ酸)のポリペプチドに融合または化学的にコンジュゲートさせて融合タンパク質を生成することができる。

20

【0226】

1つ以上の異種部分へのマルチマーTn3足場の融合またはコンジュゲーションは、直接的、すなわち、Tn3足場と異種部分の間に挟まれるリンカーを有さず、または1つ以上の本明細書に記載のリンカー配列を介するものであり得る。一部の実施形態において、足場は、Tn3足場を標的細胞中の特定の細胞表面受容体に特異的な抗体に融合またはコンジュゲートすることにより、インビトロまたはインビボにおいて異種ポリペプチドに特定の細胞型を標的化させるために使用することができる。

30

【0227】

異種ポリペプチドに融合またはコンジュゲートしているTn3足場は、当分野で公知の方法を使用するインビトロイムノアッセイおよび精製法に使用することもできる。例えば、国際公開第93/21232号パンフレット；欧洲特許第439,095号明細書；Naramura et al. Immunol. Lett. 39: 91-99, 1994; 米国特許第5,474,981号明細書；Gillis et al., PNAS 89: 1428-1432, 1992; およびFell et al., J. Immunol. 146: 2446-2452, 1991参照、これらは参照により全体として組み込まれる。

40

【0228】

一部の実施形態において、Tn3足場は、足場を免疫グロブリンまたはそのドメイン、例として、限定されるものではないが、IgG(Fc)の定常領域と、例えば、NまたはC末端を介して融合またはコンジュゲートさせることにより、ヒト免疫応答に統合することができる。同様に、Tn3足場と補体タンパク質、例えば、C1qの間の融合体は、細胞を標的化するために使用することができる。

【0229】

50

種々の刊行物は、F c R n 結合ポリペプチドを分子中に導入することにより（例えば、国際公開第97/43316号パンフレット；米国特許第5,869,046号明細書；米国特許第5,747,035号明細書；国際公開第96/32478号パンフレット；および国際公開第91/14438号パンフレット参照）、F c R n 結合親和性が保存されているが、他のF c 受容体についての親和性は大きく低減している抗体と分子を融合させることにより（例えば、国際公開第99/43713号パンフレット参照）、または分子を抗体のF c R n 結合ドメインと融合させることにより（例えば、国際公開第00/09560号パンフレット；米国特許第4,703,039号明細書参照）、半減期が改変された生理学的に活性な分子を得る方法を記載している。生理学的に活性な分子の半減期を増加させる具体的な技術および方法は、米国特許第7,083,784号明細書に見出すことができる。具体的には、T n 3 足場は、I g G からのF c 領域に融合させることができ、F c 領域は、アミノ酸残基突然変異M 252Y / S 254T / T 256E またはH 433K / N 434F / Y 436H を含み、アミノ酸位置は、K a b a t 番号付与スキームに従い命名されることが企図される。F c ドメインバリエントへのT n 3 足場の融合体は、A D C C を誘導し得ないことが具体的に企図される。

【0230】

一部の実施形態において、T n 3 足場の半減期は、T n 3 足場を本質的に決まった構造を取らない組換えポリペプチド（例えば、X T E N（商標）ポリペプチド）と遺伝子融合させることにより、またはポリエチレンギリコール（P E G）とのコンジュゲーションにより増加させることができる。

【0231】

一部の実施形態において、T n 3 足場は、インビボまたは血清半減期を増加または延長させる分子と融合させることができる。一部の実施形態において、足場は、アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン（H S A）、その新生児F c 受容体（F c R n）結合断片、P E G、多糖、抗体、補体、ヘモグロビン、結合ペプチド、リポタンパク質ならびに血流中のその半減期および／またはその組織浸透を増加させる他の因子に融合またはコンジュゲートさせることができる。これらの融合体のいずれも、標準的な方法、例えば、公に利用可能な遺伝子配列を使用して構築された組換え融合遺伝子からの融合タンパク質の発現により生成することができる。

【0232】

一部の実施形態において、T n 3 足場の特性は、H S A バリアント、すなわち、少なくともアミノ酸置換、欠失、または配列トランケーションを含む全長H S A（配列番号139）に由来する分子へのコンジュゲーションまたは融合により改善することができる。

【0233】

一部の実施形態において、H S A バリアントとのコンジュゲーションにより改善される特性は、血漿半減期である。T n 3 足場の血漿半減期の改善は、その特性の変化、例えば、血漿半減期の増加もしくは減少、または他の薬物動態パラメーターの変化であり得る。一部の実施形態において、H S A バリアントは、全長H S A（配列番号138）に由来する突然変異体である。具体的な実施形態において、H S A バリアントは、34位におけるシステインのセリンへの置換を含む（配列番号133）。T n 3 足場の血漿半減期を改変するために使用することができるH S A バリアントは、例えば、国際公開第2011/103076号パンフレットおよび国際公開第2011/051489号パンフレットに記載されており、これらは両方とも参照により全体として組み込まれる。一部の実施形態において、本発明のT n 3 足場の血漿半減期は、それを、H S A のドメインI I I 中の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むH S A バリアントと融合させることにより増加される。

【0234】

一部の実施形態において、本発明のT n 3 足場は、全長成熟H S A（配列番号138）の配列またはその断片を含むH S A バリアントを含み、但し、407、415、463、500、506、508、509、511、512、515、516、521、523、524、526、535、550、557、573、574、および580からなる群か

10

20

30

40

50

ら選択される位置における全長成熟HSA中の位置に対して番号付与される少なくとも1つのアミノ酸置換を除き；少なくとも1つのアミノ酸置換は、573位におけるリジン(K)のグルタミン酸(E)への置換を含まず、Tn3足場は、HSAバリアントにコンジュゲートしていないTn3足場の血漿半減期よりも長い血漿半減期を有する。

【0235】

一部の他の実施形態において、全長成熟HSA中の位置に対して番号付与される少なくとも1つのアミノ酸置換は、463、508、523、および524からなる群から選択される位置におけるものであり、Tn3足場は、HSAバリアントにコンジュゲートしていないTn3足場の血漿半減期よりも長い血漿半減期を有する。

【0236】

他の実施形態において、本発明のTn3足場は、全長成熟HSA(配列番号133または138)の配列またはその断片を含むHSAバリアントを含み、但し、

(a) 407位におけるロイシン(L)のアスパラギン(N)またはチロシン(Y)への置換；

(b) 415位におけるバリン(V)のトレオニン(T)への置換；

(c) 463位におけるロイシン(L)のアスパラギン(N)への置換；

(d) 500位におけるリジン(K)のアルギニン(R)への置換；

(e) 506位におけるトレオニン(T)のチロシン(Y)への置換；

(f) 508位におけるトレオニン(T)のアルギニン(R)への置換；

(g) 509位におけるフェニルアラニン(F)のメチオニン(M)またはトリプトファン(W)への置換；

(h) 511位におけるアラニン(A)のフェニルアラニン(F)への置換；

(i) 512位におけるアスパラギン酸(D)のチロシン(Y)への置換；

(j) 515位におけるトレオニン(T)のグルタミン(Q)への置換；

(k) 516位におけるロイシン(L)のトレオニン(T)またはトリプトファン(W)への置換；

(l) 521位におけるアルギニン(R)のトリプトファン(W)への置換；

(m) 523位におけるイソロイシン(I)のアスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、グリシン(G)、リジン(K)、またはアルギニン(R)への置換；

(n) 524位におけるリジン(K)のロイシン(L)への置換；

(o) 526位におけるグルタミン(Q)のメチオニン(M)への置換；

(p) 535位におけるヒスチジン(H)のプロリン(P)への置換；

(q) 550位におけるアスパラギン酸(D)のグルタミン酸(E)への置換；

(r) 557位におけるリジン(K)のグリシン(G)への置換；

(s) 573位におけるリジン(K)のフェニルアラニン(F)、ヒスチジン(H)、プロリン(P)、トリプトファン(W)、またはチロシン(Y)への置換；

(t) 574位におけるリジン(K)のアスパラギン(N)への置換；

(u) 580位におけるグルタミン(Q)のリジン(K)への置換；および

(v) 前記置換の2つ以上の組合せ

からなる群から選択される全長成熟HSA中の位置に対して番号付与される少なくとも1つのアミノ酸置換を除き、

前記Tn3足場は、前記HSAバリアントにコンジュゲートしていないTn3足場の血漿半減期よりも長い血漿半減期を有する。

【0237】

一部の実施形態において、Tn3足場は、全長成熟HSA(配列番号133または138)の配列またはその断片を含むHSAバリアントを含み、但し、

(a) 463位におけるロイシン(L)のアスパラギン(N)への置換；

(b) 508位におけるトレオニン(T)のアルギニン(R)への置換；

(c) 523位におけるイソロイシン(I)のアスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、グリシン(G)、リジン(K)、またはアルギニン(R)への置換；

10

20

30

40

50

(d) 524位におけるリジン(K)のロイシン(L)への置換；および

(e) 前記置換の2つ以上の組合せ

からなる群から選択される全長成熟HSA中の位置に対して番号付与される少なくとも1つのアミノ酸置換を除き、

前記Tn3足場は、前記HSAバリアントにコンジュゲートしていないTn3足場の血漿半減期よりも長い血漿半減期を有する。

【0238】

さらに、本発明のTn3足場は、マークー配列、例えば、精製を容易にするためのペプチドに融合させることができる。一部の実施形態において、マークーアミノ酸配列は、ポリヒスチジンペプチド(Hisタグ)、例えば、オクタヒスチジンタグ(His-8-タグ)またはヘキサヒスチジンタグ(His-6-タグ)、例えば、多くが市販されているベクターのうち、pQE発現ベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)中に提供されるタグである。Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 821-824, 1989に記載のとおり、例えば、ポリヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。精製に有用な他のペプチドタグには、限定されるものではないが、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープに対応するヘマグルチニン(「HA」)タグ(例えば、Wilson et al., Cell 37: 767, 1984参照)、FLAGタグ、Strepタグ、mycタグ、V5タグ、GFPタグ、AU1タグ、AU5タグ、ECSタグ、GSTタグ、またはOLLASタグが含まれる。

【0239】

本発明のTn3足場を含む追加の融合タンパク質は、遺伝子シャフリング、モチーフシャフリング、エキソンシャフリング、および/またはコドンシャフリング(まとめて「DNAシャフリング」と称される)の技術を介して生成することができる。

【0240】

DNAシャフリングは、標的にに対するTn3足場の作用を変化させるために(例えば、より高い親和性およびより低い解離速度を有する足場を生成するために)用いることができる。Tn3足場は、組換え前に、エラーブローンPCR、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法によるランダム突然変異誘発により変化させることができる。特異的標的に結合する、足場をコードするポリヌクレオチドの1つ以上の部分は、1つ以上の異種分子の1つ以上の構成要素、モチーフ、区画、部分、ドメイン、断片などにより組換えることができる。

【0241】

抗体およびFcドメイン融合体

一部の実施形態において、本発明のTn3足場は、抗体(例えば、IgG)のドメインまたは断片、例として、限定されるものではないが、Fcドメインに融合しているCD40L特異的モノマーサブユニットを含む。

【0242】

一部の実施形態において、1つのみのCD40L特異的モノマーサブユニットが、抗体のドメインまたは断片にコンジュゲートまたは融合している。例えば、単一のCD40L特異的モノマーサブユニットを、抗体のドメインまたは断片(例えば、抗体の重鎖または軽鎖)のポリペプチドのN末端に融合させることができる。他の実施形態において、Tn3足場は、1つ以上のCD40L特異的モノマーサブユニットを、抗体のドメインまたは断片(例えば、抗体の重鎖および/もしくは軽鎖、またはFcドメイン)のポリペプチドのN末端および/またはC末端に融合またはコンジュゲートさせることにより作出される。

【0243】

一部の実施形態において、抗体のドメインまたは断片に融合しているCD40L特異的モノマーサブユニットの一部または全部は、同一である。一部の他の実施形態において、

10

20

30

40

50

抗体のドメインまたは断片に融合している C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットの一部または全部は、異なる。

【 0 2 4 4 】

具体的な実施形態において、本発明の T n 3 足場は、 F c ドメインに融合している 1 つの C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む。他の実施形態において、本発明の T n 3 足場は、 F c ドメインに融合している少なくとも 2 つの C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む。1 つの具体的な実施形態において、 F c ドメインに融合している C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットの 2 つは同一である。1 つの具体的な実施形態において、 F c ドメインに融合している C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットの 2 つは異なる。1 つの具体的な実施形態において、 F c ドメインに融合している 2 つの C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、互いにタンデムに連結されており、 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットの一方は、 F c ドメインに融合している。10

【 0 2 4 5 】

一部の実施形態において、本発明の異なる T n 3 足場は、ヘテロダイマーの形成を助ける F c ドメイン突然変異の使用によりダイマー化することができる。 F c 領域のバリアント（例えば、アミノ酸置換および / または付加および / または欠失）が抗体のエフェクター機能を向上または縮小させ、抗体の薬物動態特性（例えば、半減期）を変化させ得ることが当分野において公知である。したがって、ある実施形態において、本発明の T n 3 足場は、 T n 3 足場の機能および / または薬物動態特性を変化させるために 1 つ以上の変化が F c 領域中でなされた変化した F c 領域を含む F c ドメインを含む。ある実施形態において、本発明の T n 3 足場は、少なくとも 1 つの F c R 媒介エフェクター機能を低減させまたは排除するために 1 つ以上の変化が F c 領域中でなされた変化した F c 領域を含む F c ドメインを含む。20

【 0 2 4 6 】

エフェクター機能および / または抗炎症活性を増加または減少させるために F c 領域のグリコシル化を改変することができることも公知である。したがって、一実施形態において、本発明の T n 3 足場は、 T n 3 足場の細胞傷害および / または抗炎症特性を変化させるためにアミノ酸残基の変化したグリコシル化を有する F c 領域を含む。

【 0 2 4 7 】

T n 3 足場トポロジー

本発明の T n 3 足場は、任意の好適な空間配置で F c ドメイン、抗体軽鎖、および抗体重鎖の C 末端に融合させることができる。例えば、企図される足場トポロジーの詳細な説明について国際公開 P C T / U S 2 0 1 1 / 0 3 2 1 8 4 号明細書参照。30

【 0 2 4 8 】

本発明の足場の生成

本明細書に記載の T n 3 足場は、新たなまたは改善された標的結合タンパク質を進化させる任意の技術において使用することができる。1 つの特定の例において、標的を固体支持体、例えば、カラム樹脂またはマイクロタイタープレートウェル上に固定化し、標的を候補足場ベース結合タンパク質のライブラリーと接触させる。このようなライブラリーは、 C D R 様ループの配列および / または長さのランダム化を介して T n 3 足場から構築されたクローンからなり得る。40

【 0 2 4 9 】

これに関して、バクテリオファージ（ファージ）ディスプレイは、1 つの周知技術であり、これは大きなオリゴペプチドライブラリーをスクリーニングして標的に特異的に結合し得るこれらのライブラリーのメンバーを同定することを可能とする。ファージディスプレイは、バリアントポリペプチドがバクテリオファージ粒子表面上のコートタンパク質への融合体としてディスプレイされる技術である（ S c o t t , J . K . a n d S m i t h , G . P . (1 9 9 0) S c i e n c e 2 4 9 : 3 8 6 ）。天然 F n I I I ドメインのループ長さおよび多様性の優先度を測定するため、バイオインフォマティクスアプローチを用いることができる。この分析を使用して、ループ長さおよび配列多様性についての50

優先度は、「制限ランダム化（restricted randomization）」アプローチを開発するために用いることができる。この制限ランダム化において、相対ループ長さおよび配列の優先度が、ライブラリー戦略の開発に組み込まれる。ループ長さおよび配列多様性分析のライブラリー開発への統合は、制限ランダム化（すなわち、アミノ酸が存在し得るランダム化ループ内のある位置が限定される）をもたらす。

【0250】

本発明はまた、非天然Tn3足場の多様な集団を含む組換えライブラリーを提供する。一実施形態において、ライブラリーは、複数のループ領域に結合している複数のベータ鎖ドメインを含む非天然Tn3足場を含み、前記ループの1つ以上は、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、置換または付加により変動する。具体的な実施形態において、ライブラリーは、野生型Tn3足場に由来するTn3足場を含む。10

【0251】

上記で詳細に説明したとおり、足場の種々のベータ鎖を連結するループは、長さおよび/または配列多様性についてランダム化することができる。一実施形態において、本発明のライブラリーは、長さおよび/または配列多様性についてランダム化された少なくとも1つのループを有するTn3足場を含む。一実施形態において、Tn3足場の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つまたは少なくとも6つのループが、長さおよび/または配列多様性についてランダム化される。一実施形態において、少なくとも1つのループが、一定に保持される一方、少なくとも1つの追加のループが、長さおよび/または配列多様性についてランダム化される。別の実施形態において、ループA B、C D、およびE Fの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てが一定に保持される一方、ループB C、D E、およびF Gの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てが長さまたは配列多様性についてランダム化される。別の実施形態において、ループA B、C D、およびE Fの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つ全てがランダム化される一方、ループB C、D E、およびF Gの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てが長さおよび/または配列多様性についてランダム化される。20

【0252】

具体的な実施形態において、本発明のライブラリーは、FnIII足場を含み、Aベータ鎖は、配列番号10または11を含み、Bベータ鎖は、配列番号12を含み、Cベータ鎖は、配列番号13または14を含み、Dベータ鎖は、配列番号15を含み、Eベータ鎖は、配列番号16を含み、Fベータ鎖は、配列番号17を含み、Gベータ鎖は配列番号18を含む。30

【0253】

具体的な実施形態において、本発明のライブラリーはFnIII足場を含み、Aベータ鎖は、配列番号10または11からなり、Bベータ鎖は、配列番号12からなり、Cベータ鎖は、配列番号13または14からなり、Dベータ鎖は、配列番号15からなり、Eベータ鎖は、配列番号16からなり、Fベータ鎖は、配列番号17からなり、Gベータ鎖は、配列番号18からなる。40

【0254】

具体的な実施形態において、本発明のライブラリーはFnIII足場を含み、Aベータ鎖は、本質的に配列番号10または11からなり、Bベータ鎖は、本質的に配列番号12からなり、Cベータ鎖は、本質的に配列番号13または14からなり、Dベータ鎖は、本質的に配列番号15からなり、Eベータ鎖は、本質的に配列番号16からなり、Fベータ鎖は、本質的に配列番号17からなり、Gベータ鎖は、本質的に配列番号18からなる。

【0255】

上記で詳細に説明したとおり、ループ内の1つ以上の残基を一定に保持することができる一方、他の残基が長さおよび/または配列多様性についてランダム化される。場合により、または代替的に、ループ内の1つ以上の残基を所定の限られた数の異なるアミノ酸に保持することができる一方、他の残基が長さおよび/または配列多様性に関してランダム50

化される。したがって、本発明のライブラリーは、縮重コンセンサス配列および／または1つ以上の不变アミノ酸残基を有する1つ以上のループを含み得るTn3足場を含む。別の実施形態において、本発明のライブラリーは、ランダム化されたBCループを有するTn3足場を含む。別の実施形態において、本発明のライブラリーは、ランダム化されたBCループを有するTn3足場を含む。さらに別の実施形態において、本発明のライブラリーは、ランダム化されたBCループを有するTn3足場を含む。

【0256】

一実施形態において、本発明のライブラリーは、ランダム化されたDEループをTn3足場を含む。一実施形態において、本発明のライブラリーは、ランダム化されたFGループを有するTn3足場を含む。別の実施形態において、本発明のライブラリーは、ランダム化されたFGループを有するFn1II足場を含む。 10

【0257】

具体的な実施形態において、本発明のライブラリーは、アミノ酸配列：

I E V (X_{A B})_n A L I T W (X_{B C})_n C E L X₁ Y G I (X_{C D})_n T T I D L (X_{D E})_n Y S I (X_{E F})_n Y E V S L I C (X_{F G})_n K E T F T T
(式中、

(a) X_{A B}、X_{B C}、X_{C D}、X_{D E}、X_{E F}、およびX_{F G}は、それぞれAB、BC、CD、DE、EF、およびFGループの配列中に存在するアミノ酸残基を表し；

(b) X₁は、アミノ酸残基AまたはTを表し；

(c) ループの長さnは、2から26の整数である)

20 を含む足場を含む。

【0258】

一部の実施形態において、本発明のライブラリーは、アミノ酸配列：

I E V K D V T D T T A L I T W X₁ D X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ C E L T Y G I K D V P G D R T T I D L W X₉ H X₁₀ A X₁₁ Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C R X₁₂ G D M S S N P A K E T F T T (配列番号167)

(式中、

(a) X₁は、アミノ酸残基セリン(S)またはロイシン(L)を表し；

(b) X₂は、アミノ酸残基アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)を表し；

(c) X₃は、アミノ酸残基ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、バリン(V)、フェニルアラニン(F)またはトリプトファン(W)を表し； 30

(d) X₄は、アミノ酸残基アラニン(A)、グリシン(G)、グルタミン酸(E)またはアスパラギン酸(D)を表し；

(e) X₅は、アミノ酸残基グルタミン酸(E)、ロイシン(L)、グルタミン(Q)、セリン(S)、アスパラギン酸(D)またはアスパラギン(N)を表し；

(f) X₆は、アミノ酸残基フェニルアラニン(F)またはチロシン(Y)を表し；

(g) X₇は、アミノ酸残基イソロイシン(I)、バリン(V)、ヒスチジン(H)、グルタミン酸(E)またはアスパラギン酸(D)を表し；

(h) X₈は、アミノ酸残基グリシン(G)、トリプトファン(W)またはバリン(V)を表し； 40

(i) X₉は、アミノ酸残基トリプトファン(W)、フェニルアラニン(F)またはチロシン(Y)を表し；

(j) X₁₀は、アミノ酸残基セリン(S)、グルタミン(Q)、メチオニン(M)またはヒスチジン(H)を表し；

(k) X₁₁は、アミノ酸残基トリプトファン(W)またはヒスチジン(H)を表し；

(l) X₁₂は、アミノ酸残基アルギニン(R)またはセリン(S)を表す)

を含む本発明のCD40L特異的Tn3モノマーサブユニットを含む。

【0259】

一部の実施形態において、本発明のライブラリーは、アミノ酸配列：

I E V X₁ D V T D T T A L I T W X₂ X₃ R S X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ C E L 50

X_{1_1} Y G I K D V P G D R T T I D L X_{1_2} X_{1_3} X_{1_4} X_{1_5} Y V H Y S I G N L K
 P D T X_{1_6} Y E V S L I C L T T D G T Y X_{1_7} N P A K E T F T T (配列番号171
)

(式中、

- (a) X₁ は、アミノ酸残基リジン (K) またはグルタミン酸 (E) を表し；
 - (b) X₂ は、アミノ酸残基トレオニン (T) またはイソロイシン (I) を表し；
 - (c) X₃ は、アミノ酸残基アスパラギン (N) またはアラニン (A) を表し；
 - (d) X₄ は、アミノ酸残基セリン (S)、ロイシン (L)、アラニン (A)、フェニルアラニン (F) またはチロシン (Y) を表し；
 - (e) X₅ は、アミノ酸残基チロシン (Y)、アラニン (A)、グリシン (G)、バリン (V)、イソロイシン (I) またはセリン (S) を表し；
 - (f) X₆ は、アミノ酸残基チロシン (Y)、セリン (S)、アラニン (A) またはヒスチジン (H) を表し；
 - (g) X₇ は、アミノ酸残基アスパラギン (N)、アスパラギン酸 (D)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；
 - (h) X₈ は、アミノ酸残基ロイシン (L)、フェニルアラニン (F)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；
 - (i) X₉ は、アミノ酸残基ヒスチジン (H)、プロリン (P)、セリン (S)、ロイシン (L) またはアスパラギン酸 (D) を表し；
 - (j) X₁₀ は、アミノ酸残基グリシン (G)、フェニルアラニン (F)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；
 - (k) X₁₁ は、アミノ酸残基アラニン (A) またはトレオニン (T) を表し；
 - (l) X₁₂ は、アミノ酸残基セリン (S)、アスパラギン (N)、グルタミン酸 (E)、アスパラギン (R) またはアスパラギン酸 (D) を表し；
 - (m) X₁₃ は、アミノ酸残基セリン (S)、グルタミン (Q)、トレオニン (T)、アスパラギン (N) またはアラニン (A) を表し；
 - (n) X₁₄ は、アミノ酸残基プロリン (P)、バリン (V)、イソロイシン (I) またはアラニン (A) またはアミノ酸無しを表し；
 - (o) X₁₅ は、アミノ酸残基イソロイシン (I) またはアミノ酸無しを表し；
 - (p) X₁₆ は、アミノ酸残基グルタミン酸 (E) またはリジン (K) を表し；
 - (q) X₁₇ は、アミノ酸残基セリン (S) またはアスパラギン (N) を表す)
- を含む本発明の C D 4 0 L 特異的 T n 3 モノマーサブユニットを含む。

【0260】

本発明は、本発明のライブラリーをスクリーニングすることにより、標的、例えば、C D 4 0 L に結合し、親 T n 3 足場と比較して増加した安定性または標的、例えば、C D 4 0 L に対する改善された作用を有する組換え T n 3 足場を同定する方法をさらに提供する。

【0261】

ある実施形態において、親 T n 3 足場と比較して増加したタンパク質安定性を有し、特異的に標的に結合する組換え T n 3 足場を同定する方法は、
 標的リガンドを本発明のライブラリーと、足場：標的リガンド複合体の形成に好適な条件下で接触させること；
 複合体から標的リガンドに結合する足場を得ること；
 工程 (b) において得られた足場の安定性が野生型 T n 3 足場のそれよりも大きいかどうかを判定すること
 を含む。

【0262】

同一の方法を使用して標的にに対する改善された結合親和性、アビディティーなどを有する組換え T n 3 足場を同定することができる。一実施形態において、工程 (a) において、本発明の足場ライブラリーを固定化標的とインキュベートする。一実施形態において、

10

20

30

40

50

工程(b)において、足場：標的リガンド複合体を洗浄して非特異的結合剤を除去し、最も強固な結合剤を極めてストリンジエントな条件下で溶出させ、P C Rに供して配列情報を回収する。工程(b)において得られた結合剤および／または配列情報は、本明細書に開示の方法または当業者に公知の方法を使用して新たなライブラリーを作出するために使用することができ、さらなる配列の突然変異誘発を用いてまたは用いずに選択プロセスを繰り返すために使用することができるが具体的に企図される。一部の実施形態において、抗原についての十分な親和性を有する結合剤が得られるまで多くの選択のラウンドを実施することができる。

【 0 2 6 3 】

本発明のさらなる実施形態は、本発明および上記の足場を含むライブラリーをコードする単離核酸分子の回収物である。 10

【 0 2 6 4 】

本発明の足場は、親和性成熟に供することができる。この当分野において認められたプロセスにおいて、特異的結合タンパク質を、特異的標的についての増加した親和性について選択するスキームに供する(Wu et al., Proc Natl Acad Sci USA. 95(11): 6037-42参照)。得られる本発明の足場は、親和性成熟前の足場と比較して少なくとも同程度の大きさの結合特性を示し得る。

【 0 2 6 5 】

本発明はまた、標的に結合して足場：標的複合体を形成し得るタンパク質足場のアミノ酸配列を同定する方法を提供する。一実施形態において、この方法は、(a)本発明のライブラリーを固定化または分離可能な標的と接触させること；(b)足場：標的複合体を遊離足場から分離すること；(c) (b)の分離された足場の複製を引き起こし、低下した多様性を有することにより、および標的に結合し得るディスプレイされた足場の濃縮により(a)におけるものとは区別される新たなポリペプチドディスプレイライブラリーをもたらすこと；d)場合により、工程(a)、および(b)を(c)の新たなライブラリーを用いて繰り返すこと；ならびにe) (d)からの種のディスプレイされた足場をコードする領域の核酸配列を決定し、それにより標的に結合し得るペプチド配列を推定することを含む。 20

【 0 2 6 6 】

別の実施形態において、本発明のTn3足場は、ライブラリースクリーンからの同定後にさらにランダム化することができる。一実施形態において、本発明の方法は、本明細書に記載の方法を使用してライブラリーから同定された足場の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つまたは少なくとも6つのループをさらにランダム化することを含む。別の実施形態において、さらにランダム化された足場を、標的に結合し得る足場を同定する後続の方法に供する。この方法は、(a)前記さらにランダム化された足場を固定化または分離可能な標的と接触させること、(b)さらにランダム化された足場：標的複合体を遊離足場から分離すること、(c) (b)の分離された足場の複製を引き起こし、場合により、工程(a)～(c)を繰り返すこと、および(d)前記さらにランダム化された足場をコードする領域の核酸配列を決定し、それにより標的に結合し得るペプチド配列を推定することを含む。 30

【 0 2 6 7 】

さらなる実施形態において、さらにランダム化された足場は、最初のライブラリーにおいて事前にランダム化された少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、または少なくとも6つのランダム化ループを含む。代替的なさらなる実施形態において、さらにランダム化された足場は、最初のライブラリーにおいて事前にランダム化されなかった少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、または少なくとも6つのランダム化ループを含む。 40

【 0 2 6 8 】

本発明はまた、少なくとも1つ以上の標的に結合する少なくとも2つのTn3足場を得る方法を提供する。この方法は、特定の応答を誘発するように協調して作用する薬剤のス 50

クリーニングを可能とする。2つ以上の足場の協調を要求するアゴニスト活性が要求される場合、このようなスクリーンを使用することは有利であり得る。この方法は、ライプラリーを再フォーマット化してマルチマー複合体を形成することなく協調薬剤のスクリーニングを可能とする。一実施形態において、本発明の方法は、標的リガンドを本発明のライプラリーと、足場：標的リガンド複合体の形成を可能とする条件下で接触させること、前記足場を架橋剤（少なくとも2つの同一または区別される足場を近接して合わせる薬剤と定義）と会合させ、足場の架橋が検出可能な応答を誘発すること、および複合体から、前記標的に結合する足場を得ることを含む。さらなる実施形態において、架橋剤は、足場特異的抗体、またはその断片、エピトープタグ特異的抗体またはその断片、ダイマー化ドメイン、例えば、Fc領域、コイルドコイルモチーフ（例えば、限定されるものではないが、ロイシンジッパー）、化学架橋剤、または当分野において公知の別のダイマー化ドメインである。10

【0269】

本発明はまた、本発明のTn3足場を利用して化合物を検出する方法を提供する。ライプラリースクリーニングにより得られたTn3足場の結合特異性に基づき、このようなTn3足場をアッセイにおいて、例えば、診断法に使用して試料中の特異的標的を検出することが可能である。一実施形態において、化合物を検出する方法は、試料中の前記化合物を本発明のTn3足場と、化合物：足場複合体の形成を可能とする条件下で接触させること、および前記足場を検出し、それにより試料中の前記化合物を検出することを含む。さらなる実施形態において、足場を標識（すなわち、放射標識、蛍光、酵素結合または比色標識）して化合物の検出を容易にする。20

【0270】

本発明はまた、本発明のTn3足場を利用して化合物を捕捉する方法を提供する。ライプラリースクリーニングにより得られたTn3足場の結合特異性に基づき、試料中の特異的標的を捕捉するためのアッセイにおいて、例えば、精製法にこのようなTn3足場を使用することが可能である。一実施形態において、試料中の化合物を捕捉する方法は、試料中の前記化合物を本発明の足場と、化合物：足場複合体の形成を可能とする条件下で接触させること、および前記複合体を試料から取り出し、それにより前記試料中の前記化合物を捕捉することを含む。さらなる実施形態において、Tn3足場を固定化して化合物：足場複合体の取り出しを容易にする。30

【0271】

一部の実施形態において、本発明のライプラリーから単離されたTn3足場は、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、またはそれを超えるランダム化ループを含む。一部の実施形態において、単離Tn3足場ループ配列を、ドナー足場からFnIIILレシーバー足場、例として、限定されるものではないが、Tn3レシーバー足場中の任意のループとスワッピングすることができる（例えば、ドナー足場からのFGループ配列を、レシーバーFnIIIL足場中の任意のループに移すことができる）。具体的な実施形態において、単離ループ配列を、レシーバー足場のコグネットループに移すことができる（例えば、ドナー足場からのFGループ配列を、FGループ位置中のFnIIILレシーバー足場に移すことができる）。一部の実施形態において、単離ループ配列は、種々のレシーバー足場とランダムに「混合し、一致させる」ことができる。40

【0272】

他の実施形態において、単離Tn3足場配列は、ループ配列により同定することができる。例えば、ライプラリーを使用して特定の標的に対してパニングし、特異的結合剤の回収物を単離する。ランダム化ループ配列は、Tn3足場バックグラウンド（すなわち、配列番号XのFGループ配列を含む、標的Xに結合する足場）とは独立して特異的配列として特性決定することができる。代替的実施形態において、足場が標的Xに結合する2つのループ配列を示す場合、ループ配列は、足場配列の不存在下で結合標的Xとして特性決定することができる。言い換えれば、特定の標的に結合するライプラリーから単離された足50

場は、足場骨格とは独立した標的に結合する可変ループ配列として発現させることができることが企図される。このプロセスは、抗体の可変領域の C D R の概念と類似する。

【0273】

親和性成熟

本発明の T n 3 足場の開発は、1つ以上のインピトロまたはインピボ親和性成熟工程を含み得る。一部の実施形態において、T n 3 モノマーサブユニットは、単一の親和性成熟の工程を受け得る。他の実施形態において、T n 3 モノマーサブユニットは、2つ以上の親和性成熟の工程を受け得る。一般に、親和性成熟 T n 3 足場の所望抗原への結合を改善する親 T n 3 足場中のアミノ酸変化、または具体的には親 T n 3 足場ループ中のアミノ酸変化をもたらす任意の親和性成熟アプローチを用いることができる。

10

【0274】

これらのアミノ酸変化は、例えば、ランダム突然変異誘発、「ウォークスルー (walk through)」突然変異誘発、および「ルックスルー (look through)」突然変異誘発を介して達成することができる。このような突然変異誘発は、F n I I I ベース結合分子の全部または一部のアブイニシオ合成の間に、例えば、エラープロン P C R、酵母または細菌の「突然変異誘発遺伝子」株、ランダムまたは規定核酸変化の組込みを使用することにより達成することができる。親和性成熟および/または突然変異誘発を実施する方法は、例えば、米国特許第 7,195,880 号明細書；米国特許第 6,951,725 号明細書；米国特許第 7,078,197 号明細書；米国特許第 7,022,479 号明細書；米国特許第 5,922,545 号明細書；米国特許第 5,830,721 号明細書；米国特許第 5,605,793 号明細書；米国特許第 5,830,650 号明細書；米国特許第 6,194,550 号明細書；米国特許第 6,699,658 号明細書；米国特許第 7,063,943 号明細書；米国特許第 5,866,344 号明細書および P C T 公開国際公開第 06023144 号パンフレットに記載されている。

20

【0275】

このような親和性成熟法は、抗原結合スクリーニングアッセイのストリンジエンシーを増加させて抗原についての改善された親和性を有する T n 3 足場を選択することをさらに要求し得る。タンパク質 - タンパク質相互作用アッセイのストリンジエンシーを増加させる当分野において承認された方法を本明細書において使用することができる。一実施形態において、アッセイ条件の1つ以上を変動させ（例えば、アッセイ緩衝液の塩濃度）所望抗原についての T n 3 足場の親和性を低減させる。別の実施形態において、T n 3 足場が所望抗原に結合するのに許容される時間の長さを低減させる。

30

【0276】

別の実施形態において、競合的結合工程をタンパク質 - タンパク質相互作用アッセイに追加することができる。例えば、最初に、T n 3 足場を所望の固定化抗原に結合させることができる。次いで、固定化抗原と結合について競合するように機能する規定濃度の非固定化抗原を添加し、それにより、抗原について最低の親和性を有する T n 3 足場を固定化抗原から溶離させ、改善された抗原結合親和性を有する T n 3 足場の選択をもたらす。アッセイ条件のストリンジエンシーは、アッセイに添加される非固定化抗原の濃度を増加させることによりさらに増加させることができる。

40

【0277】

スクリーニング法は、改善された抗原結合を有する1つ以上の T n 3 足場を濃縮するために、複数の選択ラウンドも要求し得る。一実施形態において、それぞれの選択ラウンドにおいて、さらなるアミノ酸突然変異を T n 3 足場中に導入する。別の実施形態において、それぞれの選択ラウンドにおいて、所望抗原への結合のストリンジエンシーを増加させて抗原についての増加した親和性を有する T n 3 足場が選択される。

【0278】

一部の実施形態において、親和性成熟は、T n 3 の B C、D E、および F G ループ一部の飽和突然変異誘発により実施する。一部の実施形態において、飽和突然変異誘発は、K u n k e l 突然変異誘発を使用して実施する。他の実施形態において、飽和突然変異誘発

50

は、P C Rを使用して実施する。

【0279】

一部の実施形態において、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、または6つ以上の親和性成熟ラウンドを適用する。一部の実施形態において、飽和突然変異誘発を1つのみのループに適用する一方、一部の他の実施形態において、1つのみのループまたはループの一部を1つの親和性成熟ラウンドの間に突然変異させる。一部の実施形態において、2つ以上のループまたは1つ以上のループの一部を、同一の親和性成熟ラウンドの間に突然変異させる。

【0280】

他の実施形態において、B C、D E、およびF G ループを、同一の親和性成熟ラウンドの間に同時に突然変異させる。 10

【0281】

モノマーを同一標的の異なるエピトープに結合するマルチマーTn3足場にアセンブルする場合、または二重特異性Tn3足場の場合、それぞれの結合特異性を独立してスクリーニングすることができる。

【0282】

一部の実施形態において、ループはファージディスプレイライブリーを使用してランダム化させる。一部の実施形態において、Tn3足場の所望標的への結合は、当分野において承認された方法を使用して測定することができる。また、スクリーンにおいて同定されたTn3足場のアミノ酸配列は、当分野において承認された方法を使用して決定することができる。 20

【0283】

一部の実施形態において、本発明のモノマー親和性成熟足場は、表面プラスモン共鳴または当分野において公知の他のアッセイにより計測して、親和性成熟前の同一のTn3足場と比較して少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも40倍、少なくとも60倍、少なくとも80倍、または少なくとも100倍またはそれを超えるCD40Lについての親和性の増加を示す。一部の実施形態において、本発明のモノマー親和性成熟足場は、表面プラスモン共鳴または当分野において公知の他のアッセイにより計測して5μM未満、1μM未満、500μM未満、250μM未満、100μM未満、または50μM未満の解離定数(K_d)を有する。 30

【0284】

これらの親和性成熟法は、望ましい改善された結合特性、例えば、増加した親和性、または他の望ましい特徴、例えば、好ましい薬物動態特性、高効力、低免疫原性、増加もしくは減少した交差反応性などを有するTn3足場を開発するために適用することができる。

【0285】

タンデムリピートの生成

2つのCD40L特異的モノマーサブユニットを結合させることにより形成されるダイマーであるタンデム構築物の結合は、当分野において公知の制限酵素、例として、限定されるものではないが、I I型およびI I S型制限酵素を使用する制限酵素部位におけるオリゴヌクレオチドのライゲーションにより生成することができる。 40

【0286】

本発明のマルチマーTn3足場は、C末端および/またはN末端において、および/または本明細書に記載のドメイン間にリンカーを含み得る。さらに、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つまたはポリペプチド足場を含む本発明の足場は、ダイマー化ドメイン、例として、限定されるものではないが、以下から選択される抗体部分に融合またはコンジュゲートさせることができる：

(i) VL、CL、VHおよびCH1ドメインを有するFab断片；

(ii) CH1ドメインのC末端において1つ以上のシステイン残基を有するFab断片 50

である F_{a b'} 断片；

(i i i) V H および C H 1 ドメインを有する F d 断片；

(i v) V H および C H 1 ドメインならびに C H 1 ドメインの C 末端における 1 つ以上のシスティン残基を有する F d' 断片；

(v) 抗体單一アームの V L および V H ドメインを有する F v 断片；

(v i) V H ドメインからなる d A b 断片；

(v i i) 単離 C D R 領域；

(v i i i) ヒンジ領域におけるジスルフィド架橋により結合している 2 つの F_{a b'} 断片を含む二価の断片である F(a b')₂ 断片；

(i x) 单鎖抗体分子(例えば、单鎖 F v ; s c F v) ；

10

(x) 同一ポリペプチド鎖中で軽鎖可変ドメイン(V L)に連結されている重鎖可変ドメイン(V H)を含む、2 つの抗原結合部位を有する「ダイアボディー」；

(x i) 相補的な軽鎖ポリペプチドと一緒にになって一対の抗原結合領域を形成する一対のタンデム F d セグメント(V H - C H 1 - V H - C H 1)を含む「直鎖抗体」；

(x i i) 全長抗体；ならびに

(x i i i) C H 2 - C H 3 を含み、ヒンジ領域および / または C H 1 領域の全部または一部をさらに含み得る F c 領域。

【 0 2 8 7 】

T n 3 足場の產生

本発明の T n 3 足場の組換え発現は、T n 3 足場をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を要求する。T n 3 足場をコードするポリヌクレオチドを得たら、T n 3 足場産生のためのベクターを当分野において周知の技術を使用する組換え D N A 技術により产生することができる。したがって、ヌクレオチド配列をコードする T n 3 足場を含有するポリヌクレオチドを発現させることによりタンパク質を調製する方法が本明細書に記載される。当業者に周知の方法を使用して足場ポリペプチドコード配列ならびに適切な転写および転写制御シグナルを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方には、例えば、インビトロ組換え D N A 技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換え技術が含まれる。したがって、本発明は、プロモーターに作動可能に結合している本発明の T n 3 足場をコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。

20

【 0 2 8 8 】

発現ベクターは、慣用の技術により宿主細胞に移し、次いで形質移入された細胞を慣用の技術により培養して本発明の T n 3 足場を产生する。したがって、本発明は、異種プロモーターに作動可能に結合している本発明の足場をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を含む。好適な宿主細胞には、限定されるものではないが、微生物、例えば、細菌(例えば、大腸菌(E . c o l i) および枯草菌(B . s u b t i l i s)) が含まれる。

【 0 2 8 9 】

種々の宿主発現ベクター系を、本発明の T n 3 足場を発現させるために利用することができる。このような宿主発現系は、関心対象のコード配列を产生し、続いて精製することができるビヒクルを表すが、適切なヌクレオチドコード配列により形質転換または形質移入された場合、本発明の足場をインサイチューで発現し得る細胞も表す。これらには、限定されるものではないが、微生物、例えば、足場コード配列を含有する組換えバクテリオファージ D N A 、プラスミド D N A またはコスミド D N A 発現ベクターにより形質転換された細菌(例えば、大腸菌(E . c o l i) および枯草菌(B . s u b t i l i s)) または哺乳動物細胞系(例えば、C O S 、C H O 、B H K 、2 9 3 、N S O 、および 3 T 3 細胞) が含まれる。

30

【 0 2 9 0 】

本発明の T n 3 足場の产生に有用な方法は、例えば、国際特許出願公開の国際公開第 2 0 0 9 / 0 5 8 3 7 9 号パンフレットに開示されている。本発明の足場を組換え発現によ

40

50

り產生したら、それをタンパク質の精製について当分野において公知の任意の方法により精製することができる。

【0291】

一部の実施形態において、本発明の足場は、組換え発現の間にグリコシル化され得るアミノ酸残基を置き換えることにより非グリコシル化形態で产生することができる。1つの具体的な実施形態において、グリシン - セリンリンカー（例えば、配列番号131または配列番号132）中のセリンアミノ酸を、他のアミノ酸残基、例えば、アラニン、グリシン、ロイシン、イソロイシンまたはバリン（例えば、配列番号140、141、142および143参照）、により置き換えて組換え発現の間のグリコシル化を妨害することができる。一部の具体的な実施形態において、N-グリコシル化部位を本発明のTn3足場から除去する。他の実施形態において、本発明の足場は、組換え発現後に脱グリコシル化することができる。例えば、酵素カクテルを使用する組換え発現後のインビトロ脱グリコシル化の方法は、当分野において公知である（例えば、QA-bio, Palm Desert, CAから市販されているPFGase F, Endo F Multi, Orela O-linked Glycan Release, Enzymatic CarboRelease、およびEnzymatic Deglycomx脱グリコシル化キット）。

【0292】

研究室における本発明のTn3足場の产生は、米国特許出願公開第2010-0298541A1号明細書に記載のとおり、分析スケールのリアクターまたは生産スケールのリアクターで足場を产生するためにスケールアップすることができる。

【0293】

分泌Tn3足場のスケーラブル产生

本発明のTn3足場は、細胞内で、または分泌形態として产生することができる。一部の実施形態において、分泌足場は、適正にフォールドされ、完全に機能的である。本発明のTn3足場は、スケーラブルプロセスにより产生することができる。一部の実施形態において、足場は、スケールアップして本発明の足場を分析スケールのバイオリアクター（例えば、限定されるものではないが、5L、10L、15L、30L、または50Lバイオリアクター）で产生可能な、研究室における本発明のスケーラブルプロセスにより产生することができる。他の実施形態において、Tn3足場は、スケールアップして本発明のTn3足場を生産スケールのバイオリアクター（例えば、限定されるものではないが、75L、100L、150L、300L、または500L）で产生することができる、研究室における本発明のスケーラブルプロセスにより产生することができる。一部の実施形態において、本発明のスケーラブルプロセスは、研究室において実施される产生プロセスと比較して生産効率の低減をほとんど、または全くもたらさない。

【0294】

リンカー

マルチマーTn3足場中のモノマーサブユニットは、タンパク質および/または非タンパク質リンカーにより連結することができ、それぞれのリンカーは、少なくとも2つのモノマーサブユニットに融合される。好適なリンカーは、タンパク質リンカー、非タンパク質リンカー、およびそれらの組合せからなっていてよい。リンカーの組合せは、ホモマーであってもヘテロマーであってもよい。一部の実施形態において、本発明のマルチマーTn3足場は、複数のモノマーサブユニットを含み、全てのリンカーは、同一である。他の実施形態において、マルチマーTn3足場は、複数のモノマーサブユニットを含み、リンカーの少なくとも1つは、残りのリンカーとは機能的にまたは構造的に異なる。一部の実施形態において、リンカーは、標的への結合に直接的または間接的に関与することにより、それ自体でマルチマーTn3足場の活性に寄与し得る。

【0295】

一部の実施形態において、タンパク質リンカーは、ポリペプチドである。リンカーポリペプチドは、2つ以上のモノマーサブユニットを、それらが所望活性を保持できるように

互いに対して正確な立体構造を呈するように結合させるために適切な長さを有するべきである。

【0296】

一実施形態において、ポリペプチドリンカーは、1から約1000アミノ酸残基、1から約50アミノ酸残基、1～25アミノ酸残基、1～20アミノ酸残基、1～15アミノ酸残基、1～10アミノ酸残基、1～5アミノ酸残基、1～3アミノ酸残基を含む。本発明は、ポリペプチドリンカー配列をコードする核酸、例えば、DNA、RNA、またはその両方の組合せをさらに提供する。ポリペプチドリンカー中に含めるために選択されるアミノ酸残基は、本発明のマルチマー-Tn3足場の活性とも機能とも顕著に干渉しない特性を示すべきである。したがって、ポリペプチドリンカーは全体として、本発明のTn3マルチマー足場の活性とも機能とも一致しない電荷も、内部フォールディングと干渉する電荷も、本発明のTn3マルチマー足場のCD40Lへの結合を大きく害するモノマーサブユニットの1つ以上のアミノ酸残基と結合を形成する電荷も、それらとの他の相互作用を形成する電荷も示すべきではない。10

【0297】

ポリペプチドを新規結合融合ポリペプチドに連結するための、天然および人工ペプチドリンカーの使用は、文献において周知である。したがって、2つ以上のモノマーサブユニットを融合しているリンカーは、天然リンカー、人工リンカー、またはそれらの組合せである。一部の実施形態において、本発明のTn3マルチマー足場中に存在する全てのペプチドリンカーのアミノ酸配列は、同一である。他の実施形態において、本発明のマルチマー-Tn3足場中に存在するペプチドリンカーの少なくとも2つのアミノ酸配列は、異なる。20

【0298】

一部の実施形態において、ポリペプチドリンカーは、立体構造のフレキシビリティを有する。一部の実施形態において、ポリペプチドリンカー配列は、(G-G-G-G-X)_mアミノ酸配列を含み、式中、Xは、アラニン(A)、セリン(S)、グリシン(G)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)またはバリン(V)であり、mは、正の整数である(例えば、配列番号209参照)。具体的な実施形態において、ポリペプチドリンカー配列は、(G-G-G-G-S)_mアミノ酸配列を含み、式中、mは、正の整数である(例えば、配列番号147参照)。別の具体的な実施形態において、ポリペプチドリンカー配列は、(G-G-G-G-G)_mアミノ酸配列を含み、式中、mは、正の整数である(例えば、配列番号148参照)。さらに別の具体的な実施形態において、ポリペプチドリンカー配列は、(G-G-G-G-A)_mアミノ酸配列を含む、式中、mは、正の整数である(例えば、配列番号149参照)。一部の実施形態において、ポリペプチドリンカーは、本質的に決まった構造を取らない天然または人工ポリペプチドである(例えば、Schellenberger et al., Nature Biotechnol. 27: 1186-1190, 2009参照; さらにSickmeier et al., Nucleic Acids Res. 35:D786-93, 2007参照)。30

【0299】

ペプチドリンカーは、非ポリペプチド部分のための結合基を含むアミノ酸残基が導入されるように改変することができる。このようなアミノ酸残基の例は、(続いて非ポリペプチド部分が結合される)システイン残基であり得、またはアミノ酸配列は、インビボN-グリコシリ化部位を含み得る(それにより、糖部分(インビボで)をペプチドリンカーに結合させる)。40

【0300】

一部の実施形態において、ポリペプチドマルチマー中に存在する全てのペプチドリンカーのアミノ酸配列は、同一である。あるいは、ポリペプチドマルチマー中に存在する全てのペプチドリンカーのアミノ酸配列は、異なり得る。

【0301】

Tn3足場の標識またはコンジュゲーション50

本発明のTn3足場は、非コンジュゲート形態で使用することができ、または標的検出を容易にするために、または画像化もしくは治療法のために、種々の異種部分の少なくとも1つにコンジュゲートさせることができる。Tn3足場は、精製を実施する場合、精製の前または後のいずれかで標識したまはコンジュゲートさせることができる。

【0302】

多くの異種部分は、本発明のTn3足場を結合させることができると好適な官能基を欠く。したがって、一部の実施形態において、リンカーを介してエフェクター分子を足場に結合させ、リンカーは、コンジュゲーションのための反応性基を含む。一部の実施形態において、本発明のTn3足場にコンジュゲートしている異種部分は、リンカーとして機能し得る。他の実施形態において、この部分は、開裂可能または開裂不能であり得るリンカーを介してTn3足場にコンジュゲートさせる。一実施形態において、開裂可能な結合分子は、酸化還元開裂可能結合分子であり、その結果その結合分子は、より低い酸化還元電位を有する環境、例えば、細胞質および遊離スルフヒドリル基を有するより高濃度の分子を有する他の領域中で開裂可能である。酸化還元電位の変化に起因して開裂され得る結合分子の例には、ジスルフィドを含有する分子が含まれる。10

【0303】

一部の実施形態において、本発明のTn3足場を、コンジュゲーションのための反応性基を提供するように遺伝子操作する。このような足場において、N末端および/またはC末端は、コンジュゲーションのための反応性基を提供するようにも機能し得る。他の実施形態において、N末端は、ある部分（例えば、限定されるものではないが、PEG）にコンジュゲートさせることができ一方、C末端は、別の部分（例えば、限定されるものではないが、ビオチン）にコンジュゲートさせ、またはその逆も可能である。20

【0304】

「ポリエチレングリコール」または「PEG」という用語は、カップリング剤、カップリングまたは活性化部分を有しましたは有さない（例えば、チオール、トリフレート、トレシレート、アジリジン、オキシラン、N-ヒドロキシスクシンイミドまたはマレイミド部分を有する）ポリエチレングリコール化合物またはその誘導体を意味する。「PEG」という用語は、例えば、末端のOH基がメトキシ基（mPEGと称される）により置き換えられた、500から150,000Daの分子量のポリエチレングリコール（その類似体を含む）を示すことが意図される。30

【0305】

本発明のTn3足場は、ポリエチレングリコール（PEG）により誘導体化することができる。PEGは、2つの末端ヒドロキシル基を有するエチレンオキシド繰り返し単位の直鎖水溶性ポリマーである。PEGは、典型的には約500ダルトンから約40,000ダルトンに及ぶそれらの分子量により分類される。具体的な実施形態において、用いられるPEGは、5,000ダルトンから約20,000ダルトンに及ぶ分子量を有する。本発明の足場にカップリングされたPEGは、分枝鎖でも非分枝鎖でもよい。例えば、Monfardini, C. et al. 1995 Bioconjugate Chem 6: 62-69参照。PEGは、Nektar Inc., Sigma Chemical Co. および他の会社から市販されている。このようなPEGには、限定されるものではないが、モノメトキシポリエチレングリコール（MePEG-OH）、モノメトキシポリエチレングリコール-スクシネート（MePEG-S）、モノメトキシポリエチレングリコール-スクシンイミジルスクシネート（MePEG-S-NHS）、モノメトキシポリエチレングリコール-アミン（MePEG-NH₂）、モノメトキシポリエチレングリコール-トレシレート（MePEG-TRES）、およびモノメトキシポリエチレングリコール-イミダゾリル-カルボニル（MePEG-IM）が含まれる。40

【0306】

簡潔に述べると、用いられる親水性ポリマー、例えば、PEGを、非反応性基、例えば、メトキシ基またはエトキシ基により一端においてキャッピングする。その後、ポリマーを、好適な活性化剤、例えば、ハロゲン化シアヌル（例えば、塩化、臭化またはフッ化シ50

アヌル)、カルボニルジイミダゾール、無水物試薬(例えば、無水ジハロコハク酸、例えば、無水ジプロモコハク酸)、アシルアジド、p-ジアゾニウムベンゾイルエーテル、3-(p-ジアゾニウムフェノキシ)-2-ヒドロキシプロピルエーテル)などとの反応により他端において活性化させる。次いで、活性化ポリマーを本明細書に記載のポリペプチドと反応させてポリマーにより誘導体化されたポリペプチドを產生する。あるいは、本発明のTn3足場中の官能基は、ポリマーとの反応のために活性化させることができ、または2つの基は、公知のカップリング法を使用する協調カップリング反応で結合させることができる。本発明のポリペプチドは、当業者に公知であり、当業者により使用される多数の他の反応スキームを使用してPEGにより誘導体化することは容易に認識される。PEGは、Tn3足場のいずれかの末端またはTn3足場内の1つ以上の官能基の位置において、本発明の足場にカップリングすることができる。ある実施形態において、PEGは、N末端またはC末端のいずれかにおいてカップリングされる。10

【0307】

他の実施形態において、本発明のTn3足場、その類似体または誘導体は、診断剤または検出剤にコンジュゲートさせることができる。このようなTn3足場は、臨床試験手順の一部として疾患の発症または進行のモニタリングまたは予後診断に、例えば、特定の治療法の効力を決定するために有用であり得る。

【0308】

本発明は、治療部分にコンジュゲートしているTn3足場の使用をさらに包含する。Tn3足場は、治療部分、例えば、細胞毒素、例えば、静菌剤もしくは殺細胞剤、治療剤または放射性金属イオン、例えば、線放射体にコンジュゲートさせることができる。細胞毒素または細胞傷害剤には、細胞に有害である任意の薬剤が含まれる。20

【0309】

Tn3足場のアッセイ

Tn3足場の抗原への結合親和性および他の結合特性は、当分野において公知の種々のインビトロアッセイ法、例として、例えば、平衡法(例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)またはカイネティクス(例えば、BIA CORE(登録商標)分析)、ならびに他の方法、例えば、間接結合アッセイ、競合結合アッセイ、ゲル電気泳動およびクロマトグラフィー(例えば、ゲル濾過)により測定することができる。これらのおよび他の方法は、試験されている構成要素の1つ以上に対する標識を利用し、および/または種々の検出法、例として、限定されるものではないが、発色、蛍光、発光、または同位体標識を用い得る。結合親和性およびカイネティクスについての詳細な説明は、Paul, W. E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)に見出すことができる。30

【0310】

一部の実施形態において、本発明のTn3足場は、規定のカイネティクスで標的に特異的に結合する。一部の実施形態において、本発明のTn3足場は、 1×10^{-2} M、 1×10^{-3} M、 1×10^{-4} M、 1×10^{-5} M、 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M、 1×10^{-13} M、 1×10^{-14} M未満または 1×10^{-15} M未満の解離定数または K_d (k_{off}/k_{on})を有し得る。具体的な実施形態において、本発明のTn3足場は、BIAcoreアッセイ(登録商標)により、または当分野において公知の他のアッセイにより測定して $500\text{ }\mu\text{M}$ 、 $100\text{ }\mu\text{M}$ 、 500 nM 、 100 nM 、 1 nM 、 50 pM 、 100 pM 、またはそれ未満の K_d を有する。40

【0311】

代替的な実施形態において、本発明のTn3足場の親和性は、少なくとも 1×10^{-2} M⁻¹、 1×10^{-3} M⁻¹、 1×10^{-4} M⁻¹、 1×10^{-5} M⁻¹、 1×10^{-6} M⁻¹、 1×10^{-7} M⁻¹、 1×10^{-8} M⁻¹、 1×10^{-9} M⁻¹、 1×10^{-10} M⁻¹、 1×10^{-11} M⁻¹、 1×10^{-12} M⁻¹、 1×10^{-13} M⁻¹、 1×10^{-14} M⁻¹、 1×10^{-15} M⁻¹50

10^5 M^{-1} 、または少なくとも $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ の k_{on}/k_{off} 比として算出される会合定数 (K_a) を単位として記載される。

【0312】

ある実施形態において、本発明の Tn3 足場が標的エピトープから解離する速度は、 K_d または K_a の値よりも適切であり得る。一部の実施形態において、本発明の Tn3 足場は、 10^{-3} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-4} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-5} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-6} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-7} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-8} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-9} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 未満、または 10^{-10} s^{-1} 未満の k_{off} を有する。10

【0313】

ある他の実施形態において、本発明の Tn3 足場が標的エピトープと会合する速度は、 K_d または K_a の値よりも適切であり得る。この場合、本発明の Tn3 足場は、少なくとも $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、または少なくとも $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、または少なくとも $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の k_{on} 速度で標的に結合する。

【0314】

本発明の Tn3 足場は、標的抗原のイムノアッセイまたは精製に特に有用な固体支持体に結合させることもできる。このような固体支持体には、限定されるものではないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが含まれる。20

【0315】

CD40L 特異的 Tn3 足場

本発明は、CD40L に特異的に結合する Tn3 足場を提供する。具体的な実施形態において、本発明の足場は、ヒト CD40L に特異的に結合する。他の具体的な実施形態において、本発明の Tn3 足場は、マウス、ニワトリ、アカゲザル、カニクイザル、ラット、またはウサギからの CD40L 相同体に結合する。一部の実施形態において、本発明の Tn3 足場は、CD40L の露出エピトープに結合する。このような実施形態には、細胞上で内因的に発現した CD40L および / または受容体を異所的に発現するように形質移入された細胞が含まれる。30

【0316】

一部の実施形態において、本発明の Tn3 足場は、モノマー CD40L 上でディスプレイされたエピトープを認識する。他の実施形態において、本発明の Tn3 足場は、CD40L のトリマー形態上でディスプレイされたエピトープを認識する。他の実施形態において、本発明の Tn3 足場は、膜結合 CD40L 上でディスプレイされたエピトープを認識する。他の実施形態において、本発明の Tn3 足場は、可溶性 CD40L 上でディスプレイされたエピトープを認識する。

【0317】

さらに他の実施形態において、本発明の Tn3 足場は、モノマー CD40L に結合し、CD40L 分子のオリゴマー化を妨害または干渉する。さらに他の実施形態において、本発明の足場は、CD40L と CD40 との相互作用を低減させまたは阻害する。他の実施形態において、本発明の Tn3 足場は、CD40L により媒介される細胞シグナリングをアゴナイズする。さらに他の実施形態において、本発明の Tn3 足場は、CD40L により媒介される細胞シグナリングをアンタゴナイズする。40

【0318】

本発明はまた、本明細書に記載の Tn3 足場を使用して CD40L 活性をモジュレートする方法を提供する。一部の実施形態において、本発明の方法は、CD40L を CD40L 特異的足場と接触させること、および CD40 と CD40L との相互作用を遮断することを含む。他の実施形態において、本発明の方法は、CD40L 発現細胞を CD40L 特50

異的 Tn3 足場と接触させること、および細胞表面からの CD40L のタンパク質分解開裂を妨害することを含む。他の実施形態において、本発明の方法は、CD40L モノマーを CD40L 特異的 Tn3 足場と接触させること、および CD40L オリゴマー化を妨害することを含む。他の実施形態において、CD40L のダイマー化またはオリゴマー化は、マルチマー Tn3 足場の使用を介して達成することができる。

【0319】

一部の実施形態において、本発明の方法は、当分野において公知の定型アッセイにより計測して CD40 媒介免疫応答（例えば、El que et al. 229: 152 - 172, 2009 参照）、または CD40L への CD40 結合により開始される下流シグナリング経路を低減させる CD40L 特異的足場の投与を含む。

10

【0320】

任意の特定の理論により拘束されるものではないが、本発明の CD40L 足場は、CD40 への CD40L の結合を妨害することにより、可溶性 CD40L を結合および封鎖することにより、CD40L と CD40 との相互作用を変化させるが結合を妨害しないことにより、可溶性 CD40L を生じさせるための細胞表面からの CD40L のメタロプロテアーゼ媒介酵素的開裂を妨害または向上させることにより、細胞表面 CD40L エンドサイトーシスを妨害または向上させることなどにより機能し得る。

【0321】

特異的 CD40L 結合配列

一部の実施形態において、本発明の Tn3 足場は、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つ、または少なくとも 6 つの CD40L に結合するループ配列を含む CD40L 特異的モノマーサブユニットを含む。

20

【0322】

一部の実施形態において、CD40L 特異的モノマーサブユニットは、以下から選択される CD40L 結合モノマークローンの少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つ、または少なくとも 6 つのループ配列を含む： 309 (ナイーブ Tn3 ライブラリーから単離された親 309 ファミリークローン；配列番号 20)、309FGwt (ヒト化 FG ループを有する親 309 クローン；配列番号 22)、340 (親和性成熟 309 クローン；配列番号 24)、341 (親和性成熟 309 クローン；配列番号 26)、342 (親和性成熟 309 クローン；配列番号 28 または配列番号 146)、343 (親和性成熟 309 クローン；配列番号 30)、344 (親和性成熟 309 クローン；配列番号 32)、345 (親和性成熟 309 クローン；配列番号 34)、346 (親和性成熟 309 クローン；配列番号 36)、347 (親和性成熟 309 クローン；配列番号 38)、348 (親和性成熟 309 クローン；配列番号 40)、349 (親和性成熟 309 クローン；配列番号 42)、311 (ナイーブ Tn3 ライブラリーから単離された親 311 ファミリークローン；配列番号 44)、311K4E (第 1 の親和性成熟ラウンドからのバリエント 311 ファミリークローン；配列番号 46)；311K4E_1 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリエント 311 ファミリークローン；配列番号 48)、311K4E_2 (第 2 の親和性成熟のラウンドからのバリエント 311 ファミリークローン；配列番号 50)、311K4E_3 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリエント 311 ファミリークローン；配列番号 52)、311K4E_4 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリエント 311 ファミリークローン；配列番号 54)、311K4E_5 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリエント 311 ファミリークローン；配列番号 56)、311K4E_7 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリエント 311 ファミリークローン；配列番号 58)、311K4E_8 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリエント 311 ファミリークローン；配列番号 60)、311K4E_9 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリエント 311 ファミリークローン；配列番号 62)、311K4E_10 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリエント 311 ファミリークローン；配列番号 64)、311K4E_11 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリエント 311 ファミリークローン；配列番号 66)、311K4E_12 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリエント 311 ファミリークローン；配列番号 68)。

30

40

50

からのバリアント 3 1 1 ファミリークローン；配列番号 6 8)、 3 1 1 K 4 E _ 1 3 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリアント 3 1 1 ファミリークローン；配列番号 7 0)、 3 1 1 K 4 E _ 1 4 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリアント 3 1 1 ファミリークローン；配列番号 7 2)、 3 1 1 K 4 E _ 1 5 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリアント 3 1 1 ファミリークローン；配列番号 7 4)、 3 1 1 K 4 E _ 1 6 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリアント 3 1 1 ファミリークローン；配列番号 7 6)、 3 1 1 K 4 E _ 1 9 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリアント 3 1 1 ファミリークローン；配列番号 7 8)、 3 1 1 K 4 E _ 2 0 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリアント 3 1 1 ファミリークローン；配列番号 8 0)、 および 3 1 1 K 4 E _ 2 1 (第 2 の親和性成熟ラウンドからのバリアント 3 1 1 ファミリークローン；配列番号 8 2)。 10

【 0 3 2 3 】

一部の実施形態において、 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、表 2 に列記されるループ配列から選択される少なくとも 1 つのループ配列を含む。他の実施形態において、 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、表 2 に列記される B C ループ配列から選択される少なくとも 1 つの B C ループ配列を含む。他の実施形態において、 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、表 2 に列記される D E ループ配列から選択される少なくとも 1 つの D E ループ配列を含む。他の実施形態において、 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、表 2 に列記される F G ループ配列から選択される少なくとも 1 つの F G ループ配列を含む。

【 0 3 2 4 】

一部の実施形態において、 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、表 2 に列記される B C ループ配列から選択される B C ループ配列； および 表 2 に列記される D E ループ配列から選択される D E ループ配列を含む。他の実施形態において、 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、表 2 に列記される B C ループ配列から選択される B C ループ配列； および 表 2 に列記される F G ループ配列から選択される F G ループ配列を含む。他の実施形態において、 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、表 2 に列記される D E ループ配列から選択される D E ループ配列； および 表 2 に列記される F G ループ配列から選択される F G ループ配列を含む。一部の実施形態において、 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットは、 1 、 2 または 3 つの異なる T n 3 クローンからのループ配列に対応するループ配列を含む。 30

【 0 3 2 5 】

ある実施形態において、 C D 4 0 L 特異的モノマー足場配列が配列の C 末端においてリンカーおよび / またはヒスチジンタグ (例えば、 H i s - 8 タグ) 、または追加の N 末端アミノ酸を含有する場合、これらの C 末端リンカーおよび / またはヒスチジンタグならびに追加の N 末端アミノ酸を除去することができ、したがって、対応するアミノ酸配列は、 C 末端リンカーおよび H i s タグ配列ならびに 1 つまたは複数の N 末端追加アミノ酸の欠失を含有する。

【 0 3 2 6 】

一部の実施形態において、 C D 4 0 L 特異的 T n 3 足場は、単一のモノマーサブユニット、 例えは、 3 4 2 クローン配列 (親和性成熟 3 0 9 クローン；配列番号 2 8 および / または配列番号 1 4 6) を含む。他の実施形態において、 C D 4 0 L 特異的足場は、 2 つ以上のモノマーサブユニット、 例えは、 2 つの 3 4 2 クローンモノマーサブユニット (配列番号 2 8 および / または配列番号 1 4 6) をタンデムで (例えは、配列番号 1 3 5 参照) 含む。具体的な実施形態において、本発明の T n 3 足場は、バリアント H S A にコンジュゲートしている (例えは、配列番号 1 3 4 および配列番号 1 3 5 参照) 。さらなる実施形態において、 H S A は、マルチマー T n 3 足場の N 末端または C 末端のいずれかにおいてコンジュゲートさせることができる。

【 0 3 2 7 】

具体的な実施形態において、 C D 4 0 L 特異的 T n 3 足場は、単一の 3 1 1 K 4 E _ 1 2 モノマーサブユニット、 G S リンカー、 および C 3 4 S H S A バリアント (例えは、 50

配列番号 201 参照) を含む。別の具体的な実施形態において、CD40L 特異的 Tn3 足場は、ベータ鎖 C CELTYG バリアントを有する単一の 311K4E_12 モノマーサブユニット、全グリシンリンカー、および C34S HSA バリアント(例えば、配列番号 202 参照) を含む。別の具体的な実施形態において、CD40L 特異的 Tn3 足場は、タンデムの 2 つの 311K4E_12 サブユニットおよび 2 つの GS リンカーを含み、一方の GS リンカーはサブユニットを互いに連結し、第 2 の GS リンカーは一方のサブユニットを C34S HSA バリアントに連結する(例えば、配列番号 203 参照)。さらに別の具体的な実施形態において、CD40L 特異的 Tn3 足場は、タンデムの 2 つの 311K4E_12 サブユニット、および 2 つの全グリシンリンカーを含み、一方の全グリシンリンカーはサブユニットを互いに連結し、第 2 の全グリシンリンカーは一方のサブユニットを C34S HSA バリアントに連結する(例えば、配列番号 204 参照)。

【0328】

1 つの具体的な実施形態において、CD40L 特異的 Tn3 足場は、GS リンカーを介してタンデムに連結されている 2 つの 309 サブユニットを含む(例えば、配列番号 205 参照)。別の具体的な実施形態において、CD40L 特異的 Tn3 足場は、C34S HSA バリアントに連結されている単一の 309 サブユニットを含む(例えば、配列番号 206 参照)。別の具体的な実施形態において、CD40L 特異的 Tn3 足場は、タンデムの 2 つの 309 サブユニット、および 2 つの GS リンカーを含み、一方の GS リンカーはサブユニットを互いに連結し、第 2 の GS リンカーは一方のサブユニットを C34S HSA バリアントに連結する(例えば、配列番号 207 参照)。

【0329】

具体的な実施形態において、CD40L 特異的 Tn3 足場は、単一の 342 モノマーサブユニット、GS リンカー、および C34S HSA バリアントを含む(例えば、配列番号 134 参照)。別の具体的な実施形態において、CD40L 特異的 Tn3 足場は、単一の 342 モノマーサブユニット、全グリシンリンカー、および C34S HSA バリアントを含む(例えば、配列番号 144 参照)。別の具体的な実施形態において、CD40L 特異的 Tn3 足場は、タンデムの 2 つの 342 サブユニット、および 2 つの GS リンカーを含み、一方の GS リンカーはサブユニットを互いに連結し、第 2 の GS リンカーは一方のサブユニットを C34S HSA バリアントに連結する(例えば、配列番号 135 参照)。さらに別の具体的な実施形態において、CD40L 特異的 Tn3 足場は、タンデムの 2 つの 342 サブユニット、および 2 つの全グリシンリンカーを含み、一方の全グリシンリンカーはサブユニットを互いに連結し、第 2 の全グリシンリンカーは一方のサブユニットを C34S HSA バリアントに連結する(例えば、配列番号 145 参照)。さらに別の具体的な実施形態において、CD40L 特異的 Tn3 足場は、GS リンカーによりタンデムに連結されている 2 つの 342 サブユニットを含む(例えば、配列番号 208 参照)。

【0330】

具体的な実施形態において、CD40L 特異的 Tn3 足場は含み、別の具体的な実施形態において、CD40L 特異的 Tn3 足場は、311 サブユニット、または 311 に由来するサブユニット(例えば、311K4E_12) および 309 サブユニット、またはタンデムの 309 に由来するサブユニット(例えば、342) および 2 つの GS リンカーを含み、一方の GS リンカーはサブユニットを互いに連結し、第 2 の GS リンカーは一方のサブユニットを C34S HSA バリアントに連結する(例えば、配列番号 135 参照)。さらに別の具体的な実施形態において、CD40L 特異的 Tn3 足場は、311 サブユニット、または 311 に由来するサブユニット(例えば、311K4E_12) および 309 サブユニット、またはタンデムの 309 に由来するサブユニット(例えば、342)、および 2 つの全グリシンリンカーを含み、一方の全グリシンリンカーはサブユニットを互いに連結し、第 2 の全グリシンリンカーは一方のサブユニットを C34S HSA バリアントに連結する(例えば、配列番号 145 参照)。

【0331】

10

20

30

40

50

C D 4 0 L 特異的タンデム二価 T n 3 足場および血清アルブミン (S A) 融合体の例を図 2 A (図 9 A も参照) に示す。具体的なリンカーを図 2 A に提供するが、本明細書に提供されるとおり他のリンカーが企図される。野生型成熟 S A 、例えば、ネズミ血清アルブミン (M S A) またはヒト血清アルブミン (H S A) を使用することができるが、成熟 S A 中の 1 つ以上のシステイン (C) アミノ酸残基を例えば、セリン (S) 、アラニン (A) 、グリシン (G) などにより置換することができるが企図される。

【 0 3 3 2 】

代表的な構築物を以下に示す。 S A の配列を下線により示す。リンカーを枠で囲む。多数の変動が本発明の範囲内であることが理解される。例えば、リンカーは変化させることができ (いくつかの非限定的な例が本明細書に提供される) 、最初の 1 または 2 つの N 末端アミノ酸残基 (S Q) は存在および / または代替アミノ酸残基により置換されていてよく、タグ (例えば、 6 × H i s タグ) を組み込むことができ、代替 C D 4 0 L 特異的足場 (例えば、フィブロネクチンの第 1 0 F n 3 ドメインをベースとする足場) を類似の構築物などの中で利用することができる。

【化1】

342 一価HSA構築物1(配列番号134)

[342 モノマー]-(G₄S)₂リンカー-HSA_{c₃₄s}

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKD
 TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQQSPFEDHVVLNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYEIAARR
HPFYAPELLFFAKRYKAACFLPKLDELRDEGKASSAKQLKCASTLQK
FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEEVSKLVTDLTKVTECCHGDLLEADDRADLAKYIC
ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDV
FLGMFLYELYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCYAKVFDEFKPLVEEPQ
NLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKPQVSTPTLVEVSRLGKVGSKCKHPEAKR
MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKE
TCFAEEGKKLVAASQAALGL

10

342 一価HSA構築物2(配列番号144)

[342 モノマー]-G₁₀リンカー-HSA_{c₃₄s}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKD
 TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQQSPFEDHVVLNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYEIAARR
HPFYAPELLFFAKRYKAACFLPKLDELRDEGKASSAKQLKCASTLQK
FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEEVSKLVTDLTKVTECCHGDLLEADDRADLAKYIC
ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDV
FLGMFLYELYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCYAKVFDEFKPLVEEPQ
NLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKPQVSTPTLVEVSRLGKVGSKCKHPEAKR
MPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKE
TCFAEEGKKLVAASQAALGL

20

342 二価HSA構築物1(配列番号135)

[342 モノマー]-(G₄S)₃リンカー-[342 モノマー]-(G₄S)₂リンカー-HSA_{c₃₄s}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKD
 TEYEVSLICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALI
 TWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKDTEYEVSLICRSGDMS
SNPAKETFTTGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQQSPFEDHVVLNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNE
CFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYEIAARRHPFYAPELLFFAKR
YKAACFLPKLDELRDEGKASSAKQLKCASTLQKFGERAFFKAWAVARLS
QRFPKAEEVSKLVTDLTKVTECCHGDLLEADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE
KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVFGLGMFLYELYARRHED
YSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGE
YKFQNALLVRYTKKPQVSTPTLVEVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGL

30

40

【化2】

342 二価HSA構築物2(配列番号145)

[342モノマー]-G₁₅リンカ—[342モノマー]-G₁₀リンカ—HSA_{C34S}:

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKD
 TEYEVSЛИCRSГDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGGGRLDAPSQIEVKDVTDTTALI
 TWSDDFGEYVWCELTYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKDPETEYEVSЛИCRSГDMSS
 SNPAKETFTTGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHV
 KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSЛHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPEPERNE
 CFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPFYAPELLFFAKR
 YKAATTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE
KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVFLGMFLYELYARRHPD
YSVVLLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGE
YKFQNALLVRYTCKVPQVSTPTLVEVSRLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGL

10

311K4E_12 一価HSA構築物1(配列番号201)

[311K4E_12モノマー]-(G₄S)₂リンカ—HSA_{C34S}:

20

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNPQPYVHYSIGNLK
 PDTEYEVSЛИCЛTTDGTYNNPAKETFTTGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
VLIYAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSЛHTLFGDKLCTVATLRE
TYGEMADCCAKQEPEPERNECFIQLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEI
ARRHPFYAPELLFFAKRYKAATTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCAS
LQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAK
YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEA
KDVFLGMFLYELYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE
EPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTCKVPQVSTPTLVEVSRLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEF
NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKAD
DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

30

311K4E_12 一価HSA構築物2(配列番号202)

[311K4E_12モノマー]-G¹⁰リンカ—HSA_{C34S}:

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELTYGIKDVPGDRTTIDLNPQPYVHYSIGNLK
 PDTEYEVSЛИCЛTTDGTYNNPAKETFTTGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
VLIYAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSЛHTLFGDKLCTVATLRE
TYGEMADCCAKQEPEPERNECFIQLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEI
ARRHPFYAPELLFFAKRYKAATTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCAS
LQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAK
YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEA
KDVFLGMFLYELYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVFDEFKPLVE
EPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTCKVPQVSTPTLVEVSRLGKVGSKCCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEF
NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKAD
DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

40

【化3】

311K4E_12 二価HSA構築物1(配列番号203)

[311K4E_12 モノマー]-G₄S₃リンカ—[311K4E_12 モノマー]-(G₄S)₂リンカ—HSA_{c34s}:

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
 PDTEYEVSЛИCLTTDGTYNNPAKETFTTGGGGSGGGGGGGGGGGSLDAPSQIEVEDVDTT
 ALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKPDTEYEVSЛИCL
 TTDGTYNNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAAQYLQQS
 PFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSЛHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ
 EPERNECFLQHKDDNPNLPRLVPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLIEIARRHPFYAPEL
 LFFAKRYKAATTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQLIKCASLQKFGERAFKAW
 AVARLSQRFPKAЕFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSK
 LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKCKNYAEAKDVFILGMFLYЕY
 ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAADPHECYAKVFDDEFKPLVEEPQNLIKQNC
 FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLS
 VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC
 TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK
LVAASQAALGL

10

311K4E_12 二価HSA構築物2(配列番号204)

[311K4E_12 モノマー]-G₁₅リンカ—[311K4E_12 モノマー]-G₁₀リンカ—HSA_{c34s}:

20

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELTYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
 PDTEYEVSЛИCLTTDGTYNNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGGGSLDAPSQIEVEDVDTT
 ALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKPDTEYEVSЛИCL
 TTDGTYNNPAKETFTTGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAAQYLQQS
 PFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSЛHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ
 EPERNECFLQHKDDNPNLPRLVPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLIEIARRHPFYAPEL
 LFFAKRYKAATTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQLIKCASLQKFGERAFKAW
 AVARLSQRFPKAЕFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSK
 LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKCKNYAEAKDVFILGMFLYЕY
 ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAADPHECYAKVFDDEFKPLVEEPQNLIKQNC
 FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLS
 VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC
 TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKK
LVAASQAALGL

30

【0333】

医薬組成物

別の態様において、本発明は、組成物、例えば、限定されるものではないが、薬学的に許容可能な担体と一緒に配合された、本発明のTn3足場の1つまたは組合せを含有する医薬組成物を提供する。このような組成物は、例えば、限定されるものではないが、本発明の2つ以上の異なるTn3足場の1つまたは組合せを含み得る。例えば、本発明の医薬組成物は、標的抗原上の異なるエピトープに結合し、または相補的な活性を有するTn3足場の組合せを含み得る。具体的な実施形態において、医薬組成物は、本発明の単一のモノマーTn3足場を含む。具体的な実施形態において、医薬組成物は、本発明のマルチマー—Tn3足場を含む。さらに別の具体的な実施形態において、医薬組成物は、本発明のダイマーTn3足場を含む。

40

【0334】

本発明の医薬組成物は、例えば、他の薬剤と組み合わせた組合せ療法において投与することもできる。例えば、組合せ療法は、免疫療法、化学療法、放射線療法、または薬物療法であり得る少なくとも1つの他の治療法と組み合わせた本発明のTn3足場を含み得る。本発明の医薬化合物は、1つ以上の薬学的に許容可能な塩を含み得る。

【0335】

足場の使用方法

50

本発明の Tn3 足場は、インビトロおよびインビボにおいて診断および治療有用性を有する。例えば、これらの分子を、培養物中の細胞に、例えば、インビトロもしくはエキソビド、または対象中に、例えば、インビボで投与して種々の障害を治療、予防または診断することができる。

【 0 3 3 6 】

本発明はまた、本発明の Tn3 足場を使用する方法を提供する。本発明はまた、疾患、疾患の障害または障害、例として、限定されるものではないが、癌、炎症および自己免疫疾患、感染性疾患に伴う 1 つ以上の症状の予防、診断、管理、治療または改善のための、単独または他の治療法との組合せのいずれかでの本発明の Tn3 足場の使用を包含する。
本発明はまた、疾患、障害または感染、例として、限定されるものではないが、癌、炎症 10 および自己免疫疾患、感染性疾患に伴う 1 つ以上の症状の予防、診断、管理、治療または改善のための、単独または他の治療法との組合せのいずれかでの、部分（例えば、治療剤または薬物）にコンジュゲートまたは融合している本発明の Tn3 足場の使用を包含する。
。

【 0 3 3 7 】

本発明はまた、慣習的な抗体によっては容易に達成されないエピトープを標的化する方法を提供する。例えば、一実施形態において、本発明の Tn3 足場を使用して隣接抗原を最初に標的化することができ、結合の間、別の結合ドメインが潜在抗原に会合し得る。

【 0 3 3 8 】

本発明はまた、区別される細胞型を一緒にするために本発明の Tn3 足場を使用する方法を提供する。一実施形態において、本発明のタンパク質は、1つの結合ドメインを有する標的細胞に結合し、別の結合ドメインを介して別の細胞を動員し得る。別の実施形態において、第 1 の細胞は癌細胞であり得、第 2 の細胞は免疫エフェクター細胞、例えば、NK 細胞である。別の実施形態において、本発明の Tn3 足場を使用して 2 つの区別される細胞間、例えば、免疫応答をブーストする可能性がある抗原提示細胞と T 細胞との相互作用を強化することができる。
20

【 0 3 3 9 】

本発明はまた、細胞集団を枯渇させるために Tn3 足場を使用する方法を提供する。一実施形態において、本発明の方法は、以下の細胞型の枯渇において有用である：好酸球、好塩基球、好中球、T 細胞、B 細胞、肥満細胞、单球および腫瘍細胞。
30

【 0 3 4 0 】

本発明はまた、診断試薬として Tn3 足場を使用する方法を提供する。このような診断試薬は、CD40L の存在もしくは不存在、CD40 受容体の存在、CD40 受容体への CD40L の結合効率、患者中の遊離 CD40L、試料中の遊離 CD40L、または試料中の CD40 受容体に結合した CD40L について試験するために使用することができる。
。

【 0 3 4 1 】

本発明の Tn3 足場およびそれを含む組成物は、多くの目的に、例えば、広範な慢性および急性疾患および障害、例として、限定されるものではないが、自己免疫および／または炎症疾患に対する治療剤として有用である。本明細書に記載の本発明の組成物および方法は、自己免疫障害および／または炎症障害の予防または治療に有用である。
40

【 0 3 4 2 】

自己免疫および／または炎症性障害の例には、限定されるものではないが、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および精巣炎、シェーグレン症候群、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性および他の網膜症、水晶体後線維増殖症、加齢性黄斑変性、血管新生性緑内障、血管腫、甲状腺過形成（グレーブス病を含む）、角膜および他の組織移植、ならびに慢性炎症、敗血症、関節リウマチ、腹膜炎、クローン病、再灌流損傷、敗血症、内毒素ショック、囊胞性線維症、心内膜炎、乾癬、関節炎（例えば、乾癬性関節炎）、アナフィラキシーショック、臓器虚血、再灌流損傷、脊髄損傷およ
50

び同種移植片拒絶反応。自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルー皮膚炎、慢性疲労免疫機能不全症候群（C F I D S）、慢性炎症性脱髓多発性神経障害、チャーグストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、C R E S T 症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛・線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（I T P）、I g A 神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、1型または免疫介在性糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発性筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガムマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、例えば、疱疹状皮膚炎血管炎、白斑、およびヴェゲナー肉芽腫が含まれる。

【0343】

炎症障害の例には、限定されるものではないが、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、アレルギー障害、敗血性ショック、肺線維症、未分化脊椎関節症、未分化関節症、関節炎、炎症性骨溶解、および慢性ウイルスまたは細菌感染から生じる慢性炎症が含まれる。本発明の組成物および方法を、上記疾患を予防、管理または治療するため使用される1つ以上の慣用の治療法とともに使用することができる。

【0344】

本発明は、癌、自己免疫、炎症または感染疾患またはそれらの1つ以上の症状または1つ以上の症状を予防、管理、治療または改善する方法であって、それが必要とされる対象に、本発明の1つ以上のT n 3足場を、癌治療剤ではない治療剤（別称、非癌治療法）の1つ以上との組合せで投与することを含む方法を提供する。

【0345】

このような薬剤の例には、限定されるものではないが、制吐剤、抗真菌剤、抗細菌剤、例えば、抗生素質、抗炎症剤、および抗ウイルス剤が含まれる。制吐剤の非限定例には、メトピマジンおよびメトクロプラミドが含まれる。抗真菌剤の非限定例には、アゾール薬、イミダゾール、トリアゾール、ポリエン、アンホテリシンおよびリリミジン（r y r i m i d i n e）が含まれる。抗細菌剤の非限定例には、ダクチノマイシン、ブレオマイシン、エリスロマイシン、ペニシリン、ミトラマイシン、セファロスボリン、イミペネム、アクストレオナム（a x t r e o n a m）、バンコマイシン、シクロセリン、バシトラシン、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、ゲンタマイシン、アミカシン、カナマイシン、ネオマイシン、スペクチノマイシン、トリメトプリム、ノルフロキサン、レファンピン（r e f a m p i n）、ポリミキシン、アンホテリシンB、ナイスタチン、ケトカナゾール（k e t o c a n a z o l e）、イソニアジド、メトロニダゾールおよびペントミジンが含まれる。抗ウイルス剤の非限定例には、ヌクレオシド類似体（例えば、ジドブジン、アシクロビル、ガンシクロビル、ビダルビン（v i d a r b i n e）、イドクスウリジン、トリフルリジンおよびリバビリン）、フォスカレット（f o s c a r e t）、アマンタジン、リマンタジン、サキナビル、インジナビル、リトナビル、インターフェロン（「I F N」）-、またはおよびA Z T が含まれる。抗炎症剤の非限定例には、非ステロイド抗炎症薬（「N S A I D」）、ステロイド抗炎症薬、ベータ-アゴニスト、抗コリン剤およびメチルキサンチンが含まれる。

【0346】

一実施形態において、本発明は、慢性炎症を治療し得る組成物を含む。一実施形態において、組成物は、破壊または不活性化のための免疫細胞の標的化において有用である。一実施形態において、組成物は、活性化T細胞、休止T細胞、B細胞、好中球、好酸球、好塩基球、脂肪細胞、または樹状細胞の標的化において有用である。別の実施形態において

10

20

30

40

50

、本発明は、免疫細胞機能を減少させ得る組成物を含む。別の実施形態において、組成物は、免疫細胞機能を除去し得る。

【0347】

別の実施形態において、本発明は、胃腸管の疾患の治療に有用な組成物を含む。本発明の足場は、低pH条件下で高レベルの安定性を示す。低pHにおける安定性は、組成物が種々の胃腸障害、例えば、過敏性腸症候群、胃食道逆流、腸偽閉塞、ダンピング症候群、難治性恶心、消化性潰瘍、虫垂炎、虚血性大腸炎、潰瘍性大腸炎、胃炎、ヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)疾患、クローン病、ウィップル病、セリアックスブルー、憩室炎、憩室症、嚥下障害、裂孔ヘルニア、感染性食道障害、しゃっくり、反芻などのための経口投与に好適であることを示唆する。

10

【0348】

本発明はさらに、組合せ組成物および疾患またはその症状の予防、治療、低減、または改善におけるそのような組成物の使用方法を提供する。本発明のTn3足場を、疾患またはその症状の予防、治療、低減または改善に好適な慣用の治療法と組み合わせができる。例示的な慣用の治療法は、Physician's Desk Reference(56th ed., 2002および57th ed., 2003)に見出すことができる。一部の実施形態において、本発明のTn3足場を、化学療法、放射線療法、外科手術、生物剤(抗体もしくはペプチド)を用いる免疫療法、小分子、または当分野において公知の別の治療法と組み合わせることができる。一部の実施形態において、組合せ療法は一緒に施す。他の実施形態において、組合せ療法は別個に施す。

20

【0349】

本発明はまた、疾患を診断する方法を提供する。疾患と関連する特異的標的に結合する本発明のTn3足場を、前記疾患を診断するために使用される方法に組み入れができる。一実施形態において、本発明のTn3足場を、対象における疾患を診断する方法であって、対象から試料を得ること、標的をTn3足場と、標的：足場相互作用の形成を可能とする条件下で試料中で接触させること、標的：足場複合体を同定し、およびそれにより試料中の標的を検出することを含む方法において使用する。他の実施形態において、診断すべき疾患は本明細書に記載される。

【0350】

本発明はまた、特異的標的を画像化する方法を提供する。一実施形態において、画像化剤、例えば、緑色蛍光タンパク質、他の蛍光タグ(Cy3、Cy5、ローダミンなど)、ビオチン、または放射性核種にコンジュゲートしている本発明のTn3足場を、特異的標的の存在、局在、または進行を画像化する方法において使用することができる。一部の実施形態において、本発明のTn3足場を含む標的を画像化する方法をインピトロで実施する。他の実施形態において、本発明のTn3足場を含む標的を画像化する方法をインピボで実施する。他の実施形態において、本発明のTn3足場を含む標的を画像化する方法を、MRI、PET走査、X線、蛍光検出により、または当分野において公知の他の検出法により実施する。

30

【0351】

本発明はまた、本発明の足場を使用して疾患の進行、再発、治療、または改善をモニタリングする方法も提供する。一実施形態において、疾患の進行、再発、治療、または改善をモニタリングする方法を、本明細書に提供されるとおり画像化、診断する方法、または化合物/標的を本発明のTn3足場と接触させることにより達成する。

40

【0352】

医薬投薬および投与

本発明のTn3足場を含む医薬組成物または滅菌組成物を調製するため、足場を、薬学的に許容可能な担体または賦形剤と混合する。投与のため、組成物は、好ましくは発熱物質不含であり、エンドトキシンおよび/または関連する発熱物質を実質的に含まない。治療剤のための投与計画の選択は、いくつかの要因、例として、実体の血清または組織タンオーバー速度、症状のレベル、実体の免疫原性、および生体マトリックス中の標的細胞

50

の接近性に依存する。ある実施形態において、投与計画は、許容可能なレベルの副作用と一致する患者に送達される治療剤の量を最大化する。

【0353】

本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投与量レベルは、患者に対して毒性を示すことなく、特定の患者、組成物、および投与様式について所望の治療応答を達成するために有効である活性成分の量を得るために変動させることができる。選択される投与量レベルは、種々の薬物動態要因、例として、用いられる本発明の特定の組成物、またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与時間、用いられている特定の化合物の排泄速度、治療期間、用いられる特定の組成物との組合せにおける他の薬物、化合物および/または材料、治療されている患者の年齢、性別、体重、病態、全身健康状態および既往歴、ならびに医学分野において周知の同様の要因に依存する。

10

【0354】

本発明の組成物は、当分野において公知の種々の方法の1つ以上を使用して1つ以上の投与経路を介して投与することもできる。ある実施形態において、本発明のTn3足場をインビボでの適正な分布を確保するように配合することができる。

【0355】

均等物

当業者は、定型以下の実験を使用して本明細書に記載の本発明の具体的な実施形態に対する多くの均等物を認識し、または確認することができる。このような均等物は、以下の特許請求の範囲により包含されることが意図される。

20

【0356】

本明細書に挙げられる全ての刊行物、特許および特許出願は、あたかもそれぞれの個々の刊行物、特許または特許出願が具体的かつ個別的に参照により本明細書に組み込まれると示されるのと同程度まで、参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0357】

ここで本発明を以下の実施例を参照して説明する。これらの実施例は説明にすぎず、本発明は、決してこれらの実施例に限定されると解釈されるべきではなく、本明細書に提供される技術の結果として明らかになる任意および全ての変形を包含すると解釈されるべきである。

30

【0358】

実施例1

親Tn3足場に基づく3ループライブラリーの構築

ライブラリーは、「Tn3SS4」と命名される国際特許出願公開の国際公開第2009/058379号パンフレットに記載の親Tn3足場に基づき構築した。ライブラリーは、B C、D EおよびF Gループのランダム化領域を含有した。この設計は、天然FnI I IDメインについて記載される多様性のパターン、B CおよびF Gループについての3つの異なる長さと一致する特性決定された配列およびループ長さの多様性をTn3ライブラリー中に組み込み、多様性をライブラリー中に導入するための「NHT」混合コドンスキームを使用した(H=A、T、C)。このスキームは、12/20個のアミノ酸(表3参照)をコードする12個のコドンを生成し、すなわち、それぞれのコドンは、特有のアミノ酸をコードした。さらに、停止コドンもシステイン(Cys)コドンも存在しなかつた。

40

【表3】

表3

A	AAT = Asn	ATT = Ile	ACT = Thr
G	GAT = Asp	GTT = Val	GCT = Ala
C	CAT = His	CTT = Leu	CCT = Pro
T	TAT = Tyr	TTT = Phe	TCT = Ser
	A	T	C

10

【0359】

ライプラリー多様性は、表4に示される縮重オリゴヌクレオチドを使用して生成した。

【表4】

表4

オリゴ	ループ	配列	配列番号
BC9 NHT	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGNHTNHTSCGNHTGS TNHTNHTNHTGGC TGTGAAC TGACCTATGGCATTAAA	178
BC11 NHT	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGNHTNHTBSTMHTNH TNHTNHTNHTNHT NHTGGCTGTGAAC TGACCTATGGCATTAAA	179
BC12 NHT	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGNHTVMACCGNHTN HTNHTRRCRGCNHT VTTNHTGGCTGTGAAC TGACCTATGGCATTAA A	180
DE NHT	DE	CGATCGCACCAACCATA GATCTGNHTNHTNHTN HTNHTNHTTATAG CAT TGGTAACCTGAAACCG	181
FG9 NHT	FG	GAATATGAAGTGAGCCTGATTGCNHTAMSN HTNHTGGTNHTNHT NHTKCGAAAGAACCTTACCA CCGGTG	182
FG10 NHT	FG	GAATATGAAGTGAGCCTGATTGCNHTAMSN HTNHTNHTNHTRGC NHTCCGGCGAAAGAACCTTACCA CCGGTG	183
FG11 NHT	FG	GAATATGAAGTGAGCCTGATTGCNHTAMSN HTNHTGGTNHTNHT AGCAACCCGGCGAAAGAACCTTACCA CCG GTG	184

20

ヌクレオチドコード:N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

30

40

【0360】

ライプラリーは、表5に示されるオリゴヌクレオチドを使用してアセンブルした。

【表5】

表5

オリゴ	配列	配列番号
BCX-DE ブリッジ v2	CAGATCTATGGTGGTGCGATGCCCGGCACA TCTTTAATGCCAT AGGTCAAGTTACACA	185
DE-FGX ブリッジ v2	GCAAATCAGGCTCACTCATATTGGTATCCG GTTTCAGGTTAC CAATGCTAT	186
KpnI amp rev v2	CGGGTCGGTTGGGTACCGCCACCGGTGGTA AAGGTTCTTT	187
KpnI リバース v2	CGGGTCGGTTGGGTAA	188
BC ライブライ - amp v2	GGCCCAGCCGGCCATGGCCGCCATTGAAGTG AAAGATGTGACCG ATACCACCGCGCTGATTACCTGG	189

【0361】

縮重オリゴヌクレオチド（等モル比の BC および FG ループにそれぞれ対応するオリゴヌクレオチド）、BCX-DE ブリッジ v2、DE-FGX ブリッジ v2、および KpnI amp rev v2 の混合物は、20 サイクルの PCR 反応において過剰の外部プライマーを用いることなくアセンブルした。この産物を希釈し、プライマー BC ライブライ - amp v2 および KpnI リバース v2 を使用するレギュラ - PCR 反応において増幅させた。得られた PCR 産物は、完全な Tn3 遺伝子を生成し、次いでそれを NcoI および KpnI により消化し、ファージディスプレイベクター（国際公開第 2009 / 058379 号パンフレットに記載）中にライゲートした。DNA をエレクトロポレーションにより大腸菌 (E. coli) 中に形質転換した。ライブラリーの最終多様性は、約 7.9×10^{10} 個のメンバーであると推定した。

【0362】

エレクトロポレーション後、ライブラリーを 37 ℃ において振とうしながら 1 時間インキュベートした。M13K07 ヘルパーファージを添加し、1 時間後、細胞をより大きい容量に希釈し、37 ℃ において振とうしながら一晩増殖させた。翌日、ファージを取り出し、PEG8000 による沈殿により上清から濃縮した。

【0363】

実施例 2

ヒト CD40L 特異的 Tn3 足場についてのライブラリーのパニング

> 10^{10} 個のユニーク配列を含有するファージディスプレイされた Tn3 ライブラリーを、CD40L に対してパニングした。これらのライブラリーの多様性は、抗体可変ドメイン内の 3 つの CDR ループと相似の BC、DE および FG ループの配列および長さの変動性に由来した。リード Tn3 タンパク質の選択は、組換えビオチン化ヒト CD40L および CD40L 過剰発現 CHO 細胞系に対するライブラリーのパニングにより実施した。これら 2 つの試薬に対する交互のパニングラウンドを使用してリードが組換え細胞外ドメインおよびネイティブ膜固定 CD40L を認識することを確保した。

【0364】

組換えヒト CD40L (ヒト MegacD40L ; Axor) は、5 倍モル過剰のビオチン化試薬を使用して EZ-Link スルホ - NHS - ビオチン (Pierce, Rockford, IL) によりビオチン化した。室温において 1 時間インキュベートした後、試料を PBS 中で一晩透析して未コンジュゲートビオチンを除去した。10 μg のビオチン化 CD40L を M280 ストレプトアビジンビーズ (Dynal, Carlsbad)

10

20

30

40

50

d, C A) 上で固定化し、次いで 10 mg / ml の B S A を含有する P B S 中で 2 時間プロッキングした。インプットは、実施例 1 に記載のとおり開発されたライブラリーまたはさらに標準的な構築技術、例えば、国際公開第 2009 / 058379 号パンフレットに記載のものを使用して開発されたライブラリーからなるものであった。

【 0 3 6 5 】

ファージは、10 mg / ml の B S A を含有する P B S 中で 2 時間プロッキングした。プロッキングされたインプットをプロッキングされた M 2 8 0 ストレプトアビジン対照ビーズ（標的を有さない）に添加し、ロッカー上で室温において 2 時間インキュベートしてビーズに対する結合剤のライブラリーを枯渇させた。次いで、枯渇ライブラリーを C D 4 0 L コートビーズに添加し、ロッキングプラットフォーム上で室温において 2 時間インキュベートした。P B S T (P B S + 0 . 1 % の T w e e n) により 3 回洗浄して未結合ファージを除去した後、ビーズを指数関数的に増殖する大腸菌 (E . c o l i) X L - 1 B 1 u e 細胞に添加し、続いてそれに M 1 3 K O 7 ヘルパーファージを 50 μ g / ml のカルベニシリンを含有する 60 ml の 2 × Y T 培地中で同時感染させた。ファージを振とうしながら 37 ℃ において一晩増殖させた後、一晩培養培地から P E G 沈殿により回収した。

【 0 3 6 6 】

第 2 のパニングラウンド (ラウンド 2) は、C D 4 0 L 過剰発現 C H O 細胞系に対して実施した。ファージライブラリーは、3 % の B S A / P B S 中で室温においてロッキングしながら 1 時間プロッキングした。細胞を A c c u t a s e (I n v i t r o g e n) により剥離し、5 ml の P B S により 2 回洗浄し、10⁷ 個の細胞を 1 ml の 3 % B S A / P B S 中で室温においてロッキングしながら 30 分間プロッキングした。プロッキングされた細胞を 500 × g において 5 分間回転沈降させ、プロッキングされたファージライブラリー溶液中で穏やかに再懸濁し、室温において 1 時間インキュベートした。未結合ファージは、細胞を 1 ml の 3 % B S A / P B S 中で 3 回、および P B S 中で 1 回穏やかに洗浄し、細胞をそれぞれの洗浄について新たな E p p e n d o r f チューブを使用して微小遠心機中で 500 × g で 5 分間遠心分離することによりペレット化することにより除去した。細胞ペレットを指数関数的に増殖する大腸菌 (E . c o l i) X L - 1 B 1 u e に直接添加し、次いでそれをラウンド 1 に記載のとおり処理した。

【 0 3 6 7 】

パニングラウンド 3 は、ラウンド 1 に記載のとおり実施し、但し結合ファージを、100 mM の H C 1 を添加し、次いで 1 M の T r i s - H C 1 、p H 8 により中和することにより溶出させた。溶出され、中和されたファージを使用してラウンド 1 に記載のとおり大腸菌 (E . c o l i) X L 1 B 1 u e 細胞に感染させた。

【 0 3 6 8 】

パニングラウンド 4 も、ラウンド 2 に記載のとおり細胞に対して実施し、但し、3 % B S A / P B S 中での 5 回の洗浄を実施した。ラウンド 5 は、5 μ g のビオチン化 M e g a C D 4 0 L を使用して行ったが、その他はラウンド 3 に記載のとおりであった。

【 0 3 6 9 】

5 つのパニングラウンド後、可溶性タンパク質としての得られた T n 3 バリアントのスクリーニングを実施した。増幅され、P E G 沈殿したファージ原液を P C R において使用してコードされる T n 3 配列を包含する断片のプールを增幅させた。この断片プールを N c o I + K p n I により消化し、プラスミド p S e c - o p p A (L 2 5 M) - T n 3 の対応する N c o I - K p n I 部位中にクローニングした（例えば、国際公開第 2009 / 058379 号パンフレット参照）。96 ウエル深ウェルプレート中でカルベニシリン (100 μ g / ml) を含有する自己誘導 M a g i c M e d i a (I n v i t r o g e n) に、p S e c - o p p A (L 2 5 M) - T n 3 由来構築物により形質転換された大腸菌 (E . c o l i) B L 2 1 D E 3 細胞を接種した。培養物を 37 ℃ において振とうしながら 18 時間増殖させ、細胞を遠心分離により培地から分離した。分泌された可溶性 T n 3 バリアントを含有する培地を、C D 4 0 L 結合についてのスクリーニングアッセイにおいて

10

20

30

40

50

直接使用した。

【0370】

10 セットの96個のクローンをスクリーニングして組換えCD40Lに特異的に結合したTn3タンパク質を同定した。簡潔に述べると、スクリーニングアッセイは、マイクロプレートのウェル中に固定化された抗HIs抗体への結合を介する、培地中に分泌された可溶性HIsタグ付Tn3バリアントの捕捉を利用した。捕捉後、培地および過剰のタンパク質を洗浄除外し、捕捉されたTn3バリアントとCD40Lとの相互作用を、ビオチン化ヒトMegacD40Lを利用して、SA-HRPおよび慣用のELISA試薬により残留標的（プレート洗浄後）を計測することによりモニタリングした。

【0371】

捕捉工程において、固定化された抗HIs抗体をTn3により飽和させ、それぞれのウェル中の捕捉されたTn3のモル量は、個々のクローンの発現レベルに関係なく実質的に同一になった。Tn3レベルのこの標準化は、標的相互作用の効率に比例し、タンパク質発現レベルの潜在的な差異により影響を受けないアッセイレベルをもたらした。

【0372】

このアッセイからの陽性物を配列決定して組換えCD40Lに結合する34個のユニークTn3配列を同定した。ユニークCD40L結合Tn3配列のパネルから、ロバストなアッセイシグナルおよび培養物上清のSDS-PAGEにより判断して良好な発現レベルを有する24個のクローンのサブセットを再発現および小スケール精製に供した。

【0373】

簡潔に述べると、1%のグルコース）を有するカルベニシリソ（100μg/mL）を含有するSuperbroth培地に、pSecoppA（L25M）-Tn3由来構築物により形質転換された大腸菌（E.coli）BL21DE3細胞を接種した。培養物を37において0.5~0.8の光学密度（O.D.）に増殖させ、次いで0.2mMのIPTGにより誘導した。37において5時間振とうした後、細胞を遠心分離により培地から分離した。培地からのTn3足場の精製は、Ni-NTA Superflow（Qiagen）を使用するバッチ精製により行い、20mMのイミダゾールを有する2×PBS中で洗浄し、250mMのイミダゾールを有する2×PBSにより溶出させた。試料をPBS中で透析し、Gill and von Hippel（Anal.Biochem. 182:319, 1989）に従って濃度を280nmにおけるUV吸光度により測定した。

【0374】

アッセイランギングおよびSEC挙動に基づき、8つのリードの発現をスケールアップし、機能細胞アッセイにおける試験のために低エンドトキシンレベル(<1EU/mg)に精製した。

【0375】

2つのTn3クローン（309および311と命名）は、生化学および細胞ベースアッセイにおいて類似の活性を示し（図6A、6B、6C）、最も近縁の競合クローンよりも3~5倍強力であった。

【0376】

ヒトCD40L特異の一価Tn3足場309および311は、総B細胞数、形質細胞数およびIgクラススイッチを阻害した（図6A、6Bおよび6C）。図6Aは、Jurkat D1.1細胞により刺激されたCD19陽性ヒトPBMC上のHuCD40L誘導CD86発現に対する309および311の阻害効果を示し；図6Bは、309および311によるHuCD40L刺激B細胞増殖の阻害を示し；図6CCは、T/B細胞共培養物における形質細胞数の阻害を示す。309は、FACSにより活性化初代T細胞に結合することも示した（データ示さず）。PBMCは、組換えヒトMegacD40L（Axoraxora）またはヒトCD40L発現Jurkat細胞（D1.1, ATCC）により刺激し、24時間後にCD19+/CD86+細胞の割合をFACSにより計測した。

【0377】

10

20

30

40

50

309および311リードクローンは単分散され、精製試料のサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)分析により測定されたとおり、溶液中でより高次のオリゴマーを凝集させる傾向も形成する傾向も全く示さなかった(図7A)。

【0378】

309および311リードクローンの熱安定性は、PBS pH 7.2中1mg/mLにおけるタンパク質試料を使用する示差走査熱量測定(DSC)により測定し、親Tn3タンパク質の熱安定性と比較した(図7B)。309および3011リードクローンは、 70 ± 1 の T_m を有し、それは親Tn3の T_m (72)をわずかに下回るにすぎなかった。

【0379】

ネズミ交差反応性クローンが同定されなかつたため、上記の類似のパニングプロセスを実施してM13と命名されるネズミ特異的Tn3を同定した。M13は、PBM C細胞ベースアッセイにおける活性も示した(図1A参照)。

【0380】

実施例3

CD40L特異的Tn3足場リード最適化

親和性最適化を使用して選択されたTn3リードの効力を増加させた。一般に、標的に接触するTn3ループ内の1つ以上の突然変異誘発ラウンドを実施し、コンビナトリアルファージディスプレイライブラリーから改善されたバリエントを選択した。

【0381】

3.1 ループスワッピング

2つのリード中の3つのどのループがCD40Lとの相互作用に関与するのかを決定するため、それぞれの単一ループ配列をヒトテネイシンCに見出される親Tn3ループ配列に変化させた構築物を生成した。突然変異バリエントの活性を、上記スクリーニングアッセイに記載のとおり実施された結合アッセイにおいて元のバリエントと比較した(図10A)。両方のリードについて、BCおよびDEループの突然変異は、CD40Lへの結合の完全な損失をもたらした一方、親Tn3配列へのFGループの変化は、結合に対する効果を有さず(309について)または限定された効果を有した(311)。したがって、BCおよびDEループが主としてCD40Lへの接触を担う配列を含有すると考えられ、したがって最初に親和性最適化のために選択した。

【0382】

3.2 CD40L特異的Tn3足場309リード最適化

ループスワッピング実験は309FGループ配列を親Tn3FGループ配列により結合効力の実質的な損失なしで親Tn3FGループ配列により置換することができることを示したため、この構築物(309FGwtと称する)を親和性成熟のための骨格として使用することが決定された。これは、親テネイシンC配列から逸脱する非必須突然変異を排除して考えられる免疫原性リスクを低減させる。親Tn3FGループ配列は、最終リード分子中の突然変異により後に排除されるRGDモチーフを含有したこと留意すべきである。3つのBCループライブラリーおよび1つのDEループライブラリーを生成した。

【0383】

3つのBCループライブラリーについて、縮重オリゴBC9PCR、BC9-ループNNKおよび309BC-ループNNKドープ(表6)をリバースプライマーKpn1amprevv2(表5)と一緒に使用し、BCループコドンが停止コドンにより置き換えられた309FGwt由来テンプレートを使用して3つのPCRラウンドを行った。続いて、プライマーBCライブラリーamprevv2(表5)およびKpnIリバースv2を用いるそれらの断片のPCR增幅により、全長Tn3ライブラリー断片を得た。

【0384】

DEループライブラリーについて、309FGwt由来テンプレート(DE-ループコドンが停止コドンにより置き換えられている)に対するDE PCRおよびKpnIampリバースv2を用いるPCR增幅により、ランダム化DEループおよび野生型Tn3

10

20

30

40

50

F G ループを含有する断片を得、309テンプレートに対するB C ライブライマー-a m p v 2 およびB C X - D E ブリッジv 2 を用いてP C Rにより生成されたD E ループ上流のT n 3 領域をコードする断片と組み合わせた。2つの断片を、外部プライマー-B C ライブライマー-a m p v 2 およびK p n I リバースv 2 を用いる重複P C Rにおいて結合させた。

【表6】

表6:309FGwt LO ライブライマー生成に使用されるDNAオリゴヌクレオチド

オリゴ	配列	配列番号
BC9 PCR	5'-ACCGCGCTGATTACCTGGTCT1213111GGCTGTGA ACTGACCTATGGCATTAAAGATG	190
BC 9-ループ NNK	5' -ACCGCGCTGATTACCTGGNNKNNKSMGNKGSTN NKNNKNNKGCGTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA- 3'	191
309 BC-ループ NNK ドープ	5' -ACCGCGCTGATTACCTGG76K45K45K77K44K65K78 T45K44KTGTGAACTGACCTATGGCATTAAA-3'	192
DE PCR	5'-GATGTGCCGGGCATCGCACCAACCATAAGATCTG1 11111TATAGCATTGGTAACCTGAAACCGG-3'	193
Upstr BC ループ Rev	CCAGGTAATCAGCGCGGTGGTAT	194
BC シャフル rev	CAGATCTATGGTGGTGCATCGC	195
DE シャフル FWD	TGTGAAC TGACCTATGGCATTAAAGATGT	196

1=全19アミノ酸(-cys)についてのコドン 2=Ala/Proについてのコドン 3=Glyについてのコドン;

4=70%G10%A10%C10%T 5=10%G,70%A,10%C,10%T

6=10%G,10%A,70%C,10%T

7=10%G,10%A,10%C,70%T

8=70%A15%C15%T

K=50%G/50%T

【0385】

N c o I - K p n I 断片をファージディスプレイベクター中にクローニングし、および実施例1に記載のとおりファージライブライマーを生成した。

【0386】

4つのライブライマーを、実施例2の第1のラウンドに記載のとおりビオチン化ヒトM e g a C D 4 0 L に対して別個にパニングし、ラウンド1において4 μ g のC D 4 0 L を、ラウンド2において1 μ g を使用した。ラウンド2後のファージアウトプットの増幅後、Q i a g e n S p i n M 1 3 キット(Q i a g e n , V a l e n c i a , C A)を使用して一本鎖D N Aを単離し、B C 1 i b a m p v 2 およびB C シャフルr e v を使用してB C ループライブライマーからの断片を含有するB C ループのプールを増幅させた一方、プライマー-D E - シャフルF W D およびK p n I リバースv 2 を使用してD E ループ含有断片のプールをD E ループライブライマーから増幅させた。P C R断片をゲル精製し、外部プライマー-B C 1 i b a m p v 2 およびK p n I リバースv 2 を使用してそれらの重複配列を介してアセンブルした。得られたP C R断片を使用して上記のとおりファージベクター中のライブライマーを生成した。このライブライマーを、実施例2に記載のとおりビオチン化ヒトM e g a C D 4 0 L に対して合計5つのラウンドについてパニングし、但し、ライブライマーをラウンド1から4について、5 0 n M 、2 0 n M 、2 0 n M 、および1 0 n M (5 0 μ l の総容量中)の濃度において最初に標的と2時間接触させてからプロッキングされたM 2 8 0 ストレプトアビジン化磁気ビーズと10分間インキュベートし、次いで洗浄した。

【0387】

アウトプットを、プラスミドp S e c - o p p A (L 2 5 M) - T n 3 p S e c のN c o I - K p n I 部位中にプールクローニングし、上記スクリーニングアッセイにおいて可

10

20

30

40

50

溶性タンパク質を使用して 16 個の 96 ウェルプレートを C D 4 0 L 結合についてスクリーニングした。270 個の最高評価クローナンを選択し、再アッセイし、配列決定した。10 個のクローナンを、結合アッセイおよび配列決定に基づくさらなる特性決定のために選択した。これは、P B M C アッセイにおける効力の評価、バイオセンサーアッセイにおける C D 4 0 L への結合についての K_d 測定、示差走査熱量測定により測定される熱力学安定性、およびサイズ排除クロマトグラフィー分析による溶液中でのより高次のオリゴマーの凝集または形成傾向を含んだ。結果を表 7 にまとめる。10 個の最適化クローナン (340、341、342、343、344、345、346、347、348 および 349 と命名) とアラインさせた 309 および 309 F G w t クローナンの配列を図 11 A および 11 B に示す。

10

【 0 3 8 8 】

親和性成熟バリアントは、309 クローナンよりも 1 ~ 310 g 高い効力を示し、D S C により計測されるとおり高い安定性を保持し、S E C により計測されるとおりほとんどは単分散された。

【 表 7 】

表 7

バリアント	P B M C	I C 50 (nM)	K d (nM)	SECプロファイル	T m, DSC (°C)
309	226	191	OK	72	
309 F G w t	760	nd	OK	71	
340	0.7	2.2	OK	77	
341	0.7	nd	OK(?)	71	
342	0.7	1.4	OK	73	
343	0.6	2.0	OK	69 (?)	
344	1.3	nd	OK	(65+78.5)	
345	37.3	39	OK	72	
346	9.0	14.9	OK	71	
347	11.0	10.7	OK	70	
348	1.0	1.8	?	nd	
349	38.2	21	OK(?)	nd	

20

【 0 3 8 9 】

P B M C アッセイは、ヒト C D 4 0 L 発現 J u r k a t 細胞 (D 1 . 1 , A T C C) により P B M C を刺激することにより実施し、24 時間後に C D 1 9 + / C D 8 6 + 細胞の割合を F A C S により計測した。このアッセイを使用してリーディング T n 3 足場のパネルを試験およびランキングして生化学的基準に基づく優先順位付けから浮上させた。P B M C アッセイの結果を図 10 B に示し、表 7 にまとめる。

30

【 0 3 9 0 】

親和性計測は、G L C センサーチップを 25 °C で用いる P r o t e O n X P R 3 6 タンパク質相互作用アレイシステム (B i o - R a d , H e r c u l e s , C A) 上で実施した。0.005% の T w e e n 2 0 、p H 7.4 を有する P r o t e O n リン酸緩衝生理食塩水 (P B S / T w e e n) をランニング緩衝液として使用した。ヒト M e g a C D 4 0 L をチップ上で約 2300 R U の表面密度において固定化した。T n 3 バリアント (340、342、343、345、346、347、348、および 349) の 2 倍希釈物を、P B S / T w e e n / 0.5 m g / m l の B S A 、p H 7.4 中で調製した (150 から 4.7 n M) 。それぞれの濃度の試料を 6 つの分析チャネル中に 30 μl / 分の流速において 300 秒間注入した。K_d は、P r o t e O n ソフトウェア内の平衡分析設定を使用することにより測定した。結果を表 7 に示す。

40

【 0 3 9 1 】

10 個の T C D 4 0 L 特異的 T n 3 バリアントを、D S C により安定性について分析した。簡潔に述べると、D S C 計測を V P - C a p i l l a r y D S C (M i c r o C a

50

1)上で実施した。タンパク質をP B S (p H 7.2)中に大規模透析を介して交換し、D S C分析のために0.25~0.5 mg/mlの濃度に調整した。試料を20~95において90 / 時間の走査速度において走査し、走査を繰り返さなかった。結果を表7に示す。

【0392】

リード最適化ライブラリー生成に使用された309と比べてI C₅₀の最大300倍の改善が、および309 F G w t骨格と比べて1000倍超の改善が最良のクローンについて得られた。7つのクローンは、一桁のnM範囲のK_dを有した。

【0393】

3.3 C D 4 0 L 特異的 T n 3 足場 3 1 1 リード最適化

10

上記ループ使用実験(図10A)を実施する前に、リード最適化ライブラリーにおける最初の試みは、311のF Gループ中での多様性の導入、得られたファージディスプレイライブラリーの生成およびスクリーニングにフォーカスした。スクリーニングは、上記ビオチン化ヒトM e g a C D 4 0 Lに対する4つのパンングラウンド後に実施し、大多数の陽性ヒットがB C ループ上流のT n 3 のN末端定常領域中の残基K 4からEへの偶発的突然変異を含有することが見出された。陽性ヒットのF G ループ配列の中で明らかなコンセンサスは検出されなかった。311中への単一のK 4 E突然変異の導入は、P B M C アッセイにおいて効力(約4 μMから36 nM)の約100倍の増加をもたらした(図10C参照)。

【0394】

20

ループスワップ実験は、B C およびD E ループ配列がC D 4 0 Lへの結合に要求されることを示したため、次いでこれらのループをさらなる親和性成熟のために311 K 4 E骨格中で標的化した。2つの別個のライブラリーを生成した。一方のライブラリーは、それぞれの残基が野生型311配列である50%の可能性、および他の11個のN H Tコード残基の1つである約50%の可能性を有する戦略でB C ループを標的化した。他方のライブラリーは、6残基D E ループを完全にランダム化した。

【0395】

B C ループライブラリーについて、オリゴヌクレオチドB C 1 1 - 3 1 1 G 1 y およびB C 1 1 - 3 1 1 N H T(表8)を、B C 、D E およびF G ループを含む断片を生成するためにB C ループコドンが停止コドンにより置き換えられた311由来テンプレートに対するリバースプライマーK p n I amp rev v 2(表5)を用いるP C R反応において使用した。最後に、プライマーB C ライブラリーamp K 4 E およびK p n I amp rev v 2を用いるこれらの断片の1:1混合物の增幅により、全長T n 3 ライブラリー断片を得た。

30

【0396】

D E - ループライブラリーは、上記309 F G w t D E - ループライブラリーとして生成し、但し、311由来テンプレートをP C R反応において使用し、B C ライブラリーamp K 4 E プライマーを最終P C R增幅において使用した。

【表8】

表 8.311K4E リード最適化ライブラリー生成に用いられるオリゴ

オリゴ	配列	配列番号
BC11-311 Gly	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TGGCTGTGAAC TGACCTATGGCATTAAA-3'	197
BC11-311 NHT	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TNHTTGTGAAC TGACCTATGGCATTAAA-3'	198
BC ライブラ リーアン P K4E	5'-GGCCCAGCCGCCATGGCCGCCATTGAAGTGGAAAG ATGTGACCGATAACCACCGCGCTGATTACCTGG-3'	199
BC11-311 Gly	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TGGCTGTGAAC TGACCTATGGCATTAAA-3'	197
BC11-311 NHT	5'-ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25 T37T35TNHTTGTGAAC TGACCTATGGCATTAAA-3'	198
BC ライブラ リーアン P K4E	5'-GGCCCAGCCGCCATGGCCGCCATTGAAGTGGAAAG ATGTGACCGATAACCACCGCGCTGATTACCTGG-3'	199

1=70%G, 10%A, 10%C, 10%T 2=10%G, 70%A, 10%C, 10%T

3=10%G, 10%A, 70%C, 10%T 4=10%G, 10%A, 10%C, 70%T

5=70%A, 15%C, 15%T 6=15%A, 70%C, 15%T

7=15%A, 15%C, 70%T V=33%A, 33%C, 33%G

H=33%A, 33%C, 33%T

10

20

【0397】

全長ライブラリー断片を NcoI および KpnI により消化し、ファージディスプレイベクター中にクローニングし、ファージライブラリーを実施例 1 に記載のとおり生成した。

30

【0398】

2つのライブラリーを実施例 1 に記載のビオチン化ヒト MegacD40L に対して別個にパニングし、ラウンド 1 において 10 g のタンパク質、ラウンド 2 において 5 g 、およびラウンド 3 において 5 g を使用した。ラウンド 3 後のファージアウトプットの増幅後、Qiagen キット (Qiagen, Valencia, CA) を使用して一本鎖 DNA を単離し、2つのライブラリーを 309FGwt ライブラリーに記載のとおりシャフリングした。シャフリングされたライブラリーを合計 5 つのラウンドについて 309 FGwt シャフリングライブラリーについて上記のとおりビオチン化ヒト MegacD40L に対してパニングし、ラウンド 1 から 5 について 100nM 、 20nM 、 4nM 、 1 nM および 1 nM の標的を使用した。

40

【0399】

アウトプットを上記のとおり可溶性分泌ベクター中にプールクローニングし、上記の可溶性タンパク質スクリーニングアッセイを使用して 5 つの 96 ウェルプレートを CD40L 結合についてスクリーニングした。陽性ヒットは、311K4E 骨格バリエントについて得られるシグナルに対して同定した。18 個の最高評価ユニーククローンを 311K4E_1 、 311K4E_2 、 311K4E_3 、 311K4E_4 、 311K4E_5 、 311K4E_7 、 311K4E_8 、 311K4E_9 、 311K4E_10 、 311K4E_11 、 311K4E_12 、 311K4E_13 、 311K4E_14 、 311K4E_15 、 311K4E_16 、 311K4E_19 、 311K4E_20 および 311K4E_21 (図 12A および図 12B に示される配列) と命名し、粗製未精製タンパ

50

ク質としてオフ速度ランキングについてアッセイした。未精製 Tn3 足場のオフ速度推定は、チップ上で固定化された CD40L を用いるバイオセンサーアッセイにおいて Protein XPR36 タンパク質相互作用アレイシステム (Bio-Rad, Hercules, CA) 上で実施した。Megablot CD40L を GLC チップ (BioRad) 上で固定化し、全てのバリエントを 80 nM の推定濃度に希釈し、30 μl / 分の流速において 300 秒間注入し、解離時間を 1200 秒に設定した。PBS、0.005% の Tween 20、3 mM の EDTA、pH 7.4 をランニング緩衝液として使用した。オフ速度は、センサーグラムの可視調査によりランキングした。最も遅いオフ速度を示した 4 つのバリエント、311K4E_3、311K4E_11、311K4E_12 および 311K4E_15 のサブセットを精製し、 K_d 値が 1.1 から 6.4 nM であることが測定された (表 9)。

【表 9】

表 9. ヒト CD40L への 311K4E および 4 つの親和性精製バリエント結合の K_d

311K4E バリエント	K_d (nM)
311K4E	18
311K4E_12	1.1
311K4E_11	6.3
311K4E_15	1.6
311K4E_3	6.4

10

20

【0400】

図 10D に示されるとおり、311K4E_12 の K_d の減少 (18 nM から 1 nM) は、311K4E 骨格に対する PBMC アッセイの効力の 12 倍の増加に対応する。

【0401】

まとめると、ナイープライプラリーからの最初のヒット 309 および 311 のリード最適化試験は、CD40L の一桁の nM の結合剤をもたらした。

【0402】

30

類似の最適化試験を、ネズミ特異的 M13 分子に対して実施した (データ示さず)。得られた最適化ネズミ CD40L 特異的分子 (M31 と命名) は、親分子と比べて PBMC アッセイにおける効力の約 20 倍の増加を示した (図 1A)。

【0403】

実施例 4

タグ無し CD40L 特異的 Tn3-HSA 融合体の発現および精製

図 2A および 9A に概説される HSA に融合している Tn3 構築物を、哺乳動物 293 F 細胞系中で一過的形質移入により発現させた。Tn3-HSA 融合発現構築物は、インハウス生成哺乳動物発現ベクターに基づき生成した。産物均一性を増加させるため、未対合の部分露出システィン 34 がセリンに突然変異された HSA の突然変異形態 (HSA C34S と命名) (Zhao et al., 2009, Eur. J. Pharm. Biopharm. 72 : 405 - 11) を用いた。

40

【0404】

融合タンパク質は、イオン交換クロマトグラフィー (IEC) により 1 工程精製で精製することができる。塩勾配による Q-HP カラム (GE Healthcare) からの 309-309-HSA の溶出の例を図 9B に示す。メインピークに加え、後に溶出するマイナーピークが確認された (総ピーク面積の 10% 未満を構成)。質量分析は、これらのマイナーサイドピークが O-グリコシル化 309-309-HSA 種について濃縮されることを示した。メインピークを含有する分画をプールし、後続の活性アッセイに使用した。

50

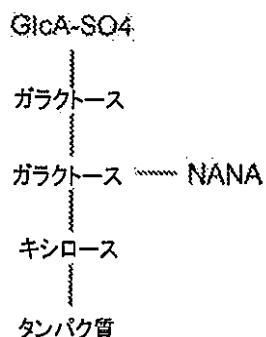
【0405】

大スケール精製のため、上記 I E X 工程に先行して培養物上清からの T n 3 - H S A 融合体を、H S A 親和性マトリックス、例えば、H i T r a p B l u e H P (G E H e a l t h C a r e) を使用する親和性クロマトグラフィーにより捕捉した。洗浄後、H S A 融合タンパク質は、オクテノ酸含有緩衝液により溶出することができた。溶出物をリン酸緩衝液中で3倍希釈した後に Q - H P カラム上にロードした。

【0406】

マイナーピークの分析により、O - 結合炭水化物部分の存在が明らかになった。O - グリカンは、以下に示される既に報告されたO - キシロシリ化コア構造 (W a k a b a y a s h i e t a l . , 1 9 9 9 , J . B i o l . C h e m . 2 7 4 : 5 4 3 6 - 5 4 4 2) に由来する炭水化物の異種混合物であることが提案された。

【化4】



10

20

【0407】

主要な結合部位は、T n 3 ドメイン間のG G G G S リンカー中に存在すると決定された。グリカンは、T n 3 とH S Aとの間に見出されるG G G G S リンカー中でより少ない程度で存在することも見出された。したがって、O - グリカンのレベルは、一価構築物と比較して二価構築物において高く、C H O 細胞と比較してH E K 細胞中で産生される材料において高かった。このレベルは、異なるT n 3 構築物間でも変動した。したがって、O - グリカンのレベルは、慎重な宿主細胞セクション、例えば、C H O 細胞またはより低レベルのO - グリカンを有する材料を産生することが見出された他の細胞の使用を介して低減させることができる。さらに、O - グリカンを含有する材料は、精製法を介して除去してO - グリカンを欠くより均一な産物を得ることができる。あるいは、リンカーは、例えば、S e r 残基をG l y に突然変異させることにより主要なO - グリカン結合部位を除去するように改変することができる。いくつかの構築物中のリンカーは、1つ以上のG G G G G リンカーを有するように再遺伝子操作した。G G G G G リンカーを有する材料中でいかなる型のO - グリカンも検出されず、活性の差異は確認されなかった(データ示さず)。

30

【0408】

実施例 5

C D 4 0 L 特異的 T n 3 足場の血清半減期の拡張

40

血清アルブミンへの融合体を、C D 4 0 L 特異的 T n 3 足場の血清半減期を拡張するための戦略として利用した。ネズミC D 4 0 L 特異的 T n 3 - M S A 融合体の薬物動態(P K)特性を測定するため、マウスP K アッセイを実施した。M S A 融合体は、対応するH S A 融合体に対するサロゲート分子の試験について選択した。それというのも、マウスF c R n はH S A にそれがM S A に結合するよりもかなり弱く結合し、エンドソームからの再循環の減少および結果的にターンオーバーの増加をもたらすためである(A n d e r s e n e t a l . J . B i o l . C h e m . 2 8 5 , 4 8 2 6 - 4 8 3 6 , 2 0 1 0)。

【0409】

H E K 2 9 3 細胞を、M S A に融合しているマウスC D 4 0 L 特異的タンデム二価T n

50

3足場の発現に使用した。高レベルの発現が観察された(図3A)。これらの構築物は、Tn3足場単位間の(G₄S)リンカーおよび足場とMSAとの間のリンカー中の3つの(G₄S)リピートとの間にリンカーを有した。さらに、N49Q突然変異をM13およびM31足場のそれぞれに導入して潜在的なN結合グリコシル化部位を除去した。この突然変異は、これらの足場の効力に影響しなかった(データ示さず)。発現レベルは、形質移入6日後に200mg/Lに推定された。精製は、C末端Hisタグを介してIMACにより実施した。精製タンパク質の収量は、1Lの培養物上清当たり125mgであると推定された。

【0410】

MSAを二価M13足場に融合させた場合、MSAを有さないM13ダイマー足場と比較して効力の8倍の減少が観察された(図3B)。MSAに融合している親和性成熟M31を含む二価足場は、MSAに融合している対応する二価M13足場よりも140倍強力であり、一価M31MSA融合体よりも約900倍強力であり、MR1抗ネズミCD40Lモノクローナル抗体と同等の効力を有した(図3C)。

【0411】

CD40L特異的Tn3-MSA融合体のPK特性を測定するため、マウスPK分析を実施した。タンパク質構築物を、10mg/kgにおいて5~7週齢雌CD-1マウス中に静脈内投与した。それぞれのマウスを種々の時点において150μl採血し、Tn3-HSA融合体の血清濃度をELISAアッセイにより測定した。簡潔に述べると、Nunc MaxiSorpプレートを抗FLAG M2抗体(Agilent)によりコートし、PBS+0.1%のTween(PBST)中4%のミルク中でブロッキングし、ネズミMegacD40L(Axxora)とインキュベートした。MegacD40Lは、そのFLAGタグを介して固定化した。血清試料およびタンパク質標準物を4%のミルクPBST中で希釈し、PBST中でプレートを洗浄した後に添加した。インキュベーション後、プレートをPBST中で洗浄し、ウサギ抗TN3ポリクローナル抗体(Covance)を使用し、標準ELISAプロトコルにおいてヤギ抗ウサギHRP-コンジュゲート抗体(Jackson ImmunoResearch)を使用してTn3-HSA融合構築物を検出した。血清試料中の濃度は、同一のTn3-HSA融合構築物の希釈物のアッセイにより作成された標準曲線の線形回帰に基づき測定した。濃度は、3匹の異なるマウスについての平均として測定した。

【0412】

図4Aにおいて確認されるとおり、M31-MSAおよびM13-M13-MSAは、それぞれ38および31時間の半減期を有した一方、M31-M31-HSA構築物は12時間の半減期を有した。比較において、M13-M13タンデム構築物自体(MSAに融合していない)は、30分間の半減期を示した(示さず)。

【0413】

マウス足場における観察とは対照的に、HSAをヒトCD40L特異的足場に融合させた場合、効力の顕著な減少は存在しなかった。図9Cは、PMBCアッセイにおいて計測されるとおり、2つの309モノマーを含むヒトCD40L特異的二価Tn3足場をHSAに融合させることによる効力の顕著な減少が存在しなかったことを示す。

【0414】

ヒトCD40L特異的342-HSAモノマー構築物のPK特性を、単回静脈内注射後にカニクイザルにおける血清半減期を向上させるための2つの置換(L463NおよびK524L)を含む342-HSAバリエントのそれと比較した。タンパク質構築物を、スローボーラス注射を介して10mg/kgにおいて体重2~5kgの雄カニクイザルに投与した。1mLの血液/動物/時点を投薬前、投薬5分および30分後;投薬2、12、24、および48時間後;ならびに4、8、11、15、22、29、36、43および57日目に末梢血管から回収した。Tn3-HSA融合体の血清濃度をELISAアッセイにより測定した。簡潔に述べると、Nunc MaxiSorpプレートを抗FLAG M2抗体(Agilent)によりコートし、PBS+0.1%のTween(PBS

10

20

30

40

50

T) 中 4 % のミルク中でブロッキングし、ヒト Meg a C D 4 0 L (A x x o r a) とインキュベートした。 Meg a C D 4 0 L は、その F L A G タグを介して固定化した。血清試料およびタンパク質標準物を 4 % のミルク P B S T 中で希釈し、 P B S T 中でプレートを洗浄した後に添加した。インキュベーション後、プレートを P B S T 中で洗浄し、ウサギ抗 T n 3 ポリクローナル抗体 (C o v a n c e) を使用し、標準 E L I S A プロトコルにおいてヤギ抗ウサギ H R P - コンジュゲート抗体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h) を使用して T n 3 - H S A 融合構築物を検出した。血清試料中の濃度は、同一の T n 3 - H S A 融合構築物の希釈物のアッセイにより作成された標準曲線の線形回帰に基づき測定した。濃度を図 4 B にプロットする。 3 4 2 - H S A 構築物の半減期は約 7 日間であった一方、 3 4 2 - H S A L 4 6 3 N / K 5 2 4 L バリアント構築物は、最初の線形期の間に 1 3 ~ 1 7 日間の増加した半減期を示した (図 4 B) 。 3 0 日後、 3 4 2 - H S A L 4 6 3 N / K 5 2 4 L バリアント構築物の血清濃度は、野生型 H S A 構築物と比較して急激に降下した。これらの観察は、サルにおいてこの構築物のいくつかの免疫原性を示し得る。

【 0 4 1 5 】

実施例 6

C D 4 0 L 特異的 T n 3 足場の特性決定

6 . 1 実験的方法

6 . 1 . 1 P B M C 刺激アッセイ：血液は、 M e d I mm u n e 安全ガイドラインに従って健常ドナーから得た。 P B M C は、 C P T チューブを介して単離し (2 0 分間における 1 5 0 0 g の回転) 、 $1 \times 1 0^6$ 個の P B M C (条件当たり) を組換えヒト Meg a C D 4 0 L (A x x o r a) またはヒト C D 4 0 L 発現 J u r k a t 細胞 (D 1 . 1 , A T C C) により刺激した。 C D 1 9 + / C D 8 6 + 細胞の割合を刺激 2 4 時間後に F A C S により計測した。このアッセイを使用してリーディング T n 3 足場のパネルを試験およびランкиングして生化学的基準に基づく優先順位付けから浮上させた。このアッセイは、ネズミ C D 4 0 L 発現細胞系 (D 1 0 . G 4) またはネズミ Meg a C D 4 0 L (A x x o r a A L X 5 2 2 1 2 0) をヒト細胞または組換えタンパク質刺激に代えて用いて実施することもできる。それというのも、ネズミリガンドはヒト受容体と交差反応するためである。

【 0 4 1 6 】

6 . 1 . 2 ネズミ C D 4 0 R / N F B アッセイ： N F B レポーター - N I H 3 T 3 細胞 (P a n o m i c s N F B レポーター系およびインハウス m C D 4 0 R 形質移入) を、ネズミ Meg a C D 4 0 L (A x x o r a , カタログ番号 A L X 5 2 2 1 2 0) 組換えタンパク質または C D 4 0 L 過剰発現 D 1 0 . G 4 細胞 (A T C C) により、 T n 3 足場を用いてまたは用いずに 2 4 時間刺激した。 B r i g h t - G l o w (P r o m e g a E 2 6 1 0) を、製造業者の指示書に従って添加した。リードアウトは、 E n V i s i o n システム (P e r k i n E l m e r) 上で実施される N F B レポーター活性化を介するルミネッセンス (7 0 0) であった。

【 0 4 1 7 】

6 . 1 . 3 ヒト C D 4 0 R / N F B アッセイ：レポーター - H E K 2 9 3 細胞 (P a n o m i c s およびインハウス) を、 Meg a C D 4 0 L (A x x o r a A L X 5 2 2 1 1 0) 組換えタンパク質または C D 4 0 L 過剰発現 D 1 . 1 J u r k a t サブクローニング細胞 (A T C C) により T n 3 足場を用いてまたは用いずに 2 4 時間刺激した。 B r i g h t - G l o w (P r o m e g a E 2 6 1 0) を、製造業者の指示書に従って添加した。リードアウトは、 E n V i s i o n システム (P e r k i n E l m e r) 上で実施される N F B レポーター活性化を介するルミネッセンス (7 0 0) であった。

【 0 4 1 8 】

6 . 1 . 4 二重細胞アッセイ：初代 T / B 細胞を、種々のドナーから単離した。抗 C D 3 刺激マイトイシン C 処理ヒト C D 4 + T 細胞 ($1 \times 1 0^5$ 個) を、精製ヒト B 細胞 ($5 \times 1 0^4$ 個) と培養した。リードアウトは、以下のとおりであった： 2 日目：活性化

10

20

30

40

50

マーカー(F A C S)、5日目：B細胞増殖(A T P 代謝産物、C e l l - T i t e r G l o , I n v i t r o g e n)、7日目：形質細胞分化(F A C S) 7日目：I g 產生(E L I S A 、R & D S y s t e m s)。

【 0 4 1 9 】

6 . 1 . 5 血小板凝集アッセイ：アデノシンニリン酸(A D P)は、C h r o n o - L o g (H a v e r t o w n , P A , U S A)製であった。全ての他の製品は、少なくとも試薬グレードであった。血液試料を、健常被験者から 1 2 . 9 mM のクエン酸ナトリウム中で採取し、1 5 0 × g において 1 5 分間遠心分離して P R P (多血小板血漿)を得た。P R P の分離後、チューブを 1 , 2 0 0 × g において 1 5 分間再度遠心分離して P P P (乏血小板血漿)を得た。M u s t a r d e t a l . (B r . J . H a e m a t o l . 2 2 : 1 9 3 - 2 0 4 , 1 9 7 2)により記載される方法を使用して血小板を洗浄し、C a C l ₂ 2 mM 、M g C l ₂ 1 mM 、0 . 1 % のデキストローズ、0 . 3 5 % のウシ血清アルブミン、0 . 0 5 U / mL のアピラーゼを含有するタイロード液、p H 7 . 3 5 中で再懸濁させた。血小板凝集は、光透過凝集計(C h r o n o - L o g 7 0 0 - 4 D R , C h r o n o - L o g C o r p o r a t i o n , H a v e r t o w n , P A , U S A)を使用して試験し、記載されるとおり示される血小板アゴニストによる血小板の刺激後 1 0 分間記録した。T n 3 足場は、可溶性 C D 4 0 L (s C D 4 0 L)とブレインキュベートして添加前に免疫複合体を形成した。
10

【 0 4 2 0 】

6 . 1 . 6 免疫化アッセイ：ヒツジ赤血球(S R B C)を C o l o r a d o S e r u m (D e n v e r , C O)から購入し、使用直前に H B S S 培地中で 1 0 倍希釈した。マウスを 0 日目に 0 . 2 mL の希釈 S R B C により免疫化した。チャレンジマウスにおける一次胚中心(G C)応答を、F A C S を介して免疫化 1 4 日後にアッセイした(G C B 細胞、非 G C B 細胞、および全ての T 細胞サブセット)。T n 3 足場および対照を 9 ~ 1 3 日目に示されるとおり 2 4 時間漸増させて投与した。
20

【 0 4 2 1 】

6 . 1 . 7 K L H 特異的 T 細胞依存性抗体応答(T D A R)アッセイ：中国産の体重 3 . 1 ~ 4 . 6 k g のカニクイザル(M a c a c a f a s c i c u l a r i s)(C o v a n c e R e s e a r c h P r o d u c t s , A l i c e T X)に、示される用量(0 . 5 、 5 、 4 0 mg / k g)の阻害剤(3 4 2 - モノマー - T n 3 - H S A および 3 4 2 - 3 4 2 二価 - T n 3 - H S A または対照 / ピヒクリルを週 1 回静脈内投薬(伏在静脈または橈側皮静脈))した。K L H (ロット番号 M D 1 5 8 6 7 8 A , S u p p l i e r P i e r c e B i o t e c h n o l o g i e s , R o c k f o r d , I l l i n o i s)を、適切量の注射用滅菌水(S u p p l i e r M i d w e s t V e t e r i n a r y S u p p l y , N o r r i s t o w n , P e n n s y l v a n i a)を用いて滅菌条件下で再構成した。バイアルを回転混合し、次いで滅菌バイアル中に一緒にプールした。1 mL の K L H 溶液(1 0 mg / mL)をそれぞれの動物の背中上で、2 つ の時点(1 日目および 2 9 日目)に正中線の左側に試験または対照品投与終了後 1 時間以内に皮下投与した。さらなる分析のための血液試料を全ての動物から以下の時点において得た：試験前、4 、 6 、 8 、 1 1 、 1 5 、 2 2 、 2 5 、 3 2 、 3 4 、 3 6 、 3 9 、 4 3 、 4 6 、 5 0 および 5 7 日目。8 、 1 5 および 2 2 日目に回収された試料は、投薬前に採取した。L H 特異的 I g M および I g G 抗体力価の評価を 8 、 1 1 および 1 5 日目において行った。1 5 日目における K L H 特異的 I g M および I g G 抗体の力価をそれぞれ図 5 G および 5 H に示す。カットポイント力価測定法は、サル血清中の抗 K L H 抗体を検出するための E L I S A フォーマットを利用した。試料を E L I S A プレート上で固定化された K L H とインキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄し、結合抗体をヤギ抗サル I g G - H R P または I g M - H R P により検出し、次いでテトラメチルベンジジン(T M B)により可視化した。
30
40

【 0 4 2 2 】

動物を利用する全ての実験について、良好な畜産の現在許容可能な実務は、例えば、G 50

uide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Academy Press, 2011に従った。Huntingdon Life Sciences, East Millstone, New Jerseyは、国際実験動物管理公認協会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International)(AAALAC)により十分公認されている。動物は、考えられる獣医学的ケアを要求する任意の条件について技術スタッフによりモニタリングし、必要により治療した。

【0423】

6.2 CD40L特異的Tn3足場は、CD40L : CD40相互作用を機能的に中和する。 10

【0424】

CD40L発現T細胞は、CD40発現B細胞に会合し、NF-Bシグナリング経路の活性化をもたらす(Zangani, 2009)。したがって、NF-B-ルシフェラーゼレポーター細胞系を使用して抗CD40L-Tn3分子がCD40会合の下流のシグナリングを阻害し得るか否かを判定した。ヒトCD40Lおよびレポーターを発現するHEK293細胞を、ヒトまたはネズミMegacD40LのいずれかによりEC₅₀(90%の阻害剤をもたらす有効濃度；すなわち、ヒトMegacD40Lについて1.5 μg/ml、およびネズミMegacD40Lについて3 μg/ml)において刺激した。 20

【0425】

ヒト特異的342分子は、ヒトCD40L誘導NF-B活性を1.5 nMのIC₅₀で阻害した(図13)。ネズミ特異的M31分子は、ネズミCD40L誘導NF-B活性をIC₅₀=1.6 nMで中和した(図1B)。陽性対照抗CD40Lモノクローナル抗体5c8(抗ヒトCD40L)およびMR1(抗ネズミCD40L)は両方とも、モノマートn3足場よりも約10倍良好に機能し、IC₅₀は0.200 nM+/-SD(アッセイの最低閾値)であった。このことは、部分的には、モノクローナル抗体のそれぞれのCD40Lとの相互作用のアビディティーに寄与するモノクローナル抗体の二価性質に起因し得た。 20

【0426】

6.3 ダイマーCD40L特異的Tn3足場は、結合の改善を示す。 30

【0427】

実験データは、CD40L特異的Tn3二価足場の結合がCD40L特異的Tn3モノマートn3足場のそれと比べて改善されたことを示す。CD40L特異的Tn3二価足場のCD40Lへの結合は、一部の場合、図2Cおよび図2D(ネズミ)、ならびに図8Aおよび図8B(ヒト)に示されるとおり、インピトロにおいて標的にに対する作用をCD40L特異的Tn3モノマートn3足場のそれと比べて約310 gだけ改善した。 40

【0428】

図2Cは、ネズミCD40L特異的一価(M13)または二価タンデム足場によるバイオセンサーチップ上で固定化されたネズミCD40受容体へのネズミCD40L結合の競合阻害を示す。M13モノマーは、1つ(1GS)、3つ(3GS)、5つ(5GS)または7つ(7GS)の「GGGGS」リピートを含む変動する長さのペプチドリンカーにより結合させた。M13-1GS-M13足場のIC₅₀は29 nMであった一方、モノマートn3足場のIC₅₀は71 nMであった。より長いリンカーを用いる二価M13足場のIC₅₀は、大幅に低かった(5~6 nM)。 40

【0429】

図2Dは、B細胞上のネズミCD40L誘導CD86発現に対するネズミCD40L特異的一価(M13)または二価タンデム足場の阻害効果を示す。二価足場は、一価足場よりも約310 g強力であった。

【0430】

図8Aおよび8Bは、示されるヒトCD40L特異的Tn3足場309および311が 50

二価タンデムフォーマットの効力を向上させたことを示す。二価311足場(図8A)および二価309足場(図8B)は、Jurkat D1.1細胞により刺激されたCD19陽性ヒトPBM C上のヒトCD40L誘導発現の阻害においてそれぞれ約7倍および500~1000倍の改善を示した。二価309足場は、Biogen製5c8抗ヒトCD40Lモノクローナル抗体と効力が同等であった。

【0431】

溶解度、安定性および精製容易性は、1つ(1GS)、3つ(3GS)、5つ(5GS)または7つ(7GS)の「GGGGS」リピートを含む変動する長さのペプチドリンカーの添加によっては影響を受けなかった(図2B参照)。

【0432】

6.4 CD40L特異的Tn3足場結合および機能

上記生化学的結合に加え、これらの新規Tn3足場が初代T細胞上で活性化後に発現される内因性CD40Lに結合し得ることを確認することが重要であった。T細胞を複数のドナーから単離し、上記のとおり活性化させた。24時間後、5c8(ヒト特異的)モノクローナル抗体およびMR1(ネズミ特異的)モノクローナル抗体による染色により判定されるとおりCD40L発現が上方調節された(データ示さず)。CD40L特異的Tn3足場分子は、モノクローナル抗体と同等レベルのCD40L発現を検出し得、これらの分子がネイティブタンパク質に結合し得ることを確認した。

【0433】

CD40L:CD40相互作用の機能的結果の1つは、B細胞上の共刺激分子の上方調節である(Yellin et al., J. Exp. Med. 6:1857-1864, 1995)。CD40L指向Tn3分子を、それらのその妨害能について試験した。ヒトまたはネズミCD40Lを内因的に発現する細胞系(それぞれD1.1 JurkatサブクローンまたはD10.G4)を使用して末梢血单核細胞(PBMC)を刺激した。刺激したら、フローサイトメトリーを介してCD19+B細胞によるCD86上方調節の割合を計測することによりB細胞の活性化を評価した。このアッセイにおいて、陽性対照モノクローナル抗体は、CD86発現を有する細胞のCD19+割合を0.170nM(5c8)および0.230nM(MR1)のIC₅₀で阻害し得た。ヒト特異的最適化Tn3、342は、CD86上方調節をIC₅₀値=0.700nM(n=5人のドナー)でアンタゴナイズし得た(図10Bおよび表7参照)。

【0434】

ネズミ特異的最適化Tn3M31は、1.5nMのIC₅₀を有した。これらの類似の結果は、Mega-CD40L組換えタンパク質を使用してPBM Cを刺激した場合に観察された。実験データは、両方の分子が、ネズミ特異的かヒト特異的かにかかわらず細胞内の主なシグナリング経路(NF-B)だけでなく、その最も重要な機能的役割の1つ:T-B細胞相互作用を阻害し得たことを実証した。この阻害作用は、多くの自己免疫疾患および病態におけるCD40Lの寄与を減衰させ得る。

【0435】

6.5 抗CD40L Tn3は、T/B共培養後にB細胞増殖および形質細胞分化を阻害する。

【0436】

T細胞上のCD40LとCD40発現B細胞との相互作用は、適応的免疫応答の発生を容易にするT細胞ヘルプの根本的態様である(Banchereau, 1994; Oxenius, 1996, van Kooten & Banchereau, 1997)。これをモデリングするため、340、342および342-342ダイマーの抗hCD40L Tn3-HSA融合体を、抗CD3刺激マイトマイシンC処理ヒトCD4+T細胞を精製ヒトB細胞と培養したT細胞およびB細胞の初代細胞共培養において評価した。B細胞の4日目において増殖して7日目までに形質細胞(PC)に分化し、それらの産生抗体クラスをスイッチする能力を計測した(PCおよび抗体データ示さず)(図15)(Ettlinger, 2007)。CD40L特異的Tn3足場342-342-HSAは、

10

20

30

40

50

T細胞誘導増殖を足場の不存在下または非特異的対照足場の存在下でのB細胞の細胞増殖と比較して少なくとも50%だけ低減し得た。増殖は、CD40L : CD40ライゲーション時の形質細胞分化の前駆シグナルの1つである。形質細胞分化および抗体クラススイッチの阻害(データ示さず)も観察された。

【0437】

6.6 CD40 : CD40L軸のインビボ破壊

T依存性免疫応答におけるCD40L : CD40R相互作用の中心的役割は、十分特性決定されている(Noelle, 1992; Renshaw, 1994, Wykes, 2003)。ネズミCD40L特異的Tn3足場M31(M31-MSAおよびM31-M31-MSA)を使用して0日目にマウスをヒツジ赤血球(SRBC)により免疫化(静脈内)することによりT依存性免疫化モデルにおけるこれらの新規分子の効果を評価した。

10

【0438】

9~13日目、マウスに示される用量の阻害剤を毎日、腹腔内注射し、14日目に脾臓およびリンパ節GC B細胞を定量した。インビボでのこの分子の31時間の短いT_{1/2}を所与とすると毎日の投薬が要求された(図4)。CD40Lは、液性応答、例えば、解剖学的部位、例えば、脾臓およびリンパ節における胚中心の生成を制御することが事前の知見から十分に確立されている(Jacob, 1991)。ここで、その形成へのCD40L : CD40軸の寄与の破壊が、GC B細胞の割合により示されるとおり、ナイーブまたは本発明者らの非特異的対照D1-MSAに対してM31-MSAについて用量依存的に観察された。

20

【0439】

M31-MSAは、10mg/kgにおいてもGC B細胞(図5B)の割合をMR1モノクローナル抗体(図5A)と同様に消失させた。細胞の他の下位集団、例として特異的T細胞集団は正常を呈し、観察結果はT細胞枯渇に起因しないことが確認された(図5C、図5D、図5E)。さらに、抗SRBC Ig ELISAデータからの結果は、胚中心B細胞データのそれを反映した(図5F)。まとめると、これらのデータは、ネズミ特異的Tn3足場M31-MSAがCD40シグナリングを介して推進される反応を解消させ得ることを示した。

【0440】

30

同様に、ヒトCD40L特異的Tn3足場342(342-HSAおよび342-342-HSA)を使用してカニクイザルのKLH特異的T細胞依存性抗体応答(TDAR)モデルにおけるこれらの新規分子の効果を評価した。ここで、CD40L : CD40軸の破壊は、KLH抗原に対する抗体生成の抑制を用量依存的にもたらす。図5Gおよび5Hに示されるとおり、342-二価構築物は、IgMおよびIgG抗体のレベルを0.5mg/kg(mpk)において抑制し、ほぼ完全な抑制は5mg/kgにおいて確認された。342-モノマー構築物も、IgMおよびIgGのレベルを抑制したが、より高濃度において、40mg/kgにおいてほぼ完全な抑制が確認された。これらのデータは、ヒト特異的Tn3足場構築物342-HSAおよび342-342-HSAが両方ともCD40シグナリングを介して推進される反応を解消し得ることを示した。

40

【0441】

6.7 ヒトCD40L特異的Tn3足場は、血小板凝集を誘導しない。

【0442】

抗CD40Lモノクローナル抗体を用いるヒト臨床試験は、数人の患者において血栓塞栓症が発症した場合に中止された(Davidson et al. Arth Rheu, 43:S271)。後続の前臨床分析は、これが抗CD40Lモノクローナル抗体のオンターゲットクラス効果であることを示唆した。したがって、血小板凝集アッセイにおいてヒトCD40L特異的Tn3足場を試験することが重要であった。

【0443】

生理学的CD40Lの3つの分子と抗CD40Lモノクローナル抗体の1つの分子との

50

比を使用した場合、凝集促進効果がクエン酸化多血小板血漿（P R P）、洗浄血小板、および全血において観察された（図16A）。これらの効果は、CD40L結合後にモノクローナル抗体Fcドメイン依存性相互作用により媒介された（データ示さず）。Fcドメイン融合体の不存在下、凝集は観察されなかった。凝集は、ダイマーとしてまたはHSA融合タンパク質としてのヒトCD40L特異的Tn3足場のいずれについても複数のドナーにおいて観察されなかった（図16Bおよび図16C）。

【0444】

臨床試験において観察される有害副作用は、血小板の存在下で可溶性CD40L／抗CD40Lモノクローナル抗体免疫複合体を作出することにより観察された（図16Aおよび図16C上の5C8トレース）。この別の例は、トランスジェニックヒトFcRIIaネズミ試験の組織構造において確認することができる（Francis et al., 2010）。可溶性CD40L／モノクローナル抗体免疫複合体の投与時、多数の血栓が投与数分以内に肺組織内で確認された。しかしながら、正常組織構造は、抗CD40LTn3足場により重複させた場合、対照試料と一致して肺中で存在した（データ示さず）。

【0445】

実施例7

CD40Lに結合するように遺伝子操作されたフィブロネクチンIII型ドメイン：2つの複合体のクローニング、発現、精製、結晶化および予備X線回折分析

組換えヒト可溶性CD40Lを、両方ともCD40L結合剤としてファージディスプレイライブラリーから単離された2つのCD40L特異的Tn3モノマー足場309および311K4E-12と共に結晶化した。結晶は、それぞれ3.1および2.9に回折した。さらに、組換えヒト可溶性CD40Lを、最適化Tn3モノマー342単独ならびに342モノマーおよび311K4E-12モノマーの両方と共に結晶化した。これらの構造についての結晶は、それぞれ2.8および1.9に回折した。対応する結晶構造は、Tn3足場とCD40Lとの相互作用の理解を支援し、より高い親和性のCD40L結合剤および複数のエピトープに結合するタンデム構築物を設計するために使用することができる。

【0446】

7.1 Tn3分子およびヒト可溶性CD40Lの発現および精製

結晶化のためにタグ無しTn3分子を産生するため、組換え発現タンパク質をペリプラズム空間中に分泌するように設計されたインハウスIPTG誘導性ベクターを使用して大腸菌（E.coli）中でタンパク質を発現させた。このベクターは、Ptacプロモーター、OppAシグナルペプチド突然変異体L25/M（MTNITKRSLLVAAAGVLAAALMAGNVAMA）（配列番号210）、C末端8×Hisタグをトロンビン開裂部位に加えて有する。Tn3配列を、シグナルペプチドとトロンビン開裂部位との間でサブクローニングした。

【0447】

発現された分泌Hisタグ付きタンパク質は、製造業者の説明書（Qiagen, Valencia, California, USA）に従ってNi-NTA樹脂を使用して精製し、次いでトロンビンにより開裂させ、次いでNi-NTA親和性精製を再度行って未切断インタクトタンパク質および切断Hisタグ付き断片を除去した。この精製工程に次いで、Aektapurifier（GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, USA）上で実施されるHiTrap Qカラム（GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, USA）を使用するイオン交換工程を行った。精製されたタグ無しTn3タンパク質は、SDS-PAGEおよびSEC結果に基づき95%超の純度および均一性を示す。

【0448】

ヒト可溶性CD40L（113-261、UNIPROT：P29965）遺伝子をN末端6×Hisタグを用いてGeneArtにより合成し、サイトメガロウイルス主要前

10

20

30

40

50

初期 (h C M V i e) プロモーターの制御下でインハウス哺乳動物発現ベクター中にクローニングした (Boshart et al . , Cell 41 : 521-530 , 1985) 。 CD40L 遺伝子をインフレームで CD33 シグナルペプチドとクローニングした。タンパク質発現を増加させるためにベクター中の EBNA および OriP 遺伝子を使用した。 CD40L 遺伝子は SV40 ポリ A 配列も取り込んでその mRNA 3' 末端の適正なプロセシングを可能とした。構築物を 293F 懸濁細胞 (293Freestyle 培地中で 293Fectin , Invitrogen , Carlsbad , California , USA) を使用して増殖させたヒト胚腎細胞 [HEK] 中に一過的に形質移入した。細胞を、標準プロトコルを使用して増殖させ、培地を 4 および 8 日後に回収した。次いで、 Ni - NTA 樹脂を使用して可溶性 CD40L タンパク質を精製し、次いで Hi - Trap SP FF カラム (GE Healthcare , Piscataway , New Jersey , USA) を使用するイオン交換工程および 50 mM の Tris pH 7.5 、 50 mM の NaCl に対する透析を行った。

【 0449 】

複合体を調製するため、 TN3 分子、 309 または 311K4E_12 もしくは 342 のいずれかを、 CD40L と 1.1 : 1 の比で混合し、 Vivaspin 濃縮器 30,000Da カットオフ ; GE Healthcare , Piscataway , New Jersey , USA) を使用して約 10 mg / ml に濃縮し、 50 mM の Tris - HC 1 、 pH 7.5 、 100 mM の NaCl 、 0.02% の NaN3 により予備平衡化した Superdex 200 10/300 GL カラム (GE Healthcare , Piscataway , New Jersey , USA) を使用するサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) に供した (図 19 、パネル A) 。分離工程後、複合体を 18 mg / ml に濃縮し、結晶化に供した。 342 - 311K4E_12 - CD40L 複合体は、本質的に上記のとおり 3 つの構成要素の 1.1 : 1.1 : 1 の比を使用して調製した。

【 0450 】

7.2 結晶化スクリーニングおよび最適化

シッティングドロップ結晶化実験は、 300 nL の容量のウェル溶液およびタンパク質複合体溶液を液滴区画で混合し、それを 50 μL のウェル溶液に対して平衡させることにより Phoenix 結晶化ロボット (Art Robbins Instruments , Sunnyvale , California , USA) を使用して 96 ウェル Intelliplate (Art Robbins Instruments , Sunnyvale , California , USA) 中で設定した。 Hampton Research (Aliso Viejo , California , USA) 、 Emerald Biosystems (Bainbridge Island , Washington , USA) および Molecular Dimensions (Apopka , Florida , USA) からの市販の結晶化スクリーンを使用した。

【 0451 】

309 - CD40L 、 342 - CD40L および 342 - 311K4E_12 - CD40L 複合体の結晶化はそれぞれ、 Additive Screen HT (Hampton Research , Aliso Viejo , California , USA) を使用する追加のスクリーニングを含む最適化工程を要求した。最適化工程において、 96 ウェルプレートのウェル溶液に最初のスクリーニングからの 80% の成功溶液および 20% のそれぞれの添加剤を充填した。液滴は、 300 nL のタンパク質溶液および 300 nL の新たなウェル溶液から後者の完全に混合した後に構成した。回折質結晶を 96 ウェルプレートから直接回収した。冷凍保存のため、増加グリセロール濃度を有する母液の 3 つの連続溶液中に結晶を移した。

【 0452 】

回折質 311 - CD40L 結晶は、冷凍剤の添加を要求しない溶液からの最初のスクリーンにおいて成長した。

【 0453 】

10

20

30

30

40

40

50

7.3 X線回折およびデータ収集

309 - CD40L複合体についてのX線回折パターンを、ADSC Q315R C CD X-Ray検出器(Area Detector Systems Corporation, Poway, California, USA)を備えるLawrence Berkeley National Laboratory(University of California, Berkeley)におけるAdvanced Light SourceのBeamline 5.0.3において単結晶から収集した。0.5°の振動範囲を有する360個の連続画像を、300mmの結晶から検出器の距離および0.8秒の曝露時間において収集した。

【0454】

311K4E_12 - CD40L、342 - CD40Lおよび342 - 311K4E_12 - CD40L複合体についてのX線回折パターンを、Rayonix 225HE検出器(Rayonix LLC, Evanston, Illinois, USA)を備えるArgonne National Laboratory(University of Chicago, Chicago, IL)におけるAdvanced Photon SourceのBeamline 31-ID-Dにおいて単結晶から収集した。1°の振動範囲を有する180個の連続画像を、300mmの結晶から検出器の距離および0.8秒の曝露時間において収集した。

【0455】

全てのデータセットについてのリダクションおよびスケーリングは、HKL2000パッケージソフト(Otwinski & Minor, Methods in Enzymology, 276: 307 - 326. 1997)を使用して実施した。

【0456】

7.4 結果および考察

309 - CD40L複合体の最も再現性の高い結晶化条件は、Peg / Ion Screen(Hampton Research)におけるB5(0.2MのNaNO₃、20%のPEG3350)であると考えられた。Additive Screenを用いるさらなる最適化により、A1条件(0.1MのBaCl₂・2H₂O)からの回折質結晶を得た。図19、パネルBに示される結晶を96ウェルプレートから回収し、20%のグリセロールを補給した母液に移した後に液体窒素中で冷却した。

【0457】

空間群対称性：結晶は、斜方晶空間群P212121に属し、格子定数a = 85.69、b = 90.64、c = 95.56であり、3.1に回折した。非対称単位は、CD40Lのトリマーおよび3つの309分子を含有し、VM値は約2.33/Daであることが予期される。

【0458】

311K4E_12 - CD40L結晶化について、Cryo I&IIスクリーン(Emerald BioStructures)により、最適化も冷凍保存も要求しない条件の数を得た。条件F7(40%のPEG600、0.1MのCH₃COONa、0.2MのMgCl₂)からの単結晶(図19、パネルC)をデータ収集に使用した。

【0459】

空間群対称性：結晶は正方晶空間群P213に属し、格子定数97.62であり、2.6に回折した。非対称単位は、1つのCD40Lおよび1つの311K4E_12分子を含有し、VM値は約2.93/Daである。

【0460】

342 - CD40L空間群対称性：結晶は空間群P321に属し、格子定数a = 93.53、b = 93.53、c = 66.69、分解能2.8であった。非対称性単位は、1つのCD40Lモノマーおよび1つの342モノマーを含有する。

【0461】

342 - 311K4E_12 - CD40L空間群対称性：結晶は空間群P21に属し、

10

20

30

40

50

格子定数 $a = 8.0 . 3.2$ 、 $b = 14.3 . 4.8$ 、 $c = 11.1 . 2.7$ 、 $\alpha = 98 . 2.2$ °、分解能 1 . 9 であった。非対称単位は、2つのCD40トリマー、6つの342モノマー、および6つの311K4E-12モノマーを含有する。

【0462】

全ての構造についてのデータ統計値を表10に示す。

【表10】

表10.X線データ収集統計値

	309-CD40L	311K4E-12
波長、Å	0.9793	0.9793
分解能、Å	50.0-3.05 (3.16-3.05) ^a	50.0-2.94
空間群	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 3
格子定数、Å	$a=85.69, b=90.64, c=95.56$	$a=97.62$
全反射数	94,024	128,140
独立反射数	14,555	6720
平均冗長度	6.5 (6.4) °	19.2 (19.7)
完全度、%	100.0 (100.0) ^a	99.4 (100.0)
R _{sym}	0.097 (0.443) ^a	0.114 (0.785)
平均I/σ (I)	17.2 (4.6) ^a	20.1 (2.4)

^a括弧内の値は、最外郭に対応する

10

	342-CD40L	342-311K4E_12-CD40L
波長、Å	0.9793	0.9793
分解能、Å	50.0-2.8 (2.83-2.82) ^a	144.5-1.9 (1.96-1.95) ^a
空間群	P321	P2 ₁
格子定数、Å	$a=93.53, b=93.53, c=66.69$	$a=80.32, b=143.48,$ $c=111.27, \beta=98.22$ °
全反射数	66,038 (549) ^a	733,814 (1806) ^a
独立反射数	8,406 (88) ^a	179,232 (1806) ^a
平均冗長度	7.9 (6.2) °	4.1 (4.2) °
完全度、%	99.9 (100.0) ^a	99.7 (99.6) ^a
R _{sym}	0.19 (0.79) ^a	0.06 (0.57) ^a
平均I/σ (I)	8.1 (1.4) ^a	14.5 (3.0) ^a

^a括弧内の値は、最外郭に対応する

20

30

【0463】

CD40Lは、トリマー（図17AのポリペプチドA、B、およびC）を形成した。それぞれの309Tn3足場（図17AのポリペプチドD、E、およびF）は、2つのCD40Lポリペプチドに接触した。結晶構造は、それぞれの309足場と第1および第2のCD40Lポリペプチドとの間に6つの特異的接触が存在することを明らかにした。BC中のアスパラギン酸17は、第1のCD40L中のトレオニン251と接触する。BCループ中のグルタミン酸18は、第1のCD40L中のアルギニン203と、および第2のCD40L中のイソロイシン204と接触する。DEループ中のセリン47は、第1のCD40L中のヒスチジン249と接触する。DEループ中のトリプトファン49は、第1のCD40L中のバリン247と接触する。FGループ中のアスパラギン酸70は、第2のCD40L中のセリン185と接触する（図17A参照）。311足場に接触するCD40Lアミノ酸残基も図18Aに示す。

40

【0464】

309の場合、それぞれの311K4E_12モノマー足場（図17BのポリペプチドA、B、およびC）は、2つのCD40Lポリペプチドと接触する。結晶構造は、それぞれの311K4E_12足場と第1および第2のCD40Lポリペプチドとの間に19個

50

の特異的接觸が存在することを明らかにした。B C ループ中のアスパラギン 17 は、第 1 の C D 4 0 L 中のチロシン 146 およびグルタミン酸 142 と接觸する。B C ループ中のアルギニン 18 は、第 1 の C D 4 0 L 中のグルタミン酸 142 、チロシン 146 、およびメチオニン 148 と接觸する。B C ループ中のセリン 19 は、第 1 の C D 4 0 L 中のグルタミン酸 142 およびロイシン 155 と接觸する。B C ループ中のセリン 22 は、第 1 の C D 4 0 L 中のアスパラギン 151 と接觸する。B C ループ中のヒスチジン 15 は、第 1 の C D 4 0 L 中のチロシン 146 と接觸する。D E ループ中のヒスチジン 51 は、第 1 の C D 4 0 L 中のチロシン 146 と、および第 2 の C D 4 0 L 中のグルタミン酸 230 と接觸する。D E ループ中のバリン 50 は、第 2 の C D 4 0 L 中のグルタミン酸 230 と接觸する。3 1 1 K 4 E _ 1 2 モノマー足場の N 末端領域は、第 2 の C D 4 0 L に連結されている。第 2 の C D 4 0 L 中のアルギニン 200 は、3 1 1 K 4 E _ 1 2 の N 末端領域中のトレオニン 7 、アスパラギン酸 8 、およびトレオニン 10 と接觸する。第 2 の C D 4 0 L 中のアルギニン 203 は、グルタミン酸 4 およびアスパラギン酸 5 と接觸する。3 0 9 足場に接觸する C D 4 0 L アミノ酸残基も図 18 B に示す。

【 0 4 6 5 】

3 0 9 および 3 1 1 K 4 E _ 1 2 との複合体中の C D 4 0 L の結晶構造は、3 1 1 K 4 E _ 1 2 および 3 0 9 モノマー足場が C D 4 0 L トリマー複合体の異なる部分中に局在する異なるエピトープに結合することを示した(図 17 C)。構造は、両方の足場が、C D 4 0 受容体と相互作用する同一の溝中で結合することを示した。

【 0 4 6 6 】

C D 4 0 L を有する 3 4 2 の結晶構造を図 17 D に提供し、この構造は、3 4 2 が C D 4 0 L の同一部分上で結合するが、親 3 0 9 クローンと比較して接觸残基の特異的变化が確認されることを示した。具体的には、3 4 2 において B C ループ中のアスパルテート 18 は C D 4 0 L のトレオニン 251 と接觸し、D E ループのヒスチジン 47 は C D 4 0 L のヒスチジン 249 と接觸し、D E ループのヒスチジン 48 は C D 4 0 L のヒスチジン 249 、セリン 245 およびセリン 248 と接觸し、D E ループのヒスチジン 50 は C D 4 0 L のバリン 247 と接觸する。

【 0 4 6 7 】

C D 4 0 L を有する 3 4 2 および 3 1 1 K 4 E _ 1 2 の結晶構造は、両方の足場が、C D 4 0 L トリマー複合体の異なる部分中に局在するそれらのそれぞれのエピトープに同時に結合し得ることを実証する(図 17 E)。別個の足場のそれぞれについての接觸(上記)は維持される。

【 0 4 6 8 】

上記の実施例は、本発明および本発明の方法の実施の種々の態様を説明する。これらの実施例は、本発明の多くの異なる実施形態の網羅的な説明を提供することが意図されない。したがって、本発明を理解の明確化の目的で説明および実施例によりある程度詳細に記載してきたが、当業者は、それに対して多くの変更および改変を添付の特許請求の範囲の趣旨からも範囲からも逸脱することなく行うことができるが容易に理解する。

【 0 4 6 9 】

本明細書に挙げられる全ての刊行物、特許および特許出願は、あたかもそれぞれの個々の刊行物、特許または特許出願が具体的かつ個別的に参照により本明細書に組み込まれると示されるのと同程度まで、参照により本明細書に組み込まれる。

本発明の実施形態として、例えば以下を挙げることができる。

(1) C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む T n 3 足場であって、前記モノマーサブユニットは、A 、 B 、 C 、 D 、 E 、 F 、および G と命名される 7 つのベータ鎖、ならびに A B 、 B C 、 C D 、 D E 、 E F 、および F G と命名される 6 つのループ領域を含み、C D 4 0 L に特異的に結合する T n 3 足場。

(2) 単一の C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む、(1)に記載の T n 3 足場。

(3) タンデムに連結されている 2 つの C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む、(1)に記載の T n 3 足場。

10

20

30

40

50

(4) 前記 2 つの C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、直接連結されている、(3)に記載の T n 3 足場。

(5) 前記 2 つの C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、リンカーにより連結されている、(3)に記載の T n 3 足場。

(6) 前記リンカーは、ペプチドリンカーを含む、(5)に記載の T n 3 足場。

(7) 前記ペプチドリンカーが、フレキシブルペプチドリンカーである、(6)に記載の T n 3 足場。

(8) 前記ペプチドリンカーが、 $(G_m X)_n$ 配列(式中、

(a) X は、セリン(S)、アラニン(A)、グリシン(G)、Leu(L)、イソロイシン(I)、またはバリン(V)であり；

10

(b) m および n は、整数であり；

(c) m は、1、2、3 または 4 であり；

(d) n は、1、2、3、4、5、6、または 7 である)

を含む、(7)に記載の T n 3 足場。

(9) 前記ペプチドリンカーが、配列番号 131、配列番号 132、配列番号 142 または配列番号 143 を含む、(8)に記載の T n 3 足場。

(10) 前記足場の C D 4 0 L への結合は、単一の C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む T n 3 足場のそれと比べて改善される、(3)に記載の T n 3 足場。

(11) 前記足場の C D 4 0 L への結合は、標的にに対する作用を単一の C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む T n 3 足場のそれと比べて改善する、(3)に記載の T n 3 足場

20

(12) 前記 C D 4 0 L への結合の改善は、結合親和性の改善、結合アビディティの改善、またはその両方である、(10)に記載の T n 3 足場。

(13) C D 4 0 L についての結合親和性およびタンパク質安定性が、単一の C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む T n 3 足場のそれらと比べて改善される、(10)に記載の T n 3 足場。

(14) C D 4 0 L についての結合アビディティおよびタンパク質安定性が、単一の C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む T n 3 足場のそれらと比べて改善される、(10)に記載の T n 3 足場。

(15) 少なくとも 1 つの C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、リンカーに、または異種部分に結合している、(1)～(9)のいずれかに記載の T n 3 足場。

30

(16) リンカーまたは異種部分が、前記足場の N 末端または C 末端にコンジュゲートしている、(15)に記載の T n 3 足場。

(17) 前記リンカーが、ペプチドリンカーを含む、(15)または(16)に記載の T n 3 足場。

(18) 前記ペプチドリンカーが、フレキシブルペプチドリンカーである、(17)に記載の T n 3 足場。

(19) 前記ペプチドリンカーが、 $(G_m X)_n$ 配列(式中、

(a) X は、セリン(S)、アラニン(A)、グリシン(G)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、またはバリン(V)であり；

(b) m および n は、整数であり；

40

(c) m は、1、2、3 または 4 であり；

(d) n は、1、2、3、4、5、6、または 7 である)

を含む、(17)または(18)に記載の T n 3 足場。

(20) 前記ペプチドリンカーが、配列番号 131、配列番号 132、配列番号 142、または配列番号 143 を含む、(19)に記載の T n 3 。

(21) 前記リンカーが、機能的部分を含む、(15)に記載の T n 3 足場。

(22) 前記機能的部分が、免疫グロブリンまたはその断片である、(21)に記載の T n 3 足場。

(23) 前記免疫グロブリンまたはその断片が、Fc ドメインを含む、(22)に記載の T n 3 足場。

50

- (24) 前記 F c ドメインが、少なくとも 1 つの F c R 媒介エフェクター機能を誘導し得ない、(23)に記載の T n 3 足場。
- (25) 前記少なくとも 1 つの F c R 媒介エフェクター機能が、A D C C である、(24)に記載の T n 3 足場。
- (26) 少なくとも 1 つの C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、異種部分に結合している、(15)に記載の T n 3 足場。
- (27) 前記異種部分が、タンパク質、ペプチド、タンパク質ドメイン、リンカー、薬物、毒素、細胞傷害剤、造影剤、放射性核種、放射性化合物、有機ポリマー、無機ポリマー、ポリエチレンギリコール (P E G) 、ビオチン、アルブミン、ヒト血清アルブミン (H S A) 、H S A F c R n 結合部分、抗体、抗体のドメイン、抗体断片、单鎖抗体、ドメイン抗体、アルブミン結合ドメイン、酵素、リガンド、受容体、結合ペプチド、非 F n I I I 足場、エピトープタグ、組換えポリペプチドポリマー、サイトカイン、および前記部分の 2 つ以上の組合せからなる群から選択される組成物を含む、(15)または(26)に記載の T n 3 足場。
10
- (28) 少なくとも 1 つの C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、P E G にコンジュゲートしている、(27)に記載の T n 3 足場。
- (29) 少なくとも 1 つの C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、アルブミンにコンジュゲートしている、(27)に記載の T n 3 足場。
- (30) 前記アルブミンが、ヒト血清アルブミン (H S A) である、(29)に記載の T n 3 足場。
20
- (31) 前記 H S A が、バリアント H S A である、(30)に記載の T n 3 足場。
- (32) 前記バリアント H S A のアミノ酸配列が、配列番号 1 3 3 である、(31)に記載の T n 3 足場。
- (33) 前記バリアント H S A が、ネイティブ H S A またはネイティブ H S A 断片と比較して少なくとも 1 つの改善された特性を有する、(31)に記載の T n 3 足場。
- (34) 前記改善された特性が、ネイティブ H S A またはネイティブ H S A 断片の血漿半減期と比較して変化した血漿半減期である、(33)に記載の T n 3 足場。
30
- (35) 前記変化した血漿半減期が、ネイティブ H S A またはネイティブ H S A 断片の血漿半減期と比較して長い血漿半減期である、(34)に記載の T n 3 足場。
- (36) 前記変化した血漿半減期が、ネイティブ H S A またはネイティブ H S A 断片の血漿半減期と比較して短い血漿半減期である、(34)に記載の T n 3 足場。
- (37) 前記 H S A バリアントが、H S A ドメイン I I 中の少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、(31)または(33)～(36)のいずれかに記載の T n 3 足場。
40
- (38) 前記 H S A バリアントが、全長成熟 H S A (配列番号 1 3 3 または 1 3 8) の配列をまたはその断片を含み、但し、4 0 7 、 4 1 5 、 4 6 3 、 5 0 0 、 5 0 6 、 5 0 8 、 5 0 9 、 5 1 1 、 5 1 2 、 5 1 5 、 5 1 6 、 5 2 1 、 5 2 3 、 5 2 4 、 5 2 6 、 5 3 5 、 5 5 0 、 5 5 7 、 5 7 3 、 5 7 4 、および 5 8 0 からなる群から選択される位置における全長成熟 H S A 中の位置に対して番号付与される少なくとも 1 つのアミノ酸置換を除き；前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、5 7 3 位におけるリジン (K) のグルタミン酸 (E) への置換を含まず、前記 H S A バリアントにコンジュゲートしていない T n 3 足場の血漿半減期よりも長い血漿半減期を有する、(31)または(33)～(37)のいずれかに記載の T n 3 足場。
- (39) 全長成熟 H S A 中の位置に対して番号付与される前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換が、4 6 3 、 5 0 8 、 5 2 3 、および 5 2 4 からなる群から選択される位置におけるものであり、前記 H S A バリアントにコンジュゲートしていない T n 3 足場の血漿半減期よりも長い血漿半減期を有する、(38)に記載の T n 3 足場。
- (40) 前記 H S A バリアントが、全長成熟 H S A (配列番号 1 3 3 または 1 3 8) の配列またはその断片を含み、但し、
(a) 4 0 7 位におけるロイシン (L) のアスパラギン (N) またはチロシン (Y) への置換；
50

- (b) 415位におけるバリン(V)のトレオニン(T)への置換；
 (c) 463位におけるロイシン(L)のアスパラギン(N)への置換；
 (d) 500位におけるリジン(K)のアルギニン(R)への置換；
 (e) 506位におけるトレオニン(T)のチロシン(Y)への置換；
 (f) 508位におけるトレオニン(T)のアルギニン(R)への置換；
 (g) 509位におけるフェニルアラニン(F)のメチオニン(M)またはトリプトファン(W)への置換；
 (h) 511位におけるアラニン(A)のフェニルアラニン(F)への置換；
 (i) 512位におけるアスパラギン酸(D)のチロシン(Y)への置換；
 (j) 515位におけるトレオニン(T)のグルタミン(Q)への置換；
 (k) 516位におけるロイシン(L)のトレオニン(T)またはトリプトファン(W)への置換；
 (l) 521位におけるアルギニン(R)のトリプトファン(W)への置換；
 (m) 523位におけるイソロイシン(I)のアスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、グリシン(G)、リジン(K)、またはアルギニン(R)への置換；
 (n) 524位におけるリジン(K)のロイシン(L)への置換；
 (o) 526位におけるグルタミン(Q)のメチオニン(M)への置換；
 (p) 535位におけるヒスチジン(H)のプロリン(P)への置換；
 (q) 550位におけるアスパラギン酸(D)のグルタミン酸(E)への置換；
 (r) 557位におけるリジン(K)のグリシン(G)への置換；
 (s) 573位におけるリジン(K)のフェニルアラニン(F)、ヒスチジン(H)、プロリン(P)、トリプトファン(W)、またはチロシン(Y)への置換；
 (t) 574位におけるリジン(K)のアスパラギン(N)への置換；
 (u) 580位におけるグルタミン(Q)のリジン(K)への置換；および
 (v) 前記置換の2つ以上の組合せ

からなる群から選択される全長成熟HSA中の位置に対して番号付与される少なくとも1つのアミノ酸置換を除き、

前記HSAバリアントにコンジュゲートしていないTn3足場の血漿半減期よりも長い血漿半減期を有する、(31)または(33)～(38)のいずれかに記載のTn3足場。

(41) 前記HSAバリアントが、全長成熟HSA(配列番号133または138)の配列またはその断片を含み、但し、

- (a) 463位におけるロイシン(L)のアスパラギン(N)への置換；
 (b) 508位におけるトレオニン(T)のアルギニン(R)への置換；
 (c) 523位におけるイソロイシン(I)のアスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、グリシン(G)、リジン(K)、またはアルギニン(R)への置換；
 (d) 524位におけるリジン(K)のロイシン(L)への置換；および
 (e) 前記置換の2つ以上の組合せ

からなる群から選択される全長成熟HSA中の位置に対して番号付与される少なくとも1つのアミノ酸置換を除き、

前記HSAバリアントにコンジュゲートしていないTn3足場の血漿半減期よりも長い血漿半減期を有する、(40)に記載のTn3足場。

(42) 少なくとも2つの同一のCD40L特異的モノマーサブユニットを含む、(3)～(14)のいずれかに記載のTn3足場。

(43) 少なくとも2つの異なるCD40L特異的モノマーサブユニットを含む、(3)～(15)のいずれかに記載のTn3足場。

(44) CD40受容体アゴニストである、(1)～(43)のいずれかに記載のTn3足場。

(45) CD40受容体アンタゴニストである、(1)～(44)のいずれかに記載のTn3足場。

。

(46) 少なくとも2つのCD40L特異的モノマーサブユニットが、同一のCD40Lエピトープに特異的に結合する、(3)～(14)のいずれかに記載のTn3足場。

10

20

30

40

50

- (47) 少なくとも 2 つの C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、異なる C D 4 0 L エピトープに特異的に結合する、(3) ~ (14) のいずれかに記載の T n 3 足場。
- (48) 前記異なる C D 4 0 L エピトープが、非重複エピトープである、(47) に記載の T n 3 足場。
- (49) 前記異なる C D 4 0 L エピトープが、重複エピトープである、(47) に記載の T n 3 足場。
- (50) 少なくとも 2 つの C D 4 0 L 分子に結合する、(1) ~ (49) のいずれかに記載の T n 3 足場。
- (51) 単一の C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、少なくとも 2 つの C D 4 0 L 分子に結合する、(1) ~ (50) のいずれかに記載の T n 3 足場。 10
- (52) 少なくとも 1 つの C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットのベータ鎖が、配列番号 3 のベータ鎖と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、(1) に記載の T n 3 足場。
- (53) 前記 A ベータ鎖が、少なくとも 1 つの突然変異を除き配列番号 1 1 を含む、(1) に記載の T n 3 足場。
- (54) 前記 B ベータ鎖が、少なくとも 1 つの突然変異を除き配列番号 1 2 を含む、(1) に記載の T n 3 足場。
- (55) 前記 C ベータ鎖が、少なくとも 1 つの突然変異を除き配列番号 1 3 または 1 4 を含み、配列番号 1 3 のシステインも配列番号 1 4 のシステインも置換されていない、(1) に記載の T n 3 足場。 20
- (56) 前記 D ベータ鎖が、少なくとも 1 つの突然変異を除き配列番号 1 5 を含む、(1) に記載の T n 3 足場。
- (57) 前記 E ベータ鎖が、少なくとも 1 つの突然変異を除き配列番号 1 6 を含む、(1) に記載の T n 3 足場。
- (58) 前記 F ベータ鎖が、少なくとも 1 つの突然変異を除き配列番号 1 7 を含み、配列番号 1 7 のシステインが置換されていない、(1) に記載の T n 3 足場。
- (59) 前記 G ベータ鎖が、少なくとも 1 つの突然変異を除き配列番号 1 8 を含む、(1) に記載の T n 3 足場。 30
- (60) 前記 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、アミノ酸配列：
I E V (X_{A_B})_n A L I T W (X_{B_C})_n C E L X₁ Y G I (X_{C_D})_n T T I D L (X_{D_E})_n Y S I (X_{E_F})_n Y E V S L I C (X_{F_G})_n K E T F T T
(式中、)
(a) X_{A_B}、X_{B_C}、X_{C_D}、X_{D_E}、X_{E_F}、および X_{F_G} は、それぞれ前記 A B、B C、C D、D E、E F、および F G ループの配列中に存在するアミノ酸残基を表す；
(b) X₁ は、アミノ酸残基 A または T を表す；
(c) ループの長さ n は、2 から 26 の整数である)
を含む、(1) ~ (59) のいずれかに記載の T n 3 足場。
- (61) 前記 A B ループの配列が、配列番号 4 または配列番号 1 3 6 を含み、前記 C D ループの配列が、配列番号 6 を含み、前記 E F ループの配列が、配列番号 8 または配列番号 1 3 7 を含む、(60) に記載の T n 3 足場。 40
- (62) 前記 B C ループの配列が、配列番号 8 3、8 4、8 5、8 6、8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2 からなる群から選択される配列を含む、(60) に記載の T n 3 足場。
- (63) 前記 D E ループの配列が、配列番号 9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、および 1 6 9 からなる群から選択される配列を含む、(60) に記載の T n 3 足場。
- (64) 前記 F G ループの配列が、配列番号 9、9 9、1 3 9、および 1 7 0 からなる群から選択される配列を含む、(60) に記載の T n 3 足場。
- (65) 前記 B C ループの配列が、配列番号 1 0 0、1 0 1、1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 0 6、1 0 7、1 0 8、1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、1 1 6、1 1 7、および 1 7 4 からなる群から選択される配列を含む、(60) に記載の T n 3 足場。
- (66) 前記 D E ループの配列が、配列番号 1 1 8、1 1 9、1 2 0、1 2 1、1 2 2、1 50

2 3、1 2 4、1 2 5、1 2 6、1 2 7、1 2 8、および1 7 5からなる群から選択される配列を含む、(60)に記載の T n 3 足場。

(67) 前記 F G ループの配列が、配列番号 1 2 9、1 3 0、および 1 7 7 からなる群から選択される配列を含む、(60)に記載の T n 3 足場。

(68) (a) 前記 B C ループの配列が、配列番号 8 3 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 9 4 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 9 または 1 3 9 を含み；

(b) 前記 B C ループの配列が、配列番号 8 3 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 9 4 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 9 9 を含み；

(c) 前記 B C ループの配列が、配列番号 8 4 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 9 5 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 9 または 1 3 9 を含み；

(d) 前記 B C ループの配列が、配列番号 8 5 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 9 4 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 9 または 1 3 9 を含み；

(e) 前記 B C ループの配列が、配列番号 8 6 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 9 6 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 9 または 1 3 9 を含み：

(f) 前記 B C ループの配列が、配列番号 8 7 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 9 7 を含み、前記 F G ループの配列は、配列番号 9 または 1 3 9 を含み；

(g) 前記 B C ループの配列が、配列番号 8 8 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 9 5 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 9 または 1 3 9 を含み；

(h) 前記 B C ループの配列が、配列番号 8 9 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 9 4 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 9 または 1 3 9 を含み；

(i) 前記 B C ループの配列が、配列番号 9 0 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 9 4 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 9 または 1 3 9 を含み；

(j) 前記 B C ループの配列が、配列番号 9_1 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 9_5 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 9_または 1_3_9 を含み；

(k) 前記 B C ループの配列が、配列番号 9 2 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 9 8 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 9 または 1 3 0 を含み、または

(1) 前記 B C ループの配列が、配列番号 9 3 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 9 4 を含む。前記 F G ループの配列が、配列番号 9 5 もしくは 1 3 9 を含む。

(60) に記載の T_{n-3} 足場。

(69) (a) 前記 B C ルー

、配列番号 118 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 129 を含み；
(b) 前記 B C ループの配列が、配列番号 101 を含み、前記 D E ループの配列が、配列

番号 119 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 129 を含み；
(c) 前記 B C ループの配列が、配列番号 102 を含み、前記 D E ループの配列が、配列

番号 120 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 129 を含み；
(d) 前記 B C ループの配列が、配列番号 103 を含み、前記 D E ループの配列が、配列

番号 1 2 1 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 1 2 9 を含み；
(e) 前記 B C ループの配列が、配列番号 1 0 4 を含み、前記 D E ループの配列が、配列

番号 122 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 129 を含み；
(f) 前記 B C ループの配列が、配列番号 105 を含み、前記 D E ループの配列が、配列

(a) 前記 B C ループの配列が、配列番号 1 0 6 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 1 2 1 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 1 2 9 を含み；

(b) 前記 B, C ループの配列が 配列番号 1, 0, 7 を含み、前記 D, E ループの配列が 配列番号 1, 2, 3 を含み、前記 F, G ループの配列が、配列番号 1, 2, 9 を含み；

(ii) 前記 B C ループの配列が、配列番号 1 0 7 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 1 2 3 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 1 2 9 を含み；

(1) 前記 D C ループの配列が、配列番号 1 0 0 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 1 1 8 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 1 2 9 を含み；

(上) 前記 B C ループの配列が、配列番号 1 0 9 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 1 2 3 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 1 2 9 を含み；

(K) 前記 B ループの配列が、配列番号 110 を含み、前記 D ループの配列が、配列番号 111 を含む。

番号 1 2 1 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 1 2 9 を含み；

(1) 前記 B C ループの配列が、配列番号 1 1 1 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 1 2 3 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 1 3 0 を含み；

(m) 前記 B C ループの配列が、配列番号 1 0 8 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 1 2 1 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 1 2 9 を含み；

(n) 前記 B C ループの配列が、配列番号 1 1 2 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 1 2 4 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 1 2 9 を含み；

(o) 前記 B C ループの配列が、配列番号 1 1 3 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 1 2 5 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 1 2 9 を含み；

(p) 前記 B C ループの配列が、配列番号 1 1 4 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 1 1 8 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 1 2 9 を含み；

(q) 前記 B C ループの配列が、配列番号 1 1 5 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 1 2 6 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 1 2 9 を含み；

(r) 前記 B C ループの配列が、配列番号 1 1 6 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 1 2 7 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 1 2 9 を含み；または

(s) 前記 B C ループの配列が、配列番号 1 1 7 を含み、前記 D E ループの配列が、配列番号 1 2 8 を含み、前記 F G ループの配列が、配列番号 1 2 9 を含む、

(60) に記載の T n 3 足場。

(70) 前記 A B ループが、配列番号 1 3 6 を含む、(69) に記載の T n 3 足場。

(71) 前記 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、配列番号 2 0 、 2 2 、 2 4 、 2 6 、 2 8 、 3 0 、 3 2 、 3 4 、 3 6 、 3 8 、 4 0 、 4 2 および 1 4 6 からなる群から選択される配列を含む、(68) に記載の T n 3 足場。

(72) 前記 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、アミノ酸配列：

I E V K D V T D T T A L I T W X ₁ D X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ C E L T Y G I K
D V P G D R T T I D L W X ₉ H X ₁₀ A X ₁₁ Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C
R X ₁₂ G D M S S N P A K E T F T T (配列番号 1 6 7)

(式中、

(a) X ₁ は、アミノ酸残基セリン (S) またはロイシン (L) を表し；

(b) X ₂ は、アミノ酸残基アスパラギン酸 (D) またはグルタミン酸 (E) を表し；

(c) X ₃ は、アミノ酸残基ヒスチジン (H) 、イソロイシン (I) 、バリン (V) 、フェニルアラニン (F) またはトリプトファン (W) を表し；

(d) X ₄ は、アミノ酸残基アラニン (A) 、グリシン (G) 、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) を表し；

(e) X ₅ は、アミノ酸残基グルタミン酸 (E) 、ロイシン (L) 、グルタミン (Q) 、セリン (S) 、アスパラギン酸 (D) またはアスパラギン (N) を表し；

(f) X ₆ は、アミノ酸残基フェニルアラニン (F) またはチロシン (Y) を表し；

(g) X ₇ は、アミノ酸残基イソロイシン (I) 、バリン (V) 、ヒスチジン (H) 、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) を表し；

(h) X ₈ は、アミノ酸残基グリシン (G) 、トリプトファン (W) またはバリン (V) を表し；

(i) X ₉ は、アミノ酸残基トリプトファン (W) 、フェニルアラニン (F) またはチロシン (Y) を表し；

(j) X ₁₀ は、アミノ酸残基セリン (S) 、グルタミン (Q) 、メチオニン (M) またはヒスチジン (H) を表し；

(k) X ₁₁ は、アミノ酸残基トリプトファン (W) またはヒスチジン (H) を表し；

(l) X ₁₂ は、アミノ酸残基アルギニン (R) またはセリン (S) を表す) を含む、(60) に記載の T n 3 足場。

(73) 前記 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、配列番号 4 4 、 4 6 、 4 8 、 5 0 、 5 2 、 5 4 、 5 6 、 5 8 、 6 0 、 6 2 、 6 4 、 6 6 、 6 8 、 7 0 、 7 2 、 7 4 、 7 6 、 7 8 、 8 0 、 および 8 2 からなる群から選択される配列を含む、(69) に記載の T n 3 足場

10

20

30

40

50

。

(74) 前記 C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、アミノ酸配列：

I E V X₁ D V T D T T A L I T W X₂ X₃ R S X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ C E L
 X₁₁ Y G I K D V P G D R T T I D L X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅ Y V H Y S I G N L K
 P D T X₁₆ Y E V S L I C L T T D G T Y X₁₇ N P A K E T F T T (配列番号 171)
)

(式中、

- (a) X₁ は、アミノ酸残基リジン (K) またはグルタミン酸 (E) を表し；
 - (b) X₂ は、アミノ酸残基トレオニン (T) またはイソロイシン (I) を表し；
 - (c) X₃ は、アミノ酸残基アスパラギン (N) またはアラニン (A) を表し；
 - (d) X₄ は、アミノ酸残基セリン (S)、ロイシン (L)、アラニン (A)、フェニルアラニン (F) またはチロシン (Y) を表し；
 - (e) X₅ は、アミノ酸残基チロシン (Y)、アラニン (A)、グリシン (G)、バリン (V)、イソロイシン (I) またはセリン (S) を表し；
 - (f) X₆ は、アミノ酸残基チロシン (Y)、セリン (S)、アラニン (A) またはヒスチジン (H) を表し；
 - (g) X₇ は、アミノ酸残基アスパラギン (N)、アスパラギン酸 (D)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；
 - (h) X₈ は、アミノ酸残基ロイシン (L)、フェニルアラニン (F)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；
 - (i) X₉ は、アミノ酸残基ヒスチジン (H)、プロリン (P)、セリン (S)、ロイシン (L) またはアスパラギン酸 (D) を表し；
 - (j) X₁₀ は、アミノ酸残基グリシン (G)、フェニルアラニン (F)、ヒスチジン (H) またはチロシン (Y) を表し；
 - (k) X₁₁ は、アミノ酸残基アラニン (A) またはトレオニン (T) を表し；
 - (l) X₁₂ は、アミノ酸残基セリン (S)、アスパラギン (N)、グルタミン酸 (E)、アスパラギン (R) またはアスパラギン酸 (D) を表し；
 - (m) X₁₃ は、アミノ酸残基セリン (S)、グルタミン (Q)、トレオニン (T)、アスパラギン (N) またはアラニン (A) を表し；
 - (n) X₁₄ は、アミノ酸残基プロリン (P)、バリン (V)、イソロイシン (I) またはアラニン (A) またはアミノ酸無しを表し；
 - (o) X₁₅ は、アミノ酸残基イソロイシン (I) またはアミノ酸無しを表し；
 - (p) X₁₆ は、アミノ酸残基グルタミン酸 (E) またはリジン (K) を表し；
 - (q) X₁₇ は、アミノ酸残基セリン (S) またはアスパラギン (N) を表す)
- を含む、(60)に記載の T n 3 足場。

(75) 配列番号 134、135、205、206、207 および 208 からなる群から選択される配列を含む T n 3 足場。

(76) 配列番号 134、135、205、206、207 および 208 からなる群から選択される配列からなる T n 3 足場。

(77) 配列番号 201、202、203、および 204 からなる群から選択される配列を含む T n 3 足場。

(78) 配列番号 201、202、203、および 204 からなる群から選択される配列からなる T n 3 足場。

(79) 前記 C D 4 0 L が、ヒト C D 4 0 L である、(1) ~ (78) のいずれかに記載の T n 3 足場。

(80) 前記 C D 4 0 L が、膜結合 C D 4 0 L (配列番号 1)、可溶性 C D 4 0 L (配列番号 2)、またはその断片である、(79) に記載の T n 3 足場。

(81) C D 4 0 L に結合し、C D 4 0 L の C D 4 0 への結合を妨害する、(1) ~ (80) のいずれかに記載の T n 3 足場。

(82) C D 4 0 L に結合し、C D 4 0 媒介シグナリングを破壊する、(1) ~ (81) のいずれ

10

20

30

40

50

か一項に記載の Tn3 足場。

(83) C D 4 0 L 発現細胞を(1)~(82)のいずれかに記載の Tn3 足場と接触させることを含む C D 4 0 L 発現細胞の活性を変化させる方法であって、前記 Tn3 足場は、C D 4 0 L に結合し、C D 4 0 L の C D 4 0 への結合を妨害する方法。

(84) C D 4 0 L 発現細胞を(1)~(82)のいずれかに記載の Tn3 足場と接触させることを含む C D 4 0 媒介シグナリング応答を変化させる方法であって、前記 Tn3 足場は、C D 4 0 L に結合し、C D 4 0 媒介シグナリングを破壊する方法。

(85) 前記 C D 4 0 媒介シグナリング応答が、T 依存性免疫応答である、(84)に記載の方法。

(86) 約 1 μM 以下、または約 500 nM 以下、または約 100 nM 以下、または約 50 nM 以下、または約 25 nM 以下、または約 10 nM 以下、または約 5 nM 以下、または約 2 nM 以下の親和性 (K_d) で C D 4 0 L に結合する、(1)~(82)のいずれかに記載の Tn3 足場。 10

(87) C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、配列番号 2 の 142 から 155、200 から 230、または 247 から 251 位に局在するアミノ酸を含む C D 4 0 L エピトープに特異的に結合する、(1)~(82)および(86)のいずれかに記載の Tn3 足場。

(88) C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、C D 4 0 L アミノ酸 E 142、Y 146、M 148、N 151、L 155、R 200、R 203、および E 230 と相互作用する、(1)~(61)、(65)~(67)、(69)、(70)、(73)、(74)、(77)、および(78)のいずれかに記載の Tn3 足場。 20

(89) C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、C D 4 0 L アミノ酸 R 203、I 204、V 247、H 249、および T 251 と相互作用する、(1)~(64)、(68)、(71)、(72)、(75)および(76)のいずれかに記載の Tn3 足場。

(90) C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットが、C D 4 0 L アミノ酸 S 245、V 247、H 249、および T 251 と相互作用する、(1)~(64)、(68)、(71)、(72)、(75)および(76)のいずれかに記載の Tn3 足場。

(91) C D 4 0 L アミノ酸 E 142、Y 146、M 148、N 151、L 155 が、第 1 の C D 4 0 L 分子中に局在し、アミノ酸 R 200、R 203、および E 230 が、第 2 の C D 4 0 L 分子中に局在する、(88)に記載の Tn3 足場。

(92) C D 4 0 L アミノ酸 R 203 および I 204 が、第 1 の C D 4 0 L 分子中に局在し、C D 4 0 L アミノ酸 V 247、H 249、および T 251 が、第 2 の C D 4 0 L 分子中に局在する、(89)に記載の Tn3 足場。 30

(93) (1)~(82)および(86)~(92)のいずれかに記載の Tn3 足場をコードする単離核酸分子。

(94) (93)に記載の核酸を含む発現ベクター。

(95) (94)に記載のベクターを含む宿主細胞。

(96) 前記核酸分子によりコードされる Tn3 足場が発現される条件下で(95)に記載の宿主細胞を培養することを含む、Tn3 足場を産生する方法。

(97) (1)~(82)および(86)~(92)のいずれかに記載の Tn3 足場および薬学的に許容可能な賦形剤を含む組成物。 40

(98) 有効量の(96)に記載の組成物を投与することを含む、自己免疫疾患の予防、治療、改善、または管理が必要とされる患者における自己免疫疾患を予防、治療、改善、または管理する方法。

(99) 治療有効量の(93)に記載の組成物を患者に投与することを含む、自己免疫疾患有する患者に投与されるコルチコステロイドの頻度および量を低減させる方法。

(100) 前記自己免疫疾患が、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および精巣炎、シェーグレン症候群、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性および他の網膜症、水晶体後線維増殖症、加齢性黄斑変性、血管新生性緑内障、血管腫、甲状腺過形成（グレーブス病を含む）、角膜および他の組織移植、ならびに慢性炎症、敗 50

血症、関節リウマチ、腹膜炎、クローン病、再灌流損傷、敗血症、内毒素ショック、囊胞性線維症、心内膜炎、乾癬、関節炎（例えば、乾癬性関節炎）、アナフィラキシーショック、臓器虚血、再灌流損傷、脊髄損傷および同種移植片拒絶反応、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスプルーピ膚炎、慢性疲労免疫機能不全症候群（C F I D S）、慢性炎症性脱髓多発性神経障害、チャーグストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、C R E S T 症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛・線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（I T P）、I g A 神経障害、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、1型または免疫介在性糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフマン症候群、全身性エリテマトーデス、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、プロトウ膜炎、血管炎、例えば、疱疹状皮膚炎血管炎、白斑およびウェゲナー肉芽腫症からなる群から選択される、(98)または(99)のいずれかに記載の方法。

(101) 前記自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデス（S L E）である、(98)または(99)のいずれかに記載の方法。

(102) 追加の治療法をさらに含み、前記治療法は、免疫療法、生物療法、化学療法、放射線療法、または小分子薬物療法である、(98)または(99)のいずれかに記載の方法。

(103) 可溶性C D 4 0 L（配列番号2）との複合体中の配列番号2 0からなるT n 3足場を含むタンパク質結晶であって、P 2₁ 2₁ 2₁ 斜方晶空間群およびa = 85.69、b = 90.64、c = 95.56 の単位格子寸法、+ / - 0.1%における結晶格子を有するタンパク質結晶。

(104) 前記結晶の非対称単位が、C D 4 0 LのトリマーおよびT n 3足場の3つの分子を含む、(103)に記載のタンパク質結晶。

(105) 構造座標の決定のためのX線を、3.2 以下の値の分解能に回折させる、(103)に記載のタンパク質結晶。

(106) 可溶性C D 4 0 L（配列番号2）との複合体中の配列番号6 8からなるT n 3足場を含むタンパク質結晶であって、P 2₁ 3立方晶空間群およびa = b = c = 97.62 の単位格子寸法、+ / - 0.1%における結晶格子を有するタンパク質結晶。

(107) 前記結晶の非対称単位が、1つのC D 4 0 L分子および1つのT n 3足場分子を含む、(106)に記載のタンパク質結晶。

(108) 構造座標を決定するためのX線を、2.7 以下の値の分解能に回折させる、(106)に記載のタンパク質結晶。

(109) 可溶性C D 4 0 L（配列番号2）との複合体中の配列番号2 8または1 4 6からなるT n 3足場を含むタンパク質結晶であって、P 3 2 1空間群および、a = 95.53、b = 93.53、c = 66.69 の単位格子寸法、+ / - 0.1%における結晶格子を有するタンパク質結晶。

(110) 前記結晶の非対称単位が、1つのC D 4 0 L分子および1つのT n 3足場分子を含む、(109)に記載のタンパク質結晶。

(111) 構造座標を決定するためのX線を、2.8 以下の値の分解能に回折させる、(109)に記載のタンパク質結晶。

(112) 可溶性C D 4 0 L（配列番号2）との複合体中の配列番号6 8および配列番号2 8または1 4 6からなる2つの異なるT n 3足場を含むタンパク質結晶であって、P 2₁ 立方晶空間群およびa = 80.32、b = 143.48、c = 111.27、= 98.22 の単位格子寸法、+ / - 0.1%における結晶格子を有するタンパク質結晶。

(113) 前記結晶の非対称単位が、2つのC D 4 0 Lトリマーおよび6つのそれぞれのT

10

20

30

40

50

n 3 足場分子を含む、(112)のタンパク質結晶。

(114) 構造座標を決定するための X 線を、1 . 9 以下の値の分解能に回折させる、(112)に記載のタンパク質結晶。

(115) シッティングドロップ蒸気拡散により結晶化されている、(103) ~ (114)のいずれか一項に記載のタンパク質結晶。

(116) (a) C D 4 0 Lとの複合体中の C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む T n 3 足場を含むある容量の液体を、沈殿剤を含むある容量のリザーバー溶液と混合すること；および

(b) 工程 (a)において得られた混合物を密閉容器中で、タンパク質結晶が形成するまで結晶化に好適な条件下でインキュベートすること 10 を含む、タンパク質結晶を作製する方法。

(117) 前記タンパク質結晶を、シッティングドロップ蒸気拡散により產生する、(116)に記載の方法。

(118) 前記 T n 3 足場が、配列番号 2 0 、配列番号 2 8 、配列番号 6 8 または配列番号 1 4 6 を含む、(116)に記載の方法。

(119) (a) データを、C D 4 0 L と複合体化された C D 4 0 L 特異的モノマーサブユニットを含む T n 3 足場のタンパク質結晶の一部の構造についてのグラフ三次元表示に変換するため；および

(b) 前記グラフ三次元表示の表示をもたらすための、

機械可読命令が符号化されたデータ保存材料を含む機械可読データ保存媒体。

(120) 前記 T n 3 足場が、配列番号 2 0 、配列番号 2 8 、配列番号 6 8 または配列番号 1 4 6 を含む、(119)に記載の機械可読データ保存媒体。

(121) 前記タンパク質結晶が、(103)に記載の結晶、(106)に記載の結晶、(118)に記載の結晶、またはそれらの任意の組合せである、(119)に記載の機械可読データ保存媒体。

【 0 4 7 0 】

配列

【 化 5 】

配列番号1

CD40L sp|P29965|CD40L_ヒト-膜形態

細胞質ドメイン = 1~20

シグナルアンカー-II型膜タンパク質領域 = 21~46

可溶性形態 = 113~261

MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRRLDKIEDERNLH
EDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNP
QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN
REASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVN
VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL

30

配列番号2

CD40L-可溶性形態は、共結晶化構築物にも対応する

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY
AQVTFCNSREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQ
PGASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL

40

配列番号3

Tn3(未改変ループを有する)

IEVKDVDTTALITWFKPLAEIDGCELYGIKDVPGRRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDE
YEVSLICRRGDMSSNPAKETFTT

【化6】

配列番号4 テネイシンCの第3FnIII、ABループ(Tn3) KDVTDTT	
配列番号5 テネイシンCの第3FnIII、BCループ(Tn3) FKPLAEIDG	
配列番号6 テネイシンCの第3FnIII、CDループ(Tn3) KDVPGDR	10
配列番号7 テネイシンCの第3FnIII、DEループ(Tn3) TEDENQ	
配列番号8 テネイシンCの第3FnIII、EFループ(Tn3) GNLKPDT	
配列番号9 テネイシンCの第3FnIII、FGループ(Tn3);さらに309FGwt、340、341、342、343、 344、345、346、347、348、および349クローンにおけるもの RRGDMSSNPA	20
配列番号10 テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖A(Tn3) RLDAPSQIEV	
配列番号11 テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖A(Tn3)N末端トランケーション IEV	
配列番号12 テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖B(Tn3) ALITW	
配列番号13 テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖C(Tn3/バリエント) CELAYGI	30
配列番号14 テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖C(Tn3) CELTYGI	
配列番号15 テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖D(Tn3) TTIDL	
配列番号16 テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖E(Tn3) YSI	40
配列番号17 テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖F(Tn3) YEVSLLC	
配列番号18 テネイシンCの第3FnIII、ベータ鎖G(Tn3) KETFTT	

【化7】

配列番号19

クローン309-ナイーブTn3ライブリーから単離された親クローン
 AIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCELTGIKDVPGRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
 EYEVSPLICYTDQEAGNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

配列番号20

クローン309-ナイーブTn3ライブリーから単離された親クローン(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCELTGIKDVPGRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
 YEVSPLICYTDQEAGNPAKETFTT

配列番号21

クローン309FGwt-「ヒト化」FGループを有する親クローン
 AIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCELTGIKDVPGRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
 EYEVSPLICRRCGDMSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

10

配列番号22

クローン309FGwt-「ヒト化」FGループを有する親クローン(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCELTGIKDVPGRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
 YEVSPLICRRCGDMSNPAKETFTT

配列番号23

クローン340-親和性成熟バリアント
 AIEVKDVTDTTALITWSDDFDNYEWCELTGIKDVPGRRTTIDLWYHMAWYSIGNLKPDT
 YEVSPLICRRCGDMSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

20

配列番号24

クローン340-親和性成熟バリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVKDVTDTTALITWSDDFDNYEWCELTGIKDVPGRRTTIDLWYHMAWYSIGNLKPDT
 YEVSPLICRRCGDMSNPAKETFTT

配列番号25

クローン341-親和性成熟バリアント
 AIEVKDVTDTTALITWSDDFADYVWCELTGIKDVPGRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
 YEVSPLICRRCGDMSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

配列番号26

クローン341-親和性成熟バリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVKDVTDTTALITWSDDFADYVWCELTGIKDVPGRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
 YEVSPLICRRCGDMSNPAKETFTT

30

配列番号27

クローン342-親和性成熟バリアント(WT FGループを有する)
 AIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYWVCELTGIKDVPGRRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDT
 YEVSPLICRRCGDMSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

配列番号28

クローン342-親和性成熟バリアント(WT FGループを有し:N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVKDVTDTTALITWSDDFGEYWVCELTGIKDVPGRRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDT
 YEVSPLICRRCGDMSNPAKETFTT

配列番号29

クローン343-親和性成熟バリアント
 AIEVKDVTDTTALITWLDDWGSYHVCELTGIKDVPGRRTTIDLWYHQAWYSIGNLKPDT
 YEVSPLICRRCGDMSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH

40

【化8】

配列番号30

クローン343-親和性成熟バリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVKDVTDTTALITWLDDWGSYHVCETYGIKDVPGDRTTIDLWYHQAWYSIGNLKPDT
 YEVS LICRRGDMSSNPAKETFTT

配列番号31

クローン344-親和性成熟バリアント
 AIEVKDVTDTTALITWSDEVGDYVVCELYGIKDVPGDRTTIDLWYHMAWYSIGNLKPDT
 YEVS LICRRGDMSSNPAKETFTTGGTLGHHHHHHH

配列番号32

クローン344-親和性成熟バリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVKDVTDTTALITWSDEVGDYVVCELYGIKDVPGDRTTIDLWYHMAWYSIGNLKPDT
 YEVS LICRRGDMSSNPAKETFTT

10

配列番号33

クローン345-親和性成熟バリアント
 AIEVKDVTDTTALITWSDDFAEYVGCELYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
 YEVS LICRRGDMSSNPAKETFTTGGTLGHHHHHHH

配列番号34

クローン345-親和性成熟バリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVKDVTDTTALITWSDDFAEYVGCELYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
 YEVS LICRRGDMSSNPAKETFTT

20

配列番号35

クローン346-親和性成熟バリアント
 AIEVKDVTDTTALITWSDDFEYYVVCETYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
 YEVS LICRRGDMSSNPAKETFTTGGTLGHHHHHHH

配列番号36

クローン346-親和性成熟バリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVKDVTDTTALITWSDDFEYYVVCETYGIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
 YEVS LICRRGDMSSNPAKETFTT

30

配列番号37

クローン347-親和性成熟バリアント
 AIEVKDVTDTTALITWSDEVGQYVGCELYGIKDVPGDRTTIDLWYHMAWYSIGNLKPDT
 YEVS LICRRGDMSSNPAKETFTTGGTLGHHHHHHH

配列番号38

クローン347-親和性成熟バリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVKDVTDTTALITWSDEVGQYVGCELYGIKDVPGDRTTIDLWYHMAWYSIGNLKPDT
 YEVS LICRRGDMSSNPAKETFTT

配列番号39

クローン348-親和性成熟バリアント
 AIEVKDVTDTTALITWSDDIGLYVVCETYGIKDVPGDRTTIDLWFHQAWYSIGNLKPDT
 YEVS LICRRGDMSSNPAKETFTTGGTLGHHHHHHH

40

配列番号40

クローン348-親和性成熟バリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVKDVTDTTALITWSDDIGLYVVCETYGIKDVPGDRTTIDLWFHQAWYSIGNLKPDT
 YEVS LICRRGDMSSNPAKETFTT

【化9】

配列番号41

クローン349-親和性成熟バリアント

AIEVKDVTDTTALITWSDEHAEFIGCELYGIKDVPGRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
EYEVSPLICRRCGMSSNPAKETFTGGGTGLGHHHHHHHH

配列番号42

クローン349-親和性成熟バリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
IEVKDVTDTTALITWSDEHAEFIGCELYGIKDVPGRRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDT
EYEVSPLICRRCGMSSNPAKETFTGGGTGLGHHHHHHHH

配列番号43

クローン311-ナイーブTn3ライブラリーから単離された親クローン

AIEVKDVTDTTALITWTNRSSYYNLHGCELYGIKDVPGRRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP
DTEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTGGGTGLGHHHHHHHH

10

配列番号44

クローン311-ナイーブTn3ライブラリーから単離された親クローン(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
IEVKDVTDTTALITWTNRSSYYNLHGCELYGIKDVPGRRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP
TEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTGGGTGLGHHHHHHHH

配列番号45

クローン311K4E-第1の親和性成熟ラウンドからのバリアント

AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYYNLHGCELYGIKDVPGRRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP
DTEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTGGGTGLGHHHHHHHH

20

配列番号46

クローン311K4E-第1の親和性成熟ラウンドからのバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
IEVEDVTDTTALITWTNRSSYYNLHGCELYGIKDVPGRRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP
TEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTGGGTGLGHHHHHHHH

配列番号47

クローン311K4E_1-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント

AIEVEDVTDTTALITWINRSYYADLHGCELYGIKDVPGRRTTIDLQIYVHYSIGNLKP
DTYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTGGGTGLGHHHHHHHH

30

配列番号48

クローン311K4E_1-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
IEVEDVTDTTALITWINRSYYADLHGCELYGIKDVPGRRTTIDLQIYVHYSIGNLKP
TKYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTGGGTGLGHHHHHHHH

配列番号49

クローン311K4E_2-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント

AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSHLDGCELYGIKDVPGRRTTIDLSSAAIVHYSIGNLKP
PDTEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTGGGTGLGHHHHHHHH

配列番号50

クローン311K4E_2-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
IEVEDVTDTTALITWTNRSSYSHLDGCELYGIKDVPGRRTTIDLSSAAIVHYSIGNLKP
DTEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTGGGTGLGHHHHHHHH

配列番号51

クローン311K4E_3-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント

AIEVEDVTDTTALITWINRSYYHNFPHCELAYGIKDVPGRRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP
DTEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTGGGTGLGHHHHHHHH

40

【化10】

配列番号52

クローン311K4E_3-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVEDVTDTTALITWINRSSYHNFPHCELAYGIKDVPGDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP
 TEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTT

配列番号53

クローン311K4E_4-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
 AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNHLCGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNNIYVHYSIGNLKP
 DTEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

配列番号54

クローン311K4E_4-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNHLCGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNNIYVHYSIGNLKP
 TEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTT

10

配列番号55

クローン311K4E_5-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
 AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNFHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP
 DTEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

配列番号56

クローン311K4E_5-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNFHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP
 TEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTT

20

配列番号57

クローン311K4E_7-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
 AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYFYSNLHGCELTYGIKDVPGDRTTIDLNPQPYVHYSIGNLKP
 DTEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

配列番号58

クローン311K4E_7-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVEDVTDTTALITWTNRSSYFYSNLHGCELTYGIKDVPGDRTTIDLNPQPYVHYSIGNLKP
 TEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTT

30

配列番号59

クローン311K4E_8-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
 AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYAYLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNPQPYVHYSIGNLKP
 DTEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

配列番号60

クローン311K4E_8-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVEDVTDTTALITWTNRSSYAYLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNPQPYVHYSIGNLKP
 TEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTT

配列番号61

クローン311K4E_9-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
 AIEVEDVTDTTALITWINRSSYANLHGCELTYGIKDVPGDRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP
 DTEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

40

配列番号62

クローン311K4E_9-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVEDVTDTTALITWINRSSYANLHGCELTYGIKDVPGDRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP
 TEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTT

【化11】

配列番号63

クローン311K4E_10-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYANYHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKP
DTEYEVSЛИCLTDGTYSNPAKETFTGGGTLGHHHHHHHH

配列番号64

クローン311K4E_10-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
IEVEDVTDTTALITWTNRSSYANYHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKP
TEYEVSЛИCLTDGTYSNPAKETFTGGGTLGHHHHHHHH

配列番号65

クローン311K4E_11-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYANLPGECELYGIKDVPGDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP
DTEYEVSЛИCLTDGTYSNPAKETFTGGGTLGHHHHHHHH

10

配列番号66

クローン311K4E_11-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
IEVEDVTDTTALITWTNRSSYANLPGECELYGIKDVPGDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP
TEYEVSЛИCLTDGTYSNPAKETFTGGGTLGHHHHHHHH

配列番号67

クローン311K4E_12-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKP
DTEYEVSЛИCLTDGTYNNAKETFTGGGTLGHHHHHHHH

20

配列番号68

クローン311K4E_12-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
IEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKP
TEYEVSЛИCLTDGTYNNAKETFTGGGTLGHHHHHHHH

配列番号69

クローン311K4E_13-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
AIEVEDVTDTTALITWINRSSYANLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNSPYVHYSIGNLKP
DTEYEVSЛИCLTDGTYSNPAKETFTGGGTLGHHHHHHHH

30

配列番号70

クローン311K4E_13-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
IEVEDVTDTTALITWINRSSYANLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKP
TEYEVSЛИCLTDGTYSNPAKETFTGGGTLGHHHHHHHH

配列番号71

クローン311K4E_14-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
AIEVEDVTDTTALITWTARSAYSHHYCELYGIKDVPGDRTTIDLRQPYVHYSIGNLKP
DTEYEVSЛИCLTDGTYSNPAKETFTGGGTLGHHHHHHHH

40

配列番号72

クローン311K4E_14-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
IEVEDVTDTTALITWTARSAYSHHYCELYGIKDVPGDRTTIDLRQPYVHYSIGNLKP
TEYEVSЛИCLTDGTYSNPAKETFTGGGTLGHHHHHHHH

配列番号73

クローン311K4E_15-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYANYHHCELYGIKDVPGDRTTIDLELYVHYSIGNLKP
DTEYEVSЛИCLTDGTYSNPAKETFTGGGTLGHHHHHHHH

【化12】

配列番号74

クローン311K4E_15-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVEDVTDTTALITWTNRSSYANYHHCELTGIKDVPGDRTTIDLELYVHYSIGNLKPDT
 EYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTT

配列番号75

クローン311K4E_16-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
 AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSDLPGCELTGIKDVPGDRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP
 DTEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

10

配列番号76

クローン311K4E_16-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVEDVTDTTALITWTNRSSYSDLPGCELTGIKDVPGDRTTIDLSSPYVHYSIGNLKP
 TEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTT

配列番号77

クローン311K4E_19-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
 AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYNSHFCELTGIKDVPGDRTTIDLNTPYVHYSIGNLKP
 DTEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

配列番号78

クローン311K4E_19-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVEDVTDTTALITWTNRSSYNSHFCELTGIKDVPGDRTTIDLNTPYVHYSIGNLKP
 TEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTT

20

配列番号79

クローン311K4E_20-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
 AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYANFHGCELTGIKDVPGDRTTIDLEQVYVHYSIGNLKP
 DTEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

配列番号80

クローン311K4E_20-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVEDVTDTTALITWTNRSSYANFHGCELTGIKDVPGDRTTIDLEQVYVHYSIGNLKP
 TEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTT

30

配列番号81

クローン311K4E_21-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント
 AIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLPGCELTGIKDVPGDRTTIDLNOVYVHYSIGNLKP
 DTEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHHH

配列番号82

クローン311K4E_21-第2の親和性成熟ラウンドからのクローンバリアント(N末端A、ならびにC末端リンカーおよびHis8タグを有さない)
 IEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLPGCELTGIKDVPGDRTTIDLNOVYVHYSIGNLKP
 TEYEVSPLICLTTDGTYSNPAKETFTT

配列番号83

クローン309および309FGwt-BCループ
 SDFGHYDG

40

配列番号84

クローン340-BCループ
 SDDFDNYEW

配列番号85

クローン341-BCループ
 SDDFADYVW

【化13】

配列番号86 クローン342-BCループ SDDFGEYVW	
配列番号87 クローン343-BCループ LDDWGSYHV	
配列番号88 クローン344-BCループ SDEVGDYVV	10
配列番号89 クローン345-BCループ SDDFAEYVG	
配列番号90 クローン346-BCループ SDDFEEYVV	
配列番号91 クローン347-BCループ SDEVGQYVG	
配列番号92 クローン348-BCループ SDDIGLYVV	20
配列番号93 クローン349-BCループ SDEHAEFIG	
配列番号94 クローン309、309FGwt、341、345、346、349-DEループ WWHSAW	
配列番号95 クローン340、344、347-DEループ WYHMAW	30
配列番号96 クローン342-DEループ WYHHAH	
配列番号97 クローン343-DEループ WYHQAW	
配列番号98 クローン348-DEループ WFHQAW	
配列番号99 クローン309-FGループ YTDQEAGNPA	40
配列番号100 クローン311、311K4E-BCループ TNRSSYYNLHG	

【化14】

配列番号101 クローン311K4E_1-BCループ INRSYYADLHG	
配列番号102 クローン311K4E_2-BCループ TNRSSYSHLDG	
配列番号103 クローン311K4E_3-BCループ INRSSYHNFPN	10
配列番号104 クローン311K4E_4-BCループ TNRSSYSNHLG	
配列番号105 クローン311K4E_5-BCループ TNRSSYSNFHG	
配列番号106 クローン311K4E_7-BCループ TNRSFYSNLHG	20
配列番号107 クローン311K4E_8-BCループ TNRSSYAYLHG	
配列番号108 クローン311K4E_9、311K4E_13-BCループ INRSSYANLHG	
配列番号109 クローン311K4E_10-BCループ TNRSSYANYHG	
配列番号110 クローン311K4E_11-BCループ TNRSSYANLPG	30
配列番号111 クローン311K4E_12-BCループ TNRSSYSNLHG	
配列番号112 クローン311K4E_14-BCループ TARSAYSHHHY	
配列番号113 クローン311K4E_15-BCループ TNRSSYANYHH	
配列番号114 クローン311K4E_16-BCループ TNRSSYSDLPG	40
配列番号115 クローン311K4E_19-BCループ THRAYSNSHSE	
配列番号116 クローン311K4E_20-BCループ TNRSLYANFHG	

【化15】

配列番号117 クローン311K4E_21-BCループ TNRSSYSNLPG	
配列番号118 クローン311、311K4E、311K4E_9、311K4E_16-DEループ SSPYVH	
配列番号119 クローン311K4E_1-DEループ DQIYVH	10
配列番号120 クローン311K4E_2-DEループ SAAIYVH	
配列番号121 クローン311K4E_3、311K4E_5、311K4E_11、311K4E_13-DEループ NSPYVH	
配列番号122 クローン311K4E_4-DEループ NNIYVH	
配列番号123 クローン311K4E_7、311K4E_8、311K4E_10、311K4E_12-DEループ NQPYVH	20
配列番号124 クローン311K4E_14-DEループ RQPYVH	
配列番号125 クローン311K4E_15-DEループ ELYVH	
配列番号126 クローン311K4E_19-DEループ NTPYVH	30
配列番号127 クローン311K4E_20-DEループ EQVYVH	
配列番号128 クローン311K4E_21-DEループ NQVYVH	
配列番号129 クローン311、311K4E、311K4E_1、311K4E_2、311K4E_3、311K4E_4、311K4E_5、311K4E_7、311K4E_8、311K4E_9、311K4E_10、 311K4E_11、311K4E_13、311K4E_14、311K4E_15、311K4E_16、311K4E_19、311K4E_20、311K4E_21-FGループ LTTDGTYSNPA	40
配列番号130 クローン311K4E_12-FGループ LTTDGTYNNPA	

【化16】

配列番号131

2GSリンカー-(Gly4Ser)2
GGGGSGGGGS

配列番号132

3GSリンカー-(Gly4Ser)3
GGGGSGGGSGGGGS

配列番号133

HSAC34S突然変異体

Cys->Ser突然変異位置を下線により示す

10

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAE
 NCDKSLHHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE PERNECFLQHKDDNPNLPRLVPEV
 DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPFYAPELLFFAKRYKAATTECCQAADKAACLLP
 KLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKGERAFKAWAVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLTK
 VHTECCHGDLLEADDRADLAKYICENQDSISSKLKECPLLEKSHCIAEVENDEMPA
 DLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVF~~LG~~FLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKC
 CAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVST
 PTLVEVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVNLQCLVHL~~E~~KTPVSDRTKCCTES
 LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKAT
 KEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

配列番号134

342-2GS-HSAC34S—価構築物

20

HSAC34Sを下線により示す

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTGYIKDVPGRRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPD
 TEYEVSЛИCRSGDMSSNPAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVL
IAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAE~~N~~CDKSLHHTLFGDKLCTVATLRETYG
 EMADCCAKQE PERNECFLQHKDDNPNLPRLVPEV~~D~~VMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARR
 HPFYAPELLFFAKRYKAATTECCQAADKAACLLP~~K~~LDELRDEGKASSAKQRLKCASLQK
 GERAFKAWAVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEADDRADLAKYIC
 ENQDSISSKLKECPLLEKSHCIAEVENDEMPA~~L~~PSLAADFVESKDVKNYAEAKDVF
 FLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQ
 NLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRLGKVGSKCKHPEAKR
 MPCaedYLSVVNLQCLVHL~~E~~KTPVSDRTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
 TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKE
 TCFAEEGKKLVAASQAALGL

配列番号135

30

342-3GS-342-2GS-HSAC34S二価構築物

HSAを下線により示す

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTGYIKDVPGRRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPD
 TEYEVSЛИCRSGDMSSNPAKETFTTGGGGSGGGGS~~R~~LDAPSQIEVKDVTDTTALI
 TWSDDFGEYVWCELTGYIKDVPGRRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDTEYEVSЛИCRSGDMS
 S~~N~~PAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHV
 KLVNEVTEFAKTCVADESAE~~N~~CDKSLHHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE PERNE
 CFLQHKDDNPNLPRLVPEV~~D~~VMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPFYAPELLFFAKR
 YKAATTECCQAADKAACLLP~~K~~LDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKGERAFKAWAVARLS
 QRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE
 KPLLEKSHCIAEVENDEMPA~~L~~PSLAADFVESKDVKNYAEAKDVF~~L~~GMFLYEYARRHPD
 YSVVLLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGE
 YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVNLQ
 CVLHEKTPVSDRTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
 RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
 AALGL

40

配列番号136

311クローンファミリーABループN末端Eバリアント
EDVTDTT

【化17】

配列番号137

311クローンファミリーEFループC末端Kバリアント
GNLKPDTK

配列番号138

HSAヒト全長

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIQAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAE
 NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLRPEV
 DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPFYAPELLFFAKRYKAACFTTECCQAADKAACLLP
 KLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTK
 VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA
 DLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVFVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKC
 CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKVPQVST
 PTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES
 LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKAT
 KEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFACEEGKKLVAASQAALGL

10

配列番号139

309FGループバリアント(RR→RS突然変異体)は、342構築物中に存在し得る
RSGDMSSNPA

配列番号140

2GX!リンカー-(Gly4X)2; X=Ala、Gly、Leu、Ile、Val
GGGGXGGGGXGGGX

20

配列番号141

3GX!リンカー-(Gly4X)3; X=Ala、Gly、Leu、Ile、Val
GGGGXGGGGXGGGX

配列番号142

G10!リンカー-(Gly4Gly)2
GGGGGGGGGGGG

配列番号143

G15!リンカー-(Gly4Gly)3
GGGGGGGGGGGGGGGG

30

配列番号144

342-G10-HSAC34S—価構築物2-全Gly!リンカー

HSAを下線により示す

SQIEVKDVTDTALITWSDDFGEYVWCELTGYIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKD
 TEYEVS LICRGDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
AFAQYLQOSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
EMADCCAKQE PERNECFLQHKDDNPNLPRLRPEV DVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARR
HPFYAPELLFFAKRYKAACFTTECCQAADKAACLLP KLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQK
FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLA
KYIC ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA
DLP SLAADFVESKDVKNYAEAKDVFVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKC
CAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKVPQVST
PTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES
LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKAT
KEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFACEEGKKLVAASQAALGL

40

【化18】

配列番号145

342-G15-342-G10-HSAC34S二価構築物2-全Gly'リンクー

HSAを下線により示す

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTGYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKD
 TEYEVS LICRSGDMSSNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGGGGRLDAPSQIEVKDVTDTTALI
 TWSSDFGEYVWCELTGYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKDTEYEVS LICRSGDM
 SNSPAKETFTTGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHV
 KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPE
 NE CFLQHKDDNPNLPRLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFAPELLFFAKR
 YKAATTECQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQLKCAASLOKFGERAFKAWAVARLS
QRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE
KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHED
YSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPONLIKONCELFEQLGE
YKFQNALLVRYTTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL
CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKE
RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQ
AALGL

10

配列番号146

クローン342-親和性成熟バリアント(下線により示されるRR→RSのFGループバリアントを有する)

IEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTGYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKD
TEYEVS LICRSGDMSSNPAKETFTT

20

配列番号147

Gly-Serリンクーモジュール、 $(G_4S)_n$ (n=1-7); $(G_4S)_n$ モジュール(n=1)を示す

GGGGS

配列番号148

Glyリンクーモジュール、 $(G_5S)_n$ (n=1-7); $(G_5S)_n$ モジュール(n=1)を示す

GGGGG

配列番号149

Gly-Alaリンクーモジュール、 $(G_4A)_n$ (n=1-7); $(G_4A)_n$ モジュール(n=1)を示す

GGGGA

配列番号150

ポリヒスチジンタグ(H₈)-精製に有用なTn3足場の任意選択構成要素を追加のリンクー残基と組み合わせることができる。

HHHHHHHH

30

配列番号151

リンクー-ポリヒスチジンタグ-精製に有用なTn3足場の任意選択構成要素

GGGSHHHHHHHH

配列番号152

成熟MSA野生型

EAHKSEIAHYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESA
 NCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQE PERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEA
 EAMCTSFKENPTTGMGHYLHEVARRH PYFAPEL LYYAEQYNEIL TQCCAEDKESCLTP
 KLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERA FKA WA VARLSQTFPNADFAEITKLATDLTK
 VNKECCHGDLLECADRAELAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPA
 DLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKC
 CAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVST
 PTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGS
 LVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAE LVKHKPKAT
 AEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALA

40

【化19】

配列番号153

成熟MSA-C34S/C579S Cys突然変異体:突然変異残基を下線により示す
EAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGVLVIAFSQYLQKSSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAA
NCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEA
EAMCTSFKENPTTFMGHLYHEVARRHYPFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTP
KLDGVKEALVSSVRQRMKCSSMOKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTK
VNKECCHGDLLECADRAELAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLKKAHCLSEVEHDTMPA
DLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVF~~L~~GTFLYEYSRRHPDYSVSLLRLAKYEATLEKC
CAEANPPACYGT~~V~~LAEFQPLVEEPK~~N~~LNKTNC~~D~~LYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVST
PTLVEAARNLGRVGT~~K~~CCTL~~P~~EDQRLPCVEDYLSAILNRV~~C~~LLHEKTPVSEHVTKCCSGS
LVERRPCFSALTVDETYVP~~E~~KFKAETFTFHSDICTL~~P~~EKEKQIKKQTALAELVKH~~K~~PKAT
AEQLKTVMDDFAQFLDTCCAADKDTCF~~S~~TEGP~~N~~LVTRSKDALA

10

配列番号154

クローンM13;BC、DE、FGループを下線により示す
IEVKDVTD~~T~~TALITWHDAFGYDFGCELT~~Y~~GIKDVP~~G~~DRTTIDLPPDHFHNYSIGNLKPD~~T~~
YEVSPLICANDHGFD~~S~~NP~~A~~KETFTT

配列番号155

クローンM13N49Q;N49Q突然変異を下線により示す
IEVKDVTD~~T~~TALITWHDAFGYDFGCELT~~Y~~GIKDVP~~G~~DRTTIDLPPDHFHQYSIGNLKPD~~T~~
YEVSPLICANDHGFD~~S~~NP~~A~~KETFTT

配列番号156

M13N49Q-1GS-M13N49Q二価構築物;N49Q突然変異を下線により示す
SQIEVKDVTD~~T~~TALITWHDAFGYDFGCELT~~Y~~GIKDVP~~G~~DRTTIDLPPDHFHQYSIGNLKPD
TEYEVSPLICANDHGFD~~S~~NP~~A~~KETFTTGGGGSR~~D~~APSQIEVKDVTD~~T~~ALITWHDAFGY
DFGCELT~~Y~~GIKDVP~~G~~DRTTIDLPPDHFHQYSIGNLKPD~~T~~YEVSPLICANDHGFD~~S~~NP~~A~~KET
FTT

20

配列番号157

M13N49Q-3GS-MSA-C34S/C579S一価構築物:突然変異を下線により示す
SQIEVKDVTD~~T~~TALITWHDAFGYDFGCELT~~Y~~GIKDVP~~G~~DRTTIDLPPDHFHQYSIGNLKPD
TEYEVSPLICANDHGFD~~S~~NP~~A~~KETFTTGGGGSR~~D~~APSQIEVKDVTD~~T~~ALITWHDAFGY
DFGCELT~~Y~~GIKDVP~~G~~DRTTIDLPPDHFHQYSIGNLKPD~~T~~YEVSPLICANDHGFD~~S~~NP~~A~~KET
FTTGGGGSR~~D~~APSQIEVKDVTD~~T~~ALITWHDAFGY
LAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLKKAHCLSEVEHDTMPADLP~~A~~IAADFVEDQEVCKNY
AEAKDVF~~L~~GTFLYEYSRRHPDYSVSLLRLAKYEATLEKCCAEANPPACYGT~~V~~LAEFQ~~P~~
LVEEPK~~N~~LNKTNC~~D~~LYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGT~~K~~C~~C~~
LPEDQRLPCVEDYLSAILNRV~~C~~LLHEKTPVSEHVTKCCSGS~~L~~VERRPCFSALTVDETYVP
KEFKAETFTFHSDICTL~~P~~EKEKQIKKQTALAELVKH~~K~~PKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCC
KAADKDTCF~~S~~TEGP~~N~~LVTRSKDALA

30

配列番号158

M13N49Q-1GS-M13N49Q-3GS-MSA-C34S/C579S二価構築物:突然変異を下線により示す
SQIEVKDVTD~~T~~TALITWHDAFGYDFGCELT~~Y~~GIKDVP~~G~~DRTTIDLPPDHFHQYSIGNLKPD
TEYEVSPLICANDHGFD~~S~~NP~~A~~KETFTTGGGGSR~~D~~APSQIEVKDVTD~~T~~ALITWHDAFGY
DFGCELT~~Y~~GIKDVP~~G~~DRTTIDLPPDHFHQYSIGNLKPD~~T~~YEVSPLICANDHGFD~~S~~NP~~A~~KET
FTTGGGGSR~~D~~APSQIEVKDVTD~~T~~ALITWHDAFGY
VQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQE~~P~~ERNEC~~F~~
LQHKDDNPSLPPFERPEAEAMTSFKENPTTFMGHLYHEVARRHYPFYAPEL~~L~~YYAEQYN
EILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEALVSSVRQRMKCSSMOKFGERAFKAWAVARLSQ~~T~~
FPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADRAELAKYMCENQATISSKLQTCCDKP
LLKKAHCLSEVEHDTMPADLP~~A~~IAADFVEDQEVCKNYAEAKDVF~~L~~GTFLYEYSRRHPDYS
VSLLRLAKYEATLEKCCAEANPPACYGT~~V~~LAEFQ~~P~~LVEEPK~~N~~LNKTNC~~D~~LYEKLGEY~~G~~
FQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGT~~K~~C~~C~~LPEDQRLPCVEDYLSAILNRV~~C~~
LHEKTPVSEHVTKCCSGS~~L~~VERRPCFSALTVDETYVP~~E~~KFKAETFTFHSDICTL~~P~~EKEKQ
IKKQTALAELVKH~~K~~PKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCAADKDTCF~~S~~TEGP~~N~~LVTRSKDALA

40

配列番号159

クローンM31;BC、DE、FGループを下線により示す
IEVKDVTD~~T~~TALITWHDP~~S~~GYDFWCELT~~Y~~GIKDVP~~G~~DRTTIDLPPDHFHY~~N~~YSIGNLKPD~~T~~
YEVSPLICANDHGFD~~S~~YPAKETFTT

50

【化20】

配列番号160

クローンM31N49Q; N49Q突然変異を下線により示す

IEVKDVTDTTALITWHDPSGYDFWCELTGIKDVPGRRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDE
YEVSPLICANDHGFDSYPAKETFTT

配列番号161

M31N49Q-1GS-M31N49Q二価構築物; N49Q突然変異を下線により示す

SQIEVKDVTDTTALITWHDPSGYDFWCELTGIKDVPGRRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDE
TEYEVSPLICANDHGFDSYPAKETFTTGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALITWHDPSGY
DFWCELTGIKDVPGRRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDEYEVSPLICANDHGFDSYPAKET
FTT

10

配列番号162

M31N49Q-3GS-MSA-C34S/C579S一価構築物; 突然変異を下線により示す

SQIEVKDVTDTTALITWHDPSGYDFWCELTGIKDVPGRRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDE
TEYEVSPLICANDHGFDSYPAKETFTTGGGGSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHF
KGLVLIAFSQYLQKSSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPN
LRENYGELADCCTKQE PERNECFLQHKDDNPSPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGH
HEVARRHYPFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEDKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMK
CSSMQKFGERAFAKAWARLSQTFPNADFAEITKLATDLTVNKECCHGDLLECADRAE
LAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLKKAHCLSEVEHDTMPADLPATAADFVEDQEVCKNY
AEAKDVFGLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQP
LVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCT
LPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVP
KEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCC
KAADKDTCFSTECPNLVTRSKDALA

20

配列番号163

M31N49Q-1GS-M31N49Q-3GS-MSA-C34S/C579S二価構築物; 突然変異を下線により示す

SQIEVKDVTDTTALITWHDPSGYDFWCELTGIKDVPGRRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDE
TEYEVSPLICANDHGFDSYPAKETFTTGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALITWHDPSGY
DFWCELTGIKDVPGRRTTIDLPDHFHQYSIGNLKPDEYEVSPLICANDHGFDSYPAKET
FTTGGGGSGGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHF
KGLVLIAFSQYLQKSSYDEHAKL
VQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQE PERNECFLQHKDDNPSPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGH
LHEVARRHYPFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEDKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMK
CSSMQKFGERAFAKAWARLSQTFPNADFAEITKLATDLTVNKECCHGDLLECADRAE
LAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLKKAHCLSEVEHDTMPADLPATAADFVEDQEVCKNY
AEAKDVFGLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTV
LAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRV
GTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALT
VDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAAELVKHKPKATAEQLKT
VMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTECPNLVTRSKDALA

30

配列番号164

クローンD1-陰性对照Tn3

IEVKDVTDTTALITWSPGERIWMFTGCELTGIKDVPGRRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDE
TEYEVSPLICPNYERISNPAKETFTT

配列番号165

D1-1GS-D1-3G-MSA-C34S/C579S二価構築物; 突然変異を下線により示す

SQIEVKDVTDTTALITWSPGERIWMFTGCELTGIKDVPGRRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDE
TEYEVSPLICPNYERISNPAKETFTTGGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALITWSPGERI
IWMFTGCELTGIKDVPGRRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDEYEVSPLICPNYERISNPAK
ETFTTGGGGSGGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHF
KGLVLIAFSQYLQKSSYDEHAKL
VQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCC
TKQE PERNECFLQHKDDNPSPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGH
LHEVARRHYPFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEDKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMK
CSSMQKFGERAFAKAWARLSQTFPNADFAEITKLATDLTVNKECCHGDLLECADRAE
LAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLKKAHCLSEVEHDTMPADLPATAADFVEDQEVCKNY
AEAKDVFGLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTV
LAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRV
GTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALT
VDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAAELVKHKPKATAEQLKT
VMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTECPNLVTRSKDALA

40

【化21】

配列番号166

クローン342RDGからSDGへの突然変異体、突然変異を下線により示す

IEVKDVTD~~T~~ALITWSDDFGEYVWCELYGIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKPDT~~E~~
YEVS~~LICR~~S~~G~~DMSSNPAKETFTT

配列番号167

309FGwtコンセンサス

全ての鎖は、親Tn3鎖であり：ベータ鎖Cは、CELYG1バリエント(配列番号14)であり；AB、CD、EFループは、親Tn3ループである

X1= SerまたはLeu

X2= AspまたはGlu

X3= His、Ile、Val、PheまたはTrp

X4= Ala、Gly、GluまたはAsp

X5= Glu、Leu、Gln、Ser、AspまたはAsn

X6= PheまたはTyr

X7= Ile、Val、His、GluまたはAsp

X8= Gly、TrpまたはVal

X9= Trp、PheまたはTyr

X10= Ser、Gln、MetまたはHis

X11= TrpまたはHis

X12= ArgまたはSer

IEVKDVTD~~T~~ALITWX1DX2X3X4X5X6X7X8CELYG1KDVPGDRTTIDLWX9HX10AX11YSIGNLKPDT~~EYE~~
VSLICRX12GDMSSNPAKETFTT

配列番号168

309FGwtコンセンサス、BCループ

X1= SerまたはLeu

X2= AspまたはGlu

X3= His、Ile、Val、PheまたはTrp

X4= Ala、Gly、GluまたはAsp

X5= Glu、Leu、Gln、Ser、AspまたはAsn

X6= PheまたはTyr

X7= Ile、Val、His、GluまたはAsp

X8= Gly、TrpまたはVal

X1DX2X3X4X5X6X7X8

10

配列番号169

309FGwtコンセンサス、DEループ

X9= Trp、PheまたはTyr

X10= Ser、Gln、MetまたはHis

X11= TrpまたはHis

WX9HX10AX11

20

30

配列番号170

309FGwtコンセンサス、FGループ

X12= ArgまたはSer

RX12GDMSSNPA

【化22】

配列番号171

311コンセンサス;全ての鎖は、親Tn3鎖であり；2つのベータ鎖Cバリエント(配列番号13および14)；CDループは、親Tn3ループである

X1= LysまたはGlu

X2= ThrまたはIle

X3= AsnまたはAla

X4= Ser、Leu、Ala、PheまたはTyr

X5= Tyr、Ala、Gly、Val、IleまたはSer(BC/N末端接觸)

X6= Tyr、Ser、AlaまたはHis

X7= Asn、Asp、HisまたはTyr

X8= Leu、Phe、HisまたはTyr

X9= His、Pro、Ser、LeuまたはAsp

X10= Gly、Phe、HisまたはTyr

X11= AlaまたはThr

X12= Ser、Asn、Glu、ArgまたはAsp

X13= Ser、Gln、Thr、AsnまたはAla

X14= Pro、Val、-、IleまたはAla(-アミノ酸無し)

X15= -またはIle(-アミノ酸無し)

X16= GluまたはLys

X17= SerまたはAsn

IEVX1DVTDTTALITWX2X3RSX4X5X6X7X8X9X10CELEX11YGIKDVPGDRTTIDLX12X13X14X15YVHYS

IGNLKPDTX16YEVSLICLTDGTYX17NPAKETFTT

配列番号172

311コンセンサス;311ファミリークローン中のベータ鎖C

X11= AlaまたはThr

CELEX11YGI

10

配列番号173

311コンセンサス;ABループ

X1= LysまたはGlu

X1DVTDFTT

20

配列番号174

311コンセンサス;BCループ

X2= ThrまたはIle

X3= AsnまたはAla

X4= Ser、Leu、Ala、PheまたはTyr X5= Tyr、Ala、Gly、Val、IleまたはSer(BC/N末端接觸)

X6= Tyr、Ser、AlaまたはHis

X7= Asn、Asp、HisまたはTyr

X8= Leu、Phe、HisまたはTyr

X9= His、Pro、Ser、LeuまたはAsp

X10= Gly、Phe、HisまたはTyr

X2X3RSX4X5X6X7X8X9X10

30

配列番号175

311コンセンサス;DEループ

X12= Ser、Asn、Glu、ArgまたはAsp X13= Ser、Gln、Thr、AsnまたはAla

X14= Pro、Val、-、IleまたはAla(-アミノ酸無し)

X15= -またはIle(-アミノ酸無し)

X12X13X14X15YVH

配列番号176

311コンセンサス;EFループ

X16= GluまたはLys

GNLKPDTX16

40

配列番号177

311コンセンサス;FGループ

X17= SerまたはAsn

LTTDGTYX17NPA

【化23】

配列番号178

BC9NHTオリゴ:ループBC

スクレオチドコード:N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T
 ACCGCGCTGATTACCTGGNHTNHTSCGNHTGSTNHTNHTNHTGGCTGTGAACCTAT
 GGCATTAAGA

配列番号179

BC11NHTオリゴ:ループBC

スクレオチドコード:N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

ACCGCGCTGATTACCTGGNHTNHTBSTMNTNHTNHTNHTNHTNHTNHTGGCTGTGAACTG
 ACCTATGGCATTAAGA

10

配列番号180

BC12NHTオリゴ:ループBC

スクレオチドコード:N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

ACCGCGCTGATTACCTGGNHTVMACCGNHTNHTNHTRRRCGCNHTVTTNHTGGCTGTGAA
 CTGACCTATGGCATTAAGA

配列番号181

DE NHTオリゴ:DEループ

スクレオチドコード:N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

20

CGATCGCACCAACCATAAGATCTGNHTNHTNHTNHTNHTNHTTATAGCATTGGTAACCTGAA
 ACCG

配列番号182

FG9NHTオリゴ:FGループ

スクレオチドコード:N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

GAATATGAAGTGAGCCTGATTGCNHTAMSNHTNHTGGTNHTNHTKCGAAAGAAACC
 TTTACCAACCGGTG

30

配列番号183

FG10NHTオリゴ:FGループ

スクレオチドコード:N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

GAATATGAAGTGAGCCTGATTGCNHTAMSNHTNHTNHTRGCNHTCCGGCGAAAGAA
 ACCTTTACCAACCGGTG

配列番号184

FG11NHTオリゴ:FGループ

スクレオチドコード:N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G; V = A/C/G; M = A/C; K = G/T

GAATATGAAGTGAGCCTGATTGCNHTAMSNHTNHTGGTNHTNHTAGCAACCCGGCGAAA
 GAAACCTTTACCAACCGGTG

40

配列番号185

BCX-DE^{v2}オリゴ

CAGATCTATGGTGGTGCATGCCCGGGCACATCTTAATGCCATAGGTCAAGTCACA

【化24】

配列番号186

DE-FGXブリッジv2オリゴ

GCAAATCAGGCTCACTTCATATTGGTATCCGGTTTCAGGTTACCAATGCTAT

配列番号187

KpnI amp rev v2オリゴ

CGGGTCGGTTGGGTACCGCCACCGTGTTAAAGGTTCTTT

配列番号188

KpnIリバースv2オリゴ

CGGGTCGGTTGGGTAA

10

配列番号189

BCライブラリーamp v2オリゴ

GGCCCAGCCGCCATGGCCGCCATTGAAGTGAAGATGTGACCGATAACCACCGCGCTGAT

TACCTGG

配列番号190

BC9PCRオリゴ

スクレオチドコード: 1=全19アミノ酸(-cys)についてのコドン; 2= Ala/Pro 50/50についてのコドン; 3= Ala/Glyについてのコドン

ACCGCGCTGATTACCTGGTCT1213111GGCTGTGAAC TGACCTATGGCATTAAAGATG

20

配列番号191

BC9-ループNNKオリゴ

スクレオチドコード: K= 50%G/50%T

ACCGCGCTGATTACCTGGNNKNNKSMGNKGSTNNKNNKNNKGCTGTGAAC TGACCTA
TGGCATTAAA

配列番号192

309BC-ループNNKドープオリゴ

スクレオチドコード: 4= 70%G10%A10%C10%T; 5= 10%G,70%A,10%C,10%T; 6=10%G,10%A,70%C, 10%T;
7= 10%G,10%A,10%C,70%T; 8= 70%A15%C15%T; K= 50%G/50%T

30

ACCGCGCTGATTACCTGG76K45K45K77K44K65K78T45K44KTGTGAAC TGACCTA
TGGCATTAAA

配列番号193

DE PCR オリゴ

スクレオチドコード: 1=全19アミノ酸(-cys)についてのコドン

GATGTGCCGGCGATCGCACCAACCATACTG111111TATAGCATTGGTAACCTGAAA
CCGG

配列番号194

Upstr BCループRevオリゴ

CCAGGTAATCAGCGCGGTGGTAT

40

配列番号195

BCシャフルrevオリゴ

CAGATCTATGGTGGTGCATCGC

配列番号196

DEシャフルFWDオリゴ

TGTGAAC TGACCTATGGCATTAAAGATGT

【化25】

配列番号197
BC11-311Glyオリゴ

ヌクレオチドコード: 1=70%G, 10%A, 10%C, 10%T; 2=10%G, 70%A, 10%C, 10%T;
3=10%G, 10%A, 70%C, 10%T; 4=10%G, 10%A, 10%C, 70%T; 5=70%A, 15%C, 15%T;
6=15%A, 70%C, 15%T; 7=15%A, 15%C, 70%T; V=33%A, 33%C, 33%G.

ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25T37T35TGGCTGTGAAC TG
ACCTATGGCATTAAA

配列番号198
BC11-311NHTオリゴ

ヌクレオチドコード: 1=70%G, 10%A, 10%C, 10%T; 2=10%G, 70%A, 10%C, 10%T;
3=10%G, 10%A, 70%C, 10%T; 4=10%G, 10%A, 10%C, 70%T; 5=70%A, 15%C, 15%T;
6=15%A, 70%C, 15%T; 7=15%A, 15%C, 70%T; V=33%A, 33%C, 33%G; H=33%A, 33%C, 33%T

10

ACCGCGCTGATTACCTGG26T25TV1T46T46T45T45T25T37T35TNHTTGTGAAC TG
ACCTATGGCATTAAA

配列番号199
BCライブラー amp K4Eオリゴ
GGCCCAGCCGGCCATTGCCGCATTGAAGTGGAAAGATGTGACCGATACCACCGCGCTGAT
TACCTGG

20

配列番号200
延長半減期HSA/バリアント(C34S, L463N, K524L)・突然変異を下線により示す

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAE
NCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPPERNECFLOQHKDDNPNLPRLVRPEV
DVMCTAFHDNEETFLKKLYEIARRHPFYAPELLFFAKRYKAFTTECCQAADKAACLLP
KLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLTK
VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA
DLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDVFGLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKC
CAAADPHECYAKVDFEKPLVEEPQNLIKQNCNELFEQLGEYKFQNALLVRYTKVPQVST
PTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVNHEKTPVSDRVTKCCTES
LVNRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQILKQTALVELVKHKPKAT
KEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

30

配列番号201
311K4E_12-1/バリアント一価構築物(GSリンクーおよびC34S HSAを含む):リンクーおよび突然変異セリンを下線により示す
SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
PDTEYEVSPLICLTTDGTYNNPAKETFTTGGGGGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
VLI~~A~~FAQYLQOSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKS~~LHTLFGDKLCTVATLRE~~
TYGEMADCCAKQEPPERNECFLOQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKLYEI
ARRHPFYAPELLFFAKRYKAFTTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCAS
LOKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAK
YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPA~~DLP~~SLAADFVESKDVKNYAEA
KDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKVDFEKPLVE
EPQNLIKQNCNELFEQLGEYKFQNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPE
AKRMPCAEDYLSVVLNQLC~~V~~LHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEF
NAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKAD
DKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

40

【化26】

配列番号202

311K4E_12-1バリアント一価構築物(ベータ鎖C CELTYGバリアント、全Gリinker、およびC34S HSAを含む);リinkerおよび突然変異セリンを下線により示す

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELTGYIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
 PDTEYEVSЛИCLTTDGTYNNPAKETFTTGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL
VLIafaQyLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSЛHTLFGDKLCTVATLRE
 TYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEI
 ARRHPFYFAYELLFFAKRYKAACFLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCAS
 LQKFGERAKAWARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLA
 YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEE
 KDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFKPLVE
 EPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPE
 AKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEF
 NAE~~TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCAD~~
 DKETCFAAEGKKLVAASQAALGL

10

配列番号203

311K4E_12-1バリアント二価構築物(GSリinkerならびにC34S HSAを含む);リinkerおよび突然変異セリンを下線により示す

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
 PDTEYEVSЛИCLTTDGTYNNPAKETFTTGGGGSGGGSGGGSRLDAPSQIEVEDVTDTT
 ALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKPDTEYEVSЛИCL
 TTDGTYNNAKETFTTGGGGSGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIafaQyLQQS
 PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSЛHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ
 EPERNECFLQHKDDNPNLPRLVPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPFYA
 PELLFFAKRYKAACFLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAKAW
 AVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLA
 KYICENQDSISSK
 LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEEAKDVFLGMFLYEY
 ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFKPLVEEPQNLIKQNCEL
 FEQLGEYKFQNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLS
 VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC
 TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCADDKETCFAAEGKK
 LVAASQAALGL

20

配列番号204

311K4E_12-1バリアント二価構築物(全GリinkerおよびS34HSAを含む);リinkerおよび突然変異セリンを下線により示す

SQIEVEDVTDTTALITWTNRSSYSNLHGCELTGYIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLK
 PDTEYEVSЛИCLTTDGTYNNPAKETFTTGGGGGGGGGGGGGRLDAPSQIEVEDVTDTT
 ALITWTNRSSYSNLHGCELAYGIKDVPGDRTTIDLNQPYVHYSIGNLKPDTEYEVSЛИCL
 TTDGTYNNAKETFTTGGGGGGGGGGDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIafaQyLQQS
 PFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSЛHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQ
 EPERNECFLQHKDDNPNLPRLVPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPFYA
 PELLFFAKRYKAACFLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAKAW
 AVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLA
 KYICENQDSISSK
 LKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEEAKDVFLGMFLYEY
 ARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFKPLVEEPQNLIKQNCEL
 FEQLGEYKFQNALLVRYTKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLS
 VVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC
 TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCADDKETCFAAEGKK
 LVAASQAALGL

30

配列番号205

309-3GS-309二価構築物

SQIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCELTGYIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPD
 TEYEVSЛИCYTDQEAGNPAKETFTTGGGGSGGGSGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALI
 TWSDEFGHYDGCELTGYIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKPDTEYEVSЛИCYTDQEА
 GNPAKETFTT

40

【化27】

配列番号206

309-2GS-HSAC34S一価構築物

SQIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCELTGYIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKD
 TEYEVSILICYTDQEAGNPAKETFTGGGGGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
 AFAQYLQQSPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
 EMADCCAKQE PERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARR
 HPFYAPELLFFAKRYKAACFTTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQK
 FGERAFKAWAVARLSQRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC
 ENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDV
 FLGMFLYEEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDFKPLVEEPQ
 NLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR
 MPCADEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
 TFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKE
 TCFAEEGKKLVAASQAALGL

10

配列番号207

309-3GS-309-2GS-HSAC34S二価構築物

SQIEVKDVTDTTALITWSDEFGHYDGCELTGYIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKD
 TEYEVSILICYTDQEAGNPAKETFTGGGGGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
 TWSDEFGHYDGCELTGYIKDVPGDRTTIDLWWHSAWYSIGNLKDTEYEVSILICYTDQE
 A GNPAKETFTTGCGGGGGSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI
 AFAQYLQQSPFEDHV
 KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG
 EMADCCAKQE PERNE
 CFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARR
 HPFYAPELLFFAKR
 YKAACFTTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQK
 FGERAFKAWAVARLS
 QRFPKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYIC
 ENQDSISSKLKECCE
 KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVKNYAEAKDV
 FLGMFLYEEYARRHPD
 YSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDFKPLVEEPQ
 NLIKQNCELFEQLGE
 YKFQNALLVRYTKKPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKR
 MPCADEYLSVVLNQL
 CVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRPCFSALEVDETYVPKEFNAE
 TFTFHADICTLSEKE
 RQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKE
 TCFAEEGKKLVAASQ
 AALGL

20

配列番号208

342-3GS-342二価構築物

SQIEVKDVTDTTALITWSDDFGEYVWCELTGYIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKD
 TEYEVSILICRSGDMSSNPAKETFTGGGGGGGGSGGGSRLDAPSQIEVKDVTDTTALI
 TWSDDFGEYVWCELTGYIKDVPGDRTTIDLWYHHAHYSIGNLKDTEYEVSILICRSGDMS
 SNPAKETFTT

30

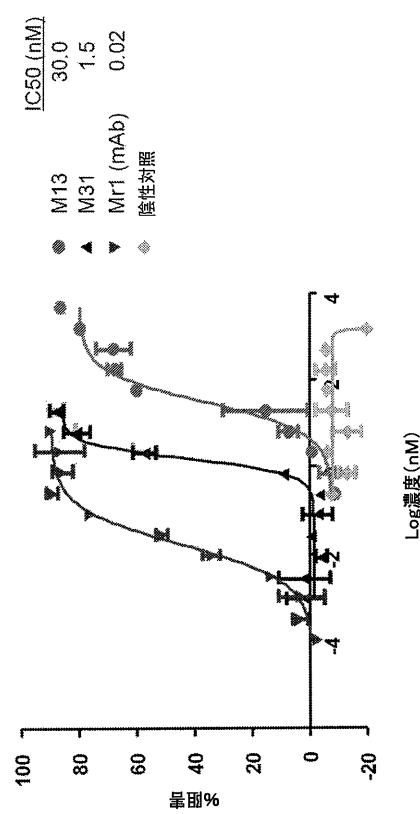
配列番号209

Gly-Serリンクモジュール、(G4X)_n(X=G, S, A, L, I, またはV, n=1-7);(G4X)_nモジュール(n=1)を示す
 GGGGX

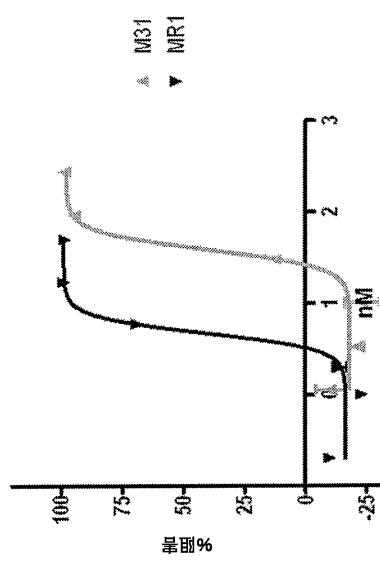
配列番号210

OppAシグナルペプチド突然変異体L25/M
 MTNITKRSVLVAAGVLAALMAGNVAMA

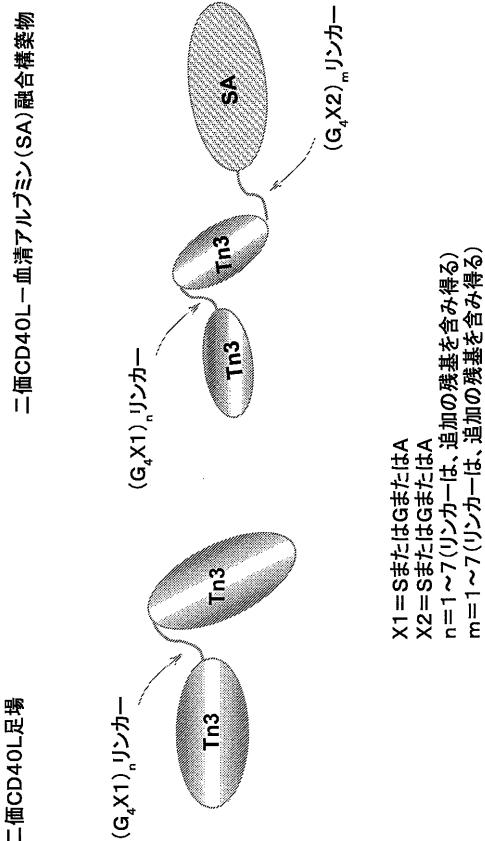
【図 1 A】



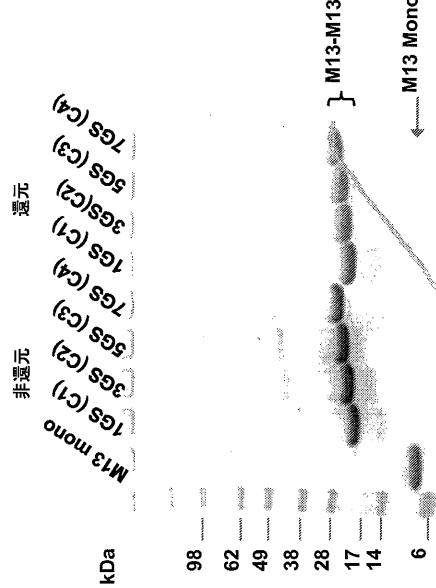
【図 1 B】



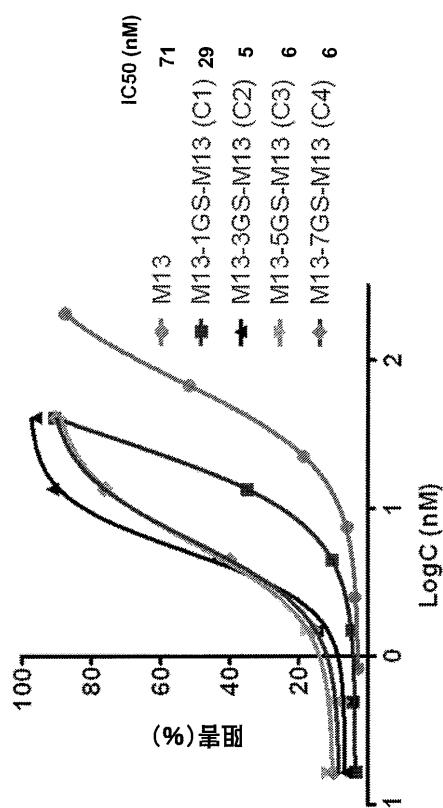
【図 2 A】



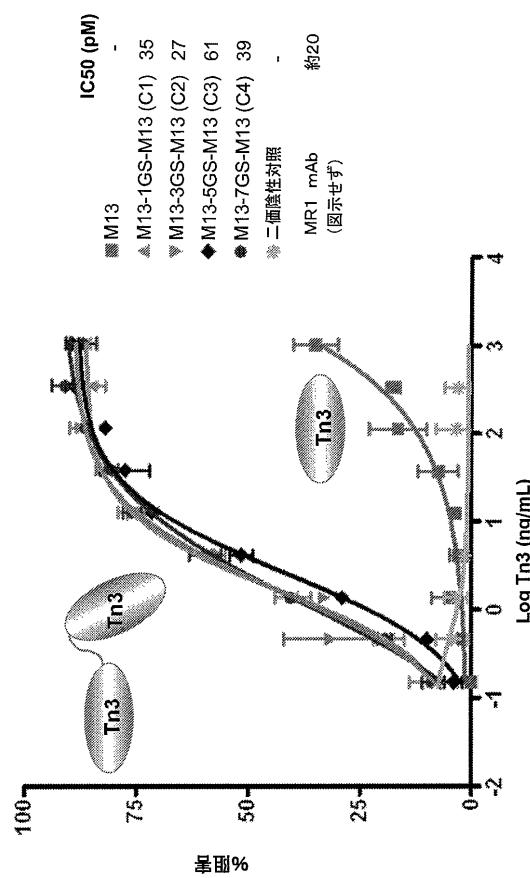
【図 2 B】



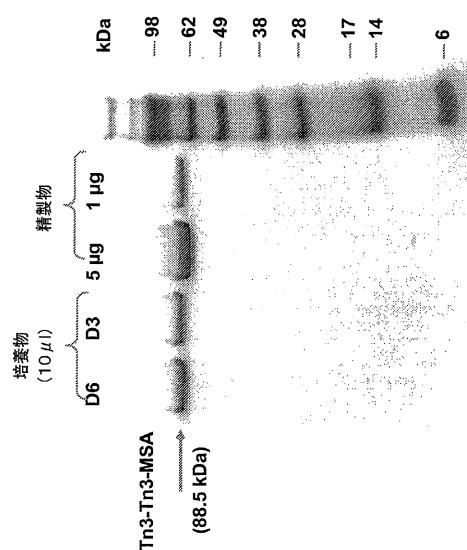
【図2C】



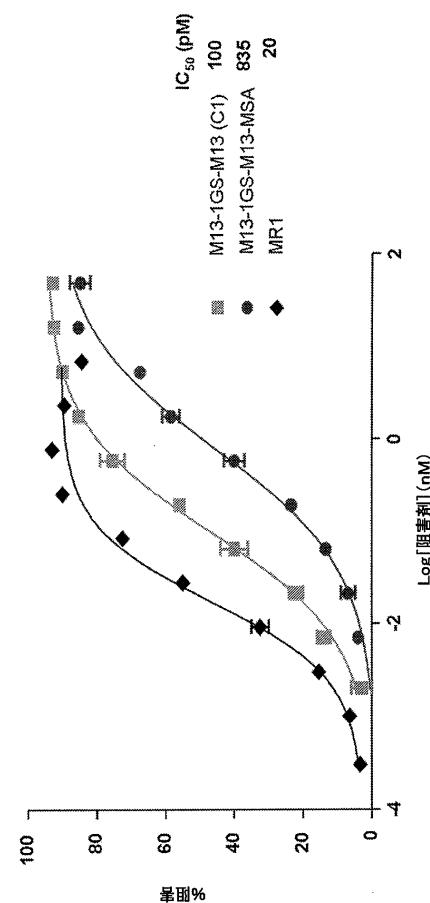
【図2D】



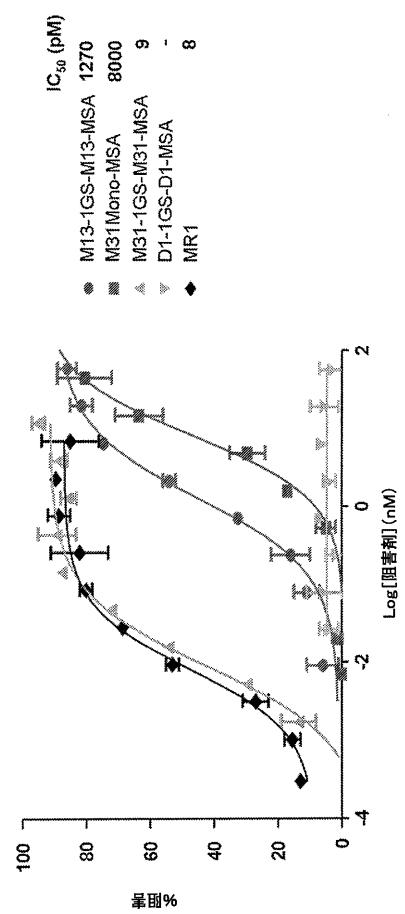
【図3A】



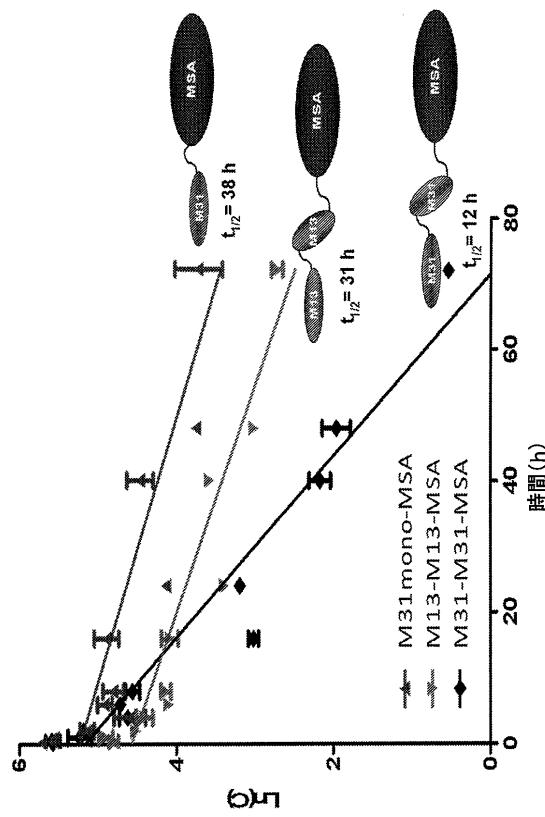
【図3B】



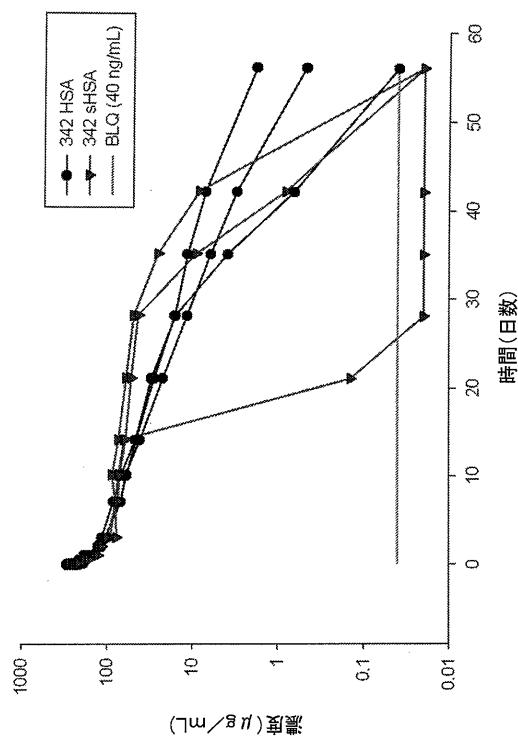
【図3 C】



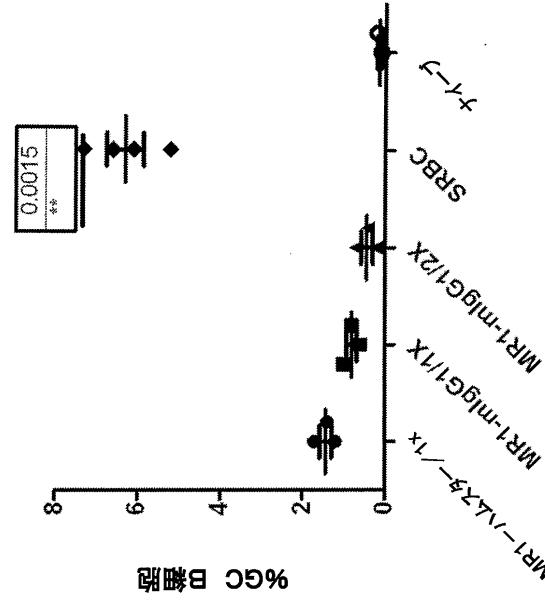
【図4 A】



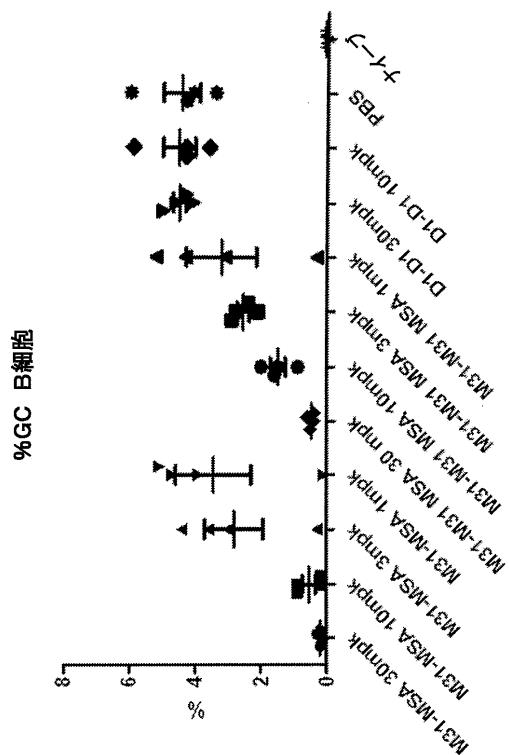
【図4 B】



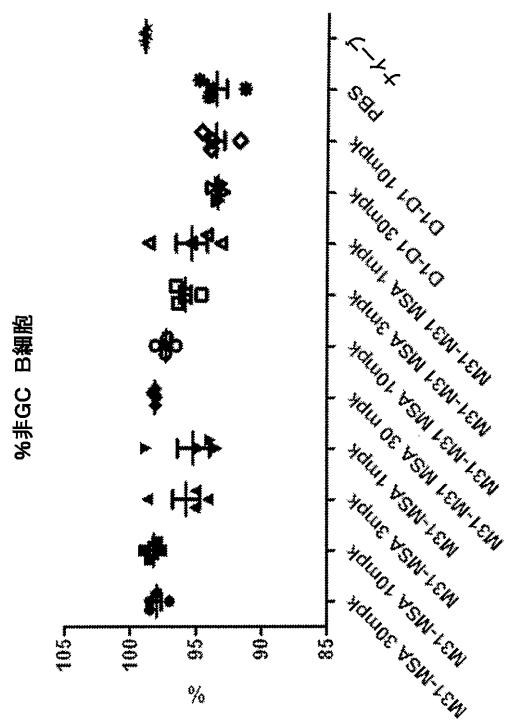
【図5 A】



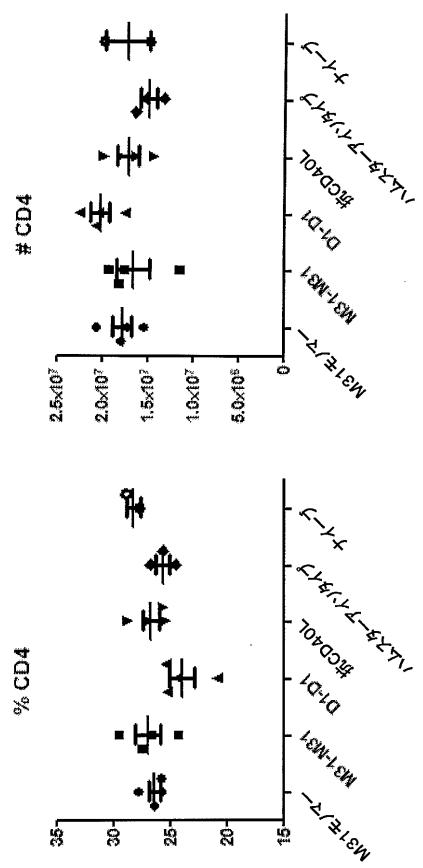
【図5B】



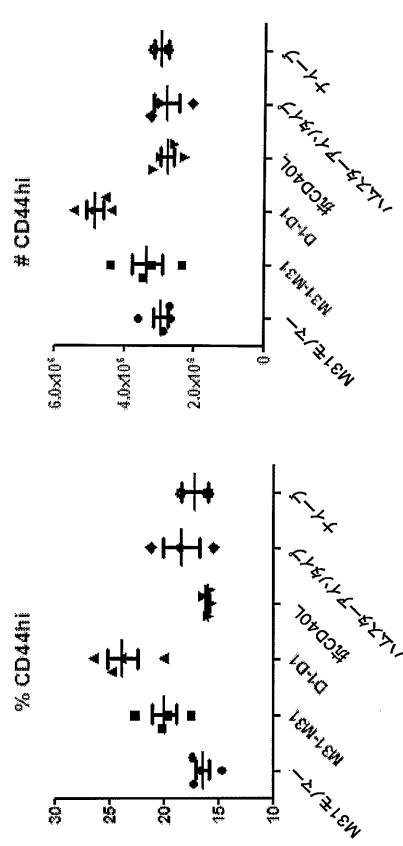
【図 5 C】



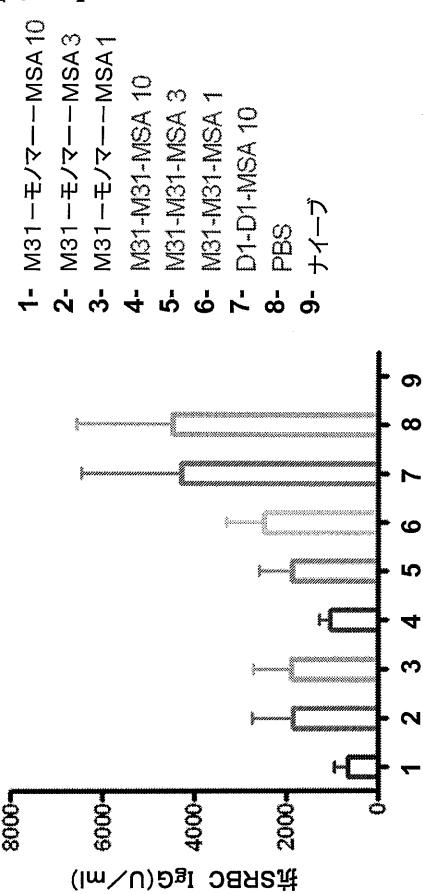
【図 5 D】



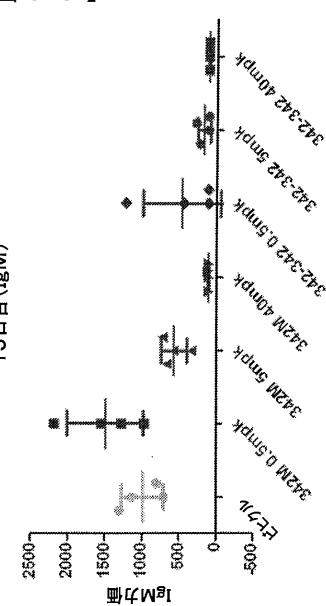
【図5E】



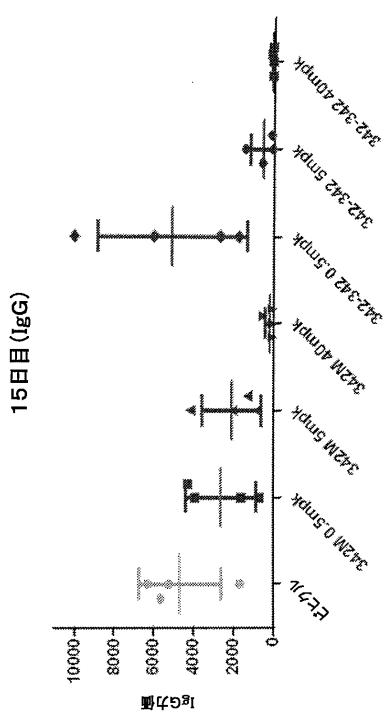
【図 5 F】



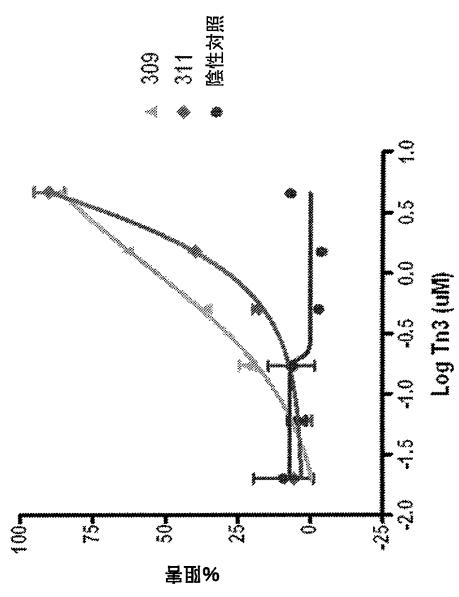
【図 5 G】



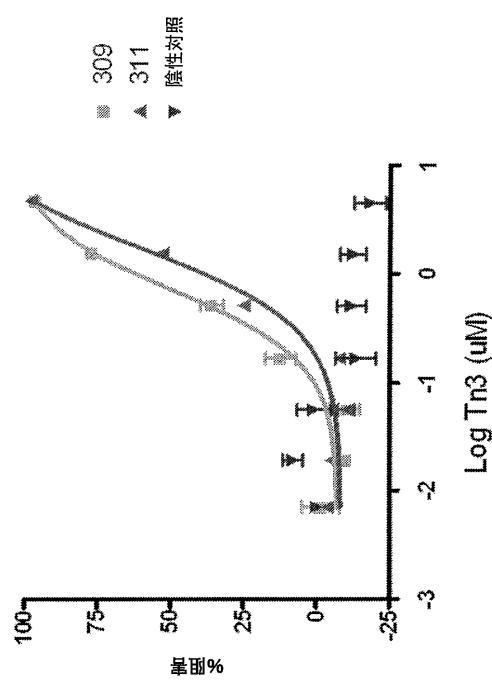
【図 5 H】



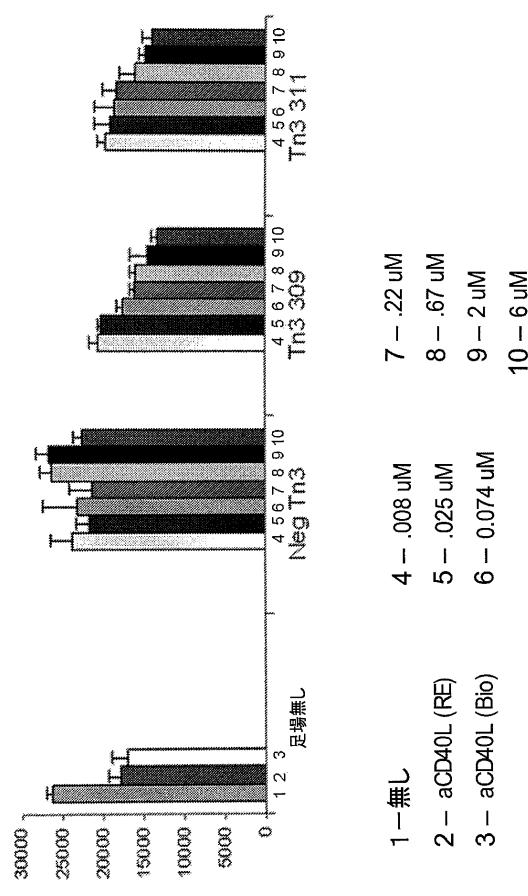
【図 6 A】



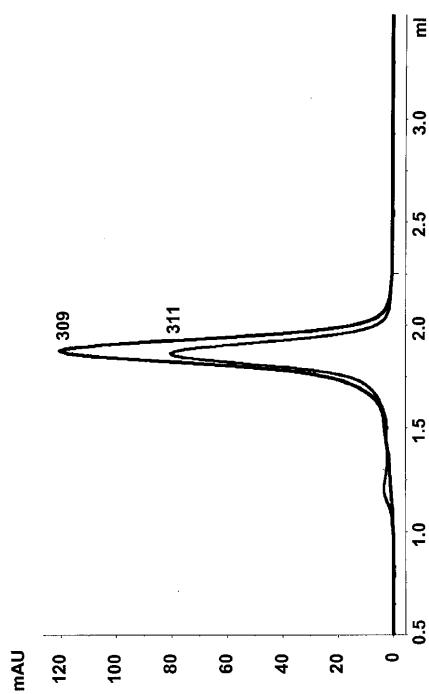
【図 6 B】



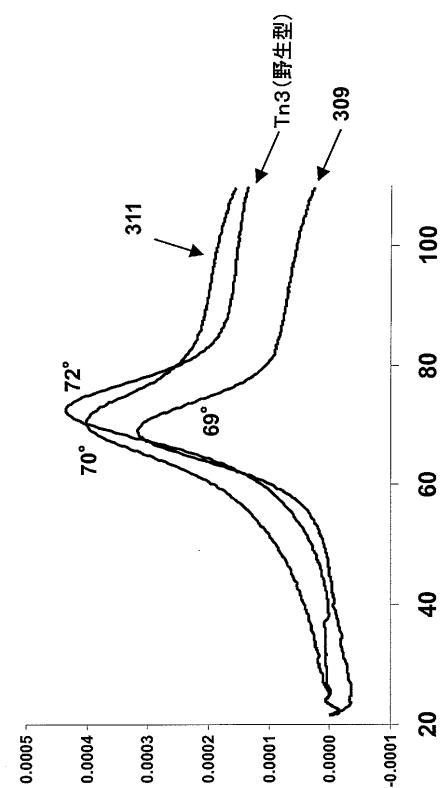
【図 6 C】



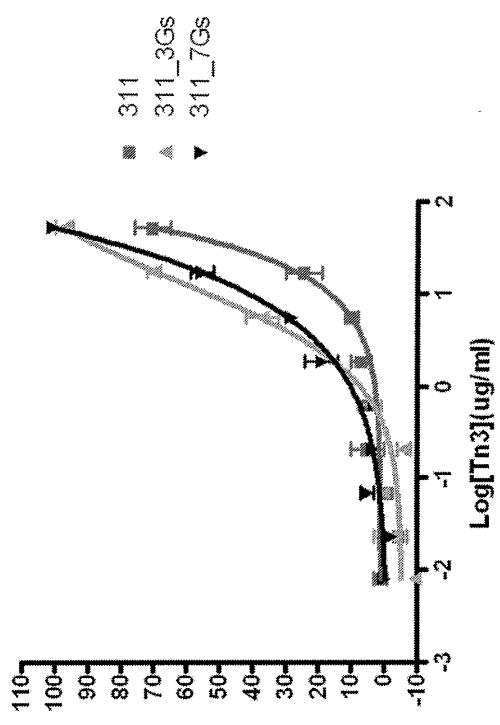
【図 7 A】



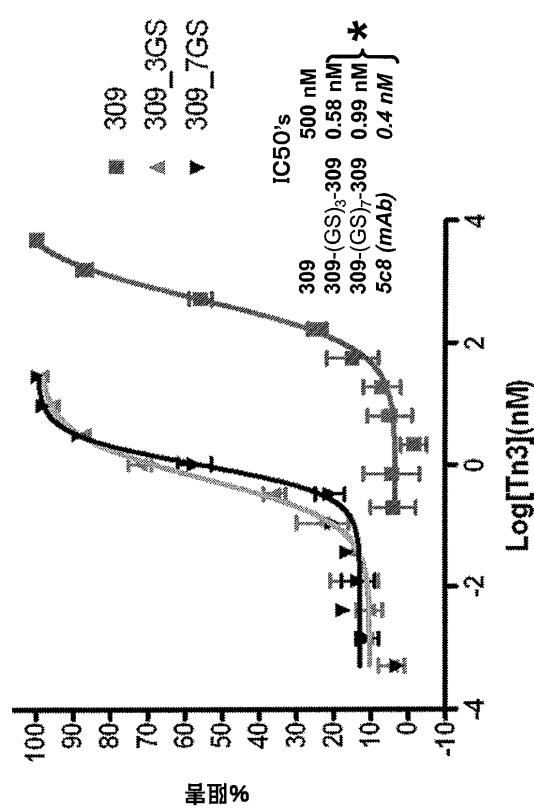
【図 7 B】



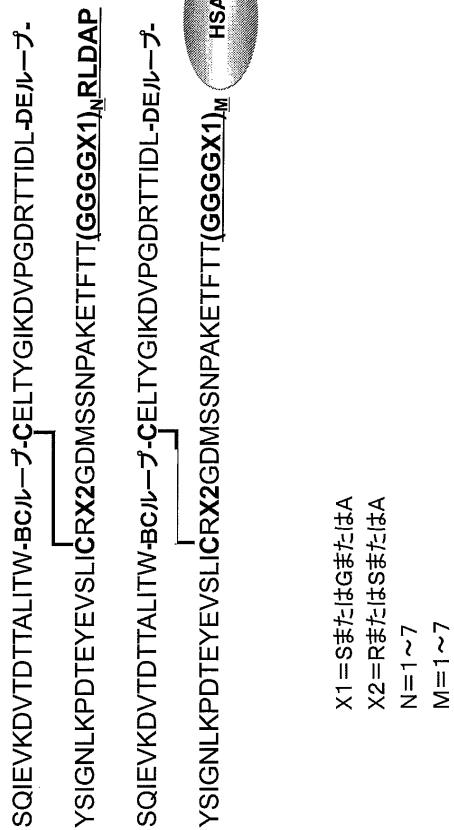
【図 8 A】



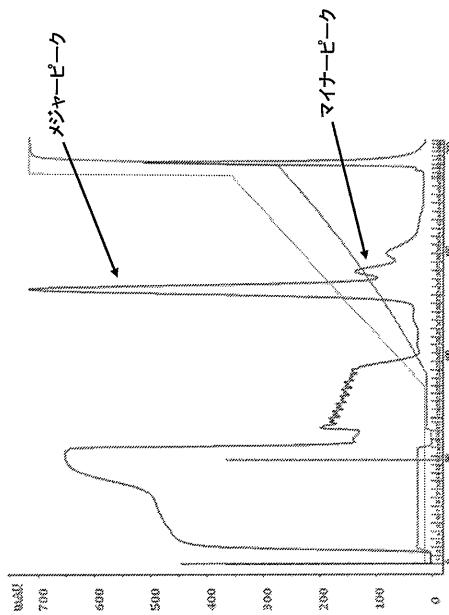
【図 8 B】



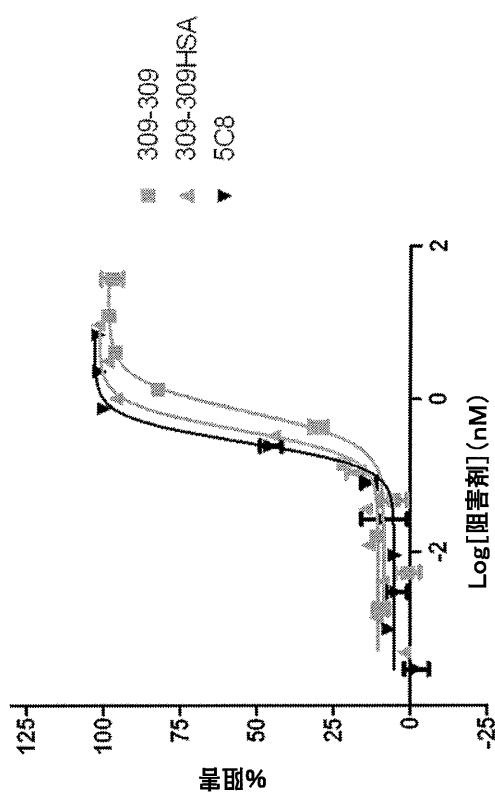
【図 9 A】



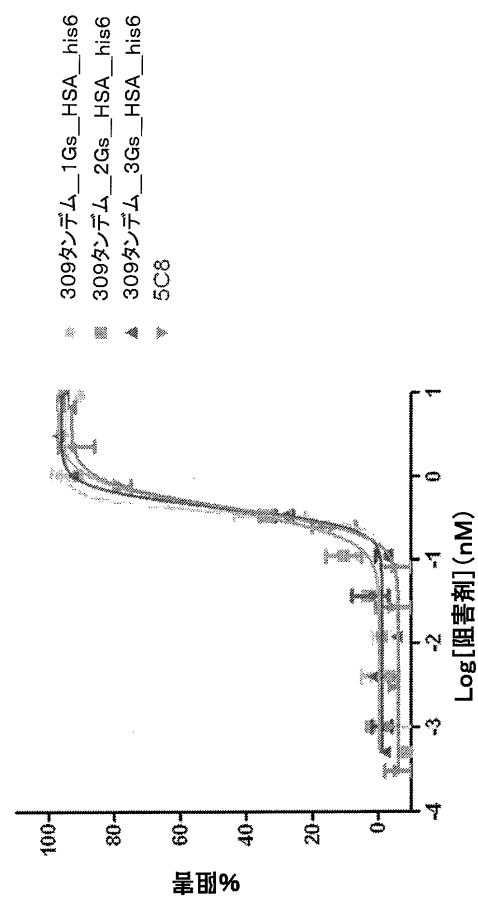
【図 9 B】



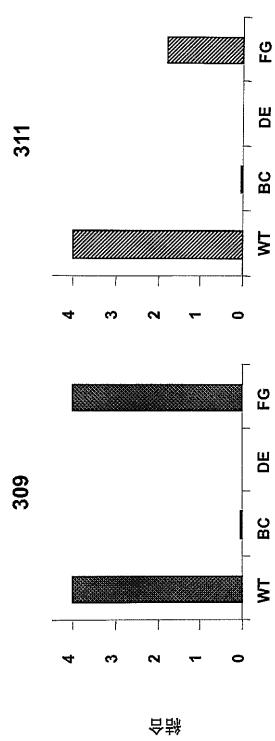
【図9C】



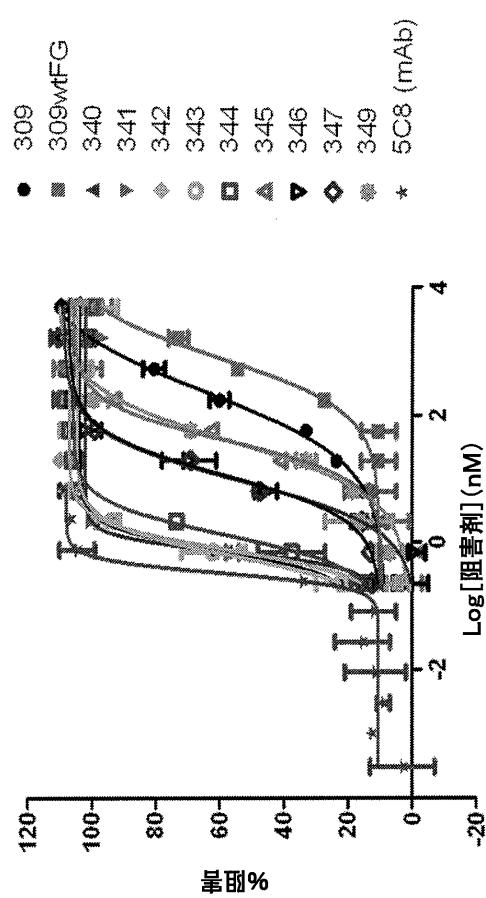
【図9D】



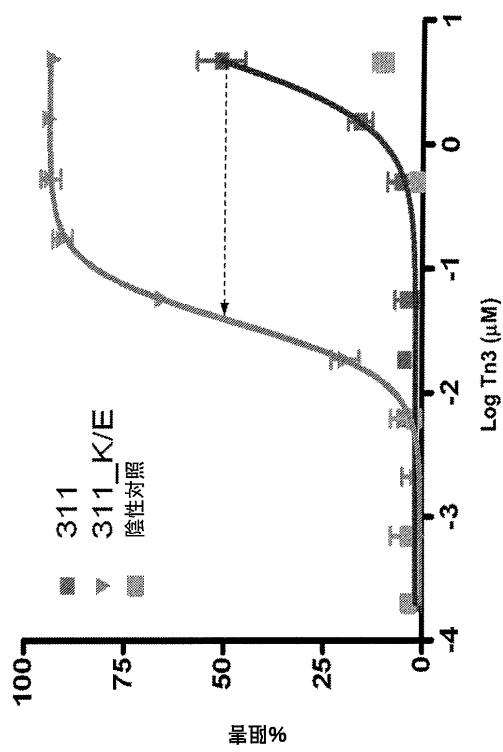
【図10A】



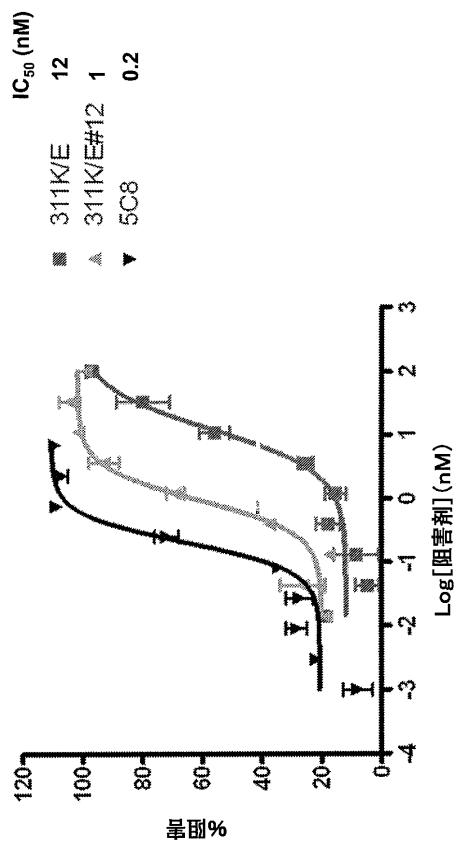
【図10B】



【図10C】



【 10D 】



【図 1 1 A】

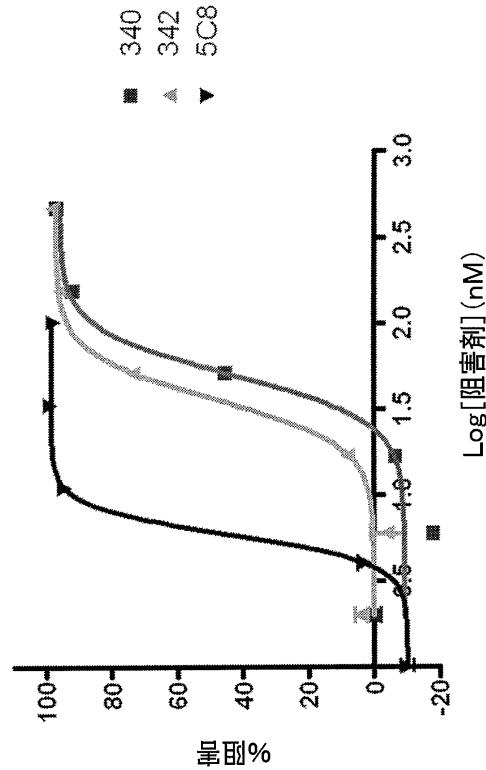
309	I EVK D VT DTT ALIT TW S D C E L T Y G I K D V P G D R T T ID
309-Gwt	I EVK D VT DTT ALIT TW S D C E L T Y G I R D V P G D R T T ID
340	I EVK D VT DTT ALIT TW S D C E L T Y G I K D V P G D R T T ID
341	I EVK D VT DTT ALIT TW S D C E L T Y G I K D V P G D R T T ID
342	I EVK D VT DTT ALIT TW S D C E L T Y G I K D V P G D R T T ID
343	I EVK D VT DTT ALIT TW S D C E L T Y G I K D V P G D R T T ID
344	I EVK D VT DTT ALIT TW S D C E L T Y G I K D V P G D R T T ID
345	I EVK D VT DTT ALIT TW S D C E L T Y G I K D V P G D R T T ID
346	I EVK D VT DTT ALIT TW S D C E L T Y G I K D V P G D R T T ID
347	I EVK D VT DTT ALIT TW S D C E L T Y G I K D V P G D R T T ID
348	I EVK D VT DTT ALIT TW S D C E L T Y G I K D V P G D R T T ID
349	I EVK D VT DTT ALIT TW S D C E L T Y G I K D V P G D R T T ID
BCループ	I EVK D VT DTT ALIT TW S D C E L T Y G I K D V P G D R T T ID
BCループサス	I EVK D VT DTT ALIT TW S D C E L T Y G I K D V P G D R T T ID

【図11B】

DEループ		FGループ																												
309	309FGmt	L	W	H	S	G	N	I	L	K	P	D	T	E	V	S	L	I	C	R	O	M	S	N	A	K	E	T	T	83
340	L	W	H	S	G	N	I	L	K	P	D	T	E	V	S	L	I	C	R	O	M	S	N	A	K	E	T	T	83	
341	L	W	H	S	G	N	I	L	K	P	D	T	E	V	S	L	I	C	R	O	M	S	N	A	K	E	T	T	83	
342	L	W	H	S	G	N	I	L	K	P	D	T	E	V	S	L	I	C	R	O	M	S	N	A	K	E	T	T	83	
343	L	W	H	S	G	N	I	L	K	P	D	T	E	V	S	L	I	C	R	O	M	S	N	A	K	E	T	T	83	
344	L	W	H	S	G	N	I	L	K	P	D	T	E	V	S	L	I	C	R	O	M	S	N	A	K	E	T	T	83	
345	L	W	H	S	G	N	I	L	K	P	D	T	E	V	S	L	I	C	R	O	M	S	N	A	K	E	T	T	83	
346	L	W	H	S	G	N	I	L	K	P	D	T	E	V	S	L	I	C	R	O	M	S	N	A	K	E	T	T	83	
347	L	W	H	S	G	N	I	L	K	P	D	T	E	V	S	L	I	C	R	O	M	S	N	A	K	E	T	T	83	
348	L	W	H	S	G	N	I	L	K	P	D	T	E	V	S	L	I	C	R	O	M	S	N	A	K	E	T	T	83	
349	L	W	H	S	G	N	I	L	K	P	D	T	E	V	S	L	I	C	R	O	M	S	N	A	K	E	T	T	83	
コントローラ	L	W	H	S	G	N	I	L	K	P	D	T	E	V	S	L	I	C	R	O	M	S	N	A	K	E	T	T	83	

【図12A】

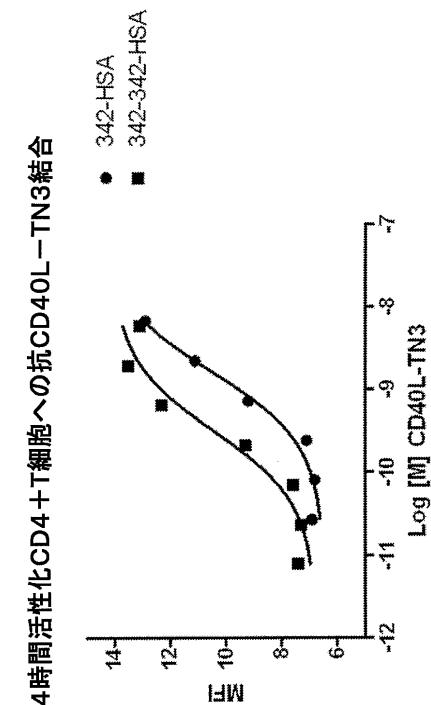
【図13】



【 図 1 2 B 】

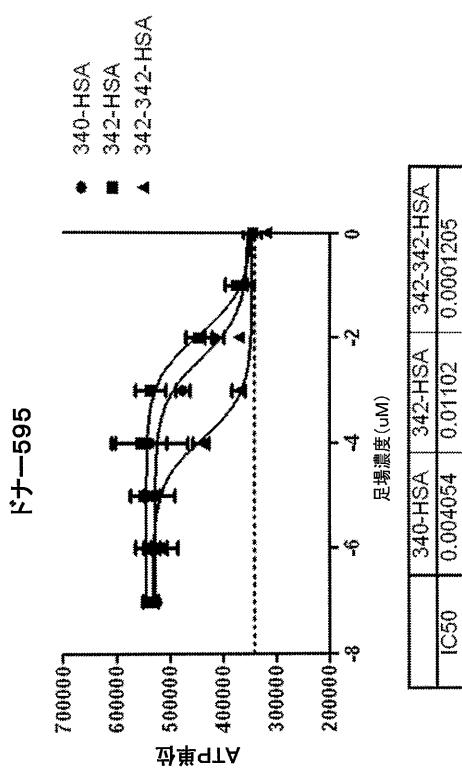
111	L G S P Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_1	L G S P Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_2	L Q C P Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_3	L S A A Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	87
1111K4E_4	L N S Y Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_5	L N S P Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_6	L N Q P Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_7	L N S P Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_8	L N S P Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_9	L N S P Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_10	L N S P Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_11	L N S P Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_12	L N Q P Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_13	L N S P Y Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_14	L R C P Y Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_15	L E L L Y Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_16	L S S P Y Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_17	L N T P Y Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_18	L E Q V Y Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	86
1111K4E_19	L X X X X Y Y S I G N L K P D T E Y E V S L I C E N P A K E T F T T	87
センサス		

【図14】

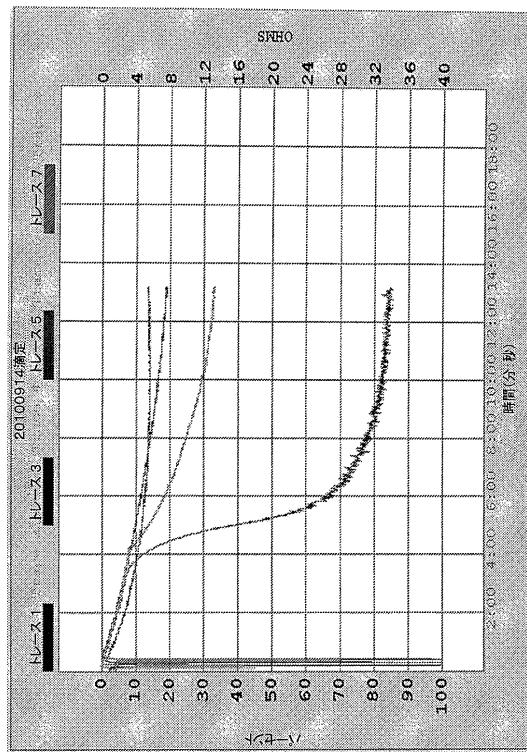


24時間活性化CD4+T細胞への抗CD40L-TN3結合

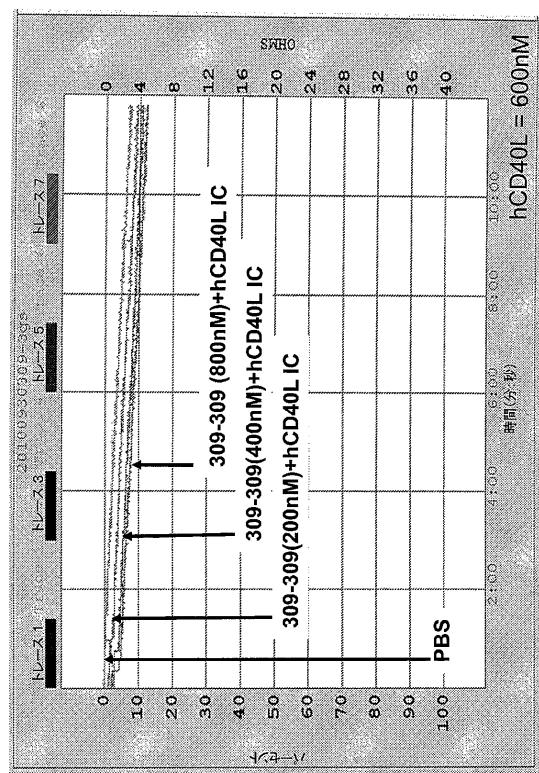
【図15】



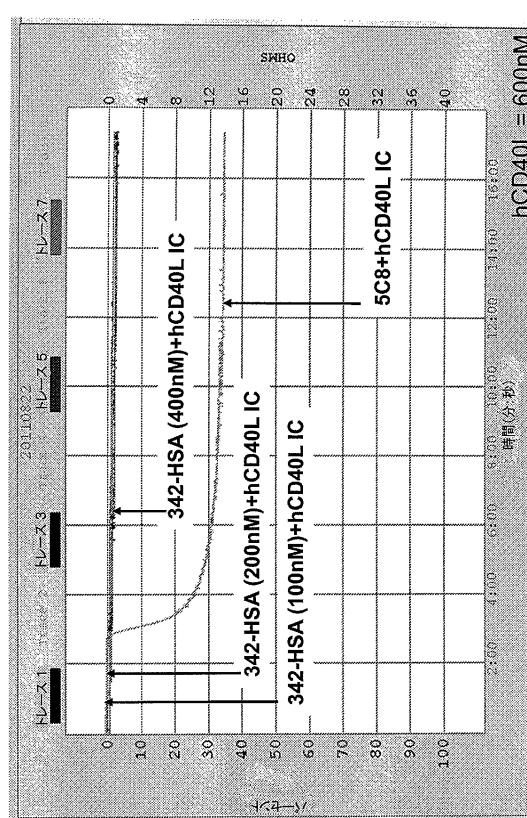
【図16A】



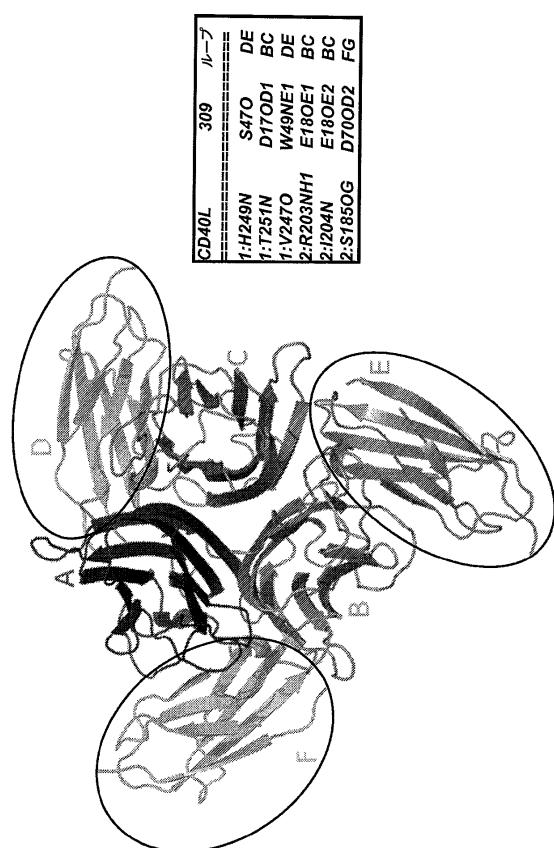
【図16B】



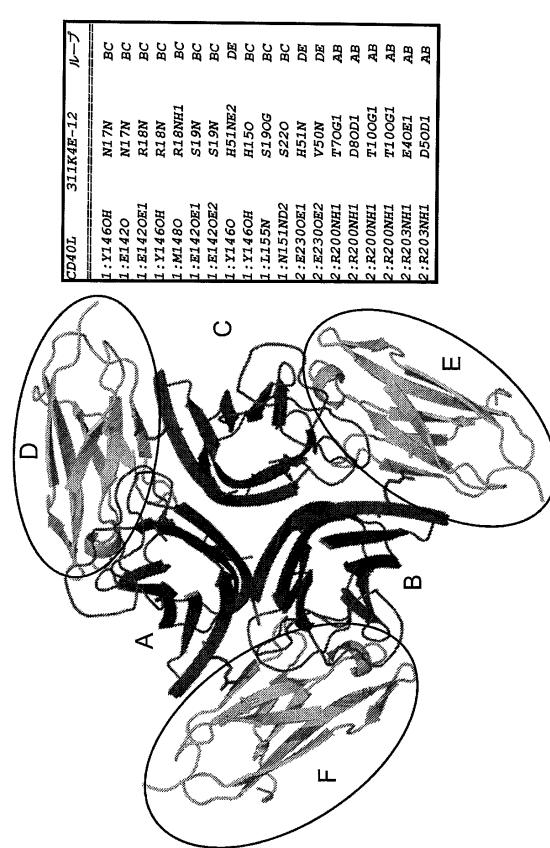
【図16C】



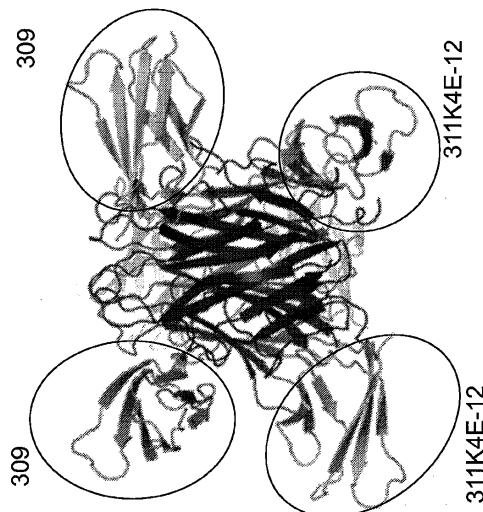
【図17A】



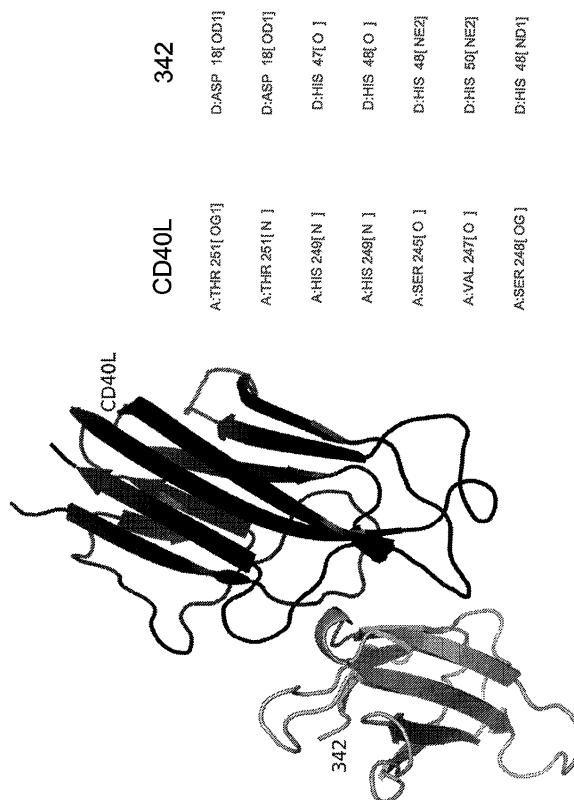
【図17B】



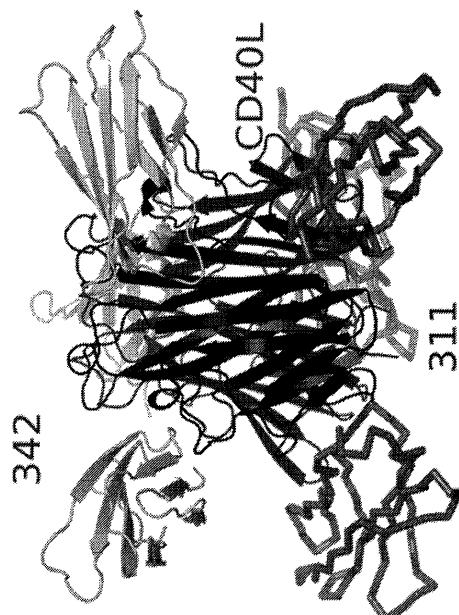
【図17C】



【図17D】



【図 17 E】



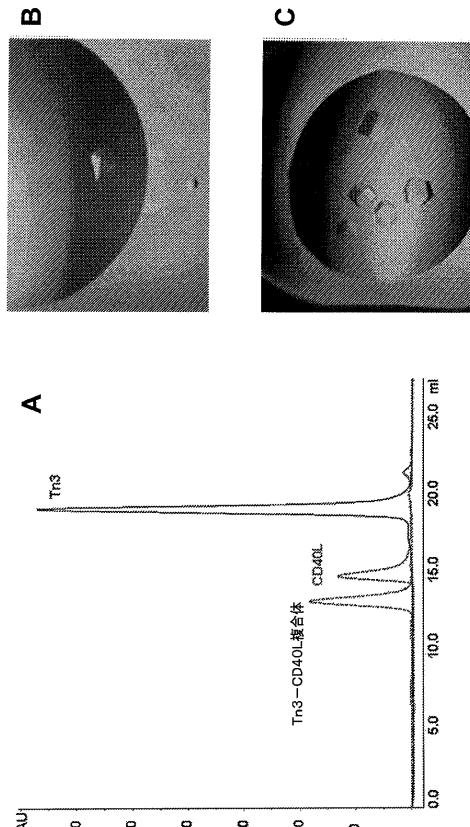
【図 18 B】

MIETYNQSP RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMGSA LEAVYTHRRRL DKIEDERNLH 60
EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LINCEBEIKSQ FEGFYKDML NKEETKKENS FEMOKGDNP 120
QIAAHVISEA SSKTTTSVLW AEKGXYTMNS NLVTLNGKQ LTVKRQELYY IYAQVTECSN 180
REASSPAPEI ASLCLIKSPGR FER~~T~~LLRAAN THSSAKPCQQ QSIHLGGYE LQP GASVFN 240
YTDPSQVSHG TGTTSFLIK L 261

【図 18 A】

MIETYNQSP RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMGSA LEAVYTHRRRL DKIEDERNLH 60
EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LINCEBEIKSQ FEGFYKDML NKEETKKENS FEMOKGDNP 120
QIAAHVISEA SSKTTTSVLW AEKGXYTMNS LTVKRQELYY IYAQVTECSN 180
REASSPAPEI ASLCLIKSPGR FER~~T~~LLRAAN THSSAKPCQQ QSIHLGGYE LQP GASVFN 240
YTDPSQVSHG TGTTSFLIK L 261

【図 19】



【配列表】

0006140712000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	17/14	(2006.01)
A 6 1 P	25/00	(2006.01)
A 6 1 P	19/00	(2006.01)
A 6 1 P	3/06	(2006.01)
A 6 1 P	7/06	(2006.01)
A 6 1 P	1/16	(2006.01)
A 6 1 P	15/00	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)
A 6 1 P	9/10	(2006.01)
A 6 1 P	27/02	(2006.01)
A 6 1 P	3/10	(2006.01)
A 6 1 P	27/06	(2006.01)
A 6 1 P	5/14	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	31/04	(2006.01)
A 6 1 P	19/02	(2006.01)
A 6 1 P	37/06	(2006.01)
A 6 1 P	1/04	(2006.01)
A 6 1 P	17/00	(2006.01)
A 6 1 P	21/02	(2006.01)
A 6 1 P	7/00	(2006.01)
A 6 1 P	17/06	(2006.01)
A 6 1 P	13/12	(2006.01)
A 6 1 P	11/00	(2006.01)
C 0 7 K	14/00	(2006.01)
C 0 7 K	14/765	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)
C 0 7 K	14/725	(2006.01)
		C
		14/725

(74)代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(72)発明者 コイル, アンソニー

アメリカ合衆国 02118 マサチューセッツ州, ボストン, ユニオン パーク 12

(72)発明者 バカ, マニュエル

アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー

(72)発明者 システッド, トーマス

アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー

(72)発明者 ドラビック, スティシー

アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー

- (72)発明者 グリンバーグ , ルバ
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州 , ゲイサーズバーグ , ワン メディミューン ウェイ , メディミューン , エルエルシー
- (72)発明者 ノバラ , シャバズ
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州 , ゲイサーズバーグ , ワン メディミューン ウェイ , メディミューン , エルエルシー
- (72)発明者 オガネスヤン , バヘー
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州 , ゲイサーズバーグ , ワン メディミューン ウェイ , メディミューン , エルエルシー
- (72)発明者 ハーブスト , ロナルド
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州 , ゲイサーズバーグ , ワン メディミューン ウェイ , メディミューン , エルエルシー
- (72)発明者 スペンサー , デビッド , ケネス
アメリカ合衆国 20878 メリーランド州 , ゲイサーズバーグ , ワン メディミューン ウェイ , メディミューン , エルエルシー

審査官 松原 寛子

- (56)参考文献 特表2011-501951(JP,A)
Therapeutic targets of the TNF superfamily , 2009年 , Vol.647 , p.8-36

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C12N 15/00
JST Plus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)
Caplus / REGISTRY (STN)
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)