

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4813656号
(P4813656)

(45) 発行日 平成23年11月9日(2011.11.9)

(24) 登録日 平成23年9月2日(2011.9.2)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C O 7 K	14/705 (2006.01)	C O 7 K	14/705
C O 7 K	19/00 (2006.01)	C O 7 K	19/00
C O 7 K	16/00 (2006.01)	C O 7 K	16/00
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21

請求項の数 28 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-534642 (P2000-534642)	(73) 特許権者	507195210
(86) (22) 出願日	平成11年3月5日(1999.3.5)		セファロン・オーストラリア・(ヴィーアイシー)・ピーティーワイ・リミテッド
(65) 公表番号	特表2002-505103 (P2002-505103A)		オーストラリア・ニュー・サウス・ウェールズ・2 1 1 3・マクアリー・パーク・エッピング・ロード・37・レヴェル・2
(43) 公表日	平成14年2月19日(2002.2.19)	(74) 代理人	100108453
(86) 国際出願番号	PCT/AU1999/000136		弁理士 村山 靖彦
(87) 国際公開番号	W01999/045110	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開日	平成11年9月10日(1999.9.10)		弁理士 志賀 正武
審査請求日	平成18年3月1日(2006.3.1)	(74) 代理人	100089037
(31) 優先権主張番号	PP 2210		弁理士 渡邊 隆
(32) 優先日	平成10年3月6日(1998.3.6)	(74) 代理人	100110364
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)		弁理士 実広 信哉
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 V様ドメイン結合分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも一つの単量体非抗体リガンドV様ドメイン(VLD)を含む、標的分子に対するアフィニティーを有する結合部分であって、前記少なくとも一つの単量体V様ドメインが、

(i) CDRループ構造のサイズが、未改変VLD中の相当するCDRループ構造と比較したときに、増大している；および/または

(ii) 改変または置換により、一以上のCDRループ構造内もしくは間に、ジスルフィド結合の形成を生じる

ように、少なくとも一つのCDRループ構造またはその一部が改変または置換されており、

非抗体リガンドが、CTLA-4、CD28またはICOSである

ことを特徴とする、結合部分。

【請求項2】

CDRループ構造のサイズが、一つのアミノ酸残基によって増大する、請求項1に記載の結合部分。

【請求項3】

CDRループ構造のサイズが、少なくとも二つのアミノ酸残基によって増大する、請求項1に記載の結合部分。

【請求項4】

10

20

C D R ループ構造のサイズが、少なくとも六つのアミノ酸残基によって増大する、請求項 1 に記載の結合部分。

【請求項 5】

C D R ループ構造のサイズが、少なくとも九つのアミノ酸残基によって増大する、請求項 1 に記載の結合部分。

【請求項 6】

改変 V L D の可溶性が、未改変 V L D と比較した場合に、改善している、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の結合部分。

【請求項 7】

改変 V L D の結合アフィニティーが、未改変 V L D と比較した場合に、変化している、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の結合部分。

10

【請求項 8】

未改変 V L D の少なくとも一つの天然リガンドに対する改変 V L D のアフィニティーが低減している、請求項 7 に記載の結合部分。

【請求項 9】

改変 V L D の結合特異性が、未改変 V L D の結合特異性と異なる、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の結合部分。

【請求項 10】

非抗体リガンドが、C T L A - 4 である、請求項 1 に記載の結合部分。

【請求項 11】

20

一以上の C D R ループ構造が、ソマトスタチンまたはヘマグルチニン由来である結合決定基で置換されている、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の結合部分。

【請求項 12】

一以上の C D R ループ構造が、抗体由来の一以上の C D R ループ構造で置換されている、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の結合部分。

【請求項 13】

抗体が、ラット、マウス、ヒト、ラクダ、ラマまたはサメ由来である、請求項 12 に記載の結合部分。

【請求項 14】

抗体が、ラクダ抗体 c A B - L y s 3 およびヒト抗メラノーマ抗体 V 8 6 から選択される、請求項 12 または請求項 13 に記載の結合部分。

30

【請求項 15】

診断剤に結合した、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の結合部分。

【請求項 16】

診断剤が、ストレプトアビジン、ビオチン、放射性同位元素、染料マーカーまたは他のイメージング剤からなる群から選択される、請求項 15 に記載の結合部分。

【請求項 17】

化学的または遺伝学的に共に結合した、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の二つ以上の結合部分を含む試薬。

【請求項 18】

40

固形支持物上に固定化した、またはバイオセンサー表面に結合させた、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の結合部分または試薬。

【請求項 19】

請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の結合部分をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 20】

請求項 19 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 21】

請求項 20 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 22】

細胞が細菌細胞である、請求項 21 に記載の宿主細胞。

50

【請求項 2 3】

結合部分を発現できる条件下で、請求項 2 1 または請求項 2 2 に記載の宿主細胞を培養すること、および任意で結合部分を回収することを含む、結合部分の作製方法。

【請求項 2 4】

結合部分がグリコシル化されていない、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

標的分子に対するアフィニティーを有する結合部分を選択する方法であって、標的分子に対するアフィニティーを有する結合部分の発現に対して、一つ以上の非抗体リガンド V L D をコードするポリヌクレオチドのライブラリーをスクリーニングすることを含み、

(i) C D R ループ構造のサイズが、未変 V L D 中の相当する C D R ループ構造と比較したときに、増大している；および/または

(i i) 変換または置換により、一以上の C D R ループ構造内もしくは間に、ジスルフィド結合の形成を生じる

ような、該ポリヌクレオチドが少なくとも一つの V L D における少なくとも一つの C D R ループ構造において変換または置換をもたらす変異生成をうけており、

非抗体リガンドが、C T L A - 4、C D 2 8 または I C O S である

ことを特徴とする、方法。

【請求項 2 6】

単離された変 V L D の可溶性が単離された未変 V L D と比較した時に改善されている、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

スクリーニング方法が、変 V 様ドメインをバクテリオファージ遺伝子 III コートタンパク質融合体として、バクテリオファージ粒子の表面にディスプレイすることを含む、請求項 2 5 または 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

スクリーニング方法が、リボソームディスプレイ選択系において、変 V 様ドメインをディスプレイすることを含む、請求項 2 5 から 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、標的分子に対するアフィニティーを有する V 様ドメイン結合分子に関する。また、本発明は、これらの V 様ドメイン結合分子を含む組成物に関し、これらの分子の使用を含む診断または処置方法に関する。また、本発明は、新規な結合アフィニティーおよび/または特異性を有する V 様ドメイン結合分子を選択する方法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

イムノグロブリン・スーパーファミリー - 抗体可変 (V) ドメイン

抗体は、特異的な高アフィニティー結合剤の実例であり、イムノグロブリンドメインの可変重鎖 (V_H) と可変軽鎖 (V_L) との相互作用による抗原結合部分を提供する。結合界面は、相補性決定領域 (C D R) と称される六つの表面ポリペプチドループによって形成され、高頻度に可変で、結合している、各可変ドメインのうちの一つが、抗原との相互作用に対して、十分に広い表面積を提供する。特異的結合剤は、V_H および V_L ドメインのみの結合によって F v モジュールを形成することができる。V ドメインをリンカーポリペプチドと結合させて、単一鎖 s c F v モジュールにすることによって、細菌の発現が、増強される。齧歯類の C D R ループ構造を、ヒト F v 枠組み上にグラフト化することによる、組み換え抗体の「ヒト化」が、W i n t e r ら、E P - 2 3 9 4 0 0 によって開示されている。

【0003】

単一鎖 F v モジュールの発現および折畳特性を改善する方法が、N i e b a ら (1 9 9 7) によって記載されていた。天然の哺乳動物の抗体から得られた単一 V ドメインの特性は

10

20

30

40

50

、Gussowら、WO/90/05144とEP0368684B1、およびDavisら、WO/91/08482によって、記載されている。単一ラクダ科動物のVドメインが、Hamersら、WO/96/34103とWO/94/25591によって、記載されている。ヒトアミノ酸配列を、ラクダ科動物のアミノ酸配列と置換することにより、ヒトV_Hドメインの表面の疎水性を低減させる方法は、DaviesとRiechmann(1994)によって記載される。CDRループにおけるシステイン残基の挿入を含み、タンパク質の安定性をさらに増強するために、ヒトV_H配列の他の領域を、ラクダの配列と置換する方法は、DaviesとRiechmann(1996)によって記載される。

【0004】

V_HまたはV_Lドメインのどちらか一方を用いて、高いアフィニティーの単一ドメイン結合剤を設計するいくつかの試みは、結合特異性の欠如と、V_HとV_Lドメインが相互作用する疎水性表面の不在下における単一ドメイン固有の不溶性により、成功していない(Korttら、1995)。

【0005】

T細胞受容体可変(V)ドメイン

T細胞受容体は、V_HとV_Lドメインの結合により生じる抗体のFvモジュールに類似する構造に、結合してなる二つのVドメインを有する。Novotnyら(1991)により、いかにして、T細胞受容体の二つのVドメイン(およびと称する)が、単一鎖ポリペプチドとして融合して発現できるのか、およびさらに、いかにして、疎水性を低減するために、直接的に抗体scFvに類似する表面残基を変化させるのかについて、記載された。他の文献には、二つのVとVドメインを含む、単一鎖T細胞受容体の発現特性について、記載されている(WulfigとPluckthun、1994; Ward、1991)。

【0006】

非抗体リガンド - CTLA-4とCD28様ドメイン

また、V様ドメインを含む特異的結合対に結合する非抗体リガンドの種類がある。これらのV様ドメインは、共に結合してFv型分子にならない傾向にあるため、抗体もしくはT細胞受容体のV様ドメインから識別される。これらの非抗体リガンドは、標的分子に対する高いアフィニティーを有する新規な結合部分を開発するための代替枠組みを提供する。従って、可溶性であるこれらの非抗体リガンドから得られた単一ドメインV様結合分子が、望ましい。適した非抗体リガンドの実施例は、CTLA-4、CD28およびICOSである(Hutloffら、1999)。

【0007】

細胞毒性Tリンパ球付随抗原4(Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4)(CTLA-4)と該相同体の細胞表面タンパク質CD28とICOSは、免疫応答時におけるT細胞制御に関連している。CTLA-4は、活性化T細胞表面上に、初期かつ一過性に発現する44kDaホモ二量体であり、免疫応答の制御に作用する抗原提示細胞上のCD80とCD86表面抗原と相互作用する(Waterhouseら、1996、van der Merweら、1997)。CD28は、T細胞上に主に発現する44kDaホモ二量体であり、CTLA-4と同様に、免疫応答の制御に作用する抗原提示細胞上のCD80とCD86表面抗原と相互作用する。最近の学説では、例えば、ノックアウトマウスにおけるCTLA-4の遺伝子欠損により、広範囲における活性化T細胞の過増殖が認められる(Waterhouseら、1995)など、利用できるリガンドに対する、CTLA-4とCD28との競合が、免疫応答のレベルを制御することがディスプレイされている。

【0008】

各CTLA-4単量体サブユニットは、N末端細胞外ドメイン、膜貫通領域、およびC末端細胞内ドメインからなる。細胞外ドメインは、N末端V様ドメイン(VLD;イムノグロブリン・スーパーファミリーに対する相同性より、約14kDaの推定分子量である)

10

20

30

40

50

と、免疫応答の制御に作用する抗原提示細胞上のCD80とCD86表面抗原と相互作用する、VLDを膜貫通領域に連結する約10残基の軸を含む。VLDは、抗体VドメインのCDR-1、CDR-2およびCDR-3に相当する表面ループを含む(Metzler、1997)。CTLA-4における最近の構造および変異研究により、CD80とCD86への結合が、A'GFCC'V様鎖から、およびCDR3様表面ループにおける高度に保存されたMYPPPY配列から、形成されたVLD表面を介して生じることが示されている(Peachら、1994;Mortonら、1996;Metzlerら、1997)。CTLA-4単量体間の二量体化は、二軸におけるシステイン残基(Cys¹²⁰)間のジスルフィド結合を介して生じ、これにより、二つの細胞外ドメインが連結されるが、V様ドメイン間での直接的な会合は認められない(Metzlerら、1997)。

10

【0009】

イン・ビトロにおけるCTLA-4の可溶性の発現

おそらく発現タンパク質の凝集により、ヒトCTLA-4分子の細胞外ドメインとV様ドメイン(VLD)のどちらも、細菌細胞において、可溶性単量体として十分に発現されていない(Linsleyら、1995)。大腸菌において、細胞外N末端ドメイン(Cys¹²⁰を含む、Met¹からAsp¹²⁴)を発現させると、二つのCTLA-4V様ドメインがCys¹²⁰におけるジスルフィド結合により連結された、二量体の分子量28kDaのタンパク質が生成される。Val¹¹⁴における先端除去により、これらシステインを除去し、可溶性単量体型での14kDaVLDの発現を可能にすることが企図された。しかしながら、生成物は凝集し、通常はグリコシル化によってマスクされていた疎水性部位が、露出し、凝集を引き起こしたことが結論づけられた(Linsleyら、1995)。

20

【0010】

真核細胞発現系(すなわち、CHO細胞と酵母*Pichia pastoris*;Linsleyら、1995;Metzlerら、1997;Gerstmayerら、1997)において、単量体のグリコシル化CTLA-4細胞外ドメインを発現させることができたとのいくつかの報告がある。これらの真核細胞発現系におけるグリコシル化は、VLDにおける二つのN-連結グリコシル化部位(Asn76とAsn108)で生じることが推定される。しかしながら、Ig-CH2/CH3ドメインに融合したCTLA-4VLDをコードする遺伝子を発現させた場合、高い収率で、Fcサブユニットに連結された二つのCTLA-4VLDを有する二量体組み換えタンパク質が生成されることが報告されているのみである(WO95/01994とAU16458/95)。AU60590/96には、天然のCD80とCD86リガンドに対するアフィニティーを保持して改変するMYPPPY表面ループにおいて、最初のチロシン(Y)が単一アミノ酸置換されたCTLA-4VLDの変異型が、記載されている。AU60590/96には、真核細胞において発現させた組み換えCTLA-4/Ig融合タンパク質として、好ましいCTLA-4VLDの可溶性が記載されているが、真核細胞発現系における凝集の問題点は解決されていない。EP0757099A2には、CTLA-4変異分子の使用、例えばCDR3様ループにおける変異体のリガンド結合における変化の作用が記載されている。

30

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明は、CTLA-4、CD28およびICOSなどの非抗体リガンドのV様ドメイン(VLD)から得られた新規な結合分子を開発した。VLD内のCDRループ構造の置換によって、結合特異性が変化して可溶性が改善された、単量体で正確に折り畳まれた分子を、予期せずに産生した。

40

【0012】

従って、本発明の第一の態様において、非抗体リガンドから得られた少なくとも一つの単量体V様ドメイン(VLD)を含み、該少なくとも一つの単量体V様ドメインが、未改変VLDと比較した場合に、改変VLDの可溶性が改善されるように、少なくとも一つのCDRループ構造もしくはその一部を改変もしくは置換されていることを特徴とする結合部

50

分を提供する。

【0013】

本発明の範囲内で、改変または置換は、少なくとも一つのCDRループ構造の一以上の物理特性（例えば、サイズ、形状、電荷、疎水性など）に対するあらゆる変化を含むことができる。改変または置換により、少なくとも一つのCDRループ構造のサイズを低減させることができる。しかしながら、好ましい実施態様において、少なくとも一つのCDRループ構造またはその一部が、

(i) 未改変VLDにおいて相当するCDRループ構造と比較した場合に、CDRループ構造のサイズが増大している；および/または、

(ii) 改変または置換により、一以上のCDRループ構造内もしくは間のジスルフィド結合が形成される、
ように改変または置換される。

10

【0014】

第二の態様において、本発明は、非抗体リガンドから得られた少なくとも一つの単量体V様ドメイン(VLD)を含み、該少なくとも一つの単量体V様ドメインは、少なくとも一つのCDRループ構造またはその一部が、

(i) 未改変VLDにおいて相当するCDRループ構造と比較した場合に、CDRループ構造のサイズが変化している；および/または、

(ii) 改変または置換により、一以上のCDRループ構造内もしくは間のジスルフィド結合が形成される、
ように改変または置換されていることを特徴とする結合部分を提供する。

20

【0015】

第二の態様の好ましい実施態様において、CDRループ構造のサイズは、少なくとも二つ、より好ましくは少なくとも三つ、さらに好ましくは少なくとも六つ、よりさらに好ましくは少なくとも九つのアミノ酸残基によって増加している。

【0016】

また、より好ましい実施態様において、本発明の第一または第二の態様の改変された結合部分は、未改変の結合部分と比較した場合に、変化した結合アフィニティーまたは特異性を示す。好ましくは、CDRループ構造を置換または改変することによる効果は、未改変VLDの一以上の天然のリガンドに対するVLDのアフィニティーを低減させるまたは消失させることである。好ましくは、CDRループ構造を置換または改変することによる効果は、VLDの結合特異性も変化することである。従って、改変VLDが、未改変VLDの結合対と異なる特異的結合対に、結合することが好ましい。

30

【0017】

「V様ドメイン」または「VLD」という言葉は、可変重鎖(V_H)または可変軽鎖(V_L)抗体に類似する構造上の特徴を有するドメインを表すことが企図される。これらの類似する構造上の特徴は、CDRループ構造を含む。「CDRループ構造」によって、我々は、抗体Vドメインにおける相補性決定領域のような、表面ポリペプチドループ構造または領域を意味する。

【0018】

「非抗体リガンド」という言葉は、抗体またはT細胞受容体でない、特異的結合対に結合するあらゆるリガンドを表すことが企図される。適切な非抗体リガンドの実施例は、CTLA-4、CD28およびICOSなどのT細胞表面タンパク質である。本発明に適したV様ドメインを提供できる他の非抗体リガンドが、他のT細胞表面タンパク質、例えば、CD2、CD4、CD7およびCD16；B細胞表面タンパク質、例えば、CD19、CD79a、CD22、CD33、CD80およびCD86；接着分子、例えば、CD48、CD54ICAMおよびCD58、であることが、当業者によって認識されるであろう。表1に列挙するこれらの分子は、本発明の単一ドメイン結合分子の基を形成する構造の一部の一覧を提供する。

40

【0019】

50

「非抗体リガンドから得られたV様ドメイン」という言葉は、非抗体リガンドから得られたV様ドメインの少なくとも一部を含むキメラV様ドメインを包括することが企図される。

【0020】

表1：非抗体リガンド

分子	サイズ	構造	
T細胞表面タンパク質			
CD 2	45 - 58 kDa	VC ¹ ドメイン	
CD 4	55 kDa	V2C2	
CD 7	40 kDa	Vドメイン	10
CD 16	50 - 65 kDa	2 x Cドメイン	
B細胞表面タンパク質			
CD 19	95 kDa	2 x Cドメイン	
CD 79a	33 kDa		
CD 22	130 - 140 kDa	1 x V 6 x Cドメイン	
CD 33	67 kDa	VCドメイン	
CD 80	60 kDa	VCドメイン	
CD 86	60 kDa	VCドメイン	
接着分子			
CD 48	45 kDa	VCドメイン	20
CD 54 ICAM	85 - 110 kDa		
CD 58	55 - 70 kDa	VCドメイン	

1V = 可変Igドメイン、C = 定常ドメイン

これらの分子は、(1) The Leucocyte Antigen Facts Book, 1993, Eds Barclay et al. Academic Press, London; および (2) CD Antigen 1996(1997) Immunology Today 18, 100-101において記載されており、これらの全ての内容が、ここに参照として取り込まれる。

【0021】

本発明の改変された結合部分の「可溶性」は、正確に折り畳まれた、単量体ドメインの産物と相関する。従って、改変VLDの可溶性は、HPLCによってアッセイすることができる。例えば、可溶性(単量体)VLDは、HPLCクロマトグラフ上で単一ピークを生じるであろうし、一方不溶性(例えば、多重結合で凝集している)VLDは、複数のピークを生じるであろう。従って、当業者であれば、通常のHPLC技術を用いて、改変VLDの可溶性の増加を検出することができるであろう。

【0022】

本発明の結合部分が、共に結合し、化学的または遺伝学的に、多価または多機能の試薬となることが、認識されるであろう。例えば、Cys¹²⁰を含む天然CTLA-4において、C末端の付加により、二量となる。

【0023】

また、本発明の結合部分は、様々な診断用製剤のための他の分子に結合させることができる。例えば、VLDは、ポリペプチドC末端を含むことができ、または多イン・ビトロアッセイにおいて、多部位で、ストレプトアビジンまたはビオチンに結合させることができる。また、VLDは、放射性同位元素、染料マーカー、または腫瘍、凝血塊などのイン・ビボ検出および/または局在のためのその他のイメージング剤に結合させることができる。また、VLDは、診断およびバイオセンサー装置のための不溶性装置および台上に結合させることによって、固定化することができる。

【0024】

本発明の第一の態様の最も好ましい実施態様において、V様ドメインは、CTLA-4分子またはCD28分子の細胞外ドメインから得られる。さらなる好ましい実施態様において、CTLA-4 V様ドメインの一以上の表面ループ、好ましくはCDR-1、CDR-2もしくはCDR-3ループ構造が、興味のある標的分子に対する結合アフィニティを

有するポリペプチドと置換される。興味のある標的分子は、限定されないが、薬剤、ステロイド、殺虫剤、抗原、成長因子、腫瘍マーカー、細胞表面タンパク質、またはウィルスコートタンパク質を含む。これらのVLDは、多特異的であり、天然の表面および改変されたポリペプチドの両方によってもたらされたアフィニティーを有することができると思われ得るであろう。

【0025】

さらなる好ましい実施態様において、CTLA-4、CD28およびICOSのV様ドメイン表面ループを置換または改変することによる効果は、CD80とCD86に対する天然のアフィニティーを消失させることである。

【0026】

好ましい一実施態様において、VLDの一以上のCDRループ構造は、抗体から得られた一以上のCDRループ構造と置換される。抗体は、あらゆる種から得ることができる。好ましい実施態様において、抗体は、ヒト、ラット、マウス、ラクダ、ラマまたはサメから得られる。抗体は、ラクダ抗体cAB-Lys3とヒト抗メラノーマ抗体V86から選択されることができる。

【0027】

さらなる好ましい実施態様において、一以上のCDRループ構造が、非抗体ポリペプチド由来の結合決定基で置換される。例えば、一以上のCDRループ構造が、ポリペプチドホルモン、例えば、ジスルフィド結合化ポリペプチド内の14残基が腫瘍細胞の認識に重要であるソマトスタチン、またはウィルスタンパク質、例えばヒトインフルエンザウィルス・ヘマグルチニンタンパク質などで置換されることができる。

【0028】

さらに好ましい実施態様において、結合部分のV様ドメインは、ラクダ科動物もしくはラマの抗体において見出されるCDRループ構造に一致するCDRループ構造を含む。例えば、CDRループ構造は、一以上の通常でない置換体（例えば、本来の極性に対して疎水性である）を含む。他の好ましい実施態様において、CDR-1とCDR-3ループ構造は、長さが非常に不均一である一般的でないコンホメーションを採ることができる。また、V様ドメインは、CDR-1とCDR-3ループ構造（幾つかのラクダV_HH抗体において見出されている）もしくはCDR-2とCDR-3ループ構造（幾つかのラマV_HH抗体において見出されている）を相互に結ぶジスルフィド結合を有することができる。

【0029】

第三の態様において、本発明は、本発明の第一または第二の態様の結合部分をコードするポリヌクレオチドを提供する。ポリヌクレオチドは、プラスミドまたは発現ベクターに組み込むことができる。

【0030】

第四の態様において、本発明は、本発明の第三の態様によるポリヌクレオチドで形質転換した原核もしくは真核宿主細胞を提供する。

【0031】

第五の態様において、本発明は、本発明の第四の態様による宿主細胞を、結合部分の発現を可能にする条件下で培養することと、任意で結合部分を回収することを含む、結合部分を生成する方法を提供する。

【0032】

本発明の好ましい実施態様において、結合部分は、細菌宿主において発現させることによって、産生させることができる。好ましくは、結合部分は、グリコシル化されていない。

【0033】

第六の態様において、本発明は、本発明の第一もしくは第二の態様の結合部分と薬学的に受容できる担体もしくは希釈剤を含む薬学的組成物を提供する。

【0034】

第七の態様において、本発明は、患者の病状を治療する方法であって、患者に本発明の第一または第二の態様による結合部分を投与することを含む方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0035】

イン・ピボで適用する場合、VLDは治療または診断する患者に一致し、あらゆる可能性の外来抗原が除去されていることが好ましい。従って、臨床に適用して使用するVLD分子は、天然のヒトのイムノグロブリン・スーパーファミリーメンバーに十分に一致していることが好ましい。

【0036】

第八の態様において、本発明は、標的分子に対するアフィニティーを有する結合部分を選択する方法であって、一以上の非抗体リガンドから得られたVLDをコードするポリヌクレオチドのライブラリーを、標的分子に対するアフィニティーを有する結合部分の発現でスクリーニングすることを含み、該ポリヌクレオチドは、少なくとも一つのVLDにおける少なくとも一つのCDRループにおける改変または置換を生じる突然変異を受けており、単離された改変VLDの可溶性が、単離された未改変VLDと比較した場合に改善されている方法を提供する。

10

【0037】

本発明の第八の態様の範囲内で、あらゆるランダムまたは標的突然変異生成方法が、V様ドメインに改変を導入するために用いられることは、当業者によって、認識されるであろう。好ましい実施態様において、突然変異生成は、標的突然変異生成である。標的突然変異生成は、好ましくは、スプライスオーバーラップPCR法を用いた、少なくとも一つのCDRループ構造内での少なくとも一つの配列の置換を含む。

【0038】

また、ポリヌクレオチドライブラリーは、非天然のCDRループ構造を含むVLDをコードする配列だけでなく、天然のイムノグロブリンにおいて見出されたCDRループ構造と十分に同一であるCDRループ構造を含むVLDをコードする配列を含むことが、当業者によって認識されるであろう。

20

【0039】

本発明の第八の態様の好ましい実施態様において、スクリーニング方法は、改変されたV様ドメインを、バクテリオファージ粒子の表面上の遺伝子IIIタンパク質融合体としてディスプレイすることを含む。該ライブラリーは、V様ドメインをコードするポリヌクレオチドを含む、pHFA、fd-tet-dogまたはpFAB.5cなどのバクテリオファージを含むことができる。

30

【0040】

第八の態様のさらに好ましい実施態様において、スクリーニング方法は、リボソームディスプレイ選択系において、改変V様ドメインをディスプレイすることを含む。

【0041】

この明細書を通して、「含む」または「含んでいる」などの言葉は、記載された要素、全過程、または要素群の包含を含意すると解されるであろうが、あらゆる他の要素、全過程、もしくは要素群の排除を含意しないと解されるであろう。

【0042】

【発明の実施の形態】

本発明は、例えば、ヒトCTLA-4分子などの、イムノグロブリン・スーパーファミリーメンバーのV様ドメインから得られた新規な可溶性VLD結合分子の設計に関する。本発明の好ましい結合分子は、以下の利点：(i)天然ヒトタンパク質の使用により、ヒトの治療に用いる場合に、免疫系応答に対する保護をしばしば必要とする工程である、組み換え分子の連続したヒト化が不要となる；(ii)ドメインが、上記のように(C末端部におけるCys120残基の組み込みにより、二量体分子を生成する)、天然の単量体である；および(iii)構造上の改変により大腸菌発現レベルが向上する、をもたらし。

40

【0043】

最初のCTLA-4構造決定の公表前に、この分子とCD28の両方の利用できる配列データおよび変異分析が分析された。これにより、抗体CDR1、2および3領域に相当する領域のモデリングまたは推測が許容された。そのような領域が、分子の枠組みに十分な

50

作用をもたらすことなく、変異または置換されやすく、従って正確に折り畳まれた分子の発現を許容すると推測されていた。続いて公表された構造 (Metzlerら、1997) により、リガンド結合部分からのCDR1の予期しなかった分離と、リガンド結合表面と接触する平らな表面を形成するCDR3の広範囲な曲がりにもかかわらず、これらの推測が正確であることが示された。

【0044】

実験の最初の設定において、ヒトCTLA-4分子のV様ドメインは、CDRループ構造を、二つの定義したポリペプチドのどちらかと置換して、改変した。二つのポリペプチドは、ヒトソマトスタチン (Som) とヒトインフルエンザウィルスヘマグルチニンタンパク質 (Ha - 標識) であった。ソマトスタチン (SRIF: ソマトスタチン遊離阻害因子) は、ループ中の中央10残基に面したジスルフィド結合を含む14残基ポリペプチドである。ヒトソマトスタチンは、生体内で生物学的に広範囲に存在し、成長ホルモン分泌の制御などの多くの異なる生理機能を媒介する (Reisne、1995)。ヒトソマトスタチンは、異なる組織特異性とアフィニティーを有する多くの特異的受容体に、結合する (少なくとも五つのサブタイプが存在する) (Schonbrunnら、1995)。これらの結合と活性の態様は、まだ理解に乏しいが、一つの顕著な特徴は、多くのガン細胞株、例えば神経 - 内分泌系のガンと小肺ガンなどに、ソマトスタチン受容体が高密度に存在することである (Reubi、1997)。非常に不安定なソマトスタチンポリペプチドと比較して、分解に耐性であるソマトスタチンの人工アナログが、そのような腫瘍のイメージング用に作製されている。

【0045】

ヘマグルチニンエピトープ配列は、9残基YPYDVPDYAからなる。この配列を特異的に認識する、商業的に製造された抗体が、利用できる。エピトープ標識は、タンパク質の構造内に、ランダムに、または方向性に取り込まれた場合、検出できる (Canfieldら、1996)。

【0046】

CTLA-4 V様ドメインにおける一以上のCDRループ構造を、ソマトスタチンまたはHA - 標識で置換することにより、異なる細菌発現系を用い、可溶性単量体未グリコシル化結合分子が生成される。この驚異的な発見により、V様ドメインが、可溶性単ドメイン分子の構築用の基の枠組みを提供し、これにより分子の結合特異性が、CDRループ構造の改変により設計されることが示された。

【0047】

V様ドメインの基本の枠組み残基は、ラクダ類動物抗体に存在する構造上の特徴に従って、改変することができる。ラクダ重鎖イムノグロブリンは、単一のVHドメインのみからなることより、「従来の」抗体構造とは異なる (Hamers - Castermanら、1993)。いくつかの特徴により、これらの抗体は、可溶性と、十分に広い抗原結合表面をディスプレイできないこととの、二つの問題を克服することができる。

【0048】

最初に、曝された枠組み残基における複数の非従来の置換 (本来の極性に対して、顕著に疎水性) により、疎水性表面が低減する一方で、内部のシート枠組み構造が維持される (Desmyterら、1996)。さらに、三つのCDRループ内で、いくつかの構造上の特徴が、通常、VLドメインによって提供される抗原結合表面の欠失を補う。CDR2ループが、他のVHドメインと大きく異ならない一方で、CDR-1と-3ループは、長さが非常に不均一である一般的でない構造を採る。例えば、Ig分子では通常5残基にであるのに対して、H1ループは2-8残基の範囲で含むことができる。しかしながら、CDR3ループは、より大きな変化を示す: 報告された17ラクダ抗体配列において、この領域の長さは、7から21残基まで変化する (Muyldermansら、1994)。第三に、多くのラクダ科動物のVHドメインが、ラクダの場合はCDR-1と-3を、ラマの場合はCDR-1と-2を相互に連結するジスルフィド結合を有する (Vuら、1997)。この構造上の特徴の機能は、ループ安定性の保持であり、抗原内のポケット

への結合を許容し、表面積を増大する、平らにならないようにより制御されたループ構造を提供する。しかしながら、全てのラクダ科動物抗体が、このジスルフィド結合を有するわけではないことから、これが構造上絶対的に必要なものではないことが示唆される。

【0049】

これらの前記特徴は、ラクダ科動物のVドメインが、可溶性分子としてイン・ビボで、様々な標的抗原に対して有効な免疫応答を形成するのに十分に高いアフィニティーで存在できる。これに対して、Igスーパーファミリーの細胞表面受容体(CD4およびCD2など)は、V様結合ドメインを含み、CDRループ以外の表面特徴を有する同種の受容体に結合するようである。これらV様ドメインは、同種の受容体に、非常に低いアフィニティーで結合する。二つの細胞表面が連結し、各々が複数の受容体を含む時に、二つの細胞間の生理的シグナリングは、複数部位の結合親和力によって媒介される。CD2は、十分に特徴づけられた例である：CD58への結合は、GFCC'C"面(抗体型CDR-1、CDR-2またはCDR-3ループではない)に局在する荷電された極性残基によって生じた小さな静電気相互作用が強く圧縮された形状によってもたらされる。これにより、低アフィニティーであるが、非常に特異的な相互作用を生じる(Bodianaら、1994)。

10

【0050】

また、本発明は、標的分子に対する新規な結合アフィニティーを有する単一VLD分子を生成し、選択する方法に関する。この方法は、イムノグロブリン・スーパーファミリーのメンバーから得られたV様ドメインの公知の分子進化法の適用を含む。該方法は、多数の変異したV様ドメインをスクリーニングするための、ファージまたはリボソームディスプレイライブラリーの生成を含む。

20

【0051】

ファージ内に含まれるDNAによってコードされるIg様タンパク質(scFv、Fab)などのタンパク質をファージが表面上にディスプレイするように、フィラメント状のfd-バクテリオファージ染色体が設計される(Smith、1985; Huseら、1989; McCaffertyら、1990; Hoogenboomら、1991)。タンパク質分子は、Fdバクテリオファージの表面上に、遺伝子III、もしくははあまり一般的でない遺伝子VIIIによってコードされたファージコートタンパク質に共有結合して、ディスプレイされることができる。遺伝子IIIコートタンパク質への抗体遺伝子の挿入により、ファージ毎に3-5組み換えタンパク質分子が、末端に位置して発現する。これに対して、遺伝子VIIIへの抗体遺伝子の挿入により、ファージ粒子毎に約2000コピーの組み換えタンパク質がディスプレイされる可能性を有するが、これは、単一にディスプレイされたタンパク質のアフィニティーを覆うことができる多価系である。また、Fdバクテリオファージの表面上の機能的Ig様フラグメントのディスプレイから、大腸菌における可溶性Ig様フラグメントの分泌に容易に変換できるため、Fdファージミドベクターが用いられる。ファージディスプレイされた遺伝子IIIコートタンパク質のN末端との融合組み換えタンパク質が、二つのタンパク質遺伝子間に戦略的に位置する終止コドンによって作製され得る。大腸菌のアンバー抑制遺伝子株において、得られたIgドメイン-遺伝子III融合体は、ファージコートにおいてアンカーとなる。

30

40

【0052】

タンパク質のアフィニティーに基づく選択方法は、あらゆる高アフィニティー結合剤、例えば抗体、抗原、受容体およびリガンドなどに適用することができる(例えば、全内容をここに参照として取り込むWinterとMilstein、1991参照)。このように、バクテリオファージ上にディスプレイされる最も高いアフィニティーの結合タンパク質の選択は、タンパク質をコードする遺伝子の回復に結びつけることができる。Igディスプレイファージは、ビーズに共有結合させた同種の結合対への結合、またはELISAもしくは固相ラジオイムノアッセイに類似する様式でのプラスチック表面への吸着によって、アフィニティー選択されることができる。あらゆるプラスチック表面のほとんどが、タンパク質抗原を吸着するであろうが、Nunc Immunotubeなどの幾つか商

50

品が、特にこの目的のために考案されている。

【0053】

リボソームディスプレイ細胞は、細胞不含翻訳系で新規合成され、選択するためにリボソーム表面上にディスプレイさせたポリペプチドを含む (Hanes と Pluckthun、1997; He と Tauszig、1997)。「細胞不含翻訳系」は、リボソーム、タンパク質の合成に要する可溶性酵素 (通常、リボソームと同じ細胞由来)、転移RNA、アデノシン三リン酸、グアノシン三リン酸、リボヌクレオチド三リン酸再生系 (例えば、ホスホエノールピルビン酸とピルビン酸キナーゼ)、および外因性 mRNA によってコードされたタンパク質の合成に要する緩衝塩を含む。ポリペプチドの翻訳は、無傷のリボソーム (すなわち、リボソーム、mRNA 分子および翻訳されたポリペプチドが単一の複合体で会合している) を維持する条件下で、行わせることができる。この有効性は、翻訳されたポリペプチドの「リボソームディスプレイ」をもたらす。

10

【0054】

選択のために、相当するリボソーム複合体と会合している、翻訳されたポリペプチドは、マトリックス (例えば、Dynabead) に結合している標的分子と混合する。標的分子は、興味のあるあらゆる化合物 (またはその一部)、例えば DNA 分子、タンパク質、受容体、細胞表面分子、代謝産物、抗体、ホルモンまたはウイルスであることができる。翻訳されたポリペプチドをディスプレイしているリボソームは、標的分子に結合するであろうし、これらの複合体は選択され、RT-PCR を用いて、該 mRNA を再度増幅させることができる。

20

【0055】

結合分子を改変する幾つかの代替方法が存在するものの、全てのディスプレイ化タンパク質のための一般的な方法は、各結合剤を同種の受容体に対するアフィニティーによってディスプレイライブラリーから選択する様式に従う。これらの剤をコードする遺伝子は、様々なイン・ビボおよびイン・ビトロ変異生成手段のいずれか一つまたは組み合わせによって、改変され、最も高いアフィニティーの結合分子をディスプレイし選択するための新規な遺伝子プールとして構築される。

【0056】

本発明の性質をより明確に理解されることができるよう、それらの好ましい形式を、以下の実施例を参照して説明する。

30

【0057】

実施例 1

遺伝子の構築とクローニング

CTLA-4STM (STM: CTLA-4 の可溶性切断変異体、CTLA-4 キメラV 様ドメインタンパク質を記載するために、ここに用いられる) 遺伝子の構築とクローニングを、標準的で、十分に記載された方法 (特異的に設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応、スプライスオーバーラップ伸長、制限酵素消化など) によって行った。用いたオリゴヌクレオチドプライマーを、図 1-4 に示す。

【0058】

野性型 STM 構造を、SfiI と NotI 制限酵素部位を各々 5' と 3' 末端に組み込んだオリゴヌクレオチドプライマー #3553 と #4316 を用いて、クローン化ヒト CTLA-4 DNA (図 5) から増幅 (逆転写されたヒト cDNA から当業者によって容易に増幅できる) した。これらの末端プライマーは、(i) #4851 または #5443 を、5' 末端に ApaI 部位を組み込むために用いた; (ii) #4486 を、Cys120 残基を含む C 末端を付加するために用いた; (iii) #5467 を、5' 末端に EcoRI 部位を組み込むために用いた; および (iv) 特定のセットの伸長プライマーをリボソームディスプレイのために用いた、ことを除く、全てのさらなる構築において用いた。

40

【0059】

図 1-4 に列挙したオリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせを用いたスプライスオー

50

バーラップPCR法を用い、様々なCDR-1、CDR-2および/またはCDR-3ループ構造置換体を生成した。以下の実施例においてより詳細に記載する変異体を、表2に列挙する。

【0060】

表2

CDR-1の組み合わせ

CDR-1

CTLA-4VLD	S ¹⁹ FVCEYA. SPGKATE.....	VRV...	
抗リゾチーム	S ¹⁹ FVCEYA. SGYTIGPYCMG.....	VRV...	10
ソマトスタチン-14	S ¹⁹ FVCEYA. AGCKNFFWKFTSCATE.	VRV...	
抗メラノーマ	S ¹⁹ FVCEYA. SGFTFSSYAMS.....	VRV...	
無作為抽出1	S ¹⁹ FVCEYA. XXXXXXG.....	VRV...	
無作為抽出2	S ¹⁹ FVCEYA. XXXXXXCXG.....	VRV...	
無作為抽出3	S ¹⁹ FVCEYA. XXarXarXXarCXG.....	VRV...	
無作為抽出4	S ¹⁹ FVCEYA. SPGXXX.....	VRV...	
無作為抽出5	S ¹⁹ FVCEYA. SPGXCX.....	VRV...	
無作為抽出6	S ¹⁹ FVCEYA. XXXXXXATE.....	VRV...	20
無作為抽出7	S ¹⁹ FVCEYA. XXXXXCXATE.....	VRV...	
無作為抽出8	S ¹⁹ FVCEYA. AGCKNXXXXXTSCATE.	VRV...	

CDR-2の組み合わせ

CDR-2

CTLA-4VLD	Q ⁴⁴ VTEVCAA. TYMMGNELTF. LDDSICT...		
抗リゾチーム	Q ⁴⁴ VTEVCAA. AINMGGITF. LDDSICT...		
ヘマグルチニン標識	Q ⁴⁴ VTEVCAA. TYPYDVPDYA. LDDSICT...		
抗メラノーマ	Q ⁴⁴ VTEVCAA. AISGSGGSTY. LDDSICT...		30
無作為抽出1	Q ⁴⁴ VTEVCAA. TYXXGXLTF. LDDSICT...		
無作為抽出2	Q ⁴⁴ VTEVCAA. CYXXGXLTF. LDDSICT...		

CDR-3の組み合わせ

CDR-3		
CTLA-4VLD	C ⁹³ KV. ELMYPPPYL.....	GIG...
抗リゾチーム	C ⁹³ KV. DSTIYASYE_CGHGLSTGGYGYDS.	GIG...
ソマトスタチン-14	C ⁹³ KV. EAGCKNFFWKTFTSC.....	GIG...
抗メラノーマ	C ⁹³ KV. GWGLRGEGDYMDV.....	GIG...
無作為抽出1	C ⁹³ KV. XXXXXXXXXXXX.....	GIG...
無作為抽出2	C ⁹³ KV. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX.....	GIG...
無作為抽出3	C ⁹³ KV. XXXXXX. C. XXXX.....	GIG...
無作為抽出4	C ⁹³ KV. XXXXXX. C. XXXX.....	GIG...
無作為抽出5	C ⁹³ KV. XXXXXXXX. C. XXXX.....	GIG...
無作為抽出6	C ⁹³ KV. XXXXXXXXXXXX. C. XXXXXXXX.....	GIG...
無作為抽出7	C ⁹³ KV. EXXXXXXXXX.....	GIG...
無作為抽出8	C ⁹³ KV. EXXXXXX. C. XXXXXXXX.....	GIG...
無作為抽出9	C ⁹³ KV. EAGCKNXXXXXXXXTSC.....	GIG...

10

【 0 0 6 1 】

CDRループ構造の無作為抽出した断片を生成するために、同様のスプライスオーバーラップ法を、記述のトリプレットが配列NNg/T(式中、Nは、あらゆる四つの可能なヌクレオチド塩基を表す)によってコードされたオリゴヌクレオチドを用いて行った。この組み合わせは、あらゆる可能なアミノ酸残基を網羅する。あるいは、無作為抽出は、アミノ酸のある部分集合に対して偏らせた(例えば、芳香族残基、図3、#5452)。

20

【 0 0 6 2 】

いくつかの事例において、STM遺伝子の構築のために様々な方法を用い、無作為抽出したオリゴヌクレオチドプライマーを、同様に(相補的制限酵素部位で)改変したCTLA-4VLDの枠組み(例えば、図2、#4254)中に直接クローニングするために、制限酵素部位を組み込むように設計した。

【 0 0 6 3 】

完全な構造を、適切な制限酵素の組み合わせ(例えば、Sfi1、Not1、ApaL1、EcoR1)で切断し、適切な発現ベクターにおける同様の部位にクローニングした。これらのベクターは、以下を含む:(i)可溶性タンパク質を生成するための発現ベクターpGC(Coiaら、1996)とpPOW(Powerら、1992;Korttら、1995)、(ii)バクテリオファージとファージミドディスプレイのため、完全STM構造を制限酵素SfiIとNotIまたはApaLIとNotIで切断し、ベクターpHFAとpFAB.5c(ファージミド)またはpfd-Tet-DOG(ファージ)にクローニングした。これらのベクターは、バクテリオファージ粒子当たり、1-2(ファージミド)または3-5(ファージ)コピーで、バクテリオファージの表面において遺伝子3タンパク質融合体として、STMをディスプレイすることを許容する(図6)。

30

40

【 0 0 6 4 】

全てのDNA構造物は、制限酵素分析とDNA配列決定によって確認し、標準的によく理解された方法(ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ウェスタンブロットなど)によって、組み換えタンパク質の発現を試験した。

【 0 0 6 5 】

実施例2

組み換えSTMタンパク質の生成と単離

組み換えタンパク質を、ペリプラズム発現系に対して異なる方法を示すベクターを用いて産生した。これらのベクターは、以下であった;(i)pGC:このベクターは、化学的(IPTG)誘導によって、不均一なタンパク質の高レベルでの発現を許容し、リーダー

50

配列によって、ペリプラズムへ標的とされる。続いて、このリーダー配列は、切断されて、成熟タンパク質を生成する。さらに、このベクターは、組み換えタンパク質のアフィニティー精製を許容する二つの枠内8残基の標識配列（FLAG標識）を含む。(ii) pGCと同様に、切断可能なリーダー配列と二つの枠内8残基の標識配列（FLAG標識）によって、ペリプラズムへ標的とされるタンパク質の発現を、高レベルで熱誘導できる pPOW。

【0066】

組み換えタンパク質は、十分に確立された方法の二つの変型である以下の方法によって精製した。(i) ベクター pGC における細菌クローンを、2 Y T 培地 / 37 / 200 rpm / 100 mg / ml アンピシリン、1% グルコース（最終）中で、一晚培養した。100 mg / ml アンピシリンと 0.1% グルコース（最終）で補充した 2 Y T 培地 0.5 または 2 l 中に、細菌を、1 / 100 希釈し、28 / 200 rpm で培養した。これらの培養物を、光学密度が 0.2 - 0.4 の範囲になるまで培養し、この段階で、それらを 1 mM の IPTG（最終）で誘導した。培養物を、16 時間（一晚）培養し、回収した。細菌は、遠心分離（Beckman JA - 14 ローターまたは相当物 / 6 K / 10 分 / 4）で回収し、ペリプラズム画分を、標準的な方法で回収した。簡単には、細菌ペレットを、100 mM の Tris - HCl / 0.5 M ショ糖 / 0.5 mM の EDTA (pH 8.0) からなるスフェロプラスト形成用緩衝液 1 / 2.5 倍容量中に再度懸濁し、1 / 500 倍容量のニワトリ卵白リゾチーム（水中 2 mg / ml）を添加し、10 分間インキュベーションした。上記スフェロプラスト用緩衝液の 0.5 x 溶液を、次いで、元の培養物の 1 / 5 倍最終容量になるまで添加し、さらに 20 分間インキュベーションを続けた。次いで細胞破片を、遠心分離（Beckman JA - 14 ローターまたは相当物 / 9 K / 15 分 / 4）によってペレットとし、ペリプラズム画分を含む上清を回収した。上記全ての操作を 4 で行った。試料を、すみやかに音波処理し、0.45 μ ニトロセルロース膜で濾過し、速やかに処理、またはアジ化ナトリウム（0.05%）の存在において 4 で保存した。凍結が必要である場合は、凍結融解を一回のみ許容した。(ii) pPOW における細菌クローンを、100 μ g / ml (w / n) アンピシリンを含む 2 x Y T 培地 100 ml 中、30 で一晚培養した。翌日、培養物を用い、OD 600 nm = 0.2 - 0.5 になるまで、100 μ g / ml (w / v) アンピシリンを含む新鮮な 2 x Y T 培地 900 ml 中に播種し、OD 600 nm = 4、すなわち後対数期になるまで、30 で振盪培養した。組み換えタンパク質の発現を誘導するために、温度を、42 まで 1 時間上昇させ、次いでさらに 20 まで 1 時間下降させた。細胞を、遠心分離（Beckman JA - 14 / 6 K rpm / 5 分 / 4）によって回収し、細胞ペレットを、100 ml の抽出用緩衝液（20 mM の Tris pH 8.0 / 0.2 mg / ml (w / v) リゾチーム / 0.1% (v / v) Tween - 20）中に再度懸濁し、4 で一晚インキュベーションした。試料を、30 秒間音波処理し、細胞破片を、遠心分離（Beckman JA - 14 / 14 K rpm / 10 分 / 4）によって回収した。「リゾチーム」洗浄液を含む水相を、保持した。次いで、細胞ペレットを、氷冷した水で二回洗浄し、この「浸透性衝撃」洗浄液を保持した。氷冷した水 100 ml 中でペレットを再度懸濁させた後、一回目の洗浄を 10 分間、二回目の洗浄を一時間、氷上でインキュベーションしながら行った。遠心分離（Beckman JA - 14 / 14 K rpm / 10 分 / 4）後、水相の pH を、10 ml の 10 x TBS、pH 8 を添加して調整した。「リゾチーム」と「浸透性衝撃」洗浄液は、プールし、可溶性または「ペリプラズム」タンパク質画分とする。ペリプラズム画分は、音波処理し、0.45 μ ニトロセルロース膜で濾過し、速やかに処理し、またはアジ化ナトリウム（0.05%）、PMSF（23 μ g / ml）および EDTA（50 mM）の存在において 4 で保存した。

【0067】

組み換えタンパク質を、スルホン酸ジビニル活性化アガロース（Mini - Leak） - 結合化抗 FLAG 抗体カラムを介したアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。ペリプラズム抽出物を、0.05% (w / v) アジ化ナトリウムを含む TBS (pH

10

20

30

40

50

8) で予め平衡化した10mlの抗FLAGカラムに、直接負荷した。結合タンパク質を、Immunopure Gentle Ag/Ab Elution Buffer (Pierce) で溶出した。次いで、試料を、TBS/0.05% (w/v) アジ化物 (pH 8) に対して透析し、限外濾過により3kDaカットオフ膜 (YM3、Diaflo) 上に濃縮し、予め調整したSuperose 12 HRまたはSuperdex 200 HRカラム (Pharmacia Biotech) を用いたHPLCにより、流速0.5 ml/minで分析した。単量体、二量体、および三量体に相当する画分を回収し、上記のように濃縮し、分析するまで4 で保存した。タンパク質濃度は、分光光度計で、A280における消光係数を用い、CTLA-4R細胞外ドメインが1.27、CTLA-4-Som1が0.92、CTLA-4-Som3が1.13、CTLA-4-抗Lysが1.05であることを測定した。上記タンパク質の化学的方法の全ては、当該分野における標準的な方法である。精製したタンパク質は、標準的な方法、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動、ウェスタンブロット、ドットブロットなどによって分析した。

10

【0068】

バクテリオファージ発現ベクターpHFA、pFAB.5cおよびfd-tet dogにおけるクローニングと発現、および続く組み換えバクテリオファージの精製は、標準的に十分に確率された方法で行った。無作為抽出したCTLA-4STMのライブラリーのスクリーニングは、標準的に十分に確率された方法で行った (Galani et al., 1997)。

【0069】

20

実施例3

ソマトスタチンとヘマグルチニンペプチドを組み込んだCTLA-4STM

最初に、CTLA-4STMのCDR1またはCDR3ループ構造を、ソマトスタチンポリペプチドで置換した。この14残基ポリペプチドは、Cys3とCys14の間の内部ジスルフィド結合によって、構造的に拘束されている (図7)。これにより、抗体において見出されたCDRループに類似した、特にジスルフィド結合によって安定化されているラクダ化動物の抗体において見出された長いCDRに類似した、別個のタンパク質ループが形成された。また、Cys120の存在または不在におけるCDR1の置換の効果、すなわち二量体が生成されるかどうかについて、試験した。これらの実験により、予期しない、驚異的な結果が得られた。CDR-1もしくは-3のどちらかを、ソマトスタチンで置換することにより、単量体タンパク質の生成が、有意に増大した。これは、図8において、CDR-3ループ構造をソマトスタチンで置換することにより、二量体/三量体タンパク質種に対する単量体の割合が有意に増大したことを示す。

30

【0070】

さらなる実験において、CDR-1と-3ループ構造の両方を、ソマトスタチンで同時に置換することによって、高レベルでの単量体タンパク質の生成がもたらされた。これにより、広範囲のループ構造の置換が、CTLA-4骨格に適合し得ることが示された。ソマトスタチンループの一つが、構造的に、CTLA-4VLDのCDR-3ループ構造に類似した様式で、分子面に対して水平に位置できる。

【0071】

40

CDRループ構造 - 置換戦略のさらなる拡大において、CDR-2に相当する領域を、8残基ヘマグルチニン (HA) 標識配列で置換した。この領域は、一部、分子の長さに亘るC"鎖を包囲するため、この部位において構造的に拘束されたソマトスタチンループの使用は、不適切であると見なされた。抗HA抗体を用いることによって、HA標識は、このCTLA-4STM上に検出することができる。ゲル濾過実験により、単量体からCDR-2単一置換体が安定でなかったことを示す凝集した種までの範囲のタンパク質種の存在が示された (図9、10)。

【0072】

三つ全てのCDRループ構造を二つのソマトスタチンと一つのHAエピトープでそれぞれ同時に置換することによって、CTLA-4CDRループ構造を、他のポリペプチドと置

50

換することができ、単量体、可溶性STMを生成できる決定的な原則が、証明された。このSTMは、正確に折り畳まれた単量体タンパク質をゲル濾過クロマトグラフィーで生成した(図9、10)。

【0073】

様々なSTMのCTLA-4VLD内のCDRループ構造置換の位置を、図9に示す。アフィニティー精製したSTMタンパク質のHPLC推移を、図10に示す。同一の結果が、二つの異なるタンパク質発現系：タンパク質の発現が化学的に誘導されるpGCと、タンパク質の発現が温度で誘導されるpPOW(実施例2参照)、において生成したタンパク質で得られた(図11)。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ウェスタンブロット分析により、CTLA-4STMが、低減し、予期した分子量まで泳動され、グリコシル化されていないことが示された。単離した単量体STMタンパク質の試験により、凍結融解0, 1または2回後に、それらが単量体型を維持していることが示された(図12)。

【0074】

構造特異的抗CTLA-4抗体により、CDR1と-3ループ構造の両方が置換されたSTMが認識されたことから、CTLA-4STMは、正しい構造を維持していた。興味深いことに、この抗体は、改変されたタンパク質種に観察された強い反応に対して、野性型単量体と、(CDR1置換された)二量体をほとんど認識しなかった。これにより、野性型STMにおいて、ある種の局所的な相互作用により、抗体結合部分が吸蔵され、この相互作用が、二つのCTLA-4分子が互いに連結される時の結果に類似することが示される(推測的には、抗体に対しての接近が阻害される)。

【0075】

実施例4

ラクダ抗リゾチーム抗体に基づくCTLA-4STM

免疫したラクダから単離したラクダV_HH抗体cAb-Lys3は、ニワトリ卵白リゾチームの活性部位のへこみ内に特異的に結合する。同様に機能するCTLA-4STMの性能を例示するために、CTLA-4VLDSTMの三つのCDRループ構造を、cAb-Lys3からの三つのCDRループ構造で置換した。置換体の位置と配列を、図9に示す。pGCまたはpPOWに基づく発現系のどちらかにおけるこのSTM(2V8)の発現により、単量体可溶性タンパク質を顕著に生成した(図10、11)。このCTLA-4STMのタンパク質可溶性は、天然のCTLA-4VLDよりも優れている。ELISA分析により、(pGC生成)精製単量体タンパク質が、非特異的抗原と比較して、およびCDR1ループ構造(PP2)内がソマトスタチンで置換されたCTLA-4STMと比較して、雌鶏リゾチームに特異的に結合することが示された(図13A)。BIAコアによるリアルタイム結合分析により、リゾチームが、固定化抗リゾチームSTMに特異的に結合することが示された(図13B)。このように、CTLA-4STM枠組みが、正確に折り畳まれ、リゾチーム抗原を結合できる様式で、CDRループ構造を呈している。CTLA-4VLD抗リゾチームの発現をさらに増強するために、コード化配列を、スプライスオーバーラップPCRによって、大腸菌の発現に優先的なコドンを含むように、調節した。

【0076】

実施例5

ヒト抗メラノーマ抗体に基づくCTLA-4STM

ヒト由来抗メラノーマ抗体V86は、特異的にヒトメラノーマ細胞に結合する。この抗体は、結合アフィニティーが、完全にV_H領域内にあり、同種のV_Lの付加により結合効率が低下し、VLDメインの小断片と共に発現させたVHドメインが、高い可溶性を有する点において独特である(CaiとGaren、1997)。CTLA-4VLD CDRループ構造の置換により、可溶性が増強し、得られたSTMを細菌発現系において生成させることができることを、さらに例示するために、CTLA-4の三つのCDRループ構造を、V86からの三つのCDRループ領域で置換した。置換の位置と配列を、図9に示す

。pGCにおけるこのSTM(3E4)の再度の発現により、CTLA-4VLDと比較して、可溶性が増強された単量体可溶性タンパク質が顕著に生成された(図10)。

【0077】

実施例6

結合分子ライブラリーとしてのCTLA-4の構築

新規な結合特異性を有するCTLA-4STMを選択するために、VLDライブラリーを、無作為抽出したCDR1とCDR3ループ構造を含むように作製した。ライブラリーを構築するために用いたオリゴヌクレオチドプライマーを、表1に列挙する。ライブラリー構築のために用いたオリゴヌクレオチドの組み合わせを、表3に示す。

【0078】

【表3】

CTLA-4STMライブラリーの組み合わせ

CDR1								
CDR3	4483*	4254	5449	5451	5452	5450	5446	4835
4482	+1	+1	////////	////////	////////	////////	////////	////////
4275	+1	+1	////////	////////	////////	////////	////////	////////
5470	////////	////////	+2	+2	+2	+2	+2	////////
5474	////////	////////	+2	+2	+2	+2	+2	////////
5471	////////	////////	+2	+2	+2	+2	+2	////////
5472	////////	////////	+2	+2	+2	+2	+2	////////
5475	////////	////////	+2	+2	+2	+2	+2	////////
5473	////////	////////	+2	+2	+2	+2	+2	////////
4836	////////	////////	////////	////////	////////	////////	////////	+3

*: オリゴヌクレオチド番号

+: ライブラリーの組み合わせ

1, 2, 3: ライブラリー番号を記載

【0079】

得られたライブラリーをコードするDNA構造物を、fd-ファージミドに基づくライブラリーを作製するためのベクターpHFAまたはpFAB.5cにクローニングし、fd-ファージに基づくライブラリーを作製するためのpfd-Tet-Dogにクローニングした(実施例1と2参照)。ライブラリー1は、ベクターpHFAにクローニングし、 2.1×10^7 個の独立したクローンからなる。ライブラリー3は、ベクターpHFA(5.7×10^5 個の独立したクローン)とpfd-Tet-Dog(2.2×10^4 個の独立したクローン)にクローニングした。ライブラリー2は、ベクターpFAB.5c(1.7×10^7 個の独立したクローン)と、pfd-Tet-Dog(1.6×10^5 個の独立したクローン)にクローニングした。ライブラリーを構築する形質転換コロニーの総数を計数し、CTLA-4STM特異的DNAの存在と割合をアッセイすることによって、多くの独立したクローンを測定した。

【0080】

ライブラリー2の場合、全ライブラリーの多様性を、代表的なクローンの配列決定によって試験した。これらの結果を表4に示す。予期された挿入サイズと配列の多様性が、観察

10

20

30

40

50

された。高い割合のUAG終止コドンが、オリゴヌクレオチド無作為抽出法と一致して、観察された。これらのコドンにより、CTLA-4STM遺伝子3タンパク質融合体の未成熟の終止が生じることを防ぐために、この終止コドンをグルタミン酸残基の挿入によって抑制する、大腸菌株Tg-1とJM109に、ライブラリを形質転換した。システイン残基は、オリゴヌクレオチドの設計から予想されたように多数存在し、CDRループ構造内および中のジスルフィド結合を形成できる位置に存在した。

【0081】

【表4】

ライブラリー2のクローンの代表的な一連からのCDR1とCDR3の挿入物

クローン	CDR1	CDR3
3M-2	ND1	LPSSDTRAYS
3M-3	QESGGRPG	LPRGPPLLSL
3M-5	SPGRCLN	ND
3M-6	EWKR*HGG	LCPGACGCVY
3M-7	NSG*NEGG	ND
3M-11	DKPVTKSG	ND
3M-17	SPGACP*	ND
3M-18	SPGKCDQ	ND
3M-19	SPGMCAR	LMYPPPYYL
3M-20	ND	PFLFLPC*FFF
3N-1	WTLGHHKLCEG	LFTCLLALCS
3N-2	SPGECYG	SWLSTTXCLSSCS
3N-3	SPG*CQD	LLGSLLSCFASLS
3N-4	SPG*CQD	SPGSLLSCFASXS
3N-5	SPGRCTD	VICHSSVCLSD/EVC
3N-6	ND	DLPSYLACSI
3N-7	SPGRCDA	ALCWDVFYCSFPSY
3N-8	ELFGHARYCKG	VSITSP*LCPVKVFD
3N-9	SPGKV*N	LFVPPVSP
3N-12	SPGDLWV	ESGLSPVSPCSLYSL
3N-13	TSANGPYG	PWAYRFLAVL
3N-14	RKTREKYG	ELMYPPPYLGI
3N-15	SPGQELT	ELFLLYAPCYLFQR

ND：挿入無し

*：UAG終止コドン

【0082】

遺伝子3タンパク質融合体としてCTLA-4STMをディスプレイするバクテリオファージ粒子を、大腸菌細胞から、標準的な方法でレスキューし、以下の実施例において記載

された多くの抗原に対して作動させた。

【0083】

実施例7

CTLA-4STMライブラリー：固型支持物上の抗原に対する選択

構造内にへこみまたはすき間を有するタンパク質に分類される四つの異なった抗原を、スクリーニング用に選択した。抗体より小さなサイズで、伸長されたCDRループ構造（特にCDR-3）を有するCTLA-4VLD STMは、これらのへこみ領域に接近できると予想された。選択された抗原は、(i)ニワトリ卵白リゾチーム(EC3.2.1.17)；(ii)ウシカルボニックアンヒドラーゼ(EC4.2.1.1)；(iii)真菌類の α -アミラーゼ(EC3.2.1.1)；および(iv)ストレプトアロテイチウス・ヒンドウスタニス(*Streptoalloteichus hindustanis*)耐性タンパク質ShBle(Gatignolら、1988)、であった。プレートに結合させる場合、コート用緩衝液中の抗原(0.1M NaHCO₃ pH8.5中1mg/ml)を、Costar ELISAプレートに標準的な方法で結合させた。レスキューしたファージとファージミド由来ライブラリーを、選択されるべきファージの低親和結合を許容するために、標準の洗浄回数よりも低い洗浄回数を用いた以外は、標準的に良く知られた方法によって、作動させた。図14に、ShBleに対して選択したライブラリーの力価を示す。四巡後、回復したバクテリオファージ力価は、対照よりも高かった。当業者にとって、これは、特定の結合部分の選択を表し、これら選択されたCTLA-4VLD STMを、pGCまたはpPOWなどの発現ベクターを用いて生成させること(実施例2に記載されたように)は、通常の方法である。

10

20

【0084】

実施例8

CTLA-4STMライブラリー：溶液中の抗原に対する選択

溶液中で選択する場合、抗原ウシカルボニックアンヒドラーゼと真菌類の α -アミラーゼを、ビオチン化し、ストレプトアビジンでコートした磁性ビーズによる捕捉を用いて、溶液中で選択した。これらの実験を通して、洗浄は、一定した、毎巡、2または5回行った。回収したバクテリオファージの溶出後の力価を、図15に示す。四巡後、回収されたバクテリオファージの力価は、対照よりも高かった。当業者にとって、これは特異的結合部分の選択を表し、次いで、(実施例2に記載したように)pGCまたはpPOWなどの発現ベクターを用い、これらの選択されたCTLA-4VLD STMを生成することが、通常の方法である。

30

【0085】

実施例9

CTLA-4ライブラリー：代替ディスプレイおよび選択系における選択

抗原結合STMのさらなる成熟と選択を許容するために、CTLA-4STMライブラリーを、プラスミドに結紮し、下流C末端スパーポリペプチド(重鎖定常ドメイン)を付加した。上流の転写および翻訳開始配列は、特異的オリゴヌクレオチド(図1-4)を用いたPCR増幅によって付加した。このPCR DNAは、RNAを生成するための鋳型として用い、HeとTauszig(1997)に記載されたように、結合化細胞不含翻訳系におけるリボソーム上にライブラリーを翻訳させてディスプレイさせた。結合を証明するために、CTLA-4STMリボソーム複合体を、肝臓B表面抗原(hbsa)、グリコホリン(glyA)およびウシ血清アルブミン(BSA)被覆化ダイナビーズ(dynabeads)上に、作動させた。hbsa、glyAおよびBSAに結合したリボソーム複合体からのRNAを、RT-PCRによって回収した。次いで、これらのRT-PCR産物を、(実施例2において記載したように)CTLA-4STMの生成を許容するpGCまたはpPOWなどの発現ベクターにクローニングすることは、通常の方法である。(この実施例におけるように)リボソーム複合体としてのCTLA-4STMのライブラリーをディスプレイし、生細胞(真核細胞または原核細胞のバックグラウンドから得られ、細菌、酵母、哺乳動物もしくは昆虫細胞を含むことができる)の表面上にディスプ

40

50

レイすることを許容する本発明に、多くの変型および/または改変がなされることができ
ることは、当業者によって、認識されるであろう。

【0086】

実施例10

CTLA-4 STM:アフィニティー成熟とCDR2変異

抗原結合STMのさらなる成熟と選択と、無作為抽出されたCDR-1、-2および-3
ライブラリーの構築を許容するために、CDR-2無作為抽出オリゴヌクレオチドプライ
マーを作製した(図1-4)。これらのプライマーの変異は、ラマ単ドメイン抗体にお
いて見出されたものに類似したCDR-2-CDR-3ジスルフィド結合を有するSTM
の構築を許容する保存されたシステイン残基を含む。スプライスオーバーラップPCRは
、無作為抽出した三つ全てのCDRループ構造を含むライブラリーの作製を許容した。

10

【0087】

広く記載された本発明の精神または範囲を逸脱することなく、特定の実施態様において示
された本発明に、多くの変型および/または改変がなされることができ
ることは、当業者によって認識されるであろう。従って、本実施態様は、全ての点では、制限ではなく例示
としてみなされるべきである。

【0088】

【参照文献1】

- Bodian DL, Jones EY, Harlos K, Stuart DI, Davis SJ (1994) Crystal structure of the extracellular region of the human cell adhesion molecule CD2 at 2.5 Å resolution. *Structure* 2: 755-766
- Cai X and Garen A (1997) Comparison of fusion phage libraries displaying VH or single-chain Fv antibody fragments derived from the antibody repertoire of a vaccinated melanoma patient as a source of melanoma-specific targeting molecules *Immunol* 94: 9261-9266 10
- Canfield VA, Norbeck L, Levenson R (1996) Localization of cytoplasmic and extracellular domains of Na,K-ATPase by epitope tag insertion *Biochem.* 35: 14165-14172
- Coia, G., Hudson, P.J., Lilley, G.G. (1996) Construction of recombinant extended single-chain antibody peptide conjugates for use in the diagnosis of HIV-1 and HIV-2. *J. Immunol. Meth.* 192:13-23
- Davies J, Riechmann L (1994) Camelising human antibody fragments: NMR studies on V_H domains *FEBS Lett.* 339(3):285-90 20
- Davies J, Riechmann L. (1996) Single antibody domains as small recognition units: design and in vitro antigen selection of camelized, human V_H domains with improved protein stability *Protein Eng* 9(6):531-7
- Desmyter A, Transue TR, Ghahroudi MA, Thi MH, Poortmans F, Hamers R, Muyldermans S, Wyns L (1996) Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme *Nat Struct Biol* 3:803-811 30
- Galanis M, Irving RA, and Hudson PJ (1997) *Current Protocols in Immunology*, 17.1.1-17.1.45.
- Gatignol A, Durand H, and Tiraby G (1988) Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein *FEBS Lett* 230: 171-175

【参照文献 2】

- Gerstmayer B, Pessara U, Wels W (1997) Construction and expression in the yeast *Pichia pastoris* of functionally active soluble forms of the human costimulatory molecules B7-1 and B7-2 and the B7 counter-receptor CTLA-4. *FEBS Lett* 407: 63-68
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363: 446-448 10
- Hanes J and Pluckthun A (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display *Proc.Natl.Acad. Sci. USA.* 94: 4937-4942
- He M and Taussig MJ (1997) Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites. *Nucl. Acids Res.* 25: 5132-5134
- Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P., and Winter, G. 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 19:4133-4137. 20
- Huse, W. D., Sastry, L., Iverson, S. A., Kang, A. S., Alting, M. M., Burton, D. R., Benkovic, S. J., & Lerner, R. A. (1989). Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*, 246: 1275-81.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eliaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I. and Kroczeck, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397: 263-266. 30
- Kortt, A.A., Guthrie, R.E., Hinds, M.G., Power, B.E., Ivancic, N., Caldwell, J.B., Gruen, L.C., Norton, R.S. and Hudson, P.J. (1995) Solution properties of *E. coli* expressed VH domain of anti-neuraminidase antibody NC41. *J. Protein Chemistry.* 14, 167-178.
- 【参照文献 3】 40

Linsley, PS, Clark EA, and Ledbetter JA (1990) The T cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with the activation antigen, B7/BB1 Proc. Natl. Acad. Sci USA 87: 5031.

Linsley PS, Nadler SG, Bajorath J, Peach R, Leung HT, Rogers J, Bradshaw J, Stebbins M, Leytze G, Brady W, et al (1995) Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules. J Biol Chem 270: 15417-24

10

McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., & Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature, 348: 552-4.

Metzler WJ, Bajorath J, Fenderson W, Shaw SY, Constantine KL, Naemura J, Leytze G, Peach RJ, Lavoie TB, Mueller L, Linsley PS (1997) Solution structure of human CTLA-4 and delineation of a CD80/CD86 binding site conserved in CD28 Nat Struct Biol 4: 527-531

20

Morton PA, Fu XT, Stewart JA, Giacoletto KS, White SL, Leysath CE, Evans RJ, Shieh JJ, Karr RW (1996) Differential effects of CTLA-4 substitutions on the binding of human CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) J Immunol 156: 1047-1054

Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, Barbosa JA, Hamers R (1994) Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. Protein Eng 7: 1129-1135.

Nieba L, Honegger A, Krebber C, Pluckthun A (1997) Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment Protein Engineering (4):435-44

30

Novotny J, Ganju RK, Smiley ST, Hussey RE, Luther MA, Recny MA, Siliciano RF, Reinherz EL (1991) A soluble, single-chain T-cell receptor fragment endowed with antigen-combining properties Proc Natl Acad Sci U S A 88(19):8646-8650.

40

【参照文献 4】

Peach RJ, Bajorath J, Brady W, Leytze G, Greene J, Naemura J, Linsley PS (1994) Complementarity determining region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1 J Exp Med 180: 2049-2058

Power, B.E., Ivancic, N., Harley, V.R., Webster, R.G., Kortt, A.A, Irving, R.A. and Hudson, P.J. (1992) High-level temperature-induced synthesis of an antibody VH-domain in *Escherichia coli* using the PelB secretion signal gene 113:95-99. 10

Reisine, T. (1995) Somatostatin. Cell Molec. Neurobiol. 15: 597-614

Reubi, J. C. (1997) Regulatory peptice receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. Q. J. Nucl. Med. 41: 63-70

Schonbrunn A, Gu YZ, Brown PJ, Loose-Mitchell D (1995) Function and regulation of somatostatin receptor subtypes. Ciba Found. Symp. 190: 204-217 20

Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science, 228, 1315-1317

van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, Davis SJ (1997) CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. J Exp Med 185: 393-403

Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S (1997) Comparison of llama VH sequences from conventional and Heavy Chain Antibodies. Molec Immunol 34: 1121-1131 30

Ward ES (1991) Expression and secretion of T-cell receptor V alpha and V beta domains using *Escherichia coli* as a host Scand J Immunol 34(2):215-220.

Waterhouse P, Marengere LE, Mittrücker HW, Mak TW (1996) CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation. Immunol Rev 153: 183-207

【参照文献 5】

40

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW (1995) Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4 Science 270: 985-988

Winter G, Milstein C. (1991). Man-made antibodies. Nature. 349: 293-299.

Wulfing C, Pluckthun A and in (1994) Correctly folded T-cell receptor fragments in the periplasm of *Escherichia coli* - Influence of folding catalysts J Mol Biol 242(5):655-69.

10

【配列表】

SEQUENCE LISTING

Applicant: Diattech Pty Ltd

5

Title of Invention: V-like domain binding molecules

Prior Application Number: PP2210

10

10 Prior Application Filing Date: 1998-03-06

Number of SEQ ID NOs: 138

Software: PatentIn Ver. 2.1

15

SEQ ID NO: 1

Length: 6

Type: PRT

20

Organism: Homo sapiens

20

Sequence: 1

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr

1 5

25

SEQ ID NO: 2

Length: 54

Type: DNA

30

Organism: Artificial Sequence

30

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide PCR primer

35

Sequence: 2

ttattactcg cggcccagcc ggccatggcc gcaatgcacg tggcccagcc tgct 54

40

SEQ ID NO: 3
 Length: 60
 Type: DNA
 5 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

10

10

Sequence: 3
 ttattactcg cggcccagcc ggccatggcc gcaatgcacg tggcccagcc tgcctgtgta 60

SEQ ID NO: 4
 15 Length: 45
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 20 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

20

Sequence: 4
 tctcacagtg cacaggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggta 45

25

SEQ ID NO: 5
 Length: 39
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

30

35 Sequence: 5
 tctcacagtg cacaggcaat gcacgtggcc cagcctgct 39

40

SEQ ID NO: 6
 Length: 43
 Type: DNA
 5 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer 10

10
 Sequence: 6
 gccacagccgg ccgaattgcg aatgcacgtg gccacagcctg ctg 43

SEQ ID NO: 7
 15 Length: 60
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence 20

Feature:
 20 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 7
 gcagctaata cgactcacta taggaacaga ccaccatgga cgtggcccag cctgctgtgg 60

25

SEQ ID NO: 8
 Length: 42
 Type: DNA 30
 Organism: Artificial Sequence

30
 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

35
 Sequence: 8
 atctgcggcc gctacataaa tctgggtacc gttgccgatg cc 42

40

SEQ ID NO: 9
 Length: 66
 Type: DNA
 5 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer 10

10 Sequence: 9
 gctgaattct gatcagtgat ggtgatggtg atgtggggcc gcgtcagaat ctgggcaagg 60
 tctctgg 66

15 SEQ ID NO: 10
 Length: 51
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence 20

20 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

25 Sequence: 10
 gcccttgggc egggagatgg tctgcttcag tggcgagggc aggtctgtgt g 51

30 SEQ ID NO: 11
 Length: 49 30
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

35 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 11
cgaggggcagg tctgtgtggg tcacggtgna cgtgaacctc tccccggag 49

SEQ ID NO: 12
5 Length: 51
Type: DNA
Organism: Artificial Sequence

Feature: 10
10 Other information: Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 12
cgtgaacctc tccccggagt tccagtcate ctgcagatg ctggctcac c 51

15 SEQ ID NO: 13
Length: 84
Type: DNA 20
Organism: Artificial Sequence

20 Feature:
Other information: Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide PCR primer

25 Sequence: 13
agctttgtgt gtgagtatgc agctggctgc aagaatttct tctggaagac tttcacatcc 60
tgtgccactg aggtccgggt gaca 84 30

SEQ ID NO: 14
30 Length: 84
Type: DNA
Organism: Artificial Sequence

Feature:
35 Other information: Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 14
 ctgggtaccg ttgccgatgc cacaggatgt gaaagtcttc cagaagaaat tcttgcagcc 60
 agcctccacc ttgcagatgt agag 84

5

SEQ ID NO: 15
 Length: 75
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence 10

10

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

15

Sequence: 15
 agctttgtgt gtgagtatgc agctggctgc aagaatnkn nknnknknkn knnkacatcc 60
 tgtgccactg aggtc 75

20

SEQ ID NO: 16 20

20

Length: 75
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

25

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

30

Sequence: 16 30

30

ctgggtaccg ttgccgatgc cacaggatgt mnnmnnmnm hnmnnmnnat tcttgcagcc 60
 agcctccacc ttgca 75

35

SEQ ID NO: 17
 Length: 21
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

SEQ ID NO: 20
 Length: 60
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

5

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

10

Sequence: 20
 ttgtggggcag ccacaaacat gggcgggtggc atcaccttcc tagatgattc cactgacag 60

SEQ ID NO: 21
 Length: 60
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

15

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

20

Sequence: 21
 atctaggaag gtgatgccac cgcacatgtt gatggctgcc gcacagactt cagtcacctg 60

25

SEQ ID NO: 22
 Length: 69
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

30

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 22
 cagcccgtgg ccgcactcgt agtaqqacgc gtagatcgtc gagtccacct tgcagatgta 60
 gagtcccgt 69

5 SEQ ID NO: 23
 Length: 72
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

10

10 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 23
 15 aatctgggta ccgttgccga tgccggagtc atagccgtac cctcccgtgg acagcccgtg 60
 gccgcactcg ta 72

SEQ ID NO: 24
 Length: 78
 20 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

20

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 25 Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 24
 gccagctttg tgtgtgagta tgccagtggg ttcaccttca gttcctaagc catgtcccgc 60
 cgggtgacag tgcctcgg 78

30

30 SEQ ID NO: 25
 Length: 51
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

35

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

5 Sequence: 25
 gccatctcgg gatccggagg ctgcacctac ctatgatgatt ccactctgcac g 51

SEQ ID NO: 26
 Length: 54 10

10 Type: LNA
 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 15 Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 26
 gtaggtcgag cctccgggatc cggagatgga tgcgcacag acttcagtca cctg 54 20

20 SEQ ID NO: 27
 Length: 69
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

25 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer 30

Sequence: 27
 30 cacgtccatg tagtagtctc cctcctcgcc gccagatccc cagcccacct tgcagatgta 60
 gagtcccg 69

SEQ ID NO: 28
 Length: 51

35 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence 40

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide PCR primer

5

Sequence: 28

aatctgggta cegttgccga tgcccacgtc catgtagtag tctccctct c 51

SEQ ID NO: 29

10

Length: 66

Type: DNA

Organism: Artificial Sequence

10

Feature:

15 Other information: Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 29

agctttgtgt gtgagtatgc annknnknnk nnknnknnkn nknnkccac tgagytccgg 60

20

gtgaca

66

20

SEQ ID NO: 30

Length: 68

Type: DNA

25

Organism: Artificial Sequence

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide PCR primer

30

Sequence: 30

cacgtggccc agcctgctgt ggtactggcc agcagccgag gcacgccag ctttgtgtgt 60

gagtatgc

68

30

SEQ ID NO: 31
 Length: 66
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

5

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

10

Sequence: 31
 gtgtgtgagt acgcgtncnn snnsnnsnns nnsnnsstgcn nsgctactga ggttcgtgtg 60
 accgtc 66

SEQ ID NO: 32

15 Length: 73
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

20

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 32
 gccagctttg tgtgtgagta tgcannknnk nnknnknnkn nknnkkgcgt ccgggtgaca 60
 25 gtgcttcggc agg 73

SEQ ID NO: 33

30 Length: 82
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

35

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR Primer

Sequence: 33
 gccagctttg tgtgtgagta tgcannknnk unknknknkn nknnknktg cnnkggcgtc 60
 cgggtgacag tgcttcggca gg 82

5 SEQ ID NO: 34
 Length: 82
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

10

10 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR Primer

Sequence: 34
 15 gccagctttg tgtgtgagta tgcannknnk ywynkywyn nknnkywytg cnnkggcgtc 60
 cgggtgacag tgcttcggca gg 82

SEQ ID NO: 35
 Length: 70
 20 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

20

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 25 Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 35
 gccagctttg tgtgtgagta tgcatttcca gccnnknkn nknnkgtccg ggtgacagtg 60
 cttcggcagg 70

30

30
 SEQ ID NO: 36
 Length: 70
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

35

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide PCR primer

5 Sequence: 36
 gccagctttg tgtgtgagta tgcatactcca gccnktgcn nknnkgtccg ggtgacagtg 60
 cttgggcagg 70

10

SEQ ID NO: 37

10 Length: 68

Type: DNA

Organism: Artificial Sequence

Feature:

15 Other information: Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 37
 gtgactgaag tctctgcggc aacctacnnk nnkggggnky agltgacctt cctagatgat 60
 20 tccatctg 68

20

SEQ ID NO: 38

Length: 30

Type: DNA

25 Organism: Artificial Sequence

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide PCR primer

30

Sequence: 38
 gtaggttgcc gcacagactt cagtcacctg 30

30

SEQ ID NO: 39
 Length: 68
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

5

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

10

Sequence: 39
 gtgactgaag tctgtgaggc atgctacnnk nnkgggnnkg agttgacctt cctagatgat 60
 tccatctg 68

SEQ ID NO: 40
 Length: 30
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

15

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

20

Sequence: 40
 gtagcatgcc gcacagactt cagtcacctg 30

25

SEQ ID NO: 41
 Length: 69
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

30

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

35

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide PCR primer

5 Sequence: 44

aatctgggta ccgttgccga tgcctcagmnn mnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn rnnnnnnnnnn 60
mnnnnnnctcc accttgccga tgtagagtc cgt 93

SEQ ID NO: 45

10

10 Length: 81

Type: DNA

Organism: Artificial Sequence

Feature:

15 Other information: Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 45

20

20 aatctgggta ccgttgccga tgcctnnnnnn mnnnnnnngcam nnnnnnnnnnnn nnnnnnnncac 60
cttgccagatg tagagtcctc t 81

SEQ ID NO: 46

Length: 87

Type: DNA

25 Organism: Artificial Sequence

Feature:

30

Other information: Description of Artificial Sequence:

Oligonucleotide PCR primer

30

Sequence: 46

aatctgggta ccgttgccga tgcctnnnnnn mnnnnnnnnng camnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 60
mnnccacttg cagatgtaga gtccctc 87

SEQ ID NO: 47
 Length: 99
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

5

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

10

Sequence: 47

```

aatctgggta cegttgccga tgcmmnmnm mnmnmnmnm nncacnmnm nnnnnnnnm 60
mnmnmnmnm nmncacct tgcagatgta gagtccct 99

```

10

SEQ ID NO: 48

15 Length: 87

Type: DNA

Organism: Artificial Sequence

20

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 48

```

aatctgggta cegttgccga tgcwrwmnm mnmnmnmng camnmnmnm nnnnnnnnm 60
25 nmncaccttg cagatgtaga gtccct 87

```

30

SEQ ID NO: 49

Length: 70

Type: DNA

30 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

35

Sequence: 49
atgcacgtgg cccagcctgc tgtggtgctg gccagcagcc gtggcctcgc cagctttgtg 60
tgtgaatatg 70

5 SEQ ID NO: 50
Length: 77
Type: DNA
Organism: Artificial Sequence 10

10 Feature:
Other information: Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 50
15 gccagccttg tgtgtgaata tgcgtctggc tataccatcg gcccgctactg catgggtgtg 60
cgtgtgacgc tgcctgg 77

20 SEQ ID NO: 51
Length: 54
Type: DNA
Organism: Artificial Sequence 20

25 Feature:
Other information: Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 51
gtgcgtgtga ccgtgctggc ccaggcggat agccaggtga ccgaagtttg cgcg 54 30

30 SEQ ID NO: 52
Length: 75
Type: DNA
Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

5 Sequence: 52
 caggtqaccg aagtttgcgc gccagcgcac aacatggggc ggccatcac ctccctggat 60
 gattccatct gcacc 75

SEQ ID NO: 53

10 Length: 66
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 15 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

Sequence: 53

20 cagaccctgg atggtcaggt ccaccgggt accgctggag gtgccgggtc agatggaatc 60
 atccag 66

SEQ ID NO: 54

Length: 57

Type: DNA

25 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

30 Sequence: 54
 cactttgcag atgtacagac cggatccat gccacgcaga cctggatgg tcaggtt 57

SEQ ID NO: 55
 Length: 66
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

5

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

10

Sequence: 55
 caggccatga ccgcattcgt aataagacgc atagatggcg ctatccactt tgcagatgta 60
 cagacc 66

SEQ ID NO: 56
 Length: 69
 Type: DNA
 Organism: Artificial Sequence

15

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide PCR primer

20

Sequence: 56
 ctgggtaccg ttgccgatgc cagaatcgta gccatagcca ccggtggaca ggccatgacc 60
 gcattcgta 69

SEQ ID NO: 57
 Length: 672
 Type: DNA
 Organism: Homo sapiens

25

Sequence: 57
 atggcttgcg ttggatttca ggggcacaag gctcagctga acctggctgc caggacctgg 60
 cctgcactc tctgttttt tctctcttc atcctgtct tctgcaaagc aatgcacgtg 120
 35 gccacgctg ctgtgttact ggcacgcagc cgaggcatcg ccagctttgt gtgtgagtat 180

gcatctccag gcaaagccac tgaggccgg gtgacagtgc ttgggcagge tgacagccag 240
 gtgactgaag ttgtgtgggc aacctacatg acggggaatg agttgacctt cctagatgat 300
 tccatctgca cgggcacctc cagtggaaat caagtgaacc tcactatcca aggaclgagg 360
 gccatggaca cgggactcta catctgcaag gtggagctca tgnaccacc gccatactac 420
 5 ctggggcatag gcaacggaa cccagatttat gtaattgatc cagaaccgtg cccagattct 480
 gaattccctc tcggatcct tgcagcagtt agtcgggggt tgttttttta tagctttctc 540
 cccacagctg tttctttgag caaaatgcta aagaaaagaa cccctcttac aacagggctc 600
 tatgtgaaaa tgcctccaac agagccagaa tgtgaaaagc aatttcagcc ttattttatt 660
 cccatcaatt ga 672

10

10

SEQ ID NO: 58
 Length: 115
 Type: PRT
 Organism: Homo sapiens

15

Sequence: 58
 Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly
 1 5 10 15

20

20 Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu
 20 25 30

Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val
 35 40 45

25

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp
 50 55 60

30

30 Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu
 85 90 95

35 Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Ala Gln
 100 105 110

40

Ile Tyr Val
115

5

SEQ ID NO: 59
Length: 7
Type: PRT
Organism: Homo sapiens

10

10

Sequence: 59
Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu
1 5

15

SEQ ID NO: 60
Length: 9
Type: PRT
Organism: Homo sapiens

20

20

Sequence: 60
Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe
1 5

30

25

SEQ ID NO: 61
Length: 9
Type: PRT
Organism: Homo sapiens

30

Sequence: 61
Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu
1 5

40

35

	SEQ ID NO: 62	
	Length: 14	
	Type: PRT	
	Organism: Homo sapiens	
5	Sequence: 62	
	Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys	
	1 5 10	10
10	SEQ ID NO: 63	
	Length: 9	
	Type: PRT	
	Organism: Artificial Sequence	
15	Feature:	
	Other information: Description of Artificial Sequence:Haemagglutinin tag	20
20	Sequence: 63	
	Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala	
	1 5	
25	SEQ ID NO: 64	
	Length: 11	
	Type: PRT	30
	Organism: Artificial Sequence	
30	Feature:	
	Other information: Description of Artificial Sequence: Sequence from anti-lysozyme antibody	
	Sequence: 64	
35	Ser Gly Tyr Thr Ile Gly Pro Tyr Cys Met Gly	
	1 5 10	40

SEQ ID NO: 65
 Length: 10
 Type: PRT
 5 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: Sequence from
 anti-lysozyme antibody 10

10 Sequence: 65
 Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe
 1 5 10

15 SEQ ID NO: 66
 Length: 24
 Type: PRT 20
 Organism: Artificial Sequence

20 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: Sequence from
 anti-lysozyme antibody

25 Sequence: 66
 Asp Ser Thr Ile Tyr Ala Ser Tyr Tyr Glu Cys Gly His Gly Leu Ser
 1 5 10 15 30

30 Thr Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Ser
 20

SEQ ID NO: 67
 Length: 11
 35 Type: PRT
 Organism: Homo sapiens 40

Sequence: 67
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5 10
 5

SEQ ID NO: 68
 Length: 10
 Type: PRT 10
 10 Organism: Homo sapiens

Sequence: 68
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
 1 5 10
 15

SEQ ID NO: 69
 Length: 15 20
 Type: PRT
 20 Organism: Homo sapiens

Sequence: 69
 Gly Trp Gly Leu Arg Gly Glu Glu Gly Asp Tyr Tyr Met Asp Val
 1 5 10 15
 25

SEQ ID NO: 70 30
 Length: 21
 Type: PRT
 30 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: Flag-tag

Sequence: 70

Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ala Asp Tyr Lys
 1 5 10 15

5 Asp Asp Asp Asp Lys
 20

10

SEQ ID NO: 71

10 Length: 14

Type: PRT

Organism: Homo sapiens

Sequence: 71

15 Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu
 1 5 10

20

SEQ ID NO: 72

20 Length: 18

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

Feature:

25 Other information: Description of Artificial Sequence:Fusion protein

30

Sequence: 72

Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Gly Pro Tyr Cys
 1 5 10 15

30

Met Gly

SEQ ID NO: 73
 Length: 24
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

5

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:Fusion protein

10

Sequence: 73

10 Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys
 1 5 10 15

Thr Phe Thr Ser Cys Ala Thr Glu
 20

15

SEQ ID NO: 74

20

Length: 18

Type: PRT

20 Organism: Artificial Sequence

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence:Fusion protein

25 Sequence: 74

Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5 10 15

30

Met Ser

30

SEQ ID NO: 75

Length: 15

35 Type: PRT

40

Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:Fusion protein
 containing random sequence

5

Sequence: 75
 Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly
 1 5 10 15 10

10

SEQ ID NO: 76
 Length: 18
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

15

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:Fusion protein
 containing random sequence 20

20

Sequence: 76
 Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5 10 15

Xaa Gly

25

30

SEQ ID NO: 77
 Length: 21
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

35

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:Fusion protein
 containing random sequence 40

Sequence: 77

Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ala Arg Xaa Xaa

1 5 10 15

5 Ala Arg Cys Xaa Gly

20

10

SEQ ID NO: 78

10 Length: 14

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

Feature:

15 Other information: Description of Artificial Sequence:Fusion protein
containing random sequence

20

Sequence: 78

Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Xaa Xaa Xaa Xaa

20 1 5 10

SEQ ID NO: 79

Length: 14

25 Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

30

Feature:

30 Other information: Description of Artificial Sequence:Fusion protein
containing random sequence

Sequence: 79

Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Xaa Cys Xaa Xaa

35 1 5 10

40

SEQ ID NO: 80
 Length: 18
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

5

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:Fusion protein
 containing random sequence

10

10 Sequence: 80
 Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
 1 5 10 15

Thr Glu

15

20

SEQ ID NO: 81
 Length: 18
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

25 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence:Fusion protein
 containing random sequence

30

30 Sequence: 81
 Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Ala
 1 5 10 15

Thr Glu

35

40

SEQ ID NO: 82
 Length: 24
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

5

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence:Fusion protein
 containing random sequence

10

10

Sequence: 82

Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ala Gly Cys Lys Asn Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Thr Ser Cys Ala Thr Glu

15

20

20

SEQ ID NO: 83

Length: 25

20

Type: PRT

Organism: Homo sapiens

Sequence: 83

Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu

25

1

5

10

15

Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr

20

25

30

30

SEQ ID NO: 84

Length: 25

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

35

40

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein

Sequence: 84

5 Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Ala Ile Asn Met Gly Gly Gly Ile
 1 5 10 15

Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr
 20 25

10

10

SEQ ID NO: 85

Length: 25

Type: PRT

15 Organism: Artificial Sequence

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein

20

20 Sequence: 85

Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp
 1 5 10 15

Tyr Ala Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr
 20 25

30

SEQ ID NO: 86

Length: 25

30 Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein

35

40

Sequence: 88

Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Cys Tyr Xaa Xaa Gly Xaa Glu Leu
1 5 10 15

5 Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr
20 25

SEQ ID NO: 89

10 Length: 13

Type: PRT

Organism: Homo sapiens

10

Sequence: 89

15 Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu
1 5 10

20

SEQ ID NO: 90

20 Length: 27

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

Feature:

25 Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein

Sequence: 90

Cys Lys Val Asp Ser Thr Ile Tyr Ala Ser Tyr Tyr Glu Cys Gly His
1 5 10 15

30

Gly Leu Ser Thr Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Ser
20 25

30

SEQ ID NO: 91
Length: 18
Type: PRT
Organism: Artificial Sequence

5
Feature:
Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein

Sequence: 91 10

10 Cys Lys Val Glu Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr
1 5 10 15

Ser Cys

15

SEQ ID NO: 92 20
Length: 18
Type: PRT
20 Organism: Artificial Sequence

Feature:
Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein

25 Sequence: 92 30

Cys Lys Val Gly Trp Gly Leu Arg Gly Glu Glu Gly Asp Tyr Tyr Met
1 5 10 15

Asp Val

30

SEQ ID NO: 93
Length: 14
35 Type: PRT 40
Organism: Artificial Sequence

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein containing random sequence

5 Sequence: 93

Cys Lys Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

10

10 SEQ ID NO: 94

Length: 18

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

15 Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein containing random sequence

20

Sequence: 94

20 Cys Lys Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa

25

SEQ ID NO: 95

Length: 14

Type: PRT

30 Organism: Artificial Sequence

30

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein containing random sequence

35

40

Sequence: 95

Cys Lys Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10

5

SEQ ID NO: 96

Length: 15

Type: PRT

10

Organism: Artificial Sequence

10

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein containing random sequence

15

Sequence: 96

Cys Lys Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

20

20

SEQ ID NO: 97

Length: 17

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

25

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein containing random sequence

30

Sequence: 97

30

Cys Lys Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa

35

40

SEQ ID NO: 98
 Length: 21
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

5

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein
 containing random sequence

10

10 Sequence: 99

Cys Lys Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

15

20

20

SEQ ID NO: 99

Length: 13

20

Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein
 containing random sequence

25

30

Sequence: 99

Cys Lys Val Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

30

SEQ ID NO: 100

Length: 18

Type: PRT

35

Organism: Artificial Sequence

40

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein containing random sequence

5 Sequence: 100

Cys Lys Val Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa

10

10

SEQ ID NO: 101

15 Length: 18

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

20

Feature:

20 Other information: Description of Artificial Sequence: Fusion protein containing random sequence

Sequence: 101

Cys Lys Val Glu Ala Gly Cys Lys Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr

25 1 5 10 15

Ser Cys

30

30

SEQ ID NO: 102

Length: 10

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

35

40

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

5 Sequence: 102
 Leu Pro Ser Ser Asp Thr Arg Ala Tyr Ser
 1 5 10

10 SEQ ID NO: 103
 Length: 8
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

15 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

20 Sequence: 103
 Gln Glu Ser Gly Gly Arg Pro Gly
 1 5

25 SEQ ID NO: 104
 Length: 10
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

30 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

35 Sequence: 104
 Leu Pro Arg Gly Pro Pro Leu Leu Ser Leu
 1 5 10

40

SFQ ID NO: 105
 Length: 7
 Type: PRT
 5 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence 10

10
 Sequence: 105
 Ser Pro Gly Arg Cys Leu Asn
 1 5

15
 SEQ ID NO: 106
 Length: 8 20
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

20
 Feature:
 Name/Key: MOD_RES
 Location: (5)
 Other information: Stop codon but Glu when expressed in Tg-1 or JM109
 25 strains of E.coli

30
 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

30
 Sequence: 106
 Glu Trp Lys Arg Glu His Gly Gly
 1 5

35 40

SEQ ID NO: 107
 Length: 10
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

5

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence 10

10 Sequence: 107

Leu	Cys	Pro	Gly	Ala	Cys	Gly	Cys	Val	Tyr
1				5					10

15 SEQ ID NO: 108

Length: 8
 Type: PRT 20
 Organism: Artificial Sequence

20 Feature:

Name/Key: MOD_RES
 Location: (4)
 Other information: Stop codon but Glu when expressed in Tg-1 of JM109
 E.coli strains

25

Feature: 30
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

30 Sequence: 108

Asn	Ser	Gly	Glu	Asn	Glu	Gly	Gly
1				5			

SEQ ID NO: 109
 Length: 8
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence
 5
 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence 10

10 Sequence: 109
 Asp Lys Pro Val Thr Lys Ser Gly
 1 5

15 SEQ ID NO: 110
 Length: 7
 Type: PRT 20
 Organism: Artificial Sequence

20 Feature:
 Name/Key: MOD_RES
 Location: {7}
 Other information: Stop codon but Glu when expressed in Tg-1 or JM109
 strains of E. coli

25
 Feature: 30
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

30 Sequence: 110
 Ser Pro Gly Ala Cys Pro Glu
 1 5

SEQ ID NO: 111
Length: 7
Type: PRT
Organism: Artificial Sequence

5
Feature:
Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
inserts possessing randomly generated sequence 10

10 Sequence: 111
Ser Pro Gly Lys Cys Asp Gln
1 5

15 SEQ ID NO: 112
Length: 7
Type: PRT 20
Organism: Artificial Sequence

20 Feature:
Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
inserts possessing randomly generated sequence

25 Sequence: 112
Ser Pro Gly Met Cys Ala Arg
1 5 30

30 SEQ ID NO: 113
Length: 11
Type: PRT
Organism: Artificial Sequence

feature:
 Name/Key: MOD_RES
 Location: (8)
 Other information: Stop codon but Glu when expressed in Tg-1 or JM109
 5 strains of E. coli

feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence
 10

Sequence: 113
 Pro Phe Leu Phe Leu Pro Cys Glu Phe Phe Phe
 1 5 10

15
 SEQ ID NO: 114
 Length: 11
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence
 20

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

25 Sequence: 114
 Trp Thr Leu Gly His His Lys Leu Cys Glu Gly
 1 5 10

30 SEQ ID NO: 115
 Length: 10
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

5 Sequence: 115

Leu Phe Thr Cys Leu Leu Ala Leu Cys Ser
 1 5 10

10

10 SEQ ID NO: 116

Length: 7

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

15 Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

20

Sequence: 116

20 Ser Pro Gly Glu Cys Tyr Gly

1 5

SEQ ID NO: 117

25 Length: 13

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

30

Feature:

30 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

Sequence: 117

Ser Trp Leu Ser Thr Thr Xaa Cys Leu Ser Ser Cys Ser

35 1 5 10

40

SEQ ID NO: 118

Length: 7

Type: PRT

5 Organism: Artificial Sequence

Feature:

Name/Key: MOD_RES

10

Location: (4)

10 Other information: Stop codon but Glu when expressed in Tg-1 or JM109 strains of E. coli

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3

15 inserts possessing randomly generated sequence

Sequence: 118

20

Ser Pro Gly Glu Cys Gln Asp

1 5

20

SEQ ID NO: 119

Length: 13

Type: PRT

25 Organism: Artificial Sequence

30

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3

inserts possessing randomly generated sequence

30

Sequence: 119

Leu Leu Gly Ser Leu Leu Ser Cys Phe Ala Ser Leu Ser

1 5 10

35

40

SEQ ID NO: 120
 Length: 13
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence
 5
 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence 10

10 Sequence: 120
 Ser Pro Gly Ser Leu Leu Ser Cys Phe Ala Ser Xaa Ser
 1 5 10

15
 SEQ ID NO: 121
 Length: 7 20
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

20
 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

25 Sequence: 121
 Ser Pro Gly Arg Cys Thr Asp 30
 1 5

30 SEQ ID NO: 122
 Length: 13
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
inserts possessing randomly generated sequence

5 Sequence: 122

Val Ile Cys His Ser Ser Val Cys Leu Ser Asp Val Cys
1 5 10

10

10 SEQ ID NO: 123

Length: 13

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

15 Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
inserts possessing randomly generated sequence

20

Sequence: 123

20 Val Ile Cys His Ser Ser Val Cys Leu Ser Glu Val Cys
1 5 10

SEQ ID NO: 124

25 Length: 10

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

30

Feature:

30 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
inserts possessing randomly generated sequence

Sequence: 124

35 Asp Leu Pro Ser Tyr Leu Ala Cys Ser Ile
1 5 10

40

SEQ ID NO: 125
 Length: 7
 Type: PRT
 5 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence 10

10 Sequence: 125
 Ser Pro Gly Arg Cys Asp Ala
 1 5

15 SEQ ID NO: 126
 Length: 14 20
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

20 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

25 Sequence: 126
 Ala Leu Cys Trp Asp Val Phe Tyr Cys Ser Phe Pro Ser Tyr 30
 1 5 10

30 SEQ ID NO: 127
 Length: 11
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

40

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
inserts possessing randomly generated sequence

5 Sequence: 127

Glu Leu Phe Gly His Ala Arg Tyr Cys Lys Gly
1 5 10

10

10 SEQ ID NO: 128

Length: 15

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

15 Feature:

Name/Key: MOD_RES

Location: (7)

Other information: Stop codon but Glu when expressed in Tg-1 of JM019
strains of E. coli

20

20

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
inserts possessing randomly generated sequence

25 Sequence: 128

Val Ser Ile Thr Ser Pro Glu Leu Cys Pro Val Lys Val Phe Asp
1 5 10 15

30

30 SEQ ID NO: 129

Length: 7

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

40

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

5 Sequence: 131
 Ser Pro Gly Asp Leu Trp Val
 1 5 10

10 SEQ ID NO: 132
 Length: 15
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

15 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence 20

Sequence: 132
 20 Glu Ser Gly Leu Ser Pro Val Ser Pro Cys Ser Leu Tyr Ser Leu
 1 5 10 15

SEQ ID NO: 133
 25 Length: 8
 Type: PRT 30
 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 30 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

Sequence: 133
 Thr Ser Ala Asn Gly Pro Tyr Gly
 35 1 5 40

SEQ ID NO: 134
 Length: 10
 Type: PRT
 5 Organism: Artificial Sequence

Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence 10

10 Sequence: 134
 Pro Trp Ala Tyr Arg Phe Leu Ala Val Leu
 1 5 10

15 SEQ ID NO: 135
 Length: 8 20
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

20 Feature:
 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
 inserts possessing randomly generated sequence

25 Sequence: 135
 Arg Lys Thr Arg Glu Lys Tyr Gly 30
 1 5

30 SEQ ID NO: 136
 Length: 12
 Type: PRT
 Organism: Artificial Sequence

Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
inserts possessing randomly generated sequence

5 Sequence: 136

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile
1 5 10

10

10 SEQ ID NO: 137

Length: 7

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

15 Feature:

Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
inserts possessing randomly generated sequence

20

Sequence: 137

20 Ser Pro Gly Gln Glu Leu Thr

1 5

SEQ ID NO: 138

25 Length: 15

Type: PRT

Organism: Artificial Sequence

30

Feature:

30 Other information: Description of Artificial Sequence: CDR1 and CDR3
inserts possessing randomly generated sequence

Sequence: 138

Glu Leu Phe Phe Leu Leu Tyr Ala Pro Cys Tyr Leu Phe Gln Arg

35 1 5 10 15

40

【図面の簡単な説明】

【図1】 CTLA-4 VLD 特異的オリゴヌクレオチド。

【図2】 CTLA-4 VLD 特異的オリゴヌクレオチド。

【図3】 CTLA-4 VLD 特異的オリゴヌクレオチド。

【図4】 CTLA-4 VLD 特異的オリゴヌクレオチド。

【図5】 ヒト CTLA-4 をコードする全長 cDNA ポリヌクレオチド配列と、ヒト CTLA-4 の VLD のポリヌクレオチド配列。

【図6】 ファージまたはファージミド表面における遺伝子3融合体としての CTLA-4 50

4 VLD STMを示す。CTLA-4 VLD STMは、黒楕円として表し；遺伝子3タンパク質は、白楕円として表し；FLAGポリペプチドは、灰色で表し；遺伝子は、類似色の記号でマークし、楕円形のファージ（ミド）ベクターの中に表す。

【図7】 ソマトスタチンポリペプチドの概念図。ソマトスタチン（ソマトトロピン遊離阻害因子SRIF）は、環状14アミノ酸ポリペプチドである。環状形状は、位置3と14におけるシステイン残基間のジスルフィド結合によって得られる。ループの先端を構成する四つの残基（Phe-Trp-Lys-Thr）は、ソマトスタチン受容体ファミリーのメンバーに対する結合に密接に関係している。

【図8】 アフィニティー精製したCTLA-4 VLDとCTLA-4 Som3 STMのサイズ排除HPLCの推移。組み換えヒトCTLA-4タンパク質を、ベクターpGCから宿主大腸菌TG1において発現させ、抗FLAGアフィニティークロマトグラフィーによるペリプラズム抽出から精製し、調整したSuperose 12 HRカラム上のサイズ排除クロマトグラフィーにかけた。精製したCTLA-4 VLDとCTLA-4-Som3 STMの溶出推移を、このグラフに重ねる。CTLA-4 VLDは、三量体（21.86分）、二量体（26.83分）および単量体（29.35分）を含む。CTLA-4-Som3 STMは、二量体（26.34分）と単量体（29.28分）を含む。トレースは、214nmでの吸光度を表し、任意単位で与えられる。

【図9】 CTLA-4ループ置換の概念図。構造物A（CTLA-4 VLD：S2）は、1-115残基にわたる野生型CTLA-4の細胞外Vドメインを表す。構造物Bは、（CTLA-4 Som1：PP2）およびC（CTLA-4 Som1-Cys120：PP5）は共に、CDR1において、14残基のソマトスタチンポリペプチドを含む。また、PP5は、Cys120を含むC末端の伸長を担持する。構造物D（CTLA-4-Som3：PP8）は、CDR3の位置に14残基ソマトスタチンポリペプチドを含む。構造物E（CTLA-4-HA2：XX4）において、CDR2はヘマグルチニン標識で置換されている。構造物F（CTLA-4-Som1-Som3：VV3）において、CDR1とCDR3の両方が、ソマトスタチンポリペプチドで置換されている。構造物G（CTLA-4-Som-HA2-Som3：ZZ3）において、CDR1とCDR3が、ソマトスタチンポリペプチドで置換されており、CDR2がヘマグルチニン標識で置換されている。構造物H（CTLA-4-抗Lys：2V8）において、三つ全てのCDRループ構造が、ラクダ抗リゾチームV_HH分子からのCDRループで置換されている。構造物I（CTLA-4-抗mel：3E4）は、三つ全てのCDRが抗メラノーマ抗体V86からのVH CDRループで置換されているCTLA-4 VLDを表す（CaiとGaren、1997）。PelB、切断可能なベクチン酸溶解遊離配列（22a）；flag、二重flag標識（AAADYKDDDDKAADYKDDDDK）。

【図10】 精製した組み換えヒトCTLA-4 STMのHPLC推移。組み換えCTLA-4 VLDは、ベクターpGCから宿主大腸菌TG1に発現させ、ペリプラズム抽出から抗FLAGアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、調整したSuperose 12 HRカラムのサイズ排除クロマトグラフィーにかけた。精製したタンパク質の溶出推移を示す。パネルA、CTLA-4二量体（PP5）；パネルB、CTLA-4 R（S2）；パネルC、CTLA-4-HA2（XX4）；パネルD、CTLA-4-Som3（PP8）；パネルE、CTLA-4-Som1（PP2）；パネルF、CTLA-4-Som1-Som3（VV3）；パネルG、CTLA-4-Som-HA2-Som3（ZZ3）；パネルH、CTLA-4-抗Lys（2V8）；パネルI、CTLA-4-抗mel（3E4）。トレースは、214nmでの吸光度を表し、任意単位で与えられる。

【図11】 細菌発現ベクターpGCまたはpPOWを用いて合成し、アフィニティー精製したCTLA-4構造物の、サイズ排除FPLC分析による比較。組み換えヒトCTLA-4 Rまたはそのループ変異体を、宿主大腸菌TOP10F'において発現させ、抗FLAGアフィニティークロマトグラフィーにより、ペリプラズム溶出液から精製し、調整したSuperose 12 HRカラムのサイズ排除クロマトグラフィーにかけた。ベクターpGCから発現させたタンパク質の溶出推移を左に示し、ベクターpPOWから発現さ

10

20

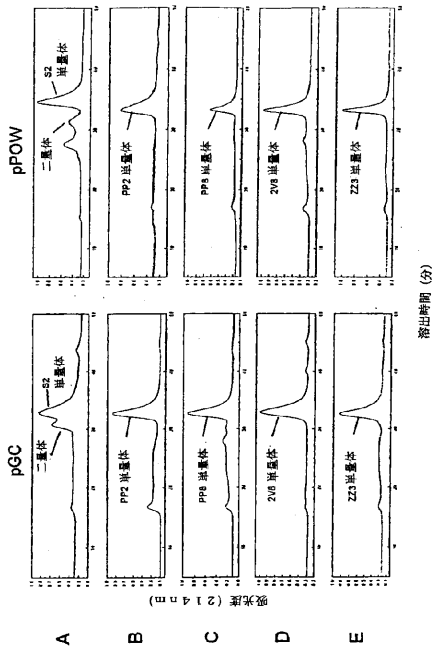
30

40

50

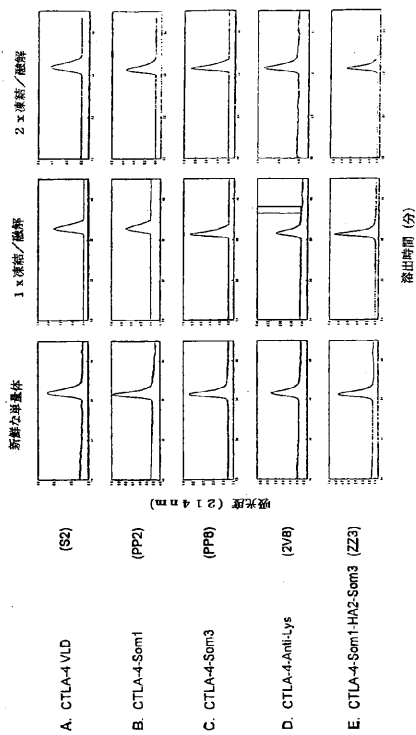
【 図 1 1 】

細菌発現ベクター-pGCまたはpPOWを用いて合成し、アフィニティー精製した組み換えCTLA-4VLD STM構造物のサイズ排除HPLC分析による比較



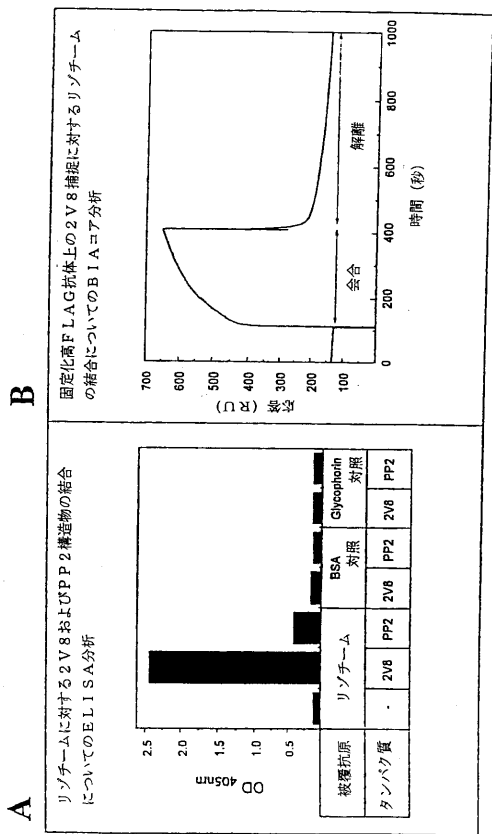
【 図 1 2 】

アフィニティー精製したCTLA-4VLD STMのサイズ排除HPLC分析: タンパク質における凝結/融解の影響



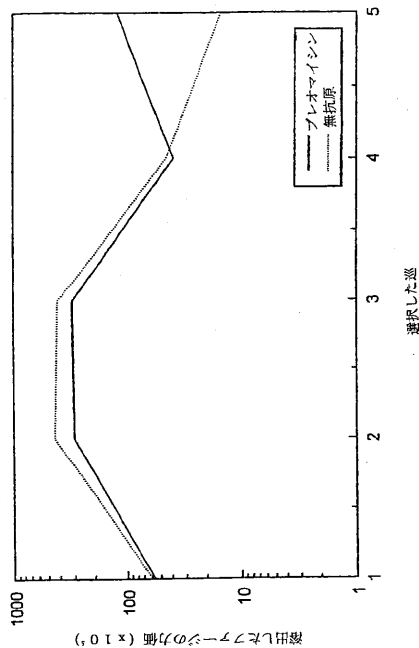
【 図 1 3 】

CTLA-4抗リンチーム構造2V8のリンチーム結合特性

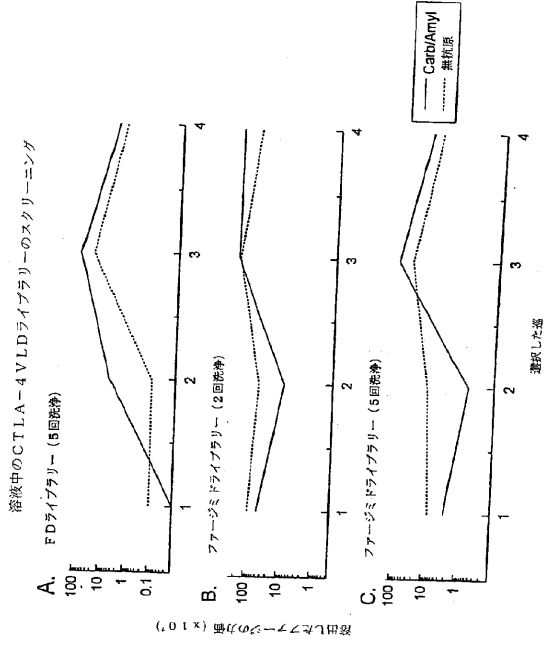


【 図 1 4 】

固定化Shプレオマイシン上でのCTLA-4VLDアジェージミドライブラリーのスクリーニング



【 15 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/70	(2006.01)	C 1 2 Q 1/70	

- (72)発明者 グレゴリー・コイア
オーストラリア・ヴィクトリア・3 0 5 6・ブランズウィック・ユニオン・ストリート・7 3
- (72)発明者 マリア・ガラニス
オーストラリア・ヴィクトリア・3 1 5 0・グレン・ウェイヴァリー・ロウィッタ・ドライブ・5
- (72)発明者 ピーター・ジョン・ハドソン
オーストラリア・ヴィクトリア・3 1 3 0・ブラックバーン・ファシア・ストリート・3 6
- (72)発明者 ロバート・アレクサンダー・イアヴィング
オーストラリア・ヴィクトリア・3 1 7 0・マルグレイヴ・ハニーサックル・アヴェニュー・1 1
- (72)発明者 スチュワート・ダグラス・ナットール
オーストラリア・ヴィクトリア・3 0 7 9・アイヴァンホー・フォード・ストリート・7 5

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 特表2 0 0 1 - 5 1 0 4 7 3 (J P , A)
J. Immunol., (1993), 150, [6], p.2281-2294

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)
C12N 15/00-15/90
PubMed